

Entwicklung und Validierung von Nachweisverfahren für genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel

Foto: dpa

Hermann Broll und Jutta Zagon (Berlin)

Der Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen hat sich in den letzten 10 Jahren weltweit erheblich ausgedehnt. Unter welchen Bedingungen transgene Pflanzen in der Europäischen Union angebaut bzw. eingeführt und verarbeitet werden dürfen, wird durch EU-Rechtssetzung einheitlich geregelt. Damit die Einhaltung der Bestimmungen überprüft werden kann, ist das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in nationaler und internationaler Kooperation daran beteiligt, Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Organismen zu entwickeln und zu validieren.

Seit 1997 sind bereits gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel in der Europäischen Union im Handel. Zehn Jahre nach der ersten Aussaat gentechnisch veränderter Pflanzen in den USA sind die An-

bauflächen weltweit auf 90 Millionen Hektar gestiegen (Abb. 1). In nunmehr einundzwanzig Ländern bewirtschaften Landwirte ihre Felder mit transgenen Pflanzen. Den größten Anteil daran hat

gentechnisch verändertes Soja mit ca. 60 %, gefolgt von Mais (ca. 24 %), Baumwolle (ca. 11 %) und Raps (ca. 5 %).

Die in der EU zugelassenen bzw. angemeldeten transgenen Pflanzen besitzen ausschließlich Resistenzgene gegenüber Pflanzenschutzmitteln bzw. neue zusätzliche Eigenschaften, die als Insektenschutz vor Fraßschädlingen dienen. Diese neuen Eigenschaften haben somit überwiegend Vorteile im Anbau. Direkte Vorteile für den Verbraucher, seien es nun günstigere oder gar „gesündere“ Lebensmittel, die auf den Einsatz der Gentechnik zurückzuführen sind, befinden sich noch im Entwicklungsstadium. Mit diesen ist frühestens in 5–10 Jahren zu rechnen.

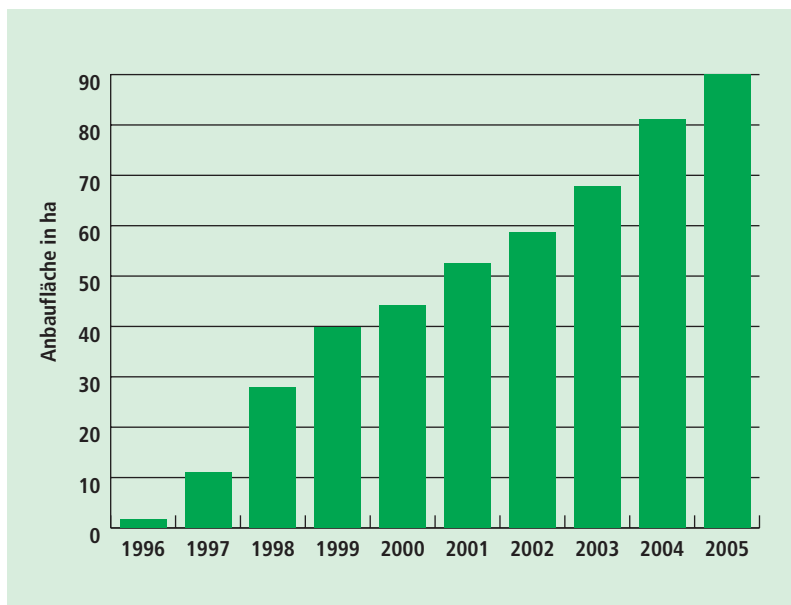


Abb. 1: Entwicklung des Anbaus von genetisch veränderten Pflanzen. Dabei handelt es sich um das 50fache der vor rund 10 Jahren angebauten Menge an GVO. Nach Clive James, 2005.

Rechtslage

Der gesamte Themenkomplex „gentechnisch veränderte Organismen (GVO)“ ist europaweit harmonisiert geregelt. Die Zulassung von Lebensmitteln, die aus GVO bestehen oder GVOs enthalten, ist bereits seit 1990 verbindlich vorgeschrieben (Richtlinie [EG] Nr. 2001/18). 1997 wurde diese Kennzeichnungspflicht auf Produkte

erweitert, bei denen der GVO durch den Herstellungsprozess zerstört wurde (VO [EG] Nr. 258/97).

Die Kennzeichnungspflicht dient der Information des Verbrauchers und bezieht sich ausschließlich auf die in der EU zugelassenen bzw. angemeldeten Produkte. Gemäß der Verordnung [EG] Nr. 1139/98 musste gekennzeichnet werden, wenn die gentechnische Veränderung im Produkt nachweisbar war. Ein Schwellenwert von 1 %, bezogen auf die jeweilige Zutat im Lebensmittel, wurde ebenfalls eingeführt, unterhalb dessen eine Kennzeichnung ausbleiben konnte, sofern die Anwesenheit zufällig und technisch unvermeidbar war. Solche Spuren des GVO können beispielsweise auf einen Pollenflug von einem Anbaufeld zu einem benachbarten Feld zurückzuführen sein oder aber durch Vermischung während der Ernte, des Transports oder der Verarbeitung zum Lebensmittel auftreten. Landwirten und Produzenten, die alle Vorsichtsmaßnahmen getroffen haben und bei deren Produkten trotzdem Spuren des GVO nachgewiesen werden konnten, sollen durch die notwendige Kennzeichnung nicht benachteiligt werden.

Mit der seit dem 18. April 2004 geltenden neuen Verordnung [EG] Nr. 1829/2003 hat sich die Kennzeichnungspflicht deutlich verschärft. Seit dem In-Kraft-Treten der Verordnung müssen alle Lebens- und Futtermittelprodukte, die aus GVO gewonnen wurden, gekennzeichnet werden. Zudem wurde der eingeführte Schwellenwert bezogen auf die jeweilige Zutat von

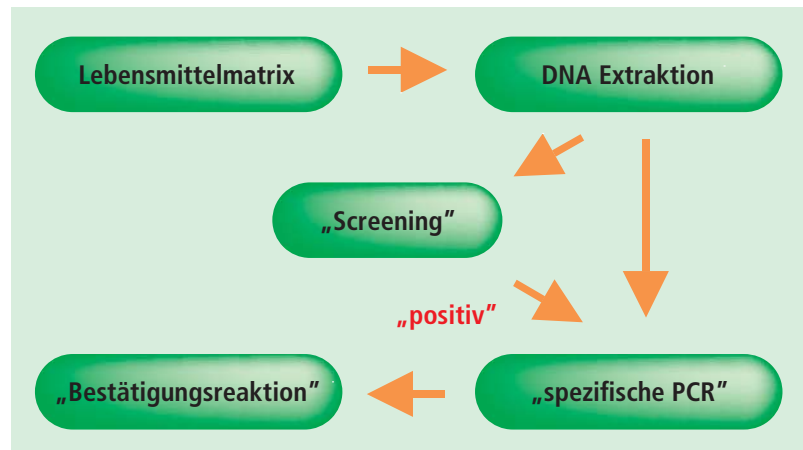


Abb. 2: Ablaufschema bei der GVO Analytik. In der Regel werden 2 Proben parallel untersucht. Die Ergebnisse dürfen nicht divergieren, sonst muss die Analyse wiederholt werden.

1 % auf 0,9 % gesenkt. Anteile darüber müssen gekennzeichnet werden, auch wenn die genetische Veränderung im Lebensmittel nicht nachgewiesen werden kann. Somit tritt anstelle des Nachweisprinzips für die Kennzeichnung nun das Anwendungsprinzip. Auch für Saatgut sind europaweite Kennzeichnungsregeln in Vorbereitung, mit einem Schwellenwert, der deutlich unterhalb der für Lebens- und Futtermittel geltenden 0,9 % zu erwarten ist.

Nachweisverfahren

Grundsätzlich sind mindestens drei unterschiedliche technische Ansätze für die Überprüfung der Kennzeichnung möglich.

Zum einen kann die zusätzlich eingeführte DNA-Sequenz direkt mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und anschließend detektiert werden, zum anderen kann das neu exprimierte Protein durch immunologische Verfahren wie dem ELISA identifiziert werden. Denkbar ist aber auch der chromatographische Nachweis eines aufgrund der gentechnischen Modifikation möglicherweise veränderten Fettsäuremusters. Letzteres stellt bislang nur theoretisch eine Möglichkeit dar; in der Praxis sind GVOs mit solchen Veränderungen in der EU weder angemeldet noch existieren die entsprechenden Nachweisverfahren.

Das Ausmaß der Proteinexpression und die Fettsäuresynthese sind abhängig von Gewebe und Umwelteinflüssen. Zudem ist es ausschließlich auf DNA-Ebene möglich, einen GVO-spezifischen Nachweis zu führen, das heißt eine definierte GVO-Linie zu identifizieren. Gleiche Proteine können nämlich von unterschiedlichen GVOs exprimiert werden. Entsprechendes gilt für ein bestimmtes Fettsäuremuster.

Des Weiteren ist der DNA-basierte PCR-Nachweis noch in stark verarbeiteten Lebensmitteln möglich. Lediglich extrem stark verarbeitete Produkte wie raffinierte Öle, Sojasoßen oder ähnliches enthalten nur noch DNA-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze. Diese Produkte können nicht bzw. noch nicht überprüft werden. In solchen Fällen müssen die Rohwaren zur Analyse herangezogen werden.

Der PCR-Nachweis der gentechnischen Veränderung erfolgt zumeist in Stufen



(Abb. 2). Zunächst werden die Proben auf das Vorhandensein bestimmter regulatorischer DNA-Sequenzen hin untersucht. In vielen in der Europäischen Union für die Lebensmittelherstellung zugelassenen GVOs ist der Promotor 35S aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) enthalten. Dabei kann mit dem Nachweis gleichzeitig auf verschiedene GVOs in einer Lebensmittelprobe „gescreent“ werden. Im positiven Fall muss jedoch eine für die gentechnische Veränderung spezifische DNA-Sequenz nachgewiesen werden. Der zweifelsfreie Nachweis eines bestimmten GVO kann ausschließlich mit Hilfe der „Event“-spezifischen PCR erfolgen, bei der der Übergang zwischen dem genetischen Konstrukt und dem Wirtsgenom vervielfältigt (amplifiziert) und anschließend in einem weiteren Schritt sichtbar gemacht wird. Nur mit Hilfe dieses Ansatzes können GVOs unterschieden werden, die das selbe Konstrukt enthalten (Abb. 3).

Theoretisch reicht eine einzelne Kopie der DNA-Zielsequenz aus, um zu einem positiven Ergebnisse in der PCR zu kommen. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, müssen sowohl Positiv- als

auch Negativ-Kontrollen in jeder Analyse mitgeführt werden. Die im Rahmen der GVO-Analytik entwickelten Verfahren haben eine Nachweisgrenze von ca. 10 Kopien. Dies entspricht in etwa einem Gehalt von 0,01 % gentechnisch veränderten Bestandteilen in einem Produkt unter normalen Analysebedingungen. Einen entscheidenden Einfluss auf die Empfindlichkeit der Methode hat dabei der Verarbeitungsgrad. Je höher das Produkt verarbeitet wurde, desto geringer ist der Gehalt an DNA und somit sinkt auch die Nachweisgrenze.

Basierend auf diesem Prinzip sind PCR-gestützte Verfahren für verschiedene in der EU zugelassene transgene Maislinien entwickelt und am validiert worden.

Durch die Entwicklung der Real-Time PCR ist auch die quantitative Bestimmung der gentechnisch veränderten Bestandteile möglich. Hierbei werden der Anteil gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen und der Anteil der Spezies jeweils getrennt anhand von Standardkurven bestimmt. Daraus kann der relative Anteil gentechnisch veränderter Bestandteile an einer Zutat bestimmt werden. Für die Erstellung

der Standardkurven werden zertifizierte Referenzmaterialien, basierend auf gemahlenem Saatgut, verwendet. Diese Materialien sind für verschiedene GVOs in den Konzentrationen 0–5 % verfügbar (Institute for Reference Material and Measurements, IRMM, Geel, Belgien).

Problem der repräsentativen Probenahme

Unabhängig von der gewählten Nachweisttechnologie steht am Anfang der Analyse eine repräsentative Probenahme. Dazu sind mehrere Stichproben zu nehmen, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die gezogene Probe tatsächlich repräsentativ für die zu untersuchende Probe ist. Je geringer die Anzahl der Stichproben ist, um so größer wird die Wahrscheinlichkeit einer nicht-repräsentativen Probe für das zu untersuchende Material. Aber auch die Verteilung des transgenen Materials hat einen entscheidenden Einfluss. Handelt es sich um Rohwaren, ist eine heterogene Verteilung sehr wahr-

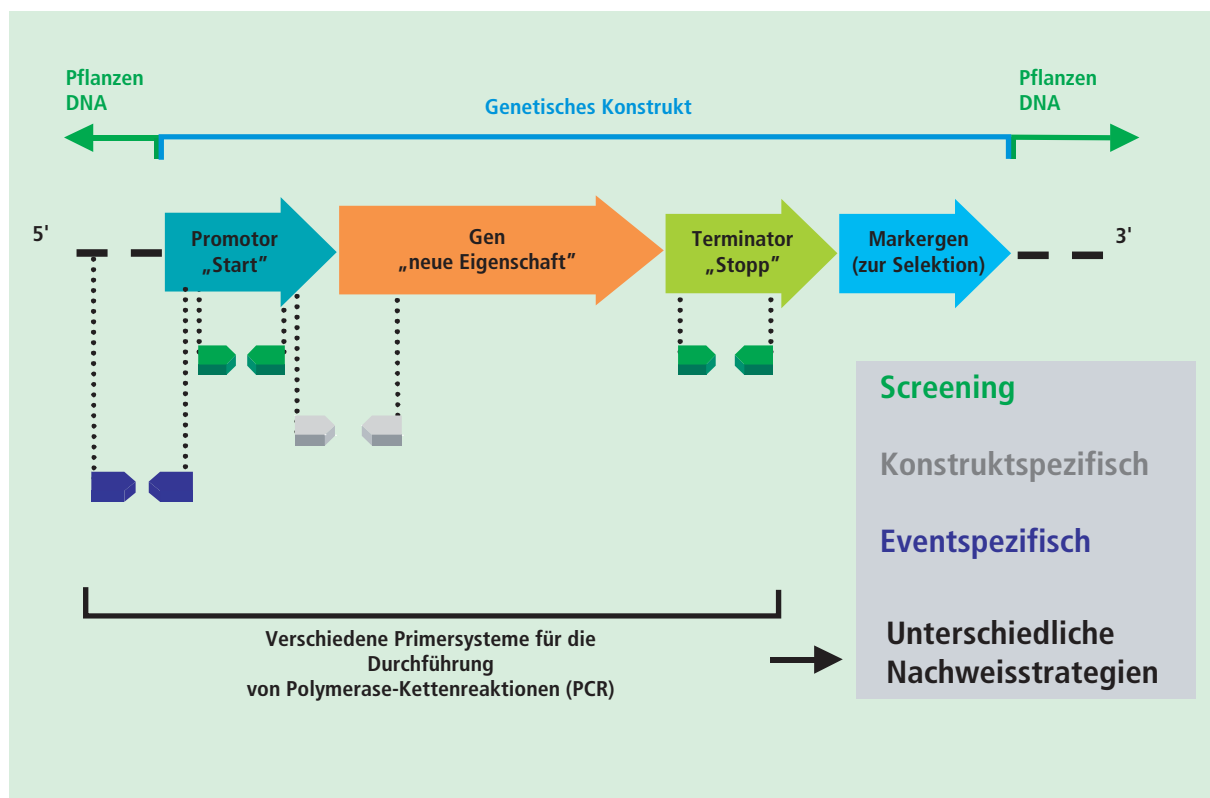


Abb. 3: Unterschiedliche Nachweisstrategien

scheinlich, also eine ungleichmäßige Verteilung mit erhöhter Konzentration des transgenen Materials in bestimmten „Nestern“. Mit zunehmenden Verarbeitungsgrad erfolgt auch eine stärkere Vermischung (Homogenisierung) des Materials, was in eine vereinfachte Probenahme mit weniger Stichproben mündet.

Im Anschluss an die Probenahme erfolgt bei der PCR-Analyse die Extraktion der DNA. Hierbei ist auf die Entfernung vorhandener Inhibitoren (Hemmstoffe) zu achten. Es sind zahlreiche Stoffe bekannt, die auch in Lebensmitteln enthalten sind und hemmend auf die Taq DNA-Polymerase wirken. Zur Identifizierung einer möglichen Inhibition muss nach jeder Extraktion die isolierte DNA mit einem für die Zutat spezifischen PCR-System untersucht werden.

Zur Bestätigung wird das amplifizierte PCR-Produkt mit Hilfe der Restriktions-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP), Sequenzierung oder DNA-DNA-Hybridisierung untersucht.

Unabhängig davon, ob der Nachweis qualitativ oder quantitativ geführt wird, sind zwei Voraussetzungen unbedingt notwendig, damit PCR-basierende Verfahren entwickelt und standardisiert werden können: (a) die DNA-Sequenz muss bekannt sein und (b) es muss Referenzmaterial des GVO zur Verfügung stehen.

Tab. 1: Internationale Standardisierung. Aktivitäten auf CEN Ebene.

Lebensmittel – Detektion genetisch veränderter Organismen und daraus hergestellter Produkte (CEN/TC275/WG11):		Status
Nukleinsäureextraktion	(EN ISO 21571)	Standard
Qualitative PCR Verfahren	(EN ISO 21569)	Standard
Protein basierende Verfahren	(EN ISO 21572)	Standard
Quantitative PCR Verfahren	(EN ISO 21570)	Standard
Probenahme	(technischer Guide*)	Entwurf
Allg. Dokument	(EN ISO 24276)	Standard

* die Arbeit wird nur auf Europäischer Ebene weitergeführt. ISO sprach sich gegen einen Probenahmestandard aus.

Standardisierung

Die Zuverlässigkeit der entwickelten Verfahren wurde in Validierungsstudien sowohl national als auch international bestimmt. Dabei wurden kodierte Proben mit unterschiedlichen GVO-Anteilen untersucht. Es zeigte sich, dass zwischen den einzelnen Labors Abweichungen im Bereich von 25–40 % vom Sollwert zu beobachten sind. Wurde bereits extrahierte DNA an die Teilnehmer verschickt, lagen die Abweichungen niedriger, zwischen 15–20 %. Dieser auch als Messunsicherheit bezeichnete Fehler ist daher bei jeder Analyse in der Form ($x \pm b$) mit anzugeben, wobei x den gemessenen Wert darstellt und b die Messunsicherheit.

Im Rahmen des Europäischen Komitees für Normung (CEN) wurde 1999 eine Arbeitsgruppe gegründet, die Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten standar-

disiert. Die Arbeiten sind weitestgehend abgeschlossen (Tab. 1). International anerkannte Normen existieren für die verschiedenen Schritte der GVO-Analyse. Diese Protokolle enthalten alle notwendigen Informationen, um in der Routine-Analyse Lebens- und Futtermittelproben zu identifizieren, die Spuren von GVOs enthalten.

Es scheint, dass die Lebens- und Futtermittelproduzenten Vorsorge getroffen haben, GVOs im Produktionsprozess zu vermeiden, denn „weiterhin sind so gut wie keine kennzeichnungspflichtigen Lebensmittel am Markt anzutreffen“ schreibt beispielsweise das für die GVO-Lebensmittelüberwachung in Baden-Württemberg zuständige Chemische und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Freiburg auf seiner Internetseite (www.cvua-freiburg.de). Dort wurden zwar in 20 % der Lebensmittel Spuren von gentechnisch veränderten Pflanzen identifiziert, in den allermeisten Fällen aber nur in sehr geringem Ausmaß unterhalb von 0,1 %. Allerdings ist abschließend die Frage zu stellen, wie lange noch Rohstoffe frei von genetisch veränderten Bestandteile zur Verfügung stehen.



Dipl.-Biol. Hermann Broll und Dr. Jutta Zagon,
Bundesinstitut für Risikobewertung,
Thielallee 88–92, 14195 Berlin.
E-Mail: h.broll@bfr.bund.de

Foto: dpa