

## Die Untersuchung von Pflanzen auf gentechnische Veränderungen

### Molekularbiologische Nachweisverfahren

Hans-Ulrich Waiblinger

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg

Molekularbiologische, DNA-basierende Methoden detektieren direkt die neu eingefügte DNA. DNA ist sehr stabil gegenüber Einflüssen wie Hitzebehandlung oder hohem Druck, zudem ist sie in jeder Gewebeart vorhanden. Deshalb kann ein weites Spektrum an Erzeugnissen, von den Rohstoffen bis hin zu verarbeiteten Lebensmitteln mittels DNA-Analyse untersucht werden. Allerdings kann bei erhitzten Produkten (z.B. Maischips), niedrigem pH (z.B. Tomatenpüree) oder sonstiger mechanischer Verarbeitung die DNA in degradiert (d.h. z.B. hydrolysiert oder depurinierter) Form vorliegen. Die Fragmentlänge der nachgewiesenen Sequenzen sollte daher insbesondere für den PCR-Nachweis so kurz gewählt werden, dass auch bei Vorliegen überwiegend kurzer DNA-Fragmente (z.B. < 300 bp) noch eine Amplifikation möglich ist [16].

#### DNA-Extraktion

Eine große Zahl von DNA-Extraktionsverfahren wurde inzwischen auch für den anschließenden Nachweis gentechnischer Veränderungen beschrieben, Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren bzw. einzelner Schritte der Extraktion miteinander verglichen [17]. Häufig werden zur Extraktion aus pflanzlichen Lebensmitteln CTAB-basierende Protokolle eingesetzt. Auch Verfahren der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB beschreiben entsprechende Methoden zur Extraktion aus Sojabohnen, Tomatenpüree oder Kartoffeln. Bestandteil des Schweizerischen Lebensmittelbuchs ist ein universell einzusetzendes Extraktionsverfahren, basierend auf DNA-Aufreinigung über Silica-Adsorptionsmatrices.

Amtliche Untersuchungsverfahren beschreiben zudem DNA-Extraktionsverfahren für Starterkulturen in Rohwürsten und Joghurt. All diese sowie noch weitere häufig zum Nachweis v.a. von GVP eingesetzten Methoden sind in der Norm EN 21571 zusammengestellt [18]. Speziell adaptierte Protokolle sind beispielsweise zur Extraktion von DNA

aus Lecithinen oder rohen Rapsölen [19] bzw. aus Pollen in Honigen [20] beschrieben. Die Qualität der extrahierten DNA für weitere quantitative Untersuchungen kann durch das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt werden; Richtwerte sind 1.8 für reine DNA und 2.0 für RNA. Die eigentliche Eignung der DNA für weitere Untersuchungen kann jedoch nur über nachfolgende molekularbiologische Analysen erfolgen [21].

Eine Möglichkeit der Überprüfung auf das Vorhandensein von Inhibitoren sind homologe oder heterologe Zusätze (Spiken) von Nukleinsäuren. Bei homologen Zusätzen werden Nukleinsäuren zugesetzt, welche in der Probe erwartet werden, bei heterologen Zusätzen werden Nukleinsäuren zugesetzt, welche in der Probenlösung nicht vorhanden sind. Für letzteren Zweck eignen sich z.B. spezielle Plasmide. Besonders für nachfolgende quantitative Untersuchungen wird die Eignung der DNA über die Amplifikation spezies-spezifischer DNA-Sequenzen mittels real-time PCR überprüft.

In Abbildung 1 ist die graphische Auswertung eines Tests auf Inhibitoren mittels DNA-Verdünnungsreihe am Beispiel von Sojalecithin dargestellt [22]. Größere Abweichungen z.B. > 0,5 des extrapolierten Ct-Wertes vom gemessenen Ct-Wert der unverdünnten DNA deuten auf Inhibition hin. Die mengenmäßige Abschätzung amplifizierbarer Spezies-DNA mittels real-time PCR gibt Aufschluss, ob die DNA tatsächlich für einen ausreichend sensitiven Nachweis bzw. eine Quantifizierung gentechnischer Veränderungen geeignet ist [22] (praktische Nachweisgrenze, s. unten).

#### Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Methoden auf Basis der PCR werden bei der Untersuchung auf gentechnische Veränderungen weitaus am häufigsten eingesetzt. Auch sind Verfahren auf Basis der Endpunkt-PCR und der Real-time PCR in vielen Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen erprobt worden. Entsprechende

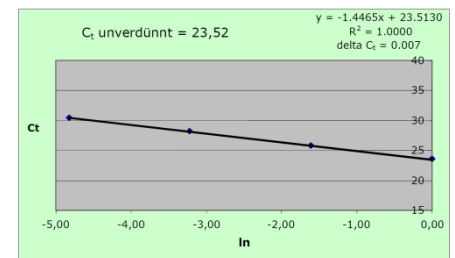


Abb. 1: Überprüfung der DNA-Extraktion auf Inhibition mittels Verdünnungsreihe [21]. Verdünnungsreihe eines DNA-Extraktes aus Sojalecithin (1+4, 1+24 and 1+124). Ct-Werte aus der Amplifikation einer Soja-Lectin-Gen-Sequenz mittels Real-time PCR (y-Achse) sind gegen den natürlichen Logarithmus (ln) des jeweiligen Verdünnungsfaktors aufgetragen (0,2, 0,04 bzw. 0,008). Der über Extrapolation der Geraden zur y-Achse erhaltene Ct-Wert wird mit dem Messwert der unverdünnten DNA verglichen (delta Ct).

Methoden in europäischen (EN) und internationalen (ISO) Normen beschrieben [8, 23,24].

#### Endpunkt PCR (Qualitative PCR)

Bereits 1995 wurde ein erstes Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Tomaten (sogenannte Flavr Savr Tomate) mittels PCR veröffentlicht [25]. Erste Verfahren zum Screening auf die P35S-, die T-nos und die *nptII*-Sequenz [9] sowie zum konstruktsspezifischen Nachweis, etwa von gentechnisch verändertem Mais Bt176 oder der Roundup Ready® Sojabohne (RRS) wurden beschrieben [26, 27] (siehe auch Artikel „**Probenahme und mögliche Nachweisstrategien**“) und validiert [23]. Die Verfahren beruhen auf der qualitativen PCR (= Endpunkt-PCR), die Detektion erfolgt in der Regel mittels Ethidiumbromid nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel.

Um auch einen Nachweis in erhitzten oder anderweitig prozessierten Lebensmitteln zu ermöglichen, wird die Fragmentgröße der

Zielsequenzen für den Nachweis möglichst gering gewählt, i.d. R. deutlich unter 200 bp, im Idealfall zwischen 60 und 150 bp [23]. In Abbildung 2 ist beispielhaft der Nachweis von RRS in Sojalecithin dargestellt [19]. Es ist erkennbar, dass auch aus Sojalecithinen noch für Soja (links, Bahnen 2 bis 4) und auch für gentechnisch veränderte Soja (rechts, Bahnen 3 und 4) charakteristische Fragmente amplifiziert werden können. Bei negativen Befunden (rechts, Bahnen 2 und 5) ist allerdings keine Aussage möglich, ob das Erzeugnis nicht kennzeichnungspflichtig im Sinne der EU-Verordnungen 1829/2003 bzw. 1830/2003 ist. Danach können nur Anteile unter 0,9 % von einer Kennzeichnung befreit werden. Auch ist im Falle eines Nachweises von Soja-DNA (links, Bahnen 2 bis 4) in den Lecithinen nicht gewährleistet, dass ein sensitiver Nachweis von RRS-Anteilen unter 0,9 % überhaupt möglich ist. Dies kann allein anhand von quantitativen Methoden erfolgen, bei denen auch die Menge an amplifizierbarer Spezies-DNA bestimmt wird (s.u.).

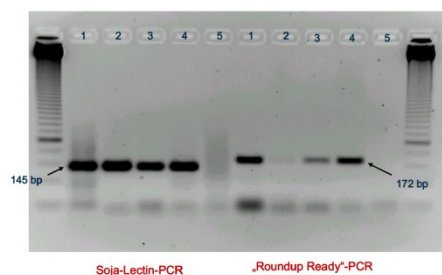


Abb. 2: Qualitative (=Endpunkt)-PCR zum Nachweis gentechnisch veränderter Soja in Sojalecithin [19]. Agarosegel-Elektrophorese nach Amplifikation eines 145 bp Abschnitts des Soja-Lectin-Gens (Amplifikationskontrolle der extrahierten DNA) (links) bzw. einer für das Roundup-Ready®-Soja (RRS)-Konstrukt spezifischen Sequenz (172 bp) (rechts).

Links und rechts außen: 50-bp-Leiter; 1 = Positivkontrolle (1% RRS, Matrix Sojamehl), 2-5 = Rohlecithin-Proben.

## Qualitätssicherung

### Allgemein

Die Anforderungen an die Durchführung und Auswertung von PCR-Untersuchungen zum Nachweis gentechnischer Veränderungen sind in internationalen Normen beschrieben [8, 23]. Dazu zählen allgemeine Anforderungen an die Labor-Organisation (Einbahnstraßen-Prinzip, Untersuchungsschritte in mindestens drei separaten Arbeitsbereichen: Extraktion / PCR-Setup / post-PCR) instrumentelle und personelle Anforderungen (z.B. Laborkleidung). Ergebnisse beruhen auf der Untersuchung zweier separater Analysenproben, beginnend bei der Einwaage [8].

### Kontrollen

Weiterhin sind in jeder PCR Kontrollen mitzuführen: Positiv-Kontrollen (z.B. genomische oder Plasmid-DNA mit der nachzuweisenden Sequenz) werden zur Sicherstellung der Sensitivität des Nachweises in möglichst niedrigen Konzentrationen eingesetzt. Amplifikationskontrollen der Proben-DNA, in der Regel über einen separaten PCR-Nachweis speziespezifischer Sequenzen (siehe auch Abbildung 2, links), dienen der Überprüfung der Eignung der extrahierten DNA für die weitere Analytik. Für eine Inhibitionskontrolle wird die Proben-DNA in unterschiedlichen (mindestens 2) Konzentrationen auf mögliche Inhibitionen überprüft. Alternativ oder zusätzlich kann sie mit DNA der nachzuweisenden Sequenz oder einer internen Positiv-Kontrolle „gespikt“ werden. Unerlässliche Negativ-Kontrollen sind Extraktionskontrollen (Extraktionsleerwert anstelle von Proben-DNA) und die PCR Reagenzienkontrolle (Wasser anstelle von Proben-DNA) [8].

### Auswertung

Entsprechend den Vorgaben [23] sind erhaltene Amplifikate – zusätzlich zum Vergleich ihrer Fragmentlänge mit der Positivkontrolle im Agarosegel – zu verifizieren. Dazu kann eine Sondenhybridisierung, Restriktionsanalyse oder eine Sequenzierung herangezogen werden. Diese teilweise recht aufwändige Bestätigung ist bei Verwendung von real-time PCR Verfahren nicht erforderlich, da die dort zusätzlich benötigten Fluoreszenz-markierten Sonden den entsprechenden Spezifitätsgewinn des Nachweises mit sich bringen.

### Semiquantitative Analytik mittels kompetitiver PCR

Besonders vor der Verbreitung der real-time PCR wurde als Endpunkt-PCR-Verfahren die kompetitive PCR zur semiquantitativen Abschätzung des Anteils gentechnischer Veränderungen eingesetzt [28]. Als Kompetitor wird in der Regel Plasmid-DNA eingesetzt, welche dieselben Primerbindungsstellen wie das Zielfragment aufweist, sich von diesem aber in der Größe unterscheidet. Die Ziel-DNA aus der Probe wird in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit dem in bekannten Konzentrationen zugegebenen Kompetitor koamplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung ermittelt man die Verdünnungsstufe der Proben-DNA, bei der annähernd gleiche Intensität der Banden vorliegen (siehe Abbildung 3). Für eine semiquantitative Bestimmung des Anteils gentechnischer Veränderungen sind doppelt kompetitive PCR-Untersuchungen für die spezies-spezifische und die GVO-spezifische Sequenz erforderlich. Nicht zuletzt aufgrund ihres

deutlich erhöhten Arbeitsaufwandes und ihres eher semiquantitativen Charakters wird die Methode seit Einführung der real-time PCR in der Praxis der GVO-Analytik kaum mehr angewendet.

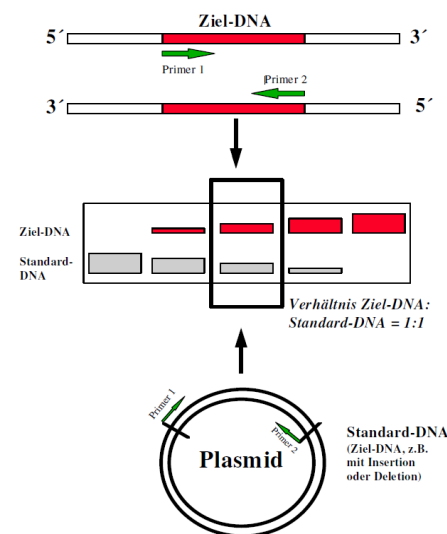


Abb. 3: Prinzip der kompetitiven PCR.

Die Ziel-DNA aus der Probe wird in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit dem in bekannten Konzentrationen zugegebenen Kompetitor (Plasmid = Standard-DNA) koamplifiziert. Nach Gelelektrophoretischer Auftrennung ermittelt man die Verdünnungsstufe der Proben-DNA, bei der annähernd gleiche Intensität der Banden vorliegen.

### Nachweis und Quantifizierung mittels real-time PCR

Die heute meist angewendete Methode in der GVO Analytik ist die real-time PCR. Vorteile gegenüber der Endpunkt-PCR sind die Möglichkeit der Quantifizierung, der Vermeidung von Kontaminationen durch simultane Amplifikation und Detektion – ohne Notwendigkeit der Öffnung des Reaktionsgefäßes – sowie die in der Reaktion beinhaltete Verifizierung mittels Fluoreszenz-markierten Sonden. Zum Prinzip der real-time PCR wird auf entsprechende Literatur verwiesen.

### Prinzip der Quantifizierung

In Abbildung 4 ist das Prinzip der Quantifizierung gentechnischer Veränderungen mittels real-time PCR am Beispiel der Roundup Ready® Soja (RRS) dargestellt und erläutert. Das erhaltene Ergebnis wird immer aus dem Verhältnis der Ergebnisse der Quantifizierung einer spezies-spezifischen und einer transgenspezifischen Sequenz berechnet.

## Qualitätssicherung

Die obigen Ausführungen zu qualitätssichernden Maßnahmen bei der Endpunkt-PCR gelten auch für die real-time PCR [8], zusätzlich werden weitere Kontrollen mitgeführt: Als Positivkontrolle dient eine Standardreihe aus genomischer oder Plasmid-DNA, ggf. können auch Hybrid-Amplikons verwendet werden [16]. Qualitätskontrollproben mit bekanntem GVO-Gehalt können, zumindest in der PCR oder auch in der kompletten Analyse, mitgeführt werden.

## Messgröße haploide Genomkopien

Als Messgröße für die Quantifizierung in den einzelnen Reaktionen werden zweckmäßigerweise zumeist Genomkopien verwendet, die man im Falle genomischer DNA durch Umrechnung aus den Literaturwerten für die haploiden Genomgewichte [30] erhält. Allerdings stützt sich eine solche Umrechnung auf Kopienzahlen auf verschiedene Annahmen. So wurde Referenzmaterial teilweise aus Material hergestellt, das heterozygot bezüglich des Transgens ist [31]. Weiterhin kann die Integrationshäufigkeit der transgenen Sequenz pro Genom je nach Transformationsevent unterschiedlich sein. Überdies können Gewebetypen von Körnern bzw. Samen unterschiedlich genetisch zusammengesetzt sein [32].

So bestehen Maiskörner beispielsweise aus 80-90 % Endosperm, welches triploid ist (2 mütterliche, ein väterliches Genom), die übrigen Gewebe, nämlich Embryo (je ein mütterliches und väterliches Genom) und Samenschale (zwei mütterliche Genome) sind dagegen diploid. Körner von hetero- und homozygotem Mais, die für sich betrachtet jeweils als "100% GVO" anzusehen sind, können im Endosperm ein Verhältnis ihrer haploiden transgenen Genome zu den gesamten haploiden Genomen von 1/3 (Pollen transgen, nicht-transgene Mutterpflanze) über 2/3 (Pollen nicht transgen, Mutterpflanze transgen) bis 3/3 (Pollen und Mutterpflanze transgen) aufweisen [31]. Auch wurde bei Mais gezeigt, dass der DANN Anteil der einzelnen Gewebetypen je nach Varietät schwanken kann [32]. Zusammenfassend sind Bestimmungen der absoluten haploiden Genom-Kopienzahlen aus Mehl-Referenzmaterialien (Gewichtsprozent) als Schätzungen anzusehen.

Zur Quantifizierung gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln über das DNA-Verhältnis gibt es dennoch in Lebensmitteln keine sinnvolle Alternative, auch beruhen alle im Ringversuch bisher validierten Verfahren darauf. Mit einem zertifizierten Referenzmaterial als Bezugsgröße werden laborübergreifend reproduzierbare Ergebnisse mit

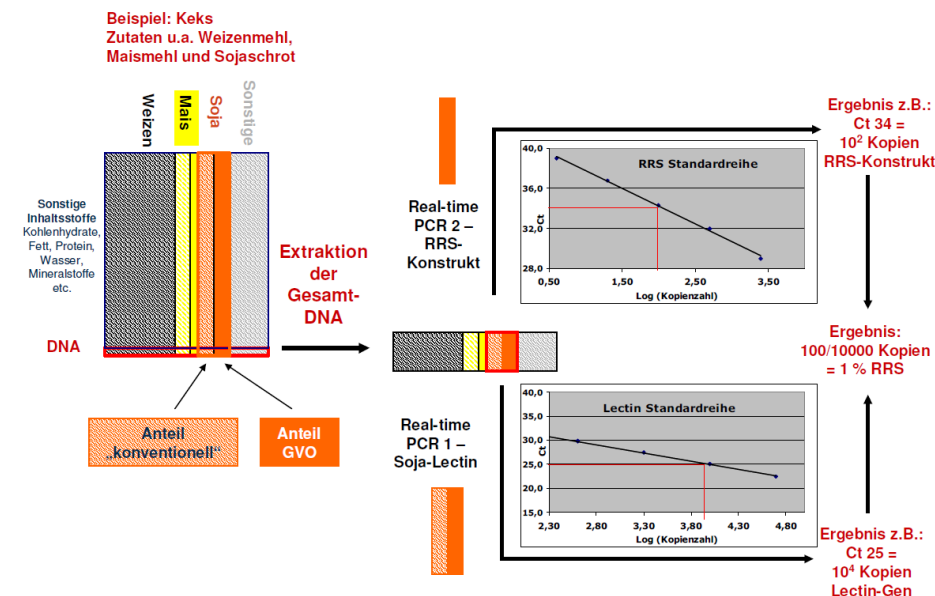


Abb. 4: Prinzip der Quantifizierung gentechnischer Veränderungen mittels Real-time PCR am Beispiel von Roundup Ready® Soja (RRS). Nach Extraktion der DNA des Lebensmittels wird diese in 2 parallelen real-time PCR Reaktionen untersucht. In Real-time PCR 1 wird als Referenz die Menge (als Genomäquivalente = Kopien) der spezies-spezifischen Soja-Lectin-Gensequenz, in real-time PCR 2 die Menge einer Sequenz aus dem für RRS spezifischen Konstrukts bestimmt. Für die Quantifizierung der Lectin bzw. RRS-Kopienzahl wird davon ausgegangen, dass in einem 100 % RRS-Standard die Lectin- und die RRS-spezifische Sequenz im Verhältnis 1:1 und jeweils als „single-copy“-Sequenzen einmal in jedem Genom vorkommen. Die Quantifizierung kann dann mittels DNA aus Referenz-Standards (z.B. Mehlen) erfolgen, die einen definierten Anteil an RRS aufweisen (z.B. 5 % RRS w/w). Die Referenz-DNA wird in verschiedenen Verdünnungsstufen, entsprechend einer Standardreihe für die Lectin- und die RRS-Sequenz untersucht. Die für die Proben-DNA jeweils erhaltenen Ct-Werte oder Crossing points werden über die jeweiligen Regressionsgeraden (Ct gegen logKopienzahl) Kopienzahlen zugeordnet. Die Kopienzahlen für die RRS- und die Lectin-Sequenz werden zueinander ins Verhältnis gesetzt. [11, 29].

guter Präzision erhalten. Besonders bei ganzen Körnern und Samen können mittels Quantifizierung über haploide Genomkopien Über- oder Unterschätzungen des „wahren Wertes“ in Gewichtsprozent bzw. in Prozent transgener Samen resultieren, etwa wenn heterozygotes Saatgut vorliegt und nur eine von 3 Genomkopien die transgene Sequenz enthält. Um den Anteil transgener Samen in Saatgut abzuschätzen, werden daher auch qualitative Verfahren mit statistischer Auswertung (Subsampling-Methoden) eingesetzt [33].

## Quantifizierung bei verarbeiteten Lebensmitteln / Referenzgene / Hybridsorten

Fehler bei der Quantifizierung gentechnischer Veränderungen mittels real-time PCR können insbesondere bei degradierter DNA entstehen, wenn die Länge der Zielsequenz von spezies-spezifischer und transgener Sequenz zu stark differiert [16]. Weiterhin sollte die Eignung der zur Quantifizierung des Referenz-Gens (Spezies) verwendeten Zielsequenz sorgfältig bewertet werden.

So wurden in einem Vergleich von vier real-time PCR-Verfahren zur Quantifizierung von

Mais-spezifischer DNA unterschiedlich starke, Mais-Varietäten-abhängige Streuungen der Ct-Werte beobachtet [34]. In letzter Zeit werden zunehmend jGVP angebaut und auch in der EU zugelassen, die hybride zweier oder mehrerer Transformationsevents sind. Z.B. weist die Maishybride NK603XMON810 sowohl Insekten- als auch Herbizidresistenz auf.

Eine analytische Differenzierung dieser sogenannten „stacked events“ von den zugrundeliegenden Einzel-Events ist nur auf Basis einer Untersuchung einzelner Körner bzw. Samen möglich. Im Rahmen des Zulassungsverfahrens werden daher zur Validierung die bestehenden Event-spezifischen Verfahren der Einzel-Events herangezogen und an den jeweiligen stacked events erprobt [35].

## Zulassungsverfahren und Event-spezifische Methoden

Nach den EU-Regelungen für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel [5] müssen Antragsteller im Rahmen des Zulassungsverfahrens sowohl Kontrollproben als auch Event-spezifische Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung der jeweiligen

GVP zur Verfügung stellen. Die Methoden werden im Rahmen des Europäischen Netzwerkes für GMO-Laboratorien (ENGL) auf ihre Eignung überprüft und validiert. Nach erfolgter Zulassung werden die Methoden über das „Molecular Register“ öffentlich zugänglich gemacht [35]. Referenzmaterialien sind über das Institute of Reference Materials and Measurement der EU-Kommission verfügbar [36].

### Validierungstudien und Anforderungen

Real-time PCR Verfahren zur Quantifizierung von GVP sind bereits in erheblicher Anzahl validiert worden. Event-spezifische Verfahren für zuzulassende GVP werden im Rahmen des ENGL validiert [35], daneben sind im Ringversuch validierte konstruktsspezifische in der Norm EN ISO 21570 [24] beschrieben. Die Validierung von real-time PCR-Verfahren zur Quantifizierung erfolgt möglichst anhand zertifizierter Referenzmaterialien sowie von Probenmaterialien mit definierten GVP-Anteilen. Ansätze zur laborinternen Validierung wurden beschrieben [37]. Für Event-spezifische Verfahren, welche die Antragsteller im Rahmen von Zulassungsverfahren vorlegen müssen, hat das ENGL Annahmekriterien für Validierungsdaten definiert [38] (siehe Tabelle 1).

Anhand von DNA-Verdünnungsreihen, welche auf verschiedenen Konzentrationsniveaus in Replika untersucht werden, können der Arbeitsbereich und die Regressionsdaten (und damit auch die PCR Effizienz) der beiden für die relative Quantifizierung benötigten real-time PCR-Systeme berechnet werden. Die hierbei erhaltenen Präzisionsdaten können auch für die Ermittlung der Sensitivität (Nachweis und Bestimmungsgrenze) des transgen-spezifischen PCR-Systems (als Kopienzahl) verwendet werden [29]. Die wiederholte Untersuchung von DNA-Lösungen mit definierten GVP-Anteilen in Form einer relativen Quantifizierung von transgen zu spezies-spezifischer Sequenz dient zur Bestimmung von Richtigkeit, Präzision ( $RSD_r$  und  $RSD_R$ ) und Sensitivität der gesamten Methode. Die Anforderungen des ENGL beziehen sich auf die Untersuchung von DANN Lösungen; die aus der DNA-Extraktion herrührende zusätzliche Streuung der Daten ist nicht zu berücksichtigen

### Besonderheit der GVO-Analytik: Praktische Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Quantifizierung gentechnischer Veränderungen erfolgt immer in Relation auf ein spezies-spezifisches Referenzgen; Ergebnisse werden in Prozent angegeben. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen können

Tab. 1: ENGL-Annahmekriterien [37] für Validierungsdaten Event-spezifischer Methoden; Daten aus in-house Validierungen bzw. aus Ringversuchen (sofern explizit in Tabelle erwähnt)

<b>Spezifität</b>	testen mit: • transgenen Events (insbesondere eng verwandte) • nicht transgenem Material (gleiche Spezies bei Event-spezifischer PCR)
<b>Arbeitsbereich</b> (in-house und Ringversuch)	1/10 bis 5-faches der Zielkonzentration (= häufig 500 Kopien; d.h. 50 bis 2500 Kopien)
<b>Richtigkeit</b> (in-house und Ringversuch)	max. $\pm 25\%$ des Referenzwertes (über den gesamten Arbeitsbereich)
<b>Steigung / PCR-Effizienz</b>	$-3,1 \geq$ Steigung Kalibrierreihe $\geq -3,6$ (Effizienz ca. 90 -110 %)
<b>R<sup>2</sup></b> (Bestimmtheitsmaß der Regression)	$> 0,98$
<b>Wiederholstandardabweichung RSD<sub>r</sub></b>	$< \pm 25\%$ über den gesamten Arbeitsbereich (mindestens 15 Replika)
<b>Reproduzierbarkeits-Standardabweichung RSD<sub>R</sub></b> (Ringversuch)	• $< \pm 35\%$ über den gesamten Arbeitsbereich • $< \pm 50\%$ bei Anteilen gentechnischer Veränderungen unter 0,2 %
<b>Bestimmungsgrenze</b>	Kriterium: $RSD_r < \pm 25\%$ : $< 1/10$ der Zielkonzentration z.B. $< 50$ Kopien
<b>Nachweisgrenze</b>	Kriterium: 95% positive; $\leq 5\%$ falsch positive: $< 1/20$ der Zielkonzentration, z.B. $< 25$ Kopien (Anm: Kriterium EN 24276 [8] für quantitative Verfahren (Ringversuche): $RSD_R \leq 33\%$ )
<b>Robustheit</b>	Inter-Assay-Abweichung $< \pm 30\%$

einerseits für das transgenspezifische PCR-System ermittelt werden (als Kopienzahl), anhand geeigneter Matrices mit entsprechend niedrigen GVP-Anteilen ist dies als relativer Wert möglich. Zumeist handelt es sich hierbei jedoch um Matrices, welche die Spezies-DNA in großen Mengen enthalten. Viele in der Praxis untersuchte Proben enthalten jedoch nur wenig DNA der jeweiligen Spezies. Dementsprechend ist hier eine sensitive Untersuchung wie bei DNA-reichen Matrices nicht möglich. Daher wurde per Norm festgelegt [8], dass bei Untersuchungen mit negativem Resultat auch eine Proben-bezogene, sogenannte praktische Nachweisgrenze anzugeben ist. Diese kann laborintern - ausgehend von dem Gehalt an Spezies-DNA - probenspezifisch abgeschätzt werden [29, 38]. Dazu wird zunächst in der Proben-DNA die Menge an artenspezifischer, mittels real-time PCR amplifizierbarer DNA ermittelt. Die Menge an gv-DNA, welche in dieser Lösung noch (theoretisch) nachweisbar bzw. quantifizierbar ist, wird dazu ins

Verhältnis gesetzt. Bestimmt werden kann diese DNA-Menge im Rahmen der Methodenvalidierung des PCR Systems zum Nachweis der transgen-spezifischen Sequenz, etwa über die Präzisionsdaten aus Wiederholbestimmungen (s.o.).

Der in der Literatur [29] beschriebene Ansatz verwendet als Kriterium für die Quantifizierungsgrenze eine maximale Streuung des Vertrauensbereichs von  $\pm 30\%$ , für die Nachweisgrenze von  $\pm 100\%$ . Langjährige Erfahrungswerte zeigen, dass bei effizienten real-time PCR-Systemen diese Kriterien bei 5 bis 10 Kopien bzw. Genomäquivalenten (Nachweisgrenze) bzw. 40 bis 100 Kopien (Bestimmungsgrenze) erreicht werden [38].

In Tabelle 2 ist die Bandbreite der relativen (= praktischen) Nachweisgrenzen, basierend auf Erfahrungswerten, dargestellt [38]. Davon ausgehend werden bei verarbeiteten Lebensmitteln und „DNA-armen“ Zutaten oft nur praktische Nachweis-/Bestimmungsgrenzen von 0,9 % oder darüber erreicht. In

Tab. 2: Relative Nachweisgrenzen bei wichtigen Lebensmittelrohstoffen [39]

Zutat/Rohstoff	zu erwartende Ausbeute an spezies-spezifischer DNA (pro PCR-Ansatz)	ungefähre relative Nachweisgrenzen (Anteil GVP-DNA an Gesamt-Spezies-DNA)
Sojalecithin	0 - ca. 10.000 Kopien	100 % - 0,05 %
Mais-Stärke, nativ	0 - ca. 7000 Kopien	100 % - 0,1 %
Mais-Stärke, modifiziert	0 - 500 Kopien	100 % - 1 %
Glucosesirup, Maltodextrine	$< 20$ Kopien	$> 25\%$

solchen Erzeugnissen ist eine analytische Überprüfung im Hinblick auf den Grenzwert von 0,9 % somit nicht möglich und es muss auf die entsprechenden Rohstoffe zurückgegriffen werden.

## Der Nachweis nicht zugelassener GVP

Der eindeutige Nachweis nicht zugelassener GVP ist auch nach Inkrafttreten der neuen EU-Verordnungen sehr schwierig bzw. unmöglich. Da in der Regel weder detaillierte Sequenzinformationen über die neu eingefügte DNA noch geeignete Referenzproben zur Verfügung stehen, müssen spezielle Untersuchungsstrategien herangezogen werden.

## Screening

Hinweise auf nicht zugelassene GVP können mit Screening- und konstrukt-spezifischen Methoden erhalten werden, welche Sequenzen aus dem eingefügten genetischen Konstrukt nachweisen können. Informationen zur Erarbeitung solcher Nachweismethoden können insbesondere aus entsprechenden Datenbanken [1, 2] abgeleitet werden. Mit derartigen Methoden und anhand von Positivkontrollen, die über diverse Quellen (z.B. auch weltweite Laborvergleichsuntersuchungen) erhältlich sind, können Methoden erarbeitet werden, die zumindest eine qualitative Aussage erlauben. Eine exakte Quantifizierung sowie eine abschließende Identifizierung des Transformations-Events wird dagegen nicht möglich sein, wenn (was die Regel ist) das Referenzmaterial fehlt. Um eine weitest mögliche Spezifizierung des Befundes zu erreichen, können die Nachweise verschiedener, für das Screening geeigneter Sequenzen kombiniert werden.

Validierte Methoden zum Nachweis von Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Pflanzen vorkommen, sind in den europäischen Normen [23, 24], der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB [40] sowie der Methodensammlung der Bund/Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG) [41] beschrieben. Eine Strategie zum Screening auf gentechnische Veränderungen mittels fünf verschiedener Zielsequenzen wird in Lit. 42 vorgestellt. Ausgewählt wurde die Kombination von real-time PCR-Verfahren zum Nachweis der P35S-Sequenz, der T-nos-Sequenz, der Übergangsequenz CTP2-CP4 EPSPS, der bar-Sequenz aus *Streptomyces hygrosopicus* sowie dem synthetischen Phosphinothricin-Acetyl-transferase-Gen (pat). Es bietet sich an, den Nachweis solcher Sequenzen in Form von Duplex oder Multiplex-real-time PCR Systemen zu kombinieren.

In Tabelle 3 sind beispielhaft (zugelassene und nicht zugelassene) gv Mais-Events zusammengestellt, über die derzeit Sequenzinformationen aus Datenbanken verfügbar sind. Es wurde gezeigt, dass die fünf genannten Sequenzen – oder jeweils zumindest eine von ihnen – in den derzeit bekannten genetischen Konstrukten von Transformationsevents auch anderer Pflanzenarten als Mais enthalten sind. Sofern Referenzmaterialien verfügbar sind, können die theoretischen Sequenzinformationen auch in der Praxis bestätigt werden (siehe Tabelle 3, fett gedruckt). Für den Nachweis nicht zugelassener GVP gilt die Nulltoleranz.

Kriterien, wann Befunde als "positiv" zu bewerten sind, sind in EN 24276 in allgemeiner Form beschrieben [8]. Zusätzliche Empfehlungen sind in einem Positionspapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft [38] genannt. Auf die Empfehlung der EU-Kommission zur Untersuchung auf nicht zugelassenen gv Reis LL601 [15] wurde bereits im Artikel „Probenahme und mögliche Nachweisstrategien“ hingewiesen.

## “Genomic Walking”

Ein positives Resultat im Screening ist zwar ein gewichtiges Indiz für eine gentechnische Veränderung. Eindeutig identifiziert werden GVP allerdings über Event-spezifische Verfahren. Strategien, um auch die spezifische Integrationsstelle von gentechnisch veränderter DNA in das Pflanzengenom zu ermitteln, werden in Lit. 42 beschrieben. Sofern Positivkontrollen vorhanden sind, kann beispielsweise mittels TAIL-PCR, der Site-Finding-PCR oder der Ligation-mediated (LM)-PCR eine Ermittlung von Sequenzen erfolgen, die bekannten Sequenzen auf dem genetischen Konstrukt benachbart sind. Allerdings ist i.d.R. nicht vorhersehbar, wie viele Schritte des Genomic Walking erforderlich werden, um auch Integrationsort-spezifische Sequenzen zu erreichen. Diese Verfahren sind insgesamt aufwändig und daher nur bedingt routinegeeignet.

Tab. 3: Genetische Elemente für ein Screening auf gentechnisch veränderte Pflanzen, am Beispiel von Mais [42]. Fett = anhand von Referenzmaterial bestätigt. + (schwach) = Ct-Wert 35 und höher; Signale können auch durch Kontaminationen durch andere GVP im verwendeten Referenzmaterial bedingt sein, da für diese Materialien (i.d.R. Mehle) nur ein bestimmter Gehalt (i.d.R. >99%) des jeweiligen Events zertifiziert wird.

Name des gv-Mais-Events	enthaltene DNA-Sequenzen				
	P35S	T-nos	CTP2-CP4EPSPS	bar	Pat
<b>3272</b>	-	+	-	-	-
<b>676, 678, 680</b>	+	-	-	-	+
<b>59122</b>	+	-	-	-	+
<b>Bt11</b>	+	+	-	-	+
<b>B16 (DLL25)</b>	+	-	-	+	-
<b>Bt176 (176; Maximizer)</b>	+	-	-	+	-
<b>CBH-351 (StarLink)</b>	+	+	-	+	-
<b>DAS-06275-8</b>	-	-	-	+	-
<b>DBT418 (Bt-Xtra)</b>	+	-	-	+	-
<b>GA 21 (Roundup Ready)</b>	-	+	-	+(schwach)	+(schwach)
<b>LY038</b>	+	+	-	-	-
<b>MIR604</b>	-	+	-	-	+(schwach)
<b>MON 80100</b>	+	+	+	-	-
<b>MON 802</b>	+	+	+	-	-
<b>MON 809</b>	+	+	+	-	-
<b>MON 810</b>	+	-	-	-	-
<b>MON 832</b>	+	+	+	-	-
<b>MON 863 (YieldGard)</b>	+	+	-	-	-
<b>MON 88017</b>	+	+	+	-	-
<b>MON89034</b>	+	+	-	-	-
<b>MS3 (SeedLink)</b>	+	+	-	+	-
<b>MS6 (SeedLink)</b>	+	+	-	+	-
<b>NK 603 (Roundup Ready)</b>	+	+	+	+(schwach)	-
<b>T14</b>	+	-	-	-	+
<b>T25</b>	+	-	-	-	+
<b>TC1507 (Herculex)</b>	+	-	-	-	+

## Molekularbiologische Methoden zum simultanen Nachweis gentechnischer Veränderungen

Angesichts der immer größer werdenden Zahl weltweit angebaute GVP auf die zu prüfen ist, sind Multimethoden gefragt. In der Praxis am häufigsten eingesetzt werden Multiplex real-time PCR Verfahren, daneben sind Microarrays und LPA-Methoden zu nennen.

### Multiplex real-time PCR

In den letzten Jahren wurde über die Anwendung von Multiplex-Verfahren zum Nachweis von GVP basierend auf der Real-time PCR berichtet [43]. Entsprechende Verfahren basieren auf der Kombination verschiedener Primerpaare in einem Reaktionsansatz; die simultane Detektion kann z.B. durch die Anwendung jeweils spezifischer Hybridisierungs sonden erfolgen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Emissionsmaxima gekoppelt sind. Eine gleichzeitige Detektion der unterschiedlichen PCR Amplifikate bzw. der Fluoreszenz daran hybridisierender Sonden ist mit geeigneten Real-time PCR Geräten möglich.

Hauptschwierigkeit bei der Verwendung von Duplex oder Multiplex-Systemen ist die u.U. erhöhte Störanfälligkeit und geringere Sensitivität solcher Verfahren. Insbesondere die Etablierung solcher Verfahren erfordert einen erhöhten Aufwand und große Sorgfalt.

Für ein simultanes Screening mittels real-time PCR wurden die Systeme zum Nachweis der pat- und der bar-Sequenz bzw. der P35S- und der T-nos-Sequenz jeweils zu Duplex-Verfahren, letztere zusätzlich mit einem Mais-spezifischen hmg-System zu einem Triplex-real-time PCR Verfahren kombiniert [42]. In einem Ringversuch wurde für das P35S-/T-nos-Duplex-Verfahren gezeigt, dass die Methode sich zum semiquantitativen Screening auf GVP eignet [41].

### Microarrays

Auf DNA-Chips oder Microarrays als miniaturisierte Träger sind DNA-Moleküle bekannter Sequenz als biomolekulare Sonden in einem geordneten Raster immobilisiert oder synthetisiert. Die oberflächengebundenen DNA-Moleküle werden mit komplementären, markierten Nukleinsäuren hybridisiert. Durch eine hohe Parallelität des Verfahrens kann prinzipiell ein großer Datendurchsatz in relativ kurzer Zeit erzielt werden.

Um eine ausreichend hohe Sensitivität in der GVO Analytik zu erreichen, werden die interessierenden Abschnitte zumeist noch in einer oder mehreren vorgeschalteten (Multi-

plex-) PCR-Reaktionen amplifiziert. Die bisher vorgestellten Microarrays detektieren simultan 5 bis 10 Screening-Elemente wie P35S, Tnos oder pat, dazu noch spezies-spezifische DNA Sequenzen zur Amplifikationskontrolle. Die bisherigen Erfahrungen zeigten, dass solche Systeme durchaus Potential für die Routine haben können. Allerdings sind die bisherigen Systeme nur qualitativer Natur; eine Bewertung der jeweiligen praktischen Nachweisgrenze in einem komplex zusammengesetzten Produkt ist daher beispielsweise auch nicht möglich. Weiterhin liegen noch keine Erfahrungen aus Ringversuchen vor.

### Ligations-abhängige Amplifizierung (LPA)

Die LPA-Technik bedient sich sequenz-spezifischer Sondenpaare, die an die Zielsequenz hybridisieren. Nach Ligation der Sonden werden die Ligationsprodukte amplifiziert. Durch Verwendung jeweils identischer Primerbindungsstellen, die an den 5'- bzw. 3'-Enden der Sonden vorhanden sind, können gleichzeitig mehrere solcher Sondenpaare verwendet und die Ligationsprodukte mit einem identischen Primerpaar simultan amplifiziert werden. Die Detektion der unterschiedlich großen Ligationsprodukte erfolgt über Fluoreszenz-markierte Primer in einer Kapillarelektrophorese. Prinzipiell soll diese Methode auch zur Quantifizierung von GVP geeignet sein [16].

### Literatur

1. BATS, Zentrum für Biosicherheit und Nachhaltigkeit, Basel: *Genetically Modified Crops: molecular and regulatory details*, BATS report, version 2 (06/2003).
2. Datenbank **AGBIOS**: GM crop database.; *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA)
3. Datenbank "Transgen":
4. European Commission: *Community Register of GM Food and Feed*.
5. Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.09.2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel (ABl. Nr. L 268/1 vom 18.10.2003), sowie Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.09.2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln (ABl. Nr. L 268/24 vom 18.10.2003).

6. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H., Van den Eede G. (2002). *Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products*. Eur. Food Res. Technol. 214:3-26.
7. Stave, J.W. (2002) *Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations, and practical considerations*. J AOAC Int 85: 780-786.
8. DIN EN ISO 24276 (2006): *Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Allgemeine Anforderungen und Definitionen*. Beuth, Berlin.
9. Pietsch K, Waiblinger HU, Brodmann P, Wurz A. (1997) *Screeningverfahren zur Identifizierung „gentechnisch veränderter“ pflanzlicher Lebensmittel*. Deutsche Lebensmittelrundschau 93 (2): 35-38.
10. Cankar K, Ravnikar M, Zel J (2005) *Real-time PCR detection of cauliflower mosaic virus to complement the 35S screening assay for genetically modified organisms*. J AOAC Intern. 88 (3), 814-822.
11. Holst-Jensen A, Ronning SB, Lovseth A, Berdal KG (2003) *PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms*. Anal Bioanal Chem 375: 985-993.
12. Padgett, SR, Kolacz, KH, Delannay X, Re DB, LaValee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB und Kishore GM (1995). *Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line*. Crop Science 35: 1451-1461.
13. EN/TS 15568 (2006) *Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Probenahmestrategien*. Beuth, Berlin.
14. Hübner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P (2001). *Validation of PCR methods for the quantification of genetically modified plants in food*. J.AOAC Intern. 84 (6): 1855-1864.
15. Entscheidung der Kommission Nr. 2006/754/EG vom 06.11.2006 zur Änderung der Entscheidung 2006/601/EG über Dringlichkeitsmaßnahmen hinsichtlich des nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Organismus „LL REIS 601“ in Reiserzeugnissen. Amtsblatt der Europäischen Union L 306/17 vom 07.11.2006.
16. Engel KH, Moreano F, Ehlert A, Busch U (2006) *Quantification of DNA from genet-*

- ically modified organisms in composite and processed foods. *Trends in Food Science & Technology* 17, 490-497.
17. Terry C, Harris N, Parkes H (2002) Detection of gm crops and their derivatives: Critical steps in sample preparation and extraction. *J AOAC Intern.* 85 (3), 768-774.
  18. DIN EN ISO 21571 (2005) Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Nukleinsäureextraktion. Beuth, Berlin.
  19. Wurz, A, Rüggeberg, H, Brodmann, P, Waiblinger, HU und Pietsch, K (1998) DNA-Extraktionsmethode für den Nachweis gentechnisch veränderter Soja in Sojalecithin. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 94, 159-161.
  20. Waiblinger HU, Ohmenhäuser M, Pietsch K, Ritter W, Steegmüller J, Krech, A, Horn, P, Schröder A (2005): Die Untersuchung von transgenem Rapspollen in Honigen mittels real-time PCR. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 101 (12), 543-549.
  21. Ring trial validation of a method for the extraction of DNA from soy lecithins (2007). *J. Verbr. Lebensm.* 1, 113-115.
  22. Bundesamt für Gesundheit, Bern, Schweiz: Schweizerisches Lebensmittelbuch (2004) Kapitel 52 B.
  23. DIN EN ISO 21569 (2005) Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren. Beuth, Berlin.
  24. DIN EN ISO 21570 (2006) Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren. Beuth, Berlin.
  25. Meyer R (1995) Nachweis gentechnologisch veränderter Pflanzen mittels PCR am Beispiel der FLAVR SAVR Tomate. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 201: 583-586.
  26. Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, Engel KH: Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* (1998) 206: 203-207.
  27. Wurz A, Willmund R (1997) Identification of transgenic glyphosate-resistant soybeans. *BgVV-Hefte* 01/1997:115-117.
  28. Pietsch K, Bluth A, Wurz A u. Waiblinger H-U (1999) Kompetitive PCR zur Quantifizierung konventioneller und transgener Lebensmittelbestandteile. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 95:57-59.
  29. Waiblinger HU, Gutmann M, Hädrich J, Pietsch K (2001) Validierung der Real-time PCR zur Quantifizierung von gentechnisch veränderter Soja. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 97:121-125.
  30. Kew, Royal Botanic Gardens. *Plant DNA C-values Database*
  31. European Commission. Institute for reference materials and measurements (2006). *ERM Application note 4.*
  32. Trifa Y, Zhang D (2004) DNA content in embryo and endosperm maize kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO quantification. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 1044-1048.
  33. Unterausschuss Methodenentwicklung der Bund-/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (2006) *Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen.* (Anmerkung Dez. 2014: Das vorliegende Konzept ist in die Methode G 30.00-2 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG eingeflossen. Es hat deswegen nur noch informativen Charakter, eine Aktualisierung des Konzeptes erfolgt nicht mehr.).
  34. Hernandez M et al (2004) Development and comparison of four real-time PCR systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4632-4637.
  35. Europäische Kommission. *Community Reference Laboratory for GMO analysis.*
  36. Europäische Kommission. *Institute for Reference Materials and Measurements. European Reference Materials (ERM).*
  37. European Network of GMO Laboratories (ENGL) (2008) *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. Version 2008. Überarbeitete Version 2015*
  38. Deutsche Lebensmittelchemische Gesellschaft (2005) Aktuelle Fragen in der GVO-Analytik, Positionspapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft. *Lebensmittelchemie* 59: 105-107 (2005).
  39. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 35 Vorläufiges Tabakgesetz, § 28 a GenTG, Beuth-Verlag.
  40. Methodensammlung der *Bund/Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG).*
  41. Waiblinger HU, Ernst B, Anderson A und Pietsch K (2007). Validation and collaborative study of a P35S and Tnos screening duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products. *Eur. J. Food Res. Technol.* (submitted)
  42. Forschungsprogramm „Ernährung/Nahrungsmittelsicherheit“ der Landesstiftung Baden-Württemberg gGmbH (2007) Abschlussbericht zum Projekt: *„Molekularbiologische Verfahren zum Nachweis von nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Pflanzen“.*
  43. Höhne M, Santisi CR, Meyer R (2002) Real-time PCR: An accurate method for the detection and quantification of 35S-CaMV promoter in genetically modified maize-containing food. *Eur Food Res Technol* 215: 59-64.