

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Nachweis von Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV) mittels real-time PCR	AM026
erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, November 2009	
Status: verabschiedet	

Anhang 8.2. Real-time PCR-Nachweis von SMRV-gag-Sequenzen

Mit diesem Nachweis wird ein Abschnitt des *gag*-Gens des **Squirrel Monkey RetroVirus** (SMRV, GenBank Accession M23385) nachgewiesen. Das PCR-Produkt ist 73 bp lang (nt 1879 – nt 1951).

8.2.1 Chemikalien

PCR-Pufferlösung mit einer Hotstart-Polymerase (z.B. ABI TaqMan Universal PCR Master Mix). Der Einsatz von UNG ist optional.

8.2.2 Primer und Sonden

Name	Oligonukleotid-Sequenz 5' nach 3'	Endkonzentration in der PCR
SMRV-gaF	GGC TTA CCC CTA GTG ATT GGT TT	400 nmol/l
SMRV-gaR	GAC TTC CAA AGG ATA TTG TCC CCT	400 nmol/l
SMRV-gaS	FAM-CTT GTC TCG TGC TGC GCT GAG CG-TAMRA	100 nmol/l

PCR-Amplifikatlänge = 73 bp

8.2.3. Reaktionsansatz

Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel-PCR-Ansatz
2x Taqman Mix (enthält Puffer, dNTPs und eine Hot-Start-Polymerase)	1 x
Primer SMRV-gaF, 10 µmol/l	0,4 µmol/l
Primer SMRV-gaR, 10 µmol/l	0,4 µmol/l
Sonde SMRV-gaS, 10 µmol/l	0,1 µmol/l
steriles Reinstwasser	--
	DNA-Menge im Einzel-PCR-Ansatz
Proben- DNA (5-20 µg/ml)	optimal: 10 – 40 ng

8.2.4. Temperatur-Zeit-Programm

Temperaturschritt	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Anzahl Zyklen
UNG-Aktivierung (falls eingesetzt)	50	120	1x
Polymerase-Aktivierung	94	600	1x
Amplifikation	94	15	45x
	60	60	

8.2.5 Validierung

Der Nachweis wurde im Rahmen eines Ringversuches des Unterausschusses Methodenentwicklung der Bund/Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik validiert. Die Reaktionen wurden im Ringversuch in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Als Mengenstandard wurde ein kalibriertes Hybrid-PCR-Produkt zur Abschätzung der gemessenen Kopienzahlen eingesetzt, das aus den Amplifikaten der Nachweise der Anhänge 8.1., 8.2., und 8.3. bestand. Die ermittelten Validierungsdaten wurden im Auftrag des BVL statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind unter Punkt 7 im Hauptdokument beschrieben.