

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Nachweis von persistierenden Agrobakterien in transgenen Kulturpflanzen und deren mikro- und molekularbiologische Charakterisierung	AM005
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, September 2000 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Agrobacterium tumefaciens ist ein Gram-negatives, peritrich begeißeltes Bodenbakterium aus der Familie der Rhizobien, welches ubiquitär, vor allem in der Rhizosphäre von Pflanzen verbreitet ist. *Agrobacterium tumefaciens* ist aufgrund seines Ti-Plasmides, welches durch Integration ins pflanzliche Genom Pflanzenkrebs induzieren kann, als pflanzenpathogen einzustufen (Clare, B.G. 1994. *Agrobacterium. Biological plant disease control.*, S. 129-146). Unter Berücksichtigung der §§5 und 7 sowie Anhang I Gentechniksicherheitsverordnung wurden Agrobakterien in der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten in Risikogruppe 1 eingestuft (s. auch Stellungnahme der ZKBS 6790-10-52 vom August 1997).

Agrobakterien werden heute routinemäßig zur Transformation höherer Pflanzen eingesetzt. Die Pflanzentumor-induzierenden Gene werden dazu aus dem Ti-Plasmid eliminiert und durch die gewünschten Transgene ersetzt. Die für die Transformation verwendeten Agrobakterien können keine Pflanzentumoren induzieren.

Nach der Pflanzentransformation und Regeneration der gentechnisch veränderten Pflanze d.h. einer erfolgreichen Integration eines Bereiches aus dem Ti-Plasmid mit der gentechnischen Veränderung (von LB bis RB) ins pflanzliche Genom, lassen sich transgene Agrobakterien insbesondere im unteren Stengelbereich und in der Wurzel noch über Monate nachweisen. Die Agrobakterien scheinen jedoch nicht über den Samen an die Nachkommen weitergegeben zu werden, (Matzk et al. 1996. *Molecular Plant Microbe Interaction MPMI 9*: 373-381).

Da lebensfähige, rekombinante Agrobakterien in den transgenen Pflanzen das Risiko eines horizontalen Gentransfers erhöhen könnten, sollten in den zur Freisetzung kommenden Pflanzen keine transgenen Agrobakterien mehr nachweisbar sein. Im Rahmen der Überwachung von Freisetzungsexperimenten mit gentechnisch veränderten Pflanzen ist daher der Nachweis persistierender rekombinanter Agrobakterien, insbesondere bei Primärtransformanden empfehlenswert.

2. Kurzbeschreibung

In Anlehnung an eine Arbeit von Matzk et al. (Localization of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant Microbe Interaction MPMI 9* (1996): 373-381) wurde für die Gentechniküberwachung eine Methode zur Anreicherung und mikrobiologischen sowie molekularbiologischen Identifizierung persistierender Agrobakterien mit einer chromosomalen Rifampicin-Resistenz erarbeitet.

Das hier vorgestellte Nachweisverfahren basiert auf folgenden Arbeitsschritten:

- Anreicherungskultur für Agrobakterien
- Biochemische Charakterisierung der isolierten Bakterienkolonien
- Durchführung der PCR, Amplifikation der spezifischen Sequenzen
- Analyse der PCR-Produkte, Größenbestimmung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese
- Spezifizierung der PCR-Produkte

3. Materialliste

3.1 Chemikalien:

Esculin (DIFCO Lab. Bestell-Nr. 0158-12)
Harnstoffagar Basis (DIFCO Lab. Bestell-Nr. 0283-17)
Oxgall (DIFCO Lab. Bestell-Nr. 0128-17)
Eisencitrat
Fleischextrakt
Hefeextrakt
 α -Lactose
Agar
 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$
tri-Na-Citrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$
 $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
Rifampicin
Cycloheximid (Sigma)
Tetracyclin
Kanamycin
Ampicillin
Streptomycin
Tween 20
Proteinase K
Tris
EDTA
Essigsäure
10 x dNTP: 2 mM dATP
 2 mM dCTP
 2 mM dGTP
 2 mM dTTP
Primer virG-1F; 25 μM ; (5' GCC GAC AGC ACC CAG TTC AC 3')
 (Pos. 367-385/ pTi15g55/virG; Access.Nr. X 62885)
Primer virG-2R; 25 μM ; (5' GCC GTA AGT TTC ACC TCA CC 3')
 (Pos. 727-747/ pTi15g55/virG ; Access.Nr. X 62885)
Primer virD-2C; 25 μM ; (5' ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT 3')
 (Pos. 17651-17670/ (C58) Ti_vir; Access.Nr. J03320)
Primer virD-2F; 25 μM ; (5' TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA 3')
 (Pos. 17851-17875/ (C58) Ti_vir; Access.Nr. J03320)
Kontroll-DNA
Hitzestabile DNA-Polymerase mit geeignetem Puffer 5U/ μl
(optimal: HotStart Enzym)
Ficoll 400
Xylene Cyanol FF
Agarose
Ethidiumbromid
DNA Längenstandard

3.2 Geräte

Schüttelbrutschrank / 28 °C
Mikroliterreaktionsgefäße
PCR-Reaktionsgefäße
Mikropipetten
Mikrozentrifuge
Thermocycler
Apparatur für horizontale Elektrophorese mit Netzgerät
UV-Durchlichtkasten
Foto- oder Video-Dokumentation

4. Medien und Lösungen

LB-Medium 10 g/l Hefeextrakt
 5 g/l Bacto Trypton
 5 g/l NaCl
 für Agarplatten zusätzlich: 18 g Agar/ l

3-Ketolactose - Agar für *Agrobacterium tumefaciens*:
 10 g/ l α -Lactose
 10 g/ l Hefeextrakt
 20 g/ l Agar

Benedict´s Reagenz
 256 g/l $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$
 132 g/l tri-Na-Citrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$
 13,2 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

Gallensalz-Esculin-Agar
 3 g/ l Fleischextrakt
 5 g/ l Pepton
 40 g/l Oxgall
 1 g/l Esculin
 0,5 g/ l Eisencitrat
 15 g/ l Agar
 Medium in destilliertem Wasser lösen und 20 Min. bei 121 °C autoklavieren. Abkühlen und Agarplatten gießen.

Urease-Agar 29 g Bacto Urea Agar Base in 100 ml entionisiertem Wasser lösen und sterilfiltrieren (nicht autoklavieren !!!)
 15 g Agar in 900 ml entionisiertem Wasser lösen und 20 Min. bei 121 °C autoklavieren;
 Agar auf 50-55 °C abkühlen und Urea Agar Base-Lösung steril zugeben; Agarplatten gießen

Lysispuffer 100 mM Tris-HCl pH 8,5
 0,05 % Tween 20
 240 ug Proteinase K / ml
 frisch ansetzen

TE: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 1 mM EDTA

TAE-Puffer: 50x Stammlösung:
242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Ladepuffer: 0,25 % (w/v) Xylencyanol
15 % (w/v) Ficoll 400
in 1x Elektrophoresepuffer

Färbe-Stammlösung: 10 mg Ethidiumbromid/ml TE
Färbe-Arbeitslösung: 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Elektrophoresepuffer

5. Kontrollstämme

A. tumefaciens C58C1 (chromosomale Rif-R) mit pEHA 101 (Hood et al. 1986), einem T-DNA freien Ti-Plasmid mit Km-R; Urease-positiv, Esculin-positiv, Ketolactonat-Bildung

E. coli K12/DH5 Urease-negativ, Esculin-negativ, keine Ketolactonat-Bildung

6. Durchführung

6.1 Anreicherungskultur

- ca. 0,1 g Pflanzenmaterial in 1 ml LB-Medium in 2 ml Mikroliterreaktionsgefäß mit einem sterilen Pistill homogenisieren (Material von unterschiedlichen Pflanzenteilen, wie Wurzeln, Blätter etc. getrennt aufarbeiten)
- homogenisiertes Pflanzenmaterial in 20 ml LB-Medium + 100 µg/ml Cycloheximid geben; bei Nachweis von Agrobakterienstämmen mit chromosomaler Antibiotikaresistenz kann darüberhinaus der Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (z.B. 10 µg/ml Rifampicin bei Stamm C58C1) die Selektivität der Anreicherung erhöhen.
- Inkubation 3 Tage bei 28 ° C und 100 Upm auf dem Rotationsschüttler
- 0,1 ml bzw. 0,2 ml der Anreicherungskultur und ggf. Verdünnungen (falls die Kulturen stark getrübt sind) ausplattieren auf LB-Agar + Rif 10 (je 2 Parallelansätze)
- Inkubation der Agarplatten für 2 Tage bei 28 ° C
- für die biochemische Identifizierung werden Agrobakterien-ähnliche Kolonien zunächst auf eine LB-Stammplatte mit sterilen Zahnstochern ausgestrichen und bei 28 ° C inkubiert
- ausgehend von der LB-Stammplatte werden die isolierten Kolonien mittels biochemischer und molekularbiologischer Nachweisverfahren identifiziert und differenziert

Ketolactose-Test (KLT)
Gallensalz-Esculin-Agar
Urease-Nachweis
Antibiotika-Resistenzspektrum
PCR-Nachweis

- Bakterien von der LB-Stammplatte auf die entsprechenden Testnährböden (s. 6.2) ausstreichen

6.2. Biochemische Methoden zur Identifizierung von Agrobakterien

6.2.1 Ketolactose-Test (KLT)

(nach Bernaerts, M.J. & J. De Ley (1963): A biochemical test for crown gall bacteria. Nature 26: 406-407)

Die zu untersuchenden Bakterien (max. 10 Kolonien pro Platte testen) werden auf α -Lactose-Agarplatten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert. Anschließend wird die Agaroberfläche mit 4 ml Benedict's Reagenz überschichtet und bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Bei 3-Ketolactose-Bildung entsteht nach einigen Stunden durch die Reduktion des CuSO_4 in Cu_2O ein gelber Ring um die Bakterienkolonien. Der KLT weist spezifisch *A. tumefaciens* (Biovar 1) und somit auch *A. tumefaciens* C58C1 Stämme nach.

6.2.2. Esculinverwertung auf Gallensalz-Esculin-Agar

Die zu untersuchenden Bakterien (max. 10 Kolonien pro Platte testen) werden auf dem Gallensalz-Esculin-Agar ausgestrichen und 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert.

Bakterien, die Esculin spalten können, wie z.B. *A. tumefaciens* bilden nach 1-2 Tagen dunkelbraun/ schwarze Kolonien; Bakterien, die Esculin nicht verwerten können, z.B. *Escherichia coli* K12 sind als helle Kolonien zu erkennen.

6.2.3. Urease-Nachweis

Die zu untersuchenden Bakterien (max. 10 Kolonien pro Platte testen) werden auf dem Ureaseagar ausgestrichen und 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert.

Bakterien, die Harnstoff mittels Urease in CO_2 und NH_3 spalten können, wie z.B. *A. tumefaciens* bilden nach 1-2 Tagen pinkfarbene Höfe um die Kolonien (stark diffundierend!); Bakterien, die keine Urease besitzen, z.B. *Escherichia coli* K12 sind als gelbliche Kolonien zu erkennen.

6.2.4. Antibiotika-Resistenzspektrum

Die zu untersuchenden Bakterienkolonien sind auf die im verwendeten Vektor vorliegenden Antibiotikaresistenzen zu testen. Dazu werden die Kolonien auf LB-Agarplatten ausgestrichen, denen Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugesetzt wurden:

(LB+Kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; LB+Tetracyclin 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; LB+Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; LB+Streptomycin). Alternativ kann auch ein Antibiogramm mit den entsprechenden Antibiotika gestempelt werden.

6.3 Auswertung der biochemischen Nachweisverfahren

A. tumefaciens C58C1 (chromosomale Rif-R) mit pEHA 101 (Hood et al. 1986), einem T-DNA freien Ti-Plasmid mit Km-R; Urease-positiv, Esculin-positiv, Ketolactonat-Bildung

7. PCR-Nachweis von Ti-Plasmid bzw. Ti-Plasmidderivate tragenden Agrobacterium tumefaciens Stämmen

7.1 Aufarbeitung der Bakterien-Proben

- die zu untersuchenden Agrobakterien-Kolonien auf LB-Agarplatten auf Einzelkolonien ausstreichen
- 2 Tage bei 28 ° C inkubieren
- Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium animpfen
- 2 Tage bei 28 ° C inkubieren
- 5 ul Flüssigkultur in 500 ul Lysispuffer pipettieren
- 1 h schüttelnd bei 60 ° C inkubieren
- 15 Min. bei 97 ° C erhitzen (Proteinase K inaktivieren)
- auf Eis abkühlen
- 30 sec. vortexen
- 1 ul des Lysat in die PCR- Reaktion einsetzen

Alternativ können die Bakterien auch in Wasser durch 15 Min. Kochen bei 97 ° C aufgeschlossen werden (dann entfällt der Proteinase-Aufschluss in Lysispuffer bei 60 ° C)

7.2 PCR-Reaktion

Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionsansätze in geeigneten Gefäßen durchgeführt. Für die Voruntersuchungen wurde ein "TRIO-Thermocycler" der Fa. Biometra und dünnwandige 200 µl PCR-Gefäße der Fa. Biozym, (Best. Nr. 711921) verwendet.

7.2.1 Reaktionsansatz

Alle Reagenzien werden während des Reaktionsansatzes auf Eis gelagert. Das Endvolumen der Reaktion beträgt 50 µl.

- Herstellen des Mastermix für n Ansätze:

n x 5 µl 10 X PCR-Puffer

n x 5 µl 10 X dNTP (200 µM)

n x 1 µl Primer virG-1F (0,5 µM) bzw. virD-2C

n x 1 µl Primer virG-2R (0,5 µM) bzw. virD-2F

n x 36 µl H₂O

- In jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert:

48 µl Mastermix

1 µl Probe (DNA)

1 µl Taq-Polymerase (1 U; HotStart Enzym, z.B. Amplitaq-Gold *)

Es wird eine eine Negativ- Kontrolle (1 ul H₂O statt Probe) und eine Positivkontrolle (1 ul A. tumefaciens C58C1/ pEH101 Bakterienlysate) mitgeführt.

- Reaktionsansätze ggf. mit 1 Tropfen (ca. 10 ul) Mineralöl überschichten (aus 100 ul Spitze tropfen lassen)
- Reaktionsansätze in geschlossenen Gefäßen mischen und ggf. kurz zentrifugieren
- die Gefäße in den auf 94 ° C vorgeheizten Thermocycler stellen
- *alternativ zum HotStart Enzym kann konventionelle Taq-Polymerase auch jetzt zugesetzt werden, "Hot Start"
- Temperatur-Zeit-Programm starten
- nach Ablauf der Amplifikation die Reaktionsansätze bei 4 ° C lagern.

7.2.2 Temperatur-Zeit-Programm:

- 1 x 10 min bei 95 °C (Aktivierung der Amplitaq- Gold-Polymerase) *
- 35 x Denaturierung 30 sec bei 94 °C
- Annealing 30 sec bei 60 °C
- Reaktion 60 sec bei 72 °C
- 1 x 10 min bei 72 °C

* Wird eine konventionelle Taq-Polymerase eingesetzt, so muß die einmalige Denaturierung auf 2 Min. verkürzt werden.

8. Analyse der PCR-Produkte

8.1 Elektrophorese

Die Produkte in den Reaktionsansätzen werden durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

- 1,0 % ige Agaroselösung in 1 x Elektrophoresepuffer in der Mikrowelle aufkochen
- nach Abkühlen auf 60 °C das verdampfte Wasser ergänzen
- die Lösung auf den Geltisch gießen und den Probenkamm einsetzen
- Gel bei Raumtemperatur erstarren lassen (ca. 30 Min.)
- Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen und etwa 2 mm mit 1 x Elektrophoresepuffer überschichten
- Probenkamm vorsichtig herausziehen
- je 15 ul der Proben mit 3 ul Ladepuffer mischen und in die Probenaschen einfüllen
- an mindestens einer Position einen DNA-Längenstandard auftragen

Die Elektrophorese wird bei etwa 5 V/cm durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese ist abhängig von der Geometrie der Elektrophoresekammer. Der Farbstoff Xylencyanol sollte etwa bis zur Mitte des Gels wandern.

Nach der Elektrophorese wird das Gel in die Färbe-Arbeitslösung überführt und für mindestens 15 Minuten unter ständigem Schwenken gefärbt. Danach erfolgt die Entfärbung in Elektrophoresepuffer oder Wasser für 15 Minuten.

Die DNA wird auf dem UV-Durchlichtkasten sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

9. Auswertung der PCR-Analysen

Ist in den Bakterienkolonien das für Ti-Plasmide spezifische virG-DNA Fragment vorhanden, muß eine Bande mit der Größe von 380 Basenpaaren zu sehen sein. Ein gleichartiges Ergebnis ist mit den Primern virD-2C/ -2F zu erwarten, wobei jedoch ein 224 Bp großes DNA-Fragment amplifiziert wird und die Amplifikatausbeute etwas niedriger ist.

Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt dann vor, wenn die 380 Bp virG-spezifische Bande und die 224 Bp virD-spezifische Bande in der zu untersuchenden Probe nicht zu sehen ist, in der *A. tumefaciens* C58C1 / pEH101 Positivkontrolle jedoch beide Fragmente amplifiziert wurden.

Theoretisch sollten sowohl virG als auch virD Operone auf den Vektorkonstrukten vorhanden sein; durch Klonierungsstrategien sind die Virulenzregionen jedoch z.T. unterschiedlicher Herkunft, so dass in manchen Fällen nur eines der beiden Primerpaare zur Amplifizierung

führt. Es ist deshalb zu empfehlen jeweils beide Primerpaare zu testen. Der Ti-Plasmid-Nachweis ist positiv zu werten, wenn mindestens 1 Primerpaar zu einem spezifischen Amplifikat geführt hat.

*Im Anschluß an die sichere Identifizierung von Ti-Plasmid-tragenden *Agrobacterium tumefaciens* Stämmen muß der transgenspezifische Nachweis geführt werden, z.B. mittels PCR. Dieser Nachweis ist abhängig von der jeweils zu untersuchenden gentechnischen Veränderung und muß entsprechend angepasst werden.

10. Spezifizierung des PCR-Produktes mittels Restriktionsverdau:

Zur Spezifizierung des 380 Bp großen virG-Amplifikates bzw. des 224 Bp virD-Amplifikates können die PCR-Ansätze mit Restriktionsenzymen gespalten oder alternativ sequenziert werden.

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Anzahl der Schnittstellen</i>	<i>Fragmentgrößen</i>
XhoI	vir G: 1 SST/ Amplifikat	181 Bp/ 199 Bp
Ava I	vir G: 1 SST/ Amplifikat	181 Bp/ 199 Bp
Pst I	vir D: 1 SST/ Amplifikat	110 Bp/ 114 Bp

10.1 Restriktionsansatz:

Der Restriktionansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 15 µl :

- 1,5 µl 10x Restriktionspuffer
- 1 µl Restriktionsenzym (3-10 U)
- 5 µl PCR-Amplifikat (unter dem Öl entnehmen)
- 7,5 µl Bidest

Die Restriktionsansätze werden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und nach Zusatz von 3 µl Ladebuffer das gesamte Volumen auf ein 1,5 % iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt; das Gel wird photographisch dokumentiert und die Fragmentgrößen anhand mitgeführter DNA-Längenstandards bestimmt.

11. Validierung

In den betreffenden Ringversuchen des Unterausschusses Methodenentwicklung wurde sowohl die biochemische Charakterisierung transgener Agrobakterien als auch der spezifische PCR-Nachweis grundsätzlich von allen 8 teilnehmenden Laboratorien erfolgreich durchgeführt.

Die Anreicherungskultur von *A. tumefaciens* und die biochemischen und molekularbiologischen Analysemethoden zur Charakterisierung von *A. tumefaciens* C58C1/ pEH101 wurden in zwei aufeinanderfolgenden Ringtests von 8 Laboratorien erfolgreich angewendet. Zur Validierung der Verfahren wurden außerdem sieben Gram-negative und Gram-positive Bakterienarten, die auch natürlicherweise aus Pflanzenmaterial angereichert werden können, mitgetestet.

In einigen Laboratorien wurden bei den PCR-Analysen bei Abweichungen von der Versuchsvorschrift z.B. bei modifizierter Lyse der Bakterien oder bei PCR-Ansätzen ohne HotStart bei *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen schwache unspezifische Amplifikate mit einer Größe über 400 Bp gebildet. Um eine hohe Spezifität der PCR-Reaktion zu gewährleisten ist es deshalb unbedingt notwendig, die vorgeschriebene Versuchsvorschrift einzuhalten; der Einsatz einer Hot-Start Polymerase ist dringend zu empfehlen.