

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
PCR-Nachweis der pSSUAra / bar - Genkassette in transgenen Kulturpflanzen	AM008
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2001 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis einer gentechnisch erzeugten Resistenz gegen Glufosinat-Herbizide ("BASTA") in Pflanzen (*bar*-Gen), die mit einem System zur Hybriderzeugung (*barnase*- und *barstar*-Gen) gekoppelt ist (Mariani, C. et al. 1990, Nature **347**, 737-741 und Mariani, C. et al. 1992, Nature **357**, 384-387).

Für derart gentechnisch veränderten Winterraps (MS1/RF1) liegt in der EU bereits eine Genehmigung zum Inverkehrbringen vor.

Mit dieser Methode werden sowohl MS1/RF1 bzw. 2- Hybriden als auch MS8/RF3- Hybriden erfasst. Nachgewiesen wird eine Genkassette, die aus dem Promotor des Gens für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase aus *Arabidopsis thaliana* (pSSUAra) und aus dem *bar*- Gen besteht. Das *bar*-Gen stammt aus *Streptomyces hygroscopicus* und codiert für eine Phosphinotricin-Acetyltransferase, wobei die Ähnlichkeit zur *pat*-Gen-codierten Phosphinotricinacetyltransferase über 80 % beträgt.

Nach Extraktion der Gesamt-DNA wird mittels spezifischer PCR in MS1/RF1+2- Hybriden ein 624 bp großes, in MS8/RF3- Hybriden dagegen ein 454 bp großes spezifisches DNA-Fragment vervielfältigt und gelelektrophoretisch nachgewiesen.

Zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten Pflanzen-DNA wird zusätzlich eine konservierte Chloroplasten - tRNA - Sequenz vervielfältigt [Taberet, P., Gielly, L., Pautou, G. und J. Bouvet: Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17(1991): 1105-1109]. Die Fragmentgröße der Kontroll-PCR ist abhängig von der eingesetzten Pflanzenart (Raps: 400 bp; Mais: 550 bp).

2. Kurzbeschreibung

Der Nachweis beruht auf einer PCR (Polymerase Chain Reaction) und besteht aus folgenden Arbeitsschritten:

- Isolierung der Gesamt-DNA aus Pflanzen (auch Keimlinge, Samen)
- Durchführung der Kontroll-PCR und der pSSUAra / *bar* -spezifischen PCR
- Agarosegelelektrophorese
- Spezifizierung des PCR-Produktes (Restriktionsanalyse)

3. Material

3.1. Chemikalien:

Ammoniumacetat
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
Chloroform
EDTA
Eisessig
Ethanol
Isopropanol
Natriumchlorid
Phenol
RNase
Tris
HCl
Isoamylalkohol

dNTP- Mix (20 mM dATP, 20 mM dCTP, 20 mM dGTP, 20 mM dTTP)

Primer PGS-bar-A2: 5'GAA GTT GAC CGT GCT TGT CT 3'

Primer PGS-bar-B2: 5'CAA GTC CAC CAG GCA AGT AA 3'

Primer A1: 5'CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3'

Primer A2: 5'GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3'

Positiv-Kontroll-DNA (Referenz)

Taq- Polymerase mit geeignetem Puffer

Hot-Start-Polymerase mit geeignetem Puffer

Restriktionsenzyme mit geeignetem Puffer

Bromphenolblau

Glycerin

Agarose

Ethidiumbromid

DNA- Längenstandard (z. B. 100 bp - Leiter)

3.2. Geräte:

Eppendorfreaktionsgefäße

PCR-Reaktionsgefäße

Mikropistille

Mikroliterpipetten

Mikroliter-Kühlzentrifuge

Wasserbad oder Thermoblock (bis 65°C)

Thermocycler

Elektrophorese-Apparatur (horizontal)

UV-Transilluminator

Polaroid- oder Video-Dokumentationssystem

3.3. Lösungen

CTAB- Extraktionspuffer	1,4 M NaCl 0,1 M Tris-HCl 20 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 autoklavieren und vor Gebrauch 2 % CTAB zusetzen, unter Rühren lösen
Phenol / Chloroform / IAA	25 : 24 : 1
Chloroform / Isoamylalkohol	24 : 1
4M Ammoniumacetat	
1x TE	10 mM Tris-HCl pH 7,8 1 mM EDTA pH 8,0
5x Ladebuffer	0,1 M EDTA (pH 8,0) 40 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer (50x TAE)	242g Tris 57,1ml Eisessig 100ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) oder
Elektrophoresepuffer (10x TBE)	108g /l Tris Base 55g/l Borsäure 9,3g/l EDTA pH 8,0
Färbe-Arbeitslösung	0,5µg Ethidiumbromid / ml Elektrophoresepuffer

4. Durchführung

4.1. DNA- Gewinnung

4.1.1. Lagerung der Proben

Pflanzenproben (Blattmaterial, Stengel, Wurzeln, Knollen usw.) werden von grobem Schmutz befreit und bei - 20°C in geeigneten Behältnissen (Plastiktüten u.ä.) gelagert. Trockene Samen werden trocken und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

4.1.2. Isolation der Gesamt-DNA aus Pflanzen

Die Extraktionsmethode beruht auf einem Verfahren von Tinker et al. [Tinker, N.A.; Fortin, M.G. and D.E. Mather. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85 (1993): 976-984]. Es können sowohl Samen als auch Blätter als Probenmaterial aufgearbeitet werden. Es empfiehlt sich, insbesondere Rapssamen auf feuchtem Filterpapier 5-6 Tage bei Raumtemperatur und normaler Beleuchtung auszu-keimen und die DNA-Isolierung an den Keimblättern durchzuführen.

Protokoll (Schnellmethode):

- 200mg Probenmaterial in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Probenmaterial mit Hilfe von flüssigem Stickstoff verspröden
- Gewebe mit Mikropistill zerreiben
- Probe in 500µl CTAB-Extraktionspuffer aufnehmen
- 60 Minuten bei 65 °C inkubieren, ggf. weiter zerkleinern
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 200µl Chloroform (100%) versetzen, vorsichtig mischen (**kein** VORTEX !)
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- obere (wäßrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 0,6 Volumen (300µl) Isopropanol versetzen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500µl 70%-igem Ethanol waschen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- DNA- Pellet trocknen und in 50µl 0,1x TE auflösen
- für die PCR sollten die Proben 1 : 6 verdünnt werden

Die nach dieser Schnellmethode isolierte DNA kann in vielen Fällen direkt in der PCR eingesetzt werden; andernfalls ist eine Aufreinigung erforderlich.

Aufreinigung der Pflanzen- DNA :

(modifiziert nach Gebhardt et al. 1989; Theor. Appl. Genet. 78: 65-75)

- DNA in insgesamt 200µl 0,1x TE lösen
- 1,5µl RNase (15 units) zusetzen
- mindestens 15 Minuten bei 37°C inkubieren
- mit 1 Volumen Phenol extrahieren; vorsichtig mischen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- obere (wäßrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahieren; vorsichtig mischen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- obere (wäßrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 2 Volumen absolutem Ethanol und 1/20 Volumen 4 M NH₄-Acetat fällen
- 15 Minuten bei -70°C oder über Nacht bei -20°C inkubieren
- 30 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500µl 70%-igem Ethanol waschen
- 10 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- DNA- Pellet trocknen und in 50µl 0,1x TE auflösen

Anmerkung: Alternativ können auch käufliche DNA-Extraktions-Kits verwendet werden. Für die PCR sollten die Proben anschließend 1 : 6 verdünnt werden.

4.2. PCR

Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionen in geeigneten Gefäßen angesetzt.

Jede zu untersuchende Probe wird in einem Ansatz zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA mit den Kontroll- Primern A1 / A2 und Taq-Polymerase sowie in einem zweiten Ansatz mit den pSSUAra / bar - spezifischen Primern *PGS-bar-A2* und *PGS-bar-B2* und Hotstart-Polymerase (z. B. "Hotstar", QIAGEN) getestet.

4.2.1. Kontrolle der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA

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

- Mastermix für n Ansätze: n x 40,8µl bidest. H₂O
n x 5 µl 10 x PCR- Puffer mit MgCl₂ (1,5 mM)
n x 1 µl dNTP-Mix (20 mM)
n x 1 µl Primer A1 (25 pmol/µl)
n x 1 µl Primer A2 (25 pmol/µl)
n x 0,2 µl Taq- Polymerase (5u/µl)
- in jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert: 1µl Proben- DNA
49µl Mastermix
- Es werden jeweils eine Leerkontrolle (1µl H₂O statt Proben-DNA), eine Negativ- Kontrolle (z. B. Bakterien-DNA) und eine Positiv- Kontrolle (z. B. Referenzprobe) mitgeführt.
- Reaktionsansätze gut mischen, ggf. mit Mineralöl überschichten und kurz zentrifugieren; Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur- Zeit- Programm starten:
 - 1 x 3 min. bei 94°C
 - 35 x 1 min. bei 94°C (Denaturierung)
1 min. bei 60°C (Annealing)
2 min. bei 72°C (Synthese)
 - 1 x 10 min. bei 72°C
- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelanalyse (s. 4.2.3) bei 4°C lagern

4.2.2. Spezifische PCR

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

- Mastermix für n Ansätze: n x 36,8µl bidest. H₂O
n x 5µl 10 x PCR- Puffer mit MgCl₂ (1,5 mM)
n x 1µl dNTP - Mix (20 mM)
n x 1µl Primer PGS- bar- A2 (25 pmol/µl)
n x 1µl Primer PGS- bar- B2 (25 pmol/µl)
n x 0,2µl Hotstart- Polymerase (5 u/ µl)
- in jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert: 5µl Proben- DNA
45µl Mastermix

- Es werden jeweils eine Leerkontrolle (5µl H₂O statt Proben- DNA), eine Negativ- Kontrolle (z. B. nicht transgene Pflanzen-DNA) und eine Positiv- Kontrolle (z. B. Referenzprobe) mitgeführt.

- Reaktionsansätze gut mischen, ggf. mit Mineralöl überschichten und kurz zentrifugieren; Reaktionsgefäße in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur- Zeit- Programm starten:

1 x	15 min. bei 95°C (Hot Start)
40 x	1 min. bei 94°C (Denaturierung)
	1 min. bei 54°C (Annealing)
	1 min. bei 72°C (Synthese)
1 x	10 min. bei 72°C

- nach Ablauf der PCR die Reaktionsansätze bis zur Gelanalyse (s. 4.2.3) bei 4°C lagern

4.2.3. Gelanalyse der PCR-Produkte

Die PCR - Amplifikate werden in einer Agarose- Gelelektrophorese analysiert:

- 1,0 % Agarose in 1 x Elektrophoresepuffer auflösen
- auf ca. 60°C abkühlen lassen, verdampftes Wasser ersetzen
- die Lösung in die Gelkammer gießen, Probenkamm einsetzen
- Gel bei Raumtemperatur erstarren lassen (ca. 30 Minuten)
- Gel in die Elektrophorese- Apparatur einsetzen und etwa 2 mm hoch mit 1 x Elektrophoresepuffer bedecken
- Probenkamm vorsichtig entfernen
- je 15µl der PCR- Amplifikate mit 3 µl Ladepuffer mischen und in die Probenaschen füllen
- an mindestens einer Position des Gels einen DNA- Längenstandard auftragen
- Elektrophoresebedingungen: ca. 5 V/cm; Dauer: ca. 45 Minuten (der blaue Farbstoff sollte etwa bis zur Mitte des Gels wandern)
- nach der Elektrophorese das Gel in die Färbe-Arbeitslösung überführen und für mindestens 15 Minuten unter ständigem Schwenken färben
- danach 15 Minuten in Wasser entfärben
- Die PCR- Amplifikate werden auf dem UV- Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

4.3. Spezifizierung der PCR - Amplifikate

Zur Spezifizierung der pSSU_{Ara} / *bar* -Amplifikate können Restriktionsenzyme eingesetzt oder die PCR- Amplifikate sequenziert werden.

Folgende Enzyme sind für eine Restriktionsspaltung geeignet:

<i>Hybride</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Zahl der Schnittstellen</i>	<i>Fragmentgrößen</i>
MS1/RF1+2	Hind III	1	357 bp + 267 bp
MS8/RF3	Hind III	1	187 bp + 267 bp

Ein Restriktionsansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 30µl:

3µl	10x Restriktionpuffer
3µl	Restriktionsenzym (10 units/µl)
10µl	PCR - Amplifikat
14µl	H ₂ O

Die Restriktionsansätze werden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, danach durch Zusatz von 6µl Ladepuffer abgestoppt. 20µl des Ansatzes werden auf ein 3%-iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird fotografisch dokumentiert, und die Fragmentgrößen werden anhand mitgeführter DNA-Längenstandards ermittelt.

4.2.4. Auswertung der PCR

Ist in einer Probe nach spezifischer PCR und Agarose-Gelelektrophorese eine Bande der Größe 624 bp zu erkennen, dann ist diese Probe transgen und enthält die pSSUAra / *bar* - Genkassette. Es handelt sich dann um die Linie MS1/RF1 oder RF2 ("PGS- Raps").

Ist in einer Probe nach spezifischer PCR und Agarose-Gelelektrophorese eine Bande der Größe 454 bp zu erkennen, dann ist diese Probe transgen und enthält die pSSUAra / *bar* - Genkassette. Es handelt sich dann um die Linie MS8/RF3 (RKI- AZ: 90, Aventis).

Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt dann vor, wenn keine spezifische Bande erhalten wurde, die Kontroll- PCR mit derselben Probe aber zu einem Amplifikat geführt hat.

5. Validierung

In den betreffenden Ringtests des Unterausschusses Methodenentwicklung wurden die spezifische PCRNachweise der eingangs beschriebenen MS1/RF1 bzw. 2- Hybriden und MS8/RF3- Hybriden (*bar*-Gen gekoppelt mit einem System zur Hybriderzeugung, *barnase*- und *barstar*-Gen) von allen 11 teilnehmenden Laboratorien erfolgreich durchgeführt.