

**DIN EN ISO 21571**

ICS 67.050

Ersatz für  
DIN EN ISO 21571:2005-05

**Lebensmittel –  
Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen  
und ihren Produkten –  
Nukleinsäureextraktion (ISO 21571:2005 + Amd 1:2013);  
Deutsche Fassung EN ISO 21571:2005 + A1:2013**

Foodstuffs –

Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products –

Nucleic acid extraction (ISO 21571:2005 + Amd 1:2013);

German version EN ISO 21571:2005 + A1:2013

Produits alimentaires –

Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés –

Extraction des acides nucléiques (ISO 21571:2005 + Amd 1:2013);

Version allemande EN ISO 21571:2005 + A1:2013

Gesamtumfang 61 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

## Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21571:2005 + A1:2013) wurde vom SC 16 „Horizontal methods for molecular biomarker analysis“ des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe 11 „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) unter der Wiener Vereinbarung parallel erarbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der CEN/TC 275/WG 11 und im ISO/TC 34/SC 16 wird über den Arbeitsausschuss NA 057-01-04 AA „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Dieses Dokument enthält die Änderung A1, die von CEN am 2013-03-01 angenommen wurde.

Der Beginn und das Ende eines Textes, der durch die Änderung eingefügt oder geändert wurde, wird im Text durch die Markierungen **A1** **A1** angezeigt.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

|           |       |                  |
|-----------|-------|------------------|
| ISO 21569 | siehe | DIN EN ISO 21569 |
| ISO 21570 | siehe | DIN EN ISO 21570 |
| ISO 24276 | siehe | DIN EN ISO 24276 |

## Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 21571:2005-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Verweisung auf die geplante aber nicht erarbeitete EN ISO 21568 wurde gelöscht;
- b) die Verweisung auf die ISO 24276:2006 wurde aktualisiert;
- c) die Anforderung an Laborproben in 5.1.2 wurde klarer formuliert;
- d) die Empfehlung, die Qualität der extrahierten DNA zu untersuchen, wurde in Abschnitt 6 aufgenommen;
- e) ein neues Verfahren zur Extraktion von Sojalecithin wurde als A.5.2 aufgenommen;
- f) das gesamte Dokument wurde redaktionell (Fußnoten) angeglichen.

## Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 21571: 2005-05

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

DIN EN ISO 21569 *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren*

DIN EN ISO 21570 *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren*

DIN EN ISO 24276 *Lebensmittel — Auf Nukleinsäuren basierende Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Lebensmittel —  
Verfahren zum Nachweis von gentechnisch  
modifizierten Organismen und ihren Produkten —  
Nukleinsäureextraktion  
(ISO 21571:2005 + Amd 1:2013)

Foodstuffs —  
Methods of analysis for the detection of genetically  
modified organisms and derived products —  
Nucleic acid extraction  
(ISO 21571:2005 + Amd 1:2013)

Produits alimentaires —  
Méthodes d'analyse pour la détection des organismes  
génétiquement modifiés et des produits dérivés —  
Extraction des acides nucléiques  
(ISO 21571:2005 + Amd 1:2013)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Februar 2005 angenommen.

Diese Änderung A1 modifiziert die Europäische Norm EN ISO 21571:2005. Sie wurde vom CEN am 1. März 2013 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

## Inhalt

|                                                                                                                            | Seite     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort</b> .....                                                                                                       | <b>3</b>  |
| <b>A1) Vorwort A1</b> .....                                                                                                | <b>3</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich</b> .....                                                                                           | <b>5</b>  |
| <b>2 Normative Verweisungen</b> .....                                                                                      | <b>5</b>  |
| <b>3 Kurzbeschreibung</b> .....                                                                                            | <b>5</b>  |
| 3.1 Allgemeines .....                                                                                                      | 5         |
| 3.2 DNA-Extraktion .....                                                                                                   | 5         |
| 3.3 Quantitative Bestimmung der DNA .....                                                                                  | 5         |
| <b>4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien</b> .....                                                                    | <b>6</b>  |
| <b>5 Durchführung</b> .....                                                                                                | <b>6</b>  |
| 5.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe .....                                                                              | 6         |
| 5.2 DNA-Extraktion/-Reinigung .....                                                                                        | 8         |
| 5.3 Quantitative Bestimmung der extrahierten DNA .....                                                                     | 9         |
| 5.4 Stabilität der extrahierten DNA .....                                                                                  | 10        |
| <b>6 Auswertung</b> .....                                                                                                  | <b>10</b> |
| <b>7 Untersuchungsbericht</b> .....                                                                                        | <b>10</b> |
| <b>Anhang A (informativ) Verfahren zur DNA-Extraktion</b> .....                                                            | <b>11</b> |
| A.1 Präparation von DNA mit PCR-Qualität unter Anwendung von DNA-Extraktionsverfahren mit Phenol/Chloroform .....          | 11        |
| A.1.1 Grundlegendes Phenol-/Chloroform-Verfahren .....                                                                     | 11        |
| A.1.2 Phenol-/Chloroform-Verfahren: Vorschrift für Rohwurst-Starterkulturen .....                                          | 14        |
| A.1.3 Phenol-/Chloroform-Verfahren: Vorschrift für Joghurt-Starterkulturen .....                                           | 18        |
| A.1.4 Phenol-/Chloroform-Verfahren: Vorschrift für Hefen und/oder Fadenpilze, die aus Lebensmitteln gewonnen wurden .....  | 22        |
| A.2 Präparation von DNA mit PCR-Qualität unter Anwendung von DNA-Extraktionsverfahren mit Polyvinyl-Pyrrolidon (PVP) ..... | 26        |
| A.2.1 Grundlegendes PVP-Verfahren .....                                                                                    | 26        |
| A.3 Präparation von DNA mit PCR-Qualität unter Anwendung von DNA-Extraktionsverfahren mit CTAB .....                       | 29        |
| A.3.1 Grundlegendes CTAB-Verfahren .....                                                                                   | 29        |
| A.4 Präparation von DNA mit PCR-Qualität unter Anwendung von DNA-Extraktionsverfahren mit Siliciumdioxid .....             | 33        |
| A.4.1 Grundlegendes Siliciumdioxid-Verfahren .....                                                                         | 33        |
| A.5 Präparation von DNA mit PCR-Qualität unter Anwendung von DNA-Extraktionsverfahren mit Guanidin-Chloroform .....        | 37        |
| A.5.1 Grundlegendes Guanidin-Chloroform-Verfahren .....                                                                    | 37        |
| A.5.2 Guanidin-Chloroform-Verfahren: Vorschrift für Sojalecithin .....                                                     | 39        |
| <b>Anhang B (informativ) Verfahren zur quantitativen Bestimmung der extrahierten DNA</b> .....                             | <b>48</b> |
| B.1 Grundlegendes UV-spektralphotometrisches Verfahren .....                                                               | 48        |
| B.2 Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung .....                                                             | 50        |
| B.3 Verfahren zur quantitativen Bestimmung extrahierter DNA durch Real Time PCR .....                                      | 54        |
| <b>Literaturhinweise</b> .....                                                                                             | <b>55</b> |

## Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21571:2005) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2005, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2005 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

## Vorwort A1

Dieses Dokument (EN ISO 21571:2005/A1:2013) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Änderung zur Europäischen Norm EN ISO 21571:2005 muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 2013, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2013 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

### Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21571:2005/Amd 1:2013 wurde vom CEN als EN ISO 21571:2005/A1:2013 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. 

## Einleitung

Die Überprüfung auf transgene Herkunft von Zutaten wird nach folgenden Schritten nacheinander (oder gleichzeitig) durchgeführt. Nach der Probenahme werden die Nukleinsäuren aus der Untersuchungsprobe extrahiert. Die extrahierten Nukleinsäuren können bei oder nach dem Extraktionsverfahren weiter gereinigt werden. Danach werden sie quantitativ bestimmt (falls erforderlich), verdünnt (falls erforderlich) und analytisch untersucht (wie z. B. mit einer Polymerase-Kettenreaktion, PCR). Diese Schritte werden ausführlich in dieser und in den folgenden Normen behandelt:

**[A1]** gestrichener Text **[A1]**

ISO 21569, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods*

ISO 21570, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods*

Weitere Angaben zu Definitionen und allgemeinen Gesichtspunkten zu den oben angeführten Schritten sind zusammengefasst in:

ISO 24276, **[A1]** *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions* **[A1]**

Die Internationale Organisation für Normung (ISO) weist darauf hin, dass die Übereinstimmung mit diesem Dokument die Verwendung eines Patents hinsichtlich des Extraktionsverfahren mit Siliciumdioxid (No EP 0389063/USP 5,234,809) in Abschnitt A.4 bedeuten kann.

Die ISO nimmt keine Stellung zur Rechtmäßigkeit, zur Gültigkeit und zum Anwendungsbereich dieser Patentrechte.

Der Halter dieser Patentrechte hat ISO zugesichert, dass er bereit ist, über Lizenzen zu vernünftigen und nicht diskriminierenden Geschäftsbedingungen mit Antragstellern in der ganzen Welt zu verhandeln. In diesem Zusammenhang ist die Erklärung des Halters dieser Patentrechte bei ISO registriert. Informationen sind erhältlich bei:

Jean Deleforge  
BioMérieux  
Chemin de l'Orme,  
69280 Marcy l'Étoile, France.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese vorstehend identifiziert wurden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt allgemeine Anforderungen an und spezifische Verfahren für die Extraktion/Reinigung von DNA und die quantitative Bestimmung fest. Diese Verfahren sind in den Anhängen A und B beschrieben.

Diese Internationale Norm wurde für Lebensmittelmatrixen erarbeitet, könnte jedoch mit einigen Anpassungen auch auf andere Matrixen wie Getreide und Futtermittel angewendet werden.

Diese Norm wurde als ein integraler Bestandteil von auf Nukleinsäuren basierenden analytischen Verfahren, insbesondere ISO 21569 zu qualitativen analytischen Verfahren und ISO 21570 zu quantitativen analytischen Verfahren erarbeitet.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 24276:  2006 , *Foodstuffs — Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

 gestrichener Text 

## 3 Kurzbeschreibung

### 3.1 Allgemeines

Das Ziel der Nukleinsäure-Extraktionsverfahren ist die Bereitstellung von Nukleinsäuren, die für die nachfolgende Analyse geeignet sind (siehe ISO 24276).

**ANMERKUNG** Die „Qualität“ der DNA bezieht sich auf die mittlere Länge der extrahierten DNA-Moleküle, die chemische Reinheit und die strukturelle Unversehrtheit der DNA-Sequenz und der Doppelhelix, z. B. Vernetzungen zwischen DNA-Basen innerhalb eines Stranges und zwischen Strängen, Einzelstranglücken, Quervernetzungen (en: cross-linking) mit Polyolen, Hämin usw. Außerdem sind derartige Veränderungen häufig sequenzspezifisch und demzufolge nicht nach dem Zufallsprinzip über das gesamte Genom verteilt, siehe [1], [2], [3] und [4].

Anwender dieser Internationalen Norm sollten berücksichtigen, dass einige Verfahren, z. B. sämtliche auf Siliciumdioxid basierenden Verfahren, patentrechtlich geschützt sein können.

### 3.2 DNA-Extraktion

Das Grundprinzip der DNA-Extraktion besteht in der Freisetzung der in der Matrix vorhandenen DNA und außerdem in der gleichzeitigen oder anschließenden Reinigung der DNA von PCR-Inhibitoren.

DNA-Extraktions- und Reinigungsverfahren sind in Anhang A beschrieben. Die Verfahren werden je nach der Erfahrung des Anwenders ausgewählt, wobei der Anwendungsbereich und die Matrixbeispiele, die in jedem Verfahren angegeben sind, zu berücksichtigen sind.

Alternative Vorschriften sind geeignet unter der Voraussetzung, dass das Verfahren an der betreffenden zu untersuchenden Matrix validiert wurde.

### 3.3 Quantitative Bestimmung der DNA

Die quantitative Bestimmung der extrahierten DNA kann von Nutzen für die anschließende PCR-Analyse sein.

Sie darf entweder mit physikalischen (z. B. Messung der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge), chemisch-physikalischen (z. B. durch Anwendung von Interkalations- oder Bindemitteln, die fluoreszierende

Strahlung aussenden können), enzymatischen (z. B. Biolumineszenznachweis) Verfahren oder durch quantitative PCR erfolgen. Letzteres Verfahren ist besonders geeignet bei zusammengesetzten Matrices oder bei Proben mit einem geringen DNA-Gehalt oder solchen, deren DNA degradiert ist.

In Anhang B sind mehrere zur Verfügung stehende Verfahren für die quantitative Bestimmung der in einer Lösung vorliegenden DNA beschrieben. Die Auswahl des geeignetsten anzuwendenden Verfahrens hängt vom Anwender ab, unter Berücksichtigung der quantitativ zu bestimmenden Menge und Qualität an DNA und infolgedessen der Matrix, aus der die DNA extrahiert wurde.

Alternative Vorschriften sind geeignet unter der Voraussetzung, dass das Verfahren an der betreffenden zu untersuchenden Matrix validiert wurde.

## **4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien**

Eine zufällige Kontamination mit DNA kann durch Staub und die Ausbreitung von Aerosolen verursacht werden. Daher sollten die Organisation der Arbeitsbereiche im Labor logischerweise

- auf der systematischen Abgrenzung der methodisch aufeinander folgenden Arbeitsschritte, die an der Erzeugung der Ergebnisse beteiligt sind, basieren und
- dem Prinzip einer „Einbahnstraße“ (engl: forward flow) bei der Probenbearbeitung folgen.

Letztere Maßnahme stellt sicher, dass die zu analysierende DNA und die durch PCR amplifizierte DNA physikalisch getrennt bleiben.

Weitere Einzelheiten sind in ISO 24276 zu finden.

## **5 Durchführung**

### **5.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe**

#### **5.1.1 Allgemeines**

Probenartspezifische Variablen (z. B. Feuchtigkeit) und der Verarbeitungsgrad können die Menge und Qualität der aus dem untersuchten Material extrahierten DNA beeinflussen. Daher hängt die Leistung eines gegebenen DNA-Extraktionsverfahrens von der Matrix ab.

Es sind geeignete Maßnahmen zu treffen, um sicherzustellen, dass die Untersuchungsprobe für die Laborprobe repräsentativ ist.

Die Untersuchungsprobe muss groß genug sein und muss eine ausreichende Anzahl an Teilchen haben, um für die Laborprobe repräsentativ zu sein **[A1] gestrichener Text [A1]**.

Aus praktischen/technischen Gründen wird empfohlen, eine Probengröße von nicht mehr als 2 g zu wählen.

Alles was auf Grund der Größe der Untersuchungsprobe ihre Repräsentativität einschränkt, muss dokumentiert werden und bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden. Die Extraktionsverfahren in den Anhängen A und B beschreiben Untersuchungsproben von 200 mg bis 500 mg und sind üblicherweise für DNA-reiches Rohmaterial (z. B. gemahlenes Getreide, Mehl) geeignet. Jedoch kann bei bestimmten Matrices, die sehr geringe DNA-Mengen oder degradierte DNA enthalten, nicht ausreichend DNA extrahiert werden, die für die weitere Analyse geeignet ist. In diesen Fällen darf die Größe der Untersuchungsprobe erhöht werden.

Die DNA-Extraktion muss an mindestens zwei Untersuchungsproben durchgeführt werden.

Die Aufbewahrung der Standards, Proben und Untersuchungsproben muss ISO 24276 entsprechen und muss derart organisiert sein, dass die zu analysierenden biochemischen Parameter erhalten bleiben (Details siehe ISO/IEC 17025).

### 5.1.2 Proben

Sämtliche Arbeitsschritte zur Vorbereitung der Untersuchungsprobe (Zerkleinern, Homogenisieren, Teilen, Trocknen) müssen **[A1]** in Übereinstimmung mit der von ISO 24276, 5.3.2, beschriebenen Gestaltung des Labors **[A1]** durchgeführt werden, wobei darauf zu achten ist, dass jegliche Kontamination der Probe oder Modifikation von deren Zusammensetzung vermieden wird.

Laborproben müssen ausreichend homogen sein, bevor **[A1]** sie reduziert oder zerkleinert werden und bevor **[A1]** die Untersuchungsprobe entnommen wird.

Bei flüssigen Proben wird das Gefäß, das die Proben enthält, geschüttelt, damit das Erzeugnis besser homogenisiert wird. Im Fall von nicht-homogenen Erzeugnissen, wie z. B. Rohöle, ist zu prüfen, ob die Ablagerungen vollständig von den Wänden des Gefäßes entfernt wurden.

Bei festen Matrices, die nicht leicht suspendiert werden können, muss die Matrix zerkleinert werden, damit die DNA leichter extrahiert werden kann. In einem derartigen Fall muss die Teilchengröße berücksichtigt werden. Die der Extraktion unterzogene Untersuchungsprobe muss eine Mindestanzahl von Teilchen enthalten **[A1]** *gestrichener Text* **[A1]**. Die Geräte zum Mahlen/Zerkleinern sollten sich für eine gründliche Reinigung eignen und sind so auszuwählen, dass die erwartete Teilchenanzahl und Verteilung der Teilchengröße innerhalb der Untersuchungsprobe erreicht werden **[A1]** *gestrichener Text* **[A1]**.

Es muss dokumentiert werden, wenn Bestandteile der Laborprobe vor der Extraktion entfernt worden sind.

Feste oder pastenförmige Produkte mit einem hohen Lipidgehalt lassen sich im Allgemeinen nicht in nur einem Schritt bis zur gewünschten Teilchengröße zerkleinern. Deshalb dürfen verschiedene Verfahren zusätzlich angewandt werden, wie z. B. die Abtrennung von Lipiden mit Hexan nach einer dazwischenliegenden Zerkleinerung, Gefrieren oder Gefriertrocknen vor dem Zerkleinern.

Zum Erleichtern des Zerkleinerns von Pasten oder viskosen Erzeugnissen ist es möglich, eine der folgenden Behandlungen auf bestimmte Matrices anzuwenden:

- Erwärmen auf eine Temperatur von höchstens 40 °C;
- Auflösen in einer geeigneten Flüssigkeit, wie Wasser;
- Gefrieren bei unter oder gleich –20 °C.

Die gesamte Laborprobe wird **[A1]** nach einer derartigen Behandlung **[A1]** homogenisiert. Die beiden Untersuchungsproben werden entnommen, wobei mögliche Verdünnungen oder Anreicherungen zu berücksichtigen sind.

Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, dass die Probe beim Mahl-/Zerkleinerungsverfahren nur minimal erwärmt wird, da eine Erwärmung die Qualität der DNA negativ beeinflussen kann.

Mahl-/Zerkleinerungsverfahren mit einem hohen Risiko einer Kontaminationsübertragung, wie die gemeinsame Anwendung von flüssigem Stickstoff und einem Mörser, sind möglichst zu vermeiden. Als eine Regel der guten Praxis sollten sämtliche Verfahrensschritte, bei denen Staub erzeugt wird, von allen anderen analytischen Schritten abgegrenzt werden.

Wenn mit Salzen, Gewürzen, Puderzucker und/oder anderen Substanzen umgegangen wird, die möglicherweise bei der Extraktion oder dem analytischen Verfahren stören, sollten entsprechende Reinigungsschritte je nach dem in Anhang A ausgewählten Verfahren berücksichtigt werden.

Beispielsweise kann in Proben von zusammengesetzten Matrices die Zielmatrix (z. B. die Panierschicht von Fischstäbchen) für die DNA-Extraktion abgetrennt werden.

## 5.2 DNA-Extraktion/-Reinigung

### 5.2.1 Allgemeines

Die folgenden Betrachtungen sind für das Design von Extraktionsverfahren gültig.

Die Qualität und Ausbeute an extrahierter Nukleinsäure mit einem gegebenen Verfahren an einer gegebenen Matrix sollten sowohl wiederholbar als auch vergleichbar sein, vorausgesetzt, es war genug Nukleinsäure in der extrahierten Matrix vorhanden.

Um DNA von guter Qualität zu erhalten, ist es ratsam gegebenenfalls Folgendes abzutrennen:

- Polysaccharide (Pektin, Cellulose, Hemicellulose, Stärke, Bindemittel usw.) mit geeigneten enzymatischen Behandlungen (z. B. Pektinase, Cellulase, Hemicellulase,  $\alpha$ -Amylase) oder durch organische Extraktion (z. B. CTAB/Chloroform);
- RNA und/oder Proteine mit einer geeigneten Behandlung, wie zum Beispiel enzymatische Behandlung durch RNase bzw. Proteinase;
- die Lipidfraktionen, z. B. durch enzymatische Behandlung oder mit Lösemitteln (z. B. *n*-Hexan);
- Salze (z. B. aus der Extraktions-/Lysepufferlösung, aus dem Präzipitationsschritt), die bei der nachfolgenden Analyse stören können.

Besonders bei festen oder getrockneten Proben muss das Volumen der Lyse-/Extraktionspufferlösung angepasst werden, um das Auflösen der DNA zu gewährleisten.

**ANMERKUNG 1** Die Reinigung der DNA kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, zum Beispiel in Form einer fraktionierten Präzipitation mit Lösemitteln, wie z. B. Phenol, Chloroform, Ethanol, Isopropanol, und/oder durch Adsorption auf festen Matrices (Anionenaustauscher auf Kunstharzbasis, Silikagel oder „poröses Glas“, Diatomeenerde (Kieselgur), Membranen usw.). Mehrere Prinzipien zur DNA-Reinigung dürfen kombiniert werden. Gegebenenfalls können Extraktion und Reinigung im selben Schritt erfolgen.

Sollte ein Copräzipitant, wie z. B. Glykogen, PEG oder t-RNA, verwendet werden, um die DNA-Ausbeute bei den Präzipitationsschritten zu erhöhen, darf er weder über Nukleaseaktivität verfügen oder PCR-Inhibitoren/ Konkurrenten (Kompetitoren) enthalten, noch Sequenzen enthalten, die mit dem potenziellen zu untersuchenden PCR-Target homolog sind. Bei gentechnisch modifizierten Pflanzen darf eine Träger (en:Carrier)-DNA z. B. DNA aus Lachs- oder Heringssperma sein.

Wenn zum Trocknen der im Anschluss an einen Präzipitationsschritt erhaltenen DNA-Pellets Vakuum-Gefriertrockner Anwendung finden, sollte das Risiko einer Kontaminationsübertragung berücksichtigt werden.

Die DNA wird erneut in Wasser oder einer Pufferlösung, die DNA vor Degradierung schützt, suspendiert.

**BEISPIEL** Eine Tris/EDTA-Pufferlösung (TE-Pufferlösung, einfach oder 0,1fach konzentriert), die auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt ist, ist für das Resuspendieren oder Verdünnen von DNA geeignet.

Wenn ein neues DNA-Extraktionsverfahren angewandt wird oder wenn eines der in Anhang A beschriebenen Verfahren auf eine neue Matrix angewandt wird, sollten die mögliche Qualität und Integrität der mit dem gewählten Verfahren extrahierten DNA folgendermassen abgeschätzt werden. Eine bekannte Menge einer Tracer-DNA (geringe Menge an DNA, die der Wiederfindung und Rückverfolgbarkeit dient), und die Probe, welche zur DNA-Extraktion verwendet wird, werden zur Lysepufferlösung hinzugegeben. Wenn der ausgewählte Tracer eine vorbestimmte Menge an DNA ist oder eine vorbestimmte Anzahl an Kopien einer speziellen DNA-Sequenz darstellt, die am Anfang der DNA-Extraktion einer Matrix beigemischt wird, muss sichergestellt werden, dass keine Ähnlichkeit der DNA-Sequenz an den Primer und Sonden-Bindungsstellen zwischen der Tracer-DNA und der zu untersuchenden Ziel-DNA-Sequenz besteht.

**ANMERKUNG 2** Die Verwendung von Tracer-DNA ist eine gute Annäherung an eine wirkliche Situation, bei der erwartet wird, dass die DNA einer gegebenen Matrix einen Komplex mit anderen Bestandteilen (z. B. Proteinen) bildet. Ein derartiges Verfahren könnte auch angewendet werden, um abzuschätzen, ob lösliche und „in trans“ wirkende PCR-Inhibitoren in der extrahierten DNA vorhanden sind (siehe ISO 24276, ISO 21569 und ISO 21570).

Tracer-DNA kann jedoch falsche Vorstellungen hinsichtlich der Wiederfindung geben, da Tracer-DNA viel leichter als die Ziel-DNA von der Matrix abtrennbar sein kann.

## 5.2.2 Kontrollen

Die durchzuführenden Kontrollen sind in Tabelle 1 in ISO 24276 beschrieben. Es sollten diese mindestens eine Extraktionsblindprobe und eine positive Extraktionskontrolle sein, können aber auch eine Umgebungs-kontrolle beinhalten.

## 5.2.3 Kontrolle der DNA-Reinheit: Interne PCR-Kontrolle

Wenn ein neues DNA-Extraktionsverfahren angewandt wird, darf das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren in der extrahierten DNA mit dotierter DNA abgeschätzt werden (siehe ISO 24276, ISO 21569 und ISO 21570). Die Menge der hinzugefügten DNA darf nicht die Höchstkonzentration überschreiten, für die die PCR ausgelegt ist, und sie muss eine festgelegte Anzahl Kopien der Zielsequenz enthalten. Diese Anzahl sollte für jede Zielsequenz einzeln festgelegt werden und als ein Vielfaches der vorhandenen unteren Nachweisgrenze angegeben werden. Idealerweise sollte die Zielkonzentration der positiven Kontroll-PCR der bei der Analyse notwendigen Empfindlichkeit entsprechen. Mit hochkonzentrierter geklonter Ziel-DNA ist vorsichtig umzugehen. Die positiven Kontrollen müssen in Bezug auf die in ihnen enthaltenen Nukleinsäuren möglichst dem Zustand des Untersuchungsmaterials entsprechen.

## 5.3 Quantitative Bestimmung der extrahierten DNA

### 5.3.1 Allgemeines

Die Qualität, Integrität und die Menge der eingesetzten Nukleinsäuren beeinflussen die Leistung des Analysenverfahrens und damit auch das Untersuchungsergebnis. Die Bestimmungsgrenze eines spezifischen Verfahrens kann daher von der Menge der eingesetzten Nukleinsäure abhängen.

**A1)** Die Gesamtmenge der in der PCR eingesetzten DNA sollte bestimmt werden, ebenso wie die Gesamtmenge an DNA der taxonomischen Zielgruppe berücksichtigt werden sollte, da DNA, die nicht von der taxonomischen Zielgruppe stammt, die Effizienz der PCR beeinträchtigen kann. **A1)**

Die quantitative Bestimmung der DNA ist hilfreich

- für den Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Vorschriften für die DNA-Extraktion hinsichtlich einer gegebenen Matrix (Wiederholbarkeit) und
- für die Konzentrationsmessung der Nukleinsäuren vor der weiteren Analyse.

### 5.3.2 Anwendungsbereich

Jedes Verfahren zur quantitativen Bestimmung muss innerhalb seines dynamischen Bereiches angewendet werden, wobei auch dessen Grad an Präzision zu berücksichtigen ist.

### 5.3.3 Quantifizierungsstandards

Die Genauigkeit der Verfahren zur quantitativen Bestimmung hängt stark von DNA-Standards ab, die zur Erstellung einer Kalibrierkurve verwendet werden.

Wenn ein Verfahren verwendet wird, das von der Größe und/oder Qualität der Nukleinsäurefragmente abhängt, dann müssen die DNA-Standards verwendet werden, die zur Größe und/oder zur Qualität der aus der Probe extrahierten erwarteten Nukleinsäure passen.

Die verwendeten Referenzsubstanzen sollten direkt (ohne Unterbrechungen) auf passende Standard-substanzen rückführbar sein [siehe ISO-Guide 30], üblicherweise nationale oder internationale Referenz-substanzen.

Wenn ein Verfahren mit interkalierenden Substanzen angewandt wird, sollte ein DNA-Standard mit einer hohen relativen Molekülmasse verwendet werden, wenn auch DNA von hoher relativer Molekülmasse quantitativ zu bestimmen ist. DNA mit geringer relativer Molekülmasse sollte verwendet werden, wenn auch DNA mit geringer relativer Molekülmasse quantitativ zu bestimmen ist. Gewöhnlich enthält DNA mit hoher

relativer Molekülmasse auch eine bestimmte Menge an Fragmenten mit geringerer relativer Molekülmasse. Das bedeutet, dass viele Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA einen bestimmten Grad an Ungenauigkeit haben, der berücksichtigt werden sollte.

**ANMERKUNG** Außerdem kann ein gewisser Anteil der extrahierten DNA je nach Matrix und Art des Extraktionsverfahrens als einzelsträngige DNA vorliegen, die viel geringere Interkalationsfähigkeiten aufweist, was zu einer Unterschätzung des gesamten DNA-Gehaltes führt. Im Unterschied dazu ist einzelsträngige DNA gleich gut durch physikalische Untersuchungsverfahren detektierbar.

Für die Erstellung einer guten Kalibrierkurve sind mindestens drei Kalibrierpunkte (vorzugsweise auf Basis von wiederholten Messungen) erforderlich. Die für jeden Kalibrierpunkt verwendete Menge an DNA-Standard hängt von der Empfindlichkeit des Verfahrens und dem zu berücksichtigenden dynamischen Bereich ab.

## **5.4 Stabilität der extrahierten DNA**

Die extrahierte DNA ist unter derartigen Bedingungen aufzubewahren, dass die Stabilität sichergestellt ist, um die anschließende Analyse durchzuführen.

Wiederholtes Gefrieren und Auftauen von DNA-Lösungen sollten vermieden werden.

## **6 Auswertung**

Das verwendete Verfahren zur DNA-Extraktion muss geeignet sein, um die erforderliche Qualität und Quantität an Nukleinsäure für die folgenden Untersuchungsschritte zu erhalten.

Die Qualität der extrahierten DNA sollte durch ein analytisches Verfahren bewertet werden, das durch dieselben qualitativen Parameter beeinflusst wird wie jenes, mit dem die DNA weiter untersucht wird  $A_{11}$  (wenn z. B. die durchzuführende Untersuchung PCR ist, sollte die Qualität der extrahierten DNA durch Verwendung geeigneter PCR-Kontrollen bewertet werden).  $A_{11}$

Weitere Parameter hinsichtlich der Verfahrenskompatibilität sind in ISO 21569, ISO 21570 und ISO 24276 angegeben.

## **7 Untersuchungsbericht**

Bei der Erstellung des Untersuchungsberichtes nach ISO 24276 müssen die folgenden zusätzlichen Angaben hinzugefügt werden, um die Labortätigkeiten zu dokumentieren:

- ein Bericht über die Herkunft der Untersuchungsproben und jede Vorbehandlung der Probe vor der DNA-Extraktion;
- die Menge der für die DNA-Extraktion verwendeten Untersuchungsprobe;
- die angewendete(n) Verfahren für die DNA-Extraktion;
- besondere Beobachtungen während der Prüfung;
- sämtliche Arbeitsschritte, die nicht im Verfahren festgelegt oder als wahlfrei anzusehen waren, die jedoch die Ergebnisse beeinflusst haben könnten;
- Auswertung der Ergebnisse;
- Name des (der) Untersuchers (Untersuchenden).

Die Behandlung und Aufbewahrung von Rohdaten sind in ISO/IEC 17025 und entsprechenden Qualitäts-sicherungsanweisungen angegeben. Dies ist regelmäßig zu beachten.

## Anhang A (informativ)

### Verfahren zur DNA-Extraktion

#### A.1 Präparation von DNA mit PCR-Qualität unter Anwendung von DNA-Extraktionsverfahren mit Phenol/Chloroform

##### A.1.1 Grundlegendes Phenol-/Chloroform-Verfahren

###### A.1.1.1 Allgemeines

Dieses Routineverfahren [5] ist für die Extraktion von DNA aus einem breiten Spektrum von Matrices (siehe A.1.1.8) geeignet.

Phenol ist gewöhnlich sehr gut für den Nukleaseabbau und die Proteindenaturierung geeignet.

Bei der Untersuchung von Blättern oder grünem Untersuchungsgut (z. B. Chicoréeblättern, getrockneter Luzerne usw.) können viele PCR-Inhibitoren auch zusammen mit DNA copräzipitiert werden. Aus diesem Grund können Schwierigkeiten dabei auftreten, reproduzierbar PCR-amplifizierbare DNA zu erhalten.

Die gefährlichen korrosiven Eigenschaften von Phenol müssen berücksichtigt werden, daher werden Verfahren zur DNA-Extraktion auf der Basis von CTAB und/oder PVP und/oder der Adsorption auf Siliciumdioxid als wichtigste Alternativen bevorzugt.

###### A.1.1.2 Validierungsstatus

Das Verfahren ist seit etwa 40 Jahren bekannt und fand breite Anwendung in allen Bereichen der Biologie, Landwirtschaft und Medizin, auch wenn es nie in Ringversuchen zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen in Lebensmitteln geprüft wurde.

###### A.1.1.3 Kurzbeschreibung

Das Verfahren umfasst einen Lyseschritt (thermische Lyse in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat und bei einem hohen EDTA-Gehalt) mit anschließender Abtrennung von Kontaminanten, wie z. B. lipophile Moleküle, Polysaccharide und Proteine und von Nukleasen, aus der DNA-haltigen wässrigen Phase mit Phenol und Chloroform. Eine abschließende DNA-Präzipitation mit Ethanol konzentriert die DNA und trennt Salze und Chloroformrückstände ab. Der kritische Schritt des Verfahrens ist der Lyseschritt [5].

###### A.1.1.4 Sicherheitsvorkehrungen

Zum Umgang mit organischen Chemikalien ist ein Abzug notwendig.

###### A.1.1.5 Reagenzien

###### A.1.1.5.1 Ethanol, Volumenanteil $\varphi$ ( $C_2H_5OH$ ) = 96 %

Aufbewahrung und Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

###### A.1.1.5.2 Eisessig ( $CH_3COOH$ )

###### A.1.1.5.3 Kaliumacetat ( $C_2H_3O_2K$ )

###### A.1.1.5.4 Salzsäure, $\varphi$ ( $HCl$ ) = 37 %

**A.1.1.5.5 Isoamylalkohol**  $[(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]$

**A.1.1.5.6 Phenol** ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ )

**A.1.1.5.7 Chloroform** ( $\text{CHCl}_3$ )

**A.1.1.5.8 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)** ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )

**A.1.1.5.9 Ethylendiamintetraessigsäure-Dikaliumsalz ( $\text{K}_2\text{EDTA}$ )** ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{K}_2$ )

**A.1.1.5.10 Kaliumhydroxid (KOH)**

**A.1.1.5.11 Kaliumchlorid (KCl)**

**A.1.1.5.12 Natriumdodecylsulfat (SDS)** ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$ )

**A.1.1.5.13 Proteinase K**, etwa 20 Einheiten je Milligramm Lyophilisat

**A.1.1.5.14 RNase-A**, DNase-frei, aus Rinderpankreas, etwa 50 Einheiten je Milligramm Lyophilisat nach Kunitz

**A.1.1.5.15 Äquilibriertes Phenol**,  $\text{pH} > 7,8$

Phenol wird mit dem Extraktionspuffer (A.1.1.5.18) ohne SDS äquilibriert oder nach [5] oder nach Empfehlungen des Herstellers hergestellt.

**A.1.1.5.16 Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung**

24 Volumenteile Chloroform (A.1.1.5.7) werden mit einem Volumenteil Isoamylalkohol (A.1.1.5.5) gemischt.

**A.1.1.5.17 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol**

1 Volumenteil äquilibriertes Phenol (A.1.1.5.15) wird mit 1 Volumenteil Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (A.1.1.5.16) gemischt.

**A.1.1.5.18 Extraktions-/Lysepufferlösung**, Stoffmengenkonzentration  $c(\text{Tris}) = 0,050 \text{ mol/l}$ ,  $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0,050 \text{ mol/l}$ , Massenkonzentration  $\rho(\text{SDS}) = 30 \text{ g/l}$

Der pH-Wert wird mit HCl oder KOH auf 8,0 eingestellt.

**A.1.1.5.19 TE-Pufferlösung**,  $c(\text{Tris}) = 0,010 \text{ mol/l}$ ,  $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0,001 \text{ mol/l}$

Der pH-Wert wird mit HCl oder KOH auf 8,0 eingestellt.

**A.1.1.5.20 Proteinase K-Lösung**,  $\rho = 20 \text{ mg/ml}$ , gelöst in sterilem Wasser

Die Lösung wird nicht autoklaviert und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt, wobei wiederholtes Gefrieren und Auftauen zu vermeiden sind.

**A.1.1.5.21 RNase-A-Lösung**,  $\rho(\text{RNase-A}) = 10 \text{ mg/ml}$  Lyophilisat

Die Lösung wird bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt, wobei wiederholtes Gefrieren und Auftauen zu vermeiden sind.

**A.1.1.5.22 Ethanol-Lösung**,  $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$

Aufbewahrung und Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$ .

#### A.1.1.5.23 Kaliumacetat-Lösung, $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{K}) = 3 \text{ mol/l}$

Der pH-Wert wird mit Eisessig auf 5,2 eingestellt. Die Lösung darf nicht autoklaviert werden und wird gegebenenfalls durch einen 0,22-µm-Filter filtriert.

#### A.1.1.6 Geräte und Ausrüstungen

Die laborübliche Ausrüstung und insbesondere Folgendes.

**A.1.1.6.1 Zentrifuge**, geeignet, um mindestens 10 000 g zu erzielen. In einigen Fällen ist eine **Kühlzentrifuge** erforderlich.

**A.1.1.6.2 Wasserbad** oder **Brutschrank**, das/der in einem Temperaturbereich von 60 °C bis 70 °C betrieben werden kann.

**A.1.1.6.3 Vakuumtrockner** (wahlfrei)

**A.1.1.6.4 Gefriertrockner** (wahlfrei)

**A.1.1.6.5 Mischer**, z. B. Vortex<sup>®1)</sup>

**A.1.1.6.6 Reaktionsgefäße**, die für Einfrieren in flüssigem Stickstoff geeignet sind

#### A.1.1.7 Durchführung

##### A.1.1.7.1 Allgemeines

Wenn die Untersuchungsprobe vorbereitet ist, wird folgende Vorschrift zur DNA-Extraktion/-Reinigung angewendet. In Abhängigkeit vom gewählten Umfang der Untersuchungsprobe ist eine maßstabsgetreue Anpassung von Massen und Volumina der Pufferlösungen erforderlich.

##### A.1.1.7.2 Extraktionsverfahren

0,25 g der Untersuchungsprobe werden in ein Reaktionsgefäß eingewogen.

1,6 ml Extraktionspufferlösung (A.1.1.5.18) und, wenn erforderlich (z. B. bei proteinreichen Matrices), 50 µl Proteinase K-Lösung (A.1.1.5.20) werden hinzugefügt. Die Inkubation erfolgt bei 60 °C bis 70 °C gewöhnlich 30 min bis 2 h (auch eine Inkubation über Nacht ist möglich). RNase A (A.1.1.5.21) wird bis zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml hinzugefügt. Die Mischung wird 30 min bei 5 000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt. 1 Volumenteil äquilibriertes Phenol (A.1.1.5.15) wird zu dem Überstand hinzugefügt und vorsichtig aber gründlich gemischt. Die Mischung wird 15 min bei 5 000 g zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein frisches Röhrchen überführt. Zum Überstand wird 1 Volumenteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (A.1.1.5.17) hinzugefügt und vorsichtig, aber gründlich gemischt. Die Mischung wird 15 min bei 5 000 g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein frisches Röhrchen überführt. Dieser Schritt wird (in Abhängigkeit von der Matrix) ein- oder zweimal wiederholt und auf jeden Fall, bis eine scharfe Grenzfläche zwischen den Phasen entstanden ist.

Zum Überstand wird 1 Volumenteil Chloroform-Isoamylalkohol (A.1.1.5.16) hinzugefügt und vorsichtig, aber gründlich gemischt. Die Mischung wird 10 min bei 5 000 g zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein frisches Röhrchen überführt. Das wird gegebenenfalls so lange wiederholt, bis eine scharfe Grenzfläche zwischen den Phasen entstanden ist. Der Überstand wird mit 0,1 Volumenteilen Kaliumacetat-Lösung (A.1.1.5.23) und 2,5 Volumenteilen 96 %iges Ethanol (A.1.1.5.1) durch Umdrehen gründlich gemischt. Die Inkubation erfolgt mindestens 5 min in flüssigem Stickstoff, 1 h bei – 80 °C oder über Nacht bei –20 °C. Bei 10 000 g (oder bis zu 13 000 g) wird mindestens 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wird vorsichtig verworfen.

1) Vortex ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Das DNA-Pellet wird sorgfältig mit 2 Volumenteilen 70 %iger Ethanollösung (A.1.1.5.22) gewaschen. Bei 10 000 g bis 13 000 g wird 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wird vorsichtig verworfen. Dieser Schritt ist wesentlich hinsichtlich der Abtrennung von präzipitierenden Salzen, die bei der anschließenden Analyse (z. B. PCR) stören könnten.

Das Pellet wird getrocknet und wieder in 100 µl Wasser oder geeigneter Pufferlösung, z. B. TE-Pufferlösung (A.1.1.5.19), gelöst. Das ist die „DNA-Master-Stammlösung“. RNase (A.1.1.5.21) wird bis zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugefügt.

#### **A.1.1.8 Auflistung von Beispielen**

Das Verfahren wurde erfolgreich angewendet, um DNA<sup>2)</sup> aus folgenden Matrices zu extrahieren:

angesäuerte Sojabohnen<sup>2)</sup>, Luzernegrünmehl, Kinderkekse<sup>2)</sup>, Säuglingsmilch<sup>2)</sup>, Bakterien und deren Sporen, Gerstenkörner, Pastete aus Rind-/Schweinefleisch<sup>2)</sup>, Bier<sup>2)</sup>, Blauschimmelkäse, Brownie<sup>2)</sup>, Maiskonserve, Karottensamen, Müsliriegel<sup>2)</sup>, Käse, Hähnchen-Nugget, Chicorée-Blätter, Chicorée-Wurzel, Schokoladenplätzchen<sup>2)</sup>, Schokoladencreme<sup>2)</sup>, Zimtplätzchen<sup>2)</sup>, Kompott, Cornflakes, Bruchreis, Dessertcreme, getrocknete Erbsen, Maiskekse<sup>2)</sup>, Maisölfutterkuchen, Maismehl, Maiskleberfutter, Maiskörner, Maniok-Pellets zum Füttern, Maniok-Tapioka-Fleisch, frisches und gekochtes<sup>2)</sup> Fleisch (Rind-, Schweine-, Hähnchen- und Putenfleisch), Melonenfruchtfleisch, Melonensamen, Hackfleisch, Zutaten vom Müsli<sup>2)</sup>, Müsli, Mungobohnensprossen<sup>2)</sup>, Haferkörner, Kartoffelknolle, Rapsölfutterkuchen (Rapskuchen), Glupacolza, Rapssamen, Wurst (Aufschnitt<sup>2)</sup> und Wurstplatte<sup>2)</sup>, siehe A.1.2 in Bezug auf ein verbessertes Extraktionsverfahren), Wiener Schnitzel, Sooi hoi sin<sup>2)</sup>, Brühwürfel, Sojaprotein in Fleischzubereitungen<sup>2)</sup>, Sojalecithin (roh braun und gelb raffiniert<sup>2)</sup>), Sojasprossen<sup>2)</sup>, Sojamilch, Sojabohnen, Sojacreme, Sojaölfutterkuchen, Soja-Tofu, Spaghetti-Sauce<sup>2)</sup>, Dinkelkörner, Zuckerrübetrockenschnitzel, frische Zuckerrübe, Zuckerrübensamen, Sonnenblumenkörner, Tofu, frische Tomaten, Tomatenpüree, Tomatensamen, vegetarischer Hamburger, Waffel (mit<sup>2)</sup> und ohne<sup>2)</sup> Schokolade), Weizenkleie, Weizenmehl, Weizenkleberfutter, Weizenkörner, Weizengrieß, Joghurt<sup>2)</sup> (siehe A.1.3 für ein verbessertes Extraktionsverfahren.)

### **A.1.2 Phenol-/Chloroform-Verfahren: Vorschrift für Rohwurst-Starterkulturen**

#### **A.1.2.1 Allgemeines**

Dieses Verfahren ist dafür ausgelegt, die Gesamt-DNA, einschließlich bakterieller Genom-DNA, aus Wurst zu isolieren. Die Anwendbarkeit des Verfahrens, um DNA von hoher Qualität zu erhalten, die für den spezifischen Nachweis von rekombinanter DNA durch PCR geeignet ist, wurde in Bezug auf Rohwurst [6] sowie hinsichtlich thermisch behandelter Rohwurst, so genannter Grillwurst [7], nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass das Extraktionsverfahren geeignet ist, um für den spezifischen Nachweis von *Staphylococcus aureus* in Rahm die Gesamt-DNA aus dieser Lebensmittelmatrix zu isolieren [8]. (Eine Zusammenfassung der Matrices, für die das Verfahren geeignet ist, ist in A.1.2.8 angegeben).

#### **A.1.2.2 Validierungsstatus**

Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch mit einer Untersuchungsprobe von 0,4 g validiert (siehe A.1.2.9).

#### **A.1.2.3 Kurzbeschreibung**

Das Verfahren besteht aus der Gewinnung von Bakterienzellen aus der Lebensmittelmatrix durch Homogenisieren der Wurstproben mit anschließendem Zentrifugierschritt. Der Bodensatz enthält nicht nur Bakterienzellen, sondern auch Fleischteilchen. Zur spezifischen Lyse der Bakterienzellen werden die Zellwände durch Hinzufügen von Lysozym zerstört. Zur Verbesserung der Zerstörung von Zellwänden von im

2) Die Wiederholpräzision kann von der Charge der Matrix und/oder deren Produktionstechnologie abhängen. In einigen Fällen konnte keine DNA gefunden werden oder sie war so weit degradiert, dass ungeachtet der angewendeten PCR-Primer/Vorschriften PCR-Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze des Verfahrens lagen. Das kann eine Ursache für geringe Reproduzierbarkeit zwischen Laboratorien sein.

Fleisch vorkommenden Milchsäurebakterien kann Mutanolysin hinzugefügt werden. Eine vollständige Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe des Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) und Proteinase K mit anschließender mehrfacher Extraktion der wässrigen Phase mit Phenol und/oder Chloroform. Der Phenol-/Chloroform-Extraktionsschritt ist wichtig für die Entfernung sämtlicher Nuklease-Aktivitäten und PCR-inhibierenden Substanzen, einschließlich derer, die aus der Lebensmittelmatrix stammen (z. B. Hämatin). Abschließend wird eine Ethanol-Präzipitation der DNA durchgeführt.

#### A.1.2.4 Sicherheitsvorkehrungen

Zum Umgang mit organischen Chemikalien ist ein Abzug notwendig.

#### A.1.2.5 Reagenzien

##### A.1.2.5.1 Isopropanol [ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ]

##### A.1.2.5.2 Ethanol, $\varphi$ ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) = 96 %

Aufbewahrung und Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

##### A.1.2.5.3 Eisessig ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

##### A.1.2.5.4 Salzsäure, $\varphi$ ( $\text{HCl}$ ) = 37 %

##### A.1.2.5.5 Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )

##### A.1.2.5.6 Isoamylalkohol [ $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ]

##### A.1.2.5.7 Phenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ )

##### A.1.2.5.8 Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ )

##### A.1.2.5.9 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )

##### A.1.2.5.10 Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{K}_2$ )

##### A.1.2.5.11 Natriumdodecylsulfat (SDS) ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$ )

##### A.1.2.5.12 Lysozym

50 000 Einheiten/mg Protein (1 Einheit erzeugt eine  $\Delta A_{450}$  von 0,001 je Minute bei einem pH-Wert von 6,24 und einer Temperatur von  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , wobei eine Suspension von *Micrococcus lysodeikticus* als Substrat verwendet wird, in einem Reaktionsgemisch von 2,6 ml bei 1 cm optischer Weglänge).

##### A.1.2.5.13 Saccharose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ )

##### A.1.2.5.14 Proteinase K, etwa 20 Einheiten/mg Lyophilisat

##### A.1.2.5.15 Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ )

**A.1.2.5.16 Äquilibriertes Phenol**, gesättigt mit Tris/HCl-Pufferlösung (pH-Wert  $> 7,8$ ) oder nach [5] oder nach Empfehlungen des Herstellers hergestellt.

##### A.1.2.5.17 Chloroform-Isoamylalkohol

24 Volumenteile Chloroform (A.1.2.5.8) werden mit einem Volumenteil Isoamylalkohol (A.1.2.5.6) gemischt.