

DIN EN ISO 17601



ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2016-09-01

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Abschätzung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen
durch quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO 17601:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17601:2016**

Soil quality –

Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil (ISO 17601:2016);

German and English version prEN ISO 17601:2016

Qualité du sol –

Estimation de l'abondance de séquences de gènes microbiens par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative à partir d'ADN directement extrait du sol (ISO 17601:2016);

Version allemande et anglaise prEN ISO 17601:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-07-01 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 des 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 naw@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 Wasserwesen (NAW), 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 77 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17601:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 345 „Charakterisierung von Böden“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der ISO 17601 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 10381-6	siehe DIN ISO 10381-6
ISO 11063	siehe DIN EN ISO 11063

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

- [1] DIN ISO 10381-6, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden unter aeroben Bedingungen für die Beurteilung mikrobiologischer Prozesse sowie der Biomasse und der Diversität unter Laboratoriumsbedingungen*
- [2] DIN EN ISO 11063, *Bodenbeschaffenheit — Verfahren zur direkten Extraktion von DNA aus Bodenproben*

Bodenbeschaffenheit — Abschätzung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO 17601:2016)

Qualité du sol — Estimation de l'abondance de séquences de gènes microbiens par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative à partir d'ADN directement extrait du sol (ISO 17601:2016)

Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil (ISO 17601:2016)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Prüfmaterialien	10
5.1 DNA	10
5.2 Bakterien	10
5.3 Plasmid	10
5.4 Enzyme	10
5.5 Chemikalien	10
5.6 Produkt für Bakterienkultur-Medium	11
5.7 Puffer und Reagenzien	11
6 Prüfeinrichtung	12
7 Durchführung	12
7.1 Vorbereitung des qPCR-Standards und Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1)	12
7.1.1 Allgemeines	12
7.1.2 Amplikon-Design (Aufgabe 1, Schritt 1)	13
7.1.3 qPCR-Standard Vorbereitung (Aufgabe 1, Schritt 2)	13
7.1.4 Isolat-DNA, Umwelt-DNA, künstliche DNA	13
7.1.5 Kalibrierung der qPCR (Aufgabe 1, Schritt 3)	16
7.2 Vorbereitung von Boden-DNA-Template und Hemm-Test (Aufgabe 2)	17
7.2.1 Allgemeines	17
7.2.2 Boden-DNA-Vorbereitung (Aufgabe 2, Schritt 4)	17
7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5)	17
7.2.4 Verdünnung der DNA-Template	19
7.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3)	19
7.3.1 Allgemeines	19
7.3.2 qPCR	19
7.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4)	19
7.4.1 Allgemeines	19
7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse	20
7.4.3 Berechnung der Kopienzahl des betrachteten Gens im Boden-DNA-Extrakt	20
8 Untersuchung der maßgeblichen Schritte der qPCR-Analyse	21
9 Formulierung der Ergebnisse der qPCR-Analyse	21
10 Internationaler Ringversuch	21
11 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Beschreibung der wichtigsten Schritte der TAqMan® qPCR-Analyse	23

Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Beurteilung von qPCR zur Quantifizierung der Abundanz ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus DNA, die direkt aus Böden extrahiert wurden.....	25
Literaturhinweise.....	39

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17601:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 345 „Charakterisierung von Böden“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 17601:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 17601:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

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

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 190, *Soil quality*, Subcommittee SC 4, *Biological methods*.

Einleitung

DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist ein lebensnotwendiger Bestandteil sämtlicher lebender Organismen, der die Enzyme kodiert, die für all ihre biologischen Aktivitäten verantwortlich sind. Durch die Untersuchung von DNA-Sequenzen aus DNA-Quellen unterschiedlicher Matrices mit molekularen Verfahren werden molekulare Marker erhalten, die zur genauen Unterscheidung und Identifizierung verschiedener Organismen (Bakterien, *Archaea* und *Eukaryoten*) verwendet werden können.

Bislang war die Entwicklung von Verfahren zur Kennzeichnung mikrobieller Indikatoren für die mikrobielle Bodenbeschaffenheit, durch die schlechte Kultivierbarkeit vieler Mikroorganismen unter Laborbedingungen und die fehlende Empfindlichkeit traditioneller mikrobiologischer Verfahren, eingeschränkt. Die jüngste Entwicklung einer Vielzahl von molekularbiologischen Verfahren, die auf der Vervielfältigung von aus dem Boden extrahierten Nukleinsäuren beruhen, stellen eine angemessene Alternative zu den klassischen mikrobiologischen Verfahren auf der Grundlage von Kulturen dar und bieten einen einzigartigen Einblick in die Zusammensetzung, den Artenreichtum und die Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften [2] [3] [4] [5] [6]. Auf DNA basierende Verfahren sind gegenwärtig in der Bodenökologie gängige Verfahren und dienen als genotypische Marker für die Bestimmung der mikrobiellen Diversität. Die Ergebnisse der molekularen Analysen von Lebensgemeinschaften und/oder Populationen von Bodenmikroorganismen stützen sich auf zwei Hauptparameter: a) die Extraktion von DNA, die repräsentativ für die Zusammensetzung der indigenen bakteriellen Lebensgemeinschaft ist; und b) den Einfluss der PCR (PCR-Bias), z. B. die Wahl der Primer, die Konzentration der amplifizierten DNA, Fehler in der PCR oder sogar das für die Analyse gewählte Verfahren. [7] [4] [8] [9]

In einer Vielzahl von Studien wurden neue Verfahren untersucht, um die Extraktion, Aufreinigung, Amplifikation und quantitative Bestimmung von DNA aus Böden zu verbessern. [10] Kürzlich hat ISO 11063 "ein Verfahren zur direkten Extraktion von Nukleinsäuren aus Bodenproben", abgeleitet aus Referenz [10] gemeldet, die ein neues Fenster zur Entwicklung standardisierter molekularer Verfahren zur Bewertung der Bodenqualität eröffnet. [11]

Ziel dieser Internationalen Norm ist es, das angewendete Verfahren zur Einrichtung und Durchführung quantitativer PCR, zur Quantifizierung der Abundanz mikrobieller Stämme im Boden als auch von funktionellen Gruppen aus direkt aus Bodenproben extrahierter DNA, zu beschreiben. Die Quantitative Bestimmung von Bodenmikrobenstämmen als auch von funktionellen Gruppen durch qPCR-Untersuchungen kann zur Entwicklung von Routinewerkzeugen für die Überwachung der Bodenqualität beitragen. Die Wiederhol- und Vergleichspräzision des quantitativen PCR-Verfahrens wurden in einem internationalen Ringversuch (siehe Anhang B) beurteilt. Die Wiederholpräzision dieses Verfahrens wurde sowohl für beide 16S rRNA-Gene als auch für Gene, die einen funktionellen Marker für Denitrifikanten (das Nitritreduktase-Gen *nirK*) kodieren, erfolgreich beurteilt. Die Wiederholpräzision dieses Verfahrens ergab einen Laboreffekt, welcher durch Interpretation der Ergebnisse der Quantifizierung der Abundanz der mikrobiellen Gruppen mittels Vergleich, entweder durch Verwendung einer externen Referenz (DNA, extrahiert aus einem Kontrollstamm) in der Prüfung oder durch Berechnung der prozentualen Variationen zwischen Behandlungen, zur Normalisierung der Daten, beseitigt werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt die entscheidenden Schritte eines Verfahrens zur quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zur Messung der Abundanz ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus Boden-DNA-Extrakten, welches eine Auswertung ausgewählter mikrobieller Gruppen liefert, fest.

Dabei ist die Anzahl an Genen nicht notwendigerweise direkt mit der Anzahl an gemessenen Organismen verbunden. Beispielsweise schwankt die Anzahl ribosomaler Operonen zwischen einer und 20 Kopien in unterschiedlichen Bakterienstämmen. Daher gibt die Menge von 16S rRNA-Sequenzen, die aus Boden-DNA-Extrakten quantifiziert wurden, keine exakte Abschätzung der Anzahl an Bodenbakterien an. Ferner ist die Anzahl an Sequenzen nicht notwendigerweise mit lebenden Mikroorganismen verbunden und kann Sequenzen umfassen, die aus toten Mikroorganismen amplifiziert wurden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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 10381-6, *Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*

ISO 11063, *Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Boden-DNA

DNA, extrahiert aus Boden mit lebender und toter Biota

BEISPIEL Mikroorganismen, Pflanzen, Tiere.

3.2

Polymerase-Kettenreaktion

PCR

Verfahren, das die Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz unter Verwendung eines Paares Oligonukleotid-Primern ermöglicht

3.3

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

qPCR

Verfahren, das die quantitative Bestimmung der Anzahl einer bestimmten DNA-Sequenz in einem DNA-*Template* (3.4) unter Verwendung eines bestimmten Paares Oligonukleotid-Primern ermöglicht

3.4

Template

DNA-Probe, die zur Durchführung der *PCR* (3.2) verwendet wird, um eine bestimmte DNA-Sequenz zu amplifizieren

3.5

Amplikon

PCR-Produkt, das durch *PCR* (3.2) aus einem *Template* (3.4) erhalten wird

3.6

Klonierungsvektor

rundes DNA-Molekül, in welches das *Amplikon* (3.5), durch Ligation eingefügt wird, um kompetente *Escherichia coli* zum Klonen des Amplikons umzuwandeln

3.7

qPCR-Standard

geklontes DNA-Ziel, das als *Template* (3.4) für die qPCR-Reaktion verwendet wird, um die Standardkurve, die sich auf die Abundanz der Zielsequenz bezieht, als Funktion von Zyklus-Schwellenwerten zu erstellen

3.8

Ohne-Template-Kontrolle

NTC

Kontrolle, üblicherweise von molekular-(hochreinem) Wasser, die als Negativkontrolle in der qPCR-Analyse verwendet wird, um die Abwesenheit einer Verunreinigung in der qPCR-Mischung zu prüfen

3.9

Zyklus-Schwellenwert

Ct

Anzahl von qPCR-Zyklen, die notwendig sind, damit das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet (d. h. den Hintergrundwert überschreitet)

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zur Abundanz der Zielsequenz.

4 Kurzbeschreibung

Diese Internationale Norm beschreibt qPCR-Analysen, mit fluoreszierenden DNA-Bindungsfarbstoffen als Reporter. Diese qPCR-Analyse wurde durch einen internationalen Ringversuch validiert, der mit SYBR Green, einem häufig verwendeten fluoreszierenden DNA-Bindefarbstoff durchgeführt wurde, der jegliche Doppelstrang-DNA bindet und durch Messung der Fluoreszenz-Steigerung über den Zyklus ermittelt werden kann.

Dieses Verfahren zielt darauf ab, die Abundanz ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus Boden-DNA-Extrakten zu messen. Das Verfahren umfasst vier Aufgaben und acht Schritte, wie in Bild 1 zusammengefasst. Nach [1] sind die drei maßgeblichen, zu validierenden Schritte bei jeder qPCR-Analyse in Bild 1 dargestellt.

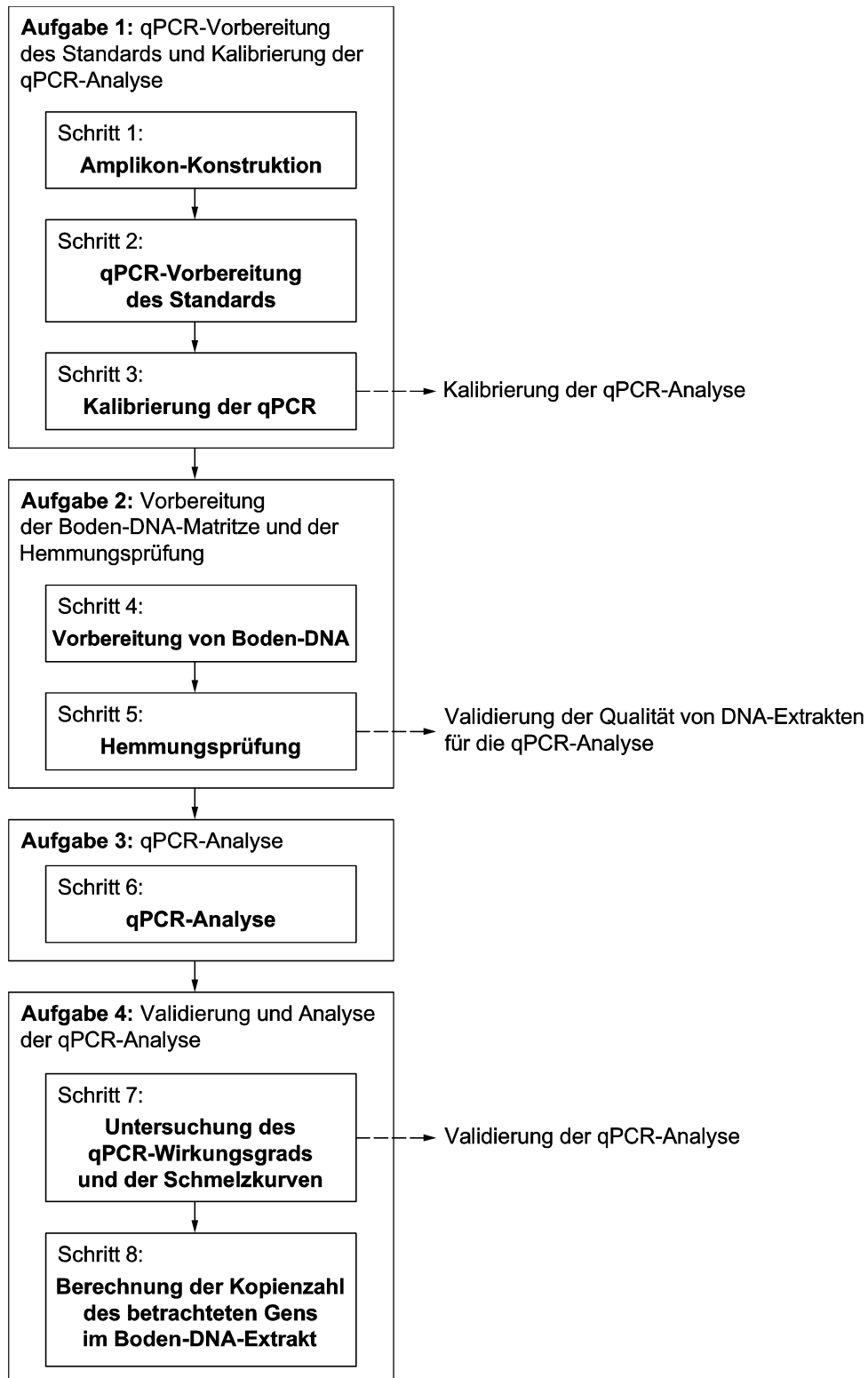


Bild 1 — Hauptaufgaben und maßgebliche Schritte zur Beurteilung der Abundanz ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch qPCR-Analyse

Diese Internationale Norm beschreibt die qPCR-Analyse, basierend auf der Verwendung von fluoreszierendem DNA-Bindefarbstoff, welcher durch einen internationalen Ringversuch mit SYBR Green®¹ qPCR validiert wurde. In Anhang A sind Informationen über die TaqMan®² qPCR-Analyse angegeben, die nicht im internationalen Ringversuch geprüft wurde. Die erste Aufgabe besteht aus drei Schritten, die den Aufbau eines optimalen Amplikons für qPCR (Schritt 1), die Vorbereitung von qPCR-Standards (Schritt 2) und das Verfahren zur Kalibrierung der qPCR-Analyse (Schritt 3), beschreiben. Die zweite Aufgabe enthält zwei zusätzliche Schritte, die die Verfahren zur Aufarbeitung von Boden-DNA-Proben (Schritt 4) und zur Prüfung der Anwesenheit von qPCR-Inhibitoren in Boden-DNA-Proben (Schritt 5) beschreiben. Die dritte Aufgabe besteht aus einem einzigen Schritt, der die Arbeitsvorschrift zur Durchführung der qPCR-Analyse (Schritt 6) beschreibt. Schließlich besteht die vierte Aufgabe aus zwei Schritten: einer beschreibt das Verfahren zur Validierung von qPCR-Analysen (Schritt 7), zur Prüfung der Qualität der qPCR-Analyse und der andere beschreibt die verschiedenen Optionen zur Berechnung der Anzahl der betrachteten Gensequenzen, kopiert aus dem Zyklus-Schwellenwert (Ct), der aus der Analyse der qPCR-Amplifikationsparzellen (Schritt 8) erzielt wurde.

5 Prüfmaterialien

5.1 DNA

5.1.1 DNA, extrahiert aus reinen Bakterien- und Pilz-Isolaten, unter Verwendung klassischer Extraktionsverfahren oder mittels kommerzieller Ausrüstung zur Extraktion genomischer DNA.

5.1.2 Boden-DNA, extrahiert aus Aliquoten (Teilproben) von Böden, nach ISO 11063.

5.2 Bakterien

5.2.1 *Escherichia coli*-Stamm, üblicherweise verwendet zum Klonen des PCR-Produkts.

5.3 Plasmid

5.3.1 Klonierungsvektor, üblicherweise verwendet zum Klonen des PCR-Produkts in geeigneten *Escherichia coli*.

5.4 Enzyme

5.4.1 Taq-Polymerase.

5.4.2 T4 DNA-Ligase.

5.4.3 T4 Gen T32.

5.4.4 Rinderserumalbumin (CAS-Nr. 9048-46-8).

5.5 Chemikalien

5.5.1 Ampicillin-Natrium, C₁₆H₁₈N₃NaO₄S (CAS-Nr. 69-52-3).

1 SYBR Green ist ein eingetragenes Warenzeichen für Molekularmarker. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO dar. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

2 TaqMan ist ein Warenzeichen von Roche Molecular Systems, Inc. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO dar. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.5.2 Borsäure, BH_3O_3 (CAS-Nr. 10043-35-3).

5.5.3 Desoxynukleotid-Lösung, dNTPs.

5.5.4 SYBR Safe® DNA-Gelfarbstoff.

5.5.5 Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CAS-Nr. 6381-92-6).

5.5.6 Glukose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (CAS-Nr. 50-99-7).

5.5.7 Salzsäure, HCl (CAS-Nr. 7647-01-0).

5.5.8 IPTG, Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranosid, (CAS-Nr. 367-93-1).

5.5.9 Magnesiumchlorid, MgCl_2 (CAS-Nr. 7786-30-3).

5.5.10 Magnesiumsulfat, MgSO_4 (CAS-Nr. 7487-88-9).

5.5.11 Wasser mit molekularbiologischer Reinheit, H_2O .

5.5.12 Kaliumchlorid, KCl (CAS-Nr. 7447-40-7).

5.5.13 Natriumchlorid, NaCl (CAS-Nr. 7647-14-5).

5.5.14 Tris[hydroxymethyl]aminomethan, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (CAS-Nr. 77-86-1).

5.5.15 X-Gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid, (CAS-Nr. 7240-90-6).

5.6 Produkt für Bakterienkultur-Medium

5.6.1 Bacto tryptone®³, enzymatischer Abbau von Kasein.

5.6.2 Hefeextraktpulver (CAS-Nr. 8013-01-2).

5.7 Puffer und Reagenzien

5.7.1 Ampicillin-Lösung, 2 g Ampicillin-Natrium in 4 ml von 0,22 μm filtersterilisiertem H_2O . Abstimmen auf 20 ml mit sterilisiertem H_2O , aufbereiten von 1 ml Aliquots und Lagerung bei -20°C .

5.7.2 EDTA, 0,5 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 186,10 g EDTA in 1 000 ml H_2O abstimmen mit NaOH (10 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) auf pH 8,0.

5.7.3 SYBR Safe™ DNA-Gelfarbstoff, verdünnen von 10,000X SYBR Safe™ Gelfarbstoff in TBE Puffer $\times 1$.

5.7.4 IPTG Stammlösung, 1 g IPTG in 8 ml H_2O . Nach sorgfältigem Vermischen wird die Lösung angepasst auf 10 ml und unter sicherheits-mikrobiologischer Nachbearbeitung sterilisiert. 1 ml Aliquot IPTG vorbereiten und bei -20°C lagern.

³ Bacto tryptone ist das Warenzeichen eines von Difco Laboratories gelieferten Produkts. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO dar. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.7.5 festes LB-Medium, 10 g Bacto-Trypton®, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g Natriumchlorid und 15 g Agar in 1 000 ml H₂O. Nach 20 Minuten dauernder Autoklavierung bei 120 °C, wird 1 ml Ampicillin-Stammlösung auf 100 mg ml⁻¹ zugefügt zum LB-Medium und, unter sicherheits-mikrobiologischer Nachbearbeitung, auf Petri-Schalen (20 ml) plattiert. 100 µl IPTG-Lösung wird auf festes LB-Ampicillin-Medium plattiert. Wenn die IPTG-Lösung in LB-Ampicillin-Medium gegeben wird, wird 20 µl X-Gal-Lösung auf das feste LB-Ampicillin-Medium plattiert. Das feste LB-Medium wird bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

5.7.6 SOC-Medium, 20 g Bacto Trypton®, 5 g Hefe-Extrakt, 0,58 g NaCl, 0,95 g MgCl₂, 2,46 g MgSO₄ und 3,60 g Glukose in 1 l H₂O. Sterilisieren durch Autoklavieren für 20 min bei 120 °C. Aufbereiten von 950 ml Aliquots und Lagerung bei -20 °C.

5.7.7 Tris-HCl, 1 mol·l⁻¹, 121,14 g Tris in 1 000 ml H₂O abstimmen mit 4 mol·l⁻¹HCl auf pH 8,0.

TBE-Puffer × 10, pH 8,0, 108 g Tris-Basis, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 mol·l⁻¹EDTA (pH 8,0) in 1 000 ml H₂O.

5.7.8 TBE-Puffer × 1, 100 ml TBE-Puffer × 10 in 900 ml of H₂O.

5.7.9 TE-Puffer × 10, pH 8,0, 100 ml von 1 mol·l⁻¹Tris-HCl pH 8,0, 20 ml von 50 mmol·l⁻¹EDTA pH 8,0 in 880 ml molekular-geeignetem Wasser.

5.7.10 TBE-Puffer × 1, 100 ml TBE-Puffer × 10 in 900 ml H₂O.

5.7.11 X-gal-Lösung, 250 mg X-Gal in 5 ml Dimethylformamid 5 ml. Nach sorgfältiger Mischung sind 0,5 ml Aliquot aufzubereiten und bei -20 °C zu lagern.

6 Prüfeinrichtung

Es ist die übliche Laborausrüstung, einschließlich Pipetten, Zentrifuge, Abzugsschrank, horizontales Elektrophorese-System, sowie Folgendes zu verwenden.

6.1 Quantitative PCR, ermöglicht quantitative Bestimmung in Echtzeit von Amplikonen aus unterschiedlichen DNA-Templates, mit theoretischer Nachweisgrenze von einer Kopie eines Sequenz-Ziels je analysierter Probe.

6.2 Spektralphotometer, ermöglicht die quantitative Bestimmung doppelsträngiger DNA bei 260 nm.

6.3 Spektralfluorimeter, ermöglicht die quantitative Bestimmung doppelsträngiger DNA.

ANMERKUNG Nur eine dieser beiden Prüfeinrichtungen ist erforderlich zur Beurteilung der DNA-Konzentration.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung des qPCR-Standards und Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1)

7.1.1 Allgemeines

Die qPCR-Analyse basiert auf der Quantifizierung der Amplikonen am Ende jedes PCR-Zyklus, mittels DNA-Farbstoff, der fluoresziert, wenn er in die doppelsträngigen Amplikonen eingefügt ist. Der Zweck dieser Aufgabe ist, die Beschreibung der Festlegung geeigneter Amplikonen zur Regelung einer qPCR-Analyse (Schritt 1), die Vorbereitung eines qPCR-Standards (Schritt 2) und die Kalibrierung der qPCR-Analyse (Schritt 3).

7.1.2 Amplikon-Design (Aufgabe 1, Schritt 1)

7.1.2.1 Allgemeines

Der erste Schritt zielt auf die Bildung des Oligonukleotid-Primerpaares; dieses kann *in silico* (am Computer), mit unterschiedlichen Programmen, unter Verwendung der Sequenz der Quantifizierung des betrachteten mikrobiellen Gens durch qPCR aus Boden-DNA-Extrakten, hergestellt werden. Die Spezifität der Primer muss *in silico*, durch Vergleich ihrer Sequenzen mit bekannten, in der Gen-Datenbank zur Verfügung stehenden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) Sequenzen, geprüft werden. Es sind nur für das Genziel bestimmte Primer in Betracht zu ziehen. Die zu betrachtenden Hauptparameter zur Entwicklung oligonukleotider Primerpaare, zur Etablierung der qPCR-Analyse, sind nachfolgend aufgelistet.

7.1.2.2 qPCR

- Die optimale Amplikon-Länge bewegt sich zwischen 100 bp und 250 bp.
- Die optimale Primer-Länge befindet sich zwischen 18 bp und 25 bp, mit einem GC-Gehalt von 50 % und einer Schmelztemperatur zwischen 58 °C und 65 °C.
- Die fünf Nukleotiden am 3'-Ende jedes Primers sollten nicht mehr als zwei G- und/oder C-Basen besitzen.
- Eine Abfolge identischer Nukleotide ist zu vermeiden, dies gilt besonders für Guanin.
- 3"-Selbstkomplementarität des Primers, als Maß seiner Tendenz zur Bildung eines Primer-Dimers mit sich selbst, sollte überprüft und vermieden werden.
- Vermeiden Sie die Entwicklung von Primern mit mehr als vier Fehlzuordnungen, weil zu hohe Degeneration des Primers zur Schwankung von qPCR-Ergebnissen beiträgt.

7.1.3 qPCR-Standard Vorbereitung (Aufgabe 1, Schritt 2)

Schritt 2 von Aufgabe 1 beschreibt das verwendete Verfahren zur Erzeugung von qPCR-Standards, die auf eine Sequenz des betrachteten mikrobiellen betrachteten Gens aus unterschiedlichen DNA-Templates (rein bakterielles oder Pilz-Isolat, Umwelt-DNA oder künstliche DNA) abzielen. Darin ist ebenfalls das Verfahren aufgeführt, zum Einfügen des qPCR-Standards in einen Klonierungsvektor, zur Umwandlung von *Escherichia coli* und zur Aufreinigung rekombinanter Plasmide, welche den qPCR-Standard für weitere Anwendung von qPCR-Analysen beherbergt.

7.1.4 Isolat-DNA, Umwelt-DNA, künstliche DNA

7.1.4.1 Allgemeines

Der erste Schritt der qPCR-Standard Vorbereitung stützt sich auf die Extraktion von DNA-Templates, von denen bekannt ist, dass sie das betrachtete mikrobielle Gen beherbergen. Das kann mit verschiedenen Werkstoffen, wie den Folgenden, begonnen werden:

- a) Reinkulturen von Mikroorganismen;

DNA wird extrahiert aus Zellen, die aus einer frischen Kultur von Mikroorganismen, mit konventionellen genomischen DNA-Extraktionsvorschriften, abgeerntet wurden.

- b) Künstliche DNA.

Falls keine biologischen Proben zur Verfügung stehen oder nicht bekannt ist, ob diese das betrachtete Gen beherbergen, kann künstliche DNA, aus der Sequenz des betrachteten Gens, synthetisch hergestellt werden.

In allen Fällen muss die Qualität der zur Amplifikation des qPCR-Standard durch PCR verwendeten DNA-Template durch Elektrophorese auf 1 % Agarose-Gel in TBE-Puffer, eingefärbt mit dem geeigneten Farbstoff (z. B. SYBR Safe™ Farbstoff), verifiziert werden. Die DNA-Konzentration wird mit Spektralphotometrie bei 260 nm gemessen. Die DNA-Template ist verdünnt zu 10 ng·µl⁻¹ in einem Endvolumen von 20 µl und gelagert bei -20 °C.

Die qPCR-Standardsequenz wird durch PCR, mittels eines spezifischen Primerpaares, das entsprechend der in Aufgabe 1 von Block 1 beschriebenen Empfehlungen entwickelt wurde, amplifiziert. Die Amplifikationsreaktion wird durchgeführt in einem 25 µl Endvolumen, das 2,5 µl of 10 × Taq-Polymerasepuffer, 200 µmol·l⁻¹ jedes dNTP, 1,5 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 0,5 µmol·l⁻¹ jedes Primers und 0,625 U Taq-Polymerase, enthält. Ein Volumen von 2,5 µl DNA (z. B. 25 ng DNA) wird als Template für die PCR-Reaktionen verwendet. PCR wird in einem Thermozykler (PCR-Block) ausgeführt, nach dem folgenden Programm: ein Zyklus von 4 Min bei 94 °C; 39 Zyklen von je 1 Min bei 94 °C, 1 min bei spezifischer Glüh-temperatur für das qPCR-Amplikon, 1,5 Min bei 72 °C sowie einem finalen Erweiterungsschritt bei 72 °C für 5 Min. Die erwartete Größe des qPCR-Standardamplikons wird verifiziert durch Elektrophorese auf 2 % Agarose-Gel in TBE-Puffer, gefärbt mit geeignetem Farbstoff (z. B. SYBR Safe™ Farbstoff). Die Amplikonen werden entweder durch das Gel, mit geeigneten Verfahren, aufgereinigt oder durch die Verwendung von Ausschluss-Chromatographiesäulen zur Entfernung der Primer. Die aufgereinigten Amplikonen werden dann mittels Spektralphotometrie bei 260 nm oder durch Spektralfluometrie quantifiziert.

7.1.4.2 Klonen, Verdünnung: Vorbereitung von qPCR-Standards

7.1.4.2.1 Ligation des Amplikons von qPCR-Standard

Für optimale Ligation eines Amplikons in einen Klonierungsvektor sollte ein 3:1 Molverhältnis der Masse des PCR-Produkts (Q in ng DNA), das für die Ligation zu verwenden ist, kalkuliert werden (siehe Gleichung 1):

$$Q = \frac{m_{\text{plasmidDNA}} \times n_{\text{insert}}}{n_{\text{plasmid}}} \times 3 \quad (1)$$

$$Q = [(Menge \text{ an Plasmid-DNA} \times \text{Größe der Einfügung (bp)}) / \text{Größe des Plasmids (bp)}] \times (3/1)$$

Dabei ist

Q Ist die Masse des PCR-Produkts in Nanogramm (ng);

$m_{\text{Plasmid DNA}}$ Ist die Masse der Plasmid-DNA in Nanogramm (ng);

$n_{\text{Einfügung}}$ Ist die Größe der Einfügung, in bp;

n_{Plasmid} Ist die Größe des Plasmids, in bp;

Unter Berücksichtigung einer Plasmidgröße von 3 000 bp, einer 16S rRNA-Einfügung von 200 bp und 50 ng Plasmid-DNA je Ligationsreaktion beträgt die Menge des je Ligation zu verwendenden PCR-Amplikons (siehe Gleichung 2):

$$Q = \frac{50 \times 200}{3\,000} \times 3 = 10 \quad (2)$$

Die Ligationsreaktion besteht aus der erforderlichen Menge des laut qPCR-Standards aufgereinigten Amplikons (Q), 50 ng Plasmid-DNA, 5 µl von 2 × Ligationspuffer, 3 U von T4 DNA Ligase, und molekulargeeignetem Wasser, um ein Endvolumen von 10 µl zu erreichen. Die Ligationsreaktion wird über Nacht bei 4 °C inkubiert oder, für adäquate T4 DNA-Ligase, eine Stunde bei Umgebungstemperatur.

Der Wirkungsgrad der Ligation wird durch Elektrophorese, durch Beladung mit 1 µl gebundenem Plasmid und offenem Plasmid (d. h. 5 ng Plasmid) auf 1 % Agarose-Gel in TBE-Puffer, gefärbt mit geeignetem Farbstoff. Gebundenes Plasmid ist gekennzeichnet durch eine kürzere Migration im Agarose-Gel.

7.1.4.2.2 Umwandlung kompetenter *Escherichia coli*

Kompetente *E. coli* werden durch Hitzeschock umgewandelt, wie unten beschrieben. Kompetente Zellen (10^8 cfu·µg⁻¹ an DNA), frisch aufgetaut, werden für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wird 1 µl der Ligationsreaktion den Zellen hinzugefügt, glatt gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Bakterienzellen werden für 50 s Hitzeschock-behandelt bei 42 °C und sofort auf Eis gelegt und für 2 min inkubiert. Dann werden 950 µl SOC-Medium hinzugefügt und die Bakterienzellen werden inkubiert bei 37 °C, unter Rühren mit 150 min⁻¹ für 1 h. 100 µl Bakterienzellen-Aliquots werden auf LB/Amp/IPTG/X-Gal festes Medium aufgebracht. Die Petrischalen werden dann über Nacht, bei 37 °C inkubiert.

7.1.4.2.3 Screening auf rekombinanten Klon

Platten werden bei 4 °C, für mehrere Stunden, platziert, um die Kolorierung der Bakterienkolonien zu akzentuieren. Weiße Kolonien werden ausgewählt, plattiert auf LB/Amp/IPTG/X-Gal festes Medium, und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mehrere weiße Kolonien wurden ausgewählt und in 100 µl molekular-geeignetes Wasser eingebracht. Die PCR wird ausgeführt, um die Anwesenheit der Einfügung im rekombinanten Klon zu bestätigen. Die Einfügung wird durch PCR, mittels SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3') und T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3') Primern, amplifiziert. Die Amplifikationsreaktion wird durchgeführt in einem 25 µl Endvolumen, das 2,5 µl 10 × Taq-Polymerasepuffer, 200 µmol·l⁻¹ jedes dNTP, 1,5 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 0,5 µmol·l⁻¹ jedes Primers und 0,625 U Taq-Polymerase, enthält. Ein Volumen von 2,5 µl Bakteriensuspension wird als Template für die PCR-Reaktionen verwendet. PCR wird in einem Thermozykler (PCR-Block) ausgeführt, nach dem folgenden Programm: ein Zyklus von 4 min bei 94 °C; 35 Zyklen von je 45 s bei 94 °C, 45 s bei 55 °C, 1,5 min bei 72 °C sowie einem finalen Erweiterungsschritt bei 72 °C für 5 min. Die erwartete Größe des qPCR-Amplikons wird verifiziert durch Elektrophorese auf 2 % Agarose-Gel in TBE-Puffer, gefärbt mit geeignetem Farbstoff.

7.1.4.2.4 Reinigung und Linearisation von rekombinantem Plasmid

Rekombinante Klone mit weißer Farbe, bestätigt durch PCR, werden in 10 ml LB/Amp flüssiges Medium geimpft, bei 37 °C unter Rühren (150 min⁻¹) über Nacht, inkubiert. Plasmid wird gereinigt aus 2 ml Zellsuspension, mittels konventioneller Mini-Aufbereitung. Die Plasmid-DNA wird dann, mittels Spektralphotometrie bei 260 nm, quantifiziert und Aliquots werden vorbereitet und bis zur Verwendung gelagert bei -20 °C.

Das Plasmid wird linearisiert mit einem Restriktionsenzym, das eine einzige Beschränkungsstelle in der Sequenz des Plasmids bietet. Der Verwender muss sicherstellen, dass das gewählte Restriktionsenzym nicht auch die Einfügung beschneidet. Aufschluss des Plasmids wird über Nacht ausgeführt, at 37 °C, in einem Endvolumen von 10 µl, das 250 ng rekombinantes Plasmid, 0,5 U Restriktionsenzym, 1 µl von 10 × Restriktionsenzym-Puffer, und molekular-gradiges Wasser enthält. Der Wirkungsgrad der Restriktion des Plasmids wird nachgewiesen durch Elektrophorese auf 1 % Agarose-Gel. Linearisiertes Plasmid wird bei -20 °C gelagert und wird als Stammlösung, zur Vorbereitung serieller Verdünnung von qPCR, verwendet.

Die Konzentration linearisierten Plasmids in DNA wird durch Spektralphotometrie bei 260 nm oder durch Spektralfluorometrie gemessen, um die Plasmidkopienanzahl zu bestimmen. Dieser Einsatz kann durch die Verwendung eines online-Rechners, wie Oligo Calc, (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) unterstützt werden. Aus dieser Stammlösung, wird eine Anfangslösung, die 0,5 × 10⁸ Kopien des qPCR-Standards je µl enthält, wird in 100 µl molekular-gradigem Wasser bereitet. Dann werden zehnfache Serienverdünnungen bereitet, um 0,5 × 10¹ Kopien des Plasmids per µl zu erzielen. Zusätzliche Zwischenverdünnungen können ebenfalls bereitet werden, abhängig vom Bereich, in dem die Kopienzahl erwartet werden.

7.1.5 Kalibrierung der qPCR (Aufgabe 1, Schritt 3)

7.1.5.1 Allgemeines

Das zur Erzeugung der Kalibrierungskurve und zur Auswertung des Wirkungsgrads der qPCR-Analyse verwendete Verfahren wird nachfolgend beschrieben.

7.1.5.2 qPCR-Analyse

Die qPCR-Kalibrierungsanalyse wird auf Serienverdünnung des geklonten Standards (reichend von 10^8 bis 10^1 Kopien je μl), unter Verwendung eines Primerpaares, das speziell auf das betrachtete Gen zielt, ausgeführt. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von $15\ \mu\text{l}$ ausgeführt, das $2\ \mu\text{l}$ Plasmidstandard, $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jedes Primers, $7,5\ \mu\text{l}$ von $2 \times$ Taq Master Mix oder $1,5\ \mu\text{l}$ von $10 \times$ Taq Master Mix mit fluoreszierendem DNA-Binddefarbstoff, dNTPs, MgCl_2 , und Taq-Polymerase und molekular-gradigem Wasser, enthält ausgeführt. Die qPCR-Reaktion wird in einem Echtzeit-Thermozykler, nach folgendem Programm, durchgeführt: ein Zyklus von 15 min bei $95\ ^\circ\text{C}$, 35 Zyklen von 30 s bei $95\ ^\circ\text{C}$, 30 s bei Glüh Temperatur, 30 s bei $72\ ^\circ\text{C}$, 30 s bei $80\ ^\circ\text{C}$, wo die Fluoreszenz gesammelt wird, sowie einer finalen Dissoziationsphase, durch Erhöhung der Temperatur von $80\ ^\circ\text{C}$ auf $95\ ^\circ\text{C}$. Die qPCR-Kalibrierung wird dreifach durchgeführt und drei NTC sind ebenfalls enthalten.

7.1.5.3 Ermitteln der Kalibrierkurve und der Berechnung des qPCR-Wirkungsgrads

Am Ende der qPCR-Analyse werden die Ergebnisse mittels automatischer Option analysiert. Die Validierung der qPCR erforderte die Einhaltung von: a) keine Amplifikation für NTC, b) eine einzige Dissoziationsspitze bei jeder Verdünnung der qPCR-Standard, und c) eine lineare Kalibrierkurve mit r^2 gleich oder höher als 98 %. Die Kalibrierkurve gibt die Ct-Anzahl als Funktion der Menge der Einträge der Kopienzahl von Standardsequenzen wieder.

Der Wirkungsgrad der qPCR-Analyse wird angesetzt, wie in Gleichung 3, aus Werten, die aus der Kalibrierkurven-Gleichung bestimmt wurden, angegeben.

$$Ct = a \cdot q + c \quad (3)$$

Dabei ist

- Ct ist der gemessene Zyklus-Schwellenwert;
- q Ist die Kopienzahl von qPCR-Standards;
- a Steigung der Kalibrierkurve;
- c Ordinate am Ursprung (Ct für 1 Kopie von qPCR-Standards).

$$E = 10^{(-1/a)} - 1 \quad (4)$$

Dabei ist

- E Wirkungsgrad der Kalibrierkurve;
- a Steigung der Kalibrierkurve.

Es ist zu beachten, dass eine Kalibrierkurve mit einer Steigung gleich $-3,32$ zu 100 % wirksam ist. Eine zweifache oder eine 10-fache Verdünnung einem vorgegebenen DNA-Template ergibt jeweils einen Ct-

Unterschied von 1 oder von 3,3 (d.h. 10^8 Ct = 10 und 10^7 Ct = 13,3) für eine qPCR-Analyse, die einen Wirkungsgrad von 100 % hat.

7.2 Vorbereitung von Boden-DNA-Template und Hemm-Test (Aufgabe 2)

7.2.1 Allgemeines

Diese Aufgabe beschreibt das Verfahren zur Vorbereitung der DNA-Template und zur Prüfung auf Anwesenheit von Taq-Polymerase-Inhibitoren in DNA-Extrakten, die als Template für qPCR-Analyse verwendet werden. Diese Prüfung ist eine obligatorische Voraussetzung zur Validierung der Qualität von DNA-Extrakten und zur Genehmigung ihrer Verwendung als Template zur Durchführung von qPCR-Analysen.

7.2.2 Boden-DNA-Vorbereitung (Aufgabe 2, Schritt 4)

Schritt 4 von Aufgabe 2 beschreibt das zur Extrahierung von DNA aus Bodenproben verwendete Verfahren. Bodenproben müssen gesammelt, bearbeitet und gelagert werden, nach ISO 10381-6. Boden-DNA-Extraktion muss ausgeführt werden, nach ISO 11063. Boden-DNA-Proben werden verdünnt auf $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ und $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5)

Das Verfahren zur Prüfung auf Anwesenheit von Taq-Polymerase-Inhibitoren in Boden-DNA-Extrakten ist nachfolgend beschrieben. Dieser Schritt muss als Voraussetzung, vor der Ausführung der qPCR-Analyse aus Boden-DNA-Extrakten, durchgeführt werden. Tatsächlich werden Taq-Polymerase-Inhibitoren, wie Huminstoffe, oft mit der Boden-DNA extrahiert und nur Boden-DNA-Extrakte, die frei von Inhibitoren sind, können der qPCR-Analyse unterzogen werden, um die Abundanz ausgewählter mikrobieller Gensequenzen in Böden zu bewerten. Nachfolgend werden zwei Hemm-Testen beschrieben.

7.2.3.1 Spicken von exogener DNA in Boden-DNA-Extrakt

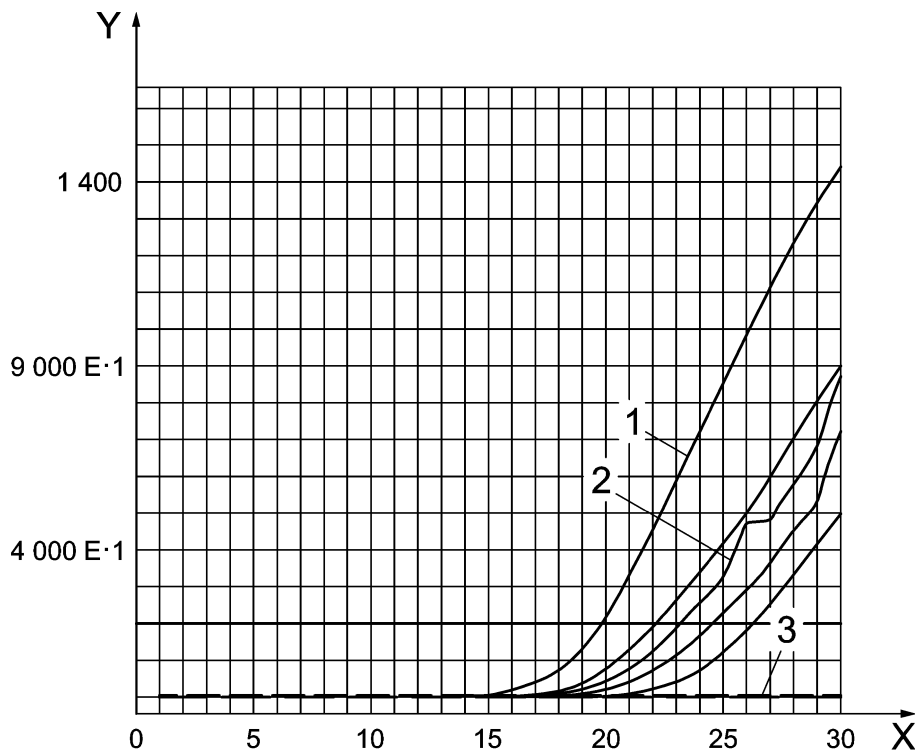
Die Suche nach Inhibitoren kann durch Quantifizierung der Abundanz von exogener DNA, mit der Boden-DNA in bekannter Menge bespickt sein. Die unten empfohlene Arbeitsvorschrift beschreibt die Analyse, die nach dem Spicken von Plasmid-DNA in Boden-DNA-Extrakte, ausgeführt wird. Dieses Verfahren kann an jegliche exogenen DNA-Quellen, durch Durchführung der qPCR mit geeignetem Primerpaar, spezifisch für die Sequenz bespickter DNA, angepasst werden.

Die qPCR wird mit SP6 und T7-Primern, spezifisch aus dem Plasmid, durchgeführt. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von $15 \mu\text{l}$ ausgeführt, das $2 \mu\text{l}$ Plasmid-DNA, $2 \mu\text{l}$ Boden-DNA (unter Verwendung der beiden Verdünnungen 1 und $0,1 \text{ ng} \mu\text{l}^{-1}$), $1,0 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jedes Primers, $7,5 \mu\text{l}$ von $2 \times$ Taq Master Mix oder $1,5 \mu\text{l}$ von $10 \times$ Taq Master Mix mit fluoreszierendem DNA-Bindefarbstoff dNTPs, MgCl_2 , und Taq-Polymerase und molekular-gradiges Wasser, enthält ausgeführt. Die qPCR-Reaktion wird in einem Echtzeit-Thermozykler, nach folgendem Programm, durchgeführt: ein Zyklus von 15 min bei 95°C , 30 Zyklen von 15 s bei 95°C , 30 s bei 55°C und 30 s bei 72°C . Der SP6-T7-qPCR-Hemm-Test wird für jede Verdünnung von zu prüfenden Boden-DNA-Extrakten durchgeführt - drei Positivkontrollen, die nur Plasmid-DNA und drei NTC enthalten.

Der Hemm-Test wird validiert durch Beachtung des Folgenden:

- a) Kein Amplikon in der NTC-Kontrolle;
- b) Ähnliche Ct-Werte in der qPCR, die aus Boden-DNA-Extrakten und aus Plasmid-DNA (Bild 2) durchgeführt wurde.

Die Boden-DNA-Verdünnung zeigt, dass keine Hemmung als Template zur Durchführung der qPCR-Analyse gewählt wurde.



Legende

- x ΔR_n
- Y Zyklus
- 1 pGEM-T
- 2 Teilweise Inhibition
- 3 Inhibition

Bild 2 — Ergebnisse des Hemm-Tests, die durch qPCR-Analyse, zielend auf die SP6-T7-Region des pGEM-T Plasmids, mit welchem eine bekannte Menge an Boden-DNA-Extrakten gespickt ist

Wird eine vollständige oder teilweise Inhibition beobachtet (d. h. jeweils kein Amplikon oder Abdrift im Ct-Wert), muss der Boden-DNA-Extrakt verdünnt werden, um die Hemmung zu entfernen und den Boden-DNA-Extrakt einem neuen Hemm-Test zu unterziehen. Ergibt dies keine Verbesserung der qPCR-Hemm-Test, dann müssen die DNA-Extrakte weiter, wie in ISO 11063 empfohlen, gereinigt und nochmals dem Hemm-Test unterzogen werden. Wenn beim Hemm-Test akzeptable Ergebnisse erzielt werden, können die Boden-DNA-Proben für qPCR-Analysen verwendet werden.

Es ist zu beachten, dass qPCR-Analysen, die aus Boden-DNA-Extrakten durchgeführt wurde, durch Verwendung von Trägerstoffen, die der Aktivität von Taq-Polymerase ähneln, verbessert werden können. Verwendet man, als eines der Beliebtesten, Rinderserumalbumin mit $400 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ der qPCR, wurde bewiesen, dass dies die Inhibition auslöst. Alternativ ergibt T4-Gen 32-Protein mit $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ der qPCR-Reaktion ähnliche Resultate.

7.2.4 Verdünnung der DNA-Template

Alternativ kann nach der Anwesenheit von Taq-Polymerase-Inhibitoren in Boden-DNA-Extrakten gesucht werden, durch Ausführung einer qPCR-Analyse, die, unter Verwendung einer 10-fach Verdünnung von Boden-DNA-Extrakten ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) als Template, auf das betrachtete Gen zielt. Die qPCR-Analyse wird unter Beachtung des oben beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Der qPCR-Hemm-Test wird für jede Verdünnung von zu prüfenden Boden-DNA-Extrakten, einschließlich drei Positivkontrollen, die nur Standard-DNA und drei NTC enthalten, durchgeführt. Der Hemm-Test wird validiert durch Beachtung des Folgenden:

- a) Kein Amplikon in der NTC-Kontrolle;
- b) Amplifikation in der Positivkontrolle;
- c) bei jeder Probenüberprüfung, Differenz der Ct-Werte von 3,32 zwischen 10-facher Verdünnung.

Boden-DNA-Extrakte, die eine Inhibition aufweisen, müssen wie in 7.2.1 vorgeschlagen behandelt werden.

7.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3)

7.3.1 Allgemeines

Schritt 6 von Aufgabe 3 beschreibt das Verfahren zur Quantifizierung der Abundanz eines mikrobiellen Gens (nachfolgend betrachtete Gen genannt) aus Boden-DNA-Extrakt. qPCR-Reaktionen werden ausgeführt mit einem Template aus a) der Verdünnung von Boden-DNA-Extrakt, ausgewählt in Schritt 5, Aufgabe 2 (Hemmungsschritt), b) Duplikat jeder Verdünnung der Kalibrierkurve (von $0,5 \times 10^8$ bis $0,5 \times 10^8$ Kopien an Standard-DNA je μl), sowie c) drei Ohne-Template-Kontrollen, ausschließlich mit molekular-gradigem Wasser.

7.3.2 qPCR

qPCR-Analyse, die auf das betrachtete Gen zielt, wird auf Replikat jedem Boden-DNA-Template, bei Verdünnung, die keine Inhibition von Taq-Polymerase auf dem Replikat jeder Plasmid-Standardverdünnung (bewegt sich zwischen 10^8 und 10^1 Kopien je μl) und auf dem Dreifachen der NTC, zeigt, ausgeführt. Es werden spezifische Primerpaare, für das betrachtete Gen, verwendet. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von $15 \mu\text{l}$ ausgeführt, das $2 \mu\text{l}$ DNA-Template, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jedes Primers, $7,5 \mu\text{l}$ von $2 \times$ Taq Master Mix oder $1,5 \mu\text{l}$ von $10 \times$ Taq Master Mix mit fluoreszierendem DNA-Bindefarbstoff, dNTPs, MgCl_2 , und Taq-Polymerase und molekular-gradiges Wasser, enthält ausgeführt. Die qPCR-Reaktion wird in einem Echtzeit-Thermozykler, nach folgendem Programm, durchgeführt: ein Zyklus von 15 min bei 95°C , 35 Zyklen von 30 s bei 95°C , 30 s bei Glühtemperatur, 30 s bei 72°C und 30 s bei 80°C , wo die Fluoreszenz gesammelt wird, sowie einer finalen Dissoziationsphase, durch Erhöhung der Temperatur von 80°C auf 95°C .

7.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4)

7.4.1 Allgemeines

Schritt 7 von Aufgabe 4 beschreibt das zur Überprüfung der Validität der qPCR-Analysen und zur Verarbeitung von qPCR-Rohergebnissen verwendete Verfahren. Schritt 8 von Aufgabe 4 schlägt zwei Rechenweisen zur Beurteilung der Abundanz des betrachteten Gens vor, ausgedrückt entweder als Sequenz-Kopienzahl je ng Boden-DNA oder je g an Boden.

7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse

7.4.2.1 Allgemeines

Am Ende der qPCR-Reaktion werden die Ergebnisse mittels automatischer Option analysiert. Die bei der Validierung der qPCR-Analyse zu berücksichtigenden Parameter sind nachfolgend eingehend beschrieben.

7.4.2.2 qPCR-Analyse

Die Validierung der qPCR erfordert die Beachtung des Folgenden:

- a) keine Amplifikation bei NTC;
- b) eine lineare Kalibrierkurve mit r^2 gleich oder höher als 98 %;
- c) Eine Dissoziationskurve, die eine einzige Spitze bei der erwarteten Schmelztemperatur, spezifisch für jedes Genziel, aufzeigt, welche die Spezifität der Amplifikation attestiert.

Bemerkenswert ist, dass, bei Verwendung eines degenerierten Primerpaars, divergente Sequenzen aus Boden-DNA-Extrakt amplifiziert werden und als Ergebnis kann die Dissoziationskurve keine einzelne scharfe Spitze bilden, wie beim Standard beobachtet, und bildet stattdessen eine flache Spitze.

7.4.3 Berechnung der Kopienzahl des betrachteten Gens im Boden-DNA-Extrakt

7.4.3.1 Allgemeines

Für jede qPCR-Analyse muss die Gleichung für die Kalibrierkurve berechnet werden, genau wie der qPCR-Wirkungsgrad. Diese beiden Parameter müssen, gemeinsam mit der geschätzten Anzahl an Kopien des betrachteten Gens, aufgezeichnet werden. Die in der qPCR-Analyse geschätzte Abundanz des betrachteten Gens kann weiter ausgeschöpft werden, um die Ergebnisse als Sequenz-Kopienzahl je ng Boden-DNA oder je g an Boden auszudrücken.

7.4.3.2 Schätzung der Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens je ng Boden-DNA

Gleichung 5 muss zur Einschätzung der Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens je ng Boden-DNA verwendet werden.

$$n[\text{betrachtete Gene}]_1 = q / (2 \times c[\text{DNA}]) \quad (5)$$

Dabei ist

- | | |
|-----------------|--|
| q | ist die Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens, gemessen in der Analyse; |
| 2 | ist das Volumen der als Template für die qPCR-Analyse verwendeten Boden-DNA, in μl ; |
| $c[\text{DNA}]$ | Ist die zur Durchführung der qPCR-Analyse verwendete Konzentration an Boden-DNA-Extrakt, in $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$; |

$n[\text{betrachtetes Gen}]_1$ Ist die Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens je ng Boden-DNA.

7.4.3.3 Schätzung der Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens je g an Boden

Gleichung 6 muss zur Einschätzung der Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens je g an Boden verwendet werden.

$$n[\text{betrachtetes Gen}]_2 = (n[\text{Betrachtete Gene}]_1 \times y) / z \quad (6)$$

Dabei ist

$n[\text{betrachtetes Gen}]_1$ Ist die Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens je ng Boden-DNA;

y Ist die Menge an Boden-DNA, extrahiert aus z g Bodenprobe, in ng;

z Ist die Menge an Bodenprobe, von welcher DNA extrahiert wird, in g Trockenmasse-Äquivalent;

$n[\text{betrachtetes Gen}]_2$ Ist die Anzahl an Sequenzen des betrachteten Gens je g an Boden (Trockenmasse-Äquivalent).

8 Untersuchung der maßgeblichen Schritte der qPCR-Analyse

Bei jeder qPCR-Analyse muss das Labor die folgenden Werte untersuchen, die für drei maßgebliche Schritte erzielt wurden, aufgezeigt in Bild 1, um die qPCR-Analyse und das Verfahren mit weiterer Analyse von qPCR-Daten zu validieren:

- a) Nachweis der Abwesenheit von Taq-Polymerase-Inhibitoren;
- b) Einschätzung des Wirkungsgrads der qPCR-Analyse aus der Kalibrierkurve;
- c) Überprüfung der Amplifikationsqualität durch Analyse der Dissoziationskurve (auf fluoreszierende DNA-Bindfarbstoffe, nur qPCR Analyse) und der Abwesenheit von Verunreinigung in NTC-Proben.

9 Formulierung der Ergebnisse der qPCR-Analyse

Die Ergebnisse der qPCR-Analyse müssen als Ergebnistabellen dargestellt werden, einschließlich der Abundanz ausgewählter mikrobieller Gensequenzen, die durch qPCR, welche direkt aus Böden extrahiert wurde, geschätzt wurden, ausgedrückt als Sequenz-Kopienzahl des betrachteten Gens je ng Boden-DNA und/oder als Sequenz-Kopienzahl des betrachteten Gens je Gramm Boden (Trockenmasse-Äquivalent). Die Ergebnisse sollten ebenfalls die Gleichung der Standardkurve darstellen, genau wie die Werte aus Ohne-Template-Kontrolle.

10 Internationaler Ringversuch

Dieses Verfahren zur Quantifizierung der Abundanz mikrobieller Gruppen wurde mittels eines internationalen Ringversuchs ausgewertet. Darin waren sechs unterschiedliche Labore involviert, bezüglich DNA-Proben, die direkt aus sechs unterschiedlichen Böden extrahiert wurden. Der Ringversuch bestand aus zwei Teilen und zielte darauf ab, den Wirkungsgrad des qPCR-Kits und von T4Gp32, bezüglich der Quantifizierung der Abundanz mikrobieller Gruppen und der Beurteilung der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision der Quantifizierung der Abundanz mikrobieller Gruppen, einzuschätzen. Die Berichte der beiden Teile des Ringversuchs sind jeweils in den Anhängen A und B bereitgestellt.

11 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

- a) eine Verweisung auf diese Internationale Norm, d. h. ISO 17601:2016;
- b) Informationen zu Boden-DNA-Extrakten, einschließlich Bezeichnung der Probe, Extrahierungsdatum und Lagerbedingungen (falls angemessen) von Nukleinsäuren;
- c) Thermische Bedingungen, die zur Durchführung der qPCR-Analyse (Zyklus-Programm, Temperatur-Erhöhung) verwendet werden und Verfahren zur Analyse von qPCR-Rohergebnissen;
- d) Ergebnistabellen, einschließlich der Abundanz ausgewählter mikrobieller Gensequenzen, die durch quantitative Echtzeit-PCR, welche direkt aus Böden extrahiert wurde, geschätzt wurden, ausgedrückt als Sequenz-Kopienzahl des betrachteten Gens je ng Boden-DNA und/oder als Sequenz-Kopienzahl des betrachteten Gens je Gramm Boden (Trockenmasse-Äquivalent);
- e) die Angabe aller nicht in dieser Internationalen Norm aufgeführten oder optionalen Verfahrensschritte sowie alle Faktoren, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.