universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung von genetischer Instabilität bei kommerziellen GVO-Linien“

verfasst von

Zita Erika Madi

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 441
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Genetik - Mikrobiologie
Betreut von:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Erwin Heberle-Bors

Abkürzungen

AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
AMP	Ampicillin
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMV	Cauliflower mosaic virus
Ct-Wert	Threshold Cycle
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleotide
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
GVO	Gentechnisch veränderte Organismen
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LB	Luria-Bertani Medium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
rtPCR	real-time PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SOB	SOB-E. coli Medium
SOC	SOB-Medium + 20 mM Glucose + 1M $MgCl_2$
SYTO	SYTO (red fluorescent nucleic acid stain, 5 mM solution in DMSO)
TAE	Tris/ Acetat / EDTA Puffer
TBE	Tris/ Borat / EDTA Puffer
TNE	Tris / NaCl / EDTA / SDS Puffer

Tris	Trishydroxymehtylaminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 7
1. Allgemeine Ziele der Untersuchung 7
1.1. Transformation und Post-Transformation 8
2. Verwendete Pflanzen 10
2.1. Mais - Zea mays 10
2.2. Sojabohne – Glycinemax (L.) Merr 12
3.Gesetzlicher Hintergrund 14
3.1. EU Directive 2001/18/EG 14
3.2. Regulation (EC) No 1829/2003 16
3.3. Regulation (EC) No 1830/2003 17
3.4. EFSA 17
B. Methoden 18
1. Theoretischer Hintergrund 18
1.1 DNA-Analysen 18
1.2. Alpha-Komplementierung 24
2. Praktische Durchführung 26
1.1. DNA Lyse und Binding 26
1.2. Washing 27
1.3. Eluierung 27
1.4. Messung und Überprüfung der Reinheit der DNA 27
1.5 Gelherstellung 28
2. PCR 28
2.1. PCR-Ansatz 28
2.2 PCR-Programm 29
2.3. PCR-Analyse 29
2.4. PCR für die Sequenzierung 30
3. Real-time PCR 32
3.1. Real-time PCR mit Syto9 32
3.2 Real-time PCR-Programm 33
3.3. Real-time PCR mit HRM-Kit 33
3.4. Real-time PCR-Programm für Type-it HRM Kit 34
4. Herstellung von Subklonen 34
4.1. PCR für Subklonierung 34
4.2. Gelherstellung 34
4.3. Ligation 35
4.4. Transformation 35
4.5. Blue-/White-Selektion 36
4.6. Überprüfung des Inserts 36
4.7. Aufreinigung der Klone 37
C. Material 38
1. Primer 38

2. Geräteliste 39
3. Kits 40
D. Ergebnisse 41
1.Transgene Sojabohne GTS 40-3-2 41
1.1. Konstrukt des GTS 40-3-2 41
1.2. Ziel und Vorgangsweise der Untersuchungen von Soja 42
1.3. Verwendete Soja-Sequenz zur Herstellung der Deletion 44
1.4. Erzeugung der Plasmide GVO- Wildtyp (GVO-wt) und Deletion (del) 45
1.5. Herstellung von Verdünnungen der Plasmide 45
1.6. Ermittlung der PCR Effizienz 45
1.7. Unterscheidung von GVO-Wildtyp (wt) und Deletion (del) mittels Scorpion Primer und HRM Analyse (High resolution melting) 46
2. Transgener Mais MON810 56
2.1. Unterscheidung von GVO-Wildtyp (GVO-wt), Deletionen (del) und Mutation (mut) mittels Scorpion Primer und HRM Analyse (High resolution melting) 56
2.2. Konstrukt des MON810 58
2.3. 3´ Plasmide 59
2.4. Real-time PCR mit genomischen Proben und Scorpion Primer 62
3. Adh1 (alcohol dehydrogenase 1) 65
3.1. Ziel und Vorgangsweise der Untersuchung von Adh1 65
3.2. Herstellung der homozygoten Allele A und F 67
3.3. Real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer und den homo- und heterozygoten Adh1 Allelen 67
3.4. Unterscheidung des Adh1-Typs bei genomischen Proben 69
3.5. Herstellung von Subklonen 73
E. Diskussion 75
1. MON810 Mais 75
2. Roundup Ready Soja 76
3. Adh1 77
F. Anhang 79
1. Kurzfassung 79
2. Abstract 81
1. Roundup Ready Soja 83
2. MON810 Mais 93
3. Adh1 95
G. Literatur 97

A. Einleitung

Bestimmung der genetischen Stabilität von GVOs anhand einer detaillierten Untersuchung von MON810, Adh1 und GTS 40-3-2

1. Allgemeine Ziele der Untersuchung

Die Vermeidung der genetischen Veränderung von Zuchtsaatgut ist für dessen Anbau und Erhaltung essentiell. Die Reglementierung des für die konventionelle Züchtung herangezogenen Saatguts erfolgt durch ISTA (International Seed Testing Association) Vorschriften, nach denen Kontaminationen in Lebens- und Futtermitteln nicht größer als 0,9% betragen dürfen. Der Schwellenwert für Bio-Produkte liegt unterhalb dieser Grenze bei 0,1%. Dieser Schwellenwert wurde festgelegt, da eine 0% Regelung aufgrund technisch unvermeidbarer und zufälliger Kontamination mit zugelassener und als sicher bewerteter GVO nicht umsetzbar ist.

Vor der möglichen Zulassung eines gentechnisch veränderten Saatgutes muss die genetische Stabilität nach der Richtlinie 2001/18/EC nachgewiesen werden. Dies ist insoweit von Bedeutung, als dass Veränderungenin der DNA Sequenz, bedingt durch die Transformation, bzw. die Post-Transformation eintreten können. Ebenso ist das Auftreten von individuellen Unterschieden zwischen Einzelpflanzen und auch Änderungen von einer Pflanzengeneration zur nächsten möglich und damit zu berücksichtigen. Bereits kleinste Abänderungen in der DNA Sequenz können Auswirkungen, z.B. in der Morphologie der Pflanze (Moch, 2006) bewirken.

EFSA (European Food Safety Authority) und EU Directive 2001/18/EC verlangen für das Risikomanagement den Nachweis der genetischen Stabilität der eingeschleusten DNA Sequenz (EU 2001, EFSA 2006). Jedoch werden pro Event lediglich einige wenige Proben mittels Southern Blot überprüft. Diese Methode eignet sich aber nicht für die Detektion von SNPs (single nucleotide

polymorphism), die somit unentdeckt bleiben können. Lediglich Veränderungen von mehreren Nukleotiden können mit ihr detektiert werden.

Für einen verlässlichen Nachweis der genetischen Stabilität wurde in dieser Arbeit eine HRM (high resolution melting) Analyse und eine real-time PCR mit Scorpion Primern gewählt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass schon kleinste Veränderungen in der genetischen Sequenz bei einer großen Anzahl in einem einzigen PCR-Lauf nachgewiesen werden können. Wenn eine Änderung im Bereich des Scorpion Primers auftritt, kann dies anhand einer veränderten PCR-Kurve eruiert werden. Durch Experimente an Plasmiden, die nur minimale Veränderungen in der Zielsequenz aufwiesen, konnte die Sensitivität des Scorpion Primers ermittelt werden: es kam selbst in Anwesenheit der unveränderten Sequenz, welche als Template beigemischt wurde, zu einer vollständigen Reduktion des Fluoreszenzsignals. Die Ergebnisse wurden zum Schluss noch mittels Sanger Sequenzierung bestätigt.

1.1. Transformation und Post-Transformation

Die genetische Stabilität ist Voraussetzung für die Vermarktung und die Kennzeichnung der GVO (EC No 1830/2003). Ziel der Transformation ist, ein einzelnes Transgen mit seiner flankierenden Region in die Plasmid DNA Sequenz zu integrieren; dabei sollten keine weiteren DNA Bruchstück integriert werden.

Während der Herstellung von transgenen Pflanzen kann es aber aufgrund verschiedener Umstände während der Transformation zu unerwünschter Abänderung in der DNA Sequenz kommen (Neumann et al., 2011). Die Veränderungen (z.B. Translokation, Duplikation, Deletion, etc.) können sowohl im Ziel Locus, als auch in anderen Loci auftreten (Wilson et al., 2004 & 2006).

Obwohl Veränderungen, die während der Transformation auftreten können, nicht wie die post-tranformationellen Veränderungen zur genetischen Stabilität gezählt werden, müssen auch diese DNA-Abänderungen betrachtet werden, da sie sich auf die trangene Pflanze auswirken können. Bei geänderter DNA Sequenz können beispielsweise aufgrund neuer RNA und (daraus resultierend)

neue Proteine entstehen (Rosati et al., 2008). Doch auch dieser Beobachtung lässt sich nicht auf alle Fälle übertragen.

Ogasawara et al. (2005) konnte zwar Veränderungen in der kodierenden Region beim Soja-Event Roundup Ready und den benachbarten Cong Genen finden, jedoch waren diese Veränderungen ohne Auswirkung auf die Aminosäure Sequenz. Die stabile Vererbung wurde auch im Feldversuch durch Untersuchung der Nachkommen und ihrer GVO Expression mittels Southern Blot überprüft.

In manchen Fällen konnte DNA Veränderung, die erst nach der Transformation auftrat, beobachtet werden. Rosati et al. (2008) verzeichnete unterschiedliche Proteinexpression in verschiedenen Geweben. In der dazu untersuchten cDNA konnten keine Unterschiede gefunden werden.

La Paz et al. (2010) untersuchte MON810 in verschiedenen Entwicklungsstadien und konnte dabei unterschiedliche Cytosin-Methylierungsmuster feststellen. Diese Veränderung war jedoch ohne Auswirkung auf den Phänotyp der Pflanzen.

Im Gegensatz zu diesen Studien liegen auch Publikationen ohne der Detektion von genetischer Instabilität der GVO vor. Neumann et al. (2011) untersuchte Mon810 Einzelkörner mittels real-time PCR mit Scorpion Primer und verifizierte die Ergebnisse mittels Sanger Sequenzierung. Es konnte in der 3´-Region kein Polymorphismus der flankierenden Region beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Punktmutation von der Region, in der sie geschieht, abhängt. Transgene Elemente können sich sowohl in funktionelle genomische Regionen integrieren, wo sie die Gen-Regulation und –Expression beeinflussen, aber auch in nicht-funktionelle Regionen, wo sie unbemerkt bleiben können.

2. Verwendete Pflanzen

2.1. Mais - Zea mays

Das aus Mexico und Peru stammende Getreide zählt wie andere heimische Getreidearten (z.B. Weizen, Gerste, Hafer und Roggen) zu den Süßgräsern (Poaceae). Mais hat am Halm in zwei Reihen angeordnete Blätter und kann eine Höhe von bis zu 5 Metern erreichen (Ingruber D., 2001). Ebenso zeichnet er sich durch getrennte männlicher und weiblicher Blüten aus.
Bereits vor 7500 Jahren gab es Wildmais, doch wurde die einjährige, monözische (einhäusige) C_4-Pflanze erst durch Christoph 1498 n. Chr. nach Europa, Südspanien gebracht.Als wilden Vorfahr des Wildmais wird das Wildgras Teosinte angenommen.

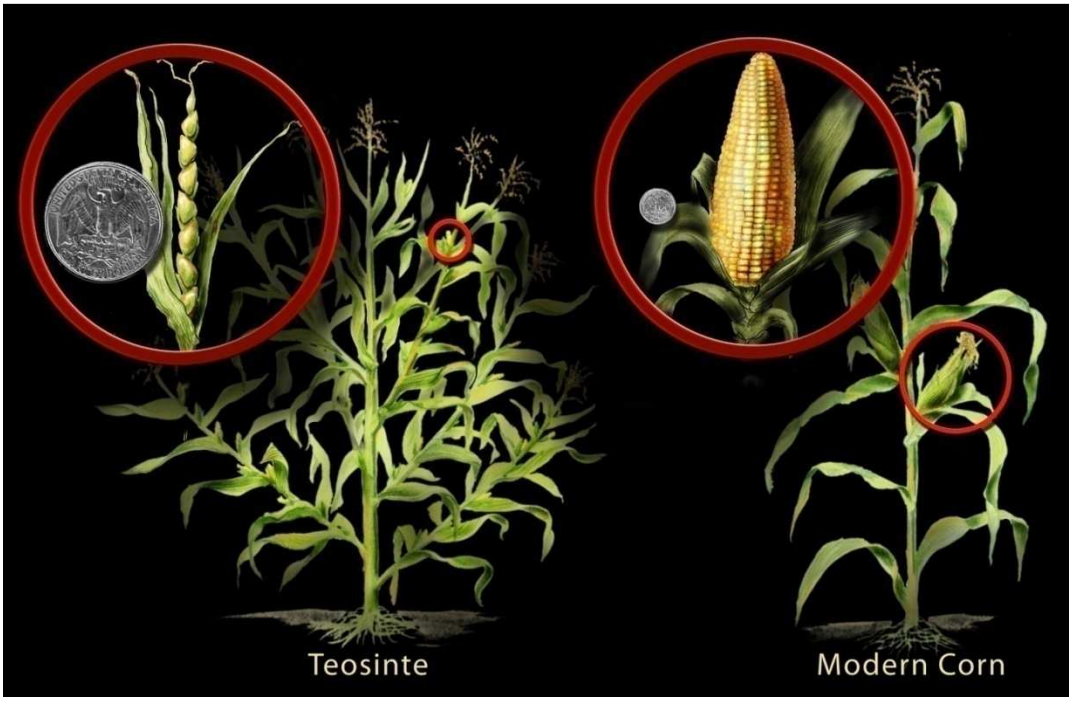


Abb.1: Teosinte und moderne Maispflanze im Vergleich (Lloyd Ch., 2008)

Der heutige Mais ist eine Domestizierungspflanze und somit in seiner Fortpflanzung auf den Menschen angewiesen. Weiters ist diese Pflanze nicht winterhart und somit auch in diesem Punkt vom Menschen abhängig.Im Gegensatz dazu sind Teosinte fähig, sich vom Menschen unabhängig zu vermehren.

Der gewöhnliche Mais unterscheidet sich morphologisch stark von Teosinte. Dies zeigt sich vor allem in der Stellung der weiblichen und männlichen Infloreszenzen (Teosinte: Seitenachsen mit terminalen männl. Infloreszenzen, Mais: Seitenachsen mit terminalen weiblichen Infloreszenzen) und der Architektur des Achsensystems (Strasburger, 2008). Allerdings weisen beide im Embryonalzustand identische Anlagen auf.
Ihre unterschiedliche Genregulation, d.h. die Regulation (Aktivierung/Inaktivierung) einzelner Gene, prägen das morphologische Erscheinungsbild dieser beider Pflanzen. Dabei handelt es sich nur um 5 DNA-Abschnitte des gesamten Chromosomensatzes (2n=20) [Oberdorfer E.; 1990], die aber gleich mehrere Merkmalsbereiche beeinflussen. Dadurch enthalten sie entweder ein einzelnes Gen mit pleiotroper Wirkung, oder (verschiedene) miteinander gekoppelter Gene (Ingruber D., 2011). Mit 2,3 Gigabasen [Anonymus 2011] weist Mais auch eine der größten Pflanzengenome auf. Diese enorme Größe wird durch eine große Anzahl an sogen. „long terminal repeatretrotransposons" erreicht.La Paz et al. (2010) konnte außerdem eine Mutationsrate von $3x10^{-5}$ Substitutionen / Seite / Generation verifizieren.

Die Ursache der massiven Verbreitung dieser bedeutsamen Kulturpflanze liegt an ihrer sehr guten Anpassungsfähigkeit an verschiedene klimatische Bedingungen und ihre große Produktivität.

Weltweit betrachtet ist der Maisanbau in den USA, wo sich auch die sogen. „cornbelt" (Maisgürtel) befinden am weitesten verbreitet. In Europa finden sich ebenfalls große Maisanbaugebiete, wie z. B. in Frankreich, Ungarn und Italien. Österreichs Maishauptanbaugebiete sind Ober- und Niederösterreich und das Burgenland, weiterer Anbau findet aber auch in Kärnten, Salzburg und der Steiermark statt.

Rang	Land	Menge (in t)
1	Vereinigte Staaten	316.165.000
2	China	177.540.788
3	Brasilien	56.060.400
34	Österreich	2.168.840
	Welt	**844.405.181**

Abb.2: Die 3 größten Maisproduzenten, Österreich und die weltweite Maisproduktion im Vergleich (2010) [http://faostat.fao.org/]

Durch die intensive Nutzung der Maispflanze besteht die Gefahr der Einengung der genetischen Variabilität durch Zucht-und Selektionsprogramme.

2.2. Sojabohne – Glycinemax (L.) Merr

Die zwischen 1700 und 1100 v. Chr. ursprünglich aus Nordostchina stammende, selbstbestäubende, einjährige Sojabohne gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (Leguminosae oder Fabaceae), Unterfamilie Schmetterlingsblütler (Faboideae). Ihre Wildform ist die *Glycinesoja*.

Abb.3.: Sojapflanze (aus: www.sojainfo.de)

Die Wuchshöhe der Sojapflanze kann zwischen 0,2 und bis zu 2,0 Metern betragen. Ihre langstieligen Blätter, die drei-, teilweise auch fünffiedrig sein können, wirft die Pflanze während der Fruchtreife ab. Die Blüten variieren zwischen weiß und lilafarben. Nach der Bestäubung werden kurze, behaarte Hülsen produziert, die 2 bis 4 Samen enthalten können. Die Sojapflanze verfügt über Pfahlwurzeln, die den Erdboden aufgrund ihrer Ausgeprägtheit stark lockern können. Sie ist außerdem die wichtigste Körnerleguminose, d.h. dass sie Symbiose mit *Rhizobiumjaponicum*(ein Knöllchenbakterium) eingeht und dadurch Luftstickstoff fixieren kann. Dabei wird zunächst molekularer Stickstoff (N_2) in Ammoniak (NH_3) und dieser wiederum in Ammonium (NH_4^+) umgewandelt.

Soja ist die weltweit wichtigste Ölsaat und ist aufgrund ihres hohen Eiweißgehalts, bzw. der Eiweißqualität mit tierischem Eiweiß zu vergleichenund hat daher einen hohen Stellenwert in der vegetarischen, bzw. veganen Ernährung. Sie wird u.a. für die Herstellung von Tofu, Sojasauce, Natto, Tempeh und Sojamilch verwendet Ihre wichtigste Bedeutung liegt jedoch in der Gewinnung von Sojaöl. Der verbleibenden Sojakuchen (etwa 80% der Masse) kann schließlich als Tierfutter verwendet werden.
Die Kultivierung der Sojapflanze ist in Gebieten mit heißen Sommern und Durchschnittstemperatur zwischen 20-30°C am optimalsten. Sie ist allerdings Temperatur-empfindlich, da ihr Wachstum bei Temperaturen unter 20°C, bzw. über 40°C signifikant abnimmt (Egli et al., 1980). Ebenso reagiert sie sensibel auf Wasser-Stress (Souza et al., 1997).

In der Sojapflanze finden sich Isoflavone, wie Genistein und Daidzein, die zur Gruppe der Phytoöstrogene gehören. Infolgedessen stand Soja immer wieder in Verdacht, bei Frauen ein hohes Risiko für Brustkrebs zu beherbergen (Messina et al., 2006). Es wurden auch Studien durchgeführt, in denen die Auswirkungen des Sojaverzehrs auf Männern beobachtet wurden. Dabei wurde u.a. die Beeinflussung des Testosteronspiegels und Zu-, bzw. Abnahme von Prostata Krebs untersucht (Hamilton-Reeves et al., 2010; Heald et al., 2007; Messina,

2010). Ebenso wurde ein unterschiedlicher Effekt von Sojakonsum, bzw. aus Soja hergestellten Produkten nach Kopfverletzungen festgestellt (White et al., 2000; Hogervorst et al., 2008).

Neben Mais und Weizen ist die Sojabohne die meistgehandelte Nutzpflanze.

Rang	Land	Menge (in t)
1	Vereinigte Staaten	40.505.700
2	Brasilien	28.562.700
3	Argentinien	4.291.710
	Welt	78.997.820

Abb. 4: Die 3 größten Sojaexporteure und der weltweite Sojaexport im Vergleich (2009)[http://faostat.fao.org/]

Die Sojaproduktion spielt in Europe eher eine untergeordnete Rolle; nur 5% Erntemenge wurde 2009 in Europa (v.a. Italien und Frankreich) produziert.

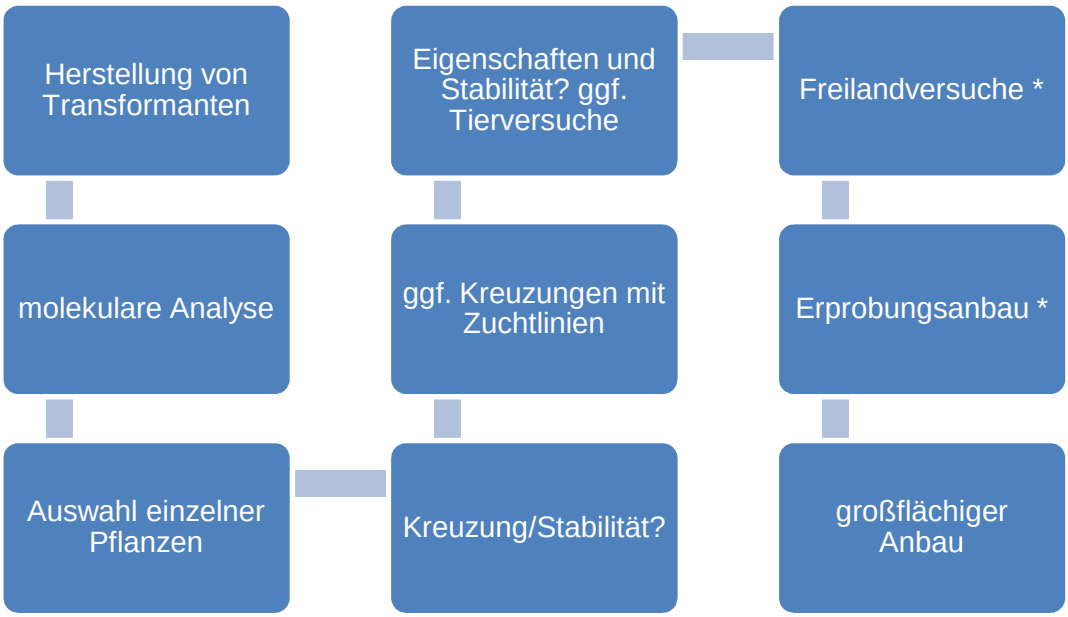
3.Gesetzlicher Hintergrund

3.1. EU Directive 2001/18/EG

Die Freisetzungslinie EU Directive 2001/18/EG regelt den Schutz der Umwelt und der menschlichen Gesundheit durch die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen (GVO) und das Inverkehrbringen von GVO. Durch Verbesserung der Effizienz und Transparenz des Genehmigungsverfahrens trägt sie zur Risikoabschätzung bei.

EU Directive 2001/18/EG soll das Verfahren für die Genehmigung der absichtlichen Freisetzung von GVO transparenter und effizienter gestalten, ebenso wie die Gewährleistung der Kontrolle von Inverkehr gebrachten GVOs. Die Umweltverträglichkeitsprüfung und die Beendigung der Freisetzung von GVO (sollten neue Informationen hinsichtlich des Risikos einer Freisetzung verfügbar sein) werden von dieser Richtlinie ebenfalls erfasst.

Die Bewertung der Umweltrisiken ist ein sehr wichtiger Punkt dieser Linie und es müssen etliche Stufen durchschritten werden, ehe es zu einer Freisetzung von GVO kommen kann.



* optional dazu z.T. ökologische Begleitforschung

Abb.5.: Schrittweises Vorgehen bei der Etablierung von gentechnisch veränderten Pflanzen für die Landwirtschaft (adaptierte Darstellung aus „Gentechnik bei Pflanzen“; Kempken und Kempken, 4. Auflage, Seite 131)

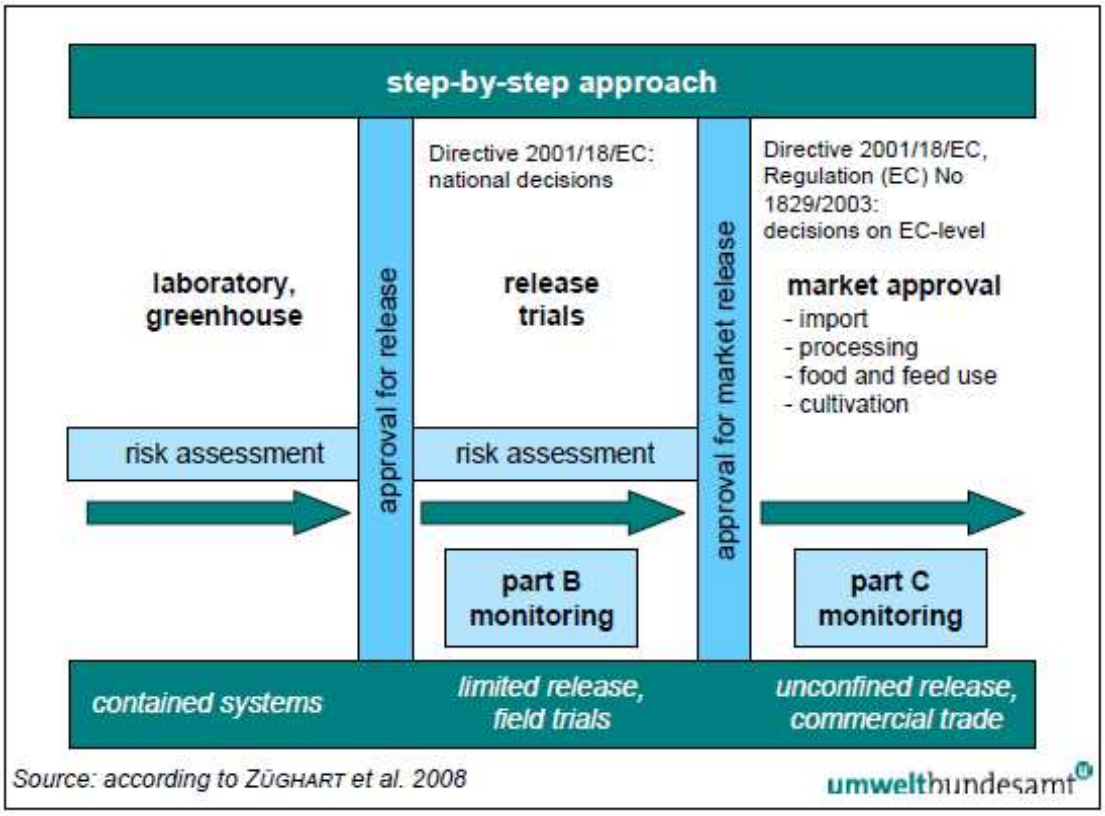


Abb.6: Überblick der einzelnen Punkte, die die Voraussetzungen für eine Freisetzung von GVO in die Umwelt bilden(Umweltbundesamt, REP-0305, Vienna, 2011/ Monitoring of genetically modified organisms)

Die genetische Stabilität ist der wichtigste Punkt für eine Marktfreigabe von GVOs. Erst wenn der EU genug Informationen hinsichtlich dieses Punktes vorliegen, wobei genau festgesetzt ist, wie dieser Nachweis erbracht werden muss, kann es zu einer Freigabe kommen: durch 2 voneinander unabhängigen Studien mit Event-spezifischen molekularen Daten muss die genetische Stabilität bewiesen werden können.

3.2. Regulation (EC) No 1829/2003

In der Verordnung (EC) No 1829/2003, auch „GVO Kennzeichnungs-Verordnung“ genannt, sind die Vorschriften für eine Risiko Abschätzung und für die Genehmigung von GVO (gentechnisch veränderte Organismen) aufgelistet. Diese Verordnung legt fest, wann Produkte unter bestimmten Voraussetzungen eine GVO-Kennzeichnung aufweisen müssen. Die Schwellenwerte liegen für GVO haltige Lebensmittel, vorausgesetzt dass dieser Anteil zufällig oder

technisch unvermeidbar entstand, bei 9.0%. Bei Bio-Produkten darf der GVO-Anteil bis 0.1% hoch sein.

3.3. Regulation (EC) No 1830/2003

Die Verordnung (EC) No 1830/2003 schreibt die Kennzeichnung, Rückverfolgbarkeit und Überwachung der GVO nach ihrer Markteinführung in Lebens- und Futtermittel vor. Gemäß dieser Verordnung müssen in Verkehr gebrachte Produkte, die GVO enthalten, oder aus diesen bestehen, Erkennungsmarker zu ihrer Identifikation aufweisen.

3.4. EFSA

Seit der Gründung der EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) am 28. Januar 2002 bemüht sich diese Agentur der EU, Informationen hinsichtlich bestehender und auch neu auftretender Risiken im Zusammenhang einer direkten oder indirekten Auswirkung auf die Futtermittel- und Lebensmittelsicherheit zu informieren und wissenschaftlich zu beraten. Dies betrifft vor allem die EU-Mitgliedstaaten, die Europäische Kommission und das Europäische Parlament. Wissenschaftliche Gutachten werden zu vielen Themen geben, z.B. zu Lebensmittel-Zusatzstoffen (Bsp. Aspartam), GVO, allergiererzeugende Lebensmittelzutaten, u.v.m.

So ist im z. B. im Dokument 2011 (Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants) die konkrete Vorgangsweise für eine Zulassung von GVO beschrieben. Darin wurde u.a. die Überprüfung der genetischen Stabilität der Einzelevents nach 5 Generationen (oder vegetative Zyklen) festgelegt.

Ebenso gehört es zu ihrem Aufgabengebiet, wissenschaftliche Daten zu erheben und auszuwerten. Damit soll die Risikobewertung durch alle verfügbaren Informationen erleichtert werden. Im Zuge des Gesundheitsschutzes der europäischen Verbraucher wird auch die Öffentlichkeit über ihre Tätigkeitsbereiche informiert.

B. Methoden

1. Theoretischer Hintergrund

1.1 DNA-Analysen

Gentechnische Veränderung können mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden. Es hat sich durchgesetzt, dass für die Detektion sowie für die Quantifizierung Real-time PCR mit Taqman-Sonden eingesetzt werden (Heid, 2008).

1.1.1 PCR

PCR (=Polymerasechainreaction) wird zur in vitro Amplifizierung der DNA verwendet. Durch die Verwendung der DNA-Polymerase, der synthetischen Oligonukleotide (Primer) sowie durch einenPuffer, der neben Tris, Magnesiumchlorid und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), enthält, wird so die chemische Verknüpfung einzelner Moleküle, die komplementär zu je einem Strang der Zielsequenz sind von 5´→ 3´- Richtung ermöglicht.

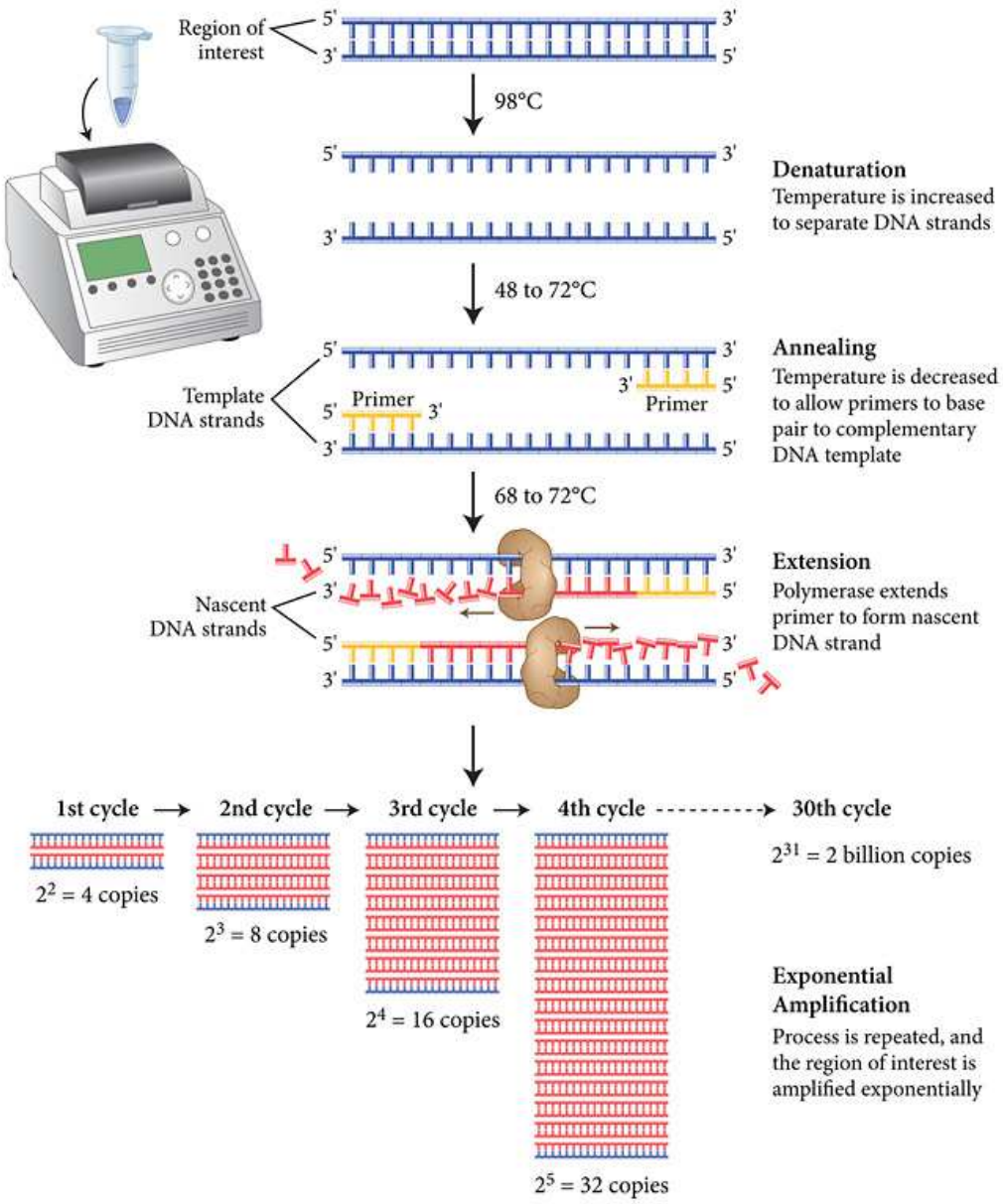


Abb.7: Ablauf einer PCR [https://www.neb.com/]

Während einer PCR können 3 wesentliche Schritte unterschieden werden (Denaturierung, Primer-Annealing und Extension):

Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, üblicherweise durch Erhöhung der Temperatur auf 90 °C bis 95 °C wird die Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden ermöglicht. Während des Primer-Annealing lagern sich die Primer bei einer Temperatur von circa 58 °C (bis circa 64 °C) an die so frei zugänglich gewordene komplementäre DNA-

Zielsequenz an. Mithilfe der Polymerase können die Primer daraufhin während der Extension bei einer Temperatur von 72 °C in 5´→ 3´ Richtung durch den Einbau der komplementärer dNTPs zu einem neuen Doppelstrang verlängert werden.
Durch die zyklische Wiederholung dieser 3 Schritte wird eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz zwischen den beiden auch als forward und reverse genannten Primern ermöglicht.

Zur weiteren Analyse der End-PCR-Produkte können diese anschließend auf ein Gel aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes die unterschiedlichen Basenpaarlängen unterschieden werden. Weisen die Produkte allerdings gleiche Längen auf, müssen andere Analysemethoden (z.B.: Sequenzierung, Restriktionsverdau, etc.) oder einer Quantifizierung mit real-time PCR zu ihrer Differenzierung herangezogen werden.

1.1.2. Real-time PCR mitTaqMan

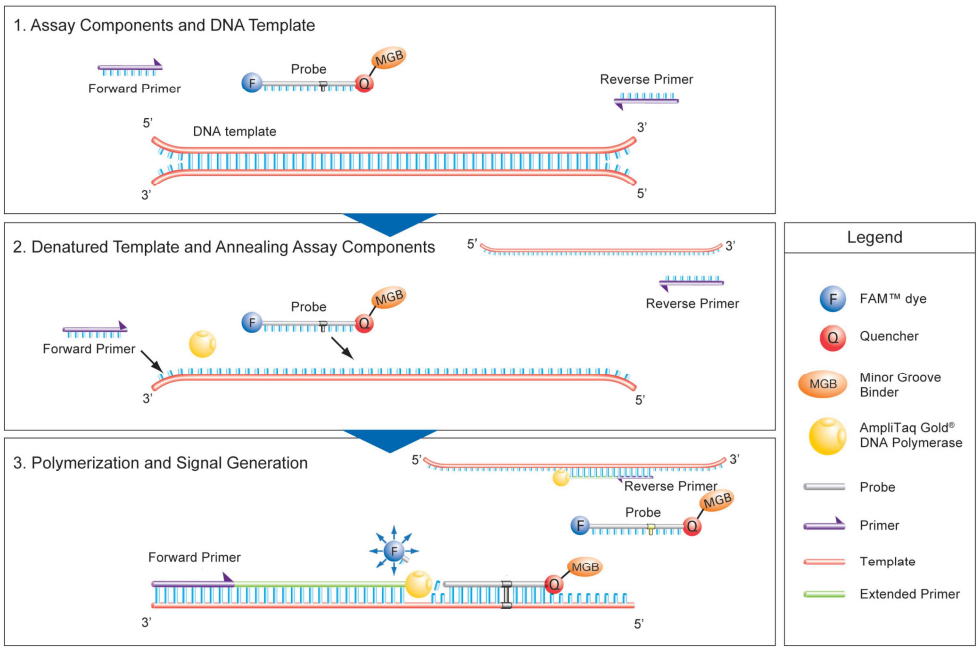


Abb. 8: Ablauf der real-time PCR mit TaqMan [aus:TaqMan® Gene Expression Assay reaction steps]

Die zur Fluoreszenz angeregte Sonde wird bei der spezifischen Wellenlänge (488 nm) durch die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs unterdrückt. Dies geschieht durch die räumliche Nähe zum Quencher, was in einen FET (Fluoreszenz-Energietransfer) resultiert. Zunächst lagern sich PCR Primer und Sonde sequenzspezifisch an. Während der Extension Phase setzt sich die TaqPolymerase an den Primer und verdrängt sie, wodurch eine Y-förmige Struktur entsteht. Die Polymerase beginnt ihre 5´->3´Exonuklease Aktivität und hydrolysiert die Sonde.
Im Zuge der Synthese des PCR-Produkts werden die Farbstoffe getrennt, da die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter unterbrochen wird. Bedingt durch die steigende Anzahl der freigesetzten Reportermoleküle wächst das Reporter-Signal. Durch die Verdrängung von nicht exakt 100%ig bindenden Sondenmolekülen, kann man sicher sein, wirklich nur sequenzspezifische Signale zu erhalten.

1.1.3.Scorpion Primer

Durch die Verwendung dieser komplexen Oligonukleotide lassen sich die Eigenschaften von PCR-Primern in einem (Uni-Scorpion) oder zwei Molekülen (Bi-Scorpion) und Real-Time PCR-Sonden vereinigen.
Scorpion Primer weisen eine charakteristischen Sekundärstruktur mit einer selbstkomplementären Schaft-Region (Thelwell 2005), deren Enden einen Quencher und einen Reporter-Fluorophor tragen, und einem PCR-Primer am 3´-Ende auf.
Wenn keine Zielsequenz vorhanden ist, absorbiert der Quencher fast zur Gänze die vom Fluorophor emittierte Fluoreszenz. Ist jedoch eine solche anwesend, kann die Reporter-Fluoreszenz gemessen werden, da sich die Loop-Region an die komplementäre DNA-Sequenz anlagert und sich dadurch der Abstand zwischen Reporter und Quencher vergrößert.

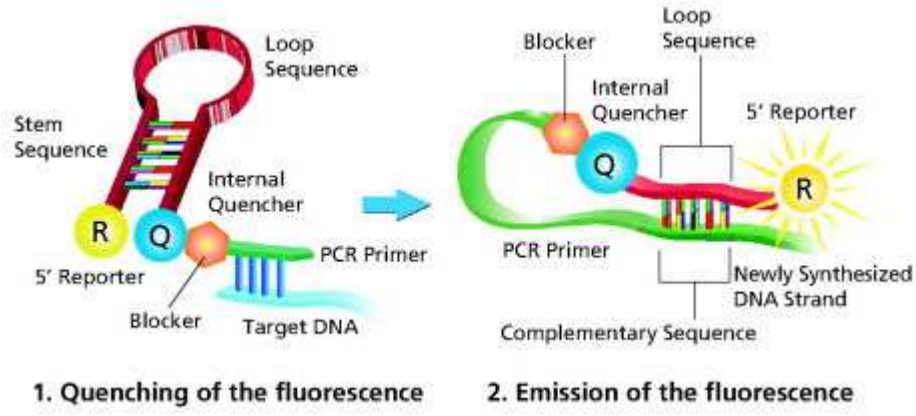


Abb.9: Scorpion Primer (aus:http://www.sigmaaldrich.com)

1.1.4. Syto9

Syto9 ist ein Zellen durchdringender Fluoreszenzfarbstoff, welches an die RNA, bzw. DNA sowohl in lebenden als auch in toten eukaryotische Zellen und gram-positiven und gram-negativen Prokaryoten bindet und dadurch die Fluoreszenz vergrößert.

Es gibt mehrere wichtige Charakteristika, die bei Syto9 Fluoreszenz Farbstoffen verifiziert wurden, wie z.B. die Permeabilität durch alle Membranen (auch bei Säuger – und Bakterienzellen), hohe Absorption mit Extinktionskoeffizienten (>50,000 cm^{-1} M^{-1}) bei sichtbarem Absorptions Maxima und sehr niedrige intrinsische Fluoreszenz. Die Excitation, bzw. Emission erfolgt bei 486/501 nm (RNA) und 485/498 nm (DNA).

In dieser Arbeit wurde Syto9 bei der real-time PCR eingesetzt, um den Anstieg der amplifizierten DNA in Form der real-time Kurve zu zeigen. Die Excitation war bei 470+/- 10 nm und die Detektion bei 510+/5 nm. Für die real-time PCR wurde auch mit Scorpion Primer gearbeitet, doch störten sich die beiden Farbstoffe durch ihre unterschiedlichen Excitations- bzw. Detektions Wellenlängen nicht.

1.1.5. HRM Analyse und Schmelzkurve

HRM (High Resolution Melt) Analyse ist eine post-PCR Methode, die verwendet wird, um genetische Variationen (DNA Methylierung, Mutation, SNP´s, DNA Fingerprinting, Screening nach Verlust der Heterozygotität, Spezies Identifizierung, u.v.m.) nachzuweisen. Sie geht mit einer Schmelzkurvenanalyse einher, bei der Doppelstrang DNA nach dem real-time PCR Lauf während einer Denaturierung (95°C) aufgeschmolzen wird und sich bei der Abkühlung (üblicherweise von 95 °C auf X °C)die Einzelstränge wieder aneinander anlagern. Währenddessen nimmt die Fluoreszenz ab, da der verwendete Farbstoff freigesetzt wird. Somit können homo- und heterozygote Allele unterschieden werde, da sie verschieden Schmelzpunkte und unterschiedliche Disassoziationsverhalten aufweisen (unspezifische PCR-Produkte haben niedrigeren Schmelzpunkt als spezifische). Diese Methode ermöglicht auch die Detektierung von SNP´s (single nucleotide polymorphism).

Die wichtigste Verwendungsmöglichkeit der HRM Analyse ist das sogenannte ´gene scanning´, bei der nach dem Vorkommen unbekannter Variationen in PCR Amplikons gesucht wird. Eine Veränderung im PCR Produkt, z.B. eine Mutation ist durch ihre veränderte Schmelzkurven sehr gut detektierbar.

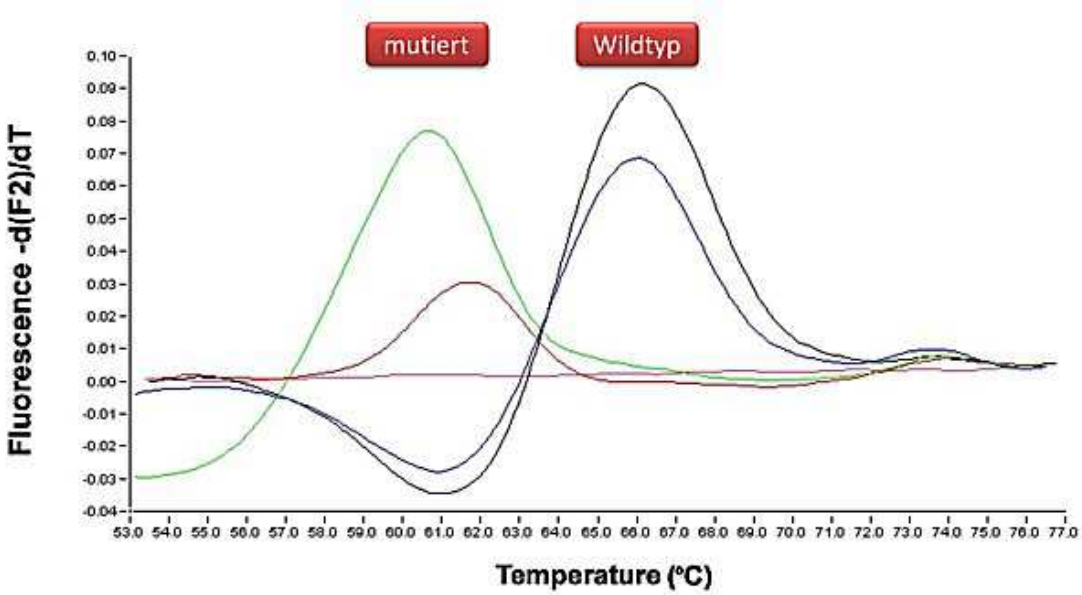


Abb.10: Schmelzkurven eines Wildtyps und einer Mutante im Vergleich (http://www.molekularpatho-trier.de/)

Wie in Abb. 10 erkennbar, ist die Schmelzkurve der Mutation nach links verschoben; dies hängt mit der Lösung der Sonde bei geringerer Temperatur (aufgrund des Mismatches) als beim Wildtyp zusammen. 50% der Bindungen sind bei dieser Temperatur noch intakt.

1.1.6. Agarosegel

Dieses Gel wird zur elektrophoreographischen Trennung einzelner DNA Abschnitte, die nach ihrer Größe geordnet werden eingesetzt. Die Konzentration solcher Gele wird nach der Größe der Komponenten gewählt, da für kleinere Partikel höhere und für größere Partikel kleinere Konzentrationen gewählt werden, um eine bessere räumliche Trennungen zu erreichen. Durch Beimischung von DNA interkalierenden Substanzen (Bsp. Ethidiumbromid) kann sichtbar gemacht werden.

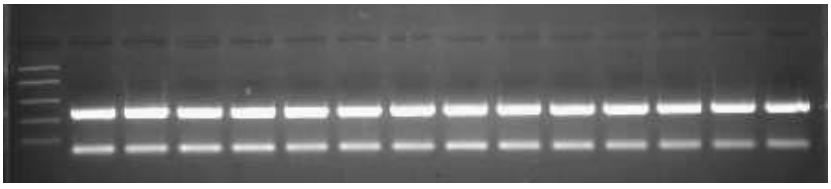


Abb. 11: Agarosegel mit M (Marker) und 14 Proben (Hier mit M13 Primern bei Überprüfung des Inserts für nachfolgende Sequenzierung)

1.2. Alpha-Komplementierung

Die alpha-Komplementierung, oder auch blau/weiß Selektion genannt, bietet eine schnelle und einfache Möglichkeit zur Überprüfung der Aufnahme eines Plasmids mit einem Insert in eine transformierte Bakterienkolonie. Dazu werden kompetente Zellen (E.coli) genutzt, die eine Deletion des LacZα (das α-Fragment des LacZ) aufweisen.

An dieser Stelle beinhaltet das Plasmid eine MCS (multiple cloning site), die mittels Restriktionsenzyme für eine Insertion einer Fremd-DNA geschnitten werden kann. Durch die Insertion wird aber das Gen und damit auch sein Produkt disruptiert. Somit kann keine funktionelle β-Galactosidase mehr hergestellt werden.

β-Galactosidase ist ein Protein, welches durch das LacZ Gens des Lac Operons – induziert durch IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) kodiert wird. Dieses Protein tritt in seiner aktiven Form als Homotetramer auf, wobei jedes Monomer aus 2 Fragmenten besteht – dem α-Fragment am NH2-Terminus und dem Ω-Fragment.
Durch die Deletion in den kompetenten Zellen ist die β-Galactosidase nicht funktionell. Erst durch die Komplementierung (durch das Plasmid) gelangt das α-Fragment in die Zelle, wo durch dessen Transkription eine funktionelle β-Galactosidase entsteht. Durch X-Gal (Analog zur Laktose, die von β-Galactosidase geschnitten werden kann) ist eine Detektierung desselben möglich, da das blaue Pigment 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo gebildet wird.

In den meisten Fällen kann also davon ausgegangen werden, dass wenn die Insertion positiv verlief, keine funktionelle Galaktosidase mehr gebildet werden kann und die Kolonien mit einem rekombinanten Plasmid scheinen daher auf X-Gal-Platten weiß auf. Trotzdem kann es vorkommen, dass weiße Kolonien aus verschiedenen Gründen trotzdem nicht das gewünschte rekombinante Plasmid beinhalten. Dies kann z.B. dann auftreten, wenn eine Kolonie keinen Vektor trägt. Ebenso kann es aber auch vorkommen, dass eine blaue Kolonie ein Insert trägt. Dies kann auftreten, wenn das Insert im LacZα „in frame“ liegt und ein STOP Codon fehlt, wodurch ein Protein gebildet werden kann, welches als LacZα fungieren kann.

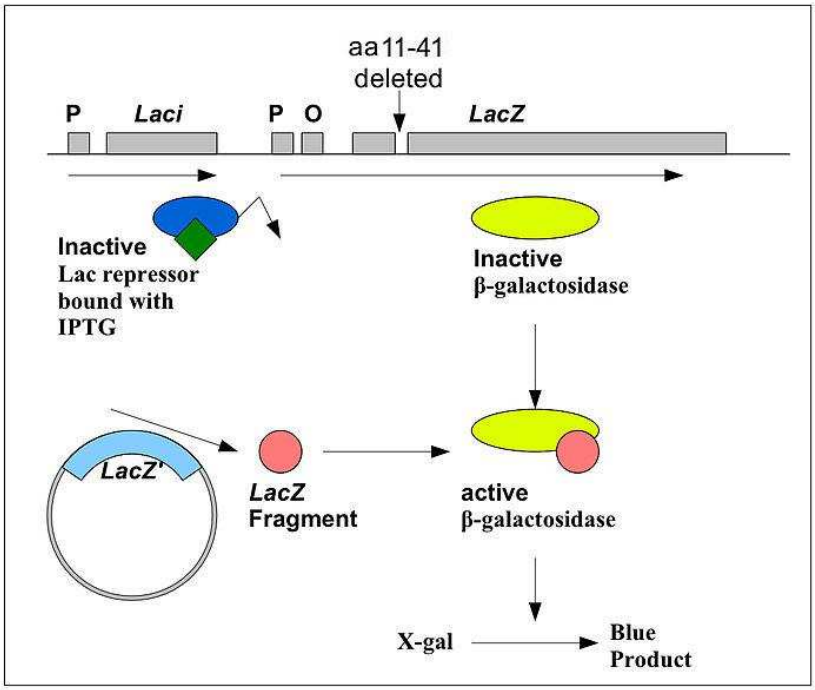


Abb.11: Blue-white Assay - Screening nach rekombinanten Vektoren
(aus: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blue_white_assay_Ecoli.jpg)

2. Praktische Durchführung

1. DNA Isolierung mittels Wizard SV Genomic DNA Purification System

1.1. DNA Lyse und Binding

Ein Mais-, bzw. ein Sojakorn wurde nach der Homogenisierung mittels einer Knoblauchpresse zu je 150 mg in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen. Anschließend wurde 820 µl TNE Puffer [10 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8), 1 % SDS],150 µl 5 M Guanidinhydrochlorid [Sigma] und 30 µl Proteinase K [0,01 mol/l; 600 mAnson-U/ml, Merck] hinzugefügt. Das Homogenat wurde kurz gevortext und anschließend über Nacht unter konstantem Schütteln bei 60°C inkubiert.

Danach wurde das Gemisch abzentrifugiert (13.200 g, 5 Min.) und vom Überstand 600 µl in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zu dieser Lösung wurde 300 µl Chloroform (> 99 %) beigemengt, für 20 Sek. gevortext und erneut zentrifugiert (13.200 g, 8 Min), wodurch zwei Phasen entstanden. Von der oberen, wässrigen Phase wurde anschließend 500 µl entnommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 4 µl RNAse (4 mg/ml) wurde das Gefäß bei 60°C und konstantem Schütteln (30 Min) inkubiert.

1.2. Washing

Die Lösung wurde mit 1 ml Wizard cleanup resin (Promega) gemischt, sofort auf ein Wizard Minicolumn (Promega) aufgetragen und unter Anlegen eines Vakuums durch den Filter gesaugt. Das Röhrchen wurde daraufhin 2mal mit je 1 ml 80% Isopropanol gewaschen.

1.3. Eluierung

Nach der Trocknung wurde mit 20 µl ddH2O (pre-) und anschließend mit 60 µl 10 mM Tris (70°C, pH 7.4) eluiert.

1.4. Messung und Überprüfung der Reinheit der DNA

Die DNA-Konzentration (ng/µl) wurde mit einem Photometer (Nano Photometer, Implen) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen und das Verhältnis von 260 zu 280 nm bestimmt. Der Wert einer sehr reinen DNA liegt bei 1,6- 1,8 (Zhou et al.1996).

Die Probe wurde danach zur zusätzlichen Überprüfung ihrer Reinheit auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, bevor sie bei -20°C gelagert wurde. Zur Durchführung einer real-time PCR wurden die Samples spätestens einen Tag vor dieser Reaktion im Verhältnis 1:5 mit TEL-Puffer (10 mM Tris, 0,2 mM EDTA) gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

1.5 Gelherstellung

Für ein 1% Agarosegel wurden 1,5 g Agarose (Sigma, for Routine Use) in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 150 ml 1xTAE-Puffer [0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA] aufgegossen und in der Mikrowelle erwärmt, bis sich die Agarose vollständig löste. Nachdem die Temperatur auf etwa 60°C gesunken war, wurde 3,2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml; Sigma) hinzugefügt, vorsichtig geschwenkt und das Gemisch in eine bereits vorbereitete Apparatur gegossen. Das bei Raumtemperatur erhärtete Gel wurde danach in die Elektrophoresekammer (gefüllt mit 1xTAE) gelegt, die Kämme entfernt und schließlich wurden die vorbereiteten Proben mit dem Quantitas DNA Marker (200bp-10kb, Biozym) aufgetragen. Die Laufbedingungen waren 140V, 400 mA und 100W (30 Min).

Mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetztes Agarosegel hilft, die nach der Größe aufgetrennte DNA zu erkennen. Im Fall von Ethidiumbromid können die durch UV-Bestrahlung angeregten Banden bei 254 nm sichtbar gemacht werden.

2. PCR

2.1. PCR-Ansatz

Die PCR wurde in einem 20 µl Ansatz unter der Verwendung der Gotaq Polymerase (5 u/µl, [Promega]) durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren 4 µl 5xGotaq Colorless Reaction Buffer (geschützte Information, pH = 8.5, 1.5 mM MgCl2); 1,5U Gotaq Polymerase; 0,5 µl 40 mM dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTGP, dTTP; pH=7,5 [Promega]); 0,5 µl Primer (100 µM [Sigma]) und 1 µl DNA. Die Probe wurde mit Nuklease-freiem, doppelt destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Menge	Reagenz	Endkonzentration
4 µl	5x Gotaq Colorless Reaction Buffer	1x
0.3 µl	Gotaq Polymerase	1,5 U

0,5 µl	Primer	2,5 µM
0.5 µl	dNTP	1 mM
13,3 µl	ddH20	
1 µl	DNA	
20 µl		

Tab.1: PCR-Ansatz zur Amplifikation der DNA-Sequenz

Die PCR-Proben wurden in 8-er Streifen aufgetragen, kurz abzentrifugiert und in einen Eppendorf Cycler gestellt.

2.2 PCR-Programm

Der Eppendorf Cycler wies eine Initiale Denaturierungsphase von 10 Minuten (94°C) auf. Weiters wurden 35 Zyklen eine Denaturierungsphase von 94°C, 30 Sekunden; eine Annealingphase von 60°C, 30 Sek. und eine Elongationsphase von 72°C, 30 Sek. programmiert. Den Schluss bildeten eine terminale Elongationsphase von 72°C, 1 Minute und die bis zum Schluss gehaltene Temperatur von 16°C.

Schritt	Zeit (s)	Temp. (°C)	Zyklen
Initiale Denaturierung	600	94	
Denaturierung	30	94	
Annealing	30	60	35
Elongation	30	72	
Terminale Elongation	60	72	
Hold/Ende	-	16	

Tab.2: PCR-Programm zur Amplifikation der DNA-Sequenz

2.3. PCR-Analyse

Zur Analyse wurden die PCR-Produkte auf einem 2,5% Agarosegel (siehe dazu auch Kapitel Methoden) aufgetragen. Von dem PCR-Produkt wurde 5 µl auf einen Parafilm gemeinsam mit 4 µl 5x loading buffer aufgetragen, gemischt und anschließend auf das fertige Gel überführt. Als Referenz wurde 4 µl vom 100

Bp Marker (Quantitas Fast DNA Marker: 200bp-10kb [Biozym] für genomische DNA und Quantitas Fast DNA Marker: 100bp-2kb [Biozym] bei Plasmiden verwendet.

2.4. PCR für die Sequenzierung

Bei genomischen Proben musste für die Sequenzierung die DNA zunächst mittels PCR amplifiziert werden. Dazu wurden M13 Primer-Sequenzen (forward und reverse) an das 3´Ende der Primer angeheftet. Bei Plasmiden entfiel die Amplifikation mittels PCR, da diese die M13-Sequenz bereits trugen.

2.4.1. PCR-Ansatz bei genomischen Proben

Die PCR wurde wie bereits bei *2.1 PCR-Ansätzen* beschrieben durchgeführt. Das PCR-Programm wurde mit einer Annealing-Temperatur von 60°C und 40 Zyklen durchgeführt.

Die PCR Produkte wurden anschließend zur Überprüfung der richtigen Bandenlänge auf ein 2,5% Agarosegel aufgetragen.

Anschließend wurden sie mittels E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega Biotek) aufgereinigt:
Ein Volumen PCR Produkt wurde mit 5 Volumen CP Puffer in einer 1,5 ml Eppendorf Tube vermengt, kurz gevortext und abgespinnt. Das Gemisch wurden danach auf den HiBind DNA Mini Column, welcher auf einem 2 ml Sammeltube gesetzt wurde, überführt. Das Tube wurde abzentrifugiert (1 Min, 13000 rpm), der Durchfluss verworfen und der Filter auf dasselbe Sammeltube gesetzt. Es erfolgte die Zugabe von 700 µl Wash Buffer, anschließend wurde erneut abzentrifugiert (1 Min, 13000 rpm) und der Durchfluss verworfen. Zum zweiten Mal, allerdings nur mit 500 µl wurde die Probe mit Wash Buffer gewaschen, abzentrifugiert (1 Min, 13000 rpm) und der Durchfluss verworfen. Zur Entfernung von Ethanol wurde das Tube anschließend wieder abzentrifugiert (2 Min, 13000 rpm). Zum Schluss wurde der HiBind DNA Mini Column auf ein neues 1,5 ml Eppendorftube gesetzt, genau auf die Filtermitte

30 µl Elutionspuffer aufgetragen und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren gelassen. Danach erfolgte die letzte Zentrifugation (1 Min, 13000 rpm).
Mit so aufgereinigten Produkten, bzw. den Plasmiden erfolgte anschließend im Zuge der Sequenzierung eine weitere DNA Amplifikation durchgeführt:

2.4.2. PCR-Ansatz für Sequenzierung

Die PCR wurde in einem 50µl Ansatz unter der Verwendung der Amplitaq Gold Polymerase (5u/µl, [Applied Biosystems]) durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren 5µl 10x GeneAmp PCR Buffer II (10 mM Tris–HCl pH 8.3, 50 mM KCl); 2U Amplitaq Gold Polymerase; 5µl $MgCl_2$ (3mM); 0,5µl 400µM dNTPs (je 10mM dATP, dCTP, dGTGP, dTTP; pH=7,5 [Promega]); 0,1 µl Primer (100 µM [Sigma]) und 2µl DNA. Die Probe wurde mit Nuklease-freiem, doppelt destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

Menge	Reagenz	Endkonzentration
5 µl	10x GeneAmp PCR Buffer II	1x
6 µl	$MgCl_2$	3 mM
0,1 µl	Primer	200 nM
0,4 µl	Amplitaq Gold	2U
0,5 µl	dNTP	400 µM
35,9 µl	dd H2O	
2 µl	DNA	
50 µl		

Tab.3: PCR-Ansatz für Sequenzierung

2.4.3. PCR-Programm für Sequenzierung

Schritt	Zeit (s)	Temp. (°C)	Zyklen
Initiale Denaturierung	480	95	
Denaturierung	15	95	38
Annealing	30	60	
Elongation	30	72	
Terminale Elongation	60	72	
Hold/Ende	-	16	

Tab.4: PCR-Programm für Sequenzierung

Die PCR Produkte wurden anschließend nach Invisorb DNA CleanUp (Invitek) aufgereinigt und nach dem Sanger Sequenzierungsprotokoll sequenziert. Die Kapillarsequenzierung wurde mithilfe von Big Dye Terminator chemistry durchgeführt und die Sequenzen wurden unter der Verwendung von Applied Biosystems 3730 x 1 Plattformen (http://www.beckmangenomics.com/documents/services/GS_Sanger_Sequenzing.pdf) dargestellt.

3. Real-time PCR

3.1. Real-time PCR mit Syto9

Die real-time PCR wurde in einem 20 µl Ansatz unter der Verwendung von RG 3000 (Corbett Research) durchgeführt. Die Bedingungen für die real-time PCR waren 2 µl 10xDyNAzyme II Hot Start buffer(15 mMTris–HCl pH 8.2, 30 mMKCl, 5 mM (NH4)2SO4, 2.5 mM MgCl2, 0.02% BSA); 0,6U DyNAzyme II Hot Start Polymerase (2U/µl [Finnzymes]); 100 nM Primer; 200 µM dNTP(je 10 mM dATP, dCTP, dGTGP, dTTP; pH=7,5 [Promega]) und 2 µl DNA. Für die HRM-Analyse, bzw. die Kontrolle mit dem Scorpion Primer wurde 4 mM Syto9 hinzugefügt und das restliche Volumen wurde mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt.

Menge	Reagenz	Endkonzentration
2 µl	10x DyNAzyme II Hot Start Reaction Buffer	1x
2 µl	Syto9	4 mM
0.3 µl	DyNAzyme Polymerase	0,6 U
0,2 µl	Primer	100 nM
0.1 µl	dNTP	200 µM
13,3 µl	ddH_20	
2 µl	DNA	
20 µl		

Tab.5: Real-time PCR-Ansatz

3.2 Real-time PCR-Programm

Schritt	Zeit (s)	Temp. (°C)	Zyklen
Initiale Denaturierung	300	95	
Denaturierung Annealing Elongation	10 30 30	95 55 72	40
HRM		70-92	

Tab.6: Real-time PCR-Programm

3.3. Real-time PCR mit HRM-Kit

Bei einigen Versuchen wurde mit dem Type-it HRM Kit (Qiagen) gearbeitet. In diesem Kit ist auch der Farbstoff EvaGreen enthalten, der bei der gleichen Wellenlänge wie Syto9 detektiert wird. Die real-time PCR wurde in einem 16 µl Ansatz unter der Verwendung von RG 3000 (Corbett Research) durchgeführt.
Dafür wurde 8 µl 2x HRM PCR Master Mix [Hot Start Taq Plus DNA Polymerase, Typ-it HRM PCR Buffer (with EvaGreen dye), Q-Solution, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)]; 0,7 µM Primer; und 2 µl DNA verwendet. Das restliche Volumen wurde mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt.

Menge	Reagenz	Endkonzentration
8 µl	2x HRM Master-Mix	1x
1.12 µl	Primer	0.7 µM
5,76 µl	DNA	
16 µl		

Tab.7: Real-time PCR Ansatz mit Type-it HRM Kit

3.4. Real-time PCR-Programm für Type-it HRM Kit

Schritt	Zeit (s)	Temp. (°C)	Zyklen
Initiale Denaturierung	300	95	
Denaturierung	10	95	40
Annealing	30	55	
Elongation	10	72	
HRM		70-85	

Tab.8: Programm der real-time PCR mit Type-it HRM Kit

4. Herstellung von Subklonen

4.1. PCR für Subklonierung

Für die Klonierung wurde zunächst eine PCR mittels spezifischen, bzw. bei Herstellung von Proben mit veränderter DNA mit entsprechenden Primern durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein 2,5% Agarosegel aufgetragen.

4.2. Gelherstellung

Für ein 2,5% Agarosegel wurden 3,75 g Agarose (Sigma, for Routine Use) in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 150 ml 1xTAE-Puffer [0,04 M

Tris-acetate, 0,001 M EDTA] aufgegossen. Die weiteren Schritte stimmen mit der bereits beschriebenen Gelherstellung überein. Als Marker wurde hier allerdings Quantitas Fast DNA Marker (100bp-2kb, Biozym) verwendet. Die Laufbedingungen waren 140V, 400 mA, 100W und 22 Min.

4.3. Ligation

Mit dem frischen PCR Produkt wurde anschließend die Ligation (auf Eis) durchgeführt, dafür wurde das TOPO TA cloning kit (Invitrogen) mit dem pCR 2.1 Vektor verwendet. Dabei wurde 1 µl frisches PCR Produkt mit 2 µl 10x Ligase Puffer, 1 µl Vektor, 15 µl sterilem Wasser und 1 µl T4 DNA Ligase auf Eis gemischt.

Menge (µl)	Reagenz
1	Frisches PCR-Produkt
2	10x Ligase Puffer
1	pCR 2.1 Vector
15	Steriles Wasser
1	T4 DNA Ligase
20	

Tab.9: Ligationsansatz

Der Ligationsansatz wurde anschließend für 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert und dann über Nacht auf 4°C gelagert.

4.4. Transformation

Für die Transformation wurden Agar Platten benötigt, dafür wurde 40 g LB-Agar (Roth) in 1 Liter ddH_2O aufgelöst und autoklaviert (121°C, 20 Min). Sobald anschließend die Agar Lösung eine Temperatur von 60°C erreicht hatte, wurden 2 ml Ampicillin [10 mg/ml; (Sigma)] hinzugefügt und gemischt. Das Agar konnte daraufhin flächendeckend in Petrischalen gegossen, bei Raumtemperatur aushärten gelassen und bei 4°C gelagert werden.

Zu je 50 µl kompetente Zellen [E. coli, JM109 Competent Cells >10^7cfu/µg (Promega)] wurden 3 µl Ligationsansatz hinzugefügt und auf Eis für 15 Minuten

inkubiert, anschließend einem Heatshock (45 Sek, 42°C) ausgesetzt und dann erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde das Gemisch mit 450 µl SOC [5 ml SOB Medium (Roth), 50 µl 1M $MgCl_2$ (Sigma), 90 µl 20% Dextrose Lösung (Dextrose, Sigma) vermengt und für 60 Minuten im Kulturinkubator (250 rpm, 37°C) inkubieren gelassen.
Währenddessen wurden die hergestellten Agar Platten vorbereitet, dazu wurde pro Platte 80 µl X-Gal [20 mg/ml (Sigma), gelöst in N´N´- Dimethylformamide (Merck)] und 16 µl IPTG [25 mg/ml (Sigma)] ausgestrichen und die Platten bei Raumtemperatur trocknen gelassen.
Anschließend wurden pro Probe 2 Platten mit je 100 µl der Inkubationslösung steril mittels Glas-Drigalski-Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 39°C in einem Wärmeschrank (Memmert) wachsen gelassen.

4.5. Blue-/White-Selektion

Die positiven, weißen auf der Agarplatte gewachsenen Kolonien wurden mittels einer 10 µl Pipettenspitze abgenommen und in eine Glaseprouvette mit je 1,5 ml LB-Medium (Roth) mit Ampicillin [50 mg/ml, (Sigma)]; senkrecht fallen gelassen. Die Inkubation der Proben erfolgte über Nacht bei 37°C, 250 rpm im Schüttler.

4.6. Überprüfung des Inserts

Zur Überprüfung, ob der richtige Bereich ligiert wurde und die abgenommenen Kolonien kein falsch positives Ergebnis zeigen, wurde anschließend eine PCR mit spezifischen, bzw. auch mit M13-Primern durchgeführt. Erst wenn mit beiden Primern die PCR-Produkte bei der Überprüfung auf dem Agarosegel die richtige Bandengröße zeigten, wurden mit den betreffenden Kolonien weiter gearbeitet.

Um die DNA zu gewinnen, wurde von der Übernacht Kultur wurden 100 µl in ein 1,5 ml Eppendorfer Tube überführt, zur Zell-Lyse für 1 Minute bei 95°C in den Thermomixer gestellt und anschließend abzentrifugiert (1 Min, 13200 g). Vom Überstand wurde dann 1 µl für die anschließende PCR verwendet. Die PCR

wurde nach der bereits beschriebenen Vorgangsweise durchgeführt und der Thermocycler mit einer Annealingphase von 60°C und 35 Zyklen programmiert.

Zur Überprüfung wurden 5 µl PCR-Produkt auf ein 2,5%-iges Agarosegel aufgetragen (22 Min, 140V, 400mA, 100W).
Die positiven Kolonien (d.h. Kolonien, die in beiden PCR-Ansätzen [spezifischer Primer und M13 Primer] in der richtigen Bp-Länge die Einzelbande aufwiesen) wurden dann für den Ausstrich mittels Impföse auf einer Agarplatte [mit Ampicillin, 10 mg/ml; (Sigma)] ausgestrichen und diese Kolonien über Nacht bei 39°C wachsen gelassen. Von diesen Platten wurde dann je eine Kolonie abgenommen und in 5 ml LB-Medium (Roth) mit Ampicillin [50 mg/ml, (Sigma)] über Nacht im Schüttler wachsen gelassen (37°C, 250 rpm).

4.7. Aufreinigung der Klone

Die Aufreinigung der Klone erfolgte nach EasyPrep Pro – Plasmid Mini Prep (Biozym).
Von der Übernacht Kultur wurde ein 2 ml Eppendorf Tube befüllt und dieser für 2 Minuten (13.000 rpm) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Eppi erneut zur Gänze befüllt, abzentrifugiert (2 Min, 13.000 rpm) und der Überstand wieder verworfen. Das Pellet wurde dann in 250 µl Buffer B1 durch Vortexen homogenisiert, danach erfolgte die Zugabe von 250 µl Buffer B2 und 350 µl Buffer B3, wobei hinter diesen Zugaben das Eppi jedes Mal 5x vorsichtig geschwenkt wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (7 Min, 13.000 rpm).
Es wurde ein Mini Spin Column wird auf ein neues 2 ml Eppi gesetzt, der gereinigte Überstand wurde auf den Filter überführt, der Deckel geschlossen und abzentrifugiert (30 Sek.,13.000 rpm). Schließlich wurde 700 µl Buffer B4 hinzugefügt, abzentrifugiert (30 Sek., 13.000 rpm), der Durchfluss verworfen und der Filter auf dasselbe Eppi aufgesetzt und erneut abzentrifugiert (2 Min., 13.000 rpm). Der Mini Spin Column wurde auf ein neues 1,5 ml Eppi gesetzt, mit 30 µl ddH_2O versetzt und für 5 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurde

wieder abzentrifugiert (1 Min, 13.000 rpm).Als letzter Schritt erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehalts via Photometrie-Messung.

C. Material

1. Primer

Name	Sequenz
VW01	5'-TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG-3'
VW03	5'-TCCATCTTTGGGACCACTGTCG-3'
3´MON810 fw	5'-CCAAGCACGAGACCGTCAA-3'
3´MON810 rev	5'-GCTCGCAAGCAAATTCGGAA-3'
3´MON810 mut	5´-GCTCGCAAGCAAATTCGGAAATGAAAGAAGGCTACCGAAATTCCTCG-3'
3´MON810 g1	5´-GCTCGCAAGCAAATTCGGAAATGAAAGAAGGCTACCGAAATCCTCG-3'
3´MON810 ga1	5´-GCTCGCAAGCAAATTCGGAAATGAAAGAAGGCTACCGAATCCTCG-3'
Adh1 Sc-fw	5´-GTAACATCGTCCAGCAGTGC-3´
Adh1 Sc-rev	5´-TTCAAAGAAAGAAACGCCTCCTT-3´
Adh1-A	5´-TTCAAAGAAAGAAACGCCTCCTTGCAAGTTGCAACATTCTTAGAT-3'
Adh1-F	5´-TTCAAAGAAAGAAACGCCTCCTTGCAAGTTGCAACATTCCTAGAT-3´
Adh M13 fw	5´-ATGTAAAACGACGGCCAGTGTAACATCGTCCAGCACTGC-3´
Adh M13 rev	5´-ACAGGAAACAGCTATGACCTTCAAAGAAAGAAACG CCTCCT-3´
M13UN	5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13REV	5'-CAGCAAACAGCTATGACC-3'
Srrfw	5´-CGGGCTGCCGCTTGACCAT-3´
Srrrev	5´-CAGCAGAGATCCCCAGGAAGATACTTATAA-3´
Srr M13 fw	5´-ATGTAAAACGACGGCCAGTCGGGCTGCCGCTTGACCAT-3´
Srr M13 rev	5´-ACAGGAAACAGCTATGACCCAGCAGAGATCCCCAGGAAG-3´
Srr del	5´-TTCAAAGAAAGAAACGCCTCCTTGCAAGTTGCAACATTCTAGAT-3'

Scorpion

Name	Sequenz
3'Mon810 Sc	5'-[Cy5]CGCGGCGAGGACTTTCGGTAGCCGCG[BHQ2][HEG]GCTCGCAAGCAAA TTCGGAA-3'
RRS Sc	5´-[Cy5] CGCGCCAAGCGCATCATGCTGGCGCG[BHQ1][HEG]CAGCAG AGATCCCCAGGAAGATACTTATAA-3´
Adh1-Sc	5´-[Cy5]CCGGTATGATCTAGGAATGTTGCCGG[BHQ1][HEG]TTCAAAGAAAGAA ACGCCTCCTT-3´
Adh1-F	5´- [Cy5]CCGGTATGATCTAGGAATGTTGCCGG[BHQ1][HEG]TTCAAAGAA AGAAACGCCTCCTT-3´

2. Geräteliste

- Sartorius Bp2100 (Waage)
- Mettler AT261 Delta Range (Analysewaage)
- Memmert (Wärmeschrank)
- Zentrifuge 5415 D (Eppendorf)
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- MS2 Minishaker (IKA)
- Gilson Pipetten pipetman (10µl, 200µl, 1000µl von Gilson)
- EBA12 Zentrifuge (Hettich)
- Liebherr (Kühlschrank, +4°C)
- ConstructaServa (Tiefkühler -20°C)
- Ultima II (Revco, -80°C)
- MR-5400 Mikrowelle (Hitachi)
- Electrophoresis Power Supply – EPS 601 (Amersham Pharmacia Biotech)
- Vakuumpumpe Neuberger (Freiburg) + Verteiler (20x) (Promega)
- Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research)
- Varioklav Dampfsterilisator H+P (Varioklav)
- Photometer (Nano Photometer, Implen)
- SyneryMillipore
- Mastercyclergradient S (Eppendorf)
- Gelscanner (BioRad)
- Inkubator, CERTOMAT BS-1 (Bram Biotech International)

- Nanophotometer(IMPLEN)

3. Kits

- Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega)
- Wizard DNA Clean-Up System (Promega)
- Invitrogen TA Cloning Kit (Invitrogen)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- Type-it HRM PCR Kit (Qiagen)
- Gotaq DNA Polymerase (Promega)
- Gotaq Hot Start Polymerase (Promega)
- TOP10 Competent cells (Promega)

D. Ergebnisse

1.Transgene Sojabohne GTS 40-3-2

1.1. Konstrukt des GTS 40-3-2

Das Konstrukt der trangenen Sojabohne GTS 40-3-2 gliedert sich in mehrere Teile auf (siehe auch Abb 11).

Plant DNA	CaMV 35S	CTP4	Cp4 epsps	Nos	Cp4 epsps trunc	unknown	Plant DNA

Abb.10: Zusammensetzung des Events GTS 40-3-2 (http://gmdd.shgmo.org)

*cp4 epsps*cassette	Promotor	P-35S-CTP4
		enhanced CaMV 35S;chloroplast transit peptide from Petunia hybrid
	Coding Region	Coding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
		From*Agrobacteriumtumefaciens*
	Terminator	NOS 3'
		*A. tumefaciens*nopaline synthase (nos) 3'-polyadenylation signal

Abb.11: Detailierte Informationen zum Zielgen(http://gmdd.shgmo.org)

Wie aus Abb. 11ersichtlich ist, beinhaltet GTS 40-3-2 nur ein einzelnes Insert, bestehend aus P-35S (CaMV 35S als Promoter), CTP4, cp4 epsps und dem T-

nos. Am 3´-Ende des T-nos befindet sich eine 250 bp große Sequenz des cp4 epsps, an die sich eine 534 bp großes Rearrangement der DNA anschließt und die schließlich in die Pflanzen DNA übergeht (http://gmdd.shgmo.org).
Die Herbizidtoleranz der transgenen Sojapflanze wird durch das eingeführte Gen cp4 epsps vermittelt, der mittels Mikropartikel Bombardement integriert wurde. Hierbei wurde ein verändertes EPSPS und zwar von Agrobacterium sp. Stamm C4 (CP4-EPSPS) verwendet und in transgene Kulturpflanzen integriert. Mit Hilfe des veränderten CP4-epsps Gens, das für die bakterielle EPSPS kodiert, wies die transgene Pflanze daraufhin eine Toleranz gegenüber Glyphosat-haltigen Herbiziden Roundup Ready. Die letale Wirkung des Wirkstoffs des Breitbandherbizids Glyphosat geht auf eine Hemmung der pflanzlichen 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) zurück, einem essentiellen Enzym beim Aufbau aromatischer Metabolite. Bei einem Mangel an sekundären Inhaltsstoffen zeigt die Pflanze zunächst Wachstumsstörungen, Chlorosen, Nekrosen und stirbt letztlich gänzlich ab.
Die ersten Anbaugebiete dieser gentechnisch veränderten Pflanze waren 1994 die USA und 1995 Kanada. Für den europäischen Markt spielt diese Pflanze vor allem als Futtermittel eine bedeutende Rolle, da jährlich Millionen Tonnen gentechnisch veränderte Soja nach Europa importiert werden.

1.2. Ziel und Vorgangsweise der Untersuchungen von Soja

Ziel der Soja Experimente war, zu untersuchen, ob es während der Haltung von Soja zu Post-Transformations Änderungen des Konstrukts kommt. Für diese Fragestellung wäre es eigentlich notwendig, die DNA Sequenz zwischen verschiedenen Generationen zu vergleichen. Leider hatte ich keine Saatgut Körner von verschiedenen Generationen zur Verfügung gehabt. Wenn es jedoch zu Post-Transformations Änderungen kommt, sollten auch Änderungen zwischen Saatgut Körnern innerhalb einer Generation auftreten, wenn man eine große Anzahl von Saatgut Körnern untersucht. Ich habe für die Untersuchungen letztere Strategieausgewählt und 1034 Körner von Sojasaatgut untersucht.

Eine zweite Schwierigkeit für die Untersuchung von Post-Transformations Änderungen besteht darin, dass keine SNP (single nucleotide polymorphism) bei transgenem Soja bekannt sind. Ich konnte also keine SNP als positive Kontrolle einsetzen. Deshalb habe ich mit einer PCR Änderungen (auf Deletionen ausgelegten) der DNA Sequenz bei GVO Soja erzeugt und folgende Experimente durchgeführt:

1. Zunächst wurde der Plasmid GVO-Wildtyp zur Ermittlung der PCR Effizienz herangezogen, indem eine 1:10 Verdünnungsreihe mit 5 gemessenen Punkten verwendet wurde.

2. Anschließend wurden die hergestellten Plasmide GVO-Wildtyp und Deletion, bzw. ihre 50:50% Mischung mittels Syto9 getestet, um eine etwa gleich hohe Konzentration der Proben sicher zustellen.

3. In einem weiteren real-time PCR Lauf wurde Syto9 und Scorpion Primer zur Unterscheidung der Plasmide gemeinsam getestet. Dies war durch die Detektion bei verschiedenen Kanälen möglich. Die Auswertung erfolgte mittels Syto9-Werten, Scorpion-Werten und HRM Analyse. Somit konnte auch festgestellt werden, wie gut Scorpion Primer und HRM Analyse für die Charakterisierung der Proben mit veränderter DNA fähig ist.

4. Weiters wurden 1034 Soja Einzelkörner in insges. 11 real-time PCR Läufen mit Syto9 und Scorpion Primer gemeinsam getestet. Als Referenz wurde auch eine Verdünnungsreihe (ausgehend von 10^{-4} ng/µl 4 weitere Verdünnungen mit Verd.faktor 5) des GVO-Wildtyps und ein Sojapool (bestehend aus 20 Proben) mitlaufen gelassen. Zunächst wurden Proben mit abweichenden Syto9 Ct-Werten ausgesondert, da sie niedrige DNA-Qualität (durch sehr hohe Ct-Werte erkennbar) aufwiesen. In den verbleibenden Proben wurde nach solchen gesucht, die sich durch hohe Scorpion Ct-Werte und niedrige HRM-Werte auszeichneten und daher als potentielle Mutanten galten.

5. Die 41 Proben wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf eine DNA Abweichung überprüft, die aber nicht gefunden werden konnte. Jedoch konnten einige Chromatogramme nicht eindeutig identifiziert werden.

6. Zur genaueren Überprüfung wurde die DNA jener Proben in Plasmide kloniert und erneut sequenziert.

7. Zusätzlich wurden pro Screening-Lauf 10 Proben mit den höchsten Scorpion Ct-Werten und den niedrigsten HRM-Werten ausgesucht, da potentielle Mutanten in beiden Clustern vertreten sein sollten. Dies traf auf 3 Proben zu, die daraufhin ebenfalls in Plasmide kloniert und sequenziert wurden.

1.3. Verwendete Soja-Sequenz zur Herstellung der Deletion

Die bei Windels et al. (2001) beschriebene Roundup Ready Sojasequenz wurde für die Herstellung einer Deletion (Cytosin) an Nukleotid Nr. 306 als Vorlage genommen (für Sequenzen siehe auch Primer).

1 tgcgcggtgtcatctatgttactagatcggggatcgatcccccaccggtccttcatgttc
61 ggcggtctcgcgagcggtgaaacgcgcatcaccggccttctggaaggcgaggacgtcatc
121 aatacgggcaaggccatgcaggccatgggcgccaggatccgtaaggaaggcgacacctgg
181 atcatcgatggcgtcggcaatggcggcctcctggcgcctgaggcgccgctcgatttcggc
241 aatgccgccacgggctgccgcttgaccatgggcctcgtcggggtctacgatttcaagcgc
301 atcatgctgggaaattttagcgagattataagtatcttcctggggatctctgctgttact
361 ggtgaatagtgagacagagtcttctgagctcataggataaaataaattataattagtaaa
421 ttttttaattaaataaatcaattacttcataaataatttttttttatagaatatgttgaca
481 ttctagccggatatagaactaatgtaaagaaaccttaaaaattttgtttggaagaatatg
541 ttattgaaagacaaatctaattaagtttatcagggtcatttgttgaagataggaaacctt
601 cagcaatttgaatattaagtaactgcttctcccagaatgatcggagtttctcctcctgct
661 attacatgagcaaaaataaaaaataaataaaagataagattaagcttcaacatgtgaagg
721 agtagtacactcaccagtgaccctaataggcaacagcatgaaaaaaaataaaaaagaata
781 aaaatagcatctacatatagcttctcgttgttagaaaaacaaaactatttgggatcggag
841 aagaactgtttgaggcgaatggcctggtcgtcgcggccatcgtcgagaagttcgtgaaga
901 agctcgaatgcggtgagaaggtagttctcttccaacagaaagttcaccacgcaattgcac
961 agcgaagatctctccacgtccattttctctctctgtctctgatcttaagccattcattca
1021 agacaagacaagagaagagaagaga

Abb.13: Roundup Ready Sojasequenz; rot markiert ist die Sequenz zwischen den Soja Primern; gelb markiert ist das deletierte Nukleotid

Die Sequenz des Primers für die Deletion geht von Nukleotid Nr.251 bis Nr.355 und weist bei Nr. 306 die Deletion eines Cytosin auf (siehe auch Abb. 13).

1.4. Erzeugung der Plasmide GVO- Wildtyp (GVO-wt) und Deletion (del)

Für den Vergleich von genomischer und Plasmid DNA wurden zunächst die Plasmide GVO-Wildtyp und Deletion hergestellt. Dazu wurde eine genomische Probe als Ausgangsmaterial verwendet und mittels PCR und geeigneten Primern (Primer siehe Tabelle 1) amplifiziert. Die Durchführung der PCR fand nach selben Protokoll wie bereits beschrieben statt (siehe dazu auch Methoden/PCR). Es wurde 40 ng/µl DNA verwendet und der Thermocycler mit einer Annealing Temperatur von 60°C und 35 Zyklen programmiert.
Zur Überprüfung der PCR wurden 5 µl PCR-Produkt auf ein 2,5% Agarosegel aufgetragen.
Das frischen PCR Produkt wurde anschließend für die Herstellung von Subklonen verwendet (für Durchführung siehe auch Methoden/Herstellung von Subklonen).

1.5. Herstellung von Verdünnungen der Plasmide

Nachdem der DNA-Gehalt der Klone mittels Photometer ermittelt wurde, wurde von diesem Wert ausgehen anschließend eine Verdünnung 10^{-1} bis 10^{-7} ng/µl mit TEL-Puffer hergestellt und die Proben zunächst für die Ermittlung der PCR Effizienz verwendet.

1.6. Ermittlung der PCR Effizienz

Zur Ermittlung der PCR Effizienz wurden GVO Plasmide eingesetzt, da sie ein wichtiger Parameter der GVO Validierung darstellen.

Für die Berechnung der PCR Effizienz (E) wird die Steigung einer Standardkurve herangezogen. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe können die daraus resultierenden Ct-Werte zur Darstellung einer Kurve verwendet werden.

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Die Steigung –m wird durch eine lineare Regressionsgerade durch die Kurve erhalten. Das heißt, wenn m= -3,32 ist, beträgt die Effizienz 1 (100%); bei m= -3,5 beträgt E nur mehr 93%; bei m= -3,6 beträgt E 90%, usw. (http://www.invitrogen.com).

Die Effizienz einer PCR sollte zwischen 90% und 100% betragen (−3.6 ≥ m ≥ −3.3).

Wie schon bei Neumann et al. (2009) wurde bei der Diplomarbeit zur Ermittlung der PCR Effizienz der Verdünnungsfaktor 1:10 gewählt. Der hergestellte GVO-Wildtyp (10^{-2} ng/µl – 10^{-6} ng/µl) wurde für die Ermittlung der PCR Effizienz herangezogen.

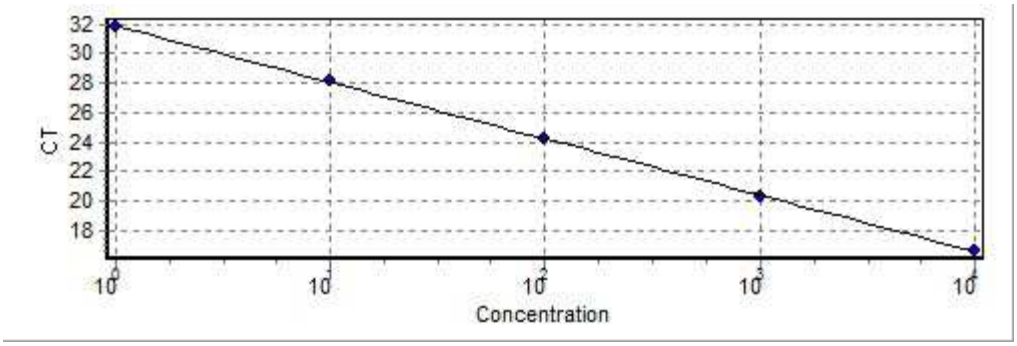


Abb.14: Bild einer Standardkurve mit Plasmiden (Verdünnungsfaktor 1:10).

In Abbildung 14 ist das Bild einer Standardkurve dargestellt. Die Effizienz betrug hier 0,93; d.h. sie lag bei 93% und damit im angestrebten Bereich.

1.7. Unterscheidung von GVO-Wildtyp (wt) und Deletion (del) mittels Scorpion Primer und HRM Analyse (High resolution melting)

1.7.1. Real-time PCR mit Plasmiden

Für die Unterscheidung der Plasmide wurden die hergestellten 10^{-6} ng/µl Verdünnung von 100% GVO-wt und del sowie eine 50:50% Mischungen mit dem GVO-Wildtyp verwendet und diese mittels real-time PCR einmal mit Syto9

und einmal mit Scorpion Primer gemeinsam getestet (Durchführung siehe auch Methoden/Real-time PCR).

1.7.1.1. Real-time PCR mit Syto9 und Plasmiden

Für die real-time PCR wurde 10 µl der 10^{-6} ng/µl verdünnten DNA verwendet und eine Annealing Temperatur von 55°C mit 40 Zyklen bestimmt.
Syto9 wurde für die Überprüfung der Proben-Konzentrationen eingesetzt, da diese bei allen Proben gleich hoch sein sollte. Bei der Auswertung des real-time PCR Laufs zeigte sich, dass alle Proben etwa die gleiche DNA Konzentration und einen sehr ähnlichen real-time PCR Verlauf aufweisen. Dadurch gab es bei den Syto9 Ct-Werten nur geringe Unterschiede zwischen den Proben. Der Ct-Wert für der GVO-Wildtyp lag bei 28,15 und sowohl für die Mutation, als auch für die 50:50% Mischung GVO-Wildtyp/Mutation lag er bei 27,95.

Eine Unterscheidbarkeit zum GVO-Wildtyp wurde erst mit der HRM Analyse erzielt, bei der die Proben gegen die Referenzprobe GVO-Wildtyp (10^{-6} ng/µl) mit dem Confidenz-Wert 100% gemessen wurden. Je mehr eine Probe von dieser abwich, desto kleiner war auch ihr Confidenz-Wert. So lag der Confidenz-Wert von 100% Deletion bei 57,08 und die der 50:50% Mischung GVO-Wildtyp/Deletion bei 71,72 (und somit in etwa in der Mitte zwischen den beiden 100%-Proben).

Die 10^{-6} ng/µl Plasmide wurden anschließend auch mit dem Scorpion Primer getestet.
Der Unterschied zwischen der Überprüfung der Proben mit Syto9 und dem Scorpion Primer ist, dass man mit Syto9 die Konzentration der Proben, die gleich hoch sein sollte misst. Demgegenüber kann der Scorpion-Wert zwischen 0% und 100% variieren. Somit können potentielle Proben mit Änderungen in der DNA durch eine veränderte real-time PCR Kurve und höhe Ct-Werte, bzw. niedrigere Confidenz-Werte (beides gemessen gegen GVO-Wildtyp, bzw. bei genomische Proben gegen einen Proben-Pool) detektiert werden.

1.7.1.2. Real-time PCR mit Scorpion Primer und Plasmiden

Für die Real-time PCR wurde 10 µl der 10-6 ng/µl verdünnten DNA verwendet und eine Annealing Temperatur von 55°C mit 40 Zyklen bestimmt (Real-time PCR Ansatz und Programm war ident mit Ansatz mit Syto9).

Bei der Auswertung der real-time PCR mit Syto9 zeigte alle Proben eine etwa gleich hohe Konzentration, demzufolge auch einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf und Ct-Werte. So betrug der Ct-Wert für den GVO-Wildtyp 33,52; der Ct-Wert für die Deletion 32,83 und für ihre 50:50% Mischung 33,25

Die Auswertung bei 660 nm mit dem Scorpion Primer zeigte allerdings ein anderes Bild:

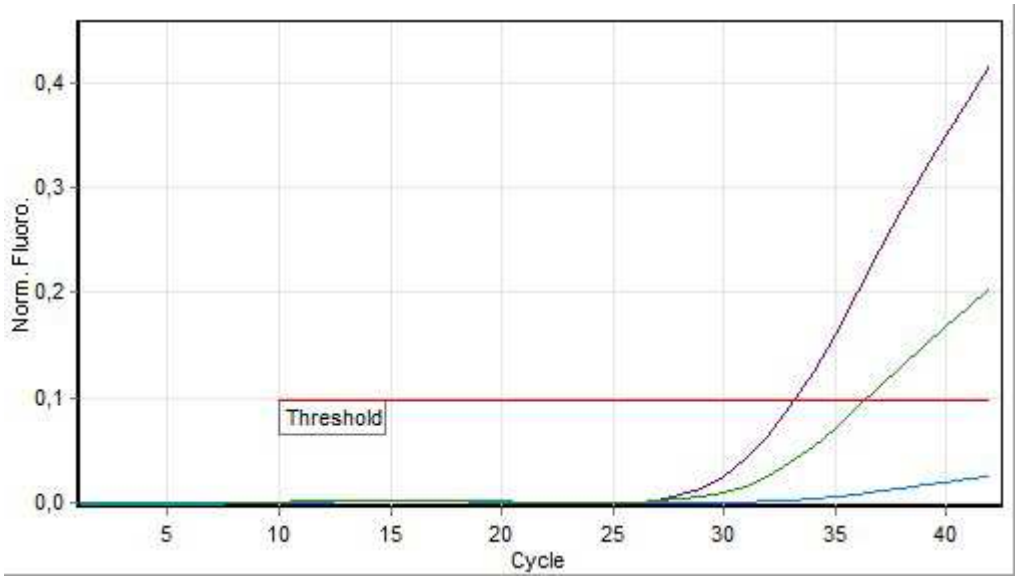


Abb.15 :Real-time PCR mit Scorpion Primer und 100%, bzw. 50:50% Plasmiden (Detektion bei 660 nm)

Für die Auswertung mit dem Scorpion Primer wurden die erneut Ct-Werte herangezogen; es wurde davon ausgegangen, dass bei Proben, die entweder in der Probensequenz, oder in der Primer Sequenz eine Mutation beherbergen, die Ct-Werte über dem Durchschnitt liegen. Der Kurvenverlauf der Proben zeigte, dass der GVO-Wildtyp den niedrigsten Ct-Wert hatte mit 33,21 hatte. Danach kam die 50:50% Mischung GVO-Wildtyp/Deletion mit einem Ct-Wert

von 36,33. Der PCR-Verlauf der Deletion konnte vom Threshold nicht erfasst werden, da es kaum einen Anstieg gab.
Die anschließende HRM Analyse machte eine Unterscheidung zwischen GVO-Wildtyp und den beiden anderen Proben möglich; da erneut gegen 100% GVO-Wildtyp gemessen wurde betrug hier der Confidenz-Wert 100%. Bei 100% Deletion wurde 62,13% und der 50:50% Mischung 72,06% erzielt.

1.7.2. Real-time PCR mit genomischen Proben

Eine hohe DNA Qualität ist essentiell für die korrekte Auswertung der HRM und Scorpion Analysen, da sie diese maßgeblich beeinflussen und beim Screening nach Proben mit DNA Abänderungen zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Da dies aber nicht immer zu 100% gewährleistet werden konnte, mussten bei der Überprüfung der Soja Einzelkörner verschiedene Untersuchungs-Methoden miteinander kombiniert werden.
Zunächst wurden Proben mit DNA von 1034 transgenen Einzelkörnern wurden nach Wizard SV Genomic DNA Purification System isoliert (siehe dazu auch Methoden) und anschließend für die real-time PCR im Verhältnis 1:5 mit TEL-Puffer (10 mM Tris, 0,2 mM EDTA) gelöst. Die genomische DNA wurde anschließend gemeinsam mit 5 Verdünnungen des GVO-Wildtyps (von einer 10^{-4} ng/µl Verdünnung ausgehenden hergestellte Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 5) mittels real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer getestet. Insgesamt gab es 11 Läufe mit je 50-100 Proben.

1.7.2.1. Real-time PCR mit Scorpion Primer

Für den real-time PCR Ansatz wurden 10 µl der 1:5 verdünnten DNA (somit betrug der DNA Gehalt durchschnittlich 40 ng/µl) verwendet und das PCR Gerät mit einer Annealing Temperatur mit 55°C und 42 Zyklen programmiert.

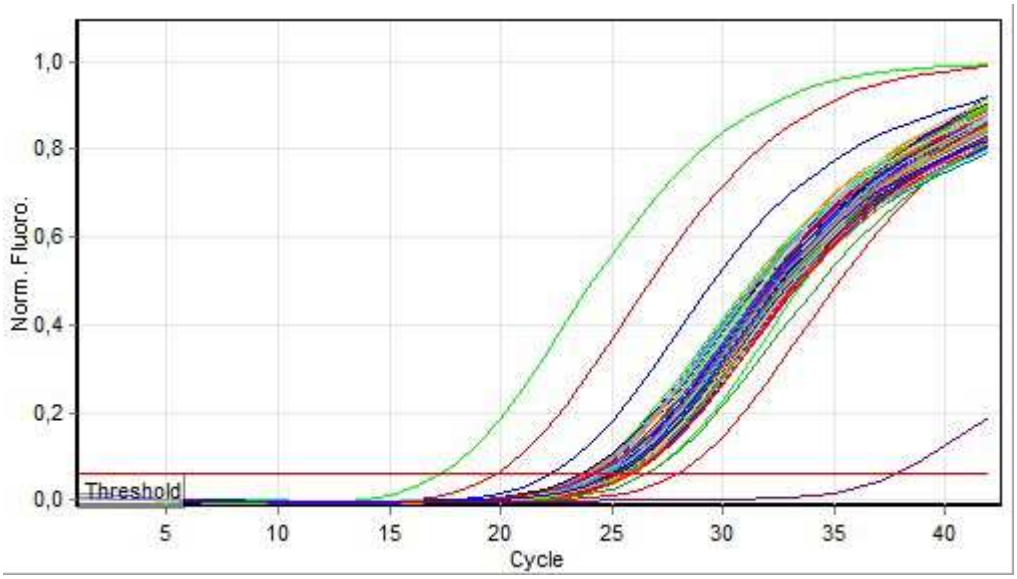


Abb.16: Beispiel einer der 11 real-time PCR Läufe mit genomischen Proben, Syto9 und Scorpion Primer

Die einzelnen real-time PCR Läufe wurden anschließend ausgewertet; es wurden die Scorpion Ct-Werte den HRM Confidenz-Werten gegenübergestellt. 41 Proben, die hohe Ct-Werte mit dem Scorpion Primer und niedrige HRM, bzw. Confidenz-Werte aufwiesen, wurden daraufhin sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse zeigte allerdings keine Abweichungen vom GVO-Wildtyp. Allerdings zeigten einige wenige Proben keine eindeutig analysierbare Sequenzierungsergebnisse. Zur genaueren Analyse wurden diese Körner daraufhin in Plasmide kloniert und erneut sequenziert. Erneut konnte keine Änderung in der Sequenz festgestellt werden. Um die Möglichkeit, Mutanten zu übersehen, möglichst gering zu halten, wurde eine weitere Auswertungs-Technik angewandt. Pro Lauf wurden je 10 Proben ausgewählt, die den höchsten Scorpion Ct-Wert, bzw. die den niedrigsten Confidenz-Wert aufwiesen. Proben, die in einem Lauf in beiden Gruppen vertreten waren, wurden für eine weitere Untersuchung ausgewählt. Insgesamt gab es nur 3 Proben (Nr. 186, 647, 598), die diese Anforderung erfüllten. Für eine anschließende real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer wurden aus allen 11 Läufen noch zusätzlich 5 weiter Proben, die die höchsten Scorpion Ct-Wert aufwiesen (Nr. 43, 45, 61, 13, 24) und 5 Proben mit den niedrigsten Confidenz-Werten (Nr. 949, 944, 950, 878, 929) ausgewählt. Zusätzlich zu

diesen genomischen Proben, die im Doppelansatz gemessen wurden, wurde ein Pool – bestehend aus 20 Proben – beim Lauf mitlaufen gelassen. Er diente als Standard zur Kontrolle für eine korrekte Auswertung aller Proben.

1.7.2.2. Real-time PCR für Subklonierung

Für die real-time PCR wurde 2 µl DNA (40 ng/µl) verwendet und das PCR Gerät so programmiert, dass die Annealing Temperatur bei 60 °C lag und 50 Zyklen aufwies.

Es wurde jeweils der Mittelwert des Doppelansatzes gebildet und die Ct-Werte mit den Confidenz-Werten verglichen.

	HRM	**Scorpion**
Name	Conf. %	Ct
Soja Nr. 186	75,4	31,54
Soja Nr. 647	86,6	31,34
Soja Nr. 598	96,8	31,85
Soja Nr. 43	95,7	32,40
Soja Nr. 45	60,2	31,72
Soja Nr. 61	50,7	32,95
Soja Nr. 13	85,9	34,41
Soja Nr. 24	19,3	33,71
Soja Nr. 949	28,4	30,70
Soja Nr. 944	10,4	30,74
Soja Nr. 950	22,6	30,77
Soja Nr. 878	61,5	32,98
Soja Nr. 929	50,4	30,18
Soja Pool	100	29,94

hoher SC Wert
niedr. HRM Wert
3 SC/HRM

Tab.12: Auswahl genomischer Probe für die Herstellung von Subklonen

1.7.3. Herstellung von Subklonen

Anschließend wurden die Proben Nr. 186, 647 und 598 subkloniert. Von 186 wurden 3 Kolonien, von 647 4 Kolonien und von 598 2 Kolonien hergestellt und diese aufgereinigt (siehe auch Methoden/Herstellung von Subklonen und Aufreinigung der Klone). Mit den Plasmiden wurde anschließen eine

Verdünnungsreihe 10^{-1} bis 10^{-5} ng/µl hergestellt. Die Verdünnungen 10^{-4} und 10^{-5} ng/µl wurden dann mit den Plasmiden GVO-wt, del, mut (auch jeweils 10^{-4} und 10^{-5} ng/µl) mittels real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer in Doppelansätzen gemeinsam getestet.

1.7.3.1. Real-time PCR mit Subklonen

Für den real-time PCR Ansatz wurden 10 µl DNA sowohl von der 10^{-4} und 10^{-5} ng/µl Verdünnung verwendet und das PCR Gerät mit einer Annealing Temperatur mit 55°C und 42 Zyklen programmiert.

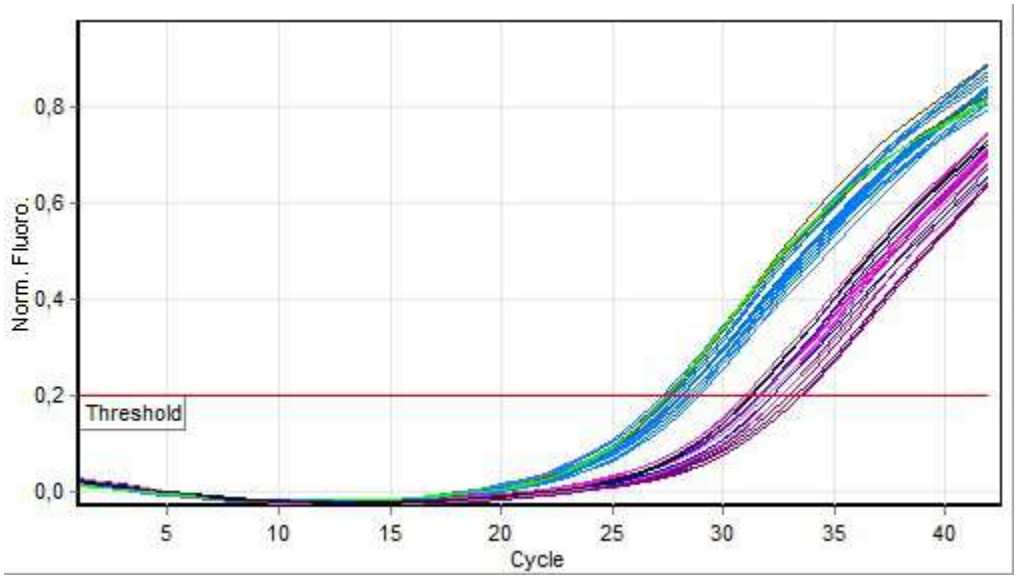


Abb.17: Real-time PCR mit Plasmiden (Detektion bei 510 nm)

Bei der Auswertung der real-time PCR mit Syto9 zeigten sich 2 Gruppen; die 1. Gruppe umfasste die 10^{-4} ng/µl Verdünnungen der Plasmide mit dem Ct-Mittelwert von 27,98 und die 2. Gruppe die 10^{-5} ng/µl Verdünnungen mit dem Ct-Mittelwert von 32,06. Die Konzentration der Proben pro Verdünnung (10^{-4}, bzw. 10^{-5} ng/µl) war in etwa gleich hoch und zeigte nur minimale Unterschiede in den Ct-Werten.

Diese Proben wurden auch bei 660 nm analysiert:

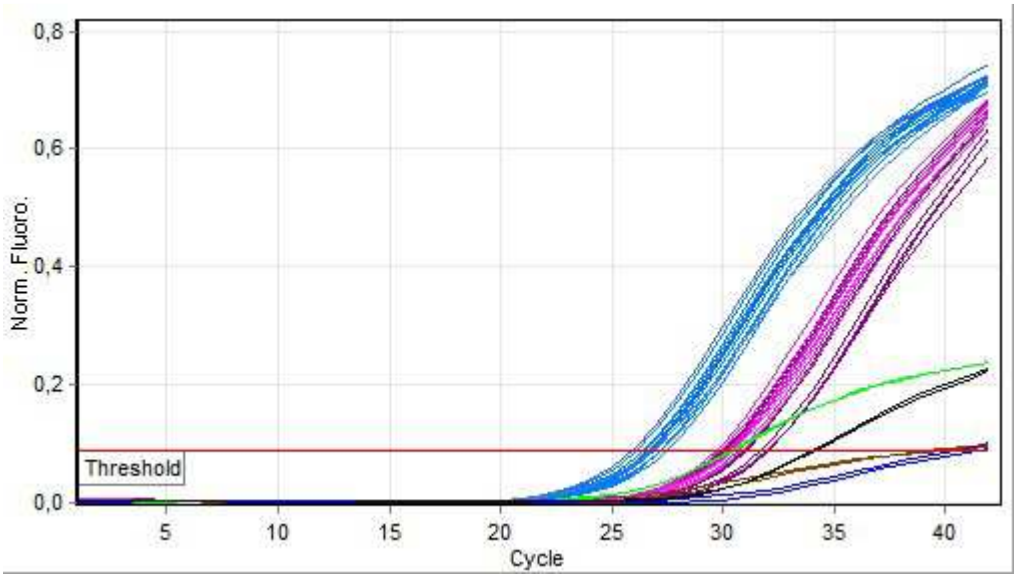


Abb.18: Real-time PCR mit Plasmiden (Detektion bei 660 nm)

Die Detektion bei 660 nm zeigte eine ähnliche Einteilung der Proben; sie konnten in mehrere Gruppen zugeordnet werden. Jedoch zeigte sich eine klare Zuordnung nur bei Gruppe 1 (10^{-4} ng/µl Verdünnungen von GVO-wt und den Kolonien der Plasmide Nr. 186, 647 und 598) bei derder Ct-Mittelwert 26,70 betrug und Gruppe 2 (10^{-5} ng/µl Verdünnungen von GVO-wt und den Kolonien der Plasmide Nr. 186, 647 und 598), in der der Ct-Mittelwert 30,77 betrug.

Von diesen Zahlen abweichende Ct-Werte ergaben sich für die Mutation und für die Deletion. Für die Mutation konnte bei 10^{-4} ng/µl ein Ct-Wert von 30,35 und bei 10^{-5} ng/µl ein Ct-Wert von 34,04 eruiert werden. Die Deletion wies bei 10^{-4} ng/µl den Ct-Wert von 39,23 auf und bei 10^{-5} ng/µl den Wert von 40,89.

.

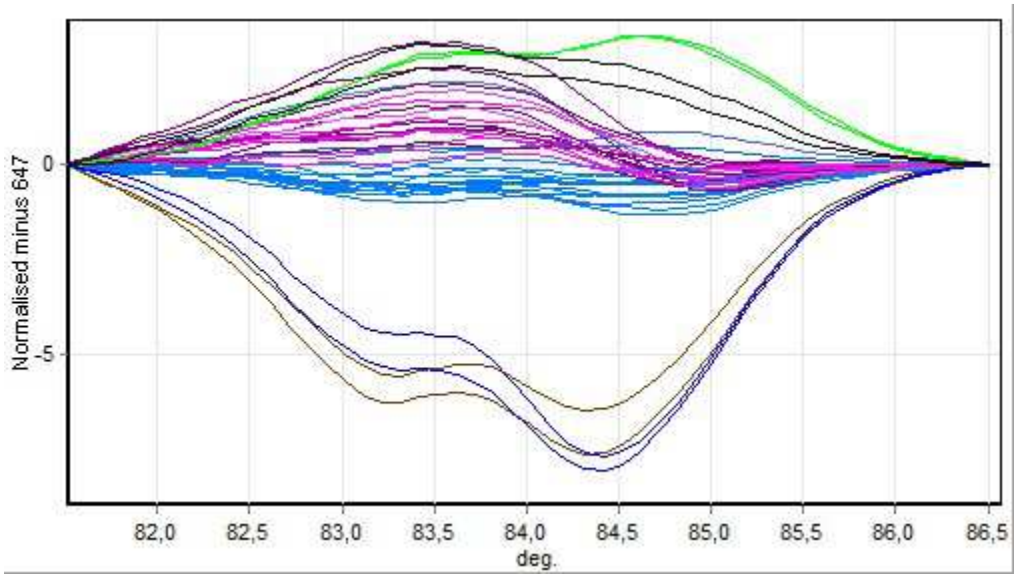


Abb.19: HRM Analyse mit Subklonen und den Plasmiden GVO-Wildtyp, Deletion und Mutation (10^{-4} und 10^{-5} ng/µl)

Für die HRM Analyse wurden die Mittelwerte der einzelnen Proben (pro Verdünnung) ermittelt und miteinander verglichen:

Name	Conf. % 10-4 ng/µl	Mittelwert	Conf. % 10-5 ng/µl	Mittelwert
186 (1)	99,75		97,45	
186(3)	98,54		99,36	
598 (1)	98,78		99,47	
598 (2)	98,46		99,35	
598 (3)	98,85		99,32	
598 (4)	99,49		99,65	
647 (1)	99,43		99,84	
647 (2)	99,28	99,07	99,59	99,25
GVO-wt	99,99		99,98	
del	41,55		41,28	
mut	87,21		93,71	

Tab.13: Zusammenfassung der Confidenz-Mittelwerte der Subklone; gemessen gegen GVO-Wildtyp

Es zeigte sich, dass die Subklone insgesamt nahe am GVO-Wildtyp lagen, so lagen die Confidenz-Werte für die 10^{-4} ng/µl Verdünnungen zwischen 98,54%

und 99,75% und die Confidenz-Werte für die 10^{-5} ng/µl Verdünnungen zwischen 97,45% und 99,84%. Der Confidenz-Mittelwert lag somit für die erste Gruppe bei 99,07% und für die zweite Gruppe bei 99,25%; somit liegt nur eine geringe Abweichung zwischen den beiden Verdünnungs-Gruppen vor.

Ebenso konnte bei den Plasmiden GVO-Wildtyp, Deletion und Mutation zwischen den Verdünnungsstufen nur eine geringe Abweichung beobachtet werden. Hier konnte allerdings eine Unterscheidung zwischen GVO-Wildtyp und den beiden anderen Proben gemacht werden. Der Confidenz-Wert der Mutante lag z.B. bei 10^{-4} ng/µl bei 87,21% und der Wert der Deletion bei 41,55%. Ähnliche Werte wurden bei der 10-5 ng/µl Verdünnung erzielt (93,71% für die Mutante und 41,28% für die Deletion).Die Subklone der Proben Nr. 186, 598 und 647 wurden daraufhin für die Sequenzierung vorbereitet.

1.7.4. Sequenzierung der Subklone

Zunächst wurde die DNA mittels PCR amplifiziert, dazu wurde eine M13 forward, bzw. reverse Sequenz an das 3´ Ende der Primer gesetzt, die später für die Sequenzierung gebraucht wurde. Für die PCR wurde 2µl einer 40 ng/µl DNA eingesetzt, die Annealing Temperaturmit 60 °C festgesetzt und 40 Zyklen wiederholt.

Die PCR Produkte wurden anschließend zur Überprüfung der richtigen Bandenlänge auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurden sie mittels E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega Biotek) aufgereinigt (siehe auch Methoden/Aufreinigung der PCR Produkte mittels E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit).

Mit so aufgereinigten Produkten erfolgte anschließend eine weitere DNA Amplifikation, dabei wurde 2 µl einer 40 ng/µl DNA eingesetzt und beim PCR Gerät eine Annealing Temperatur von 60 °C programmiert und 38 Zyklen oft wiederholt (siehe auch Methoden/PCR-Ansatz für Sequenzierung).

Die PCR Produkte wurden anschließend nach Invisorb DNA CleanUp (Invitek) aufgereinigt und nach dem Sanger Sequenzierungsprotokoll sequenziert. Die Kapillarsequenzierung wurde mithilfe von Big Dye Terminator chemistry durchgeführt und die Sequenzen wurden unter der Verwendung von Applied

Biosystems 3730 x 1 Plattformen (http://www.beckmangenomics.com/documents/services/GS_Sanger_Sequenzing.pdf) dargestellt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse zeigte auch diesmal keine Abänderungen in der DNA Sequenz.

2. Transgener Mais MON810

2.1. Unterscheidung von GVO-Wildtyp (GVO-wt), Deletionen (del) und Mutation (mut) mittels Scorpion Primer und HRM Analyse (High resolution melting)

Ziel der Untersuchungen war, die Unterscheidungsmöglichkeit von GVO-Wildtyp (GVO-wt), Deletion(en) (1xdel und 2xdel) und Mutation (mut) der transgenen Pflanze MON810 mittels Scorpion Primer und HRM (High resolution melting analysis) zu zeigen und nach Rearrangements bei genomischer DNA zu suchen. Dafür wurde in dieser Arbeit das 3´ Ende untersucht und es wurden sowohl der genomische GVO-Wildtyp, als auch mutierte, bzw. deletierte Pflanzen DNA in Plasmide kloniert.

```
3′ MON810 junction
cggctacatcgaagacagccaagacctcgagatttacctgatccgctacaacgccaagcacgagaccg
tcaacgtgcccggtactggttccctctggccgctgagcgcccccagcccgatcggcaagtgtgcccac
cacagccaccacttctccttggacatcgatgtgggctgcaccgacctgaacgaggactttcggtagcc
ttctttcatttccgaatttgcttgcgagcagtcaggtccttttgattcatctgagtttggctttacaa
tagcttttccttttccttttggcagtactagtgctttcatcatgagaatccttcttagatg
```

Abb.20: Abbildung der Zielsequenzen am 3´- Verbindungsstück(Neumann et al. 2011)

In Abbildung 20 ist die Zielsequenz vom 3´ Verbindungstsück des MON810 dargestellt. Blau gekennzeichnet wurde der forward Primer, rot wurde der reverse Primer dargestellt, die Probensequenz erscheint gelb unterlegt und die MON810 Sequenz ist unterstrichen (Neumann et al. 2011).

Bereits bei Neumann et al. (2011) konnte gezeigt werden, dass eine real-time PCR mittels Scorpion Primer gut geeignet ist, um SNPs (single nucleotide polymorphism = Einzelnukleotid Polymorphismen) in GVOs zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde der 3´ Bereich bei 50 MON810 Einzelkörnern mittels Scorpion Primer und HRM Analyse getestet. Dafür wurden zunächst diese Parameter bei Plasmiden kontrolliert, um sie für das anschließende Screening genomischer Proben als geeignete Methoden zu verifizieren.
Dabei wurde zusätzlich zu einer Type-it HRM PCR eine PCR mit Skorpion Primer, sowie eine PCR mit dem Farbstoff Syto9 durchgeführt. Durch unterschiedliche Fluoreszensen konnten alle drei Messungen in einem einzelnen Reaktionsansatz durchgeführt werden. Syto9 wird bei 510 nm, die Skorpion PCR bei 660 nm detektiert. Die HRM wird zwar auch bei 510 nm gemessen, kann aber von der Skorpion PCR unterschieden werden, da sie nach Beendigung der real-time PCR durchgeführt wird.
In mehreren Publikationen (Dong 2009, Bush 2010) wurde bereits über die Funktionsweise von HRM geschrieben.

Die zur Verfügung gestellten Plasmide, die für die Experimente verwendet wurden, wiesen beim 3´ Ende sowohl eine 1-bp, als auch eine 2-bp Deletion auf. Zusätzlich war am 3´ Ende beim Übergang ins Konstrukt eine Mutation vorhanden (Neumann 2011).Bei der Mutation wurde bei Nukleotid Nr. 193 ein G gegen ein T getauscht, bei der Einfach-Deletion wurde das Nukleotid Nr. 193 (G) deletiert und bei der Doppel-Deletion wurden die Nukleotiden Nr. 193 und 194 (G und A) deletiert.

2.1.1. Ermittlung der PCR Effizienz

Wie bereits bei GTS-40-3-2 wurde auch für das Event MON810 die PCR Effizienz ermittelt. Die Durchführung fand nach derselben Vorgangsweise wie bereits beschrieben statt.

Durch die Auswertung der Standardkurve ergab sich der Wert E=0.9, d.h. die PCR Effizienz betrug 90 %.

2.2. Konstrukt des MON810

Der Konstrukt des Maisevents MON810 setzt sich aus mehreren Bereichen zusammen (siehe Abb.22).

Plant DNA	CaMV 35S	hsp 70	cry1Ab	Plant DNA

Abb.21: Zusammensetzung des Events MON810 (http://gmdd.shgmo.org)

*cry1Ab*cassette	Promotor	P-35S
		enhanced CaMV 35S, maize HSP70 intron
	Coding Region	Coding Cry1Ab delta-endotoxin (Btk HD-1)
		From *Bacillus thuringiensis*
	Terminator	T-35S
		None. Lost through 3' truncation during integration

Abb.22: Detailierte Information des Zielgens (http://gmdd.shgmo.org)

Das Event MON810 verfügt über einen Einzel-Insert, bestehend aus CaMV 35S Promoter, hsp70 und cry1Ab.

MON810 verdankt seine Insekten Resistenz dem Cry1Ab Delta-Endotoxin, welches durch Micropartikel Bombardement ins Genom des MON820 gebracht wurde. Diese gentechnische Veränderung ist auch dem Namen Yield Gard Corn Borer bekannt (http://gmdd.shgmo.org).

Die Wirkungsweise des Bt-Toxins (von *Bacillus thuringiensis ssp. Kurstaki*), welches für das cry1A(b) Gen kodiert, zeigt sich erst im Darm des Zielorganismus, wo es (zuerst in ungiftiger Vorstufe) als Prototoxin aufgelöst wird. Artspezifische Proteasen schneiden dann das aktive toxische Zentrum, welches bis dahin am N-Terminus des Prototoxins hing. Das so entstandene Delta-Endotoxin erkennt bestimmte Kohlenwasserstoff Strukturen an der Oberfläche von Zellen (Rezeptoren) im Verdauungstrakt der Insektenlarven und verursacht dort die Bildung von Poren, die das osmotische Potential der Zelle zerstören und damit Zelllysis bewirken.

2.3. 3´ Plasmide

Zur Verfügung gestellt wurden die Plasmide GVO-Wildtyp, Mutante und eine Einfach,- bzw. eine Doppel-Deletion, die mittels HRM getestet werden sollen. Zur Überprüfung der korrekten Länge des Plasmid-Inserts wurde zunächst eine qualitative PCR durchgeführt, anschließend wurde die Plasmid DNA mit einem mittels Invisorb DNA CleanUp Kits (Invitek) auf gereinigt. Mit dieser DNA wurde dann eine HRM Analyse durchgeführt.

2.3.1. Amplifikation der DNA

Als Ausgangsprobe wurden die Plasmide GVO-Wildtyp, Mutation und 2 Deletionen (Einfach- und Zweifach Deletion) für die Vervielfältigung der DNA verwendet. Die PCR wurde mit 1 µl DNA durchgeführt und der PCR Cycler so programmiert, dass die Annealing Temperatur 60°C und 38 Zyklen betrug.
Die PCR-Produkte wurden auf einem 2,5% Agarosegel überprüft und anschließend aufgereinigt.

2.3.2. Photometrie

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde der Photometer (Nano Photometer, Implen) herangezogen, vom gemessenen Wert ausgehend wurde anschließend eine Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-6} ng/µl) mit TEL-Puffer hergestellt.
Die Verdünnung 10^{-6} ng/µl wurde schließlich für die real-time PCR mit Type-it HRM PCR Kit (Qiagen) verwendet wurde.

2.3.3. Real-time PCR und Durchführung einer HRM Analyse

Die real-time PCR wurde mit dem Type-it HRM Kit durchgeführt (siehe auch Methoden/real-time PCR). Allerdings wurde dafür 5,67 µl DNA verwendet; die Annealing Temperatur lag bei 55°C mit 40 Zyklen.
Sowohl die auf 10^{-6} ng/µl verdünnten Plasmide (100% GVO-wt, 100% mut und die beiden Deletionen 100% g1 und 100% ga1), als auch die 10^{-6} ng/µl verdünnten Mischungen des GVO-Wildtyps mit der Mutation und den beiden Deletionen im Verhältnis 50:50% wurden gemeinsam getestet.

Die HRM-Analyse zeigte, dass eine Unterscheidung zum GVO-Wildtyp nur mit der Doppel-Deletion und seiner 50:50% Mischung (2xdel/GVO-wt) gelang. Alle übrigen Proben lagen mit ihren Confidenz-Werten sehr nahe am normalisierten GVO-Wildtyp 10^{-6} ng/µl. Der Confidenz-Wert betrug für die Mutante 99,82%, für die Einfach-Deletion 99,73% und für die 50:50% Mischungen GVO-wt/mut 99,89% und GVO-wt/1xdel 98,56%. Bei der Doppel-Deletion 100% betrug sie 8,36% und bei der 50:50 Mischung GVO-wt/2xdel 44,84%.

2.3.4. Real-time PCR mit Scorpion Primer

Ebenso wurde der Scorpion Primer mit diesen Proben getestet. Dafür wurde eine real-time PCR mit der DyNAzyme II Hot Start Polymerase (Finnzymes) verwendet. Es wurde 10 µl der 10^{-6} ng/µl verdünnten Plasmid DNA eingesetzt

und bei der Programmierung des PCR Gerätes eine Annealing Temperatur von 64°C und 38 Zyklen gewählt.

Bei der Detektion bei Syto9 war ersichtlich, dass alle Proben sehr nahe bei einander lagen. Beim GVO-Wildtyp betrug der Ct-Wert 28,40; bei der Mutation 28,37; bei der Einfach-Deletion 28,25; bei der Doppel-Deletion 28,26 und bei den 50:50% Mischungen 30,24 für GVO-wt/1xdel; 29,88 für GVO-wt/2xdel und schließlich 29,81 für GVO-wt/mut. Somit lagen die Proben zwar leicht auseinander, aber es konnte nur ein sehr geringer Unterschied aufgrund Schwankungen der Methode festgestellt werden.
Die Detektion beim Scorpion Primer zeigte hingegen einen anderen PCR Verlauf:

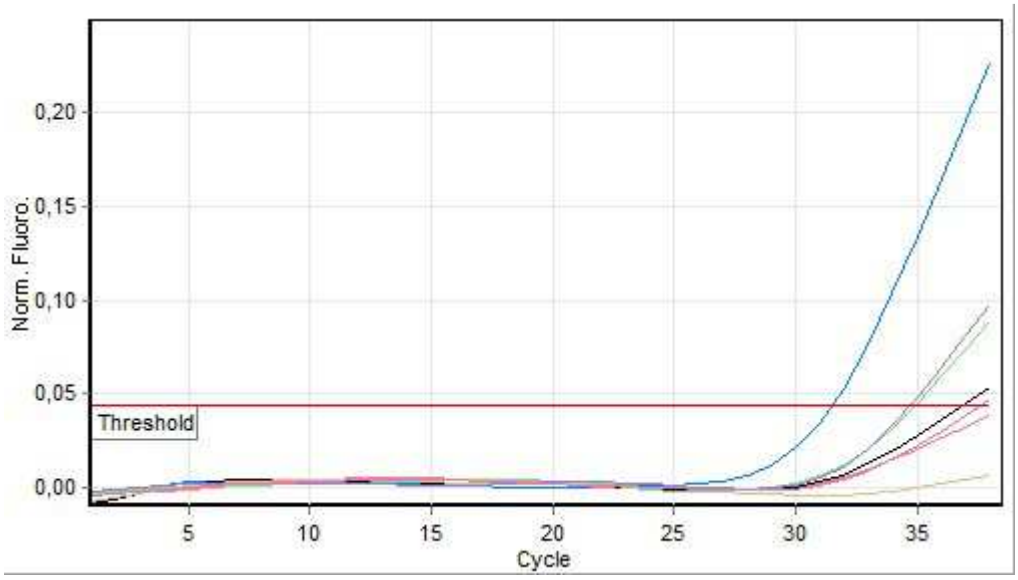


Abb.23: Real-time PCR Kurve mit Scorpion Primer

Den frühesten Anstieg verzeichnete der 100% GVO-Wildtyp (Ct=31,58), gefolgt von den 50:50% Mischungen des GVO-Wildtyps mit der Mutation (Ct=34,98) und der Einfach-Deletion (Ct=34,76). Die letzten, noch vom Threshold erfassbare Proben waren die 100% Einfach-Deletion (Ct=36,94) und die 50:50% Mischung GVO-wt/2xdel mit dem Ct-Mittelwert von 37,33. Sowohl 100% Mutation, als auch 100% Doppel-Deletion zeigten einen flachen und

späten Anstieg, sodass sie nun vom Threshold zwar nicht erfasst werden konnten, aber ansonsten hohe Ct-Werte aufgewiesen hätten.
Die HRM Analyse der Proben, gemessen gegen normalisierten 10^{-6} ng/µl GVO-Wildtyp ergab, dass sowohl die 100% Mutation, als auch die 100% Einfach-Deletion kaum vom GVO-Wildtyp zu unterscheiden waren, da ihre Confidenz-Werte bei 99,17% und 99,78% lagen. Gleiches konnte bei den 50:50% Mischungen GVO-Wildtyp und Mutation (Conf.=99,66%), bzw. Einfach-Deletion (Conf.=97,93%) beobachtet werden. Einzig die 100% Doppel-Deletion, mit einem Ct-Wert von 3,27% und ihre 50:50% Mischung mit dem GVO-Wildtyp (Ct= 23,31%) zeigten eine deutliche Abweichung von demselben.

2.4. Real-time PCR mit genomischen Proben und Scorpion Primer

Zusätzlich zu den Versuchen mit hergestellten Plasmiden wurde abschließend ein ergänzender Lauf mit 50 genomischen Proben, die unverdünnt mit Type-it PCR HRM und dem 3´ Scorpion Primer getestet wurden.

Als Kontrolle der real-time PCR wurde ein MON810-Pool, bestehend aus 20 Proben mitlaufen gelassen. Es wurden allerdings 0,625 µM forward und 0,125 µM Scorpion Primer gemeinsam mit 1,6 µl DNA (45 ng/µl) eingesetzt. Die Annealing Temperatur betrug 55°C mit 55 Zyklen Anzahl.

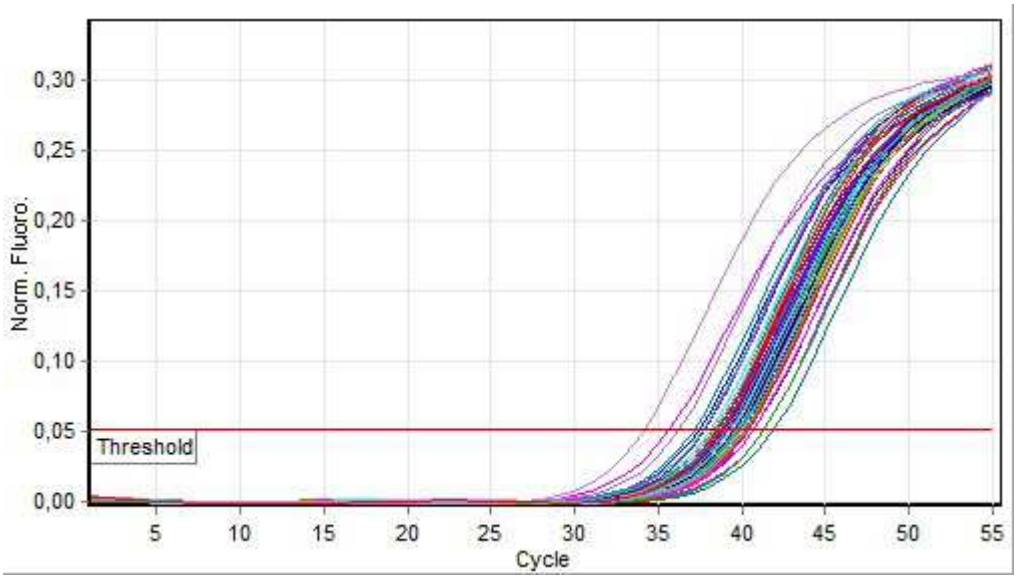


Abb.24: 50 genomische Proben mit Scorpion Primer

Für die Auswertung des PCR wurden sowohl die Ct-Werte des Syto9, als auch des Scorpion Primers herangezogen. Dies war nötig, um eine mögliche Abweichung der beiden Werte aufgrund unterschiedlicher DNA Konzentration zu überprüfen. Da sie sich aber nur geringfügig voneinander unterschieden, kann dieser Unterschied vernachlässigt werden. Der Ct-Mittelwert der 50 Proben mit Scorpion Primer betrug 39,07. Proben, die über dem Mittelwert lagen, wurden als potentielle Mutanten markiert. Dies traf bei 28 Proben zu.

Weiters wurde die Confidenz-Werte untersucht, da der Vergleich dieser beider Parameter (hoher Ct-Werte und niedrigere Confidenz-Werte) den Verdacht auf potentielle Mutanten weiter erhärten sollte. Als Referenz wurde der MON810-Pool gewählt. Die Confidenz-Werte der Proben reichten von 24,27% (bei Probe Nr. 363) bis zu 99,89% (bei Probe Nr. 434). Weder Nr. 363, noch die nächsten 4 Proben mit niedrigeren Confidenz-Werten (Nr. 405, 435, 441 und 449) erfüllten die gewählten Parameter. Auch wenn sie einen relativ niedrigeren Confidenz-Wert aufwiesen, lagen ihre Ct-Werte unter dem Durchschnitt (z.B. lag bei Probe Nr. 363 der Ct-Wert bei 35,62).

Name	Syto9 Ct	Scorpion Ct	Mittelwert	HRM Conf. %
MON810 Nr. 363	36,99	35,62	39,07	24,27
MON810 Nr. 364	38,98	41,89		99,14
MON810 Nr. 366	36,31	37,38		96,3
MON810 Nr. 369	38,38	41,32		60,86
MON810 Nr. 377	37,06	38,6		82,91
MON810 Nr. 381	36,66	38,96		99,85
MON810 Nr. 382	36,77	38,56		99,72
MON810 Nr. 383	38,67	41,3		58,22
MON810 Nr. 388	37,18	38,73		98,18
MON810 Nr. 389	37,19	39,12		85,07
MON810 Nr. 390	38,22	40,66		94,35
MON810 Nr. 391	37,31	39,1		99,88
MON810 Nr. 392	36,66	38,32		72,07
MON810 Nr. 393	37,1	39,21		66,22
MON810 Nr. 396	37,59	39,5		82,72
MON810 Nr. 397	37,33	39,99		99,49
MON810 Nr. 398	37,56	39,46		96,54
MON810 Nr. 400	36,58	38,09		98,65
MON810 Nr. 401	38,01	40,68		99,57
MON810 Nr. 402	36,41	37,11		46,13
MON810 Nr. 403	37,52	38,94		60,33
MON810 Nr. 405	37,16	38,91		41,69
MON810 Nr. 407	37,44	39,2		67,3
MON810 Nr. 408	36,93	39,06		96,33
MON810 Nr. 409	37,33	39,74		79,81
MON810 Nr. 413	36,33	38,56		49,58
MON810 Nr. 415	36,77	38,36		60,02
MON810 Nr. 416	36,93	39,32		83,51
MON810 Nr. 421	36,02	37,74		99,21
MON810 Nr. 422	37,03	38,91		46,75
MON810 Nr. 423	38,04	40,34		60,92
MON810 Nr. 424	37,4	39,52		63
MON810 Nr. 425	37,91	40,32		94,45
MON810 Nr. 426	38,14	39,89		85,97
MON810 Nr. 429	37,52	39,65		65,29
MON810 Nr. 431	37	38,82		95,49
MON810 Nr. 432	38,04	39,96		64,02
MON810 Nr. 433	38,04	39,77		61,15
MON810 Nr. 434	36,61	38,49		99,89
MON810 Nr. 435	36,68	38,35		41,13
MON810 Nr. 439	38,62	41,29		93,81
MON810 Nr. 441	36,08	37,67		37,54

MON810 Nr. 448	37,63	39,66	86,11
MON810 Nr. 449	35,96	37,64	41,89
MON810 Nr. 450	37,82	40,21	93,1
MON810 Nr. 451	38,09	40,1	96,19
MON810 Nr. 453	37,02	39,63	49,35
MON810 Nr. 455	37,59	39,95	99,88
MON810 Nr. 458	35,83	36,21	78,57
MON810 Nr. 467	36,38	34,12	73,73
MON810 Pool	36,83	38,79	100
		Ct über Mw	Wert bis 42

Tab.14: Zusammenfassung der Ergebnisse der 50 genomischen Proben mittels real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer. Orange gekennzeichnet sind Proben mit über dem Mittelwert liegenden Ct-Werten, blau markiert sind Proben mit den niedrigsten Confidenz-Werten (bis 42%).

Obwohl bei mehr als der Hälfte der Proben der Scorpion Ct-Wert über dem Mittelwert lag, wurde bei der Analyse der Confidenz-Werte ersichtlich, dass keiner der Proben durch eine Sequenzierung überprüft werden muss. Keiner der 50 genomischen Proben wies zu einem Scorpion Ct-Wert einen erniedrigten Confidenz-Wert auf.

3. Adh1 (alcohol dehydrogenase 1)

3.1. Ziel und Vorgangsweise der Untersuchung von Adh1

Für diese Arbeit wurde vom Adh1 Gen eine 174 bp große Region des ersten Introns aus GenBankAF123535, bp 18183–18356 ausgewählt. Diese Region eignet sich sehr gut für Untersuchungen mit dem Scorpion Primer und beinhaltet außerdem mehrere DNA Änderungen, die für eine HRM Analyse genutzt werden können. In der Publikation bei Broothaerts et al. (2008) wird auf homo- und heterozygote Allele, die bei 7 GVO und 4 Nicht-GVO Linien gefunden wurden, verwiesen. Da diese Proben für diese Arbeit aufgrund ihres 100% GVO-Gehalts nicht zugänglich waren, musste mit Einzelkörnern

verschiedener GVO-Linien gearbeitet werden, um dasselbe Resultat (100% GVO-Anteil) erzielen zu können. 4 verschiedene Linien wurden dazu ausgewählt:

Bt11 (100%), MON810 (100%) und die 2 stacked-events 4421VT3 und 6831RHXT, die aus je 3 GVO-Events bestanden.

Bt11 beinhaltet u.a. das Cry1Ab- und eine pat-Genkasette; durch die die Pflanze das Insektengift Bt-Toxin und Herbizidtoleranz durch Glyphosat aufweist.

6831RHXT setzt sich aus den Events NK603, TC1507 + DAS59122-7 und T25 zusammen. Die Wirkung dieses stacked-Events beruht auf den Proteinen Cry35Ab1 (codiert durch DAS59122-7), Cry1F (codiert durch TC1507), PAT (codiert sowohl durch DAS59122-7, als auch durch TC1507) und CP4 EPSPS.

4421VT3 setzt sich aus den Events MON863, NK603 und MON810 zusammen. Dadurch beinhaltet die transgene Pflanze die cp4 epsps-Genkasette und die cry1Ab- und die cry3Bb1 Genkasette. Diese Elemente verleihen der Pflanzen die Resistenz sowohl gegen Coleopteran- und Lepidoteran, sowie die Glyphosat Herbizid Resistenz.

Zunächst wurden mittels Allel-spezifische PCR eine Klonierung durchgeführt, um die Allele A und F herzustellen, die daraufhin zur Überprüfung sequenziert wurden. Anschließend wurden sie mittels real-time PCR gemeinsam mit ihrer heterozygoten (wurden im Verhältnis 1:1 der beiden homozygoten Allele) Mischung gemeinsam getestet.

Als nächstes wurde die Einzelkorn-DNA der bereits erwähnten 4 Linien isoliert und sequenziert. Da die untersuchte Region sich durch eine Deletion von 2 Nukleotiden und 5 Basen Substitution auszeichnet, erlaubte dies eine relativ einfach Zuordnung zum jeweiligen Adh1-Typ.

Als nächstes wurden Plasmide produziert, um genomische und Plasmid DNA zu untersuchen und miteinander vergleichen zu können. Sowohl homo- als auch heterozygote Plasmide wurden hergestellt und diese anschließend zur Überprüfung sequenziert.

Anschließend wurden die Plasmide mittels Syto9 und Scorpion Primer auf die Unterscheidungsmöglichkeit ihres Adh1-Typ getestet. Die genomische DNA

wurde daraufhin für die Herstellung von Subklonen (Adh1-F und Adh1-A) mit sequenzspezifischen Primern verwendet. Die Subklone wurden mittels Sequenzierung verifiziert. Mittels real-time PCR mit Scorpion Primer und HRM Analyse wurden danach die 100% homozygote, aber auch ein hergestelltes heterozygotes Allel (durch 50:50% Mischung von Adh1-F und Adh1-A) auf ihre Unterscheidbarkeit getestet, ihrem Adh1-Typ nach eingeordnet und für eine Verifizierung sequenziert.

3.2. Herstellung der homozygoten Allele A und F

Mittels Allel-spezifischer PCR wurden die Allele A und F hergestellt. Die verwendeten Primer waren Adh1-fwd/Adh1-F und Adh1-fwd/Adh1-A (siehe auch Primer). Für die PCR wurde eine genomischen Probe verwendet; es wurde 1 µl DNA (50 ng/µl) eingesetzt und das PCR Gerät mit einer Annealing Temperatur von 60 °C und 35 Zyklen programmiert.
Die PCR Produkte wurden anschließend auf einem 2,5% Agarosegel überprüft und anschließend für die Ligation verwendet. Die weiteren Schritte entsprachen der bereits beschriebenen Durchführungsmethode (siehe auch Methoden/Herstellung von Subklonen). Von den hergestellten Allelen wurde schließlich durch Mischung der beiden Allele im Verhältnis 1:1 das heterozygote Allel Adh1-A/F hergestellt. Die 3 Allele wurden anschließend auf 10^{-4} ng/µl verdünnt und gemeinsam mittels real-time PCR und Syto9 getestet.

3.3. Real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer und den homo- und heterozygoten Adh1 Allelen

Für die real-time PCR wurde 2µl DNA (10^{-4} ng/µl) eingesetzt und das PCR Gerät mit einer Annealing Temperatur von 60°C und 50 Zyklen programmiert. Es wurde im Doppelansatz gemessen.

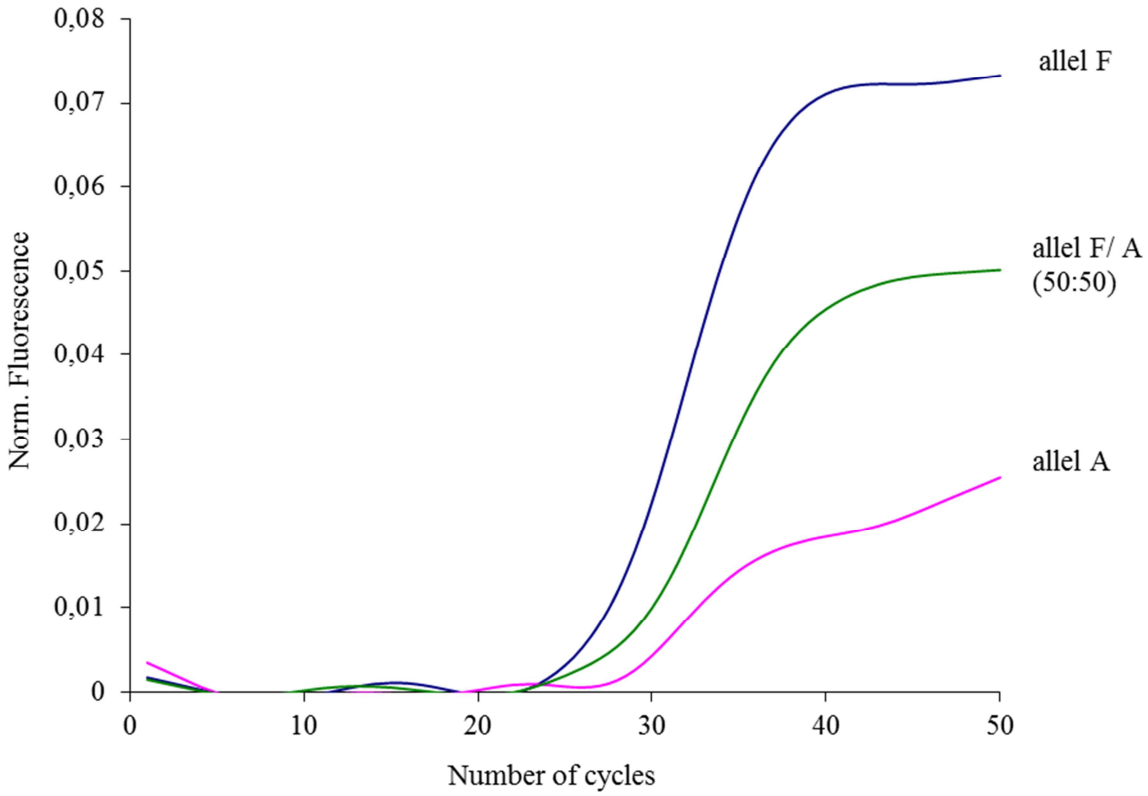


Abb.25: Real-time PCR mit homo- und heterozygoten Plasmiden (Adh1-A, Adh1-F und Adh1-A/F), Detektion bei 660 nm [Madi et al., 2013]

Die Auswertung bei 660 nm erlaubte eine gute Unterscheidbarkeit der getesteten Adh1-Allele. Das F-Allel wies einen Ct-Wert von 27,93; Allel-A/F einen Ct-Wert von 29,55 und das A-Allel von 33,65 auf.

Weiters wurden mittels HRM Analyse die Confidenz-Werte zur Unterscheidung der Adh1-Allele herangezogen.

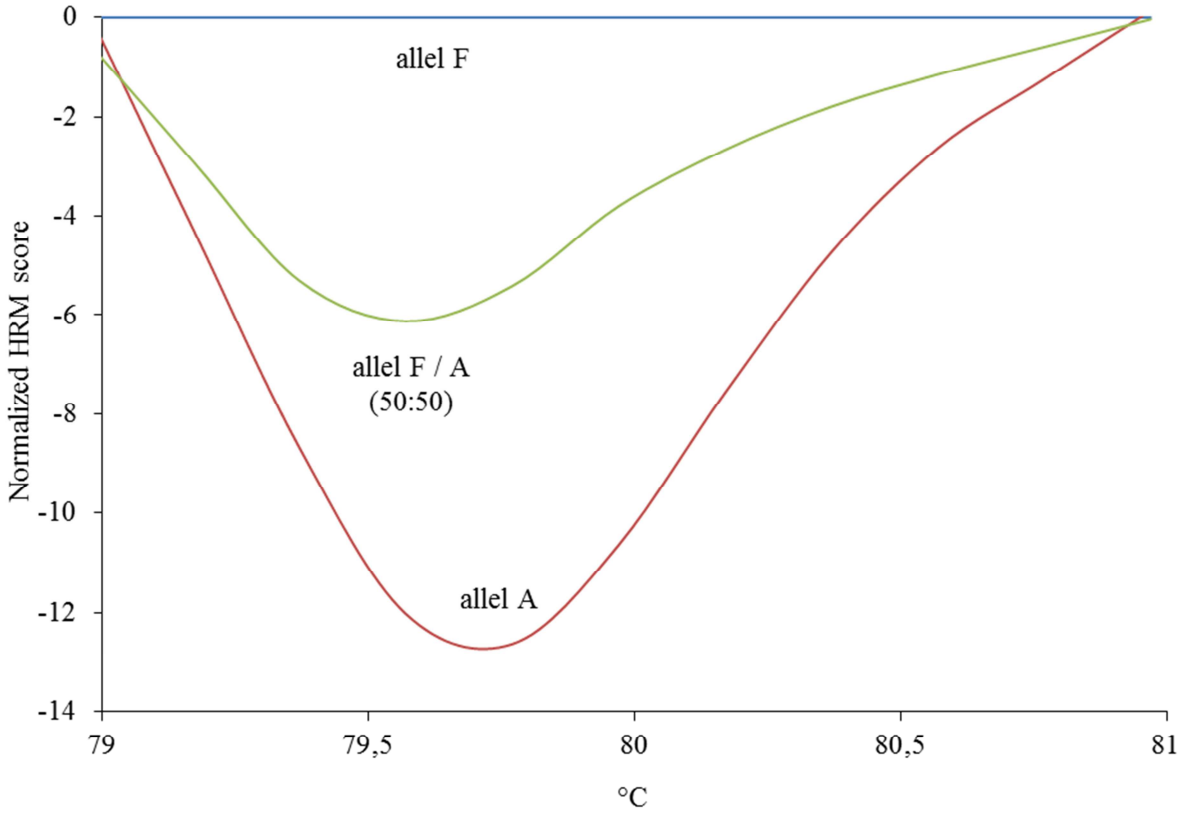


Abb.26 : HRM Analyse der homo- und heterozygoten Plasmiden (Adh1-A, Adh1-F und Adh1-A/F) [Madi et al., 2013]

Die HRM Analyse zeigte eine gute Unterscheidbarkeit zwischen den Adh1-Allelen. Indem gegen den normalisierten Adh1-F Allel als Referenz, dessen Confidenz-Wert somit 100% betrug, gemessen wurde, ergab sich für das A-Allel ein Confidenz-Wert von 53,12 % und für das A/F-Allel ein Confidenz-Wert von 88,58 %.

3.4. Unterscheidung des Adh1-Typs bei genomischen Proben

3.4.1. DNA Isolierung mittels Wizard DNA Clean-Up System

Zur genomischen DNA Gewinnung wurden zunächst Einzelkörner der 4 GVO Linien MON810, Bt11, 4421 VT3 und 6831 RHXT mittels Wizard DNA Clean-Up

System behandelt und die isolierte DNA mittels Photometer auf ihren DNA Gehalt hin überprüft.

3.4.2. Bestimmung des Adh1-Typs mittels Sequenzierung

Für die Einordnung der genomischen Proben in ihren Adh1-Typ wurden zunächst je 8 Einzelkörner der 4 GVO Linien sequenziert und untersucht. Dafür wurde zunächst eine PCR durchgeführt (siehe auch Methoden/PCR für Sequenzierung). Es wurde 1 µl DNA (50 ng/µl) verwendet und beim Thermocycler eine Annealing-Temperatur von 60°C mit 35 Zyklen programmiert. Mit den PCR Produkten wurde anschließend die Sequenzierung durchgeführt (siehe dazu Methoden).
Die Auswertung der Daten ergab, dass MON810 und 4421VT3 nur das F-Allel aufwiesen, 6831RHXT hatte 7 Körner mit F-Allel und 1 Korn mit heterozygotem F-/A-Allel und bei Bt11 konnten 3 Körner mit Adh1-F, 2 mit Adh1-F und 3 heterozygote mit beiden Allelen (Adh1-A/F) gefunden werden.

3.4.3. Real-time PCR mittels Scorpion Primer und Type-it HRM-Kit

Anschließend wurden die sequenzierten Proben mittels Scorpion PCR und HRM getestet. Für die real-time PCR wurde 2 µl DNA (50 ng/µl) eingesetzt und der PCR Cycler mit eine Annealing Temperatur von 60°C und 50 Zyklen programmiert.
Die Proben der 4 GVO Linien wiesen bei 510 nm zwar keine absolut identen Kurvenverlauf auf, variierten aber nur leicht zwischen den Ct-Werten 27,15 und 31,62; der Ct-Mittelwert für alle Proben betrug 28,80.

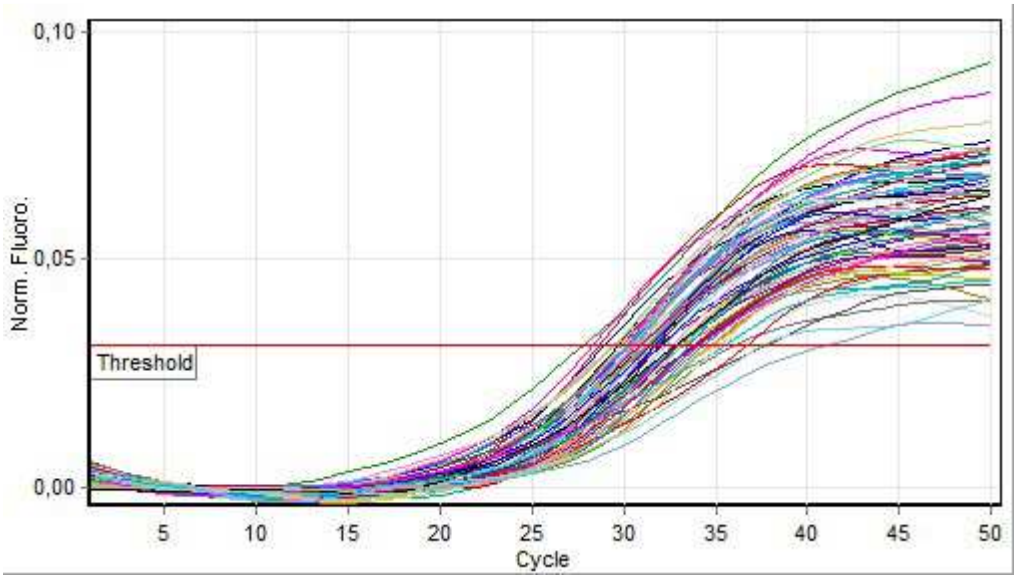


Abb.27: Real-time PCR mit genomischen Proben, Scorpion Primer und Type-it HRM Kit, Detektion bei 660 nm

Mit ausgesuchten Proben (MON810/447, 4421VT3/42, Bt11/42 und Bt11/3) wurde die real-time PCR mit Scorpion Primer und HRM Analyse im Doppelansatz wiederholt und gemeinsam mit dem ersten PCR Lauf verglichen, da bei diesen Proben die Ergebnisse unschlüssig waren. Die Proben konnten sowohl in die Kategorie A-Allel (s. Confidenz-Werte), als auch in die Kategorie F-Allel (s. Ct-Werte) eingeteilt werden. Um die Beeinflussung von inhibitorischen Unreinheiten, oder auch täglicher Variationen in der Messung überprüfen zu können, wurden sie daher erneut mit heterozygoten Proben gemessen.

Name	Conf.	Ct-syto	Ct-sco	Conf	Ct-sco	Allel
	First tests			Second tests		
MON810/1	72,755	32,48	30,32			homoz.adh1-F
MON810/5	60,425	32,58	32,27			homoz.adh1-F
MON810/434	93,125	32,9	31,94			homoz.adh1-F
MON810/441	96,1	31,22	31,66			homoz.adh1-F
MON810/447	4,46	33,58	35,52	77,8	34,11	homoz.adh1-F
MON810/451	64,2	32,04	32,43			homoz.adh1-F
MON810/462	82,32	30,16	32,89			homoz.adh1-F
MON810/424	99,99	30,5	33,05			homoz.adh1-F
RHXT/1	28,99	32,83	37,66			homoz.adh1-F
RHXT/2	75,49	31,79	37,3			homoz.adh1-F

RHXT/41	27,09	31,92	35,22			homoz.adh1-F
RHXT/61	20,61	32,11	36,95			homoz.adh1-F
RHXT/65	30,41	32,59	36,69			homoz.adh1-F
RHXT/90	5,05	34,02	34,46	22,08	34,83	heteroz.adh1-A/F
RHXT/91	14,01	33,32	32,05			homoz.adh1-F
RHXT/96	50,79	31,54	35,55			homoz.adh1-F
VT3/1	33,28	32,02	30,36			homoz.adh1-F
VT3/7	9,85	32,08	33,11			homoz.adh1-F
VT3/42	6,97	32,59	31,32	80,39	32,99	homoz.adh1-F
VT3/50	58,58	31,71	34,2			homoz.adh1-F
VT3/61	56,62	33,11	33,16			homoz.adh1-F
VT3/64	31,41	31,94	33,12			homoz.adh1-F
VT3/79	52,17	31,64	32,24			homoz.adh1-F
VT3/78	44,92	33,26	33,52			homoz.adh1-F
Bt11/3	14,39	32,68	32,17	99,24	33,17	homoz.adh1-F
Bt11/4	0,36	32,15	44,35	4,44	39,19	homoz.adh1-A
Bt11/11	2,29	32,93	39,39	22,54	37,25	heteroz.adh1-A/F
Bt11/13	31,81	31,56	33,51			homoz.adh1-F
Bt11/14	0,93	33,41	34,67	83,9	32,85	homoz.adh1-F
Bt11/19	0,12	33,86	35,44	7,32	36,39	heteroz.adh1-A/F
Bt11/21	0,86	33,97	37,6	20,75	34,04	heteroz.adh1-A/F
Bt11/17	0,3	33,205	37,19			homoz.adh1-A

Tab.15: Zuordnung der genomischen transgegen Einzelkörner MON810, Bt11, 4421 VT3 und 6831 RHXT zu ihrem jeweiligen Adh1-Typ (beide Messungen im Vergleich) [Madi et al.,2013]

Sowohl homo-, als auch heterozygote Allele ließen sich gut unterscheiden. Bei Bt11 konnten 2 Proben mit dem A-Allel gefunden werden, diese Proben wiesen einen Confidenz-Werte < 1% und Ct-Werte > 37 auf. Heterozygote Proben kamen bei 6831RHXT und Bt11 vor; die Confidenz-Werte ähnelten denen der A-Allele, da bei 2 Proben Confidenz-Werte < 10% und bei den anderen 2 Proben Confidenz-Werte < 1% auftraten.

Bei der Scorpion PCR Analyse konnte beobachtet werden, dass die Ct-Werte der heterozygoten Proben niedriger waren, als die der A-Allele. Bei heterozygoten Körnern betrug der Ct-Mittelwert 36,72 und beim homozygoten A-Allel 40,77. Die Confidenz-Werte für Proben mit dem F-Allel waren breiter gefächert, da beispielsweise die GVO Linie Bt11 einen Mittelwert von 15,17% und die Linie MON810 einen Mittelwert von 71,67% aufwiesen. Ebenso kam es

zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Auswertung der Scorpion Ct-Mittelwerte; bei MON810 lag der Wert bei 32,51 und bei 6831RHXT bei 35,92.
Von den Sequenzierungsergebnissen, bzw. den real-time PCR Daten ausgehen wurden anschließend insgesamt 10 Proben (je 1 der Linien MON810, 4421VT3, 6831RHXT und 7 der Linie Bt11) zur Herstellung von Subklonen bestimmt.

3.5. Herstellung von Subklonen

Für die PCR wurde 1µl DNA (50 ng/µl) eingesetzt und das PCR gerät mit einer Annealing Temperatur von 60 °C und 50 Zyklen programmiert. Die PCR Produkte wurden anschließend zuerst auf einem 2,5% Agarosegel überprüft und dann für die Ligation verwendet (Durchführung siehe auch Methoden).
Der DNA-Gehalt der hergestellten Plasmide wurden anschließend via Photometer eruiert und von diesen Werten ausgehen eine Verdünnung 10^{-1} bis 10^{-4} ng/µl mit ddH_2O hergestellt. Die 10^{-4} ng/µl Verdünnung wurde dann für die real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer verwendet.

3.5.1 Real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer

Für die real-time PCR wurde 2 µl DNA (10^{-4} ng/µl) verwendet und die Annealing Temperatur mit 60 °C und 50 Zyklen festgesetzt.
Es wurde im Doppelansatz gemessen und für die Analyse des Adh1-Allels der Mittelwert gebildet.

Name	Subclones	Conf.	Ct-syto	Ct-sco	Categorization
MON810/447	1	57,52	27,94	28,66	adh1-F allel
MON810/447	2	64,48	27,49	27,77	adh1-F allel
RHXT/90	1	3,7	30,75	36,76	adh1-F allel
RHXT/90	2	1,68	31,45	36,63	adh1-F allel
RHXT/90	3	89,29	30,74	31,34	adh1-A allel
VT3/42	1	85,61	25,83	25,77	adh1-F allel
VT3/42	2	4,49	26,39	27,1	adh1-F allel

Bt11/3	1	85,61	29,34	29,41	adh1-F allel
Bt11/3	2	82,28	28,18	28,75	adh1-F allel
Bt11/4	1	6,11	28,24	33,06	adh1-A allel
Bt11/4	2	6,28	26,62	33,57	adh1-A allel
Bt11/11	1	83,87	27,98	28,71	adh1-A allel
Bt11/11	2	4,3	26,74	31,67	adh1-F allel
Bt11/11	3	13,05	30,75	36,3	adh1-F allel
Bt11/19	1	11,25	31,33	37,26	adh1-F allel
Bt11/19	2	5,2	28,98	37,26	adh1-F allel
Bt11/19	3	93,52	28,36	32,23	adh1-A allel
Bt11/21	1	97,54	29,84	30,12	adh1-A allel
Bt11/21	2	4,65	28,67	30,84	adh1-F allel
Bt11/21	3	9,68	29,61	32,36	adh1-F allel

Tab.16: Real-time PCR der Adh1 Subklone mit Syto9 und Scorpion Primer; Gegenüberstellung der Syto9 Ct-Werte, der Scorpion Ct-Werte und der HRM Analyse-Werte [Madi et al., 2013]

Wie bei den genomischen Proben konnte eine deutliche Unterscheidung zwischen dem Allel A und dem Allel F festgestellt werden. Bei den homozygoten Proben war der Ct-Mittelwert 33,32 für die A-Allele und 27,91 für die F-Allele und der Confidenz-Mittelwert bei 6,20% für die A-Allele und bei 63,33% für die F-Allele. Für eine Unterscheidung zwischen allen A- und F-Allelen (inklusive solchen, die aus heterozygoten Körnern erzielt wurden) wurden Proben mit Confidenz-Werten < 20% und dem Ct-Wert >= 31 als Allele eingestuft. Proben mit Confidenz-Werten > 50% und Ct-Werten <= 31 wurden als F-Allele eingestuft.
Bei 2 Proben (4421VT3/42 Nr.2 und Bt11/19 Nr. 3) konnte diese Charakterisierungsmethode nicht angewandt werden, da ihre Ct- und Confidenz-Werte nicht schlüssig waren.

4421VT3/42 Nr.2 wurde aus einer homozygoten Probe (A-Allel) hergestellt und demzufolge auch als solcher Adh1-Typ charakterisiert. Bt11/19 Nr. 3 wies einen hohen Confidenz-Wert (93,5%), aber einen im Mittelwert liegenden Ct-Wert (32,2) auf. Diese Probe wurde ebenfalls als A-Allel eingestuft

Somit war ersichtlich, dass jedes heterozygote Template in einen F- und zwei A-Allele eingeteilt werden konnte. Zusammenfassend lässt sich für alle homo-, bzw. heterozygote Klone der Confidenz-Mittelwert bei 6,69% für die A-Allele und bei 91,06% für die F-Allele festlegen. Der Ct-Mittelwert der A-Allele lag bei 34,88 und der der F-Allele bei 30,60.

E. Diskussion

1. MON810 Mais

Die Fragestellung der Untersuchung von Mon810 war, ob bei Einzelkörnern DNA Abänderungen gefunden werden können, oder nicht.

Wie bereits bei Neumann et al. (2011) konnte die real-time PCR mit Scorpion Primer gut für die Detektion von SNPs genutzt werden. Die zunächst auf die Anwendbarkeit des Scorpion Primers und der HRM Analyse getesteten Plasmide (GVO-Wildtyp, Mutation, Einfach- und Doppel-Deletion) zeigten, dass diese Parameter gut für die Detektion von DNA Abweichungen geeignet waren. Je größer die Unterschiede zwischen den Sequenzen waren, desto deutlicher konnte zwischen GVO-Wildtyp und Proben mit DNA Abweichungen unterschieden werden. So zeigten die Mutation und die Einfach-Deletion geringfügige Abweichung vom GVO-Wildtyp, die Doppel-Deletion wies hingegen einen deutlicheren Unterschied auf. Dies konnte vor allem aufgrund der Confidenz-Werte beobachtet werden. Daher scheint die Detektion von DNA Änderungen ab 2 veränderten Nukleotiden am effektivsten zu sein.

Zusätzlich wurde die Methode, die bei Neumann et al. (2011) angewandt wurde, noch weiter optimiert. Gemeinsam mit dem Scorpion Primer wurde in einem real-time PCR Lauf der Farbstoff Syto9 verwendet, wodurch gleichzeitig zu den Scorpion Ct-Werten die Überprüfung der DNA-Konzentration, bzw. die Qualität der Proben und dadurch die Aussortierung von Proben mit schlechter DNA Qualität stattfinden konnte. Gleichzeitig gemessene Kurven, die in einem

engen Bereich gemeinsam verlaufen, zeigten, dass die DNA Konzentration der Proben ident waren und nicht den Unterschied in den Messungen mit Scorpion Primer beeinflussen.

Nachdem die Parameter Scorpion Primer und HRM Analyse bewiesen hatten, dass sie zur Unterscheidung von GVO-Wildtyp und Proben mit veränderter DNA geeignet waren, konnten diese Methoden bei 50 genomischen Proben mittels real-time PCR zum Screening eingesetzt werden. Es wurden die Syto9 und die Scorpion Ct-Werte miteinander verglichen, da eine starke Abweichung der Werte mit Syto9 in einer starken Abweichung (hohe Ct-Werte) mit dem Scorpion Primer resultiert hätte. Da dies jedoch nicht zutraf, konnten die Scorpion Ct-Werte und die Confidenz-Werte näher betrachtet werden. Es wurde nach Proben mit hohen Ct- und niedrigen Confidenz-Werten gesucht, da diese als potentiellen Mutanten galten. Doch obwohl es bei 28 Proben ein über dem Mittelwert liegender Ct-Wert gefunden werden konnte und es 5 Proben gab, die relativ niedrige Confidenz-Werte aufwiesen, konnten diese beiden Phänomene bei keiner einzelnen Proben gemeinsam beobachtet werden. Die Auswertung zeigte somit bei keiner einzigen Probe eine DNA Abweichung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass bei dem MON810 Konstrukt keine post-transformationellen Änderungen aufgetreten sind.

2. Roundup Ready Soja

Auch bei Roundup Ready Soja zeigte die Untersuchung mit Plasmiden, konnte auch bei transgenen Sojabohnen zeigen, dass real-time PCR mit Scorpion Primer zur Untersuchung von SNPs geeignet ist. Die Stabilität von DNA Konstrukten wurde zudem durch ein Screening einer hohen Anzahl einzelner Saatgutkörner (1034 Körner) überprüft, da Veränderungen die quantitative Messungen, die für die Analyse der GVO Unreinheiten durchgeführt werden, beeinflussen können. Dies trifft auch dann zu, wenn diese Veränderungen nur selten geschehen.

Da die Ergebnisse der real-time PCR maßgeblich von der Qualität der verwendeten Proben beeinflusst werden, könnte für zukünftige

Weiterentwicklung der verwendeten Methoden eine automatisierte Aufreinigung der Proben tägliche Schwankungen der DNA Reinheit vermeiden.

Wie bei MON810 wurde die Anwendbarkeit des Scorpion Primers und der HRM Analyse zunächst mit Plasmiden getestet. Dabei wurde die Empfindlichkeit der Parameter kontrolliert, um Proben mit veränderter DNA zu charakterisieren. Der GVO-Wildtyp und die Deletion zeigten mit diesen Methoden eine gute Unterscheidbarkeit, sodass diese Methoden für das Screening einer hohen Anzahl von Soja-Einzelkörnern eingesetzt werden konnten. Auffällige Proben wurden nach der Auswertung der real-time dazu, Proben auf eine neuartige DNA Veränderung, die durch Erhöhung der Mutationsrate und anderer post-transformationeller Effekte verursacht werden kann, zu überprüfen.

Die Ergebnisse des Screenings legen nahe, dass bei den Sojakörnern keine DNA Veränderungen aufgetreten sind. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass nur ein begrenzter Bereich (Scorpion Primerlänge für die Probe betrug 30 Nukleotide, plus 52 Nukleotid für die Primer) und nicht das gesamte Insert gescreent wurde. Wenn man die 100% Stabilität des Insert bestätigen möchte, wäre es nötig, das gesamte Insert zu überprüft. Hierbei müsste man aber beachten, dass die maximale Basenpaar-Länge von 90 Basen für die Scorpion Probe plus Primerlänge zu berücksichtigen wäre (Neumann et al., 2011).

3. Adh1

Ausgehend von der Ergebnissen von Broothaerts et al. (2008) wurde die allelische Diversität in Adh1 durch Subklonierung genomischer Proben untersucht. Die Möglichkeit, heterozygote Änderungen zu detektieren, war wichtig, auch wenn sie keine phenotypische Effekte bewirkten.

Zunächst wurden hierfür genomischer Proben nach ihrem Adh1 Typ (F und A) unterteilt und die DNA schließlich für die Herstellung von Subklonen verwendet. Diese Subklone wurden anschließend mittels real-time PCR mit Scorpion Primer und HRM Analyse untersucht. Dadurch ließen sich die heterozygoten Proben in F- und A-Allele einordnen,

Es scheint, dass die Zuordnung der heterozygoten Proben in ihren Adh1-Typ mit der HRM Analyse effektiver war als mit dem Scorpion Primer, da die mit HRM untersuchte Sequenz länger war, als die Sonde, die mit Scorpion untersucht wurde. Die Scorpion Analyse wird nur durch die Veränderung eines Nukleotids in der Sonde beeinflusst, während die HRM Analyse durch alle Nukleotide zwischen forward und reverse Primer beeinflusst wird. Diese Sequenz enthieltbei der untersuchten Nukleotid Abfolge mehrere Nukleotide, während die Scorpion Sonde nur ein Nukleotid Unterschied aufwies.

.

Beide Parameter haben ihre Vor- und Nachteile. Der Vorteil der HRM Analyse ist z.B., dass diese Methode mit jedem für die qualitative PCR einsetzbaren PCR Primer durchgeführt werden kann. Die Verwendung des Scorpion Primers ist etwas aufwändiger, da eine spezielle Software erforderlich ist und es in vielen Fällen schwierig ist, geeignete Primer für die gewünschte Sequenz zu herzustellen. Doch trotz allem erzielt man die besten Resultate erst in der Kombination dieser beiden Methoden.

F. Anhang

1. Kurzfassung

Gemäß EU-Richtlinie 2001/18 sollen bei der Haltung und Vermehrung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) keine genetischen Veränderungen auftreten. Durch Verordnungen der EFSA wird vorgeschrieben, GVO Saatgut nach fünf Generationen mit Southern Blots zu untersuchen. Bei diesen Kontrollen sollten keine Abweichungen der DNA Sequenz auftreten.

Ein genauer Nachweis von SNP (single nucleotide polymorphism) ist entsprechend der Publikation von Neumann et al. (2011) mittels real-time PCR mit Scorpion Primern möglich. Diese Methode wurde in der hier vorliegenden Diplomarbeit durch die Verwendung von HRM Analysen erweitert und verbessert. Zusätzlich wurde bei der Scorpion PCR ein Syto-Farbstoff zur Kontrolle der DNA Qualität eingesetzt. Syto kann durch Messungen bei einer Wellenlänge von 510 nm von Scorpion Primern unterschieden werden, die bei 660nm detektiert werden. Durch die Möglichkeit bei verschiedenen Wellenlängen zu messen, können Syto und Scorpion Primer in derselben PCR eingesetzt werden.

Für eine Darstellung der Charakteristika von Scorpion PCR und HRM wurde GVO DNA von Soja (Roundup Ready) und Mais (MON810) in Plasmide kloniert. Die Unterschiede der DNA Sequenz der Plasmide wurde durch Sanger Sequenzierung bestätigt. Scorpion Primer sowie HRM wurden verwendet, um Einfach-, und Doppel- Deletionen sowie Mutationen bei den Plasmiden nachzuweisen. Anschließend wurden Scorpion PCR und HRM eingesetzt, um Roundup Ready bei transgenem Soja Saatgut sowie MON810 bei transgenem Maissaatgut hinsichtlich genetischer Abweichungen zu screenen. Bei diesem Screening wurden zwar potentielle Unterschiede gefunden, bei einer Sequenzierung oder Subklonierung dieser Unterschiede zeigte sich jedoch, dass sowohl bei transgenem Mais (MON810), wie auch bei transgenem Soja (Roundup Ready) keine DNA Änderungen vorhanden sind.

Zusätzlich zur Untersuchung von genetischen Unterschieden bei genomischen Proben und bei Plasmiden wurde untersucht, inwieweit Scorpion PCR und HRM geeignet sind, zwischen zwei verschiedenen Allelen des Adh1 Gens zu unterscheiden. Adh1 wurde bei 2 Single-Events (Bt11 und MON810) und 2 stacked-Events (4421VT3 und 6831RHXT) mittels Scorpion PCR und HRM charakterisiert. Die Ergebnisse wurden wiederum durch Sanger Sequenzierung kontrolliert. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen homo-, bzw. den heterozygoten Allelen ist jedoch nur durch eine Subklonierung der genomischen DNA in Plasmide und eine Untersuchung von mehreren Subklonen möglich.

Allgemein zeigen die Experimente dieser Arbeit, dass eine Kombination von Scorpion PCR und HRM eine gute Möglichkeit ist, SNPs mit Unterschieden von nur wenigen Nukleotiden bei einem Screening von genomischen Proben zu finden, und heterozygote Mutationen bei transgenen Linien eindeutig zu charakterisieren.

2. Abstract

According to the EU directive 2001/18 no genetic changes should appear with the position and increase of genetically modified organisms (GMO). By orders of the EFSA it is settled that GMO seeds have to be examined after five generations with Southern Blots. With these controls no rearrangements of the DNA sequence may appear.

Neumann et al. (2011) described, how an exact analysis of SNP (single nucleotide polymorphism) is possible by using real time PCR and scorpion primer. In this dissertation this method is extended and improved by using HRM analysis. In addition to the Scorpion PCR the Syto dye was used for the examination of DNA quality.Syto could be distinguished by measurements of another wavelength (510 nm) of real time PCR with scorpion primern (660 nm). By using different wavelengths for the measurements Syto and scorpion primer could be used in the same PCR.

For the characterization of Scorpion PCR and HRM GMO DNA of soy (Roundup Ready) and maize (MON810) was cloned into plasmids. The difference in the DNA of the plasmids was confirmed by the Sanger sequencing. Scorpion primer and HRM were used for the detection of single and double deletions and mutation in the plasmids.Afterwards scorpion PCR and HRM were used to screen after genetically rearrangements in Roundup Ready transgene soy seeds and in MON810 maize seeds of the stacked-event 4421VT3. Although some potential differences could be found no genetic instabilities neither in the sequence nor with subcloning in MON810 transgene maize and transgene Roundup Ready soy could be detected.

In addition to the investigation of genetic aberrations in genomic samples and plasmids it was examined to what extent scorpion PCR and HRM are suitable to distinguish between two different alleles from the ADH1. Adh1 was characterized with 2 single events (Bt11 and MON810) and 2 stacked-events (4421VT3 and 6831RHXT) with scorpion PCR and HRM. In addition, a Sanger

sequencing wasalso carried out. Nevertheless, a distinct differentiation between homo- and the heterozygous type is only possible by cloning of the genomic DNA sample in plasmids and the examination of several subclones.

In general the experiments of this work showed that a combination of scorpion PCR and HRM was a good possibility to find SNPs with differences of one to only few nucleotides with a screening of genomic samples and also to characterize heterozygous mutations in transgene lines.

3. Auswertungen

1. Roundup Ready Soja

ad 1.7.1.1. Real-time PCR mit Syto9 und Plasmiden

Probe	Syto Ct	Conf. %
GVO-wt	28,15	100
Del	27,95	57,08
GVO-wt/del	27,95	71,72

ad 1.7.1.2. Real-time PCR mit Scorpion Primer und Plasmiden

Probe	Syto Ct	Scorp. Ct	Conf. %
GVO-wt	33,52	33,21	100
Del	32,83	n.d	62,13
GVO-wt/del	33,25	36,33	72,06

ad 1.7.2.1. Real-time PCR mit Scorpion Primer

	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
1	24,63	25,97	53,78	20	24,24	26,16	94,15	40	24,35	25,95	92,19
2	25,56	27,31	64,46	21	27,11	29,19	99,15	41	25,21	27,24	85,61
3	25,85	27,17	26,51	22	25,55	27,5	86,87	42	24,56	26,41	62,19
4	24,85	25,96	63,54	23	25,37	27,36	90,34	43	27,05	29,58	75,54
5	24,09	25,57	29,91	24	26,87	29,44	84,24	44	25,14	27,1	53,33
6	27,09	28,4	52,67	26	25,46	27,28	98,34	45	27,72	29,86	96,04
7	25,53	26,65	35,91	27	25,21	26,85	97,42	46	24,91	26,72	81,69
8	24,8	26,86	98,15	28	25,36	27,28	92,59	47	24,35	26,86	99,01
9	24,6	25,71	38,23	29	24,19	26,05	89,67	48	26,72	28,72	86,64
10	25,09	26,56	45,09	30	23,23	24,55	50,94	49	24,55	26,44	79,62
11	24,47	26,38	97,81	31	26,09	27,73	92,12	50	24,8	26,77	86,54
12	24,91	27,04	96,39	32	24,47	25,87	15,24	51	25,91	27,89	95,89
13	27,51	29,5	98,02	33	24,3	26,6	57,24	52	23,89	25,6	95,82
14	24,91	26,74	81,89	34	24,74	26,47	53,36	53	24,47	26,22	93,26
15	25,01	26,6	98,11	35	23,68	25,38	67,09	54	24,38	26,23	96,13
16	25,4	27,18	96,85	36	26,2	28,09	86,76	55	25,29	27,29	96,32
17	25,17	26,26	55,84	37	23,92	25,52	75,79	56	24,6	26,62	97,05
18	25,41	27,47	95,25	38	24,62	25,92	41,87	57	25,45	27,16	96,79
19	24,31	26,86	90,84	39	24,11	25,71	57,5	58	25,26	28,2	94,11

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
59	26,4	28,52	90,69	101	25,28	27,03	91,51	143	24,27	26,14	53,2
60	26,56	28,63	94,22	102	24,41	26,12	87,57	144	24,61	26,29	63,59
61	28,2	29,85	90,18	103	25,35	26,95	68,43	145	25,04	26,6	37,8
62	26,36	27,99	88,39	104	24,7	26,1	84,72	146	24,02	25,56	34,73
63	27,43	29,3	88,63	105	24,83	26,53	73,4	147	23,79	25,31	76,93
64	24,86	27,13	94,38	106	25,37	27,27	73,49	148	24,4	25,85	78,13
65	27,06	28,37	12,44	107	24,05	25,69	40,45	149	23,99	26,03	94,81
66	24,99	26,62	93,82	108	24,85	26,56	61,18	150	24,72	26,22	93,92
67	24,66	26,65	97,4	109	24,24	25,93	69,76	151	24,9	26,35	74,43
68	24,8	26,84	96,81	110	24,22	26,12	57,35	152	24,75	26,21	69,46
69	24,98	26,92	97,33	111	23,96	25,56	59,25	153	24,83	26,27	77,12
70	24,72	26,58	86,11	112	24,89	26,2	31,94	154	25,37	27,07	91,05
71	25,05	26,94	76,04	113	24,47	26,36	50,1	155	24,35	26,11	97,49
72	26,43	28,34	70,2	114	24,45	26,13	78,51	156	24,74	26,39	87,18
73	24,69	26,29	94,8	115	24,13	25,8	54,08	157	24,06	25,54	63,16
74	25,75	27,81	76,21	116	25,13	26,85	71,69	158	24,52	26,04	88,07
75	25,01	26,8	94,18	117	24,42	25,97	76,43	159	24,33	26,08	94,66
76	25,25	27	94,03	118	24,55	26,49	80,77	160	23,98	25,41	92,09
77	25,7	27,65	97,09	119	24,95	26,72	75,33	161	24,51	26,09	64,31
78	25,45	26,97	96,69	120	24,2	25,91	72,6	162	25,18	26,43	36,85
79	25,77	27,29	95,87	121	24,22	26,46	85,47	163	24,23	25,49	61,46
80	25,81	27,24	97,72	122	24,55	25,93	52,79	164	24,96	26,51	41,08
81	25,63	27,46	92,49	123	23,91	25,76	82,15	165	24,67	25,92	62,16
82	25,54	26,85	92,84	124	24,74	26,41	67,32	166	24,12	25,41	51,36
83	25,52	27,05	88,66	125	24,93	26,67	83,61	167	24,41	25,73	32,62
84	25,31	26,99	61,16	126	24,1	25,69	69,4	168	23,75	25,22	37,93
85	25,61	27,36	98,77	127	24,72	25,99	88,6	169	23,03	24,09	46,37
86	25,62	27,35	88,8	128	24,01	25,6	72,01	170	23,32	24,51	27,62
87	25,01	26,52	94,98	129	24,07	25,89	61,23	171	24,3	25,71	66,96
88	25,03	26,54	95,13	130	24,11	25,69	98,39	172	24,17	25,15	40,8
89	25,19	26,92	93,44	131	22,8	23,83	93,6	173	24,22	25,51	68,04
90	25,09	26,78	96,44	132	24,56	25,99	52,71	174	24,39	25,93	70,52
91	24,32	25,87	91,48	133	24,51	26,02	41,18	175	24,49	26,08	71,52
92	24,88	26,3	83,65	134	25,12	26,84	51,36	176	24,82	26,5	81,55
93	24,8	26,38	91,09	135	25,09	26,86	59,76	177	24,81	25,99	45,09
94	24,07	25,37	67,68	136	24,76	26,43	36,18	178	25,01	26,38	70,37
95	25,48	26,87	71,94	137	23,82	25,68	60,85	179	24,89	26,57	85,08
96	25,55	26,89	86,94	138	24,65	26,39	52,94	180	24,68	26,03	61,47
97	25,14	26,63	92,63	139	24,2	26,1	76,33	181	24,11	25,54	69,32
98	24,81	26,88	94,17	140	24,33	26,27	54,36	182	24,13	25,35	75,75
99	25,88	27,65	85,87	141	23,95	25,58	82,87	183	24,27	25,41	73,52
100	24,43	25,95	75,36	142	24,79	26,41	52	184	24,85	26,59	98,8

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
186	27,19	27,77	11	229	25,42	27,6	84,96	271	23,99	25,57	49,13
187	25,15	26,58	99,48	287	24,49	26,54	73,8	272	26,52	28,4	71,12
188	25,65	26,96	96,8	231	25,16	27,29	94,2	273	25,41	27,32	6,6
189	24,14	25,09	77,2	232	26,21	28,65	95,76	274	24,94	26,83	67,52
190	24,02	25,16	78,33	233	23,49	25,26	90,2	275	25,93	27,74	61,3
192	24,07	25,46	62,05	234	24,8	27,09	73,67	276	25,91	27,96	92,21
193	24,08	25,6	92,23	235	23,7	25,56	99,56	277	25,92	27,74	75,93
194	23,51	25,49	94,6	236	24,36	26,54	91,92	278	25,32	27,48	63,73
195	24,42	26,33	97,42	237	23,84	25,8	95,99	279	25,45	27,38	81,12
196	23,98	25,95	99	238	25,32	27,34	90,1	280	25,91	27,9	89,37
197	24,41	26,35	90,8	239	24,93	27,19	91,14	281	26,07	28,41	97,17
198	24,35	26,07	93,51	240	23,56	25,81	81,63	282	25,01	26,93	80,64
199	24,66	26,61	92,68	241	25,36	27,74	84,33	283	24,75	26,37	62,11
200	24,31	26,11	76,78	242	25,55	27,71	74,19	284	25,08	26,66	97,85
201	24,17	26,13	80,16	243	24,39	26,48	61,42	285	25,4	27,15	74,15
202	24,07	25,96	97,47	244	24,35	26,44	46,55	286	25,95	27,64	58,86
203	23,84	25,36	88,5	245	25,48	27,86	75,61	288	25,39	26,78	61,64
204	24,12	26,29	97,9	246	23,92	25,8	58,76	289	24,14	25,44	95,24
205	24,56	25,95	70,96	247	24,71	26,6	68,76	290	26,27	27,96	93,72
206	23,55	25,54	89	248	24,85	27	75,17	291	25,46	26,99	99,64
207	24	26,41	98,32	249	24,44	26,59	69,06	292	25,13	26,34	91,38
208	22,92	24,8	95,71	250	24,78	26,91	92,69	293	25,5	27,44	92,2
209	24,85	27,1	95,73	251	24,68	26,58	83,04	294	26,13	27,7	99,81
210	23,85	25,59	93,07	252	25,19	27,01	82,57	295	23,89	25,21	97,42
211	25,31	27,7	95,8	253	24,89	27,16	73,62	296	24,81	26,1	89,24
212	26,6	28,74	98,48	254	25,35	27,65	90,2	297	24,8	26,54	99,7
213	24,64	26,62	92,75	255	24,53	26,65	89,46	298	24,94	26,36	97,9
214	23,64	25,48	91,02	256	24,73	26,79	67	299	25,65	27,07	94,34
215	23,83	25,7	80,74	257	23,73	25,56	85,26	300	24,53	26,1	90,65
216	23,11	25,1	93,48	258	25,58	27,56	93,55	301	24,68	26,06	97,08
217	24,34	26,74	93,77	259	25,35	27,36	99,31	302	24,77	26,46	92,22
218	25,07	27,17	82,62	260	24,91	26,81	89,57	303	24,68	26,48	93,69
219	23,67	26,2	91,94	261	26,63	28,88	92,12	304	24,86	26,12	97,54
220	25,44	27,67	90,28	263	25,19	26,74	91,01	305	24,67	26,01	95,23
221	25,6	27,85	93,65	262	25,57	27,23	86,04	306	25,03	26,45	99,2
222	25,68	27,95	96,88	264	25,58	27,15	80,26	307	24,62	26,05	89,3
223	26,36	28,55	86,28	265	25,32	27,21	90,73	308	24,07	25,8	93,52
224	24,82	26,85	88,47	266	25,63	27,47	77,18	309	25,84	27,45	88,39
225	25,18	27,46	98,91	267	25,78	27,42	78,14	310	25,47	27,3	76,39
226	25,53	27,66	93,91	268	25,37	27,18	63,64	311	25,86	27,51	99,64
227	26,1	28,51	93,96	269	25,38	27,03	53,45	312	24,59	26,27	84,08
228	24,44	26,41	94,49	270	25,35	27,22	84,17	313	24,4	25,89	71,29

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
314	24,78	26,41	63,62	356	25,65	26,68	85,01	398	24,6	26,42	85,08
315	25,02	26,7	77,64	357	25,26	26,51	66,94	399	25,07	26,88	70,44
316	25,56	27,1	84,72	358	25,56	26,61	65,73	400	24,02	25,53	63,14
317	26,27	27,85	89,95	359	24,86	25,77	60,03	401	25,12	26,78	76,41
318	23,9	25,49	82,32	360	25,64	26,24	38,49	402	25,51	27,04	61,32
319	24,87	26,09	55,41	361	25,84	26,93	93,13	403	25,43	27,07	77,26
320	24,94	26,17	74,88	362	25,99	27,09	81,19	404	25,33	26,45	31,55
321	25,25	26,56	70,81	363	25,76	26,85	83,33	405	25,8	27,14	64,91
322	24,6	25,75	89,7	364	26,14	27,39	76,15	406	25,4	27,35	76,66
323	24,47	25,8	89,5	365	25,74	26,85	82,74	407	25,61	27,18	62,13
324	26,3	27,68	77,5	366	26,91	28,04	95,25	408	24,5	26,26	78,35
325	24,84	26,23	70,25	367	25,51	26,75	89,59	409	24,31	25,86	53,18
326	26,26	27,76	71,42	368	25,86	27,06	94,06	410	25,7	27,3	49,22
327	25,65	27,12	70,59	369	25,72	26,74	93,87	411	25,34	27,04	84,78
328	25,83	27,75	89,17	370	25,43	26,62	90,77	412	25,62	26,82	16,98
329	25,77	27,14	88,78	371	26,2	27,68	98,14	413	24,02	25,29	77,71
330	24,34	25,88	99,24	372	27,05	28,3	79,35	414	23,97	25,58	77,98
331	25,29	26,9	93,37	373	25,36	26,48	86,06	415	23,72	25,06	31,88
332	24,74	25,97	75,81	374	25,5	27,2	84,56	416	24,72	26,59	64,06
333	24,52	26,19	92,32	375	25,91	27,25	96,63	417	24,04	25,67	41,39
334	24,92	25,98	59,43	376	26,2	27,84	91,23	418	24,6	26,17	72,54
335	25,46	27,18	82,33	377	25,52	26,95	96,59	419	24,34	26,05	39,05
336	26,46	28,18	93,05	378	27,2	28,89	98,22	420	24,31	25,8	60,11
337	25,56	27,25	96,16	379	25,51	26,86	96,41	421	24,49	26,63	68,87
338	26,27	27,74	94,14	380	27,14	28,47	92,74	422	23,05	24,52	38,75
339	25,47	27,11	92,67	381	24,92	26,16	95,02	423	23,87	25,72	61,44
340	26,65	28,07	82,7	382	25,88	27,16	97,96	424	24,44	26,26	53,65
341	24,77	26,53	95,9	383	25,89	27,21	93,47	425	23,91	25,3	22,52
342	26,49	28,36	94,24	384	24,54	25,94	60,91	426	24,07	25,66	49,68
343	25,15	26,64	79,21	385	25,23	26,62	85,16	427	24,55	26,1	40,59
344	25,57	27,08	65,52	386	25,1	27,15	99,47	428	24	25,48	50,82
345	26,38	28,15	84,26	387	24,99	26,66	88,52	429	24,85	26,53	47,34
346	25,28	26,72	79,51	388	24,64	26,04	90,01	430	24,45	26,03	41,29
347	25,35	27,05	83,04	389	25,72	27,36	88,72	431	24,74	26,36	46,77
348	25,16	26,77	79,71	390	25,12	26,83	86,58	432	23,9	25,49	60,98
349	26,62	28,1	86,87	391	25,64	27,23	99,37	433	24,57	26,28	86,62
350	26,87	28,57	85,15	392	25,97	27,84	88,24	434	24,64	26,45	87,43
351	25,28	26,69	87,06	393	25,49	26,86	73,71	435	25,06	26,72	67,74
352	24,7	26,6	96,98	394	24,85	26,32	87,71	436	25,23	26,69	64
353	25,49	26,82	90,14	395	24,73	26,77	96,55	437	24,01	25,42	58,96
354	24,97	26,29	93,9	396	24,5	26,72	91,81	438	24,32	25,88	69,46
355	26,07	27,03	77,84	397	26,04	26,86	28,28	439	24,48	25,86	79,36

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
440	24,77	25,91	27,72	482	23,86	25,71	87,95	524	23,26	25,27	95,82
441	24,83	26,38	28,74	483	23,49	25,45	98,34	525	23,31	24,39	92,87
442	24,26	25,43	40,89	484	24,29	25,82	95,59	526	24,37	25,67	81,79
443	24,18	25,86	75,19	485	24,06	25,82	89,44	527	23,49	25,46	81,08
444	24,45	25,96	96,34	486	24,51	26,29	87,44	528	24,01	25,9	88,6
445	24,23	25,54	32,65	487	24,49	26,58	95,52	529	23,5	25,22	69,84
446	24,79	26,45	73,3	488	23,69	25,53	99,75	530	23,82	25,79	89,56
447	25,06	26,58	82,38	489	23,77	25,52	84,05	531	24,36	26,2	68,9
448	24,02	25,68	69,7	490	24,26	26,11	96,14	532	23,76	25,54	77,15
449	24,35	25,81	49,11	491	23,45	24,73	51,29	533	24,34	26,07	77,18
450	25,27	26,86	61,75	492	23,65	25,56	99,07	534	24,26	26,02	64,65
451	24,64	25,92	39,06	493	23,34	25,15	88,45	535	23,73	25,63	70,71
452	25,01	26,33	51,09	494	23,69	25,53	69,09	536	23,86	25,4	65,74
453	25,3	26,58	67,84	495	24,15	25,71	93,02	537	24,25	25,66	66,49
454	25,23	26,67	80,13	496	24,26	25,72	76	538	24,17	25,88	38,79
455	24,55	25,7	48,71	497	24,17	25,77	98,54	539	24,03	25,86	59,85
456	24,84	26,14	50,39	498	24,09	25,76	93,05	540	23,73	25,58	93,52
457	24,58	25,98	75,28	499	24,25	25,59	85,25	541	23,58	25,31	66,91
458	24,6	26,04	66,86	500	23,34	25,13	98,62	542	24,14	25,8	83,83
459	24,48	25,82	54,35	501	23,58	25,03	45,99	543	24,27	25,98	89,02
460	25,43	26,78	50,57	502	23,49	25,41	75,5	544	24,31	25,79	55,3
461	24,25	25,42	28,56	503	24,42	26,15	78,57	545	24,03	25,76	68,87
462	25,21	26,36	53,3	504	22,83	24,78	85,56	546	24,23	25,53	55,17
463	24,05	25,2	27,31	505	23,36	25,02	65,95	547	23,87	25,66	79,47
464	24,76	26,19	63,15	506	23,47	24,97	48,63	548	24,51	26,05	87,82
465	25,28	26,12	36,46	507	23,79	25,56	88,64	549	24,24	25,66	90,99
466	25,36	26,84	63,9	508	24,48	26,37	71,9	550	24,08	25,72	69,53
467	24,73	26,11	48,05	509	24,17	25,83	98,62	551	24,17	25,36	59,5
468	25,02	26,55	69,39	510	24,47	26,24	99,51	552	24,7	26,2	59,19
469	24,86	26,02	82,99	511	23,26	24,72	98,63	553	24,27	25,75	42,74
470	25,04	26,31	84,79	512	24,41	25,93	82,55	554	23,91	25,02	83,59
471	25,31	26,77	94,66	513	24,37	26,09	82,36	555	24,05	25,34	43,09
472	25,4	27,09	80,42	514	24,53	26,45	98,9	556	24,05	25,13	77,45
473	24,81	26,15	84,99	515	23,61	25,29	91,52	557	24,29	25,86	83,16
474	25,78	27,34	96,89	516	23,73	25,38	67,94	558	24,08	25,46	58,68
475	25,83	27,16	76,65	517	23,17	25	48,42	559	24,01	25,62	65,37
476	25,87	27,31	76,63	518	23,26	25,3	88,3	560	23,89	25,37	88,52
477	25,15	26,4	99,35	519	23,86	25,67	93,27	561	24,05	25,58	81,22
478	24,78	26,14	66,21	520	24,2	26,56	97,36	562	24,34	25,73	79,92
479	25,85	27,27	85,92	521	23,38	24,83	58,34	563	24,33	25,91	96,98
480	24,71	25,84	81,49	522	23,51	25,2	80,75	564	24,5	25,91	92,44
481	24,43	25,81	93,16	523	23,22	24,77	86,09	565	22,75	24,2	40,98

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
566	23,82	25,33	26,56	608	25,49	27,15	26,63	650	24,53	25,95	49,71
567	24,57	26,42	84,91	609	24,94	26,63	59,71	651	23,91	25,24	37,33
568	24,14	25,66	52,46	610	24,93	26,84	61,66	652	24,51	26,14	66,17
569	24,29	25,82	55,72	611	24,28	25,91	72,09	653	24,62	26,34	44,93
570	23,7	25,15	45,57	612	24,61	26,02	30,86	654	25,53	27,39	71,47
571	24,67	26,23	83,37	613	24,61	26,52	43,18	655	24,02	25,77	46,01
572	23,32	25,47	95	614	23,98	25,84	9,65	656	24,27	25,94	46,33
573	25,25	26,88	76,12	615	24,71	26,56	48,39	657	23,86	25,23	57,41
574	25,23	26,83	99,69	616	24,29	25,88	54,27	658	24,55	26,3	60,61
575	24,78	26,23	77,27	617	24,63	26,07	20,24	659	24,81	26,61	89,92
576	24,7	26,2	90,64	618	24,54	26,44	32,27	660	24,24	26,19	89,4
577	24,12	25,27	27,5	619	24,06	25,94	13,84	661	24,71	26,4	54,42
578	24,49	26,19	58,7	620	24,95	26,94	17,17	662	24,33	25,76	31,62
579	24,35	25,87	26,98	621	24,75	26,41	34,45	663	24,52	26,36	49,72
580	25,15	26,91	61,43	622	24,92	26,61	58	664	24,08	25,55	21,68
581	25,57	27,4	82,18	623	24,57	26,37	39,23	665	25,18	27,15	46,84
582	24,92	26,39	28,59	624	24,58	26,47	75,76	666	24,59	26,21	77,4
583	25,65	27,35	40,86	625	24,1	25,79	30,84	667	25,33	26,77	34,1
584	24,89	26,58	34,54	626	24,79	26,65	65,61	668	23,91	25,35	44,21
585	24,94	26,66	21,72	627	24,52	26,23	60,08	669	24,82	26,28	39,56
586	24,94	26,66	60,18	628	24,62	27,08	77,5	670	23,54	25,98	6,25
587	24,66	26,06	32,41	629	24,27	26,03	92,03	671	24,36	25,2	28,77
588	24,89	26,66	39,44	630	24,73	26,6	58,56	672	25,25	26,29	13,48
589	24,6	26,01	37,6	631	24,66	26,05	33,11	673	25,84	27,37	96,19
590	24,98	26,61	58,49	632	25,07	26,78	46,21	674	25,11	26,57	28,25
591	24,64	26,54	65,41	633	24,87	26,58	47,71	675	25,4	27,08	77,38
592	24,64	26,14	24,25	634	24,05	25,61	33,69	676	24,88	26,72	61,59
593	24,52	26,07	26,71	635	24,18	26,05	63,8	677	24,16	25,62	59,91
594	25,19	27,09	52,81	636	24,18	25,99	26,82	678	24,53	25,91	45,39
595	25,59	27,34	75,41	637	24,13	25,42	36,25	679	24,25	25,72	62,46
596	25,07	26,85	54,75	638	25,39	27,09	35,03	680	24,33	25,96	60,85
597	25,52	27,13	48,76	639	24,81	26,51	46,42	681	25,3	26,63	32,68
598	25,37	27,14	18,4	640	24,95	26,58	68,39	682	25,51	26,64	64,02
599	24,46	26,01	74,65	641	24,68	26,29	69,54	683	24,77	26,38	52,72
600	25,42	27,05	28,39	642	24,66	26,29	68,27	684	24,57	26,15	44,81
601	24,77	26,34	39,08	643	24,58	26,09	43,36	685	24,93	25,71	12,01
602	25,25	25,98	12,94	644	25,06	26,77	76,36	686	24,1	25,61	16,29
603	24,75	26,42	39,43	645	24,67	26,47	54,35	687	25,59	26,85	12,33
604	25,56	27,21	60,03	646	23,98	25,57	35,22	688	24,85	26,17	49,98
605	24,17	25,65	36,25	647	25,72	27,18	17,81	689	24,86	26,42	50,23
606	24,51	26,08	64,31	648	24,2	25,82	47,59	690	23,86	25,11	13,81
607	24,98	26,58	45,16	649	26,04	27,14	80,13	691	25,46	26,9	9,42

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
692	24,8	26,46	50,86	733	24,75	26,25	24,25	776	24,73	26,57	75,74
693	24,81	26,16	6,22	734	25,41	27,1	46,76	777	25,2	27,1	97
694	24,05	25,47	37,29	735	25,46	27,01	55,16	778	24,68	26,77	74,21
695	24,5	25,74	35,86	736	24,42	25,66	19,05	779	25,07	26,59	75,42
696	23,71	24,78	23,84	737	25,14	26,28	11,3	780	24,67	26,73	94
697	25,45	27,22	54,38	738	25,36	26,77	44,31	781	24,18	25,88	49,73
698	25,28	26,76	46,81	739	26,58	28,05	32,03	782	25,02	26,92	83,34
699	25,56	27,04	55,71	740	25,86	27,37	34,53	783	24,65	26,17	74,8
700	26,56	28,61	90,61	741	25,17	26,67	37,22	784	24,69	26,57	86,58
701	25,26	26,54	48,42	742	24,69	25,51	6,21	785	24,61	26,58	64,49
702	25,63	26,79	20,19	743	24,98	26,32	37,81	786	24,94	26,95	80,14
703	25,47	26,51	15,49	744	24,59	25,91	11,19	787	24,9	26,91	91,36
704	24,69	26,11	21,28	745	25,25	26,79	13,24	788	24,61	26,1	64,44
705	25,13	26,6	48,23	746	25,18	26,4	16,99	789	25,04	27,12	86,39
706	25,95	27,27	77,69	747	24,95	26,3	18,88	790	24,01	25,59	43,95
707	25,54	26,82	2,55	748	25,27	26,58	5,36	791	24,75	26,56	65,18
708	25,48	27,06	32,13	749	25,08	26,49	44,41	792	24,09	25,97	99,27
709	25,35	26,82	14,67	750	25,06	26,39	3,67	793	24,3	25,93	50,29
710	23,63	24,6	4,24	751	25,68	27,06	60,84	794	25,09	27,1	92,6
711	24,75	26,14	49,06	752	25,67	27	33,77	795	25,12	26,97	97
712	24,53	25,82	26,35	753	25,46	26,73	40,06	796	24,72	26,59	89,66
713	24,52	25,74	28,78	754	25,52	26,99	59,89	797	24,4	26,01	77,8
714	23,91	25,2	18,42	755	25,33	26,73	50,19	798	24,41	25,83	76,26
715	23,99	25,51	7,65	756	24,77	26,25	50,63	799	24,2	25,43	29,51
716	23,79	25,31	15,68	757	25,79	26,97	8,47	800	24,46	26,02	78,89
717	24,86	26,46	19,03	758	25,41	27,38	68,63	801	24,73	26,37	79,08
718	24,93	26,32	36,55	759	24,88	26,25	11,64	802	24,8	26,47	89,09
719	24,55	26,32	36,08	760	24,77	26,35	21,01	803	24,32	25,72	64,78
720	25,36	27,06	55,07	761	24,8	25,9	22,95	804	24,46	26,51	87,31
721	24,43	25,73	7,33	762	25,22	26,33	72,13	805	23,95	25,82	83,45
722	24,74	25,9	2,69	763	25,88	27,19	42,92	806	24,57	26,28	93,07
723	24,99	26,25	10,62	764	25,42	26,82	44,17	807	24,31	26,19	92,53
724	24,44	26,01	5,74	765	25,03	26,09	53,4	808	24,08	25,75	69,2
725	24,39	26,05	18,05	767	24,61	25,97	5,44	809	24,25	25,57	93,53
726	24,5	26,19	47,02	768	25,49	27,01	92,27	810	24,3	26,22	76,38
727	24,41	25,98	31,45	769	25,13	26,67	96,89	811	24,79	26,49	60,69
728	24,71	25,95	4,45	770	24,21	26	78,74	812	24,52	26,37	88,78
766	25,13	26,78	38,16	771	24,83	26,85	87,29	813	24,66	26,15	39,41
729	24,59	25,94	48,11	772	24,63	26,25	81,27	814	23,92	25,8	83,55
730	25,04	26,61	32,36	773	25,42	27,07	96,33	815	23,99	25,66	68,42
731	24,21	25,45	43,26	774	25,49	26,65	74,69	816	24,56	26,52	67,87
732	24,77	26,25	32,87	775	25,35	26,77	82,15	817	24,47	25,87	31,41

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
818	23,89	25,39	43,7	860	24,34	25,7	86,63	902	24,26	25,8	33,31
819	24,97	26,83	60,68	861	24,6	25,92	59,61	903	24,98	26,81	69,6
820	24,2	25,94	80,96	862	24,46	25,73	73,61	904	23,82	25,36	37
821	24,46	26,18	57,02	863	24,65	26,26	25,47	905	24,38	25,73	20,68
822	24,75	26,39	61,74	864	24,09	25,39	77,17	906	23,55	25,26	33,09
823	23,85	25,17	36,25	865	23,15	25,08	33,91	907	24,32	25,94	40,97
824	24,65	26,27	56,36	866	23,5	25,7	36,86	908	25,2	26,68	75,27
825	24,49	26,11	58,81	867	24,13	25,41	35,28	909	24,25	25,71	45,45
826	24,02	25,56	81,91	868	23,97	25,75	43,69	910	23,87	25,31	28,35
827	24,61	26,26	65,05	869	23,6	25,03	7,37	911	24,14	25,7	76,13
828	24,39	25,78	30,4	870	23,44	25,53	11,53	912	24,12	25,26	40,13
829	24,1	25,62	39,5	871	23,21	25,35	6,37	913	24,51	26,58	74,57
830	23,69	25,23	70,36	872	24,1	25,87	30,58	914	24,24	25,54	42,82
831	23,8	25,12	37,58	873	24,13	25,76	52,41	915	24,07	25,61	77,16
832	24,15	25,52	9,5	874	23,76	25,85	12,07	916	24,78	26,66	83,63
833	24,81	26,38	12,82	875	23,62	26,51	13,06	917	23,55	25,63	96,31
834	24,61	26,17	7,72	876	23,91	25,64	27,19	918	24,45	26,32	59,71
835	25,05	26,86	55,12	877	20,55	22,55	33,9	919	24,57	26,05	79,12
836	24,38	25,79	88,37	878	21,98	25,41	1,43	920	23,98	25,56	88,49
837	24,5	25,93	55,35	879	22,89	24,41	11,19	921	24,1	25,79	22,04
838	24,08	25,23	20,16	880	24,25	26,54	26,48	922	25,27	26,95	83,38
839	24,24	25,56	52,35	881	24,52	26,07	31,8	923	24,36	25,93	64,63
840	23,91	25,2	34,26	882	24,03	25,86	46,61	924	24,79	26,37	70,21
841	24,51	25,75	72,31	883	24,79	26,8	23,89	925	24,7	26,52	83,03
842	25,03	26,35	81,61	884	24,29	25,98	10,07	926	25,47	27,27	87,59
843	24,06	25,55	80,09	885	23,66	25,47	36,9	927	23,83	25,16	3,36
844	24,81	26,38	70,61	886	24,36	26,02	59,65	928	23,7	25,36	58,64
845	24,45	25,59	37,25	887	24,06	26,15	19,57	929	24,7	25,88	2,05
846	24,38	25,83	82,28	888	23,81	25,95	33,24	930	24,25	25,58	56,7
847	24,29	25,56	60,68	889	24,01	25,86	34,64	931	23,98	25,35	38,79
848	24,19	25,37	44,3	890	24,36	26,31	44	932	23,96	25,07	35,42
849	24,62	25,94	59,85	891	23,43	25,17	42,13	933	24,99	26,36	19,92
850	24,34	25,91	78,65	892	23,56	25,01	11,04	934	24,21	25,14	47,38
851	24,99	26,38	77,46	893	24,25	25,93	60,24	935	24,63	25,57	16,97
852	24,14	25,39	58,84	894	24,07	25,81	12,95	936	24,47	25,73	44,12
853	24,23	25,33	44,75	895	24,49	26,4	39,11	937	24,98	26,46	72,97
854	24,97	26,4	91,5	896	23,65	25,48	61,07	938	24,01	25,37	9,44
855	25,25	26,92	57,07	897	24,57	25,91	78,42	939	24,72	25,78	27,7
856	25,09	26,33	62,08	898	22,32	25,97	23,46	940	24,25	25,28	4,16
857	24,82	26,4	11,97	899	24,34	25,93	17,77	941	25,09	26,21	20
858	24,51	25,97	92,65	900	24,92	26,99	44,53	942	24,38	25,6	20,96
859	25,01	26,63	76,17	901	23,56	25,27	32,7	943	24,69	26,18	53,51

Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%	Nr.	Syto Ct	Sc Ct	Conf.%
944	24,11	25,02	0,73	978	25,02	26,5	78,52	1010	24,11	25,38	22,74
945	24,7	25,91	51,42	979	24,87	26,14	65,44	1011	24,29	25,74	57,2
946	25,36	26,49	81,13	980	24,59	25,96	60,2	1012	25,06	26,52	85,38
947	24,47	25,4	30,48	981	24,63	26,07	58,97	1013	24,44	25,72	61,67
948	24,67	25,57	5,81	982	24,75	26,19	76,09	1014	25,11	26,67	57,33
949	24,58	25,66	0,5	983	24,25	25,4	29,5	1015	24,62	26,27	57,78
950	24,04	25,34	1,18	984	24,49	25,85	55,18	1016	24,59	25,97	68,87
951	23,97	25,49	31,72	985	24,69	25,94	66,13	1017	24,96	26,7	58,76
952	24,34	25,68	52,98	986	24,61	26,01	56,52	1018	24,65	26,22	64,47
953	24,7	26,07	37,02	987	23,88	25,35	55,23	1019	24,79	26,27	72,53
954	24,63	26,04	52,11	988	24,87	26,16	58,15	1020	24,68	25,68	19,72
955	25,04	26,24	63,79	989	23,94	25,18	62,11	1021	24,59	26,22	80,46
956	24,45	25,65	39,08	990	24,65	25,57	48,96	1022	24,51	25,86	55,86
957	25,22	26,82	73,65	991	24,44	25,38	83,11	1023	25,15	26,83	59,27
960	25,16	26,32	83,62	992	25,04	26,6	84,58	1024	24,37	25,88	44,33
961	25,28	26,52	71,84	993	24,49	25,72	32,35	1025	24,88	26,17	39,82
962	25,88	27,4	99,51	994	25,02	26,56	87,86	1026	24,17	25,34	28,11
963	24,95	26,35	49,27	995	24,68	25,95	85,22	1027	25,62	27,29	83,5
964	25,23	26,6	94,77	996	24,88	26,21	39,27	1028	24,93	26,33	73,97
965	24,76	25,98	84,61	997	24,52	25,76	51,98	1029	25,01	26,17	78,99
966	24,87	26,09	87,65	998	24,61	26,25	91,47	1030	25,25	26,63	45,75
967	24,69	26,19	71,27	999	24,31	25,64	54,52	1031	24,94	26,14	17,2
968	24,72	25,94	75,01	1000	24,79	26	24,28	1032	25,5	26,77	46,39
969	24,73	25,81	50,41	1001	24,68	26,14	44,52	1033	25,21	26,39	52,21
970	23,89	25,12	42,08	1002	24,45	26,14	82,65	1034	25,18	26,36	79,56
971	24,61	26,3	54,71	1003	24,78	26,55	86,47	1035	25,32	26,29	56,39
972	24,4	25,93	80,72	1004	25,07	26,72	18,7	1036	24,85	26,06	78,19
973	24,65	25,68	34,75	1005	25,14	26,85	90,07	1037	25,14	26,49	91,89
974	24,15	25,66	79,4	1006	24,69	26,33	71,91	1038	25,55	26,77	53,52
975	24,19	25,14	64,53	1007	24,6	26,32	78,17	1039	25,22	26,67	84,78
976	24,7	26,13	48,98	1008	24,6	26,36	81,83	1040	25,48	26,72	61,76
977	25,52	26,88	94,59	1009	24,62	26,26	67,81				

ad 1.7.2.2. Real-time PCR für Subklonierung

Probe	Sc. Ct	MW Sc.	Conf. %	MW Conf	Syto Ct
Nr. 186	31,48	31,535	75,75	75,38	31,06
Nr. 186	31,59		75,01		30,9
Nr. 647	31,29	31,34	85,84	86,6	30,29
Nr. 647	31,39		87,36		30,38
Nr. 598	31,87	31,845	94,63	96,79	30,91
Nr. 598	31,82		98,95		30,9

Nr. 43	32,4	32,4	96,44	95,69	31,65
Nr. 43	32,4		94,94		31,74
Nr. 45	31,75	31,715	59,03	60,185	31,06
Nr. 45	31,68		61,34		30,83
Nr. 61	32,97	32,95	52,21	50,7	31,62
Nr. 61	32,93		49,19		31,62
Nr. 13	34,32	34,41	83,78	85,93	33,26
Nr. 13	34,5		88,08		33,44
Nr. 24	33,82	33,705	18,32	19,3	32,4
Nr. 24	33,59		20,28		32,27
Nr. 949	30,72	30,695	27,36	28,4	30,57
Nr. 949	30,67		29,44		30,38
Nr. 944	30,54	30,735	13,45	10,355	30,63
Nr. 944	30,93		7,26		31,41
Nr. 950	30,77	30,77	24,12	22,63	30,66
Nr. 950	30,77		21,14		30,97
Nr. 878	32,83	32,975	59,99	61,455	26,32
Nr. 878	33,12		62,92		26,35
Nr. 929	30,25	30,18	47,46	50,35	29,56
Nr. 929	30,11		53,24		29,42
Soja Pool	29,75	29,935	100	100	29,22
Soja Pool	30,12		100		29,25

ad 1.7.3.1. Real-time PCR mit Subklonen

	10-4 ng/µl			10-5 ng/µl		
Probe	Sc. Ct	Conf. %	Mw Conf.	Sc. Ct	Conf. %	Mw Conf.
Nr.186 (1)	26,87	99,59	99,745	32,02	98,7	97,45
Nr.186 (1)	26,71	99,9		31,99	96,2	
Nr.186 (3)	26,08	99,46	98,535	30,02	99,56	99,355
Nr.186 (3)	26,37	97,61		30,1	99,15	
Nr.598 (1)	26,65	98,77	98,775	30,35	99,78	99,465
Nr.598 (1)	26,38	98,78		30,2	99,15	
Nr.598 (2)	27,13	98,85	98,455	30,97	99,53	99,345
Nr.598 (2)	27,14	98,06		31,05	99,16	
Nr.598 (3)	26,66	97,82	98,85	30,71	99,67	99,32
Nr.598 (3)	26,59	99,88		30,28	98,97	
Nr.598 (4)	27,46	99,63	99,49	32,03	99,87	99,645
Nr.598 (4)	27,22	99,35		31,72	99,42	
Nr.647 (1)	26,74	99,48	99,43	30,88	99,88	99,84
Nr.647 (1)	26,6	99,38		30,45	99,8	
Nr.647 (2)	25,86	99,06	99,28	29,9	99,32	99,59

Nr.647 (2)	26,78	99,5		29,67	99,86	
GVO-wt	26,65	99,98	99,985	30,77	99,99	99,98
GVO-wt	26,79	99,99		30,59	99,97	
Del	38,99	36,02	41,55	41,57	44,83	41,28
Del	39,46	47,08		40,2	37,73	
Mut	30,28	86,95	87,21	34,05	91,74	93,705
Mut	30,41	87,47		34,03	95,67	

2. MON810 Mais

ad 2.3.3. Real-time PCRund Durchführung einer HRM Analyse

Probe	Syto Ct	Conf. %
GVO-wt	25,85	100
mut	26,18	99,82
1xdel	25,95	99,73
2xdel	25,19	8,36
GVO-wt/mut	28,58	99,89
GVO-wt/1xdel	28,37	98,56
GVO-wt/2xdel	28,26	44,84

ad 2.3.4. Real-time PCR mit Scorpion Primer

Probe	Syto Ct	Sc Ct	Conf. %
GVO-wt	28,4	31,58	100
Mut	28,37	n.d.	99,17
1xdel	28,25	36,94	99,78
2xdel	28,26	n.d.	3,27
GVO-wt/mut	29,81	34,98	99,66
GVO-wt/1xdel	30,24	34,76	97,93
GVO-wt/2xdel	29,88	37,72	23,31

ad 2.4. Real-time PCR mit genomischen Proben und Scorpion Primer

	Syto9	Scorpion	HRM
Name	Ct	Ct	Conf. %
Nr. 363	36,99	35,62	24,27
Nr. 364	38,98	41,89	99,14
Nr. 366	36,31	37,38	96,3
Nr. 369	38,38	41,32	60,86
Nr. 377	37,06	38,6	82,91
Nr. 381	36,66	38,96	99,85
Nr. 382	36,77	38,56	99,72
Nr. 383	38,67	41,3	58,22
Nr. 388	37,18	38,73	98,18
Nr. 389	37,19	39,12	85,07
Nr. 390	38,22	40,66	94,35
Nr. 407	37,44	39,2	67,3
Nr. 408	36,93	39,06	96,33
Nr. 409	37,33	39,74	79,81
Nr. 413	36,33	38,56	49,58
Nr. 415	36,77	38,36	60,02
Nr. 416	36,93	39,32	83,51
Nr. 421	36,02	37,74	99,21
Nr. 422	37,03	38,91	46,75
Nr. 423	38,04	40,34	60,92
Nr. 424	37,4	39,52	63
Nr. 425	37,91	40,32	94,45
Nr. 426	38,14	39,89	85,97
Nr. 429	37,52	39,65	65,29
Nr. 431	37	38,82	95,49
Nr. 432	38,04	39,96	64,02

	Syto9	Scorpion	HRM
Name	Ct	Ct	Conf. %
Nr. 391	37,31	39,1	99,88
Nr. 392	36,66	38,32	72,07
Nr. 393	37,1	39,21	66,22
Nr. 396	37,59	39,5	82,72
Nr. 397	37,33	39,99	99,49
Nr. 398	37,56	39,46	96,54
Nr. 400	36,58	38,09	98,65
Nr. 401	38,01	40,68	99,57
Nr. 402	36,41	37,11	46,13
Nr. 403	37,52	38,94	60,33
Nr. 405	37,16	38,91	41,69
Nr. 433	38,04	39,77	61,15
Nr. 434	36,61	38,49	99,89
Nr. 435	36,68	38,35	41,13
Nr. 439	38,62	41,29	93,81
Nr. 441	36,08	37,67	37,54
Nr. 448	37,63	39,66	86,11
Nr. 449	35,96	37,64	41,89
Nr. 450	37,82	40,21	93,1
Nr. 451	38,09	40,1	96,19
Nr. 453	37,02	39,63	49,35
Nr. 455	37,59	39,95	99,88
Nr. 458	35,83	36,21	78,57
Nr. 467	36,38	34,12	73,73
MON810 Pool	36,83	38,79	100

3. Adh1

ad 3.3. Real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer und den homo- und heterozygoten Plasmiden

Allel	Sc Ct	Conf. %
A	33,65	53,12
F	27,93	100
A/F	29,55	88,58

ad 3.4.3. Real-time PCR mittels Scorpion Primer und Type-it HRM-Kit

Name	Conf.	Ct-syto	Ct-sco	Conf	Ct-sco	Allel
	First tests			Second tests		
MON810/1	72,755	32,48	30,32			homoz.adh1-F
MON810/5	60,425	32,58	32,27			homoz.adh1-F
MON810/434	93,125	32,9	31,94			homoz.adh1-F
MON810/441	96,1	31,22	31,66			homoz.adh1-F
MON810/447	4,46	33,58	35,52	77,8	34,11	homoz.adh1-F
MON810/451	64,2	32,04	32,43			homoz.adh1-F
MON810/462	82,32	30,16	32,89			homoz.adh1-F
MON810/424	99,99	30,5	33,05			homoz.adh1-F
RHXT/1	28,99	32,83	37,66			homoz.adh1-F
RHXT/2	75,49	31,79	37,3			homoz.adh1-F
RHXT/41	27,09	31,92	35,22			homoz.adh1-F
RHXT/61	20,61	32,11	36,95			homoz.adh1-F
RHXT/65	30,41	32,59	36,69			homoz.adh1-F
RHXT/90	5,05	34,02	34,46	22,08	34,83	heteroz.adh1-A/F
RHXT/91	14,01	33,32	32,05			homoz.adh1-F
RHXT/96	50,79	31,54	35,55			homoz.adh1-F
VT3/1	33,28	32,02	30,36			homoz.adh1-F
VT3/7	9,85	32,08	33,11			homoz.adh1-F
VT3/42	6,97	32,59	31,32	80,39	32,99	homoz.adh1-F
VT3/50	58,58	31,71	34,2			homoz.adh1-F
VT3/61	56,62	33,11	33,16			homoz.adh1-F
VT3/64	31,41	31,94	33,12			homoz.adh1-F
VT3/79	52,17	31,64	32,24			homoz.adh1-F
VT3/78	44,92	33,26	33,52			homoz.adh1-F
Bt11/3	14,39	32,68	32,17	99,24	33,17	homoz.adh1-F
Bt11/4	0,36	32,15	44,35	4,44	39,19	homoz.adh1-A
Bt11/11	2,29	32,93	39,39	22,54	37,25	heteroz.adh1-A/F

Bt11/13	31,81	31,56	33,51			homoz.adh1-F
Bt11/14	0,93	33,41	34,67	83,9	32,85	homoz.adh1-F
Bt11/19	0,12	33,86	35,44	7,32	36,39	heteroz.adh1-A/F
Bt11/21	0,86	33,97	37,6	20,75	34,04	heteroz.adh1-A/F
Bt11/17	0,3	33,205	37,19			homoz.adh1-A

ad 3.5.1 Real-time PCR mit Syto9 und Scorpion Primer

Probe	Syto Ct	Mw Syto Ct	Sc. Ct	MW Sc. Ct	Conf. %	Mw Conf.
MON810/447 (1)	27,86	27,94	28,52	28,66	56,62	57,515
MON810/447 (1)	28,02		28,8		58,41	
MON810/447 (2)	27,66	27,485	27,71	27,765	72,4	64,48
MON810/447 (2)	27,31		27,82		56,56	
RHXT/90 (1)	30,52	30,745	35,44	36,76	3,93	3,695
RHXT/90 (1)	30,97		38,08		3,46	
RHXT/90 (2)	31,24	31,445	37,11	36,63	1,32	1,675
RHXT/90 (2)	31,65		36,15		2,03	
RHXT/90 (3)	30,83	30,74	30,94	31,34	87,12	89,29
RHXT/90 (3)	30,65		31,74		91,46	
VT3/42 (1)	25,8	25,825	25,48	25,77	78,1	85,605
VT3/42 (1)	25,85		26,06		93,11	
VT3/42 (2)	26,44	26,39	26,99	27,095	3,99	4,485
VT3/42 (2)	26,34		27,2		4,98	
Bt11/3 (1)	29,3	29,335	29,03	29,405	80,28	85,61
Bt11/3 (1)	29,37		29,78		90,94	
Bt11/3 (2)	28,22	28,175	28,86	28,75	80,83	82,275
Bt11/3 (2)	28,13		28,64		83,72	
Bt11/4 (1)	28,11	28,235	32,01	33,06	6,43	6,105
Bt11/4 (1)	28,36		34,11		5,78	
Bt11/4 (2)	26,49	26,62	31,49	33,565	6,88	6,28
Bt11/4 (2)	26,75		35,64		5,68	
Bt11/11 (1)	28,06	27,98	28,86	28,705	79,99	83,87
Bt11/11 (1)	27,9		28,55		87,75	
Bt11/11 (2)	26,68	26,74	33,22	31,665	4,21	4,3
Bt11/11 (2)	26,8		30,11		4,39	
Bt11/11 (3)	30,7	30,745	36,32	36,3	16,46	13,045
Bt11/11 (3)	30,79		36,28		9,63	
Bt11/19 (1)	32	31,325	37,13	37,255	9,14	11,245
Bt11/19 (1)	30,65		37,38		13,35	
Bt11/19 (2)	29,06	28,98	37,36	37,26	5,03	5,2
Bt11/19 (2)	28,9		37,16		5,37	
Bt11/19 (3)	28,66	28,36	32,26	32,225	90,73	93,52

Bt11/19 (3)	28,06		32,19		96,31	
Bt11/21 (1)	29,95	29,835	30,66	30,12	95,22	97,535
Bt11/21 (1)	29,72		29,58		99,85	
Bt11/21 (2)	28,9	28,665	30,93	30,835	4,28	4,645
Bt11/21 (2)	28,43		30,74		5,01	
Bt11/21 (3)	29,6	29,61	32,01	32,36	11,15	9,68
Bt11/21 (3)	29,62		32,71		8,21	

G. Literatur

Aguilera M, Querci M, Balla B, Prospero A, Ermolli M, Van den Eede G (2008) A qualitative approach for the assessment of the genetic stability of the MON 810 trait in commercial seed maize varieties. Food Anal Methods 1:252–258

Aguilera M, Querci M, Pastor-Benito S, Bellocchi G, Milcamps A, Van den Eede G (2009) Assessing copy number of MON 810 integrations in commercial seed maize varieties by 5_ eventspecific real-time PCR validated method coupled to 2_CT analysis. Food Anal Methods 2:73–79

Anonymus. MaizeSequence. 2011. http://maizesequence.org/overview.html .

Belgian Biosafety Server (2006) Molecular characterisation of the genetic maps of commercial modified plants. http://www.biosafety.be/gmcropff/TP/MGC.html

Bellocchi G., De Giacomo M., Foti N., Mazzara M., Palmaccio E., Savini C., Di Domenicantonio C., Onori R., Van den Eede G.
Testing the interaction between analytical modules: an example with RoundUp Ready Soybean line GTS 40-3-2.
BMC Biotechnology (2010) doi:10.1186/1472-6750-10-55

Broothaerts W, Corbisier P, Schimmel H, Trapmann S, Vincent S, Emons H (2008) A single nucleotide polymorphism (SNP839) in the adh1 reference gene affects the quantitation of genetically modified maize (Zea mays L.). J Agric Food Chem56(19):8825–8831

Buckler E.S., Gaut B.S., McMullen M.D. (2006) Molecular and functional diversity of maize. Cur. Op. in Plant Biol. 2006, Vol.9, 172-176

Bush SM, Krysan PJ (2010) iTILLING: a personalized approach to the identification of induced mutations in Arabidopsis. Plant Physiol 154:25–35

Cankar K., Štebih D., Dreo T., Žel J., Gruden K. (2006)Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample

matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol* 2006, 6:37

Cankar K., Chauvensy-Ancel V., Fortabat M., Gruden K., Kobilinsky A., Zel J., Bertheau Y. (2008) Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35S in maize; Anal. Biochem.379 (2008) 189-199

Choffnes DS, Philip R, Vodkin LO (2001) A transgenic locus in soybean exhibits a high level of recombination. In Vitro Cell Dev Biol Plant 37:756–762

Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC–Commission Declaration. OJ L 106, 17.4.2001, pp 1–39

Dong C, Vincent K, Sharp P (2009) Simultaneous mutation detection of three homologous genes in wheat by high resolution melting analysis and mutation surveyor. BMC Plant Biol 9:143–155

EFSA (2006) Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. EFSA J 99:1–100

Fearing PL, Brown D, Vlachos D, Meghji M, Privalle L (1997) Quantitative analysis of CryIA(b) expression in Bt maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations. Mol Breed 3:169–176

Forsbach A, Schubert D, Lechtenberg B, GilsM, Schmidt R (2003) A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the Arabidopsis thaliana genome. Plant Mol Biol 52:161–176

GMO Detection method Database (GMDD) http://gmdd.shgmo.org/ primer/view/eventspecific/2356

Hamilton-Reeves J.M., Vazquez G., Duval S.J., Phipps W.R., Kurzer M.S., Messina M.J. (2010) Clinical studies show no effects of soy protein or isoflavones on reproductive hormones in men: results of a meta-analysis.; Fertility and Sterility, Vol 94 (3): 997-1007

Herrmann M. G., Durtschi J. D., Bromley K., Wittwer C. T., Voelkerding K. V. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation, Scanning and Genotyping: Cross-Platform, Comparison of Instruments and Dyes
Clinic. Chem. 52:3, 494–503 (2006)

Herna´ndez M, Rodrı´guez-La´zaro D, Ferrando A (2005) Current methodology for detection, identification and quantification of genetically modified organisms. Curr Anal Chem 1:203–221

Hogervorst J.G., Schouten L.J., Konings E.J., Goldbohn R.A., van den Brandt R.A. (2008) Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer.; Am J Clin Nutr., Vol. 87 (5):1428-1438

Holst-Jensen A, Ronning SB, Lovseth A, Berdal (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs); Anal.Bioanal. Chem. 2003;375:985–993

Kohli, A, RM Twyman, R Abranches, E Wegel, E Stoger, and P Christou (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants.*Plant Mol Biol*, 2003: 247-258.

Kluga L, Follini S, Van den Bulcke M, Van den Eede G, Querci M (2012) Applicability of the ‘‘real-time PCR-based ready-to-use multi-target analytical system for GMO detection’’ in processed maize matrices. Eur Food Res Technol 234(1):109–118

Latham JR, Wilson AK, Steinbrecher RA (2006) The mutational consequences of plant transformation. J Biomed Biotechnol 2006:1–7

La Paz JL, Pla M, Papazova N, Puigdome`nech P, Vicient CM (2010) Stability of the MON 810 transgene in maize. Plant Mol Biol 74(6):563–571

Lehmensiek, A, MW Sutherland, and RB McNamara (2008) The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley.*Theor and Appl Genet*, 2008: 721-728.

Lemaux P. (2008) Genetically engineered plants and foods: a scientist´s analysis of the issues (part I and II); Annu. Rev. Plant Biol. 2008:771-812

Liew M., Pryor R., Palais R., Meadows C., Erali M., Lyon E., Wittwer C. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons; Clinic. Chem. 50:7, 1156-1164 (2004)

Madi, Z, C Brandes, G Neumann, D Quist, W Ruppitsch, and R Hochegger (2013) Evaluation of Adh1 alleles and transgenic soybean seeds using Scorpion PCR and HRM analysis. *Eur Food Res Technol*., Vol. 237(2) 125-135

Marmiroli N, Maestri E, Gulli M, Malcevscgi A, Peano C, Bordoni R, De Bellis G (2008) Methods for detection of GMOs in food and feed. Anal Bioanal Chem 392(3):369–384

Mason G, Provero P, Vaira AM, Accotto GP (2002) Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative realtime PCR. BMC Biotechnol 2:20

McCabe MS, Mohapatra UB et al (1999) Integration, expression and inheritance of two linked T-DNA marker genes in transgenic lettuce. Mol Breed 5(4):329–344

Messina M., McCaskill-StevensW., Lampe J. W. (2006) Addressing the Soy and Breast Cancer Relationship:Review, Commentary, and Workshop Proceedings;JNCI J Natl Cancer Inst, Vol 98(18): 1275-1284

Messina M. (2010) A Brief Historical Overview of the Past Two Decades of Soy and Isoflavone Research.; J. Nutr. Vol. 140 (7):18505-18545

Moch, K. (2006) Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen: Auswirkungen auf die Risikobewertung." *BfN-Skripten*, 2006: 1-80.

Morisset D, Demsar T, Gruden K, Vojvoda J, Stebih D, Zel J (2009) Detection of genetically modified organisms–closing the gaps. Nat Biotechnol 27(8):700–701

Nacry P, Camilleri Ch, Courtial B, Caboche M, Bouchez D (1998) Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in Arabidopsis. Genetics 149(2):641–650

Neumann, G, C Brandes, and R Hochegger (2009)Assessment of the genetic stability of GMOs with a detailed examination of MON810 and GTS 40-3-2." Endbericht zum BMGF-Projekt, Wien, 2009.

Neumann G, Brandes Ch, Joachimsthaler A, Hochegger R (2011) Assessment of the genetic stability of GMOs with a detailed examination of MON810 using Scorpion probes. Eur Food Res Technol 233(1):19–30

Nguyen HT, Jehle JA (2007) Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810. J Plant Dis Prot 114(2):82–87

Ogasawara T, Chikagawa Y, Arakawa F, Nozaki A, Itoh Y, Sasaki K, Umetsu H, Watanabe T, Akiyama H, Maitani T, Toyoda M, Kamada H, Goda Y, Ozeki Y (2005) Frequency of mutations of the transgene, which might result in the loss of the glyphosatetolerant phenotype, was lowered in Roundup Ready soybeans.J Health Sci 51:197–201

Padgette SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, Lavallee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB, Kishore GM (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci 35:1451–1461

Papazova N, Ghedira R, Van Glabeke S, Bartegi A, Windels P, Taverniers I, Roldan-Ruiz I, Van Bockstaele E, Milcamps A, Van Den Eede G, Depicker A, De Loose M (2008) Stability of the T-DNA flanking regions in transgenic

Arabidopsis thalianaplants under influence of abiotic stress and cultivation practices. Plant Cell Rep 27:749–757

Querci M., Van den Bulcke M., Zel J., Van den Eede G., Broll H.
New approaches in GMO detection
Anal Bioanal Chem. 2010 Mar;396(6):1991-2002

Querci M.,Foti N., Bogn A.,Kluga L., Broll H., Van den Eede G.
Real-Time PCR-Based Ready-to-Use Multi-Target Analytical System for GMO Detection
Food Analytical MethodsVol 2, Nr 4, 325-336

REGULATION (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. OJ L268, 18.10. 2003, pp 1–23

REGULATION (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. OJ L 268, 18.10.2003, pp 24–28

Rosati A, Bogani P, Santarlasci A, Buiatti M (2008) Characterisation of 3_ transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard maize. Plant Mol Biol 67:271–281

Ruttink T., Demeyer R., Van Gulck E., Van Droogenbroeck B., QuerciM., Taverniers I., De Loose M. (2010)Molecular toolbox for the identification of unknown genetically modified organisms.; Anal and Bioanal Chem Vol. 396 (6) p. 2073-2089

Smith N, Kilpatrick JB, Whitelam GC (2001) Superfluous transgene integration in plants. Crit Rev Plant Sci 20:215–249

Solinas A, Brown LJ, McKeen C, Mellor JM, Nicol J, Thelwell N, Brown T (2001) Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. Nucleic Acids Res 29:1–9 Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. Nucleic Acids Res 28(19):3752–3761

TaqMan-Handbook: TaqMan® Gene Expression Assay reaction steps (TaqMan® Gene Expression Assay solutions, life technologies)

Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T.
Mode of action and application of scorpion primers to mutation detection
Oxford Journals, Nucleic Acid Research, 28, 3752-3761

Type-it HRM PCR Handbook (2009)
http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Assay-Technologies/Real-Time-PCR-and-RT-PCR-Reagents/Type-it-HRM-PCR-Kit#resources

Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. (1999)
Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence.
Nat. Biotechnol.Vol17 (8):804-807.

White C.E., Campbell D.R., McDowell L.R. (2000) Effects of dry matter content on trypsin inhibitors and urease activity in heat treated soya beans fed to weaned piglets Animal Feed Scien. and Technol., Vol 87(1-2):105-115

Wilson, AK, JR Latham, and RA Steinbrecher (2006) Transformationinduced mutations in transgenic plants: analysis and biosafety implications." Biotechnol Genet Eng Rev, 2006: 209-234.

Wilson A, Latham J, Steinbrecher RA (2006) Transformation induced mutations in transgenic plants: analysis and biosafety implications. Biotechnol Genet Eng Rev 23:209–234

Windels p., Taverniers I., Depicker A., Van BockstaeleE., De Loose M. (2001)
Characterisation of the Roundup Ready soybean insert
Eur Food Res Technol (2001) 213:107–112

Windels P, De Buck S, Van Bockstaele E, De Loose M, Depicker A (2003) T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences. Plant Physiol 133(4):2061–2068

YeungAT, HattangadiD, Blakesley L, Nicolas E (2005) Enzymatic mutation detection technologies. Biotechniques 38:749–758

Zaulet M, Rusu L, Kevorkian S, Luca C, Mihacea S, Badea EM, Costache M (2009) Detection and quantification of GMO and sequencing of the DNA amplified products. Rom Biotechnol Lett 14(5):4733–4746

Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition.Appl. Environ. Microbiol. 1996(2):316-322

Verwendete Bücher

Ingruber D., Kaller-Dietrich M.; „Mais. Geschichte und Nutzung einer Kulturpflanze“; 1.Aufl. 2001; Springer Spektrum

Christopher Lloyd; „Um alles in der Welt: Die Geschichte der Erde, des Lebens und der Menschen vom Urknall bis zum 21. Jahrhundert“; 1. Aufl., 2008; Berlin Verlag

Strasburger, „Lehrbuch der Botanik“, 36.Aufl., 2008, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

E. Oberdorfer; „Pflanzensoziologische Exkursionsflora“., 6. Aufl.,1990, Ulmer, Stuttgart

Kempken und Kempken; „Gentechnik bei Pflanzen“; 4. Aufl., 2012, Springer Sprektrum

Internetquellen

http://www.sojainfo.de

http://faostat.fao.org/

http://www.transgen.de/home/

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

http://www.umweltbundesamt.at/umweltsituation/gentechnik/gentechnikgesetze/nationalegvogesetze/

http://www.efsa.europa.eu/de/

http://www.jusline.at/Gentechnikgesetz_(GTG).html

http://bmg.gv.at/home/Schwerpunkte/Gentechnik

http://www.bmwf.gv.at/startseite/forschung/national/forschungsrecht/gentechnik/

http://www.umweltbundesamt.at/umweltsituation/gentechnik/zulassungen/

http://eur-lex.europa.eu/de/index.html

http://www.cera-gmc.org/

http://www.seedtest.org/en/home.html

http://portal.wko.at/wk/format_detail.wk?angid=1&stid=154539&dstid=323&opennavid=18507

http://www.lebensministerium.at/land/produktion-maerkte/pflanzliche-produktion/gentechnik/EU_Ebene.html

http://www.proplanta.de/Agrar-News/GVO-%D6sterreich

http://www.ris.bka.gv.at/

http://www.molekularpatho-trier.de/

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blue_white_assay_Ecoli.jpg)

http://www.beckmangenomics.com/documents/services/GS_Sanger_Sequenzing.pdf)

http://gmdd.shgmo.org/

https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr

http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/custom-dna-probes/scorpions-probes.jpg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Christian Brandes für seine Unterstützung, seine konstruktive Kritik und seine Hilfestellung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ebenfalls möchte ich Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Erwin Heberle-Bors für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit danken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich stets unterstützt und ermutig hat.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Zita Erika Madi

Geburtsdatum: 30.09.1980

Geburtsort: Siofok (Ungarn)

Familienstand: ledig

Schul- und Berufsausbildung:

1987 – 1988	1. Klasse Volksschule in Ungarn
1988 – 1991	Volksschule Schwechat
1991 – 1999	Gymnasium Schwechat
1999	Matura
seit 1999	Studium Biologie/Mikrobiologie-Genetik

weitere berufliche Tätigkeiten:

Mai 2002 - Juli 2006	immer wieder Laborarbeit bei MFPL (Department of Medical Biochemistry – Division of Molecular Biology)
Juli/Aug./Okt. 2010	Praktikum bei AGES (Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit)
Nov. 2010 - April 2011	Diplomarbeit bei AGES
seit Mai 2011	Persönliche Assistenz bei Dr. Brandes (AGES)

Fremdsprachen: Ungarisch, Englisch, Französisch

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Diplomarbeit selbständig verfasst, andere als die angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt und mich auch sonst keiner unerlaubten Hilfe bedient habe.
Weiters versichere ich, dass ich diese Diplomarbeit bisher weder im Inland noch im Ausland in irgendeiner Form als Prüfungsarbeit vorgelegt habe.

Datum: Unterschrift:

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“