

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 8.6 PCR- Nachweis der VCPMA16- bzw. VCPMA19 Konstrukte in Kartoffeln mit Phytophthora-Resistenz (BASF Plant Science GmbH)

Mit diesem PCR-Nachweis werden gentechnisch veränderten Kartoffellinien, die mit den Konstrukten VCMA16 und VCMA19 transformiert wurden, erfasst. Es wird ein Sequenzbereich des Promotors und der 5´ - nicht-translatierten Region des *Rpi-blb-2*-Gens aus *Solanum bulbocastanum* amplifiziert.

Das Plasmid **VCPMA16** enthält ein genomisches Fragment des *Rpi-blb-2*-Gens aus der Wildkartoffel *Solanum bulbocastanum* (BVL-AZ.6786-01-0183, -191), welches Resistenz gegen *Phytophthora infestans* vermittelt. Flankiert wird dieser Bereich von den endogenen Promotor- und Terminatorregionen. Weiterhin enthält dieses Plasmid das *Rpi-blp-1*-Gen, das ebenfalls aus *S. bulbocastanum* stammt und wie das *Rpi-blb-2*-Gen von den endogenen Promotor- und Terminatorregionen begrenzt wird. *Rpi-blb1* und *Rpi-blb2* kodieren für Proteine des NBS-LRR (nucleotide binding site-leucine rich repeat)-Typs.

Das Plasmid **VCPMA19** ist wie das Plasmid VCPMA16 aufgebaut (BVL-AZ. 6786-01-0183), und unterscheidet sich von diesem nur durch eine um ca. 1600 bp längere Promotor- und Terminatorsequenz des *Rpi-blb-1* Gens.

Gentechnisch veränderte Kartoffellinien, die mit diesen Konstrukten transformiert wurden, enthalten zusätzlich das *ahas*-Gen (*acetohydroxyacid synthase*) aus *Arabidopsis thaliana*, flankiert vom *nos*-Promotor und der *nos*-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.

8.6.1 Primersequenzen (Herkunft BASF Plant Science GmbH)

- Primer **VCPMA16F**: 5´ TCT AGA TCC CCG GTC GAC TCT 3´
- Primer **VCPMA16R**: 5´ TTC GAA AAGTGC AAC ATG ACA AAT 3´
(nt 1503-1480, GenBank: AY426259)
- Sonde **VCPMA16-S** (ggf. zur Bestätigung): 5´ FAM - AGG ATC CCC ACT CCA TCC GTTCAC TT – TAMRA-3´

Das Primerpaar **VCPMA16F/R** eignet sich zum **Nachweis von** transgenen Kartoffellinien, die mit den **Plasmiden VCPMA16 und VCPMA19** transformiert wurden. Die Größe des PCR- Produktes mit diesen Primern beträgt **75 bp**.

Die nachfolgend, informativ aufgeführten Primer dienen zum spezifischen Nachweis eines Sequenzbereichs aus dem Vektoranteil des pVCPMA19 Plasmids; sie wurden nicht im Ringversuch validiert.

- Primer **VCPMA19F**: 5´ AAC TTA ATT TCA GCA GAC AGT CAT GAT C 3´
(nt 317-344, GenBank: AY426259)
- Primer **VCPMA19R**: 5´ TTG TCT GGA ATA TAC TAT TAC CTT GAG AGT AAT 3´
(nt 445-413 , GenBank: AY426259)
- Sonde **VCPMA19-S** (MGB-Probe; (ggf. zur Bestätigung):
5´-TCAATCTACTTGTGCACA -3´

Die Größe des PCR- Produktes mit diesen Primern beträgt **128 bp**.

8.6.2 PCR-Reaktionsansatz

Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel-PCR- Ansatz
10x Reaktionspuffer	1 x
**MgCl₂, 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)

8.6.3 Temperatur- Zeit- Programm

1 x	10 min. bei 95°C	(Hot-Start)
35 x	1 min. bei 94°C	(Denaturierung)
	1 min. bei 58°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.

8.6.4 Restriktionsanalyse

Eine Bestätigung des PCR-Amplifikates ist theoretisch mit *BamHI* bzw. *XhoI* (50bp/ 30bp) möglich.

Alternativ kann der PCR-Nachweis als Real-Time PCR unter Verwendung der unter 8.6.1 angegebenen Sonde durchgeführt werden. Dieses Verfahren wurde jedoch nicht im Ringversuch validiert

8.6.5 Verfahrenskenndaten und Validierung

Die Nachweisgrenze für das beschriebene Primerpaar liegt bei 200 pg genomischer Kartoffel-DNA. Mischungen mit Gehalten von 1% transgener DNA (entsprechen berechneten 111 Kopien der Zielsequenz) in nicht transgener Kartoffel-DNA werden unter optimalen Bedingungen erkannt. Es 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 Überwachungslaboratorien 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 (H, I, J), 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 VCPMA16F/ VCPMA16R in Proben ab einem Gehalt von 5% der transgenen Zielsequenz (entsprechend ca. 500 Kopien) keine falschnegativen 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	0	0	0	3

Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	111
Gesamtanzahl untersuchter negativer Proben	78
Gesamtanzahl untersuchter positiver Proben	33
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativer Proben	3