

DIN EN ISO 17601:2018-08 (D)

Bodenbeschaffenheit - Ermittlung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO 17601:2016); Deutsche Fassung EN ISO 17601:2018

Inhalt	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Vorwort.....	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung.....	8
5 Prüfmaterialien.....	10
5.1 DNA	10
5.2 Bakterien	10
5.3 Plasmid	10
5.4 Enzym.....	10
5.5 Chemikalien	10
5.6 Komponenten für ein Bakterien-Nährmedium	11
5.7 Pufferlösungen und Reagenzien.....	11
6 Prüfeinrichtung.....	12
7 Durchführung	13
7.1 Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1).....	13
7.1.1 Allgemeines	13
7.1.2 Amplifikat-Design (Aufgabe 1, Schritt 1).....	13
7.1.3 Herstellung des qPCR-Standards (Aufgabe 1, Schritt 2).....	13
7.1.4 DNA aus Isolaten und Umweltproben, künstliche DNA.....	14
7.1.5 Kalibrierung der qPCR (Aufgabe 1, Schritt 3)	16
7.2 Herstellung der Boden-DNA-Matrize und Hemm-Test (Aufgabe 2).....	17
7.2.1 Allgemeines.....	17
7.2.2 Aufbereitung von Boden-DNA (Aufgabe 2, Schritt 4).....	17
7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5).....	17
7.2.4 Verdünnung der DNA-Matrize.....	19
7.3 qPCR- Analyse (Aufgabe 3).....	20
7.3.1 Allgemeines.....	20
7.3.2 qPCR.....	20
7.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4)	20
7.4.1 Allgemeines	20
7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse	20
7.4.3 Berechnung der Kopienzahl des interessierenden Gens im Boden-DNA-Extrakt.....	21
8 Kritische Schritte der qPCR-Analyse.....	22
9 Angabe der Ergebnisse der qPCR-Analyse	22
10 Internationaler Ringversuch	22
11 Prüfbericht	22

Anhang A (informativ) Beschreibung der wichtigsten Schritte einer TaqMan® qPCR-Analyse.....	24
A.1 Allgemeines.....	24
A.2 Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung (Aufgabe 1).....	24
A.2.1 Amplifikat-Design (Aufgabe 1, Schritt 1).....	24
A.2.2 Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1, Schritt 3).....	24
A.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3).....	25
A.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4).....	25
Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung einer qPCR zur	
quantitativen Bestimmung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus	
direkt aus dem Boden extrahierter DNA.....	26
B.1 Am Ringversuch beteiligte Laboratorien.....	26
B.2 Organisation des Ringversuchs.....	26
B.3 Material und Verfahren.....	27
B.3.1 Böden.....	27
B.3.2 Extraktion, Aufreinigung und quantitative Bestimmung von Boden-DNA sowie Hemm-	
Test.....	27
B.3.3 Quantitative qPCR-Analyse.....	28
B.3.4 Statistische Analysen.....	29
B.4 Ergebnisse.....	29
B.4.1 Analyse der Standardkurven für die qPCR von <i>16S-rRNA</i> und <i>nirK</i>	29
B.4.2 Wiederholpräzision von qPCR-Analysen.....	31
B.4.3 Vergleichpräzision von qPCR-Analysen.....	34
B.4.4 Vergleich der in den verschiedenen Böden quantitativ bestimmten Kopienzahlen der	
<i>16S-rRNA</i> - und <i>nirK</i> -Sequenz.....	37
B.5 Schlussfolgerungen und Empfehlungen.....	38
B.5.1 Schlussfolgerungen.....	38
B.5.2 Empfehlungen.....	39
Literaturhinweise.....	40