

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Real-Time PCR zur quantitativen Bestimmung gentechnisch veränderter Rapslinien mit dem 35S/<i>pat</i>-Genkonstrukt	AM019
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2006 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Zurzeit befinden sich diverse transgene Rapslinien, die gegen das Herbizid Glufosinat tolerant sind, in Freisetzungen, ihr Inverkehrbringen ist in der EU beantragt oder ist bereits genehmigt. Genetischer Hintergrund für die Glufosinat-Toleranz dieser Linien ist die Kombination des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (*Cauliflowermosaic-Virus* CaMV) mit einem synthetischen Phosphinotricin-Acetyltransferase-Gen, dem *pat*-Gen. Dieses 35S/*pat*-Genkonstrukt liegt in den nachfolgenden Rapslinien vor und kann zu deren quantitativer Bestimmung verwendet werden:

Bezeichnung	Unique Identifier	Status Stand 03/2006	Rechtsgrundlage
HCN10, HCN14, HCN92 bzw. Topas 19/2	ACS-BNØØ7-1	Notifizierung als Lebensmittelzusatzstoff Futtermittel EU-Import und Prozessierung genehmigt; HCN10, HCN14 u. HCN92 stammen von Topas 19/2 ab	VO 258/97 Teil C 90/220/EC überführt nach Artikel 8 und 20 der VO 1829/2003
T45 bzw. HCN28	ACS-BN-ØØ8-2	Notifizierung als Lebensmittelzusatzstoff Event T45 wird auch als HCN28 bezeichnet	258/97 überführt nach Artikel 8 der VO 1829/2003 EU-Zulassung nach VO1829/2003 beantragt
Liberator pHoe6/Ac	ACS-BN-ØØ9-3	EU-Zulassung beantragt; Freisetzungen erfolgt	2001/18/EC
Falcon GS 40/90	ACS-BN-Ø1Ø-4	EU-Zulassung beantragt; Freisetzungen erfolgt	2001/18/EC

Die Methode beschreibt ein Routineverfahren zur quantitativen Bestimmung der 35S/*pat*-spezifischen DNA-Sequenz - dem Übergang zwischen dem 35S-Promotor und dem (modifizierten) *pat*-Gen - in DNA aus Raps (*Brassica napus L. spp. oleifera*) mittels Real-Time PCR in einem so genannten TaqMan[®] 5'-Nuclease Assay [1].

Dabei wird die Kopienzahl des 35S/*pat*-Genkonstrukts und die Kopienzahl des rapspezifischen Referenzgens *pepC* (Phosphoenolpyruvat-Carboxylase) gemessen. Aus dem Verhältnis der ermittelten Kopienzahlen lässt sich der Anteil an gentechnisch veränderter Raps-DNA in den Untersuchungsproben berechnen. Die Quantifizierung des GVO-Anteils erfolgt unter der Voraussetzung, dass das Verhältnis der Kopienzahl des Transgens zu der des Referenzgens im Genom des GVO bekannt und in Untersuchungsmaterial und Referenzmaterial identisch ist. Die Methode ermöglicht insbesondere die Quantifizierung von transgenen Rapsamen der oben aufgeführten GVO-Linien in konventionellem Rapsaatgut.

2. Beschreibung des Verfahrens

Die quantitative Bestimmung beruht auf der Amplifikation der Übergangssequenz von dem 35S-Promotor zu einem synthetischen *pat*-Gen, wie sie im Plasmid pHoe6/Ac vorliegt. Die

Menge des 111 bp großen PCR-Amplifikats wird mit Hilfe einer 35S/*pat*-spezifischen Sonde, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist, in jedem PCR-Zyklus gemessen. Dabei fungiert FAM als Reporterfarbstoff, während der Farbstoff TAMRA als so genannter Quencher (Farblöcher) fungiert. Das Detektionsverfahren beruht auf dem TaqMan 5' Nuclease Assay, in dem die beiden Farbstoffe nach Bindung der Sonde an die Zielsequenz durch die 5' Exonukleaseaktivität der Polymerase räumlich voneinander getrennt werden und so die Auslöschung der Fluoreszenz von FAM durch TAMRA unterbleibt. Die Zunahme der FAM-Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl neu synthetisierter 35S/*pat*-Kopien und wird in jedem Zyklus gemessen, um daraus später den Ct-Wert abzuleiten. Dieser Wert entspricht der Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal erstmals einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt. In einer gegebenen PCR ist der Ct-Wert ein Maß für die Anfangskopienzahl der detektierten DNA-Sequenz. Für die Berechnung der Kopienzahl werden gleichzeitig Kalibriermessungen mit definierten DNA-Standards aus Referenzmaterial durchgeführt.

In einer parallelen Real-Time PCR-Analyse mit der gleichen Proben-DNA wird ein 93 bp großes Fragment des Raps-spezifischen *pepC*-Gens amplifiziert und nach dem gleichen Prinzip die Kopienzahl bestimmt.

Für die Bestimmung des relativen Anteils 35S/*pat*-spezifischer DNA in einer Probe wird die Kopienzahl des Transgens mit der des Referenzgens ins Verhältnis gesetzt. Der so errechnete prozentuale Wert entspricht dem Anteil gentechnisch veränderten Rapsmaterials in der Probe unter der Voraussetzung, dass das Verhältnis von 35S/*pat*-Sequenz zu Referenzgen im Genom des Untersuchungsmaterials und dem des Referenzmaterials identisch sind.

3. Chemikalien und Lösungen

Die hier dargestellte Methode ist für die Verwendung des Universal Mastermix der Firma Applied Biosystems und den ABI Prism[®] Sequence Detection Systemen der Firma konzipiert. Bei Verwendung von anderen Chemikalien und Geräten sind die Reaktionsbedingungen und Geräteeinstellungen entsprechend den Angaben des Herstellers anzupassen. Die bei Verwendung des ABI Prism[®] Sequence Detection System benutzten Reagenzien und Materialien sind im Weiteren mit * gekennzeichnet.

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien sowie steriles deionisiertes Wasser zu verwenden

DNA-Sequenzen der Oligonukleotid-Primer :

35SP03.f	5' AAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACA 3'
pat-7.r	5' CGGCCATATCAGCTGCTGTAG 3'
pep-F2	5' GAGAACTGAATGAGAGGTGCATTGT 3'
pep-R2	5' AGTTCCTAAATTCTTGAGACGIGTT 3'

DNA-Sequenzen der Oligonukleotid-Sonden:

GSS01.s	5' FAM -CCGGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAGGC- TAMRA 3'
pep-S	5' FAM -ACACGCTCGTTGATTCCAATGTTCTTCA- TAMRA 3'

Primer und Sonden werden synthetisch hergestellt und in H₂O gelöst. Von den so erhaltenen Stammlösungen werden wiederum Arbeitslösungen mit den unten angeführten Konzentrationen hergestellt

Arbeitslösungen der 35S/pat-spezifischen Primer und Sonde:

Bezeichnung	Konzentration	Funktion
35SP03.f	5 µmol/l	35S/pat-Primer 1
pat-7.r	5 µmol/l	35S/pat-Primer 2
GSS01.s	5 µmol/l	35Spat-Sonde

Das mit diesem Primerpaar erzeugte Amplifikat hat eine Länge von von 111 bp.

Arbeitslösungen der pepC-spezifischen Primer und Sonde:

Bezeichnung	Konzentration	Funktion
pep-F2	5 µmol/l	rapsspezifischer Primer 1
pep-R2	5 µmol/l	rapsspezifischer Primer 2
pep-S	5 µmol/l	rapsspezifische Sonde

Das mit diesem Primerpaar erzeugte Amplifikat hat eine Länge von von 93 bp.

4. Material und Geräte

Materialien, Geräte, Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung autoklaviert werden. Zur Vermeidung von Kontaminationen wird die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dringend empfohlen.

- Nitrilhandschuhe
- Für die Real-Time PCR geeignete Gefäße und Deckel bzw. Folien (z.B. Optical Adhesive Covers (Art.Nr. 4311971)* und 96-Well Optical Reaction Plate (Art.Nr. 4306737)*)
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse Größen)
- Reaktionsgefäße (diverse Größen)
- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit
Im Ringversuch wurden folgende Geräte erfolgreich eingesetzt: ABI Prism ® Sequence Detection Systeme 7000, 7700, 7900 (Fa. Applied Biosystems), LightCycler (Fa. Roche) und iCycler (Fa. Bio-Rad)
- Mikrozentrifuge

5. Durchführung

5.1 Herstellung der Reaktionsgemische für den Nachweis 35S/pat-spezifischer und pepC-spezifischer DNA

Als Vorbereitung für die Untersuchungen wird ein Reaktionsgemisch aus Primern, Sonde und „TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)“* hergestellt. Diesem wird nach der Aufteilung in

die Reaktionsgefäße die zu messende DNA zugesetzt. Das Endvolumen je Reaktion beträgt 25 µl (20 µl Reaktionsgemisch + 5 µl extrahierte DNA). Dazu werden folgende Lösungen in ein steriles 1,5 ml Mikroliterreaktionsgefäß pipettiert:

Reaktionsgemisch für den *35S/pat*-Nachweis:

Reagenzien	Endkonzentration	µl pro Ansatz
Primer 35SP03.f [5 µmol/l]	200 nmol/l	1.0
Primer pat-7.r [5 µmol/l]	200 nmol/l	1.0
Sonde GSS01.s [5 µmol/l]	100 nmol/l	0.5
steriles deion. Wasser	-	5.0
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)*	1x	12.5

Reaktionsgemisch für den *pepC*-Nachweis:

Reagenzien	Endkonzentration	µl pro Ansatz
Primer pep-F2 [5 µmol/l]	200 nmol/l	1
Primer pep-R2 [5 µmol/l]	200 nmol/l	1
Sonde pep-S [5 µmol/l]	100 nmol/l	0.5
steriles deion. Wasser	-	5
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)*	1x	12.5

Die DNA-Isolate jeder Probe sind mindestens als Triplikate zu messen. Die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl der durchzuführenden PCR-Reaktionen und einem Überschuss zum Ausgleich von Pipettiergenauigkeiten. Bevor jeweils 20 µl der Reaktionsgemische in die Reaktionsgefäße (z.B. Mikrotiterplatte) vorgelegt werden sind diese gut zu durchmischen. Anschließend werden je 5 µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen hinzu pipettiert und ggf. 2 min zentrifugiert.

5.2 Kalibriermessungen

Für Kalibriermessungen (Standardkurve) werden mindestens 5 Kalibrierlösungen verwendet, die definierte Mengen der nachzuweisenden DNA-Sequenzen enthalten und den Messbereich der Proben abdecken. Dazu ist eine Verdünnungsreihe genomischer DNA wenn möglich aus zertifiziertem Referenzmaterial einzusetzen. Jede Verdünnungsstufe der Kalibrierreihe sollte mindestens als Duplikat gemessen werden. Falls die Ct-Werte für das Referenzgen in den Kalibrierlösungen und/oder in den Proben < 22 betragen, sollte die Messung nach Verdünnung der DNA wiederholt werden. Bei einer relativen Standardabweichung der errechneten Kopienzahl von über 30% ist die Messung zu wiederholen, wenn möglich mit konzentrierteren DNA-Lösungen. Höhere relative Standardabweichungen weisen auf technische Probleme oder die Quantifizierungsgrenze der Methode hin.

Ein Richtwert für die Anzahl der Kopien des Referenzgens ergibt sich aus der Literatur (Hübner et al., 2001 [2]), wonach 100 ng Raps-DNA 77000 haploiden Genomkopien und Referenzgenkopien entsprechen, unter der Annahme, dass das Referenzgen in Einzelkopie im Genom vorliegt.

5.3 Geräteeinstellungen

Bei Real-Time PCR-Geräten im Mikrotiterplatten-Format ist folgendes Temperatur-Zeit-Programm zu verwenden:

Schritt	Einstellung
Aktivierung der Polymerase	10 min / 95°C
Amplifikation (45 Zyklen)	15 sec / 95°C 60 sec / 60°C

Das Reaktionsvolumen „25 µl“ ist in der Gerätesoftware einzugeben. Position und probenspezifische Angaben der Referenz-, Kontroll- und Untersuchungsproben sind in den Eingabevorlagen einzutragen und mit FAM als Reporterfarbstoff zu definieren. Wird ROX als Messreferenzfarbstoff verwendet ist dies ebenfalls bei der Geräteeinstellung zu berücksichtigen.

6. Auswertung

Die Auswertung erfolgt gemäß den Anweisungen des Geräteherstellers. Zur Berechnung der Basislinie sind in der Regel Zyklus 5 bis 15 heranzuziehen. Für die Berechnung der Ct-Werte ist in der Regel ein Wert <0,2 als geeigneter Schwellenwert zu verwenden*.

Anhand der von der Gerätesoftware berechneten Ct-Werte werden die Kopienzahlen berechnet. Die Kopienzahlen der 35S/*pat*-spezifischen Sequenzen und die des *pepC*-Gens einer Probe werden über die Kalibrierkurven ermittelt. Für ihre Berechnung werden die Werte für den y-Achsenabschnitt und für die Steigung der entsprechenden Regressionsgerade in folgende Formel eingetragen.

$$\text{Kopienzahl} = 10^{((\text{Ct-Wert} - \text{y-Achsenabschnitt}) / \text{Steigung})}$$

Aus den Kopienzahlen der Replikate einer Probe sind der Mittelwert der Kopienzahl, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung zu bestimmen.

Die relative Menge 35S/*pat*-spezifischer Sequenzen wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Menge (\%)} = \frac{\text{Mittelwert der Kopienzahl des Transgens (35S/pat) in der Probe}}{\text{Mittelwert der Kopienzahl des Referenzgens (pepC) in der Probe}} \times 100$$

Die Berechnung der Standardabweichung der relativen Menge erfolgt nach der Formel für die Division von Messwerten (Fenner, 1931 [3]; Sachs, 1978 [4]):

$$S = \frac{1}{\bar{x}_2} \sqrt{\bar{x}_1^2 s_{\bar{x}_2}^2 + \bar{x}_2^2 s_{\bar{x}_1}^2}$$

wobei

\bar{x}_1 = Mittelwert der Kopienzahl des Transgens

\bar{x}_2 = Mittelwert der Kopienzahl des Referenzgens

$s_{\bar{x}_1}$ = Standardabweichungen der Mittelwerte der Kopienzahl des Transgens

$s_{\bar{x}_2}$ = Standardabweichungen der Mittelwerte der Kopienzahl des Referenzgens

Hinweise:

- Gegebenenfalls müssen Verdünnungen der Proben-DNA bei der Berechnung berücksichtigt werden.
- Die Berechnung des GVO-Gehaltes einer Untersuchungsprobe aus dem Verhältnis der Kopienanzahl von Transgen und Referenzgen erfolgt unter der Voraussetzung, dass das Kopienverhältnis im Genom des Referenzmaterials mit dem des Untersuchungsmaterials

übereinstimmt. Es wird darauf hingewiesen, dass der Genotyp der Rapslinie in der Probe von dem des Referenzmaterials abweichen kann.

7. Qualitätssicherung

7.1 Durchführung von Kontrollmessungen

Für jede Messung wird empfohlen, folgende Kontrollen in Duplikaten_mitzuführen:

- **Negative Reagenzienkontrolle (no template control)** - (Reaktionsansatz, der mit Wasser anstatt DNA-Extraktionslösung versetzt wird). Der Reagenzienkontrolle muss negativ sein, ansonsten ist das Reaktionsgemisch kontaminiert bzw. es liegt eine Verschleppung von DNA während des PCR-Ansatzes vor.
- **Negative DNA-Extraktionskontrolle** - eine Probe, die durch den ganzen Extraktionsschritt mitgeführt wurde, die aber mit Sicherheit keine 35S/*pat*-spezifische DNA enthält. Falls kein entsprechendes Rapssaatgut verfügbar ist, kann hierfür DNA-Extraktionspuffer verwendet werden. Diese Kontrolle muss negativ sein, ansonsten ist eine Kontamination bei der DNA-Extraktion zu vermuten.
- **Kalibrier-Standards** - DNA zur Kalibriermessung mit Angaben zu den Kopienzahlen oder dem GVO-Gehalt. In der Regel wird eine Verdünnungsreihe genomischer DNA aus der transgenen Linie verwendet.
- **Positivkontrolle** - DNA aus Material, in dem sich ein definierter Anteil des nachzuweisenden Genabschnitts befindet. Soweit verfügbar sollten zertifizierte Referenzmaterialien (z.B. IRMM) verwendet werden.

Sollten die Kontrollen nicht das erwartete Ergebnis ergeben, muss die Untersuchung wiederholt werden. Die Messung der Proben-DNA sollte grundsätzlich **in Triplikaten** erfolgen.

7.2 Validierung

Diese Methode wurde 2006 mit der transgenen Rapslinie Falcon GS40/90 unter der Teilnahme von 14 Laboren validiert. Die Messung einer Probe (DNA-Lösungen) mit vorgegebenem Anteil der 35S/*pat*-Sequenz von 0,1% ergab im Ringversuch einen Mittelwert der Ergebnisse aller Teilnehmer von 0,14%. Die Standardabweichung lag hier bei 37%. Die Messung einer 0,5 % Probe ergab einen Mittelwert von 0,51% mit einer relativen Standardabweichung von 21%. Bei dieser Auswertung sind Grubbs- und Cochran-Ausreißer entfernt worden.

Weitere Validierungsdaten können beim Hamburger Gentechniküberwachungslabor erfragt werden.

8. Literatur

[1] **Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. and Gelfand, D.H.** (1991)

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:357-362

[2] **Hübner, P., Waiblinger, H.-U., Pietsch, K., Brodmann, P.** (2001)

Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plants in Food. J. AOAC Int. **84**:1855-1864.

[3] **Fenner, G.** (1931) Das Genauigkeitsmaß von Summen, Differenzen, Produkten und Quotienten der Beobachtungsreihe. Die Naturwissenschaften **19**:310

[4] **Sachs, L.** (1978) Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Heidelberg