

Staatliche Fachschule für Lebensmitteltechnik Berlin
an der Emil-Fischer-Schule Berlin

Technikerarbeit

**Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum
Nachweis von gentechnisch
verändertem Mais**

Vorgelegt von:

Christian Eckl

Berlin, April 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Allgemeine Einführung in das Thema	4
2.1 Der Begriff Gentechnik	4
2.2 Aufbau und Struktur der zellulären DNA.....	4
2.3 Warum Gentechnik bei der Lebensmittelherstellung?	6
2.4 Der Bt-Mais.....	7
2.5 Anbaugebiete des Bt-Mais.....	10
2.6 Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von genetisch veränderten Organismen (GVO) in Lebensmitteln.....	12
3. Nachweisverfahren zur Detektion von genetisch verändertem Mais	14
3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als qualitativer Nachweis	14
3.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	15
3.3 Empfindlichkeit und Fehleranfälligkeit der Polymerase-Kettenreaktion ...	20
3.4 Positiv- und Negativkontrolle	21
4. Material und Methoden	22
4.1 Chemikalien und Reagenzien.....	22
4.2 Geräte und Materialien	24
4.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion.....	24
4.4 Nachweis der PCR-Produkte mit der Agarose-Gelelektrophorese	28
5. Ergebnisse	31
5.1 Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte.....	31
5.2 Auswirkung der Anzahl der PCR-Zyklen auf die Detektion kleinster Mengen von [Cry1A]-DNA in den Proben	32
6. Diskussion	33
9. Glossar	41
Abbildungsverzeichnis	44
Tabellenverzeichnis	44
Quellenverzeichnis	45

1. Einleitung

In den letzten Jahren hat der Anbau und die Vermarktung gentechnisch veränderter Pflanzen und daraus gewonnener Erzeugnisse, insbesondere Lebens- und Futtermittel deutlich zugenommen. Durch den Einsatz von Gentechnologie vollzieht sich eine bedeutende Änderung im Bereich der menschlichen Ernährung. Im Lebensmittelbereich existieren seit längerem Kennzeichnungsvorschriften für gentechnisch veränderte Organismen (GVO). Deswegen muss bei EU-Produkten auf gentechnische Veränderung hingewiesen werden. Inzwischen ist es für Lebensmittelhersteller unerlässlich geworden, ihre Produkte auf GMO zu prüfen.

Die Verwendung von Gentechnik in Lebensmitteln stößt vor allem in der Bevölkerung auf kontroverse Debatten und es werden klare Informationen seitens des Endverbrauchers erwartet. Der Konsument hat das Recht zu erfahren, wie Lebensmittel hergestellt werden und welche Inhaltsstoffe sie enthalten. Es musste daher eine verlässliche reproduzierbare Methode gefunden werden, die selbst geringste gentechnische Veränderungen aufspürt. Genetisch verändertes Material lässt sich auf DNA-Basis ermitteln. Als analytisches Nachweisverfahren hat sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) seit ihrer Einführung 1985 durch Kary Mullis (MÜLLER, 2001) etabliert. Die PCR-Methode setzt dort an wo die gentechnische Veränderung durchgeführt wurde, nämlich am Erbmaterial der Pflanzen.

Mit Hilfe der PCR-Technik können gezielt "fremde" DNA-Abschnitte in einem zyklischen Prozess vermehrt und analytisch untersucht werden.

In der vorliegenden Technikerarbeit wird anhand einschlägiger Fachliteratur die Bedeutung und die Schwierigkeiten bei der Anwendung der PCR-Analyse, die vor allem mit der Sensitivität der Methode zusammenhängen, erläutert. Hierfür wurden verschiedene positive Proben für das Bt-Gen *Cry1a* auf die Funktion des Nachweises laboranalytisch untersucht. Es handelt sich um jenes Gen, welches in gentechnisch verändertem Mais vorkommt und den Mais vor Schädlingsbefall schützen soll.

2. Allgemeine Einführung in das Thema

2.1 Der Begriff Gentechnik

Gentechnik bezeichnet ein Verfahren zur gezielten Veränderung der genetischen Eigenschaften eines Organismus durch Eingriffe in dessen Erbinformation. Die gesamte genetische Information eines Organismus ist in lebenden Zellen in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Durch gentechnische Methoden kann Fremd-DNA in das Genom einer Zelle oder eines Organismus eingeschleust werden (ENCARTA, 2009). Mit empfindlichen Methoden ist es gentechnisch möglich, gezielt einzelne vorteilhafte Eigenschaften in einen Organismus einzupflanzen oder unerwünschte Eigenschaften daraus zu entfernen (SCHLIEPER, 2005).

2.2 Aufbau und Struktur der zellulären DNA

1953 wurde die Molekülstruktur der DNA von James Watson und Francis Crick entschlüsselt. Die Bausteine der DNA sind Nukleotide. Sie setzen sich aus jeweils einem Zucker (Desoxyribose), einer Phosphorsäure und einer Base zusammen. Im Zellkern höherer Organismen verbinden sich die einzelnen Komponenten zu einem Riesenmolekül aus zwei Nukleotidsträngen in Form einer DNA-Doppelhelix. In jedem der beiden Stränge ist durch die Abfolge seiner Nukleotide die gesamte Erbinformation enthalten. Jene Erbinformation ist in jeder Zelle eines Organismus, mit Ausnahme der roten Blutkörperchen, vollständig vorhanden. Eine Verbindung der beiden Stränge erfolgt über die Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thyamin (T), wobei sich immer A mit T und C mit G paart.

Agrund der komplementären Struktur kann die DNA bei der Zellteilung durch enzymatische Aktivität identisch verdoppelt werden. Sie wird zunächst in zwei Einzelstränge geteilt, die jeweils wieder zu einem Doppelstrang ergänzt werden. Die verdoppelte DNA wird dann auf die beiden Tochterzellen übertragen. Bei der Kopie der DNA zur Übertragung der Erbinformationen auf die Tochterzellen, öffnet sich die DNA an den Stellen, die von der DNA-

Polymerase abgelesen werden. Es erfolgt dann ein komplexerer Vorgang der DNA-Verdoppelung, an dem mehrere Enzyme beteiligt sind.

Bei der Übersetzung der DNA in Eiweiße (Proteine) wird in einem ersten Schritt die genetische Information in einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) übertragen. Die RNA-Polymerase schreibt hierbei die genetische Information der DNA-Matrize in RNA um. Es entsteht ein so genanntes mRNA-Molekül, das die genetische Information aus dem Zellkern weiterträgt. Diese Information wird in einem zweiten Schritt mit Hilfe der Ribosomen in das entsprechende Protein übersetzt. Diese Eiweiße führen fast alle Aufgaben des Lebens aus.

Für jedes Protein ist ein Gen vorhanden, welches dessen spezifische Information trägt, zum Teil sind es sogar mehrere Gene, die zum Aufbau eines Proteins beitragen. Diese Gene sind in erster Annäherung nacheinander, wie Perlen einer Perlenkette, auf der DNA aufgereiht (sie ergeben so die DNA-Sequenz). Ein Gen bezeichnet also einen bestimmten Abschnitt auf der DNA, der für ein bestimmtes Protein codiert. Der Mensch besitzt ca. 30 000 Gene. Die Gesamtheit dieser Gene in einer Zelle wird als Genom bezeichnet.

Seit Anfang der siebziger Jahre ist es möglich, DNA-Moleküle mit Hilfe von Restriktionsenzymen an ganz bestimmten Stellen zu schneiden (TRANSGEN, 2009). Durch diese molekularen Scheren ist es nun möglich ganze Gene aus einem Organismus herauszuschneiden und sie mit einem anderen Enzym, der so genannten Ligase in eine neue Empfänger-DNA „einzukleben“ (zu ligieren).

2.3 Warum Gentechnik bei der Lebensmittelherstellung?

Gentechnisch veränderte Lebensmittel werden aus oder mit Hilfe von gentechnisch veränderten Organismen hergestellt. Der Mensch nimmt pro Tag ca. 2 g DNA mit seiner Nahrung auf. Dadurch, dass weltweit bereits ein großer Anteil lebenswichtiger Pflanzen gentechnisch verändert ist, enthält auch ein großer Teil der daraus hergestellten Lebensmittel gentechnisch veränderte Bestandteile.

Es werden vorwiegend landwirtschaftliche Interessen verfolgt, wenn bei Pflanzen gentechnische Veränderungen vorgenommen werden. Die Gentechnik soll der Landwirtschaft größere sowie bessere Erträge liefern und gleichzeitig die Arbeit erleichtern. Der Vorteil gentechnischer Methoden für die Landwirtschaft liegt in der gezielten Einführung bestimmter Gene in das Genom der Pflanzen. Hierdurch sollen die Produktionskosten gesenkt und die Qualität der Produkte gesteigert werden.

Beispiele für gentechnisch veränderte (gv) Pflanzen sind Insekten-resistenter Mais und Herbizid-resistentes Soja oder Kartoffeln die anstatt der beiden Stärkekomponenten Amylose und Amylopektin nur noch das verzweigte Amylopektin enthalten. Zudem lässt sich die Frischhaltung von Lebensmitteln positiv beeinflussen. Somit können Tomaten dazu gebracht werden, trotz reifer Ernte nicht so schnell zu verderben.

Andere Ziele sind die Lebensmittel durch mehr Vitamin-Gehalt gesünder zu machen oder allergenfrei zu produzieren. Das Entfernen von Allergenen ist ein besonders wichtiger Aspekt gentechnischer Veränderungen. Die Gentechnik in der Landwirtschaft soll auch einen wichtigen Beitrag zum Umweltschutz liefern, indem Pestizide sparsamer eingesetzt werden (DIALOG<>GENTECHNIK, 2009).

2.4 Der Bt-Mais

Das Kürzel Bt steht für *Bacillus Thuringiensis*. Dieses seit fast 100 Jahren weltweit bekannte Bodenbakterium ist in der Lage ist, ein spezielles Protein zu erzeugen, das Bt-Toxin, welches bestimmte Fraßinsekten abtöten kann. Daher eignet es sich besonders als Pflanzenschutzmittel.

Im Gegensatz zu vielen chemischen Insektiziden ist das Bt-Toxin für den Menschen unschädlich, da es schnell im Magen-Darmtrakt abgebaut werden kann (AGENDA 21 TREFFPUNKT, 2009). Es sind ca. 170 natürlich vorkommende Bt-Toxine mit unterschiedlicher Wirkungsbreite bekannt (TRANSGEN, 2009). Bt-Präparate sind in Deutschland seit 1964 als Schädlingsbekämpfungsmittel zugelassen und werden auch im Öko-Landbau verwendet.

Mittels gentechnischer Verfahren ist es gelungen, spezielle Bt-Toxin-Gene aus dem Bodenbakterium zu isolieren und in das Genom des Mais einzubauen. Der um das Bt-Gen erweiterte Mais wird kurz als Bt-Mais bezeichnet. Bt-Mais produziert mit Hilfe des eingebauten Bt-Gens von sich aus das Bt-Toxin und kann dadurch eine Reihe von Schädlingen selbst abwehren, ohne dass zusätzliche Pflanzenschutzmittel von außen hinzugegeben werden müssen. Auf diese Art und Weise fungiert die gentechnische Veränderung als eine Art eingebauter Pflanzenschutz.

Um gentechnisch vermittelte Insektenresistenz zu erzeugen, werden verschiedene Varianten von Bt-Genen übertragen, bei Mais Cry 1Ab, Cry1AC und Cry9c. Diese unterscheiden sich sowohl in der Länge als auch in den verwendeten Promotoren. Promotoren sind die Schaltstellen für das Kopieren der genetischen Information in RNA. Je nach Bt-Gen Variante unterscheiden sich die transgenen Maissorten sowohl hinsichtlich der Menge des Bt-Toxins sowie auch durch dessen Verteilung in der Pflanze. So produzieren einige Bt-Maissorten das Bt-Toxin vor allem im Stängel, andere hingegen in allen Pflanzenteilen (TRANSGEN, 2009).

Auch der in Europa zugelassen Bt-Mais MON810 bildet das Bt-Toxin Cry1Ab, das spezifisch für einen Schädling, den Maiszünsler (siehe Abb. 1), giftig ist. Nach heutigem Kenntnisstand kann Bt-Mais je nach Anbaugebiet zu einer Verringerung des Einsatzes chemischer Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden (TRANSGEN, 2009). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass der Maiszünsler gegen das Bt-Toxin-Gen resistent wird.

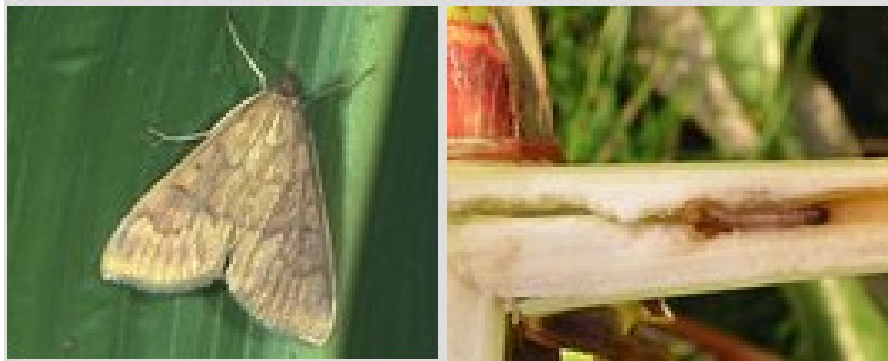


Abb. 1: Maiszünsler und Maiszünslerlarve

Gezeigt ist der wirtschaftlich bedeutendste Maisschädling, ein Kleinschmetterling, dessen Larven zunächst an den Blättern fressen, sich später aber in die Stengel und Kolben der Maispflanze bohren. (<http://www.biosicherheit.de/de/lexikon>)

In den Anfängen der landwirtschaftlichen Nutzung gentechnischer Veränderung von Pflanzen wurden auch Antibiotika-Resistenzgene, die für die Bakterienkultur notwendig waren, unbeabsichtigt in die Pflanzen eingebracht. Diese verwendeten Resistenzgene konnten unter Umständen auch von anderen Organismen aufgenommen werden. Das wiederum könnte dazu führen, dass Krankheitserreger des Menschen vermehrt Antibiotikaresistenzen genau gegen diese Gene entwickeln könnten. Man ist deshalb seit längerer Zeit bemüht, das Einbringen von Antibiotika-Resistenzgenen in Pflanzen zu unterlassen.

Weltweit werden vorwiegend Bt-Maissorten kommerziell genutzt, die eine Resistenz gegen den Maiszünsler besitzen. Es handelt sich hierbei um einen grau-braunen Falter (siehe Abb. 1), der bis zu 30 Prozent Ertragsverluste verursachen kann. Der Vergleich von herkömmlichen Mais mit Bt-Mais ist der Abb. 2 zu entnehmen.



Abb. 2: Bt-Mais und konventioneller Mais

Im Bild links ist zu sehen, dass die genveränderten Maiskolben keine Zünslerschäden aufweisen. Im Bild rechts sind herkömmliche Maiskolben mit deutlichen Zünslerschäden sichtbar (TRANSGEN, 2009).

Die möglichen Zünslerschäden auf einem konventionellen Maisfeld sind in der Abb. 3 aufgezeigt. Durch das frühzeitige Welken der Blätter tritt eine starke Ertragsminderung ein.



Abb. 3: Zünslerschäden auf einem Maisfeld

Anhand der Abbildung sind die erheblichen Ertragsverluste durch den Maiszünsler zu sehen (TRANSGEN, 2009).

2.5 Anbauggebiete des Bt-Mais

In den USA wird Bt-Mais seit etwa einem Jahrzehnt großflächig angebaut. Dort betrug 2007 der Anteil an gvMais mit 18,4 Millionen Hektar 73% vom gesamten Maisanbau. Bt-Mais wächst in nennenswerten Umfang aber auch in Kanada, Argentinien, Südafrika und auf den Philippinen.

Österreich, Griechenland, Ungarn, Frankreich und seit 2009 auch Deutschland haben die EU-weite Zulassung für MON810-Mais außer Kraft gesetzt und nationale Verbote erlassen. Trotzdem hat sich die weltweite Anbaufläche von Bt-Mais auf 35 Millionen Hektar erhöht. Das entspricht der gesamten landwirtschaftlichen Fläche in Deutschland. Während weltweit bereits 24 Prozent der Maiserzeugung von Bt-Maissorten stammen, sind es in europäischen Ländern nur wenige Prozent.

Vor vier Jahren wurde in Deutschland erstmals regulär gentechnisch veränderter Bt-Mais angebaut. Bis zu dem gesetzlichen Verbot 2009 sind die Flächen stetig angestiegen. Die Anbaufläche betrug in Jahr 2008 etwa 3.173 Hektar- ca. 0,15% der Maiserzeugung. Vor 2005 hatte es bereits einen begrenzten Versuchs- und Erprobungsanbau gegeben.

Die einzige gentechnisch veränderte Pflanze (gv-Pflanze), die bis vor kurzem in Deutschland landwirtschaftlich genutzt werden durfte, war der BT-Mais von Monsanto, MON 810. Er wurde in der EU 1998 gentechnikrechtlich zugelassen. Die ersten Maissorten die auf MON810-Mais zurückgehen, wurden 2005 sortenrechtlich zugelassen. In Deutschland waren sieben dieser Sorten im Handel. Seit der Anbausaison 2005 müssen alle Flächen, auf denen gentechnisch veränderte Pflanzen stehen, im öffentlichen Standortregister beim Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz eingetragen werden. Das Register gibt daher detailliert über die mit Bt-Mais bewirtschafteten Flächen Auskunft. Bis 2008 sind die Anbau-Standorte und Anbauflächen stetig gestiegen, was auch anhand der Abb. 4 und Abb. 5 statistisch deutlich wird. (TRANSGEN, 2009).

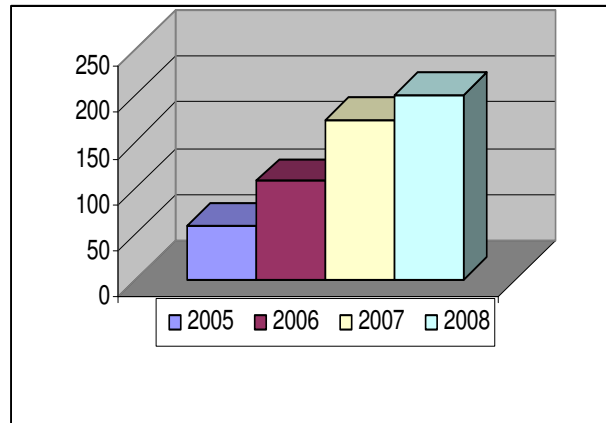


Abb. 4: Anzahl der Anbau-Standorte für Bt-Mais in Deutschland

Auf dem Diagramm ist ein deutlicher kontinuierlicher Anstieg der BT-Mais-Anbau-Standorte in den letzten Jahren zu sehen (TRANSGEN, 2009).

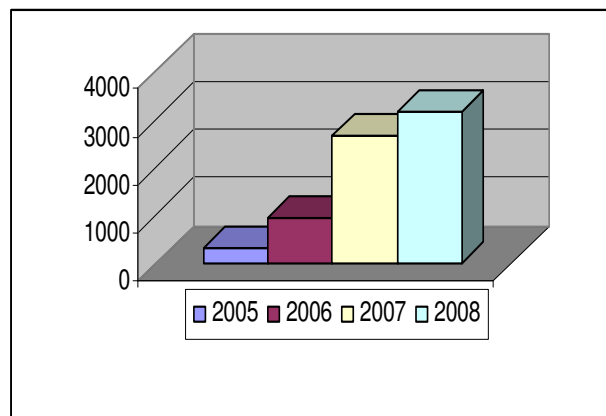


Abb. 5: Anbaufläche in Hektar für Bt-Mais in Deutschland

Es ist grafisch ersichtlich, dass bei der Anbaufläche für Bt-Mais von 2005 bis 2008 jährlich ein starker Zuwachs vorhanden war (TRANSGEN, 2009).

2.6 Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von genetisch veränderten Organismen (GVO) in Lebensmitteln

Seit 2003 existiert in allen EU-Ländern eine neue Verordnung, in der die Zulassung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln einheitlich und in gesetzlich verbindlicher Form geregelt werden soll: (EG) Nummer 1829/2003 [über gentechnisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel] und (EG) Nummer 1830/2003 [über Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung genetisch veränderter Organismen (GVO) und aus diesen hergestellte Lebensmittel und Futtermittel]. 2004 wurden die neuen Bestimmungen wirksam. Bis zu diesem Zeitpunkt galten gentechnisch veränderte Lebensmittel rechtlich als "neuartige Lebensmittel". In dieser Verordnung wurde die Zulassung und Kennzeichnung durch die seit 1997 gültige Novel-Food-Verordnung geregelt.

In der Novel-Food-Verordnung gibt es für gentechnisch veränderte Lebensmittel (gvLebensmittel) eine eigene Verordnung (1829/2003) mit verschärften Sicherheitsanforderungen, erweiterter Kennzeichnung und Informationsrechten für die Öffentlichkeit. Somit wurde auch das Zulassungsverfahren geändert.

Geltungsbereich: Unter die Verordnung 1829/2003 fallen Lebensmittel, Zutaten, Zusatzstoffe und Aromen, die gentechnisch veränderte Organismen (GVO) sind (z.B. Mais) oder solche enthalten, die mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen produziert werden, wenn diese noch im Lebensmittel vorhanden sind. Ein Beispiel hierfür ist Yoghurt mit gvMilchsäurebakterien, die selbst GVOs sind oder daraus hergestellt wurden, unabhängig davon, ob der jeweilige GVO noch im Lebensmittel nachweisbar ist oder nicht. Maisstärke beispielsweise oder Zucker aus gentechnisch veränderten Pflanzen wären ein weiteres Beispiel oder Würze aus gentechnisch veränderter Hefe.

Schwellenwert: Lebensmittel und Zutaten mit geringfügigen, unbeabsichtigten GVO-Beimischungen sind von den Zulassungs- und Kennzeichnungsbestimmungen ausgenommen, wenn der Anteil der jeweiligen Menge nicht mehr als 0,9 Prozent beträgt.

Bis zum Jahr 2003 waren gentechnisch veränderte Lebensmittel nur dann kennzeichnungspflichtig, wenn die jeweiligen GVOs, aus denen sie hergestellt worden waren, im Endprodukt nachgewiesen werden konnten. Jedoch ist dies bei vielen hoch verarbeiteten Zutaten nicht der Fall, da GVO-Bestandteile bei einigen Prozessen, wie bei der Herstellung von raffiniertem Öl, weitgehend abgebaut werden. So wird DNA durch längere Hitzebehandlung in ihre Bausteine zerlegt. Deswegen waren bis dato Lecithin oder Öl aus gvSojabohnen nicht nachweisbar und nicht kennzeichnungspflichtig (TRANSGEN, 2009).

Aus Gründen des Verbraucherschutzes verordnete die Europäische Union die Rückverfolgbarkeit von genetisch veränderten Organismen (GVO) und von aus GVO hergestellten Erzeugnissen über die gesamte Lebensmittelkette hinweg. Anhand der Rückverfolgbarkeit von GVO wird die Kontrolle und Überprüfung der Angaben auf dem Etikett, die Beobachtung potenzieller Auswirkungen auf die Umwelt sowie das Zurückziehen von auf Mensch oder Tier gesundheitlich schädlich wirkenden Produkten ermöglicht (EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT, 2009). Auch das Zurückziehen von gesundheitlich schädlichen Produkten wird durch die Rückverfolgbarkeit ermöglicht.

In Deutschland wird die Einhaltung der Kennzeichnungsbestimmungen kontrolliert. Dafür sind die Bundesländer zuständig. Verstöße gegen die Kennzeichnungsbestimmungen können mit hohen Geldstrafen geahndet werden.

3. Nachweisverfahren zur Detektion von genetisch verändertem Mais

3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als qualitativer Nachweis

Für den Nachweis des Bt-Mais auf DNA-Ebene, stellt die Polymerase-Kettenreaktion aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit die am häufigsten angewandte Methode in der Praxis dar.

Die PCR-Methode wurde 1983 von Kary Mullis erfunden (MÜLLER, 2006). Seine Absicht war es ein Verfahren zu entwickeln, womit DNA durch einen sich immer wieder wiederholenden Verdoppelungsprozess, in mehreren Zyklen so oft kopiert wird, dass man die Produkte des Prozesses sichtbar machen kann. Dies gelang ihm mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase, welche DNA in bis zu 55 Zyklen zuverlässig *in vitro*, das heißt, im Reagenzglas, vervielfältigt. Seit der im Jahre 1985 von Saiki et al. publizierten ersten PCR-Veröffentlichung nahm die Anzahl der PCR-Publikationen drastisch zu. Sieben Jahre danach wurde Mullis 1993 der Noelpreis für Chemie zugesprochen (MÜLLER, 2009).

Der Vorteil dieser Methode für gentechnische Analysen sei im Folgenden erläutert: Es kann eine zusätzlich eingeführte DNA-Sequenz aus einem Organismus isoliert und direkt mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden. Die vervielfältigte DNA wird anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt, sichtbar gemacht und somit detektiert.

Weil theoretisch ein einziges DNA-Molekül in der Probenlösung ausreicht, um den entsprechenden Nachweis zu erbringen, ist die PCR eine extrem empfindliche Methode. Somit gelingt mit ihr der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen.

Als qualitativen Nachweis versteht man eine "Ja"-oder "Nein"-Aussage, ob eine genetische Veränderung bei der Maispflanze vorliegt. Die Quantitative PCR erbringt zusätzlich Aussagen über die genaue Menge der nachgewiesenen DNA, ist aber etwas aufwändiger und erfordert eine spezielle Laborausrüstung.

3.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der DNA-Vervielfältigung (Replikation), die in jeder lebenden Zelle stattfindet, ist die Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion. Die PCR-Methode erlaubt eine exponentielle Vermehrung von DNA-Abschnitten auf hochspezifische und empfindliche Weise, durch eine Abfolge biochemischer Reaktionen, die bei verschiedenen Temperaturen in einem Reaktionsgefäß ablaufen. Unter dem Begriff "Polymerase-Kettenreaktion" versteht man, dass eine Reaktion die Grundlage für die nächste Reaktion bildet; in diesem Fall der Polymerase-Kettenreaktion werden kurze DNA-Stücke (als PCR-Produkte) gebildet, die wiederum als Matrize (Kopiergrundlage) für die nächsten identischen DNA-Kopien dienen. Die Produkte des vorherigen Zyklus sind also Ausgangsstoffe für den nächsten.

Es werden für die PCR folgende grundlegende Komponenten benötigt:

- Die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält
- Zwei Primer oder Startermoleküle, das sind zwei 18-24 Basenpaare lange synthetische Oligonukleotide (einzelsträngige kleine DNA-Stücke), die Base für Base genau zur Ziel-DNA passen müssen. Man nennt solche DNA-Fragmente auch komplementär. Diese werden im PCR-Prozess an die Startpunkte für die DNA-Vervielfältigung gebunden und sie legen zugleich Anfang und Ende der DNA-Kopie fest.
- Die Taq-Polymerase, ein thermostabiles Enzym, das aus dem hitzeliiebenden Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Sie ist bei hohen Temperaturen (95°C) beständig und hat ihr Aktionsoptimum bei 72°C, wo sie den festgelegten Abschnitt zu kopieren vermag.
- Desoxynukleotidtriphosphate, welche die Bausteine für den von der Taq-Polymerase zusammenzubauenden (zu synthetisierenden) DNA-Abschnitt darstellen
- Magnesiumchlorid-Ionen (Mg^{2+}), die in genau eingestellter Konzentration notwendig für die Funktionalität der Taq-Polymerase sind.
- Pufferlösungen, die eine für die DNA-Synthese geeignete Umgebung sicherstellen
- Ultrareines Wasser

Die PCR besteht in ihrem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten:

1. Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges:

Durch das Erhitzen der doppelsträngigen Ziel-DNA auf 95°C werden die Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Nukleotiden eines DNA-Doppelstranges, wie in Abb. 6 veranschaulicht, aufgeschmolzen. Das Zucker-Phosphat-Rückgrad der DNA, dessen Basenfolge die genetische Information enthält, bleibt unter diesen Bedingungen stabil. Durch anschließendes Absenken der Temperatur auf einen Temperaturbereich zwischen 50°C und 60°C (siehe Schritt 2.) können die exakten Bedingungen für die Anlagerung der Startersequenzen eingestellt werden, wobei die großen DNA-Fragmente immer noch aufgetrennt bleiben.

2. Anlagerung des Primers:

Durch das Herabsetzen der Temperatur auf 50-60°C, je nach Basenfolge in der Ziel-DNA, verbinden sich die Primer (Startermoleküle) mit der DNA-Zielsequenz. Diesen Vorgang nennt man Hybridisierung. Diese Verbindung ist nur dann stabil wenn Primer und DNA-Abschnitt sich ergänzen (komplementär sind), sich also zwischen ihren Bausteinen Basenpaare bilden können. Die Verbindung erfolgt über so genannte Wasserstoffbrücken, wobei sich immer die Basen Adenin mit Thyamin und Cytosin mit Guanin paaren. Am 3'-Ende dieses Basen-gepaarten Abschnittes beginnen die Polymerasen, sobald die Temperatur auf das Temperaturoptimum für das Enzym, 72°C, angehoben wurde damit, weitere komplementäre Nukleotide anzubauen und damit die Verbindungs-Sequenz, dem Doppelstrang zwischen Primern und Matrizen-DNA zu verlängern.

3. Kettenverlängerung:

Die Temperatur wird nun auf 72°C erhöht. Dies ist die ideale Arbeitstemperatur für die verwendete Taq-Polymerase, welche weitere Nukleotide an die entsprechenden DNA-Enden der einzelsträngigen Startermoleküle, immer passend zur DNA-Matrize, anbaut. Dabei werden die verwendeten Primer vom 3'OH-Ende beginnend in 5'>3'-Richtung verlängert. Dieser Prozess wird als Synthese eines neuen Stranges bezeichnet.

Die Angaben 5' und 3' beziehen sich auf die beiden unterschiedlichen Enden der einzelsträngigen DNA-Startermoleküle (Primer). Wenn man sich das Zucker-Phosphat-Rückgrad der DNA genauer ansieht, so kann man feststellen, dass bei der Kettenverlängerung immer die an bestimmten C-Atomen des Zuckers gebundenen OH-Gruppen betroffen sind. Zur Unterscheidung werden diese Verknüpfungsorte als 5'- oder 3'-Ende bezeichnet.

Die langen Einzelstränge dienen als Matrize für die einzelnen, an die zu verlängernde Kette angebauten Basen. Die Primer werden nicht wieder abgelöst, da sie den Anfang eines jeden Einzelstranges bilden und mit der neugebildeten DNA fest verankert sind. Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte: Aufschmelzen der DNA, Anlagern der Primer und Synthese des neuen Stranges, verdoppelt sich jedes Mal die Anzahl an kopierten DNA-Molekülen. Um zu gewährleisten, dass dieser Prozess 45 Mal ablaufen kann, muss ein riesiger Überschuss an Primern zur Reaktion hinzugegeben werden. Diese Moleküle sind allerdings so klein, dass sie trotzdem mit dem bloßen Auge kaum sichtbar sind.

Der Zyklus: Aufschmelzen der DNA, Primer-Anlagerung und DNA-Ketteverlängerung werden in einem automatischen Thermocycler für den Nachweis von gvMais 45-mal durchlaufen. Man kann sich dabei vorstellen, dass nach 20 Zyklen auf diese Weise aus einem einzigen DNA-Doppelstrang in etwa eine Million Moleküle entstehen. Daraus ergibt sich die Formel 2^n für: n =Anzahl der Zyklen. In der folgenden Abbildung (Abb. 5) ist der Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion in den wichtigsten Einzelschritten anschaulich dargestellt.

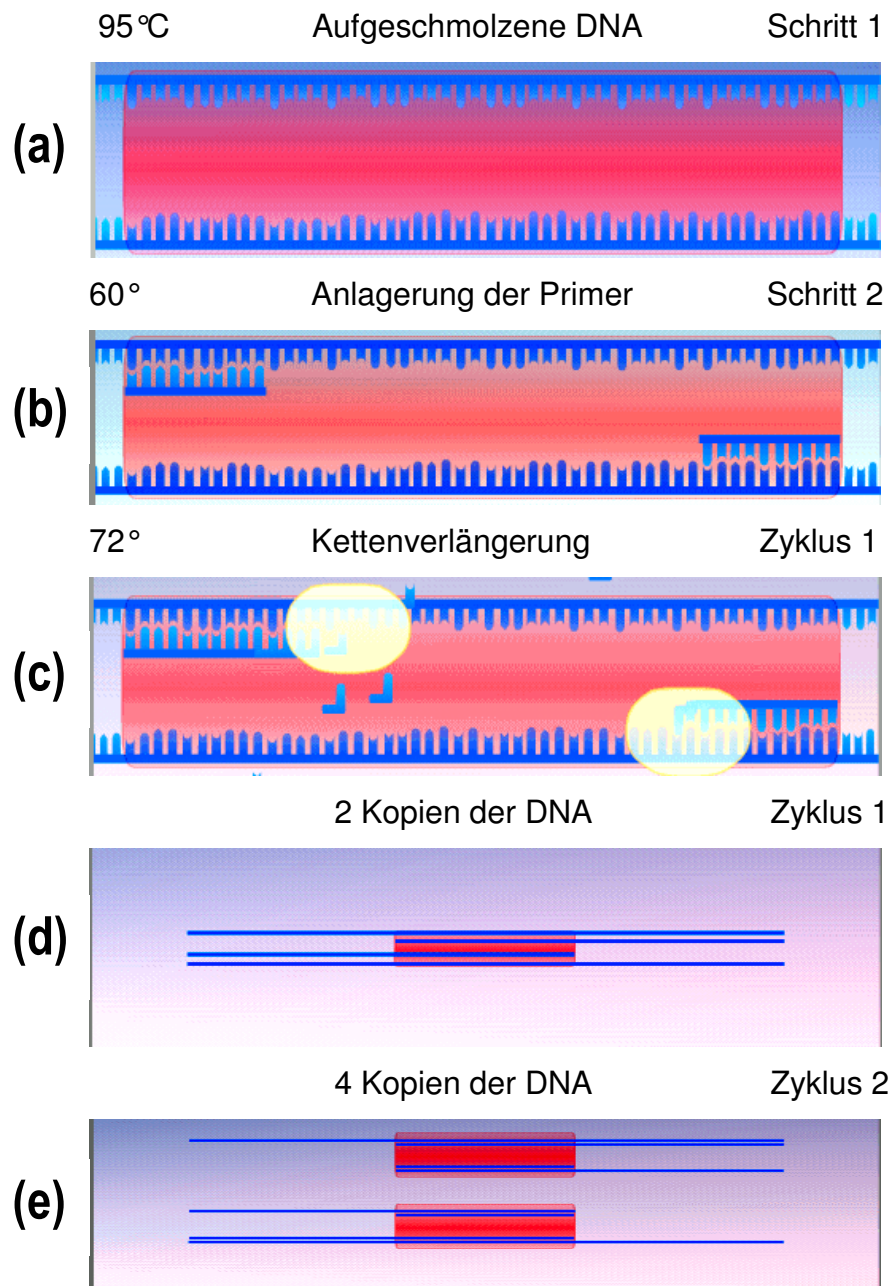


Abb. 6: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (nach SUMANAS, 2009)

In dieser Abbildung ist zunächst gezeigt, wie der DNA-Doppelstrang bei 95°C aufgeschmolzen wird (a). In diesem speziellen Falle, bei 60°C (b), lagern sich die Primer basengenau an den Matrizenstrang an und bei 72°C (c) beginnt die Kettenverlängerung. Es ist weiterhin gezeigt, dass nach der ersten Ableserunde aus einem Molekül zwei Kopien entstehen (d), in der zweiten Ableserunde entstehen aus zwei Kopien vier Kopien (e), in der 20. Ableserunde wird die Anzahl von 1 000 000 Kopien überschritten. Die Reaktion wird so lange durchgeführt, bis so viele Kopien entstanden sind, dass man die entstandene DNA im UV-Licht sichtbar machen kann. Die folgende, durch die Formel 2^n ermittelte Tabelle (Tab. 1) gibt in Zahlen Aufschluss über die Vervielfältigungsstufen bei der Polymerase-Kettenreaktion unter Idealbedingungen.

Tab. 1: Anzahl der Zyklen im Verhältnis zur Anzahl der DNA-Ziel-Bereiche (Fragmente)

Es ist tabellarisch ersichtlich, dass anhand der Formel 2^n (n=Anzahl der Zyklen) sich die DNA-Zielbereiche mit jedem Zyklus theoretisch verdoppeln, unter Voraussetzung eines optimalen Ablaufs der PCR.

Die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt sich mit jedem Zyklus. Nach etwa einer Stunde und 30 Zyklen erhält man 2^{30} , also über eine Milliarde Kopien.

Anzahl der Zyklen	Anzahl der Ziel DNA-Bereiche
1	2
2	4
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
10	1024
12	4096
14	16384
16	65536
20	1048576
24	16777216
28	268435456
30	1073741824
32	4294967296

Zur visuellen Auswertung unter UV-Licht werden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel, das spezifische Farbstoffe für die DNA enthält, aufgetragen. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden die aufgetragenen DNA-Stücke über einen gewissen Zeitraum der Länge nach sortiert. Dieser Schritt wird auch Auftrennen der DNA-Fragmente genannt. Nukleinsäuren sind wegen ihres Zucker-Phosphatrückgrates negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode (MÜLLER, 2001). Die aufgetrennten DNA-Banden werden im Bezug auf ihre Größe mit einem

bekannten DNA-Marker (hier die KB PLUS DNA Leiter) verglichen und somit die Länge bestimmt. Dabei werden PCR-Produkte unterschiedlicher Basenpaarlängen aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit unterschieden. Kürzere DNA-Stücke bewegen sich schneller als die längeren durch das Gel, ähnlich als ob man verschiedene Siebe unterschiedlicher Maschengröße untereinander zum sortieren unterschiedlich großer Partikel verwendet.

3.3 Empfindlichkeit und Fehleranfälligkeit der Polymerase-Kettenreaktion

Die exponentielle und spezifische Vervielfältigung eines bestimmten Gen-Abschnitts wird mit der Polymerase-Kettenreaktion so empfindlich durchgeführt, dass im Idealfall ein einziges Gen nachweisbar ist. Der große Vorteil der PCR ist ihre extreme Empfindlichkeit, dies ist aber gleichzeitig auch ihr nicht zu unterschätzendes Problem. In der Praxis sind es kleinste Verunreinigungen, wie sie etwa beim Pipettieren durch übertragene Mini-Kondenswasser-Teilchen aus dem Pipettenschaft oder aus der Raumluft entstehen. Diese kleinsten nicht mehr sichtbaren Feuchtigkeitströpfchen, die die PCR-Reaktion regelrecht sabotieren können nennt man Aerosole. Aerosole können DNA in kleinsten Flüssigkeitströpfchen tragen oder auch Staubpartikel und die Kontamination mit nur einem "falschen" DNA-Molekül kann ein falsch-positives Ergebnis herbeiführen.

Das Risiko falscher Resultate lässt sich durch umfangreiche Vorsichtsmaßnahmen minimieren, was in der anschließenden Diskussion dieser Arbeit genauer aufgeführt ist. Somit ist es in der Praxis u.a. sinnvoll, geplackte Pipettenpitzen zu verwenden, diese bei jedem Pipettiervorgang zu wechseln und regelmäßig neue Handschuhe zu verwenden. Bedeutend ist auch die Verwendung von aliquotierten Lösungen (Teilmengen) um Kreuzkontaminationen zu verhindern.

3.4 Positiv- und Negativkontrolle

Bei der PCR-Analyse muss generell eine Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt werden. Die Positivkontrolle gibt bei jedem Versuch Auskunft darüber, ob richtig pipettiert wurde und ob die Reaktion generell funktioniert hat. Die Negativkontrolle, die jeweils auch die letzte pipettierte Probe sein sollte, gibt Auskunft darüber, ob sauber gearbeitet wurde oder ob falsch positive Ergebnisse zu erwarten sind. Um reproduzierbare Ergebnisse mit dieser sehr empfindlichen Methode zu erhalten, sind bei jeder PCR diese Kontrollen immer notwendigerweise mitzuführen.

Die Positivkontrolle sollte eine Reaktion sein, die unter den gegebenen Bedingungen zuverlässig abläuft, und Aufschluss darüber gibt, ob alle Reaktionskomponenten hinzu gegeben wurden und diese noch aktiv sind.

Die Negativkontrolle besteht aus einem kompletten Reaktionsansatz, jedoch ohne die zu vervielfältigende Ziel-DNA, zum Identifizieren möglicher Kontaminationen.

Das Zusammenpipettieren der Reaktionen sollte unbedingt auf Eis erfolgen. Die Taq-Polymerase hat zwar bei Raumtemperatur nur eine sehr geringe Polymeraseaktivität, diese reicht jedoch aus, um den Primer zu verlängern, welche bei dieser Temperatur auch an falscher Stelle binden und zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Verunreinigungen durch Fremd-DNA können zu irreführenden Ergebnissen und falschen Schlüssen führen. So besteht die Gefahr einer Verwechslung unbeabsichtigter Kontaminationen mit tatsächlicher gentechnischer Veränderung. Deswegen existieren bei dieser Nachweismethode strenge Richtlinien zur Handhabung der Proben, um zuverlässige Aussagen zu erhalten.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die räumliche Trennung von Arbeiten mit positiven Proben und Orten, an denen eine PCR-Reaktion zusammenpipettiert wird. Nur an absolut sauberen Arbeitsplätzen kann diese Arbeit zuverlässig gelingen, deshalb werden die PCR-Arbeitsplätze auch öfters mit UVC-Licht bestrahlt, das jede Fremd-DNA zerstört.

4. Material und Methoden

Begleitend zu dem Literaturstudium wurden praktische Versuchsreihen durchgeführt, bezüglich der Funktion der Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von DNA-Abschnitten, welche in gentechnisch verändertem Mais vorkommen.

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Hot Star Taq Master Mix	Qiagen, Hilden
Wasser A. bidest.	Qiagen, Hilden
LE Agarose, Seakem	Biozym, Hameln
TAE-Puffer	Merck, Darmstadt
Farbstoff GelStar	Cambrex Bio Science, Rockland
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glycerin-Probenpuffer; 40 % Glycerin	Emil-Fischer-Schule, Berlin
40 mM TAE, pH 8,3	
0,1 % (w/v) Xylencyanol	
0,1 % (w/v) Bromthymolblau	

Nukleinsäuren	Hersteller
1 KB-Plus DNA-Leiter Längenmarker, Angabe in Basenpaaren: 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 5000, 12 000 Synthetische Oligonukleotide (Primer) 100µM Primer-Stocks wurden zu Gebrauchsstocks 1:10 verdünnt	Invitrogen, Karlsruhe TIB MOLBIOL, Berlin
GVO Maismehl MZ 5 (5% MON-810), Maismehl MZ 5 Zertifiziertes Referenzmaterial IRMM-413 Nr. 76182	Fluka, Buchs

Tab. 2: Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR

Primer	Sequenz 5´-3´Richtung	Nachweis	Länge (bp)	Referenz
Cry1Ab	ACCATCAACAGCCGCTACAACGACC	Bt-Mais	184	Hupfer, 1998
Cry1As	TGGGGAACAGGCTCACGATGTCCAG	Bt-Mais	184	Hupfer, 1998
Ivr1A	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC	Mais- Invertase- Gen	226	Ehlers, 1997
Ivr1B	GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC	Mais- Invertase- Gen	226	Ehlers , 1997

4.2 Geräte und Materialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipettenspitzen mit Filter	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml/0,5ml)	Schubert, Leipzig

Geräte	Hersteller
Tischzentrifuge	Sigma, Osterode
Vortex Mixer	Scientific Industries, Bohemia
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer	Bio Rad, München
Power-Supply	Bio Rad, München
UV-Transillumulator	LTF Labortechnik, Wasserburg
Digitalkamera mit Orangefilter	Kodak DC 290, Stuttgart

4.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Für den Nachweis von gentechnisch verändertem Mais wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die das Delta-Endotoxin-Gen von *Bacillus thuringiensis* [*CRY1A*] und/oder das Invertase-Gen [IVR] erkennen.

Beim *Bacillus thuringiensis* [*CRY1A*]-Gen handelt sich um jenes Gen, welches in genetisch verändertem Mais vorkommt und den Mais vor Schädlingsbefall schützen soll. Das Invertase-Gen kommt hingegen in jeder Maispflanze vor, unabhängig von gentechnischer Veränderung und dient somit als interner Standard.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die benötigten Mengen an Reagenzien und Lösungen für den PCR-Reaktionsansatz und den Mastermix berechnet. Unter Einbeziehung des Pipettierverlustes wurde ein Proben-Ansatz zusätzlich erstellt.

PCR-Reaktionsansatz für 1 Probe:

Beispiel: PCR-Reaktion für den spezifischen Nachweis des *CRY1A*-Gens

(Positivkontrolle)

Lösung/Reagenz	Menge in μl	Endkonzentration
Hot Star Taq Master Mix	25 μl	2,5 U Taq-Polymerase
Primer Cry1Ab	2 μl	0,4 μM
Primer Cry1As	2 μl	0,4 μM
DNA (vorgelegt)	10 μl	
Wasser	11 μl	
μl Gesamt	50 μl	

PCR-Reaktionsansatz für 1 Probe:

Beispiel: PCR-Reaktion für den spezifischen Nachweis des *IVR*-Gens

(Positivkontrolle)

Lösung/Reagenz	Menge in μl	Endkonzentration
Hot Star Taq Master Mix	25 μl	2,5 U Taq-Polymerase
Primer lvr1A	2 μl	0,4 μM
Primer lvr1B	2 μl	0,4 μM
DNA (vorgelegt)	10 μl	
Wasser	11 μl	
μl Gesamt	50 μl	

Voraussetzung für die Durchführung der für die PCR notwendigen Pipettiervorgänge war die Sicherstellung von sterilen Arbeitsflächen, um Kontaminationen der Proben zu verhindern.

Die für die PCR-Reaktion benötigten tiefgekühlten Reagenzien wurden auf ca. 4°C unter gelegentlichem Schütteln in einem Kühlblock aufgetaut:

- Ultrasauberes Wasser
- Primerpaare, spezifisch für das nachzuweisende Gen
- Hot Star Taq Master Mix mit den benötigten Puffersubstanzen, Nukleotiden und Salzen

Speziell bei dem Hot Star Taq Master Mix musste das Auftauen auf 4°C mittels eines Eppendorf Thermomixers und ständigem Mixen bei 750 upm erfolgen, damit vor allem die darin enthaltene Magnesiumchlorid-Ionen gelöst werden. Die benötigten Reaktionsgefäße mussten ebenfalls auf einem Kühlblock stets auf vorgeschriebener Kühltemperatur von 4°C gehalten werden.

Pipettiervorgänge:

Es wurde ein Master-Mix hergestellt, welcher alle benötigten Reagenzien, außer die zu vermehrende DNA enthielt (dies ist generell bei mehreren PCR-Reaktionen sinnvoll, um sich unnötiges Pipettieren zu ersparen). Hierfür wurde der Hot Star Taq Master Mix, mit der enthaltenen Taq-Polymerase, den Puffersubstanzen, Nukleotiden und Salzen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Die für die PCR-Reaktion spezifischen Primer sowie hochreines bidestilliertes Wasser wurden hinzugefügt. Die Mastermix-Komponenten wurden mit einem Vortexer vorsichtig vermischt und kurz zentrifugiert, damit die Reagenzien nicht am Gefäßrand verbleiben.

Der berechnete Reaktionsmix wurde zu gleichen Teilen auf die bereits in kleinen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegten DNA-Proben wie folgt pipettiert:

- Positivkontrolle
- DNA-Probe
- Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurde eine für die eine für die PCR wichtige Komponente, zumeist hochreines PCR-Wasser oder eine für das *[CRY1A]*-Gen von *Bacillus thuringiensis* negative DNA verwendet. Danach wurden die PCR-Ansätze sorgfältig vermischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in einen auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt und das PCR-Programm für Mais gestartet (Tab. 3).

Tab. 3: Verwendetes Thermocycler-Temperaturprogramm für Bt-Mais

Der Eppendorf-Thermocycler ist in der Lage Temperaturzyklen einer Polymerase-Kettenreaktion automatisiert durchzuführen.

Deckeltemperatur = 105 °	
<u>Blocktemperatur</u>	<u>Zeit</u>
1 T=95°	0:15:00 min
2 T=95°	0:00:45 min
3 T=60°	0:00:45 min
4 T=72°	0:00:35 min
5 Zurückkehren zu 2	Wiederholung 45 mal
6 T=72°	0:05:00 min
7 T = bei 4°	

4.4 Nachweis der PCR-Produkte mit der Agarose-Gelelektrophorese

Für den spezifischen qualitativen Nachweis der PCR-Produkte, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden die PCR-Produkte mit den enthaltenen DNA-Fragmenten auf einem 2 %igen Agarosegel entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld bei konstantem Strom aufgetrennt. Anschließend wurden die PCR-Produkte, DNA-Fragmente von definierter Größe, auf einem UV-Transimulator sichtbar gemacht.

Durchführung:

Zur Herstellung eines 2 %igen Agarose-Gels, wurde in einem Laborkolben 0,56 g LE-Agarose eingewogen und unter Schütteln in 40 ml 1xTAE-Puffer homogen vermischt. Die Mischung wurde in einer Mikrowelle für 2 Minuten unter gelegentlichem leichtem Schütteln auf höchster Stufe erhitzt. Nach anschließendem Abkühlen des Gels auf ungefähr 45-50°C wurden 2 µl GelStar-Farbstoff hinzugegeben und die Suspension leicht geschwenkt. Danach wurde das flüssige Gel zügig und möglichst luftblasenfrei in einen dafür vorgesehenen Gelträger mit eingesetztem Kamm gegossen.

Nachdem das Gel bei ca. 15-20minütiger Stehzeit ausreichend polymerisieren konnte (Monomere reagieren zu Polymere), wurde es in eine dafür vorgesehene Elektrophorese-Kammer gegeben und mit TAE-Laufpuffer bis zur vollständiger Bedeckung des Gels beschichtet.

Für die Vorbereitung der PCR-Ansätze wurden 10µl Auftragspuffer mit je 50µl PCR-Ansatz in den kleinen Reaktionsgefäßen gemischt und die Flüssigkeiten durch "Herunterschleudern" zusammengeführt. Zusätzlich wurden 10µl Ladungspuffer mit 10µl DNA-Leiter gemischt. Der Ladungspuffer diente hierbei zum einbringen von Indikatorfarbe zur Kontrolle des Gellaufs und Beschweren der PCR-Produkte damit die Proben zuverlässig in die Geltaschen absinken.

Sobald die PCR-Ansätze für die Gelelektrophorese vorbereitet waren, wurde der zu dem Gelträger gehörende Gelkamm entfernt. Die so erhaltenen Geltaschen wurden mit je 20 µl Probe beladen. 20µl KB-Leiter wurden als Längenstandard in die entsprechenden Geltaschen aufgetragen. Außerdem musste eine Kontrolle durchgeführt werden, die gezeigt hat, dass bei der PCR-Reaktion keine Verunreinigungen vorhanden waren. In der PCR-Kontrolle ohne DNA-Zugabe (Negativkontrolle) durfte kein Reaktionsprodukt zu sehen sein, welches für transgenem Mais spezifisch ist. Sobald alle Proben in den Geltaschen aufgetragen waren, wurde das Elektrophorese-Programm gestartet

Nach ausreichender Auftrennung der DNA-Fragmente (ca. 20-30 Minuten) bei konstantem Strom (110 mA) wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transillumulator sichtbar gemacht und anschließend photographisch am PC dokumentiert. Der gesuchte DNA-Abschnitt galt als nachgewiesen, wenn die Trennung der Fragmente mittels der Gelelektrophorese soweit erfolgt war, dass aufgetrennten DNA-Banden im Vergleich zum Längenstandard (Abb. 6) eindeutig der Größe des zu erwartenden PCR-Produktes zugeordnet werden konnten. Die Länge der gesuchten DNA-Sequenzen wurde ausgewertet.

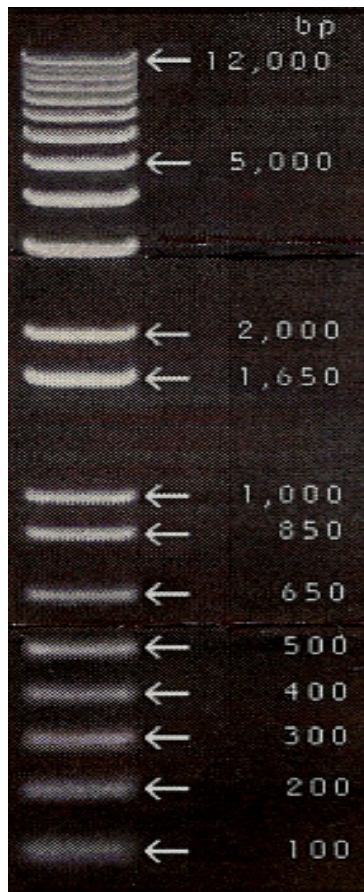


Abb.7: Darstellung einer 1Kb Plus DNA-Leiter

Die 1Kb Plus DNA-Leiter besteht aus einem Gemisch von DNA-Strängen aufsteigender Länge. Sie ist der im Genlabor der Emil-Fischer-Schule am häufigsten benutzte Längenmarker bei der Agarose-Gelelektrophorese. Die Länge der DNA-Sequenz des PCR-Produktes in Basenpaaren kann durch sie bestimmt werden. Bei der gvMais-PCR waren die Fragmente von 100 bis 300 Basenpaaren wichtig für die Zuordnung der spezifischen Fragmentlängen.

5. Ergebnisse

5.1 Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte

Im ersten Experiment (Abb. 8) wurde ein Größenvergleich des *Bacillus thuringiensis* [*Cry1A*]-Gens und des *Invertase-Gens* [*IVR*] vorgenommen. Man sieht deutlich, dass die Auftrennung bei der Agarose-Gelelektrophorese eine gewisse Laufstrecke zurückgelegt haben muss, damit man beide Fragmente aufgrund ihrer Länge voneinander unterscheiden kann. Die DNA-Fragmente werden mit dem Längenstandard, der Kb Plus DNA-Leiter verglichen, sie sind kurz unterhalb im Falle von gvMais und kurz oberhalb der 200 bp-Bande im Falle des Invertase-Gens zu sehen.

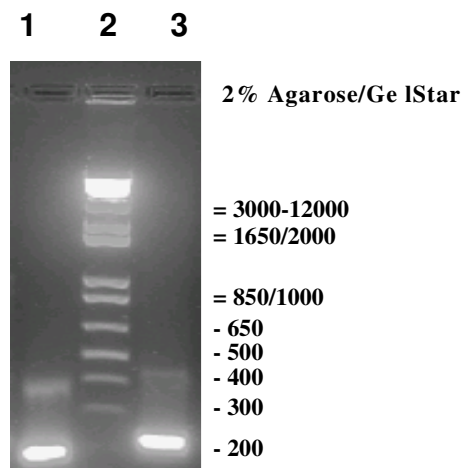


Abb. 8: Durch PCR vervielfachte DNA-Abschnitte des Delta-Endotoxin-Gens von *Bacillus thuringiensis* [*Cry1A*] und des *Invertase-Gens* [*IVR*] von Mais.

Spur # 1: PCR-Fragmente für *Cry1A*, 184 bp

Spur # 2: Längen-Marker ist die Kb-Plus-Leiter

Spur # 3: PCR-Fragmente für *IVR*, 226 bp

Auf dem Gel ist gut sichtbar, dass die DNA-Abschnitte für *CRY1A* und *IVR* unterschiedliche Längen besitzen. Bei 380 bp in der Spur # 1 und bei 420 bp in der Spur # 3 sind im Hintergrund unspezifische DNA-Fragmente zu sehen, was auf fehlerhafter Primerbindung (Random-Priming) zurückzuführen ist.

5.2 Auswirkung der Anzahl der PCR-Zyklen auf die Detektion kleinster Mengen von [Cry1A]-DNA in den Proben

Eine offensichtlich mit Aerosolen kontaminierte Probe wurde einer PCR mit dem [Cry1A] Primersatz unterzogen (Abb. 9).

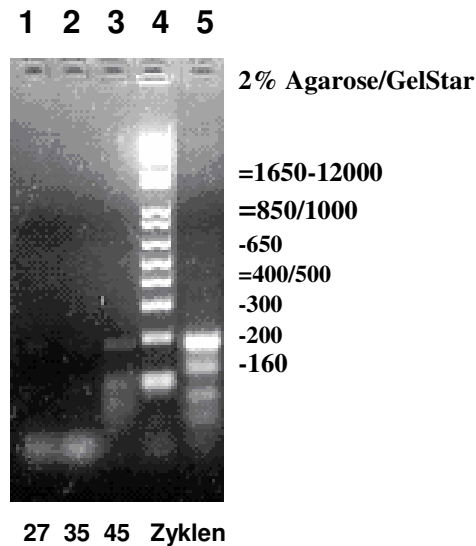


Abb. 9: PCR mit drei Negativkontrollen und einer Positivkontrolle für den DNA-Abschnitt des Delta-Endotoxin-Gens von *Bacillus thuringiensis* [Cry1A] von genverändertem Mais.

Spur # 1:
Negativ-Kontrolle für *Cry1A*/ 27Zyklen
Spur # 2:
Negativ-Kontrolle für *Cry1A*/ 35 Zyklen
Spur # 3:
Kontaminierte Negativkontrolle für *Cry1A* /
45 Zyklen
Spur # 4:
Längen-Marker ist die Kb-Plus-Leiter
Spur # 5:
Positiv-Kontrolle für *Cry1A*,184bp

Bei der zweiten Mais-PCR wurden drei Negativkontrollen mit unterschiedlicher Zyklenzahl durchgeführt sowie eine Positivkontrolle des vervielfachten DNA-Abschnitts des Delta-Endotoxin-Gens von *Bacillus thuringiensis* [Cry1A] mit regulärer Zyklenzahl. Das Ergebnis zeigt, dass die PCR alle Verunreinigungen sichtbar macht, sobald man über einen Schwellenwert, die so genannte Nachweisgrenze gekommen ist. Bei 27 und 35 Zyklen war noch keine Kontamination sichtbar, da man unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Jedoch war bei 45 Zyklen eine deutliche Kontamination mit Aerosolen festzustellen.

Somit ist ersichtlich, dass durch die Erhöhung der Zykluszahlen die Empfindlichkeit der PCR deutlich gesteigert wird. Im Vergleich der Spur #3 und Spur #5 ist bei der Positivkontrolle ein deutlich stärkeres Signal vorhanden, als bei der kontaminierten Negativ-Kontrolle, weil bei der Positivkontrolle eindeutig mehr DNA-Menge vervielfacht wurde.

6. Diskussion

Die Polymerase-Kettenreaktion als analytisches Nachweisverfahren gewinnt in der Lebensmittelindustrie zunehmend an Bedeutung, durch den vermehrten Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen und damit bestehender Kennzeichnungspflicht innerhalb der EU.

Durch die PCR-Analytik lassen sich bereits kleinste Mengen DNA-Material in Lebensmitteln nachweisen. Trotz scheinbarer Einfachheit der Methode erfordert die PCR Sorgfalt und Erfahrung bei der Durchführung und bei der Interpretation der Ergebnisse. Umfangreiche Kenntnisse und Erfahrungen mit molekularen Verfahren, sorgfältigste Einhaltung von Vorsichtsmaßnahmen sowie umfangreiche Kontrollreaktionen bei der Durchführung sind notwendig.

Es kann zahlreiche Gründe geben wieso die PCR nicht klappt. Für eine erfolgreiche PCR müssen verschiedene chemische sowie physikalische Parameter eingehalten werden. Leider passiert es sehr oft, dass die gewünschten Resultate nach einer PCR nicht erhalten werden. So einfach die Durchführung einer PCR erscheint, so komplizierter kann die Fehlersuche sein, wenn das gewünschte Amplifikat nicht erhalten wird oder unspezifische Fragmente auftreten (MÜLLER, 2001). Für die Fehlersuche findet man im Trouble-shooting-Teil (Fehlersuche) verschiedener Hersteller von PCR-Kits viele Hinweise.

Da sich durch die PCR bereits geringste Mengen DNA nachweisen lassen, ist es enorm wichtig, Verunreinigungen der PCR-Reaktionsansätze durch PCR-Produkte vorausgegangener Versuche oder "Fremd-DNA" aus anderen Quellen zu vermeiden.

Einen der kritischen Faktoren in der Praxis stellen Aerosole (Mini-Teilchen in unserer Luft) dar. Kleinste Verunreinigungen, etwa durch das Pipettieren übertragene Mini-Teilchen in unserer Luft, Staubpartikel und die Kontamination mit nur einem "falschen" Molekül können zu einem falsch-positiven Ergebnis herbeiführen. Bei dem Pipettiervorgang bewegt sich eine Flüssigkeit durch die enge Öffnung der Pipettenspitze. Dabei können Aerosole entstehen, welche z.B. winzigste DNA-Bereiche enthalten. Diese können dennoch die Pipetten kontaminieren und somit auf eine andere Probe übertragen werden.

Anschaulich erklärt, kann z.B. ein einziges Mini-Tröpfchen aus der Luft (Aerosol), das sich beim Öffnen eines Reaktionsgefäßes nach der PCR bildet, zehntausende Kopien der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz enthalten. So besteht die Gefahr dass sich Spuren vorheriger PCR-Analysen im Labor verteilen und somit in den Primern, Nukleotiden oder Polymerasen landen können. Selbst kleinste Verunreinigungen durch Tröpfchen an Handschuhen, Pipettenspitzen oder achtlos weggeworfene PCR-Gefäße können gravierende Folgen haben. Werden Vorsichtsmaßnahmen bei der PCR nicht genauest eingehalten, entstehen häufig unspezifische PCR-Produkte, wie multiple Banden oder unerwünschte Bandenschmier. Diese häufig auftretenden Fehler entstehen meist durch eine Fehlpaarung der Primer (Oligonukleotide) in Folge einer bereits geringen Erwärmung der PCR-Gefäße bei den Pipettiervorgängen. Diese Moleküle binden entweder an unspezifischen Stellen oder können auch als sogenannte Primer-Dimere miteinander verknüpfen. Obwohl die optimale Reaktionstemperatur der Polymerase bei 72 °C liegt, ist sie auch bei Zimmertemperatur bereits aktiv und beginnt Nukleotide an die Primer anzubauen. Das stört die spätere Reaktion erheblich, weshalb das Ansetzen der PCR zwingend auf Eis erfolgt. In Tabelle 4 sind verschiedene Kontaminationsquellen aufgeführt, die bei der PCR-Analyse durch besondere Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden sollten.

Tab. 4: Mögliche Kontaminationsquellen bei der PCR (MÜLLER, 2001)

Biologisches Material	Verbrauchsmaterial	Arbeitsplatz
Methode der Probengewinnung	Reaktiongefäße	Laborgeräte
Matrize	Pipettenspitzen	Homogenisatoren
Zellsuspensionen	"Steriles A.bidest"	Hood-Filtereinsätze
Aerosole	Verwendete Reagenzien	Pipetten

Das Risiko falscher Resultate kann durch das Einhalten von verschiedenen Vorsichtsmaßnahmen im Laborbetrieb minimiert werden:

Somit lässt sich die Gefahr von Kreuzkontaminationen verhindern, indem man räumliche Bereiche vor der DNA-Vervielfältigung von Arbeitsbereichen für Arbeiten nach der DNA-Vervielfältigung trennt. Diese Arbeiten sollten in separaten Räumen erfolgen. Um freigesetzte Aerosole als Kontaminationsquelle zu vermeiden ist eine Verwendung von Filterspitzen sinnvoll, also Pipettenspitzen, die im oberen Durchgang zur Pipette hin einen Filter enthalten.

Für jeden Pipettiervorgang ist das Verwenden von frischen Pipettenspitzen zwingend erforderlich, um eine Kontamination der Reagenzien sowie der PCR-Ansätze zu vermeiden. Zudem ist es sinnvoll die Handschuhe bei den Arbeitsvorgängen häufiger zu wechseln und eine sterile Sicherstellung der Arbeitsflächen mit Ethanol zu gewährleisten.

Darüber hinaus sollten stets neue und sterilisierte Reaktionsgefäße und Lösungen benutzt und diese stets ordnungsgemäß beschriftet werden, um Kontaminationen eindeutig nachzuvollziehen.

Im oben dokumentierten Versuch wurde exemplarisch eine Kontamination nachgewiesen und gezeigt, dass ein Schwellenwert überwunden werden muss, um die Kontamination nachzuweisen. Dieser Schwellenwert ist abhängig von der Menge des eingetragenen kontaminierenden Materials. Befindet sich die Menge an Ziel-DNA unterhalb des Schwellenwertes, so handelt es sich um eine falsch-negative Probe, die durch weitere Schritte erkannt werden könnte. Nach 45 Zyklen konnten in dieser Arbeit Kontaminationen mit Aerosolen durch die anschließende Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Dies zeigt, dass es sinnvoll ist bei Lebensmittelkontaminanten, die auch in Spuren nachgewiesen werden müssen, die Anzahl der Zyklen zu erhöhen. Das Gel in Abb. 10 zeigt die unterschiedlichen Nachweisgrenzen der PCR am Beispiel einer DNA-Probe aus gvMais, erstellt aus verschiedenen Verdünnungen (vergl. Dissertation von Tim Reuter, 2003, verändert).

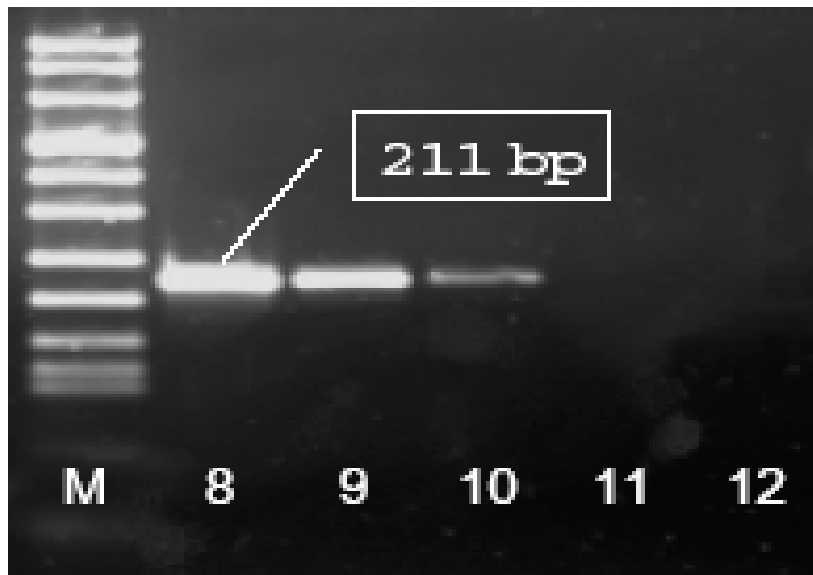


Abb. 10: Nachweisgrenze der PCR am Beispiel einer DNA-Probe aus gvMais, erstellt aus verschiedenen Verdünnungen

Die erste Spur (M) zeigt den Längenmarker. Der hier verwendete Längenmarker besitzt die Fragmentgrößen 1116, 883,692,501,404, 331, 242, 190, 147, 111, 67 und 34 bp. Die PCR-Reaktionen wurden mit je 2 µl DNA durchgeführt. Nach 40 Zyklen jeweils wurden 8 µl Probe, versetzt mit 2 µl Ladungspuffer, auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Proben wurden mit Ethidiumbromid angefärbt.

In der Spur (8) ist ein PCR Fragment der gv Mais-DNA-Ausgangskonzentration von 0,8 ng/µl aufgetragen, in der Spur 9 sind 0,08 ng/µl und in der Spur (10) sind 0,008 ng/µl aufgetragen worden. Die Vermehrung der DNA in der Spur (11) liefert kein sichtbares Ergebnis, ein zu erwartendes ist Signal kann unter den gegebenen Nachweisbedingungen nicht mehr sichtbar gemacht werden. Spur (12) zeigt die Negativkontrolle.

(Quelle: Dissertation von Tim Reuter, 2003, verändert)

Zur Erklärung: Auf diesem Gel kann man die Abnahme der Signale für jede Verdünnung von DNA-Ausgangslösungen, die als Basis für eine nachfolgende PCR dienen, gut verfolgen. Bei genauer Betrachtung dieses Gels wird deutlich, dass in Spur (11) die DNA-Konzentration nur unterhalb der Nachweisgrenze liegt und dass man nicht davon ausgehen kann, dass nichts mehr vorhanden wäre.

Die Nachweisgrenze für ein mit Ethidiumbromid angefärbte Gele liegt bei ca. 50 ng/Spur, wenn DNA aufgetragen wird, die im Signal darunter liegt, ist die DNA zwar da, aber man sieht sie nicht. Das von uns verwendete Färbereagens GelStar ist unter unseren Bedingungen 5-10 Mal empfindlicher.

Wichtig ist immer, dass bei jedem Reaktionsansatz Kontrollreaktionen mitgeführt werden. Die Positivkontrolle gibt Auskunft, ob die Reaktion generell zuverlässig abgelaufen ist, die Negativkontrolle gibt Auskunft darüber, ob man sauber gearbeitet hat.

Auf Basis einschlägiger Fachliteratur und der begleitenden praktischen Versuche lässt sich schlussfolgern, dass die PCR in der Praxis eine sehr empfindliche Nachweismethode zum Nachweis von genetisch verändertem Material ist, der eine saubere und exakte Durchführung zu Grunde liegt. Es müssen viele Regeln beachtet werden, um genaue Ergebnisse zu erhalten.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Technikerarbeit werden anhand einschlägiger Fachliteratur und eigener Experimente mit gvMais die Bedeutung und die entstehenden Komplikationen bei der PCR-Analyse von gvLebensmitteln besprochen. Verschiedene Proben des Bt-Gens Cry1a wurden laboranalytisch untersucht. Es handelt sich um jenes Gen, welches in genetisch verändertem Mais vorkommt und vor Schädlingsbefall schützen soll. Die Polymerase-Kettenreaktion ist die empfindlichste Methode zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln. Diese Empfindlichkeit ist zugleich der Grund für die Störanfälligkeit der PCR, vor allem bei ungeübten Experimentatoren. Die Anwendung dieser Methode wird am Beispiel des Nachweises von transgenem Mais besprochen. Diese Studie konzentriert sich auf die wichtigsten Probleme, die bei der Durchführung von PCR-Reaktionen auftreten können. In Bezug auf gvMais-Nachweise ist die PCR die in der Praxis am meisten angewandte Methode, speziell aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit. Ihre extreme Empfindlichkeit ist zugleich auch ihr größtes Problem in der Praxis. Kleinste Verunreinigungen, die durch Aerosole oder Staubpartikel hervorgerufen werden können, führen leicht zu falschen Resultaten. Das Risiko falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse lässt sich durch umfangreiche Vorsichtsmaßnahmen minimieren, dies wird in der Diskussion in dieser Arbeit genauer besprochen. Wichtig ist immer, dass bei jedem Reaktionsansatz Kontrollreaktionen mitgeführt werden, um genaue Ergebnisse zu erhalten. Die Positivkontrolle gibt Auskunft, ob die Reaktion generell zuverlässig abgelaufen ist, die Negativkontrolle gibt Auskunft darüber, ob man sauber gearbeitet hat. Akribische Arbeitstechniken sind bei der Durchführung der Reaktionen unerlässlich.

8. Summary

The objective of the present study was to investigate pitfalls of the polymerase chain reaction (PCR). Hands-on experiments, recent publications, and relevant technical literature are utilized in this thesis. PCR is the most sensitive method to detect genetically modified food contamination. This study focuses on most relevant problems connected with the PCR technique. Different samples of the specific bt-maize-fragment Cry1a were examined in terms of sensitivity and susceptibility for adverse reactions of the polymerase chain reaction. The Cry1a mutation was created in order to protect maize from pests. The biggest advantage of the PCR-analysis, its extreme sensitivity, is responsible for the biggest occurring problems in practical application by lay people. The smallest impurities, for example aerosols caused by pipetting, dust particles, and contaminations with only one false molecule can cause false results. The risks of false positive or false negative results can be minimized by various precautions, which are discussed in detail in this study. Control reactions must always be included to obtain reliable results. The positive control allows us to see whether the reaction has worked, and the negative control shows that the method was conducted correctly. Most important is to work precisely and to avoid contaminations of any kind.

9. Glossar

Aerosole:

Kleinste Minitröpfchen in der Luft. Sie bestehen aus einem Gemisch aus festen oder flüssigen Schwebeteilchen

Bacillus Thuringiensis (bt):

Bodenbakterium, das für Fraßinsekten ein giftiges Kristallprotein bildet. Es wird als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel eingesetzt

Basen:

Bausteine der Nukleinsäuren DNA und RNA

Chromosom:

Träger der Erbinformationen im Zellkern

DNA:

(Engl. Desoxiribonucleotidacid) In allen Lebewesen vorkommendes Biomolekül. Trägerin der Erbinformationen

Elektrophorese:

Methode zur Trennung von Molekülgemischen; die Elektrophorese liefert das typische Bandenmuster, mit denen das Vorhandensein bestimmter Gene sichtbar gemacht wird

Enzyme:

Sind Eiweißstoffe, die als Biokatalysatoren chemische Reaktionen in biologischen Systemen bewirken

Gen:

Definierter Abschnitt der DNA und Träger der Erbinformationen. Gene enthalten die verschlüsselte Information zur Herstellung von RNA

Genom:

Gesamtheit der Erbinformationen in einer Zelle

GVO:

Gentechnisch veränderte Organismen

In Vitro:

Bezeichnet Vorgänge außerhalb des lebenden Organismus

Maiszünsler:

Wirtschaftlich bedeutender Maisschädling

Nukleotide:

Kleinste Bausteine der DNA

Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Verfahren mit dem in einer Kettenreaktion kleinste Mengen eines DNA-Abschnitts vervielfältigt werden können

Plasmide:

In Bakterien vorkommende kleine DNA-Moleküle, sie werden unter natürlichen Bedingungen zwischen verschiedenen Zellen ausgetauscht

Primer:

Kurzes DNA-Stück, das für den Nachweis von bestimmten DNA-Abschnitten mit der PCR erforderlich ist

Proteine (Eiweißstoffe):

Aus Aminosäuren aufgebaute Moleküle, verantwortlich für die Struktur und Funktion einer jeder lebenden Zelle

RNA:

Abkürzung für Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleacid), wichtige Substanz für die Umsetzung der Erbinformation

Rückverfolgbarkeit:

Möglichkeit gentechnisch veränderte Produkte über die gesamte Vertriebs- und Produktionskette zurückverfolgen zu können

Taq-Polymerase

Thermostabiles Enzym, es dient zum Kopieren eines festgelegten DNA-Abschnitts bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Transgen:

Gen, das mit gentechnischen Verfahren in das Erbgut eines Organismus einer anderen Art eingebracht wurde.

Transkription:

Der erste Schritt bei der Übermittlung der Erbinformation

Begriffe von:

(DAS HUMANOGENPROJEKT, AUSGABE JANUAR 2003, z.T. verändert)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Maiszünsler und Maiszünslerlarve

Abb. 2: Bt-Mais und konventioneller Mais

Abb. 3: Zünslerschäden auf einem Maisfeld

Abb. 4: Anzahl der Anbau-Standorte für Bt-Mais in Deutschland

Abb. 5: Anbaufläche in Hektar für Bt-Mais in Deutschland

Abb. 6: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Abb. 7: Darstellung einer 1Kb Plus DNA-Leiter

Abb. 8: Mais-PCR #1

Abb. 9: Mais-PCR #2

Abb. 10: Nachweisgrenze der PCR

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Anzahl der Zyklen im Verhältnis zur Anzahl der DNA-Ziel-Bereiche
(Fragmente)

Tab. 2: Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR

Tab. 3: Verwendetes Thermocycler-Temperaturprogramm für Bt-Mais

Tab. 4: Mögliche Kontaminationsquellen bei der PCR

Quellenverzeichnis

ANONYM (2006): Warum Gentechnik? Dialog<>Gentechnik.

<http://www.dialoggentechnik.at/?id=10011150&UIN=97fe026233e8b4c10da398f002b5e2fc>

ANONYM (2009): Bt-Mais. Agenda21-Treffpunkt.

<http://www.agenda21-treffpunkt.de/lexikon/Bt-Mais.htm>

ANONYM (2009): Bacillus Thuriengiensis: Die Karriere eines Bakteriums.

Bundesverband Verbraucher Initiative e.V. (Gentechnik).

<http://www.biosicherheit.de/de/mais/bt-konzept/552.doku.html>

ANONYM (2009): Maiszünsler in Deutschland.

Bundesverband Verbraucher Initiative e.V. (Gentechnik).

<http://www.transgen.de/anbau/btkonzept/226.doku.html>

ANONYM (2009): Standortregister 2008.

Bundesverband Verbraucher Initiative e.V. (Gentechnik).

<http://www.transgen.de/aktuell/882.doku.html>

ANONYM (2009): Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit.

Bundesverband Verbraucher Initiative e.V. (Gentechnik).

<http://www.transgen.de/aktuell/archiv/44.doku.htm>

ANONYM (2009): Lexikon

Bundesverband Verbraucher Initiative e.V. (Gentechnik).

<http://www.transgen.de/lexikon>

ANONYM (2007): Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO). Europäische Gemeinschaft.

<http://europa.eu/scadplus/leg/de/lvb/l21170.htm>

ANONYM (2009): Gentechnik. Microsoft Encarta Online-Enzyklopädie
Gentechnik.

http://de.encarta.msn.com/encyclopedia_761557775/Gentechnik.html

EHLERS, B., E. STRAUCH, M. GOLTZ, D. KUBSCH, H. WAGNER, H. MAIDHOF, J. BENDIEK, B. APPEL UND H.-J. BUHK (1997): Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. Bundesgesundhbl. **4**, 118-121.

HAESE, A.; SCHNÖGL, S.; WADZACK J. (2003): Glossar. Das Humanogenprojekt. 3.Auflage. Druckpunkt Berlin, S. 28.

HUPFER, C., H. HOTZEL, K. SACHSE, AND K.H. ENGEL (1998): Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung a-Food Res. Technol. **206**: 203-207.

MAURER, J. (2006): The Mythology of PCR: A Warning to the Wise. PCR Methods in Foods. Springer, Heidelberg S. 28.

MÜLLER, H.-J. (2001): Einleitung; PCR-Matritze. PCR-Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum. Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin, S.1/7.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A.,ARNHEIM N., (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. Science. **230**:1350-1354.

SCHLIEPER, C. (2005): Gentechnik. Grundfragen der Ernährung. 18. Auflage. Verlag Dr. Felix Büchner, Hamburg, S.336.

Abbildungen:

BUNDESVERBAND VERBRAUCHER INITIATIVE E.V. (GENTECHNIK)

(2009):

Bt-Mais; Schäden durch Maiszünsler; Maiszünsler und Maiszünslerlarve.

<http://www.transgen.de/fotoarchiv/913.doku.html>,

SUMANAS, INC (2009):

The Polymerase Chain Reaction (PCR).

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>,

TIM REUTER (2003):

Nachweisgrenze der PCR.

<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/03/03H312/t5.pdf>

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Technikerarbeit selbstständig erstellt und keine anderen, als die genannten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, 27.04.2009

Christian Eckl

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. E. Hausmann für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, die mir wertvollen fachlichen Ratschlägen und stets hilfreicher Unterstützung auf wissenschaftlichem Gebiet zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, meiner Lebensgefährtin und meinen Freunden für ihre immer gewährte Hilfe und Unterstützung.