DIN EN ISO 17601

DIN

ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2024-10-09
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 17601:2018-08

Entwurf

Bodenbeschaffenheit – Ermittlung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO/DIS 17601:2024); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17601:2024

Soil quality –
Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil (ISO/DIS 17601:2024);
German and English version prEN ISO 17601:2024

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/DIS 17601:2024);
Version allemande et anglaise prEN ISO 17601:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-08-09 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 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 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 86 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

Nationales Vorwort

Das Dokument prEN ISO 17601:2024 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA "Biologische Verfahren" im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigefügt. 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 11063 siehe DIN EN ISO 11063

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 EN ISO 17601:2018-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

a) Anhang C wurde um Beispiele für etablierte qPCR-Systeme zur Quantifizierung bestimmter mikrobieller Gruppen oder ihrer Funktion erweitert;

b) Dokument redaktionell überarbeitet.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 11063, *Bodenbeschaffenheit — Direkte Extraktion von DNA aus Bodenproben*

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

– Leerseite –

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

August 2024

prEN ISO 17601

Bodenbeschaffenheit – Ermittlung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO/DIS 17601:2024)

Soil quality – Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil (ISO/DIS 17601:2024)

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/DIS 17601:2024)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

E DIN EN ISO 17601:2024-09
prEN ISO 17601:2024 (D)

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort . . . 5
Vorwort . . . 6
Einleitung . . . 7
1 Anwendungsbereich . . . 8
2 Normative Verweisungen . . . 8
3 Begriffe . . . 8
4 Kurzbeschreibung . . . 9
5 Prüfmaterialien . . . 11
5.1 DNA . . . 11
5.2 Bakterien . . . 11
5.3 Plasmid . . . 11
5.4 Enzym . . . 11
5.5 Chemikalien . . . 11
5.6 Komponenten für ein Bakterien-Nährmedium . . . 12
5.7 Pufferlösungen und Reagenzien . . . 12
6 Prüfeinrichtung . . . 13
7 Durchführung . . . 13
7.1 Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1) . . . 13
7.1.1 Allgemeines . . . 13
7.1.2 Amplifikat-Entwicklung (Aufgabe 1, Schritt 1) . . . 14
7.1.3 Herstellung des qPCR-Standards (Aufgabe 1, Schritt 2) . . . 14
7.1.4 DNA aus Isolaten und Umweltproben, künstliche DNA . . . 14
7.1.5 Kalibrierung der qPCR (Aufgabe 1, Schritt 3) . . . 17
7.2 Herstellung der Boden-DNA-Matrize und Hemm-Test (Aufgabe 2) . . . 18
7.2.1 Allgemeines . . . 18
7.2.2 Aufbereitung von Boden-DNA (Aufgabe 2, Schritt 4) . . . 18
7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5) . . . 18
7.2.4 Verdünnung der DNA-Matrize . . . 19
7.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3) . . . 20
7.3.1 Allgemeines . . . 20
7.3.2 qPCR . . . 20
7.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4) . . . 20
7.4.1 Allgemeines . . . 20
7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse . . . 20
7.4.3 Berechnung der Kopienzahl des interessierenden Gens im Boden-DNA-Extrakt . . . 21
8 Untersuchung der kritischen Schritte der qPCR-Analyse . . . 22
9 Angabe der Ergebnisse der qPCR-Analyse . . . 22
10 Internationaler Ringversuch . . . 22
11 Prüfbericht . . . 22
Anhang A (informativ) Beschreibung der wichtigsten Schritte einer TaqMan® qPCR-Analyse . . . 23
A.1 Allgemeines . . . 23
A.2 Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung (Aufgabe 1) . . . 23
A.2.1 Amplifikat-Entwicklung (Aufgabe 1, Schritt 1) . . . 23
A.2.2 Kalibrierung der qPCR-Aalyse (Aufgabe 1, Schritt 3) . . . 23
A.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3) . . . 24
A.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4) . . . 24
Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung einer qPCR zur quantitativen Bestimmung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus direkt aus dem Boden extrahierter DNA . . . 25
B.1 Am Ringversuch beteiligte Laboratorien . . . 25
B.2 Organisation des Ringversuchs . . . 25

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

B.3 Material und Verfahren . . . 26
B.3.1 Böden . . . 26
B.3.2 Extraktion, Aufreinigung und quantitative Bestimmung von Boden-DNA sowie Hemm-Test . . . 26
B.3.3 Quantitative qPCR-Analyse . . . 27
B.3.4 Statistische Analysen . . . 27
B.4 Ergebnisse . . . 28
B.4.1 Analyse der Standardkurven für die qPCR von *16S-rRNA* und *nirK* . . . 28
B.4.2 Wiederholpräzision von qPCR-Analysen . . . 30
B.4.3 Vergleichpräzision von qPCR-Analysen . . . 32
B.4.4 Vergleich der in den verschiedenen Böden quantitativ bestimmten Kopienzahlen der *16S-rRNA*- und *nirK*-Sequenz . . . 35
B.5 Schlussfolgerungen und Empfehlungen . . . 37
B.5.1 Schlussfolgerungen . . . 37
B.5.2 Empfehlungen . . . 37
Anhang C (informativ) **Beispiele gängiger Primer-Systeme für eine qPCR-basierte quantitative Bestimmung von Marker-Genen in Bodenproben . . . 39**
C.1 Anwendungsbereich . . . 39
C.2 Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung wichtiger struktureller Komponenten des Boden-Mikrobioms . . . 39
C.2.1 Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung von Bakterien und Archaea . . . 39
C.3 Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung von wichtigen funktionellen Gruppen . . . 39
C.3.1 Marker-Gene für wichtige funktionelle Gruppen, die am Stickstoffumsatz im Boden beteiligt sind . . . 39
C.4 Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale der Analysen . . . 40
Literaturhinweise . . . 43

Bilder

Bild 1 — Hauptaufgaben und kritische Schritte bei der Schätzung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen mittels qPCR . . . 10
Bild 2 — Ergebnisse des Hemm-Tests, durchgeführt mittels qPCR-Analyse, die auf den SP6-T7-Bereich des pGEM-T-Plasmids abzielt, das in bekannter Menge zu Boden-DNA-Extrakten hinzugegeben wurde . . . 19
Bild B.1 — Box-Whisker-Plots, die die Verteilung der Parameter der Standardkurven (Steigung, Y-Achsenabschnitt und R^2) und der Effizienz der qPCR-Analyse darstellen, gemessen von den sechs am Ringversuch zu qPCR-Analysen für *16S-rRNA* (16S) und *nirK* (nirK) beteiligten Laboratorien . . . 28
Bild B.2 — Mittelwerte der Parameter der Standardkurven (Steigung, Y-Achsenabschnitt und R^2) und der Effizienz der qPCR-Analyse, gemessen von den sechs am Ringversuch zu qPCR-Analysen für *16S-rRNA* (blau) und *nirK* (braun) beteiligten Laboratorien . . . 29
Bild B.3 — Quantitative Bestimmung der Kopienzahl von *16S-rRNA* in den sechs untersuchten Böden (Viseu, Gargalianoi, La Piacenza, Limagne, Pierrelaye und Thessaloniki) durch die sechs Laboratorien (A bis F) . . . 33
Bild B.4 — Quantitative Bestimmung der Kopienzahl der *nirK*-Sequenz in den sechs untersuchten Böden (Viseu, Gargalianoi, La Piacenza, Limagne, Pierrelaye und Thessaloniki) durch die sechs Laboratorien (A bis F) . . . 34

Tabellen

Tabelle B.1 — Liste von verwendeten qPCR-Geräten, qPCR-Kits und der Verwendung von T4Gp32 durch die jeweiligen am Ringversuch zu ISO 17601 beteiligten Laboratorien . . . 25

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

Tabelle B.2 — Physikalisch-chemische Eigenschaften von für den Ringversuch zu ISO 17601 verwendeten Böden 26
Tabelle B.3 — Primerpaare, die zur Amplifikation der Sequenzen von pGEM-T, *16S-rRNA* und *nirK* durch qPCR verwendet wurden 27
Tabelle B.4 — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für *16S-rRNA* (unabhängig von der betrachteten Boden-DNA), durchgeführt mittels ANOVA (α = 0,05) an den Mittelwerten des log (Kopienzahl von *16S-rRNA* je 0,2 ng Boden-DNA) 30
Tabelle B.5 — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für *nirK* (unabhängig von der betrachteten Boden-DNA), durchgeführt mittels ANOVA (α = 0,05) an den Mittelwerten des log (Kopienzahl von *nirK* je 0,2 ng Boden-DNA) 32
Tabelle B.6 — Einstufung des Bodens in eine Rangordnung entsprechend den von den verschiedenen Laboratorien (A bis F) erhaltenen Häufigkeiten von *16S-rRNA* [vom niedrigsten (oben in der Tabelle) bis zum höchsten (unten in der Tabelle) Wert]. Der in Klammern angegebene Buchstabe gibt die statistische Gruppe an 36
Tabelle B.7 — Einstufung des Bodens in eine Rangordnung entsprechend den von den verschiedenen Laboratorien (A bis F) erhaltenen Häufigkeiten von *nirK* [vom niedrigsten (oben in der Tabelle) bis zum höchsten (unten in der Tabelle) Wert]. Der in Klammern angegebene Buchstabe gibt die statistische Gruppe an; unterschiedliche Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin 37
Tabelle A.1 — Einzelheiten zu den vorgeschlagenen Primer-Systemen zum Erhalt ausgewählter Marker-Gene 41

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17601:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 17601:2018 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 17601:2024 wurde von CEN als prEN ISO 17601:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

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*.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 17601:2016).

Die wesentlichen Änderungen sind folgende:

— Anhang C wurde durch die Aufnahme von Beispielen gängiger qPCR-Systeme zur quantitativen Bestimmung bestimmter mikrobieller Gruppen oder ihrer Funktion erweitert.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

Einleitung

DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist ein wichtiger Bestandteil lebender Organismen, der die Enzyme kodiert, die für deren biologischen Aktivitäten verantwortlich sind. Durch die Untersuchung von DNA-Sequenzen aus DNA-Quellen, die mit einer Vielzahl von molekularen Verfahren aus unterschiedlichen Umweltmatrices extrahiert werden, werden molekulare Marker erhalten, die zur genauen Unterscheidung und Identifizierung verschiedener Organismen (Bakterien, *Archaea* und *Eukaryoten*) verwendet werden können.

Bislang waren die meisten Untersuchungen mit dem Ziel der Entwicklung von mikrobiellen Qualitätsindikatoren, die auf komplexe Umgebungen, wie z. B. Boden, anwendbar sind, durch die mangelhafte Kultivierbarkeit vieler Mikroorganismen unter Laborbedingungen und mangelnde 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 basieren auf zwei Hauptkomponenten: a) der Extraktion von DNA, die repräsentativ für die Zusammensetzung der indigenen bakteriellen Lebensgemeinschaft ist, und b) dem Einfluss der PCR (PCR-Bias), wie z. B. der Wahl der Primer, der Konzentration der amplifizierten DNA, Fehlern in der PCR oder sogar dem für die Analyse gewählten 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]. Mit ISO 11063, in der ein aus Literaturhinweis [10] abgeleitetes „Verfahren zur direkten Extraktion von DNA aus Bodenproben“ angegeben ist, ergeben sich unlängst neue Möglichkeiten für die Entwicklung genormter molekularer Verfahren zur Einschätzung der Bodenbeschaffenheit [11].

Das Ziel dieser Internationalen Norm ist die Beschreibung eines Verfahrens, das für die Organisation und Durchführung von quantitativen PCR-Analysen für die quantitative Bestimmung der Häufigkeit (Abundanz) von Mikroorganismenstämmen im Boden sowie von funktionellen Gruppen aus direkt aus Bodenproben extrahierter DNA angewendet wird. Die quantitative Bestimmung von Mikroorganismenstämmen im Boden sowie von funktionellen Gruppen durch qPCR-Analysen kann zur Entwicklung von Routinewerkzeugen zur Überwachung der Bodenbeschaffenheit beitragen. Die Reproduzierbarkeit (Wiederholpräzision) und die Vergleichbarkeit (Vergleichpräzision) des Verfahrens der quantitativen PCR wurden in einem internationalen Ringversuch beurteilt (siehe Anhang B). Die Wiederholpräzision dieses Verfahrens wurde sowohl für 16S-rRNA-Gene als auch für Gene, die einen funktionellen Marker von Denitrifikanten (das Nitritreduktase-Gen *nirK*) darstellen, erfolgreich evaluiert. Die Vergleichpräzision dieses Verfahrens hat einen Laboreffekt offengelegt, der durch Auswertung der Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Häufigkeit der mikrobiellen Gruppen durch Vergleich, entweder durch Verwendung einer externen Vergleichsbasis (aus einem Kontrollstamm extrahierte DNA) im Versuch oder durch Berechnung eines Prozentsatzes der Abweichungen zwischen Behandlungen zum Normieren der Daten überwunden werden kann.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt die entscheidenden Schritte eines Verfahrens der quantitativen Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zur Messung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus Boden-DNA-Extrakten fest, welche eine Schätzung ausgewählter mikrobieller Gruppen ermöglicht.

Dabei gilt, dass die Anzahl von Genen nicht zwangsläufig direkt mit der Anzahl an gemessenen Organismen korreliert. Zum Beispiel reicht die Anzahl des ribosomalen Operons in unterschiedlichen Bakterienstämmen von einer Kopie bis zu 20 Kopien. Daher ergibt die Anzahl der 16S-rRNA-Sequenzen, die aus Boden-DNA-Extrakten quantitativ bestimmt wurde, keinen genauen Schätzwert für die Anzahl der Bodenbakterien. Außerdem ist die Anzahl der Sequenzen nicht unbedingt mit lebenden Mikroorganismen verbunden und kann auch Sequenzen umfassen, die von toten Mikroorganismen amplifiziert wurden.

Eine Auflistung derzeit gängiger qPCR-Analysen zur Beurteilung ausgewählter funktioneller Merkmale des Boden-Mikrobioms ist in Anhang C aufgeführt.

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 108400, *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 — Direct extraction of soil DNA*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten 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
Boden-DNA
aus dem Boden extrahierte DNA von lebenden und toten Biota

BEISPIEL Mikroorganismen, Pflanzen, Tiere.

3.2
Polymerase-Kettenreaktion
PCR
Verfahren, das die Vervielfältigung (Amplifikation) einer spezifischen DNA-Sequenz unter Verwendung eines spezifischen Paares von Oligonukleotid-Primern ermöglicht

3.3
quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qPCR
Verfahren, das die quantitative Bestimmung der Anzahl einer spezifischen DNA-Sequenz in einer DNA-*Matrize* (3.4) unter Verwendung eines spezifischen Paares von Oligonukleotid-Primern ermöglicht

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

3.4
Matrize
DNA-Probe, die zur Durchführung einer *PCR* (3.2) verwendet wird, um eine spezifische DNA-Sequenz zu amplifizieren

3.5
Amplifikat
PCR-Produkt, das durch *PCR* (3.2) aus einer *Matrize* (3.4) generiert wird

3.6
Klonierungsvektor
ringförmiges DNA-Molekül, in das das *Amplifikat* (3.5) durch Ligation eingefügt wird und das verwendet wird, um kompetente Zellen von Escherichia coli für das Klonieren eines Amplifikats zu transformieren

3.7
qPCR-Standard
geklontes DNA-Fragment, das als *Matrize* (3.4) für die qPCR-Reaktion verwendet wird, um die Standardkurve zu erstellen, in der die Häufigkeit der Zielsequenz als Funktion des Schwellenwert-Zyklus (Ct) aufgetragen ist

3.8
Kontrolle ohne Matrize
NTC
Kontrolle, üblicherweise Wasser mit molekularbiologischer Reinheit, die als Negativkontrolle in der qPCR-Analyse zur Überprüfung auf das Nichtvorhandensein von Verunreinigungen im qPCR-Mix verwendet wird

3.9
Schwellenwert-Zyklus
Ct
Anzahl von qPCR-Zyklen, die erforderlich ist, damit das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert (d. h. den Hintergrundwert) überschreitet

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

4 Kurzbeschreibung

Diese Internationale Norm beschreibt eine qPCR-Analyse unter Verwendung eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs als Reporter. Diese qPCR-Analyse wurde durch einen internationalen Ringversuch validiert, der mit SYBR Green, einem häufig verwendeten, DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt wurde, der an jede doppelsträngige DNA bindet und durch Messung des Anstiegs der Fluoreszenz während des Zyklus nachgewiesen werden kann.

Ziel dieses Verfahrens ist die Messung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus Boden-DNA-Extrakten. Das Verfahren umfasst vier Aufgaben und acht Schritte, die in Bild 1 zusammengefasst sind. In Übereinstimmung mit Literaturhinweis [1] sind die drei kritischen, für jede qPCR-Analyse zu validierenden Schritte, in Bild 1 markiert.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

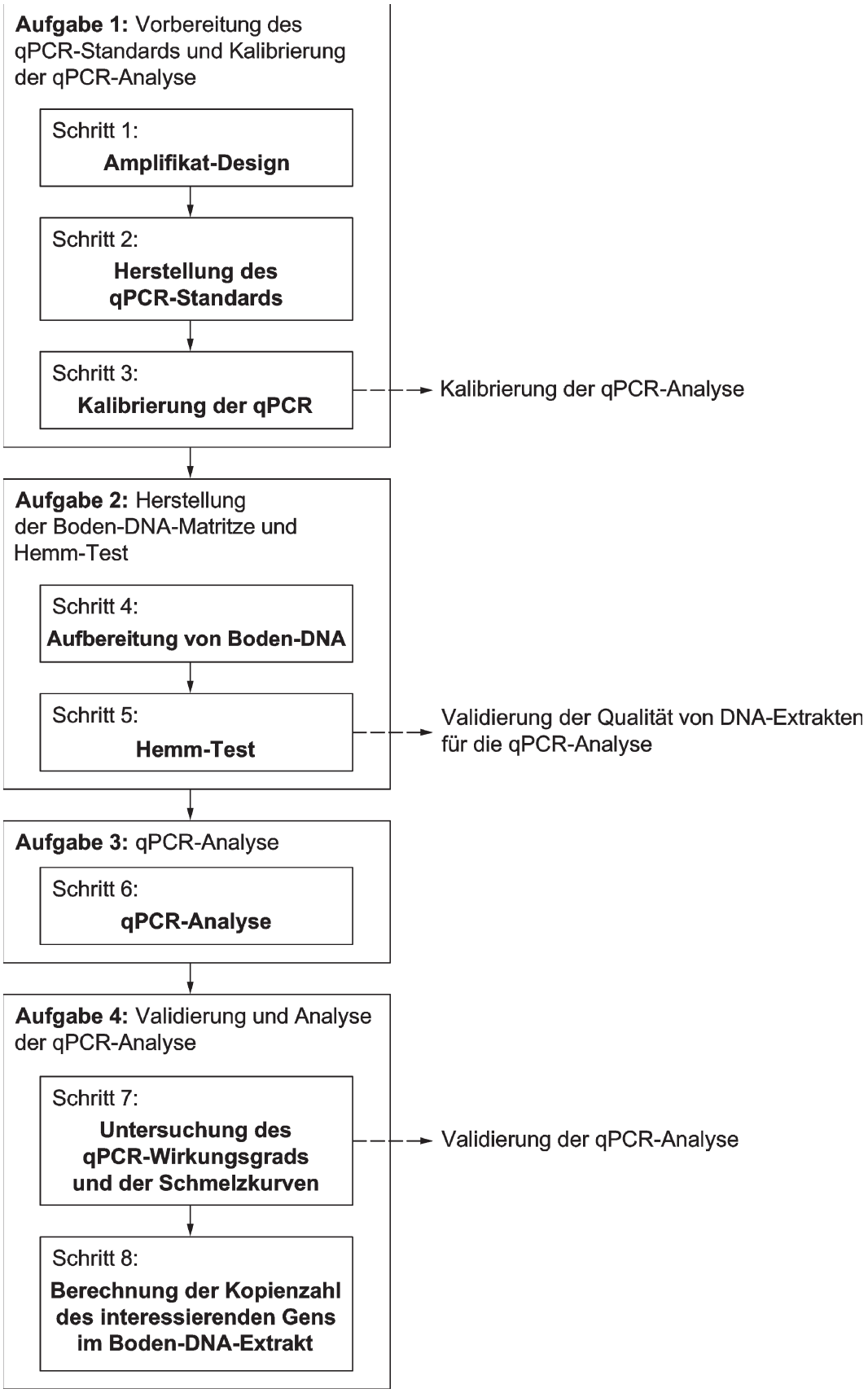


Bild 1 — Hauptaufgaben und kritische Schritte bei der Schätzung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen mittels qPCR

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

Diese Internationale Norm beschreibt eine qPCR-Analyse auf der Grundlage der Verwendung eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs, der durch einen internationalen Ringversuch unter Verwendung von SYBR Green®[1] validiert wurde. In Anhang A sind Informationen über eine TaqMan®[2] basierte qPCR-Analyse dargestellt, die nicht im internationalen Ringversuch geprüft wurde. Die erste Aufgabe besteht aus drei Schritten, in denen die Entwicklung eines optimalen Amplifikats für qPCR (Schritt 1), die Herstellung von qPCR-Standards (Schritt 2) und das Verfahren zur Kalibrierung der qPCR-Analyse (Schritt 3), beschrieben werden. Die zweite Aufgabe umfasst zwei weitere Schritte, in denen die Verfahren zur Vorbereitung von Boden-DNA-Proben (Schritt 4) und zur Prüfung auf das Vorhandensein von qPCR-Inhibitoren in Boden-DNA-Proben (Schritt 5) beschrieben werden. Die dritte Aufgabe besteht aus einem einzigen Schritt, in dem die Arbeitsvorschrift zur Durchführung der qPCR-Analysen (Schritt 6) beschrieben wird. Abschließend besteht die vierte Aufgabe aus zwei Schritten; in einem wird das Verfahren zur Validierung von qPCR-Analysen (Schritt 7) zur Überprüfung der Qualität der qPCR-Analyse beschrieben, in dem anderen (Schritt 8) die verschiedenen Möglichkeiten zur Berechnung der Kopienzahl der Sequenzen des interessierenden Gens aus dem Schwellenwert-Zyklus (Ct, en: cycle threshold), ermittelt aus der Analyse von qPCR-Amplifikationskurven.

5 Prüfmaterialien

5.1 DNA

5.1.1 **DNA**, extrahiert aus reinen Bakterien- und Pilz-Isolaten unter Anwendung klassischer Extraktionsverfahren oder durch Verwendung eines handelsüblichen Kits zur Extraktion von genomischer DNA.

5.1.2 **Boden-DNA**, extrahiert aus Bodenteilproben nach ISO 11063.

5.2 Bakterien

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

5.3 Plasmid

5.3.1 **Klonierungsvektor**, üblicherweise zum Klonieren des PCR-Produkts in kompetenten *Escherichia coli* verwendet.

5.4 Enzym

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-Natriumsalz**, $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$ (CAS-Nr. 69-52-3).

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

---

1 SYBR Green ist ein eingetragenes Warenzeichen von Molecular Probes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. 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 Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

5.5.3 **Desoxynukleotid-Lösung**, dNTP.

5.5.4 **SYBR Safe® DNA-Färbereagenz.**

5.5.5 **EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz**, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2\,H_2O$ (CAS-Nr. 6381-92-6).

5.5.6 **Glucose**, $C_6H_{12}O_6$ (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**, $C_4H_{11}NO_3$ (CAS-Nr. 77-86-1).

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

5.6 Komponenten für ein Bakterien-Nährmedium

5.6.1 **Bacto tryptone®**[3], Casein, enzymatisch verdaut.

5.6.2 **Hefeextrakt, Pulver** (CAS-Nr. 8013-01-2).

5.7 Pufferlösungen und Reagenzien

5.7.1 **Ampicillin-Lösung**, 2 g Ampicillin-Natriumsalz in 4 ml H_2O lösen, das mit einem 0,22-µm-Filter sterilisiert wurde. Auffüllen auf 20 ml mit sterilisiertem H_2O, herstellen von 1-ml-Aliquoten und aufbewahren bei **–**20 °C.

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

5.7.3 **SYBR Safe™ DNA-Färbereagenz**, SYBR Safe™ mit dem Faktor 10,000 in einfach konzentrierter TBE-Pufferlösung verdünnen.

5.7.4 **IPTG-Stammlösung**, 1 g IPTG in 8 ml H_2O lösen. Nach sorgfältigem Mischen wird die Lösung auf 10 ml aufgefüllt und in einer mikrobiologischen Sterilwerkbank sterilisiert. Herstellen von 1 ml-Aliquoten von IPTG und aufbewahren bei **–**20 °C.

5.7.5 **Festes LB-Medium**, 10 g Bacto tryptone®, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid und 15 g Agar in 1 000 ml H_2O lösen. Nach dem Autoklavieren für 20 min bei 120 °C wird 1 ml Ampicillin-Stammlösung

---

3 Bacto tryptone ist das Warenzeichen des Produktes, geliefert von Difco Laboratories. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

von 100 mg · ml^{-1} zum LB-Medium hinzugefügt und dieses in einer mikrobiologischen Sterilwerkbank in Petrischalen (20 ml) gegossen. 100 µl IPTG-Lösung werden auf festem LB-Ampicillin-Medium ausplattiert. Wenn die IPTG-Lösung in das LB-Ampicillin-Medium eingedrungen ist, werden 20 µl X-Gal-Lösung auf dem festen LB-Ampicillin-Medium ausplattiert. Das feste LB-Medium wird bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

5.7.6 SOC-Medium, 20 g Bacto tryptone®, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,95 g $MgCl_2$, 2,46 g $MgSO_4$ und 3,60 g Glucose in 1 l H_2O lösen. Sterilisieren durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120 °C. Herstellen von 950-ml-Aliquoten und aufbewahren bei −20 °C.

5.7.7 Tris-HCl, 1 mol · l^{-1}, 121,14 g Tris in 1 000 ml H_2O lösen, einstellen mit HCl von 4 mol · l^{-1} auf pH 8,0.

TBE-Pufferlösung, 10-fach konzentriert, pH 8,0, 108 g Tris-Base, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 mol · l^{-1} EDTA (pH 8,0) in 1 000 ml H_2O.

5.7.8 TBE-Pufferlösung, einfach konzentriert, 100 ml 10-fach konzentrierte TBE-Pufferlösung in 900 ml H_2O lösen.

5.7.9 TE-Pufferlösung, 10-fach konzentriert, pH 8,0, 100 ml 1 mol · l^{-1} Tris-HCl mit pH 8,0, 20 ml 50 mmol · l^{-1} EDTA mit pH 8,0 in 880 ml Wasser mit molekularbiologischer Reinheit.

5.7.10 TE-Pufferlösung, einfach konzentriert, 100 ml 10-fach konzentrierte TE-Pufferlösung in 900 ml H_2O lösen.

5.7.11 X-Gal-Lösung, 250 mg X-Gal in 5 ml Dimethylformamid lösen. Nach sorgfältigem Mischen herstellen von 0,5-ml-Aliquoten und aufbewahren bei −20 °C.

6 Prüfeinrichtung

Neben einer üblichen Laborausrüstung, einschließlich Pipetten, Zentrifuge, Abzugsschrank und einem horizontalem Elektrophoresesystem sind folgende Geräte zu verwenden.

6.1 Quantitative PCR, ermöglicht die quantitative Bestimmung von Amplifikaten von verschiedenen DNA-Matrizen mit einer theoretischen Nachweisgrenze von einer Kopie eines Sequenz-Targets je analysierter Probe in Echtzeit.

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

6.3 Fluoreszenzspektrometer, das die quantitative Bestimmung von doppelsträngiger DNA ermöglicht.

ANMERKUNG Nur eines dieser beiden Geräte ist für die Ermittlung der DNA-Konzentration erforderlich.

7 Durchführung

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

7.1.1 Allgemeines

Die qPCR-Analyse beruht auf der quantitativen Bestimmung der Amplifikate am Ende jedes PCR-Zyklus unter Verwendung eines DNA-Farbstoffs, der fluoresziert, wenn er in den doppelsträngigen Amplifikaten eingelagert wird. Der Zweck dieser Aufgabe besteht in der Beschreibung der Festlegung eines geeigneten Amplifikats, um eine qPCR-Analyse zu etablieren (Schritt 1), der Herstellung des qPCR-Standards (Schritt 2) und der Kalibrierung der qPCR-Analyse (Schritt 3).

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

7.1.2 Amplifikat-Entwicklung (Aufgabe 1, Schritt 1)

7.1.2.1 Allgemeines

Der erste Schritt zielt auf die Entwicklung eines Olinukleotid-Primerpaares ab; es kann unter Anwendung verschiedener Programme und unter Verwendung der Sequenz des interessierenden mikrobiellen Gens, das durch qPCR aus Boden-DNA-Extrakten quantitativ zu bestimmen ist, in *silico* (computergestützt) entwickelt werden. Die Spezifität der Primer muss in *silico* durch Vergleich der Sequenzen mit bekannten Sequenzen, die in der Datenbank „Genbank“ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) zur Verfügung stehen, überprüft werden. Es dürfen nur Primer in Betracht gezogen werden, die für das Gen-Target spezifisch sind. Die bei der Entwicklung eines Oligonukleotid-Primerpaares für die Etablierung einer qPCR-Analyse zu berücksichtigenden Hauptparameter sind nachstehend aufgeführt.

7.1.2.2 qPCR

— Optimale Länge des Amplifikats liegt im Bereich von 100 bp bis 250 bp.

— Optimale Primerlänge liegt im Bereich zwischen 18 bp und 25 bp mit einem GC-Gehalt von 50 % und einer Schmelztemperatur zwischen 58 °C und 65 °C.

— Die fünf Nukleotide am 3‘-Ende jedes Primers sollten nicht mehr als zwei G- und/oder C-Basen enthalten.

— Eine Abfolge identischer Nukleotide ist zu vermeiden, das gilt besonders für Guanin.

— Die 3‘-Selbstkomplementarität des Primers, die als Maß für dessen Neigung gilt, ein Primer-Dimer mit sich selbst zu bilden, sollte überprüft und vermieden werden.

— Eine Entwicklung von Primern mit mehr als vier Fehlpaarungen ist zu vermeiden, weil eine zu hohe Degeneration (des genetischen Codes) des Primers zur Schwankung von qPCR-Ergebnissen beiträgt.

7.1.3 Herstellung des qPCR-Standards (Aufgabe 1, Schritt 2)

In Schritt 2 von Aufgabe 1 wird das Verfahren beschrieben, das zur Herstellung von qPCR-Standards angewendet wird, die eine Sequenz des interessierenden mikrobiellen Gens aus verschiedenen DNA-Matrizen (DNA aus reinem Bakterien- oder Pilz-Isolat, DNA aus Umweltproben oder künstliche DNA) zum Ziel haben. Außerdem wird das Verfahren beschrieben, das zum Einfügen des qPCR-Standards in einen Klonierungsvektor, zum Transformieren von *Escherichia coli* und zum Aufreinigen des rekombinanten Plasmids, das den qPCR-Standard für die weitere Verwendung für qPCR-Analysen enthält, angewendet wird.

7.1.4 DNA aus Isolaten und Umweltproben, künstliche DNA

7.1.4.1 Allgemeines

Der erste Schritt bei der Herstellung von qPCR-Standards stützt sich auf die Extraktion von DNA-Matrizen, von der bekannt ist, dass sie das interessierende mikrobielle Gen enthalten. Das kann ausgehend von verschiedenen Materialien, wie z. B. den folgenden, erfolgen:

a) Reinkulturen von Mikroorganismen;

   Die DNA wird unter Anwendung herkömmlicher Arbeitsvorschriften für die Extraktion genomischer DNA aus Zellen extrahiert, die von einer frischen Mikroorganismenkultur geerntet wurden.

b) künstliche DNA.

Wenn keine biologischen Proben zur Verfügung stehen oder bekanntermaßen das interessierende Gen enthalten, kann künstliche DNA synthetisiert werden, die aus der Sequenz des interessierenden Gens besteht.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

In allen Fällen muss die Qualität der für die Amplifikation des qPRC-Standards durch PCR verwendeten DNA-Matrize durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel in TBE-Pufferlösung durch Färbung mit einem geeigneten Farbstoff (z. B. Färbemittel SYBR Safe™) verifiziert werden. Die Konzentration der DNA wird durch Spektralphotometrie bei 260 nm gemessen. Die DNA-Matrize wird auf 10 ng·µl^{-1} in einem Endvolumen von 20 µl verdünnt und bei −20 °C aufbewahrt.

Die Sequenz des qPCR-Standards wird unter Verwendung eines spezifischen, nach den in Aufgabe 1, Schritt 1 beschriebenen Empfehlungen entwickelten Primerpaares durch PCR amplifiziert. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, das 2,5 µl 10-fach konzentrierte Taq-Polymerase-Pufferlösung, 200 µmol·l^{-1} von jedem dNTP, 1,5 mmol·l^{-1} $MgCl_2$, 0,5 µmol·l^{-1} von jedem Primer und 0,625 U Taq-Polymerase enthält. Ein Volumen von 2,5 µl DNA (z. B. 25 ng DNA) wird als Matrize für die PCR-Reaktionen verwendet. Die PCR wird in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt: ein Zyklus von 4 min bei 94 °C, 39 Zyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei der für das Amplifikat des qPCR-Standards spezifischen Annealing-Temperatur, 1,5 min bei 72 °C und ein abschließender Extensionsschritt bei 72 °C für 5 min. Die erwartete Größe des Amplifikats des qPCR-Standards wird durch Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel in TBE-Pufferlösung, die mit einem geeigneten Farbstoff gefärbt ist (z. B. Färbemittel SYBR Safe™), verifiziert. Die Amplifikate werden entweder aus dem Gel unter Anwendung geeigneter Verfahren oder unter Anwendung von Ausschlusschromatographiesäulen aufgereinigt, um die Primer zu entfernen. Die gereinigten Amplifikate werden anschließend durch Spektralphotometrie bei 260 nm oder Fluoreszenzspektrometrie quantitativ bestimmt.

7.1.4.2 Herstellung des qPCR-Standards durch Klonierung und Verdünnung

7.1.4.2.1 Ligation des Amplifikats des qPCR-Standards

Für eine optimale Ligation eines Amplifikats in einen Klonierungsvektor sollte ein Molverhältnis von 3 : 1 verwendet werden; die Masse des für die Ligation zu verwendenden PCR-Produkts (Q in ng DNA) kann berechnet werden [siehe Gleichung (1)]:

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

Q = [(Menge an Plasmid-DNA × Größe des Inserts (bp)/Größe des Plasmids (bp)] × (3/1)

Dabei ist

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

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

n_{insert} die Größe des Inserts, in bp;

n_{plasmid} die Größe des Plasmids, in bp.

Unter Berücksichtigung einer Plasmidgröße von 3 000 bp, eines 16S-rRNA-Inserts von 200 bp und von 50 ng Plasmid-DNA je Ligationsreaktion beträgt die je Ligation zu verwendende Menge an PCR-Produkt [siehe Gleichung (2)]:

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

Das Ligationsreaktionsgemisch umfasst die erforderliche Menge an gereinigtem Amplifikat des qPCR-Standards (Q), 50 ng Plasmid-DNA, 5 µl 2-fach konzentrierte Ligationspufferlösung, 3 U T4-DNA-Ligase und Wasser mit molekularbiologischer Reinheit, um ein Endvolumen von 10 µl zu erreichen. Die Inkubation des Ligationsreaktionsgemisches erfolgt über Nacht bei 4 °C oder bei einer geeigneten T4-DNA-Ligase eine Stunde bei Umgebungstemperatur.

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

Die Effizienz der Ligation wird durch Elektrophorese verifiziert, indem 1 µl ligiertes Plasmid und offenes Plasmid (d. h. 5 ng Plasmid) auf ein 1%iges Agarosegel in TBE-Pufferlösung, gefärbt mit geeignetem Farbstoff, aufgebracht werden. Das ligierte Plasmid zeichnet sich durch eine kürzere Migration im Agarosegel aus.

7.1.4.2.2 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*

Kompetente *E. coli* werden, wie nachstehend beschrieben, durch Hitzeschock transformiert. Frisch aufgetaute kompetente Zellen (10^8 KBE·µg^{-1} DNA) werden 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird 1 µl Ligationsreaktionsgemisch zu den Zellen hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Bakterienzellen werden mit Hitzeschock behandelt, indem sie für 50 s bei 42 °C inkubiert werden, unmittelbar im Anschluss werden sie auf Eis gestellt und für 2 min inkubiert. Anschließend werden 950 µl SOC-Medium hinzugefügt und die Bakterienzellen werden bei 37 °C unter Rühren bei 150 min^{-1} für 1 h inkubiert. Aliquote Anteile der Bakterienzellen von 100 µl werden auf festem LB/Amp/IPTG/X-Gal-Medium ausplattiert. Die Petrischalen werden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.1.4.2.3 Screening auf rekombinante Klone

Die Platten werden für mehrere Stunden bei 4 °C inkubiert, um die Färbung der Bakterienkolonien anzuregen. Weiße Kolonien werden ausgewählt, auf festem LB/Amp/IPTG/X-Gal-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mehrere weiße Kolonien werden dann in 100 µl Wasser mit molekularbiologischer Reinheit überimpft. Es wird eine PCR durchgeführt, um das Vorhandensein des Inserts im rekombinanten Klon zu bestätigen. Das Insert wird durch PCR unter Verwendung der Primer SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG −3') und T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG −3') amplifiziert. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, das 2,5 µl 10-fach konzentrierte Taq-Polymerase-Pufferlösung, 200 µmol·l^{-1} von jedem dNTP, 1,5 mmol·l^{-1} $MgCl_2$, 0,5 µmol·l^{-1} von jedem Primer und 0,625 U Taq-Polymerase enthält. Ein Volumen von 2,5 µl Bakteriensuspension wird als Matrize für die PCR-Reaktionen verwendet. Die PCR wird in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt: ein Zyklus von 4 min bei 94 °C, 35 Zyklen von 45 s bei 94 °C, 45 s bei 55 °C, 1,5 min bei 72 °C und ein abschließender Extensionsschritt bei 72 °C für 5 min. Die Größe des erwarteten PCR-Amplifikats wird durch Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel in TBE-Pufferlösung, die mit einem geeigneten Farbstoff gefärbt ist, verifiziert.

7.1.4.2.4 Aufreinigung und Linearisierung des rekombinanten Plasmids

Rekombinante Klone, weiß und durch PCR bestätigt, werden in 10 ml flüssiges LB/Amp-Medium überimpft und über Nacht unter Rühren (150 min^{-1}) bei 37 °C inkubiert. Das Plasmid wird unter Anwendung einer herkömmlichen Minipräparation aus 2 ml Zellsuspension aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wird anschließend durch Spektralphotometrie bei 260 nm quantitativ bestimmt, es werden Aliquots hergestellt und bis zum Gebrauch bei −20 °C aufbewahrt.

Das Plasmid wird mit einem Restriktionsenzym linearisiert, wobei in der Sequenz des Plasmids nur eine einzige Restriktionsstelle vorliegt. Der Anwender muss sicherstellen, dass das gewählte Restriktionsenzym nicht auch das Insert zerschneidet. Der Aufschluss des Plasmids erfolgt über Nacht bei 37 °C in einem Endvolumen von 10 µl, das 250 ng rekombinantes Plasmid, 0,5 U Restriktionsenzym, 1 µl 10-fach konzentrierte Pufferlösung für das Restriktionsenzym und Wasser mit molekularbiologischer Reinheit enthält. Die Effizienz der Restriktion des Plasmids wird durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel verifiziert. Das linearisierte Plasmid wird bei −20 °C aufbewahrt und als Stammlösung für die Herstellung einer Verdünnungsreihe des qPCR-Standards für die Kalibrierung der qPCR-Analysen verwendet.

Die Konzentration der DNA des linearisierten Plasmids wird durch Spektralphotometrie bei 260 nm oder durch Fluoreszenzspektrometrie gemessen, um die Kopienzahl des Plasmids zu bestimmen. Dieser Arbeitsgang kann durch Anwendung eines Online-Rechners, wie z. B. oligo calc (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html), erleichtert werden. Aus dieser Stammlösung wird eine Ausgangslösung in 100 µl Wasser mit molekularbiologischer Reinheit hergestellt, die $0{,}5 \times 10^8$ Kopien des qPCR-Standards je µl enthält. Anschließend wird eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt, um $0{,}5 \times 10^1$ Kopien des Plasmids je µl zu erreichen. In Abhängigkeit von dem Bereich, in dem die Kopienzahlen erwartet werden, können auch zusätzliche, dazwischenliegende Verdünnungen hergestellt werden.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

7.1.5 Kalibrierung der qPCR (Aufgabe 1, Schritt 3)

7.1.5.1 Allgemeines

Nachstehend ist das zur Erstellung der Kalibrierkurve und Bewertung der Effizienz der qPCR-Analyse angewendete Verfahren beschrieben.

7.1.5.2 qPCR-Analyse

Die Analyse zur Kalibrierung der qPCR wird an einer Verdünnungsreihe des geklonten Standards (im Bereich von 10^8 bis 10^1 Kopien je µl) unter Verwendung eines Primerpaares durchgeführt, das spezifisch für das entsprechende Gen ist. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von 15 µl durchgeführt, das 2 µl Plasmidstandard, 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$ von jedem Primer, 7,5 µl zweifach konzentrierten Taq-Mastermix oder 1,5 µl 10-fach konzentrierten Taq-Mastermix mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, dNTP, $MgCl_2$ und Taq-Polymerase sowie Wasser mit molekularbiologischer Reinheit enthält. Die qPCR-Reaktion wird in einem Echtzeit-Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt: ein Zyklus von 15 min bei 95 °C, 35 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei Annealing-Temperatur, 30 s bei 72 °C, 30 s bei 80 °C, wobei jeweils die Fluoreszenz erfasst wird, und ein abschließendes Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA in die jeweiligen Einzelstränge (Dissoziation) durch Erhöhung der Temperatur von 80 °C auf 95 °C. Die Kalibrierung der qPCR wird dreifach durchgeführt, darüber hinaus sind auch drei NTC (en: non template controls) in die Analyse integriert.

7.1.5.3 Erstellen der Kalibrierkurve und Berechnen der Effizienz der qPCR

Am Ende der qPCR-Analyse werden die Ergebnisse unter Anwendung der automatischen Option analysiert. Die Validierung der qPCR erfordert die Einhaltung von Folgendem: a) keine Amplifikation bei NTC, b) ein einzelner Dissoziationspeak für jede Verdünnung des qPCR-Standards und c) eine lineare Kalibrierkurve mit r^2 gleich oder größer 98 %. Die qPCR-Kalibrierkurve ergibt den Ct-Wert als Funktion der Menge von der logarithmierten Kopienzahl der Sequenzen des Standards.

Die Effizienz der qPCR-Analyse wird nach Gleichung (3) aus den Werten bestimmt, die aus der Gleichung für die Kalibrierkurve bestimmt wurden.

$$\mathrm{Ct} = a \cdot q + c \tag{3}$$

Dabei ist

Ct der gemessene Schwellenwert-Zyklus;

q die Kopienzahl des qPCR-Standards;

a die Steigung der Kalibrierkurve;

c der Ordinatenabschnitt am Ursprung (Ct für 1 Kopie des qPCR-Standards).

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

Dabei ist

E die Effizienz der Analyse zur Kalibrierung;

a die Steigung der Kalibrierkurve.

Es muss beachtet werden, dass eine Kalibrierkurve mit einer Steigung von −3,32 eine Effizienz von 100 % bedeutet. Eine zwei- oder zehnfache Verdünnung einer bestimmten DNA-Matrize ergibt einen Unterschied im Ct-Wert von 1 bzw. 3,3 (d. h. 10^8 Ct = 10 und 10^7 Ct = 13,3) für eine qPCR-Analyse, die zu 100 % effizient ist.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

7.2 Herstellung der Boden-DNA-Matrize und Hemm-Test (Aufgabe 2)

7.2.1 Allgemeines

In dieser Aufgabe wird das Verfahren beschrieben, das zur Herstellung der DNA-Matrize und zur Überprüfung auf das Vorhandensein von Inhibitoren der Taq-Polymerase in DNA-Extrakten, die als Matrize für die qPCR-Analyse verwendet werden, angewendet wird. Diese Prüfung ist eine zwingende Voraussetzung für die Validierung der Qualität von DNA-Extrakten und ermöglicht deren Verwendung als Matrize bei der Durchführung von qPCR-Analysen.

7.2.2 Aufbereitung von Boden-DNA (Aufgabe 2, Schritt 4)

In Schritt 4 von Aufgabe 2 wird das Verfahren beschrieben, das zur Extraktion von DNA aus Bodenproben angewendet wird. Bodenproben müssen nach ISO 10381-6 entnommen, behandelt und gelagert werden. Die Extraktion der Boden-DNA muss nach ISO 11063 erfolgen. Boden-DNA-Proben werden auf 1 ng · µl^{-1} und 0,1 ng · µl^{-1} verdünnt und bis zum Gebrauch bei −20 °C aufbewahrt.

7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5)

Nachstehend ist das Verfahren beschrieben, das zur Prüfung auf das Vorhandensein von Inhibitoren der Taq-Polymerase in Boden-DNA-Extrakten angewendet wird. Dieser Schritt ist eine Voraussetzung und muss vor der Durchführung der qPCR-Analyse an Boden-DNA-Extrakten erfolgen. Tatsächlich werden Inhibitoren der Taq-Polymerase, wie z. B. huminsäureähnliche Stoffe, häufig zusammen mit der Boden-DNA extrahiert und nur ein Boden-DNA-Extrakt, der frei von Inhibitoren ist, kann einer qPCR-Analyse zur Messung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen im Boden unterzogen werden. Nachstehend sind zwei Hemm-Tests beschrieben.

7.2.3.1 Aufstocken des Boden-DNA-Extrakts mit exogener DNA

Die Analyse von Inhibitoren kann erfolgen, indem die Häufigkeit von exogener DNA quantitativ bestimmt wird, von der eine bekannte Menge zur Boden-DNA zugegeben wird. Die nachstehend vorgeschlagene Arbeitsvorschrift beschreibt die Analyse, die nach der Aufstockung des Boden-DNA-Extrakts mit Plasmid-DNA erfolgt. Dieses Verfahren kann an beliebige Quellen von exogener DNA angepasst werden, indem die qPCR mit einem geeigneten, für die Sequenz der hinzugefügten DNA spezifischen Primerpaar durchgeführt wird.

Die qPCR wird unter Verwendung von Plasmid-spezifischen SP6- und T7-Primern durchgeführt. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von 15 µl durchgeführt, das 2 µl Plasmid-DNA, 2 µl Boden-DNA (unter Verwendung der zwei Verdünnungen 1 ng · µl^{-1} und 0,1 ng · µl^{-1}), 1,0 µmol · l^{-1} von jedem Primer, 7,5 µl zweifach konzentrierten Taq-Mastermix oder 1,5 µl 10-fach konzentrierten Taq-Mastermix mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, dNTP, $MgCl_2$ und Taq-Polymerase sowie Wasser mit molekularbiologischer Reinheit enthält. Die qPCR-Reaktion wird in einem Echtzeit-Thermocycler 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 zu prüfende Verdünnung des Boden-DNA-Extrakts, drei Positivkontrollen, die nur Plasmid-DNA enthalten, und drei NTC durchgeführt.

Der Hemm-Test ist validiert, wenn Folgendes eingehalten wird:

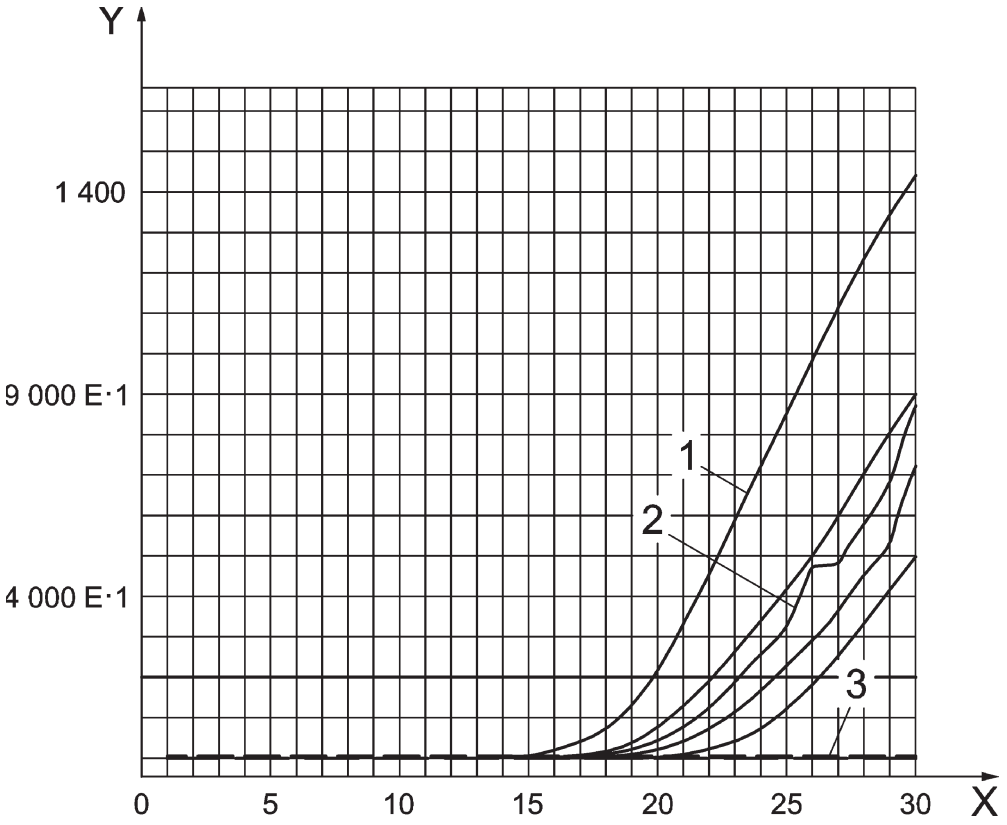
a) kein Amplifikat in der NTC-Kontrolle;

b) ähnliche Ct-Werte in der am Boden-DNA-Extrakt und an Plasmid-DNA durchgeführten qPCR (Bild 2).

Die Verdünnung der Boden-DNA, die keine Hemmung aufweist, wird als Matrize für die Durchführung der qPCR-Analyse gewählt.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09



Legende

X ΔRn
Y Zyklus
1 pGEM-T
2 teilweise Hemmung
3 Hemmung

Bild 2 — Ergebnisse des Hemm-Tests, durchgeführt mittels qPCR-Analyse, die auf den SP6-T7-Bereich des pGEM-T-Plasmids abzielt, das in bekannter Menge zu Boden-DNA-Extrakten hinzugegeben wurde

Wenn eine vollständige oder teilweise Hemmung beobachtet wird (d. h. kein Amplifikat bzw. Abweichung im Ct-Wert), muss der Boden-DNA-Extrakt verdünnt werden, um die Hemmung zu beseitigen, und erneut einem Hemm-Test unterzogen werden. Wenn das nicht zu einer Verbesserung des qPCR-Hemm-Tests führt, müssen die DNA-Extrakte nach den Empfehlungen in ISO 11063 weiter aufgereinigt und erneut dem Hemm-Test unterzogen werden. Wenn für den Hemm-Test annehmbare Ergebnisse erhalten werden, können die Boden-DNA-Proben für die Durchführung der qPCR-Analyse verwendet werden.

Es ist zu beachten, dass eine an Boden-DNA-Extrakt durchgeführte qPCR-Analyse durch Verwendung von Trägern verbessert werden kann, die die Aktivität der Taq-Polymerase fördern. Unter den verbreitetsten ist Rinderserumalbumin, das bei Verwendung in einer Konzentration von 400 $ng \cdot \mu l^{-1}$ qPCR-Reaktionsgemisch nachgewiesenermaßen die Hemmung beseitigt. Alternativ werden mit T4-Gen-32-Protein in einer Konzentration von 30 $ng \cdot \mu l^{-1}$ qPCR-Reaktionsgemisch ähnliche Ergebnisse erzielt.

7.2.4 Verdünnung der DNA-Matrize

Alternativ kann das Vorhandensein von Inhibitoren der Taq-Polymerase im Boden-DNA-Extrakt durch Durchführung einer qPCR-Analyse, bei der das interessierende Gen Ziel ist, unter Verwendung einer Dezimalverdünnung des Boden-DNA-Extrakts (10 $ng \cdot \mu l^{-1}$, 1 $ng \cdot \mu l^{-1}$, 0,1 $ng \cdot \mu l^{-1}$) als Matrize geprüft werden. Die qPCR-Analyse wird nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren durchgeführt. Der qPCR-Hemm-Test wird für jede

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

zu prüfende Verdünnung von Boden-DNA-Extrakt, einschließlich drei Positivkontrollen, die nur Standard-DNA enthalten, und drei NTC, durchgeführt. Der Hemm-Test ist validiert, wenn Folgendes eingehalten wird:

a) kein Amplifikat in der NTC-Kontrolle;

b) Amplifikation in der Positivkontrolle;

c) bei jeder geprüften Probe beträgt die Differenz der Ct-Werte zwischen Dezimalverdünnungen 3,32.

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

7.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3)

7.3.1 Allgemeines

In Schritt 6 von Aufgabe 3 ist das Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Häufigkeit eines mikrobiellen Gens (nachfolgend als interessierendes Gen bezeichnet) aus Boden-DNA-Extrakt beschrieben. qPCR-Reaktionen werden durchgeführt, wobei Folgendes als Matrize verwendet wird: a) die in Schritt 5, Aufgabe 2 (Hemm-Schritt) gewählte Verdünnung des Boden-DNA-Extrakts, b) Doppelproben jeder Verdünnung der Kalibrierkurve (von $0{,}5 \times 10^8$ bis $0{,}5 \times 10^8$ Kopien der Standard-DNA je µl) und c) drei Kontrollen ohne Matrize, die nur aus Wasser mit molekularbiologischer Reinheit bestehen.

7.3.2 qPCR

Die qPCR, die auf das interessierende Gen abzielt, wird an Doppelproben aller Boden-DNA-Matrizen bei den Verdünnungen, die keine Hemmung der Taq-Polymerase aufweisen, an Doppelproben von jeder Verdünnung des Plasmidstandards (im Bereich von 10^8 bis 10^1 Kopien je µl) und an drei NTC durchgeführt. Es wird ein für das interessierende Gen spezifisches Primerpaar verwendet. Die Amplifikationsreaktion wird in einem Endvolumen von 15 µl durchgeführt, das 2 µl DNA-Matrize, 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$ von jedem Primer, 7,5 µl zweifach konzentrierten Taq-Mastermix oder 1,5 µl 10-fach konzentrierten Taq-Mastermix mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, dNTP, $MgCl_2$ und Taq-Polymerase sowie Wasser mit molekularbiologischer Reinheit enthält. Die qPCR-Reaktion wird in einem Echtzeit-Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt: ein Zyklus von 15 min bei 95 °C, 35 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei geeigneter Annealing-Temperatur, 30 s bei 72 °C und 30 s bei 80 °C, wobei die Fluoreszenz erfasst wird, und eine abschließende Dissoziationsstufe durch Erhöhung der Temperatur von 80 °C auf 95 °C.

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

7.4.1 Allgemeines

In Schritt 7 von Aufgabe 4 wird das Verfahren beschrieben, dass zur Überprüfung der Gültigkeit der qPCR-Analyse und zur Verarbeitung der Rohdaten der qPCR angewendet wird. In Schritt 8 von Aufgabe 4 werden zwei Berechnungsmöglichkeiten zur Ermittlung der Häufigkeit des interessierenden Gens vorgeschlagen, die entweder als Kopienzahl der Sequenz je ng Boden-DNA oder je g Boden angegeben wird.

7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse

7.4.2.1 Allgemeines

Am Ende der qPCR-Reaktion werden die Ergebnisse unter Anwendung der automatischen Option analysiert. Nachstehend werden die Parameter ausführlich beschrieben, die bei der Validierung der qPCR-Analyse zu berücksichtigen sind.

7.4.2.2 qPCR-Analyse

Die Validierung der qPCR erfordert die Einhaltung von folgenden Parametern:

a) keine Amplifikation bei NTC;

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

b) eine lineare Kalibrierkurve mit r^2 gleich oder größer 98 %;

c) eine Dissoziationskurve, die einen einzigen Peak bei der erwarteten, für das jeweilige Gen-Target spezifischen Schmelztemperatur aufweist, der die Spezifität der Amplifikation bestätigt.

Es ist zu erwähnen, dass bei Verwendung eines degenerierten Primerpaares abweichende Sequenzen vom Boden-DNA-Extrakt amplifiziert werden und die Dissoziationskurve dadurch keinen einzelnen schmalen Peak bilden kann, wie er beim Standard beobachtet wird, sondern einen gleichmäßigen (breiten) Peak.

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

7.4.3.1 Allgemeines

Bei jeder qPCR-Analyse müssen die Kalibrierkurve sowie die Effizienz der qPCR berechnet werden. Diese beiden Parameter müssen mit der ermittelten Kopienzahl des interessierenden Gens aufgezeichnet werden. Die in der qPCR-Analyse gemessene Häufigkeit des interessierenden Gens kann überdies genutzt werden, um die Ergebnisse als Kopienzahl der Sequenz je ng Boden-DNA oder je g Boden anzugeben.

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

Gleichung (5) ist anzuwenden, um die Anzahl der Sequenzen des interessierenden Gens je ng Boden-DNA zu schätzen.

$$n\,[\text{gene of interest}]_1 = q/\,(2 \times c\,[DNA]) \tag{5}$$

Dabei ist

q die Anzahl der Sequenzen des interessierenden Gens, gemessen in der Analyse;

2 das Volumen der Boden-DNA, die als Matrize für die qPCR-Analyse verwendet wurde, in µl;

$c[DNA]$ die Konzentration des Boden-DNA-Extrakts, der zur Durchführung der qPCR-Analyse verwendet wurde, in $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$;

$n[\text{gene of interest}]_1$ die Anzahl der Sequenzen des interessierenden Gens je ng Boden-DNA.

7.4.3.3 Schätzung der Anzahl der Sequenzen des interessierenden Gens je g Boden

Gleichung (6) ist anzuwenden, um die Anzahl der Sequenzen des interessierenden Gens je g Boden zu schätzen.

$$n\,[\text{gene of interest}]_2 = \left(n\,[\text{gene of interest}]_1 \times y\right)/z \tag{6}$$

Dabei ist

$n[\text{gene of interest}]_1$ die Anzahl der Sequenzen des interessierenden Gens je ng Boden-DNA;

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

z die Menge der Bodenprobe, aus der die DNA extrahiert wurde, in g Trockenmasseäquivalent;

$n[\text{gene of interest}]_2$ die Anzahl der Sequenzen des interessierenden Gens je g Boden (Trockenmasseäquivalent).

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09

8 Untersuchung der kritischen Schritte der qPCR-Analyse

Bei jeder qPCR-Analyse muss das Laboratorium die folgenden, für die drei kritischen, in Bild 1 dargestellten Schritte erhaltenen Werte untersuchen, um die qPCR-Analyse zu validieren und die weitere Analyse von qPCR-Daten durchzuführen:

a) Verifizieren des Nichtvorhandenseins von Inhibitoren der Taq-Polymerase;

b) Ermittlung der Effizienz der qPCR-Analyse aus der Kalibrierkurve;

c) Überprüfung der Qualität der Amplifikation durch Analyse der Dissoziationskurve (nur bei qPCR-Analysen mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff) und des Nichtvorhandenseins von Verunreinigungen in NTC-Proben.

9 Angabe der Ergebnisse der qPCR-Analyse

Die Ergebnisse der qPCR-Analyse müssen in Form von tabellierten Ergebnissen angegeben werden, einschließlich der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen, ermittelt durch qPCR an direkt aus dem Boden extrahierter DNA, angegeben als Kopienzahl der Sequenz des interessierenden Gens je ng Boden-DNA und/oder als Kopienzahl der Sequenz des interessierenden Gens je g Boden (Trockenmasseäquivalent). In den Ergebnissen sollten auch die Gleichung der Kalibrierkurve sowie die Werte für die Kontrolle ohne Matrize angeführt werden.

10 Internationaler Ringversuch

Dieses Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Häufigkeit mikrobieller Gruppen wurde durch einen internationalen Ringversuch bewertet, an dem sechs verschiedene Laboratorien teilnahmen und der an DNA-Proben durchgeführt wurde, die direkt aus sechs verschiedenen Böden extrahiert wurden. Der Ringversuch bestand aus zwei Teilen mit dem Ziel, die Auswirkung des jeweiligen qPCR-Kits und der Zugabe des T4Gp32-Proteins auf die quantitative Bestimmung der Häufigkeit mikrobieller Gruppen zu ermitteln und die Wiederholpräzision und Vergleichpräzision der quantitativen Bestimmung der Häufigkeit mirkrobieller Gruppen zu bewerten. Die Berichte der beiden Teile des Ringversuchs sind in Anhang A bzw. Anhang B angeführt.

11 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

a) eine Verweisung auf diese Internationale Norm, d. h. ISO 17601:2016;

b) Angaben zum Boden-DNA-Extrakt, einschließlich Bezeichnung der Probe, Datum der Extraktion, Dauer und Bedingungen der Aufbewahrung der Nukleinsäuren (falls zutreffend);

c) die zur Durchführung der qPCR-Analyse angewendeten thermischen Bedingungen (Zyklusprogramm, Temperaturanstieg) und das zur Analyse der Rohergebnisse der qPCR angewendete Verfahren;

d) tabellierte Ergebnisse, einschließlich der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen, gemessen durch quantitative Real-Time-PCR an direkt aus dem Boden extrahierter DNA, angegeben als Kopienzahl der Sequenz des interessierenden Gens je ng Boden-DNA und/oder als Kopienzahl der Sequenz des interessierenden Gens je Gramm Boden (Trockenmasseäquivalent);

e) die Angabe aller nicht in dieser Internationalen Norm festgelegten oder optionalen Einzelheiten sowie alle Faktoren, die die Ergebnisse beeinflusst haben können.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 17601:2024-09