

PCR-Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen, die von pBR322 abgeleitete Sequenzen enthalten**AM002**Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, September 1998
Status: verabschiedet**1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die hier dargestellte Methode ermöglicht den Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen (GVO), die von pBR322 abgeleitete Sequenzen (ColE1 Origin und das amp^r 3'-Ende) enthalten. Im Rahmen eines Ringtest des Arbeitskreises "Gentechnische Überwachungslaboratorien" wurde die Methode am Beispiel des Nachweises von pUC-Plasmiden in *E. coli* erfolgreich getestet. Prinzipiell ist der Nachweis jedoch auch für alle anderen Organismen, z.B. transgene Pflanzen und Zelllinien anwendbar. Die Methode der DNA-Isolierung muss jedoch, abweichend von diesem Protokoll, für den jeweiligen Organismus angepaßt werden.

2. Kurzbeschreibung

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

- Aufarbeitung der Proben, Isolierung der DNA
- Durchführung der PCR, Amplifikation der spezifischen Sequenzen
- Analyse der PCR-Produkte, Größenbestimmung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese

3. Materialliste**3.1 Chemikalien:**

Tris

HCl

EDTA

Essigsäure

10 x dNTP:

2 mM dATP

2 mM dCTP

2 mM dGTP

2 mM dTTP

Primer ColE-1; 25 µM; (5' CGGTA ACTATCGTCTTGAGTCCAAC 3')

Primer ColE-2; 25 µM; (5' GTGCCTCACTGATTAAGCATTGG 3')

Kontroll-DNA 5 fg/µl (z. B. pUC-K1)

Hitzestabile DNA-Polymerase mit geeignetem Puffer

Ficoll 400

Xylene Cyanol FF

Agarose

Ethidiumbromid
DNA Längenstandard

3.2 Geräte

Eppendorfgefäße
PCR-Gefäße
Mikropipetten
Mikrozentrifuge
Thermocycler
Apparatur für horizontale Elektrophorese mit Netzgerät
UV-Durchlichtkasten
Foto- oder Video-Dokumentationseinrichtung

4. Lösungen:

TE: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 1 mM EDTA

Elektrophoresepuffer: TAE oder TBE

TAE-Puffer: 50x Stammlösung
 242 g Tris
 57,1 ml Essigsäure
 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

TBE-Puffer: 5x Stammlösung
 54 g Tris
 27,5 g Borsäure
 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Ladepuffer: 6x Stammlösung
 0,25 % (w/v) Xylencyanol
 40% (w/v) Sucrose
 in 1x Elektrophoresepuffer
 bei 4 °C lagern

Färbe-Stammlösung: 10 mg Ethidiumbromid/ml in TE
Färbe-Arbeitslösung: 0,5 µg Ethidiumbromid/ml in H₂O

5. Durchführung

5.1 Aufarbeitung der Proben

Die Aufarbeitung der Proben ist abhängig von der Fragestellung. Für eine qualitative Aussage genügt ein Schnellnachweis aus Einzelkolonien oder einer Bakteriensuspension. Zum Nachweis sehr geringer Mengen gentechnisch veränderter Organismen aus verunreinigten Proben (Boden, Abwasser) ist die Verwendung von isolierter DNA zu empfehlen.

5.1. Arbeitsprotokoll

A) Aufarbeitung für den Schnellnachweis aus Proben:

Um die beste Nachweisgrenze zu erzielen kann die zu untersuchende Probe direkt in die PCR eingesetzt werden. Das eingesetzte Volumen sollte dabei 1/10 des Reaktionsvolumen nicht übersteigen (LB-Medium inhibiert in diesen Mengen nicht). Falsch negative Ergebnisse, die auf Inhibitoren zurückzuführen sind, lassen sich durch Zugabe von Kontroll-DNA (pUC-K1 = pUC 18 mit einer etwa 100 bp großen Insertion in der Targetsequenz) zu jeder Reaktion weitgehend ausschließen.

B) Aufarbeitung für den Nachweis aus reinen Kulturen:

- die Zellen werden mit einer sterilen Impföse von einer Kolonie entnommen und in 200µl TE (siehe unten) in einem Eppendorfgefäß suspendiert, oder alternativ 20 µl einer stationären Kultur mit 180 µl TE verdünnt.
- die Probe für 5 min auf 96 °C erhitzt
- die Probe für 1 Min. auf Eis abkühlen
- die Probe kräftig mischen
- die Probe bei 11000 g zentrifugieren

Den Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen; ein Teil (z.B. 5 µl) dieses Überstands wird in der PCR eingesetzt.

C) Wie in der Einführung bereits erläutert, ist dieser Nachweis für ein breites Spektrum von Organismen anwendbar. Da die Isolierung von DNA aus bestimmten Organismen jeweils z.T. sehr spezifische Methoden erfordert, wird auf eine Beschreibung der DNA-Isolierung hier verzichtet.

5.2 PCR-Reaktion

Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionsansätze in geeigneten Gefäßen durchgeführt. Für die Voruntersuchungen wurden ein "Thermocycler 60" der Fa. Biomed und PCR-Gefäßen der Fa. Sarstedt, (Best. Nr. 72. 733. 050) verwendet.

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 Endkonzentration)
- n x 1 µl Primer ColE-1 (0,5 µM Endkonzentration)
- n x 1 µl Primer ColE-2 (0,5 µM Endkonzentration)

- In jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert:

- 12 µl Mastermix
- 31 µl H₂O
- 1 µl Kontroll-DNA (5 fg)
- 5 µl Probe (DNA)
- 1 µl Taq-Pol (0,5 U - 1 U)

Es wird eine Reaktionskontrolle (5 µl TE mit Kontroll-DNA) und eine Negativ- Kontrolle (5 µl TE statt der Probe) mitgeführt.

- Reaktionsansätze in geschlossenen Gefäßen mischen 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 2 min bei 94 °C
- 35 x Denaturierung 30 sec bei 94 °C
- Annealing 30 sec bei 60 °C
- Synthese 60 sec bei 72 °C
- 1 x 10 min bei 72 °C

6. Analyse der PCR-Produkte

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

- durch Kochen in der Mikrowelle eine 1,5 %ige Agaroselösung in Elektrophoresepuffer herstellen (auf vollständiges Lösen prüfen!)
- nach Abkühlen auf 60 °C das verdampfte Wasser ergänzen
- die Lösung auf den Gelträger gießen und den Probenkamm positionieren
- das Gel bei Raumtemperatur erstarren lassen (etwa 15 min)
- den Gelträger in die Elektrophoresekammer einsetzen
- Mindestens 10 min vor dem Start der Elektrophorese das Gel etwa 2 mm mit Elektrophoresepuffer überschichten
- den Probenkamm entfernen
- je 20 µl der Proben mit 5 µl Ladepuffer mischen und in die Probenaschen füllen
- an mindestens einer Position des Gels den DNA-Längenstandard auftragen (Vorbereitung analog zu den Proben).

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 min unter ständigem Schwenken gefärbt. Danach erfolgt die Entfärbung in Elektrophoresepuffer oder Wasser für 15 min.

Die DNA wird auf dem UV-Durchlichtkasten sichtbar gemacht und dokumentiert.

7. Auswertung

Ist in der Probe das entsprechende pBR322-verwandte DNA Fragment vorhanden, muss eine Bande mit der Größe von 491 Basenpaaren zu sehen sein. Wenn DNA des Kontrollplasmids pUC-K1 eingesetzt wurde, sollte auch eine Bande von etwa 600 Basenpaaren erkennbar sein. Die Kontrollbande ist nur dann zu erkennen, wenn die Konzentration der pBR322 spezifischen Sequenz in der Probe in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Kontrollplasmids. Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt dann vor, wenn bei einer Probe nur die für das Kontrollplasmid pUC-K1 spezifische Bande von 607 Basenpaaren erkennbar ist.

Anmerkung: Die Nachweisgrenze der beschriebenen Methode wurde zum Vergleich in verschiedenen gentechnischen Überwachungslaboratorien bestimmt. Sie ist von mehreren Faktoren abhängig. Insbesondere die Art und der Hersteller der verwendeten Polymerase, sowie die gerätetechnische Ausstattung wie z.B. Modell des Thermocyclers, des UV-Transluminators und des bildgebenden Verfahrens haben starken Einfluß auf die Nachweisgrenze. Als Anhaltswert für die Leistungsfähigkeit der letzten beiden Geräte wurde die Menge an HindIII-geschnittener Lambda DNA bestimmt, bei der die kleinste der auftretenden Banden (564 bp) noch deutlich zu erkennen ist. In mehreren Laboratorien wurde eine DNA-Menge von etwa 3 ng (\approx 250 ng aufgetragener Lambda DNA) ermittelt. Die Mindestempfindlichkeit der Nachweismethode, die von allen teilnehmenden Laboren erreicht wurde, beträgt 1 fg pUC-Plasmid wenn gereinigte DNA eingesetzt wurde. Beim direkten Einsatz von transformierten Bakterien liegt die Nachweisgrenze bei etwa 1-3 Zellen.

8. Validierung

Im Ringtest des Unterausschuß Methodenentwicklung wurde der spezifische Nachweis von pBR322 abgeleitete Sequenzen/Plasmiden mittels PCR von allen 4 teilnehmenden Laboratorien erfolgreich durchgeführt.