

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 8.4 PCR- Nachweis des pHAS3- Konstruktes in Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel (BASF Plant Science GmbH)

Mit diesem PCR Nachweis wird der Übergang des 3'-Endes des *gbss*- (granule bound starch synthase) Promotors zum 3'-Ende des invertierten *be2*- Gens (GenBank AR123355) erfasst.

Das **Plasmid pHAS3** enthält Fragmente der *be1* und *be2* (branching enzyme) – kodierenden Regionen aus Kartoffel als doppelten inverted repeat unter der Kontrolle des *gbss*-Promotors aus Kartoffel und der *nos*- (nopaline synthase)-Polyadenylierungssequenz aus *Agrobacterium tumefaciens* (BVL-Az- 6786-01-172). Diese Elemente inhibieren in transgenen Kartoffelpflanzen die Expression der endogenen *be1*- und *be2*-Gene und führen zur Reduktion der Amylopektin-Fraktion zu Gunsten des Amylose-Gehaltes.

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* (Octopine-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.

8.4.1 Primersequenzen

Primer **pGBSS-3F**: 5' TAGTGGAGGGAGGGACCAGT 3'
(nt 181-200, GenBank A23740; Dr. S. Feldmann)

Primer **BE2-3R**: 5' TGCCGTCAAACATGTTTCAGT 3'
(nt 1229-1210, GenBank: AJ011889; Dr. S. Feldmann)

8.4.2 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 %
Primer 1, 20-50 µmol/l	0,4 µmol/l
Primer 2, 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)

8.4.3 Temperatur- Zeit- Programm

1 x	10 min. bei 95°C	(Hot-Start)
35 x	1 min. bei 94°C	(Denaturierung)
	1 min. bei 60°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.

Die Größe des PCR- Produktes mit diesen Primern beträgt **490 bp**.

8.4.4 Restriktionsanalyse

Amplifikat	Enzym	Schnittstellen	Fragmentgrößen
490 bp (pGBSS-3F/BE2-3R)	<i>Apa I</i>	2	310 bp + 160 bp + 20bp

8.4.5 Verfahrenskenndaten und Validierung

Die Nachweisgrenze für das beschriebene Primerpaar lag laborintern bei etwa 100 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 betragen 1% (entsprechen berechneten 111 Kopien der Zielsequenz) bzw. 100% (entsprechen berechneten 11.111 Kopien der Zielsequenz; haploides Kartoffelgenom entspricht 1,8 pg).

Der Ringversuch zeigte, dass das Primerpaar pGBSS-3F/BE2-3R in Proben mit einem Gehalt von nur 1% der transgenen Zielsequenz in vielen Laboren falsch-negative Ergebnisse ergibt. Aus den Ergebnissen des Ringversuches kann keine Nachweisgrenze abgeleitet werden, da keine Proben mit 5% der transgenen Zielsequenz untersucht wurden.

	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	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gesamtzahl der Proben	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Falsch positive Ergebnisse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Falsch-negative Ergebnisse	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0

Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	100
Gesamtanzahl untersuchter negativer Proben	80
Gesamtanzahl untersuchter positiver Proben	20
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativer Proben	7