

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Qualitative PCR zum Nachweis transgener Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Schädlingsresistenz	AM022
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2009	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt verschiedene, qualitative PCR- Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Kartoffellinien, die in ihrem Stärkestoffwechsel modifiziert wurden oder in die eine Schädlingsresistenz eingeführt wurde.

Im Rahmen der gesetzlichen Überwachung von Freisetzungen und des Inverkehrbringens von GVO (§ 25 GenTG) sind die beschriebenen Nachweisverfahren bei der Analyse von DNA aus Pflanzenmaterial (Blattmaterial, Samen, Knollen etc.) 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 (Primer: A1/A2) ist bei Vorliegen von Kartoffel- DNA **570 bp** groß.

Mittels PCR werden anschließend je nach Fragestellung transgenspezifische DNA-Fragmente vervielfältigt und gelelektrophoretisch nachgewiesen (siehe Anhänge unter 8.). Zur Spezifizierung der Amplifikate wird die Restriktionsanalyse eingesetzt. Ebenso kann mittels Sequenzierung der Amplifikate eine Bestätigung der Ergebnisse erfolgen.

3. Material

3.1. Chemikalien

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

- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
- Chloroform
- EDTA
- Ethanol
- Isopropanol
- Natriumchlorid
- Proteinase K
- Reinstwasser, steril (H₂O)
- Tris (hydroxymethyl)- Aminomethan
- DNeasy Plant Mini Kit der Fa. Qiagen
- dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl₂- Lösung
- Primer A1: 5´ CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3´ [nt 1 - 20 , Genbank: DQ131549]
- Primer A2: 5´ GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3´ [nt 571-552, Genbank: DQ131549]
- Spezifische Primerpaare für die Transgen- Nachweise (siehe Anhänge unter 8.)
- Positiv- Kontroll- DNA (Referenzmaterial)
- Taq- Polymerase. Hot-Start- Polymerase mit geeignetem Puffer oder alternativ Hot-Start- Mastermix (enthält Puffer, dNTP´s, MgCl₂ und Polymerase)
- Restriktionsenzyme mit geeignetem Puffer

3.2. Geräte und Verbrauchsmaterial

- sterile Mikropistille für 1,5 ml bzw. 2 ml Mikroliterreaktionsgefäße
- sterile 2 ml (Rundboden) und 1,5 ml (Spitzboden) Mikroliterreaktionsgefäße mit Verschluss
- sterile, DNase-freie PCR – Reaktionsgefäße, 0,2 ml
- Mikroliter- Kolbenhubpipetten (diverse Volumina)
- Einmal- Pipettenspitzen (diverse Volumina, aerosolgeschützt, steril)
- Thermomix- Gerät (temperierbarer Schüttler für Mikroliterreaktionsgefäße)
- Vortex- Gerät (Schüttelmixer)
- Mikroliter- Tischzentrifuge
- Thermocycler

3.3. Lösungen

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

<u>CTAB- Extraktionspuffer</u>	1,4 M NaCl
	0,1 M Tris-HCl
	20 mM Na ₂ EDTA pH 8,0

- autoklavieren und vor Gebrauch 2 % CTAB zusetzen; unter Rühren lösen

<u>RNAse A</u>	100 mg/mL
----------------	-----------

<u>Proteinase K- Lösung</u>	20 mg/ml (bei -20°C lagern)
-----------------------------	-----------------------------

<u>Ethanol</u>	75%-ige Lösung
----------------	----------------

4. Durchführung

4.1. Lagerung der Proben

Frisches Pflanzenmaterial und Kartoffelknollen werden von anhaftender Erde und Feuchtigkeit befreit und in verschlossenen Papier- oder Plastik- Tüten tiefgekühlt bei -20°C (± 3°C) gelagert.

4.2. DNA- Extraktion

Aufgrund des hohen Stärkegehaltes von Kartoffelmaterial wird ausdrücklich empfohlen, für die DNA- Extraktion eine CTAB- Methode anzuwenden. Die unten aufgeführte *modifizierte* CTAB- Methode gewährleistet einen für die nachfolgenden PCR- Nachweise geeigneten Reinheitsgrad der Kartoffel- DNA. Die daran anschließende Säulenreinigung der DNA ist optional.

Die CTAB- Extraktionsmethode beruht auf einem Verfahren von Tinker et al. [2] und eignet sich sowohl für kleinere Mengen Samen und Blattmaterial als auch für Wurzel- und Knollen- gewebe.

Hinweis: Bei Kartoffelknollen ist die Schale zur DNA- Gewinnung deutlich besser geeignet als das Stärkegewebe.

Bei der Verwendung anderer DNA- Extraktionsmethoden, z. B. mit käuflichen Kits, ist sicherzustellen, dass das Verfahren zu DNA von vergleichbarer oder besserer Qualität führt.

Gegebenenfalls ist das jeweils anzuwendende Hersteller- Protokoll den hier empfohlenen bzw. im Einzelfall benötigten Mengen an Ausgangsmaterial anzupassen.

Modifizierte CTAB- Methode:

- Kartoffelblattstück (100 - 200 mg) in ein verschließbares 2 ml-Reaktionsgefäß überführen und in 1 ml CTAB- Extraktionspuffer aufnehmen
- Kartoffelblatt mit einem Mikropistill zerkleinern
- 10 µl RNase A (100mg/ml) zugeben; 30 sec. kräftig mischen, z.B. mit Vortex
- 30 Min. bei 65°C schüttelnd inkubieren (zwischenmisch 3-4 mal kurz vortexen)
- 20 sec. bei 11000xg zentrifugieren
- 25 µl Proteinase K- Lösung zugeben; kräftig mischen, z.B. mit Vortex
- 2 h bei 65°C im Thermomixer unter Schütteln inkubieren
- gelegentlich noch mal zerkleinern und kräftig schütteln
- nicht lysiertes Probenmaterial für 10 min bei 11000xg pelletieren
- 800 µl vom Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführen
- 600 µl Chloroform zugeben und mischen (vortexen)
- zur Phasentrennung 10 min bei 11000xg zentrifugieren obere Phase in ein steriles 2ml Reaktionsgefäß überführen, in dem die gleiche Menge Chloroform vorgelegt wurde; 4-5 mal invertieren, 15sec vortexen
- 5 min bei 11000xg zentrifugieren (RT) bis deutliche Phasentrennung erfolgt ist
- 600 µl der oberen wässrigen Phase abnehmen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- 480 µl Isopropanol zugeben, mischen und 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen (fällen)
- 15 min bei 11000xg zur Pelletierung der DNA zentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Reinigung der gefällten DNA:
- auf das DNA- Pellet 500 µl 75% Ethanol geben und vortexen
- 5 min bei 11000xg zentrifugieren
- Überstand vollständig abnehmen und verwerfen
- Reinigungsschritt wiederholen
- danach nochmals bei 11000xg zentrifugieren und restlichen Überstand vorsichtig und vollständig mit der Pipette abnehmen und verwerfen
- DNA- Pellet 5 Minuten bei Raumtemperatur trocknen
- DNA- Pellet in 200 µl H₂O lösen (schütteln und vortexen)

Optional anschließende Aufreinigung über Qiagen DNeasy- Säule:

- wenn das DNA-Pellet vollständig gelöst ist, 300 µl Puffer AP3/E aus dem DNeasy Plant Mini Kit der Fa. Qiagen zugeben und kräftig schütteln
- 20 sec. bei 11000xg zentrifugieren
- Probenlösung langsam und vorsichtig auf eine DNeasy Mini Spin Column geben und bei 4500xg zentrifugieren
- Filtrat verwerfen und neues 2 ml Reaktionsgefäß unter der Säule anbringen
- Säule dreimal nacheinander mit je 500 µl AW- Puffer (aus dem DNeasy- Kit) waschen
- nach jedem Waschschrift Säule 1 min bei 4500xg zentrifugieren und Filtrat verwerfen
- zur vollständigen Abtrennung der ethanolhaltigen Waschlösung abschließend 90 s bei 11000xg zentrifugieren
- DNeasy mini spin column auf neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß stecken
- 80 µl Elutionspuffer AE (aus dem DNeasy- Kit; auf 65°C vorgewärmt) auf Säule auftragen, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren und 1 min bei 4500xg zentrifugieren
- 30 µl Elutionspuffer AE (auf 65°C vorgewärmt) auf Säule auftragen, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren und 1 min bei 4500xg zentrifugieren
- 30 s bei 11000xg zentrifugieren, Säule verwerfen
- Reaktionsgefäß mit DNA-Eluat (110 µl) verschließen und bei 6°C (± 2°C) im Kühlschrank aufbewahren

Die DNA- Konzentration kann beispielsweise durch Messung im UV/VIS- Spektrophotometer [3], durch Messung der Fluoreszenz mittels PicoGreen im Fluorimeter [4] ermittelt oder nach einer Elektrophorese im Agarosegel abgeschätzt werden.

4.3. PCR-Reaktion

Jede zu untersuchende Probe wird in einem Ansatz zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA mit den Kontroll- Primern A1 /A2 sowie in weiteren Ansätzen mit den Transgen- spezifischen Primern (siehe Anhänge unter 8.) getestet.

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

Beispielhaft werden hier jeweils Reaktionsansätze aufgeführt, bei denen das Endvolumen der Einzelreaktion 25 µl beträgt. Der PCR- Ansatz kann mit anderen Volumina erfolgen, wenn gezeigt worden ist, dass vergleichbare oder bessere Ergebnisse erzielt werden können; die Konzentration der Zutaten ist dann entsprechend anzupassen.

4.3.1. Kontrolle der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA mittels PCR

Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel-PCR- Ansatz
10x Reaktionspuffer	1 x
**MgCl ₂ , 25 mmol/l	1,5 mmol/l
**dNTP-Mix, 10-20 mmol/l je dNTP	0,2 - 0,4 mmol/l je dNTP
Dimethylsulfoxid (p.A.); optional	5 %
<i>Primer A1</i> , 25-50 µmol/l (siehe 3.1.)	0,5 – 1,0 µmol/l
<i>Primer A2</i> , 25-50 µmol/l (siehe 3.1.)	0,5 – 1,0 µmol/l
**Taq- Polymerase (5 units/ µl)	1 unit
steriles Reinstwasser	--
	DNA-Menge im Einzel-PCR- Ansatz
Proben- DNA (5-20 µg/ ml)	optimal: 10 – 40 ng

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

- Es werden jeweils eine PCR-Reagenzienkontrolle (2 µl H₂O statt Proben- DNA), eine Negativ- Kontrolle (z.B. 2 µl bakterielle DNA) und eine Positiv-Kontrolle (2 µl Kartoffel-DNA) mitgeführt.
- Reaktionsansätze in den fest verschlossenen PCR-Gefäßen gut mischen, ggf. mit Mineralöl überschichten 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	

Die PCR- Bedingungen sind für jeden Thermocycler und für die verwendeten Polymerasen einzeln anzupassen, sofern keine zufrieden stellenden Amplifikate erzielt werden.

- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelelektrophorese bei 6°C (± 2°C) lagern

4.3.2 Transgen-spezifische PCR- Nachweise

Die PCR-Reaktionsmixe und die Temperatur-Zeit-Programme für die Transgen-spezifischen PCR- Nachweise sind in den Anhängen unter 8 aufgeführt.

Grundsätzlich gilt bei der Durchführung der PCR-Nachweise folgendes:

- Die Qualität und Quantität der DNA sollte überprüft (z.B. photometrisch) und die DNA-Konzentration gleichmäßig eingestellt werden. In die PCR sollten 10-40 ng DNA eingesetzt werden um optimale Amplifikate zu erhalten.
- Es werden jeweils eine PCR-Reagenzienkontrolle (H₂O statt Proben- DNA), eine Negativ- Kontrolle (PCR mit negativer Kontroll-DNA) und eine Positiv-Kontrolle (PCR mit positiver Kontroll-DNA) mitgeführt.
- Reaktionsansätze in den fest verschlossenen 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 Anhänge unter 8.).
- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelelektrophorese bei 6°C (± 2°C) lagern

4.4. Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Gelelektrophorese der PCR- Produkte erfolgt analog zur SOP „**PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosat- resistenten transgenen Pflanzen**“ des UAM (Unterausschuss „Methodenentwicklung“) des LAG vom März 2002.

4.5 Spezifizierung der PCR - Amplifikate

Zur näheren Spezifizierung der einzelnen PCR-Amplifikate ist beispielsweise deren Sequenzierung oder eine Restriktionsanalyse (siehe Anhänge unter 8.) anzuschließen.

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

5. Auswertung

Negativ- Kontrollen

Sowohl die PCR-Reagenzienkontrolle (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.

Positiv-Kontrollen

Als Positive DNA-Zielkontrolle wird Referenz-DNA oder DNA verwendet, die aus einem zertifizierten Referenzmaterial oder einer bekannten Positivprobe stammt, die für die zu untersuchende Sequenz oder den zu untersuchenden Organismus repräsentativ ist. Die Positivkontrolle muß ein positives Ergebnis ergeben. Wird in der Positivkontrolle kein Amplifikat erhalten, so ist die Funktionalität der PCR-Reagenzien und des Thermocyclers zu prüfen.

Kontrolle der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA

Die Kontroll- PCR mit dem Primerpaar A1/A2 muss bei der untersuchten Kartoffelprobe 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 aus der Probe ist zu wiederholen. Deren Ergebnis ist wiederum in der Kontroll- PCR zu testen.

Transgen-spezifische PCR

Ist in einer Kartoffel- Probe nach der Transgen - spezifischen PCR ein Amplifikat in der erwarteten Größe nachweisbar (siehe Anhänge unter 8.), dessen Sequenz durch Restriktionsanalyse oder Sequenzierung bestätigt wurde, dann enthält diese Probe diese gentechnische Veränderung.

Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt dann vor, wenn in der Probe keine spezifischen Amplifikate nachweisbar sind, die Kontroll- PCR (siehe 4.2.1) mit derselben Probe aber zu einem entsprechenden Amplifikat geführt hat.

6. Validierung

Die Validierung der Transgen- spezifischen PCR- Nachweisverfahren erfolgte in Ringversuchen des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ der B/LAG „Gentechnik“. Die Verfahrenskenndaten für die Einzelverfahren sind in den zugehörigen Anhängen unter 8. aufgeführt.

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] Tinker, N.A.; Fortin, M.G. and D.E. Mather (1993): Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85, 976-984
- [3] Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Nukleinsäureextraktion (ISO 21571:2005); Deutsche Fassung EN ISO 21571:2005
- [4] Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. (1996) PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Res.* 13:2623-2625

8. Anhänge mit den Transgen- spezifischen PCR- Nachweisen

Übersicht (Stand: 20.3.2009):

- Anhang 8.1** PCR- Nachweis der p35S- bar- Übergangssequenz
- Anhang 8.2** PCR- Nachweis der BE1- R1- antisense- Übergangssequenz in Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel (BASF/Solavista)
- Anhang 8.3** PCR- Nachweis des Acetohydroxyacid-Synthase Gens (ahas) in transgenen Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Phythophthora-resistenz (BASF Plant Science GmbH)
- Anhang 8.4** PCR- Nachweis des pHAS3- Konstruktes in Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel (BASF Plant Science GmbH)
- Anhang 8.5** PCR- Nachweis des pAP4 Konstruktes in Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel (BASF Plant Science GmbH)
- Anhang 8.6** PCR- Nachweis der VCPMA16- bzw. VCPMA19- Konstrukte in Kartoffeln mit Phytophthora-Resistenz (BASF Plant Science GmbH)