

Möglichkeiten der DNA-Analytik zur sicheren und reproduzierbaren Bestimmung von GVO in Saatgut vor dem Hintergrund von Schwellenwerten

Vortrag anlässlich des
Saatguthandelstages
Burg Warberg, 12. Mai 2009

Ulf Rathjens
Eurofins GeneScan GmbH

Eurofins GeneScan (1/3)

GVO Analytik ist unsere Kernkompetenz

Kompetenzzentrum für GVO-Analysen innerhalb der Eurofinsgruppe

Analytik

Testkits

Auftragsentwicklung

Beratung

Ausgeprägtes molekularbiologisches Know-how

- PCR / Realtime PCR
- DNA-Extraktion
- Methodenentwicklung

Mehr als 15 Erfahrung in der analytischen Molekularbiologie

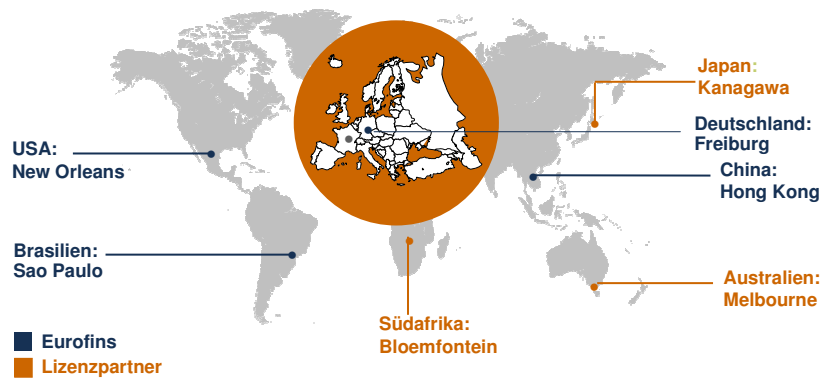
- Erstes (kommerzielles) Labor für den GVO Nachweis in Europa

Aktive Zusammenarbeit mit lokalen und europäischen Behörden

Aktive Mitarbeit bei Normung und Standardisierung

Eurofins GeneScan (2/3)

- Globales GVO Analyse Netzwerk
- Weltweites Lösungskonzept mit einheitlichen GeneScan Standards



11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

3

Eurofins GeneScan (3/3)

Qualitätskennzahlen für die molekularbiologische Analytik

- ISO 17025 akkreditiert
- ISO 9001 zertifiziert
- Regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen
- Anwendung stringenter Kontrollen
 - Analyse in Duplikaten (beginnend bei der Einwaage); positive, negative Kontrollreaktionen bei allen Proben, Inhibitionskontrollen durch Spiken oder IPC der individuellen Probe
 - Methoden und Kontrollen konform mit CEN/ISO, CRL, §64 LFGB
- Raumkonzept zur Vermeidung von Querkontaminationen
- Optimierte DNA-Extraktionsmethoden für unterschiedliches Probenmaterial
- Schnelle Entwicklung neuer Nachweissysteme
- Hoher Probendurchsatz und schnelle Bearbeitungszeit

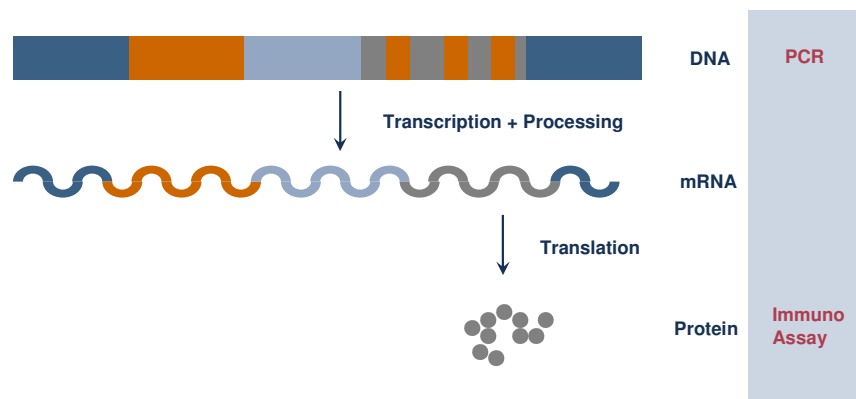
11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

4

GVO-Analytik 1/2

DNA ↔ Protein-Nachweis Genexpression



11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

5

GVO-Analytik

DNA ↔ Protein-Nachweis

DNA Nachweis

- Breites „Screening“ möglich
- Identifizierung
- Nachweis nicht-codierender Sequenzen
- EU Referenz-Methoden verfügbar
- DNA gibt es in (nahezu) jeder Zelle
- Konstanter DNA-Gehalt
- Hitzestabil
- Zuverlässige Analyse auch in stark verarbeiteten Proben

Protein Nachweis

- Sensitivität hängt von pflanzlichen Gewebe ab
- Manche GVO bilden kein „transgenes“ Protein
- Nachweise nur für eine begrenzte Anzahl von GVO verfügbar
- Stabilität hängt vom nachgewiesenen Protein ab
- Schneller und kostengünstiger

11-May-09

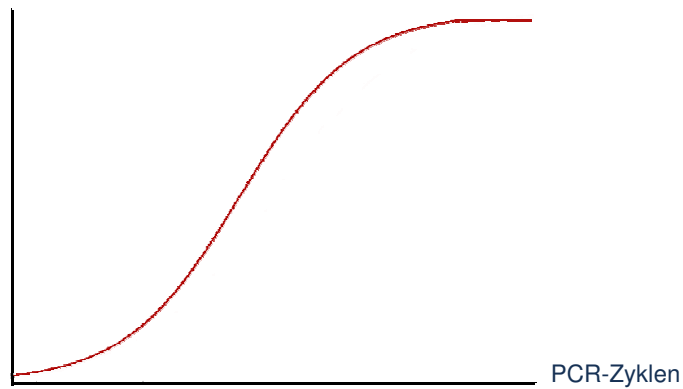
Eurofins GeneScan GmbH

6

GVO-Analytik PCR (1/2)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Produkte



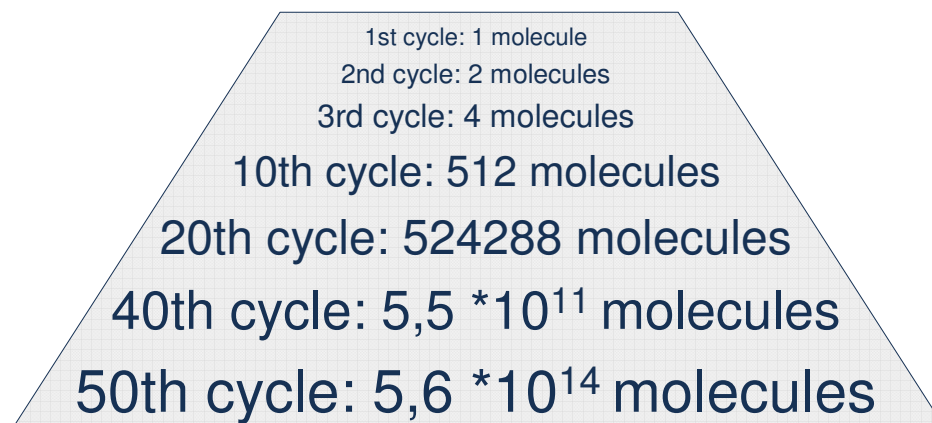
11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

7

GVO-Analytik PCR (2/2)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR)



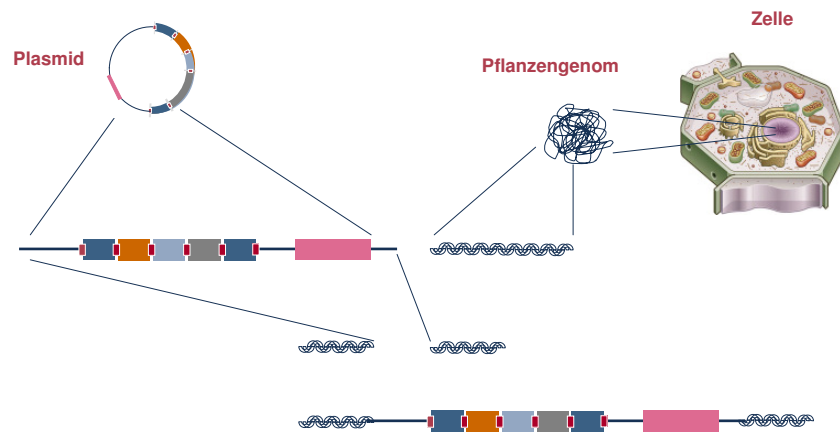
11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

8

Gene, GVO (1/2)

Transformation der Pflanzenzelle (Gentransfer)



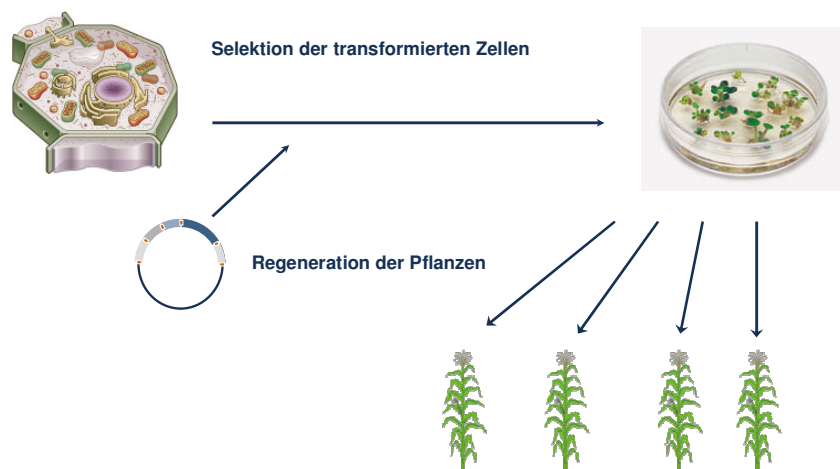
11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

9

Gene, GVO (2/2)

Regeneration der Pflanzen



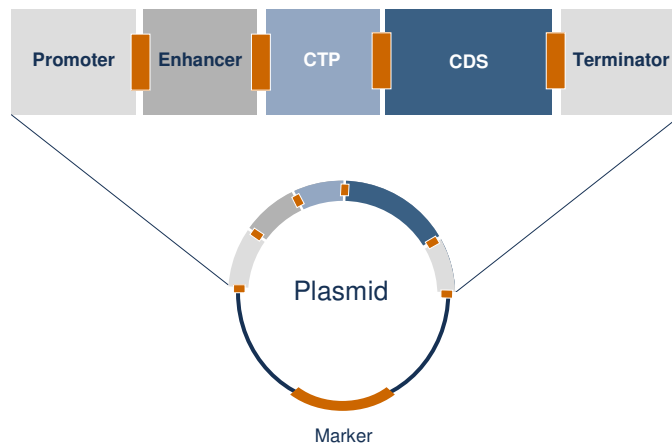
11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

10

Gene, GVO, Nachweis von GVO (1/4)

gv-Pflanzen - Plasmid



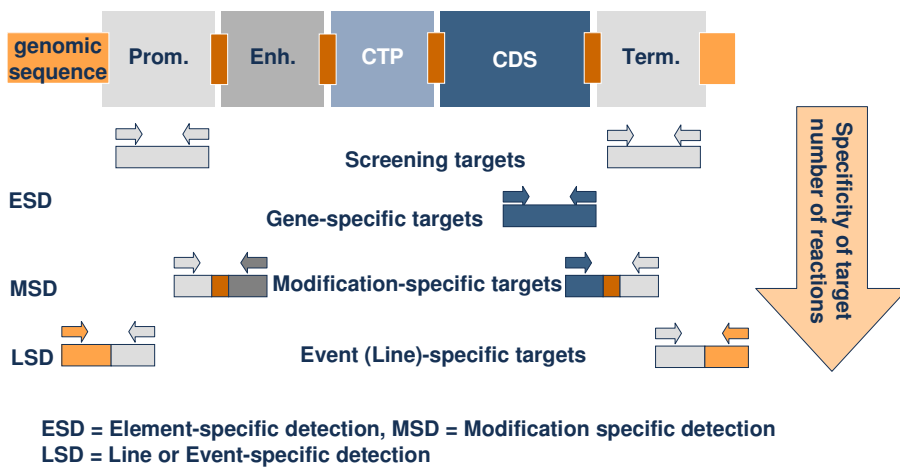
11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

11

Gene, GVO, Nachweis von GVO (2/4)

Spezifität der Nachweismethoden

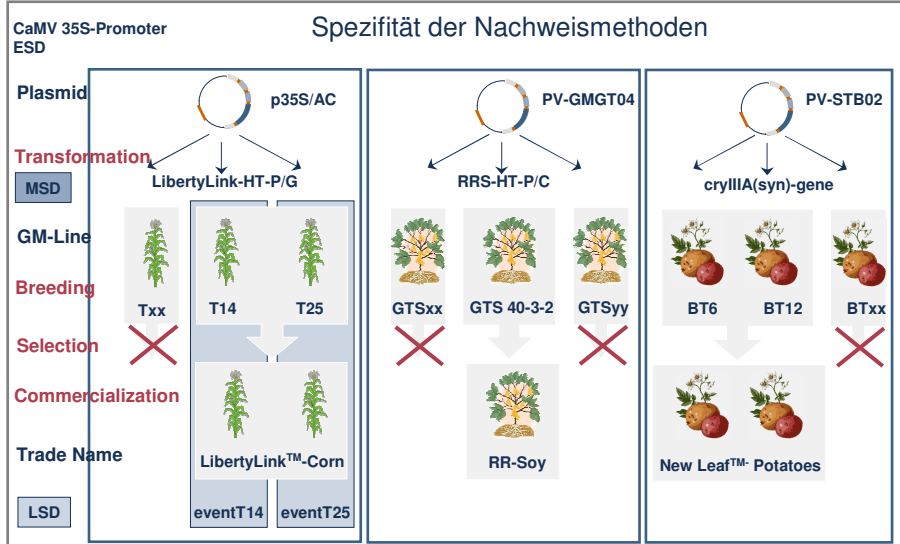


11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

12

Gene, GVO, Nachweis von GVO (3/4)



11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

13

Gene, GVO, Nachweis von GVO (4/4)

Spezifität der Nachweismethoden, Beispiel kommerzialisierter gv-Raps*

Handelsname	Linie	35S	nos	FMV	EPSPS	bar	pat(s)	nptII
Roundup Ready™	RT73 (GT73) GT200 (RT200)	-	-	✓	✓	-	-	-
LibertyLink™	Falcon GS 40/90 Liberator C/6Ac T45 Topas 19/2	✓	-	-	-	-	✓	(✓)
SeedLink™	MS1 x RF1 MS1 x RF2 MS8 x RF3	-	✓	-	-	✓	-	(✓)
Laurical™	23-18-17 23-198	✓	-	-	-	-	-	✓
Navigator™	Westar Oxy-235	✓	✓	-	-	-	-	-
Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)		✓	-	-	-	-	-	-
Roundup Ready™ Soja	GTS 40-3-2	✓	✓	-	✓	-	-	-

(✓): Nicht alle Linien

*: Auszug, bitte sprechen Sie uns für weitere Details zur Ausarbeitung einer geeigneten Analysestrategie im Vorfeld an.

11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

14

Rechtsrahmen (1/2)

Drei zentrale EU-Rechtsvorschriften sind zu berücksichtigen

- **EU-Freisetzungsrichtlinie (2001/18/EG)**
 - **Einfuhr von vermehrungsfähigen GVP oder Samen**
 - **Anbau von GVP**
- **Verordnung (EG) über gv-Lebens- und Futtermittel (1829/2003)**
 - **Lebens- und Futtermittel, die aus gv-Pflanzen hergestellt werden oder solche enthalten**
- **Verordnung (EG) 1830/2003**
 - **Rückverfolgbarkeit- und Kennzeichnung von GVO**

Sortenzulassung

- **Neben der gentechnikrechtlichen Zulassung ist bei gentechnisch verändertem Saatgut – wie bei konventionellem Saatgut – eine Zulassung nach dem deutschen Saatgutverkehrsgesetz erforderlich**

Rechtsrahmen (2/2)

Kennzeichnung von Saatgut– bisher kein zentraler Schwellenwert

- **Nach der EU-Freisetzungsrichtlinie (und dem darauf basierendem deutschen Gentechnikgesetz) muss gentechnisch verändertes Saatgut gekennzeichnet werden**
- **Im Gegensatz zu Lebens- und Futtermittel gibt es bisher keinen Kennzeichnungsschwellenwert**
- **Nationale Übergangsregelungen, z.b. Empfehlung LAG**

Definitionen

Grenzwert (hier GVO Grenzwert)

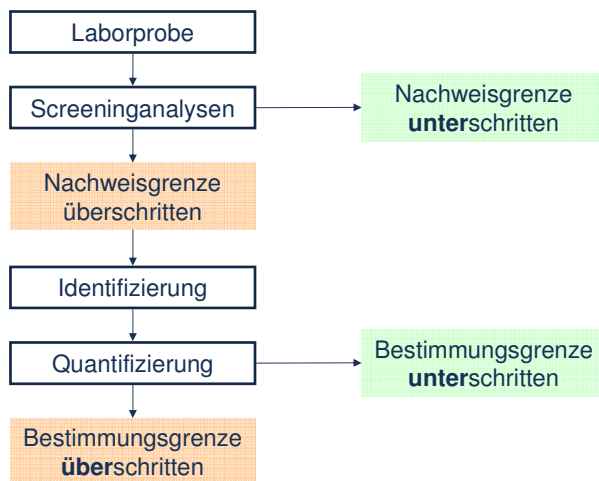
- Stellt die zulässige Obergrenze für das zufällige oder technisch unvermeidbare Vorhandensein von Vermischungen mit GVO dar
- Bei Überschreiten des Grenzwertes darf das Produkt nicht mehr in Verkehr gebracht werden

Schwellenwert (hier GVO Schwellenwert)

- Gibt den höchsten Grad der zufälligen oder technisch unvermeidbaren Vermischung mit GVO an, über dem das Produkt zu kennzeichnen ist

Zur Überprüfung von Schwellenwerten und / oder Grenzwerten ist die Quantifizierung des GVO-Anteils notwendig

Quantitativer Prüfplan



Quelle: LAG, Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen, 2006

Quantitative Real-time PCR (1/5)

Quantifizierung: Trans - Gen gegen Referenz - Gen

Genetische Modifizierung

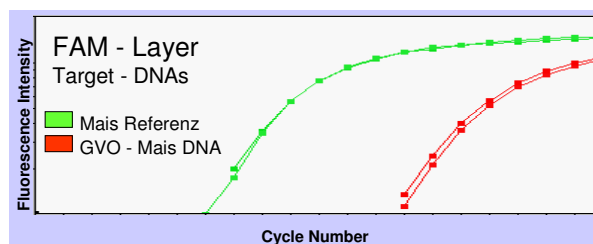


Transgen spezifische PCR

Endogene Referenz Gen



Spezies spezifische PCR



11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

19

Quantitative Real-time PCR (2/5)

Auszug: Definitionen in der PCR Analytik

Nachweisgrenze / LOD

- Derjenige kleinste Gehalt eines Analyten in einer Probe, der mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nachgewiesen werden kann
- Akzeptanzkriterium ENGL an eine quantitative PCR: LOD = mind. 1/20 eines Kennzeichnungsschwellenwertes (z.B. 0,045% bezogen auf 1829/2003)

Bestimmungsgrenze / LOQ

- Entspricht demjenigen kleinsten Gehalt eines Analyten in einer Probe, der mit einer vorgegebenen Präzision quantifiziert werden kann. Konzentrationswert bei dem der relative Fehler erstmals eine vorgegebene Schranke (i.d.R. 25%) unterschreitet
- Akzeptanzkriterium ENGL an eine quantitative PCR: LOQ = mind. 1/10 Kennzeichnungsschwellenwert (z.B. 0,09% bezogen auf 1829/2003)

11-May-09

Eurofins GeneScan GmbH

20

Quantitative Real-time PCR (3/5)

Akzeptanzkriterien einer quantitativen PCR-Methode

Quelle: Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO testing, ENGL
13. October 2008

- Phase 1: Akzeptanzkriterien einer quantitativen Nachweismethode die vom Antragsteller eingereicht wird
 - u.a. $RSD_r \leq 25\%$ über den gesamten Messbereich der Methode
 - z.B. RSD_r 25,56% bei 0,15% T25*
- Phase 2: Methodvalidierung durch Ringversuch
 - u.a. $RSD_R < 35\%$ über den gesamten Messbereich der Methode. Bei Konzentrationen von $< 0,2\%$ ist eine RSD_R von $< 50\%$ akzeptabel.
 - z.B. RSD_R 25,56% bei 0,15% T25*

* Quelle Reference Laboratory for GM Food and Feed: Validation Report Maize T25

Quantitative Real-time PCR (4/5)

Bezugsgröße des GVO-Schwellenwertes

- Anzahl der Samen
 - 0,1% entspräche z.B. 1 gv-Samen / 1000 Samen
- Masse der Samen
 - 0,1% entspräche z.B. 1g gv-Samen / 1000g Samen
- Die Anzahl haploider Genome (HGE Konzept CRL)
 - 0,1% entspräche z.B. 1 haploides gv-Genom / 1000 haploiden Genomen

Unterschiede möglich

Vereinfachtes Beispiel, heterozygote Samen

Diploider Samen durch gv-Pollenbestäubung einer nicht gv-Pflanze entstanden:

- 1 Samen / 1000 = 0,1%
- 1000 Samen entsprechen 2000 haploiden Genomen
 - -> 1 haploides Genom / 2000 -> 0,05%

Quantitative Real-time PCR (5/5)

Folgende Fragestellungen sollten bei der Bewertung der quantitativen Ergebnisse berücksichtigt werden

- Effekte durch Zygotiestatus und Ploidiegrad bei der Kalibrierung und Auswertung der Quantitativen PCR
 - Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen LAG 2006
 - 2004/787/EG [...] prozentualen Anteil der gv-DNA-Kopien an der Anzahl zieltaxonspezifischer DNA-Kopien, bezogen auf haploide Genome (HGE)
- Berücksichtigung der Messunsicherheit der Methode
 - Durch Probengröße (Anzahl Samen bei Saatgutpartien)
 - Quantitative real-time PCR

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Ulf Rathjens
Eurofins GeneScan GmbH

Kontakt:
Ulf Rathjens
ulfrathjens@eurofins.de
T: 0049 (0) 40 49294 732