

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 8.1. Real-time PCR-Nachweis von *c-myc*-Sequenzen (Amplifikationskontrolle)

Mit diesem Verfahren wird ein Abschnitt des *c-myc*-Gens nachgewiesen. Bei *c-myc* handelt es sich um ein Gen, das eine stark konservierte Nukleotid-Sequenz aufweist, d.h. zwischen verschiedenen Spezies eine hohe Sequenzübereinstimmung zeigt. Deswegen eignet sich *c-myc* als universelles Referenzgen und somit zur Amplifikationskontrolle. Für den Nachweis wurden Primer und Sonde so konzipiert, dass sie für eine möglichst breite Palette von Spezies als Nachweis eingesetzt werden können (H. Ellerbrok, Robert Koch-Institut, unveröffentlicht). Der Nachweis ist auch als Kontrollreaktion für RNA bzw. cDNA einsetzbar. Als Beispiel für die Position der Primer wird hier das menschliche *c-myc*-Gen angeführt (Genbank Accession X00364.2). Das *c-myc*-PCR-Produkt ist 81 bp lang (nt 6987 – nt 7067).

8.1.1. Chemikalien

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

8.1.2. Primer und Sonden

Name	Oligonukleotid-Sequenz 5' nach 3'	Endkonzentration in der PCR
myc-6015F	GCC AGA GGA GGA ACG AGC T	400 nmol/l
myc-6095R	GGG CCT TTT CAT TGT TTT CCA	400 nmol/l
myc-6049S	FAM- TGC CCT GCG TGA CCA GAT CCC -TAMRA	100 nmol/l

PCR- Amplifikatlänge =81 bp

8.1.3. Reaktionsansatz

Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel-PCR-Ansatz
2x Taqman Mix (enthält Puffer, dNTPs und eine Hot-Start-Polymerase)	1 x
Primer myc-6015F, 10 µmol/l	0,4 µmol/l
Primer myc-6095R, 10 µmol/l	0,4 µmol/l
Sonde myc-6049S, 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

8.1.4. 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	

8.1.5. Validierung

Der Nachweis wurde im Rahmen eines Ringversuchs 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 7. im Hauptdokument beschrieben.