



GVO Screening -Kit

Nachweis von gentechnischen
Veränderungen mittels
Polymerase-
kettenreaktion(PCR)



GVO-Screening Kit

Nachweis von gentechnischen Veränderungen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

I. Einführung

Die Gentechnik stellt die Landwirtschaft vor neue Herausforderungen. Einerseits eröffnet die Produktion transgener Pflanzen neue Möglichkeiten der Lebensmittelherstellung, die zunehmend Einsatz finden und dazu führen, dass das Angebot an neuartigen Pflanzen und Lebensmitteln, die mittels gentechnischer Verfahren hergestellt wurden oder transgenes Material enthalten, weltweit zunimmt. Andererseits lehnen viele Verbraucher den Konsum gentechnisch veränderter Lebensmittel ab und fordern eine strikte Kennzeichnungspflicht dieser Produkte. Der Gesetzgeber hat diesem Verlangen Rechnung getragen. Bereits seit 1997 gibt es EU-weite Vorschriften zur Kennzeichnung gentechnisch veränderter Lebensmittel, im Jahr 2004 wurden diese deutlich verschärft.

Wie kann jedoch überprüft werden, ob ein pflanzliches Lebensmittel die Kennzeichnung „ohne Gentechnik“ verdient und frei ist von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) bzw. deren Produkten? Prinzipiell kann der GMO-Nachweis auf den veränderten Phänotyp oder den veränderten Genotyp gerichtet sein. Das heißt, man weist mit entsprechenden Methoden das oder die neu eingebrachten Protein(e) nach oder zeigt direkt die Veränderung des genetischen Materials. Letzteres ist die bessere Methode, da sie auch in hochverarbeiteten Lebensmitteln noch funktioniert.

Dabei hat sich insbesondere die diesem Kit zugrundeliegende Methode der Polymerase-kettenreaktion (PCR) als Methode der Wahl durchgesetzt, wobei der Nachweis durch die Vervielfältigung von zwei DNA-Sequenzen erfolgt. Sequenz 1 umfasst einen pflanzentypischen Genbereich, der somit sowohl in der normalen als auch in der gentechnisch veränderten Pflanze vorkommt. Ein positives PCR-Ergebnis signalisiert, daß die verwendeten Reagenzien und Verfahren ordnungsgemäß arbeiten und das die Probe pflanzliche DNA enthält (Positivkontrolle).

Sequenz 2 bezieht sich auf einen DNA-Abschnitt, der in vielen gentechnisch veränderten Pflanzen vorkommt. Da man nicht weiß, welche gentechnische Veränderung gegebenenfalls vorliegt, macht es Sinn, ein sog. Screening¹ durchzuführen. Ein positives PCR-Ergebnis liefert einen ersten Hinweis darauf, dass eine gentechnische Veränderung vorliegen könnte. Um zu verstehen, warum mit dieser Methode kein endgültiger Beleg für das Vorliegen einer gentechnischen Veränderung abgeleitet werden kann, bedarf es im Folgenden einer näheren Betrachtung des Nachweisverfahrens.

¹ Screening (engl. Durchsiebung, Rasterung, Selektion, Durchleuchtung): Ein systematisches Testverfahren, das innerhalb eines definierten Prüfbereichs alle Objekte, die bestimmte Eigenschaften tragen, identifiziert.

Bei der gentechnischen Veränderung von Pflanzen fanden bislang sehr oft die gleichen Regulationseinheiten Verwendung. Die Abb. 1 zeigt schematisch eine „Genkassette“, wie sie in vielen gentechnisch veränderten Pflanzen vorkommt.

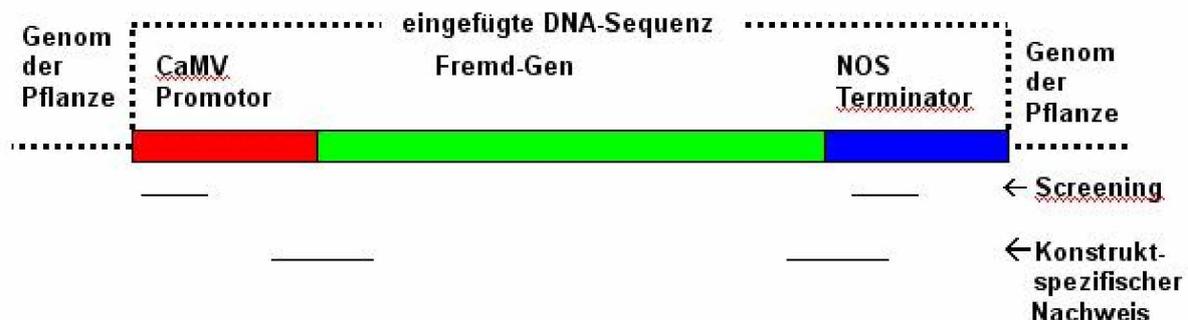


Abb. 1: Prinzip des molekularen Nachweises gentechnischer Veränderungen.

Mit Hilfe von Screening-Verfahren lassen sich in der Gentechnik häufig verwendete genetische Regulationselemente nachweisen.

Konstrukt-spezifische Nachweise zielen auf die Übergangssequenzen, die so in der Natur nicht vorkommen und belegen zweifelsfrei das Vorliegen eines GVO.

CaMV-Promotor: Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (engl.Cauliflower Mosaic Virus)

NOS-Terminator: Terminator des Nopalin-Synthase-Gens

Ein negativer CaMV-p35S-Nachweis ist damit jedoch nicht unbedingt gleichbedeutend mit GVO-Freiheit, da nicht alle gentechnisch veränderten Pflanzen diesen Promotor enthalten.

Das Vorhandensein von CaMV-35S-Promotor-Sequenzen ist ein Hinweis auf einen GVO, jedoch kein Beweis. Ein positives Ergebnis beim 35S-Promotor-Screening kann transgenen Ursprung sein, aber auch durch eine CaMV-Infektion hervorgerufen werden.

Erfahrungsgemäß sind jedoch fast alle als 35S-positiven Proben aus dem Handel tatsächlich transgen und nicht CaMV-infiziert. Die Virusinfektionsrate ist entsprechend klein, da das Virus im Pflanzenanbau unerwünscht ist und entsprechend bekämpft wird.

Liegt ein positives Testergebnis vor, kann durch sogenannte konstrukt-spezifische Verfahren die gentechnische Veränderung nachgewiesen werden. Für solche Nachweise eignen sich besonders Übergangssequenzen, die zum Beispiel Teile des Promotors und des neu eingefügten Gens tragen (vgl. Abb. 1). Sie sind spezifisch, da sie in natürlichen Organismen nicht vorkommen und daher ursächlich auf eine gentechnische Manipulation zurückzuführen sind. Ein solcher spezifischer Nachweis ist jedoch nicht Bestandteil dieses GVO-Screening-Kits.

Die vorliegende Anleitung beschreibt einen PCR-Test zum Nachweis des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus. Der Kit enthält zwei PCR-Systeme. Das Plant-Referenzsystem amplifiziert einen Teilbereich eines in jeder Pflanze vorhandenen Gens (plant 186 bp) und dient, wie eingangs erwähnt, als Positivkontrolle für die DNA-Extraktion und die PCR.

Das CaMV-Promotorsystem amplifiziert eine Sequenz innerhalb des 35S-Promotors aus den CaMV (p35S-195 bp) und fungiert als eigentliches „Screeningwerkzeug“.

Mit dem Kit-System lassen sich sowohl pflanzliche Gewebe als auch pflanzliche Lebensmittelproben untersuchen.

II. Inhalt

Der Kit beinhaltet für 4 Arbeitsgruppen die Reagenzien mit jeweils folgendem Inhalt. Jede Gruppe kann damit 3 Isolationen durchführen.

DNA-Isolation

- 8 GVO-haltige Proben (4 x Soja, 4 x Futtermittel): je 200 mg homogenisiert
- Lysepuffer A: 14 ml
- Proteinase K: 260 µl
- Bindepuffer B: 7 ml
- Waschpuffer C: 6 ml
- Waschpuffer D: 9 ml
- Elutionspuffer E: 2 ml
- Zentrifugationssäulchen inkl. Auffangröhrchen (12 Stück)
- zusätzliche Auffangröhrchen (24 Stück)

PCR

für insgesamt 20 PCR-Reaktionen

- Kontroll-DNA Soja 35S pos.: 40 µl DNA
- Kontroll-DNA Soja: 40 µl DNA
- Primermix 35S: 100 µl
- Primermix plant: 100 µl
- Reaktionsmix (bestehend aus DNA-Polymerase, MgCl₂, Puffer, dNTPs): 1,8 ml
- H₂O (steril): 1 ml

Gel-Elektrophorese

(Auswertung der Untersuchung)

- Gelladepuffer (6-fach konzentriert, für die DNA-Gel-Elektrophorese): 120 µl
- DNA-Längenstandard (ausreichend für 12 Agarosegele a 15 µl Längenstandard): 180 µl
- DNA-Färbelösung, 200-fach konzentriert: 3 ml
- Agarose: 6g
- TAE-Elektrophoresepuffer (50-fach-konzentriert): 50 ml

Lagertemperatur beachten !

Raumtemperatur: Säulen, Auffanggefäße und Puffer für die DNA-Isolierung, GVO-haltige Proben, Agarose, TAE-Elektrophoresepuffer

Kühlschrank 4°C: Gelladepuffer, DNA-Färbelösung, DNA-Längenstandard

Gefrierfach -18°C: Proteinase K, Kontroll-DNA, Reaktionsmix, PCR-Primer

III. DNA-Isolation

Vorbereitung des Arbeitsplatzes und Warnhinweise

Arbeitsplatz und Gerätschaften wie Ständer, Pinzetten etc. mit Spülmittel und warmem Wasser reinigen, anschließend mit 70 % Ethanol und Haushaltstüchern abreiben.

Sowohl für die Arbeitsplatzvorbereitung als auch für die einzelnen Arbeitsschritte Einmalhandschuhe, Schutzbrille und Kittel tragen.

Vor dem Experiment die Einmalhandschuhe gegen neue austauschen!

Hinweis:

Dämpfe der Flüssigkeiten nicht einatmen. Der Bindepuffer B und Waschpuffer C enthalten Guanidin. Sollte dennoch Hautkontakt auftreten, bitte mit Leitungswasser abspülen.

1. Achtung: **Elutionspuffer E** vor Benutzung (Punkt 13) auf ca. 80°C erwärmen (Wasserbad oder Wärmeschrank).
2. Falls Sie Lebensmittel aus dem Handel überprüfen möchten, so sollte ebenfalls ca. 200mg Probe (homogenisiert im sterilen und DNA-freien Mörser) eingesetzt werden. Gut geeignet sind Sojamehle, Chips, Flips u.ä. Knabberereien. Die 200 mg können im Vergleich mit den im Kit enthaltenen GVO-haltigen Proben abgeschätzt werden.
3. Je 200 mg homogenisiertes Material mit **ca. 1 ml LysepufferA** und 20 µl Enzym Proteinase K versetzen und 30 Sek. kräftig vermischen.
4. 30 Min. bei 65°C temperieren, alle 10 Min. schütteln.
5. Zentrifugation für 5 Min. mit ca. 10.000 U/Min.
6. 300 µl des relativ klaren Überstandes in 1,5 ml Gefäß geben + **500 µl Bindepuffer B** hinzugeben und 30 Sek. vermischen.
7. Deckel der Säule beschriften und ins 2 ml Auffangröhrchen setzen.
8. 650 µl des Gemisches aus Überstand und Bindepuffer auf die Säule geben.
9. Zentrifugation für 60 Sek. mit 10.000 U/Min., anschließend Auffanggefäß einschließlich Inhalt entfernen verwerfen.
10. Säule in neues Auffanggefäß setzen und 400µl **Waschpuffer)** auf die Säule geben.
11. Zentrifugation für 60 Sek. mit 10.000 U/Min, anschließend Auffanggefäß einschließlich Inhalt verwerfen.
12. Säule in neues Auffanggefäß setzen und **650 µl Waschpuffer D** auf die Säule geben, für 60 Sek. mit 10.000 U/Min. zentrifugieren, anschließend Auffanggefäß einschließlich Inhalt verwerfen.

13. Säule in ein neues beschriftetes 1,5 ml Gefäß setzen und 100 µl des auf 80°C erwärmten **Elutionspuffers CE** auf die Säule pipettieren.
14. 5 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen.
15. Zentrifugation für 60 Sek. mit 10.000 U/Min. **Achtung:** jetzt wird nur die Säule verworfen.
16. Das Eluat, d.h. die Flüssigkeit im 1,5 ml Gefäß, enthält die isolierte DNA.

Das DNA-Isolat kann direkt für die PCR-Reaktion eingesetzt oder bei –18°C längerfristig gelagert werden.

IV. PCR

Vorbereitung

Arbeitsplatz und Gerätschaften wie Ständer, Pinzetten etc. mit Spülmittel und warmem Wasser reinigen, anschließend mit 70 % Ethanol und Haushaltstüchern abreiben.

Sowohl für die Arbeitsplatzvorbereitung als auch für die einzelnen Arbeitsschritte Einmalhandschuhe, Schutzbrille und Kittel tragen.

Vor dem Experiment die Einmalhandschuhe gegen neue austauschen !

Alle Ansätze werden mit beiden PCR-Systemen (plant-186bp + p35S-196bp) getestet. Das Plant-System dient zur Überprüfung, ob überhaupt pflanzliche DNA bzw. PCR-fähige DNA vorhanden ist.

Falls dies nicht gegeben ist, kann kein positives Ergebnis beim CaMV-35S-Screening erreicht werden, da die pflanzliche DNA aus der Positivkontrolle bzw. einer Probe, die aus pflanzlichem Material hergestellt wurde, quantitativ überwiegt.

Die Plant-PCR sollte für ein aussagefähiges Experiment immer ein positives Ergebnis liefern!

Als Negativkontrolle sollte anstelle von DNA H₂O hinzugegeben werden. Bei sauberem Arbeiten, d.h. keiner DNA-Verschleppung aus anderen Ansätzen, sollte dieser PCR-Ansatz auf jeden Fall negativ sein!

Ansetzen der PCR-Reaktionen

Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes beträgt 50 μl (DNA jeweils 2 μl):

PCR plant

PCR-Mastermix-Komponenten	Volumen (μl) / Reaktion
Primermix (plant)	5
Reaktionsmix (grün)	43

PCR 35S

PCR-Mastermix-Komponenten	Volumen (μl) / Reaktion
Primermix (35S)	5
Reaktionsmix (grün)	43

Vorgehen:

1. Überlegen und ausrechnen, wie viele PCR-Ansätze mit welchem Primermix benötigt werden.
2. Reaktionsgefäße sorgfältig beschriften (wasserfester feiner Filzstift)
3. Der „Mastermix“, d.h. die entsprechende Menge für X PCR-Reaktionen wird aus dem jeweiligen Primermix (plant bzw. 35S) plus Reaktionsmix hergestellt. Dies geschieht durch Überführen des Reaktionsmixes in den Primermix. Vermischen der Flüssigkeiten bei geschlossenem Deckel durch mehrfaches Anstoßen des Mixes mit dem Finger. Anschließend das Gefäß leicht auf die Arbeitsfläche tippen, damit sich die gesamte Flüssigkeit wieder am Boden sammelt.
4. Jeweils 48 μl des PCR-Mastermixes in die einzelnen Reaktionsgefäße aufteilen. Dies kann pro Mastermix (35S bzw. plant) mit ein und derselben Pipettenspitze erfolgen.
5. Je 2 μl DNA bzw. H_2O für die Negativkontrolle zugeben. Jede DNA mit einer neuen Pipettenspitze einfüllen und dabei mit dem Mastermix vorsichtig vermischen.

6. Deckel der Reaktionsgefäße verschließen und ggf. kurz anzentrifugieren, falls sich die Flüssigkeit im Gefäß durch den Durchmischungsvorgang in kleine Tröpfchen verteilt hat.
7. Reaktionsgefäße nach Arbeitsgruppen sortiert in das PCR-Gerät setzen und das PCR-Programm starten.

PCR-Programm

Für die zwei PCR-Systeme (plant / p35S) gilt folgendes PCR-Programm:

1 x	Denaturierung	95°C	2 Min.
45 x	Denaturierung	95°C	20 Sek.
	Primerbindung	53°C	35 Sek.
	Synthese	72°C	45 Sek.
1 x	Auffüllen der unvollständigen DNA-Stränge	72°C	3 Min.
1 x	Kühlung	15°C	∞

Die PCR-Bedingungen wurden auf einem PCR-Gerät mit einer Aufheizrate von 2,5°C/Sek. etabliert. Auch in Wasserbädern mit entsprechenden Temperaturen läuft die PCR mit dem oben genannten Programm einwandfrei.

Die PCR-Produkte können über Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden, d.h. die Gelelektrophorese muß nicht unmittelbar im Anschluß an die PCR erfolgen.

Gießen des Agarosegels

Für die Darstellung der PCR-Produkte eignet sich ein 2%iges Agarosegel, welches mit dem mitgelieferten 25fach-konzentrierten TAE-Elektrophoresepuffer hergestellt wird. Dieser wird zuvor 1:24 mit destilliertem Wasser verdünnt.

1. Die Agarosemenge wird für ein 2%iges Gel abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben gegeben.
2. Eine entsprechende Menge 1fach-konz. Elektrophoresepuffer wird im Messzylinder abgemessen und hinzugegeben.
3. Die Agarose wird in der Mikrowelle oder im kochenden Wasser solange erhitzt, bis sie vollständig geschmolzen ist. Zwischendurch den Erlenmeyerkolben herausnehmen und schwenken, damit dies erfolgen kann. Vorsicht: Küchenhandschuhe tragen zum Anfassen des heißen Erlenmeyerkolbens. Außerdem kann Siedeverzug auftreten, so dass die Agarose herausspritzen kann.
4. Die flüssige Agarose auf ca.80°C abkühlen lassen und dann das Gel gießen.
5. Den Kamm einstecken und das Agarosegel erstarren lassen (ca. 20 Min.).
6. Das Gel mit Elektrophoresepuffer überschichten und den Kamm vorsichtig entfernen.
7. Durch die Zähne des Kamms sind in der festen Agarose Geldaschen entstanden, in die später die Proben pipettiert werden.

Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Dazu verwendet man kleine Reaktionsgefäße. Zuerst werden pro Probe 3 µl Gelladepuffer in die Gefäße gegeben, anschließend von den jeweiligen PCR-Ansätzen 15 µl.

Der Gelladepuffer hat zwei Funktionen: Er beschwert durch seinen Glycerinanteil einerseits die DNA-Lösung, so dass diese leicht in die Taschen des Agarosegels absinken kann. Andererseits beinhaltet der Gelladepuffer einen Farbstoff (oder mehrere), so dass der Verlauf der elektrophoretischen Trennung im Gel angezeigt wird.

Durchführung der Elektrophorese

Das Spannungsgerät an die Elektrophoresekammer anschließen, wobei sich der Minuspol auf der Seite mit den Taschen und der Pluspol auf der entgegengesetzten Seite befindet. Die Elektrophorese wird sofort nach dem

Auftragen der Proben gestartet. Die angelegte Spannung ist abhängig von der verwendeten Elektrophoresekammer. Als Faustregel gilt eine Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand.

Die Elektrophorese wird beendet, wenn die untere Farbstoffbandes des DNA-Längenmarkers (Bromphenolblau) ca. $\frac{3}{4}$ der Gellänge erreicht hat.

Färbung des Agarosegels

1. zunächst wird die DNA-Färbelösung vorbereitet, indem 1ml des Konzentrats der Färbelösung mit 200 ml destilliertem Wasser verdünnt wird. Die Färbelösung kann übrigens mehrfach verwendet werden. Sie wird in einem Gefäß verschlossen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.
2. Nach der Elektrophoresis wird das Agarosegel vorsichtig mit einem Küchen-Pfannenwender in eine Gelfärbeschale überführt und mit der Färbelösung übergossen.
3. Das Gel wird ca. 10-15 Min. gefärbt, Schale dazu ab und an etwas schwenken.
4. Anschließend die Färbelösung zum Aufbewahren in eine Flasche gießen. Das Gel wird dann mit Leitungswasser so lange entfärbt, bis der Hintergrund ausreichend hell erscheint und sich die gefärbten DNA-Banden gut von dem Hintergrund abheben.
5. Die blau-gefärbten DNA-Banden können durch Fotografieren des Gels im Durchlicht (z.B. Leuchtkasten zur Dia-Betrachtung) dokumentiert werden.
6. Heben Sie das Gel mit Haushaltsfolie abgedeckt im Kühlschrank auf. Häufig wird das Färberesultat nach einigen Stunden besser.

Auswertung der Untersuchung

Die unteres Abbildung stellt ein Gel dar, auf dem DNA-Banden aus den beiden PCR-Systemen plant und 35S zu sehen sind. GVO-positive Proben sollten ebenfalls in beiden PCR-Systemen dies Bandenmuster aufweisen.

Wichtig ist, dass in den Negativkontrollen keine DNA-Banden zu sehen sind, da in diesen Ansätzen keine DNA hinzugefügt worden ist.

(bp = Basenpaare)

- 1. plant-Kontroll-PCR: 186 bp
- 2. 35S-Screening-PCR: 196 bp

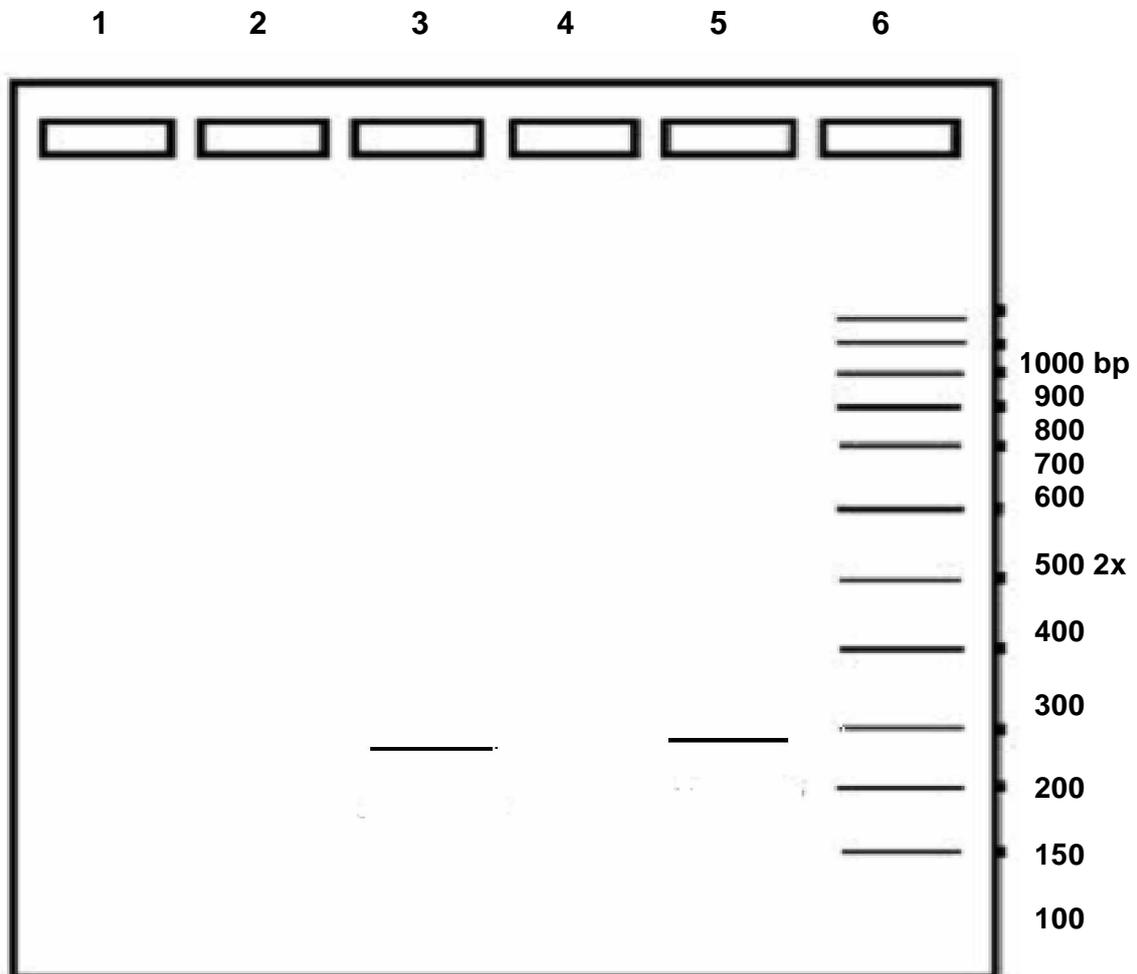


Abb. 2: Schematische Darstellung der PCR-Produkte der plant- und der 35S-PCR im Agarosegel.

Spur 3: plant-PCR-Produkt (186 bp)

Spur 5: 35S-PCR-Produkt (196 bp)

Spur 6: DNA-Längenmarker mit den nebenstehenden Fragmentlängen