

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	

Anhang 8.1 PCR- Nachweis der p35S- bar Übergangssequenz

Nachgewiesen wird der Übergang zwischen dem 35S- Promotor aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) und dem bar- Gen aus *Streptomyces hygrosopicus*, welches in gentechnisch veränderten Pflanzen Herbizidtoleranz gegenüber Glufosinat (Basta®) vermittelt. Die Methode kann als Screening-Methode für die häufig verwendete p35S- bar Genkassette verwendet werden. Die p35S- bar Genkassette ist beispielsweise in gentechnisch veränderten Kartoffellinien mit verändertem Stärkestoffwechsel der Firma Solavista GmbH & Co. KG (z.B. verschiedene DPST-Linien mit Vektor BE7-102; Freisetzungsanträge BVL-AZ: 6786-01-142 und -149) enthalten.

Grundlage für die Durchführung der PCR-Nachweise in diesem Anhang ist die Arbeitsanweisung „Qualitative PCR zum Nachweis transgener Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Schädlingsresistenz“; dort finden sich unter anderem Hinweise zum Anwendungsbereich und zur Probenvorbereitung.

8.1.1 Primersequenzen

- Primer **pac1-F**: 5´ CAG AAC TCG CCG TAA AGA CT 3´ (nt 6941-6960, Genbank: V00141)
- Primer **bar-1R** : 5´ CGC TCT TGA AGC CCT GTG CCT 3´ (nt 364-344, Genbank: AY528455)
- Primer **35S-bar1**: 5´ GCA CAA TCC CAC TAT CCT TCG C 3´ [1]
- Primer **35S-bar2**: 5´ TCC GTC CAC TCC TGC GGT TC 3´ [1]

Das PCR- Produkt mit den Primern **pac1-F / bar-1R** ist ca. **900 bp** groß.

Das PCR- Produkt mit den alternativen Primern **35S-bar1/35S-bar2** ist ca. **250 bp** groß [1].

8.1.2 PCR- Reaktionsansatz

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 %
Vorwärts- Primer, 25-50 µmol/l	0,5 – 1,0 µmol/l
Rückwärts- Primer, 25-50 µmol/l	0,5 – 1,0 µmol/l
**Hot-Start- Polymerase (5 U/ µl)	1 U
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®Taq- Mastermix)

8.1.3 Temperatur- Zeit- Programm

1 x	15 min. bei 95°C	(Hot-Start)
35 x	1 min. bei 94°C	(Denaturierung)
	1 min. bei 59°C	(Annealing)
	1 min. bei 72°C	(Synthese)
1 x	5 min. bei 72°C	

Die PCR- Bedingungen, besonders die Annealing- Temperatur, sind gegebenenfalls für den Thermocycler und für die verwendeten Polymerasen einzeln anzupassen.

8.1.4 Restriktionsanalyse

Amplifikat	Enzym	Schnittstellen	Fragmentgrößen
900 bp (<i>pac1-F/bar-1R</i>)	Nco I	1	550 bp + 350 bp
	oder Sal I	1	820 bp + 80 bp
250 bp (<i>35S-bar1/2</i>)	Bgl I	1	ca. 100 bp + 150 bp

8.1.5 Verfahrenskenndaten und Validierung

Die Nachweisgrenze (VB 95%) für die Amplifizierung der *p35S-bar* Zielsequenz mit den beschriebenen Primerpaaren liegt bei 200 pg genomischer Kartoffel-DNA, die die Zielsequenz enthält. Um in der PCR optimale Amplifikatmengen zu erhalten, wird empfohlen bei Analysen mit Blattmaterial zwischen 10-40 ng DNA je Reaktion einzusetzen.

Im Februar 2007 wurde der Nachweis mit dem Primerpaar *35S-bar1/35S-bar2* durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ der Bund/ Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik in einem Ringversuch validiert, an dem 13 bundesdeutsche Überwachungslaboratorien teilnahmen.

Es wurden von jedem Labor 8 Proben untersucht. 5 Proben enthielten mittels CTAB-Aufreinigung isolierte DNA von gentechnisch veränderten Linien mit dem Konstrukt pBE7-102 mit unterschiedlichen Transgen-Anteilen sowie eine DNA-Probe einer nicht transgenen Kartoffellinie. 3 Proben bestanden aus Blattmaterial von gentechnisch veränderten sowie einer nicht gentechnisch veränderten Kartoffelpflanze.

Die DNA-Proben wurden durch Mischen von 100% transgener DNA (Linie DPST0059-0004; Konstrukt BE7-102) mit DNA der nicht gentechnisch veränderten Kartoffellinie (Aveka) eingestellt. Die Gehalte der Proben, die die Zielsequenz enthielten betragen 1% (entsprechen berechneten 111 Kopien der Zielsequenz) bzw. 100% (entsprechen berechneten 11.111 Kopien der Zielsequenz; haploides Kartoffelgenom entspricht 1,8 pg).

Die DNA-Extraktion aus den Blattproben erfolgte in allen Laboren mit dem in der SOP beschriebenen CTAB-Protokoll mit zusätzlicher Säulenaufreinigung. Zusätzlich wurden von einigen Laboren alternative Extraktionsmethoden getestet. Bei der Aufreinigung von DNA

aus Kartoffeln empfiehlt sich nach den daraus vorliegenden Erfahrungen die Verwendung eines CTAB-Protokolls ggf. in Kombination mit zusätzlicher Säulenaufreinigung.

Die Ergebnisse des Ringversuchs sind in der folgenden tabellarischen Darstellung wiedergegeben. Der Ringversuch ergab, dass das Primerpaar **35S-bar1/35S-bar2** in Proben ab einem Gehalt von 1% der transgenen Zielsequenz (entsprechend 111 Kopien) keine falsch-negativen Ergebnisse zeigte.

	Probe							
	A	B	C	D	E	H	I	K
	DNA 5% BE7-102	DNA 0% (Aveka)	DNA 1% BE7-102	DNA 1% BE7-102	DNA 5% BE7-102	Blatt BE7-102	Blatt BE7-102	Blatt (Aveka)
Jahr des Ringversuchs	2007							
Anzahl der Laboren	13							
Anzahl der Laboren, die Ergebnisse vorgelegt haben	13	13	13	13	13	13	13	13
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	13	13	12	12	13	12	12	13
Gesamtzahl der Proben	13	13	12	12	13	12	12	13
Falsch positive Ergebnisse	0	0	0	0	0	0	0	0
Falsch-negative Ergebnisse	0	0	0	0	0	0	0	0

Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	100
Gesamtanzahl untersuchter negativer Proben	26
Gesamtanzahl untersuchter positiver Proben	74
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativen Proben	0

Das Primerpaar *pac1-F/bar-1R* wurde nur in einem Ringvorversuch von 8 Laboren getestet. Da es von 7 Laboren erfolgreich eingesetzt wurde, ist es ebenfalls zum Nachweis des *p35S-bar* Genbereiches geeignet.

8.1.6 Literatur:

- [1] Ehlers, B., Strauch, E., Goltz, M., Kubsch, D., Wagner, H., Maidhof, H., Bendiek, J., Appel, B. und H.-J. Buhk (1997): Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. Bundesgesundhbl. 4/97, 118-121