ANALYSEN
GUTACHTEN
BERATUNGEN

aktuelle Kurzinformationen zu

Gentechnisch verändertem Raps

Stand Mai 2011

Institut Kirchhoff Berlin GmbH

Institu
Kirchh
Berlin

Ziele der „Grünen Gentechnik“ …

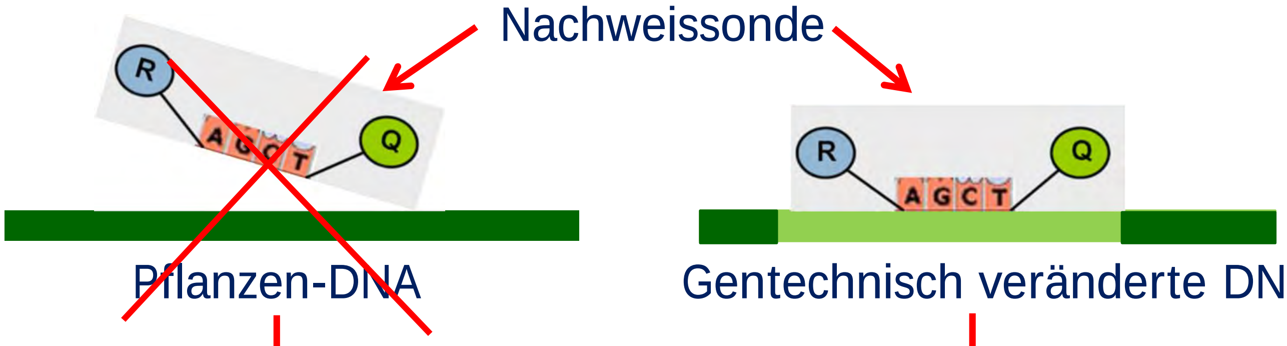
www.biosicherheit.de

- Schädlingskontrolle
- Trocken-,
- Säure-,
- Temperatur-
- & Salztoleranz
- Verbesserung des Nährstoffgehalts & Verarbeitungsqualität
- Ω-3-Fettsäuren-, Zuckergehalts, Farbe
- Industrierohstoffe (biologisch abbaubares Plastik, Schmieröle)
- Pharmazeutische Produkte (Hormone, Impfstoffe oder Antikörper)

Institut
Kirchh
Berlin

Enthält das Produkt überhaupt GVO?

Screening-Verfahren:



Nicht-GVO

GVO

Nachweissonde

Pflanzen-DNA

Gentechnisch veränderte DNA

negativ

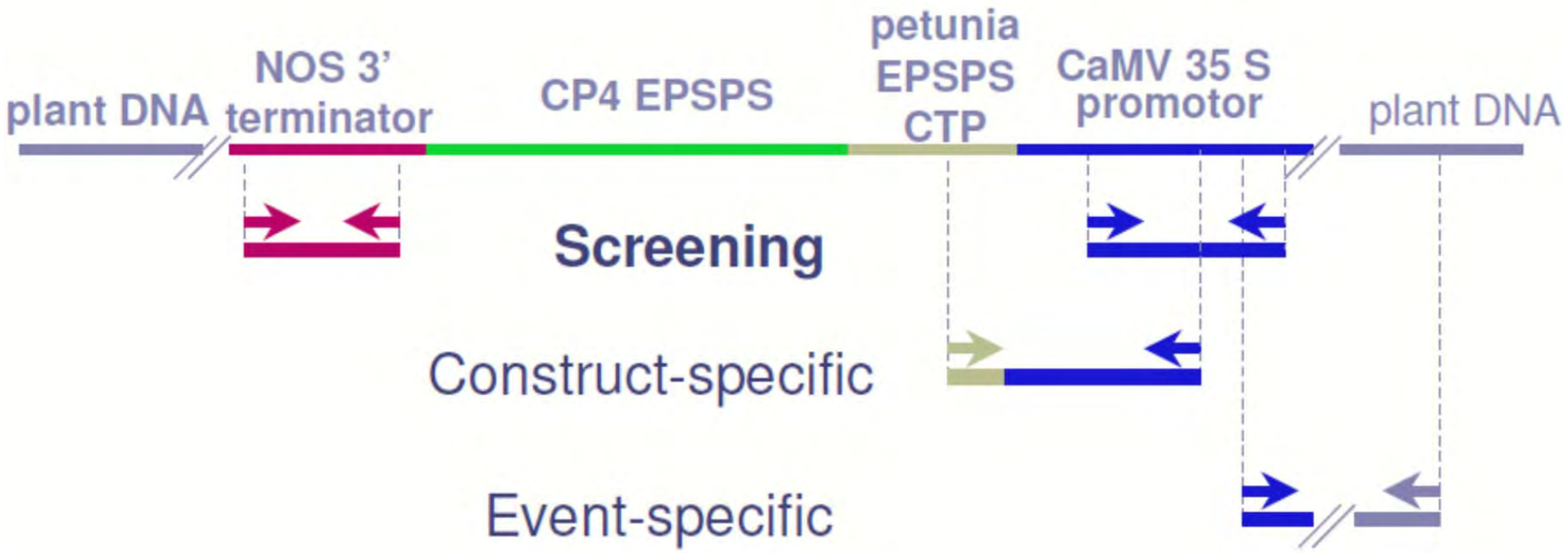
positiv

- Vorhanden in unterschiedlichen gv Pflanzen!
- Selektionsgene (z.B. Resistenzgene)
- Promotoren = Sequenz zur Expression eines Gens (Transkription), z. B. 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus, P35S
- Terminatoren = Beendigung der Transkription,

  z. B. NOS-T. aus *Agrobacterium tumefaciens*, T-nos

Institut
Kirchhoff
Berlin

Strategien zum Nachweis gentechnisch veränderter Pflanzen mittels PCR


plant DNA
NOS 3' terminator
CP4 EPSPS
petunia EPSPS CTP
CaMV 35 S promotor
plant DNA
Screening
Construct-specific
Event-specific

Institut
Kirchh
Berlin

Ablauf der Analytik

Probenvorbereitung

Homogenisation

↓

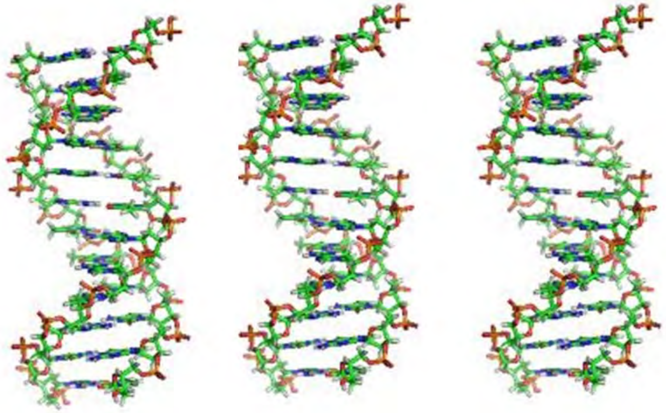
DNA-Extraktion

↓

Real-time PCR Analyse

↓

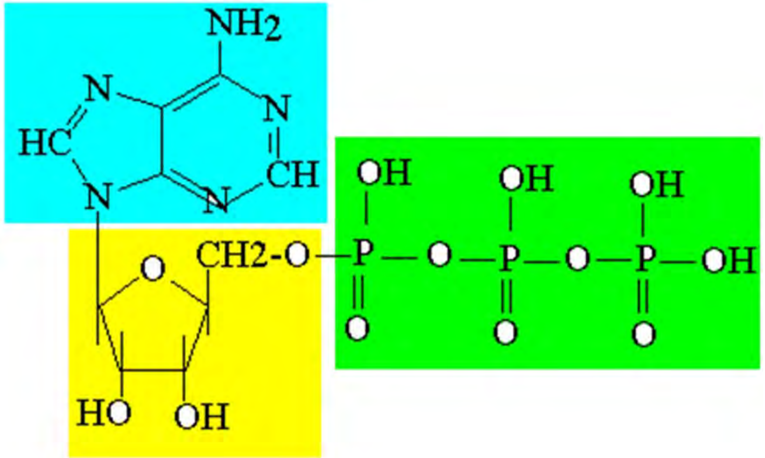
Interpretation der Ergebnisse

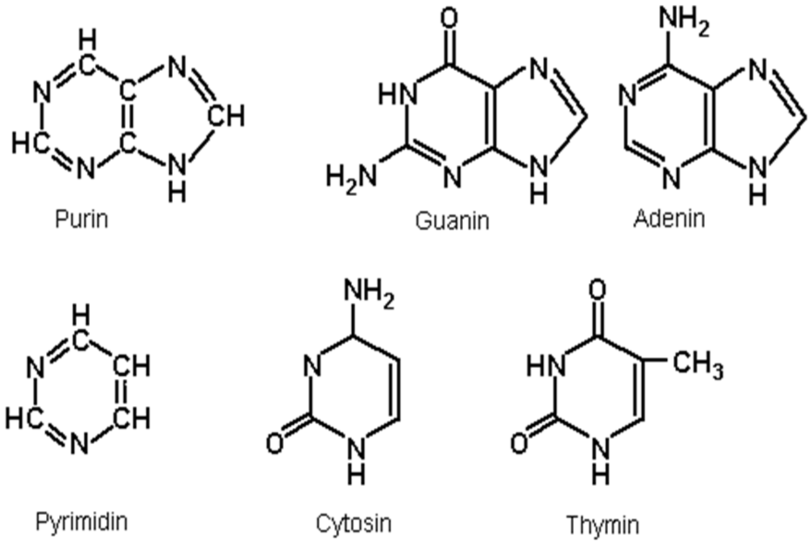


Achtung
Gen-Raps
GREENPEACE

Institut
Kirchh
Berlin

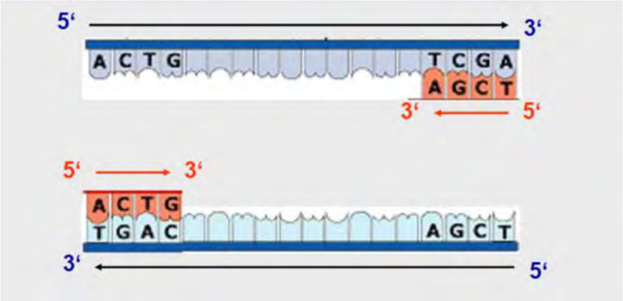
PCR – „Zutaten“


NH2
N
N
HC
CH
N
N
O
CH2-O
OH
P
O
P
O
P
OH
O
O
O
OH
OH
HO
OH

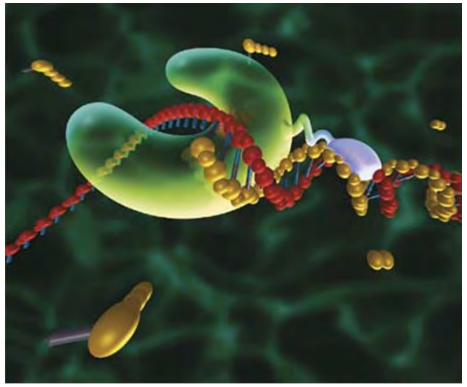

Purin
Guanin
Adenin
Pyrimidin
Cytosin
Thymin

Template = isolierte DNA

Primer


5'
3'
A C T G
T C G A
A G C T
3'
5'
5'
3'
A C T G
T G A C
A G C T
3'
5'

Taq DNA-Polymerase

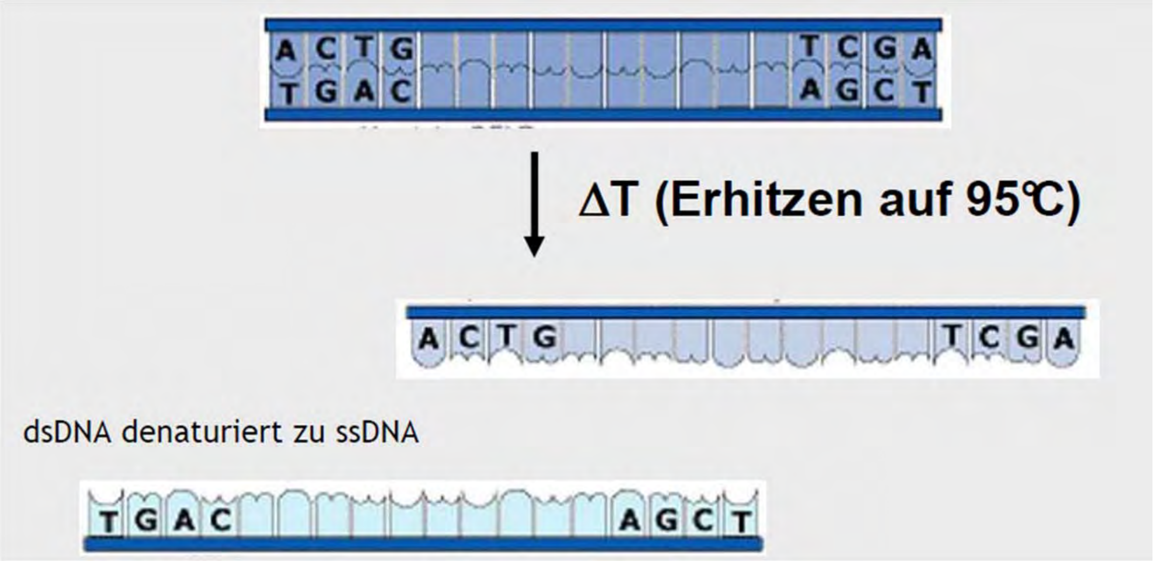


ccg.vital-it.ch/ icons/taq.polymerase.jpg

Institut
Kirchhoff
Berlin

Ablauf einer PCR I

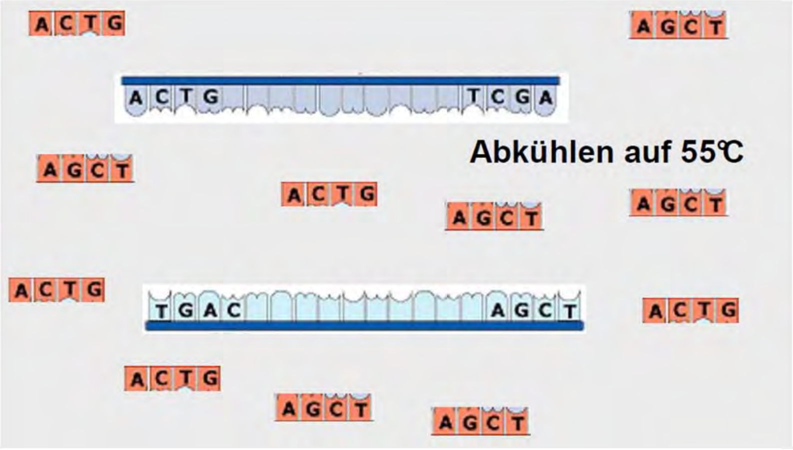
1. Denaturierungsphase


A C T G
T G A C
T C G A
A G C T

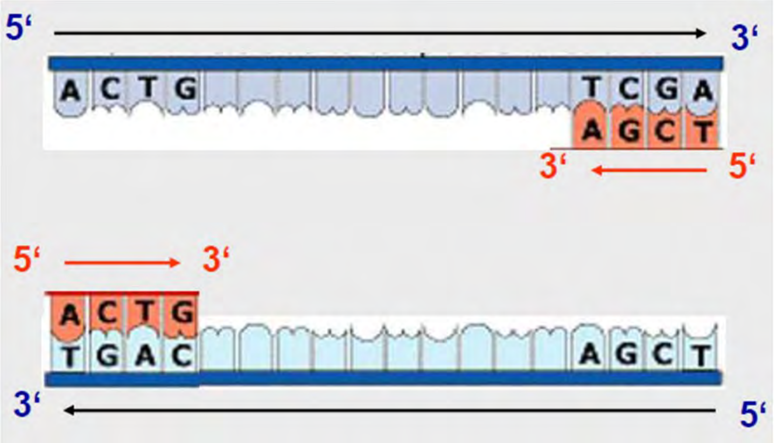
ΔT (Erhitzen auf 95℃)

dsDNA denaturiert zu ssDNA

2. Annealingphase


A C T G
A G C T
T C G A
T G A C

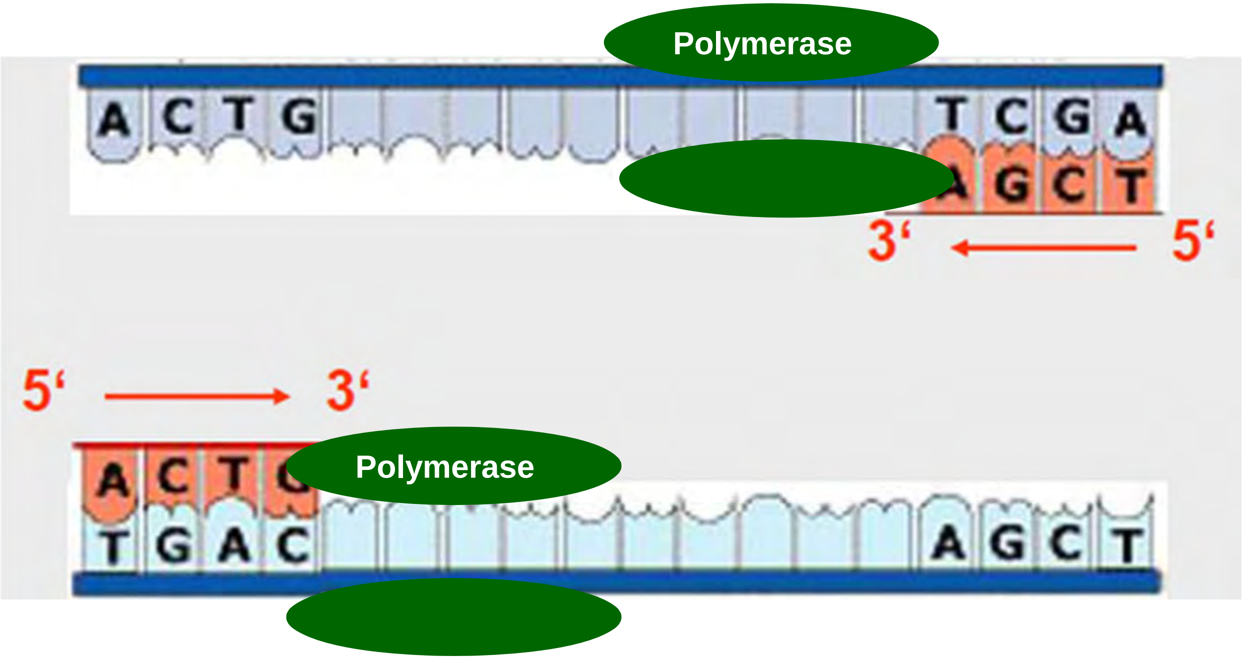
Abkühlen auf 55℃

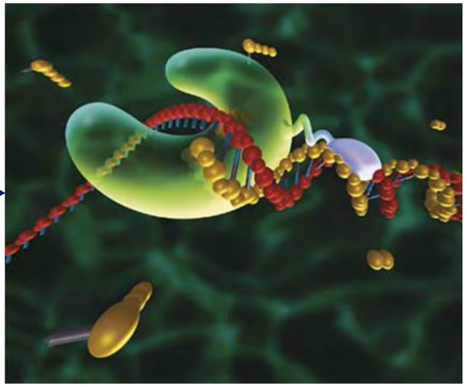

5'
3'
A C T G
T C G A
A G C T
3'
5'
5'
3'
A C T G
T G A C
A G C T
3'
5'

Institut
Kirchh
Berlin

Ablauf einer PCR II

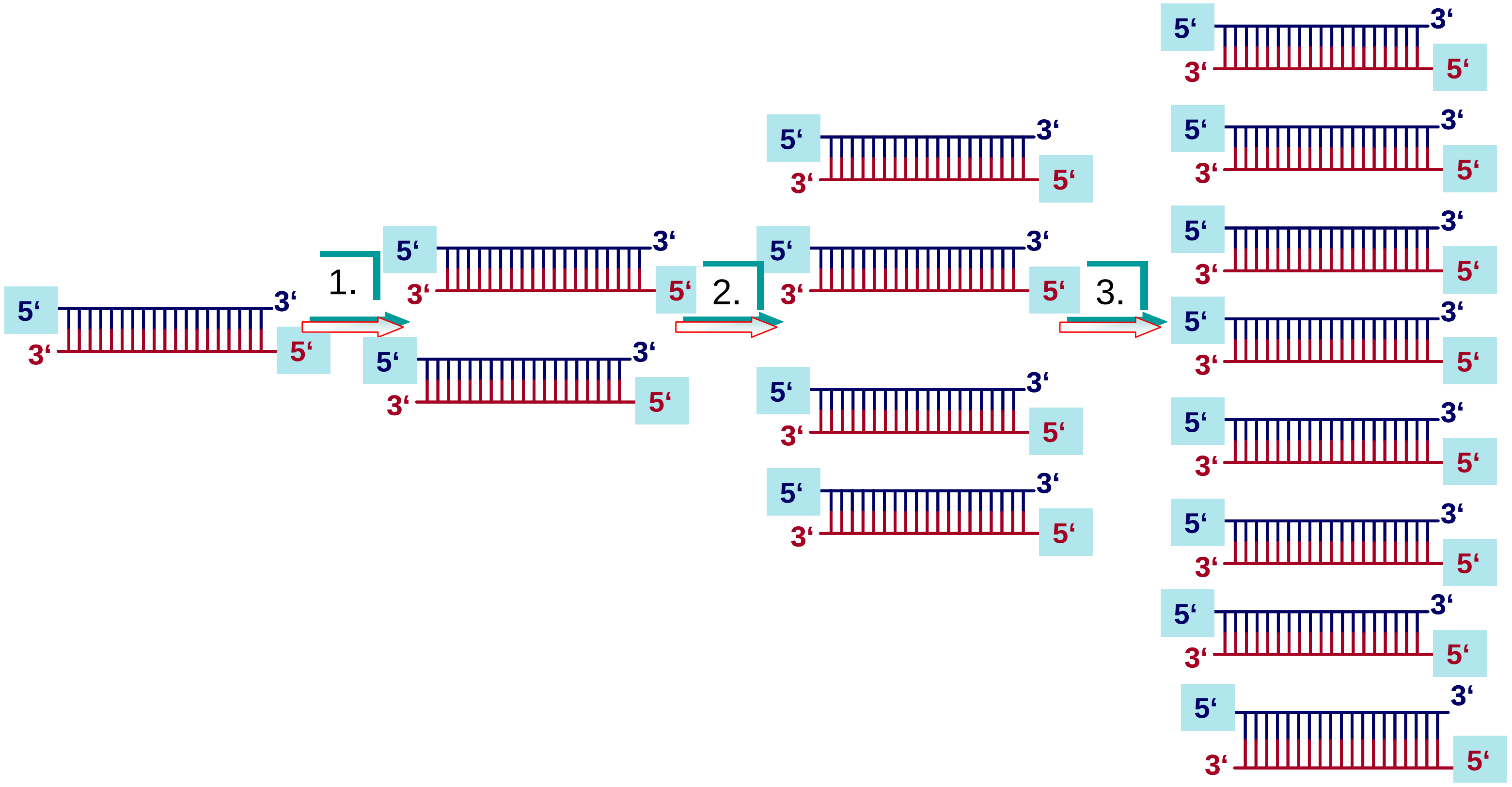
3. Elongationsphase


Polymerase
A C T G
T C G A
A G C T
3‘
5‘
5‘
3‘
A C T G
Polymerase
T G A C
A G C T



Institut
Kirchh
Berlin

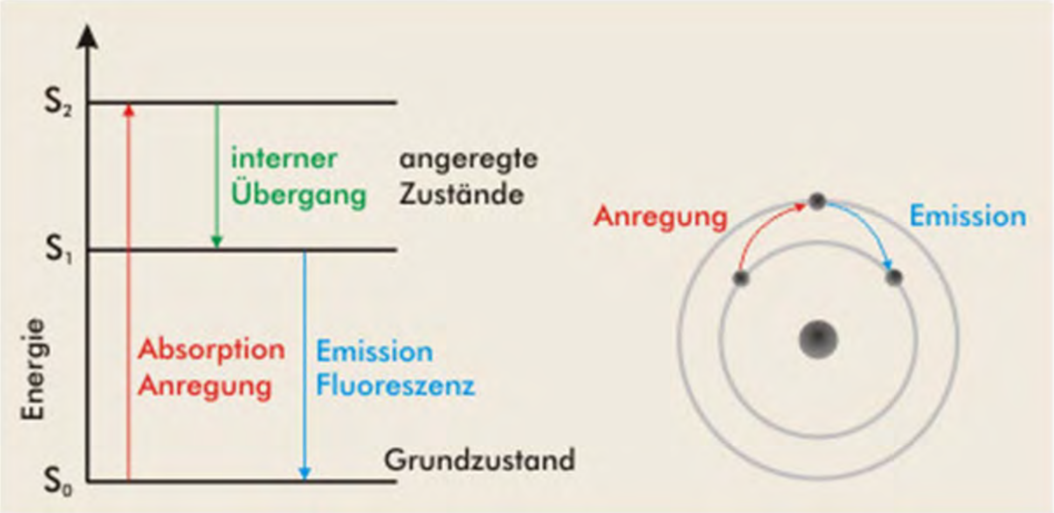
Reaktion der PCR



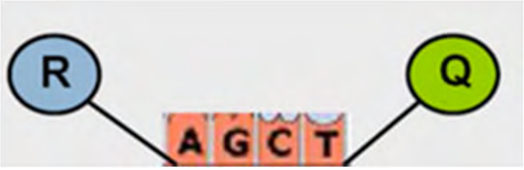
Aus 1 Kopie werden nach 38 Zyklen **2^{38} = 274.877.906.944** Kopien

„Real-Time“-PCR

- „Real Time“ = „in Echtzeit“
- PCR plus Fluoreszenzfarbstoffe = Fluoreszenz


S_2
S_1
S_0
Energie
interner Übergang
angeregte Zustände
Absorption Anregung
Emission Fluoreszenz
Grundzustand
Anregung
Emission

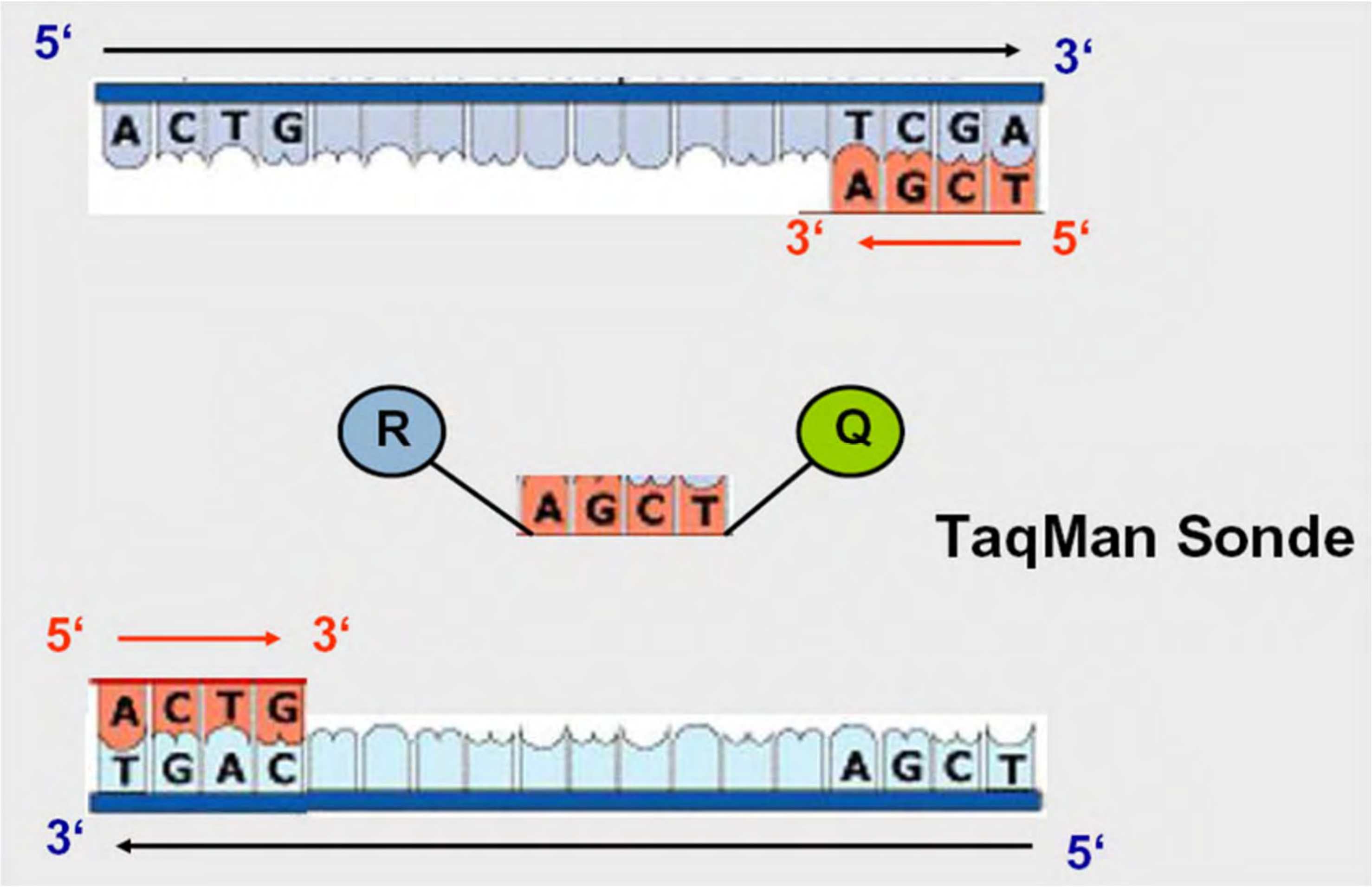
- proportionale Fluoreszenzzunahme mit PCR-Produktmenge
- Möglichkeit der Quantifizierung
- spezifische Sondensysteme
  - ✓ TaqMan



Institu
Kirchh
Berlin

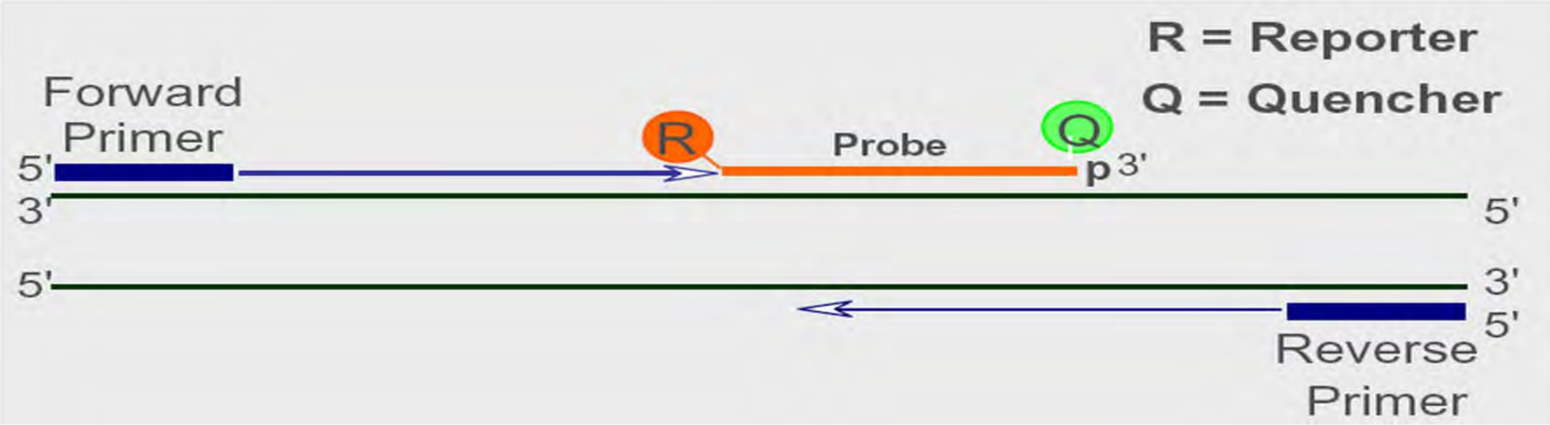
spezifische Sonde - TaqMan Sonde

Prinzip:

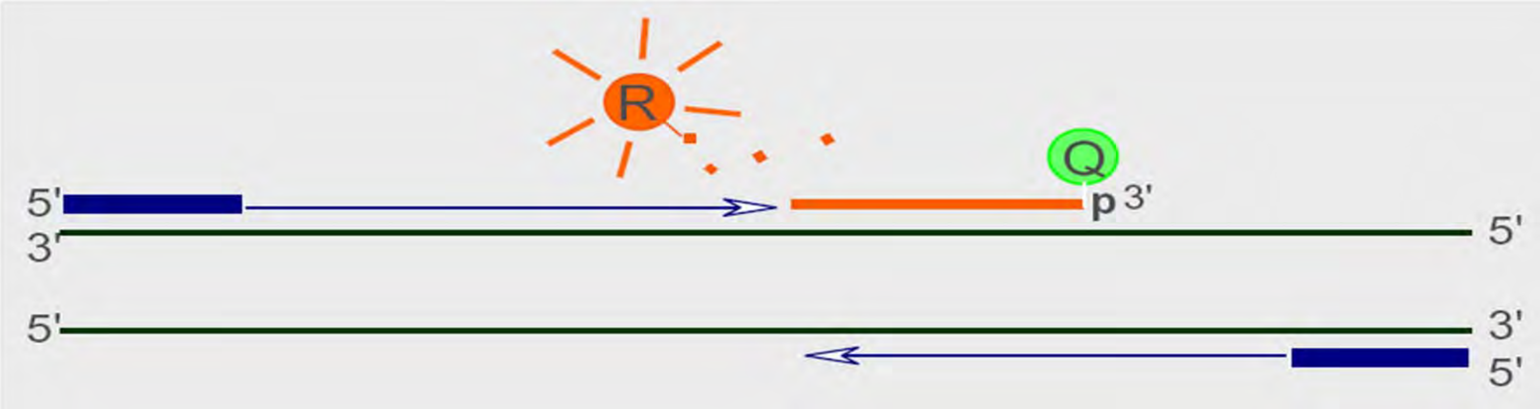

5'
3'
A C T G
T C G A
A G C T
3'
5'
R
Q
A G C T
TaqMan Sonde
5'
3'
A C T G
T G A C
A G C T
3'
5'

Institu
Kirchh
Berlin

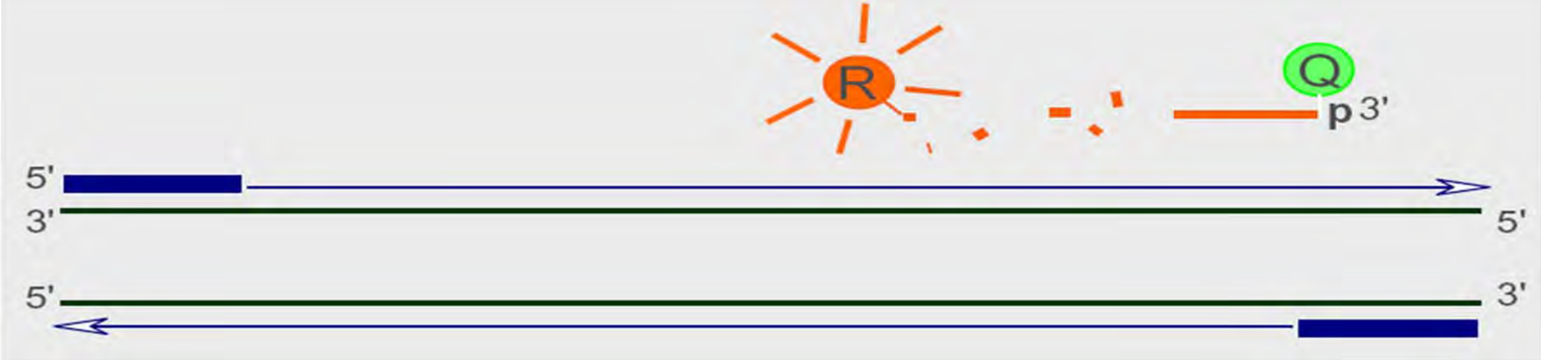
1. Annealingphase


R = Reporter
Q = Quencher
Forward Primer
5'
3'
R
Probe
Q
p 3'
5'
5'
3'
5'
Reverse Primer

2. Elongation: Sonden-Entfernung

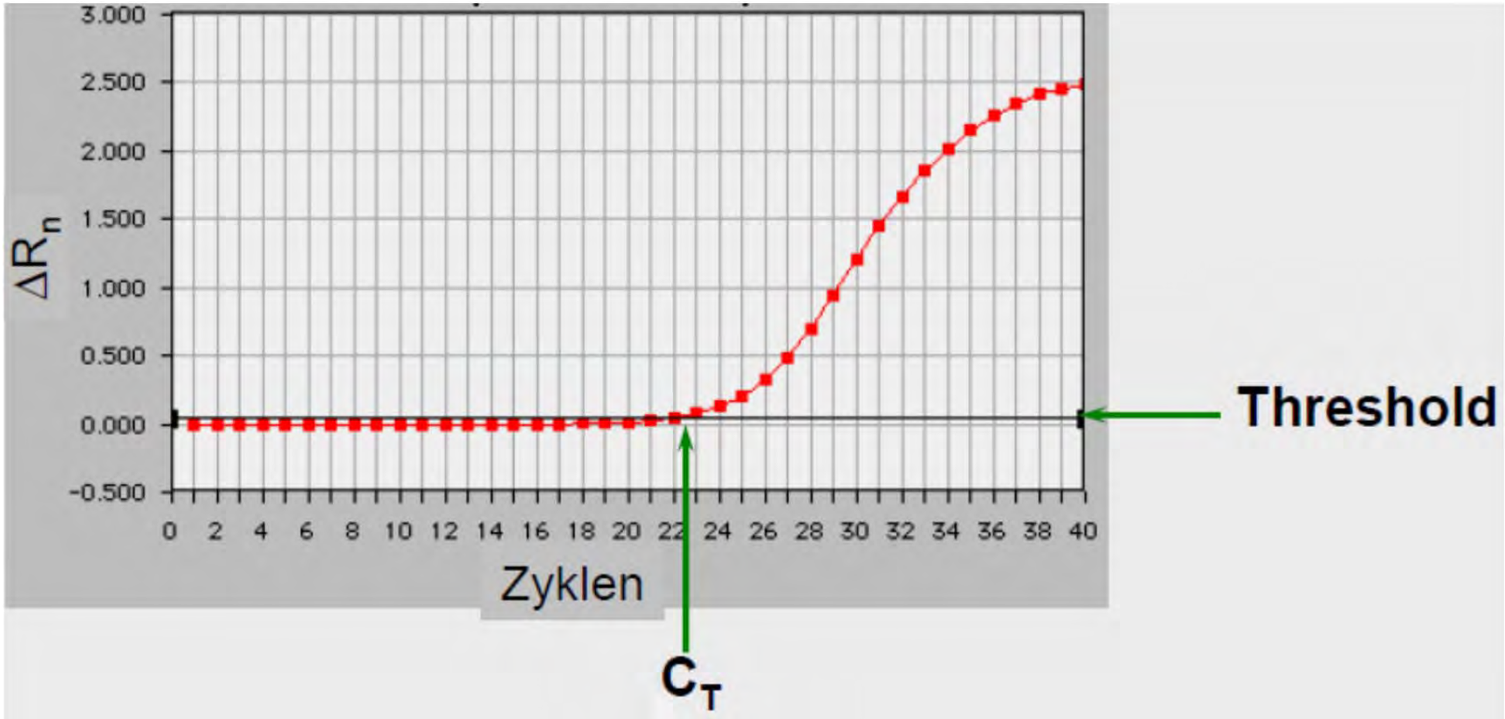

R
Q
p 3'
5'
3'
5'
5'
3'
5'

3. Ende der Polymerisation



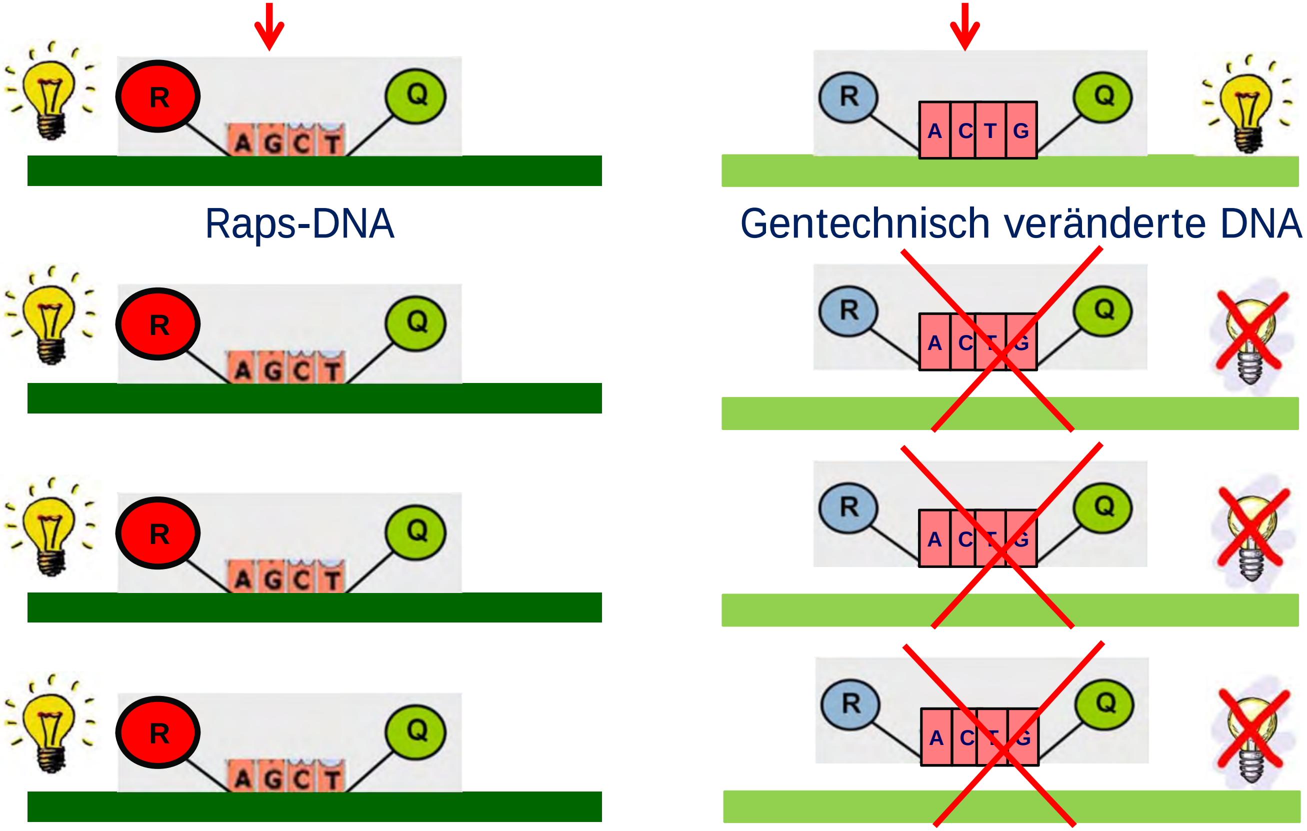
Institut
Kirchh
Berlin

Auswertung mittels Amplifikationsblot



Je weniger DNA in der Probe desto höher ist der C_T-Wert!

Quantitative Analyse



Nachweissonde für Raps

Raps-DNA

4 Raps-DNA-Moleküle

Nachweissonde für GVO

Gentechnisch veränderte DNA

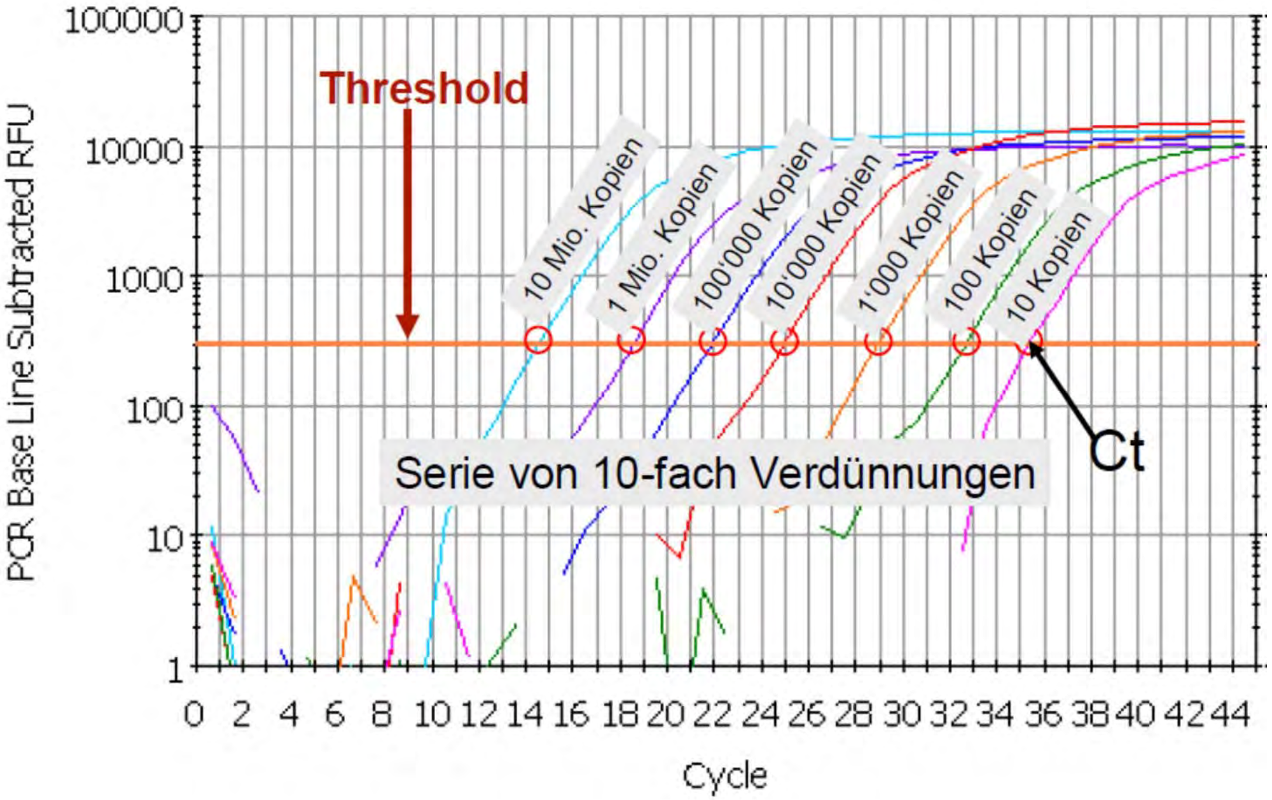
1 gentechnisch verändertes DNA-Molekül

↓

Probe enthält 25% GVO

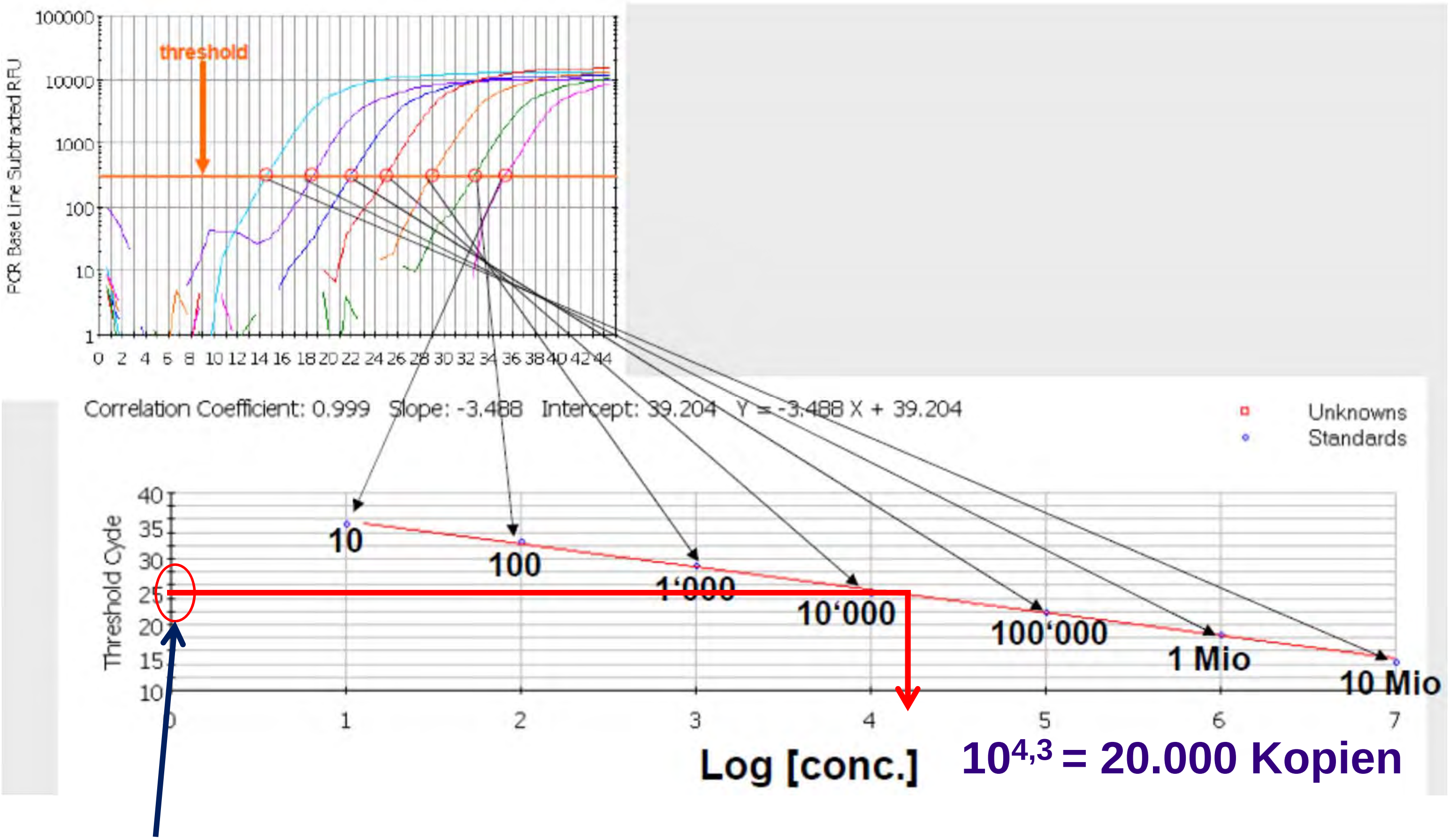
Institut
Kirchh
Berlin

Quantitative Real-time PCR



Institut
Kirchh
Berlin

Berechnung eines Messwertes



Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 Y = -3.488 X + 39.204

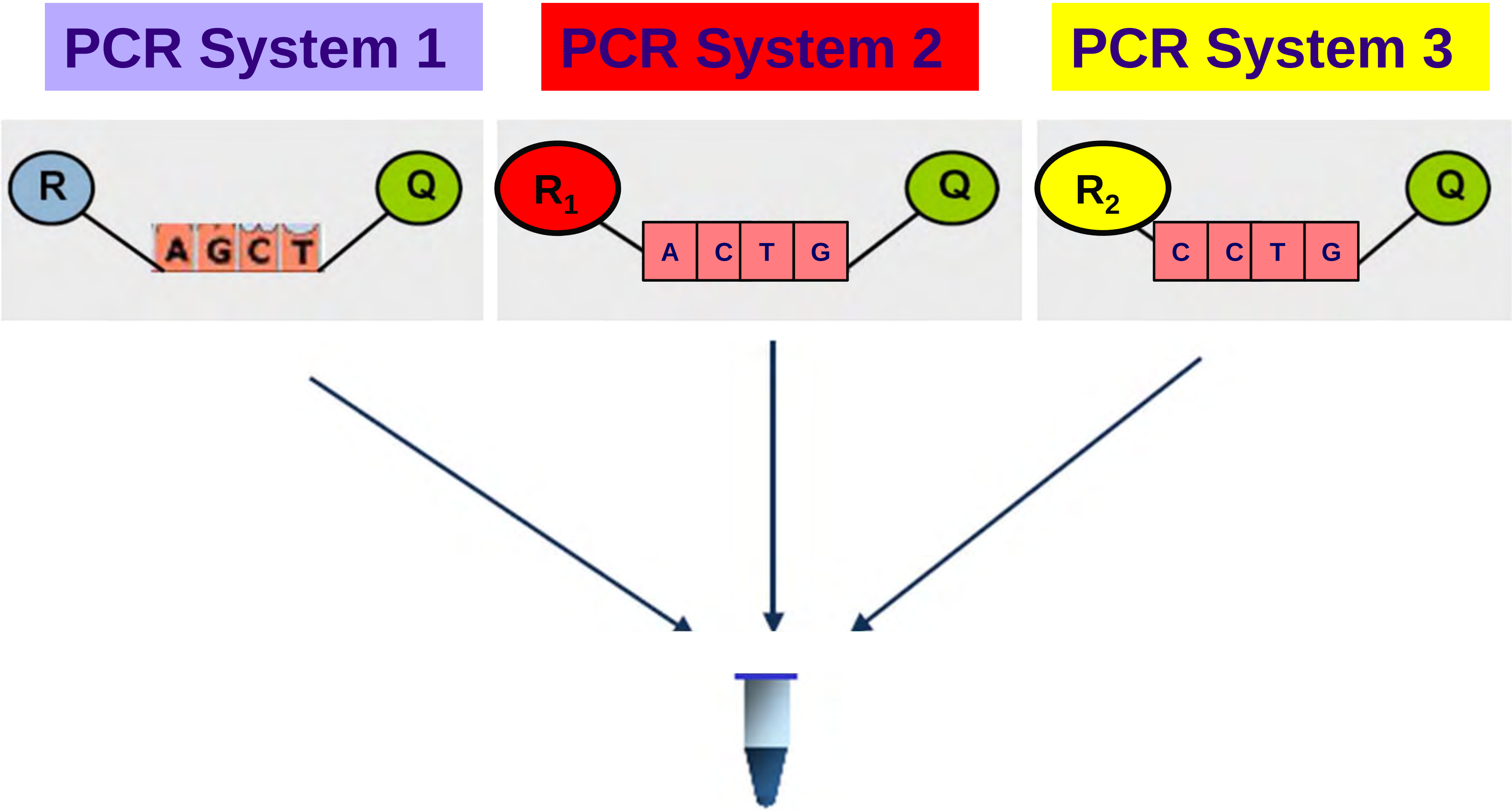
$10^{4,3}$ = 20.000 Kopien

Messwert

Institut
Kirchh
Berlin

Was ist Multiplex PCR?

- Kombination mehrerer PCR Systeme in einer Reaktion
- Gleichzeitige Amplifikation unterschiedlicher Sequenzen


PCR System 1

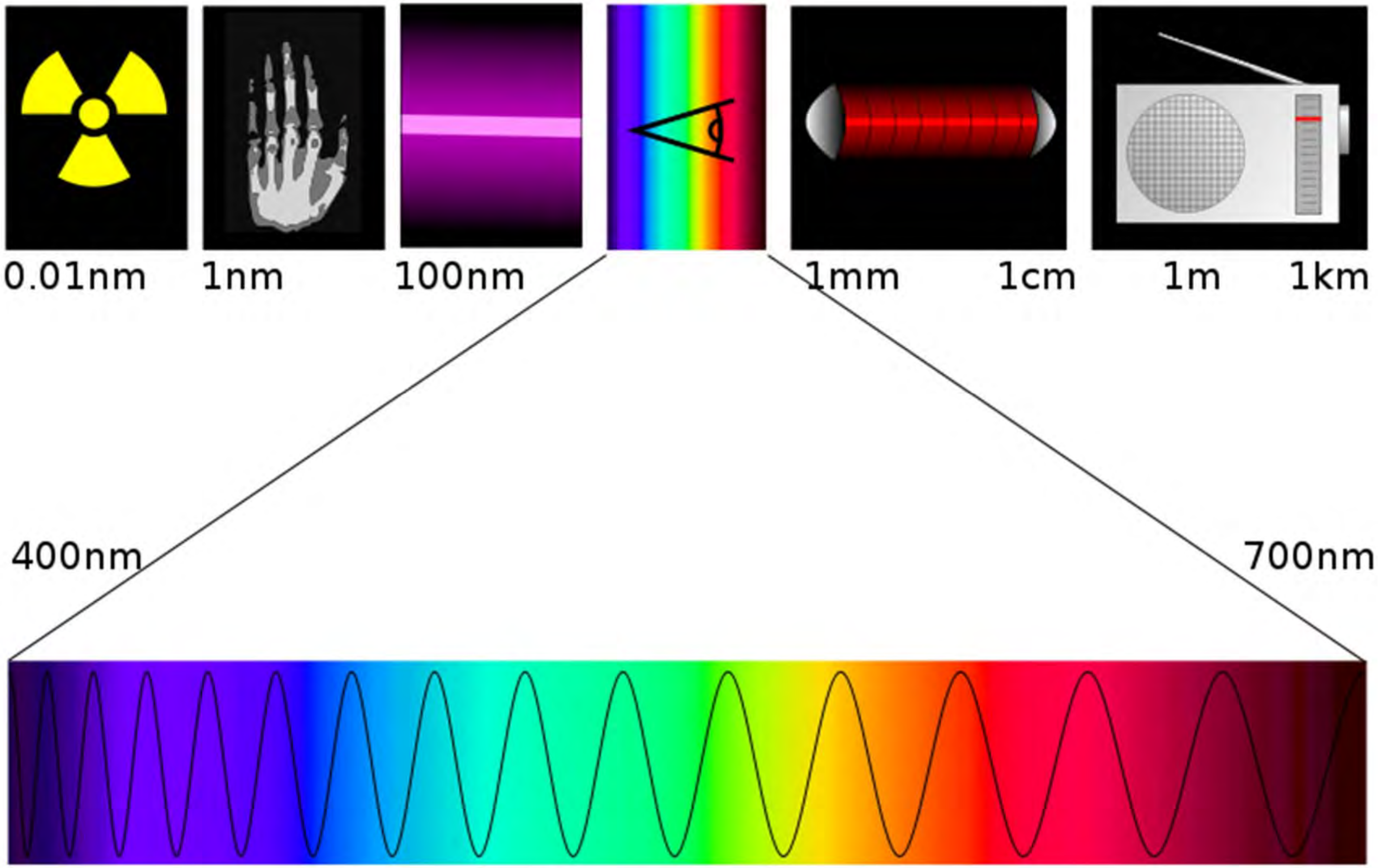
PCR System 2

PCR System 3

R
A G C T
Q
R_1
A C T G
Q
R_2
C C T G
Q

Institu
Kirchh
Berlin

Detektion über verschiedene Fluorophore


0.01nm
1nm
100nm
1mm
1cm
1m
1km
400nm
700nm

Institu
Kirchh
Berlin

Multiplex Systeme Raps

- **Raps spezifisches Referenzsystem (Gen CruA)**

Multiplex I:

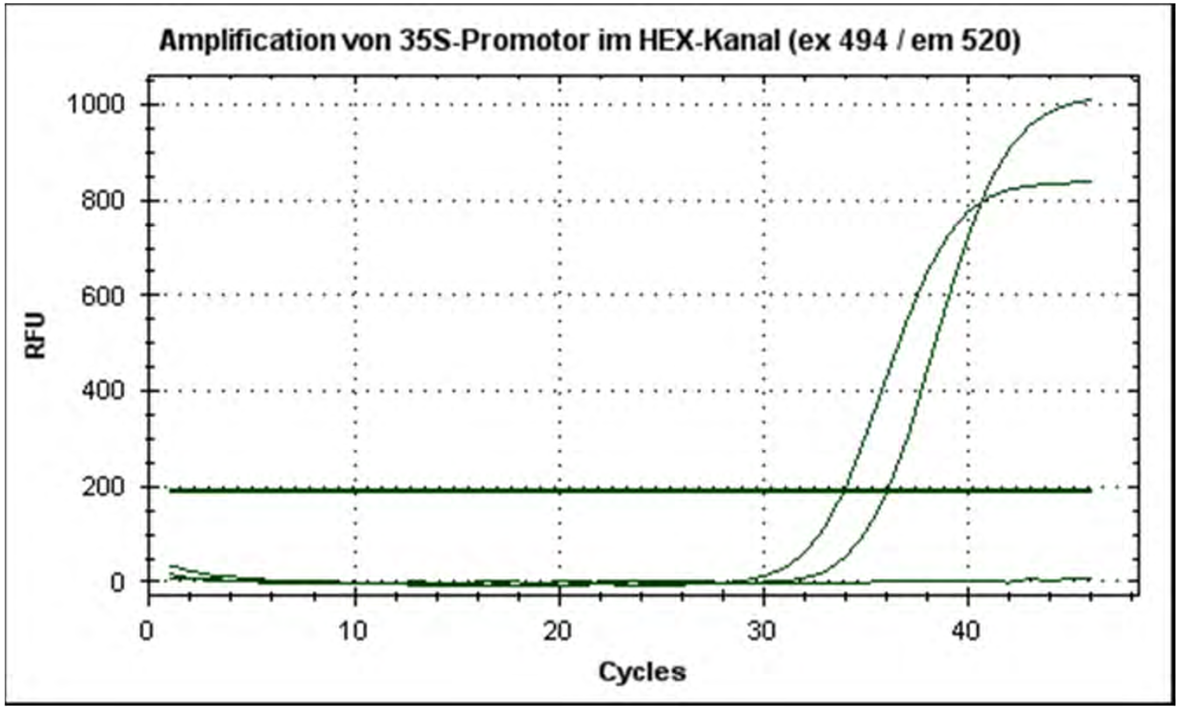
- Nos-Terminator = aus *Agrobacterium tumefaciens*
- 35S-Promoter = Pro. des Blumenkohlmosaikvirus
- CaMV = Blumenkohlmosaikvirus – „Schädling“

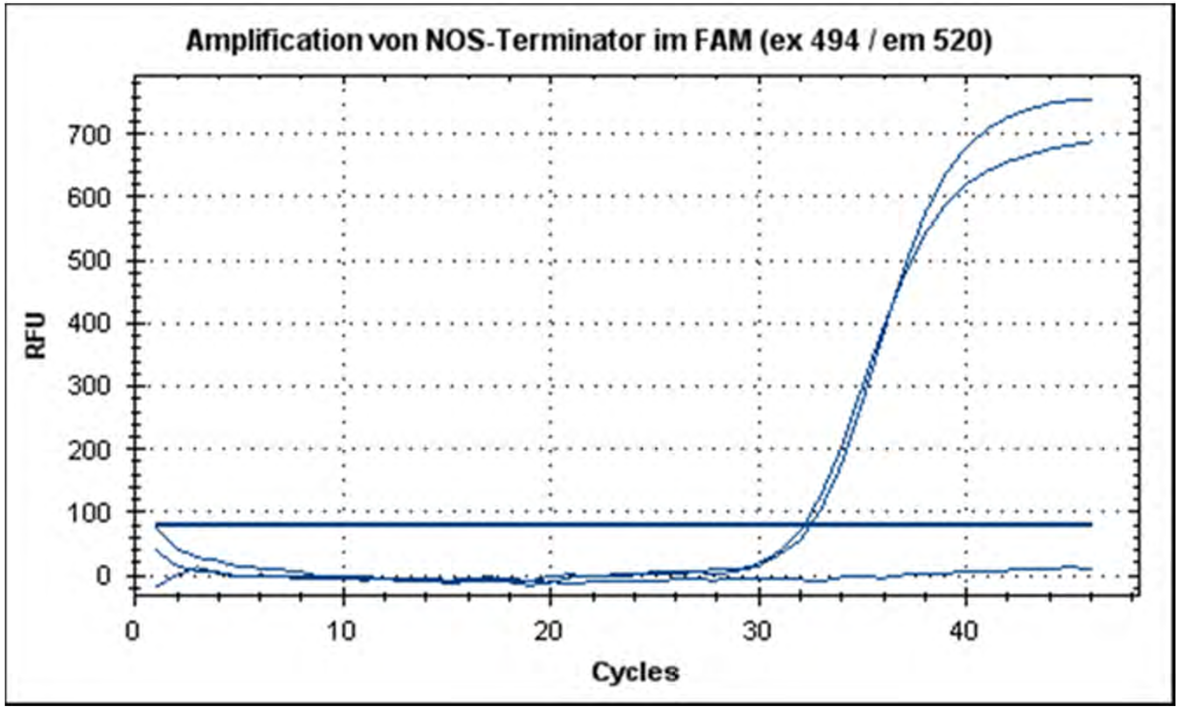
Multiplex II:

- FMV Promoter = 35S Promotor
  Braunwurz-Mosaicvirus
- bar Gen = Herbizidresistenz
- pat Gen = Herbizidresistenz
- CTP2 & CP4 EPSPS = Herbizidresistenz

Farben	Anregung/ Detektion [nm]
Blau	365/470
Grün	470/510
Gelb	530/555
Orange	585/610
Rot	625/660
Crimson	670/710

Institut
Kirchh
Berlin


Amplification von 35S-Promotor im HEX-Kanal (ex 494 / em 520)


Amplification von NOS-Terminator im FAM (ex 494 / em 520)

Institut Kirchhoff Berlin

Screening Tabelle

Name of Event	Plant	Author-ization EU	P35S		T-nos		CTP2-CP4 EPSPS		bar		35S-pat		FMV	
23-198, 23-18-27 (Laurical)	rape	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
Falcon GS40/90	rape	A	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
GT200	rape	-	-		-		+		-		-		+	
GT73	rape	A	-	-	-	wp	+	+	-	wp	-	-	+	+
HCN 10, HCN 92,Topas19/2 (LibertyLink)	rape	A	+	+	-	wp	-	-	-	-	+	+		
Liberator L62 (pHoe6/AC)	rape	A	+		-		-		-		+			
MS1, RF1, RF2; MS1xRF1 (PGS1) MS1xRF2 (PGS2) (SeedLink)	rape	A	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-		
MS8, RF3, MS8xRF3 (SeedLink)	rape	A	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
OXY 235	rape	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-		-	-
Phy 23	rape	-							+		-			
PHY36	rape	-	-		-		-		+		-			
T45, HCN 28 (LibertyLink)	rape	A	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+		