

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
PCR- Nachweis von <i>E. coli</i> B- und BL21- Stämmen	AM018
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2005	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt spezifische Nachweismethoden für *Escherichia coli* B-Wildtyp und *Escherichia coli* BL21- Derivate mittels Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR).

Im Rahmen der gesetzlichen Überwachung von gentechnischen Anlagen und Arbeiten gemäß §25 GenTG ist die Identifizierung von *Escherichia coli* - Stämmen und ihre Zuordnung zu sogenannten "Sicherheitsstämmen" eine häufige, sicherheitsrelevante Fragestellung. Während pathogene *E. coli*- Stämme der Risikogruppe 2 angehören, wurden neben *E. coli* K12 verschiedene *E. coli* B- Derivate als Sicherheitsmaßnahmen anerkannt und in die RG 1 eingeordnet. Dazu gehören neben dem *E. coli* B- Wildtyp u. a. die Expressionsstämme BL21, BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS, die von der Firma STRATAGENE vertrieben werden und in vielen Forschungseinrichtungen Verwendung finden.

2. Kurzbeschreibung

Die hier vorgestellten Nachweise basieren auf der PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction), in der spezifische Sequenzen von *E. coli* B und BL21- Stämmen amplifiziert werden.

Zum eindeutigen Nachweis und zur Differenzierung verschiedener *E. coli* B- Derivate wurden PCR- Primer anhand von stammspezifischen DNA- Sequenzen entwickelt.

Eine ***E. coli* B Wildtyp**- spezifische Sequenz wird bei *Schneider et al.* [1] beschrieben. Die aufgrund dieser Sequenz entwickelten Primer `ECB-3` (nt 8 - 27, Genebank: AJ271006) und `ECB-2` (nt 145 – 164, Genebank: AJ271006) ergeben ein PCR- Produkt von 157 bp. Das Amplifikat kann mittels Restriktionsanalyse überprüft werden.

Die Primer `DE3-A` und `DE3-B` führen in der PCR zu einem für ***E. coli* BL21 DE3** spezifischen 950 bp- Amplifikat, wobei der A- Primer im lacUV5- Promotor (nt 42 – 61, Genebank Y00412) und der B- Primer im T7- RNA- Polymerase- Gen (nt 3558 – 3577, Genebank NC_001604) des Prophagen *DE3* binden. Das Amplifikat kann mittels Restriktionsanalyse überprüft werden.

Das Plasmid pLysS im Stamm ***E. coli* BL21 (DE3) pLysS** enthält neben ursprünglich aus dem pBR322- Plasmid stammenden Sequenzen das Lysozyme- Gen aus dem T7- Phagen (RNA- Polymerase- Inhibitor). Der Primer `pLysS-for` bindet in der pBR322- Sequenz (nt 1707 – 1726), der Primer `pLysS-rev` dagegen im T7-Lysozym- Gen (nt 2136 – 2155) des Plasmids. In der PCR entsteht ein 449 bp- großes pLysS- spezifisches Amplifikat, das mittels Restriktionsanalyse überprüft werden kann.

Der Stamm *E. coli* **BL21** (ohne DE3 bzw. pLysS) läßt sich mit dieser SOP nicht nachweisen, da bisher gesicherte Informationen zu stammspezifischen DNA- Sequenzen fehlen.

3. Material

3.1 Chemikalien

- bidest. H₂O, steril
- dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl₂- Lösung
- Taq- Polymerase oder Hot-Start- Polymerase mit geeignetem Puffer
alternativ: HotStar- Mastermix (enthält Puffer, dNTPs, MgCl₂ und Polymerase)
- Primer ECB-2: (5` CAC TAC CCG TGT TAT TCC AT 3`)
- Primer ECB-3: (5` GCA TCA GGT GCA ACA TAC AT 3`)
- Primer DE3-A: (5` CTT CCG GCT CGT ATA ATG TG 3`)
- Primer DE3-B: (5` GCC TGA ACG GTT GTA TTG TC 3`)
- Primer pLysS-for: (5` GTC ACT ATG GCG TGC TGC TA 3`)
- Primer pLysS-rev: (5` CGC TCA CTG CTT GTC ACA CT 3`)

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

- Sterile Eppendorf- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Sterile PCR- Reaktionsgefäße (0,2 ml)
- Mikroliter- Kolbenhubpipetten (diverse Volumina)
- sterile Mikroliter- Filterspitzen (diverse Volumina)
- Mikroliter- Tischzentrifuge
- Thermocycler mit Heizdeckel

4. Durchführung

4.1 Probenvorbereitung

Voraussetzung für die Untersuchung sind Einzelkolonien der zu untersuchenden Bakterien. Für die Untersuchung hat es sich bewährt, Bakterien mit einer Impfnadel von einer isolierten Kolonie direkt in einen PCR-Ansatz zu übertragen. Eine weitere Vorbehandlung ist meist nicht notwendig.

Zur Bakterienkultivierung, DNA- Gewinnung und ggf. DNA- Reinigung wird an dieser Stelle auf die SOP „Nachweis von *E. coli* K-12 Stämmen mit PCR und Phage U3“ des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ der LAG verwiesen [2].

4.2 PCR-Reaktionsansatz

Beispielhaft wird in Tabelle 1 ein Reaktionsansatz aufgeführt, bei dem das Endvolumen der Einzelreaktion 25 µl beträgt. Der PCR- Ansatz kann mit anderen Volumina erfolgen, die Konzentration der Zutaten ist dann entsprechend anzupassen.

Tabelle 1: PCR- Reaktionsmix

Reaktionsvolumen: 25 µl		
Reagenz (Stammlösung)	Konzentration im Einzel- PCR- Ansatz	Reaktionsmix für n* PCR- Ansätze
10x Reaktionspuffer	1 x	n x 2,5 µl
MgCl₂, 25 mmol/l	1,5 mmol/l	n x 1,5 µl
dNTP-Mix, 20 mmol/l je dNTP	0,4 mmol/l je dNTP	n x 0,5 µl
Vorwärts- Primer, 25 µmol/l	0,5 µmol/l	n x 0,5 µl
Rückwärts- Primer, 25 µmol/l	0,5 µmol/l	n x 0,5 µl
Taq- Polymerase (5 units/ µl)	1 unit	n x 0,2 µl
deionisiertes, steriles Wasser	--	n x 14,3 µl (ad 20 µl)
Je 20 µl Reaktionsmix werden in die PCR- Gefäße pipettiert. Anschließend wird die Proben-DNA zugesetzt :		
Stammlösung	Konzentration im Einzel- PCR- Ansatz	Zugabe pro PCR- Ansatz
Proben- DNA (10 - 40 µg/ ml)	50 – 200 ng	5 µl

- * Es wird ca. 5% mehr Reaktionsmix als nötig hergestellt, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.
- ** Reagenz nur zusetzen, wenn nicht bereits im Reaktionspuffer enthalten (wie z. B. bei HotStar®-Mastermix)

Es werden eine Negativ-Kontrolle (5 µl H₂O statt Proben- DNA) und eine Positiv- Kontrolle (DNA eines entsprechenden Referenz- *E. coli*- Stammes) mitgeführt.

Die Reaktionsansätze werden in den geschlossenen PCR- Gefäßen gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Die PCR- Gefäße werden in den auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt, und das entsprechende Temperatur-Zeit-Programm (siehe 4.3) wird gestartet.

Nach Ablauf der Amplifikation werden die PCR- Reaktionsansätze bei 4 °C gelagert.

4.3 Temperatur-Zeit-Programme

Die PCR- Bedingungen, besonders die Annealing- Temperatur (s. Tabelle 2), sind für jeden Thermocycler und für die verwendeten Polymerasen einzeln anzupassen.

Tabelle 2: Temperatur-Zeit- Programme

Programmschritte	Spezifischer Nachweis von:			Zeitregime
	B Wildtyp	BL21 DE3	BL21 (DE3) pLysS	
Step 1: Vorheizen	95°C	95°C	95°C	(alle Nachweise)
Step 2: Denaturieren (Taq) <i>oder</i> <u>Aktivierung der Hotstart-Polymerase</u>	T = 95°C T = 95°C	T = 95°C T = 95°C	T = 95°C T = 95°C	4 min. <i>oder</i> 15 min.
Step 3: Denaturieren	T = 94°C	T = 94°C	T = 94°C	1 min.
Step 4: Annealing	T = 58°C	T = 60°C	T = 65°C	1 min.
Step 5: Elongation	T = 72°C	T = 72°C	T = 72°C	1 min.
Step 6: Zykluszahl	35x	35x	35x	
Step 7: Elongation	T = 72°C	T = 72°C	T = 72°C	5 min.
Step 8: Kühlen	5°C	5°C	5°C	

4.4 Gel- Analyse der PCR-Produkte

Die gelelektrophoretische Analyse der PCR- Produkte erfolgt analog zur SOP „Nachweis von *E. coli* K-12 Stämmen mit PCR und Phage U3“ [2].

4.5 Spezifizierung der PCR - Amplifikate

Zusätzlich zur Gelanalyse können zur näheren Spezifizierung der einzelnen PCR - Amplifikate folgende Restriktionsenzyme eingesetzt werden:

<i>E. coli</i> - Nachweis	Amplikon	Enzym	Schnittstellen	Fragmentgrößen
B Wildtyp	157 bp	Hinc II	1	55 bp + 102 bp
BL21 DE3	950 bp	Pvu I	1	198 bp + 752 bp
BL21(DE3) pLysS	449 bp	Bam HI	1	163 bp + 286 bp

Die Restriktionsansätze erfolgen analog zur SOP „PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate- resistenten transgenen Pflanzen“ des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ der LAG [3].

5. Auswertung

In der mitgeführten Negativ- Kontrolle (H₂O) darf während der PCR kein Amplifikat entstehen. Ein Amplifikat bei dieser Kontrolle lässt auf eine Verschleppung von DNA oder Probenmaterial schließen. In diesem Fall ist der gesamte PCR- Ansatz zu wiederholen.

Ein positives Untersuchungsergebnis liegt vor, wenn in einer Probe in der entsprechenden spezifischen Nachweis- PCR ein PCR- Amplifikat der erwarteten Größe erhalten wurde, das sich in die unter 4.5 angegebenen Restriktionsfragmente spalten lässt:

- PCR-Amplifikat 157 bp: ***E. coli* B Wildtyp**
- PCR-Amplifikat 950 bp: ***E. coli* BL21 DE3**
- PCR-Amplifikat 449 bp: ***E. coli* BL21 DE3 pLysS**

Ein negatives Untersuchungsergebnis liegt vor, wenn in einer Probe keines der spezifischen PCR- Amplifikate erhalten wurde, die jeweilige Positiv- Kontrolle aber ein PCR- Amplifikat entsprechender Größe enthält.

Zur Absicherung der Ergebnisse aus den PCR- Analysen kann zusätzlich eine K12- PCR (siehe SOP „Nachweis von *E. coli* K-12 Stämmen mit PCR und Phage U3“ [2]) und/oder eine PFGE- Analyse (siehe SOP „Differenzierung von *E. coli*- Stämmen mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese“ [4]) durchgeführt werden.

6. Validierung

Im Februar 2005 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ der LAG in einem Ringversuch validiert, an dem 10 bundesdeutsche Überwachungslaboratorien teilnahmen.

An jeden Teilnehmer waren sechs codierte Proben in Form von Bakterien- Stichkulturen in LB- Agar verschickt worden. Es wurden ein *E. coli* BL21 (DE3)- Stamm, ein *E. coli* BL21 (DE3) pLysS- Stamm sowie ein *E. coli* B Wildtyp- Stamm richtig erkannt. Alle teilnehmenden Laboratorien wendeten die vorliegende Nachweis- Methode „mit Erfolg“ an.

7. Literatur

- [1] Schneider, D. et al. (2000) Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. XI. Characterization of Insertion Sequence-Mediated Mutations and Rearrangements. *Genetics* 156: 477-488.
- [2] Bundesgesundhbl. (2002) 45: 999-1002
- [3] Bundesgesundhbl. (2002) 45: 925-929
- [4] Bundesgesundhbl. (2002) 45: 1004-1005