

# Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen

Unterausschuss Methodenentwicklung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik  
(LAG)

(Stand: März 2006)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b><u>Grundsätze</u></b>	<b>2</b>
1.1	Zielsetzung	2
1.2	Arbeitsbereich	2
1.3	Methoden	2
<b>2.</b>	<b><u>Auswahl und Umfang der Saatgutproben</u></b>	<b>3</b>
2.1	Probennahme	3
2.2	Größe der Laborprobe	3
2.3	Größe der Untersuchungsproben	3
<b>3.</b>	<b><u>GVP-Saatgut-Analytik</u></b>	<b>4</b>
3.1	Prüfpläne	4
3.2	Qualitative PCR	5
3.2.1	PCR-Methoden	
3.2.2	Auswertung und Dokumentation qualitativer PCR-Ergebnisse	
3.3	Prüfung des GVP-Anteils mittels Subsampling	6
3.3.1	Prüfung der Laborprobe auf GVP-Anteile	
3.3.2	Kontrolle weiterer Prüfwerte mit Hilfe des Subsampling-Verfahrens	
3.4	Real-time PCR	8
3.4.1	Real-time PCR-Methoden	
3.4.2	Auswertung und Dokumentation quantitativer Messergebnisse	
<b>4.</b>	<b><u>Schlussbemerkungen</u></b>	<b>10</b>
<b>5.</b>	<b><u>Glossar</u></b>	<b>10</b>
<b>6.</b>	<b><u>Literatur</u></b>	<b>10</b>

## Anhänge

- Anhang 1: Qualitative PCR-Nachweise mit Hilfe konventioneller PCR
- Anhang 2: Prüfplan für Subsampling
- Anhang 3: Prüfplan für quantitative PCR-Nachweise
- Anhang 4: Real-time PCR-Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis

# **1. Grundsätze**

## **1.1 Zielsetzung**

Der Unterausschuss "Methodenentwicklung" der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG) schlägt ein bundesweit einheitliches Vorgehen bei der Überwachung von konventionellem Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) vor und unterbreitet hiermit ein Konzept für die Untersuchung von Saatgut mit Hilfe von PCR-Methoden sowie für die Auswertung der Daten und die Dokumentation der Ergebnisse. Das Konzept gilt im Wesentlichen auch für die Untersuchung von Saatgut zugelassener gentechnisch veränderter Sorten auf GVP, für die in der EU keine Genehmigung zum Inverkehrbringen erteilt worden ist bzw. deren Genehmigung sich nicht auf Anbauzwecke erstreckt.

## **1.2 Arbeitsbereich**

Das vorliegende Konzept beinhaltet Handlungsempfehlungen für die Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen. Es werden Probenvorbereitung, Analysemethoden sowie Auswertung und Dokumentation der Analyseergebnisse beschrieben.

Die Probennahme selbst ist nicht Bestandteil dieses Konzepts; sie sollte nach den anerkannten Grundsätzen der Saatgutverkehrskontrolle erfolgen. Der Zeitpunkt der Probennahme sollte möglichst so frühzeitig gewählt werden, dass die Saatgutanalytik noch vor der Aussaat abgeschlossen ist.

Informationen über die weltweit zugelassenen und zur Zulassung beantragten gentechnisch veränderten Pflanzen und deren Transformationsereignisse sind unter folgenden Adressen verfügbar: <http://www.agbios.com>, [www.gmo-compass.org](http://www.gmo-compass.org), <http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>, [www.gmo-watch.org](http://www.gmo-watch.org), <http://gmoinfo.jrc.it>, [www.transgen.de](http://www.transgen.de), [www.bvl.bund.de](http://www.bvl.bund.de) .

## **1.3 Methoden**

Für den Nachweis gentechnischer Veränderungen wird grundsätzlich die Anwendung von PCR-Verfahren empfohlen.

In den Anhängen 1 und 4 dieses Konzepts sind konventionelle und Real-time PCR-Methoden zusammengestellt, die, soweit nicht anders angegeben, in nationalen bzw. internationalen Ringversuchen validiert wurden.

Aufgrund der zu erwartenden Einführung von Schwellenwerten für GVP in Saatgut ist zukünftig die quantitative Bestimmung des GVP-Anteils erforderlich. Daher wird in dem aktuellen Konzept bereits auf diese Anforderung eingegangen.

Als quantitatives PCR-Verfahren bietet sich die Real-time PCR an (siehe 3.4). Aber auch qualitative PCR-Nachweise mit entsprechender statistischer Auswertung (Subsampling, siehe 3.3) können zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, dass ein Schwellenwert unter- oder überschritten ist, herangezogen werden.

## **2. Auswahl und Umfang der Saatgutproben**

### **2.1 Probennahme**

Die Probennahme sollte gemäß der Praxis der Saatgutenerkennung bzw. Saatgutverkehrskontrolle [1] nach den geltenden Vorschriften der International Seed Testing Association (ISTA) erfolgen. Sie wird in der Regel durch amtliche Probennehmer der Saatgutenerkennungs- bzw. Saatgutverkehrskontrollstellen durchgeführt. Für die Gewinnung einer repräsentativen Saatgutprobe wurden entsprechende Kriterien zur Erstellung geeigneter Probennahmepläne veröffentlicht [1-7]. Sie sollen gewährleisten, dass Einflüsse durch Inhomogenität der zu untersuchenden Saatgutpartie berücksichtigt werden.

Zusätzlich zur Laborprobe<sup>1</sup> ist eine Rückstellprobe<sup>1</sup> bereitzustellen. Diese wird ggf. für Nachuntersuchungen benötigt.

### **2.2 Größe der Laborprobe**

Bei der Herstellung von Saatgut wird in der Regel große Sorgfalt darauf verwendet, dass dieses möglichst homogen ist. Neben der kontrollierten Erzeugung führt auch die Saatgutaufbereitung vor dem Vertrieb (Beizen, Pillieren) zu einer weiteren Homogenisierung. Bisher liegen noch keine Daten über die Verteilung von GVP-Anteilen in Saatgutpartien vor.

Bis solche Daten vorliegen, soll in diesem Konzept von einer Probe ausgegangen werden, die repräsentativ für die zu untersuchende Partie ist, und in der die GVP-Anteile homogen verteilt sind.

Die Laborprobe soll hinreichend Saatgut für die Untersuchung im Labor zur Verfügung stellen (siehe 2.3). Für weitere Untersuchungen ist auf die Rückstellprobe gleicher Größe zurückzugreifen.

Aus der Laborprobe wird im Untersuchungslabor die **Untersuchungsprobe**<sup>1</sup> gewonnen. Die Laborprobe sollte vor der Gewinnung der Untersuchungsprobe homogenisiert (gemischt) werden.

### **2.3 Größe der Untersuchungsproben**

Erfahrungsgemäß legt die technisch realisierbare Erfassungsgrenze<sup>1</sup> einer PCR zum Nachweis gentechnisch veränderter Sequenzen in Saatgut bei ca. 0,1%.

Die genauen Erfassungsgrenzen der hier vorgeschlagenen qualitativen PCR-Nachweise (siehe Anhang 1) sowie von Real-time PCR-Verfahren (siehe Anhang 4) müssen jedoch im jeweiligen Untersuchungslabor ermittelt werden.

*Beispiel:* Orientiert man sich an der oben genannten technisch realisierbaren Erfassungsgrenze, sollte die Größe der Untersuchungsprobe so bemessen sein, dass bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit (Confidence Level) von 95% ein GVP-Anteil von mindestens 0,1% in der Probe erfasst werden kann. Für die Berechnung des Umfangs der Proben gilt dann in Anlehnung an [8, 9] mit  $n$  = Anzahl der Samen aller analysierten

---

<sup>1</sup> Siehe Glossar.

Untersuchungsproben,  $V$  = maximaler angenommener GVP-Anteil in der Saatgutpartie in % und  $P$  = Vertrauenswahrscheinlichkeit in %:

$$n = \log(1-(P/100))/\log(1-(V/100))$$

Ergebnis: Eine Untersuchungsprobe sollte mindestens 2995 Samen enthalten, um einen GVP-Anteil von 0,1% mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% zu erfassen.

Sollen dagegen mit Hilfe der qualitativen PCR statistische Aussagen darüber getroffen werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein vorgegebener Prüfwert<sup>1</sup> unter- oder überschritten wird, kann nach Remund et al. [9], das sogenannte **Subsampling** angewendet werden. Dazu werden qualitative PCR-Nachweisreaktionen mit mehreren Untersuchungsproben aus einer Laborprobe durchgeführt. Anzahl und Größe der aus einer Laborprobe gewonnenen Untersuchungsproben richten sich dabei nach dem vorgegebenen Prüfwert (siehe 3.3).

### **3. GVP-Saatgut-Analytik**

#### **3.1 Prüfpläne**

Ziel der Untersuchung von Saatgut auf GVP-Anteile ist es, das Vorhandensein sowohl zugelassener als auch nicht zugelassener GVP festzustellen. Um auch Anteile nicht zugelassener GVP sicher nachweisen zu können, muss die Analytik so ausgerichtet sein, dass in der Untersuchungsprobe ein einzelner gentechnisch veränderter Samen nachgewiesen werden kann.

Um ein Untersuchungsergebnis von = 0,1% mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% zu ermitteln, müssen mindestens 2995 Körner untersucht werden. Die angewendeten Verfahren müssen in der Lage sein, einen gentechnisch veränderten Samen in einer Untersuchungsprobe nachzuweisen. Durch die Anwendung des Subsamplings (siehe 3.3) kann die Anwesenheit gentechnisch veränderter Bestandteile im Saatgut, die nicht einem GVO im Sinne des GenTG entsprechen<sup>2</sup>, weitgehend ausgeschlossen werden. Die Untersuchung kann durch qualitative PCR-Nachweise (siehe 3.2) oder soweit verfügbar durch quantitative PCR-Verfahren (siehe 3.4) erfolgen.

Folgende zwei Prüfpläne werden empfohlen:

#### 1. Entnahme von drei Untersuchungsproben aus der Laborprobe (Subsampling)

Die Laborprobe wird vor dem Mahlen in drei Untersuchungsproben mit je 1000 Samen aufgeteilt. Das Verfahren kann angewendet werden, wenn die Erfassungsgrenze der jeweils eingesetzten PCR-Nachweise mindestens 0,1 % beträgt.

Ist in keiner Untersuchungsprobe eine transgene DNA-Sequenz nachweisbar, liegt der Gehalt des Saatguts an transgenen Samen mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95 % unter 0,1 %.

---

<sup>1</sup> Siehe Glossar.

<sup>2</sup> Unter gentechnisch veränderten Bestandteilen, die nicht einem GVO im Sinne des GenTG entsprechen, sind Verunreinigungen zu verstehen, die nicht keimfähig sind, z.B. Stäube aus GVO oder mit GVO-Materialien verunreinigte Beize.

Wenn nur einige der Untersuchungsproben positive Ergebnisse aufweisen, kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass das Saatgut gentechnisch veränderte Bestandteile, die nicht einem GVO im Sinne des GenTG entsprechen, enthält.

## 2. Entnahme einer Untersuchungsprobe aus der Laborprobe

Aus der Laborprobe wird eine Untersuchungsprobe mit mindestens 2995 Samen gewonnen.

Das Verfahren kann angewendet werden, wenn die Erfassungsgrenze der jeweils eingesetzten PCR-Nachweise mindestens 0,03 % beträgt.

Ist in der Untersuchungsprobe keine transgene DNA-Sequenz nachweisbar, liegt der Gehalt des Saatguts an transgenen Samen mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95 % unter 0,1 %.

Bei einem positiven Ergebnis der Untersuchungsprobe sollte geklärt werden, ob dieses Ergebnis durch gentechnisch veränderte Bestandteile, die nicht einem GVO im Sinne des GenTG entsprechen, verursacht wird. Dazu ist anschließend an der Rückstellprobe das Subsampling-Verfahren (Untersuchung von 3 Untersuchungsproben mit je 1000 Samen) anzuwenden.

## 3.2 Qualitative PCR

### 3.2.1 PCR-Methoden

Aus der Untersuchungsprobe wird durch sorgfältiges Zerkleinern das Saatguthomogenat hergestellt. Davon wird eine Teilmenge zur DNA-Extraktion eingesetzt, die laut laborinterner Methodvalidierung die Einhaltung der Erfassungsgrenze (z. B. 0,1%) sicherstellt (mindestens zwei DNA-Extraktionen = Doppelbestimmung).

Aus der gewonnenen DNA wird schließlich die für die PCR-Reaktion notwendige Menge an DNA eingesetzt, die laut laborinterner Methodvalidierung die Einhaltung der Erfassungsgrenze sicherstellt. Mehrfachmessungen sind zu empfehlen.

Informationen zu den spezifischen qualitativen PCR-Nachweisen (nachweisbare Transgene, Genabschnitte, Primersequenzen, PCR-Parameter) finden sich in Anhang 1 (konventionelle PCR) und Anhang 4 (Real-time PCR). Sie gelten auch für die Anwendung des Subsamplings (siehe 3.3).

### 3.2.2 Auswertung und Dokumentation qualitativer PCR-Ergebnisse

Wurde *in allen DNA-Extraktionen* einer Untersuchungsprobe das entsprechende DNA-Fragment mittels qualitativer PCR nachgewiesen, wird vorgeschlagen, das Ergebnis für die Laborprobe entsprechend der folgenden Formulierung anzugeben:

Probenbezeichnung (z. B. Sorte, Anerkennungsnr.)  
Gentechnische Veränderung nachgewiesen (Linie{n})

Anzahl der analysierten Untersuchungsproben:

Anzahl der positiven Untersuchungsproben:

Anzahl der Samen in der Untersuchungsprobe:

Art des Nachweises (qualitativ/quantitativ):

Verwendete Prüfmethode (nachgewiesener Genabschnitt):

Erfassungsgrenze des PCR-Nachweises (z. B. 0,1%):

Wurde das fragliche DNA- Fragment *in keiner der DNA-Extraktionen* nachgewiesen, wird vorgeschlagen, das Ergebnis für die Laborprobe entsprechend der folgenden Formulierung anzugeben:

Probenbezeichnung (z. B. Sorte, Anerkennungsnr.)  
Gentechnische Veränderung nicht nachgewiesen

Anzahl der analysierten Untersuchungsproben:  
Anzahl der positiven Untersuchungsproben:  
Anzahl der Samen in der Untersuchungsprobe:  
Art des Nachweises (qualitativ/quantitativ):  
Verwendete Prüfmethode (nachgewiesener Genabschnitt):  
Erfassungsgrenze des PCR-Nachweises (z. B. 0,1%):

*Hinweis zur Beurteilung von Messergebnissen:*

Wurde nur *in einer oder einigen DNA-Extraktionen* einer Untersuchungsprobe das entsprechende DNA-Fragment mittels qualitativer PCR nachgewiesen, sind die Untersuchungen zu wiederholen und die Ergebnisse gegebenenfalls mit einer anderen Methode auf ihre Reproduzierbarkeit hin zu prüfen.

Daran kann sich eine Quantifizierung mittels Real-time PCR anschließen. Gegebenenfalls ist die Rückstellprobe zu untersuchen.

### 3.3 Prüfung des GVP-Anteils mittels Subsampling

Durch Teilung der Laborprobe in mehrere Untersuchungsproben, qualitative PCR-Analyse und Auswertung der Ergebnisse mit statistischen Methoden ist es möglich, den GVP-Anteil in der Laborprobe abzuschätzen. Hierbei wird der Anteil transgener Samen in der Laborprobe ermittelt, die mindestens eine Kopie des nachzuweisenden Genabschnitts enthalten.

Werden qualitative PCR-Nachweisreaktionen (Methoden siehe Anhänge 1 und 4) mit dem Ziel durchgeführt, einen bestimmten Prüfwert zu kontrollieren, so sind bei positiven Ergebnissen sequenziell weitere kleinere Untersuchungsproben aus der Laborprobe zu untersuchen (so genanntes *Subsampling*). Durch die Auswertung der ermittelten Positiv-/Negativbefunde einer Reihe von Untersuchungsproben können nach Remund et al. [9] statistisch gesicherte Aussagen darüber gemacht werden, ob ein vorgegebener GVP-Prüfwert über- oder unterschritten wird.

Die Entwicklung und Auswahl eines effizienten Prüfplans ist dabei u. a. abhängig von der Höhe des einzuhaltenden Prüfwertes, aber auch von der Größe des Anteils transgener Samen.

Dazu muss die Anzahl der Samen in den Untersuchungsproben auf den zu kontrollierenden Prüfwert abgestimmt sein (Prüfplan siehe Abbildung im Anhang 2). Zur Ermittlung der erforderlichen Parameter (Samenzahl, Anzahl der Untersuchungsproben, Bewertung positiver Ergebnisse) kann die von der ISTA zur Verfügung gestellte Microsoft Excel-basierte Software „SeedCalc“<sup>1</sup> [7] als Hilfsmittel dienen.

---

<sup>1</sup> Auf der Homepage der ISTA (International Seed Testing Association) sind dazu verschiedene Statistikprogramme (Stand Februar 2006: seedcalc3, seedcalc5 und seedcalc7) verfügbar [7].

### 3.3.1 Prüfung der Laborprobe auf GVP-Anteile

Im ersten Schritt der Untersuchung soll geklärt werden, ob die Laborprobe Anteile von GVP enthält. Geht man von einer Erfassungsgrenze der eingesetzten PCR-Nachweise von **0,1%** aus, und nimmt diese als **Prüfwert** an, sind Untersuchungsproben von höchstens 1000 Samen zu untersuchen. Dieser Ansatz soll sicherstellen, dass ein GVP-Samen in 1000 sicher erkannt wird. Statistisch abgesicherte Ergebnisse lassen sich hierbei durch die Untersuchung von mindestens **3 Untersuchungsproben** mit je **1000 Samen** erzielen (vgl. auch 2.3).

Ist in keiner der Untersuchungsproben ein GVP nachweisbar, wird der Prüfwert 0,1% mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% unterschritten. Bei einer oder mehr GVP-positiven Untersuchungsproben sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den wahrscheinlichen Gehalt der Probe zu ermitteln (siehe Anhang 2).

### 3.3.2 Kontrolle weiterer Prüfwerte mit Hilfe des Subsampling-Verfahrens

Ob ein festgestellter GVP-Anteil weitere Konsequenzen hat, ist davon abhängig, welcher Schwellenwert für diese GVP gilt. Die Identifizierung der GVP ist deshalb eine Voraussetzung für weitere Maßnahmen.

Derzeit existieren in der EU keine Schwellenwerte für Saatgut. In der Diskussion sind Werte zwischen 0,1% und 1%. Die folgenden Beispiele sind deshalb nur exemplarisch ausgeführt, um das Prinzip des Vorgehens zu verdeutlichen. Für den konkret zu kontrollierenden Prüfwert müssen die hier genannten Samenzahlen pro Untersuchungsprobe neu ermittelt werden.

Für die Berechnung der folgenden Werte wurde die Excel-Tabelle „Seedcalc3.xls“ verwendet [7]. Die Größe der Untersuchungsproben in den folgenden Tests ist so ausgelegt, dass der zu kontrollierende Prüfwert mit 95%iger Vertrauenswahrscheinlichkeit unterschritten wird, wenn in keiner der 3 Untersuchungsproben eine GVP nachweisbar war. Bei einer oder mehr GVP-positiven Untersuchungsproben sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den wahrscheinlichen GVP-Gehalt der Probe zu ermitteln.

*Beispiele für eine Berechnung mit der Excel-Tabelle „SeedCalc3.xls“ (Tabelle Impurity Estimation):*

#### **Prüfwert 0,3%**

Mit 3 Untersuchungsproben soll die Einhaltung des Prüfwertes von 0,3% mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% kontrolliert werden. Die Zahl der Samen ist so zu variieren, dass die Obergrenze des GVP-Gehalts 0,3% mit 95%iger Vertrauenswahrscheinlichkeit nicht überschreitet.

Eintragungen in der Tabelle „SeedCalc3.xls“:

# of Seed Pools = 3;

**# of Seeds per Pool = 330;**

# Deviant Pools = 0;

desired Confidence Level = 95%

**Ergebnis** = Computed % in Sample = 0,00%;  
Upper Bound of True % Impurity = 0,30  
Lower Bound of True % Purity = 99,7

#### **Prüfwert 0,5%**

Für die Kontrolle des Prüfwertes 0,5% sind **3 Untersuchungsproben** mit je **200 Samen** zu untersuchen.

### **Prüfwert 0,9%**

Für die Kontrolle des Prüfwertes 0,9% sind **3 Untersuchungsproben** mit je **110 Samen** zu untersuchen.

Bei Bedarf einer genaueren Quantifizierung muss sich eine weitere Eingrenzung des GVP-Gehalts mit dem „Subsampling-Verfahren“ oder, falls verfügbar, einer Real-time PCR anschließen.

Anmerkung: Der zu kontrollierende Prüfwert sollte bei der angeforderten Menge der Laborprobe berücksichtigt werden (z. B. Prüfwert von 0,5% = mind. 3600 Samen).

## **3.4 Real-time PCR**

### 3.4.1 Real-time PCR-Methoden

Die Real-time PCR kann sowohl für qualitative GVP-Nachweise als auch für die Quantifizierung des Anteils gentechnisch veränderter DNA eingesetzt werden. Informationen über die derzeit verfügbaren, validierten Real-time PCR-Verfahren finden sich in Anhang 4.

### 3.4.2 Auswertung und Dokumentation quantitativer Messergebnisse

Der Prüfplan für die Untersuchung von Saatgutproben mit Hilfe der Real-time PCR ist in Anhang 3 abgebildet.

Bei der Angabe der Messergebnisse aus der Real-time PCR muss berücksichtigt werden, dass es sich nur um *relative* quantitative Messwerte von GVP-Gehalten in den Proben handelt. In der Regel wird gleichzeitig eine Messung gegen ein speziesspezifisches Vergleichsgen (Referenzgen) durchgeführt, die der „Normalisierung“ der eingesetzten DNA-Menge dient (Bestimmung des Kopienverhältnisses von Transgen zu Referenzgen in der Probe).

Bei der Angabe von quantitativen Messergebnissen ist die Messunsicherheit des Messverfahrens zu berücksichtigen. Diese setzt sich zusammen aus der Messunsicherheit der Messmethode und der Messunsicherheit, die durch die Anzahl der untersuchten Samen bestimmt wird.

Für die Messunsicherheit  $U_1$  der Messmethode gilt nach [10]:

$$U_1 = \frac{t * SD * 100\%}{Mittelwert * \sqrt{n}}$$

(SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Messwerte, t= Wert für n-1 aus der t-Tabelle)

Für die Messunsicherheit  $U_2$ , die durch die Anzahl der untersuchten Samen verursacht wird, gilt modifiziert nach [11]:

$$U_2 = \frac{1 + \sqrt{1 + n * V}}{n * V} * 100\%$$

(n = Anzahl der untersuchten Samen, V = GVP-Anteil in der Saatgutpartie als Dezimalzahl)

Mit Hilfe dieser Zusammenhänge kann die Gesamtmessunsicherheit  $U_{\text{ges}}$  eines Messergebnisses angegeben werden:

$$U_{\text{ges.}} = \sqrt{U_1^2 + U_2^2}$$

( $U_1$  = Messunsicherheit der Messmethode,  $U_2$  = Messunsicherheit, die durch die Anzahl der untersuchten Samen verursacht wird)

*Beispiel:* Für eine Untersuchungsprobe von 3000 Samen mit einem gemessenen GVP-Anteil von 1% und einer Messunsicherheit der Messmethode von 20% ergibt sich eine Messunsicherheit, die durch die Samenanzahl verursacht wird, von 22% und damit eine Gesamtmessunsicherheit von 30%.

Es wird vorgeschlagen, bei der Dokumentation von quantitativen Messergebnissen die Messunsicherheit einschließlich der entsprechenden Vertrauenswahrscheinlichkeit P anzugeben, die die oben beschriebene Gesamtmessunsicherheit berücksichtigt. Für die Angabe von quantitativen Ergebnissen wird folgende Formulierung vorgeschlagen:

Probenbezeichnung (z. B. Sorte, Anerkennungsnr.)  
Gentechnische Veränderung nachgewiesen (Linie{n})

Anzahl der analysierten Untersuchungsproben:  
Anzahl der positiven Untersuchungsproben:  
Anzahl der Samen in der Untersuchungsprobe:  
Verwendete Prüfmethode (nachgewiesener Genabschnitt):  
Messwert:  
Messunsicherheit (bei P =95%):  
Bestimmungsgrenze des PCR-Nachweises:

*Hinweis: Der angegebene Transgen-Gehalt beruht auf der Annahme, dass das Referenzgen und das nachgewiesene Transgen im Verhältnis von 1:X vorliegen.*

Liegt ein Messergebnis unterhalb der Bestimmungsgrenze<sup>1</sup> wird folgende Formulierung vorgeschlagen: „Gentechnische Veränderung nachgewiesen, aber nicht quantifizierbar“.

Das Ergebnis der quantitativen Real-time PCR-Analyse heterozygoter Maiskörner, welches auf Basis des Verhältnisses der Anzahl transgener DNA-Kopien zu der Anzahl ziltaxonomischer DNA-Kopien, bezogen auf haploide Genome, errechnet wird, kann durch den Ploidiegrad sowie die Masseanteile der Gewebe (Endosperm, Embryo und Perikarp) deutlich beeinflusst werden.

Ist dieser Einfluss bezüglich einer zu untersuchenden Probe bekannt, sollte das quantitative Ergebnis mit Hilfe einer Subsampling-Analyse abgesichert werden.

---

<sup>1</sup> Siehe Glossar.

## 4. Schlussbemerkungen

In begründeten Einzelfällen können Nachweise von GVP in Saatgut mit anderen als den hier angegebenen PCR-Methoden vorgenommen werden, sofern die Gleichwertigkeit nachgewiesen werden kann.

Im Falle eines positiven Befundes (GVP-Nachweis) ist mit dem Auftraggeber zu klären, ob das Ergebnis von einem zweiten Labor bestätigt werden soll. Aus statistischen Gründen muss eine Vergleichsuntersuchung in einem zweiten Labor nicht zum gleichen Ergebnis führen, wenn das Ergebnis im Bereich der Erfassungsgrenze liegt.

Der Unterausschuss "Methodenentwicklung" schlägt der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG) vor, das vorliegende **"Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen"** den Ländern als Handlungskonzept zu empfehlen.

Das vorliegende Konzept wird durch den Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG ständig entsprechend dem Stand der Wissenschaft und Technik weiterentwickelt.

## 5. Glossar:

Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*): Konzentrationswert bei dem der relative Fehler erstmals eine vorgegebene Schranke (üblicherweise 33 %) unterschreitet (Definition in Anlehnung an [10]).

Die Bestimmungsgrenze entspricht dem niedrigsten Analytengehalt, der *mit einer vorgegebenen Präzision* quantifiziert werden kann, sie stellt eine erweiterte Messsicherheit dar.

Erfassungsgrenze (*limit of detection*): derjenige kleinste Gehalt eines Analyten in einer Probe, der mit hoher vorgegebener Wahrscheinlichkeit (meist P = 95 %) nachgewiesen werden kann (Definition in Anlehnung an [10]).

Laborprobe: eine Probe, die zum Versand an ein Laboratorium vorbereitet und für die Inspektion oder Untersuchung im Labor bestimmt ist (Definition in Anlehnung an [3, 12]).

Prüfwert: festgelegter Wert für einen GVP-Gehalt, dessen Überschreitung kontrolliert wird. Nach Festlegung von Schwellenwerten für GVP-Anteile im Saatgut entsprechen diese den Prüfwerten.

Rückstellprobe: eine zweite Laborprobe, die ggf. für Nachuntersuchungen bestimmt ist.

Untersuchungsprobe: eine für die Untersuchung oder Analyse vorbereitete Probe (Definition in Anlehnung an [3, 12]); Teil der Laborprobe, der als Einheit in der Laboruntersuchung analysiert wird.

## 6. Literatur

- [1] Probenehmer-Richtlinie der Arbeitsgemeinschaft der Anerkennungsstellen für landwirtschaftliches Saat- und Pflanzgut (2001)  
Hrsg.: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft

- [2] Kruse, M.: Probenahmepläne zur Nachprüfung der Verunreinigung von konventionellem Saatgut mit GVO Saatgut.  
VDLUFA-Schriftenreihe 57, Teil 2: 562 - 567 (2001)
- [3] pr EN ISO 21568 Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Sampling (ISO/DIS 21568:2005)
- [4] Whitaker, T., Freese, L., Giesbrecht, F. and Slate, A.:  
Sampling Grain Shipments To Detect Genetically Modified Seed.  
Journal of AOAC International 84:1941-1946 (2001)
- [5] Lischer, P.: Sampling Procedures to Determine the Proportion of Genetically Modified Organisms in Raw Materials. Part I: Correct Sampling, Good Sampling Practice.  
Mitt. Lebensm. Hyg. 92: 290-304. (2001)
- [6] Lischer, P.: Sampling Procedures to Determine the Proportion of Genetically Modified Organisms in Raw Materials. Part II: Sampling from Batches of Grain  
Mitt. Lebensm. Hyg. 92:305-311. (2001)
- [7] ISTA (International Seed Testing Association): [www.seedtest.org/en/content---1--1143--279.html](http://www.seedtest.org/en/content---1--1143--279.html) (Download seedcalc3)
- [8] <http://archive.gipsa.usda.gov/biotech/samplingplan1.xls> (Qualitative Test Sample Size Calculator im Tabellenblatt single)
- [9] Remund, K., Dixon, D., Wright, D. and Holden L.:  
Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits  
Seed Science Research 11, 101-119 (2001)
- [10] Kromidas, S.: Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim (1999)
- [11] Hübner, P., Waiblinger, H.-U., Pietsch, K. and P. Brodmann:  
Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plants in Food.  
Journal of AOAC International 84: 1855-1864 (2001)
- [12] prEN ISO 24276:2005 Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Allgemeine Anforderungen und Definitionen (Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions)
- [13] DIN EN ISO 21569:2005 Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Qualitative auf Nukleinsäure basierende Verfahren (Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods), Berlin: Beuth Verlag

- [14] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Gliederungsnummer L00.00-31, Juli 2001: „Screeningverfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln durch den Nachweis von DNA-Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Organismen vorkommen“. Beuth Verlag GmbH
- [15] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Gliederungsnummer L24.01-1, Januar 1997: „Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Kartoffeln durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde“. Beuth Verlag GmbH
- [16] Allmann et al. (1993), 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
- [17] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Gliederungsnummer L15.05-1, Mai 2002: „Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais (*Zea mays* L.) mit Hilfe des PCR (Polymerase Chain Reaction) und Restriktionsanalyse oder Hybridisierung des PCR-Produktes“. Beuth Verlag GmbH
- [18] Tätigkeitsberichte (2002): Drei Nachweismethoden für transgene Pflanzen; Bericht des Unterausschusses Methodenentwicklung des Länderausschusses Gentechnik Bundesgesundheitsblatt 45: 925-934
- [19] Hess N., Ulrich A., Hoffmann T. (2002): Insertionsspezifische Nachweisverfahren für transgene Pflanzenlinien unter Anwendung der inversen PCR. Bundesgesundheitsblatt 45: 626-633
- [20] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Gliederungsnummer L23.01.22-1, März 1998: „Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Sojabohnen durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde.“ Beuth Verlag GmbH
- [21] DIN EN ISO 21570:2005 Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Quantitative auf Nukleinsäure basierende Verfahren (Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods), Berlin: Beuth Verlag

*siehe auch:*

Methodensammlung des Unterausschusses "Methodenentwicklung" der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG): <http://www.lag-gentechnik.de/>

## Anhang 1: Qualitative PCR-Nachweise mit Hilfe konventioneller PCR

Die folgenden PCR-Methoden zum Nachweis von GVP sind, sofern nicht anders angegeben, durch amtliche Ringversuche validiert. Mit den hier dargestellten Methoden können folgende transgene Pflanzen nachgewiesen werden:

- **Mais:** Bt176; Bt11; Bt10 ; T14; T25; Mon810
- **Raps:** Topas19/2; Falcon GS40/90; Liberator pHoe6/Ac; GT73; GT200 ; MS1/RF1(RF2); MS8/RF3; fettsäureveränderter Raps mit der pCaMV-*nptII*-Genkassette
- **Zuckerrüben:** T120-7; H7-1; # 77; T252; # 203; GTSB77
- **Soja:** Roundup Ready Soja (GTS 40-3-2)
- **Kartoffeln:** Alle Linien mit dem *nptII*-Gen: tBK50-13/tBK50-66; IEH 92-527-1; Bt6/Bt10/Bt12/Bt16/Bt17/Bt23; SPBT02; ATBT04; RBMT21/RBMT22; RBMT15; SEMT15; HLMT15-46

### 1. Screeningmethoden

#### 1.1 Mais und Soja

Ein Screening nach dem CaMV-35S-Promotor erfasst gegenwärtig 16 transgene Mais-Linien sowie 5 transgene Soja-Linien. Es sollte mit Hilfe einer der folgenden Methoden durchgeführt werden:

- EN ISO 21569, Anhang B.1 [13] bzw. § 64 LFGB, L 00.00-31 [14]  
35S-1            5´-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A -3´  
35S-2            5´-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA -3´  
Annealing:    54 °C            Produkt: 195 bp  
Restriktionsanalyse:            Xmn I: 115 bp + 80 bp
- EN ISO 21569, Anhang B.2 [13]  
35s-cf3           5´- CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG -3´  
35s-cr4           5´-TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C -3´  
Annealing:    62 °C            Produkt: 123 bp

Zwei weitere Mais-Linien können mit einem zusätzlichen Screening nach dem NOS-Terminator erfasst werden. Dazu kann eines der folgenden Verfahren verwendet werden:

- EN ISO 21569, Anhang B.3 [13]  
HA-nos118f    5´-GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG-3´  
HA-nos118r    5´-GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC-3´  
Annealing:    62 °C            Produkt: 118 bp
- § 64 LFGB, L 00.00-31 [14]  
NOS-1           5´-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG -3´  
NOS-3           5´-TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA -3´  
Annealing:    54 °C            Produkt: 180 bp  
Restriktionsanalyse:            Nsi I: 96 bp + 84 bp

## 1.2 Raps

Ein Screening nach dem CaMV-35S-Promotor erweist sich bei Raps als ungünstig, da viele der Raps-GVP nicht erfasst werden und das Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) Raps befallen kann, wodurch die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Proben erhöht wird.

Um 13 bekannte transgene Raps-Linien zu erfassen, müssen gegenwärtig je Einzelprobe vier konstruktsspezifische Nachweise durchgeführt werden (siehe 2.2).

## 1.3 Zuckerrüben

Ein Screening ist hier vom Aufwand her nicht sinnvoll. Um 6 transgene Zuckerrüben-Linien zu erfassen, müssen je Probe zwei konstruktsspezifische Nachweise durchgeführt werden (siehe 2.2).

## 1.4 Kartoffel

Die oben genannten transgenen Kartoffeln können mit einer der nachfolgenden Screening-Methoden zum Nachweis des *nptII*-Gens erfasst werden [13, 14]:

- EN ISO 21569, Anhang B.4 [13] bzw. § 64 LFGB, L 00.00-31 [14]  
APH2 kurz 5´-CTC ACC TTG CTC CTG CCG AGA-3´  
APH2 revers 5´-CGC CTT GAG CCT GGC GAA CAG-3´  
Annealing: 60 °C Produkt: 215 bp  
Restriktionsanalyse: Rsa I: 122 bp + 93 bp
- § 64 LFGB, L 00.00-31 [14]  
TN5-1 5´-GGA TCT CCT GTC ATC T -3´  
TN5-2 5´-GAT CAT CCT GAT CGA C -3´  
Annealing: 50°C Produkt: 173 bp  
Restriktionsanalyse: Rsa I: 136 bp + 37 bp

Eine weitere empfehlenswerte *nptII*-Nachweismethode verwendet folgende Primer (Feldmann, unveröffentlicht):

npt-2F 5´-CTG ATG CCG CCG TGT TCC -3´  
npt-2R 5´-ATG TTT CGC TTG GTG GTC -3´  
Annealing: 53°C Produkt: 323 bp (Pos. 96 – 419 bp)  
Restriktionsanalyse: PstI: 234 bp + 89 bp  
(Diese Methode ist noch nicht validiert.)

## 1.5 Kontrolle der DNA-Amplifizierbarkeit (u. a. bei negativem Screening-Ergebnis)

Für die Kontroll-PCR wird die Verwendung der **Primer A1/A2** (konservierte Chloroplasten-Leu-tRNA) vorgeschlagen, die bei Mais ein Amplifikat von 531 bp, bei Raps ein Amplifikat von 384 bp, bei Kartoffeln ein Amplifikat von 550 bp und bei Zuckerrüben ein Amplifikat von 644 bp liefern.

- EN ISO 21569, Anhang A.2 [13]; § 64 LFGB L 24.01-1 [15] bzw. Unterausschuss Methodenentwicklung [18]  
A1 5´-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG -3´  
A2 5´-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC -3´  
Annealing: 55°C bzw. 60°C

Alternativ können für die Kontroll-PCR die **EU-Primer** (hochkonservierte 18S-rRNA) verwendet werden [16], die bei allen Pflanzen [und anderen Eukaryonten (Tiere, Hefen)] ein 136 bp-Amplifikat liefern. Dazu muss jedoch, aufgrund der hohen Kopienzahl, die Probe stark verdünnt werden (Vorschlag: 1:25).

EU --            5'-TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A -3'  
EU +            5'-AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T -3'  
Annealing:                            60°C  
(Diese Methode ist noch nicht validiert.)

## 2. Spezifische Nachweise

### 2.1 Mais

Bei im Screening positiven Mais-Proben besteht die Notwendigkeit der Differenzierung zwischen in der EU zugelassenen und nicht zugelassenen GVP. Spezifische Nachweise sind in der Norm EN ISO 21569 [13] bzw. in § 64 LFGB 15.05-1 [17] beschrieben:

- **Bt 176** (Konstrukt-spezifischer Nachweis)

EN ISO 21569, Anhang C.4 [13] bzw. § 64 LFGB 15.05-1 [17]  
CRY03            5'-CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT -3' (CDPK-Promotor)  
CRY04            5'-GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT -3' (*cryIA* (b)-Gen)  
Annealing:                            63°C                            Produkt: 211 bp  
Hybridisierungs-Sonde: DIG- ATGGACAACAACCCCAACATC  
Restriktionsanalyse:    *Taq* I: 168 + 22 + 21 bp

- **Bt 11 / Bt 10** (Konstrukt-spezifischer Nachweis)

EN ISO 21569, Anhang C.3 [13] bzw. § 64 LFGB 15.05-1 [17]  
IVS2-2            5'-CTG GGA GGC CAA GGT ATC TAA T -3' (IVS2 intron)  
PAT-B            5'-GCT GCT GTA GCT GGC CTA ATC T -3' (*pat*-Gen)  
Annealing:                            64°C                            Produkt: 189 bp  
Hybridisierungs-Sonde: DIG- TATCTGTCTCAGGGGCAGACTC  
Restriktionsanalyse:    *Hinf* I: 73 + 116 bp

Bei Positiv-Proben sollte zur weiteren Spezifizierung eine Bt10-eventspezifische PCR durchgeführt werden:

[\[http://gmo-crl.jrc.it/summaries/Bt10%20Detection%20Protocol.pdf\]](http://gmo-crl.jrc.it/summaries/Bt10%20Detection%20Protocol.pdf)

JSF3            5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG G -3'  
JSR3            5'-GGG AAT AAG GGC GAC ACG G -3'  
Annealing:                            62°C                            Produkt: 130 bp

- **T14 / T 25** (Konstrukt-spezifischer Nachweis)

EN ISO 21569, Anhang C.5 [13] bzw. § 64 LFGB 15.05-1 [17]  
T25-F7: 5'- ATG GTG GAT GGC ATG ATG TTG -3'  
T25-R3: 5'- TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CC -3'  
Annealing:                            64°C                            Produkt: 209 bp  
Restriktionsanalyse:    *Hinf* I: 121 und 88 bp  
   *Mwo* I: 141 und 68 bp

oder:

CaMV-F 5'-ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C -3' (CaMV-35S-Promotor)

pac3-R 5'-CCC AAC CTT TGA TGC CTA TGT G -3' (*pat*-Gen)  
Annealing: 60°C Produkt: 370 bp  
Restriktionsanalyse: EcoRV: 140 bp + 230 bp  
Sal I: 60 bp + 310 bp [18]

Bei Positiv-Proben erfolgt eine Unterscheidung von T14 und T25 mit Hilfe einer eventspezifischen PCR [19], die für T25 spezifisch ist:

P 369: 5'- TGC TCT GCT TGA CCT TGG TTG C -3'  
P 370: 5'- CTG ATG CGG TAT TTT CTC CTT ACG -3'  
Annealing: 60°C Produkt: 549 bp  
Restriktionsanalyse: Ssp I: 132 und 417 bp

(Diese Methode ist noch nicht validiert. Die Erfassungsgrenze von 0,1 % wird nicht sicher erreicht)

Die Identifizierung der Linie T25 kann alternativ über die im Anhang 4 genannte eventspezifische Real-time PCR des CRL/JRC erfolgen.

- **MON 810** (Eventspezifischer Nachweis)

EN ISO 21569, Anhang D.1 [13] bzw. § 64 LFGB 15.05-1 [17]  
VW01: 5'- TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CG -3'  
VW03: 5'- TCC ATC TTT GGG ACC ACT GTC G -3'  
Annealing: 64°C Produkt: 170 bp  
Restriktionsanalyse: Mwo I: 109 und 61 bp  
Hae III: 126 und 44 bp

## 2.2 Raps und Zuckerrüben

Der qualitative Nachweis von verschiedenen Genkonstrukten in transgenem Raps erfolgt mit Hilfe von Methoden aus dem Unterausschuss "Methodenentwicklung" der LAG [18]. Bei transgenen Zuckerrüben können mit zwei dieser Nachweismethoden 6 GVP ebenfalls erfasst werden:

- **Topas 19/2, Falcon GS40/90, Liberator pHoe6/Ac (Raps, Aventis), T252 und T120-7 (Zuckerrüben, Aventis)** [18]

CaMV-F 5'-ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C -3' (CaMV-35S-Promotor)  
pac3-R 5'-CCC AAC CTT TGA TGC CTA TGT G -3' (*pat*-Gen)  
Annealing: 60°C Produkt: 370 bp  
Restriktionsanalyse: EcoRV: 140 bp + 230 bp  
Sal I: 60 bp + 310 bp

Mit dem *npt II*-Nachweis (siehe 1.4) kann eine Unterscheidung des in der EU zugelassenen **Topas 19/2- Raps (Aventis)** von nicht zugelassenen Aventis-Raps-Sorten im Anschluss an eine positive p35S-*pat*-PCR erfolgen.

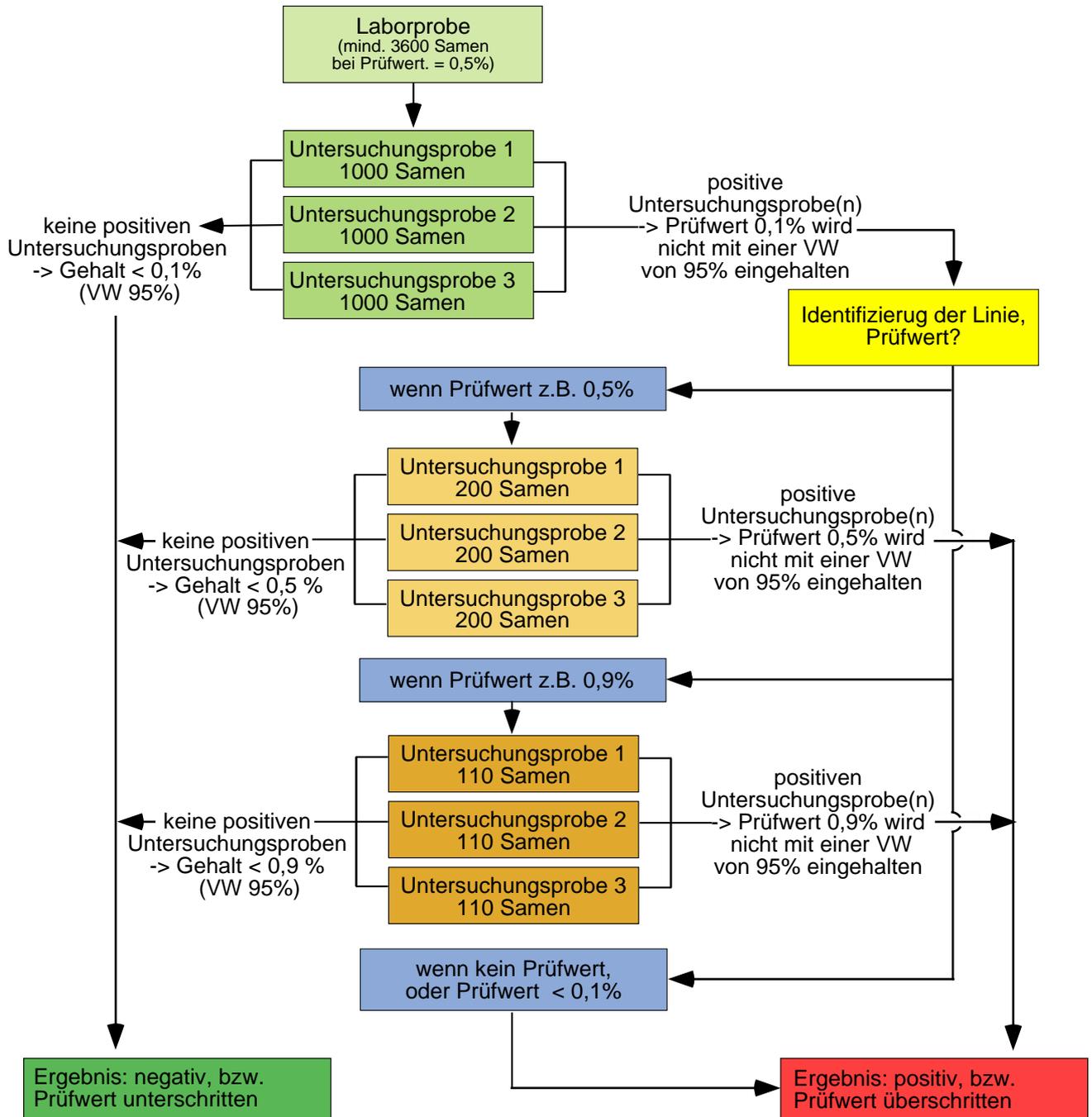
- **GT73, GT200 (Raps, Monsanto) sowie H7-1, #77, #203 und GTSB77 (Zuckerrüben, Monsanto bzw. Syngenta)** [18]

*Die Primer-Sequenzen für diesen Nachweis sind vertraulich!  
Anfragen sind an den UA Methodenentwicklung zu richten.*



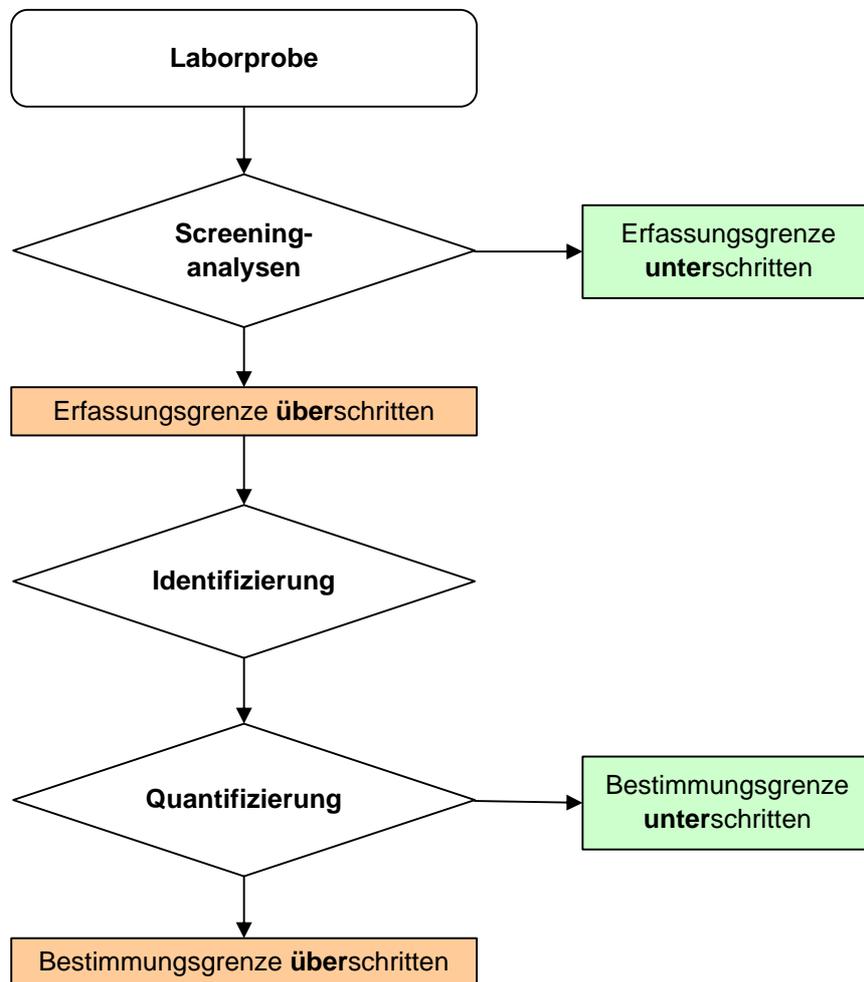
## Anhang 2: Prüfplan für Subsampling

### Beispiel für den Ablauf der Untersuchung von Saatgutproben auf gentechnisch veränderte Linien (Subsampling)



VW 95% = Vertrauenswahrscheinlichkeit 95% = confidence 95%

### Anhang 3: Prüfplan für quantitative PCR-Nachweise



## Anhang 4: Real-time PCR-Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis

### 1. Im Zuge der Zulassung nach VO (EG) Nr. 1829/2003 validierte Real-time PCR-Verfahren

Nach den Verordnungen (EG) Nr. 1829/2003 und (EG) Nr. 641/2004 sind Antragsteller im Rahmen des Zulassungsverfahrens für einen GVO verpflichtet, ein Nachweisverfahren, das eventspezifisch den GVO identifiziert und quantifiziert, bereitzustellen. Ein solches Verfahren wird dann durch das europäische Referenzlaboratorium (CRL) in Zusammenarbeit mit dem ENGL in einem internationalen Ringversuch validiert und, wenn die Methode sich als tauglich erwiesen hat, veröffentlicht. Bisher handelt es sich bei allen eingereichten Methoden um Real-time PCR-Verfahren. Inzwischen wurden für die folgenden GVO quantitative Real-time PCR-Nachweisverfahren sowie die entsprechenden Validierungsberichte unter <http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm> veröffentlicht (Stand: März 2006):

Gentechnisch veränderter Mais der Linien: Bt11, NK603, GA21, MON863, MON810, TC1507, T25, 1507 x NK603, 59122, NK603 x MON810, MON863 x MON810, MON863 x NK603, MON863 x MON810 x NK603

Gentechnisch veränderte Zuckerrübe der Linie: H7-1

### 2. Verfahren nach DIN EN ISO 21570

In den Anhängen der Norm DIN EN ISO 21570 sind Real-time PCR-Verfahren für den Nachweis des 35S-Promotors, der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 sowie verschiedener gentechnisch veränderter Maislinien beschrieben [21]. Für die Quantifizierung sollten die validierten Real-time PCR-Systeme (Kombination aus Referenz- und spezifischem System) der DIN EN ISO 21570 verwendet werden.

#### Referenzsysteme für Mais

##### **Alkoholdehydrogenase1-Gen (*adh1*):**

Anhang A.1 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zur absoluten quantitativen Bestimmung der DNA des *adh1*-Gens von Mais

ADH-FF3	5'-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC -3' (300 nmol/l)
ADH-RR4	5'-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC -3' (300 nmol/l)
ADH1-MDO	5'-FAM-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-TAMRA -3' <sup>a</sup> (200 nmol/l)
Produkt:	134 bp

##### **High-mobility-group-Protein-Gen (*hmg*):**

Anhang D.2 Ereignisspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Maislinie MON 810

ZM1-F	5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA -3' (300 nmol/l)
ZM2-R	5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T -3' (300 nmol/l)
Sonde ZM1	5'-FAM-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA -TAMRA-3' <sup>a</sup> (160 nmol/l)
Produkt:	79 bp

### **Maisstärkesynthase IIb -Gen (zSSIIb):**

Anhang C.9 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Maislinie T25

zSSIIb 1-5'	5'-CTC CCA ATC CTT TGA CAT CTG C -3' (500 nmol/l)
zSSIIb 1-3'	5'-TCG ATT TCT CTC TTG GTG ACA GG -3' (500 nmol/l)
zSSIIb-Taq	5'-FAM-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-TAMRA -3' <sup>a</sup> (200 nmol/l)
Produkt:	151 bp

### **Referenzsysteme für Soja**

#### **Lectin-Gen (*le1*):**

Anhang C.1 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2

Lectin-F	5'-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T -3' (900 nmol/l)
Lectin-R	5'-GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA -3' (900 nmol/l)
Lectin-TMP	5'-FAM-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG-TAMRA -3' <sup>a</sup> (100 nmol/l)
Produkt:	81 bp

Anhang C.2 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2

Lectin-Gen (*le1*):

GM1-F	5'-CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC -3' (600 nmol/l)
GM1-R	5'-GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC -3' (600 nmol/l)
Sonde GM1	5'-FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC -TAMRA -3' <sup>a</sup> (120 nmol/l)
Produkt:	74 bp

Anhang C.4 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2

Lectin-Gen (*le1*):

Le1n02-5'	5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC A -3' (500 nmol/l)
Le1n02-3'	5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TT -3' (500 nmol/l)
Le1-Taq	5'-FAM-AGC TTC GCC GCT TCC TTC AAC TTC AC-TAMRA-3' <sup>a</sup> (200 nmol/l)
Produkt:	118 bp

### **Spezifische Systeme**

#### **Anhang B: Screeningverfahren**

B.1 Screening-Verfahren zur relativen quantitativen Bestimmung der 35S-Promotor-DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2

35S-F	5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3' (300 nmol/l)
35S-R	5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C -3' (900 nmol/l)
35S-TMP	5'-FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA -3' <sup>a</sup> (100 nmol/l)
Produkt:	82 bp

#### **Anhang C: Konstruktspezifische Verfahren**

C.1 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2

RRS-F	5'-GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT -3' (900 nmol/l)
-------	--

- RRS R 5'-GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C -3' (900 nmol/l)  
 RRS-TMP 5'-FAM-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG -  
 TAMRA -3<sup>a</sup> (100 nmol/l)  
 Produkt: 83 bp
- C.2 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der  
 Sojabohnenlinie GTS 40-3-2  
 RR1-F 5'-CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA -3' (600 nmol/l)  
 RR1-R 5'-GAG CCA TGT TGT TAA TTT GTG CC -3' (600 nmol/l)  
 Sonde RR1 5'-FAM-CAA GCT GAC TCT AGC AGA TCT TTC-TAMRA -3<sup>a</sup>  
 (125 nmol/l)  
 Produkt: 74 bp
- C.3 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA von  
 Event176-Mais  
 CRY2-F 5'-CCC ATC GAC ATC AGC CTG AGC -3' (300 nmol/l)  
 CRY2-R 5'-CAG GAA GGC GTC CCA CTG GC- 3' (300 nmol/l)  
 Sonde BTSYN 5'-FAM-ATG TCC ACC AGG CCC AGC ACG-TAMRA-3<sup>a</sup>  
 (160 nmol/l)  
 Produkt: 129 bp
- C.4 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der  
 Sojabohnenlinie GTS 40-3-2  
 RRS 01-5' 5'-CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TGG -3' (500 nmol/l)  
 RRS 01-3' 5'-GAC TTG TCG CCG GGA ATG -3' (500 nmol/l)  
 RRS-Taq 5'-FAM-CGC AAC CGC CCG CAA ATC C -TAMRA -3<sup>a</sup>  
 (200 nmol/l)  
 Produkt: 121 bp
- C.5 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der  
 Maislinie MON 810  
 MON 810 2-5' 5'-GAT GCC TTC TCC CTA GTG TTG A-3' (500 nmol/l)  
 MON 810 2-3' 5'-GGA TGC ACT CGT TGA TGT TTG -3' (500 nmol/l)  
 MON 810-Taq 5'-FAM-AGA TAC CAA GCG GCC ATG GAC AAC AA-  
 TAMRA -3<sup>a</sup> (200 nmol/l)  
 Produkt: 113 bp
- C.6 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der  
 Maislinie Event176  
 E176 2-5' 5'-TGT TCA CCA GCA GCA ACC AG -3' (500 nmol/l)  
 E176 2-3' 5'-ACT CCA CTT TGT GCA GAA CAG ATC T -3' (500 nmol/l)  
 E176-Taq 5'-FAM-CCG ACG TGA CCG ACT ACC ACA TCG A-  
 TAMRA -3<sup>a</sup> (200 nmol/l)  
 Produkt: 100 bp
- C.7 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der  
 Maislinie Bt11  
 Bt11 3-5' 5'-AAA AGA CCA CAA CAA GCC GC -3' (500 nmol/l)  
 Bt11 3-3' 5'-CAA TGC GTT CTC CAC CAA GTA CT -3' (500 nmol/l)  
 Bt11-2-Taq 5'-FAM-CGA CCA TGG ACA ACA ACC CAA ACA TCA-  
 TAMRA -3<sup>a</sup> (200 nmol/l)  
 Produkt: 127 bp
- C.8 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der  
 Maislinie GA21  
 GA21 3-5' 5'-GAA GCC TCG GCA ACG TCA -3' (500 nmol/l)

GA21 3-3' 5'-ATC CGG TTG GAA AGC GAC TT -3' (500 nmol/l)  
 GA21-2-Taq 5'-FAM—AAG GAT CCG GTG CAT GGC CG-TAMRA -3'<sup>a</sup>  
 (200 nmol/l)  
 Produkt: 133 bp

C.9 Konstruktspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Maislinie T25  
 T25 1-5' 5'-GCC AGT TAG GCC AGT TAC CCA -3' (500 nmol/l)  
 T25 1-3' 5'-TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CCT -3' (500 nmol/l)  
 T25-2-Taq 5'-FAM-TGC AGG CAT GCC CGC TGA AAT C-TAMRA -3'<sup>a</sup>  
 (200 nmol/l)  
 Produkt: 149 bp

#### Anhang D Ereignisspezifische (eventspezifische) Verfahren

D.1 Ereignisspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Maislinie Bt11  
 Bt113JFor 5'-GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA -3' (750 nmol/l)  
 Bt113Jrev 5'-TCC AAG AAT CCC TCC ATG AG -3' (750 nmol/l)  
 Bt113JFT 5'-FAM-AAA TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA-TAMRA<sup>a</sup> -3' (250 nmol/l)  
 Produkt: 70 bp

D.2 Ereignisspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DNA der Maislinie MON 810  
 Mail-F1 5'-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT -3' (300 nmol/l)  
 Mail-R1 5'-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT -3' (300 nmol/l)  
 Sonde Mail-S2 5'-FAM-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-TAMRA P- 3'<sup>a</sup>  
 (180 nmol/l)  
 Produkt: 92 bp

### **3. vom Unterausschuss "Methodenentwicklung" validierte Verfahren**

Real-Time PCR zur quantitativen Bestimmung gentechnisch veränderter Rapslinien mit dem 35S/pat-Genkonstrukt in konventionellem Saatgut

Konstruktspezifisches Verfahren:

Referenzsystem für Raps (*pep*-Gen)

pep-F2 5'-GAG AAC TGA ATG AGA GGT GCA TTG T -3' (200 nmol/l)  
 pep-R2 5'-AGT TCC TAA ATT CTT GAG ACG IGT T -3' (200 nmol/l)  
 pep-S 5'-FAM-ACA CGC TCG TTG ATT CCA ATG TTC TTC A –  
 TAMRA-3' (100 nmol/l)  
 Produkt:

Spezifisches System (p35S-CaMV/pat):

35SP03.f 5'-AAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACA -3' (200 nmol/l)  
 pat-7.r 5'- CGGCCATATCAGCTGCTGTAG -3' (200 nmol/l)  
 GSS01.s 5'- FAM-CCGGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAGGC-  
 TAMRA -3'<sup>a</sup> (100 nmol/l)  
 Produkt: 111 bp

<sup>a</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin