

| | |
|---|--------------|
| Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik | |
| Real-time PCR Verfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter Rapslinien mit dem bar/T-g7-Genkonstrukt | AM025 |
| Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, November 2009 | |
| Status: verabschiedet | |

1 Einleitung

Rapslinien, die das bar/Tg7-Genkonstrukt tragen, sog. SeedLink[®]-Rapslinien wie z.B. Ms1, Ms8, Rf1, Rf2, Rf3 sowie ihre Kreuzungsprodukte, sind gentechnisch veränderte Linien, die eine Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat aufweisen. Die Herbizidtoleranz dieser Rapslinien wird durch die Expression des aus *Streptomyces hygroscopicus* stammenden *bar*-Gens erreicht [1]. Das Gen kodiert für das Enzym Phosphinothricin-Acetyl-Transferase, welches Glufosinat in eine biologisch unwirksame Form umwandelt.

Zur aktuellen Zulassungssituation dieser Rapslinien wird auf das Gemeinschaftsregister genetisch veränderter Lebensmittel und Futtermittel und Entscheidungen auf Grundlage der Richtlinie 2001/18/EG verwiesen [2, 3, 4].

2 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Screening-Verfahren zum Nachweis bestimmter gentechnisch veränderter Rapslinien. Es eignet sich für die Untersuchung von DNA-Isolaten aus verschiedenen Matrices, insbesondere aus vegetativem Raps-Pflanzenmaterial und Raps-Saatgut. Der konstrukt-spezifische Nachweis mittels Real-time PCR zielt auf die Übergangssequenz zwischen dem *bar*-Gen und dem aus *Agrobacterium tumefaciens* stammenden Terminator T-g7 ab. Durch die Ermittlung des bar/T-g7 spezifischen Anteils in Bezug auf ein rapsspezifisches Referenzgen [Acetyl-CoA-Carboxylase (*BnAccg8*-) Gen] mit dem Standardkurvenverfahren unter Verwendung sogenannter Hybridmoleküle können Rückschlüsse auf die Menge von transgenem Raps im Untersuchungsmaterial gezogen werden [5, 6, 7]. Zur nachfolgenden Spezifizierung und sicheren Quantifizierung des relativen Anteils bestimmter SeedLink[®]-Rapslinien sind event-spezifische Methoden zu verwenden. Die Methode erlaubt den Nachweis von gentechnisch veränderten Sequenzen ab einem GVO-Anteil von 0,045 %.

3 Verfahren

In der vorliegenden Methode werden die Übergangsregion des *bar*-Gens zum T-g7 Terminator einerseits und ein Fragment des rapsspezifischen *BnACCg8*-Referenzgens andererseits mittels Real-time PCR in zwei Reaktionen amplifiziert. Die Größe der Amplifikate beträgt 121 bp (bar/T-g7) bzw. 101 bp (*BnACCg8*).

Für die Abschätzung des relativen gv Gehalts werden als Quantifizierungsstandards Verdünnungen eines Hybridmoleküls benutzt, welches die Zielsequenzen der *bar/T-g7*-Genkassette und des *BnAccg8*-Gens im Verhältnis 1:1 beinhaltet.

4 Geräte, Materialien und Reagenzien

Diese Methode wurde vom Unterausschuss Methodenentwicklung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik mit Real-time PCR-Geräten verschiedener Hersteller (ABI 7500, ABI 7000, MX3000P und iCycler) und des 2x TaqMan Universal PCR Mastermix der Firma Applied Biosystems validiert. Werden andere Geräte oder Reagenzien verwendet, so sind die Geräteeinstellungen bzw. Reaktionsbedingungen gemäß den Herstellerangaben anzupassen.

4.1 Geräte und Materialien

Kunststoff- und Glasmaterialien dürfen nur verwendet werden, wenn sie steril sind. Zur Vermeidung von Kontaminationen wird die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dringend empfohlen.

- Real-time PCR-Gerät
- Tischzentrifuge
- Kolbenhubpipetten (diverse Volumina)
- Einmalhandschuhe (puderfrei)
- PCR-Verbrauchsmaterial:
 - 96-Well PCR-Mikrotiterplatten
 - passende Abdeckungen für PCR-Mikrotiterplatten
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
 - sterile Reaktionsgefäße (diverse)

4.2 Reagenzien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- steriles deionisiertes Wasser
- 2x TaqMan Universal PCR Mastermix
- Primer und Sonden (siehe Tabelle 1)
- Synthetische Quantifizierungsstandards:
Die Quantifizierungsstandards, bestehend aus einer Verdünnungsreihe von Hybridmolekülen in einem Konzentrationsbereich von ca. 10 bis 10⁵ Kopien/μl, sind auf Anfrage über den Unterausschuss Methodenentwicklung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (www.lag-gentechnik.de) zu beziehen. Die Herstellung erfolgt nach dem in [5, 7] beschriebenen Verfahren.

Tabelle 1: Sequenzen von Primern und Sonden [7]

| Name | Oligonukleotid-Sequenz (5´-3´) |
|---------------------------|---|
| bar/T-g7.F | GGT ACC GCC CCG TCC G |
| bar/T-g7.R | ACT GAG TGC GAT ATT ATG TGT AAT ACA T |
| BnACCg8.F | GAA GTT AGT TCG AGC CTG TGT T |
| BnACCg8.R | GAC CAA TGG AAC GAA TGT CTA ATA G |
| bar/T-g7.S ^(a) | FAM- TCC TGC CCG TCA CCG AGA TC -TAMRA |
| BnACCg8.S ^(a) | VIC- TGT TCG TCC TTC ATC TCG CTC G -TAMRA |

^(a) Gleichwertige Reporter- und/oder Quencherfarbstoffe dürfen verwendet werden, wenn gezeigt wird, dass sie zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen. Es ist dabei nicht zwingend erforderlich, unterschiedliche Reporterfarbstoffe zu verwenden, da die PCR-Nachweise getrennt durchgeführt werden.

5 Hinweise zur Qualitätssicherung

5.1 PCR-Reaktionen und Kontrollen

Proben und Kontrollen sollten mindestens in Doppelbestimmung analysiert werden.

In jeder Testdurchführung sollten gemäß den Allgemeinen Anforderungen der Amtlichen Methodensammlung nach §28b GenTG [8], die dort angegebenen Kontrollen mitgeführt werden und zu den erwarteten Ergebnissen führen. In Tabelle 2 sind die Kontrollen für die vorliegende SOP konkret aufgelistet:

Tabelle 2 – Kontrollen für die PCR-Analyse

| | Negative Prozesskontrolle ^a | Positive Prozesskontrolle ^a | Negative Extraktionskontrolle ^b | Positive Extraktionskontrolle ^b | PCR-Inhibitionskontrolle ^c | Positive Kontroll-DNA ^d | PCR-Reagenzienkontrolle ^d |
|---|--|--|--|--|---------------------------------------|--|--------------------------------------|
| Probenaufbereitung | Nicht transgene Rapslinie | Seed-Link [®] -Rapslinie | | | | | |
| Nukleinsäureextraktion | ↓ | ↓ | Nicht transgene Rapslinie oder Wasser | Seed-Link [®] Rapslinie | | | |
| Amplifikation | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | Amplifikationskontrolle | Seed-Link [®] -Rapslinie (mind. 30-50 Kopien) | Wasser |
| Nachweis des PCR- Produktes | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| erwartetes Ergebnis des PCR-Nachweises | negativ | positiv | negativ | positiv | positiv | positiv | negativ |
| ^a Die Häufigkeit der Anwendung ist im Qualitätssicherungsprogramm des Labors festzulegen. ^b Diese Kontrolle ist nicht erforderlich, wenn die negative bzw. positive Prozesskontrolle durchgeführt wird. ^c Die PCR-Inhibitionskontrolle kann als interne oder externe Amplifikationskontrolle durchgeführt werden. Sie ist verbindlich bei jeder PCR durchzuführen, wenn alle PCR-Nachweise der Probe negativ sind, und für jene Matrizes, für die die Menge der amplifizierbaren DNA nicht bekannt ist. ^d Diese Kontrolle ist mit jeder verwendeten Charge der PCR-Reagenzien in jedem PCR-Lauf durchzuführen ↓ Verfahrensschritt, der die Einbeziehung dieser Kontrolle umfasst. | | | | | | | |

5.2 Synthetische Quantifizierungsstandards

Als Quantifizierungsstandards werden mindestens vier Verdünnungsstufen einer Hybridmolekül-Stammlösung in einem Konzentrationsbereich von ca. 10 bis 10⁵ Kopien/μl in jeweils drei Parallelen vermessen. Die gemittelten Ct-Werte der Quantifizierungsstandards dienen der Erstellung der Kalibriergeraden.

6 Durchführung

Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmaßnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind einzuhalten [8].

6.1 Herstellung der PCR-Mastermixe

Folgende Angaben gelten für PCR-Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 25 µl (20 µl Mastermix + 5 µl Proben-DNA, Quantifizierungsstandards bzw. positive Kontroll-DNA).

Tabelle 2: Mastermix für den Nachweis der *barT-g7*-Genkassette

| Reagenzien | Endkonzentration PCR-Ansatz [nmol/l] |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Primer <i>barT-g7.F</i> | 300 |
| Primer <i>barT-g7.R</i> | 300 |
| Sonde <i>barT-g7.S</i> | 300 |
| steriles deionisiertes Wasser | - |
| TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) | 1x |

Tabelle 3: Mastermix für den Nachweis des Raps-spezifischen *BnACCg8*-Gens

| Reagenzien | Endkonzentration PCR-Ansatz [nmol/l] |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Primer <i>BnACCg8.F</i> | 300 |
| Primer <i>BnACCg8.R</i> | 300 |
| Sonde <i>BnACCg8.S</i> | 300 |
| steriles deionisiertes Wasser | - |
| TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) | 1x |

- Die Kavitäten einer 96-Well Platte werden mit Mastermix (20 µl) vorbelegt.
- 5 µl der Proben-DNA (etwa 100 ng) bzw. 5 µl DNA der in Kapitel 4 und 5 genannten Quantifizierungsstandards und Kontrolllösungen werden zu dem Mastermix pipettiert.
- Die Mikrotiterplatte wird mit der Abdeckfolie verschlossen.

6.2 Geräteeinstellungen

Die Reaktionsansätze werden bei folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubiert:

Tabelle 4: Temperatur-Zeit-Programm

| Schritt | Einstellung | Zyklen |
|------------------------|---------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 10 min / 95°C | - |
| Denaturierung | 15 sec / 95°C | 45 |
| Annealing + Elongation | 60 sec / 60°C | |

7 Auswertung

Die Auswertung der Real-time PCR-Untersuchungen erfolgt gemäß den Anweisungen des Geräteherstellers.

Sofern die Untersuchung darauf abzielt, den relativen Gehalt der transgenen Sequenz abzuschätzen, werden zur Erstellung von Kalibriergeraden die gemittelten Ct-Werte der Quantifizierungsstandards gegen den Logarithmus der jeweiligen Kopienzahlen aufgetragen [5]. Die Steigung und der Achsenabschnitt der Kalibriergeraden liefern die Grundlage für die Berechnung der Kopienzahlen in den unbekanntenen Proben.

8 Validierung

Zur Überprüfung der Spezifität des *BnACCg8*-Referenzgens für Raps (*Brassica napus*) wurde der Nachweis mit DNA-Isolaten aus *Brassica oleracea ssp. botrytis*, *Brassica oleracea ssp. gemmifera*, *Brassica oleracea ssp. italica*, *Brassica alba (Sinapis alba)*, *Glycine max*, *Gossypium arboreum*, *Helianthus annuus*, *Lycopersicon esculentum*, *Panicum miliaceum*, *Secale cereale*, *Solanum tuberosum*, *Sorghum bicolor*, *Triticale*, *Triticum aestivum*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Oryza sativa* und DNA-Isolaten aus konventionellem Raps sowie den gentechnisch veränderten Rapslinien Falcon GS40/90, T45, Liberator L62, Ms1xRf1, Ms8xRf3 überprüft (Bezugsquellen: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzen Gatersleben, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit). Der Nachweis des *BnACCg8*-Referenzgens war spezifisch für Rapslinien (*Brassica napus*).

Die Spezifität des Nachweises der *bar/T-g7*-Genkassette wurde anhand von DNA-Isolaten aus konventionellem Raps und den gentechnisch veränderten SeedLink[®]-Rapslinien Ms1, Ms8, Rf1, Rf2, Rf3 sowie ihrer Kreuzungsprodukte überprüft. Nur mit den SeedLink[®]-Rapslinien wurden spezifische Amplifikate erzielt.

Die Validierung des Screening-Verfahrens erfolgte unter Teilnahme von 14 Laboren des Unterausschusses Methodenentwicklung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik. Die Messwerte von vier Laboren wurden aufgrund von technischen Problemen bzw. Kontaminationen nicht in der Auswertung berücksichtigt. Es wurden DNA-Proben mit GVO-Anteilen von 0,045 %; 0,09 %; 0,9 %; 1,8 % und 4,5% verschickt. Die Proben wurden durch Mischung von DNA aus konventionellem und transgenem Raps (Ms8xRf3) hergestellt. Die Real-time PCR wurden mit jeweils 100 ng der entsprechenden DNA-Mischung als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Reaktionen mit den Quantifizierungsstandards, die ebenfalls als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, enthielten jeweils 5, 10, 100, 1.000, 10.000 und 100.000 Kopien.

Die Ergebnisse aller verwendeten Real-time PCR-Geräte (Modelle: ABI 7500, ABI 7000, MX3000P und iCycler) sind in der Tabelle 5 dargestellt. Die Untersuchung der DNA-Probe mit einem GVO-Anteil von 0,045 % ergab positive Ergebnisse in 100% der Fälle. Dies entspricht einer Nachweisgrenze von 34 Kopien des Transgens pro PCR-Ansatz.

Da die relative Standardabweichung im Ringversuch relativ hoch war, sollte die Methode ohne zusätzliche Validierung nicht zur Quantifizierung eingesetzt werden. Es wird empfoh-

len, das Verfahren als Real-time Screening einzusetzen und im Falle positiver Befunde anschließend mit event-spezifischen Methoden zu spezifizieren und ggf. zu quantifizieren.

Tabelle 5: Ergebnisse des Ringversuches

| Probe | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GVO-Anteil [%] | 0,045 | 0,09 | 0,9 | 1,8 | 4,5 |
| Anzahl an Laboren | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Anzahl der Ausreißer | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Anzahl an Laboren ohne Ausreißer | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Mittelwert GVO-Anteil [%] | positiv | 0,09 | 0,84 | 1,69 | 4,17 |
| Wiederfindung [%] | 100,00 | 102,81 | 93,42 | 94,06 | 92,59 |
| Standardabweichung der Reproduzierbarkeit [%] | - | 0,04 | 0,39 | 0,61 | 1,30 |
| Relative Standardabweichung der Reproduzierbarkeit [%] | - | 47,68 | 43,28 | 33,71 | 28,99 |

9 Literatur

1. Bruderer S., Leitner K. E. (2003): Genetically Modified (GM) Crops: molecular and regulatory details, Version 2. BATS, Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability. Zurich, Schweiz.
<http://www.bats.ch/gmo-watch/GVO-report140703.pdf>
2. Community register of genetically modified food and feed.
http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
3. Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates vom 12. März 2001 *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L 106 S. 1, zuletzt geändert am 11. März 2008 durch Artikel 1 der Richtlinie 2008/27/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt im Hinblick auf die der Kommission übertragenen Durchführungsbefugnisse *Amtsblatt der Europäischen Union* L 81 S. 45
4. Entscheidung der Kommission vom 26. März. 2007 über das Inverkehrbringen gentechnisch veränderter, gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium toleranter Ölrapssprodukte (*Brassica napus* Linien Ms8, Rf3 und Ms8xRf3) gemäß der Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates. *Amtsblatt der Europäischen Union* L 100: 20-24
5. Pardigol A., Guillet S., Pöpping B. (2003): A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *Eur. Food Res. Technol.* 216: 412-420
6. Moreano F., Pecoraro S., Bunge M., Busch U. (2005): Entwicklung von synthetischen DNA-Standards für die relative Quantifizierung von DNA aus transgenem Raps mit Real-time PCR. *Lebensmittelchemie* 59 (4): 95.

7. Moreano F., Pecoraro S., Bunge M. Busch, U. (2005): Development of synthetic DNA-standards for the quantitative screening of different genetically modified rape-seed lines via Real-time PCR. In: Proceedings of the Euro Food Chem XIII conference, Macromolecules and Their Degradation Products in Food – Physiological, Analytical and Technological Aspects. Hamburg, Deutschland, 21.-23. September, 1, 154-158.
8. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG G 00.00–5: Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Allgemeine Hinweise und Anforderungen Beuth-Verlag; Im Druck