



Leitfaden für die Probenahme und die Untersuchung zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in Leinsamen

Dieses Dokument wurde von der § 64 LFGB Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) erarbeitet. Die Arbeitsgruppe besteht aus Sachkennern aus den Bereichen der Lebensmittel- und Futtermittelüberwachung der Bundesländer, der Wissenschaft und der beteiligten Wirtschaft [1]. Der Leitfaden soll zu einer einheitlichen Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln auf Verunreinigungen mit nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Leinsamen bei der Überwachung durch die zuständigen Landesbehörden sowie der Eigenkontrolle der Wirtschaft beitragen.

Probenahme für Lebensmittel

Die Probenahme von Leinsamen für Lebensmittelzwecke erfolgt auf der Grundlage eines Probenahmeschemas für nicht zugelassene GVO des Arbeitskreises Lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (ALS) [2]. Dieses Probenahmeschema berücksichtigt die Europäische Kommissionsempfehlung 2004/787/EG [3] und ist auch im Einklang mit einem Probenahmeprotokoll der Kanadischen Getreide Kommission (Canadian Grain Commission) zur Eigenkontrolle von Leinsamen-Exporten aus Kanada in die Europäische Union [4].

Aufgrund der Ähnlichkeit des Korngewichts für Samen sind die im ALS-Probenahmeschema für Rapssamen angegebenen Probenmengen für Leinsamen anzuwenden. Die Probengrößen für verpackte oder für unverpackte Produkte sind der jeweiligen Tabelle des ALS Probenahmeschemas zu entnehmen [2].

Bei Samen werden aus der Laborprobe 4 Teilproben von jeweils 60 g (ca. 10.000 Samen) entnommen und getrennt vermahlen. Mit jeder Teilprobe ist daher bei der Untersuchung hinsichtlich gentechnisch veränderter Leinsamen eine relative Nachweisgrenze von 0,01% erreichbar.

Probenahme für Futtermittel

Die Probenahme von Leinsamen für Futtermittelzwecke erfolgt entsprechend eines Probenahmeschemas zum Nachweis von zugelassenen GVO, das vom Arbeitskreis PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA erstellt wurde [5]. Dieses Schema basiert auf der Futtermittel-Probenahme- und Analyseverordnung (FPA) für die amtliche Futtermittelüberwachung und berücksichtigt im Wesentlichen die Empfehlung 2004/787/EG der Kommission [3]. Um im Einklang zum Probenahmeprotokoll der Kanadischen Getreide Kommission (Canadian Grain Commission) zur Eigenkontrolle von Leinsamen-Exporten aus Kanada in die Europäische Union [4] zu stehen, sind vier Analysen von je 60 g (ca. 10.000 Samen) notwendig, d. h. eine Laborprobe sollte aus mindestens 240 g (ca. 40.000 Samen) bestehen.

Probenvorbereitung und DNA Extraktion

Aus jeder vermahlenden Teilprobe ist als Untersuchungsprobe (*test portion*) eine DNA Extraktion durchzuführen. Das Untersuchungsprotokoll der Kanadischen Getreide Kommission [4] verweist auf den Fast ID Genomic DNA Extraction Kit [6].

Erfolgreiche DNA-Extraktionen sind von Mitgliedern der § 64 Arbeitsgruppe mit Verfahren aus den Anhängen der ISO 21571 [7] durchgeführt worden, insbesondere mit der DNA Extraktion mit dem CTAB-Verfahren (Anhang A.3.1), wobei hier seitens der Arbeitsgruppe eine Mindesteinwaage für die Untersuchungsprobe von 1 g für die anschließende DNA Extraktion empfohlen wird.

Andere Extraktions- und Reinigungsverfahren (Kit-Systeme), gegebenenfalls auch mit geringerer Einwaage, können eingesetzt werden, sofern die Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

PCR-Nachweis

Jede Proben-DNA wird mindestens in einer Doppelbestimmung untersucht. Als DNA-Menge (photometrisch bestimmt) sollten ca. 100 ng pro PCR-Ansatz eingesetzt werden. Bei einem angenommenen haploiden Genomgewicht (1C) von ca. 0,7 pg für Leinsamen entspricht diese DNA-Menge 140.000 Kopien einer Einzelkopie-Zielsequenz, die in jedem PCR-Ansatz anwesend sind. Für PCR Verfahren mit einer Nachweisgrenze von 10 Kopien kann dem entsprechend eine relative Nachweisgrenze von ca. 0,01% erreicht werden.

Für den Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Leinsamen („CDC Triffid“ FP967) eignen sich zurzeit die im Folgenden genannten real-time PCR Verfahren.

Nachweis von T-nos (erstes Screening)

Real-time PCR basiertes Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz aus der Terminator-Region des Nopal-Synthase-Gens (*T-nos*) aus *Agrobacterium tumefaciens* [8]. Das mit diesem Verfahren amplifizierte T-nos Fragment hat eine Länge von 84 bp.

Nachweis des P-nos – nptII Konstrukts (erweitertes Screening)

Real-time PCR basiertes Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz aus der Übergangsregion eines Konstrukts bestehend aus dem Nopal-Synthase-Gen Promotor (*P-nos*) aus *Agrobacterium tumefaciens* und dem Neomycin-Phosphotransferase II Gens (*nptII*) aus dem Tn5 Transposon des *Escherichia coli* Stammes K12 [9]. Die Länge des amplifizierten Fragments hängt vom jeweiligen GVO ab und beträgt für FP967 ca. 165 bp. Das Verfahren ist für die Aufnahme in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB vorgesehen und wurde im November 2009 in einem Ringversuch validiert. Die Durchführung des Verfahrens ist ausführlich in Anhang 1 beschrieben.

Nachweis T-nos - Spec

Real-time PCR basiertes Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz des Überganges der Terminator-Region des Nopal-Synthase-Gen (*T-nos*) aus *Agrobacterium tumefaciens* in einen Sequenzbereich des Dihydrofolatreduktase-Gens aus *Escherichia coli*. Das amplifizierte Fragment hat eine Länge von 95 bp. Die Methode wurde vom Gemeinschaftlichen Referenzlabor der EU (CRL-GMFF) in-house validiert und veröffentlicht [10, 11]. Sie eignet sich für den Nachweis des gentechnisch veränderten Leinsamen Events FP967. Das Verfahren ist für die Aufnahme in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB vorgesehen und wurde im November 2009 erfolgreich in einem Ringversuch validiert.

Event-spezifischer Nachweis von FP967

Sofern vom CRL-GMFF oder von anderer Seite ein validiertes event-spezifisches real-time PCR Verfahren nach Veröffentlichung dieser Empfehlung bekanntgegeben wird, ist dieses Nachweisverfahren entsprechend der im Anwenderprotokoll beschriebenen Vorschriften durchzuführen.

Nachweisverfahren für Leinsamen DNA zur Kontrolle

Für den Nachweis von Leinsamen DNA zur Bestätigung der Amplifizierbarkeit der Proben-DNA kann als Referenzgen-Nachweisverfahren das Stearoyl-Acyl-Carrier Protein Desaturase 2 (SAD) Gen amplifiziert werden [11]. Das amplifizierte Fragment hat eine Größe von 77 bp.

Auswertung der PCR-Ergebnisse

Alle Negativ- und Positivkontrollen müssen das erwartete Ergebnis aufweisen (siehe ISO 24276 [12]).

Wird im ersten PCR-Analysegang ein Screening PCR-Verfahren (Zielsequenzen *T-nos* oder *P-nos-nptII*) verwendet, gilt die Zielsequenz als nachgewiesen, wenn mit der Proben-DNA aus mindestens einer der vier Teilproben in der Doppelbestimmung ein amplifikationsbedingter Anstieg der gemessenen Fluoreszenz festzustellen ist.

Im Falle eines positiven Screening-Ergebnisses sind die Proben-DNAs in einem weiteren Analysegang mit dem T-nos - Spec PCR-Verfahren, oder (sofern verfügbar) mit einem FP967 event-spezifischen PCR-Verfahren zu untersuchen.

Die gentechnische Veränderung in Leinsamen ist nachgewiesen, wenn mit der Proben-DNA aus mindestens einer der vier Teilproben mit dem T-nos - Spec PCR-Verfahren oder (sofern verfügbar) mit einem FP967 event-spezifischen PCR-Verfahren in der Doppelbestimmung ein amplifikationsbedingter Anstieg der gemessenen Fluoreszenz festzustellen ist.

Literatur

- [1] Die Mitglieder der §64 LFGB Arbeitsgruppe (alphabetische Reihenfolge): Hermann Broll, Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin); Dr. Claudia Brünen-Nieweler, Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Münsterland–Emscher-Lippe (Münster); Dr. Sabine Burkhardt, Landeslabor Berlin-Brandenburg (Berlin); Dr. Ulrich Busch, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Oberschleißheim); Dr. Antje Dietz-Pfeilstetter Julius-Kühn-Institut (Braunschweig); Sabine Domey, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (Jena); Dr. Norbert Graf, Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Institut für Lebensmittelchemie (Trier); Gerda Hempel Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (Dresden); Dr. Norbert Hess, Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Dr. Matthias Kuhn, Congen GmbH (Berlin); Dr. Dietrich Mäde, Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen Anhalt (Halle); Dr. Gabi Mücher, Gen-ial GmbH (Troisdorf); Dr. Anne Nemeth, Eurofins Genescan GmbH (Freiburg); Dr. Ralf Reiting, Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (Kassel); Dr. Hermann Rüggeberg, Impetus GmbH (Bremerhaven); Dr. Manuela Schulze, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Braunschweig); Dr. Brigitte Speck, Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg (Karlsruhe); Hans-Ulrich Waiblinger, Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (Freiburg); Dr. Karl Woll, Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken).
- [2] Probenahmeschema Gentechnik – nicht zugelassene GVO (2008/49) J. Verbr. Lebensm. 3 (2008): 233 – 235.
http://www.bvl.bund.de/cln_027/DE/06__Gentechnik/00__doks__downloads/Probenahmeschema_202008,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Probenahmeschema_2008_engl.pdf
- [3] Empfehlung der Kommission 2004/787/EG vom 04. 10.2004 für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkte oder in Produkten im Kontext der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003. Amtsbl Europ Union L 348/18 vom 24.11.2004.
- [4] Sampling and Testing Protocol for the Canadian Flaxseed Exported to the European Union. Canadian Grain Commission, Oct. 29 2009;
<http://www.grainscanada.gc.ca/gmflax-lingm/stpf-peevl-eng.pdf>
- [5] Probenahme von Futtermitteln zur Untersuchung auf Bestandteile von in der EU zugelassenen GVO im Rahmen einer Überprüfung der Kennzeichnungspflicht. 11/2008. <http://www.vdlufa.de>
- [6] Fast ID Genomic DNA Extraction Kit - Instruction Manual. siehe <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/flax.htm>
- [7] ISO 21571:2005, Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Nukleinsäureextraktion.
- [8] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Band I (L), L 00.00-116: Nachweis einer bestimmten, häufig in gentechnisch veränderten Organismen (GVO) verwendeten DNA-Sequenz aus *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos) in Lebensmitteln - Screening-Verfahren. Dezember 2007
- [9] Reiting R, unveröffentlicht (siehe Anhang 1)
- [10] Report on the Verification of the Performance of a Construct-Specific Assay for the Detection of Flax CDC Triffid Event FP967 Using Real-Time PCR siehe <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/flax.htm>
- [11] NOST-Spec construct-specific method for the detection of CDC Triffid Flax (Event FP967) using real-time PCR. siehe <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/flax.htm>
- [12] ISO 24276:2006, Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Allgemeine Anforderungen und Definitionen

Anhang 1

Real-time PCR method for the detection of the nopaline synthase promoter (*P-nos*) and neomycin phosphotransferase gene (*nptII*) construct in genetically modified crops
<http://www.bvl.bund.de/pnos-npt2-screening>

Stand: 3. Dezember 2009