

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
PCR-Nachweis der p35S / pat - Genkassette in transgenen Kulturpflanzen	AM001
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, September 1998	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt ein Verfahren zum spezifischen Nachweis einer häufig verwendeten gentechnisch erzeugten Resistenz gegen Glufosinat-Herbizide ("BASTA") in Pflanzen mittels PCR-Amplifizierung. Die nachgewiesene Genkassette besteht aus dem 3' Ende des p35S-Promotors des CaMVirus und dem 5' Ende des pat-Gens aus *Strepto-myces viridochromogenes* (synthetisches Gen mit an Pflanzen angepaßten Codon-gebrauch), welches für die Phosphinotricin-acetyltransferase codiert und in transgenen Pflanzen Resistenz gegen Glufosinat-Herbizide ("BASTA") vermittelt.

Nach Extraktion der Gesamt-DNA wird ein etwa 370 Bp großes p35S-Promotor/ pat spezifisches Fragment mittels PCR vervielfältigt und gelelektrophoretisch nachgewiesen. Zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten Pflanzen-DNA wird zusätzlich eine konservierte Chloroplasten - tRNA -Sequenz vervielfältigt [Taberlet, 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).

Im Rahmen eines Ringtests des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ wurde die Methode am Beispiel von herbizidresistentem, transgenem Raps und Mais getestet.

2. Kurzbeschreibung

Der hier vorgestellte Nachweis basiert auf einer PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) und besteht aus folgenden Arbeitsschritten:

- Isolierung der Gesamt-DNA aus Pflanzen
- Durchführung der pat-spezifischen - PCR und der Eukaryonten-PCR
- Agarosegelelektrophorese
- Spezifizierung des PCR-Produktes

3. Materialliste

- 3.1 Chemikalien:**
- Ammoniumacetat
 - Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
 - Chloroform
 - EDTA
 - Eisessig
 - Ethanol
 - Isopropanol
 - Natriumchlorid
 - Phenol
 - RNAse
 - Tris
 - HCl
 - Isoamylalkohol

10 x dNTP-Mix (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP)
 Primer CaMV-F; 25 µM;(5' ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C 3')
 Primer pac3-R (B6/B48); 25 µM;(5' CCC AAC CTT TGA TGC CTA TGT G 3')
 Primer A1; 25 µM;(5' CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3')
 Primer A2; 25 µM;(5' GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3')
 Kontroll-DNA
 Hitzestabile DNA-Polymerase mit geeignetem Puffer
 Restriktionsenzyme mit geeigneten Puffern
 Xylene Cyanol FF
 Sucrose
 Agarose
 Ethidiumbromid
 DNA-Längenstandard (z.B. Lambda-DNA HindIII geschnitten)

3.2 Geräte :

Eppendorfreaktionsgefäße
 PCR-Reaktionsgefäße
 Mikropistill, z.B. Eppendorf Artikel-Nr. 0030 120.973
 Mikroliterpipetten
 Mikroliter-Kühlzentrifuge
 Wasserbad oder Thermoblock (bis 65 °C)
 Thermocycler
 Apparatur für horizontale Elektrophorese mit Netzgerät
 UV-Durchlichtkasten
 Foto- oder Video-Dokumentation

4. Lösungen

CTAB-Extraktionspuffer	1,4 M NaCl 0,1 M Tris-HCl 20 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 3 % CTAB (w/v) - autoklavieren (ohne CTAB) - vor der Extraktion 3 % CTAB und - 0,2 % Mercaptoethanol zusetzen, lösen
Phenol/ Chloroform/ IAA	25:24:1
Chloroform/ Isoamylalkohol	24:1
4 M Ammoniumacetat	
1 x TE	10 mM Tris-HCl pH 7,8 1 mM EDTA pH8
5 x Ladepuffer:	0,25 % (w/v) Xylencyanol 40 % (w/v) Sucrose in Wasser (bei 4 ° C lagern)
10 x TBE-Elektrophoresepuffer	108 g/l Tris Base 55 g/l Borsäure 9,3 g/l EDTA (pH 8)
<u>alternativ:</u>	
50 x TAE-Elektrophoresepuffer:	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Färbe-Stammlösung:	1% Ethidiumbromid
Färbe-Arbeitslösung:	0,5 µg Ethidiumbromid /ml Elektrophoresepuffer

5. Durchführung

5.1 Aufarbeitung der Proben

A) Isolierung der Gesamt-DNA aus Pflanzen

Die Extraktionsmethode beruht auf einem Verfahren von Tinker et al. (Tinker, N.A., M.G. Fortin and DE 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.

Anmerkung: Alternativ können auch käufliche DNA-Extraktions-Kits verwendet werden.

5.1. Arbeitsprotokoll

- 200 mg Probenmaterial in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Gewebe mit dem Mikropistill zerkleinern
- Probe in 500 µl CTAB-Extraktionspuffer aufnehmen
- 60 Minuten bei 65⁰ C inkubieren, gelegentlich nochmal zerkleinern
- 10 Minuten bei 14.000 Upm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 200 µl Chloroform (100%) versetzen, vorsichtig mischen (**kein VORTEX !**)
- 10 Minuten bei 14.000 Upm zentrifugieren
- obere (wässrige) Phase in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- mit 0,6 Volumen (300 µl) Isopropanol versetzen
- 10 Minuten bei 14.000 Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70% igem Ethanol waschen
- 10 Minuten bei 14.000 Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- DNA-Pellet trocknen
- DNA in 100 µl 0,1 x TE auflösen

Bemerkung: Die nach der Schnellmethode isolierte DNA kann in vielen Fällen direkt in die PCR-Amplifizierung eingesetzt werden; andernfalls ist eine weitere Aufreinigung erforderlich.

Aufreinigung der Pflanzen-DNA

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

- DNA in 200 µl 0,1 x TE lösen
- Zusatz von 1,5 µl RNAse (15 U)
- mindestens 15 Minuten bei 37⁰C inkubieren
- mit 1 x Volumen Phenol extrahieren; vorsichtig mischen
- 10 Minuten bei 14.000 Upm und 4⁰ C zentrifugieren
- wässrigen Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen
- mit 2 x Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol extrahieren, vorsichtig mischen
- 10 Minuten bei 14.000 Upm und 4⁰ C zentrifugieren
- wässrigen Überstand in neues Gefäß überführen
- mit 2 Volumen absolutem Ethanol + 1/20 Volumen 4 M NH₄Acetat fällen
- 15 Min. bei -70⁰C oder ÜN bei - 20⁰C inkubieren
- 30 Minuten bei 14.000 Upm und 4⁰ C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70 % igem Ethanol waschen
- 10 Minuten bei 14.000 Upm und 4⁰ C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- DNA trocken
- DNA in 50 µl 0,1 X TE lösen

5.2 PCR-Reaktion

Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionsansätze in geeigneten Gefäßen durchgeführt. Für die Voruntersuchungen wurde ein "OmniGene -Thermocycler" der Fa. Hybaid und PCR-Gefäße der Fa. Biozym, (Best. Nr. 711010) verwendet.

Jede zu untersuchende Probe wird in einem Ansatz mit den 35S-Promotor/pat-spezifischen Primern CaMV-F/ pac3-R amplifiziert sowie in einem zweiten Ansatz zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA mit den universellen Primern A1/ A2.

5.2.1 Reaktionsansatz:

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

- Herstellen des Mastermix für n Ansätze:
 - n x 5 µl 10 X PCR-Puffer
 - n x 5 µl 10 X dNTP (200 µM)
 - n x 1 µl Primer CaMV-F (0,5 µM)
 - n x 1 µl Primer pac 3-R (0,5 µM)

bzw. für Eukaryonten- Kontroll-PCR: Mastermix wie oben jedoch mit Primer A1/ Primer A2

- In jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert:
 - 12 µl Mastermix
 - 35 µl H₂O
 - 2 µl Probe (DNA)
 - 1 µl Taq-Polymerase (0,5 -1 U)

Es wird jeweils eine Reaktionskontrolle (2 µl TE statt der Probe), eine Negativ- Kontrolle (nicht transgene Raps- bzw. Mais - DNA) und eine Positivkontrolle (pat-transgene Raps- oder Mais-DNA) mitgeführt.

- Reaktionsansätze in geschlossenen Gefäßen mischen, ggf. mit PCR-Mineralöl überschichten und anschließend kurz zentrifugieren
- die Gefäße in den auf 94 °C vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur-Zeit-Programm starten
- nach Ablauf der Amplifikation die Reaktionsansätze bei 4 °C lagern

5.2.2 Temperatur-Zeit-Programm:

- 1 x 3 min bei 94 °C
- 35 x

Denaturierung	60 sec bei 94 °C
Annealing	60 sec bei 60 °C
Synthese	120 sec bei 72 °C
- 1 x 10 min bei 72 °C

6. Analyse der PCR-Produkte

6.1 Elektrophorese

Die Produkte in den Reaktionsansätzen werden durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

- 1,0 % ige Agaroselösung in 1 x Elektrophoresepuffer in der Mikrowelle aufkochen
- nach Abkühlen auf 60 °C das verdampfte Wasser ergänzen
- die Lösung auf den Geltisch gießen und den Probenkamm einsetzen
- Gel bei Raumtemperatur erstarren lassen (ca. 30 Min.)

- Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen und etwa 2 mm mit 1 x Elektrophorese-puffer überschichten
- Probenkamm vorsichtig herausziehen
- je 15 µl der Proben mit 3 µl Ladepuffer mischen und in die Probentaschen einfüllen
- an mindestens einer Position einen DNA-Längenstandard auftragen

Die Elektrophorese wird bei etwa 5 V/cm durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese ist abhängig von der Geometrie der Elektrophoresekammer. Der Farbstoff Xylencyanol sollte etwa bis zur Mitte des Gels wandern.

Nach der Elektrophorese wird das Gel in die Färbe-Arbeitslösung überführt und für mindestens 15 Minuten unter ständigem Schwenken gefärbt. Danach erfolgt die Entfärbung in Elektrophorese-puffer oder Wasser für 15 Minuten. Die DNA wird auf dem UV-Durchlichtkasten sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

7. Auswertung des PCR-Analysen

Ist in der Probe das 35S-Promotor/ pat-spezifische DNA Fragment vorhanden, muß eine Bande mit der Größe von 370 Basenpaaren zu sehen sein. Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt dann vor, wenn die 370 Bp pat-spezifische Bande nicht zu sehen ist, die Eukaryonten-spezifische PCR mit den Primern A1 und A2 aber zu einem Amplifikat geführt hat.

8. Spezifizierung des PCR-Produktes mittels Restriktionsverdau:

Zur Spezifizierung des 370 Bp großen p35S-P/ pat-Amplifikates können die PCR-Ansätze mit Restriktionsenzymen gespalten oder alternativ sequenziert werden.

Für die Überprüfung des CAMV-F/pac3-R spezifischen 370 Bp-PCR-Fragmentes eignen sich folgende Restriktionsansätze:

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Anzahl der Schnittstellen</i>	<i>Fragmentgrößen</i>
Sal I	1 SST/ Amplifikat	60 Bp / 310 Bp
Eco RV	1 SST/ Amplifikat	140 Bp / 230 Bp

8.1 Restriktionsansatz:

Der Restriktionansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 15 µl :

- 1,5 µl 10x Restriktionspuffer
- 1 µl Restriktionsenzym
- 5 µl PCR-Amplifikat (unter dem Öl entnehmen)
- 7,5 µl Bidest

Die Restriktionsansätze werden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und nach Zusatz von 3 µl Ladepuffer das gesamte Volumen auf ein 2 % iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt; das Gel wird photographisch dokumentiert und die Fragmentgrößen anhand mitgeführter DNA-Längenstandards bestimmt.

9. Validierung

In den betreffenden Ringtests des Unterausschusses Methodenentwicklung wurde der spezifische PCR-Nachweis der eingangs beschriebenen 35S-/pat-Genkassette von allen 6 teilnehmenden Laboratorien erfolgreich durchgeführt.

Die Nachweisgrenze für die PCR-Amplifizierung des pat-Gens mit den beschriebenen Primerpaaren liegt je nach Pflanzenart zwischen 10 pg und 100 pg genomischer Pflanzen-DNA. Um in der PCR optimale Ausbeuten zu erhalten wird bei Einzelkornanalysen bzw. Blattanalysen eine Templatmenge zwischen 1-10 ng DNA empfohlen.

Die Amplifizierungsausbeute ist dabei deutlich von der Art und dem Hersteller der eingesetzten hitzestabilen Taq-Polymerase abhängig.

Wird die PCR-Amplifizierung durch Hemmstoffe, wie Pillierungsmittel, Stärke etc. gestört,

sollten Verdünnungen des DNA-Templates in die PCR eingesetzt werden. Insbesondere bei Pillierungsmitteln ist der Einsatz des einzelstrangbindenden T4-Gen32-Proteins (Bestell-Nr. 97298, Fa. Boehringer Mannheim) zur Reduktion inhibierender Faktoren sehr zu empfehlen. Die Methode ist für Einzelkorn- bzw. Blattanalysen einsetzbar. Bei Rapssamen und verwandten Senfsamen können jedoch auch Mischproben von maximal 20 Samen aufgearbeitet werden. In derartigen Mischproben ist 1 transgener Samen noch nachweisbar (Nachweisgrenze 5%). Um in Mischproben bessere Nachweisgrenzen zu erreichen, ist eine Erhöhung der DNA-Aufarbeitungsmenge erforderlich.