

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Molekularbiologische Identifizierung von Pilzen mittels ITS-PCR und nachfolgender Sequenzierung	AM028
Erstellt vom <i>Unterausschuss Methodenentwicklung</i> der LAG, März 2011 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur Analyse der Nukleotidsequenz des 5,8S rRNA-Gens und der benachbarten ITS- (Internal Transcribed Spacer) DNA-Sequenz für die Gattungs- und Speziesidentifizierung bei Pilzen [1]. Durch Vergleich der ermittelten ITS-Sequenz und der 5,8S rRNA-Gensequenz eines zu identifizierenden Pilzstammes werden Sequenzähnlichkeiten bestimmt, die als Grundlage für eine Zuordnung zu einer taxonomischen Gruppe herangezogen werden.

Die Nukleotidsequenz dieser Region beträgt etwa 500-600 Basenpaare (Bp). Neben hoch konservierten Bereichen, in denen die Sequenz für alle Pilze identisch ist, kommen über den Bereich des 5,8S rRNA-Gens und der benachbarten ITS-Region verteilt auch variable bis hochvariable Bereiche vor, die als Signatursequenzen für eine Spezies, Gattung oder Gruppe von Pilzen charakteristisch sein können. Die Analyse dieser Teilsequenzen ermöglicht eine taxonomische Zuordnung von Pilzstämmen, um im Rahmen der Gentechniküberwachung gentechnische Arbeiten überprüfen sowie mögliche Pilzkontaminationen nachweisen zu können.

Da die öffentlichen Sequenzdatenbanken weder qualitätsgesichert noch vollständig für alle in Frage kommenden Pilze sind, muss der Anwender von Fall zu Fall entscheiden, ob mit dieser Methode allein oder unter Zuhilfenahme weiterer mikrobiologischer Kriterien eine Identifizierung durchgeführt wird.

2. Kurzbeschreibung

Nach Extraktion der genomischen DNA aus einer Reinkultur des zu untersuchenden Pilzes wird die Sequenz des 5,8S rRNA Gens und des benachbarten ITS-Genombereiches mit dem Primerpaar ITS-1/ ITS-4 mittels PCR amplifiziert (Abb.1).

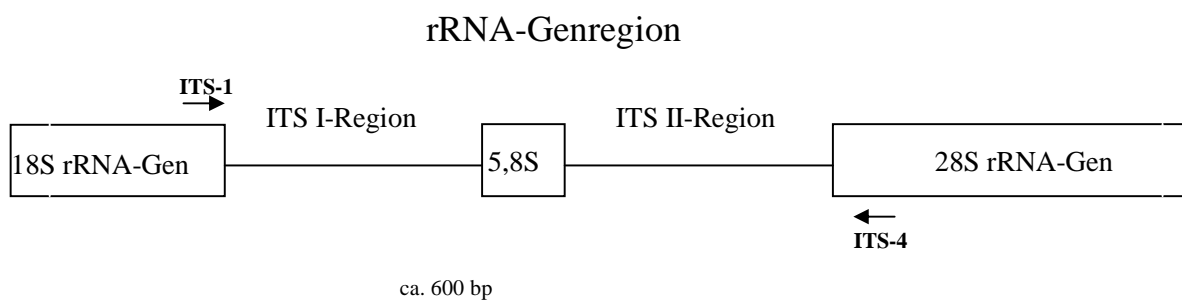


Abbildung 1: Schematische Darstellung der rRNA-Gene und der ITS-Region bei Pilzen

Nach Aufreinigung des PCR-Produktes wird dieses im weiteren Verlauf der Untersuchung mit den spezifischen PCR-Primern sequenziert. Die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenz erfolgt über eine Da-

tenbankrecherche, aus der sich durch den Grad der Übereinstimmung mit hinterlegten Sequenzen die Identifizierung der Spezies, Gattung oder Gruppe von Pilzen ergibt.

Anmerkung: Diese Methode wurde in einem Ringversuch (siehe Punkt 7.3.1) auf Basis der Sanger-Sequenzierung mit dem so genannten Cycle Sequencing [2] validiert. Nach Aufreinigung der Sequenzierungsansätze wurden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mittels Multi-Color Detektion aufgezeichnet und automatisch ausgelesen.

Andere Verfahren zur Sequenzierung können angewendet werden, sofern sie zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

3. Chemikalien

Es sind analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Chemikalien und Kunststoffmaterialien zu benutzen. Das verwendete Wasser muss bidestilliert oder von vergleichbarer Qualität sein.

- 3.1 DNA-Extraktionskit
- 3.2 Desoxynukleosid-triphosphat-(dNTP-)Lösung, enthaltend dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils c = 10 mmol/l
- 3.3 ggf. MgCl₂-Lösung (c = 25 mmol/l)
- 3.4 Thermostabile DNA-Polymerase für hot-start-PCR mit geeignetem PCR-Reaktionspuffer
- 3.5 Ethanol, σ = 96%
- 3.6 Aufreinigungs-kit für PCR-Produkte
- 3.7 Oligonukleotide (siehe Tabelle 1)

Tabelle 1: Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur
ITS-1	5`TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3`	52 °C
ITS-4	5`TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3`	52° C

4. Geräte und Hilfsmittel

Kunststoffmaterialien müssen für molekularbiologische Zwecke geeignet sein. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.

- 4.1 Kühlbare Tischzentrifuge für Mikrolitergefäße mit einer Zentrifugalbeschleunigung bis 13000 x g
- 4.2 Laborheizblock mit Schüttelvorrichtung und Temperaturregulierbarkeit bis auf 65 °C
- 4.3 Reagenzglasschüttler
- 4.4 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße
- 4.5 dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße
- 4.6 Variable Kolbenhubpipetten

- 4.7 aerosolgeschützte Einmal-Pipettenspitzen, 1 µl – 1000 µl
- 4.8 Einmal-Handschuhe (puderfrei)
- 4.9 Zentrifugierbare Silikamembran-Säulen und Auffanggefäße
- 4.10 Thermocycler
- 4.11 Internetfähiger Computer
- 4.12 DNA-Sequenzierer

5. Probenahme und Probenvorbereitung

Es ist sicherzustellen, dass die Untersuchungsprobe als Reinkultur vorliegt und für die Laborprobe repräsentativ ist [3, 4].

Die genomische DNA wird aus einer frisch gewachsenen Reinkultur der zu untersuchenden Pilzprobe isoliert [5]. Für die Extraktion und Aufreinigung von genomischer DNA aus Pilzen eignen sich kommerzielle Kits.

6. Durchführung

Hinweis: Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmaßnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind einzuhalten [6]. Bei allen Arbeitsschritten sind Einmal-Handschuhe zu tragen, gegebenenfalls sind diese zwischen den Verfahrensschritten zu wechseln.

6.1 PCR zur Amplifikation des 5,8S rRNA-Gens und der ITS-Region

Die Verfahrensbeschreibung gilt für Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 25 µl je PCR-Ansatz. Das Reaktionsgemisch wird immer als Mastermix mit den in Tabelle 2 angegebenen Reagenzien hergestellt. Der Mastermix enthält mit Ausnahme der DNA-Probe alle Einzelbestandteile des Reaktionsatzes. Jede zu untersuchende Probe wird mit dem Primerpaar ITS-1/ ITS-4 amplifiziert.

Für die Durchführung der PCR gelten die allgemeinen Anforderungen und Definitionen, die in der Amtlichen Methode G 00.00-5 [6] beschrieben sind.

Hinweis: Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionen in geeigneten Gefäßen angesetzt. Alle Reagenzien werden schonend aufgetaut, vor der Verwendung kurz zentrifugiert und während des Pipettierens auf Eis oder in einem Kühlblock gelagert.

Es wird empfohlen, ca. 5 % mehr Mastermix als nötig herzustellen, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen.

- Den Mastermix gut mischen, kurz zentrifugieren und pro PCR-Ansatz 24 µl in die Reaktionsgefäße pipettieren.
- 1 µl Proben-DNA (ca. 10 – 50 ng DNA) zum PCR-Ansatz hinzupipettieren; in die Kontroll-PCR-Ansätze sind die jeweils vorgesehenen Kontrollproben hinzuzugeben.
- Reaktionsansätze in den geschlossenen PCR-Gefäßen gut mischen und kurz zentrifugieren.

- Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur-Zeit-Programm starten (siehe Tabelle 3).

Parallel zu den PCR-Ansätzen für die zu analysierende Probe sind folgende Kontrollen mitzuführen:

- PCR-Reagenzienkontrolle (1 µl Reinstwasser statt der Probe)
- PCR-Positivkontrolle (genomische DNA aus einem Pilz, z.B. *Aspergillus alliaceus*), die mit den gewählten Primern amplifizierbar ist)
- PCR-Ansatz mit negativer Extraktionskontrolle (z.B. Nährmedium)

Tabelle 2: Reaktionsansatz

Reagenz (Stammlösung)	Endkonzentration
10 x PCR-Reaktionspuffer	1 x
MgCl ₂ ¹	1,5 mmol/l
dNTP-Mix ¹	je dNTP 0,1 mmol/l
Forward-Primer ITS-1	0,4 µmol/l
Reverse-Primer ITS-4	0,4 µmol/l
Thermostabile Hot-Start DNA Polymerase ¹	0,5-1 unit
Wasser	--
¹ Reagenz nur zusetzen, wenn nicht bereits im PCR-Reaktionspuffer enthalten	

6.2 Temperatur-Zeit-Programm

Für die hier beschriebenen PCR-Ansätze hat sich das in Tabelle 3 angegebene Temperatur-Zeit-Programm bewährt.

Tabelle 3: Temperatur-Zeit-Programm für die PCR mit den Primern ITS-1/ITS-4

Schritt	Parameter	Temperatur	Zeit	Zyklen	
1	Initiale Denaturierung / Aktivierung der Hot-Start-DNA-Polymerase*	95 °C	10 min*	1	
2	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	20 s	35
		Anlagerung (Annealing)	52 °C	30 s	
		Verlängerung (Elongation)	72 °C	90 s	
3	Verlängerung (Elongation)	72 °C	10 min	1	

* Aktivierungszeit abhängig von der eingesetzten Hot-Start DNA-Polymerase

6.3 Lagerung

Nach Beendigung des PCR-Programms sind die PCR-Reaktionsansätze bei 6 ± 2°C im Kühlschrank zu lagern oder direkt weiter zu bearbeiten.

6.4 Analyse und Auswertung der PCR-Produkte

Ein kleiner Volumenanteil jedes PCR-Ansatzes (z.B. 5 µl) wird mittels Elektrophorese (z.B. 1 % Agarosegel) aufgetrennt und über ein Geldokumentationssystem ausgewertet. In den Pilzproben sowie in der Positivkontrolle sollte ein etwa 500 – 900 Bp großes PCR-Fragment deutlich nachweisbar sein. In der Negativkontrolle und der negativen Extraktionskontrolle sollten keine Amplifikate gebildet werden.

6.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Amplifikate sind mit Hilfe eines geeigneten Verfahrens, z.B. mit einem Kit aufzureinigen, um Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen aus dem PCR-Ansatz zu entfernen. Die aufgereinigten PCR-Produkte werden bis zur Sequenzierung bei 6 ± 2 °C aufbewahrt. Die Dauerlagerung erfolgt bei -20 ± 2 °C.

6.6 Sequenzierung des PCR-Produkts

Die Sequenzierung des PCR-Amplifikates erfolgt entsprechend der verfügbaren Methode. Eine in der Praxis bewährte Methode stellt die Kapillarelektrophorese dar.

Die Nukleotidsequenz des Amplifikates wird mit den in der PCR verwendeten Primern aus beiden Orientierungen so weit bestimmt, dass eine ausreichende Auswertung über Datenbankvergleich (siehe 6.7, Tab. 4) möglich ist.

6.7 Auswertung der Sequenzierung

Die editierten DNA-Sequenzen müssen für die weitere Auswertung in eine geeignete DNA-Analyse-Software geladen und mittels Datenbankvergleich analysiert werden. Die Qualität der erzielbaren Resultate bei der Identifizierung von Pilzen auf Basis von rRNA-Gensequenzen hängt in erster Linie von der benutzten Referenzdatenbank ab. In vielen Fällen ist die öffentliche und universelle, sehr umfangreiche NCBI Datenbank [7] für die Auswertung geeignet, die Datenbanken von Gene Bank, EMBL und DDBJ enthält (Achtung: nicht qualitätskontrolliert).

Die zu verwendenden Parameter zur Identifizierung der erhaltenen, editierten Sequenz über eine Datenbanksuche sind der Qualität und Länge der Sequenz in Bezug auf den verwendeten Algorithmus anzupassen.

Die erhaltenen Übereinstimmungen mit den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen werden tabellarisch festgehalten. Der tabellarische Auswertungsbogen der Datenbankanalyse enthält neben den Angaben zur Zugangsnummer („accession number“) und Sequenzbeschreibung ähnlicher Sequenzen die Informationen zur Beurteilung der Sequenzübereinstimmung. Entscheidend für die Beurteilung ist die Punktzahl („score“), die zur quantitativen Beurteilung der Sequenzübereinstimmung zwischen Suchsequenz und Datenbanksequenz heranzuziehen ist. Der „score“ sollte mindestens 700 bits betragen; der „e-value“ als Angabe der Wahrscheinlichkeit, Sequenzen mit dem gleichen Score zu finden, sollte möglichst gegen Null gehen und die Sequenzübereinstimmung sollte bei ≥ 98 % liegen.

7. Leistungsmerkmale der Methode

7.1 Spezifität der Datenbanksuche

Die Qualität des Ergebnisses des Sequenzvergleichs hängt ab von der Diversität der Organismengruppe, zu der das Pilzisolat gehört, den Fehlern bei der Bestimmung der Nukleotidsequenz und der Quantität und Qualität der Datenbank.

Damit kann die Spezifität dieser Methode von einer Organismengruppe zur anderen Organismengruppe stark schwanken. Bei einigen Pilzgruppen wird eine Identifizierung bis zur Speziesebene möglich sein, bei anderen nicht. Allerdings kann auf der Grundlage dieser ersten Zuordnung entschieden werden, ob und welche zusätzlichen mikrobiologischen und/oder molekularbiologischen Untersuchungen (z.B. speziesspezifische PCR) zur weiteren Charakterisierung bzw. Identifizierung der vorliegenden Pilze notwendig sind.

7.2 Spezifität der 5,8S rRNA-Gen/ ITS-PCR

Die für die Amplifizierung des 5,8S rRNA-Gens und des ITS-Genombereiches verwendeten Primer sind universelle Primer, die für diese Genombereiche bei Pilzen spezifisch sind. Dies wurde empirisch durch Abgleich der GenBank-Sequenzdatenbank mittels blastn und experimentell in zahlreichen Veröffentlichungen [1] bestätigt.

7.3 Zuverlässigkeit der Methode

7.3.1 Ringversuch

Diese Methode wurde im April 2009 in einem Ringversuch des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik für einige Pilzspezies validiert (Koordination BY, NI). Am Ringversuch nahmen neun bundesdeutsche Überwachungslaboratorien teil. An die Teilnehmer des Ringversuches wurden als codierte Proben 5 Pilzkulturen und 5 genomische DNA-Proben (10 ng/µl) der Pilzspezies *Aspergillus alliaceus*, *Mucor genevensis*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* sowie DNA von *Aspergillus alliaceus* als Positivkontrolle weitergegeben.

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte mit dem UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Fa. Mobio) bzw. in einem Labor mit dem Tissue Kit (Fa. Qiagen) nach Zymolyase-/Lytikase-Vorbehandlung.

Mit Hilfe des Primerpaares ITS-1/ITS-4 wurden die 5,8S rRNA-Gen/ ITS-Teilsequenzen mit unterschiedlichen Thermocyclern (z.B. Biometra, Life Technologies - Applied Biosystems, Eppendorf) amplifiziert und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) aufgereinigt. Die Sequenz wurde mit Hilfe der Multicolor-Detektionstechnik in Kapillarsequenzierern bestimmt (ABI 310; ABI 3100; Beckman CEQ 8000).

Mit jedem der hier aufgeführten Primer wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt, so dass 2 Sequenzen pro Probe zur Verfügung standen. Die einzelnen, editierten Nukleotidsequenzen der jeweiligen Proben wurden über das Internet bei NCBI mit dem blastn Algorithmus [7] gegen eine allgemeine, redundante Nukleotid-Datenbank abgeglichen. Zur Datenbankrecherche wurden die in der Tabelle 4 angegebenen Einstellungen verwendet.

Tabelle 4: Einstellungen zur Datenbankrecherche im Ringversuch

Database	Optimize for	General Parameters	Scoring Parameters Matrix	Filters and Masking Filter
nucleotide collection (nr/nt)	somewhat similar sequences (blastn)	max target sequences: 100	match/mismatch scores: 1, -2	low complexity regions: YES
		short queries: Yes	gap costs: existence: 0; extension: 2	mask for lookup table only: YES
		expect threshold: 10		
		word size: 11		

Alle teilnehmenden Laboratorien konnten die kodierten Proben in der erwarteten Weise den oben genannten Pilzen zuordnen. Die Pilzstämme *Aspergillus alliaceus*, *Mucor genevensis* und *Fusarium culmorum* konnten mit dieser Methode bis auf Speziesebene von den Ringversuchsteilnehmern identifiziert werden. Wie erwartet, ließ sich bei den Pilzstämmen *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrysogenum* und *Aspergillus niger* die Gattung nicht eindeutig bestimmen (s. Tabelle 5).

Bei der Probe *Aspergillus niger* (s. Tabelle 5, *) wurde von 3 Laboren in der Sequenzierung *Penicillium sp.* nachgewiesen, was sich nach morphologischer Untersuchung auf eine geringfügige Beimischung in den Ursprungproben zurückführen ließ, die durch Zwischenkultivierung in den Laboren angereichert worden war. Die Ergebnisse dieser Labore für diese Probe wurden in der Gesamtauswertung nicht berücksichtigt.

Tabelle 5: Ergebnisse des Ringversuches zur Identifizierung von Pilzen

Organismus	Probe	Anzahl eingereicherter Ergebnisse	Anzahl angenommener Ergebnisse	Anzahl der Labore eindeutig identifiziert		Ergebnisse gemäß blastN
				Gattung	Spezies	
<i>Aspergillus alliaceus</i>	DNA	9	9	9	9	<i>Aspergillus alliaceus</i>
<i>Mucor genevensis</i>	DNA	9	8	7	7	<i>Mucor genevensis</i>
	Pilzisolat	9	8	8	8	
<i>Fusarium culmorum</i>	DNA	9	9	9	9	<i>Fusarium culmorum</i>
	Pilzisolat	9	9	9	9	
<i>Fusarium graminearum</i>	DNA	9	9	9	0	<i>Fusarium sp.</i> (= <i>Gibberella sp.</i>) <i>Colleotrichum</i>
	Pilzisolat	9	9	9	0	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DNA	9	9	6	1	<i>Penicillium sp.</i> <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. commune</i> , <i>Hyalodendron sp.</i> , <i>Botryosphaeria sp.</i>
	Pilzisolat	9	9	7	0	
<i>Aspergillus niger</i>	DNA	9	7*	6	0	<i>Aspergillus sp.</i> <i>A. niger</i> , <i>A. vadensis</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>Verticillium bulbillosum</i> <i>Gliocladium cibotii</i>
	Pilzisolat	9	6*	5	0	

7.3.2 Laborinterne Validierung

In einigen Laboren wurden bisher über 100 verschiedene Pilzstämme aus Stammsammlungen, Routineproben oder Ringversuchen mit diesem Verfahren untersucht.

Unter den überprüften Stämmen waren folgende Gattungen vertreten:

Absidia, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Eurotium*, *Emericella*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Klyveromyces*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pichia*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Rhynosporium*, *Saccharomyces*, *Schizophyllum*, *Sporobolomyces*, *Stephanoascus*, *Tremella*, *Wallemia*, *Yarrowia*.

Von 55 untersuchten Pilzisolaten verschiedener Gattungen konnten mit dieser Methode (Annealingtemperatur 55°C, AmpliTaq Polymerase) im Vergleich zu herkömmlichen mikrobiologischen Methoden 49 Pilze bis zur Spezies, Gattung oder Ordnung identifiziert werden. Eine Übereinstimmung auf Speziesebene wurde bei 41 Isolaten bzw. bei einem Isolat auf Gattungsebene erreicht.

Sieben Isolate, die mikrobiologisch bis auf Speziesebene identifiziert wurden (*Penicillium nalgiovense*, *Penicillium griseofulvum*, *Candida kefir*, *Penicillium claviforme*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium camberti* und *Aspergillus ochraceus*) konnten durch Sequenzierung auf Gattungsebene übereinstimmend erkannt werden. Zwei auf Gattungsebene (*Tremella*, *Sporobolomyces*) mit mikrobiologischen Methoden identifizierte Isolate ließen sich mittels Sequenzierung einmal nur bis auf Familienebene und einmal nicht mehr auf Phylumebene (Basidiomycota/Ascomycota) korrekt zuordnen. Ein mikrobiologisch auf Gattungsebene identifiziertes Isolat konnte mittels Sequenzierung bis zur Spezies bestimmt werden (*Wallemia sebi*).

Vier Isolate konnten nicht hinreichend identifiziert werden. Es handelte sich hierbei um die Spezies *Alternaria alternata*, *Absidia corimbifera*, *Sporobolomyces spez.* und *Aspergillus candidum*.

8. Literatur

- [1] White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990). Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, pp. 315-322. New York, Academic Press.
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Press
- [3] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, Band VI (G), G 00.00-1: Probenahme- und Untersuchungsverfahren für die Gentechniküberwachung – Allgemeine Anforderungen und Hinweise
- [4] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, Band VI (G), G 20.00-1: Nachweis und Identifizierung von Bakterien und Pilzen – Allgemeine Hinweise und Anforderungen
- [5] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, Band VI (G), G 00.00-4: Verfahren zur Nukleinsäureextraktion – Allgemeine Anforderungen und Hinweise
- [6] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, Band VI (G), G 00.00-5: Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – Allgemeine Anforderungen und Hinweise
- [7] National Center for Biotechnology Information. Basic Local Alignment Search Tool (blast) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>