

DIN EN ISO 17174



ICS 67.120.30

Entwurf

Einsprüche bis 2024-03-26
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17303
(DIN SPEC 10703):2019-06;
Ersatz für
E DIN EN ISO 17174:2023-06

**Untersuchung auf molekulare Biomarker –
DNA-Barcoding von Fisch und Fischprodukten anhand definierter
mitochondrialer Cytochrom b- und Cytochrom c-Oxidase I-Genabschnitte
(ISO/DIS 17174:2023);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17174:2023**

Molecular biomarker analysis –
DNA barcoding of fish and fish products using defined mitochondrial cytochrome b and
cytochrome c oxidase I gene segments (ISO/DIS 17174:2023);
German and English version prEN ISO 17174:2023

Analyse de biomarqueurs moléculaires –
Codes-barres d'ADN de poissons et de produits à base de poisson à l'aide de segments de
gènes mitochondriaux de cytochrome b et cytochrome c oxydase I (ISO/DIS 17174:2023);
Version allemande et anglaise prEN ISO 17174:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-01-26 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument 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 oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17174:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-08-02-02 AK „Molekularbiologische Speziesanalytik“ 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.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 21571	siehe	DIN EN ISO 21571
ISO 20813	siehe	DIN EN ISO 20813

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 17303 (DIN SPEC 10703):2019-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Abschnitt 1: Hinweis zu Ringversuchsdaten wurde ergänzt;
- b) Abschnitt 2: Normative Verweisungen auf ISO 22949-1 und ISO 20813 wurden aufgenommen, EN ISO 24276 wurde entfernt;
- c) Abschnitt 3: Quellenangaben wurden geprüft und überarbeitet, Begriffsdefinitionen wurden punktuell überarbeitet, Begriffe 3.13 und 3.14 neu aufgenommen;
- d) Anhang A, Tabelle A.1: weitere Fischarten wurden ergänzt;
- e) Literaturverzeichnis wurde geprüft, aktualisiert und ergänzt;
- f) Dokument redaktionell geprüft und überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 21571, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäure Extraktion*

DIN EN ISO 20813, *Untersuchung auf molekulare Biomarker — Verfahren zur Identifizierung und zum Nachweis von Tierarten in Lebensmitteln (Nukleinsäureverfahren) — Allgemeine Anforderungen und Definitionen*

– *Entwurf* –

E DIN EN ISO 17174:2024-03

– Leerseite –

Untersuchung auf molekulare Biomarker – DNA-Barcoding von Fisch und Fischprodukten anhand definierter mitochondrialer Cytochrom b- und Cytochrom c-Oxidase I-Genabschnitte (ISO/DIS 17174:2023)

Molecular biomarker analysis – DNA barcoding of fish and fish products using defined mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase I gene segments (ISO/DIS 17174:2023)

Analyse de biomarqueurs moléculaires – Codes-barres d'ADN de poissons et de produits à base de poisson à l'aide de segments de gènes mitochondriaux de cytochrome b et cytochrome c oxydase I (ISO/DIS 17174:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Symbole und Abkürzungen	9
5 Kurzbeschreibung	9
6 Reagenzien und Werkstoffe	10
7 Prüfeinrichtung	11
8 Durchführung	11
8.1 Probenvorbereitung	11
8.2 DNA-Extraktion	11
8.3 PCR	11
8.3.1 Allgemeines	11
8.3.2 PCR-Ansatz	12
8.3.3 Temperatur-Zeit-Programm	13
8.3.4 PCR-Kontrollen	14
9 Bewertung	14
9.1 Bewertung der PCR-Produkte	14
9.2 Bewertung der PCR-Ergebnisse	14
9.3 Sequenzierung der PCR-Produkte	15
9.4 Bewertung der Sequenzdaten	15
9.5 Vergleich der Sequenz mit öffentlichen Datenbanken	16
9.5.1 Allgemeines	16
9.5.2 Sequenzvergleich der <i>cytb</i> - und/oder <i>cox1</i> -DNA Sequenzen mit GenBank	16
9.5.3 Sequenzvergleich von <i>cox1</i> -DNA-Sequenzen mit BOLD	17
10 Interpretation von Ergebnissen der Datenbankabfrage	18
11 Validierungsstatus und Leistungskriterien	19
11.1 Ringversuch zur Identifizierung von Fischarten durch Analyse von <i>cytb</i> -Sequenzen	19
11.2 Ringversuch zur Identifizierung von Fischarten durch Analyse von <i>cox1</i> -Sequenzen	19
12 Prüfbericht	21
Anhang A (informativ) Praktische Laborerfahrungen hinsichtlich der Amplifizierbarkeit von <i>cytb</i> - und <i>cox1</i> -Segmenten untersuchter Fischarten	22
A.1 Beispiele für amplifizierte Fischarten	22
Literaturhinweise	25

Tabellen

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der <i>cytb</i> -Genregion [1]	10
Tabelle 2 — Oligonukleotide für die Amplifikation der <i>cox1</i> -Genregion [2] [3]	10
Tabelle 3 — Sequenzierungsprimer für die <i>cox1</i> -PCR-Produkte [3]	11
Tabelle 4 — Komponenten für die <i>cytb</i> -PCR	12
Tabelle 5 — Komponenten für die <i>cox1</i> -PCR	12
Tabelle 6 — Temperatur-Zeit-Programm für die <i>cytb</i> -PCR	13
Tabelle 7 — Temperatur-Zeit-Programm für die <i>cox1</i> -PCR	13
Tabelle 8 — Validierungsdaten des Ringversuchs zu <i>cytb</i>	19
Tabelle 9 — Auswertung der Ergebnisse des Ringversuchs zu <i>cytb</i> in Abhängigkeit von der Fischart	19

Tabelle 10 — Ergebnisse des Ringversuchs zu *cox1* 20

Tabelle 11 — Auswertung der Ergebnisse des Ringversuchs zu *cox1* in Abhängigkeit von der
Fischart 20

Tabelle A.1 — Praktische Laborerfahrungen 22

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17174:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food Products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 17303:2019 ersetzen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 17174:2023 wurde von CEN als prEN ISO 17174:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO [eine/keine] Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee 34 „Food Products“, Unterkomitee SC 16 „Horizontal methods for molecular biomarker analysis“, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelaauthentizität“, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Lebensmittelsicherheit ist ein Schwerpunkt des Verbraucherschutzes. In den letzten drei Jahrzehnten hat im Handel mit Lebensmitteln ein Globalisierungsprozess stattgefunden. Die Handelswege für Fisch werden immer länger und komplexer, sodass für die Sicherstellung der Lebensmittelsicherheit zuverlässige Instrumente zur Rückverfolgbarkeit benötigt werden. Die korrekte Kennzeichnung von Lebensmitteln ist sowohl Voraussetzung für sichere Fischerzeugnisse und fairen Handel als auch für die weitestmögliche Einschränkung illegaler, ungemeldeter und unregulierter (IUU) Fischerei. Insbesondere die Tatsache, dass Fische zunehmend in Exportländern verarbeitet werden, macht die Identifizierung der Art (Spezies) anhand morphologischer Merkmale unmöglich. Die Entwicklung harmonisierter und genormter Verfahrensvorschriften für die Authentifizierung von Fischerzeugnissen ist notwendig, um verlässliche Verfahren für den Nachweis von potentiell Lebensmittelsicherheitsrisiken zu etablieren.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für die Identifizierung von einzelnen Fischen und Fischfilets bis zur Ebene der Gattung oder Art fest. Es ermöglicht die Identifizierung einer großen Anzahl kommerziell wichtiger Fischarten mittels DNA-Barcoding.

Dieses Verfahren wurde an rohem Fisch validiert. Laborerfahrungen deuten auf eine zusätzliche Anwendbarkeit auf verarbeitete Fischerzeugnisse hin, z. B. kalt geräucherte, heiß geräucherte, gesalzene, tiefgefrorene, gekochte, gebratene und frittierte Proben.

Das beschriebene Verfahren ist in der Regel ungeeignet für die Analyse stark verarbeiteter Lebensmittel, z. B. Fischkonserven, mit stark degradierter DNA, bei denen die Fragmentlängen nicht für eine Amplifikation der Zielsequenzen (Targets) ausreichen. Außerdem ist es nicht anwendbar auf zusammengesetzte Fischerzeugnisse, die Mischungen aus zwei oder mehr Fischarten enthalten.

Die Identifizierung der Fischarten erfolgt durch PCR-Amplifikation entweder eines Segments des mitochondrialen Cytochrom-b-Gens (*cytb*) oder des Cytochrom-c-Oxidase-I-Gens (*cox1*, *syn COI*) oder von beiden, gefolgt von der Sequenzierung der PCR-Produkte und einem anschließenden Sequenzvergleich mit Einträgen in Datenbanken.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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 16577, *Molecular biomarker analysis — Vocabulary for molecular biomarker analytical methods in agriculture and food production*

ISO 20813, *Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) — General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16577 und die folgenden Begriffe.

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

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Alignment

Sequenz-Alignment Sequenzanordnung

Anordnung von Nukleinsäuresequenzen oder Proteinsequenzen nach den Ähnlichkeitsbereichen

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Sequenz-Alignment ist ein Prozess oder Ergebnis eines Abgleichs der Nukleotidreste zweier oder mehrerer biologischer Sequenzen, um einen maximalen Grad der Identität zu erreichen.

[QUELLE: ISO 16577:2022, 3.7.18 – modifiziert, Anmerkung 1 zum Begriff hinzugefügt, alternative Benennung hinzugefügt]

3.2

FASTA-Format

textbasiertes Format zur Darstellung von Nukleotid- oder Aminosäure-(Protein-)Sequenzen, bei dem die Nukleotide oder Aminosäuren durch Einbuchstabencodes dargestellt werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Eine Sequenz im FASTA-Format beginnt mit einer einzeiligen Beschreibung, der Zeilen mit Sequenzdaten folgen. Die Beschreibungszeile („define“) wird am Anfang von den Sequenzdaten durch ein Größer-als-Zeichen („>“) abgegrenzt. Es wird empfohlen, dass alle Textzeilen weniger als 80 Zeichen lang sind.

Anmerkung 2 zum Begriff: Eine Beispielsequenz im FASTA-Format ist:

> Sample_04_cytb

```
ATGGCCAGCCTCCGAAAACTCATCCCCTTCTAAAGATTGCTAATGATGCATTAGTAGACCTTCTGCCCCCTCT      AACCTCT
CAACATTATGAACTTCGGGTCTCTCCTAGGCCTCTGCTTAGCCGCCAAATCTTAACAGGACTATTT      CTAGCGATACATT
ATACCGCAAACGTCGAGATAGCTTTCTCATCCGTCGTACACATCTGCCGCGACGTAAATTAC      GGATGACTAATCCGCAACA
TACACGCCAACGGCGCTTCTTTCTTCTTCATCTGCCTCTACCTACACATTGCACGA      GGCCTATATTACGGCTCCTACTTATT
CATAGAGACCTGAAACATTGGAGTTGTACTATTCTTTTAGTAATAATG ACCGCCTTCGTAGGCTACGTCCTCCCT
```

Anmerkung 3 zum Begriff: In der Mitte der FASTA-Eingabe sind keine Leerzeilen zulässig. Die Sequenzen werden entsprechend den IUB/IUPAC-Standardcodes für Aminosäuren und Nukleinsäuren angegeben, mit folgenden Ausnahmen:

- Kleinbuchstaben sind zulässig und werden in Großbuchstaben umgewandelt;
- ein einzelner Binde- oder Gedankenstrich kann verwendet werden, um eine Lücke unbestimmter Länge darzustellen.

Es ist üblich, die Sequenz mit einem „*“ (Sternchen) zu beenden und eine Leerzeile zwischen der Beschreibung und der Sequenz zu lassen.

[QUELLE: ISO 16577:2022, 3.1.2, modifiziert – in Anmerkung 2 zum Begriff wird ein anderes Beispiel verwendet; in Anmerkung 3 zum Begriff wurde der dritte Aufzählungspunkt gestrichen]

3.3

Identität

Ausmaß, in dem zwei (Nukleotid- oder Aminosäure-)Sequenzen die gleichen Reste an den gleichen Positionen in einem Alignment haben, oftmals als prozentualer Anteil ausgedrückt

Anmerkung 1 zum Begriff: In der Sequenzdatenbank „Barcode of Life“ (BOLD) wird statt der Benennung „identity“ (Identität) die Benennung „similarity“ (Ähnlichkeit) verwendet.

3.4

introgressierte DNA

Allel einer Art (Spezies), die im Genpool einer anderen, abweichenden Art integriert ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Introgression ist in der Regel eine Folge von Hybridisierung und Rückkreuzung von Individuen, die verschiedenen Arten angehören.

3.5

Abfragesequenz Abfrage

Sequenz (oder andere Art eines Suchbegriffs), die mit den in einer Datenbank enthaltenen Einträgen verglichen wird

3.6

Abdeckung der Abfragesequenz

prozentualer Anteil der Abfragesequenz, der durch das Alignment mit der Datenbanksequenz abgedeckt wird

3.7

Sequenzähnlichkeit

Identität zwischen zwei oder mehr DNA-Sequenzen, gemessen als prozentualer Anteil

[QUELLE: ISO 16577:2022, 3.7.21]

3.8

Spezifizität

analytische Spezifizität

diagnostische Spezifizität

Vermögen eines Nachweisverfahrens, den jeweiligen Organismus oder Krankheitserreger von anderen Organismen zu unterscheiden, unabhängig davon, ob sie mit ihm verwandt sind oder nicht, sowie das Ausmaß, in dem die Analyse bekannte oder unbekannte Varianten/Varietäten des Organismus unterscheiden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Spezifizität ist ein Begriff, der dasselbe Phänomen wie Selektivität beschreibt, aber auf eine andere Art und Weise; während Selektivität auf die analytische Chemie und Physik angewendet wird, wird Spezifizität auf Organismen und Krankheitserreger angewendet.

[QUELLE: ISO 16577:2022, 3.3.76]

4 Symbole und Abkürzungen

Glu	Glutaminsäure, Glutamat
tRNA	Transfer-RNA
<i>cox1</i> , <i>syn COI</i>	Cytochrom c-Oxidase I-Gen
<i>cytb</i>	Cytochrom b-Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
I	Inosin
R	PuRin-Base (Adenin oder Guanin)
T	Thymin
Y	Pyrimidin-Base (Cytosin oder Thymin)
IUU	illegal, ungemeldet und unreguliert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (en: polymerase chain reaction)

5 Kurzbeschreibung

DNA wird unter Anwendung eines geeigneten Verfahrens aus Fisch und Fischerzeugnissen extrahiert. Segmente von etwa 460 Basenpaaren (bp) von *cytb* und/oder von etwa 650 bp von *cox1* werden mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifikation des *cytb*-Segments wird ein Satz aus zwei Primern verwendet. Bei der Amplifikation von *cox1* wird ein Satz aus vier Primern verwendet, um die Amplifikation von DNA möglichst vieler Fischarten sicherzustellen. Einige der verwendeten Primer schließen nicht eindeutige Basen ein, um die Anzahl der mithilfe der beiden Verfahren ermittelten Arten zu erhöhen. Die Nukleotidsequenzen der PCR-Produkte werden mittels eines geeigneten DNA-Sequenzierungsverfahrens, z. B. Sanger-Sequenzierung, bestimmt. Die beiden für die Erzeugung des *cytb*-Amplikons verwendeten PCR-Primer werden auch für die Sequenzierung verwendet. Die *cox1*-Primer haben M13-Schwänze (en: M13 tails), die eine Sequenzidentifizierung der

cox1-Amplikons mit M13-Sequenzierungsprimern ermöglichen. Die bestimmte Sequenz wird durch den Vergleich mit Sequenzeinträgen in Datenbanken bewertet, was eine Zuordnung der Sequenz zu einer Fischart oder -gattung anhand des Grades der Identität mit den dort eingetragenen Sequenzen ermöglicht.

Die Entscheidung, ob das *cytb*- oder das *cox1*-Segment oder beide für die Fischidentifizierung herangezogen werden, hängt von der deklarierten Fischart, insbesondere der Anwendbarkeit des PCR-Verfahrens für diese Fischart und der Verfügbarkeit von Vergleichssequenzen in den öffentlichen Datenbanken ab.

6 Reagenzien und Werkstoffe

Falls nicht anders festgelegt, werden für die Analyse ausschließlich Reagenzien von anerkannter Qualität für die Molekularbiologie sowie destilliertes oder demineralisiertes Wasser oder Wasser entsprechender Reinheit nach ISO 20813 verwendet. Die Labororganisation muss ISO 20813 entsprechen.

- 6.1 Thermostabile DNA-Polymerase (für Hot-Start-PCR)¹
- 6.2 PCR-Reaktionspuffer (einschließlich MgCl₂ oder mit separater MgCl₂-Lösung)¹
- 6.3 Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)²
- 6.4 Oligonukleotide (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2)

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der *cytb*-Genregion [1]

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids
L14735	5'-AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A-3'
H15149ad	5'-GCI CCT CAR AAT GAY ATT TGT CCT CA-3'

Tabelle 2 — Oligonukleotide für die Amplifikation der *cox1*-Genregion [2] [3]

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids ^a
VF2_t1	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C-3'
FishF2_t1	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> CGA CTA ATC ATA AAG ATA TCG GCA C-3'
FishR2_t1	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACA</i> CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A-3'
FR1d_t1	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACA</i> CCT CAG GGT GTC CGA ARA AYC ARA A-3'
^a Der M13-Schwanz des jeweiligen Primers ist fett und kursiv hervorgehoben.	

ANMERKUNG Die Abkürzungen der DNA-Basen in Tabelle 1 und Tabelle 2 beruhen auf den von der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [4] veröffentlichten Empfehlungen für eine eindeutige und einheitliche Nomenklatur.

- 1 Im Ringversuch wurde für die *cytb*-Amplifikation der Maxima® Hot Start PCR Master Mix (doppelt konzentriert) der Fermentas GmbH (gebrauchsfertige PCR-Puffer-Lösung einschließlich thermostabiler DNA-Polymerase) und für die *cox1*-Amplifikation die BIOTAQ™ DNA-Polymerase von Bioline mit 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer und separater MgCl₂-Lösung verwendet. Neben der empfohlenen BIOTAQ™ DNA-Polymerase wurden im Ringversuch auch andere Mastermixe und Polymerasen erfolgreich eingesetzt. Maxima® Hot Start PCR Master Mix (doppelt konzentriert) der Fermentas GmbH (gebrauchsfertige PCR-Puffer-Lösung einschließlich thermostabiler DNA-Polymerase) und BIOTAQ™ DNA-Polymerase von Bioline sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO.
- 2 Die Desoxynukleosidtriphosphate können auch in einem handelsüblichen PCR-Mastermix enthalten sein.

- 6.5 Trehalose
- 6.6 Agarose
- 6.7 Geeigneter DNA-Größenstandard
- 6.8 Sequenzierungsprimer (siehe Tabelle 3)

Tabelle 3 — Sequenzierungsprimer für die *cox1*-PCR-Produkte [3]

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids
M13F (-21)	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13R (-27)	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

7 Prüfeinrichtung

Zusätzlich zur gewöhnlichen Laborausstattung sollten folgende Geräte verwendet werden.

- 7.1 UV-Spektralphotometer oder Fluorometer zur Bestimmung der DNA-Konzentration.
- 7.2 Thermocycler.
- 7.3 Gelelektrophoresegerät.
- 7.4 Geldokumentationssystem.
- 7.5 DNA-Sequenzierungsautomat.

8 Durchführung

8.1 Probenvorbereitung

Die zur DNA-Extraktion verwendete Einwaage muss für die Laborprobe repräsentativ sein; dafür kann beispielsweise der folgende Leitfaden verwendet werden. Bei Proben aus verarbeiteten Materialien (z. B. Fertiggerichte) müssen einzelne reine Fischstücke separiert und analysiert werden. Für die Analyse von aus mehreren Teilen bestehenden Proben (z. B. Tüten mit verschiedenen Filets) werden Einwaagen für jede vermutete Fischart entnommen und getrennt analysiert. Um das Risiko der Amplifikation anhaftender Kontaminanten zu minimieren, darf das Material der Untersuchungsprobe nicht von der Oberfläche der Laborprobe entnommen werden, siehe auch ISO 20813.

8.2 DNA-Extraktion

Bezüglich der Extraktion von DNA aus der Untersuchungsprobe sollten die in ISO 21571:2005 [5] beschriebenen allgemeinen Anweisungen und Maßnahmen befolgt werden. Es können beispielsweise die in ISO 21571:2005, Anhang A [5] beschriebenen DNA-Extraktionsverfahren angewendet werden. Für die Extraktion und Reinigung der DNA können handelsübliche Kits verwendet werden, sofern diese für die Verwendung für die Extraktion von DNA aus Fisch validiert sind.

8.3 PCR

8.3.1 Allgemeines

Für die Amplifikation von mitochondrialen *cytb*- und *cox1*-Fragmenten werden universelle Primer verwendet. Der Primer H15149ad ist ein universeller Primer mit spezifischen Anpassungen für Fische, der an den

cytb-Abschnitt bindet. L14735 bindet an einen Abschnitt im benachbarten hochkonservierten t-RNA-Glu-Gen [1]. Die Primer, die für die Amplifikation des mitochondrialen *cox1*-Fragments verwendet werden, wurden für die 5'-Region des *cox1* von Fischen [2] [3] entworfen.

Beide Primersätze wurden an einem sehr breiten taxonomischen Spektrum von Fischarten geprüft. Derzeit ist bekannt, dass das Primerpaar L14735/H15149ad – mit einigen Ausnahmen – nicht mit Proben reagierte, die als Barramundi (*Lates calcarifer*) oder Nilbarsch (*Lates niloticus*) gekennzeichnet waren [6]. Der *cox1*-Primersatz hat nur in wenigen Fällen versagt (< 5 % der geprüften Arten) [2].

8.3.2 PCR-Ansatz

Das Verfahren wurde für ein Gesamtvolumen von 25 µl (*cytb*) bzw. 20 µl (*cox1*) je PCR validiert. Für die *cytb*-PCR bzw. *cox1*-PCR müssen die in Tabelle 4 bzw. Tabelle 5 angegebenen Reagenzien verwendet werden.

Die Reagenzien werden bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und sollten vor der Verwendung kurz zentrifugiert werden. Ein PCR-Reagenziengemisch wird hergestellt, das mit Ausnahme des DNA-Extraktes alle PCR-Komponenten in den angegebenen Konzentrationen enthält. Die Menge des PCR-Reagenziengemisches hängt vom Gesamtvolumen je PCR sowie von der Gesamtzahl der Reaktionen ab und schließt eine ausreichende Pipettierreserve ein.

Positive PCR-Ergebnisse werden bei der Verwendung einer DNA-Konzentration von ungefähr 1 ng DNA je µl Reaktionslösung [25 ng (*cytb*) oder 20 ng (*cox1*)] erwartet.

Zur Verbesserung des PCR-Ergebnisses kann die DNA-Menge erhöht (z. B. um die Ausbeute des PCR-Produkts zu erhöhen) oder verringert werden (z. B. um eine Inhibition der PCR zu vermeiden).

Tabelle 4 — Komponenten für die *cytb*-PCR

Reagens (Stammlösung)	Endkonzentration in der Reaktionslösung
PCR-Puffer	1-fach
MgCl ₂ ^a	1,5 mmol/l
dNTP-Mix ^a	0,2 mmol/l je dNTP
Primer L14735	500 nmol/l
Primer H15149ad	500 nmol/l
Hot-Start-DNA-Polymerase	0,5 Units bis 1 Unit
Wasser	auf Endvolumen auffüllen
Proben-DNA	etwa 1 ng/µl
^a Reagens wird nur verwendet, falls nicht bereits im PCR-Puffer enthalten.	

Tabelle 5 — Komponenten für die *cox1*-PCR

Reagens (Stammlösung)	Endkonzentration in der Reaktionslösung
Trehalose ^a	5 %
PCR-Puffer	1-fach
MgCl ₂ ^b	2,5 mmol/l
dNTP-Mix ^b	0,2 mmol/l je dNTP
Primer VF2_t1	100 nmol/l
Primer FishF2_t1	100 nmol/l
Primer FishR2_t1	100 nmol/l