

Biochemie

**Quantitative Nachweismethoden für Proteine
und DNA aus gentechnisch veränderten
Organismen in Lebensmitteln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster,
vorgelegt von

Hans-Josef Brunnert
aus Lippstadt

2002

Dekan:	Prof. Dr. V. Leute
Erster Gutachter:	Prof. Dr. F. Spener
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. K.-H. Klempnauer
Tag der mündlichen Prüfung:	19., 21. und 24. Juni 2002
Tag der Promotion:	24. Juni 2002

Für Melanie
und meine Eltern

Nicht weil es schwer ist,
wagen wir es nicht,
sondern weil wir es
nicht wagen, ist es schwer

Seneca, Philosoph,
4 v. Chr - 59 n.Chr.

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungen und Definitionen	1
2 Zusammenfassung	3
3 Einleitung	6
3.1 Gentechnisch veränderte Organismen.....	6
Marktsituation.....	7
Herbizidresistenzen.....	7
Insektizidresistenzen.....	8
Weitere Eigenschaften transgener Pflanzen	9
Transformationsmethoden.....	10
3.2 Strategie des GVO-Nachweises	11
3.3 Protein-Analytik.....	12
3.4 DNA-Analytik.....	14
Quantitative DNA-Analytik.....	15
3.5 PCR-ELISA.....	18
3.6 Kulturpflanze Soja, Analyt Roundup Ready	20
4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
5 Experimenteller Teil	23
5.1 Geräte.....	23
5.2 Materialien.....	24
PCR.....	26
5.3 Proben	27
5.4 Arbeitsmethoden Immunanalytik	28
5.4.1 Rekombinante NPTII.....	28
5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
5.4.3 SDS-Polyacrylamidelektrophorese	29
5.4.4 Erzeugung der Anti-NPTII Antikörper.....	29
5.4.5 Reinigung der Antikörper durch Affinitätschromatographie.....	29
5.4.6 Biotinylierung der Antikörper.....	29
5.4.7 Western-Blot	30
5.4.8 ELISA zur Titerbestimmung	30
5.4.9 NPTII-ELISA.....	31
5.4.10 Protein Extraktion aus Tomatenfruchtfleisch.....	32
5.5 Arbeitsmethoden DNA-Analytik	32
5.5.1 Sequenzdatenverarbeitung	32
5.5.2 PCR.....	32

5.5.3 Eingesetzte Oligonukleotide.....	33
5.5.4 PCR-ELISA.....	34
5.5.5 DNA-Elektrophorese.....	35
5.5.6 Optische Gelauswertung.....	36
5.5.7 ALFexpress DNA Analysesystem	37
5.5.8 Klonierung von DNA-Fragmenten	38
5.5.9 Herstellung kompetenter Bakterien, RbCl-Methode.....	38
5.5.10 Transformation und Stammhaltung der Bakterien.....	39
5.5.11 Plasmid DNA-Isolierung	39
5.5.12 Restriktionsspaltung der DNA	39
5.5.13 Sequenzierung der DNA.....	39
5.5.14 Herstellung spezieller Plasmide durch PCR und Mutagenese.....	40
5.5.15 Herstellung der Plasmid Verdünnungsreihen.....	41
5.5.16 DNA-Extraktion aus Lebensmitteln	42
5.5.17 Quantifizierung der Gesamt-DNA in Lebensmittel-Extrakten	44
5.5.18 Realzeit-PCR mit SYBR-Green	45
5.5.19 Daten Auswertung.....	45
6 Ergebnisse.....	47
6.1 Immun-Analytik.....	47
6.1.1 Erzeugung von Antikörpern gegen NPTII	47
6.1.2 Reinigung der Antikörper aus Serum	47
6.1.3 NPTII Nachweis durch Western-Blot	48
6.1.4 NPTII- <i>Sandwich</i> ELISA	50
6.1.4.1 Entwicklung des <i>sandwich</i> -ELISA.....	50
6.1.4.2 Ausarbeitung der Extraktionsbedingungen.....	50
6.1.5 Anwendung des NPTII-ELISA auf PGIP-Tomaten.....	53
6.1.6 Anwendung des NPTII-ELISA auf Zeneca Tomaten	54
6.2 DNA-Analytik.....	56
6.2.1 Konzept der DNA-Nachweise	56
6.2.2 DNA-Extraktion	57
6.2.3 Auswahl der PCR-Bedingungen	59
6.2.4 Qualitatives CaMV35S- <i>Screening</i> mit PCR-ELISA Auswertung	61
6.2.5 Konstruktion der Kompetitoren für die PCR.....	63
6.2.5.1 CaMV35S-Kompetitor.....	67
6.2.5.2 Roundup Ready Kompetitor.....	68
6.2.5.3 Soja Lektin-Gen Kompetitor	69
6.2.5.4 Doppelkompetitoren	71
6.2.5.5 Gewinnung eines heterologen Kompetitors (Artefakt)	71
6.2.6 PCR-ELISA Charakterisierung.....	73
6.2.6.1 PCR-ELISA zum Nachweis von Produkten der CaMV35S- und RR-PCRs.....	73
6.2.6.2 PCR-ELISA zum Nachweis von Produkten der Soja Lektin-Gen PCRs.....	76
6.2.6.3 Hintergrundsignale der PCR-ELISA im Vergleich.....	80

6.2.6.4 Kalibrationskurven	81
6.2.6.5 Kooperativer Effekt in der Hybridisierung	83
6.2.6.6 Nachweisgrenze des CaMV35S PCR-ELISA.....	87
6.2.6.7 Validierung des PCR-ELISA für die Auswertung kompetitiver PCRs	88
6.2.7 Validierung der Kompetitoren für die PCR	90
6.2.7.1 Prüfung der PCR-Effizienz durch Endpunktbestimmung.....	91
Normierungsplasmid pCR RRTK	91
Normierungsplasmid pCR GMTK	91
PCR mit Normierungsplasmiden	91
6.2.7.2 Bestimmung der PCR-Effizienz im exponentiellen Bereich.....	93
Quantifizierung der DNA durch Realzeit-PCR.....	95
6.2.7.3 Heteroduplex-Bildung durch homologe Kompetitoren	96
6.2.7.4 Einsatz des heterologen Kompetitors (Artefakt) in der PCR	100
Kontrollplasmide pCR 35SKArte und pCR 35STArte	101
Kontrollplasmid pCR 35STKArte.....	101
ALF-Analyse zu Artefakt, Target- und Kompetitor-Amplikons.....	101
6.2.7.5 Einsatz linearisierter Plasmide.....	102
6.2.7.6 Reproduzierbarkeit der Kompetitor Präparation	103
6.2.8 Anwendungen kompetitiver PCR	105
6.2.8.1 Semiquantitative, kompetitive CaMV35S PCR.....	105
6.2.8.2 Semiquantitative, kompetitive CaMV35S PCR im Ringversuch.....	106
Durchführung.....	107
Vorversuch	107
DNA-Extraktion der Test- und Kontroll-Proben	107
Kontrollversuch zur Überprüfung der Materialien für den Ringversuch.....	108
Hauptversuch	110
Evaluierung der PCR-ELISA Ergebnisse.....	111
Statistische Parameter.....	114
Zusammenfassung der Ringversuchs-Ergebnisse.....	115
6.2.8.3 Bestimmung der Soja-DNA Konzentration in Extrakten	116
<i>Screening</i> und spezifische Analyse einer gemischten Probenauswahl.....	119
6.2.8.4 Doppeltkompetitive PCR	122
6.2.8.5 Ausführung einer doppeltkompetitiven PCR mit RR-Bohnen	123
6.2.8.6 Präzision und Wiederfindung in der doppeltkompetitiven PCR	130
7 Diskussion	132
7.1 Proteinanalytik	132
7.2 Nukleinsäureanalytik.....	136
DNA-Extraktionsmethoden.....	136
PCR.....	138
Qualitative PCR mit PCR-ELISA Auswertung	138
Konstruktion von Kompetitoren	139
Hintergrundsignale, Kalibrationskurven und Nachweisgrenze des PCR-ELISA....	142

Validierung der Kompetitoren	145
Semiquantitative, kompetitive PCR.....	148
Semiquantitative, kompetitive PCR im Ringversuch	149
Soja-DNA-Anteil in Extrakten prozessierter oder gemischter Proben	151
Doppeltkompetitive PCR	152
TaqMan-Technologie.....	155
7.3 Schlussbetrachtung	156
8 Literaturverzeichnis.....	158
9 Anhang.....	171
9.1 Vektorkarten.....	171
9.2 EU-Ringversuchsprotokoll.....	177
Lebenslauf.....	189
Danksagung.....	190

1 Abkürzungen und Definitionen

ALF	ALFexpress Analysesystem, <i>allelic fragment</i>
AP	alkalische Phosphatase
ÄP	Äquivalenzpunkt
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bio	Biotin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum Albumin
Bt176	gentechnisch veränderte Maissorte
CaMV35S	Blumenkohlmosaik Virus, <i>cauliflower mosaic virus</i> , Protein mit 35 Svedberg Sedimentationskonstante
Ct	Grenzwertzyklus, <i>threshold cycle</i>
CTAB	Cetylammoniumbromid
CTP	chloroplastidäres Transitpeptid
CP4-EPSPS	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase des Agrobakterienstammes CP4
Cry	Endotoxine aus Agrobakterium <i>Bacillus thuringensis</i>
CV	Variationskoeffizient, <i>coefficient of variation</i>
Dig	Digoxigenin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E	Amplifikationseffizienz
ELISA	Enzym vermittelter Immunadsorptions Assay, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EU	Europäische Union
F _{ab}	Antigen bindendes Antikörperfragment
FDA	US amerikanische, staatliche Überwachungsstelle für Nahrungs- und Arzneimittel, <i>US Food and Drug Administration</i>
GM	Soja, <i>Glycine max</i>
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
ICB	Institut für Chemo- und Biosensorik
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
IPTG	Isopropyl-βD-thiogalactopyranosid
JRC	Forschungszentrum der EU, Geel, <i>Joint Research Centre</i>

K	Kompetitor
LB-Medium	Nährmedium nach Luria und Bertani
LMBG	Lebensmittel und Bedarfsgegenständegesetz
NPTII	Neomycinphosphotransferase Typ II
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
NOS 3'	Nopalinsynthase-Terminator
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PG	Polygalacturonase
PGIP	Polygalacturonase inhibierendes Protein
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
Q _{Si}	Signal-Quotient
Q _{St}	Stoffmengen-Quotient
RR	Roundup Ready Soja, gentechnisch veränderte Soja
RV	Ringversuch
SAv	Streptavidin
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodiumdodecylsulfat</i>
SSC	Kochsalz Zitratpuffer, <i>saline sodium citrate</i>
SYBR-Green	Fluoreszenzfarbstoff
T	Target
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
tg	transgen
wt	Wildtyp

2 Zusammenfassung

Der Einsatz molekularbiologischer Methoden zur Veränderung des Erbguts von Pflanzen ist neben der klassischen Züchtung in den 1990er Jahren ein wichtiger Aspekt in der Agrarindustrie geworden. Als „gentechnisch veränderte Organismen“ (GVOs) unterliegen sie daher gemäß internationaler und nationaler Vorschriften Zulassungsbeschränkungen und Kennzeichnungsbestimmungen. Mit der Nutzung pflanzlicher GMOs als Nahrungsmittel ist ein Wandel der Lebensmittelanalytik verbunden, die nunmehr eine Identifizierung und Quantifizierung der neuen Sortenmerkmale zur Überprüfung der Kennzeichnung abhängig von gesetzlichen Schwellenwerten ermöglichen muss.

Die Analytik betrifft Proteine und Nukleinsäuren, die für ein GMO charakteristisch sind. Man unterscheidet das *Screening*, die Durchmusterung einer großen Probenzahl nach einem bestimmten, allgemeinen Merkmal, und den spezifischen GMO-Nachweis. Notwendig sind hierzu sichere qualitative Methoden für einen hohen Probendurchsatz und quantitative Methoden zur präzisen Gehaltsbestimmung, zu deren Entwicklung und Etablierung diese Arbeit im Rahmen eines EU-Projektes beiträgt.

Die Bestimmung von Proteinen erfolgt immunologisch durch Western-Blot oder ELISA, zum Nachweis bestimmter Nukleinsäuresequenzen ist deren spezifische Vervielfältigung in der PCR notwendig. Für erstere wurde die qualitative und quantitative Detektion eines für viele GMOs charakteristischen Proteins, der Neomycinphosphotransferase Typ II (NPTII) nach Erzeugung und Reinigung von Antikörpern etabliert und an zwei Sorten gentechnisch veränderter Tomaten erfolgreich demonstriert. Die Prozessierung von Tomaten zu Tomatenmark beeinflusst die immunologische Detektierbarkeit negativ. Auch die Extraktion mit mechanischem Stress für Proteine zeigte einen negativen Effekt auf die Nachweisgrenze. Der Western-Blot wies eine Nachweisgrenze von 0,1 ng rekombinanter NPTII pro Spur auf. Es zeigte sich, dass der NPTII-Nachweis durch einen *Sandwich*-ELISA in Proteinextrakten aus Fruchtfleisch problemlos möglich war. Die Nachweisgrenze hierbei betrug 0,03 ng/ml und die niedrigste, nachgewiesene NPT-Menge im Proteinextrakt einer GMO-Tomate lag bei 1 ng/mg. Damit erfüllt der Einsatz des NPTII-ELISA im *Screening* unverarbeiteter Tomaten alle an eine Routinemethode gestellten Anforderungen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag bei der DNA-Analytik von GMOs durch die Polymerasekettenreaktion (PCR), die wegen der exponentiellen Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes eine hervorragende Nachweisgrenze aufweist und daher auch bei geringen GMO-Anteilen und stark prozessierten Lebensmitteln einen Nachweis erlaubt. Die amplifizierten Sequenzen können beliebige DNA-Teilstücke der gentechnisch veränderten Pflanze oder der Wildtyp-Pflanze sein. So konnten in dieser Arbeit eine PCR-*Screening*-Methode, eine GMO-spezifische und Pflanzenart-spezifische Methode entwickelt werden. Der Nachweis der Amplikons erfolgte in allen drei Fällen mit Hilfe eines ELISA (PCR-ELISA). Nach Fixierung und Denaturierung der Amplikons in Mikrotiterplatten schließt dieser eine spezifische Hybridisierung mit markierten Sonden, die anschließend immundetektiert werden, ein. Diese Methode erlaubte, im Gegensatz zum herkömmlichen Nachweis durch Trennung im Gel und Färbung mit dem gesundheitsschädlichen Ethidiumbromid, (i) den sensitiven Amplikon-Nachweis, (ii)

das digitale Auslesen der Ergebnisse, (iii) einen hohen Probendurchsatz und (iv) die parallele Analyse der bei einer kompetitiven PCR entstehenden Produkte.

Ein qualitativer Analysengang für Proben, der aus DNA-Extraktion, PCR und Nachweis der Amplikons durch PCR-ELISA besteht, wurde erfolgreich etabliert. Am Beispiel von GVO-haltigen Soja Mehlen (Roundup Ready Soja mit transgener Herbizid-Resistenz, RR) war es erst nach geschickter Wahl der Versuchsparameter möglich, Daten zu erhalten, die die Rangfolge der GVO-Gehalte qualitativ richtig wiedergaben. Allerdings lieferte diese einfache Methode, die in Anwesenheit von Inhibitoren wenig robust ist, falsch negative Ergebnisse. Dem wurde durch Einsatz von Kompetitorplasmiden vorgebeugt, die durch zielgerichtete Mutagenese konstruiert wurden. Der Kompetitor (K) hatte mit der zu amplifizierenden GVO-Zielsequenz (Target, T) jeweils die Primerbindungsstellen gemein und die produzierten Amplikons wurden durch Hybridisierung mit einer entsprechenden Sonde nachgewiesen. Neben dieser Inhibitionskontrolle konnten ebenfalls GVO-Gehalte bei Bezug auf ein Referenzmehl bestimmt werden. Durch eine Serie von PCRs mit verschiedenen Kompetitor-Mengen konnte darüber hinausgehend die Kopienzahl der T-Matrizen ermittelt werden.

Die Promotor Sequenz des *cauliflower mosaic virus* (CaMV35S) wird bei der Generierung transgener Pflanzen oft eingesetzt und ist daher ideal für *Screening*-Zwecke geeignet. Die PCR-ELISA-Analyse der Amplikons einer kompetitiven PCR mit konstanter CaMV35S-Kompetitor-Menge und DNA-Extrakten aus Proben mit steigendem GVO-Gehalt liefert proportional steigende Signal-Quotient (T/K-Signal). Dies bildete für den folgenden EU-weiten Ringversuch die Grundlage für die semiquantitative Bestimmung der RR-Gehalte von Sojamehl-Proben durch kompetitive CaMV35S-PCR. GVO-haltige Proben konnten hier, bezogen auf ein Referenz-Sojamehl mit einem Gehalt von 0,5 % RR, als höher oder niedriger konzentriert klassifiziert werden. Es gab keine falsch negativen Ergebnisse, auch wurden Inhibitor-haltige DNA-Extrakte korrekt identifiziert. Diese Ergebnisse zeigten die hohe Güte des Verfahrens - Kombination von kompetitiver PCR und PCR-ELISA - für die Schwellenwertbeurteilung auf.

Die Bestimmung von Gesamt-DNA einer Probe durch UV-Messung erwies sich für prozessierte, komplexe Proben, bestehend aus unterschiedlichen Pflanzenarten, als nicht sinnvoll. Daher wurde zur Bestimmung des Anteils an amplifizierbarer Soja-DNA eine weitere PCR mit anschließendem PCR-ELISA, auf der Basis des Soja-spezifischen Lektin-Gens, etabliert. Dieses semiquantitative Verfahren diente im weiteren bestens zur Beurteilung der Ergebnisse von *Screening*- und RR-spezifischen PCRs, die mit prozessierten Lebensmitteln und infolgedessen mit inhomogenen DNA-Extrakten durchgeführt wurden.

Der Äquivalenzpunkt einer Serie kompetitiver PCRs ist durch die gleiche initiale Kopienzahl für T- und K-Sequenz definiert und kann nur dann korrekt bestimmt werden, wenn T- und K-Sequenz mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden. Die Prüfung auf gleiche Amplifikations-Effizienz von in dieser Arbeit entworfenen und klonierten Kompetitoren, im Vergleich mit den Targetsequenzen, wurden durch Realzeit-PCR möglich. Ein alternatives Vorgehen, das Fixieren des initialen, molekularen Verhältnisses von Target und Kompetitor bei 1:1, wurde durch Klonierung beider Sequenzen in ein „Normierungsplasmid“ und Analyse damit erhaltener PCR-Produkte erreicht. In der Tat wurde auch nach PCR bis in den Plateaubereich ein 1:1-Verhältnis der entsprechenden Amplikons gefunden.

Durch parallelen Einsatz des Doppelkompetitorplasmids in zwei Serien GVO- und Soja-spezifischer PCRs und den Einsatz von Normierungsplasmiden in den entsprechenden PCR-ELISAs zur Auswertung konnten Interassay-Schwankungen eliminiert werden. Die ermittelten Kopienzahlen am Äquivalenzpunkt konnten, unabhängig von externen Standards, prozentual aufeinander bezogen und GVO-Gehalte korrekt bestimmt werden. Auf elegante Weise konnten so reine Sojabohnen (100 % RR) und Referenzmaterial (2 % RR) präzise quantifiziert werden.

Die PCR-ELISA-Auswertung ist der klassischen, optischen Gelauswertung kompetitiver PCRs überlegen. Die Kombination aus kompetitiver PCR und PCR-ELISA ist unkompliziert, präzise, robust und gerade in Hinblick auf das hohe Probenaufkommen in der GVO-Routineanalytik gewinnbringend einsetzbar.

3 Einleitung

In den vergangenen Jahren wurden die Möglichkeiten der Gentechnik genutzt, um in Pflanzen fremde Gene einzuführen, die ihnen neue Eigenschaften verleihen. Diese veränderten Pflanzen werden als gentechnisch veränderte Organismen (GVOs) bezeichnet und daraus hergestellte Nahrungsmittel sind die bedeutendsten Vertreter der „Neuartigen Lebensmittel“ (*novel foods*). Diese sind nach Prüfung und Durchlaufen von Zulassungsverfahren für Anbau, Import und Verarbeitung für den Konsum durch Menschen vorgesehen. Ein Teil der Bevölkerung hat ethische Vorbehalte gegenüber der Verwendung von GMOs, andere befürchten direkte oder indirekte gesundheitliche Schäden als Folge der gentechnischen Veränderungen [1, 2, 3, 4]. Aus diesem Grund wurden in der Europäischen Union (EU) im Zuge der Markteinführung Verordnungen erlassen, die das Inverkehrbringen, die Nutzung und die Kennzeichnung der GMOs regeln. *Novel Foods* und Inhaltstoffe, die nachweisbar andere Charakteristika als konventionelle Nahrungsmittel haben, müssen als solche gekennzeichnet werden, um den Verbraucher zu informieren und ihm bewusste Kaufentscheidungen zu ermöglichen.

Unter die Novel Food-Verordnung (EG/258/97) fallen neben gentechnisch veränderten Lebensmitteln auch Produkte oder Zutaten aus Chemikalien oder Rohstoffen, die bisher nicht zur Ernährung verwendet wurden, wie z. B. synthetische Fettersatzstoffe. Ohne ausdrückliche Zulassungen dürfen neuartige Lebensmittel, deren Struktur, Zusammensetzung oder Nährwert Verbrauchern nicht vertraut sind, weil neue Technologien eingesetzt oder unbekannte Rohstoffe verwendet wurden, nicht auf den Markt gelangen. Aus diesem Verbot und den weltweit vernetzten Warenströmen, die eine Vermischung von konventionellen und gentechnisch veränderten Lebensmitteln begünstigt, resultiert die Notwendigkeit für neue analytische Verfahren. Der Schwellenwert, unterhalb dessen von einer unbeabsichtigten Kontamination mit zugelassenen GMOs ausgegangen wird, wird durch eine EU-Verordnung (EG/49/2000) festgelegt und liegt für Lebensmittel bei 1 % je Zutat. Die Bestimmung dieses Gehaltes kann auf Basis von Proteinen oder DNA, die aus der gentechnischen Veränderung resultieren, erfolgen. Nicht zugelassene GMOs werden in der EU nicht toleriert [5].

Die Novel Food-Verordnung enthielt ursprünglich keine präzisen Vorschriften über Form, Wortlaut und Platzierung der Kennzeichnung für GMO-haltige Lebensmittel. Insbesondere für Soja- und Maiszutaten gibt es jedoch eine Durchführungsbestimmung, die Verordnung zur Kennzeichnung von Neuartigen Lebensmitteln (EG/1139/98). Treffen die Voraussetzungen für eine Kennzeichnung für Lebensmittel und Zutaten aus GMO-Soja und GMO-Mais zu, muss im Zutatenverzeichnis die betreffende Zutat mit der Angabe "aus genetisch veränderten Sojabohnen hergestellt" bzw. „Mais“ versehen werden. Unter dem Terminus „genetisch“ verändert wird sinngemäß „gentechnisch“ verändert verstanden, da sonst züchterische Veränderungen ebenfalls eingeschlossen wären [5].

3.1 Gentechnisch veränderte Organismen

Die Einsatzzwecke von gentechnisch veränderten Organismen in der Landwirtschaft sind vielfältig. Es wurde eine Vielzahl von Strukturgenen aus verschiedenen Spenderorganismen

durch molekularbiologische Methoden in Nutzpflanzen integriert. Die eingeführten Strukturgene können Resistenz (gegen Herbizide, Schadinsekten, Viren und Pilze), veränderte Haltbarkeit oder Reife, Änderung der Zusammensetzung von Inhaltsstoffen oder männliche Sterilität bewirken. Die weitaus größte Gruppe, der bei der US-Behörde für Nahrungs- und Arzneimittel (*US Food and Drug Administration*, US-FDA) offengelegten und als Nahrungs- und Futtermittel in den USA zugelassenen Pflanzen, bilden die Herbizid-resistenten GVOs, gefolgt von den Insekten-resistenten GVOs [6]. Der EU-Zulassung geht in der Regel die US-Zulassung voraus, so dass prinzipiell eine Prognose der künftigen europäischen Marktsituation möglich ist. Da jedoch seit Oktober 1998 ein *de facto* Moratorium bei der Zulassung neuer GVOs in der EU besteht, wächst mit der Zahl der US-Zulassungen die Zahl der weltweit gehandelten, aber nicht EU-zugelassenen GVOs.

Marktsituation

Im Jahr 2000 wurden weltweit auf 44 Millionen Hektar landwirtschaftlicher Nutzfläche transgene Pflanzen angebaut. Den größten GVO-Anteil in Millionen Hektar machte der Anbau von Soja (25,8), gefolgt von Mais (10,3), Baumwolle (5,3) und Raps (2,8) aus. In den vier Ländern USA, Kanada, Argentinien und China liegen 99 % aller GVO-Anbauflächen. Der GVO-Anteil an der Weltproduktion dieser Nutzpflanzen lag bei Soja mit 36 % am höchsten. Beim Anbau von Baumwolle (16 %), Raps (11 %) und Mais (7 %) wurde bislang ein größerer Anteil konventionellen Saatgutes verwendet. Während für die Anbauflächen für GVO-Soja (+19 %) und GVO-Baumwolle (+43 %) im Jahr 2000 deutliche Zuwächse registriert wurden, ist die Anbaufläche für Mais (-8 %) und Raps (-27 %) im Vergleich zum Vorjahr gesunken. Nach Schätzung wird die GVO-Anbaufläche im Jahr 2001 50 Millionen ha betragen [7].

Die nach Europa importierte Menge, beispielsweise an Sojaschrot, stieg in der Vergangenheit an und betrug im ersten Quartal 2001 3,56 Mio. Tonnen. Derzeit werden Vertragsanbau und spezielle Handelssysteme (Segregation) etabliert, um den europäischen Bedarf an GVO-freier Soja unter Vermeidung transgener Soja decken zu können. Dies führt jedoch zu Preissteigerungen für „Premium-Qualitäten“ [8].

Herbizidresistenzen

Das nicht-selektive systemische Blatt-Herbizid Glyphosat (Roundup Ready, N-(Phosphonomethyl)-glycin) wurde 1971 von Monsanto eingeführt. Die Inhibierung der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) und somit des Shikimat-Biosyntheseweges durch Glyphosat verhindert in Pflanzen die Synthese von aromatischen Aminosäuren und deren sekundären Metaboliten. Die CP4-EPSPS aus dem *Agrobacterium* Stamm CP4 wird dagegen kaum gehemmt. Das entsprechende Gen wurde erfolgreich in das Genom verschiedener Pflanzen eingeführt. Die wohl bekannteste Pflanze mit dieser zusätzlichen Eigenschaft ist die marktbeherrschende Roundup Ready Soja der Fa. Monsanto (Abschnitt 3.6, [9]), deren qualitativer und quantitativer Nachweis im Mittelpunkt dieser Arbeit steht.

Phosphinotricin (PPT, 2-Amino-4(hydroxymethylphosphinoyl)buttersäure, Glufosinat), war die zuerst beschriebene natürlich vorkommende Aminosäure mit einer Phosphinsäure-Gruppierung. Phosphinotricin ist ein Analogon des L-Glutamin und ein Glutaminsynthetase-Inhibitor

mit herbizider Wirkung. Es ist aktiver Bestandteil mehrerer Peptid-Antibiotika aus Streptomyceten-Kulturen und unter dem Namen „Basta“ oder „Total“ im Handel. Die Glutaminsynthetase dient zur Reduktion von freiem Ammonium, das in der Zelle akkumuliert und toxisch wirkt. Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* kodiert für eine Phosphinotricin-Acetyltransferase (PAT) und verleiht transgenen Pflanzen, wie Mais, Soja, Reis und Raps, Resistenz gegen PPT.

Bromoxynil (3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonnitril) ist ein Blattherbizid und inhibiert das Photosystem II durch Anlagerung an eine Komponente des Chinonbindungskomplexes der Pflanzen, so dass der Elektronentransport unterbrochen wird. Das Protein, für das das *bxn*-Gen aus *Klebsiella ozeanae* kodiert, ist eine spezifische Nitrilase, die die Nitrilgruppe des Bromoxynil in eine Carboxygruppe umwandelt und so das Herbizid entgiftet. Dieses Konzept wurde durch gentechnische Veränderung von Baumwolle und Raps in kommerziell erhältlichen Nutzpflanzen (USA) umgesetzt.

Sulfonylharnstoff-Herbizide, wie beispielsweise das 1982 von DuPont eingeführte Metsulfuron-methyl, sind Mitosehemmer. Sie blockieren das Enzym Acetylacetat-Synthase (ALS), das erste Enzym in der Biosynthese verzweigter Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin). Zwei Wege wurden bisher genutzt, um eine 100 bis 1000-fach gesteigerte Toleranz gegen diese Herbizidklasse zu erzeugen. Zum einen wurde durch Einbringen einer zusätzlichen ALS-Variante aus einem *Aradopsis* Kultivar (für GVO-Flachs) und zum anderen durch ein chimäres Gen, abgeleitet von zwei verschiedenen Tabak Genen (für GVO-Baumwolle), Resistenz erzeugt.

Insektizidresistenzen

Das Gram-positive, Sporen bildende Agrobakterium *Bacillus thuringiensis* wurde 1911 von Ernst Berliner nach Untersuchung einer seuchenhaften Erkrankung von Mehlmotten erstmals beschrieben. Die Bakterien produzieren kristalline Proteine mit insektizider Wirkung, die δ -Endotoxine genannt werden und Fraßgifte darstellen. Im Jahr 1970 wurde eine besonders virulente Subspezies (*Bacillus thuringiensis subspec. kurstaki*) isoliert, dessen Toxinanteil am Totalprotein 50 % beträgt [10]. Die inaktiven Kristalle werden im Magentrakt von Insekten solubilisiert und proteolytisch zur aktiven Form der Toxine gespalten. Aktiviert binden die Proteine an spezifische Rezeptoren im Darm, bilden dort Poren und stören den Ionen-transport durch Epithelzellen, die in der Folge lysiert werden [11, 12]. Auf Mensch und Säugetier haben diese Endotoxine keine Wirkung, daher werden routinemäßig Bakteriensuspensionen auf Pflanzen gesprüht. Sie sind im Freien nur kurze Zeit insektizid wirksam und werden leicht abgewaschen.

In den achtziger Jahren wurden die Gene der insektiziden Proteine isoliert und in transgene Pflanzen eingesetzt. Erst nach synthetischer Anpassung des ursprünglichen, bakteriellen Aminosäurecodon-Gebrauchs an denjenigen von Pflanzen konnte in diesen eine ausreichende Menge Endotoxin gebildet werden, um die gewünschte Resistenz zu erzielen [13]. Die über 1000 isolierten Toxin-Gene teilen sich in *cry*-Gene und *cyt*-Gene auf. Letztere haben *in vitro* eine große Wirkung, während die *cry*-Gene *in vivo* und *in vitro* wirken. Die *cry*-Gene werden nach zum Teil sehr spezifischer Tötungswirkung in römisch nummerierte Gruppen

unterteilt (I Lepidopteren (Schmetterlinge), II Lepidopteren und Dipteren (Zweiflügler), III Colepteren (Käfer) und IV Dipteren) und weisen entweder eine Größe von circa 70 kDa oder von 130-140 kDa auf.

In den USA wurden von der FDA von 1994 bis 2001 13 GVOs (Mais, Baumwolle, Tomate und Kartoffel) mit verschiedenen *cry*-Genen für den menschlichen Verzehr und zur Tierfütterung zugelassen. In der EU sind nur fünf insektenresistente Maissorten mit teilweise eingeschränkter Zulassung als Pflanze (Anbau, Import, Verarbeitung zu Futtermitteln) oder als Lebensmittel vertreten.

Weitere Eigenschaften transgener Pflanzen

Verändertes Reifeverhalten von Früchten, das zu längerer Lagerdauer und somit verlängerten Zeitspannen für Transport und Handel führt, wurde auf zwei verschiedenen Wegen erreicht. Mit Gegensinn-RNA (*antisense*), einem Mechanismus zur Gen-Regulation, der in Bakterien natürlich vorkommt [14, 15], kann das Expressionsniveau eines Wildtyp-Proteins erniedrigt werden. Es wird postuliert, dass Sinn- und Gegensinn-RNA nach der Transkription Hybride bilden und so die Translation unterbinden [16]. Diese Erklärung des molekularen Mechanismus ist nicht unumstritten, Positionierungseffekte und ungewöhnliche dreidimensionale Strukturen der Gegensinn-RNA werden ebenso diskutiert [17]. Die erste und bekannteste, genetisch veränderte Pflanze dieser Art, die in den USA unter dem Namen *MacGregor's* vermarktet wurde, war die Flavr Savr™ -Tomate, der Fa. Calgene. Bei der GVO-Tomate der Fa. Zeneca, ist die Orientierung der zusätzlichen RNA nicht eindeutig bekannt. Bei diesen Tomaten wurde die Produktion des Zellwand-auflösenden Proteins Polygalacturonase (PG) auf 1 % des Wildtyp-Niveaus gesenkt und die Lagerungsfähigkeit der reifen Frucht deutlich erhöht.

Die Stoffwechselwege des Phytohormons Ethylen, es wird nach der frühzeitigen Ernte zum gezielte „Nachreifen“ in Begasungsanlagen eingesetzt, ist ebenfalls ein Ziel für Manipulationen. Der Schlüsselschritt der Produktion des endogenen Ethylen geht von S-Adenosylmethionin (SAM) aus. Aus ihm wird der direkte Vorläufer, Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) des pflanzlichen Ethylens gebildet. Durch fruchtspezifische, ethylenabhängige Promotoren in transgenen Pflanzen, die eine *E. coli* T3-Phagen SAM-Hydrolase steuert, wird der Stoffwechselweg gezielt unterbrochen (Kürbis, Fa. Agritope). Ebenso kann eine ACC-Deaminase aus *Pseudomonas chloraphis*, die in Tomaten (Fa. Monsanto) eingebracht wurde, den Reifeprozess durch Abbau des relevanten Vorläufermoleküls von Ethylen verlangsamen [16].

Männliche Sterilität ist für die Hybridzüchtung dienlich und verhindert die Produktion von Saatgut aus vorherigen Ernten (populärwissenschaftlich: Terminator-Technologie). Die Expression einer Ribonuklease des Bakteriums *Bacillus amyloliquefaciens* im Tapetum, der den Pollensack umgebenden Zellschicht, blockiert die korrekte Pollenproduktion und führt zu sterilen Pflanzen (Barnase-Gen). Gesteuert wird diese exklusive Expression durch den Staubbeutel-spezifischen Promotor des TA29-Gen aus *Nicotiana tabacum* bei Rapssorten und durch den PCA55-Promotor aus *Zea mays* bei transgenem Mais. Die Wiederherstellung der Fruchtbarkeit kann durch die Verwendung einer zweiten Hybridsorte (*restorer line*)

erfolgen, in der ein Barstar genanntes Gen einen spezifischen Barnase-Inhibitor produziert. Diese Kombination wird von der Fa. AgrEvo für transgenen Mais genutzt.

Virusresistenz als gentechnisch eingeführte Eigenschaft kann durch Expression von Virushüllproteinen oder durch Expression einer viralen Replikase in den GVOs (Kartoffel, Kürbis, Papaya, Kartoffel) erzeugt werden. Pflanzenviren haben in der Regel ein eng begrenztes Wirtsspektrum. Die Virusreplikation in einer Pflanzenzelle ist fein auf die vorhandene Proteinzusammensetzung und -konzentration, sowie deren Lokalisation eingestellt. Ist schon eines der Virusproteine vorhanden, kann kein ungehinderter Befall stattfinden. Die Hüllprotein vermittelte Virusresistenz wird jedoch noch kontrovers diskutiert [16].

Veränderte Inhaltsstoffe der GVO-Pflanzen spielen nach Anzahl der Zulassungen bisher eine untergeordnete Rolle, gewinnen aber zunehmend an Bedeutung. Mit *antisense*-Technik wurde beispielsweise in Sojabohnen der Gehalt der endogenen Δ -12-Desaturase gesenkt und dadurch der Gehalt an Ölsäure gesteigert (DuPont). Ein gesteigerter Anteil von Laurinsäure in Rapsöl wurde durch Einbringen einer Lauroyl-Acyl-carrier-Protein Esterase in Raps erreicht (Fa. Calgene). Raps wurde ebenfalls verändert, um einen funktionellen Futtermittelzusatz zu erhalten (Phytaseed, BASF AG); eine Pilz-Phytase (*Aspergillus niger*) spaltet Phytinsäure, einen Phosphatspeicher in Pflanzensamen in Phosphat und *myo*-Inosit und macht diese für Tiere ohne Wiederkäuermagen verdaulich. Zukünftige GVOs werden wahrscheinlich zunehmend über multifaktorielle Eigenschaften verfügen, wie der „golden rice“ [18, 19], der einen neuen Biosyntheseweg zur Erzeugung von β -Carotin durch vier zusätzlichen Enzyme aufweist und ein funktionalisiertes Nahrungsmittel für den Menschen darstellt (*functional food*). Dieser Reis soll zur Bekämpfung von Auswirkungen der Mangelernährung in asiatischen Ländern, in denen großen Bevölkerungsteile erblinden, eingesetzt werden, befindet sich aber noch im Forschungsstadium.

Transformationsmethoden

Transformation von Pflanzenzellen mit DNA kann durch biologische (Agrobakterien), physikalische (Partikelbeschuss, Mikroinjektion) und chemische (CaCl_2 , PEG) Methoden erfolgen. Anschließend muss unter Ausübung von Selektionsdruck eine Regeneration der transformierten Zelle zur kompletten Pflanze erfolgen. Aus vielen Geweben, wie Wurzel, Stängel und Blatt, gelingt dies durch Einsatz von Kulturmedien und Phytohormonen besser als aus Protoplasten. Pflanzenzellen sind weitgehend totipotent, so dass meist eine komplette, sexuell fortpflanzungsfähige Pflanze gezogen werden kann.

Die größte Bedeutung kommt der Transformation mit Agrobakterien zu [20]. Diese haben die Fähigkeit entwickelt, Gene zwischen den Organismenreichen auszutauschen, um sich des Stoffwechsels der Pflanze zu bedienen. Das *Agrobacterium tumefaciens* zeichnet sich zudem dadurch aus, bei Eintritt durch eine Wunde und unter Einfluss der pflanzlichen Wundreaktion, tumorinduzierend zu wirken. Diese Eigenschaft ist durch Ti-Plasmide (circa 200 kbp) gegeben. Sie enthalten neben Genen, die für die Bildung des geeigneten Habitats (Tumor) durch Variation von pflanzeigenem Cytokinin und Auxin verantwortlich sind, auch solche, für den Transfer von einzelsträngiger Ti-DNA zum Nukleus des Wirtes und deren Integration. Im Wildtyp-Agrobakterium wird das Gen für die Nopalinsynthese übertragen, diese

sorgt durch Nopalinproduktion für eine Umleitung des Aminosäurestoffwechsels zum Parasiten. Das Bakterium erschließt sich so eine geeignete Stickstoffquelle [21]. Das große Ti-Plasmid lässt sich von den virulenten Genen befreien (entwaffnen), so dass die Morphologie der Pflanze nicht verändert wird. Zwischen der rechten und linken Erkennungssequenz der Ti-DNA kann sich nach Manipulation jede beliebige Sequenz befinden, die bei einer gezielten Infektion übertragen wird. Die Anwendbarkeit der Transformationsmethode ist wegen der Spezifität der Bakterien-Wirt Wechselwirkung limitiert. Während Zweikeimblättrige relativ sicher transformiert werden können, ist dies für Monokotyledonen, zu denen die wichtigsten Nutzpflanzen gehören, noch nicht möglich [16]. Die *Antisense*-Tomaten der Fa. Zeneca und der Fa. Calgene wurden durch Agrobakterien transformiert.

Der Beschuss mit Gold- oder Wolframpartikeln (2 µm Durchmesser) erlaubt die direkte Transformation beliebiger Zellen mit jeglicher DNA, die an die Partikel gebunden ist [22]. Zwar lassen sich so auch die wichtigen Nutzpflanzen wie Mais, Weizen und Reis transformieren, der Partikelbeschuss weist jedoch eine geringe Transformations-Effizienz auf und macht somit einen höheren Durchmusterungsaufwand nötig. Während die Integration bei Transformation durch Agrobakterien vergleichsweise gerichtet in Transkriptions-aktiven Regionen stattfindet, ist bei letzterer Methode der Integrationsort zufällig. Die Roundup Ready Soja (Abschnitt 3.6) und der Mais MON810 der Fa. Monsanto (Expression des CryIA(b) unter CaMV35S-Einfluss) entstanden beispielsweise durch Beschuss mit Plasmid beladenen Partikeln.

Die Mikroinjektion ist eine mühsame Methode kleinste Mengen DNA in Pflanzenzellen zu bringen, da sehr viele einzelne Zellen mit Geschick manipuliert werden müssen. Ihr Vorteil ist jedoch, dass eine genaue Menge DNA sogar in einzelne Zellkompartimente appliziert werden können. Die Methode ist lediglich bei Zellarten, die in nur kleinen Mengen vorkommen, sinnvoll [16].

Polymer- oder Salz-vermittelte Protoplastentransformation ähnelt der Transformation von Bakterien. Die Zellwand von Pflanzenzellen wird enzymatisch abgedaut und DNA in Gegenwart von Polyethylenglykol oder/und CaCl₂ durch Poren in der Plasmamembran, die mit und ohne Unterstützung von elektrischen Impulsen gebildet werden, aufgenommen. Der Basta-resistente Mais Liberty Link der Fa. AgrEvo wurde auf diese Weise erzeugt. Die Regeneration von Protoplasten ist allerdings oft problematisch [23].

3.2 Strategie des GVO-Nachweises

Bei der Analyse von unbekanntem Lebensmittelproben stellt sich die Frage, ob nach einem generellen oder dem bestimmten Merkmal eines einzigen Organismus gesucht werden soll. Das Durchsuchen einer großen Probenanzahl anhand eines generellen Merkmals für GVOs, auch *Screening* genannt, ermöglicht bei der gegenwärtigen, geringen Verbreitung, den größten Teil der fraglichen Proben als GVO-frei auszusondern und Analysekapazitäten zu sparen (Abb. 1) [2, 24]. Fällt eine Probe im *Screening* positiv aus, muss sich ein spezifischer Nachweis anschließen, der den GVO eindeutig identifiziert. Dabei wird zunächst nach zugelassenen GVOs gesucht, wird keines gefunden, kann es sich um einen GVO ohne Zulassung handeln. Eine untergeordnete Rolle spielt in diesem Zusammenhang auch das

Vorkommen von Fremd-DNA aus den ursprünglichen Spenderorganismen. Beispielsweise führt das natürlich auftretende Blumenkohlmosaik-Virus, dessen Promotor häufig in der GVO-Konstruktion eingesetzt wird, bei infizierten Pflanzen zu falsch positiven Ergebnissen im *Screening* und zu negativen Ergebnissen beim Versuch einen GVO spezifisch nachzuweisen [25].

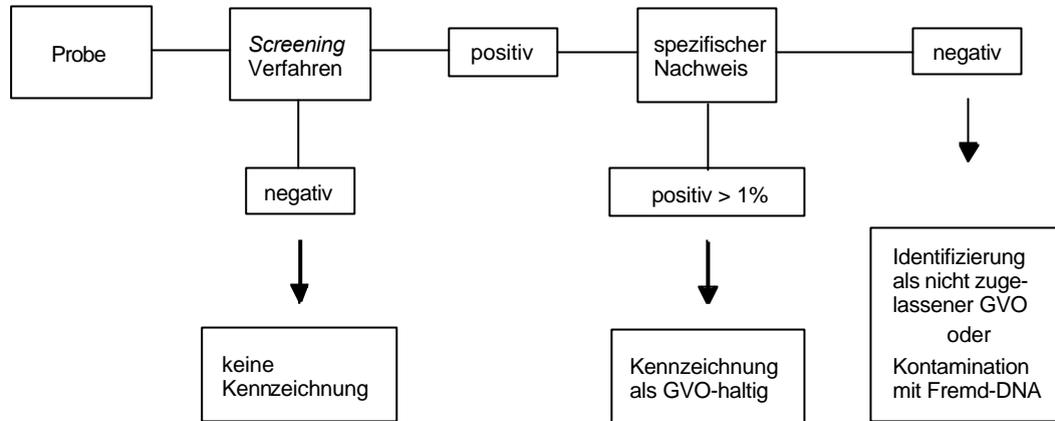


Abb. 1 Analysestrategie für GVOs

Abläufe einer Routineuntersuchung von Nahrungsmitteln nach gentechnischen Veränderungen

Zumindest der spezifische GVO-Nachweis muss quantitativ geführt werden, da die in Europa geltende Kennzeichnungspflicht erst ab 1 % GVO-Gehalt besteht. Bei der Auswahl des *Screening*-Verfahrens muss bedacht werden, dass dessen allgemeine Anwendbarkeit und die vorgegebene Nachweisgrenze die Zweckmäßigkeit der gesamten Analysestrategie bestimmt. Für das *Screening*-Verfahren und den spezifischen Nachweis kommt sowohl die Detektion der GVO-Proteine, als auch die Detektion der zugrunde liegenden DNA in Frage. Es können jedoch nur tatsächlich exprimierte und organismusfremde Proteine sinnvoll analysiert werden. Im Gegensatz dazu kann bei DNA jegliche eingebrachte Sequenz zur Untersuchung dienen. Prinzipieller Vorteil des Proteinnachweises ist dessen einfache und schnelle Durchführung, die oft direkt zu quantitativen Aussagen führt. Vorteil des DNA-Nachweises ist hingegen dessen extrem niedrige Nachweisgrenze durch die Vervielfältigung der Zielsequenz in der Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) [26]. Nachteil des Proteinnachweises sind dessen Empfindlichkeit gegenüber Denaturierung und Abbau der Analyten, z.B. in verarbeiteten Proben. Während DNA als Analyt von diesen Effekten weniger stark betroffen ist, ist deren quantitativer Nachweis aufwändiger.

3.3 Protein-Analytik

Ein Immunoassay ist ein Nachweisverfahren das sich zur Bestimmung von biologisch aktiven Substanzen wie Hormonen, Pharmaka, Opiaten und diagnostisch wichtiger Proteine, insbesondere wegen der hochspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion eignet. Um auch für sehr niedrige Konzentrationen quantitative Aussagen machen zu können, muss einer der Reaktionspartner mit einer empfindlich nachweisbaren Substanz (z. B. Markierung mit radioaktiven Stoffen) oder mit einem signalverstärkenden Enzym gekoppelt werden [27]. In Festphasen-gekoppelten Immunoassays (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*) wird

dieses Prinzip zur parallelen Analyse von vielen Proben im Vergleich mit einer bekannten Menge Standardantigenen verwirklicht. In dieser Arbeit wird ein *Sandwich-ELISA* verwendet, bei dem die Detektion des Immunkomplexes über gekoppeltes Biotin erfolgt (Abb. 2). An dieses bindet seinerseits Streptavidin, an das ein signalverstärkendes Enzym, alkalische Phosphatase, konjugiert ist.

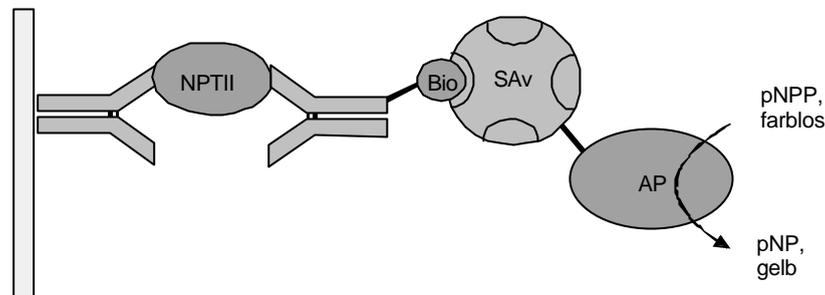


Abb. 2 Sandwich-ELISA

Der Aufbau erfolgt schrittweise von links nach rechts. Antikörper werden adsorptiv an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) gebunden. Das Antigen Neomycinphosphotransferase Typ II (NPTII) aus einer unbekannt Probe oder einer Standardlösung wird gebunden und von einem zweiten Antikörper, der mit Biotin (Bio) dekoriert ist, erkannt. Die Biotin-Gruppe wird mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat (SAv-AP) durch eine Farbreaktion mit *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) detektiert. Das gebildete dephosphorylierte Produkt (pNP) kann in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät spektrophotometrisch bestimmt werden.

Eine weitere Detektionsmethode, jedoch mit eingeschränkter Möglichkeit zur Quantifizierung, stellt der Immunoblot (Western-Blot) dar. Die Proteine einer Probe werden dabei zuerst entsprechend ihrer Größe durch SDS-Gelelektrophorese getrennt, elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und dort mit Antikörpern nachgewiesen. Ein entsprechender Nachweis-komplex kann mit dem biotinylierten Antikörper, wie in Abb. 2, und dessen indirektem Nachweis durch Streptavidin-alkalische Phosphatase aufgebaut werden. Da die Proteine der Proben bei dieser Prozedur im Gegensatz zum ELISA denaturiert werden müssen, ist wegen potenziell veränderter Epitope mit einer anderen Empfindlichkeit zu rechnen.

Die Veränderungen in GVOs führen in fast allen Fällen zur Expression von zusätzlichen oder veränderten Proteinen in der gesamten Pflanze oder, bei Verwendung von entsprechenden Promotoren, in bestimmten Geweben. Im Falle der Herbizidresistenzen ist keine transgene Expression von weiteren Enzymen notwendig. Wird im GVO jedoch lediglich die Expression von Wildtyp-Proteinen, wie der Polygalacturonase, durch *Antisense*-Techniken reduziert, muss mit der transgenen DNA ein geeigneter Marker in die Pflanze eingebracht werden, um die Transformanten bei der Regeneration zu selektionieren. In allen transgenen Tomaten (Fa. Zeneca, Calgene (zwei Tomatensorten), Monsanto, Agritope und DNA Plant Technology, Stand: Juli 2001) sowie in einigen Kürbis-, Kartoffel-, Raps- und Flachs-GVOs, die von der US-FDA-zugelassenen wurden, wurde die Neomycinphosphotransferase Typ II (NPTII), die in der Literatur auch als Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APH(3')II, EC 2.7.1.95) bezeichnet wird, verwendet. NPTII verleiht Resistenz gegen die Antibiotika Neomycin und Kanamycin, die neben Prokaryonten auch auf Eukaryonten durch Inhibierung der Proteinbiosynthese toxisch wirken. Sie ist von der FDA als ungefährlich bei Verzehr durch Mensch und Tier eingestuft worden und daher in GVOs weit verbreitet.

Es gibt kein Protein, das in allen zugelassenen GVOs exprimiert wird und somit in einem einzigen Immunoassay zum *Screening* jeglicher Organismen dienen kann. Die Tatsache, dass in allen GVO-Tomaten NPTII exprimiert wird, während es in der Natur ansonsten nur von Bakterien mit dem Transposon Tn5 produziert wird, macht es für diese Pflanzenart zu einem geeigneten *Screening*-Parameter.

3.4 DNA-Analytik

Die PCR erlaubt die spezifische Vervielfältigung und Identifizierung von Abschnitten genomischer DNA. Die PCR ist ein enzymatischer, zyklischer Prozess, der noch mit DNA aus sehr wenigen Zellen (circa 10 Genomkopien, [28]) zum Erfolg führt. Da die genetische Information in allen Zellen vorhanden ist, ist die PCR nicht, wie der Proteinnachweis, auf das Gewebe, in dem das transgene Protein exprimiert wird, beschränkt.

Die Einfachheit der Anwendung und der außerordentlich empfindliche Nachweis geringer Templat-Mengen haben die PCR auch in der Lebensmittelanalytik zu einem anerkannten Werkzeug für qualitative Untersuchungen gemacht [2, 29, 30, 31]. Die PCR weist jedoch keine strikte Abhängigkeit von Edukt- und Produktmengen auf. Sie kann vielmehr, je nach individueller Effizienz der Reaktion, Anwesenheit von Inhibitoren oder Variationen der Reaktionsbedingungen, zu unterschiedlichen Produktmengen führen [32]. Bei der üblichen Ausführung einer PCR mit einer festen Zyklenzahl spielt das Erreichen eines Plateaus, zu dem die zu Beginn exponentielle Amplifikation führt und dessen Niveau variabel ist [33, 34], eine große Rolle. Mit Erreichen dieses Niveaus ist ein Rückschluss auf die initiale Matrizenmenge nicht mehr möglich.

Der spezifische, qualitative Nachweis der gentechnisch veränderten DNA ist für alle relevanten GVOs möglich [29]. Die notwendige Sequenzinformation ist in der Regel aus den Patenten, Datenbanken [35] oder Veröffentlichungen der Erfinder/Produzenten im Zuge der Zulassung [6] bekannt oder wurde durch unabhängige Forschung [36, 37] zugänglich. Der spezifische Nachweis eines GVO erfolgt in der Regel durch Analyse eines einzigartigen Sequenzübergangs zweier genetischer Elemente innerhalb der eingebrachten Veränderung [38] oder überspannt die Grenze zwischen Wildtyp-DNA und insertierter DNA am Integrationsort [36].

Für *Screening*-Analysen auf DNA-Ebene sollte ein ubiquitäres Element zur Verfügung stehen, das allen GVOs zu eigen ist. Ein solches genetisches Element existiert offensichtlich nicht. In der Schweiz dient der Nachweis des sehr häufig verwendeten viralen CaMV35S-Promotors (Cauliflower mosaic virus, Blumenkohlmosaik Virus) in der offiziellen *Screening*-Methode [2, 39]. Es ist abzusehen, dass der differenzierte Einsatz von Promotoren bei zukünftigen GVOs, wie er aus den US-Zulassungen, die den EU-Zulassungen in der Regel vorausgehen, bereits zu erkennen ist, dazu führt, dass immer mehr Organismen durch ein „Ein-Kriterium“-Raster fallen. Daher wird die *Screening*-Analytik oft auf weitere häufig verwendete Elemente wie den Terminator des Nopalinsynthase-Gens (NOS3'), das *nptII*-Gen und die Ti-Plasmid Grenzen ausgedehnt [31]. Analysiert man Lebensmittelproben mit einer limitierten Zahl potenziell genetisch veränderter Organismen, ist meistens ein *Screening*-Parameter ausreichend. Alle gegenwärtig US-zugelassenen GVO-Soja Sorten (Monsanto, AgrEvo und DuPont) weisen,

bei drei völlig verschiedenen Strukturgenen, beispielsweise den CaMV35S-Promotor als gemeinsames Element auf, der somit ein hinreichender Parameter ist, um *Screening*-Untersuchungen in Sojaprodukten durchzuführen.

Quantitative DNA-Analytik

Nach der Identifizierung der potenziellen GVOs durch *Screening*-Analytik ist der spezifische Nachweis notwendig. Dieser kann zur Feststellung des Organismus qualitativ erfolgen. Zur Klärung der Frage, ob eine Kennzeichnung erfolgen muss, sind wegen des 1 % Schwellenwertes jedoch quantitative Messungen notwendig.

Der direkte Weg DNA spezifisch in Extrakten von Proben nachzuweisen, ist der Southern-Blot [40], bei dem restringierte DNA im Agarosegel nach Größe aufgetrennt und auf Membranen transferiert wird, wo sie dann nach spezifischer Hybridisierung nachgewiesen werden kann. In Abwandlung dieses Prinzips können mit punktförmiger Auftragung [41], unter Auslassung der Größenauftrennung, mehr Proben pro Membran aufgebracht werden. Diese Ausführung erlaubt bei Auftragung quantifizierter DNA-Standards die Signale zu vergleichen und Konzentrationen zu bestimmen. Die Methoden verlangen die Isolierung sehr großer DNA-Mengen und sind in der Ausführung langsam und aufwändig, so dass sie sich weder für den Durchsatz vieler Proben, noch zur Spurenanalytik [42] eignen. Daher wird der quantitative DNA-Nachweis allgemein nach einer Vervielfältigung mit Hilfe der PCR geführt.

Die einfachste Vorgehensweise unter Verwendung der PCR ist eine Betrachtung der entstehenden Produkte im exponentiellen Bereich der Vervielfältigung. PCRs zu einer Probe werden dabei nach Durchlauf unterschiedlich vieler Zyklen abgebrochen und die entstandenen Produkte mit einer extern vorgegeben Menge verglichen (Abb. 3). Unter der Annahme, dass die Amplifikationseffizienz E über die durchlaufene Anzahl von Zyklen konstant bleibt und jede Probe frei von Inhibitoren ist, kann man nach Gleichung 1 den Rückschluss auf die initiale Stoffmenge (N_0) an Matrizen zu Beginn der PCR ziehen oder die benötigten Zyklen direkt als logarithmische Maßzahl der Konzentration verwenden. N_n ist die Stoffmenge nach n Zyklen, die aus N_0 bei einer Effizienz von $E = 1$ (theoretisch mögliche Vervielfältigung bei Verdopplung) bis $E = 0$ (keine Vervielfältigung) entsteht.

$$\text{Gleichung 1} \quad N_n = N_0 (1 + E)^n$$

In der ursprünglichen Ausführung [43, 44, 45, 46] wurden die Produkte z. B. im Agarosegel analysiert, was zu einem hohen Arbeitsaufwand führte. Mit modernen PCR-Thermoblöcken mit optischen Detektionsmodulen kann die Produktzunahme bis zum Erreichen einer extern vorgegebenen, möglichst geringen Produktmenge bequem durch Fluoreszenzmessung im Reaktionsgefäß in Realzeit beobachtet werden (siehe Abschnitt 6.2.7.2, Messung durch SYBR-Green Anlagerung und Abschnitt 7.2.1.1, durch Sonden). Aufgrund der sehr empfindlichen Messung der Fluoreszenz liegt der detektierbare Grenzwert der Produktbildung bei geringen Zyklenzahlen und die PCR hat den exponentiellen Bereich noch nicht überschritten.

Die präzise Quantifizierung mit dieser Art von PCR kann jedoch durch eine Reihe von Unbestimmtheiten, die während der Probenvorbereitung oder im Zuge der Reaktion auftauchen können, behindert werden. Essentielle Bedingung bei Vergleich zweier Proben ist die gleiche Amplifikations-Effizienz. Geringe Variationen der Reaktionsbedingungen, wie sie durch verschiedene Matrices erzeugt werden, verstärken sich im exponentiellen Amplifikationsprozess enorm. Diese Unwägbarkeiten können durch Normalisierung mit internen Referenzgenen teilweise ausgeräumt werden. Bei Expressionsstudien, bei denen die mRNA zuerst revers in cDNA transkribiert wird, stellen oft sogenannte Haushaltsgene (*housekeeping genes*), von denen angenommen wird, dass sie immer in konstanten Mengen transkribiert werden, diesen Bezug dar [47].

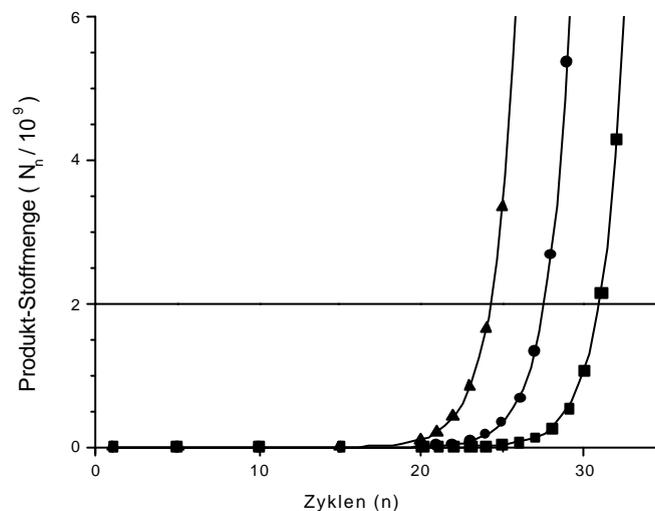


Abb. 3 DNA-Quantifizierung durch PCR innerhalb des exponentiellen Bereichs

Entwicklung der Stoffmengen N nach n Zyklen entsprechend Gleichung 1 (Effizienz = 1). Bei verschiedenen initialen Stoffmengen N_0 (■, 1; ● 10, ▲, 100) wird eine bestimmte Produktmenge nach Durchlaufen von n PCR-Zyklen (■, 30,9; ● 27,6; ▲, 24,2) akkumuliert. Der Grenzwert, hier $N = 2 \cdot 10^9$, wird willkürlich bei einer möglichst geringen, signifikant nachweisbaren Produktmenge festgelegt.

Ein weiteres, vom Konzept einfaches Verfahren, das jedoch in der praktischen Durchführung aufwändig ist, stellt die limitierende Verdünnung dar (*limiting dilution*) [48, 49]. Dabei wird durch Verdünnung des DNA-Extraktes, der als Matrize in der PCR eingesetzt wird, diejenige Verdünnungsstufe ermittelt, bei der gerade eben kein PCR-Produkt mehr erhalten wird und somit die initiale Matrizenmenge der Nachweisgrenze der PCR (als konstant angenommen) entspricht. Bei gering konzentrierten DNA-Lösungen führt die koextrahierte Matrix der Probe gegebenenfalls zu veränderten Effizienzen und somit zu veränderten Nachweisgrenzen, während sie bei hoch konzentrierter DNA effektiv verdünnt wird. Dieser Effekt reduziert die Vergleichbarkeit bei großen Konzentrationsdifferenzen. Neben vielen Verdünnungsstufen zur sukzessiven Ermittlung des relevanten Verdünnungsbereiches, ist ebenfalls eine nach statistischen Gesichtspunkten ausreichende Versuchsanzahl notwendig, was zu aufwändig vielen, einzelnen PCRs pro Probe führt.

Eine präzisere Quantifizierung kann mit der kompetitiven PCR erzielt werden [50]. Diese Untersuchungsmethode basiert auf der Koamplifikation einer spezifischen Zielsequenz

(*Target*) mit einer bekannten Menge eines internen Standards (Kompetitor) in einem einzigen Reaktionsgefäß (Abb. 4). Sie wurden zuerst von Gilliland *et al.* [32] beschrieben und hat vielfach Anwendung gefunden [Übersichtsartikel 50, 51, 52]. Der weitaus größte Teil der Literatur beschreibt Anwendungen, in denen nach reverser Transkription von mRNA die entstandene cDNA durch kompetitive PCR quantifiziert wird. Anders als bei dem GVO-Nachweis, interessieren bei diesen Messungen des Expressionsniveaus bestimmter Proteine oft die relativen Verläufe statt der absoluten Gehalte. In der Lebensmittelanalytik sind kompetitive PCRs jedoch ebenfalls vertreten [34, 36, 53, 54, 55, 56, 57].

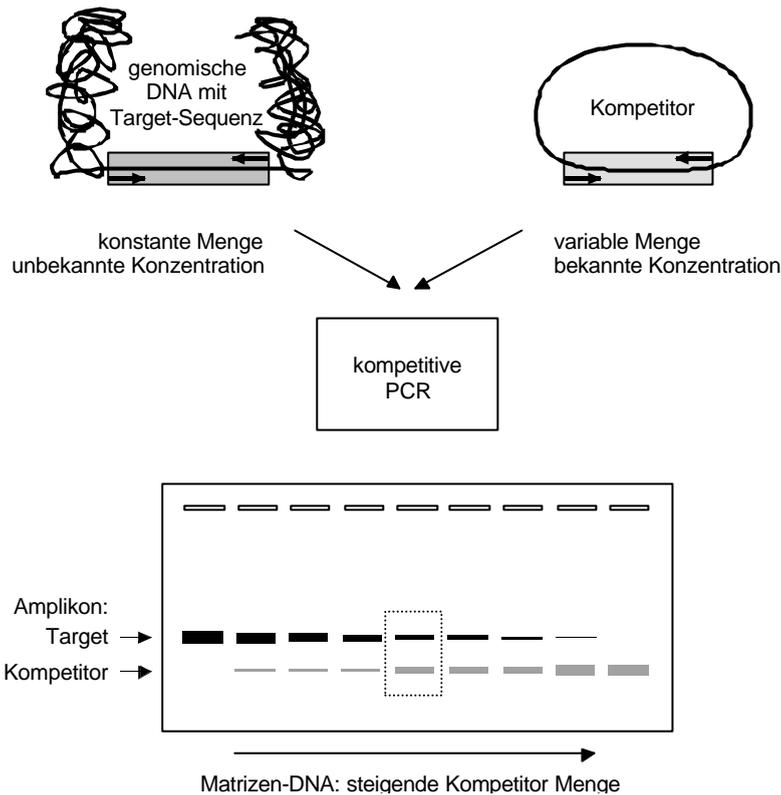


Abb. 4 Schematischer Ablauf einer kompetitiven PCR

Zu einer konstanten Menge genomischer Proben-DNA wird in einer Serie kompetitiver PCRs eine steigende, bekannte Menge eines Kompetitorplasmids gegeben und amplifiziert. Die unterschiedlich großen Produkte werden im Agarosegel untersucht und der Äquivalenzpunkt (gleiche Amplikonmengen) ermittelt.

Der Kompetitor besitzt die gleichen Primerbindungsstellen wie das Target und muss für verlässliche Messungen mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden. Das Effizienzkriterium ist essenziell [58, 59, 60, 61] und bedarf besonderer Beachtung, denn Korrekturberechnungen sind kompliziert und die Aussagen mit großen Unsicherheiten behaftet [62].

Während gleiche Effizienz für Target- (E^T) und Kompetitor-Sequenz (E^K) bei einer kompetitiven PCR prinzipiell gegeben sein muss ($E^T = E^K$), muss die Effizienz der PCR für zwei DNA-Extrakte unterschiedlicher Proben, die individuell mit Inhibitoren aus der koextrahierten Matrix belastet sein können, nicht gleich sein ($(E^T = E^K)_{PCR1} \geq$ oder $\leq (E^T = E^K)_{PCR2}$). Entscheidend ist, dass Target und Kompetitor im selben Gefäß, unter den gleichen Bedingungen und mit gleicher Effizienz amplifiziert werden. Nur dann kann von dem Stoffmengenverhältnis der Produkte auf die ursprünglichen Verhältnisse von Target- und Kompetitor-DNA

zurückgeschlossen werden (siehe Abschnitt 6.2.7). Gleiche Effizienz muß in allen Phasen der PCR gegeben sein; Konkurrenz kann folglich nicht nur im exponentiellen, sondern mit gleicher Präzision im linearen und im Plateau-Bereich der PCR durchgeführt werden [52, 63]. Dies unterscheidet die kompetitive PCR grundsätzlich von den beiden zuvor beschriebenen Methoden.

Zur Auswertung kompetitiver PCR wird in der Regel der Stoffmengen-Quotient (Q_{St}) von Target- zu Kompetitor-Amplikon herangezogen [52]. Für eine Serie kompetitiver PCRs mit sinkenden Kompetitor-Mengen und konstanter Menge Target-DNA zeigt der Stoffmengen-Quotient bei doppeltlogarithmischer Auftragung gegen die eingesetzte Kompetitor-Menge Linearität. Dieser Zusammenhang wird im Folgenden (siehe Gleichung 5, S. 92) eingehend beschrieben.

Die Möglichkeiten Kompetitoren zu konstruieren sind in der Literatur vielfältig beschrieben worden. Zu nennen sind hier die Overlap-PCR [64, 65] (Abb. 23 dieser Arbeit), *looped oligo*-Methode [66, 67] (Abb. 21 dieser Arbeit) und Deletion/Insertion durch Kombination von Restriktion und Ligation [65, 67, 68]. Es wurden aber auch natürlich vorkommende Kompetitoren verwendet. Klonierte genomische Fragmente eines Gens mit Intron (größeres Produkt) wurden dabei zur mRNA Synthese genutzt und diese der Proben-mRNA (*in vivo* prozessiert Intron-frei, kleineres Produkt) in einer kompetitiven RT-PCR zugesetzt [32]. Für bestimmte Gene in verschiedenen Spezies (Mensch-Nager) finden sich bei Datenbankabgleichen gelegentlich identische Sequenzen für Primerbindungsstellen, die jedoch interne Sequenzen mit geringerer Homologie (Größendifferenz, unterschiedliche Restriktionsstellen) umschließen. So kann durch Zusatz von definierten Mengen Nager-RNA zur humanen Proben-RNA eine quantitative Aussage gewonnen werden [69].

Um den eingesetzten Kompetitor bequem quantifizieren zu können, wird er häufig kloniert in Form eines Plasmids eingesetzt. Die PCR-Produkte von Target und Kompetitor müssen sich in mindestens einer Eigenschaft, wie der Länge, Schnittstellen oder Hybridisierungsstellen unterscheiden. Target- und Kompetitor-Amplikon werden getrennt voneinander quantifiziert, im einfachsten Fall durch Agarosegelelektrophorese und densitometrische Auswertung. In dieser Arbeit wird die Analyse der PCR-Produkte basierend auf Hybridisierung durchgeführt. Damit geht die in den Methoden nach §35 des Lebensmittel und Bedarfsgegenstände Gesetzes (LMBG) geforderte Bestätigungsreaktion für Amplikons mit in die Analyse ein.

3.5 PCR-ELISA

Der PCR-ELISA, der in dieser Arbeit verwendet wird, stellt eine Methode dar, PCR-Produkte ohne Verwendung von Ethidiumbromid schnell und mit einer niedrigen Nachweisgrenze bei großem, parallelen Durchsatz zu detektieren [70, 71] (Abschnitt 6.2.6). Amplikons werden im PCR-ELISA nicht durch ihre Größe, sondern durch sequenzspezifische Hybridisierung identifiziert, die im Vergleich zur Identifizierung durch Southern-Blot wesentlich schneller von Statten geht [70, 72].

Nach einer PCR mit einem biotinylierten (Bio) und einem konventionellen Primer werden Aliquots der Produkte ohne weitere Aufarbeitung in Puffer verdünnt, in Streptavidin (SAv) beschichtete Mikrotiterplatten gegeben und durch die hohe Biotin-Affinität des Streptavidins

irreversibel gebunden (Abb. 5). Einzelne oder im Gemisch vorliegende Amplikone können nach alkalischer Denaturierung mit einer sequenzspezifischen Sonde hybridisiert werden. Der Hybridisierung unter Hochsalzbedingungen (Kochsalz/Zitrat-Puffer, 5xSSC) folgen Waschschritte bei niedrigeren Salzkonzentrationen (PBS, circa 1xSSC). Die Digoxigenin markierte Sonde wird durch ein anti-Dig-F_{ab}-alkalische Phosphatase-Konjugat detektiert. Dazu setzt die alkalische Phosphatase (AP) das farblose Substrat *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu gelbem Nitrophenolat (pNP) um. Die Absorption bei 405 nm, die proportional zur initialen, immobilisierten Amplikon Menge ist, wird im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Der Nachweis der beiden Amplikone einer kompetitiven PCR kann durch Aufteilen der Reaktionsprodukte und separate Hybridisierung mit unterschiedlichen Sonden erreicht werden.

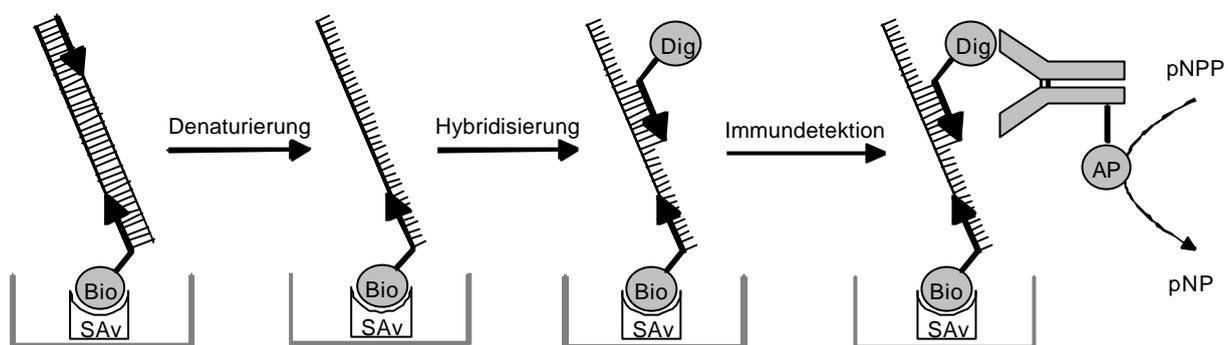


Abb. 5 Detektion des biotinylierten Amplikons durch PCR-ELISA

Schema der Nachweis-Reaktion auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte.

Neben dem hier verwendeten PCR-ELISA Aufbau, der weit verbreitet ist [64, 68, 73, 74, 72, 75, 76], sind in der Literatur zahlreiche weitere Varianten beschrieben. Sie sehen beispielsweise alternativ eine Hybridisierung in der Lösung statt an der festen Phase vor [144]. Analyse durch eine Immobilisierung der Sonde statt des PCR-Produktes und anschließende Zugabe des thermisch oder alkalisch denaturierten Amplikons ist ebenfalls möglich [66, 87, 88, 81, 85, 77, 89, 86]. Weiterhin können zwei Oligonukleotide, eines zum Fixieren und eines zur Sequenz-spezifischen Detektion, in der Hybridisierungslösung mit unmarkierten Amplikon eingesetzt und an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gebunden werden [146, 78]. Die Immobilisierung von DNA, Amplikon, Oligonukleotiden aber auch ganzer Plasmide [79, 80], die die Hybridisierungssequenz in einfacher oder mehrfacher Kopie insertiert haben, kann neben der beschriebenen Streptavidin/Biotin-Fixierung ebenso durch Reaktion von terminalen Aminogruppen der verwendeten Primer an Oberflächen spezieller, reaktive Mikrotiterplatten erfolgen [65, 67, 81, 145, 82, 83]. Die Ausführung der PCR mit nicht markierten Primern und markierten Nukleotiden ist ebenfalls verbreitet [64, 85, 86, 87, 88, 89]. Der Nachweis des Hybridisierungsereignisses kann durch die eingeführte Markierung (z. B. Dig, Biotin oder Fluoreszein) aber auch mit Antikörpern gegen Doppelstrang-DNA erfolgen (Fa. Diasorin). Ebenso kann die Signal Erzeugung/Verstärkung durch andere Enzyme oder andere Substrate (z. B. Peroxidase/*ortho*-Phenylendiamin, alkalische Phosphatase/CDP-Star mit Luminometerauswertung) realisiert werden [109, 76].

PCR-ELISA Formate, die den gleichzeitigen Einbau der Immobilisierungs- (z. B. Bio) und der Detektionsmarkierungen (z. B. Dig) durch PCR vorsehen [144, 90, 91, 92], sind zwar sehr empfindlich, aber deutlich störanfällig. Das Auftreten von Primer-Dimeren erzeugt hier gegebenenfalls Signale, die ebenso wie unspezifische Produkte ohne Überprüfung der amplifizierten Sequenz zu falsch positiven Auswertungen führt. Der in Abb. 5 vorgestellte, sequenzielle PCR-ELISA mit Hybridisierung einer Sonde am fixierten Einzelstrang ist aus eigenen Vorarbeiten als robust und zweckdienlich bekannt und wurde daher in dieser Arbeit als grundlegendes Werkzeug weiter verwendet. Mit ihm wurden Signale (optische Dichten, ODs) für die Target- und Kompetitor-Amplikons der kompetitiven PCRs bestimmt. Aus diesen ODs wurden zur Auswertung häufig Signal-Quotienten (Q_{Si}) gebildet. Letztere sind wegen individuellen Hybridisierungsverhaltens von Sonden im PCR-ELISA nicht zwingend gleich den zuvor beschriebenen Stoffmengen-Quotienten (Q_{St}).

3.6 Kulturpflanze Soja, Analyt Roundup Ready

Die Sojabohne (*Glycine max*; Syn.: *Glycine hispida*) ist eine einjährige Pflanze und wurde vor langer Zeit zuerst in China und später auch in Japan kultiviert. Sie gehört zu den Leguminosen, die mit Hilfe von Stickstoffbakterien den Stickstoff aus der Luft erschließen können und daher in der Regel keinen Kunstdünger benötigen. Sie bietet eine von keiner anderen Kulturpflanze erreichte Kombination von hohem Eiweiß- (30-50 %) und Fettgehalt (15-20 %) bei einem hohen Ertrag pro Anbaufläche. Die unreifen Bohnen können wie Erbsen als Gemüse verzehrt werden, reife Bohnen sind schwer verdaulich und müssen eingeweicht und gekocht werden. Der überwiegende Teil der Sojaproduktion wird zur Tierfütterung verwendet. Zum Verzehr für den Menschen werden die Bohnen gekeimt (Sprossen), zu Sojamilch oder Tofu (Sojaquark) verarbeitet oder zu Produkten wie Sojasoße (Shoyu), Sojapaste (Miso), Käse (Sufu), Tempeh und Natto (ganze Bohnen) fermentiert [93]. Soja ist Rohstoff für verschiedenste Lebensmittel-Zutaten und Zusatzstoffe, darunter der Emulgator Soja-Lecithin als ein Massenprodukt. Es wird geschätzt, dass 20000 bis 30000 Lebensmittelprodukte und Zusatzstoffe in irgendeiner Form Sojakomponenten enthalten [8].

Die transgene, Glyphosat resistente Roundup Ready Soja (RR)-Bohne wurde von der Fa. Monsanto durch Partikelbeschuss des Soja Cultivars A5403 erzeugt. Das verwendete Plasmid (PV GMT04, 10511bp, Abb. 6A) basiert auf dem pUC119-Plasmid und trägt die bakterielle CP4-EPSPS, der die Sequenz für das chloroplastidäre Transitpeptid (CTP) aus Petunie vorangestellt ist. Durch Southern-Blot wurde der Transfer einer Teilsequenz von 2,2 kbp in eine regenerierte Pflanze (Glyphosat tolerante Soja, Linie GTS40-3-2) bestätigt [9]. Darin enthalten war der konstitutive Blumekohlmosaikvirus 35S-Promotor (CaMV35S) gefolgt von der CTP, der CP4-EPSPS und einem 3'-Fragment des Nopalinsynthase-Gens des *Agrobacterium tumefaciens* als Terminator (NOS 3'). Das Plasmid enthielt zusätzlich das GUS-Gen (β -Glucuronidase-Gen, ursprünglich gedacht zur Identifizierung von Transformanten durch Farbreaktionen), das Kanamycin-Resistenzgen (nptII, zur Selektion in Bakterien) und eine zweite Kopie der EPSPS unter Einfluss des *figwort*-Mosaik Virus 35S Promotors. Diese Sequenzen wurden nicht in die transformierte Pflanze übertragen (Abb. 6B).

Die detaillierte Sequenz der übertragenen DNA wurde nicht in der grundlegenden Arbeit von Padgett *et al.* [9], Mitarbeiter der Fa. Monsanto, veröffentlicht. Vielmehr haben Studer *et al.* [94] den Sequenzübergang von CaMV35S-Promotor über die Sequenz des CTP zur CP4-EPSPs und Windels *et al.* [37] (Abb. 6B) die beiden Übergänge der genomischen Pflanzen-DNA in die transgene DNA beschrieben. Letztere Arbeit zeigte, dass es sich bei der gentechnischen Veränderung nicht um eine einfache Insertion handelte, sondern dass weitere Umordnungen des RR-Genoms stattfanden. Es wurde ein zusätzlich insertiertes 254 bp Fragment der CP4-EPSPs, das aus dem Transformationsvektor stammt, und eine bisher unbekannte 534 bp Sequenz, die sich auch im Wildtyp-Soja Genom findet, entdeckt. Weiter wurde von Windels *et al.* [37] berichtet, dass die genomischen 5'- und 3'-wt-Soja DNA (Abb. 6B) Bereiche in nicht transformierten Pflanzen nicht direkt aufeinander folgen. Unter Annahme einer einfachen Insertion wäre die gentechnische Veränderung durch eine einfache PCR mit flankierenden Primern nachzuweisen. Ein kleines Amplikon hätte die Wildtyp-Soja, ein großes Amplikon die GVO-Soja nachgewiesen. Diese Arbeiten sind jedoch für eine weitere spezifische Analytik der RR und für das Verständnis von gentechnischen Veränderungen wertvoll.

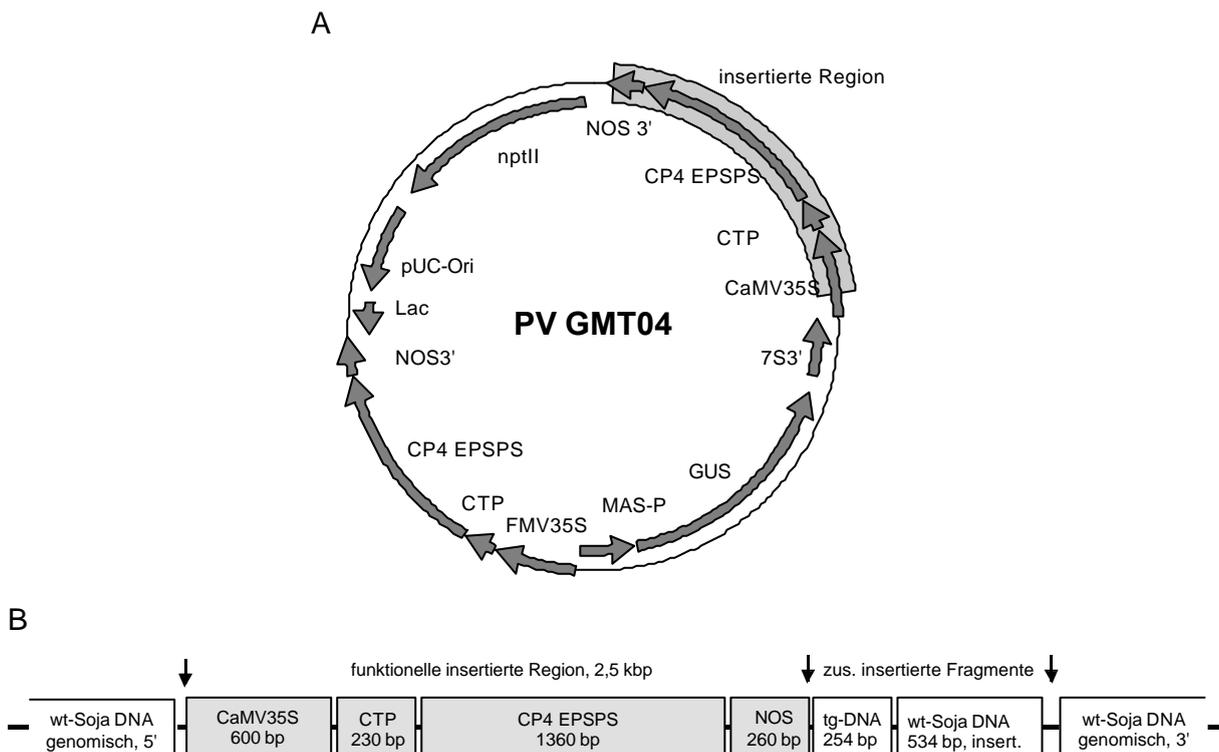


Abb. 6 Genomische Charakterisierung der Roundup Ready Sojabohne

A, Plasmid PV GMT04 zur Transformation von Wildtyp-Soja (Cultivar A5403) Partikelbeschuss. Genetische Elemente: nptII, Neomycinphosphotransferase; pUC-Ori, Replikationsstartpunkt für *high copy* Plasmide; Lac, partieller Lac-Promotor; NOS3', Terminator der Nopalinsynthese; CP4-EPSPS, 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase; CTP, chloroplastidäres Transitpeptid; FMV35S, *figwort mosaic virus* 35S Promotor; MAS-P, Mannopin Synthase Promotor; GUS, β -Glucuronidase-Gen; 7S3', Terminator der α -Einheit des Soja 7S *seed storage*-Proteins, CaMV35S, Blumenkohlmosaikvirus 35S Promotor. B, gentechnische Veränderung des Soja Genoms in RR, grau unterlegt die von Padgett *et al.* [9] publizierte, insertierte Sequenz. Windels *et al.* [37] haben die Übergänge zur Wildtyp-Soja untersucht und zusätzlich insertierte Fragmente von transgener DNA (tg) aus der CP4-EPSPS kodierenden Sequenz und Wildtyp-Soja DNA (wt) gefunden.

4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, im Rahmen eines von der Europäischen Union geförderten Projektes mehrere Methoden zur qualitativen und quantitativen Detektion der GVOs durch deren Nachweis auf der Ebene der Proteine und Nukleinsäuren zu entwickeln. Eine Methode sollte dabei einerseits zum spezifischen GVO-Nachweis am Beispiel der Roundup Ready Soja dienen. Dieser Analyt hat zur Zeit die höchste praktische Relevanz. Weitere Methoden sollten andererseits auch im *Screening* einer großen Probenzahl, (a) dem in GVOs häufig verwendeten Selektionsmarker Neomycinphosphotransferase (NPTII) und (b) dem ebenfalls prominenten genetischen Element, dem CaMV35S-Promotor, eingesetzt werden.

Zu diesem Zweck sollen Antikörper gegen eine rekombinante NPTII erzeugt und ein ELISA-Protokoll entwickelt werden, mit dem in Tomaten die transgene NPTII-Expression nachgewiesen werden kann. In weiteren Untersuchungen soll die Anwendbarkeit dieses Verfahrens bei prozessierten Lebensmitteln beurteilt werden.

Der Nukleinsäurenachweis aus DNA-Extrakten der Proben soll nach PCR-Vervielfältigung mit einem PCR-ELISA, der durch die integrierte Hybridisierung eine spezifische Bestätigungsreaktion bei hohem Probendurchsatz erlaubt, durchgeführt werden. Neben einer rein qualitativen Nutzung soll auf der Basis des PCR-ELISA ein Verfahren zur Quantifizierung von DNA in Extrakten mit Hilfe der kompetitiven PCR etabliert und eingesetzt werden. Die Konstruktion und Validierung von klonierten Kompetitoren für die PCR mit verschiedenen Verfahren ist dazu ebenso notwendig, wie die Validierung der Auswertung.

Die Extrakte anspruchsvoller Proben variieren sowohl in Bezug auf DNA-Qualität als auch -Quantität individuell stark. Die interne Normierung von Ergebnissen für ein GVO-Gen auf ein Referenzgen der Pflanzenart wird als doppelkompetitive PCR bezeichnet und soll im Zuge dieser Arbeit etabliert werden. Hiermit soll die Möglichkeit geschaffen werden, den GVO-Gehalt im Bereich der EU-Schwellenwerte von beliebigen, auch prozessierten und mit weiteren Organismen gemischten Lebensmitteln ohne Verwendung von externem Referenzmaterial zu bestimmen.

Das entwickelte Verfahren der kompetitiven PCR und PCR-ELISA-Auswertung soll dann in unabhängigen Laboren, die wenig oder keine Erfahrung mit der PCR-ELISA Technik haben, auf Anwenderfreundlichkeit und Aussagekraft in Routineanwendungen getestet werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte

Elektrophorese

Constant Power Supply 2297 Macrodrive S	LKB Bromma (Freiburg im Breisgau)
Elektrophoresis-Power Supply-EPS 600, ALFexpress Analysesystem	Pharmacia (Freiburg im Breisgau)
Gelkammern für Agarosegel, Power Supply PPS 200-1D	MWG-Biotech GmbH (Ebersberg)
Minigel Twin-Kammer, Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Western Blot-Apparatur	Werkstatt des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Münster

FPLC und Säulenmaterialien

HiLoad-System, Steuereinheit GP 10, UV- Detektor UVicord SII, Pumpe P-50, Kollektor Frac-100, Einkanal Schreiber REC102, 10/10 Leersäule, CH aktivierte Sepharose	Pharmacia (Freiburg im Breisgau)
--	----------------------------------

pH-Messgerät

Einstabmesskette U 402 M3-S7/60	Mettler (Toledo, USA)
Knick-Serie pH Meter 763 Multi Calamatic	Knick (Berlin)

Pipetten

Research Pipette, Mehrkanal-Pipette, Multipipette	Eppendorf (Hamburg)
--	---------------------

Polymerasekettenreaktion

Hybaid Thermoblock	MWG-Biotech (Ebersberg)
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
GeneAmp 5700	Perkin Elmer (Weiterstadt)

Schütteln und Inkubieren

Blockthermostat BT200	Kleinfeld (Gehrden)
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg)
Schüttelinkubator Certomat R mit Inkubations- haube Certomat H	Braun (Melsungen)
Trockenbrutschrank	WTB Binder Labortechnik (Tuttlingen)
Vortex Genie Mixer	Bender & Holbein (Zürich, CH)

Photometer

Photometer Lambda 11/Bio, Fluoreszenz-
photometer LS50 Perkin Elmer (Weiterstadt)

ELISA Reader MR5000 Dynatec (Denkendorf)

Waagen

Oberschalen Waage, Analysenwaage Sartorius (Göttingen)

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415 C Eppendorf (Hamburg)

Laborzentrifuge 2K15 Sigma (Deisenhofen)

Kühlzentrifuge J2-MI Beckman (München)

Sonstige Geräte

Bioklav 25 KSG (Olching)

Varioklav 500 H+P Labortechnik (Oberschleißheim)

Sterilgard Sicherheitswerkbank Baker Company (Sanford, ME, USA)

Ultraschallquelle Dr. Hielscher, Faust (Köln)

Ultraturrax T25 IKA Labortechnik (Staufen im Breisgau)

Wasseraufbearbeitung Seralpur Pro 90 CN Seral (Ransbach-Baumbach)

ELISA Waschvorrichtung, 8-fach parallel
Werkstatt des Organisch-Chemischen
Instituts der Universität Münster

5.2 Materialien**Elektrophorese**

Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung Amresco (Göttingen)

Ammoniumperoxodisulfat, ServaBlue R250 Serva (Heidelberg)

TEMED, Bromphenolblau, Xylencylanol,
Ethiudiumbromid, EDTA, Harnstoff Sigma (Deisenhofen)

Glycerin, Natriumcarbonat, Essigsäure,
Borsäure Fluka (Neu-Ulm)

Größenmarker

λ -Marker, λ -DNA *EcoRI/Hind* III geschnitten Appligene (Heidelberg)

pUC19-Marker, *Msp* I geschnitten MBI Fermentas (St Leon Rot)

λ -DNA, *Hind* III geschnitten; DNA-Marker λ -
MixII Molekularbiologisches und biochemisches
Labor Dr. Bartling (Bielefeld)

Molekulargewichtsmarker LMW Pharmacia (Freiburg im Breisgau)

Proteinblotting

Nitrocellulosemembran, Blottingpapiere GB002	Schleicher & Schuell (Dassel)
Essigsäure, Glycin, Tris, Methanol, Tween 20	Fluka (Ulm)
4-Chlor-1-naphthol, bovines Serum Albumin, Wasserstoffperoxid, Schwefelsäure, BCIP, NBT, Streptavidin	Sigma (Deisenhofen)
Schwarze Tinte	Pelikan (Hannover)

Bakterien und Vektoren

<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS, pET 3c	Novagen (Madison, WI, USA)
<i>E. coli</i> XL10 gold	Stratagene (Heidelberg)
pGEM T Easy	Promega (Mannheim)
pCR Skript (Amp, Cam)	Stratagene (Heidelberg)

Kulturmedien

Agar, Ampicillin, Chloramphenicol, Kana- mycin, Glycerin, RbCl, K-Acetat, CaCl ₂ , MnCl ₂	Sigma (Deisenhofen)
Caseinhydrolysat, Hefeextrakt,	Gibco (Eggenstein)
Natriumchlorid, Natriumhydroxid	Fluka (Neu-Ulm)
Isopropyl-β-D-thiogalactosid	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Natriumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydro- genphosphat	Merck (Darmstadt)

DNA-Isolierung

Easypure Gel Extraction Kit	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Agarose Gel Extraction Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
GFX Micro Plasmid Kit	Pharmacia (Freiburg im Breisgau)
Wizard Plasmid Isolation Kit	Promega (Mannheim)
CTAB, Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), RNAse A, Isopropanol, Ethanol, GuHCl	Sigma (Deisenhofen)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe), E. Merk (Darmstadt)
Invisorb Spin Plant Kit	InViTek (Berlin)

PCR

Primer	MWG Biotech (Ebersberg), BioTeZ (Berlin), Metabion (Martinsried), Gibco (Eggenstein)
Amplitaq Gold, Big Dye Sequencing Kit	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Biotherm <i>Taq</i> -Polymerase, Nukleotid-Mix	Genecraft (Münster)
<i>Pfu</i> -, <i>Pfx</i> -Polymerase	Gibco (Eggenstein)
Hering Sperma DNA, DMSO	Sigma (Deisenhofen)
Gelfiltrationskartusche	MoBiTech (Göttingen)

Enzyme

Restriktionsenzyme	Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach, Taunus)
Restriktionsenzym <i>Srf</i> I	Stratagene (Heidelberg)
T4-DNA Ligase	Genecraft (Münster), New England Biolabs (Schwalbach, Taunus), Stratagene (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase aus Shrimps	Boehringer (Mannheim)

ELISA

Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten	Steffens (Eberingen)
Polystyrol Mikrotiterplatten, MaxiSorb	Nunc (Wiesbaden)
Anti Dig F _{ab} -Fragment alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein A Peroxidase-Konjugat, Streptavidin alkalische Phosphatase-Konjugat	BioRad (München)
pNPP (kristalin, lose oder Tabletten), OPD, Magnesiumchlorid, BSA, NaOH, Lauroylsarkosin, Trinatriumcitrat, Ascorbat, Natriumhydrogencarbonat, Formamid	Sigma (Deisenhofen)
Blocking Reagenz	Boehringer (Mannheim)
Digoxigenin markierte Sonden	BioTeZ (Berlin), MWG Biotech (Ebersberg)
NPTII ELISA Kit	5'Prime→3'Prime Inc. (Boulder, CO, USA)

Sonstige Reagenzien

Pico Green DNA Quantification Kit I	Molecular Probes (Leiden, NL)
Biotinylierungsreagenz	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
CH-aktivierte Sepharose 4B	Pharmacia (Freiburg im Breisgau)
Dialyseschlauch, 10 kDa	Medicell (London, GB)
Dialyseplättchen	Millipore (Eschborn)

5.3 Proben

1. Ganze Wildtyp- und RR-Bohnen waren im Zuge von Ringversuchen innerhalb eines Arbeitskreises (nach §35 LMBG) zur Entwicklung von Methoden zum Nachweis von GVOs in Lebensmitteln zugänglich. Organisator des Arbeitskreises und der Ringversuche war das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) in Berlin. RR-Bohnen sind Bohnen der Linie GTS40-3-2 der Fa. Monsanto.

2. Sojamehle mit verschiedenen RR-Gehalten. Herstellung durch: *Institute for Reference Material and Methods* (IRMM) des *Joint Research Center* (JRC, Geel, Belgien) der Europäischen Union, kommerziell erhältlich über Fa. Fluka. Wildtyp- und Roundup Ready-Sojabohnen wurden separat gemahlen, der Wassergehalt nach Gefriertrocknung bestimmt und die einem bestimmten Prozentgehalt (0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % GVO) entsprechenden Mengen 0 % und 100 % Mehle gemischt. Diese Mischungen wurden über mehrere Stunden in wässriger Suspension mittels Ultra-Turrax intensiv homogenisiert, gefriergetrocknet, gemahlen und unter Argon abgefüllt (erste Generation IRMM-410 [95]). Die Homogenität und geringe Korngröße (50 µm) soll den Einsatz geringer Probenmengen (100 mg) erlauben. Mittlerweile sind ausschließlich Materialien der dritten Generation (IRMM-410R), die unter veränderten Bedingungen hergestellt werden, verfügbar.

3. Gentechnisch veränderte Tomaten wurden von *Ente per le Nuove Technologie Energia e Ambiente* (ENEA, Rom, M. Leonardi) zur Verfügung gestellt (PGIP-Tomaten). Die Tomaten (*lycopersicon esculentum*, cultivar Moneymaker) wurden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* transfiziert. Das verwendete Plasmid (Plasmid pMOG636) enthielt die NOS 5'- und CaMV35S-Promotoren, ein Polygalacturonase inhibierendes Protein (PGIP) und NPTII als Resistenzmarker und dem NOS3'-Terminator [96].

4. Zeneca Tomaten (transgene Linie Nema282F) wurden von Zeneca Ltd. [97] für einen EU-weiten Ringversuch bereitgestellt, an dem das ICB teilnahm. Die Tomaten enthalten neben dem Wildtyp-Gen der Polygalacturonase (PG) mit einem Intron zusätzlich in *sense* oder *antisense*-Richtung den 5'-Terminus des PG-Gen ohne Intron. Das PG-Gen ist vom CaMV35S-Promotor und NOS3'-Terminator flankiert. Durch *mRNA*-Suppression wird das PG-Niveau auf 1 % gesenkt. Laut den Unterlagen, die zur US-Zulassung bei der FDA eingereicht wurden, kann die Fa. Zeneca die Orientierung der RNA nicht genau festlegen.

5. Bt176 Mais-Mehl (2 % GVO) wurde vom JRC analog den Soja-Mehlen hergestellt. Bt176 Mais exprimiert das insektizide CryIAb-Protein und beinhaltet das *bar*-Gen (Phosphinotricin-Resistenz) unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors.

Die folgenden Proben (Punkt 6-10) wurden vom BGVV in Zusammenarbeit mit der *Groupe Limagrain Agroindustry Company* (Frankreich, M. Baron) und der Technische Universität Berlin (D. Knorr) aus rohen Bohnen oder Körnern des Wildtyps und der genetisch veränderten Sorte entsprechend den aktuellen technischen Standards hergestellt.

6. Hitzesterilisierte, gemahlene Mais-Körner. Die Präparation entsprach kommerziell erhältlichem Dosen-Mais, der nach dem Blanchieren in einer Lösung von 1-2 % Salz und Zucker gegeben und sterilisiert wird [98]. Die Probe (100 % Bt 176 Mais) lag in getrockneter und gemahlener Form vor.

7. Mais-Grieß. Die Präparation bestand aus gereinigten und gemahlene Maiscornkernen. Für die Herstellung von Grieß werden Hülle und Keimling nach Quellen der Körner entfernt. Die Zerkleinerung erfolgt üblicherweise in Walzwerken bis zu einer Korngröße von 200-500 µm. Häufigster Verwendungszweck von Grieß ist Polenta [98]. Die Probe enthielt 100 % Bt 176 Mais.

8. Texturiertes Soja-Protein. Nach Entfettung von Soja-Flocken werden die Soja-Proteine, sie sind zu 80 % löslich, unter alkalischen Bedingungen in Lösung (pH 8-9) gebracht und die festen Bestandteile entfernt. Zur Gewinnung der Proteine wird die Lösung unter zusätzlicher Verwendung von Binde-Agentien durch Spinndüsen in ein saures Präzipitations-Bad (pH 4-5) gepresst. Dabei wird eine Fleisch ähnliche Struktur erhalten [98]. Die Probe enthielt 2 % RR.

9. Tofu. Soja-Bohnen werden mit Wasser gequollen (10-faches Volumen) und bei Temperaturen knapp unter dem Siedepunkt für 15-20 min pasteurisiert. Aus Sojamilch, dem Überstand, wird durch Zugabe von Calciumsulfat (3 g/kg) ein Präzipitat erhalten, das ausgepresst und gewaschen wird [98]. Zwei Proben mit 100 und 2 % Roundup Ready Soja waren verfügbar.

10. Mehl-Mischung. Die Mehle wurden aus ganzen Körnern bzw. Bohnen gewonnen. 1 % Bt176-Mais, 49 % wt-Mais und 50 % RR wurden gemischt. Die Mahl- und Mischprozesse wurden nicht detailliert mitgeteilt.

5.4 Arbeitsmethoden Immunanalytik

5.4.1 Rekombinante NPTII

Zur Expression des Enzyms NPTII wurde *E. coli* BL21 DE3 pLysS pETnptII in einer Schüttelkultur in LB-Medium angezogen und mit IPTG induziert. Die erhaltenen Einschlusskörper der NPTII wurden in 4 M Harnstoff gelöst, durch Dialyse renaturiert und durch fraktionierte Fällung, gefolgt von Gelfiltration, gereinigt. So präparierte NPTII zeigte eine spezifische Aktivität von 180 mU/mg in einem gekoppelten enzymatischen Test und 98 % Reinheit (SDS-Gel). Detaillierte Protokolle finden sich bei Brunnert [70].

5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Konzentrationen von reinen Proteinen wurden durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm in Quarzküvetten (1 cm optischer Weg) bestimmt. Die Absorption von renaturierter NPTII der Konzentration $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ beträgt $(0,872 \pm 0,024)$ OD [70], der von $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ Rinderserum Albumin (bovines Serum Albumin, BSA) 0,68 OD [102]. Für $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ polyklonale Antikörper wurde eine Absorption 1,35 OD angenommen [100].

Konzentrationen in Proteingemischen, wie sie bei Pflanzenextraktionen entstehen, wurden in phosphatsaurer Lösung mit Coomassie-Blau nach Bradford [99], angepasst an das Mikrotiterformat [100], durch Kalibration mit BSA ($0 - 200 \text{ µg} \times \text{ml}^{-1}$) im verwendeten Extraktionspuffer bestimmt.

5.4.3 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Elektrophoresen wurden mit einem diskontinuierlichem Tris-Glycin-Puffersystem [101] Polyacrylamidgel durchgeführt. Um das Gel in einem Zuge gießen zu können wurde der Sammelgel-Lösung 10 % Glycerin zugefügt, so dass es ohne Vermischung mit der Trenngel-Lösung überschichtet werden konnte. Reduzierende Bedingungen wurden durch Dithiothreitol (DTT) im Probenpuffer eingestellt. Die im Gel getrennten Proteine wurden sauer/ethanolisch fixiert und mit Coomassie-Blau gefärbt [100].

5.4.4 Erzeugung der Anti-NPTII Antikörper

Am Veterinär Forschungsinstitut Brünn (M. Franek) wurden 3 Kaninchen durch je 4 subkutane Injektionen mit rekombinanter NPTII immunisiert. Durch Ausbluten der Tiere (A, B, C) wurden insgesamt 160 ml Serum erhalten.

5.4.5 Reinigung der Antikörper durch Affinitätschromatographie

Sechs Milligramm rekombinante NPTII wurden zur Kopplung an CH-aktivierte Sepharose 4B (1,5 g getrocknetes Material, modifiziert mit 6-Aminohexansäure-N-hydroxysuccinimid) in NaHCO₃-Puffer (100 mM, pH 8,0) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Puffersubstanz Tris enthält Amino-Gruppen und diente dazu, überschüssige aktive Gruppen des Gels abreagieren zu lassen. Das Gel (3 ml) mit kovalent gebundener NPTII wurde in eine 10/10 Säule der Pharmacia HiLoad-Apparatur, bestehend aus Niederdruckpumpe (P-50), Probenschleife, Steuereinheit GP10 und Fraktionskollektor (Frac-100) gefüllt. Die Chromatogramme an Hand eines UV-Detektors (UVicordSII) wurden mit einem Einkanal-Schreiber (REC102) aufgezeichnet.

Als Laufpuffer wurde eine Phosphat-gepufferte Kochsalz Lösung (*phosphate buffered saline*, PBS, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 7,99 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2 bis 7,4) verwendet, als Elutionspuffer Glycin/HCl (100 mM, pH 2,8). Eine Vorlage von 200 µl Phosphatpuffer (500 mM, pH 9,0) im Fraktionskollektor erlaubte das schnelle Umpuffern der 1 ml Fraktionen auf pH (7,0 ± 0,1). Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml·min⁻¹ und die aufgetragene Serummenge 1 ml. Relevante Fraktionen wurden nach 1:100 Verdünnung durch Titer-ELISA identifiziert (siehe Abschnitt 5.4.8).

5.4.6 Biotinylierung der Antikörper

Affinitätsgereinigte Antikörper (6 mg) wurde gegen NaHCO₃ (100 mM, pH 8,5) dialysiert und auf 1,2 ml konzentriert und anschließend mit dem wasserlöslichen Biotinylierungsreagenz „longarm-Biotin-NHS“ (Natriumsulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-capronat) für 2 h unter leichtem Rühren inkubiert. Dabei reagieren Aminogruppen des Proteins mit der aktivierten Carbonylgruppe des Esters. Überschüssiges Reagenz reagierte nach Zugabe von Ethanolamin (5 µl) ab und wurde durch Dialyse gegen PBS/0,02 % Natriumazid entfernt. Ein Biotinylierungsgrad wurde nicht bestimmt. Der biotinylierte Antikörper wurde bei 4°C in PBS/0,02 % Natriumazid gelagert.

5.4.7 Western-Blot

Zum immunchemischen Nachweis wurden SDS-gelelektrophoretisch getrennte Proteine in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,5, 20 % Methanol) durch ein elektrisches Feld ($100 \text{ mA}/50 \text{ cm}^2$, 30 min) auf eine Nitrocellulosemembran (45 μm Porengröße) transferiert. Die Markerspur wurde abgetrennt und die verbleibende Membran nach Hitzefixierung (60°C, 30 min) mit 3 % BSA in PBS blockiert (1 h bis über Nacht, ÜN).

Im Falle der Immundetektion mit Antikörperserum wurde anschließend 3 \times gewaschen (PBS mit 0,1 % Tween, PBS-T), mit einer 1:3000 Verdünnung des Serum des Kaninchen C in PBS-T mit 0,5 % BSA (PBS-T-BSA) 1 h unter Schütteln inkubiert, gewaschen und mit Protein A-Peroxidase Konjugat (1:3000, 2 h) inkubiert. Nach Waschen mit PBS-T und Umpuffern auf Detektionspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl) wurde eine Farbreaktion mit 4-Chlor-1-Naphthol (0,6 $\text{mg}\times\text{ml}^{-1}$ vorgelöst in Methanol) und 0,02 % Wasserstoffperoxid durchgeführt. Die Farbreaktion wurde nach 20 min durch Transfer der Membran in Wasser abgebrochen.

Zur Detektion mit biotinylierten Antikörpern wurde, nach dem Blockieren der Membran mittels BSA (ÜN) zur Vermeidung unspezifischer Bindungen, zuerst mit Streptavidin (20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, 2 h) und anschließend mit Biotin (100 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, 2 h) in PBS-T-BSA inkubiert. Die im Zuge der Reinigung und Modifizierung um den Faktor 10 konzentrierten Antikörper des C-Serums, wurden in einer 1:3000 Verdünnung (PBS-T-BSA, 1 h) der Präparation zur Detektion der transferierten NPTII eingesetzt. Nach Waschen, Inkubation mit Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (1:3000 in PBS-T-BSA), Waschen und Äquilibrieren ($2 \times 10 \text{ min}$) im Detektionspuffer (100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 100 mM Tris, pH 9,5) wurde die Farbreaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT) durchgeführt. Es wurde ein Gemisch aus 170 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BCIP und 340 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ NBT eingesetzt, ein Umsatz zu blau violetten Produkten, die am Ort des Entstehens präzipitieren, erfolgt innerhalb von 10 bis 30 min. Die Farbreaktion wurde durch Transfer in Wasser abgebrochen.

Indian Ink-Färbung: Die nach dem Proteintransfer abgetrennte Marker-Spur der Nitrocellulose-Membran wurde in Waschpuffer (WP, PBS mit 0,3 % Tween 20) bei RT unter Schütteln gewaschen (4-fach, 10 min). Die Färbung erfolgt über mehrere Stunden bis über Nacht in Tinte-haltigem Puffer (WP, 1 % Essigsäure, 0,1 % schwarze Pelikan Tinte, durch einen Papier Faltenfilter filtriert). Anschließend wurde der Membranstreifen in Wasser ($2 \times 10 \text{ min}$) und in WP gewaschen, bis die Proteine gegenüber dem Hintergrund deutlich erkennbar waren [102].

5.4.8 ELISA zur Titerbestimmung

Nach Optimierung der adsorbierten Menge NPTII wurde folgendes Protokoll (Tab. 1) zur Titerbestimmung und zur Detektion der relevanten Fraktionen der Affinitätschromatographie eingesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen je Verdünnungsstufe durchgeführt. Jeder Inkubation folgte ein Waschschritt (3-fach) mit 300 μl PBS-T (0,1 %). Die aufgeführten Schritte wurden mit 100 μl je Vertiefung durchgeführt, die Stoppreaktion erfolgte durch Zugabe von 200 μl . Das Auslesen der optischen Dichten (ODs) erfolgte bei 490 nm im

Mikrotiterplatten-Lesegerät. Mit einer Ausnahme fanden alle Reaktionen bei Raumtemperatur statt.

Tab. 1 ELISA-Protokoll zur Antikörper Titerbestimmung

Komponente	Konzentration	Puffer	Inkubation
NPTII	0,5 ng×ml ⁻¹	Beschichtungspuffer	1 h oder ÜN, 4°C
BSA	0,5 % w/v	PBS	1 h
Antiserum	1:10 ² - 1:10 ⁵	Probenpuffer	1 h
Protein A-POD	1:3000	Probenpuffer	1 h
OPD, H ₂ O ₂	0,4 mg×ml ⁻¹ , 0,05 %	Detektionspuffer	10-30 min
H ₂ SO ₄	2 M	Stopplösung	

Beschichtungspuffer: 100 mM Na-Carbonat, pH 9,6; Probenpuffer: PBS-T-BSA, Detektionspuffer: 100 mM Citrat / 200 mM Na₂PO₄, pH 5,0

5.4.9 NPTII-ELISA

Nach Optimierung der adsorbierten Menge immobilisierter anti NPTII-Antikörper (aus Serum B isoliert) und biotinylierter Detektor-Antikörper (aus Serum C isoliert) wurde folgendes Protokoll zur Bestimmung des NPTII-Gehaltes von unbekanntenen Proben durch Vergleich anhand einer Standardkurve mit rekombinant erzeugter und durch UV-Spektroskopie quantifizierter NPTII eingesetzt. Standards und Proben wurden jeweils doppelt bestimmt.

Tab. 2 Protokoll zur Bestimmung von NPTII durch Sandwich-ELISA

Komponente	Konzentration	Puffer	Inkubation
anti NPTII-AK	2 µg×ml ⁻¹	Beschichtungspuffer	1 h oder ÜN, 4°C
BSA	0,5 % w/v	PBS	1 h
Proben/Standards	0 - 0,8 ng×ml ⁻¹	Probenpuffer	1 h
anti NPTII-AK-bio	2 µg×ml ⁻¹	Probenpuffer	1 h (2,5 h)
SAv-AP	1:3000	Probenpuffer	30 min
pNPP	1 mg×ml ⁻¹	Detektionspuffer	10-60 min
NaOH	0,75 N	Stopplösung	

Beschichtungspuffer: 100 mM Na-Carbonat, pH 9,6; Probenpuffer: PBS-T-BSA; Detektionspuffer: Beschichtungspuffer mit 3 mM MgCl₂; anti NPTII-AK-bio: biotinylierter anti NPTII-Antikörper aus Kaninchen; SAv-AP: Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat.

Jeder Inkubation folgte ein Waschschritt (3-fach) mit 300 µl PBS-T (0,1 %). Die aufgeführten Schritte wurden mit 100 µl je Vertiefung der Mikrotiterplatte durchgeführt; Ausnahme ist der Blockierschritt mit 300 µl Lösung. Die Probenextrakte sollten zur Vermeidung von Matrix-bedingten Messwertverfälschungen maximal 10 % der pipettierten Probenlösung betragen. Jedes Ergebnis wurde als Doppelbestimmung je Probe ermittelt. Eine längere Inkubationszeit mit biotinyliertem anti-NPTII-Antikörper kann zur Signalsteigerung bei geringen

NPTII-Konzentrationen dienen. Die Stoppreaktion (Zugabe von 100 μ l) kann entfallen, wenn direktes Auslesen der ODs bei 405 nm im Mikrotitelplatten-Leser erfolgte, da bei NaOH-Zugabe keine Farbänderung eintritt.

5.4.10 Protein Extraktion aus Tomatenfruchtfleisch

Tomatenfruchtfleisch (2 g) wurde mit dem Spatel aus aufgetauten Tomatenproben entnommen und in ein 50 ml Gefäß überführt. Nach Wägung wurde kalter Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl, 10 mM Na-Borat, pH 7,8, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 % Ascorbat, 0,05 % Tween 20) [113] zugegeben und auf Eis gelagert, bis der Aufschluss durch Turrax-Behandlung (20 s, 13500 $U\text{min}^{-1}$, Aufsatzradius 2 cm) abgeschlossen war. Zwischen mehrfachen Behandlungen wurde 1 min pausiert. Nach Zentrifugation (7000 g, 10 min) wurden die Probenüberstände direkt im ELISA und Bradford-Test vermessen.

5.5 Arbeitsmethoden DNA-Analytik

5.5.1 Sequenzdatenverarbeitung

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm „GAP“ des GCG-Paketes (Heidelberg Unix Sequences Resources Version 4.0, HUSAR, DKFZ Heidelberg), mit „ClustalX Multiple Sequence Alignment Program“ (Version 1.8, The National Center for Biotechnology Information, NCBI, kopierbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder mit dem BLAST-Algorithmus (NCBI, ebenda verfügbar) durchgeführt. Mit dem Programm „Primer3“ (<http://www-genome.wi.mit.edu>) wurden Primer und Sonden ausgewählt und Parameter für Selbsthybridisierung durch interne Komplementarität der Oligonukleotide ermittelt. Zur Planung von DNA-Konstrukten und zur Ermittlung erwarteter Restriktionsmuster wurde das Programm „Clone Manager 5.03“ (Scientific & Educational Software) verwendet. Strukturvorhersagen für einzelsträngige DNA wurde mit dem Programm „mfold“ durchgeführt (<http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/dna>), das eine Umsetzung des thermodynamischen Modells der „nächster Nachbarschaft“ (*nearest neighbour*) [103] darstellt.

5.5.2 PCR

PCR Ansätze enthielten, sofern nicht anders angegeben, 0,5 U Polymerase, je 200 μ M der dNTPs, je 0,4 μ M der Primer und die vom Hersteller empfohlene Menge Pufferkonzentrat. Die Endkonzentration an Magnesiumionen betrug in der Regel 1,5 mM. Das Reaktionsvolumen von 25 μ l wurde mit vollentsalztem Wasser aufgefüllt. Bei Verwendung von *hot-start*-Polymerasen (siehe Abschnitt 6.2.3) ist das Pipettieren der Reaktionsansätze bei Raumtemperatur möglich, bei nicht-*hot-start*-Polymerasen wurde auf Eis pipettiert. Die Reaktionen wurde in dünnwandigen 400 μ l Gefäßen in Thermoblöcke mit Deckelheizung durchgeführt. Als preiswerte DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde Biotherm *Taq* verwendet. Für kompetitive PCRs wurde die modifizierte *hot-start*-Polymerase AmpliTaq Gold verwendet. *Pfu*-Polymerasen aus *Pyrococcus furiosus* weisen eine höhere Kopiergenauigkeit als *Taq*-Polymerasen auf und wurden in der Regel zur Erzeugung von Amplikons verwendet, die kloniert werden sollten. Pfx ist der Handelsname für einen *Pfu*/Antikörper-Komplex, der bei

Temperaturerhöhung während der PCR zerfällt. Erst bei Temperaturen, bei denen Primer/Proben-DNA-Hybride, die zu unspezifischen Produkten führen könnten, wieder geschmolzen sind, steht aktive *Pfu*-Polymerase zu Verfügung. Ein Andau des 5'-Terminus, wie er bei Gebrauch von *Pfu* auftreten kann, wird durch Pfx so ebenfalls unterbunden.

PCR-Ansätze wurden räumlich getrennt von DNA-Extraktion und post-PCR Schritten in einem separaten Arbeitsbereich unter einer Sicherheitswerkbank mit einem ausschließlich hierfür bestimmten Pipettensatz und Einmalpipettenspitzen mit Filtereinsätzen pipettiert, um Kontaminationen zu vermeiden. Es wurden gesonderte Kittel getragen; Einweghandschuhe wurden regelmäßig gewechselt. Gefäße mit DNA-haltigen Lösungen wurden vor dem Öffnen zentrifugiert, um Aerosolbildung zu vermeiden.

5.5.3 Eingesetzte Oligonukleotide

Die CaMV35S-PCR mit der Primerkombination 35S3-bio/35S2 detektiert den CaMV35S-Promotor, die RR-PCR mit der Primerkombination 35S3-bio/petu-r1 detektiert den Roundup Ready spezifischen Übergang von dem CaMV35S-Promotors zum chloroplastidären Transitpeptid (Tab. 3). Die GM0304- und GM0104-PCR detektieren mit den Primerkombinationen GM03/GM04-bio und GM01/GM04-bio das Soja Lektin-Gen (Tab. 4). Weitere Informationen zur Bedeutung und Lage der Primer finden sich in Abschnitt 6.2.5 (Abb. 19). Die angewendeten PCR-Programme sind jeweils in der Legende des Experiments vermerkt.

Tab. 3 Oligonukleotide des CaMV35S- und RR-PCR Systems

Name*	Sequenz (5' → 3')
35S1 ^a	gct cct aca aat gcc atc a
35S2 ^a	gat agt ggg att gtg cgt ca
35S3-bio ^b	Bio-cta caa atg cca tca ttg cg
35SKkonst ^c	gat agt ggg att gtg cgt cat ccc tta ctt cga tgt tag caa gct cca gaa cgt ctt ctt ttt cca cg
petu-r1 ^d	tgt atc cct tga gcc atg ttg t
p35Sf2 ^d	tga tgt gat atc tcc act gac g
RR-T-Dig ^b	Dig-ttg ctt tga aga cgt ggt tg
RR-K-Dig ^c	Dig-ttc gat gtt agc aag ctc ca

* Bedeutung der Oligonukleotid-Suffixe: bio: 5'-Biotin Markierung, Dig: 5'-Digoxyigenin Markierung, Primer aus ^a[30], ^b[70], ^cdiese Arbeit, ^d[104].

Tab. 4 Oligonukleotide des Soja Lektin-Gen Systems

Name*	Sequenz (5' → 3')
GM01 ^a	tgc cga agc aac caa aca tga tcc t
GM02 ^a	tga tgg atc tga tag aat tga cgt t
GM03 ^a	gcc ctc tac tcc acc ccc atc c
GM04-bio ^a	Bio-gcc cat ctg caa gcc ttt ttg tg
GM-Z ^b	gcg atc gag tag tga gag tcg tc
GM01-Anker ^b	aga agt ttc aga tcc cgg gta atg tgg atg ggg gtg gag tag a
GM-Z-Anker ^b	acc cgg gat ctg aaa ctt ctc gct tcc ttc aac ttc acc ttc
GM-T-Dig ^b	Dig-tgg gac aaa gaa acc ggt ag
GM-K-Dig ^b	Dig-acc cgg gat ctg aaa ctt ct

* Bedeutung der Oligonukleotid-Suffixe: bio: 5'-Biotin Markierung, Dig: 5'-Digoxyigenin Markierung, Primer aus ^a[105], ^bdiese Arbeit.

Die Bedingungen für die Amplifikation eines 531 bp langen Fragmentes (Primer A1/A3-bio, Tab. 5) mit AmpliTaq Gold Polymerase aus dem t-RNA^{Leu}-Gen von Mais waren: Initiale Denaturierung 94°C / 10 min; 35 Zyklen 94°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min). Die Amplifikation von Abschnitten des Polygalakturonasogens aus Tomate mit den Primern PG34L und PG34R (Tab. 5) fand unter folgenden Bedingungen statt: Initiale Denaturierung 94°C / 10 min; 35 Zyklen 94°C / 30 s, 60°C / 60 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 6 min). Im Fall von Wildtyp-Tomaten DNA wurde ein 383 bp Fragment erhalten, im Falle der transgenen Zeneca Tomaten zusätzlich ein Fragment mit 180 bp.

Tab. 5 Sonstige Oligonukleotide

Name*	Sequenz (5' → 3')	Spezifität
A1 ^a	cga aat cgg tag acg cta cg	t-RNA ^{Leu} , Chloroplasten, Pflanzen
A3-bio ^b	Bio-ggg gat atg gcg aaa tcg	t-RNA ^{Leu} , Chloroplasten, Pflanzen
PG34L ^c	gga tcc tta gaa gca tct agt	Polygalakturonasogen, Tomate
PG34R ^c	cgt tgg tgc atc cct gca tgg	Polygalakturonasogen, Tomate

* Bedeutung der Oligonukleotid-Suffixe: bio: 5'-Biotin Markierung, Dig: 5'-Digoxyigenin Markierung, Primer aus ^a[106], ^b[107], ^c[108].

5.5.4 PCR-ELISA

Die Schritte des folgenden Protokolls (Tab. 6) wurden in 100 µl Volumen unter Schütteln durchgeführt (Eppendorf Thermomixer, 300 Uxmin⁻¹). Zwischen den Inkubationen wurde 3-fach mit 300 µl Probenpuffer gewaschen und die Mikrotiterplatte auf einem Tuch ausgeschlagen. Mit einer Ausnahme fanden alle Reaktionen bei Raumtemperatur statt. Probenpuffer und Blockpuffer wurden immer frisch angesetzt. Das Blockingreagenz des Hybridisie-

nungspuffers löste sich erst in der Wärme (70°C) zu einer opaleszierenden Flüssigkeit. Dieser Puffer wurde aliquotiert und unsteril bei -20°C gelagert. Das Abstoppen der Farbreaktion entfiel, wenn der Versuch direkt ausgelesen wurde. Die maximale OD_{405nm} lag bei 1,5.

Tab. 6 PCR-ELISA Protokoll

Komponente	Konzentration	Puffer	Inkubation
PCR-Produkt	10 - 35 $\mu\text{l}\times\text{ml}^{-1}$ ^a	Probenpuffer	30 min
NaOH	0,2 N	Denaturierungspuffer	5 min
Sonde	10 - 200 nM ^b	Hybridisierungspuffer	30 h, RT/37°C ^c
anti Dig F _{ab} -AP	1:1000	Blockpuffer	30 min
pNPP	1 mg $\times\text{ml}^{-1}$	Detektionspuffer	10-30 min
NaOH	0,75 N	Stopplösung	

^a GM0304 und GM0104-PCR 10 $\mu\text{l}\times\text{ml}^{-1}$; CaMV35S-PCR 20 $\mu\text{l}\times\text{ml}^{-1}$; RR-PCR 35 $\mu\text{l}\times\text{ml}^{-1}$;

^b RR-T-Dig, RR-K-Dig: 20 nM, GM-T-Dig: 200 nM, GM-K-Dig: 10 nM; ^c RR-Systeme: RT, GM-Systeme: 37°C; Probenpuffer: PBS-T; Hybridisierungspuffer: 5xSSC, 0,1 % Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS, 1 % Blockingreagenz; 5xSSC: 750 mM NaCl, 75 mM Natrium Citrat/HCl, pH 7,0; Blockpuffer: PBS-T- BSA; Detektionspuffer: 50 mM NaHCO₃, pH 9,6, 3 mM MgCl₂.

Zur Analyse der Produkte einer kompetitiven PCR wurden 5 bis 17,5 μl der Reaktionslösung in 500 μl Waschpuffer verdünnt und in Aliquots (100 μl) in vier Vertiefungen pipettiert. In je zwei Vertiefungen wurden mit der Target- oder der Kompetitor-Sonde hybridisiert, so dass jedes Signal doppelt bestimmt wurde. Die Auswertung der Serien kompetitiver PCRs sieht die Bildung eines Signal-Quotienten (Q_{Si}) aus T- und K-Signal vor. Beide werden zuvor um das Hintergrundsignal, den PBS-T als Probe mit der entsprechenden Sonde erzeugt korrigiert. Im Falle sehr hoher T-Amplikon Mengen, K-Amplikon liegt kaum vor, können sich das Signal der K-Sonde und der K-Hintergrundsignal gleichen, eine Quotientenbildung ist dann nicht möglich (Divisor gleich Null). Gleiches gilt auch für sehr hohe K-Amplikon Mengen. Die Abweichung des Quotienten vom Mittelwert wurde durch Fehlerfortpflanzung berechnet.

5.5.5 DNA-Elektrophorese

Die Elektrophoresen zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurden im Agarosegel oder Polyacrylamidgel (PAGE, *polyacrylamid gel electrophoresis*) in TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) als Laufpuffer durchgeführt. Gele mit Gehalten von 0,8 bis 2 % (w/v) Agarose sind zur Auftrennung großer Fragmente (20 kbp - 100 bp) geeignet. Die Auftrennung mehrerer kleiner Fragmente (30 - 500 bp) mit geringen Längendifferenzen gelingt mit PAGE (8-12 % Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch (C = 2,7 %), 0,2 % N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 0,08 % Ammoniumperoxodisulfat). Nach Inkubationen (5-10 min) in einem Färbegrad (0,5 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid) und in einem Wasserbad werden DNA-Banden im UV-Licht (Transiluminator) sichtbar. Photographien der Gele werden in dieser Arbeit farbinvertiert dargestellt.

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus dem Gel erfolgte durch Ausschneiden im UV-Licht und Einsatz eines Gelextraktionskits (Easypure, Genomed). Der DNA-Extraktionskit der Fa. Clontech eignete sich besonders für die Aufreinigung von Biotin- und Dig-markierten PCR-Produkten aus dem Gel, da die finale Lösung kaum Substanzen enthielt, die die UV-Quantifizierung der DNA störte. Zur Abschätzung nicht aufgereinigter Amplikon-Mengen wurden diese im Gel parallel mit bekannten Mengen eines gleich großen Fragmentes verglichen.

5.5.6 Optische Gelauswertung

Die quantitative Auswertung von Agarose- oder PAGE-Gelen wurde mit Hilfe des Programms Osiris 3.6 durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Visualisierungs-Software, entwickelt am Genfer Universitäts Hospital, die kostenfrei aus dem Internet bezogen werden kann (<http://www.expasy.ch/UIN>). Digitalen Bildern kann die Farbintensität und Lage jedes einzelnen Punktes entnommen werden. Datensätze der Werte entlang einer Linie in Elektro-phoreserichtung wurden in Auswertesoftware (Origin 6.0, Abschnitt 5.5.19) importiert (vgl. Abb. 7). Die Ethidiumbromid-Fluoreszenz unterliegt bei hohen DNA-Mengen pro Fläche einer Selbstlöschung (Quenchen). Es treten je nach Belichtungsdauer ebenfalls Intensitäts-Sättigungseffekte der CCD-Kamera auf. Target und Kompetitor, Produkte der kompetitiven PCRs, unterscheiden sich nur wenig in der Länge, daher weisen die korrespondierenden Banden nur geringfügig unterschiedliche Peak-Breiten und -Höhen auf. Bei der Auswertung von Serien kompetitiver PCRs wurde zur Signal-Quotientenbildung (Q_{Si}) immer die maximale Peakhöhe, korrigiert um den Mittelwert der Basislinie, herangezogen; war kein Peak detektierbar, wurde 1 als willkürlicher Wert (Divisor bei Quotientenbildung) der Farbintensität eingesetzt.

In Abb. 7 sind die Helligkeits-Intensitäten (linear zwischen 0 = Weiß und 256 = Schwarz) in Einheiten-freien Graustufen gegen die Laufweite in Bildpunkten (Pixel) für die Verdünnungsreihe eines PCR-Produktes (PAGE, Abb. 38B, S. 87) zur objektiven Bestimmung der Nachweisgrenze aufgetragen. Ein Signal wurde als signifikant gewertet, wenn es das Rauschen der Basislinie um das 3-fache der Standardabweichung des Basislinienmittelwertes überstieg. Dazu wurde die Schwankung der Basislinie im Laufweitenbereich von 100 bis 250 Pixeln verwendet, also an einer Stelle, an der kein Peak erwartet wurde.

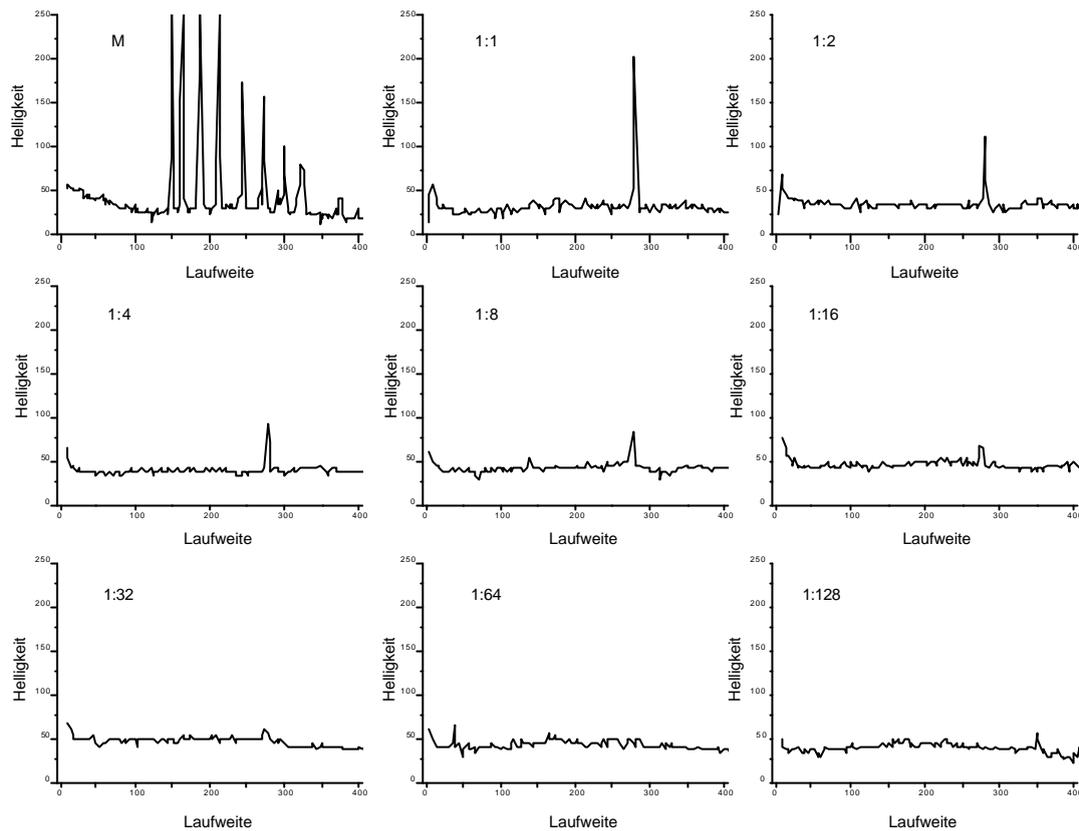


Abb. 7 Optische Auswertung eines PAGE-Gel Photos mit dem Programm Osiris

Die Helligkeit (Ordinate, dimensionslos) wurde in Abhängigkeit von der Laufstrecke (Abszisse, Angabe in Pixel) dem digitale PAGE-Bild (Abb. 38B) entnommen. M, DNA-Größenmarker (pUC19, MspI geschnitten). Die weiteren Paneele sind entsprechend der eingesetzten Verdünnung eines Target Amplikons der CaMV35S-PCR gekennzeichnet.

5.5.7 ALFexpress DNA Analysesystem

Das in dieser Arbeit genutzte ALFexpress DNA Analysesystem (*allelic fragment*, Pharmacia Biotech) wurde mit einem denaturierenden 10 % Polyacrylamidgel (12 M Harnstoff, C = 2,6 %) betrieben. Das Gel (0,5 mm dick, circa 20 cm breit) enthielt 40 Taschen, die zur vertikalen Elektrophorese bei 50 °C beschickt wurden. Aliquots (1 µl) der PCRs mit Cy5-markiertem Primer 35S2-Cy5 wurden mit Probenpuffer (Formamid, 0,5 % Dextranblau) auf 5 µl aufgefüllt, hitzedenaturiert (100°C, 2 min) und bis zur Aufgabe auf Eis gelagert. Nach circa 20 cm Laufstrecke durchdrang ein Helium-Neon Laser (633 nm) das Gel und regte über dessen gesamte Breite die Fluoreszenz der an den DNA-Einzelsträngen befindlichen Cy5-Farbstoffmoleküle an. Die Emission wurde in jeder Spur von separaten Photodioden registriert. Die an einen Steuerungsrechner weitergeleiteten Daten wurden mit dem Programm „Allelink“ (Pharmacia) ausgewertet. In den erhaltenen Chromatogrammen der Cy5-Fluoreszenz wurden automatisch Peaks detektiert und die darunterliegenden Flächen integriert. Diese Signalintegrale sind proportional zur Stoffmenge und, anders als bei der Interkalation mit Ethidiumbromid, unabhängig von der Größe der PCR-Produkte. Die Rohdaten wurden in Abbildungen automatisch auf die höchste Emission normiert. Signal-Quotienten (Q_{Si}) wurden

aus den Integralen von T- und K-Amplikon einer Serie kompetitiver PCRs gebildet. Beim Einstellen von Geräteparametern wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

5.5.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte die durch den Einsatz von *Taq*-Polymerase entstanden sind, tragen 3'-Adenosin-Überhänge. Der kommerziell erhältliche pGEM T-Easy Vektor ist linearisiert und mit 3'-Thymidin-Überhängen versehen, so dass bei 4 - 16 °C Vektor und PCR-Produkt als Insert bevorzugt unter A/T Paarung hybridisieren. Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt.

PCR-Produkte mit glatten Termini (*blunt end*), die durch den Einsatz der *Pfu*-Polymerase entstanden sind, wurden in den linearisiert vorliegenden pCR-Skript Vektor (*blunt end*) ligiert. Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers (Stratagene) in Anwesenheit der Restriktionsendonuklease *SrfI* bei Raumtemperatur (1 h) durchgeführt. In einem religierten Vektor ohne Insert wird die *SrfI*-Erkennungsequenz (GCCC | GGGC) wieder hergestellt und er wird erneut gespalten. Ist ein Insert in den Vektor ligiert worden, bleibt das erwünschte Produkt erhalten, sofern es nicht zufällig die *SrfI*-Erkennungsequenz komplettiert. Durch dieses Vorgehen wird die Effizienz einer *blunt end*-Ligation drastisch gesteigert.

Die Ligation von Fragmenten (Vektor und Insert), die aus Restriktionen von Plasmiden stammen, wurde mit T4 DNA Ligase bei 4 - 16 °C im mitgelieferten Puffer der Hersteller durchgeführt. Die Ligation von Termini mit Überhängen (*sticky end*) erfolgte in der Regel mit T4-Ligase der Fa. Boehringer (1 U pro Ansatz). Bei Ligation von glatten Enden (*blunt end*) oder bei ausbleibendem Erfolg wurde alternativ eine hoch konzentrierte Ligase der Fa. New England Biolabs (400 U pro Ansatz) verwendet.

Die Vektorpräparation bei *blunt end*-Ligationen erfolgte in der Regel durch Restriktion des Plasmids und Dephosphorylierung durch alkalischer Phosphatase aus Shrimp (37°C, 10-60 min). Puffer und Enzym wurden zum Restriktionsansatz pipettiert und das benötigte Fragment anschließend durch präparative Agarosegelelektrophorese und Gelelution gewonnen.

Die Abtrennung der Ligasen und anderer Proteine aus DNA-haltigen Reaktionsansätzen wurde durch sequenzielle Extraktion der Lösung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (25:24) bewerkstelligt. Die DNA wurde durch Salz/Ethanol-Zugabe (1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, 2,5-faches Volumen Ethanol, -70°C, ≥1 h) aus der wässrigen Phase gefällt.

5.5.9 Herstellung kompetenter Bakterien, RbCl-Methode

Mit einer Einzelkolonie einer Stammkultur auf LB-Agar (LB-Medium mit 1,5 % Agar) wurde eine Übernacht-Vorkultur in flüssigem LB-Medium (5 g/l NaCl, 10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, pH 7,5) angeimpft. Im Falle von XL10 gold *E. coli* wurde dem Medium Kanamycin (30 µg×ml⁻¹) zugesetzt. Ein Episom dieses Stammes trägt das TN10-Transposon, das eine entsprechende Resistenz verleiht und eine Selektion durch das Antibiotikum ermöglicht. Ein Prozent der Vorkultur wurden zu LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ gegeben. Nach Wachstum

bis $OD_{600nm} = 0,4$ bis $0,6$ wurden die Zellen pelletiert (4500 g, 4°C, 5 min) und in 40 % des Ursprungs-Volumens von eisgekühltem TFB1 (10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM $RbCl$, 15 % Glycerol, 30 mM K-Acetat, pH 5,8, eingestellt mit 1 M Essigsäure) resuspendiert. Nach Inkubation (4°C, 5 min) wurde erneut zentrifugiert (4500 g, 4°C, 5 min) und in eisgekühltem TFB2 (4 % des Ursprungs-Volumens, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl$, 15 % Glycerol, pH 6,5, 10 mM MOPS, 3-Morpholino-1-propansulfonsäure, eingestellt mit 1 M KOH) resuspendiert. Nach abschließender Inkubation (15 bis 60 min) auf Eis wurden Aliquots à 200 μ l in 1,5 ml Gefäßen in einem Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

5.5.10 Transformation und Stammhaltung der Bakterien

Ein Aliquot auf Eis aufgetauter, kompetenter Zellen wurde mit 0,5 - 3 μ l eines Ligationsansatzes oder 0,01 bis 1 ng Plasmid DNA gemischt, 30 min auf Eis und 45 s bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert. Nach 2 min Lagerung auf Eis wurde 500 μ l LB Medium zugegeben und der Transformationsansatz unter Schütteln bei 37°C ohne Selektionsdruck für 1 h inkubiert. Anschließend wurden je 50 und 300 μ l auf Ampicillin- ($50 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) oder Chloramphenicol- ($25 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) haltigen Agarplatten mit X-Gal (0,002 %) und IPTG (40 μ M) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ligationsansätze, die auf Grund geringer DNA-Mengen oder Anwesenheit von störenden Proteinen nicht zu transformierten Bakterien-Klonen führten, wurden mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (siehe Abschnitt 5.5.8) und durch Ethanol-Fällung konzentriert. Das Gefäß mit dem entstandenen Pellet wurde direkt durch Zugabe von kompetenten Bakterien zur Transformation genutzt.

Bakterien aus Einzelkolonien eines Transformationsansatzes nach Ausstrich wurden nach Überimpfen unter Selektionsdruck in 10 ml LB-Medium über Nacht angezogen und unter Zugabe von 30 % Glycerin in Aliquots bei -70°C gelagert.

5.5.11 Plasmid DNA-Isolierung

Plasmid-DNA wurde aus Übernachtskulturen der Bakterien unter Selektionsdruck durch Aufarbeiten von 1,5 bis 3 ml Kultur mit dem „GFX Micro Plasmid Prep Kit“ der Firma Pharmacia gewonnen. Die Lagerung von Plasmiden erfolgte in Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5) bei -20°C oder -70°C.

5.5.12 Restriktionsspaltung der DNA

Die selektive Spaltung von DNA mit Endonukleasen der Firmen New England Biolabs und Boehringer erfolgte nach Herstellerangaben. Bei Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen wurde ein kompatibler Puffer verwendet oder sequenziell, nach Dialyse auf einem Filterblatt (Millipore), restringiert.

5.5.13 Sequenzierung der DNA

Zur Sequenzanalyse der ϕ Plasmid-DNA wurde der Big Dye Sequencing Kit (Perkin Elmer) verwendet. Plasmid DNA (500 ng), Sequenzierprimer (7,5 pmol) und Komponenten-Mix des Kit (4 μ l) wurden in einer 20 μ l Reaktion bei folgendem Temperaturprofil eingesetzt: 25 Zyklen, Denaturierung, 94°C/30 s; Hybridisierung, 43-50°C / 15 s; Elongation 60°C / 4 min. Dabei

wurden mit vier verschiedenen Fluorophor-markierten Abbruchnukleotiden ssDNA-Fragmente erzeugt, die sich durch Kapillarelektrophorese (ABI Prism 310, Arbeitskreis Prof. Brinckmann, Gerichtsmedizin Münster) trennen ließen. Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden markierte Abbruchnukleotide durch Gelfiltration (0,7 ml Kartuschen) entfernt, der Reaktionsansatz lyophilisiert und in Formamid aufgenommen. Es wurden Sequenzinformationen, beginnend 30 nt stromaufwärts des Primers, bis zu 450 nt gewonnen. Bei Sequenzierung der DNA mit inversen oder repetitiven Elementen, wie sie beim Klonieren der Doppelkompetitoren und Normierungsplasmiden vorkommt, bricht die Sequenzierung bei Erreichen des Elementes ab. Meistens handelt es sich um Teile der *multicloning site* zweier ähnlicher Plasmide. In diesen Fällen wurden lediglich die Ausgangsplasmide sequenziert und die Produktplasmide durch Restriktion analysiert.

5.5.14 Herstellung spezieller Plasmide durch PCR und Mutagenese

Zur Klonierung des Plasmids pGEM 35ST wurde DNA nach der CTAB I Methode (Abschnitt 5.5.16) aus ganzen, gequollenen RR-Bohnen isoliert und verdünnt in einer PCR (25 µl, 1 U Biotherm *Taq*) mit dem Primerpaar 35S1 und 35S2 eingesetzt. Das 195 bp große Amplikon wurde unter den folgenden Bedingungen erhalten: Initiale Denaturierung 95°C / 3 min; 35 Zyklen 95°C / 30 s, 54°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 3 min.

Die PCR-Mutagenese (*looped oligo*-PCR, Abb. 21, Seite 67), die zum Kompetitorplasmid pCR 35SK führte, wurde mit 2 ng des Plasmids pGEM 35ST als Matrize in einer PCR (50 µl, *Pfu*-Polymerase) mit dem 68 nt langen Konstruktionsprimer Konst35SK und dem Primer 35S1 unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung 95°C / 2 min; 33 Zyklen 95°C / 30 s, 53°C / 60 s, 72°C / 90 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Der Einsatz der *Pfu*-Polymerase barg die Gefahr, dass die eingesetzten Primer vom 5'-Terminus ausgehend angedaut werden konnten. In der Tat fand sich bei der Sequenzierung des klonierten Kompetitors daher neben Plasmiden mit dem korrekten Insert auch ein Plasmid mit einem Insert, dem zwei terminale Basenpaare fehlten.

Bei der Konstruktion des RR-Kompetitors mittels *overlap*-PCR (Abb. 22, Seite 69) wurden separat zwei Amplikons, A und B, in PCRs (50 µl) mit der *hot start*-Polymerase Pfx erzeugt. Amplikon A (168 bp) entstand mit den Primern 35S1 und 35S2 sowie dem Plasmid pCR 35SK (0,5 ng) als Matrize. Amplikon B (171 bp) entstand mit den Primern p35S-f2 und petu-r1 und Einsatz von 125 ng DNA aus RR, isoliert nach CTAB II Protokoll (Abschnitt 5.5.16), als Matrize. Folgendes PCR-Programm kam zur Anwendung: Initiale Denaturierung 94°C / 2 min; 28 Zyklen 94°C / 15 s, 53°C / 30 s, 68°C / 40 s; finale Elongation 68°C / 5 min. Für die *overlap*-PCR wurden gleiche Teile Amplikon A (Gel-gereinigt) und B (ungereinigtes PCR-Produkt) gemischt und mit Pfx-Polymerase ohne Zugabe von Primern in einem 25 µl Ansatz dem folgenden PCR-Programm unterzogen: Initiale Denaturierung 94°C / 2 min; 10 Zyklen 94°C / 15 s, 65°C / 30 s, 68°C / 40 s; keine finale Elongation. Um ein klonierbares, doppelsträngiges DNA-Fragment zu erhalten, wurde anschließend eine *border*-PCR mit den Außenprimern 35S1 und petu-r1 durchgeführt. Zum vorliegenden *overlap*-PCR-Ansatz wurden dazu, bei nun verdoppeltem Volumen, die Primer 35S1/petu-r1 sowie zusätzlicher Puffer und dNTPs zugefügt und folgendes PCR-Programm angewendet: ohne initiale

Denaturierung; 25 Zyklen 94°C / 15 s, 53°C / 30 s, 68°C / 40 s; finale Elongation 68°C / 5 min.

Ein Target-Amplikon zur Klonierung von Teilen des Soja Lektin-Gens wurde aus Soja DNA (350 ng, nach der Wizard II Methode gewonnen, Abschnitt 5.5.16) in einer PCR (50 µl) mit den Primern GM01, GM-Z und *Pfu*-Polymerase unter den folgenden Bedingungen gewonnen: Initiale Denaturierung 95°C / 2 min; 33 Zyklen 95°C / 30 s, 66°C / 60 s, 72°C / 150 s; finale Elongation 72°C / 7 min. Das entstandene Amplikon (783 bp) wurde aus einem präparativen Agarosegel isoliert, aufgereinigt, in den pCR Skript(Amp) Vektor ligiert und *E. coli* XL10 gold Zellen mit der entstandenen, zirkulären DNA (Plasmid pCR GMT) transformiert. Für die Mutagenese zum Kompetitorplasmid pCR GMK (Abb. 23, Seite 70) wurde in einer PCR (50 µl) mit *Pfu*-Polymerase und den Primern GM01/GM01-Anker sowie dem Plasmid pCR GMT (0,1 ng) als Matrize das 163 bp großes Amplikon A erzeugt. Unter Verwendung der Primer GM-Z und GM-Z-Anker entstand unter gleichen Bedingungen ein 625 bp großes Amplikon B. Folgendes PCR-Programm kam zur Anwendung: Initiale Denaturierung 95°C / 2 min; 28 Zyklen 94°C / 30 s, 65°C / 60 s, 72°C / 150 s; finale Elongation 72°C / 7 min. Nach Isolierung beider Fragmente aus einem präparativen Agarosegel wurden sie im gleichem Verhältnis zur *overlap*-PCR mit *Pfu*-Polymerase in einem 25 µl Ansatz bei folgendem PCR-Programm eingesetzt: Initiale Denaturierung 95°C / 2 min; 10 Zyklen 95°C / 30 s, 66°C / 30 s, 72°C / 90 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Um eine ausreichende Menge doppelsträngiger DNA für eine Ligation zu erhalten, wurde eine *border*-PCR mit den Außenprimern GM01 und GM-Z durchgeführt. Zum *overlap*-PCR-Ansatz wurden dazu, unter Verdopplung des Volumens, Primer zugefügt, frischer Puffer und dNTPs ergänzt und folgendes PCR-Programm angewendet: keine initiale Denaturierung; 25 Zyklen 95°C / 30 s, 66°C / 30 s, 72°C / 150 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Das gewünschte Amplikon wurde im Agarosegel elektrophoretisch gereinigt, eluiert und in den pCR Skript(Cam)-Vektor ligiert.

Unter folgenden Bedingungen wurden mit RR-DNA (200 ng, nach der CTAB II Methode gewonnen) in einer PCR (50 µl) mit den Primern 35S1, 35S2 und *Pfu*-Polymerase unspezifische Produkte erzeugt: Initiale Denaturierung 95°C / 2 min; 33 Zyklen 95°C / 30 s, 53°C / 60 s, 72°C / 90 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Die Ausführung der PCR ohne *hot-start* und mit einer großen Menge DNA, führte zu einer Vielfalt von Nebenprodukten und dem nur schwach ausgeprägten Hauptprodukt (195 bp). Nach Analyse durch PAGE (10 %, nicht gezeigt) war eine Leiter von feinen Banden sichtbar, in der analytischen Agarosegel-Elektrophorese ein Schmier im Bereich von 150-600 bp. Die Produkte dienen zur Klonierung des heterologen Kompetitors pCR 35SArte (Abschnitt 6.2.5.5, Seite 71).

5.5.15 Herstellung der Plasmid Verdünnungsreihen

Von der Stammkultur eines Klones wurde ein Vereinzelausstrich auf Antibiotikumhaltigen LB-Agarplatten durchgeführt, die Bakterien von Einzelkolonien in 10 ml LB-Flüssigmedium unter Selektionsdruck in Übernachtskultur vermehrt und Plasmid-DNA isoliert. Die Herstellung von Plasmid Verdünnungsreihen erfolgte unter der gleichen Prävention zur Verhinderung von Kontaminationen wie die PCR oder DNA-Isolierung. Unter paralleler

Behandlung mit einem Mastermix (Restriktionsenzym, Puffer) wurden eine Blindprobe (Puffer der Plasmidisolierung) und das entsprechende Kompetitorplasmid restringiert und mit UV-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) auf 200 µl aufgefüllt. Die Blindprobe enthält das Restriktionsenzym, diese Protein-haltige Lösung diente in der folgenden UV-spektroskopischen Untersuchungen als Hintergrundwert. Der Quotient $OD_{260/280}$ der DNA wurde kontrolliert und sollte 1,8 bis 1,9 betragen. Die Ausgangskonzentration der restringierten Plasmide, ermittelt durch $OD_{260} = 1$ für $50 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ DNA und der mit dem Programm Clone Manager berechneten Plasmidgröße, liegt üblicherweise in der Größenordnung von 10^{10} Plasmid-Kopien/µl und wurde auf 10^6 Kopien/µl (Stammlösung) verdünnt (Verdünnungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 10 ng/µl *Hind* III geschnittene Lambda Phagen-DNA [109, 110]). Aus der Stammlösung wurden durch sequenzielle 1:10 Verdünnungen Arbeitslösungen hergestellt. Die Blindprobe, der UV-Puffer und der Verdünnungspuffer wurden durch PCR mit den betreffenden Primern auf Kontamination mit Matrizen DNA untersucht. Alternativ wurde preiswertere Heringsperma-DNA (25 ng/µl, geschert) statt geschnittener Lambda-DNA als Träger-DNA eingesetzt.

5.5.16 DNA-Extraktion aus Lebensmitteln

Alle Extraktionsschritte wurden räumlich getrennt von post-PCR Schritten wie Klonierungen, PCR-ELISA und Agarosegelelektrophorese in einem separaten Arbeitsbereichen durchgeführt, um die Kontamination mit Amplikons aus vorherigen Versuchen zu vermeiden. Bei der Extraktion der DNA aus Probenmaterial wurden gesonderte Kittel getragen; Einweghandschuhe wurden regelmäßig gewechselt, um eine Kontamination der Proben untereinander zu vermeiden. Gefäße mit DNA-haltigen Lösungen wurden vor dem Öffnen zentrifugiert, gegebenenfalls wurde das Versprühen von Aerosol durch Verwendung kleiner Zellstofflappen unterbunden. Ein eigens für Extraktionen bestimmter Pipettensatz wurden zusammen mit Einmalpipettenspitzen mit Filtereinsätzen verwendet. Lösungen, insbesondere Elutions- und Verdünnungspuffer für extrahierte DNA, wurden durch entsprechende PCRs auf Kontamination geprüft.

CTAB I: Die beschriebene Methode zur DNA-Isolierung basiert auf einer Vorschrift der offiziellen Methoden nach §35 LMBG [111]. Eine Menge von 100 mg Pflanzenmaterial (Mais- oder Soja-Mehl, gequollene Sojabohnen) wurde mit einem sterilen Pistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerkleinert, mit 500 µl Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Extraktionspuffer (2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) versetzt und mindestens 30 min bei 65°C inkubiert. Vom Überstand nach Zentrifugation (12000 g, RT, 10 min) wurden 250 µl in neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 für 30 s durch Inversion gemischt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (12000 g, RT, 10 min) wurden 150 µl der oberen, wässrigen Phase in einem weiteren Gefäß mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Bei Raumtemperatur erfolgte die Fällung von DNA für mindestens 30 min. Das Pellet nach Zentrifugation (12000 g, RT, 10 min) wurde mit eiskaltem, 70 % Ethanol gewaschen und im Exsikkator im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die DNA von 100 mg Probe wurde üblicherweise in 100 µl Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) aufgenommen und 1:10 verdünnt in der PCR eingesetzt.

CTAB II: Aufbauend auf die CTAB I Methode wurde mit dem gleichen CTAB-Extraktionspuffer (600 µl pro 100 mg), jedoch zusätzlich mit Proteinase K (20 µl) sowie RNase A (20 µl), der Probenaufschluss für mindestens 2 h bei 60°C unter Schütteln durchgeführt. Lyophilisierte Proteinase K wurde in PBS gelöst (20 mg×ml⁻¹) oder als kommerziell erhältliche Lösung (Fa. E. Merck) mit definierter Proteaseaktivität (>600 mU×ml⁻¹, nach Anson) eingesetzt. RNase A Lösung (20 mg×ml⁻¹ in PBS) wurde aus lyophilisiertem Protein hergestellt, potenziell enthaltene DNAsen wurden durch 20 min Kochen deaktiviert. Der Überstand des Probenaufschlusses (300 µl) nach Zentrifugation (12000 g, RT, 10 min) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 extrahiert. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (12000 g, RT, 10 min) wurden 250 µl der oberen, wässrigen Phase in einem weiteren Gefäß mit dem doppelten Volumen CTAB-Präzipitationspuffer (0,5 % w/v CTAB, 40 mM NaCl, pH-Wert nicht eingestellt) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, RT, 10 min) wurde der DNA-Niederschlag in NaCl-Lösung (350 µl, 1,2 M) aufgenommen, mit 3 µl RNase A versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol (350 µl) extrahiert. Die DNA aus der wässrigen Phase wurde nach Überführen (300 µl) in ein weiteres Gefäß mit Isopropanol (Zugabe 0,8-faches Volumen, ≥ 30 min, RT) gefällt. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 % Ethanol (500 µl) gewaschen, getrocknet und bei 60 °C in 100 µl Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 min) aufgenommen. Nach ausgiebiger Zentrifugation wurden, ohne Sediment aufzuwirbeln, maximal 90 µl Lösung entnommen und verwendet. Die erhaltenen Lösungen wurden mindestens 1:10 verdünnt oder in definierten Konzentrationen nach UV-spektroskopischer Quantifizierung zur PCR eingesetzt.

InVitek I: Die Zusammensetzung der im kommerziellen Extraktions-Kit für Pflanzenmaterial (Invisorb Spin Plant Kit) enthaltenen Puffer ist nicht bekannt. Ein gezielter RNA-Verdau ist nicht vorgesehen, da der Hersteller schon durch optimierte Bedingungen eine RNA-Bindung an das verwendete Säulenmaterial vermeiden wollte. Die Extraktionen von 60 mg Sojamehl wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Aufschluss der Probe (65°C, Schütteln, 30 min) unter Verwendung von Proteinase K und einer Zentrifugation wurden durch Zugabe von Bindepuffer zum Überstand die Bindebedingungen eingestellt. Diese Lösung wurde auf eine Zentrifugations-Säule mit DNA-bindender Matrix gegeben, 1 min inkubiert und schließlich 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde 2-fach mit Ethanol-haltigem Puffer gewaschen, getrocknet und die gebundene DNA durch Aufgabe von 100 µl des vorgewärmten (65°C), mitgelieferten Elutionspuffers (pH 8-9) eluiert.

InVitek II: Die Durchführung erfolgte wie bei der Extraktion InVitek I, jedoch wurde im Anschluss an die reguläre Inkubation zum Probenaufschluss ein 5 min RNA-Verdau (Zugabe von 10 µl, 10 mg×ml⁻¹) angefügt. Während dieser Inkubation kühlte die Probe von 65°C auf Raumtemperatur ab.

Wizard I: Homogenisiertes Probenmaterial (100-300 mg) wurden in einem Reaktionsgefäß mit 860 µl Wizard-Extraktionspuffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 % SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA), 100 µl Guanidin-Hydrochloridlösung (5 M) und 40 µl Proteinase K (20 mg×ml⁻¹) für mindestens 3 h bei 60°C unter Schütteln inkubiert. Je nach Quellverhalten der Probe, insbesondere bei Mehlen, war der Einsatz kleinerer Mengen (50-80 mg) sinnvoll, um einen

ausreichenden Überstand bei der nachfolgenden Zentrifugation (15000 g, 10 min) zu erhalten. Zum Überstand des Aufschlusses (500 µl) wurde in einem weiteren Gefäß 1 ml des DNA-bindenden Harzes (*Wizard-resin*, Promega) gegeben, gemischt und 1 min inkubiert. Das mit DNA beladene Harz wurde mit Hilfe einer Spritze mit einer Einweg-Kartusche filtriert, dort mit 2 ml 80 % Isopropanol gewaschen und anschließend durch Zentrifugation (15000 g, 2 min) und Inkubation bei Raumtemperatur (5 min) getrocknet. Die Elution erfolgte mit Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) oder Wasser durch Pipettieren von vorgewärmter 50 µl Elutionsflüssigkeit (70°C) in die Kammer der Kartusche. Nach 1 min Inkubation und Zentrifugation (15000 g, 1 min) wurde der Elutionsschritt wiederholt, so dass 100 µl Eluat erhalten wurden. Die erhaltenen Lösungen wurden mindestens 1:10 verdünnt zur PCR eingesetzt.

Wizard II: Die Durchführung erfolgte wie bei der Extraktion Wizard I, jedoch wurde im Anschluss an die reguläre Inkubation zum Probenaufschluss ein 5 min RNA-Verdau (Zugabe von 10 µl, 10 mg×ml⁻¹) angefügt. Während dieser Inkubation kühlte die Probe von 65°C auf Raumtemperatur ab.

Wizard III: Die Durchführung erfolgte wie bei Extraktion Wizard II, jedoch wurden zwei Proteinextraktionsschritte eingeführt. Im Anschluss an die Inkubation zum Probenaufschluss wurde der Überstand (500 µl) mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 extrahiert und bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Der überführte wässrige Überstand (450 µl) wurde einem 5 min RNA-Verdau (RNAse A, 10 µl, 10 mg×ml⁻¹) unterzogen, bevor ein zweites Mal mit Chloroform/Isoamylalkohol (450 µl) extrahiert wurde. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot (400 µl) der wässrigen Phase mit dem DNA bindendem Harz (1 ml) gemischt und analog den vorherigen Wizard-Methoden aufgearbeitet.

5.5.17 Quantifizierung der Gesamt-DNA in Lebensmittel-Extrakten

UV-Spektroskopie: Von DNA-Präparationen wurde unter Verwendung von Quarzküvetten das UV-Spektrum von 220 bis 330 nm aufgezeichnet. Als Referenz diente der Elutionspuffer, geeignete Verdünnungen zeigten Absorptionen von 0,01 bis 1,5 bei 260 nm. Nach Korrektur um die Streulicht-Absorption (320 nm) wurde $\epsilon_{260} = 0,02 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ zur Berechnung der Konzentration reiner DNA herangezogen.

Fluorimetrische dsDNA Quantifizierung: Der Farbstoff PicoGreen bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung bei 502 nm mit maximaler Emission bei 523 nm. Im PicoGreen-Assay wurde, an das verwendete Gerät angepasst, bei 480 nm angeregt und die Emission bei 520 nm registriert (Spaltbreite je 3 nm, Messintervall 2 s/ Vertiefung). Es wurde ein PC-gesteuertes Fluorimeter mit Mikrotiterplatten Adapter verwendet. Mit Assaypuffer (2 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) verdünnte Proben wurden mit dem gleichen Volumen (100 µl) der Farbstofflösung (1:200 der kommerziell erhältlichen Stammlösung, im Assaypuffer) in einer weißen Fluoreszenz-Mikrotiterplatte versetzt, 2-3 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und ausgelesen. Zur Kalibration (Abb. 8) wurde UV-quantifizierte, proteinfreie dsDNA aus Wildtyp-Sojabohnen-Mehl (Wizard III) in kontinuierlichen (1:2)-Verdünnungen eingesetzt (Konzentrationsbereich von 3 - 300 ng×ml⁻¹ dsDNA). Alle Messwerte wurden doppelt, die Hintergrundfluoreszenz mindestens 3-fach bestimmt. Die

Nachweisgrenze berechnet sich aus der 3-fachen Standardabweichung des Hintergrundfluoreszenz und der Steigung der Ausgleichsgerade.

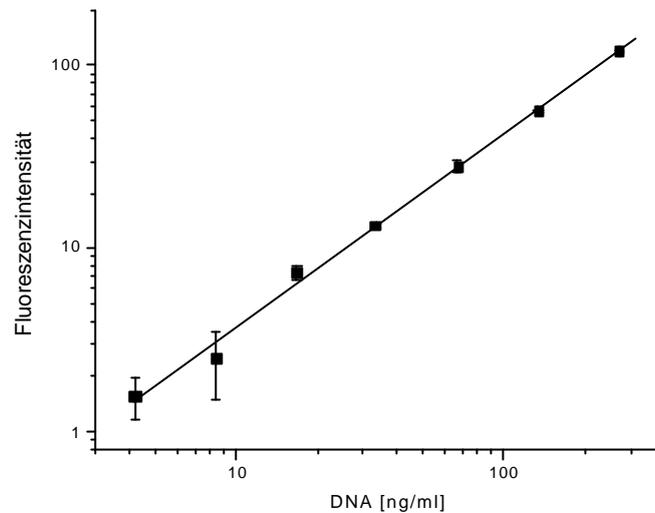


Abb. 8 DNA-Quantifizierung durch PicoGreen Assay

Die Fluoreszenzintensität (dimensionslos) ist frei skalierbar, Nachweisgrenze = $3,2 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ (Hintergrundfluoreszenz + $3 \times \text{SD}$), ($R = 0,9996$, Doppelbestimmungen, 8 Standards)

Speziell für Soja-DNA kann die Bestimmung von Pflanzenart-spezifischer DNA durch quantitative, kompetitive PCR mit Kalibration durch bekannte Mengen UV- oder fluorometrisch bestimmter DNA erfolgen (Abschnitt 6.2.8.3).

5.5.18 Realzeit-PCR mit SYBR-Green

Realzeit-PCR wurde mit dem GeneAmp[®] 5700 *Sequence detection system* und dem SYBR-Green Kit der Firma Perkin Elmer Biosystems durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 μl . Zur Bedienung des Gerätes wurde den Angaben im Handbuch gefolgt. Die erhaltenen Daten wurden zur Bearbeitung in das Programm Origin 6.0 (Abschnitt 5.5.19) importiert.

5.5.19 Daten Auswertung

Alle Daten wurden mit Hilfe der Software Microcal Origin 6.0 (Microcal Software) dargestellt. Es diente ebenfalls zur Berechnung von abgeleiteten Größen und zum Anpassen von Ausgleichsgeraden, sowie zur Ermittlung statistischer Parameter. Zur Prüfung, ob sich zwei fehlerbehaftete Werte gleichen, wurde der Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\leq 5 \%$ angewandt (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$). Alle Ergebnisse, die mit $N=2$ Messungen pro Standard oder Probe ermittelt wurden, sind als Mittelwert \pm Abweichung vom Mittelwert angegeben. Alle Ergebnisse mit $N \geq 3$ Messungen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Der Variationskoeffizient einer Messung bezeichnet die prozentuale Standardabweichung einer Messung bezogen auf ihren Mittelwert.

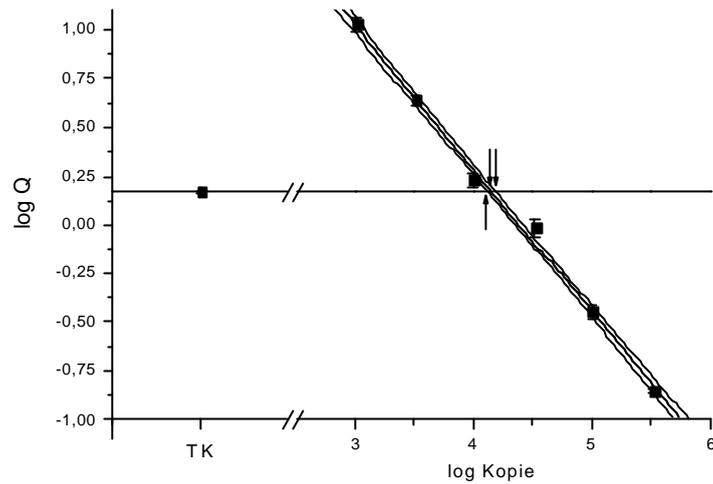


Abb. 9 Ergebnis und Fehlerbestimmung einer Regression mit Konfidenzintervall

Der Datensatz entspricht der PCR-ELISA-Auswertung der kompetitiven PCR mit Primern GM01/GM04bio gemäß Abb. 59. TK, Messwert eines Normierungsversuches, der die Lage der Ablesegeraden bestimmt. Die Regressionsgerade ist von Kurven, die den oberen und unteren Konfidenzintervall begrenzen, umschlossen. An den Schnittpunkten mit der Ablesegerade, durch Pfeile gekennzeichnet, wird das Ergebnis und der minimale und maximale Wert abgelesen.

Die Ermittlung des Ergebnisses und des Fehlers der verwendeten Regressionsgerade bei doppelt logarithmischer Darstellung von Signal-Quotienten (Q_{Si} , Target- / Kompetitor-Signal, für PCR-ELISA bzw. Gel-Auswertung) der kompetitiven PCR ist in Abb. 9 dargestellt. Ein Konfidenzintervall (68 %) wurde mit Origin 6.0 ermittelt und die Schnittstelle der Ablesegerade (Signal-Quotient eines Normierungsplasmids) mit der betreffenden Hüllkurve um die Regressionsgerade in einer vergrößerten Darstellung graphisch bestimmt.

6 Ergebnisse

6.1 Immun-Analytik

6.1.1 Erzeugung von Antikörpern gegen NPTII

Zur Antikörpererzeugung benötigte NPTII wurde rekombinant durch Überexpression in *E. coli* Zellen und Renaturierung der anfallenden Einschlusskörper erzeugt [70]. Das Protein wies nach Analyse durch SDS-PAGE eine Reinheit von mindestens 98 % auf. Es wurde in einem flüchtigen Puffer (Ammoniumcarbonat, 50 mM, pH 9,6) lyophilisiert. Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte durch subkutane Injektionen von je 500 µg NPTII mit Adjuvantien und 4 *Booster*-Injektionen. Nach Schlachtung standen insgesamt 160 ml Antiseren aus 3 Kaninchen (A, B, C) zu Verfügung.

Eine Bestimmung des jeweiligen Titers wurde im Mikrotiterplattenformat durchgeführt (Abb. 10). Das Serum mit der höchsten Konzentration, Serum C, erreichte diesen Wert bei einer 1:28000 Verdünnung, die Seren A (1:21000) und B (1:13000) schon bei geringeren Verdünnungen. Bei den weiteren Versuchen wurde Serum C eingesetzt.

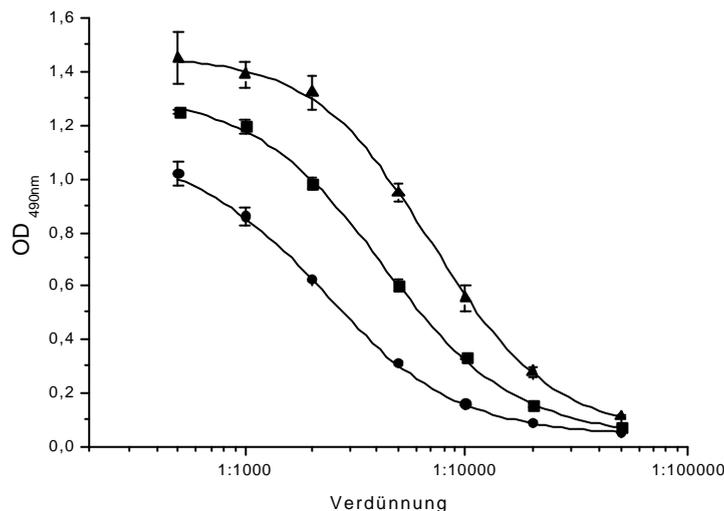


Abb. 10 Bestimmung des anti-NPTII Titers in Kaninchen Antiseren

Mikrotiterplatten wurden mit rekombinanter NPTII (50 ng) beschichtet, freie Stellen mit BSA abgeblockt und mit verschiedenen Verdünnungen der Antiseren (■ A; ● B; ▲ C) inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit Protein A-Peroxidase-Konjugat und der Farbreaktion mit o-Phenylendiamin nachgewiesen. Als Titer wurde diejenige Verdünnung definiert, bei der eine durch den Wendepunkt der sigmoidalen Kurve führende Gerade, mit der Steigung der Kurve am Wendepunkt, den ELISA-Hintergrundwert annimmt.

6.1.2 Reinigung der Antikörper aus Serum

Zur Isolierung der polyklonalen Antikörper aus Kaninchenserum durch Affinitätschromatographie wurde rekombinante NPTII an CH-aktivierte Sepharose gekoppelt. Wenn Serum durch dieses Säulenmaterial geleitet wurde, banden NPTII-spezifische Antikörper vollständig an, während sich die restlichen Serumproteine im Durchfluss befanden. Durch pH-Wechsel des Elutionspuffers wurden die Antikörper eluiert und fraktioniert aufgefangen (Abb. 11A). Die

relevanten Fraktionen wurden durch Titer-ELISA ermittelt (Abb. 11B) und vereinigt. Die Ausbeute pro ml Serum wurde UV-spektroskopisch bestimmt und betrug bei Serum C 730 μg . Serum A (365 μg) und Serum B (200 μg) wiesen, entsprechend der geringeren Titer, niedrigere Ausbeuten auf.

Die gereinigten Antikörper wurden im SDS-PAGE-Gel analysiert (Abb. 11C) und erzeugten im nicht reduzierten Zustand eine hochmolekulare Bande (> 94 kDa), wie für ein Antikörper (Masse circa 150 kDa) erwartet. Im reduzierten Zustand sind die schweren Ketten (50 kDa) deutlich sichtbar, während die leichten Ketten (25 kDa) nur als Schmier zu erkennen sind. Die Auftragung des ungereinigten Serums verdeutlicht die Menge und Vielzahl der entfernten Proteine.

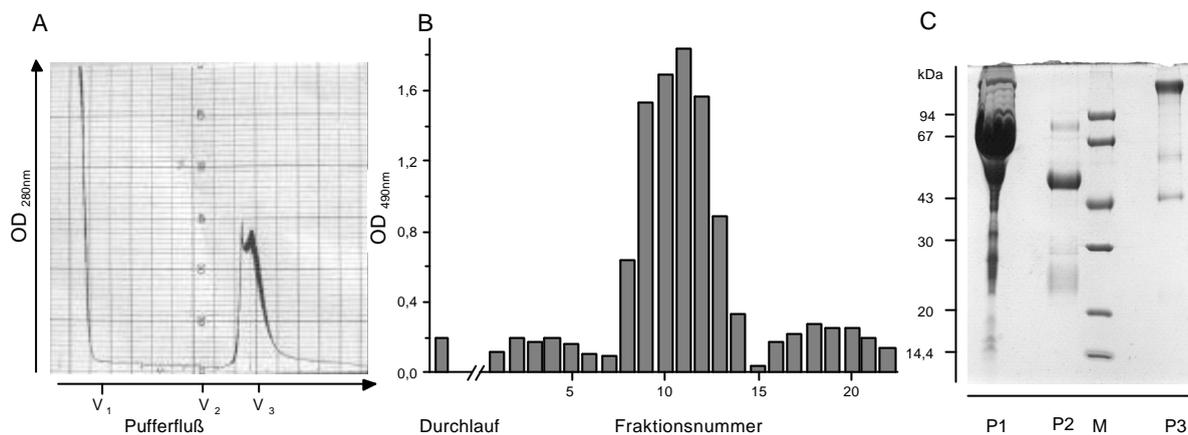


Abb. 11 Affinitätschromatographische Fraktionierung des Antikörperserums

A, Chromatogramm; Durchlauf bei Auftragung von 1 ml Serum bis V₁ (5 ml, PBS pH 7,3); Elution durch pH-Sprung bei V₂ (20 ml, Glycin pH 2,8); Antikörper-Peak bei V₃ (25 ml). B, Identifizierung relevanter Fraktionen durch Titer-ELISA; C, SDS-PAGE (11 %, Coomassie-Färbung); alle unter reduzierenden Bedingungen: P1 Antiserum (pur, 1,5 μl), P2, affinitätsgereinigter Antikörper (8,8 μg); M, Größenstandard. Analyse unter nicht reduzierenden Bedingungen: P3, affinitätsgereinigter Antikörper (8,8 μg).

6.1.3 NPTII Nachweis durch Western-Blot

Die gentechnisch veränderten PGIP-Tomaten tragen neben einem Gen für ein Polygalacturonase-inhibierendes Protein (PGIP, *polygalacturonase inhibiting protein*), das Resistenz gegen Befall durch pathogene Pilze erzeugen soll, das *npt II*-Gen. Das Markerenzym NPTII wird unter Einfluss des Nopalinsynthese Promotors konstitutiv exprimiert und ermöglichte eine Kallusselektion der transformierten Organismen.

Mittels Western-Blot kann NPTII im Proteinextrakt nach elektrophoretischer Auftrennung entsprechend der Größe im SDS-PAGE-Gel, Transfer auf eine Membran und Immundetektion mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Zwei Wege wurden zu diesem Nachweis beschritten, die sich im Nachweis der Immundekoration unterscheiden.

Unter direkter Verwendung von verdünntem Antiserum C (1:3000) banden darin enthaltene anti-NPTII-Antikörper an das auf die Membran transferierte Antigen. Anschließend wurden gebundene Antikörper mit Protein A-Peroxidase Konjugat in einer Farbreaktion mit 4-Chlor-1-Naphthol sichtbar gemacht. Der Nachweis von 6 bis 15 ng rekombinanter NPTII pro Spur war

so möglich. Dies war jedoch nicht empfindlich genug, um die Expression von NPTII in Geweben gentechnisch veränderter PGIP-Tomaten nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Eine geringere Nachweisgrenze für NPTII ist durch Verwendung des Streptavidin/Biotin Systems zur Detektion des primär gebundenen anti-NPTII-Antikörpers erreicht worden. Die auf die Membran transferierte NPTII wurde dazu mit affinitätsgereinigten, biotinylierten Antikörpern des C-Serums immundekoriert. Auf Grund der extrem hohen Affinität von Streptavidin (SAv) und Biotin erfasst das Konjugat aus SAv und alkalischer Phosphatase (AP) die Antikörper nahezu vollständig. Das Indikatorenzym wurde über die Farbreaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat und Nitrotetrazoliumblau (BCIP/NBT) nachgewiesen.

Der wesentlich empfindlichere Nachweis mit dem Streptavidin/Biotin-System war zuerst nur begleitet von Störsignalen, horizontal und vertikal auf dem Blotmembran orientiert, möglich. Streifen über die gesamte Breite der Membran wurden durch Elektrophoresesubstanzen verursacht. Daher wurde das Trenngel ohne Glycerin angefertigt und die Dicke der Gele auf 0,5 mm halbiert. Hohe Proteinbeladungen verursachten zusätzliche, schwache Banden innerhalb einer Elektrophoresespur. Eine unerwünschte Anbindung des SAv-AP-Konjugats z.B. an weitere Proteine der Probe, die gelegentlich beobachtet wird [112], wurde durch Schritte, die über den üblichen BSA-Blockierschritt hinausgehen, verhindert. Die Störung wurden durch eine sequenzielle Behandlung der Membran mit SAv und Biotin reduziert. Unerwünschte SAv-Bindestellen von Proteinen werden durch SAv blockiert, so dass das SAv-AP-Konjugats hier nicht mehr gebunden werden kann. Die Biotin-Bindekapazität des im zusätzlichen Blockierschritt verwendeten SAv wurde anschließend vollständig durch freies Biotin abgesättigt, so dass der biotinylierte Antikörper nicht an das zusätzliche SAv binden konnte.

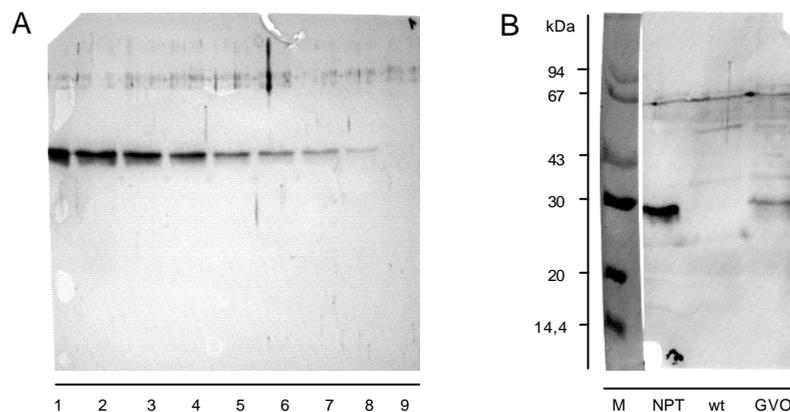


Abb. 12 Nachweis der NPT II im verbesserten Western-Blot

Western-Blot nach SDS-PAGE (11 %) mit biotinyliertem Antikörper. A, Verdünnungsreihe, Spur 1 bis 8, 5, 2,5, 1,5, 1, 0,5, 0,3, 0,2 und 0,1 ng rekombinante NPTII, Spur 9, leer. B, Western-Blot Analyse von Tomaten-Proteinextrakten, M, Indian Ink gefärbter Marker; NPT, 1 ng rek. NPTII; wt, Wildtyp-Tomate; GVO, gentechnisch veränderte PGIP-Tomate, die Probenextrakte enthalten je 6 µg Protein nach Bradford-Bestimmung.

Die Nachweisgrenze für NPTII im verbesserten Western-Blot mit biotinylierten Antikörpern und zusätzlichem Streptavidin/Biotin Blockierschritt liegt bei 0,1 ng (Abb. 12A). Sie liegt damit um den Faktor 60 niedriger als im zuvor beschriebenen Western-Blot mit den Antiseren. In einem Proteinextrakt einer gentechnisch veränderten PGIP-Tomate konnte mit dieser

Prozedur daher erfolgreich NPTII nachgewiesen werden (Abb. 12B). Die entsprechende Spur weist bei der gleichen Laufweite wie das rekombinante Protein eine Bande auf, während hier für die Wildtyp-Tomate kein Signal erscheint. Man kann abschätzen, dass die NPTII-Menge pro Gesamtprotein deutlich kleiner als 1 ng NPTII/ 6 µg (< 167 ppm) ist.

6.1.4 NPTII-Sandwich ELISA

6.1.4.1 Entwicklung des sandwich-ELISA

Ein ELISA im *Sandwich*-Format beinhaltet die schrittweise Adsorption affinitätsgereinigter Antikörper an die Mikrotiterplatte, Blockieren der verbleibenden freien Oberfläche, Inkubation mit Standards oder Proben und Inkubation mit biotinylierten Antikörpern. Daran schließt sich die Dekoration mit SAV-AP Konjugat, das die Farbreaktion mit *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) ermöglicht (Abb. 2, Seite 13).

Durch Optimierung der verschiedenen Konzentrationen des immobilisierten und des biotinylierten Antikörpers sowie unterschiedlicher Inkubationszeiten wurde ein ELISA-Protokoll erstellt, das bei linearer Kalibration die Quantifizierung der NPTII bis zu $0,8 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ ermöglicht. Die Nachweisgrenze betrug $(0,03 \pm 0,01) \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$. Sie wurde jeweils aus der 3-fachen Standardabweichung des Nullwertes von 3 Kalibrationen gebildet. Der durchschnittliche Variationskoeffizient einer dreifach bestimmten OD eines Messpunktes einer Kalibration ($R = 0,998$) mit $N = 9$ Punkten betrug 2 %.

Die in dieser Arbeit rekombinant hergestellte NPTII wurde mit der NPTII eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits verglichen, die über die Neomycinaffinität chromatographisch aus Lysaten von *E. coli*-Zellen, die mit dem Transposon Tn5 ausgestattet sind, gereinigt worden war. Im ELISA der Fa. 5'Prime→3'Prime zeigten beide NPTII-Präparationen die gleichen Steigungen, Hintergrundwerte und Nachweisgrenzen. Die Enzym-Präparationen waren nicht unterscheidbar. Somit erlaubte die Verwendung rekombinanter NPTII als Standard ebenfalls die Bestimmung nativer NPTII aus GVO Tomaten.

6.1.4.2 Ausarbeitung der Extraktionsbedingungen

Als Modellpflanze für den Nachweis von GVO-Protein dienten PGIP-Tomaten, die mechanisch in Gegenwart eines Extraktionspuffers (EP, Seite 32) aufgeschlossen wurden. Dieser Puffer wurde von Rogan *et al.* [113] für die Extraktion von Proteinen aus Baumwollpflanzen optimiert. Ein Vergleich der ermittelten NPTII- und Gesamtprotein-Mengen (NPTII-ELISA bzw. Bradford-Bestimmung) nach Extraktion von PGIP-Tomaten mit verschiedenen Puffern, denen je eine Komponente fehlte, legte nahe, dass Tween 20 im EP die allgemeine Proteinfreisetzung beim Aufschluss erhöht. Die weiteren Komponenten (Ascorbat, Magnesiumchlorid, Natriumborat), im Vergleich zu reinem Tris-Puffer (mit und ohne Tween), haben eine stabilisierende Wirkung auf die Immundetektierbarkeit der NPTII (nicht dargestellt). Somit ist der EP zur Extraktion von Tomaten geeignet.

Sowohl bei Ultraschall- als auch bei Turrax-Behandlungen wurde das Tomatengewebe effizient durch die Scherkräfte aufgeschlossen. Die Menge an freigesetztem Gesamtprotein unterschied sich bei beiden Methoden nicht. Bei einem Masse-zu-Volumen Verhältnis von 1:5

(2 g Tomate/10 ml EP) wurden $132 \pm 46 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ Protein (N = 4, 20 s Turrax) freigesetzt. Durch eine 4-fache Wiederholung des Aufschlusses ließ sich nur ein geringer Ausbeutezugewinn von 15 % erreichen. Alternativ wurde durch Inkubation von Fruchtfleisch in eisgekühltem Extraktionspuffer und anschließendem, heftigem Schütteln (vortexen) ebenfalls Protein freigesetzt. Mit $64 \pm 8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ (N = 4) ist diese Proteinmenge um den Faktor 2 geringer, aber ausreichend hoch zum Nachweis der NPTII-Expression in PGIP-Tomaten durch den *Sandwich*-ELISA.

Die 20 s Turrax-Behandlung und die schonenden Extraktionen durch Schütteln glichen sich in der durch ELISA nachgewiesenen Menge NPTII pro Gesamtprotein. Bei mehrfachen Turrax-Behandlungen nimmt jedoch die NPTII-Menge relativ zur Proteinmenge ab. In Abb. 13 ist dies an zwei Beispielen dargestellt. Die nachgewiesene Menge NPTII sinkt auf 69 % bei hohem, ursprünglichem Gehalt, beziehungsweise auf 29 % bei niedrigerer Ursprungskonzentration. Auf Grund der Empfindlichkeit der NPTII gegenüber intensivem, mechanischem Aufschluss wurde dieser auf eine 20 s Turrax-Behandlung begrenzt.

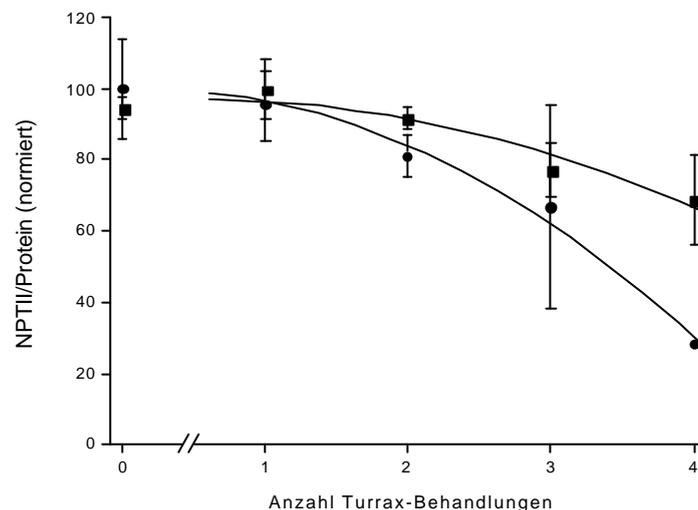


Abb. 13 Einfluss des mechanischen Probenaufschlusses auf die Proteinextraktion

Fruchtfleisch zweier Tomaten wurde durch einmaliges Vortexen (90 s, zuvor 30 min Inkubation auf Eis) oder mehrfach durch Turrax-Behandlungen (je 20 s, $13500 \text{ U}\times\text{min}^{-1}$) auf Eis aufgeschlossen. Der Quotient von NPTII-Gehalt (NPTII-ELISA) und der Gesamtproteinmenge (Bradford-Test) wurde gebildet und auf den maximalen Gehalt der Probe (● 21, ■ 34 ng NPTII/ μg Protein) normiert.

Anschließend wurden verschiedene Einflüsse, denen NPTII als Bestandteil gentechnisch veränderter Tomaten durch Prozessierung als Lebensmittel ausgesetzt ist, simuliert und der NPTII-Nachweis durchgeführt. Die meisten Tomaten werden während der Verarbeitung erhitzt, z.B. beim Zerkleinern (*hotbreak*, 70°C - 95°C), während der Verarbeitung (Eindicken von Tomatenpüree bei 78°C , Pulvertrocknung in Sprühtürmen), bei der Abfüllung (90°C , Tomatenmark) und bei der Sterilisation (95°C , Tomatenpulpe, Schälto­maten) [114]. Tomatenmark stellt darüber hinaus eine saure Probenmatrix dar. Zwei Gramm doppelt konzentriertes Mark gelöst in 10 ml Wasser zeigten einen pH-Wert von 4,3.

Nach 120 min im sauren Milieu einer Testlösung (pH 4,3) war NPTII in Gegenwart von 0,5 % BSA bei Raumtemperatur durch ELISA noch nachweisbar. Bei Inkubation der gleichen

Lösung bei 90°C (Konditionen der Tomatenmarkabfüllung) präzipitierte in weniger als 2,5 min massiv Protein. Im Überstand war nach Umpuffern auf pH 7,1 keine NPTII detektierbar (Abb. 14).

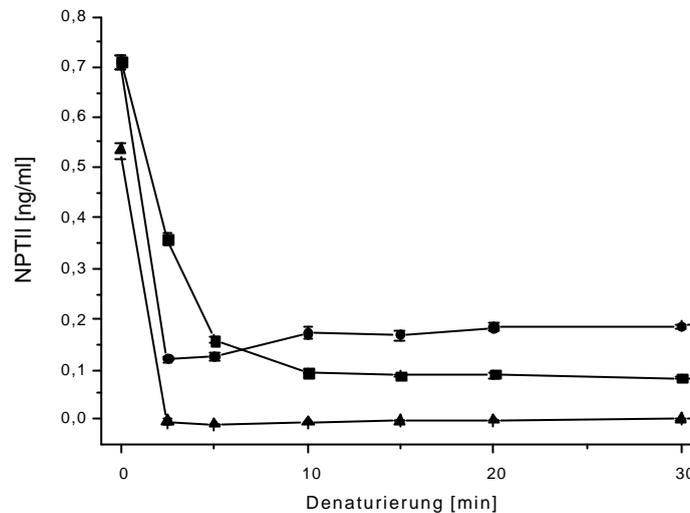


Abb. 14 Einfluss thermischer Behandlung der NPTII auf ihren Nachweis durch ELISA

Nach thermischer Behandlung wurde die Lösung zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe des NPTII-ELISA analysiert. ▲, 90°C in Citratpuffer pH 4,3, anschließend umpuffert auf pH 7,1; ●, 90°C in PBS; ■ 70°C in PBS; alle Puffer enthalten 0,5 % BSA und 0,1 % Tween 20.

Nach kurzer Inkubation bei 90°C in PBS (pH 7,3) mit 0,5 % BSA war die durch ELISA nachweisbare Menge NPTII auf 17 % gesunken. Im Verlauf längerer Inkubation bei diesen Bedingungen steigt der Anteil leicht auf 26 % der initialen Testlösung. Es wurde nach scharfer Zentrifugation (21000 g, 10 min) optisch kein präzipitiertes Protein detektiert, jedoch opaleszierte die Lösung. Die Abnahme der nachweisbaren Menge NPTII ist bei 70°C und gleichen Pufferbedingungen deutlich zu verfolgen. Nach 10 min wurde ein Niveau von 13 % erreicht. Es wurde keine Verfärbung der Lösung oder ausgefallenes Protein beobachtet. Die verschiedenen Nachweis-Niveaus für 90°C- und 70°C-Behandlung sind erstaunlich. Sie könnten eventuell durch verschiedene Konformationen der denaturierten aber noch löslichen NPTII bedingt sein.

Wurden die Proteinextrakte aus Tomaten unzureichend verdünnt, trat ein Matrixeffekt bei der Kalibration der NPTII auf. Betrag im Proteinextrakt der Standardlösungen der Anteil aus Wildtyp-Tomaten 20 %, war die erhaltene Gerade im Vergleich zu Standards in reinem Probenpuffer (PBS-T-BSA) parallel zu höheren OD-Werten verschoben (Geradengleichung, $OD = A + B \times C_{NPTII}$; Ordinaten-Abschnitt, $A = OD(C_{NPTII} = 0)$; Steigung, $B = \Delta OD / \Delta C_{NPTII}$). Dies wurde an zwei gleiche Kalibrationen, im Bereich von 0 bis 0,8 ng NPTII \times ml⁻¹ angefertigt mit und ohne Proteinextrakt einer Wildtyp-Tomate (je 8 Standards, $R = 0,999$), deutlich. Sie wiesen gleiche Steigungen ($B_{mit\ Extrakt} = 0,944 \pm 0,020$, $B_{ohne\ Extrakt} = 0,953 \pm 0,020$) aber unterschiedliche Achsenabschnitte auf ($A_{mit\ Extrakt} = 0,206 \pm 0,008$, $A_{ohne\ Extrakt} = 0,159 \pm 0,008$). Die Zugabe von 20 % Wildtyp Tomaten-Extrakt erhöhte die gemessenen NPTII-Konzentration also formal um $(0,049 \pm 0,009)$ ng \times ml⁻¹. Diese Auswirkung des Matrixeffekts

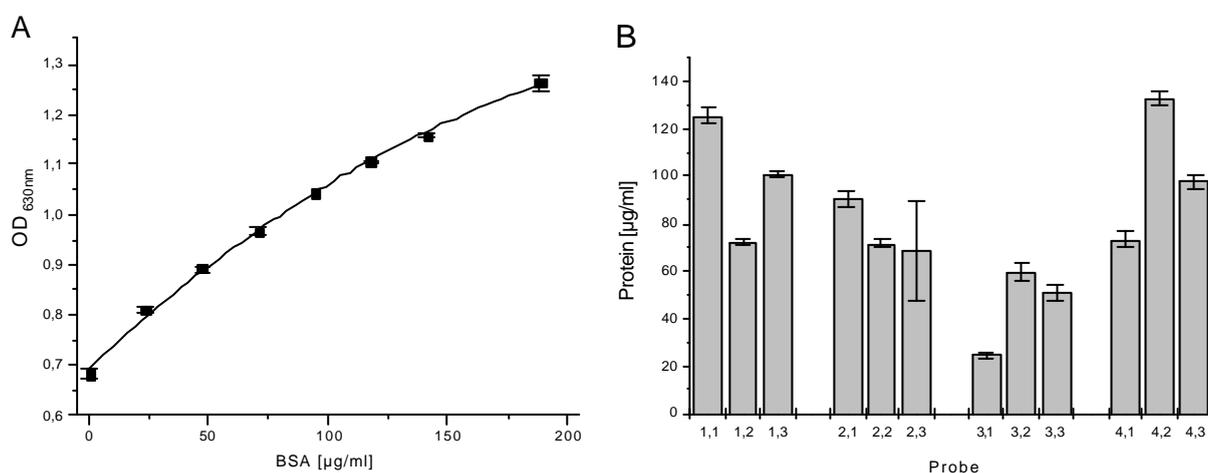
wurde durch einen verringerten Probenanteil, maximal 10 % des aufgetragenen Volumens, erfolgreich umgangen (Daten nicht gezeigt).

6.1.5 Anwendung des NPTII-ELISA auf PGIP-Tomaten

Zur Veranschaulichung wird die Analyse verschiedener Transformationslinien der PGIP-Tomate und einer Wildtyp-Tomate vorgestellt.

Nach Turrax-Auflösung wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen an Gesamtprotein je Probe gemessen (Abb. 15A, B). Dies spiegelt die unterschiedliche Einwaage und Effizienz beim Aufschluss wider. Im ELISA wiesen die Extrakte der Proben 2, 3 und 4 deutlich NPTII auf, während die Wildtyp-Tomate (Probe 1) hingegen kein Signal für NPTII zeigt (Abb. 15C, D), da die OD Werte des ELISA hier im Bereich des Hintergrundes liegen. Bezieht man den NPTII-Gehalt jeder individuellen Probe auf das extrahierte Gesamtprotein, ergibt sich für die Tomate Probe 2 (Line 6-20, *single copy* Insertion des TransformationsPlasmids) ein Gehalt von (30 ± 3) ng NPTII/ μ g Protein ($N = 3$). Dieser Wert ist nicht signifikant unterschiedlich zu (33 ± 5) ng NPTII/ μ g Protein für Tomate Probe 3, die aus der selben Transformationslinie stammt (Line 6-14, *single copy*). Im Gegensatz dazu wurde für Probe 4 (Line 3-39, *multi copy*) mit (12 ± 1) ng NPTII/ μ g Protein nur etwa 40 % des NPTII-Gehaltes der beiden anderen Proben gefunden. Befunde dieser Art werden häufiger berichtet. Sie können eventuell durch Positionseffekte der transgenen DNA innerhalb des Genoms bedingt sein.

Der Mittelwert der Variationskoeffizienten (CV) wurde aus drei unabhängigen Messungen einer Probe gebildet ($CV_{\text{Probe 1}} = 10,3 \%$; $CV_{\text{Probe 3}} = 16,8 \%$; $CV_{\text{Probe 4}} = 9,0 \%$); die Werte für Wildtyp-Tomate, die zwangsläufig einen hohen relativen Fehler beinhaltet, wurden daher nicht eingeschlossen. Durch die wiederholte, parallele Analyse konnte eine Intra-Assay Variation von durchschnittlich 12 % für die GVO-positiven Analysen ermittelt werden.



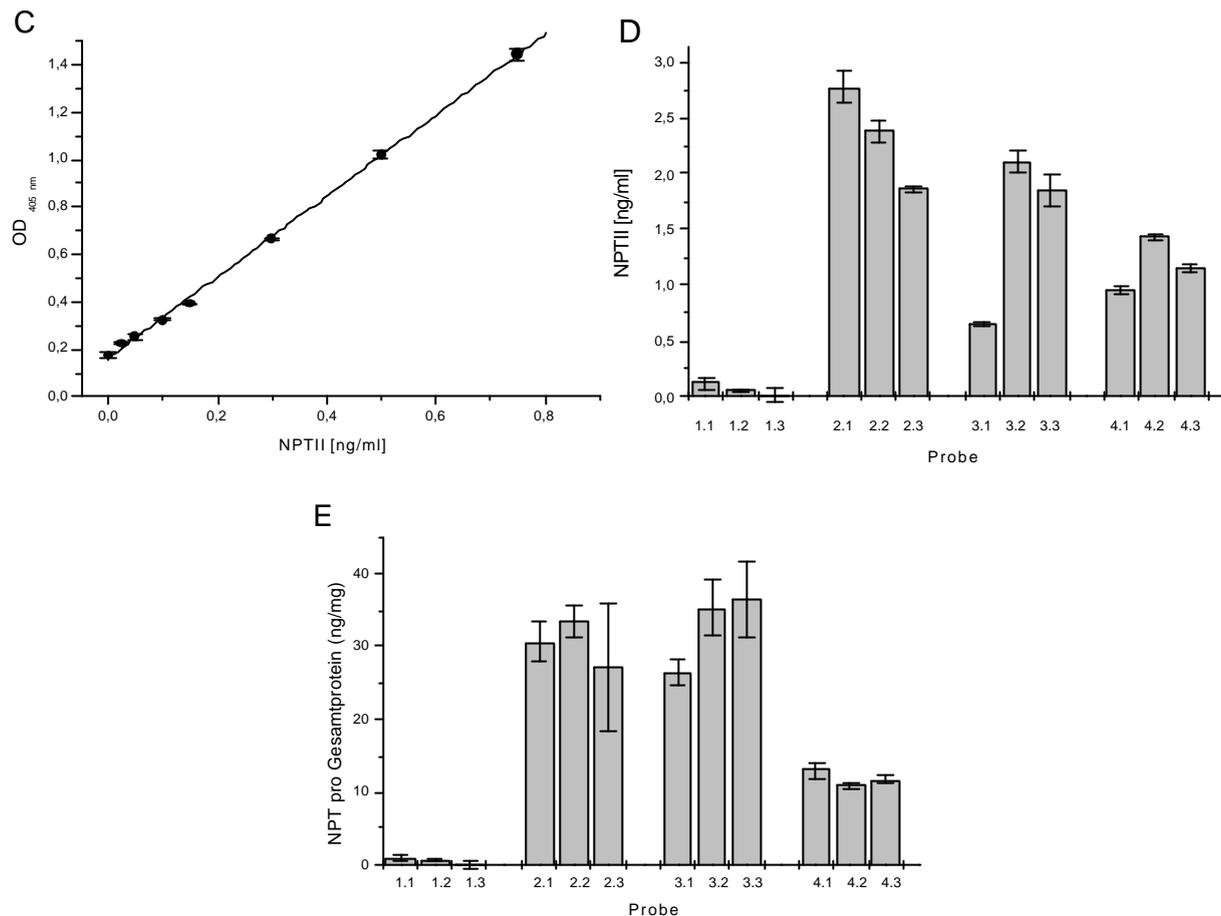


Abb. 15 NPTII Quantifizierung der NPTII in gentechnisch veränderten PGIP-Tomaten

In drei parallelen Analysen wurden Probe 1 (Wildtyp-Tomate), Proben 2 und 3 (PGIP-Tomate der Linie 6) und Probe 4 (PGIP-Tomate der Linie 3) untersucht. Zur Extraktion wurden 1,5 bis 2,2 g Fruchtfleisch in 12 ml EP mit Turrax aufgeschlossen. A, Kalibration Bradford (quadratische Regression, $R = 0,9989$, $N = 3$ Messwerte pro Standard); B, Gesamtproteinkonzentration gemessen im unverdünnten Extrakt ($N = 3$ Messwerte pro Probe); C, Kalibration NPTII-ELISA ($R = 0,9995$, $N = 2$ Messwerte pro Standard); D, NPTII-Gehalt in 1:10 Verdünnung gemessen ($N = 2$ Messwerte pro Probe); E, relativer NPTII-Gehalt.

6.1.6 Anwendung des NPTII-ELISA auf Zeneca Tomaten

Im Rahmen des EU-Projektes wurden auch Proben der gentechnisch veränderten Zeneca-Tomaten zugänglich. Diese dienen ursprünglich zusammen mit Wildtyp-Tomaten in einem qualitativen Ringversuch auf Nukleinsäureebene als unbekannte Proben.

Aus 10 unbekannt Proben und zwei Kontrollen wurde jeweils Gesamtprotein extrahiert und die Konzentration nach Bradford bestimmt (Mittelwert = $121 \pm 58 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$). Diese Extrakte wurden mit Probenpuffer 1:5 verdünnt und mittels NPTII-ELISA analysiert. Der zu erwartende Matrixeffekt durch die erhöhte Probenmenge wurde billigend in Kauf genommen, da die NPTII-Konzentration der Positiv-Kontrolle in Vorversuchen lediglich im Bereich der Nachweisgrenze des ELISAs lag. Den Vorversuchen entsprechend wurde dann die Kalibration ($R = 0,9992$, Abb. 16A) durch niedriger konzentrierte Standards angepasst. Zusätzlich wurde durch verlängerte Inkubation mit biotinyliertem Antikörper (140 statt 60 min) das ELISA-Protokoll leicht modifiziert. Die Nachweisgrenze für NPTII in diesem speziellen Experiment betrug

0,011 ng×ml⁻¹. Der NPTII-Gehalt relativ zum Protein-Gehalt der Proben A2, A4, A5 und A9 lag über dem der Positiv-Kontrolle, es handelte sich hierbei also um gentechnisch veränderte Tomaten. In den verbleibenden 6 Tomaten (A1, A3, A6, A7, A8, A10) wurde keine NPTII exprimiert, also handelte es sich hier um Wildtyp-Tomaten (Abb. 16B).

Eine Bestätigung dieses Ergebnisses wurde durch PCR-Analyse erhalten (Daten von T. Borchers zur Verfügung gestellt). Aus 100 mg Fruchtfleisch der gleichen Tomaten wurde nach der CTAB I Methode DNA gewonnen und Polygalacturonase-Sequenzen durch PCR mit den Primern: PG24L und PG24R amplifiziert. In jedem DNA-Extrakt mit amplifizierbarer DNA muss ein Amplikon von 383 bp für das Wildtyp-Polygalacturonase Gens erscheinen. Zusätzlich ist bei gentechnisch veränderten Tomaten ein 180 bp langes Fragment sichtbar. Dieses zeigt die verkürzte, zusätzlich insertierte Polygalacturonase Sequenz an. Die Proben A2, A4, A5 und A9 wiesen, wie die Positiv-Kontrolle, diese 180 bp-Bande auf und stammen aus gentechnisch veränderten Tomaten (Abb. 16C). Das Ergebnis entspricht demjenigen der Proteinanalytik.

Bei den untersuchten Zeneca Tomaten betrug der NPTII-Gehalt pro Gesamtprotein nur einen Bruchteil desjenigen der PGIP-Tomaten. Dies kann grundsätzlich durch eine geringere Expressionsrate, verursacht durch unterschiedliche, vorgeschaltete Promotoren oder durch Positionseffekte im Genom der transformierten Tomaten, bedingt sein. Der besonders geringe relative Gehalt der Positivkontrolle ist wahrscheinlich durch mehrfache Auftau- und Gefrierprozesse der Probe bedingt, die zu Vorversuchen herangezogen wurde.

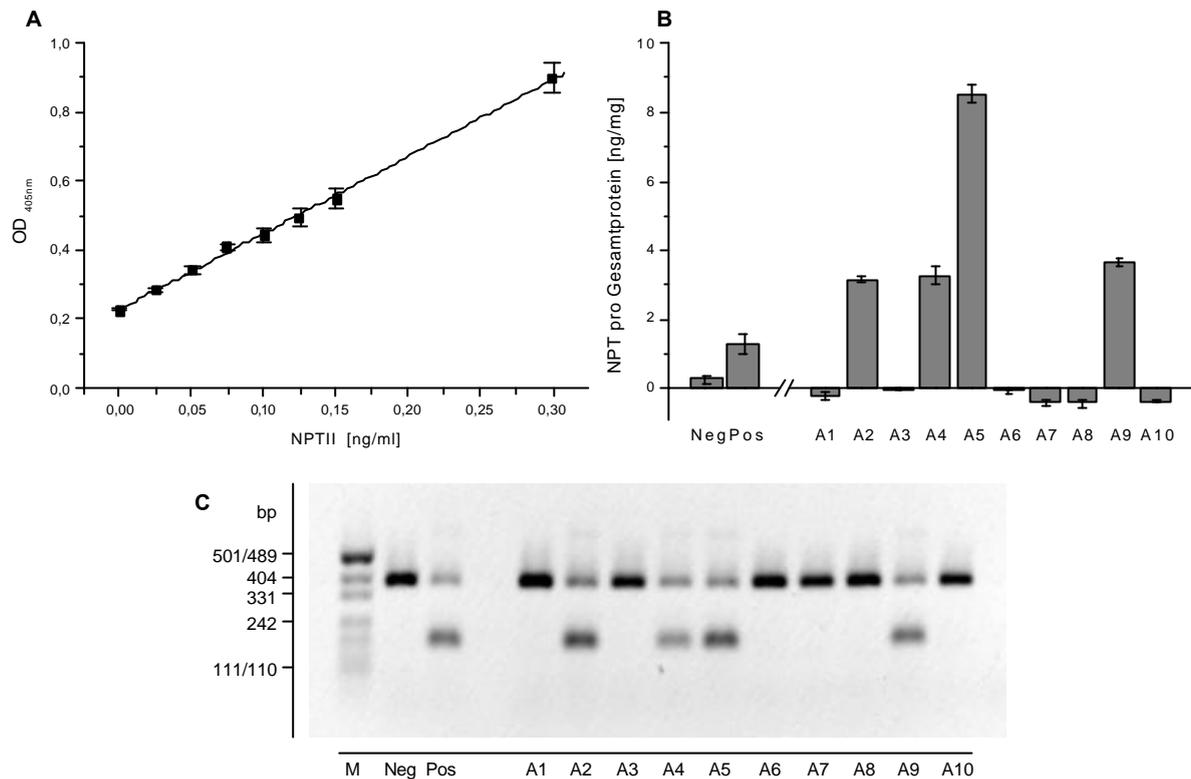


Abb. 16 Prüfung auf NPTII Protein und GVO-DNA in Zeneca-Tomaten

A, Kalibration des NPTII-ELISA; B, relativer NPTII-Gehalt bezogen auf extrahiertes Gesamtprotein; C, qualitative DNA-Analyse mit PG spezifischen Primern, Agarosegel. Neg, Negativ-Kontrolle, Wildtyp-Tomate; Pos, Positiv-Kontrolle, gentechnisch veränderte Zeneca Tomate mit NPTII-Expression und zusätzlicher, nicht-Wildtyp PG-Sequenz; A1 bis A10, Tomatenproben.

6.2 DNA-Analytik

6.2.1 Konzept der DNA-Nachweise

Die in dieser Arbeit dargestellten Methoden zur DNA-Analytik basieren auf der Extraktion von DNA aus Probenmaterial, ihrer Amplifizierung in Gegenwart von Kompetitor-Plasmiden und der Detektion der entstandenen PCR-Produkte durch PCR-ELISA.

Die Extraktion aus dem Probenmaterial wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt, die in Abschnitt 6.2.2 dargestellt und verglichen werden. Die Auswahl einer geeigneten Polymerase zur Vervielfältigung der DNA durch PCR, insbesondere wenn mehrere Produkte entstehen sollen, ist ein entscheidender Schritt (Abschnitt 6.2.3). Die klassische DNA-Analytik führt mit Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte und Ethidiumbromidfärbung primär zu qualitativen Aussagen, die visuell gewonnen werden. Mit dem in Abschnitt 3.5 vorgestellten PCR-ELISA wird durch spezifische Hybridisierung in Mikrotiterplatten eine objektive Messung mit digitaler Auslesung ermöglicht. An einem Beispiel (Abschnitt 6.2.4) werden Fehlerquellen der qualitativen PCR-Analytik ohne Kompetitoren aufgezeigt, die die Notwendigkeit von Inhibitions- und Amplifikationskontrollen begründen.

6.2.2 DNA-Extraktion

Die Isolierung ausreichender DNA-Mengen für die PCR stellt wegen der enormen Vervielfältigung der Zielsequenz in diesem Verfahren primär ein geringes Problem dar. In der Tat kann man aus Soja- und Mais-Mehlen oder Bohnen mit einfachen, schnellen Methoden DNA isolieren, die für qualitative Ja/Nein-Aussagen durch PCR geeignet ist. Für quantitative, kompetitive PCR-Verfahren, die in dieser Arbeit erarbeitet wurden, ist jedoch eine Quantifizierung der als Templat eingesetzten DNA notwendig.

Korrekte Quantifizierung setzt in der Regel die Abtrennung der koextrahierten Ribonukleinsäure (RNA) oder Proteine voraus. In Handbüchern der Molekularbiologie [115, 116] wird eine Begutachtung der Qualität und Quantität der extrahierten DNA im Agarosegel empfohlen. Die Aussagekraft ist aber, bis auf die Beurteilung der Fragmentierung, gering. Die Quantifizierung der DNA in Extrakten erfolgte daher generell mittels UV-Spektroskopie unter Verwendung der Absorption der enthaltenen Purin- und Pyrimidin-Basen bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge zeigen DNA und RNA ein Absorptionsmaximum; Proteine liefern trotz ihres Absorptionsmaximums bei 280 nm ebenfalls einen Beitrag. Zur Beurteilung des Proteinanteils wurde der Quotient aus $OD_{260/280}$ herangezogen, der für proteinfreie Extrakte 1,8 beträgt [115].

Fluoreszenzspektroskopie mit dem Farbstoff PicoGreen stellt ein Quantifizierungsverfahren für doppelsträngige DNA dar. An dsDNA gebunden fluoresziert der Farbstoff nach maximaler Anregung bei 502 nm mit maximaler Emission bei 523 nm [117]. Der PicoGreen-Assay ist über einen großen DNA-Konzentrationsbereich ($1 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ bis $1 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) linear (Abb. 8, Seite 45). Er wurde zur Quantifizierung der DNA in Extrakten mit Protein- oder RNA-Verunreinigungen eingesetzt.

Tab. 7 zeigt eine Zusammenstellung typischer Daten verschiedener Extraktionsmethoden. Sie wurden zu verschiedenen Zwecken und Zeitpunkten während der Anfertigung dieser Arbeit genutzt und sind im Folgenden beschrieben.

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), ein kationisches Detergenz, das der wesentliche Bestandteil des Extraktionspuffers der CTAB I und CTAB II-Methode ist, zerstört die Zell- und nukleären Membranen der Pflanzen und anderer Gewebe unter Freisetzung der DNA und weiterer Komponenten. Durch unterschiedliche Löslichkeiten im Vergleich zu Polysacchariden gelangt DNA dabei unter Hochsalzbedingungen bevorzugt in Lösung [118]. Lösliche Proteine im Extrakt werden durch eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion entfernt und die verbleibende DNA kann nach Isopropanol-Fällung, Entfernung von CTAB und Salz durch Ethanol-Waschschritte und Aufnahme in einem geeigneten Puffer zur PCR eingesetzt werden (CTAB I). Ein DNA-Abbau durch freigesetzte endogene Nukleasen wird durch EDTA im Extraktionspuffer unterbunden; es chelatisiert deren Cofaktoren Magnesium- und Calcium-Ionen. Kann bei der Isopropanolfällung mitgerissenes CTAB, das die PCR stark inhibiert, nicht vollständig entfernt werden, besteht die Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse. Die Basis-Methode CTAB I ist mit geringem Zeit- und Arbeits-Aufwand verbunden; sie liefert jedoch Protein-haltige Extrakte mit Quotienten $OD_{260/280}$ weit unter dem idealen Wert von 1,8 (Tab. 7). Da die ebenfalls extrahierte RNA nicht abgedaut und daher copräzipitiert wurde, war eine DNA-Quantifizierung per UV-Spektrum nicht sinnvoll. RNA in frisch erzeugten Extrakten war

nach Agarosegelelektrophorese deutlich als hochmolekularer Schmier sichtbar (nicht gezeigt). Der Pico Green-Assay zeigte, dass im DNA-Extrakt lediglich 5-10 % der Absorption bei 260 nm auf dsDNA zurückgehen, ein Befund der sich ebenfalls bei Zimmermann *et al.* [119] findet.

Tab. 7 Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden

DNA-Konzentrationen sind ungeachtet der RNA- und Protein-Gehalte UV-spektrometrisch bestimmt ($OD_{260} 1 = 50 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) und beziehen sich auf 100 mg Einwaage und 100 μl Endvolumen. Die Spalte „RNA entfernt“ kennzeichnet, ob während der Extraktion gezielt RNA abgebaut wurde. Probenarten sind in der Regel Mehl oder Bohnen. Der berechnete Zeitbedarf bezieht sich auf parallele Bearbeitung von circa 10 Proben von der Einwaage bis zur Elution, ohne eine gegebenenfalls vorrausgehende Homogenisierung zu berücksichtigen.

Extraktions- methode	Probenart	Proben- zahl	DNA Konzentration [$\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$]	$OD_{260/280}$ MW \pm SD	RNA entfernt	Dauer [h:min]
CTAB I	Sojabohne	15	526 \pm 175	1,36 \pm 0,06	nein ^a	2:20
CTAB II	Sojamehl	18	150 \pm 80	1,93 \pm 0,04	ja	6:20
CTAB II	prozessierte Lebensmittel ^d	6 5 ^e	48 \pm 25 54 \pm 21 ^e	1,64 \pm 0,29 1,76 \pm 0,1 ^e	ja	6:20
InViTek I	Sojamehl	3	327 \pm 112	1,69 \pm 0,37	nein ^b	1:40
InViTek II	Sojamehl	3	123 \pm 102	0,92 \pm 0,15	ja	1:45
Wizard I	Sojamehl	18	1059 \pm 232	1,58 \pm 0,03	nein ^c	4:20
Wizard II	Sojamehl	9	184 \pm 16	1,39 \pm 0,07	ja	4:25
Wizard II	Maismehl	12	118 \pm 8	1,75 \pm 0,05	ja	4:25
Wizard III	Sojamehl	4	331 \pm 34	1,76 \pm 0,02	ja	5:05
Wizard III	prozessierte Lebensmittel ^d	6	183 \pm 94	1,74 \pm 0,1	ja	5:05

MW: Mittelwert; Anteil der DNA an der Absorption (OD_{260}) nach Pico-Green Assay: ^a 5-10 %, ^b nicht ermittelt, ^c 50-90 %. ^d Die 6 prozessierten Lebensmittel bestanden aus: getrocknetem und gemahlenem, hitzesterilisiertem, gekochtem Mais; einem Mais- und Sojamehl-Gemisch (je 50 %); Maisgrieß; texturiertem Sojaprotein; 2 Tofu Präparationen; ^e Wertung ohne Ausreißer: Soja/Mais-Mehlgemisch.

Aufbauend auf die CTAB I-Methode war im CTAB II-Protokoll mit dem gleichen Puffer, jedoch zusätzlich mit RNase A und Proteinase K zur Unterstützung der Zellyse, eine DNA-Extraktion möglich, die zu deutlich verbesserter DNA-Qualität führte. Nach der Entfernung der Hauptproteinfraktion durch Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion, war der wesentliche Schritt hierbei die selektive Fällung hochmolekularer DNA. Sie wurde durch Senkung des CTAB-Gehaltes auf 1 % und des Salzgehaltes auf 0,5 M NaCl erreicht. Das DNA Präzipitat war unter Hochsalzbedingungen ($> 0,7$ M) wieder löslich und der RNA-Verdau wurde noch einmal fortgesetzt. Eine zweite Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion, bei der in der Regel nur noch eine geringe Interphase sichtbar war, wurde durchgeführt, bevor die DNA mit Isopropanol gefällt und mit 80 % Ethanol gewaschen wurde. Diese aufwändigere Methode lieferte für Soja-Mehle Protein- und RNA-freie Extrakte bei akzeptablen Ausbeuten. Für eine Auswahl von stärker prozessierten Lebensmitteln waren die Ausbeuten zwar deutlich geringer, jedoch lag

der Quotient $OD_{260/280}$, außer für eine einzelne Probenart (Ausreißer), im Bereich für proteinfreie DNA-Lösungen.

Die InViTek I Extraktions-Methode ist mit wenig Arbeitsaufwand schnell durchzuführen. Die Probe wurde unter Zusatz von Proteinase K aufgeschlossen, die DNA in bestimmten Puffern (Zusammensetzung unbekannt) im Durchfluss an eine Festphase (Zentrifugationssäulen) gebunden und in Niedrigsalzpuffer eluiert. Es werden der CTAB I Methode entsprechende Nukleinsäure Ausbeuten eines Gemisches aus DNA und RNA erhalten. Schließt man einen RNA-Verdau an die Extraktion an (InViTek II), zeigt sich am Quotient $OD_{260/280}$, dass Proteine nicht ausreichend entfernt werden.

Den Wizard Methoden I, II und III lag ein Probenaufschluss mit anionischem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zu Grunde, der in Gegenwart von EDTA, Proteinase K und Guanidinium Hydrochlorid (GuHCl) durchgeführt wurde. EDTA inhibiert Nukleaseaktivitäten, Proteinase K und GuHCl unterstützen die Zellyse. Die erhaltene Aufschlusslösung wurde ohne zusätzliches Einstellen von Bindebedingungen zu einer Suspension von DNA-bindendem Harz (Wizard Resin, Promega) gegeben. Anschließend wurde durch eine Kartusche filtriert, mit 80 % Isopropanol gewaschen und durch Niedrigsalzpuffer in der Wärme eluiert (Wizard I). RNA band unter diesen Bedingungen ebenfalls an das Harz. Ein RNA-Anteil, bezogen auf die OD_{260} , von 10 bis 50 % wurde mit Hilfe des Pico Green Assay gefunden. Ein RNA-Verdau nach dem Probenaufschluss schließt jedoch den RNA-Anteil von der Ko-Extraktion aus (Wizard II). Um Proteinverunreinigungen effektiver zu entfernen, sieht die Wizard III Methode nach dem Probenaufschluss zwei Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktionen vor. RNA wurde nach der ersten Extraktion verdaut, verbleibendes Protein und die zuvor zugegebene RNAse A wurden in der zweiten Extraktion entfernt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie im Wizard I Protokoll beschrieben. Die leicht erhöhte DNA-Ausbeute aus Sojamehl bei Anwendung des Wizard III- statt des Wizard II-Protokolls wurde vermutlich durch eine ungeschmälert verfügbare DNA-Bindungskapazität des Harzes erreicht. Proteinadsorption an das Harz, als eine mögliche Konkurrenzreaktion, fand in geringerem Umfang statt.

Durch die Wizard I Methode wurde im Vergleich zum CTAB I Protokoll, bei geringerer Verunreinigung des Extraktes mit Proteinen, eine hohe Ausbeute an Nukleinsäuren (DNA+RNA) erzielt. Wurde die RNA im Zuge der Extraktion verdaut, sinkt die durch OD_{260} bestimmte Ausbeute erwartungsgemäß (CTAB II + Wizard II). Jedoch stieg im Falle der Wizard II DNA-Extraktion aus Sojamehl der Grad an Proteinverunreinigung ($OD_{260/280} \ll 1,8$). Dies Problem trat bei Mais Extraktionen nicht auf ($OD_{260/280} \approx 1,8$). Mais enthält mehr Stärke als Soja, die sich ihrerseits durch einen hohen Proteinanteil auszeichnet.

Um möglichst jeder Probenart, inklusive Mischungen gerecht zu werden und reine, UV-quantifizierbare DNA mit einem universellen Protokoll zu isolieren, eignet sich die Wizard III Methode, bei der RNA und Protein gezielt entfernt wurde, am besten. Mit ihr konnte sowohl aus Sojamehl wie auch aus einer kleinen Auswahl von prozessierten Lebensmitteln DNA in gewünschter Qualität bei guten Ausbeuten isoliert werden. Detaillierte Daten einer Wizard III-Extraktion sind ebenfalls in Abschnitt 6.2.8.3 (Seite 116) dargestellt.

6.2.3 Auswahl der PCR-Bedingungen

Der folgende Abschnitt zeigt die Bedeutung der Polymerase für die Vervielfältigung der DNA in der PCR auf, insbesondere wenn mehrere Produkte entstehen sollen.

Bei der kompetitiven PCR mit anschließender Gelanalyse muß die Bildung von unspezifischen Nebenprodukten vermieden werden, um eine zweifelsfreie Zuordnung der Produkte zu gewährleisten. Die Analyse der PCR-Produkte mittels spezifischer Hybridisierung, wie sie beim Einsatz des PCR-ELISA erfolgt, würde auch in einem unerwünschten Gemisch mit Nebenprodukten die sequenzspezifische Detektion sicherstellen. In einer PCR kann nur eine begrenzte Menge Amplikon erzeugt werden, Nebenprodukte reduzieren somit das Entstehen der relevanten Amplikons und wurden daher vermieden. Spezifität einer PCR mit gegebenen Primern lässt sich primär durch die Wahl einer möglichst hohen Primer-Hybridisierungstemperatur (*Annealing*) während der Zyklen erreichen. Da aber schon vor dem Erreichen der initialen Denaturierung bei 95°C unspezifische Hybridisierung und anschließende Elongation möglich ist, resultieren trotzdem oft Nebenprodukte. In Abb. 17 wird gezeigt, wie sich die Steigerung der Primer-Hybridisierungstemperatur (T_{Anneal}) auf die CaMV35S PCR auswirkt. Bei sehr niedrigen Temperaturen entstand nicht das erwartete Amplikon, sondern eine Vielzahl unerwünschter Nebenprodukte. Erst bei einer Hybridisierungstemperatur von 59,5°C war das erwartete 191 bp große Fragment Hauptprodukt, das aber noch immer von einigen Neben-Produkten begleitet wurde.

Dem Entstehen von Nebenprodukten wurde mit der *hot start*-PCR Technik (Heißstart) entgegengewirkt. Hier wird die Polymerase entweder erst bei hoher Temperatur (> 80°C) zugesetzt (manueller *hot start*) oder sie liegt bis zum Erreichen einer hohen Temperatur in inaktiver Form vor. Letzteres kann durch die modifizierte Polymerase AmpliTaq Gold erreicht werden, die erst nach einer zusätzlichen Hitzebehandlung (Verlängerung der initialen Denaturierung auf 10 min, 95°C) aktiv ist. Da bei kompetitiven PCRs oft sehr viele Reaktionsansätze parallel pipettiert werden, deren Handhabung untereinander gleich sein muss, lässt sich ein manueller *hot-start* nicht sachgerecht realisieren. Er birgt zusätzlich ein nicht tragbares Kontaminationsrisiko. *Hot Start*-PCRs mit AmpliTaq Gold verliefen im Vergleich zu konventionellen Polymerasen über einen größeren Temperaturbereich ohne Bildung von Nebenprodukten (nicht gezeigt, 51,5 bis 68,5°C). Im Routineexperiment der CaMV35S-PCR mit AmpliTaq Gold betrug T_{Anneal} 54°C. Die Abwesenheit von Nebenprodukten dieser Routine-*hot start*-PCRs ist in dieser Arbeit in einer Vielzahl von Experimenten zu sehen (z. B. Abb. 32A). AmpliTaq Gold wurde daher für alle kompetitiven PCRs gewählt.

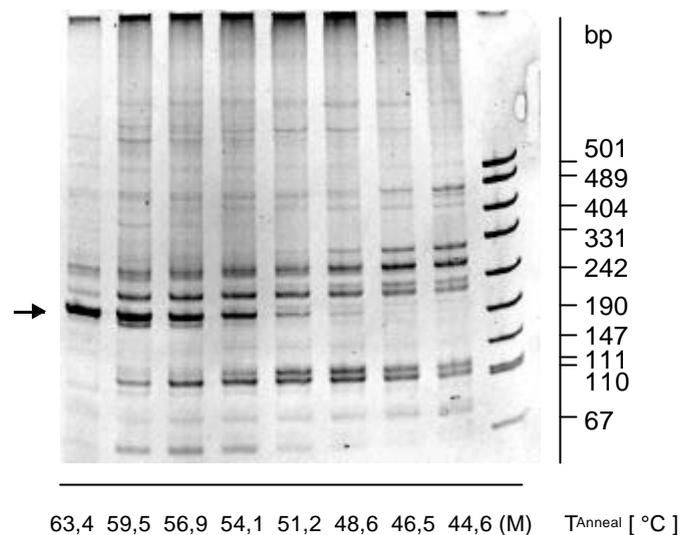


Abb. 17 Spezifität einer PCR mit *Taq*-Polymerase ohne *hot start* Bedingungen

Die CaMV35S-PCR (Primer 35S3-bio/35S2) wurde mit unmodifizierter *Taq*-Polymerase (Biotherm, GeneCraft) und 125 ng DNA aus 2 % RR-Mehl (CTAB II-Extraktionsprotokoll) parallel mit variierten Primer Hybridisierungstemperaturen (T_{Anneal}) durchgeführt (Gradiententhermoblock). PCR-Programm: Initiale Denaturierung 94°C / 3 min; 35 Zyklen 95°C / 30 s, T_{Anneal} / 30 s, 72°C / 45 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Die Reaktionsansätze wurden mittels PAGE und Ethidiumbromidfärbung analysiert. Der Pfeil markiert das erwartete, 191 bp große Produkt; M, pUC19 DNA-Marker.

Die Nachweisgrenze für Sequenzen aus Sojabohnen nach einer CaMV35S-, RR- und GM0304-PCR lag bei circa 10 - 50 pg genomischer DNA, wenn 35 PCR-Zyklen durchlaufen wurden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der GVO-Sequenzen (CaMV35S-, RR-PCR) wurde mit 10 bis 150 ng Gesamt-DNA pro Ansatz durchgeführt, die Quantifizierung der Pflanzenart-typischen Soja-Sequenzen (GM-PCRs) mit 1 - 5 ng durchgeführt. Die Hybridisierungstemperaturen der Primer wurden der Literatur entnommen und bedurften keiner weiteren Optimierung. Die verwendeten PCR-Programme weisen Zyklenzahlen von 30 bis 50 auf. Bei höheren Zyklenzahlen tritt die Produktbildung in die Plateauphase ein und maximiert die Ausbeute. Zudem werden auf diese Weise selbst schwache Kontaminationen der Blind-Proben deutlich positiv und warnen vor falsch positiven Ergebnissen.

6.2.4 Qualitatives CaMV35S-Screening mit PCR-ELISA Auswertung

In der vorausgehenden Diplomarbeit [70] wurde ein PCR-ELISA zur Analyse der PCR-Produkte nach CaMV35S-PCR (Primerpaar 35S3-bio/35S2, Sonde RR-T-Dig) entwickelt. Ziel war die Sequenz des konstitutiven Promotors des Blumenkohlmosaik Virus (*cauliflower mosaic virus*) im Extrakt einer Probe. Dieser Promotor wurde in vielen transgenen Pflanzen verwendet und kann daher zu *Screening*-Analysen dienen. Er liefert somit einen allgemeinen Hinweis auf GVOs, die, wie die Roundup Ready Sojabohne, diese Sequenz enthalten.

In der Entwicklungsphase des PCR-ELISA standen noch keine zertifizierten Sojabohnen-Mehle kommerziell zur Verfügung. Alle Versuche konnten lediglich mit DNA aus ganzen Bohnen als Probe durchgeführt werden, diese repräsentierten nur die beiden Extremfälle, GVO-positive und GVO-negative Proben. Nach Abschluss der Diplomarbeit wurden, vor der Markteinführung durch die Firma Fluka, zertifizierte Mehle mit bestimmten RR-Gehalten durch die Teilnahme an einem EU-weiten Ringversuch verfügbar. Ziel dieses EU-Ringversuches

war der qualitative Nachweis des CaMV35S-Promotors und des NOS-Terminators. Es handelte sich bei den Proben um 16 Mehle mit zuerst unbekanntem Gehalten von 0, 0,1, 0,5 und 2 % Roundup Ready Soja (RR) in Wildtyp-Soja (Test-Proben). Die Gehalte wurden nach Ringversuchsende vom Ausrichter (M. Lipp, IRMM Ispra) offengelegt. Sie repräsentieren die für die DNA-Spurenanalytik relevanten Konzentrationen im Bereich des gesetzlich festgelegten Schwellenwertes.

Die Ausführung der beiden folgenden, unabhängigen Versuche entspricht dem Vorgehen bei einer Durchmusterung nach potenziell GVO-haltigen Proben. Aus 2 Referenzmehlen (0 und 2 % RR) und 16 Test-Proben, ebenfalls Mehle, wurde DNA nach der Extraktionsmethode Wizzard I isoliert (unabhängige Extraktionen A und B). Im Versuch A wurden die DNA-Extrakte unverdünnt, im Versuch B 1:10 verdünnt als Templat in CaMV35S-PCRs mit unterschiedlichen Zyklenzahlen eingesetzt. Die Produkte der PCRs wurden mittels PCR-ELISA durch Hybridisierung mit der Sonde RR-T-Dig analysiert (Abb. 18).

PCR-ELISA mit Probenpuffer allein ergibt das Hintergrundsignal. Soja-Mehle mit bekanntem RR-Gehalt dienten als Kontrollen. Sie ergaben für die 0 % RR-Probe Signale, die gleich dem PCR-ELISA Hintergrundsignal waren und für die 2 %-Referenzprobe deutlich höhere Signale. Die absolute Signalhöhe hängt von der Dauer der Farbreaktion ab und ist somit variabel. Entscheidend für die Interpretation sind das Überschreiten des Hintergrundsignals und die Signalintensität in Relation zur positiven Kontrollprobe. Eine PCR ohne Zugabe von DNA wurde als Reagenzienkontrolle durchgeführt und ebenfalls im PCR-ELISA analysiert. Sie zeigen bei beiden Versuchen, dass keine Kontamination der PCR-Reagenzien vorlag.

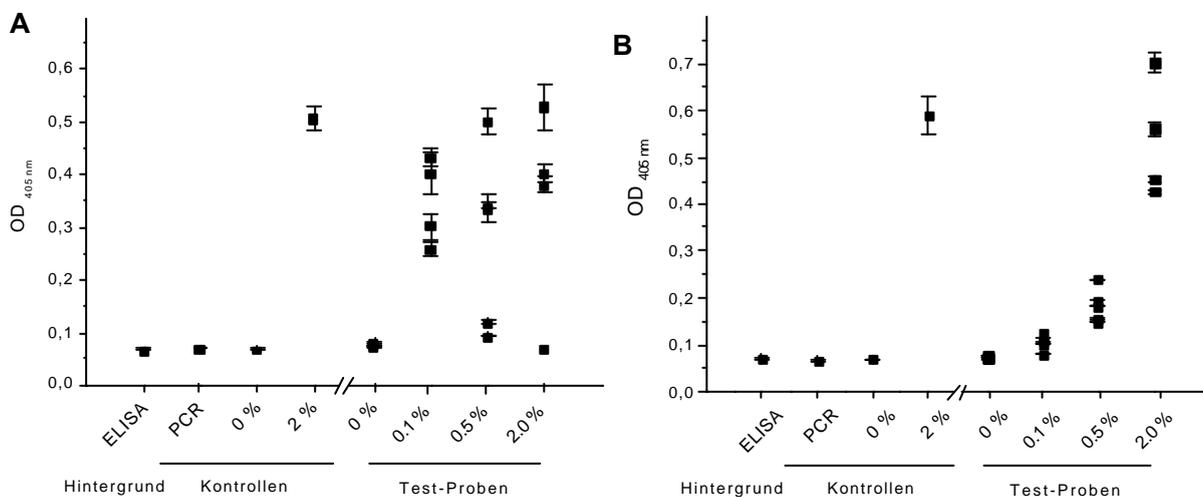


Abb. 18 Qualitative Analyse der Sojaproben mit CaMV35S-PCR und PCR-ELISA

PCR-Produkte zweier Reihen von Soja-DNA-Extrakten (A und B) wurden mit dem PCR-ELISA analysiert. Von bekannten und Test-Proben (Sojamehl) mit unterschiedlichen RR-Gehalten wurde DNA isoliert (Wizzard I-Methode) und in der CaMV35S-PCR als Templat eingesetzt. Die PCRs wurden unterschiedlich ausgeführt (A, 1 µl Templat, 40 Zyklen; B, 0,1 µl Templat, 30 Zyklen). PCR-Programm: initiale Denaturierung 95°C / 10 min; n Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 90 s; finale Elongation 72°C / 5 min. ELISA-Hintergrund, Applikation von Puffer statt eines PCR-Ansatzes; Kontrollen: PCR, Reagenzien-Kontroll PCR ohne DNA-Zugabe; 0 und 2 %, bekannte Proben; Test-Proben: 0 % (N = 3); 0,1 % (N = 4); 0,5 % (N = 5); 2 % (N = 4).

In beiden Versuchen A und B unterschied sich das Signal der negativen Proben (0 % RR, es ist keine CaMV35S-Promotor Sequenz vorhanden) nicht signifikant von demjenigen der 0 %-

Kontrolle, der PCR-Reagenzienkontrolle und dem PCR-ELISA-Hintergrundsignal. Die GVO-negativen Test-Proben wurden somit in beiden Analysen korrekt identifiziert. Von den GVO-positiven Test-Proben wies eine Probe (2 % RR, Abb. 18A) ein durch Inhibition bedingtes, falsch-negatives Resultat auf. Außerdem zeigten zwei 0,5 %-RR Proben des Versuchs A ebenfalls ein sehr geringes Signal. Diese beiden Proben wurden jedoch korrekt als positiv gewertet, da ihre Signale signifikant über den Signalen der Negativ-Kontrollen und der Hintergrundsignale liegen. Im Fall des Versuchs B liegen die Signale aller RR-haltigen Proben signifikant oberhalb des Mittelwertes aller RR-freien Proben (Students t-Test).

Im Versuch A zeigte sich ein unregelmäßiger Verlauf bei Auftragung der Signalintensitäten der Test-Proben gegen die vorliegenden RR-Gehalte, während die Signalhöhe im Versuch B mit dem RR-Gehalt korrelierte. In Versuch B war daher eine Abschätzung des Gehaltes einer Test-Probe innerhalb einer Gruppe gleich behandelter Proben möglich. Durch die geschickte Wahl von Zyklenzahl (30 oder 40) und Templat-Menge (0,1 oder 1 μ l) kann die unterschiedlich vorangeschrittene Vervielfältigung von DNA aus Proben mit verschiedenem RR-Gehalt im dynamischen Bereich des PCR-ELISAs abgebildet werden. Die PCR muss sich dazu noch im exponentiellen Bereich befinden. Diese Abstimmung ist ein iterativer Prozess. Da die in jedem PCR-Ansatz eingesetzte Templat-Menge, wie bei qualitativen Verfahren üblich, nicht kontrolliert wird, streut sie, so dass quantitative Aussagen nur begrenzt möglich sind. Im Versuch A wurde die PCR, sofern sie nicht inhibiert ist, durch viele Zyklen und eine große Templat-Menge bis in die Plateauphase geführt. Die gebildete Menge ist hier für alle GVO-positiven Proben nahezu unabhängig von dem RR-Gehalt, so dass lediglich eine Ja/Nein-Aussage möglich ist.

Zwei mögliche Gründe für die PCR-Inhibition in Versuch A (zwei 0,5 %, eine 2 % RR-haltige Probe) können erwogen werden. Die eingesetzte DNA-Menge lag nach Schätzung auf Grund der UV-Absorption bei 260 nm im Bereich von 0,4 bis 1,2 μ g pro PCR. Dies ist in einigen Fällen mehr als die vom Polymerase-Anbieter empfohlenen DNA-Menge pro PCR (0,5 μ g). Die wahrscheinlichere Ursache sind jedoch aus dem Probenmaterial stammende Inhibitoren, die bei der DNA-Extraktion unzureichend entfernt worden sind. Eine gängige Methode, die Wirkung von PCR-Inhibitoren herabzusetzen, ist die Verdünnung der betreffenden Lösung, wie in Versuch B geschehen. Bei den zwei 0,5 % RR-haltigen Proben des A-Versuchs mit geringen Signalhöhen ist die Produktbildung reduziert, aber nicht vollständig unterdrückt. Bei der falsch-negativen 2 % RR-Probe ist die Produktbildung ganz verhindert worden. Im Gegensatz zu allen anderen Extrakten der A-Versuchsreihe ließ sich aus der extrahierten DNA der falsch-negativen 2 %-RR-Probe in einer Soja spezifischen Kontroll-PCR (GM0304-PCR, nicht gezeigt) das erwartete Fragment ebenfalls nicht amplifizieren, eine Indiz, das die angenommene Inhibition untermauert.

In der durchgeführten Form erlaubt der PCR-ELISA qualitative Ja/Nein-Aussagen für die Anwesenheit des CaMV35S-Promotors in Proben. Quantitative Aussagen, wie die über eine untere Nachweisgrenze (Abb. 18B, $\leq 0,1$ % RR), sind nur unter ganz bestimmten Bedingungen möglich. Das Auftreten von Inhibition macht deutlich, dass der Einsatz einer einzigen, rein qualitativen PCR nicht ausreichend ist, um eine fehlerfreie Detektion sicher zu stellen. Die Durchführung einer Inhibitionskontrolle und einer Amplifikationskontrolle mit Hilfe einer weiteren Pflanzenart-typischen PCR ist daher unerlässlich.

6.2.5 Konstruktion der Kompetitoren für die PCR

Das Ziel der CaMV35S-PCR (Primer 35S3-bio/35S2, Target-Amplikon 191 bp) ist die Durchmusterung von Proben nach dem CaMV35S Promotor. Die Soja-Lektin-PCR mit den Primern GM03/GM04-bio (Target-Amplikon 118 bp) erlaubt die Pflanzenart Soja mit Hilfe des in einfacher Kopie im Genom von Wildtyp- und transgener Soja (RR) vorhandenen Lektin-Gens nachzuweisen. Als Target wird in dieser Arbeit diejenige Sequenz eines Organismus bezeichnet, deren Existenz durch PCR nachgewiesen werden soll.

Bei der Konstruktion geeigneter Kompetitoren sind zwei Aspekte, das Verhalten bei kompetitiver Amplifikation und die Hybridisierungseigenschaften bei der beabsichtigten Detektion im PCR-ELISA, zu beachten. Die durch das nachzuweisende genetische Element in der PCR-Analyse vorgegebenen Target- und die zu konstruierenden Kompetitor-Sequenzen sollen für den enzymatischen Prozess der PCR ununterscheidbar sein, also eine gleichwertige Konkurrenz um Polymerase, Primer und andere limitierende Komponenten eingehen. Die Konstruktion der Kompetitoren war zunächst auf kleine PCR-Produkte (191/118 bp) ausgerichtet, sie erfüllen folgende Kriterien:

Die Primerbindungsstellen und deren 3'-Umgebung wurden wie in der gegebenen Target-Sequenz in der Kompetitorsequenz beibehalten. Auch die Basenabfolge im Bereich zwischen den Primerbindungsstellen wurde weitestgehend erhalten, so dass ein homologer Kompetitor entstand. Target und Kompetitor sollten jedoch Hybridisierungsstellen für unterschiedliche Sonden mit möglichst gleichen Hybridisierungscharakteristika aufweisen, um die getrennte Quantifizierung der Amplikons durch Hybridisierung im PCR-ELISA zu ermöglichen. Durch eine geringe Längendifferenz der Target- und Kompetitor-Amplikons sollte zusätzlich die Unterscheidung in der PAGE ermöglichen. Target und Kompetitor sollten sich weiterhin durch enzymatische Restriktion unterscheiden lassen.

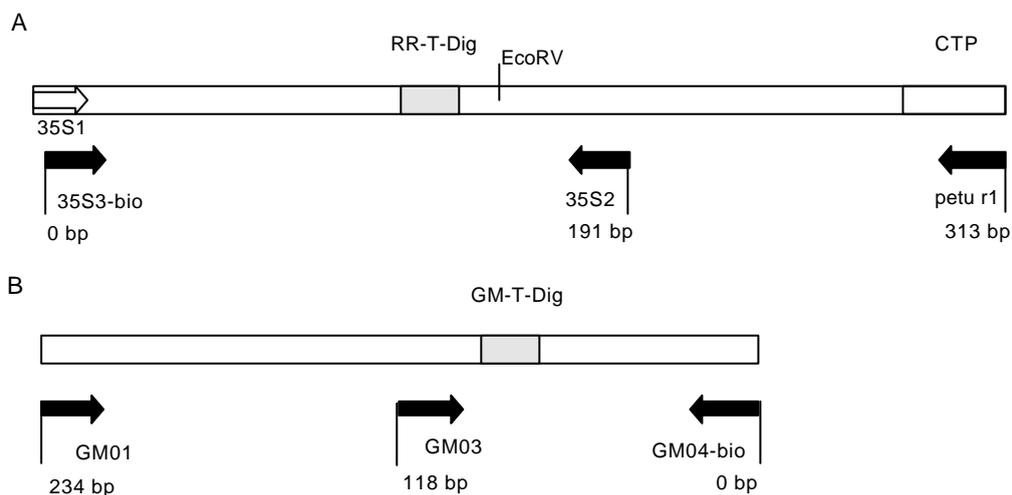


Abb. 19 Ausschnitte des Genoms der RR-Bohne

Lage von Primern (Pfeile), Sondenbindungsstellen (grau) und Restriktionsschnittstellen. A, Sequenz des Roundup Ready Konstruktes, Kombination aus GenBank Eintragung V00141, CaM-Virus 35S Promoter Region, und dem bei Studer *et al.* [94] beschriebenen Sequenzübergang zum chloroplastidären Transitpeptid (CTP) aus Petunie. Primer 35S1 liegt 4 nt in 5'-Richtung vor dem Primer 35S3-bio. B, Soja Lektin-Gen Sequenz (GenBank K00821). Die Sequenzen sind maßstabsgetreu in 5'→3' Richtung skizziert, die Basenpaarzahl der im PCR-ELISA genutzten Amplikons sind, ausgehend vom biotinylierten Primer, eingezeichnet.

Nach Festlegung obiger Kriterien und Klonierung der ersten Kompetitoren wurden im Verlauf der Arbeit zusätzlich größere PCR-Produkte mit je einem neuen und einem beibehaltenen Primer erzeugt. In der RR-PCR wurde die gentechnisch veränderte RR-Bohne spezifisch mit den Primern 35S3-bio und petu-r1 (Target-Amplikon, 313 bp) nachgewiesen. Die Abfolge der beiden genetischen Elemente CaMV35S-Promotor und chloroplastidäres Transitpeptid aus Petunie ist charakteristisch für diese transgene Soja-Linie. Die Primerkombination GM01/GM04-bio in der Soja-Lektin-PCR führt zu einem 234 bp großen Target-Amplikon und dient, wie die GM0304-PCR, dem Nachweis der Pflanzenart. Die Lage der Restriktionschnittstellen, Sonden und hinzugekommenen Primer sind ebenfalls in Abb. 19 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Target spezifischen Sonden RR-T-Dig und GM-T-Dig auch die größeren PCR-Produkte detektieren.

Die Längendifferenz von Target- und Kompetitor-Amplikon sollte möglichst gering sein, um der Bevorzugung des kleineren Amplikons in der PCR vorzubeugen. Sie wurde auf Grund des Trennvermögens der PAGE bei 200 bp auf circa 15 % der Target-Amplikon Länge festgelegt. Da den Nukleotiden, die bei der Elongation den Primern zuerst angefügt werden, ein größerer Einfluss auf die PCR-Effizienz zugeschrieben wurden, erfolgten die Deletionen erst 8 nt (RR-Kompetitor) bzw 4 nt (GM-Kompetitor) vom 3'-Ende der Primer entfernt.

Für die Erzeugung von Hybridisierungsstellen für die Sonden in den Kompetitorsequenzen wurde jeweils eine Zufallssequenz durch ein willkürliches „Proteinwort“ generiert, bestehend aus Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code (RR-System: MELANIE; GM-System: WALDFEE). Diese „Proteinworte“ wurden in die möglichen Kombinationen auf Nukleinsäureebene rückübersetzt und als Kandidaten-Sequenzen anhand des Programms Primer3 überprüft. Die entworfenen Sonden wurden wie PCR-Primer betrachtet und konnten als solche auch erfolgreich eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt). Die korrespondierenden Target- und Kompetitor-Sonden mussten als wichtigstes Kriterium den gleichen Schmelzpunkt und GC-Gehalt aufweisen. Weiterhin wurde für die Target- und Kompetitor-Sonde verlangt, dass der vom Programm Primer3 berechnete Parameter für die Selbsthybridisierung, also für die Bildung einer Haarnadelstruktur in Oligonukleotiden durch interne Komplementarität oder die Aneinanderlagerung zweier Oligonukleotide, den gleichen Wert annehmen und möglichst gering ausfallen soll.

Die Lage der RR-T Sonde war in vorausgehenden Arbeiten [70] nach gleichen Kriterien festgelegt worden. Die Lage der Target-Sonde innerhalb des GM0304-Amplikons (118 bp) wurde ebenfalls mit dem Programm Primer3 bestimmt. In einer Bestätigungsreaktion darf die Hybridisierungsstelle einer Sonde nicht mit den Primerbindungsstellen überlappen, so dass hier nur 72 bp frei verfügbar waren. Die Hybridisierungsstelle wurde möglichst weit entfernt von dem biotinylierten Primer GM04-bio, der im PCR-ELISA zur Fixierung des Einzelstranges an der Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte dient, positioniert. Es wurde vermutet, dass eine größere Entfernung zur festen Phase, durch eine damit erzielte bessere Zugänglichkeit, die Hybridisierung positiv beeinflusst. Im Design der RR-Kompetitorsequenz fällt eine *EcoRV*-Schnittstelle durch Deletion weg. Im Gegenzug sollte im GM-Kompetitor eine neu eingeführte *SmaI*-Restriktionsstelle zur Identifizierung von PCR-Produkten oder nach Klonierung dienen.

Abschließend wurden potenzielle Wechselwirkungen von Kompetitor-Sonde mit Target-Sequenz und umgekehrt, mit dem Programm GAP, das durch Sequenzvergleich (*Alignment*)

die jeweils größte Übereinstimmung zweier Sequenzen liefert, für alle Kombinationen gesucht. So sollte sichergestellt werden, dass keine bereits zufällig in dem Target vorhandene Sequenz als Hybridisierungsstelle mit der Kompetitor-Sonde gewählt wurde. Diese Vorgehensweise gibt Auskunft darüber, welche maximale Fehlhybridisierung bei einer Paarung von Amplikon und der nicht passenden Sonde auftreten kann (*worst case*). Maximal wurden 4 bis 5 aufeinanderfolgende Übereinstimmungen, begleitet von doppelten und einzelnen Basenpaarungen im Alignment gefunden (Abb. 20). Die potenziellen Wechselwirkungen aller Sonden lagen ausschließlich in solchen Sequenzbereichen vor, die nicht Sondenbereichen entsprechen. Die entworfene Kompetitor-Sonde und die nicht korrespondierende Target-Sequenz (A, C) des gleichen PCR-Systems zeigten jeweils eine geringere Anzahl positiver Übereinstimmungen im Alignment, als die korrespondierende Target-Sonde (B, D).

A	51	GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCAT	CaMV35S-Target Sequenz
	100		
			10 WW, $T_m^* = 24,6^\circ\text{C}$
	20tggagcttgctaacatcgaa.....	RR-K-Dig, Kompetitor-Sonde (rk)
	1		
B	-4	<u>GGCACTACAAATGCCATCATTGCGATAAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGAT</u>	CaMV35S-Kompetitor Sequenz
	46		
			11 WW, $T_m^* = 28,9^\circ\text{C}$
	20caaccacgtcttcaaagcaa.....	RR-T-Dig, Target-Sonde (rk)
	1		
C	67	GCCAGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCACCTTCTATGCCCTGAC <u>CACAAA</u>	GM0304-Target Sequenz
	18		
			11 WW, $T_m^* = 32,7^\circ\text{C}$
	1accgggatctgaaacttct.....	GM-K-Dig Sonde
	20		
D	49	TCCTTCAACTTCACCTTCTATGCCCTGAC <u>CACAAAAGGCTTGCAGATGG</u>	GM0304-Kompetitor Sequenz
	1		
			12 WW, $T_m^* = 35,4^\circ\text{C}$
	1tgggacaaagaaaccggtag....	GM-T-Dig, Target-Sonde
	20		

Abb. 20 Potenzielle Fehlpaarungen der Sonde mit dem Amplikon

Alignment (Programm GAP) von Target- und Kompetitor-Sequenzen mit der nicht verwandten Sonde. Die CaMV35S-Sequenzen entsprechen Produkten einer PCR mit den Primern 35S1/35S2 (195 bp); bei den GM-Sequenzen mit den Primern GM03/GM04-bio (118 bp). In B ist die Lage des Primers 35S3-bio und in C und D die Lage des Primers GM04-bio unterstrichen. Abhängig vom 5'→3' dargestellten Strang sind die Sonden teilweise revers komplementär notiert (rk). Die Anzahl der positiven Wechselwirkungen (WW, vertikale Striche) ist notiert. T_m^* , maximale Hybridisierungstemperatur der WW nach Gleichung 2 (siehe Text).

Die gefundenen Sequenzidentitäten (Abb. 20) sind sporadisch innerhalb der Sonde verteilt, daher ist die Berechnung von Schmelzpunkten als Anhaltspunkt für die Stabilität einer angenommenen partiellen Hybridisierung nicht trivial. Wertet man alle positiven Wechselwirkungen der potenziellen Fehlpaarungen der Sonden so, als bildeten sie eine ununter-

brochene Folge, werden nach Gleichung 2 [116], die angegebenen Temperaturen (T_m^*) erhalten.

$$\text{Gleichung 2 } T_m^* = 81,5 + 16,6(\log_{10}([\text{Ion}^+])) + 0,41 \times (\%GC) - 600/\text{bp-Länge}$$

Die Waschschr itte im Hybridisierungs-ELISA werden mit PBS ($c(\text{Na}^+) = 0,142 \text{ M}$, $c(\text{K}^+) = 0,008 \text{ M}$) durchgeführt, so dass die Konzentration an monovalenten Ionen $0,150 \text{ M}$ betrug. Statt der Länge eines Oligonukleotids wurde die Anzahl der positiven Wechselwirkungen eingesetzt. Die vereinfachende Berechnung kann nur als Abschätzung dienen. Die Schmelztemperaturen liegen maximal bei $35,4^\circ\text{C}$, daher weisen die Fehlpaarungen der Sonden vermutlich keine ausgeprägte Stabilität auf.

6.2.5.1 CaMV35S-Kompetitor

Der DNA-Abschnitt, der in der CaMV35S-Screening PCR amplifiziert wird und die Target-Sequenz darstellt, wurde zuerst kloniert, sequenziert und diente als Grundlage für die gerichtete PCR-Mutagenese. Mit Hilfe der *looped-oligo*-Methode wurde das Kompetitor-Plasmid pCR 35SK erzeugt.

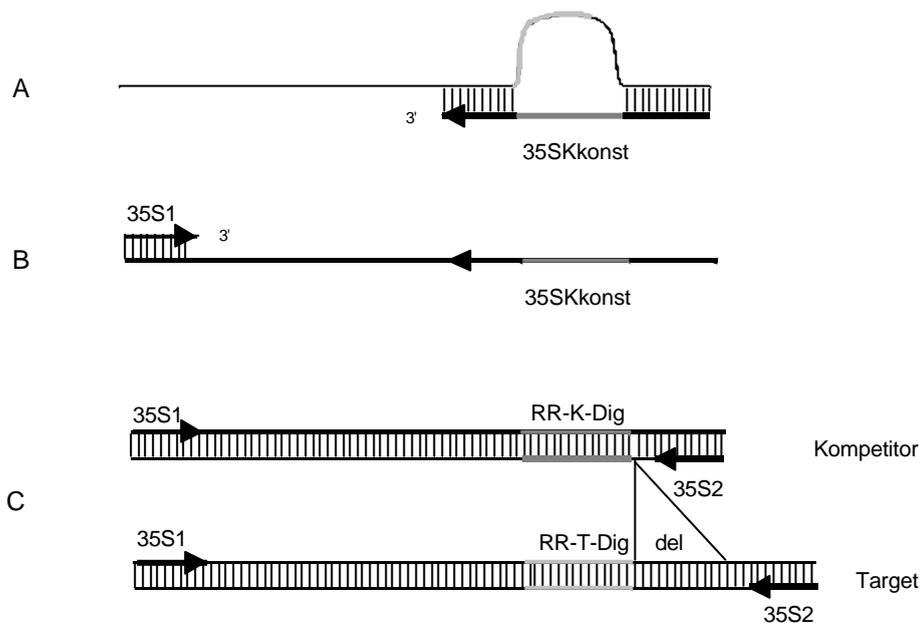


Abb. 21 PCR-Mutagenese durch *looped oligo*-PCR

Das Oligonukleotid 35SKkonst (68 nt) hybridisiert partiell an die Matrizen DNA (CaMV35S-Promotor, Target-Sequenz), die dazu eine Schleife (*loop*) ausbildet, und kann in der PCR elongiert werden (A). Neu entstandene DNA-Stränge mit der durch den Konstruktionsprimer vorgegebenen Sequenz dienen in weiteren PCR-Zyklen als Matrizen (B, Elongation von Primer 35S1) und werden exponentiell vermehrt; die Menge der ursprünglich als Matrize dienenden Target-Sequenz wächst nur linear. Das Hauptprodukt der PCR (Kompetitor Amplikon, 168 bp) ist kürzer als das entsprechende Produkt der Target-Sequenz (195 bp). Bei dem Vergleich der beiden PCR-Produkte (C) ist der Primer 35S2 eingezeichnet, der in der kompetitiven PCR genutzt wird und die gleiche Sequenz wie der 5'-Bereich des 35SKkonst aufweist. Die neu eingeführte Sequenz (dunkel grau, 20 nt) dient der Sonde RR-K-Dig im PCR-ELISA als Hybridisierungsstelle. Der Hybridisierungsstelle der Target-Sequenz (Sonde RR-T-Dig, hellgrau) folgt ein Bereich (27 bp, del), der deletiert wurde und eine *Eco* RV-Schnittstelle enthielt.

DNA aus RR-Bohnen wurde isoliert und mit den Primern 35S1 und 35S2 einer PCR unterzogen. Das PCR-Produkt (195 bp) wurde in den pGEM T-Easy Vektor ligiert. Nach

Transformation wurde Plasmid-DNA eines Klon, der sowohl positiv in der Blau/Weiß-Durchmusterung als auch in der Restriktionsanalyse war, sequenziert. Das Plasmid pGEM 35ST wies die gewünschte, der GenBank Eintragung V00141 (*cauliflower mosaic virus, complete sequence*) entsprechende Sequenz auf.

Zur PCR-Mutagenese wurde das Plasmid pGEM 35ST als Matrize in einer PCR mit dem 68 nt langen Konstruktionsprimer 35SKkonst und dem zuvor verwendeten Primer 35S1 eingesetzt. Die Produkte dieser *looped oligo*-PCR (Abb. 21), die glatte Enden aufwiesen, wurden durch präparative Agarosegel-Elektrophorese isoliert und in den pCR-Skript (Amp)-Vektor ligiert. Eine *EcoRV*-Restriktionsstelle (Abb. 19A, Seite 64) der Targetsequenz wurde gezielt deletiert, so dass dieser Unterschied zur leichten Identifizierung des Kompetitors dienen konnte. Plasmid-DNA eines Klonen (pCR 35SK, sequenziert), die die gewünschte Mutation aufwies, wurde als Kompetitor ausgewählt.

Die CaMV35S-Promotor Target-Sequenz und die Sequenz des konstruierten Kompetitors beinhalten die gleichen Bindungsstellen für den Primer 35S1 und den um 4 Nukleotide in 3'-Richtung verschobenen Primer 35S3-bio, sowie für den auf dem Gegenstrang bindenden Primer 35S2. Die Sequenz direkt vor den Primerbindungsstelle 35S2 blieb unverändert. Acht Nukleotide abwärts (3'-Richtung) des Primers 35S2 wurden 27 nt deletiert und 20 nt mutiert. So weisen die Produkte, bei 86 % Sequenzidentität unterschiedliche Größen und Sonden-Hybridisierungsstellen auf.

6.2.5.2 Roundup Ready Kompetitor

Die gentechnische Veränderung innerhalb des RR-Genoms schließt dem CaMV35S Promotor eine Sequenz für ein chloroplastidäres Transitpeptid aus Petunie an (Abb. 6, Seite 21). Durch Ausdehnung des zuvor klonierten CaMV35S-Kompetitors (Abschnitt 6.2.5.1) über die Grenze der beiden genetischen Elemente hinaus entstand ein Kompetitor, der in der RR-spezifischen PCR (Primer 35S3-bio/petu-r1, Abb. 19B, Seite 64) eingesetzt werden kann.

Die Konstruktion, als Erweiterung des CaMV35S-Kompetitors, erfolgte mittels *overlap*-PCR (Abb. 22). Dazu wurden separat zwei Amplikons, A und B erzeugt. In der ersten PCR mit den Primern 35S1, 35S2 und dem Plasmid pCR 35SK als Matrize entstand das 168 bp große Kompetitor-Amplikon (A). Mit den Primern p35S-f2 und petu-r1 entstand bei Zugabe der RR-DNA als Matrize in der zweiten PCR ein 171 bp großes Amplikon (B), das den Übergang von Promotor zum Transitpeptid beinhaltet. Zur *overlap*-PCR wurden gleiche Teile Amplikon A und B gemischt und mit Pfx-Polymerase ohne Zugabe von Primern einer PCR unterzogen. Dabei kann der 3'-Terminus des Kompetitor-Amplikonstranges (A), der den Primer 35S1 enthält, auf die gewünschte Länge (290 nt) verlängert werden, da er intern mit 28 nt des B-Fragment hybridisiert. Im Gegensatz dazu wird keiner der B-Fragment-Stränge verlängert, da aufgrund der Mutation und Deletion in der RR-Sequenz der 3' Terminus des B-Stranges, der den Primer petu-r1 enthält, ohne Hybridisierungs- und damit Elongationsmöglichkeit bleibt. Um ein klonierbares, doppelsträngiges DNA-Fragment zu erhalten, wurden eine *border*-PCR mit den Außenprimern 35S1 und petu-r1 durchgeführt. Zum bestehenden *overlap*-PCR-Ansatz wurden dazu die Primer 35S1/petu-r1, sowie zusätzlicher Puffer und dNTPs zugefügt.

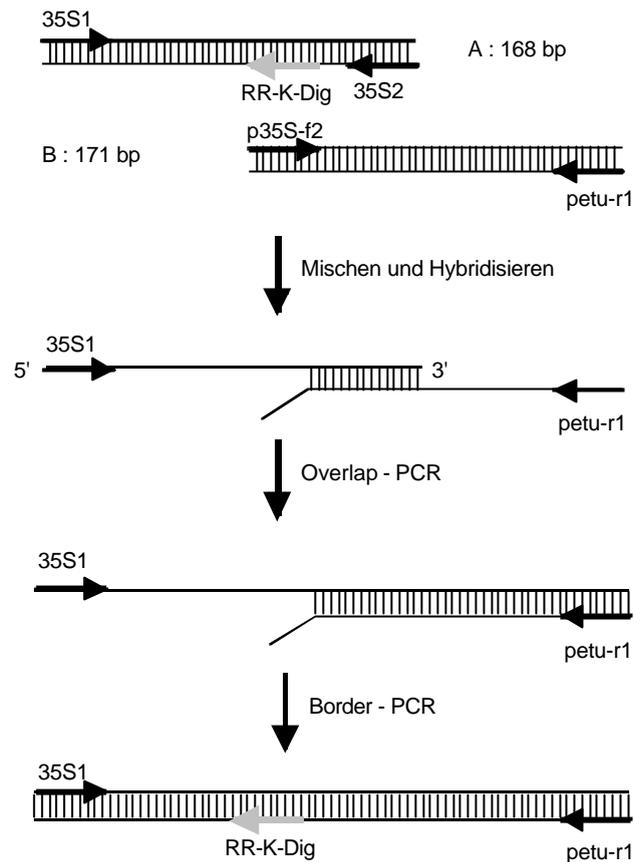


Abb. 22 Konstruktion des RR-Kompetitors mit Hilfe von *Overlap*-PCR

Ausgangsbasis sind ein PCR-Produkt des CaMV35S-Kompetitors (Fragment A, Primer 35S1/35S2) und der Roundup Ready Sojabohne (Fragment B, Primer p35s-f2/petu-r1), Primer sind als schwarze Pfeile eingezeichnet, die Sequenz der Kompetitor Sonde RR-K-Dig (grau) bleibt erhalten.

In einer parallelen Kontroll-PCR mit RR-DNA und den Primern 35S1/petu-r1 wurde das Target-Produkt (317 bp) erhalten. Das Produkt der *overlap*-PCR zeigte im Vergleich dazu, wie erwartet, in einem PAGE-Gel eine Hauptbande für den Kompetitor bei geringerer Größe (290 bp). Beide Produkte wurden jeweils in den pCR Skript(Cam)-Vektor ligiert und *E. coli* mit dieser DNA transformiert. Nach Blau/Weiß-Durchmusterung und Restriktionsanalyse wurden die Kompetitor- (pCR RRK) und die Target-Plasmid-DNA (pCR RRT) positiver Klone sequenziert. Sie zeigten jeweils die erwartete, mutierte oder Wildtyp-Sequenz beginnend mit der Primersequenz 35S1 bis zu dem Primer petu-r1.

6.2.5.3 Soja Lektin-Gen Kompetitor

Ein Teil der DNA-Sequenz des Soja Lektin-Gens (Le1, GenBank Eintragung: K00821) wurde kloniert, sequenziert und diente in einer *overlap*-PCR als Matrize für eine gerichtete PCR-Mutagenese, die zum GM-Kompetitor führte. Die Namensgebung beruht auf dem Organismus Namen (*glycine max*); das Lektin-Gen kommt im Soja Genom in einfacher Kopie vor. Da andere Organismen keine gleichartigen Sequenzen aufweisen ist dieses Gen zur Identifizierung der Pflanzenart geeignet.

Aus Soja DNA wurde mit den Primern GM01, GM-Z in einer PCR ein Amplikon (783 bp) mit der Target-Sequenz erzeugt und in den pCR Skript(Amp) Vektor ligiert. Die Plasmid-DNA

eines nach Blau/Weiß-Durchmusterung und Restriktionsanalyse positiven Klonen wurde isoliert. Die Sequenzierung des Plasmids pCR GMT (436 bp des Inserts) erfasste den für spätere, analytische PCRs (Primer GM01 bis GM04, Abb. 19, Seite 64) interessierenden Bereich, der die literaturbeschriebene Sequenz korrekt aufwies. Der Primer GM-Z liegt 5'-Richtung hinter dem Primer GM04-bio und wurde wegen der einfacheren Gelaufreinigung großer PCR-Produkte eingesetzt.

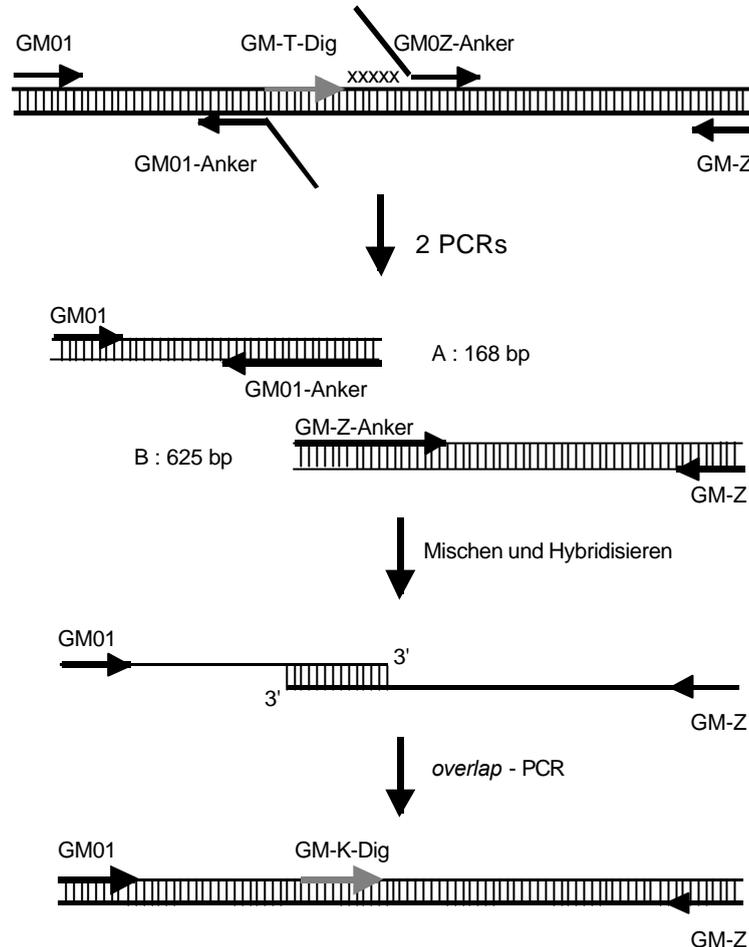


Abb. 23 Konstruktion des Soja Lektin-Gen Kompetitors

Zwei Produkte (A: Primer GM01/GM01-Anker und B: GM-Z/GM0Z- Anker) aus PCRs mit Soja DNA als Matrize werden gemischt, mit ihren 3'-Termini hybridisiert und in einer weiteren PCR (*overlap* PCR) verlängert. Schwarze Pfeile kennzeichnen die verwendeten Primer, Pfeile die Lage der Sonden GM-T-Dig (hellgrau) in der Ausgangssequenz; in der Kompetitorsequenz GM-K-Dig (dunkelgrau, enthält *Sma* I Schnittstelle).

Die Konstruktion des GM Kompetitors erfolgte ebenfalls mittels *overlap*-PCR (Abb. 23). Dazu wurden wieder separat zwei Amplikons, A und B, erzeugt. In der PCR mit *Pfu*-Polymerase und den Primern GM01/GM01-Anker sowie dem Plasmid pCR GMT als Matrize, entstand das 163 bp große Amplikon A. Unter Verwendung der Primer GM-Z und GM-Z-Anker entstand unter gleichen Bedingungen das 625 bp großes Amplikon B. Die Ankerprimer, GM01-Anker und GM-Z-Anker, binden außerhalb eines 35 bp-Sequenzbereiches mit der Sondenregion GM-T (20 nt) und weiteren 15 nt, die dadurch deletiert werden. Sie beinhalten jeweils 5'-terminal eine komplementäre Sequenz, die nicht in dem Lektin-Gen enthalten ist und die die zukünftige Sondenregion des GM-Kompetitors darstellt. Nach Isolierung beider Fragmente A und B aus

einem präparativen Agarosegel wurden sie im gleichem Verhältnis zur *overlap*-PCR mit *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Hybridisiert in der *overlap*-PCR derjenige Strang des A-Amplikons, der den GM01 Primer enthält, mit demjenigen Strang des B-Amplikons, der den Primer GM-Z enthält, kann die *Pfu*-Polymerase die Stränge am jeweiligen 3' Terminus verlängern.

Um eine ausreichende Menge doppelsträngiger DNA für eine Ligation zu erhalten, wurde eine *border*-PCR mit den Außenprimern GM01 und GM-Z durchgeführt. Neben der erwarteten Hauptbande bei (753 bp) wurden ebenfalls Produkte von falscher Größe erhalten. Durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Sma* I konnte das gewünschte Produkt identifiziert werden. Das betreffende Amplikon wurde aus einem Agarosegel eluiert und in den pCR Skript(Cam)-Vektor ligiert. Die Plasmid-DNA (pCR GMK) eines nach Blau/Weiß-Durchmusterung und Restriktionsanalyse positiven Klones wurde sequenziert. Die Sequenzierreaktion umfasste den für spätere PCRs (Primer GM01 bis GM04) relevanten Bereich (442 bp des Inserts), der die bekannte Sequenz und die eingeführten Veränderungen korrekt aufwies.

6.2.5.4 Doppelkompetitoren

Eine Kombination der Kompetitor Sequenzen für das Soja Lektin-Gen und das RR-spezifische PCR-System in einem Plasmid vereinfacht die Handhabung von Verdünnungsreihen. Solch ein Doppelkompetitor fixiert ein durch statistische Streuung unbeeinflusstes, äquimolares Verhältnis der in der PCR verfügbaren DNA-Matrizen.

Das RR-Kompetitor Plasmid (pCR RRK) wurde zu diesem Zweck mit *Hind* III linearisiert. Das 725 bp große *Hind* III-Fragment des GM-Kompetitor Plasmids (pCR GMK) wurde ungerichtet in den dephosphorylierten Vektor ligiert. Nach Isolierung von Plasmid-DNA aus 8 Klonen traten beide Orientierungen in der Restriktionsanalyse auf. Bei keinem der Klone handelte es sich um ein Religat des Vektors. Zum Einsatz in der kompetitiven PCR wurde das entstandene Plasmid pCR RRKGMK mit *Pvu* II-restringiert. Der Doppelkompetitor pCR 35SKGMK war ein experimenteller Vorläufer entstand auf gleiche Weise aus dem *Hind* III geöffneten, dephosphorylierten Plamid pCR 35SK und dem 725 bp großen *Hind* III-Fragment aus pCR GMK.

6.2.5.5 Gewinnung eines heterologen Kompetitors (Artefakt)

Ein heterologer Kompetitor enthält zwischen den Primerbindungsstellen, die er mit dem Target gemeinsam hat, intern eine andere Sequenz. Dies kann durch Einklonieren einer bekannten Sequenz über Restriktionsschnittstellen geschehen, aber auch, wie hier realisiert, durch einen Zufallsprozess in einer PCR mit geringer Stringenz.

als heterologer, also nicht sequenzverwandter, Kompetitor dienen. Seine Verwendung für diesen Zweck wird in Abschnitt 6.2.7.3 beschrieben.

6.2.6 PCR-ELISA Charakterisierung

6.2.6.1 PCR-ELISA zum Nachweis von Produkten der CaMV35S- und RR-PCRs

Bei der Konstruktion des in Abschnitt 6.2.5.1 beschriebenen CaMV35 Kompetitors wurde die Sequenz, die die Hybridisierung mit der Sonde RR-T-Dig erlaubt, entfernt und in eine Sequenz mutiert, die eine Hybridisierung mit der Sonde RR-K-Dig ermöglicht. Das ursprünglich entwickelte PCR-ELISA-Protokoll [70] wird von den Unterschieden der Amplikons nicht berührt (Anbindungszeit des Amplikons an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte, Denaturierungszeit, Inkubationszeit für die Immundetektion des Digoxigenin einer Sonde). Da die neu entworfene Kompetitor-Sonde in Länge, Basenzusammensetzung, Schmelzpunkt und Hybridisierungsparametern der bestehenden Target-Sonde gleicht (Abschnitt 6.2.5), wurde erwartet, dass sich auch die Hybridisierungseigenschaften gleichen. Dies wurde für die Inkubationsdauer und Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung überprüft.

Für die Target-Sonde wurde in vorausgehenden Arbeiten [70] eine kurze Hybridisierungszeit bis zum Erreichen eines oberen Signalniveaus festgestellt. Dieses Ergebnis wurde hier reproduziert (Abb. 25). Bereits nach circa 5 min Hybridisierung der Target-Sonde an die gebundene einzelsträngige DNA wurde das maximale Signalniveau erreicht. Das Signal für die Hybridisierung der Kompetitor-DNA und -Sonde erreichte dieses Niveau jedoch erst nach 10 min. Die zuvor für die Target-Sonde festgelegte Inkubationszeit von 5 min wurde allerdings für das generelle Protokoll, das auch für den später besprochenen Soja Lektin-Gen PCR-ELISA gilt, auf 30 min ausgedehnt.

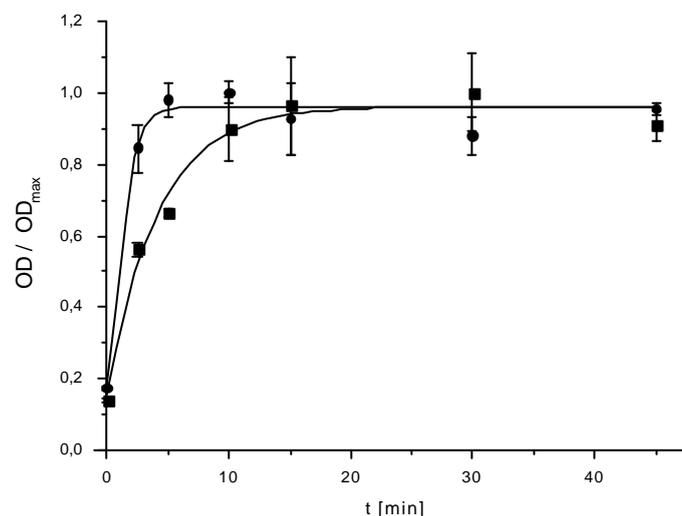


Abb. 25 Hybridisierungskinetik der Sonden RR-T-Dig und RR-K-Dig

Die Hybridisierungszeiten bei 25°C für Target- (●, 191 bp) und Kompetitor- (■, 163 bp) PCR-Produkt der CaMV35S-PCR (je 20 ± 5 ng nach Gelanalyse) mit der jeweiligen, spezifischen Sonde (RR-T-Dig oder RR-K-Dig) wurde im PCR-ELISA variiert. Aufgetragen sind die auf maximale OD normierten Mittelwerte.

Die Hybridisierung zeigte bei dem bereits etablierten CaMV35S System (Target-Amplikon, 191 bp und Sonde) keine Signaländerung bei Temperaturerhöhung. Für das Kompetitor-

Amplikon wurde jedoch bei 37°C verglichen mit Hybridisierung bei Raumtemperatur (25°C) eine deutliche Signalerhöhung deutlich (Abb. 26A). Da die Inkubationszeit zum Erreichen des Endpunktes der Hybridisierung ausreichend lang gewählt wurde, ist eine Temperatur-bedingte Verschiebung des Gleichgewichtes durch veränderte Zugänglichkeit der Hybridisierungssequenz wahrscheinlich. Der Signalzuwachs bei höheren Temperaturen war für die längeren Amplikons der RR-PCR noch deutlich erkennbar (Abb. 26B). Hier stieg das Kompetitorsignal auf etwa den doppelten Wert an, während das Targetsignal nur geringfügig stieg. Alle Hybridisierungen im PCR-ELISA mit Amplikons aus CaMV35S- und RR-PCR wurden weiterhin routinemäßig bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Konzentration von 20 pM für die Target-Sonde wurde ebenfalls für die Kompetitor-Sonde beibehalten, da in Versuchen mit kleineren (0,25-fach) oder größeren (4-fach) Mengen das gleiche Signal erhalten wurde. Die Sonde liegt somit im deutlichen Überschuss vor. Die Erwartung, dass durch die geeignete Wahl kritischer Parameter (Länge, GC-Gehalt, Hybridisierungstemperatur, Selbsthybridisierung), auch gleiches kinetisches Verhalten der Target- und Kompetitorsonde erreicht werden kann, wurde also nicht erfüllt.

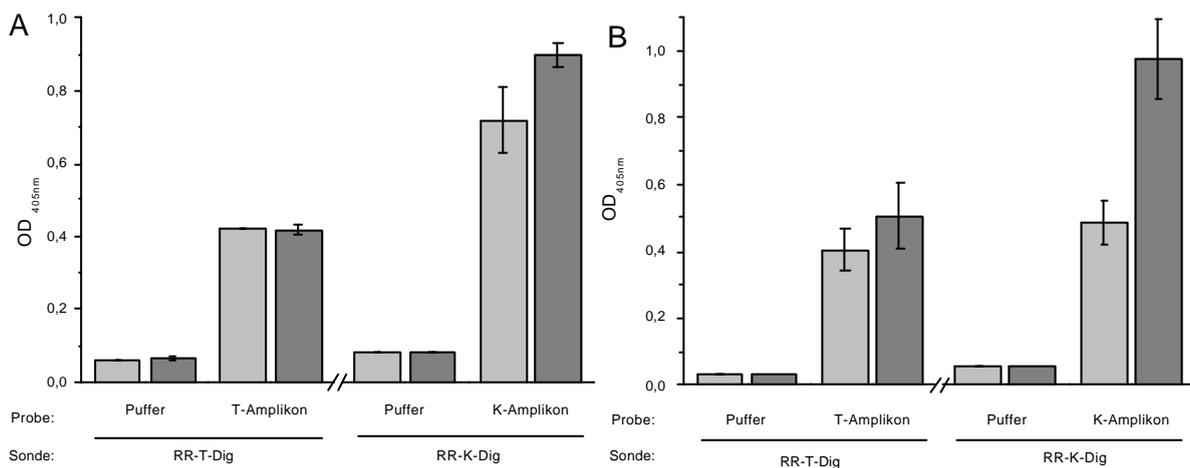


Abb. 26 Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung der RR-Sonden im PCR-ELISA

A, Target (T, 191 bp)- und Kompetitor (K, 164 bp)-Amplikon der CaMV35S-PCR (je circa 12 ± 3 ng, Primer 35S3-bio/35S2); B, Target- (T, 313 bp) und Kompetitor-Amplikon (K, 286 bp) RR-PCR; je circa 20 ± 5 ng, Primer 35S3-bio/petu-r1) wurden bei Raumtemperatur (25°C, hell) und bei 37°C (dunkel) im PCR-ELISA hybridisiert. Puffer als Probe diente zur Ermittlung des Hintergrundsignales. Die Bestimmung der Amplikonmengen erfolgte durch Gelanalyse.

Ergebnisse des PCR-ELISA für Produkte der CaMV35S- und RR-PCR sind in Abb. 27 an Hand einer kompetitiven PCR mit DNA aus RR dargestellt, die ausführlicher in Abschnitt 6.2.8 beschrieben werden. Hier soll exemplarisch Gelanalytik und PCR-ELISA für die beiden PCR-Systeme CaMV35S und RR verglichen werden. Bei der kompetitiven PCR wurde eine konstante Menge DNA-Extrakt mit einer steigenden Menge Kompetitor versetzt.

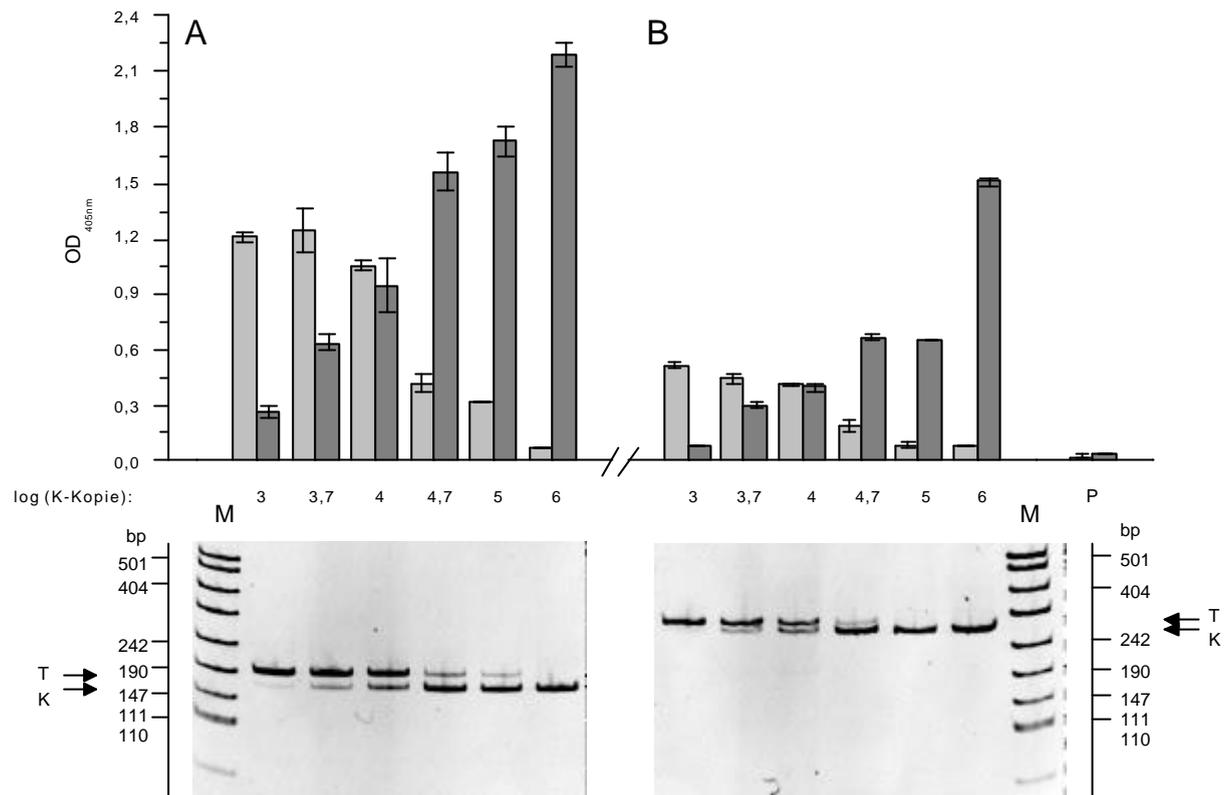


Abb. 27 Analyse der CaMV35S- und RR-PCR durch PCR-ELISA und PAGE

PCRs, die mit einer konstanten Menge RR-DNA (125 ng, nach CTAB II-Protokoll isoliert) und steigender Menge RR-Kompetitor (K, Plasmid pCR RR-K, 10^3 bis 10^6 Kopien pro PCR) durchgeführt wurden, sind parallel im PCR-ELISA (oben) und im PAGE-Gel (10 %, Ethidiumbromidfärbung, unten) analysiert worden (je 2 μ l Probenvolumen). A, CaMV35S-PCRs (Primer 35S3-bio/35S2); B, RR-PCRs (Primer 35S3-bio/petu-r1); P, Hintergrundsignal des PCR-ELISA mit Puffer als Probe; M, pUC19 DNA Marker; T, Target-Amplikon (helle Balken im ELISA); K, Kompetitor-Amplikon (dunkel). PCR-Programm: initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 35 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min.

Rein qualitativ zeigt sich im PAGE-Gel (Abb. 27, unten) die abnehmende Bandenintensitäten des Target-Amplikons (CaMV35S, 191 bp; RR, 313 bp) und die sich im Gegenzug intensivierenden Banden des Kompetitor-Amplikons (CaMV35S, 164 bp; RR, 286 bp). Der PCR-ELISA (Abb. 27, oben) wurde für beide kompetitive PCRs parallel unter Verwendung der gleichen Lösungen und Inkubationszeiten durchgeführt. Der Verlauf der Intensitäten im Gel korreliert mit den PCR-ELISA Daten. Die PCR-ELISA Signale für die Produkte der RR-PCR waren dabei jedoch deutlich niedriger, als diejenigen der CaMV35S-PCR. Die niedrigeren Signale wurden bei späteren ELISAs durch eine längerer Farbreaktion (10 min \rightarrow 60-90 min) oder höhere Probenmengen (2 μ l \rightarrow 3,5 μ l) kompensiert. Die Steigerung des Probenvolumens führte jedoch zu einer leicht erhöhten Kreuzhybridisierung.

Das Trennvermögen des Polyacrylamidgels erlaubte die Unterscheidung zweier Produkte einer kompetitiven PCR, die bei einer Gesamtlänge von circa 300 bp eine Differenz von 27 bp aufweisen. Eine Analyse im Agarosegel (z. B. 2,5 %) war nicht möglich, da Target- und Kompetitor-PCR-Produkte als eine Bande erschienen.

6.2.6.2 PCR-ELISA zum Nachweis von Produkten der Soja Lektin-Gen PCRs

Für den PCR-ELISA zur Detektion von Produkten der GM0304 und GM0104 PCR (Target- und Kompetitor-Amplikon) wurde die Anbindungszeit des Amplikons an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte, die Denaturierungszeit und die Inkubationszeit für die Immundetektion aus dem CaMV35S-PCR-ELISA übernommen. Die Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und der generelle Zeitablauf des Protokolls, mit einer Verlängerung der Hybridisierungszeit, konnte beibehalten werden.

Der Hybridisierung von Target- (GM-T-Dig) und Kompetitor-Sonde (GM-K-Dig) mit der jeweiligen korrekten Sequenz kommt, als zentraler Schritt des PCR-ELISAs, die größte Bedeutung zu. Beide GM-Sonden wurden unter theoretischen Gesichtspunkten nach gleichen Kriterien ausgesucht, respektive konstruiert (Abschnitt 6.2.5). Ihre Hybridisierungseigenschaften wurden experimentell durch Variation von Sondenkonzentrationen, Inkubationsdauer der Hybridisierung, Temperaturabhängigkeit und durch verschiedene Hybridisierungspuffer überprüft. Dabei wurde erneut deutlich, dass sich das angestrebte Ziel, mit gleichen Auswahlkriterien Sonden zu finden, die sich in ihrem kinetischen Verhalten vollkommen gleichen, nicht realisieren ließ.

Zur Angleichung der Hybridisierungen der beiden korrespondierenden GM-Sonden, muss ausreichendes Schütteln der Mikrotiterplatte sichergestellt werden. Wurde während des Hybridisierungsschrittes nicht geschüttelt, mündete das Target-Signal bei mittleren Sondenkonzentrationen (50 nM GM-T-Dig, Inkubation bis 30 min) noch nicht in ein oberes Signalebene ein, wie es für den Kompetitor beobachtet wird (Daten nicht gezeigt). Schütteln während der Inkubation beschleunigte diese Hybridisierung und wurde fortan bei allen Experimenten angewendet.

Die Target-Sondenmenge (200 nM) musste im optimierten Protokoll deutlich höher als die Konzentration der Sonden in dem CaMV35S-PCR-ELISA (20 nM) gewählt werden. Die Steigerung der Target-Sondenkonzentration führt bei einer konstanter Menge immobilisierten Target-Amplikons bis zu 150 nM zu einer weiteren Signalsteigerung, erst dann wurde ein oberes Signalebene erreicht (Abb. 28). Die mögliche Beschleunigung der Hybridisierung durch Temperaturerhöhung wurde ebenfalls untersucht. Da der PCR-ELISA später ohne aufwändige, temperierbare Schüttelinkubatoren durchgeführt werden sollte, kam jedoch als erhöhte Hybridisierungstemperatur nur 37°C (Brutschrank) in Betracht. Unter diesen Bedingungen wurde für die Sonde GM-T-Dig schon ab einer Inkubationsdauer von 20 min das Erreichen eines oberen Signalebens beobachtet, während die Ausführung bei Raumtemperatur erst später (circa 40 min) zum Erreichen eines oberen Niveaus führte (Abb. 29). Selbst bei geringeren Konzentrationen verlief die Hybridisierung der Kompetitor-Sonde GM-K-Dig jedoch schneller. Hier wurde schon nach 5 bis 10 min das Einmünden in oberes Signalebene beobachtet. Da sich das Verhalten der Sonde GM-K-Dig bei 37°C und Raumtemperatur glich (Daten nicht gezeigt), erfolgt die Hybridisierung beider Sonden des GM-Systems im optimierten Protokoll bei der höheren Temperatur (37°C, 30 min).

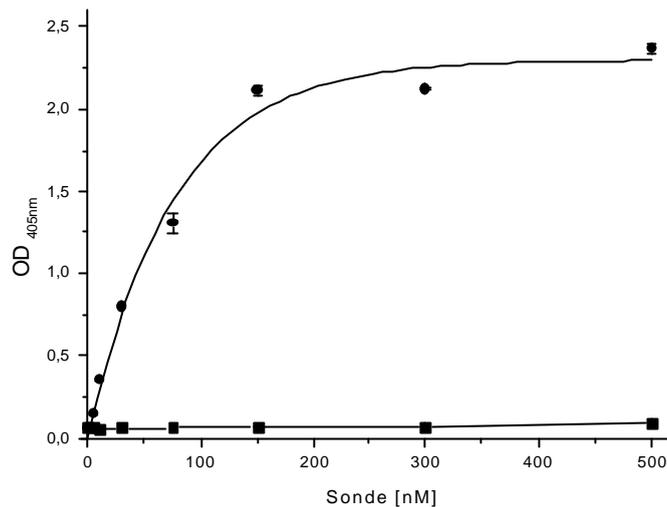


Abb. 28 Variation der GM-T-Dig Sondenkonzentration im PCR-ELISA

Konstante Mengen Target-Amplikon (20 ± 5 ng pro Vertiefung, GM03/GM04-bio PCR) wurden immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen der korrespondierenden Sonde hybridisiert (RT, 40 min). ●, Amplikon immobilisiert; ■, Hintergrundsignal, Puffer als Probe.

Die Sonde GM-K-Dig sollte ausschließlich im dem neu eingeführten Sequenzbereich des Kompetitor-Amplikons binden (Abb. 20, Seite 66). Dennoch wurde im Zuge der Optimierung des GM-PCR-ELISAs eine leichte Kreuzhybridisierung der Sonde GM-K-Dig mit dem Target-Amplikon (118 bp, Primer GM04-bio/GM03) festgestellt. Die Kompetitor-Sonde wurde zu Beginn der Untersuchungen bewusst in hohen Konzentrationen eingesetzt (150 nM). Dies begünstigte die Kreuzhybridisierung, so dass der Einfluss verschiedener Hybridisierungspuffer gut beobachtet werden konnte. Die Hybridisierung bei 37°C im Standard-Hybridisierungspuffer (5x SSC, 0,1 % Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS, 1 % Blockingreagenz) erzeugte 19 % Kreuzhybridisierung bezogen auf das Signal, das von 25 ± 5 ng Target-Amplikon pro Vertiefung mit der GM-T-Sonde erhalten wurde. Diese Kreuzhybridisierung blieb auch nach Waschen (5 min) unter Niedrigsalzbedingungen mit 0,1x SSC Puffer bei 37°C erhalten. Wurde die gleiche Hybridisierung bei Raumtemperatur ausgeführt, sankt die Kreuzhybridisierung leicht auf 13 %. Bei Steigerung des Blockingreagenzanteils von 1 auf 2 % sank die Kreuzhybridisierung deutlich auf 7 %. Die Hybridisierung bei 50°C im Standard-Hybridisierungspuffer erhöhte die Kreuzhybridisierung auf 28 %. Wurde dem Hybridisierungspuffer 50 % Formamid und 2 % Blockingreagenz zugesetzt, ergab sich eine Kreuzhybridisierung von 32 %.

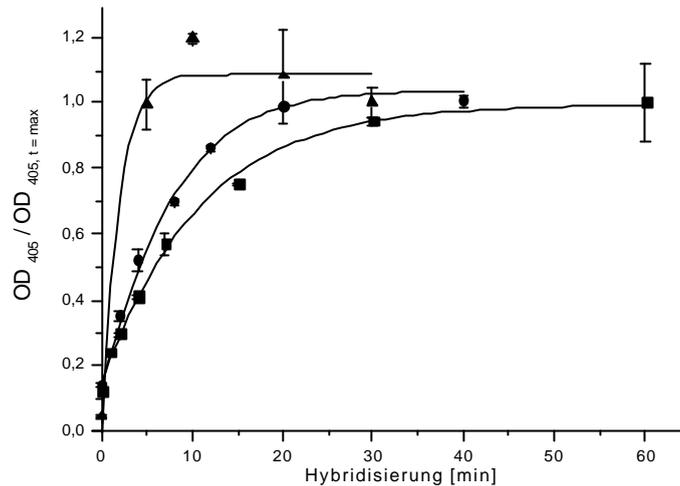


Abb. 29 Hybridisierungskinetik der GM-T-Dig und GM-K-Dig Sonden

Konstante Mengen Target- oder Kompetitor-Amplikon (25 ± 5 ng / Vertiefung, GM03/GM04-bio PCR) wurden immobilisiert und bei steigenden Inkubationszeiten mit den korrespondierenden Sonden hybridisiert. ●, Target-Amplikon / GM-T-Dig Sonde (200 nM), 37°C; ■, Target-Amplikon / GM-T-Dig Sonde (200 nM), 25°C; ▲, Kompetitor-Amplikon / GM-K-Dig Sonde (10 nM), 37°C.

In der Regel steigert die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur die Spezifität einer Hybridisierung [115]. Die Zugabe von Formamid reduziert die Wechselwirkungen der Wasserstoffbrückenbindung der Watson-Crick-Basenpaarung und steigert ebenfalls prinzipiell die Hybridisierungsspezifität [115, 120]. Diese gewünschte Wirkung wurde hier jedoch nicht beobachtet. Erstaunlicher Weise wurde der umgekehrte Fall beobachtet, beide Methoden steigern die Kreuzhybridisierung. Wurde die Hybridisierungstemperatur jedoch auf RT gesenkt, sank die Kreuzhybridisierung ebenfalls. Da die Sonde GM-K-Dig parallel mit der Sonde GM-T-Dig (Hybridisierung bei 37°C) eingesetzt werden sollte, war eine veränderte Inkubationstemperatur, ebenso wie ein geänderter Hybridisierungspuffer unerwünscht. Es bot sich daher an, die Kreuzhybridisierung durch Variation der Sonden-Konzentration zu beeinflussen.

Die unerwünschte Kreuzhybridisierung hing linear mit der Konzentration der eingesetzten Sonde GM-K-Dig zusammen (Abb. 30A). Das Signal für die korrekte Hybridisierung mit dem Kompetitor-Amplikon stieg dagegen unter gleichen Bedingungen steil an und mündete schon bei 1,25 bis 2,5 nM Sonde in einer Signalsättigung. An dieser Stelle liegt Amplikon und Sonde im molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:2 vor. Die Berechnung erfolgte unter Annahme vollständiger Immobilisierung des Amplikons, das durch Abschätzung im Vergleich mit Markerbanden im PAGE-Gel quantifiziert wurde. Bei der Festlegung der Sondenkonzentration auf 10 nM wurde berücksichtigt, dass größere Mengen (bis 100 ng) Amplikon ebenfalls noch im Bereich der Signalsättigung liegen sollen und dass dabei die Kreuzhybridisierung 1-2 % nicht überschreitet. Diese Kriterien werden bei 10 nM GM-K-Dig Sonde erfüllt (Abb. 30B), wie sich auch in später gezeigten Experimenten bestätigte (siehe Abb. 32).

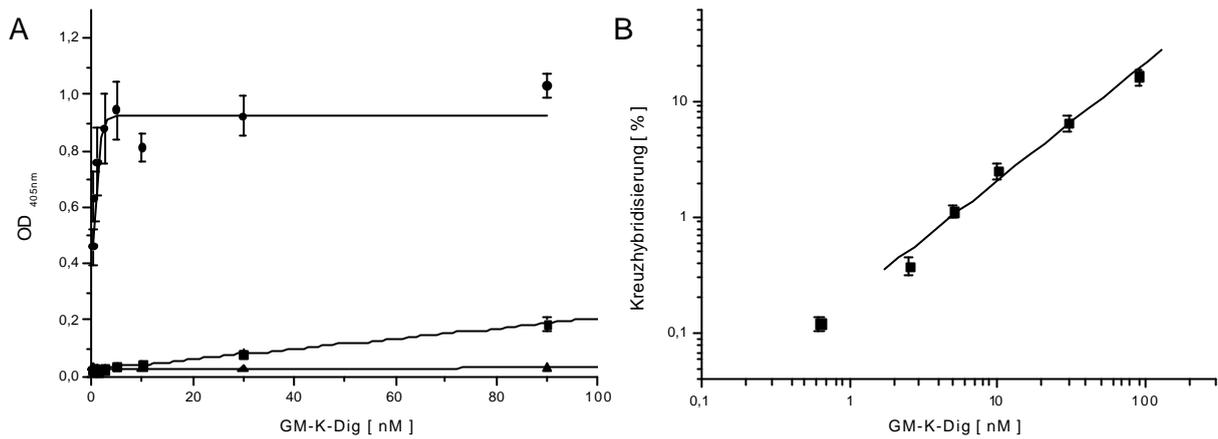


Abb. 30 Optimierung der GM-K-Dig Sondenkonzentration für den PCR-ELISA

Eine konstante Menge (20±5 ng, Abschätzung durch Vergleich mit Markerbanden im PAGE-Gel) Kompetitor- (●) oder Target-Amplikon (■) der Soja Lektin-Gen PCR (Primer GM04-bio/GM03) wurden im PCR-ELISA mit steigenden Mengen Sonde GM-K-Dig hybridisiert; Hintergrundsignal mit Probenpuffer (▲). A, PCR-ELISA Rohdaten; B, prozentuale Kreuzhybridisierung des Target-Amplikons bei Hybridisierung mit der Kompetitor-Sonde; die Werte wurden nach Abzug des Hintergrundsignales für Probenpuffer aufeinander bezogen.

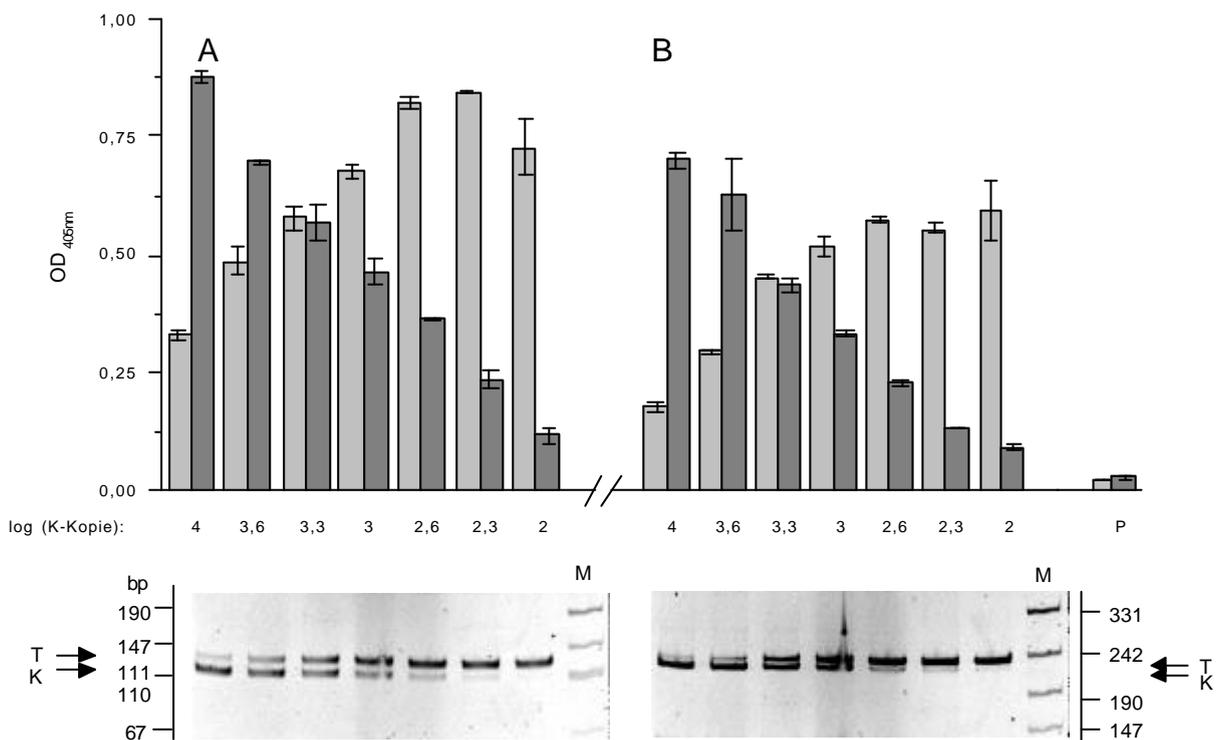


Abb. 31 Analyse der GM0304- und GM0104-PCR durch PCR-ELISA und PAGE

PCRs mit konstanter Menge Soja-DNA (12,5 ng, nach CTAB II-Protokoll isoliert) und steigender Menge RR-Kompetitor (K, Plasmid pCR RRK, 10² bis 10⁴ Kopien pro PCR) wurden parallel durch PCR-ELISA (oben) und durch PAGE (10 %, Ethidiumbromidfärbung, unten) analysiert (je 2 µl Probenvolumen). A, GM0304-PCRs (Primer GM04-bio/GM03); B, GM0104-PCRs (Primer GM04-bio/GM01); P, Hintergrundsignal des PCR-ELISA mit Puffer als Probe; M, pUC19 DNA Marker; T, Target-Amplikon (hell Balken im ELISA); K, Kompetitor-Amplikon (dunkel). PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 40 Zyklen 95°C / 30 s, 61°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min.

Nach dieser Optimierung wurden die Ergebnisse des PCR-ELISA mit jenen aus konventioneller PAGE anhand der Produkte einer kompetitiven Soja-Lektin-Gen PCR verglichen

(Abb. 31). Der PCR-ELISA zeigte die gleichen, abnehmenden Intensitäten der Signale des Kompetitor-Amplikons (GM0304, 103 bp bzw. GM0104, 219 bp) und die sich im Gegenzug intensivierenden Signale des Target-Amplikons (GM0304, 118 bp bzw. GM0104, 234 bp) wie das Gel. Die PCR-ELISA Signale für die längeren Produkte der GM0104-PCR sind, im Gegensatz zu dem Vergleich von CaMV35S und RR-PCR-ELISA, nur geringfügig niedriger als diejenigen der kürzeren GM0304-Amplikons.

6.2.6.3 Hintergrundsignale der PCR-ELISA im Vergleich

Das Hintergrundsignal (OD_{405}) für einen gegebenen PCR-ELISA setzt sich aus verschiedenen Beiträgen zusammen: (i) der Licht-Absorption der Mikrotiterplatte, (ii) spontan hydrolysiertem pNPP, (iii) unspezifisch in der Vertiefung gebundenes anti-Dig-AP-Konjugat das pNPP umsetzt und (iv) aus einem Signal, verursacht durch unspezifisch gebundene Dig-markierte Sonden, die immundetektiert werden. Während die drei erstgenannten Signal-Quellen für jeden PCR-ELISA gleich sind, weisen die einzelnen Sonden der in dieser Arbeit vorgestellten PCR-ELISAs unterschiedlich große, unspezifische Bindungen auf, die darüber hinaus noch durch Kreuzhybridisierung überlagert sein können. Für die Auswertung der PCR-ELISA Analysen kompetitiver PCRs erfolgte eine Quotientenbildung zweier Nettosignale ($OD_{\text{Netto}} = OD_{\text{Messwert}} - OD_{\text{Hintergrund}}$), so dass das in die Berechnung eingehende Hintergrundsignal durchaus von Bedeutung ist.

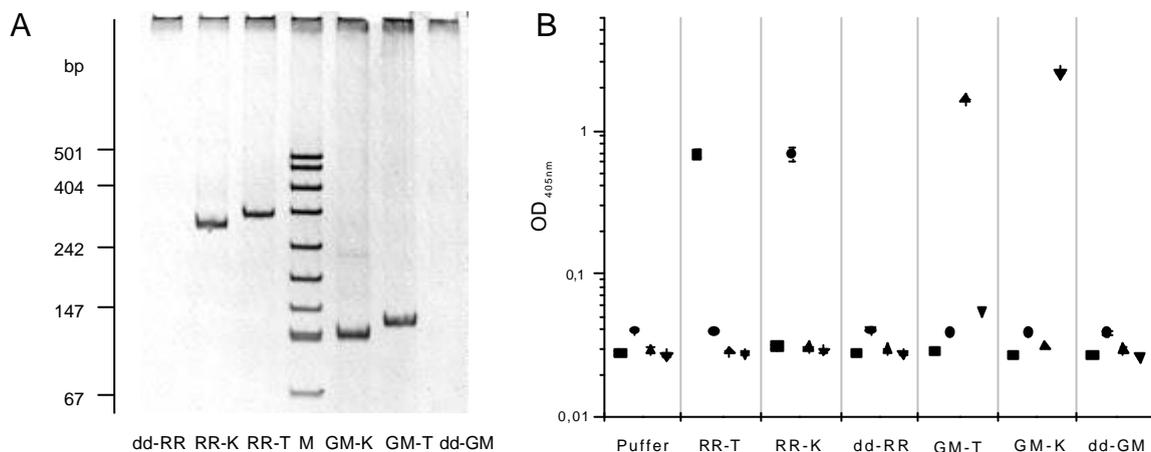


Abb. 32 Hintergrundsignale bei Hybridisierung mit Dig-markierten Sonden

Analyse biotinylierter PCR-Produkte, Probenpuffer und Reagenzienkontrolle im PCR-ELISA zur Abschätzung der zu erwartenden Hintergrundsignale. A, PAGE-Gel der PCR-Produkte (2 μ l, Ethidiumbromid-gefärbt); RR-PCR mit Primern 35S3-bio/petu-r1: dd-RR, Reagenzienkontrolle ohne Matrizen DNA; RR-K, Kompetitor Produkt, 286 bp; RR-T, Target Produkt, 313 bp; M, pUC19 DNA Marker; GM-PCR mit Primern GM04-bio/GM03; dd-GM, Reagenzienkontrolle ohne Matrizen DNA; GM-K, Kompetitor Produkt, 103 bp; GM-T, Target Produkt, 118 bp. B, PCR-ELISA mit 2 μ l Probenvolumen, zusätzlich wurde das Signal des Probenpuffers (PBS-T, N = 4) gemessen. Die im Hybridisierungsschritt verwendeten Sonden waren: ■, RR-T-Dig; ●, RR-K-Dig; ▲, GM-T-Dig; ▼, GM-K-Dig.

Zur näheren Untersuchung der Hintergrundsignale und Kreuzhybridisierungen wurden die in Abb. 32A gezeigten PCR-Produkte und Reagenzienkontrollen verwendet. Im PCR-ELISA wiesen die Sonden RR-T-Dig, GM-T-Dig und GM-K-Dig im Falle von Probenpuffer als Probe sehr niedrige Signale auf (Abb. 32B). In allen Fällen, mit und ohne immobilisierter DNA, führte RR-K-Dig zu einem um 15 % erhöhten, absoluten Hintergrundsignal. Dies ist wahrscheinlich auf eine Wechselwirkung dieser Sonde mit der Streptavidin-beschichteten Oberfläche

zurückzuführen, da der Wert unabhängig von der Anwesenheit immobilisierter DNA ist. Während die Kompetitor-Sonde der Lektin-Gen PCRs, GM-K-Dig, zwar ein niedriges Hintergrundsignal und keine Kreuzhybridisierung mit den immobilisierten Amplikons (Target oder Kompetitor) der RR-PCR zeigte, wurde ein deutlich erhöhtes Signal mit dem GM-Target Amplikon festgestellt. Der Betrag dieses Signales, korrigiert um den Wert für Probenpuffer als Probe, beträgt 1,1 % des Signales, das das Kompetitor Amplikon bei Hybridisierung mit der korrekten Sonde (GM-K-Dig) erzielte. Hier handelte es sich um eine echte Kreuzhybridisierung, die trotz Optimierung der Sondeninkubation (siehe Abb. 30) auftrat, aber auf ein akzeptables Maß reduziert wurde. Die Sonde RR-T-Dig zeigt bei Hybridisierung mit dem Einzelstrang des RR-Kompetitor-Amplikons ebenfalls eine minimale Kreuzhybridisierung (0,5 %), diese nimmt bei höheren Probenvolumina deutlich zu. Bei Analyse von 4 µl einer vergleichbaren RR-PCR, die ausschließlich Kompetitor-Amplikon enthielt, betrug sie bis zu 5 %.

6.2.6.4 Kalibrationskurven

Die Kalibrationskurven der hier verwendeten PCR-ELISA wiesen prinzipiell den in Abb. 33 gezeigten sigmoidalen Verlauf auf, der in unterschiedlicher Ausprägung für alle Amplikons galt, die in dieser Arbeit genutzt wurden. Dominiert wurde er durch einen linearen Bereich und das Einmünden in ein oberes, maximales Signalniveau. Eine progressive Anfangssteigung war bei Immobilisierung langer Amplikons (RR-Target/ Kompetitor) besonders ausgeprägt und wurde vermutlich durch verschieden stark ausgeprägte intramolekulare Sekundärstrukturbildung der einzelsträngigen Amplikons beeinflusst.

Allein durch Gegenüberstellung der PCR-ELISA Signale lassen sich die Mengen zweier Amplikons, wegen potenziell unterschiedlicher Hybridisierungseffizienzen der Sonden, nur bedingt vergleichen. Zur Bestimmung einer Amplikonmenge in PCR-Produkten bedarf es daher einer Kalibration mit bekannten Amplikon-Mengen in der gleichen Primer-haltigen Matrix, da koimmobilisierte DNA das Signal ebenfalls beeinflusste (Abschnitt 6.2.6.5).

Es ist zu vermuten, dass das in Abb. 33 bei Zugabe großer Volumina auftretende obere Signalniveau primär auf eine erschöpfte Biotin-Bindungskapazität der Streptavidin beschichteten Kavitäten zurückzuführen ist; eine Limitierung durch die Sonde, die im Überschuss vorliegt, ist wahrscheinlich von geringerer Bedeutung. Große Probenvolumina wurden daher in der Regel vermieden (Einsatz 1-3,5 µl PCR/ Vertiefung). Die Bindekapazität wird außer durch die biotinylierten PCR-Produkte auch durch die nicht inkorporierten biotinylierten Primer des PCR-Ansatzes reduziert. Sie könnten in einem gesonderten, an die PCR angeschlossenen Gelfiltrations- oder Extraktionsschritt entfernt werden. Dies würde zusätzlichen Material- und Zeit-Aufwand bedeuten. Die in Routineexperimenten verwendeten Probenvolumina wurden daher so gewählt, dass die eingebrachte Menge Biotin die maximale Bindekapazität des Streptavidins einer Kavität (16-20 pmol) nicht überschritt.

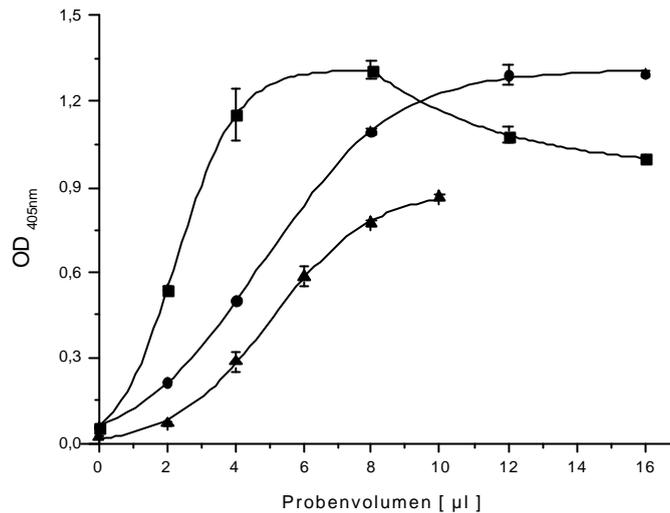


Abb. 33 Kalibrationskurven für PCR-ELISAs

Steigende Volumina der Produkt-Lösungen aus einer GM0304-PCR (■, Primer GM04-bio/GM03, Target-Amplikon 118 bp), einer CaMV35S-PCR (●, Primer: 35S3-bio/ 35S2, Target-Amplikon 191 bp) und einer RR-PCR (▲, Primer: 35S3-bio/ petu-r1, Target-Amplikon 313 bp) wurden immobilisiert und im PCR-ELISA mit spezifischen Sonden (RR-T-Dig, GM-T-Dig) hybridisiert. Die PCRs wurden bis in das Plateau geführt, der Amplikongehalt wurde nicht bestimmt.

Die Verwendung größerer Mengen PCR-Produkt kann zu einer Signalreduktion führen. Die Verringerung des Signals des GM0304-PCR-ELISA, die nach Erreichen eines Maximalniveaus auftrat (Abb. 33), konnte (siehe unten) auf mangelnde Qualität der Aufreinigung des Primer GM04-bio durch die Hersteller zurückgeführt werden. Eine Berechnung der maximalen Menge eingebrachten Biotins erfolgte durch UV₂₆₀-Quantifizierung der markierten Oligonukleotide, die in einer Konzentration von 0,4 µM in der PCR eingesetzt wurden. Eine potenzielle Verunreinigung der Präparation mit Biotinylierungsreagenz wird dabei nicht aufgedeckt. Da nach der Synthese verbliebenes Reagenz die Biotin-Bindekapazität der Mikrotiterplattenvertiefung reduziert, sollte es durch HPLC-Fraktionierung abgetrennt werden. Eine Qualitätskontrolle bei jeder Primer-Charge ist ratsam.

Die Konkurrenz um die begrenzte Biotin-Bindungskapazität durch biotinylierte PCR-Produkte, Primer und nicht abgetrenntes Biotinylierungsreagenz ist in Abb. 34A dargestellt. Abb. 34B zeigt, wie sich die Zugabe von 3 verschiedenen Präparationen UV-quantifizierter, biotinylierter Oligonukleotide auf die Anbindung eines gleichzeitig Dig- und Biotin-markierten, aufgereinigten Amplikons auswirkt (belegt ~ 1 % der nominalen Bindekapazität), das anschließend durch direkte Detektion nachgewiesen wurde. Die Bindekapazität für das kleine Molekül Biotin betrug 16-20 pmol pro Vertiefung (Herstellerangabe). Sie wurde wahrscheinlich wegen des größeren sterischen Anspruches der Oligonukleotide nicht erreicht. Bei Verwendung geringer Mengen des Oligonukleotids GM04-bio (2 pmol) wird das ELISA-Signal deutlicher reduziert, als dies bei den Oligonukleotids 35S3-bio und B3-bio der Fall ist. Letztere verursachten erst ab einer 3-fach höheren Konzentration (6-10 pmol) die Signalreduktion. Diese Messung bewies, dass die gezeigte Präparation des Oligonukleotids GM04-bio mit nicht abgetrenntem Biotinylierungsreagenz verunreinigt ist. Sie war zuvor durch frühe Sättigung und Abknicken der Kalibration aufgefallen (Abb. 33) und wurde ersetzt.

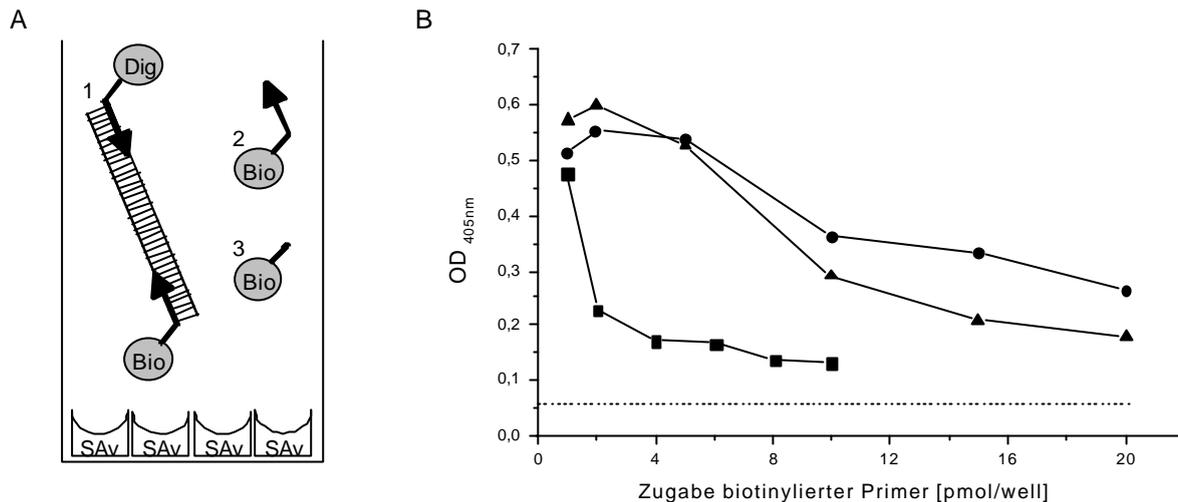


Abb. 34 PCR-ELISA Signalunterdrückung durch nicht abgetrenntes Biotin in Primerpräparationen

A, Konkurrenz um die Biotin-Bindungs Kapazität einer Streptavidin beschichteten Mikrotitervertiefung bei Anwesenheit von 1. doppelt markiertem (Biotin und Dig) PCR-Produkt, 2. Biotin markiertem Primer und 3. freiem Biotinylierungsreagenz, die Dig-Markierung wird immun detektiert. B, Bei der Immobilisierung einer konstanten Menge doppelt markierten PCR-Produkts (Primer GM04-bio/GM05-Dig, 0,12 pmol/Kavität, aufgereinigt und UV-quantifiziert) wurden steigende Mengen biotinylierter Primer zugegeben (Oligonukleotide UV-quantifiziert; ■, GM04-bio; ●, 35S3-bio; ▲, A3-bio). Aufgetragen sind Einzelbestimmungen. Es wurde dem PCR-ELISA Protokoll unter Auslassung der Denaturierung und Hybridisierung gefolgt. Gepunktete Linie, Hintergrundsignal der Immundetektion ohne immobilisiertes Amplikon.

6.2.6.5 Kooperativer Effekt in der Hybridisierung

Die Koimmobilisierung eines spezifischen Amplikons und beliebiger DNA ohne passende Hybridisierungsstelle hatte einen unerwarteten Effekt für die Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde und somit auf die Höhe des PCR-ELISA-Signals. Target- und Kompetitor-Amplikon ergaben mit der für sie spezifischen Sonde ein Signal, das durch Zugabe des jeweils anderen Amplikons ebenso wie durch Zugabe eines „Schmier“-Produktes (Abb. 35A) um 60-90 % gesteigert wurde. Das „Schmier“-Produkt wurde durch Verwendung einer normalen *Taq* Polymerase ohne den sonst üblichen *hot start* und durch eine extrem niedrige *Annealing*-Temperatur (35°C) erhalten wird. Es handelte sich bei der Signalsteigerung nicht um Kreuzhybridisierung, da bei alleinigem Einsatz der betreffenden DNA kein Hybridisierungssignal erhalten wurde (Abb. 35B).

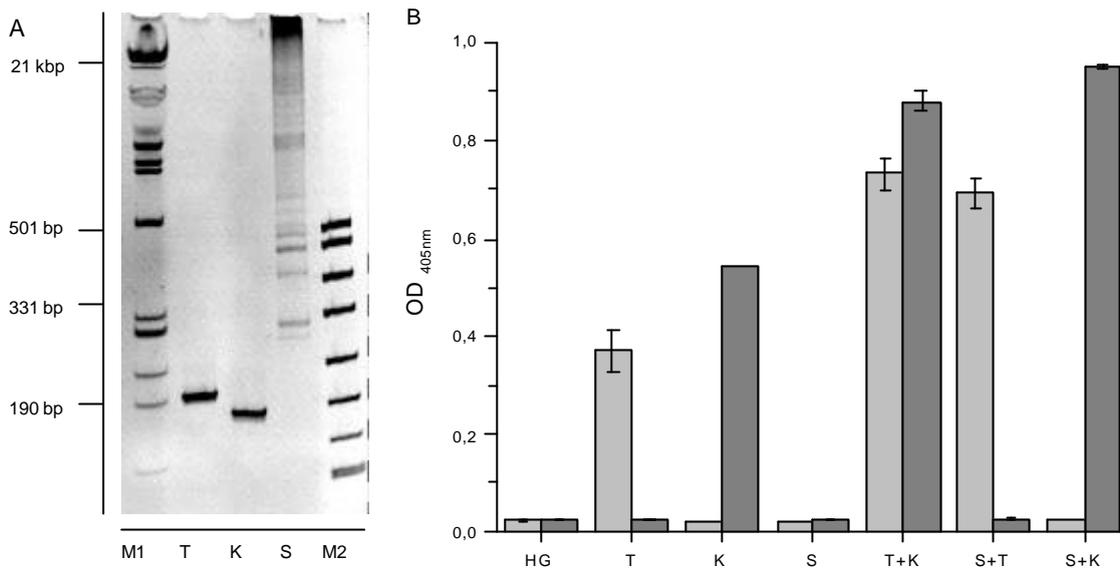


Abb. 35 Effekt koimmobilisierter DNA auf die Hybridisierung im PCR-ELISA

A, PAGE-Analyse der CaMV35S PCR-Produkte; T, Target Amplikon, 191 bp, K, Kompetitor, 164 bp; S, „Schmier“-Produkte aus unspezifischer PCR mit den gleichen Primern; M1, Marker λ MixII; M2, Marker pUC19. B, PCR-ELISA, unter A gezeigte PCR-Produkte wurden allein oder im angegebenen Gemisch koimmobilisiert und mit den Sonden RR-T-Dig (hell) und RR-K-Dig (dunkel) hybridisiert. Primer: 35S3-bio/35S2, Matrize: je $2 \cdot 10^5$ Kopien/25 μ l Plasmid pCR RRT oder pCR RRK, AmpliTaq Gold, PCR-Programm: initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 50 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 90 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Schmier-PCR: Matrize, 125 ng Wildtyp-Soja-DNA, Biotherm Taq, PCR-Programm: initiale Denaturierung 95°C / 2 min; 50 Zyklen 95°C / 30 s, 35°C / 30 s, 72°C / 90 s; finale Elongation 72°C / 5 min.

Der beobachtete Effekt ließ eine bessere Nachweisgrenze für Amplikons bei Hybridisierungsereignissen in Gegenwart anderer Amplikons erwarten. Wurden Target oder Kompetitor Amplikon einer CaMV35S-PCR (Primer 35S3-bio/35S2) mit einer konstanten Menge eines nicht verwandten, biotinylierten Amplikons (531 bp-Fragment des Mais tRNA-Leu Gen) immobilisiert, erhöhte sich der Messwert für die korrekte Hybridisierung der Dig-markierten T-Sonde mit immobilisiertem Target-Amplikon (Abb. 36A) und der K-Sonde mit immobilisiertem Kompetitor-Amplikon (Abb. 36B) jeweils um den Faktor 2. Die Zugabe von nicht verwandtem Amplikon führte dabei weder zu erhöhten Hintergrundsignalen (Signal bei 0 μ l) noch zu einer Kreuzhybridisierung. Die Sensitivität wurde in dem Experiment mit koimmobilisierter DNA im Vergleich zu derjenigen bei Verwendung reiner Amplikons gesteigert, die Nachweisgrenze somit gesenkt. Die Höchstmenge des Target- oder Kompetitor-Amplikon die aufgetragen werden kann, ohne eine Signalsättigung zu bewirken (siehe Kalibrationen Abb. 33, Seite 82), würde in diesem Fall jedoch geringer sein, da insgesamt zusätzlich immobilisiertes, biotinyliertes Amplikon die Bindungskapazität der Streptavidin-beschichteten Mikrotitervertiefung verringert.

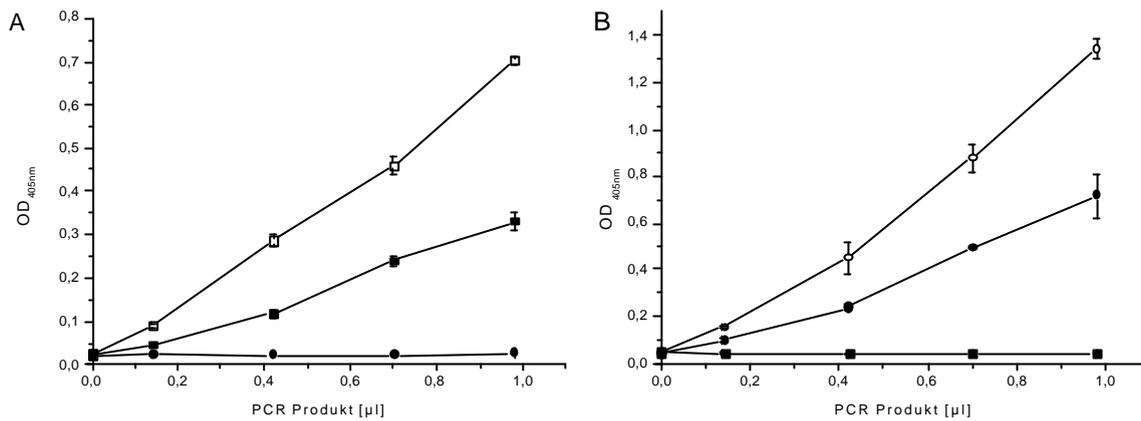


Abb. 36 Einfluss koimmobilisierter DNA auf die Sensitivität des PCR-ELISA

PCR-ELISA, CaMV35S-Target (■, □) oder Kompetitor Amplikon (●, ○) je 25 ng/µl, Hybridisierung mit Target-(A) und Kompetitor-Sonde (B), offene Symbole: Messwerte je unter Zusatz einer konstanten Menge nicht verwandten, biotinylierten PCR-Produkts (A1/A3-bio, 125 ng)

Um zu einem grundlegenden Verständnis solcher PCR-Versuche zu gelangen, bei denen zwangswise zwei verschiedene PCR-Produkte entstehen, die mittels PCR-ELISA detektiert werden, wurde die kontinuierliche Abfolge von sinkendem Target (T)- bei steigendem Kompetitor (K)-Amplikon Anteil, wie sie üblicherweise bei kompetitiven PCRs anfallen (Abb. 31, Seite 79), durch Mischung reiner PCR-Produkte simuliert. Es wurden die beiden Fälle verglichen, in denen a) die absolute Menge an Amplikon sinkt und b) die absolute Menge der Amplikon-DNA im aufgegebenen Probenvolumen gleich bleibt. Hier verändert sich nur das Verhältnis der Komponenten zueinander. Im Fall a) wurde das Probenvolumen mit Wasser verdünnt im Fall b) mit dem zum Target-Amplikon korrespondierenden Kompetitor-Amplikon und umgekehrt. In Abb. 37A sind die unmittelbaren Messergebnisse von GM0304-ELISAs dargestellt, in Abb. 37B sind aus diesen Ergebnissen abgeleitete Signal-Quotienten, wie sie bei den später beschriebenen kompetitiven PCRs zur Auswertung genutzt werden, zu sehen.

Wenn die untersuchte Probe mit Wasser ergänzt wurde, stieg die Kurve progressiv an. Im Gegensatz dazu entstanden Kurven mit umgekehrter Krümmung (degressiver Steigung), wenn das Probenvolumen mit komplementären Amplikon aufgefüllt wurde. Der Vergleich der beiden Verläufe für Fall a) und b) lässt die Vermutung zu, dass das nicht direkt an der Hybridisierung beteiligte Amplikon einen partiellen Beitrag zur Effizienz der spezifischen Hybridisierung leistet oder dass eine mögliche Hemmung der Hybridisierung bei niedrigen Konzentrationen aufgehoben wird.

Die beobachtete, größere Sensitivität des Amplikon-Nachweises hat bei der Bildung von Signal-Quotienten jedoch negative Auswirkungen. Der Quotient von OD T/OD K (korrigiert um das jeweilige Hintergrundsignal), führt bei halb-logarithmischer Auftragung zu einem linearen Zusammenhang (Abb. 37B), wie er von kompetitiven PCRs bekannt ist. Im Fall a) der mit Wasser verdünnten GM0304-Amplikons PCR Systems ergab sich eine größere Steigung als im Fall b), der die Produktverhältnisse wie in kompetitiven PCRs simuliert.

Der Effekt steht im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen (Abb. 35, 36). Es werden gerade bei niedrigen Amplikonmengen, z. B. für das Target bei einem Anteil von 25 %, die Hybridisierungs-Signale durch das ebenfalls vorliegende Kompetitor Amplikon (75 %) drastisch erhöht. Der Kompetitor seinerseits ist hier mit viel weniger Fremd-DNA koimmo-

bilisiert (25 %) und erfährt nur eine geringe Signalerhöhung bei Hybridisierung mit der für ihn spezifischen Sonde. Die analoge Situation findet sich, wenn wenig Kompetitor (25 %) mit viel Target-Amplikon (75 %) zusammen immobilisiert wird. Da die Gesamtmenge aller Amplikon-Gemische gleich ist, ergibt sich ein symmetrischer Effekt.

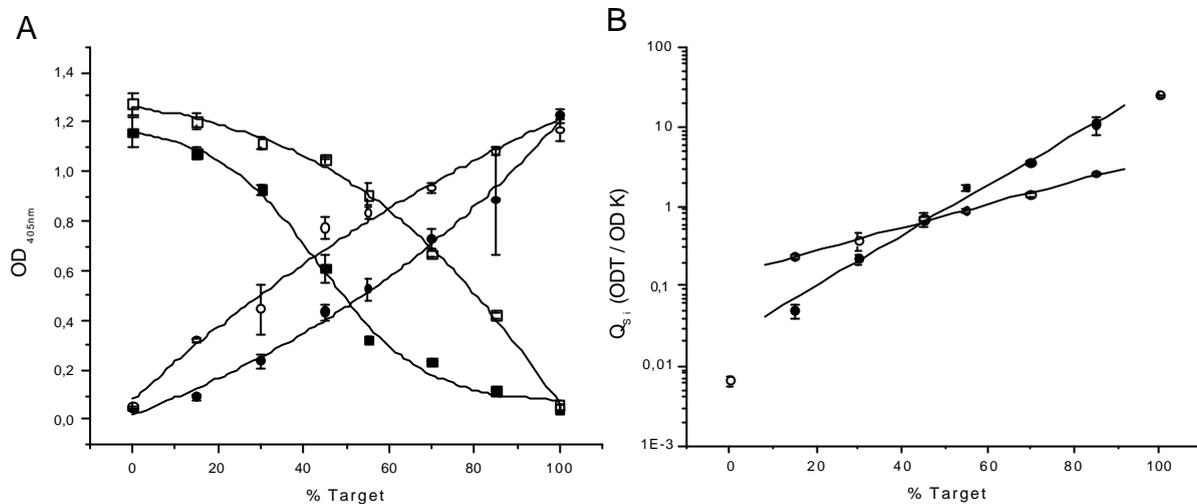


Abb. 37 Einfluss der Verdünnung und des Verhältnisses eines Amplikon-Gemisches auf die PCR-ELISA Signale

Target oder Kompetitor PCR-Produkte wurden mit Wasser (Fall a, gefüllte Symbole) oder dem korrespondierenden Kompetitor- respektive Target-Amplikon (Fall b, offene Symbole) bei konstantem Gesamtvolumen gemischt und mit der Target- oder Kompetitor-Sonde hybridisiert. Aus dem Target-Amplikon Anteil (Abszisse) am Gemisch berechnet sich der Kompetitor-Amplikon Anteil durch (100 - % Target). A, Produkte der GM0304-PCR, Primer GM04-bio/GM03, Proben-Gesamtvolumen 1,0 µl; T-Amplikon: ● und ○, ergeben OD T; K-Amplikon: ■ und □, ergeben OD K; B, Quotient der Hintergrundwert-korrigierten OD's aus Graph A (OD T/ OD K).

Für die Ermittlung eines Schnittpunktes der Signal-Quotienten-Geraden eines Experimentes mit der Horizontalen bei einem bestimmten Quotienten (z.B. $Q_{Si} = 1$) resultiert aus dem beschriebenen Effekt ein Nachteil. Bei gleichem Konfidenzintervall um die Ausgleichsgerade folgt aus einer geringeren Steigung ein größeres Ergebnisintervall (formuliert z. B. als Mittelwert \pm SD) für die abgelesenen Werte der Abzisse. Dieses entspricht einer geringeren Genauigkeit des Systems im Vergleich mit einer Analyse reiner Amplikons. Messungen mit Amplikon- Gemischen weisen im Gegenzug theoretisch einen größeren Messbereich auf. Dies ist bei der praktischen Durchführung kompetitiver PCRs sinnvoll.

Der in diesem Abschnitt beschriebenen Effekt der Hybridisierungsverstärkung war kein singuläres Ereignis, sondern ließ sich mit biotinylierten Produkten aus „Schmier“-PCRs, aus definierten PCRs für nicht verwandte Sequenzen und mit Target/Kompetitor Paaren (GM0304- und CaMV35S-PCR-System, letzteres nicht gezeigt) demonstrieren. Der Effekt war ebenfalls nicht auf den Gebrauch eines speziellen Oligonukleotids als Sonde beschränkt, sondern zeigte sich vielmehr mit allen vier in dieser Arbeit genutzten Sonden. Er hatte wesentlichen Einfluss auf die Sensitivität des PCR-ELISAs bei der Detektion von PCR-Produkten der kompetitiven PCR.

6.2.6.6 Nachweisgrenze des CaMV35S PCR-ELISA

Der Nachweis der Amplikons durch PCR-ELISA ist für alle in dieser Arbeit vorgestellten PCR-Systeme empfindlicher als durch Agarose- oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung. Dies wird am Beispiel des Amplikons der CaMV35S-PCR gezeigt. Ein PCR-Produkt wurde an Hand einer Verdünnungsreihe durch Agarose- (Abb. 38A) und Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 38B) analysiert und das Photo mit Hilfe des Programmes Osiris 3.6 digital ausgewertet. Die Konzentration des nicht aufgereinigten Amplikons wurde durch parallele Auftragung eines quantifizierten, geschnittenen Plasmids abgeschätzt (Daten nicht gezeigt). So war außer dem Vergleich der Nachweisgrenzen auch die Angabe der absoluten DNA-Menge möglich.

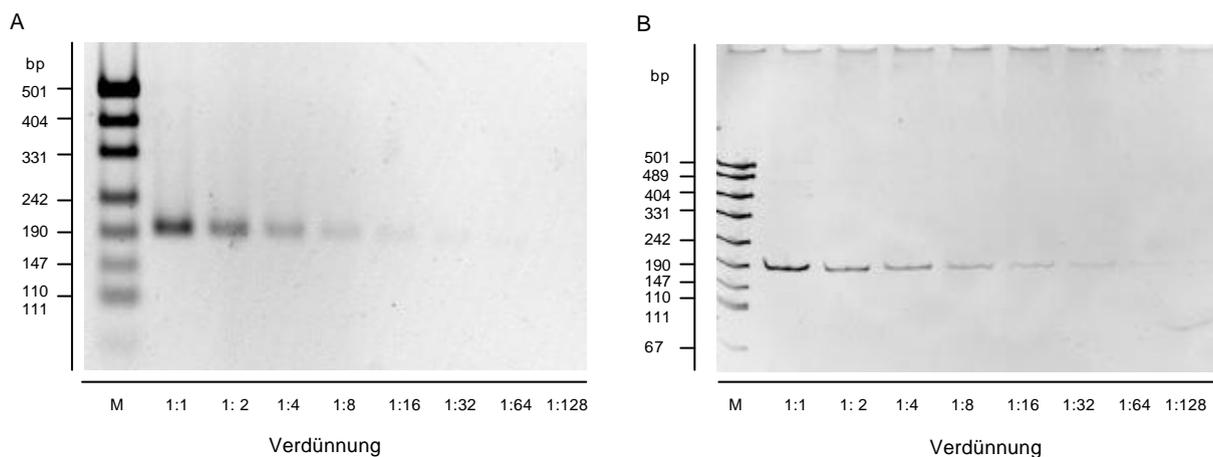


Abb. 38 Nachweisgrenze eines PCR-Produktes in der Gelelektrophorese

Verdünnungsreihe des Target-Amplikons der CaMV35S-PCR (191 bp, 7 ± 3 ng/ μ l). A, Agarosegel (2,5 %); B, PAGE 12 %; M, DNA-Größenmarker (82 ng pUC19, MspI geschnitten); 2 μ l Probenvolumen in der angegebenen Verdünnung, Ethidiumbromidfärbung.

Das Signal für das 191 bp große Amplikon war bei digitaler Gelauswertung nach Agarosegelelektrophorese bis zur 1:8 Verdünnung ($1,8 \pm 0,8$ ng/Spur) und in der PAGE bis zur 1:32 Verdünnung signifikant detektierbar ($0,44 \pm 0,2$ ng/Spur). In der PCR-ELISA Analyse der gleichen Amplikon Verdünnungsreihe sanken die Signale stetig mit sinkender Konzentration (Abb. 39). Während die 1:256-Verdünnung kein signifikantes Signal mehr erzeugte, war die 1:128-Verdünnung ($0,11 \pm 0,04$ ng / Vertiefung) noch signifikant positiv. Das Detektionslimit des PCR-ELISA, vergleichbar festgelegt durch Unterschreiten des Hintergrundsignals plus dessen 3-facher Abweichung, lag daher um den Faktor 16 niedriger als bei der Agarosegelelektrophorese und um den Faktor 4 niedriger als bei der PAGE.

Die Ethidiumbromidfärbung ist proportional zur Masse, die Hybridisierung aber proportional zur Anzahl der DNA-Stränge, daher kann sich dieses Verhältnis für sehr große Produkte ändern. Da die Nachweisgrenze für ein Amplikon abhängig von der Menge der koimmobilisierten DNA ist, sinkt die Nachweisgrenze im Fall einer kompetitiven PCR unter den hier angegebenen Wert. Bei einer kompetitiven PCR ist gerade bei geringen Anteilen des einen Amplikons (z. B. Target) der Anteil des zweiten, präsenten Amplikons (z. B. Kompetitor) sehr hoch.

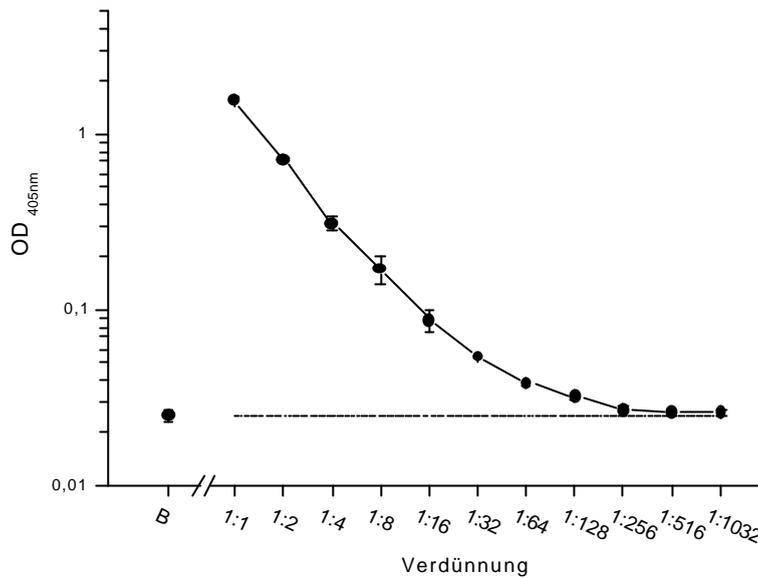


Abb. 39 Nachweisgrenze eines PCR-Produktes im PCR-ELISA

PCR-ELISA (Sonde RR-T-Dig, 2 µl Probenvolumen, 90 min Farbraktion) zur Verdünnungsreihe des Target-Amplikons der CaMV35S-PCR (vgl. Abb. 38); Messungen des Amplikons in den angegebenen Verdünnungsstufen; B, Hintergrundsignal durch Auftragung des Verdünnungspuffers.

6.2.6.7 Validierung des PCR-ELISA für die Auswertung kompetitiver PCRs

Die Auswertung der kompetitiven PCRs durch PCR-ELISA wurde durch ALF-Analysen überprüft. Im Gegensatz zur Auswertung durch Ethidiumbromid-gefärbte Polyacrylamid- oder Agarose-Gele hängen diese nicht von der Amplikonlänge und Basenzusammensetzung ab. Hierzu wurde die kompetitive CaMV35S-PCR mit einem Fluorophor-markierten (Cy5) Primer (35S2-Cy5) durchgeführt und mit dem ALFexpress DNA Analysesystem ausgewertet. Das Vorgehen stellte sicher, dass genau ein Fluorophor pro Amplikon inkorporiert wurde und jedes Amplikon unabhängig von der Größe ein definiertes Signal erzeugte. Die Markierung der Amplikons beeinflusste den parallel durchgeführten PCR-ELISA nicht, da der Cy5-tragende Gegenstrang im Denaturierungsschritt entfernt wurde. Die Produktmengen von Target und Kompetitor wurden bei der ALF-Analyse nach elektrophoretischer Trennung (denaturierendes Polyacrylamidgel) mit Hilfe von Laseranregung durch Photodioden detektiert.

Für die Signal-Quotienten des Target und Kompetitors wurden bei beiden Methoden die erwartete Linearität (siehe Abschnitt 3.4, Seite 14) bei doppeltlogarithmischer Auftragung des Signal-Quotienten gegen die eingesetzte Kompetitormenge gefunden (Abb. 40). Für die ALF-Analyse weist die lineare Regression einen etwas besseren Korrelationskoeffizienten ($R = 0,9996$, eine Auftragung je PCR und Kompetitor Konzentration) als der PCR-ELISA ($R = 0,9986$, Doppelbestimmung je PCR und Kompetitor Konzentration) auf, darin spiegelt sich die größere Streuung der PCR-ELISA Messwerte wider. Daraus, und aus der größeren Steigung der Geraden für die ALF-Auswertung der kompetitiven PCR, ergab sich hier eine präzisere Ablesung des Ergebnisses in Form der Kopienzahl am Äquivalenzpunkt, während die PCR-ELISA-Auswertung einen größeren Arbeitsbereich (Kompetitor Mengen) aufwies.

Zur Überprüfung einer Grundvoraussetzung der kompetitiven PCR, der Gleichheit der Amplifikationseffizienz von Target und Kompetitor, wurde das Plasmid pCR 35STK kloniert,

das sowohl die CaMV35S-Target als auch die Kompetitorsequenz enthält. Bei der Gewinnung des Artefakt-Kompetitors (Seite 71) wurde neben dem Klon, der ein Plasmid mit Nicht-CaMV35S-Promotor-Sequenz als Insert aufwies (pCR 35SArte), auch Klone mit dem korrekten CaMV35S-Promotor-Insert gefunden (195 bp). Ein geeignetes Plasmid (pCR 35ST, Klon 3) wurde isoliert und die korrekte CaMV35S-Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Zur Klonierung des Plasmids pCR 35STK wurde das 643 bp große *Pvu* II-Fragment aus pCR 35ST aus einem präparativen Agarosegel isoliert und ungerichtet, als Insert mit glatten Enden, in den *Eco* RV geöffneten, dephosphorylierten Vektor pCR 35SK ligiert. Eine Überprüfung durch Restriktionsanalyse zeigte, dass das erhaltene Plasmid pCR 35STK die Sequenzen von Target und Kompetitor im gleichen Verhältnis enthielt. Durch dieses Vorgehen wurde das Verhältnis der beiden Matrizen der CaMV35S-PCR auf molekularer Ebene fixiert. Die Verwendung dieses Plasmids als Templat in der PCR spiegelt genau die Verhältnisse am Äquivalenzpunkt einer kompetitiven PCR wider.

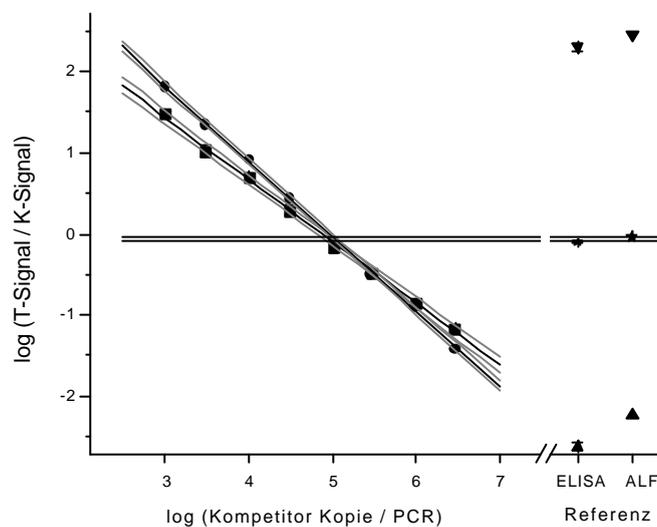


Abb. 40 ALF- und PCR-ELISA-Analytik zur Auswertung einer kompetitiven PCR

PCR mit RR-DNA (125 ng, nach CTAB II-Protokoll aus ganzen Soja-Bohnen isoliert) und steigenden Mengen des Kompetitor-Plasmids pCR GMK35SK, Primer 35S3-bio/35S2-Cy5. ●, Integrale korrespondierender Peakflächen in ALF-Messungen; ■, PCR-ELISA Messung. Die Ausgleichsgeraden (schwarze Linie) und deren Konfidenzintervalle (68 %, graue Linie) sind eingezeichnet. (▼), reines T-Amplikon, PCR mit RR-DNA ohne Kompetitor; (▲) reines K-Amplikon, PCR mit $2 \cdot 10^4$ Kopien Kompetitor Plasmid. (★) PCR mit Plasmid pCR 35STK zu Normierungszwecken, gleiche Target- und Kompetitor-Mengen als Matrize, im Bereich des Äquivalenzpunktes sind Hilfslinien eingezeichnet. PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 35 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min.

Im ALF-Experiment lag der Signal-Quotient einer PCR mit dem Plasmid pCR 35STK mit 0,96 sehr nahe am theoretischen Wert von 1. Die Differenz der Signale von Kompetitor und Target PCR-Produkt um 4 % lag innerhalb der Variationsbreite, die bei wiederholten PCRs mit dem Plasmid pCR 35STK auftreten ($0,99 \pm 0,06$; N = 4). Diese Ergebnisse bestätigten die grundlegende Annahme, dass der Kompetitor dem Target in der PCR äquivalent ist. Aus diesem Grund wurde dieses und weitere analoge Plasmide als Normierungsplasmid bezeichnet.

Der Einsatz des mit dem Normierungsplasmid pCR 35STK erhaltenen Amplifikongemisches im PCR-ELISA zeigt, welche Signal-Quotienten für das Vorliegen gleicher Kopienzahlen von

Target und Kompetitor in der PCR zu erwarten sind. Dieser Quotient kann daher ebenfalls zum Ablesen des Äquivalenzpunktes einer kompetitiven PCR mit PCR-ELISA-Auswertung dienen. Der durch Hybridisierungs-ELISA ermittelte Signal-Quotient am Äquivalenzpunkt (0,79) liegt unterhalb des entsprechenden Wertes des ALF-Experimentes. Bei dem PCR-ELISA dominiert also das Kompetitor-Signal gegenüber dem Target-Signal (Abb. 40).

Tab. 8 Vergleich von ALF und PCR-ELISA für die Auswertung der kompetitiven PCRs

Die positive und negative Abweichung vom Ergebnismittelwert der Messungen aus Abb. 40, abgelesen am Schnittpunkt der Regression und der Referenzgeraden, wurde durch Ablesen am 68 % Konfidenzintervall der Ausgleichsgeraden ermittelt. Sie sind aufgrund der logarithmischen Achse nicht symmetrisch.

Methode	Target-Kopien/ng DNA	pos. Abweichung Kopie/ng (%)	neg. Abweichung Kopie/ng (%)
ALF	782	27 (3,5)	25 (3,2)
PCR-ELISA	840	53 (6,3)	51 (6,1)

Die Übereinstimmung der PCR-ELISA-Messungen mit der ALF-Analytik bei der Bestimmung des Äquivalenzpunktes innerhalb einer Reihe kompetitiver PCRs bestätigte die Richtigkeit des PCR-ELISA (Tab. 8). Das mittels PCR-ELISA gefundene Ergebnis ($\log K\text{-}(Kopie/PCR) = 5,021 \pm 0,027$) unterschied sich auf der Ebene der logarithmischen Werte nicht signifikant (Students t-Test) von demjenigen der ALF-Analytik ($\log K\text{-}(Kopie/PCR) = 4,990 \pm 0,015$). Die zusätzlich im Experiment gezeigten Werte für PCRs, die ausschließlich Kompetitor- oder Target-Produkt erzeugen, markieren den maximalen Arbeitsbereich des jeweiligen Messverfahrens. Der Signal-Quotient wurde hier aus Messwert und dem korrespondierenden Hintergrund-korrigierten Signal der jeweils anderen Sonde gebildet (Rauschen bzw. Kreuzhybridisierung) und zeigt die maximal möglichen Quotienten. Bei beiden Verfahren findet sich eine prinzipielle Spannweite möglicher Quotienten von 4 bis 5 Dekaden.

6.2.7 Validierung der Kompetitoren für die PCR

Eine wesentliche Voraussetzung für quantitative, kompetitive PCR ist die Gleichheit der Amplifikationseffizienz eines Primerpaares für die beiden korrespondierenden Target- und Kompetitor-Sequenzen. Nach der exemplarischen Überprüfung für das CaMV35S PCR-System wird nun mit zwei weiteren Methoden zur Validierung bestätigt, dass die konstruierten Kompetitoren für die quantitative, kompetitive PCR geeignet sind. Bei der ersten Methode (Endpunktbestimmung, PAGE-Analytik) wird durch Einklonieren von Target- und Kompetitor-Sequenzen in ein Plasmid und Einsatz dieses Normierungsplasmids in der PCR die Gleichheit der initialen Matrizenmoleküle fixiert ("molekulares Fixieren"). Liegen die Produkte nach einer PCR mit vielen Zyklen ebenfalls im gleichen Stoffmengen-Verhältnis (1:1) vor, ist sichergestellt, dass sie mit der gleichen Amplifikationseffizienz vervielfältigt wurden. Es handelt sich um für den PCR-Prozess ununterscheidbare Sequenzen. Bei der zweiten Methode (Bestimmung im exponentiellen Bereich) ist die Untersuchung der einzelnen Amplifikationseffizienzen bei geringen Zyklenzahlen mittels Realzeit-PCR mit SYBR-Green möglich,

ohne dass Kompetition eine Rolle spielt. Hier ist ein wichtiger theoretischer Parameter unabhängig und separat für Target- und Kompetitorsequenz direkt messbar.

6.2.7.1 Prüfung der PCR-Effizienz durch Endpunktbestimmung

Normierungsplasmid pCR RRTK

Das Normierungsplasmid pCR RRTK kann als Matrize in der CaMV35S *Screening*-PCR (Primer 35S3-bio/35S2) und in der Roundup Ready spezifischen RR-PCR (Primer 35S3-bio/petu-r1) dienen und lieferte auf Grund der separat einklonierten Target- und Kompetitor-Sequenzen gleichzeitig Amplikons für die Target- und Kompetitor-Sequenz. Das 605 bp Fragment des *Pvu* II und *Hind* III *Eco* RV geschnittenen Plasmids pCR RR-T enthält die Target Sequenz und wurde in den *Eco* RV und *Hind* III geöffneten, dephosphorylierten und aufgereinigten Vektor pCR RR-K ligiert. Nach Isolierung von Plasmid-DNA und Restriktionsanalyse wurde das erwartete Restriktionsmuster gefunden, die Plasmid DNA (pCR RRTK) eines Klones wurde im Folgenden verwendet.

Normierungsplasmid pCR GMTK

Das Normierungsplasmid pCR GMTK kann als Matrize in der GM0304- (Primer GM03/GM04-bio) oder GM0104-PCR (Primer GM01/GM04-bio) dienen. Es resultieren, den Target- und Kompetitor-Sequenzen des Soja Lektin-Gen Systems entsprechend, beide Amplikons. Das 725 bp große *Hind* III Fragment des Plasmids pCR GMK wurde dazu in den *Hind* III geöffneten, dephosphorylierten und aufgereinigten Vektor pCR GMT ligiert. Nach Isolierung von Plasmid-DNA aus 12 Klone und Restriktionsanalyse wurde bei Plasmiden von 10 Klone das erwartete Restriktionsmuster gefunden, die Plasmid DNA eines Klones wurde im Folgenden eingesetzt. Bei einem Klon war das Insert doppelt in den Vektor ligiert worden; nur bei einem Klonen handelte es sich um ein Religat des Vektors.

PCR mit Normierungsplasmiden

Der Planung des folgenden Versuches liegt zu Grunde, dass das Verhältnis von Target und Kompetitor in der PCR im Verlauf beliebig vieler Zyklen konstant bleiben soll. Nimmt man an, die Amplifikationseffizienzen von Target (E^T) und Kompetitor (E^K) seien gleich, bleibt das initiale Verhältnis (Stoffmengen-Quotient) von Target- (T_0 , Index entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen n) und Kompetitor-Matrizen (K_0), wie es durch die Normierungsplasmide erzwungen wird ($T_0 = K_0$), für alle späteren Zyklen gleich $Q_{St}^{T/K}(n) = 1$ (Gleichung 5). Gleichung 5 geht aus der Division von Gleichung 3 und Gleichung 4 hervor, die das exponentielle Entstehen von Target oder Kompetitor in der PCR beim Durchlaufen von n Zyklen beschreiben. Sie belegt zudem das Q_{St} als Funktion von K_0 eine Hyperbel beschreibt, wenn T_0 konstant ist. Dies führt bei der häufig gewählten, doppeltlogarithmischen Auftragung (vgl. Abb. 40) zu einer linearen Darstellung.

Gleichung 3 $T_n = T_0 (1 + E^T)^n$

Gleichung 4 $K_n = K_0 (1 + E^K)^n$

Gleichung 5 $Q_n^{T/K} = \frac{T_n}{K_n} = \frac{T_0}{K_0} \times \left(\frac{1+E^T}{1+E^K} \right)^n$

Sind die Effizienzen E^T und E^K jedoch unerwünschter Weise ungleich, nimmt auch die Basis des exponentiellen Terms in Gleichung 5 einen Wert ungleich 1 an, der mit der Zyklenzahl potenziert wird. Daraus ergibt sich eine umso größer werdende Abweichung des Verhältnisses (T_n/K_n) nach der PCR zum initialen Verhältnis T_0/K_0 , je mehr Zyklen durchlaufen werden. Für das Beispiel $T_0 = K_0$, $E^T = 95\%$ und $E^K = 85\%$ würde sich für eine kompetitive PCR mit 40 Zyklen ein Stoffmengen-Quotient berechnen, der mit $Q_{St} = 8,2$ deutlich vom richtigen Wert $Q_{St} = 1,0$ abweicht.

Für das beschriebene Experiment wurde aus diesem Grund eine hohe Zyklenzahl gewählt. Bei unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen der hier konstruierten Kompetitoren und der Target-Sequenzen sollten sich unter diesen Bedingungen deutliche Effekte ergeben, die mittels Gelanalytik begutachtet werden können. Dies ist, im Rahmen der Genauigkeit der Gelanalytik, nicht der Fall. Abb. 41 zeigt, dass, gemäß der Erwartung, für alle vier PCR-Systeme gleich intensive Banden erhalten werden.

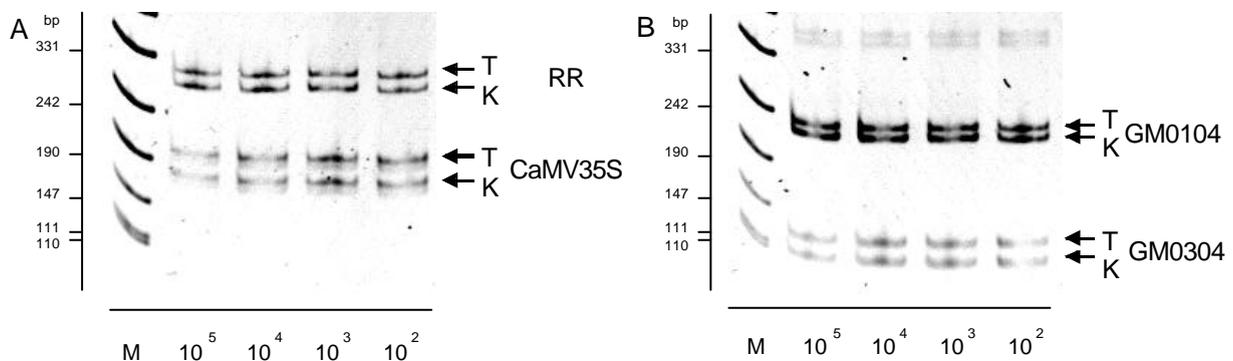


Abb. 41 PCR mit Normierungsplasmiden zur Prüfung auf gleiche Amplifikationseffizienz der Target- und Kompetitor-Sequenz

In vier verschiedenen PCRs wurden sinkende Mengen der betreffenden Normierungsplasmide als Matrize verwendet (10^5 bis 10^2 Kopien/ 25 μ l). PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 50 Zyklen 95°C / 30 s, T_{Anneal} / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min. In der CaMV35S- und RR-PCR wurde das Normierungsplasmid pCR RRTK (Gel A; $T_{\text{Anneal}} = 55^\circ\text{C}$), für die GM0304- und GM0104-PCR das Normierungsplasmid pCR GMTK (Gel B; $T_{\text{Anneal}} = 61^\circ\text{C}$) eingesetzt. In der PAGE wurden zwei analoge PCRs (je 1 μ l) zusammen in einer Spur aufgetragen. M, pUC19 DNA Marker; T, Target-PCR-Produkt; K, Kompetitor-PCR-Produkt.

Um die benachbarte Anordnung von T- und K-Sequenz innerhalb der Normierungsplasmide aufzuheben, wurden pCR RRTK (*Sac* I, *Sma* I) und pCR GMTK (*Eco* RI) vorsorglich restringiert eingesetzt. Im Experiment wurden verschiedene Mengen des Plasmids eingesetzt, um den gesamten Bereich, in dem in Routineexperimenten Äquivalenzpunkte gefun-

den werden, abzudecken. Da bei der PCR durch Produkt-Anreicherung, durch dNTP- und Primer-Verbrauch und durch thermische Inaktivierung der Polymerase ein Übergang von exponentiellem Produktzuwachs in eine Sättigung erfolgt, weisen die angewendeten 50 Zyklen keineswegs die gleiche Effizienz auf. Generell tritt eine Sättigung umso später ein, je weniger Templat zugegeben wird und erhöht somit die Zahl der Zyklen im exponentiellen Bereich.

Für alle vier PCR-Systeme wurden mit den zwei Normierungsplasmiden Banden, sowohl in allen Fällen großer (10^5) als auch niedrige (10^2) Templat-Mengen, von gleicher Intensität erhalten (Abb. 41). Auch bei PCRs mit hohen Templat-Mengen, für die auf jeden Fall der Bereich der Produktsättigung erreicht wurde, in dem die Beschreibung der PCR durch einfache Formeln nicht mehr möglich ist, kommt es ebenfalls zu keiner Verschiebung der Produktverhältnisse. Aus der beobachteten Gleichheit von Target- und Kompetitor-Produktmenge lässt sich ableiten, dass die klonierten Kompetitoren pCR RRK und pCR GMK die gewünschten Kriterien zum Einsatz in der kompetitiven PCR sowohl im exponentiellen Bereich als auch im Bereich der Sättigung erfüllen.

6.2.7.2 Bestimmung der PCR-Effizienz im exponentiellen Bereich

Die Realzeit-PCR mit SYBR-Green bietet die Möglichkeit die Zunahme an Produkt zu verfolgen. Durch Anlagerung des im PCR-Mix vorhandenen Farbstoffes SYBR-Green an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und der daher auftretenden Fluoreszenzerhöhung kann ein Zyklus definiert werden, bei dem eine bestimmte Amplikonmenge erreicht wird. Der betreffende Zyklus, der nicht nur natürliche Zahlenwerte annehmen kann, wird mit C_t (*cycle threshold*, Grenzwertzyklus) bezeichnet, die entsprechende Amplikon-Menge (als Molekülzahl) mit A_{C_t} . Nach Abschluss der PCR kann zusätzlich die Dissoziationstemperatur des DNA/SYBR Green-Adduktes ermittelt werden, die von der Länge und dem GC-Gehalt des Amplikons abhängt. Auf diese Weise kann zwischen dem Erscheinen von korrekten Amplikons (lang) und Primer-Dimeren (kurze Fragmente), die ebenfalls ein Signal erzeugen, unterschieden werden. Aus Gleichung 6, die als Spezialfall der Gleichung 3 das exponentielle Entstehen von A_{C_t} nach C_t Zyklen aus der Anfangsmenge A_0 der Matrizenmoleküle beschreibt, ergibt sich durch Umformung Gleichung 7, die den linearen Zusammenhang zwischen Zykluszahl C_t (Abhängige) und dem Logarithmus der Anfangsmenge $\log A_0$ (Variable) beschreibt. Die eingangs erwähnte Effizienz (E) einer PCR ist somit durch die Steigung experimentell zugänglich (Gleichung 8).

$$\text{Gleichung 6:} \quad A_{C_t} = A_0 \times (1+E)^{C_t}$$

$$\text{Gleichung 7:} \quad C_t = \frac{\log A_{C_t}}{\log(1+E)} - \frac{1}{\log(1+E)} \times \log A_0$$

$$\text{Gleichung 8:} \quad E = \exp(-\Delta \log A_0 / \Delta C_t) - 1$$

Mit dieser Methode wurde für vier Primersysteme die Effizienz der einzelnen Target- oder Kompetitor-PCRs bestimmt. Sowohl für Target- als auch für Kompetitor-PCRs wurde die erwartete lineare Abnahme der Ct-Werte bei steigender Anfangsmenge der Matrizenmoleküle gefunden (Abb. 42). Die jeweils korrespondierenden PCRs mit homologen Target- oder Kompetitor-Produkten wiesen etwa gleiche Effizienzen auf, die sich gemessen an den überlappenden Fehlerbereichen nicht signifikant voneinander unterscheiden (Tab. 9). Auch mit dieser Methode, die nicht durch Konkurrenz während der PCR beeinflusst wird, wurde für die Eignung der konstruierten Kompetitoren grundlegend bestätigt.

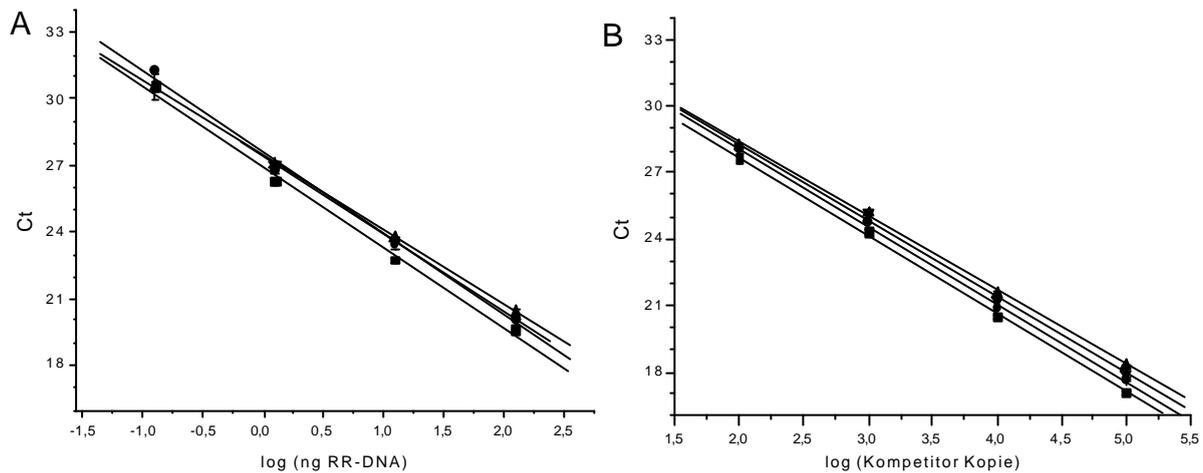


Abb. 42 Realzeit-PCR mit genomischer DNA aus RR (Target) und Kompetitoren

In einer Realzeit-PCR mit SYBR-Green (25 μ l Ansatz) wurden unter Verwendung von AmpliTaq Gold und SYBR Green, sowie: A, steigende Mengen genomische DNA, nach Wizzard II Protokoll aus ganzen Roundup Ready Bohnen isoliert, und B, sinkende Mengen des Doppelkompetitor Plasmids pCR RRGGMK als Matrize in einem GeneAmp 5700 PCR-Block mit Fluoreszenzdetektion eingesetzt. PCR (●) CaMV35S, (■) RR, (▲) GM0304, (▼) GM0104; PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; Zyklen (95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s).

Wird der Mittelwert der Amplifikationseffizienzen genutzt, um nach Gleichung 5 (Seite 92) den Stoffmengen-Quotienten einer kompetitiven PCR mit dem Normierungsplasmid ($Q_{St} = T_0/K_0 = 1$) nach beispielsweise 40 Zyklen zu berechnen, werden von $Q_{AP} = 1$ abweichende Ergebnisse vorausgesagt. Der Quotient für die Normierungsplasmide betrüge nach dieser theoretischen Betrachtung für das CaMV35S-PCR-System $Q_{St} = 0,40$, für das RR-PCR-System $Q_{St} = 0,33$, für das GM0304-PCR-System $Q_{St} = 0,77$ und für des GM0104-PCR-System $Q_{St} = 0,72$. Das spiegelt wider, dass in allen vier PCR Systemen die jeweilige Targetsequenz tendenziell eine geringere Effizienz als die etwas kürzere Kompetitorsequenz aufweist. Wahrscheinlich lässt sich das auf die unterschiedliche Länge zurückführen, da längere Amplikons, bei gleichem PCR-Programm, generell eine Tendenz zu geringerer Effizienz aufweisen [121]. Da die experimentelle Ergebnisse mit Normierungsplasmiden (Abb. 41) zeigten, dass in allen vier PCRs beide Amplikons gleich effizient amplifiziert werden, ist die theoretische Voraussage der Konkurrenz anhand isoliert bestimmter Effizienzen der Sequenzen offensichtlich von begrenztem Wert.

Tab. 9 Vergleich von Amplifikations-Effizienzen

R, Korrelationskoeffizienten für die linearen Regressionen in Abb. 42; S, Zahl der in die Regression eingegangenen Messpunkte; E, Amplifikations-Effizienz nach Gleichung 8; ΔE , Fehler der Effizienz, ermittelt aus dem Fehler des Steigungsfaktors der linearen Regression.

PCR	Matrize ^a	Größe	R	S	E (%)	ΔE (%)
CaMV35S	T	191 bp	0,9975	4	88,2	6,0
	K	164 bp	0,9994	4	92,6	3,0
RR	T	313 bp	0,9974	4	86,4	5,8
	K	286 bp	0,9997	4	91,6	1,6
GM0304	T	118 bp	0,9999	4	98,1	1,4
	K	103 bp	0,9994	4	99,4	3,3
GM0104	T	234 bp	0,9997	3	92,1	3,0
	K	219 bp	0,9990	4	93,7	4,1

^a T, Targetsequenz, RR-DNA; K, Kompetitor, Doppelkompetitorplasmid

Quantifizierung der DNA durch Realzeit-PCR

Durch die hier gezeigte Realzeit-PCR mit SYBR-Green war ebenfalls eine Quantifizierung der DNA möglich, wenn bekannte Mengen DNA als Kalibrator dienen. Im vorliegenden Fall diente die Kompetitorsequenz, die die gleiche Amplifikationseffizienz wie das jeweilige Target besitzt, zur externen Kalibration. Das Kompetitorplasmid ist ein UV-quantifizierter Standard, so dass Abb. 42B eine Kalibration der Messgröße Ct-Wert versus Anzahl der Matrizenmoleküle darstellt. Die Anzahl Matrizenmoleküle der genomischen RR-DNA konnte für die drei größeren DNA-Mengen, deren Ct-Werte in Bereich der Kalibrationsgeraden liegen, ermittelt werden (Abb. 43).

Bei der Beurteilung der Quantifizierung durch Realzeit-PCR ist ausschlaggebend, dass die Ergebnisse untereinander keinen Widerspruch ergeben. Keiner der gefundenen Werte weicht signifikant von den anderen drei Ergebnissen ab. Die in der CaMV35S-PCR amplifizierte Sequenz ist Teil der amplifizierten Sequenz der RR-PCR. Gleiches gilt für die Sequenz der GM0304- und GM0104-PCR (vgl. Abb. 19, Seite 64). Daher müssen diese Paare jeweils zwingend übereinstimmen. Von beiden unabhängigen Sequenzen (RR-Konstrukt und Lektin-Gen) ist bekannt, dass sie beide in einfacher Kopie im Soja-Genom vorkommen, daher müssen sie bei intakt isolierter, genomischer DNA im gleichen Verhältniss vorkommen. Der gefundene Einklang lässt den Schluss auf die interne Konsistenz der Ergebnisse der Quantifizierung durch Realzeit-PCR mit externer Kalibration durch Kompetitor-Plasmid zu.

Der Mittelwert aller vier PCR-Systeme beträgt 183 ± 7 Kopien/ng DNA, dies sind nur circa 22 % der in der Literatur gefunden Kopienzahl (Propidiumjodid-Färbung der DNA in Zellen, *Flow-Zytometrie*, 818 Kopien pro ng) [122]. Der direkte Vergleich ist wahrscheinlich nicht sinnvoll, da in der PCR-Methodik eine Quantifizierung über die Amplifizierung der Gene, bei der *Flow-Zytometrie* jedoch ein Summenparameter für die Anlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes gemessen wird.

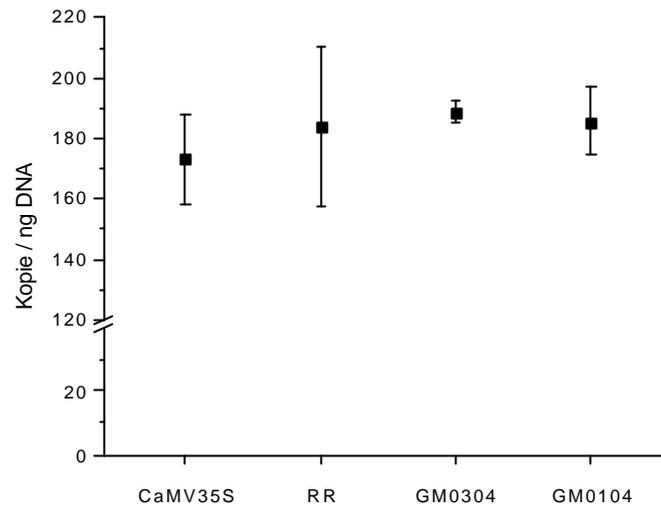


Abb. 43 DNA-Quantifizierung durch Realzeit-PCR mit externer Kalibration

Bestimmung der Kopienzahl für je drei RR-DNA-Extrakte (Abb. 42A, 1,25; 12,5 und 125 ng) anhand der externen Kalibration (Abb. 42B) mit bekannten Mengen des Doppelkompetitor-Plasmids pCR RRKGMK.

Eine Quantifizierung durch Realzeit-PCR mit SYBR-Green ohne interne Kontrollen kann nur erfolgreich sein, wenn in jeder einzelnen Probe Inhibition vollständig ausgeschlossen ist. Dies wird hier durch die Analyse einer Verdünnungsreihe sichergestellt. Läge eine PCR-Inhibition durch einen Störstoff vor, würde sich dessen Einfluss durch die Verdünnung reduzieren, die Effizienz der Reaktion würde folglich steigen und die idialerweise lineare Kennlinie Ct versus Proben-Verdünnung würde eine Krümmung aufweisen.

6.2.7.3 Heteroduplex-Bildung durch homologe Kompetitoren

Bei der Auswertung kompetitiver PCRs unter Verwendung von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen traten bei gleichzeitiger Erzeugung von T- und K-Amplikons zusätzliche Banden geringerer Mobilität auf. Im Folgenden wird der Nachweis geführt, dass es sich dabei nicht um hochmolekulare und vollständig doppelsträngige DNA-Störprodukte handelte, sondern um Heteroduplex DNA. Die Bildung solcher Komplexe ist auf homologe Sequenzen in der kompetitiven PCR beschränkt.

Der Grad der Heteroduplex Bildung hängt vom Verhältnis der Amplikons zueinander und dem Temperaturprofil des PCR-Programmes ab. Es ist bei gleichen Konzentrationen von Target- und Kompetitor-Amplikon am stärksten ausgeprägt. In einer typischen Serie kompetitiver PCRs mit einem DNA-Extrakt und einer Verdünnungsreihe des Kompetitors wird dieser Äquivalenzpunkt bewusst durchlaufen. Der Heteroduplex-Effekt trägt zur Reduktion der Target- und Kompetitor-Bandenintensitäten bei und erschwert so die optische Gelauswertung.

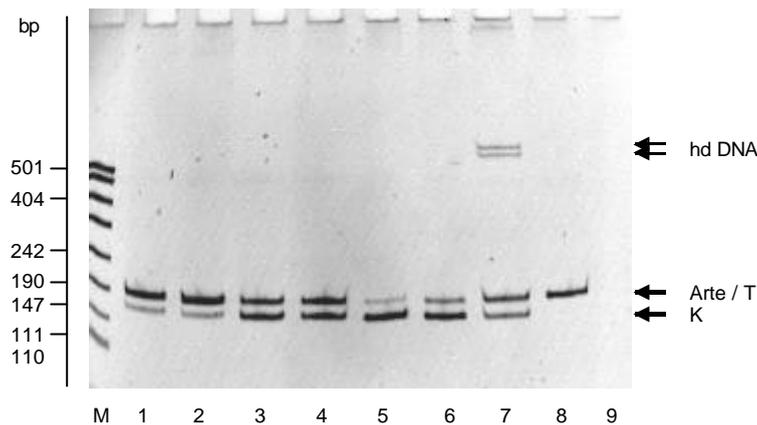


Abb. 44 Vermeidung der Heteroduplex-Bildung durch heterologe Sequenzen in der kompetitiven PCR

Eine konstante Menge CaMV35S Kompetitor (pCR 35SK) wurde mit einer sinkenden Menge pCR 35SArte (Spuren 1 bis 6) in einer PCR mit den Primern 35S1/35S2 eingesetzt. PAGE, Ethidiumbromid-Färbung; Spur 7, PCR mit pCR 35STK; Spur 8, Target-Amplikon, PCR mit RR-DNA; Spur 9, Reagenzienkontrolle der PCR. PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 40 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Pfeile kennzeichnen die Laufweite der erwartete PCR-Produkte: Spur 1 bis 6, Artefakt-Amplikon (184 bp, Arte); Spur 7 und 8, Amplikon der CaMV35S-Sequenz (195 bp, Target, T); Arte und T haben trotz unterschiedlicher Größe gleiche Laufweiten. Spuren 1 bis 7, Amplikon des CaMV35S Kompetitors (168 bp, K); Gleiche Mengen homologen Amplikons von T und K führen in der PCR zu Heteroduplex-Banden (hd DNA)

In Abb. 44 ist die Heteroduplex-Bildung der Amplikons im CaMV35S PCR-System gezeigt. Durch PCR mit dem Plasmid pCR 35STK als Matrize wurden gezielt gleiche Mengen T- und K-Amplikon erzeugt, die nach gelelektrophoretischer Trennung zwei zusätzliche Heteroduplex-Banden im Bereich ≥ 500 bp aufwiesen. Der heterologe Artefakt-Kompetitor wies außer den gleichen Primerbindungsstellen keine signifikante Homologie zu den Produkten des CaMV35S-Systems auf (Abb. 21, Seite 67). Da das Amplikon des Artefakt-Kompetitors sich trotz unterschiedlicher Größe (11 bp Differenz) nach PAGE nicht vom CaMV35S-Target Amplikon unterscheiden ließ, wurde für die hier interessierende Fragestellung die kompetitive PCR mit einer konstanten Menge Kompetitor-Plasmid durchgeführt. Die in der PCR-Serie eingesetzten Verdünnungen des Artefakt-Kompetitors wurden experimentell so justiert, dass sie den Bereich gleicher Amplikonmengen überstrichen. Im Gegensatz zu den homologen Sequenzen wurde hier keine Heteroduplexbildung beobachtet.

Ein Erklärungsansatz für die Bildung einer Heteroduplex DNA aus zwei homologen Sequenzen von dsDNA-Target (Einzelstränge: T^A/T^B) und -Kompetitor (Einzelstränge K^A/K^B) ist in Abb. 45 dargestellt. Es resultieren jeweils zwei Heteroduplex-Spezies (T^A/K^B und T^B/K^A) mit Bereichen von einzel- und doppelsträngiger DNA, die die gefundene Retardierung und das Auftreten zweier Banden für topologisch verschiedene Spezies erklären. Liegt eine Endonuklease-Erkennungssequenz (*Eco* RV, *Sma* I) innerhalb des postulierten Bereiches einzelsträngiger DNA der Heteroduplex vor, kann an dieser Stelle nicht restringiert werden, beide Heteroduplex Banden bleiben erhalten. Liegt eine Endonuklease-Erkennungssequenz (*Xmn* I, *Cfo* I) jedoch innerhalb des Bereiches doppelsträngiger DNA vor, werden sowohl die höhermolekularen Heteroduplex Spezies als auch die konventionellen Amplikons restringiert.

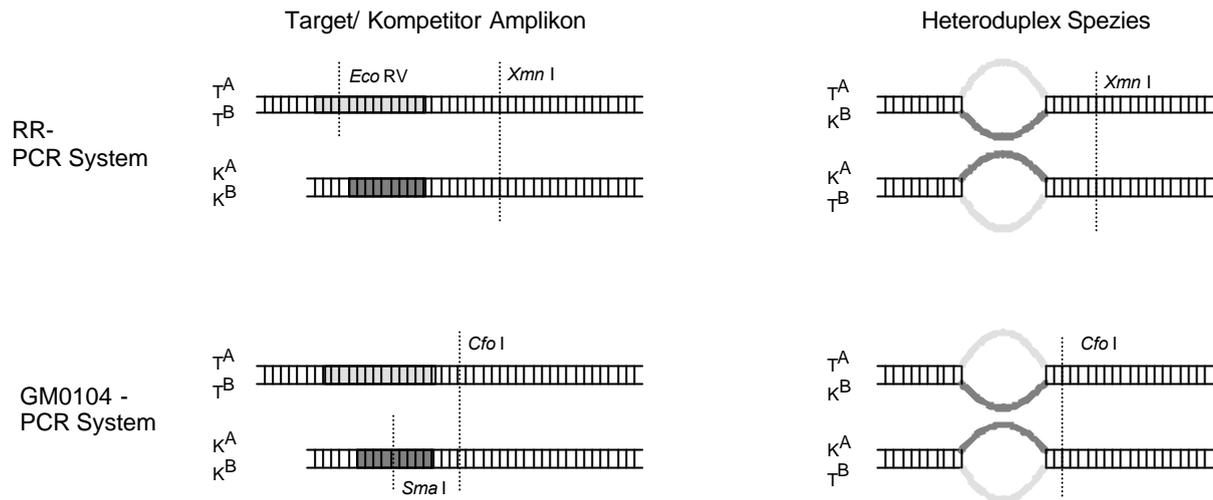


Abb. 45 Heteroduplexbildung aus homologen Einzelsträngen

Schematische Darstellung der PCR-Produkte aus den Einzelsträngen T^A/T^B für das Target und K^A/K^B für den Kompetitor und den durch gemischte Hybridisierung möglichen Heteroduplex Strukturen. Endonuklease-Erkennungssequenzen, gestrichelte Linien; hellgraue Bereiche: Sequenz, die ausschließlich im Target-Amplikon vorliegt; dunkelgraue Bereiche, Sequenz, die ausschließlich im Kompetitor-Amplikon vorliegt; die restlichen Bereiche weisen identische Sequenzen auf, Striche zwischen oberem und unteren Einzelstrang symbolisiert Basenpaarung; Darstellung nicht maßstabsgetreu.

Außer im CaMV35S-System trat Heteroduplexbildung ebenfalls bei Konkurrenz bei der Roundup Ready spezifischen PCR (RR, Primer 35S3-bio/petu-r1) und bei der kompetitiven Soja Lektin-Gen PCR (GM0104, Primer GM04-bio/GM01) auf. Das gleiche gilt für die GM0103-PCR (Primer GM04-bio/GM03, Daten nicht gezeigt). Durch Restriktionsanalyse lassen sich Aussagen über die Struktur treffen. Die resultierenden Fragmente sind in Tab. 10 zusammengefasst. Im Kompetitor der RR-PCR ist bei der Konstruktion (Abschnitt 6.2.5.2) eine *EcoRV*-Erkennungssequenz durch Deletion fortgefallen, eine ursprüngliche *XmnI*-Sequenz blieb in beiden Produkten erhalten. Die Restriktion mit *EcoRV* führte, dem Modell entsprechend, bei dem Targetprodukt zu Spaltfragmenten, ließ jedoch die Heteroduplex DNA und Kompetitor Amplikon unbeeinflusst (Abb. 46A). Im Gegensatz dazu wurden von *XmnI* sowohl Target- und Kompetitor-Amplikon als auch die Heteroduplexspezies vollständig gespalten. Es wurden keine unerwarteten Fragmente gefunden. Dies bestätigt die Hypothese, dass die hochmolekularen Banden aus Heteroduplex-DNA bestehen, die sich aus den bekannten Sequenzen zusammensetzen.

Tab. 10 Produkte der Restriktionsanalyse von Heteroduplex Spezies

Die Fragmentgröße von Target- oder Kompetitor-Amplikon und die nach Restriktion erwarteten Fragmente sind angegeben.

PCR-Primer	Target	Kompetitor
RR	313 bp $\xrightarrow{\text{EcoRV}}$ 151 bp + 162 bp	286 bp $\xrightarrow{\text{EcoRV}}$ keine Fragmentierung
RR	313 bp $\xrightarrow{\text{XmnI}}$ 202 bp + 111 bp	286 bp $\xrightarrow{\text{XmnI}}$ 175 bp + 111 bp
GM0104	234 bp $\xrightarrow{\text{SmaI}}$ keine Fragmentierung	219 bp $\xrightarrow{\text{SmaI}}$ 147 bp + 72 bp
GM0104	234 bp $\xrightarrow{\text{CfoI}}$ 117 bp + 117 bp	219 bp $\xrightarrow{\text{CfoI}}$ 117 bp + 102 bp

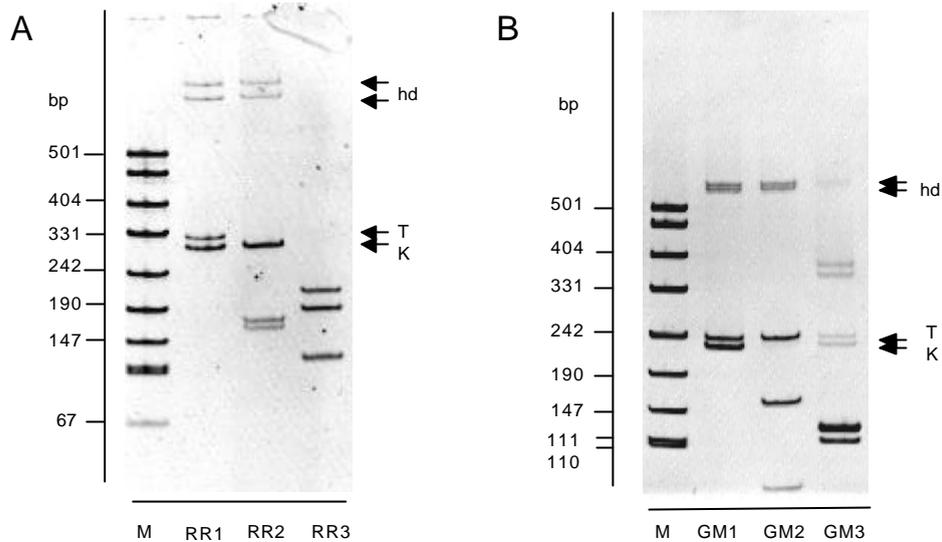


Abb. 46 Heteroduplex Strukturhinweise durch Restriktionsanalyse

Gleiche Mengen Kompetitor (K) und Target (T) Amplikon wurden in zwei PCR-Ansätzen erzeugt, vor und nach unterschiedlichen Restriktionen durch PAGE (Ethidiumbromid-gefärbt) analysiert; Heteroduplex DNA, hd; A: RR1, Roundup Ready PCR (Primer 35S3-bio/petu-r1) mit Plasmid pCR RRTK; RR2, *Eco* RV-Restriktion der Produkte aus Spur RR1; RR3, *Xmn* I-Restriktion der Produkte aus Spur RR1. B: GM1, Soja Lektin-Gen PCR (Primer GM04-bio/GM01) mit Plasmid pCR GMTK; GM2, *Sma* I-Restriktion der Produkte aus Spur GM1; GM3, *Cfo* I-Restriktion der Produkte aus Spur. M, pUC19 DNA Marker.

Bei dem Kompetitor des GM0104-Systems ist durch PCR-Mutagenese eine *Sma* I-Schnittstelle neu eingeführt worden (Abschnitt 6.2.5.3) und eine *Cfo* I-Schnittstelle bleibt erhalten. Wie erwartet spaltet *Sma* I auch das entsprechende Kompetitor Amplikon und belässt die Heteroduplex-DNA unbeeinflusst (Abb. 46B). Im Gegensatz dazu spaltet *Cfo* I sowohl Target- und Kompetitor-Amplikon als auch die Heteroduplex-Spezies. Es wurde eine größere Menge DNA aufgetragen, so sind neben den bekannten Fragmenten aus Target und Kompetitor ebenfalls zwei verkürzten Heteroduplex Spezies (350-380 bp) zu erkennen. Diese Restriktionen liefern ebenfalls Indizien für das Vorliegen der postulierten Heteroduplex-Struktur.

Da Heteroduplices einzelsträngige Bereiche aufweisen, sollten sie ohne weitere Denaturierung eine Hybridisierung mit beiden Sonden erlauben. Dies konnte durch Vergleich der PCR-Produkte mit und ohne Heteroduplex erfolgreich nachgewiesen werden. RR-Target und RR-Kompetitor Amplikon als reine Produkte und als Gemisch, wie sie nach PCR mit einem Normierungsplasmid erhalten werden, wurden in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert und mit der Target- (RR-T-Dig) oder Kompetitor-Sonde (RR-K-Dig) hybridisiert (Abb. 47B und C). War Heteroduplex DNA in den Produkten anwesend, wurde ein Signal erhalten, das die erwartete Hybridisierung anzeigte. Es lag deutlich über den Hintergrundsignalen für Versuche, bei denen keine DNA immobilisiert worden war oder ein nicht zur Sonde passendes Amplikon vorlag. Erstaunlicher Weise vermochte die einzelsträngige Sonde auch an das passende, jedoch doppelsträngig vorliegende Amplikon ohne vorherige Denaturierung zu binden. Dies könnte durch eine Gleichgewichtsreaktion, einen Einschub in den Doppelstrang möglich sein. Dennoch ist der Signalzuwachs bei Anwesenheit von

Heteroduplex DNA 2- bis 7-fach größer. Die freie Zugänglichkeit der Sondenbereiche ist ein weiteres Indiz für die Schleifenstruktur der Heteroduplices.

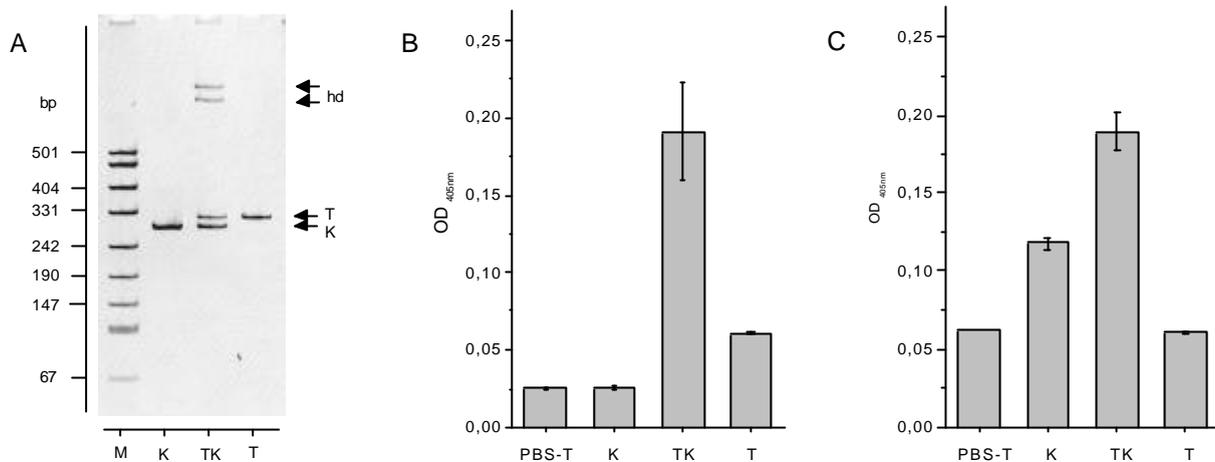


Abb. 47 Direkte Hybridisierung der RR-Amplikons mit Heteroduplex-Struktur

Biotinylierte PCR-Produkte (A, PAGE Ethidiumbromid-gefärbt) der RR-PCR (Primer 35S3-bio/petu-r1, 2 μ l) wurden in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert und ohne Denaturierung bei Raumtemperatur mit der Sonde RR-T-Dig (B) und RR-K-Dig (C) (40 min, in Hybridisierungspuffer des PCR-ELISA) inkubiert. Eine Immundetektion mit anti-Dig-F_{ab}-AP-Konjugat (40 min) und Farbreaktion (60 min) wurde gemäß PCR-ELISA-Protokoll durchgeführt. K, Kompetitor-Produkt (290 bp), durch PCR mit Plasmid (pCR RRK, 10⁶ Kopien/25 μ l) erzeugt; TK, Gemisch der Amplikons nach PCR mit Plasmid pCR RRTK (10⁶ Kopien/25 μ l); T, Target-Amplikon (313 bp), durch PCR mit RR-DNA (CTAB II Extraktion, 125 ng/25 μ l). M, pUC19 DNA-Marker; PBS-T, Hintergrundsignal des ELISA bei Verwendung des Verdünnungspuffers.

6.2.7.4 Einsatz des heterologen Kompetitors (Artefakt) in der PCR

Das Plasmid pCR 35SArte war durch Selektion klonierter PCR-Produkte mit reduzierter Spezifität gefunden worden (Abschnitt 6.2.5.2). Es enthielt ein PCR-Artefakt mit korrekten Primerbindungsstellen (Primer 35S1/35S2), das jedoch eine andere interne Sequenz aufwies und sich daher in Restriktionsschnittstellen von der CaMV35S Promotorsequenz unterschied. Dieses PCR-Artefakt wies Ähnlichkeit zur ursprünglichen CaMV35S-Sequenz in der Länge (Promotorsequenz 195 bp / Artefakt 184 bp) und der Basenzusammensetzung (49,7 % GC / 50,5 % GC) auf. Dieses Plasmid war daher prinzipiell als heterologer Kompetitor in einer quantitativen, kompetitiven PCR geeignet. Dies wurde überprüft.

Da das Justieren zweier Plasmidlösungen auf gleiche Menge Templat für die PCR nicht trivial ist (siehe Reproduzierbarkeit von Kompetitorpräparationen, Abschnitt 6.2.7.6 und Einfluss der Vollständigkeit der präparativen Restriktion, Abschnitt 6.2.7.5) und kleine Differenzen durch die exponentielle Vervielfältigung der PCR eventuell überproportional verstärkt werden, wurde wieder der Ansatz des "molekularen Fixierens" gewählt (Abschnitt 6.2.7, Seite 90). Hierbei werden Sequenzen, die in gleicher Kopienzahl eingesetzt werden sollen, durch Klonierung in einem Plasmid vereinigt. Der CaMV35S Kompetitor pCR 35SK (Abschnitt 6.2.5.1) stellt als zur Targetsequenz homologer Kompetitor die Referenz zu dem Artefaktkompetitor dar. Im Folgenden ist zuerst die Klonierung benötigter Plasmide und anschließend ein PCR-Experiment mit ALF-Analyse der Produkte beschrieben.

Kontrollplasmide pCR 35SKArte und pCR 35STArte

Zwischen den beiden einklonierten Sequenzen des Normierungsplasmids pCR 35STK (3772 bp) befinden sich zwei *Sma* I-Schnittstellen, die ein 204 bp-Fragment flankieren, das durch *Sma* I-Restriktion, Gelaufreinigung des Restvektors und dessen Religation im Plasmid pCR 35STK Δ *Sma* (3568 bp) deletiert wurde. Durch dessen *Bam* HI-*Pvu* II-Restriktion wurden zwei Fragmente, die die Target- oder Kompetitor-Sequenz enthalten, gewonnen und nach jeweiliger Gelaufreinigung mit dem *Bam* HI-*Sma* I geöffneten Artefakt-Kompetitor Plasmid pCR 35SArte ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden mittels Restriktion analysiert. Es entstanden die Plasmide pCR 35STArte und pCR 35SKArte, die die Target- bzw. die Kompetitor-Sequenz mit der Artefaktsequenz fusionieren.

Kontrollplasmid pCR 35STKArte

Eine Vereinigung aller drei Sequenzen (T, K, Arte), die in einer PCR mit den Primern 35S1 und 35S2 ein Amplikon ergeben, wurde durch Ligation des 617 bp großen NotI-Fragmentes aus pCR 35STK, das die CaMV35S-Target und -Kompetitor Sequenz enthält, in das NotI geöffnete Plasmid pCR 35SArte (3145 bp) erreicht. Der Vektor wurde dephosphoryliert und wie das Insert gelelektrophoretisch aufgereinigt in einer Ligation eingesetzt. Die erhaltene Plasmid-DNA (pCR 35STKArte) wurde durch Restriktionsanalyse überprüft.

ALF-Analyse zu Artefakt, Target- und Kompetitor-Amplikons

Um Störprodukte durch überlappende PCR zu vermeiden, wurden die DNA-Stränge zirkulärer Plasmide durch Restriktion zwischen zwei zu amplifizierenden Sequenz-Bereichen, unterbrochen. Das Plasmid mit der einklonierten Artefakt-Sequenz pCR 35SArte wurde dazu mit *Eco* RV linearisiert eingesetzt. Die Plasmide pCR 35ST und pCR 35SK wurden vor ihrem Einsatz mit *Eco* RI linearisiert. Um im Falle des pCR 35STKArte die drei Stellen, die amplifiziert werden können, zu trennen, wurde das Plasmid mit *Eco* RI und *Eag* I restringiert und dadurch 3 gleich große Fragmente, die jeweils als Templat dienten, erhalten. Das Plasmid pCR 35SKArte und pCR 35STArte wurden mit *Bam* HI und pCR 35STK mit *Sma* I linearisiert.

Mit 35S2-Cy5 stand ein Fluoreszenzfarbstoff-markierter Primer zur Verfügung, so dass die PCR-Produkte mit dem ALFexpress DNA Analysensystem quantitativ analysiert werden konnten. Dienten Target, Kompetitor und Artefakt der PCR einzeln als Templat, ergaben sich Fluoreszenzsignale bei den erwarteten Amplikon-Größen (Abb. 48, T, K, A). Diente jedoch pCR 35STKArte (K+A+T) unter gleichen Bedingungen als Templat, dominiert der Peak für die amplifizierte Artefakt-Sequenz deutlich (Verhältnis, K:A:T = 2:10:1) gegenüber den beiden anderen Amplikons. Ein ähnliches Bild ergab sich auch für pCR 35SArteK (A+K) und pCR 35SArteT (A+T). Hier zeigte ebenfalls das Amplikon des Artefakt-Kompetitors ein wesentlich höheres Signal als die koamplifizierten Sequenzen für CaMV35S-Target (A:T = 10:1) oder -Kompetitor (A:K = 3:1). Ein dem Verhältnis der eingesetzten Templat-Menge entsprechendes Amplikon-Verhältnis wurde lediglich nach PCR mit dem Plasmid pCR 35STK gefunden. Zwei etwa gleich große Peaks mit bevorzugter Bildung des kleineren

Amplikons zeigen, dass CaMV35S- Target und -Kompetitor mit ähnlicher Effizienz amplifiziert wurden (K:T = 10:9).

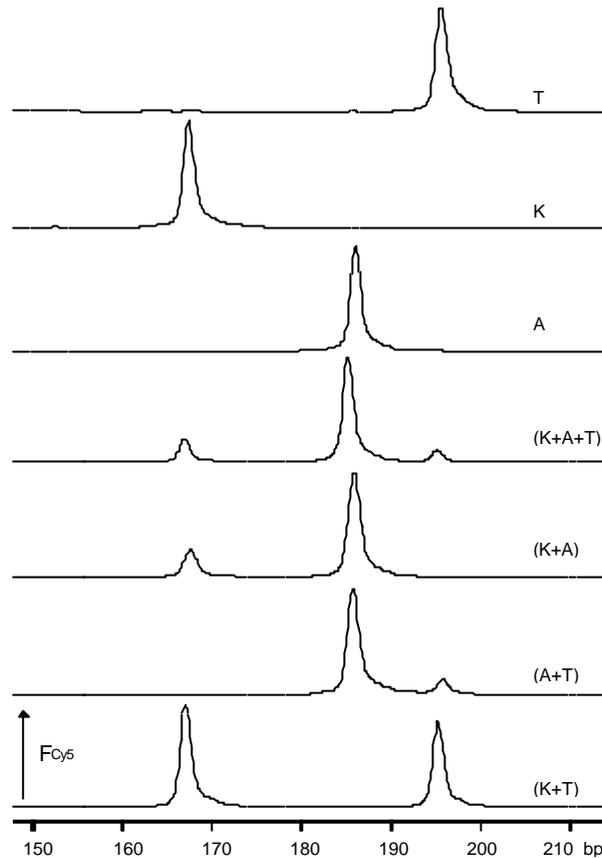


Abb. 48 Validierung potenzieller Kompetitoren der CaMV35S-PCR

PCR-Produkte (Primerpaar 35S1/35S2-Cy5) wurden durch Gelelektrophorese getrennt (ALFexpress DNA Analysesystem) und mit Hilfe des Cy5-Fluoreszenzsignals quantifiziert (F_{Cy5} , Ordinatenwerte skaliert auf den Maximalwert). PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 35 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 30 s; finale Elongation 72°C / 5 min). Als Matrize (10^3 bis 10^4 Kopien/25 μ l) in den Reaktionen dienten folgende Plasmide: T, pCR 35ST; A, pCR 35SArte; K, pCR 35SK; K+A+T, pCR 35STKArte; K+A, pCR 35SKArte; A+T, pCR 35STArte; K+T, pCR 35STK. Amplikongrößen: T, Target CaMV35S Sequenz der Roundup Ready Soja, 195 bp; K: CaMV35S-Kompetitor, 168 bp; A, heterologer-Artefakt Kompetitor, 184 bp. Skalierung der Abszisse mit internem ALF-Standard bei 100 + 300 bp.

Aus diesen Untersuchungen folgt, dass das Artefakt-Plasmid als heterologer Kompetitor im Gegensatz zum homologen CaMV35S-Kompetitor nicht zur fehlerfreien Quantifizierung durch kompetitive PCR unter Annahme äquivalenter Amplifikation genutzt werden kann, da es bei gemeinsamer PCR mit der CaMV35S-Promotor Sequenz überproportional amplifiziert wird.

6.2.7.5 Einsatz linearisierter Plasmide

Die kloniert vorliegenden Kompetitoren können prinzipiell zirkulär oder linearisiert in der kompetitiven PCR eingesetzt werden. In sämtlichen Versuchen dieser Arbeit wurden restringierte Plasmide eingesetzt. Zur Demonstration der Bedeutung dieses Präparations-Schrittes

wurde ein DNA-Extrakt von RR-haltigem Mehl (1 %, CTAB II- Extraktionsprotokoll) im direkten Vergleich von geschnittenem und ungeschnittenem Kompetitor pCR 35SK eingesetzt.

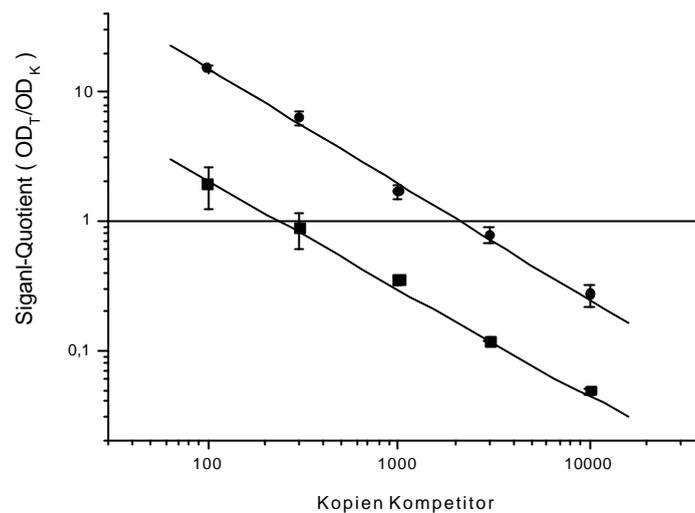


Abb. 49 Vergleich von linearisiertem und zirkulärem Plasmid in der kompetitiven PCR

DNA aus 1 % RR-Mehl (125 ng, CTAB II Extraktion) wurde mit Verdünnungen des *Eco* RI- linearisierten (■) oder zirkulären (●) Kompetitor-Plasmids pCR 35SK eingesetzt. PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 35 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Die Reaktionsansätze wurden durch PCR-ELISA analysiert.

Beide Serien von kompetitiver PCRs wurden anschließend durch PCR-ELISA analysiert (Abb. 49). Bei doppeltlogarithmischer Auftragung des Signal-Quotienten gegen die eingesetzte Kopienzahl wurden zwei parallele Geraden erhalten ($R_{\text{linear}} = 0,998$ und $R_{\text{zirkulär}} = 0,993$). Der Schnittpunkt mit der horizontalen Linie beim Signal-Quotienten 1, als Näherungswert für das Vorliegen gleicher T- und K-Amplikonmengen, lag für linearisiertes Kompetitor-Plasmid bei 230 Kopien, für zirkuläres bei 2174 Kopien. Für das Erreichen des gleichen Signal-Quotienten war bei Verwendung von zirkulärem Plasmid die 9,5-fache Menge Kompetitor notwendig. Die Amplifizierbarkeit des zirkulären Plasmids in den anfänglichen Zyklen der PCR war also viel geringer als die Amplifizierbarkeit der linearisierte DNA. Der gezeigte Effekt ist ein wichtiger Aspekt bei dem Vergleich zweier Serien kompetitiver PCRs mit unabhängig hergestellten Kompetitor-Verdünnungsreihen, da nur bei vollständigem Schnitt gleiche Ergebnisse (Kopien /DNA-Menge) zu erwarten sind.

6.2.7.6 Reproduzierbarkeit der Kompetitor Präparation

Die Reproduzierbarkeit der am Äquivalenzpunkt einer kompetitiven PCR vorliegenden Anzahl Kompetitorkopien wurde durch Einsatz von vier unabhängig voneinander hergestellten und verdünnten Kompetitorpräparationen überprüft.

Ausgehend von der Stammkultur eines Klonen (*E. coli* XL10 gold pCR 35SKGMk) wurde Plasmid-DNA isoliert, *Eco* RV restringiert, mittels UV-Spektrum quantifiziert, mit Hering Sperma-DNA-haltigem Tris-Puffer verdünnt (10^2 bis 10^5 Kopien/ μ l) und mit DNA aus RR-Mehl einer kompetitiven PCR unterzogen. Pro Verdünnungsreihe wurden fünf PCRs durchgeführt, die durch PCR-ELISA mit den Sonden RR-T-Dig und RR-K-Dig analysiert wurden. Eine PCR mit dem Normierungsplasmid pCR 35STK wurde dabei ebenfalls im PCR-ELISA mitgeführt. Zur Ermittlung des Äquivalenzpunktes jeder Verdünnungsreihe diente

der PCR-ELISA Signal-Quotient der Amplikons eines Normierungsplasmids (Abb. 50). Die Ablese erfolgte beim Schnittpunkt von Messpunkte-Regressionsgerade und horizontaler Gerade in Höhe des Normierungsplasmid-Quotienten.

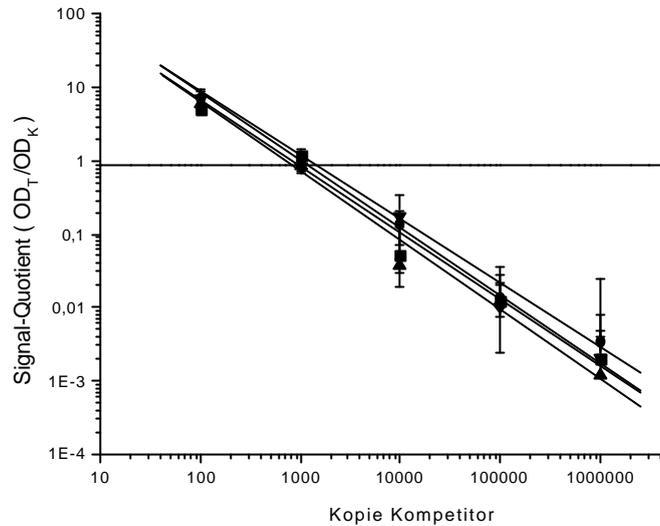


Abb. 50 Reproduzierbarkeit der Kompetitor Präparationen

Ein DNA-Extrakt (1 % RR-DNA, 75 ng/ PCR) wurde mit vier unabhängig und parallel präparierten Kompetitor-Verdünnungsreihen (V1, ▼; V2, ■; V3, ▲; V4, ●) in einer kompetitiven PCR (Primer 35S3-bio/35S2) eingesetzt und durch PCR-ELISA analysiert. Die horizontale Linie ($Q_{Si} = 0,906$, durch Messung mit dem Normierungsplasmid pCR 35STK ermittelt) diente zur Ablese des ÄP.

Die Streuung der Kopienzahlen am Äquivalenzpunkt (SD des MW- $K_{\text{ÄP}}$) ist vergleichbar mit den Ablesefehlern ($\Delta K_{\text{ÄP}}$) die sich aus den individuellen linearen Regressionen ergaben (Tab. 11). Nach diesem Kriterium wichen die vier Ergebnisse nicht signifikant voneinander ab. Bei Betrachtung des Ergebnisses auf logarithmischer Ebene ($\log \text{MW-}K_{\text{ÄP}} = 2,96 \pm 0,10$) lag der Variationskoeffizient bei 3,4 % und war mit 24 % auch für delogarithmierte Werte befriedigend.

Dennoch war die Übereinstimmung nicht optimal. Die Vermutung lag nahe, dass wegen geringfügig unterschiedlicher Ausgangsbedingungen bei der Plasmidisolierung, der Restriktion oder der Handhabung vieler Verdünnungsschritte (bis $1:10^{10}$) eine Schwankung der Kompetitormolekülzahlen von einer Verdünnungsreihe zur anderen auftritt. In später dargestellten Untersuchungen (Tab. 15, Seite 131) wurden 3 gleiche Kompetitorverdünnungsreihen aus einer einzigen Stammlösung (10^6 Kopien / μl) hergestellt. Die dort ermittelten Variationskoeffizienten der Kopienzahlen am Äquivalenzpunkt liegen für zwei unabhängige PCR-ELISA-Systeme mit einer Reproduzierbarkeit von 8,0 % und 8,3 % deutlich unter den 24 % für Kompetitorverdünnungsreihen, die völlig unabhängig, beginnend mit der Einzelkolonie des Plasmid-tragenden Klonen, hergestellt wurden.

Tab. 11 Reproduzierbarkeit der Herstellung von Kompetitorpräparationen

Daten zu den in Abb. 50 dargestellten Graphen. R, Korrelationskoeffizient der linearen Regression mit 5 Messpunkten; $K_{\text{ÄP}}$, Kopien am Äquivalenzpunkt; $\Delta K_{\text{ÄP}}$, negativer/positiver Fehler (68 % Konfidenzintervall) der Ablesung. MW- $K_{\text{ÄP}}$, Mittelwert \pm Standardabweichung der $K_{\text{ÄP}}$ aller Kompetitorverdünnungsreihen V1 bis V4.

Kompetitor-Verdünnungsreihe	R	$K_{\text{ÄP}}$	$\Delta K_{\text{ÄP}}$
V 1	0,996	1038	-234/+281
V 2	0,992	789	-254/+333
V 3	0,992	692	-219/+283
V 4	0,997	1161	-215/+251
MW- $K_{\text{ÄP}}$		920 \pm 217	

Eine Konsequenz aus diesen Untersuchungsergebnissen ist, dass Proben zu verschiedenen Zeitpunkten nur unter Verwendung der selben Kompetitor-Verdünnungsreihe optimal exakt bestimmt werden können. Da aber auch die Haltbarkeit von Kompetitorpräparationen begrenzt ist und in der Praxis das Ergebnis nicht in Form absoluter Kopien am Äquivalenzpunkt vorliegen muss, wurde das Konzept erweitert. Es sieht den Einsatz von Doppelkompetitoren für zwei quantitative PCRs zum parallelen Nachweis zweier Gene im DNA-Extrakt einer Probe vor (vgl. Abschnitt 6.2.8.4).

6.2.8 Anwendungen kompetitiver PCR

6.2.8.1 Semiquantitative, kompetitive CaMV35S PCR

Wird eine Reihe PCRs mit einer einzigen Kompetitor-Konzentration durchgeführt, wird sie als semiquantitative, kompetitive PCR bezeichnet. Eine Probe erzielt dabei innerhalb einer Gruppe gleichartiger Proben einen Signal-Quotienten, der mit dem Quotienten einer Standardprobe verglichen wird. Im Gegensatz zur klassischen, kompetitiven PCR (eine Serie von PCRs zu einem einzigen DNA-Extrakt wird mit mehreren Kompetitor-Verdünnungen durchgeführt) ist dieses Verfahren für die parallele Bearbeitung einer großen Zahl von Proben geeignet. Als Ergebnis der semiquantitativen Untersuchung kann formuliert werden, dass eine Probe unter strikt festgelegten Bedingungen einen höheren/niedrigeren Signal-Quotienten und somit einen höheren/niedrigeren Gehalt als eine bekannte Standardprobe hat. Durch den Bezug auf diese Referenzprobe stellt sie eine relative Quantifizierung dar.

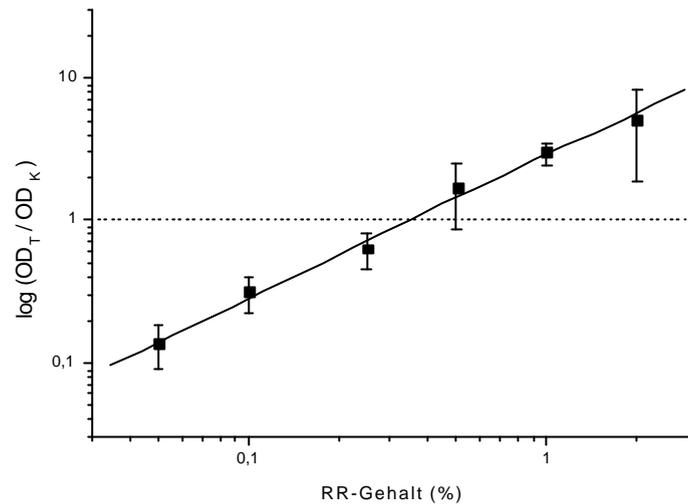


Abb. 51 Kalibration der semiquantitativen, kompetitiven CaMV35S PCR

Roundup Ready DNA wurde in einer kompetitiven PCR (Primer 35S3-bio/35S2) jeweils mit einer konstanten Menge des Kompetitors pCR 35SK (5×10^3 Kopien/25 μ l Reaktion) eingesetzt und die Produkte mit Hilfe des PCR-ELISAs analysiert. DNA (125 ng/25 μ l PCR) wurde nach CTAB II-Protokoll aus Referenzmehlen (0, 0,1, 0,5 und 2 % RR-Gehalt) isoliert; RR-Gehalte von 0,05, 0,25 und 1 % wurden durch Mischung mit Wildtyp Soja-DNA (0 % RR) erhalten. Die Analysen wurden mit N = 3-5 Isolaten oder Mischungen pro Gehalt durchgeführt, eine Ausgleichsgerade der Messwerte (Logarithmus der Signal-Quotienten) ist eingezeichnet ($R = 0,998$). PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 50 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min.

Variiert der RR-DNA-Gehalt in extrahierter Soja DNA, bei konstanter Menge Gesamt-DNA im kompetitiven PCR-Ansatz, dann ergibt sich der in Abb. 51 gezeigte, lineare Verlauf des Signal-Quotienten nach der PCR-ELISA Analyse der PCR-Produkte einer semiquantitativen, kompetitiven CaMV35S PCR. In einer doppeltlogarithmische Auftragung ist das lineare Verhalten über 1,5 Dekaden gezeigt. Diese Abhängigkeit kann im Prinzip ebenfalls als externe Kalibration für unbekannte Proben dienen.

Eine verringerte Kompetitormenge würde die Gerade in Abb. 51 parallel nach oben verschieben. Ebenso gilt, dass die Signal-Quotienten sinken und die Regressionsgerade parallel nach unten verschoben würde, wenn die eingesetzte Proben-DNA-Menge oder der RR-Gehalt erhöht würde. Abhängig von der eingesetzten Menge des Kompetitors lag der Signal-Quotient $Q_{Si} = 1$ in diesem Experiment bei einem RR-Gehalt von 0,35 %. Die Kompetitormenge ist experimentell auf den gewünschten Messbereich (125 ng Soja-DNA, 0,05 - 2 % RR-Gehalt) eingestellt worden. Zu jeder Probe lässt sich unabhängig von einer Kalibration mit mehreren Standards beispielsweise korrekt aussagen, ob sie eine Konzentration größer oder kleiner als die 0,25 % RR Probe hat, wenn diese Probe als Referenz in einem semiquantitativen Ansatz dient.

Die Signal-Quotienten der einzelnen Messpunkte wiesen im Vergleich zu Werten der klassischen kompetitiven PCR (z. B. Abb. 40, Seite 89) eine größere Streuung auf (durchschnittlicher CV = 37 %). Als Ursache kommen Matrixunterschiede oder die individuelle Handhabung zur Verdünnung der DNA-Extrakte nach UV-Quantifizierung in Betracht. Bei Einsatz einer Verdünnungsreihe eines einzigen Extraktes traten geringere Schwankungen auf (Daten nicht gezeigt).

6.2.8.2 Semiquantitative, kompetitive CaMV35S PCR im Ringversuch

Der im Folgenden beschriebene Ringversuch mit 13 Teilnehmer wurde im Rahmen eines EU-Projektes (SMT4-CT96-2072) durchgeführt. Ziele dieses EU-Projektes war die Entwicklung und Validierung von Methoden für den Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) als Bestandteile von Lebensmitteln. Die drei Ziele des Ringversuches (RV) waren :

1. Erstmaliger Einsatz des PCR-ELISA zur Detektion der gentechnisch veränderten Organismen. Der Hybridisierungsschritt ersetzt die Identifizierung der Amplikons durch Southernblot oder Restriktion.
2. Verwendung eines Kompetitors als interne Inhibitionskontrolle, anstelle einer zweiten PCR, die die Amplifizierbarkeit eines Referenzgen des Organismus nachweist.
3. Klassifizierung von Soja Proben anhand ihres Gehaltes an RR in drei Gruppen. Neben GVO-negativen Proben, wird die Gruppe der GVO-positiven Proben in zwei Subgruppen bezüglich eines Schwellenwertes eingeteilt (größer/kleiner RR-Gehalt $0,4 \pm 0,2$ %).

Durchführung

Das Original-Protokoll befindet sich im Anhang. Innerhalb des Ringversuches wurde DNA gemäß CTAB II-Protokoll aus Soja Mehlen isoliert; je Probe wurden zwei Extraktionen durchgeführt. Nach UV-Quantifizierung dieser RNA- und Protein-freien Präparation wurden 125 ng DNA in einer PCR (Primer 35S3-bio/35S2) mit experimentell justiertem Kompetitor (pCR 35SK, 10^4 Kopien pro PCR) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des PCR-ELISA analysiert.

Jeder Teilnehmer erhielt 6 Test-Proben, sowie eine negative (0 % RR), eine positive (0,5 % RR) Sojamehl-Probe zur Kontrolle, einen Referenz-DNA-Extrakt und die gebrauchsfertig eingestellte Kompetitor DNA. Der Referenz-DNA-Extrakt wurde zentral (von mir im ICB) aus 0,5 % RR-haltigem Sojamehl hergestellt und UV-quantifiziert. Er wies einen Quotienten $OD_{260/280}$ von 1,9 auf und wurde auf eine DNA-Konzentration von 25 ng/ μ l eingestellt. Der RR-Gehalt der Positiv-Kontrolle und des Referenz-DNA-Extraktes betrug 0,5 %. Es wurde ein Gehalt gewählt, der nahe dem geplanten Schwellenwert lag.

Vorversuch

Die Mehrzahl der Teilnehmer hatte noch keine praktische Erfahrung mit der PCR-ELISA Technik. Vor der Durchführung des Hauptversuches hatte jeder Teilnehmer Gelegenheit sich durch einen Vorversuch (Analyse von drei PCRs), mit dem Protokoll vertraut zu machen. Es wurde dazu eine PCR mit Referenz-DNA und Kompetitor (Target-Kontroll-PCR, *target control*), eine PCR nur mit Kompetitor-DNA (Kompetitor-Kontrolle, *competitor control*) und eine PCR ohne jegliche Matrizen-DNA (Reagenzien-Kontrolle, *mastermix control*) durchgeführt und die Produkte im PCR-ELISA untersucht. Bei der Target-Kontrolle wurden dabei mit beiden Sonden Signale erwartet, da beide Matrizen-Spezies in der PCR vorhanden waren. Die Kompetitor-Kontrolle soll nur das Kompetitor-Signal zeigen und entspricht somit dem Ergebnis für eine RR-negative Probe. Die Reagenzien-Kontrolle soll lediglich Signale in Höhe des ELISA-Hintergrundsignales und damit die Kontaminationsfreiheit des PCR-

Ansatzes zeigen. Die Handhabung war für alle Teilnehmer unproblematisch und führte in allen Fällen zu auswertbaren Ergebnissen.

DNA-Extraktion der Test- und Kontroll-Proben

Die DNA-Extrakte der Teilnehmer wiesen Ausbeuten von 2,5 bis 30 µg pro 100 mg Sojamehl auf. Die extrahierte DNA wurde in 100 µl Tris/HCl (2 mM, pH 8,5) gelöst und hatte eine durchschnittliche Konzentration von 150 ng/µl. Die Schwankungen der Ausbeute innerhalb der einzelnen Labore waren im Vergleich mit eigenen Extraktionen unerwartet hoch. Dies zeigt sich in einer größeren Standardabweichung des Mittelwertes der DNA-Konzentration je Labor (Abb. 52A). Der Quotient $OD_{260/280}$ (Abb. 52B), der eine potenzielle Proteinverunreinigung anzeigt, lag nur bei 50 % aller Extrakte (N = 216) der Teilnehmer im erwünschten Bereich von 1,7-1,9. Zwei Teilnehmer (H, L) extrahierten DNA mit sehr niedrigem Quotienten (Mittelwert $OD_{260/280} < 1,6$), Labor I ermittelte unerwartet hohe Werte (Mittelwert $OD_{260/280} = 2,0$) und ein weiterer Teilnehmer (Labor E) lieferte keine Quotienten-Werte. Im Vergleich zu eigenen DNA-Extrakten wurden bei den Messungen der Teilnehmer häufig geringere Quotienten, also höhere Proteinverunreinigungen gefunden. Da die UV-Messungen auf unterschiedlichen Geräten durchgeführt wurden, sind die Angaben nur begrenzt aussagekräftig. Für eine umgekehrt proportionale Korrelation von DNA-Qualität, in Form des Quotienten, zur Ausbeute wurde keine offensichtliche Tendenz gefunden. Entgegen den Anweisungen der RV-Protokolls extrahierte Labor E nicht doppelt, sondern lediglich einfach pro Probe.

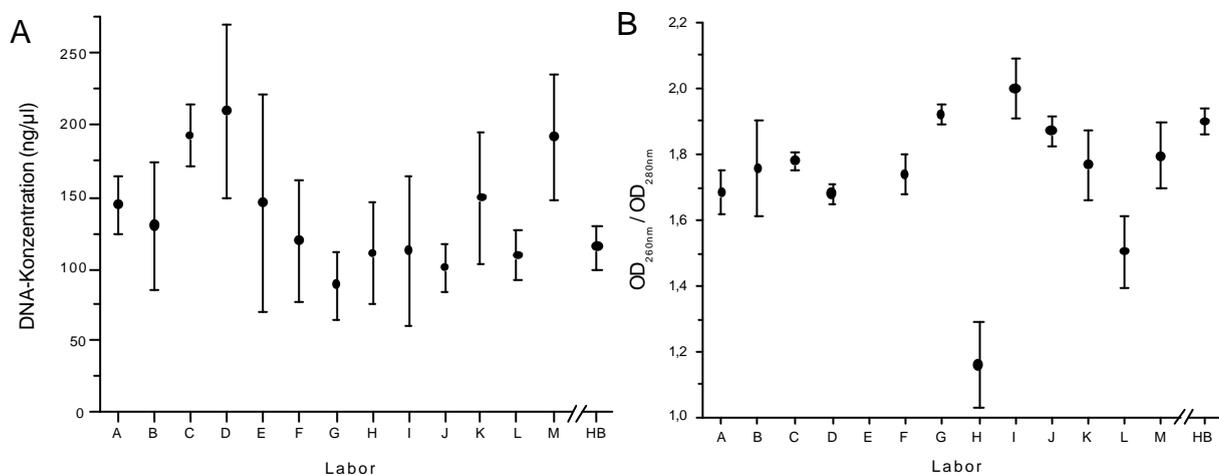


Abb. 52 Charakterisierung extrahierter DNA

UV-Messungen der DNA-Extrakte aus homogenem Probenmaterial (Sojamehl) durch die Ringversuchsteilnehmer (Labore A-D und F-M, je 16 Extrakte; Labor E, 8 Extrakte) nach CTABII-Protokoll isoliert und eine typische eigene Extraktion (HB, 9 Extrakte). A, DNA-Konzentration der Extrakte, B, Quotienten von UV-Absorptionen.

Die Kompetitormenge in der semiquantitativen, kompetitiven PCR ist genau auf eine bestimmte Menge Proben-DNA eingestellt. Systematische Fehler in der DNA Bestimmung sind in Maßen tolerierbar, weil sie alle Extrakte gleichmäßig betreffen (z. B. stets 20 % Überbestimmung). Unter diesen Umständen wäre lediglich eine größere Steigung bei der linearen Abhängigkeit des Signal-Quotienten vom RR-Gehalt zu finden. Bei Einsatz der doppelten DNA-Menge einer 0,5 % RR-haltigen Probe, erzielt diese beispielsweise den

Quotienten einer 1 % RR-Probe. Eine gleichartige, moderate Abweichung würde auch die Referenzprobe betreffen und somit ohne Effekt auf das Ergebnis der relativen Quantifizierung sein. Dies ist nicht der Fall, wenn die Fehler in der DNA-Quantifizierung unregelmäßig innerhalb einer Gruppe von Extraktionen auftreten. Eine mögliche Fehlerquelle der Quantifizierung der Gesamt-DNA vor deren Einsatz in der PCR ist der Anteil nicht entfernter Proteine. Da dieser Anteil durch den Quotienten $OD_{260/280}$ charakterisiert wird, ist eine möglichst geringe Schwankung dieses Wertes Voraussetzung für reproduzierbare und genaue Messungen. Dieses Qualitätskriterium der DNA-Extrakte wurde jedoch im Ringversuchsprotokoll nicht zwingend festgeschrieben.

Kontrollversuch zur Überprüfung der Materialien für den Ringversuch

Rückstellproben aller versandten Materialien (Kompetitor, Referenz-DNA-Extrakt, Sonden, Primer, RNase A, Proteinase K, AmpliTaq Gold Polymerase, Blocking Reagenz, BSA, Anti-Dig-F_{ab}-Fragment, pNPP) wurden nach einer Karenzzeit von 2 Wochen nach Verschicken an die Teilnehmer zur Durchführung eigener, begleitender Kontrollen eingesetzt. Es wurden dazu zwei DNA-Extraktionen je RR-Gehaltsstufe (0, 0,1, 0,5, 2 %) durchgeführt. Nach UV-Quantifizierung der DNA, kompetitiver PCR und PCR-ELISA Analyse der Produkte nach Ringversuchsprotokoll bestätigte sich für diese Proben der lineare Zusammenhang von Signal-Quotient versus RR-Gehalt (Abb. 53). Bei 0,28 % RR-Gehalt sind die Signale für Kompetitor- und Target-Amplikon gleich ($Q_{Si} = 1$). Er stellt den GVO-Schwellenwert dieses Experimentes dar. Dieses Ergebnis glich dem bereits in Abb. 51 (Seite 105) dargestellten Resultat, das mit anderen DNA-Extrakten erhalten wurde.

Zum Zeitpunkt der Versendung der Ringversuchsproben wurde Referenzmaterial, ebenfalls ein Sojamehl, mit 1 % RR-Gehalt einer neuen Charge verfügbar, das auch als Test-Probe versandt wurde. Dieses Material wurde jedoch erstmalig in diesem Kontrollversuch mit kompetitiver PCR und PCR-ELISA untersucht. Es wies laut PCR-ELISA einen Signal-Quotienten auf, der deutlich größer ist als derjenige der 2 % Probe und fügte sich somit nicht in das bisherige Bild ein (Abb. 53, siehe auch Abb. 51, 1 % durch Mischung von 0 + 2% Extrakten). Auf Grund der Kalibration mit den übrigen Referenz-Materialien ergibt sich für die 1 % RR-haltige Probe durch Extrapolation ein RR-Gehalt von $(2,6 \pm 0,5)$ %. In weiteren Versuchen mit DNA aus wiederholten Extraktionen konnte dieses Ergebnis (nicht gezeigt, Kalibration, $R = 0,986$) bestätigt werden, der RR-Gehalt des 1 % RR-Referenzmehles betrug hier $(2,7 \pm 0,3)$ %.

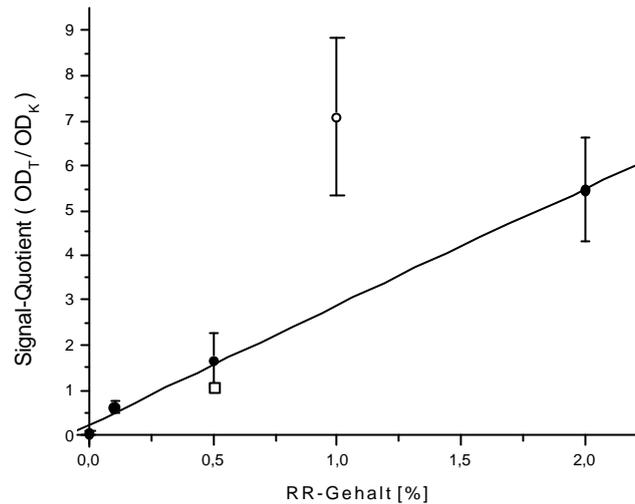


Abb. 53 Überprüfung der Ringversuchs-Materialien

DNA (125 ng, eigene Extraktion siehe Abb. 52, HB) wurde mit 10^4 Kopien Kompetitor pCR 35SK pro Probe in einer kompetitiven PCR eingesetzt und die Produkte mit PCR-ELISA analysiert. Dem Ringversuchsprotokoll wurde gefolgt und nur die ausgegebenen Materialien verwendet. PCR-Programm: Initiale Denaturierung $95^\circ\text{C} / 10 \text{ min}$; 50 Zyklen $95^\circ\text{C} / 30 \text{ s}$, $55^\circ\text{C} / 30 \text{ s}$, $72^\circ\text{C} / 60 \text{ s}$; finale Elongation $72^\circ\text{C} / 5 \text{ min}$. Aufgetragen sind die PCR-ELISA Signal-Quotienten (●, Mittelwert und Abweichung, $N = 4$) von je zwei Extraktionen pro RR-Gehalt und eine Ausgleichsgerade (4 Messwerte, Gehalte 0, 0,1, 0,5 und 2 % RR, $R = 0,998$). Der Referenz-DNA-Extrakt (□, Doppelbestimmung, 0,5 % RR-Gehalt) und ein Extrakt einer 1 % RR-haltigen Probe (○, Doppelbestimmung, abweichende Charge des Referenz Sojamehles) wurden ebenfalls analysiert.

Hauptversuch

Im Hauptversuch wurde die von den Teilnehmern isolierte DNA in gleicher Weise in der semiquantitativen, kompetitiven PCR eingesetzt, wie die Referenz DNA zuvor im Vorversuch (10^4 Kompetitor Kopien pro 125 ng DNA). Es wurden neben den PCRs mit DNA-Extrakten von Test- und Kontroll-Proben, eine Target-Kontrolle (mit 0,5 % RR Referenzextrakt) und eine Kompetitor-Kontrolle (kein Extrakt zugegeben) durchgeführt. Eine Reagenzien-Kontrolle, bei der kein Produkt entsteht, entfiel, da der Kompetitor direkt dem PCR-Mastermix (Reagenzienmischung) zugesetzt wurde. Im PCR-ELISA wurden auch die Produkte des Vorversuches wiederholt aufgetragen. Die Anwendung des PCR-ELISA auf die PCR-Produkte verlief prinzipiell problemlos, einige Spezialfälle werden besprochen.

Bei Labor H zeigte der kompetitive Ansatz eine Inhibition der PCR durch die DNA-Extrakte der Proben an. Inhibition liegt vor, wenn weder T- noch K-Signal auftreten. Die Referenz-DNA (von mir extrahiert) führte wie erwartet in der PCR des Labors H sowohl zu Target- als auch zu Kompetitor-Signalen. Nur bei der vom Teilnehmer selbst extrahierten DNA fiel das Kompetitor-Signal im PCR-ELISA fort, ohne dass im Gegenzug ein Target-Signal auftrat. Dies war sowohl für die Positiv- und Negativ-Kontrolle, wie auch für sämtliche Test-Proben der Fall. Diese Inhibition wäre ebenfalls bei Analyse einer einzelnen, statt aller Proben offensichtlich geworden. Dieser Teilnehmer trug zwar nicht zum quantitativen Aspekt des RV bei. Der PCR-ELISA wurde jedoch erfolgreich angewendet und die semiquantitative kompetitive PCR diente zur Aufdeckung eines, im Falle einer qualitativen PCR, wahrscheinlich falsch negativen Befundes. Zwei der drei gesteckten Ziele des Ringversuches (siehe Seite 106) wurden hier erreicht. Die Inhibition könnte durch unzureichend entferntes CTAB

aus der Extraktion oder durch verbliebene Proteine (niedrige Quotienten $OD_{260/280}$ in Abb. 52B, Seite 108) bedingt sein.

Die im Vorversuch von Labor I erfolgreich eingesetzte Kompetitor-Präparation erwies sich bei Lagerung als instabil. Nach Durchführung der kompetitiven PCR mit DNA der Test-Proben konnten durch PCR-ELISA im Hauptversuch in keinem Fall Kompetitor-Amplikon detektiert werden. Mindestens in der PCR zur Kompetitor-Kontrolle und zur Negativ-Kontrolle muss dies jedoch der Fall sein. Die Positiv-Kontrollprobe und einige andere Proben erzeugten jedoch mit dem selben, offensichtlich vollständigen und intakten *Mastermix* Target-Amplikons. Die erneut aufgetragenen PCR-Produkte des Vorversuchs erzeugten unterdessen die gleichen Target- und Kompetitor-Signale wie zuvor. Der PCR-ELISA wurde folglich korrekt durchgeführt. Die Störung betrifft nur die Kompetitor-Amplikon, so dass offensichtlich keine oder eine nicht ausreichende Menge Kompetitor-Matrizen DNA in der PCR des Hauptversuches vorhanden war.

Probleme mit der Haltbarkeit der Kompetitor-Präparation traten aus eigener Erfahrung bei Verwendung von 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) als Verdünnungspuffer auf. Die Auswirkungen der geringen Haltbarkeit stark verdünnter Kompetitor-Plasmidlösungen traten nicht reproduzierbar auf und ermöglichten somit nur schwer die Optimierung der Lagerungsbedingungen. Da Adsorption der DNA an Gefäßwänden eine mögliche Ursache ist, wurde für weitere Kompetitor-Präparationen *Hind* III geschnittene Lambda Phagen-DNA (10 ng/ μ l) als Träger-DNA zu den Verdünnungspuffern zugesetzt. Diese störte die PCR nicht und deckte die Bindekapazität der Gefäßwände ab. Zusätzlich wurden ab dieser Erfahrung Arbeitslösungen immer frisch aus Stammlösungen ($\geq 10^6$ Kopien / μ l) verdünnt.

Evaluierung der PCR-ELISA Ergebnisse

Optische Dichten des PCR-ELISA nach Hybridisierung mit Target- oder Kompetitor-Sonde wurden als signifikant positiv angesehen, wenn sie das Hintergrundsignal (Messung mit Puffer statt Amplikonlösung) der individuellen Sonde um das Doppelte überstiegen. Unabhängig vom nachfolgend beschriebenen Evaluierungstyp galt eine Probe als RR-frei (RR-Gehalt = 0 %), wenn kein signifikantes Target-Signal gemessen wurde ($OD^T_{Probe} \leq 2 \times OD^T_{Hintergrund}$), während für die gleiche Probe ein großes Kompetitor-Signal ($OD^K_{Probe} \gg 2 \times OD^K_{Hintergrund}$) registriert wurde. Die RV-Teilnehmer dokumentierten alle OD-Werte des Target- und Kompetitor-Signals und nahmen eine vorläufige Evaluierung nach Typ A vor. Evaluierung nach Typ B wurde zentral von mir durchgeführt.

Evaluierung-Typ A: Beim RR-Gehalt des Schwellenwertes sollte die Gleichheit der PCR-ELISA-Signale ($Q_{Si} = 1$) erreicht werden. Der simple Vergleich der absoluten Signalthöhe ist besonders Anwender-freundlich, da keine weitere Auswertung notwendig ist. Ist das Target-Signal größer als das Kompetitor-Signal, liegt der Gehalt über dem Schwellenwert; ist das Target-Signal kleiner, liegt er darunter. Der Schwellenwert war in der Vorbereitung des Ringversuches willkürlich durch Wahl der Kompetitor-Menge festgelegt worden und experimentell zu einem RR-Gehalt von $0,4 \% \pm 0,2 \%$ bestimmt worden.

Bei Auswertung der Daten der RV-Teilnehmer wurde festgestellt, dass abweichend von der ursprünglichen Planung vermutlich generell weniger Kompetitor-DNA pro 125 ng Proben-DNA

in der kompetitiven PCR eingesetzt wurde. Dieser Verlust, der wahrscheinlich durch Transport und Lagerung auftrat und wie beschrieben bei Labor I extrem war, führte zu höheren Signal-Quotienten für den geplanten Schwellenwert. Deutlich wird dies z.B., wenn alle Proben mit einem RR-Gehalt von 0,1 % begutachtet werden. Es ergibt sich im Durchschnitt aller Teilnehmer ein Signal-Quotient von $Q_{Si, 0,1\% RR} = 1,17 \pm 0,94$ (Abb. 54). Der erwartete Quotient sollte jedoch zwischen 0,17 und 0,5 liegen (vgl. Abb. 51). Der Graph in Abb. 54 vermittelt weiterhin einen Eindruck davon, wie heterogen die Signal-Quotienten, inklusive offensichtlicher Ausreisser, verteilt sind. Der Kontrollversuch im eigenen Labor (Abb. 53) ergab für die 0,1 % RR-Proben mit $Q_{Si} = 0,64 \pm 0,13$ ebenfalls einen zu hohen Wert. Auf Grund dieser veränderten Lage bestand die Notwendigkeit eine aufwändigere Auswertung (Typ B), als die zuerst geplante (Typ A) zu wählen.

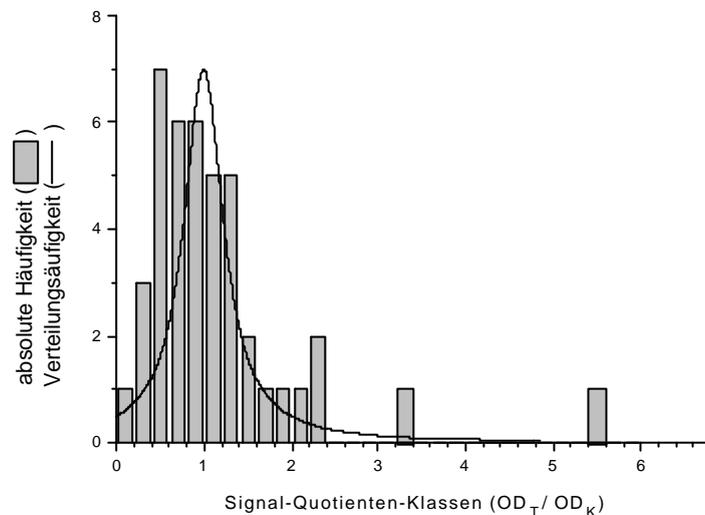


Abb. 54 Histogramm der Signal-Quotienten aller Proben mit 0,1 % RR-Gehalt

Die PCR-ELISA Messergebnisse der DNA-Extrakte mit 0,1 % RR-Gehalt ($N = 42$) wurden betrachtet. Das Balkendiagramm zeigt die Häufigkeit der Zugehörigkeit zu Quotienten-Klassen (Schrittweite 0,2). Der Liniengraph zeigt die kontinuierliche Verteilungshäufigkeit um den Mittelwert $Q_{Si} = 1,17$ (Skalierung: maximale Häufigkeit bei Ordinatenwert = 7). Der ursprünglich erwartete Quotient für diese Proben betrug 0,17 bis 0,5 und wurde deutlich überschritten.

Evaluierung-Typ B: Statt eines Vergleiches der absoluten Signalhöhen wurden nun die Signal-Quotienten aus Target- und Kompetitor Signal der Test-Proben mit dem Signal-Quotienten der Positiv-Kontrolle verglichen. Da die Positiv-Kontrolle einen RR-Gehalt von 0,5 % aufwies, sollten alle Proben mit einem geringeren Signal-Quotienten einen kleineren, alle Proben mit einem größeren Quotienten einen höheren RR-Gehalt haben. Der Schwellenwert nach Evaluierung Typ B betrug somit 0,5 % RR-Gehalt, die Positiv-Kontrolle entsprach einer externen Referenzprobe.

Den Vergleich der Evaluierungen nach Typ A und B zeigt Tab. 12 im Detail; Tab. 13 gibt eine Übersicht der Daten. Bei 78 ausgegebenen Proben wurden für 66 Proben prinzipiell verwertbare Ergebnisse für eine Klassifizierung erhalten (alle außer jenen aus Labor H und I). Es handelte sich um 11 GVO-freie und 55 GVO-positive Proben. Von den GVO-positiven Proben waren 22 unterhalb und 33 oberhalb des Schwellenwertes von 0,5 % RR. Alle evaluierten Proben mit RR-Gehalt von 0,1, 1 oder 2 % wurden nach beiden Evaluierungstypen

korrekt als GVO-haltig identifiziert (100 % korrekt). Die Ausführung der PCR mit einem Kompetitor führte somit nicht zu falsch-negativ klassifizierten Proben.

Tab. 12 Vergleich der PCR-ELISA Auswertung des Hauptversuchs nach Typ A und B

Die Ergebnisse der semiquantitativen, kompetitiven PCR sind im Detail dargestellt. Der RR-Gehalt der 6 Test-Proben der Labore gefolgt von den Evaluierungen [Typ A/Typ B] wird gezeigt. (+), Probe wurde in Doppelbestimmung korrekt klassifiziert; (-), Probe wurde in Doppelbestimmung falsch klassifiziert, (≠) Doppelbestimmungen weichen von einander ab, Klassifizierung nicht möglich.

Labor	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5		Probe 6	
A	0	[+/+]	0,1	[+/+]	0,1	[+/+]	2	[+/+]	2	[+/+]	2	[+/+]
B	1	[+/+]	2	[+/+]	2	[+/+]	0,1	[+/+]	0,1	[+/+]	0	[+/+]
C	0	[+/+]	0,1	[+/+]	0,1	[+/+]	1	[+/+]	1	[+/+]	2	[+/+]
D	2	[+/+]	1	[+/+]	1	[+/+]	0,1	[-/+]	0,1	[-/+]	0	[+/+]
E ^a	0,1	[-/≠ ^b]	0	[+/+]	2	[+/+]	1	[+/+]	2	[+/+]	0,1	[-/+]
F	0,1	[-/+]	0	[+/+]	1	[+/+]	2	[+/+]	1	[+/+]	0,1	[-/+]
G	2	[+/+]	0,1	[≠/+]	0	[+/+]	1	[+/+]	0,1	[≠/+]	2	[+/+]
H ^c	1		0		0,1		0,1		2		1	
I ^d	1		1		2		0		0,1		0,1	
J	0,1	[+/+]	0,1	[≠/+]	2	[+/+]	2	[+/+]	1	[+/+]	0	[+/+]
K	1	[+/+]	2	[+/+]	0	[-/-] ^e	0,1	[≠/+]	2	[+/- ^f]	0,1	[≠/≠ ^g]
L	2	[+/+]	2	[+/+]	0,1	[≠/+]	0	[+/+]	0,1	[+/+]	1	[+/+]
M	1	[+/+]	0,1	[-/+]	0	[+/+]	1	[+/+]	0,1	[≠/+]	2	[+/+]

^a Pro Probe wurde nur eine statt zwei Extraktionen durchgeführt. ^b Ergebnis: RR-positiv, Zuordnung erfolgte nicht, da die Abweichung vom Mittelwert des Quotienten der Test-Proben mit der Abweichung vom Mittelwert des Signal-Quotienten der 0,5 % GVO-Referenz überlappte. ^c Keine Evaluierung möglich, Inhibition der PCR durch DNA-Extrakte. ^d Ausfall wichtiger Kontrollen, Abwesenheit des Kompetitor-Signals. ^e Falsch positives Ergebnis, der Gehalt der Probe wurde als kleiner bezüglich des Schwellenwertes klassifiziert. ^f Falsche Klassifizierung, der RR-Gehalt einer korrekt als positiv erkannten Test-Probe wurde jedoch als kleiner bezüglich des Schwellenwertes klassifiziert. ^g GVO-positiv, Ergebnisse der Extraktion 1 und 2 für diese Probe differieren und können nicht evaluiert werden; eine für diesen Fall vorgeschriebene, dritte Extraktion wurde nicht durchgeführt.

Bei Evaluierung nach Typ A werden für die besonders interessante Gruppe der 0,1 % RR-haltigen Proben nur 36 % der Proben korrekt klassifiziert (Tab. 13). Die Bezugsgröße (100%) ist hierbei die Zahl aller ausgegebenen Proben. Werden lediglich diejenigen Test-Proben betrachtet, die eindeutige Ergebnisse zeigten (15 Proben), sind mit 8 geringfügig GVO-positiven Proben 53 % korrekt bestimmt worden. Sieben Proben konnten hier wegen differierender Ergebnisse der Doppelbestimmungen nicht evaluiert werden. Bei der Evaluierung aller ausgegebenen Proben nach Typ B ist die relative Anzahl der korrekt klassifiziert innerhalb der Gruppe der 0,1 % RR-haltigen Proben mit 91 % wesentlich größer. Darüber hinaus konnten hier lediglich zwei Proben mit 0,1 % RR-Gehalt nicht eindeutig klassifiziert werden. Alle evaluierten Proben (20) mit einem RR-Gehalt von 0,1 % wurden bei der Evaluierung Typ B korrekt als positiv und unterhalb des Schwellenwertes von 0,5 % RR-Gehalt erkannt (100 % korrekt). Von den 11 evaluierten Proben, die kein RR-Mehl enthielten, wurden 10 Proben richtig erkannt (91 % korrekt); in einem Fall trat eine schwache Kontami-

nation einer Test-Probe auf. Nach den PCR-ELISA Ergebnissen ordnete Labor K diese Probe als GVO-positiv, jedoch unterhalb des Schwellenwertes ein. Die Gruppe aller Proben über dem Schwellenwert (1 und 2%, N = 33) wurde zu insgesamt 97 % korrekt erkannt. Eine einzige Probe (Nummer 5, 2 % RR-Gehalt) wurde von Labor K korrekt als positiv erkannt, sie wies aber einen zu geringen Signal-Quotienten ($Q_{\text{Probe 5}} < Q_{0,5\% \text{ Referenz}}$) auf und wurde somit bei Evaluierung nach Typ B inkorrekt als kleiner dem Schwellenwert klassifiziert. Ein möglicher Grund dafür kann eine zu geringe Templatmenge in der PCR zu Probe 5 gewesen sein.

Tab. 13 Die Ergebnisse des Hauptversuches in der Übersicht

Auswertung der Daten der semiquantitativen, kompetitiven PCR des Hauptversuchs. Zusammenfassung der Daten aus Tab. 12. Daten der Labore H und I sind nicht berücksichtigt.

Evaluierungstyp		Zahl der Proben			
		0 %	0,1 %	1 %	2 %
gesamt		11	22	14	19
korrekt	A	10	8	14	19
	B	10	20	14	18
falsch	A	1	7	-	-
	B	1	-	-	1
nicht evaluiert	A	-	7	-	-
	B	-	2	-	-
relative	A	91 %	36 %	100 %	100 %
Korrektheit ^a	B	91 %	91 %	100 %	95 %

^a prozentuales Verhältnis von korrekt klassifizierten Proben zur Zahl der ausgegebenen Proben

Statistische Parameter

Die Daten der Proben mit 0,1 % RR Gehalt wurden zur Ermittlung statistischer Parameter herangezogen. Die Signal-Quotienten dieser Auswahl (N = 42 Einzelwerte, entsprechend der Daten in Abb. 54) repräsentieren am besten das gewünschte Verhältnis ($Q = 1$, ursprünglich für den Schwellenwert) von Target- und Kompetitor-Signal am Äquivalenzpunkt.

Jede Bestimmung der optischen Dichte im PCR-ELISA wurde als Doppelbestimmung durchgeführt ($OD = \frac{1}{2}OD_1 + \frac{1}{2}OD_2$). Die durchschnittliche prozentuale Abweichung vom Mittelwert der PCR-ELISA Doppelbestimmung ($\Delta OD = |OD - OD_1|$) mit der Target-Sonde betrug ($4,6 \pm 4,2$) % und unterschied sich nicht deutlich von der relativen Messungsgenauigkeit der ODs der Kompetitor-Sonde ($4,9 \pm 4,4$ %). Zur Berechnung der Signal-Quotienten ($Q_{Si} = OD_T / OD_K$) einer Probe wurde von dem jeweiligen OD-Wert des Target- oder Kompetitor-Signals der ELISA-Hintergrundwert abgezogen, dieser ist gering ($OD_{\text{Blank}} = 0,03$ bis $0,1$) und seine Abweichung vom Mittelwert trug nicht signifikant zur Ungenauigkeit des berechneten Signal-Quotienten bei. Die relative Abweichung eines Signal-Quotienten, betrug für die Auswahl durchschnittlich $\Delta Q_{Si} / Q_{Si} = (9,5 \pm 6,0)$ %.

Bei eigenen PCR-ELISA Analysen von PCRs mit Normierungsplasmiden wurden Variationskoeffizienten der Signal-Quotienten von $CV = 8$ bis 16% ($N = 3$) ermittelt. Diese stellen, wegen der Fixierung des T- zu K-Templat Verhältnisses die Schwankung des Mittelwertes nach PCR und PCR-ELISA dar. Diese Reproduzierbarkeit des Signal-Quotienten ist unabhängig von der Probenextraktion, UV-Quantifizierung und individueller Handhabung der Proben-DNA und der Kompetitorlösung. Da jedem Teilnehmer zwei Proben mit $0,1\%$ RR-Gehalt als Test-Proben zugeteilt wurden, konnte je Teilnehmer die Reproduzierbarkeit des Quotienten innerhalb des Assays ermittelt werden. Es wurde die Abweichung der ermittelten Signal-Quotienten der zwei Proben mit gleichem Gehalt aufeinander bezogen. Beide Proben wurden bei 10 Teilnehmern evaluiert (Labore: A, B, C, D, F, G, J, K, L und M). Die Signal-Quotienten, mit durchschnittlich (33 ± 27) % Abweichung, lagen deutlich weiter auseinander als die relative Abweichung der Signal-Quotientenbestimmung ($9,5 \pm 6,0\%$) und der selbst ermittelten Variationskoeffizienten bei Analysen von PCRs mit Normierungsplasmiden ($8 - 16\%$). Der Vergleich von zwei unabhängigen, gleichen Proben spiegelt die geringe Reproduzierbarkeit aller Schritte des Verfahrens, von der Qualität der DNA-Extraktion, über die kompetitive PCR bis zur Ungenauigkeit der OD-Bestimmung im PCR-ELISA, wider.

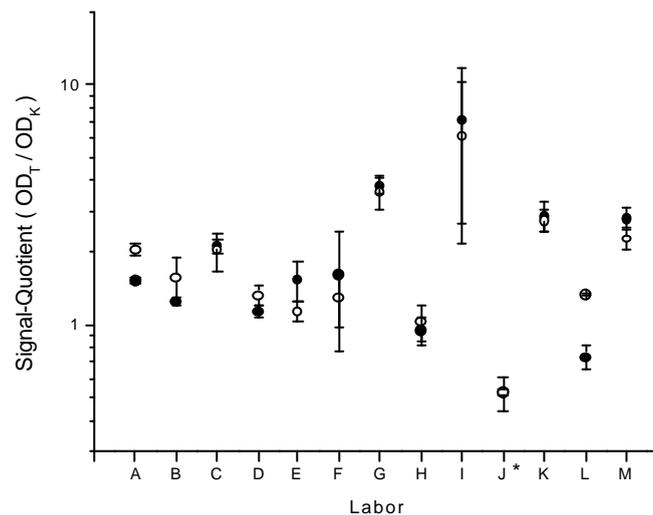


Abb. 55 Reproduzierbarkeit der Signal-Quotientenbestimmung im PCR-ELISA

Signal-Quotienten für PCR-Produkte der Target-Kontroll PCR (125 ng Referenz-DNA / 10^4 Kopien Kompetitor) bei wiederholter PCR-ELISA Analyse im Vorversuch (○) und Hauptversuch (●). Der RR-Gehalt der Referenz-DNA beträgt $0,5\%$. Je Labor sind die Mittelwerte für den Quotienten (Doppelbestimmung) und dessen Abweichung aufgetragen. *Ausnahme wegen Probenverwechslung bei Labor J: $0,1\%$ -RR.

Die Produkte der Target-Kontroll-PCR des Vorversuchs wurden erneut im PCR-ELISA des Hauptversuchs aufgetragen. Diese Produkte enthielten Target- und Kompetitor-Amplikon und entstammten einer PCR, durchgeführt mit dem zugesandtem DNA-Referenz Extrakt und Kompetitor. Da der gewünschte Signal-Quotient nach PCR-ELISA für Proben mit $0,4\%$ RR-Gehalt bei $Q_{Si} = 1$ liegen sollte, sollten die Produkte der Target-Kontroll-PCR ($0,5\%$ RR) ursprünglich einen Signal-Quotienten von circa $Q_{Si} = 1,25$ erzeugen, dieser wurde jedoch in der Mehrzahl der Fälle überschritten (Abb. 55). Darüber hinaus differierte der Signal-Quotient deutlich von Labor zu Labor. Diese geringe Vergleichbarkeit zeigte, dass vorjustierte DNA-

Lösungen nach Lagerung und Versand in fremden Laboren zu unterschiedlichen Ergebnissen führten.

Mit Hilfe der Daten in Abb. 55 lässt sich ebenfalls eine Aussage zur Reproduzierbarkeit von PCR-ELISA Messungen bei wiederholter Analyse eines PCR-Produktes machen. Die Mittelwerte der Quotienten unterschieden sich bei wiederholter Auftragung bis zu 80 % (mittlere Schwankung (20 ± 21) %). In der Regel (Ausnahmen Labor A und L) stimmten die Messwerte beider Signal-Quotienten für ein betrachtetes Labor aber gut überein oder zeigten mindestens überlappende Ergebnisse. Diese Reproduzierbarkeit des Q_{Si} -Wertes für ein PCR-Produkt (20 ± 21) % war besser als die Genauigkeit der Q_{Si} -Wertbestimmung zweier unabhängig extrahierter, gleicher Proben $((33 \pm 27)$ %). Sie war aber schlechter als die Messungengenauigkeit des Q_{Si} -Wertes für verschiedene Proben $(9,5 \pm 6,0)$ %.

Zusammenfassung der Ringversuchs-Ergebnisse

Mit dem vorgestellten Protokoll wurde gezeigt, dass das Analysesystem bestehend aus semiquantitative, kompetitiver PCR und PCR-ELISA geeignet ist, die Abwesenheit von Inhibition sicherzustellen (interne Amplifikationskontrolle) und eine Klassifizierung von gentechnisch veränderter Soja, die in einer vorgegebenen Matrix vorliegt (Sojamehl) zu ermöglichen. Der PCR-ELISA ist auch in Händen von ungeübten Anwendern robust. Das Justieren sämtlicher Versuchs-Materialien und die einfache Auswertung (Typ A) gelangen nur bedingt. Eine komplexere Auswertung (Typ B) unter Bezug auf eine Kontrollprobe wurde erfolgreich angewendet. Alle evaluierten 0,1 % RR-Proben wurden korrekt klassifiziert, die Unterscheidung von geringfügig und konzentriert GVO-haltigen Proben gelang. Alle Ziele des Ringversuches wurden erreicht.

6.2.8.3 Bestimmung der Soja-DNA Konzentration in Extrakten

Die Extraktion von amplifizierbarer DNA aus beliebigen Proben stellt in der Regel kein großes Problem dar. Die exakte Bestimmung der eingesetzten DNA-Menge ist jedoch für die semiquantitative, kompetitive PCR von entscheidender Bedeutung. Die in dieser Arbeit bisher verwendete Methode der DNA-Quantifizierung durch Bestimmung der UV-Absorption bei 260 nm kann nur bei Protein-freien DNA-Präparationen ($OD_{260/280} \sim 1,8$) angewandt werden. Ungleichmäßige Proteinverunreinigungen der Standards oder Proben stellen eine Fehlerquelle dar. Die im vorangehenden Kapitel beschriebenen, semiquantitativen Untersuchungen wurden an reinen Soja-Proben durchgeführt. Besteht eine Probe jedoch aus einer Mischung von Soja und weiteren Organismen, wird von letzteren ebenfalls DNA extrahiert. In Unkenntnis dieser Tatsache würde nach simpler UV-Messung eine von allen vorhandenen Organismen stammende Gesamtmenge DNA, und entsprechend ein zu geringer Soja-DNA Anteil, in der PCR eingesetzt werden. Dieses Vorgehen muss im Vergleich zu reinen Soja-Standards zu Unterbestimmungen des RR-Gehaltes der Mischprobe führen. Da eine Probe nach den gültigen EU-Verordnungen bei einem Massengehalt des GVO von größer 1% bezogen auf die Summe des Organismus (Wildtyp und GVO) als GVO-haltig gekennzeichnet werden muss, ist der Sojaanteil der extrahierten DNA relevant. Im Folgenden wird die Bestimmung des Soja-DNA Gehaltes in Extrakten durch semiquantitative PCR und Kalibration mit UV-quantifizierter, reiner Soja DNA beschrieben. Es wird darüber hinaus

gezeigt, welchen Einfluss die Prozessierung der Lebensmittel durch Fragmentierung der DNA auf die UV-spektroskopische Quantifizierung und kompetitive PCR hat.

Die klassischen Methoden zur Charakterisierung einer gemischten Auswahl von DNA-Extrakten sind in Abb. 56 dargestellt. Unverdünnt aufgetragene Extrakte aus Sojamehl Standard Proben (S1-S4) und von Test-Proben (P1-P8) zeigten im Agarosegel DNA unterschiedliche Fragmentierung. Der Quotient der UV-Absorptionen ($OD_{260/280}$) diente als Indikator für Proteinverunreinigungen. Die DNA-Konzentration wurde anhand der OD_{260} bestimmt. Die Proben enthielten Wildtyp-Soja und -Mais, RR sowie transgenen Bt176 Mais, letzterer beinhaltet unter anderem ein *cry*-Gen und den CaMV35S-Promotor.

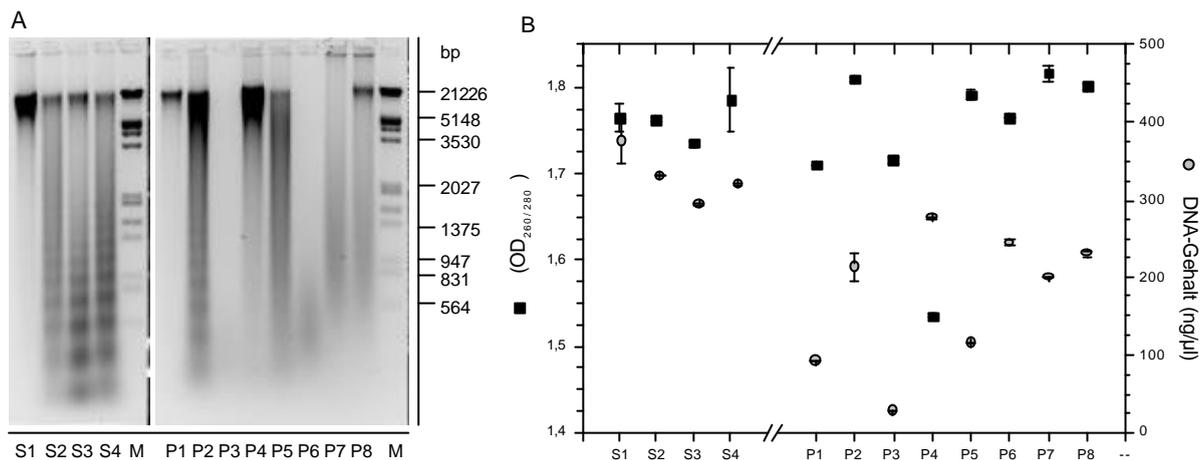


Abb. 56 Gel- und UV-spektroskopische Analyse von DNA verschiedener Proben

Nach dem Wizard III-Protokoll wurde DNA aus 100 mg Probenmaterial gewonnen und im Agarosegel (A, 1 %, 10 μ l unverdünnter Extrakt, Ethidiumbromid-Färbung) und durch UV Spektroskopie (B) analysiert. S1-4, Soja DNA aus Referenzmehlen (Fluka): S1, 0 % RR, 3,8 μ g; S2, 0,1 % RR, 3,3 μ g; S3, 0,5 % RR, 2,9 μ g; S4, 2 % RR, 3,2 μ g. DNA aus Proben: P1, ganze, gequollene RR-Bohne, 0,9 μ g; P2, 2 % Bt176-Maismehl, 2,1 μ g; P3, hitzesterilisierte, gemahlene Bt176-Maiskörner, 0,3 μ g; P4, Mehl-Mischung: 1 % Bt176-Mais, 49 % wt-Mais, 50 % RR, 2,8 μ g; P5, Bt176-Mais Grieß, 1,2 μ g; P6, texturiertes Soja-Protein, incl. 2 % RR, 2,5 μ g; P7, RR Tofu, 2 μ g; P8, Tofu mit 2 % RR, 2,3 μ g; Mengenangaben nach UV-Messung; M, DNA Marker λ III.

Referenz Sojamehle mit RR-Gehalten von 0 % bis 2 % sind zum Zwecke der Kalibrierung oder Nachweisgrenzenbestimmung kommerziell erhältlich. Hieraus extrahierte DNA war im Fall der Wildtyp-Soja (0 % RR, S1) hochmolekular, während die RR-haltigen Proben (S2, S3, S4) deutlich fragmentiert sind (Abb. 56A). Dies ist offensichtlich auf die intensive Mschung (UltraTurrax) bei der Herstellung zurückzuführen (Abschnitt 5.3, Seite 27). Aus den fein gemahlene Mehlen (S1-S4) ließ sich, im Vergleich zu den Test-Proben, mit hoher Ausbeute DNA isolieren (Abb. 56B). Im Extrakt aus ganzen Sojabohnen (P1) liegt DNA ebenfalls hochmolekular vor. Probe P2, ein Referenz Mais-Mehl mit 2 % Bt176-Mais (Fluka), wies sowohl hochmolekulare als auch fragmentierte DNA auf. Die Herstellung erfolgte wie bei Soja Referenzmehlen. Aus hitzesterilisierten, gemahlene Mais-Körnern (P3) ließ sich nur sehr wenig DNA isolieren, so dass keine Aussage zur Fragmentierung gemacht werden konnte. Aus einer Mais/Soja-Mehlmischung (P4) ließ sich eine große Menge hochmolekularer DNA isolieren, die allerdings eine deutliche Proteinverunreinigung aufwies. DNA aus Grieß (P5), einem von Spelzen und Keimlingen befreiter, gemahlener Mais, war ebenfalls deutlich fragmentiert. Texturiertes Sojaprotein (P6) ist ein stark prozessiertes Lebensmittel. Aus ihm

ließ sich zwar recht viel DNA (hoher OD_{260} -Wert) gewinnen, diese war allerdings stark fragmentiert. Der DNA-Schmier von unter 1000 bp Größe war im Gel zwar sichtbar, rief jedoch trotz eines annähernd gleichen DNA Gehaltes wie Probe S3 nur, eine verschwindend geringe Färbung im Gel hervor. Beide Tofu-Proben (P7 und P8) enthielten wie die Proben S2-S4 stark fragmentierte DNA. Der Anteil hochmolekularer DNA im Tofu (P8 mit 2 % RR) ist wahrscheinlich durch weniger stark gemahlene Ausgangsmaterialien im Vergleich zu Tofu-Probe P7 (100 % RR) bedingt.

Es zeigte sich allgemein eine mit dem Prozessierungsgrad der Probe steigende Fragmentierung der DNA. Proben, die feiner zerkleinert vorlagen (S1-4), wiesen eine höhere Extraktions Ausbeute auf als eine mit einem Pistill zerstoßene, gequollene Bohne (P1). Mit einer Ausnahme (P4) führte das gewählte Extraktionsprotokoll zu spektroskopisch reiner DNA ($OD_{260/280} = 1,7-1,8$). Die Frage, ob die isolierte DNA ausschließlich aus Soja stammt, ob noch weitere Organismen in der Probe vorhanden waren oder ob die DNA amplifizierbar ist, kann jedoch mit diesen Methoden nicht beantwortet werden.

Eine Aussage über den Soja-DNA Gehalt in DNA-Extrakten kann mit einer PCR auf ein Pflanzenart-typisches Referenzgen der Soja erhalten werden, in diesem Fall das Soja Lektin-Gen. In einem kompetitiven PCR-Ansatz wird dazu die Soja-DNA Menge durch Vergleich mit Kalibrator-DNA aus reiner Soja (UV-quantifiziert) bestimmt. Dieses Vorgehen ist sowohl für Mischungen von Soja mit anderen Organismen, als auch bei fragmentierter oder durch Prozessierung in der Amplifizierbarkeit reduzierter DNA sinnvoll. Nur derjenige DNA-Anteil wird quantifiziert, der aus Soja stammt, amplifizierbar ist und somit in den weiteren PCRs einen Beitrag zum potenziellen Nachweis des gentechnischen RR-Konstruktes liefern kann.

Die Kalibration mit Soja DNA durch semiquantitative PCR mit einer konstanten Kompetitor Konzentration (Abb. 57A) unterscheidet sich nicht wesentlich von der Kalibration mit verschiedenen Extrakten (Abb. 51, kompetitive CaMV35S PCR); hier wurde jedoch nur ein einziger Extrakt in mehreren Verdünnungen eingesetzt. Der technisch optimale Messbereich wurde durch geeignete Wahl der Kompetitormenge erreicht und liegt um den Signal-Quotienten 1, da sich hier die OD's für Target- und Kompetitor-Amplikon gleichen.

Von den Proben S2-S4 und P1-P8 wurden anhand der UV-Messungen 100 ng für die kompetitive PCR eingesetzt. PCR mit den Primern GM04-bio/GM01 ergab Target- (234 bp) oder Kompetitor-Amplikons (219 bp), die im PCR-ELISA durch spezifische Hybridisierung in separaten Vertiefungen bestimmt wurden. Wie erwartet führte die Abwesenheit von Soja DNA dazu, dass für die Proben P2 (Maismehl), P3 (hitzesterilisierte, gemahlene Maiskörner) und P5 (Maisgrieß) kein Target-Signal gemessen wurde. Da jedoch gleichzeitig ein hohes Kompetitor-Signal erhalten wurde, konnte ein falsch negatives Ergebnis durch Inhibition der PCR sicher ausgeschlossen werden. Das Resultat erlaubt den Ausschluss der Proben von weiteren Untersuchungen auf das Vorhandensein von RR, da die GM04-bio/GM01-PCR für RR und Wildtyp-Soja ein Produkt ergeben hätte. Für die restlichen Proben konnte anhand der Kalibration mit reiner Soja-DNA der Soja DNA-Gehalt bestimmt werden (Abb. 57B).

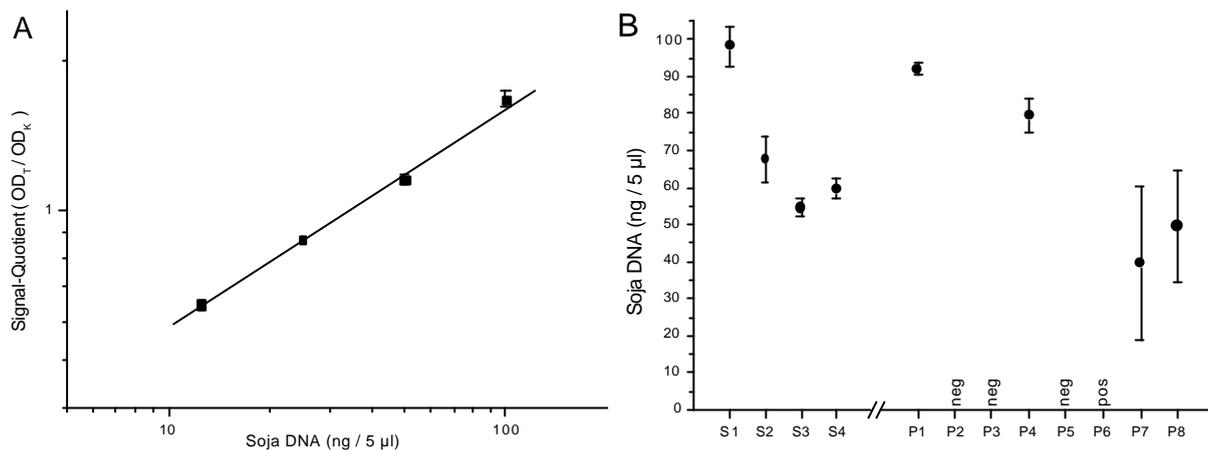


Abb. 57 Bestimmung des Soja-DNA Gehaltes in Extrakten mit Nicht-Soja-DNA

A, Kalibration der kompetitiven PCR (Primer GM04-bio/GM01) mit $1,8 \cdot 10^4$ Kompetitor Kopien (pCR RRKGMK) und einer steigenden DNA Mengen aus Soja-Mehl (Extraktion S1, Abb. 56). B, Aliquots der Extrakte P1 - P8 (Abb. 56) wurden in der selben kompetitiven PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden gemäß PCR-ELISA vermessen. Berechnung des Soja DNA-Gehaltes gemäß Kalibration ($R = 0,996$). Die DNA-Extrakte wurden UV-spektroskopisch quantifiziert und auf 100 ng/5 µl eingestellt. PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 50 Zyklen 95°C / 30 s, 61°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Bezeichnungen: neg, kein signifikantes Target-Signal detektiert, Probe enthält keine Soja-DNA; pos, Detektion eines signifikanten Target-Signals, die Probe enthält Soja-DNA, Quantifizierung war nicht möglich, da der Signal-Quotient unterhalb der Kalibratorwerte lag.

Die DNA-Extrakte der drei weiteren Referenz-Sojamehle (S2-S4) wiesen deutlich geringere Soja-DNA-Konzentrationen (55-68 ng/5µl) als die Probe S1 auf, die für die Kalibration gewählt worden war. Dies kann mit deutlichen Unterschieden in der Fragmentierung korreliert werden (Abb. 56A). Die Mehle der Proben S2-S4 wurden bei ihrer Präparation häufiger durch Turrax-Behandlung gemischt. Die dadurch verursachte geringere Fragmentlänge der isolierten DNA der Proben S2-S4 führt vermutlich zu einer Überbestimmung des für die kompetitive PCR relevanten DNA-Gehaltes durch UV-Bestimmung. Strangbrüche zwischen den Primerbindungsstellen zerstören Matrizen für die PCR, ohne die UV-relevante Gesamtmenge DNA zu reduzieren. Ein weiterer Grund könnte Hypochromie, also ein geringerer Extinktionskoeffizient, der höher geordneten, nativen DNA im Vergleich zur fragmentierten DNA, weniger geordneten Struktur sein.

Aus ganzen RR-Bohnen (P1) isolierte DNA zeigt als einzige der untersuchten Proben in der Quantifizierung durch kompetitive PCR annähernd den gewünschten Soja-DNA Gehalt (Abb. 57). Sie gleicht somit in UV-Eigenschaften und PCR-Verhalten der Referenzprobe (S1). Wie die zur Kalibration verwendete DNA des 0 %-RR Referenzmehls S1 besteht die P1-DNA ebenfalls fast ausschließlich aus hochmolekularer DNA (Abb. 56). Der Extrakt der Probe P4, die je zur Hälfte aus Mais- und Soja-Mehl besteht, weist eine große Menge Soja-DNA auf, die mehr als der Hälfte der eingesetzten 100 ng Gesamt-DNA (nach UV-Bestimmung) entspricht. Durch die kompetitive PCR wurden ($79,6 \pm 4,8$) ng Soja-DNA bestimmt. Vermutlich liegt die Ursache in einer bevorzugten Extraktion von DNA aus Soja. So könnte das beigemischte Sojamehl beim Probenaufschluss wegen unterschiedlicher Korngrößen besser zugänglich sein. Möglicherweise unterscheidet sich auch der individuelle DNA-Gehalt bezogen auf die jeweilige Mehlmasse. Daraus folgt, dass aus den Verhältnissen der extrahierten DNA nicht unbedingt auf die Verhältnissen in der ursprünglichen Probe geschlossen werden kann.

Der Extrakt der Probe P6 (texturiertes Soja-Protein) enthält Soja DNA, wie aus dem signifikanten Target Signal abgeleitet werden kann. Da dies jedoch im Vergleich zum Kompetitor Signal gering ist, bleibt der Quotient unterhalb des Kalibrationsbereiches. Eine Extrapolation der Kalibration unter den Wert des kleinsten Standards (12,5 ng/5µl) ergab ~3,5 ng/5µl DNA. Die Tofu-Proben (P7, P8) wiesen ebenfalls Soja DNA-Gehalte auf, die deutlich niedriger als die eingestellten 100 ng/ 5µl lagen. Alle drei Proben zeigten im Agarosegel eine augenfällige, starke Fragmentierung der DNA, die zu einer Überbestimmung des DNA-Gehaltes durch UV-Spektroskopie im Vergleich zur kompetitiven PCR führte.

Screening und spezifische Analyse einer gemischten Probenauswahl

Die quantitativen Ergebnisse der Soja-DNA Bestimmung lassen sich gemeinsam mit jenen der semiquantitativen PCRs, die den CaMV35S-Promotor oder das RR-Genkonstrukt nachweisen, nutzen. Bei einem GVO-Gehalt von größer 1 % bezogen auf die Summe (Wildtyp und GVO) muss ein ganz oder teilweise daraus bestehendes Lebensmittel als GVO-haltig gekennzeichnet werden. Proben, die dieses Kriterium deutlich überschreiten, könnten schon nach den hier ausgearbeiteten Analysen als GVO-haltig gekennzeichnet werden. Eine weiteres, auf doppeltkompetitiver PCR beruhendes Verfahren zur Bestimmung des genauen GVO-Gehaltes im Bereich des Schwellenwertes, wird anschließend im Abschnitt 6.2.8.4 vorgestellt.

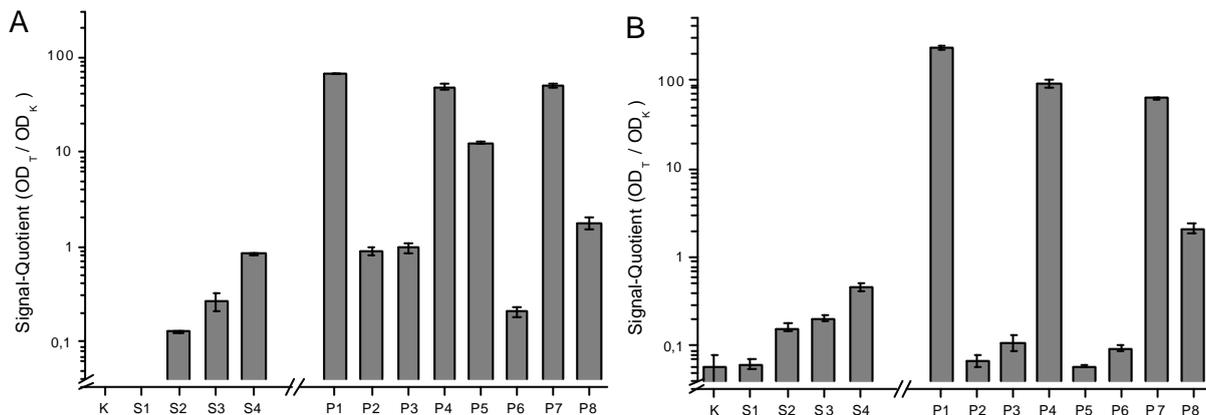


Abb. 58 CaMV35S-Screening und RR-spezifische PCR-ELISA Analyse

Die in Abb. 56 charakterisierten DNA-Extrakte wurden in zwei semiquantitativen PCRs mit je 100 Kopien Kompetitor (pCR RRKGMK) pro 100 ng DNA-Extrakt (nach UV-Bestimmung) eingesetzt. PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 50 Zyklen 95°C / 30 s, 55°C / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min. Die PCR-Produkte der CaMV35S-PCR (A) und der RR-PCR (B) wurden im PCR-ELISA analysiert. K, PCR nur mit Kompetitorplasmid zur Bestimmung der Kreuzhybridisierung. Weitere Probenbezeichnungen siehe Legende zu Abb. 56, Seite 117.

Zur *Screening*- und zur spezifischen-Analyse wurden wiederum je 100 ng DNA der Proben (UV-Bestimmung) zusammen mit einer konstanten Menge Kompetitor in der jeweiligen PCR eingesetzt und die Produkte durch PCR-ELISA analysiert (Abb. 58). Die Referenz-Sojamehl-Proben weisen erwartungsgemäß mit steigendem RR-Gehalt steigende Signal-Quotienten auf (S2-S4). Im Fall der kompetitiven CaMV35S *Screening* PCR und des PCR-ELISA zur Auswertung ist keine Kreuzhybridisierung messbar; im Falle des RR-spezifischen PCR-ELISA liegt sie bei 6 %. Sie wurde durch Analyse einer PCR, die nur Kompetitor-Plasmid enthielt, ermittelt. Die RR-freie Soja Probe (S1, 0 % RR) erzielte in den PCR-ELISA Analysen

Werte für den Signal-Quotienten, die den Werten für Hintergrund oder Kreuzhybridisierung entsprachen. Bei allen betrachteten Test-Proben (P1 bis P8) wurde in der *Screening*-Analytik die DNA-Sequenz des CaMV35S Promotors nachgewiesen (Abb. 58A). Er diene als Indikator für die Anwesenheit gentechnisch veränderter Organismen. Die Proben P1, P4, P5 und P7 wiesen dabei sehr hohe Quotienten auf, ein Hinweis auf Proben mit hohem GVO-Anteil. Die Proben P2, P3 und P8 ergaben etwas niedrigere Quotienten, in der gleichen Größenordnung wie die des 2 % RR-Standard (S4). Der Quotient der Probe P6 gleicht demjenigen des 0,5 % RR-Standards (S3). Im Sinne des analytischen Konzepts des GVO-Nachweises (Abb. 1) ist das Ergebnis dieses *Screenings* ein zwingender Grund weitere Analysen mit den Proben durchzuführen.

Der spezifische Nachweis des RR-Genkonstruktes durch semiquantitative PCR (Abb. 58B) zeigte, dass die Proben P1, P4 und P7 einen viel höheren Anteil RR-DNA im Extrakt aufweisen als die 2 % RR-Standard-Probe. Trotz eines etwas niedrigeren Quotienten zeigte die Analyse der Probe P8 deutlich RR-DNA an. Die Proben P2, P3, P5 und P6 haben Quotienten unterhalb des kleinsten Referenzmehles (S2, 0,1 % RR) und weisen daher keine oder nur eine geringe Menge RR-DNA in den Extrakten der Proben auf.

Die Deutung der Ergebnisse im Hinblick auf die tatsächliche Zusammensetzung gibt für die Probe P1 ein eindeutiges Bild. Für diese RR-Bohnen wurde die eingesetzte DNA Menge korrekt als Soja DNA identifiziert (Abb. 57). Der sehr hohe Quotienten nach CaMV35S-PCR zeigt deutlich die prinzipielle Anwesenheit eines GVO an. Der Quotient des RR-PCR-ELISA ist ebenfalls sehr hoch und zeigt, dass die Probe hauptsächlich aus RR besteht. Diese Probe muss nach den gültigen Verordnungen als GVO-haltig gekennzeichnet werden.

Das unterschiedliche Verhalten der DNA-Extrakte der Proben P2, P3 und P5 im CaMV35S-*Screening* und in der RR-spezifischen Bestimmung tritt besonders hervor. Wie für Proben, die als einzigen GVO Bt 176 Mais enthalten erwartet, wird nur die CaMV35S Sequenz, nicht jedoch die RR-Sequenz gefunden. Hier trägt der Soja-Nachweis zur Klärung bei, da nachgewiesen wurde, dass keine Soja DNA im Extrakt vorlag (Abb. 57, Seite 118) und daher ebenfalls keine RR-DNA vorhanden sein kann. Im Sinne einer vollständigen GVO-Analyse würde der Nachweis einer anderen Pflanzenart (hier Mais) und eine spezifische Bestimmung eines anderen GVO-Konstruktes folgen.

Mischprobe (1 % Bt-Mais, 49 % wt-Mais, 50 % RR) P4 zeigte ein ähnliches Verhalten wie Probe P1. Der DNA-Extrakt enthielt eine große Menge Soja DNA (circa 80 ng/PCR); in der extrahierten DNA konnte die CaMV35S Promotor- und die RR-Sequenz nachgewiesen werden. Der Sojabestandteil der Probe stammt folglich zu hohen Anteilen aus RR und die Probe muss wegen ihres RR-Gehaltes als GVO-haltig gekennzeichnet werden. Im analytischen Routinebetrieb würde eine CaMV35S-Promotor haltige Probe weiteren Untersuchungen unterzogen. So würde in qualitativen PCRs wahrscheinlich ebenfalls auf das Vorhandensein von Mais oder anderen Pflanzenarten analysiert. Nach der Bestimmung von Mais als Bestandteil würde anschließend speziell auf Anwesenheit von GVO-Mais getestet. Dies würde gegebenenfalls einen zweiten Anlass zur Kennzeichnung geben.

Probe P6 zeigte im *Screening* nach dem CaMV35S-Promotor einen positiven Befund. Da bei der vorherigen Bestimmung wenig Soja-DNA gefunden wurde (< 12,5 ng) und in der RR-

Analytik nur ein Signal unterhalb der Nachweisgrenze erhalten wurde, wäre eine weitergehende Analytik notwendig. Wenig Soja-DNA im Extrakt kann zum einen durch einen geringen Soja-Anteil in der Probe aber auch durch eine geringe Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA bedingt sein. Eine Ermittlung von DNA weiterer Organismen in der Probe bliebe hier ohne Erfolg (texturiertes Soja Protein ist ein reines Soja Produkt). Eine Erhöhung der Matrizen-DNA Menge, auf eine Veränderung dieses Parameters weisen schon die Ergebnisse der kompetitiven GM0104-PCR hin, führte zum deutlichen Nachweis von RR-DNA.

Die DNA-Extrakte der Tofu Proben 7 und 8 enthielten deutliche Mengen an Soja-DNA. Wie für RR haltigen Tofu erwartet, konnte sowohl der CaMV35S-Promotor als auch die RR-Sequenz nachgewiesen werden. Im Einklang mit den unterschiedlichen Gehalten (100 bzw 2 % RR) hat Probe 7 bei ähnlichem Soja-DNA Gehalt im Extrakt einen höheren Anteil an CaMV35S- und RR-DNA als Probe 8. Beide Proben müssen als GVO-haltig gekennzeichnet werden.

In den vorgestellten Analysen wurde die kompetitive Lektin-Gen PCR und der zugehörige PCR-ELISA nicht zur Justierung des DNA-Gehaltes auf einen bestimmten Wert genutzt, sondern lediglich zur parallelen Kontrolle der DNA-Menge und zur Pflanzenart-Bestimmung. Ein solches Vorgehen ist in analytischen Routinelabor aus Zeitgründen ebenfalls sinnvoll [2]. An der sehr heterogenen Auswahl von unterschiedlich stark verarbeiteten Proben konnte gezeigt werden, dass die UV-spektroskopische Bestimmung der einzusetzenden Soja DNA eine Fehlerquelle darstellt, die mit dem Pflanzenart-spezifischen GM-PCR-ELISA aufgedeckt werden konnte. Der Anteil amplifizierbarer DNA war umso geringer, je höher der Fragmentierungsgrad war. Die korrekte, einfache Abschätzung des GVO-Gehaltes unter Bezug auf Referenz DNA-Extrakte, wie in der semiquantitativen GVO-Gehalt Bestimmung bei RR-Mehlen (Abschnitt 6.2.8.2), ist bei den hier dargestellten semiquantitativen PCRs (Abb. 58) wegen der unterschiedlichen Probenbeschaffenheit nicht möglich. Eine exakte Bestimmung des GVO-Gehaltes einer Probe kann daher nur durch Einbeziehen der Amplifizierbarkeit der Pflanzenart-spezifischen Sequenz (Lektin-Referenzgens) in die Quantifizierung eines GVO-Gens möglich sein. Dies wird in der doppelkompetitiven PCR umgesetzt.

6.2.8.4 Doppelkompetitive PCR

Die quantitative, kompetitive PCR in der klassischen Ausführung stellt das Titrieren eines DNA-Extraktes mit einer steigenden Menge eines Kompetitors und die Bestimmung der zum Erreichen der Äquivalenz von Target- und Kompetitor-Produkt benötigten Kopienzahl dar. Diese Ausführung bedarf im Gegensatz zur semiquantitativen PCR mehrerer paralleler Reaktionsansätze. Sie erlaubt die Beobachtung des regelmäßigen Verlaufs des Stoffmengen-Quotienten Q_{St} aus Target- und Kompetitor-Amplikon nach PCR und dessen Erreichen von $Q_{St} = 1$, oder der Interpolation auf diesen Wert. Die prinzipielle Anwendung dieser Methode ist beispielsweise in den Abb. 40, 48 und 49 zu sehen. Die Bildung des Signal-Quotienten aus PCR-ELISA Signalen (Q_{Si}) spiegelt, wegen der unterschiedlichen Hybridisierungseffizienzen der Target- und Kompetitor-Sonden nicht unmittelbar den Quotienten der Produkt-Stoffmengen wieder. Durch den Einsatz von Normierungsplasmiden in der PCR und Analyse der resultierenden Produkte im nachfolgenden PCR-ELISA kann jedoch ein geeigneter Signal-

Quotient zur Ableitung des Äquivalenzpunktes ermittelt werden (Abschnitt 6.2.6.7, Seite 88).

Die Ermittlung der Kopien am Äquivalenzpunkt für einen Proben-DNA Extrakt stellt zwar eine absolute Messgröße dar, sie ist aber von zu vielen Faktoren abhängig, um mit ihr eine absolute Quantifizierung des GVO-Gehaltes zu erlauben. Der Bezug der ermittelten Kopien des Target-Gens am Äquivalenzpunkt auf die initiale Templatmenge in Kopien, berechnet mit Hilfe der absoluten Genomgröße des untersuchten Organismus (ein Soja Genomäquivalent entspricht 1,155 pg, [122]), ist daher kein Erfolg versprechender Ansatz. Für zuverlässige Berechnungen des GVO-Gehaltes kann daher nicht die einfache Quantifizierung durch über eine UV-Messung verwendet werden, die Quantifizierung der Pflanzenart-typischen DNA muss, wie bereits in Abschnitt 6.2.8.3 praktiziert, ihre Amplifizierbarkeit berücksichtigen. Ferner tragen die Schwankungen der Kompetitorpräparation ebenfalls zur Ungenauigkeit des so entstandenen absoluten Ergebnisses bei (Abschnitt 6.2.7.5 und 6.2.7.6).

Der Einsatz eines einzigen Doppelkompetitors (hier pCR RRKGMK) stellt wegen der geringeren statistischen Schwankungen in Hinblick auf Material- und Zeitaufwand eine große Vereinfachung des experimentellen Ablaufes dar. Er stellt in der doppelkompetitiven PCR sicher, dass in den beiden kompetitiven PCRs, die im Folgenden aufeinander bezogen werden, per Definition exakt die gleiche Anzahl Matrizen-Moleküle des jeweils benötigten Kompetitors vorliegen. Die Schwankungen der Kompetitorpräparation durch individuelle Restriktion, UV-Bestimmung und Verdünnung haben daher keinen Einfluss mehr. Die primären Ergebnisse in Form der Kopien am Äquivalenzpunkt können einfach durch prozentualen Bezug der GVO-Gen-Kopienzahl auf die Referenzgen-Kopienzahl zur Berechnung des GVO-Gehaltes genutzt werden. Eine Kalibration oder der Vergleich mit einer Referenzprobe, wie bei dem zuvor vorgestellten Vorgehen, ist nicht mehr notwendig.

6.2.8.5 Ausführung einer doppelkompetitiven PCR mit RR-Bohnen

Für die Machbarkeit der quantitativen Analytik mit doppelkompetitiver PCR und PCR-ELISA-Auswertung wurde als geeigneten Realprobe ein DNA-Extrakt aus ganzen RR-Bohnen gewählt. Es wurden vier Serien kompetitiver PCR mit dem Doppelkompetitor pCR RRKGMK durchgeführt. Diese Messungen stellten zum einen eine direkte und elegante Möglichkeit dar, die vier in dieser Arbeit vorgestellten kompetitiven PCRs (CaMV35S, RR, GM0304, GM0104) untereinander zu vergleichen und repräsentiert zum anderen eine Realproben-Messung. In dem DNA-Extrakt und Genom der RR-Bohne, liegen die nachzuweisenden Sequenzen des CaMV35S Promotors, des Übergangs von Promotor zum chloroplastidären Transitpeptid (RR-PCR) sowie das Lektin-Gen (GM0304 und GM0104 PCRs) im gleichen Verhältnis vor (Kopienzahl GVO-Gen zu Referenzgen = 1:1, GVO-Gehalt = 100%). Diese Probe hat also die Eigenschaften eines Ur-Titers. Eine Forderung an die vier verschiedenen analytischen Systeme war daher, dass für alle quantitativen, kompetitiven PCRs die gleiche Kompetitor-menge zur Erreichung des Äquivalenzpunktes benötigt wird. Der GVO-Gehalt, ermittelt als prozentuales Verhältnis von Kopienzahl des GVO-Gens am ÄP zur Kopienzahl des Referenz-Gens am ÄP, muss bei Abwesenheit von systematischen Fehlern gleich 100 % sein. Dieser Versuch demonstriert ebenfalls an einem übersichtlichen

Beispiel die zu erwartenden relativen Ergebnisse und deren Fehler im Vergleich von PCR-ELISA und optischer Gelauswertung. Den Ergebnissen der kompetitiven PCR werden jene aus Realzeit-PCR mit SYBR-Green gegenübergestellt.

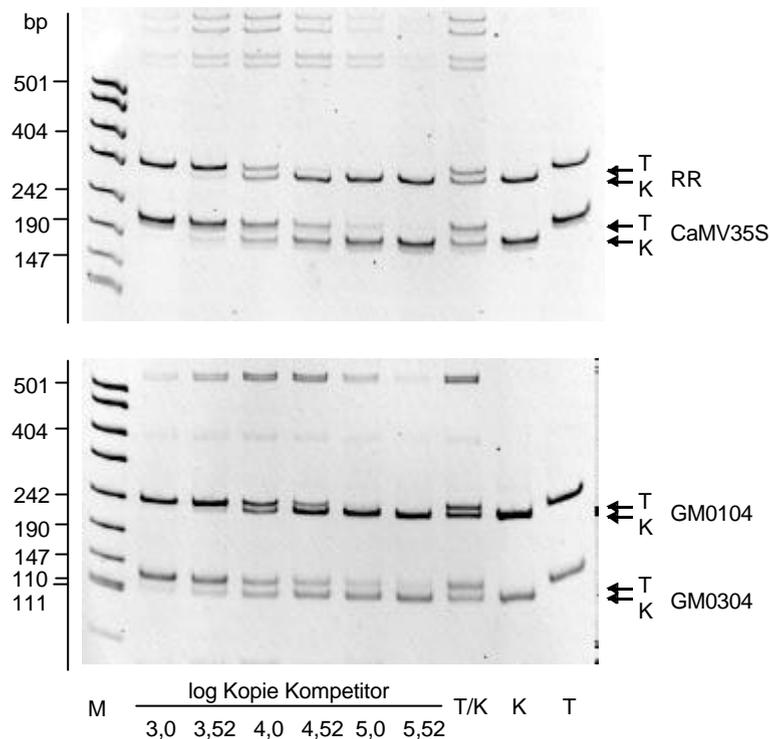


Abb. 59 Kompetitive PCR eines RR-DNA-Extraktes mit vier PCR Systemen

Roundup Ready DNA (125 ng, nach Wizzard III-Protokoll aus ganzen Bohnen isoliert) wurde in vier Reihen kompetitiver PCR jeweils mit steigenden Mengen des Doppelkompetitors pCR RRGGMK (10^3 bis $3,3 \times 10^5$ Kopien/25 μ l Reaktion) eingesetzt. T/K kennzeichnet PCRs mit den Normierungsplasmiden (2×10^4 Kopie/25 μ l Reaktion; pCR RRTK, oberes Gel; pCR GMTK, unteres Gel). K, PCR mit Doppelkompetitor (2×10^4 Kopie/25 μ l Reaktion) als Matrize ohne RR-DNA; T, PCR nur mit RR-DNA als Matrize. In dem PAGE-Gel (Ethidiumbromid-gefärbt) sind zwei analoge Reaktionen (je 1 μ l) zusammen in einer Spur aufgetragen. Da sich die Produkte ausreichend unterschieden, wurde die Zahl der benötigten Gele so zu Gunsten der Übersichtlichkeit halbiert. PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 50 Zyklen 95°C / 30 s, T_{Anneal} / 30 s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min. T_{Anneal} für RR- und CaMV35S-PCR, 55°C; T_{Anneal} für GM0304- und GM0104-PCR, 61°C.

In allen vier Reihen der kompetitiven PCRs, mit konstanter Menge RR-DNA-Extrakt und steigender Kompetitormenge ist die Abnahme der Intensität der Target-Amplikon Bande und Steigerung der Intensität der Kompetitor-Amplikon Bande mit zunehmender Anzahl Doppelkompetitor-Moleküle zu erkennen (Abb. 59). Als Referenz für das Vorliegen einer gleichen Anzahl von Target- und Kompetitor-Matrizen, wurde je eine PCR mit den Normierungsplasmiden pCR RRTK und pCR GMTK aufgetragen. Reine Target- und Kompetitor-Produkte dienten später zur Bestimmung der maximal erreichbaren Signal-Quotienten im PCR-ELISA. Die PCR wurde mit 50 Zyklen durchgeführt und befand sich somit in der Sättigung der Produktbildung.

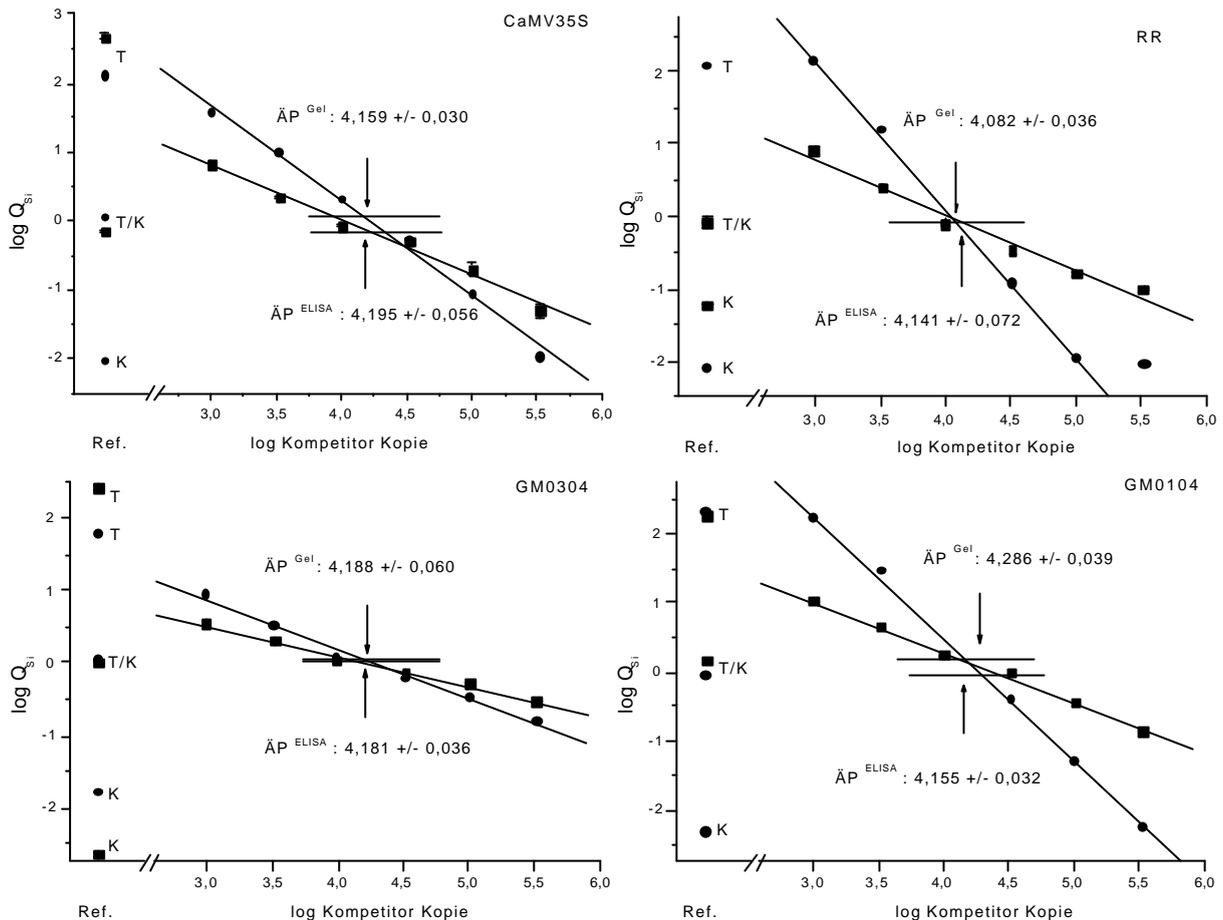


Abb. 60 Graphische Auswertung der kompetitiven PCRs mit Gel- und ELISA-basierten Verfahren

Die in Abb. 59 beschriebenen Reaktionsansätze wurden mit Hilfe des PCR-ELISA (■) und der optischen Gelauswertung (●) analysiert. Die Signal-Quotienten der (Q_{Si} , Target/Kompetitor) sind logarithmisch gegen die eingesetzte Kopienzahl aufgetragen. Ref, Target (T)- und Kompetitor (K)-Produkt sind als Referenzen für maximal erreichbare $\log Q_{Si}$ -Werte aufgetragen. Die waagerechte Hilfslinien in Höhe der $\log Q_{Si}$ -Werte der Normierungsplasmide (T/K, ÄP) dienen zur Ablesung. Am Schnittpunkt (durch Pfeile gekennzeichnet) mit der Regressionsgeraden der Serie kompetitiver PCRs (jeweils für ELISA oder optische Gelauswertung) ist das Lot auf die Abszisse gefällt und gibt die zur Erreichung des ÄP benötigte Anzahl Kompetitor-Moleküle an. Notiert ist der Logarithmus der Kopienzahl am ÄP und die Ablesungenauigkeit, letztere ist durch Ablesen am 68 %-Konfidenzintervall (nicht eingezeichnet) der linearen Regression ermittelt.

In Abb. 60 sind die Auswertungen der Serien kompetitiver PCRs mittels optische Auswertung der Bandenintensitäten (Abschnitt 5.5.6, Seite 36) und PCR-ELISA für die vier untersuchten Systeme parallel dargestellt. Nach doppeltlogarithmischer Auftragung und linearer Regression erfolgte die Ablesung der am Äquivalenzpunkt vorliegenden Anzahl Kompetitor-Moleküle bei dem Signal-Quotienten der PCR-Produkte des Normierungsplasmids, anhand einer Hilfslinie. Die Fehler der Kopienzahl am Äquivalenzpunkt wurden graphisch ermittelt. Sie wurde durch die Grenzen des Konfidenzintervalles (68 %) um die Regressionsgerade bestimmt (Abb. 9, Seite 46), die hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt sind. Die Abweichungen vom Mittelwert spiegeln die Güte der Regression wider und nicht die statistische Schwankung des Ergebnisses bei wiederholter Messung. Letztere wird in Abschnitt 6.2.8.6 behandelt. Weiterhin sind in Abb. 60 Messungen von reinem Target- und Kompetitor-Amplikon als Referenzwerte für die maximale Spannweite des Messbereiches gezeigt. Sie repräsentieren

die begrenzenden Quotienten von niedrigen und hohen Signalen (z. B. für eine Hybridisierung von passender Target-Sonde an das Target-Amplikon) und dem korrespondierenden Hintergrundsignal (Hybridisierung der Kompetitor-Sonde an das Target-Amplikon) im PCR-ELISA. Diese Referenzwerte resultieren aus Kreuzhybridisierung und unspezifischer Bindung des anti-Dig-AP Konjugates an Oberflächen. Für die gleiche Grenzwertbetrachtung bei optischer Gelauswertung wurde der Quotient von Peak-Höhe und dem Rauschen der Basislinie gebildet. Durch die logarithmische Darstellung in Abb. 60 sind Q_{Si} -Werte ≤ 0 nicht eingezeichnet (Abschnitt 5.5.4, Seite 34).

Bei Betrachtung der erhaltenen Regressionen (Abb. 60, Tab. 14) wird erneut deutlich, dass die PCR-ELISA-Auswertung im Vergleich zur optischen Auswertung zu geringeren Steigungen führt (vergleiche ebenfalls Abb. 37, Seite 86 und Abb. 40, Seite 89). Daraus resultiert für den ELISA prinzipiell ein größerer Messbereich bei gleichzeitig niedrigerer Sensitivität. Im Gegenzug sollten daher die ermittelten Fehler der ELISA-Messungen größer sein als diejenigen der optischen Auswertung. Dieser erwartete Effekt wird aus den in Abb. 60 ermittelten Äquivalenzpunkten und ihren Fehlern nicht deutlich. Die durchschnittlichen prozentualen Fehler des positiven, größeren Fehlerintervalls (Tab. 14, $\Delta+/\ddot{A}P$) beträgt für die PCR-ELISA-Auswertung ($12,5 \pm 4,4$) % und für die optische Gelauswertung ($10,0 \pm 3,4$) %. Sie unterscheiden sich offensichtlich nicht signifikant.

Tab. 14 Numerische Auswertung der vier kompetitiven PCRs nach PCR-ELISA

Die Daten sind Abb. 60 entnommen und beschreiben die Analyse einer 100 % RR-haltigen Soja Probe. Die Kompetitor-Kopien am Äquivalenzpunkt ($\ddot{A}P$) sind als delogarithmierte Werte pro 125 ng RR-DNA angegeben, ebenso wie die positive und negative Abweichung vom Mittelwert ($\Delta+/-$). Die Steigung ($\delta = -\Delta \log Q_{Si} / \Delta \log \text{Kompetitor Kopie} \pm SD$), der Korrelationskoeffizient (R) der linearen Regression und der durchschnittliche, relative Fehlerintervall sind je nach Auswertungsart der kompetitiven PCR (Abb. 60) notiert. Außer bei der gekennzeichneten (*, N = 5), sind in alle Regressionen N = 6 Messwerte eingegangen. Der Mittelwert der positiven, größeren Fehlerintervalle um den jeweiligen Äquivalenzpunkt in Prozent ist notiert.

PCR-System	PCR-ELISA	opt. Gelauswertung
CaMV35S	$\ddot{A}P = 15650, \Delta(+2150/ -1890)$ $\delta = (0,796 \pm 0,045), R = 0,994$	$\ddot{A}P = 14405, \Delta(+1020/ -952)$ $\delta = (1,400 \pm 0,044), R = 0,998$
RR	$\ddot{A}P = 13833, \Delta(+2501/ -2119)$ $\delta = (0,772 \pm 0,056), R = 0,989$	$\ddot{A}P = 12077, \Delta(+ 1048/ -965)$ $\delta = (2,076 \pm 0,089), R = 0,997^*$
GM0304	$\ddot{A}P = 15171, \Delta(+1618/ -1462)$ $\delta = (0,415 \pm 0,019), R = 0,996$	$\ddot{A}P = 15428, \Delta(+2302/ -2003)$ $\delta = (0,687 \pm 0,043), R = 0,992$
GM0104	$\ddot{A}P = 14294, \Delta(+1095/ -1017)$ $\delta = (0,734 \pm 0,024), R = 0,998$	$\ddot{A}P = 19318, \Delta(+ 1803/ -1649)$ $\delta = (1,783 \pm 0,070), R = 0,997$
pos. Fehlerintervall	$\Delta+/\ddot{A}P = 12,5 \pm 4,4$ %	$\Delta+/\ddot{A}P = 10,0 \pm 3,4$ %
$\ddot{A}P$ -Mittelwert	$\ddot{A}P = 14737 \pm 824 (\pm 5,5$ %)	$\ddot{A}P = 15307 \pm 3019 (\pm 19,7$ %)

Auffällig ist die geringere Steigung (δ , Tab. 14) der Regressionen des kompetitiven GM0304 PCR-Systems im Vergleich. Sie beträgt nur etwa die Hälfte (52 - 56 %) der Steigungen der drei weiteren Systeme. Der Effekt tritt sowohl bei PCR-ELISA, als auch bei der optischen

Gelauswertung auf und ist somit in der PCR an sich begründet. Im Laufe der Arbeit wurde die Variabilität dieser Steigungen bereits beobachtet aber nicht detailliert untersucht, eine Abhängigkeit von der PCR-Zykluszahl und von Rehybridisierungs-Verhalten der Amplikons in der PCR sind jedoch wahrscheinlich.

Die Gleichheit von Signalen ($Q_{Si} = 1$) kann, nur in erster Näherung als Auswertekriterium dienen. Die Ableseung des Logarithmus der Kopienzahl am ÄP erfolgt für PCR-ELISA und Gelauswertung bei differierenden, meistens geringfügig von $\log Q_{Si} = 0$ verschiedenen Quotienten. Auf einer logarithmischen Skala scheint dieser Unterschied gering, beim Delogarithmieren der Werte sind diese Auswirkungen jedoch groß und unregelmäßig von einem PCR-ELISA zum anderen. Im Falle der CaMV35S-PCR-ELISA Auswertung ergäbe sich beispielsweise ein ÄP bei 10046 $\Delta(+1415/-1323)$ Kopien/125 ng statt bei 15650, wie nach Nutzung des Normierungsplasmids (Tab. 14). Die Korrektur und Normierung trägt der unterschiedlichen Fluoreszenz Rechnung, die bei der Gel-Analytik je nach Amplikonlänge gefunden werden. Beim PCR-ELISA weisen Target- und Kompetitor-Sonden differierende Hybridisierungseffizienzen oder Kinetiken auf, die berücksichtigt werden müssen.

Der Signal-Quotient einer PCR mit den Normierungsplasmiden stellt keinen konstanten Wert dar. Er schwankt von Versuch zu Versuch geringfügig mit der Hybridisierungstemperatur, der Pufferzusammensetzung oder der Dauer von Inkubations- und Waschschrinen. Er muss, wie die Kalibration eines klassischen ELISAs, jeweils individuell bestimmt werden. Das Gleiche gilt prinzipiell für die maximal erreichbaren Signal-Quotienten für reines T- oder K-Amplikon. Diese Quotienten sind im PCR-ELISA durch Kreuzhybridisierung bedingt und schwanken ebenfalls von Versuch zu Versuch. Im vorliegenden Experiment erzeugte reines RR-Kompetitor Produkt eine relativ hohe und bewusst tolerierte Kreuzhybridisierung (6 % des Kompetitor Wertes, $\log Q_{Si} = -1,22$). Dieser Effekt ist aus früheren Experimenten bekannt und auf die hohe Probenmenge, die zu geringen Entwicklungszeiten der Farbreaktion für den RR-PCR-ELISA führt, zurückzuführen. Der Signal-Quotient des Normierungs-Plasmids ist im Gegensatz dazu, speziell in der doppelkompetitiven PCR mit Kompetitorreihen, von größerer Bedeutung, da er der Ableseung des Ergebnisses dient.

Den Ergebnissen der kompetitiven PCRs, ermittelt durch optische Gelauswertung und durch PCR-ELISA (Tab. 14), werden Ergebnisse gegenübergestellt, die mit Realzeit-PCR mit SYBR-Green (Abschnitt 6.2.7.2, Seite 93) der gleichen RR-DNA-Präparation und einer externen Kalibration des Doppelkompetitorplasmids erhalten wurden (Abb. 61). Die Richtigkeit der Gehalts-Bestimmung drückt sich durch die Nähe zum 100 % Soll-Wert aus, da die amplifizierte Sequenzen in allen vier PCR-Systeme im gleichen Verhältnis vorliegen. Als gemeinsamer Bezugspunkt, in Kopien des Referenzgens pro ng Gesamt-DNA, aller Messungen wurde das Ergebnis des GM0304-Systems gewählt, daher ist die Prozentangabe für dieses System nicht aussagekräftig.

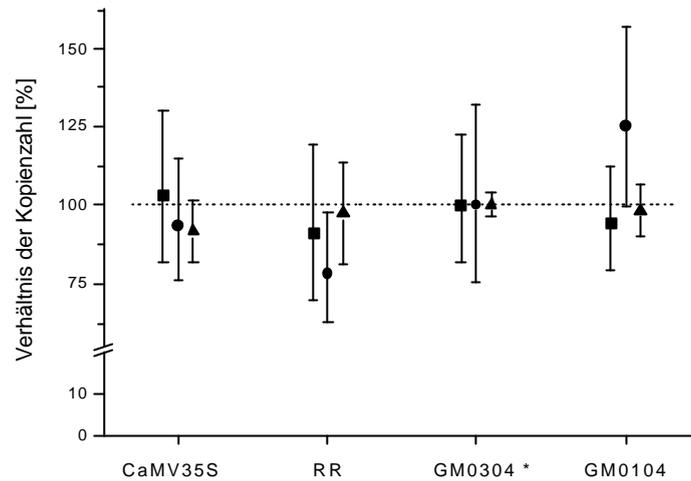


Abb. 61 Vergleich der RR-Quantifizierung durch kompetitive und Realzeit-PCR

Vergleich von kompetitiver PCR, ausgewertet durch PCR-ELISA oder Gel und Realzeit-PCR mit externer Kalibration. Das prozentuale Verhältnis der Kopienzahlen am Äquivalenzpunkt ist für jede Analyseart der vier PCR-Systeme auf das Ergebnis der GM0304-PCR (*, Basis) ermittelt worden. Die Daten veranschaulichen die PCR-ELISA- (■) und Gelauswertung (●) der in Abb. 59, Abb. 60 und Tab. 14 gezeigten kompetitiven PCR im Vergleich mit Daten der Realzeit-PCR mit SYBR-Green (▲). Wiederfindung (Sollwert = 100%), Präzision (Größe der Abweichungen vom Ergebnismittelwert) und das Fehlen systematischer Abweichungen (Ergebnisse streuen um den 100%-Wert) können abgelesen werden. Die Abweichungen stellen bei PCR-ELISA- und Gelauswertung die Ablesungenauigkeit dar; bei der Realzeit-PCR mit externer Kalibration ist die Standardabweichung von drei Messungen bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen (vgl. Abb. 43) eingezeichnet.

Die Auswertung der kompetitiven PCR mittels PCR-ELISA führt zu geringeren Abweichungen vom erwarteten 100 %-Wert (CaMV35S: 103 %, RR: 94 % und GM0104: 91 % Wiederfindungsrate) als die optische Gelauswertung (CaMV35S: 93 %, RR: 78 % und GM0104: 125 % Wiederfindungsrate). Die auf einem anderen Messprinzip beruhende Realzeit-PCR zeigt die geringsten Abweichungen (CaMV35S: 98 %, RR: 93 % und GM0104: 92 % Wiederfindungsrate). Die Fehler der Endergebnisse sind wegen des graphischen Vorgehens nur für jene nach ELISA- und Gel-Auswertung vergleichbar (siehe Abb. 7 und 60). Die ermittelten Fehler bewegen sich für beide Auswertungssysteme in der gleichen Größenordnung, der durchschnittliche Fehler nach oben bzw. unten beträgt + 25/- 20 %. Bei der Realzeit-PCR wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Messungen verwendet.

Da die RR-Bohne gewissermaßen als Ur-Titer für ein äquimolares Verhältnis von Referenz- und GVO-Gen dient, beruhen die Abweichungen in diesen Messungen auf experimentellen Fehlern. Prinzipiell könnte die Kopienzahl je ng DNA jedes beliebigen PCR-Systems als Bezugsgröße gewählt werden. Um die maximale Abweichung von den Erwartungen zu betrachten, muss daher beispielsweise das Ergebnis der Gelauswertung für das RR- und das GM0104-System beachtet werden. Die Kopienzahl am ÄP differiert ohne Überlappung der Fehlerintervalle, was zu dem falschen Schluss führt, der Gehalt an RR-DNA sei um 37,5 % kleiner als der Soja-DNA Gehalt. Bei der ELISA-Auswertung hingegen tritt bei Vergleich von RR- und CaMV35S die größte Ungleichheit der Einzelergebnisse auf (Differenz = 11,6 %). Zwar überlappen die Intervalle noch, dennoch müsste interpretiert werden, dass zusätzlich zur DNA mit RR-Sequenz weitere DNA, die ausschließlich CaMV35S-Sequenz enthält, quantifiziert wurde. Beide Schlussfolgerungen entsprechen nicht der Probe, da reine RR-DNA eingesetzt wurde. Als logische Konsequenz kann man für dieses individuelle

Experiment einen experimentell ermittelten, maximalen Fehler der Methode formulieren. Er ist mit 37,5 % für die optische Auswertung des Geles dreimal so groß wie für die PCR-ELISA-Auswertung (11,6 %). Für die Realzeit-PCR wurde durch Vergleich für die Paarung CaMV35S/GM0304 (91,7 %) ein maximaler, experimenteller Fehler von 8,3 % ermittelt.

Der Mittelwert der absoluten Kopienzahlen pro DNA-Masse der vier unterschiedlichen PCR-Systeme liegt im kompetitiven Ansatz bei Auswertung mit dem PCR-ELISA (118 ± 7 Kopien / ng RR-DNA) und bei Gelauswertung (122 ± 24 Kopien / ng RR-DNA) circa 35 % unter dem Mittelwert der Realzeit-PCR (183 ± 7 Kopien / ng RR-DNA). Diese Tatsache darf nicht irritieren, da die Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten, mit verschiedenen Kompetitorverdünnungsreihen und mit zwei unterschiedlichen Messprinzipien durchgeführt wurden. Ausschlaggebend ist lediglich die Übereinstimmung der Kopienverhältnisse (GVO-Gehalte), die durch Verwendung eines einzigen Doppelkompetitor-Plasmids erreicht wurde.

6.2.8.6 Präzision und Wiederfindung in der doppelkompetitiven PCR

Zur Beurteilung der Präzision und Wiederfindung einer doppelkompetitiven PCR, mit PCR-ELISA-Detektion diente UV-quantifizierte, nach dem CTAB II-Protokoll isolierte DNA aus 2 % RR-haltigem Sojamehl (Fluka, zertifiziertes Referenzmehl). Zum Vergleich wurde die optische Auswertung von Bandenintensitäten nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung herangezogen.

In der RR spezifischen PCR (Primer 35S3-bio/petu-r1) wurde 150 ng, in der Soja Lektin-Gen spezifischen PCR (Primer GM04-bio/GM01) 3 ng DNA zusammen mit 6 verschiedenen Doppelkompetitor-Mengen eingesetzt. Die unterschiedlichen Mengen an Matrizen-DNA (1:50) gleichen das, in diesem Fall bekannte, Verhältnis von Referenzgen und dem zu quantifizierenden 2 %-GVO-Gen aus. Der Äquivalenzpunkt ist folglich bei der gleichen Kompetitor Kopienzahl zu erwarten und der experimentelle Ablauf wird vereinfacht, da die selbe Reihe von Doppelkompetitor Verdünnungen genutzt werden kann. Die kompetitiven PCRs, 3 unabhängige Reihen je PCR System, wurden mit je einer, separat aus einer einzigen Stammlösung (10^6 Kopien/ μ l) verdünnten Doppelkompetitor-Reihe durchgeführt. Die Auswertung der kompetitiven PCRs erfolgte unter Bezug auf das jeweilige Normierungsplasmid pCR RRTK und pCR GMTK wie zuvor in Abschnitt 6.2.8.5 beschrieben und ist in Tab. 15 zusammengefasst. Als Präzision des Messverfahrens wird die Streuung der individuellen Ergebnisse in Prozent um den Ergebnis-Mittelwert angegeben. Als Wiederfindung wird die Abweichung des Ergebnisses von dem bekannten RR-Gehalt der kommerziell erhältlichen Standardprobe angegeben.

Bei den 3 unabhängigen Messungen fanden sich die Äquivalenzpunkte der Messungen, je nach Auswertung, bei verschiedenen absoluten Kompetitor Kopienzahlen. Die dem Gel durch optische Auswertung entnommenen Kopienzahlen am ÄP, weisen mit 22 und 26 % Streuung eine geringere Präzision auf als die durch PCR-ELISA gewonnenen Ergebnisse (8,0 und 8,3 % Streuung). Die resultierenden RR-Gehalte (in Prozent) wiesen jedoch eine vergleichsweise geringe Streuung um den Mittelwert auf. Die Präzision der PCR-ELISA-Auswertung bezüglich des GMO-Gehaltes der kompetitiven PCR ist wiederum mit 5,4 % deutlich besser als diejenige der optischer Gelauswertung (9,1 %). Die Wiederfindung beider Auswerteverfahren

ist ungefähr gleich (75 %, 77 %). Die Abweichung des Messergebnisses vom Wert 2 % als RR-Gehalt, der als wahrer Wert angenommenen wurde, ist wahrscheinlich durch das Referenzmaterial, die vorgeschalteten Verdünnungsschritte und die kompetitive PCR bedingt und nicht durch die unterschiedlichen Auswerteverfahren.

Tab. 15 Doppelkompetitive PCR mit DNA aus 2 % RR-Mehl

Drei identisch durchgeführte, unabhängige Serien kompetitiver PCR (pCR GMKRRK; 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250 Kopien/ PCR) wurden der optischen Gelauswertung und dem PCR-ELISA unterzogen. PCR-Programm: Initiale Denaturierung 95°C / 10 min; 40 Zyklen 95°C / 30 s, $T_{\text{Anneal}} / 30$ s, 72°C / 60 s; finale Elongation 72°C / 5 min; RR-PCR, 150 ng DNA, $T_{\text{Anneal}} = 55^\circ\text{C}$; GM0104-PCR, 3 ng DNA, $T_{\text{Anneal}} = 61^\circ\text{C}$. Die Signal-Quotienten am Äquivalenzpunkt (ÄP) wurden durch Werte aus parallelen PCR-Ansätzen mit dem jeweiligen Normierungsplasmid festgelegt. Die Kopienzahlen am ÄP für jedes PCR-System sind angegeben, die Berechnung des prozentualen RR-Gehaltes erfolgte unter Berücksichtigung des 1:50 Verhältnisses beim Einsatz der Matrizen DNA in der kompetitive PCR.

ÄP-Ermittlung:	optische Gelauswertung			PCR - ELISA		
	RR-PCR	GM-PCR	GVO-Gehalt	RR-PCR	GM-PCR	GVO-Gehalt
Messung 1	1356	1665	1,63 %	1832	2353	1,56 %
Messung 2	1339	1928	1,38 %	1831	2599	1,41 %
Messung 3	2061	2556	1,61 %	2096	2777	1,51 %
Kopien \pm SD	1585 \pm 412	2050 \pm 458		1920 \pm 153	2576 \pm 213	
Präzision, Kopie	26 %	22 %		8,0 %	8,3 %	
RR-Gehalt (%)			1,54 \pm 0,14			1,49 \pm 0,08
Präzision, GVO			9,1 %			5,4 %
Wiederfindung			77 %			75 %

Für diejenige Analyse, die mit dem gleichen Vorgehen das Überschreiten des 1 % GVO-Schwellenwertes (EU-Verordnung) und somit die Überprüfung der Kennzeichnungspflicht ermöglichen soll, ist eine 1:100 Verdünnung des DNA-Extraktes für die Quantifizierung des Referenz-Gens (z.B. 1,5 ng) verglichen mit dem Extrakt für die GVO-Gen Quantifizierung geeignet (z.B. 150 ng). Für die GVO-Gen PCR sollten 10 - 150 ng DNA pro PCR eingesetzt werden. Da die Nachweisgrenze von RR-DNA in einer CaMV35S-, RR- und GM0304-PCR mit 35 Zyklen bei circa 10 - 50 pg Soja-DNA liegt (Daten nicht gezeigt), wäre bei einer 0,1 % RR-haltigen Probe (125 ng entsprechen \sim 100 Kopien) messbar, dass sie zwar GVO-haltig ist aber ihre Konzentration weit unter dem Grenzwert (1 %) liegt. Die Gerade für das GVO-Gen wäre jedoch im Vergleich zur Geraden für das Referenz-Gen zu geringen Quotienten verschoben. Bei Einsatz der gleichen Kompetitor-Verdünnungsreihe (siehe Legende Tab. 15) für beide PCRs läge jedoch der Äquivalenzpunkt der kompetitiven GVO-PCR bei einer Kopienzahl unterhalb der kleinsten Kompetitor Menge ($<$ 250 Kopien).

7 Diskussion

Zu Beginn des EU-Projektes *Development of Methods to identify foods produced by means of genetic engineering*, in dessen Rahmen diese Promotionsarbeit durchgeführt wurde, war der quantitative Aspekt der GVO-Analytik noch zweitrangig. Ebenso war noch offen, ob der Nachweis von Proteinen oder Nukleinsäuren zur Beurteilung herangezogen würde. Erst mit Festlegung der zulässigen Schwellenwerte (10.01.2000, EG/49/2000, [5]) trat der qualitative Aspekt in den Hintergrund. Auf beiden analytischen Gebieten, demjenigen der Proteinanalytik und der Nukleinsäureanalytik von gentechnisch veränderten Organismen, konnten innerhalb dieser Arbeit quantitative Nachweise mit Erfolg an Realproben durchgeführt werden. Dabei wurden die grundsätzliche Eignung und die Grenzen bei unterschiedlichen Fragestellungen herausgearbeitet. Für den Proteinnachweis wurde dazu das Enzym NPTII rekombinant hergestellt, um Antikörper in Kaninchen zu erzeugen und zu isolieren und um als Standard im ELISA zu dienen. Das Gewicht lag hier weniger auf der Etablierung des Immunoassays, der eine Standardtechnik darstellt. Vielmehr stand die Anwendbarkeit auf unverarbeitete und prozessierte Lebensmittel im Mittelpunkt. Die quantitative Nukleinsäureanalytik durch kompetitive PCR und PCR-ELISA ist im Gegensatz dazu keine weit verbreitete Routinemethode. Auf diesem Gebiet mussten die Voraussetzungen der quantitativen Analyse in Bezug auf Koamplifikation von DNA-Spezies und Amplikonnachweis durch PCR-ELISA überprüft werden. Zuerst wird im Folgenden jeder Bereich separat diskutiert, anschließend werden die beiden Methoden vor dem Hintergrund der Routineanalytik besprochen.

7.1 Proteinanalytik

Ausgehend von dem rekombinanten Protein (Neomycinphosphotransferase II) [70] konnte eine große Menge polyklonaler Antikörper erzeugt und affinitätsgereinigt werden. Sie wurden teilweise biotinyliert und in einem *Sandwich*-ELISA sowie im Western-Blot eingesetzt. In früheren Untersuchungen hatten Fuchs *et al.* [123] nachgewiesen, dass sich in Bakterien rekombinant hergestellte NPTII nicht von der in transgenen Pflanzen (Baumwolle) exprimierten unterscheidet. Das rekombinante Protein konnte daher zur Analyse der transgenen Tomaten (Realproben) als Standard eingesetzt werden.

In ersten Western-Blots mit Antiserum und Protein A-Peroxidase Konjugat wurde eine Nachweisgrenze von 6 bis 16 ng NPTII erreicht, die zur Detektion von NPTII in transgenen Tomaten nicht ausreichend war. Zur Steigerung der Sensitivität wurden affinitätsgereinigte Antikörper biotinyliert und die hohe Biotin/Streptavidin Bindungsaffinität genutzt, um auf eine Membran transferierte NPTII mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat zu visualisieren. Mit einer unteren Nachweisgrenze von 100 pg pro Spur wurde dabei ein niedriger Wert erreicht. Im BioRad Blotting-Handbuch [124] wird der gleiche Wert als typische Untergrenze bei der Detektion in einem vergleichbaren Aufbau mit einem alkalische Phosphatase-konjugierten Zweitantikörper angegeben. Der Nachteil der empfindlicheren Detektion bestand in Hintergrundsignalen durch das SAV-AP-Konjugat, die jedoch mit zusätzlichen Blockierungsschritten reduziert werden konnten.

Im optimierten Western-Blot war aus transgenen PGIP-Tomaten stammende NPTII bei der Auftragung von 6 µg Gesamtprotein detektierbar. Die nachgewiesene Menge liegt dabei deutlich unter 1 ng NPTII. In einem parallelen *Sandwich*-ELISA wurden für die gleiche Probe ein NPTII Gehalt von circa 0,18 ng bestimmt, so dass die beiden Techniken prinzipiell vergleichbare Ergebnisse lieferten. Der Western-Blot eignet sich im Gegensatz zum NPTII-ELISA allerdings nicht für geringer konzentrierte Proben, da sich die Analysen bereits im Bereich der Nachweisgrenze bewegen.

Die Extraktion von NPTII aus den Proben ist ein kritischer Punkt. Es zeigte sich eine Empfindlichkeit gegenüber der mechanischen Belastung bei dem Aufschluss von Probenmaterial, so dass höhere Gesamtproteinkonzentrationen und somit die Auftragung einer größeren Menge Protein im Western-Blot auf diesem Wege schwierig erscheinen. Eine Möglichkeit, die eingesetzte Proteinmenge pro Analyse zu erhöhen, besteht durch Konzentration der Extrakte mittels Salzpräzipitation oder durch Nutzung von Ultrafiltrationskartuschen. Eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von NPTII wurde bereits bei der Aufreinigung von rekombinanter NPTII genutzt [70] und kann alternativ leicht zur quantitativen Fällung umgewandelt werden. Beide Möglichkeiten bedeuten jedoch einen Mehraufwand und sind eventuell mit Proteinverlust verbunden. Eine Aussage über den NPTII-Gehalt in Relation zum Gesamtprotein ist in diesen Fällen mit größeren Fehlern behaftet. Die weiterführenden Arbeiten konzentrierten sich daher auf den ELISA, der einen höheren Probendurchsatz ermöglicht und eine bessere Nachweisgrenze aufweist.

Die Nachweisgrenze des *Sandwich*-ELISA lag nach Optimierung bei einer Konzentration von $0,03 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ entsprechend einer absoluten Menge von 3 pg NPTII. Sie ist damit vergleichbar mit der Nachweisgrenze eines kommerziellen NPTII-ELISA-Kits mit gleichem *Sandwich* Aufbau (Fa. 5'Prime→3'Prime) und eines *Sandwich*-ELISA mit Peroxidase konjugierten Detektionsantikörper [113]. Durch Verlängerung der Inkubation mit dem zweiten Antikörper im hier entwickelten Protokoll konnte die Nachweisgrenze noch einmal auf $0,011 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ verbessert werden. Bei extrahiertem Gesamtprotein mit einer Konzentration von $100 \text{ µg} \times \text{ml}^{-1}$, dem Durchschnittswert aus eigenen Extraktionen, und einer 1:10 Probenverdünnung entspricht dies einer Nachweisgrenze von 1 bis 3 ppm.

Die quantitative Bestimmung der NPTII durch den ELISA unterlag Störungen durch das mechanisch unterstützte Extraktionsverfahren, mit dem möglichst viel Gesamtprotein freigesetzt werden sollte. Der Einsatz von Scherkräften durch Ultraschall oder Turrax-Behandlungen erwies sich dabei als gleich effektiv. Durch wiederholten Aufschluss wurde zwar die Proteinmenge des Extrakts leicht erhöht, jedoch sank der relative NPTII-Anteil. Dies kann durch Solubilisierung weiterer Proteine, wahrscheinlicher aber durch die Denaturierung der bereits freigesetzten NPTII verursacht sein. Ein schonender Aufschluss durch Inkubation in Puffer und intensivem Schütteln führte zwar zu vergleichsweise wenig Protein im Extrakt, das jedoch einen hohen NPTII-Anteil aufwies. Aus diesen Ergebnissen kann auf eine mechanische Empfindlichkeit der NPTII geschlossen werden.

Um die vorliegenden, geringen NPTII-Gehalte zu bestimmen, sollte eine möglichst große Probenmenge für dem ELISA gewählt werden. Ein 20 %-Anteil des Extraktes aus Wildtyp-Tomaten in Probenpuffer führte jedoch schon zu einer Erhöhung der ELISA-Hintergrundwerte.

Der Matrixeffekt war im typischen Kalibrationsbereich (0 bis $0,8 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$) konstant und konnte durch Begrenzung der Probenmenge auf 10 % eliminiert werden. Diese Begrenzung bestimmte somit die Nachweisgrenze des Assays.

Als in den 1980er Jahren der Einsatz der NPTII zur Selektion transgener Pflanzen populär wurde [113], kamen für die NPTII-Bestimmungen, alternativ zu den vorgestellten immunologischen Nachweisen, Enzym-Aktivitätsassays [125, 126, 127] zum Einsatz. Das Prinzip war die Übertragung von γ^{32} -Phosphat aus markiertem ATP auf Neomycin, das anschließend mit verschiedenen Methoden abgetrennt und quantifiziert wurde. Diese Methoden waren zeit- und kostenintensiv, verursachten erhöhten Entsorgungsaufwand für die radioaktiven Stoffe und waren wegen instabiler enzymatischer NPTII-Aktivität störanfällig [128, 70]. Sie waren darüber hinaus teilweise nur auf quantitative Aussagen ausgelegt und im Gegensatz zur immunologischen Bestimmung nicht für Messungen mit hohem Durchsatz geeignet.

Weitere, in der neueren Literatur beschriebene und für den GVO-Nachweis relevante Immunoassays sind ein ELISA zur Quantifizierung des δ -Endotoxin CryIA(b) aus Bt176 Mais (Cry-ELISA) [129] und ein ELISA zur Quantifizierung der bakteriellen CP4-EPSPS aus RR [130]. Der Cry-ELISA ist ein *Sandwich*-ELISA mit polyklonalen Kaninchen- und Ziegen-Antikörpern. Er hat im Vergleich zu dem NPTII-ELISA eine recht hohe, absolute Nachweisgrenze von 50 pg pro Vertiefung. Die durchschnittliche Expression von CryIA(b) war im Blatt mit $12,8 \text{ } \mu\text{g}/\text{mg}$ löslichem Protein wesentlich höher als die NPTII Expression in Tomatenfruchtfleisch (Zeneca Tomate: $3 \text{ ng}/\text{mg}$). Auch der Nachweis von CryIA(b) in Maiskörnern, die einen geringeren Gehalt aufwiesen (1% des Blatt-Gehaltes), gelang mit diesem ELISA gut [129]. Neben der relativ hohen Konzentration des Analyten ist die naturbedingte Stabilität des kristallin in der Pflanze vorliegenden Cry-Proteins ein weiterer Vorteil im Vergleich zur cytosolisch vorliegenden NPTII. Diese ist thermisch (Abb. 14, Seite 52) und mechanisch (Abb. 13, Seite 51) empfindlich und könnte nach Ernte der Frucht ebenfalls natürlichen Abbauprozessen unterliegen.

Der EPSPS-ELISA zur Identifizierung von RR verwendet immobilisierte monoklonale Antikörper aus Maus (Fänger) und aus Kaninchen (Detektor), die das Enzym CP4-EPSPS detektieren. Dieser *Sandwich*-Aufbau wird mit einem biotinylierten Maus-anti-Kaninchen-Antikörper über ein Neutravidin-Peroxidase-Konjugat detektiert. Die absolute Nachweisgrenze lag bei $2,5 \text{ pg CP4-EPSPS /Vertiefung}$. Die Freisetzung von EPSPS aus gemahlener Sojabohne wurde durch Scherkräfte (Turrax) und einen Kochprozess in Gegenwart von Detergenzien (SDS) bewirkt. Es konnte damit noch ein 0,25 % RR-Anteil in Wildtyp-Soja detektiert werden [130]. Bezogen auf die durchschnittliche Gesamtprotein-Extraktion aus Tomaten Fruchtfleisch ($650 \text{ } \mu\text{g Protein/ g Einwaage}$) ergibt sich auf Grund der eigenen Messungen für die höhere NPTII-Konzentration in der PGIP-Tomaten №2 und №3 ($30 \text{ ng NPTII/ mg Protein}$) ein NPTII-Gehalt von circa $20 \text{ ng/g Fruchtfleisch}$. Dies ist verglichen mit der CP4 EPSPS-Konzentration in Roundup Ready Soja ($210 \text{ } \mu\text{g/g Bohne}$, [130]) sehr gering. Neben allgemeinen Positionseffekten im Genom der beiden unterschiedlichen Pflanzen und dem unterschiedlichen Wasseranteil der untersuchten Gewebe lassen sich die enormen Unterschiede wahrscheinlich auf den Gebrauch des starken CaMV35S-Promotors

im Falle der RR im Gegensatz zum Nopalinsynthase Promotor in den transgenen Tomaten zurückführen [131].

Desidario *et al.* [96] bestimmten durch Southern-Blots mit DNA der gentechnisch veränderten PGIP-Tomaten, dass bei Linie 3 wenigstens 3 Insertionen des Transformationsvektors, dieser trug das PGIP-Gen und die NPTII Resistenz, aus dem *Agrobacterium tumefaciens* stattfanden dagegen nur eine einzige bei Linie 6. Erstaunlicherweise war trotz mehrfacher Insertion die erwartete PGIP-Aktivität in einem enzymatischen Test bei Linie 6-Tomaten um ein Drittel niedriger als bei Linie 3-Tomaten. Dieses unabhängige Ergebnis stimmt tendenziell mit den eigenen Untersuchungen überein. Der NPTII-Anteil am Gesamtprotein ist bei den *single copy*-Linien (30 ± 3 ng/ μ g und 33 ± 5 ng/ μ g) deutlich höher als bei der *multi copy*-Linie (12 ± 1 ng/ μ g). Ein absoluter Vergleich ist nicht sinnvoll möglich, da auch untransformierte Tomaten neben der transgenen eine basale PGIP-Aktivität zeigen und die Sequenzen von NPTII und PGIP in der transgenen PGIP-Tomate unter Einfluss verschiedener Promotoren stehen.

Der Verwendungszweck der Zeneca-Tomate mit geänderten Reifeverhalten ist laut US-FDA Zulassungsunterlagen [6] eine verbesserte Verarbeitung zu Tomatenmark. Da der direkte Konsum von erntefrischen Tomaten also nicht beabsichtigt ist, wurde mit rekombinanter NPTII die Auswirkung verschiedener Verarbeitungsschritte simuliert. Bei der Herstellung des Tomatenmarks werden Tomaten bei 70°C zerkleinert und bei 90°C abgefüllt [114]. Zwar ist NPTII in der sauren Umgebung (pH Wert von Tomatenmark) bei Raumtemperatur über längere Zeit (2 h) stabil, sie präzipitiert jedoch bei Erhitzung sofort. Auch in neutraler Umgebung ist eine starke Reduktion des mittels ELISA messbaren Gehaltes zu erkennen. Während dieser Prozess bei 70°C erst nach 10 min vollständig abgeschlossen war, führte die Behandlung bei 90°C in weniger als 5 min zu einem sehr niedrigen Niveau. Für den ohnehin geringen NPTII-Gehalt der Zeneca-Tomate ist anzunehmen, dass sowohl die saure Fällung, als auch die thermische Behandlung ausreichend sind, um die immunologisch nachweisbare NPTII Menge unter das Detektionslimit zu senken. Ein Nachweis von prozessierten Tomaten mit immunologischen Methoden war daher nicht zweckmäßig.

Von den wenigsten NPTII exprimierenden GVOs sind bis heute in Europa Proben zu erhalten. Das Gleiche gilt für Daten über relative NPTII-Gehalte für Pflanzen, die über die entsprechende Resistenz selektioniert wurden. Ausnahmen bilden transgener Flachs der Universität Saskatchewan, Kanada (0,4 ng/mg in Samen), Kürbis der Fa. Agritope Inc. (Linie A 77 ng/mg, Linie B 16 ng/mg) und Radiccio rosso der Fa. Bejo Zaden (3 Linien 50-220 ng/mg). Hier wurde im Zuge der US-FDA-Zulassungen [6] der Gehalt an NPTII pro Gramm Gesamtprotein der Pflanze berichtet. Das *nptII*-Gen ist unter verschiedenen Promotoren unterschiedlich stark exprimiert. Diese Arbeit und die bekannte Literatur zeigen, dass NPTII in GVO-Pflanzen in jedem Fall mit einem NPTII-ELISA nachgewiesen werden kann und dieser somit zum *Screening* den Organismen eingesetzt werden kann.

7.2 Nukleinsäureanalytik

DNA-Extraktionsmethoden

Die DNA-Extraktion stellt sowohl für die qualitative als auch für die quantitative PCR einen entscheidenden Schritt dar. Die Konzentration der extrahierten DNA bestimmt die untere Nachweisgrenze der PCR, ausgedrückt im prozentualen GVO-Gehalt. Wird viel Gesamt-DNA in der PCR eingesetzt, kann trotz geringer GVO-Gehalte noch ein Amplikon erhalten werden. Daneben ist die Qualität der extrahierten DNA ein ebenso wichtiger Parameter. Sie lässt sich in die Kriterien Quantifizierbarkeit (behindert durch RNA- und Protein-Verunreinigung) und PCR-Inhibition (Störung durch Extraktionsreagenzien [132] oder koextrahierte Substanzen [133]) der Probe, aufteilen. Da RNA- und Protein-Verunreinigungen bei der gängigen UV-Quantifizierung stören und zu Überbestimmung der tatsächlichen DNA-Menge führen, sollten diese möglichst effektiv entfernt werden. Die Wirkung von Inhibitoren der PCR tritt unregelmäßig zu Tage; eine PCR mit geringer Amplikonausbeute kann sowohl eine geringe Templat-Menge, als auch eine geringe Effizienz anzeigen. Eine konsequente Untersuchung dieses Parameters, z. B. durch Realzeit-PCR [134], ist aufwändig. Da von den meisten Inhibitoren angenommen werden kann, dass ihre Wirkung linear mit der Konzentration abnimmt, lässt sich deren Einfluss durch großzügige Verdünnung abschwächen, während die verringerte Templat-Menge durch die enorme Vervielfältigung in der PCR kompensiert wird [135]. Dies ist ein weiterer Grund, eine hohe Extraktionsausbeute anzustreben.

Vor dem Hintergrund der Ausbeute, der Reinheit, der Fähigkeit Inhibitoren abzutrennen und der Geschwindigkeit sind die vorgestellten Extraktionsmethoden im Folgenden bewertet. Es empfiehlt sich das Wizard III-Protokoll als universelle Methode für unverarbeitete und prozessierte Lebensmittel. Für die semiquantitative PCR ist die korrekte UV-Quantifizierung der als Templat eingesetzten Gesamt-DNA essentiell, daher sind Methoden ohne gezielte RNA-Entfernung (CTAB I, InViTek I und Wizard I) prinzipiell nicht geeignet, obwohl mit ihnen große Mengen Nukleinsäuren isoliert werden können. Für qualitative PCR-Analysen bietet sich die Wizard I-Methode jedoch an, da diese Extraktionsmethode eine höhere Ausbeute, bestimmt durch Absorption bei 260 nm und Pico-Green-Bestimmung, aufweist und damit den größeren Spielraum für Verdünnungen zur Inhibitionsprävention bietet. Wizard I-Extrakte, die im Vergleich weniger RNA und Proteine enthalten (Tab. 7), wurden für qualitative Analysen erfolgreich in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt (Abb. 18B). Der Zeitbedarf ist mit 4 h 20 min zwar höher als für die CTAB I-Methode (2 h 20 min), jedoch ist darin eine 3 h Inkubation enthalten, so dass die tatsächliche, effektive Arbeitszeit geringer ist.

Zimmermann *et al.* [119] berichteten bei einem systematischen Vergleich der Re-extraktion von zuvor quantifizierten Extrakten gleiche Wiederfindungsraten (20 %) für die Wizard I und CTAB I-Methode. Nach Durchführung des CTAB-Protokolls wurde jedoch eine deutliche PCR-Inhibition beobachtet. Die Qualität einer Extraktion wurde dort durch PCRs mit verschiedenen Extrakt-Verdünnungen ermittelt. In Fällen, bei denen bei hohen Konzentrationen Inhibition auftrat, konnte bei mittleren ein Produkt erhalten werden, da der Inhibitor verdünnt wurde. Bei geringen Konzentrationen trat, wegen fehlender Matrizenmoleküle, kein Produkt mehr auf. Das CTAB-Reagenz trat hier zuerst als Inhibitor der PCR auf und führte abhängig

von der Verdünnungsstufe zu falsch negativen Ergebnissen. Es muss durch Isopropanol-Fällung und Ethanol-Waschschritte sorgfältig entfernt werden, was offensichtlich nicht immer gelingt. SDS ist ebenfalls ein potenzieller PCR-Inhibitor [132] und wird im Extraktionspuffer der Wizard I-Methode eingesetzt. Hier treten jedoch seltener Inhibitionen auf. Dies lässt den Schluss zu, dass das Waschen der an das Wizard-Harz gebundenen DNA im Gegensatz zum Waschen des DNA-Pellets im Zuge des CTAB I-Protokolls ausreichend effektiv verläuft.

Prinzipiell ergaben sich mit den beiden Methoden, bei denen DNA an Trägermaterial gebunden und nach Waschschritten eluiert werden (Wizard und InViTek), höhere Ausbeuten als bei Protokollen mit Fällung der DNA aus Extraktionslösungen (CTAB). Zudem ist eine Fällung mit größerem Zeitaufwand verbunden und erfordert mehr Erfahrung in der Handhabung. Diese Argumente sprechen für eine Trägermaterial-unterstützte Extraktion. Andererseits mussten Zimmermann *et al.* [119] bei Anwendung der Wizard I Methode feststellen, dass das Anbinden von nicht-fragmentierter hochmolekularer DNA an das Harz nicht möglich war. Das verwendete Trägermaterial, ein Harz, dient ursprünglich zur Reinigung von Plasmid-DNA und vermeidet durch eine obere Ausschlussgrenze von 20 kbp die Isolierung von genomischer Bakterien-DNA. Eine kurze Ultraschallbehandlung des Extraktes vor dem Bindungsschritt ist jedoch ausreichend, um die enthaltene DNA zu fragmentieren. Verarbeitete Lebensmittel und Mehle enthalten bereits fragmentierte DNA, so dass diese Behandlung zur Steigerung der Extraktionsausbeute nicht notwendig ist.

Zur sicheren Beseitigung von Proteinverunreinigungen ist, unabhängig vom Probenaufschluss und der DNA-Selektions Methode (Fällung oder Bindung) eine Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion unerlässlich. Als weiterer Vorteil ist, dass neben Proteinen ebenfalls potenzielle Inhibitoren entfernt werden [116]. Die Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion geht über die Protokollschritte, die die Anbieter entsprechender Extraktions-Kits empfehlen, hinaus, da Chloroform und Isoamylalkohole mindergiftig sind und aus Sicherheitsgründen gemieden werden. Ist die Probenmatrix (z. B. Mais) bekannt, kann abhängig von Probeneigenschaften, wie Protein- oder Stärke-Gehalt, bei der Extraktion jedoch auf diesen Schritt verzichtet werden. Schon das Wizard II-Protokoll ergab für Maismehle DNA in guter Qualität und Quantität, so dass eine zusätzliche Chloroform-Extraktion nicht notwendig war. Die in InViTek-Protokollen genutzte Matrix erlaubt zwar eine schnelle Extraktion, unerwünschte Proteine wurden jedoch deutlich stärker gebunden und eluiert als durch das Wizard-Harz. Auf eine mögliche Optimierung durch zusätzliche Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde hier verzichtet.

Das CTAB II- und Wizard III-Protokoll ergab DNA in guter Qualität, die für die quantitative PCR geeignet war. Im Falle des Wizard III-Protokolls war die Ausbeute doppelt (Sojamehle) bis vierfach (Auswahl prozessierter Lebensmittel) höher. Die effektive Arbeitszeit beider Methoden unterschied sich nicht wesentlich, jedoch waren die Wizard Materialien deutlich teurer. Die Nutzung von CTAB ist ebenfalls eine sinnvolle Alternative, wenn z. B. die offizielle Methode einer Behörde (§35 LMBG) unabhängig von einem bestimmten Hersteller sein soll. Die Verwendung des potenziellen Inhibitors CTAB stellt zwar eine Gefahr dar, diese sollte jedoch durch zwei verschiedene Fällungen und durch einen Ethanol-Waschschritt minimiert werden. Bei der Mehrzahl der Teilnehmer des PCR-ELISA Ringversuches trat bei

Verwendung des CTAB II-Protokolls keine Inhibition auf. Lediglich bei Teilnehmer H wurde Inhibition aller extrahierten Proben beobachtet (Abschnitt 6.2.8.2), was wegen der in der kompetitiven PCR eingeschlossenen Inhibitionskontrolle jedoch nicht zu falsch negativen Ergebnissen führt. Allgemein wurde einer schwachen Inhibition durch regelmäßige Anwendung vieler PCR-Zyklen entgegengewirkt.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten und den bei Zimmermann *et al.* [119] behandelten Extraktionsmethoden wurden eine Vielzahl weiterer spezifischer Methoden publiziert. Sie sind für stark raffinierte Proben, wie Lezithin [136], kakaohaltige Lebensmittel [137] oder Öl [138, 139], für fermentiertes Material, wie Silomais [140] oder Würste [141] und für hitzebehandelte Produkte, wie Polenta [142] und Brot [143], angepasst. Häufig unterscheiden sie sich von den genannten Verfahren nur durch den initialen Schritt, bei dem eine Hauptkomponente oder bekannte Inhibitoren abtrennt werden oder bei dem der Extrakt weiter konzentriert wird.

PCR

Die angewendeten PCRs wurden dahingehend optimiert, spezifisch das gewünschte Produkt in Gegenwart großer Mengen an Hintergrund-DNA zu erzeugen. Der wesentliche Schritt war die Wahl einer *hot-start* Polymerase (AmpliTaQ Gold), die die Amplifikation von Nebenprodukten und Primer-Dimeren minimiert (Abschnitt 6.2.3). Die spezifische Amplifikation der Zielsequenzen bei kompetitiver PCR (Target und Kompetitor), ebenso wie bei qualitativer PCR (ausschließlich Target), konnte so auch ohne Steigerung der Annealing-Temperatur sichergestellt werden.

Qualitative PCR mit PCR-ELISA Auswertung

Der CaMV35S PCR-ELISA wurde zur Veranschaulichung des Potenzials für das qualitative *Screening* nach genetischen Elementen, die typisch für GVOs sind, ausgewählt. Das Verfahren ermöglicht, bei gleichzeitiger Bestätigung der Amplikonidentität durch Hybridisierung im Mikrotiterplattenformat, die bequeme, parallele Analyse vieler Proben. Das digitale Ergebnis ermöglichte, im Gegensatz zur optischen Gelauswertung, die einfache Anwendung der Signifikanzkriterien. Quantitative Aussagen über die untere Nachweisgrenze sind, abhängig von der Ausführung der PCR, nur unter bestimmten Bedingungen möglich. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass Inhibitions- und Amplifikationskontrolle unerlässlich sind.

In den Versuchen wurden zwei Varianten vorgestellt. Bei Anwendung vieler PCR-Zyklen waren nur zwei Signalniveaus möglich: Es wurden OD₄₀₅-Werte für das Hintergrundsignal erhalten, wenn die untersuchte Probe GVO-negativ war und ein hohes Signal bei einer GVO-positiven Probe. Auf diese Weise war keine Unterscheidung von hohen und niedrigen GVO-Gehalten möglich; die PCR wurde bis in die Plateauphase geführt. Die Wahl einer geringeren Zyklenzahl barg dagegen das Risiko, Proben mit geringen GVO-Gehalten durch Unterschreiten der Nachweisgrenze als falsch-negativ zu deklarieren. Hier lag die untere Nachweisgrenze bei $\leq 0,1$ % RR-Gehalt. Diese ist nur durch Analyse mehrerer bekannter Proben zu ermitteln und schwankt wahrscheinlich von Versuch zu Versuch. Die Nachweisgrenze hängt ebenfalls von der Menge amplifizierbarer DNA ab, die als Templat in die PCR gegeben wird und hier nicht auf einen bestimmten Gehalt eingestellt ist; sie ist vermutlich

nicht für alle Proben gleich. Der sichere Nachweis von geringen GVO-Gehalten und die gleichzeitige Quantifizierung sind einander entgegengesetzte Ziele, die nicht mit einfacher PCR verwirklicht werden können.

Gutierrez *et al.* [144] bezeichnen eine analoge Analyse aus PCR und anschließendem PCR-ELISA zur Bestimmung bakterieller Verunreinigungen in Fleisch-Proben als quantitativ. Sie konnten eine lineare Korrelation der OD-Werten nach PCR-ELISA mit der Zahl der kolonieformenden Einheit (cfu, *colony forming unit*), wie sie mit klassischen mikrobiologischen Methoden ermittelt werden, aufzeigen. Die Methode sieht aber keine Normierung der DNA-Menge, die in die PCR gegeben wird, und keine interne Kontrollen vor. Bei Gutierrez *et al.*, wie bei den eigenen Versuchen beruht die Korrelation wahrscheinlich auf einer implizierten Gleichbehandlung der Proben und darauf, dass die PCR den Bereich exponentieller Amplifikation nicht verlässt, wodurch eine hohe untere Nachweisgrenze und somit falsch negative Ergebnisse in Kauf genommen werden. Man kann annehmen, dass die Reproduzierbarkeit der vorgestellten Versuche gering ist. Diese und analoge Methoden können daher nur unter Vorbehalten als quantitativ bezeichnet werden.

Inhibition als ein mögliches Problem und die Verdünnung von DNA-Extrakten als präventive Gegenmaßnahme wurden gezeigt (Abb. 18A), letztere setzt jedoch die Nachweisgrenze (in % GVO) herab. Es empfiehlt sich eine Inhibitionskontrolle durch interne Kontrollen, z. B. durch Zugabe eines GVO-positiven Extraktes, in einer parallelen PCR oder eines internen Standards in derselben PCR. Darüber hinaus muss die prinzipielle Amplifizierbarkeit von DNA des Extraktes mit einer zweiten, Pflanzenart-typischen PCR sichergestellt werden. Daher konzentrierten sich die weiteren Arbeiten auf quantitative, kompetitive PCRs.

Konstruktion von Kompetitoren

Aus den vielfältigen Möglichkeiten einen Kompetitor zu klonieren wurden für die gezielte Mutagenese die *looped*-Oligo Methode und die *Overlap*-PCR gewählt. Die *looped*-Oligo Methode führt unter Verwendung eines langen Mutageneseprimers bei wenigen Arbeitsschritten schnell zum Ziel. Diese Methode wurde in der Literatur genutzt, um Sondenbereiche einzuführen, die direkt an einen der Primer grenzen [66, 67]. Die in dieser Arbeit festgelegten Kriterien für einen Kompetitor sehen jedoch vor, dass der Bereich in 3'-Richtung vor dem Primer in der Target- und Kompetitorsequenz gleich sein soll (Wildtyp-DNA-*Spacer*, 8 bp), da vermutet wurde, dass dem Synthesestart der Polymerase in Bezug auf die Effizienz eine höhere Bedeutung zukommt. Der erzeugte CaMV35S-Kompetitor weist die gleichen Amplifikationseffizienzen wie die Targetsequenz auf. Es wurde experimentell jedoch nicht belegt, dass die *Spacer*-Sequenz einen Einfluss auf die Amplifikations-Effizienz hat. Zur systematischen Absicherung wäre dazu das Klonieren einer Vielzahl von Kompetitoren notwendig gewesen. Das Nichtbeachten dieses Kriteriums führt jedoch nicht zwingend zu ungeeigneten Kompetitoren. Bei davon abweichend konstruierten, literaturbeschriebenen Kompetitoren [66, 67] wurde ebenfalls von gleicher Amplifikationseffizienz für Target und Kompetitoren berichtet. Dennoch bietet es sich an, bei der Klonierung der Kompetitoren den potenziellen Einfluss des Spacers zwischen Primer- und mutierter Sequenz zu berücksichtigen, da dies nur einen geringen Aufwand (8 nt-längerer Mutageneseprimer) bedeutet.

Die *Overlap*-PCR [64, 65] wurde in dieser Arbeit ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Sie ist durch mehrere PCRs und die Kombination von PCR-Produkten geringfügig aufwändiger. Sie war jedoch besser geeignet als die *looped*-Oligo Methode weiter innen liegende Bereiche einer Sequenz zu modifizieren. Bei der *Overlap*-Methode ist das Beibehalten des 3'-Bereichs vor einer Primerbindungsstelle (Wildtyp-DNA-*Spacer*) direkt eingeschlossen.

Bei Wahl der Hybridisierung als Detektionsmethode nach einer kompetitiven PCR ist auf jeden Fall ein Austausch der Wildtyp-Sequenz an der Sonden Bindungsstelle notwendig. Dies kann durch eine Mutation der Wildtyp-DNA allein oder durch Deletion gefolgt von Insertion fremder DNA geschehen. Zu diesem Zweck muss eine Sequenz gefunden werden, die die zukünftige Sondenregion darstellt. Kriterien für deren Auswahl sind üblicherweise der gleiche Schmelzpunkt der Sonden oder die Abwesenheit der Sequenz im Genom des Organismus [64]. Es werden jedoch oft nur die grundsätzlichen Forderungen an den Kompetitor in Bezug auf das Amplifikationsverhalten gestellt (gleiche Primer, Länge, GC-Gehalte) [51, 58, 63]. Auf eine detaillierte Erläuterung der Auswahlkriterien, die ausschlaggebend für das Hybridisierungsverhalten sind, wird in der Regel in den Veröffentlichungen zu Gunsten der Darstellung der Funktionalität (gleiche Signalhöhen pro ng Amplikon, fehlende Kreuzhybridisierung) verzichtet [65, 66, 67, 68, 145, 146].

Die in dieser Arbeit gewählten Kriterien waren gleiche Schmelzpunkte, gleicher GC-Gehalt, gleiche Selbsthybridisierungsparameter und eine randständige Hybridisierungsstelle im Amplikon. Die terminale Lage der Hybridisierungsstelle sollte die Mobilität des fixierten Stranges nach Immobilisierung an der Oberfläche der Mikrotiterplatte erhöhen und somit die Hybridisierungs-Kinetik verbessern. Bei der Planung betrachtete Selbsthybridisierung von Sonden durch interne Komplementarität zielt auf deren maximale Verfügbarkeit für die Hybridisierung mit dem in den Einzelstrang überführten Amplikon. Diese Betrachtungsweise entspricht den Bedingungen der Primerauswahl für die PCR. Primer, die eine hohe Komplementarität des 3'-Terminus mit der internen Sequenz haben, sind ineffektiv, da sie an sich selbst hybridisieren und eine Elongation ermöglichen. Dadurch werden sie für die Erzeugung des gewünschten Amplikons unbrauchbar und finden sich als niedermolekularer Schmier im Agarosegel. Analog entzieht sich eine Sonde, die mit sich selbst statt mit dem einzelsträngigen Amplikon hybridisiert, der Signalerzeugung im PCR-ELISA.

Nach Wahl der Sondenbereiche der Target-Sequenzen und der Konstruktion der Kompetitoren sind wesentliche Charakteristika der Detektionssysteme festgeschrieben. Ziel der vorausgehenden Überlegungen war es, neben der notwendigen Gleichheit in der Amplifikationseffizienz, die jeweilige Hybridisierung der Kompetitor-Sonde und der gegebenen Wildtyp Target-Sonde gleich zu gestalten. Die Daten zur PCR-ELISA Charakterisierung (Abschnitt 6.2.6) zeigten, dass letzteres Ziel nicht erreicht wurde. Target- und Kompetitor-Sonde wiesen in beiden Systemen unter jeweils gleichen Bedingungen eine unterschiedliche Hybridisierungskinetik auf. Das Verhalten der entsprechenden RR-Sonden (Abb. 25) unterscheidet sich dabei untereinander weniger als das der GM-Sonden (Abb. 29). Die Eigenschaften der einzelnen PCR-ELISA mussten daher durch verlängerte Inkubationszeiten und Variation der Hybridisierungstemperatur angeglichen werden.

Ein Grund für die Abweichungen der Hybridisierungseigenschaften könnte eine unterschiedliche Sekundärstruktur der einzelsträngigen DNA auf der Mikrotiterplatten-Oberfläche sein. Sie kann sich einstellen, nachdem der Gegenstrang des Amplikons im Denaturierungsschritt entfernt und mit Puffer gewaschen wurde. Für die Bildung von Sekundärstrukturen im RR-Kompetitor-Amplikon spricht, dass sich durch Temperatursteigerung ($25^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$) im Hybridisierungsschritt das PCR-ELISA-Signal verdoppelte (Abb. 26). Die Temperatursteigerung könnte dabei die Zugänglichkeit des Sondenbereiches durch Schmelzen einer partiellen Selbsthybridisierung erhöhen.

Zum Zeitpunkt der Planung war für einzelsträngige DNA noch kein Programm zur Begutachtung von Sekundärstrukturen, wie der Ausbildung eines doppelsträngigen Stammes (*hairpin*) oder von Schleifen (*loops*) verfügbar. Mit dem Internet-gestützten Programm „mfold“ sind Berechnungen auf Grund der freien Energien und Nachbarschafts-Wechselwirkungen möglich [103]. Mit ihrer Hilfe kann beispielsweise das Hybridisierungsverhalten von DNA-Sekundärstruktur-abhängigen Sonden geplant und interpretiert werden. Diese wurden beispielsweise analytisch zur Genotypisierung von Hepatitis C Virus-Varianten von Dong *et al.* genutzt [147]. Dabei hybridisierten verschiedene Biotin-markierte Sonden, bei 37°C in Lösung mit alkalisch denaturierten, Fluorescein-markierten PCR-Produkten. Diese Hybride bildeten sich je nach Genotyp unterschiedlich aus, da Sequenz-abhängig unterschiedliche Sekundärstrukturen ausgebildet werden. Sie wurden über Biotin an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten gebunden und mit einem Konjugat von anti-Fluorescein-Antikörper mit alkalischer Phosphatase nachgewiesen. Zwei ursprünglich nicht direkt aufeinander folgenden Sequenzen (je 8 nt in einer 18mer Sonde) hybridisierten unter Ausbildung einer Brücke mit Sequenzen, die einen mit dem Programm „mfold“ vorausgesagten *hairpin* des einzelsträngigen Amplikons flankieren. Die Ausbildung eines *hairpin* ist dabei von einzelnen Punktmutationen, die die Virustypen unterscheiden, abhängig.

Analysiert man die Sequenz des GM0304-PCR-Produktes für Target und Kompetitor mit dem Programm „mfold“, kann man die erhaltenen Strukturen dahingehend interpretieren, dass sich im einzelsträngigen Target-Amplikon nur eine geringe Zugänglichkeit für die Sonde ergibt. Von den 20 nt, die mit der Target-Sonde hybridisieren sollen, gehen nach der Strukturvoraussage 15 nt eine intramolekulare Wechselwirkung ein (Abb. 62A). Hier muss für eine Hybridisierung mit der betreffenden Sonde zuerst ein doppelsträngiger Bereich aufgebrochen werden. Nach energetischen Gesichtspunkten erklärt sich die geringe Triebkraft der Reaktion mit der Sonde dadurch, dass in der Summe lediglich die Hybridisierungsenergie von 5 zusätzlichen Basenpaarungen gewonnen wird. Diese Effekte könnten Ursache für die größere Menge der im PCR-ELISA benötigter GM-T-Dig Sonde (200 nM) sein. Für das Kompetitor-Amplikon werden unter den gleichen Voraussetzungen nur 9 nt durch interne Basenpaarung belegt (Abb. 62B). Dies lässt eine bessere Zugänglichkeit der Hybridisierungsstelle und eine günstigere Energiebilanz vermuten. Im Einklang mit dieser Erklärung wurde für diese Hybridisierung tatsächlich ein schnelles Erreichen der Signalsättigung im PCR-ELISA schon bei 1 nM Kompetitor Sonde beobachtet. Die hohe Target-Sondenkonzentration dient, entsprechend dem Massenwirkungsgesetz, als zusätzliche Triebkraft, um die Hybridisierung der Sonde an dem Einzelstrang zu erzwingen.

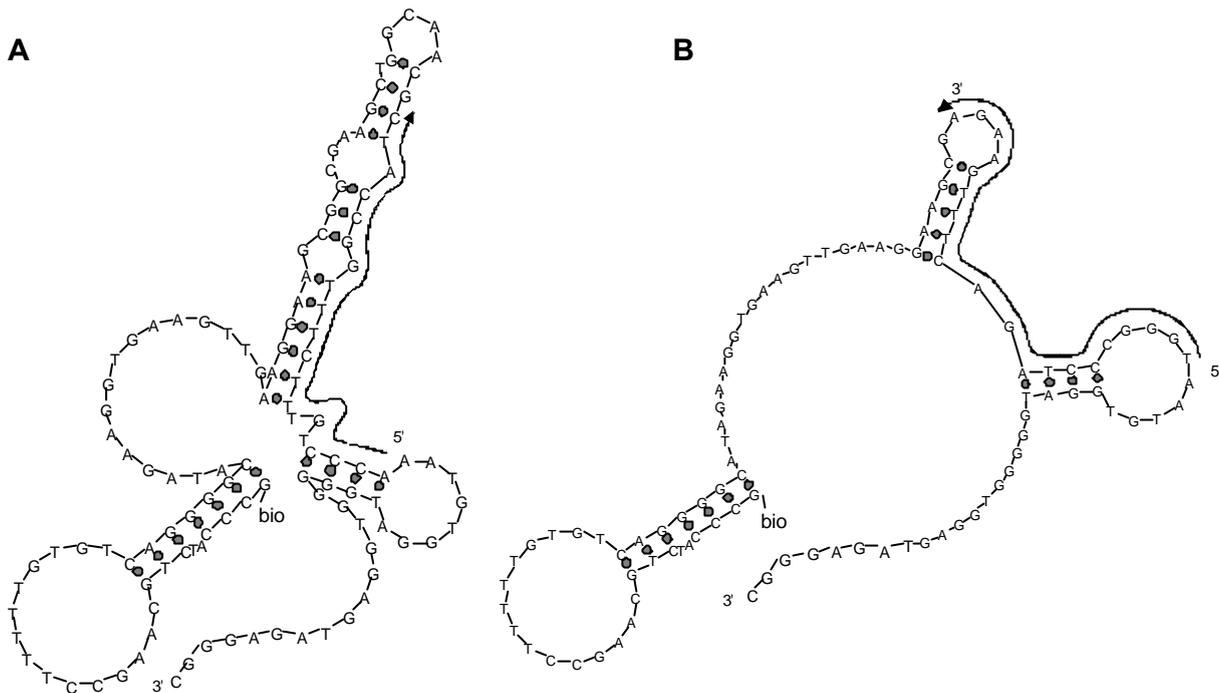


Abb. 62 Strukturvorhersagen für einzelsträngige DNA

Anwendung des Programmes "mfold" auf die Sequenz des biotinylierten Stranges des Target- (A) und Kompetitor-Amplikon (B) der Soja Lektin-Gen PCR (GM0304). Die Pfeile symbolisieren die Lage der Sonden, die im PCR-ELISA hybridisieren. Simulierte Bedingungen: 37°C Hybridisierungstemperatur, 750mM NaCl (5xSSC).

Die Hybridisierungs-Kinetik einer Sonde ist daher über ihre eigenen Eigenschaften hinaus stark von der Sequenz des immobilisierten, einzelsträngigen Amplikons bestimmt. Aus diesen Betrachtungen folgt, dass für zukünftige Hybridisierungs-Experimente die Kriterien zur Wahl der Sondensequenz um die Betrachtung der Sekundärstruktur-Bildung erweitert werden sollte. Einschlägige eigene Erfahrungen oder Literaturdaten dazu fehlen jedoch noch [148]. Die *mfold*-Voraussagen beziehen sich auf eine Hybridisierung in Lösung, während der in dieser Arbeit angewendete PCR-ELISA eine Fixierung an einer Oberfläche vorsieht. Der biotinylierte 5'-Terminus in der Streptavidinbindungstasche ist für die Hybridisierung teilweise unzugänglich. Daher ist fraglich, ob sich dieser Teil der Sekundärstruktur (7 Wechselwirkungen) der einzelsträngigen DNA, wie sie in Abb. 62A zu sehen ist, überhaupt bilden kann. Zudem könnten bei sehr dichter Belegung der Oberfläche neben den intramolekularen auch intermolekulare Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Ein Hinweis darauf ist die beobachtete Veränderung des Hybridisierungseigenschaften bei Koimmobilisierung weiterer DNA (Abschnitt 6.2.6.5).

Hintergrundsignale, Kalibrationskurven und Nachweisgrenze des PCR-ELISA

Geringe Hintergrundsignale des PCR-ELISA sind für eine aussagekräftige Auswertung wichtig. Sind sie erhöht, geht wegen des begrenzten Auflösungsvermögens und Messbereichs des ELISA-Lesegerätes die Dynamik (Spannweite möglicher Signal-Quotienten) der Auswertung verloren. Das Hintergrundsignal im PCR-ELISA bei Auftragung von Puffer als Probe ist bei Hybridisierung mit allen Sonden sehr gering (Abb. 32). Wird bei Auftragung von

Amplikons, die keine passende Sequenz für eine Hybridisierung aufweisen, ein Hintergrundsignal erhalten, spricht man von Kreuzhybridisierung. Dieses erhöhte Signal kann bei fehlenden Kontrollen ein falsch positives Ergebnis vortäuschen. Um eine Fehlinterpretation zu vermeiden, müssen reine Target- oder Kompetitorprodukte als Kontrollen aufgetragen werden und mit der jeweils anderen Sonde hybridisiert werden. In Abb. 40 ist auf diese Weise die Spannweite möglicher Messwerte des CaMV35S-PCR-ELISAs ermittelt worden, die sich nicht von derjenigen der ALF-Referenzmethode unterschied. Besonders deutlich trat die Kreuzhybridisierung bei der GM-K Sonde auf, die ein Signal mit dem GM-T Amplikon lieferte. Durch Reduktion der Sonde-Menge (1 mM) konnte dieser Effekt auf ein tolerierbares Maß minimiert werden (Abb. 30). Dies war möglich, da die GM-K Sonde, im Vergleich zur GM-T Sonde, die höher konzentriert eingesetzt werden muss (200 mM), effektiv und schnell hybridisiert.

Eine weitere Kreuzhybridisierung trat im RR-PCR-System auf. Die RR-T Sonde zeigt ein geringes Signal mit dem reinen RR-K Amplikon. Diese Kreuzhybridisierung (0,5 %) wird deutlich erhöht (bis zu 6 %), wenn die Probenmenge zu Gunsten einer schnelleren Farbreaktion gesteigert wird. Daraus folgt eine Verschlechterung der Detektionsgrenze in der semiquantitativen kompetitiven PCR; geringe Target Amplikon Mengen konnten nicht von der großen Kompetitor-Amplikon Menge einer gering konzentrierten GVO-positiven Probe unterschieden werden. Die Nachweisgrenze des RR-PCR-ELISA liegt bei 0,1 % RR-Gehalt eines Sojamehles, während sie beim CaMV-35S PCR-ELISA, bei dem keine störende Kreuzhybridisierung auftrat, deutlich darunter lag (Abb. 58). Daher wird bei verlängerter Farbreaktion eine geringere Probenmenge ($\leq 2 \mu\text{l}$) für den RR-PCR-ELISA empfohlen. Bei der quantitativen PCR mit einer Serie kontinuierlicher Kompetitorverdünnungen, bei der bei Gleichheit von Target- und Kompetitormenge abgelesen wird, kommt der Effekt nicht zum Tragen. Der Äquivalenzpunkt, der in der Nähe des Signal-Quotienten 1 liegt und durch ein Normierungsplasmid festgelegt wird, ist fernab der geringen Signal-Quotienten der Kreuzhybridisierung. Die Kreuzhybridisierung kann zu Gunsten von geringerer Analysedauer in Kauf genommen werden.

Die Kalibrationskurven aller PCR-ELISAs (Abb. 33) wiesen nur einen begrenzten linearen Bereich auf. Die Abnahme der Steigung bei hohen Konzentrationen ist problemlos durch Erschöpfung der Biotin-Bindungs Kapazität der Kavitäten zu erklären, während die progressive Anfangssteigung ungewöhnlich erscheint. Hier könnten erneut Sekundärstrukturen eine Rolle spielen, die bei geringen Amplikonkonzentrationen eine geringere Effektivität der Hybridisierung bedingen. Dies entspräche einer Selbsthemmung, die bei dichter Belegung der Oberfläche aufgehoben wird. Dabei könnten intramolekulare von intermolekularen Wechselwirkungen abgelöst werden. Für diesen Erklärungsansatz spricht der beobachtete, kooperative Effekt (Abschnitt 6.2.6.5), bei dem durch Immobilisierung zusätzlicher DNA, die jedoch keine passende Hybridisierungsstelle aufweist, eine deutliche Signalerhöhung erzielt wurde. Ein weiterer Erklärungsansatz ist eine Steigerung der Attraktivität der Oberfläche für beispielsweise die T-Sonde. Die dichtere Belegung mit beliebiger DNA könnte die Verweildauer von Sondenmolekülen aus der Lösung an der beschichteten Oberfläche erhöhen und durch die räumliche Nähe deren spezifische Hybridisierung an die T-Amplikons begünstigen.

Die Form der Kalibrationskurve ist für die Analyse kompetitiver PCRs, außer bei der Festlegung der minimalen und maximalen Probenmenge, nicht von Bedeutung. Die Form der Kurve unterscheidet sich wegen des kooperativen Effekts unter Bedingungen, bei den zwei Produkte erscheinen deutlich von derjenigen, bei der ein einzeln vorliegendes Amplikon mit Wasser verdünnt wird (Abb. 37). In einer Serie kompetitiver PCRs sinkt die Menge des immobilisierten Amplikons (z. B. Target), während die Menge des korrespondierenden zweiten Amplikons (z. B. Kompetitor) umgekehrt proportional steigt. Diese wechselseitige Beeinflussung kann mit den vorliegenden Daten nicht quantitativ beschrieben werden. Jedoch zeigt ein Experiment mit Mischungen aus reinen Amplikons (Abb. 37), dass sowohl mit separat immobilisierten, als auch mit gemischten Amplikons eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus des Quotienten vom Verhältnis der Amplikons erhalten wird. Diese Linearität, bei unterschiedlichen Steigungen, ist in beiden Fällen gegeben und ist somit unabhängig vom kooperativen Effekt. Sie ist Voraussetzung für den Einsatz des PCR-ELISA bei der Analyse kompetitiver PCRs.

Die Eignung des PCR-ELISAs zur Auswertung kompetitiver PCRs wird ebenfalls durch die mit einer realen Proben-DNA durchgeführten, vergleichenden PCR-ELISA- und ALF- Messungen deutlich. Da für diese unabhängige Überprüfung des PCR-ELISA spezielle, fluoreszenzmarkierte Primer benötigt wurden, erfolgte die Demonstration nur exemplarisch an dem CaMV35S-PCR System. Die ALF-Messung ist anders als der PCR-ELISA unabhängig von einer Hybridisierung und im Gegensatz zur Gel-Auswertung nach Ethidiumbromid-Färbung massenunabhängig. Die theoretisch geforderte, lineare Abhängigkeit des Logarithmus des Signal-Quotienten vom Logarithmus der zugegebenen Kompetitormenge [58] wurde experimentell bestätigt. Die lineare Regression erlaubt die Bestimmung von Äquivalenzpunkten, die nicht zwingend genau auf dem Schnittpunkt liegen. Die unterschiedlichen Steigungen der Geraden spiegeln dabei die unterschiedliche Sensitivität der beiden Messsysteme wider. Die graphische Ablesung des Äquivalenzpunktes der kompetitiven PCR führte für beide Methoden zum gleichen Ergebnis in Form von Kopien pro eingesetzter DNA-Menge.

Ebenso wie die Kurvenform ist auch die absolute Nachweisgrenze für die einzelnen Amplikons nicht von außerordentlicher Bedeutung. Die Nachweisgrenzen sind für die Produkte aller PCR-Systeme im PCR-ELISA deutlich besser als im Agarosegel mit Ethidiumbromid-Färbung. Darüber hinaus war das Gel wegen seines unzureichenden Trennungsvermögens nicht zur Auswertung kompetitiver PCRs mit Produkten, die sich nur minimal in der Größe unterschieden, geeignet. Für den CaMV35S-PCR-ELISA wurde exemplarisch gezeigt, dass die Nachweisgrenze für reines Target-Amplikon bei $0,11 \pm 0,04$ ng/ Vertiefung liegt (Abb. 39). Dieser Wert ist um den Faktor 16 niedriger als in der Agarosegelelektrophorese. In Literatur-beschriebenen PCR-ELISAs wurde bei gleichem ELISA-Aufbau (immobilisiertes Amplikon, Denaturierung, Hybridisierung mit markierter Sonde, Immundetektion und photometrische Auswertung) Nachweisgrenzen bis zu 0,02 ng/ Vertiefung berichtet [149]. Der in dieser Arbeit genutzte CaMV35S-PCR-ELISA weist also eine vergleichbare Empfindlichkeit auf.

In einer quantitativen PCR mit kontinuierlichen Kompetitorreihen ist der Äquivalenzpunkt für die Auswertung durch das Vorliegen gleich großer Mengen an Target- und Kompetitor-

Amplikon definiert. Es handelt sich dabei immer um vergleichsweise große Amplikonmengen, da die PCR mit 30-50 Zyklen durchgeführt wird. Je niedriger die Nachweisgrenzen für ein Amplikon ist, desto geringer kann sein Anteil in einem PCR-Produkt-Gemisch sein. Somit können auch Signal-Quotienten fernab des Äquivalenzpunktes bestimmt werden. Mit den etablierten PCR-ELISAs lassen sich die Produkte von kompetitiven PCRs, bei denen die Kompetitor-Konzentration 3 Dekaden überstreicht, bequem analysieren (vgl. Abb. 40 und 60). Eine Erweiterung dieser Spanne durch niedrigere Nachweisgrenzen ist nicht notwendig.

Validierung der Kompetitoren

Die größte Bedeutung bei der Auswahl eines Kompetitors kommt der Gleichheit der Amplifikationseffizienz von Kompetitor und Target zu [50, 58, 59, 61, 62, 63, 121, 150]. Theoretische Berechnungen und experimentelle Belege zeigen, dass bei Ungleichheit massive Über- oder Unterbestimmungen eintreten [59, 62]. Die Korrektur ungleicher Effizienzen ist aufwändig und gelingt nur unter bestimmten Umständen für relative Vergleiche von initialen Templatmengen (nach 0 PCR-Zyklen, z.B. $T_0^{\text{Probe1}} > T_0^{\text{Probe2}}$), eine absolute Quantifizierung (z.B. $T_0 = 10^3$ Kopien/ng DNA) ist nicht möglich [150].

Die Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Kompetitoren erfolgte unter sorgfältiger Berücksichtigung der entscheidenden, publizierten Kriterien. Diese sind identische Primerbindungsstellen, gleiche Amplikonlängen, gleiche GC-Gehalte und eine möglichst geringe Veränderung der internen Sequenz [121, 150]. Ein weiteres Kriterium, das Beibehalten der Wildtyp-DNA direkt vor dem 3'-Bereich eines Primers, wurde zusätzlich gewählt. Aus der Vielzahl der Veröffentlichungen zu Kompetitoren lässt sich ableiten, dass das Erfüllen dieser Kriterien keine Garantie für die erfolgreiche Konstruktion von Kompetitoren darstellt und immer eine gezielte, experimentelle Überprüfung erfolgen muss.

Eine häufig verwendete Methode die Gleichheit der Effizienzen zu überprüfen, ist die Ermittlung der Steigung der doppeltlogarithmischen Auftragung des Stoffmengen-Quotienten ($Q_{\text{St}, n}$, nach n Zyklen) der Produkt-Mengen gegen die Kompetitormenge. Diese Möglichkeit wird aus Gleichung 9 deutlich, die durch Logarithmieren und Umformung von Gleichung 4 gewonnen wird. Die initiale Target-Matrizenmenge T_0 ist für eine Serie kompetitiver PCRs konstant und damit auch dessen Logarithmus. Wenn die Effizienzen für Target (E^T) und Kompetitor (E^K) tatsächlich gleich sind, nimmt der Zyklen-abhängige, letzte Term den Wert 0 an. Der Stoffmengen-Quotient der Amplikon-Mengen hängt dann nur von dem Logarithmus der Kompetitor-Matrizenmenge K_0 ab, daher wird eine Steigung von -1 vorausgesagt.

$$\text{Gleichung 9} \quad \log(Q_{\text{St}, n}) = \log(T_0) - \log(K_0) + n \times \log\left(\frac{1 + E^T}{1 + E^K}\right)$$

Diese Methode kann jedoch nur angewandt werden, wenn die Stoffmengen über einen großen Bereich gemessen werden können. Bei einer Auswertung durch Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid ist wegen der Färbung des Hintergrundes und der Signalsättigung bei hohen Konzentrationen [150] und bei dem PCR-ELISA wegen der variablen Hybrid-

sierungs-Effizienzen (nicht lineare Kalibration, Abb. 33) diese systematische Voraussetzung nicht erfüllt.

Auf Grund theoretischer Voraussagen kam Raeymaekers [58] unter Einbeziehen von Zyklus-abhängigen Effizienzen zu dem Schluss, dass, bei Abwesenheit von systematischen Fehlern der Produktquantifizierung, das Steigungskriterium ($\Delta \log Q_{St} / \Delta \log K_0 = -1$) ein notwendiges aber nicht ausreichendes Kriterium zur Kontrolle der Effizienzgleichheit ist. Weiterhin wurden später dynamische Effekte der PCR beschrieben (variable Effizienzen durch Produkthanreicherung), die erklären, warum dieses Steigungskriterium nicht uneingeschränkt anwendbar ist. In einer fortgeschrittenen PCR, bei der ein Amplikon (z.B. das Target) in großer Überzahl vorliegt, wird seine Amplifikation durch eine Konkurrenzreaktion behindert. Die Rehybridisierung der in hoher Konzentration vorliegenden Einzelstränge unterdrückt eine Hybridisierung mit den Primern. Unabhängig von der gegebenen Effizienzgleichheit der beiden Matrizen bei Beginn der PCR wird dadurch die individuelle Amplifikationseffizienz des Targets bei fortgeschrittener PCR gesenkt. Infolgedessen unterliegt der gering konzentrierte Kompetitor zur gleichen Zeit einer Bevorzugung ($E^K > E^T$, [151, 152]). Der hintere Term der Gleichung 9 nimmt daher einen Wert ungleich 0 an. Diese Abweichung tritt erst ab einer bestimmten Produktmenge auf und führt trotz korrekter, initialen Amplifikationseffizienzen zu Steigungen ($\Delta \log Q_{St} / \Delta \log K_0$), die einen anderen Betrag als 1 aufweisen.

In dieser Arbeit wurden zwei weitere Wege zur Kontrolle der Effizienzgleichheit aufgezeigt, die in der Literatur noch nicht beschrieben wurden (Abschnitt 6.2.7.1). Die Simulation des Äquivalenzpunktes durch „molekulares Fixieren“ des initialen Target/Kompetitor-Verhältnisses in Form eines NormierungsPlasmids ist zwar naheliegend, aber bei den Anwendern der kompetitiven PCR nicht etabliert. Sie ermöglicht auf elegante, einfache Weise eine Kontrolle gerade des Amplikonverhältnisses, dem die größte Bedeutung bei der Auswertung zukommt. In dieser Arbeit wurden Normierungsplasmide ($T_0 = K_0$) für alle fraglichen PCRs erzeugt. Mit ihnen konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der absoluten, initialen Matrizenzahl im Rahmen der Messgenauigkeit gleiche Produktmengen für Kompetitor und Target erzeugt werden (Abb. 41). Die Versuche wurden mit hoher Zyklenzahl (n) durchgeführt, so dass bei ungeeigneten Kompetitoren ($E^T \neq E^K$) eine deutliche Abweichung ($\log Q_{St} \neq 0$) offensichtlich geworden wäre (vgl. Gleichung 9). Die erzeugten Kompetitoren erfüllen folglich die an sie gestellten Anforderungen. Da die Normierungsplasmide in der PCR gleiche T und K-Amplikonmengen erzeugten, konnten sie weiterhin sinnvoll zur Bestimmung des Signal-Quotienten am Äquivalenzpunkt im PCR-ELISA genutzt werden. Dieser Signal-Quotient unterliegt durch Schwankungen der Sondenkonzentrationen, Pufferzusammensetzungen, Inkubationsdauer und Temperaturdifferenzen gewissen Interassay-Schwankungen und kann auf diese Weise individuell bestimmt werden.

Ein einfacher Weg die Effizienz einer PCR direkt zu bestimmen, ist die Realzeit-PCR mit unterschiedlichen, initialen Matrizen-Mengen (Abschnitt 6.2.7.2). Die lineare Abhängigkeit des Grenzwertzyklus C_t vom Logarithmus der eingesetzten Mengen erlaubt eine Berechnung über den Steigungsfaktor (Gleichung 8) [134]. Bei diesen Untersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede in den Effizienzen der vier kompetitiven PCRs (CaMV35S, RR, GM0304, GM0104) gefunden. Die Effizienzen belegten jedoch, dass kleinere Amplikons

tendenziell effizienter amplifiziert wurden. Der Kontrolle der Effizienzgleichheit von Target und Kompetitor einer kompetitiven PCR auf diesem Wege liegt die unbestätigte Hypothese zu Grunde, dass Effizienzen, die unter Umständen ermittelt werden, unter denen nur ein Produkt erzeugt wird (E_{Simplex}), gleich denjenigen Effizienzen sind, die bei der gleichzeitigen Produktion von zwei verschiedenen Amplikons (E_{Duplex}) realisiert werden. Die Ergebnisse müssen daher so interpretiert werden, dass für den Fall, dass in den Simplex-PCRs für Target oder Kompetitor eine von einander abweichende Effizienz gefunden würde, dies wahrscheinlich auch für die kompetitive PCR gilt. Da jedoch gleiche Simplex-Effizienzen ermittelt wurden, sind durch die Realzeit-PCR-Experimente mögliche Vorbehalte ausgeräumt worden. Letztere Prüfung allein wäre zur Validierung jedoch nicht ausreichend.

Außer der kompetitiven PCR kann die Realzeit-PCR mit SYBR-Green zur Quantifizierung von DNA eingesetzt werden (Abb. 43). Sie führt unter kontrollierten Bedingungen zu Ergebnissen, die zur Überprüfung der Ergebnisse der kompetitiven PCR mit PCR-ELISA-Auswertung dienen konnten (Abb. 61). Bei Verwendung einer Kalibration durch bekannte DNA-Mengen stellt sie eine bequeme Methode mit einem weiten Einsatzfeld dar, da mit kommerziell erhältlichen Materialien ohne Planung, Klonierung und Validierung von Kompetitoren Ergebnisse erhalten werden können. Es muss dabei lediglich die Abwesenheit von Inhibitoren in der Proben-DNA durch Analyse mehrerer Verdünnungsansätze sichergestellt werden. Die Realzeit-PCR mit SYBR-Green schließt jedoch keine sequenzspezifische Bestätigungsreaktion ein, eine Forderung die immer Teil der gerichtsfesten Methoden nach §35 LMBG ist.

Neben der gezielten Mutagenese von Target-Sequenzen, die zu homologen Kompetitoren mit neuen Sondenregionen führte, wurde in einer PCR mit geringer Stringenz ein Artefakt erzeugt, das kloniert als heterologer Kompetitor diente (Plasmid pCR 35SArte, Abschnitt 6.2.5.5). Dieser erfüllt die meisten Anforderung an einen Kompetitor, abgesehen von der Tatsache, dass die interne Sequenz zwischen den Primern keine Homologie zu der Target Sequenz aufweist. Er weist die gleichen Primerbindungsstellen (35S1/35S3-bio) und die gleiche Amplikon-Länge (Target 195 bp/ Arte 184 bp) bei ähnlichem GC-Gehalt (Target 49,7 % / Arte 50,5 %) auf.

Nach Siebert und Larrick [63] sind diese heterologen Kompetitoren ebenfalls gut zur kompetitiven PCR geeignet. Der nach ihrer MIMICS-Methode (Clontech, Palo Alto, CA) hergestellte Kompetitor weist ein nicht-lineares Verhalten und eine Steigung von ($\Delta \log Q_{SI} / \Delta \log \text{Kompetitor} = -0,35$) auf. Er ist laut Raemaeykers [58] zur absoluten Quantifizierung ungeeignet. Der verwendete Kompetitor unterscheidet sich deutlich in der Größe (300/550 bp) und hat eine vom Target verschiedene interne Sequenz.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass heterologe Kompetitoren das Kriterium der Effizienzgleichheit erfüllen können. Dennoch scheint die Wahrscheinlichkeit dafür geringer als bei der Konstruktion eines homologen Kompetitors. Abschnitt 6.2.7.4 zeigt, dass der Artefakt-Kompetitor in der kompetitiven PCR eine deutlich höhere Amplifikationseffizienz als die CaMV35S-Target- und Kompetitorsequenzen aufweist. Zum Nachweis wurden die entsprechenden Sequenzen gemeinsam in ein Plasmid kloniert, um wiederum die initialen Verhältnisse (1:1:1) auf molekularer Ebene zu fixieren. Während die Paarung von Target- und gezielt klonierter Kompetitor-Sequenz zu gleichen Produktmengen führte, wurden diese

Amplikons in Gegenwart des Artefaktkompetitors unterproportional amplifiziert (Abb. 48). Der Artefaktkompetitor kann somit nicht zur quantitativen, kompetitiven PCR eingesetzt werden. Eine Zyklus-abhängige Verschiebung des Äquivalenzpunktes und eine Ungleichheit der Quotienten von initialer Target/Kompetitor-Menge zur Target/Kompetitor-Menge nach Amplifikation wäre die Folge (vgl. Gleichung 9) [62, 58, 61, 150]. Darüber hinaus ist die Darstellung eines Kompetitors durch PCR mit geringer Stringenz ein Zufallsprozess, der unter Umständen eine aufwändige Durchmusterung vieler Klone erfordert.

Aufgrund der fehlenden Sequenzübereinstimmungen besitzt der heterologe Artefakt-Kompetitor dennoch einen Vorteil. Während bei den homologen Kompetitoren am Äquivalenzpunkt die Bildung zweier Heteroduplex-Spezies auftrat, wurde dieses Phänomen bei der Gelanalyse kompetitiver PCRs mit dem Artefakt (Abb. 44) nicht beobachtet. Die Heteroduplexes aller Target- und Kompetitor-Paare dieser Arbeit ließen sich in der PAGE gut von den Banden der normalen Homoduplex Produkte trennen. In einigen Arbeiten, bei denen die Trennung der Amplikons einer quantitativen, kompetitiven PCR durch Gelanalyse erzielt wurde, berichteten die Autoren von einem störenden Einfluss der Heteroduplexes, insbesondere bei Unterscheidung der Produkte durch Restriktion [59, 121, 153, 154]. Die Heteroduplex-DNA, die sich gemäß einer binomischen Verteilung aus Target- und Kompetitor-Amplikon bildet, ist gerade am Äquivalenzpunkt, der für die Auswertung die größte Bedeutung besitzt, maximal. So entziehen sich relevante und unterschiedlich große Anteile der Analyten der korrekten Erfassung [153].

In allen Fällen wurden die Heteroduplex Produkte retardiert und erschienen wie höhermolekulare Amplikons. Die Ausbildung einer Schlaufe einzelsträngiger DNA in der Heteroduplex prägte vermutlich das Verhalten bei dem Durchwandern des engmaschigen Polyacrylamid-Geles. Neben dem Laufverhalten war ein weiteres Merkmal der Heteroduplex-DNA ihre fehlende Restringierbarkeit in den Bereichen, die zur Kompetitor Konstruktion mutiert wurden [153]. Dies wurde an verschiedenen Restriktionsstellen im RR- und GM0104-PCR-Produkt zum Beleg der Annahme einer Heteroduplex-Struktur demonstriert (Abb. 46). Die Heteroduplex-DNA bestand demnach hauptsächlich aus doppelsträngigen Bereichen, die restringiert werden konnten und einzelsträngigen Bereichen, die nicht durch Endonukleasen vom Typ II restringiert werden konnten. Die einzelsträngigen Bereiche verliehen den Heteroduplexes im Gegenzug die Fähigkeit mit Sonden zu hybridisieren, ohne dass die DNA zuvor zum Einzelstrang denaturiert werden musste (Abb. 47). Ein geringes Signal war bei Durchführung des PCR-ELISA auch ohne Denaturierungsschritt wegen des Einschubs von konzentriert vorliegender Sonde in die normale Homoduplex-DNA detektierbar. Die Ausbildung einer Schlaufe erhöhte jedoch die Zugänglichkeit und damit das Signal für Produkte mit Heteroduplexstruktur um ein Mehrfaches.

Semiquantitative, kompetitive PCR

Die semiquantitative, kompetitive PCR erlaubt bei genauer Kontrolle der Gesamt-Menge der PCR eingesetzten Proben DNA eine relative Bestimmung des GVO-Gehaltes an Hand von Standardproben. Mit einer einzigen Standardprobe kann eine Aussage über das Über- oder Unterschreiten eines durch sie definierten Schwellenwertes getroffen werden, Kalibrationen

mit mehreren Standards sind aber ebenso möglich. Der Messung liegt ebenfalls eine Konkurrenz wie sie Gleichung 5 beschreibt zu Grunde. Eingeschränkt wird die Aussagekraft des Verfahrens durch Schwankungen in den eingesetzten Proben DNA-Mengen. Diese sind durch Protein- und RNA-Verunreinigung, Fragmentierung der DNA oder Verdünnungsungenauigkeiten, wie sie im Zuge der DNA-Quantifizierung und Extraktion auftreten, bedingt. Der Variationskoeffizient der Signal-Quotienten einer PCR-ELISA-Kalibration einer semiquantitativen PCR (Abb. 51) war daher größer ($CV_Q = 37\%$) als bei PCR und PCR-ELISA-Analyse eines Normierungsplasmids ($CV_Q = 8$ bis 16%). Dennoch lassen sich beispielsweise Soja-Mehl Proben mit um den Faktor zwei differierenden GVO-Gehalten unterscheiden.

Während bei der Intra-Assay Betrachtung (Vergleich unterschiedlicher Proben innerhalb eines semiquantitativen PCR-Experiments) die Qualität und Quantität der DNA in Extrakten von großer Bedeutung ist, ist bei dem Inter-Assay Vergleich (mehrere unabhängige Messungen einer Probe) die Reproduzierbarkeit der Präparation des Kompetitors ausschlaggebend. Um die als Plasmid vorliegenden Kompetitoren für den PCR-Prozess voll zugänglich zu machen, mussten sie durch Restriktion von der spiralierten in eine lineare Form überführt werden (Abschnitt 6.2.7.5). Zudem musste die Plasmidlösung nach UV-Quantifizierung bis zu 10^{10} -fach verdünnt werden. Diese Schritte können von Präparation zu Präparation inhomogen verlaufen. Experimentell wurde dafür eine Reproduzierbarkeit von 24% (Schwankungsbreite der benötigten Kopien zum Erreichen eines bestimmten Signal-Quotienten bei vier unabhängigen Verdünnungsreihen mit derselben Proben-DNA) ermittelt. Diese verbessert sich auf circa $8,0\%$, wenn Verdünnungsreihen aus einer einzigen Kompetitor-Stammlösung hergestellt werden. Daraus folgt, dass es nicht problemlos möglich ist eine quantitative oder semiquantitative PCR mit hoher Präzision bei der selben absoluten Kopienzahl oder bei dem selben Quotienten in einem unabhängigen Versuch zu wiederholen. Für reproduzierbare Messergebnisse muss auf die selbe Präparation zurückgegriffen werden. Als Konsequenz aus den Schwankungen der Proben-DNA- und Kompetitor Präparation sollte in einer semiquantitativen PCR eine Referenzprobe mit bekanntem Gehalt mitgeführt werden.

Semiquantitative, kompetitive PCR im Ringversuch

Auf der Konferenz der Teilnehmer des EU-Projektes DMIF-Gen (Rom, 1998) wurden Daten dieser Arbeit zur NPTII-Analytik und zur semiquantitativen DNA-Analytik vorgestellt. Von den Teilnehmern wurde die semiquantitative *Screening*-PCR mit Roundup Ready Sojamehl für einen Ringversuch ausgewählt, so dass dieses Verfahren durch unabhängige Labore getestet wurde. Bei der Planung des Ringversuches wurden dessen Ziele schrittweise aufeinander aufbauend formuliert; sie konnten ohne Einschränkung erreicht werden. Zum ersten Mal wurde erfolgreich ein PCR-ELISA in der GVO-Analytik eingesetzt; er erwies sich als robust und sicher in der Handhabung. Die Nutzung des Kompetitors als interne Kontrolle ergab in einem Fall wertvolle Indizien für das Vorliegen von Inhibition. Das anspruchsvollste Ziel, die Klassifizierung von Proben in drei Gruppen: negativ; positiv, aber unterhalb eines Schwellenwertes und positiv, oberhalb eines Schwellenwertes, wurde ebenfalls erreicht. Der Ringversuch gab weiterhin Anstöße zur Verbesserung der Kompetitorlagerung und lieferte statistische Daten über den Gesamtprozess der Analyse von DNA-Extraktion bis zur ELISA-Auswertung, die eine bessere Einschätzung von Ergebnissen erlaubt.

Die Extraktion der DNA erwies sich als Schwankungs-anfälliger, als dies aus eigenen Versuchen bekannt war. Die Ausbeuten und die Proteinverunreinigung schwankten deutlich sowohl innerhalb der Proben eines Teilnehmers, aber auch von Teilnehmer zu Teilnehmer. Die Klassifizierung des GVO-Gehaltes beruhte auf semiquantitativer, kompetitiver PCR, daher war die Homogenität der eingesetzten DNA-Isolate *in puncto* korrekter Quantifizierung und Qualität entscheidend. Da die Test-Proben mit geringer (0,1 % RR) und hoher (1 %, 2 % RR) Konzentration dem 0,2-fachen respektive dem 2-/4-fachen des Schwellenwertes (0,5 % RR) entsprechen, wirkte sich die beobachtete Inhomogenität jedoch nicht stark aus. Nur eine einzige evaluierte Probe (2 % RR, Labor K, Probe 5) wurde, vermutlich auf Grund dieser Schwankungen, als GVO positiv und gering konzentriert und somit falsch eingeordnet. Weiterhin trat eine falsch-positive Probe auf Grund von Kontaminationen auf, sie wurde durch das semiquantitative Verfahren aber lediglich als gering konzentriert eingeordnet und somit zumindest in der Auswirkung begrenzt.

Bemerkenswert war, dass eine neue Charge des Referenzmaterials der Fa. Fluka mit 1 % RR-Gehalt bei einem Kontrollversuch der Ringversuchsreagenzien wiederholt einen höheren Gehalt als die 2 % RR-Proben aufwies. Diese Chargeninhomogenität führte dazu, dass zwei annähernd gleiche Gehalte (2 bis 2,7 % RR) die Klasse der höher konzentrierten Proben bildeten. Diese Beobachtung deckt sich mit Resultaten anderer Mitglieder des §35 LMBG-Arbeitskreises und schweizer Analyselabore zu dieser Zeit (T. Borchers und P. Hübner, persönliche Mitteilung).

Die ursprünglich vorgesehene, für den Anwender einfachere Evaluierung (Typ A, Schwellenwert bei $Q_{Si} = 1$, ohne Bezug auf eine mitgeführte Referenz) basiert darauf, dass mit einer vorjustierten Kompetitorlösung und den individuell vom Teilnehmer extrahierten DNAs exakt ein bestimmtes Verhältnis Kompetitor/DNA-Menge in allen Laboren erreicht werden kann. Dies war nicht der Fall. Zu der Variation in der Qualität und Quantität der DNA-Extrakte kam eine Instabilität der Kompetitor-Präparation, die erstmalig während des Ringversuches auftrat. In 7 der 11 Labore mit auswertbaren Ergebnissen wurden dennoch bei Evaluierung nach Typ A alle Proben richtig klassifiziert. Dies zeigt, dass die Methode robust ist und das Vorjustieren der Materialien, insbesondere des Kompetitors, zwar nicht vollständig, aber prinzipiell gelang. Dennoch wurde letztlich der Evaluierungstyp B, der eine vom Teilnehmer mitgeführte Referenzprobe vorsieht, gewählt, da hier eine Kontrolle des eingestellten Verhältnisses beim Schwellenwert (0,5 % RR) eingeschlossen ist. Diese „Ein-Punkt Kalibration“ durch den Anwender erlaubt eine Korrektur möglicher Abweichungen. Beim Evaluierungstyp B wurden 100 % der evaluierten gering GVO-haltigen Proben korrekt klassifiziert. Die Gruppe der höher konzentrierten GVO-haltigen Proben wurde zu 97 % korrekt klassifiziert. Diese Daten zeigen eindeutig, dass die entwickelte Methode zur Klärung der Frage, ob der GVO-Gehalt einer unbekanntes Sojamehl Probe ober- oder unterhalb eines Schwellenwertes liegt, geeignet ist.

In der Beschreibung von Ringversuchen, die ebenfalls semiquantitative Untersuchungen durch kompetitive PCR zur Schwellenwertbestimmung darstellen, die allerdings durch Gelanalytik ausgewertet wurden, kommt Hübner *et al.* [53] zu ähnlichen Ergebnissen. Es wurden Proben, die ober- oder unterhalb eines Schwellenwertes lagen, korrekt identifiziert.

Die Methode war auch hier zur Begutachtung des GVO-Gehaltes unbekannter Proben geeignet.

Die statistischen Daten zum Ringversuch bestätigen, dass sich die Ungenauigkeit der OD-Bestimmung für die T- und K-Amplikons direkt in der Ungenauigkeit des Signal-Quotienten einer Probe niederschlägt. Diese beträgt durchschnittlich ($9,5 \pm 6,0$) %. Im Gegensatz zur logarithmischen Darstellung bei Einsatz dekadischer Kompetitorverdünnungen (beispielsweise Abb. 37) sind die Ergebnisse hier auf der Ebene delogarithmierter Werte formuliert, was bei der Beurteilung der Schwankungsbreiten von Ergebnissen beachtet werden muss. Die Abweichung bei wiederholter Ermittlung des Quotienten für ein zuvor erzeugtes PCR-Produkt ((20 ± 21) %) in zwei unabhängigen PCR-ELISAs ist höher und spiegelt die Interassay Variabilität wider. Verglichen damit ist die Reproduzierbarkeit der Quotienten zweier paralleler Analysen der selben Probe mit (33 ± 27) % geringer. Diese größere Intraassay Variabilität zeigt, dass die Variation des gesamten Testverfahrens zu großen Teilen in der Extraktion und der kompetitiven PCR begründet ist und eine Präzisierung des Verfahrens angebracht ist. Diese Präzisierung wurde durch den Bezug auf das Ergebnis einer weiteren kompetitiven PCR zur Ermittlung des Soja-DNA Anteils erreicht.

Soja-DNA-Anteil in Extrakten prozessierter oder gemischter Proben

Für eine aussagekräftige Bestimmung des GVO-Gehaltes einer Probe nach der vorgestellten semiquantitativen Methode darf für die als Templat in die PCR gegebene DNA-Menge nur derjenige DNA-Anteil angerechnet werden, der aus Soja stammt, amplifizierbar ist und somit in den weiteren PCRs einen Beitrag beim potenziellen Nachweis des gentechnischen RR-Konstruktes liefern kann. Neben der zuvor besprochenen potenziellen Verunreinigung von DNA-Extrakten mit RNA oder Proteinen, die zur Überschätzung der zur PCR zugegebenen DNA-Menge führt, stellt die Fragmentierung von DNA oder die Mischung von Soja mit weiteren Pflanzenarten in einer Probe eine weitere Unsicherheit bei der semiquantitativen Bestimmung nach UV-Quantifizierung der Gesamt-DNA dar.

Um die relevante Soja-DNA Menge fraglicher Proben zu bestimmen, diente eine Kalibration mit UV-quantifizierter, reiner Soja-DNA in einer kompetitiven PCR auf das Soja Lektin-Gen bei konstanten Kompetitor-Mengen. Die erhaltenen Produkte wurden im optimierten GM-PCR-ELISA analysiert. Die lineare Abhängigkeit des Signal-Quotienten von der eingesetzten Menge wurde mit DNA aus einem Soja-Referenzmehl gezeigt, das laut Agarosegel-Analyse nur gering fragmentiert war. Weitere Soja-Referenzmehle wiesen im Gegensatz dazu, wegen der intensiven Mischung bei der Herstellung, stärker fragmentierte DNA auf. Ein Unterschied zwischen den Extrakten der formal gleichen Mehle wird ebenfalls bei der Quantifizierung durch kompetitive PCR deutlich (Abb. 57). Der experimentell bestimmte Soja-Gehalt der stärker fragmentierten DNA-Extrakte war um ein Drittel geringer als derjenige der Kalibrator-DNA, obwohl die Konzentrationen mittels UV-Spektroskopie gleich eingestellt wurden. Grund ist vermutlich die geringere durchschnittliche Fragmentlänge der isolierten DNA. Strangbrüche zwischen den Primerbindungsstellen, die Matrizen für die PCR zerstören, ohne jedoch die UV-quantifizierbare Gesamtmenge DNA zu reduzieren, kommen häufiger vor. Ein weiterer Grund könnte die Hypochromie des höher geordneten Zustandes von DNA sein, die

zu einem geringeren Extinktionskoeffizienten von nativer DNA führt [155]. Beide Effekte weisen in die gleiche Richtung. Wie groß der jeweilige Beitrag ist, ist nicht klar. Vom Standpunkt der Amplifizierbarkeit tritt eine Überbestimmung des Gehaltes von fragmentierter DNA auf.

Mit der kompetitiven GM0104-PCR zum Nachweis des für Soja charakteristischen Lektin-Gens und dem angeschlossenen PCR-ELISA (Abb. 57) konnte ebenfalls die Abwesenheit oder Anwesenheit von Soja-DNA in Extrakten einiger Mais-haltiger Proben bestimmt werden. Dieses Vorgehen ist bei Proben mit unbekanntem Inhaltsstoffen zweckmäßig. Die Anwendung einer kompetitiven statt einer einfachen, qualitativen PCR ist hier sinnvoll, um auszuschließen, dass Inhibition der Grund für ein ausbleibendes Signal ist. Wird DNA aus Gemischen von Organismen, z. B. Soja und Mais, isoliert, stellt die kompetitive PCR mit konstanten Kompetitor-Mengen und einer Kalibration eine Möglichkeit dar, gezielt den Soja-Anteil zu bestimmen. Dies wurde an einer Mehl-Probe, die je zur Hälfte aus Mais und Soja besteht, demonstriert. Bemerkenswert ist hier, dass mehr als die Hälfte der isolierten DNA aus Soja (80 %) stammte. Somit wird unterstrichen, dass nicht aus dem Verhältnis der extrahierten DNA auf die ursprüngliche Zusammensetzung einer Probe geschlossen werden kann. Ebenso muss auch bei bekannter Zusammensetzung einer Misch-Probe der relevante, Pflanzenart-typische DNA-Anteil selektiv quantifiziert werden.

Neben der kompetitiven GM0104-PCR, bei der ein Target-PCR-Produkt von 219 bp entsteht, war die GM0304-PCR (Target Produkt 118 bp) ebenfalls geeignet, den Soja DNA-Gehalt eines Extraktes nach dem gleichen Messprinzip zu bestimmen. Da ein kleinerer Teil des selben Gens amplifiziert wird, muss bei Vernachlässigung des Einflusses des Fragmentierungsgrades das gleiche Ergebnis erhalten werden. Die Messungen an einer 100 % RR-Probe (Tab. 14, DNA ist aus ganzen Bohnen isoliert) machen dies deutlich. Beide kompetitive PCRs weisen den gleichen Äquivalenzpunkt auf. Bei sehr stark fragmentierter DNA, wie sie aus Proteinisolaten erhalten würde, ist zu erwarten, dass durch die GM0304-PCR, wegen des kleineren Produkts eine höhere Soja-DNA-Konzentration gemessen wird als mit der GM0104-PCR. Experimentelle Daten zur Größe dieses Effektes wurden allerdings nicht gezeigt.

Die vorgestellte kompetitive PCR mit Kalibration zur Bestimmung der Soja-DNA ermöglicht durch Kombination mit den Ergebnissen des semiquantitativen CaMV35S *Screenings* und des spezifischen RR-Nachweises deren sichere Interpretation. Es konnten Soja-Proben von Nicht-Soja-Proben unterschieden werden und die geringe Amplifizierbarkeit stark prozessierter DNA aufgedeckt werden. Das gleichzeitige Bearbeiten der drei kompetitiven PCRs und der PCR-ELISA ist bequem, da identische Arbeitsschritte mit nur teilweise verschiedenen Lösungen durchgeführt werden müssen. Die Nutzung von Multipetten und automatischem ELISA-Waschgerät erlaubt dabei rationelles Arbeiten mit hohem Probendurchsatz, wie es für Routinelabore zweckmäßig ist.

Doppelkompetitive PCR

Mit der doppelkompetitiven PCR konnten mehrere Probleme der GVO-Quantifizierung ausgeräumt oder umgangen werden. Wird nicht nur das GVO-Gen durch kompetitive PCR

erfasst, sondern auch ein Pflanzenart-typisches Referenz-Gen, ist sichergestellt, dass sich die Messung nur auf die amplifizierbare und relevante DNA bezieht. Fragmentierung durch Prozessierung und Mischungen von DNAs mehrerer Organismen führen nicht mehr zu systematischen Fehlern, wie sie bei UV-Quantifizierung der Gesamt-DNA auftreten können. Der Einsatz eines klonierten Doppelkompetitors, stellt dabei zweifelsfrei sicher, dass exakt die gleiche Kopienzahl des GVO-Kompetitors und des Referenz-Gen-Kompetitors in der verwendeten Verdünnungsreihe vorliegt. Unterschiede der individuellen Verdünnungsreihen durch Restriktion oder Handhabung bei der Präparation fallen so fort. Damit wurde das gleiche Prinzip der „molekularen Fixierung“ wie bei den Normierungsplasmiden eingesetzt.

Die Wahl eines reinen RR DNA-Extraktes als Probe erlaubt auf elegante Weise die Überprüfung der kompetitiven PCR bei einem 100 % GVO-Gehalt. Die Ergebnisse aller vier beschriebenen PCRs müssen bei dieser bekannten Probe die gleiche Kopienzahl am Äquivalenzpunkt ergeben. In der Tat wurde dieses Resultat im Rahmen der Messgenauigkeit erzielt und somit bestätigt, dass die klonierten Kompetitoren und die PCR-ELISAs zum Nachweis der Produkte der kompetitiven PCR alle notwendigen Anforderungen erfüllen. Keines der individuellen Ergebnisse (als Kopien/ng DNA) wich signifikant vom Mittelwert der anderen drei Ergebnisse ab. Das Ergebnis der vier Reihen kompetitiver PCRs schwankte um $\pm 5,5$ % bei der PCR-ELISA-Auswertung um den Mittelwert (118 Kopien/ng DNA) und um $\pm 19,7$ % bei der optischen Gelauswertung (122 Kopien/ng DNA). Die Ergebnisse dieser beiden verschiedenen Auswertungsverfahren unterschieden sich also nicht signifikant. Mit der 100 % RR Probe als „Ur-Titer“ in der kompetitiven PCR wurde ein maximaler, experimenteller Fehler für die Auswertungsverfahren durch Bezug des niedrigsten auf das höchste Ergebnis formuliert. Für die Gelauswertung betrug in diesem Experiment die größte Abweichung vom wahren Wert -37,5 %. Diese Unterbestimmung ist circa dreimal so groß, wie die maximale Abweichung der Auswertung der kompetitiven PCR durch den PCR-ELISA (11,6 %).

Als weiterer Bezug wurde den kompetitiven PCRs die Realzeit-PCR mit SYBR-Green gegenüber gestellt (Abb. 43 und 61). Mit diesem technisch aufwändigen System konnte unter Verwendung von Kalibrationen für jede der vier PCR-Systeme ebenfalls bestimmt werden, dass die fraglichen Sequenzen in gleicher Kopienzahl im Extrakt vorlagen. Da keine interne Inhibitions-Kontrolle eingeschlossen war, wurde der Extrakt in mehreren Verdünnungen amplifiziert, um durch eine spezielle Auswertung die Effizienz zu bestimmen. Ist diese konstant, ist sichergestellt, dass die Probe Inhibitor-frei ist. Nur nach dieser Kontrolle ist eine korrekte Quantifizierung anhand einer Kalibration mit Inhibitor-freien Plasmidverdünnungen möglich. Das Ergebnis der vier Realzeit-PCRs schwankte mit $\pm 3,7$ % weniger um den Mittelwert von 183 Kopien/ng DNA, als die PCR-ELISA-Auswertung der kompetitiven PCRs. Der maximale, experimentelle Fehler betrug 8,3 % und war im Vergleich ebenfalls geringer.

Bei der Gegenüberstellung von PCR-ELISA und optischer Gelauswertung zeigten beide in allen vier kompetitiven PCRs gleiche Korrelationskoeffizienten der linearen Regression und formal gleiche Ablesefehler in der Auftragung der Daten (log Signal-Quotient versus log Kompetitormenge). Diese Auftragung wies für den PCR-ELISA geringere Steigungen als für die Gelauswertung auf, ein Effekt, der in der Verstärkung der Hybridisierung gering konzen-

trierter Amplikons durch ko-immobilisierte DNA begründet ist. Diese Experimente zeigten deutlich die Bedeutung der Normierungsplasmide, die Target- und Kompetitor-Sequenz im gleichen Verhältnis aufweisen. Die Ablesung muss bei individuell ermittelten Signal-Quotienten für jedes PCR-ELISA System erfolgen. Die Annahme, dass der Äquivalenzpunkt einem Signal-Quotient $Q_{Si} = 1$ dem Stoffmengen-Quotient $Q_{St} = 1$ entspricht gilt für den PCR-ELISA offensichtlich nur in erster Näherung. Es wurden allgemein Signal-Quotienten von $1,0 \pm 0,4$ gefunden.

Weiterhin wurde bei der Auswertung der GM0304-PCR eine geringere Steigung als bei den anderen Systemen ermittelt. Dies ist wahrscheinlich durch besonderes Rehybridisierungsverhalten der akkumulierten GM0304-Amplikons in den fortgeschrittenen Zyklen bedingt. Mathieu-Daudé *et al.* [151] beschrieben diesen Effekt theoretisch und zeigten an Beispielen, dass er in RT-PCRs zu einer überproportionalen Detektion von gering konzentrierter mRNA führte. Konzentriert vorliegende Amplikons (Majorität) rehybridisieren schneller zu doppelsträngiger DNA als gering konzentrierte. Die Halbwertszeit der Rehybridisierung ist umgekehrt proportional zur DNA-Konzentration [151]. Dieser Effekt begünstigt das Annealing von Primern an Amplikons der Minorität und deren effektivere Amplifizierung. Das Verhältnis der Produkte wird nivelliert, eine Abflachung der Steigung ist die Folge. Der im Vergleich mit den anderen PCRs deutlich stärkere Effekt wird eventuell durch die geringe Größe der PCR-Produkte (118/103 bp) verursacht, die günstigere Diffusionseigenschaften aufweisen.

Nachdem gezeigt wurde, dass mittels doppelkompetitiver PCR die Konzentration einer 100 % RR-haltigen Probe richtig bestimmt werden konnte, wurde eine 2 % RR-haltige zertifizierte Referenzmehl-Probe zur Ermittlung von Präzision und Wiederfindung der Methode vermessen (Tab. 15). Wieder wurde gezeigt, dass mit dem PCR-ELISA und der optischen Gelauswertung grundsätzlich gleiche Ergebnisse erzielt wurden. Das Ergebnis der optischen Gel-Auswertung war mit $(1,54 \pm 0,14)$ % GVO-Gehalt jedoch unpräziser ($CV = \pm 9,1$ %) als das Ergebnis des PCR-ELISA mit $(1,49 \pm 0,08)$ % GVO-Gehalt ($CV = \pm 5,4$ %, $N = 3$). Die Wiederfindungsrate der Messung in Bezug auf den nominalen Gehalt von 2 % RR war im Falle von PCR-ELISA (75 %) und der optischen Gel-Auswertung (77 %) annähernd gleich. Sie wurde wesentlich durch die kompetitive PCR oder Charakteristika der Proben bestimmt und betrifft nicht die Auswertungsmethode.

Dieses Abweichen um -25 % vom richtigen Wert (2 % RR) lag deutlich über der im Abschnitt 6.2.8.5 ermittelten maximalen experimentellen Abweichung (PCR-ELISA 11,6 %) und war insofern unerwartet, da alle bisherigen Überprüfungen einen systematischen Fehler ausschlossen. Da die kompetitive PCR an sich nicht die Ursache für eine so große Abweichung sein kann, lag die Vermutung nahe, dass die Fragmentierung der DNA, eine fehlerhafte Mischung der Referenzprobe oder Variation in der Handhabung, einzeln oder in Kombination, der Grund sind. Eine geringe Varianz ist auch durch den Gebrauch von Pipetten zum Mischen der 1:50-Verdünnung der DNA (um den ÄP bei der gleichen Kompetitor Verdünnungsstufe zu erreichen) denkbar. Die Folgen unterschiedlicher Fragmentierung der DNA für die Referenzproben wurde bereits in Abschnitt 6.2.8.3 behandelt. Trotz gleichen DNA-Gehalts nach UV-Quantifizierung wurden unterschiedliche Ergebnisse in der PCR erzielt. Das PCR-Produkt der Soja Lektin-Gen PCR (Referenzgen, 234 bp) in der Bestimmung der 2 % RR-

Probe ist kleiner, als das Produkt des GVO-Gens (RR, 313 bp). Daher könnte die Kopienzahl, die für letzteres ermittelt wird, stärker von Fragmentierung betroffen sein und so fälschlich die Messung eines zu geringen Gehaltes verursachen.

Eine fehlerbehaftete Mischung der Referenzprobe (Fluka, erste Generation) kommt am wahrscheinlichsten in Frage, da bereits bei den semiquantitativen Bestimmungen in der kompetitiven CaMV35S-PCR (Abb. 53) eine Chargen-abhängige Unregelmäßigkeit bei den GVO-Gehalten auftrat. Die 1 %-Probe einer Charge wies höhere Signal-Quotienten in der semiquantitativen Bestimmung des CaMV35S-Promotors als eine 2 % GVO-Probe einer anderen Herstellungscharge auf. Als möglicher Grund kommt eine stärkere Fragmentierung der 2 % Probe in Frage, was sich in einer geringeren Zahl initialer Matrizen auswirkt. Das *Joint Research Centre*, Geel publizierte kürzlich [156], dass nach veränderten Herstellungsbedingungen die Referenzmaterialien (derzeit dritte Generation) nun über alle Gehaltsstufen homogen verteilt, weniger stark fragmentierte DNA enthalten.

Mit der TaqMan-Technologie, ebenfalls eine Realzeit-PCR, kann wie mit der Realzeit-PCR mit SYBR-Green der GVO-Gehalt einer Probe gemessen werden; sie ist im folgenden Absatz dargestellt. Wurtz *et al.* [54] bestimmten mit diesem Verfahren für eine 2% RR-haltige Referenzprobe einen GVO Gehalt von $(1,8 \pm 0,02)$ %. Ebenso zeigte ein weiterer Ringversuch innerhalb des §35 LMBG-Arbeitskreises zur Entwicklung von Methoden zum Nachweis von GVOs in Lebensmitteln (Organisator: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, BGVV, Berlin; T. Börchers, persönliche Mitteilung) eine deutliche Unterbestimmung von 2 % RR Referenzproben. Der Mittelwert bei Doppelbestimmung durch neun Teilnehmer lag bei $(1,61 \pm 0,18)$ % RR, also rund 20 % unter dem Soll-Wert.

TaqMan-Technologie

Eine Alternative zur quantitativen, kompetitiven PCR ist die TaqMan-Methode, eine spezielle Realzeit-PCR, die in der GVO-Analytik in kurzer Zeit eine weite Verbreitung gefunden hat. Sie stellt einen 5'-3'-Nuklease Assay [157] dar und basiert, wie die Realzeit-PCR mit SYBR-Green, auf der Detektion der entstehenden Amplikons im Verlauf der PCR. Hier wird jedoch nicht die Einlagerung eines Fluoreszenz-Farbstoffes, sondern der Abbau einer intern hybridisierten Sonde verfolgt. Die Sonde ist mit terminalen Modifikationen, einem Fluoreszenz-Reporter und einem Fluoreszenz-Löcher versehen. Der Reporter kann nur detektiert werden, wenn er räumlich von dem Löcher entfernt wird; dies ist der Fall, wenn beide Moleküle getrennt in Lösung vorliegen. Während der Primerextension in der PCR wird die Sonde, die wie die Primer an einen Einzelstrang hybridisiert, jedoch am 3'-Terminus nicht verlängert werden, kann durch die 5'-Nukleaseaktivität der Polymerase abgedaut (Abb. 63). Die Auswertung der im geschlossenen Gefäß detektierten Fluoreszenz kann wie in Abschnitt 6.2.7.2 erfolgen. Das Verfahren impliziert eine spezifische Hybridisierung und somit die Bestätigung der Amplikon-Sequenz, die nach §35-LMBG für DNA-Nachweismethoden gefordert wird.

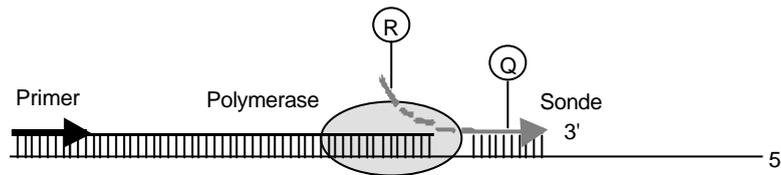


Abb. 63 Schema der Siganlerzeugung nach dem TaqMan-Prinzip

Bei der Elongation eines Primers verdrängt die Polymerase eine mit Fluoreszenz-Reporter (R) und -Löcher (Q, Quencher) markierte Sonde und daut sie durch ihre 5'-Exonukleaseaktivität ab. Liegen Quencher und Reporter-Farbstoff getrennt in Lösung vor, kann letzterer detektiert werden.

Verschiedene Firmen bieten Kits an, die alle notwendigen Reagenzien zur Bestimmung des RR-Gehaltes unter Verwendung der TaqMan-Methode gebrauchsfertig beinhalten (GeneScan, Berlin; ConGen, Berlin). Diese Systeme detektieren unter Verwendung von Kalibrationen mit DNA aus einem RR-Referenzmehl beispielsweise eine RR-spezifische und eine Soja-spezifische Sequenz, deren Mengen aufeinander bezogen werden. Die TaqMan-Technologie ist jedoch wie die PCR von der Fa. Hoffman La Roche patentiert. Der notwendige Thermocycler mit optischer Detektionseinrichtung (z.B. Gene Amp 7700 oder Lightcycler) und die Reagenzien stellen einen erheblichen Kostenfaktor dar.

Bei einem systematischen Vergleich der TaqMan-Realzeit-PCR (RR Quantifizierung) und der quantitativen, kompetitiven PCR (Mais Bt176 Quantifizierung nach [94]) kamen Hübner *et al.* [158] zu dem Ergebnis, dass sich die Variationskoeffizienten bei Messungen im Bereich des Schwellenwertes nicht unterscheiden und beide Methoden bei Einsatz von 200 ng Proben DNA eine ähnliche untere Bestimmungsgrenze von 0,1 % GVO aufweisen. Unterhalb dieses Gehaltes ist wegen einer geringen absoluten Kopienzahl der GVO-Sequenz keine statistisch gesicherte Aussage mehr möglich [158, 159, 160]. Da in der quantitativen, kompetitiven Bestimmung Serien von PCRs durchgeführt und analysiert wurden (optische Gelauswertung, [94]), während bei der Realzeit-PCR die gesamten Messungen in einem Gefäß durchgeführt wurden, war die Handhabung hier prinzipiell aufwändiger.

Unter Abwägung von Kosten und Leistungen der Methoden empfiehlt sich der Einsatz der TaqMan-Realzeit-PCR beispielsweise zur Ermittlung gerichtsfester Daten oder Analysen im Rahmen hoheitlicher Überwachungsaufgaben. An die Analysen solcher Proben werden andere Anforderungen gestellt als an die routinemäßige Überwachung von Waren Ein- und Ausgängen im industriellen Maßstab. Im letzteren Fall bietet sich eine preisgünstige semiquantitative *Screening*- oder GVO-spezifische kompetitive PCR mit PCR-ELISA Auswertung an. Eine exakte Quantifizierung einzelner Proben durch doppeltkompetitive PCR erscheint für den Routineablauf nur bei weitergehender Automatisierung vertretbar.

7.3 Schlussbetrachtung

Bei direktem Vergleich zeigen Analysedauer, Probendurchsatz und Reproduzierbarkeit des NPTII-ELISA die prinzipiellen Vorteile der Immun-Analytik gegenüber der kompetitiven PCR, auch mit PCR-ELISA Auswertung, auf. Letztere weist jedoch den Vorteil eines wesentlich größeren Messbereiches und eine relativ geringe Empfindlichkeit gegen Probedenaturierung auf. Im Falle der Immundetektion ist die Etablierung jedes neuen Tests für Proteine neuer

GVOs mit größerem zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden, als bei den kompetitiven PCR-Methoden. Die Bereitstellung eines geeigneten Analyseverfahrens oder Referenzmaterials im Zuge der Zulassung von GVOs ist derzeit nicht verpflichtend vorgesehen, während die genetischen Elemente der Veränderungen bekannt sind. Daher ist das Design von Primern und die Klonierung von Kompetitoren im Vergleich zur Erzeugung eines GVO-spezifischen Proteins und dagegen gerichteter Antikörper vergleichsweise unproblematisch. Aus Gründen der größeren Flexibilität haben sich die PCR-Methoden im Vergleich zu den immunologischen Methoden zunächst in der Anwendung durchgesetzt.

Als zukünftige Nutzung der Proteinnachweise ist eine rasche, qualitative Vor-Ort-Analytik z.B. für Stichproben bei Waren Ein- und Ausgänge denkbar. Auf dem NPTII-ELISA aufbauend könnte durch immunchromatographische Methoden, also durch Teststreifen wie sie beispielsweise zum Schwangerschaftsnachweis genutzt werden, eine einfache Kontrolle bestimmter, frischer Gemüse durchgeführt werden. Solche Systeme wurden bereits für Proteine der RR entwickelt und erfolgreich getestet [161].

Die DNA-Analytik erlaubt das *Screening* und den spezifischen Nachweis bis in den Bereich der Spurenanalytik. Ihre herausragende Bedeutung bei Nachweisen von GVOs in komplexen, prozessierten Lebensmitteln, die sich aus verschiedenen Pflanzen zusammensetzen ist offensichtlich. Dabei ist die Verdrängung der qualitativen Verfahren zu Gunsten quantitativer Methoden in der Zukunft auf Grund der geltenden EU-Schwellenwerte wahrscheinlich [24]. Wegen der Vielzahl von GVOs mit unterschiedlichen genetischen Elementen, existiert der Bedarf diese in einem lückenlosen *Screening* nach allen enthaltenen Pflanzenarten und allen potenziellen GVO-Genen parallel nachzuweisen. Die Entwicklung von Multiplex-PCRs ist daher sinnvoll. Die technischen Möglichkeiten der Realzeit-PCR durch die TaqMan-Technologie beschränken sich zu Zeit jedoch auf vier PCRs, die durch Wahl geeigneter Fluorophore unterscheidbar durchgeführt werden können (Gene Amp 7700). Ihr Einsatz bleibt daher wahrscheinlich auf die exakte Quantifizierung von Gehalten nach qualitativem Nachweis beschränkt. Die Auswertung der Multiplex-PCRs, die gegebenenfalls auch kompetitiv ausgeführt werden können, kann durch Hybridisierung auf Oligonukleotid-Mikrochips erfolgen. Ein richtungsweisendes Beispiel in rein qualitativer Ausrichtung ist der GVO-Chip der Fa. GeneScan (GVO-Symposium, Frankfurt 2002). Es stünden nach DNA-Extraktion, kompetitiver Multiplex-PCR und Chip-Analyse schnell semiquantitative Ergebnisse über in der Probe vorhandene Pflanzenarten und potenzielle GVOs zur Verfügung, mit deren Hilfe man über die Notwendigkeit exakter Quantifizierung durch TaqMan- oder kompetitive PCR entscheiden kann. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen über den Hybridisierungsnachweis von PCR-Produkten können als Vorarbeiten dienen und lassen sich prinzipiell direkt auf die Chip-Technologie übertragen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Stave, J.W. (1999) Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO - future needs. *Food Control*, 10: 367-374.
- [2] Hübner, P., Studer, E. und Lüthy, J. (1999) Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nat Biotechnol*, 17: 1137-1138.
- [3] Mitten, D.H., MacDonald, R. und Klonus, D. (1999) Regulation of foods derived from genetically engineered crops. *Curr Opin Biotechnol*, 10: 298-302.
- [4] The Royal Society, Großbritannien (2002) Genetically modified plants for food use and human health - an update. Policy document 4/02, <http://www.royalsoc.ac.uk>.
- [5] Geltendes Gemeinschaftsrecht der EU, <http://www.europa.eu.int/eur-lex/de>.
- [6] Internetadresse der US-FDA, Zugriff auf Zulassungsdaten unter <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biocon.html>
- [7] International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)-Report 2000, <http://www.isaaa.org>
- [8] Arbeitsgemeinschaft TransGen des Bundesverbandes Verbraucherinitiative e.V., Berlin, <http://www.transgen.de>
- [9] Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delanny, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Pescjke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. und Kishore, G.M. (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci*, 35: 1451-1461.
- [10] Hofte, H. und Whiteley, H.R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 53: 242-255.
- [11] Gill, S.S., Cowles, E.A. und Pietrantonio, P.V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*, 37: 615-636.
- [12] English, L. und Slatin, S.L. (1992) Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem Mol Biol*, 22: 1-7.
- [13] Murray, E.E., Lotzer, J. und Eberle, M. (1989) Codon usage in plants. *Nucleic Acids Res*, 17: 477-498.
- [14] Mizuno, T., Chou, M. und Inouye, M. (1984) A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 1966-1970.
- [15] Simons, R.W. und Klecker, N. (1983) Translational control of IS10 transposition. *Cell*, 34: 683-691.

- [16] Niederhauser, C., Gilgen, M. und Meyer, R. (1996) Gentechnologisch veränderte pflanzliche Lebensmittel: Stand der anwendungsorientierten Forschung und potentielle Nachweismöglichkeiten mit molekularbiologischen Methoden. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg*, 87: 307-367.
- [17] Jørgensen, R. (1991) Silencing of plant genes by homologous transgenes. *AgBiotech News and Information*, 4: 265-273.
- [18] Burkhardt, P., Beyer, P., Wünn, J., Klöti, A., Armstrong, G., Schledz, M., von Lintig, J. und Potrykus, I. (1997) Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant Physiol*, 11: 1071-1078.
- [19] Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. und Potrykus, I. (2000) Engineering provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287: 303-305.
- [20] Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. und Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.
- [21] Knippers, R. (1997) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [22] Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. und Sanford, J.C. (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327: 70-73.
- [23] Rhodes, C.A., Lowe, K. und Ruby, K. (1988) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryonic maize cell cultures. *Bio/technology*, 6: 56-60.
- [24] Schreiber, G.A. (1999) Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. *Food Control*, 10: 351-352.
- [25] Wolf, C., Scherzinger, M., Wurz, A., Pauli, U., Hübner, P. und Lüthy, J. (2000) Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur Food Res Technol*, 210: 367-372.
- [26] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- [27] Falbe, J. und Regitz, M. (1995) CD Römpp Chemie Lexikon, Version 1.0. Thieme, Stuttgart.
- [28] Piatak, M. Jr., Luk, K.C., Williams, B. und Lifson, J.D. (1993) Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques*, 14: 70-81.

- [29] Meyer, R. (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, 10: 391-399.
- [30] Pietsch, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P. und Wurtz, A. (1997) Screeningverfahren zur Identifizierung "gentechnisch veränderter" pflanzlicher Lebensmittel. *Dtsch Lebensm Rundsch*, 93: 35-38.
- [31] Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. und Kroath, H. (1999) Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem*, 47: 5038-5043.
- [32] Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. und Bunn, H.F. (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 2725-2729.
- [33] Morrison, C. und Gannon, F. (1994) The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta*, 1219: 493-498.
- [34] Hardegger, M., Brodmann, P. und Herrmann, A. (1998) Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur Food Res Technol*, 209: 83-87.
- [35] Datenbank zu Konstrukten genetisch veränderter Pflanzen und ihrer Nachweise, entstanden im Rahmen des EU-Projektes SMT4-CT96-2072, http://www.bgvv.de/GEN_DMIF_APP.html.
- [36] Zimmermann, A., Lüthy, J. und Pauli, U. (2000) Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm-Wiss Technol*, 33: 210-216.
- [37] Windels, P., Taverniers, I., Depicker, A., Bockstaele, E.V. und Loose, M.D. (2001) Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *Eur Food Res Technol*, 213: 107-112.
- [38] Meyer, R. (1995) Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the FLAVR SAVR(TM) tomato as an example. *Z Lebensm Unters Forsch*, 201: 583-586.
- [39] Anonymus (1998) Schweizerisches Lebensmittelbuch. Bundesamt für Gesundheit, Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern.
- [40] Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98: 501-517.
- [41] Kafatos, F.C., Jones, C.W. und Efstratiadis, A. (1979) Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res*, 7: 1541-1552.

- [42] McCabe, M.S., Power, J.B., deLaat, A.M.M. und Davey, M.R. (1997) Detection of single-copy genes in DNA from transgenic plants by nonradioactive Southern blot analysis. *Mol Biotechnol*, 7: 79-84.
- [43] Clementi, M., Menzo, S., Manzin, A. und Bagnarelli, P. (1995) Quantitative molecular methods in virology. *Arch Virol*, 140: 1523-1539.
- [44] Ferre, F. (1992) Quantitative or semiquantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl*, 2: 1-9.
- [45] Foley, K.P., Leonard, M.W. und Engel, J.D. (1993) Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet*, 9: 380-385.
- [46] Cross, N.C.P. (1995) Quantitative PCR techniques and applications. *Br J Haematol*, 89: 693-697.
- [47] Coutlée, F., He, Y., Saint-Antoine, P., Olivier, C. und Kessous, A. (1995) Coamplification of HIV type 1 and beta-globin gene DNA in a nonisotopic polymerase chain reaction assay to control for amplification efficiency. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 11: 363-371.
- [48] Luque, F.A., Caruz, J.A., Pineda, J.A., Torres, Y., Larder, B. und Leal, M (1994) Provirus load changes in untreated and zidovudine treated human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Infect Dis*, 169: 267-273.
- [49] Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J. und Morley, A.A. (1992) Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 13: 444-449.
- [50] Zimmermann, K. und Mannhalter, J.W. (1996) Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques*, 21: 268-279.
- [51] Orlando, C., Pinzani, P. und Pazzagli, M. (1998) Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*, 36: 255-269.
- [52] Kochanowski, B. und Reischl U. (1999) Quantitative PCR: A survey of the present technology. In Kochanowski, B. und Reischl U. (Hrsg.) *Quantitative PCR Protokolls*. Humana Press, Totowa, S. 3-30.
- [53] Hübner, P., Studer, E. und Lüthy, J. (1999) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 10: 353-358.
- [54] Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C. und Willmund, R. (1999) Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control*, 10: 385-389.
- [55] Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Moreano, F. und Engel, K.H. (2000) PCR-based quantification of genetically modified Bt-maize: single-competitive versus dual competitive approach. *Eur Food Res Technol*, 212: 95-99.

- [56] Dahinden, I., von Büren, M. und Lüthy, J. (2001) A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *Eur Food Res Technol*, 212: 228-233.
- [57] von Büren, M., Stadler, M. und Lüthy, J. (2001) Detection of wheat adulteration of spelt flour and products by PCR. *Eur Food Res Technol*, 212: 234-239.
- [58] Raeymaekers, L. (1993) Quantitative PCR - theoretical considerations with practical implications. *Anal Biochem*, 214: 582-585.
- [59] Hayward, A.L., Oefner, P.J., Sabatini, S., Kainer, D.B., Hinojos, C.A. und Doris, P.A. (1998) Modeling and analysis of competitive RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 26: 2511-2518.
- [60] Stolovitzky, G. und Cecchi, G. (1996) Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 12947-12952.
- [61] Raeymaekers, L. (1995) A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Res*, 5: 91-94.
- [62] Alvarez, M., Depino, A.M., Podhajcer, O.L., Pitossi, F.J. (2000) Bias in estimation of DNA content by competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 287: 87-94.
- [63] Siebert, P.D. und Larrick, J.W. (1992) Competitive PCR. *Nature*, 359: 557-558.
- [64] Gallinella, G., Zerbini, M., Musiani, M., Venturoli, S., Gentilomi, G. und Manaresi, E. (1997) Quantitation of parvovirus B19 DNA sequences by competitive PCR: differential hybridization of the amplicons and immunoenzymatic detection on microplate. *Mol Cell Probes*, 11: 127-133.
- [65] Hall, L.L., Bicknell, G.R., Primrose, L., Pringle, J.H., Shaw, J.A. und Furness, P.N. (1998) Reproducibility in the quantification of mRNA levels by RT-PCR-ELISA and RT competitive-PCR-ELISA. *Biotechniques*, 24: 652-658.
- [66] Lahijani, R., Duhon, M., Lusby, E., Betita, H. und Marquet, M. (1998) Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Human Gene Therapy*, 9: 1173-1180.
- [67] Denis, M., Soumet, C., Legeay, O., Arnauld, C., Bounaix, S., Thiéry, R. und Jestin, A. (1997) Development of a semiquantitative PCR assay using internal standard and colorimetric detection on microwell plate for pseudorabies virus. *Mol Cell Probes*, 11: 439-448.
- [68] Guenther, P.C. und Hart, C.E. (1998) Quantitative, competitive PCR assay for HIV-1 using a microplate-based detection system. *Biotechniques*, 24: 810-816.
- [69] Garte, S.J. und Ganguly, S. (1996) Quantitative polymerase chain reaction using homologous internal standards. *Anal Biochem*, 243: 183-186.

- [70] Brunnert, H.J (1997) Heterologe Expression der Neomycinphosphotransferase Typ II und Entwicklung eines PCR-ELISA für den CaMV35S Promotor zum Nachweis gentechnisch veränderter Lebensmittel. Diplomarbeit, Universität Münster.
- [71] Brunnert, H.J., Spener, F. und Börchers, T. (2001) PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. *Eur Food Res Technol*, 213: 366-371.
- [72] Roymans, R.T., Onland, G. und Postma, B.H. (1996) One-day detection of PCR amplified *Chlamydia trachomatis* DNA in clinical samples: ELISA versus Southern blot hybridisation. *J Clin Pathol*, 49: 581-583.
- [73] Alard, P., Lantz, O., Sebagh, M., Calvo, C.F., Weill, D., Chavanel, G., Senik, A. und Charpentier, B. (1993) A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells. *Biotechniques*, 15: 730-737.
- [74] Gautheret, A., Aubin, J.T., Poirel, L., Chopineau, S., Agut, H. und Dussaix, E. (1996) Detection and variant identification of HHV-6 by a non-radioactive hybridization microplate assay for amplimers detection. *J Virol Methods*, 58: 33-40.
- [75] Berg, S., Luneberg, E. und Frosch, M. (1996) Development of an amplification and hybridization assay for the specific and sensitive detection of *Mycoplasma fermentans* DNA. *Mol Cell Probes*, 10: 7-14.
- [76] Dufour, V., Arnauld, C., Lantz, O., Peguillet, I., Morvilliers, K., Emmanuel, A. und Jestin, A. (1999) Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection. *J Immunol Methods*, 229: 49-60.
- [77] Scheu, P., Gasch, A. und Berghof, K. (1999) Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA. *Lett Appl Microbiol*, 29: 416-420.
- [78] Mansy, F., Brancart, F., Liesnard, C., Bollen, A. und Godfroid, E. (1999) A PCR based DNA hybridisation capture system for the detection of human cytomegalovirus. A comparative study with other identification methods. *J Virol Methods*, 80: 113-122.
- [79] Kawai, S., Maekawajiri, S. und Yamane, A. (1993) A simple method of detecting amplified DNA with immobilized probes on microtiter wells. *Anal Biochem*, 209: 63-69.
- [80] Keller, G.H., Huang, D.P. und Manak, M.M. (1989) A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. *Anal Biochem*, 177: 27-32.
- [81] Soumet, C., Ermel, G., Boutin, P., Boscher, E. und Colin, P. (1995) Chemiluminescent and colorimetric enzymatic assays for the detection of PCR-amplified *Salmonella* sp. products in microplates. *Biotechniques*, 19: 792-796.

- [82] Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J. und Jørgensen, P.H. (2001) Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol*, 146: 87-97.
- [83] Grennan, B., O'Sullivan, N.A., Fallon, R., Carroll, C., Smith, T., Glennon, M. und Maher, M. (2001) PCR-ELISA for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry samples. *Biotechniques*, 30: 602-610.
- [84] Ritzler, M. und Altwegg, M. (1996) Sensitivity and specificity of a commercially available enzyme-linked immunoassay for the detection of polymerase chain reaction amplified DNA. *J Microbiol Methods*, 27: 233-238.
- [85] Gilligan, K., Shipley, M., Stiles, B., Hadfield, T.L. und Ibrahim, M.S. (2000) Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Mol Cell Probes*, 14: 71-78.
- [86] Beyer, W., Pocivalsek, S. und Böhm, R. (1999) Polymerase chain reaction-ELISA to detect *Bacillus anthracis* from soil samples - limitations of present published primers. *J Appl Microbiol*, 87: 229-236.
- [87] Grimm, C. und Geisen, R. (1998) A PCR-ELISA for the detection of potential fumonisin producing *Fusarium* species. *Lett Appl Microbiol*, 26: 456-462.
- [88] Callens, M. und De Clercq, K. (1999) Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J Virol Meth*, 77: 87-99.
- [89] Courtney, B.C., Smith, M.M. und Henchal, E.A. (1999) Development of internal controls for probe-based nucleic acid diagnostic assays. *Anal Biochem*, 270: 249-256.
- [90] Landgraf, A., Reckmann, B. und Pingoud, A. (1991) Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal Biochem*, 198: 86-91.
- [91] Ortiz, A. und Ritter, E. (1996) A rapid method for detecting specific amplified PCR fragments in microtiter plates. *Nucleic Acids Res*, 24: 3280-3281.
- [92] Hahn, M., Dörsam, V., Friedhoff, P., Fritz, A. und Pingoud, A. (1995) Quantitative polymerase chain reaction with enzyme linked immunosorbent assay detection of selective digested amplified sample and control DNA. *Anal Biochem*, 229: 236-248.
- [93] Herrmann, K (1983) Exotische Lebensmittel, Inhaltsstoffe und Verwendung. Springer-Verlag, Berlin.
- [94] Studer, E., Rhyner, C., Lüthy, J. und Hübner, P. (1998) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Z Lebensm Unters Forsch*, 207: 207-213.

- [95] Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. und Anklam, E. (1999) IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J AOAC Int*, 82: 923-928.
- [96] Desiderio, A., Aracri, B., Leckie, F., Mattei, B., Salvi, G., Tigelaar, H., Van Roekel, J.S.C., Baulcombe, D.C., Melchers, L.S., DeLorenzo, G. und Cervone, F. (1997) Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interactions*, 10: 852-860.
- [97] Smith, C., Watson, C.F., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W. und Grierson, D. (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 224: 477-481.
- [98] Fangauf, K.W. (1996) Proteinreiche Sojaerzeugnisse. In Heiss, R. (Hrsg.), *Lebensmitteltechnologie - biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren zur Lebensmittelverarbeitung*. Springer, Berlin, S. 243-250.
- [99] Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of μg quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- [100] Börchers, T. (1987) Enzym-Immuno-Assay für kardiales Fettsäurebindungsprotein aus Rinderherz - Entwicklung und erste Anwendungen. Diplomarbeit, Universität Münster.
- [101] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- [102] Holtzhauser, M. (1997) *Biochemische Labormethoden*. Springer, Berlin.
- [103] SantaLucia, J.J. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 1460-1465.
- [104] Jankiewicz, A., Broll, H. und Zagon, J. (1999) The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG § 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer). *Eur Food Res Technol*, 209: 77-82.
- [105] Meyer, R., Chardonens, F., Hübner, P. und Lüthy, J. (1996) Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203: 339-344.
- [106] Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. und Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molec Biol*, 17: 1105-1109.
- [107] Busch, U., Mühlbauer, B., Schulze, M. und Zagon, J. (1999) Development of a reference method for detection of genetically modified tomatoes (Zeneca). *Dtsch Lebensm Rundsch*, 2: 52-56.

- [108] Börchers, T., Franke, R. und Spener, F. (1997) Simplified detection of genetically modified food by PCR-ELISA. In: Food produced by means of genetic engineering. 2nd Status Report: Schreiber, G.A. und Bögl, K.W. (Hrsg.); Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, BgVV-Heft 1: 123-133.
- [109] Fischer, P., Liu, X., Lizotte Waniewski, M., Kamal, I.H., Ramzy, R.M. und Williams, S.A. (1999) Development of a quantitative, competitive polymerase chain reaction--enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* DNA. *Parasitol Res*, 85: 176-183.
- [110] Kohler, K., Rost, A.K. und Remke, H. (1997) Calibration and storage of DNA competitors used for contamination-protected competitive PCR. *Biotechniques*, 23: 722-726.
- [111] Anonymus (1998) Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Sojabohnen durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Kettenreaktion) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde; L23.01.22. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG. Verlag Beuth, Berlin.
- [112] Haugland, R.P. (1999) Molecular Probes - Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, CD-ROM, 7th edition. Eugene, OR, USA.
- [113] Rogan, G., Ream, J., Berberich, S. und Fuchs, R.L. (1992) Enzyme linked immunosorbent assays for quantitation of neomycin phosphotransferase II in genetically modified cotton tissues extracts. *J Agric Food Chem*, 40: 1453-1458.
- [114] Eyring, G. (1996) Tomatenerzeugnisse. In Heiss, R. (Hrsg.), Lebensmitteltechnologie - Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren zur Lebensmittelverarbeitung. Springer, Berlin, S. 205-211.
- [115] Ausubel, F., Brent, M., Kingston, R., Moore, R.E., Seidman, D.D., Smith, J.G. und Struhl, J.A. (1992) Current Protocols in Molecular Biology, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- [116] Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
- [117] Teare, J.M., Islam, R., Flanagan, R., Gallagher, S., Davies, M.G. und Grabau, C. (1997) Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques*, 22: 1170-1174.
- [118] van de Ven, M.T.G., Lanham, P.G. und Brennan, R.M. (1996) Isolation and purification of plant nucleic acids. In Clapp, J.P. (Hrsg.) Species Diagnostic Tools, PCR and other Nucleic Acid Methods. Humana Press, Totowa, NJ, USA.

- [119] Zimmermann, A., Lüthy, J. und Pauli, U. (1998) Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z Lebensm Unters Forsch*, 207: 81-90.
- [120] Anonymus (1997) DIG nucleic detection kit - Produkbeiblatt. Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim.
- [121] McCulloch, R.K., Choong, C.S. und Hurley, D.M. (1995) An evaluation of competitor type and size for use in the determination of messenger-RNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl*, 4: 219-226.
- [122] Arumuganthan, K. und Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Reporter*, 9: 208-218.
- [123] Fuchs, R.L., Heeren, R.A., Gustafson, M.E., Rogan, G.J., Bartnicki, D.E., Leimgruber, R.M., Finn, R.F., Hershman, A. und Berberich, S.A. (1993) Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase-II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein. *Bio/technology*, 11: 1537-1542.
- [124] Anonymus (1996) Protein Blotting - A guide to transfer and detection. BioRad, Hercules, CA, USA.
- [125] Fregien, N. und Davidson, N. (1985) Quantitative *in situ* gel electrophoretic assay for neomycin phosphotransferase activity in mammalian cell lysates. *Anal Biochem*, 148: 101-104.
- [126] Staebell, M., Tomes, D., Weissinger, A., Maddock, S., Marsh, W., Huffman, G., Bauer, R., Ross, M. und Howard, J. (1990) A quantitative assay for neomycin phosphotransferase activity in plants. *Anal Biochem*, 185: 319-323.
- [127] Cabanes-Bastos, E., Day, A.G. und Lichtenstein, C.P. (1989) A sensitive and simple assay for neomycin phosphotransferase II activity in transgenic tissue. *Gene*, 77: 169-176.
- [128] Goldman, P.R. und Northrop, D.B. (1976) Purification and spectrophotometric assay of neomycin phosphotransferase II. *Biochem Biophys Res Commun*, 69: 230-236.
- [129] Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warran, G.W., Wright, M. und Evola, S.V. (1993) Field Performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/technology*, 11: 194-200.
- [130] Rogan, G.J., Dudin, Y.A., Lee, T.C., Magin, K.M., Astwood, J.D., Bhakta, N.S., Leach, J.N., Sanders, P.R. und Fuchs, R.L. (1999) Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready[®] soybeans. *Food Control*, 10: 407-414.

- [131] Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. und Fraley, R.T. (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res*, 15: 1543-1558.
- [132] Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. und Rasmussen, O.F. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol*, 17: 37-45.
- [133] Demeke, T. und Adams, R.P. (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*, 12: 332-334.
- [134] Anonymus (1999) Handbuch zum GeneAmp 5700 *Sequence detection system*. Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA.
- [135] Wiedbrauk, D.L., Werner, J.C. und Drevon, A.M. (1995) Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol*, 33: 2643-2646.
- [136] Wurz, A., Rüggeberg, H., Waiblinger, H.U. und Pietsch, K. (1998) DNA extraction method for the detection of genetically modified soya in soya lecithin. *Dtsch Lebensm Rundsch*, 95: 159-161.
- [137] Tengel, C., Schüßler, P., Sprenger-Haußels, M., Setzke, E. und Balles, J. (2000) Improved detection of genetically modified soya and maize components in cacao containing foods and food additives. *Dtsch Lebensm Rundsch*, 96: 129-135.
- [138] Pauli, U., Liniger, M. und Zimmermann, A. (1998) Detection of DNA in soybean oil. *Z Lebensm Unters Forsch*, 207: 264-267.
- [139] Hübner, P., Studer, E., Häfliger, D., Stadler, M., Wolf, C. und Looser, M. (1999) Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. *Accred Qual Assur*, 4: 292-298.
- [140] Hupfer, C., Mayer, J., Hötzel, H., Sachse, K. und Engel, K.H. (1999) The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *Eur Food Res Technol*, 209: 301-304.
- [141] Straub, J.A., Hertel, C. und Hammes, W.P. (1999) The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. *Eur Food Res Technol*, 210: 62-67.
- [142] Hupfer, C., Hötzel, H., Sachse, K. und Engel, K.H. (1998) Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch*, 206: 203-207.
- [143] Straub, J.A., Hertel, C. und Hammes, W.P. (1998) Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya beans in wheat bread production. *Z Lebensm Unters Forschung*, 208: 77-82.

- [144] Gutierrez, R., Garcia, T., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez, P.E. und Martin, R. (1998) Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Lett Appl Microbiol*, 26: 372-376.
- [145] Taniguchi, A., Kohsaka, H. und Carson, D.A. (1994) Competitive RT-PCR ELISA - a rapid, sensitive and nonradioactive method to quantitate cytokine messenger-RNA. *J Immunol Methods*, 169: 101-109.
- [146] Alexandre, I., Zammateo, N., Ernest, I., Ladriere, J.M., Le, L., Hamels, S., Chandelier, N., Vipond, B. und Remacle, J. (1998) Quantitative determination of CMV DNA using a combination of competitive PCR amplification and sandwich hybridization. *Biotechniques*, 25: 676-683.
- [147] Dong, F., Allawi, H.T., Anderson, T., Bruce, P.N. und Lyamichev, V.I. (2001) Secondary structure prediction and structure-specific sequence analysis of single stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, 29: 3248-3257.
- [148] Niemeyer, C.M. und Blohm, D. (1999) DNA-Mikroarrays. *Angew Chem*, 111: 3039-3043.
- [149] Lantz, O., Bonney, E. und Taoufik, Y. (1999) Quantifying amplicons with ELISA. In Kochanowski, B. und Reischl, U. (Hrsg.): *Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, Totowa, S. 157-170.
- [150] Raeymaekers, L. (2000) Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol*, 15: 115-122.
- [151] Mathieu-Daude, F., Welsh, J., Vogt, T. und McClelland, M. (1996) DNA rehybridization during PCR: the 'C₀t effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res*, 24: 2080-2086.
- [152] Raeymaekers, L. (1999), General principles in quantitative PCR. In Kochanowski, B. und Reischl, U. (Hrsg.): *Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, Totowa, S.31-43.
- [153] Serth, J., Panitz, F., Herrmann, H. und Alves, J. (1998) Single-tube nested competitive PCR with homologous competitor for quantitation of DNA target sequences: theoretical description of heteroduplex formation, evaluation of sensitivity, precision and linear range of the method. *Nucleic Acids Res*, 26: 4401-4408.
- [154] Henley, W.N., Schuebel, K.E. und Nielsen, D.A. (1996) Limitations imposed by heteroduplex formation on quantitative RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 226: 113-117.
- [155] Galla, H.J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [156] Kramer, G.N., Pauwels, J., Le Guern, L., Schimmel, H. und Trapmann, S. (2001) Recent production of candidate reference materials at IRMM. *Fresenius J Anal Chem*, 370: 142-146.

- [157] Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. und 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: 7276-7280.
- [158] Hübner, P., Waiblinger, H.U., Pietsch, K. und Brodmann, P. (2001) Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J AOAC Int*, 84: 1855-1864.
- [159] Prokisch, J., Zeleny, R., Trapmann, S., Guern, L.L., Schimmel, H., Kramer, G.N. und Pauwels, J. (2001) Estimation of the minimum uncertainty of DNA concentration in a genetically modified maize sample. *Fresenius J Anal Chem*, 370: 935-939.
- [160] Kay, S. und Van den Eede, G. (2001) The limits of GMO detection. *Nat Biotechnol*, 19: 405.
- [161] Fagan, J., Schoel, B., Haegert, A., Moore, J. und Beeby, J. (2001) Performance assessment under field conditions of a rapid immunological test for transgenic soybeans. *Int J Food Sci Technol*, 36: 357-367.

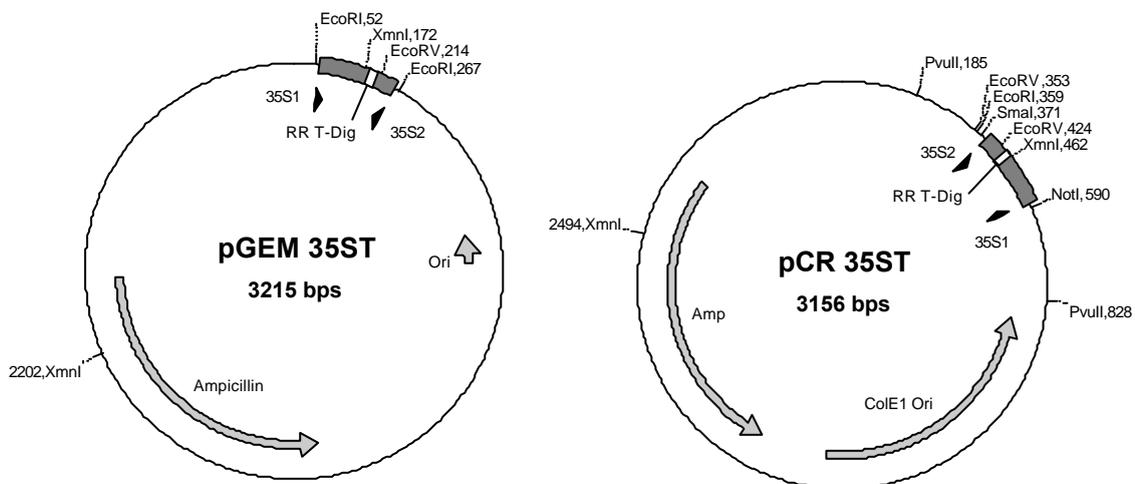
9 Anhang

9.1 Vektorkarten

Den in dieser Arbeit klonierten Plasmiden liegen kommerzielle Klonierungsvektoren zu Grunde, die in transformierten Bakterien mit hoher Kopienzahl vorliegen.

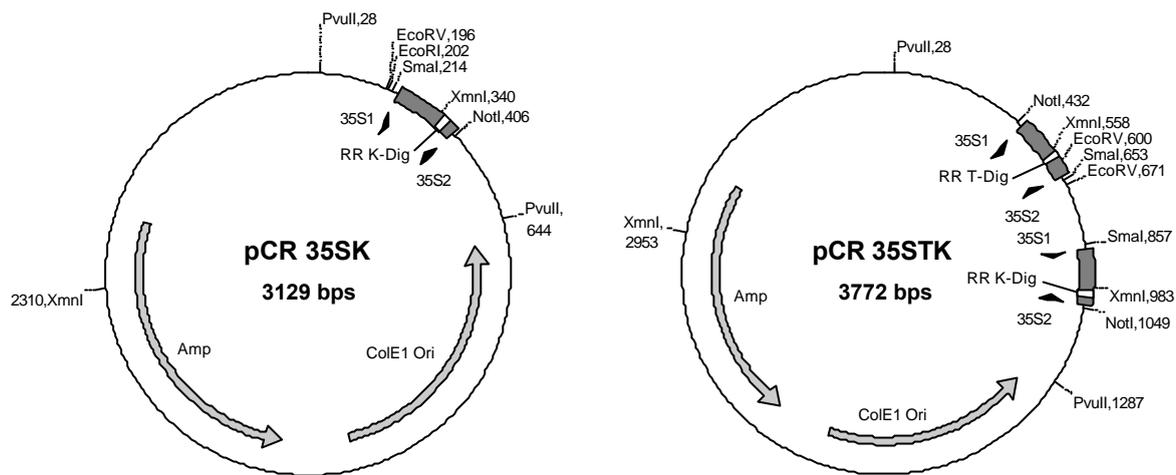
Der pGEM T Easy-Vektor der Fa. Promega erlaubt das Einklonieren von PCR-Fragmenten mit 3' A-Überhängen; Produktplasmide, die aus ihm hervorgegangen sind, beginnen mit der Bezeichnung „pGEM“. Der pCR Skript-Vektor der Fa. Stratagene dient zum Einklonieren von PCR-Produkten mit glatten Enden, er ist mit dem Ampicillin- oder Chloramphenicol-Resistenzgen ausgestattet, die Bezeichnungen von Produktplasmiden beginnen jeweils mit „pCR“.

Weiter gilt die Konvention, dass die enthaltene DNA-Sequenz, bezeichnet nach derjenigen PCR (35S: CaMV35S-PCR, RR: RR-PCR, GM: GM0304- und GM0104-PCR), die zu einem Produkt führt und die Information, ob das Target- oder/und Kompetitor-Produkt entsteht, im Namen angezeigt wird. Die Artefaktsequenz wurde mit der Bezeichnung „Arte“ gekennzeichnet.



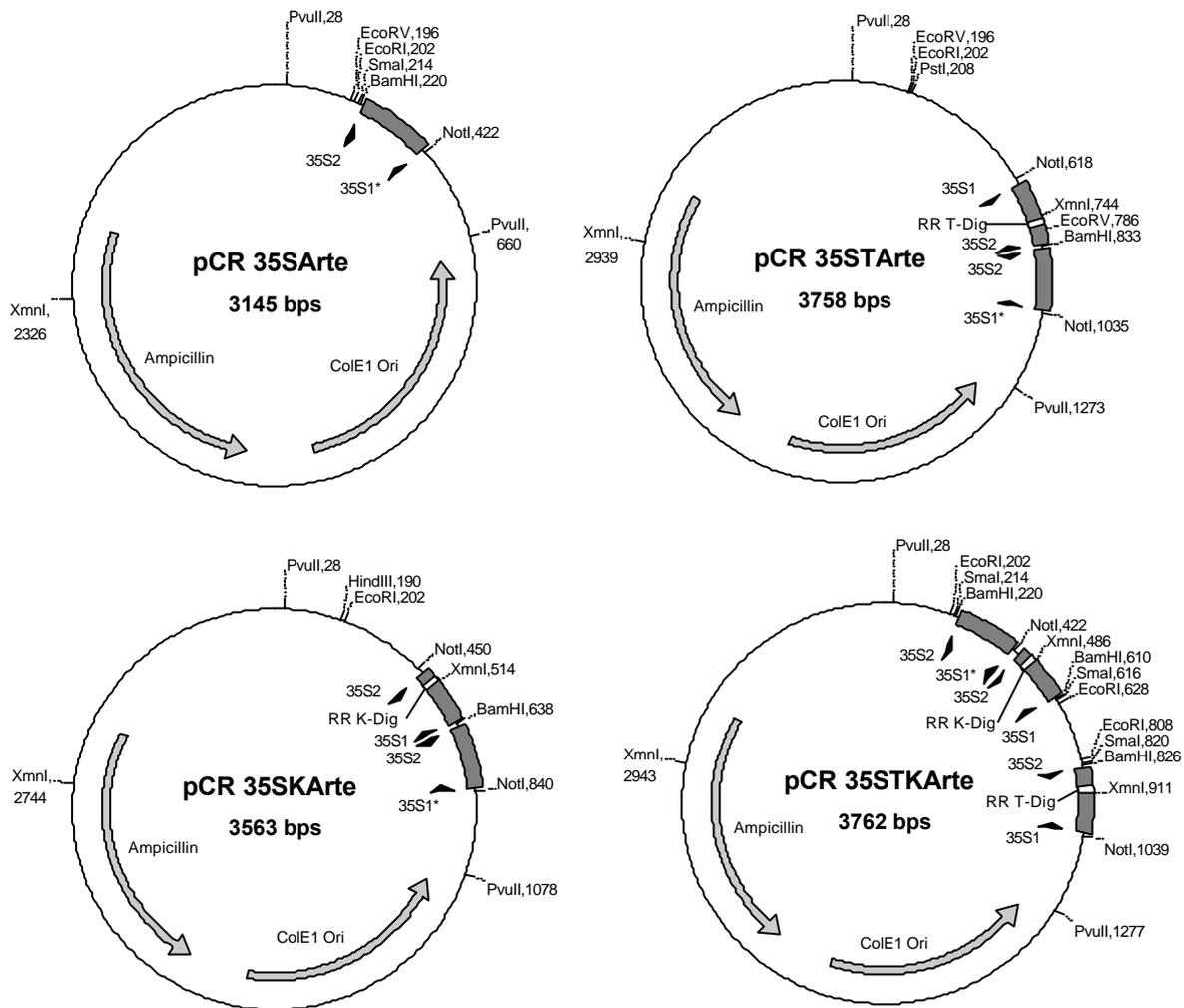
Vektorkarten 1: Plasmide mit der Target Sequenz der CaMV35S-PCR

Die möglichen Primer und die Target-Sondenbindungsstelle (RR T-Dig) des pGEM 35ST (Klonierung S.67) und pCR 35ST (Klonierung S.89) sind eingezeichnet. Vom Primer 35S1 ausgehend, vier Basen zur Insertmitte verschoben, kann ebenfalls der Primer 35S3-bio binden.



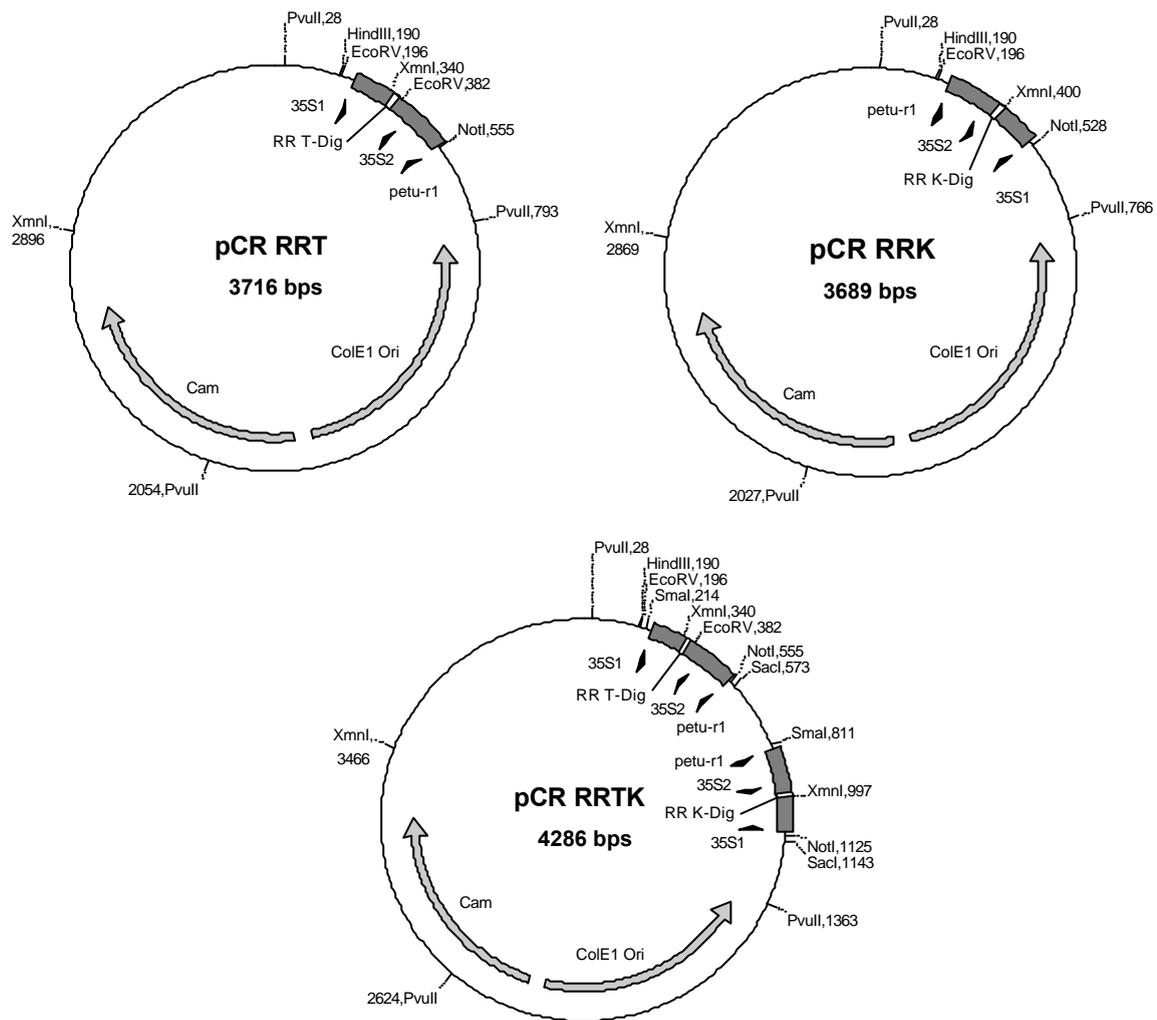
Vektorkarten 2: Kompetitor- und Normierungsplasmid der CaMV35S-PCR

Die möglichen Primer und die Kompetitor-Sondenbindungsstelle (RR K-Dig) des pCR 35SK (Klonierung S.68) und pCR 35STK (Klonierung S.89) sind eingezeichnet. Vom Primer 35S1 ausgehend, vier Basen zur Insertmitte verschoben, kann ebenfalls der Primer 35S3-bio binden.



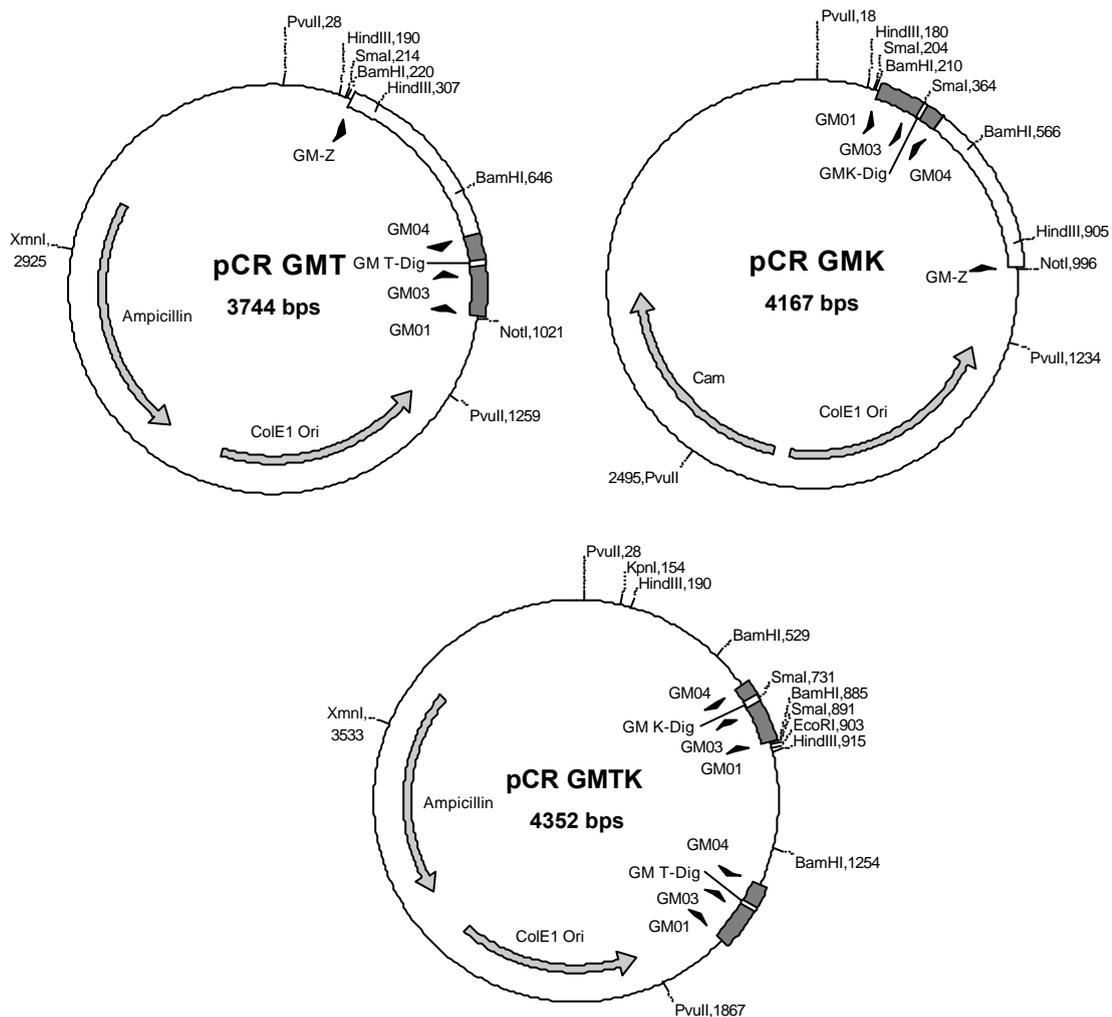
Vektorkarten 3: Heterologer Artefakt-Kompetitor und seine Kombinationen mit homologen CaMV35S Target- und Kompetitor-Sequenzen

Die möglichen Primer und die Target- (RR T-Dig) oder Kompetitor-Sondenbindungsstelle (RR K-Dig) der pCR 35SArte (Klonierung S.72), pCR 35STArte (Klonierung S.101), pCR 35SKArte (Klonierung S.101) und pCR 35STKArte (Klonierung S.101) sind eingezeichnet. Außer bei der Artefakt-Sequenz kann vom Primer 35S1 ausgehend, vier Basen zur Insertmitte verschoben, ebenfalls der Primer 35S3-bio binden. Beim Artefaktinsert sind daher die 35S1-Primer gekennzeichnet (*).



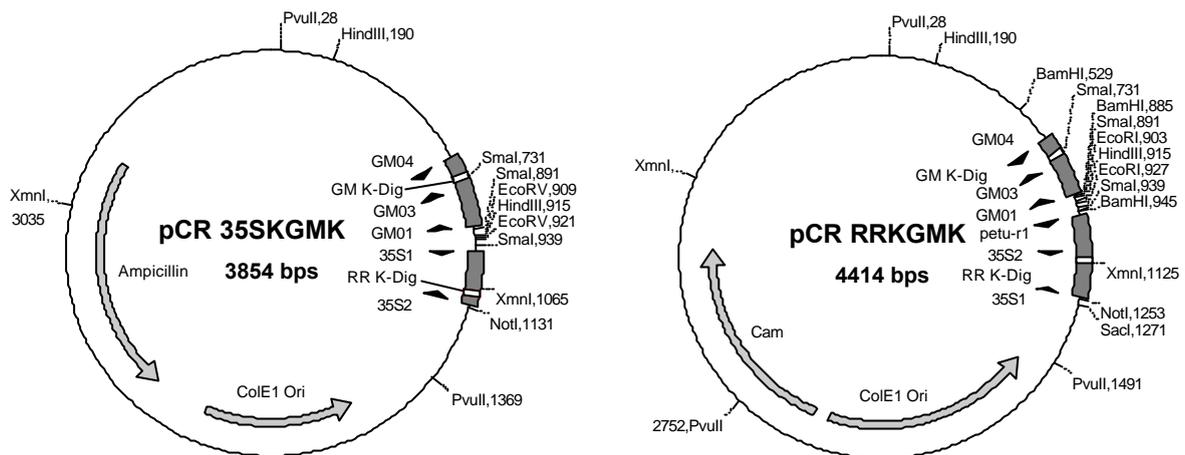
Vektorkarten 4: Target-, Kompetitor- und Normierungs-Plasmid der RR-PCR

Die möglichen Primer und die Target- oder Kompetitor-Sondenbindungsstelle der pCR RRT (Klonierung S.69), pCR RRK (Klonierung S.68) und pCR RRTK (Klonierung S. 91) sind eingezeichnet. Vom Primer 35S1 ausgehend, vier Basen zur Insertmitte verschoben, kann ebenfalls der Primer 35S3-bio binden. Diese Plasmide können sowohl in der CaMV35S-PCR (Primer 35S3-bio/35S2) als auch in der RR-PCR (Primer 35S-bio/ petu-r1) eingesetzt werden.



Vektorkarten 5: Target-, Kompetitor- und Normierungs-Plasmide der GM-PCRs

Die möglichen Primer und die Target- oder Kompetitor-Sondenbindungsstelle der pCR GMT (Klonierung S.70), pCR GMK (Klonierung S.71) und pCR GMTK (Klonierung S.91) sind eingezeichnet. Diese Plasmide können sowohl in der GM0304-PCR (Primer GM03/GM04-bio) als auch in der GM0104-PCR (Primer GM01/GM04-bio) eingesetzt werden. Der Primer GM-Z diente lediglich zur Konstruktion der Plasmide.



Vektorkarten 6: Doppelkompetitoren

Die möglichen Primer und die Target- oder Kompetitor-Sondenbindungsstelle der pCR 35SKGMK (Klonierung S.71) und pCR RRRKGMK (Klonierung S.71) sind eingezeichnet. Diese Plasmide können jeweils in zwei PCRs als Matrize dienen. Vom Primer 35S1 ausgehend, vier Basen zur Insertmitte verschoben, kann ebenfalls der Primer 35S3-bio binden.

9.2 EU-Ringversuchsprotokoll

Interlaboratory trial: PCR-ELISA RR-Soja

-1-

SMT4-CT96-2072

Partner 5, ICB-Münster

Interlaboratory trial „Semiquantitative detection of soybean flour containing RoundUpReady® soybean by a PCR-ELISA for the CaMV35S promoter“

1. Concept and scope

This interlaboratory trial has three different aims: 1. For the first time a PCR-ELISA [1] based on hybridisation of Dig-labelled oligonucleotide probes will be used in an interlaboratory trial for detection of genetically modified organisms (GMOs). 2. In contrast to earlier ringtrials, an internal amplification control will be used instead of a second PCR (e.g. with the lectin gene as target) usually performed as external amplification control. For this an internal DNA-standard (competitor) is added to the DNA extract of the sample. This competitor is characterised by the same primer binding sites and amplification efficiency as the target. Both PCR products can be detected by hybridisation with their respective DNA probes. 3. Moreover, by adding defined amounts of internal standard and genomic DNA to the amplification mix, classification of soybean samples with different contents of RoundUp Ready® into three groups will be possible. Samples are GMO negative if only the competitor probe (internal amplification control), but not the target probe yields an ELISA signal. A threshold level is defined by equivalency of ELISA signals for target and competitor probe and under the conditions of this ringtrial is set to approximately 0.4% GMO. Thus samples with a target signal lower or higher than the competitor signal have GMO contents below or above the threshold level, respectively.

DNA is extracted from soybean flour according to the CTAB precipitation method [2]. Of this protein- and RNA free DNA preparation 125 ng (UV-measurement) are used in the competitive PCR. A part of the CaMV35S promoter (191 bp) is amplified using a 5'-biotinylated forward primer. Prior to the main ringtrial with unknown samples the PCR conditions and the subsequent ELISA will be established in a short pretrial. In the main trial the mastermix contains 10^4 copies of the internal standard (competitor) per sample. Of each sample two extracts will be prepared. With each of these one PCR will be performed and the PCR products will be analysed in duplicate in a streptavidin coated microtiter plate with both Dig-labelled oligonucleotide probes in different wells. Single stranded DNA is generated by alkaline treatment and hybridised to the Dig-labelled T- or C-probes (specific for target and competitor, respectively). For detection an anti-Dig-alkaline phosphatase conjugate is bound and enzymatic conversion of the substrate p-nitrophenylphosphate is monitored with an ELISA reader at 405 nm. The samples are classified by comparison of target and competitor signals.

Construction of competitor DNA, development of the semi-quantitative PCR procedure and the PCR-ELISA will be described elsewhere [3].

2. Samples

Each participant receives the following material:

- 6 vials with soybean flour of unknown RoundUpReady® content (1 g).
- 1 negative control flour with 0% RoundUpReady® soybean (1 g)
- 1 positive control flour with 0.5% RoundUpReady® soybean (1 g)
- 1 reference DNA extract prepared from flour with 0.5% RoundUpReady® soybean (30 µl x 25 ng/µl)
- internal standard-DNA (competitor): 2×10^4 copies/µl (20 µl)

other materials provided:

- RNase A (1.1 ml x 20 mg/ml)
- Proteinase K (1 ml x 0.6 Anson-U/ml)
- 2 streptavidin coated microtiter plates (strips)
- AmpliTaq Gold DNA polymerase with 10 x buffer (5 µl)
- dNTP mix
- Primer 35S3-bio (150 µl x 5 pmol/µl)
- Primer 35S2 (150 µl x 5 pmol/µl)
- T-probe (15 µl x 20 pmol/µl)
- C-probe (15 µl x 20 pmol/µl)
- Blocking reagent (1 g)
- Bovine serum albumin (BSA) (200 mg)
- Anti-Dig-F_{ab}-alkaline phosphatase conjugate (30 µl)
- pNPP tablets (5 pcs)

Competitor DNA, primer and probes may only be used in this ringtrial!

3. Reagents

In general, reagents suitable for molecular biology should be used. Water should be bidistilled (or of comparable quality) and sterile. Buffers for DNA extraction should be autoclaved.

3.1 DNA-extraction

Hexadecyltrimethylammoniumbromide (CTAB)
 Chloroform/isoamylalcohol (24:1)
 Ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt (Na₂-EDTA)
 Isopropanol
 Ethanol (70% v/v)
 Sodium chloride (NaCl)
 Hydrochloric acid (HCl)
 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris-base)
 RNase A (20 mg/ml): Inactivate DNases by incubation at 70°C (30 min). Store at 4°C (up to 1 week) or at -20°C
 Proteinase K (0.6 Anson-U/ml, Merck): store at 4°C!
 CTAB-extraction buffer: CTAB (20 g/l), NaCl (1.4 mol/l), Tris-base (0.1 mol/l), Na₂-EDTA (20 mmol/l),
 adjusted to pH = 8.0 with HCl
 CTAB-precipitation buffer: CTAB (5 g/l), NaCl (40 mmol/l), do not adjust pH
 NaCl-solution (1.2 mol/l)
 Tris-HCl (2 mM, pH 8.5)

3.2 PCR

Taq-DNA polymerase (5 U/μl): AmpliTaq Gold (PE Biosystems)
 PCR buffer solution (10 x): GeneAmp 10 x PCR buffer, containing MgCl₂ (15 mmol/l)
 dNTPs (2.5 mmol/l each)
 Primer 35S3-bio (5 pmol/μl): 5'-Biotin-CTACAAATGCCATCATTGCG-3'
 Primer 35S2 (5 pmol/μl): 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'
 Competitor DNA (2 x 10⁴ copies/μl): For pretrial prepare 20 μl of a 1 x 10³ copies/μl solution
 by 1:10 dilution with Tris-HCl (2 mmol/l, pH 8.5, see 3.1)

optional: mineral oil
 Water, suitable for PCR

3.3 ELISA

Disodium hydrogenphosphate (Na₂HPO₄)
 Monopotassium dihydrogenphosphate (KH₂PO₄)
 Sodium chloride (NaCl)
 Potassium chloride (KCl)
 Sodium citrate
 Sodium hydroxide (NaOH)
 Hydrochloric acid (HCl)
 Tween-20
 Bovine serum albumin (BSA)
 Blocking reagent (Roche Diagnostics)
 N-Lauroylsarcosine
 Sodium dodecyl sulfate (SDS)
 T-probe (20 pmol/μl): 5'-Digoxigenin-TTGCTTTGAAGACGTGGTTG-3'
 C-probe (20 pmol/μl): 5'-Digoxigenin-TTCGATGTTAGCAAGCTCCA-3'
 Anti-Dig F_{ab}-alkaline phosphatase (Roche Diagnostics)
 Sodium bicarbonate (NaHCO₃)
 Sodium carbonate (Na₂CO₃)
 p-Nitrophenyl phosphate, disodium, tablets (pNPP, 5 mg/tablet)
 Magnesium chloride (MgCl₂)
 Streptavidin coated microtiter strips, 16-20 pmol biotin-binding capacity per well
 10x Phosphate buffered saline (10x PBS): NaCl (1.37 mol/l), KCl (26.8 mmol/l), Na₂HPO₄ (79.9 mmol/l),
 KH₂PO₄ (14.7 mmol/l), pH 7.4. Dilute 1:10 to prepare PBS-T.
 PBS-T: 1x PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20
 PBS-T-BSA: PBS-T containing 0.5% (w/v) BSA

Denaturation solution: NaOH (0.2 mol/l), check pH \approx 13,3

5x Sodium saturated citrate (5x SSC): NaCl (750 mmol/l), sodium citrate (75 mmol/l), pH 7.0 with HCl

Hybridisation buffer: 5x SSC, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.02% (w/v) SDS, 1% (w/v) blocking reagent.

Prepare 0.5 l of 5 x SSC with N-lauroylsarcosine and SDS and use 50 ml of this to dissolve 0.5 g blocking reagent by heating (e.g. several pulses in a microwave oven, do not boil). Stir until the blocking reagent is completely dissolved (opaque solution).

Substrate buffer: NaHCO₃ (35 mmol/l), Na₂CO₃ (15 mmol/l), MgCl₂ (3 mmol/l), pH 9.6

Substrate solution: prepare always fresh by dissolving 2 pNPP-tablets in 10 ml substrate buffer

Stop solution: NaOH (0.75 mol/l)

Prepare PBS-T-BSA fresh or store at maximum for 2 days at 4°C. Hybridisation buffer may be stored at -20°C, sterile 5x SSC at room temperature.

4. Equipment

4.1. DNA extraction

sterile, aerosol protected filtertips; 2 ml and 1.5 ml reaction vessels; micro centrifuge; block-heater for incubations at 65°C; UV-photometer; quartz-microcuvettes.

4.2 PCR

Thermocycler (with or without heated lid); thin-walled reaction vessels; sterile, aerosol protected filtertips.

4.3 ELISA

Multichannel pipet or Multipette; optional: ELISA-washer; microtiter plate reader equipped with 405 nm filter; incubator or hybridisation oven for 37°C incubations.

5. Procedure

Precautions to prevent contaminations have to be thoroughly followed. E.g. three separate rooms and dedicated laboratory coats and pipets should be used for extraction, PCR assembly and in particular post-amplification steps like the hybridisation ELISA. Only aerosol protected filtertips may be used for DNA-extraction and PCR.

5.1 DNA-extraction

This DNA extraction procedure is similar to that described in ref. [2]. The two extractions (A and B) should not be performed at the same time. All centrifugations have to be carried out at 12 000 - 15 000 g. In our laboratory the following protocol yields DNA extracts with concentrations ranging from 75 to 120 ng/μl.

- 5.1.1 fill 100 mg homogeneous sample in 2 ml reaction vessel
- 5.1.2 add 600 μl CTAB-extraction buffer, 20 μl proteinase K und 20 μl RNase A and mix well
- 5.1.3 incubate for >2 h at 60 to 65°C, mix from time to time (or permanently)
- 5.1.4 centrifuge for 10 min
- 5.1.5 transfer aqueous solution (approx. 300 μl) into new 1.5 ml vessel
- 5.1.6 add 350 μl chloroform-isoamylalcohol and mix by vortexing
- 5.1.7 centrifuge for 10 min to separate phases
- 5.1.8 transfer aqueous solution (approx. 250 μl) into new vessel
- 5.1.9 add 2-fold volume CTAB-precipitation buffer
- 5.1.10 incubate for 60 min at room temperature (RT)
- 5.1.11 centrifuge for 10 min
- 5.1.12 discard supernatant
- 5.1.13 dissolve precipitate in 350 μl NaCl-solution and add 3 μl RNase A, incubate for 5 min at RT
- 5.1.14 add 350 μl chloroform-isoamylalcohol
- 5.1.15 centrifuge for 10 min to separate phases
- 5.1.16 transfer aqueous solution (approx. 300 μl) into new vessel
- 5.1.17 add 0.8-fold volume isopropanol and mix
- 5.1.18 let precipitate for 30 min at RT
- 5.1.19 centrifuge for 10 min

- 5.1.20 discard supernatant thoroughly
- 5.1.21 wash pellet with 500 μ l 70% (v/v) ethanol
- 5.1.22 centrifuge for 5 min
- 5.1.23 discard supernatant thoroughly
- 5.1.24 dry DNA-pellet (be careful not to overdry)
- 5.1.25 dissolve DNA-pellet for 20 min at 60°C in 100 μ l Tris-HCl (2 mmol/l, pH 8,5)
- 5.1.26

5.2 Quantitation of DNA by UV-spectrometry

In order to use each time the same amount of genomic DNA in the semi-quantitative PCR, the DNA concentration of the extract has to be determined as precisely as possible. In this ring trial quantitation by UV-spectrometry will be used. Estimation of DNA concentration by means of an agarose gel is not sufficient. The DNA should be free from those impurities that affect UV-quantitation. This is indicated by a ratio of the absorptions at 260 nm and 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) close to 1.8. The DNA-solution used for UV-quantitation must not be used for PCR to prevent contaminations!

- 5.2.1 centrifuge DNA obtained in step 5.1.25 (10 min, 15 000 g)
- 5.2.2 transfer 90 μ l (at the most) of the supernatant without disturbing the pellet into a new reaction vessel
- 5.2.3 dilute an aliquot 1:15 with Tris-HCl (2 mmol/l, pH 8.5), choose volume sufficient for quartz-microcuvette.
- 5.2.4 record OD_{260} , OD_{280} and OD_{320} using Tris-HCl (2 mmol/l, pH 8.5) as reference. Subtract OD_{320} from OD_{260} and OD_{280} for baseline correction (Tab. 7).
- 5.2.5 calculate DNA concentration according to: $OD_{260} = 1$ for 1 cm optical path and a DNA-concentration of 50 ng/ μ l
- 5.2.6 adjust one aliquot of the remaining DNA-solution to 25 ng/ μ l by dilution with Tris-HCl (2 mmol/l, pH 8.5).

5.3 PCR

For PCR AmpliTaq Gold polymerase (Perkin Elmer) is used in an assay volume of 25 μ l. In the pretrial a PCR (3 reactions) with 10^4 copies of competitor in the absence (competitor control) and presence (target control) of a reference DNA extract from 0.5% GMO soybean flour (provided with the ringtrial material) will be done. As a master mix control a PCR without any template DNA is included (Table 1). For the main trial (20 reactions) a reaction mix containing 10^4 copies internal standard-DNA (competitor) per reaction is pipetted as described in Table 2. DNA from both extractions (A and B) of the samples is analysed in parallel by PCR (using the same master mix for a total of 20 PCRs, Tab. 4 B). To each 20 μ l mastermix intended for the flour samples 5 μ l DNA extract (125 ng, step 5.2.6) is added. As a reagent control (RC A, RC B) the Tris-HCl buffer of step 5.1.25 is used. The reference DNA extract (from 0.5% GMO flour) is also included in both PCR sets. As additional extraction controls soybean flours with 0% and 0.5% GMO content are provided.

In PCR-cyclers without heated lid the reaction mixture is overlaid with mineral oil. The PCR-program (Tab. 3) is suitable for most PCR-cyclers, an optimisation of the annealing temperature should normally not be necessary for the ringtrial. For quantitation of amplicons the hybridisation ELISA (5.4) will be used. No detection of PCR products by agarose gel electrophoresis is necessary.

Table 1: Pretrial PCR**A) Master mix (without competitor)**

reagent	concentration	amount	volume/ reaction	volume/ 4 reactions
H ₂ O			6.4 µl	25.6 µl
dNTP mix	2.5 mmol/l	5 nmol	2 µl	8 µl
10x buffer	10 x		2.5 µl	10 µl
Primer 35S3-bio	5 pmol/µl	10 pmol	2 µl	8 µl
Primer 35S2	5 pmol/µl	10 pmol	2 µl	8 µl
AmpliTaq Gold	5 U/µl	0.5 U	0.1 µl	0.4 µl

B) pipetting scheme

number	reaction	master mix	Tris-HCl (pH 8.5)	template
I	master mix control	15 µl	10 µl	-
II	competitor control	20 µl	5 µl	5 µl competitor ¹⁾
III	target control	20 µl	-	5 µl competitor ¹⁾ + 5 µl reference DNA extract

¹⁾ 2 x 10³ copies/µl, see 3.2.

5.4 ELISA

As a post-PCR analysis the ELISA like the agarose gel electrophoresis requires the usual precautions to prevent contaminations!

The PCR products of the pretrial will be analysed with both probes in a hybridisation ELISA (Table 4 A). The arrangement of the PCR products obtained in the main trial is shown in Table 4 B. PCR products of both extractions are analysed in duplicate in the same hybridisation-ELISA. Amplicons bound in the wells of the plate are analysed with the C-probe and T-probe, respectively. Thus for one PCR 4 wells are needed, each receiving 2 µl of the PCR product. To reduce pipetting errors, 10 µl of the PCR product are diluted with 490 µl PBS-T. Of this prediluted mix 100 µl are added to each of the 4 wells. In all subsequent incubations a volume of 100 µl is used as well. Between steps the wells have to be washed three times with at least 200 µl PBS-T (using either an ELISA-washer or a multichannel pipet/Multipette). The ELISA procedure is described in detail in Table 5.

Table 2: Scheme for pipetting of the PCR for the main trial

<i>reagent</i>	<i>concentration</i>	<i>amount</i>	<i>volume/ reaction</i>	<i>for 21 reactions</i>	<i>remarks</i>
H ₂ O			10.9 µl	228.9 µl	}
dNTP mix	2.5 mmol/l	5 nmol	2 µl	42 µl	
10 x buffer	10-fold		2.5 µl	52.5 µl	
primer 35S3-bio	5 pmol/µl	10 pmol	2 µl	42 µl	} master mix
primer 35S2	5 pmol/µl	10 pmol	2 µl	42 µl	(20 µl/reaction)
competitor DNA ¹⁾	2 x 10 ⁴ copies/µl	10 ⁴ copies	0.5 µl	10.5 µl	
AmpliTaq gold	5 U/µl	0.5 U	0.1 µl	2.1 µl)
Tris-HCl (pH 8.5)	2 mmol/l		5 µl		reagent control ²⁾
DNA extract	25 ng/µl	125 ng	5 µl		samples, reference DNA

¹⁾ competitor DNA as provided with the reagents

²⁾ reagent controls RC A and RC B contain only buffer used for dissolving the DNA

Table 3: PCR program

<i>step</i>	<i>time / min:s</i>	<i>temperature / °C</i>	
initial denaturation	10:00	94	
denaturation	00:30	94	}
annealing	00:30	55	} 50 cycles
elongation	01:00	72	}
final elongation	05:00	72	

Interlaboratory trial: PCR-ELISA RR-Soja

-7-

Table 4: Arrangement of the samples on the plate

blank: PBS-T instead of PCR-products as ELISA blank
 RC: PCR-reagent control
 0%: Negative control, 0% GMO
 0.5%: Positive control, 0.5% GMO (close to the threshold level)
 Ref: Reference DNA extract (0.5% GMO)

Note that ELISA strips should be labelled to allow identification.

A) pretrial

	1	2
A	blank)
B	pretrial I	}T-probe
C	pretrial II	
D	pretrial III)
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
E	blank)
F	pretrial I	} C-probe
G	pretrial II	
H	pretrial III)

B) main trial

	T-probe						C-probe					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank 1		Sample 1 A		Sample 5 A		blank 1		Sample 1 A		Sample 5 A	
B	blank 2		Sample 1 B		Sample 5 B		blank 2		Sample 1 B		Sample 5 B	
C	RC A ¹⁾		Sample 2 A		Sample 6 A		RC A ¹⁾		Sample 2 A		Sample 6 A	
D	RC B ¹⁾		Sample 2 B		Sample 6 B		RC B ¹⁾		Sample 2 B		Sample 6 B	
E	0% A		Sample 3 A		Ref A ¹⁾		0% A		Sample 3 A		Ref A ¹⁾	
F	0% B		Sample 3 B		Ref B ¹⁾		0% B		Sample 3 B		Ref B ¹⁾	
G	0.5% A		Sample 4 A		Pretrial II ²⁾		0.5% A		Sample 4 A		Pretrial II ²⁾	
H	0.5% B		Sample 4 B		Pretrial III ²⁾		0.5% B		Sample 4 B		Pretrial III ²⁾	

¹⁾two PCRs with the same solution (Tris/HCl or template)

²⁾repeated measurement of PCR product from pretrial (additional control of ELISA)

Table 5: ELISA procedure

No	step	solution	incubation¹⁾
1	predilution	mix 10 µl PCR product with 490 µl PBS-T	
2	binding	add 100 µl prediluted PCR mix (= 2 µl PCR product) to wells	30 min, RT
	3 x wash ²⁾	PBS-T	RT
3	denaturation	0.2 mol/l NaOH	5 min, RT
	3 x wash	PBS-T	RT
4	hybridisation	20 pmol/ml T- or C-probe in hybridisation buffer ³⁾	30 min, 37°C
	4 x wash	PBS-T	RT
5	immuno detection	anti-Dig-F _{ab} -AP-conjugate 1:1000 in PBS-T-BSA	30 min, RT
	4 x wash	PBS-T	RT
6	colour reaction	pNPP (1 mg/ml) in substrate buffer ⁴⁾ ; measure plate at 405 nm after 20 min; repeat until highest OD ₄₀₅ values (e.g. reagent controls with C-probe) are above 1	20 - 60 min, 37°C
7	stop	0.75 mol/l NaOH	RT
8	final reading	document absorptions at 405 nm ⁵⁾	

¹⁾ Incubations (100 µl) may be done with or without shaking.

²⁾ All wash steps should be done with at least 200 µl. After incubations or washing steps the microtiter wells are emptied by means of an ELISA washer or by flicking the plate over a sink. To remove residual washing buffer after the last wash step, plates should be hit on a wad of paper towels. Always use a fresh paper towel on top.

³⁾ dilute stock solution (20 µmol/l) 1:1000 in hybridisation buffer. Pipet probes as indicated in Table 4.

⁴⁾ prepare fresh (10 min before use)

⁵⁾ ELISA-blanks are typically < 0.1 OD₄₀₅.

6. References

- [1] Börchers, T., Franke, R. and Spener, F. (1997) Simplified detection of PCR products by PCR ELISA. In „Foods produced by means of genetic engineering, 2nd status report“. G.A. Schreiber, K.W. Bögl (Eds), BgVV Heft 1/1997, pp. 123-133
- [2] Wurz, A et al., (1999) Report Interlaboratory trial on RoundupReady[®] soybeans
- [3] Brunnert, H.J., Spener, F., and Börchers, T., manuscript in preparation

7. Evaluation

7.1 UV-quantitation

Results of the UV-measurements have to be documented in Table 7.

7.2 ELISA measurements

From each ELISA double determination ($OD1^T$, $OD2^T$ for T-probe, $OD1^C$, $OD2^C$ for C-probe) means OD^T and OD^C and deviation from mean $\Delta OD^T = |OD^T - OD1^T|$ (and analogous for ΔOD^C) are calculated. These are documented in Table 8. In the pretrial no significant signal should be obtained with both probes for the pretrial I product. Product II should yield a significant signal only with the C-probe, product III with both probes. In the main trial, the reagent blank (RC A and RC B) and the 0% control flour should give a signal close to the ELISA blank (Table 8B) with the T-probe (OD^T). On the other hand, here the C-probe should yield a signal (OD^C) clearly above the blank (internal amplification control). Signals with both probes are considered as significant if $OD > 2 \times OD_{ELISA\ blank}$. Since ELISA blanks are slightly different with both probes, signals have to be compared with their corresponding blanks ($OD^T_{ELISA\ blank}$ or $OD^C_{ELISA\ blank}$). Moreover, signals for the positive controls (0.5% flour and reference DNA extract) have to be significantly higher than ELISA blanks for both, the T-probe (OD^T) and the C-probe (OD^C).

7.3 Criteria for evaluation

In preliminary experiments a threshold level, defined as the GMO content yielding identical signals for both probes in the PCR-ELISA ($OD^T = OD^C$), of $0.4\% \pm 0.2\%$ has been established. This trial aims to classify soybean flour containing 0%, 0.1%, 1% and 2% GMO into three different categories relative to the threshold level by simply comparing OD^T and OD^C (Tab. 6). Since close to the threshold level of 0.4% no reliable discrimination is possible by this approach, flour with 0.5% GMO is only included as positive control. The final classification of the samples has to be indicated in Table 9.

Table 6: Classification of samples

critierion ¹⁾	category
$OD^T \approx OD^T_{ELISA\ blank}$ and $OD^C \gg OD^C_{ELISA\ blank}$	GMO-free samples
$OD^T_{ELISA\ blank} < OD^T < OD^C$	GMO content < 0.4%, but GMO positive
$OD^T > OD^C$	GMO content > 0.4%

¹⁾for criteria of significance see 7.2

7.4 Troubleshooting

1. If $OD1$ and $OD2$ for one sample deviate so much, that a clear classification becomes impossible, analysis by ELISA has to be repeated.
2. If samples without target signal yield no significant competitor signal or if results for extractions A and B lead to different classifications, the PCR should be repeated (including RC and 0.5% positive control). This is not necessary for the positive control flour (0.5% GMO) and the reference DNA extract, due to the chosen threshold level.
3. If for a certain sample still no unambiguous result is obtained, a third DNA extraction has to be performed to reach a decision. All three extracts of this sample have then to be analysed simultaneously by PCR-ELISA (including controls as above). Moreover, DNA extractions have to be repeated as well, if an insufficient amount of DNA has been isolated.

Interlaboratory trial: PCR-ELISA RR-Soja

-10-

8. Documentation

Please send results to:

Dr. Torsten Borchers
 Institut für Chemo- und Biosensorik
 Mendelstr. 7
 48149 Münster
 Germany

Fax: +49-251-980 2890

Laboratory:

Thermocycler:
 Microtiterplate reader:

Table 7: UV-quantitation

Sample	OD _{260 corr} / OD _{280 corr}	DNA conc. (ng/μl)
0% A ¹⁾		
0% B		
0.5% A		
0.5% B		
Sample 1 A		
Sample 1 B		
Sample 2 A		
Sample 2 B		
Sample 3 A		
Sample 3 B		
Sample 4 A		
Sample 4 B		
Sample 5 A		
Sample 5 B		
Sample 6 A		
Sample 6 B		

¹⁾OD_{260 corr} = OD₂₆₀ - OD₃₂₀, OD_{280 corr} = OD₂₈₀ - OD₃₂₀

Table 8 A: ELISA results for pretrial

time for colour reaction: min

Sample	OD1 ^T	OD2 ^T	OD ^T	ΔOD ^T	OD1 ^C	OD2 ^C	OD ^C	ΔOD ^C
ELISA blank								
pretrial I								
pretrial II								
pretrial III								

Table 8 B: ELISA results for main trial

time for colour reaction: min

Sample	OD1 ^T	OD2 ^T	OD ^T	ΔOD ^T	OD1 ^C	OD2 ^C	OD ^C	ΔOD ^C
blank 1			see below				see below	
blank 2								
RC A								
RC B								
0% A								
0% B								
0.5% A								
0.5% B								
Sample 1 A								
Sample 1 B								
Sample 2 A								
Sample 2 B								
Sample 3 A								
Sample 3 B								
Sample 4 A								
Sample 4 B								
Sample 5 A								
Sample 5 B								
Sample 6 A								
Sample 6 B								
Ref A								
Ref B								
pretrial II								
pretrial III								

mean ± SD of ELISA blanks (n=4):

OD^T_{ELISA blank} : ±

OD^C_{ELISA blank} : ±

please document repeated experiments accordingly

Table 9: Classification of samples

please indicate (X) your final decision according to results of Tab. 8 and criteria of Tab. 6 taking into account both extractions and any repeated experiment (see 7.4):

Sample	GMO content 0%	GMO content < 0.4%, but positive	GMO content > 0.4%
0% control			
0.5% control ¹⁾			
1			
2			
3			
4			
5			
6			

¹⁾extractions A and B for the 0.5% control sample may lead to different classifications due the chosen threshold level of 0.4%.

Date

Signature

Lebenslauf

Persönliche Daten	Name	Hans-Josef Brunnert
	Geburtsdatum	23.03.1970
	Geburtsort	Lippstadt

Elektronischen Version: keine weitere Daten dargestellt

Herzlichen Dank

Herrn Prof. Dr. Spener danke ich für die Möglichkeit die aktuelle und interessante analytische Fragestellung zu bearbeiten. Seine Diskussionsbereitschaft, sein fachliches Interesse und seine Unterstützung beim Anfertigen hat, mit besonderem sprachlichen Verständnis, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Torsten Borchers für die intensive Betreuung. Für Diskussionen stand er stets engagiert und mit großer Erfahrung zur Verfügung, seine konstruktiven Anregungen haben sehr zum Erfolg beigetragen.

Vielen Dank schulde ich auch meinen direkten Laborkollegen/Innen für Rat und Tat, kurzweilige Arbeitstage und Unterstützung in allen Lebenslagen: Shiela Srivastav, Kai Schmengler, Regina Franke, Brigitte Loddenkötter, Janine Michel, Andreas Potthoff, Frank Schnütgen, Andrea Schreiber und Gunter Steltenkamp.

Mein Dank gilt auch den Kollegen und Gästen des Instituts für Chemo- und Biosensorik für eine angenehme Arbeitsatmosphäre: Maik Brinkmann, Hermann vom Bruch, Rainer Feldbrügge, Silke Flotho, Erik Fraundorfer, Andreas Gorschlüter, Vitali Grigorenko, Lutz Haalk, Sabine Irmer, André Josten, Paul Kemper, Göran Key, Stefanie Meier, Ulrich Meyer, Holger Olschewski, Carolin Peter, Volker Plegge, Stefan Pohl, Viola Podsadlowski, Chamras Promptmas, Sabine Schreiber, Ricardo Schuch, Karsten Schult, Silke Weber, Inka Wolf und Mahmud Yunis.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Spener und weiteren Mitarbeitern der Biochemie möchte ich für die Kollegialität und stets freundliche Aufnahme ungeachtet des Status eines „Fernbetreuten“ danken, insbesondere bei Amine Abadi, Bertram Bleck, Monika Brummel, Thorsten Hanhoff, Jens Hörentrup, Stefan Lüdke-Enking, Josef Mieth, Christian Schachtrup, Burkhard Schütt, Christan Wolfrum.

Beate Botterbrot, Lucy Forster, Marianne Schürmann und Carsten Hohoff, Mitarbeitern des Arbeitskreises Brinkmann der Gerichtsmedizin Münster, danke ich für die engagierte Hilfe bei Sequenzierungen und ALF-Experimenten.

Der Donnerstags-Runde und den StaVi-Clubbern danke ich für die freundschaftlich verbrachte Zeit in nettem Reizklima sowie der bewussten und unbewussten Unterstützung während der Promotion. Es sind: Nikolaus Burdos, Ralf Dickhut, Ansgar Erlenkötter, Ruth Ferfers, Carsten Gerdemann, Sebastian Horstmann, Yvonne Hupka, Markus Kohlhoff, Kerstin Krause, Kaan Toprak, Claudia Wenner und Nikola Wiethölter.

Ein besonderes Dankeschön für Geduld, Motivation, Ablenkung und andauernde, nicht in Worte zu fassende Unterstützung schulde ich meiner Liebsten, Melanie Dickhut.