

Herausgegeben von J. Zagon, G. Crnogorac, L. Kroh, M. Lahrssen-Wiederholt, H. Broll

Nachweis von gentechnisch veränderten Futtermitteln

Eine Studie zur Anwendbarkeit von Verfahren aus der Lebensmittelanalytik

Impressum

BfR Wissenschaft

Herausgegeben von J. Zagon, G. Crnogorac, L. Kroh,
M. Lahrssen-Wiederholt, H. Broll

Nachweis von gentechnisch veränderten Futtermitteln –
Eine Studie zur Anwendbarkeit von Verfahren aus der
Lebensmittelanalytik

Bundesinstitut für Risikobewertung
Pressestelle
Thielallee 88-92
14195 Berlin

Berlin 2006 (BfR-Wissenschaft 05/2006)
116 Seiten, 24 Abbildungen, 40 Tabellen
€ 10,-

Druck: Umschlag, Inhalt und buchbinderische Verarbeitung
BfR-Hausdruckerei Dahlem

ISSN 1614-3795 ISBN 3-938163-15-1

Inhalt

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Vorwort | 7 |
| 2 | Einleitung | 9 |
| 3 | Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel – Rechtliche Grundlagen | 11 |
| 3.1 | Entwicklungen in der Gesetzgebung | 11 |
| 3.2 | Kennzeichnungsregelungen | 12 |
| 3.3 | Schwellenwerte | 13 |
| 3.4 | Einheitliches Zulassungsverfahren | 13 |
| 4 | Genetisch veränderte Pflanzen: Ziele und neue Eigenschaften | 15 |
| 4.1 | Transgene Linien („Events“) | 15 |
| 4.2 | Herbizidresistenz | 15 |
| 4.3 | Insektenresistenz | 15 |
| 4.4 | Pilzresistenz | 16 |
| 4.5 | Virusresistenz | 16 |
| 4.6 | Markergene | 16 |
| 5 | Zulassung von GVO für Lebens- und Futtermittelzwecke in Europa und weltweit | 17 |
| 5.1 | Globale Situation | 17 |
| 5.2 | Die Situation in Europa | 17 |
| 6 | Anbau von GVO | 25 |
| 6.1 | Anbau von GVO als Futter- oder Lebensmittel weltweit | 25 |
| 6.2 | Anbau von GVO als Lebens- und Futtermittel in der EU | 26 |
| 7 | Futtermittelimporte und Verarbeitung in Europa | 29 |
| 7.1 | Futtermittelimporte nach Europa | 29 |
| 7.2 | Mischfutter als Quelle für GVO-Einträge | 30 |
| 7.3 | Mischfutterherstellung | 31 |
| 8 | Analytik – Theoretische Grundlagen | 33 |
| 8.1 | Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) | 33 |
| 8.2 | Die Bestätigungsreaktion | 35 |
| 8.3 | Relative Quantifizierung mittels real-time PCR am Beispiel der TaqMan™-Technologie | 35 |
| 8.4 | Relative Quantifizierung anhand von Standardkurven | 37 |
| 9 | Material und Methoden | 39 |
| 9.1 | Basis-Chemikalien | 39 |
| 9.2 | Fertigreagenzien | 39 |
| 9.3 | Enzyme | 39 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 9.4 | Primer für die PCR (alle Primer synthetisiert von TIB-MOLBIOL, Berlin) | 40 |
| 9.4.1 | Screening-spezifische Primer | 40 |
| 9.4.2 | Soja-spezifische Primer | 40 |
| 9.4.3 | Roundup-Ready-Soja-spezifische Primer | 40 |
| 9.4.4 | Mais-spezifische Primer | 40 |
| 9.4.5 | Bt176-Mais-spezifische Primer | 40 |
| 9.4.6 | Bt11-Mais-spezifische Primer | 40 |
| 9.4.7 | T25-Mais-spezifische Primer | 41 |
| 9.4.8 | MON810-Mais-spezifische Primer | 41 |
| 9.4.9 | Chloroplasten-spezifische-Primer | 41 |
| 9.4.10 | Weizen-spezifische-Primer | 41 |
| 9.5 | Primer und Sonden für real-time-PCR Systeme | 41 |
| 9.5.1 | Screening-Primer (CaMV 35S Promotor) und Sonde | 41 |
| 9.5.2 | Soja-spezifische Primer und Sonde | 42 |
| 9.5.3 | Roundup-Ready-Soja-spezifische Primer und Sonde | 42 |
| 9.5.4 | Mais-spezifische Primer und Sonde | 42 |
| 9.5.5 | Bt176-Mais-spezifische Primer und Sonde | 42 |
| 9.5.6 | Bt11-Mais-spezifische Primer und Sonde | 42 |
| 9.5.7 | T25-Mais-spezifische Primer und Sonde | 43 |
| 9.5.8 | MON810-Mais-spezifische Primer | 43 |
| 9.5.9 | Raps-spezifische Primer und Sonde | 43 |
| 9.5.10 | Falcon-/Liberator-Raps-spezifische Prime und Sonde | 43 |
| 9.5.11 | GT73-Raps-spezifische Primer und Sonde | 43 |
| 9.5.12 | Proben | 44 |
| 9.5.13 | Verbrauchsmaterialien | 45 |
| 9.5.14 | Geräte | 45 |
| 9.6 | Methoden | 46 |
| 9.6.1 | Probenaufarbeitung (DNA-Präparation) | 46 |
| 9.6.2 | DNA-Extraktion mittels CTAB | 46 |
| 9.6.3 | DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food® Kit | 47 |
| 9.6.4 | DNA-Konzentrationsbestimmung | 47 |
| 9.6.5 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 48 |
| 9.6.6 | Agarose-Gelelektrophorese | 51 |
| 9.6.7 | Real-time PCR-System: TaqMan (TM) | 52 |
| 9.6.7.1 | Relative Quantifizierung mit TaqMan (TM) | 52 |
| 9.6.7.2 | Bestimmung der Nachweisgrenze für real-time PCR-Systeme | 55 |
| 10 | Ergebnisse | 57 |
| 10.1 | Probenaufarbeitung (DNA-Präparation) | 57 |
| 10.1.1 | DNA-Extraktion mittels CTAB-Methode gemäß amtlicher Methoden L-00.00-31, L-23.01.22-1, (EN/ISO 21571:2005, A.3) | 57 |
| 10.1.2 | DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food® Kit | 57 |
| 10.2 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 58 |
| 10.2.1 | Analyseschritte | 58 |
| 10.2.2 | Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotors (Screening-Verfahren) nach der amtlichen Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-00.00-31 bzw. prEN/ISO 2159:20 | 60 |
| 10.2.3 | Qualitativer Nachweis von Soja und Roundup Ready-Soja nach der amtlichen Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005 | 60 |
| 10.2.4 | Qualitativer Nachweis von Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-16.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005 | 62 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 10.2.5 | Qualitativer Nachweis von Bt176-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005 | 63 |
| 10.2.6 | Qualitativer Nachweis von Bt11-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005 | 63 |
| 10.2.7 | Qualitativer Nachweis von T25- und MON810-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005 | 64 |
| 10.2.8 | Qualitativer Nachweis von Chloroplasten gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-24.01-1 bzw. prEN ISO 2159:2005 | 66 |
| 10.2.9 | Qualitativer Nachweis von Getreide (Weizen) | 68 |
| 10.3 | Real-time PCR-System: TaqMan (TM) | 69 |
| 10.3.1 | Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotor mittels real-time PCR gemäß Methode ISO/FDIS 21570:2004(E) | 69 |
| 10.3.2 | Qualitativer und quantitativer Nachweis von Soja und RR-Soja gemäß Methode ISO/FDIS 21570:2004(E) | 70 |
| 10.3.3 | Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und Bt176-Mais gemäß Methode ISO/FDIS 21570: 2004(E) | 74 |
| 10.3.4 | Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und Bt11-Mais | 75 |
| 10.3.5 | Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und T25-Mais | 77 |
| 10.3.6 | Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und MON810-Mais gemäß europäischer Norm ISO/FDIS 21570: 2004(E) | 79 |
| 10.3.7 | Qualitativer Nachweis von Raps und genetisch verändertem Raps mittels real-time PCR | 81 |
| 10.3.8 | Bestimmung der Nachweisgrenze für die verwendeten real-time PCR-Systeme | 82 |
| 10.3.8.1 | Bestimmung der Nachweisgrenze für das Soja- und RR-Soja real-time PCR-System (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 83 |
| 10.3.8.2 | Bestimmung der Nachweisgrenzen für die real-time PCR-Mais-Systeme (amtliche Methode L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 85 |
| 10.3.8.3 | Bestimmung der Nachweisgrenze für die eingesetzten Raps-Systeme | 87 |
| 10.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 90 |
| 11 | Diskussion und Schlussbetrachtung | 93 |
| 11.1 | Probenauswahl und Probenaufarbeitung (DNA-Präparation) | 93 |
| 11.2 | Screening | 94 |
| 11.3 | Nachweis der Pflanzenarten und der Amplifizierbarkeit pflanzlicher DNA | 96 |
| 11.4 | GVO-spezifischer Nachweis | 98 |
| 11.5 | relative Quantifizierung von GVO mittels real-time PCR | 99 |
| 11.6 | Nachweisgrenzen für Real-time PCR-Systeme | 100 |
| 12 | Zusammenfassung | 103 |
| 13 | Literatur | 105 |

| | | |
|-----------|------------------------------------|------------|
| 14 | Nützliche Internet-Adressen | 109 |
| 14.1 | Europäische Kommission | 109 |
| 14.2 | Behörden Deutschland | 109 |
| 14.3 | Datenbanken | 109 |
| 15 | Abbildungsverzeichnis | 111 |
| 16 | Tabellenverzeichnis | 113 |

1 Vorwort

"Vom Acker auf den Teller"

Im Januar 2000 wurde das "Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit" von der Europäischen Kommission veröffentlicht. Als Ziel wird im Weißbuch die Schaffung einheitlicher Qualitätsstandards auf höchstem Niveau für Lebens- und Futtermittel in der Europäischen Union formuliert. Ein wesentlicher Aspekt ist hierbei die zukünftige Einbeziehung der gesamten Herstellungskette eines Lebensmittels in die rechtlichen Rahmenbedingungen "vom Acker auf den Teller" („from farm to fork“). Für Lebens- und Futtermittel, die aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) hergestellt werden, mündete dieser Grundgedanke in neue, EU-weit gültige Rechtsvorschriften (siehe Abschnitt 3) (http://www.europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_de.pdf).

Eine wesentliche Reform der seit April 2004 in der EU in Kraft getretenen erneuerten Regelungen für das Inverkehrbringen von GVO ist die konsequente Einbeziehung von Futtermitteln. Falls diese aus GVO hergestellt worden sind oder bestehen gelten nun sowohl für die Marktzulassungsverfahren als auch für die Bereiche Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung die selben Vorschriften wie für die Lebensmittel. Damit steht die Futtermittelkontrolle vor einer neuen Herausforderung, denn zuvor wurden GVO-Futtermittel unter separaten Regularien behandelt und waren völlig von einer Kennzeichnungspflicht ausgenommen. Neu ist weiterhin, dass zukünftig mit einem Antrag auf Marktzulassung auch eine Methode zur zweifelsfreien Identifizierung des GVO sowie geeignetes Referenzmaterial vom Antragsteller zur Verfügung gestellt werden müssen. Eine derartige Methode zielt auf den Nachweis des Ortes, an welchem "fremde" DNA (Desoxyribonukleinsäure) in das Genom des veränderten Organismus eingebaut wurde. Über diese gesetzliche Vorgabe hinaus gibt es jedoch auch die Möglichkeit, Übersichts- (Screening) Verfahren einzusetzen, welche eine größere Zahl von GVO parallel erfassen. Die Entwicklung einer Standardmethode erfordert grundsätzlich die sorgfältige Validierung (Erhebung statistischer Daten), vorzugsweise in Ringversuchen mit mehreren Laboren. Diese Aufgabe wird auf europäischer Ebene von der gemeinschaftlichen Forschungsstelle der Europäischen Kommission (JRC, Ispra) mit Hilfe eines europäischen Netzwerkes kompetenter GVO-Laboratorien (ENGL) – zu dessen Gründungsmitgliedern auch das BfR zählt – wahrgenommen. Der Weg zu einem europäischen Standardverfahren verläuft in einem zeitaufwendigen Verfahren über das Europäische Normungsbüro (CEN).

Unabhängig von der jüngsten europäischen Entwicklung hat das BfR als federführende Institution auf nationaler Ebene mit Hilfe eines Expertengremiums insgesamt sieben Methoden zur Identifizierung von GVO in Lebensmitteln in die amtliche Methodensammlung nach § 64 des FLGB (Futter- und Lebensmittelgesetzbuch; vormals § 35 LMBG) eingebracht. Für die in Europa relevanten GVO-Soja- und Maislinien sowie häufig in GVO vorkommende genetische Elemente stehen robuste, spezifische- und Screening-Verfahren nach § 64 FLGB in der Lebensmittelanalytik zur Verfügung. Es lag daher auf der Hand, bereits existierende Nachweismethoden für GVO, welche sich im Lebensmittelbereich bewährt haben, auch für die Analyse von Futtermitteln heranzuziehen bzw. für diese spezielle Anwendung zu optimieren. Die Kontrolle der Kennzeichnung kann auf diese Weise über das Erntegut und Futter bis zum Lebensmittel rasch und effektiv ohne zusätzliche Normierungsarbeit und Zeitverzögerung aufgenommen werden – "vom Acker auf den Teller".

Verbraucher und Landwirte können somit auf eine lückenlose Kontrolle gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel vertrauen.

2 Einleitung

Für die Überprüfung von Lebensmitteln, die aus genetisch veränderten Organismen (GVO) hergestellt wurden, existieren bereits eine Reihe von Untersuchungsverfahren, die in einer amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren gemäß § 64 des LFGB (Lebens- und Futtermittelgesetzbuches, vormals § 35 LMBG) aufgeführt sind. Zusätzlich sind europäische Normen verfügbar. Die meisten Verfahren beruhen auf dem molekularbiologischen Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), mit deren Hilfe gezielt „fremde“ DNA-Abschnitte in einem zyklischen Prozess vermehrt und einer Analyse zugeführt werden können. Methoden, die auf dem Nachweis eines „fremden“ Proteins basieren, werden im vorliegenden Report nicht behandelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Anwendbarkeit dieser PCR-Nachweisverfahren auf Futtermittel zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen. Dazu wurden unter Anwendung von § 64-Methoden des LFGB, CEN/ISO Standards, Methoden aus der Methodensammlung des Länderausschusses Gentechnik (LAG) sowie von in der Literatur verfügbaren Nachweissystemen handelsübliche Futtermittelproben auf gentechnisch veränderte Bestandteile (Soja, Mais, Raps) sowie auf das Vorhandensein der Pflanzenarten untersucht. In den Nachweis der Pflanzenart wurde Getreide einbezogen, da z.B. Weizen ein wichtiger Bestandteil in Futtermitteln ist.

Vor dem Hintergrund einer Kennzeichnungspflicht von genetisch veränderten (gv)-Futtermitteln ab einem Gehalt von 0,9% bezogen auf die Zutat, wurden des Weiteren Quantifizierungsmethoden, welche für GMO enthaltende Lebensmittel verfügbar sind, auf Futtermittel übertragen.

Die experimentellen Arbeiten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Goranka Crnogorac: „Anwendbarkeit von für GMO Lebensmittel bestehender Nachweisverfahren mit Real Time PCR auf GMO Futtermittel“), am Bundesinstitut für Risikobewertung in Zusammenarbeit mit der TU-Berlin (Prof. Dr. Kroh) durchgeführt. Die Analysen-Ergebnisse des vorliegenden Berichtes sind der schriftlichen Arbeit entnommen, welche im Oktober 2003 im Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin eingereicht wurde.

Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der globalen und europäischen Situation auf dem Futtermittelmarkt, dem gültigen Rechtsrahmen sowie der aktuellen Aktivitäten zur Methodenentwicklung auf EU-, Bundes- und Länderebene diskutiert. Hieraus ergeben sich praktische Empfehlungen für Methoden zur Detektion von GMO in Futtermitteln.

Zielgruppe dieses Berichtes ist die offizielle Futtermittelkontrolle aber auch andere Labore, die mit der Überprüfung und Qualitätssicherung von Futtermitteln betraut sind. Für den mit der Thematik noch nicht vertrauten Leser enthält der vorliegende Bericht eine kurze Einführung in die analytischen Verfahren sowie ausführliche Quellenhinweise für den Zugang zu Methoden, GMO-Register und Datenbanken.

Aufgrund der mittlerweile üblichen Verbreitung von Datenbanken und Listen über das Internet werden die entsprechenden Adressen (URL) in Klammern direkt im Text angegeben und zusätzlich in einem gesonderten Internet-Link Verzeichnis aufgeführt.

3 Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel – Rechtliche Grundlagen

3.1 Entwicklungen in der Gesetzgebung

Am 7. November 2003 traten in der Europäischen Union zwei neue Verordnungen über Lebens- und Futtermittel aus genetisch veränderten Organismen (GVO) in Kraft, welche nach einer Umsetzungsfrist seit dem 18. April 2004 in allen EU-Mitgliedsstaaten anzuwenden sind. Die Verordnungen regeln sowohl das Verfahren der Marktzulassung [VO (EG) Nr. 1829/2003¹] als auch Maßnahmen zur Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnungsvorschriften für GMO in Lebens- und Futtermitteln [VO (EG) Nr. 1830/2003]². Entsprechende Durchführungsbestimmungen zur VO (EG) Nr. 1829/2003 sind in der Verordnung [VO (EG) Nr. 641/2004]³ enthalten. Lebens- und Futtermittel werden somit erstmalig in einen gemeinsamen rechtlichen Rahmen gestellt. Eine Reihe älterer Verordnungen werden ersetzt und gesetzliche Lücken insbesondere mit Blick auf die Futtermittel geschlossen. Ein Kernpunkt der Novellierung ist die vollständige Auskoppelung von GMO (bzw. Produkte aus diesen) aus der bisher seit dem 15. Mai 1997 für Lebensmittel gültigen "Novel-Foods-Verordnung" [VO (EG) Nr. 258/97]⁴.

Pflanzliches Material zum Futtermittelgebrauch wurde im Falle des Importes oder Anbaues von noch lebensfähigen Agrarerzeugnissen (z.B. Maiskörner, Futterrüben) seit Beginn der ersten GMO-Importe nach Europa in den neunziger Jahren ausschließlich unter der derzeit gültigen Freisetzungsrichtlinie [(EG) Nr. 2001/18]⁵ bzw. deren Vorläuferversion [RL 90/220/EWG] behandelt. Unter diese Freisetzungsrichtlinie fallen zusätzlich – nach wie vor – GMO-Saatgut, -Zierpflanzen und Tier-Impfstoffe mit lebensfähigen Erregern, die mit der Umwelt in Kontakt kommen können. Bis zum in Kraft treten der Novel Foods VO im Mai 1997 waren auch GMO-Pflanzen zum Zwecke der Lebensmittelverarbeitung ausschließlich dieser Richtlinie unterstellt.

Die Freisetzungsrichtlinie enthält eine Reihe wichtiger Definitionen, die auch übergreifend in anderen, GMO betreffende Gesetze Anwendung finden. Gemäß den Begriffsbestimmungen ist ein „Organismus“ jede "biologische Einheit, die in der Lage ist, sich zu vermehren oder Erbgut zu übertragen". Ein "GMO" ist ein "Organismus, dessen genetisches Material so verändert worden ist, wie es auf natürliche Weise durch Kreuzen und/oder natürliche Rekombination nicht möglich ist".

Die vom Bundestag am 17. Februar diesen Jahres beschlossene Änderung des Gentechnikgesetzes (GenTG) stellt eine Umsetzung der zwingenden Vorgaben des EG-Gentechnikrechts dar. Es regelt u.a. die Einführung eines Standortregisters, das vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) geführt wird und das alle in Deutschland angebauten Flächen mit gentechnisch veränderten Pflanzen enthält. Darüber hinaus ist die „Gute fachliche Praxis“ als Instrument der Vorsorge vor Verunreinigung mit GMO in dem Gesetz verankert. Konkrete Maßnahmen, die dabei einzuhalten sind, sollen in einer weiteren Verordnung geregelt werden. Beispielsweise sollen Mindestabstände von gentechnisch veränderten Maisfeldern gegenüber konventionellen oder ökologischen Maisfeldern definiert werden.

¹ Verordnung (EG) 1829/2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel (Verordnung der Europäischen Kommission und des Rates vom 22.09.2003)

² Verordnung (EG) 1830/2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen (Verordnung der Europäischen Kommission und des Rates vom 22.09.2003)

³ Verordnung (EG) 641/2004 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 (Europäische Kommission vom 06.04.2004)

⁴ Verordnung (EG) Nr. 258/97 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten (Novel Foods-Verordnung) (27.01.1997)

⁵ Richtlinie Nr. 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates (Richtlinie der Europäischen Kommission und des Rates vom 12.03.2001)

Noch nicht abschließend geklärt sind die Details der Haftungsregelungen (§ 36 a GenTG). Ist beispielsweise eine wesentliche Beeinträchtigung vorhersehbar, kann der potenziell Betroffene vom GVO-Landwirt verlangen, dass er den GVO-Anbau unterlässt oder zumindest geeignete Schutzmaßnahmen ergreift. Kommt es zu einer wesentlichen Beeinträchtigung, soll der Betroffene vom GVO-Landwirt Entschädigung verlangen können. Beim Zusammentreffen mehrerer möglicher Verursacher soll grundsätzlich eine gesamtschuldnerische Haftung greifen.

3.2 Kennzeichnungsregelungen

Die neue Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen in Lebens- und Futtermitteln sieht vor, dass prinzipiell jede Verwendung eines GVOs in der Vertriebs- und Produktionskette zu etikettieren ist. Dabei spielt keine Rolle, ob GVO im Endprodukt analytisch nachweisbar sind oder nicht. Damit ist die frühere Regelung für Lebensmittel außer Kraft gesetzt, der zufolge stark verarbeitete Produkte (wie z.B. Öle), bei denen "fremde" DNA und/oder Protein fast vollkommen zerstört und somit nicht mehr nachweisbar sind, von der Kennzeichnung ausgenommen waren [Verordnung (EG) Nr. 1139/98⁶]. Ebenso entfallen eine Reihe vormaliger, mit der Novel-Foods-Verordnung verknüpfte Zusatzbestimmungen im Lebensmittelbereich bezüglich der Etikettierung von GVO und GVO-Produkten (Derivate) inklusive Zusatzstoffe und Aromen [Verordnungen (EG) Nr. 49/2000⁷ und Nr. 50/2000⁸]. Futtermittelausgangsstoffe und deren Produkte (wie z.B. Sojaschrot aber auch Futtermittel-Zusatzstoffe aus GVO) fielen nicht in den Anwendungsbereich dieser Verordnungen.

Die derzeit gültige Kennzeichnung für verarbeitete Lebens- und Futtermittel enthält den Wortlaut: „aus genetisch verändertem xx hergestellt“, wobei unter „xx“ für den Endverbraucher die Pflanzenart (z.B. Mais, Soja), nicht aber einzelne transgene Pflanzenlinien sichtbar aufgelistet werden. Im Falle noch lebensfähiger GVO (z.B. Import, Lagerung von Agrargrundstoffen zum Zwecke der Verarbeitung) war eine Kennzeichnung unter der abgelösten Richtlinie 90/220/EWG nicht vorgeschrieben. Diese wurde für GVO im Sinne des Gesetzes erst mit der novellierten Fassung RL 2001/18/EG nach Ablauf der Umsetzungsfrist zum 17. Oktober 2002 eingeführt. Die Kennzeichnung für lebensfähige GVO gemäß der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG erfordert den Wortlaut: "Dieses Produkt enthält genetisch veränderte Organismen".

Erzeuger und Händler von Produkten aus GVO sind nach der neuen Gesetzgebung darüber hinaus verpflichtet, detaillierte Informationen weiterzuleiten und zu archivieren. Zur lückenlosen Rückverfolgbarkeit von GVO muss gemäß Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 jeder, der Agrarrohstoffe und deren Produkte aus GVO erzeugt oder mit ihnen handelt, Informationen über alle in einem Lebensmittel oder Rohstoff vorhandene GVO an die nachfolgenden Abnehmer weiterleiten. Hierzu wurden mit der Verordnung [VO (EG) Nr. 65/2004]⁹ die Rechtsvorschriften für ein System von Erkennungsmarkern (Unique Identifier) für die verschiedenen GVO auf dem europäischen Markt erlassen. Die Kennzeichnung entfällt – als einzige Ausnahme – bei Produkten die "mit Hilfe von" GVO erzeugt wurden. Dies trifft beispielsweise auf Tiere zu, die GVO-Futtermittel erhalten haben und deren Produkte wie z.B. Eier, Milch oder Fleisch, die weiterhin kennzeichnungsfrei bleiben.

⁶ Verordnung (EG) Nr. 1139/98 über Angaben, die zusätzlich zu den in der Richtlinie 79/112/EWG aufgeführten Angaben bei der Etikettierung bestimmter aus genetisch veränderten Organismen hergestellter Lebensmittel vorgeschrieben sind (Verordnung des Rates vom 26.05.98)

⁷ Verordnung (EG) Nr. 49/2000 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1139/98 des Rates über Angaben, die zusätzlich zu den in der Richtlinie 79/112/EWG aufgeführten Angaben bei der Etikettierung bestimmter aus genetisch veränderten Organismen hergestellter Lebensmittel vorgeschrieben sind (Europäische Kommission vom 10.01.2000)

⁸ Verordnung (EG) Nr. 50/2000 über die Etikettierung von Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten, die genetisch veränderte oder aus genetisch veränderten Organismen hergestellte Zusatzstoffe und Aromen enthalten (Europäische Kommission vom 10.01.2000)

⁹ Verordnung (EG) Nr. 65/2004 über ein System für die Entwicklung und Zuweisung spezifischer Erkennungsmarker für genetisch veränderte Organismen (Verordnung der Europäischen Kommission und des Rates vom 14.01.2004)

3.3 Schwellenwerte

In den neuen Regelungen sind Schwellenwerte für tolerierbare GVO-Mengen definiert, die für Futter- wie Lebensmittel gleichermaßen gültig sind. Schwellenwerte sind notwendig, da eine absolute „Gentechnik-Freiheit“ konventioneller Produkte mittlerweile nicht mehr zu garantieren ist. Beim Anbau wie bei Ernte, Lagerung, Transport und Verarbeitung etwa von Soja sind Vermischungen mit GVO kaum zu verhindern. Sofern sie zufällig in das Produkt gelangen und technisch unvermeidbar sind, bleiben GVO-Anteile bis zum jeweiligen Schwellenwert kennzeichnungsfrei. Seit dem 18. April 2004 beträgt dieser Schwellenwert 0,9%. Handelt es sich um GVO, die in der EU noch nicht zugelassen sind, von Expertengremien in der EU jedoch aufgrund Prüfung vorhandener Unterlagen als sicher eingestuft werden, sinkt der Schwellenwert auf 0,5%. Für alle anderen, nicht autorisierten GVO gilt faktisch eine Nulltoleranz.

3.4 Einheitliches Zulassungsverfahren

Nicht nur die Aufhebung der getrennten Zulassungen für Lebens- oder Futtermittel aus GVO ist eine wesentliche Neuerung der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003. Neu ist weiterhin die zukünftige Befristung von Neuzulassungen. Diese werden zunächst für einen Zeitraum von zehn Jahren erteilt und sind auf Antrag für weitere zehn Jahre erneuerbar. Des Weiteren haben Antragssteller eine Methode zur eindeutigen Identifizierung des GVO, die auf den Integrationsort der Genkassette im Genom zielt, sowie Kontrollmaterial zu liefern. Für die Validierung dieser Methoden ist auf europäischer Ebene die gemeinschaftliche Forschungsstelle der Europäischen Kommission (JRC, Ispra) mit Hilfe eines europäischen Netzwerkes kompetenter GVO-Laboratorien (ENGL) (<http://engl.jrc.it/>) zuständig. Die Mitglieder des ENGL sind von den Mitgliedstaaten benannte Laboratorien (<http://www.irmm.jrc.be/html/homepage.htm>).

Die unter der Novel Foods VO eingeführte Trennung in Antrags- und vereinfachtes Anmeldeverfahren wurde abgeschafft und durch ein einheitliches Zulassungsverfahren ersetzt. Anmeldeverfahren waren bislang für Produkte aus GVO möglich, die hinsichtlich der Sicherheitsbewertung als im Wesentlichen gleichwertig zum konventionellen Produkt eingestuft wurden.

Die Bewertung der Anträge wird nicht mehr von den einzelnen Mitgliedstaaten als Erstprüfstelle für eingehende Anträge durchgeführt, sondern zentral von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EBLS bzw. European Food Safety Agency EFSA). Nach wie vor kann eine Zulassung nur für Produkte erteilt werden, die keine nachteiligen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch, Tier oder die Umwelt haben und den Verbraucher oder Anwender nicht irreführen. Für genetisch veränderte Organismen (GVO), die – wie z.B. Mais oder Sojabohnen – sowohl als Futtermittel wie auch als Lebensmittel verwendet werden können, muss eine Zulassung für beide Verwendungszwecke beantragt werden.

Antragsstellern wurde die Möglichkeit eingeräumt, die im Antragsverfahren gemäß VO (EG) Nr. 258/1997 oder unter der Freisetzungsrichtlinie befindlichen genetisch veränderten Produkte in Anträge gemäß VO (EG) Nr. 1829/2003 umzuwandeln. Darüber hinaus wurde der Fortbestand bereits auf dem Markt befindlicher Produkte eingeräumt.

Antragsteller und Zulassungsinhaber bzw. deren Vertreter müssen in der Europäischen Union (EU) ansässig sein. Zulassungsanträge sind an die zuständige Behörde eines Mitgliedstaates – in Deutschland an das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (<http://www.bvl.bund.de>) – zu richten. Die nationale Behörde übermittelt den Antrag an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EBLS, internationale Bezeichnung: EFSA, European Food Safety Agency). Diese leitet eine Kopie an die übrigen Mit-

gliedstaaten weiter. Eine dem Antrag beizufügende Zusammenfassung wird von der EBLS veröffentlicht.

Die EBLS wird innerhalb von sechs Monaten nach Vorliegen des vollständigen Dossiers das Ergebnis der Antragsprüfung in Form einer Stellungnahme an die Kommission, die Mitgliedstaaten und den Antragsteller übermitteln. Die Stellungnahme wird – mit Ausnahme der vertraulichen Informationen – veröffentlicht und es besteht die Möglichkeit, innerhalb von 30 Tagen Kommentare dazu einzureichen. Über den Stand der Verfahren informiert die Kommission online unter <http://gmo-crl.jrc.it>.

Nähere Informationen zum rechtlichen Hintergrund und Stand der Zulassungsverfahren sind auch auf der Webseite des BfR (<http://www.bfr.bund.de>) veröffentlicht.

Alle zugelassenen GVO auf dem europäischen Markt werden in einem offiziellen Register der EU geführt. Eine Kurzbeschreibung der zugelassenen GVO sowie Informationen über Zulassungsdatum, Unique Identifier, Verwendungszweck, Verfügbarkeit von Detektionsmethode und Referenzmaterial sind unter dem vollständigen Register der in Europa unter VO (EG) Nr. 1829/2003 zugelassenen GVO auf dem Server der Europäischen Gemeinschaft unter http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm für die Öffentlichkeit einsehbar.

4 Genetisch veränderte Pflanzen: Ziele und neue Eigenschaften

4.1 Transgene Linien („Events“)

Ziel der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung ist in erster Linie die Erzeugung ertragreicher, robuster, gegen Schädlinge und Krankheiten widerstandsfähiger Pflanzen. Hierzu werden ein oder mehrere Gene sowie deren regulierende Signalsequenzen gezielt in das Genom der Wirtspflanze eingebracht. Eine Übersicht zu Einsatz und Methodik der Gentechnologie in Landwirtschaft und Pflanzenzucht findet sich beispielsweise in Menrad et al., 2003 [1]. Der Ort, an welchem sich nach einem erfolgreichen gentechnischen Experiment die "fremde" Gensequenz im Genom der Wirtspflanze befindet, ist spezifisch und unverwechselbar. Eine derartige durch Gentechnik erzeugte neue Kultursorte bezeichnet man auch als "transgene Linie" oder "Event". Derzeit auf dem Markt befindliche Events besitzen überwiegend Herbizid- oder Insektenresistenz, aber auch eine Kombination beider Merkmale. Bislang noch weniger verbreitet aber von zukünftiger Bedeutung ist die gezielte Veränderung biochemischer und ernährungsphysiologischer Eigenschaften. Der Vitamin A-angereicherte "Golden Rice" ist ein Beispiel für diese Entwicklung [2]. Genetisch veränderte Tiere spielen im Bereich der Lebens- und Futtermittelproduktion – auch aufgrund starker ethischer Bedenken und umweltrelevanter Fragestellungen – zur Zeit keine Rolle. Ein in Kanada entwickelter gentechnisch veränderter Lachs [3] wurde für die Vermarktung bisher nicht zugelassen.

4.2 Herbizidresistenz

Die Einführung der Resistenz gegen die Wirkstoffe Glyphosat oder Glufosinat gehört zu den häufigsten genetischen Manipulationen. Glyphosat (N-(Phosphonomethyl)glycin) ist ein nichtselektives Breitbandherbizid, welches rasch und systemisch auf den gesamten Organismus aller Pflanzenarten wirkt. Die Roundup Ready[®]-Sojabohne der amerikanischen Firma Monsanto produziert aufgrund einer genetischen Veränderung die EPSP-Synthase (5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase). Dieses Enzym eines Bodenbakteriums hebt die spezifische Hemmung der pflanzenendogenen EPSP-Synthase durch das Herbizid Glyphosat auf. Glyphosattoleranz ist mittlerweile in vielen Pflanzen auf gentechnischem Wege eingebracht worden, u.a. neben Soja in Raps (z. B. Linie GT73) aber auch in Mais (s. GVO-Datenbank: <http://www.agbios.com>).

Ein weiteres Beispiel für eine in genetisch veränderten Pflanzen verbreitete Herbizidresistenz ist die Basta[®]-Resistenz (Handelsname „Liberty“) gegen den wirksamen Bestandteil Phosphinothricin (PPT) bzw. Glufosinat (Ammoniumsalz des PPT). PPT ist ein unspezifisches Kontaktherbizid, welches strukturell der Glutaminsäure ähnelt und als kompetitiver Inhibitor der Glutaminsynthase wirksam ist. Bodenbakterien wie z.B. *Streptomyces hygroscopicus* enthalten das Enzym Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT), welches PPT durch Acetylierung inaktiviert. Das für das Enzym kodierende Gen (abgekürzt PAT oder bar Gen) wurde auf verschiedene Kulturpflanzen wie z. B. Soja (LibertyLink[®] Soja), Raps (z.B. Liberator-, Falkon-Raps) oder Mais (z.B. T25-Mais, Bt11-Mais) übertragen (<http://www.agbios.com>).

4.3 Insektenresistenz

Die bisher gentechnisch erzeugten Resistenzen gegen Insekten beruhen zum größten Teil auf dem Einbau eines Bt-Toxin-Gens aus dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* in die Pflanze. Dieses Bt-Eiweiß wirkt toxisch gegenüber bestimmten Insektenarten. Der mittels Gentechnologie eingebaute Schutz vermittelt z. B. beim Mais Resistenz gegenüber der Zünslerlarve (eine Schmetterlingsraupe). *Bacillus thuringiensis* synthetisiert bei der Sporenbildung ein kristallines Protein, das noch keine toxische Wirkung besitzt. Wird dieses Protoxin z. B. von Raupen mit der Nahrung aufgenommen, so wird es im basischen Milieu des

Verdauungstraktes zu einem oder mehreren Proteinen hydrolysiert. Diese binden an Rezeptoren der Epithelzellen der Darmwand, in der Folge kommt es zur Zerstörung der Zellmembranen und Lysierung der Epithelzellen [4]. Das Toxin ist nur in bestimmten Insektenarten wirksam.

4.4 Pilzresistenz

Die Resistenz gegenüber Pilzinfektionen beispielsweise von Getreide wie Weizen und Gerste aber auch leicht verderblichen Früchten zählt zu den Hauptprojekten im Pflanzenschutz. Pilzresistenter Weizen aber auch Weinreben und Kartoffeln sind daher Gegenstand intensiver Forschung. In Europa wurde bislang noch kein pilzresistenter GVO zugelassen.

4.5 Virusresistenz

Resistenzen gegen Viren spielen bei den in Europa als Lebens- oder Futtermittel genutzten Pflanzen bislang keine Rolle. Bestrebungen bestehen auf diesem Gebiet primär im Bereich anfälliger Früchte, vor allem in wärmeren Anbaugebieten, wie der Papaya oder Melone, für die in den USA – nicht jedoch in Europa – bereits Marktzulassungen existieren (<http://www.agbios.com>).

4.6 Markergene

Markergene werden eingesetzt, um die erfolgreich transformierten Bakterien- und/oder Pflanzenzellen zu identifizieren. Es handelt sich hierbei in der Regel um Antibiotikaresistenz-Gene (z.B. das Gen für die Ampicillinresistenz (*bla*; beta-Lactamase) oder *nptII*; Neomycinphosphotransferase). Die verwendeten Markergene in den GV-Pflanzen auf dem Europäischen Markt wurden nach Einzelfallprüfungen zugelassen. Ein Gutachten vom 2. April 2004 zum Einsatz von Antibiotikaresistenz-Markergenen des für Sicherheitsfragen der Gentechnik im Lebens- und Futtermittelbereich zuständigen Expertengremiums (GMO Panel) der europäischen Lebensmittelbehörde (EFSA) spricht dennoch die Empfehlung aus, dass Antibiotikaresistenz-Marker zukünftig gänzlich vermieden werden sollten. Daher werden derartige Marker-Sequenzen in der neueren Entwicklung von GVO zunehmend wieder entfernt bzw. Antibiotika-Marker durch alternative Selektionssysteme ersetzt. Zu dieser neuen Generation von GV-Pflanzen gehört z. B. Bt11-Mais, welcher im Gegensatz zum Bt176-Mais das Antibiotikaresistenzgen „*bla*“ (β-Lactamase) nicht mehr enthält (http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/catindex_en.html).

5 Zulassung von GVO für Lebens- und Futtermittelzwecke in Europa und weltweit

5.1 Globale Situation

Über hundertundzwanzig Events sind zur Zeit legal auf den globalen Märkten in den USA, Japan, Kanada, Argentinien u.a. Staaten offiziell als Lebens- und/oder Futtermittel registriert, wobei in den meisten Fällen die Zulassung für beide Zwecke erfolgt ist. Ein umfassender Überblick zu den weltweit kommerzialisierten Linien ist in der kanadischen Agbios Biotech Crop Database (<http://www.agbios.com>) zu finden. Die Datenbank enthält umfangreiche Informationen über mehr als 120 Events inklusive den Stand der weltweiten Zulassung. Eine detaillierte Beschreibung der molekularbiologischen Charakteristika transgener Pflanzen weltweit bietet der BATS Report 2003 [42]. Dieser Report enthält auch Informationen über autorisierte GVO, die nicht für die Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion angebaut werden (z.B. Zierpflanzen). Die Auflistung umfasst ca. 150 Events, darunter auch GVO, die in Asien (China, Japan) für den Anbau zugelassen wurden. Auffällig ist die Vielfältigkeit der genetisch veränderten Linien bei Raps (27 Events), Kartoffeln (25 Events), Mais (22 Events), Reis und Tomate (je 19 Events) sowie Baumwolle (15 Events) gegenüber Sojabohnen (11 Events). Allerdings spiegeln diese Zahlen nicht die Relevanz einzelner Linien hinsichtlich ihrer weltweiten Verbreitung bzw. Anbauflächen und Erntemengen wider (s. hierzu Kapitel 6).

5.2 Die Situation in Europa

Vor dem Hintergrund von mehr als hundert transgenen Linien („Events“) für den Lebens- und/oder Futtermittelgebrauch auf den Weltmärkten gestaltete sich die Situation in Europa bis April 2004 aufgrund eines fünfjährigen Zulassungsstops übersichtlich. Insgesamt fünfzehn GVO-Produkte waren nach der Novel Foods Verordnung (EG) Nr. 258/97 bis zum in Kraft treten der Nachfolgeverordnungen im November 2003 als Lebensmittel zugelassen. Im Einzelnen waren dies: Produkte aus vier Maislinien (Bt11, MON810, MON809, T25), raffiniertes Öl aus sechs Rapslinien (MS8xRF3; MS1xRF1; Topas 19/2; GT73; Liberator L 62; Falcon GS 40/90), raffiniertes Öl aus insekten-toleranter Baumwolle (IPC line 531 und RR line 1445) sowie ein bakterielles Produkt aus *Bacillus subtilis* (Riboflavin). Zusätzlich waren unter der älteren Freisetzungsrichtlinie 90/220/EW bis Mai 1997 die Roundup Ready™-Sojabohne (07.05.1996) und Bt176 Mais (04.02.1997) als erste GVO legal für die Lebensmittelproduktion auf dem Europäischen Markt. Die Maislinie MON809, für welche eine Zulassung bestand, wurde im Übrigen nach Aussage des Zulassungsinhabers nicht angebaut und vertrieben. Im laufenden Antragsverfahren gemäß Artikel 4 der VO (EG) Nr. 258/97 befanden sich bis November 2003 weitere fünf Maislinien und zwei Kreuzungen transgener Maislinien (GA21, Bt11 (Zuckermais), MON810xGA21, BtCRY1F 1507, NK603, MON863, MON863xMON810, zwei Sojabohnenlinien (A2704-12, A5547-127) und eine Zuckerrübe (T9100152).

Prozessierte Futtermittelprodukte aus GVO waren demgegenüber völlig legal und ohne spezielle Zulassungsverfahren oder Kennzeichnungsregelungen auf dem Markt. Dies betraf im übrigen auch eine Reihe von Futter- und Lebensmittelzusatzstoffen, für welche bei der zurückliegenden Markteinführung hinsichtlich ihrer Zulassung keine GVO-spezifischen gesetzlichen Regelungen galten. Derartige Produkte aus GVO fielen z.B. unter die Richtlinie 70/524/EWG¹⁰ für Zusatzstoffe in der Tierernährung bzw. 89/107/EEC¹¹ für Lebensmittel-Additive oder Aromen 88/388/EWG¹² und waren demnach legal – aber nicht gesondert als GVO behandelt – auf dem Markt. Diese Produkte werden nun mit der neuen Gesetzgebung

¹⁰ Richtlinie 70/542/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung (des Rates vom 23.11.70)

¹¹ Richtlinie 89/107/EEC zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über Zusatzstoffe, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen (des Rates vom 21.12.88)

¹² Richtlinie 88/388/EWG zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Aromen zur Verwendung in Lebensmitteln und über Ausgangsstoffe für ihre Herstellung, geändert durch die Richtlinie 91/71/EWG der Kommission (des Rates vom 22.06.88)

ebenfalls erfasst. Regelungen für Produkte dieser Kategorien sind in der VO (EC) No. 1829/2003 im Artikel 8 (Absatz 1) für Lebensmittel und im entsprechenden Artikel 20 (Absatz 1) für Futtermittel niedergelegt. Unter diesen Artikeln wird unterschieden, ob eine Zulassung bereits nach einer gültigen GVO-spezifischen Gesetzgebung (Novel Foods VO oder Freisetzungsrichtlinie) erfolgte (Artikel 8(1), 20(1), Buchstabe a) oder der Markteintritt des Produktes unter anderen Gesetzen (Artikel 8(1), 20(1), Buchstabe b) stattfand. Für alle bis dato 7. November 2004 auf dem Markt befindlichen GVO-Produkte wurde eine Übergangsfrist eingeräumt. Binnen eines halben Jahres konnten die Inhaber dieser Produkte deren Zulassung bzw. Verkehrsfähigkeit der Kommission gegenüber belegen und verlängern. Rechtmäßig auf dem Markt befindliche genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel oder Produkte aus diesen bleiben daher weiterhin verkehrsfähig, wenn der Kommission bis zum Stichtag 18. Oktober 2004 das Datum des erstmaligen Inverkehrbringens und die für Anträge gemäß VO (EG) Nr. 1829/2003 erforderlichen ergänzenden Unterlagen übermittelt wurden. Der Fortbestand der Zulassung wird allerdings nur für drei Jahre gewährt und muss nach dieser Zeit im regulären Antragsverfahren verlängert werden. Unter diese Regelung fallen sechszwanzig genetisch veränderte Erzeugnisse, darunter auch zwei mikrobielle Erzeugnisse, welche offiziell in der EU für zunächst drei Jahre vermarktet werden dürfen (Tabelle 1). Von diesen erhielten mittlerweile fünf (Stand 08.03.2006) GVO-Maislinien: Bt-11 Gemüsemais (Register Nr. 01), NK603 (Register Nr. 02), MON863 (Reg.-Nr. 03), GA21 (Reg.-Nr. 04) und DAS 1507 (Reg.-Nr. 05) die (zehnjährige) Marktzulassung für Europa als Futter- und Lebensmittel nach dem Antragsverfahren unter der neuen Verordnung (EG) Nr. 1829/2003. Dies sind die ersten Registereinträge des offiziellen europäischen Registers für marktzugelassene GVO (http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/ndex_en.cfm).

Zu den sechszwanzig fortbestehenden verkehrsfähigen Produkten und vier Registerneueinträgen kommen weitere dreiunddreißig GVO-Produkte (Stand März 2006), die sich im Antragsverfahren gemäß Artikel 5 der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 befinden. Aufgrund der rasant zunehmenden Zahl der Anträge wurde hier auf eine tabellarische Übersicht, welche schnell die Aktualität verlieren würde, verzichtet und es wird an dieser Stelle auf die Webseite des BfR verwiesen (<http://www.bfr.bund.de>), auf welcher eine ständig aktualisierte Liste der Zulassungen und Antragsverfahren für GVO geführt wird.

Tabelle 1: Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel, für welche der Fortbestand der Marktzulassung nach VO (EG) Nr. 1829/2003 Artikel 8 und 20 (1) a, b gewährt wurde

| Nr.* | Pflanze Event Unique Identifier (ID) | Zweck | Freisetzung alt RL | Freisetzung novelliert RL | Novel Foods VO (EG) | Fortbestand Artikel 8/20(1)a, b VO (EG) 1829/2003 | Neuzulassung VO (EG) 1829/2003 |
|------|---|---|--------------------------|---------------------------------|------------------------|---|--------------------------------------|
| 1 | Mais Bt 11 SYN-BT011-1 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | 09.06.98 | | | 18.04.05 | |
| | | Anbau, Verwendung wie jedes andere Agrargut | | Antrag | | | |
| | | Verwendung als Lebens- (Futter)mittel (Produkt) | | | 30.01.98 | 18.04.05 | 19.05.05 Süssm. |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 2 | Mais NK 603 MON-00603-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | 22.01.03 | | | |
| | | Anbau | | Zurückgez. | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/(Futter)mittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | 26.10.04 |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 3 | Mais MON810 MON-00810-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | 03.08.98 | | | 18.04.05 | |
| | | Anbau | 03.08.98 | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/(Futter)mittel (Produkt) | 03.08.98 | | 10.12.97 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 4 | Mais MON863 MON-00863-5 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | 06.05.03 | | | |
| | | Anbau | | Antrag | | | 13.01.06 |
| | | Verwendung als Lebens-/(Futter)mittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 5 | Soja MON 40-3-2 MON-04032-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | 07.05.96 | | | 18.04.05 | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 6 | Mais NK603xMON810 MON-00603-6 XMON-00810-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | Antrag | | | |
| | | Anbau | | Antrag | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |

Fortsetzung Tab. 1: Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel, für welche der Fortbestand der Marktzulassung nach VO (EG) Nr. 1829/2003 Artikel 8 und 20 (1) a, b gewährt wurde

| Nr.* | Pflanze Event Unique Identifier (ID) | Zweck | Freisetzung alt RL | Freisetzung novelliert RL | Novel Foods VO (EG) | Fortbestand Artikel 8/20(1)a, b VO (EG) 1829/2003 | Neuzulassung VO (EG) |
|------|--|---|--------------------------|---------------------------------|------------------------|---|-------------------------|
| | | | 90/220 | 2001/18 | 258/97 | 1829/2003 | 1829/2003 |
| 7 | Mais DAS1507 DAS-01507-16 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | 01.09.03 | | | |
| | | Anbau | | Antrag | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | 03.03.06 |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 8 | Raps (Brassica napus L.) GT73 MON-00037-7 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | 22.01.03 | | | |
| | | Anbau | | Antrag | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 10.11.97 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 9 | Baumwolle MON 1445 MON-01445-2 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 05.07.02 | 18.04.05 | Antrag |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 10 | Baumwolle MON 531 MON-00531-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 05.07.02 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 11 | Mais T25 ACS-ZM003-2 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | 03.08.98 | | | 18.04.05 | |
| | | Anbau | 03.08.98 | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 12.01.98 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |
| 12 | Mais MON 531 x MON 1445 MON-00531-6 X MON-01445-2 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | Antrag |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |

Fortsetzung Tab. 1: Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel, für welche der Fortbestand der Marktzulassung nach VO (EG) Nr. 1829/2003 Artikel 8 und 20 (1) a, b gewährt wurde

| Nr.* | Pflanze Event Unique Identifier (ID) | Zweck | Freisetzung alt RL | Freisetzung novelliert RL | Novel Foods VO (EG) | Fortbestand Artikel 8/20(1)a, b VO (EG) 1829/2003 | Neuzulassung VO (EG) |
|------|--|---|--------------------------|---------------------------------|------------------------|---|-------------------------|
| | | | 90/220 | 2001/18 | 258/97 | | 1829/2003 |
| 13 | Mais GA21 MON-00021-9 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | Zurückgez. | | | | |
| | | Anbau | Antrag | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | 13.01.06 |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 14 | Mais Bt176 SYN-EV176-9 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | 04.02.97 | | | 18.04.05 | |
| | | Anbau | 04.02.97 | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 15 | Raps (Brassica napus L. oleifera Metzg.) MS8,RF3,MS8 x RF3 ACS-BN005-8, ACS- BN003-6, ACS-BN005-8 x ACS-BN003-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | Antrag | | | |
| | | Anbau | | Antrag | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 21.10.99 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |
| 16 | Mais GA21 x MON 810 MON-00021-9 x MON- 00810-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 17 | Raps (Brassica napus L. oleifera Metzg.) MS1, RF1, MS1xRF1 ACS-BN004-7, ACS- BN001-4, ACS-BN004- 7xACS-BN001-4 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | 28.02.96 | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 10.06.97 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |

Fortsetzung Tab. 1: Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel, für welche der Fortbestand der Marktzulassung nach VO (EG) Nr. 1829/2003 Artikel 8 und 20 (1) a, b gewährt wurde

| Nr.* | Pflanze Event Unique Identifier (ID) | Zweck | Freisetzung alt RL | Freisetzung novelliert RL | Novel Foods VO (EG) | Fortbestand Artikel 8/20(1)a, b VO (EG) 1829/2003 | Neuzulassung VO (EG) |
|------|---|---|--------------------------|---------------------------------|------------------------|---|-------------------------|
| | | | 90/220 | 2001/18 | 258/97 | 1829/2003 | 1829/2003 |
| 18 | Raps (Brassica napus L. oleifera Metzg.) MS1, RF2, MS1xRF2 ACS-BN004-7, ACS- BN002-5, ACS-BN004- 7xACS-BN002-5 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | 21.06.97 | | | 18.04.05 | |
| | | Anbau | 21.06.97 | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 10.06.97 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |
| 19 | Raps (Brassica napus L. oleifera Metzg.) TOPAS 19/2 ACS-BN007-1 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | 09.06.98 | | | 18.04.05 | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | 09.06.97 | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |
| 20 | Mais MON 863 x MON 810 MON-00863-5 x MON- 00810-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | 06.05.03 | | | |
| | | Anbau | | Antrag | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | Antrag |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |
| 21 | Hefe/Biomasse (Saccharomyces cerevisi- ae) pMT742 oder pAK729- Hefebiomasse ID nicht anwendbar | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |
| 22 | Mais T45 ACS-BN008-2 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | Antrag |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |

Fortsetzung Tab. 1: Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel, für welche der Fortbestand der Marktzulassung nach VO (EG) Nr. 1829/2003 Artikel 8 und 20 (1) a, b gewährt wurde

| Nr.* | Pflanze Event Unique Identifier (ID) | Zweck | Freisetzung alt RL | Freisetzung novelliert RL | Novel Foods VO (EG) | Fortbestand Artikel 8/20(1)a, b VO (EG) 1829/2003 | Neuzulas- sung VO (EG) 1829/2003 |
|------|--|---|--------------------------|---------------------------------|------------------------|---|---|
| | | | 90/220 | 2001/18 | 258/97 | | |
| 23 | Mais MON 863x NK 603 MON-00863-5 x MON-00603-6 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | Antrag | | | |
| | | Anbau | | Antrag | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | Antrag |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 24 | Baumwolle MON 15985 MON-15985-7 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | Antrag |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 25 | Baumwolle MON 15985 x MON1445 MON-15985-7xMON-01445-2 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | Antrag |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | 18.04.05 | |
| 26 | pCABL-Bakterielle Bio- masse <i>ID nicht anwendbar</i> MON-00531-6 X MON-01445-2 | Import, Lagerung, Verarbeitung, Futter (GVO) | | | | | |
| | | Anbau | | | | | |
| | | Verwendung als Lebens-/Futtermittel (Produkt) | | | | 18.04.05 | |
| | | Lebensmittelzusatzstoff | | | | | |
| | | Futtermittelzusatzstoff | | | | | |

Reihenfolge gemäß Europäischem Register http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
(geordnet nach Datum der Notifizierung bzw. Zulassung bei der EU)

6 Anbau von GVO

6.1 Anbau von GVO als Futter- oder Lebensmittel weltweit

Weltweit nehmen die Anbauflächen für GVO-Pflanzen sowie die Zahl der genetisch veränderten Pflanzenlinien in rasantem Tempo zu. Eine umfangreiche aktuelle Dokumentation über die globale Entwicklung von Anbauflächen, Ernte- sowie Export- und Importmengen für GVO wird jährlich vom International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA) herausgegeben [5], (<http://www.isaaa.org>). Demnach hat die weltweite Anbaufläche für genetisch veränderte Pflanzen im Jahr 2004 um 20% gegenüber 2003 auf mittlerweile 81 Mio. ha verteilt auf 17 Länder zugenommen. In der Reihenfolge der Größe der Anbaufläche stehen nach wie vor die USA an erster Stelle, gefolgt von Argentinien, Kanada, Brasilien und China (Abb. 1). Annähernd 99% der globalen GVO-Anbauflächen befinden sich in diesen Ländern. Der Rest verteilt sich auf weitere zwölf Länder. Neben südamerikanischen Ländern wie Paraguay, Uruguay oder Mexiko weitet sich der Anbau von GVO auch auf Schwellenländer wie Indien, Südafrika oder die Philippinen aus, wobei die Verteilung der angebaute GVO-Pflanzen je nach den klimatischen und Bodenbedingungen sehr unterschiedlich ausfällt. Global steht Soja mit 60% (48.4 Mio ha) der Gesamtfläche, auf welcher im Jahr 2004 GV-Pflanzen angebaut wurden, nach wie vor an erster Stelle gefolgt von Mais mit 23 % (19.3 Mio ha). An dritter und vierter Stelle stehen Baumwolle mit 11% (9 Mio ha) sowie Raps mit 6% (4.3 Mio ha) der weltweiten Anbaufläche für GV-Pflanzen (Abb. 2).

Abbildung 1: Anbau von GVO im Jahr 2005 nach Ländern (in Mio ha); Quelle: Nach James, Clives (2004): Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, ISAAA Briefs 32-2004, Ithaca, NY, ISBN 1-892456-36-2

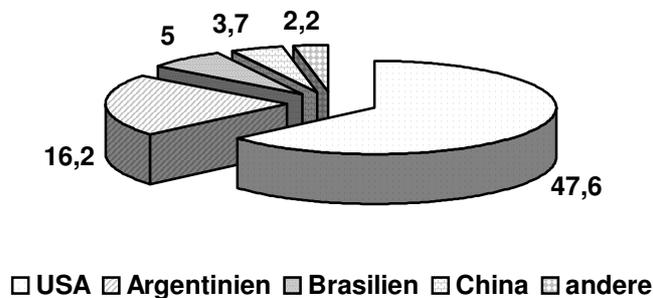
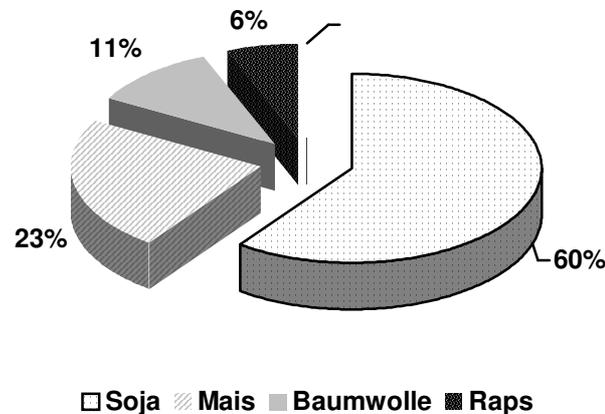


Abbildung 2: Anteil von GVO-Pflanzen am weltweiten Anbau (2004); Quelle: Nach James, Clives (2004): Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, ISAAA Briefs 32-2004, Ithaca, NY, ISBN 1-892456-36-2



6.2 Anbau von GVO als Lebens- und Futtermittel in der EU

Alle gentechnisch veränderten Pflanzen, die kultiviert werden sollen, müssen gemäß der EU-Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG für den Anbau innerhalb der EU freigegeben werden. Erst nach der Genehmigung gemäß dieser Bestimmungen kann auch eine durch konventionelle Kreuzung zwischen GVO x nicht-GVO gewonnene Sorte aus einem zugelassenen GVO in einem Verfahren nach der Richtlinie 2002/53/EG der Sortenzulassung unterzogen werden. Der gemeinsame Sortenkatalog für landwirtschaftliche Pflanzenarten wird anhand der Kataloge der Mitgliedstaaten zusammengestellt. Sobald eine Saatgutsorte ordnungsgemäß in den Katalog eines Mitgliedstaates aufgenommen ist, wird die Kommission davon unterrichtet und ersucht, die Sorte durch Veröffentlichung im Amtsblatt in den gemeinsamen Katalog aufzunehmen. Nur die in dem gemeinsamen Katalog verzeichneten Saatgutsorten können in allen 25 EU-Staaten angebaut werden, alle anderen hingegen nur in dem jeweiligen Mitgliedstaat. Die EU-Kommission hat am 8. September 2004 entschieden, 17 Sorten des Monsanto 810 Maises aus einzelstaatlichen Katalogen (Frankreich sechs Sorten, Spanien elf Sorten) in den gemeinschaftlichen Sortenkatalog der EU aufzunehmen. Im Prinzip können diese Sorten damit in allen 25 EU-Staaten vermarktet werden, nachdem sie zuvor nur in den nationalen Katalogen in Frankreich und Spanien gelistet waren und dort angebaut werden konnten.

Die Maislinien Bt176, T25 und MON 810 sind in der EU bereits seit 1997/98 nach der Freisetzungsrichtlinie 90/220/EWG für den Anbau zugelassen. Des Weiteren erhielten im Jahr 1996 zwei Hybrid-Rapslinien (MS1xRF1; MS1xRF2) die Anbaugenehmigung jedoch, nur für den eingeschränkten Zweck der Saatgutproduktion (kein Anbau für Futter-/Lebensmittelzwecke).

Der Anbau von GVO in Europa war – von Freisetzungsversuchen im Forschungsbereich abgesehen – im kommerziellen Bereich verglichen mit der globalen Situation bis zum Jahr 2004 äußerst gering. Spanien war zunächst das einzige EU-Land, das die grüne Gentechnik

zu kommerziellen Zwecken betrieb und ist bei der Erzeugung von genverändertem Mais auf ca. 50.000 Hektar landwirtschaftlicher Fläche europäischer Spitzenreiter. Demgegenüber nehmen sich die Zahlen anderer EU-Länder bescheiden aus, wenn auch ab 2005 beim Bt-Maisanbau ein Aufwärtstrend zu verzeichnen ist. In Frankreich und Portugal werden für das Jahr 2005 Anbauflächen für Bt-Mais von 500 bzw. 780 Hektar geschätzt. Erstmals wurde 2005 auch auf einer Fläche von ca. 300 Hektar in Tschechien Bt-Mais angebaut. Der Antrag

auf Anbau der Maissorte T25/Chardon LL in UK, für das ab dem Jahr 2005 bereits eine eingeschränkte Erlaubnis zur Tierfutterproduktion vorlag, wurde mittlerweile von Bayer Cropscience aus wirtschaftlichen Gründen zurückgezogen und eine erneute Beantragung des kommerziellen Anbaues nicht vor 2008 erwartet.

In Deutschland werden transgene Pflanzen bislang nur versuchsweise angebaut. Gentechnisch veränderter Mais wuchs auf ca. 300 Hektar im Jahr 2004. An dem Erprobungsanbau beteiligten sich 30 Betriebe aus sieben Bundesländern. Mit dem Erprobungsanbau im Rahmen der Sortenzulassung sollen praktische Erfahrungen gewonnen werden, um ein Nebeneinander von gentechnisch verändertem und gentechnikfreiem Maisanbau zu organisieren. Außer Bt-Mais werden bislang in der EU keine weiteren GVO zu kommerziellen Zwecken angebaut.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung in einigen osteuropäischen Ländern. Die Balkanstaaten Bulgarien und Rumänien werden voraussichtlich 2007 der EU beitreten. Rumänien unterhält die drittgrößte Sojaproduktion in Europa mit ca. 75.000 Hektar im Jahr 2003. Roundup Ready™ Sojabohnen werden in Rumänien bereits seit 1999 angebaut, der Anteil von GV Soja wird für das Jahr 2003 bereits auf 55-60% an der Gesamternte geschätzt [6]. In Bulgarien wurde erst 2004 ein Gesetzentwurf zur Regelung des Verkehrs mit gentechnisch verändertem Saatgut in das Parlament eingebracht. Es wird jedoch auf Basis der Saatgutkataloge davon ausgegangen, dass der Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen wie Mais, Soja und Tabak in Bulgarien bereits Praxis ist. Zahlenschätzung liegen hierzu nicht vor.

Generelle Informationen der EU über den Stand der Antragsverfahren, Gesetzgebung, Methodenentwicklung etc. für Freisetzung und Lebens- und Futtermittelgebrauch sind auf der offiziellen Internetseite der Kommission veröffentlicht (http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/index_en.htm).

7 Futtermittelimporte und Verarbeitung in Europa

7.1 Futtermittelimporte nach Europa

Obwohl die EU im Bereich der Getreide und Maisproduktion lediglich auf geringe Importmengen zurückgreift, ist die Einfuhr von proteinreichen Agrar-Rohstoffen zur Futtermittelproduktion nach wie vor ein bedeutender Handelssektor. Insgesamt wird für das Jahr 2004 eine Importmenge von ca. 39 Mio t (aufgeteilt in ca. 8 Mio t stärkereiche Argrargüter und 31 Mio t proteinreiche Argrargüter inklusive 27 Mio t Ölschrote/-kuchen) für die Mischfutterindustrie angegeben. Allein im ersten Halbjahr 2005 wird eine Gesamtimportmenge von 19 Mio t in die EU geschätzt, was bis Jahresende das Erreichen der Importzahlen der Vorjahre (zwischen ca. 37 und 39 Mio t seit 2000) vermuten lässt. (Quelle: Töpfer International, Statistikbroschüre 2005; download unter http://www.acti.de/media/Toepfer_Statistikbroschüre_Dezember05.pdf).

Aufgrund der günstigen Weltmarktpreise und ernährungsphysiologischen Eigenschaften spielt insbesondere Soja eine herausragende Rolle. In diesem Bereich greift die EU in großem Umfang (>90%) auf Importe aus den USA, Brasilien und Argentinien zurück. Durch Einfuhr von Soja wurde die infolge des im Dezember 2000 verabschiedeten Tiermehlverbots entstandene "Eiweißlücke" geschlossen. Die EU importiert jährlich etwa 16 Mio t Sojabohnen und 20 Mio t Sojaschrot. Sojaschrot ist somit das wichtigste Einzelfuttermittel der EU und deckt ca. 55% des Gesamtverbrauchs an eiweißhaltigen Futtermitteln ab. Gentechnisch veränderte Sojabohnen bilden inzwischen mehr als die Hälfte der Welt-Erzeugung. Eine Trennung von gentechnisch veränderten Sojabohnen von konventionellen Sojabohnen erfolgt in der Regel nicht. „Nicht GVO-Soja“ ist nur noch über Vertragsanbau z.B. aus den USA oder Brasilien erhältlich. Die Nachfrage nach GVO-freiem Soja ist in der EU gemessen am Verbrauch in der Futtermittelindustrie verhältnismäßig gering und wird auf ca. 100.000 t pro Jahr, hauptsächlich zur Herstellung von Tofu, Sojamilch und Bioprodukten für die menschliche Ernährung, geschätzt.

Europa ist bei Mais weitgehend Selbstversorger. 2,5 Mio t Körnermais wurden im Jahr 2005 gegenüber einer Produktionsmenge von ca. 47 Mio t in die EU importiert. 60% der Maisproduktion wird als Körner- oder Silomais direkt als Tierfutter verwertet. Die nicht erfolgende Trennung von GVO- und konventionellen Mais nach der Ernte hat in den vergangenen Jahren zu einer weiteren Abnahme der Mais-Importe aus den USA in die EU geführt. Lediglich Maiskleberfutter wurde im Jahr 2004 in nennenswertem Umfang (3,4 Mio t) aus den USA und Argentinien in die EU eingeführt. Maiskleber steht hinter Soja an zweiter Stelle der importierten Futtermittelausgangsstoffe, gefolgt von Palmkernschrot mit ca. 3,6 Mio t (Herkunft Malaysia und Indonesien) sowie mit abnehmender Bedeutung Sonnenblumenschrot, Futtererbsen, Fischmehl, Kokosschrot, Baumwollschrot, Rapschrot, Lupinen u.a. (Zahlen: Töpfer International, 2005).

Bezüglich Rapschrot – als weitere Ölsaart von Bedeutung für die Futtermittelindustrie – bestreitet die EU(25) als zweitgrößter Weltproduzent neben China (ca. 8 Mio; 2003/2004) mit über 7 Mio t in den Jahren 2003/2004 fast ein Drittel der Weltproduktion (ca. 23 Mio t). Daher sank in der EU der Import von verarbeitetem, futtermitteltauglichen Rapschrot in den vergangenen zehn Jahren auf eine geringe Menge von 45.000 t (2003/2004). Da China Rapschrot hauptsächlich für den Eigenbedarf produziert, sind Raps-Importe in die EU insbesondere aus dem Hauptexportland Kanada und eventuell Indien möglich. In Kanada wird bereits seit 1995 genetisch veränderter Raps angebaut (z.B. Linie HCN92, Brassica napus, Liberty-LinkTM Innovator), weshalb bei Raps-Importen aus Kanada eine reelle Kontaminationsgefahr mit GVO-Raps besteht.

Bei der Gewinnung von Baumwollfasern werden die anfallenden Samen zu verschiedenen Futtermitteln und -zusätzen verarbeitet. Derartige Produkte spielen in der EU gegenüber Getreide und anderen Ölsaaten jedoch nur eine relativ geringe Rolle. In den Jahren 2003 bis

2005 importierte die EU zwischen 98-112.000 t Baumwollschrot zur Futtermittelverarbeitung. (Zahlen: Toepfer International 2005). Hauptexportländer von Baumwollschrot sind neben China und den USA Argentinien, Brasilien und Paraguay. Von den USA ist bekannt, dass gentechnisch veränderte Baumwolle auf ca. einem Drittel der Anbaufläche wächst. In China zählt Baumwolle seit der Einführung im Jahre 1997 sogar zu den wachstumsstärksten GVO. Für das Jahr 2004 wird eine Anbaufläche von 3.7 Mio ha geschätzt, was annähernd 66% der Gesamtanbaufläche für Baumwolle in China entspricht (Zahlenangaben nach [5]). Sowohl in Importware aus China wie auch aus den USA sind daher Vermischungen mit GVO möglich. Für die zurückliegenden Jahre liegen noch keine statistischen Daten zur Herkunft des in die EU importierten Baumwollschrotes vor:

7.2 Mischfutter als Quelle für GVO-Einträge

In Deutschland wurden im Jahr 2004 ca. 20 Mio t Mischfutter hergestellt. 37,8% des Mischfutters werden an Schweine, 31,0% an Rinder, 15,3 % an Mastgeflügel, 11,1% an Nutzgeflügel und 4,8% an Kälber, Pferde und sonstige Tiere verfüttert. Mischfutter setzen sich aus Einzelfuttermitteln und in der Regel Zusatzstoffen sowie Mineralfutter zusammen. Fertiges Mischfutter kann daher aus bis zu 30 verschiedenen Komponenten bestehen wie z.B. Mais, Sojaschrot, Erbsen, Öle, Vitamine, Mineralstoffe (Quelle: Deutscher Verband Tiernahrung e.V., DVT, www.dvtiernahrung.de).

Die heutigen Produktionsleistungen an Fleisch, Eiern und Milch wären ohne den gezielten Einsatz hochenergetischen und auf die speziellen physiologischen Bedürfnisse der Tierart abgestimmten Mischfutters nicht möglich. Ca. 26-27% des Energiebedarfes in der Nutztierhaltung wird mittels Mischfutter gedeckt. Der Rest entstammt zumeist der inländischen primären Produktion an Heu, Weidegras, Raufutter und Hackfrüchten sowie Getreide, Silagen oder Ölsaaten-Schrote. In diesem Bereich ist eine mögliche Kontamination mit GVO zur Zeit noch gering. Dagegen ist die Situation aufgrund der Komplexität und unterschiedlichsten Herkunft der Komponenten beim Mischfutter unübersichtlicher. Eine wichtige Quelle für Rohstoffe für die Futtermittelherstellung sind zudem Reststoffe aus der Ernährungsindustrie [7], welche teilweise auch auf Importwegen nach Europa gelangen. Kontaminationen mit GVO in Futtermitteln sind insbesondere bei Ölsaaten-Schroten, inklusive Soja, aber auch Maisprodukten möglich.

Ölschrote (Extraktionsschrote, Ölkuchen, Expeller) sind die bedeutsamsten Eiweißlieferanten im Mischfutter. Für eine Verfütterung sind nahezu alle Rückstände von Ölfrüchten geeignet, die nach dem Auspressen und Extrahieren des Pflanzenöls in den Ölmühlen als Nebenprodukt anfallen. Besonders zu nennen sind Sojaextraktionsschrot, Sojaproteinkonzentrat, Rapsextraktionsschrot, Rapskuchen und Maiskeimextraktionsschrot.

Das Sojaextraktionsschrot ist heute in Deutschland das am meisten verfütterte Eiweißkraftfutter. Es wurde zunächst schwerpunktmäßig in der Milchviehhaltung eingesetzt, heute wird es auch zunehmend in der Schweine- und Geflügelfütterung genutzt. Wegen hoher Preise für Getreide verwendet die europäische Mischfutterindustrie auch zunehmend Sojabohnen für die Verfütterung an Milchkühe, an Schweine und an Geflügel [8].

Rapsextraktionsschrot wird insbesondere in der Schweinemast eingesetzt. Rapskuchen und Rapsextraktionsschrot werden auch an Mastrinder und Milchkühe verfüttert [8].

Sowohl der Maiskeimkuchen als auch das Maiskeimextraktionsschrot, deren Ausgangsmaterial aus der Stärkeindustrie kommt, haben mit rund 21% einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Rohprotein. Beide haben einen hohen Energiegehalt und sind in erster Linie Kraftfutter für Rinder und Schafe.

7.3 Mischfutterherstellung

Zur Herstellung von Mischfuttermitteln werden Futtermittelausgangserzeugnisse aus pflanzlichen, tierischen oder mineralischen Rohstoffen verwendet. Zu den Ausgangsrohstoffen gehören Getreidesorten (Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Mais, Triticale) sowie Nebenerzeugnisse aus der Verarbeitung von Getreidekörnern (Weizen-, Roggen-, Maiskleie-Futtermehl, Quellstärken, Malzkeime, Biertreber), Ölsaaten und deren Nebenerzeugnisse (Soja-, Raps-, Sonnenblumen-, Kokos-, Palmkern-, Leinextraktionsschrote und -kuchen). Weiterhin sind Knollen, Wurzeln und deren Erzeugnisse und Nebenerzeugnisse (Zuckerrüben, Trockenschnitte, Kartoffeleiweiß, Melasse), Milcherzeugnisse (Magermilch-, Molke-, Kaseinpulver), Mineralstoffe, Öle und Fette sowie Aminosäuren zu nennen.

Einer der wichtigsten Eiweißquellen für Tiere ist Sojaschrot, das bei der Verarbeitung von Sojabohnen als Koppelprodukt bei der Ölgewinnung anfällt. Im Verarbeitungsprozess in der Ölmühle werden die Sojabohnen mechanisch zerkleinert und das Öl mit Hilfe eines Lösungsmittels abgetrennt. Der verbleibende Feststoff, das Sojaschrot, wird in den Toastanlagen getoastet (über einen Zeitraum von ca. 30 min mit etwa 105 °C heißem Dampf behandelt), um Lösungsmittelreste zu entfernen und unerwünschte Inhaltsstoffe (z.B. Trypsin-hemmstoffe) abzubauen. Der Toastungsprozess bewirkt die Verbesserung der biologischen Wertigkeit und Verdaulichkeit des Sojaeiweißes. Anschließend wird der Feuchtigkeitsgehalt des Schrotes in Schrotrocknern reduziert (<http://www.oelmuehlen.de>).

Die eigentliche Mischfutterproduktion beginnt mit der exakten Dosierung der Rohstoffe mit modernen computergesteuerten Verwiegungsanlagen nach den Rezepturen der Mischfutterhersteller. Zusätzlich werden zur Homogenisierung Flüssigkomponenten wie Melasse, Fett etc. dosiert. Je nach Bedarf erfolgt nun eine Vermahlung. Mischanlagen gewährleisten eine sorgfältige Vermischung. Je nach Art des Mischfutters wird dieses nun zu Lagerung und Verkauf gebracht oder einer Weiterverarbeitung (Granulieren) unterzogen (<http://mischfutter.at>).

Unter Granulieren versteht man die Anwendung verschiedener Verfahren um mehlartigem Mischfutter gröbere Strukturen zu geben. Als häufigstes Verfahren ist hier das Pelletieren zu nennen. Zunächst wird in einer Vorstufe, dem Expandieren, das Futter mechanisch in einem Druckbehälter unter hoher Wasserdampfzugabe einem hohen Druck ausgesetzt. Hierbei werden bei einer Temperatur von bis zu 130 °C während einer Einwirkzeit von 5-10 s bis zu 50 bar erreicht. Anschließend erfolgt das Pelletieren. Durch meist zylinderförmige Bohrungen wird die Mischfuttermasse in Matrizen gepresst. Als Endprodukt erhält man dabei so genannte Pellets von unterschiedlicher Härte. Durch Expandieren und Pelletieren wird die Verdaulichkeit verbessert und die Staubfreiheit des Mischfutters erreicht. Diese Technik wird vor allem bei der Produktion von Alleinfutter angewendet.

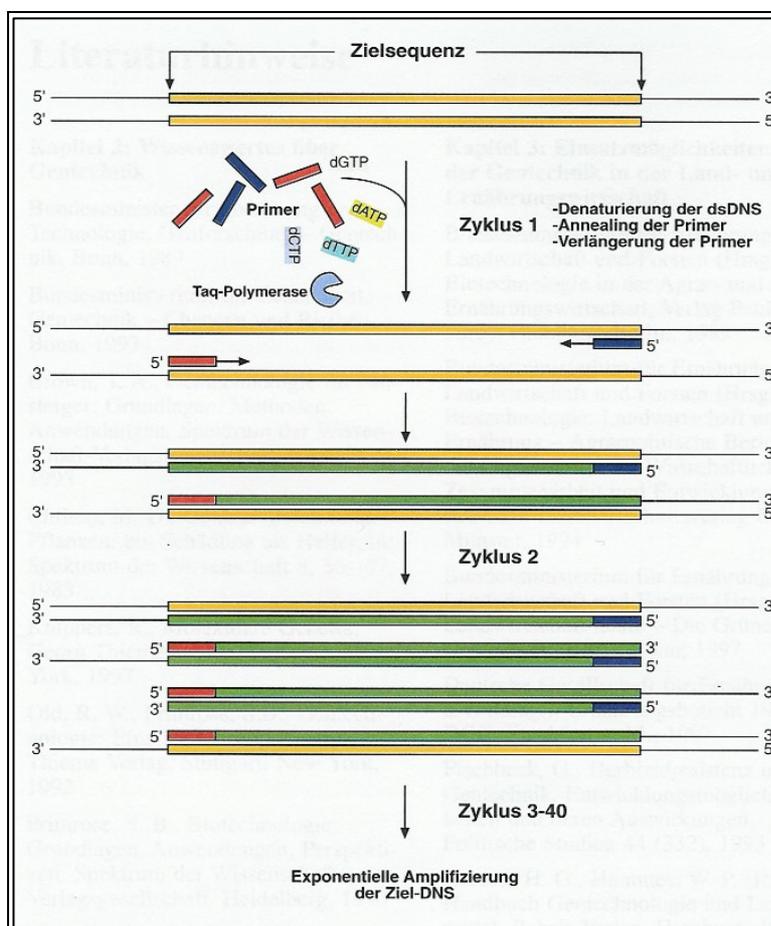
In Mehrproduktanlagen sind Kreuzkontaminationen durch technisch bedingte Verschleppungen von Bestandteilen vorangegangener Rezepturen nicht auszuschließen. Durch festgelegte Produktionsreihenfolgen und Spülchargen können diese Verschleppungen weitgehend minimiert, jedoch nicht vollständig verhindert werden [9].

8 Analytik – Theoretische Grundlagen

8.1 Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine in vitro-Technik, mit welcher gezielt Desoxyribonucleinsäure-(DNA)-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, amplifiziert (vervielfältigt) werden können. Grundlegende Voraussetzungen für die PCR sind: amplifikationsfähige DNA, ausreichende Mengen an Target-DNA (zu vervielfältigende, bekannte Ziel-DNA-Sequenz bzw. „template-DNA“) gegenüber der Gesamt-DNA, kurze Startsequenzen (Primer) und die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren. In der Regel werden genomische DANN-Mengen unter einem Mikrogramm, z.B. 50 ng bis 100 ng, eingesetzt [10]. Das Reaktionsprinzip entspricht der Replikation (Verdopplung) der DNA in der Zelle [11]. Im ersten PCR-Schritt wird die DNA bei 94 °C oder 95 °C denaturiert, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA, die als Matrize dienen. Anschließend wird die Temperatur auf ca. 58-64°C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im massiven Überschuss vorhandenen Primer an die einzelsträngige Template-DNA kommen kann. Danach wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der DANN-Polymerase (bei der Taq-Polymerase 72 °C) erhöht, wobei der Primer am 3'-Ende verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Hiermit ist der erste Reaktionszyklus abgeschlossen. Der Zeit/Temperatur-Zyklus wird in einem Thermocycler ca. 30-40 Mal wiederholt. Dabei dienen die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize. Ab dem vierten Zyklus vermehrt sich die Zielsequenz exponentiell [12], die Zahl der Template-DNAs verdoppelt sich in einem Zyklus (Abb. 3).

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Neben der ausgeprägten Spezifität, die auf der Wahl einer ausschließlich im Analyten vorkommenden DNA Sequenz basiert, zeichnet sich die PCR durch eine hohe Sensitivität aus. Theoretisch reicht ein Molekül Target-DNA aus, um es in der PCR zu vervielfältigen. Nach 20 PCR-Zyklen sollte sich die Zielsequenz theoretisch 2^{20} fach vermehrt haben, vorausgesetzt, dass die Ausbeute in jeder Runde 100%ig ist. Diese Effizienz wird in der Praxis in der Regel nicht erreicht, da der Verlauf der PCR von vielen Faktoren wie Inhibitoren, Enzymaktivität, Primerbindung- und Verfügbarkeit beeinflusst wird. Nach 25-30 Zyklen sinkt die Kapazität der Polymerase und die Reaktion erreicht ein Plateau. Mit zunehmender Konzentration der Ziel-DNA kommt es zudem zur Hybridisierung der DNA-Stränge untereinander, was die Anlagerung der Primer verhindert und damit die Effektivität der Vervielfältigung senkt. In der Praxis liegt die Effizienz der PCR aufgrund nicht vermeidbarer hemmender Faktoren in der Reaktion zwischen 70-80 % (Abb. 4). Bei qualitativen Verfahren wird üblicherweise eine untere Detektionsgrenze von ca. zehn Genomkopien erreicht.

Die PCR und Varianten der Methodik sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Daher sei an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur verwiesen [11], [12], [13].

Abbildung 4: Theoretische und experimentell bestimmte DNA Kopienzahl in der PCR in Abhängigkeit von der Zyklenzahl (Quelle: Vorlesung Hermann Broll, Tu-Berlin, Fachbereich Lebensmittelchemie, Sommersemester 2005)

| | Theoretische | | Reelle Kopienzahl | | | |
|--|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| durchschnittlicher Vermehrungsfaktor je Zyklus | 2 | 1,65 | 1,60 | 1,55 | 1,50 | 1,45 |
| Vermehrung | | | | | | |
| 10 Zyklen | 10^3 | 150 | 110 | 80 | 58 | 41 |
| 20 Zyklen | 10^6 | $2,2 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^4$ | $6,4 \times 10^3$ | $3,3 \times 10^3$ | $1,7 \times 10^3$ |
| 30 Zyklen | 10^9 | $3,3 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^6$ | 5×10^5 | $1,9 \times 10^5$ | 7×10^4 |
| 40 Zyklen | 10^{12} | 5×10^8 | $1,5 \times 10^8$ | $4,1 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $2,8 \times 10^6$ |
| | 100% | 82,5% | 80% | 77,5% | 75% | 72,5% |

8.2 Die Bestätigungsreaktion

Die zweifelsfreie Identifizierung des PCR-Produktes erfolgt in der „klassischen“ Endpunkt-PCR durch Restriktionsenzyme, die das PCR-Produkt in Abschnitte definierter Länge schneiden. Diese werden anschließend nach Auftrennung in einem Agarosegel sichtbar gemacht.

Das Prinzip der Auftrennung von PCR-Produkten beruht auf deren Fähigkeit, in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung zu wandern. In Abhängigkeit von Molekülgröße und Form wandern die DNA-Fragmente in einem Agarosegel, das mit einem Zusatz von Ethidiumbromid versehen und in einer Pufferlösung suspendiert ist, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Laufstrecke in Richtung des positiven Pols ist umgekehrt proportional zu der Größe der DNA-Fragmente.

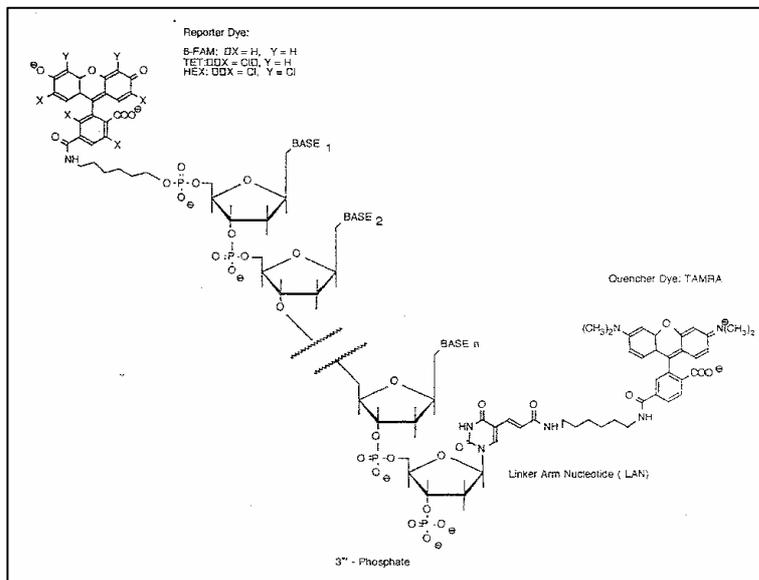
Nach der Elektrophorese werden die DNA-Fragmente mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid aus dem Agarosegel lagert sich in die DNA-Struktur ein. UV-Strahlung mit 254 nm wird von der DNA absorbiert und an das Ethidiumbromid transmittiert, das Strahlung der Wellenlängen 302 nm und 366 nm absorbiert. Dieses emittiert dann das Licht der Wellenlänge 590 nm. Das Gel mit den DNA-Banden kann dann photographisch festgehalten werden.

Die mitgeführten DNA-Längenstandards bekannter Größe dienen zur Ermittlung der Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente der unbekannteren Proben.

8.3 Relative Quantifizierung mittels real-time PCR am Beispiel der TaqMan™-Technologie

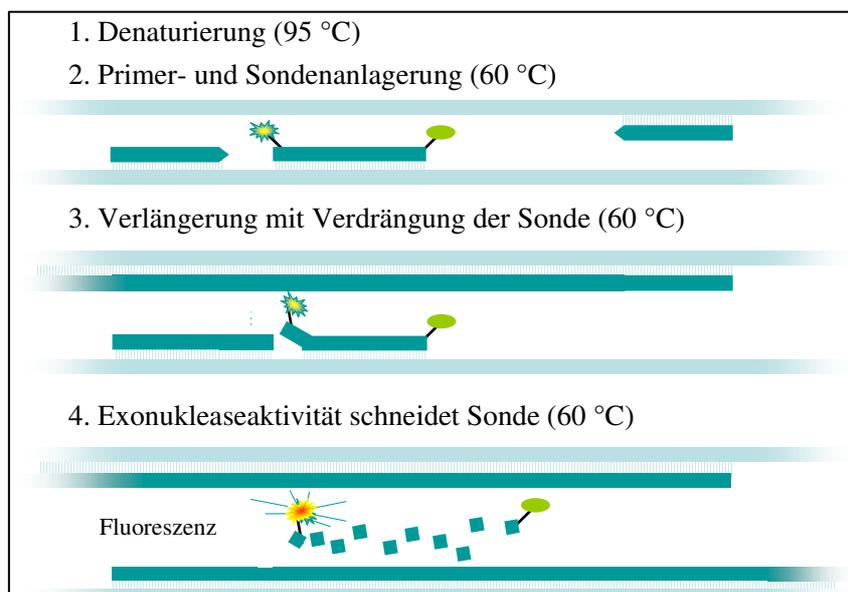
Die TaqMan™-PCR misst die Zunahme an PCR-Produkten während der PCR. Hierzu wird eine spezielle fluorogene Sonde („Probe“) eingesetzt, die spezifisch an das neu entstehende Amplifikat bindet. Eine nachträgliche Bestätigung der Reaktion mittels Restriktionsenzymen entfällt. Eine Hybridisierungssonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluorescein-Derivat) markiert. Das 3'-Ende trägt einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat). Die Sonde ist mit einem 3'-OH-Phosphatrest blockiert, so dass eine Extension des 3'-Endes während der PCR verhindert ist. Die Sequenz der Sonde muss so geschaffen sein, dass sie in einem Sequenzbereich zwischen beiden PCR-Primern mit der DNA hybridisiert. In diesem Zustand wird die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregte Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt, indem ein Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) vom Reporter- zum Quencherfarbstoff stattfindet. Ein Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes kann dadurch nicht detektiert werden. Wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase während der PCR zerschnitten, ist der Reporter-Farbstoff von der Nachbarschaft des Quenchers befreit und in der Lage, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren. Die Fluoreszenzzunahme während der PCR ist dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional und lässt sich anhand einer Kurve in Echtzeit (real time) darstellen. In Abbildung 5 ist die chemische Struktur einer TaqMan™-PCR-Sonde dargestellt. Das TaqMan™-PCR-Prinzip ist in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 5: TaqManTM-Sonde. Beispiel einer TaqManTM-Sonde mit einem Reporter- und Quencherfluoreszenzfarbstoff an den jeweiligen Enden der Sonden



Ein häufig verwendeter Reporter-Farbstoff ist FAM (6-Carboxy-Fluorescein), welcher bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird und in ausreichender Entfernung eines Quencher-Moleküls Fluoreszenz der Wellenlänge 518 nm emittiert. Weitere zur Verfügung stehende Farbstoffe sind beispielsweise TET (Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein), JOE (2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) oder HEX (Hexachloro-6-carboxy-fluorescein). Als Quencher-Farbstoff wird üblicherweise TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rodamin) verwendet, das bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird und Fluoreszenz der Wellenlänge 582 nm emittiert.

Abbildung 6: Prinzip der TaqManTM-PCR (Quelle: Vorlesung Hermann Broll, TU-Berlin, Fachbereich Lebensmittelchemie, Sommersemester 2005)



8.4 Relative Quantifizierung anhand von Standardkurven

Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Der Anstieg der Fluoreszenz ist der Anreicherung an Amplifikat direkt proportional und kann in einem geeigneten Detektor (z.B. ABI PRISM™ 7700) in jedem Zyklus verfolgt werden. Beim Anstieg der Fluoreszenz im Laufe der Zyklen kreuzt die Kurve nach ca. > 20 Zyklen die durch die Höhe des Grundrauschens definierte Basislinie. Derjenige Zellzyklus-Wert, an welchem die Fluoreszenzkurve die Basislinie schneidet, wird Threshold Cycle genannt (C_T -Wert). Dabei gilt: Je höher die Startkopienzahl des Analyten, desto niedriger (früherer Anstieg der Fluoreszenz) wird der C_T -Wert ausfallen.

Der C_T -Wert ist für die Quantifizierung die bestimmende Kenngröße. Für die relative Quantifizierung werden Standardkurven aus mindestens fünf Verdünnungsstufen eines Standardmaterials (vorzugsweise aus zertifiziertem Referenzmaterial extrahierte DNA), erstellt. Für jede Verdünnungsstufe wird der C_T -Wert ermittelt. Aus diesen Werten wird über den Logarithmus der jeweiligen Startkopienzahl eine Standardkurve erstellt (Abb. 7). Für die relative Quantifizierung von GVO sind zwei getrennte Standardkurven notwendig. Eine Standardkurve wird mit einem Primersystem für eine pflanzenarttypische Sequenz aufgezeichnet. Die zweite Standardkurve wird mit einem Primersystem, welches spezifisch für die gentechnische Veränderung ist, ermittelt. Anhand dieser Standardkurven kann die Startkopienzahl der zu untersuchenden, unbekanntenen Proben sowohl für die Pflanzenart, als auch für die gentechnische Veränderung interpoliert und bestimmt werden. Werden beide Werte (für Pflanzenart und GVO) ins Verhältnis gesetzt, ist das Resultat die Angabe von GVO-Anteilen in Prozent bezogen auf die jeweilige Zutat. Das Standardkurvenverfahren ist beispielhaft für Roundup Ready™ Sojabohne in Abbildung 8 dargestellt und beschrieben.

Abbildung 7: Vom Fluoreszenz-Signal zur Kopienzahl: Auftragung der Cycle-Threshold- Werte (C_T -Werte) über die Startkopienzahl der Standard-Lösungen.

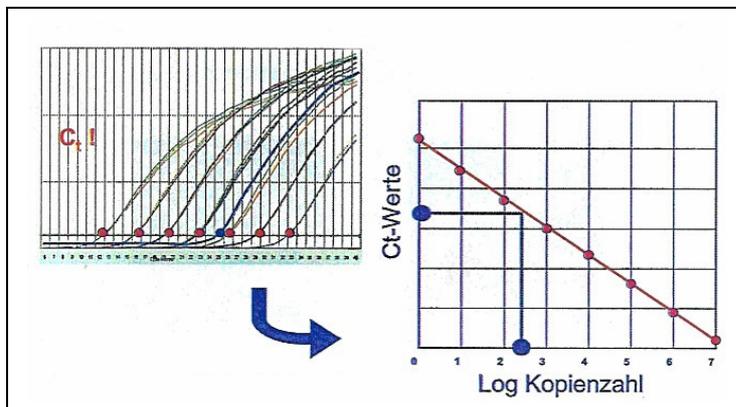
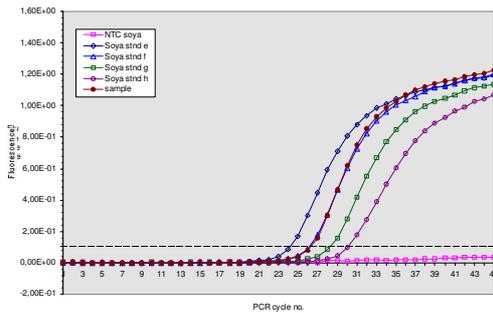
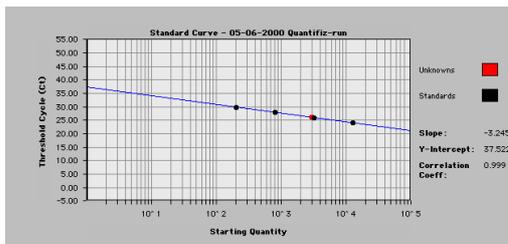
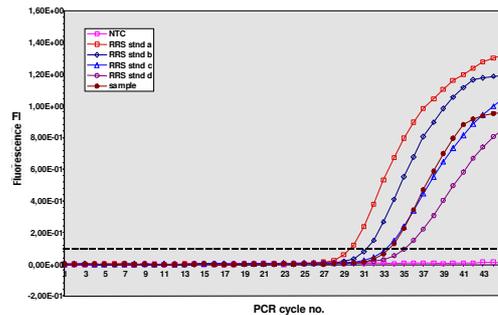


Abbildung 8: Relative Quantifizierung von Roundup Ready™ (RR™) Sojabohne mittels zweier Eichkurven für „Soja“ und RR™ Soja. Die C_T -Werte sowie die Startkopienzahl lassen sich für die unbekannte Probe anhand der Eichkurve (C_T -Wert = Ordinate/Startkopienzahl = Abszisse) ablesen. Beide Werte werden ins Verhältnis gesetzt und die Menge „Soja“ zu „RR™ Soja“ bestimmt. (Quelle: Vorlesung Hermann Broll, TU Berlin, Fachbereich Lebensmittelchemie, Sommersemester 2005)

Lektin Quantifizierung



RRS Quantifizierung



9 Material und Methoden

Anmerkung: Grundsätzlich müssen analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Chemikalien verwendet werden, mit denen weitgehend steril gearbeitet werden muss. Das verwendete Wasser muss bidestilliert oder von vergleichbarer Qualität und autoklaviert sein.

9.1 Basis-Chemikalien

| Produkt | Hersteller |
|---|------------|
| Agarose LE | Boehringer |
| Bisbenzimid H 33258 | Sigma |
| Borsäure | Sigma |
| Calf Thymus DNA (5 U) | Sigma |
| Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) | Merck |
| Essigsäure 100% | Merck |
| Ethanol abs. | Merck |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz, (Titriplex III) | Merck |
| Glycerin 87%, p.A. | Merck |
| Isopropanol | Merck |
| Natriumacetat, wasserfrei | Merck |
| Natriumchlorid | Merck |
| Ready Red (Chloroform/Isoamylalkohol) | Qbiogene |
| Saccharose | Merck |
| Salzsäure 25% | Merck |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Merck |
| Xylencyanol | Merck |
| Wasser (dest.) | Fluka |

9.2 Fertigreagenzien

| Produkt | Hersteller |
|--|--------------------|
| dATP (10 mM) | Applied Biosystems |
| dCTP (10 mM) | Applied Biosystems |
| dGTP (10 mM) | Applied Biosystems |
| dUTP (20 mM) | Applied Biosystems |
| DNA-Längenstandard 50 Bp (200 ng/μl) | GIBCO BRL® |
| DNA-Längenstandard 100 Bp (200 μg/μl) | GIBCO BRL® |
| Ethidiumbromid, 1%ige Lösung in Wasser | Merck |
| Gene Amp®10x PCR Puffer II (ohne mgCl ₂) | Applied Biosystems |
| Magnesiumchlorid (25 mM) | Applied Biosystems |
| NucleoSpin Food® Kit | Macherey-Nagel |
| TaqMan®-Universal PCR Mastermix | Applied Biosystems |

9.3 Enzyme

| Produkt | Hersteller |
|--------------------------------|--------------------|
| Ampli Taq Gold™ (5 U/μl) | Applied Biosystems |
| Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) | Merck |

9.4 Primer für die PCR (alle Primer synthetisiert von TIB-MOLBIOL, Berlin)

9.4.1 Screening-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|-------------|----------------------------------|-----------------|---|------|
| 35S-1 | 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3' | 195 | a) §64 LFGB L-00.00-31 [14] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [16] |
| 35S-2 | 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3' | | | |

9.4.2 Soja-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|-------------|--------------------------------------|-----------------|---|------|
| GM03 | 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3' | 118 | a) §64 LFGB L-23.01.22 [17] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [18] |
| GM04 | 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3' | | | |

9.4.3 Roundup-Ready-Soja-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|-------------|-------------------------------------|-----------------|---|------|
| p35s-f2 | 5'-TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G-3' | 172 | a) §64 LFGB L-23.01.22 [17] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [19] |
| petu-r1 | 5'-TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T-3' | | | |

9.4.4 Mais-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|-------------|---|-----------------|--|------|
| IVR1-F | 5'-CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C-3' | 226 | a) §64 LFGB L-15.05-1 [20] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [21] |
| IVR1-R | 5'-GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C-3' | | | |

9.4.5 Bt176-Mais-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|-------------|----------------------------------|-----------------|--|------|
| Cry03 | 5'-CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT-3' | 211 | a) §64 LFGB L-15.05-1 [20] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [22] |
| Cry04 | 5'-GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT-3' | | | |

9.4.6 Bt11-Mais-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|-------------|-------------------------------------|-----------------|--|------|
| IVS2-2 | 5'-CTG GGA GGC CAA GGT ATC TAA T-3' | 189 | a) §64 LFGB L-15.05-1 [20] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [23] |
| PAT-B | 5'-GCT GCT GTA GCT GGC CTA ATC T-3' | | | |

9.4.7 T25-Mais-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|-------------|--------------------------------------|-----------------|--|------|
| T25-F7 | 5'-ATG GTG GAT GGC ATG ATG TTG-3' | 209 | a) §64 LFGB L-15.05-1 [20] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [23] |
| T25-R3 | 5'-TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CC-3' | | | |

9.4.8 MON810-Mais-spezifische Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|-------------|--------------------------------------|-----------------|--|------|
| VW01 | 5'-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CG-3' | 170 | a) §64 LFGB L-15.05-1 [20] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [23] |
| VW03 | 5'-TCC ATC TTT GGG ACC ACT GTC G-3' | | | |

9.4.9 Chloroplasten-spezifische-Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|-------------|------------------------------|-----------------|--|------|
| Plant1-F | 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' | 500-600* | a) §64 LFGB L-24.01-1 [24] b) prEN ISO 2159:2005 [15] | [25] |
| Plant1-R | 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3' | | | |
| Plant2-F | 5'-GGAAGCTGTTCTAACGAATCG-3' | 199 | ./. | [26] |
| Plant2-R | 5'-CTCGAAAACAATGAATTGAAGG-3' | | | |

*Fragmentgröße abhängig von Pflanzenart

9.4.10 Weizen-spezifische-Primer

| Primer-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|-------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|------|
| WBR11-F | 5'-GTAACCTCCAAATTCAGAGAAAC-3' | 201 | ./. | [27] |
| WBR13-R | 5'-TCTCTAATTTAGAATTAGAAGGAA-3' | | | |

9.5 Primer und Sonden für real-time-PCR Systeme

(Alle Primer und Sonden wurden synthetisiert von TIB MOLBIOL®, Berlin)

9.5.1 Screening-Primer (CaMV 35S Promotor) und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|--------------------|---|-----------------|---|------|
| 35S-F | 5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT-3' | 82 | a) SLMB-Methode 52B/2.1.3/2000 [28] b) ISO/FDIS 21570:2004(E) [29] | [30] |
| 35S-R | 5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C-3' | | | |
| 35S-TMP (Sonde) | 5'-FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC g-TAMRA-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.2 Soja-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|--------------------|---|-----------------|------------------------------|------|
| GM1-F | 5'-CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC-3' | 74 | ISO/FDIS 21570: 2004(E) [29] | [29] |
| GM1-R | 5'-GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC-3' | | | |
| GM1 (Sonde) | 5'-FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC – TAMRA-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.3 Roundup-Ready-Soja-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|--------------------|--|-----------------|------------------------------|------|
| RR1-F | 5'-CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA-3' | 74 | ISO/FDIS 21570: 2004(E) [29] | [29] |
| RR1-R | 5'-GAG CCA TGT TGT TAA TTT GTG CC-3' | | | |
| RR1 (Sonde) | 5'-FAM-CAA GCT GAC TCT AGC TCT T TC-TAMRA-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.4 Mais-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|--------------------|--|-----------------|------------------------------|------|
| ZM1-F | 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3' | 79 | ISO/FDIS 21570: 2004(E) [29] | [32] |
| ZM1-R | 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3' | | | |
| ZM1 (Sonde) | 5'-FAM-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA – TAMRA-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.5 Bt176-Mais-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|--------------------|---|-----------------|------------------------------|------|
| Cry2-F | 5'-CCC ATC GAC ATC AGC CTG AGC-3' | 129 | ISO/FDIS 21570: 2004(E) [29] | [32] |
| Cry2-R | 5'-CAG GAA GGC GTC CCA CTG GC-3' | | | |
| BTSYN (Sonde) | 5'-FAM-ATG TCC ACC AGG CCC AGC ACG – TAMRA-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.6 Bt11-Mais-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standard-methode | Lit. |
|--------------------|---|-----------------|------------------|------|
| Bt11-F | 5'-TCT TGG CGG CTT ATC TGT CTC-3' | k.A. | ./. | [44] |
| Bt11-R | 5'-TCA ACT GGT CTC CTC TCC GG-3' | | | |
| Bt11-S (Sonde) | 5'-FAM-CGT GTT CCC TCG GAT CTC GAC ATG T-TAMRA-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.7 T25-Mais-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|--------------------|--|-----------------|-----------------|------|
| T25-F | 5'-GGA AGT TCA TTT CAT TTG GAG AGG-3' | 83 | ./. | [45] |
| T25-R | 5'-GGC CAT ATC AGC TGC TGT AGC-3' | | | |
| T25-FAM (Sonde) | 5'-FAM- GCC TAA TCT CAA CTG GTC TCC TCT CCG GA -TAMRA-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.8 MON810-Mais-spezifische Primer

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|--------------------|---|-----------------|------------------------------|------|
| Mail-F1 | 5'-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT-3' | 92 | ISO/FDIS 21570: 2004(E) [29] | [29] |
| Mail-R1 | 5'-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3' | | | |
| Mail-S2 (Sonde) | 5'-FAM- AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-TAMRA P-3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

9.5.9 Raps-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|--------------------|--|-----------------|-----------------|------|
| Pep-F | 5'-CAG TTC TTG GAG CCG CTT GAG-3' | k.A.** | ./. | [33] |
| Pep-R | 5'-TGA CGG ATG TCG AGC TTC ACA-3' | | | |
| PEP (Sonde) | 5'-FAM- ACA GAC CTA CAG CCG ATG GAA GCC TGC -TAMRA -3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

** keine Angabe in Originalliteratur

9.5.10 Falcon-/Liberator-Raps-spezifische Prime und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|--------------------|--|-----------------|-----------------|------|
| Pat-F | 5'-CGC GGT TTG TGA TAT CGT TAA C-3' | k.A.** | ./. | [33] |
| Pat-R | 5'-TCT TGC AAC CTC TCT AGA TCA TCA A-3' | | | |
| Pat (Sonde) | 5'-FAM- AGG ACA GAG CCA CAA ACA CCA CAA GAG TG-TAMRA -3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

** keine Angabe in zitierter Quelle

9.5.11 GT73-Raps-spezifische Primer und Sonde

| Primer/Sonden-Bez. | Sequenz | Amplifikat (Bp) | Standardmethode | Lit. |
|--------------------|---|-----------------|-----------------|------|
| EPS336-F | 5'-CCA ATG GGT CGT GTG TTG AA-3' | k.A.** | ./. | [34] |
| EPS444-R | 5'-TTG GCG TTG GAG TCT TTG GT-3' | | | |
| EPS932-S (Sonde) | 5'-FAM- AGA CGG TGA TCG TCT TCC AGT TAC CTT GC -TAMRA -3' * | | | |

*FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine

** keine Angabe in zitierter Quelle

9.5.12 Proben

Alle untersuchten Proben (Tabelle 2) sind handelsübliche Futtermittel, die am Versuchsgut Marienfelde, Berlin, und Versuchsgut Dahlem, Berlin, verfüttert werden. Die Probenahme ist von Dritten durchgeführt worden.

Tabelle 2: Untersuchte Proben

| Proben-Nr. | Bezeichnung | Zusammensetzung ¹ | Beschaffenheit | Hersteller |
|------------|---|--|---|---|
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | Triticale, Sojaextraktionsschrot, Rapsexpeller, Melasseschnitzel, Melasse, Gerste, Weizenkleie, Vormischung 8176, Natriumchlorid | Pellets, ca. 2 cm lang | Gerswalder Mühle GmbH & Co. KG, Prenzlau |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | Triticale, Sojaextraktionsschrot, Gerste, Melasse, Melasseschnitzel, Vormischung, Kalvicin, Pflanzenfett RSM | Grob gemahlene Pulver | Gerswalder Mühle GmbH & Co. KG, Prenzlau |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I Alleinfutter für Sauen Type 031 | Gerste, Weizengrießkleie, Maiskleberfütter, Rapsextraktionsschrot, Zuckerrohrmelasse, Sojaextraktionsschrot, dampferhitzt, Birtreber, Calciumcarbonat, Bierhefe, Calcium-Natrium-Phosphat, Haferschälkleie, Lysin, Zusatzstoff-Vorm.-Nr.8011 | ursprünglich Pellets, in gemahlener Form erhalten | STRÖH Hobbersdorf, Mühlenbetriebe-Krafftutterwerk, Pansdorf |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | Haferflocken, Mais aufgeschlossen, Molkepulver, Magermilchpulver, Sojaproteinkonzentrat, Kartoffeleiweiß, Pflanzenfett, Sojabohnen aufgeschlossen, Calciumcarbonat, Monocalciumphosphat, L-Lysin HCl, Natriumchlorid, L-Threonin, DL-Methionin, Tryptophan Magnesiumoxid | kleine Pellets, ca. 0,5 cm lang | SALVANA Tiernahrung GmbH, Elmshorn-Sparrieshoop |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03 weniger Fett | Weizenschrot, Maisschrot, Sojaschrot, Grünmehl, Sojaöl, DL-Methionin, Perlkalk, Monocalciumphosphat, Vormischung LE. 7 04-0025, Carophyll Rot | Grob gemahlene Pulver | Die Versuchsgutmitarbeiter Marienfelde, Berlin vermischen die einzelnen Bestandteile selbst zum Futtermittel. |
| 03101AL | LE1-P, Alleinfutter I für Legehennen | Weizen, Sojaextraktionsschrot dampferhitzt, Mais, Calciumcarbonat, Mineralfutter, Sojaöl, Luzernegrünmehl, Calcium-Natrium-Phosphat | kleine Pellets | FMS Futtermittel GmbH Selbelang, Selbelang |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde (Haferersatz) | Gerste, Weizen, Triticale, Weizenkleie, Luzernegrünmehl, Melasseschnitzel, Zuckerrübenmelasse, Mineralfutter, Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Calciumpropionat | große Pellets | FMS Futtermittel GmbH Selbelang, Selbelang |

Fortsetzung Tabelle 2: Untersuchte Proben

| Proben-Nr. | Bezeichnung | Zusammensetzung ¹ | Beschaffenheit | Hersteller |
|------------|---|--|--|--|
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | Weizengrießkleie, Zuckerrüben-trockenschnitzel, Luzernegrünmehl, Gerstenflocken, Maisflocken, Weizenflocken, Zuckerrohrmelasse, Sojaöl, Mais extrudiert, Johannisbrotschrot, Hafer-schälkleie, Weizenkleie, Zuckerrübenmelasse, Maiskleberfutter, Vormischung, Weizenkleber-futter, Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Hefe getrocknet, Mono-Dicalcium-phosphat (anorg.) | Müsli | Muskator-Werke, Düsseldorf |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | Zuckerrüben-trockenschnitzel | große, sehr harte Pellets, ca. 2 cm lang | FMS Futtermittel GmbH Selbelang, Selbelang |

¹ Zur Begriffsbeschreibung über einzelne Bestandteile der Futtermittel s. [35]

9.5.13 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|--------------------|
| ABI PRISM [®] Optical Caps | Applied Biosystems |
| MicroAmp [®] Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems |
| Micro Amp PCR-Gefäße | Perkin Elmer |
| NucleoSpin Food [®] columns | Macherey-Nagel |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml | Eppendorf |

9.5.14 Geräte

| Bezeichnung | Hersteller, Typenbezeichnung |
|--------------------------|--|
| Digitalkamera | Biostep |
| Elektrophorese-Station | Pharmacia, EPS 3500 XL |
| Fluorometer | Hoefer, DyNAQuant [™] 200 |
| Gekühlte Tischzentrifuge | Eppendorf, Centrifuge 5417 R |
| Labormessermühle | Retsch, Grindomix GM 200 |
| Mikroliterzentrifuge | Roth |
| Mikrowelle | Bosch |
| Minishaker (Vortexer) | IKA, Minishaker MS1 |
| PCR-Arbeitshaube | Herolab, Clenecab |
| Präzisionswaage | Mettler, PM 2000 |
| Real-time-PCR-System | Applied Biosystems, ABI Prism [™] 7700 Sequence Detector WAB, Turbula [®] Typ T2 F |
| Schüttelmischer | Holten, HB 2448 |
| Sicherheitswerkbank | Faster BHA 48 |
| Sicherheitswerkbank | Perkin Elmer, GeneAmp [®] 2400 |
| Thermocycler | Eppendorf, Thermomixer 5436 |
| Thermomixer | Eppendorf, Thermomixer comfort |
| Thermomixer | Heraeus, Megafuge 1.0 |
| Tischzentrifuge | Eppendorf, Concentrator 5301 |
| Vakuumpzentrifuge | |

9.6 Methoden

9.6.1 Probenaufarbeitung (DNA-Präparation)

Für die Probenaufarbeitung wurde die CTAB-Methode nach L-23.01.22-1 aus der Amtlichen Sammlung der Untersuchungsverfahren nach LMBG § 35 (§64 LFGB) verwendet [17]. Die Methode ist als europäische Standardmethode (EN/ISO 21571:2005, [36]) erhältlich.

Alternativ dazu wurde mit dem NucleoSpin Food[®] Kit extrahiert, um die DNA-Ausbeute vergleichen zu können [37].

9.6.2 DNA-Extraktion mittels CTAB

Chemikalien

CTAB-Extraktionspuffer (pH=8), enthaltend CTAB (ρ , = 20 g/l), NaCl (c = 1,4 mol/l), Tris (c = 0,1 mol/l), Na₂-EDTA (c = 20 mMol/l), eingestellt mit HCl und filtriert (Filterporengröße 0,22 μ m)

CTAB-Präzipitationslösung, enthaltend CTAB (ρ = 5 g/l) und NaCl (c = 0,04 mol/l)

dest. Wasser

Ethanol 70%ig

Isopropanol

Natriumchlorid-Lösung, c = 1,2 mol/l

Ready Red (Chloroform/Isoamylalkohol)

Durchführung

Die gesamte Menge der Futtermittelprobe wurde mittels einer Labormessermühle gemahlen. Anschließend wurde die Probe in einem Schüttelmischer ca. 2 h vollständig homogenisiert. Die Probe 03106AL, Zuckerrübetrockenschnitzel, wurde aufgrund der harten Beschaffenheit zunächst in dest. Wasser für ca. 2 h aufgequollen (40 g Pellets in 80 ml H₂O) und dann gemahlen.

200 mg der homogenen Probe wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Nach Zugabe von 1000 μ l CTAB-Extraktionspuffer wurde gemischt und 30 min bei 65°C unter Schütteln im Thermomixer inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 15000 g und bei einer Temperatur von 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 μ l Ready Red versetzt und 30 s mit Hilfe eines Minishakers gemischt. Zur Phasentrennung wurde 10 min bei 12000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dazu zwei Volumenteile CTAB-Präzipitationslösung hinzugegeben und mit Hilfe eines Minishakers gemischt. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation unter leichtem Schütteln im Thermomixer bei Raumtemperatur. Der Reaktionsansatz wurde bei 15000 g und einer Temperatur von 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 350 μ l NaCl (c = 1,2 mol/l) gelöst. Nach der Zugabe von 350 μ l Ready Red wurde 30 s mit Hilfe eines Minishakers gemischt und zur Phasentrennung 10 min bei etwa 12000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. In ein neues Reaktionsgefäß wurde die obere (wässrige) Phase überführt, mit 0,6 Volumenteile Isopropanol zur Fällung versetzt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Um die ausgefallene DNA zu isolieren, wurde 30 min bei 15000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Auf das Pellet wurden 500 μ l Ethanol (σ = 70%) gegeben und unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend wurde 15 min bei 15000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die trockene DNA wurde anschließend in 30 μ l bzw. 100 μ l dest. Wasser gelöst.

9.6.3 DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food® Kit

Die DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin Food® Kit der Firma Macherey-Nagel beruht auf dem gleichen Prinzip wie die CTAB-Extraktion. Im ersten Schritt wird die DNA durch eine Lyse der Zellen freigesetzt. Die gelöste DNA wird an die NucleoSpin Food®-Säule gebunden, mehrmals gewaschen und anschließend mit einem Puffer eluiert.

Chemikalien

Ethanol abs.

Proteinase K [20 mg/ml]

Puffer CF (Lysepuffer), unmittelbar vor Gebrauch auf 65°C erhitzt

Puffer C2

Puffer C3

Puffer C4, hergestellt aus C2 und C3, indem Puffer C3 (1 Volumenteil) 5 min bei 70°C erhitzt, dann in Puffer C2 (4 Volumenteile) gegeben und gut gemischt wird.

Puffer C5

Puffer CE, unmittelbar vor Gebrauch auf 70°C erhitzt

Puffer CQW

Durchführung

Die gesamte Menge der Futtermittelprobe wurde mittels einer Labormessermühle gemahlen. Anschließend wurde die Probe in einem Schüttelmischer ca. 2 h vollständig homogenisiert. Die Probe 03106AL, Zuckerrübenschnitzel, wurde aufgrund der harten Beschaffenheit zunächst in dest. Wasser für ca. 2 h aufgequollen (40 g Pellets in 80 ml H₂O) und dann gemahlen.

200 mg der homogenen Probe wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen, 1100 µl Puffer CF (65°C) dazugegeben und sorgfältig mit Hilfe eines Minishakers gemischt. Nach der Zugabe von 20 µl Proteinase K wurde kurz gemischt und 30 min bei 65°C unter Schütteln im Thermomixer inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 15000 g und einer Temperatur von 4°C 10 min zentrifugiert. 300 µl des klaren Überstands wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 350 µl Puffer C4 und 200 µl absolutem Ethanol versetzt und 30 s mit Hilfe eines Minishakers gemischt. Die NucleoSpin Food®-Säule wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß platziert und 750 µl der Probenmischung auf die Säule gegeben. Anschließend wurde 1 min bei 11000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, 400 µl Puffer CQW auf die Säule gegeben und 1 min bei 11000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Für den Waschschrift wurden 700 µl Puffer C5 auf die Säule gegeben und 1 min bei 11000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Mit 200 µl Puffer C5 wurde ein zweites Mal gewaschen und 2 min bei 11000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 30 µl bzw. 100 µl Puffer CE (70°C) 5 min stehen gelassen. Anschließend wurde 1 min bei 11000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert.

9.6.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde mit dem Photometer DyNAQuant™ 200 bestimmt. Dabei handelt es sich um eine fluorometrische Messung. Das Prinzip der Messung basiert auf der Fluoreszenzeigenschaft des Farbstoffes Bisbenzimid.

Bisbenzimid besitzt ein Absorptionsmaximum bei 356 nm und ein schwaches Emissionsmaximum bei 492 nm. In Gegenwart von DNA lagern sich die Moleküle des Farbstoffes in die DNA-Helix an und binden so an die DNA. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum nach 365 nm und das Emissionsmaximum nach 458 nm [13]. Die DNA-Lösung wird mit Licht von 365 ± 7 nm bestrahlt und über einen Filter die Fluoreszenz bei 460 ± 15 nm registriert.

Chemikalien

Bisbenzimid

Calf Thymus DNA: 5 U, 250 µg

TE Puffer 1x : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,4

TNE 10x : 100 mM Tris, 2 M NaCl, 10 mM EDTA

Tris-HCl 1M : 1M Tris pH 8,0

dest. Wasser

DNA Standard Stock Solution [1 mg/ml] : 250 µg Calf Thymus DNA in 250 µl TE Puffer

DNA Standard Solution 1:10 [100 ng/µl] : 50 µl DNA Standard Stock Solution [1 mg/ml] mit 450 µl TE Puffer 1:10 verdünnt

Dye Stock-Solution [1 mg/ml] (Färbelösung): 10 mg Bisbenzimid mit dest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt

Working Solution (frisch zubereitet) 10 ml TNE 10x und 10 µl Dye Stock-Solution mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt

Durchführung

2 ml Working Solution wurden in die Glas-Küvette gegeben und am DynaQuant™ auf ZERO eingestellt. Anschließend wurden 2 µl DNA Standard [100 ng/µl] dazugegeben und auf dem Vortexer gemischt. Dieser Wert wurde auf 100 ng/ml (± 4) kalibriert. Diese Arbeitsschritte wurden wiederholt, um diesen Wert zu bestätigen. Nach der Kalibrierung wurden die Proben vermessen. 2 ml Working Solution wurden in die Küvette pipettiert und auf ZERO gedrückt, anschließend 2 µl Probe dazugegeben, gemischt auf dem Vortexer und der DNA-Gehalt in ng/µl abgelesen.

9.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für Screeningverfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen wurde die Methode L-00.00-31 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (§ 64 LFGB) vor einem spezifischen Nachweis verwendet [15]. Hierzu wurde auf eine Promotor-Sequenz aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV35S-Promotor) getestet. Das Verfahren ist in eine Europa-Norm (prEN/ISO 2159:2005) konvertiert worden.

Die amtliche Methode L15-05-1 [20] (prEN/ISO 2159:2005) wurde als ein Routineverfahren zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais (*Zea mays* L.) verwendet. Dabei wurde jeweils mit Hilfe der PCR mit einem geeigneten Primerpaar eine für die gentechnische Veränderung spezifische Sequenz amplifiziert. Als Zielsequenzen wurden Übergänge zwischen benachbarten, für die gentechnische Veränderung charakteristischen Sequenzen (z.B. Promotor/Gensequenz) gewählt [20].

Die amtliche Methode L23-01-22-1 [17] (prEN/ISO 2159:2005) beschreibt ein Routineverfahren zum Nachweis bestimmter DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenzen von glyphosatresistenten Sojabohnen (*Glycine max*) mit dem spezifischen Primerpaar p35s-f2/petu-r1, welches an der CaMV35S-Promotersequenz und an die *Petunia hybrida* Chloroplasten-Transit-Signal-Sequenz bindet.

Die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA wurde in einem Parallelansatz mit einem Primerpaar kontrolliert, das aus einem Bereich des Lektin-Gens stammt, welches speziesspezifisch für *Glycine max* ist [17].

Der Nachweis von Getreide/Weizen wurde nach Dahinden et al., 2001, [27] durchgeführt. Für die Kontroll-PCR wurden spezifische Primer für den Nachweis eines multicopy-Chloroplastengenes, gemäß der amtlichen Methode L-24.01-1 [24], verwendet.

Allgemein galt die gesuchte Sequenz als nachgewiesen, wenn die durch einen Vergleich mit gelelektrophoretisch aufgetrennten Längenstandards ermittelte Größe des PCR-Produktes

der erwarteten Länge der gesuchten DNA-Sequenz entsprochen hat, an der zu untersuchenden Probe als auch an einer parallel analysierten konventionellen Probe mit dem Kontrollprimerpaar ein PCR-Produkt der zu erwartenden Größe erhalten wurde, und wenn folgende Kontrollen durchgeführt wurden, die gezeigt haben, dass das Analysesystem nicht verunreinigt war, d.h. in den PCR-Kontrollansätzen ohne DNA-Zusatz kein PCR-Reaktionsprodukt und in den Kontrollansätzen mit Negativproben kein für das transgene Material spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte.

Chemikalien

| | |
|---------------------------|---|
| dNTP-Mischung: | 100 µl 10 mM dATP, 100 µl 10 mM dCTP, 100 µl 10 mM dGTP, 100 µl 20 mM dUTP |
| Puffer | Gene Amp 10x PCR Puffer II |
| MgCl ₂ -Lösung | 25 mM/1,5 ml |
| Polymerase | Ampli Taq Gold® [5 U/ml] |
| Primer1 | 20 µmol/µl |
| Primer2 | 20 µmol/µl |
| dest. Wasser | |

Durchführung

Im Probenaufarbeitungsraum (Extraktionsraum) wurden jeweils 2 µl (50-100 ng) der DNA-Proben in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße gegeben. Im PCR-Ansatz-Raum wurden die Mastermix-Komponenten für 25 µl Volumenansatz unter dem Mastermix-Abzug in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben (Beispiel siehe Tabelle 3) und anschließend mit Hilfe eines Vortexers gemischt.

Tabelle 3: Beispiel für die Zusammensetzung eines Mastermix für sieben Ansätze

| Substanz [Einheit] | Ausgangskonz. | Endkonz. | Menge pro Ansatz [µl] | Gesamtmenge [µl] |
|--------------------------------|---------------|----------|-----------------------|------------------|
| 10x Puffer [µM] | 10 | 1 | 2,5 | 17,5 |
| MgCl ₂ [mM] | 25 | 2 | 2 | 14 |
| dNTPs [mM] | 2,5 | 0,1 | 1 | 7 |
| Primer 1 | 20 | 0,5 | 0,625 | 4,375 |
| Primer 2 | 20 | 0,5 | 0,625 | 4,375 |
| Ampli Taq Gold®-Polymerase [U] | 5 | 1 | 0,2 | 1,4 |
| Wasser | | | 16,05 | 112,35 |

Unter der Sicherheitswerkbank wurde die berechnete Menge Mastermix (23 µl) für jede Probe sowie eine Wasserprobe als Kontrolle zugegeben und mit Hilfe eines Vortexers gemischt. Nachdem die PCR-Ansätze vorbereitet waren, wurden die verwendeten Verbrauchsmaterialien dem Autoklaven zugeführt und die Sicherheitswerkbänke mit UV-Licht dekontaminiert. Die PCR wurde in einem separaten PCR-Raum durchgeführt. Die angewendeten Temperaturprogramme sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verwendete Zeit-/Temperaturprofile in der PCR

| PCR-System | Primer, Endkonzentration | Temperaturprogramm | |
|------------------|---|---|---|
| CaMV35S-Promotor | 35S-1/35S-2 je 0,2 µM Größe des PCR-Produkts: 195 Bp | Denaturierung der DNA 35maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 10 min bei 95°C 20 s bei 95°C 40 s bei 54°C 40 s bei 72°C 3 min bei 72°C |
| Soja | GM03 / GM04 je 0,4 µM Größe des PCR-Produkts: 118 Bp | Denaturierung der DANN 35maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 10 min bei 95°C 30 s bei 95°C 30 s bei 60°C 60 s bei 72°C 3 min bei 72°C |
| RR-Soja | p35s-f2 / petu-r1 je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 172 Bp | Denaturierung der DNA 40maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 10 min bei 95°C 30 s bei 95°C 30 s bei 62°C 25 s bei 72°C 3 min bei 72°C |
| Mais | IVR1-F / IVR1-R je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 226 Bp | Denaturierung der DANN 42maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 12 min bei 95°C 30 s bei 95°C 30 s bei 64°C 30 s bei 72°C 10 min bei 72°C |
| Bt176-Mais | CRY03 / CRY04 je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 211 Bp | Denaturierung der DANN 38maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 12 min bei 95°C 30 s bei 95°C 30 s bei 63°C 30 s bei 72°C 10 min bei 72°C |
| Bt11-Mais | IVS2-2 / PAT-B je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 189 Bp | Denaturierung der DANN 38maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 12 min bei 95°C 30 s bei 95°C 30 s bei 64°C 30 s bei 72°C 10 min bei 72°C |
| T25-Mais | T25-F7 / T25-R3 je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 209 Bp | Denaturierung der DANN 40maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 12 min bei 95°C 30 s bei 95°C 30 s bei 64°C 30 s bei 72°C 10 min bei 72°C |
| MON810-Mais | VW01 / VW03 je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 170 Bp | Denaturierung der DANN 40maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 12 min bei 95°C 30 s bei 95°C 30 s bei 64°C 30 s bei 72°C 10 min bei 72°C |
| Chloroplasten | Plant1-F / Plant1-R je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: ca.600 Bp | Denaturierung der DANN 35maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 3 min bei 94°C 20 s bei 96°C 40 s bei 54°C 40 s bei 72°C 3 min bei 72°C |
| Chloroplasten | Plant1-F / Plant1-R je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 532 Bp | Denaturierung der DANN 40maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 10 min bei 94°C 30 s bei 94°C 60 s bei 60°C 7 min bei 72°C |
| Chloroplasten | Plant2-F / Plant2-R je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 199 Bp | Denaturierung der DANN 40maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 10 min bei 94°C 30 s bei 94°C 60 s bei 60°C 3 min bei 72°C |
| Getreide/Weizen | WBR11-F/WBR13-R je 0,5 µM Größe des PCR-Produkts: 201 Bp | Denaturierung der DANN 45maliger Durchlauf des folgenden Zyklus abschließende Elongation | 3 min bei 94°C 20 s bei 96°C 1 min 20 s bei 60°C 1 min 20 s bei 72°C 3 min bei 72°C |

9.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Theorie

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Trennung der PCR-Produkte nach Größe. Das Prinzip ist unter Abschnitt 2.2 beschrieben. Als Farbstoff im Ladepuffer wurde Xylencyanol verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid konnte die DNA nach UV-Anregung sichtbar gemacht werden.

Chemikalien

Agarose LE (low electroendosmosis)

Ethidiumbromid-Lösung: 1%ig

Gel-Ladepuffer: 0,25% Xylencyanol, 40% Saccharose

DNA-Längenstandard: 50 Bp DNA Leiter [200 ng/µl]
100 Bp DNA Leiter [200 ng/µl]

0,5x TBE-Puffer: 0,045 M Tris-borat, 0,001 M EDTA

dest. Wasser

Durchführung

Um ein 1,5%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid herzustellen, wurden 2,3 g Agarose LE eingewogen und in 150 ml Elektrophorese-Pufferlösung (0,5x TBE- Puffer) durch Erwärmen in der Mikrowelle suspendiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 15 µl Ethidiumbromid dazugegeben und leicht geschwenkt. Anschließend wurde das flüssige Gel sofort in einen Gelträger mit eingesetzten Kämmen gegossen. Nach dem Polymerisieren (ca. 1 h) wurde das Gel in die mit 0,5x TBE-Puffer beschickte Elektrophorese-Kammer gelegt.

Anschließend wurden die Ansätze für die Gelelektrophorese vorbereitet. In 0,5 ml Reaktionsgefäße wurden jeweils 2 µl des Gel-Ladepuffers vorgelegt und 10 µl der amplifizierten Proben bzw. 3 µl Längenstandard (50 Bp DNA Leiter oder 100 Bp DNA Leiter) und 7 µl dest. Wasser zugegeben. Das ganze Volumina der so vorbereiteten Proben wurde auf das Gel aufgetragen, und das Elektrophorese-Programm, das aus zwei Phasen bestand, wurde gestartet:

Phase 1: 300 V, 100 mA, 1 min

Phase 2: 150 V, 100 mA, 45 min

Mit dem Programm „Biostep Video Luminiszenz 12+“ erfolgte die Bildaufnahme der Agarosegele. Zuerst wurde das Gel positioniert und die Einstellung der Schärfe, des Bildausschnittes und die korrekte Wahl des Filters an der Kamera vorgenommen. Nach dem Einschalten der Transluminations erfolgte die Aufnahme mit folgenden Parametern:

Belichtungsdauer des UV-Lichtes 3400 ms, Blende 8 und Anzahl der addierten Bilder 4 bis 6. Mit dem Programm „Phoretix 1D Advanced“ wurden die Bilder anschließend bearbeitet, indem die Kontraste und Helligkeit der Bilder optimiert wurden. Die Bilder wurden mit einem Sony Digital Printer ausgedruckt.

9.6.7 Real-time PCR-System: TaqMan (TM)

9.6.7.1 Relative Quantifizierung mit TaqMan (TM)

Theorie

Mit der TaqManTM-PCR-Technologie (Prinzip siehe Einführung, 8.3) wurde die DNA-Konzentration fluorometrisch bestimmt. Dazu wurde der ABI PRISMTM 7700 Sequence Detector verwendet.

Chemikalien

TaqMan[®] Universal PCR Mastermix ohne Uracil: Ampli Taq Gold[®] DNA Polymerase
AmpErase UNG
dNTPs
passive Referenz (Farbstoff ROX)
optimierte Pufferkomponenten inklusive MgCl₂

Primer forward/reverse [20 µM]

Sonde [20 µM]

dest. Wasser

Durchführung

Die Mastermix-Komponenten wurden wie beschrieben (s. PCR-Mastermixe, Abschnitt 9.6.5, Tab. 3) zuzüglich der Sonde pipettiert. Für die Versuche am 7700 Sequence Detector wurde ein „Universel-Mastermix“ der Firma Applied Biosystems verwendet, der bis auf die Primer und Sonde bereits alle notwendigen Reagenzien enthält. Die quantitative Zusammensetzung des Mastermix war abhängig von der Anzahl der Ansätze und der gewählten Menge an Primern und Sonde, und musste daher für jeden Versuch neu berechnet werden. Es wurde immer ein 25 µl Ansatz verwendet.

Zur Überprüfung der Reinheit des Mastermix und einer Kontamination beim Ansetzen der PCR wurde auch hier eine Wasserprobe mitgeführt, die neben den üblichen Mastermix statt der zu amplifizierenden DNA nur das zur Verdünnung verwendete dest. Wasser enthalten hat.

Die Tabelle 5 zeigt ein Beispiel für die Zusammensetzung eines Mastermix für ein real-time PCR System. In Tabelle 6 sind Primer- und Sondenkonzentrationen, die für den Mastermix verwendet wurden, angegeben.

Tabelle 5: Beispiel für die Zusammensetzung des Mastermix für RRTM-Soja-Nachweis mit 50 Ansätzen

| Substanz [Einheit] | Ausgangskonz. | Endkonz. | Menge [µl] pro Ansatz (25µl) | Gesamtmenge [µl] |
|--|---------------|----------|------------------------------|------------------|
| TaqMan [®] Universal PCR Mastemix | 2x | 1x | 12,5 | 625 |
| Forward Primer [µM] | 20 | 0,3 | 0,375 | 18,75 |
| Reverse Primer [µM] | 20 | 0,3 | 0,375 | 18,75 |
| Sonde [µM] | 20 | 0,2 | 0,25 | 12,5 |
| Wasser | | Rest | 6,5 | 325 |

Tabelle 6: Verwendete Primer- und Sondenkonzentrationen für den Mastermix

| Nachweissystem | Primerpaar/Sonde | Ausgangskonz. [μM] | Endkonz. [μM] |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| CaMV 35S-Promotor | 1. Primer 35S-F | 20 | 0,3 |
| | 2. Primer 35S-R | 20 | 0,9 |
| | Sonde 35S-TMP | 20 | 0,1 |
| Soja | 1. Primer GM1-F | 20 | 0,3 |
| | 2. Primer GM1-R | 20 | 0,3 |
| | GM1-Sonde | 20 | 0,2 |
| RR-Soja | 1. Primer RR1-F | 20 | 0,3 |
| | 2. Primer RR1-R | 20 | 0,3 |
| | RR1-Sonde | 20 | 0,2 |
| Mais | 1. Primer ZM1-F | 20 | 0,2 |
| | 2. Primer ZM1-R | 20 | 0,2 |
| | ZM1-Sonde | 20 | 0,1 |
| Bt176-Mais | 1. Primer CRY2-F | 20 | 0,2 |
| | 2. Primer CRY2-R | 20 | 0,2 |
| | Sonde Bt SYN | 20 | 0,1 |
| Bt11-Mais | 1. Primer Bt11-F | 20 | 0,2 |
| | 2. Primer Bt11-R | 20 | 0,2 |
| | Bt11-Sonde | 20 | 0,1 |
| T25-Mais | 1. Primer T25-F | 20 | 0,2 |
| | 2. Primer T25-R | 20 | 0,2 |
| | T25-Sonde | 20 | 0,1 |
| MON810-Mais | 1. Primer Mail-F1 | 20 | 0,3 |
| | 2. Primer Mail-R1 | 20 | 0,3 |
| | Sonde Mail-S2 | 20 | 0,2 |
| Raps | 1. Primer pep-F | 20 | 0,3 |
| | 2. Primer pep-R | 20 | 0,3 |
| | pep-Sonde | 20 | 0,2 |
| Falkon-Raps/ Liberator-Raps | 1. Primer pat-F | 20 | 0,3 |
| | 2. Primer pat-R | 20 | 0,3 |
| | pat-Sonde | 20 | 0,2 |
| GT73-Raps | 1. Primer eps336-F | 20 | 0,2 |
| | 2. Primer eps444-R | 20 | 0,2 |
| | Sonde eps392-T | 20 | 0,1 |

Die Mastermix-Komponenten wurden in ein Gefäß zusammenpipetiert und anschließend mit Hilfe eines Vortexers gemischt.

Die Standard-Lösungen wurden immer aus 100%ig genetisch verändertem Material (Sojabohne, Maismehl und Rapssamen) hergestellt. Es wurden Verdünnungen mit definierten Kopienzahlen hergestellt, indem die Konzentration [$\text{ng}/\mu\text{l}$] der extrahierten Ausgangs-DNA mit Hilfe der Genomgröße einzelner Pflanzenarten in die Genomäquivalente (Kopien) umgerechnet wurde (siehe Tabelle 7). Am Beispiel der Sojapflanze sieht die Berechnung wie folgt aus:

Es wurde von der Annahme ausgegangen, dass eine Kopie des Genkonstrukts je Genom vorliegt und dass die Genomgröße der Sojapflanze $1,13 \times 10^9$ Basenpaare beträgt (ISO/FDIS 21570:2004(E) [29]). Mit Hilfe der Genomgröße wurde das Molekulargewicht ausgerechnet, indem man den Genomgröße-Wert mit einer Konstante (660) multipliziert hat, da es um eine doppelsträngige DNA geht.

$$\begin{aligned} \text{Molekulargewicht} &= 1,13 \times 10^9 \text{ Bp} * 660 \\ &= 7,5 \times 10^9 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Um zu wissen, wie viel ein Genomäquivalent Sojapflanze wiegt, wurde das Molekulargewicht mit der Avogadro-Konstante geteilt ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) [38]:

1 Genomäquivalent Soja wiegt: $(7,5 \times 10^9 \text{ g/mol}) : (6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}) = 1,25 \text{ pg}$

1 Genomäquivalent Soja = 1,25 pg

x = 100.000 pg

x = 80.000 Genomäquivalente

Damit sind in 100 ng Soja-DNA 80.000 Genomäquivalente (Kopien).

Wenn zum Beispiel 179 ng/μl DNA aus 100%ig RRTM-Soja extrahiert wurde, muss ausgerechnet werden, wie viel Kopien das entspricht, und die DNA entsprechend verdünnt werden.

100 ng = 80.000 Kopien

179 ng = x Kopien

x = 143.200 Kopien

Anschließend wurde die Ausgangs-DNA-Lösung (149200 Kopien) zur einer Standardreihe verdünnt, indem die Standard-Lösungen mit 2000 Kopien, 200 Kopien, 20 Kopien, 2 Kopien und 1 Kopie hergestellt wurden. Ausgehend davon, dass pro Ansatz 5 μl DNA-Lösung eingesetzt wurden, beinhaltete die Standardreihe Lösungen mit 10000 Kopien, 1000 Kopien, 100 Kopien, 10 Kopien und 5 Kopien.

Aus der Tabelle 7 können die Genomgrößen einzelner Pflanzenarten entnommen werden.

Tabelle 7: Genomgrößen einzelner Pflanzenarten

| Pflanzenart | Genomgröße | Angabequelle |
|-------------|--------------------------------|--|
| Soja | $1,13 \times 10^9 \text{ Bp}$ | ISO/FDIS 21570:2004(E) [29] |
| Mais | $2,65 \times 10^9 \text{ Bp}$ | ISO/FDIS 21570:2004(E) [29] |
| Raps | $1,127 \times 10^9 \text{ Bp}$ | www.rbgekew.org.uk/cval/database1.html |

Jeweils 5 μl der DNA-Proben (10-50 ng) wurden in die MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate doppelt vorgelegt (Doppelbestimmung). Für jede zu amplifizierende Probe sowie für die Wasserprobe und Standard-Lösungen wurden 20 μl Mastermix zugegeben. Somit war die Gesamtmenge jedes Ansatzes 25 μl. Anschließend wurde die Reaktionsplatte bei 1000 g für 1 min zentrifugiert, damit sich der gesamte Ansatz im Reaktionsgefäß luftblasenfrei am Boden befindet.

Mindestens 10 min vor Beginn einer TaqManTM-PCR wurde der ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection Systems eingeschaltet und der Macintosh-Rechner gestartet, so dass der Heizdeckel eine Temperatur von 104 °C erreichen konnte. Das 7700 Sequence Detector-Programm wurde geöffnet und eine neue Maske mit dem Einstellungen „Single Reporter“, „7700 Sequence Detector“ und „Real Time“ erstellt. Im „Setup-View“-Fenster wurden der Probentyp (z.B. Unknown oder Standard), das Fluoreszenzniveau (immer FAM) und das Thermocycler-Programm eingegeben (*Bedienungshinweise*: a) Applied Biosystems, SDS Compendium 7700 – Vers. 3.0; b) PE Biosystems: Anwender-Information zur Inbetriebnahme des ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection Systems, 1999; c) Schild, T.A. (2000): Einführung in die Real-time TaqManTMPCR-Technologie, 7700 SDS Workshop, Vers. 2.1). In der Tabelle 8 ist das Temperaturprogramm angegeben, das immer verwendet wurde. Da die AmpliTaq Gold bereits bei Temperaturen von > 55 °C eine signifikante Aktivität besitzt, wurde Annealing und Extension zu einem gemeinsamen Schritt zusammengefasst und somit auf eine separate Extension bei 72 °C verzichtet. Damit wurde eine 2-Schritt-PCR durchgeführt.

Tabelle 8: Temperaturprogramm für Untersuchungen am 7700 SDS Gerät

| Prozess | | Zeit [min] | Temperatur [°C] |
|-------------------------------------|-----------|---------------|--------------------|
| Start: Aktivierung und Aufschmelzen | | 10:00 | 95 |
| Denaturierung | 45 Zyklen | 00:15 | 95 |
| Annealing + Extension | | 01:00 | 60 |

9.6.7.2 Bestimmung der Nachweisgrenze für real-time PCR-Systeme

Theorie

Zur korrekten Auswertung der Quantifizierungsergebnisse, wurden die Nachweisgrenzen für die TaqMan™ PCR-Systeme bestimmt.

Durchführung

Es wurden dreimal gleiche Reihen von DNA-Lösungen mit definierten Kopienzahlen aus 100%ig gentechnisch verändertem Material (Sojabohne, Maismehl und Rapssamen) hergestellt, welche 1000 Kopien, 100 Kopien, 50 Kopien, 10 Kopien, 5 Kopien und 1 Kopie in 5 µl Ansatz enthielten. Nachdem die DNA-Lösungen verdünnt waren, wurden Mastermix und PCR-Ansätze wie beschrieben (9.6.7.1) vorbereitet und anschließend mit dem 7700 SDS Gerät gemessen und ausgewertet.

10 Ergebnisse

10.1 Probenaufarbeitung (DNA-Präparation)

Voraussetzung für eine erfolgreiche PCR ist die Extraktion ausreichender Mengen PCR-geeigneter DNA. Alle neun untersuchten Proben (s. Tab. 2, Abschnitt 9.5.12) wurden nach der CTAB-Methode (wie beispielsweise in der amtlichen Methode L-00.00-31, L-23.01.22-1, bzw. EN/ISO 21571:2005, A.3 [36] beschrieben) extrahiert. Zusätzlich wurde an ausgewählten Beispielen auch ein kommerzieller Kit (NucleoSpin Food® Kit) eingesetzt. Vorteile der Extraktion mittels Kit sind neben einer einfachen Anwendung die gute Reproduzierbarkeit, aber auch ein deutlich verkürzter Zeitaufwand. Nachteilig ist der höhere Kostenfaktor.

10.1.1 DNA-Extraktion mittels CTAB-Methode gemäß amtlicher Methoden L-00.00-31, L-23.01.22-1, (EN/ISO 21571:2005, A.3)

Es wurde eine 200 mg homogenisierte Probe jeweils dreimal extrahiert. Dabei wurde immer eine Extraktionskontrolle (Wasser) mitgeführt. Die extrahierte DNA wurde, wenn in Tabelle 9 nicht anders vermerkt, in 30 µl Wasser gelöst. Die erzielten DNA-Ausbeuten sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: DNA-Ausbeuten der untersuchten Proben mittels CTAB- Extraktion nach amtlicher Methode L-23.01.22-1

| Probennr. | Probenbezeichnung | 1. Extraktion [ng/µl] | 2. Extraktion [ng/µl] | 3. Extraktion [ng/µl] |
|-----------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | 407 (1:2) | 436 (1:2) | 428 (1:2) |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | 103 (in 100 µl H ₂ O) | 337 | 761 |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I Alleinfutter für Sauen Type 031 | 410 | 235 | 353 |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | 13 | 14 | 11 |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03, weniger Fett | 302 | 402 | 275 |
| 03101AL | LE1-P, Alleinfutter I für Legehennen | 548 | 261 | 374 |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde, Haferersatz | 122 | 92 | 65 |
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | 197 (in 100 µl H ₂ O) | 160 (in 100 µl H ₂ O) | 181 (in 100 µl H ₂ O) |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | 1 | 1 | 0 |
| EK | Extraktionskontrolle | 0 | 0 | 0 |

Die extrahierten DNA-Mengen mittels CTAB-Methode waren mit Ausnahme der Proben 03094AL und 03106AL ausreichend bis sehr gut. Die Extraktionskontrollen zeigten keine Kontamination des Mastermixes.

10.1.2 DNA-Extraktion mittels NucleoSpin Food® Kit

Proben 03094AL und 03106AL, bei denen die CTAB-Extraktion nur geringe DNA-Ausbeuten erzielten, wurden mit dem NucleoSpin Food® Kit extrahiert. Weiterhin wurde die Probe 03102AL, bei welcher mittels CTAB-Standardverfahren genügend DNA gewonnen wurde, zu Vergleichszwecken ebenfalls mit dem Kit extrahiert.

Bei der Extraktion mittels Kit wurden folgende DNA-Ausbeuten erzielt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Erzielte DNA-Ausbeuten der untersuchten Proben durch Extraktion mittels NucleoSpin Food® Kit

| Probennummer | Probenbezeichnung | 1. Extraktion [ng/µl] | 2. Extraktion [ng/µl] | 3. Extraktion [ng/µl] |
|--------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | 33 (in 30µl CE-Puffer) | 21 (in 30 µl CE-Puffer) | 57 (in 30 µl CE-Puffer) |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde (Haferersatz) | 75 (in 100 µl CE-Puffer) | 62 (in 100 µl CE-Puffer) | 54 (in 100 µl CE-Puffer) |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | 10 (in 30µl CE-Puffer) | 10 (in 30 µl CE-Puffer) | 12 (in 30 µl CE-Puffer) |
| EK | Extraktionskontrolle | 0 | 1 | 0 |

Bei den Proben 03094AL und 03106AL ist die mittels Kit extrahierte DNA-Menge um den Faktor 3-10 höher als bei der CTAB-Methode. Die DNA-Ausbeute der Probe 03102AL ist mit derjenigen der CTAB-Methode vergleichbar.

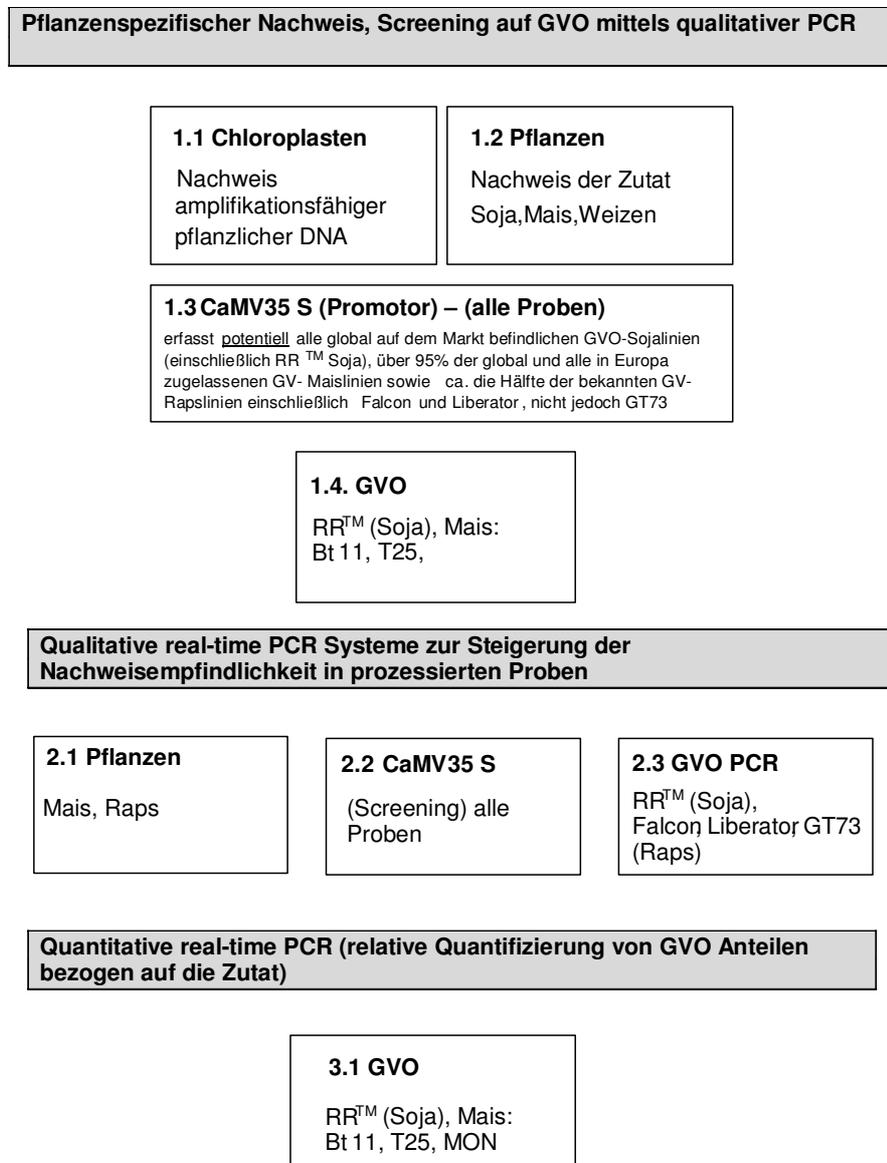
Fazit: Die amtliche CTAB-Methode (EN/ISO 21571:2005, A.3) ist für die meisten der hier untersuchten Futtermittelproben gut anwendbar. Im Falle stark prozessierter Proben (Saugferkel Spezial-Futter) oder schlecht aufzuschließender Proben (harte Rübetrockenschnitzel) lieferte der NucleoSpin Food® Kit jedoch deutlich bessere Ergebnisse.

10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

10.2.1 Analyseschritte

Die mehrstufige analytische Strategie ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Die Präsenz amplifikationsfähiger pflanzlicher DNA und Pflanzenarten in den neun Futtermittelproben (s. Tab. 2, Abschnitt 9.5.12) wurde anhand pflanzen- und chloroplastenspezifischer Systeme in einer qualitativen einfachen PCR mittels Detektion der PCR-Produkte in Agarosegelen überprüft. Des Weiteren folgte mit allen Proben ein qualitatives Screening in einer PCR, welche das Vorhandensein des CaMV 35S (Cauliflower Mosaicvirus) Promotors überprüft. Das Screening gibt einen ersten Überblick zu vermutlich mit GVO kontaminierten Proben. Das verwendete 35S Screening System erfasst alle global zugelassenen *gv*-Sojalinien (einschließlich der in Europa zugelassenen Roundup Ready™ Sojabohne) sowie die in Europa zugelassenen GV Maislinien Bt 176, Bt 11, T25 und MON810 und > 95 % der in anderen Ländern verkehrsfähigen GV-Maislinien. Die 35S-PCR detektiert theoretisch auch die Rapslinien Falcon und Liberator, bzw. zwei von den drei in das Untersuchungsprogramm einbezogenen Rapslinien (die dritte Rapslinie, GT73, besitzt keinen 35S Promoter), welche in Europa marktfähig sind. Zur Erfassung höher prozessierter oder Minderkomponenten, die z.B. beim Raps zu erwarten waren (Ölpressrückstände), wurden in einer zweiten Analyse-Stufe sensitive real-time PCR Systeme eingesetzt. An *gv*-positiven Proben wurden sowohl „klassische“ Endpunkt PCR-Systeme (Auswertung der PCR-Produkte im Elektrophoresegel) wie auch real-time Systeme zur Detektion der spezifischen gentechnischen Veränderung eingesetzt. Im Falle von Raps wurden ausschließlich real-time Systeme verwendet.

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Analyseschritte

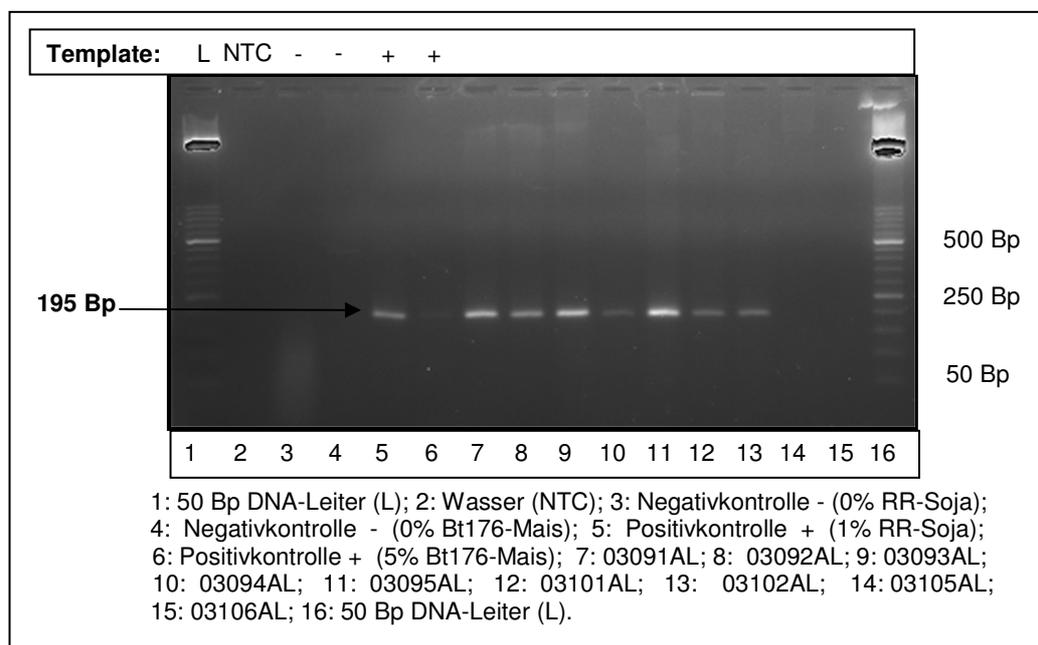


10.2.2 Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotors (Screening-Verfahren) nach der amtlichen Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-00.00-31 bzw. prEN/ISO 2159:20

Abbildung 10 zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte nach der für den CaMV 35S-Promotor spezifischen PCR (amtliche Methode L-00.00-31, prEN/ISO 2159:20).

Bei den Positivkontrollen erscheint eine Bande von 195 Bp. Bei sieben Proben konnte ein Amplifikat von 195 Bp nachgewiesen werden, was als erster Hinweis auf eine genetische Veränderung interpretiert werden kann. Bei zwei Proben 03105AL [Ovator PegaPlus/Pferde-Müsli] und 03106AL [melassierte Trockenschnitzel] war der Befund negativ.

Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis des CaMV 35S-Promotors mit den Primern 35S1 und 35S2 (nach amtlicher Methode L-00.00-31, prEN/ISO 2159:20)



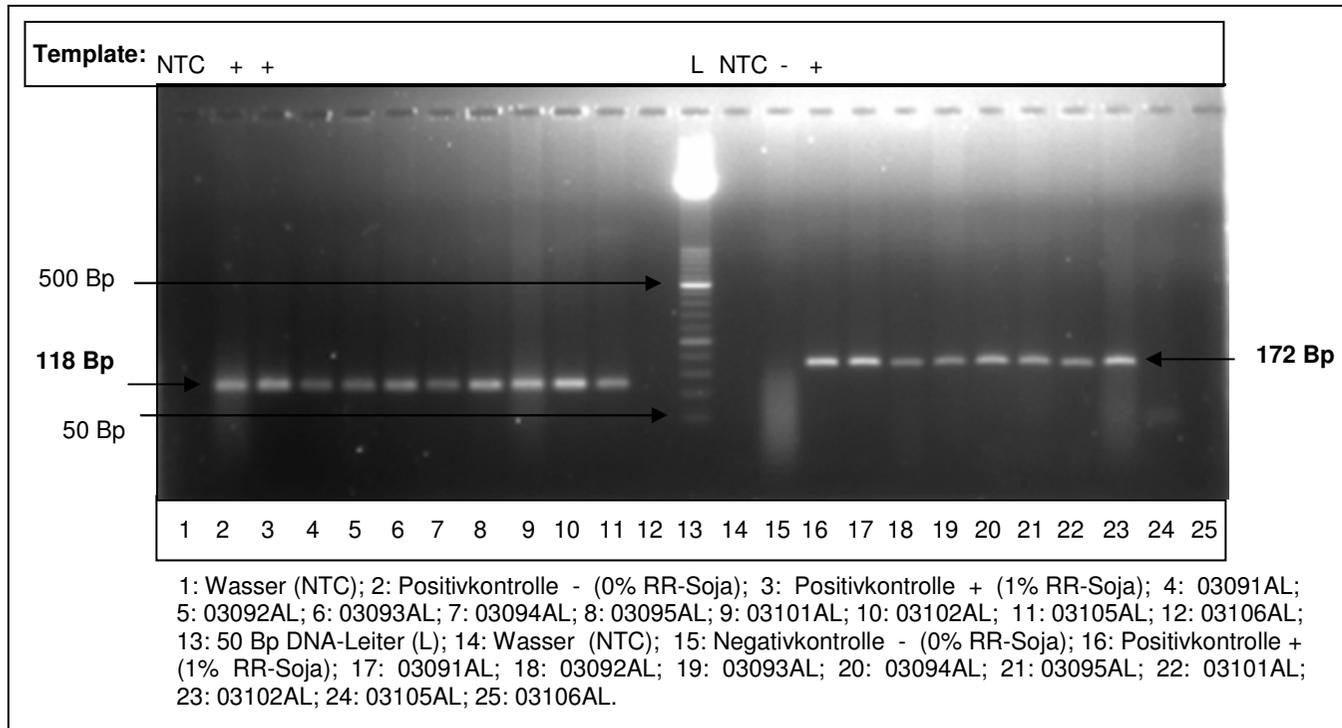
10.2.3 Qualitativer Nachweis von Soja und Roundup Ready-Soja nach der amtlichen Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005

Der spezifische Nachweis für Soja und für gentechnisch veränderte Soja ist in Abbildung 11 dargestellt.

Bei dem spezifischen Sojanachweis zeigt die Positivprobe eine Bande von 118 Bp. Eine Bande identischer Fragmentgröße zeigte sich auch bei allen anderen untersuchten Proben, außer bei der Probe 03106AL. Damit konnte Soja in allen untersuchten Proben, außer in der Probe 03106AL (melassierte Trockenschnitzel), nachgewiesen werden.

Roundup Ready Soja konnte in allen Proben, außer in den Proben 03105AL (Ovator PegaPlus/Pferde-Müsli) und 03106AL nachgewiesen werden. Bei diesem Nachweis wurden PCR-Produkte der Größe von 172 Bp erzielt.

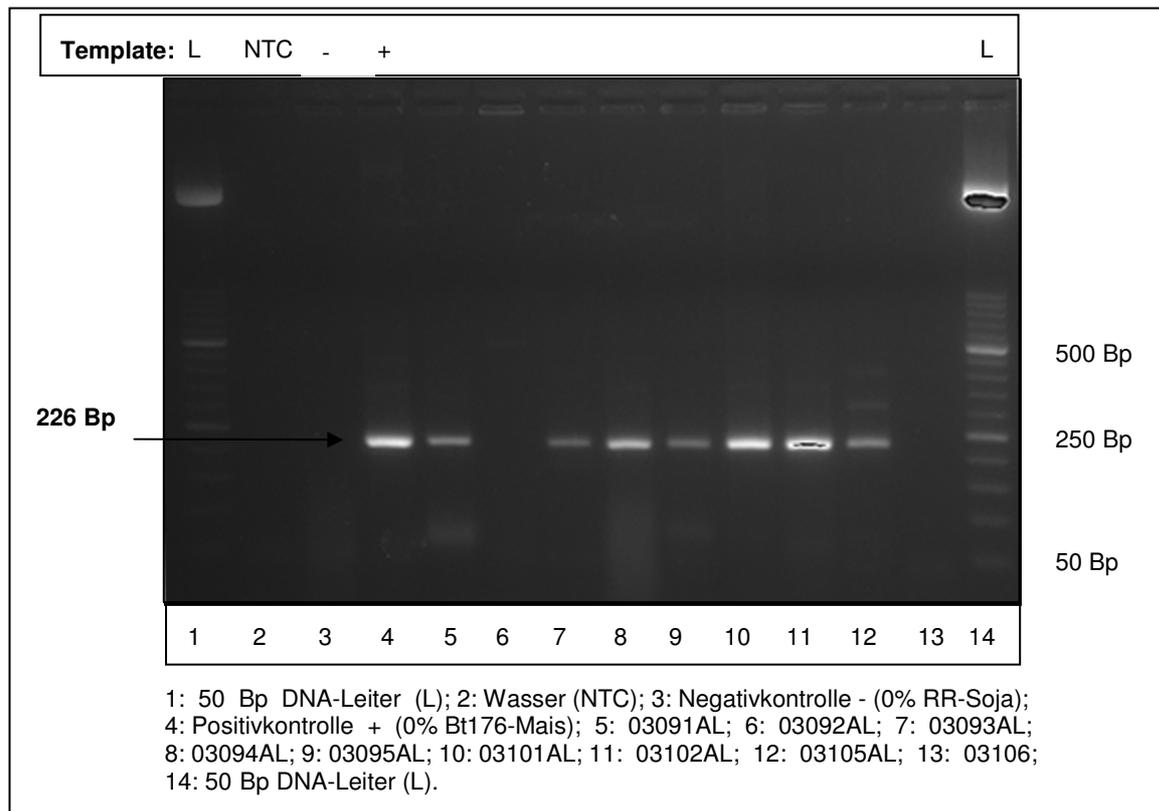
Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte für den Nachweis von Soja (Taschen 1-12; Primern: GM03 / GM04) und Roundup Ready-Soja (Taschen 14-25; Primern: p35s-f2/petu-r1) gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-23.01.22



10.2.4 Qualitativer Nachweis von Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-16.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005

Abbildung 12 zeigt die Aufnahme des Gels mit den elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten des spezifischen Nachweises für Mais.

Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Mais gemäß amtlicher Methode L-15.05-1 mit dem Primern IVR1-F und IVR1-R

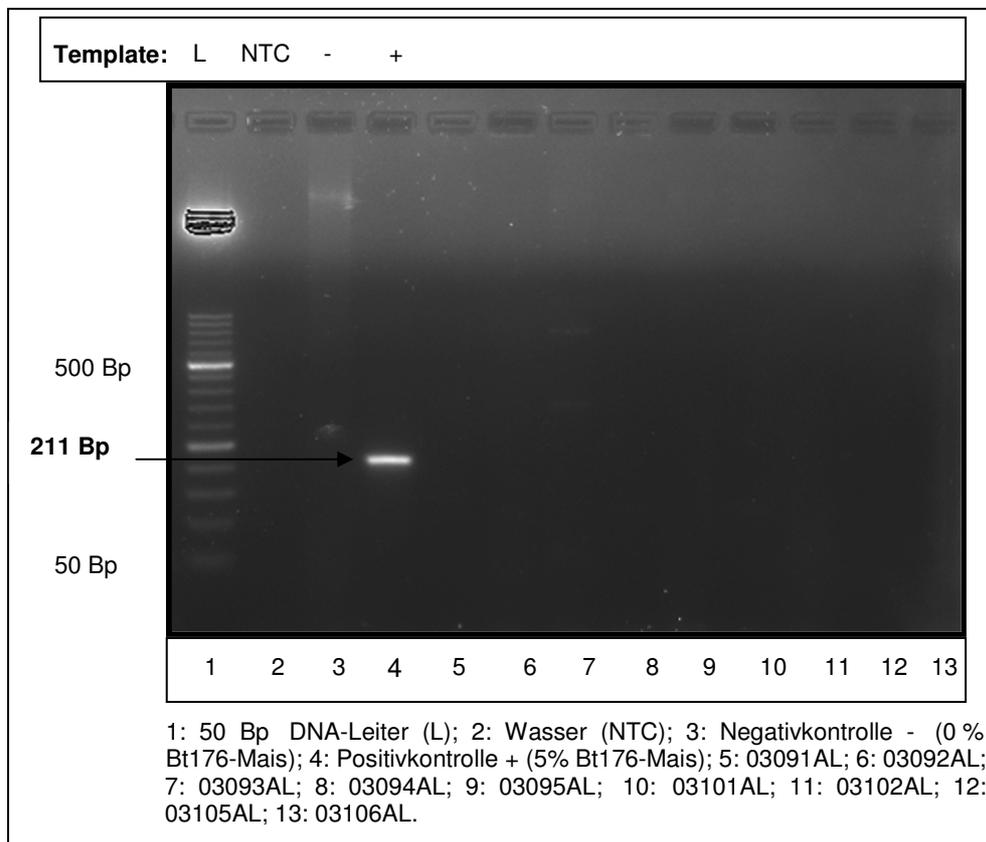


Bei dem spezifischen Nachweis von Mais konnten PCR-Produkte der Größe von 226 Bp bei allen untersuchten Proben außer bei den Proben 03092AL (Kälberergänzungsfutter) und 03106AL (Trockenschnitzel) erzielt werden. Bis auf diese Proben war Mais in allen Futtermitteln nachweisbar. Bei den zwei negativen Proben war Mais auch nicht in der Liste der Inhaltsstoffe aufgeführt.

10.2.5 Qualitativer Nachweis von Bt176-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005

Der spezifische Nachweis von Bt176-Mais ist in der Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Bt176-Mais mit den Primern CRY03 und CRY04 nach Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1

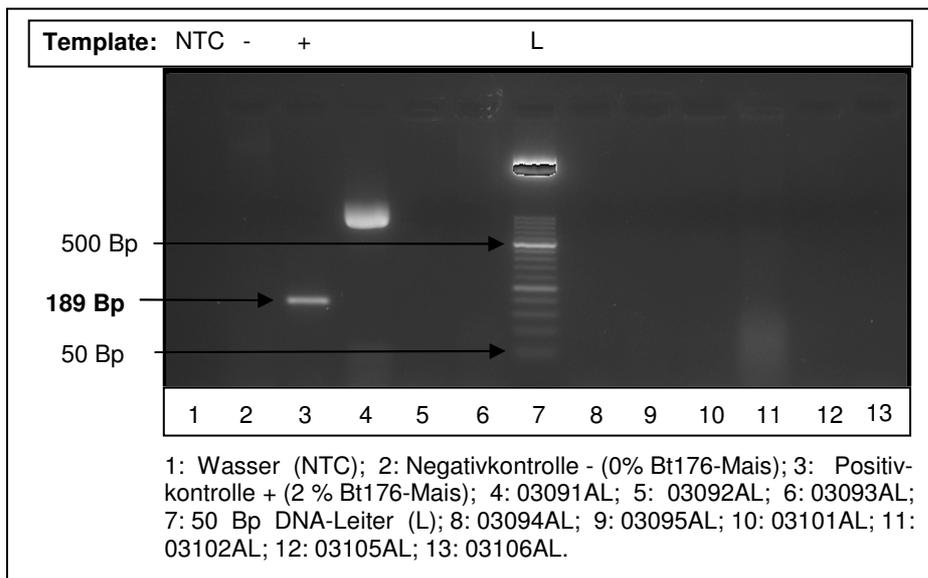


Bei keiner der untersuchten Proben konnte ein PCR-Produkt der Größe von 211 Bp nachgewiesen werden, d.h. in den untersuchten Proben konnte kein Bt176-Mais nachgewiesen werden.

10.2.6 Qualitativer Nachweis von Bt11-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005

Abbildung 14 zeigt die Aufnahme des Gels mit den elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten des spezifischen Nachweises für Bt11-Mais. Es konnte kein PCR-Produkt der Größe von 189 Bp bei den untersuchten Proben nachgewiesen werden, d.h. in den untersuchten Proben konnte kein Bt11-Mais nachgewiesen werden.

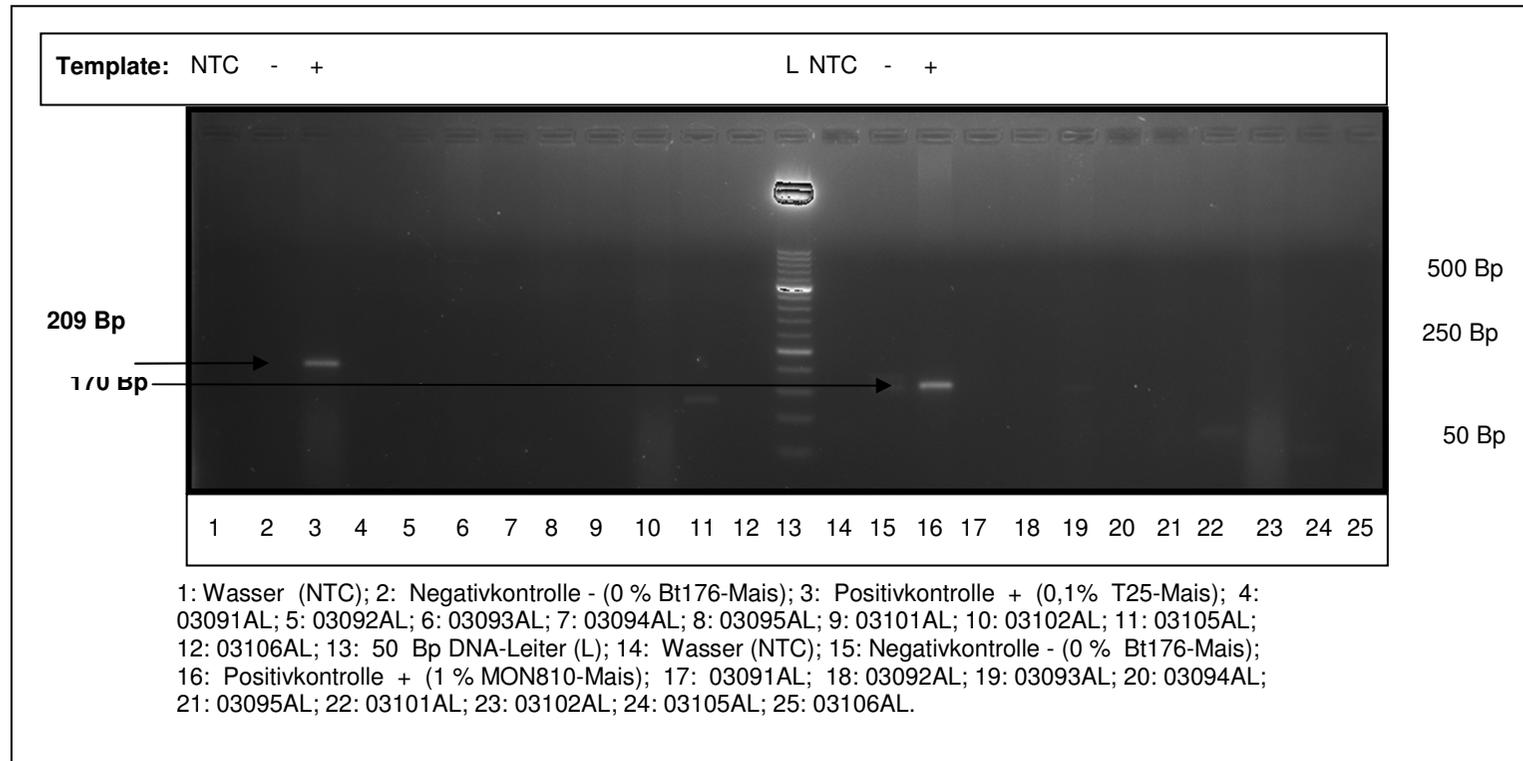
Abbildung 14: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Bt11-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 mit den Primern IVS2-2 und PAT-B



10.2.7 Qualitativer Nachweis von T25- und MON810-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005

Der spezifische Nachweis von T25- und MON810-Mais ist in der Abbildung 15 dargestellt.

Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von T25-Mais (Taschen 1-12; Primern: T25-F7 / T25-R3) und MON810-Mais (Taschen 14-25; Primern: VW01/VW03) nach der amtlichen Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1



Bei den untersuchten Proben konnte kein PCR-Produkt der Größe von 209 Bp bzw. 170 Bp nachgewiesen werden und somit weder T25-Mais noch MON810-Mais nachgewiesen werden.

10.2.8 Qualitativer Nachweis von Chloroplasten gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-24.01-1 bzw. prEN ISO 2159:2005

In den Abbildungen 16, 17 und 18 sind die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte des spezifischen Chloroplasten-DNA-Nachweises mittels amtlicher Methode L-24.01-1 [24] (Abb. 16), eines modifizierten PCR Protokolls basierend auf der amtlichen Methode [39] (Abb. 17) sowie mit einem auf Basis der Primer nach Taberlet et al., 1991 [25] neu entwickeltem Primer-System [26] (Abb. 18) abgebildet.

Abbildung 16: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-24.01-1 zum Nachweis von Chloroplasten-DNA mit dem Primerpaar plant1-F/ plant1-R

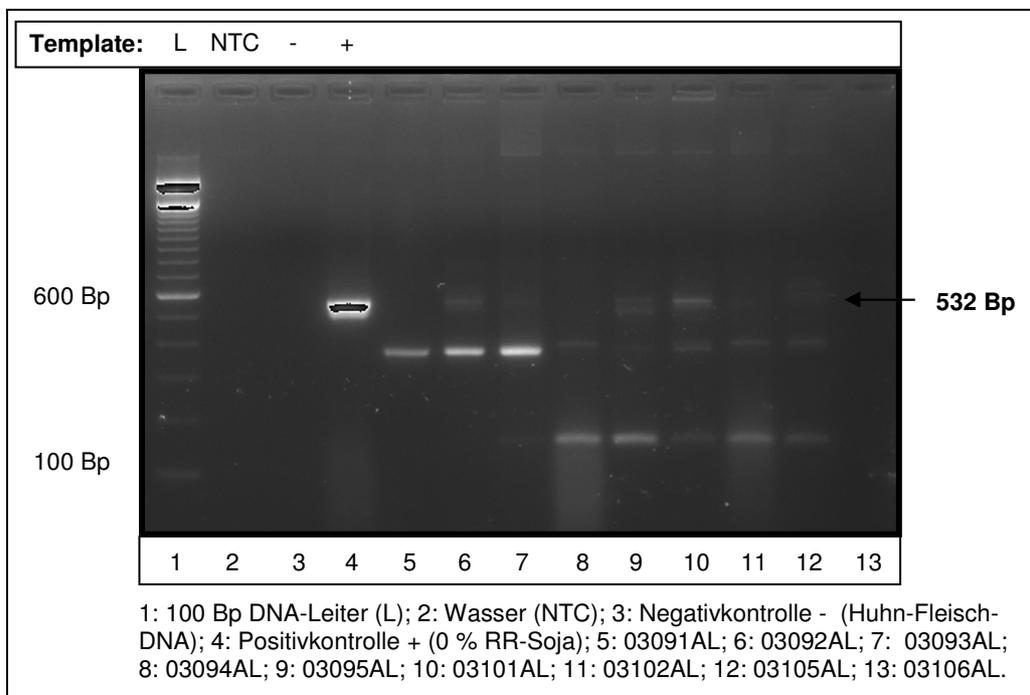
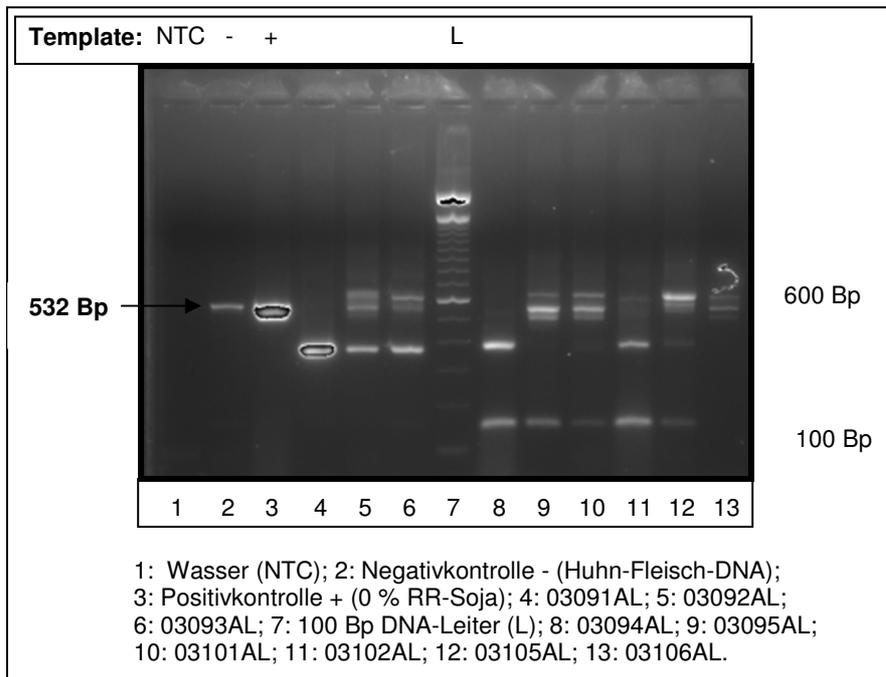


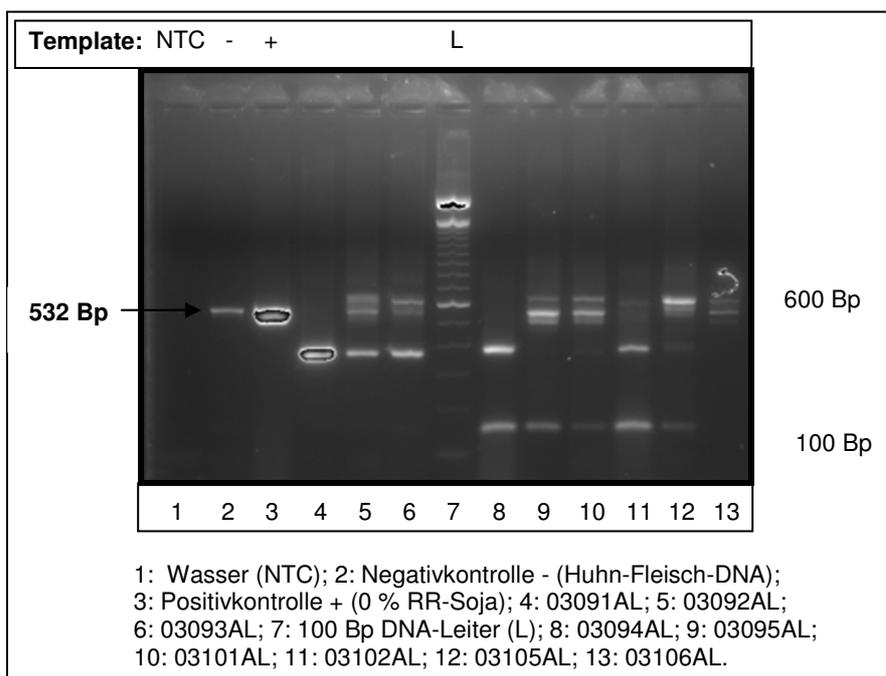
Abbildung 17: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Chloroplasten-DNA mit dem Primerpaar plant1-F/ plant1-R, Produkte gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-24.01-1, modifiziertes PCR Protokoll nach Tony, 2002 [39]



Mit dem Primerpaar plant1-F/plant1-R (siehe Abbildung 16) sind PCR-Produkte unterschiedlicher Größe erzielt worden. Während die Positivkontrolle (Sojamehleextrakt) eine einzige Bande von 532 Bp aufweist, war das Ergebnis bei den untersuchten Proben, welche alle unterschiedliches pflanzliches Material enthalten, bis zu vier schwache Banden im Bereich \geq 532 Bp.

Unter veränderten PCR-Bedingungen gemäß Tony et al. [26] (siehe Abbildung 17) nahm die Anzahl der detektierbaren Banden im Bereich zwischen 500-600 Bp zu.

Abbildung 18: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Chloroplasten-DNA mit dem Primerpaar plant2-F/ plant2-R (nach Tony et al., 2003 [26])

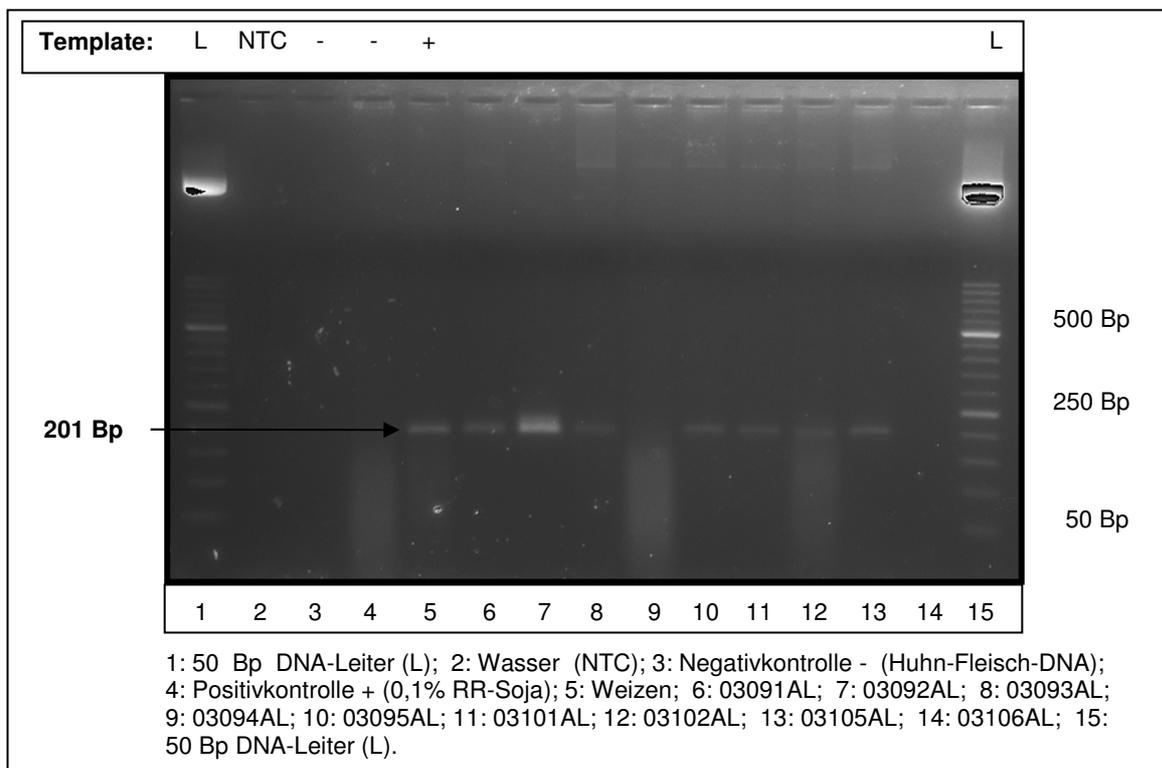


Mit dem chloroplasten-spezifischen Primerpaar plant2-F/plant2-R nach Tony et al., 2003 [26] (siehe Abbildung 18), welches PCR-Produkte einer Größe von 199 Bp amplifiziert, ließ sich in allen Proben das diffuse Bandenspektrum auf eine einzige distinkte Bande reduzieren. Allerdings war auch eine schwache aber deutliche Bande in der Negativkontrolle (DNA aus Huhn) nachweisbar. Die Reagenzienkontrolle (Wasser) war jedoch sauber, so dass eine Kontamination des Mastermixes ausgeschlossen werden kann. Die Positivkontrolle (0,1% RRTM Soja) sowie ein Kontrollextrakt aus Hafer war ebenfalls negativ, was auf der zu geringen Auftragsmenge oder mäßige Qualität der eingesetzten DNA beruhen könnte, während in einem DNA Extrakt aus Weizen, wie zu erwarten, ebenfalls eine Bande von 199 Bp nachweisbar war.

10.2.9 Qualitativer Nachweis von Getreide (Weizen)

Der spezifische Nachweis von Weizen wurde nach einem veröffentlichten System nach Dahinden et al., 2001 [27] durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 19 dargestellt.

Abbildung 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Weizennachweis mit dem Primerpaar WBR11-F / WBR13-R (nach Dahinden et al., 2001 [27])



Die Positivkontrolle zeigt eine Bande von 201 Bp. Bei allen Proben, außer bei den Proben 03094AL (Ergänzungsfutter für Saugferkel) und 03106AL (Zuckerrübetrockenschnitzel), konnte Weizen nachgewiesen werden.

10.3 Real-time PCR-System: TaqMan (TM)

10.3.1 Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotor mittels real-time PCR gemäß Methode ISO/FDIS 21570:2004(E)

Die Ergebnisse des real-time PCR-Nachweises des CaMV 35S-Promotors mit dem Primerpaar 35S-F/35S-R und der Sonde 35S-TMP sind in den Tabellen 11 und 12 für die untersuchten Proben mit den dazugehörigen C_T-Werten aufgelistet. Ergebnisse oberhalb eines C_T-Wertes von 40 werden als negativ eingestuft.

Tabelle 11: Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotors mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570:2004(E)). C_T-Werte der Proben 03091AL, 03092AL, 03093AL, 03094AL, 03095AL, 03101AL und 03102AL

| Probe | C _T | C _T -Mittelwert | Probe | C _T | C _T -Mittelwert |
|-------------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------------|----------------|----------------------------|
| Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 45,00 45,00 | 45,00 | Negativkontrolle (0% Bt176-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (1% RR-Soja) | 29,74 29,35 | 29,545 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Extraktionskontrolle | 38,76 | 41,88 | 03091AL (1:40) | 27,82 | 27,865 |
| | 45,00 | | | 27,91 | |
| | 45,00 | 45,00 | | 28,01 | 27,875 |
| | 45,00 | 45,00 | | 27,74 | |
| | 45,00 | | | 28,70 | 28,515 |
| | 45,00 | | 28,33 | | |
| 03092AL (1:40) | 28,70 | 28,60 | 03093AL (1:40) | 28,11 | 28,23 |
| | 28,50 | | | 28,35 | |
| | 27,77 | 27,825 | | 28,75 | 29,585 |
| | 27,88 | | | 30,42 | |
| | 28,02 | 28,095 | | 28,40 | 28,27 |
| | 28,17 | | 28,13 | | |
| 03094AL (1:5) | 29,03 | 28,98 | 03095AL (1:40) | 26,06 | 26,04 |
| | 28,93 | | | 26,02 | |
| | 29,53 | 29,52 | | 25,96 | 25,92 |
| | 29,51 | | | 25,88 | |
| | 30,60 | 30,565 | | 25,27 | 25,53 |
| | 30,53 | | 25,79 | | |
| 03101AL (1:40) | 30,43 | 30,28 | 03102AL (1:10) | 28,52 | 28,415 |
| | 30,13 | | | 28,31 | |
| | 30,30 | 30,48 | | 28,64 | 28,59 |
| | 30,66 | | | 28,54 | |
| | 30,10 | 30,175 | | 30,10 | 30,01 |
| | 30,25 | | | 29,92 | |

Tabelle 12: Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotors mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570:2004(E)). C_T-Werte der Proben 03105AL und 03106AL

| Probe | CT | CT-Mittelwert | Probe | CT | CT-Mittelwert |
|-------------------------------|----------------|---------------|----------------------------------|----------------|---------------|
| Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 45,00 45,00 | 45,00 | Negativkontrolle (0% Bt176-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (1% RR-Soja) | 29,05 28,41 | 28,73 | Positivkontrolle (1% Bt176-Mais) | 34,20 33,53 | 33,865 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 | 45,00 | Extraktionskontrolle | 45,00 | 45,00 |
| | 45,00 | | | 45,00 | |
| | | | | 38,79 | |
| | 45,00 | | 45,00 | | |
| 03105AL (1:10) | 37,06 | 36,09 | 03106AL (unverdünnt) | 45,00 | 45,00 |
| | 35,12 | | | 45,00 | |
| | 37,44 | 37,24 | | 45,00 | 45,00 |
| | 37,04 | | | 45,00 | |
| | 37,14 | 37,15 | | 45,00 | 45,00 |
| | 37,16 | | | 45,00 | |

Die Negativkontrolle sowie die Wasser- und Extraktionskontrolle ergaben einen C_T -Wert von 45. Die Positivkontrolle und alle untersuchten Proben außer der Probe 03106AL (Rübetrockenschnitzel, Tab. 12) ergaben einen C_T -Wert unterhalb von 40, was auf die Präsenz von CaMV 35S-Promotor hindeutet. Damit besteht in allen Proben außer bei der Probe 03106AL der Verdacht auf eine gentechnische Veränderung.

10.3.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Soja und RR-Soja gemäß Methode I-SO/FDIS 21570:2004(E)

Die Ergebnisse für den Nachweis von Soja mit dem Primerpaar GM1-F/GM1-R und der GM1-Sonde sowie des Nachweises von RR-Soja mit dem Primerpaar RR1-F/RR1-R und der RR1-Sonde in den Proben 03091AL, 03094AL, 03102AL, 03105AL und 03106AL sind für die untersuchten Proben mit den dazugehörigen C_T -Werten in Tabelle 13 aufgelistet. Um die relative Quantifizierung durchführen zu können, wurde eine Standardreihe aus 100%igen RR-Sojabohnen hergestellt (Abbildung 20).

Tabelle 13: Qualitativer und quantitativer Nachweis der RR-Soja mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570:2004(E)) C_T -Werte der Proben 03091AL, 03094AL, 03102AL, 03105AL und 03106AL

| Soja-System | | | RR-Soja-System | | |
|-------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------------|
| Probe | C_T | C_T -Mittelwert | Probe | C_T | C_T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 22,82 22,93 | 22,875 | Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (1% RR-Soja) | 21,80 21,86 | 21,83 | Positivkontrolle (1% RR-Soja) | 30,98 30,88 | 30,93 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Standard1: 5 Kopien | 35,41 35,04 | 35,23* | Standard1: 5 Kopien | 38,59 37,05 | 37,82* |
| Standard2: 10 Kopien | 36,09 35,07 | 35,58 | Standard2: 10 Kopien | 38,71 37,05 | 37,88 |
| Standard3: 100 Kopien | 31,83 32,63 | 32,23 | Standard3: 100 Kopien | 34,73 33,81 | 34,27 |
| Standard4: 1000 Kopien | 28,32 28,33 | 28,325 | Standard4: 1000 Kopien | 30,59 30,78 | 30,685 |
| Standard5: 10000 Kopien | 25,55 25,19 | 25,37 | Standard5: 10000 Kopien | 27,36 27,16 | 27,26 |
| 03091AL (1:20) | 26,92 26,98 26,78 26,69 27,57 27,46 | 26,95 26,735 27,515 | 03091AL (1:20) | 28,13 27,89 27,42 27,58 28,35 28,13 | 28,01 27,50 28,24 |
| 03094AL (1:5) | 27,69 27,59 28,09 27,99 28,83 29,12 | 27,635 28,04 28,975 | 03094AL (1:5) | 29,22 29,10 29,90 29,51 30,28 30,39 | 29,16 29,705 30,335 |
| 03102AL (1:10) | 29,55 29,75 29,68 30,45 31,26 31,13 | 29,65 30,065 31,195 | 03102AL (1:10) | 31,03 30,62 31,23 31,17 32,04 32,28 | 30,825 31,20 32,16 |
| 03105AL (1:10) | 34,97 35,50 35,67 35,75 35,19 35,05 | 35,235 35,71 35,12 | 03105AL (1:10) | 36,58 36,24 38,13 37,23 38,22 36,51 | 36,545 37,68 37,365 |

Tabelle 13: Qualitativer und quantitativer Nachweis der RR-Soja mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) CT-Werte der Proben 03091AL, 03094AL, 03102AL, 03105AL und 03106AL

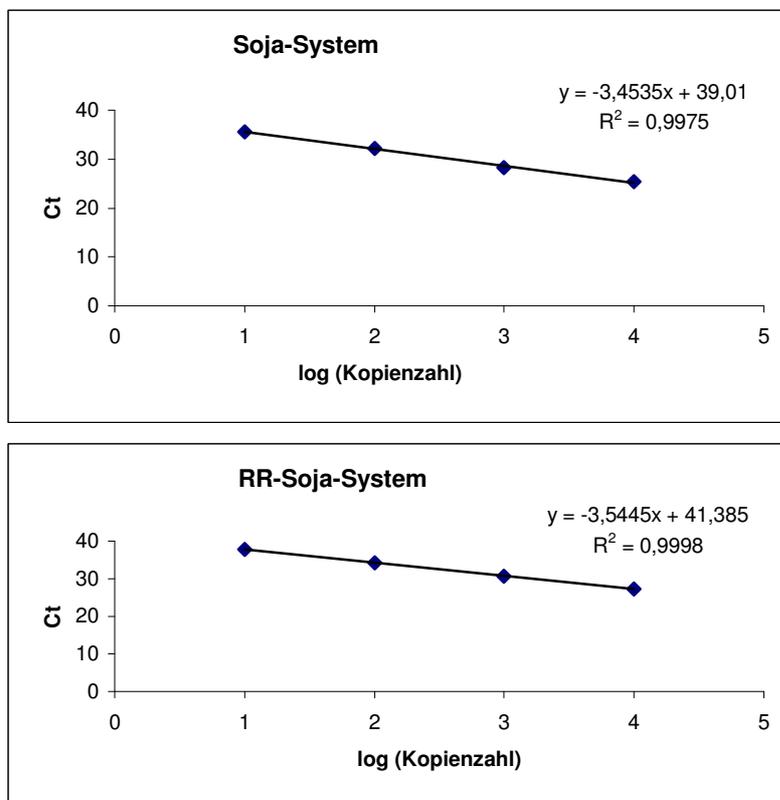
| Soja-System | | | RR-Soja-System | | |
|--------------------|----------------|----------------------------|--------------------|----------------|----------------------------|
| Probe | C _T | C _T -Mittelwert | Probe | C _T | C _T -Mittelwert |
| 03106AL unverdünnt | 36,92 | 40,96 | 03106AL unverdünnt | 45,00 | 42,34 |
| | 45,00 | | | 39,68 | |
| | 37,81 | 37,275 | | 37,56 | 38,135 |
| | 36,74 | 38,175 | | 38,71 | 37,76 |
| | 38,26 | | | 37,95 | |
| 38,09 | 37,57 | | | | |

* Dieser Wert wurde aus der Standardreihe herausgenommen. Dadurch wurde eine Standardgerade mit höherem Bestimmtheitsmaß R² erreicht.

In allen untersuchten Proben, mit Ausnahme der Probe 03106AL (Zuckerrübenschnitzel) konnten Soja und Roundup Ready Soja nachgewiesen werden. Es ergaben sich C_T-Werte für das Soja- und RR-Soja-System zwischen 38 und 42. Der Extrakt der Probe 03106AL wurde unverdünnt eingesetzt, so dass ein Vorhandensein von Soja in dieser Probe klar ausgeschlossen wird.

Um den Anteil der Roundup Ready Soja am Gesamtsojagehalt in den untersuchten Proben zu bestimmen, wurden die C_T-Werte der Standardreihe (Standard 1 bis 5, Tabelle 13) in Abhängigkeit von dem dekadischen Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen (siehe Abbildung 20).

Abbildung 20: Standardreihen für die Quantifizierung von Soja- und RRTM-Soja mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E))



Mit Hilfe der Geradengleichungen für beide Standardreihen wurde der RRTM-Soja-Gehalt berechnet:

$$\text{Soja-System: } y = -3,4535x + 39,01$$

$$\text{RR-Soja-System: } y = 3,5445x + 41,385$$

$$\rightarrow y = C_T\text{-Wert (gemessene Größe); } x = \log (\text{Kopien})$$

Die auf dieser Basis ermittelten Kopienzahlen für beide Systeme sind in Tabelle 14 für die Proben 03091AL, 03094AL, 03102AL und 03105AL zusammengefasst. Um den prozentualen Anteil der Roundup Ready Soja am Gesamt-Sojagehalt in den untersuchten Proben zu bestimmen, wurden die errechneten Kopienzahlen des RR-Soja-Systems im Verhältnis zu den errechneten Kopienzahlen des Soja-Systems gesetzt und mit 100 multipliziert. Für jede untersuchte Probe wurden drei Ergebnisse erhalten, da jede Probe dreimal extrahiert wurde. Aus diesen drei Werten wurde ein Mittelwert gebildet (siehe Tabelle 15). Analog wurden auch für die übrigen Proben (03092AL, 03093AL, 03095AL und 03101AL) C_T-Werte (nicht gezeigt) ermittelt und die relativen Anteile von RR-Soja am Gesamt-Sojagehalt ermittelt. In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse aller untersuchten Proben zusammengefasst.

Tabelle 14: Ermittelte Kopienzahlen für Soja und RRTM-Soja in den untersuchten Proben

| Soja-System | | | | RR-Soja-System | | | |
|-------------------------------|----------------------------|-------------|------------|-------------------------------|----------------------------|-------------|-----------|
| Probe | C _T -Mittelwert | log Kopien | Kopien | Probe | C _T -Mittelwert | log Kopien | Kopien |
| Negativkontrolle (0%RR-Soja) | 22,875 | 4,672071811 | 46997,1813 | Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 45,00 | -1,01988997 | 0,0955 |
| Positivkontrolle (1% RR-Soja) | 21,83 | 4,974663385 | 94332,9433 | Positivkontrolle (1% RR-Soja) | 30,93 | 2,949640288 | 890,5130 |
| 03091AL (1:20) | 26,95 | 3,492109454 | 3105,3421 | 03091AL (1:20) | 28,01 | 3,773451827 | 5935,4251 |
| | 26,735 | 3,554365137 | 3583,9764 | | 27,50 | 3,917336719 | 8266,7865 |
| | 27,515 | 3,328507311 | 2130,6264 | | 28,24 | 3,708562562 | 5111,6671 |
| 03094AL (1:5) | 27,635 | 3,293759954 | 1966,7989 | 03094AL (1:5) | 29,16 | 3,449005501 | 2811,9365 |
| | 28,04 | 3,176487621 | 1501,3696 | | 29,705 | 3,295246156 | 1973,5410 |
| | 28,975 | 2,905747792 | 804,9109 | | 30,335 | 3,117509995 | 1310,7202 |
| 03102AL (1:10) | 29,65 | 2,710293905 | 513,2086 | 03102AL (1:10) | 30,825 | 2,979263648 | 953,3748 |
| | 30,065 | 2,590125959 | 389,1580 | | 31,20 | 2,873465933 | 747,2500 |
| | 31,195 | 2,262921674 | 183,1984 | | 32,16 | 2,602623783 | 400,5196 |
| 03105AL (1:10) | 35,235 | 1,093093963 | 12,3906 | 03105AL (1:10) | 36,545 | 1,365495839 | 23,2004 |
| | 35,71 | 0,955552338 | 9,0272 | | 37,68 | 1,045281422 | 11,0989 |
| | 35,12 | 1,126393514 | 13,3781 | | 37,365 | 1,134151502 | 13,6192 |

Tabelle 15: Ergebnisse der Bestimmung des prozentualen Anteils der Roundup Ready Soja am Gesamt-Sojagehalt für die Proben 03091AL, 03094AL, 03102AL, 03105AL und 03106AL

| Probe | Anteil der RR-Soja am Gesamtsojagehalt (%) | Mittelwert – Anteil der RR-Soja am Gesamtsojagehalt |
|----------------------------------|--|---|
| Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 0,00 | 0,00% |
| Positivkontrolle (1%RR-Soja) | 0,94 | 0,94% |
| 03091AL | 191,14 230,66 239,91 | 220,57% ± 25,90% |
| 03094AL | 142,97 131,45 162,84 | 145,75% ± 15,88% |
| 03102AL | 185,77 192,02 218,63 | 198,81% ± 17,45% |
| 03105AL | 187,24 122,95 101,80 | 137,33% ± 44,50% |

Bei der Negativkontrolle wurde erwartungsgemäß kein RR-Soja nachgewiesen. Für die Positivkontrolle (Soll: 1% RR-Soja) wurde ein Gehalt von 0,94% RR-Soja bestimmt. Bei den untersuchten Proben wurde für den Anteil von RR-Soja am Gesamt-Sojagehalt ein theoretisch nicht möglicher Wert über 100% berechnet. Dies beruht auf der sehr hohen Konzentration des Analyten in den Proben, wodurch die Grenzen für die Quantifizierung bei den hier eingesetzten Systemen überschritten werden. Für diese Proben kann ein Anteil an RR-Soja am Gesamt-Sojagehalt von 100% angenommen werden. Lediglich eine Probe (Legehennenfutter, 03101AL) lag im quantifizierbaren Messbereich (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Prozentuale Anteile der Roundup Ready Soja am Gesamt-Sojagehalt aller untersuchten Proben

| Probe | Probenbezeichnung | Soja | Anteil von RR-Soja am Gesamtsojagehalt (%) |
|---------|--|------|--|
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | + | 100,00 |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | + | 100,00 |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I, Alleinfutter für Sauen Type 031 | + | 100,00 |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | + | 100,00 |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03, weniger Fett | + | 100,00 |
| 03101AL | LE1-P, Alleinfutter I für Legehennen | + | 35,52 ± 5,60 |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde, Haferersatz | + | 100,00 |
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | + | 100,00 |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | - | - |

10.3.3 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und Bt176-Mais gemäß Methode ISO/FDIS 21570: 2004(E)

Die Ergebnisse des Nachweises mittels real-time PCR von Mais gemäß der europäischen Norm ISO/FDIS 21570: 2004(E) mit dem Primerpaar ZM1-F/ZM1-R und der ZM1-Sonde sowie von Bt176-Mais mit dem Primerpaar Cry2-F/Cry2-R und der BTSYN-Sonde sind in Tabelle 17 beispielhaft an drei untersuchten Proben dargestellt. Die C_T -Werte der übrigen Proben wurden in gleicher Weise bestimmt (Werte nicht gezeigt). Zur relativen Quantifizierung wurde eine Standardreihe aus 100%igem Bt176-Mais hergestellt (Abbildung 21) und der relative GVO-Anteil wie unter 8.3.2 (für RR-Soja beschrieben) bestimmt. Das Gesamtergebnis der qualitativen und quantitativen Analyse ist für alle Proben in Tabelle 18 dargestellt. C_T -Werte über 40 wurden als negatives Ergebnis gewertet.

Tabelle 17: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Bt176-Mais mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) - C_T -Werte der Proben 03095AL, 03101AL und 03105AL

| Mais-System | | | Bt176-Mais-System | | |
|------------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|---|---------------------------------|
| Probe | C_T | C_T -Mittelwert | Probe | C_T | C_T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% Bt176-Mais) | 22,61 22,67 | 22,64 | Negativkontrolle (0% Bt176-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (0,1% Bt176-Mais) | 24,87 24,40 | 24,635 | Positivkontrolle (0,1% Bt176-Mais) | 35,47 37,49 | 36,48 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Standard 1: 2 Kopien | 35,27 35,08 | 35,175 | Standard 1: 2 Kopien | 36,38 36,09 | 36,235 |
| Standard 2: 10 Kopien | 33,35 34,18 | 33,765 | Standard 2: 10 Kopien | 34,37 33,11 | 33,74 |
| Standard 3: 100 Kopien | 28,68 28,90 | 28,79 | Standard 3: 100 Kopien | 30,02 29,89 | 29,955 |
| Standard 4: 1000 Kopien | 25,40 25,93 | 25,665 | Standard 4: 1000 Kopien | 26,27 26,30 | 26,285 |
| Standard 5: 10000 Kopien | 22,36 22,19 | 22,275 | Standard 5: 10000 Kopien | 22,48 22,65 | 22,565 |
| 03095AL (1:40) | 25,84 25,55 25,38 25,68 25,33 25,31 | 25,695 25,53 25,32 | 03095AL (1:40) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 |
| 03101AL (1:40) | 29,02 29,33 28,19 29,03 28,04 28,18 | 29,175 28,61 28,11 | 03101AL (1:40) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 |
| 03105AL (1:10) | 26,99 27,12 27,17 26,81 27,14 26,91 | 27,055 26,99 27,025 | 03105AL (1:10) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 |

In allen untersuchten Proben (außer Zuckerrübenschnitzel, 03106AL, Daten nicht gezeigt) konnte zwar Mais, in keiner Probe jedoch spezifisch Bt176-Mais nachgewiesen werden (Tabelle 17 und 18). Bei der Negativkontrolle wurde kein Bt176-Mais (0%) nachgewiesen. Die eingesetzte Positivkontrolle (Soll: 0,1% Bt176-Mais) wies einen Gehalt von 0,18% Bt176-Mais auf.

Abbildung 21: Standardreihen für die Quantifizierung von Mais- und Bt176-Mais mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E))

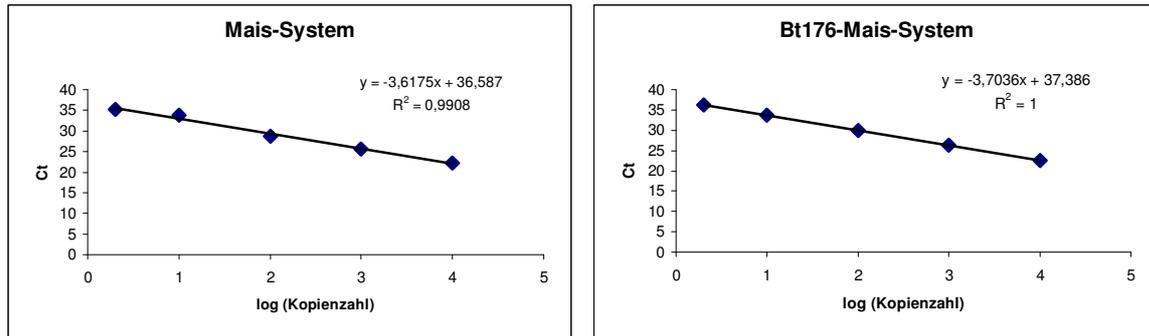


Tabelle 18: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und Bt-176-Mais-Anteiles aller untersuchten Proben

| Probe | Probenbezeichnung | Mais | Anteil des Bt176-Mais am Gesamtmaisgehalt |
|---------|--|------|---|
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | + | 0,00% |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | + | 0,00% |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I, Alleinfutter für Sauen Type 031 | + | 0,00% |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | + | 0,00% |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03, weniger Fett | + | 0,00% |
| 03101AL | LE1 - P, Alleinfutter I für Legehennen | + | 0,00% |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde, Haferersatz | + | 0,00% |
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | + | 0,00% |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | - | - |

10.3.4 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und Bt11-Mais

Die Ergebnisse des Nachweises von Mais mittels real-time PCR mit dem Primerpaar ZM1-F/ZM1-R und der ZM1-Sonde sowie von Bt11-Mais mit dem Primerpaar Bt11-F / Bt11-R und der Bt11-S-Sonde sind beispielhaft für die Proben 03091AL, 03101AL und 03105AL in Tabelle 19 dargestellt. Alle übrigen Proben wurden in gleicher Weise analysiert und die C_T -Werte ermittelt (Daten nicht gezeigt). Um die relative Quantifizierung durchführen zu können, wurde eine Standardreihe aus 100%igem Bt11-Mais hergestellt (Abb. 22) und der relative GVO-Gehalt wie unter 8.3.2 (für RR-Soja) beschrieben bestimmt. Das Gesamtergebnis der relativen Quantifizierung ist für alle Proben Tabelle 20 abgebildet.

Tabelle 19: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Bt11-Mais mittels real-time PCR - C_T-Werte der Proben 03091AL, 03101AL und 03105AL

| Mais-System | | | Bt11-Mais-System | | |
|-----------------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|
| Probe | C _T | C _T - Mittelwert | Probe | C _T | C _T - Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% MON810-Mais) | 22,04 22,04 | 22,04 | Negativkontrolle (0% MON810-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (1% Bt11-Mais) | 23,73 23,79 | 23,76 | Positivkontrolle (1% Bt11-Mais) | 32,34 32,93 | 32,635 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Standard 1: 5 Kopien | 36,26 34,74 | 35,50 | Standard 1: 5 Kopien | 35,89* 45,00* | - |
| Standard 2: 10 Kopien | 33,78 35,13 | 34,455 | Standard 2: 10 Kopien | 36,43 36,26 | 36,345 |
| Standard 3: 100 Kopien | 30,12 29,87 | 29,995 | Standard 3: 100 Kopien | 31,91 31,52 | 31,715 |
| Standard 4: 1000 Kopien | 26,56 26,68 | 26,62 | Standard 4: 1000 Kopien | 28,37 28,33 | 28,35 |
| Standard 5: 10000 Kopien | 23,15 23,21 | 23,18 | Standard 5: 10000 Kopien | 25,51 25,07 | 25,29 |
| Standard 6: 25000 Kopien | 21,65 21,58 | 21,615 | Standard 6: 25000 Kopien | 23,58 23,80 | 23,69 |
| 03091AL (1:40) | 33,13 | 32,855 | 03091AL (1:40) | 45,00 | 45,00 |
| | 32,58 | | | 45,00 | |
| | 31,97 | | | 45,00 | |
| | 32,81 | 32,275 | | 45,00 | |
| | 32,08 | 32,445 | | 45,00 | |
| 32,64 | | 45,00 | | | |
| 03101AL (1:20) | 29,50 | 31,07 | 03101AL (1:20) | 45,00 | 45,00 |
| | 29,51 | | | 45,00 | |
| | 28,90 | | | 29,205 | |
| | 28,80 | 28,44 | | 45,00 | |
| | 28,08 | | | 45,00 | |
| | 28,00 | | | 45,00 | |
| 03105AL (1:10) | 27,51 | 27,755 | 03105AL (1:10) | 45,00 | 45,00 |
| | 27,49 | | | 45,00 | |
| | 26,61 | | | 27,05 | |
| | 27,42 | 27,73 | | 45,00 | |
| | 28,04 | | | 45,00 | |
| | 27,61 | | | 45,00 | |

*Wert aus der Standardreihe herausgenommen. Dadurch wurde eine Standardgerade mit höherem Bestimmtheitsmaß R² erreicht.

60

60

In allen untersuchten Proben (mit Ausnahme der Zuckerrübenschnitzel, Probe 03106AL, Daten nicht gezeigt) konnte zwar die Pflanzenart Mais, nicht jedoch Bt11-Mais nachgewiesen werden (Tabellen 19 und 20). In der Negativkontrolle wurde kein Bt11-Mais (0%) nachgewiesen. Für die Positivkontrolle (Soll: 1% Bt11-Mais) wurde ein Gehalt von 1,24% Bt11-Mais bestimmt.

Abbildung 22: Standardreihen für die Quantifizierung von Mais- und Bt11-Mais mittels real-time PCR

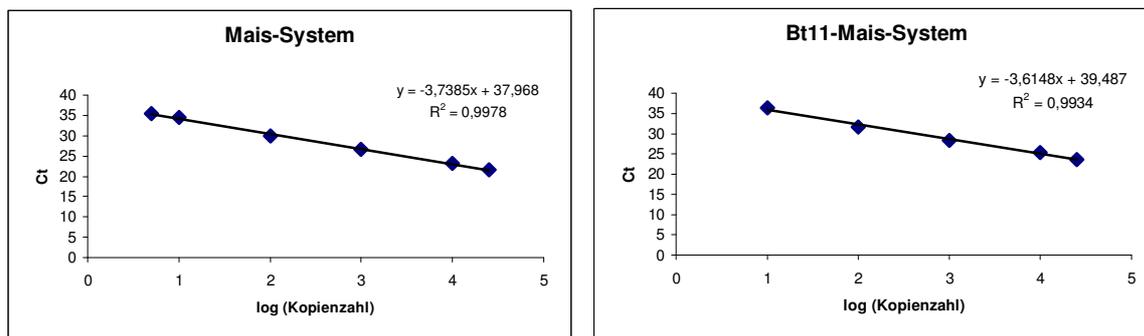


Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse des Mais- und Bt11-Mais-Nachweises aller untersuchten Proben.

Tabelle 20: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und Bt11-Mais-Gehaltes aller Proben

| Probe | Probenbezeichnung | Mais | Anteil des Bt11- Mais am Gesamtmaisgehalt (%) |
|---------|--|------|---|
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | + | 0,00 |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | + | 0,00 |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I, Alleinfutter für Sauen Type 031 | + | 0,00 |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | + | 0,00 |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03, weniger Fett | + | 0,00 |
| 03101AL | LE1 – P, Alleinfutter I für Legehennen | + | 0,00 |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde, Haferersatz | + | 0,00 |
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | + | 0,00 |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | - | - |

10.3.5 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und T25-Mais

Die Ergebnisse des Nachweises von Mais mittels real-time PCR mit dem Primerpaar ZM1-F/ZM1-R und der ZM-1 Sonde sowie von T25-Mais mit dem Primerpaar T25-F/T25-R und der T25-FAM-Sonde für die Proben 03091AL, 03101AL, 03102AL und 03105AL sind in Tabelle 21 dargestellt. Alle übrigen Proben wurden in gleicher Weise analysiert und die C_T -Werte ermittelt (Daten nicht gezeigt). Um die relative Quantifizierung durchführen zu können, wurde eine Standardreihe aus 100%igen T25-Mais hergestellt (Abb. 23) und der relative GVO-Gehalt (wie beispielhaft unter 8.4 für RRTM-Soja beschrieben) bestimmt. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung für alle Proben sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

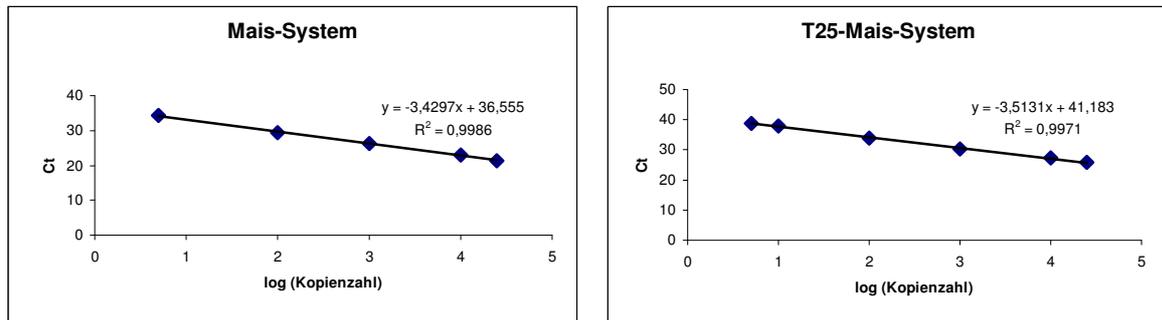
In allen untersuchten Proben (mit Ausnahme der Zuckerrübenschnitzel, Probe 03106AL, Daten nicht gezeigt) konnte zwar die Pflanzenart Mais, jedoch kein T25-Mais nachgewiesen werden (Tabellen 21 und 22). Bei der Negativkontrolle wurde kein T25-Mais (0%) nachgewiesen. Für die Positivkontrolle (Soll: 0,1% T25-Mais) wurde ein Gehalt von 0,09% T25-Mais bestimmt.

Tabelle 21: Qualitativer und quantitativer Nachweis von T25-Mais mittels real-time PCR - C_T-Werte der Proben 03091AL, 03101AL, 03102AL und 03105AL

| Mais-System | | | T25-Mais-System | | |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| Probe | C _T | C _T -Mittelwert | Probe | C _T | C _T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% MON810-Mais) | 21,99 22,04 | 22,015 | Negativkontrolle (0% MON810-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (0,1% T25-Mais) | 23,38 23,43 | 23,405 | Positivkontrolle (0,1% T25-Mais) | 38,45 38,46 | 38,455 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Standard 1: 5 Kopien | 34,62 34,03 | 34,325 | Standard 1: 5 Kopien | 37,97 39,73 | 38,85 |
| Standard 2: 10 Kopien | 33,51 34,91 | 34,21* | Standard 2: 10 Kopien | 38,43 37,37 | 37,90 |
| Standard 3: 100 Kopien | 29,34 29,44 | 29,39 | Standard 3: 100 Kopien | 33,51 34,21 | 33,86 |
| Standard 4: 1000 Kopien | 26,29 26,31 | 26,30 | Standard 4: 1000 Kopien | 30,17 30,24 | 30,205 |
| Standard 5: 10000 Kopien | 23,03 22,96 | 22,995 | Standard 5: 10000 Kopien | 27,42 27,28 | 27,35 |
| Standard 6: 25000 Kopien | 21,25 21,58 | 21,415 | Standard 6: 25000 Kopien | 25,75 26,04 | 25,895 |
| 03091AL (1:40) | 33,01 33,18 32,05 31,82 32,06 32,80 | 36,15 31,935 32,43 | 03091AL (1:40) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 45,00 |
| 03101AL (1:20) | 29,00 29,02 28,53 28,53 28,12 27,97 | 29,01 28,53 28,045 | 03101AL (1:20) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 45,00 |
| 03102AL (1:10) | 26,12 25,99 26,57 26,32 27,81 27,21 | 26,055 26,445 27,51 | 03102AL (1:10) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 45,00 |
| 03105AL (1:10) | 26,45 27,34 26,83 27,18 28,02 27,38 | 26,895 27,005 27,70 | 03105AL (1:10) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 45,00 |

Dieser Wert wurde aus der Standardreihe herausgenommen. Dadurch wurde eine Standardgerade mit höherem Bestimmtheitsmaß R² erreicht.

Abbildung 23: Standardreihen für die Quantifizierung von Mais- und T25-Mais mittels real-time PCR



Die Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse des Mais- und T25-Mais-Nachweises aller untersuchten Proben.

Tabelle 22: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und T25-Mais-Anteiles aller Proben

| Probe | Probenbezeichnung | Mais | Anteil des T25-Mais am Gesamt-Maisgehalt (%) |
|---------|--|------|--|
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | + | 0,00 |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | + | 0,00 |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I, Alleinfutter für Sauen Type 031 | + | 0,00 |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | + | 0,00 |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03, weniger Fett | + | 0,00 |
| 03101AL | LE1-P, Alleinfutter I für Legehennen | + | 0,00 |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde, Haferersatz | + | 0,00 |
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | + | 0,00 |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | - | - |

10.3.6 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Mais und MON810-Mais gemäß europäischer Norm ISO/FDIS 21570: 2004(E)

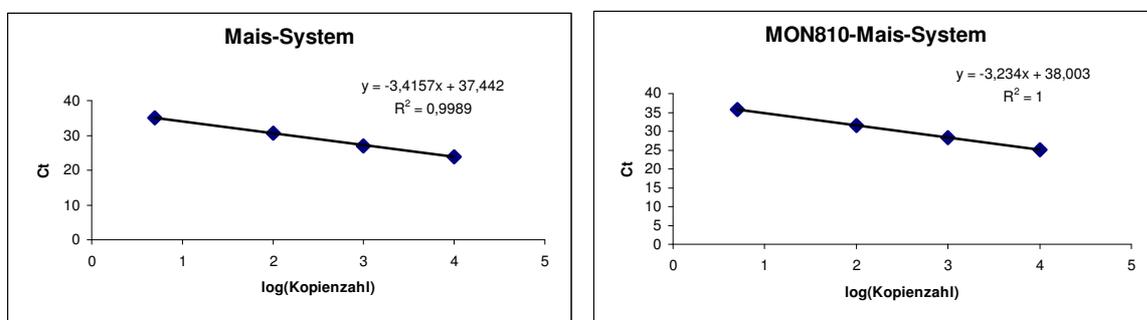
Die Ergebnisse des Nachweises von Mais mittels real-time PCR nach der Europäischen Norm ISO/FDIS 21570: 2004(E) mit dem Primerpaar ZM1-F/ZM1-R und der ZM-1 Sonde sowie von MON810-Mais mit dem Primerpaar Mail-F1/Mail-R1 und der Mail-S2-Sonde ist für die Proben 03092AL, 03093AL und 03094AL in Tabelle 23 dargestellt. Alle übrigen Proben wurden in gleicher Weise analysiert und die C_T -Werte ermittelt (Daten nicht gezeigt). Um die relative Quantifizierung durchführen zu können, wurde eine Standardreihe aus 100%igen MON810-Mais hergestellt (Abb. 24) und der relative GVO-Gehalt wie unter 8.4 (für RR-Soja) beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung für alle Proben sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 23: Qualitativer und quantitativer Nachweis mittels real-time PCR von MON810-Mais (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) – C_T-Werte der Proben 03092AL, 03093AL und 03094AL

| Mais-System | | | MON810-Mais-System | | |
|-----------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|--|----------------------------------|
| Probe | C _T | C _T -Mittelwert | Probe | C _T | C _T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% MON810-Mais) | 22,10 22,00 | 22,05 | Negativkontrolle (0% MON810-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (1% MON810-Mais) | 23,09 22,98 | 23,035 | Positivkontrolle (1% MON810-Mais) | 30,17 30,08 | 30,125 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Standard 1: 5 Kopien | 34,68 35,47 | 35,075 | Standard 1: 5 Kopien | 36,54 34,93 | 35,735 |
| Standard 2: 10 Kopien | 35,23 37,74 | 36,485* | Standard 2: 10 Kopien | 35,36* 45,00* | - |
| Standard 3: 100 Kopien | 30,53 30,86 | 30,695 | Standard 3: 100 Kopien | 31,53 31,59 | 31,56 |
| Standard 4:1000 Kopien | 26,81 27,11 | 26,96 | Standard 4:1000 Kopien | 28,23 28,32 | 28,275 |
| Standard 5:10000 Kopien | 23,90 23,92 | 23,91 | Standard 5:10000 Kopien | 24,90 25,25 | 25,075 |
| 03092AL (1:10) | 35,60 45,00 36,07 35,50 33,78 35,10 | 35,60 35,785 34,44 | 03092AL (1:10) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 38,13 | 45,00 45,00 41,565 |
| 03093AL (1:20) | 29,01 28,68 30,59 31,27 28,35 28,15 | 28,845 30,93 28,25 | 03093AL (1:20) | 45,00 36,88 45,00 38,54 45,00 45,00 | 40,94 41,77 45,00 |
| 03094AL (1:5) | 28,38 28,62 29,00 28,35 28,58 30,10 | 28,50 28,675 29,34 | 03094AL (1:5) | 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 45,00 | 45,00 45,00 45,00 |

*Dieser Wert wurde aus der Standardreihe herausgenommen. Dadurch wurde eine Standardgerade mit höherem Bestimmtheitsmaß R² erreicht.

Abbildung 24: Standardreihen für die relative Quantifizierung von Mais- und MON810 Mais mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E))



In allen untersuchten Proben (mit Ausnahme der Zuckerrübenschnitzel, Probe 03106AL, Daten nicht gezeigt) konnte die Pflanzenart Mais, jedoch kein MON810-Mais nachgewiesen werden (Tabellen 23 und 24). Bei der Negativkontrolle wurde kein MON810-Mais (0%) nachgewiesen. Für die Positivkontrolle (Soll: 1% MON810-Mais) wurde ein Gehalt von 1,65% MON810-Mais bestimmt.

Die Tabelle 24 gibt die Ergebnisse des Mais- und MON810-Mais-Nachweises aller untersuchten Proben an.

Tabelle 24: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und MON810-Mais-Anteiles aller Proben

| Probe | Probenbezeichnung | Mais | Anteil des MON810-Mais am Gesamtmaisgehalt (%) |
|---------|--|------|--|
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | + | 0,00 |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | + | 0,00 |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I, Alleinfutter für Sauen Type 031 | + | 0,00 |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | + | 0,00 |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03, weniger Fett | + | 0,00 |
| 03101AL | LE1-P, Alleinfutter I für Legehennen | + | 0,00 |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde, Haferersatz | + | 0,00 |
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | + | 0,00 |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | - | - |

10.3.7 Qualitativer Nachweis von Raps und genetisch verändertem Raps mittels real-time PCR

Für die qualitative Analyse von Raps und genetisch verändertem Raps wurden ausschließlich real-time PCR-Systeme aus der Literatur nach Zeitler et al., 2002 [33] sowie dem LAG (Länderausschuss Gentechnik, Methodenentwicklung, <http://www.lag-gentechnik.de>) verwendet [34]. Die Proben wurden jeweils dreimal extrahiert und die DNA für den Einsatz in der Real-time PCR zusammengemischt (gepoolt). Die Ermittlung der C_T -Werte erfolgte in Doppelbestimmung, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Die Ergebnisse zum Nachweis von Raps in der real-time PCR mit dem Primerpaar Pep-F/Pep-R und der Pep-Sonde [33] sind in der Tabelle 25 beispielhaft an vier untersuchten Proben dargestellt. Alle übrigen Proben wurden nach dem gleichen Verfahren analysiert (Daten nicht gezeigt). C_T -Werte über 40 wurden als negativ bewertet. In allen untersuchten Proben außer in der Probe 03106AL (Zuckerrübenschnitzel) konnte Raps nachgewiesen werden.

Tabelle 25: Qualitativer Nachweis von Raps mittels real-time PCR nach Zeitler et al., 2001 [33]

| Raps-System | | | | | |
|--------------------------------|----------------|-------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------|
| Probe | C_T | C_T -Mittelwert | Probe | C_T | C_T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% GVO-Raps) | 23,17 23,11 | 23,14 | Positivkontrolle (100% Falcon-Raps) | 20,65 20,56 | 20,605 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | 03091AL (1:20) | 22,10 22,12 | 22,11 |
| 03092AL (1:10) | 29,36 29,34 | 29,35 | 03093AL (1:20) | 24,61 25,17 | 24,89 |
| 03094AL (1:5) | 37,77 37,63 | 37,70 | 03095AL (1:20) | 30,42 30,16 | 30,29 |
| 03101AL (1:20) | 31,60 32,29 | 31,945 | 03102AL (1:10) | 31,20 30,71 | 30,955 |
| 03105AL (1:10) | 33,76 32,82 | 33,29 | 03106AL unverdünnt | 45,00 45,00 | 45,00 |

Der Nachweis für die *gv*-Rapslinien Falcon (GS 40/90, Agrevo) und Liberator (L 62, Agrevo) erfolgte in der real-time PCR mit dem Primerpaar Pat-F/Pat-R und der Pat-Sonde [33]. Dieses System weist spezifisch das in beiden GVO vorhandene Gen für das Enzym Phosphotricin-Acetyltransferase (PAT-Gen) nach. GT73-Raps, welcher kein PAT-Gen enthält, jedoch das Gen für die bakterielle CP4-EPSPS (5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase) besitzt, wurde mit dem für das modifizierte EPSPS spezifische Primerpaar EPS336-F/EPS444-R und der EPS932-S-Sonde nachgewiesen [34]. In der Tabelle 26 sind für alle untersuchten Proben die ermittelten C_T -Werten aufgeführt. C_T -Werte über 40 werden als negatives Ergebnis gewertet.

Tabelle 26: Qualitativer Nachweis von Falcon-, Liberator- [33] und GT73-Raps [34] mittels real-time PCR

| Falcon-/Liberator-Raps-System | | | GT73-Raps-System | | |
|--|----------------|-------------------|-----------------------------------|----------------|-------------------|
| Probe | C_T | C_T -Mittelwert | Probe | C_T | C_T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% GVO-Raps) | 45,00 45,00 | 45,00 | Negativkontrolle (0% GVO-Raps) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (100% Falcon-Raps) | 24,30 24,18 | 24,24 | Positivkontrolle (100% GT73-Raps) | 22,88 23,12 | 23,00 |
| Positivkontrolle (100% Liberator-Raps) | 24,13 23,76 | 23,945 | | | |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03091AL (1:20) | 45,00 45,00 | 45,00 | 03091AL (1:20) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03092AL (1:10) | 45,00 38,04 | 41,52 | 03092AL (1:10) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03093AL (1:20) | 45,00 45,00 | 45,00 | 03093AL (1:20) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03094AL (1:5) | 45,00 45,00 | 45,00 | 03094AL (1:5) | 43,39 44,69 | 44,04 |
| 03095AL (1:20) | 38,03 45,00 | 41,515 | 03095AL (1:20) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03101AL (1:20) | 45,00 45,00 | 45,00 | 03101AL (1:20) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03102AL (1:10) | 45,00 45,00 | 45,00 | 03102AL (1:10) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03105AL (1:10) | 45,00 45,00 | 45,00 | 03105AL (1:10) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 03106AL unverdünnt | 45,00 45,00 | 45,00 | 03106AL unverdünnt | 45,00 45,00 | 45,00 |

In keiner der untersuchten Proben konnte gentechnisch veränderter Raps der Linien Falcon-, Liberator- oder GT73 nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen, mit Extrakten aus 100% Material der respektiven GV-Rapslinien hergestellt, ergaben mit den jeweils angewendeten real-time Verfahren C_T -Werte zwischen 23 und 24, während alle Negativproben – wie auch die untersuchten Proben – durchschnittliche C_T -Werte im Bereich von 41 bis 45 aufwiesen

10.3.8 Bestimmung der Nachweisgrenze für die verwendeten real-time PCR-Systeme

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der real-time PCR-Systeme wurde jeweils dreimal eine Verdünnungsreihe von DNA-Lösungen mit definierten Kopienzahlen aus 100%ig gentechnisch verändertem Material (Sojabohne, Maismehl und Rapssamen) hergestellt. Im 5 μ l Ansatz waren 1000 Kopien, 100 Kopien, 50 Kopien, 10 Kopien, 5 Kopien und 1 Kopie enthalten. Diese Ansätze wurde mit Hilfe der TaqMan[®]-Technologie doppelt gemessen.

10.3.8.1 Bestimmung der Nachweisgrenze für das Soja- und RR-Soja real-time PCR-System (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005)

In der Tabelle 27 sind die untersuchten DNA-Lösungen mit den dazugehörigen C_T -Werten aufgelistet.

Tabelle 27: Bestimmung der Nachweisgrenzen für das Soja- und RR-Soja real-time PCR-System (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| Soja-System | | | RR-Soja-System | | |
|---------------------------------|--|------------------------------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| Probe | C_T | C_T -Mittelwert | Probe | C_T | C_T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 23,46 23,09 | 23,275 | Negativkontrolle (0% RR-Soja) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (0,1% RR-Soja) | 23,60 23,55 | 23,575 | Positivkontrolle (0,1% RR-Soja) | 35,44 36,52 | 35,98 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 1 Kopie | 45,00 45,00 45,00 35,35 45,00 38,20 | 45,00 40,175 41,60 | 1 Kopie | 45,00 45,00 45,00 45,00 39,28 45,00 | 45,00 45,00 42,14 |
| 5 Kopien | 34,80 33,75 35,98 34,66 34,52 35,56 | 34,275 35,32 35,04 | 5 Kopien | 36,96 45,00 37,44 36,32 40,61 37,47 | 40,98 36,88 39,04 |
| 10 Kopien | 34,39 35,02 35,42 35,13 34,25 33,83 | 34,705 35,275 34,04 | 10 Kopien | 37,21 38,44 36,34 36,37 36,14 35,86 | 37,825 36,355 36,00 |
| 50 Kopien | 32,20 31,81 32,41 32,14 32,26 32,42 | 32,005 32,275 32,34 | 50 Kopien | 33,31 33,29 33,10 33,29 33,59 33,21 | 33,30 33,195 33,40 |
| 100 Kopien | 30,76 30,80 31,32 31,22 30,51 30,81 | 30,78 31,27 30,66 | 100 Kopien | 32,86 32,53 32,31 33,17 32,01 32,21 | 32,695 32,74 32,11 |
| 1000 Kopien | 27,71 27,48 27,54 27,65 27,64 28,13 | 27,595 27,595 27,885 | 1000 Kopien | 29,05 29,14 28,61 28,79 28,92 29,14 | 29,095 28,70 29,03 |

Um die Nachweisgrenze zu ermitteln, wurden die Richtigkeit und die Präzision des Soja- und RR-Soja-Systems errechnet. Dazu wurden der Mittelwert, die Wiederholvarianz (s_{ij}^2), Wiederholstandardabweichung (s_{ij}), Wiederholbarkeit bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% (Vertrauensbereich, $r_j = 2,8 \times s_{ij}$) und die relative Wiederholstandardabweichung (RSD_r) ermittelt (siehe Tabelle 28).

Aus der Tabelle 28 kann man ablesen, dass sich beim Soja-System für die Wiederholvarianz, die Wiederholstandardabweichung, die relative Wiederholstandardabweichung und den Vertrauensbereich ab fünf Kopien der Sprung zu kleineren Werten auftritt. Die Nachweisgrenze für das Soja-System liegt also bei fünf Kopien. Für das spezifische RR-Soja-System ist dies für die Präzisionsparameterwerte erst ab zehn Kopien dokumentiert. Damit liegt die Nachweisgrenze für den RR-Soja-System bei 10 Kopien.

Tabelle 28: Richtigkeit und Präzision der real-time PCR Soja- und RR-Soja-Systeme (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| Soja-System | | | | | | | |
|----------------|------------------------------|---------|---------------|---------------|--------|--------|--------|
| Richtigkeit | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | C _T -Mittelwert | 42,258 | 34,878 | 34,673 | 32,223 | 30,903 | 27,692 |
| Präzision | s _{ij} ² | 18,8524 | 0,6267 | 0,3714 | 0,0517 | 0,0937 | 0,0529 |
| | s _{ij} | 4,3419 | 0,7917 | 0,6094 | 0,2274 | 0,3061 | 0,2301 |
| | r _j | 12,1574 | 2,2167 | 1,7064 | 0,6367 | 0,8571 | 0,6442 |
| | RSD _r [%] | 10,27 | 2,27 | 1,76 | 0,71 | 0,99 | 0,83 |
| RR-Soja-System | | | | | | | |
| Richtigkeit | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | C _T -Mittelwert | 44,047 | 38,967 | 36,727 | 33,298 | 32,515 | 28,942 |
| Präzision | s _{ij} ² | 5,4531 | 10,9408 | 0,9082 | 0,0265 | 0,1877 | 0,0448 |
| | s _{ij} | 2,3352 | 3,3077 | 0,9530 | 0,1628 | 0,4332 | 0,2116 |
| | r _j | 6,5385 | 9,2615 | 2,6684 | 0,4558 | 1,2130 | 0,5925 |
| | RSD _r [%] | 5,30 | 8,49 | 2,59 | 0,49 | 1,33 | 0,73 |

Um die Auswirkung der Fehler auf die Bestimmung der Nachweisgrenze, die bei den Verdünnungsschritten entstehen, zu ermitteln, wurden die Vergleichsvarianz (s_{Rj}²) und die relative Vergleichsstandardabweichung (RSD_R) errechnet und mit der relativen Wiederholstandardabweichung (RSD_r) verglichen (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Relative Wiederholstandardabweichung (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichung (RSD_R) der Soja- und RR-Soja real-time PCR-Systeme (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| Soja-System | | | | | | | |
|----------------|------------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Präzision | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | s _{Rj} ² | 23,2271 | 0,6544 | 0,4368 | 0,0564 | 0,1129 | 0,0535 |
| | RSD _r [%] | 11,40 | 2,32 | 0,95 | 0,74 | 0,42 | 0,81 |
| | RSD _R [%] | 11,40 | 2,32 | 1,91 | 0,74 | 1,09 | 0,83 |
| RR-Soja-System | | | | | | | |
| Präzision | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | s _{Rj} ² | 5,4531 | 12,6259 | 1,0689 | 0,0302 | 0,1976 | 0,0523 |
| | RSD _r [%] | 5,30 | 9,12 | 1,40 | 0,52 | 1,18 | 0,42 |
| | RSD _R [%] | 5,30 | 9,12 | 2,82 | 0,52 | 1,37 | 0,79 |

Die Werte für die relative Wiederholstandardabweichung und die relative Vergleichsstandardabweichung des Soja-Systems wie auch für das RR-Soja-System liegen bei fast allen Verdünnungsstufen im gleichen Bereich. Somit kann die Auswirkung der Verdünnungsfehler auf die Bestimmung der Nachweisgrenze vernachlässigt werden.

Um die Nachweisgrenze in Prozenten angeben zu können, wurde folgende Berechnung durchgeführt. Die Nachweisgrenze für RR-Soja-System liegt bei zehn Kopien (Genomäquivalente). Die Genomgröße von Soja ist 1,13 x 10⁹ Bp [25], und ein Sojagenom wiegt 1,25 pg.

1 Genom Soja = 1,25 pg

10 Genome Soja = x $x = 12,5 \text{ pg} = 0,0125 \text{ ng}$

Bei einem PCR-Ansatz von z.B. 50 ng Soja-DNA folgt:

50 ng = 100%

0,0125 ng = x $x = 0,025\%$

Somit können mit dem System 0,025% RR-Soja bei einem PCR-Ansatz von 50 ng Soja-DNA nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze in Prozenten für Soja-System wurde genauso berechnet. Die Tabelle 30 gibt die ermittelten Nachweisgrenzen für das Soja- und RR-Soja-System an.

Tabelle 30: Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenzen für die real-time PCR Soja- und RRTM-Soja-Systeme (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| System | Nachweisgrenze [Kopien] | Nachweisgrenze DNA [ng] | Nachweisgrenze [%] |
|---------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| Soja | 5 Kopien | 0,0063 ng | 0,013% |
| RR-Soja | 10 Kopien | 0,0125 ng | 0,025% |

10.3.8.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen für die real-time PCR-Mais-Systeme (amtliche Methode L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für die real-time Mais-Systeme wurden Mais-DNA-Lösungen aus 100%igem Bt11-/ bzw. 5%igem Bt176 Maismehl hergestellt und die real-time PCR mit dem Primerpaar und der Sonde (ZM1-F/ZM1-R und ZM1-Sonde) für das Mais-System durchgeführt. Für die Bestimmung der Nachweisgrenze für das real-time PCR-System zur spezifischen Detektion von Bt176 Mais wurde das Primerpaar Cry2-F / Cry2-R und die BTSYN-Sonde eingesetzt. In der Tabelle 31 sind die untersuchten DNA-Lösungen mit den dazugehörigen CT-Werten aufgelistet.

Tabelle 31: Bestimmung der Nachweisgrenze für die real-time Mais- und Bt176-Mais-Systeme (L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| Mais-System | | | Bt176-Mais-System | | |
|------------------------------------|--|------------------------------------|----------------------------------|--|-----------------------------------|
| Probe | C _T | C _T -Mittelwert | Probe | C _T | C _T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% MON 810-Mais) | 22,19 22,06 | 22,125 | Negativkontrolle (0% Bt176-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (2% Bt11-Mais) | 24,07 25,13 | 24,60 | Positivkontrolle (5% Bt176-Mais) | 30,83 32,06 | 31,445 |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 1 Kopie | 36,75 36,40 36,86 37,95 37,28 35,41 | 36,575 37,406 36,345 | 1 Kopie | 34,37 36,23 45,00 35,33 36,71 45,00 | 35,30 40,164 40,855 |
| 5 Kopien | 33,89 34,19 34,85 32,82 33,94 34,47 | 34,04 33,835 34,205 | 5 Kopien | 32,59 33,30 34,42 33,81 34,84 35,20 | 32,945 34,115 35,02 |

Fortsetzung Tabelle 31: Bestimmung der Nachweisgrenze für die real-time Mais- und Bt176-Mais-Systeme (L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| Mais-System | | | Bt176-Mais-System | | |
|-------------|----------------|----------------------------|-------------------|----------------|----------------------------|
| Probe | C _T | C _T -Mittelwert | Probe | C _T | C _T -Mittelwert |
| 10 Kopien | 33,19 | 32,95 | 10 Kopien | 31,69 | 32,07 |
| | 32,71 | | | 32,45 | |
| | 33,05 | 33,18 | | 33,26 | 32,855 |
| | 33,31 | 32,87 | | 32,45 | 32,585 |
| | 32,99 | | | 32,49 | |
| 32,75 | 32,68 | | | | |
| 50 Kopien | 30,24 | 30,44 | 50 Kopien | 30,81 | 30,53 |
| | 30,64 | | | 30,25 | |
| | 30,39 | 30,54 | | 30,37 | 30,085 |
| | 30,69 | 30,85 | | 29,80 | 30,84 |
| | 31,00 | | | 30,71 | |
| 30,70 | 30,97 | | | | |
| 100 Kopien | 29,20 | 29,62 | 100 Kopien | 29,90 | 29,68 |
| | 30,04 | | | 29,46 | |
| | 29,53 | 29,64 | | 29,29 | 29,29 |
| | 29,75 | 29,72 | | 29,29 | 29,35 |
| | 29,49 | | | 29,29 | |
| 29,95 | 29,41 | | | | |
| 1000 Kopien | 26,39 | 26,34 | 1000 Kopien | 25,54 | 25,73 |
| | 26,29 | | | 25,92 | |
| | 26,00 | 26,21 | | 26,20 | 26,11 |
| | 26,42 | 26,345 | | 26,02 | 25,885 |
| | 26,36 | | | 26,16 | |
| 26,33 | 25,61 | | | | |

Um die Nachweisgrenze zu ermitteln, wurden die Richtigkeit und die Präzision des Mais- und Bt176-Mais-Systems errechnet (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Richtigkeit und Präzision der real-time PCR Mais- und Bt176-Mais-Systeme (L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| Mais-System | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|--------|--------|--------|
| Richtigkeit | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | | C _T -Mittelwert | 36,775 | 34,027 | 33,000 | 30,610 | 29,660 |
| Präzision | s _{ij} ² | 0,7295 | 0,4767 | 0,0563 | 0,0706 | 0,0988 | 0,0234 |
| | s _{ij} | 0,8541 | 0,6904 | 0,2372 | 0,2656 | 0,3143 | 0,1530 |
| | r _j | 2,3915 | 1,9331 | 0,6643 | 0,7438 | 0,8801 | 0,4285 |
| | RSD _r [%] | 2,32 | 2,03 | 0,72 | 0,87 | 1,06 | 0,58 |
| Bt176-Mais-System | | | | | | | |
| Richtigkeit | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | C _T -Mittelwert | 38,773 | 34,027 | 32,503 | 30,485 | 29,440 | 25,908 |
| Präzision | s _{ij} ² | 23,9029 | 0,9664 | 0,2542 | 0,1858 | 0,0561 | 0,0771 |
| | s _{ij} | 4,8891 | 0,9830 | 0,5042 | 0,4311 | 0,2368 | 0,2777 |
| | r _j | 13,6894 | 2,7525 | 1,4118 | 1,2070 | 0,6631 | 0,7777 |
| | RSD _r [%] | 12,61 | 2,89 | 1,55 | 1,41 | 0,80 | 1,07 |

Aus der Tabelle 32 ist ersichtlich, dass sich beim Mais-System für die Präzisionsparameter erst ab fünf Kopien kleine Werte ergeben haben. Die Nachweisgrenze für das Mais-System liegt bei fünf Kopien. Beim Bt176-Mais-System sind die Werte für die Präzisionsparameter erst ab zehn Kopien klein. Damit ist die Nachweisgrenze für den Bt176-Mais-System zehn Kopien.

Um die Auswirkung der Fehler auf die Bestimmung der Nachweisgrenze, die bei den Verdünnungsschritten entstehen, zu ermitteln, wurden die s_{Rj}²- und RSD_R-Werte errechnet und mit den RSD_r-Werten verglichen (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Relative Wiederholstandardabweichung (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichung (RSD_R) der Mais- und Bt176-Mais-Systeme (L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005)

| Mais-System | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Präzision | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | s_{Ri}^2 | 0,8012 | 0,7486 | 0,0593 | 0,0740 | 0,1609 | 0,0312 |
| | RSD _r [%] | 2,43 | 2,54 | 0,74 | 0,78 | 1,35 | 0,67 |
| | RSD _R [%] | 2,43 | 2,54 | 0,74 | 0,89 | 1,35 | 0,67 |
| Bt176-Mais-System | | | | | | | |
| Präzision | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | s_{Ri}^2 | 27,6154 | 1,1661 | 0,2649 | 0,2029 | 0,0614 | 0,0799 |
| | RSD _r [%] | 13,55 | 1,20 | 1,42 | 1,13 | 0,63 | 1,09 |
| | RSD _R [%] | 13,55 | 3,17 | 1,58 | 1,48 | 0,84 | 1,09 |

Die relative Wiederholstandardabweichung und die relative Vergleichsstandardabweichung des Mais-Systems liegt bei allen Kopienzahlen im gleichen Bereich. Dies trifft auch für das Bt176-Mais-System zu. Somit kann die Auswirkung der Verdünnungsfehler bei der Bestimmung der Nachweisgrenze vernachlässigt werden.

Um die Nachweisgrenze in Prozenten angeben zu können, wurde die Berechnung, wie unter Abschnitt 9.6.7.1 dargestellt, durchgeführt, wobei für Mais eine Genomgröße von $2,65 \times 10^9$ Bp und für 1 Maisgenom ein Gewicht von 2,91 pg angenommen wird.

Die Nachweisgrenzen für die hier verwendeten Bt11-, T25- und MON810-Mais real-time PCR-Systeme wurden in gleicher Weise ermittelt.

Die Tabelle 34 gibt die für alle angewendeten real-time PCR Verfahren für Mais und genetisch veränderten Mais für einen PCR-Ansatz von 50 ng Mais-DNA an.

Tabelle 34: Nachweisgrenzen der Mais- und GVO-Mais real-time PCR Systeme

| System | Nachweisgrenze [Kopien] | Nachweisgrenze [ng] | Nachweisgrenze [%] |
|-------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Mais | 5 | 0,0146 | 0,029 |
| Bt176-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |
| Bt11-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |
| T25-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |
| MON810-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |

10.3.8.3 Bestimmung der Nachweisgrenze für die eingesetzten Raps-Systeme

Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen für die hier verwendeten Raps- bzw. GV-Raps real-time PCR-Systeme [33], [34], wurden Raps-DNA-Lösungen aus einer Bio-Raps-Probe (0% GVO-Raps), bzw. aus 100%igem Material der genetisch veränderten Linien hergestellt. In der Tabelle 35 sind die mit den jeweiligen real-time PCR-Systemen für den Nachweis von Raps bzw. Gt73 Raps untersuchten DNA-Lösungen mit den dazugehörigen C_T-Werten aufgelistet.

Tabelle 35: Bestimmung der Nachweisgrenze für die real-time Raps- und GT73-Raps-Systeme [33], [34]

| Raps-System | | | GT73-Raps-System | | |
|--------------------------------------|--|------------------------------------|--|--|-----------------------------------|
| Probe | C _T | C _T -Mittelwert | Probe | C _T | C _T -Mittelwert |
| Negativkontrolle (0% MON810-Mais) | 45,00 45,00 | 45,00 | Negativkontrolle (0% GVO-Raps) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| Positivkontrolle (0% GVO-Raps) | 23,01 22,70 | 22,855 | Positivkontrolle (100% GT73-Raps) | 24,14 23,59 | 23,865 |
| Positivkontrolle (100% GT73-Raps) | 23,25 23,30 | 23,275 | | | |
| Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 | Wasserkontrolle (NTC) | 45,00 45,00 | 45,00 |
| 1 Kopie | 45,00 45,00 45,00 36,77 45,00 45,00 | 45,00 40,885 45,00 | DNA-Lösung mit 1 Kopie wurde nicht hergestellt. | | |
| 5 Kopien | 45,00 36,59 38,67 36,40 38,82 38,36 | 40,795 37,535 38,59 | 5 Kopien | 45,00 45,00 35,74 35,89 36,78 37,06 | 45,00 35,815 36,92 |
| 10 Kopien | 36,51 36,18 37,08 45,00 37,38 45,00 | 36,345 41,04 41,19 | 10 Kopien | 35,90 38,01 35,57 36,77 37,02 35,87 | 36,955 36,17 36,445 |
| 50 Kopien | 33,12 33,07 34,37 33,94 33,74 33,47 | 33,095 34,155 33,605 | 50 Kopien | 33,95 33,73 33,22 34,31 34,05 33,59 | 33,84 33,765 33,82 |
| 100 Kopien | 32,29 32,05 32,35 32,77 32,24 32,46 | 32,17 32,56 32,35 | 100 Kopien | 32,67 32,44 33,05 32,17 32,75 33,13 | 32,555 32,61 32,94 |
| 1000 Kopien | 28,32 28,77 28,63 28,62 28,87 27,63 | 28,545 28,625 28,25 | 1000 Kopien | 28,59 28,98 28,55 28,47 28,53 28,70 | 28,785 28,51 28,615 |

Um die Nachweisgrenze zu ermitteln wurden die Richtigkeit und die Präzision des Raps- und GT73-Raps-Systems errechnet (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Richtigkeit und Präzision der real-time PCR Raps- und GT73-Raps-Systeme [33], [34]

| Raps-System | | | | | | | |
|------------------|----------------------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|
| Richtigkeit | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | CT-Mittelwert | 43,6280 | 38,9730 | 36,788 | 33,6180 | 32,3600 | 28,6420 |
| Präzision | srj ² | 11,2888 | 9,8229 | 0,2942 | 0,2509 | 0,0587 | 0,0432 |
| | srj | 3,3599 | 3,1342 | 0,5424 | 0,5009 | 0,2423 | 0,2078 |
| | rj | 9,4077 | 8,7756 | 1,5188 | 1,4024 | 0,6785 | 0,5818 |
| | RSD _r [%] | 7,7000 | 8,0400 | 1,47 | 1,4900 | 0,7500 | 0,7300 |
| GT73-Raps-System | | | | | | | |
| Richtigkeit | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| | CT-Mittelwert | | 39,2450 | 36,523 | 33,8080 | 32,7020 | 28,6370 |
| Präzision | srj ² | | 20,1263 | 0,8484 | 0,1460 | 0,1319 | 0,0341 |
| | srj | | 4,4862 | 0,9211 | 0,3821 | 0,3631 | 0,1848 |
| | rj | | 12,5615 | 2,5790 | 1,0699 | 1,0167 | 0,5174 |
| | RSD _r [%] | | 11,4300 | 2,52 | 1,1300 | 1,1100 | 0,6500 |

Aus der Tabelle 36 kann man ablesen, dass sich beim Raps-System [33] für die Präzisionsparameter erst ab zehn Kopien kleine Werte ergeben haben. Das gleiche trifft auf das GT73-Raps-System [34] zu. Die Nachweisgrenze für das Raps- und GT73-Raps-System liegt bei zehn Kopien.

Um die Auswirkung der Fehler auf die Bestimmung der Nachweisgrenze, die bei den Verdünnungsschritten entstehen, zu ermitteln, wurden die s_{Rj}^2 - und die RSD_r-Werte errechnet und mit den RSD_r-Werten verglichen (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Relative Wiederholstandardabweichung (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichung (RSD_R) der real-time PCR Raps- [33] und GT73-Raps-Systeme [34]

| Raps-System | | | | | | | |
|------------------|----------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| Präzision | s_{Rj}^2 | 11,2888 | 12,6821 | 0,3770 | 0,3027 | 0,0616 | 0,0507 |
| | RSD _r [%] | 7,7000 | 9,1400 | 0,6300 | 0,6200 | 0,6700 | 0,7800 |
| | RSD _R [%] | 7,7000 | 9,1400 | 1,6600 | 1,6400 | 0,7700 | 0,7800 |
| GT73-Raps-System | | | | | | | |
| | Kopienzahl | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| Präzision | s_{Rj}^2 | | 25,1537 | 1,2024 | 0,2413 | 0,1620 | 0,0349 |
| | RSD _r [%] | | 0,3300 | 3,0000 | 1,4500 | 1,2300 | 0,6200 |
| | RSD _R [%] | | 12,7800 | 3,0000 | 1,4500 | 1,2300 | 0,6500 |

Die relative Wiederholstandardabweichung und die relative Vergleichsstandardabweichung des Raps-Systems sind bei den meisten Kopienzahlen gleich. Das gleiche trifft auf das GT73-Raps-System zu. Somit ist die Auswirkung der Verdünnungsfehler auf die Bestimmung der Nachweisgrenze vernachlässigbar.

Um die Nachweisgrenze in Prozenten angeben zu können, wurde die Berechnung unter der Annahme einer Genomgröße für Raps von $1,127 \times 10^9$ Bp [<http://www.rbgkew.org.uk/eval/database1.html>] und einem Gewicht von 1,24 pg für 1 Raps-genom durchgeführt.

Die Nachweisgrenzen für das Falcon- und das Liberator-Raps-System wurden in gleicher Weise ermittelt. Die Tabelle 38 gibt die ermittelten Nachweisgrenzen für Raps- und GVO-Raps-Systeme bei einem PCR-Ansatz von 50 ng Raps-DNA an.

Tabelle 38: Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenzen für die real-time PCR Raps- [33] und GVO-Raps-Systeme [33], [34]

| System | Nachweisgrenze [Kopien] | Nachweisgrenze [ng] | Nachweisgrenze [%] |
|----------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Raps | 10 | 0,0124 | 0,025 |
| Falcon-Raps | 5 | 0,0062 | 0,012 |
| Liberator-Raps | 14 | 0,0174 | 0,035 |
| GT73-Raps | 10 | 0,0124 | 0,025 |

10.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Tabelle 39 sind alle Ergebnisse, die bei der Untersuchung von Futtermittelproben mittels Polymerase-Kettenreaktion erzielt wurden, zusammengefasst.

Tabelle 39: Zusammenfassung der Ergebnisse aller mittels PCR untersuchten Proben

| Proben-nummer | Proben-bezeichnung | Nachweis | Methoden | | Bestandteil deklariert |
|---------------|--|--------------------|----------|---------------|------------------------|
| | | | PCR | Real-time-PCR | |
| 03091AL | Ergänzungsfutter für Milchkühe MLP 18-4 4183 | CaMV 35S-Promotor | + | + | |
| | | Soja | + | + | ja |
| | | Roundup Ready Soja | + | 100% | |
| | | Mais | + | + | nein |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | - | + | ja |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| | Weizen | + | n.d. | ja | |
| 03092AL | Ergänzungsfutter für Kälber KAF Kalvi 4340 | CaMV 35S-Promotor | + | + | |
| | | Soja | + | + | ja |
| | | Roundup Ready Soja | + | 100% | |
| | | Mais | - | + | nein |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | + | nein |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| | Weizen | + | n.d. | nein | |
| 03093AL | Holstenstolz Sauenfutter I, Alleinfutter für Sauen, Type 031 | CaMV 35S-Promotor | + | + | |
| | | Soja | + | + | ja |
| | | Roundup Ready Soja | + | 100 % | |
| | | Mais | + | + | ja |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | + | ja |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| | Weizen | + | n.d. | ja | |

Fortsetzung Tabelle 39: Zusammenfassung der Ergebnisse aller mittels PCR untersuchten Proben

| Probennummer | Probenbezeichnung | Nachweis | Methoden | | Bestandteil deklariert |
|--------------|--|--------------------|----------|---------------|------------------------|
| | | | PCR | Real-time-PCR | |
| 03094AL | SALVANA Prestarter, Ergänzungsfutter für Saugferkel | CaMV 35S-Promotor | + | + | |
| | | Soja | + | + | ja |
| | | Roundup Ready Soja | + | 100% | |
| | | Mais | + | + | ja |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | + | nein |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| Weizen | - | n.d. | nein | | |
| 03095AL | Legehennenfutter LR mod. 03 (Selbstmischung) Fütterung ab Mischung v. 11.03.03, weniger Fett | CaMV 35S-Promotor | + | + | |
| | | Soja | + | + | ja |
| | | Roundup Ready Soja | + | 100% | |
| | | Mais | + | + | ja |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | + | nein |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| Weizen | + | n.d. | ja | | |
| 03101AL | LE1-P, Alleinfutter für Legehennen | CaMV 35S-Promotor | + | + | |
| | | Soja | + | + | ja |
| | | Roundup Ready Soja | + | 35,52%±5,60% | |
| | | Mais | + | + | ja |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | + | nein |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| Weizen | + | n.d. | ja | | |
| 03102AL | P Standard Ergänzungsfuttermittel für Pferde (Haferersatz) | CaMV 35S-Promotor | + | + | |
| | | Soja | + | + | nein |
| | | Roundup Ready Soja | + | 100% | |
| | | Mais | + | + | nein |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | + | nein |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| Weizen | + | n.d. | ja | | |
| 03105AL | Ovator PegaPlus Basis-Müsli ohne Hafer, Ergänzungsfuttermittel für Pferde | CaMV 35S-Promotor | - | + | |
| | | Soja | + | + | ja |
| | | Roundup Ready Soja | - | 100% | |
| | | Mais | + | + | ja |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | + | nein |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| Weizen | + | n.d. | ja | | |

Fortsetzung Tabelle 39: Zusammenfassung der Ergebnisse aller mittels PCR untersuchten Proben

| Probennummer | Probenbezeichnung | Nachweis | Methoden | | Bestandteil deklariert |
|--------------|---------------------------|--------------------|----------|---------------|------------------------|
| | | | PCR | Real-time-PCR | |
| 03106AL | Melassierte Tr.-Schnitzel | CaMV 35S-Promotor | - | - | |
| | | Soja | - | - | nein |
| | | Roundup Ready Soja | - | - | |
| | | Mais | - | - | nein |
| | | Bt176-Mais | - | - | |
| | | Bt11-Mais | - | - | |
| | | T25-Mais | - | - | |
| | | MON810-Mais | - | - | |
| | | Raps | n.d. | - | nein |
| | | GVO-Raps | n.d. | - | |
| | | Weizen | - | n.d. | nein |

Bedeutung:

- + Die Methode wurde angewendet und es ergab sich ein positives Ergebnis.
- Die Methode wurde angewendet und es ergab sich ein negatives Ergebnis.
- n.d. Die Methode wurde nicht angewendet.

Beim GVO-Raps wurde auf Falcon-, Liberator- und GT73-Raps getestet.

Tabelle 40 fasst alle erzielten Ergebnisse für die Nachweisgrenzen der hier angewendeten Real-time PCR-Systeme zusammen.

Tabelle 40: Nachweisgrenzen der verwendeten Real-time PCR-Systeme

| Real-time PCR-System | Nachweisgrenze [Kopien] | Nachweisgrenze [ng] | Nachweisgrenze [%] |
|----------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Soja | 5 | 0,0063 | 0,013 |
| RR-Soja | 10 | 0,0125 | 0,025 |
| Mais | 5 | 0,0146 | 0,029 |
| Bt176-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |
| Bt11-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |
| T25-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |
| MON810-Mais | 10 | 0,0291 | 0,058 |
| Raps | 10 | 0,0124 | 0,025 |
| Falcon-Raps | 5 | 0,0062 | 0,012 |
| Liberator-Raps | 14 | 0,0174 | 0,035 |
| GT73-Raps | 10 | 0,0124 | 0,025 |

11 Diskussion und Schlussbetrachtung

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die EU-Verordnung VO (EG) Nr. 1829/2003 für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel. Mit dieser neuen Verordnung werden Futtermittel den Lebensmitteln bezüglich der Zulassung und Kennzeichnung von GVO gleichgesetzt. Die Aufgabe bestand darin, handelsübliche Futtermittelproben auf GVO zu analysieren und dabei die bereits für GVO-Lebensmittel existierenden validierten Untersuchungsverfahren, wie sie z.B. in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren gemäß § 64 des LFGB (vormals § 35 LMBG) vorliegen, auf Futtermittel anzuwenden und gegebenenfalls anzupassen. Derzeit stehen in der „Amtlichen Sammlung“ u.a. vier qualitative PCR Systeme für die Detektion der GV-Maislinien Bt176, T25, MON810 und Bt11 sowie ein qualitatives PCR-System für die Detektion von Roundup Ready™ (RR-)Sojabohnen zur Verfügung. Es handelt sich ausschließlich um „konventionelle“ PCR-Systeme. Quantitative real-time PCR-Systeme, die zum Teil unter Koordination des BfR validiert wurden (z.B. für MON810, Bt176 und RR™ Soja), sind als europäische Normen in Form von FDIS/ISO Standards publiziert. Diese Systeme wurden ebenfalls zur Probenanalytik herangezogen. In Ringversuchen validierte Systeme für den Nachweis von *gv*-Raps sind in der Methodensammlung des LAG (Länderausschuss Gentechnik) veröffentlicht bzw. wurden der Literatur entnommen. In diesem Bereich existieren noch keine § 64 Methoden oder CEN/ISO Standards, da verarbeitete Rapsprodukte (Fette, Öle), wie sie normalerweise in Lebensmitteln verwendet werden, vor dem April 2004 nicht kennzeichnungspflichtig waren. Die Ergebnisse werden im Folgenden anhand der einzelnen Verfahrensschritte diskutiert.

11.1 Probenauswahl und Probenaufarbeitung (DNA-Präparation)

Bei den neun untersuchten Futtermittelproben handelt es sich um reguläre Handelsware, welche im Versuchsgut Marienfelde und im Versuchsgut Dahlem des BfR, Berlin, an die Versuchstiere verfüttert wird. Das Spektrum der untersuchten Proben reicht von geringen bis stärkeren Verarbeitungsgraden und spiegelt die marktübliche Situation wider. Die Proben wurden ohne spezielle Probenahmepläne von Dritten aus der handelsüblichen Verpackung entnommen und portioniert. Weitere Ergebnisse für die Futtermittelanalytik von achtundzwanzig Allein- und Mischfuttermitteln unterschiedlichster Verarbeitungsgrade (inklusive Maiskleber, Milchaustauscher, Pflanzenpellets etc.) sowie sechs Futtermittelvorprodukte mittels der in der vorliegenden Studie eingesetzten real-time PCR-Systeme wurden am BfR im Rahmen eines Forschungsprojektes zum Verbot des Einsatzes von GVO in der ökologischen Landwirtschaft („Öko-Projekt“) erzielt [40] und können zum Vergleich ebenfalls herangezogen werden.

Die DNA-Ausbeuten mittels standardisierter CTAB-Extraktionsmethode (gemäß amtlicher Methode §64 L23-01-22-1 bzw. FDIS ISO 2159:2005) lagen bei den meisten Proben zwischen ca. 100 und 550 ng/µl und damit in einem erfahrungsgemäß für die PCR sehr gut geeigneten Bereich. Die Ausnahme bildeten die Proben 03094AL (Ergänzungsfuttermittel für Saugferkel) und 03106AL (melassierte Zuckerrübetrockenschnitzel). Die Ursache für die geringe DNA-Ausbeute bei diesen beiden Proben lässt sich durch den Herstellungsprozess erklären. Bekanntermaßen wirken sich Temperatur, Druck und pH-Wert negativ auf die DNA-Ausbeute aus. Bei den Zuckerrübetrockenschnitzeln, bei welchen die mit Abstand niedrigsten Ausbeuten gemessen wurden, kommt noch der konsistenzbedingte schlechte mechanische Aufschluss der Probe hinzu. Die untersuchten Pellets der Probe 03106AL hatten eine sehr harte Beschaffenheit, was unter anderem darauf hindeutet, dass diese unter sehr hohem Druck pelletiert worden waren. Zuckerrübetrockenschnitzel fallen bei der Zuckerherstellung an, wobei zuerst die Zuckerrübenschnitzel extrahiert (70-85 min bei 69-73°C und pH 5,6-5,8) und anschließend getrocknet und pelletiert werden [41].

Der Herstellungsprozess dürfte auch die Ursache für die geringen DNA-Ausbeuten des Saugferkel-Ergänzungsfuttermittels (Probe 03094AL) sein. Diese Probe enthält speziell auf-

geschlossenen Mais und Sojabohnen (Tabelle 2), da bei den Saugferkeln der Verdauungsmechanismus noch nicht vollständig entwickelt ist. Die Jungtiere benötigen daher ein leicht verwertbares Futter. Der Aufschlussprozess verursacht offensichtlich eine erhebliche DNA-Degradation, was sich auf die DNA-Ausbeute negativ ausgewirkt hat (Tabelle 9).

Zur Optimierung der DNA-Ausbeuten wurde neben der CTAB-Anwendung auch die DNA-Extraktion mittels eines kommerziellen Kits (NucleoSpin Food[®] Kit) durchgeführt. Das Ergebnis war bei Proben, aus denen sich ausreichend DNA extrahieren lässt, mit der CTAB-Methode vergleichbar. Bei den kritischen Proben mit niedriger DNA-Ausbeute konnten jedoch Steigerungen um das Drei- bis Zehnfache erzielt werden. Durch die Anwendung des Kits konnte die DNA-Ausbeute für Rübenschnitzel von 1 ng/µl auf 10-12 ng/µl, beim Saugferkelfutter von ca. 11-14 ng/µl auf 21-57 ng/µl verbessert werden. Da die extrahierte Menge und Qualität an DNA nun auch bei den Trockenschnitzeln für eine PCR-Analytik ausreichend war, wurde auf weitere Optimierungsschritte im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Es sind aber durchaus weitere Verbesserungen, beispielsweise durch eine Genomvervielfältigung („whole genome amplification“) vor dem analytischen Schritt in Kombination mit optimierten Aufschlussprotokollen bei harten und trockenen Proben denkbar. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die hier standardmäßig eingesetzte CTAB-Methode ein gut geeignetes Verfahren auch im Bereich der Futtermittelanalytik ist. Bei schwierigen Proben (CTAB-Ausbeuten unter 10 ng/µl) ist jedoch auch die Verwendung von speziellen Extraktionskits in Erwägung zu ziehen.

Bei beiden Extraktions-Methoden (CTAB bzw. Kit) wurde zur Überprüfung einer eventuellen Kontamination während der Extraktion immer eine Extraktionskontrolle (Wasser wird wie Probe behandelt) mitgeführt. Die Extraktionskontrollen wiesen in keinem Fall eine Verunreinigung auf und unterstreichen die Korrektheit der Ergebnisse.

11.2 Screening

Ein sinnvoller erster Schritt, der nachfolgende Analyseschritte ersparen kann, ist der Einsatz eines Screening-Verfahrens. Ein Screening beruht auf dem Nachweis sehr häufig und in vielen verschiedenen GVO vorkommender Signal- oder Markersequenzen, wie z.B. der Promotor des Cauliflower Mosaic Virus 35S-Gens (CaMV 35S) oder der NOS-(Nopalin-Synthase-Gen)-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*. Zwar wird immer noch eine Einzelanalyse der Probe durchgeführt, jedoch erfasst das Ergebnis eine große Anzahl potenzieller GVO, die alle durch ein negatives Ergebnis ausgeschlossen werden können. Bei einem positiven Ergebnis liegt der Verdacht auf einen GVO nahe. In diesem Fall muss ein spezifischer Nachweis des in Frage kommenden GVO erfolgen.

Ein geeignetes Screening-Verfahren steht mit der § 64-Methode L-00.00-31 des LFGB (Lebens- und Futtermittelgesetzbuch) (bzw. prEN ISO 2159:2005) zum qualitativen PCR-Nachweis des CaMV 35S Promotors, des NOS-Terminators sowie des Neomycinphosphotransferasegens (nptII) zur Verfügung. Zur Zeit sind die durch die amtlichen Methode nachgewiesenen Screening-Elemente, in mehr als 80% der weltweit bekannten GVO vorhanden, wobei das häufigste Element der CaMV 35S Promotor ist, auf welchen sich die Untersuchungen konzentrierten. Unter Verwendung des für den CaMV 35S Promotor spezifischen Primerpaares 35S1/35S2 und der Standardmethodenvorschrift (L-00.00-31) lag bei fast allen Proben der Hinweis auf eine gentechnische Veränderung vor (Amplifikat von 195 bp Größe). Dieses Ergebnis ist vor dem Hintergrund der mittlerweile marktführenden Position von genetisch verändertem Soja (s. Abschnitt 6.1) und der Präsenz von Soja in den untersuchten Proben nicht überraschend.

Ausnahmen bildeten die Probe 030105AL („Pferde-Müsli“) und 03106AL (Zuckerrübenschnitzel), bei denen das Ergebnis des Screenings mittels konventioneller PCR (§ 64-Methode L-00.00-31) negativ war. Bei der Probe 030105AL, einem haferfreien Ergänzungsfuttermittel

für Pferde, konnte jedoch mit dem alternativ eingesetzten qualitativen real-time PCR-Verfahren (ISO/FDIS 21570:2004(E) [29]) der CaMV 35S Promotor zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen beiden Methoden lassen sich als Folge einer stärkeren Fragmentierung und dadurch minderer Qualität der DNA in dieser Probe, welche eigentlich durch gute DNA-Ausbeuten (> 150 ng/µl) charakterisiert war, erklären. Das real-time System ist hier offensichtlich erfolgreicher, da die Zielsequenz kleiner (82 Bp) als diejenige der amtlichen Screening-Methode L-00.00-31 (195 bp) ist.

Der negative Befund des CaMV 35-S Promotor-Screening mittels amtlicher Methode bei der Zuckerrübenschnitzel-Probe wurde demgegenüber auch mit dem real-time System bestätigt. Derzeit sind in Europa keine *gv*-Zuckerrüben auf dem Markt. Außerhalb Europas sind drei genetisch veränderte Zuckerrüben für die Lebens- und/oder Futtermittelproduktion zugelassen. Davon enthalten zwei Linien, Event GTSB77 und T120-7 (ACS-BVØØ1-3), welche ab 1998 in den USA, Kanada, Japan, Australien und den Philippinen für den Handel autorisiert wurden, den CaMV 35S Promotor. Die erst in den Jahren 2004/2005 in den USA, Philippinen, Kanada und Australien zugelassene *gv*-Zuckerrübe H7-1 (KM-ØØØ71-4) enthält den 35S Promotor des Feigen Mosaic-Virus (P-FMV), welcher durch das hier angewendete offizielle Screening-Verfahren höchstwahrscheinlich nicht erfasst würde. Aufgrund des erst kürzlich erfolgten Markteintritts dieser *gv*-Zuckerrüben und der vernachlässigbaren Rolle von Zuckerrüben als Agrar-Importware nach Europa, ist eine Kontamination der untersuchten Zuckerrübenprobe durch illegale *gv*-Zuckerrüben-Importe zur Zeit sehr unwahrscheinlich. Die *Beta vulgaris* Linie H7-1 befindet sich derzeit im Antragsverfahren auf Marktzulassung gemäß Artikel 5 der Verordnung VO (EG) Nr. 1829/2003.

Eine Screening-Methode für Raps- und Zuckerrübensorten, welche zur Zeit der experimentellen Arbeiten zu diesem Report noch nicht zur Verfügung stand, ist über die Methodensammlung des Länderausschuss Gentechnik (LAG) öffentlich einsehbar (<http://www.lag-gentechnik.de>). Diese auf der konventionellen PCR basierenden Methode würde nicht nur die Zuckerrübe H7-1 (und zwei weitere zur Zeit in Europa nicht im Antragsverfahren befindliche *gv*-Zuckerrübenlinien #77; pMON17204 und #203; pMON17209), sondern auch die Rapsorten GT73 und GT200 erfassen. Die Methode wurde erfolgreich im Ringversuch unter Beteiligung von fünfzehn bundesdeutschen und einem Schweizer Überwachungslabor validiert [34]. Das PCR-System hat aber mit Blick auf verarbeitete Produkte den Nachteil erheblicher Amplifikatgrößen mit 482 Bp für Zuckerrüben bzw. 494 Bp für Raps und scheint daher primär für die Untersuchung von Saatgut und reinem Pflanzenmaterial geeignet. Dies trifft auch auf zwei weitere in der Methodensammlung des LAG veröffentlichten Screening-geeigneten Systeme zu: Der PCR-Nachweis der pSSUAra/bar-Genkassete in transgenen Kulturpflanzen erfasst die Raps-Hybriden MS1/RF1+2 (Amplifikatgröße 624 Bp) sowie MS8/RF3 (Amplifikatgröße 454 Bp) [34]. Eine dritte Screening-Methode des LAG zielt auf den PCR-Nachweis einer p35S/pat-Genkassete und vervielfältigt ein Fragment von 370 Bp in „pat-transgenen“ Raps- oder Maissorten [34]. Mangels Verfügbarkeit nationaler oder europäischer Screeningverfahren für *gv*-Raps- und Zuckerrübe, sind die LAG-Methoden jedoch eine erwägenswerte Analysemöglichkeit.

Das Beispiel der Zuckerrübe H7-1 zeigt, dass die Ergebnisse aus Screening-Tests immer vor dem Hintergrund der aktuellen Anwendung und Verbreitung der nachgewiesenen Screening-Elemente bewertet werden müssen. Screening-Verfahren bedürfen einer ständigen Anpassung an die Marktsituation. Solange noch keine standardisierten Verfahren zur Verfügung stehen, mit welchen sich in einem einzigen Analyseschritt parallel eine größere Anzahl von GVO- und Pflanzenarten in einer Probe zweifelsfrei identifizieren lassen, sind Listen von Screening-Elementen für GVO (z.B. Anhang Methode L-00.00-31) sowie die Entwicklung von Entscheidungsbäumen (s. Positionspapier des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) [42] http://www.vdlufa.de/vd_00.htm?5) ein praktisches Hilfsmittel zur Reduktion von Einzelanalysen. Eine weitere nützliche Quelle sind Datenbanken, welche die genetischen Elemente in weltweit vermarkteten GVO auflisten

(z.B. <http://www.agbios.com>). Ein ausführliches molekularbiologisches Kompendium der genetischen Veränderungen in *gv*-Pflanzen weltweit, inklusive GVO in Freisetzungsversuchen, ist im BATS Report 2003 [43] (<http://www.bats.ch/gmo-watch/GVO-report140703.pdf>) veröffentlicht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die § 64 PCR-Methode L-00.00-31 (Screening) (prEN ISO 2159:2005) auf die hier untersuchten üblichen Futtermittel gut anwendbar ist. Bei stärker verarbeiteten Proben sind jedoch u. U. real-time PCR-Verfahren empfehlenswerter. Da bei den Futtermitteln gegenüber Lebensmitteln eine geringere Vielfalt vorherrscht, können Futtermittel-Matrices, welche stärker fragmentierte DNA enthalten, in der Praxis empirisch schnell eingegrenzt werden. Dem entsprechend wird die Wahl der geeigneten Untersuchungsmethode ausfallen. Vor diesem Hintergrund ist eine Ergänzung des Methodenspektrums um validierte, auf der real-time PCR basierende Screening-Verfahren, die weitere Screening-Elemente wie z.B. den NOS-Terminator einschließen, äußerst sinnvoll. Die nationale Expertengruppe „§ 64 – Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebens-(Futter)mittel“ untersucht zur Zeit die Eignung eines auf der real-time PCR basierendem multiplex-Verfahrens für die Routineanwendung. Das Duplex-Verfahren analysiert sowohl den NOS-Terminator als auch den CaMV 35S Promotor gleichzeitig in einem Ansatz.

11.3 Nachweis der Pflanzenarten und der Amplifizierbarkeit pflanzlicher DNA

Die PCR-Analysen der Pflanzenarten Soja und Mais sind Bestandteil der amtlichen Methoden §-64 L23-01-22-1 (RRTM-Soja) bzw. L15-05-1 (Maislinien Bt176, MON810, T25, Bt11), (prEN ISO 2159:2005), und wurden parallel zum spezifischen Nachweis von *gv*-Soja und Mais durchgeführt. Offizielle validierte Nachweismethoden für Raps oder Getreidearten wie Weizen sind derzeit noch nicht verfügbar. Für den Nachweis der Pflanzenart Raps wurde daher auf ein in der Literatur publiziertes qualitatives real-time System [33], zum Nachweis der Getreidearten Weizen, Roggen, Gerste auf ein qualitatives, publiziertes PCR-System [27] zurückgegriffen.

Soja

Der Nachweis der Pflanzenart Soja gelang in allen Proben sowohl mittels offizieller Methode L23-01-22-1 als auch mit dem real-time System nach ISO/FDIS 21570: 2004(E) [29] ohne Probleme. Eindeutig als sojafrei (im Rahmen der Nachweisgrenzen für die Methoden) wurden lediglich die Zuckerrübenschnitzel (03106AL), welche auch kein Soja auf der Zutatenliste aufführen, analysiert.

Mais

Der qualitative Nachweis der Pflanzenart Mais mittels real-time PCR nach ISO/FDIS 21570: 2004(E) [29] gelang in allen Proben (mit Ausnahme der Rübenschnitzel), einschließlich dreier Proben, die Mais nicht auf der Zutatenliste führen (03091AL/Ergänzungsfutter für Milchkühe; 03092AL/Ergänzungsfutter für Kälber; 03102AL/P Standard-Ergänzungsfutter für Pferde). Die Probe 03092AL war die einzige, in welcher ein divergierendes Ergebnis zwischen der deutschen amtlichen Methode L15-05-1 für Mais (negatives Ergebnis) und der real-time PCR (positives Ergebnis) auftrat. Dass Mais in der Probe 03092AL mit der § 64-Methode nicht nachgewiesen werden konnte, liegt an der geringen Menge desselben in dieser Probe (C_T-Wert ca. 36 bei 1:10-Verdünnung). Der Mais stammt entweder aus dem in der Probe enthaltenden Pflanzenfett (siehe Probenzusammensetzung, Tabelle 2) oder resultiert aus einer Kontamination (z.B. während der Probenahme), welche offensichtlich durch das empfindlichere real-time System erfasst wird. Die Probe 03102AL enthielt außerdem nicht deklariertes Soja.

Raps

Dass Kontaminationen der Proben mit nicht deklarierten pflanzlichen Bestandteilen häufig sind, war besonders für Raps auffällig. Der spezifische Nachweis von Raps wurde mit dem

Primerpaar Pep-F/Pep-R und der Pep-Sonde in einem real-time PCR-System nach Zeitler et al., 2002 [33] durchgeführt. In lediglich zwei von neun Proben war Raps als Bestandteil deklariert (03091AL/Ergänzungsfutter für Milchkühe; 03093AL/Holstenstolz Sauenfutter) und dort auch in höherer Konzentration nachweisbar (C_T -Werte von ca. 22-25). In den übrigen Proben (außer Zuckerrüebentrockenschnitzeln) wurde mittels der hier eingesetzten real-time PCR ebenfalls Raps nachgewiesen. Bei den meisten positiven Proben lag der C_T -Wert zwischen 29 und 33, ausgenommen bei der Probe 03094AL (Saugferkelfutter) mit einem C_T -Wert von ca. 37. Der C_T -Wert der Probe 03094AL spricht für eine Kontamination. Geringe Verunreinigungen durch Stäube bei Lagerung und Probenahme oder dem fabrikmäßigen Verarbeitungsprozess können hierfür verantwortlich sein. Eine Kontamination nach der Probenahme im Untersuchungslabor wird ausgeschlossen, da alle mitgeführten Kontrollen (Negativ-Kontrollen, Wasserkontrollen) „sauber“ waren. Dies gilt ebenso für die Mais-, Soja- oder Getreidesysteme.

Getreide

Der Nachweis von Getreide mit dem Primerpaar WBR11-F/WBR13-R [27] ergab wie erwartet ein PCR-Produkt der Größe von 201 Bp bei den sieben untersuchten Proben, in denen Weizen/Triticale oder Gerste deklariert war. Die Proben 03094AL (Saugferkelfutter) und 03106AL (Zuckerrübenschnitzel), in denen kein Getreide auf der Zutatenliste stand, war demgegenüber (korrekt) „Getreide-negativ“. Die Zuordnung zu den Getreidearten Weizen, Gerste oder Roggen war in den positiven Proben jedoch mittels einfacher elektrophoretischer Auswertung nicht möglich. Gerste (z.B. ausgewiesen als Bestandteil in Probe 03092AL) ergibt mit dem Primerpaar WBR11-F/WBR13-R zwar gegenüber Weizen ein kleineres PCR-Produkt von 196 Bp Größe. In der Agarose-Gelelektrophorese und mit Hilfe eines 50 Bp DNA-Standardmarkers lässt sich diese Bande vom PCR-Produkt für Weizen (201 Bp) jedoch kaum unterscheiden. Des Weiteren ergibt dieses Primerpaar mit Roggen ebenfalls ein PCR-Produkt der Größe von 201 Bp. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist der qualitative PCR-Nachweis von Getreide nach Dahinden et al., 2001 [27] auch in prozessierten Proben zwar gut einsetzbar, die Methode ist jedoch nicht für eine schnelle Sortendifferenzierung geeignet.

Amplifizierbare pflanzliche DNA

Zum Nachweis amplifizierbarer DNA wurde das System von Taberlet et al., 1991 [25] eingesetzt, welches auch in der ersten veröffentlichten Standardmethode zum Nachweis eines GVO in Lebensmitteln [24] verwendet wird. Die Methode beruht auf dem Nachweis einer multicopy Chloroplasten-tRNA-Sequenz und erzielt mit verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich große Amplifikate im Bereich zwischen 400 und 600 Bp. Die Analyseergebnisse zeigen, dass in der Proben-DNA (welche überwiegend eine Mischung pflanzlicher DNA enthält) unter Verwendung dieses Standardsystems in der elektrophoretischen Auswertung – wie zu erwarten – mehrere PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe pro PCR-Ansatz nachweisbar sind. Eine Modifikation der PCR-Bedingungen gegenüber der offiziellen Methodenvorschrift [39] führte bei den meisten Proben sogar zu einer Zunahme sichtbarer Fragmente nach der Elektrophorese. Die Fragmentgröße des Amplifikates von 500-600 Bp scheint also auch in stärker verarbeiteten Futtermitteln – wahrscheinlich aufgrund der höheren Zahl der Chloroplasten-DNA in den DNA-Extrakten gegenüber genomischer DNA – grundsätzlich kein Problem zu sein. Bei stärker degradierten Proben, wie z.B. Probe 03091AL (Ergänzungsfutter für Milchkühe) ist das Bandenspektrum jedoch deutlich reduziert, so dass nur noch eine charakteristische Hauptbande zu sehen ist, obwohl diese Probe gemäß Deklaration Soja, Raps und Weizen (darüber hinaus auch Mais) enthält. Eine Zuordnung zu den Pflanzenarten zu den Banden ist ohne größeren Aufwand (Referenzproben, Restriktionsanalysen) nicht möglich.

Für die Analyse reinen Pflanzenmaterials ist die Methode nach Taberlet et al., 1991 [25] gut geeignet, wie auch die Validierungsdaten für die amtliche Methode L-24.01-1, „Nachweis einer gentechnischen Veränderung in Kartoffeln“ [24], und die LAG Methodensammlung (s. Abschnitt „Screening“) zeigen. Die Reduktion des Bandenspektrums auf eine einzige Bande

von 199 Bp ließ sich mit einem in der Literatur veröffentlichten PCR-System, welches ebenfalls auf dem Chloroplasten-t-RNA-Gen basiert (Tony et al., 2003 [26]) erreichen. Allerdings waren bei diesem System die Positivkontrollen nicht zufriedenstellend, bzw. es waren keine Banden sichtbar oder zu schwach. Interessanterweise ließ sich auch bei einer als Negativprobe eingesetzten Fleischprobe vom Huhn Chloroplasten-DNA nachweisen. Die Präsenz plastidärer DNA wurde in einer Fütterungsstudie mit Hühnern im Blut sowie Muskel- und Organgeweben nachgewiesen [26].

Die Entwicklung und Validierung neuer real-time Systeme zum Nachweis amplifikationsfähiger Pflanzen-DNA erfolgt zur Zeit am BfR im Rahmen eines europäischen Forschungsprojektes (TRACE, Tracing Food Commodities in Europe, Contract no.: 006942).

Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere hinsichtlich der in Mischfuttermitteln häufig eingesetzten Pflanzenarten Soja, Mais und Raps Kreuzkontaminationen eher die Regel denn die Ausnahme sind. Die pflanzenspezifischen Nachweisverfahren als Bestandteil der offiziellen Methoden L23-01-22-1 für Soja und L15-05-1 für Mais (prEN ISO 2159:2005) sind für die Analyse von Futtermitteln sehr gut einsetzbar.

11.4 GVO-spezifischer Nachweis

Nachweis von Roundup Ready™

Aufgrund der marktführenden Position von Roundup Ready™ (RR™)-Sojabohnen ist bei einem positiven Screeningergebnis und nachgewiesener Präsenz von Soja als nachfolgender Schritt der spezifische GVO-Nachweis auf RR™ Soja durchzuführen. Alle Proben wurden mit der amtlichen Methode L23-01-22-1 auf die Präsenz von *gv*-Soja (Roundup Ready Soja) untersucht. Mit dem Primerpaar p35s-f2/petu-r1 konnte bei allen untersuchten Proben, außer bei den Proben 03105AL („Pferde-Müsli“) und 03106AL (Zuckerrübenschnitzel), in der elektrophoretischen Auswertung ein PCR-Produkt der Größe von 172 Bp – und somit RR™-Soja – nachgewiesen werden. Die Probe 03106AL (Zuckerrübenschnitzel) war in der Pflanzenartenanalyse sowohl mit der amtlichen Methode als auch mit einem real-time PCR-Verfahren im Rahmen der Detektionsgrenzen der Methoden sojafrei, so dass hier auch kein RR™-Soja zu erwarten war. Bei der mit der amtlichen Methode RR™-negativen Probe 03105AL (haferfreies Pferde-Müsli), konnte jedoch mit dem alternativ eingesetzten qualitativen real-time PCR-Verfahren das RR™-Konstrukt zweifelsfrei nachgewiesen werden, was sich auch mit den Befunden des CaMV 35S Screenings mittels real-time PCR deckt. Die relative Quantifizierung mittels real-time PCR ergab für diese Probe sogar einen anteiligen RR™-Sojagehalt bezogen auf die Zutat „Soja“ von 100%. Interessanterweise gelingt der Pflanzenartnachweis „Soja“ gemäß der amtlichen Methode L23-01-22-1 bei dieser Probe problemlos, nicht jedoch der spezifische Nachweis einer gentechnischen Veränderung. Da der Sojanachweis in der amtlichen Methode L23-01-22-1 eine kleinere Sequenz von 118 Bp gegenüber 172 Bp des spezifischen RR™-Nachweises amplifiziert, unterstützt dies die Vermutung eines höheren Degradations-Grades genomischer DNA in dieser Probe. Das hier eingesetzte real-time System (Amplifikat: 74 Bp) ist in dieser Hinsicht günstiger als die amtliche Methode L23-01-22-1.

Der real-time PCR basierende Soja- und *gv*-Soja-Nachweis wurde auch erfolgreich im Rahmen der am BfR durchgeführten Studie zum Kontrollverfahren bezüglich des GVO-Verbotes in der ökologischen Landwirtschaft an 28 weiteren Futtermitteln und sechs Vormischungen eingesetzt. Dabei konnte bei allen bereits im Screening (real-time PCR nach European Norm ISO/FDIS 21570:2004(E) [29]) aufgefallenen Proben zweifelsfrei RR™-Soja nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Gehalte in dieser Untersuchung lagen zwischen 1,5 und bis zu 85%. Die höchsten Gehalte an RR™ bezogen auf Soja wurden in Milchleistungsfutterproben mit 27, 75 und 85%, die niedrigsten in Bio-Sojabohnen (0,3%), Bio-Pferdefutter (1,5%) und Bio-Hühnerfutter (3%) bestimmt [40].

Mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die § 64-Methode L23-01-22-1 zum Nachweis von Soja und gentechnisch verändertem Soja (Roundup Ready™ Soja) auch auf die hier untersuchten Futtermittel prinzipiell angewendet werden kann. Bei einer stärker verarbeiteten Probe (03105AL, „Pferde-Müsli“) von neun untersuchten Proben war jedoch das real-time PCR-Verfahren, welches eine Zielsequenz unter 118 Bp amplifiziert, überlegen.

Nachweis von Bt176, T25, Bt11 und Bt176 Mais

Für den spezifischen Nachweis einer gentechnischen Veränderung in Mais wurde die § 64-Methode L15-05-1 eingesetzt. Diese Methode weist in einer qualitativen „Endpunkt-PCR“ die *gv*-Maislinien Bt176, Bt11 und T25 konstruktsspezifisch sowie MON810 eventspezifisch (Integrationsort der genetischen Veränderung) nach. Es wurden alle Proben, unabhängig von den Ergebnissen der pflanzenspezifischen PCR untersucht. Mit der amtlichen Methode konnte in keiner der Proben eine der untersuchten GVO-Maislinien nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Resultat ergab sich beim Einsatz der real-time PCR Systeme.

Trotz der durchweg negativen Befunde bezüglich *gv*-Mais in den Futtermittelproben, ergibt sich aus den korrekten Positiv- und Negativkontrollen, dass die § 64-Methode L15-05-1 zum Nachweis von Mais und GVO-Mais (Bt176-, Bt11-, T25- und MON810-Mais) in Futtermitteln prinzipiell angewendet werden kann. Das Ergebnis unterstreicht die derzeit noch geringe Relevanz von *gv*-Mais auf dem europäischen Futtermittelmarkt und deckt sich mit den Erfahrungen aus der bereits zitierten „Öko-Studie“, bei welcher in insgesamt 34 Futtermittel- und Vormischungsproben kein *gv*-Mais bei Vorhandensein der Zutat „Mais“ nachweisbar war [40].

Nachweis von GT73, Falcon- und Liberator Raps

Für den Nachweis von GT73, Falcon- und Liberator Raps standen zur Zeit der experimentellen Arbeiten zu diesem Bericht noch keine offiziellen Methoden zur Verfügung. Daher wurde für die spezifischen *gv*-Raps Nachweise auf qualitative real-time PCR-Methoden zurückgegriffen, welche vom LAG veröffentlicht sind [34]. Aufgrund der neuen gesetzlichen Vorschriften sind event-spezifische quantitative real-time PCR-Systeme von den Antragsstellern an die EU zu übermitteln. Für Raps werden daher zukünftig entsprechende Methoden zur Verfügung stehen und durch die EU veröffentlicht. Auf diesem Weg sind bereits Methoden für die *gv*-Rapslinien GT73, GS 40/90, MS8, RF3, MS8xRF3 verfügbar, die im Rahmen dieser Arbeit noch nicht berücksichtigt werden konnten (Liste verlinkt unter <http://www.gmo-crl.jrc.it>).

Bei korrekt durchgeführten Kontrollen ließen sich im Rahmen der Nachweisgrenzen für die Systeme (ca. 10 Genom) in keiner Probe die überprüften *gv*-Rapslinien detektieren. Dieser Befund zeigt die noch geringe Relevanz von *gv*-Raps gegenüber z.B. RR™-Soja (s. auch Abschnitt „Screening“). Der Befund deckt sich mit den Ergebnissen der Analyse von 34 weiteren Futtermittel-/Futtermittelvormischungen, die im Rahmen einer Studie zum GVO-Verbot im Ökolandbau unter Anwendung der „LAG-Methoden“ am BfR durchgeführt und 2004 abgeschlossen wurde [40].

11.5 relative Quantifizierung von GVO mittels real-time PCR

Soja

Daten für die relative Quantifizierungen wurden nur für RR™-Soja ermittelt, da dies die einzige nachgewiesene *gv*-haltige pflanzliche Komponente in den untersuchten Futtermitteln war. Die für eine Quantifizierung benötigten Standardreihen ergaben Geradengleichungen mit einem Bestimmtheitsmaß von $> 0,99$ und lagen damit im linearen Bereich. Bei der Positivkontrolle wurden 0,94% (bei einem Soll von 1%) RR™-Soja bezogen auf die Zutat „Soja“ bestimmt. Bei den untersuchten Proben mit Positivergebnis wurde ein RR™-Sojaanteil am Gesamtsojagehalt über 100% quantifiziert, ausgenommen bei der Probe 03101AL (Alleinfutter für Legehennen) mit einem Gehalt von ca. 35 % RR™-Soja bezogen auf die Zutat. Der theoretisch nicht mögliche Wert $>100\%$ beruht nach den Analyseergebnissen für 100%iges GVO-Sojamaterial darauf, dass die beiden Systeme (Soja- und RR™-Soja-System) nicht gleicher-

maßen effizient sind. Die Effizienz des Soja-Systems ist geringer. Bei Proben mit geringem bis mäßigem RRTM-Sojaanteil wirkt sich dies nicht aus. Bei Proben mit 100%igen RR-Sojaanteil summiert sich anscheinend der Fehler, und es werden höhere C_T-Werte für das RRTM-Soja-System detektiert und damit höhere Werte für Zahlen für das RRTM-Soja-System berechnet. Für Proben mit berechneten Anteilen oberhalb 100% RRTM-Soja, wurde daher vereinfacht ein Gesamtsojagehalt von 100% angenommen. Da die Kennzeichnung von GVO in Futtermitteln (bezogen auf die jeweilige Zutat) ab einem Schwellenwert von 0,9% GVO (für unbeabsichtigte Kontamination) bzw. von 0,5 % GVO (für in der EU noch nicht auf dem Markt befindliche, aber hinsichtlich der Sicherheitsbewertung positiv beurteilte GVO) erfolgen muss, ist eine exakte Zahlenangabe des GVO-Anteils oberhalb der Fehlerbreite um den höchsten Schwellenwert ohnehin weder sinnvoll noch notwendig.

Aus den Ergebnissen der Probenanalyse kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das hier verwendete, auf der TaqManTM-Technologie genutzte System nach ISO/FDIS 21570:2004 [29] für die Quantifizierung von Roundup ReadyTM-Soja in Futtermitteln gut geeignet ist. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass für die Futtermittelherstellung in Deutschland die Verwendung von GVO-Soja üblich ist. In sieben der acht auf RRTM-Soja geprüften Proben wurde ein RRTM-Sojaanteil am Gesamtsojagehalt von 100% quantifiziert. Diese Ergebnisse sind aufgrund der einleitend vorgestellten Importsituation von Soja und Sojaschrot aus den USA, Argentinien und Brasilien nicht ungewöhnlich.

Mais

Mit dem spezifischen Nachweissystemen für gentechnisch veränderten Mais konnten im Einklang mit den Ergebnissen aus dem Screening in den untersuchten Proben keine der überprüften GVO-Maislinien (Bt175, Bt11, T25, MON810) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Positiv-, Negativ- sowie Wasserkontrollen zeigen, dass die Untersuchungen richtig und kontaminationsfrei durchgeführt wurden. Die für die quantitativen real-time Systeme etablierten Standardkurven lagen im linearen Bereich. Bei der Quantifizierung der Positivkontrollen (Soll: 0,1% oder 1% GVO-Mais) wurden die erwarteten Soll-Gehalte nachgewiesen.

Aus den Ergebnissen wird geschlossen, dass die hier verwendeten TaqManTM real-time PCR-Systeme sowohl für den qualitativen Nachweis wie zur Quantifizierung der oben genannten GVO-Maislinien in den Futtermitteln geeignet ist. Die Systeme für die Maislinien Bt176 und MON810 liegen als europäische Standards vor (ISO/FDIS 21570:2004(E)). Beide Systeme wurden unter Koordination des BfR in Ringversuchen getestet. Im Falle des Mail-F1/Mail-F2-Primer Systems zum Nachweis der Maislinie MON810 wurde die Validierung sogar in einem weltweiten Ringversuch, unter Beteiligung der USA und anderer Länder, vorgenommen [29]. Die Negativbefunde für GVO-Mais in den untersuchten Futtermittelproben spiegeln die weitgehende Unabhängigkeit der EU von Mais-Importen und die derzeit noch geringe Relevanz von gv-Mais in der europäischen Agrarwirtschaft wider.

11.6 Nachweisgrenzen für Real-time PCR-Systeme

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für alle verwendeten TaqManTM PCR-Systeme wurden dreimal gleiche Reihen von DNA-Lösungen mit definierten Zahlen aus 100%ig gentechnisch verändertem Material (Sojabohnen, Maismehl und Rapsamen) für jedes System hergestellt. Bei jedem der real-time PCR-Systeme gleichen sich die C_T-Werte der drei jeweiligen Reihen von DNA-Lösungen.

Unter Verwendung des Soja/RRTM-Soja-Systems gemäß prEN ISO 21569:2005 [14] lag die ermittelte Nachweisgrenze für die Komponenten „Soja“ bei fünf Genom. Die Nachweisgrenze für das RRTM-Soja lag mit zehn Genom höher als die Nachweisgrenze für das Soja-System. Bei einem PCR-Ansatz von 50 ng Soja-DNA können somit 0,0125 ng RRTM-Soja mit diesem System nachgewiesen werden. Das entspricht einem RRTM-Sojaanteil am Gesamtsojagehalt von 0,025%, was vor dem Hintergrund der Schwellenwertregelung von 0,9% ausreichend ist.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die verwendeten quantitativen Mais real-time System erzielt. Die Nachweisgrenze für die Komponente „Mais“ (bestimmt mittels Maissystem des europäischen Standards ISO/FDIS 21570:2004(E) unter Verwendung des Primerpaares ZM1-F/ZM1-R) lag mit 5 Genom niedriger als die Nachweisgrenzen für die respektiven spezifischen GVO-Mais-Systeme. Diese war bei allen hier verwendeten real-time Systemen zum Nachweis von Bt176-, Bt11-, T25- und MON810-Mais gleich und lag bei zehn. Bei einem PCR-Ansatz von 50 ng Mais-DNA können somit 0,0291 ng GVO-Mais nachgewiesen werden. Das sind 0,058% GVO-Mais bezogen auf den Gesamtmaisgehalt. Die Nachweisgrenze ist ausreichend, um die gesetzliche Deklarationspflicht zu überprüfen.

Beim qualitativen real-time Raps-System nach Zeitler et al., 2001 [33] lag die Nachweisgrenze bei zehn Genom. Die Nachweisgrenzen der eingesetzten *gv*-Raps-Systeme (nach Methodensammlung des LAG [34]) unterschied sich jedoch. Das Falcon-Raps-System ist mit einer Nachweisgrenze von fünf Genom am empfindlichsten. Bei einem PCR-Ansatz von 50 ng Raps-DNA können mit dieser Technik 0,012% Falcon-Raps bezogen auf den Gesamttrapsgehalt nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für das GT73-Raps-System lag bei zehn Genom, das Liberator-Raps-System bei 14 und war daher von geringster Nachweisempfindlichkeit. Die Systeme sind gleichwohl für den Nachweis von Raps und den überprüften *gv*-Rapslinien als Zutat in Futtermitteln sehr gut geeignet.

12 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit einer Reihe bereits für *gv*-Lebensmittel existierender Untersuchungsverfahren auf *gv*-Futtermittel. Hierzu wurden neun handelsübliche Futtermittelproben auf genetisch veränderte Zutaten (Soja, Mais und Raps) mittels der deutschen amtlichen Methoden, europäischer Normen (CEN/ISO Methoden), Methoden aus der Methodensammlung des LAG (Länderausschuss Gentechnik) sowie in der Literatur veröffentlichte Systeme untersucht. Die deutschen und europäischen auf der PCR und real-time PCR basierenden Standardmethoden aus dem Lebensmittelbereich waren durchweg auch für die Analyse von Futtermitteln sehr gut geeignet und können für diesen Zweck empfohlen werden. Besondere Anpassungen der Systeme für die Futtermittelanalytik waren nicht notwendig. Lediglich die Probenvorbereitung kann spezielle Aufarbeitungsschritte erfordern, wie das Beispiel der pelletierten Rübenschnitzel zeigt. Die in den offiziellen Standards beschriebene CTAB-Extraktionsmethode [36] ist ebenfalls gut für Futtermittel geeignet. Die erzielten DNA-Ausbeuten mittels CTAB oder NucleoSpin Food[®] Kit waren ungefähr gleich und bei den meisten Proben sehr gut für die PCR verwertbar. Bei stark verarbeiteten Proben kann jedoch die Kit-Extraktionsmethode erfolgreicher sein. Dies betraf zwei von den neun untersuchten Proben.

Es wurde gezeigt, dass die auf der TaqMan[™]-Technologie basierenden Nachweissysteme für die Qualifizierung und Quantifizierung von GVO-Bestandteilen in den Futtermitteln (Roundup Ready Soja, Bt176-, Bt11-, T25- und MON810-Mais sowie Falcon-, Liberator- und GT73-Raps) gut geeignet sind. Weiterhin wurde mit den bei der Bestimmung der Nachweisgrenze für real-time PCR-Systeme erzielten Ergebnissen nachgewiesen, dass der gesetzlich vorgeschriebene Schwellenwert von 0,9% mit den zur Verfügung stehenden Systemen überprüft werden kann. In einem am BfR durchgeführten Forschungsprojekt zum GVO-Verbot in der Bio-Landwirtschaft wurden weitere 28 Misch- und Alleinfuttermittel unterschiedlichster Verarbeitungsgrade sowie sechs Futtermittelvormischungen mittels der hier eingesetzten real-time Systeme ebenfalls qualitativ und quantitativ erfolgreich untersucht [40]. Bei stärker prozessierten Proben ist generell der Einsatz von real-time PCR-Systemen den „klassischen“ Endpunkt PCR-Analysen vorzuziehen. Die Wahl des geeigneten Systems muss empirisch erfolgen.

Die Ergebnisse der Futtermittelanalyse zeigen, dass zur Zeit eine Hauptkontamination mit Roundup Ready[™]-Soja zu erwarten ist, während *gv*-Mais oder Rapslinien noch keine Rolle spielen. Für RR[™]-Soja wurden bei den hier untersuchten Futtermitteln Werte zwischen 35 bis 100% bezogen auf die Zutat ermittelt.

Eine gezielte Screening-Strategie kann die Anzahl notwendiger Einzelanalysen eingrenzen. Hierzu ist die Kenntnis von Screening-Elementen in den auf den Weltmärkten und in Europa befindlichen GVO unerlässlich. Quellen für Screening-Elemente sind öffentlich zugängliche GVO-Datenbanken (z.B. <http://www.agbios.com>) Nützliche Entscheidungsbäume basierend auf Listen von Screening-Elementen sowie Nachweismethoden sind in einem umfangreichen Strategiepapier des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) veröffentlicht. In diesem „Konzeptpapier zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln“ wird ebenfalls die Verwendung der derzeit für Lebensmittel zur Verfügung stehenden Standardmethoden empfohlen [42].

Für die Analyse von Raps oder Getreidebestandteilen in Futtermitteln besteht zur Zeit eine Lücke in der Verfügbarkeit offizieller Standardmethoden. Für diese Untersuchungszwecke wird als Interimslösung empfohlen, auf publizierte, (möglichst in Ringversuchen) validierte Systeme zurückzugreifen, wie sie z.B. vom Länderausschuss Gentechnik (LAG) oder dem Europäischen Netzwerk von GVO-Laboratorien über die Gemeinschaftliche Forschungsstelle der Europäischen Kommission in Ispra/Italien im Internet in speziellen Methodensammlungen zur Verfügung gestellt werden (s. Liste der Internetquellen im Anhang).

Eine hier in der Literatur beschriebene „klassische“ PCR-Methode zum Nachweis von Getreide [27] wurde speziell mit dem Ziel, Weizen nachzuweisen, eingesetzt. Die Differenzierung von Roggen und Gerste ist mit diesem System nicht ohne größeren experimentellen Aufwand möglich.

Ein Engpass insbesondere bei der Analyse nicht autorisierter GVO bleibt nach wie vor die häufig mangelnde Verfügbarkeit von Referenzmaterialien. Eine Liste von kommerziell erhältlichen Referenzmaterialien ist im Konzeptpapier des VDLUFA [42] enthalten. Referenzmaterial kann auch vom Institute for Reference Materials and Testing (IRMM) (link zum online Katalog: <http://www.irmm.jrc.be/html/homepage.htm>) oder über diverse Firmen (z.B. Fluka: <http://www.sigmaaldrich.com>) bezogen werden.

Informationen zu den in Europa zugelassenen oder im Antragsverfahren befindlichen GVO – einschließlich Hinweisen auf eine Quelle für Referenzmaterial – sind im vollständigen Register der in Europa unter VO (EG) Nr. 1829/2003 zugelassenen GVO auf dem Server der Europäischen Gemeinschaft für die Öffentlichkeit einsehbar. (http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)

13 Literatur

- [1] Menrad, K. et al. (2003): Gentechnik in der Landwirtschaft, Pflanzenzucht und Lebensmittelproduktion – Stand und Perspektiven. Heidelberg: Physica-Verlag, 2003
- [2] Potrykus, I. (2003): Nutritionally enhanced rice to combat malnutrition disorders of the poor, *Nutr Rev*, 61, 6Pt2, 101-104
- [3] Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., Swanson, P., Chan, W.-K. (1994) *Nature* 371: 209-210
- [4] Brandt, P. (1995): Transgene Pflanzen. Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien, Birkhäuser Verlag, 1995
- [5] Clives, J. (2004): Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, ISAAA Briefs 32-2004, Ithaca, NY, ISBN 1-892456-36-2
- [6] Brookes, G. (2004): The farm level impact of insect resistant maize in Spain and herbicide tolerant soybeans in Romania“, Intern. Fesenius Conference „GM Crops and Foods“, October 2004, Cologne/Germany
- [7] Grote, H., Jacobi, H. (1996): Die Bedeutung der Nebenerzeugnisse für die Mischfutterherstellung, *Krafftutter Zeitschrift für die Futtermittel und Getreidewirtschaft*, Heft 9, September 1996, 340-343
- [8] Lennerts, L. (1984): Ölschrote, Ölkuchen, pflanzliche Öle und Fette, Verlag Alfred Strothe
- [9] Anonymus. Europäische Zeitschrift für die Futtermittel- und Getreidewirtschaft (2002): Ursachen und Beherrschung von Verschleppungen und Kreuzkontaminationen, Heft 4 (April 2002), 151-159
- [10] Beneke, B., Hagen, M., Thiele, M., Laube, S. (2001): Molekularbiologischer Nachweis transgener Pflanzenbestandteile in Futter- und Lebensmitteln: Möglichkeiten einer qualitativen und quantitativen Analyse, Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Detmold, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 52, 73-112
- [11] Gassen, H.G., Sachse, G.E., Schulte, A. (1994): PCR, Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion, Gustav Fischer Verlag
- [12] Newton, C.R., Graham, A. (1994): PCR, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- [13] Mühlhardt, C.: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 3. Auflage, Spektrum
- [14] prEN ISO/FDIS 21569:2005, Europäische Norm, Lebensmittel-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und Produkten – Qualitative und Nukleinsäuren basierende Methoden
- [15] L-00.00-31 “Screeningverfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln durch den Nachweis von DNA-Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Organismen vorkommen“. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (§64 LFGB). Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Loseblattsammlung, Beuth-Verlag GmbH, Berlin, Köln, September 1989, rev. Juli 2001
- [16] Pietsch, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P., Wurz, A. (1997): Screening-Verfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 93 (H2), 35-38
- [17] L-23.01.22-1 “Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Sojabohnen durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reacti-

- on) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde“. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (§64 LFGB). Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Loseblattsammlung, Beuth-Verlag GmbH, Berlin, Köln, März 1998
- [18] Meyer, R., Chardonnens, F., Hübner, P., Lüthy, J. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soja in processed meat products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203, 339-344
- [19] Wurz, A., Willmund, R. In: G.A. Schreiber, K.W. Bögl (Hrsg.). Foods produced by means of genetic engineering – 2nd status report. *BgVV-Hefte 1/1997* (BgVV, Berlin), 115-117
- [20] L-15.05-1 “Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais (*Zea mays* L.) mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Restriktionsanalyse oder Hybridisierung des PCR-Produktes“. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (§64 LFGB). Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Loseblattsammlung, Beuth-Verlag GmbH, Berlin, Köln, Mai 2002
- [21] Ehlers, B., Strauch, E., Goltz, M., Kubsch, D., Wagner, H., Maidhof H., Bendiek, J., Appel B., Buhk H.-J. (1997), Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR, *Bundesgesundheitsblatt*, 4/97: 118-121
- [22] Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.H. (1997): Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205: 442-445
- [23] Broll, H. (2001): persönliche Mitteilung, BgVV
- [24] L-24.01-1 “Nachweis einer gentechnischen Veränderung in Kartoffeln durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA Sonde“. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (§64 LFGB). Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Loseblattsammlung, Beuth-Verlag GmbH, Berlin, Köln, Januar 1997
- [25] Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J (1991): Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA, *Plant Mol. Biol.*, 17, 1105-1109
- [26] Tony, M.A., Butschke, A., Broll, H., Grohmann, L., Zagon, J., Halle, I., Dänicke, S., Schauzu, M., Hafez, H.M., Flachowsky, G. (2003): Safety assessment of Bt 176 maize in broiler nutrition: Degradation of maize-DNA and its metabolic fate, *Archives of Animal Nutrition – Archiv für Tierernährung*, 57(4), 235-252
- [27] Dahinden, L., von Büren, M., Lüthy, J. (2001): A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients, *European Food Research and Technology*, 212, 228-233, Springer-Verlag
- [28] Schweizerisches Lebensmittelbuch SLMB, Kapitel 52B/2.1.3/2000 (Eidgenössische Drucksachen und Materialzentrale, PO Box, CH 3000, Bern)
- [29] ISO/FDIS 21570:2004(E), Final Draft International Standard, Date: 2004-10-5, Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods, © ISO 2004
- [30] Pauli, U., Liniger, M., Schrott, M., Schouwey, B., Hübner, Ph., Brodmann, P., Eugster, A. (2001): Quantitative detection of genetically modified soybean and maize: method evaluation in a Swiss Ring Trial. *Mitt. Lebens. und Hyg.*, 92, 145-158
- [31] Hübner, Ph., Waiblinger, H.-U., Pietsch, K., Brodmann, P. (2001): Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J AOAC Int.*, 84, 1855-1864

- [32] Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.H. (1998): Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Lm. Unters. Forsch.*, 206 (Band A), 203-207
- [33] Zeitler, R., Pietsch, K., Waiblinger, H. U. (2002): Validation of real-time PCR methods for the quantification of transgenic contamination in rape seed. *Eur Food Res Technol*, 214, 346 – 351
- [34] Anonymus (2001), Konzept für ein einheitliches Vorgehen bei der experimentellen gentechnischen Überwachung von GVO-Anteilen in konventionellem Saatgut, Vereinbarung des Unterausschusses "Methodenentwicklung" des LAG (Länderausschuß Gentechnik), Berlin, 30. März 2001/Stand September 2001, 8 Seiten, Internetpublikation (<http://www.lag-gentechnik.de>).
- [35] Sülflohn, K. (2003): Grüne Broschüre 2003, Das geltende Futtermittelrecht mit Typenliste für Einzel- und Mischfuttermittel, Stand November 2002, Bonn, Allround Media Service, 2003
- [36] EN/ISO 21571:2005, A.3: Lebensmittel-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Nukleinsäureextraktion.
- [37] Macherey Nagel: Protocol for genomic DANN purification from food with NucleoSpin® Food, 2003
- [38] Grimm, B., Wörstenfeld, W., Gutmacher, E., Martin, K. (1996): Das neue Tafelwerk, 1. Auflage, Volk und Wissen Verlag GmbH
- [39] Tony, M.A. (2002): persönliche Mitteilung, Methode etabliert am BfR
- [40] Jansen, B., Klempt, L., Broll, H. (2004): Abschlussbericht zum Projekt 02OE072, „Praktikabilität des Kontrollverfahrens zum GVO-Verbot“ im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL) zum Themenbereich „Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie Maßnahmen zum Technologie- und Wissenstransfer im ökologischen Landbau“, 01.05.2002 – 31.12.2003. Download inklusive Handbuch in der Datenbank „Organic Eprints“ (Organic Eprints ist ein internationales, öffentlich zugängliches Archiv für wissenschaftliche Veröffentlichungen zum ökologischen Landbau. Archiviert werden überwiegend elektronische Volltext-Dokumente. Zu jedem Eintrag werden die vollständigen bibliographischen Angaben und weitere Metadaten zur Verfügung gestellt)
<http://orgprints.org/3257/>
- [41] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle (2001): Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Auflage, Springer-Verlag
- [42] VDLUFA, Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Positionspapier „Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln (Arbeitspapier des Arbeitskreises PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten“, download: http://www.vdlufa.de/vd_00.htm?5
- [43] Bruderer, S., Leitner K.E. (2003): Genetically Modified (GM) Crops: molecular and regulatory details. BATS (Zentrum für Biosicherheit und Nachhaltigkeit) – Report, Version 2, Internetpublikation, © BATS, 30/06/2003, (download unter <http://www.bats.ch/gm-watch/GVO-report140703.pdf>)
- [44] Hempel, G. (2003), Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen, Sitz Dresden, persönliche Mitteilung
- [45] Brodmann, P.D., Ilg, E.C., Berthoud, H. und Herrmann, A. (2002): real-time quantitative polmerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. *J of AOAC Int.*, Vol. 85, No. 3, 646-652

14 Nützliche Internet-Adressen

Anmerkung: Leider ändern sich Internet-Adressen häufig. Auf die Korrektheit der Adressen kann daher keine Gewähr gegeben werden. Die nachfolgenden Adressen wurden Anfang Mai 2006 überprüft.

14.1 Europäische Kommission

Weißbuch „Lebensmittelsicherheit“:

http://www.europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_de.pdf

Europäisches Netzwerk kompetenter GVO-Laboratorien (ENGL; Koordination: JRC, Ispra):

<http://engl.jrc.it/>

Generelle Informationen der EU über den Stand der Antragsverfahren, Gesetzgebung, Methodenentwicklung etc.

http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/index_en.htm

<http://biotech.jrc.it/>

EFSA (European Food Safety Agency); Informationen über die Ergebnisse der Sicherheitsbewertung für GVO („GMO Opinions“)

http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/catindex_en.html

Vollständiges Register der in Europa unter VO (EG) Nr. 1829/2003 zugelassenen GVO sowie GVO mit Fortbestand der Marktfähigkeit auf dem Server der Europäischen Gemeinschaft unter: http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm

Referenzmaterial

Institute for Reference Materials and Testing (IRMM) (online-Katalog, enthält GVO-Mehle):

<http://www.irmm.jrc.be/html/homepage.htm>

Europäisches GVO-Register

http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm

14.2 Behörden Deutschland

BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit). Kontaktstelle in Deutschland für Antragsteller, Links zu Datenbanken- und Register:

<http://www.bvl.bund.de>

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Aktuelle Listen zugelassener und im Antragsverfahren befindlicher GVO; Informationen über Zulassungsverfahren und zur Sicherheitsbewertung:

<http://www.bfr.bund.de>

RKI (Robert Koch-Institut). Links zu Freisetzungen von GVO, Register zugelassener GVO:

<http://www.rki.bund.de>

14.3 Datenbanken

Liste von für Futter- und Lebensmittelzwecke zugelassener GVO (Suchmodi nach Event/Pflanze, gentechnisch eingebrachtes Element/“trait“)

<http://www.agbios.com>

Genomgrößen

www.rbgkew.org.uk/cval/database1.html

Anbau (und Entwicklung auf dem Agrarsektor) von GVO weltweit
ISAAA Briefs:

<http://www.isaaa.org>

Zahlen zum Futtermittelmarkt (Importe/Exporte)

Töpfer International. Download Statistikbroschüre 2005:

http://www.acti.de/media/Toepfer_Statistikbroschüre_Dezember05.pdf

Mischfutterindustrie (Deutscher Verband Tiernahrung e.V.):

<http://www.dvtiernahrung.de>

Verarbeitungsprozesse von Ölsaaten und Mischfutter

<http://www.oelmuehlen.de>

<http://www.mischfutter.at>

Methodensammlungen/Listen mit Screeningelementen

Methoden des Länderausschuss Gentechnik:

<http://www.lag-gentechnik.de>

Positionspapier „Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln (Arbeitspapier des Arbeitskreises PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten“, (inklusive Tabelle mit Screening-Elementen) download unter „VDLUFA Info's“ – „Positionspapier“:

http://www.vdlufa.de/vd_00.htm?5

Europa (Joint Research Center / ENGL):

<http://www.gmo-crl.jrc.it>

Informationen über Zulassungen und molekularbiologische Informationen zu GVO weltweit:
BATS-Report, 2003, Version 2, 30/06/2003, Molecular Information: Dr. Shirin Bruderer, Regulatory Information: Katharina E. Leitner:

<http://www.bats.ch/gmo-watch/GVO-report140703.pdf>

15 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Anbau von GVO im Jahr 2005 nach Ländern (in Mio ha); Quelle: Nach James, Clives (2004): Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, ISAAA Briefs 32-2004, Ithaca, NY, ISBN 1-892456-36-2 | 25 |
| Abbildung 2: Anteil von GVO-Pflanzen am weltweiten Anbau (2004); Quelle: Nach James, Clives (2004): Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, ISAAA Briefs 32-2004, Ithaca, NY, ISBN 1-892456-36-2 | 26 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 33 |
| Abbildung 4: Theoretische und experimentell bestimmte DNA Kopienzahl in der PCR in Abhängigkeit von der Zyklenzahl (Quelle: Vorlesung Hermann Broll, Tu-Berlin, Fachbereich Lebensmittelchemie, Sommersemester 2005) | 34 |
| Abbildung 5: TaqMan TM -Sonde. Beispiel einer TaqMan TM -Sonde mit einem Reporter- und Quencherfluoreszenzfarbstoff an den jeweiligen Enden der Sonden | 36 |
| Abbildung 6: Prinzip der TaqMan TM -PCR (Quelle: Vorlesung Hermann Broll, TU-Berlin, Fachbereich Lebensmittelchemie, Sommersemester 2005) | 36 |
| Abbildung 7: Vom Fluoreszenz-Signal zur Kopienzahl: Auftragung der Cycle-Threshold- Werte (CT-Werte) über die Startkopienzahl der Standard-Lösungen. | 37 |
| Abbildung 8: Relative Quantifizierung von Roundup Ready TM (RRTM) Sojabohne mittels zweier Eichkurven für „Soja“ und RRTM Soja. Die CT-Werte sowie die Startkopienzahl lassen sich für die unbekannte Probe anhand der Eichkurve (CT-Wert = Ordinate/Startkopienzahl = Abszisse) ablesen. Beide Werte werden ins Verhältnis gesetzt und die Menge „Soja“ zu „RRTM“ Soja bestimmt. (Quelle: Vorlesung Hermann Broll, TU Berlin, Fachbereich Lebensmittelchemie, Sommersemester 2005) | 38 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung der Analyseschritte | 59 |
| Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis des CaMV 35S-Promotors mit den Primern 35S1 und 35S2 (nach amtlicher Methode L-00.00-31, prEN/ISO 2159:20) | 60 |
| Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte für den Nachweis von Soja (Taschen 1-12; Primern: GM03 / GM04) und Roundup Ready-Soja (Taschen 14-25; Primern: p35s-f2/petu-r1) gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-23.01.22 | 61 |
| Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Mais gemäß amtlicher Methode L-15.05-1 mit dem Primern IVR1-F und IVR1-R | 62 |
| Abbildung 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Bt176-Mais mit den Primern CRY03 und CRY04 nach Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 | 63 |
| Abbildung 14: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Bt11-Mais gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 mit den Primern IVS2-2 und PAT-B | 64 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von T25-Mais (Taschen 1-12; Primern: T25-F7 / T25-R3) und MON810-Mais (Taschen 14-25; Primern: VW01/VW03) nach der amtlichen Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-15.05-1 | 65 |
| Abbildung 16: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-24.01-1 zum Nachweis von Chloroplasten-DNA mit dem Primerpaar plant1-F/ plant1-R | 66 |
| Abbildung 17: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Chloroplasten-DNA mit dem Primerpaar plant1-F/ plant1-R, Produkte gemäß amtlicher Methode § 35 LMBG (§ 64 LFGB) L-24.01-1, modifiziertes PCR Protokoll nach Tony, 2002 [39] | 67 |
| Abbildung 18: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis von Chloroplasten-DNA mit dem Primerpaar plant2-F/ plant2-R (nach Tony et al., 2003 [26]) | 67 |
| Abbildung 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Weizennachweis mit dem Primerpaar WBR11-F / WBR13-R (nach Dahinden et al., 2001 [27]) | 68 |
| Abbildung 20: Standardreihen für die Quantifizierung von Soja- und RRTM-Soja mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) | 71 |
| Abbildung 21: Standardreihen für die Quantifizierung von Mais- und Bt176-Mais mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) | 75 |
| Abbildung 22: Standardreihen für die Quantifizierung von Mais- und Bt11-Mais mittels real-time PCR | 77 |
| Abbildung 23: Standardreihen für die Quantifizierung von Mais- und T25-Mais mittels real-time PCR | 79 |
| Abbildung 24: Standardreihen für die relative Quantifizierung von Mais- und MON810 Mais mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) | 80 |

16 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel, für welche der Fortbestand der Marktzulassung nach VO (EG) Nr. 1829/2003 Artikel 8 und 20 (1) a, b gewährt wurde | 19 |
| Tabelle 2: Untersuchte Proben | 44 |
| Tabelle 3: Beispiel für die Zusammensetzung eines Mastermix für sieben Ansätze | 49 |
| Tabelle 4: Verwendete Zeit-/Temperaturprofile in der PCR | 50 |
| Tabelle 5: Beispiel für die Zusammensetzung des Mastermix für RRTM-Soja-Nachweis mit 50 Ansätzen | 52 |
| Tabelle 6: Verwendete Primer- und Sondenkonzentrationen für den Mastermix | 53 |
| Tabelle 7: Genomgrößen einzelner Pflanzenarten | 54 |
| Tabelle 8: Temperaturprogramm für Untersuchungen am 7700 SDS Gerät | 55 |
| Tabelle 9: DNA-Ausbeuten der untersuchten Proben mittels CTAB- Extraktion nach amtlicher Methode L-23.01.22-1 | 57 |
| Tabelle 10: Erzielte DNA-Ausbeuten der untersuchten Proben durch Extraktion mittels NucleoSpin Food® Kit | 58 |
| Tabelle 11: Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotors mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)). CT-Werte der Proben 03091AL, 03092AL, 03093AL, 03094AL, 03095AL, 03101AL und 03102AL | 69 |
| Tabelle 12: Qualitativer Nachweis des CaMV 35S-Promotors mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)). CT-Werte der Proben 03105AL und 03106AL | 69 |
| Tabelle 13: Qualitativer und quantitativer Nachweis der RR-Soja mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) CT-Werte der Proben 03091AL, 03094AL, 03102AL, 03105AL und 03106AL | 70 |
| Tabelle 14: Ermittelte Kopienzahlen für Soja und RRTM-Soja in den untersuchten Proben | 72 |
| Tabelle 15: Ergebnisse der Bestimmung des prozentualen Anteils der Roundup Ready Soja am Gesamt-Sojagehalt für die Proben 03091AL, 03094AL, 03102AL, 03105AL und 03106AL | 73 |
| Tabelle 16: Prozentuale Anteile der Roundup Ready Soja am Gesamt-Sojagehalt aller untersuchten Proben | 73 |
| Tabelle 17: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Bt176-Mais mittels real-time PCR (ISO/FDIS 21570: 2004(E))- CT-Werte der Proben 03095AL, 03101AL und 03105AL | 74 |
| Tabelle 18: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und Bt-176-Mais-Anteiles aller untersuchten Proben | 75 |
| Tabelle 19: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Bt11-Mais mittels real-time PCR - CT-Werte der Proben 03091AL, 03101AL und 03105AL | 76 |
| Tabelle 20: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und Bt11-Mais-Gehaltes aller Proben | 77 |
| Tabelle 21: Qualitativer und quantitativer Nachweis von T25-Mais mittels real-time PCR - CT-Werte der Proben 03091AL, 03101AL, 03102AL und 03105AL | 78 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 22: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und T25-Mais-Anteiles aller Proben | 79 |
| Tabelle 23: Qualitativer und quantitativer Nachweis mittels real-time PCR von MON810-Mais (ISO/FDIS 21570: 2004(E)) – CT-Werte der Proben 03092AL, 03093AL und 03094AL | 80 |
| Tabelle 24: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Mais- und MON810-Mais-Anteiles aller Proben | 81 |
| Tabelle 25: Qualitativer Nachweis von Raps mittels real-time PCR nach Zeitler et al., 2001 [33] | 81 |
| Tabelle 26: Qualitativer Nachweis von Falcon-, Liberator- [33] und GT73-Raps [34] mittels real-time PCR | 82 |
| Tabelle 27: Bestimmung der Nachweisgrenzen für das Soja- und RR-Soja real-time PCR-System (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 83 |
| Tabelle 28: Richtigkeit und Präzision der real-time PCR Soja- und RR-Soja-Systeme (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 84 |
| Tabelle 29: Relative Wiederholstandardabweichung (RSDr) und relative Vergleichsstandardabweichung (RSDR) der Soja- und RR-Soja real-time PCR-Systeme (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 84 |
| Tabelle 30: Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenzen für die real-time PCR Soja- und RRTM-Soja-Systeme (amtliche Methode L-23.01.22 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 85 |
| Tabelle 31: Bestimmung der Nachweisgrenze für die real-time Mais- und Bt176-Mais-Systeme (L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 85 |
| Tabelle 32: Richtigkeit und Präzision der real-time PCR Mais- und Bt176-Mais-Systeme (L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 86 |
| Tabelle 33: Relative Wiederholstandardabweichung (RSDr) und relative Vergleichsstandardabweichung (RSDR) der Mais- und Bt176-Mais-Systeme (L-15.05-1 bzw. prEN ISO 2159:2005) | 87 |
| Tabelle 34: Nachweisgrenzen der Mais- und GVO-Mais real-time PCR Systeme | 87 |
| Tabelle 35: Bestimmung der Nachweisgrenze für die real-time Raps- und GT73-Raps-Systeme [33], [34] | 88 |
| Tabelle 36: Richtigkeit und Präzision der real-time PCR Raps- und GT73-Raps-Systeme [33], [34] | 89 |
| Tabelle 37: Relative Wiederholstandardabweichung (RSDr) und relative Vergleichsstandardabweichung (RSDR) der real-time PCR Raps- [33] und GT73-Raps-Systeme [34] | 89 |
| Tabelle 38: Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenzen für die real-time PCR Raps- [33] und GVO-Raps-Systeme [33], [34] | 90 |
| Tabelle 39: Zusammenfassung der Ergebnisse aller mittels PCR untersuchten Proben | 90 |
| Tabelle 40: Nachweisgrenzen der verwendeten Real-time PCR-Systeme | 92 |

Bereits erschienene Hefte der Reihe BfR-Wissenschaft

- 01/2004 Herausgegeben von L. Ellerbroek, H. Wichmann-Schauer, K. N. Mac
Methoden zur Identifizierung und Isolierung von Enterokokken und deren
Resistenzbestimmung
€ 5,-
- 02/2004 Herausgegeben von M. Hartung
Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2002
€ 15,-
- 03/2004 Herausgegeben von A. Domke, R. Großklaus, B. Niemann, H. Przyrembel,
K. Richter, E. Schmidt, A. Weißenborn, B. Wörner, R. Ziegenhagen
Verwendung von Vitaminen in Lebensmitteln - Toxikologische und ernäh-
rungsphysiologische Aspekte
€ 15,-
- 04/2004 Herausgegeben von A. Domke, R. Großklaus, B. Niemann, H. Przyrembel,
K. Richter, E. Schmidt, A. Weißenborn, B. Wörner, R. Ziegenhagen
Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln - Toxikologische und ernäh-
rungsphysiologische Aspekte
€ 15,-
- 05/2004 Herausgegeben von M. Hartung
Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003
€ 15,-
- 01/2005 Herausgegeben von A. Weißenborn, M. Burger, G.B.M. Mensink, C. Klemm,
W. Sichert-Hellert, M. Kersting und H. Przyrembel
Folsäureversorgung der deutschen Bevölkerung - Abschlussbericht zum For-
schungsvorhaben
€ 10,-
- 02/2005 Herausgegeben von R. F. Hertel, G. Henseler
EriK – Entwicklung eines mehrstufigen Verfahrens der Risikokommunikation
€ 10
- 03/2005 Herausgegeben von P. Luber, E. Bartelt
Campylobacteriose durch Hähnchenfleisch
Eine quantitative Risikoabschätzung
€ 5
- 04/2005 Herausgegeben von A. Domke, R. Großklaus, B. Niemann, H. Przyrembel,
K. Richter, E. Schmidt, A. Weißenborn, B. Wörner, R. Ziegenhagen
Use of Vitamins in Foods
Toxicological and nutritional-physiological aspects
€ 15
- 01/2006 Herausgegeben von A. Domke, R. Großklaus, B. Niemann, H. Przyrembel,
K. Richter, E. Schmidt, A. Weißenborn, B. Wörner, R. Ziegenhagen
Use of Minerals in Foods
Toxicological and nutritional-physiological aspects
€ 15

- 02/2006 Herausgegeben von A. Schulte, U. Bernauer, S. Madle, H. Mielke, U. Herbst,,
H.-B. Richter-Reichhelm, K.-E. Appel, U. Gundert-Remy
Assessment of the Carcinogenicity of Formaldehyde
Bericht zur Bewertung der Karzinogenität von Formaldehyd
€ 10
- 03/2006 Herausgegeben von W. Lingk, H. Reifenstein, D. Westphal, E. Plattner
Humanexposition bei Holzschutzmitteln
Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben
€ 5
- 04/2006 Herausgegeben von M. Hartung
Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2004
€ 15

Die Hefte der Reihe BfR-Wissenschaft sind erhältlich beim:

Bundesinstitut für Risikobewertung
Pressestelle
Thielallee 88-92
D-14195 Berlin

Fax: 030-8412 4970
E-Mail: pressestelle@bfr.bund.de