



# Quantitative Bestimmung von **Roundup Ready Raps GT73** (Transformationsereignis-spezifisch)

## **SOP338**

(2. Version)

### Änderungen zu Version

Version	Änderungen	Grund
2	Aktualisierung des Mastermixes und der Reaktionsbedingungen	Wechsel des real-time PCR Geräts und der PCR-Chemie von ABI (TaqMan 7700) auf RotorGene (Qiagen)
2	Angabe Referenzmaterial	bisher keine Angaben dazu

Standort: siehe Beilage "Standort"

Autorin: C. Bagutti

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch	2	SOP338_2.doc
8/2/13	CB	8.2.2013	PB		

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ZWECK

Diese SOP beschreibt ein Routineverfahren zur quantitativen Bestimmung von bestimmten DNA-Sequenzen, die in der gentechnisch veränderten Rapsorte GT73 vorkommen.

## 1.2 ANWENDUNGSBEREICH

Mit der Methode können gentechnisch veränderte Pflanzen nachgewiesen werden, die das GT73-Konstrukt im Genom enthalten. Die Methode kann für alle Lebensmittel angewendet werden, aus denen amplifizierbare DNA extrahiert werden kann.

## 1.3 LITERATUR / HERKUNFT

Monsanto Company SOP BQ-QC-0155-01 (1999) Canola RT73 Nested Event Specific PCR

# 2 PRINZIP

DNA-Sequenzen der Roundup Ready Rapsorte GT73 werden mit zwei spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert. PCR-Produkte werden mittels einer fluoreszenzmarkierten GT73-spezifischen Sonde fluorometrisch während jedem PCR-Zyklus (Real-time) nachgewiesen. Dabei wird die Nuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase ausgenutzt, indem die Sonde während der Polymerisation gespalten und dadurch ein Fluoreszenzfarbstoff (FAM) von Quencher (TAMRA) räumlich getrennt und dadurch fluoreszierend wird.

Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt ergibt den Ct-Wert. Für die Quantifizierung der Menge des GT73-Gens in der Probe wird der Ct-Wert der Probe mit dem Ct-Wert eines Standards in Beziehung gebracht.

# 3 PRÜFEINRICHTUNGEN

## 3.1 MATERIAL & GERÄTE

(Die Validierung dieser Methode wurde mit den Geräten, Chemikalien und Lösungsmittel der angegebenen Lieferanten resp. Hersteller durchgeführt. Prinzipiell können auch andere Lieferanten resp. Hersteller berücksichtigt werden. Bei den Materialien, welche mit einem \* markiert, sollte in einem solchen Falle eine vorherige Vergleichsvalidierung durchgeführt werden.)

## 3.2 GERÄTE UND MATERIAL

(Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.)

- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit (Rotor-Gene 6000 Corbett Life Science PO-1192)\*
- Roboter: CAS-1200 Liquid Handling System Corbett Life Science DO-1191
- Mikrozentrifuge
- Kolbenhubpipetten (diverse)
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- Eppendorfröhrchen (diverse)
- Nitrilhandschuhe puderfrei (z.B.: Roth AG, Reinach/BL)
- PCR-Verbrauchsmaterial:
  - Diverse aerosolgeschützte Pipettenspitzen
  - Diverse Röhrchen (für den Roboter)
  - Diverse Eppendorfröhrchen
  - Siehe Bestell-Liste im Geräte-Buch des Roboters DO-1191

### 3.3 REAGENZIEN

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

- Steriles deionisiertes Wasser
- Taq Polymerase: ABsolute™ QPCR Mastermix (Thermo Scientific, ABgene AB-1133, vertrieben durch AxonLab AG)\* oder QuantiTect® Multiplex PCR No ROX Master Mix (Qiagen Cat. No 204745)\*
- Primers (P) und Sonden (S):

GT73F1	P	5'-TCA TAC TCA TTG CTG ATC CAT GTA GA -3'
GT73R1	P	5'-AAG CTT ATA CGA AGG CAA GAA AAG G -3'
GT73TMP1	S	FAM-TTC CCG GAC ATG AAG ATC ATC CTC CTT C-Dabcyl

### 3.4 LÖSUNGEN

- GT73F1: 3 µM Primer-Lösung (10x konzentriert)
- GT73R1: 9 µM Primer-Lösung (10x konzentriert)
- GT73TMP1: 2 µM Sonden-Lösung (10x konzentriert)

§ Primer und Sonden werden im Originalröhrchen durch Zugabe des entsprechenden Volumens an TE-Buffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

### 3.5 REFERENZMATERIAL

- Raps, DNA / GT73 (1%) / EX051554R
- Raps, Samen / GT73 (100%) / EX030249A

## 4 AUSFÜHRUNG

Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmassnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind in einer separaten QS-Richtlinie (RL L001) beschrieben.

### 4.1 HERSTELLUNG DES MASTERMIXES

#### 4.1.A Menge DNA in 10 µl : 200 ng

Die folgenden Angaben gelten für **50 µl** Ansätze (**10 µl** DNA -Extrakt mit 20ng/µl + **40 µl** Mastermix).

Folgende Lösungen werden in ein steriles Eppendorfröhrchen pipettiert:

#### QuantiTect -PCR-Mastermix:

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz	µl für 10 Ansätze
Primer <b>GT73F1</b> [3 µM]	300 nM	5	50
Primer <b>GT73R1</b> [9 µM]	900 nM	5	50
Sonde <b>GT73TMP1</b> [2 µM]	200 nM	5	50
<b>QuantiTect</b> Multiplex PCR Master Mix (2x)	1x	25	250

#### 4.1.B Menge DNA in 5 µl : 200 ng

Die folgenden Angaben gelten für **25 µl** Ansätze (**5 µl** DNA -Extrakt mit 40ng/µl + **20 µl** Mastermix).

Folgende Lösungen werden in ein steriles Eppendorfröhrchen pipettiert.

#### TaqMan-PCR-Mastermix:

Reagenzien		Endkonz.	µl für einen Ansatz	µl für 10 Ansätze
Primer <b>GT73F1</b>	[3 µM]	300 nM	2,5	25
Primer <b>GT73R1</b>	[9 µM]	900 nM	2,5	25
Sonde <b>GT73TMP1</b>	[2 µM]	200 nM	2,5	25
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)		1x	12,5	125

## 4.2 ZUGABE MASTERMIX ZUM DNA-EXTRAKT

Die PCR-Reaktionen werden mit dem Pipettierroboter hergestellt (siehe entsprechendes Gerätehandbuch)

- 5 µl extrahierte DNA (20 ng/µl) + 20 µl Mastermix

## 4.3 REAL-TIME-PCR

Bedienung des Thermocycler (Rotor-Gene) siehe entsprechendes Gerätehandbuch.

- Rotor-Gene mit den PCR-Röhrchen bestücken.
- Freie Plätze im Rotor-Gene mit leeren PCR-Röhrchen auffüllen.

Mit folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubieren:

Schritt	
Aktivierung der Polymerase	15 Min. / 95°C
Amplifikation (50 Zyklen)	15 Sek. / 95°C 60 Sek. / 60°C

## 5 AUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgt gemäss Handbuch des entsprechenden Thermocycler (Rotor-Gene).

#### Hinweise:

- Nulllinie in der linearen Darstellung festlegen (in der Regel zwischen dem 5. und 20. Zyklus; wenn möglich einheitlich beim 10. Zyklus).
- Wahl eines geeigneten Thresholds (Schwellenwert) in der logarithmischen Darstellung (wenn möglich einheitlich bei 0.02).
- Die Schwellenwerthorizontale soll die Amplifikationskurve im unteren Drittel des linearen Bereichs schneiden.
- Die Menge amplifizierbarer GT73-DNA wird in Bezug auf den Ct-Wert einer Referenz-DNA-Lösung berechnet.
- Achtung: Das Resultat bezieht sich auf eine bestimmte DNA-Menge und nicht auf die Menge einer Probe.

## 6 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

Die Vorgaben der QS-Richtlinie RL L001 „Die Polymerase Chain Reaction (PCR) Analytik“ sind zu erfüllen.

In jeder Analysenreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- ein **Reagenzien-Blindwert / Mastermixkontrolle** (Mastermix, der mit Wasser anstatt DNA-Extraktionslösung versetzt wird). Der Reagenzien-Blindwert muss negativ sein, ansonsten ist der Mastermix kontaminiert.
- eine **Negativkontrolle** (eine negative Extraktionskontrolle; eine Probe, die durch den ganzen Extraktionsschritt mitgeführt wurde, die aber mit Sicherheit keinen GT73 Raps enthält). Die Negativkontrolle muss negativ sein, ansonsten ist eine Kontamination bei der DNA-Extraktion zu vermuten.

- eine **Positivkontrolle** (eine positive Probe, die mit Sicherheit gentechnisch veränderten RT73 Raps enthält). Die Positivkontrolle muss positiv sein, ansonsten muss ein Fehler in der PCR vermutet werden. Es kann eine geringe Konzentration (z.B.: 0.1%) untersucht werden, um zusätzlich zu zeigen, dass die Sensitivität genügend empfindlich ist (**Empfindlichkeitskontrolle**).
- Bei optimaler Amplifikation von 100% beträgt die **Steigung der Kalibrationsgeraden** -3.32. Die Aussagekraft der Steigung der Kalibrationsgeraden ist bei einem kleinen Kalibrationsbereich (z.B. nur über eine Dekade von 10% bis 100%) stark eingeschränkt.

Steigung	Amplifikationseffizienz in %
-3.32	100
-3.4	97
-3.5	93
-3.6	90
-3.8	83
-4.0	78
-4.3	70
-4.9	60
-5.7	50

- Die Steigung (Slope) der Kalibrationskurve sollte zwischen -3.3 und -3.7 sein. Dies wird durch eine Zwei- oder Dreifachbestimmung der Kalibrationspunkte leichter erreicht.  
 ⇒ Die Steigung wird periodisch in die Datei „Regelkarte\_Slope GT73“ eingetragen.  
 Liegt die Steigung ausserhalb dieses Bereichs, dann entscheidet der Prüfleiter über eine allfällige Wiederholung der Kalibration.
- Eine genaue Gehaltsbestimmung hat durch eine 3-fach-Bestimmung zu erfolgen.  
 Wenn die Kontrollen nicht das gewünschte Resultat ergeben, dann müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung, allenfalls nach Durchführung geeigneter Massnahmen wiederholt werden.

## 7 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

Die Validierungsunterlagen bilden ein eigenes Dokument, um eine problemlosere Anpassung zu ermöglichen.

