



**Semi-quantitative Bestimmung von
Antibiotika-Resistenzgenen sowie des
 β -Glucuronidase-Reportergens in
GV-Pflanzen
(Amp^R, Hph^R, NptII^R, GUS)
mittels Tetraplex Real Time Detection**

SOP516 (1. Version)

Verfasserin: Claudia Bagutti

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch		
20/3/12	CB	24.3.12	CB	1	SOP516_1.doc

1 EINLEITUNG

1.1 ZWECK

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA-Sequenzen von Antibiotikaresistenzgenen sowie des β -Glucuronidase-Reportergenens uidA, welche häufig in gentechnisch veränderten (GV-) Pflanzen (siehe Liste [Anhang 1](#)) vorkommen.

1.2 ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode dient dem Screening von Pflanzen-DNA auf das Vorhandensein der Resistenzgene amp, hph, nptII und für das Reportergen GUS. Diese Resistenzgene und dieses Reportergen werden in vielen GV-Pflanzenarten eingesetzt (siehe Liste [Anhang 1](#)).

Nachweis	Funktion	Gen und Herkunft des Gens	Entwicklung durch
amp ^R	Ampicillin-Resistenz	bla(TEM1)- β -Lactamase aus <i>Salmonella paratyphi</i>	KLBS nach [1]
hph ^R	Hygromycin-Resistenz	Hygromycin B Phosphotransferase aus <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	KLBS nach [2]
nptII ^R	Neomycin ¹ -Resistenz	Aminoglycosid-Phosphotransferase	KLBS nach UAM LAG ²
GUS	Reportersystem	β -Glucuronidase (uid A) aus <i>E.coli</i>	KLBS nach [3, 4]

Die untersuchte Pflanzen-DNA wird vorgängig aus Pflanzenteilen enthaltenen Proben extrahiert. Die optimale Extraktionsmethode hängt dabei von der Matrix ab, beispielsweise SOP500 "Extraktion von DNA aus Pollenhörschen".

2 PRINZIP

Der Nachweis der vier Antibiotika-Resistenzgene bzw. des β -Glucuronidase-Reportergens erfolgt mittels real-time Detection. Die Genfragmente (vgl. Kap. 1.2.) werden mit je zwei spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert. PCR-Produkte werden mittels einer fluoreszenz-markierten, spezifischen DNA-Sonde fluorometrisch während jedem PCR-Zyklus (Real-time) nachgewiesen. Dabei tragen die Sonden für jedes der Systeme unterschiedliche Fluoreszenzmarker und Quencher:

Nachweis	Fluoreszenzmarker/Quencher
amp ^R	FAM / BHQ1
hph ^R	JOE / BHQ1
nptII ^R	Cy5 / BHQ2
GUS	ROX / BHQ2

Durch die Spaltung der Sonde während der Polymerisation wird der Fluoreszenz-Farbstoff vom Quencher räumlich getrennt und dadurch fluoreszierend. Die verschiedenen Systeme können durch Messung der Fluoreszenzsignale bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden. Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert (Cycle threshold). Für die Abschätzung der Menge amplifizierbarer GVO-DNA in der Probe wird der spezifische Ct-Wert der Probe mit dem Ct-Wert einer Standardreihe in Beziehung gebracht.

Die Wahl der in den Tetraplexnachweis integrierten Primer- und Sondensystem erfolgte aufgrund publizierter Methoden (siehe Tabelle Kap. 1.2.). Bei allen Systemen lagen konventionelle PCR-Systeme vor, sodass eine Sonde dazu in-House entwickelt werden musste. Dies erfolgte mittels der Software PrimerExpress[®] (ABI) oder CLC (CLC bio).

¹ Resistenz auch gegen Kanamycin und Gentamycin B wirksam

² UAM LAG: Unterausschuss Methodenentwicklung der Länderarbeitsgemeinschaft, Deutschland

3 PRÜFEINRICHTUNGEN

(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.)

3.1 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

3.2 REAGENZIEN

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

- Steriles deionisiertes Wasser
- Absolute™ QPCR Mastermix (Thermo Scientific, ABgene AB-1133, vertrieben durch AxonLab AG)*
- Primers (P) und Sonden (S):

amp

amp-F	P	TATTGACGCCGGGCAAGA
amp-R	P	ACTGTCATGCCATCCGTAAGATG
amp-P	S	FAM- ACTCGGTCGCCCATACACTATTCTCAGA -BHQ1

hph

hph-F	P	TGCGCCGATGGTTTCTACA
hph-R	P	GGTCAGGCTCTCGCTGAATT
hph-P	S	JOE- TATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCC -BHQ1

nptII

nptII-F	P	CCTTGAGCCTGGCGAACA
nptII-R	P	GCATCGAGCGAGCACGTA
nptII-P	S	Cy5- CCTGATCGACAAGACCGGCTTCCAT -BHQ2

GUS

GUS-F	P	CACCTGGGTGGACGATATCAC
GUS-R	P	CGCAGTTCAACGCTGACATC
GUS-P	S	ROX- ACGCATGTCGCGCAAGACTGTAACC -BHQ2

3.3 LÖSUNGEN

- TE-Buffer (1mM Tris, pH 8; 0.01 mM EDTA)
- Primer und Sonde: 10 µM Primer-Lösung[§]

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

3.4 REFERENZMATERIALIEN

Die Methode wurde mit DNA-Extrakten der nachfolgenden Pflanzen sowie dem AR-Referenzplasmid (35NANHG: basierend auf pCR2.1 Plasmid-Backbone mit Fragmenten der Antibiotika-Resistenzgene Amp, Hph, NptII und des Reportersystems GUS sowie des 35S (Promotersequenz aus SOP423), NOS (Terminatorsequenz aus SOP423) entwickelt und validiert.

Nachweis	Referenz-DNA (Pflanzenart)
amp	Bt10 (Mais)
hph	GV-Kartoffel (Quelle Anke Belter, Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt)
nptII	Mon863x810 (Mais)
GUS	GTSB77 (Zuckerrübe)

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 HERSTELLEN DES MASTERMIXES

Der Mastermix kann (muss aber nicht) mit einem Pipettierroboter hergestellt werden (siehe dazu entsprechendes Gerätehandbuch).

- Für den PCR-Mastermix (25 µl Ansatz) wird als erstes ein Primer-und-Sonden-Mix (jeweils 2 µl pro 25 µl PCR-Ansatz einzusetzen) hergestellt:

Primer-und-Sonden-Mix

Primer und Sonden (jeweils 100 µM)		Endkonz. (nM)	µl pro Ansatz*
Sonden	amp-P	200	0.050
	hph-P	200	0.050
	nptII-P	200	0.050
	GUS-P	200	0.050
Primer	amp-F	400	0.100
	amp-R	400	0.100
	hph-F	400	0.100
	hph-R	400	0.100
	nptII-F	700	0.175
	nptII-R	700	0.175
	GUS-F	600	0.150
	GUS-R	600	0.150
TE-Puffer		-	0.750
Total			2

* dient zur Rechenhilfe

PCR-Mastermix

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz*
Primer-Sonden-Mix	-	2.0
Wasser	-	5.5
ABsolute™ QPCR Mastermix (2x)	1x	12.50
Total		20

* dient zur Rechenhilfe

4.2 ZUGABE DES DNA-EXTRAKTS ZUM MASTERMIX

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 Nuss-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 des QS-HB, Kapitel 6, Anhang: „Die Polymerase Chain Reaktion (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 **Positivkontrolle** (eine positive Probe, die mit Sicherheit bar, cp4epsps, pat bzw. GOX-DNA enthält, z.B. Referenz- oder Vergleichsprobe): Die Positivkontrolle muss positiv sein, ansonsten muss ein Fehler in der PCR vermutet werden. Es sollte eine Konzentration (z.B.: Deklarationsgrenze: 0.1%) untersucht werden, die für die Analyse sinnvoll ist.
- Eine **Inhibitionskontrolle**: Die Inhibitionskontrolle wird über das FNC-System (vgl. SOP327, SOP423) gemacht. Sie wird für jeden DNA-Extraktionsansatz der gleichen Matrix gemacht. Sind die Ct-Werte einer Probe mit DNA-Extrakt signifikant höher als die Ct-Werte einer Probe mit Wasser, muss von einer Inhibition der PCR ausgegangen werden. Da sich die Konzentration des Referenzplasmids bei der Herstellung von neuem Mastermix leicht verändern kann, sollten nur Ct-Werte von Proben, die denselben Mastermix enthalten, verglichen werden.

Eine Gehaltsbestimmung (Abschätzung) der Proben hat durch eine 2-fach-Extraktion und eine 2-fach-Bestimmung zu erfolgen. Für ein erstes Screening auf positive Proben reicht in der Regel eine einfache Extraktion.

Wichtiger Hinweis:

- Diverse Bakterien können Antibiotikaresistenzgene tragen (siehe Validierungsunterlagen). Enthalten die zu untersuchenden Proben Bakterien-DNA oder DNA eines anderen Ursprungs mit bakterieller Verunreinigungen, kann es zu einer falsch-positiver Amplifikation kommen. Falls eine falsch-positives Resultat nicht aufgrund der Herkunft der Probe ausgeschlossen werden kann, kann der positive Befund durch einen weiteren GV-Nachweis erhärtet und z.B. durch einen Event-spezifischen Nachweis bestätigt werden.
- Aufgrund der biotechnologischen Herstellung der Taq Polymerase mit GV-E. coli (und u.U. anderer im Verfahren eingesetzter Reagenzien) kann es zu einem systemischen falsch-positiver Resultat bzw. einem Hintergrundrauschen (wahrscheinlich bei amp, möglich bei nptII, GUS) kommen. Dieses manifestiert sich in diesem Fall bereits im Reagenzien-Blindwert (Mastermixkontrolle, NTC: No-Template-Control). Je nach Anbieter und Batch der Taq Polymerase bzw. des PCR Mastermixes variiert dieses Signal.

Wenn die Kontrollen nicht die erwarteten Resultate ergeben, dann entscheidet der Prüfleiter, ob die Untersuchung allenfalls nach Einleitung geeigneter Massnahmen wiederholt werden soll.

7 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

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

8 REFERENZEN

1. Ehlers, B., et al., *Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 1997. **40**(4): p. 118-121.
2. McCormick, et al., *Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food*. Journal of Applied Microbiology, 1998. **84**(6): p. 969-980.
3. Weng, H., et al., *Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with HMG I/Y as an endogenous reference gene*. Plant Molecular Biology Reporter, 2004. **22**(3): p. 289-300.
4. Ding, J., et al., *Validation of a Rice Specific Gene, Sucrose Phosphate Synthase, Used as the Endogenous Reference Gene for Qualitative and Real-Time Quantitative PCR Detection of Transgenes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(11): p. 3372-3377.

9 REFERENZEN

Publikationen aus Kap. 8