

# Multiplex-real time PCR für das GVO-Screening

---

Hans-Ulrich Waiblinger

GDCh-Seminar „Aktuelle Trends der Real-time PCR in der  
Lebensmittelanalytik, 25.-26.11.2010

# Allgemeine Bemerkungen – Optimierung einer Duplex-PCR für das GVO-Screening

- Ziel: Vergleichbare Effizienzen für beide Targets

$$Y = x (1+E)^n$$

mit

- E = PCR-Effizienz
- x = ursprüngliche Zahl der Targets (Kopien)
- y = Zahl der Targets im Zyklus n

- $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$

slope = Steigung Kalibrierfunktion

slope	Effizienz (%)
3,32	100
3,0	115
3,5	93
4,0	78

# Optimierung einer GVO-Screening-Duplex-PCR

---

## GVO-Screening:

Sensitivität möglichst ca. 10 Kopien = ca. 0,02 % GVO  
(50.000 cp Referenz-Gen)

## Parameter („Rohdaten“)

- möglichst niedrige  $C_T$ -Werte
- möglichst starke Anstiege der Fluoreszenz ( $\Delta R_n$ ).

# Parameter für Optimierung GVO-Screening-Duplex-PCR

---

- Primerkonzentration (ca. 100 –1000 nM)
- Probe Konzentration (ca. 50 –300 nM)
- Polymerasekonzentration
- $\text{MgCl}_2$ , Nukleotide, Puffer Zusammensetzung...

Kosten-Beispiele	Preis Real-time PCR-Mastermix/25 µl
Singleplex-PCR	Ca. 1 €
Multiplex-PCR	Ca. 1,50 €
Polymerase, 1U	ca. 0,50 ct

# Optimierung einer GVO-Screening-Duplex-PCR

---

## Strategie:

- Verwendung von „Singleplex-validierten“ Primer-Probe Systemen
- Limitierung des Primers des effizienteren/robusteren Systems
- bei Target Überschuss (z.B. Referenz Gen):  
Primer-Limitierung dieses Systems
- Optimierung der Sondenkonzentration  
( $\Delta R_n$  möglichst  $> 1,0$  für höhere Sensitivität)
- Möglichst Mastermixes für single PCR einsetzen
- Verwendung von Sonden mit Dark-Quenchern  
(geringere Hintergrundfluoreszenz, größeres  $\Delta R_n$ )

# in-house Validierung von PCR-Systemen, generelle Anmerkungen

---

## 1) Kalibrierung mit Verdünnungsreihen aus genomischer DNA (z.B. 5 % Bt11-Mais); i.d.R. 5 Replika

- $C_T$ -Werte ( $\bar{x}$ , StdDev)
- Regression 1. Grades (log cp /  $C_T$ -Werte):  
slope / Korrelationskoeffizient
- Präzisionsdaten der Konzentrationsniveaus (cp):

Vertrauensbereich<sub>(rel., 95%)</sub> = Mittel  $\pm$  u / Mittel

mit Messunsicherheit u =  $\frac{s * t}{\sqrt{n}}$

x = Mittelwert Kopienzahl

s = StdDev Kopien

t = t- oder Studentfaktor (Tabellenwert), n=5:

(P = 95%): t = 2,776

n = Zahl der Replika (n = 5)

# in-house Validierung of PCR-Systeme, generelle Anmerkungen

---

LOD and LOQ, aus Präzisions-Daten:

LOD:  $CI_{(rel., 95\%)} < ca. \pm 50 \%$

LOQ:  $CI_{(rel., 95\%)} < ca. 30\%$

# in-house Validierung der PCR-Systeme, generelle Anmerkungen

---

- 2) Validierung mit Referenz Materialien (Mix):  
z.B. für semi-quantitative Methoden
  - *Quantifizierung:*  
DNA-Extraktion aus verschiedenen Niveaus (mind. 3 Replika);  
jeweils: Ratio bestimmen:  
Transgen-spezifische DNA (cp) / Spezies-spezifische DNA (cp)
  - LOD, LOQ, „Wiederfindung“



# in-house Validierung der PCR-Systeme, generelle Anmerkungen

---

## 3) Validierung mit DNA-Mischungen:

v.a. Bewertung von kompetitiven oder Matrix Effecten beim Screening

- Mischung von geringen Kopienzahlen der transgenen Zielsequenz in Hintergrund-DNA (z.B. 10 cp Bt11-DNA in 50.000 cp Mais-DNA)
- jeweils: Transgen-spezifische DNA (cp)
- LOD, LOQ

# Optimierung P35S / T-nos- Screening Primer-Sonden

- CaMV 35S Promotor (P35S): 82 bp (s. ISO 21570:2005)
- nos-Terminationssequenz aus *A. tumefaciens* (T-nos): 84 bp;  
s. § 64 L00.00-116 (12/2007)

## **PCR-Primer**

35S-FTM	5'- gCC TCT gCC gAC AgT ggT -3'
35S-RTM	5'- AAg ACg Tgg TTg gAA CgT CTT C -3'
180-F	5'- CATgTAATgCATgACgTTATTTATg-3'
180-R	5'- TTgTTTTCTATCgCgTATTAAATgT-3'

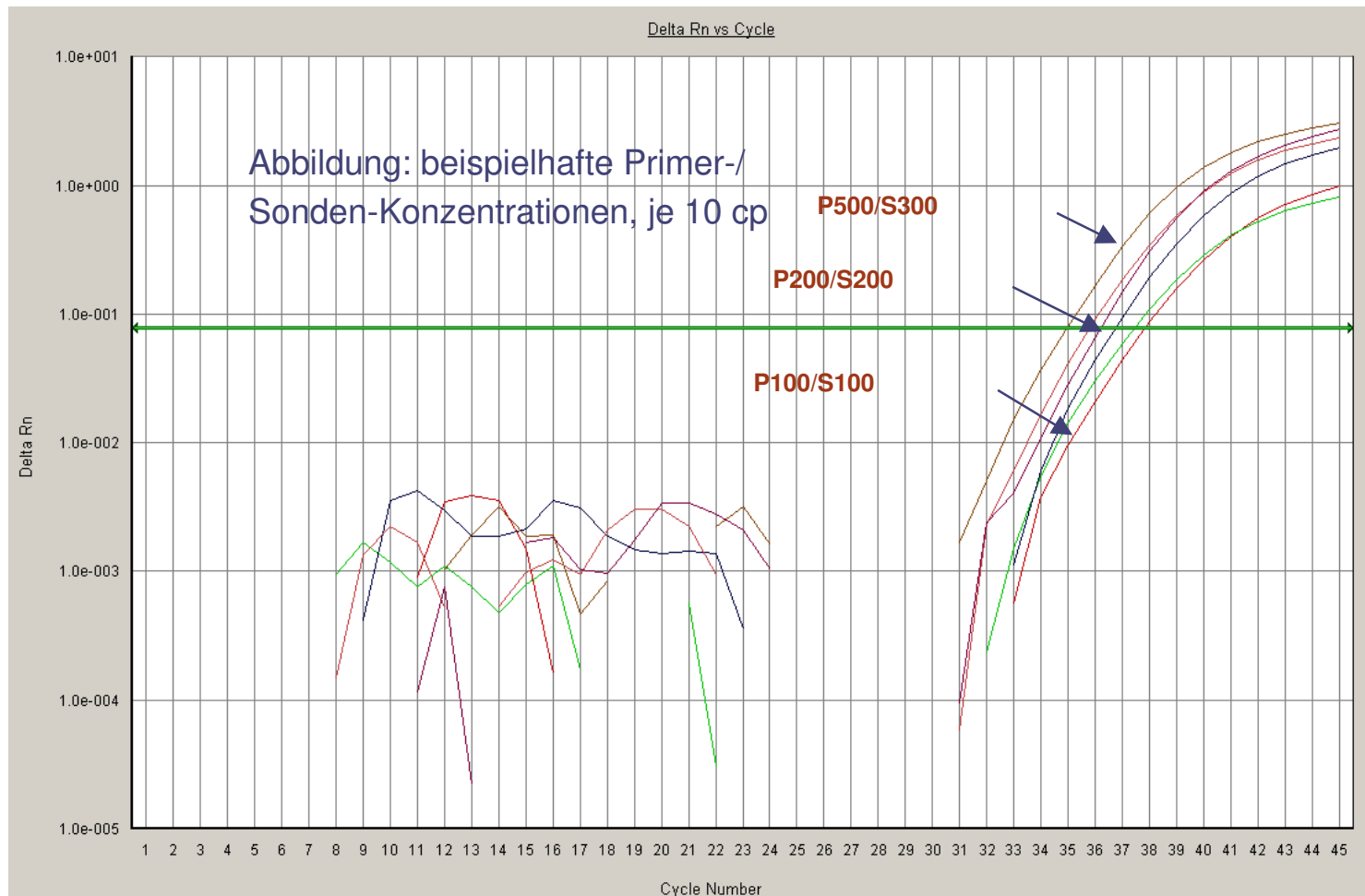
## **Sonden**

35S-TMP-FAM	5'-FAM- CAA AgA Tgg ACC CCC ACC CAC g – Black Hole Quencher 1- 3'
TM-180YY	5'-Yakima Yellow - ATgggTTTTTATgATTAgAgTCCCGCAA - Black Hole Quencher 1 - 3'

# Optimierung P35S / T-nos- Screening

## Versuch 1, P-35S-System

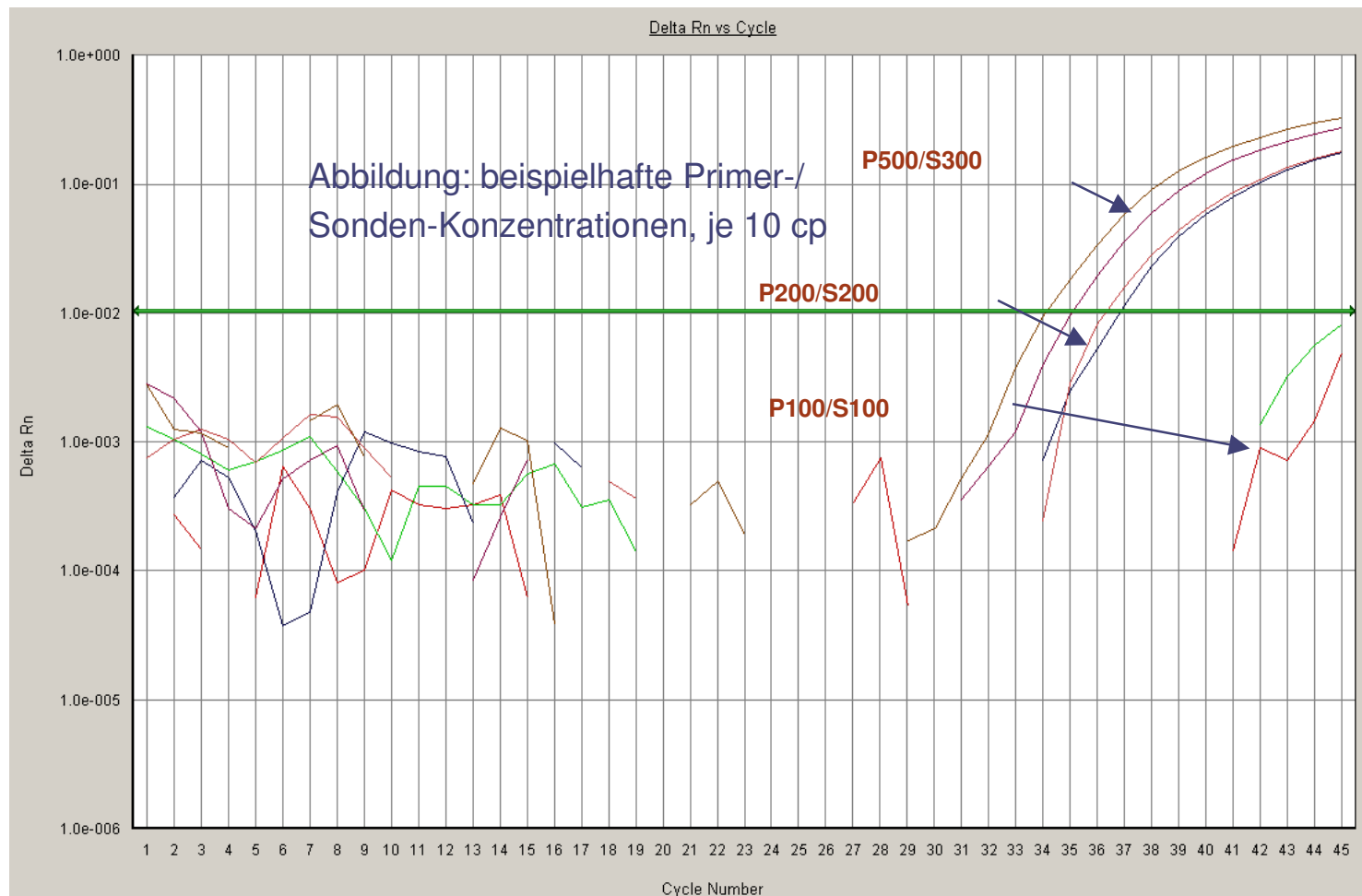
- Primer-Konzentration jeweils 100 bis 1000 nM
- Sonde 100 –300 nM



# Optimierung P35S / T-nos- Screening

## Versuch 1, T-nos-System

- Primer-Konzentration jeweils 100 bis 1000 nM
- Sonde 100 –300 nM



# Optimierung GVO-Screening-Duplex-PCR, Ergebnisse Versuch 1

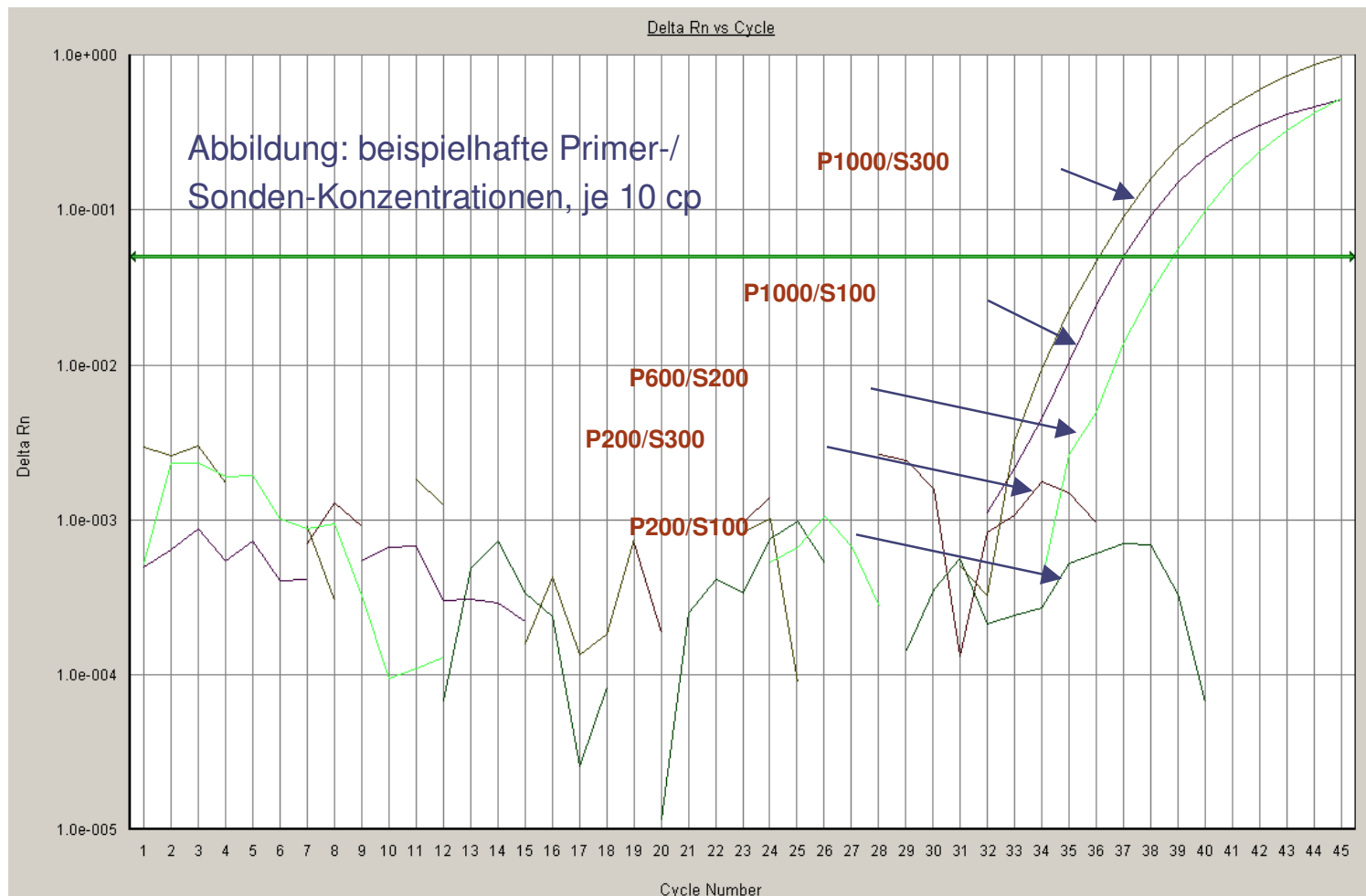
---

- P35S-Primer robuster → limitieren,  
T-nos Primer bei 200 nM und mehr testen

# Optimierung P35S / T-nos- Screening

## Versuch 2, T-nos-System

- Primer-Konzentration jeweils 200 bis 1000 nM
- Sonde 100 –300 nM



# Optimierung GVO-Screening-Duplex-PCR, Ergebnis Versuch 2

---

- Beste Resultate:  
P35S-Primer tief (100 nM)  
T-nos-Primer hoch (1000 nM)
- Sonden:  
Änderung bei P35S hat kaum Einfluss  
T-nos höhere Konz. wählen

# Optimierung GVO-Screening-Duplex-PCR, Versuch 3

---

Optimierung mit Duplika-Ansätzen:

- P35S- und T-nos-Sonden Konzentrationen
- T-nos Primer (kleines Konzentrationsintervall)
- P35S Primer fix bei 100 nM

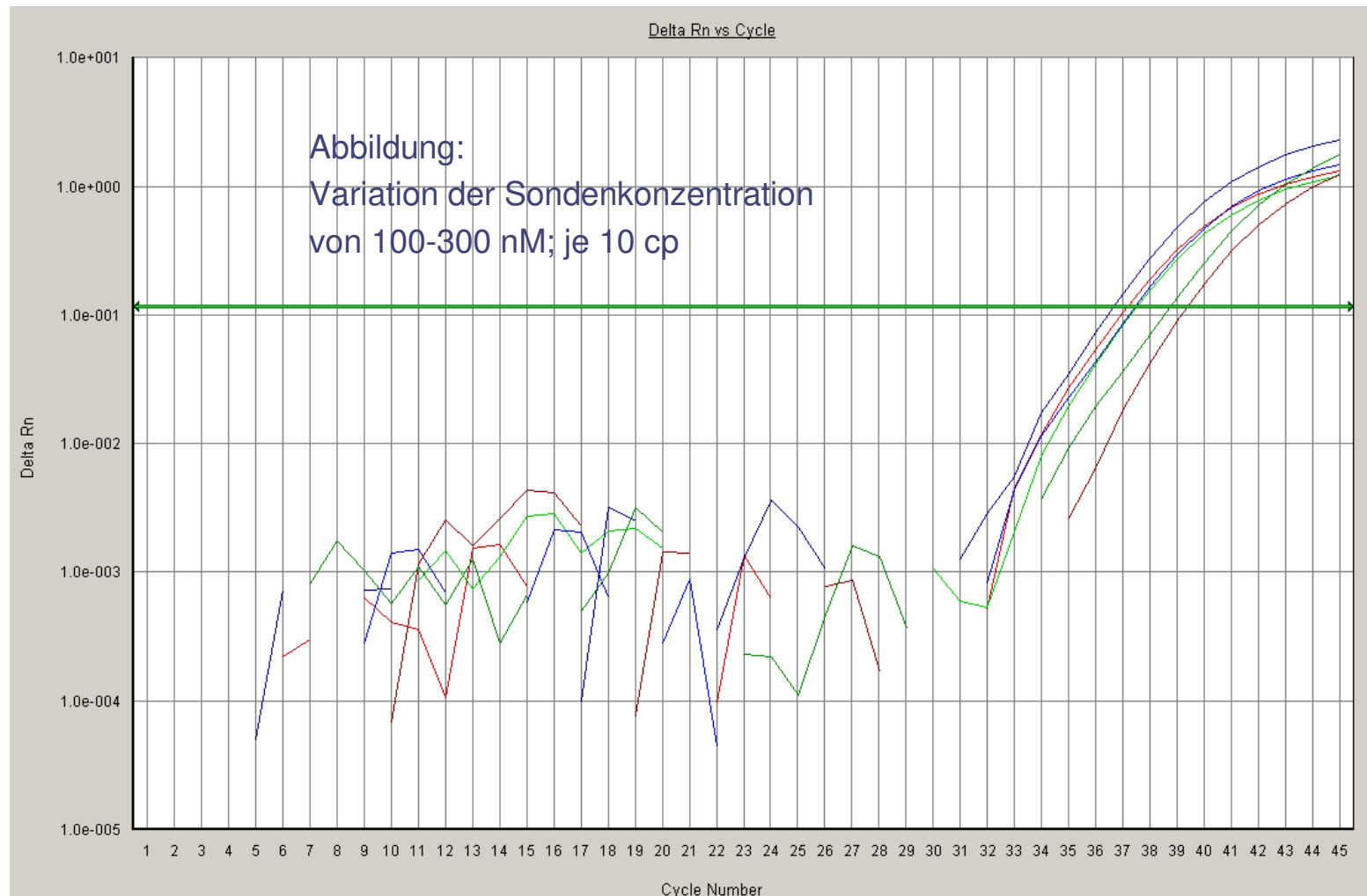
System	P35S		T-nos	
	getestet	Ergebnis: optimale Konzentration	getestet	Ergebnis: optimale Konzentration
<b>Primer 1</b>	100 nM	100 nM	800-1000 nM	1000 nM
<b>Primer 2</b>	100 nM	100 nM	800-1000 nM	1000 nM
<b>Sonde</b>	100-300 nM	100 nM	100-300 nM	200 nM



# Optimierung P35S / T-nos- Screening

## Versuch 3, P-35S-System

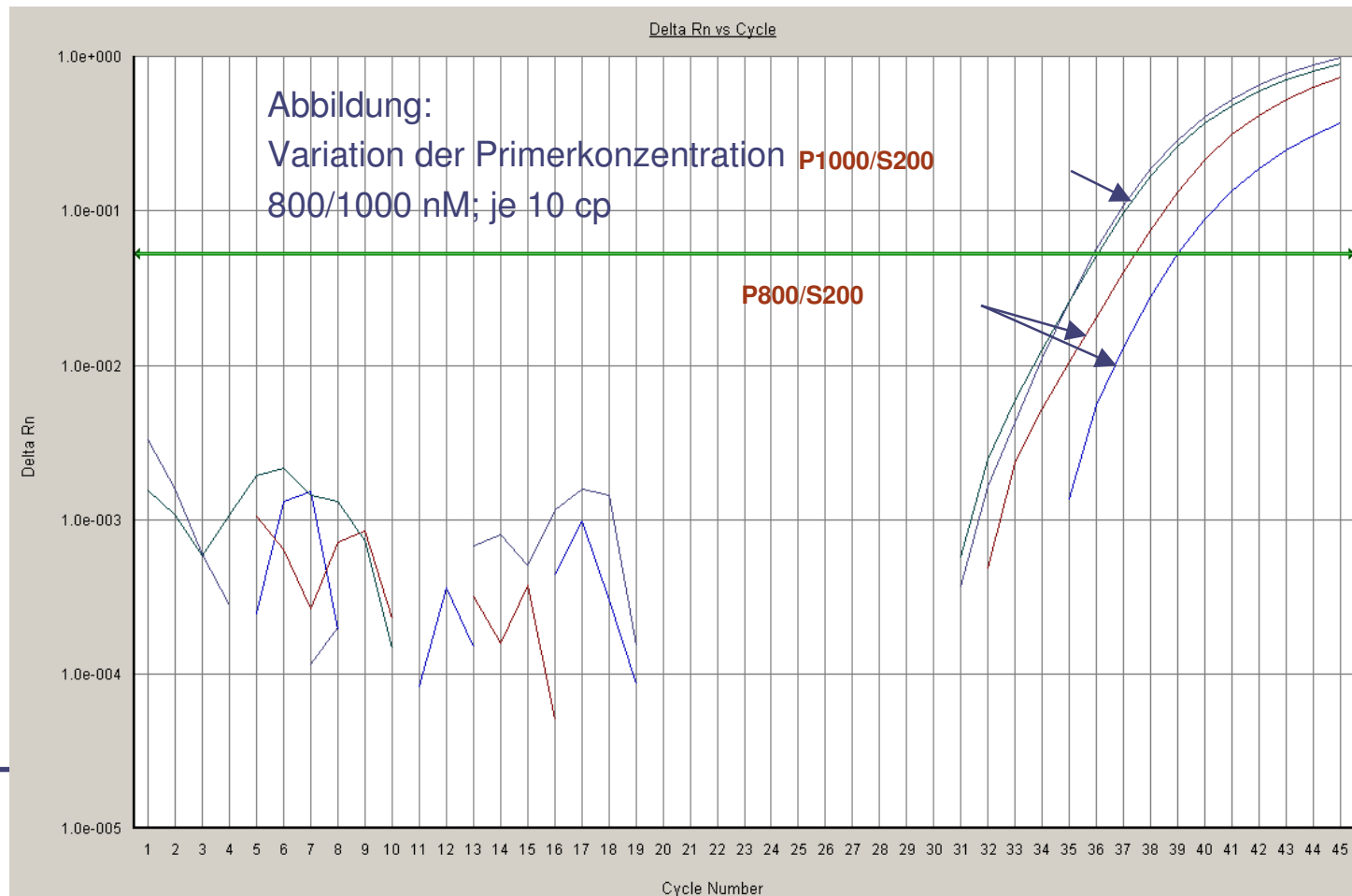
- Primer-Konzentration jeweils 100 nM
- Sonden 100 –300 nM



# Optimierung P35S / T-nos- Screening

## Versuch 3, T-nos-System

- Primer-Konzentration jeweils 800 bis 1000 nM
- Sonde 200 nM



# In-house- Validierung P35S / T-nos- Duplex-System – Zusammenfassung

---

- ausreichende Sensitivität (0,02 %),  
ab 0,05 % gute Präzisionsdaten
- Nachweis auch bei Überschuss eines der Targets  
möglich
- Gute Wiederfindungen ab 0,1 % für P35S und ab  
1,0% für T-nos

# P35S / T-nos- Duplex-System

## Validierungsdaten und Ringversuch

Eur Food Res Technol (2008) 226:1221–1228  
DOI 10.1007/s00217-007-0748-z

ORIGINAL PAPER

### Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products

Hans-Ulrich Waiblinger · Britta Ernst ·  
Annette Anderson · Klaus Pietsch

Juni 2008

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB		
L	Untersuchung von Lebensmitteln  Nachweis von bestimmten, häufig in gentechnisch veränderten Organismen (GVO) verwendeten <b>DNA-Sequenzen</b> aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV 35S-Promotor, <b>P35S</b> ) sowie aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ( <b>T-nos</b> ) in Lebensmitteln  Screening-Verfahren	00.00
		122

# Optimierung Triplex Real-time PCR P35S / T-nos / *hmga*

- P35S / T-nos; s. Duplex-Verfahren
- Mais-spezifisches System aus dem high mobility group protein (*hmga*) (getestet in einigen ENGL-Validierungsstudien)

35S-FTM	5'- gCC TCT gCC gAC AgT ggT -3'
35S-RTM	5'- AAg ACg Tgg TTg gAA CgT CTT C -3'
180-F	5'- CATgTAATgCATgACgTTATTTATg-3'
180-R	5'- TTgTTTTCTATCgCgTATTAAATgT-3'
ZM1-F	5'- TTg gAC TAg AAA TCT CgT gCT gA - 3'
ZM1-R	5'- gCT ACA TAG GGA gCC TTg TCC T - 3'

## **Sonden**

35S-TMP-FAM	5'-FAM- CAA AgA Tgg ACC CCC ACC CAC g – Black Hole Quencher 1- 3'
TM-180YY	5'-YY - ATgggTTTTTATgATTAgAgTCCCGCAA - Black Hole Quencher 1 - 3'
Probe ZM1	5'-Cy5 - CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA- Deep Dark Quencher - 3'



# Optimierung Triplex Real-time PCR P35S / T-nos / *hmga*, Versuch 1

---

- Primer-/Sonden-Konzentration P35S/T-nos: wie Duplex
- *hmga*: Primer/Sonden wie Singleplex
- ABI Universal PCR-Master Mix
- Getestet: 2 Konzentrationen:
  - 0,1 % Bt11 (50 cp in 50.00 cp Mais-DNA)
  - 0,02 % Bt11 (10 cp in ca. 50.000 cp Mais-DNA)
- Ergebnis: *hmga* gute Effizienz, aber T-nos: keine Amplifikation

# Optimierung Triplex Real-time PCR

## P35S / T-nos / *hmga*, Versuch 2

---

- Mastermix for Multiplex PCR oder höhere Polymerase Konzentration (+2 U/PCR)
- Primer-/Sonden-Konzentration für *hmga*-System limitieren  
Primerkonz. reduzieren von 300 nM über 200 und 100 nM auf schließlich:

System	P35S	T-nos	hmga
Primer 1	100 nM	1000 nM	40-100 nM
Primer 2	100 nM	1000 nM	40-100 nM
Sonde	100 nM	200 nM	100 nM

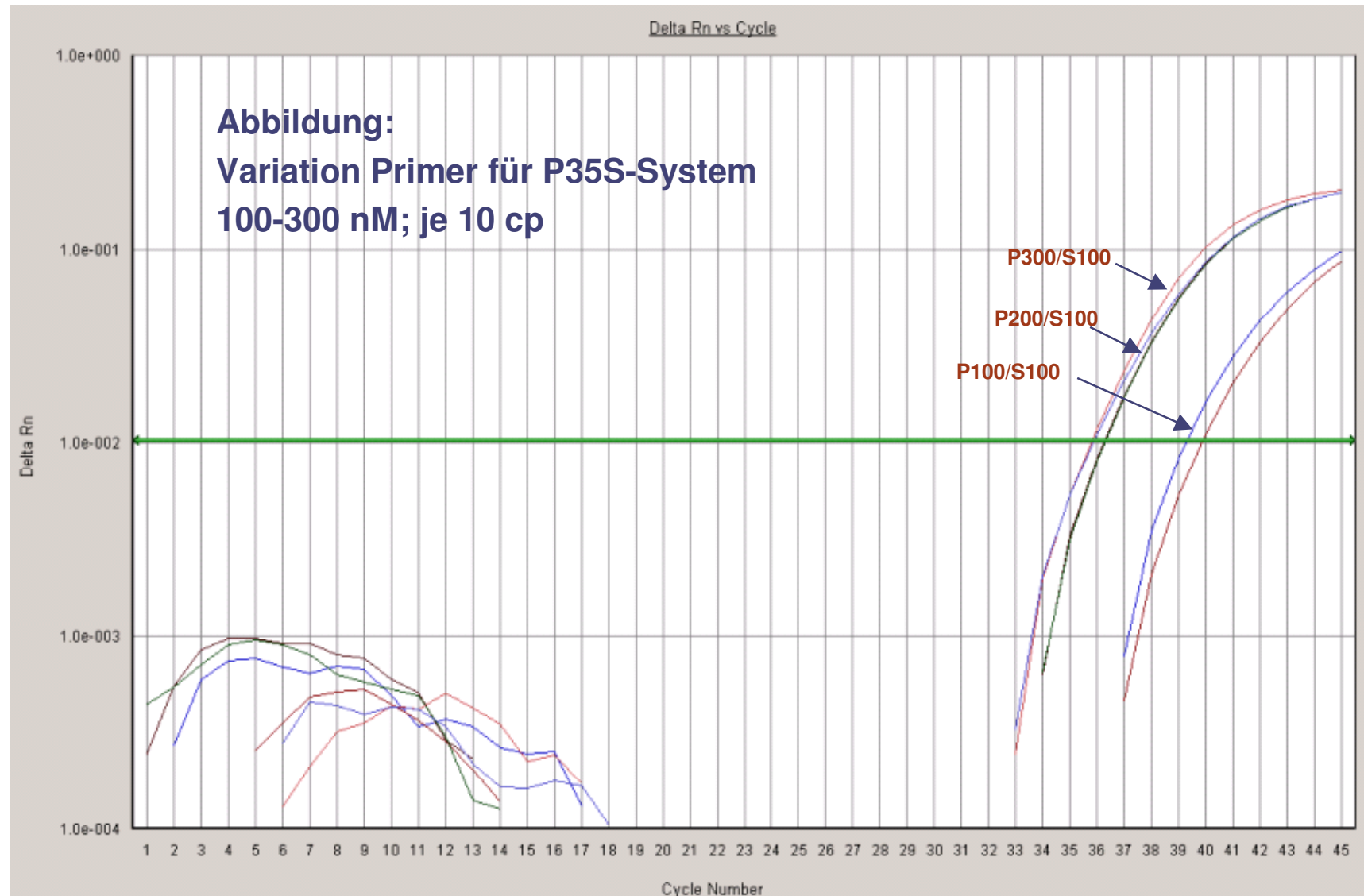
# Optimierung Triplex Real-time PCR P35S / T-nos / *hmga*, Versuch 3

- Primer-/Sonden-Konzentration für P35S-System optimieren
- Insgesamt wurden folgende Bedingungen getestet (V1 –V3):

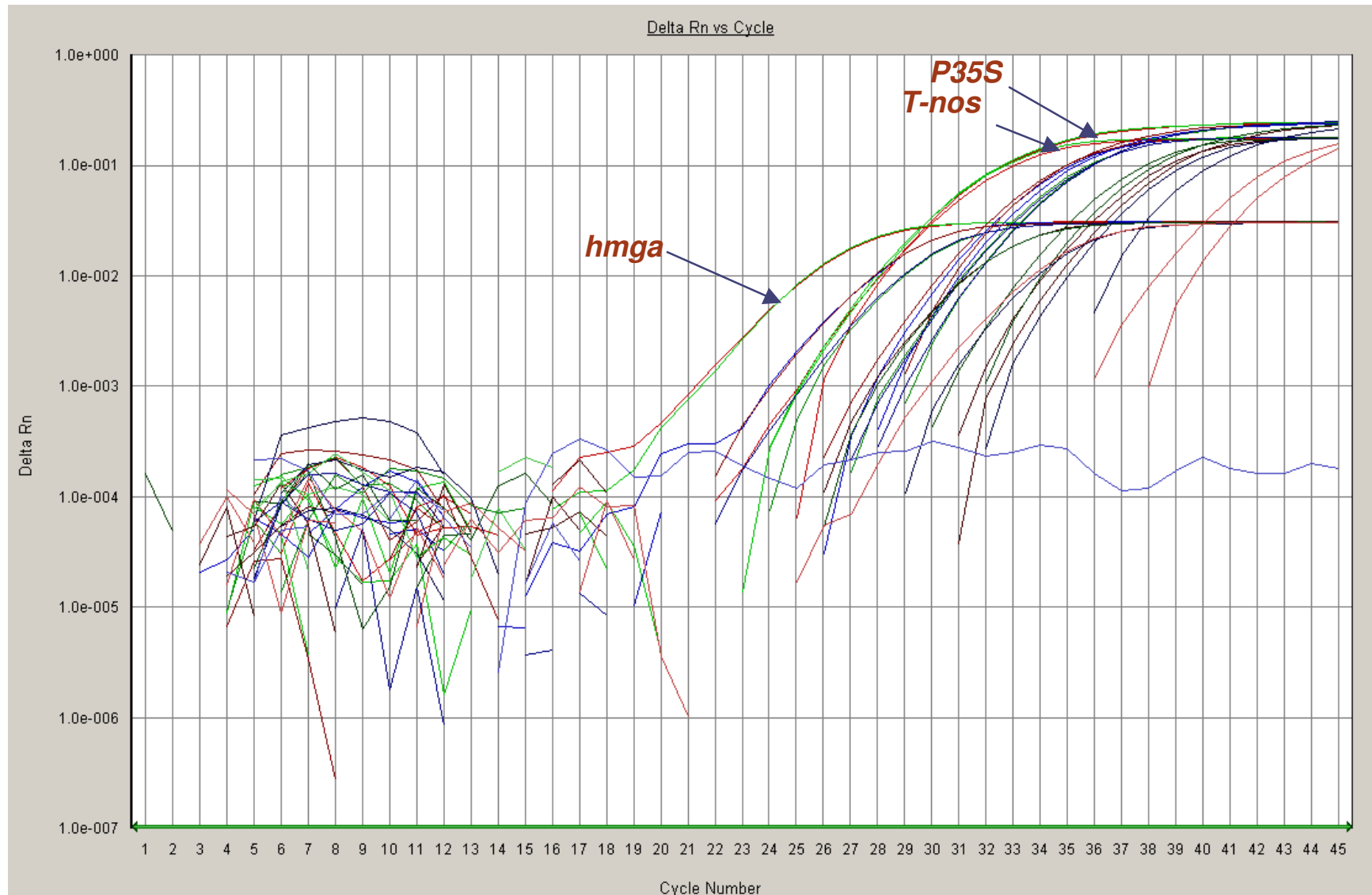
System	P35S		T-nos		hmga (Mais)	
	getestet	Ergebnis: optimale Kon- zentration	getestet	Ergebnis: optimale Kon- zentration	getestet	Ergebnis: optimale Kon- zentration
Primer 1	100-300 nM	200 nM	1000 nM	1000 nM	40-300 nM	70 nM
Primer 2	100-300 nM	200 nM	1000 nM	1000 nM	40-300 nM	70 nM
Sonde	100-200 nM	100 nM	200 nM	200 nM	160 -100nM	100 nM



# Optimierung Triplex Real-time PCR P35S / T-nos / *hmga*, Versuch 3



# Validierung Triplex Real-time PCR Verdünnungsreihe, alle Systeme

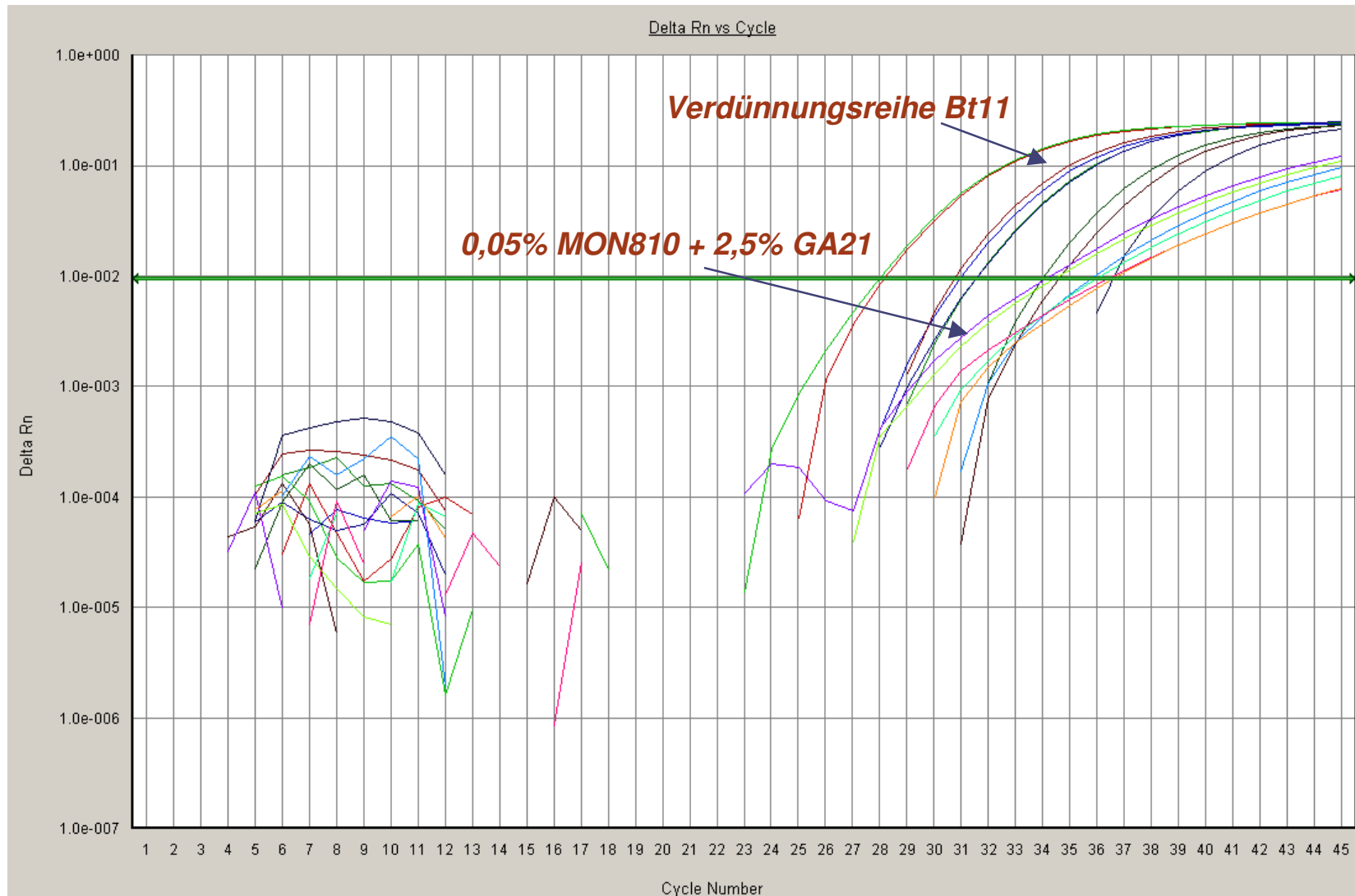


# Validierung P35S / T-nos- / *hmga*-Triplex-System – Kalibrierfunktion-Vergleich mit Single-PCR

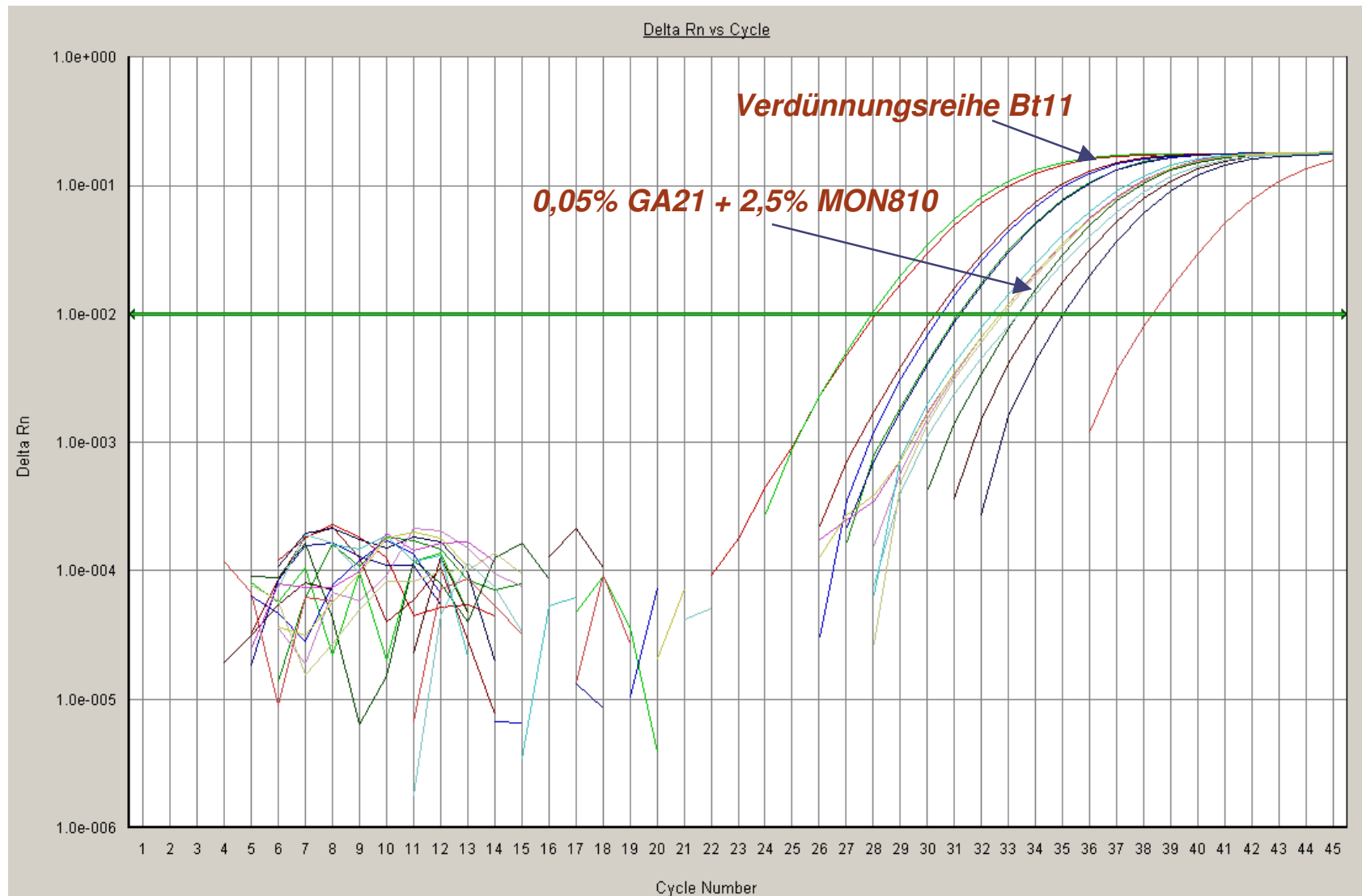
---

	P35S (Triplex)	P35S (Duplex)	NOS (Triplex)	NOS (Duplex)
<b>Arbeitsbereich</b>	<b>je 10 bis 2500 cp/PCR-Ansatz</b>			
<b>Slope/Effizienz</b>	<b>-3,57 / 91 %</b>	<b>-3,41 / 97 %</b>	<b>-3,20 / 105 %</b>	<b>-3,42 / 96 %</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,98</b>	<b>0,99</b>	<b>0,97</b>	<b>0,98</b>
<b>Ungefähre Nach- weisgrenze</b>	<b>10 cp</b>	<b>10 cp</b>	<b>10 cp</b>	<b>10 cp</b>

# Validierung Triplex Real-time PCR Test P35S-System auf kompetitive Effekte



# Validierung Triplex Real-time PCR Test T-nos-System auf kompetitive Effekte



# Zusammenfassung

---

- Multiplex-Real-time PCR in der GVO-Analytik speziell geeignet für Screening Zwecke
- optimiert speziell für „semiquantitativen“ Gebrauch
- Validation in Ringversuchen für diese Anwendung möglich
- spätestens ab Triplex sind Multiplex-PCR geeignete Reagenzien erforderlich (Polymerase, Multiplex Kits)

# Screening Tabelle zum Nachweis zugelassener und nicht zugelassener gentechnisch veränderter Pflanzen

Name of Event	Plant	Authori- zation EU	P35S		T-nos		CTP2- CP4EPSPS		bar		35S-pat		CRM
			S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	
SPBT02-5, SPBT02-7	potato	-	+		+		-		-		-		
EH92-527-1	potato	x <sup>2</sup>	-	sp	+	+	-	-	-	-	-	-	x
3272	maize	x <sup>2</sup>	-	sp	+	+	-	-	-	-	-	-	x
676, 678, 680	maize	-	+		-		-		-		+		
59122	maize	x <sup>1</sup>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	x
B16 (DLL25)	maize	-	+		-		-		+		-		

# Amtliche Lebensmittelüberwachung – vor allem Screening eingesetzt

---

- CVUA FR:  
mehr als 90 % der Analysen  
(real-time PCR)
- P35S and T-nos die am häufigsten untersuchten Targets
  - P35S: derzeit mind. 46 Events
  - T-nos: derzeit mind. 35 Events



# Weitere Zielsequenzen für das Screening

---

Screening auf weitere Sequenzen sinnvoll:

→ gv Pflanzen ohne P35S oder T-nos

→ zusätzliche Infos zur Identifizierung

# Zielsequenzen und amtliche Methoden für das Screening

- 5 Targets :  
von 81 möglichen Events derzeit nur 4 nicht erfasst  
(2x Baumwolle, 1x Soja, 1x Mais)

Screening Zielsequenz	Offizielle real-time PCR Methode verfügbar ? (Ringversuch-validiert)
P35S	ja (auch Duplex)
T-nos	ja (auch Duplex)
bar	ja
CTP2-CP4EPSPS	ja
P35S-pat	ja

## Screening Tabelle

---

- Liste von Events, für die ausreichende Informationen verfügbar sind (z.B. AGBIOS, BATS)
- Anwesenheit oder Abwesenheit ausgewählter Targets
- Analytische Bestätigung mittels zertifizierter Referenzmaterialien oder anderer Kontrollproben

# Screening Tabelle – zwei Versionen

a) veröffentlichte Version – nur offizielle Methoden berücksichtigt

[http://www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/bioanal/screening\\_neu.xls](http://www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/bioanal/screening_neu.xls)

Name of Event	Plant	Authori- zation EU	P35S		T-nos		CTP2- CP4EPSPS		bar		35S-pat		RM
			S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	
3272	maize	P	-	wp	+	+	-	-	-	-	-	-	x

b) interne Version der deutschen GMO-Arbeitsgruppen:  
Ringversuch-Validierung in Arbeit

Name of Event	Plant	Authori- zation EU	P35S		T-nos		CTP2- CP4EPSPS		bar		35S-pat		Pnos-nptII		Pnos		FMV		35S-nptII		pTA29- barnase		pSSUara- bar		35S-bar		RM
			S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	
3272	maize	P	-	wp	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x

# Screening Tabelle - Details

**A = authorized**  
**P = pending**  
**- = not authorized**

**S = Daten aus Sequenzinformationen**  
**(z.B. Plasmid Karte)**  
**R = analytische Bestätigung anhand von**  
**Referenzmaterial/Kontrollproben**

Name of Event	Plant	Authori- zation EU	P35S		T-nos		CTP2- CP4EPSPS		bar		35S-pat		CRM
			S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	
305423	soybean	P	-	wp	-	wp	-	-	-	-	-	-	x
356043	soybean	P	(+)	wp	-	wp	-	-	-	-	-	-	x
A2704-12, A2704-21, A5547-35 (LibertyLink)	soybean	A	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	x
A5547-127 (LibertyLink)	soybean	-	+	+	-	-	-	-	-	wp	+	+	x
G94-1, G94-19, G-168 (Optimum)	soybean	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
GTS 40-3-2 (Roundup Ready)	soybean	A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	x
GU262 (LibertyLink)	soybean	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
MON 89788	soybean	A	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
W62, W98 (Liberty Link)	soybean	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	

**zusätzliche Hinweise**  
**im Kommentarfeld**

**wp = unerwartetes Signal,**  
**weak positive (Ct = 35 und höher)**

# Screening Tabelle – Spezifitätstests

---

Verwendung genomischer DNA von Referenzmaterialien  
(mindestens zwei Labors ):

- Bestätigung von „-“:

hohe Kopienzahl amplifizierbarer gv DNA,  
z.B. 10.000 - 50000 cp

- Bestätigung von: „+“:

niedrige Kopienzahl amplifizierbarer gv DNA (10 – 50 cp)

---

## Screening Tabelle in der Routine

---

- Screening auf  
*T-nos, P35S, bar, pat, CTP2-EPSPS*  
*weist alle Events nach, die z.B. in AGBIOS*  
*genannt sind,*  
mit folgenden exceptions:  
Mais LY038, Soja DP-305423, BPS-CV127-9, Baumwolle 281-24-236 x 3006-210-23
- maximal 5 real-time PCRs notwendig;  
bei Multiplexing entsprechend weniger

## Screening Tabelle & Laborroutine

---

- Screening auf 5 und mehr Elemente kann die mögliche Zahl von Events reduzieren, auf die in der Spezifizierung getestet werden muss



# Beispiel

## P35S und T-nos positiv / CTP2-EPSPS, bar und pat negativ

Name of Event	Plant	Authori- sation EU	P35S		T-nos		CTP2- CP4EPSPS		bar		35S-pat	
			S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
3272	maize	P	-	wp	+	+	-	-	-	-	-	-
GA 21 (Roundup Ready)	maize	A	-	-	+	+	-	-	-	wp	-	-
MIR 162		P	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MIR604	maize	P	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MON 810	maize	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MON 863 (YieldGard)	maize	A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MON89034	maize	P	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
DP 098140-6	maize	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

- 8 Events möglich
  - signifikante CT-Differenz (mehr als 3,3):  
Hinweis, dass mehr als 1 Event enthalten ist



## Alternative: Multiplexing mittels Event-spezifischer PCR

---

- Beispiel: 4 Events + Referenzgen
  - Vorteil: bei Spezies wie Soja kann Screening entfallen
  - semiquantitative Aussagen möglich, weitere Quantifizierung kann u.U. unterbleiben
  - Nachteil:  
nicht zugelassene GVO bleiben unberücksichtigt

# Alternative: Multiplexing mittels Event-spezifischer PCR

---

- Beispiel „All Soy GVO“ Pentaplex
- Referenz: Lectin
- A 5547-127, GTS 40-3-2 (RRS), MON 89788
- A 2704-12: bisherige Tests am CVUA FR:  
zu starke Hintergrundfluoreszenz, nicht auswertbar

# Beispiel Validierungsdaten „All Soy GVO“ Pentaplex (1)

## 1. Validierungsdaten DNA-Verdünnungsreihen (n=4)

### a) Event GTS 40-3-2

Arbeitsbereich		10 bis 2500 Kopien / 5µl		
Slope/Effizienz		-3,57 / 91 %		
R <sup>2</sup>		0,96		
Ungefähre Nachweisgrenze		ca. 5-10 Kopien/Ansatz		
Soll Verdünnungsstufe (Kopienzahl GTS 40-3-2)	Ist Mittelwert gefundene Kopien	Mittelwert Ct-Werte	Standard- abweichung (Kopienzahl)	Vertrauensbereich (95%) (Kopienzahl (rel; %))
2500	2617	25,66	82	5,0
500	466	28,42	1662	43
100	102	30,69	8	10
30	38	32,33	17	56
10	11	34,39	7	79
5	6	35,42 (4 von 4 pos.)	4	86

# Beispiel Validierungsdaten „All Soy GVO“ Pentaplex (2)

b) Event MON 89788				
Arbeitsbereich		10 bis 2500 Kopien / 5µl		
Slope/Effizienz		-3,17 / 107 %		
R <sup>2</sup>		0,9847		
Ungefähre Nachweisgrenze		ca. 5-10 Kopien/Ansatz		
Soll Verdünnungsstufe (Kopienzahl MON 89788)	Ist Mittelwert gefundene Kopien	Mittelwert Ct-Werte	Standard- abweichung (Kopienzahl)	Vertrauensbereich (95%) (Kopienzahl (rel; %))
2500	2802	23,94	205	12
500	464	26,44	93	25
100	102	28,52	21	26
30	26	30,40	9	44
10	11	31,69	5	58
5	6	32,47 (4 von 4 pos.)	1,8	38



# Beispiel Validierungsdaten „All Soy GVO“ Pentaplex (3)

c) Event A 5547-127				
Arbeitsbereich		10 bis 2500 Kopien / 5µl		
Slope/Effizienz		-3,98 / 78%		
R <sup>2</sup>		0,9204		
Ungefähre Nachweisgrenze		ca. 5-10 Kopien/Ansatz		
Soll Verdünnungsstufe (Kopienzahl A 5547-127)	Ist Mittelwert gefundene Kopien	Mittelwert Ct-Werte	Standard- abweichung (Kopienzahl)	Vertrauensbereich (95%) (Kopienzahl (rel; %))
2500	2251	24,03	94	6,7
500	457	26,79	94	26
100	130	28,95	19	18
30	41	30,93	6,3	19
10	10	33,71	7,5	91
5	9,7	- (3 von 4 pos.)	-	-



# Beispiel Validierungsdaten „All Soy GVO“ Pentaplex (4)

d) Lectin-Gen				
Arbeitsbereich		ca. 70 bis 36000 Kopien / 5µl		
Slope/Effizienz		-3,19 / 106 %		
R <sup>2</sup>		0,9959		
Ungefähre Nachweisgrenze		nicht ermittelt		
Soll Verdünnungsstufe (Kopienzahl Lec- tin)	Ist Mittelwert gefundene Kopien	Mittelwert Ct-Werte	Standard- abweichung (Kopienzahl)	Vertrauensbereich (95%) (Kopienzahl (rel; %))
36200	entfällt	20,43	1309	6
6640	entfällt	22,78	231	4
1400	entfällt	24,93	61	5
404	entfällt	26,66	25	8
127	entfällt	28,27	15	15
70	entfällt	29,09	6	10



# Beispiel Validierungsdaten „All Soy GVO“ Pentaplex (5)

## 3. Test auf kompetitive Effekte (Targetüberschuss), n= 2

	Anzahl der positiven Proben	Mittelwert Ct
10 cp <b>GTS 40-3-2</b> /1000 cp A 2704-12	2/2	33,1
10 cp <b>GTS 40-3-2</b> /1000 cp A 5547-127	2/2	34,2
10 cp <b>GTS 40-3-2</b> /1000 cp MON 89788	2/2	32,6
10 cp A <b>5547-127</b> /1000 cp MON 89788	2/2	33,4
10 cp A <b>5547-127</b> /1000 cp A 2704-12	2/2	33,0
10 cp A <b>5547-127</b> /1000 cp GTS 40-3-2	2/2	33,8
10 cp <b>MON 89788</b> /1000 cp A 2704-12	2/2	32,8
10 cp <b>MON 89788</b> /1000 cp GTS 40-3-2	2/2	35,0
10 cp <b>MON 89788</b> /1000 cp A 5547-127	2/2	35,2





# Beispiel Validierungsdaten „All Soy GVO“ Pentaplex (6)

---

4. relative Quantifizierung gegen Lectin-Referenzgen (n=3)			
Referenzmaterial % gv-Soja (Gew.%), Soll	Ist: Mittelwerte (in %) (n=3)	Standardabweichung	Variationskoeffizient
GTS 40-3-2 (RRS), 0,1%	0,07	0,03	40 %
RRS 1 %	0,63	0,10	16 %

# Alternative: Multiplexing mittels Event-spezifischer PCR

---

- Vorteil:  
bei Spezies wie Soja kann Screening entfallen  
→ semiquantitative Aussagen möglich,  
weitere Quantifizierung kann u.U. unterbleiben  
→ Nachteil:  
nicht zugelassene GVO bleiben unberücksichtigt