DEUTSCHE LEBENSMITTEL-RUNDSCHAU

»DLR

111. Jahrgang **Mai 2015** Behr's Verlag I Hamburg I ZKZ 9982

Analytik » Forschung » Technik » Recht

» Metabolomic Profiling

LC-MS/MS-Multimethode zur Quantifizierung von Hydroxysterolen und Gallensäuren aus biologischen Matrizes (Werner et al.)

» Sonderthema: Biochemische Methoden

– **GVO sicher und schnell detektieren**
Grundlagen zum Screening auf gentechnisch veränderte Pflanzen in Lebens- und Futtermitteln (Waldherr/Dörries)

» Nicht deklarierte Allergene

ALTS/ALS veröffentlicht aktualisierte Beurteilungswerte (Verbeek)

» Antihaftbeschichtete Pfannen

Emissionen flüchtiger organischer Verbindungen (Frank et al.)

B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, 22085 Hamburg
ZKZ 9982, Entgelt bezahlt, PVSt, Deutsche Post L

GVO schnell und sicher detektieren

Grundlagen zum Screening auf gentechnisch veränderte Pflanzen in Lebens- und Futtermitteln

Florian Waldherr und Hans-Henno Dörries

Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) können in der Lebensmittelkette in verschiedenen Formen eine Rolle spielen. Im Folgenden bezieht sich der Begriff GVO allerdings ausschließlich auf gentechnisch veränderte (GV) Pflanzen, deren Einsatz bei der Erzeugung von Lebens- und Futtermitteln seit Beginn des kommerziellen Anbaus 1996 kritisch diskutiert wird.

Dr. Florian Waldherr

Zur Person
Biotechnologe mit Schwerpunkt molekularbiologische Lebensmittelanalytik, Key-Account-Manager und Produktmanager für die BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam

Trotzdem wächst die globale Anbaufläche für GVO stetig. Basierend auf den Daten des ISAAA-Reports 2014 werden weltweit auf 181 Millionen Hektar in 28 Ländern GVO angebaut. Spitzenreiter sind die USA, Brasilien und Argentinien, auf die in Summe mehr als 75 % der Flächen entfallen. Die Tendenz ist generell steigend. In Europa spielt der Anbau von GVO kaum eine Rolle. Nur Spanien setzt bedingt auf GV-Mais (ca. 30 % der Maisanbaufläche).

GVO – Die aktuelle Situation

Die genaue Anzahl an existierenden GVO-Arten ist schwer zu beziffern, da es global keine zentrale Erfassung und Kontrolle diesbezüglich gibt. Datenbanken listen bis zu über 370 Sorten auf. Insbesondere Soja, Mais, Baumwolle, Raps und in geringerem Maße Zuckerrüben werden als gentechnisch veränderte Sorten angebaut. Über 80 % des weltweit kultivierten Soja sind GVO, der Anteil bei der Baumwolle beträgt fast 70 %, bei Mais und Raps sind es ca. 25 %. Regional können die Anteile wesentlich höher sein – in den USA kommen z. B. Soja, Mais, Baumwolle und Zuckerrüben fast ausschließlich als GVO zum Einsatz. Insgesamt gibt es eine Vielfalt weiterer GV-Sorten bei verschiedenen Arten (z. B. Reis, Kartoffel, Papaya, Alfalfa, etc.), die teilweise regionale Bedeutung haben, teilweise aber auch nur experimentell kultiviert oder nicht weiter verwendet werden.

Obwohl sich der Anbau von GVO derzeit auf bestimmte Regionen konzentriert, bedingen der weltweite Handel und Transport von entsprechenden Rohstoffen und Produkten eine globale Verbreitung. Diese erfolgt entweder als entsprechende Ware oder durch Vermischung über Geräte, Lager- und Transporteinrichtungen, Produktionsstätten etc. auch ungewollt als Kontamination in gentechnikfreien Gütern (Abb. 1).

Gesetzliche Regulierungen

Der Umgang mit GVO ist in den meisten Ländern der Welt gesetzlich geregelt, wenn auch global keinesfalls einheitlich. In der Regel gibt es Zulassungsverfahren für Anbau und Verwendung von GV-Nutzpflanzen und häufig auch eine Kennzeich-

nung von Produkten, die GVO enthalten (in den USA z. B. ist diese aber freiwillig). Art und Umfang der Zulassungsverfahren sind sehr unterschiedlich, was global zu einer mangelnden Transparenz und Verfügbarkeit von Informationen führt, die im Widerspruch zu der teilweise unkontrollierten Verbreitung von GVO-Rohstoffen und -Produkten steht.

In der EU regeln die Verordnung (EG) 1829/2003, die Verordnung (EG) 1830/2003 und darauf aufbauende Regulierungen die Zulassung und Verwendung von GVO. Grundsätzlich gilt, dass nur zugelassene GVO verwendet werden dürfen und die Produkte daraus gekennzeichnet sein müssen. Ausnahmen gibt es für unvermeidbare Kontaminationen < 0,9 % und für Produkte, die mit Hilfe von GVO hergestellt wurden (z. B. Milch von Tieren, die mit GVO gefüttert werden). National (z. B. in Deutschland) gibt es daher optionale „Positiv-Kennzeichnungen" von Produkten, die entlang der gesamten Herstellungskette (inkl. Futtermittel) ohne Gentechnik produziert werden. Nicht zugelassene GVO werden auch in Spuren nicht toleriert.

Die geltenden Regeln bedingen eine entsprechende Analytik: Zum einen für Hersteller und Handel, um Gewissheit über Rohstoffe, Zutaten und Produkte und deren korrekte Kennzeichnung zu erlangen, zum anderen für die zuständigen Behörden, um die Einhaltung der Regulierungen überwachen und durchsetzen zu können. Dabei stellt sich in den meisten Fällen die Frage, ob eine Probe überhaupt GVO enthält. Bei positiven Proben interessiert dann ggf. eine genaue Identifizierung zur Prüfung des Zulassungsstatus oder darauf folgend eine Quantifizierung.

Das GVO-Screening

Es erfordert einen geeigneten Screening-Ansatz, um die generelle Frage nach der allgemeinen Präsenz von GVO zu beantworten, ohne jedes einzelne „Event" (eine einzelne GVO-Art, resultierend aus einer erfolgreichen Transformation) separat testen zu müssen. Dieser liefert idealerweise auch konkrete Hinweise auf die Identität detektierter Events. Dem Screening liegt das zugrunde, was ein GVO gegenüber den durch Evolution oder Züchtung entstandenen Artverwandten auszeichnet.

Abb. 1
Keine Überraschungen: Ein geeignetes Screening ermöglicht es, in Rohstoffen und Produkten GVO effektiv aufzuspüren.

Was ist ein GVO und wie entsteht er?

Bei den am Markt derzeit vorkommenden GV-Pflanzen handelt es sich in der Regel um transgene Organismen: In das Genom der Ausganspflanze wurde zusätzliches genetisches Material eingebaut, das im natürlichen Genpool der Art nicht vorkommt.

Um ein entsprechendes Fremdgen, z. B. für eine Herbizidresistenz, in einer Pflanze zu exprimieren, wird ein Konstrukt aus dem Gen selbst und regulierenden Promotor- und Terminatorsequenzen (z. B. aus Pflanzenviren (CaMV, FMV)) und optional weiteren Markern erstellt, das vermehrt und in die Zielzelle eingebracht wird. Dort wird das Konstrukt relativ ungerichtet ins Pflanzgengenom (Transformation) integriert. Funktionale Klone (Event) werden selektiert und schließlich der optimale Klon als Produkt auf den Markt gebracht.

Die ideale Detektionsmethode: Real-Time-PCR

Der Unterschied zwischen einer durch Kreuzung „natürlich" erzeugten Sorte und einer GV-Pflanze liegt also direkt im Erbgut begründet. Darum sind DNA-ba-

» Ein gutes Screening muss möglichst viele GVO erfassen! «

sierte Nachweise die direkteste Möglichkeit der Analyse.

Die Real-Time-PCR hat sich hierfür durch hohe Spezifität und Sensitivität als hervorragend geeignet erwiesen. Die Kosten für die Analytik sind moderat, die Untersuchungen leicht durchzuführen, die Ergebnisse gut zu interpretieren und die Ausrüstung ist auch für viele andere Untersuchungen im Bereich Lebens- und Futtermittelanalytik nutzbar (Allergennachweise, Tierartenbestimmungen, Mikrobiologie). Darüber hinaus bietet die Real-Time-PCR auch noch die Möglichkeit der Quantifizierung, was z. B. für die Kontrolle der Schwellenwerte zur Kennzeichnung notwendig ist.

» Die Real-Time-PCR ist die ideale Technologie für das GVO-Screening. «

Wie detektiert man GVO?

Die DNA-Sequenz des Konstrukts einschließlich seiner Übergangsbereiche ins Pflanzengenom an den Integrationsstellen bietet bezogen auf die Spezifität unterschiedliche Ebenen des Nachweises (Abb. 2):

- *Elementspezifisch* können einzelne Bestandteile des Konstrukts, wie z. B. Promotor- oder Terminator-Sequenzen nachgewiesen werden. Diese können in verschiedenen Konstrukten und Events vorkommen und werden auch in ihren natürlichen Quellen wie z. B. entsprechenden Viren detektiert.
- *Konstruktspezifische* Sequenzen befinden sich am Übergang von gekoppelten Elementen, z. B. von einem Promotor in ein Gen für Herbizidresistenz. Die Spezifität ist höher als bei elementspezifischen Sequenzen, dennoch können identische Konstrukte in verschiedenen Events vorkommen.
- *Eventspezifische* Sequenzen befinden sich an den Übergängen zwischen dem Pflanzengenom und dem integrierten Konstrukt. Da die Integrationsstelle einzigartig ist, ist an dieser Stelle gezielt ein bestimmtes Event nachzuweisen.

Für ein Screening bieten sich vor allem die elementspezifischen Marker-Sequenzen an, da diese in vielen GVO weit verbreitet sind. Die Ergänzung des Screenings durch konstruktspezifische Marker verbessert die Erfassung (mehr Events werden detektiert) und vereinfacht die Identifizierung. Entsprechende PCR-Systeme für qualitative und quantitative Nach-

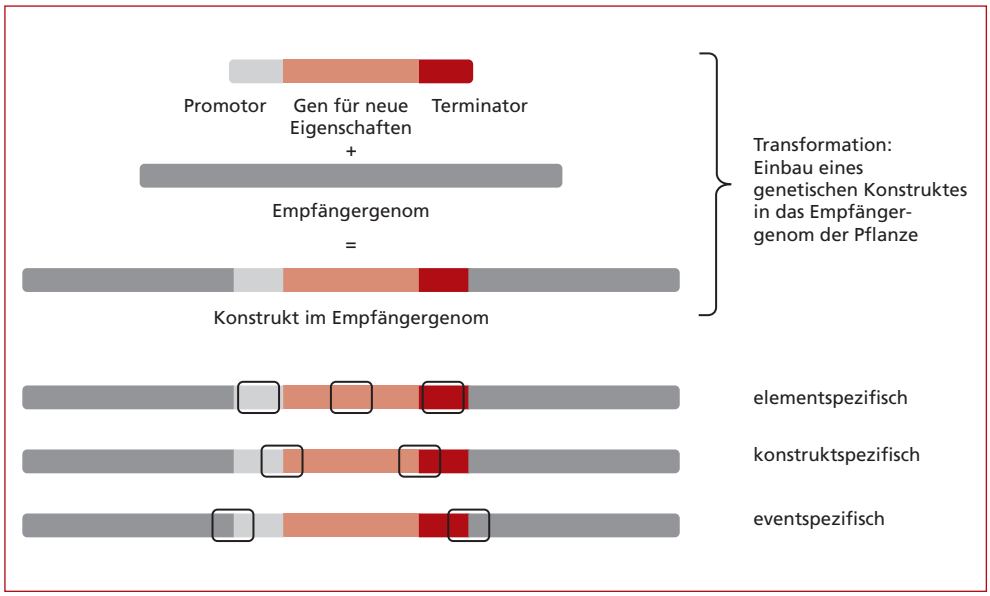


Abb. 2 Genetischer Aufbau eines GVO. Die zusätzliche genetische Information wird als Konstrukt aus regulatorischen Elementen und der aktiven Gensequenz ins Pflanzengenom eingebracht. Dort integriert bieten sich Sequenzabschnitte mit unterschiedlichen Spezifitätsebenen für den Nachweis an.

Tab. 1 Ausschnitt aus Screening-Matrix. Hier werden speziell Rapsarten betrachtet. Im beschriebenen Beispiel wird ein Basisscreening auf P-35S, T-NOS und FMV-34S durchgeführt, das nur für P-35S ein positives Resultat liefert. Damit kommen (nach Ausschluss des natürlich vorkommenden CaMV-Virus) noch 5 verschiedene Events in Frage (schwarz umrandet). Das erweiterte Screening im 2. Anlauf engt die Möglichkeiten auf Topas19/2 ein (rot umrandet).

Event		GVO-Screening 1			GVO-Screening 2				
	Plant	P-35S	T-NOS	FMV-34S	bar	35S-pat	CTP2-CP4-EPSPS	P-NOS-nptII	P-35S-nptII
Laurical 23-198 (Event 23)	Canola	+	–	–	–	–	–	–	+
Falcon GS40/90	Canola	+	–	–	–	+	–	–	–
Liberator L62 (pHoe6/AC)	Canola	+	–	–	–	+	–	–	–
T45, HCN 28	Canola	+	–	–	–	+	–	–	–
Topas19/2	Canola	+	–	–	–	+	–	+	–
MS1, RF1, RF2; MS1xRF1	Canola	–	+	–	+	–	–	+	–
MS8, RF3, MS8xRF3	Canola	–	+	–	+	–	–	–	–
GT73	Canola	–	–	+	–	–	+	–	–
MON 88302	Canola	–	–	+	–	–	+	–	–
OXY 235	Canola	+	+	–	–	–	–	–	–
PHY14, PHY23, PHY35	Canola	–	–	–	+	–	–	–	–
GT200	Canola	–	–	–	–	–	+	–	–

weise für solche Screening-Marker finden sich z. B. in den Normen ISO 21569 und ISO 21570.

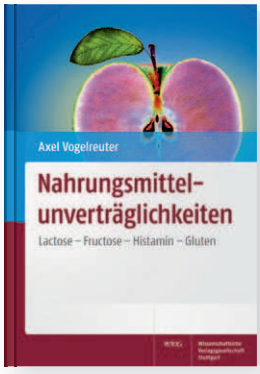
Der Matrix-basierte Screening-Ansatz

Die technische Regel DIN CEN/TS 16707:2014-12 beschreibt, wie man sich die vorhandenen Sequenzinformationen für ein effektives Screening auf das Vorhandensein autorisierter und nicht-autorisierter GVO zu Nutze macht: Dargestellt wird das Screening auf Basis einer „Matrix". Die Matrix ist in diesem Zusammenhang eine tabellarische Darstellung von GVO-Events in Beziehung zur Präsenz verschiedener event- und konstruktspezifischer Elemente in den Events (Tab. 1).

Nach Extraktion der (Pflanzen-)DNA (und ggf. Prüfung von Menge und Qualität) wird eine selektierte, geeignete Reihe

Der Autor dieses kompakten Fachbuchs schildert Bedeutung, Vorkommen und Klinik der häufigsten Nahrungsmittelunverträglichkeiten sowie deren Diagnostik und Therapie. Praxistipps, Fallbeispiele, Differenzialdiagnosen und weitere Zusatzinformationen liefern dem Leser das Rüstzeug für die kompetente Beratung seiner Patienten.

Gratis-Download
des Anamnesefragebogens für alle Interessierten unter:
www.Online-PlusBase.de



Von Axel Vogelreuter.
2012. XII, 230 Seiten. 41 farbige Abbildungen. 34 farbige Tabellen. Mit Anamnesefragebogen. Gebunden. € 42,– [D].
ISBN 978-3-8047-2938-4

E-Book **PDF.** € 42,– [D].
ISBN 978-3-8047-3102-8
E-Book **E-PUB.** € 42,– [D].
ISBN 978-3-8047-3116-5

(E-Books sind online zum Download erhältlich unter **www.buchoffizin.de**)

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
Birkenwaldstraße 44 | 70191 Stuttgart
Telefon 0711 2582 -341 | Telefax 0711 2582 -390
www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de

Alle Preise inklusive MwSt. (D), sofern nicht anders angegeben. Lieferung erfolgt versandkostenfrei innerhalb Deutschlands. Lieferung ins Ausland zuzüglich Versandkostenpauschale von € 8,90 pro Versandstück.

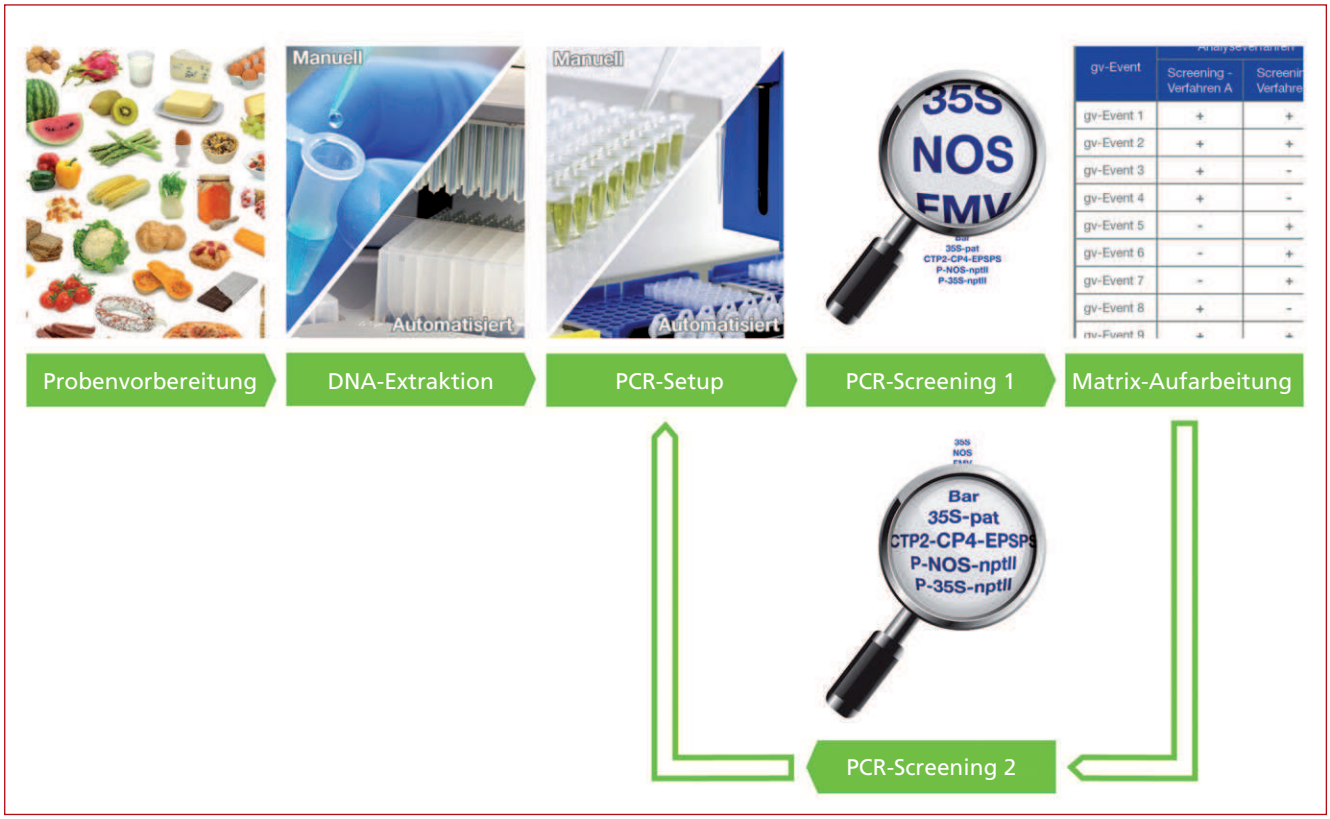


Abb. 3 Ablauf eines GVO-Screenings mit validierten Kitsystemen: Nach Abwiegen und Homogenisieren der Probe kann die Automation manuell (Spinfilter-Säulchen) oder automatisiert (Magnetic Beads) erfolgen. Das PCR-Setup kann ebenfalls von Hand oder von einem Roboter pipettiert werden, wobei lyophilisierte Multiplex-Kits hier den Aufwand besonders bei manueller Bearbeitung erheblich reduzieren. Ein Basisscreening auf P-35S, T-NOS und P-FMV kann für positive Proben nach Auswertung mit der Matrix noch mal durch eine weitere Screening-Runde mit anderen Markern erweitert werden.

» Ein gutes Kitsystem ermöglicht in jedem Labor ein GVO-Screening. «

von PCR-Verfahren angewandt, um die Präsenz ausgewählter element- und konstruktspezifischer Marker in der Probe zu prüfen, über Ausschluss die Anzahl möglicher GVO-Events einzuengen und das weitere Vorgehen festzulegen: Prüfung weiterer Screening-Elemente oder ggf. auch taxonspezifischer (pflanzenartspezifischer) Sequenzen zur genaueren Eingengung oder direkte Bestätigung über eventspezifische Verfahren.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der Ersparnis von Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand, indem man die für die Probe relevanten Bereiche einer Screening-Matrix auswählt (z. B.: Welche Pflanzenarten sind möglich/wahrscheinlich?) und dann gezielt analysiert. Insbesondere die Abwesenheit von GVO kann damit effizient belegt werden. Entsprechende Screening-Matrizes wurden in der Literatur bereits publiziert (z. B. bei *H-U. Waiblinger* et al. oder *A. Block* et al.).

GVO-Screening in der Laborpraxis

Oft herrscht insbesondere bei kleineren Laboren oder in Betriebslaboren eine zögerliche Haltung bei der Einführung eines eigenen GVO-Screenings, selbst wenn die Real-Time-PCR schon als Methode grundlegend (z. B. für die Mikrobiologie) etabliert ist. Dies liegt oft an der scheinbaren Komplexität der Thematik und des vermeintlich hohen Arbeitsaufwandes für ein eventuell unsicheres Ergebnis. Dies trifft aber nur dann zu, wenn komplizierte manuelle chemische DNA-Extraktionsmethoden und Einzel-PCRs für die Bearbeitung gewählt werden. Durch die Ver-

wendung von validierten, abgestimmten und den offiziellen Normen entsprechenden Kits für DNA-Extraktion und Real-Time-PCR kann ein GVO-Screening aber schnell und unkompliziert im Labor etabliert werden.

Ein einzigartig umfassendes System steht z. B. in Form der foodproof®-Kits der Firma *BIOTECON Diagnostics GmbH* zur Verfügung. Lyophilisiert vorbereitete Kits für Multiplex-PCRs und optionale Automatisierung von Probenvorbereitung und PCR-Setup ermöglichen eine sensitive und sichere Analytik. Die Hands-on-time wird reduziert, Fehler minimiert und zeit- und kostspielige Wiederholungen vermieden. Die modulare Zusammensetzung der Kitsysteme erlaubt ein angepasstes Screening-Design (Abb. 3).

Ein Beispiel

Bei einer Probe kommt nur Raps als mögliche GV-Pflanzenart in Frage. Also wird nur dieser Teil einer Matrix betrachtet.

Ein Screening auf P-35S, T-NOS und FMV ergibt ein positives Resultat auf P-35S. Damit kommen noch fünf mögliche Events in Frage (Tab. 1). Über einen zusätzlichen Nachweis des CaMV kann dieser natürliche Virus als Quelle für das Signal ausgeschlossen werden.

Im nächsten Schritt wird das Screening auf bar, 35S-pat, CTP2-CP4-EPEPS, P-NOS-nptII und P-35S-nptII ausgeweitet. Da hier P-35S-pat und P-NOS-nptII positive Ergebnisse zeigen, kann mittels der Matrix bis auf ein Event – TOPAS 19/2 – eingegrenzt werden (Tab. 1). Dieses kann abschließend noch mittels eines eventspezifischen Nachweises bestätigt werden (ggf. muss auch beachtet werden, dass die Probe zusätzlich Falcon GS40/90, Liberator L62 und T45 enthalten kann, was zu keinem andern Screening-Ergebnis führt).

Bewertung und Ausblick

Die beschriebene Methode stellt das aktuelle Optimum im GVO-Screening dar. Es ist aber wichtig, nicht aus den Augen zu verlieren, dass sich der GVO-Markt weiter entwickeln wird. GVO der nächsten Generationen tragen oft keine Screening-Marker mehr. Ein Screening wird daher zukünftig auch eventspezifische Elemente enthalten müssen, wobei zu beachten sein wird, welche Events für die konkrete Probe relevant sind.

Fazit

Durch den weltweit wachsenden Markt mit GVO wird nicht zuletzt angesichts z. T. kritischer Verbrauchergruppen eine engmaschige Kontrolle, v. a. auch Eigenkontrolle bei Lebens- und Futtermittelherstellern immer wichtiger. Kommerzielle Systeme ermöglichen hierbei eine schnelle Etablierung der Analytik in nahezu jedem Labor, um schnell, sicher und günstig Gewissheit über Produkte und Rohstoffe zu erhalten.

Literatur und weitere Quellen

- *Holst-Jensen A* et al.: Detecting unauthorized genetically modified organisms (GMO) and derived materials. Biotechnol Adv **30,** 13148–1335 (2012).
- *Waiblinger H-U* et al.: A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. Anal Bioanal Chem **396,** 2065–2072 (2010).
- *Block A* et al.: The GMO seek matrix: a decision support tool for optimizing the detection of genetically modified plants. BMC Bioinformatics **14,** 256 (2013).
- DIN CEN/TS 16707: Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und ihren Produkten – Strategien für das Screening mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR).
- ISO 21569:2005: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods.
- ISO 21570:2005: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods.
- *James C:* Global status of commercialized biotech/gm crops: 2014. ISAAA, Ithaca/USA (2014).
- Center for Environmental Risk Assessment: GM Crop Database; online unter www.cera-gmc.org/GMCropDatabase (letzter Zugriff 20.4.2015).

Die DLR können Sie online lesen unter www.dlr-online.de → Archiv
Passwort: Sterole

» Das matrix-basierte Screening ist einfach und effektiv! «

Anschrift der Autoren

Dr. Florian Waldherr
Dr. Hans-Henno Dörries
BIOTECON Diagnostics GmbH
Hermannswerder 17
14473 Potsdam
fwaldherr@bc-diagnostics.com
www.bc-diagnostics.com