

Die Untersuchung von Pflanzen auf gentechnische Veränderungen

Probenahme und mögliche Nachweisstrategien

Hans-Ulrich Waiblinger

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg

Probenahme

Die derzeit nachzuweisenden gentechnisch veränderten Produkte sind pflanzlicher Herkunft. Viele Argumente sprechen dafür, auf gentechnische Veränderungen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Produktionskette, also beispielsweise nach der Ernte zu untersuchen. So ist die für den molekularbiologischen Nachweis aus dem Lebensmittel zu isolierende DNA in der Regel in großen Mengen und von guter Qualität anzutreffen. Bei stark verarbeiteten, komplex zusammengesetzten Produkten ist ein sensitiver Nachweis aufgrund der deutlich schlechteren DNA-Qualität, den geringeren Mengen an DNA der interessierenden Spezies oft nur schwer oder nicht mehr möglich. Außerdem beziehen sich die Grenzwerte für die Kennzeichnung auf die jeweilige Zutat, im Zweifel sind also die Zutaten bzw. Rohstoffe eines Lebensmittels zu untersuchen.

Getreidekörner oder Hülsenfrüchte wie Soja werden auf dem Weg von der Ernte zur Verarbeitung oft zu großen Chargen zusammengefasst. Bei „erntenahen“ Handels- bzw. Produktionsstufen können größere Inhomogenitäten bezüglich enthaltener gentechnisch veränderter (gv) Körner bestehen. Daher kommt der Probenahme bei der Untersuchung auf gentechnische Veränderungen eine sehr große Bedeutung zu. Einerseits ist die Zahl der Entnahmepunkte und der entnommenen Einzelproben der Chargengröße anzupassen. Andererseits sollte die Zahl der Partikel, die in der Laborprobe enthalten ist, ausreichend hoch sein. In einer technischen Spezifikation wird als Zielgröße für den Nachweis von gentechnisch veränderter Partikel (GVP) 10.000 Partikel angegeben [1]. Bei heterogen verteilten gv Körnern bzw. Partikeln mit einem erwarteten Anteil von 1 % ist dann von einem Probenahmefehler von etwa 20 % auszugehen (95% Wahrscheinlichkeit) [2]. Ausgehend von dieser Partikelzahl können in homogenen Chargen Anteile von 0,030 % an gv-Partikeln mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% detek-

tiert werden. Aufgrund des unterschiedlichen Tausendkorngewichts betragen die erforderlichen Laborprobengrößen für Maiskörner etwa 3 kg, für Raps dagegen nur 40 Gramm.

Nicht zugelassene GVO

Für nicht zugelassene gentechnisch veränderte Organismen (GVO) gilt die Nulltoleranz, d.h. selbst geringste Spuren sind nicht erlaubt. Liegen besondere Verdachtsmomente auf Kontamination durch nicht zugelassene GVO im sehr geringen Spurenbereich vor, ist ggf. die Größe der Laborprobe weiter zu erhöhen.

So hat die EU-Kommission aufgrund des Verdachts auf Verunreinigungen durch nicht zugelassene gv Reis empfohlen, aus einer Probe von 2,5 Kilogramm vier Teilproben à 240 Gramm (entsprechend je ca. 10.000 Körnern) zu entnehmen, diese separat zu untersuchen und die Probe bereits dann als positiv anzusehen, wenn eine der Teilproben ein positives Resultat liefert [3]. Durch diese „Sub-Sampling“ können somit auch Verunreinigungen an gv-Reis von deutlich unter 0,01 % mit hoher Wahrscheinlichkeit erfasst werden.

Die weitere Probenvorbereitung (d.h. die Homogenisation) bis hin zur Einwaage muss diesen Anforderungen ebenfalls angepasst sein. Gerade beim molekularbiologischen Nachweis wird häufig mit geringen Probenmengen unter 1 Gramm gearbeitet. Dies ist dann sinnvoll, wenn die Partikelgröße des homogenisierten Probenmaterials so gering und damit die Partikelzahl so hoch ist, dass die ursprüngliche Probe (10.000 oder mehr Körner oder Partikel) auch in einer geringen Einwaage repräsentiert ist, andernfalls ist die Probeneinwaage entsprechend zu erhöhen.

Nachweisstrategien

Prinzipiell kommen für den Nachweis zwei Strategien in Frage:

- Nachweis des **Phänotyps**, d.h. Nachweis der durch die gentechnische Veränderung

bewirkten neuen Eigenschaften bzw. neuen Inhaltsstoffe

- Nachweis des **Genotyps**, d.h. Nachweis der neu eingefügten bzw. veränderten DANN-Sequenzen

Nachweis des Phänotyps

Nachweis von neu gebildeten Proteinen

Durch die in das Genom neu eingefügte Erbsubstanz werden in der Regel neue Proteine gebildet (exprimiert), die bestimmte Eigenschaften vermitteln sollen. Eine Eigenschaft kann beispielsweise eine Herbizidresistenz, eine Farbe einer Blüte oder ein veränderter Fettsäurestoffwechsel sein. Insbesondere immunologische Verfahren, bei denen spezifische Antikörper direkt gegen das neue Protein gerichtet sind, bieten sich für einen sensitiven Nachweis an.

Eine Reihe von Immunoassays (ELISA-Tests) bzw. Lateral-flow-Schnelltests wurden dafür entwickelt und werden auch kommerziell zum Nachweis angeboten [4, 5]. Immunologische Tests zum Nachweis der verschiedenen Kristallproteine (cry) aus insektenresistenten Sorten, zum Nachweis der Enzyme Enol-Pyruvyl-shikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) bzw. Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) in herbizidresistenten Sorten sind im Einsatz. ELISA-Verfahren zum Nachweis des insektenresistenten Mais MON 810 (Cry1Ab-Protein) bzw. der herbizidresistenten Roundup Ready® Sojabohne (EPSPS-Protein) wurden erfolgreich im Ringversuch validiert, bei Mehlen wurde eine Sensitivität von ca. 0,1 bis 0,3 % erreicht [5].

Besonders bei der Ernte, d.h. unter Feldbedingungen, werden Streifen-Schnelltests (Lateral-flow bzw. Dip-Stick) verwendet. In Abbildung 1 ist exemplarisch ein solcher kommerziell angebotener Sandwich-Lateral-Flow-Streifentest dargestellt, der zum gleichzeitigen Nachweis folgender Proteine eingesetzt werden kann:

- CP4 EPSPS (z.B. NK 603 Mais, Roundup Ready® Soja)
- CRY3Bb (z.B. MON 863 Mais)
- CRY1Ab (z.B. Bt 11 oder MON 810-Mais)

Ein spezifischer monoklonaler Antikörper ist an kolloidales Gold gekoppelt ("Gold Pad"). Während der Testdurchführung wird das kolloidale Antikörper-Gold-Konjugat durch den Probenextrakt gelöst und aufgrund der Kapillarwirkung des Trägermaterials über weitere Bereiche mit immobilisierten spezifischen Antikörpern in Richtung Absorber transportiert. Die Ausbildung von Sandwich-Antigen-Antikörper-Komplexen an den vorgesehenen Stellen des Teststreifens zeigt das Vorhandensein der jeweiligen Proteine an. Die Nachweisgrenzen der Tests werden mit 0,1 bis 1% der jeweiligen GVP angegeben [5]. Allerdings sind der Verwendung solcher Tests Grenzen gesetzt:

- die Menge der exprimierten Proteine kann z.B. sorten- und standortabhängig schwanken;
- die Menge der exprimierten Proteine kann stark gewebeabhängig sein, so ist etwa das cry-Protein vor allen in den Blättern und nicht in den Körnern vorhanden;
- in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln können beim immunologischen Nachweis unspezifische Reaktionen und Matrixeffekte auftreten;
- bei erhitzten Lebensmitteln können, bedingt durch die Denaturierung der Proteine, Antigen-Antikörper-Reaktionen beeinträchtigt sein.

Solche Schnelltests dienen daher in erster Linie zur schnellen und kostengünstigen Erst-Kontrolle von Rohmaterialien bei der Ernte.

Nachweis sonstiger phänotypischer Merkmale

Der Nachweis der am häufigsten übertragenen Merkmale, nämlich der Insekten- bzw. Herbizidresistenz (z.B. durch Besprühen mit Herbizid), kommt allenfalls bei der intakten Pflanze, nicht aber im Lebensmittel in Frage. Im Falle einer veränderten Zusammensetzung wichtiger Inhaltsstoffe, wie etwa des Fettsäurespektrums bei laurinsäurereichem Raps, kommen chromatographische Verfahren wie GC oder LC/LC-MS in Frage. Allerdings unterliegen Parameter wie das Triglycerid-Spektrum natürlichen Schwankungen, weshalb quantitative Aussagen bzw. sensitive Untersuchungen i.d.R. nicht möglich sind.

Nachweis des Genotyps

Der Nachweis gentechnischer Veränderungen erfolgt heute überwiegend über den genotypischen Nachweis. Neu eingefügte bzw.

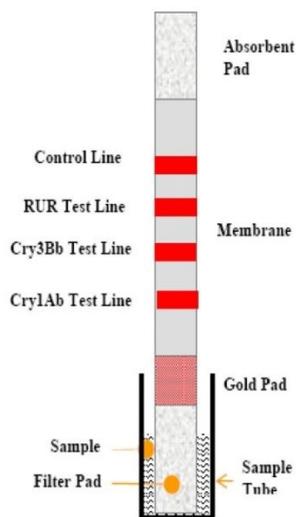


Abb. 1: Proteinbasierende Schnelltests, Beispiel eines kommerziellen Lateral flow-tests zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Kristallproteine (Cry) sowie des EPSPS-Proteins der Roundup Ready®(RUR) Sojabohne. Erläuterungen siehe Text.

Illustration of Positive and Negative Results



Example of test strip results (left to right)

- 1) Unreacted (left)
- 2) negative (non-GMO)
- 3) RUR positive
- 4) Cry3Bb positive
- 5) Cry1Ab positive
- 6) Cry3Bb and Cry1Ab positive
- 7) RUR, Cry3Bb and Cry1Ab positive

veränderte DNA-Sequenzen werden mittels molekularbiologischer Verfahren, in erster Linie basierend auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) detektiert. Bei der Auswahl der DNA-Sequenzen für den Nachweis von GVP in Pflanzen werden derzeit folgende Strategien unterschieden [4, 6]:

Screening-Verfahren

Damit der Wirtsorganismus die neue Eigenschaft überhaupt ausprägt, wird häufig nicht nur das Gen für die eigentliche Eigenschaft (Strukturgen) übertragen, sondern zusätzlich auch Vektorsequenzen, Reporter- oder Selektionsgene (z.B. Antibiotikaresistenz, nptII-Gen) und Sequenzen von Promotoren (35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus, P35S) und Terminatoren (NOS-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*, T-nos). Konstitutive Promotoren wie z.B. P35S werden häufig eingesetzt, um hohe Expressionsraten des neuen Gens zu gewährleisten. Marker- oder Reportergene werden häufig zusätzlich mit den Strukturgenen eingeschleust, damit die erfolgreich transformierten Pflanzenzellen leichter identifiziert werden können. In den meisten Fällen werden dafür Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene eingesetzt. Da diese Sequenzen in den unterschiedlichen gv Pflanzen gemeinsam vorkommen, eignen sie sich besonders für Screeningverfahren (siehe Abbildungen 2 und 3) [7].

Bei positiven Screening-Ergebnissen im Nachweis der P35S- bzw. T-nos Sequenz sind mögliche natürliche Kontaminationen durch das Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) bzw. *Agrobacterium tumefaciens* zu berücksichtigen. So sind Brassicaceen wie Raps häufig von einer natürlichen Infektion durch

CaMV betroffen. Durch einen Nachweis weiterer spezifischer DNA-Sequenzen der jeweiligen Organismen (z.B. aus CaMV [8]) kann beispielsweise auf eine solche Kontamination geprüft werden.

Erfahrungsgemäß kritisch zu hinterfragen sind positive Resultate, die im Screening auf Antibiotikaresistenzgene erhalten wurden, wie etwa nptII (vermittelt Resistenz gegen Neomycin/Kanamycin) oder bla (vermittelt Resistenz gegen Ampicillin). Derartige Resistenzgene sind mittlerweile in vielen ubiquitär vorhandenen Mikroorganismen nachweisbar. Außerdem können Klonierungsvektoren, etwa zur Herstellung von Polymerasen für den PCR-Nachweis, solche Sequenzen enthalten und diese auch in den Polymerase-Präparaten noch nachweisbar sein [9].

Dennoch sind Screening-Verfahren oft die einzig mögliche analytische Strategie bei der Untersuchung auf (in der EU) nicht-zugelassene GVP. Mangels detaillierter Sequenzinformationen und/oder geeigneter Kontrollproben stehen häufig keine weitergehenden Tests zur Verfügung.

Konstrukt-spezifische Verfahren

Zum eigentlichen Nachweis der gentechnischen Veränderung werden konstrukt-spezifische Verfahren eingesetzt. Hierbei werden überlappende Sequenzen aus DNA-Konstrukten (z.B. von Plasmidvektoren) nachgewiesen, die zur Veränderung von gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzt werden. Beispielsweise ist die Verknüpfung der P35S Sequenz (Herkunft Blumenkohlmosaikvirus) zum Herbizidresistenzgen bar (aus dem Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus*) (siehe Abbildung 2) so in der Natur

