

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
<b>Qualitative PCR zum Nachweis transgener Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Schädlingsresistenz</b>	<b>AM022</b>
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2009	
Status: verabschiedet	

## **Anhang 8.2 PCR- Nachweis der BE1- R1- antisense- Übergangssequenz in Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel (BASF/Solavista)**

Nachgewiesen wird der Übergang zwischen dem antisense- BE1- Gen aus *Solanum tuberosum* und dem antisense- R1- Gen aus *Solanum tuberosum* in Kartoffeln mit gentechnisch verändertem Stärkestoffwechsel der Firma Solavista GmbH & Co. KG (z.B. verschiedene DPST-Linien mit Vektor BE7-102; Freisetzungsanträge BVL-AZ: 6786-01-142 und -149).

Das BE1- Gen codiert in Kartoffeln für ein Verzweigungsenzym (1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme 1), das an der Amylopektinbildung beteiligt ist und  $\alpha$ -1,6- Verzweigungen einführt. Das R1- Enzym ist an der Phosphorylierung von Stärke in Kartoffeln beteiligt. Durch die Einführung eines antisense- Konstrukts dieser Gene in die transgenen Kartoffeln wird die Enzymbildung unterdrückt und der Stärkestoffwechsel verändert.

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.

### **8.2.1 Primersequenzen (Herkunft Fa. Solavista ; BVL-AZ: 6786-01-142)**

- Primer **BE1anti-1F** (AP24): 5' CAT CTG CAA ACT CAC GAT ACG 3'  
(nt 646-626 , Genbank: Y08786)
- Primer **R1anti-1R** (AP25): 5' TCA GCC AAT TAC TCT TCA CTG G 3'  
(nt 1359-1380 , Genbank: AY027522)

Die Größe des PCR- Produktes mit diesen Primern beträgt **660 bp**.

### **8.2.2 PCR- Reaktionsansatz**

<b>Reagenz (Stammlösung)</b>	<b>Konzentration im Einzel- PCR- Ansatz</b>
<b>10x Reaktionspuffer</b>	1 x
<b>**MgCl<sub>2</sub>, 25 mmol/l</b>	1,5 mmol/l
<b>**dNTP-Mix, 10-20 mmol/l je dNTP</b>	0,2 - 0,4 mmol/l je dNTP
<b>Dimethylsulfoxid (p.A.); optional</b>	5 %
<b>Primer BE1anti-1F, 25-50 <math>\mu</math>mol/l</b>	0,5 – 1,0 $\mu$ mol/l
<b>Primer R1anti-1R, 25-50 <math>\mu</math>mol/l</b>	0,5 – 1,0 $\mu$ mol/l
<b>**Hot-Start- Polymerase (5 U/ <math>\mu</math>l)</b>	1 U

<b>steriles Reinstwasser</b>	--
	<b>DNA-Menge im Einzel- PCR- Ansatz</b>
<b>Proben- DNA (5-20 µg/ ml)</b>	optimal 10 – 40 ng

\*\* Reagenz nur zusetzen, wenn nicht bereits im Reaktionspuffer enthalten (wie z. B. bei HotStar®Taq- Mastermix)

### 8.2.3 Temperatur- Zeit- Programm

1 x	15 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.

### 8.2.4 Restriktionsanalyse

Amplifikat	Enzym	Schnittstellen	Fragmentgrößen
<b>660 bp</b>	<b>Spe I</b>	<b>1</b>	230 bp + 430 bp
	oder <b>Ssp I</b>	<b>1</b>	260 bp + 400 bp

### 8.2.5 Verfahrenskenndaten und Validierung

Die Nachweisgrenze (VB 95%) für das beschriebene Primerpaar liegt bei 200 pg genomischer Kartoffel-DNA, die die Zielsequenz enthält. Um in der PCR optimale Amplifikatmengen zu erhalten, wird empfohlen bei Analysen von Blattmaterial zwischen 10-40 ng DNA je Reaktion einzusetzen.

Im Februar 2007 wurde das Verfahren durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ der Bund/ Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik in einem Ringversuch validiert, an dem 13 bundesdeutsche Überwachungs laboratorien teilnahmen.

Es wurden von jedem Labor 8 Proben untersucht. 5 Proben enthielten mittels CTAB-Aufreinigung isolierte DNA von gentechnisch veränderten Linien mit dem Konstrukt pBE7-102 mit unterschiedlichen Transgen-Anteilen sowie eine DNA-Probe einer nicht transgenen Kartoffellinie. 3 Proben bestanden aus Blattmaterial von gentechnisch veränderten sowie einer nicht gentechnisch veränderten Kartoffelpflanze.

Die DNA-Proben wurden durch Mischen von 100% transgener DNA (Linie DPST0059-0004; Konstrukt BE7-102) mit DNA der nicht gentechnisch veränderten Kartoffellinie (Aveka) eingestellt. 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).

Die DNA-Extraktion aus den Blattproben erfolgte in allen Laboren mit dem in der SOP beschriebenen CTAB-Protokoll mit zusätzlicher Säulenaufreinigung. Zusätzlich wurden von einigen Laboren alternative Extraktionsmethoden getestet. Bei der Aufreinigung von DNA aus Kartoffeln empfiehlt sich nach den daraus vorliegenden Erfahrungen die Verwendung eines CTAB-Protokolls ggf. in Kombination mit zusätzlicher Säulenaufreinigung.

Die Ergebnisse des Ringversuchs sind in der folgenden tabellarischen Darstellung wiedergegeben.

	Probe							
	A	B	C	D	E	H	I	K
	DNA 5% BE7-102	DNA 0% (Aveka)	DNA 1% BE7-102	DNA 1% BE7-102	DNA 5% BE7-102	Blatt BE7-102	Blatt BE7-102	Blatt (Aveka)
Jahr des Ringversuchs	2007							
Anzahl der Laboratorien	13							
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	13	13	13	13	13	13	13	13
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	13	13	12	12	13	13	13	13
Gesamtzahl der Proben	13	13	12	12	13	13	13	13
Falsch positive Ergebnisse	0	0	0	0	0	0	0	0
Falsch-negative Ergebnisse	0	0	0	0	0	1	0	0

Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	102
Gesamtanzahl untersuchter negativer Proben	26
Gesamtanzahl untersuchter positiver Proben	76
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativen Proben	1

Der Ringversuch ergab, dass das Primerpaar **BE1anti-1F/ R1anti-1R** in Proben ab einem Gehalt von 1% der transgenen Zielsequenz (entsprechend 111 Kopien) keine falsch-negativen Ergebnisse zeigte, wenn DNA von guter Qualität eingesetzt wird.