Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 88 (1997)

Heft: 2

Artikel: Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne "Roundup Ready™" = Sensitive method for the detection of the genetically engineered soy bean "Roundup Ready™"

Autor: Köppel, Esther / Stadler, Markus / Lüthy, Jürg

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982319

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 22.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88, 164–175 (1997)
Eingegangen 10. März 1997. Angenommen 17. März 1997

Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne «Roundup Ready™»

Sensitive Method for the Detection of the Genetically Engineered Soy Bean «Roundup Ready™»

Key words: GMOs, «Roundup Ready™» soy bean, Labelling of food, PCR

Esther Köppel, Markus Stadler, Jürg Lüthy und *Philipp Hübner*
Universität Bern, Departement für Chemie und Biochemie,
Labor für Lebensmittelchemie, Bern

Einleitung

Die schweizerische Lebensmittelverordnung (LMV) regelt seit dem 1. Juli 1995 zusätzlich auch die Zulassung und die Deklaration von gentechnisch veränderten Lebensmitteln. Unter diese Gesetzgebung fallen *Lebensmittel, Zusatzstoffe und Verarbeitungshilfsstoffe, die gentechnisch veränderte Organismen sind oder daraus gewonnen wurden.* Diese Stoffe *müssen mit dem Hinweis «GVO-Erzeugnis» gekennzeichnet sein* (Art. 22 Abs. 1k.)*; nicht unter die Deklarationspflicht fallen Erzeugnisse, die vom Organismus abgetrennt und vom Erbmaterial gereinigt sind (z. B. chemisch definierbare Stoffe).* Für den Vollzug bedeutet dies, dass Methoden benötigt werden, die es erlauben, die gentechnischen Veränderungen am Erbgut dieser GVO-Erzeugnisse möglichst sensitiv direkt nachzuweisen. Zu diesem Zweck bieten sich vor allem molekularbiologische Methoden an, wobei die Entwicklung eines neuen Nachweissystems nur unter der Voraussetzung möglich ist, dass genügend Informationen über die verwendeten Reportergene, Transgene, Terminatoren, Promotoren sowie deren Gen-Konstrukte vorhanden sind. Gentechnische Veränderungen können spezifisch mittels PCR *(Polymerase Chain Reaction)* und Gen-Sonden (Southern-Blot) nachgewiesen werden, wobei die PCR-Analytik die grössere Sensitivität aufweist (1–3).

Zum heutigen Zeitpunkt (März 1997) sind in der Europäischen Union (EU) zwei GVO-Lebensmittel zugelassen («Roundup Ready™» Sojabohne von der Firma Monsanto; «Maximizer» Mais von der Firma Ciba-Geigy Seeds). Die Schweizer Behörden haben nach ausführlicher Begutachtung die «Roundup Ready™» Sojabohne von der Firma Monsanto für den Schweizer Markt zugelassen

(4). Lebensmittel und Futtermittel, die Erbmaterial aus GVO-Erzeugnissen enthalten, müssen mit «GVO» oder «gentechnisch verändert» bezeichnet werden.

In dieser Arbeit beschreiben wir die Entwicklung und die Evaluation eines sensitiven PCR-Systems zum Nachweis der gentechnisch veränderten Sojabohne «Roundup Ready™» der US-Firma Monsanto.

Versuchsanordnung

Probematerial

«Roundup Ready™» Sojabohnen-DNA wurde aus entsprechenden Blättern, die uns vom Migros-Genossenschaftsbund zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Als Negativkontrollen wurden konventionelle Sojabohnen (*Glycine max*) sowie weitere pflanzliche und tierische Lebensmittel mitgeführt.

Isolation und Charakterisierung der Nukleinsäuren

300 mg der zerkleinerten Probe wurden abgewogen und in einem sterilen 2,2-ml-Eppendorfröhrchen mit 860 µl Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA und 1% [w/v] Sodium-dodecyl-sulfat [SDS]) versetzt. Zur Mischung wurden 100 µl einer 5 M Guanidin-Hydrochloridlösung (Nr. G-3272, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) und 40 µl (20 mg/ml) Proteinase K (Nr. 24 568, E. Merck, Darmstadt) gegeben, das Reaktionsgemisch durch Vortexen gemischt und bei 55–60 °C ca. 15 Stunden auf einem Thermomixer geschüttelt. Nach der Verdauung wurden die Proben bei 14 500 x g während 10 Minuten zentrifugiert, 450 µl der wässerigen Phase wurden zu 1 ml Wizard™ DNA-Purification Resin (Nr. A 767C, Promega, Madison, WI, USA) gegeben und vorsichtig, durch mehrmaliges Kippen der Röhrchen, gemischt. Nach dem Wizard™ DNA Aufarbeitungsprotokoll wurde die gereinigte DNA mit 50 µl Wasser (70 °C) eluiert. 5 µl der unverdünnten DNA-Lösung wurden zu 45 µl Reaktionsmischung für die PCR gegeben.

Oligonukleotide

Die PCR-Primer wurden durch Microsynth (Schmidheini, CH-9436 Balgach) auf einem DNA-Synthesizer hergestellt. Die gelieferten Primer wurden darauf im Labor aliquotiert, lyophilisiert und bei –20 °C aufbewahrt. Die DNA-Sequenzen und Positionen der Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Positionen, Sequenzen und Längen der PCR-Primer wurden mit Hilfe der Computer Software *Oligo 5,0 Primer Analysis Software* (NBI, Plymouth, MN 55447-5434) bestimmt.

Tabelle 1. Liste der verwendeten PCR-Primer

Bezeichnung	Primer-Sequenz	Zielgen	Position	Referenz
RR01	5'-TGGCGCCCATGGCCTGCATG-3'	CP4 EPSPS	1630 (14)	diese Arbeit
RR02	5'-CCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATA-3'	P-E35S	2138 (14)	diese Arbeit
RR04	5'-CCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGT-3'	CTP-EPSPS	1984 (14)	diese Arbeit
RR05	5'-TGCGGGCCGGCTGCTTGCA-3'	CP4 EPSPS	1805 (14)	diese Arbeit
GM01	5'-TGCCGAAGCAACCAAACATGATCCT-3'	Lectin (Le1)	1099 (15)	(5)
GM02	5'-TGATGGATCTGATAGAATTGACGTT-3'	Lectin (Le1)	1512 (15)	(5)
GM03	5'-GCCCTCTACTCCACCCCCATCC-3'	Lectin (Le1)	1215 (15)	(5)
GM04	5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG-3'	Lectin (Le1)	1332 (15)	(5)
TR03	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'	18S-rDNA	315 (10)	(10)
TR04	5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'	18S-rDNA	451 (10)	(10)

Die Primer RR01 und RR05 sind komplementär zur DNA-Sequenz des transgenen CP4 *EPSPS*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, der Primer RR02 hybridisiert an den CaMV35S Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus. Der Primer RR04 erkennt eine Sequenz des *CTP-EPSPS*-Gens für das Signalpeptid (Chloroplast Transit Peptid) der EPSPS aus *Petunia hybrida*. Die Oligonucleotide GM01 – GM04 wurden bereits früher für den Nachweis von Sojabohnen in prozessierten Fleischwaren beschrieben (5).

Polymerase Kettenreaktion und Analyse der DNA-Amplifikate

Die Amplifikation der pflanzlichen DNA aus Sojabohnen mit dem Primerpaar RR01/RR02 wurde in einem Endvolumen von 50 µl in 0,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen nach folgenden Standardbedingungen ausgeführt: 1 x Reaktionspuffer (Promega); 2,0 µg/ml Bovines Serumalbumin (Nr. A-8022, Sigma); 2,5 mM Magnesiumchlorid; 0,2 mM Mischung der vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP); je 0,5 µM der beiden Primer; 1 Unit *Taq* DNA Polymerase (Promega). Die Amplifikation erfolgte in 45 Vervielfältigungszyklen: vorgängig ein Denaturierungsschritt bei 96 °C für 3 Minuten, dann 96 °C für 36 Sekunden und 1 min bei 65 °C (Zwei-Schritte-PCR). Am Schluss erfolgte ein Extensionsschritt bei 72 °C für 3 min auf einem Progene Thermal Cycler (Techne, Princeton, NY, USA).

Die Amplifikation mit dem Primerpaar RR04/RR05 wurde ebenfalls in 50 µl Endvolumen nach obenstehenden Standardbedingungen mit insgesamt 35 Zyklen durchgeführt. Die Bedingungen für die sojabohnenspezifische Lectin-PCR (5) wurden wie folgt modifiziert: Die Magnesiumchlorid-Konzentration betrug 1 mM, und die Amplifikation fand auf einem PHC-I Thermal Cycler (Techne, Princeton, NY, USA) statt. Die Amplifikationsprodukte (20 µl) wurden mittels Elektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel (MP-Agarose, Boehringer, Mannheim) in Tris-Borate Puffer (0,5xTBE: 0,045 M Tris-Borate, 0,001 M EDTA, pH 8,0) (6) aufgetrennt und durch Färben mit Ethidiumbromid im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

Resultate und Diskussion

Design des PCR-Nachweissystems

Die «Roundup Ready™» Sojabohne von Monsanto trägt als Transgen ein hybrides *EPSPS*-Gen, welches Resistenz beziehungsweise Toleranz gegenüber dem Herbizid Roundup (Glyphosat) von Monsanto vermittelt. Das Enzym 3-Enolpyruvyl-Shikimat-5-Phosphat-Synthase (EPSPS) wirkt auf dem Syntheseweg von Chorismat, einem Intermediat in der Bildung aromatischer Aminosäuren. Dieser Weg findet sich bei Bakterien, Pilzen und Pflanzen, fehlt aber in tierischen Zellen. Der von EPSPS katalysierte Schritt und die Struktur von Roundup (Glyphosat)

sind in Abbildung 1 dargestellt. Da das Genprodukt, die 3-Enolpyruvyl-Shikimat-5-Phosphat-Synthase (EPSPS), in die Chloroplasten transportiert werden muss, wurde vor das für die Roundup-Toleranz verantwortliche CP4-*EPSPS*-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens* die Signalsequenz (Chloroplast Transit Peptid, CTP) des EPSPS-Gens aus *Petunia hybrida* kloniert (7). Damit wird erreicht, dass das Enzym CP4-*EPSPS* in die Chloroplasten eingeschleust wird. Das *Petunia-Agrobacterium*-Hybridgen steht unter der Kontrolle des starken CaMV 35S-Promoters aus dem Blumenkohlmosaikvirus, welcher in allen Pflanzenteilen aktiv ist. Die Expression des Transgens wird mit dem Polyadenylierungssignal und dem Terminator des *NOS*-Gens (Nopaline-Synthase-Gen) aus *Agrobacterium tumefaciens* terminiert. Bei der Sojabohnentransformationslinie mit der höchsten Roundup-Toleranz (Linie 40-3) segregierte diese Toleranz in der zweiten Generation in

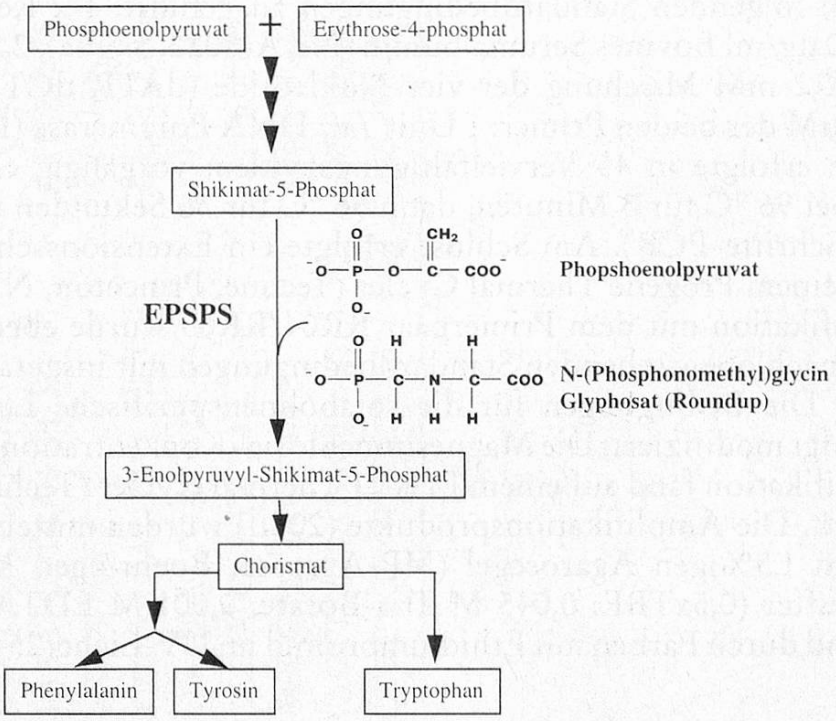

Abb. 1. Wirkungsweise des Herbizids Glyphosat. Das Enzym 3-Enolpyruvyl-Shikimat-5-Phosphat-Synthase (EPSPS) katalysiert die Anlagerung von Phosphoenolpyruvat (PEP) an Shikimat-5-Phosphat, einem Intermediat zu Chorismat, aus welchem die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet werden (16). Bei Pflanzen ist die EPSPS in den Chloroplasten oder in den Plastiden lokalisiert (17). Das Herbizid Glyphosat (N-(Phosphonomethyl)glycin; Handelsname: Roundup) ist ein kompetitiver Inhibitor dieses Syntheseschrittes (18, 19). Die EPSPS aus dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm CP4 wird natürlicherweise wenig von Glyphosat inhibiert, ohne die Affinität für das natürliche Substrat PEP zu verlieren (7, 20). Diese zweite Eigenschaft ist deshalb wichtig, weil es zwar gelang, Glyphosat-tolerante EPSPS aus *Petunia* durch gezielte Mutagenese herzustellen, diese Mutanten wiesen aber eine deutlich tiefere Affinität für PEP auf. Transgene Sojapflanzen mit diesen Mutanten-EPSPS würden daher in Abwesenheit des Herbizids Glyphosat langsamer wachsen als konventionelle Sojapflanzen und wären daher für die praktische Anwendung in der Landwirtschaft ungeeignet (7).

eine hohe Toleranz (Linie 40-3-2) und in eine tiefe Toleranz (Linie 40-3-1). Interessanterweise fand sich bei der unter dem Namen «Roundup Ready™» kommerzialisierten Linie 40-3-2 nur ein Fragment des verwendeten Plasmids PV-GMGT04, welches zwei Kopien des Hybridgens, das bakterielle Selektionsgen *kan* sowie das histochemisch nachweisbare Markergen *gus* trägt, im Pflanzengenom integriert (7). Dieses integrierte Fragment umfasst einen Teil des Promoters, das hybride Transgen sowie die Terminatorstruktur des *NOS*-Gens (Abb. 2). Eine zweite Kopie des Plasmids PV-GMGT04 wurde bei der Parentallinie 40-3 an einem zweiten Ort integriert und vermittelt die tiefe Toleranz gegenüber Glyphosat. Diese zweite Kopie segregierte in der R_2-Generation bei der Linie 40-3-2, so dass in dieser Linie kein *gus* und *kan* nachweisbar sind.

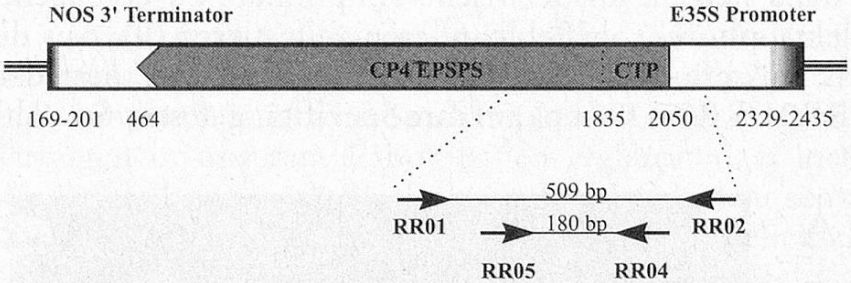

Abb. 2. Struktur des Transgens der gentechnisch hergestellten «Roundup Ready™» Sojabohne von Monsanto. Das ins pflanzliche Genom integrierte Transgen ist als Rechteck dargestellt, die Integrationsorte sowie die genauen Bruchstellen des eingeführten Genkonstrukts sind nicht bekannt (7). Die angegebenen Positionsnummern beziehen sich auf (7, 14). Die schattierten Bereiche am linken (169–201) und rechten (2329–2435) Ende des Rechtecks symbolisieren den kartierten Bereich der Bruchstellen gemäss (7). Die Positionen der Expressionssignale E35S Promoter aus dem Blumenkohlmosaikvirus und des *NOS*-Terminators aus *A. tumefaciens* sind oberhalb des Rechtecks, diejenigen des exprimierten hybriden Transgens bestehend aus dem Chloroplast-Transit-Peptid aus *Petunia* (2050–1835) und dem *EPSPS*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* Stamm CP4 (1834–464) sind innerhalb des Rechtecks angegeben. Die Lage der in dieser Arbeit beschriebenen PCR-Primer ist unterhalb des Genkonstrukts zusammen mit den Primernbezeichnungen und der Grösse der entsprechenden Amplifikate dargestellt. Die genauen Positionsnummern der Primer finden sich in Tabelle 1.

Aus diesen Gründen kann ein spezifisches PCR-Nachweissystem für die «Roundup Ready™» Sojabohne nur auf den folgenden genetischen Elementen basieren: CaMV 35S-Promoter, *NOS*-Terminator, CP4-*EPSPS*-Gen aus *Agrobacterium* sowie *EPSPS-CTP*-Gen aus *Petunia*. Da die beiden Elemente CaMV 35S-Promoter und *NOS*-Terminator in vielen transgenen Pflanzen verwendet werden, eignen sich diese Elemente alleine hervorragend für eine Screening-Methode für transgene pflanzliche Lebensmittel (8), hingegen für den beabsichtigten spezifischen Nachweis der «Roundup Ready™» Sojabohne musste eine Kombination der oben aufgezählten genetischen Elemente gewählt werden. Wir haben uns entschieden, ein nested-PCR-System zu entwickeln, bei dem die äusseren Primer auf dem CaMV 35S-Promoter und auf dem CP4-*EPSPS*-Gen liegen. Die inneren Primer

begrenzen ein Fragment zwischen dem CP4-*EPSPS*-Gen und dem *CTP-EPSPS*-Signalpeptidgen aus *Petunia*. Die Anordnung der Primer und die entsprechenden PCR-Amplifikate sind in Abbildung 2 dargestellt, die Primersequenzen finden sich in Tabelle 1.

Spezifität des «Roundup Ready™» Sojabohnen-PCR-Nachweissystems

Die Spezifität unseres neu entwickelten Nachweissystems für die «Roundup Ready™» Sojabohne wurde an verschiedenen pflanzlichen (Soja, Flavr-Savr-Tomate, Mais, Reis, Hafer, Dinkel, Roggen, Kartoffel) und tierischen Lebensmitteln (Hausschwein) überprüft. Es ist bekannt, dass nested-PCR-Systeme mit hohen Zyklenzahlen dazu neigen, unspezifische Amplifikate zu erzeugen, welche sich nach der Gelelektrophorese als Fehlbanden manifestieren (9). Aus diesem Grund haben wir das äussere (RR01/RR02; 509 bp) und das nested-PCR-System (RR01/RR02; RR04/RR05; 180 bp) auf ihre Spezifität getestet. Sowohl beim äusse-

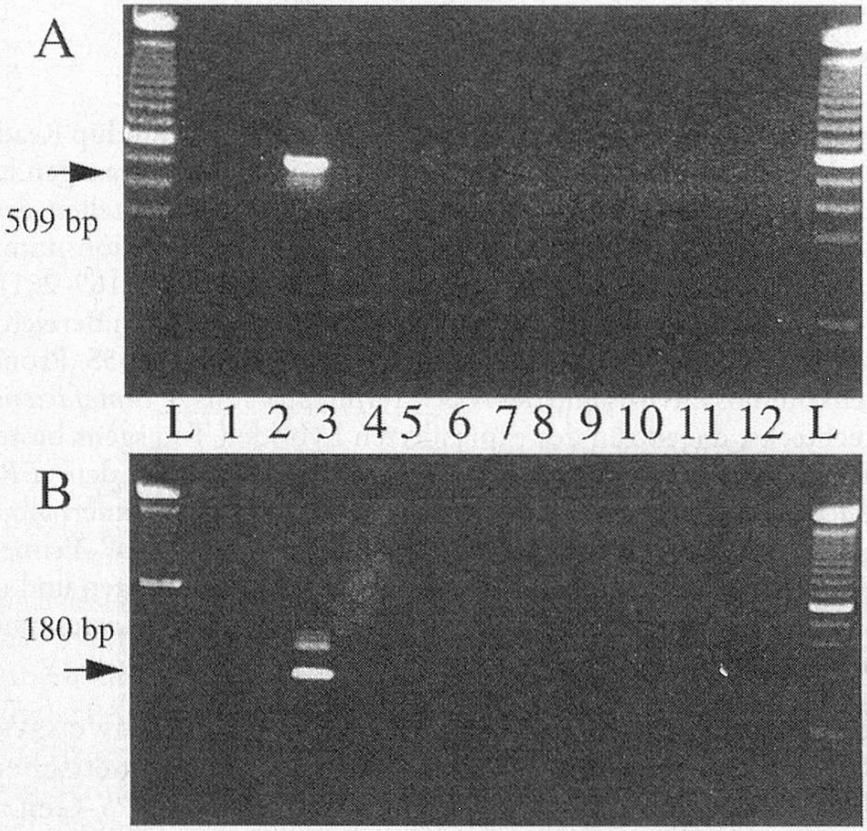

Abb. 3. Spezifität des Nachweissystems für die «Roundup Ready™» Sojabohne von Monsanto. Agarosegel Elektrophorese der Amplifikate nach der einfachen (A) und nach der nested (B) PCR. Folgende Lebensmittel wurden getestet: «Roundup Ready™» Soja (Spur 3); konventionelle Soja (Spur 4); Flavr-Savr-Tomate (Spur 5); Mais (Spur 6); Reis (Spur 7); Hafer (Spur 8); Dinkel (Spur 9); Roggen (Spur 10); Kartoffel (Spur 11) und Hausschwein (Spur 12). Kontrollen waren die negative Isolationskontrolle (Spur 1) und die negative PCR-Kontrolle (Spur 2). Die 100-bp-Leiter (L) dient der Bestimmung der Amplifikatsgrössen.

ren als auch beim nested-PCR-System wurde ein DNA-Fragment der richtigen Grösse nur bei der positiven Kontrolle «Roundup Ready™» Sojabohne erhalten (siehe Abb. 3). Keine Amplifikate ergaben insbesondere konventionelle Sojabohnen. Die Amplifizierbarkeit der aus den verschiedenen Proben isolierten DNA wurde mit der früher beschriebenen «Eukaryonten-PCR» (10) verifiziert. Aufgrund dieser Resultate kann festgehalten werden, dass unser nested-PCR-System spezifisch für die «Roundup Ready™» Sojabohne von Monsanto ist. Bei Vergleichen der verwendeten Primersequenzen mit der GenEMBL-Datenbank fanden sich zudem keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten DNA-Sequenzen.

Sensitivität des «Roundup Ready™» Sojabohnen-PCR-Nachweissystems

Sojabohnen werden oft zu verschiedenen Produkten verarbeitet, welche sowohl als Zutaten wie auch als Zusatzstoffe in der Lebensmittelindustrie Verwendung finden (11, 12). Besonders häufig wird Sojalecithin als Emulgator (E322) eingesetzt (13). Vorabklärungen in unserem Labor haben ergeben, dass insbesondere bei Rohlecithin aus Sojabohnen noch Sojabohnen-DNA mit dem sensitiven nested-Lectin-PCR-System (5) nachweisbar ist. Daher wählten wir ebenfalls ein nested-PCR-Format für die Entwicklung eines ähnlich sensitiven Nachweissystems für die «Roundup Ready™» Sojabohne. Um die Sensitivität unseres neuen «Roundup Ready™» sojabohnenspezifischen Nachweissystems mit denjenigen des Sojalectingen-Nachweises (5) und denjenigen des CaMV 35S-Promoter- und des *NOS*-Terminator-Nachweises (8) zu vergleichen, wurden serielle 10fache Verdünnungen einer aus der «Roundup Ready™» Sojabohne isolierten und photometrisch quantifizierten DNA-Lösung hergestellt und mit den verschiedenen PCR-Systemen amplifiziert. Diese experimentell bestimmten Nachweisgrenzen lassen sich sehr gut direkt miteinander vergleichen, da jeweils die gleichen Verdünnungen in den verschiedenen Systemen getestet wurden. Da es sich bei der Probe um 100% GVO-Soja handelte, konnten die Ergebnisse mit den Nachweisgrenzen des Lectin-PCR-Systems für konventionelle Sojabohnen-DNA verglichen werden. Die

Tabelle 2. Sensitivität verschiedener Soja-spezifischer PCR-Systeme

PCR-System	PCR-Format	Anzahl PCR-Zyklen	Nachweisgrenze (in pg DNA)
RR01/RR02	einfach	45	20 bis 200
RR04/RR05	einfach	45	20
RR01/RR02 & RR04/RR05	nested	45/35	20
GM01/GM02	einfach	45	200
GM01/GM02 & GM03/GM04	nested	45/35	200
35S1/35S2	einfach	45	2000
NOS1/NOS3	einfach	45	2000

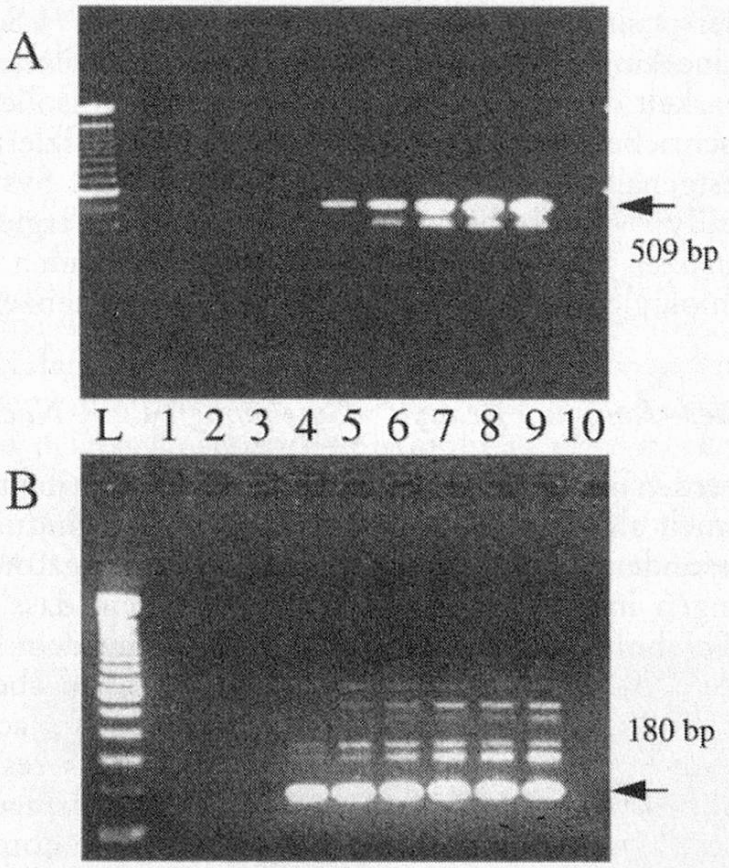

Abb. 4. Sensitivität des Nachweissystems für die «Roundup Ready™» Sojabohne von Monsanto. Agarosegel Elektrophorese der Amplifikate nach der einfachen (A) und nach der nested (B) PCR. Folgende «Roundup Ready™» Soja-DNA-Mengen wurden getestet: 20 fg (Spur 1); 200 fg (Spur 2); 2 pg (Spur 3); 20 pg (Spur 4); 200 pg (Spur 5); 2 ng (Spur 6); 20 ng (Spur 7); 200 ng (Spur 8), 2 µg (Spur 9) und keine DNA (PCR-Negativkontrolle; Spur 10). Die 100-bp-Leiter (L) dient der Bestimmung der Amplifikatsgrössen.

Resultate dieser Sensitivitätstests sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Nachweisgrenzen für das äussere PCR-System (RR01/RR02; 509 bp) und für das innere PCR-System (RR04/RR05; 180 bp) liegen bei 200 bis 20 pg DNA. Das nested-PCR-System (RR01/RR02; RR04/RR05) weist eine Sensitivität von 20 pg DNA auf und ergibt zudem stärkere Signale (siehe Abb. 4). Die Nachweisgrenze für das nested-Lectin-PCR-System liegt bei 200 pg «Roundup Ready™» Sojabohnen-DNA und bei 200 pg konventionelle Sojabohnen-DNA (Resultate nicht dargestellt). Die Nachweisgrenzen für den CaMV 35S-Promoter- und den *NOS*-Terminator-Nachweis (8) liegen jeweils bei 2000 pg. Die Anwendung von nested-PCR-Systemen bei lebensmittelrelevanten Matrizen kann die Sensitivität des Nachweises eindeutig erhöhen, auch wenn sich die Nachweisgrenze des äusseren und des nested-PCR-Systems nur um eine Grössenordnung unterscheiden. Diese Erfahrungen haben wir beim Nachweis von konventioneller Sojabohnen-DNA aus Sojalecithinproben aus verschiedenen Bearbeitungsstufen gemacht (unveröffentlichte Resultate).

Schlussfolgerung

Die Entwicklung und Evaluation einer hochsensitiven und spezifischen Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne «Roundup Ready™» ist die Voraussetzung für die Überprüfung der gesetzlichen Deklarationsvorschriften betreffend dieses GVO-Lebensmittel. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode erlaubt den spezifischen Nachweis von wenigen Genkopien des in die Sojabohne eingeführten Genkonstruktes (Transgens). Obwohl diese experimentell gefundene Nachweisgrenze bei der praktischen Analyse von Lebensmitteln wegen unvermeidbarer Matrixeffekte bei der DNA-Isolation und bei der nachfolgenden PCR-Analyse selten erreicht werden kann, glauben wir, dass wir mit dieser Methode dem Vollzug ein robustes Werkzeug in die Hand geben, um die vom Gesetzgeber verlangte und angestrebte Einhaltung der Deklarationsvorschriften von GVO-Lebensmitteln zu kontrollieren.

Dank

Wir möchten uns bei Herrn *P. Brodmann* (Kantonales Labor Basel-Stadt) für die zur Verfügungstellung der Screening-Methode für GVO-Lebensmittel (35S Promoter- und NOS-Terminator-Systeme) bedanken. Herrn Dr. *R. Battaglia* vom Migros Genossenschaftsbund danken wir für das Beschaffen von «Roundup Ready™» Soja-Material.

Zusammenfassung

Für den Nachweis der in der EU und in der Schweiz als Lebensmittel und als Futtermittel zugelassenen gentechnisch veränderten Sojabohne «Roundup Ready™» wurde eine spezifische und sensitive PCR-Nachweismethode entwickelt. Das Austesten der Spezifität zeigte auf, dass ausser der «Roundup Ready™» Sojabohne insbesondere die konventionelle Sojabohne kein Signal ergibt. Die experimentell bestimmte Nachweisgrenze liegt bei 20 pg DNA.

Résumé

Une méthode de détection spécifique et sensitive a été développée sur la base de PCR en vue de la mise en évidence du soja «Roundup Ready™» génétiquement modifié. Ce soja a été admis par les autorités de la UE et de la Suisse comme aliment humain et animale. La méthode est spécifique pour le soja «Roundup Ready™» tandis que le soja conventionnel ne donnait pas de réaction. La limite de détection déterminée par des essais atteint 20 pg ADN.

Summary

For the detection of the genetic engineered soybean «Roundup Ready™», which is admitted in the EU and in Switzerland as food and animal feed, a specific and sensitive PCR-based method was developed. The specificity testing only yielded signals with the

«Roundup Ready™» soybean, whereas conventional soy bean tested negative. The experimentally determined detection limit was 20 pg DNA.

Literatur

1. *Niederhauser, C., Gilgen, M.* und *Meyer, R.:* Gentechnologisch veränderte pflanzliche Lebensmittel: Stand der anwendungsorientierten Forschung und potentielle Nachweismöglichkeiten mit molekularbiologischen Methoden. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **87**, 307–367 (1996).
2. *Meyer, R.:* Nachweis gentechnologisch veränderter Lebensmittel mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86**, 648–656 (1995).
3. *Meyer, R.:* Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the FLAVR SAVR tomato as an example. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **201**, 583–586 (1995).
4. *Anonym:* Gesuch der Monsanto (Suisse) AG. Schweizerisches Handelsamtsblatt **251**, 8069 (1997).
5. *Meyer, R., Chardonnens, F., Hübner, P.* and *Lüthy, J.:* Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **203**, 339–344 (1996).
6. *Sambrook, J., Fritsch, E.F.* and *Maniatis, T.:* Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.
7. *Padgette, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I.* et al.: Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci. **35**, 1451–1461 (1995).
8. *Pietsch, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P.* und *Wurz, A.:* Screeningverfahren zur Identifizierung «gentechnisch veränderter» pflanzlicher Lebensmittel. Dtsch. Lebensm. Rundsch. **93**, 35–38 (1997).
9. *Bell, D.A.* and *DeMarini, D.M.:* Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. Nucleic Acids Research **19**, 5079 (1991).
10. *Allmann, M., Candrian, U., Höfelein, C.* and *Lüthy, J.:* Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **196**, 248–251 (1993).
11. *Leidner, A.:* Im Herbst auf den Tisch: Gentechnisch veränderte Sojabohnen. Ernährungslehre und -praxis **10**, B38–B39 (1996).
12. *HS:* Roundups sorgen für heissen Herbst. Biospektrum **2**, 8–10 (1996).
13. *Krawcyk, T.:* Lecithin: consider the possibilities. INFORM **7**, 1158–1167 (1996).
14. *Monsanto:* patent WO 92/04449 132–136.
15. *Vodkin, L.O., Rhodes, P.R.* and *Goldberg, R.B.:* Ca Lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. Cell **34**, 1023–1031 (1983).
16. *Lehninger, A.L., Nelson, D.L.* and *Cox, M.M.:* Principles of biochemistry. Worth Publishers, New York 1993.
17. *della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T.* and *Kishore, G.:* Translocation of the precursor of 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 6873–6877 (1986).

18. *Steinrucken, H.C.* and *Amrhein, N.:* The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Comm. **94**, 1207–1212 (1980).
19. *Steinrucken, H.C.* and *Amrhein, N.:* 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. 2. Inhibition by glyphosate [*N*-(phosphonomethyl)glycine] Eur. J. Biochem. **143**, 351–357 (1984).
20. *Barry, G., Kishore, G., Padgette, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D.* et al.: Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: Singh, B.K. et al. (ed.), Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD 1992.

Esther Köppel
Markus Stadler
PD Jürg Lüthy
Dr. Philipp Hübner
Universität Bern
Departement für Chemie und Biochemie
Labor für Lebensmittelchemie
Freiestrasse 3
CH-3012 Bern