

Entwurf einer *Standard Operating Procedure (SOP)* für ein quantitatives ddPCR-System zum Nachweis einer Rapsmutante

Systemeigenschaften: Dieses System dient dem Nachweis einer durch CRISPR/Cas9 induzierten Mutation (+1 bp) des Anfälligkeitgens *BnCr1a* auf Chromosom A09 in der C3E3 Mutante, welche aus der Raps-Linie Mozart erzeugt wurde.

I.) DNA-Isolation

Die Isolation genomischer DNA für PCR Amplifikationen erfolgte mit dem GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) aus 100 mg frischem Blattmaterial nach Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und auf 100 ng/5 µl = 20 ng/µl eingestellt.

II.) Amplifikation der Zielregionen

Primer: CRT1 A09_fw 5'- AGG AAG GTG CGA TCT GAG TTT +C -3'
22-mer T_m: 58,5 °C % G/C: 50

CRT1 A09_rev 5'- CGC GAC GAG GCC GA +T -3'
15-mer T_m: 58,9 °C % G/C: 73

Sonde: CRT1 A09_WT-Sonde 5'-HEX-CAA CTT CAT CTC TC- BMN-Q535-MGB
15-mer T_m: 64,0 °C % G/C: 43

CRT1 A09_MT-Sonde 5'-6-FAM-CAA CTT TCA TCT CTC-BMN-Q535-MGB
16-mer T_m: 65,0 °C % G/C: 40

Amplikon: 101 bp

MasterMix (MM)

	Endkonzentration	Menge
2x Biorad	1x	10,00 µl
CRT1 A09_fw (100 µM)	900 nM	0,18 µl
CRT1 A09_rev (100 µM)	900 nM	0,18 µl
CRT1 A09_WT-Sonde (10 µM)	200 nM	0,40 µl
CRT1 A09_MT-Sonde (10 µM)	200 nM	0,40 µl
H ₂ O _{bideest}		3,84 µl
Total		15 µl

Reaktionsansatz: 15 µl MM + 5 µl Template (20 ng/µl)

PCR-Einstellungen

BioRad C1000 Touch

Fast-Modus:

95°C	10 min	}	45 Zyklen
94°C	30 sec		
60°C	1 min		
98°C	10 min		

III.) Datenauswertung

Nach dem Lauf erfolgt eine automatische Auswertung mit dem QX200-Reader und der QuantaSoft Software (Bio-Rad). Diese automatische Auswertung wird manuell überprüft. Die Quantifizierung kann freigegeben und ausgewertet werden, wenn:

- NTCs und Positiv-Kontrollen negativ bzw. positiv sind.
- Eine Übersättigung des Systems ausgeschlossen werden kann, d.h. auch negative Droplets vorhanden sind.

Bei der Bewertung der Proben werden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Homogenität der Einzelergebnisse einer Probe: übereinstimmende Kopienzahlen in den Doppelreaktionen
- Quantifizierungsergebnisse in der Regel auf eine Nachkommastelle runden
- die Bestimmungsgrenze (LOQ) ist üblicherweise 0,1 %
- Die Standardabweichung vom gemittelten Prozentanteil GMO/Spezies sollte in den vier Einzelergebnissen 30 % nicht übersteigen („Ausreißer“ können ggf. unberücksichtigt bleiben). Als Richtlinie für die Ergebnisdarstellung im Prüfbericht gilt eine Geräteabhängige Abweichung/Messunsicherheit von +/- 10-20 %. In Einzelfällen kann die Abweichung/Messunsicherheit größer oder kleiner berichtet werden. Die Abschätzung der Messunsicherheit erfolgt somit nur Geräte-spezifisch.

IV.) Leistungsmerkmale des Systems

Spezifität

Inklusivität und Exklusivität

Alle Reaktionen und NTCs wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Templatekonzentration für Target- und Non-Target-DNA betrug 1000 - 2000 Kopien genomische DNA/PCR-Ansatz.

DNA-Quantifizierung erfolgte vorzugsweise durch ddPCR oder aber Nano-Drop Messung (Eine Kopie Raps-Genom= 1,15 pg)

Spezies/GVO	Ref-Mat.-Nr.	Kopien WT-Raps	Kopien MUT-Raps	Rohdaten (Dateiname)
WT-Raps	Mozart-WT	1.304	nd	230418-01
		1.348	nd	
MUT-Raps	MT-C3E3	nd	1.146	230426-02
		nd	1.167	
nonGMO-Mais	NG-0094	nd	nd	230418-01
		nd	nd	
nonGMO-Soja	NG-0088	nd	nd	
		nd	nd	
Dinkel	PF-0690	nd	nd	
		nd	nd	
Reis	PF-0180	nd	nd	
		nd	nd	

Roggen	PF-0109	nd	nd	
		nd	nd	
Sonnenblume	PF-0806	nd	nd	
		nd	nd	
Weizen	PF-0113	nd	nd	
		nd	nd	
Weißer Senf	PF-0236	nd	nd	
		nd	nd	

Sensitivität und Nachweisgrenze (LOD)

20.000, 10.000, 1.000 und 100 Kopien DNA-Template/PCR-Ansatz wurden in Triplikaten in 100-200 ng Background-DNA (λ -DNA) und 20, 10 und 5 Kopien in 10ner-Replikaten in 100-200 ng Background-DNA (λ -DNA) unter Standardreaktionsbedingungen amplifiziert.

Spezies/GVO Kopien/PCR- Ansatz	Ref-Mat.-Nr.	Kopien WT Raps	Kopien MT Raps	Rohdaten (Dateiname)
20.000 K	Mozart WT	21.436	nd	230418-01
		24.722	nd	
		24.139	nd	
10.000 K		9.069	nd	
		12.386	nd	
		10.603	nd	
1.000 K		1.258	nd	
		1.259	nd	
		1.141	nd	
100 K		137	nd	
		167	nd	
		129	nd	
20 K		27	nd	
		23	nd	
		39	nd	
		26	nd	
		29	nd	
		36	nd	
		35	nd	
		50	nd	
10 K	25	nd		
	34	nd		
	22	nd		
	11	nd		
	7	nd		
	34	nd		
	32	nd		
	26	nd		
5 K	11	nd		
	13	nd		
	13	nd		
	21	nd		
		9	nd	
		7	nd	

		5	nd	
		19	nd	
		1	nd	
		20	nd	
		7	nd	
		5	nd	
		15	nd	
		10	nd	

Spezies/GVO Kopien/PCR- Ansatz	Ref-Mat.-Nr.	Kopien WT Raps	Kopien MT Raps	Rohdaten (Dateiname)
20.000 K	MT C3E3	nd	22.660	230426-02
		nd	22.142	
		nd	21.781	
10.000 K		nd	11.283	
		nd	11.054	
		nd	11.186	
1.000 K		nd	1.120	
		nd	988	
		nd	1.025	
100 K		nd	104	
		nd	113	
		nd	118	
20 K		nd	14	
		nd	17	
		nd	22	
		nd	20	
		nd	18	
		nd	18	
		nd	25	
		nd	19	
		nd	16	
		nd	17	
10 K		nd	10	
		nd	9	
		nd	8	
		nd	13	
		nd	8	
		nd	5	
		nd	11	
		nd	5	
	nd	11		
	nd	14		
5 K	nd	1		
	nd	6		
	nd	9		
	nd	6		
	nd	2		
	nd	6		
	nd	10		
	nd	3		
	nd	4		
	nd	7		

Die Nachweisgrenzen für den WT Mozart und die C3E3 Mutante liegen jeweils > 5 Kopien/PCR-Ansatz (230418-01 & 230426-02).

Selektivität

Die Selektivität wurde unter asymmetrischen Bedingungen bestimmt. Dazu wurden 5 Kopien Target-DNA des 1. Systems in 5.000 Kopien Target-DNA des 2. Systems und umgekehrt in Hexa-Replikaten analysiert.

Kopien Target-DNA 1. System pro PCR-Ansatz	Kopien Target-DNA 2. System pro PCR-Ansatz	Kopien 1. System (MT)	Kopien 2. System (WT)	Rohdaten (Dateiname)
5.000 K	5 K	5.658	4	230503-01
		5.842	2	
		5.436	9	
		5.619	7	
		5.643	9	
		5.409	4	
5 K	5.000 K	4	6.113	
		7	6.615	
		3	6.238	
		6	6.673	
		5	6.718	
		3	7.081	

Robustheit

Für die Überprüfung der Robustheit wurde ein multifaktorielles Versuchsdesign mit orthogonaler Struktur gemäß folgender Tabelle gewählt:

PCR-Gerät System	A				B			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Primer-Konzentration	uv	-30%	uv	-30%	uv	-30%	uv	-30%
Sonden-Konzentration	uv	-30%	-30%	uv	-30%	uv	uv	-30%
Mastermix-Volumen	14 µl	14 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	14 µl	14 µl
Annealing-Temperatur	+1°C	-1°C	+1°C	-1°C	-1°C	+1°C	-1°C	+1°C

uv: unverändert

Die Messungen wurden in Triplikaten bei 3-facher LOD, d.h. 20 Kopien Target-DNA/5 µl durchgeführt und die erhaltenen Kopie-Werte wie folgt dokumentiert:

Raps WT:

PCR-Gerät	A				B			
System	1	2	3	4	1	2	3	4
Triplikation	22	27	22	25	23	22	32	24
	29	32	29	22	34	27	38	32
	26	28	36	21	29	31	36	28
Durchschnitt	26	29	29	23	29	27	35	28
Dateiname	230424-01 & 230424-04				230424-02 & 230424-05			

Raps MT:

PCR-Gerät	A				B			
System	1	2	3	4	1	2	3	4
Triplikation	22	37	33	24	26	29	29	50
	27	24	20	21	21	28	28	19
	35	25	17	28	27	28	36	16
Durchschnitt	28	29	24	24	25	28	31	28
Dateiname	230424-01 & 230424-04				230424-02 & 230424-05			

Das System gilt als ausreichend robust, wenn auch bei veränderten Bedingungen alle Ansätze eindeutig positive Ergebnisse liefern.