



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Modul Spezielle Gentechnologie

**Real Time PCR – basierter Nachweis von GVO mit Hilfe des 35S-Promotors mit der
TaqMan™-Technologie**

Arbeitsanleitung und Leitfaden auf Grundlage der Bachelorarbeit:

Entwicklung und Anwendung einer Real Time PCR-Methode zum Nachweis von genetisch
modifizierten Pflanzen auf Basis des 35S-Promotors

Verfasser: Arne Gerhardt

Neubrandenburg, 28.02.2014



Abkürzungen

CaMV P35S Cauliflower Mosaikvirus Promotor 35S

ERM European Reference Material

MM Mastermix

Bp Basenpaare

6-FAM 6-Carboxyfluorescein

TAMRA Tetramethylrhodamin

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Arbeitsanleitung	3
2.1	Isolierung pflanzlicher DNA	3
2.2	Reinheitsprüfung und Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA	5
2.3	PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen.....	6
3	Auswertung - Ermittlung des GVO-Gehaltes	9
3.1	Absolute Quantifizierung anhand von Standards	9
3.2	Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	10
4	Literatur.....	11
5	Tabellen und Abbildungen.....	12
6	Anlage	13

1 Einleitung

Diese Anleitung soll als Leitfaden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von genetisch modifizierten Organismen dienen. Gegenstand ist die Real Time PCR unter Verwendung der TaqMan™-Technologie mit Hilfe der CaMV-35S-Promotorsequenz als Charakteristikum genetisch modifizierten Pflanzenmaterials. Die Verwendung der 35S-Sequenz in Form von Primern und Sonden stellt in diesem Kontext ein sogenanntes Event-spezifisches Verfahren dar. Solche werden oftmals als Screening-Verfahren eingesetzt. Die Gensequenz ist nicht zwingend an eine spezielle Pflanzenart gebunden, sondern wurde im Zuge der gentechnischen Modifikation in das Genom des Zielorganismus eingebaut (Kempken, Kempken; 2004) (Menrad et al., 2003).



Abb.1: Charakterisierung der DNA einer transgenen Pflanze am Beispiel einer GV-Sojabohne (IKB, 2011)

Promotorsequenzen haben im Allgemeinen die Aufgabe, die Transkription sowie letztendlich die Expression zu nachfolgender Gene zu fördern bzw. zu verstärken, wobei der 35S-Promotor in diesem Fall für eine starke Expression sorgt (Kempken, Kempken; 2004) (Menrad et al., 2003). Durch die Abbildung 1 wird eine Gensequenz beschrieben, die in einer GV-Sojabohne enthalten sein kann. Ferner gibt es Konstrukt-spezifische Verfahren, bei denen eine für die jeweilige Pflanze typische Gensequenz Gegenstand der Untersuchung ist. Für die Abbildung 1 betrifft dies die Bereiche CTP und CP4 EPSPS (siehe Padgett, 1995). Der Einsatz fluorogener Sonden ermöglicht die Detektion des 35S-Promotors mit der oben genannten Methode.

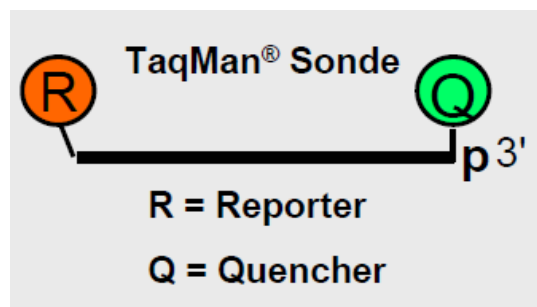


Abb. 2: Schematische Darstellung einer TaqMan™-Sonde (GDCh, 2010)

Diese Sonden besitzen am 5'-Ende der 35S-Sequenz einen Reporter-Farbstoff, in diesem Fall 6-FAM (siehe Abbildung 2). Am 3'-Ende befindet sich ein Quencher-Molekül (TAMRA), das die Fluoreszenz zunächst unterdrückt (siehe auch Anlage 1). Der PCR-Vorgang (siehe Abbildung 3) beginnt mit einer Denaturierung des Templates bei 95°C („Schmelzen“). Die entstehenden Einzelstränge dienen als Matrize für die Primer und Sonden. Darauf folgende Schritte (siehe Abbildung 3, Nr. 2, 3, 4) verlaufen im Gegensatz zu einer Standard-PCR isotherm, beispielsweise bei 60°C.

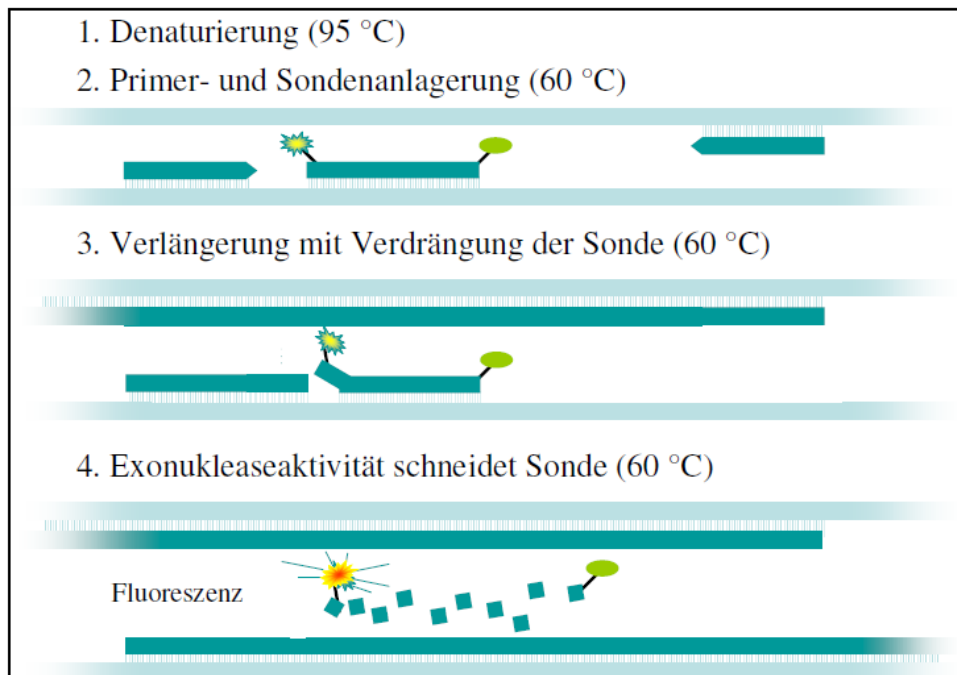


Abb. 3: Prinzip der *TaqMan*TM-Technologie (Zagon et al., BfR, 2006)

Nach Anlagerung der Primer und Sonden (Annealing) verlängert die Polymerase die jeweiligen Sequenzen (Elongation). Dabei wird die Sonde verdrängt. Die Exonuklease-Aktivität der Polymerase schneidet die Sonde. Es besteht keine räumliche Nähe mehr zwischen Reporter-Farbstoff und Quencher. 6-Fam emittiert folglich Strahlung bei einer Wellenlänge von 518 nm. Dieses Signal wird im Light-Cycler gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenz wird in einem Fluoreszenzintensität-Zyklenzahl-Diagramm dargestellt (Müller, 2001) (Tevfik Dorak, 2006) (Zagon et al., BfR, 2006).

2 Arbeitsanleitung

2.1 Isolierung pflanzlicher DNA

Die folgenden Schritte beschreiben die DNA-Isolierung mit dem SureFood PREP Plant Kit. Alternativ können weitere Extraktionsmethoden, wie zum Beispiel der MasterPure DNA Purification Kit, herangezogen werden.

Aufschluss des Zellmaterials.

Einwaage von 50 mg Probe (1,5 ml Eppendorf-Tube)

Zugabe von 400 µl Lysis-Puffer, 20 µl Proteinase K, vortexen

Inkubation (65°C, 1h, Schüttel-Wasserbad)

Filtern des Lysats, Einstellen optimaler Reaktionsbedingungen.

Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge) bei 13.000 U/min, RT, 2 min

Überführung des Überstandes auf einen Spin Filter (in gelbem Receiver Tube)

Zentrifugation bei 13.000 U/min, RT, 2 min

Spin Filter werfen

Zugabe von 200 µl Binding Buffer, vortexen

Bindung der DNA an einen Spin-Filter.

Lösung in neuen Spin Filter überführen, der in ein neues Receiver Tube gesetzt wurde

Inkubation (RT, 1 min)

Zentrifugation bei 13.000 U/min, RT, 2 min

Filtrat werfen, Spin Filter wieder ins Receiver Tube setzen

Waschen des Spin Filters (Pre Wash Buffer).

Zugabe von 550 µl Pre Wash Buffer

Zentrifugation bei 13.000 U/min, RT, 1 min

Filtrat werfen, Spin Filter wieder ins Receiver Tube setzen

Waschen des Spin Filters (Wash Buffer).

Zugabe von 550 µl Wash Buffer

Zentrifugation bei 13.000 U/min, RT, 1 min

Filtrat werfen, Spin Filter wieder ins Receiver Tube setzen

Zugabe von 550 µl Wash Buffer
Zentrifugation bei 13.000 U/min, RT, 1 min
Filtrat verwerfen

Trocknen des Spin Filters (Abzug).

Spin Filter wieder ins Receiver Tube setzen
Zentrifugation bei 13.000 U/min, RT, 2 min

Elution der DNA vom Spin Filter.

Spin Filter in ein klares Receiver Tube setzen
Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (auf 65°C erwärmt!!!)
Inkubation (RT, 3 min)
Zentrifugation bei 13.000 U/min, RT, 2 min
Spin Filter verwerfen, Eluat entspricht der Proben-DNA

Achtung !!! Sofern bereits extrahierte Proben verwendet werden, ist unbedingt darauf zu achten, dass im Fall einer Kühltank-Lagerung Kondensatbildung vor Verwendung auftritt. Diese führt zu einer Konzentrationsänderung des Templates. Durch kurzes Zentrifugieren lässt sich diese Fehlerquelle beheben. Besonders bei Standards ist dieser Fakt sehr wichtig für spätere Quantifizierungs-Ergebnisse.

2.2 Reinheitsprüfung und Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA

Kriterium für die Reinheit einer DNA-Probe ist das Verhältnis der optischen Dichte von 260 nm zu 280 nm. Das Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der 4 Basen beträgt 260 nm. Aussagen über mangelnde Reinheit der isolierten Proben sind in diesem Fall nicht unbedingt mit einer schlechten Messung verbunden. Aufgrund der Spezifität der TaqMan™-Primer und -Sonden steht zunächst das Vorhandensein der jeweiligen komplementären Sequenzen im Vordergrund. Auch mit einem OD_{260/280}-Verhältnis von beispielsweise 1,3-1,5 können Amplifizierungen erfolgen. Dennoch sollte die Probe möglichst gut aufgeschlossen vorliegen. Trübungen etc. könnten später im Light-Cycler zu Fehlinterpretationen führen (Thermo Fisher Scientific, 2011).

$$\left(\frac{Abs_{260} - Abs_{320}}{Abs_{280} - Abs_{320}} \right)$$

Die 320 nm repräsentieren das Grundrauschen, das vom jeweiligen Wert subtrahiert wird. Ein optimales OD_{260/280}-Verhältnis sollte einen Wert von 1,8-2,0 haben. Zur photometrischen Reinheitsprüfung der DNA-Proben wird ein Spektralphotometer MULTISKAN GO der Fa. Thermo Fisher Scientific Oy (Vantaa, Finnland) mit der dazugehörigen Software „ScanIt RE for Multiskan GO 3.2“ verwendet. Die Proben werden mit Hilfe einer µdrop-Platte vermessen (Applikationsvolumen 1-2 µl). Es gilt dabei, dass eine optische Dichte von 1 eine Konzentration von 50 ng/µl besitzt (Thermo Fisher Scientific, 2011).

$$c_{DNA} \left(\frac{ng}{\mu l} \right) = ABS_{260nm} * 50 \frac{ng}{\mu l} * \frac{10}{0,51} = ABS_{260nm} * 50 \frac{ng}{\mu l} * 19,6$$

In Anbetracht der optischen Weglänge muss ein Multiplikationsfaktor von 20 laut Hersteller in die Berechnung einfließen. Tatsächlich beläuft sich dieser auf 19,6. Die durch die beschriebenen Gleichungen ermittelten Werte bildeten die Grundlage für Ausgangskonzentrationen als Voraussetzung für Verdünnungsreihen, sowie Probenverdünnungen (Thermo Fisher Scientific, 2011).

2.3 PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen

Zu verwendende Primer und Sonden sind in der Tabelle 1 dargestellt. Prinzipiell können auch andere spezifische Primer/Sonden je nach Einsatzzweck der PCR verwendet werden.

Tab. 1: Sequenzen verwendeter Primer und Sonden (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)

Primer/Sonde	Konzentration	Sequenz
35S-F	20 mmol	GCC TCT GCC GAC AGT GGT
35S-R	20 mmol	AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTTC
35S-TMP	-	6FAM-CAA AGA TGG ACC CCA CCC ACG--TMR
GM1-F	20 mmol	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC
GM1-R	20 mmol	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC
GM1-Sonde	-	6FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC--TMR

Ein Ansatz erfordert verschiedene Komponenten, die in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt sind. Alternativ können auch PCR-Kits, z.B. peqGOLD „Hot“ Start-Mix Real Time, verwendet werden. Eventuelle Anpassungen der Ansätze sind entsprechend der Herstellerinformation vorzunehmen.

Tab. 2: Zusammensetzung Pre-MM

Reagenzien	Volumen pro Ansatz (µl)
Hot-Start-Polymerase (peqGOLD „Hot“)	0,125
Reaktionspuffer Y	2,5
dNTPs	1
MgCl ₂ , 0,25 mmol	1
Reinstwasser	14,375
Summe pro Ansatz:	19 µl

Tab. 3: Zusammensetzung MM (= 1 Ansatz)

Reagenzien	Volumen pro Ansatz (µl)
Pre-MM	19
Primer Forward	0,375
Primer Reverse	0,375
Sonde	0,25
Probe	5
Summe pro Ansatz:	25 µl

Aus der in Abschnitt 2.2 beschriebenen Konzentrationsbestimmung ist die Ausgangskopienzahl des extrahierten Standards zu ermitteln. Die Berechnung orientiert sich

an der Vorgehensweise von Zagon et al. (BfR, 2006). Demnach wurde basierend auf der Genomgröße (Soja) das Moleküllgewicht bestimmt (siehe Gleichung III). Die Konstante 660 berücksichtigt die Doppelsträngigkeit der DNA. Es wird davon ausgegangen, dass die Genomgröße (Soja) $1,13 \cdot 10^9 \text{ Bp}$ beträgt.

$$M = 1,13 \cdot 10^9 \text{ Bp} \cdot 660$$

$$M = 7,5 \cdot 10^9 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Ein Genomäquivalent Soja entsprechend einer Kopie ergibt sich aus dem Quotienten der Molekülmasse und der Avogadro-Konstante.

$$1 \text{ Kopie} = \frac{7,5 \cdot 10^9 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{6,02 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}} \approx 1,25 \cdot 10^{-14} \text{ g}$$

$$1 \text{ Kopie} = 1,25 \text{ pg}$$

Umgerechnet ergibt sich über das Verhältnis, dass 100 ng Soja DNA einer Kopienzahl von 80.000 entspricht. Diese Grundlage wird zur Berechnung der Verdünnungsreihe herangezogen (siehe Tabelle 4) (Zagon et al., BfR, 2006).

Tab. 4: Herstellen der Standards

Ausgangskonzentration des Stammextrakts [c = 229,5 ng/µl]			
Standard	Anzahl der Kopien	Log ₁₀ (Kopien)	Verdünnung
Extrakt 4	siehe Berechnung		Konz.-abhängig
Std. I	100.000	5,0	
Std. II	50.000	4,7	1:2
Std. III	10.000	4,0	1:5
Std. IV	1.000	3,0	1:10
Std. V	100	2,0	1:10
Std. VI	10	1,0	1:10
Std. VII	5	0,7	1:2

Einstellungen bezüglich des Temperaturverlaufs sollten nach Abbildung 4 vorgenommen werden. Über die Software Biorad CFX Manager können die aufgeführten Parameter verändert oder ein neues Programm geschrieben werden.

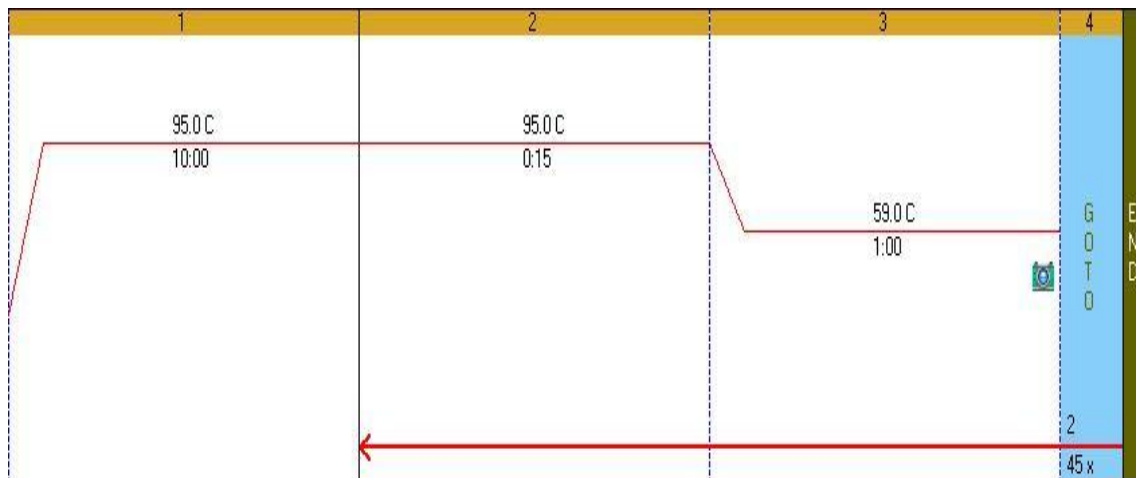


Abb. 4: Temperaturprotokoll Real Time PCR

Nach dem Start kann der Verlauf der Messung online beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensitäten werden in einem RFU-Zyklen-Diagramm angezeigt. Es ist weiterhin möglich, die Anzahl der Zyklen zu erhöhen, sofern die Voreinstellung nicht genügt.

3 Auswertung / Berechnung des GVO-Gehaltes

3.1 Absolute Quantifizierung anhand von Standards

Hierzu bedarf es einer Ermittlung der Kopienzahlen mit Hilfe von GVO-spezifischen (35S) sowie Pflanzen-spezifischen (GM1) Primern und Sonden. Werte zur Erstellung beider Quantifizierungsgeraden sowie Proben-Werte (Kopienzahlen) anhand dieser Geraden sind dem Abschlussprotokoll zu entnehmen. Es ist außerdem empfehlenswert, diese Diagramme per Microsoft Excel zu erstellen, um eine Funktionsgleichung zu erhalten, die zur Berechnung der Kopienzahlen dient (siehe Anlage 2). Jede Probe wird anhand der 2 Standard-Kurven (GM1, 35S) vermessen, indem der jeweilige Kopienwert, der durch Rücktransformation des Logarithmus der Kopienzahl (siehe Abbildung 5) entsteht, in die Geradengleichung eingesetzt wird. Abbildung 5 zeigt das Prinzip dieser Quantifizierung.

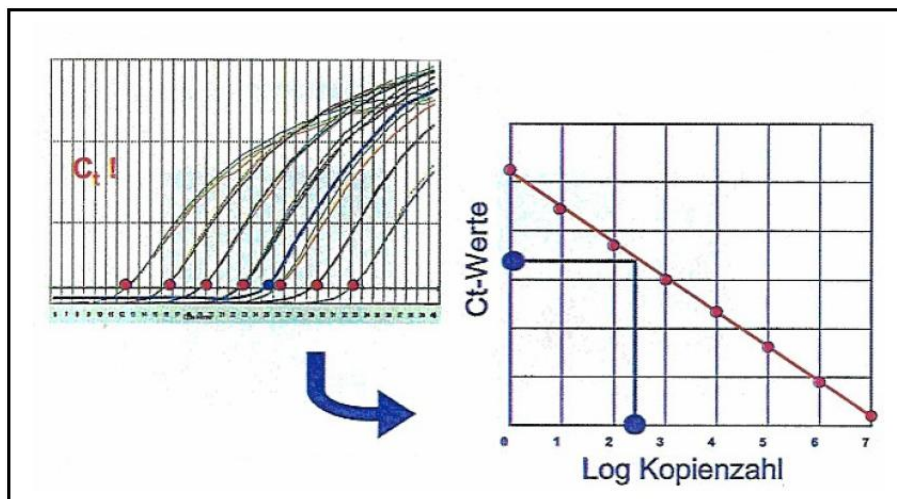


Abb. 5: C_t-Werte über Standard-Kopienzahlen

Die ermittelten Kopienzahlen (GM1 und 35S *einer* Probe) werden mit folgender Formel ins Verhältnis gesetzt:

$$\%GVO = \frac{\text{Kopienzahl } 35S \text{ ProbeX} * 100}{\text{Kopienzahl GM1 ProbeX}}$$

Sofern die Proben unterschiedlich stark verdünnt worden sind, ist der Verdünnungsfaktor vorher herauszurechnen. Bei gleicher Verdünnung spielt dieser Fakt keine Rolle, da nur das Verhältnis der Kopienzahlen gemessener Proben entscheidet.

3.2 Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Die relative Quantifizierung bezieht sich auf einen Standard, der als Referenzmaterial bezogen oder selbst hergestellt werden kann. Im letzteren Fall genügt eine definierte Mischung von Ausgangsmaterialien während der Einwaage des Probenmaterials vor der Isolierung der DNA. Eine 100%ige GVO-Probe (z.B. RR-Soja, gemahlen) wird demnach mit einer Blank-Probe in einem beliebigen Verhältnis gemischt. Sofern eine Vermutung bezüglich des GVO-Gehaltes zu untersuchender Proben besteht, kann der Standard in dessen Nähe gesetzt werden. Die Einwaage bezieht sich im Fall eines 10%-Standards auf 5 mg 100%-igen GVO-Ausgangsmaterials sowie 45 mg einer Blankprobe.

Tab. 5: Beispiel zur relativen Quantifizierung mit 35S- und GM1-Sonden und -Primern

Standard/ Probe	Ct GM1	Ct 35S	Mittelwert Ct GM1	Mittelwert Ct 35S	ΔC_t GM1	ΔC_t 35S	$\Delta\Delta C_t$	GVO- Gehalt (%)
Standard (S)	22,0 22,0	34,2 34,2	22,0	34,2	4,31	-1,7	- 6,01	10 %
Probe (P)	26,13 26,13	32,5 32,5	26,13	32,5	(P – S)	(P – S)		64 %

(Beispiel nach GDCh, 2010)

Aus der 2. und 3. Spalte der Tabelle 5 ist ersichtlich, dass diese Quantifizierung aus 8 Messungen besteht. Standard sowie Probe werden als Doppelmessung jeweils mit GM1- sowie 35S-Primern vermessen. Aus den Doppelbestimmungen wird jeweils der Mittelwert gebildet. Durch Subtraktionen der Mittelwerte erhält man den entsprechenden ΔC_t -Wert. Eine weitere Subtraktion (ΔC_t 35S - ΔC_t GM1) liefert den für diese Methode relevanten $\Delta\Delta C_t$ -Wert.

$$\%GVO = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Mit Hilfe dieser Formel wird der GVO-Gehalt anschließend berechnet.

4 Literatur

GDCh – Gesellschaft Deutscher Chemiker, “Aktuelle Trends der Real-Time-PCR in der Lebensmittelanalytik“, Freiburg, 25.-26. Nov. 2010

IKB (Institut Kirchhoff Berlin GmbH): Aktuelle Kurzinformationen zu genetisch verändertem Soja - Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) Soja. www.institut-kirchhoff.de/de/Download/Kundeninfoblatt_GVO_Soja.pdf. Vertreten durch: Dr. E. Kirchhoff, Dr. Jutta Kunert-Kirchhoff, Inhaltlicher Verantwortlicher: Norbert Pletz. Institut Kirchhoff Berlin GmbH, Albestr. 3-4, 12159 Berlin, Mai 2011

Kempken, F.; Kempken, R.: Gentechnik bei Pflanzen. 2. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 2004

Müller, H.-J.: PCR – Polymerase - Kettenreaktion. 1. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2001

Padgett, S. R.; Kolacz, K. H.; Delannay, X.; Re, D. B.; La Vallee, B. J.; Tinius, C. N.; Rhodes, W. K.; Otero, Y. I.; Barry, G. F.; Eichholtz, D. A.; Pescke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N. B.; Kishore, G. M.: Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* 35: S. 1451-1461, 1995

Tevfik Dorak, M.: Real-Time PCR. ISBN: 978-0-41537734-8. ASIN: B00DHPBCKC. © 2006 Taylor & Francis Group. New York: Taylor and Francis – Verlag, 2006

Thermo Fisher Scientific: DNA quantification in micro-liter volumes with Thermo Scientific μ Drop Plate. pdf-Datei des Herstellers. <http://www.thermoscientific.com/en/product/drop-plate.html>. SP&A Application Laboratory, Vantaa, Finland, 2011

Zagon, J.; Crnogorac, G.; Kroh, L.; Lahrssen-Wiederholt; Broll, H.: Nachweis von gentechnisch veränderten Futtermitteln – Eine Studie zur Anwendbarkeit von Verfahren aus der Lebensmittelanalytik. Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: BfR-Wissenschaft, 05/2006

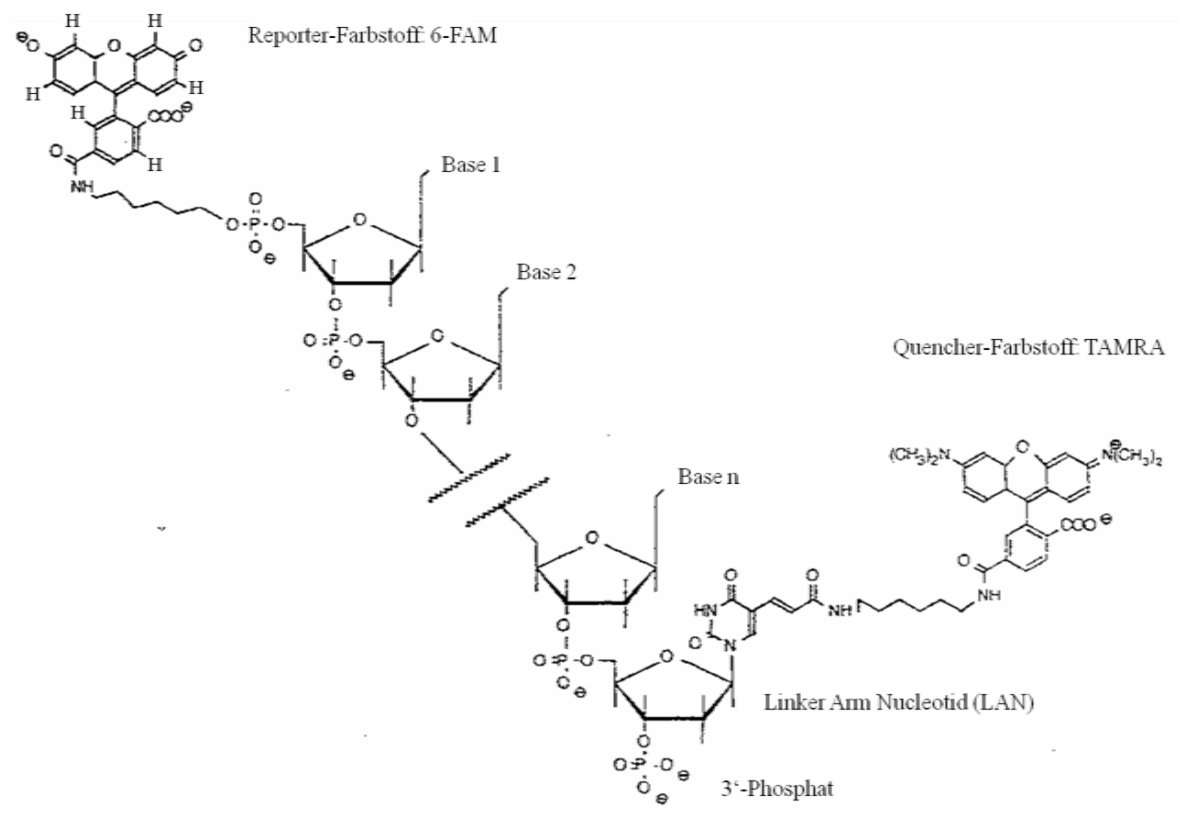
5 Tabellen und Abbildungen

Tab. 1	Sequenzen verwendeter Primer und Sonden (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)
Tab. 2	Zusammensetzung Pre-MM
Tab. 3	Zusammensetzung MM (= 1 Ansatz)
Tab. 4	Herstellen der Standards
Tab. 5:	Beispiel zur relativen Quantifizierung mit 35S- und GM1-Sonden und -Primern

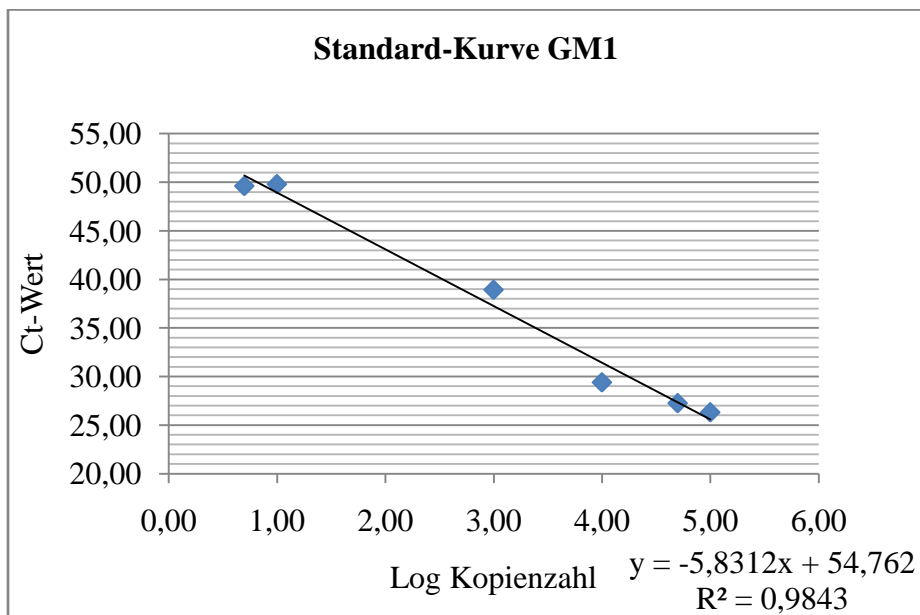
Abb. 1	Charakterisierung der DNA einer transgenen Pflanze am Beispiel einer GV-Sojabohne (IKB, 2011)
Abb. 2	Schematische Darstellung einer TaqMan TM -Sonde (GDCh, 2010)
Abb. 3	Prinzip der <i>TaqMan</i> TM -Technologie (Zagon et al., BfR, 2006)
Abb. 4	Temperaturprotokoll Real Time PCR
Abb. 5:	C _t -Werte über Standard-Kopienzahlen

6 Anlagen

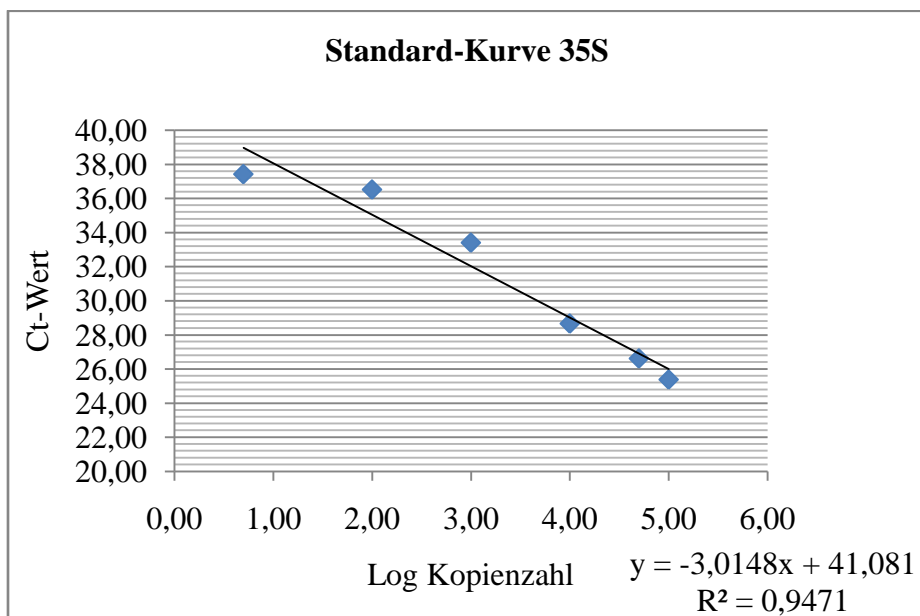
Anlage 1: Darstellung einer TaqMan™-Sonde (modifiziert nach Zagon et al., BfR, 2006; GDCh, 2010)



Anlage 2: Beispiele für Standardkurven (GM1 und 35S)



C_t-Wert-Log₁₀(Kopien)-Diagramm der GM1-Standard



C_t-Wert-Log₁₀(Kopien)-Diagramm der 35S-Standard