

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
PCR-Nachweis der 35S-nptII-Übergangssequenz, der pNapin-BayTe-Übergangssequenz und des <i>plsC</i>-Gens	AM015
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, November 2004	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt Verfahren zum qualitativen PCR- Nachweis von bestimmten gentechnisch veränderten Rapslinien, die in ihrer Fettsäure-Zusammensetzung bzw. im Speicherlipid-Muster modifiziert wurden.

Im Rahmen der gesetzlichen Überwachung von Freisetzung und des Inverkehrbringens von GVO (§ 25 GenTG) sind die beschriebenen Nachweisverfahren bei der Analyse von DNA aus einzelnen Pflanzen (Blattmaterial, Samen etc.) und aus Saatgut anwendbar.

2. Nachweis- Prinzip

Nach Extraktion der Pflanzen-DNA wird zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA eine konservierte Chloroplasten-Leu-tRNA-Sequenz [1] mittels PCR (Polymerase- Kettenreaktion) vervielfältigt. Das Produkt dieser Kontroll-PCR ist bei Vorliegen von Raps-DNA **384 bp** groß.

Alternativ kann zur Kontrolle ein **248 bp**-Fragment aus dem Raps- spezifischen *pepC*-Gen (Phosphoenolpyruvate-Carboxylase) mittels PCR vervielfältigt werden [2].

Mittels PCR werden anschließend folgende Transgen-spezifische DNA-Fragmente vervielfältigt und gelelektrophoretisch nachgewiesen.

- Übergang zwischen dem 35S- Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) und dem *npt II*-Gen aus dem *E. coli*-Transposon Tn5. Letzteres codiert für eine Neomycin- Phosphotransferase, die Kanamycin-Resistenz vermittelt und oft zu Selektionszwecken in transgene Pflanzen integriert wird.
Die Größe des PCR-Amplikons (Primer: 35S-X/NPTa) ist abhängig von der spezifischen DNA- Sequenz der jeweiligen Transformante (siehe RKI- Az.: 6786-01- 38; 55; 56; 57; 61). Liegt sog. *Laurat*-Raps (RKI-Az.: 61) vor, der mit dem Plasmid pCGN3828 transformiert wurde, beträgt die Größe des Amplikons **554 bp**. Bei sog. *Trierucin*-Raps (RKI-Az.: -55), der mit dem Plasmid pRESS transformiert wurde, beträgt die Größe des Amplikons dagegen ca. **450 bp**.
- Übergang zwischen dem Napin-Gen- Promotor aus *Brassica rapa* und dem Thioesterase-Gen aus *Umbellularia californica* (Lorbeer) aus sog. *Laurat*- Raps, der mit dem Plasmid pCGN3828 transformiert wurde. Das Amplikon (Primer: napin5'-F/BayTe-R) ist **314 bp** groß.
- Gen für die Acylglycerol-3-phosphate-acyltransferase 8 (*plsC*) aus *Limnanthes douglasii* aus sog. *Trierucin*- Raps, der mit dem Plasmid pRESS transformiert wurde. Das Amplikon (Primer: LPAAT-F/R) ist **603 bp** groß.

Zur Kontrolle des PCR-Produktes schließt sich jeweils eine Restriktionsanalyse an. Es ist empfehlenswert, das jeweils erhaltene Amplikon außerdem zu sequenzieren.

3. Material

3.1. Chemikalien:

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

- bidest. H₂O, steril
- dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl₂- Lösung
- Primer A1: 5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3' [nt (864) 871, Genbank: AF451573]
- Primer A2: 5' GGGGATAGAGGGACTTGAAC 3' (nt 1250, Genbank: AF451573)
- Primer PEP3-5: 5' GCTAGTGTAGACCAGTTCTTG 3' (nt 3626, Genbank: D13987)
- Primer PEP3-6 : 5' CACTCTTGTCTCTTGTCCCTC 3' (nt 3873, Genbank: D13987)
- Primer NPta: 5'GTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTC 3' (nt 1820, Genbank: U00004)
- Primer 35S-X: 5' ACGTTCCAACCACGTCTTCA 3' (nt 7304, Genbank: NC_001497)
- Primer napin5'-F: 5' TGTCACGCCAGGACATGAGCTACA 3' (nt 70, Genbank: J02782)
- Primer BayTe-R : 5' GGCCATCACGAGCCAACATTACAG 3' (nt 211, Genbank: M94159)
- Primer LPAAT-F : 5' CCGCAACAGGAGACAATAAAA 3' (nt 36, Genbank: X83266)
- Primer LPAAT-R : 5' TATTGGGAGATGTGACTGAAG 3' (nt 639, Genbank: X83266)
- Positiv- Kontroll- DNA (Referenzmaterial)
- Taq-Polymerase oder Hot-Start-Polymerase mit geeignetem Puffer
alternativ: Hot-Start-Mastermix (enthält Puffer, dNTP's, MgCl₂ und Polymerase)
- Restriktionsenzyme mit geeignetem Puffer

3.2. Geräte

- sterile Eppendorfreaktionsgefäße: 2 ml und 1,5 ml
- Sterile PCR – Reaktionsgefäße, 0,2 ml
- Mikroliter- Kolbenhubpipetten (diverse Volumina)
- Einmal- Pipettenspitzen (diverse Volumina, aerosolgeschützt, steril)
- Mikroliter- Tischzentrifuge
- Thermocycler

4. Durchführung

4.1. Lagerung der Proben und DNA- Gewinnung

Frisches Pflanzenmaterial wird von Erde befreit und in verschlossenen Plastik-Tüten bei –20°C gelagert. Samen und Saatgut- bzw. Futtermittel-Homogenate werden in fest verschlossenen Behältnissen trocken und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

Zur DNA- Gewinnung aus Pflanzenmaterial und Saatgut-Homogenaten wird an dieser Stelle auf die SOP „**PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate-resistenten transgenen Pflanzen**“ des Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG vom März 2002 verwiesen.

Die DNA-Konzentration in den erhaltenen Extrakten wird entweder durch Messung im UV/VIS-Spektrophotometer ermittelt oder nach einer Elektrophorese im Agarosegel abgeschätzt

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 PEP3-5/ PEP3-6 und Taq- oder Hot-Start-Polymerase sowie in weiteren Ansätzen mit den Transgen-spezifischen Primern und Hot-Start- Polymerase getestet.

Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionen in geeigneten Gefäßen angesetzt. Alle Reagenzien werden während des Pipettierens auf Eis gelagert.

Beispielhaft werden hier jeweils Reaktionsansätze aufgeführt, bei denen das Endvolumen der Einzelreaktion 30 µl beträgt. Der PCR-Ansatz kann mit anderen Volumina erfolgen, die Konzentration der Zutaten ist dann entsprechend anzupassen.

4.2.1. Kontrolle der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA mittels PCR

Zur Amplifikationskontrolle mit den Primern A1/A2 wird an dieser Stelle auf die SOP „PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate-resistenten transgenen Pflanzen“ des Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG vom März 2002 verwiesen.

Tabelle 1: PCR- Reaktionsmix Primer PEP3-5 / PEP3-6

Reaktionsvolumen: 30 µl		
Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel- PCR- Ansatz	Reaktionsmix für n* PCR- Ansätze
10x Reaktionspuffer	1 x	n x 3,0 µl
MgCl ₂ , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	n x 1,8 µl
dNTP-Mix, 20 mmol/l je dNTP	0,4 mmol/l je dNTP	n x 0,6 µl
Primer PEP3-5, 25 µmol/l	0,5 µmol/l	n x 0,6 µl
Primer PEP3-6, 25 µmol/l	0,5 µmol/l	n x 0,6 µl
Taq- oder Hot-Start-Polymerase (5 units/ µl)	1 unit	n x 0,2 µl
deionisiertes, steriles Wasser	--	n x 18,2 µl (ad 25 µl)
Je 25 µl Reaktionsmix werden in die PCR- Gefäße pipettiert. Anschließend wird die Proben-DNA zugesetzt :		
Stammlösung	Konzentration im Einzel- PCR- Ansatz	Zugabe pro PCR- Ansatz
Proben- DNA (10 - 40 µg/ ml)	50 – 200 ng	5 µl

* Es wird ca. 5% mehr Reaktionsmix als nötig hergestellt, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

** Reagenz nur zusetzen, wenn nicht bereits im Reaktionspuffer enthalten (wie z. B. bei HotStar®-Mastermix)

- Es werden jeweils eine Amplifikationsreagenzkontrolle (5 µl H₂O statt Proben-DNA), eine Negativ-Kontrolle (z. B. 5 µl Bakterien-DNA) und eine Positiv-Kontrolle (z. B. 5 µl Raps-DNA) mitgeführt.
- Reaktionsansätze in den geschlossenen PCR-Gefäßen gut mischen, ggf. mit Mineralöl überschichten und kurz zentrifugieren.
- Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur-Zeit-Programm starten (siehe unten). Die PCR- Bedingungen, besonders die Annealing-Temperatur, sind für jeden Thermocycler und für die verwendeten Polymerasen einzeln anzupassen:

1 x	4 bzw. 15 min. bei 95°C	(Denaturierung bzw. Hot-Start)
35 x	1 min. bei 94°C	(Denaturierung)
	1 min. bei 58°C	(Annealing)
	1 min. bei 72°C	(Synthese)
1 x	5 min. bei 72°C	
- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelanalyse bei 4°C lagern

4.2.2. Spezifische PCR- Nachweise

Tabelle 2: PCR- Reaktionsmix spezifische Nachweise

Reaktionsvolumen: 30 µl		
Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel-PCR-Ansatz	Reaktionsmix für n* PCR-Ansätze
10x Reaktionspuffer	1 x	n x 3,0 µl
MgCl ₂ , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	n x 1,8 µl
dNTP-Mix, 20 mmol/l je dNTP	0,4 mmol/l je dNTP	n x 0,6 µl
Vorwärts- Primer, 25 µmol/l (siehe 3.1)	0,5 µmol/l	n x 0,6 µl
Rückwärts- Primer, 25 µmol/l (siehe 3.1)	0,5 µmol/l	n x 0,6 µl
Hot-Start-Polymerase (5 units/ µl)	1 unit	n x 0,2 µl
deionisiertes, steriles Wasser	--	n x 18,2 µl (ad 25 µl)
Je 25 µl Reaktionsmix werden in die PCR- Gefäße pipettiert. Anschließend wird die Proben- DNA zuge- setzt :		
Stammlösung	Konzentration im Einzel- PCR- Ansatz	Zugabe pro PCR- Ansatz
Proben- DNA (10 - 40 µg/ ml)	50 – 200 ng	5 µl

* Es wird ca. 5% mehr Reaktionsmix als nötig hergestellt, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

** Reagenz nur zusetzen, wenn nicht bereits im Reaktionspuffer enthalten (wie z. B. bei HotStar®Taq-Mastermix)

- Es werden jeweils eine Amplifikationsreagenzkontrolle (5 µl H₂O statt Proben-DNA), eine Negativ- Kontrolle (z. B. 5 µl nicht transgene Pflanzen- DNA) und eine Positiv- Kontrolle (z. B. 5 µl Referenzproben-DNA) mitgeführt.
- Reaktionsansätze in den geschlossenen PCR-Gefäßen gut mischen, ggf. mit Mineralöl überschichten und kurz zentrifugieren;
- Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das betreffende Temperatur- Zeit- Programm starten (siehe Tabelle). Die PCR- Bedingungen, besonders die Annealing-Temperatur, sind für jeden Thermocycler und für die verwendeten Polymerasen einzeln anzupassen.

Tabelle 3 : Temperatur-Zeit-Programme (spezifische Nachweise)

Programmschritte	Spezifischer Nachweis von			Zeitregime
	p35S-nptII	napin-5'-BayTE	LPAAT (plsC)	
	Primer: 35S-X/NPTa	Primer: napin5'-F/BayTe-R	Primer: LPAAT-F/LPAAT-R	(alle Nachweise)
	95°C	95°C	95°C	
Step 1: Vorheizen				
Step 2: Denaturieren (Taq) oder <u>Aktivierung der Hot-Start-Polymerase</u>	T = 95°C T = 95°C	T = 95°C T = 95°C	T = 95°C T = 95°C	4 min. od. <u>15 min.</u>
Step 3: Denaturieren	T = 94°C	T = 94°C	T = 94°C	1 min.
Step 4: Annealing	T = 55-60°C	T = 58-65°C	T = 55- 60°C	1 min.
Step 5: Elongation	T = 72°C	T = 72°C	T = 72°C	1 min.
Step 6: Zykluszahl	35x	35x	35x	
Step 7: Elongation	T = 72°C	T = 72°C	T = 72°C	5 min.
Step 8: Kühlen	5°C	5°C	5°C	

- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelanalyse bei 4°C lagern

4.3. Gelanalyse der PCR-Produkte

Die Gel- Analyse und -Dokumentation der PCR-Produkte erfolgt analog zur SOP „PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate-resistenten transgenen Pflanzen“ des Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG vom März 2002.

4.4. Spezifizierung der PCR - Amplifikate

Da es verschiedene, in ihrer Fettsäure-Zusammensetzung veränderte Raps-Transgene gibt, die die *p35S-npt II*-Genkassette enthalten, ist besonders bei der Saatgut-Analytik zu empfehlen, die PCR-Amplifikate aus der *p35S-nptII*-PCR stets zu sequenzieren und die Sequenzen vorzugsweise mit vom Hersteller autorisierten oder veröffentlichten Sequenzdaten zu vergleichen. Zusätzlich können zur näheren Spezifizierung der einzelnen PCR-Amplifikate folgende Restriktionsenzyme eingesetzt werden:

<i>Raps-Transformante</i>	<i>Amplikon</i>	<i>Enzym</i>	<i>Schnittstellen</i>	<i>Fragmentgrößen</i>
1. p35S-nptII- PCR				
Laurat-Raps	554bp	Eco RI	1	264 bp + 290 bp
Trierucin-Raps	450bp	Pst I	1	100 bp + 350 bp
2. napin-5'- BayTe- PCR				
Laurat-Raps	314bp	Nde I	1	104 bp + 210 bp
3. LPAAT- PCR				
Trierucin-Raps	603bp	Bam HI	1	346 bp + 257 bp

Die Restriktionsansätze erfolgen analog zur SOP „**PCR-Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate-resistenten transgenen Pflanzen**“ des Unterausschusses Methodenentwicklung des LAG vom März 2002.

5. Auswertung

Negativ-Kontrollen

Sowohl die Amplifikationsreagenzkontrolle (Wasser) als auch die Negativ-Kontrollen (siehe 4.2) müssen *in allen* PCR- Reaktionen negative Ergebnisse liefern. Positive Befunde bei diesen Kontrollen lassen auf eine Verschleppung von DNA schließen. Sollten diese Kontrollen ein PCR-Amplifikat enthalten, ist der gesamte PCR- Ansatz bzw. die DNA-Extraktion zu wiederholen.

Kontroll-PCR

Die Kontroll-PCR mit den Primerpaaren A1/A2 oder pep3-5/pep3-6 muss bei der untersuchten Rapsprobe 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 zu wiederholen. Deren Ergebnis ist wiederum in der Kontroll- PCR zu testen.

Spezifische PCR

Ist in einer Raps-Probe nach der p35S-*npt II*-spezifischen PCR ein Amplifikat von 450 oder 554 bp zu erkennen, das sich in die unter 4.4. angegebenen Restriktionsfragmente spalten lässt, und können auch die pNapin-BayTe-Übergangssequenz bzw. das *plsC*-Gen entsprechend dieser Vorschrift nachgewiesen werden, dann enthält diese Saatgutprobe eine gentechnische Veränderung, die in bekannten Raps-Transgenen mit modifizierter Fettsäurezusammensetzung vorliegt.

Auf den Nachweis der p35S-*npt II*-Übergangssequenz kann verzichtet werden, wenn die für die pNapin-BayTe-Übergangssequenz bzw. für das *plsC*-Gen spezifische PCR Amplifikate und Restriktionsfragmente der genannten Größen liefert.

Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt dann vor, wenn spezifische Amplifikate weder in der p35S-*npt II*-spezifischen PCR noch in der für die pNapin-BayTe-Übergangssequenz bzw. für das *plsC*-Gen spezifischen PCR auftritt, die Kontroll-PCR (siehe 4.2.1) mit der selben Probe aber zu einem entsprechenden Amplifikat geführt hat.

Ergeben sich in der p35S- *npt II*-spezifischen PCR Amplifikate anderer Größe und/oder kann ein Fragment nicht, wie oben beschrieben, geschnitten werden, dann enthält die Probe keine anhand dieser Vorschrift exakt nachweisbare gentechnische Veränderung. In diesem Fall muss das Untersuchungsergebnis allgemein formuliert werden, z. B.: "*Es wurden DNA- Sequenzen nachgewiesen, die natürlicherweise so nicht vorkommen.*".

HINWEIS: Der gentechnisch veränderte Mais MON863 enthält ebenfalls eine p35S-*nptII*-Genkassette; die spezifische PCR ergibt hierbei ein ca. 490 bp-Produkt. Dies ist insbesondere bei der Analyse von Futtermitteln zu berücksichtigen.

6. Validierung

Im September 2004 wurde diese Methode durch den Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG in einem Ringversuch validiert, an dem 15 bundesdeutsche Überwachungslaboratorien teilnahmen. An jeden Teilnehmer waren fünf codierte Proben sowie drei Kontrollproben verschickt worden. Es wurden zwei verschiedene Raps-Transgene mit verändertem Fettsäure-Stoffwechsel sowie eine Mais MON863-Probe richtig erkannt. Alle teilnehmenden Laboratorien wendeten die vorliegende Nachweis- Methode „*mit Erfolg*“ an.

7. Literatur

- [1] 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
- [2] Waiblinger et al. (1999) *DLR* 95: 44-48