

<b>Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)</b>	
<b>PCR-Nachweis der pFMV / CTP / EPSPS-Genkassette in transgenen Kulturpflanzen</b>	<b>AM009</b>
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2002 Status: verabschiedet	

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis einer gentechnisch erzeugten Resistenz gegenüber Glyphosat- Herbiziden (z. B. Roundup<sup>®</sup>) in Kulturpflanzen, insbesondere in Raps und Zuckerrüben, die T- DNA aus folgenden Plasmiden enthalten: pMON17204, MON17209, pMON17227 und pMON17237.

Die uns zur Verfügung stehenden Daten belegen, dass mit dieser Methode sowohl die Rapsorten GT73 und GT200 als auch die Zuckerrübensorten #77, #203 sowie H7-1 der Firma Monsanto sicher erfasst werden können. Für Roundup-Ready<sup>®</sup>- Soja eignet sich diese Methode aufgrund von Sequenzmodifikationen nicht.

Nachgewiesen wird eine Genkassette, die aus folgenden Genabschnitten besteht:

- 35S- Promotor des Feigenwurz Mosaik Virus (pFMV, auch pCMoVb),
- Chloroplasten- Transitpeptidsequenz (CTP2) des EPSPS-Gens aus *Arabidopsis thaliana* - und
- EPSPS- Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*, Stamm CP4 (CP4- EPSPS).

Das CP4- EPSPS- Gen codiert für eine bakterielle 5- Enolpyruvyl- shikimate- 3- phosphate Synthase, die den transgenen Pflanzen Glyphosate- Resistenz verleiht.

Nach Extraktion der Gesamt-DNA wird zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten Pflanzen-DNA eine konservierte Chloroplasten - Leu- tRNA - Sequenz vervielfältigt [Primer: A1 / A2; siehe Taberet, P., Gielly, L., Pautou, G. und J. Bouvet: Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17(1991): 1105-1109].

Die Fragmentgröße dieser Kontroll- PCR ist abhängig von der eingesetzten Pflanzenart (Raps: 384 bp; Zuckerrübe: 644 bp; Mais: 531 bp).

Alternativ kann zur Kontrolle ein 136 bp- Fragment aus einer in Eukaryonten hochkonservierten 18S-rRNA - Sequenz mittels PCR vervielfältigt werden [Primer EU+ /EU- ; siehe Allmann et al., Z. Lebensm. Unters. u. Forsch. (1993) 196: 248 - 251].

Mittels spezifischer PCR (Primer UAM-1 /UAM-2) wird anschließend aus Zuckerrüben ein 482 bp- großes bzw. aus Raps ein 494 bp - großes spezifisches DNA-Fragment vervielfältigt und gelelektrophoretisch nachgewiesen. Dabei bindet ein PCR- Primer im FMV- Promotor, der zweite am 5'- Ende des CP4-EPSPS- Gens.

## **2. Kurzbeschreibung**

Der Nachweis beruht auf der PCR (polymerase chain reaction) und besteht aus folgenden Arbeitsschritten:

- Isolierung der Gesamt- DNA aus Pflanzenmaterial
- Durchführung der Kontroll- PCR und der pFMV - EPSPS - spezifischen PCR
- Agarosegelelektrophorese
- Spezifizierung des PCR-Produktes (Restriktionsanalyse oder Sequenzierung)

## **3. Material**

### **3.1. Chemikalien**

*Hinweis:* Die Chemikalien müssen analysenrein, steril und für die Molekularbiologie geeignet sein.

Ammoniumacetat

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Chloroform

EDTA

Eisessig

Ethanol

Guanidinium Hydrochlorid

HCl

Isoamylalkohol

Natriumchlorid

Phenol

Proteinase K

RNase

SDS

Tris (hydroxymethyl)- aminomethan

Wizard<sup>®</sup> Miniprep DNA Purification Resin (Promega, A7141 o. A7701)

dNTP- Mix (20 mM dATP, 20 mM dCTP, 20 mM dGTP, 20 mM dTTP)

Primer A1: 5'CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3'

Primer A2: 5'GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3'

Primer EU +: 5' AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT 3'

Primer EU -: 5' TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA 3'

Primer UAM-1: *Die Primer- Sequenzen für diesen Nachweis sind vertraulich !*

Primer UAM-2: *Anfragen sind an den UA "Methodenentwicklung" zu richten*

Positiv- Kontroll- DNA (Referenzmaterial)

Taq- Polymerase mit geeignetem Puffer

Hot-Start- Polymerase mit geeignetem Puffer

Restriktionsenzyme mit geeignetem Puffer

Bromphenolblau

Glycerin

Agarose

Ethidiumbromid

DNA- Längenstandard (z. B. 100 bp - Leiter)

Wasser, bidestilliert

### 3.2. Geräte

50 ml- Falcon- Röhren, steril  
Eppendorfreaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml; steril  
PCR – Reaktionsgefäße, 0,2 ml; steril  
Mikropistille, steril  
Mikroliterpipetten, verschiedene Volumina  
Mikroliterpipetten- Filterspitzen, verschiedene Volumina, steril  
2 ml- Einwegspritzen (mit Kolben), steril  
Wizard<sup>®</sup>- Minisäulen (Promega, A7211), steril  
Probenhomogenisator (sterilisierbarer Mixer, Kugelmühle o. ä.)  
Vortex  
Vakuum- Manifold für Wizard<sup>®</sup>- Minisäulen (optional)  
Mikroliter- Kühlzentrifuge  
Wasserbad oder Thermoblock (mindestens bis 70°C)  
Thermocycler  
Elektrophorese- Apparatur (horizontal)  
UV – Transilluminator  
Polaroid- oder Video- Dokumentationssystem  
UV/VIS- Spektrophotometer

### 3.3. Lösungen

*Hinweis:* Soweit nicht anders angegeben, ist unter „Lösung“, eine wässrige Lösung zu verstehen.

CTAB- Extraktionspuffer	1,4 M NaCl 0,1 M Tris-HCl 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA	pH 8,0; autoklavieren
	vor Gebrauch 2 % CTAB zusetzen, unter Rühren lösen	
SDS- Extraktionspuffer	10 mM Tris 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % SDS	pH 8,0; autoklavieren
Guanidin HCl- Lösung	5 M,	autoklavieren
Proteinase K- Lösung	20 mg/ml	(bei -20°C lagern)
RNase A- Lösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH7,5) und 15 mM NaCl	15 Minuten kochen, abkühlen lassen; bei -20°C lagern
Isopropanol	80%-ige Lösung	
Phenol / Chloroform / IAA	25 : 24 : 1	
Chloroform / Isoamylalkohol	24 : 1	
Ammoniumacetat- Lösung	4 M;	autoklavieren

1x TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	pH 7,8 pH 8,0	
Tris- Puffer	10 mM;	pH 8,0	
5x Ladepuffer	0,1 M EDTA (pH 8,0) 40 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau		
Elektrophoresepuffer (50x TAE)	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l H <sub>2</sub> O		oder
Elektrophoresepuffer (10x TBE)	108 g /l Tris Base 55 g/l Borsäure 9,3 g/l EDTA (pH 8,0)		
Färbe- Arbeitslösung	0,5 µg Ethidiumbromid / ml Elektrophoresepuffer		

## **4. Durchführung**

### **4.1. DNA- Gewinnung**

#### **4.1.1. Lagerung der Proben**

Pflanzenproben (Blattmaterial, Stengel, Wurzeln, Knollen usw. ) werden von Schmutz befreit und bei -20°C in geeigneten Behältnissen (Plastiktüten u.ä.) gelagert.

Trockene Samen und Saatgut- Homogenat werden in verschlossenen Behältnissen trocken und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

#### **4.1.2. Isolation der Gesamt- DNA aus Pflanzenmaterial**

Die hier angegebenen Methoden für die DNA- Gewinnung aus Einzelpflanzen (Protokoll 1) und aus Saatgut (Protokoll 2) sind als Leitlinien für die DNA- Extraktion anzusehen.

Bei der Verwendung anderer DNA- Extraktionsmethoden, z. B. mit käuflichen Kits, ist die Vergleichbarkeit durch das Mitführen von geeigneten Kontrollen nachzuweisen. Gegebenenfalls ist das jeweils anzuwendende Hersteller- Protokoll den hier empfohlenen bzw. im Einzelfall benötigten Mengen an Ausgangsmaterial anzupassen.

### **Protokoll 1: DNA- Gewinnung mittels CTAB aus Einzelpflanzen- Proben**

Die CTAB- Extraktionsmethode (Protokoll 1) beruht auf einem Verfahren von Tinker et al. [Tinker, N.A.; Fortin, M.G. and D.E. Mather. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. Theor. Appl. Genet. 85 (1993): 976-984] und eignet sich sowohl für kleinere Mengen Samen und Blattmaterial als auch für Rübenkörper. Es wird empfohlen, Samen für Einzelanalysen auf feuchtem Filterpapier bei Raumtemperatur und normaler Beleuchtung einige Tage auszukeimen und die DNA-Isolierung an den Keimblättern durchzuführen. Bei Zuckerrüben wurden gute Erfahrungen mit der DNA- Isolation aus den Keimlingswurzeln gemacht.

- 100 - 200 mg Probenmaterial (Blätter, Rübenkörper u. ä.) in ein 2 ml - Eppendorf- Reaktionsgefäß überführen
- Probenmaterial mit Hilfe von flüssigem Stickstoff versprühen
- Gewebe mit Mikropistill zerreiben und homogenisieren
- Probe in 500 µl CTAB- Extraktionspuffer aufnehmen

- 60 Minuten unter Schütteln bei 65 °C inkubieren, ggf. weiter zerkleinern
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 200 µl Chloroform (100%) versetzen, vorsichtig mischen (**kein VORTEX !**)
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- obere (wäßrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 0,6 Volumen (300 µl) Isopropanol versetzen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70%-igem Ethanol waschen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- DNA- Pellet trocknen und in 50 µl 0,1x TE auflösen

Die nach dieser Schnellmethode isolierte DNA kann in vielen Fällen direkt in der PCR eingesetzt werden; andernfalls ist eine Aufreinigung erforderlich (Protokoll 3).

*Anmerkungen:* Alternativ können käufliche DNA- Extraktions- Kits verwendet werden (siehe oben).

### **Protokoll 2: DNA- Gewinnung aus Saatgut- Homogenat mittels Wizard, – Resin**

Größere Mengen Saatgut werden nach der Wizard®- Methode (Promega, Protokoll 2) extrahiert und müssen vor der DNA- Isolation ausreichend homogenisiert werden, um repräsentative Mischproben zu erhalten (Homogenisierung kleiner Mengen z. B. mit flüssigem Stickstoff und Mörser/Pistill - größere Mengen mit leistungsstarkem Mixer, Schlagwerk oder Kugelmühle).

- für jede Saatgutprobe 2 x 3g in 50 ml- Falcon einwiegen (Doppelbestimmung)
- 10 ml SDS- Extraktionspuffer zugeben; einen Aufarbeitungsleerwert mitführen
- Proben 30 Minuten bei 55-60°C schütteln, abkühlen lassen
- 2-3 Minuten bei ca. 1000 Upm zentrifugieren
- vom Überstand 1 ml in ein 2 ml- Eppendorf- Tube pipettieren
- Zugabe von 40 µl Proteinase K und 100 µl Guanidin HCl
- 10 Sekunden kräftig vortexen
- mindestens 3h bei 55-60°C unter Schütteln inkubieren, abkühlen lassen
- 10 Minuten bei 12.000 Upm zentrifugieren
- vom wässrigen Überstand 500 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit 5 µl RNase versetzen; 5 Minuten bei 56-60°C inkubieren.
- Lösung mit 1 ml Wizard® - Resin versetzen und durch mehrmaliges Umkippen mischen
- 2 ml- Einwegspritze und Wizard, - Minisäule zusammenstecken (Säule beschriften!)
- Lösung in die Spritze geben und mittels Kolben durch die Säule stoßen; bei Verwendung eines Vakuum- Manifold: Lösung mit Vakuum durch die Säule ziehen
- mit ca. 2 ml 80%-igem Isopropanol das Tube ausspülen und die Säule waschen
- Säule von der Spritze trennen und auf ein neues Reaktionsgefäß (ohne Deckel) setzen
- 2 Minuten bei 12.000 Upm zentrifugieren,
- Säule 5 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen
- DNA- Elution von der Säule in ein neues Reaktionsgefäß mit 200 µl 70°C- heißem 10 mM Tris-Puffer (pH8,0); 1 Minute inkubieren
- 1 Minute bei 7000 Upm zentrifugieren; DNA bei -20°C lagern

Die nach dieser Methode isolierte DNA kann oftmals direkt in der PCR eingesetzt werden; andernfalls ist eine Aufreinigung erforderlich (Protokoll 3).

*Anmerkung:*

Alternativ können auch andere DNA- Extraktions- Methoden verwendet werden (siehe oben).

### **Protokoll 3: Aufreinigung der Pflanzen- DNA**

(modifiziert nach Gebhardt et al. 1989; Theor. Appl. Genet. 78: 65-75)

- DNA in insgesamt 200 µl 0,1x TE lösen
- 2 µl RNase zusetzen
- mindestens 15 Minuten bei 37°C inkubieren
- mit 1 Volumen Phenol extrahieren; vorsichtig mischen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- obere (wäßrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahieren; vorsichtig mischen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- obere (wäßrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 2 Volumen absolutem Ethanol und 1/20 Volumen 4 M NH<sub>4</sub>-Acetat fällen
- 15 Minuten bei -70°C oder über Nacht bei -20°C inkubieren
- 30 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70% -igem Ethanol waschen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- DNA- Pellet trocknen und in 50 µl 0,1x TE auflösen

#### **4.1.3 Abschätzung der DNA- Konzentration**

Die DNA- Konzentration in den nach 4.1.2 erhaltenen Extrakten wird entweder durch Messung im UV/VIS- Spektrophotometer ermittelt oder nach einer Elektrophorese im Agarosegel abgeschätzt. Für den Einsatz in der PCR ist die DNA- Konzentration auf ca. 40 ng/µl (+/- 5 ng) einzustellen. Von dieser DNA werden 1- 5 µl (40- 200 ng DNA) in einer 50µl - PCR eingesetzt.

#### **4.2. PCR**

Jede zu untersuchende Probe wird in einem Ansatz zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA mit den Kontroll- Primern A1 /A2 (oder alternativ mit den Primern EU - / EU +) und Taq- Polymerase sowie in einem weiteren Ansatz mit den pFMV - EPSPS- spezifischen Primern und Hotstart- Polymerase getestet.

In Abhängigkeit vom verwendeten Thermocycler und der eingesetzten Taq- Polymerase müssen das Temperatur- Zeit- Programm und die Enzymmenge bei Bedarf angepasst werden. Bei Verwendung von Thermocyclern ohne beheizbaren Deckel sind die PCR- Ansätze mit Mineralöl zu überschichten.

Alle Reagenzien werden während des Pipettierens auf Eis gelagert.

*Anmerkung:*

Die Methodenbeschreibungen gelten jeweils für ein Gesamtvolumen pro PCR- Ansatz von 50 µl. Wird das Gesamtvolumen pro PCR- Ansatz variiert, so sind die Volumina der einzusetzenden Lösungen entsprechend umzurechnen.

#### 4.2.1. Kontrolle der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA (Kontroll- PCR)

##### Primer A1 / A2:

- Mastermix für n Ansätze:

n x	5 µl	10 x PCR- Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)
n x	1 µl	dNTP - Mix (20 mM)
n x	1 µl	Primer A1 (25 pmol/µl)
n x	1 µl	Primer A2 (25 pmol/µl)
n x	0,2 µl	Taq- Polymerase (5 u/ µl)
n x	bidest. H <sub>2</sub> O ad 45- 49 µl	

- in jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert:

1 - 5 µl	Proben- DNA
45- 49 µl	Mastermix

- Es werden jeweils eine Leer- oder Wasserkontrolle (1- 5 µl H<sub>2</sub>O statt Proben- DNA), eine Negativ- Kontrolle bzw. Extraktionskontrolle und eine Positiv- Kontrolle (z. B. Pflanzen- DNA) mitgeführt.

- Reaktionsansätze gut mischen und kurz zentrifugieren; Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur- Zeit- Programm starten:

1 x	3 min. bei 94°C
35 x	1 min. bei 94°C (Denaturierung)
	1 min. bei 60°C (Annealing)
	2 min. bei 72°C (Synthese)
1 x	10 min. bei 72°C

- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelanalyse (s. 4.2.3) bei 4°C lagern

### **alternativ: Primer EU+ / EU- :**

Es handelt sich beim 18S- rRNA- Gen um ein multi- copy- Gen, weshalb in der PCR weniger DNA und Primer eingesetzt werden sollten.

- Mastermix für n Ansätze:

n x	41,3 µl	bidest. H <sub>2</sub> O
n x	5 µl	10 x PCR- Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)
n x	1 µl	dNTP - Mix (20 mM)
n x	1 µl	Primer EU + (10 pmol/µl)
n x	1 µl	Primer EU - (10 pmol/µl)
n x	0,2 µl	Taq- Polymerase (5 u/ µl)

- in jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert:

0,5 µl Proben- DNA  
49,5 µl Mastermix

- Es werden jeweils eine Leer- oder Wasserkontrolle (0,5 µl H<sub>2</sub>O statt Proben- DNA), eine Negativ-Kontrolle bzw. Extraktionskontrolle und eine Positiv- Kontrolle (z. B. Pflanzen- DNA) mitgeführt.
- Reaktionsansätze gut mischen und kurz zentrifugieren; Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur- Zeit- Programm starten:

1 x	3 min. bei 95°C	
30 x	30 sec. bei 95°C	(Denaturierung)
	30 sec. bei 60°C	(Annealing)
	30 sec. bei 72°C	(Synthese)
1 x	5 min. bei 72°C	

- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelanalyse (s. 4.2.3) bei 4°C lagern

### **4.2.2. Spezifische PCR**

- Mastermix für n Ansätze:

n x	5 µl	10 x PCR- Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)
n x	1 µl	dNTP - Mix (20 mM)
n x	1 µl	Primer UAM-1 (25 pmol/µl)
n x	1 µl	Primer UAM-2 (25 pmol/µl)
n x	0,2 µl	Hotstart- Polymerase (5 u/ µl)
n x	bidest. H <sub>2</sub> O ad 45- 49 µl	

- in jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert:

1- 5 µl Proben- DNA  
45- 49 µl Mastermix

- Es werden jeweils eine Leer- oder Wasserkontrolle (1- 5 µl H<sub>2</sub>O statt Proben- DNA), eine Negativ-Kontrolle bzw. Extraktionskontrolle und eine Positiv- Kontrolle (Referenzprobe) mitgeführt.
- Reaktionsansätze gut mischen und kurz zentrifugieren; Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur-Zeit-Programm starten:

1 x	15 min. bei 95°C	(Hot Start)
40 x	60 sec. bei 94°C	(Denaturierung)

	60 sec. bei 60- 65°C	(Annealing)
	80 sec. bei 72°C	(Synthese)
1 x	10 min. bei 72°C	

- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelanalyse (s. 4.2.3) bei 4°C lagern

#### 4.2.3. Gelanalyse der PCR-Produkte

Die PCR - Amplifikate werden in einer Agarose- Gelelektrophorese analysiert:

- Agarose in 1 x Elektrophoresepuffer auflösen (Agarose- Konzentration: 1- 2 %)
- auf ca. 60°C abkühlen lassen, verdampftes Wasser ersetzen
- die Lösung in die Gelkammer gießen, Probenkamm einsetzen
- Gel bei Raumtemperatur erstarren lassen (ca. 30 Minuten)
- Gel in die Elektrophorese- Apparatur einsetzen und etwa 2 mm hoch mit 1 x Elektrophoresepuffer bedecken
- Probenkamm vorsichtig entfernen
- je 15 µl der PCR- Amplifikate mit 3 µl Ladepuffer mischen und in die Probentaschen füllen
- an mindestens einer Position des Gels einen DNA- Längenstandard auftragen
- Elektrophoresebedingungen: ca. 5 V/cm; Dauer: ca. 45 Minuten (der blaue Farbstoff sollte etwa bis zur Mitte des Gels wandern)
- nach der Elektrophorese das Gel in die Färbe- Arbeitslösung überführen und für mindestens 15 Minuten unter ständigem Schwenken färben
- danach 15 Minuten in Wasser entfärben
- Die PCR- Amplifikate werden auf dem UV- Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

*Anmerkung:* Abgesehen von der hier beschriebenen Agarose- Gelelektrophorese können auch andere Systeme zur Analyse der DNA eingesetzt werden. Demgemäß können sich Variationen bezüglich der erforderlichen Ausrüstung und der Chemikalien und Lösungen ergeben.

#### 4.3. Spezifizierung der PCR - Amplifikate

Zur Spezifizierung der pFMV/EPSPS - Amplifikate können Restriktionsenzyme eingesetzt oder die PCR- Amplifikate sequenziert werden.

Folgendes Enzym ist für eine Restriktionsspaltung geeignet:

<b>Pflanzenart</b>	<b>Amplifikat</b>	<b>Enzym</b>	<b>Schnittstellen</b>	<b>Fragmentgrößen</b>
<b>Raps</b>	<b>494 bp</b>	<b>Bgl II</b>	<b>1</b>	<b>131 bp + 363 bp</b>
<b>Zuckerrübe</b>	<b>482 bp</b>	<b>Bgl II</b>	<b>1</b>	<b>131 bp + 351 bp</b>

Ein Restriktionsansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 30 µl:

3 µl	10x Restriktionpuffer
3 µl	Restriktionsenzym (10 units/µl)
10 µl	PCR - Amplifikat
14 µl	H <sub>2</sub> O

Die Restriktionsansätze werden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach durch Zusatz von 6 µl Ladepuffer abgestoppt. 20 µl des Ansatzes werden auf ein 2-3% - iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird fotografisch dokumentiert, und die Fragmentgrößen werden anhand mitgeführter DNA- Längenstandards ermittelt.

## **5. Auswertung der PCR**

### *Kontrollen*

Sowohl die Leer- oder Wasserkontrollen als auch die Negativ- bzw. Extraktionskontrollen müssen in allen PCR- Reaktionen negative Ergebnisse liefern. Positive Befunde bei diesen Kontrollen lassen auf eine Verschleppung von DNA oder Probenmaterial schließen. Bei positiver Leer- oder Wasserkontrolle ist der gesamte PCR- Ansatz zu wiederholen; bei positiver Negativ- bzw. Extraktionskontrolle ist die DNA neu zu extrahieren.

### *Kontroll- PCR*

Die Kontroll- PCR mit den Primerpaaren A1 / A2 oder EU+ / EU - muss bei der untersuchten Probe ein Amplifikat in der erwarteten Größe liefern. Ein negativer Befund weist darauf hin, dass die aus der Probe extrahierte DNA nicht in ausreichender Menge und/oder Reinheit vorliegt. In diesem Fall muss vor dem Einsatz in der spezifischen PCR eine DNA- Aufreinigung durchgeführt werden, oder die DNA- Extraktion ist unter geeigneten Bedingungen zu wiederholen. Deren Ergebnis ist wiederum in der Kontroll- PCR zu testen.

### *Spezifische PCR*

Ist in einer Pflanzen- DNA- Probe nach pFMV- EPSPS- spezifischer PCR und Agarose- Gelelektrophorese ein Amplifikat mit einer Größe von, je nach untersuchter Pflanzenart, 482 bp bzw. 494 bp zu erkennen, das sich in die unter 4.3 angegebenen Restriktionsfragmente spalten läßt, dann ist diese Probe gentechnisch verändert und enthält ein oder mehrere Genkonstrukte zur möglichen Ausprägung einer Glyphosate- Resistenz.

Führt die spezifische PCR zu einem Amplifikat, der Restriktionsverdau jedoch nicht zu den erwarteten Fragmentlängen, müssen eine Sequenzierung des Amplifikates und ein Abgleich mit entsprechenden Sequenzdaten (z. B. aus Freisetzungunterlagen, Gen- Datenbanken) zur endgültigen Identifizierung angeschlossen werden.

Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt dann vor, wenn das genannte spezifische Amplifikat nicht auftritt, die Kontroll- PCR (siehe 4.2.1) mit der selben Probe aber zu einem Amplifikat in der erwarteten Größe geführt hat.

## **6. Ringversuch**

Im März 2002 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ des LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 15 bundesdeutsche und ein Schweizer Überwachungs-labor teilnahmen.

Alle 16 Laboratorien wendeten die vorliegende Nachweismethode „mit Erfolg“ an.

An jeden Teilnehmer waren sieben codierte Proben sowie eine positive Kontrollprobe (Raps) verschickt worden. Diese sieben Proben (zwei positive und zwei negative Zuckerrübenproben sowie eine positive und zwei negative Rapsproben) wurden von allen beteiligten Laboren richtig erkannt.

Zusätzlich untersuchten acht der teilnehmenden Laboratorien die sieben Proben, ebenfalls erfolgreich, quantitativ mittels Real-time-PCR. Die dabei verwendete Methode bildet die Grundlage für die geplante Validierung eines quantitativen Nachweises der gentechnisch erzeugten Glyphosate-Resistenz in Pflanzenmaterial.