

Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR

Von B. Ehlers, E. Strauch, M. Goltz, D. Kubsch, H. Wagner, H. Maidhof, J. Bendiek, B. Appel und H.-J. Buhk

Zusammenfassung

Ein PCR-Nachweis für gentechnisch veränderten Mais »Event 176« der Fa. Ciba-Geigy wurde etabliert. Der Mais enthält Gene, die Selbstschutz gegen den Maiszünsler (Delta-Endotoxin-Gen aus *Bacillus thuringiensis*) und Toleranz gegen das Herbizid Basta (Phosphinothricin-Resistenz-Gen aus *Streptomyces hygrosopicus*) vermitteln. Zudem enthält der Mais ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Für die Amplifikation von Bereichen aus allen drei Genen wurden PCR-Primer entworfen. Mit Hilfe dieser Primer und mit »Event 176«-Mais-DNA als Template konnten die entsprechenden Genebereiche in der PCR amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden sequenziert, um ihre Identität zu bestätigen. Mit Hilfe der Delta-Endotoxin-PCR wurden, auch in Gegenwart von 10⁴fachem Überschuß nicht gentechnisch veränderter Mais-DNA, fünf haploide Genome der »Event 176«-DNA nachgewiesen.

Summary

Identification of genetically modified maize by PCR

A PCR-test for the genetically modified maize »Event 176« of Ciba-Geigy was established. The maize contains genes conferring resistance to the European corn borer (delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*) and tolerance to the herbicide Basta (phosphinothricin resistance gene from *Streptomyces hygrosopicus*). The maize contains also an ampicillin resistance gene. Primers were designed and using »Event 176«-maize-DNA as template internal regions of the three genes were amplified with PCR. The PCR products were sequenced to confirm their identity. Using the delta-endotoxin primers in PCR down to 5 haploid genomes of »Event 176«-DNA could be detected, even in the presence of a 10⁴fold excess of DNA from non-modified maize.

Resistenz gegen Schädlinge ist eine der Eigenschaften, die mit Hilfe gezielter genetischer Veränderungen in Nutzpflanzen eingebracht werden. Dem hier untersuchten Mais (»Event 176«) wurde von der Firma Ciba-Geigy mit dem *cryIA(b)*-Gen aus *Bacillus thuringiensis* ein Delta-Endotoxin-Gen übertragen, das einen Selbstschutz gegen den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) vermittelt. Zu Selektionszwecken wurde, zusammen mit dem *cryIA(b)*-Gen, ein Gen (*bar*) eingebracht, dessen Expression Toleranz gegen das Herbizid Basta vermittelt. Weiter wurde das β -Lactamase-Gen (*amp^R*) eingeführt, das aus dem Plasmid stammt, in dem die gentechnische Konstruktion zunächst in *Escherichia coli* erfolgte. Es kann in Bakterien Ampicillinresistenz bewirken. Das Plasmid wurde zur Transformation des Mais benutzt.

Dieser Mais wurde 1996 in den USA bereits auf ca. 0,5 % der Maisanbaufläche angebaut. Die Genehmigung zum uneingeschränkten Inverkehrbringen dieses Mais in der Europäischen Union wurde von der Firma Ciba-Geigy gemäß Richtlinie 90/220/EWG in Frankreich beantragt und nach Entscheidung durch

die EU-Kommission von der zuständigen französischen Behörde im Februar 1997 ausgesprochen.

Ziel einer Arbeitsgruppe im Fachbereich Genetik, Gentechnik des Robert Koch-Institutes war es, kurzfristig ein PCR-Verfahren zu etablieren, das einen spezifischen und hinreichend sensitiven Nachweis der gentechnischen Veränderungen erlaubt und es den für den Vollzug des Gentechnikgesetzes zuständigen Behörden ermöglicht, Überwachungsaufgaben durchzuführen.

Methode

Es wurden analysenreine, für die Molekularbiologie bestimmte Chemikalien (inklusive H₂O) und weitestgehend Einweg-Materialien verwendet. Glasgefäße und Mörser wurden autoklaviert. Sie sollten zudem durch Abflammen oder chemisch-physikalische Behandlung von DNA-Spuren befreit werden.

Die Aufarbeitung von gentechnisch verändertem Mais und nicht verändertem Mais erfolgte mit verschiedenen Geräten sowie zeitlich und räumlich getrennt, um Kreuzkontamination der Untersuchungsmaterialien zu verhin-

dern. In einem jeweils anderen räumlichen Bereich erfolgten das Ansetzen der PCR-Reaktionen sowie die Analysen der Amplifikate (Gelelektrophorese, Sequenzierung), um falsch-positive PCR-Signale durch Kontamination zu vermeiden.

DNA-Präparation

Die DNA-Präparation wurde durchgeführt in Anlehnung an: Dellaporta, S., »Plant DNA Miniprep and Microprep«, aus: Freeling, M., und Valbot, V. (Hrsg.): The Maize Handbook; Springer Verlag, 1994, S. 521.

Fünf bis sieben Maiskörner (ca. 1,7 g) wurden grob zerkleinert und nach Zugabe von 1 g Seesand und flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert. Das Maismehl-Sandgemisch wurde mit 7 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0; 65 °C) versetzt, 10 Min. bei 65 °C inkubiert, dann mit 2,5 ml 5M-Kaliumacetat-Lösung gemischt, 30 Min. im Eisbad inkubiert und 10 Min. bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand (ca. 7 ml) wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gemischt und

10 Min. bei 10 000 g zentrifugiert, das Sediment mit 80 % kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und aufgenommen in 1 ml Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA ; 60 °C). Nach 10 Min. im Eisbad wurde 10 Min. bei 10 000 g zentrifugiert und der Überstand mit 40 µg/ml RNase A (DNAse-frei) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach jeweils einmaliger Extraktion mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wurde der wässrige Überstand mit 0,7 ml 3M-Natriumacetat-Lösung pH 5,2 versetzt und mit TE-Puffer auf 7 ml aufgefüllt. Nach erneuter DNA-Fällung (s. o.) wurde das gewaschene und getrocknete Pellet in 250-500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde dann fluorometrisch bestimmt und die Reinheit der DNA mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Messung des UV-Spektrums überprüft.

Aus 1 g trockener Maiskörner wurden 40-60 µg DNA in Fragmenten von 10 bis > 50 kb Länge isoliert.

DNA, die ohne Extraktion mit organischen Lösungsmitteln isoliert wurde, ergab in der PCR vergleichbare Resultate.

PCR-Primer

Folgende Primer wurden entworfen (Tab. 1):

Delta-Endotoxin-Gen aus *Bacillus thuringiensis* (*cryIA(b)*-Gen: crystal protein gene): Die Sequenz des modifizierten Gens ist nicht veröffentlicht und wurde von der Firma Ciba-Geigy zur Verfügung gestellt. Es wurde ein

Primerpaar aus dem Bereich des Gens ausgewählt, der für das aktive, nach Trypsin-Verdau erhaltene insektizide Protein kodiert (Primer: *cryIA(b)*).

Phosphinothricin-Resistenzgen aus *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*-Gen): Von Ciba-Geigy wurde die Sequenz des verwendeten *bar*-Gens zur Verfügung gestellt. (a) Es wurde ein Primer-Paar ermittelt, das einen Teil der kodierenden Sequenz des *bar*-Gens amplifiziert (Primer: *bar*). (b) Die Expression des *bar*-Gens im gentechnisch veränderten Mais erfolgt vom 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus. Mittels publizierter Sequenzen (Genbank-Nr. A18053) wurde zusätzlich ein Primerpaar ausgewählt, das den Bereich des 35S-Promotors vor dem mRNA-Start sowie den N-terminalen Bereich des *bar*-Gens amplifiziert (Primer: 35S-*bar*).

Ampicillin-Resistenzgen aus dem Plasmid pUC19: Es wurde ein Primerpaar gewählt, das die Sequenz der kodierenden Region (861 bp) fast vollständig amplifiziert (828 bp); der Sense-Primer beginnt 12 bp nach dem 5'-Ende der kodierenden Region, der Antisense-Primer endet 21 bp vor dem 3'-Ende der kodierenden Region (Primer: *amp^R*).

Invertase-Gen aus Mais: Für Kontrollzwecke wurde das *ivr1*-Gen verwendet, das für eine Invertase kodiert (Genbank-Nr. U16123). Die amplifizierte Sequenz ist Teil des Exon 3 (Primer: *ivr1*).

Alle Primer wurden mit Hilfe des Programmes »Primer Premier Version 4.0« (Fa. Premier Biosoft International, Palo Alto; USA) ausgewählt und von Fa. Pharmacia bezogen.

PCR

Die DNA-Polymerase Amplitaq Gold™ (Fa. Perkin-Elmer) wurde verwendet, um das Ansetzen der PCR-Reaktionen bei Raumtemperatur zu ermöglichen und unspezifische Amplifikation vor dem Start der PCR zu verhindern. Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

1 Unit Amplitaq Gold™ DNA-Polymerase; 1/10 Vol. 10xPuffer (Fa. Perkin Elmer); 200 µM dNTP-Mix (Fa. Biometra); 1,25 mM MgCl₂; 5 % Dimethyl-Sulfoxid (DMSO, Fa. Sigma); je 0,5 µM Sense- und Antisense-Primer; n µl DNA-Lösung; H₂O (Fa. Fluka) ad 50 µl.

Die Ansätze wurden bis auf die Primer und die DNA-Lösung als Mastermix hergestellt. Zur Durchführung der PCR wurde ein »GeneAmp« PCR System 2400 Thermocycler (Fa. Perkin Elmer) mit folgenden Parametern eingesetzt:

- Aktivierung der Amplitaq Gold™ DNA-Polymerase und Denaturierung der DNA bei 95 °C /12 Min.;
- 42 Zyklen mit 95 °C/30 s (Denaturierung), 59 °C/30 s für die Gene 35S-*bar* und *amp^R* oder 64 °C/30 s für die Gene *ivr1*, *cryIA(b)* und *bar* (Annealing); 72 °C/30 s (Elongation);
- abschließende Elongation bei 72°C/10 Min.; bis zur Analyse der PCR-Produkte 4 °C.

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit 2 % Agarose in 2x TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat, pH 7,9, 1 mM EDTA) bei 5 V/cm.

Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden die PCR-Ansätze zunächst chromatografisch gereinigt, um PCR-Primer und Salze zu entfernen. Die Reinigung erfolgte über zentrifugierbare Chromatographiesäulen (»MicroSpin™ S-400 HR«, Fa. Pharmacia) nach Angaben des Herstellers.

Die Sequenzierung wurde als »Cycle-Sequencing« mit Farbstoff-markierten Terminatoren durchgeführt. Zur Anwendung kam der »Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit« (Applied Biosystems/Perkin-Elmer). Das Protokoll des Herstellers wurde geringfügig modifiziert: Für jede Sequenzreaktion wurden 30 ng PCR-Amplifikat, 4 pmol Primer und 6 ml »Terminator Ready Reaction Mix« eingesetzt und

Tabelle 1: Primersequenzen für die PCR

Gen	Primersequenz 5'→3' (sense/antisense)	Länge des PCR- Produktes (bp)
<i>ivr1</i>	CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C	226 ¹
<i>cryIA(b)</i>	ACC ATC AAC AGC CGC TAC AAC GAC C TGG GGA ACA GGC TCA CGA TGT CCA G	184 ¹
<i>bar</i>	GCA GGA ACC GCA GGA GTG GA AGC CCG ATG ACA GCG ACC AC	264 ¹
35S- <i>bar</i>	GCA CAA TCC CAC TAT CCT TCG C TCC GTC CAC TCC TGC GGT TC	ca. 365 ²
<i>amp^R</i>	CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CC GGC ACC TAT CTC AGC GAT CTG TCT A	828 ¹

1 Länge des PCR-Produktes gemäß Sequenzdaten der Firma Ciba-Geigy.

2 Länge des PCR-Produktes gemäß publizierter Sequenzen (CaMV; *bar*) errechnet und durch Teilsequenzierung ermittelt.

Wasser ad 20 ml Endvolumen zugegeben.

Die Sequenzreaktion erfolgte in einem Thermocycler des Typs »GeneAmp PCR System 2400« (Perkin-Elmer) unter folgenden Bedingungen: 2 Min. 30 s/96 °C, anschließend 25 Zyklen mit 10 s/96 °C (Denaturierung), 5 s/59 °C bzw. 64 °C (Annealing; Temperatur abhängig vom Primer) und 4 Min. 60 °C (Elongation).

Nach Ende der Sequenzreaktion wurde die DNA nach Angaben des Herstellers gefällt, einmal gewaschen und getrocknet. Die Proben wurden anschließend auf automatischen DNA-Sequenzierungs-Automaten des Typs »ABI Prism™ 373A und 310« (Fa. Applied Biosystems/Perkin-Elmer) elektrophoretisch aufgetrennt, erfaßt und analysiert. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde mittels der Software »MacAutoAssembler™« (Fa. Applied Biosystems/Perkin-Elmer) vorgenommen.

Ergebnisse

Untersucht wurden

- Körner der gentechnisch veränderten Maislinie »Event 176« (Fa. Ciba-Geigy) mit den ins Chromosom integrierten Genen *cryIA(b)*, *bar* und *amp^R*,
- Körner der nicht gentechnisch veränderten Ausgangsmaislinie CG00526 (Fa. Ciba-Geigy) sowie
- handelsüblicher Futtermais.

Mit DNA der Mais-Linie »Event 176« und den Primerpaaren *cryIA(b)*, *bar* und *amp^R* wurden Amplifikate erhalten, die die erwartete Größe (184 bp, 264 bp und 828 bp) hatten (Abb. 1). Mit dem Primerpaar 35S-*bar* wurde ein Amplifikat von ca. 375 bp erhalten. Weder mit Futtermais-DNA (Abb. 1) noch mit DNA der Ausgangslinie CG00526 (ohne Abb.) konnten diese Sequenzen amplifiziert werden. Die Kontroll-PCR (Nachweis des Invertase-Gens) erzeugte mit allen drei Mais-DNAs Amplifikate der erwarteten Größe (226 bp) und gleicher Intensität. Sequenzierung der Amplifikate ergab in allen Fällen, daß die gesuchten Genabschnitte in der PCR amplifiziert wurden.

Die Gene *cryIA(b)*, *bar* und *amp^R* wurden damit in DNA der Mais-Linie »Event 176« spezifisch nachgewiesen.

Die Sensitivität des oben gezeigten PCR-Nachweises wurde exemplarisch

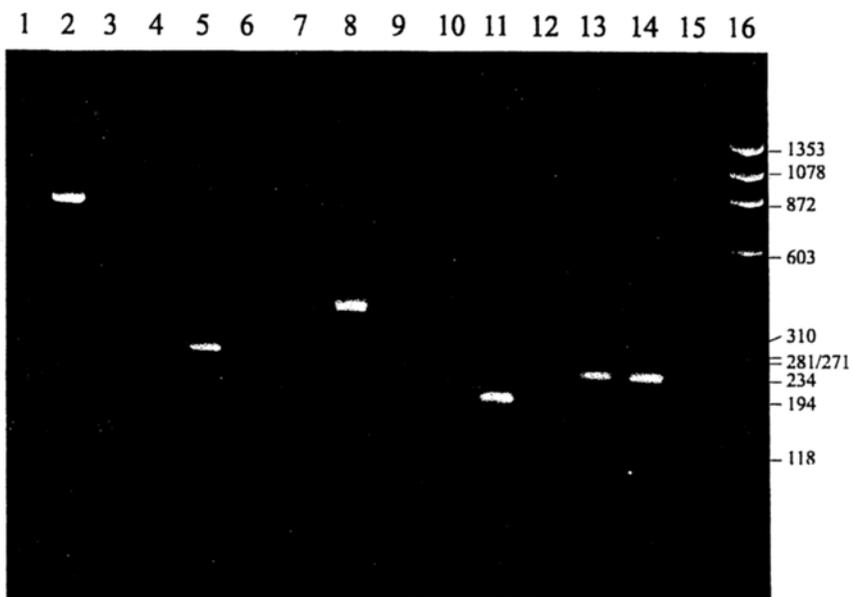


Abbildung 1: Nachweis des Delta-Endotoxin-Gens, des Phosphinothricin-Resistenz-Gens und des Ampicillin-Resistenz-Gens in gentechnisch verändertem Mais.

Als Template wurden 20 ng DNA verwendet. Dies entspricht ca. 10⁴ haploiden Maisgenomen. Spur 1, 4, 7, 10, 13: PCR mit Kontrollmais (Futtermais)-DNA; Spur 2, 5, 8, 11, 14: PCR »Event 176«-Mais-DNA; Spur 3, 6, 9, 12, 15: PCR ohne DNA; Spur 1-3: Primer *amp^R*; Spur 4-6: Primer *bar*; Spur 7-9: Primer 35S-*bar*; Spur 10-12: Primer *cryIA(b)*; Spur 13-15: Primer *ivr1*; Spur 16: Molekulargewichtsstandard (Bakteriophage PhiX, *HaeIII*-Verdau; 450 ng).

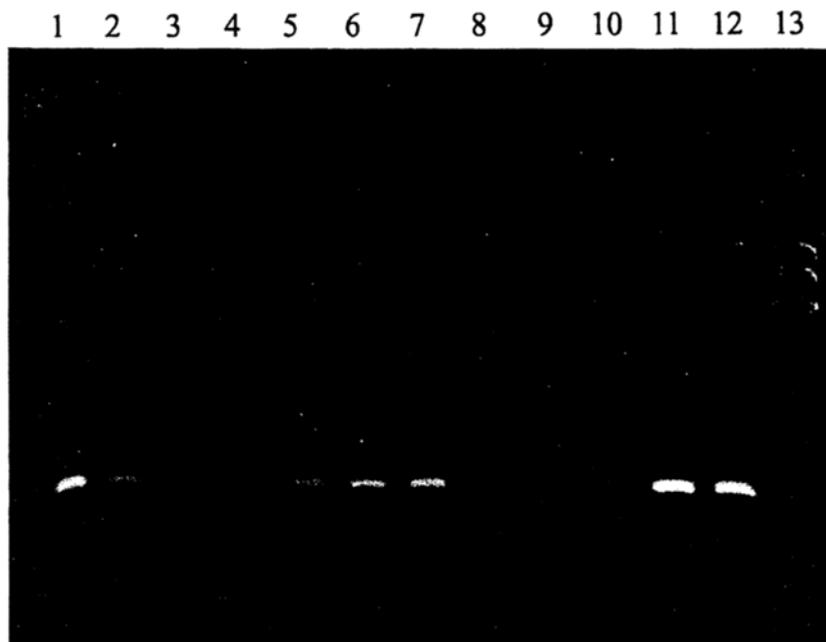


Abbildung 2: Nachweis des Delta-Endotoxin-Gens in DNA aus gentechnisch verändertem Mais (Mais-Linie »Event 176«), gemischt mit unterschiedlichen Mengen von DNA aus nicht gentechnisch verändertem Mais.

Als Template wurden 20 pg (Spur 1-4, 12) oder 10 pg (Spur 5-9, 11) »Event 176«-DNA verwendet. Dies entspricht ca. 10 bzw. 5 haploiden Maisgenomen. Amplifiziert wurde in Gegenwart von Kontroll-Mais-DNA: 20 ng, 100 ng, 200 ng, 1000 ng (Spur 1-4); 10 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng, 1000 ng (Spur 5-9). (Spur 10: kein Template; Spur 11, 12: ohne Kontroll-Mais-DNA; Spur 13: Molekulargewichtsstandard (Bakteriophage PhiX, *HaeIII*-Verdau; 450 ng).

mit dem Primerpaar *cryIA(b)* weiter untersucht. Ein deutliches und reproduzierbares PCR-Signal wurde noch mit 10 pg DNA erhalten (Abb. 2 Spur 11). Dies entspricht ca. fünf haploiden Maisgenomen.

Um abschätzen zu können, ob der Nachweis des *cryIA(b)*-Gens auch gelingt, wenn »Event 176«-Mais als Beimischung von unverändertem Mais vorliegt, wurde »Event 176«-Mais-DNA mit steigenden Mengen von DNA aus unverändertem Mais gemischt. Diese Mischungen wurden als Template in der PCR mit dem Primerpaar *cryIA(b)* verwendet. Abbildung 2 zeigt, daß der *cryIA(b)*-PCR-Nachweis noch an einer DNA-Mischung mit einem Mischungsverhältnis von 1 : 10 000 gelingt (Abb. 2, Spur 3 u. 7). Somit könnte der gentechnisch veränderte Mais auch dann noch identifiziert werden, wenn er lediglich als 0,01-%-Beimischung vorliegt.

Bei Mischungsverhältnissen von 1 : 50 000 (Spur 4 u. 8) sowie 1 : 100 000 (Spur 9) wurde kein PCR-Produkt mehr gefunden. Als Grund sind zu hohe absolute DNA-Konzentrationen (0,5 µg bzw. 1 µg) im PCR-Ansatz anzunehmen.

Zusammenfassung und Diskussion

Die Gene *cryIA(b)*, *bar* und *amp^R* wurden in DNA der Mais-Linie »Event 176« spezifisch und mit hoher Sensitivität nachgewiesen. Die für das Gen *cryIA(b)* erzielte Sensitivität entspricht einem Nachweis des gentechnisch veränderten »Event 176«-Mais in 10⁴fachem Überschuß von nicht gentechnisch verändertem Mais. An grünem Pflanzenmaterial wurde der PCR-Nachweis nicht durchgeführt. Es ist jedoch davon auszugehen, daß er hier ebenso einsetzbar ist.

Mit den verwendeten *amp^R*-Primern wurden 828 von 861 bp des *amp^R*-Gens amplifiziert. Es ist somit davon auszugehen, daß ein vollständiges *amp^R*-Gen in der gentechnisch veränderten Pflanze erhalten geblieben ist.

Die Überprüfung der Identität der PCR-Produkte wurde durch Bestimmung von Teilsequenzen vorgenommen, um eindeutige Resultate zu erhalten. Geeignete, technisch weniger aufwendige Alternativen sind Restriktionsverdau von PCR-Produkten mit nachfolgender gelelektrophoretischer Analyse der DNA-Fragmente oder Southern Blot-Hybridisierung mittels geeigneter Sonden.

Anschrift der Verfasser:

Dr. B. Ehlers, Dr. E. Strauch, Dr. M. Goltz, D. Kubsch, Dr. H. Wagner, Dr. H. Maidhof, Dr. J. Bendiek, Prof. Dr. B. Appel und Dr. H.-J. Buhk, Fachbereich Genetik, Gentechnik, Robert Koch-Institut, Postfach 65 02 80, 13302 Berlin