

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 8.3 PCR- Nachweis des Acetohydroxyacid-Synthase-Gens (*ahas*) in transgenen Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Phytophthora-Resistenz (BASF Plant Science GmbH)

Nachgewiesen werden Bereiche innerhalb des modifizierten *ahas*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* in gentechnisch veränderten Kartoffeln der Firma BASF Plant Science GmbH, deren Stärkestoffwechsel durch Einführen der Konstrukte pAP4 oder pHAS3 modifiziert wurde bzw. die eine Phytophthoraresistenz basierend auf den Konstrukten VCPMA16 und VCPM19 aufweisen. Der Nachweis des *ahas*-Gens kann als Screening-Methode für diese gentechnisch veränderten Kartoffellinien eingesetzt werden.

Zur anschließenden Spezifizierung der Linien eignen sich die Methoden der Anhänge 8.4 bis 8.6.

Anmerkung: Für ein Screening potenziell transgener Kartoffelpflanzen eignen sich ebenfalls die Sequenzen des *nos*-Terminators und des *nos*-Promotors.

Das Enzym Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS) katalysiert in Pflanzen die ersten Schritte in der Biosynthese einiger Aminosäuren und ist damit Ziel verschiedener Klassen von Herbizidwirkstoffen. Deren Wirkung beruht auf einer Störung der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren, was zum Absterben der Pflanze führt.

Ein aus *Arabidopsis thaliana* modifiziertes *ahas*-Gen dient als Selektionsmarker in den transgenen Kartoffellinien mit den Konstrukten pAP4, pHAS3, VCPMA16 und VCPM19. Dabei steht das *ahas*-Gen unter der Kontrolle des *nos*-Promotors und der *ocs* (Octopin-Synthase)-Polyadenylierungssequenz des *Agrobacterium tumefaciens* und verleiht den Kartoffelpflanzen eine Herbizidtoleranz.

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.

8.3.1 Primersequenzen

- Primer **at-ahas1F** 5´ TCA ACA ACA GCT TGC GAT TC3´
(nt 1082-1101, GenBank: X51514; Dr. S. Feldmann)
- Primer **at-ahas2R** 5´ TCC CCG TAA GCT CAA CAA AC 3´
(nt 1284-1265, GenBank: X51514; Dr. S. Feldmann)
- Primer **at-ahas3F:** 5´ ACT CCC TCT CCA ACC AAA C 3´
(nt 531-549, GenBank: X51514; Dr. S. Feldmann)

Die Größe des PCR- Produktes mit dem sensitiveren Primerpaar **at-ahas1F/ at-ahas2R** beträgt theoretisch **200 Bp** mit dem Primerpaar at-ahas3F/ at-ahas2R **733 bp**.

8.3.2 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	0,1 mmol/l je dNTP
Dimethylsulfoxid (p.A.); optional	5 %
<i>Primer 1</i> , 20-50 µmol/l	0,4 µmol/l
<i>Primer 2</i> , 20-50 µmol/l	0,4 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)

8.3.3 Temperatur- Zeit- Programm (Primer: atahas1F/atahas2R)

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.

8.3.4 Restriktionsanalyse

Amplifikat	Enzym	Schnittstellen	Fragmentgrößen
at-ahas3F/at-ahas2R			
770 bp	MluI	1	ca. 350bp /420 bp

8.3.5 Verfahrenskennndaten und Validierung:

Die Nachweisgrenze des Verfahrens mit dem Primerpaar **at-ahas1F/2R** liegt bei 200 pg genomischer Kartoffel DNA, für das Primerpaar **at-ahas3F/at-ahas2R** bei etwa 1000 pg. Im Ringversuch wurde das Verfahren durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ der Bund/ Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik im September 2008 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 (Primerpaar at-ahas3F/2R | Primerpaar at-ahas1F/2R).

Die Gehalte der transgenen DNA betragen 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 zeigte, dass das Primerpaar at-ahas1F/2R empfindlicher ist als das at-ahas3F/2R Primerpaar; jedoch bei 1% Gehalt der transgenen Zielsequenz vereinzelt auch falsch-negative Ergebnisse auftreten können.

	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 11									
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	6 8	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	6 8	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9
Gesamtzahl der Proben	6 8	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9	6 9
Falsch positive Ergebnisse	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Falsch-negative Ergebnisse	0 0	3 0	0 0	0 0	0 0	2 0	4 1	0 0	3 0	4 3

Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	60 89
Gesamtanzahl untersuchter negativer Proben	12 18
Gesamtanzahl untersuchter positiver Proben	48 71
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0 0
Gesamtanzahl falsch negativer Proben	16 4