DIN EN ISO 21286

ICS 13.080.30 Einsprüche bis 2020-01-29

Entwurf

Bodenbeschaffenheit – Allgemeine Anleitung zur Verwendung des DNA-Barcodes in ökotoxikologischen Untersuchungen (ISO 21286:2019); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21286:2019

Soil quality –
Identification of ecotoxicological test species by DNA barcoding (ISO 21286:2019);
German and English version prEN ISO 21286:2019

Qualité du sol –
Identification des espèces par codes-barres ADN dans les essais d'écotoxicologie (ISO 21286:2019);
Version allemande et anglaise prEN ISO 21286:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-11-29 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an 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, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 58 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 21286:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 21286:2019 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche 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 internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 11267	siehe	DIN EN ISO 11267
ISO 11268-1	siehe	DIN EN ISO 11268-1
ISO 11268-2	siehe	DIN EN ISO 11268-2
ISO 17512-1	siehe	DIN ISO 17512-1
ISO 17512-2	siehe	DIN ISO 17512-2
ISO 21285	siehe	E DIN EN ISO 21285

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

E DIN EN ISO 21285, *Bodenbeschaffenheit — Reproduktionstest zur Prüfung der Bodenbeschaffenheit mit Hypoaspis aculeifer (Gamasina, Acari)*

DIN EN ISO 11267, *Bodenbeschaffenheit — Hemmung der Reproduktion von Collembolen (Folsomia candida) durch Verunreinigungen*

DIN EN ISO 11268-1, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 1: Bestimmung der akuten Toxizität auf Eisenia fetida/Eisenia andrei*

DIN EN ISO 11268-2, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Eisenia fetida/Eisenia andrei*

DIN ISO 17512-1, *Bodenbeschaffenheit — Vermeidungsprüfung zur Bestimmung der Bodenbeschaffenheit und der Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten — Teil 1: Prüfung von Regenwürmern (Eisenia fetida und Eisenia andrei)*

DIN ISO 17512-2, *Bodenbeschaffenheit — Vermeidungsprüfung zur Bestimmung der Bodenbeschaffenheit und der Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten — Teil 2: Prüfung mit Collembolen (Folsomia candida)*

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

– Entwurf –

CEN/TC 444

Datum: 2019-12

prEN ISO 21286:2019

CEN/TC 444

Sekretariat: NEN

Bodenbeschaffenheit — Allgemeine Anleitung zur Verwendung des DNA-Barcodes in ökotoxikologischen Untersuchungen (ISO 21286:2019)

Qualité du sol — Identification des espèces par codes-barres ADN dans les essais d'écotoxicologie (ISO 21286:2019)

Soil quality — Identification of ecotoxicological test species by DNA barcoding (ISO 21286:2019)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 4

Vorwort 5

Einleitung 6

1 Anwendungsbereich 8

2 Normative Verweisungen 8

3 Begriffe 8

4 Grundsatz 9

5 Reagenzien und Materialien 10
5.1 Biologisches Material 10
5.2 Enzym 10
5.3 Oligonukleotid-PCR-Primer 11
5.4 Reagenzien 11

6 Prüfeinrichtung 12

7 Allgemeine Anforderungen 12
7.1 Gute Laborpraxis und Vermeidung von Verunreinigungen 12
7.2 Sicherheitsvorkehrungen 13
7.2.1 Chemische Gefährdungen 13
7.2.2 Physikalische Gefährdungen 13

8 Durchführung 13
8.1 DNA-Isolierung 13
8.2 Quantifizierung 14
8.3 PCR 14
8.3.1 Ziel-Genomregion 14
8.3.2 Primer-Entwicklung 15
8.3.3 Primer-Synthese 15
8.3.4 PCR 15
8.4 Prüfen der Amplikon-Größe 17
8.5 Reinigung 17
8.6 Sequenzierung 17
8.7 Bioinformatik 18
8.7.1 Allgemeines 18
8.7.2 Qualitätsprüfung des Elektropherogramms oder Rohdatensequenzen 18
8.7.3 Ausschneiden von Regionen schlechter Qualität und von Primer-Sequenzen 18
8.7.4 Sequenz-Überlappung 19
8.7.5 Sequenz-Verifizierung 19
8.7.6 Überprüfen der editierten Sequenz 19
8.7.7 Spezies-Zuordnung 20
8.7.8 Qualität der Referenzdatenbanken 21

9 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse 22

10 Gültigkeit der Prüfung 22

11 Prüfbericht 22

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Anhang A (informativ) Die *Eisenia* Barcoding Initiative: Ringversuch zur Beurteilung der Anwendbarkeit des DNA-Barcodings für die Identifizierung von *Eisenia*-Spezies 24

Literaturhinweise 28

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 21286:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 21286:2019 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21286:2019 wurde von CEN als prEN ISO 21286:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Vorwort

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

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

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

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

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality,* Unterkomitee SC 4, *Biological characterization* erarbeitet.

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

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Einleitung

Die Identifizierung von Prüfspezies beruht derzeit üblicherweise auf den morphologischen Merkmalen. Dies bringt jedoch nicht immer eindeutige Ergebnisse, weil

a) nur wenige taxonomische Experten verfügbar sind;

b) eng verwandte Arten sich durch einige wenige, leicht übersehene Merkmale unterscheiden können; und

c) noch wichtiger ist, dass mehrere Testspezies tatsächlich Komplexe von kryptischen Arten sind.

Ein gutes Beispiel dafür ist der Kompostwurm *Eisenia fetida/andrei* (in ISO 11268-1, ISO 11268-2 und ISO 17512-1 verwendet), bei dem morphologische Eigenschaften allein möglicherweise nicht ausreichen, um zwischen beiden Spezies zu unterscheiden [5] [36]. Ein anderes, wohlbekanntes Beispiel ist die Raubmilbe, *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) [50], die mit *H. miles* verwechselt werden kann, die in der biologischen Schädlingsbekämpfung häufig eingesetzt wird [31].

Die fehlerhafte Identifizierung von Spezies, die Verwendung einer Morphospezies, die eigentlich ein Komplex kryptischer Arten ist, oder die Durchmischung von Spezies in Laborkulturen können für die Zuverlässigkeit der ökotoxikologischen Prüfungen ein ernsthaftes Problem darstellen. Geschwister-Spezies in einem morphologischen Komplex können ökologische, verhaltensbezogene und physiologische Unterschiede aufweisen und sich auch in ihrer Reaktion auf Giftstoffe unterscheiden (z. B. [2] [17] [35] [40]). Dies scheint auch der Fall zu sein beim Springschwanz *Folsomia candida* (in ISO 11267 und ISO 17512-2 verwendet), bei dem in natürlichen Populationen von *F. candida* und in Laborstämmen genetische Differenzen in erheblichem Umfang festgestellt wurden [9] [19] [41]. Zwar wurden bei verschiedenen Laborstämmen nur geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Chemikalien festgestellt [12] [9], in anderen Studien wurden aber signifikante Veränderungen im Phenmedipham-Vermeidungsverhalten und unterschiedliche Eignungsreaktionen auf Kadmiumbelastung zwischen genetisch differenzierten Stämmen erkannt [14] [30]. Auch wenn zwei Spezies in ähnlicher Weise auf Giftstoffe reagieren, kann ferner das Vorhandensein von zwei Spezies in einer Laborkultur zur Produktion steriler Hybriden führen, die das Ergebnis der Reproduktionsprüfungen verfälschen [36].

Durch die Identifizierung von Spezies mittels DNA-Barcoding können diese Probleme beseitigt und sichergestellt werden, dass die für Tests verwendeten Spezies oder Stämme korrekt charakterisiert sind. Daraufhin kann die Qualitätssicherung verbessert werden, da die Ergebnisse aus unterschiedlichen ökotoxikologischen Labors wesentlich zuverlässiger und besser vergleichbar sind.

Für *Eisenia fetida/E. andrei* wurde diese Arbeit, einschließlich eines internationalen Ringversuchs, bereits durchgeführt ([36], siehe Anhang A). Die Ergebnisse dieses Ringversuchs lassen sich wie folgt zusammenfassen:

— Das DNA-Barcoding ist ein zuverlässiges und praktisches Verfahren für die Identifizierung von *Eisenia*-Spezies.

— Nur 17 von 28 Ökotoxikologie-Labors erzielten die richtige taxonomische Zuordnung. In den meisten Labors mit falscher oder unbekannter Zuordnung wird mit *E. andrei* gearbeitet.

— Das Vorhandensein eines kryptischen Artenpaars in *E. fetida* ist eine plausible Hypothese.

— Wichtig ist, dass Regenwürmer für ökotoxikologische Prüfungen regelmäßig anhand von DNA-Barcoding identifiziert bzw. neu identifiziert werden.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Für andere Arten von Invertebraten, die in der Bodenökotoxikologie Einsatz finden, sowie für Pflanzen liegen sehr wahrscheinlich ähnliche Erfahrungen und Empfehlungen vor. Das DNA-Barcoding hat sich als nützlich für die Identifizierung von Proben und die Abgrenzung von Spezies in vielen Organismengruppen, einschließlich anderer Regenwürmer [13] [37], Enchytraeen [16], Milben [15], Collembolen [32], Mollusken [42], Nematoden [28] und Pflanzen [8] erwiesen.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Protokoll für die Identifizierung ökotoxikologischer Proben (hauptsächlich Invertebraten und Pflanzen) auf Artenebene mit Hilfe des DNA-Barcodings. Dieses Protokoll kann von Labors verwendet werden, die das DNA-Barcoding für die weitgehende Standardisierung des Labor- und Datenanalyse-Workflows einsetzen, damit diese im Einklang mit EU-Normen und Richtlinien arbeiten.

Dieses Dokument soll keinen bestimmten Stamm für jedes Prüfverfahren, sondern das präzise Dokumentieren der verwendeten Arten/Stämme vorgeben.

ANMERKUNG 1 Dies bedeutet nicht, dass das DNA-Barcoding parallel zu jedem Prüfungsdurchgang durchgeführt werden muss, sondern nur regelmäßig (z. B. einmal jährlich, zum Beispiel bei Prüfungen von Referenzstoffen) und immer wenn eine neue Kultur angelegt oder einer vorhandenen Kultur neue Individuen hinzugefügt werden.

Dieses Dokument hat nicht das Ziel, die morphologisch-basierte Identifizierung von Arten zu kopieren oder zu ersetzen. Das DNA-Barcoding wird vielmehr als ein ergänzendes Instrument zur Identifizierung vorgeschlagen, wenn die Morphologie keine schlüssigen Ergebnisse liefert oder für die Diagnose kryptischer Arten, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse verschiedener Ökotoxikologie-Labors sich auf die gleiche Art oder den gleichen Stamm beziehen.

Dieses Dokument ist anwendbar für die Identifizierung unreifer Formen ohne morphologische Diagnosemerkmale (Eier, Larven, Jugendstadium), sowie für die durchgängige Identifizierung von Proben, die in Feldüberwachungsstudien gesammelt wurden und bei denen zahlreiche Organismen unterschiedlicher Taxa klassifiziert werden.

ANMERKUNG 2 Grundsätzlich können alle Arten, die üblicherweise für ökotoxikologische Prüfungen verwendet werden, durch DNA-Barcoding analysiert werden. Neben den Regenwürmern *Eisenia fetida* und *E. andrei* sind weitere Beispiele landbewohnender Arten *Lumbricus terrestris, L. rubellus, Allolobophora chlorotica, Aporrectodea rosea* und *A. caliginosa, Dendrodrilus rubidus, Enchytraeus albidus* und *E. crypticus (Haplotaxida); Folsomia candida, F. fimetaria, Proisotoma minuta* und *Sinella curviseta (Collembola); Hypoaspis aculeifer* und *Oppia nitens (Acari); Aleochara bilineata* und *Poecilus cupreus (Coleoptera); Scathophaga stercoraria, Musca autumnalis (Diptera)* oder *Pardosa sp. (Arachnida)*. Nematoden oder Schnecken und sogar Pflanzen können dieser Liste auch hinzugefügt werden

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

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 http://www.iso.org/obp

— IEC Electropedia: verfügbar unter http://www.electropedia.org/

3.1
Amplikon
spezifisches DNA-Produkt, das durch PCR (3.5) mit einem Paar PCR-Primer (3.6) erzeugt wird

3.2
DNA-Barcode
einzigartiges Muster der DNA-Sequenz, das jede Art kennzeichnet

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

3.3
Elektropherogramm
Trace-Datei
Kombination aus einer grafischen Darstellung einer Sanger DNA-Sequenz mit farbcodierten Spitzen, wobei jede Farbe einem Nukleotid entspricht

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie werden automatisch durch DNA-Sequenzprogramme bereitgestellt.

3.4
Phred Quality Score
Q-Score
Qualitätsmaßzahl für die Bewertung der Genauigkeit einer Sequenzierungsreaktion

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieses Qualitätsmaß gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine bestimmte Base vom Sequenzierungsprogramm falsch bestimmt wird. Phred-Scores sind logarithmische Maße. Wird also einer Base von Phred ein Q-Score von 30 (Q30) zugewiesen, bedeutet dies, dass die Base 1-mal von 1 000 falsch bestimmt wird. Eine Genauigkeit von 99 % (Q20) bedeutet eine Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Bestimmung von 1 zu 100, das heißt jede 100. Sequenzbestimmung der analysierten Basenpaare wahrscheinlich einen Fehler enthält.

3.5
Polymerase-Kettenreaktion
PCR
molekularbiologische Technik für die schnelle Synthetisierung mehrerer Kopien eines bestimmten DNA-Segments durch Verwendung der DNA-Polymerase und eines Oligonukleotid-Primerpaars

3.6
PCR-Primer
kurze Oligonukleotide (meist 15 bis 30 Nukleotide lang), die die PCR-Amplifikation von DNA zwischen bestimmten Positionen ermöglichen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die beiden Primer (ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer) sind basenpaarig zum oberen und unteren Strang der Template-DNA, und ihre 3'-OH-Enden verlaufen konvergent.

4 Grundsatz

DNA-Barcoding ist ein molekulares Verfahren, das eine kurze, standardisierte DNA-Region (den DNA-Barcode) als genetische Markierung für die Identifizierung von Spezies verwendet [22].

Seit seiner Einführung 2003 und dem Beginn des „Barcode-of-Life"-Projekts wird das DNA-Barcoding systematisch nicht nur in der biologischen Forschung, sondern auch in Industriebranchen eingesetzt, in denen die richtige Identifizierung biologischer Grundstoffe von wesentlicher Bedeutung ist, zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie. Sie hilft beispielsweise bei der Erkennung von Betrug in pflanzlichen Medizinprodukten [29] und wurde von der Food and Drug Administration (FDA) für die Identifizierung von Meeresfrüchten und Fischen übernommen [21] [44]. Das DNA-Barcoding wird sich wahrscheinlich in vielen Bereichen als Routineprüfung durchsetzen, vor allem in der Qualitätskontrolle und Rückverfolgbarkeit von Lebensmitteln [20].

Kurz gefasst zielt das DNA-Barcoding darauf ab,

a) die Nukleotid-Sequenz der standardisierte DNA-Region einer unidentifizierten Probe (Prüfkörper) zu erhalten;

b) diese Sequenz mit Hilfe von Verfahren der Bioinformatik mit den bekannten Sequenzen in einer Referenzdatenbank zu vergleichen; und

c) ausgehend von diesem Vergleich die Probe nach Spezies zu identifizieren.

AVA Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Das DNA-Barcoding kann daher nur dann ein hilfreiches Werkzeug für die Identifizierung sein, wenn eine verlässliche, übersichtliche Referenzdatenbank zur Verfügung steht, die genügend Proben jeder Spezies aus dem gesamten geografischen Gebiet enthält, um auch Varianzen innerhalb einer Spezies berücksichtigen zu können. Das DNA-Barcoding geht ferner davon aus, dass Sequenzen in dieser Barcode-Region zwischen Mitgliedern einer Spezies ähnlicher sind als Sequenzen anderer Spezies (der so genannte „Barcode Gap“). Vor der Anwendung des DNA-Barcodings sollte daher eine Studie der Zielorganismengruppe zur Abgrenzung der Spezies ausgeführt werden, um die Wirksamkeit des Verfahrens für die Unterscheidung von Spezies zu bewerten.

Eine wesentliche Voraussetzung ist, dass das DNA-Barcoding nur von geschulten Personen durchgeführt wird. Es werden einerseits geschulte Labortechniker benötigt, um die Laborprotokolle für jede Organismengruppe zu optimieren. Andererseits muss das Leitungssystem im Labor durch Wissenschaftler überwacht werden, die in Genomik und Systematik geschult sind. Diese Wissenschaftler sollten auch für die Elektropherogramm und/oder rohe DNA-Sequenzdatei Analyse und die Zuordnung der Spezien zuständig sein.

5 Reagenzien und Materialien

5.1 Biologisches Material

Die geeignete Aufbewahrung der Prüfkörper ist ein kritischer Faktor, um DNA von guter Qualität aus den Proben zu erhalten. Soweit möglich, sollten Proben für das DNA-Barcoding aus frisch geerntetem oder frisch eingefrorenem Gewebe entnommen werden. Der Kontakt mit Konservierungsstoffen wie Ethylacetat oder Formaldehyd sollte vermieden werden, da diese die DNA zerstören.

Für die Langzeitlagerung von Gewebeproben ist das Einfrieren bei −80 °C oder in Flüssigstickstoff bei −196 °C das bevorzugte Verfahren. Die DNA in getrockneten Prüfkörpern bleibt im Allgemeinen über mindestens ein Jahr stabil, die Schädigung wird jedoch mit der Zeit immer problematischer [23].

In Ethanol aufbewahrtes Material kann im frischen Zustand gut analysiert werden, die DNA wird jedoch langsam saurer und beschädigt, wenn das Ethanol nicht regelmäßig erneuert oder gepuffert wird. Für die richtige Aufbewahrung des Gewebes ist eine Ethanol-Konzentration von 95 % bis 99 % zu verwenden und darauf zu achten, dass das Ethanol-Volumen mindestens dreimal größer als das Gewebe-Volumen ist. Um die Ethanol-Konzentration auf mindestens 95 % zu halten, muss die Ethanol-Lösung in den ersten Tagen (mindestens drei Tage) nach der Probenahme ausgetauscht werden und der Probenbehälter luftdicht verschlossen werden, um Verdunstung zu vermeiden [23]. Eine Kombination aus niedrigen Temperaturen (−20 °C) und Ethanol begünstigt die Langzeitlagerung der Proben und verhindert Schäden durch wiederholte Tau- und Frierzyklen.

Generell gilt, dass die DNA-Barcodinganalyse möglichst schnell nach der Gewebegewinnung folgen sollte, aber auch Proben, die über mehrere Monate angemessen aufbewahrt und gelagert wurden, sind für die DNA-Gewinnung gut verwendbar [21] [23].

5.2 Enzym

Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus* ist der Standard für PCR. Es hat sich gezeigt, dass Hot-Start-Taq-Polymerasen und/oder High-Fidelity-DNA eine hohe Leistung beim DNA-Barcoding bieten und eine größere Amplifikationsempfindlichkeit und einen einfacheren Reaktionsaufbau als Standard-Polymerasen ermöglichen (http://ccdb.ca/resources/).

Alternativ dürfen voroptimierte kommerzielle Master-Mischungen verwendet werden. Diese bestehen aus einer vorgemischten, gebrauchsfertigen Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, $MgCl_2$ und Reaktionspuffern in optimalen Konzentrationen für die effiziente Verstärkung von DNA-Mustern in routinemäßigen PCR.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

5.3 Oligonukleotid-PCR-Primer

Für Oligonukleotid PCR Primer siehe 8.3.2 und 8.3.3.

5.4 Reagenzien

5.4.1 Nuklease-freies Wasser von molekularer Reinheit (dd H_2O).

5.4.2 TE Puffer (Tris-EDTA Puffer), 1-fach, pH 8,0.

1 ml 1 mol/l Tris-Base (pH 8,0), 0,2 ml EDTA (0,5 mol/l) in 98,8 ml molekularem Wasser lösen. Den pH-Wert auf 8,0 mit konzentriertem HCl einstellen.

5.4.3 Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs).

5.4.4 PCR-Puffer, ohne Mg (500 mmol/l KCl, 100 mmol/l Tris-HCl, pH 8,3 bei 25 °C).

Der Puffer wird üblicherweise mit jedem Enzym als 10- oder 5-fach-Konzentrat mitgeliefert. Es ist nur der mit jedem Enzym mitgelieferte Puffer zu verwenden.

5.4.5 Magnesiumchlorid, $MgCl_2$.

5.4.6 PCR-Additive (optional): Trehalosedihydrat, bovines Serumalbumin (BSA), Formamid, Dimethylsulfoxid (DMSO).

5.4.7 Agarose (analytische Reinheit, Standardschmelztemperatur).

5.4.8 TAE (Puffer in Gel), 50-fache Stammlösung, pH 8,3.

Zu lösen sind 242 g Tris-Base [tris(hydroxymethyl)aminomethan], 57,1 ml Eisessig (17,4 mol/l), 100 ml EDTA-Lösung mit 500 mmol/l (pH 8,0) in 842,9 ml Wasser molekularer Reinheit.

5.4.9 Längenstandard für 100 bp DNA-Leiter: ein kommerziell erhältlicher Molekulargewichtsmarker für die Größenbestimmung von Doppelstrang-DNA mit 100 bis 1 000 Basenpaaren bei der Gel-Elektrophorese.

5.4.10 6-fach-Beladungspuffer: 3 ml 100%iges Glycerol, 0,025 g Bromphenolblau, 0,025 g Xylencyanol FF in 7 ml Wasser molekularer Reinheit.

5.4.11 Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) oder eine sicherere Alternative der Nukleinsäure-Einfärbung.

5.4.12 PCR-Reinigungskit, mit Verwendung enzymatischer Reaktionen, Magnetpartikeln oder Silikamembran-basierter Reinigung.

5.4.13 5-fach-Sequenzierungspuffer (400 nm Tris-HCl, pH 9,0, 10 mmol/l $MgCl_2$).

5.4.14 BigDye® Terminator V3.1 Zyklus-Sequenzierungskit.[1]

---

1 Dieses Protokoll ist mit dem Kapillar-Elektrophoresesystem des DNA-Analyzers 3730 und den Chemikalien des BigDye Terminators validiert. Beide sind eingetragene Warenzeichen von Applied Biosystems. Diese Angabe dient zur Orientierung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Empfehlung des genannten Produkts durch ISO dar. 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 21286:2020-01

5.4.15 Pop-7-Polymer für DNA-Analyzer 3730.[1]

5.4.16 Kapillar-Array, 50 cm, des DNA-Analyzers 3730.[1]

5.4.17 GeneScan™ 500 LIZTM DYE Größenstandard.[1]

5.4.18 Hochentionisiertes Formamid.

6 Prüfeinrichtung

Die übliche Laboreinrichtung mit Mikropipetten, Zentrifuge und den folgenden speziellen Ausrüstungen:

6.1 Spektrophotometer, für die Messung von Konzentration und Reinheit der Doppelstrang-DNA mit 260 nm.

6.2 Laminar-Flow-Abzugshaube.

6.3 PCR Thermocycler.

6.4 Horizontales Elektrophorese-System.

6.5 Stromversorgung für die Elektrophorese.

6.6 Gel-Dokumentation.

6.7 Automatisiertes DNA Sequenzierungssysteme, für die DNA-Sequenzierung (z. B. 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems).[2]

7 Allgemeine Anforderungen

7.1 Gute Laborpraxis und Vermeidung von Verunreinigungen

Eine gute Laborpraxis und gezielte Strategien zur Vermeidung von Kontamination sind erforderlich, um die Gefahr der Kontamination während der DNA-Isolierung und den PCR-Schritten durch eine zuvor im Labor verarbeitete DNA, einen Amplikon-Übertrag von vorangegangenen PCR-Tests oder durch Querkontamination zwischen Proben zu minimieren.

Einige grundlegende Schritte müssen beachtet werden, um eine exogene Kontamination und die Übertragung zwischen Proben zu vermeiden: Arbeiten auf einer sauberen Oberfläche, Tragen von Handschuhen und Verwendung von Einweg- oder sterilisierten Instrumenten. Falls möglich, sollten im Labor getrennte Räume — oder mindestens unterschiedliche Tische und Arbeitsplätze — für die Template-Gewinnung, die Herstellung der PCR-Reagenzien und die Amplifikation verwendet werden. Der Arbeitsablauf muss immer vom reinsten zum unreinsten Bereich gehen. In jedem Arbeitsbereich sollten eigene Versorgungsleitungen und Reagenzien sowie Laborkittel und Handschuhe vorhanden sein. Der Aufbau für die PCR-Reaktionen sollte unter der Laminar-Flow-Haube erfolgen. Ferner müssen sterile Kunststoffteile und aerosol-beständige gefilterte Pipettenspitzen verwendet werden.

---

2 Dieses Protokoll wurde mit dem kapillaren Elektrophoresesystem 3730 DNA Analyzer und der BigDye Terminatorchemie validiert. Sie sind eingetragene Warenzeichen von Applied Biosystems. Diese Information dient der Benutzerfreundlichkeit dieses Dokuments und stellt keine Billigung des genannten Produkts durch dieses Dokument dar. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass sie zu den gleichen Ergebnissen führen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Bei der Arbeit mit mehreren Proben ist darauf zu achten, dass keine Querkontamination zwischen Proben stattfindet. Jeder Gegenstand (Handschuhe, Oberflächen), der mit einer Probe in Kontakt gerät, muss entsorgt oder durch Abwischen mit 1%iger Bleichlösung und sorgfältiges Abspülen mit Wasser gereinigt werden, bevor mit der nächsten Proben weitergearbeitet wird. Instrumente, mit denen Gewebefragmente angefasst werden (Pinzette, Schere, Skalpelle usw.), müssen vor und nach der Arbeit mit jeder Probe sterilisiert werden. Zu diesem Zweck ist das Instrument in 70%iges bis 96%iges Ethanol zu tauchen und dann kurz über die Flamme eines Bunsenbrenners oder eines Feuerzeugs zu halten, um den Alkohol abzubrennen.

7.2 Sicherheitsvorkehrungen

7.2.1 Chemische Gefährdungen

WARNHINWEIS 1 — Die Einfärbung mit Ethidiumbromid (EtBr) ist für die Darstellung der DNA in Agarose-Gels üblich. EtBr ist ein potenzielles Mutagen und reizt Haut, Augen und Atemwege. Direkten Hautkontakt vermeiden, Nitrilhandschuhe und einen geeigneten Augenschutz tragen. Die Einfärbung von Gels sollte immer in einem eigenen Laborbereich erfolgen und EtBr-Abfälle sollten in entsprechend gekennzeichneten Behältern entsorgt werden.

WARNHINWEIS 2 — In den letzten Jahren sind mehrere Alternativen zu EtBr (z. B. GreenSafe®, Sybr® Safe, GelRed™)[3] in den Handel gekommen. Diese Produkte gelten allgemein als weniger gefährlich als EtBr. Sie sind jedoch trotzdem mutagen und sollten auch mit der gebotenen Vorsicht verwendet und entsorgt werden.

WARNHINWEIS 3 — Formamid, das in Sequenzierungsreaktionen verwendet wird, kann Augen, Haut und Atemwege reizen. Es kann zu Entwicklungsstörungen und Geburtsdefekten führen. Beim Umgang mit Formamid sind Schutzbrillen, Schutzkleidung und Handschuhe zu tragen.

7.2.2 Physikalische Gefährdungen

Bei Elektrophorese-Versuchen besteht die Gefahr von Stromschlägen bei unsachgemäßer Durchführung. Elektrophorese-Geräte und ihre Stromversorgungen müssen routinemäßig überprüft werden, um sicherzustellen, dass sie einwandfrei funktionieren, dass Drähte, Kabel und Stecker unbeschädigt und korrekt isoliert sind, und dass die Puffertanks keine Risse oder Lecks aufweisen. Während der Elektrophorese wird empfohlen, da jede nasse Oberfläche leitend werden kann, keinen Teil der Ausrüstung (Tank, Drähte) zu berühren, solange die Stromversorgung eingeschaltet ist.

Häufig werden Ultraviolett-(UV-)Transilluminatoren eingesetzt, um fluoreszente Farbstoffe sichtbar zu machen, die in der Gel-Elektrophorese eingesetzt werden; sie stellen eine Gefahr einer potenziellen UV-Strahlungsbelastung dar. Laborkittel, -handschuhe und -schutzbrillen sowie Gesichtsschutz sind zu tragen, wenn eine Gefahr der Exposition besteht, vor allem bei der Verwendung ungeschirmter Transilluminatoren.

8 Durchführung

8.1 DNA-Isolierung

Dieser Prozess kann entweder mit einem kommerziellen DNA-Isolierungskit oder nach einem Standardprotokoll für die DNA-Isolierung durchgeführt werden. Die Auswahl des DNA-Isolierungskits oder des

3 GreenSafe®, Sybr® Safe, GelRed™ sind eingetragene Warenzeichen von NZYTech, Thermo Fisher Scientific bzw. Biotium. Diese Angabe dient zur Orientierung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Empfehlung des genannten Produkts durch ISO dar. 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 21286:2020-01

Protokolls kann abhängig von den besonderen Merkmalen der Probe getroffen werden. Bei frischen oder frisch gewonnenen Gewebeproben liefert ein Chelex-basiertes DNA-Gewinnungsverfahren in der Regel eine ausreichende Menge an DNA für das DNA-Barcoding. Für archivalische Proben oder sehr kleine Prüfkörper sollten jedoch empfindlichere Methoden verwendet werden (z. B. Silikamembran-basierte DNA-Gewinnungsverfahren) [23]. Die Verwendung kommerziell erhältlicher Kits kann hilfreich sein, da die vorgefertigten Reagenzien die Standardisierung der Technik erleichtern.

Bei sehr kleinen Organismen (d. h. Längen < 0,5 cm) — wie Collembolen, Milben oder kleine Insekten — darf der gesamte Prüfkörper verarbeitet werden. Bei größeren Organismen können verschiedene Körperteile ausgewählt werden, einschließlich Muskelbiopsien, Bauch, Beine, Antennen oder Eier. Außen liegende Körperflächen, der Verdauungstrakt und Körperteile, die Haare, Borsten oder gehärtete Exoskelette enthalten, sollten vermieden werden.

Bei Regenwürmern, Ringelwürmern und anderen Anneliden wird empfohlen, die Prüfkörper vor der Gewebeprobeentnahme etwa 24 h auf einem feuchten Filterpapier aufzubewahren, damit der Darminhalt entleert wird.

Die DNA-Isolierung aus Pflanzengewebe kann aufgrund ihres hohen Gehalts an komplexen Polysacchariden, Polyphenolen und anderen sekundären Metaboliten, die die DNA-Qualität beeinträchtigen und anschließende Reaktionen verhindern können, sehr anspruchsvoll sein. Verbindungen wie CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) und PVP (Polyvinylpyrrolidon) können bei der Entfernung von Polysacchariden bzw. Polyphenolen helfen; sie werden daher in Puffern für die DNA-Isolierung bei Pflanzen häufig eingesetzt.

Ausführliche Protokolle für die DNA-Isolierung aus tierischem oder pflanzlichem Gewebe sind in [43] und auf der Webseite zum DNA-Barcoding des DNA Learning Center (http://www.dnabarcoding101.org/) zu finden.

Parallel muss eine Negativkontrolle (ohne Gewebe) mit allen Chargen aus der gleichen Gewinnung erfolgen, um eine DNA-Kontamination der Analysereagenzien oder eine Kontamination zwischen Proben zu erkennen. Diese Negativkontrolle muss die DNA-Isolierung und die PCR-Schritte parallel zu den Prüfproben durchlaufen.

8.2 Quantifizierung

Nach der DNA-Isolierung sollte die Ausbeute und Reinheit der DNA-Probe bestimmt werden, entweder

a) mit einem Spektrophotometer mit einer UV-Lampe für die Messung der Absorbanz der Probe bei 260 nm; oder

b) mit einem Fluorometer, das fluoreszierende DNA-bindende Farbstoffe für die spezifische Quantifizierung von Doppelstrang-DNA verwendet.

Die DNA-Probe wird typischerweise mit Wasser von molekularer Reinheit auf 10 ng/µl verdünnt und sollte bei längerer Aufbewahrung bei −20 °C oder bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

8.3 PCR

8.3.1 Ziel-Genomregion

Die Ziel-Genomregion (oder der DNA-Barcode) ist je nach Taxon unterschiedlich. Der Standard-DNA-Barcode für fast alle tierischen Gruppen ist eine 658-Basenpaarregion im mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase-1-Gen (COI). Für Landpflanzen wird eine Kombination der chloroplastischen Gene *mat*K und *rbc*L als DNA-Barcode der Pflanze empfohlen [8], obwohl die erfolgreiche Unterscheidung von Spezies mit dieser Kombination bei bestimmten Pflanzengruppen eingeschränkt sein kann.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Zu beachten ist, dass der übliche DNA-Barcode in bestimmten Fällen möglicherweise nicht ausreichend ist. In diesen Fällen dürfen zusätzliche Genomregionen untersucht werden.

8.3.2 Primer-Entwicklung

Ein kritischer Faktor in der PCR-Stufe ist die Auswahl geeigneter Primer-Paare. Bei der Auswahl oder der Entwicklung optimaler Primer ist daher mit großer Sorgfalt vorzugehen.

Im ersten Schritt sind die Fachliteratur und Datenbanken (z. B. die BOLD Primer-Datenbank unter http://www.boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch) nach vorhandenen Primern zu durchsuchen, die bereits erfolgreich für die Amplifikation des DNA-Barcodes in der jeweiligen Organismengruppe eingesetzt wurden.

Sind keine öffentlichen Primer verfügbar oder sind die ausgewählten Primer-Paare für die Zielspezies nicht verwendbar, dürfen neue Primer-Paare entwickelt werden. Für die Entwicklung von Primern können Sequenzen der gleichen Genomregion verwendet werden, die zum gleichen Taxon oder verwandten Taxa gehören und in der BOLD-Datenbank (http://www.boldsystems.org/) und die GenBank-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) öffentlich zugänglich sind. Frei zugängliche Online-Ressourcen wie Primer-BLAST [45] sind ein hilfreiches Instrument, um spezifische Primer für die Ziel-Genomregion zu finden. Dieses Programm überprüft auch die Spezifizität des Primers anhand einer vom Benutzer ausgewählten Datenbank, um zu bestätigen, dass die entwickelten Primer keine anderen Genomregionen als die spezifische Zielregion amplifizieren.

8.3.3 Primer-Synthese

Primer dürfen bequemerweise bei einem Primer-Lieferanten bestellt werden, der sich auf die Synthese von Oligonukleotiden spezialisiert hat. Eine Standard-Entsalzungsreinigung ist für Primer, die für das DNA-Barcoding verwendet werden, ausreichend.

Die Primer werden üblicherweise in lyophilisiertem Zustand in Nanomol-Mengen verschickt und geliefert. Vor der PCR sollten sie zentrifuguert und in TE Puffer oder destilliertem Wasser erneut suspendiert werden, um eine Stammlösung von 100 µmol/l zu erhalten. Alternativ können Primer bei mehreren Herstellern bestellt werden, die bereits bei einer bestimmten Konzentration (typischerweise zwischen 10 µmol/l und 100 µmol/l) resuspendiert wurden. In beiden Fällen sind resuspendierte Primer als Einweg-Aliquots aufzubewahren und bei −20 °C zu lagern.

8.3.4 PCR

Für die Standard-PCR werden die Reaktionen in sterilen, dünnwandigen 0,2-ml-Röhrchen oder einem gleichwertiges PCR-Plattenformat aufgebaut. Die Endkonzentrationen der Reagenzien für eine typische PCR-Reaktion mit einem Endvolumen von 25 µl sind wie folgt (siehe Tabelle 1):

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01

Tabelle 1 — Endkonzentrationen der Reagenzien für eine typische PCR-Reaktion mit einem Endvolumen von 25 µl

Reagenz	Anfangs-konzentration	Volumen µl	Endkonzentration
PCR-Puffer	10-fach	2,5	1-fach
$MgCl_2$	50 mmol/l	0,75	1,5 mmol/l
dNTPs	2,5 mmol/l	2,0	0,2 mmol/l
Vorwärtsprimer	0,1 mmol/l	0,125	0,5 µmol/l
Rückwärtsprimer	0,1 mmol/l	0,125	0,5 µmol/l
Taq-Polymerase	5 Einheiten/µl	0,125	0,025 Einheiten/µl
Template-DNA	10 ng/µl	2,5	1 ng/µl
Nukleasefreies steriles Wasser		16,875	

Wasser und Puffer sind immer zuerst zuzugeben, die Taq-Polymerase zuletzt.

Laufen mehrere PCR-Reaktionen gleichzeitig ab, so ist es hilfreich, eine Master-Mischung herzustellen, die alle Reagenzien außer der Template-DNA enthält. Dadurch wird die Zeit für die Vorbereitung verkürzt und die Gefahr von Pipettierungsfehlern verringert. Eine ausreichende Menge Master-Mischung für die Reaktionen herstellen, die amplifiziert werden sollen, sowie eine zusätzliche Menge als Ausgleich für Pipettierungsfehler (als Faustregel sollte eine zusätzliche Reaktion auf zehn Proben eingerechnet werden).

Durch die Zugabe PCR-verstärkender Stoffe im PCR-Gemisch kann der Ertrag des jeweiligen PCR-Produkts erhöht und der Effekt auf PCR-Inhibitoren in der Reaktion überbrückt werden. Einige dieser Verstärker sind Trehalose, bovines Serumalbumin (BSA), Betain, Formamid oder DMSO (z. B. [18] [39]). Alternativ dürfen voroptimierte kommerzielle Master-Mischungen verwendet werden.

Durch die hohe Empfindlichkeit ist PCR besonders empfänglich für Spurenkontamination. Für die Pipettierung der PCR-Reagenzien müssen daher sterile Spitzen (vorzugsweise Filterspitzen) verwendet werden. DNA-Templates (und andere PCR-Produkte) sind bei der Vorbereitung des PCR-Reaktionsgemischs ebenfalls von den PCR-Reagenzien entfernt zu halten. Darüber hinaus — und neben der Negativkontrolle der DNA-Isolierung — muss jeder Reaktionssatz eine PCR-Negativkontrolle umfassen, die alle Reagenzien aus dem DNA-Template enthält. Diese PCR-Negativkontrolle dient zur Erkennung von DNA-Kontamination in den PCR-Reagenzien.

Die PCR findet in einem Thermocycler (PCR-Block) mit dem folgenden Programm statt:

— ein Zyklus von 4 Minuten bei 94 °C;

— 35 Zyklen von 30 Sekunden bei 94 °C, 40 Sekunden bei der spezifischen Annealing-Temperatur (T_a) für die PCR-Primer, 1 Minute bei 72 °C;

— ein abschließender Verlängerungsschritt bei 72 °C über 5 Minuten.

ANMERKUNG Wert T_a der Primer wird üblicherweise 2 °C bis 6 °C niedriger als deren Schmelztemperatur eingestellt, sofern vom Primer-Lieferanten nichts Anderes angegeben wird. Alternativ kann T_a mit Hilfe eines Online-Rechners (http://tmcalculator.neb.com) geschätzt werden. Nicht nur das T_a, sondern auch andere PCR-Zyklusparameter können je nach Art der Template-DNA oder der DNA-Polymerasen modifiziert werden (siehe Empfehlung des Herstellers).

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21286:2020-01