

DIN EN 15634-2



ICS 07.100.30; 67.120.10

Entwurf

Einsprüche bis 2018-06-20
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 15634-2
(DIN SPEC 10701-1):2012-04

**Lebensmittel –
Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen
Verfahren –
Teil 2: Sellerie (*Apium graveolens*) – Nachweis einer spezifischen
DNA-Sequenz in Brühwürsten mittels Real-time-PCR;
Deutsche und Englische Fassung prEN 15634-2:2018**

Foodstuffs –

Detection of food allergens by molecular biological methods –

Part 2: Celery (*Apium graveolens*) – Detection of a specific DNA sequence in cooked sausages by real-time PCR;

German and English version prEN 15634-2:2018

Produits alimentaires –

Détection des allergènes alimentaires par des méthodes d'analyse de biologie moléculaire –

Partie 2: Célerie (*Apium graveolens*) – Détection d'une séquence d'ADN spécifique dans des saucisses cuites par PCR en temps réel;

Version allemande et anglaise prEN 15634-2:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-04-20 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 43 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)



Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-2:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-05 AA „Lebensmittelallergene“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 15634-2 (DIN SPEC 10701-1):2012-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Entfernung der CAS-Nummern in 3.2 „Extraktionsreagenzien“;
- b) strukturelle und redaktionelle Anpassungen.

Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekulargenetischen Verfahren — Teil 2: Sellerie (*Apium graveolens*) — Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz in Brühwürsten mittels Real-time PCR

*Produits alimentaires — Détection des allergènes alimentaires par des méthodes d'analyse de biologie moléculaire — Partie 2 : Céleri (*Apium graveolens*) — Détection d'une séquence d'ADN spécifique dans des saucisses cuites par PCR en temps réel*

*Foodstuffs — Detection of food allergens by molecular biological methods — Part 2: Celery (*Apium graveolens*) — Detection of a specific DNA sequence in cooked sausages by real-time PCR*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	6
5.1 Allgemeines	6
5.2 Extraktionsreagenzien	6
5.3 DNA-Reinigung mittels Festphasenextraktion	7
5.4 Reagenzien für die Real-time-PCR	7
6 Geräte und Ausrüstungen	7
6.1 Allgemeines	7
6.2 DNA-Extraktion	8
6.3 PCR	8
7 Durchführung	8
7.1 Allgemeines	8
7.2 Probenvorbereitung	8
7.3 Herstellung der Extrakte	9
7.3.1 DNA-Extraktion mit CTAB und DNA-Reinigung	9
7.3.2 Quantitative Bestimmung und Normalisierung der DNA-Konzentration	10
7.4 Ansatz für die Real-time-PCR	10
7.4.1 Reaktionsgemisch für die Real-time-PCR	10
7.4.2 Positive Kontrolle für DNA-Ziele	11
7.4.3 Negative Kontrolle für DNA-Ziele	12
7.4.4 PCR-Inhibitionskontrolle	12
7.4.5 Amplifikations-Reagenzienkontrolle	12
7.4.6 Negative Extraktionskontrolle	12
7.4.7 Positive Extraktionskontrolle	12
7.4.8 Temperatur-Zeit-Programm (Real-Time-PCR)	13
7.4.9 Kriterien für die Annahme bzw. Zurückweisung	13
7.4.10 Identifizierung	14
8 Angabe der Ergebnisse	14
8.1 Angabe eines positiven Ergebnisses	14
8.2 Angabe eines negativen Ergebnisses	14
8.3 Unklare Ergebnisse	14
9 Validierung	15
9.1 Allgemeines	15
9.2 Laborinterne Validierung	15
9.2.1 Probenart und -mengen für die laborinterne Validierung	15
9.2.2 Ringversuchsdaten	15
9.2.3 Selektivität	16
9.3 Ringversuch-Validierung	17
9.3.1 Aufbau des Ringversuchs	17
9.3.2 Probenart und -mengen für die Ringversuch-Validierung	18

9.3.3	Ergebnisse der Ringversuch-Validierung.....	18
10	Untersuchungsbericht.....	20
	Literaturhinweise.....	21

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-2:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 15634-2:2012 ersetzen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für den qualitativen Nachweis von Sellerie (*Apium graveolens*) in Brühwürsten (z. B. Frankfurter, Wiener) fest.

Der Nachweis von Sellerie mittels Real-time-PCR beruht auf der Vervielfältigung einer 101 bp (Basenpaar) langen Sequenz aus dem Gen der Mannitoldehydrogenase (GenBank Acc. No. AF067082¹⁾) von Sellerie (*Apium graveolens*).

Das Verfahren wurde an mit Sellerie dotierten Brühwürsten (Bayrischer Leberkäse) validiert. Zu diesem Zweck wurde ein Fleischbrät bestehend aus Massenanteilen von 50 % Schweinefleisch, 25 % Schweinefett, 23 % zerstoßenem Eis und 1,8 % einer Mischung aus Natriumchlorid, Nitrit, Nitrat, Phosphaten und Ascorbaten nach einem Standardverfahren für Brühwürste hergestellt. Das Fleischbrät wurde mit gemahlener Selleriesaat oder alternativ mit Sellerieknollenpulver jeweils auf die Dotierungsstufe 1 000 mg/kg aufgestockt. Niedrigere Dotierungsstufen wurden durch Verdünnung mit selleriefreiem Fleischbrät erhalten. Das Brät wurde in Gefäße abgefüllt und für 60 min auf 65 °C erwärmt [2].

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Die gesamte DNA der Brühwürste wird unter Verwendung von Cetyltrimethylammoniumbromid (en: cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) aus der Probenmatrix isoliert. Potentielle PCR-Inhibitoren werden von der extrahierten DNA durch eine Reinigung über Festphasensäulen entfernt. Real-time-PCR wird zum Nachweis einer selleriespezifischen Sequenz eingesetzt. Dieses Verfahren mit Real-time-PCR beinhaltet eine Fluoreszenzdetektion mit einer sequenzspezifischen Hydrolyse [1], [2].

1) NCBI-GeneBank® ist ein Beispiel für ein geeignetes Suchwerkzeug zur freien Verwendung. Diese Information dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und stellt keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN dar.

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

Sofern nicht anders festgelegt, sollten die folgenden allgemeinen Bedingungen für die Analyse befolgt werden. Es werden nur analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien verwendet. Die Reagenzien sollten in Form von kleinen Aliquoten aufbewahrt werden, um das Risiko einer Verunreinigung auf ein Minimum zu verringern. Das gesamte verwendete Wasser muss frei von DNA oder Nukleasen sein, z. B. bidestilliert oder von gleichwertiger Qualität (Reinheitsgrad für die Molekularbiologie). Sofern nicht anderweitig festgelegt, müssen die Lösungen durch Lösen der entsprechenden Reagenzien in Wasser hergestellt und autoklaviert werden.

5.2 Extraktionsreagenzien

5.2.1 Chloroform.

5.2.2 Ethanol, Volumenanteil $\varphi = 70 \%$.

5.2.3 Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Na_2EDTA).

5.2.4 Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB).

5.2.5 Salzsäure, $\varphi = 37 \%$.

5.2.6 Isoamylalkohol.

5.2.7 Isopropanol.

5.2.8 Proteinase K.

5.2.9 Natriumchlorid.

5.2.10 Natriumhydroxid.

5.2.11 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS).

5.2.12 Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch, 24 Volumenteile Chloroform (5.2.1) werden mit einem Volumenteil Isoamylalkohol (5.2.6) gemischt.

Ähnliche, im Handel erhältliche Gemische dürfen verwendet werden.

5.2.13 CTAB-Extraktionspufferlösung, enthält:

- CTAB (5.2.4), Massekonzentration $\rho = 20 \text{ g/l}$,
- Natriumchlorid (5.2.9), Stoffmengenkonzentration $c = 1,4 \text{ mol/l}$,
- TRIS (5.2.11), $c = 0,1 \text{ mol/l}$,
- Na_2EDTA (5.2.3), $c = 0,02 \text{ mol/l}$.

Der pH-Wert muss durch Zugabe von Salzsäure (5.2.5) auf 8,0 eingestellt werden.

5.2.14 Proteinase-K-Lösung, $\rho = 20 \text{ mg/ml}$.

Aufbewahrung nach dem Lösen in Form von kleinen Aliquoten bei -20°C . Nicht autoklavieren.

5.2.15 TE-Pufferlösung, enthält:

- TRIS (5.2.11), $c = 0,001 \text{ mol/l}$, und
- Na_2EDTA (5.2.3), $c = 0,000 1 \text{ mol/l}$.

Der pH-Wert muss durch Zugabe von Salzsäure (5.2.5) oder Natriumhydroxidlösung (5.2.10) auf 8,0 eingestellt werden.

5.3 DNA-Reinigung mittels Festphasenextraktion

Für die DNA-Reinigung können verschiedene Verfahren angewendet werden.

Es sind unterschiedliche Formate im Handel erhältlich, darunter Spin-Filter-Säulchen bzw. -Platten. Geeignete, handelsübliche Kits können verwendet werden.

5.4 Reagenzien für die Real-time-PCR

5.4.1 Konzentrierte PCR-Pufferlösung²⁾ (enthält Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl_2 und Hotstart-*Taq*-Polymerase).

5.4.2 Oligonukleotide, jeweils $c = 20 \text{ }\mu\text{mol/l}$.

5.4.2.1 Allgemeines

Bezüglich Informationen zur DNA-Zielsequenz und Validierung der Selektivität siehe 6.3.

ANMERKUNG Beim Ringversuch erhielten die Teilnehmer ihre Primer- und die Sondenlösung aus dem gleichen Herstellungslos.

5.4.2.2 Forward primer (iF) Cel-MDH iF 5'-CgA TgA gCg TgT ACT gAg TC – 3'.

5.4.2.3 Reverse primer (iR) Cel-MDH iR 5'-AAT Agg AAC TAA CAT TAA TCA TAC CAA AC – 3'.

5.4.2.4 Cel-MDH probe (Sonde) 5'-FAM-AAC AgA TAA CgC TgA CTC ATC ACA CCg-TAMRA – 3' ³⁾.

6 Geräte und Ausrüstungen

6.1 Allgemeines

Die allgemeinen Aspekte sind in prEN 15634-1 [3] beschrieben. Zusätzlich zur gewöhnlichen Laboraus-rüstung sind folgende Geräte und Ausrüstungen notwendig.

-
- 2) Für die PCR-Pufferlösung können gebrauchsfertige Gemische oder Einzelsubstanzen verwendet werden, solange sie mit den für den Ringversuch angegebenen Ergebnissen vergleichbar oder besser als diese sind.
 - 3) FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin; gleichwertige Reporter- und/oder Quencher-farbstoffe können verwendet werden, wenn gezeigt wird, dass sie zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der PCR-Analytik und der daraus resultierenden Gefahr von DNA-Kontaminationen ist die Verwendung von aerosolgeschützten Filterspitzen beim DNA-Extraktionsverfahren verbindlich.

6.2 DNA-Extraktion

6.2.1 Geeignete Reaktionsgefäße, Volumina von 1,5 ml und 2 ml, steril; sterile 50-ml-Zentrifugenröhrchen.

6.2.2 Thermostat oder Wasserbad, vorzugsweise mit Schüttelfunktion.

6.2.3 Zentrifuge, die geeignet ist, 50-ml-Reaktionsgefäße bei 8 000 g ⁴⁾ zu zentrifugieren.

6.2.4 Zentrifuge, die geeignet ist, 1,5-ml- und 2-ml-Reaktionsgefäße bei 14 500 g zu zentrifugieren.

6.2.5 Gerät und/oder Material zur Probenzerkleinerung, z. B. Küchenmixer.

6.2.6 UV-Spektralphotometer oder andere Nachweisgeräte, welche für die DNA-Mengenabschätzung geeignet sind.

6.3 PCR

6.3.1 Geeignete PCR-Gefäße.

6.3.2 Mikrozentrifuge für PCR-Gefäße.

6.3.3 Real-time-PCR-Gerät, geeignet zur Anregung und Emissionsmessung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden.

7 Durchführung

7.1 Allgemeines

Die allgemeinen Aspekte sind in prEN 15634-1 [3] beschrieben.

Im Allgemeinen umfassen Faktoren, die DNA-Nachweisfahren beeinträchtigen, PCR-Inhibitoren, saurer pH-Wert und/oder übermäßige Wärmebehandlung des Lebensmittelerzeugnisses und Verminderung oder Entfernung von DNA beim Produktionsprozess. Der Nachweis von Sellerieknollenpulver ist im Vergleich zu äquivalenten Mengen an Selleriesaat geringer, wie im Ringversuch gezeigt.

7.2 Probenvorbereitung

Es sollte sichergestellt werden, dass die nach dem Vermahlen oder Homogenisieren entnommene Untersuchungsprobe repräsentativ für die Laborprobe ist.

Um das Risiko von Verschleppungskontaminationen zu vermeiden, sollte die gesamte Ausrüstung vor dem Übergang zur nächsten Probe gründlich gereinigt werden. Beispiele für Reinigungsmittel oder Reinigungsverfahren umfassen: DNA abbauende Wirkstoffe, Hypochloritlösung, heißes Wasser und chemische Reinigungsmittel.

4) $g = 9,81 \text{ m} \times \text{s}^{-2}$

7.3 Herstellung der Extrakte

7.3.1 DNA-Extraktion mit CTAB und DNA-Reinigung

Parallel zu den Untersuchungsproben sollten die unter 7.4.6 und 7.4.7 aufgeführten Kontrollen in geeignetem Umfang ausgeführt werden.

Jede Analyse sollte nach folgendem Protokoll **doppelt** durchgeführt werden:

- 2 g der homogenisierten Probe in 50-ml-Zentrifugenröhrchen einwiegen (Röhrchen A);
- 10 ml CTAB-Puffer (5.2.13) zugeben;
- 30 µl Proteinase-K-Lösung (5.2.14) zugeben und durch Inversion, Pipettieren oder Verwendung eines Laborschüttelgerätes mischen;
- 90 min bei 65 °C inkubieren und dabei schütteln;
- 5 min bei Raumtemperatur und 6 000 g bis 8 000 g zentrifugieren;
- 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (5.2.12) in einem 2-ml-Reaktionsgefäß vorlegen (Röhrchen B);
- 700 µl Überstand von Röhrchen A zu Röhrchen B hinzufügen und 30 s gründlich mischen;
- 15 min bei Raumtemperatur und etwa 14 500 g zentrifugieren;
- 500 µl Isopropanol (5.2.7) in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß vorlegen (Röhrchen C);
- 500 µl Überstand (wässrige Phase) von Röhrchen B zu Röhrchen C hinzufügen und durch Inversion, Pipettieren oder Verwendung eines Laborschüttelgerätes vorsichtig mischen;
- Röhrchen C 30 min bei Raumtemperatur inkubieren;
- 15 min bei Raumtemperatur und etwa 14 500 g zentrifugieren;
- Überstand mit einer Pipette oder durch behutsames Ausgießen vorsichtig abziehen und verwerfen;
- 500 µl Ethanol (5.2.2) in das Reaktionsgefäß geben und das Reaktionsgefäß mehrmals schwenken;
- 5 min bei Raumtemperatur und etwa 14 500 g zentrifugieren;
- Überstand mit einer Pipette oder durch behutsames Ausgießen vorsichtig abziehen und verwerfen;
- extrahierte DNA zur Entfernung der verbliebenen Spuren des Ethanol z. B. durch Umdrehen von Röhrchen C und Trockenlaufen auf Papierhandtücher trocknen;
- getrockneten DNA-Extrakt in 100 µl TE-Pufferlösung (5.2.15) lösen;

Anstelle des obenstehend beschriebenen DNA-Extraktionsverfahrens kann auch ein im Handel erhältliches Kit verwendet werden, wenn sichergestellt ist, dass vergleichbare oder bessere Ergebnisse erzielt werden.

- Reinigung des DNA-Extrakts, z. B. mit Festphasenextraktion. Bei handelsüblichen Kits sind die Anweisungen des jeweiligen Kit-Herstellers zu beachten.

Der gereinigte DNA-Extrakt kann für kurze Zeit (etwa 1 Woche) bei 4 °C aufbewahrt werden. Längerfristige Lagerungen über mehrere Monate sollten bei –18 °C erfolgen.

7.3.2 Quantitative Bestimmung und Normalisierung der DNA-Konzentration

Die Konzentration eines DNA-Aliquots kann im UV-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden (Konzentration in ng/μl = 50 × Optische Dichte × Verdünnungsfaktor des gemessenen Aliquots).

Zur Überprüfung der Reinheit kann die Probe zusätzlich bei 280 nm gemessen werden. Der Quotient des Wertes der Optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm sollte etwa 1,8 betragen.

Die DNA-Konzentration kann auch mit einem anderen geeigneten Verfahren abgeschätzt werden.

ANMERKUNG Beim Ringversuch wurden die DNA-Extrakte auf eine Massenkonzentration von etwa 20 ng/μl eingestellt, z. B. durch Verdünnen mit Wasser.

7.4 Ansatz für die Real-time-PCR

7.4.1 Reaktionsgemisch für die Real-time-PCR

Das als Beispiel nachstehend beschriebene Verfahren gilt für ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 μl (20 μl PCR-Gemisch [PCR-Mix] und 5 μl DNA-Extrakt) mit den in Tabelle 1 angegebenen Reagenzien. Die in Tabelle 1 angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen. Die PCR darf auch mit größeren Volumina durchgeführt werden, wenn die Lösungen entsprechend angepasst werden.

Parallel zu den Untersuchungsproben sollten die unter 7.4.3 bis 7.4.7 aufgeführten Kontrollen in geeignetem Umfang mitgeführt werden.

Vor der Verwendung sollten die Reagenzien z. B. auf einem Eis-/Kühlblock schonend aufgetaut und kurz zentrifugiert werden. Falls erforderlich, sollten die Reagenzien während der Herstellung des PCR-Gemisches in einem Eisbad oder Kühlblock gekühlt aufbewahrt werden. Es ist darauf zu achten, jedes Reagenz unmittelbar vor dem Pipettieren sorgfältig zu durchmischen.

Es sollte ein PCR-Gemisch hergestellt werden, das alle Bestandteile außer dem DNA-Extrakt enthält. Die benötigte Menge an PCR-Gemisch richtet sich nach der Anzahl der durchzuführenden Reaktionen zuzüglich einer Pipettierreserve von etwa 10 %.

Zwei Wiederholungen jedes DNA-Extraktes sollten mit PCR untersucht werden. Je Reaktion sollten 5 μl DNA-Extrakt eingesetzt werden.

ANMERKUNG Um falsch-negative Ergebnisse aufgrund von PCR-Inhibition bzw. stark degradierter DNA auszuschließen, kann die Eignung der isolierten DNA, beispielsweise durch Amplifikation universeller Sequenzen aus Pflanzen, überprüft werden [4].

Tabelle 1 — Reaktionsgemisch für die Real-time-PCR

Reagenz	Endkonzentration der Substanz
a) 2x PCR-Pufferlösung (5.4.1)	1x
b) Primer Cel-MDH iF	0,3 µmol/l
c) Primer Cel-MDH iR	0,3 µmol/l
d) Sonde Cel MDH-probe	0,2 µmol/l
e) Wasser	
f) DNA-Extrakt (etwa 20 ng/µl, max. 50 ng/µl)	

- Die PCR-Reagenzien mischen [siehe Tabelle 1, a) bis e)], kurz zentrifugieren (bis zu 10 s) und je PCR-Reaktion 20 µl in die Reaktionsgefäße pipettieren.
- Für die Proben-Reaktionen jeweils 5 µl des Proben-DNA-Extrakts [siehe Tabelle 1, f)] in das vorgelegte PCR-Gemisch pipettieren.
- Für die **positive DNA-Zielkontrolle** (7.4.2) 5 µl einer Sellerie-Referenz-DNA in das vorgelegte PCR-Gemisch pipettieren.
- Für die **negative DNA-Zielkontrolle** (7.4.3) 5 µl des selleriefreien Proben-DNA-Extrakts in das vorgelegte PCR-Gemisch pipettieren.
- Für die **PCR-Inhibitionskontrollen** (7.4.4) ein Aliquot Sellerie-Kontroll-DNA (z. B. 100 Kopien des in Literaturhinweis [1] beschriebenen 279 bp langen Amplikons) zu einem Aliquot der extrahierten Proben-DNA pipettieren.
- Für die **Amplifikations-Reagenzienkontrolle** (7.4.5) 5 µl Wasser in das vorgelegte PCR-Gemisch pipettieren.
- Für die **negative Extraktionskontrolle** (7.4.6) 5 µl des jeweiligen Kontrollextrakts in den vorgelegten PCR-Mix pipettieren.
- Für die **positive Extraktionskontrolle** (7.4.7) 5 µl des DNA-Extrakts einer Sellerie enthaltenden Referenzprobe in das vorgelegte PCR-Gemisch pipettieren.
- Die Reaktionsgefäße in das PCR-Gerät überführen und das in 7.4.8 beschriebene Temperatur-Zeit-Programm starten.

7.4.2 Positive Kontrolle für DNA-Ziele

Im Allgemeinen gibt es vier Arten von positiver Kontrolle für DNA-Ziele:

- 1) Referenz-DNA;
- 2) DNA, die aus einem zertifizierten Referenzmaterial extrahiert wurde;
- 3) bekannte Positivprobe, die für die zu untersuchende Sequenz repräsentativ ist;
- 4) das zu untersuchende Target.