

Fast-Modus:

95°C	10 min	}	45 Zyklen
94°C	30 sec		
60°C	1 min		
98°C	10 min		

III.) Datenauswertung

Nach dem Lauf erfolgt eine automatische Auswertung mit dem QX200-Reader und der QuantaSoft Software (Bio-Rad). Diese automatische Auswertung wird manuell überprüft. Die Quantifizierung kann freigegeben und ausgewertet werden, wenn:

- NTCs und Positiv-Kontrollen negativ bzw. positiv sind.
- Eine Übersättigung des Systems ausgeschlossen werden kann, d.h. auch negative Droplets vorhanden sind.

Bei der Bewertung der Proben werden folgende Kriterien berücksichtigt:

- a) Homogenität der Einzelergebnisse einer Probe: übereinstimmende Kopienzahlen in den Doppelreaktionen
- b) Quantifizierungsergebnisse in der Regel auf eine Nachkommastelle runden
- c) die Bestimmungsgrenze (LOQ) ist üblicherweise 0,1 %
- d) Die Standardabweichung vom gemittelten Prozentanteil GMO/Spezies sollte in den vier Einzelergebnissen 30 % nicht übersteigen („Ausreißer“ können ggf. unberücksichtigt bleiben). Als Richtlinie für die Ergebnisdarstellung im Prüfbericht gilt eine Geräteabhängige Abweichung/Messunsicherheit von +/- 10-20 %. In Einzelfällen kann die Abweichung/Messunsicherheit größer oder kleiner berichtet werden. Die Abschätzung der Messunsicherheit erfolgt somit nur Geräte-spezifisch.

IV.) Leistungsmerkmale des Systems

Spezifität

Inklusivität und Exklusivität

Alle Reaktionen und NTCs wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Templatekonzentration für Target- und Non-Target-DNA betrug 1000 - 2000 Kopien genomische DNA/PCR-Ansatz.

DNA-Quantifizierung erfolgte vorzugsweise durch ddPCR oder über Nano-Drop Messung

Spezies/GVO	Ref-Mat.-Nr.	Kopien WT-Gerste	Kopien MT-Gerste	Rohdaten (Dateiname)
WT-Gerste	PL-1146	2.433	nd	221213-01
		2.563	nd	
MT-Gerste	PL-1147	nd	2.366	
		nd	2.330	
nonGMO-Mais	NG-0094	nd	nd	
		nd	nd	
nonGMO-Raps	NG-0436	nd	nd	
		nd	nd	
nonGMO-Soja	NG-0088	nd	nd	
		nd	nd	
		nd	nd	

Dinkel	PF-0690	nd	nd
Reis	PF-0180	nd	nd
		nd	nd
Roggen	PF-0109	nd	nd
		nd	nd
Sonnenblume	PF-0806	nd	nd
		nd	nd
Weizen	PF-0113	10	nd
		14	nd

Sensitivität und Nachweisgrenze (LOD)

20.000, 10.000, 1.000 und 100 Kopien DNA-Template/PCR-Ansatz wurden in Triplikaten und 20, 10 und 5 Kopien in 10ner-Replikaten in 100-200 ng Background-DNA (z. B. Heringssperm-DNA) unter Standardreaktionsbedingungen amplifiziert.

Spezies/GVO Kopien/PCR-Ansatz	Ref-Mat.-Nr.	Kopien Gerste WT	Kopien Gerste MT	Rohdaten (Dateiname)
20.000 K	Gerste WT	24.454	nd	221213-01
		24.973	nd	
		23.945	nd	
10.000 K		11.657	nd	
		12.585	nd	
		9.266	nd	
1.000 K		1.085	nd	
		987	nd	
		949	nd	
100 K		72	nd	
		86	nd	
		78	nd	
20 K		19	nd	
		13	nd	
		6	nd	
		10	nd	
		22	nd	
		22	1	
		29	nd	
		18	nd	
10 K	11	nd		
	13	nd		
	8	nd		
	12	nd		
	8	nd		
	9	nd		
	13	nd		
	5	nd		
	12	nd		
5 K	12	nd		
	15	nd		
	7	nd		
	5	nd		
	8	nd		
	1	nd		
	2	nd		
	4	nd		
	4	nd		
3	nd			
8	nd			
7	nd			

		4	nd	
Spezies/GVO Kopien/PCR-Ansatz	Ref-Mat.-Nr.	Kopien Gerste WT	Kopien Gerste MT	Rohdaten (Dateiname)
20.000 K	Gerste MT	nd	20.663	221213-02
		nd	20.138	
		nd	19.249	
10.000 K		nd	11.675	
		nd	11.980	
		nd	9.909	
1.000 K		nd	1.062	
		nd	1.089	
		nd	1.071	
100 K		1	101	
		nd	80	
		nd	72	
20 K		1	13	
		nd	24	
		nd	24	
		nd	23	
		nd	16	
		nd	20	
		nd	12	
		nd	22	
		nd	18	
		nd	27	
10 K		nd	9	
		nd	5	
		nd	10	
		nd	11	
		nd	11	
		1	13	
		nd	9	
		nd	17	
	nd	14		
	nd	6		
5 K	nd	1		
	nd	7		
	nd	11		
	nd	3		
	nd	4		
	nd	4		
	nd	1		
	nd	6		
	nd	3		
	nd	3		

Die Nachweisgrenzen für den WT Golden Promise DH1-6 und der *pdil5-1*-Mutante liegen jeweils bei > 5 Kopien/PCR-Ansatz (221213-01 und 221213-02).

Selektivität

Die Selektivität wurde unter asymmetrischen Bedingungen bestimmt. Dazu wurden 5 Kopien Target-DNA des 1. Systems in 5.000 Kopien Target-DNA des 2. Systems und umgekehrt in Hexa-Replikaten analysiert.

Kopien Target-DNA 1. System (Gerste MT) pro PCR-Ansatz	Kopien Target-DNA 2. System (Gerste WT) pro PCR-Ansatz	Kopien 1. System (Gerste MT)	Kopien 2. System (Gerste WT)	Rohdaten (Dateiname)
5.000 K	5 K	4780	8	221216-01
		4824	2,8	
		5068	5,6	
		5292	5,6	
		4832	3,2	
		5240	8	
5 K	5.000 K	2,8	5360	
		4,8	5320	
		5,2	5680	
		2,4	5360	
		2,2	5200	
		5,2	5240	

Robustheit

Für die Überprüfung der Robustheit wurde ein multifaktorielles Versuchsdesign mit orthogonaler Struktur gemäß folgender Tabelle gewählt:

PCR-Gerät	A				B			
System	1	2	3	4	5	6	7	8
Primer-Konzentration	uv	-30%	uv	-30%	uv	-30%	uv	-30%
Sonden-Konzentration	uv	-30%	-30%	uv	uv	-30%	-30%	uv
Mastermix-Volumen	14 µl	14 µl	16 µl	16 µl	14 µl	14 µl	16 µl	16 µl
Annealing-Temperatur	+1°C	-1°C	+1°C	-1°C	-1°C	+1°C	-1°C	+1°C

uv: unverändert

Die Messungen wurden in Triplikaten nahe der LOD (20 Kopien Target-DNA/5 µl) durchgeführt und die erhaltenen Kopie-Werte wie folgt dokumentiert:

WT Golden Promise DH1-6:

PCR-Gerät	A				B			
System	1	2	3	4	5	6	7	8
Triplikat	30	20	19	18	34	14	24	28
	16	24	14	20	18	21	24	31
	20	30	15	20	24	21	15	22
Durchschnitt	22	25	16	19	25	19	21	27
Dateiname:	221214-01 & 221215-01				221214-02 & 221215-02			

pdil5-1-Mutante:

PCR-Gerät	A				B			
System	1	2	3	4	5	6	7	8
Triplikat	27	22	23	21	16	34	17	20
	18	38	28	14	13	23	26	25
	15	25	25	20	18	23	23	22
Durchschnitt	20	28	25	18	16	27	22	22

Dateiname:	221214-01 & 221215-01	221214-02 & 221215-02
-------------------	-----------------------	-----------------------

Das System gilt als ausreichend robust, wenn auch bei veränderten Bedingungen alle Ansätze eindeutig positive Ergebnisse liefern.