

PCR – Eine Methode zum Nachweis gentechnisch veränderter Organismen (GVO)

Egert, Michael, Dr. (LUFA Nord-West Institut für Futtermittel, Oldenburg);

Einleitung

Die Gentechnik eröffnet für die Landwirtschaft und die Lebensmittelherstellung viele neue Möglichkeiten. Das Marktangebot an neuartigen Pflanzen und Lebensmitteln, die häufig aus oder mit Hilfe gentechnisch veränderter Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen hergestellt sind, nimmt weltweit zu. Im Jahr 2002 betrug die weltweite Anbaufläche von gentechnisch veränderten Pflanzen 58,7 Mio. Hektar (GV-Sojabohnen: 36,5 Mio. ha; GV-Mais: 12,4 Mio. ha; GV-Raps: 3 Mio. ha; GV-Baumwolle: 6,8 Mio. ha). Die Hauptanbauggebiete liegen in den USA, Argentinien, China und Kanada. Weltweit beträgt der Anteil von GVO-Sorten bei der Sojabohne 51 %. Beim GV-Mais liegt der Anteil an der Welterzeugung bei 9 % und beim Raps bei 12 % (Quelle: ISAAA Report No. 27-2002).

Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln

Ein Teil der Verbraucher lehnt gentechnische Verfahren in der Landwirtschaft und in der Lebensmittelherstellung ab. Als Orientierungshilfe wünschen Sie eine Kennzeichnung gentechnisch veränderter Produkte. Der Gesetzgeber hat dem Rechnung getragen. Anfang Juli hat das Europa-Parlament zwei neuen Verordnungen zu gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln zugestimmt. Ab Herbst gibt es schärfere Vorschriften, vor allem bei der Kennzeichnung. Nach einer Übergangsfrist gelten die neuen Regelungen dann ab Anfang 2004.

Die Verordnungen enthalten umfassende Vorschriften über die Zulassung, Sicherheitsbewertung und Kennzeichnung von Lebensmitteln, Zutaten und Zusatzstoffen sowie Futtermitteln und Futtermittelzusatzstoffen aus gentechnisch veränderten Organismen. Erzeugnisse, die sowohl als Lebensmittel als auch als Futtermittel verwendet werden können, dürfen nur für beide Zwecke zugelassen werden. Die Kennzeichnung stützt sich nicht mehr allein auf den analytischen GVO-Nachweis im Endprodukt, sondern auf ein warenbegleitendes Dokumentationssystem. Vorgeschrieben wird eine Dokumentation über den gesamten Produktionsprozess. Für Lebensmittel und für Futtermittel, die unvermeidbar mit gentechnisch verändertem Material verunreinigt sind, gibt es zukünftig einen Schwellenwert, der bei 0,9 % liegt. Nicht gekennzeichnet werden müssen Produkte, die „unbeabsichtigte, technisch unvermeidbare Verunreinigungen bis zu 0,9 %“ enthalten. Ebenfalls nicht kennzeichnungspflichtig sind alle Lebensmittel von Tieren, die gentechnisch verändertes Futter erhalten haben (z.B. Fleisch, Milch und Eier).

Mit der Umsetzung der neuen Regelungen werden die Voraussetzungen geschaffen, um das seit fünf Jahren geltende „europäische Gentechnik-Moratorium“ für die Zulassung von GV-Pflanzen aufzuheben.

Möglichkeiten des Nachweises von gentechnisch veränderten Organismen

Zur Kennzeichnung und Deklaration sollte immer auch eine Kontrolle mit anerkannten Untersuchungsmethoden gehören. Durch die gentechnische Modifikation unterscheidet sich eine Pflanze oder ein Produkt in mindestens einer Eigenschaft von seiner ursprünglichen Form. Dieser Unterschied kann zur Identifizierung genutzt werden. Prinzipiell stehen für den Nachweis gentechnischer Veränderungen die folgenden Nachweisstrategien zur Verfügung:

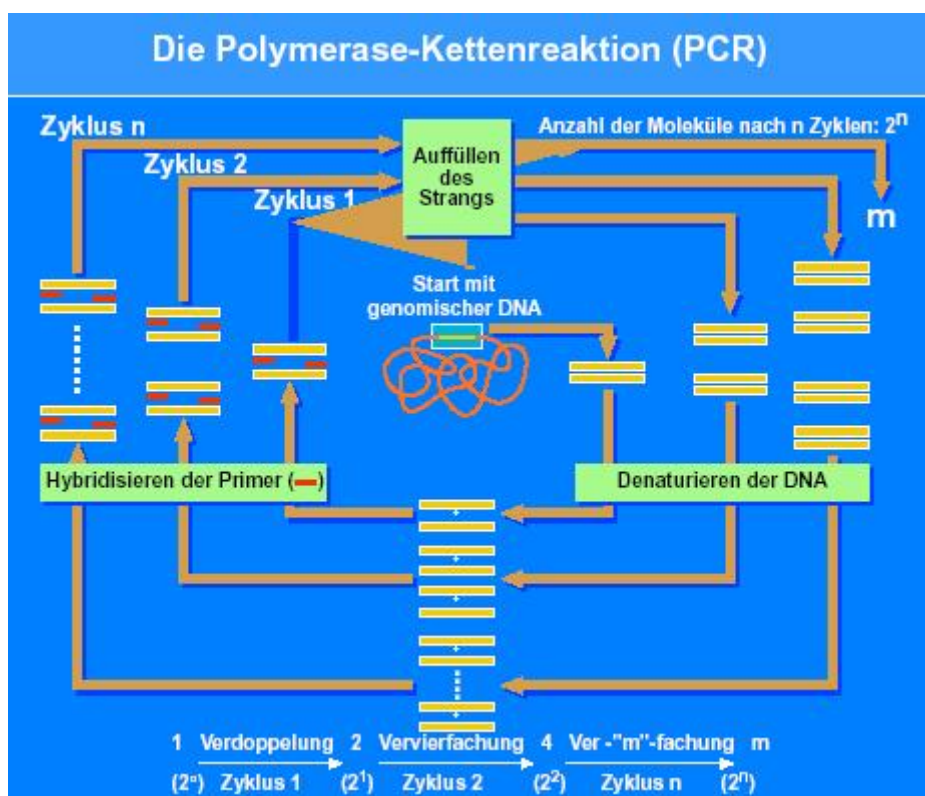
- auf Ebene der Erbinformation (DNA) kann die gentechnische Veränderung direkt nachgewiesen werden,
- auf Proteinebene kann das von der Erbinformation gebildete Protein nachgewiesen werden,
- die gentechnische Veränderung kann auch anhand der neuen Eigenschaft (z.B. Resistenz gegenüber einem Herbizid) nachgewiesen werden.

Da selbst in hochverarbeiteten Lebensmittel und Futtermittel meist noch DNA enthalten ist, hat sich in der Praxis der Nachweis gentechnischer Veränderungen auf DNA-Ebene durchgesetzt. Die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt und hat sich innerhalb weniger Jahre zu einem elementaren und unersetzlichen Hilfsmittel in der Forschung und in der Analytik entwickelt. Die PCR (Polymerase-Chain-Reaction) vervielfältigt die mit Hilfe einer spezifischen Sonde aufgespürte gentechnische Veränderung in kurzer Zeit so oft, dass sich diese DNA nachweisen lässt. Mit Hilfe der PCR-Methode können Spuren von DNA, die in kleinsten Probenmengen enthalten sind, nachgewiesen werden. Die extreme Empfindlichkeit erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen im Laborbetrieb und in der Laborausstattung. Welcher DNA-Bereich vervielfältigt wird, hängt von den eingesetzten Primern (kleine künstliche DNA-Fragmente) ab. In Abhängigkeit von der DNA-Sequenz lagern sie sich an spezifische Bereiche der DNA an. Das Enzym DNA-Polymerase beginnt an diesen Andockstellen mit der Vervielfältigung der DNA.

Das Prinzip einer PCR-Reaktion (s. Abbildung 1):

Die aus einer Probe zuvor isolierte doppelsträngige DNA wird durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C in zwei Einzelstränge getrennt (*Denaturierung*). Anschließend wird die Temperatur gesenkt, so dass sich die im Überschuss vorhandenen Primer an die für sie jeweils spezifische einzelsträngige Zielsequenz anlagern können (*Annealing*). Danach wird die Temperatur auf 72 °C erhöht und eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt (*Elongation*). Aus einem DNA-Doppelstrang sind somit in diesem ersten Zyklus zwei DNA-Doppelstränge geworden. Diese können jetzt wieder durch Erhitzen auf 95 °C in vier Einzelstränge getrennt werden usw.. Durch den kurzzeitigen periodischen Wechsel der Temperatur wird immer wieder DNA denaturiert, Primer lagern sich an und werden zum Doppelstrang ergänzt. Durch diese Wiederholung der Zyklen (*Denaturierung, Annealing, Elongation*) kommt es letztlich zu einer spezifischen Vervielfältigung (Amplifizierung) einer Zielsequenz mit definierter Größe.

Abbildung 1: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



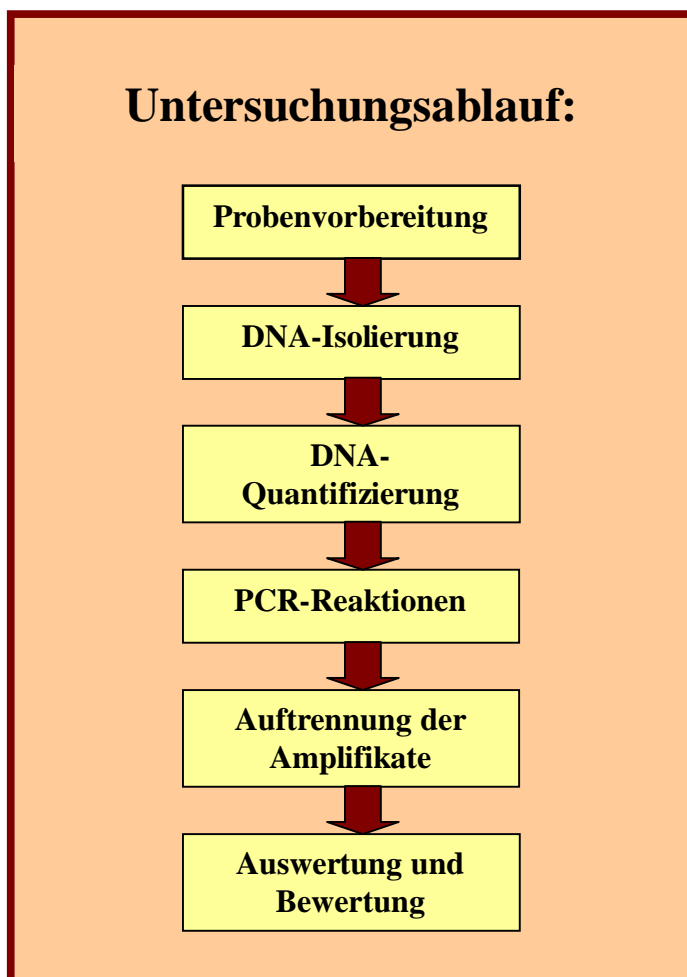
Quelle: www.biologie.de/Nuetzliches/FCI-CD/ausschnitte/Folie15

Untersuchungsablauf (s. Abbildung 2)

Für den Nachweis gentechnischer Veränderungen stehen mittlerweile standardisierte und validierte PCR-Methoden zur Verfügung, die i.d.R. einen GVO-Anteil von etwa 0,1 % sicher nachweisen können. Das Grundprinzip all dieser Verfahren sei hier kurz dargestellt.

Im ersten Untersuchungsschritt werden die Proben homogenisiert und vermahlen, bevor die DNA aus den Proben isoliert und deren Ausbeute überprüft wird. Der Nachweis erfolgt durch die Amplifikation von zwei DNA-Sequenzen mit Hilfe der PCR. Es wird jeweils eine Kontrollreaktion und eine spezifische Reaktion durchgeführt. In der Kontrollreaktion wird ein Teilbereich des maistypischen Invertase-Gens bzw. des sojatyptischen Lektingens amplifiziert, welches sowohl in der konventionellen als auch in der gentechnisch veränderten Pflanze vorkommt. Die Kontrollreaktion dient der Überprüfung der Testparameter. Ein positives Signal der Kontrollreaktion zeigt, dass die verwendeten Reagenzien und die Handhabung ordnungsgemäß funktionieren und dass aus dem Probenmaterial ein singuläres Gen nachweisbar ist. Mit der spezifischen Reaktion wird parallel ein DNA-Abschnitt nachgewiesen, welcher für die jeweilige gentechnische Veränderung typisch ist. Die Genkonstrukte, welche in die GVO-Pflanzen eingebracht wurden, enthalten modifizierte Gene, welche so in der Natur sonst nicht vorkommen. Der Nachweis erfolgt durch die Amplifikation eines Teilbereichs dieser modifizierten Gene. Die PCR-Produkte (Amplifikate) werden elektrophoretisch aufgetrennt und, mittels Vergleich mit einem Längenstandard und einem Amplifikat der entsprechenden positiven Kontrolle, auf die zu erwartende Größe überprüft.

Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Untersuchung



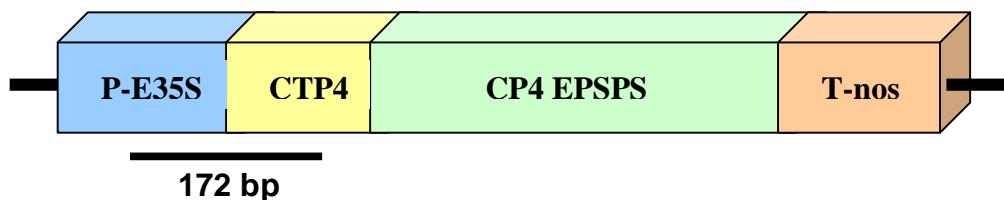
Positive Ergebnisse müssen durch weitere Verfahren bestätigt werden. Bei der Auswertung und Bewertung von PCR-Ergebnissen ist besonders darauf zu achten, dass die mitgeführten Kontrollen die richtigen Resultate liefern. Die Extraktions- und Wasserkontrollen dienen als probenunabhängige Systemkontrollen. Diese Kontrollen müssen negative Ergebnisse liefern. Die Kontrollreaktion (z.B. der Nachweis des Lektingens bei Soja) zeigt an, ob aus dem Probenmaterial DNA in ausreichender Menge und Qualität isoliert werden konnte, um eine Amplifikation mit der PCR zu ermöglichen. Eine Unterscheidung von Sequenzveränderungen, die mit Hilfe gentechnischer Methoden erzielt wurden, von Sequenzveränderungen, die auch mit anderen Verfahren erzielt werden oder natürlicherweise auftreten können, setzt voraus, dass DNA-Sequenzen nachgewiesen werden, die spezifisch sind für Veränderungen, die mit Hilfe von gentechnischen Verfahren erreicht worden sind.

Screeningverfahren und spezifische Nachweisverfahren

Bei den PCR-Nachweisverfahren unterscheidet man zwischen Screeningverfahren und spezifischen Nachweisverfahren. In gentechnisch veränderten Pflanzen wurden bisher sehr oft die gleichen Regulationssequenzen verwendet (z.B. der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus als "Start-Stelle" und der NOS-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* als "Stopp-Stelle"). **Abbildung 3** zeigt diese beiden, mit P-E35S und T-nos benannten Regulationssequenzen exemplarisch für die Roundup Ready® Sojabohne. Der CaMV35S-Promotor oder der NOS-Terminator sind in über 80 % der bisher bekannten weltweit kommerzialisierten gentechnisch veränderten Pflanzen vorhanden. Mit Hilfe dieses Screeningverfahrens lässt sich somit ein Großteil der bisher bewilligten gentechnisch veränderten Pflanzen nachweisen. In der EU sind bisher eine

herbizidresistente Sojabohne (Roundup Ready®), drei insektenresistente Maissorten (Bt176, Bt11, MON810) und eine herbizidresistente Maissorte (T25) für die Weiterverarbeitung zugelassen. Sie alle besitzen den 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus als neue Regulationssequenz und lassen sich durch den 35S-Screeningnachweis aufspüren. Bei einem positiven Screening Ergebnis muss eine Bestätigung erfolgen, um eine natürliche Kontamination der Probe z.B. mit dem Blumenkohlmosaikvirus ausschließen zu können. Für den Nachweis von gentechnisch veränderten Rapspflanzen ist ein solcher Screeningnachweis nur begrenzt möglich. Hier sind meist mehrere spezifische PCR-Nachweisverfahren erforderlich.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genkassette in der Roundup Ready® Sojabohne



Für spezifische Verfahren eignet sich besonders der Nachweis der DNA-Sequenz von den Übergängen zwischen Regulationssequenzen und neu eingefügten Genen, da diese Sequenzabfolgen natürlicherweise nicht vorkommen. Das für die transgene Roundup Ready® Sojabohne spezifische 172 bp große DNA-Fragment ist in der **Abbildung 3** als Balken gekennzeichnet.

Da die Kennzeichnungspflicht derzeit für Lebensmittel bei einem Schwellenwert von 1 % und zukünftig für Lebens- und Futtermittel bei einem Schwellenwert von 0,9 % gentechnisch verändertem Bestandteil im Produkt ausgelöst wird, muss auch eine hinreichend genaue Quantifizierung erfolgen. Neben den qualitativen Nachweisverfahren erlaubt die sog. Taq-Man™-PCR eine hinreichend genaue Quantifizierung der neu eingeführten DNA in unverarbeiteten und auch in verarbeiteten Erzeugnissen. Dadurch ist eine Überprüfung von „Schwellenwerten“ möglich. Bei der Quantifizierung wird der gentechnisch veränderte Mais- bzw. Soja-DNA-Anteil bezogen auf den Gesamt Mais- bzw. Soja-DNA-Anteil ermittelt.

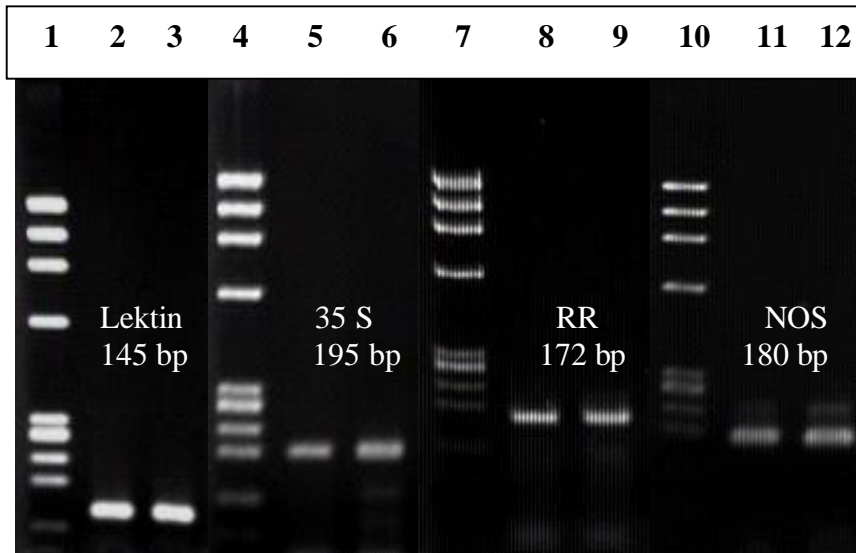
Nachweis von Roundup Ready® Soja und Bt176 Mais

Vorgestellt wird hier der Screeningnachweis einer Promotor-Sequenz aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV35S-Promotor) sowie einer Terminator-Sequenz aus *Agrobacterium tumefaciens* (NOS-Terminator). Beide Sequenzen sind neben einem Transitpeptid und dem Gen für die bakterielle EPSP-Synthase in der Roundup Ready® Sojabohne enthalten. Der spezifische Nachweis erfolgt durch die Amplifikation der Übergangsstelle der Sequenzen des 35S-Promotors und der Sequenz für das Transitpeptid CTP4 (s. **Abbildung 3**). Diese Übergangsstelle ist gentechnisch konstruiert worden und kommt in der Natur nicht vor.

Bt176 Mais enthält ebenfalls den CaMV35S-Promotor, nicht jedoch den NOS-Terminator.

Abbildung 4 zeigt die auf einem Agarosegel aufgetrennten Amplifikate für Roundup Ready® Soja. In der Kontrollreaktion wurde ein 145 bp großer Teilbereich des sojatyptischen Lektingens amplifiziert. Das 195 bp große Amplifikat weist den 35S-Promotor und das 180 bp große Amplifikat den NOS-Terminator nach. Das 172 bp große DNA-Fragment ist spezifisch für die transgene Roundup Ready® Sojabohne.

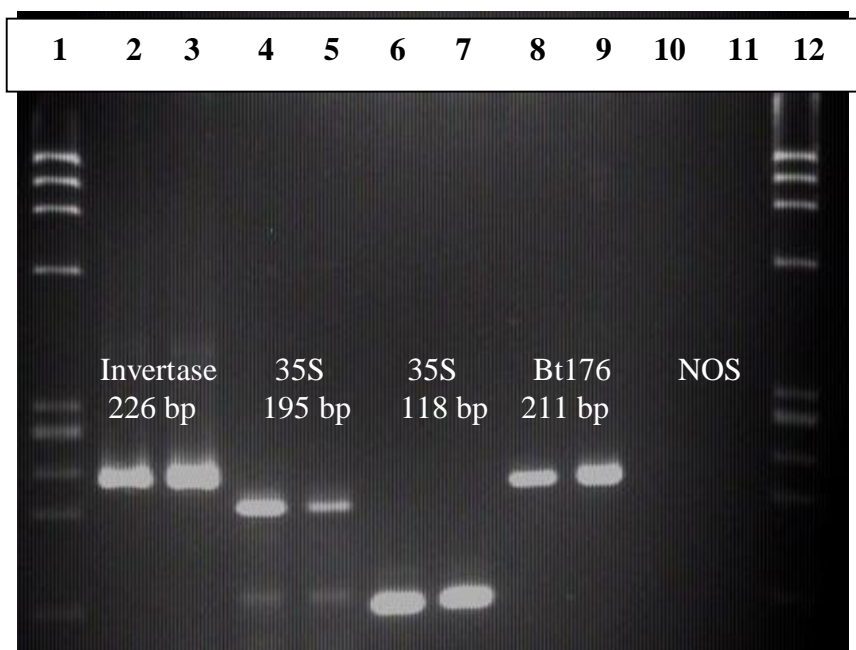
Abbildung 4: Agarosegel zum Nachweis von Roundup Ready® Soja DNA



Größenmarker: Spuren 1, 4, 7, 10; RR®-Soja DNA: Spuren 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12

Abbildung 5 zeigt die auf einem Agarosegel aufgetrennten Amplifikate für Bt176 Mais. In der Kontrollreaktion wurde ein 226 bp großer Teilbereich des maistypischen Invertase-Gens amplifiziert. Die 195 bp und 118 bp großen Amplifikate weisen unterschiedliche Teilbereiche des 35S-Promotors nach. Da der Bt176 Mais keinen NOS-Terminator enthält, ist bei diesem Nachweis auch kein Amplifikat sichtbar. Das 211 bp große DNA-Fragment ist spezifisch für den transgenen Bt176 Mais.

Abbildung 5: Agarosegel zum Nachweis von Bt176-Mais DNA



Größenmarker: Spuren 1, 12; Bt176-Mais DNA: Spuren 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

Nachweis gentechnischer Veränderungen in der LUFA Nord-West

Die LUFA Nord-West bietet den Nachweis gentechnischer Veränderungen bereits seit 1998 als Dienstleistung an. Auftraggeber sind in erster Linie Handel, Lebensmittelindustrie und Futtermittelindustrie. Im Vordergrund steht dabei der Nachweis von gentechnisch verändertem Mais und von gentechnisch veränderter Soja. Der Nachweis von gentechnisch verändertem Raps spielt eine untergeordnete Rolle. Von den im Zeitraum zwischen 1999 und 2003 von der LUFA Nord-West untersuchten über 4200 Proben waren ca. 11 % als GVO-positiv zu bewerten. Der überwiegende Anteil davon war auf den Nachweis von Roundup Ready® Soja zurückzuführen. Während es sich bei den positiven GVO-Mais Befunden meist um Verschleppungen von Bt176-Mais bzw. Mon810-Mais in der Größenordnung von <0,1 bis 0,2 % handelte, wurden bei sojahaltigen Proben deutlich höhere GVO-Anteile ermittelt.

Ergebnis der Untersuchung von 3765 Maisproben

Bei den untersuchten Maisproben handelt es sich in erster Linie um Maiskörner, Maismehle, maishaltige verarbeitete Lebensmittel und um handelsübliche Futtermittel. Von den in den Jahren 1999 bis 2003 untersuchten insgesamt 3765 Maisproben bzw. maishaltigen Proben enthielten 161 Proben Anteile von GVO-Mais. Das entspricht 4,3 % der Proben. Der Wert schwankte in den zurückliegenden fünf Jahren zwischen 2,6 % und 6,4 %. In diesem Zeitraum war keine Zunahme beim Anteil GVO-positiver Maisproben erkennbar (s. **Tabelle 1**). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Deutschland zurzeit kaum transgener Mais verarbeitet wird. Dies gilt sowohl für Lebensmittel, als auch für Futtermittel. Die Größenordnung des GVO-Anteiles in den positiven Proben lag zwischen <0,1 % und 4 %. Nahezu alle positiven Proben lagen damit unterhalb des zukünftig für die Kennzeichnung geltenden Schwellenwertes von 0,9 % (s. **Tabelle 2**). Der in der EU erzeugte konventionelle Mais scheint derzeit den Bedarf zu decken.

Tabelle 1: Nachweis von transgenem Mais in den Jahren 1999 bis 2003

Maisproben	1999	2000	2001	2002	2003 1. Halbjahr
Anzahl der untersuchten Proben	773	851	759	849	533
Anteil GVO-positiver Proben in %	5,4 %	2,6 %	3,8 %	6,4 %	2,6 %

Tabelle 2: Anteil der nach zukünftigem Schwellenwert kennzeichnungspflichtigen Proben

Maisproben	1999	2000	2001	2002	2003 1. Halbjahr
Anteil Proben mit < 0,9 % GVO-Mais	100 %	93,7 %	100 %	100 %	100 %
Anteil Proben mit ≥ 0,9 % GVO-Mais	0%	6,3 %	0 %	0 %	0 %

Ergebnis der Untersuchung von 458 Sojaprogen

Bei den untersuchten Sojaprogen handelt es sich in erster Linie um handelsübliche Futtermittel und um Sojaextraktionsschrote. Von den in den Jahren 2000 bis 2003 untersuchten insgesamt 458 Sojaprogen bzw. sojahaltigen Proben enthielten 306 Proben Anteile von Roundup Ready® Soja. Das entspricht 66,8 % der Proben. Der Wert nahm von 35,7 % im Jahr 2000 auf 86,3 % im Jahr 2003 kontinuierlich zu (s. **Tabelle 3**). Die Größenordnung des GVO-Anteiles in den positiven Proben lag zwischen <0,1 % und 100 %. Zwischen 15 % und 38,7 % der in den zurückliegenden Jahren untersuchten Sojaprogen überschritten den zukünftig für die Kennzeichnung geltenden Schwellenwertes von 0,9 % (s. **Tabelle 4**). Wie die Ergebnisse zeigen, enthält ein Großteil der auf dem Markt befindlichen Futtermittel gentechnisch veränderte Soja. Im Gegensatz zum Mais handelt es sich hierbei nicht nur um Spuren, die durch Verschleppung erklärbar wären. Soja muss importiert werden und der weltweite Anteil von GVO-Sorten bei der Sojabohne beträgt bereits 62 %. GVO-freie Soja steht somit nur begrenzt zur Verfügung.

Tabelle 3: Nachweis von transgenem Soja (Roundup Ready®) in den Jahren 2000 bis 2003

Sojaprogen	2000	2001	2002	2003 1. Halbjahr
Anzahl der untersuchten Proben	70	169	146	73
Anteil GVO-positiver Proben in %	35,7 %	66,9 %	71,9 %	86,3 %

Tabelle 4: Anteil der nach zukünftigem Schwellenwert kennzeichnungspflichtigen Proben

Sojaprogen	2000	2001	2002	2003 1. Halbjahr
Anteil Proben mit < 0,9 % GVO-Mais	85 %	61,3 %	63,6 %	68,0 %
Anteil Proben mit ≥ 0,9 % GVO-Mais	15 %	38,7 %	36,4 %	32,0 %