

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
<b>Real-time PCR-Verfahren zum Event-spezifischen Nachweis der Rapslinien Falcon GS40/90 und Liberator pHoe6/Ac</b>	<b>AM030</b>
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, Dezember 2011	
Status: verabschiedet	

## 1 Einleitung

Gentechnisch veränderte Pflanzen mit einer Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat (BASTA®, LibertyLink®) enthalten häufig Genkonstrukte mit einer Kombination des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus und dem pat-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* (35S-pat). Die verfügbaren konstruktsspezifischen Nachweisverfahren werden in Screeningverfahren für die Saatgutanalytik eingesetzt. Sie erlauben aber keine Zuordnung des Befundes zu einer der bekannten, bislang nicht für den Anbau zugelassenen Rapslinien.

Die hier beschriebenen Event-spezifischen Nachweisverfahren ermöglichen eine Differenzierung der gentechnisch veränderten Rapslinien Falcon GS40/90 (ACS-BNØ1Ø-4) und Liberator pHoe6/Ac (ACS-BNØØ9-3).

Zur aktuellen Zulassungssituation dieser Rapslinien wird auf das Gemeinschaftsregister genetisch veränderter Lebensmittel und Futtermittel und Entscheidungen auf Grundlage der Richtlinie 2001/18/EG verwiesen [1, 2].

## 2 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt Real-time PCR-Verfahren zum Event-spezifischen Nachweis der gentechnisch veränderten Rapslinien Falcon GS40/90 (ACS-BNØ1Ø-4) und Liberator pHoe6/Ac (ACS-BNØØ9-3). Beide Linien enthalten als gentechnische Veränderung die 35S-pat Genkassette. Die Linie Liberator pHoe6/Ac enthält nur eine Kopie dieses Konstrukts, während die Linie Falcon GS40/90 zwei Kopien dieses Konstrukts enthält, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, an den Integrationsorten „Avalon“ (GS40/90-1) und „Falcon“ (GS40/90-2) [3]. Für den eindeutigen Nachweis der Linie Liberator pHoe6/Ac ist deshalb ein Event-spezifisches Nachweisverfahren ausreichend, während für die Linie Falcon GS40/90 und deren Nachkommen insgesamt zwei Event-spezifische Nachweisverfahren erforderlich sind. Da die beiden Integrationsorte der Linie GS40/90 segregieren können, enthalten Nachkommen der Linie Falcon GS40/90 ggf. nur noch einen der beiden Integrationsorte.

Bei den Verfahren handelt es sich jeweils um eine Real-time PCR, in der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden eingesetzt werden. Zur Abschätzung des GVO-Anteils auf Basis der Kopienzahlverhältnisse in einer DNA-Probe kann ein Referenzgen-Nachweis für Raps, z.B. der CruA-Nachweis, wie er für die Linie GT73 vom Europäischen Referenzlabor für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel validiert wurde, eingesetzt werden [4]. Bei bekanntem Genotyp kann der GVO-Anteil in der Probe unter Verwendung eines geeigneten Standards ermittelt werden.

Das Verfahren ist prinzipiell für die Untersuchung von Saatgut verwendbar. Es ist auch für die Untersuchung von anderen Produkten wie z.B. Futtermitteln und Lebensmitteln geeignet, wenn aus der jeweiligen Matrix amplifizierbare DNA extrahiert werden kann.

### 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die im Dokument G 00.00-2 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren des Bandes VI – Gentechnik - aufgeführten Begriffe und Definitionen [5].

### 4 Kurzbeschreibung

Aus der Untersuchungsprobe wird mit einer geeigneten Methode DNA extrahiert. Für die Analyse der DNA werden drei Event-spezifische Real-time PCR Nachweise für die Rapslinien Liberator pHoe6/Ac und Falcon GS40/90 durchgeführt. Die PCR-Produkte werden mittels Oligonukleotidsonden nachgewiesen, die jeweils mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Reporterfarbstoff bzw. Quencher) markiert sind und im DNA-Sequenzbereich zwischen den jeweiligen Primern binden. Beim Nachweis von Liberator pHoe6/Ac wird ein PCR-Produkt von 96 bp generiert und mit einer MGB-Sonde detektiert. Für den Nachweis der beiden Integrationsorte der Linie Falcon GS40/90 werden die Nachweise GS40/90-1 (Avalon) und GS40/90-2 (Falcon) eingesetzt. Die Größe des Amplifikats beträgt 166 bp für den Nachweis GS40/90-1 und 83 bp für den Nachweis des Events GS40/90-2.

Da die beiden Integrationsorte der Linie GS40/90 segregieren können, müssen beide Nachweise durchgeführt werden, um in der Probe die Anwesenheit der Linie bzw. entsprechender Nachkommen nachzuweisen.

Eine Abschätzung des GVO-Anteils der Linien kann auf Grundlage einer Messung der Kopienzahl des Raps Referenzgens Cruciferin A (CruA) [4] vorgenommen werden. Durch diese Messung kann auch die praktische Nachweisgrenze für eine DNA-Probe berechnet werden. Die Größe des Amplifikats dieses Real-time PCR-Nachweises beträgt 101 bp.

Als Kalibrierstandards können Verdünnungsreihen genomischer DNA der entsprechenden gentechnisch veränderten Linien oder Plasmidstandards eingesetzt werden, die ein Hybrid-PCR-Produkt mit den Sequenzen des Integrationsortes des jeweiligen GVO und des CruA-Gens enthalten [6].

Anmerkung: Es ist bei der Probenvorbereitung darauf zu achten, dass die Anzahl der Körner in der Analysenprobe auf die Nachweisgrenze der PCR-Methoden abgestimmt ist [7].

### 5 Geräte, Materialien und Reagenzien

Die hier beschriebenen Methoden wurden mit Real-time PCR-Geräten verschiedener Hersteller sowie dem 2 x TaqMan Universal PCR Mastermix der Firma Applied Biosystems validiert (siehe 9.3.). Werden andere Geräte oder Reagenzien verwendet, so sind die Geräteeinstellungen bzw. Reaktionsbedingungen gemäß den Herstellerangaben anzupassen.

#### 5.1 Geräte und Materialien

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen DNase-frei sein. Zur Vermeidung von Kontaminationen wird die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dringend empfohlen.

- Real-time PCR-Gerät
- Tischzentrifuge
- Kolbenhubpipetten (diverse Volumina)
- Einmalhandschuhe (puderfrei)

- PCR-Verbrauchsmaterial:
  - 96-Well PCR-Mikrotiterplatten
  - passende Abdeckungen für PCR-Mikrotiterplatten
  - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
  - DNase-freie Reaktionsgefäße (diverse)

## 5.2 Reagenzien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- steriles deionisiertes Wasser
- PCR-Pufferlösung<sup>1</sup> (einschließlich MgCl<sub>2</sub>, dNTP's und hitzestabile DNA-Polymerase)
- Primer und Sonden (siehe Tabelle 1a bis 1d)
- Kalibrierstandards:  
Als Kalibrierstandards können Verdünnungsreihen von genomischer DNA (von ca. 20 bis 10<sup>5</sup> Kopien/μl) der entsprechenden gentechnisch veränderten Linien oder geeignete Plasmid-DNAs eingesetzt werden.

Anmerkung: Die im Ringversuch verwendeten Kalibrierstandards bestanden aus Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA, die jeweils eine Kopie des Amplifikats der Event-spezifischen Zielsequenz und eine Kopie des CruA-Amplifikats in einem Konzentrationsbereich von ca. 20 bis 10<sup>5</sup> Kopien/5 μl enthielten. Die Herstellung des Amplifikates erfolgte nach dem in [4] beschriebenen Verfahren. Auf Anfrage können diese Plasmid-Standards über den Unterausschuss Methodenentwicklung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik [8] bezogen werden. Die Kalibrierstandards dienen primär als positive Kontroll-DNAs, mit denen auch das Erreichen der Nachweisgrenze überprüft werden kann.

**Tabelle 1a:** Oligonukleotide zum Nachweis von Falcon GS40/90 (Integrationsort 1)

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
Falcon GS40/90-Integrationsort 1 (Avalon) als Zielsequenz		
816AvaF	5'- GAA AAC GAC AAA AAC TGC GAA AT -3'	200 nmol/l
817AvaR	5'- TGG CTT GTG TTT TAT GTT TGG AAA -3'	800 nmol/l
818AvaS	5'-(FAM)- TGC GGG CAG TGC CTT CAG TTT TCC - (TAMRA)-3' <sup>a</sup>	200 nmol/l
<sup>a</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin		

<sup>1</sup> Im Ringversuch wurde als PCR-Pufferlösung der ABI TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Gleichwertige Produkte anderer Hersteller dürfen verwendet werden, wenn gezeigt wird, dass sie zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

**Tabelle 1b:** Oligonukleotide zum Nachweis von Falcon GS40/90 (Integrationsort 2)

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
Falcon GS40/90-Integrationsort 2 (Falcon) als Zielsequenz		
319FaIF	5' - TGC GGC CAA GCT CAG GAT-3'	200 nmol/l
320FaIR	5' - TTT TGA CTC ATA TAC CCT TTT GCA AA-3'	400 nmol/l
321FaIS	5' - (FAM) - AGA TTG TCG TTT CCC GCC TTC GGT TT - (TAMRA) - 3' <sup>a</sup>	200 nmol/l
<sup>a</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin		

**Tabelle 1c:** Oligonukleotide zum Nachweis von Liberator pHoe6/Ac

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
Liberator pHoe6/Ac-Integrationsort als Zielsequenz		
375LibF	5' - CCA TAT TGA CCA TCA TAC TCC CC - 3'	200 nmol/l
376LibR	5' - TGA CTT TGA ACA ATA ATT TCA GTA ACA TAT A - 3'	800 nmol/l
377LibS	5' - (FAM)-CCT GAT GTA AAC AAT AAA ATT - MGB-NFQ - 3' <sup>a</sup>	100 nmol/l
<sup>a</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, MGB-NFQ:Minor Groove Binding non-fluorescent quencher		

**Tabelle 1d:** Oligonukleotide zum Nachweis von CruA (Referenzgen, validierte Methode zum Nachweis von GT73 des EURL [4])

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
Cruciferin A (CruA) Raps Referenzgen als Zielsequenz		
MDB510	5' - GGC CAG GGT TTC CGT GAT - 3'	800 nmol/l
MDB511	5' - CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG - 3'	800 nmol/l
TM003	5' - FAM- AGT CCT TAT GTG CTC CAC TTT CTG GTG CA - TAMRA - 3' <sup>a</sup>	200 nmol/l
<sup>a</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin		

## 6 Durchführung

Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmaßnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind einzuhalten [9].

### 6.1 Herstellung der PCR-Mastermixe

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze der verschiedenen Real-time PCR-Nachweise ist in der Tabelle 2 beschrieben. Für alle Ansätze ist vorab ein Mastermix herzustellen, der alle Reagenzien außer der Proben-DNA bzw. der DNA der Kalibrierstandards oder positiven Kontrollen enthält.

- Die Kavitäten einer 96-Well Platte werden mit Mastermix vorbelegt.
- Proben-DNA (etwa 100 ng) bzw. DNA der unter Punkt 5.2 und 7 genannten Kalibrierstandards oder Kontrolllösungen wird zu dem Mastermix pipettiert.
- Die Mikrotiterplatte wird mit der Abdeckfolie verschlossen.

**Tabelle 2: Reaktionsansatz je Reaktionsgefäß**

Gesamtvolumen	25 µl
Proben-DNA oder Kontrollen	100 ng
PCR-Pufferlösung <sup>1</sup> (einschließlich MgCl <sub>2</sub> , dNTP's und DNA-Polymerase)	1 x
Primer 816AvaF+817AvaR od. 319FaIF+320FaIR od. 375LibF+376LibR	siehe Tabelle 1a,b od. c
Sonde 818AvaS oder 321FaIS oder 377LibS	siehe Tabelle 1a,b od. c
Wasser	Differenz bis 25 µl

### 6.2 Geräteeinstellungen

Das in Tabelle 3 aufgeführte Temperatur-Zeit-Programm ist für alle vier Nachweise zu verwenden.

**Tabelle 3: Temperatur-Zeit-Programm**

Schritt	Parameter	Temperatur	Zeit	Fluoreszenz-Messung	Zyklen	
1	UNG-Aktivierung (optional)	50 °C	2 min	nein	1	
2	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	nein	1	
3	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	15 s	nein	45
		Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation)	60 °C	60 s	ja	

## 7 Hinweise zur Qualitätssicherung

Proben und Kontrollen sollten mindestens in Doppelbestimmung analysiert werden.

Bei jeder PCR-Analyse sollen gemäß den allgemeinen Anforderungen der amtlichen Methodensammlung nach §28b GenTG [9] die dort angegebenen Kontrollen mitgeführt werden und zu den erwarteten Ergebnissen führen. Als negative Prozesskontrolle ist Raps zu verwenden, der die entsprechenden Events nicht enthält. Da Rapssaatgut der hier beschriebenen Linien als positive Prozesskontrolle nur bedingt verfügbar ist, wird auf den Einsatz von Plasmid-DNA als positive Kontroll-DNA verwiesen (siehe 5.2 Kalibrierstandards)

## 8 Auswertung

Die Auswertung der Real-time PCR-Untersuchungen erfolgt gemäß den Anweisungen des Geräteherstellers mit dem jeweiligen Datenanalyseprogramm. Erfolgte die Amplifikation der DNA-Zielsequenz in einer Probe (positives Ergebnis), wird die Zykluszahl errechnet, bei der ein vorgegebener Fluoreszenzschwellenwert überschritten wurde (z.B. Ct-Wert).

Sofern die Untersuchung darauf abzielt, den relativen Gehalt der gentechnisch veränderten Sequenz abzuschätzen, werden zur Erstellung von Kalibriergeraden die ermittelten Ct-Werte der Kalibrierstandards gegen den Logarithmus der jeweiligen Kopienzahlen aufgetragen. Die Steigung und der y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden liefern die Grundlage für die Berechnung der Kopienzahlen in den unbekanntenen Proben.

Die Zielsequenzen gelten als nachgewiesen, wenn

- mit den Event-spezifischen Primerpaaren und den entsprechenden Sonden ein amplifikationsbedingter Anstieg der gemessenen Fluoreszenz festzustellen ist,
- in den PCR-Kontrollansätzen ohne DNA-Zugabe (PCR-Reagenzienkontrolle, negative Extraktionskontrolle) kein amplifikationsbedingter Fluoreszenzanstieg festzustellen ist, und
- in den Ansätzen zur Amplifikationskontrolle (positive Kontroll-DNA) die erwarteten Ct-Werte erreicht werden.

Anmerkung: Da die beiden Integrationsorte der Linie GS40/90 segregieren können, enthalten Nachkommen der Linie Falcon GS40/90 ggf. nur noch einen der beiden Integrationsorte.

## 9 Validierung (Zuverlässigkeit der Methoden/Ringversuch)

### 9.1 Herstellung der Proben

Die Validierung der oben beschriebenen Nachweise erfolgte im Rahmen eines Ringversuchs des Unterausschusses Methodenentwicklung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG).

Untersucht wurden 9 Proben. Die Proben bestanden aus Wildtyp Raps-DNA, denen gentechnisch veränderte Raps-DNA, eingestellt auf definierte Kopienzahlen der nachzuweisenden Event-spezifischen Zielsequenz, zugemischt war. Die Proben enthielten entweder einen der drei Events oder alle drei. Die Kopienzahl der Event-spezifischen Zielsequenzen war nominal auf 20 Kopien bzw. 80 Kopien eingestellt. Dabei wurde ein haploides Genomgewicht von 1,15 pg zugrunde gelegt [4].

Die Kopienzahl der nachzuweisenden Event-spezifischen Zielsequenzen in 100 ng DNA in jeder Probe ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

**Tabelle 4: Zusammenstellung der Proben, die im Ringversuch gemessen wurden**

Proben	GVO-Gehalt (Kopien)			Theoretischer GVO-Gehalt (%) *		
	GS40/90-1 Avalon	GS40/90-2 Falcon	Liberator pHoe6/Ac	GS40/90-1 Avalon	GS40/90-2 Falcon	Liberator pHoe6/Ac
1	0	0	0	0	0	0
2	0	80	0	0	0,1	0
3	80	0	0	0,1	0	0
4	0	0	80	0	0	0,1
5	80	80	80	0,1	0,1	0,1
6	0	20	0	0	0,03	0
7	20	0	0	0,03	0	0
8	0	0	20	0	0	0,03
9	20	20	20	0,03	0,03	0,03

\* Der theoretische GVO-Gehalt (%) unter der Annahme, dass das Ausgangsmaterial homozygot ist und nur eine Kopie der gentechnisch veränderten Sequenz im Genom integriert hat.

Durch diese Zusammensetzung der Proben wurden die Nachweise gleichzeitig auf Kreuzreaktivität geprüft.

## 9.2 Herstellung der Standards

Drei Hybrid-PCR-Produkte, die das Amplifikat des jeweiligen Event-spezifischen Nachweises mit dem Amplifikat des Raps-Referenzgens CruA kombinierten [6] wurden separat in ein pUC abgeleitetes Plasmid kloniert (pKS-Avalon/CruA; pKS-Falcon/CruA; pKS-Libera/CruA).

Die DNA-Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde durch eine PicoGreen-Quantifizierung (Quant-iT, Fa. Invitrogen) bestimmt und auf Grundlage der Plasmidgröße die Kopienzahl in jeder Lösung berechnet.

Durch Verdünnung der Plasmid-DNA jedes Events wurden Stammlösungen mit jeweils  $10^9$  Kopien/ $\mu$ l hergestellt. Diese dienten als Ausgangslösung für die Herstellung von jeweils 6 Standardlösungen mit folgenden Kopienzahlen/ $5\mu$ l für jedes Event: 62500; 12500; 2500; 500; 100; 20.

Die drei Standardreihen wurden auf Linearität überprüft.

## 9.3 Lösungen und Geräte:

Primer und Sonden (Fa. BioTeZ) sowie der 2x TaqMan Universal PCR Mastermix (Fa. Applied Biosystems) wurden vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit zur Verfügung gestellt. Von den Teilnehmern wurden folgende Geräte zur Messung verwendet: ABI StepOnePlus, ABI 7000, ABI 7500, ABI 7500 fast, ABI 7700, ABI 7900HT, Biorad CFX96, Biorad iCycler, Roche LightCycler 480 und Stratagene MX3005P.

In drei unabhängigen Messansätzen wurde für jede Probe die Kopienzahl der Event-spezifischen Zielsequenz (GS40/90-1; GS40/90-2; Liberator pHoe6/Ac) und die Referenzgen-Kopienzahl (CruA) ermittelt.

#### 9.4 Ergebnisse des Ringversuchs

Jede Probe wurde von den Teilnehmern in einer Doppelbestimmung mit jeweils 5 µl der Proben-DNA-Lösungen mittels der drei Event-spezifischen Systeme unter den in den Tabellen 1 bis 3 beschriebenen Bedingungen analysiert. Die Plasmid-DNA-Lösungen für die Kalibrierung mit 20 bis 62500 Kopien wurden jeweils als Doppelbestimmung gemessen. Die Ergebnisse des Ringversuchs sind in den Tabellen 5 bis 11 dargestellt.

**Tabelle 5: Gemessene Kopienzahlen der GS40/90-1 (Avalon) positiven Proben**

	Nachweis GS40/90-1 (Avalon)			
	nominal 80 Kopien		nominal 20 Kopien	
	Probe 3	Probe 5	Probe 7	Probe 9
Labor 1	79	72	11	28
Labor 2	242	261	91	96
Labor 3	287	220	66	61
Labor 4	92	89	21	22
Labor 5	112	136	41	12
Labor 6	452	680	233	209
Labor 7	81	69	16	17
Labor 8	129	156	46	70
Labor 9	720	619	216	183
Labor 10	186	146	30	51
Labor 11	101	68	17	28
Labor 12	114	182	53	57
Mittelwert	216	225	70	70
Stdabw.	193	208	76	64

Die Ergebnisse zeigen eine große Standardabweichung bedingt durch die Messwerte der Labore 6 und 9. Die Werte liegen jedoch innerhalb der Grenzen für Ausreißer (Ausreißer-tests nach Grubbs, Cochran [10]) und wurden deshalb nicht aus der Auswertung entfernt. Von der Mehrzahl der Teilnehmer wurden höhere Kopienzahlen gemessen als erwartet. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der relativ geringen Effizienz des Nachweises zu suchen. Abhängig vom verwendeten Messgerät wurden bei den niedrigen Kopienzahlen Ct-Werte über 40 gemessen.

**Tabelle 6: Gemessene Kopienzahlen der GS40/90-2 (Falcon) positiven Proben**

	Nachweis GS40/90-2 (Falcon)			
	nominal 80 Kopien		nominal 20 Kopien	
	Probe 2	Probe 5	Probe 6	Probe 9
Labor 1	103	101	25	23
Labor 2	102	111	32	31
Labor 3	109	128	27	23
Labor 4	90	74	13	29
Labor 5	109	127	33	21
Labor 6	45	67	18	12
Labor 7	81	98	21	22
Labor 8	112	83	17	21
Labor 9	121	126	26	23
Labor 10	107	104	24	21
Labor 11	82	84	19	22
Labor 12	86	82	27	20
Mittelwert	96	99	23	22
Stdabw.	20	21	6	5

**Tabelle 7: Gemessene Kopienzahlen der Liberator Hoe6/Ac positiven Proben**

	Nachweis Liberator pHoe6/Ac			
	nominal 80 Kopien		nominal 20 Kopien	
	Probe 4	Probe 5	Probe 8	Probe 9
Labor 1	79	83	21	26
Labor 2	110	96	24	25
Labor 3	104	112	19	19
Labor 4	92	87	16	29
Labor 5	87	119	31	27
Labor 6	119	134	36	26
Labor 7	78	86	21	25
Labor 8	59	89	21	16
Labor 9	99	95	25	18
Labor 10	78	86	24	25
Labor 11	71	99	20	33
Labor 12	88	87	20	21
Mittelwert	89	98	23	24
Stdabw.	17	16	6	5

**Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse**

	Event-Nachweis nominal 80 Kopien			Event-Nachweis nominal 20 Kopien			CruA-Nachweis nominal 50 000 Kopien		
	Mittelwert (Kopien)	Stdabw. (Ko- pien)	rel. Stdabw. (%)	Mittelwert (Kopien)	Stdabw. (Ko- pien)	rel. Stdabw. (%)	Mittelwert (Kopien)	Stdabw. (Ko- pien)	rel. Stdabw. (%)
GS40/90-1 (Avalon)	221	196	88,7	70	70	100,0	50859	5108	10,0
GS40/90-2 (Falcon)	97	19	19,6	23	4	17,4	55541	9625	17,3
Liberator pHoe6/Ac	93	15	16,1	24	4	16,7	60165	9934	16,5

**Tabelle 9: Auswertung der Ergebnisse für den Nachweis GS40/90-1 (Avalon)**

Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	12
Anzahl der Laboratorien, die ein Ergebnis vorgelegt haben	12
Anzahl der Laboratorien, deren Ergebnis angenommen wurde	12
Gesamtanzahl angenommener Ergebnisse	108
Gesamtanzahl untersuchter Mischproben	24
Gesamtanzahl untersuchter Einzelproben	84
Gesamtanzahl positiver Proben	48
Gesamtanzahl negativer Proben	60
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativer Proben	0

**Tabelle 10: Auswertung der Ergebnisse für den Nachweis GS40/90-2 (Falcon)**

Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	12
Anzahl der Laboratorien, die ein Ergebnis vorgelegt haben	12
Anzahl der Laboratorien, deren Ergebnis angenommen wurde	12
Gesamtanzahl angenommener Ergebnisse	108
Gesamtanzahl untersuchter Mischproben	24
Gesamtanzahl untersuchter Einzelproben	84
Gesamtanzahl positiver Proben	48
Gesamtanzahl negativer Proben	60
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativer Proben	0

**Tabelle 11: Auswertung der Ergebnisse für den Nachweis Liberator pHoe6/Ac**

Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	12
Anzahl der Laboratorien, die ein Ergebnis vorgelegt haben	12
Anzahl der Laboratorien, deren Ergebnis angenommen wurde	12
Gesamtanzahl angenommener Ergebnisse	108
Gesamtanzahl untersuchter Mischproben	24
Gesamtanzahl untersuchter Einzelproben	84
Gesamtanzahl positiver Proben	48
Gesamtanzahl negativer Proben	60
Gesamtanzahl falsch positiver Proben	0
Gesamtanzahl falsch negativer Proben	0

## 9.5 Sensitivität

In den Tabellen 8 bis 11 sind die Ringversuchsergebnisse bzw. die Anteile positiver Resultate sowie die Präzisionsdaten für die untersuchten Proben dargestellt. In allen Proben, die die Event-spezifischen Zielsequenzen enthielten, waren diese auch nachweisbar. Die Bestimmung der Ringversuchsproben mit der geringsten auf 20 Kopien eingestellten Zielsequenz ergab in allen Laboren eine Amplifikation. Die Ct-Mittelwerte der Proben mit nominal 80 Kopien betragen 35,1 +/- 1,9 (Nachweis GS40/90-1 Avalon), 33,3 +/- 1,4 (Nachweis GS40/90-2 Falcon) und 33,4 +/- 1,0 (Nachweis Liberator pHoe6/Ac). Die auf eine Konzentration von 20 Kopien pro 5 µl eingestellten Proben ergab in allen Laboren eine Amplifikation. Die Ct-Mittelwerte der Proben-DNA betragen 37,2 +/- 1,8 (Nachweis GS40/90-1 Avalon), 35,5 +/- 1,5 (Nachweis GS40/90-2 Falcon) und 35,5 +/- 1,1 (Nachweis Liberator pHoe6/Ac).

Die Nachweisgrenze kann daher aufgrund der Ergebnisse relativ mit 0,03 % (DNA-Proben mit diesem relativen Verhältnis der Event-spezifischen Kopien zu Genomkopien der Spezies Raps) bzw. absolut mit 20 Kopien angegeben werden. Die Bestimmungsgrenze wurde nicht ermittelt, kann jedoch durch Multiplikation der Nachweisgrenze mit dem Faktor 3 geschätzt werden [9, DIN 32645]. Die relativen Standardabweichungen betragen beim Nachweis von 20 Kopien der Zielsequenzen 100 % (Nachweis GS40/90-1 Avalon), 17,4 % (Nachweis GS40/90-2 Falcon) und 16,7 % (Nachweis Liberator pHoe6/Ac). Die relativen Standardabweichungen für den GS40/90-2 Falcon- und Liberator pHoe6/Ac-Nachweis erfüllen die Anforderungen für die quantitative Bestimmung von GVO-Zielsequenzen von maximal 25 %. Die Ergebnisse des GS40/90-1 Avalon Nachweises zeigen eine große Standardabweichung. Von der Mehrzahl der Teilnehmer wurden höhere Kopienzahlen gemessen als erwartet. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der relativ geringen Effizienz des Nachwei-

ses zu suchen. Die Präzisionsdaten des GS40/90-1 Avalon Nachweises erfüllen somit nicht die Anforderungen für die quantitative Bestimmung von GVO-Zielsequenzen von maximal 25 % (33 % zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze). Es wird darauf hingewiesen, dass die Überprüfung der Eignung der Methoden zur Quantifizierung nicht vorrangig Gegenstand des Ringversuches war.

## 9.6 Spezifität

In den Proben wurden keine Kreuzreaktionen (falsch positive Amplifikationen) der drei Event-spezifischen Nachweise GS40/90-1 (Avalon), GS40/90-2 (Falcon) und Liberator pHoe6/Ac festgestellt (Tabelle 9 bis 11). In weiteren Bestimmungen der Spezifität konnten außerhalb des Ringversuches keine Kreuzreaktionen der drei Event-spezifischen Nachweisverfahren mit DNA verschiedener gentechnisch veränderter Pflanzen detektiert werden.

Tabelle 12: Prüfung der Nachweise auf Kreuzreaktivität mit anderen gentechnisch veränderten Pflanzen

		Event-spezifische Nachweise		
		GS40/90-1 (Avalon)	GS40/90-2 (Falcon)	Liberator pHoe6/Ac
	Auf Kreuzreaktion getestete Linien			
GVO Soja	5 % GTS 40-3-2; IRMM ERM-BF410f	-	-	-
	A2704-12; Bayer 32RRMM0020 (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
	A5547-127; Bayer 32RRMM0028 (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
GVO Mais	5% Bt11; IRMM ERM-BF412f	-	-	-
	5% Bt176; IRMM 411R SET	-	-	-
	5% NK603; IRMM BF415a	-	-	-
	5% MON810; IRMM 413-5	-	-	-
	> 90% MON863; RKI	-	-	-
	1% 59122;IRMM ERM-BF424c	-	-	-
	1% 59132 (E-32); CRL EM0108AB1B (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
	1% CBH-351; Sigma; GMO Genomic DNA Standard Set for Mais NR.69407	-	-	-
1% TC1507; IRMM-BF418c	-	-	-	
100% T25; Aventis/AgrEvo	-	-	-	
100% MON88017; AOCS 0406-D	-	-	-	
GVO-Papaya	55-1/63-1 (Sunup); LGL, Bayern (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
GVO Raps	100% Nachkomme der Transformante Liberator pHoe6/Ac (StUA BI)	-	-	+
	100% GS40/90; Bundessortenamt	+	+	-
	100% GT73; AOCS 0304-B	-	-	-

	100% MS1xRF1; RV des UAM, 2001	-	-	-
	100% MS8xRF3; RV des UAM, 2001	-	-	-
	1% OXY-235; Sigma; Qualitative GMO Reference Material Set, 55231-1K-F	-	-	-
	100% T45; AOCs 0208-A	-	-	-
	TOPAS 19/2; Bayer 32RRMM0018 (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
	Trierucin; Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
GVO Reis	LL601; Bayer 32RRMM0363 (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
	LL62; Bayer 32RRMM0199 (GenomiPhi-Kit amplifizierte DNA)	-	-	-
GVO-Zuckerrübe	100% T120-7; RV des UAM 2001	-	-	-

Die hier verwendeten Primer und Sonden wurden darüberhinaus durch einen Sequenzvergleich mit GenBank auf theoretische Kreuzreaktionen geprüft. Eine Übereinstimmung mit der Sequenz von TI-Plasmiden finden sich bei den Primern 816AvaF, 818AvaS, 321FalS und 375LibF. Die Sequenzen der anderen Primer sind in GenBank nicht zu finden. Der Datenbankvergleich der Amplikon-Sequenzen von GS40/90-1 (Avalon), GS40/90-2 (Falcon) und Liberator pHoe6/Ac ergab nur partielle Übereinstimmungen mit den Sequenzen in GenBank und der EURL-Sequenzdatenbank (Sequenzen von TI-Plasmiden).

## 9.7 Zusammenfassende Bewertung

Nach den Ergebnissen aus dem Ringversuch sind die drei hier beschriebenen Event-spezifischen Real-time PCR-Verfahren für einen qualitativen Nachweis und somit eine Differenzierung der gentechnisch veränderten Rapslinien Falcon GS40/90 und Liberator pHoe6/Ac geeignet. Weiterhin sind die Methoden für GS40/90-2 (Falcon) und Liberator pHoe6/Ac auch geeignet, eine quantitative Abschätzung der Kopienzahl der Event-spezifischen Zielsequenzen vorzunehmen. Hierbei sollten für die Auswertung nicht weniger als 20 Kopien der Event-spezifischen Zielsequenz vorliegen. Bei bekanntem Genotyp (Zygotiegrad) kann der GVO-Anteil einer Probe unter Verwendung der in dieser Methode beschriebenen Plasmid-Standards für die Nachweise GS40/90-2 (Falcon) und Liberator pHoe6/Ac ermittelt werden.

## 10 Literatur

- [1] Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates vom 12. März 2001 *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L 106 S. 1, zuletzt geändert am 11. März 2008 durch Artikel 1 der Richtlinie 2008/27/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt im Hinblick auf die der Kommissi-

on übertragenen Durchführungsbefugnisse *Amtsblatt der Europäischen Union* L 81 S. 45

- [2] Community register of genetically modified food and feed.  
[http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm) (Stand 30.09.2011)
- [3] Hess N., Ulrich A., Hoffmann T. (2002): Insertionsspezifische Nachweisverfahren für transgene Pflanzenlinien unter Anwendung der inversen PCR. *Bundesgesundheitsblatt* 45: 626-633
- [4] European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed  
<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu> (Stand 30.09.2011)
- [5] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-2 (2010-08): „Begriffe und Definitionen“.
- [6] Pardigol A., Guillet S., Pöpping B. (2003): A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *Eur. Food Res. Technol.* 216: 412-420
- [7] Unterausschuss Methodenentwicklung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik: Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen. <http://www.lag-gentechnik.de>
- [8] [www.lag-gentechnik.de](http://www.lag-gentechnik.de) (Stand 30.09.2011)
- [9] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG G 00.00–5 (2010-08): Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Ketten-reaktion Hinweise und Anforderungen Beuth-Verlag
- [10] DIN ISO 5725-5 Berichtigung 1:2006-04 Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen - Teil 5: Alternative Methoden für die Ermittlung der Präzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-5:1998), Berichtigungen zu DIN ISO 5725-5:2002-11 (ISO 5725-5:1998/Cor. 1:2005)