

Methodensammlung der Bund/ Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Nachweis von Fluoreszenzgen-Sequenzen in gentechnisch veränderten Zierfischen (GloFish®) mittels PCR – Screening	AM032
Erstellt vom <i>Ausschuss Methodenentwicklung</i> der LAG V01: verabschiedet August 2026	

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	2
1 Zweck und Anwendungsbereich	3
2 Begriffe	4
3 Grundlagen des Verfahrens	4
3.1 Gewinnung von Probenmaterial.....	4
3.2 Kurzbeschreibung des Untersuchungsablaufs	5
4 Prüfeinrichtungen	5
4.1 Geräte und Materialien	5
4.2 Chemikalien und Reagenzien	5
5 Durchführung	7
5.1 Allgemeines	7
5.2 Probenvorbereitung (informativ).....	8
5.2.1 Entnahme von Tupferproben („Skin Swabbing“)	8
5.2.2 DNA-Extraktion (informativ)	8
5.3 PCR.....	8
5.3.1 Reaktionsansatz	9
5.3.2 Temperatur-Zeit-Programm	9
5.3.3 Mitzuführende Kontrollen	10
5.3.4 Amplifikationskontrolle	10
5.3.5 Lagerung	10
6 Analyse	10
7 Auswertung	10
8 Übersicht zu nachgewiesenen Kombinationen von Fluoreszenzgenen	11
9 Qualitätssicherung	12
10 Zuverlässigkeit der Methode	12
10.1 Sensitivität	12
10.2 Robustheit	13
10.3 Ringversuch.....	14

10.4 Zusammenfassende Bewertung des Ringversuchs	17
11 Dokumentation	17
12 Schrifttum	17
13 Anhang (Informativ)	19
13.1 Übersicht Primerbindungsstellen	19

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide	6
Tabelle 2: Reaktionsansatz HotStarTaq®	9
Tabelle 3: Temperatur-Zeit-Programm (HotStarTaq®)	9
Tabelle 4: Kombinationen nachgewiesener Fluoreszenzgene in gv-Trauermantelsalmlern.....	11
Tabelle 5: Kombinationen nachgewiesener Fluoreszenzgene in gv-Zebrabärblingen	12
Tabelle 6: Nachweisgrenzen.....	13
Tabelle 7: Übersicht Ringversuchsproben.....	14
Tabelle 8: Verwendete Thermocycler und Elektrophorese-Apparaturen.....	15
Tabelle 9: Auswertung der Ergebnisse der Ringversuchsproben	15

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: GloFish® Trauermantelsalmler.....	3
Abbildung 2: GloFish® Zebrabärblinge	3
Abbildung 3: Tupfer-Probenahme	8
Abbildung 4: Bindungsstellen verschiedener Primer im TurboRFP und abgeleiteten TurboFP-Sequenzen	19
Abbildung 5: Alignment von DsRed2 mit DsRed 1 und abgeleiteten Fluoreszenzgenesequenzen mit Primerbindungsstellen	19

1 Zweck und Anwendungsbereich

In den USA und in Taiwan wurden gentechnisch veränderte (gv) Zierfischarten, zum Beispiel Zebraabärblinge (*Danio rerio*) oder auch verschiedene Salmmler-Arten (sogenannte Tetra-Fische, z. B. Trauermantelsalmmler (*Gymnocorymbus ternetzii*)) entwickelt, die in fluoreszierenden Farben bei Tages- oder Anregungslicht auffällig leuchten. Die unterschiedliche Färbung beruht auf der ektopischen Expression einer Bandbreite von rekombinanten Fluoreszenzgenen.

In den USA sind derartige gv-Zierfische mit dem Handelsnamen GloFish® seit mehreren Jahren zugelassen. Da in der EU bislang keine Autorisierung für das Inverkehrbringen nach Richtlinie 2001/18/EG von gv-Zierfischen beantragt und erteilt wurde, sind Verkauf und private Haltung solcher Tiere in der EU nicht zulässig¹. Dennoch gibt es in regelmäßigen Abständen Verdachtsfälle, bei denen die genannten Aquarienfische auf Handelsplattformen beziehungsweise im Privatbereich entdeckt werden.



Abbildung 1: GloFish® Trauermantelsalmmler²



Abbildung 2: GloFish® Zebraabärblinge³

Die in dieser Methode beschriebenen PCR-Verfahren zum Screening auf Fluoreszenzgene, welche in den GloFish® bislang nachgewiesen wurden, eignen sich teilweise zum gv-Screening in verschiedenen Fischarten (z. B. Nachweise GloGreen, GloYellow; modifiziert nach [1] für gv-Trauermantelsalmmler, gv-Zebraabärblinge). Teilweise können phänotypisch ähnliche Färbungen (z. B. rot/orange) in verschiedenen gv-Spezies aber auch auf Fluoreszenzgenen unterschiedlicher Spenderorganismen beruhen.

¹ https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/06_gentechnik/2025/01_Zierfische.html

² <https://aquatichouse.com.pk/product/12-mix-color-flourocent-tetra-glow-fish/>

³ <https://shop.glofish.com/products/assorted-danio-collection>

Bei Funden von gv-Zebrabärblingen aus 2025 ließ sich die orange/rote Färbung, wie schon im Jahr 2007, häufig auf *DsRed*-abgeleitete Fluoreszenzgensequenzen aus *Discosoma* sp. [2] zurückführen. Bei gv-Trauermantelsalmern beruht die rot/orangene Färbung dagegen nach aktuellem Stand auf *TurboRFP* bzw. eine pinke und blaue Färbung auf von *TurboRFP*-abgeleiteten Sequenzderivaten (*TurboFP635* bzw. *TagBFP*). Diese Fluoreszenzgene wurden mittlerweile aber auch in einigen gv-Zebrabärblingen nachgewiesen.

Die vorliegende Methode beschreibt vier qualitative PCR-Verfahren zum Screening auf bislang in gv-Zierfischen (Trauermantelsalmern, Zebrabärblinge) nachgewiesene Fluoreszenzgensequenzen sowie eine geeignete Kontroll-Amplifikation, die über Sequenzierung auch zur Spezies-Bestimmung geeignet ist.

Weiterhin wird informativ ein Probenahmeverfahren für die tierschonende Gewinnung von DNA über ein nicht-invasives Tupferverfahren beschrieben.

Inwieweit die hier angeführten Screening-PCR-Nachweise auch für andere GloFish®-Spezies geeignet sind, wird vom Grad der Sequenzhomologie zu den in o. g. Spezies verwendeten Transgenen abhängen, wurde aber im Rahmen des Ringversuchs nicht getestet.

Es wird empfohlen, unabhängig von der gv-Fischspezies (z. B. Trauermantelsalmern, Zebrabärblinge) grundsätzlich alle vier PCR-Screening-Nachweise durchzuführen, da bei der Untersuchung weiterer Funde eine starke, durch Kreuzungen hervorgerufene Durchmischung der Transgene in privaten Züchtungen festgestellt wurde und alle Fluoreszenzgene sowohl in gv-Trauermantelsalmern als auch in gv-Zebrabärblingen nachgewiesen wurden.

2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren Band VI –Gentechnik aufgeführten Begriffe und Definitionen [3].

3 Grundlagen des Verfahrens

3.1 Gewinnung von Probenmaterial

Die Probenahme und Herstellung der Untersuchungsproben über DNA-Extraktion war nicht Bestandteil des Ringversuchs, ist aber in diesem Dokument informativ aufgeführt.

Zum Nachweis von Fluoreszenzgensequenzen in lebenden gv-Zierfischen wird für die Gewinnung von DNA ein nicht-invasives und tierschonendes Probenahmeverfahren über Tupferproben der Schleimhaut empfohlen [4]. Sofern tote Fische vorliegen, kann DNA aus Muskelmasse isoliert werden.

Alternativ oder auch ergänzend (z. B. wenn der Verdacht auf Haltung von gv-Zierfischen vorliegt, aber vor-Ort keine Fische vorgefunden werden), kann Aquariumwasser und Sediment zur Isolierung von DNA (sogenannte environmental DNA; eDNA) und nachfolgender PCR-Analytik eingesetzt werden. Hier können ggf. schwache Amplifikate als Indiz auf das Vorhandensein gentechnischer Veränderung gewertet werden.

Hinweis: Bei der Untersuchung von Aquariumwasser ist zu berücksichtigen, dass der Zeitpunkt des letzten Wasserwechsels, die Leistungsstärke der Pumpe sowie das Verhältnis von Wasservolumen zu Anzahl der Fische beeinflusst, ob ausreichend isolierbare eDNA für einen erfolgreichen PCR-Nachweis vorhanden sein wird. Daher sollte ein möglichst großes Volumen Aquariumwasser beprobt und nach Ankonzentration für die DNA-Isolierung eingesetzt werden (z. B. 100 ml). Das hier genannte Verfahren der Probenahme und der Aufreinigung von Aquariumwasser war nicht Bestandteil des Ringversuchs, sondern muss bei Bedarf in-house validiert werden.

3.2 Kurzbeschreibung des Untersuchungsablaufs

Nach Extraktion der genomischen DNA aus den zu analysierenden Fischproben wird zunächst eine PCR-Amplifikationskontrolle sowie vier Screening-PCR-Analysen auf die rekombinanten Fluoreszenzgenesequenzen (siehe Tabelle 1) durchgeführt.

Die PCR-Produkte werden mit Hilfe von Gelelektrophorese oder alternativen halbautomatisierten Elektrophorese-Verfahren aufgetrennt und auf das Vorliegen von Amplifikaten mit der erwarteten Größe untersucht.

Eine Verifizierung und Spezifizierung der Amplifikate kann nachfolgend über Sanger-Sequenzierung und blastn-Auswertung (bzw. Alignment mit erwarteten Fluoreszenzgenen) erfolgen, wodurch sich die Screening-Amplifikate aufgrund von Sequenzvariationen einzelnen Fluoreszenzgenen zuordnen lassen. Alternativ können anschließend auch weitere PCRs zur Spezifizierung durchgeführt werden.

4 Prüfeinrichtungen

4.1 Geräte und Materialien

Bezüglich der Geräte und Materialien wird auf die amtliche Methode G 00.00–1 [5] verwiesen. Außer der laborüblichen Ausstattung sind nachfolgende Geräte und Materialien erforderlich.

- Sterile Wattestäbchen/Einmal-Tupfer
- Tischzentrifuge für Mikrolitergefäße mit einer Zentrifugalbeschleunigung bis 13.000 xg
- Laborheizblock mit Schüttelvorrichtung und einer Temperaturregulierbarkeit
- Thermocycler-Gerät
- Apparatur für horizontale Elektrophorese mit Netzgerät oder
- Ggf. Halb-automatisierte Elektrophorese, z. B. MultiNA, Tape Station
- Ggf. Ethidiumbromid-Färbegrad und UV-Durchlichttisch sowie entsprechende Foto- oder Video-Dokumentation

4.2 Chemikalien und Reagenzien

Hinweis: Die Validierung dieser Methode wurde mit den Geräten, Chemikalien und Materialien der angegebenen Hersteller durchgeführt. Prinzipiell können auch Produkte von anderen Herstellern verwendet werden, sofern gezeigt wurde, dass diese zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- Für die Extraktion genomischer DNA geeignete Kits, z. B. QIAamp® DNA Mini Kit, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen)
- HotStar Polymerase, z. B. HotStarTaq® DNA Polymerase (Fa. QIAGEN) oder AmpliTaq Gold™ DNA-Polymerase (Fa. applied biosystems by Thermo Fisher Scientific)
- dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 10 mM), z. B. Fa. Promega
- Oligonukleotide (siehe Tabelle 1)
- Reinstwasser, steril
- Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese bzw.
- Reagenzien für die halbautomatische Elektrophorese
- Positive Kontroll-DNA (positiv getestete Probe oder verdünntes PCR-Amplifikat), Negative Kontroll-DNA, PCR-Reagenzienkontrolle NTC (steriles Reinstwasser)

Tabelle 1: Oligonukleotide

Primer	Primersequenz 5'- 3'	bp	Nachweis	Access- Nr.	Position	Annealing- temperatur [°C]	Literatur/ Herkunft
Amplifikationskontrolle							
CytB_fish-1F	AAA AAC CAC CgT TgT TAT TCA ACT A	460	Amplifikationskontrolle Cytochrom b Oxidase für Fisch Barcode / Sequenzierung			50	[6, 7]
CytB_fish-1R	gCI CCT CAR AAT gAY ATT TgT CCT CA						
Screening auf Fluoreszenzgensequenzen							
TurboRFP-2F	CTT CAA gTg CAC ATC CgA gg	613	TurboRFP; erfasst auch Turbo FP635, FP602 und mBFP aus Seeanemone Entacmaea quadricolor; Differenzierung über Sequenzierung möglich	KF419 293	3782- 3801	57	GAA Hi, 2025
TurboRFP-2R	TTT gCT Agg gAg gTC gCA gT				3208- 3189		
mCherry-1F	CAC gAg TTC gAg ATC gAg gg	551	DsRed aus Anemone (soft coral type) Discosoma sp. und abgeleitete Fluoreszenzgene	AY640 630	1077- 1096	57	GAA Hi, 2014
DsRed-2R	TAg TCC TCg TTg Tgg gAg gT				565- 546		
GloYellow-2F	AgC Tgg CCT CCC AgT Tgg T	116	YFP (yellow fluorescent protein); abgeleitet von GFP, 90% Ähnlichkeit über 97% der Sequenz; Glofish™ yellow, maximal diskriminierend; erfasst ZsYellow1	MN38 0784	10396- 10378	57	[1] modif. als konv. PCR
GloYellow-2R	gTA ACg Tgg ACA TCA CC				10271- 10287		
GloGreen-2F	Agg Agg gCT CCC AgT TgT C	126	GFP (green fluorescent protein) aus Qualle Aequorea victoria; Glofish™	MN22 4161.1	3884- 3902	57	[1] modif. als

Primer	Primersequenz 5' - 3'	bp	Nachweis	Access- Nr.	Position	Annealing- temperatur [°C]	Literatur/ Herkunft
GloGreen-2R	gCA ACg CCg ACA TCA CC		green, maximal diskriminierend; erfasst auch ZsGreen1		4009- 3993		konv. PCR
Spezifizierung / Verifizierung von Fluoreszenzgensequenzen (Informativ)							
Turbo FP635- 1F	ggC ACC CAg ACC ATg AAg AT	315	<i>Turbo RFP</i> aus <i>Entacmaea</i> <i>quadricolor</i> ; erfasst auch Turbo FP602, TurboFP635; Differenzierung über Sequenzierung möglich	KF419 293	3742- 3761	57	GAA Hi, 2015
Turbo FP635- 1R	CTC CCA gCC gAg TgT TTT CT				3466- 3447		
mBFP-1F/	CAT gTC gTT TCT gCC TTC C	280	monomeric blue fluorescent protein aus Seeanemone <i>Entacmaea</i> <i>quadricolor</i>	KM48 6817.1	6469- 6487	53	GAA Hi 2020
mBFP-1R	gAC CTT CAT CAA CCA CAC C				6226- 6208		
ZsGreen-1F	CCA TgA AgT ACC gCA Tgg Ag	147	ZsGreen1 <i>Zoanthus</i> (Krustenanemone) fluorescent green protein; mammalian codon optimized	MN22 4161.1	4291- 4272	57	GAA Hi, 2019
ZsGreen-1R	ACA AgA TgT CCT Cgg CgA Ag				4145- 4164		
RERIO2206	ACA ACA CCg TgA AgC TgA Agg TgA CCA Ag	506	<i>DsRed1</i> und 2, Anemone (soft coral type) <i>Dicosoma</i> sp.	AY640 630	1019- 1047	64	[2]
RERIO2207	ggT gTA gTC CTC gTT gTg ggA ggT gAT gTC				571- 542		
GloYellow-2S	Sonde: 5'-(FAM)-ACg CCg TTg AAg ATg CTC TTg Tgg TAg AT-(TAMRA)-3'	116	Glofish yellow, maximal diskriminierend	MN38 0784		60	[1] ⁴
GloGreen-2S	Sonde: 5'-(FAM)-ACg CCg TAg AAC TTg gAC TCg Tgg TAC A- (TAMRA) 3'	126	Glofish green, maximal diskriminierend	MN22 4161.1		60	[1] ⁴

5 Durchführung

5.1 Allgemeines

Für die Durchführung der DNA-Extraktion und der PCR gelten die allgemeinen Hinweise und Anforderungen aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren, Band VI – Gentechnik; G 00.00-4 [8] und G 00.00-5 [9].

⁴ Zur Verifizierung der GloYellow-2F/GloYellow-2R bzw. GloGreen-2F/GloGreen-2R-PCR-Amplifikate aus der konventionellen PCR kann bei Bedarf eine Real-Time PCR mit den Primern sowie der zugehörigen Sonde GloYellow-2S bzw. GloGreen-2S angeschlossen werden. Die Primer-Sonden-Konzentration im Assay beträgt dafür 300/300/500 nMol/l. Für die Real-Time PCR muss ein geeigneter Real-Time PCR-Mastermix eingesetzt werden (z. B. Universal Mastermix (Hologic Diagenode Cat# DMML-D2-D600) [nach 1], Quantitect Multiplex Mastermix, Qiagen).

5.2 Probenvorbereitung (informativ)

5.2.1 Entnahme von Tupferproben („Skin Swabbing“)

- Einmalhandschuhe tragen
- Fisch mit kleinem Kescher aus dem Aquarium isolieren
- mit sterilem Einmaltupfer einen Schuppenabstrich aus der Schleimschicht entnehmen
 - Tupfer 4-5 x vom Kopf zur Schwanzflosse streichen
 - Tupferabstrich in 200 µl PBS-Puffer resuspendieren

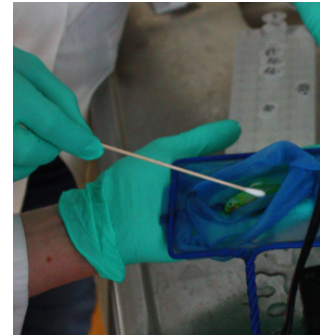


Abbildung 3: Tupfer-Probenahme

- Beprobten Fisch umgehend in das Aquarium zurücksetzen (bzw. übergangsweise in ein großes Becherglas, falls weitere Fische aus dem Aquarium beprobt werden sollen).
- Zur Kontrolle sollten zusätzlich immer mindestens 200 µl Aquariumwasser aufgearbeitet werden.

Hinweis: Im Aquariumwasser lässt sich aufgrund von Ausscheidungen der Fische teilweise auch die gentechnische Veränderung nachweisen (sehr schwache Signale). Dies ist abhängig vom Zeitpunkt des Wasserwechsels, der Anzahl der Fische im Aquarium sowie von weiteren Faktoren.

5.2.2 DNA-Extraktion (informativ)

Die genomische DNA kann manuell z. B. unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kits aus Gewebeproben toter Fische oder aus Tupferproben extrahiert werden oder auch mit einem Extraktionsroboter mit einem entsprechenden Reagenzien-Kit.

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus den in 200 µl PBS-Puffer resuspendierten Tupferproben kann mit dem QIAamp® DNA Mini Kit erfolgen und nach Aufreinigung in 100 µl Elutionspuffer eluiert werden.

Erfolgreiche Amplifikationen wurden auch mit Tupferproben erhalten, die in 50 µl 50mM NaOH aufgenommen und mit einer modifizierten HotShot gDNA – Methode nach Meeker et al 2007 [10] aufgearbeitet wurden. Dieses Extraktionsverfahren wurde im Rahmen dieser Methode nicht in-house getestet.

Da die DNA-Ausbeute aus Tupferproben (bzw. aus Wasserproben) gering ist, wird in diesem Fall auf die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration verzichtet. Die DNA wird unverdünnt in die PCR eingesetzt.

Über eine Amplifikationskontrolle (z. B. *CytB* [6, 7] oder *IFF* [2]) ist sicherzustellen, dass die isolierte DNA amplifizierbar ist. Durch nachfolgende Sequenzierung des *CytB*-fish-Amplifikates kann eine Speziesbestimmung erfolgen.

5.3 PCR

Die hier beschriebenen PCR-Verfahren wurden mit der HotStarTaq® DNA-Polymerase (Fa. Qiagen) validiert. Alternativ können DNA-Polymerasen anderer Hersteller eingesetzt werden, wenn gezeigt wird, dass sie gleichwertig oder besser sind.

5.3.1 Reaktionsansatz

Die Verfahrensbeschreibung gilt für Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 25 µl je PCR-Ansatz. Das Volumen des Reaktionsansatzes kann verändert werden, wenn gezeigt wird, dass gleichwertige oder bessere Ergebnisse erzielt werden.

Das Reaktionsgemisch wird immer als Mastermix mit den in Tabelle 2 angegebenen Reagenzien hergestellt. Der Mastermix enthält mit Ausnahme der DNA-Probe alle Einzelbestandteile des Reaktionsansatzes. Alle Reagenzien werden schonend aufgetaut, vor der Verwendung kurz zentrifugiert und während des Pipettierens auf Eis oder in einem Kühlblock gelagert. Es wird empfohlen, mindestens einen Ansatz mehr Mastermix als nötig herzustellen, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen.

Tabelle 2: Reaktionsansatz HotStarTaq®

Komponenten	Endkonzentration	PCR-Ansatz [µl]
10 x PCR-Puffer (mit MgCl ₂)	1x	2,5
1 mMol/l dNTPs	0,2 mMol/l je dNTP	5
Primer 1 (20 µMol/l)	400 nMol/l	0,5
Primer 2 (20 µMol/l)	400 nMol/l	0,5
Q-Solution	1x	2,5
HotStarTaq®-Polymerase	0,3 U	0,06
Proben-DNA bzw. Kontroll-DNA	- 20 ng	1-2
steriles Reinstwasser		ad 25 µl

- Den Mastermix gut mischen, kurz zentrifugieren und pro PCR-Ansatz 24 µl in die Reaktionsgefäße pipettieren.
- 1 µl Proben-DNA (bis zu 20 ng) zum PCR-Ansatz hinzu pipettieren; in die Kontroll-PCR-Ansätze die jeweils vorgesehenen Kontrollproben hinzugeben.
- Reaktionsansätze in den geschlossenen PCR-Gefäßen gut mischen und kurz zentrifugieren.
- Reaktionsgefäße in den Thermocycler stellen und das entsprechende Temperatur-Zeit-Programm starten (siehe Tabelle 3).

5.3.2 Temperatur-Zeit-Programm

Tabelle 3: Temperatur-Zeit-Programm (HotStarTaq®)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vorheizen	95 °C		1
Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	35
Anlagerung (Annealing)	Siehe Tabelle 1	1 min	
Verlängerung (Elongation)	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Lagerung	10 °C		1

Hinweis: Die Zykluszeiten für Denaturierung und Annealing im Amplifikationsschritt müssen abhängig vom

verwendeten Thermocycler ggf. angepasst werden.

5.3.3 Mitzuführende Kontrollen

In jeder Analysenreihe sind parallel folgende Kontrollen mitzuführen [9]:

- PCR-Reagenzienkontrolle (NTC)
- PCR-Ansatz mit Aquariumwasser (nur bei Tupferproben)
- PCR-Ansatz mit Kontroll-DNA mit Zielsequenz (Positivkontrolle)
- PCR-Ansatz mit Kontroll-DNA ohne Zielsequenz (Negativkontrolle)
- PCR-Ansatz mit negativer Extraktionskontrolle (NEK): PBS sowie Extraktionskit-Reagenzienkontrolle

5.3.4 Amplifikationskontrolle

Zur Überprüfung der Qualität und Amplifizierbarkeit der DNA wird eine Amplifikationskontrolle durchgeführt. Dazu wird die Amplifikation eines universell in Fischen vorhandenen Segmentes des mitochondrialen *Cytochrom B*-Gens empfohlen (Tabelle 1). Diese Amplifikate eignen sich mit nachfolgender Sequenzierung und blastn-Abgleich auch zur Speziesbestimmung (Barcoding) [6] [7].

Alternativ können aber auch andere Fisch-spezifische Nachweisverfahren als geeignete Amplifikationskontrollen verwendet werden, z. B. *Parvalbumin* (IFF232 Primersystem) [2].

5.3.5 Lagerung

Nach Beendigung des Temperatur-Zeit-Programmes sind die PCR-Proben bis zur weiteren Analyse gekühlt zu lagern.

6 Analyse

Die Auftrennung und Größenbestimmung der PCR-Amplifikate (z. B. 5 µl PCR + 1 µl 6x Ladepuffer) erfolgt mittels Gelelektrophorese in einem 1,5 – 2 %-Agarose-Gel unter Verwendung geeigneter DNA-Längenstandards und nachfolgender photographischer Geldokumentation. Alternativ kann auch eine Auftrennung über halbautomatische Elektrophorese erfolgen.

7 Auswertung

In positiven Proben sowie in der Positivkontrolle sollten die spezifischen Amplifikate in der erwarteten Größe nachweisbar sein. In der Negativkontrolle und der negativen Extraktionskontrolle sollten keine Amplifikate entstehen. Ein Amplifikat bei dieser Kontrolle lässt auf eine Verschleppung bzw. Kontamination von DNA oder Probenmaterial schließen. In diesem Fall ist der gesamte PCR-Ansatz zu wiederholen.

Bei unspezifischen Amplifikaten ist die Ursache zu klären, z. B. durch Sequenzierung oder durch Einsatz Spezies-spezifischer Negativkontrollen.

Zur eindeutigen Spezifizierung der rekombinanten Fluoreszenzgene kann eine Sanger-Sequenzierung der Amplifikate unter Verwendung der jeweiligen PCR-Primer angeschlossen werden. Alternativ können zur Verifizierung weitere PCR-Analysen angeschlossen werden (siehe Tabelle 1, Tabelle 4 und Tabelle 5).

8 Übersicht zu nachgewiesenen Kombinationen von Fluoreszenzgenen

In den Proben aus aktuell verfügbaren GloFish® – Funden (Stand 10/2025) wurden bei der Analyse auf gentechnische Veränderung mit den in dieser Methode dargestellten Primersystemen die in Tabelle 4 (gv-Trauermantelsalmler) und Tabelle 5 (gv-Zebrabärblinge) dargestellten Kombinationen rekombinanter Fluoreszenzgene nachgewiesen.

Für den Vollzug des Gentechnikgesetzes (GenTG) ist hinsichtlich nicht zugelassener GVO der positive PCR-Screening-Nachweis in der Regel ausreichend.

Wenn zusätzlich Aussagen über die vorliegenden Fluoreszenzgene getroffen werden sollen, wird die Sequenzierung der Amplifikate mit nachfolgender blastn-Analyse empfohlen (z. B. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> oder <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alternativ kann der Sequenzabgleich auch mit den jeweiligen Fluoreszenzgenen durchgeführt werden.

Ergänzend können zur Spezifizierung auch weitere PCR-Analysen durchgeführt werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 4: Kombinationen nachgewiesener Fluoreszenzgene in gv-Trauermantelsalmlern

PCR	Probe	Phänotyp	gelb/gelb-grün / grün	grün / grün-gelb	blau	orange	orange	pink	weiß/ rosa
		Anzahl Fische getestet	7 (NI, NRW, TH)	6 (NI,NRW)	2 (NI, NRW)	3 (NI)	6 (NRW, HE)	5 (NI, NRW)	2 (NI)
Screening -Nachweise									
TurboRFP-2F/ TurboRFP-2R	Screening (+ Seq spezifisch)	-	+	+	+	+	+	-	
mCherry-1F / DsRed-2R	Screening (+ Seq spezifisch)	-	-	-	-	-	-	-	
GloGreen-2F/ GloGreen-2R	Screening (+ Seq spezifisch)	+	+	-	-	-	-	-	
GloYellow-1F/ GloYellow-1R	Screening (+ Seq spezifisch)	-	-	-	-	+	-	-	
weitere Nachweise zur Verifizierung / Spezifizierung									
Turbo FP635-1F/ Turbo FP635-1R	Spezifisch + Seq	-	-	-	+	+	+	-	
mBFP-1F/ mBFP-1R	Spezifisch	-	+	+	-	-	-	-	
ZsGreen-1F/ ZsGreen-1R	Spezifisch	+	+	-	-	-	-	-	
Nachgewiesene Fluoreszenzgene									
Fluoreszenz-Gen 1 / Herkunft		ZsGreen1	ZsGreen1	TagBFP / mTagBFP	TurboRFP	TurboRFP	Turbo FP635	./.	
		Zoanthus sp.	Zoanthus sp.	Entacmaea quadricolor	Entacmaea quadricolor	Entacmaea quadricolor	Entacmaea quadricolor		
Fluoreszenz-Gen 2 / Herkunft			TagBFP /mTagBFP			ZsYellow1			
			Entacmaea quadricolor						

Tabelle 5: Kombinationen nachgewiesener Fluoreszenzgene in gv-Zebrabärblingen

PCR Probe	Phänotyp	orange - dunkel	rot	lila	orange-grün/ grün	orange - hell
	Anzahl Fische getestet	3 (TH, HE)	2 (TH)	1 (HE)	2 (HE)	2 (TH)
PCR-Screening-Nachweise						
TurboRFP-2F/ TurboRFP-2R	Screening (+ Seq spezifisch)	-	-	+	-	-
mCherry-1F / DsRed-2R	Screening (+ Seq spezifisch)	+	+	-	+	-
GloGreen-2F/ GloGreen-2R	Screening (+ Seq spezifisch)	-	-	-	+	-
GloYellow-1F/ GloYellow-1R	Screening (+ Seq spezifisch)	+	-	-	-	+
weitere PCR-Nachweise zur Verifizierung / Spezifizierung						
RERIO 2206/ RERIO 2207	Spezifisch + Seq	+	+			-
Nachgewiesene Fluoreszenzgene						
Fluoreszenz-Gen 1 / Herkunft	DsRed2	DsRed	TagBFP	ZsGreen1	ZsYellow1	
	<i>Discosoma sp.</i>	<i>Discosoma sp.</i>	<i>Entacmaea quadricolor</i>	<i>Zoanthus sp.</i>		
Fluoreszenz-Gen 2 / Herkunft	ZsYellow1			DsRed/ DsRed2		
				<i>Discosoma sp.</i>		

9 Qualitätssicherung

Die Qualitätssicherung geschieht anhand der in der PCR mitgeführten Kontrollen. Wenn die Kontrollen nicht die erwarteten Fragmente liefern, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung, nach Durchführung geeigneter Maßnahmen wiederholt werden.

10 Zuverlässigkeit der Methode

Die Primersysteme, die größtenteils schon seit Jahren routinemäßig in der Überwachung gentechnischer Anlagen Verwendung finden, wurden erfolgreich in-house validiert (GAA Hildesheim, NI) und für die Analyse von verschiedenfarbigen gv-Zierfischen eingesetzt (gv-Trauermantelsalmmler: gelb, grün, blau, orange und pink; gv-Zebrabärbling: dunkel-orange, rot, lila, grün, hell-orange, siehe Tabelle 4 und Tabelle 5). Die Amplifikate ließen sich über Sequenzierung eindeutig bekannten Fluoreszenzgenen zuordnen.

10.1 Sensitivität

In der in-house Validierung wurden die Nachweisgrenzen näherungsweise für die entsprechenden Primerpaare an Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA (10ng/μl bis 1 ag/μl) bzw. genomischer Fisch-DNA (10ng/μl bis 1 pg/μl) bestimmt.

Tabelle 6: Nachweisgrenzen

Primer	Verwendete DNA-Polymerase	Template/ Größe bp	Nachweisgrenze/ PCR*	Kopienzahl**
TurboRFP-2F/TurboRFP-2R	HotStarTaq DNA Polymerase	Plasmid 8810 bp	100 ag (12+/12) 50 ag (6+/12)	10
mCherry-1F/Ds-Red-2R	HotStarTaq DNA Polymerase	Plasmid 6018 bp	50 ag (12+/12)	8
GloYellow-2F/GloYellow-2R	HotStarTaq DNA Polymerase	Genomische DNA Zebrafisch 1,41E+09 bp	20 pg (12+/12) 10 pg (2+/12)	13
GloGreen-2F/GloGreen-2R	HotStarTaq DNA Polymerase	Genomische DNA Trauermantelsalm 1,82E+09 bp	200 pg (12+/12) 100 pg (7+/12)	100

* Anzahl positive PCRs bei 12 Parallelen

** Kopienzahl bezogen auf Template-Größe in bp (bei 12 positiven Parallelen)

Bei Verwendung von AmpliTaq Gold™ DNA-Polymerase (applied biosystems by Thermo Fisher Scientific) ist die für das Primerpaar TurboRFP-2F/TurboRFP-2R ermittelte Nachweisgrenze etwa um den Faktor 10 niedriger, aber für die Analyse von gv-Fischmaterial mit einem GVO-Anteil von 100% ebenfalls geeignet.

10.2 Robustheit

Die vier PCR-Nachweise sowie die Amplifikationskontrolle (CytB-fish) wurden in-house mit fünf verschiedenen Hot Start DNA-Polymerasen getestet:

HotStarTaq® DNA Polymerase (Fa. Qiagen), AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (applied biosystems by Thermo Fisher Scientific), OneTaq® Hot Start DNA Polymerase (Fa. NEB), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Fa. NEB) und Platinum™ II Taq Hot-Start DNA Polymerase (Fa. Invitrogen by ThermoFisher Scientific).

Alle vier PCR-Screening-Nachweise sowie die PCR-Amplifikationskontrolle CytB-fish lieferten mit der HotStarTaq® DNA Polymerase sehr gute Ergebnisse; die AmpliTaq™ Gold DNA lieferte in den vier Transgennachweisen und der Amplifikationskontrolle ebenfalls gute Amplifikate.

Mit Platinum™ II Taq Hot-Start DNA Polymerase wurden ebenfalls in allen PCR-Nachweisen eindeutige Amplifikate erhalten, allerdings waren bei dem GloGreen-Nachweis in negativen Proben einige unspezifische, größere Banden zu beobachten (die jedoch keinen Einfluss auf die Bewertung hatten).

Im GloGreen – Nachweis traten insbesondere mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, aber auch mit OneTaq® Hot Start DNA Polymerase neben dem erwarteten Signal zahlreiche unspezifische Signale auf. Die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase war auch im GloYellow-Nachweis nicht optimal und für den CytB-fish-Nachweis nicht geeignet.

Die beiden PCR-Nachweise mit den Primerpaaren TurboRFP-2F/TurboRFP-2R und mCherry-1F/Ds-Red-2R lieferten mit allen getesteten Polymerasen gute Ergebnisse.

10.3 Ringversuch

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde in einem vom Ausschuss Methodenentwicklung der Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik koordinierten Ringversuch, an dem insgesamt 11 Laboratorien teilnahmen, geprüft.

Eine Übersicht über die im Ringversuch getesteten Probenmaterialien ist in Tabelle 7 dargestellt. Es wurden Proben der beiden Spezies gv-Zebrabärbling und gv-Trauermantelsalmmler untersucht. Das Material stammte aus entsprechenden Funden aus der Überwachung (NI, NRW, TH). Neben sechs Proben, bei denen die DNA-Extrakte aus Gewebe von toten Fischen hergestellt und auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt wurden, wurden zwei DNA-Extrakte aus Tupferproben der Fischhaut als Proben bereitgestellt. Die DNA-Extrakte aus Tupferproben wurden in ihrer Konzentration nicht eingestellt (d. h. sie lagen bei <1ng/ µl).

Die Herstellung der DNA-Extrakte erfolgte für die Proben 1, 3, 5 und 7 mit dem Maxwell 16 unter Verwendung des FFS Nucleic Acid Extraktion Kits (Promega, Custom X9431/NRW), für die Proben 2 und 6 mit dem DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen/TH) und für die Proben 4 und 8 mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen/NI).

Tabelle 7: Übersicht Ringversuchsproben

RV-Probe	*Fischspezies	Phänotyp	Matrix	Nachgewiesenes Fluoreszenzgen 1	Nachgewiesenes Fluoreszenzgen 2
1	Trauermantelsalmmler	Grün-Blau	Gewebe	TagBFP	ZsGreen1
2	Zebrabärbling	rot	Gewebe	DsRed1	
3	Trauermantelsalmmler	orange	Gewebe	ZsYellow1	TurboRFP
4	Trauermantelsalmmler	Grün-Blau	Swab	ZsGreen1	TagBFP
5	Trauermantelsalmmler	Lila	Gewebe	TurboFP635	
6	Zebrabärbling	orange - dunkel	Gewebe	DsRed2	ZsYellow1
7	Trauermantelsalmmler	orange	Gewebe	ZsYellow1	TurboRFP
8	Trauermantelsalmmler	Blau	Swab	TagBFP	

* Trauermantelsalmmler (*Gymnocorymbus ternetzii*) bzw. Zebrabärbling (*Danio rerio*)

Die Teilnehmenden erhielten acht kodierte Gefäße mit DNA-Lösungen (je 20 µl bei DNA aus Gewebe bzw. 15 µl bei DNA aus Tupferproben) als Untersuchungsproben und für jeden der vier Nachweise eine Positivkontrolle ((15 µl; PK1 und PK2 eingestellt auf 2 ng/µl (Plasmide); PK3 und PK4 eingestellt auf 10 ng/µl (Fisch-DNA)).

Zur Durchführung der vier Screening-PCR-Nachweise sowie der Amplifikationskontrolle wurden den Teilnehmenden die zehn Oligonukleotide als fertige Arbeitslösung 20 µMol/l zur Verfügung gestellt (30 µl). Die für die konventionellen PCR-Nachweise einzusetzende HotStarTaq® Polymerase (Qiagen) sowie die Nukleotide musste von den Laboren selbst beschafft werden.

Die Durchführung der vier konventionellen Screening-PCR-Analysen und deren elektrophoretische Auftrennung war verbindlich vorgeschrieben. Die Durchführung der Amplifikationskontrolle und Sanger-Sequenzierung war den teilnehmenden Laboren freigestellt.

Die Proben waren in jedem PCR-Nachweis als Einfachbestimmung zu untersuchen.

Im Ringversuch wurden von den 11 teilnehmenden Laboren die in Tabelle 8 aufgelisteten Geräte eingesetzt.

Tabelle 8: Verwendete Thermocycler und Elektrophorese-Apparaturen

Labor	Thermocycler	Elektrophorese
1	T-One, TRIO 48, Biometra	2% Agarose-Gele; 1xTAE-Puffer; 250 mA; Laufzeit: 45 min.
2	Eppendorf Gradientencycler	Agarosegele
3	Opus CFX96	Fragmentanalyser (Agilent)
4	ProFlex PCR (Thermo)	Agarosegele/BioDoc Analyse
5	Bio Rad C1000 Touch/Bio Rad PTC Tempo Thermal Cycler	Invitrogen E-Gel Power Snap
6	TRIO 48, Biometra	4150 Tape Station (Agilent)
7	SensoQ 3/Sensoquest	Agarosegele 2%, 80V, 95 Min.
8	Eppendorf Mastercycler nexus gradient eco IV	Agarosegele; Biometra Compact XS/S 3 % Agarosegel; 60 V Spannung; 1,5 h Laufzeit
9	Veriti 96 well (Thermo)	Agarosegele
10	ABI 7500 real-time System	Agarosegele, OWL A3-1 Thermo
11	TRIO 48, Biometra	MultiNA (Fa. Shimadzu), Tape Station 4200 (Agilent)

Falsch-Positiv-Rate / Falsch-Negativ-Rate

Die Ergebnisse des Ringversuchs mit Angaben zu den Falsch-Positiv- bzw. Falsch-Negativ-Raten sind in Tabelle 9 dargestellt. Alle Resultate der 11 teilnehmenden Labore für die in den vier PCR-Nachweisen positiven und negativen Proben (insgesamt 352 PCR-Ergebnisse) konnten für die Auswertung herangezogen werden. Es wurden keine falsch-positiven und keine falsch-negativen Ergebnisse abgegeben.

Tabelle 9: Auswertung der Ergebnisse der Ringversuchsproben

Parameter	Wert
Anzahl teilnehmender Labore	11
Anzahl Laboratorien, die PCR-Ergebnisse vorgelegt haben	11
Anzahl Laboratorien mit PCR-Ergebnissen, die in die Auswertung einbezogen wurden	11
Anzahl der Proben je Labor	8
Anzahl der angenommenen PCR-Ergebnisse (PCR 1 – PCR 4 insgesamt)	352
PCR 1 – TurboRFP-2F/TurboRFP-2R - Screening auf TurboRFP und abgeleitete Sequenzen	
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die TurboRFP als Zielsequenz enthielten	66
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die TurboRFP Zielsequenz nicht enthielten	22
Anzahl falsch-positiver PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)
Anzahl falsch-negativer PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)
PCR 2 – mCherry-1F/Ds-Red-2R - Screening auf DsRed und abgeleitete Sequenzen	
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die DsRed als Zielsequenz enthielten	22
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die DsRed Zielsequenz nicht enthielten	66
Anzahl falsch-positiver PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)
Anzahl falsch-negativer PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)

Parameter	Wert
PCR 3 – GloYellow-2F/GloYellow-2R - Screening auf GloYellow	
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die GloYellow als Zielsequenz enthielten	33
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die GloYellow als Zielsequenz nicht enthielten	55
Anzahl falsch-positiver PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)
Anzahl falsch-negativer PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)
PCR 4 – GloGreen-2F/GloGreen-2R - Screening auf GloGreen (ZsGreen1)	
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die GloGreen als Zielsequenz enthielten	22
Anzahl der PCR-Ergebnisse für Proben, die GloGreen als Zielsequenz nicht enthielten	66
Anzahl falsch-positiver PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)
Anzahl falsch-negativer PCR-Ergebnisse (Rate in Prozent)	0 (0 %)

Anmerkungen:**Ad PCR 3:**

In der Probe P2 traten in 2 Laboren extrem schwache Amplifikate auf, die aber vor dem Hintergrund der Amplifikationskontrolle und 100 % GVO-Material negativ und damit richtig bewertet wurden.

Ad PCR4:

In Probe P8 (Tupfer) traten in 6 Laboren extrem schwache Amplifikate auf, die aber vor dem Hintergrund der Amplifikationskontrolle und dem vorliegenden 100 % GVO-Material negativ zu bewerten waren. Da es sich um DNA aus einer Tupferprobe handelt, könnte es sich möglicherweise um minimale Hintergrundkontamination von Aquariumwasser handeln.

In den beiden gv-Zebrabärbling Proben P2 und P6 wurden auch von 1 bzw. 2 Laboren sehr schwache Signale detektiert, die ebenfalls richtig negativ bewertet wurden.

Amplifikationskontrolle (optional)

Die Amplifikationskontrolle wurden von acht Laboren für alle acht Proben durchgeführt und 63 von 64 Proben waren amplifizierbar. Die Amplifikate der Proben aus gv-Zebrabärblingen waren durchweg schwächer als bei den Proben aus gv-Trauermantelsalmeln. Auch bei der einen falsch-negativen Probe handelte es sich um gv-Zebrabärbling.

Sanger-Sequenzierung von PCR-Amplifikaten (optional)

Vier teilnehmende Labore führten eine Sequenzierung aller bzw. einiger Amplifikate durch und erreichten damit eine Verifizierung sowie Spezifizierung der PCR-Screening – Amplifikate.

Die Labore 1, 2 und 5 und 11 verifizierten und spezifizierten die TurboRFP-Amplifikate und konnten damit eine korrekte Zuordnung der Proben zu den verschiedenen Fluoreszenz-Referenzgenen ableiten:

TurboRFP Proben P3, P7

TurboFP635 Probe P5

TagBFP Proben P1, P4, P8

Die Labore 1, 2, 5, 9 und 11 verifizierten und spezifizierten die mCherry-1F/DsRed-2R -Amplifikate und konnten damit eine korrekte Zuordnung der Proben zu den verschiedenen Fluoreszenz-Referenzgenen ableiten:

DsRed1 Probe P2

DsRed2 Probe P6

Die Labore 2, 5, 9 und 11 sequenzierten die GloYellow-2F/-2R Amplifikate und konnten damit eine Spezifizierung erreichen:

ZsYellow1 Proben P3, P6

Die Labore 2, 5, 9 und 11 sequenzierten die GloGreen-2F/-2R Amplifikate und konnten damit eine Spezifizierung erreichen

ZsGreen1 Proben P1, P4, (P8)

10.4 Zusammenfassende Bewertung des Ringversuchs

Die im Ringversuch getesteten konventionellen PCR-Nachweise sind zum Screening von GloFish-Proben geeignet. Dies gilt für die PCR 1, 2 und 3 uneingeschränkt. Für PCR 4 gilt die Eignung mit Einschränkungen, da teilweise unspezifische Zusatzbanden auftreten können. Daher sollten bei diesem Nachweis bei schwachen Amplifikaten zur Verifizierung ggf. weitere PCRs durchgeführt werden (z. B. ZsGreen oder der PCR-Nachweis als Real-Time PCR mit zusätzlicher GloGreen Sonde).

11 Dokumentation

Die Ergebnisse der durchgeführten PCR-Reaktionen sind Bestandteil des Prüfberichtes. Allgemeine Hinweise und Anforderungen an den Untersuchungsbericht sind in der amtlichen Methode G 00.00-1 [5] angegeben.

12 Schrifttum

- [1] F. Debode, A. Marien, Q. Ledoux, E. Janssen, C. Ancion, and G. Berben, "Detection of ornamental transgenic fish by real-time PCR and fluorescence microscopy," (in eng), *Transgenic Res*, vol. 29, no. 3, pp. 283–294, Jun 2020, doi: 10.1007/s11248-020-00197-9.
- [2] H. Rehbein and J. Bogerd, "Identification of genetically modified Zebrafish (*Danio rerio*) by Protein- and DNA-Analysis," vol. 2, ed. J. Verbr. Lebensm., 2007, pp. 122–125.
- [3] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-2: Probenahme- und Untersuchungsverfahren für die Überwachung nach dem Gentechnikrecht - Begriffe und Definitionen - 2024-06.
- [4] C. Breacker, I. Barber, W. H. Norton, J. R. McDermid, and C. A. Tilley, "A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish," (in eng), *Zebrafish*, vol. 14, no. 1, pp. 35–41, Feb 2017, doi: 10.1089/zeb.2016.1348.
- [5] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-1: Probenahme- und Untersuchungsverfahren für die Überwachung nach dem Gentechnikrecht - Allgemeine Hinweise und Anforderungen - 2010-08.
- [6] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, L10.00-26: DNS-Barcoding von Fisch und Fischprodukten anhand definierter mitochondrialer Cytochrom-b und

- Cytochrom-c-Oxidase!-Genabschnitte. (Übernahme Norm DIN EN ISO 17174, Dezember 2024). 2025-04.
- [7] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB DNS-Barcoding zur Fischartenidentifizierung in Fisch und Fischerzeugnissen anhand definierter mitochondrialer Cytochrom-b und Cytochrom-c-Oxidase-Genabschnitte. L10.00-12 (Übernahme Norm DIN CEN/TS 17303, Juni 2019). 2021-07.
- [8] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-4: Verfahren zur Nukleinsäureextraktion - Allgemeine Hinweise und Anforderungen -. 2010-08
- [9] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-5: Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - Allgemeine Hinweise und Anforderungen -. 2009-09.
- [10] N. D. Meeker, S. A. Hutchinson, L. Ho, and N. S. Trede, "Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues," (in eng), Biotechniques, vol. 43, no. 5, pp. 610, 612, 614, Nov 2007, doi: 10.2144/000112619.

13 Anhang (Informativ)

13.1 Übersicht Primerbindungsstellen

Nachfolgend ist für die verschiedenen *TurboFP*-Primer⁵ die Position der Primerbindung im *TurboRFP* sowie abgeleiteten *TurboFP*-Sequenzen dargestellt.

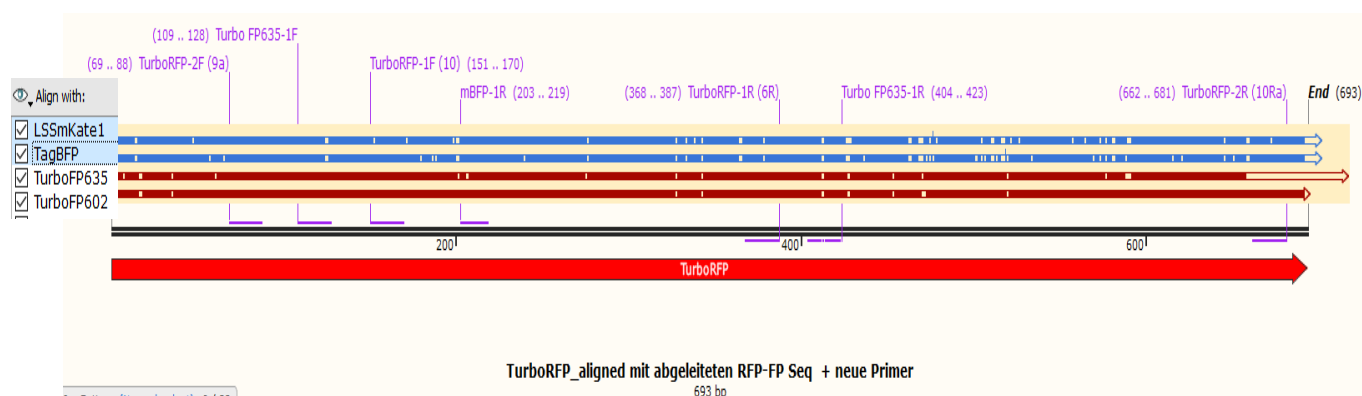


Abbildung 4: Bindungsstellen verschiedener Primer im TurboRFP und abgeleiteten TurboFP-Sequenzen

In der folgenden Abbildung sind *DsRed* und davon abgeleitete Fluoreszenzgene gegeneinander abgeglichen und die Primerbindungsstellen der verschiedenen Primer⁵ dargestellt.

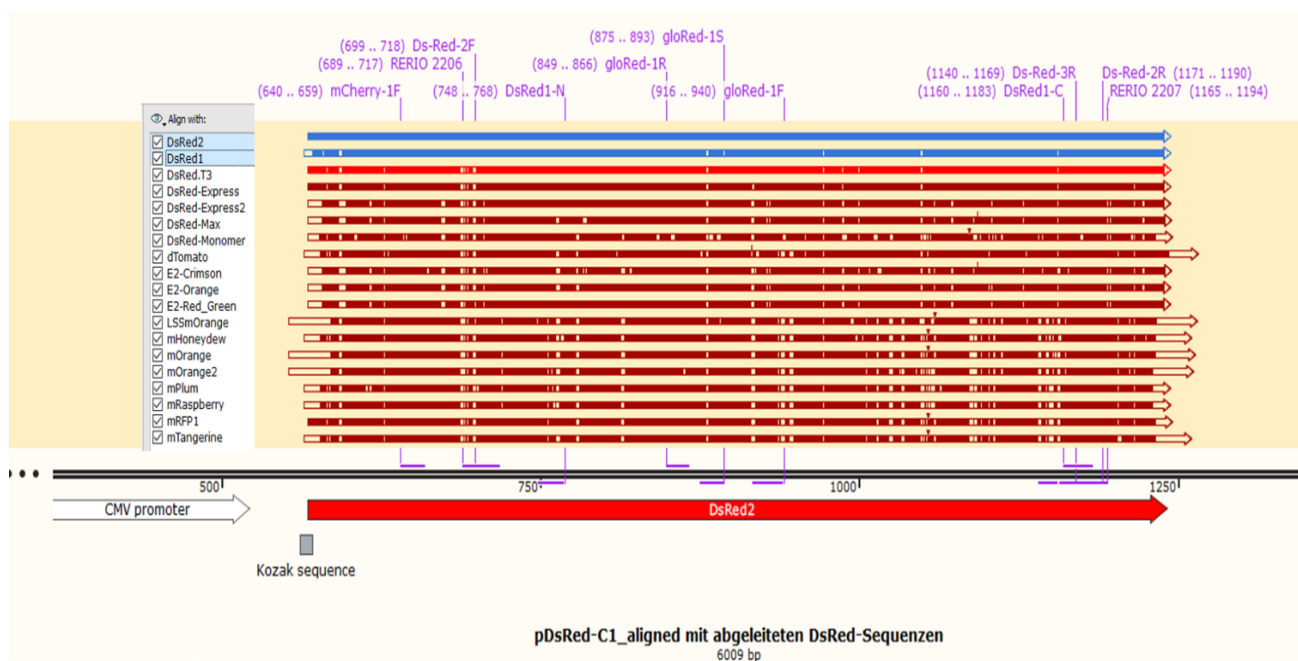


Abbildung 5: Alignment von DsRed2 mit DsRed 1 und abgeleiteten Fluoreszenzgenesequenzen mit Primerbindungsstellen

⁵ Primersequenzen von Primern, die in dieser Methode nicht verwendet wurden, können der **LAG-Primertabelle** entnommen werden.
<https://lag-gentechnik.de/ausschuss-methodenentwicklung>