

DIN EN ISO 21569/A1

ICS 67.050

Einsprüche bis 2012-04-27
Vorgesehen als Änderung von
DIN EN ISO 21569:2005-09

Entwurf**Lebensmittel –****Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten –****Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren****(ISO 21569:2005/DAM 1:2011);****Deutsche Fassung EN ISO 21569:2005/prA1:2011**

Foodstuffs –

Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products –

Qualitative nucleic acid based methods (ISO 21569:2005/DAM 1:2011);

German version EN ISO 21569:2005/prA1:2011

Produits alimentaires –

Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés –

Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques

(ISO 21569:2005/DAM 1:2011);

Version allemande EN ISO 21569:2005/prA1:2011

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2012-02-27 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

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

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

Gesamtumfang 103 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument ist eine Änderung der Norm EN ISO 21569:2005-09. Es wurde im Unterkomitee SC 16 „Horizontal methods for molecular biomarker analysis“ (Sekretariat: ANSI, Vereinigte Staaten) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food production“ (Sekretariat: Frankreich/Brasilien) in Zusammenarbeit mit dem europäischen Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) erarbeitet. Das zuständige europäische Gremium ist die Arbeitsgruppe WG 11 „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ des CEN/TC 275.

Die Mitarbeit des DIN in der CEN/TC 275/WG 11 wird vom Arbeitsausschuss „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ wahrgenommen.

Gegenüber DIN EN ISO 21569:2005-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) das Inhaltsverzeichnis wurde um die einzelnen Verfahren ergänzt;
- b) Informationen zur Angabe von Ergebnissen wurden konkretisiert;
- c) einzelne neue Verfahren wurden in den Anhängen A bis D als die folgenden Abschnitte A.5, A.6, B.6, B.7, B.8, B.9, C.6, C.7, C.8 und D.2 ergänzt:
 - A.5 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt
 - A.6 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten
 - B.6 Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (*Agrobacterium tumefaciens* NOS-Terminator — t-NOS)
 - B.7 Screening-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen (*FMV-35S*-Promotor)
 - B.8 Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis des *bar*-Gens von *Streptomyces hygroscopicus*
 - B.9 Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln, die häufig in gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) verwendet werden und aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (*CaMV-35S*-Promotor, *P35S*) sowie aus *Agrobacterium tumefaciens* (*t-NOS*) stammen — Screening-Verfahren
 - C.6 Konstruktspezifisches Verfahren zum qualitativen Nachweis von gentechnisch modifizierten DNA-Sequenzen in Papaya-Ring-Spot-Virus-resistenter Papaya (SunUp™, Rainbow™)
 - C.7 Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus der gentechnisch modifizierten Reislinie TT51-1 (Sorte Bt63)
 - C.8 Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis der *ctp2-cp4-epsps*-Sequenz zum Screening auf Bestandteile von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln
 - D.2 Ereignisspezifisches Verfahren zum Nachweis der Rapslinie RT73
- d) Literaturhinweise wurden ergänzt.

Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren (ISO 21569:2005/DAM 1:2011)

Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques (ISO 21569:2005/DAM 1:2011)

Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods (ISO 21569:2005/DAM 1:2011)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp: Änderung
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.4c

Inhalt

Seite

Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
Anhang A (informativ) Für die taxonomische Zielgruppe spezifische Verfahren.....	7
A.5 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt.....	7
A.6 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten	15
Anhang B (informativ) Screening-Verfahren	23
B.6 Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NOS-Terminator — t-NOS)	23
B.7 Screening-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen (<i>FMV</i> -35S-Promotor).....	31
B.8 Auf Real-Time PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis des <i>bar</i> -Gens von <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	41
B.9 Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln, die häufig in gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) verwendet werden und aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (<i>CaMV</i> -35S-Promotor, <i>P35S</i>) sowie aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>t-NOS</i>) stammen — Screening-Verfahren	49
Anhang C (informativ) Konstruktspezifische Verfahren	61
C.6 Konstruktspezifisches Verfahren zum qualitativen Nachweis von gentechnisch modifizierten DNA-Sequenzen in Papaya-Ring-Spot-Virus-resistenter Papaya (<i>SunUp</i> TM , <i>Rainbow</i> TM).....	61
C.7 Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus der gentechnisch modifizierten Reislinie TT51-1 (Sorte Bt63)	70
C.8 Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis der <i>ctp2-cp4-epsps</i> -Sequenz zum Screening auf Bestandteile von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln.....	78
Anhang D (informativ) Ereignisspezifische Verfahren	88
D.2 Ereignisspezifisches Verfahren zum Nachweis der Rapslinie RT73.....	88
Literaturhinweise	98

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21569:2005/prA1:2011) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21569:2005/DAM 1:2011 wurde vom CEN als EN ISO 21569:2005/prA1:2011 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

1 Anwendungsbereich

Dieser Änderung dient der Bereitstellung zusätzlicher Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten und als Aktualisierung der derzeit vorliegenden Norm EN ISO 21569 entsprechend den gegenwärtigen Erfordernissen.

Sämtliche Änderungen sind nachstehend aufgeführt:

Inhaltsverzeichnis

Das Inhaltsverzeichnis sollte entsprechend den Überschriften aller in den Anhängen A bis D aufgeführten Verfahren wie folgt geändert werden.

Anhang A (informativ) Für die taxonomische Zielgruppe spezifische Verfahren

- A.1 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Sojabohnen
- A.2 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Multi-copy-DNA-Sequenzen, die in allen Pflanzenchloroplasten vorkommen
- A.3 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches und GMO-Screening-Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Tomaten und/oder gentechnisch modifizierten Zeneca®-Tomaten stammt
- A.4 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Mais
- A.5 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt.....
- A.6 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten

Anhang B (informativ) Screening-Verfahren

- B.1 Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (CaMV-35S-Promotor)
- B.2 Alternatives Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (CaMV-35S-Promotor).....
- B.3 Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (*Agrobacterium tumefaciens* NOS-Terminator)
- B.4 Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (*npt II*-Gen)
- B.5 Screening-Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus gentechnisch modifizierten Tomaten stammt (Zeneca®-F282).....
- B.6 Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (*Agrobacterium tumefaciens* NOS-Terminator — t-NOS)
- B.7 Screening-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen (*FMV*-35S-Promotor)
- B.8 Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis des *bar*-Gens von *Streptomyces hygroscopicus*
- B.9 Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln, die häufig in gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) verwendet werden und aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (*CaMV*-35S-Promotor, *P35S*) sowie aus *Agrobacterium tumefaciens* (*t-NOS*) stammen — Screening-Verfahren

Anhang C (informativ) Konstruktspezifische Verfahren

- C.1** Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA Sequenzen aus gentechnisch modifizierten GTS 40-3-2 (Roundup Ready®-Sojabohnen).....
- C.2** Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA Sequenzen aus gentechnisch modifizierten Tomaten (Zeneca®-F282)
- C.3** Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem Bt 11-Mais.....
- C.4** Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem Event 176-Mais (Bt 176-Mais)
- C.5** Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem T 25-Mais
- C.6** Konstruktspezifisches Verfahren zum qualitativen Nachweis von gentechnisch modifizierten DNA-Sequenzen in Papaya-Ring-Spot-Virus-resistenter Papaya (SunUp™, Rainbow™)
- C.7** Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus der gentechnisch modifizierten Reislinie TT51-1 (Sorte Bt63).....
- C.8** Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis der *ctp2-cp4-epsps*-Sequenz zum Screening auf Bestandteile von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln

Anhang D (informativ) Ereignisspezifische Verfahren

- D.1** Ereignisspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem MON 810-Mais
 - D.2** Ereignisspezifisches Verfahren zum Nachweis der Rapslinie RT73
- Literaturhinweise**

Einleitung, erster Spiegelstrich

„— Probenahme (ISO 21568)“ wird gestrichen.

4.1, 2. Absatz, 2. Zeile

Der letzte Teil des Satzes wird in eine Anmerkung ausgegliedert, so dass sich folgender Wortlaut ergibt: „Ein qualitatives Ergebnis muss eindeutig das Vorhandensein oder Fehlen des untersuchten genetischen Elements nachweisen, bezogen auf geeignete Kontrollen.“

ANMERKUNG Nachweisgrenzen und Umfang der untersuchten Teilprobe sind kritische Aspekte eines Verfahrens.“

7.3.3.3.3, 2. Absatz, 2. Zeile

„einer repräsentativen“ wird gestrichen und durch „einer angemessenen“ ersetzt, so dass sich folgender Wortlaut ergibt: „Bei Primern, die für den Nachweis taxonspezifischer Targetsequenzen ausgelegt sind, sollte nachgewiesen sein, dass der Nachweis dieser Sequenzen in einer angemessenen Anzahl unterschiedlicher Mitglieder der taxonomischen Gruppe zuverlässig erfolgt.“

9.4

9.4 wird so geändert, dass sich folgender Wortlaut ergibt:

Die Ergebnisse von derselben Teilprobe müssen widerspruchsfrei sein. Wenn die Ergebnisse für die beiden Wiederholungsbestimmungen „+/-“ lauten, sind die beiden PCR für die entsprechende Teilprobe zu wiederholen. Wenn die beiden neuen Wiederholungsbestimmungen bei der Untersuchung „+/-“ oder „-/-“ ergeben, wird die Teilprobe als negativ angesehen.

Die Ergebnisse aller Teilproben müssen widerspruchsfrei sein. Wenn mindestens eine Teilprobe zu einem positiven Ergebnis und mindestens eine andere zu einem negativen Ergebnis führt, muss die Analyse wiederholt werden.

Wenn mindestens eine Wiederholung des Verfahrens, beginnend mit der Nukleinsäureextraktion, zu Ergebnissen führt, die nicht eindeutig sind, wie z. B. zu einem positiven und einem negativen Ergebnis, sollte im Untersuchungsbericht angegeben werden, dass die Probe bei der Nachweisgrenze negativ ist.

Abschnitt 10

Der zweite Spiegelstrich wird gestrichen und durch folgenden ersetzt:

„— die Spezifität des Analysenverfahrens (ereignisspezifisches, konstruktsspezifisches oder Screening-Verfahren);“

Literaturhinweise

Literaturhinweis „[40] EN ISO 21568, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Probenahme (ISO 21568:2005)*“ wird gestrichen.

„[41]“ wird in „[40]“ geändert

Die Abschnitte A.5, A.6, B.6, B.7, B.8, B.9, C.6, C.7, C.8 und D.2 werden wie folgt hinzugefügt:

Anhang A (informativ)

Für die taxonomische Zielgruppe spezifische Verfahren

A.5 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt

A.5.1 Zweck, Relevanz und wissenschaftliche Grundlage

Vom GMO Detection Laboratory der Shanghai Jiao Tong University (GMDL-SJTU) wurde ein Ringversuch zur Validierung der Anwendbarkeit eines für die taxonomische Zielgruppe spezifischen Verfahrens organisiert, wobei für die qualitative Analyse von gentechnisch modifiziertem (GM) oder Nicht-GM-Reis das Sucrose-Phosphat-Synthase(*SPS*)-Gen als endogenes Gen verwendet wird. Am Ringversuch nahmen zwölf Laboratorien aus Spanien, Korea, Litauen, Slowenien, Japan, Italien und China teil.

Die Verfahrensvorschrift für den Ringversuch umfasste die folgenden Module:

- qualitative PCR zur Validierung der Heterogenität des *SPS*-Gens innerhalb von Reissorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft;
- qualitative PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zur Validierung der Artspezifität des *SPS*-Gens für Reis;
- qualitative PCR zur Bewertung der Nachweisgrenze (LOD) des festgelegten qualitativen *SPS*-PCR-Assays.

Der Ringversuch wurde nach [41] durchgeführt.

Die Ergebnisse des Ringversuchs sowie die zugehörige Vorschrift sind in A.5.3 angeführt.

A.5.2 Anwendungsbereich

Das Verfahren wurde für Reissaatgut, Reis und andere verarbeitete Reisprodukte optimiert. Die Anwendbarkeit des *SPS*-Gens wurde in diesem Ringversuch bewertet, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die aus Reissaatgut und andere Pflanzenmaterialien extrahiert wurden.

Der Organisator des Ringversuchs stellte den Teilnehmern des Ringversuchs die verfahrensspezifischen Reagenzien (Primer, Sonden, Reaktions-Mastermix) und die zu untersuchenden, aus Reismaterialien extrahierten DNA-Proben zur Verfügung.

A.5.3 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.5.3.1 Robustheit des Verfahrens

Die Robustheit wurde an einem System für die qualitative PCR des *SPS*-Gens bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen (d. h. 56 °C, 58 °C und 60 °C) an drei verschiedenen DNA-Proben mit bekannten Mengen an Reis-DNA (Proben mit 10 ng, 1 ng, 0,1 ng Reis-Genom-DNA) und mit drei Wiederholungen je Probe geprüft. Bei dem System für die qualitative PCR wurde die erwartete Robustheit nachgewiesen und das System wies bei allen drei Annealing-Temperaturen und drei Konzentrationen der Reis-DNA-Proben ein gutes Leistungsverhalten auf.

Das System für die qualitative PCR des *SPS*-Gens wurde auch an verschiedenen Thermocyclern (PTC-100, MJ Research und Bio-Rad, Allplied Biosystems) mit drei verschiedenen Reaktionsvolumina (25 µl, 30 µl und 50 µl) und drei Wiederholungen je Volumen geprüft. Das System für die qualitative PCR wies die erwartete

Robustheit und bei den verschiedenen Thermocyclern und Reaktionsvolumina ein gutes Leistungsverhalten auf.

A.5.3.2 Versuch innerhalb eines Laboratoriums

Das *SPS*-Gen aus Reis wurde in [41] als geeignet für die Verwendung als ein endogenes Referenzgen zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von GM-Reis beschrieben. Die genauen technischen Angaben wurden in modifizierter Form aus [41] übernommen.

Im Ringversuch wurden zur Probenvorbereitung alle DNA-Proben vom GMDL-SJTU nach dem aus ISO 21571, Abschnitt A.3 [42] übernommenen CTAB-Verfahren extrahiert. Die quantitative Bestimmung der extrahierten DNA durch spektrometrische Messung erfolgte nach einem aus ISO 21571, Abschnitt B.1 [42] übernommenen Verfahren. Nach der quantitativen Bestimmung der DNA wurde eine qualitative PCR unter Anwendung eines 18S-PCR-Systems durchgeführt, um Angaben über eine mögliche PCR-Inhibition zu erhalten.

Das System für die PCR des *SPS*-Gens wurde unter Verwendung von Reis-Genom-DNA von drei Forschern am GMDL-SJTU geprüft. Die Ergebnisse waren zufriedenstellend; insbesondere für die qualitative PCR zeigen die Ergebnisse, dass das *SPS*-Gen für Reis spezifisch ist, die Nachweisgrenze (LOD) liegt bei etwa 0,1 %.

A.5.3.3 Ringversuch

Für den Ringversuch erhielt jeder Teilnehmer zwölf Proben von Reis-DNA für die Prüfung auf Heterogenität, zehn DNA-Proben von Pflanzen außer Reis und eine DNA-Probe von Reis zur Prüfung auf Artspezifität sowie zehn reihenverdünnte Reisproben zur Bewertung der LOD. Außerdem wurden eine negative und eine positive Kontrolle einbezogen.

Die Heterogenität des *SPS*-Gens innerhalb von Reissorten wurde unter Verwendung von zwölf Reissorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft in China, wie z. B. Najing14, Taipei309, Shengnong265, Jinyinbao, Minghui78, Huke3, Guangluai4, Zhe733, Hejiang19, Baizhehu, Xiangwanxian9 und Nipponbare, bewertet. Die von den zwölf Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigten, dass von insgesamt 144 (12 × 12) Proben von Reis-DNA mit dem System für die PCR des *SPS*-Gens 143 positive Ergebnisse erhalten wurden. Das bedeutet, dass der Anteil falsch negativer Ergebnisse (Falsch-negativ-Rate) des Systems für die PCR des *SPS*-Gens für Reis bei 0,69 % (1/144) liegt (siehe Tabelle A.14). Diese Daten weisen auf eine geringe Heterogenität des *SPS*-Gens in der Zielregion hin.

Tabelle A.14 — Ergebnisse der Prüfung der qualitativen PCR auf Spezifität

Jahr des Ringversuchs	2007
Anzahl der Laboratorien	12
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	12
Anzahl der Proben je Laboratorium	22
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	264
Anzahl der Proben, die Reis enthalten	144
Anzahl der Proben, die keinen Reis enthalten	120
Falsch positive Ergebnisse	2 (1,67 %)
Falsch negative Ergebnisse	1 (0,69 %)

Die Artspezifität des *SPS*-Gens wurde mit einer Probe von Reis-Genom-DNA (Guangluai4) und zehn weiteren Pflanzen-DNA validiert, die aus stammesgeschichtlicher Sicht mit Reis verwandt, gewöhnliche GM-Kulturpflanzen oder Modellpflanzen waren, wie z. B. die Fruchtmaterialien von Bambus (*Phyllostachys*), grünem Fennich (*Setaria viridis* (Linn.) Beauv), Gerste (*Hordeum vulgare*), Weizen (*Triticum aestivum*), Kolbenhirse

(*Setaria italica*), Raps (*Brassica napus*), Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Sojabohne (*Glycine max*) und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Die von den zwölf Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigten, dass von insgesamt 120 (10×12) Proben von nicht aus Reis stammender Pflanzen-DNA mit dem System für die PCR des SPS-Gens 118 negative Ergebnisse erhalten wurden. Das bedeutet, dass der Anteil falsch positiver Ergebnisse (Falsch-positiv-Rate) des Systems für die PCR des SPS-Gens für die anderen zehn Pflanzenmaterialien bei 1,67 % (2/120) lag (siehe Tabelle A.14). Diese Daten weisen darauf hin, dass das SPS-Gen für den Nachweis von Reis artspezifisch ist.

Die Nachweisgrenze (LOD) des Systems für die PCR des SPS-Gens wurde mit qualitativer PCR und einem gemischten Mehl validiert, das Mais und verschiedene Mengen von Reissaatgut enthält: sämtliche der zwölf Laboratorien wiesen die aus dem gemischten Mehl extrahierte DNA-Probe nach, die 0,1 % oder mehr Reis enthielt, und zwei der zwölf Laboratorien wiesen 0,01 % Reis nach, der im gemischten Mehl enthalten war. Diese Daten weisen darauf hin, dass die LOD des Systems für die PCR des SPS-Gens 0,1 % beträgt (siehe Tabelle A.15).

Tabelle A.15 — Ergebnisse der Prüfung der qualitativen PCR bezüglich der LOD

Jahr des Ringversuchs	2007				
Relative Konzentration ($W_{\text{rice}}/W_{\text{maize}}$)	10 %	1 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
Anzahl der Laboratorien	12	12	12	12	12
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	12	12	12	12	12
Anzahl der Proben je Laboratorium	2	2	2	2	2
Anzahl der angenommenen Ergebnisse der Laboratorien	12	12	12	12	12
Positive Ergebnisse	12 (100 %)	12 (100 %)	12 (100 %)	4 (33,33 %)	2 (16,67 %)

A.5.3.4 Molekulare Spezifität

A.5.3.4.1 Allgemeines

Zur qualitativen Validierung des SPS-Gens als ein spezifisches Reis-Gen wurde ein 279-bp-Fragment der konservierten Region des SPS-Gens ausgewählt und mit spezifischen Primern amplifiziert.

A.5.3.4.2 Experimentell

Die aus den elf verschiedenen Pflanzenmaterialien (einschließlich Reis) extrahierten DNA-Proben wurden wie beschrieben [41] mit dem System für die PCR des SPS-Gens analysiert. Von den elf Proben führte nur die Reis-DNA zu positiven Ergebnissen. Die anderen zehn Proben (siehe A.5.3.3) führten zu negativen Ergebnissen.

Die aus zwölf verschiedenen Reissorten extrahierten DNA-Proben wurden mit dem von [41] entwickelten System für die PCR des SPS-Gens analysiert. Alle zwölf Proben führten zu positiven Ergebnissen.

Die DNA wurde aus fünf Proben von gemischtem Mehl, die unterschiedliche Mengen an Reis enthielten, extrahiert. Diese Proben wurden wie beschrieben [41] mit dem System für die PCR des SPS-Gens analysiert. Bei den Proben, die 10 %, 1 % und 0,1 % Reis enthielten, wurden positive Ergebnisse erzielt. Die anderen beiden Proben (0,05 % und 0,01 %) führten zu negativen Ergebnissen.

A.5.3.4.3 Theoretisch

Die theoretische Spezifität des Primers für das SPS-Gen wurde durch Suche nach Homologien unter Anwendung des Programms BLASTN 2.0MP-WashU unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Datum der Recherche: 9. Januar 2010) beurteilt. Die zur Abfrage verwendete 279-bp-Sequenz ist Teil der NCBI-Eintrag-

Nummer U33175 (Nukleotide 1055 bis 1333). Die Ergebnisse der BLAST-Recherche bestätigten die vollständige Identität der Suchsequenz mit der *SPS*-Gen-Sequenz von Reis und die fehlende Homologie mit anderen Genen und Arten.

A.5.4 Kurzbeschreibung und Zusammenfassung

Diese Methode ist ein PCR-Verfahren zur Anwendbarkeit des *SPS*-Gens als ein endogenes Reisgen beim qualitativen Nachweis von GM- oder Nicht-GM-Reis. Die Heterogenität, Artspezifität des *SPS*-Gens und LOD wurden als Teil der Validierung des vorliegenden Verfahrens beurteilt. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 279 bp wurde durch Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

A.5.5 Definitionen

Siehe ISO 5725-1 [43] und ISO 24276 [44].

A.5.6 Probenart und -mengen

Nachstehend sind die Daten aus dem Ringversuch als Beispiele für Probenarten und -mengen angeführt, die für das vorliegende Verfahren geeignet sind.

In diesem Ringversuch wurden aus den Samen von zwölf Reissorten, zehn weiteren Pflanzenmaterialien (siehe A.5.3.3) und dem gemischten Mehl, das verschiedene Gehalte an Reis in Maismehl enthielt, extrahierte DNA-Proben verwendet.

Die Teilnehmer erhielten die folgenden Proben:

- zwölf DNA-Proben von 12 verschiedenen Reissorten, die in verschiedenen Gebieten Chinas häufig angebaut wurden (d. h. Najing14, Taipei309, Shengnong265, Jinyinbao, Minghui78, Huke3, Guangluai4, Zhe733, Hejiang19, Baizhehu, Xiangwanxian9 und Nipponbare), 20 ng/μl, jeweils 50 μl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Heterogenität des *SPS*-Gens innerhalb von Reissorten verwendet;
- elf DNA-Proben von Reis (Guangluai4) und weiteren zehn Pflanzenmaterialien, die aus stammesgeschichtlicher Sicht mit Reis verwandt (d. h. Bambus, grüner Fennich, Gerste, Weizen, Kolbenhirse), gewöhnliche GM-Kulturpflanzen (d. h. Raps, Tomate, Kartoffel, Sojabohne) oder Modellpflanzen (d. h. Ackerschmalwand) waren, 20 ng/μl, jeweils 50 μl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Artspezifität des *SPS*-Gens in Reis verwendet;
- zehn DNA-Proben von dem gemischten Mehl aus Mais und verschiedenen Mengen an Reis, 20 ng/μl, jeweils 50 μl. Diese DNA-Proben waren Doppelblindproben einer Reihe von fünf Konzentrationen, die zur Prüfung der LOD des Systems für die PCR des *SPS*-Gens verwendet wurden;
- negative DNA-Zielkontrolle (bezeichnet als N): DNA aus Lachssperma (20 g/μl);
- positive DNA-Zielkontrolle (bezeichnet als P): Genom-DNA von Reis (Guangluai4) (20 ng/μl). Sämtliche DNA-Proben wurden von GMDL-SJTU unter Anwendung des CTAB-Verfahrens gereinigt. Die negativen und positiven DNA-Zielkontrollen wurden bei jeder PCR-Platte verwendet;
- Folgende Reaktionsreagenzien, Primer für das System für die PCR des *SPS*-Gens:
 - Primerpaar für die herkömmliche PCR: *SPS*-F/*SPS*-R;
 - DNA-Verdünnungslösung (einfach konzentrierte TE-Pufferlösung, 1,2 ml).

A.5.7 Nachweisgrenze (LOD), Anwendungsbereich

In Übereinstimmung mit dem entwickelten Verfahren beträgt die relative LOD des qualitativen PCR-Verfahrens etwa 0,1 %. Das System für die PCR des SPS-Gens kann für den spezifischen Nachweis und die Identifizierung von Reismaterialien in anderen Pflanzenmaterialien verwendet werden.

A.5.8 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Vergleichspräzision des Verfahrens ergibt sich aus den Ergebnissen des Ringversuchs (siehe A.5.3.3).

A.5.9 Störungen

Die extrahierte DNA sollte vor der PCR-Analyse auf PCR-Inhibitoren untersucht werden, um falsch negative Ergebnis auszuschließen.

A.5.10 Physikalische/Umgebungsbedingungen

Siehe ISO 24276 zu Einzelheiten, wie z. B.

- die Aufrechterhaltung streng getrennter Arbeitsbereiche für DNA-Aufbereitung, PCR-Ansatz, PCR-Amplifikation und Elektrophorese;
- vor dem Gebrauch sollten sämtliche DNA-Rückstände von der gesamten Ausrüstung entfernt werden;
- zur Vermeidung von Kontamination sollten Aerosol-geschützte Filterpipettenspitzen verwendet werden;
- es sind nur puderfreie Handschuhe zu verwenden und diese sind oft zu wechseln.

A.5.11 Geräte/Ausrüstungen

- Mikrozentrifuge;
- Gefrierschrank bei –20 °C und Kühlschrank bei 4 °C;
- Mikropipetten;
- Mischer, z. B. Vortex-Mischer;
- Mikrozentrifugenröhrchen, 0,2 ml, 1,5 ml und 2,0 ml;
- Spitzen und Aerosol-geschützte Spitzen für Mikropipetten;
- Gestell für Reaktionsgefäße;
- Vinyl- oder Latexhandschuhe;
- Gerät für die Amplifikation der DNA (Thermocycler oder ein gleichwertiges Gerät);
- Elektrophoresegerät mit Netzanschluss;
- bildgebendes System für die Gel-Analyse;
- Mikrowellengerät (wahlfrei).

A.5.12 Reagenzien/Hilfsstoffe

A.5.12.1 Allgemeines

Sämtliche Reagenzien sollten den Festlegungen von ISO 24276 [44] entsprechen.

A.5.12.2 DNA-Extraktion

- CTAB: Cetyltrimethylammoniumbromid (hochrein);
- TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (für die Molekularbiologie geeignete Qualität);
- EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (mittels Titration bestimmte Reinheit von 99,9 %);
- Ethanol (mindestens 96%ig);
- Isopropanol (mindestens 99,7%ig);
- Chloroform (mindestens 99%ig);
- NaCl (mindestens 99%ig);
- NaOH (mindestens 98%ig, wasserfrei);
- steriles destilliertes Wasser;
- RNAse A-Lösung, 10 mg/ml;
- Proteinase K-Lösung, 20 mg/ml;
- Verdünnungspufferlösung: TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (für die Molekularbiologie geeignete Qualität), 10 mmol/l, pH 9,0;
- Salzsäure (HCl), $\varphi(\text{HCl}) = 37 \%$;
- DNA aus Heringssperma, DNA aus Kalbsthymus oder DNA des Lambda-Bakteriophagen.

A.5.12.3 Qualitative PCR

- Wasser;
- PCR-Pufferlösung (ohne MgCl_2), 10-fach;
- MgCl_2 -Lösung, 25 mmol/l;
- dNTP-Lösung, von jedem 2,5 mmol/l;
- Primer (siehe Tabelle A.16);
- thermostabile DNA-Polymerase.

A.5.12.4 Elektrophorese

Zu Einzelheiten siehe z. B. ISO 21571, B.2.

- 10-fach konzentrierte Beladungspufferlösung (1 % SDS, 50 % Glycerol, 0,05 % Bromphenolblau).

A.5.13 Entnahme, Transport, Konservierung und Lagerung von Proben

DNA-Lösungen dürfen bei 4 °C höchstens eine Woche aufbewahrt werden, für eine Langzeitlagerung sind –20 °C erforderlich. Bei einem qualitativen und quantitativen Real-time-PCR-Ansatz sollten die PCR-Reagenzien im aufgetauten Zustand bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt werden.

A.5.14 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Es sollte sichergestellt werden, dass die Untersuchungsprobe für die Laboratoriumsprobe repräsentativ ist, z. B. durch Zerkleinern oder Homogenisieren der Proben. Die zu berücksichtigenden Maßnahmen und Arbeitsschritte sind in ISO 21571 [42] und ISO 24276 [44] beschrieben.

A.5.15 Kalibrierung von Geräten

Die Geräte, z. B. Thermocycler und Pipetten, sollten nach ISO/IEC 17025 [45] kalibriert werden.

A.5.16 Analysenschritte**A.5.16.1 Aufbereitung der DNA für die qualitative PCR**

Die erhaltenen DNA-Proben, die für den Versuch benötigt werden, sind aufzutauen, vorsichtig zu mischen und zu zentrifugieren. Aufgetaute Reagenzien sind bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufzubewahren.

A.5.16.2 PCR-Reagenzien**A.5.16.2.1 Herkömmlicher PCR-Mastermix**

Ein herkömmliches PCR-Reaktionsgemisch, das Folgendes enthält: einfach konzentrierte PCR-Pufferlösung, 200 nmol/l von jedem dNTP, 2,5 mmol/l Mg^{2+} , 330 nmol/l Forward/Reverse Primer, 1 U Taq-DNA-Polymerase.

A.5.16.2.2 Primer

Siehe Tabelle A.16.

Tabelle A.16 — Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die qualitative PCR

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids (5' nach 3')
Primersequenz für die qualitative PCR	
SPS-Primer F	TTg CgC CTg AAC ggA TAT
SPS-Primer R	ggA gAA gCA CTg gAC gAgg

A.5.16.3 Durchführung**A.5.16.3.1 Allgemeines**

Die qualitative PCR für das SPS-Gen von Reis wurde für ein Gesamtvolumen von 30 µl je Reaktionsgemisch entwickelt. Die Verwendung von 100 ng Matrizen-DNA je Reaktionsgefäß wird empfohlen.

- Der für den Versuch benötigte PCR-Mastermix ist aufzutauen, vorsichtig zu mischen und zu zentrifugieren. Die aufgetauten Reagenzien sind bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufzubewahren.
- 25 µl/Röhrchen des Mastermixes sind in 200-µl-PCR-Reaktionsröhrchen zu verteilen. Es sind jeweils 5 µl der DNA-Probenlösung, der bezüglich Reis positiven Kontrolle, der negativen Kontrolle und der Leerwertkontrolle (H_2O) in die Reaktionsröhrchen zu geben.

- Der Inhalt der PCR-Röhrchen ist vorsichtig zu mischen, die Röhrchen sind in der Mikrozentrifuge 10 s bei 1 000 g zu zentrifugieren.
- Die Platte ist im Gerät anzuordnen.
- Die PCR ist unter den Bedingungen für die Zyklen der qualitativen PCR durchzuführen.

A.5.16.4 PCR-Kontrollen

Siehe 7.5 und ISO 24276.

A.5.16.5 Temperatur-Zeit-Programm (PCR)

Der PCR-Assay wurde für die Anwendung in einem PCR-Thermocycler PTC-100 (MJ Research) und ABI 2720 (Applied Biosystems) optimiert. Obwohl auch andere PCR-Geräte verwendet werden dürfen, sind die Einstellwerte des Thermocyclers möglicherweise zu verifizieren. Die Parameter der Zyklen für die Durchführung der qualitativen PCR sind in Tabelle A.17 angeführt.

Tabelle A.17 — Temperatur-Zeit-Programm für die qualitative PCR

Schritt	Stufe		Temperatur °C	Zeit s	Anzahl der Zyklen
1	Aktivierung/initiale Denaturierung		94	900	1
2a	Amplifikation	Denaturierung	94	30	35
2b		Annealing	58	30	
2c		Elongation	72	30	
3	Abschließende Elongation		72	420	1

A.5.16.6 Elektrophorese

- Nach Abschluss des PCR-Programms ist in jedes Reaktionsröhrchen 1 µl der 10-fach konzentrierten Beladungspufferlösung zu geben und mit den PCR-Produkten zu mischen.
- Das Elektrophoresegel (2 % Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) ist mit jeweils 10 µl von jedem PCR-Produkt zu beladen.
- Der Gellauf ist im Elektrophoresegerät 20 min bei 5 V/cm durchzuführen.
- Das Gelbild ist mit einer UV-Geldokumentation oder einem gleichartigen System aufzuzeichnen.

A.5.16.7 Annahme-/Zurückweisungskriterien

Die zur Auswertung der Ergebnisse aus dem Ringversuch angewendeten Anforderungen an die Leistung des Verfahrens sind:

In der bezüglich Reis positiven Kontrolle (Probe P) sollte ein Fragment von 279 bp nachgewiesen werden, in der negativen Kontrolle (Probe N) und in der Leerwertkontrolle sollte kein Zielfragment nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 279 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA von SPS enthält und das Ergebnis „positiv“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „negativ“.

A.5.16.8 Identifizierung

Das spezifische Produkt sollte ein Fragment von 279 bp sein; andere bei der Agarose-Gelelektrophorese vorliegende Banden sind unerwartete Produkte.

A.5.17 Identifizierung der Proben

Siehe 9.4 und A.5.16.8.

A.5.18 Auswertung

Die erwartete Länge des Amplifikats von SPS beträgt 279 bp.

In der bezüglich Reis positiven Kontrolle (Probe P) sollte ein Fragment von 279 bp nachgewiesen werden, in der negativen Kontrolle (Probe N) und in der Leerwertkontrolle sollte kein Zielfragment nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 279 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA von SPS enthält und das Ergebnis „positiv“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „negativ“.

A.5.19 Führen von Aufzeichnungen

Das Führen von Aufzeichnungen sollte den Anforderungen von ISO/IEC 17025 [45] gerecht werden.

A.5.20 Berichterstattung

Die Berichterstattung sollte den Anforderungen von ISO 24276 [44] und ISO/IEC 17025 [45] gerecht werden.

A.5.21 Sicherheitsvorkehrungen

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276 [44].

A.5.22 Reinhaltung/Abfallbeseitigung

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276 [44].

A.6 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten

A.6.1 Zweck, Relevanz und wissenschaftliche Grundlage

Das *LAT52*-Gen kodiert ein hitzestabiles, glycosyliertes, Cystein-reiches Protein, das für die Entwicklung (Reifung) der Tomatenpollen notwendig ist. Es wurde bewiesen, dass das System zum Nachweis von *LAT52* dafür geeignet ist, als artspezifisches Gen bei der Identifizierung und quantitativen Bestimmung von GM-Tomaten eingesetzt zu werden [46]. Vom GMO Detection Laboratory der Shanghai Jiao Tong University (GMDL-SJTU) wurde ein Ringversuch zur Validierung der Anwendbarkeit des Tomatengens *LAT52* als artspezifisches Gen zur qualitativen Analyse gentechnisch modifizierter (GM) oder Nicht-GM-Tomaten organisiert. Am Ringversuch nahmen dreizehn Laboratorien aus den USA, Singapur, Korea, Litauen, Slowenien, Norwegen, Italien und China teil [47]. Die Ergebnisse sind in Tabelle A.18 und Tabelle A.19 angeführt.

Die Verfahrensvorschrift für den Ringversuch umfasste die folgenden Module:

- qualitative PCR zur Validierung der Heterogenität des *LAT52*-Gens innerhalb von Tomatensorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft;
- qualitative PCR zur Validierung der Artspezifität des *LAT52*-Gens für Tomaten;
- qualitative PCR zur Bewertung der Nachweisgrenze (LOD) des festgelegten qualitativen *LAT52*-PCR-Assays.

Der Ringversuch wurde nach folgenden international anerkannten Leitlinien durchgeführt:

- ISO 5725 wird besonders in Bezug auf das Maß für die Präzision (d. h. Wiederhol- und Vergleichpräzision) und Richtigkeit berücksichtigt [48];
- IUPAC-Protokoll „Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies“ (Vorschrift zur Gestaltung, Durchführung und Auswertung von Studien zur Verfahrensleistung) [49].

A.6.2 Anwendungsbereich

Das vorliegende Verfahren beschreibt den Nachweis von Tomaten-DNA unter Anwendung qualitativer PCR.

Das Verfahren wurde für Tomatensaatgut, Tomaten (Früchte), Tomatenketchup, Tomatensaft und andere verarbeitete Produkte aus Tomaten optimiert. Die Anwendbarkeit des *LAT52*-Gens wurde in einem Ringversuch untersucht, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die aus Tomatensaatgut und andere Pflanzenmaterialien extrahiert wurden.

A.6.3 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.6.3.1 Robustheit des Verfahrens

Die Robustheit des Systems für die qualitative PCR von *LAT52* wurde vom Verfahrensentwickler bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen (d. h. 56 °C, 58 °C und 60 °C) an drei verschiedenen DNA-Proben mit bekannten Mengen an DNA aus Tomatensaatgut (Proben mit 10 ng, 1 ng, 0,1 ng Tomaten-Genom-DNA und drei Wiederholungen je Probe) geprüft. Die Systeme für die qualitative PCR wiesen die erwartete Robustheit und bei allen drei Annealing-Temperaturen und drei Konzentrationen der Tomaten-DNA-Proben ein zufriedenstellendes Leistungsverhalten auf.

Das System für die qualitative PCR von *LAT52* wurde vom Verfahrensentwickler auch an verschiedenen Thermocyclern (PTC-100 von MJ Research, S1000 von Bio-Rad und 9700 von Applied Biosystems) mit drei verschiedenen Reaktionsvolumina (25 µl, 30 µl und 50 µl und drei Wiederholungen je Volumen) geprüft. Das System für die qualitative PCR wies bei den verschiedenen Thermocyclern und Reaktionsvolumina die erwartete Robustheit auf.

A.6.3.2 Versuch innerhalb eines Laboratoriums

Das *LAT52*-Gen aus Tomaten hat sich bei der Validierung als geeignet für die Verwendung als artspezifisches Gen zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von GM-Tomaten erwiesen [46]. Die genauen, hier angeführten technischen Angaben wurden in modifizierter Form aus [46] übernommen.

Bei der Validierungsuntersuchung wurden zur Probenvorbereitung die DNA-Proben vom GMDL-SJTU nach dem aus ISO 21571 (Abschnitt A.3) [42] übernommenen CTAB-Verfahren extrahiert. Die quantitative Bestimmung der Menge der insgesamt extrahierten DNA durch spektrometrische Messung erfolgte nach einem aus ISO 21571 (Abschnitt B.1) [42] übernommenen Verfahren. Nach der quantitativen Bestimmung der DNA wurde ein qualitativer PCR-Lauf unter Anwendung eines 18S-PCR-Systems durchgeführt, um Angaben über eine mögliche PCR-Inhibition zu erhalten [50].

Das System für die PCR von *LAT52* wurde unter Verwendung von Tomaten-Genom-DNA von drei Bearbeitern am GMDL-SJTU mit zufriedenstellenden und widerspruchsfreien Ergebnissen geprüft; insbesondere für die qualitative PCR zeigen die Ergebnisse, dass das *LAT52*-Gen für Tomaten spezifisch ist, die relative Nachweisgrenze (LOD) beträgt mindestens 0,1 % (Massenanteil).

A.6.3.3 Ringversuch

Die Heterogenität des *LAT52*-Gens innerhalb von Tomatensorten wurde unter Verwendung von zwölf Tomatensorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft in China, wie z. B. Shengnong2, Jifan4, Zhongsu5, Yashu6, Jiafen1, Shenfeng2, Hongza9, R144, Nongyou30, Dongnong704, Lichun und Zaokui, validiert. Die von dreizehn Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigten, dass von insgesamt 156 (12 × 13) Proben von Tomaten-DNA mit dem System für die PCR des *LAT52*-Gens 155 positive Ergebnisse erhalten wurden. Das bedeutet, dass die Falsch-negativ-Rate des Systems für die PCR

von LAT52 für Tomaten bei 0,64 % (1/156) liegt (siehe Tabelle A.18). Diese Daten weisen auf eine geringe Heterogenität des LAT52-Gens bei den Tomatensorten in China hin.

Tabelle A.18 — Ergebnisse der qualitativen PCR

Jahr des Ringversuchs	2007
Anzahl der Laboratorien	13
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	13
Anzahl der Proben je Laboratorium	22
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	286
Anzahl der Proben, die Tomate enthalten	156
Anzahl der Proben, die keine Tomate enthalten	130
Falsch positive Ergebnisse	4 (3,08 %)
Falsch negative Ergebnisse	1 (0,64 %)

Die Artspezifität des LAT52-Gens wurde mit einer Probe von Tomaten-Genom-DNA (Jiafen1) und zehn weiteren Pflanzen-DNA validiert, die aus stammesgeschichtlicher Sicht mit Tomate verwandt, gewöhnliche GM-Kulturpflanzen oder Modellpflanzen waren, wie z. B. die Fruchtmaterialien von Aubergine (*Solanum melongena*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Paprika (*Capsicum annuum*); Mais (*Zea mays*), Sojabohne (*Glycine max*), Rüben (*Brassica rapa*), Reis (*Oryza sativa*); Blattmaterialien von Petunia (*Petunia hybrida*), Virginischer Tabak (*Nicotiana tabacum*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Die von dreizehn Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigen, dass von insgesamt 130 (10 × 13, ohne die Probe von Tomaten-DNA) Proben von DNA aus unterschiedlichen Pflanzen mit dem System für die PCR des LAT52-Gens 126 negative Ergebnisse erhalten wurden. Demzufolge liegt die Falsch-positiv-Rate des Systems für die PCR des LAT52-Gens bei 3,08 % (126/130) (siehe Tabelle A.18). Die falsch positiven Ergebnisse können in einer Kontamination im Verlauf der PCR begründet sein. Diese Daten weisen darauf hin, dass das LAT52-Gen für den Nachweis von Tomate artspezifisch ist.

Die Nachweisgrenze (LOD) des Systems für die PCR von LAT52 wurde mit qualitativer PCR unter Verwendung eines gemischten Mehl validiert, das Mais und Tomatensaatgut enthält. Sämtliche der dreizehn Laboratorien konnten die aus dem gemischten Mehl extrahierte DNA-Probe nachweisen, die 0,1 % oder mehr Tomate enthielten, und zwei Laboratorien konnten den Gehalt von 0,01 % Tomate im gemischten Mehl nachweisen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die LOD des Systems für die PCR von LAT52 0,1 %, angegeben als Massenanteil, beträgt (siehe Tabelle A.19).

Tabelle A.19 — Ergebnisse der Prüfung der qualitativen PCR bezüglich der LOD

Jahr des Ringversuchs	2007				
Relative Konzentration ($W_{\text{tomato}}/W_{\text{maize}}$)	2 %	0,5 %	0,1%	0,05%	0,01%
Anzahl der Laboratorien	13	13	13	13	13
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	13	13	13	13	13
Anzahl der Proben je Laboratorium	2	2	2	2	2
Anzahl der Proben	26	26	26	26	26
Positive Ergebnisse	25 (96,2%)	25 (96,2%)	26 (100%)	0 (0%)	2 (15,4%)

A.6.3.4 Molekulare Spezifität

A.6.3.4.1 Allgemeines

Das *LAT52*-Verfahren ist auf das Tomaten-Gen *LAT52* ausgerichtet, von dem im haploiden Genom verschiedener Tomatensorten stabil eine Einzelkopie vorliegt. Mit den spezifischen Primern (Tabelle 20) wurde ein Amplifikat mit einer Länge von 92 bp amplifiziert.

A.6.3.4.2 Experimentell

Die aus den elf verschiedenen Pflanzenmaterialien (einschließlich Tomate) extrahierten DNA-Proben wurden vom Verfahrensentwickler mit dem System für die PCR von *LAT52* analysiert. Von den elf Proben führte nur die Tomaten-DNA zu positiven Ergebnissen. Die anderen zehn Proben (siehe A.6.3.3) führten zu negativen Ergebnissen.

Die aus zwölf verschiedenen Tomatensorten extrahierten DNA-Proben wurden vom Verfahrensentwickler mit dem System für die PCR von *LAT52* analysiert (siehe A.6.6). Alle Proben führten zu positiven Ergebnissen.

A.6.3.4.3 Theoretisch

Die theoretische Spezifität des *LAT52*-Primers wurde durch Suche nach Homologien unter Anwendung des Programms BLASTN 2.0MP-WashU unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Datum der Recherche: 20. Januar 2010) beurteilt. Die zur Abfrage verwendete 92-bp-Sequenz ist Teil der NCBI-Eintrag-Nummer X15855 (Nukleotide 1385 bis 1476). Die Ergebnisse der BLAST-Recherche bestätigten die vollständige Identität der Suchsequenz mit der für Staubbeutel von Tomaten spezifischen *LAT52*-Gen-Sequenz und zeigten keine Homologie mit anderen Genen und Arten auf.

A.6.4 Kurzbeschreibung und Zusammenfassung

Diese Methode ist ein qualitatives PCR-Verfahren unter Anwendung des *LAT52*-Gens als artspezifisches Gen von Tomaten zum qualitativen Nachweis von GM- oder Nicht-GM-Tomaten. Der Nachweis des PCR-Produktes mit einer Länge von 92 bp erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

A.6.5 Definitionen

Siehe ISO 5725-1 [43] und ISO 24276 [44].

A.6.6 Probenart und -mengen

Im Ringversuch wurden die folgenden Proben verwendet:

- zwölf DNA-Proben aus Saatgut von 12 verschiedenen Tomatensorten, die in verschiedenen Gebieten Chinas häufig angebaut wurden (d. h. Shengnong2, Jifan4, Zhongsu5, Yashu6, Jiafen1, Shenfeng2, Hongza9, Nongyou30, R144, Dongnong704, Lichun und Zaokui), 20 ng/µl, jeweils 50 µl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Heterogenität der *LAT52*-Zielsequenz innerhalb von Tomatensorten verwendet;
- elf DNA-Proben von Tomatensaatgut (Jiafen1) und die Blätter von weiteren zehn Pflanzenmaterialien, die aus stammesgeschichtlicher Sicht mit Tomate verwandt (d. h. Aubergine, Kartoffel, Petunia und Paprika), gewöhnliche GM-Kulturpflanzen (d. h. Mais, Sojabohne, Rüben und Reis) oder Modellpflanzen (d. h. Tabak und Ackerschmalwand) waren, 20 ng/µl, jeweils 50 µl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Spezifität des *LAT52*-Verfahrens verwendet;
- zehn DNA-Proben von dem gemischten Mehl aus Mais und mit verschiedenen Gehalten an Tomate, 20 ng/µl, jeweils 50 µl. Diese DNA-Proben wurden als Doppelblindproben einer Reihe von fünf Tomaten-Konzentrationen hergestellt und zur Prüfung der LOD des Systems für die PCR von *LAT52* verwendet.

A.6.7 Nachweisgrenze (LOD), Anwendungsbereich

Die LOD des Verfahrens betrug etwa 0,1 % (relative Masse des Tomatenmaterials). Das LAT52-Verfahren kann für den spezifischen Nachweis und die Identifizierung von Tomatenmaterialien in einer Probe eingesetzt werden.

Mit dem System für die PCR von LAT52 wurden DNA-Proben analysiert, die aus fünf gemischten Mehlen extrahiert wurden, die unterschiedliche Mengen (Massenanteil) von Material aus Tomatensaatgut enthielten. Nur die Mehlproben mit einem Gehalt von 0,1 % oder darüber (d. h. 2 %, 0,5 % und 0,1 %) führten zu positiven Ergebnissen. Die anderen beiden Proben (d. h. 0,05 % und 0,01 %) führten zu negativen Ergebnissen.

A.6.8 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Gesamt(mess)unsicherheit des Verfahrens ergibt sich aus den Ergebnissen des Ringversuchs (siehe A.6.3.3).

A.6.9 Störungen

Die extrahierte DNA sollte vor der PCR-Analyse auf PCR-Inhibitoren untersucht werden, um falsch negative Ergebnis auszuschließen.

A.6.10 Physikalische/Umgebungsbedingungen

Siehe ISO 24276 [44] zu Einzelheiten.

A.6.11 Geräte/Ausrüstungen

- Gerät für die Amplifikation der DNA (Thermocycler oder ein gleichwertiges Gerät);
- Elektrophoresegerät mit Netzanschluss;
- Dokumentationssystem für die Gel-Analyse;
- Mikrowellengerät.

A.6.12 Reagenzien/Hilfsstoffe

Sämtliche Reagenzien müssen den Festlegungen von ISO 24276 [44] entsprechen.

- herkömmlicher PCR-Mastermix (siehe A.6.16.2.1);
- Oligonukleotide (siehe Tabelle A.20).

A.6.13 Entnahme, Transport, Konservierung und Lagerung von Proben

DNA-Lösungen sollten bei 4 °C höchstens eine Woche aufbewahrt werden, für eine Langzeitlagerung sind –20 °C erforderlich. Bei einem qualitativen Ansatz müssen die PCR-Reagenzien im aufgetauten Zustand bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt werden.

A.6.14 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe sollte für die Laboratoriumsprobe repräsentativ sein, z. B. durch Zerkleinern oder Homogenisieren der Proben. Die zu berücksichtigenden Maßnahmen und Arbeitsschritte sind in ISO 21571 [42] ausführlich beschrieben.

Die DNA-Proben wurden vom GMDL-SJTU unter Anwendung des CTAB-Verfahrens nach ISO 21571 (Abschnitt A.3) [42] extrahiert.

A.6.15 Kalibrierung von Geräten

Die Geräte, z. B. Thermocycler und Pipetten, sollten z. B. nach ISO/IEC 17025 [45] kalibriert werden.

A.6.16 Analysenschritte

A.6.16.1 Aufbereitung der DNA für die qualitative PCR

In Bezug auf die Extraktion von DNA aus der Untersuchungsprobe sollten die allgemeinen in ISO 21571 [42] beschriebenen Anweisungen und Maßnahmen eingehalten werden. Es wird empfohlen, eines der im Anhang zu jener Norm beschriebenen DNA-Extraktionsverfahren auszuwählen.

A.6.16.2 PCR-Reagenzien

A.6.16.2.1 Herkömmlicher PCR-Mastermix

Der herkömmliche PCR-Mastermix für die Reaktion enthält einfach konzentrierte PCR-Pufferlösung, 200 µmol/l von jedem dNTP, jeweils 400 pmol/l des Forward und Reverse Primers und 1 IU Hot-Star-Taq-DNA-Polymerase.

A.6.16.2.2 Primer

Tabelle A.20 — Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die qualitative PCR

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids (5' nach 3')
LAT52-Primer F	A gAC CAC gAg AAC gAT ATT TgC
LAT52-Primer R	TT CTT gCC TTT TCA TAT CCAg ACA

A.6.16.3 Durchführung

Der PCR-Ansatz wurde für ein Gesamtvolumen von 30 µl je Reaktionsgemisch entwickelt. Die Verwendung von 100 ng Matrizen-DNA je Reaktionsgefäß wird empfohlen.

Der für den Versuch benötigte herkömmliche PCR-Mastermix ist aufzutauen, vorsichtig zu mischen und zu zentrifugieren. Die aufgetauten Reagenzien sind bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufzubewahren.

25 µl/Röhrchen des Mastermixes sind in 200-µl-PCR-Reaktionsröhrchen zu verteilen. Es sind jeweils 5 µl der DNA-Probenlösung, der bezüglich Tomate positiven Kontrolle, der negativen Kontrolle und der Leerwertkontrolle (H₂O) in die Reaktionsröhrchen zu geben.

Der Inhalt der PCR-Röhrchen ist vorsichtig zu mischen, die Röhrchen sind kurz in der Mikrozentrifuge zu zentrifugieren.

Die Platte ist im Gerät anzuordnen.

Die PCR ist unter den in A.6.16.5 beschriebenen Bedingungen für die Zyklen der qualitativen PCR durchzuführen.

A.6.16.4 PCR-Kontrollen

Positive und negative Zielkontrollen sollten nach ISO 24276 [44] erfolgen.

A.6.16.5 Temperatur-Zeit-Programm (PCR)

Der PCR-Assay wurde für die Anwendung in einem PCR-Thermocycler PTC-100 (MJ Research) und ABI 2720 (Applied Biosystems) optimiert. Obwohl auch andere PCR-Geräte verwendet werden dürfen, sollten die Einstellwerte des Thermocyclers verifiziert werden. Das Temperatur-Zeit-Programm ist in Tabelle A.21 angeführt.

Tabelle A.21 — Temperatur-Zeit-Programm für die qualitative PCR

Schritt	Stufe		Temperatur °C	Zeit s	Anzahl der Zyklen
1	Aktivierung/initiale Denaturierung		94	900	1
2a	Amplifikation	Denaturierung	94	30	35
2b		Annealing	56	30	
2c		Elongation	72	30	
3	Abschließende Elongation		72	420	1

A.6.16.6 Elektrophorese

Nach der PCR sind in jedes Reaktionsröhrchen 2 µl Beladungspufferlösung zu geben und mit dem PCR-Produkt zu mischen.

Das Elektrophoresegel (3 % Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) ist mit jeweils 10 µl von jedem PCR-Produkt zu beladen.

Der Gellauf ist im Elektrophoresegerät 20 min bei 5 V/cm durchzuführen.

Das Gel wird abgebildet und mit einem geeigneten bildgebenden System für die Gel-Analyse aufgezeichnet.

Aufgrund des kurzen Amplifikats sollte TBE als Pufferlösung für die Elektrophorese verwendet werden.

A.6.16.7 Annahme-/Zurückweisungskriterien

In der bezüglich Tomate positiven Kontrolle (Probe P) sollte ein Fragment von 92 bp nachgewiesen werden, in der negativen Kontrolle (Probe N) und in der Leerwertkontrolle sollte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 92 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA von LAT52 enthält und das Ergebnis „positiv“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „negativ“.

A.6.16.8 Identifizierung

Das spezifische Produkt sollte ein Fragment von 92 bp sein; das Vorliegen anderer DNA-Fragmente weist auf eine unspezifische Amplifikation hin.

A.6.17 Identifizierung der Proben

Siehe A.6.6.

A.6.18 Auswertung

Die erwartete Länge des Amplifikats von LAT52 beträgt 92 bp.

In der bezüglich Tomate positiven Kontrolle (Probe P) sollte ein Fragment von 92 bp nachgewiesen werden, in der negativen Kontrolle (Probe N) und in der Leerwertkontrolle sollte kein Zielfragment nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 92 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung

amplifizierbare DNA von *LAT52* enthält und das Ergebnis „nachgewiesen“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „nicht nachgewiesen“.

Das PCR-Produkt mit einer Länge von 92 bp kann mit DNA-Sequenzanalyse verifiziert werden.

A.6.19 Führen von Aufzeichnungen

Das Führen von Aufzeichnungen muss den Anforderungen von ISO/IEC 17025 [45] gerecht werden.

A.6.20 Berichterstattung

Die Berichterstattung muss den Anforderungen von ISO 24276 [44] und ISO/IEC 17025 [45] gerecht werden.

A.6.21 Sicherheitsvorkehrungen

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276 [44].

A.6.22 Reinhaltung/Abfallbeseitigung

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276 [44].

Anhang B (informativ)

Screening-Verfahren

B.6 Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (*Agrobacterium tumefaciens* NOS-Terminator — t-NOS)

B.6.1 Zweck, Relevanz und wissenschaftliche Grundlage

Die Untersuchung auf das Vorliegen der t-NOS-DNA-Sequenz von *Agrobacterium tumefaciens* wird üblicherweise als Screeninginstrument zum Nachweis von gentechnisch modifiziertem (GM) Pflanzenmaterial angewendet, da viele im Handel befindliche GMO-Sorten dieses Element enthalten [51]. Einer Recherche in einer öffentlichen Datenbank zufolge enthalten mindestens 43 GMO-Sorten das t-NOS-Element [52]. Ausführliche technische Angaben zum qualitativen Real-time-PCR-Verfahren für t-NOS und die Ergebnisse der Validierung mittels Ringversuch wurden veröffentlicht [53]. Am Ringversuch nahmen 24 Laboratorien aus Deutschland, Österreich und der Schweiz teil. Die Gestaltung der Studie erfolgte nach dem IUPAC-Protokoll [49] unter Verwendung von 12 DNA-Blindproben, die als Zielanalyt die t-NOS-Sequenz in zwei unterschiedlichen Konzentrationen enthielten (sechsmal 0,5 % NK603-Mais-DNA und sechsmal 0,1 % NK603-Mais-DNA), und 6 DNA-Blindproben, die die t-NOS-Zielsequenz nicht enthielten (sechsmal Nicht-GM-Mais-DNA). Die Ergebnisse des Ringversuchs für die t-NOS-Zielsequenz wurden zur Bestimmung der Falsch-positiv- und der Falsch-negativ-Rate verwendet. Außerdem wurden die Daten der Validierung der Verfahrensspezifität und der Anwendbarkeit in einem praktischen Ansatz zum Screening auf Material von GM-Kulturpflanzen veröffentlicht [54].

B.6.2 Anwendungsbereich

Das vorliegende Verfahren beschreibt eine Verfahrensweise zum Nachweis einer DNA-Sequenz aus dem Terminationsbereich des Nopal-Synthase-Gens (t-NOS) aus *Agrobacterium tumefaciens* mit qualitativer Real-time-PCR. In vielen Pflanzen wird t-NOS als regulatorisches Element eingesetzt, deshalb ist das Verfahren für ein Screening auf das Vorliegen von Material von GM-Kulturpflanzen geeignet. Es kann zur Analyse von DNA angewendet werden, die aus Lebensmitteln und auch aus anderen Produkten (z. B. Futtermitteln, Saatgut) extrahiert wurde. Die Anwendung dieses Verfahrens erfordert, dass für die Analyse eine hinreichende Menge an amplifizierbarer DNA aus der entsprechenden Matrix extrahiert werden kann.

ANMERKUNG Die t-NOS-DNA-Sequenz aus *Agrobacterium tumefaciens* kann auch in Proben nachgewiesen werden, die DNA aus diesen Bakterien, jedoch keine gentechnisch modifizierten DNA-Sequenzen enthalten. Zur Bestätigung sämtlicher positiven Ergebnisse werden deshalb Analysen unter Anwendung konstruktsspezifischer und/oder ereignisspezifischer Verfahren durchgeführt.

B.6.3 Validierungsstatus und Leistungskriterien

B.6.3.1 Robustheit des Verfahrens

Die Robustheit des Verfahrens wurde an verschiedenen Real-time-PCR-Geräten (ABI5700, ABI7700, ABI7900, ABI7500, RotorGene 3000, iCycler, LightCycler 1.2/1.5), mit verschiedenen Reaktionsvolumina (20 µl und 25 µl) und verschiedenen PCR-Reagenzien-Kits (QuantiTect Probe PCR Kit von Qiagen, LightCycler TaqMan Master Kit von Roche, TaqMan Universal Master Mix von Applied Biosystems) geprüft. Das qualitative Real-time-PCR-Verfahren für t-NOS wies bei den verschiedenen PCR-Geräten, verschiedenen Reaktionsvolumina und mit verschiedenen Reagenzien-Kits die erwartete Robustheit auf und funktionierte gut.

B.6.3.2 Versuch innerhalb eines Laboratoriums

Verschiedene DNA-Proben mit bekannten Mengen an Genom-DNA, die aus Maismehl mit 5 % NK603 extrahiert wurden, (50 ng, 12,5 ng, 3,1 ng und 0,78 ng) wurden in 6 Wiederholungen je Probe analysiert. Bei sämtlichen DNA-Konzentrationen waren in der PCR-Prüfung alle sechs Wiederholungen positiv. Bei den angeführten DNA-Konzentrationen wurden die Werte für RSD_r von 6,9 %, 8,5 %, 9,5 %, 22 % und 24,4 % und die sich daraus ergebenden Vertrauensbereiche (CI 95 %) von 7,3 %, 8,9 %, 9,9 %, 23,1 % bzw. 25,6 % bestimmt [53].

B.6.3.3 Ringversuch

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde in einem Ringversuch nach dem IUPAC-Protokoll [49] mit insgesamt 24 teilnehmenden Laboratorien geprüft [53]. Die teilnehmenden Laboratorien erhielten DNA-Proben, die entweder die t-NOS-Sequenz als Zielanalyt enthielten oder nicht. Jedes Laboratorium erhielt 18 DNA-Blindproben, die aus einem Satz von sechs Proben aus Maismehl mit 0,1 % NK603 (ERM BF-415) extrahierter DNA, einem Satz von sechs Proben aus Maismehl mit 0,5 % NK603 (ERM BF-415) extrahierter DNA und einem Satz von sechs Proben aus Nicht-GM-Maismehl extrahierter DNA bestanden. Dieser Versuchsaufbau wurde angewendet, um repräsentative Daten zu den Falsch-positiv-/Falsch-negativ-Raten zu erhalten, wie in Tabelle B.13 dargestellt. Außerdem erhielten die Teilnehmer eine positive DNA-Zielkontrolle, die aus einer DNA-Lösung von 0,5 % NK603 (20 ng/µl) bestand. Außerdem erhielten die Teilnehmer die Lösungen der Primer, die Sonde und ein handelsübliches Reagenzien-Kit (QuantiTect™ Probe PCR Kit oder das LightCycler TaqMan® Master Kit). Zwölf Laboratorien wendeten eine an Kunststoffgefäße angepasste Real-time-PCR-Ausrüstung (ABI 5700, 7700, 7500 oder 7900, RotorGene, iCycler) an und zwölf Laboratorien eine an Glaskapillaren angepasste Real-time-PCR-Ausrüstung (LightCycler 1.2/1.5). Jede Probe wurde von den Teilnehmern unter Verwendung von 5 µl der unbekannten Probe unter den in den Tabellen B.15 und B.16 beschriebenen Bedingungen in einer einzelnen PCR untersucht. Außerdem war die Amplifizierbarkeit der DNA-Proben von den Laboratorien unter Anwendung ihres entsprechenden bewährten maisspezifischen Real-time-PCR-Verfahrens für das Referenzgen zu analysieren

Zur Herstellung von DNA-Proben, die die t-NOS-DNA-Zielsequenz enthalten, wurden ZRM (IRMM, Geel) von NK603-Mais bei zwei Konzentrationen (BF-415b mit 1 g/kg und BF-415c mit 4,9 g/kg) verwendet. Zur Herstellung von t-NOS-negativen DNA-Untersuchungsproben wurde GM-negatives Maismehl verwendet, das bereits im Eignungsprüfungsprogramm von USDA/GIPSA vom April 2006 verwendet wurde (USDA/GIPSA, 2006). Die den Teilnehmern bereitgestellte positive DNA-Zielkontrolle enthielt aus ZRM mit 0,5 % NK603 (BF-415c) extrahierte DNA. Zur Extraktion der Proben-DNA wurde ein Kitsystem auf Basis der Silicagel-Membrantechnologie (NucleoSpin® Food von Macherey-Nagel GmbH, Düren) angewendet. Die Menge der extrahierten DNA wurde mit einem spektrometrischen Verfahren im UV-Bereich [42, Anhang B] gemessen und die endgültige zur Herstellung von kodierten aliquoten Anteilen der DNA-Probe verwendete DNA-Lösung wurde auf eine Konzentration von 20 ng/µl eingestellt.

Die Ergebnisse des Ringversuchs für das Real-time-PCR-Verfahren für t-NOS sind in Tabelle B.13 angeführt.

Tabelle B.13 — Ergebnisse des Ringversuchs

Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	24
Anzahl der Laboratorien nach der Eliminierung der Ausreißer	23
Anzahl der Proben je Laboratorium	18
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	414 ^a
Anzahl der t-NOS-positiven Proben	256
Anzahl der t-NOS-negativen Proben	133
Falsch positive Ergebnisse	3 ^b (2,2 %)
Falsch negative Ergebnisse	0 (0 %)
^a Die Ergebnisse von einem Laboratorium wurden ausgeschlossen, weil von diesem Laboratorium eine Kontamination mit t-NOS-DNA, die falsch positive Ergebnisse zu Folge hatte, im Untersuchungsbericht aufgeführt wurde. ^b Drei Laboratorien gaben im Untersuchungsbericht für eine der t-NOS-negativen DNA-Untersuchungsproben ein falsch positives Ergebnis an (bei einem Ct-Wert von 26,6, 38,9 bzw. 39,6). Die in diesen Laboratorien eingesetzten Real-time-PCR-Geräte waren ein ABI 5700 bzw. LightCycler 1.2.	

B.6.3.4 Molekulare Spezifität

B.6.3.4.1 Allgemeines

Zum Nachweis der t-NOS-DNA-Sequenz wird ein 84-bp-Fragment vom 3'-Endbereich des Nopalinsynthase-Gens von *Agrobacterium tumefaciens* ausgewählt und mit spezifischen Primern amplifiziert.

Ein falsch positives Ergebnis kann auftreten, weil die amplifizierte Sequenz vom *Agrobacterium* stammt, das ein natürlich vorkommendes Bodenbakterium ist. Positive Ergebnisse können das Vorliegen eines Materials aus einer GM-Pflanze anzeigen, können jedoch nicht ohne zusätzliche Bestätigung als Vorliegen ausgelegt werden. Die mögliche Kontamination des Untersuchungsguts mit *Agrobacterium* oder verwandten Bakterien sollte berücksichtigt werden.

B.6.3.4.2 Experimentell

Die aus den verfügbaren Referenzmaterialien [54] extrahierten DNA-Proben wurden analysiert und die folgenden Events bei der Real-time-PCR für t-NOS positiv geprüft:

- Sojamehl: GTS 40-3-2 (MON-Ø4Ø32-6);
- Maismehl: Event 3272 (SYN-E3272), Bt 11 (SYN-BT Ø11-1), CBH-351 (ACS-ZMØØ4-3), GA21 (MON-ØØØ21-9), MIR604 (SYN-IR6Ø4-5), MON 809 (PH-MON8Ø9-2), MON 863 (MON-ØØ863-5), MON 88017 (MON-88017-3), NK603 (MON-ØØ6Ø3-6);
- Rapsblätter: MS1 × RF1 (ACS-BNØØ4-7 × ACS-BNØØ1-4), MS8 × RF8 (ACS-BNØØ5-8 × ACS-BNØØ3-6); OXY 235 (ACS-BNØ11-5);
- Reismehl: Bt63;
- Papayafrucht: Sunup (55-1);
- Kartoffelmehl: EH92-527-1 (BPS-25271-9);
- gemahlene Baumwollsaamen: MON1445 (MON-Ø1445-2), MON531 (MON-ØØ531 6), MON15985 (MON-15985-7).

Wie erwartet führte die DNA, die aus den Referenzmaterialien [54] der folgenden Events extrahiert wurde, zu negativen Ergebnissen: 59122-Mais (DAS-59122-7), MON 810-Mais (MON-ØØ81Ø-6), T 14-Mais (ACS-ZMØØ2-1), T 25-Mais (ACS ZMØØ3 2), TC1507-Mais (DAS-Ø15Ø7-1), Laurical 23-198-Raps (CGN-89465-2), GS40/90-Raps, T45-Raps (ACS-BNØØ8-2), LL62-Reis (ACS-OSØØ2-5), LL601-Reis (BCS-OSØØ3-7), A2704-12-Sojabohnen (ACS-GMØØ5-3), A5547-127-Sojabohnen (ACS-GMØØ6-4).

B.6.3.4.3 Theoretisch

Die zur Abfrage verwendete 84-bp-Sequenz ist in der Genbank-Datenbank unter der NCBI-Eintrag-Nummer FN550390 enthalten. Die Ergebnisse der BLAST-Recherche bestätigten die vollständige Identität der Suchsequenz mit mehreren Datenbankeinträgen, die die t-NOS-Sequenz enthalten, und zeigten keine Homologie mit anderen Datenbankeinträgen auf (Datum der Recherche: 22. April 2010).

B.6.4 Kurzbeschreibung und Zusammenfassung

Ein 84-bp-DNA-Fragment aus dem Terminationsbereich des Nopalin-Synthase-Gens (t-NOS) aus *Agrobacterium tumefaciens* wird durch Real-time-PCR amplifiziert und nachgewiesen. Die angereicherten PCR-Produkte werden im Verlauf eines Zyklus (Echtzeit) mit einer für die Zielsequenz spezifischen Oligonukleotid-Sonde gemessen, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist (FAM als Reporter-Farbstoff und TAMRA als Quencher) und zwischen den beiden Primern in der DNA-Sequenz bindet (sogenannte „TaqMan®-Chemie“) [55].

B.6.5 Definitionen

Siehe ISO 5725 [43] und ISO 24276 [44].

B.6.6 Probenart und -mengen (Analyt und Matrix)

Nachstehend sind die Daten aus dem Ringversuch als Beispiele für Probenarten und -mengen angeführt, die für das vorliegende Verfahren geeignet sind.

Es wurden DNA-Proben verwendet, die aus Soja-, Mais-, Reis- und Kartoffelmehl sowie aus anderen Pflanzenmaterialien extrahiert wurden [54]. Im Ringversuch erhielten die Teilnehmer DNA-Proben, die aus Maismehl mit 0,1 % und 0,5 % (*m/m*) NK603 (ERM BF-415) und aus einem GM-negativen Maismehl extrahiert wurden [53]. Die DNA-Konzentration wurde auf 20 ng/µl eingestellt. Die Endkonzentration der je Reaktion hinzugefügten Proben-DNA sollte 200 ng nicht überschreiten.

In Bezug auf die Extraktion von DNA aus der Untersuchungsprobe sollten die in ISO 21571 beschriebenen allgemeinen Anweisungen und Maßnahmen eingehalten werden. Es wird empfohlen, eines der im Anhang zu jener Norm beschriebenen DNA-Extraktionsverfahren auszuwählen.

B.6.7 Nachweisgrenze (LOD), Anwendungsbereich

Die relative LOD des Verfahrens ist kleiner oder gleich 0,1 %, weil alle aus dem Maismehl mit 0,1 % NK603 extrahierten Proben im Ringversuch richtig nachgewiesen wurden. Die Menge an 0,1 % NK603-Mais-DNA, die von den Laboratorien in der PCR verwendet wurde, betrug 100 ng. Ausgehend von der Annahme, dass die Molekülmasse des haploiden Maisgenoms 2,72 pg [56] je Kopie beträgt und dass die t-NOS-DNA-Sequenz im heterozygoten NK603-Mais-Material in zwei Kopien vorliegt [57], wurden von sämtlichen Laboratorien bei einem mittleren Ct-Wert von $34,6 \pm 2,4$ etwa 37 Kopien nachgewiesen.

Weitere Versuche mit geringen Kopiezahlen der t-NOS-Sequenz wurde in einem Ringversuch mit 5 Laboratorien unter Anwendung verschiedener PCR-Geräte (ABI 7900, ABI 7700, LightCycler 1.4) durchgeführt und die Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen B.15 und B.16 beschrieben. Von jedem Laboratorium wurden 10 Wiederholungsbestimmungen von 100 ng DNA untersucht, die aus Nicht-GM-Mais extrahiert und mit aus NK603-Maismehl extrahierter DNA aufgestockt wurde, was 20 Kopien der t-NOS-Zielsequenz je Reaktion entsprach. In 51 von 51 Reaktionen wurden positive Ergebnisse erhalten (100 %). Außerdem wurden in einem Ringversuch unter Anwendung eines Real-time-PCR-Gerätes (ABI 7500) geringere Aufstockkonzentrationen analysiert. In 15 von 15 Reaktionen wurden 10 Kopien der

t-NOS-Zielsequenz nachgewiesen, in 13 von 15 Reaktionen 5 Kopien. Demzufolge wird geschätzt, dass die absolute LOD des Verfahrens unter Verwendung von mit NK603-Mais-DNA aufgestocker Nicht-GM-Mais-DNA im Bereich von 5 bis 10 Kopien der t-NOS-Zielsequenz liegt.

Im Allgemeinen hängt die praktische LOD des Verfahrens von der Genomgröße der taxonomischen Zielgruppe und der in der PCR verwendete Menge von Proben-DNA ab.

B.6.8 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Vergleichpräzision des Verfahrens ergibt sich aus den Ergebnissen des Ringversuchs (siehe B.6.3.3).

B.6.9 Störungen

Die Menge, Qualität und Amplifizierbarkeit der Nukleinsäure-Matrize beeinflussen das erhaltene Untersuchungsergebnis (siehe ISO 21571 [42]). Deshalb sollte die für die Analyse verwendete Nukleinsäure z. B. mit einem für die taxonomische Zielgruppe spezifischen PCR-Verfahren überprüft werden.

B.6.10 Physikalische/Umgebungsbedingungen

Siehe ISO 24276 [44] zu Einzelheiten.

B.6.11 Geräte/Ausrüstungen

- Thermocycler für Real-time-PCR, ausgestattet mit einer Energiequelle, die für die Anregung fluoreszierender Moleküle geeignet ist, und mit einem optischen Nachweissystem, das für den Nachweis der während der PCR erzeugten Fluoreszenzsignale geeignet ist;
- Reaktionsröhrchen mit Deckeln oder Verschlüssen, die ohne Beschädigung wiederholt auf 100 °C erwärmt und auf 4 °C abgekühlt werden können, und die das während des Amplifikationsprozesses erzeugte Fluoreszenzsignal nicht beeinflussen;
- UV-Spektralphotometer zur Bestimmung der DNA-Konzentration.

B.6.12 Reagenzien/Hilfsstoffe

Hinsichtlich der Qualität von Reagenzien sowie spezifischer eingesetzter Reagenzien siehe ISO 24276 [44]. Hinsichtlich spezifischer Reagenzien siehe auch B.6.16 (Analysenschritte).

B.6.13 Entnahme, Transport, Konservierung und Lagerung von Proben

DNA-Lösungen können bei 4 °C höchstens eine Woche aufbewahrt werden, für eine Langzeitlagerung sind –20 °C erforderlich. Siehe auch ISO 21571 [42].

B.6.14 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Siehe auch ISO 21571 [42].

B.6.15 Kalibrierung von Geräten

Die Geräte (z. B. Thermocycler) sollten nach ISO/IEC 17025 [45] kalibriert werden.

B.6.16 Analysenschritte

B.6.16.1 Aufbereitung von DNA-Extrakten

B.6.16.1.1 DNA-Extraktion

Die DNA wird unter Anwendung eines geeigneten Verfahrens aus der Untersuchungsprobe extrahiert [42].

B.6.16.1.2 Quantitative Bestimmung der DNA

Die quantitative Bestimmung der Menge der insgesamt extrahierten DNA durch spektrometrische Messung erfolgte nach einem in ISO 21571 (Abschnitt B.1) [42] beschriebenen Verfahren.

B.6.16.1.3 Bewertung der Unversehrtheit der DNA

Die Unversehrtheit der extrahierten DNA (Menge, Qualität und Amplifizierbarkeit) kann in einem Real-time-PCR-Versuch mit einem Verfahren bestimmt werden, das auf eine für die taxonomische Zielgruppe spezifische (endogene) Sequenz ausgerichtet ist.

B.6.16.2 PCR-Reagenzien

B.6.16.2.1 Thermostabile DNA-Polymerase, Pufferlösungen usw.

- thermostabile DNA-Polymerase für hot-start-PCR;
- PCR-Pufferlösung (enthält $MgCl_2$ und die Desoxyribonukleosid-Triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP); z. B. QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen) für Real-time-PCR unter Einsatz von Kunststoffgefäßen oder LightCycler® TaqMan® Master (Roche) für die Verwendung von Glaskapillaren.

Es können gebrauchsfertige Reagenziengemische oder einzelne Bestandteile verwendet werden. Reagenzien und Polymerasen, die zu gleichen oder besseren Ergebnissen führen, dürfen ebenfalls verwendet werden.

B.6.16.2.2 Primer

Tabelle B.14 — Oligonukleotide

Name	DNA-Sequenz der Oligonukleotide
t-NOS als Zielsequenz	
180-F	5'- CAT gTA ATg CAT gAC gTT ATT TAT g -3'
180-R	5'- TTg TTT TCT ATC gCg TAT TAA ATg T -3'
Tm-180	5'-(FAM) – ATg ggT TTT TAT gAT TAg AgT CCC gCA A - (TAMRA) –3' ^a
^a FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin	

Gleichwertige Reporter- und/oder Quencherfarbstoffe können verwendet werden.

B.6.16.3 Durchführung

Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen von 25 µl je PCR, wenn Reaktionsgefäße aus Kunststoff eingesetzt werden, und von 20 µl beim Einsatz von Glaskapillaren. Es sollten die in den Tabellen B.15 bzw. B.16 angeführten Reagenzien verwendet werden.

Tabelle B.15 — Zugabe von Reagenzien bei der Real-time-PCR unter Einsatz von Reaktionsgefäßen aus Kunststoff

Reagens	Endkonzentration	Volumen je Probe μl
2-fache PCR-Pufferlösung (einschließlich MgCl_2 , dNTP und DNA-Polymerase) ^a	1-fach	12,5
Primer 180-F, $c = 10 \mu\text{mol/l}^b$	400 nmol/l	1
Primer 180-R, $c = 10 \mu\text{mol/l}^b$	400 nmol/l	1
Sonde Tm-180, $c = 10 \mu\text{mol/l}^b$	100 nmol/l	0,25
Wasser	—	5,25
Proben-DNA	bis zu 200 ng	5
Gesamtes Reaktionsvolumen	—	25
^a Wenn QuantiTect Probe PCR-Mastermix (Qiagen) verwendet wird.		
^b Andere Arbeitskonzentrationen dürfen verwendet werden.		

Tabelle B.16 — Zugabe von Reagenzien bei der Real-time-PCR bei Einsatz von Glaskapillaren

Reagens	Endkonzentration	Volumen je Probe μl
5-fache PCR-Pufferlösung (einschließlich MgCl_2 , dNTP und DNA-Polymerase) ^a	1-fach	4
Primer 180-F, $c = 10 \mu\text{mol/l}^b$	1 $\mu\text{mol/l}$	2
Primer 180-R, $c = 10 \mu\text{mol/l}^b$	1 $\mu\text{mol/l}$	2
Sonde Tm-180, $c = 10 \mu\text{mol/l}^b$	200 nmol/l	0,4
Wasser	—	6,6
Proben-DNA	bis zu 200 ng	5
Gesamtes Reaktionsvolumen	—	20
^a Wenn LightCycler® TaqMan® Master (Roche) verwendet wird.		
^b Andere Arbeitskonzentrationen dürfen verwendet werden.		

B.6.16.4 PCR-Kontrollen

Als positive Kontrolle kann ein zertifiziertes Referenzmaterial von GTS 40-3-2 (0,1 % Sojabohnenmehl ERM BF410b) verwendet werden. Alle weiteren geeigneten Kontrollen sollten wie in ISO 24276 [44] beschrieben einbezogen werden.

B.6.16.5 Herstellung von Standards

Als Standard für die positive Kontrolle kann eine DNA-Lösung mit einer bekannten Konzentration (ng/ μl) und Kopiezahl der t-NOS-Sequenz, berechnet aus dieser Konzentration, hergestellt werden.

ANMERKUNG Wenn genomische Pflanzen-DNA als Standard-DNA verwendet wird, kann als erster Schritt die Anzahl der Genomäquivalente auf der Grundlage der Molekülmasse des entsprechenden haploiden Genoms [56] der Pflanzenart unter Anwendung folgender Gleichung berechnet werden: