**Bahan pangan — Metode analisis untuk deteksi produk rekayasa genetik dan produk turunannya — Ekstraksi asam nukleat**

“Apabila diketahui RSNI ini mengandung kekayaan intelektual, pihak yang berkepentingan diminta untuk memberikan informasi beserta data pendukung (pemilik kekayaan intelektual, bagian yang terkena kekayaan intelektual, alamat pemberi kekayaan intelektual, dan lain-lain).”

***Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction***

**(ISO 21571:2005 dan ISO 21751:2005/Amd.1:2013, IDT)**

**Daftar isi**

[Prakata ii](#_Toc162434296)

[Pendahuluan iii](#_Toc162434297)

[1    Ruang lingkup 2](#_Toc162434298)

[2    Acuan normatif 2](#_Toc162434299)

[3    Prinsip 2](#_Toc162434300)

[3.1    Umum 2](#_Toc162434301)

[3.2    Ekstraksi DNA 2](#_Toc162434302)

[3.3    Kuantifikasi DNA 4](#_Toc162434303)

[4    Persyaratan umum laboratorium 4](#_Toc162434304)

[5    Prosedur 4](#_Toc162434305)

[5.1    Preparasi porsi uji 4](#_Toc162434306)

[5.2    Ekstraksi/pemurnian DNA 8](#_Toc162434307)

[5.3    Kuantifikasi DNA hasil ekstraksi 12](#_Toc162434308)

[5.4    Stabilitas DNA hasil ekstraksi 14](#_Toc162434309)

[6    Interpretasi 14](#_Toc162434310)

[7    Laporan hasil uji 14](#_Toc162434311)

[Lampiran A 16](#_Toc162434312)

[Lampiran B 96](#_Toc162434313)

[Bibliografi 112](#_Toc162434314)

# Prakata

SNI ISO 21571:2005, *Bahan pangan — Metode analisis untuk deteksi produk rekayasa genetik dan produk turunannya — Ekstraksi asam nukleat*, merupakan standar yang disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari ISO 21571:2005, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*dan ISO 21571:2005/Amd.1:2013, dengan metode adopsi terjemahan dua bahasa dan ditetapkan oleh BSN Tahun 202X.

Standar ini menggantikan SNI ISO 21571:2005, *Bahan pangan — Metode analisis untuk deteksi organisme hasil rekayasa genetika dan produk turunannya — Ekstraksi asam nukleat*, yang disusun dengan metode adopsi *republication-reprint* dan ditetapkan oleh BSN Tahun 2021.

Dalam Standar ini istilah “*this International Standard”* pada standar ISO 21571:2005 dan ISO 21571:2005/Amd.1:2013 yang diadopsi diganti dengan “*this Standard*” dan diterjemahkan menjadi “Standar ini”.

Terdapat standar yang dijadikan sebagai acuan normatif dalam Standar ini telah diadopsi menjadi SNI, yaitu:

* ISO 24276:2006, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*, telah diadopsi dengan tingkat keselarasan identik menjadi SNI ISO 24276:2006, *Bahan pangan — Metode analisis untuk deteksi organisme hasil rekayasa genetika dan produk turunannya — Persyaratan dan definisi umum*.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 19-07, Metode Uji Biomolekuler dan Bioteknologi. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 13 Maret 2024 di Jakarta melalui pertemuan fisik dan telekonferensi, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal ..... sampai dengan .... dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya, yaitu ISO 21571:2005 dan ISO 21571:2005/Amd.1:2013, dan/atau dokumen terkait lain yang menyertainya.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas dan ruang lingkup HAKI tersebut.

# Pendahuluan

Pencarian asal-usul bahan yang direkayasa secara genetik dilakukan melalui tahapan yang berurutan atau simultan. Setelah pengumpulan sampel, asam nukleat diekstraksi dari porsi uji. Asam nukleat hasil ekstraksi dapat dimurnikan lebih lanjut, secara simultan atau setelah proses ekstraksi. Setelah itu, asam nukleat dikuantifikasi (jika perlu), diencerkan (jika perlu) dan digunakan dalam prosedur analitik (seperti PCR). Tahapan tersebut dijelaskan secara rinci dan mengacu pada Standar berikut:

ISO 21569, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods.*

ISO 21570, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods.*

Informasi lebih lanjut mengenai definisi dan bagian umum yang berkaitan dengan tahapan yang diacu di atas terdapat pada:

ISO 24276, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions.*

*The International Organization for Standardization* (ISO) memberikan perhatian terhadap fakta bahwa klaim terhadap pemenuhan Standar ini mungkin melibatkan penggunaan paten terkait metode ekstraksi berbasis silika (No. EP 0389063/USP 5.234.809) yang dijelaskan pada Pasal A.4.

ISO tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas dan ruang lingkup hak paten ini.

Pemegang hak paten ini telah meyakinkan ISO bahwa yang bersangkutan bersedia menegosiasikan lisensi dengan syarat dan ketentuan yang wajar dan tidak diskriminatif dengan pemohon di seluruh dunia. Dalam hal ini, pernyataan pemegang hak paten ini terdaftar di ISO. Informasi dapat diperoleh dari:

Jean Deleforge,

BioMérieux

Chemin de l'Orme,

69280 Marcy-l'Étoile, Prancis.

Perhatian tersebut diarahkan pada kemungkinan bahwa beberapa bagian dari Standar ini dapat menjadi subjek hak paten selain yang disebutkan di atas. ISO tidak bertanggung jawab untuk mengidentifikasi salah satu atau seluruh hak paten tersebut.

**Introduction**

The search for genetically modified origin of ingredients is performed by means of the following successive (or simultaneous) steps. After sample collection, nucleic acids are extracted from the test portion. Extracted nucleic acids can be further purified, simultaneously or after the extraction process. Afterwards, they are quantified (if necessary), diluted (if necessary) and subjected to analytical procedures (such as PCR). These steps are detailed in this and the following Standards:

ISO 21569, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods.*

ISO 21570, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods.*

Further information about definitions and general items involving the steps cited above are collected in:

ISO 24276, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions.*

The International Organization for Standardization (ISO) draws attention to the fact that it is claimed that compliance with this document may involve the use of a patent concerning the silica-based extraction method (No. EP 0389063/USP 5,234,809) given in Clause A.4.

ISO takes no position concerning the evidence, validity and scope of this patent right.

The holder of this patent right has assured the ISO that he/she is willing to negotiate licences under reasonable and non-discriminatory terms and conditions with applicants throughout the world. In this respect, the statement of the holder of this patent right is registered with ISO. Information may be obtained from:

Jean Deleforge,

BioMérieux

Chemin de l'Orme,

69280 Marcy-l'Étoile, France.

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this document may be the subject of patent rights other than those identified above. ISO shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan untuk memastikan bahwa penyajian SNI dengan metode dua bahasa dapat menampilkan bahasa Indonesia pada halaman genap dan bahasa Inggris pada halaman ganjil.”**

**Bahan pangan — Metode analisis untuk deteksi produk rekayasa genetik dan produk turunannya — Ekstraksi asam nukleat**

1    Ruang lingkup

Standar ini memberikan persyaratan umum dan metode khusus untuk ekstraksi/pemurnian dan kuantifikasi DNA. Metode tersebut dijelaskan pada Lampiran A dan B.

Standar ini telah ditetapkan untuk matriks pangan, tetapi dapat juga diterapkan untuk matriks lain, seperti biji-bijian dan pakan.

Standar ini telah dirancang sebagai bagian integral dari metode analisis berbasis asam nukleat, khususnya ISO 21569 tentang metode analitik secara kualitatif, dan ISO 21570 tentang metode analitik secara kuantitatif.

2    Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan Standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan tersebut (termasuk seluruh perubahan/amendemennya).

ISO 24276:2006, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

3    Prinsip

3.1    Umum

Tujuan metode ekstraksi asam nukleat adalah untuk menyediakan asam nukleat yang sesuai untuk analisis selanjutnya (lihat ISO 24276).

**CATATAN**    “Kualitas” DNA tergantung pada panjang rata-rata molekul DNA yang diekstrak, kemurnian bahan kimia dan integritas struktural sekuens DNA dan utas ganda (misalnya *intra-, inter-strand linking between DNA bases, single-strand gaps, cross-linking with polyols, haemin*, dan lain-lain). Selain itu, perubahan semacam itu seringkali spesifik terhadap sekuens dan konsekuensinya tidak terdistribusi secara acak di seluruh genom (lihat Referensi [1], [2], [3] dan [4]).

Pengguna Standar ini sebaiknya mencatat bahwa beberapa metode (misalnya semua metode berbasis silika), kemungkinan dilindungi oleh hak paten.

3.2    Ekstraksi DNA

Prinsip dasar ekstraksi DNA terdiri atas pelepasan DNA yang terdapat dalam matriks dan selanjutnya, secara simultan atau berkelanjutan, memurnikan DNA dari inhibitor *polymerase chain reaction* (PCR).

Metode ekstraksi/pemurnian DNA dijelaskan pada Lampiran A. Pemilihan metode merupakan pilihan berdasarkan pengalaman pengguna, dengan mempertimbangkan ruang lingkup dan contoh matriks sebagaimana yang diberikan dalam setiap metode.

**Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction**

**1    Scope**

This Standard provides general requirements and specific methods for DNA extraction/purification and quantitation. These methods are described in Annexes A and B.

This Standard has been established for food matrices, but could also be applicable to other matrices, such as grains and feed.

It has been designed as an integral part of nucleic-acid-based analytical methods, in particular ISO 21569 on qualitative analytical methods, and ISO 21570 on quantitative analytical methods.

**2    Normative references**

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 24276:2006, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

**3    Principle**

**3.1    General**

The objective of nucleic acid extraction methods is to provide nucleic acids suitable for subsequent analysis (see ISO 24276).

**NOTE**    The “quality” of DNA depends on the average length of the extracted DNA molecules, the chemical purity and the structural integrity of the DNA sequence and of the double helix (e.g. intra-, inter-strand linking between DNA bases, single-strand gaps, cross-linking with polyols, haemin, etc). Moreover, such alterations are often sequence-specific and consequently not randomly distributed all over the genome (see References [1], [2], [3] and [4]).

Users of this Standard should note that some methods (e.g. all silica-based methods), might be covered by patent rights.

**3.2    DNA extraction**

The basic principle of DNA extraction consists of releasing the DNA present in the matrix and further, concurrently or subsequently, purifying the DNA from polymerase chain reaction (PCR) inhibitors.

DNA extraction/purification methods are described in Annex A. Method-selection is an experience-based choice of the user, taking into account the scope and examples of matrices as given in each method.

Protokol alternatif dapat digunakan jika metode tersebut telah divalidasi pada masing-masing matriks yang dipelajari.

3.3    Kuantifikasi DNA

Kuantifikasi DNA hasil ekstraksi dapat berguna untuk analisis PCR selanjutnya.

Kuantifikasi DNA tersebut dapat dilakukan dengan metode fisika (misalnya pengukuran absorbansi pada panjang gelombang tertentu), fisika-kimia (misalnya penggunaan bahan interkalasi atau pengikat yang dapat memancarkan fluoresens), enzimatik (misalnya deteksi bioluminesens) atau dengan PCR kuantitatif. Metode PCR kuantitatif sangat sesuai untuk matriks komposit atau untuk sampel dengan kandungan DNA rendah atau yang DNA-nya terdegradasi.

Terdapat beberapa metode yang tersedia untuk mengkuantifikasi jumlah DNA yang ada dalam larutan, seperti yang dijelaskan pada Lampiran B. Pengguna memilih metode yang paling tepat untuk diterapkan, tergantung pada jumlah dan kualitas DNA yang akan dikuantifikasi, dan sebagai konsekuensi, tergantung pada matriks dari DNA yang telah diekstraksi.

Protokol alternatif dapat digunakan jika metode tersebut telah divalidasi pada masing-masing matriks yang dipelajari.

4    Persyaratan umum laboratorium

Kontaminasi DNA dapat berasal dari debu dan penyebaran aerosol. Oleh karena itu, penataan area kerja di laboratorium didasarkan pada

* penataan alat secara sistematis sesuai langkah-langkah metodologi yang digunakan untuk mendapatkan hasil, dan
* prinsip “*forward flow*” untuk penanganan sampel.

Prinsip *forward flow* memastikan bahwa DNA yang akan dianalisis dan DNA yang diamplifikasi dengan PCR secara fisik terpisah (tempat yang berbeda).

Rincian lebih lanjut dapat ditemukan di ISO 24276.

5    Prosedur

5.1    Preparasi porsi uji

**5.1.1    Umum**

Variabel khusus komoditas (misalnya kelembapan) dan pemrosesan dapat berdampak pada jumlah dan kualitas DNA yang diekstraksi dari porsi uji yang diperiksa. Oleh karena itu karakteristik kinerja dari suatu metode ekstraksi DNA tergantung pada matriksnya.

Lakukan tindakan yang tepat untuk memastikan bahwa porsi uji sudah mewakili sampel laboratorium.

Porsi uji harus memiliki ukuran dan jumlah partikel yang cukup agar mewakili sampel laboratorium.

Alternative protocols are suitable provided that the method has been validated on the respective matrix under investigation.

**3.3    DNA quantitation**

Quantitation of extracted DNA could be useful for subsequent PCR analysis.

It may be performed by either physical (e.g. measure of absorbance at a specific wavelength), chemical-physical (e.g. use of intercalating or binding agents able to emit fluorescence), enzymatic (e.g. bioluminescence detection) methods or by quantitative PCR. The latter method is especially suitable for composite matrices or for samples with a low DNA content or whose DNA is degraded.

There are several methods available to quantify the DNA present in a solution, as described in Annex B. It is for the user to choose the most appropriate one to be applied, depending on the amount and quality of DNA to be quantified and, consequently, on the matrix from which the DNA has been extracted.

Alternative protocols are suitable, provided that the method has been validated on the respective matrix under investigation.

**4    General laboratory requirements**

Accidental contamination of DNA can originate from dust and spreading aerosols. As a consequence, the organization of the work area in the laboratory is logically based on

* the systematic containment of the methodological steps involved in the production of the results, and
* a “forward flow” principle for sample handling.

The latter ensures that the DNA to be analysed and the amplified DNA generated by PCR remain physically segregated.

Further details can be found in ISO 24276.

**5    Procedure**

**5.1    Preparation of the test portion**

**5.1.1    General**

Commodity-specific variables (e.g. humidity) and processing can impact the amount and quality of DNA extracted from the material under investigation. Therefore the performance characteristics of a given DNA extraction method depend on the matrix.

Take appropriate measures to ensure that the test portion is representative of the laboratory sample.

The test portion shall be of sufficient size and shall contain a sufficient number of particles to be representative of the laboratory sample.

Untuk alasan praktis/teknis, tidak disarankan porsi uji melebihi ukuran 2 g.

Setiap batasan yang timbul dari ukuran porsi uji yang menyebabkan bahan tersebut tidak mewakili sampel laboratorium harus dilaporkan dan dipertimbangkan dalam interpretasi hasil analitik. Metode untuk ekstraksi DNA pada Lampiran A menjelaskan porsi uji dari (200 – 500) mg, yang biasanya cukup untuk bahan baku yang kaya akan DNA (misalnya biji-bijian yang telah digerus, tepung). Namun, untuk matriks tertentu yang mengandung jumlah DNA yang sangat rendah atau DNA terdegradasi, jumlah DNA hasil ektraksi yang diperoleh mungkin tidak cukup untuk analisis. Dalam kasus ini, porsi uji kemungkinan perlu ditingkatkan.

Ekstraksi DNA harus dilakukan setidaknya pada dua porsi uji.

Penyimpanan standar, sampel dan porsi uji harus sesuai dengan ISO 24276 dan harus diatur sedemikian rupa untuk mempertahankan parameter biokimia yang akan dianalisis (untuk detailnya, lihat ISO/IEC 17025).

**5.1.2    Sampel**

Semua prosedur untuk preparasi sampel uji (misalnya penggerusan, homogenisasi, pembagian, pengeringan) harus dilakukan sesuai dengan rancangan laboratorium yang telah ditentukan pada ISO 24276:2006, 5.3.2, untuk mencegah semua kontaminasi sampel atau modifikasi komposisinya.

Sampel laboratorium harus cukup homogen sebelum dikurangi atau digerus dan sebelum mengambil porsi uji.

Untuk sampel cair, kocok wadah yang berisi sampel untuk meningkatkan kehomogenan produk. Untuk sampel produk non-homogen seperti minyak mentah, periksa apakah endapan telah benar-benar hilang dari dinding wadah.

Untuk matriks padat yang tidak dapat tersuspensi secara mudah, matriks harus digerus untuk mengurangi ukuran partikel dan/atau memudahkan ekstraksi DNA. Dalam kasus seperti itu, ukuran partikel harus diperhatikan. Porsi uji yang akan diekstrak harus mengandung jumlah minimum partikel. Alat penggilingan/penggerusan harus dapat dibersihkan secara menyeluruh dan harus dipilih agar distribusi ukuran dan jumlah partikel yang diinginkan dalam porsi uji dapat diperoleh.

Jika komponen sampel laboratorium telah hilang sebelum ekstraksi, maka prosedur tersebut harus dilaporkan.

Produk pangan akhir yang berbentuk padat atau pasta dan memiliki kandungan lipid yang tinggi seringkali tidak mudah digerus menjadi ukuran partikel yang diinginkan dalam satu tahap. Oleh karena itu, beberapa prosedur dapat ditambahkan, seperti penghilangan lipid menggunakan heksana setelah penggerusan, pembekuan atau pengeringan beku sebelum penggerusan.

Untuk memfasilitasi penggerusan pasta atau produk kental, dimungkinkan untuk menerapkan salah satu perlakuan terhadap matriks sebagai berikut:

* pemanasan hingga suhu maksimum 40 °C;
* pelarutan dalam pelarut yang sesuai seperti air;
* pembekuan pada suhu di bawah atau sama dengan −20 °C.

For practical/technical reasons, it is not recommended to exceed a size of 2 g.

Any restrictions that arise from the size of the test portion which prevent it from being representative shall be reported and taken into consideration in the interpretation of the analytical results. The methods for DNA extraction in Annex A describe test portions from 200 mg to 500 mg, which are usually adequate for DNA-rich raw materials (e.g. ground grains, flour). However, for certain matrices containing very low amounts or degraded DNA, insufficient DNA suitable for analysis can be extracted. In these cases, the test portion may be increased.

DNA extractions shall be carried out at least on two test portions.

Storage of standards, samples and test portions shall comply with ISO 24276 and shall be organized in such a way as to preserve the biochemical parameters to be analysed (for details, see ISO/IEC 17025).

**5.1.2    Samples**

All operations for the preparation of test samples (e.g. grinding, homogenization, division, drying) shall be carried out in accordance with the laboratory design specified in ISO 24276:2006, 5.3.2, taking care to prevent all contamination of the sample or modification of its composition.

Laboratory samples shall be sufficiently homogeneous before reducing or grinding and before taking the test portion.

For liquid samples, shake the vessel containing the sample to improve the homogenization of the product. In the case of non-homogenous products like raw oils, check that the sediments have been completely removed from the walls of the vessel.

For solid matrices that cannot easily be suspended, the matrix shall be ground to reduce the particle size and/or facilitate the extractability of DNA. In such a case, attention shall be paid to the particle size. The test portion subjected to extraction shall contain a minimum number of particles. Milling/grinding devices should be capable of being thoroughly cleaned and shall be selected in order to achieve the expected particle number and particle size distribution within the test portion.

If components of the laboratory sample have been removed prior to extraction, then such procedures shall be reported.

Final food products that are solid or paste and have high lipid contents are often not easy to grind to the desired particle size in a single step. Several procedures may therefore be added, such as lipid removal using hexane after intermediate grinding, freezing or freeze-drying before grinding.

In order to facilitate the grinding of paste or viscous products, it is possible to apply one of the following treatments to certain matrices:

* heating to a maximum temperature of 40 °C;
* dissolving in an appropriate liquid such as water;
* freezing at a temperature below or equal to −20 °C.

Setelah perlakuan tersebut, homogenkan keseluruhan sampel laboratorium. Ambil dua porsi uji dengan mempertimbangkan kemungkinan pengenceran atau konsentrasinya.

Selama penggilingan/penggerusan, tindakan pencegahan harus dilakukan untuk memastikan bahwa pemanasan sampel terjaga pada kondisi minimum karena pemanasan dapat menimbulkan dampak negatif terhadap kualitas DNA yang diekstraksi.

Teknik penggilingan/penggerusan dengan risiko kontaminasi silang yang tinggi (seperti kombinasi penggunaan nitrogen cair dan mortar) harus dihindari sejauh mungkin. Sebagai cara berlaboratorium yang baik, setiap tahapan metodologi yang menghasilkan kontaminan harus dipisahkan dari semua tahap analitik lainnya.

Jika terdapat garam, rempah, gula bubuk dan/atau zat lain yang berpotensi mengganggu ekstraksi atau metode analitik, tahap pemurnian yang tepat harus dipertimbangkan sesuai dengan metode yang dipilih (lihat Lampiran A).

Sebagai contoh, dalam sampel dari matriks komposit, matriks target (misalnya lapisan tepung dari stik ikan) dapat diisolasi untuk ekstraksi DNA.

5.2    Ekstraksi/pemurnian DNA

**5.2.1    Umum**

Pertimbangan berikut berlaku untuk rancangan metode ekstraksi.

Kualitas dan hasil asam nukleat yang diekstraksi menggunakan metode tertentu pada matriks tertentu harus *repeatable* dan *reproducible* dalam analisis, asalkan terdapat asam nukleat yang cukup dalam matriks yang merupakan asal asam nukleat diekstraksi.

Agar DNA dengan kualitas baik dapat diperoleh, disarankan, untuk menghilangkan bagian berikut ini:

* polisakarida (pektin, selulosa, hemiselulosa, pati, pengental, dan lain-lain) menggunakan perlakuan enzim yang sesuai (misalnya pektinase, selulase, hemi-selulase, α-amilase) atau ekstraksi organik (misalnya CTAB/kloroform);
* RNA dan/atau protein menggunakan perlakuan yang sesuai, seperti perlakuan enzimatik, masing-masing menggunakan RNase dan proteinase;
* fraksi lipid menggunakan misalnya perlakuan enzim, atau pelarut (misalnya *n*-heksana);
* garam (misalnya yang berasal dari bufer ekstraksi/lisis, dari tahap presipitasi) yang dapat mengganggu proses analisis selanjutnya.

Khususnya untuk sampel padat atau kering, volume bufer lisis/ekstraksi harus disesuaikan untuk menjamin DNA tersebut dapat larut.

**CATATAN 1**    Pemurnian DNA dapat dilakukan dengan cara yang berbeda seperti presipitasi fraksionasi, menggunakan pelarut seperti fenol, kloroform, etanol, isopropanol, dan/atau dengan adsorpsi pada matriks padat (*anion exchange resin*, gel silika atau gel kaca, tanah diatom, membran, dan lain-lain). Beberapa prinsip pemurnian DNA dapat digabungkan. Jika sesuai, ekstraksi dan pemurnian dapat dilakukan dalam tahapan yang sama.

After such treatment, homogenize the whole laboratory sample. Sample the two test portions, taking into account possible dilutions or concentrations.

During milling/grinding, precautions should be taken to ensure that the heating of the sample is kept to a minimum since heating can have a negative impact on the quality of the extracted DNA.

Milling/grinding techniques with a high risk of cross-contamination (such as the combined use of liquid nitrogen and mortar) shall be avoided as far as possible. As a rule of good practice, any dust-producing methodological step should be contained from all other analytical steps.

If salts, spices, powdered sugars and/or other substances that could potentially interfere with the extraction or analytical method are present, appropriate purification steps should be considered according to the selected method (see Annex A).

For example, in samples from composite matrices, the target matrix (e.g. the breading layer of fish sticks) can be isolated for DNA extraction.

**5.2    DNA extraction/purification**

**5.2.1    General**

The following considerations apply for the design of extraction methods.

The quality and yield of nucleic acid extracted using a given method on a given matrix should be both repeatable and reproducible in terms of analysis, provided sufficient nucleic acid is present in the matrix from which it has been extracted.

In order to obtain a good quality DNA, it is advisable, where relevant, to remove the following:

* polysaccharides (pectin, cellulose, hemi-cellulose, starch, thickeners, etc.) using appropriate enzyme treatments (e.g. pectinase, cellulase, hemi-cellulase, α-amylase) or organic extraction (e.g. CTAB/chloroform);
* RNA and/or proteins using an appropriate treatment, such as enzymatic treatment by RNase and proteinase, respectively;
* the lipid fractions using for example enzyme treatments, or solvents (e.g. *n*-hexane);
* salts (e.g. from the extraction/lysis buffer, from the precipitation step) able to interfere with the subsequent analysis.

In particular for solid or dried samples, the volume of lysis/extraction buffer should be adapted to guarantee the DNA is dissolved.

**NOTE 1**    DNA purification can be performed by different means such as fractionated precipitation, using solvents like phenol, chloroform, ethanol, isopropanol, and/or by adsorption on solid matrices (anion exchange resin, silica or glass gel, diatomaceous earth, membranes, etc.). Several DNA purification principles may be combined. If appropriate, extraction and purification can be performed within the same step.

Apabila ko-presipitan DNA seperti glikogen, PEG atau t-RNA digunakan untuk meningkatkan perolehan kembali DNA selama tahap presipitasi, maka ko-presipitan DNA tersebut sebaiknya tidak mengandung tingkat aktivitas nuklease atau inhibitor/kompetitor PCR yang dapat dideteksi, atau tidak membawa kesamaan sekuens dengan target PCR potensial yang diperiksa. Untuk tanaman produk rekayasa genetik, *carrier* DNA dapat digunakan (misalnya DNA sperma salmon atau *herring*).

Saat menggunakan pengering vakum beku untuk mengeringkan pelet DNA yang diperoleh setelah tahap presipitasi, risiko kontaminasi silang harus dipertimbangkan.

Lakukan resuspensi DNA dalam air atau dalam larutan bufer yang dapat mencegah DNA dari degradasi.

**CONTOH**    bufer tris/EDTA (1× atau 0,1× TE) pH 8,0 cocok digunakan untuk resuspensi atau untuk pengenceran DNA.

Ketika menyiapkan jenis ekstraksi DNA baru, atau ketika menerapkan salah satu metode yang dijelaskan pada Lampiran A untuk matriks baru, kualitas dan integritas potensial dari DNA yang diekstraksi menggunakan protokol yang dipilih harus diestimasi dengan pendekatan berikut. DNA pelacak dengan jumlah tertentu ditambahkan ke buffer lisis ditambah sampel yang digunakan untuk ekstraksi DNA. Ketika pelacak yang dipilih adalah sejumlah DNA yang ditentukan sebelumnya atau mewakili sejumlah *copy* sekuens DNA tertentu yang dicampur ke matriks pada awal ekstraksi DNA, perhatian harus diberikan untuk memastikan sedikitnya kemiripan sekuens DNA antara DNA pelacak dan sekuens DNA target yang diuji.

**CATATAN 2**    Penggunaan DNA pelacak merupakan alat estimasi yang sesuai untuk mengetahui kondisi sebenarnya ketika terdapat kemungkinan kompleksitas antara DNA dari matriks tertentu dengan komponen lainnya (misalnya protein). Metode tersebut juga dapat digunakan untuk mengestimasi keberadaan inhibitor PCR terlarut dan *trans-acting* dalam DNA yang diekstraksi (lihat ISO 24276, ISO 21569 dan ISO 21570).

Akan tetapi, DNA pelacak dapat memberikan kesalahan informasi terkait perolehan DNA kembali karena DNA pelacak mungkin lebih mudah terpisah dari matriks dibandingkan dengan DNA target.

**5.2.2    Kontrol**

Kontrol yang digunakan dijelaskan dalam Tabel 1 ISO 24276:2006. Kontrol ini direkomendasikan minimal mencakup kontrol blanko dan kontrol positif ekstraksi, tetapi dapat juga mencakup kontrol lingkungan.

**5.2.3    Kontrol kemurnian DNA: Kontrol PCR internal**

Saat menyiapkan jenis ekstraksi baru, keberadaan inhibitor PCR dalam DNA yang diekstraksi dapat diperkirakan dengan menggunakan DNA *spikes* (lihat ISO 24276, ISO 21569, dan ISO 21570). Jumlah DNA yang ditambahkan harus tidak melebihi batas maksimum yang dibutuhkan dalam PCR dan harus mengandung jumlah *copy* sekuens target yang pasti. Jumlah ini harus ditentukan secara individual untuk setiap sekuens target dan ditunjukkan sebagai kelipatan dari batas bawah deteksi yang ada. Idealnya, konsentrasi kontrol positif target PCR sebaiknya sesuai dengan sensitivitas yang diperlukan dalam analisis. Perhatian harus diberikan saat menggunakan DNA target yang diklon dengan kepekatan tinggi. Sedapat mungkin, kontrol positif harus sesuai dengan kondisi bahan uji yang berkaitan dengan kandungan asam nukleat.

Should a DNA co-precipitant such as glycogen, PEG or t-RNA be used to improve the DNA recovery during the precipitation steps, it should neither contain any detectable level of nuclease activity or PCR inhibitors/competitors, nor bear any sequence similarity with the potential PCR target under study. For genetically modified plants, a carrier DNA may be used (e.g. salmon or herring sperm DNA).

When using vacuum freeze dryers to dry the DNA pellets obtained after a precipitation step, the risk of cross contamination should be taken into account.

Re-suspend the DNA in water or in a buffer solution that prevents DNA from degradation.

**EXAMPLE**    A tris/EDTA (TE, 1× or 0,1×) buffer adjusted to pH 8,0 is appropriate for re-suspending or diluting DNA.

When setting up a new type of DNA extraction, or when applying one of the methods described in Annex A to a new matrix, the potential quality and integrity of the extracted DNA using the chosen protocol should be estimated by the following approach. A known quantity of a tracer DNA is added to the lysis buffer plus sample used for DNA extraction. When the chosen tracer is a predetermined amount of DNA or represents a predetermined number of copies of a particular DNA-sequence mixed to a matrix at start of DNA extraction, attention shall be paid to ascertain the lack of DNA sequence similarity between the tracer DNA and the target DNA sequence under study.

**NOTE 2**    The use of a tracer DNA is a good approximation to a real situation where DNA of a given matrix, complexed to other components (e.g. proteins) is expected. Such a method may also be used to estimate the presence of soluble and *trans*-acting PCR inhibitors in the extracted DNA (see ISO 24276, ISO 21569 and ISO 21570).

However, tracer DNA may give a misleading impression of recovery, since tracer DNA may be much easier to separate from matrix than the target DNA.

**5.2.2    Controls**

The controls to be included are described in Table 1 of ISO 24276:2006. These should as a minimum include an extraction blank control and a positive extraction control, but may also include an environment control.

**5.2.3    Control of DNA purity: Internal PCR control**

When setting up a new type of extraction, the presence of PCR inhibitors in the extracted DNA may be estimated using DNA spikes (see ISO 24276, ISO 21569 and ISO 21570). The amount of added DNA shall not exceed the maximum level supported by PCR and shall contain a definite number of target sequence copies. This number should be determined individually for each target sequence and indicated as a multiple of the existing lower limit of detection. Ideally, the target concentration of the positive control PCR should correspond to the sensitivity needed in the analysis. Care shall be taken when using highly concentrated cloned target DNA. As far as possible, the positive controls shall conform to the conditions of the test material with regard to the nucleic acids they contain.

5.3    Kuantifikasi DNA hasil ekstraksi

**5.3.1    Umum**

Kualitas, integritas, dan jumlah cetakan asam nukleat memengaruhi kinerja metode dan hasil analitik yang diperoleh. Oleh karena itu, batas deteksi metode tertentu dapat bergantung pada jumlah asam nukleat yang digunakan. Jumlah total DNA yang digunakan dalam PCR harus ditentukan dan jumlah total dari DNA takson target harus diperhitungkan, mengingat DNA takson yang tidak ditargetkan dapat memengaruhi efisiensi PCR.

Kuantifikasi DNA bermanfaat untuk

* membandingkan efisiensi protokol ekstraksi DNA yang berbeda untuk matriks tertentu (*repeatability*), dan
* mengukur konsentrasi asam nukleat sebelum tahap analisis.

**5.3.2    Kisaran aplikasi**

Setiap metode kuantifikasi harus diterapkan dalam kisaran dinamisnya, juga mempertimbangkan tingkat presisinya.

**5.3.3    Standar kuantitas**

Keakuratan metode kuantifikasi tergantung pada standar asam nukleat yang digunakan dalam melakukan kalibrasi metode.

Jika menggunakan metode yang sensitif terhadap ukuran dan/atau kualitas fragmen asam nukleat, maka harus digunakan standar asam nukleat yang sesuai dengan ukuran dan/atau kualitas asam nukleat yang diharapkan seperti asam nukleat yang diekstraksi.

Bahan acuan yang digunakan sebaiknya dipastikan ketertelusurannya terhadap acuan yang dinyatakan, biasanya standar nasional atau internasional, melalui rantai perbandingan yang tidak terputus [lihat ISO Guide 30].

Apabila metode yang menggunakan agen interkalasi diterapkan, standar DNA massa molekul tinggi harus digunakan untuk mengkuantifikasi DNA massa molekul tinggi. DNA massa molekul rendah harus digunakan untuk mengkuantifikasi DNA massa molekul rendah. Asam nukleat massa molekul tinggi biasanya juga mengandung sejumlah fragmen dengan massa molekul rendah. Hal ini berarti bahwa banyak metode untuk kuantifikasi DNA memiliki tingkat ketidakakuratan, yang harus dipertimbangkan.

**CATATAN**    Selain itu, tergantung pada matriks dan jenis metode ekstraksi, porsi tertentu dari DNA yang diekstraksi mungkin diperoleh kembali sebagai DNA utas tunggal (dengan kapasitas interkalasi yang lebih buruk), menyebabkan kandungan DNA tidak terestimasi secara keseluruhan. Sebaliknya, DNA utas tunggal terdeteksi dengan baik dan merata melalui pengukuran secara fisika.

Setidaknya tiga poin (sebaiknya direplikasi) diperlukan untuk konstruksi kurva kalibrasi yang baik. Jumlah DNA standar yang digunakan untuk setiap poin kalibrasi tergantung pada sensitivitas metode dan kisaran dinamis yang dipertimbangkan.

**5.3    Quantitation of the extracted DNA**

**5.3.1    General**

The quality, integrity and amount of the nucleic acid template influences the performance of the analytical method, and hence the analytical results obtained. The limit of detection of a specific method may therefore depend on the amount of nucleic acids used. The total amount of DNA used in the PCR should be determined as well as the total amount of target taxon DNA shall be considered, as non-target taxon DNA can affect the efficiency of the PCR.

Quantitation of DNA is helpful

* to compare the efficiency of different DNA extraction protocols for a given matrix (repeatability), and
* to measure the concentration of nucleic acids prior to analysis.

**5.3.2    Range of application**

Each method of quantitation shall be applied within its dynamic range, also considering its level of precision.

**5.3.3    Quantity standards**

The accuracy of the quantitation methods depends on the nucleic acid standards used to calibrate the method.

If using a method that is sensitive to the size and/or quality of the nucleic acid fragments, then the nucleic acid standards that match the size and/or quality of the expected nucleic acid as extracted from the sample shall be used.

The reference material used should ensure traceability to stated references, usually national or international Standards, through an unbroken chain of comparison [see ISO Guide 30].

When a method using intercalating agents is employed, high molecular mass DNA standard should be used when high molecular mass DNA is to be quantified. Low molecular mass DNA should be used when low molecular mass DNA is to be quantified. High molecular mass nucleic acid usually also contains a certain amount of lower molecular mass fragments. This means that many methods for DNA quantitation suffer from a certain degree of inaccuracy, which should be taken into account.

**NOTE**    Additionally, depending on the matrix and type of extraction method, a certain portion of the extracted DNA may be recovered as single-stranded DNA (with much poorer intercalation capacity), leading to an underestimation of the overall DNA content. In contrast, single-stranded DNA is equally well detected by physical measurements.

At least three points (preferably replicated) are required for the construction of a good calibration curve. The amount of standard DNA used for each calibration point depends on the sensitivity of the method and on the dynamic range under consideration.

5.4    Stabilitas DNA hasil ekstraksi

DNA yang telah diekstraksi harus disimpan dalam kondisi di mana stabilitas DNA terjamin untuk analisis selanjutnya.

Tindakan pembekuan dan pencairan larutan DNA secara berulang harus dihindari.

6    Interpretasi

Metode ekstraksi DNA yang digunakan harus sesuai untuk memperoleh kualitas dan kuantitas asam nukleat yang dipersyaratkan pada analisis selanjutnya.

Kualitas asam nukleat yang diekstraksi harus diuji menggunakan metode analitik yang dipengaruhi oleh parameter kualitas yang sama seperti analisis yang akan dilakukan pada asam nukleat hasil ekstraksi (misalnya jika analisis yang akan dilakukan adalah PCR, kualitas DNA hasil ekstraksi harus diuji menggunakan kontrol PCR yang memadai).

Parameter lebih lanjut terkait kesesuaian metode dapat dilihat pada ISO 21569, ISO 21570 dan ISO 24276.

7    Laporan hasil uji

Saat menerbitkan laporan hasil uji akhir yang sesuai dengan ISO 24276, tambahan informasi pada dokumen terkait aktivitas laboratorium harus memuat:

* pernyataan yang menjelaskan asal-usul dari porsi uji, dan setiap pemrosesan awal dari sampel sebelum melakukan ekstraksi asam nukleat;
* ukuran porsi uji yang digunakan untuk ekstraksi asam nukleat;
* metode ekstraksi asam nukleat yang digunakan;
* pengamatan khusus yang dilakukan selama pengujian;
* langkah operasional yang tidak ditentukan dalam metode atau dianggap opsional tetapi berpengaruh terhadap hasil;
* interpretasi hasil;
* nama analis.

Penanganan dan penyimpanan data mentah dijelaskan pada ISO/IEC 17025 dan pada skema pemastian kualitas terkait. Konsistensi harus tercapai.

**5.4    Stability of extracted DNA**

The DNA extracted shall be stored under such conditions that the stability is ensured to perform the subsequent analyses.

Repeated freezing and thawing of DNA solutions should be avoided.

**6    Interpretation**

The DNA extraction method employed shall be appropriate to obtain the quality and quantity of nucleic acid required for the subsequent analysis.

The quality of the extracted nucleic acid should be assessed using an analytical method that is influenced by the same quality parameters as the analysis to be performed on the extracted nucleic acid (e.g. if the analysis to be performed is PCR, the quality of the extracted DNA should be assessed using adequate PCR controls).

Further parameters for method compatibility can be found in ISO 21569, ISO 21570 and ISO 24276.

**7    Test report**

When issuing the final test report in accordance with ISO 24276, the following additional information to document the activity of the laboratory shall be included:

* a statement describing the derivation of the test portions, and any preliminary processing of the sample before nucleic acid extraction;
* the size of the test portions used for the nucleic acid extraction;
* the nucleic acid extraction method used;
* any special observations made during testing;
* any operation not specified in the method or considered to be optional but that can have an effect on the results;
* the interpretation of the results;
* the experimentor's name.

Handling and storage of raw data are described in ISO/IEC 17025 and related quality assurance schemes. Consistency should be achieved.

# Lampiran A

(informatif)

**Metode untuk ekstraksi DNA**

**A.1    Preparasi DNA berkualitas PCR menggunakan metode ekstraksi DNA berbasis fenol/kloroform**

**A.1.1    Metode fenol/kloroform dasar**

**A.1.1.1    Umum**

Metode rutin ini (lihat Referensi [5]) sesuai untuk ekstraksi DNA yang berasal dari berbagai macam matriks (lihat A.1.1.8).

Fenol biasanya sangat sesuai untuk destruksi enzim nuklease dan denaturasi protein.

Apabila yang diuji adalah daun atau bahan hijau (misalnya daun *chicory*, alfalfa kering), maka inhibitor PCR juga dapat berko-presipitasi secara bersamaan dengan DNA. Dengan demikian, mungkin terjadi kesulitan untuk memperoleh DNA yang dapat diamplifikasi PCR secara *reproducible*.

Sifat bahaya korosif dari fenol harus menjadi perhatian, oleh sebab itu penggunaan metode ekstraksi DNA berdasarkan CTAB dan/atau PVP dan/atau adsorpsi silika lebih disukai sebagai metode alternatif utama.

**A.1.1.2    Status validasi**

Metode ini telah diterapkan secara luas di semua bidang biologi, agronomi, dan kedokteran, selama 40 tahun terakhir, tetapi belum pernah dievaluasi melalui studi interlaboratorium untuk deteksi produk rekayasa genetik/PRG (*genetically modified organism/*GMO) pada bahan pangan.

**A.1.1.3    Prinsip**

Metode ini terdiri dari tahap lisis (lisis termal dengan ketersediaan natrium dodesil sulfat dan kandungan EDTA yang tinggi) diikuti dengan penghilangan kontaminan (seperti molekul lipofilik, polisakarida, dan protein) dan enzim nuklease dari fase cair yang mengandung DNA dengan menggunakan fenol dan kloroform. Presipitasi DNA akhir menggunakan etanol akan memekatkan DNA dan menghilangkan garam dan residu kloroform. Tahapan kritis dari metode ini adalah tahap lisis [5].

**A.1.1.4    Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

**A.1.1.5    Reagen**

**A.1.1.5.1    Etanol**, fraksi volume *ϕ*(C2H5OH) = 96%

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**Annex** **A**

(informative)

**Methods for DNA extraction**

**A.1    Preparation of PCR-quality DNA using phenol/chloroform-based DNA extraction methods**

**A.1.1    Basic phenol/chloroform method**

**A.1.1.1    General**

This routine method (see Reference [5]) is suitable for the extraction of DNA from a wide variety of matrices (see A.1.1.8).

Phenol is usually very suitable for nuclease destruction and protein denaturation.

When foliar or green material (e.g. chicory leaves, dried alfalfa) is investigated, many PCR inhibitors may also be co-precipitated together with DNA. For this reason, difficulties may be encountered in obtaining PCR-amplifiable DNA reproducibly.

The corrosive hazardous properties of phenol must be taken into consideration, thus the use of DNA extraction methods based on CTAB and/or PVP and/or silica adsorption are favoured as primary alternatives.

**A.1.1.2    Validation status**

The method has been widely applied in all areas of biology, agronomy and medicine, over the past 40 years, but has never been evaluated through interlaboratory studies for GMO detection in foodstuffs.

**A.1.1.3    Principle**

The method consists of a lysis step (thermal lysis in presence of sodium dodecyl sulfate and a high EDTA content) followed by the removal of contaminants (such as lipophylic molecules, polysaccharides and proteins) and nucleases from the DNA-containing aqueous phase using phenol and chloroform. A final DNA precipitation with ethanol concentrates the DNA and eliminates salts and residual chloroform. The critical step of the method is the lysis step [5].

**A.1.1.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for handling organic chemicals.

**A.1.1.5    Reagents**

**A.1.1.5.1    Ethanol**, volume fraction *ϕ* (C2H5OH) = 96 %

Store and use at −20 °C.

**A.1.1.5.2    Asam asetat glasial** (CH3COOH).

**A.1.1.5.3    Kalium asetat** (C2H3O2K).

**A.1.1.5.4    Asam klorida**, *ϕ*(HCl) = 37%.

**A.1.1.5.5    Isoamil alkohol** [(CH3)2CHCH2CH2OH].

**A.1.1.5.6    Fenol** (C6H5OH).

**A.1.1.5.7    Kloroform** (CHCl3).

**A.1.1.5.8    Tris(hidroksimetil)-aminometana** (Tris) (C4H11NO3).

**A.1.1.5.9    Garam dikalium asam etilendiaminatetraasetat** (K2EDTA) (C10H14N2O8K2).

**A.1.1.5.10    Kalium hidroksida** (KOH).

**A.1.1.5.11    Kalium klorida** (KCl).

**A.1.1.5.12    Natrium dodesil** **sulfat** (*sodium dodecyl sulfate*/SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.1.5.13    Proteinase K**, sekitar 20 Units/mg liofilisat.

**A.1.1.5.14    RNase-A**, bebas DNase, dari pankreas sapi, sekitar 50 Kunitz Units/mg liofilisat.

**A.1.1.5.15    Fenol setimbang**, pH > 7,8.

Gunakan fenol setimbang dengan bufer ekstraksi (A.1.1.5.18) tanpa SDS, atau disiapkan sesuai dengan Referensi [5], atau sesuai dengan rekomendasi pemanufaktur.

**A.1.1.5.16    Kloroform-isoamil alkohol**

Campurkan kloroform (A.1.1.5.7) sebanyak 24 bagian volume dengan isoamil alkohol (A.1.1.5.5) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.1.5.17    Fenol-kloroform-isoamil alkohol**

Campurkan fenol setimbang (A.1.1.5.15) sebanyak 1 bagian volume dengan larutan kloroform-isoamil alkohol (A.1.1.5.16) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.1.5.18    Bufer ekstraksi/lisis**, konsentrasi zat *c*(Tris) = 0,050 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,050 mol/l, konsentrasi massa *ρ*(SDS) = 30 g/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau KOH.

**A.1.1.5.19    Bufer TE**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau KOH.

**A.1.1.5.20    Larutan Proteinase-K**, *ρ* = 20 mg/ml, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.1.1.5.2    Glacial acetic acid** (CH3COOH).

**A.1.1.5.3    Potassium acetate** (C2H3O2K).

**A.1.1.5.4    Hydrochloric acid**, *ϕ*(HCl) = 37 %.

**A.1.1.5.5    Isoamyl alcohol** [(CH3)2CHCH2CH2OH].

**A.1.1.5.6    Phenol** (C6H5OH).

**A.1.1.5.7    Chloroform** (CHCl3).

**A.1.1.5.8    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.1.1.5.9    Ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt** (K2EDTA) (C10H14N2O8K2).

**A.1.1.5.10    Potassium hydroxide** (KOH).

**A.1.1.5.11    Potassium chloride** (KCl).

**A.1.1.5.12    Sodium dodecyl sulfate** (SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.1.5.13    Proteinase K**, approximately 20 Units/mg lyophilisate.

**A.1.1.5.14    RNase-A**, DNase-free, from bovine pancreas, approximately 50 Kunitz Units/mg of lyophilisate.

**A.1.1.5.15    Equilibrated phenol**, pH > 7,8.

Use phenol equilibrated against extraction buffer (A.1.1.5.18) without SDS, or prepared according to Reference [5], or according to the manufacturers recommendations.

**A.1.1.5.16    Chloroform-isoamyl alcohol**

Mix 24 volume parts of chloroform (A.1.1.5.7) with 1 volume part of isoamyl alcohol (A.1.1.5.5).

**A.1.1.5.17    Phenol-chloroform-isoamyl alcohol**

Mix 1 volume part of equilibrated phenol (A.1.1.5.15) with 1 volume part of the chloroform-isoamyl alcohol solution (A.1.1.5.16).

**A.1.1.5.18    Extraction/lysis buffer**, substance concentration *c*(Tris) = 0,050 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,050 mol/l, mass concentration *ρ*(SDS) = 30 g/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or KOH.

**A.1.1.5.19    TE buffer**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or KOH.

**A.1.1.5.20    Proteinase-K solution**, *ρ* = 20 mg/ml, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.1.1.5.21    Larutan RNase-A**, *ρ* = 10 mg/ml liofilisat.

Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.1.1.5.22    Larutan etanol**, *ϕ*(C2H5OH) = 70%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.1.1.5.23    Larutan kalium asetat**, *c*(C2H3O2K) = 3 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 5,2 menggunakan asam asetat glasial. Tidak boleh diautoklaf. Jika perlu, saring dengan filter 0,22 μm.

**A.1.1.6    Peralatan**

Peralatan laboratorium yang biasa digunakan dan, khususnya, peralatan berikut.

**A.1.1.6.1    *Centrifuge***, memiliki kemampuan memutar dengan percepatan putar minimum 10.000 × *g*.

Dalam beberapa tahap kegiatan, diperlukan *centrifuge* berpendingin.

**A.1.1.6.2    Penangas air atau inkubator**, mempunyai kisaran suhu kerja 60  – 70 °C.

**A.1.1.6.3    Pengering vakum** (opsional).

**A.1.1.6.4    Pengering beku** (opsional).

**A.1.1.6.5    Mikser**, misalnya Vortex®[[1]](#footnote-1))

**A.1.1.6.6    Tabung mikro *centrifuge***, tahan terhadap pembekuan dalam nitrogen cair.

**A.1.1.7    Prosedur**

**A.1.1.7.1    Umum**

Setelah porsi uji matriks selesai dipersiapkan, terapkan protokol ekstraksi/pemurnian DNA berikut. Adaptasi skala alat ukur massa dan volume bufer diperlukan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih.

**A.1.1.7.2    Prosedur ekstraksi**

Timbang 0,25 g sampel uji di dalam tabung mikro.

**A.1.1.5.21    RNase-A solution**, *ρ* = 10 mg/ml lyophylisate.

Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.1.1.5.22    Ethanol solution**, *ϕ* (C2H5OH) = 70 %.

Store and use at −20 °C.

**A.1.1.5.23    Potassium acetate solution**, *c*(C2H3O2K) = 3 mol/l.

Adjust the pH to 5,2 with glacial acetic acid. Do not autoclave. If necessary, filter through a 0,22 µm filter.

**A.1.1.6    Apparatus and equipment**

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

**A.1.1.6.1    Centrifuge**, capable of achieving a minimum acceleration of 10 000 *g*.

In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.1.1.6.2    Water bath or incubator**, working in a temperature range from 60 °C to 70 °C.

**A.1.1.6.3    Vacuum dryer** (optional).

**A.1.1.6.4    Freeze dryer** (optional).

**A.1.1.6.5    Mixer**, e.g. Vortex®1)

**A.1.1.6.6    Reaction vessels**, resistant to freezing in liquid nitrogen.

**A.1.1.7    Procedure**

**A.1.1.7.1    General**

Once the matrix test portion has been prepared, apply the following DNA extraction/purification protocol. Scale-adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

**A.1.1.7.2    Extraction procedure**

Weigh 0,25 g of the test sample into a microtube.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1)    Vortex is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this Standard and does not constitute an endorsement by ISO of this product. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results.

Tambahkan 1,6 ml bufer ekstraksi (A.1.1.5.18) dan, jika diperlukan (misalnya pada matriks yang kaya protein) tambahkan 50 μl larutan proteinase K (A.1.1.5.20). Inkubasi pada suhu (60 – 70) °C, biasanya selama 30 menit hingga 2 jam (inkubasi semalaman juga dimungkinkan). Tambahkan RNase A (A.1.1.5.21) hingga konsentrasi akhir sebesar 0,1 μg/ml. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 5.000 × *g* selama 30 menit dan kumpulkan supernatan di dalam tabung baru. Tambahkan fenol setimbang (A.1.1.5.15) sebanyak 1 bagian volume ke dalam supernatan, lalu aduk secara perlahan dan menyeluruh. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 5.000 × *g* selama 15 menit dan kumpulkan kembali fase cair yang terdapat pada bagian atas ke dalam tabung baru. Tambahkan fenol-kloroform isoamil alkohol (A.1.1.5.17) sebanyak 1 bagian volume ke dalam supernatan, lalu aduk secara perlahan dan menyeluruh. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 5.000 × *g* selama 15 menit dan kumpulkan kembali fase cair ke dalam tabung baru. Ulangi tahap ini satu kali atau beberapa kali (tergantung jenis matriks) hingga lapisan pembatas antara kedua fase larutan sudah terlihat bersih.

Tambahkan kloroform/isoamil alkohol (A.1.1.5.16) sebanyak 1 bagian volume ke dalam supernatan, lalu aduk secara perlahan dan menyeluruh. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 5.000 × *g* selama 10 menit dan kumpulkan fase cair yang terdapat pada bagian atas ke dalam tabung baru. Ulangi tahap ini, jika diperlukan, hingga lapisan pembatas antara kedua fase larutan sudah terlihat bersih. Campurkan supernatan dengan larutan kalium asetat (A.1.1.5.23) sebanyak 0,1 bagian volume dan etanol 96% (A.1.1.5.1) sebanyak 2,5 bagian volume, kemudian aduk secara merata dengan cara membolak-balik tabung. Inkubasi selama minimal 5 menit dalam nitrogen cair, atau selama 1 jam pada suhu −80 °C, atau semalaman pada suhu −20 °C. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 10.000 × *g* (atau hingga 13.000 × *g*) pada suhu 4 °C setidaknya selama 15 menit, lalu buang supernatan dengan hati-hati.

Cuci pelet DNA dengan hati-hati menggunakan larutan etanol 70% (A.1.1.5.22) sebanyak 2 bagian volume. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar (10.000 *–* 13.000) × *g* pada suhu 4 °C selama 15 menit, lalu buang supernatan dengan hati-hati. Tahap ini sangat penting untuk menghilangkan garam-garam yang mengendap yang dapat mengganggu proses analisis selanjutnya (misalnya PCR).

Keringkan pelet DNA dan larutkan kembali dalam 100 μl air atau bufer yang sesuai, misalnya bufer TE (A.1.1.5.19). Larutan ini merupakan master stok DNA. Tambahkan RNase-A (A.1.1.5.21) hingga konsentrasi akhir sebesar 0,1 μg/ml.

**A.1.1.8    Daftar contoh**

Metode ini telah berhasil diterapkan untuk mengekstrak DNA[[2]](#footnote-2)) dari matriks berikut:

kacang kedelai yang diasamkan2), alfalfa yang dikeringkan, biskuit bayi2), susu bayi2), bakteri dan spora daripadanya, biji jelai, *beef/pork paté*2), bir2), keju biru, brownies2), jagung kaleng, biji wortel, sereal batangan2), keju, nuget ayam, daun *chicory*, akar *chicory*, kukis cokelat2), pasta cokelat2), kukis kayu manis2), *compotes*, *cornflakes*2), *cracked rice*, *dessert cream*2), *dried pea seeds*, biskuit jagung2), *maize feeding oil cakes*, tepung jagung, pakan gluten jagung, biji jagung, pelet keras ubi kayu untuk pakan, daging ubi kayu, daging segar dan matang2) (sapi, babi, ayam dan kalkun), daging buah melon, biji melon, daging cincang, *muesli ingredients*2), *muesli*2), kecambah kacang hijau2), biji oat, umbi kentang, *rapeseed feeding oil cake*, *glupacolza*, *rapeseed seeds*, sosis (irisan2) dan koktail2))

Add 1,6 ml of extraction buffer (A.1.1.5.18) and, when necessary (e.g. in protein-rich matrices), 50 µl of proteinase K solution (A.1.1.5.20.) Incubate at 60 °C to 70 °C, usually for between 30 min to 2 h (overnight incubation is also possible). Add RNase A (A.1.1.5.21) up to a final concentration of 0,1 µg/ml. Centrifuge at 5 000 *g* for 30 min and recover the supernatant in a fresh tube. Add 1 volume of equilibrated phenol (A.1.1.5.15) to the supernatant, then mix gently and thoroughly. Centrifuge at 5 000 *g* for 15 min and recover the upper aqueous phase in a fresh tube. Add 1 volume of phenol-chloroform isoamyl alcohol (A.1.1.5.17) to the supernatant, then mix gently and thoroughly. Centrifuge at 5 000 *g* for 15 min and recover the aqueous phase in a fresh tube. Repeat this step once or more times (depending on the matrix) until the interface between the phases is clean.

Add 1 volume of chloroform/isoamyl alcohol (A.1.1.5.16) to the supernatant, then mix gently and thoroughly. Centrifuge at 5 000 *g* for 10 min and recover the upper aqueous phase in a fresh tube. Repeat, if necessary, until the interface between the phases is clear. Mix the supernatant with 0,1 volume of potassium acetate solution (A.1.1.5.23.) and 2,5 volumes of 96 % ethanol (A.1.1.5.1), then mix thoroughly by inversion. Incubate for at least 5 min in liquid nitrogen, or 1 h at −80 °C, or overnight at −20 °C. Centrifuge at 10 000 *g* (or up to 13 000 *g*) at 4 °C for at least 15 min, then carefully discard the supernatant.

Carefully wash the DNA pellet with 2 volumes of 70 % ethanol solution (A.1.1.5.22). Centrifuge at 10 000 *g* to 13 000 *g* at 4 °C for 15 min, then discard carefully the supernatant. This step is essential for the removal of the precipitating salts that could interfere with the subsequent analysis (e.g. PCR).

Dry the pellet and re-dissolve it in 100 µl of water or appropriate buffer, e.g. TE buffer (A.1.1.5.19). This is the DNA master stock. Add RNase-A (A.1.1.5.21) up to a final concentration of 0,1 µg/ml.

**A.1.1.8    List of examples**

The method has been successfully applied to extract DNA2) from the following matrices:

acidified soya beans2), dehydrated alfalfa, baby biscuits2), baby milk2), bacteria and spores thereof, barley seeds, beef/pork paté2), beer2), blue cheese, brownies2), canned corn, carrot seeds, cereal bars2), cheese, chicken nuggets, chicory leaves, chicory roots, chocolate cookies2), chocolate paste2), cinnamon cookies2), compotes, cornflakes2), cracked rice, dessert cream2), dried pea seeds, maize biscuits2), maize feeding oil cakes, maize flour, maize gluten feed, maize seeds, manioc hard pellets for feed, manioc tapioca meat, fresh and cooked2) meats (beef, pork, chicken and turkey), melon fruit pulp, melon seeds, minced meat, muesli ingredients2), muesli2), mung bean sprouts2), oat seeds, potato tuber, rapeseed feeding oil cake, glupacolza, rapeseed seeds, sausages (slicing2) and cocktail2))

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

2)    Repeatability may depend on the batch of the matrix and/or to its production technology. In some cases, DNA could not be found or was degraded in such way that PCR results were below the limit of detection of the method, irrespective of the PCR primers/protocols used. This may be a source of low reproducibility between laboratories.

(lihat A.1.2 untuk metode ekstraksi yang diperbarui), *schnitzel*, *sooie hoi sin*2), *soup balls*, *soya protein in meat preparations*2), lesitin kedelai (*raw brown and yellow refined*2)),kecambah kedelai2), minuman kedelai, kacang kedelai, krim kacang kedelai, *soya bean feeding oil cake*, tahu kedelai, saus spageti2), *spelt seeds*, gula bit (*dried pulp*), gula bit (*fresh root*), biji gula bit, biji bunga matahari, tahu, buah tomat segar, pure tomat2), biji tomat, hamburger vegetarian, wafel (dengan2) dan tanpa2) cokelat), dedak gandum, tepung gandum, pakan gluten gandum, biji gandum, semolina gandum, *yoghurt*2) (lihat A.1.3 untuk metode ekstraksi DNA yang diperbarui).

**A.1.2    Metode fenol/kloroform: Protokol untuk kultur starter sosis fermentasi**

**A.1.2.1    Umum**

Metode ini dirancang untuk mengisolasi DNA total, termasuk DNA genom bakteri, yang berasal dari sosis. Aplikabilitas metode untuk memperoleh DNA berkualitas tinggi yang sesuai untuk deteksi DNA rekombinan secara spesifik menggunakan PCR telah terbukti untuk sosis fermentasi[6] serta sosis fermentasi yang diberi perlakuan termal, yang disebut sebagai *summer sausages*[7]. Selain itu, metode ekstraksi ini terbukti sesuai untuk mengisolasi DNA total dari krim untuk mendeteksi secara spesifik *Staphylococcus aureus* yangterdapat dalam matriks pangan ini[8]. (Untuk ringkasan matriks yang sesuai dengan metode ini, lihat A.1.2.8.).

**A.1.2.2    Status validasi**

Metode ini telah divalidasi melalui studi interlaboratorium pada porsi uji sebesar 0,4 g (lihat A.1.2.9).

**A.1.2.3    Prinsip**

Metode terdiri dari perolehan kembali sel bakteri dari matriks pangan melalui homogenisasi sampel sosis, diikuti dengan tahap sentrifugasi. Sedimen tidak hanya mengandung sel bakteri tetapi juga partikel daging. Untuk lisis sel bakteri secara spesifik, dinding sel bakteri didegradasi melalui penambahan lisozim. Untuk meningkatkan degradasi dinding sel dari laktobasili daging, dapat ditambahkan mutanolisin. Lisis sel secara lengkap dilakukan melalui penambahan deterjen SDS (natrium dodesil sulfat/*sodium dodecyl sulfate*) dan proteinase-K, diikuti oleh beberapa ekstraksi terhadap fase cair menggunakan fenol dan/atau kloroform. Tahap ekstraksi fenol/kloroform merupakan tahap yang penting untuk mengeliminasi aktivitas nuklease dan senyawa penghambat PCR termasuk yang berasal dari matriks pangan (misalnya hematin). Presipitasi akhir dari DNA dilakukan menggunakan etanol.

**A.1.2.4    Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

**A.1.2.5**    **Reagen**

**A.1.2.5.1    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.1.2.5.2    Etanol**, *φ*(C2H5OH) = 96%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.1.2.5.3    Asam asetat glasial** (CH3COOH).

**A.1.2.5.4    Asam klorida,** *ϕ*(HCl) = 37%.

(see A.1.2 for an improved extraction method), schnitzel, sooie hoi sin2), soup balls, soya protein in meat preparations2), soya lecithin (raw brown and yellow refined2)), soya sprouts2), soya drinks, soya beans, soya bean cream, soya bean feeding oil cake, soya bean tofu, spaghetti sauce2), spelt seeds, sugar beet (dried pulp), sugar beet (fresh root), sugar beet seeds, sunflower seeds, tofu, tomato fresh fruit, tomato purée2), tomato seeds, vegetarian hamburger, waffles (with2) and without2) chocolate), wheat bran, wheat flour, wheat gluten feed, wheat seeds, wheat semolina, yoghurt2) (see A.1.3 for an improved extraction method).

**A.1.2    Phenol/chloroform method: Protocol for starter cultures of fermented sausages**

**A.1.2.1    General**

This method is designed to isolate the total DNA, including bacterial genomic DNA, from sausages. The applicability of the method to obtain DNA of high quality suitable for the specific detection of recombinant DNA by PCR has been demonstrated for fermented sausages[6] as well as for thermally treated fermented sausages, so-called summer sausages[7]. In addition, the extraction method was shown to be suitable to isolate total DNA from cream to detect specifically *Staphylococcus aureus* in this food matrix[8]. (For a summary of the matrices for which the method is suitable, see A.1.2.8.)

**A.1.2.2    Validation status**

This method has been validated by an interlaboratory study on a test portion of 0,4 g (see A.1.2.9).

**A.1.2.3    Principle**

The method consists of the recovery of bacterial cells from the food matrix by homogenization of the sausage samples, followed by a centrifugation step. The sediment contains not only bacterial cells but also meat particles. For specific lysis of the bacterial cells, the cell walls are degraded by addition of lysozyme. To improve the degradation of cell walls of meat lactobacilli, mutanolysin can be added. Complete lysis of the cells is performed by addition of the detergent SDS (sodium dodecyl sulfate) and proteinase-K, followed by several extractions of the aqueous phase with phenol and/or chloroform. The phenol/chloroform extraction step is important to eliminate any nuclease activities and PCR-inhibiting substances including those arising from the food matrix (e.g. haematin). A final precipitation of DNA by ethanol is performed.

**A.1.2.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for handling organic chemicals.

**A.1.2.5    Reagents**

**A.1.2.5.1    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.1.2.5.2    Ethanol**, *φ*(C2H5OH) = 96 %.

Store and use at −20 °C.

**A.1.2.5.3    Glacial acetic acid** (CH3COOH).

**A.1.2.5.4    Hydrochloric acid**, *ϕ*(HCl) = 37 %.

**A.1.2.5.5    Natrium hidroksida** (NaOH).

**A.1.2.5.6    Isoamil alkohol** [(CH3)2CHCH2CH2OH)].

**A.1.2.5.7    Fenol** (C6H5OH).

**A.1.2.5.8    Kloroform** (CHCl3).

**A.1.2.5.9    Tris(hidroksimetil)-aminometana**(Tris) (C4H11NO3).

**A.1.2.5.10    Garam dinatrium asam etilendiamintetraasetat** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.1.2.5.11    Natrium dodesil sulfat** (*sodium dodecyl sulfate*/SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.2.5.12    Lisozim**

50.000 U/mg protein (1 U akan menghasilkan Δ*A*450 sebesar 0,001 per menit pada pH 6,24 dan suhu 25 °C, menggunakan suspensi *Micrococcus lysodeikticus* sebagai substrat, dalam campuran reaksi sebanyak 2,6 ml menggunakan jalur cahaya berukuran 1 cm).

**A.1.2.5.13    Sukrosa** (C12H22O11).

**A.1.2.5.14    Proteinase-K,** sekitar 20 Units/mg liofilisat.

**A.1.2.5.15    Natrium asetat** (C2H3O2Na).

**A.1.2.5.16    Fenol setimbang,** dijenuhkan dengan bufer Tris/HCl (pH > 7,8), atau dipersiapkan sesuai dengan Referensi [5], atau sesuai dengan rekomendasi pemanufaktur.

**A.1.2.5.17    Kloroform-isoamil alkohol**

Campurkan kloroform (A.1.2.5.8) sebanyak 24 bagian volume dengan isoamil alkohol (A.1.2.5.6) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.2.5.18    Fenol-kloroform-isoamil alkohol**

Siapkan dengan cara mencampurkan fenol setimbang (A.1.2.5.16) sebanyak 25 bagian volume dengan kloroform (A.1.2.5.8) sebanyak 24 bagian volume serta isoamil alkohol (A.1.2.5.6) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.2.5.19    Larutan mutanolisin**, mengandung mutanolisin dengan konsentrasi 500 U/ml atau 5.000 U/ml, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan berulang.

**A.1.2.5.20    Larutan lisozim,** mengandung 10 mg/ml, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan berulang.

**A.1.2.5.21    Larutan sukrosa**, *ρ*(C12H22O11) = 400 g/l.

**A.1.2.5.5    Sodium hydroxide** (NaOH).

**A.1.2.5.6    Isoamyl alcohol** [(CH3)2CHCH2CH2OH)].

**A.1.2.5.7    Phenol** (C6H5OH).

**A.1.2.5.8    Chloroform** (CHCl3).

**A.1.2.5.9    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.1.2.5.10    Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.1.2.5.11    Sodium dodecyl sulfate** (SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.2.5.12    Lysozyme**

50 000 U/mg protein (1 U will produce a Δ*A*450 of 0,001 per minute at pH 6,24 and 25 °C, using a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* as substrate, in a 2,6 ml reaction mixture using a 1 cm light path).

**A.1.2.5.13    Sucrose** (C12H22O11).

**A.1.2.5.14    Proteinase-K**, approximately 20 Units/mg lyophilisate.

**A.1.2.5.15    Sodium acetate** (C2H3O2Na).

**A.1.2.5.16    Equilibrated phenol**, saturated with Tris/HCl (pH > 7,8) buffer, or prepared according to Reference [5], or according to the manufacturer's recommendations.

**A.1.2.5.17    Chloroform-isoamyl alcohol**

Mix 24 volume parts of chloroform (A.1.2.5.8) with 1 volume part of isoamyl alcohol (A.1.2.5.6).

**A.1.2.5.18    Phenol-chloroform-isoamyl alcohol**

Prepare by mixing 25 volume parts of equilibrated phenol (A.1.2.5.16) with 24 volume parts of chloroform (A.1.2.5.8) and 1 volume part of isoamyl alcohol (A.1.2.5.6).

**A.1.2.5.19    Mutanolysin-solution**, containing 500 U/ml or 5 000 U/ml mutanolysin, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.1.2.5.20    Lysozyme solution**, containing 10 mg/ml, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid freezing and thawing.

**A.1.2.5.21    Sucrose solution**, *ρ*(C12H22O11) = 400 g/l.

**A.1.2.5.22    Larutan bufer A**, *c*(Tris) = 0,020 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,020 mol/l, *c*(NaCl) = 0,1 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.1.2.5.23    Bufer ekstraksi/lisis**, mengandung larutan bufer A (A.1.2.5.22) sebanyak satu bagian volume dan larutan sukrosa (A.1.2.5.21) sebanyak satu bagian volume.

**A.1.2.5.24    Larutan SDS**, *ρ*(SDS) = 250 g/l.

**A.1.2.5.25    Larutan proteinase-K,** mengandung 20 mg/ml, disimpan pada suhu −20 °C, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan berulang.

**A.1.2.5.26    Larutan etanol**, *ϕ*(C2H5OH) = 70%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.1.2.5.27    Larutan natrium asestat**, *c*(C2H3O2Na) = 3 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 5,2 dengan asam asetat glasial.

**A.1.2.5.28    Bufer TE**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 dengan HCl atau NaOH.

**A.1.2.6    Peralatan**

Peralatan laboratorium yang biasa digunakan dan khususnya, peralatan berikut.

**A.1.2.6.1    Alat dan/atau bahan untuk memotong jaringan** (misalnya pisau bedah).

**A.1.2.6.2    *Centrifuge***, memiliki kemampuan memutar dengan percepatan putar hingga 12.000 × *g*.

Pada beberapa tahapan diperlukan *centrifuge* berpendingin.

**A.1.2.6.3    Penangas air atau inkubator**.

**A.1.2.6.4    Pengering vakum** (opsional).

**A.1.2.6.5    Mikser**, misalnya Vortex®1).

**A.1.2.7    Prosedur**

**A.1.2.7.1    Umum**

Setelah porsi uji matriks selesai dipersiapkan, terapkan protokol ekstraksi/pemurnian DNA berikut. Adaptasi skala alat ukur massa dan volume bufer diperlukan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih.

**A.1.2.5.22**    **Buffer solution A**, *c*(Tris) = 0,020 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,020 mol/l, *c*(NaCl) = 0,1 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.1.2.5.23**    **Extraction/lysis buffer**, containing one volume part of buffer solution A (A.1.2.5.22) and one volume part of sucrose solution (A.1.2.5.21).

**A.1.2.5.24**    **SDS solution**, *ρ*(SDS) = 250 g/l.

**A.1.2.5.25**    **Proteinase-K solution**, containing 20 mg/ml, stored at −20 °C, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.1.2.5.26**    **Ethanol solution**, *ϕ*(C2H5OH) = 70 %.

Store and use at −20 °C.

**A.1.2.5.27**    **Sodium acetate solution**, *c*(C2H3O2Na) = 3 mol/l.

Adjust the pH to 5,2 with glacial acetic acid.

**A.1.2.5.28**    **TE buffer**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.1.2.6    Apparatus and equipment**

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

**A.1.2.6.1    Instrument and/or material for chopping tissue** (e.g. scalpel).

**A.1.2.6.2    Centrifuge**, capable of achieving an acceleration of 12 000 *g*.

In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.1.2.6.3    Water bath or incubator**.

**A.1.2.6.4    Vacuum dryer** (optional).

**A.1.2.6.5    Mixer**, e.g. Vortex®1).

**A.1.2.7    Procedure**

**A.1.2.7.1    General**

Once the matrix test portion has been prepared, apply the following DNA extraction/purification protocol. Scale-adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

**A.1.2.7.2    Preparasi sampel**

Potong sosis daging, homogenkan dan tambahkan (200 – 500) mg ke dalam air sebanyak 3 bagian volume (hingga 1,5 ml). Letakkan pada suhu kamar selama sekitar 10 menit.

**A.1.2.7.3    Prosedur ekstraksi**

Pindahkan fase cair (suspensi) sebanyak 500 μl secara hati-hati ke dalam tabung mikro *centrifuge* yang baru. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* selama 10 menit.

Buang supernatan dan suspensikan kembali pelet dalam 500 μl bufer ekstraksi/lisis (A.1.2.5.23).

Tambahkan 50 μl larutan lisozim (A.1.2.5.20). Inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Jika hasilnya tidak memuaskan, lisozim dapat dikombinasikan dengan 10 U mutanolisin (A.1.2.5.19), tetapi pengaruh spesifik matriks dengan cara ini harus diuji sebelum menjadi aplikasi rutin.

Tambahkan 25 µl larutan SDS (A.1.2.5.24) dan 25 µl larutan proteinase-K (A.1.2.5.25), kemudian inkubasi selama 10 menit pada suhu 60 °C.

Tambahkan fenol/kloroform/isoamil alkohol (A.1.2.5.18) sebanyak 1 bagian volume kemudian aduk.

Lakukan sentrifugasi campuran dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 3 menit. Pindahkan fase cair bagian atas ke vial baru.

Tambahkan kloroform-isoamil alkohol (A.1.2.5.17) sebanyak 1 bagian volume kemudian aduk.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 3 menit. Pindahkan fase cair bagian atas ke dalam tabung mikro *centrifuge* yang baru.

Tambahkan larutan natrium asetat (A.1.2.5.27) sebanyak 0,1 bagian volume dan isopropanol (A.1.2.5.1) sebanyak 1 bagian volume. Campurkan secara perlahan beberapa kali dengan cara membolak-balik tabung.

Biarkan pada suhu ruang selama minimal 30 menit. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 15 menit. Dekantasi supernatan dan buang.

Cuci pelet dengan hati-hati menggunakan setidaknya 500 μl larutan etanol (A.1.2.5.26), kocok secara perlahan. Lakukan sentrifugasi campuran tersebut dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 10 menit. Tahapan ini sangat penting untuk menghilangkan garam-garam yang mengendap yang dapat mengganggu analisis lebih lanjut (misalnya PCR).

Buang supernatan.

Keringkan pelet dan larutkan kembali dalam 100 μl air atau bufer yang sesuai, misalnya bufer TE (A.1.2.5.28). Larutan ini merupakan stok master DNA.

**A.1.2.7.2    Sample preparation**

Chop the meat sausage, homogenize it and add 200 mg to 500 mg to 3 volumes of water (up to 1,5 ml). Keep at room temperature for about 10 min.

**A.1.2.7.3    Extraction procedure**

Carefully transfer 500 µl of the aqueous phase (suspension) to a new reaction vessel. Centrifuge for 10 min at 12 000 *g.*

Discard the supernatant and re-suspend the pellet in 500 µl of extraction/lysis buffer (A.1.2.5.23).

Add 50 µl of lysozyme solution (A.1.2.5.20). Incubate at 37 °C for 1 h. If the results are not satisfactory, lysozyme may be combined with 10 U of mutanolysin (A.1.2.5.19), but the matrix-specific effect of this should be tested prior to routine application.

Add 25 µl of SDS solution (A.1.2.5.24) and 25 µl of proteinase-K solution (A.1.2.5.25), then incubate for 10 min at 60 °C.

Add 1 volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (A.1.2.5.18) and mix.

Centrifuge the mixture for 3 min at about 12 000 *g*. Transfer the upper aqueous phase to a new vial.

Add 1 volume of chloroform-isoamyl alcohol (A.1.2.5.17) and mix.

Centrifuge for 3 min at about 12 000 *g*. Transfer the upper phase to a new reaction vessel.

Add 0,1 volume of sodium acetate solution (A.1.2.5.27) and 1 volume of isopropanol (A.1.2.5.1). Mix gently several times by inversion.

Keep at room temperature for at least 30 min. Centrifuge for 15 min at about 12 000 *g*. Decant the supernatant and discard it.

Wash the pellet carefully with at least 500 µl of ethanol solution (A.1.2.5.26), shaking gently. Centrifuge the mixture for 10 min at about 12 000 *g*. This step is essential for the removal of the precipitating salts that could interfere with the subsequent analysis (e.g. PCR).

Discard the supernatant.

Dry the pellet and re-dissolve it in 100 µl of water or appropriate buffer, e.g. TE buffer (A.1.2.5.28). This is the DNA master stock.

**A.1.2.8    Daftar contoh**

Lihat Tabel A.1.

**Tabel A.1 — Daftar matriks yang metodenya telah berhasil diterapkan**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Matriks yang sudah dianalisis** | **Mikroorganisme** | **Referensi** |
| Sosis fermentasi | *Lactobacillus curvatus* | [6] |
| *Summer sausage* (perlakuan termal) | *Lactobacillus curvatus* | [7] |
| Krim | *Staphylococcus aureus* | [8] |

**A.1.2.9    Validasi**

Data validasi pada Tabel A.2 telah dielaborasi dalam studi kolaboratif yang dilakukan oleh tim “*Development of methods for identifying foodstuffs produced by genetic engineering techniques*” dari *the Commission of the former German Federal Health Board* untuk penerapan metode sesuai dengan Pasal 35 dari *the German Foodstuffs Act*[6].

Dalam studi kerjasama tersebut, sebanyak dua sampel ditemukan tergolong kesalahan positif palsu (*false positive*), yang mungkin disebabkan oleh pengemasan yang tidak tepat. Mutanolisin tidak digunakan dalam studi ini.

**Tabel A.2 — Data validasi**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Jumlah laboratorium yang berpartisipasi** | **Jumlah sampel sosis per laboratorium** | **Jumlah total sampel** | **Jumlah sampel yang diidentifikasi dengan benar** |
| 15 | 10 | 150 | 148 (sampel kontrol dan sampel PRG) |

**A.1.3    Metode fenol/kloroform: Protokol untuk kultur *starter* dari yoghurt**

**A.1.3.1    Umum**

Metode ini menjelaskan prosedur ekstraksi DNA gabungan yang berasal dari kultur *starter* yang digunakan untuk fermentasi dari produk susu yoghurt. Prosedur ini berhasil dilakukan pada yoghurt biasa, yoghurt yang mengandung bahan yang berbeda seperti buah-buahan, zat aditif dan zat penstabil serta pada produk dengan kandungan lemak yang berbeda (lihat A.1.3.8 dan Referensi [9], [10], [11]). DNA yang berkualitas PCR juga diekstrak dari yoghurt yang diperlakukan secara termal [12].

**A.1.3.2     Status validasi**

Metode ini telah divalidasi dalam studi interlaboratorium, lihat A.1.3.9.

**A.1.2.8    List of examples**

See Table A.1.

**Table A.1 — List of matrices for which the method has been successfully applied**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Matrices successfully analysed** | **Microorganism** | **Reference** |
| Fermented sausage | *Lactobacillus curvatus* | [6] |
| Summer sausage (thermally treated) | *Lactobacillus curvatus* | [7] |
| Cream | *Staphylococcus aureus* | [8] |

**A.1.2.9    Validation**

The validation data in Table A.2 have been elaborated in a collaborative study carried out by the working group “Development of methods for identifying foodstuffs produced by genetic engineering techniques” of the Commission of the former German Federal Health Board for the implementation of methods according to article 35 of the German Foodstuffs Act[6].

In this collaborative study, two samples were false positive, probably caused by incorrect packing. Mutanolysin was not used for this study.

**Table A.2 — Validation data**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Number of laboratories participating** | **Number of sausage samples per laboratory** | **Number of total samples** | **Number of samples correctly identified** |
| 15 | 10 | 150 | 148 (control samples and GMO samples) |

**A.1.3    Phenol/chloroform method: Protocol for starter cultures of yoghurt**

**A.1.3.1    General**

This method describes a procedure for the extraction of bulk DNA from starter cultures used for the fermentation of the milk product yoghurt. This procedure was successfully carried out with plain yoghurts, yoghurts containing different ingredients such as fruits, additives and stabilizers and with products of different fat content (see A.1.3.8 and References [9], [10], [11]). DNA of PCR quality was also extracted from yoghurts that were thermally treated [12].

**A.1.3.2    Validation status**

This method has been validated in an interlaboratory study; see A.1.3.9.

**A.1.3.3    Prinsip**

Metode ini pada dasarnya adalah prosedur ekstraksi fenol-kloroform yang diterapkan untuk matriks pangan khusus. *Starter* gram-positif dari yoghurt dipanen setelah mengendapkan kasein yang terkoagulasi pada pH basa. Sel-sel bakteri yang sudah dikumpulkan disuspensi kembali dalam larutan bufer dan diperlakukan dengan lisozim (dan mutanolisin) untuk merusak dinding sel. Lisis sel dilakukan dengan menambahkan deterjen ionik seperti natrium dodesil sulfat (*sodium dodecylsulfate*/SDS). Protein dihilangkan dengan perlakuan proteinase-K dan beberapa tahap fenol/kloroform dan kloroform berikutnya. DNA akhirnya diendapkan menggunakan alkohol.

**A.1.3.4    Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

**A.1.3.5    Reagen**

**A.1.3.5.1    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.1.3.5.2    Etanol**, *ϕ*(C2H5OH) = 96%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.1.3.5.3    Asam asetat glasial** (CH3COOH).

**A.1.3.5.4    Natrium klorida** (NaCl).

**A.1.3.5.5    Natrium sitrat** (C6H5Na3O7).

**A.1.3.5.6    Asam klorida,** *ϕ*(HCl) = 37%.

**A.1.3.5.7    Natrium hidroksida** (NaOH).

**A.1.3.5.8    Isoamil alkohol** [(CH3)2CHCH2CH2(OH)].

**A.1.3.5.9    Fenol** (C6H5OH).

**A.1.3.5.10    Kloroform** (CHCl3).

**A.1.3.5.11    Tris(hidroksimetil)-aminometana** (Tris) (C4H11NO3).

**A.1.3.5.12    Garam dinatrium asam etilendiaminatetraasetat** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.1.3.5.13    Natrium dodesil sulfat** (*sodium dodecyl sulfate*/SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.3.5.14    Lisozim**, 50.000 U/mg protein (1 U akan menghasilkan Δ*A*450 0,001 per menit pada pH 6,24 dan suhu 25 °C, menggunakan suspensi *Micrococcus lysodeikticus* sebagai substrat, dalam 2,6 ml campuran reaksi dengan 1 cm jalur cahaya).

**A.1.3.5.15    Sukrosa** (C12H22O11).

**A.1.3.5.16    Proteinase-K**, sekitar 20 Units/mg liofilisat.

**A.1.3.5.17    Natrium asetat** (C2H3O2Na).

**A.1.3.3    Principle**

This method is basically a phenol-chloroform extraction procedure that is adapted for a special food matrix. The Gram-positive starters of the yoghurts are harvested after resolving the coagulated casein at alkaline pH. The recovered cells are re-suspended in a buffered aqueous solution and treated with lysozyme (and mutanolysin) in order to damage the cell walls. Cell lysis is carried out by adding an ionic detergent such as sodium dodecylsulfate (SDS). Proteins are removed by proteinase-K treatment and several subsequent phenol/chloroform and chloroform steps. DNA is finally precipitated with alcohol.

**A.1.3.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for handling organic chemicals.

**A.1.3.5    Reagents**

**A.1.3.5.1    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.1.3.5.2    Ethanol**, *ϕ*(C2H5OH) = 96 %.

Store and use at −20 °C.

**A.1.3.5.3    Glacial acetic acid** (CH3COOH).

**A.1.3.5.4    Sodium chloride** (NaCl).

**A.1.3.5.5    Sodium citrate** (C6H5Na3O7).

**A.1.3.5.6    Hydrochloric acid**, *ϕ*(HCl) = 37 %.

**A.1.3.5.7    Sodium hydroxide** (NaOH).

**A.1.3.5.8    Isoamyl alcohol** [(CH3)2CHCH2CH2(OH)].

**A.1.3.5.9    Phenol** (C6H5OH).

**A.1.3.5.10    Chloroform** (CHCl3).

**A.1.3.5.11    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.1.3.5.12    Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.1.3.5.13    Sodium dodecyl sulfate** (SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.3.5.14    Lysozyme**, 50 000 U/mg protein (1 U will produce a Δ*A*450 of 0,001 per minute at pH 6,24 and 25 °C, using a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* as substrate, in a 2,6 ml reaction mixture with 1 cm light path).

**A.1.3.5.15    Sucrose** (C12H22O11).

**A.1.3.5.16    Proteinase-K**, approximately 20 Units/mg lyophilisate.

**A.1.3.5.17    Sodium acetate** (C2H3O2Na).

**A.1.3.5.18    Larutan natrium sitrat** *ρ*(C6H5Na3O7) = 400 g/l.

**A.1.3.5.19    Larutan sodium hidroksida**, *c*(NaOH) = 0,4 mol/l.

Larutkan dalam air steril, tetapi tidak boleh diautoklaf. Siapkan sesaat sebelum digunakan.

**A.1.3.5.20    Natrium klorida/larutan natrium sitrat** (SSC, dipekatkan 5×), *c*(NaCl) = 0,75 mol/l, *c*(C6H5Na3O7) = 0,075 mol/l

Dianjurkan untuk menyiapkan larutan SSC sebagai larutan stok pekat (misalnya SSC 20×), karena larutan dengan konsentrasi garam yang tinggi biasanya lebih stabil. Encerkan sebelum digunakan.

**A.1.3.5.21    Fenol setimbang**, sesuaikan pH menjadi 8, jenuhkan dengan bufer Tris/HCl (pH > 7,8), atau sebagai contoh, siapkan sesuai Referensi [5] atau menurut rekomendasi pemanufaktur.

**A.1.3.5.22    Kloroform-isoamil alkohol**

Campurkan kloroform (A.1.3.5.10) sebanyak 24 bagian volume dengan isoamil alkohol (A.1.3.5.8) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.3.5.23    Fenol-kloroform-isoamil alkohol**

Siapkan dengan mencampurkan fenol setimbang (A.1.3.5.21) sebanyak 25 bagian volume dengan kloroform (A.1.3.5.10) sebanyak 24 bagian volume dan isoamil alkohol (A.1.3.5.8) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.3.5.24    Larutan mutanolisin,** mengandung 500 U/ml atau 5.000 U/ml mutanolisin, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.1.3.5.25    Larutan lisozim**, mengandung 10 mg/ml lisozim, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.1.3.5.26    Larutan sukrosa**, *c*(C12H22O11) = 400 g/l.

**A.1.3.5.27    Larutan bufer A**, *c*(Tris) = 0,020 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,020 mol/l, *c*(NaCl) = 0,100 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.1.3.5.28    Bufer ekstraksi/lisis**, mengandung larutan bufer A (A.1.3.5.27) sebanyak 1 bagian volume dan larutan sukrosa (A.1.3.5.26) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.3.5.29    Larutan SDS**,*ρ*(SDS) = 250 g/l.

**A.1.3.5.30    Larutan proteinase-K**, mengandung 20 mg/ml, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.1.3.5.18    Sodium citrate solution**, *ρ*(C6H5Na3O7) = 400 g/l.

**A.1.3.5.19    Sodium hydroxide solution**, *c*(NaOH) = 0,4 mol/l.

Dissolve in sterile water, but do not autoclave. Prepare freshly before use.

**A.1.3.5.20    Sodium chloride/sodium citrate solution** (SSC, concentrated 5×), *c*(NaCl) = 0,75 mol/l, *c*(C6H5Na3O7) = 0,075 mol/l.

It is advisable to prepare the SSC solution as a concentrated stock solution (e.g. SSC 20×), because solutions with a high salt concentration are usually more stable. Dilute before use.

**A.1.3.5.21    Equilibrated phenol**, adjusted to pH 8, saturated with Tris/HCl (pH > 7,8) buffer, or for example, prepared according to Reference [5], or according to the manufacturer's recommendations.

**A.1.3.5.22    Chloroform-isoamyl alcohol**

Mix 24 volume parts of chloroform (A.1.3.5.10) with 1 volume part of isoamyl alcohol (A.1.3.5.8).

**A.1.3.5.23    Phenol-chloroform-isoamyl alcohol**

Prepare by mixing 25 volume parts of equilibrated phenol (A.1.3.5.21) with 24 volume parts of chloroform (A.1.3.5.10) and 1 volume part of isoamyl alcohol (A.1.3.5.8).

**A.1.3.5.24    Mutanolysin solution**, containing 500 U/ml or 5 000 U/ml mutanolysin, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.1.3.5.25    Lysozyme solution**, containing 10 mg/ml of lysozyme, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid freezing and thawing.

**A.1.3.5.26    Sucrose solution**, *c*(C12H22O11) = 400 g/l.

**A.1.3.5.27    Buffer solution A**, *c*(Tris) = 0,020 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,020 mol/l, *c*(NaCl) = 0,100 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.1.3.5.28    Extraction/lysis buffer**, containing 1 volume part of buffer solution A (A.1.3.5.27) and 1 volume part of sucrose solution (A.1.3.5.26).

**A.1.3.5.29    SDS Solution**, *ρ*(SDS) = 250 g/l.

**A.1.3.5.30    Proteinase-K solution**, containing 20 mg/ml, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing

**A.1.3.5.31    Larutan etanol**, *ϕ*(C2H5OH) = 70%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.1.3.5.32    Larutan natrium asetat**, *c*(C2H3O2Na) = 3 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 5,2 menggunakan asam asetat glasial.

**A.1.3.5.33    Bufer TE**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.1.3.6    Peralatan**

Peralatan laboratorium yang biasa digunakan dan khususnya, peralatan berikut.

**A.1.3.6.1    *Centrifuge***, memiliki kemampuan memutar dengan percepatan putar hingga 12.000 × *g*. Di beberapa tahapan diperlukan *centrifuge* berpendingin.

**A.1.3.6.2    Penangas air atau inkubator**

**A.1.3.6.3    Pengering vakum** (opsional)

**A.1.3.6.4    Mikser**, misalnya Vortex®1).

**A.1.3.7    Prosedur**

**A.1.3.7.1    Umum**

Setelah porsi uji matriks selesai disiapkan, terapkan protokol ekstraksi/pemurnian DNA berikut. Aturlah skala alat ukur massa dan volume bufer yang digunakan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih.

**A.1.3.7.2    Prosedur ekstraksi**

Kocok yoghurt dengan sempurna. Pindahkan 250 μl yoghurt ke dalam tabung mikro *centrifuge* berukuran 2 ml. Tambahkan 80 µl larutan natrium sitrat (A.1.3.5.18). Tambahkan 150 μl larutan NaOH (A.1.3.5.19) dan aduk secara merata. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* selama 2 menit.

Diameter pelet seharusnya tidak lebih besar dari 0,7 cm dan volume pelet sekitar 100 μl. Jika tidak, tahap ini (penambahan 80 μl larutan natrium sitrat dan 150 μl NaOH) harus diulangi.

Buang lapisan lemak bagian atas dan lapisan cair supernatan dan lakukan suspensi pelet kembali dalam 500 μl larutan SSC 5× (A.1.3.5.20). Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama minimal 2 menit dan buang supernatan. Lakukan suspensi pelet kembali dalam 500 μl larutan SSC 5×. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 2 menit dan buang supernatan.

Lakukan suspensi pelet kembali dalam 500 μl bufer ekstraksi/lisis (A.1.3.5.28). Tambahkan 50 µl larutan lisozim (A.1.3.5.25). Inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Jika hasilnya tidak memuaskan, lisozim dapat dikombinasikan dengan 10 U mutanolisin (A.1.3.5.24), tetapi pengaruh spesifik matriks dengan cara ini harus diuji sebelum menjadi aplikasi rutin.

**A.1.3.5.31    Ethanol solution**, *ϕ*(C2H5OH) = 70 %.

Store and use at −20 °C.

**A.1.3.5.32    Sodium acetate solution**, *c*(C2H3O2Na) = 3 mol/l.

Adjust the pH to 5,2 with glacial acetic acid.

**A.1.3.5.33    TE buffer**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.1.3.6    Apparatus and equipment**

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

**A.1.3.6.1    Centrifuge**, capable of achieving an acceleration of 12 000 *g.* In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.1.3.6.2    Water bath or incubator**.

**A.1.3.6.3    Vacuum dryer** (optional).

**A.1.3.6.4    Mixer**, e.g. Vortex®1).

**A.1.3.7    Procedure**

**A.1.3.7.1    General**

Once the matrix test portion is prepared, apply the following DNA extraction/purification protocol. Some scale-adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

**A.1.3.7.2    Extraction procedure**

Shake the yoghurt well. Transfer 250 µl of yoghurt to a 2-ml reaction vessel. Add 80 µl of sodium citrate solution (A.1.3.5.18). Add 150 µl of NaOH solution (A.1.3.5.19) and mix well. Centrifuge at about 12 000 *g* for 2 min.

The pellet should not be much bigger than 0,7 cm in diameter and about 100 µl in volume. Otherwise these steps (adding 80 µl of sodium citrate solution and 150 µl of NaOH) should be repeated.

Discard the upper layer of fat and the aqueous supernatant and re-suspend the pellet in 500 µl of 5× SSC solution (A.1.3.5.20). Centrifuge for at least 2 min at about 12 000 *g* and discard the supernatant. Resuspend the pellet in 500 µl of 5× SSC solution. Centrifuge for 2 min at about 12 000 *g* and discard the supernatant.

Resuspend the pellet in 500 µl of extraction/lysis buffer (A.1.3.5.28). Add 50 µl of lysozyme solution (A.1.3.5.25). Incubate at 37 °C for 1 h. If results are not satisfying, lysozyme may be combined with 10 U of mutanolysin (A.1.3.5.24), but the matrix-specific effect of this should be tested prior to routine application.

Tambahkan 25 μl larutan SDS (A.1.3.5.29) dan 25 μl larutan proteinase-K (A.1.3.5.30). Inkubasi selama 10 menit pada suhu 60 °C. Tambahkan 500 μl fenol/kloroform/isoamil alkohol (A.1.3.5.23) dan campukan sampai homogen. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 3 menit. Pindahkan fase cair bagian atas ke tabung mikro *centrifuge* baru. Tambahkan kloroform/isoamil alkohol (A.1.3.5.22) sebanyak 1 bagian volume dan campurkan sampai homogen. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 3 menit.

Pindahkan fase atas ke dalam tabung mikro *centrifuge* baru. Tambahkan larutan natrium asetat (A.1.3.5.32) sebanyak 0,1 bagian volume dan isopropanol (A.1.3.5.1) sebanyak 1 bagian volume. Inkubasi pada suhu ruang setidaknya selama 30 menit. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 15 menit. Buang supernatan. Cuci pelet dengan hati-hati dalam setidaknya 500 μl larutan etanol (A.1.3.5.31). Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 10 menit. Tahap ini sangat penting untuk menghilangkan garam-garam yang mengendap serta dapat mengganggu analisis selanjutnya (misalnya PCR). Buang supernatan.

Keringkan pelet dan larutkan kembali dalam 100 μl air steril atau bufer yang sesuai, misalnya bufer TE (A.1.2.5.33). Larutan ini merupakan stok master DNA.

**A.1.3.8     Daftar contoh**

Lihat Tabel A.3.

**Tabel A.3** — **Daftar matriks yang metodenya telah berhasil diterapkan**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Matriks yang berhasil dianalisis** | **Kandungan, aditif, dan lain-lain** | **Mikroorganisme** | **Referensi** |
| Yoghurt tanpa perisa | lemak 0,3%, lemak 3,5%  | *Streptococcus thermophilus* | [9], [11] |
| Yoghurt buah | lemak 1,5%, pati termodifikasi, hazelnut, gelatinlemak 1,5%, protein 3,8%, aspartam, *acesulfam*, nanaslemak 3,5%, perisa, gelatin, persik, kelapalemak 10%, pati termodifikasi, lemon, perisa, kacang almon, pektin, karotena, riboflavin | *Streptococcus thermophilus* | [9] |
| Yoghurt tanpa perisa dengan perlakuan suhu | lemak 3,5%  | *Streptococcus thermophilus* | [12] |

**A.1.3.9    Validasi**

Data validasi pada Tabel A.4 telah dielaborasi dalam studi kolaboratif yang dilakukan oleh tim “*Development of methods for identifying foodstuffs produced by genetic engineering techniques*” dari *the Commission of the former German Federal Health Board* untuk implementasi metode sesuai Pasal 35 dari German Foodstuffs Act [11].

Add 25 µl of SDS solution (A.1.3.5.29) and 25 µl of proteinase-K solution (A.1.3.5.30). Incubate for 10 min at 60 °C. Add 500 µl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (A.1.3.5.23) and mix. Centrifuge for 3 min at about 12.000 *g*. Transfer the upper aqueous phase to a new reaction vessel. Add 1 volume of chloroform/isoamyl alcohol (A.1.3.5.22) and mix. Centrifuge for 3 min at about 12.000 *g*.

Transfer the upper phase to a new reaction vessel. Add 0,1 volume of sodium acetate solution (A.1.3.5.32) and 1 part by volume of isopropanol (A.1.3.5.1). Keep for at least 30 min at room temperature. Centrifuge for 15 min at about 12 000 *g.* Discard the supernatant. Wash the pellet carefully in at least 500 µl of ethanol solution (A.1.3.5.31). Centrifuge for 10 min at about 12 000 *g*. This step is essential for the removal of the precipitating salts that could interfere with the subsequent analysis (e.g. PCR). Discard the supernatant.

Dry the pellet and re-dissolve it in 100 µl of water or appropriate buffer, e.g. TE buffer (A.1.2.5.33). This is the “DNA master stock”.

**A.1.3.8    List of examples**

See Table A.3.

**Table A.3 — List of matrices for which the method has been successfully applied**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Matrices successfully analysed** | **Contents, additives etc.** | **Micro-organism** | **Reference** |
| Plain yoghurt | 0,3 % fat, 3,5 % fat | *Streptococcus thermophilus* | [9], [11] |
| Fruit yoghurts | 1,5 % fat, modified starch, hazelnuts, gelatine1,5 % fat, 3,8 % protein, aspartam, acesulfam, pineapple3,5 % fat, flavour, gelatine, peach, coconut10 % fat, modified starch, lemon, flavour, almonds, pectin, carotin, riboflavin  | *Streptococcus thermophilus* | [9] |
| Thermally treated plain yoghurt | 3,5 % fat | *Streptococcus thermophilus* | [12] |

**A.1.3.9    Validation**

The validation data in Table A.4 have been elaborated in a collaborative study carried out by the working group “Development of methods for identifying foodstuffs produced by genetic engineering techniques” of the Commission of the former German Federal Health Board for the implementation of methods according to article 35 of the German Foodstuffs Act [11].

Pada uji coba kolaboratif ini, dua laboratorium tidak melakukan verifikasi melalui metode hibridisasi. Mutanolisin tidak digunakan dalam uji coba ini.

**Tabel A.4 — Data validasi**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Jumlah laboratorium yang berpartisipasi** | **Jumlah sampel yoghurt per laboratorium** | **Jumlah sampel total** | **Jumlah sampel yang diidentifikasi dengan benar** |
| 20 | 10 | 200 | 200 (99 sampel kontrol dan 101 sampel PRG) |

**A.1.4    Metode fenol/kloroform: Protokol untuk ragi dan/atau fungi berfilamen yang dipanen dari bahan pangan**

**A.1.4.1    Umum**

Metode ini menjelaskan ekstraksi satu tahap dan pemurnian DNA berkualitas PCR dari ragi atau fungi berfilamen[13], atau populasi mikroba yang diisolasi. Metode ini sangat sesuai untuk penelusuran DNA dari mikroorganisme yang direkayasa secara genetik dalam matriks yang sangat kompleks[14], [15]. Metode ini dapat digunakan baik untuk mengekstrak DNA total dari matriks[14], [15], maupun DNA total dari fraksi mikroba melalui pemisahan secara langsung dari matriks atau dipanen dari kultur starter (kultur cair atau koloni agar).

**CATATAN**    Pemisahan fraksi mikroba dari porsi uji memberikan hasil yang reliabel apabila dilakukan sebelum ekstraksi DNA.

DNA total dari matriks dapat juga diekstraksi mengunakan protokol alternatif pada Lampiran A. Akan tetapi, protokol ini tidak menjamin bahwa DNA dari semua mikroorganisme (terutama dari fungi yang resistan terhadap lisis, atau bakteri Gram negatif) akan diisolasi secara acak dengan hasil reliabel. Meskipun protokol ini dapat digunakan untuk ekstraksi DNA total dalam matriks seperti yoghurt, susu atau keju, efisiensi ekstraksi telah terbukti reliabel hanya untuk matriks padat yang telah dihaluskan atau digiling dan harus selalu diperiksa berdasarkan matriksnya.

**A.1.4.2    Status validasi**

Metode ekstraksi DNA ini telah diterapkan dan divalidasi[13] untuk 25 genus fungi yang mewakili 325 spesies (termasuk ragi yang digunakan untuk produksi roti atau anggur, dan *Penicillia* spp.[16] yang digunakan oleh produsen keju biru) dalam bentuk miselium atau spora (di antaranya spesies yang paling tahan terhadap kerusakan atau lisis seperti *Aspergillus fumigatus* dan *Cryptococcus neoformans*). Metode ini telah dirancang untuk menghindari kontaminasi antar porsi dan kontaminasi laboratorium sehingga sesuai untuk ekstraksi DNA rutin berskala besar dan aplikasi PCR. Tidak ada variasi dalam kualitas cetakan pada PCR kualitatif yang diamati setelah penyimpanan jangka panjang pada suhu −20 °C hingga 5 tahun, atau antara preparasi DNA yang berbeda dari organisme yang sama. Meskipun kualitas DNA sudah sesuai untuk PCR kualitatif, namun DNA tersebut sulit dipotong dengan beberapa enzim restriksi. Untuk tujuan seperti PCR kuantitatif, DNA yang diperoleh dengan metode ini harus dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan prinsip biokimia lain seperti yang dijelaskan pada A.4 sebagai contoh.

At this collaborative trial, two laboratories did not carry out the verification by hybridization. *Mutanolysin* was not used for the trial.

**Table A.4 — Validation data**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Number of laboratories participating** | **Number of yoghurt samples per laboratory** | **Number of total samples** | **Number of samples correctly identified** |
| 20 | 10 | 200 | 200 (99 control samples and 101 GMO samples) |

**A.1.4    Phenol/chloroform method: Protocol for yeasts and/or filamentous fungi harvested from foodstuffs**

**A.1.4.1    General**

This method describes a one-step extraction and purification of PCR-quality DNA from yeast or filamentous fungi[13], or isolated microbial populations. It is well suited for the tracing of the DNA from genetically modified microorganisms in highly complex matrices[14], [15]. It can be used either to extract total DNAfrom the matrix[14], [15], or from the microbial fraction either directly segregated from a matrix or harvested from starter cultures (liquid or agar colonies).

**NOTE**    Separation of the microbial fraction from the test portion yields the most reliable results if done prior to DNA extraction.

Total DNA from the matrix may also be extracted by the alternative protocols of Annex A. However, these protocols do not guarantee that DNA from all microorganisms (especially from lysis-resistant fungi, or Gram-negative bacteria) would be randomly isolated with a reliable yield. Although the present protocol may be used for total DNA extraction in matrices such as yoghurt, milk or cheese, the extraction efficiency has been shown to be reliable for extensively ground or milled solid matrices only and shall always be checked on a matrix basis.

**A.1.4.2    Validation status**

This DNA extraction method has been applied and validated[13] for 25 fungal genera representing 325 species (including yeasts used for bakery or wine production, and *Penicillia* spp.[16] used by blue cheese producers) under mycelium or spore forms (among which the most breakage- or lysis-resistant species such as *Aspergillus fumigatus* and *Cryptococcus* *neoformans*). The method has been designed to avoid inter-portion and laboratory contamination making it suitable for large-scale routine DNA extractions and PCR applications. No variation in template quality in qualitative PCR was observed after long-term storage at −20 °C after up to 5 years, or between different DNA preparations from the same organism. Although the quality of the DNA is suitable for qualitative PCR, it can be poorly digestible with some restriction enzymes. For purposes such as quantitative PCR, the DNA obtained with the present method shall be further purified using another biochemical principle such as the one described in A.4 as an example.

**A.1.4.3    Prinsip**

Bakteri, ragi atau miselia dihancurkan dan DNA diekstraksi secara simultan melalui agitasi berkecepatan tinggi dengan keberadaan *glass beads* yang terdapat dalam campuran Tris-fenol-kloroform-EDTA-SDS yang diikuti dengan presipitasi menggunakan etanol.

**A.1.4.4     Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

**A.1.4.5     Reagen**

**A.1.4.5.1    Etanol**, *φ*(C2H5OH) = 96%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.1.4.5.2    Asam asetat glasial** (CH3COOH).

**A.1.4.5.3    Asam sulfat**, *φ*(H2SO4) ˃ 90%.

**A.1.4.5.4    Kalium bikarbonat** (KHCO3).

**A.1.4.5.5    Kalium asetat** (C2H3O2K).

**A.1.4.5.6    Asam klorida** *φ*(HCl) = 37%.

**A.1.4.5.7    Isoamil alkohol** [(CH3)2CHCH2CH2OH].

**A.1.4.5.8    Fenol** (C6H5OH).

**A.1.4.5.9    Kloroform** (CHCl3).

**A.1.4.5.10    Tris(hidroksimetil)-aminometana** (Tris) (C4H11NO3).

**A.1.4.5.11    Garam dikalium asam etilendiaminatetraasetat** (K2EDTA) (C10H14N2O8K2).

**A.1.4.5.12    Kalium hidroksida** (KOH).

**A.1.4.5.13    Natrium dodesil sulfat** (*sodium dodecyl sulfate*/SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.4.5.14    RNase-A**, bebas DNase, dari pankreas sapi, sekitar 50 Unit Kunitz/mg liofilisat.

**A.1.4.5.15    Fenol setimbang**, sesuaikan pH menjadi > 7,8.

Fenol (A.1.4.5.8) disiapkan misalnya sesuai dengan Referensi [5] dan (opsional) akhirnya disetimbangkan terhadap bufer ekstraksi (A.1.4.5.18) tanpa SDS, atau sesuai dengan rekomendasi pemanufaktur.

**A.1.4.5.16    Kloroform-isoamil alkohol**

Campurkan kloroform (A.1.4.5.9.) sebanyak 24 bagian volume dengan isoamil alkohol (A.1.4.5.7) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.4.3    Principle**

Basically, bacteria, yeasts or mycelia are disrupted and the DNA is simultaneously extracted by high-speed agitation in the presence of glass beads in a mixture of Tris-phenol-chloroform-EDTA-SDS followed by precipitation with ethanol.

**A.1.4.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for handling organic chemicals.

**A.1.4.5    Reagents**

**A.1.4.5.1    Ethanol**, **(C2H5OH) = 96 %.

Store and use at −20 °C.

**A.1.4.5.2    Glacial acetic acid** (CH3COOH).

**A.1.4.5.3    Sulfuric acid**, **(H2SO4) > 90 %.

**A.1.4.5.4    Potassium bicarbonate** (KHCO3).

**A.1.4.5.5    Potassium acetate** (C2H3O2K).

**A.1.4.5.6    Hydrochloric acid**, **(HCl) = 37 %.

**A.1.4.5.7    Isoamyl alcohol** [(CH3)2CHCH2CH2OH].

**A.1.4.5.8    Phenol** (C6H5OH).

**A.1.4.5.9    Chloroform** (CHCl3).

**A.1.4.5.10    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.1.4.5.11    Ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt** (K2EDTA) (C10H14N2O8K2).

**A.1.4.5.12    Potassium hydroxide** (KOH).

**A.1.4.5.13    Sodium dodecyl sulfate** (SDS) (C12H25O4SNa).

**A.1.4.5.14    RNase-A**, DNase-free, from bovine pancreas, approximately 50 Kunitz Units/mg lyophilisate.

**A.1.4.5.15    Equilibrated phenol**, adjusted to pH > 7,8.

Phenol (A.1.4.5.8) prepared according to, for example, Reference [5] and (optional) finally equilibrated against extraction buffer (A.1.4.5.18) without SDS, or according to the manufacturer’s recommendations.

**A.1.4.5.16    Chloroform-isoamyl alcohol**

Mix 24 volume parts of chloroform (A.1.4.5.9.) with 1 volume part of isoamyl alcohol (A.1.4.5.7).

**A.1.4.5.17    Fenol-kloroform-isoamil alkohol**

Siapkan dengan cara mencampurkan fenol setimbang (A.1.4.5.15) sebanyak 1 bagian volume dengan kloroform-isoamil alkohol (A.1.4.5.16) sebanyak 1 bagian volume.

**A.1.4.5.18    Bufer ekstraksi/lisis**, *c*(Tris) = 0,050 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,050 mol/l, *ρ*(SDS) = 30 g/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau KOH.

**A.1.4.5.19    Bufer TE**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau KOH.

**A.1.4.5.20    Larutan RNase-A**, **(RNase-A) = 10 mg/ml liofilisat.

Simpan pada suhu −20 °C.

**A.1.4.5.21    Larutan etanol**, *φ*(C2H5OH) = 70%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.1.4.5.22    Larutan kalium asetat**, *c*(C2H3O2K) = 3 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 5,2 menggunakan asam asetat glasial. Tidak boleh diautoklaf. Jika perlu, saring melalui filter 0,22 μm.

**A.1.4.5.23    *Glass beads* yang dikondisikan**

Inkubasi *glass beads* berdiameter (0,2 – 0,5) mm semalaman dalam H2SO4 pekat (A.1.4.5.3). Cuci dengan air steril, didihkan dalam larutan KHCO3 (A.1.4.5.24), cuci lagi dengan air steril, dan keringkan pada suhu 80 °C menggunakan vakum.[13], [14]

**A.1.4.5.24    Larutan kalium bikarbonat**, **(KHCO3) = 50 g/l.

Siapkan sesaat sebelum digunakan dengan pelarut air.

**A.1.4.6     Peralatan**

Peralatan laboratorium yang biasa digunakan dan khususnya, peralatan berikut.

**A.1.4.6.1    *Cell disruptor***, untuk tabungmikro polietilena berukuran 2 ml dengan tutup ulir, dengan frekuensi penghancuran minimal 100 *beats*/menit [misalnya Mini-BeadBeater™[[3]](#footnote-3))].

**A.1.4.6.2    Tabung mikro**, *O-ring-secured,* tabung polietilena berukuran 2 ml dengan tutup ulir.

**A.1.4.6.3    Perangkat filter**, menggunakan filter serat kaca (*fiber glass*) berdiameter 25 mm.

**A.1.4.5.17    Phenol-chloroform-isoamyl alcohol**

Prepare by mixing 1 volume part of equilibrated phenol (A.1.4.5.15) with 1 volume part of chloroform-isoamyl alcohol (A.1.4.5.16).

**A.1.4.5.18    Extraction/lysis buffer**, *c*(Tris) = 0,050 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,050 mol/l, *ρ*(SDS) = 30 g/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or KOH.

**A.1.4.5.19    TE buffer**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(K2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or KOH.

**A.1.4.5.20    RNase-A solution**, **(RNase-A) = 10 mg/ml lyophylisate.

Store at −20 °C.

**A.1.4.5.21    Ethanol solution**, *φ*(C2H5OH) = 70%.

Store and use at −20 °C.

**A.1.4.5.22    Potassium acetate solution**, *c*(C2H3O2K) = 3 mol/l.

Adjust to pH 5,2 with glacial acetic acid. Do not autoclave. If necessary, filter through a 0,22 µm filter.

**A.1.4.5.23    Conditioned glass beads**

Incubate glass beads of 0,2 mm to 0,5 mm diameter overnight in concentrated H2SO4 (A.1.4.5.3). Wash them with autoclaved water, boil in KHCO3 solution (A.1.4.5.24), wash again with autoclaved water, and dry at 80 °C under vacuum.[13], [14]

**A.1.4.5.24    Potassium bicarbonate solution**, **(KHCO3) = 50 g/l.

Prepare freshly in water.

**A.1.4.6    Apparatus and equipment**

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

**A.1.4.6.1    Cell disruptor**, for 2 ml screw-capped polyethylene microtubes, with a beating frequency of at least 100 beats/min [e.g. Mini-BeadBeater™[[4]](#footnote-4))].

**A.1.4.6.2    Microtubes**, O-ring-secured, screw-capped 2 ml polyethylene tubes.

**A.1.4.6.3    Filtering device**, for 25 mm diameter-glass fibre filters.

**A.1.4.6.4    *Centrifuge***, mampu menahan tabung mikro berukuran 2 ml dengan percepatan putar minimal 10.000 × *g*.

Pada beberapa tahap diperlukan *centrifuge* berpendingin.

**A.1.4.6.5    Penangasair atau inkubator**

**A.1.4.6.6    Pengering vakum** (opsional). Direkomendasikan untuk preparasi bahan A.1.4.5.23.

**A.1.4.6.7    Mikser**, misalnya Vortex®1).

**A.1.4.7    Prosedur**

**A.1.4.7.1    Preparasi porsi uji dan fraksi mikroba**

Protokol untuk isolasi fraksi mikroba, yang terkadang dikaitkan dengan tahap pengayaan pada media agar atau media cair sebagai kontrol kualitas mikrobiologis pangan, dapat digunakan untuk ekstraksi DNA lebih lanjut dari populasi mikroba, yang dianggap sebagai ingredien.

Populasi mikroba diisolasi dengan tepat menggunakan mulai dari (1 – 2) ml sampel laboratorium sebagai porsi standar (lihat A.1.3). Sebagai alternatif, ragi atau fungi berfilamen yang diisolasi dari porsi uji dapat dibiakkan sebagai kultur starter. Dalam kedua kasus tersebut, mikroorganisme dipanen dan diproses lebih lanjut sesuai dengan A.1.4.7.2 atau disimpan pada suhu –20 °C hingga pemrosesan dilakukan.

**A.1.4.7.2    Ekstraksi DNA**

**A.1.4.7.2.1**Untuk miselia yang terkumpul pada filter serat kaca, cuci lapisan miselia dua kali dengan bufer lisis (A.1.4.5.18) yang tidak mengandung SDS. Pisahkan lapisan fungi dari filter dan pindahkan ke tabung mikro berukuran 2 ml dengan tutup ulir (A.1.4.6.2) yang berisi *glass beads* yang dikondisikan (A.1.4.5.23) (setengah ukuran tabung), 600 μl bufer lisis (A.1.4.5.18) dan 600 μl fenol-kloroform-isoamil alkohol (A.1.4.5.17). Pemrosesan lebih lanjut dijelaskan pada A.1.4.7.2.3.

**A.1.4.7.2.2**Untuk pelet dari total populasi mikroba, bakteri, miselium, ragi atau mikroorganisme mirip ragi, cuci sel satu kali dengan 1 ml bufer lisis (A.1.4.5.18) yang tidak mengandung SDS, lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar (10.000 – 13.000) × *g* selama 10 menit, ulangi paling tidak satu kali kemudian suspensikan kembali dalam 600 µl bufer lisis (A.1.4.5.18) dan pindahkan ke dalam tabung mikro yang berisi *glass beads* dan fenol-kloroform seperti pada A.1.4.7.2.1.

**A.1.4.7.2.3**Setelah tahap A.1.4.7.2.1 atau A.1.4.7.2.2, agitasi tabung mikro setidaknya 100 *beats*/menit pada *cell-disrupter* (A.1.4.6.1) selama (1 – 2) menit, kemudian segera inkubasikan pada suhu 65 °C selama (30 – 120) menit. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar (10.000 – 13.000) × *g* selama 10 menit. Pindahkan supernatan ke tabung mikro baru.

Sebagai pilihan lain untuk PCR kuantitatif lebih lanjut, setelah inkubasi selama 30 menit, lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar (10.000 – 13.000) × *g* selama 15 menit. Pindahkan supernatan ke dalam tabung mikro, tambahkan RNase-A (A.1.4.5.20) dengan konsentrasi akhir 0,001 mg/ml dan inkubasi selama (30 – 90) menit pada suhu 65 °C.

**A.1.4.6.4    Centrifuge**, capable of holding 2 ml microtubes at a minimum acceleration of 10 000 *g*.

In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.1.4.6.5    Water bath or incubator.**

**A.1.4.6.6    Vacuum dryer** (optional). It is recommended for the preparation of item A.1.4.5.23.

**A.1.4.6.7    Mixer**, e.g. Vortex®2).

**A.1.4.7    Procedure**

**A.1.4.7.1    Preparation of the test portion and the microbial fraction**

Protocols for the isolation of the microbial fraction, occasionally coupled to an enrichment step on agar or in liquid media for food microbiological quality controls, can be exploited for further DNA extraction from the microbial population, being defined as an ingredient.

Starting from 1 ml to 2 ml of the laboratory sample as standard portion, the microbial population is isolated appropriately (see A.1.3). Alternatively, yeasts or filamentous fungi isolated from the test portion may be grown as starter cultures. In both cases, the microorganisms are harvested and further processed according to A.1.4.7.2 or stored at −20 °C until processing is carried out.

**A.1.4.7.2    DNA extraction**

**A.1.4.7.2.1**For mycelia collected on glass fibre filters, wash the mycelial mat twice with lysis buffer (A.1.4.5.18) not containing SDS. Peel off the fungal mat fromthe filter and transfer it to a 2 ml screw-capped microtube (A.1.4.6.2) containing conditioned glass beads (A.1.4.5.23) (half a tube), 600 µl of lysis buffer (A.1.4.5.18) and 600 µl of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (A.1.4.5.17). Further processing is described in A.1.4.7.2.3.

**A.1.4.7.2.2**For pellets of either total microbial population, bacteria, mycelium, yeasts or yeast-like micro-organisms, wash the cells once with 1 ml of lysis buffer (A.1.4.5.18) not containing SDS, centrifuge at 10 000 *g* to 13 000 *g* for 10 min, repeat at least once then resuspend in 600 µl of lysis buffer (A.1.4.5.18) and transfer to a microtube containing glass beads and phenol-chloroform as in A.1.4.7.2.1.

**A.1.4.7.2.3**After step A.1.4.7.2.1 or A.1.4.7.2.2, agitate the microtube at least at 100 beats/min on a cell-disrupter (A.1.4.6.1) for 1 min to 2 min, then incubate immediately at 65 °C for 30 min to 120 min. Centrifuge at 10 000 *g* to 13 000 *g* for 10 min. Transfer the supernatant to a new microtube.

Optionally for further quantitative PCR, after 30 min of incubation, centrifuge at 10 000 *g* to 13 000 *g* for 15 min. Transfer the supernatant into a common microtube, add RNase-A (A.1.4.5.20) at a final concentration of 0,001 mg/ml and incubate further for 30 min to 90 min at 65 °C.

Tambahkan larutan kalium asetat (A.1.4.5.22) dengan konsentrasi akhir 0,3 mol/l. Campurkan, tambahkan 1,2 ml etanol (A.1.4.5.1), dan inkubasi pada suhu −20 °C selama semalaman atau selama 1 jam pada suhu −80 °C. Endapkan sampai menjadi pelet DNA pada percepatan putar (10.000 – 13.000) × *g* selama 15 menit pada suhu 4 °C.

Cuci pelet DNA secara hati-hati menggunakan larutan etanol (A.1.4.5.21). Tiriskan tabung mikro dengan posisi terbalik di atas kertas dan keringkan tabung mikro menggunakan vakum. Larutkan DNA dalam (50 – 100) μl air steril. Penyimpanan jangka panjang (hingga 5 tahun) dapat dilakukan pada suhu −20 °C. Penggunaan air sebagai pengganti *bufer* TE (A.1.4.5.19) telah divalidasi[13]. Larutan ini merupakan stok master DNA.

**A.1.4.8    Daftar contoh**

Jumlah spesies/*strain* yang diuji ditunjukkan dalam tanda kurung:

*Absidia corymbifera*(1), *Acremonium* spp. (2), *Aspergillus* spp. (119), *Candida* spp. (7), *Cladosporium* spp*.* (2), *Cryptococcus* spp. (6), *Epidermophyton floccosum* (1), *Fusarium solani* (1), *Malbranchea pulchella*(1), *Geotrichum* spp. (2), *Microsporum canis* (1), *Paecilomyces* spp. (2), *Penicillium* spp. (20), *Pityrosporum ovale* (1), *Rhizopus* spp. (2), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Schizosaccharomyces pombe* (1), *Scopulariopsis brevicaulis* (1), *Trichoderma* spp. (124), *Trichophyton* spp. (2), *Trichosporon* spp. (2), *Ulocladium botrytis* (1), *Verticillium tenerum* (1).

**A.1.4.9     Validasi**

Keefektifan metode ini telah divalidasi pada fungi[13]. Analisis kuantitatif dari efisiensi ekstraksi menunjukkan bahwa penggunaan *glass milling* adalah cara yang paling efektif[18].

**A.2    Preparasi DNA berkualitas PCR menggunakan metode ekstraksi DNA berbasis polivinil-pirolidon (PVP)**

**A.2.1    Metode dasar PVP**

**A.2.1.1     Umum**

Metode[19] sederhana, cepat dan murah ini, sesuai untuk berbagai matriks, khususnya yang mengandung senyawa polifenol dalam jumlah tinggi.

**A.2.1.2    Status validasi**

Metode ini telah divalidasi secara *in-house* dan digunakan untuk preparasi rutin DNA di banyak laboratorium, meskipun belum dievaluasi secara resmi dalam studi interlaboratorium.

**A.2.1.3     Prinsip**

Metode ini terdiri atas tahap lisis (lisis termal dengan adanya natrium dodesil sulfat dan kandungan EDTA tinggi), diikuti dengan penghilangan kontaminan seperti molekul polifenol, polisakarida, metabolit dan protein terlarut, dari fase cair yang mengandung DNA dalam kombinasi dengan PVP dan amonium asetat. Tahap presipitasi alkohol akhir dapat memekatkan DNA dan menghilangkan garam, lihat juga Referensi [19], [20], [21], [22] dan [23].

**A.2.1.4     Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

Add potassium acetate solution (A.1.4.5.22) at 0,3 mol/l final concentration. Mix, add 1,2 ml of ethanol (A.1.4.5.1) and incubate at −20 °C overnight or for 1 h at −80 °C. Pellet the DNA at 10 000 *g* to 13 000 *g* for 15 min at 4 °C.

Wash carefully the pelleted DNA with ethanol solution (A.1.4.5.21). Drain the microtube upside down on paper and dry the microtube under vacuum. Dissolve the DNA in 50 µl to 100 µl of water. Long-term (up to 5 years) storage at −20 °C is permitted. The use of water instead of TE buffer (A.1.4.5.19) has been validated [13]. This is the DNA master stock.

**A.1.4.8    List of examples**

The number of species/strains investigated is indicated within brackets:

*Absidia corymbifera*(1), *Acremonium* spp. (2), *Aspergillus* spp. (119), *Candida* spp. (7), *Cladosporium* spp*.* (2), *Cryptococcus* spp. (6), *Epidermophyton floccosum* (1), *Fusarium solani* (1), *Malbranchea pulchella*(1), *Geotrichum* spp. (2), *Microsporum canis* (1), *Paecilomyces* spp. (2), *Penicillium* spp. (20), *Pityrosporum ovale* (1), *Rhizopus* spp. (2), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Schizosaccharomyces pombe* (1), *Scopulariopsis brevicaulis* (1), *Trichoderma* spp. (124), *Trichophyton* spp. (2), *Trichosporon* spp. (2), *Ulocladium botrytis* (1), *Verticillium tenerum* (1).

**A.1.4.9    Validation**

The effectiveness of the method has been validated in the case of fungi[13] Quantitative analysis of the extraction efficiency has shown that the use of glass milling was most effective[18].

**A.2    Preparation of PCR-quality DNA using polyvinyl-pyrrolidone (PVP)-based DNA extraction methods**

**A.2.1    Basic PVP method**

**A.2.1.1    General**

This simple, fast and cheap method[19] is suitable for a wide range of matrices, in particular the ones containing high amounts of polyphenolic compounds.

**A.2.1.2    Validation status**

The method has been in-house validated and is used for routine DNA preparations in many laboratories, although it has not yet been evaluated in official interlaboratory studies.

**A.2.1.3    Principle**

The method consists of a lysis step (thermal lysis in presence of sodium dodecyl sulfate and a high EDTA content), followed by the removal of contaminants such as polyphenolic molecules, polysaccharides, metabolites and soluble proteins, from the DNA-containing liquid phase in combination with PVP and ammonium acetate. A final alcohol-precipitation step allows concentration of the DNA and the elimination of salts, see also References [19], [20], [21], [22] and [23].

**A.2.1.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for handling organic chemicals.

**A.2.1.5     Reagen**

**A.2.1.5.1    Etanol** **(C2H5OH) = 96%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.2.1.5.2    Isopropanol** (CH3CHOHCH3).

**A.2.1.5.3    Polivinilpirolidon** (PVP), massa molekul *M* = 360.000 D; viskositas intrinsik (nilai K) = 80 hingga 100[[5]](#footnote-5)).

**A.2.1.5.4    Asam asetat glasial** (CH3COOH).

**A.2.1.5.5    Asam klorida**, **(HCl) = 37%.

**A.2.1.5.6    Natrium klorida** (NaCl).

**A.2.1.5.7    Tris (hidroksimetil) -aminometana (Tris)** (C4H11NO3).

**A.2.1.5.8    Garam dinatrium asam etilendiaminatetraasetat** (Na2EDTA).

**A.2.1.5.9    Natrium dodesil sulfat** (*sodium dodecyl sulfate*/SDS)(C12H25O4SNa).

**A.2.1.5.10    Amonium asetat** (C2H3O2NH4).

**A.2.1.5.11    Larutan etanol**, **(C2H5OH) = 70%.

Simpan dan gunakan pada suhu −20 °C.

**A.2.1.5.12    Bufer ekstraksi**, pH 8,0, *c*(Tris) = 0,2 mol/l, *c*(NaCl) = 0,250 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,025 mol/l, **(SDS) = 50 g/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.2.1.5.13    Larutan amonium asetat**, *c*(NH4C2H3O2) = 7,5 mol/l.

Larutkan dalam air steril dan dapat juga disterilkan dengan filtrasi menggunakan filter 0,22 µm.

**A.2.1.5.14    Bufer TE**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.2.1.6    Peralatan**

Peralatan laboratorium yang biasa digunakan dan, khususnya, peralatan berikut.

**A.2.1.6.1    *Centrifuge***, memiliki kemampuan memutar dengan percepatan putar hingga 10.000 × *g*.

Dalam beberapa tahap diperlukan *centrifuge* berpendingin.

**A.2.1.5    Reagents**

**A.2.1.5.1    Ethanol**, **(C2H5OH) = 96%.

Store and use at −20 °C.

**A.2.1.5.2    Isopropanol** (CH3CHOHCH3).

**A.2.1.5.3    Polyvinylpyrrolidone** (PVP), molecular mass *M* = 360 000 D; intrinsic viscosity (K value) = 80 to 100 [[6]](#footnote-6)).

**A.2.1.5.4    Glacial acetic acid** (CH3COOH).

**A.2.1.5.5    Hydrochloric acid**, **(HCl) = 37%.

**A.2.1.5.6    Sodium chloride** (NaCl).

**A.2.1.5.7    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.2.1.5.8    Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt** (Na2EDTA).

**A.2.1.5.9    Sodium dodecyl sulfate** (SDS) (C12H25O4SNa).

**A.2.1.5.10    Ammonium acetate** (C2H3O2 NH4).

**A.2.1.5.11    Ethanol solution**, **(C2H5OH) = 70%.

Store and use at −20 °C.

**A.2.1.5.12    Extraction buffer**, pH 8,0, *c*(Tris) = 0,2 mol/l, *c*(NaCl) = 0,250 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,025 mol/l, **(SDS) = 50g/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.2.1.5.13    Ammonium acetate solution**, *c*(NH4C2H3O2) = 7,5 mol/l.

Dissolve in sterile water and possibly sterilize by filtration through a 0,22 µm filter.

**A.2.1.5.14    TE buffer**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.2.1.6    Apparatus and equipment**

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

**A.2.1.6.1    Centrifuge**, capable of achieving an acceleration of 10 000 *g.*

In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.2.1.6.2**    **Penangas air atau inkubator**.

**A.2.1.6.3    Pengering vakum** (opsional).

**A.2.1.6.4    Pengering beku** (opsional).

**A.2.1.6.5    Mikser**, contohnya Vortex®1).

**A.2.1.7    Prosedur**

**A.2.1.7.1    Umum**

Setelah porsi uji matriks selesai disiapkan, terapkan protokol ekstraksi/pemurnian DNA berikut. Aturlah skala alat ukur massa dan volume bufer yang digunakan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih.

**A.2.1.7.2    Prosedur ekstraksi**

Timbang 0,25 g bahan yang telah digiling, dihaluskan atau berbentuk cair ke dalam vial. Tambahkan 1 ml bufer ekstraksi (A.2.1.5.12). Agitasi suspensi pada suhu 65 °C selama 1 jam, biarkan dingin hingga suhu ruang. Campur secara berurutan suspensi dengan 60 mg bubuk PVP (A.2.1.5.3) dan larutan amonium asetat (A.2.1.5.13) sebanyak 0,5 bagian volume. Inkubasi di atas es selama 30 menit.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 10.000 × *g* selama 10 menit dan pindahkan supernatan ke tabung baru. Campur lisat dengan isopropanol (A.2.1.5.2) sebanyak 1 bagian volume dan inkubasi pada suhu −20 °C selama 30 menit. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 10.000 × *g* pada suhu 4°C selama 10 menit dan buang supernatan secara hati-hati.

Cuci pelet DNA dengan larutan etanol (A.2.1.5.11) sebanyak 2 bagian volume. Tahap ini sangat penting untuk membuang garam yang dapat mengganggu analisis selanjutnya (misalnya PCR). Buang supernatan secara hati-hati (apabila pelet terlepas, lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 10.000 × *g* pada suhu 4 °C selama 10 menit). Keringkan pelet dan larutkan kembali dalam 100 µl air steril atau bufer yang sesuai, misalnya bufer TE (A.2.1.5.14). Larutan ini merupakan stok master DNA.

**A.2.1.8    Daftar contoh**

Metode ini telah berhasil diterapkan untuk mengekstrak DNA[[7]](#footnote-7)) dari matriks sebagai berikut:

biskuit bayi9), susu bayi9), *Belgian paté*, tepung roti (gandum atau jagung) dari stik ikan, brownies9), jagung kalengan, sereal batangan9), kroket keju, nuget ayam, ayam, kukis cokelat9), pasta cokelat9), *corn flakes*9), keripik, *dessert cream*9), susu formula bayi, biskuit jagung9), tepung jagung, daging segar dan matang (sapi, babi, ayam dan kalkun), daging cincang, *muesli*9), *pop corn*, susu bubuk, sosis (irisan9) dan koktail9)), *schnitzel*, kecambah kedelai9), bola sup, protein kedelai dalam penyiapan daging9), lesitin kedelai9), minuman kedelai9), krim kacang kedelai, saus spageti9), *speculoos*, tahu, hamburger vegetarian, wafel cokelat9), wafel9), yoghurt9).

**A.2.1.6.2    Water bath or incubator**.

**A.2.1.6.3    Vacuum dryer** (optional).

**A.2.1.6.4    Freeze dryer** (optional).

**A.2.1.6.5    Mixer**, e.g. Vortex®2).

**A.2.1.7    Procedure**

**A.2.1.7.1    General**

Once the matrix test portion has been prepared, apply the following DNA extraction/purification protocol. Scale-adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

**A.2.1.7.2    Extraction procedure**

Weigh 0,25 g of milled, crushed or liquid material into a vial. Add 1 ml of extraction buffer (A.2.1.5.12). Agitate the suspension at 65 °C for 1 h, cool to room temperature. Mix sequentially the suspension with 60 mg of PVP powder (A.2.1.5.3) and with 0,5 volume of ammonium acetate solution (A.2.1.5.13). Incubate on ice for 30 min.

Centrifuge at 10 000 *g* for 10 min and transfer the supernatant to a fresh tube. Mix the lysate with 1 volume of isopropanol (A.2.1.5.2) and incubate at −20 °C for 30 min. Centrifuge at 10 000 *g* at 4 °C for 10 min and carefully discard the supernatant.

Wash the DNA pellet with 2 volumes of ethanol solution (A.2.1.5.11). This step is essential for the removal of any salts that could interfere with the subsequent analysis (e.g. PCR). Carefully discard the supernatant (in the case of a loose pellet, centrifuge at 10 000 *g* at 4 °C for 10 min). Dry the pellet and redissolve it in 100 µl of water or appropriate buffer, e.g. TE buffer (A.2.1.5.14). This is the DNA master stock.

**A.2.1.8    List of examples**

The method has been successfully applied to extract DNA[[8]](#footnote-8)) from the following matrices:

baby biscuits10), baby milk10), Belgian paté, breadcrumbs (wheat or corn) from fish sticks, brownies10), canned maize, cereal bars10), cheese croquettes,chicken nuggets, chicken, chocolate cookies10), chocolate paste10), corn flakes10), crisps, dessert creams10), infant formula**,** maize biscuits10), maize flour, fresh and cooked meat (beef, pork, chicken and turkey), minced meat, muesli10), pop corn, powder milk, sausages (slicing10) and cocktail10)), schnitzel, soya sprouts10), soup balls, soya protein in meat preparations10), soya lecithin10), soya drinks10), soya bean cream, spaghetti sauces10), speculoos, tofu, vegetarian hamburgers, waffles with chocolate10), waffles10), yoghurts10).

**A.3    Preparasi DNA berkualitas PCR menggunakan metode ekstraksi DNA berbasis CTAB**

**A.3.1    Metode dasar CTAB**

**A.3.1.1     Umum**

Metode ini dapat diterapkan untuk ekstraksi DNA dari matriks tanaman dan bagian yang berasal dari tanaman, terutama karena kemampuan metode ini untuk menghilangkan polisakarida dan senyawa polifenol yang dapat memengaruhi kualitas DNA. Metode ini juga berguna untuk beberapa matriks lain (lihat A.3.1.8).

**A.3.1.2     Status validasi**

Metode ini telah di-*ring tested* (lihat A.3.1.9).

Metode ini umumnya digunakan untuk preparasi DNA rutin di banyak laboratorium.

**A.3.1.3    Prinsip**

Metode ini terdiri atas tahap lisis (lisis termal dengan adanya CTAB), diikuti dengan beberapa tahap ekstraksi untuk menghilangkan kontaminan, seperti polisakarida dan protein[24].

Untuk beberapa matriks, sangat berguna untuk melakukan tahap enzimatik berbeda seperti yang dijelaskan pada A.3.1.7. Alfa-amilase ditambahkan ke dalam bufer lisis untuk memecah pati apabila menggunakan matriks mengandung amilum. Perlakuan sampel dengan proteinase-K diperlukan dalam berbagai matriks untuk menghilangkan protein. Selain itu, perlakuan dengan RNase direkomendasikan untuk matriks tersebut karena ko-presipitasi RNA dapat mengganggu uji analitik selanjutnya.

Konsentrasi garam selama tahap ekstraksi sangat penting untuk menghilangkan kontaminan, karena endapan asam nukleat-CTAB akan terbentuk jika konsentrasi garam turun di bawah sekitar 0,5 mol/l pada suhu ruang dan/atau jika suhu turun di bawah 16 °C. Melalui peningkatan konsentrasi garam (misalnya penambahan natrium klorida), penghilangan protein terdenaturasi dan polisakarida yang terkompleks dengan CTAB tercapai, sementara asam nukleat akan larut. Kloroform digunakan untuk memisahkan lebih lanjut asam nukleat dari kompleks antara CTAB dan polisakarida/protein.

Terakhir, asam nukleat dimurnikan dengan presipitasi isopropanol dan pencucian dengan etanol.

**A.3.1.4    Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

**A.3.1.5    Reagen**

**A.3.1.5.1    α-Amilase** (opsional), spesies *Bacillus* tipe IIa, (1.500 – 3 000) units/mg protein.

**A.3.1.5.2    Kloroform** (CHCl3).

**A.3.1.5.3    Etanol**, **(C2H5OH) = 96%.

**A.3.1.5.4    Garam dinatrium asam etilendiaminatetraasetat** (Na2-EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.3    Preparation of PCR-quality DNA using the CTAB-based DNA extraction methods**

**Basic CTAB method**

**A.3.1    Basic CTAB method**

**A.3.1.1    General**

The method is applicable to the extraction of DNA from plants and plant-derived matrices, in particular because of its ability to remove polysaccharides and polyphenolic compounds that would otherwise affect the DNA quality. It is also useful for some other matrices (see A.3.1.8).

**A.3.1.2    Validation status**

This method has been ring tested (see A.3.1.9).

The method is commonly used for routine DNA preparations in many laboratories.

**A.3.1.3    Principle**

The method consists of a lysis step (thermal lysis in the presence of CTAB), followed by several extraction steps in order to remove contaminants, such as polysaccharides and proteins[24].

For some matrices, it is helpful to perform different enzymatic steps as outlined in A.3.1.7. Alpha-amylase is added to the lysis buffer to digest the starches in case of amylaceous matrices. Treatment of samples with proteinase-K is necessary in a variety of matrices to eliminate proteins. Also treatment with RNase is usually recommended for those matrices where RNA co-precipitation may disturb the subsequent analytical test.

The salt concentration during the extraction steps is very important for the removal of the contaminants, since a CTAB-nucleic acid precipitate will occur if the salt concentration drops below approximately 0,5 mol/l at room temperature and/or if the temperature drops below 16 °C. By increasing the salt concentration (e.g. addition of sodium chloride), the removal of denaturated proteins and polysaccharides complexed to CTAB is achieved, while the nucleic acids are solubilized. Chloroform is used to further separate the nucleic acids from CTAB and polysaccharide/protein complexes.

Finally, the nucleic acids are purified by isopropanol precipitation and washing with ethanol.

**A.3.1.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for handling organic chemicals.

**A.3.1.5    Reagents**

**A.3.1.5.1    *α*-Amylase** (optional), type IIa from *Bacillus* species, 1 500 to 3 000 units/mg of protein.

**A.3.1.5.2    Chloroform** (CHCl3).

**A.3.1.5.3    Ethanol**, **(C2H5OH) = 96%.

**A.3.1.5.4    Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt** (Na2-EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.3.1.5.5    Heksadesil-trimetil-amonium-bromida** (CTAB) (C19H42BrN).

**A.3.1.5.6    Asam klorida,** **(HCl) = 37%.

**A.3.1.5.7    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.3.1.5.8    Proteinase-K** (opsional), sekitar 20 Unit/mg liofilisat.

**A.3.1.5.9    RNase A, bebas DNase**, (opsional) dari pankreas sapi, sekitar 50 Unit/mg liofilisat.

**A.3.1.5.10    Natrium klorida** (NaCl).

**A.3.1.5.11    Natrium hidroksida** (NaOH).

**A.3.1.5.12    Tris(hidroksimetil)-aminometana** (Tris) (C4H11NO3).

**A.3.1.5.13    Larutan α-Amilase** (opsional), *c*(*α-*amilase) = 10 mg/ml.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20°C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.3.1.5.14    Bufer ekstraksi CTAB**, *ρ*(CTAB) = 20 g/l, *c*(NaCl) = 1,4 mol/l, *c*(Tris) = 0,1 mol/l, *c*(Na2 EDTA) = 0,02 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.3.1.5.15    Bufer presipitasi CTAB**, *ρ*(CTAB) = 5 g/l, *c*(NaCl) = 0,04 mol/l.

**A.3.1.5.16    Larutan natrium klorida,** *c*(NaCl) = 1,2 mol/l.

**A.3.1.5.17    Larutan etanol**, *ϕ*(C2H5OH) = 70%.

**A.3.1.5.18    Larutan Proteinase-K** (opsional), *ρ* = 20 mg/ml, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20°C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.3.1.5.19    Larutan RNase-A** (opsional), *ρ*(RNase A) = 10 mg/ml.

Simpan dalam alikuot pada suhu −20 °C.

**A.3.1.5.20    Bufer TE**, *c*(Tris) = 0,01 mol/l, *c*(Na2 -EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.3.1.6     Peralatan**

Peralatan laboratorium yang biasa digunakan dan, khususnya, peralatan berikut.

**A.3.1.6.1    Oven atau inkubator,** sebaiknya dengan pengocok/*shaker*.

**A.3.1.6.2    *Centrifuge*,** misalnya *microcentrifuge***,** yang memiliki kemampuan memutar dengan percepatan putar hingga 12.000 × *g*.

Pada beberapa tahap, diperlukan *centrifuge* berpendingin.

**A.3.1.5.5    Hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromide** (CTAB) (C19H42BrN).

**A.3.1.5.6    Hydrochloric acid**, **(HCl) = 37%.

**A.3.1.5.7    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.3.1.5.8    Proteinase-K** (optional), approximately 20 Units/mg of lyophilisate.

**A.3.1.5.9    RNase A, DNase-free**, (optional) from bovine pancreas, approximately 50 Units/mg of lyophilisate.

**A.3.1.5.10    Sodium chloride** (NaCl).

**A.3.1.5.11    Sodium hydroxide** (NaOH).

**A.3.1.5.12    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.3.1.5.13    *α*-Amylase solution** (optional), *c*(*α*-amylase) = 10 mg/ml.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.3.1.5.14    CTAB extraction buffer**, *ρ*(CTAB) = 20 g/l, *c*(NaCl) = 1,4 mol/l, *c*(Tris) = 0,1 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,02 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.3.1.5.15    CTAB-precipitation buffer**, *ρ*(CTAB) = 5g/l, *c*(NaCl) = 0,04 mol/l.

**A.3.1.5.16    Sodium chloride solution**, *c*(NaCl) = 1,2 mol/l.

**A.3.1.5.17    Ethanol solution**, *ϕ*(C2H5OH) = 70%.

**A.3.1.5.18    Proteinase-K solution** (optional), *ρ* = 20 mg/ml, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.3.1.5.19    RNase-A solution** (optional), *ρ*(RNase A) = 10 mg/ml.

Store in aliquots at −20 °C.

**A.3.1.5.20    TE buffer**, *c*(Tris) = 0,01 mol/l, *c*(Na2-EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.3.1.6    Apparatus and equipment**

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

**A.3.1.6.1    Oven or incubator**, preferably with a shaker.

**A.3.1.6.2    Centrifuge**, e.g. microcentrifuge, capable of achieving an acceleration of up to 12 000 *g.*

In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.3.1.6.3    Mikser**, misalnya Vortex®1).

**A.3.1.6.4    Pengering vakum** (opsional)

**A.3.1.7     Prosedur**

**A.3.1.7.1    Umum**

Setelah porsi uji matriks selesai disiapkan, terapkan protokol ekstraksi/pemurnian DNA berikut. Aturlah skala alat ukur massa dan volume bufer yang digunakan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih.

**A.3.1.7.2    Ekstraksi sampel**

Timbang (200 – 300) mg sampel uji di dalam tabung.

Tambahkan 1,5 ml bufer ekstraksi CTAB (A.3.1.5.14) yang telah dihangatkan sebelumnya (suhu 65°C) dan homogenkan. (Dalam beberapa kasus, mungkin diperlukan jumlah bufer yang lebih banyak untuk melarutkan matriks). Tambahkan 10 µl larutan *α-*amilase(A.3.1.5.13, opsional), 10 µl larutan RNase A (A.3.1.5.19, opsional) dan campurkan secara perlahan. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 65 °C, sambil diagitasi. Tambahkan 10 µl larutan proteinase-K (A.3.1.5.18, opsional), aduk secara perlahan dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C, sambil diagitasi (opsional). Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 10 menit. Pindahkan supernatan ke tabung baru, tambahkan kloroform (A.3.1.5.2) sebanyak (0,7 – 1) bagian volume dan campurkan secara merata.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 12.000 × *g* selama 15 menit. Pindahkan fase bagian atas (cair) ke dalam tabung baru.

**A.3.1.7.3    Presipitasi CTAB**

Tambahkan bufer presipitasi CTAB (A.3.1.5.15) sebanyak 2 bagian volume. Inkubasi selama 60 menit pada suhu ruang tanpa diagitasi. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* selama 15 menit. Buang supernatan. Larutkan endapan DNA dengan menambahkan 350 µl larutan NaCl (A.3.1.5.16). Tambahkan 350 µl kloroform (A.3.1.5.2) dan campurkan secara merata. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* selama 10 menit. Pindahkan fase cair ke dalam tabung baru.

**CATATAN**    Presipitasi CTAB tidak diperlukan untuk semua matriks, hanya untuk matriks yang kaya protein dan polisakarida. Sebagai alternatif, pemurnian DNA fase padat (misalnya menggunakan kolom spin) dimungkinkan asalkan hasilnya setara.

**A.3.1.7.4    Presipitasi DNA**

Tambahkan isopropanol (A.3.1.5.7) sebanyak 0,6 bagian volume, campurkan secara perlahan dengan cara membolak-balik tabung dan biarkan tabung pada suhu ruang selama 20 menit. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* selama 15 menit. Buang supernatan. Tambahkan 500 µl larutan etanol (A.3.1.5.17) ke dalam tabung dan bolak-balikkan beberapa kali. Tahap ini sangat penting untuk memastikan penghilangan CTAB secara sempurna. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* selama 10 menit. Buang supernatan. Keringkan pelet DNA dan larutkan kembali dalam 100 μl air steril atau bufer yang sesuai, misalnya bufer TE (A.3.1.5.20). Larutan ini merupakan stok master DNA.

**A.3.1.6.3    Mixer**, e.g. Vortex®2).

**A.3.1.6.4    Vacuum dryer** (optional).

**A.3.1.7    Procedure**

**A.3.1.7.1    General**

Once the matrix test portion has been prepared, apply the following DNA extraction/purification protocol. Scale-adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

**A.3.1.7.2    Sample extraction**

Weigh 200 mg to 300 mg of the test sample into a tube.

Add 1,5 ml of pre-warmed (65 °C) CTAB extraction buffer (A.3.1.5.14) and mix. (In some cases a higher amount of buffer may be required to suspend the matrix.) Add 10 µl of *α*-amylasesolution (A.3.1.5.13, optional), 10 µl of RNaseA solution (A.3.1.5.19, optional) and mix gently. Incubate for 30 min at 65 °C, under agitation. Add 10 µl of proteinase-K solution (A.3.1.5.18, optional), smoothly mix the tubes and incubate for 30 min at 65 °C, under agitation (optional). Centrifuge for 10 min at approximately 12 000 *g.* Transfer the supernatant to a new tube, add 0,7 to 1 volume of chloroform (A.3.1.5.2) and mix thoroughly.

Centrifuge for 15 min at approximately 12 000 *g.* Transfer the upper phase (aqueous) to a new tube.

**A.3.1.7.3    CTAB-precipitation**

Add 2 volumes of the CTAB precipitation buffer (A.3.1.5.15). Incubate for 60 min at room temperaturewithout agitation. Centrifuge for 15 min at 12 000 *g*. Discard the supernatant. Dissolve the precipitated DNA by adding 350 µl of NaCl solution (A.3.1.5.16). Add 350 µl of chloroform (A.3.1.5.2) and mix thoroughly. Centrifuge for 10 min at 12 000 *g*. Transfer the aqueous phase into a new tube.

**NOTE**    CTAB-precipitation is not necessary for all matrices, only for protein- and polysaccharide-rich matrices. Alternatively, a solid-phase purification of the DNA (e.g. by the use of spin columns) is possible assuming the results are equivalent.

**A.3.1.7.4    DNA precipitation**

Add 0,6 volume of isopropanol (A.3.1.5.7), mix smoothly by inverting the tube and keep the tube at room temperature for 20 min. Centrifuge for 15 min at 12 000 *g*. Discard the supernatant. Add 500 µl of ethanol solution (A.3.1.5.17) to the tubeand invert several times. This is the critical step ensuring the complete removal of CTAB. Centrifuge for 10 min at 12 000 *g*. Discard the supernatant. Dry the DNA pellet and redissolve it into 100 µl of water or an appropriate buffer, e.g. TE buffer (A.3.1.5.20). This is the DNA master stock.

**A.3.1.8     Daftar contoh**

Metode ini telah berhasil diterapkan untuk mengekstrak DNA[[9]](#footnote-9)) dari matriks berikut:

makanan bayi (bubuk), makanan bayi, *baking mix*, biskuit, kaldu kubus11), permen asam manis, jagung kalengan, krim karamel11), *cattle cakes*, serealia (beras, gandum, oat, *rye*, *buckwheat*, *millet*), cokelat batang11), krim cokelat11), cokelat11), kukis cokelat11), kukis, bir jagung11), *cornflakes*11), *dessert cream*, dekstrosa11), isian *pralines*, pastri, ikan11), *fish fingers*11), *flakes of whole soya bean*, kentang goreng, *gravy*11), ham rebus, madu11), makanan instan, tangkai jagung, tepung jagung, embrio jagung11), pakan gluten jagung, biji jagung, daun jagung, pati asli jagung11), minyak jagung (asli) 11), protein jagung11), benih jagung, semolina jagung, margarin11), daging segar, susu bubuk, susu, makanan hewan campuran, *muesli*11), biji kacang hijau, daun mustar, *popcorn* (mentah), keripik kentang, pati kentang (asli), umbi kentang, daun *rape*, *rape press cake*, minyak biji *rape* (*crude*/asli)11), biji *rape*, lesitin kedelai mentah11), makanan siap saji, *salami* (kandungan lemak tinggi), camilan asin (jagung), sosis, bahan penyedap11), pati yang dimodifikasi (beberapa jenis)11), krim asam dengan bawang bombay11), tepung kedelai, tauge (diawetkan, dibekukan), protein kedelai11), minuman kedelai11), biji kedelai, tahu kedelai, kacang kedelai (diasamkan)11), daun gula bit, biji gula bit, biji bunga matahari, surimi dengan kedelai11), jagung manis, cangkang *taco*, *taramas* (*paste of fish roes*), tembakau, saus tomat11), konsentrat tomat11), tomat (buah), keripik tortilla11), hamburger vegetarian, wafel11), pati gandum (asli), yoghurt11).

**A.3.1.9    Validasi**

Data validasi pada Tabel A.5 telah dielaborasi dalam studi kolaboratif yang dilakukan oleh tim “*Development of methods for identifying foodstuffs produced by genetic engineering techniques*” dari *Commission of the former German Federal Health Board* untuk penerapan metode berdasarkan Pasal 35 dari *the German Foodstuffs Act*(lihat Referensi [25], [26], [27]). Matriks yang diuji adalah kentang, kedelai, dan tomat. Dalam studi interlaboratorium ini, prosedur dilakukan dengan 100 mg bahan sampel. Tahap presipitasi CTAB diperlukan untuk analisis biji kedelai dan tepung kedelai. Tahap enzimatik tidak dilakukan dalam studi ini.

Untuk studi kolaboratif pada biji kedelai, dua laboratorium peserta menggunakan protokol yang banyak mengalami modifikasi dan salah satu laboratorium tidak melanjutkan lima pengujian sampel. Jadi, 22 dari 25 laboratorium mengidentifikasi seluruh 110 sampel dengan benar.

Untuk studi kolaboratif pada kentang, tiga sampel diidentifikasi negatif palsu dan satu sampel positif palsu. Tiga sampel tidak dinilai karena hasil yang ambigu di antara kedua ulangan.

**A.3.1.8    List of examples**

The method has been successfully applied to extract DNA[[10]](#footnote-10)) from the following matrices:

baby food (powder), baby food, baking mix, biscuits, bouillon cubes12), sweet and sour candies, canned corn, caramel cream12), cattle cakes, cereal grains (rice, wheat, oat, rye, buckwheat, millet), chocolate bars12), chocolate cream12), chocolates12), chocolate cookies12), cookies, corn beer12), cornflakes12), dessert cream, dextrose12), fillings of pralines, fine pastries, fish12), fish fingers12), flakes of whole soya bean, French fries, gravy12), boiled ham, honey12), instant meals, maize ear, maize flour, maize germs12), maize gluten feed, maize grids, maize leaves, maize native starch12),maize oil (native) 12), maize proteins12), maize seeds/grains, maize semolina, margarine12), fresh meat, milk powder, milk, mixed pet food, muesli12), mungbean seeds, mustard leaves, popcorn (raw), potato chips, potato starch (native), potato tubers, rape leaves, rape press cake, rape seed oil (crude/native) 12), rape seed seeds, raw soya lecithin12), ready-meals, salami (high fat content), salty snacks (maize), sausages, seasoning agents12), modified starches (some types of) 12), sour cream with onion12), soya flour, soya germs (preserved, frozen), soya protein12), soya drinks12), soya bean seeds/grains, soya bean tofu, soya beans (acidified)12), sugar-beet leaves, sugar-beet seeds, sunflower seeds, surimi with soya12), sweet corn, taco shells, taramas (paste of fish roes), tobacco, tomato ketchup12), tomato-concentrate12), tomatoes (fruits), tortilla chips12), vegetarian hamburgers, waffles12), wheat starch (native), yoghurts12).

**A.3.1.9    Validation**

The validation data in Table A.5 have been elaborated in collaborative studies carried out by the working group “Development of methods for identifying foodstuffs produced by genetic engineering techniques” of the Commission of the former German Federal Health Board for the implementation of methods according to article 35 of the German Foodstuffs Act (see References [25], [26], [27]). The matrices tested were potatoes, soya beans and tomatoes. In these interlaboratory studies, the procedure was carried out with 100 mg of sample material. The CTAB precipitation step was necessary for the analysis of soya bean and soya flour. The enzymatic steps were not carried out in these interlaboratory studies.

For the collaborative study on soya beans, two participants used strongly modified protocols and in one laboratory the testing of the five samples was discontinued. So 22 out of 25 participants identified all 110 samples correctly.

For the collaborative study on potatoes, three samples were identified false negative and one sample false positive. Three samples were not assessed due to ambiguous results between both replicates.

**Tabel A.5 – Data validasi**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Matriks** | **Jumlah laboratorium yang berpartisipasi** | **Jumlah sampel per laboratorium** | **Jumlah total sampel** | **Jumlah sampel yang diidentifikasi dengan benar** |
| Biji kedelai[25] | 25 | 5 | 125 | 110 |
| Kentang[26] | 18 | 10 | 180 | 173 |
| Tomat[27] | 18 | 5 | 90 | 90 |

**A.4    Preparasi DNA berkualitas PCR menggunakan metode ekstraksi DNA berbasis silika**

**A.4.1    Metode dasar silika**

**A.4.1.1    Umum**

Metode ini sesuai untuk ekstraksi DNA dari berbagai jenis matriks (lihat contoh di A.4.1.8). Metode ini juga dapat digunakan sebagai tahap pemurnian lebih lanjut dari larutan DNA yang diperoleh setelah ekstraksi DNA menggunakan metode lain.

Metode ini diadopsi dari protokol yang telah dipublikasi[28]. Metode ini memiliki beberapa keuntungan untuk matriks yang sesuai, khususnya untuk menghindari penggunaan reagen yang sangat beracun. Selain itu, prosedur ini dapat dengan mudah disesuaikan untuk analisis manual berkecepatan tinggi dan untuk otomatisasi, terutama karena kurangnya tarikan antar-muka (seperti antara air-kloroform) dan karena membutuhkan sentrifugasi dengan percepatan putar rendah.

Metode ini biasanya tidak disarankan untuk mengekstraksi DNA dari matriks dengan kandungan lemak tinggi.

**A.4.1.2    Status validasi**

Metode ini telah divalidasi secara *in-house* dan digunakan untuk preparasi DNA rutin di banyak laboratorium, meskipun belum dievaluasi secara resmi dalam studi interlaboratorium. Prinsip metode ini juga telah diimplementasikan dalam berbagai metode berbasis kit yang telah berhasil di-*ring tested* (lihat Referensi [29], [30] dan [31]).

**A.4.1.3    Prinsip**

Metode ini terdiri atas tahap lisis (lisis termal dengan adanya natrium dodesil sulfat dalam larutanbufer), diikuti dengan tahap pemurnian menggunakan resin silika , dengan adanya reagen *chaotropic* guanidin-hidroklorida. Prinsip dari metode ini adalah ikatan asam nukleat ke silika dengan kondisi aktivitas air yang rendah karena pengaruh entropi[32]. Kontaminan dibersihkan dari resin dengan isopropanol, sementara DNA tetap melekat. Tahap elusi akhir menggunakan larutan bufer garam rendah memungkinkan perolehan kembali DNA.

Pengguna Standar ini harus memahami bahwa metode berbasis silika mungkin dilindungi oleh hak paten [33].

**A.4.1.4    Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

**Table A.5 — Validation data**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Matrix** | **Number of laboratories participating** | **Number of samples per laboratory** | **Number of total samples** | **Number of samples correctly identified** |
| Soya beans[25] | 25 | 5 | 125 | 110 |
| Potatoes[26] | 18 | 10 | 180 | 173 |
| Tomatoes[27] | 18 | 5 | 90 | 90 |

**A.4    Preparation of PCR quality DNA using the silica-based DNA extraction methods**

**A.4.1    Basic silica method**

**A.4.1.1    General**

The method is suitable for DNA extraction from a wide range of matrices (see examples in A.4.1.8). This method can also be employed as a further purification step of DNA solutions obtained after DNA extraction with other methods.

The method is adapted from a published protocol[28]. It has some advantages for the matrices for which it is suitable, in particular for the avoidance of heavily toxic reagents. Furthermore, the procedure can be easily adapted for manual high-throughput analyses and for automation, in particular because of the lack of labile interfaces (such as water-chloroform) and because low-speed centrifugation is required.

The method is usually not recommended to extract DNA from fat-rich matrices.

**A.4.1.2    Validation status**

The method has been in-house validated and is used for routine DNA preparations in many laboratories, although it has not yet been evaluated by official interlaboratory studies. The principle of this method has also been implemented in various kit-based methods that were successfully ring tested (see References [29], [30] and [31]).

**A.4.1.3    Principle**

The method consists of a lysis step (thermal lysis in the presence of sodium dodecyl sulfate in a buffered solution), followed by a purification step realised by means of a silica resin, in the presence of the chaotropic reagent guanidine-hydrochloride. The principle of the method is the binding of nucleic acids to silica under low water activity due to an entropic effect[32]. Contaminants are washed from the resin by isopropanol, while the DNA stays attached. A final elution step with a low-salt buffer solution permits DNA recovery.

Users of this International Standard are made aware that silica-based methods may be covered by patent rights[33].

**A.4.1.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for handling organic chemicals.

**A.4.1.5    Reagen**

**A.4.1.5.1    Natrium Klorida** (NaCl).

**A.4.1.5.2    Tris(hidroksimetil)-aminometana** (Tris) (C4H11NO3).

**A.4.1.5.3    Garam dinatrium asam etilendiaminatetraasetat** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.4.1.5.4    Asam klorida**, *φ*(HCl) = 37%.

**A.4.1.5.5    Natrium hidroksida** (NaOH).

**A.4.1.5.6    Natrium dodesil sulfat** (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)(C12H25O4SNa).

**A.4.1.5.7    Proteinase-K**,sekitar 20 U/mg liofilisat.

**A.4.1.5.8    Guanidin hidroklorida** (CH5N3-HCl).

**A.4.1.5.9    Kalium Klorida** (KCl).

**A.4.1.5.10    Dinatrium hidrogen fosfat (**Na2HPO4).

**A.4.1.5.11    Kalium dihidrogen fosfat** (KH2PO4).

**A.4.1.5.12    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.4.1.5.13    Silika** (SiO2), silikon dioksida dengan distribusi ukuran partikel antara 0,5 µm dan 10 µm (80% antara 1 µm hingga 5 µm)[[11]](#footnote-11)).

**A.4.1.5.14    RNase-A,** bebas DNase, sekitar 100 Unit Kunitz/mg liofilisat.

**A.4.1.5.15    Larutan Proteinase-K**, *ρ* = 20 mg/ml.

Larutkan dalam air steril atau bufer sebagaimana dijelaskan pada Referensi [34]. Tidak boleh diautoklaf. Simpan dalam alikuot pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.4.1.5.16    Larutan guanidin hidroklorida l**, *с*(CH5N3-HCl) = 5 mol/l.

Autoklaf pada suhu 121 °C maksimum selama 15 menit.

**A.4.1.5.17    Larutan guanidin-HCl II**, *с*(CH5N3-HCl) = 6 mol/l.

Autoklaf pada suhu 121 °C maksimum selama 15 menit.

**A.4.1.5.18    Larutan bufer PBS**, *с*(NaCl) = 0,157 mol/l, *с*(KCl) = 0,0027 mol/l, *с*(Na2HPO4) = 0,010 mol/l, *с*(KH2PO4) = 0,0018 mol/l

Sesuaikan pH menjadi 7,5 menggunakan HCl.

**A.4.1.5    Reagents**

**A.4.1.5.1    Sodium chloride** (NaCl).

**A.4.1.5.2    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.4.1.5.3    Ethylenediaminetetraacetic acid-disodium salt** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.4.1.5.4    Hydrochloric acid**, *φ*(HCl) = 37%.

**A.4.1.5.5    Sodium hydroxide** (NaOH).

**A.4.1.5.6    Sodium dodecyl sulfate** (SDS) (C12H25O4SNa).

**A.4.1.5.7    Proteinase-K**,approximately 20 U/mg of lyophilisate.

**A.4.1.5.8    Guanidine hydrochloride** (CH5N3-HCl).

**A.4.1.5.9    Potassium chloride** (KCl).

**A.4.1.5.10    Disodium hydrogen phosphate** (Na2HPO4).

**A.4.1.5.11    Potassium dihydrogen phosphate** (KH2PO4).

**A.4.1.5.12    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.4.1.5.13    Silica** (SiO2), silicon dioxide with particle size distribution between 0,5 and 10 µm (80% between 1 µm to 5 µm) [[12]](#footnote-12)).

**A.4.1.5.14    RNase-A**, DNase-free, approximately 100 Kunitz Units/mg of lyophilisate.

**A.4.1.5.15    Proteinase-K solution**, *ρ* = 20 mg/ml.

Dissolve the enzyme in autoclaved water or buffer as described in Reference [34]. Do not autoclave this solution. Store in aliquots at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.4.1.5.16    Guanidine hydrochloride solution I**, *c*(CH5N3-HCl) = 5 mol/l.

Autoclave for a maximum of 15 min at 121°C.

**A.4.1.5.17    Guanidine-HCl solution II**, *c*(CH5N3-HCl) = 6 mol/l.

Autoclave for a maximum of 15 min at 121 °C.

**A.4.1.5.18    PBS-buffer solution**, *c*(NaCl) = 0,157 mol/l, *c*(KCl) = 0,0027 mol/l, *c*(Na2HPO4) = 0,010 mol/l, *c*(KH2PO4) = 0,0018 mol/l.

Adjust the pH to 7,5 with HCl.

**A.4.1.5.19    Suspensi silika**

Timbang 5 g silika (A.4.1.5.13) dalam tabung berukuran 50 ml dan tambahkan 50 ml bufer PBS (A.4.1.5.18). Campurkan secara sempurna dan biarkan mengendap selama 2 jam. Buang supernatan menggunakan pipet. Tambahkan 50 ml bufer PBS, campurkan secara sempurna dan biarkan mengendap selama 2 jam. Buang supernatan. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 2.000 × *g* selama 2 menit. Buang supernatan yang tersisa. Lakukan suspensi pelet kembali hingga 50 ml dalam larutan guanidin-HCl II (A.4.1.5.17). Gunakan dalam waktu (2 – 5) bulan. Campurkan secara sempurna sebelum digunakan.

**A.4.1.5.20    Bufer ekstraksi TNE-SDS**, *с*(NaCl) = 0,150 mol/l, *с*(Tris) = 0,002 mol/l, *с*(Na2EDTA) = 0,002 mol/l, *ρ*(SDS) = 10 g/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH dan autoklaf sebelum menambahkan SDS.

**A.4.1.5.21    Larutan isopropanol**, *φ*[CH3CH(OH)CH3] = 80%

**A.4.1.5.22    Larutan bufer TE**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l dan *с*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.4.1.5.23    Larutan RNase-A**, *ρ*(RNase) = 10 mg/ml.

Simpan dalam alikuot pada suhu −20oC, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.4.1.6    Peralatan**

Peralatan laboratorium yang biasa digunakan dan, khususnya, peralatan berikut.

**A.4.1.6.1    *Centrifuge***, memiliki kemampuan memutar dengan percepatan putar minimum 2.000 × *g*.

Dalam beberapa tahap, diperlukan *centrifuge* berpendingin.

**A.4.1.6.2    Oven atau inkubator**, dengan suhu kerja 60 °C.

**A.4.1.6.3    Pengocok (*shaker*)**, untuk dimasukkan ke dalam oven/inkubator.

**A.4.1.6.4    Mikse**r, misalnya Vortex**®**1).

**A.4.1.6.5    Vial sentrifugasi**, 50 ml, untuk preparasi suspensi silika.

**A.4.1.7     Prosedur**

**A.4.1.7.1    Umum**

Setelah porsi uji matriks selesai disiapkan, terapkan protokol ekstraksi/pemurnian DNA berikut. Aturlah skala alat ukur massa dan volume bufer yang digunakan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih.

**A.4.1.5.19    Silica suspension**

Weigh 5 g of silica (A.4.1.5.13) into a 50 ml tube and add 50 ml of PBS-buffer (A.4.1.5.18). Mix well and allow to settle for 2 h. Remove the supernatant by aspiration with a pipette. Add another 50 ml of the PBS-buffer, mix well and allow to settle again for 2 h. Remove the supernatant by aspiration. Centrifuge for 2 min at 2 000 *g*. Discard the remaining supernatant. Resuspend the pellet up to 50 ml in guanidine-HCl solution II (A.4.1.5.17). Use within 2 to 5 months. Mix well before use.

**A.4.1.5.20    TNE-SDS extraction buffer**, *c*(NaCl) = 0,150 mol/l, *c*(Tris) = 0,002 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,002 mol/l, *ρ*(SDS) = 10g/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH and autoclave before adding the SDS.

**A.4.1.5.21    Isopropanol solution**, *φ*[CH3CH(OH)CH3] = 80%.

**A.4.1.5.22    TE-buffer solution**, *c*(Tris) = 0,010 mol/l and *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.4.1.5.23    RNase-A solution**, *ρ*(RNase) = 10 mg/ml.

Store in aliquots at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.4.1.6    Apparatus and equipment**

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

**A.4.1.6.1    Centrifuge**, capable of achieving an acceleration of at least 2.000 *g*.

In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.4.1.6.2    Oven or incubator**, with a working temperature of 60 °C.

**A.4.1.6.3    Shaker**, to be put inside the oven/incubator.

**A.4.1.6.4    Mixer**, e.g. Vortex®2).

**A.4.1.6.5    Centrifugation vials**, 50 ml, for preparation of the silica suspension.

**A.4.1.7    Procedure**

**A.4.1.7.1    General**

Once the matrix test portion has been prepared, apply the following DNA extraction/purification protocol. Scale-adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

**A.4.1.7.2    Prosedur ekstraksi**

Timbang (200 – 300) mg bahan yang telah digiling atau dihaluskan ke dalam vial. Tambahkan 2 ml bufer ekstraksi (A.4.1.5.20) dan 20 µl larutan Proteinase-K (A.4.1.5.15). Inkubasi selama (1 – 5) jam dalam oven pada suhu 60 °C. Selama waktu inkubasi, kocok sampel dengan kuat (sekitar 250 per menit). Lakukan setrifugasi dengan percepatan putar 2.000 × *g* selama 15 menit. Pindahkan 550 µl supernatan ke tabung baru.

Tambahkan supernatan yang telah dipindahkan dengan 2 µl larutan RNase (A.4.1.5.23) selama 5 menit pada suhu 37 °C (langkah hidrolisis RNA ini direkomendasikan sebelum pengikatan silika, jika tidak, RNA yang terhidrolisis dan nukleotida yang dihasilkan dapat mengganggu pada saat pengukuran spektrometri UV selanjutnya). Tambahkan 55 µl larutan guanidin-HCl I (A.4.1.5.16) dan 100 µl suspensi silika (A.4.1.5.19) ke dalam supernatan. Campurkan secara hati-hati beberapa kali. Diamkan tabung selama kurang lebih 1 menit.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 800 × *g* selama 2 menit. Buang supernatan dan tambahkan 500 µl larutan isopropanol (A.4.1.5.21). Tutup tabung dan campurkan dengan bantuan mikser (A.4.1.6.4) bila memungkinkan, untuk melarutkan kembali pelet secara sempurna.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 1.500 × *g* selama 2 menit. Buang supernatan dan keringkan pelet. Tambahkan 100 µl larutan bufer TE (A.4.1.5.22). Resuspensikan dengan hati-hati untuk melarutkan kembali pelet. Inkubasi sampel pada suhu 60 °C selama 5 menit. Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 2.000 × *g* selama 5 menit. Pindahkan 80% supernatan ke dalam tabung baru. Hati-hati saat memindahkan supernatan agar partikel silika tidak terbawa, karena dapat menghambat aktivitas enzim (misalnya DNA polimerase, endonuklease restriksi).

Tambahkan supernatan tersebut dengan 2 µl larutan RNase (A.4.1.5.23) selama 1 jam pada suhu 37 °C, atau semalaman pada suhu ruang. Larutan ini adalah stok master DNA.

**A.4.1.8     Daftar contoh**

Metode ini telah berhasil diterapkan untuk mengekstrak DNA[[13]](#footnote-13)) dari matriks berikut:

Kecambah jagung15), tepung jagung, pakan gluten jagung15), daun jagung, pati jagung yang dimodifikasi15), pati jagung15), biji jagung, semolina jagung, protein kedelai15), biji kedelai, daun kedelai, gula bit (umbi segar), gula bit (*puree* beku), daun gula bit.

**A.5    Preparasi DNA berkualitas PCR menggunakan metode ekstraksi DNA berbasis guanidinium-kloroform**

**A.5.1    Metode dasar guanidin-kloroform**

**A.5.1.1     Umum**

Metode ini sesuai untuk ekstraksi DNA dari berbagai macam matriks pangan dan pakan (lihat A.5.1.8). Tahap pemurnian lebih lanjut mungkin diperlukan, tergantung pada sampel.

**A.4.1.7.2    Extraction procedure**

Weigh 200 mg to 300 mg of milled or crushed material into a vial. Add 2 ml of extraction buffer (A.4.1.5.20) and 20 µl of Proteinase-K solution (A.4.1.5.15). Incubate for 1 h to 5 h in the oven set at 60 °C. During the incubation time, shake the samples vigorously (approximately 250 min−1). Centrifuge for 15 min at 2 000 *g*. Transfer 550 µl of the supernatant to a new tube.

Treat the transferred supernatant with 2 µl of RNase solution (A.4.1.5.23) for 5 min at 37 °C (this hydrolysing RNA step is recommended before the silica binding, otherwise the hydrolysed RNA and the resulting nucleotides may interfere with subsequent UV-spectrometry measurements). Add 55 µl of the guanidine-HCl solution I (A.4.1.5.16) plus 100 µl of the silica suspension (A.4.1.5.19) to the supernatant. Mix carefully several times. Leave the tubes on the bench for approximately 1 min.

Centrifuge for 2 min at approximately 800 *g.* Discard the supernatant and add 500 µl of the isopropanol solution (A.4.1.5.21). Close the tubes and mix, possibly with the aid of the mixer (A.4.1.6.4), to completely resuspend the pellet.

Centrifuge for 2 min at approximately 1 500 *g*. Discard the supernatant and dry the pellet. Add 100 µl of TE-buffer solution (A.4.1.5.22). Mix carefully in order to resuspend the pellet. Incubate the samples at 60 °C for 5 min. Centrifuge for 5 min at 2 000 *g*. Transfer 80% of the supernatant to a new tube. Be careful not to transfer any silica particles because of their inhibiting activity on enzymes (e.g. DNA polymerase, restriction endo­nucleases).

Treat the transferred supernatant with 2 µl of RNase solution (A.4.1.5.23) for 1 h at 37 °C, or overnight at room temperature. This is the DNA master stock.

**A.4.1.8    List of examples**

The method has been successfully applied to extract DNA[[14]](#footnote-14)) from the following matrices:

germs from maize16), maize flour, maize gluten feed16), maize leaves, maize-modified starches16), maize native starch16), maize seeds, maize semolina, protein from soya beans16), soya beans, soya bean leaves, sugar beet (fresh root), sugar beet (frozen pulp), sugar beet leaves.

**A.5    Preparation of PCR quality DNA using guanidinium–chloroform-based DNA extraction methods**

**A.5.1    Basic guanidine-chloroform method**

**A.5.1.1    General**

This method is suitable for DNA extraction from a wide range of food and feed matrices (see A.5.1.8). A further purification step may be necessary depending on the sample.

**A.5.1.2     Status validasi**

Metode ini telah divalidasi secara *in-house*.

**A.5.1.3    Prinsip**

Metode ini terdiri atas lisis termal dan enzimatik dengan ketersediaan natrium dodesil sulfat dalam bufer guanidinium terdenaturasi, biasanya diikuti dengan tahap pemurnian tergantung pada matriksnya.

Kontaminan seperti lipid dan protein dihilangkan dengan tahap ekstraksi kloroform setelah lisis, kemudian DNA dipresipitasi dengan isopropanol sebelum dimurnikan.

**A.5.1.4     Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

Lemari asam diperlukan untuk menangani bahan kimia organik.

**A.5.1.5     Reagen**

**A.5.1.5.1    α-Amilase**¸ dari *Bacillus* spp tipe IIA, (1.500 – 5.000) Unit/mg liofilisat.

**A.5.1.5.2    Asam asetat glasial** (CH3COOH).

**A.5.1.5.3    Kloroform** (CHCl3).

**A.5.1.5.4    Etanol**, *φ*(C2H5OH) = 96%

**A.5.1.5.5    Garam dinatrium asam etilendiaminatetraasetat** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2)

**A.5.1.5.6    Guanidin hidroklorida** (CH5N3-HCl).

**A.5.1.5.7    Asam Klorida,** *φ*(HCl) = 37%.

**A.5.1.5.8    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.5.1.5.9    Proteinase-K,** sekitar 20 unit / mg liofilisat.

**A.5.1.5.10    RNase-A**, bebas DNAse, dari prankeas sapi, sekitar 50 Kunitz Unit/mg liofilisat.

**A.5.1.5.11    Natrium klorida** (NaCl).

**A.5.1.5.12    Natrium dodesil sulfat** (*sodium dodecyl sulfate*/SDS) (C12H25O4SNa).

**A.5.1.5.13    Natrium hidroksida** (NaOH).

**A.5.1.5.14    Tris(hidroksimetil)-aminometana** (Tris)(C4H11NO3).

**A.5.1.5.15    Larutan** **α-Amilase**, *ρ* = 10 mg/ml, dilarutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C, tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.5.1.5.16    Larutan etanol**, *φ*(C2H5OH) = 70%

**A.5.1.2    Validation status**

The method has been validated in-house.

**A.5.1.3    Principle**

The method consists of a thermal and enzymatic lysis in presence of sodium dodecyl sulfate in a denaturating guanidinium buffer, occasionally followed by a purification step depending on the matrix.

Contaminants such as lipids and proteins are eliminated by a chloroform-extraction step after the lysis, then DNA is precipitated by isopropanol before purification.

**A.5.1.4    Safety precautions**

A fume hood is necessary for manipulation of organic chemicals.

**A.5.1.5    Reagents**

**A.5.1.5.1    *α*-Amylase**, type IIa from *Bacillus* spp., 1 500 to 5 000 Units/mg of lyophilisate.

**A.5.1.5.2    Glacial acetic acid** (CH3COOH).

**A.5.1.5.3    Chloroform** (CHCl3).

**A.5.1.5.4    Ethanol**, *φ*(C2H5OH) = 96%.

**A.5.1.5.5    Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt** (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**A.5.1.5.6    Guanidine hydrochloride** (CH5N3-HCl).

**A.5.1.5.7    Hydrochloric acid**, *φ*(HCl) = 37%.

**A.5.1.5.8    Isopropanol** [CH3CH(OH)CH3].

**A.5.1.5.9    Proteinase-K**, approximately 20 Units/mg lyophilisate.

**A.5.1.5.10    RNase-A**, DNase-free, from bovine pancreas, approximately 50 Kunitz Units/mg of lyophilisate.

**A.5.1.5.11    Sodium chloride** (NaCl).

**A.5.1.5.12    Sodium dodecyl sulfate** (SDS) (C12H25O4SNa).

**A.5.1.5.13    Sodium hydroxide** (NaOH).

**A.5.1.5.14    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**A.5.1.5.15    *α*-Amylase solution**, *ρ* = 10 mg/ml, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.5.1.5.16    Ethanol solution**, *φ*(C2H5OH) = 70%.

**A.5.1.5.17    Bufer ekstraksi**, *c*(Tris) = 0,1 mol/l, *c*(NaCl) = 0,15 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,05 mol/l, *ρ* (SDS) = 10 g/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.5.1.5.18    Larutan guanidin hidroklorida,** *c*(CH5N3-HCl) = 5 mol/l

Autoklaf setelah preparasi (maksimum 15 menit pada suhu 121 °C).

**A.5.1.5.19    Larutan proteinase-K**, *ρ* = 20 mg/ml, larutkan dalam air steril.

Tidak boleh diautoklaf. Simpan pada suhu −20 °C tetapi hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.5.1.5.20    Larutan RNase-A,** *ρ* = 10 mg/ml.

Simpan dalam alikuot pada suhu −20 °C.

**A.5.1.5.21    Bufer TE**, *c*(Tris) = 0,01 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan HCl atau NaOH.

**A.5.1.6    Peralatan**

**A.5.1.6.1    *Centrifuge***, memiliki kemampuan memutar dengan percepatan putar hingga 8.000 × *g*. Dalam beberapa tahap diperlukan *centrifude* berpendingin.

**A.5.1.6.2    Oven atau inkubator**, sebaiknya dengan *shaker*.

**A.5.1.6.3    Mikser,** misalnya Vortex**®**1)

**A.5.1.7    Prosedur**

**A.5.1.7.1    Umum**

Setelah porsi uji matriks selesai disiapkan, terapkan protokol ekstraksi/pemurnian DNA berikut. Aturlah skala alat ukur massa dan volume bufer yang digunakan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih.

**A.5.1.7.2    Prosedur ekstraksi**

Timbang (200 – 500) mg bahan yang telah digiling atau dihaluskan ke dalam tabung mikro. Tambahkan 1,6 ml bufer ekstraksi (A.5.1.5.17) yang telah dihangatkan sebelumnya (60 °C).

Tambahkan 10 µl larutan RNase-A (A.5.1.5.20) dan 10 µl larutan α-amilase (A.5.1.5.15), dan aduk perlahan dengan membalikkan tabung secara manual. Inkubasi selama 50 menit pada suhu 60 °C dengan pengadukan ringan. Tambahkan larutan guanidin-hidroklorida (A.5.1.5.18) sebanyak 1/10 bagian volume, kemudian campur menggunakan mikser (A.5.1.6.3).

Tambahkan 20 µl larutan Proteinase-K (A.5.1.5.19), campurkan secara sempurna dengan membalikkan tabung secara manual dan inkubasi selama minimal 2 jam pada suhu 60 °C dengan agitasi ringan. Diamkan tabung selama 15 menit kemudian lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar minimum 8.000 × *g* selama 15 menit.

**A.5.1.5.17    Extraction buffer**, *c*(Tris) = 0,1 mol/l, *c*(NaCl) = 0,15 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,05 mol/l, *ρ*(SDS) = 10g/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.5.1.5.18    Guanidine hydrochloride solution**, *c*(CH5N3-HCl) = 5 mol/l.

Autoclave after preparation (maximum 15 min at 121 °C).

**A.5.1.5.19    Proteinase-K solution**, *ρ* = 20 mg/ml, dissolved in sterile water.

Do not autoclave. Store at −20 °C, but avoid repeated freezing and thawing.

**A.5.1.5.20    RNase-A solution**, *ρ* = 10 mg/ml.

Store in aliquots at −20 °C.

**A.5.1.5.21    TE buffer**, *c*(Tris) = 0,01 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH.

**A.5.1.6    Apparatus and equipment**

**A.5.1.6.1    Centrifuge**, capable of achieving an acceleration of 8 000 *g.* In some steps a refrigerated centrifuge is required.

**A.5.1.6.2    Oven or incubator**, preferably with a shaker.

**A.5.1.6.3    Mixer**, e.g. Vortex®2).

**A.5.1.7    Procedure**

**A.5.1.7.1    General**

Once the matrix test portion has been prepared, apply the following DNA extraction/purification protocol. Scale-adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

**A.5.1.7.2    Extraction procedure**

Weigh 200 mg to 500 mg of milled or crushed material into a microtube. Add 1,6 ml of prewarmed (60 °C) extraction buffer (A.5.1.5.17).

Add 10 µl of the RNase-A solution (A.5.1.5.20) and 10 µl of the *α*-amylase solution (A.5.1.5.15), and mix gently by inverting manually the tube. Incubate for 50 min at 60 °C under gentle agitation. Add 1/10 volume of guanidine-hydrochloride solution (A.5.1.5.18) solution, then mix with the mixer (A.5.1.6.3).

Add 20 µl of the Proteinase-K solution (A.5.1.5.19), mix smoothly by inverting the tube manually and incubate for at least 2 h at 60 °C under gentle agitation. Leave the tubes on the bench for 15 min then centrifuge for 15 min at a minimum acceleration of 8 000 *g*.

Pindahkan supernatan ke dalam tabung baru. Tambahkan kloroform (A.5.1.5.3) sebanyak 1 bagian volume dan campur menggunakan mikser (A.5.1.6.3). Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar minimum 8.000 × *g* selama 15 menit. Pindahkan supernatan ke dalam tabung baru. Tambahkan isopropanol (A.5.1.5.8) sebanyak 0,6 bagian volume, campurkan dengan membalikkan tabung dan letakkan tabung di atas es selama 50 menit.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar minimum 8.000 × *g* selama 20 menit. Cuci pelet dengan setidaknya 2 ml larutan etanol (A.5.1.5.16) dan lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar minimum 8.000 × *g* selama 10 menit. Tahap ini penting untuk menghilangkan garam yang dapat mengganggu analisis selanjutnya (misalnya PCR). Buang supernatan. Keringkan pelet dan larutkan kembali dalam 100 μl air steril atau bufer yang sesuai, misalnya bufer TE (A.5.1.5.21). Larutan ini merupakan stok master DNA. Jika tahap pemurnian lebih lanjut dibutuhkan, hal tersebut harus dilakukan terhadap stok master DNA.

**A.5.1.8    Daftar contoh**

Metode ini telah berhasil diterapkan untuk mengekstrak DNA[[15]](#footnote-15)) dari matriks berikut:

Kacang kedelai yang diasamkan, jagung kalengan, *cattle cakes*, cokelat batangan17), *dessert cream*17), *flakes of whole soya bean*, *maize ears*, tepung jagung, kecambah jagung17), pakan gluten jagung17), *maize grid*, pati jagung yang dimodifikasi17), protein jagung17), biji jagung, semolina jagung, pati jagung17), biji-bijian *rapeseed*, saus17), tepung kedelai, tahu kedelai, lesitin kedelai (*raw brown*17) dan *refined yellow*17)), protein kedelai, biji-bijian kedelai, sari kedelai, keripik tortilla17).

Metode ini belum berhasil diterapkan bahkan pada ukuran sampel uji sebesar 1 g dari minyak, maltodekstrin, D-glukosa, maltitol, manitol, atau xilitol.

**A.5.2    Metode guanidin kloroform: Protokol untuk lesitin kedelai**

**A.5.2.1    Tujuan, relevansi dan dasar ilmiah**

Lesitin kedelai adalah bahan yang sering digunakan dalam banyak produk pangan sebagai bahan pengemulsi. Lesitin kedelai dapat dihasilkan dengan atau tanpa menggunakan kedelai yang dimodifikasi/direkayasa secara genetik (RG). Metode yang dijelaskan di sini dapat digunakan untuk mengekstraksi DNA yang terdapat dalam sampel agar dapat dilakukan analisis PCR selanjutnya untuk mendeteksi sekuens DNA yang berasal dari kedelai RG.

Metode ini didasarkan pada Referensi [44], dan prosedur yang sangat mirip telah divalidasi dalam uji kolaboratif di Swiss. Pada penelitian tersebut, untuk tujuan interpretasi, jumlah DNA hasil ekstraksi ditentukan secara spektrometrik (Referensi [35], bagian 1.3). *The Chemical and Veterinary Institute Freiburg*, Jerman, melaksanakan uji kolaboratif tambahan dengan 12 laboratorium yang berpartisipasi di mana jumlah DNA kedelai yang dapat diekstraksi dan diamplifikasi ditentukan dengan *quantitative real-time* PCR. Untuk mengetahui hasilnya, lihat Referensi [45].

Transfer the supernatant into a new tube. Add 1 volume of chloroform (A.5.1.5.3) and mix with a mixer (A.5.1.6.3). Centrifuge for 15 min at a minimum acceleration of 8 000 *g*. Transfer the supernatant to a new tube. Add 0,6 volumes of isopropanol (A.5.1.5.8), mix inverting and put the tubes on ice for 50 min.

Centrifuge for 20 min at a minimum acceleration of 8 000 *g*. Wash the pellet with at least 2 ml of ethanol solution (A.5.1.5.16) and centrifuge for 10 min at a minimum acceleration of 8 000 *g.* This step is essential for the removal of any salts that could interfere with the subsequent analysis (e.g. PCR). Discard the supernatant. Dry the pellet and redissolve it in 100 µl of water or appropriate buffer, e.g. TE buffer (A.5.1.5.21). This is the DNA master stock. If a further purification step is required, it shall be performed on the DNA master stock.

**A.5.1.8    List of examples**

The method has been successfully applied to extract DNA[[16]](#footnote-16)) from the following matrices:

acidified soya bean, canned corn, cattle cakes, chocolate bars18), dessert cream18), flakes of whole soya bean, maize ears, maize flour, maize germs18), maize gluten feed18), maize grids, maize modified starches18), maize proteins18), maize seeds/grains, maize semolina, maize native starches18), rapeseed seeds/grains, sauces18), soya flour, soya bean tofu, soya lecithin (raw brown18) and refined yellow18)), soya protein, soya seeds/grains, soya tonyu, tortilla chips18).

The method has not yet been successfully applied even on a 1 g test sample size of oils, maltodextrine, d‑glucose, maltitol, mannitol or xylitol.

**A.5.2    Guanidine chloroform method: Protocol for soybean lecithin**

**A.5.2.1    Purpose, relevance and scientific basis**

Soybean lecithin is a frequent ingredient and is used in many food products as an emulsifier. Soybean lecithin can be either produced using genetically modified (GM) or non-modified soybeans. The method described here can be used to extract DNA present in the sample in order to perform subsequent PCR analyses for detection of genetically modified DNA sequences derived from GM soybeans.

The method is based on Reference [44], and a very similar procedure has been validated in a collaborative trial in Switzerland. In that study, for the purpose of interpretation, the quantity of extracted DNA was spectrometrically determined (Reference [35], section 1.3). The Chemical and Veterinary Institute Freiburg, Germany, conducted an additional collaborative trial with 12 participating laboratories where the amount of extractable and amplifiable soybean DNA was determined by means of quantitative real-time PCR. For the results, see Reference [45].

**A.5.2.2    Ruang lingkup**

Metode ini masing-masing menjelaskan prosedur ekstraksi DNA dari lesitin kedelai yang terdapat dalam minyak sayur mentah dan *cold-pressed*. Apabila kandungan DNA dari bahan sampel rendah, pendekatan *real-time* PCR digunakan untuk kuantifikasi jumlah DNA yang diisolasi dari porsi uji dan untuk menghitung berapa batas pendeteksian secara praktis yang dapat diperoleh dalam analisis PCR dari DNA yang diekstrak.

**A.5.2.3    Status validasi dan kriteria performa**

**A.5.2.3.1    Kriteria validasi**

Metode yang dijelaskan dalam subpasal ini telah divalidasi dalam uji kolaboratif dengan menentukan kuantitas DNA kedelai yang dapat diekstraksi dan diamplifikasi menggunakan *real-time* PCR. Studi kolaboratif dilakukan mengikuti protokol IUPAC (Referensi [46]).

**A.5.2.3.2    Ketangguhan metode**

Metode telah diterapkan secara rutin di laboratorium pengujian PRG milik pemerintah dan swasta di Jerman dan Swiss selama lebih dari 10 tahun dan tidak ada kendala yang dilaporkan. Meskipun data ketangguhan spesifik (misalnya dengan memodifikasi parameter metode) tidak tersedia, pengalaman laboratorium menunjukkan bahwa adanya variasi kecil tidak memengaruhi performa dari metode.

**A.5.2.3.3    Uji intralaboratorium**

Bahan yang digunakan dalam studi kolaboratif diuji pada laboratorium pengembangan metode terkait tingkat presisi intralaboratorium dari metode.

Untuk mengestimasi presisi, sebanyak lima kali ekstraksi DNA dari masing-masing lima lesitin kedelai disiapkan dan diukur menggunakan *real-time* PCR pada kondisi yang *repeatable* menggunakan metode spefisik untuk gen lektin kedelai sesuai dengan ISO 21570:2005,[41] C.2. Hasil uji tersebut ditunjukkan pada Tabel A.6.

**Tabel A.6 — Validasi intralaboratorium dari metode ekstraksi DNA dengan lima sampel lesitin kedelai (n = masing-masing 5 ekstraksi)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Nomor sampel lesitin** | **Rata-rata jumlah *copy* lektin** | ***Repeatability s*impangan baku,** *sr***Jumlah *copy*** | **Koefisien keragaman dari *repeatability*,** *CV, r***, %** |
| 1 | 20.464 | 5.367 | 26 |
| 2 | 3.203 | 620 | 19 |
| 3 | 2.005 | 306 | 15 |
| 4 | 6.978 | 331 | 5 |
| 5 | 14 | 8 | 61 |

**A.5.2.2    Scope**

This method describes a procedure for DNA extraction from soybean lecithins in raw and cold-pressed vegetable oils, respectively. If the DNA content of the sample material is low, the real-time PCR approach is used for quantitation of the amount of DNA isolated from a test portion and for the calculation of the practical limit of detection achievable in PCR analysis of the extracted DNA, respectively.

**A.5.2.3     Validation status and performance criteria**

**A.5.2.3.1    Validation criteria**

The method described in this subclause has been validated in a collaborative trial by determining the quantity of extractable, amplifiable soybean DNA by means of quantitative real-time PCR. The collaborative study was performed in accordance with the IUPAC protocol (Reference [46]).

**A.5.2.3.2    Robustness of the method**

The method has been routinely used in enforcement and private GMO testing laboratories in Germany and Switzerland for more than 10 years and no problems have been reported. Although specific robustness data (e.g. by modifying method parameters) are not available, the experiences of the laboratories showed that small variations in conditions does not interfere with the performance of the method.

**A.5.2.3.3    Intralaboratory trial**

The materials used in the collaborative trial study were tested in the method developers’ laboratory regarding the intralaboratory precision of the method.

For estimation of the precision, five DNA extractions from each of five soybean lecithins were prepared and measured by real-time PCR under repeatability conditions using a soybean lectin gene specific method according to ISO 21570:2005,[41] C.2. The results are given in Table A.6.

**Table A.6 — Intralaboratory validation of the DNA extraction method with five soybean lecithin samples (***n* = 5 **extractions each)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Lecithin sample No.** | **Mean lectin copy No.** | **Repeatability standard deviation**, *sr*copy No. | **Coefficient of variation of repeatability**, *CV, r*% |
| 1 | 20.464 | 5.367 | 26 |
| 2 | 3.203 | 620 | 19 |
| 3 | 2.005 | 306 | 15 |
| 4 | 6.978 | 331 | 5 |
| 5 | 14 | 8 | 61 |

Sebelum uji kolaboratif, DNA diekstraksi dari lima lesitin kedelai komersial dan diuji untuk inhibisi PCR. DNA yang disiapkan dari setiap sampel kemudian diencerkan menggunakan bufer TE (1 bagian volume DNA diencerkan dengan 4 bagian volume TE; 1 bagian volume DNA hasil pengenceran pertama diencerkan dengan 4 bagian volume TE, 1 bagian volume DNA hasil pengenceran kedua diencerkan dengan 4 bagian volume TE). Perbedaan antara nilai Ct yang dihitung (diekstrapolasi) dari sampel DNA yang tidak diencerkan dan nilai Ct terukur dari setiap pengenceran DNA dengan angka di bawah 0,1 menunjukkan bahwa preparasi DNA bebas dari inhibitor PCR.

**A.5.2.3.4    Uji kolaboratif**

Uji kolaboratif (studi validasi) dilakukan pada 12 laboratorium (Referensi [45]). Sampel yang digunakan terdiri dari lima sampel lesitin kedelai komersial. Setiap laboratorium menerima 15 sampel yang telah diberi kode dan satu DNA standar untuk kalibrasi. Sampel didistribusikan sehingga setiap peserta menerima tiga sampel identik dari masing-masing lima lesitin kedelai. Ekstraksi DNA secara tunggal dilakukan per sampel oleh setiap laboratorium. Hasil ekstraksi yang dikembalikan ditetapkan sebagai lima sampel lesitin yang berbeda dalam evaluasi uji kolaboratif.

DNA yang telah diekstraksi diuji dengan *real-time* PCR yang mengamplifikasi sekuens DNA dari gen lektin kedelai berdasarkan metode yang terdapat dalam ISO 21570:2005,[41], bagian C.2. DNA standar untuk proses kalibrasi disiapkan dari tepung kedelai [ERM BF410a[[17]](#footnote-17))] menggunakan *the Plant Mini Kit*3) (Qiagen, Hilden/Germany) dimulai dengan ekstraksi CTAB (lihat A.3). Konsentrasi DNA diestimasi secara fluorimetrik dengan metode dsDNA PicoGreen3) (Referensi [17]). DNA standar ditentukan dengan *copy number* (cp) ekuivalen genom haploid per mikroliter. Untuk penghitungan, diasumsikan bahwa massa genom haploid untuk kedelai adalah sebesar 1,13 pg. Pengenceran berseri disiapkan dengan rentang sekitar 50.000 cp/5 µl hingga 80 cp/5 µl. Tujuh laboratorium menggunakan peralatan *real-time* PCR ABI3) (ABI 7000, 7500, 7700), dan lima laboratorium menggunakan Light Cycler3) (Roche) dengan memodifikasi prosedur yang dijelaskan pada ISO 21570:2005,[41] C.2 sebagai berikut: PCR dilakukan dalam 20 µl volume akhir mengandung QuantiTect Probe PCR Master Mix3) (Qiagen), primer GM1-F dan GM1-R masing-masing dengan konsentrasi 500 nmol/l serta probe GM1 150 nmol/l. Program *real-time* PCR dilakukan dengan: tahap inisiasi selama 900 detik pada suhu 95 °C, dilanjutkan sebanyak 45 siklus pada suhu 95 °C selama 10 detik, pada suhu 60 °C selama 30 detik serta pada suhu 72 °C selama 30 detik. Akuisisi sinyal fluoresens dilakukan sepanjang tahap elongasi. Laju peningkatan suhu diatur pada 2 °C/detik.

Sebagai kriteria kesesuaian metode, limit deteksi praktis, LODprac, untuk kedelai hasil rekayasa genetik ditentukan berdasarkan ISO 24276. Nilai dihitung secara individu untuk masing-masing sampel menggunakan Rumus (A.1):

$LOD\_{prac} \%=\frac{LOD\_{abs}}{c\_{s, DNA}}×100$ (A.1)

Keterangan:

$LOD\_{abs}$ merupakan LOD dari metode *real-time* PCR *event-specific* yang digunakan untuk kuantifikasi, dalam *copy* per PCR;

**CATATAN**    Untuk perhitungan dalam Tabel A.7, diasumsikan bahwa LOD adalah 10 *copy*.

Prior to the collaborative trial, DNA was extracted from five commercial soybean lecithins and tested for PCR inhibition. The DNA prepared from each sample was further diluted using TE buffer (1 volume DNA diluted with 4 volumes of TE; 1 volume of first DNA dilution diluted with 4 volumes of TE, 1 volume of second DNA dilution diluted with 4 volumes of TE). The difference between the calculated (extrapolated) *C*t-value of the undiluted DNA sample and the measured *C*t-value of each DNA dilution was below 0,1, showing that DNA preparations were free of PCR-inhibitors.

**A.5.2.3.4 Collaborative trial**

A collaborative trial (validation study) was carried out in 12 laboratories (Reference [45]). Five commercial soybean lecithin samples were used. Each laboratory received 15 coded samples and a standard DNA for calibration. The samples were distributed in a way that each participant received three identical samples of each of the five soybean lecithins. A single DNA extraction was performed per sample by each laboratory. The returned results were assigned to the five different lecithin samples for evaluation of the collaborative trial.

The extracted DNAs were tested in a real-time PCR amplifying a DNA sequence of the soybean lectin gene according to the method in ISO 21570:2005,[41] C.2. Standard-DNA for calibration was prepared from soybean flour [ERM BF410a[[18]](#footnote-18))] by using the Plant Mini Kit3) (Qiagen, Hilden/Germany) starting with a CTAB extraction (see A.3). The concentration of DNA was estimated fluorimetrically with the PicoGreen3) dsDNA method (Reference [17]). DNA-standards were defined by the copy number (cp) of haploid genome equivalents per microlitre. For the calculation, a haploid genome mass for soybean of 1,13 pg was assumed. A dilution series was prepared ranging from about 50 000 cp/5 µl to 80 cp/5 µl. Seven laboratories used ABI3) real-time PCR equipment (ABI 7000, 7500, 7700), and five laboratories used the Light Cycler3) (Roche) with the following modifications to the protocol described in ISO 21570:2005,[41] C.2: PCR was performed in a 20 µl final volume containing QuantiTect Probe PCR Master Mix3) (Qiagen), primers GM1-F and GM1-R at 500 nmol/l each and 150 nmol/l of probe GM1. Real-time PCR program was: initial step with 900 s at 95 °C, then 45 cycles with 10 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C. Fluorescence signal acquisition was done within the elongation step. The temperature ramping rate was set to 2 °C/s.

As a criterion for the suitability of the method, the practical limit of detection, LODprac, for genetically modified soya was determined in accordance with ISO 24276. The value was calculated individually for each sample using Formula (A.1):

$LOD\_{prac} \%=\frac{LOD\_{abs}}{c\_{s, DNA}}×100$ (A.1)

where

$LOD\_{abs}$ is the LOD of the event-specific real-time PCR method used for quantitation, in copies per PCR;

**NOTE**    For the calculations in Table A.7, an LOD of 10 copies is assumed.

$c\_{s, DNA}$ merupakan jumlah DNA kedelai yang dapat diamplifikasi dalam sampel, dalam *copy* per PCR, ditentukan menggunakan metode *real-time* PCR spesifik untuk gen acuan kedelai.

Tabel A.7 merangkum hasil uji kolaboratif. Pada empat dari lima sampel lesitin yang diuji, diperoleh nilai rata-rata LODprac di bawah 0,9% (contoh untuk ambang batas yang ditetapkan pada peraturan yang berlaku). Untuk sampel lesitin 2, LODprac dengan nilai rata-rata di atas 0,9% hanya diperoleh pada satu laboratorium, sedangkan untuk sampel lesitin 3 diperoleh pada dua laboratorium. Untuk sampel lesitin 5, semua laboratorium mampu mengamplifikasi kurang dari 80 *copy* gen lektin, sehingga LODprac sebesar atau kurang dari 0,9% tidak tercapai. Selain itu, dilakukan penghitungan terhadap koefisien keragaman dari *reproducibility* untuk jumlah *copy* lektin yang dilaporkan untuk kelima sampel lesitin. Secara total, data *real-time* PCR yang berasal dari 36 ekstraksi per sampel lesitin digunakan untuk evaluasi. Tidak terdapat *outliers* yang dihilangkan dalam perhitungan koefisien keragaman dari *reproducibility*, *CV, R*. Data presisi untuk sampel 5 tidak dapat ditampilkan karena rendahnya jumlah *copy* lektin di bawah LOQ dari metode. Perlu dicatat bahwa data presisi mencerminkan koefisien keragaman *reproducibility* dari jumlah *copy* yang diekstraksi dari sampel lesitin pada kondisi *reproducibility* dalam uji kolaboratif.

**Tabel A.7 — Rangkuman data validasi**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| No. sampel lesitin | Rata-rata jumlah *copy* lektin | Koefisien keragaman dari *reproducibility*, *CV, R*% | Rata-rata batas deteksi praktis, LODprac% | Jumlah laboratorium dengan nilai LODprac < 0,9% |
| 1 | 17.044 | 67 | 0,06 | 12/12 |
| 2 | 3.630 | 63 | 0,28 | 11/12 |
| 3 | 2.318 | 57 | 0,43 | 10/12 |
| 4 | 8.325 | 52 | 0,12 | 12/12 |
| 5 | < 80 | tidak ditentukan | > 10 | 0/12 |

**A.5.2.4    Prinsip dan ringkasan**

Bahan sampel yang kental dihomogenkan setelah dipanaskan dan diekstraksi dengan heksana setelah penambahan bufer guanidin tiosianat. Intervensi komponen pengganggu dipisahkan dengan cara mengekstraksi komponen tersebut menggunakan kloroform, dan RNA yang terdapat di dalam larutan dihancurkan menggunakan RNase A. DNA diendapkan dengan isopropanol yang mengandung glikogen, kemudian dicuci menggunakan etanol dan dilarutkan dalam air. Untuk pemurnian DNA, selanjutnya dilakukan tahap filtrasi gel (menggunakan *cross-linked dextran gel for size exclusion chromatography*).

**A.5.2.5    Istilah dan definisi**

Untuk tujuan subpasal ini, istilah dan definisi yang terdapat pada ISO 5725-1[43] dan ISO 24276 berlaku.

**A.5.2.6    Jenis dan jumlah sampel**

Pastikan bahwa sampel uji mewakili sampel laboratorium. Langkah operasional yang perlu dipertimbangkan dijelaskan pada 5.1. Bahan sampel harus sehomogen mungkin.

$c\_{s, DNA}$ is the amount of amplifiable soybean DNA in the sample, in copies per PCR, determined by means of real-time PCR method specific for a soybean reference gene.

Table A.7 summarizes the results of the collaborative trial. In four out of five lecithin samples, mean values of LODprac below 0,9% (example for an existing legislative threshold) were obtained. For lecithin sample 2, the LODprac was above 0,9% in only one laboratory, for lecithin sample 3 in two laboratories. For the lecithin sample 5, all laboratories amplified fewer than 80 copies of the lectin gene, and thus an LODprac of 0,9% or less could not be achieved. In addition, the coefficient of variation of reproducibility for the lectin copy numbers reported for the five lecithin samples were calculated. In total, real-time PCR data of 36 extractions per lecithin sample were used for the evaluation. No outliers were eliminated for the calculations of the coefficient of variation of reproducibility, *CV, R*. Precision data for sample 5 cannot be given because of the low amount of lectin copies below the LOQ of the method. It is noted, that the precision data reflect the coefficient of variation of reproducibility of the copy numbers extracted from the lecithin samples under reproducibility conditions in the collaborative trial.

**Table A.7 — Summary of the validation data**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Lecithin sample No.** | **Mean lectin copy No.** | **Coefficient of variation of reproducibility**, *CV, R*% | **Mean practical limit of detection**, LODprac% | **No. laboratories with**LODprac < 0,9% |
| 1 | 17 044 | 67 | 0,06 | 12/12 |
| 2 | 3 630 | 63 | 0,28 | 11/12 |
| 3 | 2 318 | 57 | 0,43 | 10/12 |
| 4 | 8 325 | 52 | 0,12 | 12/12 |
| 5 | <80 | not determined | >10 | 0/12 |

**A.5.2.4    Principle and summary**

Viscous sample material is homogenized after heating and extracted with hexane after addition of a guanidine thiocyanate buffer. Interfering accompanying substances are separated by extraction with chloroform, and the RNA present in the solution is digested with RNase A. The DNA is precipitated with isopropanol in the presence of glycogen, then washed with ethanol and dissolved in water. For purification of the DNA, a subsequent gel filtration step (using a cross-linked dextran gel for size exclusion chromatography) is carried out.

**A.5.2.5    Terms and definitions**

For the purposes of this subclause, the terms and definitions given in ISO 5725-1[43] and ISO 24276 apply.

**A.5.2.6    Sample type and amounts**

Ensure that the test sample is representative of the laboratory sample. Measures and operational steps to be taken into consideration are described in 5.1. Sample material should be as homogeneous as possible.

**A.5.2.7    Estimasi ketidakpastian pengukuran**

Ketidakpastian pengukuran data *real-time* PCR lektin yang dinilai dalam uji kolaboratif disebut sebagai koefisien keragaman *reproducibility*. Hasil pengukuran tersebut disajikan pada Tabel A.7.

**A.5.2.8    Interferensi**

Tingkat kemurnian lesitin dapat mengganggu kemampuan untuk mengekstraksi DNA yang berasal dari sampel lesitin akibat adanya degradasi DNA yang menyertai proses ini.

**A.5.2.9    Kondisi fisik atau lingkungan**

Tidak ada kondisi spesifik yang disyaratkan. Lihat ISO 24276 untuk rincian lebih lanjut.

**A.5.2.10    Peralatan**

Peralatan laboratorium biasa dan khususnya peralatan berikut.

**A.5.2.10.1**    ***Table-top centrifuge*** memiliki kemampuan menampung tabung mikro *centrifuge* berukuran 1,5 ml atau 2 ml, dengan percepatan putar setidaknya 12.000 × *g*.

**A.5.2.10.2**    ***Centrifuge*** memiliki kemampuan menampung tabung sentrifugasi berukuran 50 ml, dengan percepatan putar setidaknya 4.000 × *g*.

**A.5.2.10.3**    **Tabung *centrifuge* polipropilena** dengan kapasitas 1,5 ml, 2,0 ml, dan 50 ml, untuk digunakan pada sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* dan 4.000 × *g*.

**A.5.2.10.4**    ***Heating block with shaking device***.[[19]](#footnote-19))

**A.5.2.10.5    Pengering vakum,** opsional.

**A.5.2.10.6**    **Multi mikser**, misalnya Vortex.

**A.5.2.10.7**    ***Real-time PCR thermal cycler*** yang dilengkapi dengan perangkat sumber energi yang sesuai untuk eksitasi molekul fluoresens serta sistem deteksi optik yang sesuai untuk mendeteksi sinyal fluoresens yang dihasilkan selama PCR.

**A.5.2.10.8**    **Tabung mikro *centrifuge***dan **penutup** yang dapat dipanaskan hingga 100 °C dan didinginkan hingga 4 °C secara berulang tanpa mengalami kerusakan dan tidak berpengaruh terhadap sinyal fluoresens yang dihasilkan selama amplifikasi.

**A.5.2.10.9**    **Spektrofotometer-UV**atau**fluorometer** untuk menentukan konsentrasi DNA.

**A.5.2.11    Reagen and bahan**

Untuk kualitas reagen yang digunakan, lihat ISO 24276.

**A.5.2.11.1    Guanidin tiosianat.**

**A.5.2.7    Estimation of measurement uncertainty**

The measurement uncertainty of the lectin real-time PCR data assessed in the collaborative trial is given as coefficent of variation of reproducibility. The results are given in Table A.7.

**A.5.2.8    Interferences**

The degree of refinement of the lecithin can interfere with the ability to extract DNA from lecithin samples due to the DNA degradation accompanied by this processing.

**A.5.2.9    Physical or environmental conditions**

No specific conditions required. See ISO 24276 for details.

**A.5.2.10    Apparatus**

Usual laboratory equipment and in particular the following.

**A.5.2.10.1    Table-top centrifuge** for 1,5 ml or 2 ml centrifugation vessels, at least 12 000 *g*.

**A.5.2.10.2    Centrifuge** for 50 ml centrifuge tube, at least 4 000 × *g*.

**A.5.2.10.3    Polypropylene centrifugation vessels** of capacities 1,5 ml, 2,0 ml, and 50 ml, for use in centrifuges at 12 000 *g* and 4 000 *g*.

**A.5.2.10.4    Heating block with shaking device**.[[20]](#footnote-20))

**A.5.2.10.5    Vacuum drier**, optional.

**A.5.2.10.6    Multi mixer**, e.g. Vortex.

**A.5.2.10.7    Real-time PCR thermal cycler** equipped with an energy source suitable for the excitation of fluorescent molecules and an optical detection system suitable for the detection of the fluorescence signals generated during PCR.

**A.5.2.10.8    Reaction vessels** and **caps** or **closures** which can be repeatedly heated to 100 °C and cooled to 4 °C without damage and which do not influence the fluorescence signal generated during the amplification.

**A.5.2.10.9    UV-spectrophotometer** or **fluorometer** to determine the concentration of DNA.

**A.5.2.11    Reagents and materials**

For the quality of the reagents used, see ISO 24276.

**A.5.2.11.1    Guanidine thiocyanate**.

**A.5.2.11.2    Tris(hidroksimetil)aminometana** (tris) atau **tris(hidroksimetil)aminometana-hidroklorida** (tris·HCl).

**A.5.2.11.3    Garam dinatrium asam etilendiaminatetraasetat** (Na2EDTA).

**A.5.2.11.4    *Pancreatic RNase A***.

**A.5.2.11.5    Glikogen**.

**A.5.2.11.6    Polietilenglikol tert-oktilfenil eter** [4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenilpolietilenglikol] [Triton X 1003)].

**A.5.2.11.7    n-Heksana**.

**A.5.2.11.8    Kloroform**.

**A.5.2.11.9    Natrium klorida**.

**A.5.2.11.10    Natrium hidroksida**.

**A.5.2.11.11    Asam klorida**, c(HCl) = 0,1 mol/l.

**A.5.2.11.12    Larutan natrium hidroksida**, c(NaOH) = 0,1 mol/l. Timbang 10 g of natrium hidroksida ke dalam labu ukur 250 ml, dan isi labu ukur dengan air hingga tanda tera.

**A.5.2.11.13    Isopropanol** (2-propanol).

**A.5.2.11.14    Etanol,** *φ*(C2H5OH) = 70% fraksi volume. Campurkan 70 ml etanol dengan 30 ml air.

**A.5.2.11.15    Bufer Tris HCl**, pH = 6,4, c(tris·HCl) = 0,1mol/l. Larutkan 1,57 g Tris·HCl dalam air dengan volume sekitar 70 ml, sesuaikan pH menjadi 6,4 menggunakan asam klorida, pindahkan ke labu ukur berukuran 100 ml, dan tambahkan air hingga tanda tera.

**A.5.2.11.16    Tris·HCl + bufer NaCl**, pH 7,5, c(tris·HCl) = 10 mmol/l, c(NaCl) = 15 mmol/l. Larutkan 0,166 g tris·HCl dan 88 mg natrium klorida dalam air dengan volume sekitar 70 ml, sesuaikan pH menjadi 7,5 menggunakan asam klorida, pindahkan ke dalam labu ukur 100 ml, dan tambahkan air hingga tanda tera.

**A.5.2.11.17    Larutan EDTA**, pH 8,0, c = 0,5mol/l. Larutkan 18,6 g garam dinatrium EDTA dalam air dengan volume sekitar 70 ml, sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan pelet natrium hidroksida pertama dan selanjutnya larutan natrium hidroksida, pindahkan ke dalam labu ukur 100 ml, dan tambahkan air hingga tanda tera.

**A.5.2.11.18    Larutan buffer TE**, c(tris) = 0,010 mol/l and c(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

**A.5.2.11.19**    **Bufer guanidine tiosianat**, c(tris·HCl) ≈ 4,6 mol/l, c(Na2EDTA·2H2O) ≈ 0,02 mol/l, *ρ*[Triton X 1003)] ≈ 11,8 g/l. Campurkan 2,6 g Triton X 1003) (A.5.2.11.6) dan 120 g guanidin tiosianat (A.5.2.11.1) dan larutkan dalam 100 ml bufer tris·HCl (A.5.2.11.15), 8,8 ml larutan EDTA (A.5.2.11.17) dan 13,2 ml air. Volume akhir bufer adalah sekitar 220 ml dengan ~pH 7,2. Larutan tersebut dapat disimpan paling lama 12 bulan pada suhu ruang.

**A.5.2.11.20    Larutan RNAse A**, *ρ*(RNase A) ≈ 10 mg/ml, sesuai dengan instruksi pemanufaktur atau Referensi [3], B.17.

**A.5.2.11.2    *Tris*(hydroxymethyl)aminomethane** (tris) or ***tris*(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride** (tris·HCl).

**A.5.2.11.3    Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt** (Na2EDTA).

**A.5.2.11.4    Pancreatic RNase A**.

**A.5.2.11.5    Glycogen**.

**A.5.2.11.6    Polyethyleneglycol tert-octylphenyl ether** [4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenylpolyethyl-eneglycol] [Triton X 1003)].

**A.5.2.11.7    *n*-Hexane**.

**A.5.2.11.8    Chloroform**.

**A.5.2.11.9    Sodium chloride**.

**A.5.2.11.10    Sodium hydroxide**.

**A.5.2.11.11    Hydrochloric acid**, *c*(HCl) = 0,1 mol/l.

**A.5.2.11.12    Sodium hydroxide solution**, *c*(NaOH) = 0,1 mol/l. Weigh 10 g of sodium hydroxide into a 250 ml volumetric flask, and fill the flask with water to the calibration mark.

**A.5.2.11.13    Isopropanol** (2-propanol).

**A.5.2.11.14    Ethanol**, *φ*(C2H5OH) = 70% volume fraction. Mix 70 ml of ethanol with 30 ml of water.

**A.5.2.11.15    Tris**·**HCl buffer**, pH = 6,4, *c*(tris·HCl) = 0,1 mol/l. Dissolve 1,57 g of tris·HCl in approximately 70 ml of water, adjust to pH 6,4 using hydrochloric acid, transfer to a 100 ml volumetric flask, and make up to volume with water.

**A.5.2.11.16    Tris**·**HCl + NaCl buffer**, pH 7,5, *c*(tris·HCl) = 10 mmol/l, *c*(NaCl) = 15 mmol/l. Dissolve 0,166 g of tris·HCl and 88 mg of sodium chloride in approximately 70 ml of water, adjust to pH 7,5 using hydrochloric acid, transfer to a 100 ml volumetric flask, and make up to volume with water.

**A.5.2.11.17    EDTA solution**, pH 8,0, *c* = 0,5 mol/l. Dissolve 18,6 g of EDTA disodium salt in approximately 70 ml of water, adjust to pH 8,0 using first sodium hydroxide pellets and then sodium hydroxide solution, transfer to a 100 ml volumetric flask, and make up to volume with water.

**A.5.2.11.18    TE buffer solution**, *c*(tris) = 0,010 mol/l and *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

**A.5.2.11.19    Guanidine thiocyanate buffer**, *c*(tris·HCl) ≈ 4,6 mol/l,*c*(Na2EDTA·2H2O) ≈ 0,02 mol/l, *ρ*[Triton X 1003)] ≈ 11,8 g/l. Mix 2,6 g of Triton X 1003) (A.5.2.11.6) and 120 g of guanidine thiocyanate (A.5.2.11.1) and dissolve in 100 ml of tris·HCl buffer (A.5.2.11.15), 8,8 ml of EDTA solution (A.5.2.11.17) and 13,2 ml of water. The buffer has a final volume of approximately 220 ml at ~pH 7,2. The solution can be kept for at least 12 months at room temperature.

**A.5.2.11.20    RNase A solution**, *ρ*(RNase A) ≈ 10 mg/ml, in accordance with the manufacturer's instructions or Reference [3], B.17.

Larutkan 10 mg RNase A (A.5.2.11.4) dalam 1,0 ml tris·HCl + bufer NaCl (A.5.2.11.16). Panaskan larutan selama (15 – 20) menit pada suhu 95 °C, biarkan dingin secara perlahan hingga suhu ruang, lalu bagi menjadi alikuot 50 µl. Simpan larutan dalam kondisi beku, hindari tindakan pembekuan dan pencairan secara berulang.

**A.5.2.11.21    Larutan glikogen**, *ρ*(glikogen) ≈ 20 mg/ml. Timbang 200 mg glikogen dalam tabung *centrifuge* berukuran 15 ml dan larutkan dalam 10 ml air bebas ion. Larutan yang sudah dialikuot dapat disimpan selama 24 bulan pada suhu 5 °C.

**A.5.2.11.22    Bufer elusi**, (0,2× TE), c(tris·HCl) = 2 mmol/l, c(EDTA) = 0,2 mmol/l, pH 8,0. Larutkan 158 mg tris·HCl dan 37 mg garam dinatrium EDTA dalam air dengan volume sekitar 400 ml; sesuaikan pH menjadi 8,0. Pindahkan larutan ke dalam labu ukur berukuran 500 ml dan tambahkan air hingga tanda tera. Autoklaf larutan tersebut. Larutan yang sudah dialikuot dapat disimpan setidaknya selama 12 bulan pada suhu ruang.

**A.5.2.11.23    Kolom MicroSpin S-300 HR** untuk pemurnian DNA lebih lanjut (Amersham Pharmacia Biotech)[[21]](#footnote-21))

**A.5.2.11.24    Quant-iT PicoGreen dsDNA Quantitation Kit** untuk kuantifikasi DNA secara fluorometri (Invitrogen), opsional.5)

**A.5.2.12    Koleksi, transportasi, pengawetan dan penyimpanan sampel**

Tidak terdapat persyaratan khusus.

**A.5.2.13    Preparasi sampel uji**

Terapkan protokol ekstraksi dan pemurnian DNA berikut. Aturlah skala alat ukur massa dan volume bufer yang digunakan sesuai dengan ukuran porsi uji yang dipilih..

Biasanya, lesitin atau minyak tanaman yang belum dimurnikan dapat ditimbang secara langsung. Sampel lesitin yang kental dipanaskan terlebih dahulu hingga suhu 60 °C dan diaduk sempurna sebelum ditimbang.

**A.5.2.14    Kalibrasi instrumen**

Instrumen harus dikalibrasi sebagaimana dijelaskan pada ISO/IEC 17025.[39]

**A.5.2.15    Langkah-langkah metode**

**A.5.2.15.1    Umum**

Untuk ekstraksi pelarut, bahan sampel yang kental diperlakukan dengan heksana danbufer guanidin tiosianat. Komponen pengganggu dihilangkan dengan ekstraksi kloroform dan RNA yang tersisa diurai menggunakan RNase A. DNA diendapkan dengan isopropanol yang mengandung glikogen, kemudian dicuci menggunakan etanol dan dilarutkan dalam larutan cair. Untuk menghilangkan inhibitor PCR, DNA dimurnikan melalui filtrasi gel.

Dissolve 10 mg of RNase A (A.5.2.11.4) in 1,0 ml of tris·HCl + NaCl buffer (A.5.2.11.16). Temper the solution for 15 min to 20 min at 95 °C, allow to cool slowly to room temperature, and then divide into 50 µl aliquots. Store the solution frozen, avoiding repeated freezing and thawing.

**A.5.2.11.21    Glycogen solution**, *ρ*(glycogen) ≈ 20 mg/ml. Weigh 200 mg of glycogen into a 15 ml plastics centrifuge tube and dissolve in 10 ml of deionized water. The aliquoted solution can be kept for 24 months at 5 °C.

**A.5.2.11.22    Elution buffer**, (0,2× TE), *c*(tris·HCl) = 2 mmol/l, *c*(EDTA) = 0,2 mmol/l, pH 8,0. Dissolve 158 mg of tris·HCl and 37 mg of EDTA disodium salt in approximately 400 ml of water; adjust to pH 8,0. Transfer the solution to a 500 ml volumetric flask and make up to volume with water. Autoclave the solution. The aliquoted solution can be kept for at least 12 months at room temperature.

**A.5.2.11.23    MicroSpin S-300 HR column** for additional DNA purification (Amersham Pharmacia Biotech)[[22]](#footnote-22))

**A.5.2.11.24    Quant-iT PicoGreen dsDNA Quantitation Kit** for fluorometric quantitation of DNA (Invitrogen), optional.5)

**A.5.2.12    Sample collection, transport, preservation and storage**

No specific requirements.

**A.5.2.13****Test sample preparation**

Apply the following DNA extraction and purification protocol. Scale adaptation of masses and buffer volumes is required as a function of the selected size of the test portion.

Usually, lecithin or plant oils which have not been refined can be weighed in directly. Viscous lecithin samples are heated to 60 °C first and shaken up well prior to being weighed in.

**A.5.2.14    Instrument calibration**

Instruments should be calibrated as per ISO/IEC 17025.[39]

**A.5.2.15    Method steps**

**A.5.2.15.1    General**

For solvent extraction, the viscous sample material is treated with hexane and guanidine thiocyanate buffer. Interfering material is removed by extraction with chloroform and the remaining RNA is digested with RNase A. The DNA is precipitated in the presence of glycogen with isopropanol, washed with ethanol, and dissolved in an aqueous solution. For removal of PCR-inhibitors, the DNA is purified by means of gel filtration.

**A.5.2.15.2    Prosedur ekstraksi DNA**

Pastikan bahwa bahan sampel sehomogen mungkin dan pindahkan sebanyak 2,5 g ke dalam tabung *centrifuge* polipropilena berukuran 50 ml.

Kontrol blanko ekstraksi harus diproses secara paralel.

Tambahkan 15 ml n-heksana dan larutkan lesitin.

Tambahkan 2 ml bufer guanidin tiosianat dan aduk secara merata (misalnya selama (10 – 20) detik menggunakan mikser).

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar sekitar 4.000 × *g* selama 10 menit.

Tuang sebagian besar fase heksana bagian atas.

Pindahkan fase cair bagian bawah (tanpa sedimen) ke dalam tabung mikro *centrifuge* polipropilena steril berukuran 2 ml.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 10.000 × *g* selama 10 menit.

Pindahkan 1 ml fase cair bagian bawah ke dalam tabung mikro *centrifuge* polipropilena berukuran 2 ml.

Tambahkan 0,5 ml kloroform dan aduk secara merata selama kurang lebih 2 menit.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 10.000 × *g* selama 10 menit.

Pindahkan (500 - 750) µl supernatan cair ke dalam tabung mikro *centrifuge* polipropilena baru berukuran 1,5 ml dan tambahkan 5 µl larutan RNAse A. (Penguraian molekul dengan RNAse A dilakukan pada uji kolaboratif dan dapat diabaikan, dalam hal ini jika dapat diterapkan, lanjutkan tahap langsung ke penambahan glikogen.)

Inkubasi campuran selama 10 menit pada suhu ruang untuk menghidrolisis setiap ko-isolasi RNA.

Tambahkan 4 µl larutan glikogen dan isopropanol sebanyak 0,8 bagian volume (relatif terhadap volume supernatan yang digunakan), campurkan secara perlahan, dan inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 12.000 × *g* selama 10 menit.

Buang supernatan; cuci endapan DNA dengan 500 µl etanol.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar tidak kurang dari 12.000 × *g* selama 5 menit.

Buang supernatan secara hati-hati, keringkan endapan DNA pada suhu ruang atau menggunakan vakum.

Larutkan endapan DNA dengan 50 µl bufer elusi (misalnya di lemari es semalaman; panaskan sebentar apabila tidak larut secara sempurna).

**A.5.2.15.2    DNA extraction procedure**

Ensure that the sample material is as homogeneous as possible and transfer 2,5 g to a 50 ml polypropylene centrifugation vessel.

An extraction blank control shall be processed in parallel.

Add 15 ml of *n*-hexane and dissolve lecithin.

Add 2 ml of the guanidine thiocyanate buffer and mix thoroughly (e.g. for 10 s to 20 s using a mixer).

Centrifuge for 10 min at approximately 4 000 × *g*.

Decant the major part of the upper hexane phase.

Transfer the lower, aqueous phase (without sediment) to a sterile 2 ml polypropylene reaction vessel.

Centrifuge for 10 min at 10 000 × *g*.

Transfer 1 ml of the lower, aqueous phase to a sterile 2 ml polypropylene reaction vessel.

Add 0,5 ml of chloroform and mix thoroughly for approximately 2 min.

Centrifuge for 10 min at 10 000 × *g*.

Transfer 500 µl to 750 µl of the aqueous supernatant to a new 1,5 ml polypropylene reaction vessel and add 5 µl of RNase A solution. (The RNase A digestion was performed in a collaborative trial and may be omitted, if applicable, in which case, proceed directly to the addition of glycogen.)

Incubate the mixture for 10 min at room temperature in order to hydrolyse any co-isolated RNA.

Add 4 µl of glycogen solution and 0,8 volumes of isopropanol (relative to the supernatant volume used), mix gently, and incubate for 30 min at room temperature.

Centrifuge for 10 min at no less than 12 000 × *g*.

Discard the supernatant; wash the DNA precipitate with 500 µl of ethanol.

Centrifuge for 5 min at no less than 12 000 × *g*.

Carefully draw off the supernatant, dry the DNA precipitate at room temperature or under vacuum.

Dissolve the DNA precipitate in 50 µl of elution buffer (e.g. in the refrigerator over night; heat slightly if not fully dissolved).

**A.5.2.15.3    Pemurnian DNA menggunakan filtrasi gel**

Kolom filtrasi gel yang siap pakai digunakan untuk pemurnian DNA lebih lanjut. Kolom atau prinsip pemurnian lainnya dapat digunakan apabila sesuai dengan tujuan ini dan memberikan hasil yang setara.

Lakukan resuspensi resin dalam kolom Microspin S300 HR3) dengan mengocok secara intensif.

Buka sedikit tutup sekrup dengan cara memutar seperempat putaran dan lepaskan penutup kolom bagian bawah.

Tempatkan kolom Microspin S300 HR3) ke dalam tabung mikro *centrifuge* polipropilena berukuran 3 ml.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 770 × *g* selama 1 menit.

Tempatkan kolom Microspin S300 HR3) ke dalam tabung mikro *centrifuge* polipropilena baru berukuran 1,5 ml; lepaskan tutup sekrup.

Masukkan larutan DNA secara perlahan (50 µl) ke dalam kolom.

Lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar 770 × *g* selama 2 menit.

DNA terdapat dalam eluat. Larutan DNA harus disimpan dalam lemari pendingin. Penyimpanan pada suhu 4 °C cukup untuk menyimpan larutan DNA selama (1 – 2) minggu, sedangkan untuk penyimpanan lebih lama, diperlukan suhu penyimpanan −20 °C.

**A.5.2.15.4    Kuantifikasi DNA**

Apabila jumlah DNA yang diisolasi dari sampel mencukupi, kuantifikasi DNA dapat dilakukan secara spektrometrik menggunakan spektrometer-UV seperti yang dijelaskan pada B.1. Sebagai alternatif, konsentrasi DNA dapat diestimasi secara fluorimetrik dengan metode dsDNA PicoGreen3) (Referensi [17]) menggunakan *reagent kit system* (A.5.2.11.24) atau produk yang setara.

Dikarenakan lesitin seringkali memiliki kandungan DNA yang rendah, maka kuantifikasi terhadap DNA kedelai yang dapat diamplifikasi lebih disukai menggunakan *real-time* PCR (lihat B.3). Metode kuantifikasi gen lektin kedelai terdapat dalam ISO 21570:2005,[41] C.2.

**A.5.2.15.5    Evaluasi integritas DNA**

Integritas DNA yang diperoleh dari ekstraksi tidak dievaluasi lebih lanjut, karena kriteria kualitas untuk DNA hasil ekstraksi adalah kemampuan teramplifikasinya dalam analisis PCR lanjutan menggunakan metode spesifik kedelai dimana sekuens DNA target adalah ≤100 bp.

**A.5.2.15.6    Preparasi standar**

DNA standar untuk kalibrasi disiapkan dari tepung kedelai [ERM BF410a3)] menggunakan protokol CTAB. Konsentrasi DNA diestimasi secara fluometrik menggunakan metode dsDNA PicoGreen3) (Referensi [17]).

**A.5.2.15.3    DNA purification by means of gel filtration**

A ready-to-use gel filtration column is used for additional DNA purification. Other columns or purification principles can be used if they are suitable for this purpose and perform equivalently.

Resuspend the resin in a Microspin S300 HR3) column by intensive vortexing.

Open the screw cap slightly by twisting by a quarter-turn and break off the lower column closure.

Place the Microspin S300 HR3) column into a 3 ml polypropylene reaction vessel.

Centrifuge at 770 × *g* for 1 min.

Place the Microspin S300 HR3) column into a new 1,5 ml polypropylene reaction vessel; remove the screw cap.

Slowly load the DNA solution (50 µl) on to the column.

Centrifuge at 770 × *g* for 2 min.

The DNA is present in the eluate. DNA solutions should be kept refrigerated. If stored for 1–2 weeks, storage at 4 °C is sufficient; for longer storage periods, a storage temperature of −20 °C is required.

**A.5.2.15.4    DNA quantitation**

If the amount of DNA isolated from the sample is sufficient, DNA quantitation can be done spectrometrically using a UV-spectrometer as described in B.1. Alternatively, the concentration of DNA can be estimated fluorimetrically by the PicoGreen3) dsDNA method (Reference [17]) using a reagent kit system (A.5.2.11.24) or an equivalent product.

Since lecithin often has a low DNA content, the quantitation of the amplifiable soybean DNA is preferably done using real-time PCR (see B.3). A method for quantitation of the soybean lectin gene is indicated in ISO 21570:2005,[41] C.2.

**A.5.2.15.5    DNA integrity evaluation**

The integrity of DNA obtained from the extractions is not evaluated further, since the quality criteria for the extracted DNA is its amplifiability in subsequent PCR analyses using soybean specific methods where the target DNA sequences are ≤100 bp.

**A.5.2.15.6    Preparation of standards**

Standard-DNA for calibration is prepared from soybean flour [ERM BF410a3)] using a CTAB protocol. The concentration of DNA is estimated fluorimetrically with the PicoGreen3) dsDNA method (Reference [17]).

**A.5.2.15.7    Kriteria penerimaan atau penolakan**

Jumlah DNA spesies yang dapat diamplifikasi dalam sampel (*copy* per PCR), yang ditentukan menggunakan *real-time* PCR, harus cukup untuk memperoleh LOD praktis sebesar 0,9% atau lebih kecil untuk DNA spesifik PRG.

**A.5.2.15.8    Identifikasi**

Hasil metode ekstraksi DNA dapat diverifikasi melalui metode gen acuan spesifik kedelai sebagaimana terdapat dalam ISO 21570:2005,[41], C.2. Metode spesifik kedelai lainnya dapat digunakan, apabila metode tersebut menunjukkan performa yang setara atau lebih baik.

**A.5.2.16    Identifikasi sampel**

Semua sampel harus diidentifikasi dengan jelas.

**A.5.2.17    Penghitungan**

Untuk penghitungan LOD praktis, lihat A.5.2.3.4.

**A.5.2.18    Penyimpanan rekaman**

Penyimpanan rekaman harus sesuai dengan ISO/IEC 17025.[39]

**A.5.2.19    Pelaporan**

Pelaporan harus dilakukan sebagaimana ditetapkan dalam ISO 24276 dan standar lain yang berlaku (ISO/IEC 17025[39]).

**A.5.2.20    Tindakan keamanan**

Sebuah lemari asam diperlukan ketika menangani bahan kimia organik. Jika menggunakan sarung tangan, pastikan sarung tangan tersebut bebas tepung. Kontaminasi silang dapat dicegah dengan penggunaan *aerosol-protected pipette tips*.

**A.5.2.21    Pencegahan polusi dan pembuangan limbah**

Tidak ada persyaratan khusus. Mengacu pada ISO 24276.

**A.5.2.15.7    Accept or reject criteria**

The amount of amplifiable species DNA in the sample (copies per PCR), determined by means of real-time PCR, shall be sufficient to achieve a practical LOD of 0,9% or less for a GMO-specific DNA.

**A.5.2.15.8    Identification**

The result of the DNA extraction method can be verified via soybean-specific reference gene methods as indicated in ISO 21570:2005,[41], C.2. Other soybean-specific methods can be used, if they show equivalent or better performance.

**A.5.2.16    Sample identification**

All samples shall be identified unambiguously.

**A.5.2.17    Calculations**

For calculation of the practical LOD, see A.5.2.3.4.

**A.5.2.18    Record keeping**

Record keeping shall conform to ISO/IEC 17025.[39]

**A.5.2.19    Reporting**

Reporting should be carried out as specified in ISO 24276 and other applicable standards (ISO/IEC 17025[39]).

**A.5.2.20    Safety measures**

A hood is required when handling organic chemicals. If gloves are used, ensure that they are powder free. Cross-contamination can be prevented by using aerosol-protected pipette tips.

**A.5.2.21    Pollution prevention and waste disposal**

No specific requirements. Refer to ISO 24276.

# Lampiran B

(informatif)

**Metode kuantifikasi DNA hasil ekstraksi**

**B.1    Metode dasar spektrometri ultraviolet**

**B.1.1    Umum**

Lampiran ini menjelaskan metode rutin untuk menentukan konsentrasi DNA dalam larutan.

**B.1.2    Status validasi**

Metode ini telah di-*ring-tested* secara luas dan hasilnya telah dipublikasi[35]. Sebagai contoh, metode ini berhasil diterapkan dalam sebuah studi interlaboratorium mengenai deteksi PRG yang diselenggarakan oleh *the Federal Office of Public Health,* Bern dan *the Cantonal Laboratories of Basel dan Zurich*, Swiss.

**B.1.3    Prinsip**

Asam nukleat dalam larutan menyerap sinar ultraviolet (UV) dalam rentang (210 - 300) nm dengan penyerapan maksimum pada 260 nm. Karena DNA, RNA, dan nukleotida memiliki penyerapan maksimum pada 260 nm, kontaminasi RNA dan nukleotida pada larutan DNA tidak dapat ditentukan dengan spektrometri UV. Oleh sebab itu, RNA harus dihilangkan secara enzimatik selama ekstraksi DNA sebelum kuantifikasi DNA. Selain itu, oligonukleotida dan nukleotida yang berasal dari hidrolisis RNA harus dihilangkan (misalnya dengan perlakuan silika, seperti yang dijelaskan pada A.4.1.7.2). Oligonukleotida dan nukleotida yang dihasilkan oleh perlakuan RNase, jika tidak dihilangkan (misalnya dengan perlakuan silika) dapat menyebabkan estimasi yang berlebihan terhadap kandungan DNA sampel. Selain itu, DNA utas ganda menyerap lebih sedikit sinar UV dibandingkan dengan DNA utas tunggal. Karena proporsi DNA utas tunggal dalam larutan tidak diketahui, untuk menghindari estimasi kandungan DNA yang berlebihan, semua DNA dalam sampel uji diubah bentuk menjadi bentuk utas tunggal dengan menggunakan agen denaturasi natrium hidroksida. Karena asam nukleat tidak menyerap sinar UV pada panjang gelombang 320 nm, pembacaan pada panjang gelombang 320 nm bersifat informatif untuk penentuan serapan latar belakang akibat penyebaran cahaya dan senyawa UV-aktif.

Pembuatan kurva kalibrasi tidak diperlukan, asalkan koefisien ekstingsi molar yang sesuai dipilih sebagai fungsi dari jenis asam nukleat yang dipelajari dan/atau integritasnya.

Namun, kalibrasi spektrometer harus diverifikasi secara berkala melalui pengukuran konsentrasi larutan DNA acuan.

**B.14    Kisaran aplikasi**

Metode ini dapat diterapkan pada konsentrasi DNA dalam kisaran (2 – 50) µg/ml. Sebelum kuantifikasi, harus dilakukan pengenceran yang sesuai dari DNA hasil ekstraksi, agar berada dalam rentang linier pengukuran spektometri (kerapatan optik antara 0,05 hingga 1).

**CATATAN**    Biasanya, senyawa residu (misalnya CTAB dari prosedur ekstraksi DNA) dapat mengganggu deteksi spektometri UV pada 260 nm, karena senyawa tersebut menyerap cahaya pada panjang gelombang ini.

**Annex B**

(informative)

**Methods for the quantification of the extracted DNA**

**B.1    Basic ultraviolet spectrometric method**

**B.1.1    General**

This annex describes a routine method to determine the concentration of DNA in solutions.

**B.1.2    Validation status**

The method has been widely ring-tested and results published[35]. As an example, it was successfully applied within an interlaboratory study on GMO detection organized by the Federal Office of Public Health, Bern, and the Cantonal Laboratories of Basel and Zurich, Switzerland.

**B.1.3    Principle**

Nucleic acids in solution absorb ultraviolet (UV) light in the range from 210 nm to 300 nm with an absorption maximum at 260 nm. Since DNA, RNA and nucleotides have their absorption maximum at 260 nm, RNA and nucleotide contamination of DNA solutions cannot be determined by UV spectrometry. For this reason, RNA must be removed enzymatically during DNA extraction before DNA determination. Also, oligonucleotides and nucleotides derived from RNA hydrolysis should be eliminated (e.g. by silica treatment, as outlined in A.4.1.7.2). Oligonucleotides and nucleotides generated by RNase treatment, if not removed (e.g. by silica treatment) can lead to an overestimation of the DNA content of the sample. Moreover, double-stranded DNA absorbs less UV light compared to single-stranded DNA. Since the proportion of single-stranded DNA in the solution is unknown, to avoid overestimation of the DNA content, all the DNA in the test sample is converted to its single-stranded form by using the denaturing agent sodium hydroxide. Since nucleic acids do not absorb at 320 nm, reading at 320 nm is informative for the determination of background absorption due to light scattering and UV-active compounds.

The production of a calibration curve is not necessary, provided that an appropriate molar extinction coefficient is chosen as a function of the type of nucleic acid under study and/or its integrity.

However, the calibration of the spectrometer should be verified periodically by measuring the concentration of reference DNA solutions.

**B.1.4    Application range**

The method is applicable to DNA concentrations in the range from 2 µg/ml to 50 µg/ml. Before quantitation, suitable dilutions of the extracted DNA to be quantified should be made, in order to be in the linear range of the spectrometric measurement (optical density between 0,05 to 1).

**NOTE**    Occasionally, residual compounds (e.g. CTAB from the DNA extraction procedure) may interfere with the UV spectrometric detection at 260 nm, because they absorb at this wavelength.

**B.1.5    Reagen**

**B.1.5.1    Tris(hidroksimetil)-aminometana** (Tris) (C4H11NO3).

**B.1.5.2    Natrium hidroksida** (NaOH).

**B.1.5.3    Asam klorida**, *ϕ*(HCl) = 37%.

**B.1.5.4    *Carrier* DNA**, misalnya DNA sperma *Herring*[[23]](#footnote-23)), atau DNA *Calf Thymus*24).

**B.1.5.5    Larutan DNA acuan**

Siapkan larutan stok DNA 10 mg/ml dengan cara melarutkan 100 mg *carrier* DNA (B.1.5.4) ke dalam 10 ml bufer pengenceran (B.1.5.7). DNA yang terlarut pada konsentrasi ini hanya secara perlahan dan larutan yang dihasilkan sangat kental. Setelah itu, encerkan lebih lanjut larutan stok DNA acuan yang telah disiapkan ini dengan bufer pengenceran hingga konsentrasi kerja yang diinginkan (misalnya 25 μg/ml).

**B.1.5.6    Larutan natrium hidroksida**, *c*(NaOH) = 2 mol/l.

**B.1.5.7    Bufer pengenceran**, *c*(Tris) = 0,01 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 9,0 menggunakan HCl.

**B.1.6    Peralatan**

**B.1.6.1    Spektrometer UV**, baik *single-beam* maupun *double-beam*, atau instrumen *array* fotodioda dapat digunakan.

**B.1.6.2    Mikser/*shaker***, misalnya Vortex®1).

**B.1.6.3    Tabung pengukuran mikro**, misalnya sel/kuvet kuarsa atau plastik yang sesuai untuk deteksi UV pada panjang gelombang 260 nm.

Ukuran tabung pengukuran mikro yang digunakan menentukan volume untuk pengukuran: sel setengah mikro (1.000 μl), sel mikro (400 μl), sel ultra mikro (100 μl), dan kapiler kuarsa (3 μl hingga 5 μl). Jalur optik dari sel standar biasanya adalah 1 cm.

**B.1.7    Prosedur**

**B.1.7.1    Pengukuran larutan DNA acuan**

Kalibrasi spektrometer yang tepat dapat diverifikasi dengan menggunakan larutan DNA acuan, sebagai berikut:

* untuk mengukur blanko, hanya bufer pengenceran (B.1.5.7) yang digunakan untuk mengisi tabung pengukuran mikro;
* tabung pengukuran mikro diisi dengan larutan DNA acuan (B.1.5.5).

Penyerapan diukur untuk larutan blanko dan DNA acuan pada panjang gelombang 260 nm dan 320 nm.

**B.1.5    Reagents**

**B.1.5.1    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**B.1.5.2    Sodium hydroxide** (NaOH).

**B.1.5.3    Hydrochloric acid**, *ϕ*(HCl) = 37%.

**B.1.5.4    Carrier DNA**, e.g. Herring Sperm DNA[[24]](#footnote-24)), or Calf Thymus DNA25).

**B.1.5.5    DNA reference solution**

Prepare a DNA stock solution with 10 mg/ml by dissolving 100 mg carrier DNA (B.1.5.4) in 10 ml of dilution buffer (B.1.5.7). DNA dissolves at this concentrations only slowly and the resulting solution is very viscous. Afterwards dilute this prepared stock reference DNA-solution further with dilution buffer up to the desired working concentration (e.g. 25 µg/ml).

**B.1.5.6    Sodium hydroxide solution**, *c*(NaOH) = 2 mol/l.

**B.1.5.7    Dilution buffer**, *c*(Tris) = 0,01 mol/l.

Adjust the pH to 9,0 with HCl.

**B.1.6    Apparatus and equipment**

**B.1.6.1    UV-spectrometer**, single-beam, double-beam or photodiode array instruments are suitable.

**B.1.6.2    Mixer/shaker**, e.g. Vortex® 2).

**B.1.6.3    Measurement vessels**, for examplequartz cells/cuvettes or plastic cells/cuvettes suitable for UV detection at a wavelength of 260 nm.

The size of the measurement vessels used determines the volume for measurement: half-micro cells (1 000 µl), micro cells (400 µl), ultra-micro cells (100 µl) and quartz capillaries (3 µl to 5 µl). The optical path of standard cell is usually 1 cm.

**B.1.7    Procedure**

**B.1.7.1    Measurement of a reference DNA solution**

The correct calibration of the spectrometer can be verified by the use of a reference DNA solution, as follows:

* for blank measurement only dilution buffer (B.1.5.7) is used to fill the measurement vessel;
* the measurement vessel is filled with the reference DNA solution (B.1.5.5).

Absorption is measured for both the blank and reference DNA solutions at wavelengths of 260 nm and 320 nm.

**B.1.7.2    Pengukuran larutan DNA uji dengan konsentrasi yang tidak diketahui**

Untuk larutan blanko, campurkan bufer pengenceran (B.1.5.7) ditambah larutan natrium hidroksida (B.1.1.5.13), sehingga diperoleh konsentrasi akhir NaOH sebesar 0,2 mol/l. Campuran ini digunakan untuk mengisi tabung pengukuran mikro.

Campur larutan DNA uji dengan larutan natrium hidroksida, dan jika diperlukan dengan bufer pengenceran, untuk mendapatkan konsentrasi NaOH akhir sebesar 0,2 mol/l. Campuran ini digunakan untuk mengisi tabung pengukuran mikro.

Ukur serapan setelah inkubasi selama 1 menit untuk larutan blanko dan larutan DNA acuan pada panjang gelombang 260 nm dan 320 nm. Pembacaan akan stabil setidaknya selama 1 jam.

**CONTOH 1**    Untuk larutan blanko, campurkan 90 μl bufer pengenceran dan 10 μl larutan natrium hidroksida, lalu pindahkan ke dalam tabung mikro berukuran 100 μl.

**CONTOH 2**    Untuk larutan DNA uji, campurkan 80 μl bufer pengenceran atau air, 10 μl larutan natrium hidroksida, dan 10 μl larutan DNA dengan konsentrasi yang tidak diketahui, lalu pindahkan ke dalam tabung mikro berukuran 100 μl.

**B.1.8    Evaluasi**

Serapan (OD) pada panjang gelombang 320 nm (latar belakang) dikurangi dari serapan pada panjang gelombang 260 nm, menghasilkan serapan terkoreksi pada 260 nm.

Jika OD terkoreksi pada panjang gelombang 260 nm sama dengan 1, maka estimasi konsentrasi DNA adalah 50 μg/ml untuk DNA utas ganda, atau 37 μg/ml untuk DNA utas tunggal (misalnya yang didenaturasi dengan natrium hidroksida).

Pengukuran yang realiabel memerlukan nilai OD lebih besar dari 0,05 pada panjang gelombang 260 nm.

Terakhir, hitung konsentrasi massa, *ρ*, dari larutan DNA uji utas ganda, dengan mempertimbangkan faktor denaturasi dan faktor pengenceran yang diterapkan sesuai dengan Persamaan (1):

$ρ\_{DNA}=F×(OD\_{260}-OD\_{320})×37$ (1)

**Keterangan:**

$F$ merupakan faktor pengenceran;

$OD\_{260}$ merupakan serapan pada panjang gelombang 260 nm;

$OD\_{320}$ merupakan serapan pada panjang gelombang 320 nm;

37 merupakan faktor konversi, dalam mikrogram per mililiter.

**CONTOH**    Untuk perhitungan dengan faktor pengenceran 10 dan OD260 sebesar 0,658 dan OD320 sebesar 0,040:

*ρ*DNA = 10 × (0,658 – 0,040) × 37 µg/ml = 229 µg/ml.

**B.1.7.2    Measurement of a test DNA solution of unknown concentration**

For the blank solution, mix dilution buffer (B.1.5.7) plus sodium hydroxide solution (B.1.1.5.13), so that a final NaOH substance concentration of 0,2 mol/l is reached. This mixture is used to fill the measurement vessel.

Mix the test DNA solution with sodium hydroxide solution and, if needed, with dilution buffer, to obtain a final NaOH substance concentration of 0,2 mol/l. This mix is used to fill the measurement vessel.

Measure the absorption after 1 min incubation time for both the blank and reference DNA solutions at wavelengths of 260 nm and 320 nm. The reading is stable for at least 1 h.

**EXAMPLE 1**    For the blank solution, mix 90 µl of dilution buffer and 10 µl of sodium hydroxide solution and transfer to a 100 µl measurement vessel.

**EXAMPLE 2**    For the test DNA solution, mix 80 µl of dilution buffer or water, 10 µl of sodium hydroxide solution and 10 µl of a DNA solution of unknown concentration and transfer to a 100 µl measurement vessel.

**B.1.8    Evaluation**

The absorption (OD) at 320 nm (background) is subtracted from the absorption at 260 nm, resulting in the corrected absorption at 260 nm.

If the corrected OD at 260 nm equals 1, then the estimated DNA concentration is 50 µg/ml for double-stranded DNA, or 37 µg/ml for single-stranded DNA (i.e. denatured with sodium hydroxide), respectively.

Reliable measurements require OD values at a wavelength of 260 nm to be greater than 0,05.

Finally, calculate the mass concentration, *ρ*, of the double-stranded test DNA solution, taking into consideration the denaturation and the dilution factor applied according to Equation (1):

$ρ\_{DNA}=F×(OD\_{260}-OD\_{320})×37$ (1)

where

$F$ is the dilution factor;

$OD\_{260}$ is the absorbance at 260 nm;

$OD\_{320}$ is the absorbance at 320 nm;

37 is the conversion factor, in micrograms per millilitre.

**EXAMPLE**For a calculation with a dilution factor of 10 and an OD260 of 0,658 and an OD320 of 0,040:

*ρ*DNA = 10 × (0,658 – 0,040) × 37 µg/ml = 229 µg/ml.

**B.2    Elektroforesis gel agarosa dan metode pewarnaan etidium bromida**

**B.2.1    Umum**

Lampiran ini menjelaskan metode rutin untuk menentukan konsentrasi DNA dalam larutan. Elektroforesis gel agarosa DNA dan pewarnaan etidium bromida (EtBr) memberikan cara untuk memperkirakan jumlah DNA dan sekaligus menganalisis kondisi fisiknya (misalnya, tingkat degradasi, keberadaan sisa RNA dan beberapa kontaminan). Metode ini juga berlaku jika DNA yang tersedia tidak mencukupi untuk deteksi spektrometri, atau jika DNA tidak cukup dimurnikan dan mungkin mengandung zat yang menyerap radiasi ultraviolet[36]. Elektroforesis gel biasanya tidak direkomendasikan untuk mengukur DNA yang terdegradasi. Jika hal ini terjadi, sebaiknya menggunakan metode lain.

**B.2.2    Status validasi**

Metode ini sudah dikenal selama bertahun-tahun dan telah diterapkan secara luas, meskipun belum pernah diuji dalam studi interlaboratorium untuk mendeteksi PRG dalam bahan pangan.

**B.2.3    Prinsip**

DNA terpisah secara elektroforesis, berdasarkan muatan dan massa molekulnya, ketika dimasukkan ke dalam ayakan molekuler (gel agarosa) dan dikenai medan listrik dengan adanya larutan bufer[37].

EtBr berinterkalasi dengan DNA dan ketika tereksitasi oleh sinar ultraviolet, memancarkan fluoresens jingga. Karena jumlah fluoresensi sebanding dengan massa total DNA, jumlah DNA dalam sampel dapat diperkirakan dengan membandingkan fluoresensi yang dihasilkan oleh sampel yang tidak diketahui dengan serangkaian standar kuantitas. Massa molekuler dari standar tersebut harus serupa dengan massa DNA yang sedang dikuantifikasi, karena interkalasi EtBr, dan dengan demikian emisi fluoresensi juga bergantung pada panjang fragmen DNA. EtBr juga mewarnai DNA utas tunggal dan RNA. Untuk estimasi kandungan DNA yang lebih tepat, RNA harus dihilangkan secara enzimatik.

**B.2.4    Kisaran aplikasi**

Metode ini dapat diterapkan pada konsentrasi DNA dalam kisaran (5 - 500) ng apabila menggunakan sistem akuisisi gambar fotografi. Sistem berbasis CCD untuk dokumentasi video mungkin lebih sensitif.

**B.2.5    Tindakan pencegahan untuk keselamatan**

EtBr adalah mutagen dan karsinogen yang kuat dan harus ditangani dengan hati-hati. Penggunaan sarung tangan adalah wajib. Semua larutan dan gel yang mengandung EtBr harus didekontaminasi sebelum dibuang, lihat Referensi [36].

Sinar ultraviolet (UV-C) sangat berbahaya terutama untuk retina mata. Selalu gunakan perangkat pelindung UV (khususnya masker) saat bekerja.

**B.2.6    Reagen**

Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan menggunakan bufer elektroforesis TAE atau TBE.

Biasanya, reagen yang digunakan dalam metode ini tidak memerlukan tingkat biologi molekuler. Larutan seperti yang dijelaskan dalam metode ini biasanya tidak perlu diautoklaf.

**B.2    Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining method**

**B.2.1    General**

This annex describes a routine method to determine the concentration of DNA in solutions. Agarose gel electrophoresis of DNA and ethidium bromide (EtBr) staining provide a way of estimating the quantity of DNA and to analyse at the same time its physical state (e.g. degree of degradation, presence of residual RNA and of some contaminants). The method also applies if insufficient DNA is available for spectrometric detection, or if the DNA is not sufficiently purified and may contain substances that absorb ultraviolet radiation[36]. Gel electrophoresis is usually not recommended to quantify DNA if degraded. If this is the case, other methods should be employed.

**B.2.2    Validation status**

The method has been known for many years and has been widely applied, although it has never been tested in interlaboratory studies for GMO detection in foodstuffs.

**B.2.3    Principle**

DNA separates electrophoretically, on the basis of its charge and molecular mass, when loaded onto a molecular sieve (agarose gel) and subjected to an electric field in the presence of a buffer solution[37].

EtBr intercalates into the DNA and, when excited by ultraviolet light, emits orange fluorescence. Because the amount of fluorescence is proportional to the total mass of DNA, the quantity of DNA in the sample can be estimated by comparing the fluorescence produced by the unknown sample with that of a series of quantity standards. The molecular mass of such standards must be similar to that of the DNA under quantitation, because EtBr intercalation, and thus fluorescence emission, also depends on the length of the DNA fragments. EtBr also stains single-stranded DNA and RNA. For a more precise estimation of the DNA content, RNA must be removed enzymatically.

**B.2.4    Application range**

The method is applicable to DNA concentrations in the approximate range from 5 ng to 500 ng when photographic image acquisition systems are used. CCD-based systems for video documentation may be more sensitive.

**B.2.5    Safety precautions**

EtBr is a powerful mutagen and a carcinogen and must be handled with care. The use of gloves is compulsory. All solutions and gels containing EtBr should be decontaminated before disposal, see Reference [36].

Ultraviolet light (UV-C) is dangerous especially for eye retina. Always wear UV protection devices (facial mask in particular) when using it.

**B.2.6    Reagents**

The agarose gel electrophoresis may be carried out as TAE buffer electrophoresis or as TBE buffer electrophoresis.

Usually, molecular biology grade is not necessary for the reagents described in this method. Solutions as described in this method do not usually need to be autoclaved.

**B.2.6.1    Agarosa**, sesuai untuk elektroforesis DNA dan untuk pemisahan ukuran molekul DNA yang diinginkan.

**B.2.6.2    Asam borat** (H3BO3), hanya untuk sistem bufer TBE.

**B.2.6.3    Bromofenol biru** (C19H9Br4O5SNa) dan/atau xilena sianol FF (C25H27N2O6S2Na).

**B.2.6.4    Standar kuantitas DNA**, dari massa molekuler yang sesuai (misalnya DNA *linearized Lambda Phage* digunakan sebagai standar untuk DNA dengan massa molekuler tinggi dan DNA *restriction-digested Lambda Phage* untuk DNA dengan massa molekuler lebih rendah).

**B.2.6.5    Standar massa molekuler DNA**, misalnya sediaan komersial yang mengandung fragmen DNA dari massa molekuler yang sangat tinggi hingga sangat rendah.

**B.2.6.6    Asam asetat glasial** (CH3COOH), hanya untuk sistem bufer TAE.

**B.2.6.7    Garam dinatrium asam etilendiaminatetraasetat** (Na2-EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**B.2.6.8    Etidium bromida** (EtBr) (C21H20N3Br).

**B.2.6.9    Gliserol** (C3H8O3).

**B.2.6.10    Natrium asetat** (C2H3O2Na), hanya untuk sistem bufer TAE.

**B.2.6.11    Asam klorida**, *ϕ*(HCl) = 37%.

**B.2.6.12    Natrium hidroksida** (NaOH).

**B.2.6.13    Tris (hidroksimetil)-aminometana** (Tris) (C4H11NO3).

**B.2.6.14    Larutan bufer TAE (1x)**, *c*(Tris) = 0,050 mol/l, *c*(C2H3O2Na) = 20 mmol/l, *c*(Na2-EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 menggunakan asam asetat glasial atau NaOH. Dianjurkan untuk menyiapkan larutan bufer TAE sebagai larutan stok pekat (maksimum konsentrasi 50 kali). Buang jika terlihat adanya endapan. Pengenceran bufer elektroforesis pekat dapat dilakukan, segera sebelum digunakan, dengan air non-steril air (mono)-distilasi atau deionisasi.

**B.2.6.15 Larutan bufer tris/borat (TBE) (0,5x)**, *c*(Tris) = 0,055 mol/l, *c(*asam borat) = 0,055 mol/l, *c*(Na2 EDTA) = 0,001 mol/l.

Sesuaikan pH menjadi 8,0 dengan HCl atau NaOH. Dianjurkan untuk menyiapkan larutan bufer TBE sebagai larutan stok pekat (maksimum konsentrasi 10 kali). Buang jika terlihat adanya endapan. Pengenceran bufer elektroforesis pekat dapat dilakukan, segera sebelum digunakan, dengan air non-steril, air (mono)-distilasi atau deionisasi.

**B.2.6.16    Larutan bufer *loading* sampel (5x)**, *ϕ*(gliserol) = 50%, *ρ*(bromofenol biru) = 2,5 g/l dan/atau *ρ*(xilen sianol) = 2,5 g/l, dilarutkan dalam bufer elektroforesis (B.2.6.14 atau B.2.6.15).

**B.2.6.17    Larutan etidium bromida**, *c*(EtBr) = 0,5 mg/l.

**B.2.6.1    Agarose**, suitable for DNA electrophoresis and for the intended size separation of the DNA molecules.

**B.2.6.2    Boric acid** (H3BO3), for the TBE buffer system only.

**B.2.6.3    Bromophenol blue** (C19H9Br4O5SNa) and/or xylene cyanole FF (C25H27N2O6S2Na).

**B.2.6.4    DNA quantity standard**, of suitable molecular mass (e.g linearized Lambda Phage DNA for high molecular mass DNA and restriction-digested Lambda Phage DNA for lower molecular mass DNA).

**B.2.6.5    DNA molecular mass standard**, for example a commercial preparation containing DNA fragments from very high to very low molecular mass.

**B.2.6.6    Glacial acetic acid** (CH3COOH), for the TAE buffer system only.

**B.2.6.7    Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt** (Na2-EDTA) (C10H14N2O8Na2).

**B.2.6.8    Ethidium bromide** (EtBr) (C21H20N3Br).

**B.2.6.9    Glycerol** (C3H8O3).

**B.2.6.10    Sodium acetate** (C2H3O2Na), for the TAE buffer system only.

**B.2.6.11    Hydrochloric acid**, *ϕ*(HCl) = 37%.

**B.2.6.12    Sodium hydroxide** (NaOH).

**B.2.6.13    Tris(hydroxymethyl)-aminomethane** (Tris) (C4H11NO3).

**B.2.6.14    TAE buffer solution (1x)**, *c*(Tris) = 0,050 mol/l, *c*(C2H3O2Na) = 20 mmol/l, *c*(Na2-EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with glacial acetic acid or NaOH. It is advisable to prepare the TAE buffer solution as a concentrated stock solution (maximum 50-fold concentrated). Discard it if a precipitate is visible. Dilution of the concentrated electrophoresis buffers can be carried out, immediately before its use, with non-sterile, (mono)-distilled or deionised water.

**B.2.6.15    Tris/borate (TBE) buffer solution (0,5x)**, *c*(Tris) = 0,055 mol/l, *c*(boric acid) = 0,055 mol/l, *c*(Na2EDTA) = 0,001 mol/l.

Adjust the pH to 8,0 with HCl or NaOH. It is advisable to prepare the TBE buffer solution as a concentrated stock solution (maximum 10-fold concentrated). Discard it if precipitation is visible. Dilution of the concentrated electrophoresis buffers can be carried out, immediately before its use, with non-sterile, (mono)-distilled or deionised water.

**B.2.6.16    Sample loading buffer solution (5x)**, *ϕ*(glycerol) = 50%, *ρ*(bromophenol blue) = 2,5 g/l and/or *ρ*(xylene cyanol) = 2,5 g/l, dissolved in electrophoresis buffer solution (B.2.6.14 or B.2.6.15).

**B.2.6.17    Ethidium bromide solution**, *c*(EtBr) = 0,5 mg/l.

Dianjurkan untuk menyimpan larutan etidium bromida sebagai konsentrat (misalnya 10 mg/ml) pada suhu 5 °C dalam kondisi gelap (EtBr peka terhadap cahaya). Hindari penimbangan EtBr. Larutan stok harus dibuat dengan melarutkan air dengan jumlah yang sesuai dalam bejana yang telah berisi bubuk EtBr, atau sebagai alternatif dengan menggunakan tablet EtBr yang telah ditimbang sebelumnya. Pelarutan EtBr harus dilakukan terlindung dari cahaya, dengan pengadukan ringan pada suhu ruang. Biasanya membutuhkan waktu sekitar 1 jam.

**B.2.7    Peralatan**

**B.2.7.1    *Microwave oven* atau penangas air**

**B.2.7.2    Peralatan untuk elektroforesis gel agarosa**, dilengkapi dengan aksesori dan catu daya.

**B.2.7.3    Lampu atau *trans-illuminator* UV**, sebaiknya dengan panjang gelombang 312 nm.

Sebagai alternatif, dapat digunakan peralatan untuk kromatografi kolom asam nukleat dan sistem deteksi yang sesuai atau sistem lain yang serupa.

**B.2.7.4    Instrumen perekaman**, misalnya sistem dokumentasi foto dengan film ASA 3.000 dan filter UV yang memadai untuk fluoresensi yang dipancarkan EtBr.

Sebagai alternatif, dapat juga menggunakan sistem dokumentasi video dengan kamera CCD, serta filter UV yang memadai dan perangkat lunak analisis kuantitatif (opsional).

**B.2.8    Prosedur**

**B.2.8.1    Umum**

Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan menggunakan bufer elektroforesis TAE atau TBE. Gunakan bufer yang sama untuk melarutkan agarosa dan mengisi tangki elektroforesis.

**B.2.8.2    Preparasi gel agarosa**

Ketebalan gel harus tidak lebih dari 1 cm.

Konsentrasi dan kualitas agarosa menentukan kapasitas resolusi gel. Untuk kuantifikasi DNA dengan massa molekul tinggi, digunakan konsentrasi agarosa antara 8 g/l dan 10 g/l. Untuk DNA dengan massa molekul rendah (misalnya terdegradasi atau terestriksi), dapat menggunakan konsentrasi agarosa yang lebih tinggi (hingga 40 g/l)[38].

Timbang agarosa dalam jumlah yang tepat (B.2.6.1) dan tambahkan ke dalam larutan bufer elektroforesis (B.2.6.14 atau B.2.6.15). Biarkan larutan mendidih dalam *microwave oven* atau penangas air (B.2.7.1), sampai agarosa benar-benar larut. Ganti volume yang hilang akibat penguapan dengan jumlah air yang setara, campur dengan cara diaduk (hindari terperangkapnya gelembung udara), dinginkan larutan hingga suhu sekitar 60 °C dan biarkan pada suhu tersebut hingga digunakan. Siapkan penyangga gel (baki gel) dengan sisir sampel yang sesuai yang ditempatkan pada posisinya. Tuangkan larutan agarosa ke dalam baki gel dan biarkan gel mengeras pada suhu ruang (biasanya direkomendasikan selama 1 jam).

It is advisable to store the ethidium bromide solution as a concentrate (e.g. 10mg/ml) at 5° C in the dark (EtBr is light-sensitive). It is also advisable to avoid weighing EtBr. The stock solution should be prepared by dissolving an appropriate amount of water in the vessel already containing the EtBr powder, or alternatively, by employing pre-weighed EtBr tablets. Solubilization of EtBr should be carried out protected from light, under agitation at room temperature. This usually takes approximately 1 h.

**B.2.7    Apparatus and equipment**

**B.2.7.1    Microwave oven or boiling water bath**

**B.2.7.2    Equipment for agarose gel electrophoresis**, with accessories and power supply.

**B.2.7.3    Ultraviolet (UV) trans-illuminator or lamp**, preferably with wavelength of 312 nm.

Alternatively, equipment for column chromatography of nucleic acids and the according detection system or other similar suitable systems may be used.

**B.2.7.4    Recording instrument**, for example a photo documentation system with 3.000 ASA films and UV filter adequate for EtBr-emitted fluorescence.

As an alternative, a video-documentation system with CCD camera, adequate UV filter and (optional) quantitative analysis software may be used.

**B.2.8    Procedure**

**B.2.8.1    General**

The agarose gel electrophoresis may be carried out as TAE buffer electrophoresis or as TBE buffer electrophoresis. Use the same buffer to dissolve the agarose and to fill the electrophoresis tank.

**B.2.8.2    Agarose gel preparation**

Gels should not be thicker than 1 cm.

The agarose concentration and quality determines the resolution capacity of the gel. For high molecular mass DNA quantitation, agarose concentrations between 8 g/l and 10 g/l are used. For low molecular mass DNA (e.g. degraded or restricted) higher agarose concentrations are used (up to 40 g/l)[38].

Weigh an appropriate amount of agarose (B.2.6.1) and add it to the electrophoresis buffer solution (B.2.6.14 or B.2.6.15). Allow the solution to boil in a microwave oven or in a water bath (B.2.7.1), until the agarose is completely dissolved. Replace the volume lost by evaporation with an equivalent amount of water, mix by swirling (avoid air bubbles trapping), cool down the solution to about 60° C and keep it at this temperature until usage. Prepare a gel support (gel tray) with a suitable sample comb placed in right position. Pour the agarose solution onto the gel tray and allow the gel to solidify at room temperature (1 h is usually recommended).

**B.2.8.3    Preparasi sampel DNA**

Campurkan larutan DNA sampel (misalnya 5 μl hingga 10 μl) dengan sekitar 20% (dengan memperhatikan volume sampel akhir) dari bufer *loading* (B.2.6.16) (misalnya tambahkan 2,5 μl bufer *loading* untuk 10 μl sampel DNA), aduk dan aplikasikan campuran tersebut dalam slot sampel (sumuran) dengan pipet mikro. Jika sampel yang tidak diketahui terlalu pekat, lakukan beberapa pengenceran untuk dimasukkan ke dalam gel.

Untuk menentukan ukuran fragmen DNA yang diekstraksi, tambahkan bufer *loading* sampel (B.2.6.16) dengan proporsi 20% terhadap volume sampel ke dalam jumlah yang sesuai dari standar massa molekuler DNA (B.2.6.5) dan lakukan elektroforesis secara paralel.

Untuk memperkirakan konsentrasi sampel, jalankan sampel kuantitas DNA standar secara paralel. Sampel tersebut mengandung jumlah yang diketahui (dalam rentang dinamis metode, yaitu 5 ng hingga 500 ng) dari standar kuantitas DNA (B.2.6.4) yang diencerkan dalam air atau dalam bufer elektroforesis (B.2.6.14 atau B.2.6.15). Direkomendasikan untuk menggunakan standar kuantifikasi yang mengandung setidaknya 5 titik kalibrasi (yaitu jumlah DNA yang berbeda).

**B.2.8.4    Elektroforesis *submarine***

Lepaskan sisir sampel dengan hati-hati dari gel. Pindahkan gel (beserta baki gelnya) ke sel elektroforesis, sehingga sumuran berada lebih dekat dengan katoda (elektroda negatif). Isi sel dengan bufer elektroforesis (B.2.6.14 atau B.2.6.15). Lapisi gel dengan sekitar 2 mm bufer yang sama dan masukkan sampel menggunakan pipet mikro.

Lakukan elektroforesis pada suhu ruang dengan tegangan dan intensitas daya yang sesuai (umumnya direkomendasikan tegangan konstan maksimum 5 V/cm, dengan memperhatikan jarak antar elektroda). Dalam kondisi tersebut, DNA bermuatan negatif, sehingga berpindah dari katoda ke anoda. Waktu elektroforesis tergantung pada jarak migrasi yang diperlukan, pada arus yang dihasilkan oleh catu daya, bufer yang digunakan, elektro-endosmosis, dan konsentrasi agarosa dalam gel.

**B.2.8.5    Pewarnaan**

Setelah menyelesaikan elektroforesis, inkubasi gel selama (15 - 50) menit dalam larutan etidium bromida (B.2.6.17) pada suhu ruang, dalam kondisi gelap (dan/atau dalam tangki baja tahan karat berpenutup) dengan agitasi secara perlahan.

Jika diperlukan, kurangi pewarnaan latar belakang gel dengan cara merendam gel dalam air selama (10 - 30) menit.

Sebagai alternatif pewarnaan setelah proses elektroforesis, EtBr dapat ditambahkan ke dalam gel sebelum dituang. Dalam hal ini, EtBr ditambahkan ke dalam gel hingga konsentrasi akhir 0,01 mg per mililiter gel ketika gel telah didinginkan hingga suhu 60 °C.

Jika gel ditetesi dengan EtBr, masukkan sampel yang tidak diketahui dan standar kuantitas DNA (B.2.6.4) ke dalam slot terpisah yang dibuat dengan sisir yang sama pada gel yang sama. Jika tidak, jumlah etidium bromida akan berbeda untuk keduanya, sehingga memberikan hasil kuantifikasi yang salah. Untuk meminimalkan masalah pergerakan EtBr dalam gel, sejumlah EtBr juga dapat ditambahkan ke bufer elektroforesis (tangki). Setelah elektroforesis gel, biasanya tidak diperlukan tahap pengurangan/penghilangan warna.

**B.2.8.3    DNA sample preparation**

Mix the sample DNA solutions (e.g. 5 µl to 10 µl) with approximately 20% (with respect to the final sample volume) of loading buffer (B.2.6.16) (e.g. add 2,5 µl of loading buffer to 10 µl of DNA sample), mix and apply the mixture to the sample slots (wells) with a micropipette. If the unknown samples are suspected to be too concentrated, also provide some dilutions of them to be loaded onto the gel.

To determine the size of the extracted DNA fragments, add the sample loading buffer (B.2.6.16) in the proportion of 20% with respect to the sample volume) to a suitable amount of the DNA molecular mass standard (B.2.6.5) and carry out electrophoresis in parallel.

To estimate the concentration of the unknown sample, run standard DNA quantity samples in parallel. Such samples contain known amounts (within the dynamic range of the method, i.e. 5  ng to 500 ng) of the DNA quantity standard (B.2.6.4) diluted in water or in electrophoresis buffer (B.2.6.14 or B.2.6.15). It is recommended to use quantitation standards containing at least 5 calibration points (i.e. different amounts of DNA).

**B.2.8.4    Submarine electrophoresis**

Carefully remove the samples comb from the gel. Transfer the gel (with its gel tray) to the electrophoresis cell, so that the wells reside closer to the cathode (negative electrode). Fill the cell with the electrophoresis buffer (B.2.6.14 or B.2.6.15). Overlay the gel with approximately 2 mm of the same buffer and load the samples using a micropipette.

Carry out the electrophoresis at room temperature at the appropriate voltage and power intensity (generally a maximum constant voltage of 5 V/cm, with respect to the distance between the electrodes, is recommended). Under the described conditions, DNA is negatively charged, so it migrates from the cathode to the anode. The electrophoresis time depends on the migration distance required, on the current generated by the power supply, the buffer used, the electro-endosmosis and the concentration of the agarose in the gel.

**B.2.8.5    Staining**

After completing the electrophoresis, incubate the gel for 15 min to 50 min in the ethidium bromide solution (B.2.6.17) at room temperature, possibly in the dark (and/or in a stainless steel tank with a cover) with gentle shaking.

If necessary, reduce the background staining by de-staining the gel in water for 10 min to 30 min.

As an alternative to post-electrophoresis staining, EtBr can be added to the gel before pouring it. In this case, EtBr is added to the gel to a final concentration of 0,01 mg per millilitre of gel when the gel has been cooled to a temperature of 60 °C.

If the gel is cast with ethidium bromide, load the unknown sample and the DNA quantity standard (B.2.6.4) into separate slots produced with the same comb on the same gel. Otherwise the quantity of ethidium bromide will be different for the two, so yielding erroneous quantitation results. To minimize the problems of EtBr movement in the gel, some EtBr can also be added to the electrophoresis (tank) buffer. After the gel electrophoresis, no de-staining step is usually required.

**B.2.8.6    Rekaman gel**

Pindahkan gel ke permukaan trans-iluminator, nyalakan lampu UV dan rekam fluoresensi DNA dengan fotografi atau dokumentasi video.

**B.2.9    Evaluasi/interpretasi**

Kandungan DNA dari sampel diestimasi dengan membandingkan sampel yang tidak diketahui dengan sampel standar kuantitas DNA yang dielektroforesis secara paralel. Evaluasi ini dapat dilakukan secara visual atau, lebih baik lagi, dengan bantuan perangkat lunak kuantifikasi yang mampu menghitung kurva kalibrasi yang memadai.

**B.3    Metode *real time* PCR untuk kuantifikasi DNA hasil ekstraksi**

Ketika matriks yang memiliki sedikit DNA diekstraksi, terkadang tidak mungkin untuk mengkuantifikasi DNA yang diperoleh dengan metode fisika biasa (misalnya yang dijelaskan dalam lampiran ini), karena sensitivitasnya yang kurang memadai. Jika diperlukan kuantifikasi tersebut, pendekatan *real-time* PCR dapat digunakan. Metode ini juga memberikan informasi tentang kemampuan amplifikasi PCR dari molekul DNA yang diisolasi yang tidak dapat dilakukan melalui pengukuran konsentrasi DNA secara fisika. Secara rinci, lihat ISO 21570.

**B.2.8.6    Gel recording**

Transfer the gel to the trans-illuminator surface, switch on the UV light and record the DNA fluorescence by photography or video-documentation.

**B.2.9    Evaluation/interpretation**

The DNA content of the sample is estimated by comparing the unknown samples with the DNA quantity standard samples that underwent electrophoresis in parallel. This evaluation can be carried out visually or, better, with the aid of a quantitation software able to calculate an adequate calibration curve.

**B.3    Real time PCR method for quantitation of extracted DNA**

When DNA-poor matrices are extracted, the quantitation of the obtained DNA is not always possible with the usual physical methods (e.g. the ones described in this annex), because of their insufficient sensitivity. Where such quantitation is necessary, a real time PCR approach can be followed. This method also provides information on the PCR amplificability of isolated DNA molecules that cannot be provided by physical measurements of DNA concentrations. For details, see ISO 21570.

# Bibliografi

1. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, JG., Smith, JA., Struhl, K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons (1988) (ISBN 0-471-50338-X)
2. Sambrook, J., Russel D “Molecular Cloning, a Laboratory Manual” 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001) (ISBN 0-87969-576-5)
3. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T., eds. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 1989 [Superseded by Green M.R., Sambrook J., eds. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th Edition, 2012]
4. Prokisch, J. Zeleny, R., Trapmann, S., Le Guern, L., Schimmel, H., Kramer, G.N, Pauwels, J. Estimation of the minimum uncertainty of DNA concentration in a genetically modified maize sample candidate certified reference material. *Fresenuis J. Analy. Chem*. (2001) **370**(7) pp. 935-9
5. Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Vol. 3, Appendix E.3, *Purification of nucleic acids*. (1987) (ISBN 0‑87969-309-6)
6. Detection of a genetic modification of *Lactobacillus curvatus* in uncooked-meat sausage by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 08.00-44 In: *Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods*. Federal Health Office, September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
7. Straub, J. A., Hertel, C. and Hammes, W.P. The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. *Eur. Food Res. Technol*. (1999) **210**, pp. 62-67
8. Straub, J. A., Hertel, C. and Hammes, W. P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphyloccus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Protect*. (1999) **62**, pp. 1150-1156
9. Lick, S., Keller, M., Bockelmann, W., Heller, K.J. Optimized DNA extraction method for starter cultures from yoghurt. *Milk Sci. Int*. (1998) **51**, pp. 183-186
10. Lick, S., Heller, K.J. Quantitation by PCR of yoghurt starters in a model yoghurt produced with a genetically modified *Streptococcus thermophilus.* *Milk Sci. Int*. (1998) **53**, pp. 671-675
11. Detection of a genetic modification of *Streptococcus thermophilus* in yoghurt by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 02.02-4 In: *Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods*. Federal Health Office, September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
12. Lick, S., Keller, M., Krusch, U., Heller, K.J. Identification of starter cultures in thermally treated plain yoghurt using geneprobes and PCR. *J. Dairy Res*. (1998) **63**, pp. 607-613
13. Van Vaerenbergh, B., Grootaert, B., Moens, W. Validation of a method for the preparation of fungal genomic DNA for Polymerase chain reaction (PCR) and Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). *J. Mycol. Méd*. (1995) **5**, pp. 133-139
14. Haynes, K.A., Westerneng, T.J., Fell J.W., Moens, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain amplification of large subunit ribosomal DNA. *J. Med.& Vet. Mycology* (1995) **33**, pp. 319-325
15. Guillaume, G.: Verbrugge, D., Chasseur-Libotte, M-L., Moens, W., Collard, J-M.: PCR typing of tetracycline determinants (Tet A-E) in Salmonella enterica Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **32**, pp. 77-85
16. Pedersen, LH., Skouboe, P., Boysen, M., Soule, J., Rossen, L: Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*, 1997, **35**(2), pp. 169‑77
17. Ahn S.J., Costa J., Emanuel J.R. PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996, **13** pp. 2623–2625
18. Haugland, R.A., Heckman, J.L., Wymer, L.J. Evaluation of differents methods for the extraction of fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. In: *J.Microbiol. Methods*, 1999, **37**(2), pp. 165‑176
19. Kim, C.S., Lee, C. H., Shin, J.S., Chung, Y.S., and Hyung, N.I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25,** No. 5, pp. 1085-1086
20. Berthelet, M., Whyte, L.G., and Greer, C. W.: Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, **138**, pp. 17‑22
21. Petit, F., Craquelin, S., Guespin-Michel, J., and Buffet-Janvresse, C. Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. *Res. Microbiol*., 1999, **150,** pp. 143-151
22. Watson, R.J., and Blackwell, B.: Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can J. Microbiol*., 2000, **46**, pp. 633-642
23. Griffiths, R. J., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., and Bailey, M.J.: Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Appl. Environ. Microbiol*., 2000, **66,** No. 12, pp. 5488-5491
24. Rogers, S.O. and Bendich, A.J.. *Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual* A6 (1988) pp. 1-10
25. Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of soya beans by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 23.01.22-1, March 1998. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Ver­fahren zur Probe­nahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: *Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgVV*). March 1998 Bd. 1 1999-03 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
26. Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 24.01-01, February 1996, revised in January 1997. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: *Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods*/BgVV). Jan 1997 Bd. 1 (1997-01 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
27. Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of tomatoes bean by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 25.03.01-1, November 1999. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: *Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods*/BgVV). Nov 1999 Bd. 1 (1999-11 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
28. Boyle, J.S., and Lew, A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification, *Trends in Genetics*, Vol. **11**(1), p. 8, 1995
29. Brodmann, P., Eugster, A., Hübner, Ph., Meyer, R., Pauli, U., Vögeli, U. and Lüthy, J. Nachweis gentechnisch veränderter Roundup Ready™ Sojabohnen mittels der Polymerase - Kettenreaktion (PCR). *Methodenvorprüfung im Rahmen der Subkommission 29a des Schweizerischen Lebensmittelbuches. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg*. 1997, **88**, pp. 722-731
30. Hübner, P., Studer, E., and Lüthy, J. Quantitative Competitive PCR for the Detection of Genetically Modified in Food. *Food Control,*1999, **10**, pp. 353-358
31. Hübner, P., Studer, E., and Lüthy, J. Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nat Biotechnol*. 1999, **17**, pp. 1137-1138
32. Melzak, K.A., Sherwood, C.S., Turner, R.F.B. and Haynes, C.A. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J. Colloid and Interface Science,* 1996, **181**, pp. 635-644
33. Patents: EP 0389063, USP5,234,809
34. Sambrook, J., Fritsch, E.F, and Maniatis, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 2nd ed, Vol. 5, Appendix B 16, 1989 *Proteinase-K*. (ISBN 0-87969-509-6)
35. Swiss Food Manual, Chapter 52B, Section 1 to 5.(2000) *Eidgenössische Drucksachen und Materialzentrale*, CH-5005 Bern, available on CD.
36. Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed., Vol. 5, Appendix 5, (1989) *Quantitation of DNA and RNA* (ISBN 0-88989-509-8)
37. Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd ed., Vol. 1, Chapter 6, (1989) *Gel electrophoresis of DNA* (ISBN 0-88989-509-8,)
38. Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. In: *“Molecular Cloning: a Laboratory Manual*” 2nd ed., Vol. 1, Section 6.5, table 8.1 (1989) (ISBN 0-88989-509-8)
39. ISO/IEC 17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.*
40. ISO 21569, *Foodstuffs* *— Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products* *— Qualitative nucleic acid based methods*
41. ISO 21570, *Foodstuffs* *— Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products* *— Quantitative nucleic acid based methods*
42. ISO Guide 30, *Terms and definitions used in connection with reference materials*
43. ISO 5725-1, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*
44. Wurz A., Rüggeberg H., Brodmann P., Waiblinger H.-U., Pietsch K. DNA-Extraktionsmethode für den Nachweis gentechnisch veränderter Soja in Sojalecithin [DNA extraction method for the detection of genetically modified soy in soy lecithin]. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 1998, **94** pp. 159–161
45. Waiblinger H.-U., Ernst B., Graf N., Pietsch K. Ringtrial validation of a method for the extraction of DNA from soy lecithins. *J. Verbrauch. Lebensm.* 2007, **2** pp. 113–115
46. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.* 1995, **67**, pp. 331–343

**Informasi perumus SNI**

**[1] Komite Teknis Perumusan SNII**

Komite Teknis 19-07 Metode uji biomolekuler dan bioteknologi

**[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ketua | : | Sony Suhandono |
| Sekretaris | : | Nuri Wulansari |
| Anggota | : | Febriana Sari |
|  |  | Dini Apriori |
|  |  | Nur Azizah |
|  |  | Puji Rahayu |
|  |  | Ahmad Rusdan Handoyo Utomo |
|  |  | Mohammad Zainal Abidin |
|  |  | Reflinur |
|  |  | Mastur |
|  |  | Temmy Desiliyarni |
|  |  | Aksarani ‘Sa Pratiwi |
|  |  | Nurul Haruningtyas |
|  |  | Raafqi Ranasasmita |

**[3] Konseptor Rancangan SNI**

1. Mastur
2. Nur Azizah
3. Ida N. Orbani
4. Muflihani Yanis
5. Ginindar A. Adhis

**[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis Perumusan SNI**

Direktorat Pengembangan Standar Agro, Kimia, Kesehatan dan Penilaian Kesesuaian

Deputi Bidang Pengembangan Standar

Badan Standardisasi Nasional

1. 1)    Vortex merupakan contoh produk yang sesuai dan tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. Produk yang setara dapat digunakan jika terbukti mampu memberikan hasil yang setara [↑](#footnote-ref-1)
2. 2)    *Repeatability* dapat bergantung pada *batch* dari matriks dan/atau teknologi produksinya. Dalam beberapa kasus, DNA mungkin tidak ditemukan atau terdegradasi sedemikian rupa sehingga hasil PCR berada di bawah batas deteksi metode, terlepas dari primer/protokol PCR yang digunakan. Hal ini dapat menjadi sumber rendahnya *reproducibility* interlaboratorium. [↑](#footnote-ref-2)
3. 5)    Mini-BeatBeater merupakan contoh produk yang sesuai dan tersedia secara komersial dari produk Biospec. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. Produk yang setara dapat digunakan jika terbukti mampu memberikan hasil yang setara [↑](#footnote-ref-3)
4. 6)    Mini-BeadBeater is an example of a suitable product available commercially from Biospec products. This information is given for the convenience of users of this International Standard and does not constitute an endorsement by ISO of this product. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results. [↑](#footnote-ref-4)
5. 7)    SIGMA P-5288 merupakan contoh produk yang sesuai dan tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. Produk yang setara dapat digunakan jika terbukti mampu memberikan hasil yang setara. [↑](#footnote-ref-5)
6. 8)    SIGMA P-5288 is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this International Standard and does not constitute an endorsement by ISO of this product. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results. [↑](#footnote-ref-6)
7. 9)*Repeatability* dapat bergantung pada *batch* dari matriks dan/atau teknologi produksinya. Dalam beberapa kasus, DNA mungkin tidak ditemukan atau terdegradasi sedemikian rupa sehingga hasil PCR berada di bawah batas deteksi metode, terlepas dari primer/protokol PCR yang digunakan. Hal ini dapat menjadi sumber rendahnya *reproducibility* interlaboratorium. [↑](#footnote-ref-7)
8. 10)    Repeatability may depend on the batch of the matrix and/or to its production technology. In some cases, DNA could not be found or was degraded in such a way that PCR results were below the limit of detection of the method, irrespective of the PCR primers/protocols used. This may be a source of low reproducibility between laboratories. [↑](#footnote-ref-8)
9. 11)    *Repeatability* dapat bergantung pada *batch* dari matriks dan/atau teknologi produksinya. Dalam beberapa kasus, DNA mungkin tidak ditemukan atau terdegradasi sedemikian rupa sehingga hasil PCR berada di bawah batas deteksi metode, terlepas dari primer/protokol PCR yang digunakan. Hal ini dapat menjadi sumber rendahnya *reproducibility* interlaboratorium. [↑](#footnote-ref-9)
10. 12)    Repeatability may depend on the batch of the matrix and/or to its production technology. In some cases, DNA could not be found or was degraded in such a way that PCR results were below the limit of detection of the method, irrespective of the PCR primers/protocols used. This may be a source of low reproducibility between laboratories. [↑](#footnote-ref-10)
11. 13)    SIGMA S-5631 merupakan contoh produk yang sesuai dan tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. Produk yang setara dapat digunakan jika terbukti mampu memberikan hasil yang setara. [↑](#footnote-ref-11)
12. 14)    SIGMA S-5631 is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this International Standard and does not constitute an endorsement by ISO of this product. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results. [↑](#footnote-ref-12)
13. 15)*Repeatability* dapat bergantung pada *batch* dari matriks dan/atau teknologi produksinya. Dalam beberapa kasus, DNA mungkin tidak ditemukan atau terdegradasi sedemikian rupa sehingga hasil PCR berada di bawah batas deteksi metode, terlepas dari primer/protokol PCR yang digunakan. Hal ini dapat menjadi sumber rendahnya *reproducibility* interlaboratorium. [↑](#footnote-ref-13)
14. 16)    Repeatability may depend on the batch of the matrix and/or to its production technology. In some cases, DNA could not be found or was degraded in such a way that PCR results were below the limit of detection of the method, irrespective of the PCR primers/protocols used. This may be a source of low reproducibility between laboratories. [↑](#footnote-ref-14)
15. 17)*Repeatability* dapat bergantung pada *batch* dari matriks dan/atau teknologi produksinya. Dalam beberapa kasus, DNA mungkin tidak ditemukan atau terdegradasi sedemikian rupa sehingga hasil PCR berada di bawah batas deteksi metode, terlepas dari primer/protokol PCR yang digunakan. Hal ini dapat menjadi sumber rendahnya *reproducibility* interlaboratorium. [↑](#footnote-ref-15)
16. 18)    Repeatability may depend on the batch of the matrix and/or to its production technology. In some cases, DNA could not be found or was degraded in such a way that PCR results were below the limit of detection of the method, irrespective of the PCR primers/protocols used. This may be a source of low reproducibility between laboratories. [↑](#footnote-ref-16)
17. 19)    Produk tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. Produk yang setara dapat digunakan jika terbukti mampu memberikan hasil yang setara. [↑](#footnote-ref-17)
18. 20)    Product available commercially. This information is given for the convenience of users of this document and does not constitute an endorsement of this product by ISO. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results. [↑](#footnote-ref-18)
19. 21)    The Eppendorf Thermomixer merupakan contoh produk yang sesuai dan tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. [↑](#footnote-ref-19)
20. 22)    The Eppendorf Thermomixer is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this document and does not constitute an endorsement by ISO of this product. [↑](#footnote-ref-20)
21. 23)    Kolom dan kit uji merupakan contoh produk yang sesuai dan tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. Produk yang setara dapat digunakan jika terbukti mampu memberikan hasil yang setara. [↑](#footnote-ref-21)
22. 24)    The column and test kit indicated are examples of suitable products available commercially. This information is given for the convenience of users of this International Standard and does not constitute an endorsement by ISO of these products. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results. [↑](#footnote-ref-22)
23. 24)    Produk dari Sigma tersedia D-7290 dan D-1501. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan bentuk promosi oleh ISO atas produk tersebut. [↑](#footnote-ref-23)
24. )    These are available from Sigma as D-7290 and D-1501, respectively. This information is given for the convenience of users of this International Standard and does not constitute an endorsement by ISO of this product. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results. [↑](#footnote-ref-24)