

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 8.5 PCR- Nachweis des pAP4- Konstruktes in Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel (BASF Plant Science GmbH)

Mit diesem PCR-Nachweis wird der Übergang zwischen dem Promotor und dem darauf folgenden Abschnitt des *gbss*-(granule bound starch synthase) Gens des pAP4- Konstruktes erfasst.

Das **Plasmid pAP4** enthält ein Fragment der *gbss* kodierenden Region als doppelten inverted repeat mit einem Spacer aus *gbss*-Gensequenzen, flankiert vom *gbss*-Promotor (alle aus Kartoffel) und dem *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* (BVL-Az. 6786-01-173; -183, -191). Die Expression des endogenen *gbss*-Gens soll durch RNA-Interferenz inhibiert werden und zu einer Reduzierung der Amylose-Fraktion und damit zu einer Erhöhung des Amylopektin-Anteils in der Kartoffelstärke führen.

Das Konstrukt enthält weiterhin ein aus *Arabidopsis thaliana* modifiziertes *ahas*-Gen als Selektionsmarker. Dabei steht das *ahas*-Gen unter der Kontrolle des *nos*-Promotors und der *ocs* (Octopin-Synthase)-Polyadenylierungssequenz aus *Agrobacterium tumefaciens*.

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.

8.5.1 Primersequenzen (Herkunft BASF Plant Science GmbH)

- **Primer pAP4-F:** 5' TGG TAA CTT TTA CTC ATC TCC TCC AA 3' (nt 943-968 , GenBank: A23740)
- **Primer pAP4-R:** 5' AAA TGC GAG GGT GCC ATA GA 3' (nt 3900-3881, GenBank: A23741)

Optional:

- **Sonde pAP4-S:** 5'- FAM-TATTTCTGATTTTCATGCAGGTCGACTTGCA –TAMRA-3'

Die Größe des PCR- Produktes mit diesen Primern beträgt **77 bp**.

8.5.2 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 mmol/l je dNTP

Dimethylsulfoxid (p.A.); optional	5 %
Primer 1, 20-50 µmol/l	0,8 µmol/l
Primer 2, 20-50 µmol/l	0,8 µmol/l
**Taq- Polymerase (5 U/ µl)	1 U
steriles Reinstwasser	--

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

8.5.3 Temperatur- Zeit- Programm

1 x	10 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 anzupassen.

8.5.4 Restriktionsanalyse

Eine Bestätigung des PCR-Amplifikates ist theoretisch mit dem Restriktionsenzym *AccI* bzw. *SaI* (50bp/30 bp) möglich.

Alternativ kann der PCR-Nachweis als Real-Time PCR unter Verwendung der unter 8.5.1 angegebenen Sonde durchgeführt werden. Dieses Verfahren wurde jedoch nicht in einem Ringversuch validiert.

8.5.5 Verfahrenskenndaten und Validierung

Die Nachweisgrenze (VB 95%) für das beschriebene Primerpaar liegt bei 1000 pg genomischer Kartoffel-DNA. Um in der PCR optimale Amplifikatmengen zu erhalten, wird empfohlen bei Analysen von Blattmaterial zwischen 10-40 ng DNA je Reaktion einzusetzen.

Im September 2008 wurde das Verfahren durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ der Bund/ Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik in einem Ringversuch validiert, an dem 11 bundesdeutsche Überwachungs laboratorien teilnahmen. Es wurden 10 Proben genomischer DNA (20 ng/ µl) der gentechnisch veränderten Linien mit den Konstrukten pHAS3, pAP4 und pVCPMA16 sowie DNA nicht transgener Linien (Kuras, Festien) verschickt. Die Ergebnisse des Ringversuchs sind in der folgenden tabellarischen Darstellung wiedergegeben. Die Gehalte der Proben, die die Zielsequenz enthielten (E, F, G), betrugen 1% (entsprechen berechneten 111 Kopien der Zielsequenz), 5% (entsprechen berechneten 555 Kopien der Zielsequenz) bzw. 100% (entsprechen berechneten 11.111 Kopien der Zielsequenz; haploides Kartoffelgenom entspricht 1,8 pg).

Der Ringversuch ergab, dass das Primerpaar pap4-F/pap4-R in Proben ab einem Gehalt von 5% der transgenen Zielsequenz (entsprechend ca. 500 Kopien) keine falsch-negativen Ergebnisse zeigte.

	Probe									
	A 100% pHAS3	B 1% pHAS3	C 0% (Kuras)	D 0% (Festien)	E 100% pAP4	F 5% pAP4	G 1% pAP4	H 100% VCPMA16	I 5% VCPMA16	J 1% VCPMA16
Jahr des Ringversuchs	2008									
Anzahl der Laboratorien	11									
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Gesamtzahl der Proben	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Falsch positive Ergebnisse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Falsch-negative Ergebnisse	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0

Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	110
Gesamtanzahl untersuchter negativer Proben	77
Gesamtanzahl untersuchter positiver Proben	33
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativer Proben	3