Mögliche Nachweisstrategien

Prinzipiell kommen für den Nachweis zwei Strategien in Frage:

- Nachweis des **Phänotyps**, d.h. Nachweis der durch die gentechnische Veränderung bewirkten neuen Eigenschaften bzw. neuen Inhaltsstoffe
- Nachweis des **Genotyps**, d.h. Nachweis der neu eingefügten bzw. veränderten DNA-Sequenzen

Nachweis des Phänotyps

Nachweis von neu gebildeten Proteinen

Durch die in das Genom neu eingefügte Erbsubstanz werden in der Regel neue Proteine gebildet (exprimiert), die bestimmte Eigenschaften vermitteln sollen. Eine Eigenschaft kann beispielsweise eine Herbizidresistenz, eine Farbe einer Blüte oder ein veränderter Fettsäurestoffwechsel sein.

Insbesondere immunologische Verfahren, bei denen spezifische Antikörper direkt gegen das neue Protein gerichtet sind, bieten sich für einen sensitiven Nachweis an.

Eine Reihe von Immunoassays (ELISA-Tests) bzw. Lateral-flow-Schnelltests wurden dafür entwickelt und werden auch kommerziell zum Nachweis angeboten [1, 2]. Immunologische Tests zum Nachweis der verschiedenen Kristallproteine (cry) aus insektenresistenten Sorten, zum Nachweis der Enzyme Enol-Pyruvyl-shikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) bzw. Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) in herbizidresistenten Sorten sind im Einsatz.

ELISA-Verfahren zum Nachweis des insektenresistenten Mais MON 810 (Cry1Ab-Protein) bzw. der herbizidresistenten Roundup Ready Sojabohne (EPSPS-Protein) wurden erfolgreich im Ringversuch validiert, bei Mehlen wurde eine Sensitivität von ca. 0,1 bis 0,3 % erreicht [2].

Besonders bei der Ernte, d.h. unter Feldbedingungen, werden Streifen-Schnelltests (Lateral-flow bzw. Dip-Stick) verwendet. In Abbildung 1 ist exemplarisch ein solcher kommerziell angebotener Sandwich-Lateral-Flow-Streifentest dargestellt, der zum gleichzeitigen Nachweis folgender Proteine eingesetzt werden kann:

- CP4 EPSPS (z.B. NK 603 Mais, Roundup Ready Soja)
- CRY3Bb (z.B. MON 863 Mais)
- CRY1Ab (z.B. Bt 11 oder MON 810-Mais)

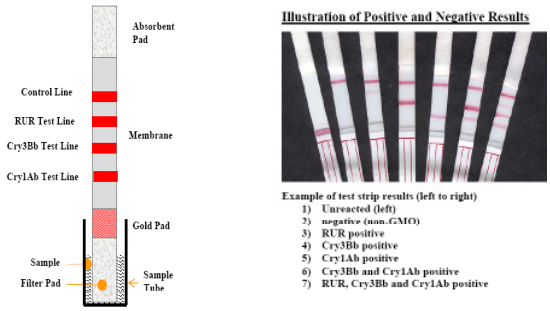

Abbildung 1 Proteinbasierende Schnelltests, Beispiel eines kommerziellen Lateral flow-tests zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Kristallproteine (Cry) sowie des EPSPS-Proteins der Roundup Ready® (RUR) Sojabohne. Erläuterungen siehe Text.

Ein spezifischer monoklonaler Antikörper ist an kolloidales Gold gekoppelt (“Gold Pad”). Während der Testdurchführung wird das kolloidale Antikörper-Gold-Konjugat durch den Probenextrakt gelöst und aufgrund der Kapillarwirkung des Trägermaterials über weitere Bereiche mit immobilisierten spezifischen Antikörpern in Richtung Absorber transportiert. Die Ausbildung von Sandwich-Antigen-Antikörper-Komplexen an den vorgesehenen Stellen des Teststreifens zeigt das Vorhandensein der jeweiligen Proteine an. Die Nachweisgrenzen der Tests werden mit 0,1 bis 1% der jeweiligen GVP angegeben [2].

Allerdings sind der Verwendung solcher Tests Grenzen gesetzt:

- die Menge der exprimierten Protein kann z.B. sorten- und standortabhängig schwanken;
- die Menge der exprimierten Proteine kann stark gewebeabhängig sein, so ist etwa das cry-Protein vor allen in den Blättern und nicht in den Körnern vorhanden;
- in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln können beim immunologischen Nachweis unspezifische Reaktionen und Matrixeffekte auftreten;
- bei erhitzten Lebensmitteln können, bedingt durch die Denaturierung der Proteine, Antigen-Antikörper-Reaktionen beeinträchtigt sein.

Solche Schnelltests dienen daher in erster Linie zur schnellen und kostengünstigen Erst-Kontrolle von Rohmaterialien bei der Ernte.

Nachweis sonstiger phänotypischer Merkmale

Der Nachweis der am häufigsten übertragenen Merkmale, nämlich der Insekten- bzw. Herbizidresistenz (z.B. durch Besprühen mit Herbizid), kommt allenfalls bei der intakten Pflanze, nicht aber im Lebensmittel in Frage.
Im Falle einer veränderten Zusammensetzung wichtiger Inhaltsstoffe, wie etwa des Fettsäurenspektrums bei laurinsäure-reichem Raps, kommen chromatographische Verfahren wie GC oder LC/LC-MS in Frage. Allerdings unterliegen Parameter wie das Triglycerid-Spektrum natürlichen Schwankungen, weshalb quantitative Aussagen bzw. sensitive Untersuchungen i.d.R. nicht möglich sind.

Nachweis des Genotyps

Der Nachweis gentechnischer Veränderungen erfolgt heute überwiegend über den genotypischen Nachweis. Neu eingefügte bzw. veränderte DNA-Sequenzen werden mittels molekularbiologischer Verfahren, in erster Linie basierend auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) detektiert.
Bei der Auswahl der DNA-Sequenzen für den Nachweis von GVP in Pflanzen werden derzeit folgende Strategien unterschieden [1, 3]:

Screening-Verfahren

Damit der Wirtsorganismus die neue Eigenschaft überhaupt ausprägt, wird häufig nicht nur das Gen für die eigentliche Eigenschaft (Strukturgen) übertragen, sondern zusätzlich auch Vektorsequenzen, Reporter- oder Selektionsgene (z.B. Antibiotikaresistenz, nptII-Gen) und Sequenzen von Promotoren (35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus, P35S) und Terminatoren (NOS-Terminator aus Agrobacterium tumefaciens, T-nos). Konstitutive Promotoren wie z.B. P35S werden häufig eingesetzt, um hohe Expressionsraten des neuen Gens zu gewährleisten. Marker- oder Reportergene werden häufig zusätzlich mit den Strukturgenen eingeschleust, damit die erfolgreich transformierten Pflanzenzellen leichter identifiziert werden können. In den meisten Fällen werden dafür Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene eingesetzt. Da diese Sequenzen in den unterschiedlichen gv Pflanzen gemeinsam vorkommen, eignen sie sich besonders für Screeningverfahren (siehe Abbildungen 2 und 3) [4].

Bei positiven Screening-Ergebnissen im Nachweis der P35S- bzw. T-nos Sequenz sind mögliche natürliche Kontaminationen durch das Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) bzw. Agrobacterium tumefaciens zu berücksichtigen. So sind Brassicaceen wie Raps häufig von einer natürlichen Infektion durch CaMV betroffen. Durch einen Nachweis weiterer spezifischer DNA-Sequenzen der jeweiligen Organismen (z.B. aus CaMV [5]) kann beispielsweise auf eine solche Kontamination geprüft werden.

Erfahrungsgemäß kritisch zu hinterfragen sind positive Resultate, die im Screening auf Antibiotikaresistenzgene erhalten wurden, wie etwa nptII (vermittelt Resistenz gegen Neomycin/Kanamycin) oder bla (vermittelt Resistenz gegen Ampicillin). Derartige Resistenzgene sind mittlerweile in vielen ubiquitär vorhandenen Mikroorganismen nachweisbar. Außerdem können Klonierungsvektoren, etwa zur Herstellung von Polymerasen für den PCR-Nachweis, solche Sequenzen enthalten und diese auch in den Polymerase-Präparaten noch nachweisbar sein [6].

Dennoch sind Screening-Verfahren oft die einzig mögliche analytische Strategie bei der Untersuchung auf (in der EU) nicht-zugelassene GVP. Mangels detaillierter Sequenzinformationen und/oder geeigneter Kontrollproben stehen häufig keine weitergehenden Tests zur Verfügung.

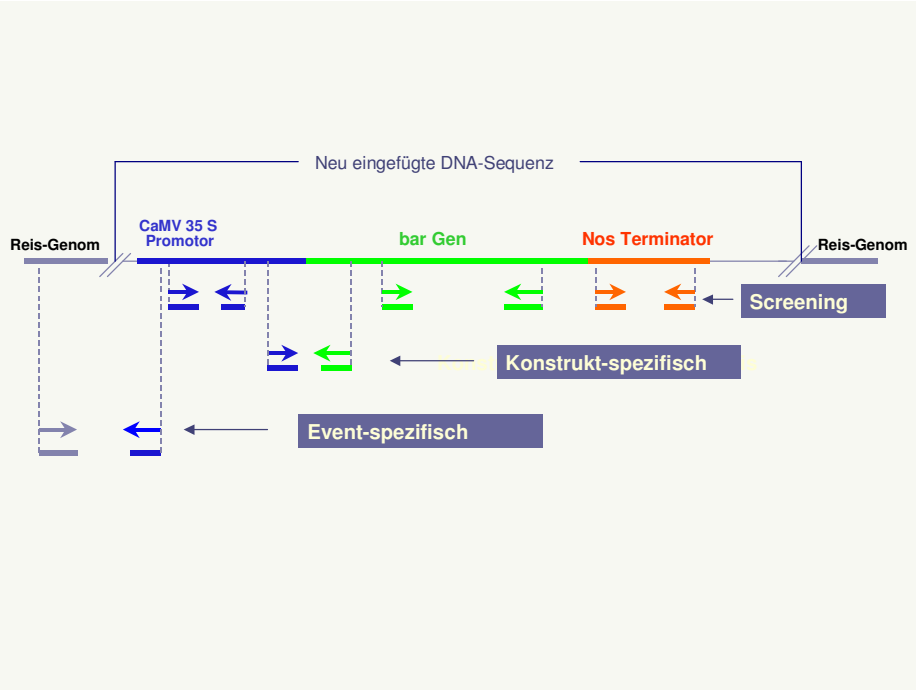

Abbildung 2 Prinzip des molekularbiologischen Nachweises gentechnischer Veränderungen am Beispiel von gv Reis LL601. Mit Hilfe von Screening-Verfahren lassen sich in der Gentechnik häufig verwendete genetische Elemente (z.B. CaMV 35 S Promotor, bar-Gen oder nos-Terminator) nachweisen. Der konstrukt-spezifische Nachweis beinhaltet bei dem LL601 Reis die überlappende Sequenz vom CaMV 35 S Promotor in das bar-Gen. Für den event-spezifischen Nachweis wird die Integrationsstelle der neu eingefügten DNA in das Reis-Genom verwendet.

Konstrukt-spezifische Verfahren

Zum eigentlichen Nachweis der gentechnischen Veränderung werden konstrukt-spezifische Verfahren eingesetzt. Hierbei werden überlappende Sequenzen aus DNA-Konstrukten (z.B. von Plasmidvektoren) nachgewiesen, die zur Veränderung von gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzt werden. Beispielsweise ist die Verknüpfung der P35S-Sequenz (Herkunft Blumenkohlmosaikvirus) zum Herbizidresistenzgen bar (aus dem Bodenbakterium Streptomyces hygroscopicus) (s. Abb. 2) so in der Natur nicht anzutreffen. In Abbildung 3 ist die Karte des Plasmidvektors dargestellt, der zur Transformation der Sojabohne „Roundup Ready®“ (Event GTS 40-3-2) verwendet wurde [7]. Ein konstrukt-spezifisches Verfahren zum Nachweis dieser gv-Sojabohne beruht beispielsweise auf dem Nachweis des Übergangs der CP4 EPSPS-Sequenz aus Agrobacterium sp. 4 zur Chloroplasten-Transit-Peptidsequenz aus Petunie (CP4 EPSPS - CTP 4) [8].

Event-spezifische Verfahren

Die jeweilige GVP (Transformations-Event, z.B. LL601-Reis) wird schließlich durch den Nachweis von Sequenzen im Bereich der Integrationsstelle des Transformationsvektors in das Pflanzengenom identifiziert, etwa des Übergangs von der P35S-Sequenz auf dem Plasmidvektor in das Reisgenom (s. Abb. 2).

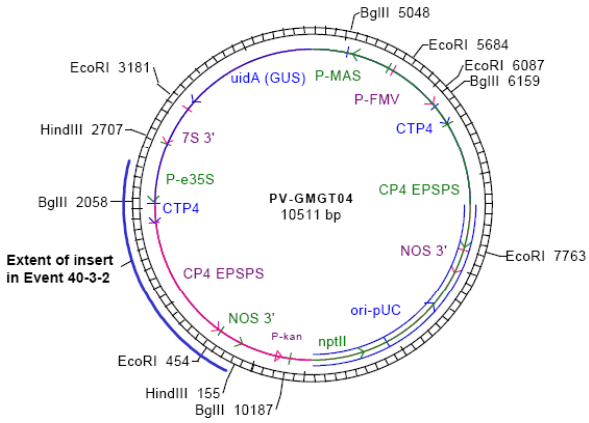

Abbildung 3 Plasmid-Karte des Vektors PV-GMGT04, der zur Transformation der Roundup Ready® Sojabohne verwendet wurde. Erläuterungen zu wichtigen Sequenzabschnitten: P-e35S = 35S-Promotor aus Blumenkohlmosaikvirus (P35S), NOS 3' = Nopalinsynthase 3' Transkriptionsterminator aus Agrobacterium tumefaciens (T-nos), CTP4 = Chloroplasten-Transitpeptid-Sequenz aus Petunia hybrida; CP4 EPSPS = Enol-Pyruvyl-Shikimat-Phosphat-Synthase-Gen aus Agrobacterium sp. 4.

Literatur

1. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H., Van den Eede G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. Eur. Food Res. Technol. 214:3-26.
2. Stave, J.W. (2002) Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations, and practical considerations. J AOAC Int 85: 780-786.
3. DIN EN ISO 24276 (2006): Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Allgemeine Anforderungen und Definitionen. Beuth, Berlin.
4. Pietsch K, Waiblinger HU, Brodmann P, Wurz A. (1997) Screeningverfahren zur Identifizierung „gentechnisch veränderter“ pflanzlicher Lebensmittel. Deutsche Lebensmittelrundschau 93 (2): 35-38.
5. Cankar K, Ravnikar M, Zel J (2005) Real-time PCR detection of cauliflower mosaic virus to complement the 35S screening assay for genetically modified organisms. J AOAC Intern. 88 (3), 814-822.
6. Holst-Jensen A, Ronning SB, Lovseth A, Berdal KG (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms. Anal Bioanal Chem 375: 985-993.
7. Padgette, SR, Kolacz, KH, Delannay X, Re DB, LaValee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB und Kishore GM (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Science 35: 1451-1461.
8. Wurz A, Willmund R (1997) Identification of transgenic glyphosphate-resistant soybeans. BgVV-Hefte 01/1997:115-117.