Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Leitfaden für die Probenahme und Untersuchung zum Nachweis von Pollen gentechnisch veränderter Pflanzen in Honig

Der Leitfaden wurde in Zusammenarbeit mit der § 64 LFGB Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und den für die Überwachung zuständigen Landesbehörden sowie unter Mitwirkung des Arbeitskreises Lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des BVL (ALS) verfasst. Er stellt eine Empfehlung dar und soll zur einheitlichen Probenahme und Untersuchung von Honig auf Pollenanteile gentechnisch veränderter Pflanzen bei der Überwachung durch die zuständigen Landesbehörden sowie der Eigenkontrolle der Wirtschaft beitragen.

Probenahme

Die Probennahme erfolgt in Anlehnung an DIN 10742:2011-06 [1] in der Menge von mindestens 1 kg. Im Labor werden von der Probe zwei Untersuchungsproben von jeweils 50 g entnommen.

Probenvorbereitung und DNA Extraktion

Der Honig kann zur Homogenisierung erwärmt werden und wird durch Rühren gut gemischt.
Für jede Untersuchungsprobe erfolgt eine CTAB basierte DNA-Extraktionsmethode für Honig, optional mit anschließender Aufreinigung [2, 3].
Jede Untersuchungsprobe wird in vier Teilen von je 12,5 g des homogenisierten Honigs auf sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt, nach Zugabe von jeweils ca. 40 ml destilliertem Wasser bei 30-40°C für ca. 10 min unter Schütteln gelöst und anschließend 10 min bei ca. 4.000 x g zentrifugiert.
Die abzentrifugierten Pollen werden mit 5 ml destilliertem Wasser suspendiert und die 4 Teiluntersuchungsproben vereinigt. Die Pollensuspension wird mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von ca. 20-30 ml aufgefüllt und noch einmal 5 min bei ca. 4.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, die Pollen in ca. 0,5 ml sterilem Wasser resuspendiert und die Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, welches ca. 100 mg Glas-Perlen (Partikelgröße ca. 500 µm) enthält. Die Suspension wird über Nacht stehen gelassen und anschließend in einer Schwingmühle bei einer Frequenz von 20 s^{-1} bzw. mit einem mechanischen Schnellschüttelgerät (z. B. Vortex) für 1 min geschüttelt [2, 3].
Für die Extraktion wird 1 ml CTAB-Puffer zugegeben und für 30 min bei 65°C und maximaler Schüttelfrequenz im Thermoschüttler inkubiert. Optional kann an dieser Stelle ein RNaseVerdau erfolgen. Nach Zugabe von Proteinase K-Lösung erfolgt unter Schütteln eine weitere Inkubation für 60 min bei ca. 65°C. Die Proben werden bei Raumtemperatur abgekühlt und 10 min bei mindestens 13.000 x g zentrifugiert. 1 ml des klaren Überstandes werden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. 500 µl Chloroform werden zugegeben und für ca. 30 s gemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 x g wird die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wird mit 0,8 Volumenanteilen Isopropanol für 30 min bei Raumtemperatur gefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 15.000 x g pelletiert. Das Pellet wird mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen [3].
Weitere Methoden können verwendet werden, wenn sie Ergebnisse von vergleichbarer oder besserer Qualität liefern.
Optional kann mit der gewonnenen DNA ein Aufreinigungsverfahren zur Entfernung möglicher Inhibitoren durchgeführt werden [2].

Die unverdünnten DNA-Lösungen sollten mit einem geeigneten Verfahren (z.B. [4]) auf das Vorhandensein von Inhibitoren untersucht werden. Die Kontrolle der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA kann durch ein pflanzenspezifisches PCR-Verfahren erfolgen (z. B. [5]).

PCR-Nachweis

Die DNA sollte möglichst unverdünnt in die PCR eingesetzt werden. DNA, die für die Messung einer Standardreihe verwendet wird, sollte aus Referenzmaterial mit einer geeigneten Extraktionsmethode isoliert werden [6].

Für die Untersuchung auf Pollen von gentechnisch veränderten Pflanzen in Honig wird eine Untersuchungsstrategie mit zunehmender Spezifität in der Reihenfolge der verwendeten Real-time PCR Verfahren angewendet.

Screening-Verfahren

Zur Untersuchung auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen werden zunächst validierte Screening-Verfahren [7, 8, 9, 10] eingesetzt (z. B. P35S, T-nos, bar, CTP2-CP4EPSPS). Mit der Kombination von mehreren Screening-Verfahren können positive Befunde spezifiziert werden [11, 12]. Um die einzusetzenden Screening-Verfahren einzugrenzen, kann vorab eine Untersuchung auf Pflanzenspezies-spezifische Referenzgene (z.B. Raps, Mais, Soja und ggf. weitere Spezies) durchgeführt werden [7, 8, 9, 13].

Event-spezifischer Nachweis

Anschließend an das orientierende Screening erfolgt die Spezifizierung und Quantifizierung idealerweise mit validierten Event-spezifischen Verfahren [7, 9, 13]. Bei fehlender Verfügbarkeit von Event-spezifischen Verfahren kann eine Spezifizierung durch Anwendung weiterer Screening und Konstrukt-spezifischer Verfahren erreicht werden [7, 8, 9, 10, 14]. Das für die Quantifizierung verwendete Referenzmaterial muss im Untersuchungsbericht detailliert beschrieben werden.

Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die Ergebnisse für die Analyseproben und Kontrollproben müssen eindeutig sein und die Kontrollen müssen die erwarteten Ergebnisse zeigen (gemäß DIN EN ISO 24276 [15]).

Bei Quantifizierung mit einem Event-spezifischen Verfahren ist die praktische Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Verhältnis der theoretisch erreichbaren Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze des Transgen-Nachweises zur Proben-bezogenen Menge an amplifizierter Spezies-DNA zu ermitteln [6].

Bei der Entscheidung, wann ein Real-time PCR-Ergebnis als positiv zu bewerten ist, kann der Einsatz von Qualitätskontroll-DNA hilfreich sein, z. B. [16].

Literatur

[1] DIN 10742:2011-06, Untersuchung von Honig - Leitfaden zur Probenahme. Beuth, Berlin.

[2] Waiblinger HU, Ohmenhäuser M, Pietsch K, Ritter W, Steegmüller J, Krech A, Horn P, Schroeder A: Die Untersuchung von transgenem Rapspollen in Honigen mittels Real-time-PCR. Dtsch. Lebensm. Rdsch. (2005) 101, Heft 12: 543–549.

[3] Waiblinger HU, Wurz A, Freyer R, Pietsch K: Spezifischer Nachweis von gentechnisch verändertem Raps in Honig. Dtsch. Lebensm. Rdsch. (1999) 95, Heft 5: 192–195.

[4] European Network of GMO Laboratories: Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. Version 22.07.2011. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/ENGL%20MV%20WG%20Report%20July%202011.pdf

[5] Laube I, Hird H, Brodmann P, Ullmann S, Schöne-Michling M, Chrisholm J, Broll H: Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. Food Chemistry (2010) 118: 979–986.

[6] Untersuchung auf gentechnisch veränderte Lebensmittel (2007/43) J. Verbr. Lebensm. 2 (2007): 440−444. http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/nachweis_kontrollen/probenahmeschema.pdf?__blob=publicationFile&v=1

[7] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 35 Vorläufiges Tabakgesetz, § 28 a GenTG, Beuth-Verlag.

[8] DIN EN ISO 21569:2005, Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren. Beuth, Berlin.

[9] DIN EN ISO 21570:2006, Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren. Beuth, Berlin.

[10] Methodensammlung der Bund/Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG). http://www.lag-gentechnik.de/

[11] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/screening_tabelle_gvoNachweis.xls?__blob=publicationFile&v=4

[12] Waiblinger HU, Grohmann L, Mankertz J, Engelbert D, Pietsch K: A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. Anal Bioanal Chem (2010) 396: 2065–2072.

[13] European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm

[14] European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/default.htm

[15] DIN EN ISO 24276:2006, Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Allgemeine Anforderungen und Definitionen. Beuth, Berlin.

[16] Waiblinger HU, Graf N, Broll H, Grohmann L, Pietsch K: Evaluation of Real-time PCR results at the limit of detection. J. Verbr. Lebensm. (2011) DOI 10.1007/s00003-011-0669-4.

Stand: 29. September 2011