



**Konzept zur
Analytik von gentechnisch
veränderten Futtermitteln**

– erarbeitet vom Arbeitskreis PCR-Analytik des VDLUFA



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43
91058 Erlangen

Telefon: 09131/764-0
Telefax: 09131/764-102

E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

Autorinnen und Autoren des Berichts:

Dr. Michael Egert, LUFA Nord-West, Oldenburg
Dr. Diana Hormisch, LUFA Speyer, Speyer
Dr. Dietrich Mäde, LAV Sachsen-Anhalt, Halle
Dr. Sven Pecoraro, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Dr. Karsten Westphal, Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Leipzig

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Sven Pecoraro
Tel.: 089/31560-585
E-Mail: sven.pecoraro@lgl.bayern.de

Stand:

April 2006 (2. Auflage, inhaltlich unveränderter Nachdruck im Februar 2007 der 1. Auflage vom April 2006)

ISBN 978-3-939652-05-2 (Print Ausgabe)
ISBN 978-3-939652-22-9 (Online Ausgabe)

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung – auch von Teilen – Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars erbeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Publikation wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden.



*Sehr geehrte Damen und Herren,
liebe Leserinnen und Leser,*

seit dem 18. April 2004 ist die Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union anzuwenden. Sie regelt insbesondere das Zulassungsverfahren und die Kennzeichnung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und daraus abgeleiteten Produkten. Zusätzlich trat am 15. April 2004 die Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebens- und Futtermitteln in Kraft.

Gentechnisch veränderte Futtermittel wurden mit den neuen Verordnungen wie Lebensmittel kennzeichnungspflichtig. Ein wesentlicher Punkt bei der Umsetzung dieser Verordnungen ist die Überwachung der Einhaltung der Verordnungen auf analytischer Ebene. Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit untersucht daher seit April 2004 zusätzlich auch Futtermittel auf das Vorhandensein von gentechnisch veränderten Bestandteilen, z.B. aus Mais, Soja oder Raps. Ziel der Analysen ist einerseits die Kontrolle der Einhaltung der Deklarationspflicht für zugelassene GMO, andererseits die Feststellung, ob in der EU nicht zugelassene GMO oder daraus hergestellte Materialien in Futtermitteln enthalten sind.

Vor diesem Hintergrund erarbeitete der Arbeitskreis PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) unter der Federführung des LGL das vorliegende Konzept zur Analytik gentechnisch veränderten Futtermittel, welches dem derzeitigen Stand der Wissenschaft und Technik entspricht.

Die Publikation stellt eine umfangreiche Zusammenstellung über die geltenden EU-Verordnungen, Zulassungen, Kennzeichnungsbestimmungen und Analysestrategien dar und ist Fachleuten der Futtermittelüberwachung und Futtermittelanalytik, aber auch allen Interessierten eine wertvolle Handreichung.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. Volker Hingst

Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln¹

Arbeitspapier des Arbeitskreises PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)

Egert M., LUFA Nord-West; Hormisch D.E., LUFA Speyer; Mäde D., LAV Sachsen-Anhalt;
Pecoraro S., LGL Bayern; Westphal K., Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

1. Grundsätze	4
1.1 Zielsetzung	4
1.2 Gesetzliche Bestimmungen	4
1.2.1 Zulassung von GVO als Futtermittel in der EU	4
1.2.2 Kennzeichnungspflichtige Futtermittel und Form der Kennzeichnung	5
2. Unterschiede zwischen Futtermitteln und Lebensmitteln mit Auswirkungen auf die Überwachung der VO (EU) Nr. 1830/2003	7
3. Probenahmeverfahren zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln	8
3.1 Probenahmeverfahren von Futtermitteln	8
3.2 Übersicht über GVO-Probenahmeverfahren aus anderen Bereichen	8
4. Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln	10
4.1 Analyseverfahren und -methoden	10
4.2 Probenvorbereitung	11
4.3 DNA-Extraktion	11
4.4 Analysensysteme – qualitative und quantitative Verfahren	12
4.4.1 Konventionelle PCR	12
4.4.2 Real-Time PCR	12
4.5 Allgemeine Methodenübersicht	12
4.5.1 Europäische Standards	12
4.5.2 Nationale Standards nach § 64 LFGB [13]	14
4.5.3 Methoden zum Nachweis von transgenen Kulturpflanzen und zur Untersuchung von Saatgut - Methodensammlung des Bund/Länderausschusses Gentechnik (BLAG)	14
4.6 Empfehlung von Methoden zum Nachweis von GVO und daraus hergestellten Materialien in Futtermitteln	14
4.7 Sicherung der Analysenqualität	15
4.7.1 Referenzmaterial	15
4.7.2 Kontrolluntersuchungen	16
4.7.3 Ringversuche und Laborvergleichsuntersuchungen	16
4.8 Auswertung und Beurteilung der Messergebnisse	17
4.8.1 Auswertung der Messergebnisse bei der qualitativen Bestimmung	17
4.8.2 Auswertung der Messergebnisse bei der quantitativen Bestimmung	17
4.8.3 Anmerkungen	18
4.8.4 Anforderungen an den Prüfbericht	18

¹ Gentechnisch veränderte Futtermittel sind gemäß VO 1829/2003, Art. 2, Punkt 7 Futtermittel, die GVO enthalten, daraus bestehen oder hergestellt werden.

5. Empfehlungen zur Futtermittelauswahl.....	19
5.1 Einfluss des Verarbeitungsgrades	19
5.2 Einfluss der Zusammensetzung.....	19
5.3 Gentechnisch veränderte Pflanzenspezies in Futtermitteln und geeignete Nachweisverfahren	20
5.3.1 Soja.....	20
5.3.2 Mais.....	21
5.3.3 Raps.....	21
5.3.4 Baumwolle.....	21
5.3.5 Zuckerrübe.....	22
5.3.6 Kartoffel.....	22
6. Glossar.....	23
7. Literatur.....	24
8. Übersicht Internetadressen.....	25
8.1 EU-Ebene.....	25
8.2 Nationale Ebene.....	26
8.3 Sonstige	26
9. Anmerkungen.....	26
 Anlagen.....	 27

- Anlage A: Screeningelemente und Konstrukte in gentechnisch veränderten Pflanzen
- Anlage B: Qualitative Methoden zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Futtermitteln (konventionelle PCR)
- Anlage C: Quantitative Methoden zur Bestimmung von gentechnischen Veränderungen in Futtermitteln (Real-Time PCR)
- Anlage D: Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Soja-Einzel-futtermitteln
- Anlage E: Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Mais-Einzel-futtermitteln
- Anlage F: Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Raps-Einzel-futtermitteln
- Anlage G: Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Misch-futtermitteln

1. Grundsätze

1.1 Zielsetzung

Seit dem 18.04.2004 ist die Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 [1] über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union anzuwenden.

Mit der Veröffentlichung der Verordnung (EG) Nr. 65/2004 [2] über ein System für die Entwicklung und Zuweisung spezifischer Erkennungsmarker für genetisch veränderte Organismen trat in den Mitgliedsstaaten am 15.04.2004 auch die Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 [3] über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebens- und Futtermitteln in Kraft.

Ein wesentlicher Punkt bei der Umsetzung dieser Verordnungen ist die Überwachung der Einhaltung der Verordnungen auch auf analytischer Ebene.

Zum einen sollen Futtermittel im Zusammenhang mit GVO auf deren Deklarationspflicht hin kontrolliert werden, zum anderen, ob in der EU nicht zugelassene GVO oder daraus hergestellte Materialien im Futtermittel enthalten sind.

Da die genannten Verordnungen für Futtermittel andere Regelungen in Bezug auf zugelassene GVO-Linien vorsehen als für Lebensmittel, ergeben sich in Konsequenz teilweise unterschiedliche Anforderungen an die analytische Überwachung. Weiterhin sind Unterschiede in der Zusammensetzung von Lebens- und Futtermitteln in der Analytik zu berücksichtigen.

Entsprechend wurde vom Arbeitskreis PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA das vorliegende Konzept erarbeitet, welches dem derzeitigen Stand der Wissenschaft und Technik entspricht.

1.2 Gesetzliche Bestimmungen

1.2.1 Zulassung von GVO als Futtermittel in der EU

GVO werden auf Antrag von der EU zum Einsatz in Futtermitteln sicherheitsbewertet und zugelassen. Die zugelassenen Futtermittel werden in das Gemeinschaftsregister für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel eingetragen. Informationen über den Stand der Zulassung von GVO bzw. eine Aufnahme in die Liste nach Art. 18 der VO (EG) Nr. 641/2004 [4] sind über folgende Internetadressen zugänglich:

- Europäisches Gemeinschaftsregister:
http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
- Übersicht über die in der EU zugelassenen genetisch veränderten Futtermittel:
http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/2001-18-ec_authorized_en.pdf
- Übersicht über die in der EU in der Zulassung befindlichen gentechnisch veränderten Futtermittel:
http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/2001-18-ec_pending_authos_en.pdf
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/catindex_en.html

Je nach Zulassungsstatus und Sicherheitsbewertung der GVO-Linien gelten gemäß VO (EG) 1829/2003 unterschiedliche Regelungen (siehe Tab. 1):

Zugelassene GVO und daraus hergestellte Materialien sind in Futtermitteln erlaubt; diese Futtermittel sind jedoch zu kennzeichnen (siehe 1.2.2). Ausgenommen von der Kennzeichnung sind zufällige oder technisch unvermeidbare Beimengungen an GVO bis zu einem Gehalt von nicht höher als 0,9 %.

Nicht zugelassene GVO und daraus hergestellte Materialien, die eine befürwortende Stellungnahme erhalten haben und für die Analysenmethoden zum Nachweis öffentlich zur Verfügung stehen (Art. 47 Abs. 1 der VO (EG) Nr. 1829/2003 [1]), werden innerhalb einer Übergangsfrist von 3 Jahren mit einem Gehalt bis zu 0,5 % in Futtermitteln toleriert, vorausgesetzt eine solche Beimengung ist nachweislich zufällig oder technisch unvermeidbar in das Produkt gelangt. Bei Überschreiten dieses Schwellenwertes besteht Verkehrsverbot.

Für nicht zugelassene GVO und daraus hergestellte Materialien, die keine positive Sicherheitsbewertung haben, besteht innerhalb der EU ebenfalls ein Verkehrsverbot.

Tab. 1: Einteilung von GVO und daraus hergestellten Materialien gemäß VO (EG) 1829/2003

	Zulassungsstatus von GVO und daraus hergestellten Materialien	Schwellenwert	Folgen bei Überschreiten des Schwellenwertes
1	in der EU zugelassen	> 0,9%	Kennzeichnungspflicht
		≤ 0,9 %	Kennzeichnungspflicht, wenn nicht zufällig oder technisch unvermeidbar
2	in der EU nicht zugelassen, positiv sicherheitsbewertet mit hinterlegter Analysenmethode	> 0,5%	Verkehrsverbot
		≤ 0,5%	Verkehrsverbot, wenn nicht zufällig oder technisch unvermeidbar
3	in der EU nicht zugelassen, ohne positive Sicherheitsbewertung	kein	Verkehrsverbot

1.2.2 Kennzeichnungspflichtige Futtermittel und Form der Kennzeichnung

Die VO (EG) 1829/2003 besagt, dass grundsätzlich alle Futtermittel, die in der EU zugelassene GVO enthalten, daraus bestehen oder aus solchen hergestellt wurden, zu kennzeichnen sind.

Ausnahmen davon gelten unterhalb der Schwellenwerte (siehe Tab. 1) bei Nachweis des Unternehmens, dass diese Gehalte zufällig oder technisch unvermeidbar in das Futtermittel gelangt sind.

Eine Kennzeichnungspflicht besteht bei Überschreiten des Schwellenwertes von 0,9 % (Art. 24 Abs. 2 der VO (EG) Nr. 1829/2003 [1]).

Die gesetzlich festgelegten Schwellenwerte gelten laut VO (EG) Nr. 1829/2003 Art. 24 Abs. 2 [1] im Kontext mit VO (EG) Nr. 641/2004 Art. 19 Abs. 2 [4] für das Futtermittel und jeden Futtermittelbestandteil, aus dem es besteht.

Dies bedeutet, dass auch die einzelnen deklarierten Komponenten eines Mischfuttermittels selbst den Anforderungen der oben genannten VO bezüglich der Schwellenwerte unterliegen, auch wenn mehrere Komponenten einer Pflanzenspezies (wie z.B. Maiskleber, Maisschrot, Maismehl) im Futtermittel enthalten sind.

Bei Vorliegen mehrerer unterschiedlicher GVO oder daraus hergestellter Materialien einer Pflanzenart in einem Futtermittelbestandteil sind zur Überprüfung des Schwellenwertes die festgestellten Anteile der einzelnen GVO-Linien zu addieren.

Die Kennzeichnungspflicht besteht für gentechnisch veränderte Futtermittel, selbst wenn die gentechnische Veränderung aufgrund der Verarbeitung im Futtermittel analytisch nicht mehr nachweisbar ist (nachweisunabhängige Kennzeichnung).

Tab. 2: Nach VO (EG) Nr. 1829/2003 [1] und VO (EG) Nr. 1830/2003 [3] zu kennzeichnende Futtermittelbestandteile und Form der Kennzeichnung

Futtermittelbestandteil	Beispiel	Form der Kennzeichnung	gesetzliche Bestimmungen
zu kennzeichnen			
1 das Futtermittel besteht aus einem GVO	vermehrungsfähige gv-Körner, z.B. vermehrungsfähige gv-Sojabohnen oder gv-Maiskörner als Einzelfuttermittel	„genetisch veränderter“ [Bezeichnung des Organismus] zusätzlich: Angabe des spezifischen Erkennungsmarkers	Art. 25 Abs. 2 a der VO (EG) Nr. 1829/2003 Art. 4 Abs. 1 bis 3 der VO (EG) Nr. 1830/2003
2 das Futtermittel enthält GVO	Einzel- und Mischfutter mit vermehrungsfähigen gv-Körnern	„genetisch veränderter“ [Bezeichnung des Organismus] zusätzlich: Angabe des spezifischen Erkennungsmarkers	Art. 25 Abs. 2 a der VO (EG) Nr. 1829/2003 Art. 4 Abs. 1 bis 3 der VO (EG) Nr. 1830/2003
3 das Futtermittel ist aus GVO hergestellt (unabhängig von der Nachweisbarkeit im Endprodukt)	Sojaöl aus gv-Sojabohnen oder Mischfuttermittel, das Sojaextraktionsschrot aus gv-Sojabohnen enthält	„aus genetisch verändertem“ [Bezeichnung des Organismus] hergestellt“	Art. 25 Abs. b der VO (EG) Nr. 1829/2003; Art. 5 Abs. 1 bis 4 der VO (EG) Nr. 1830/2003
4 Produkte eines Tieres, das ein GVO ist *: aus GVO hergestellt	Fleisch und Milch von einem transgenen Tier	„aus genetisch verändertem“ [Bezeichnung des Organismus] hergestellt“	Art. 13 Abs. 1 der VO (EG) Nr. 1829/2003
nicht zu kennzeichnen			
5 Produkte von Tieren, die „mit“ GVO gefüttert werden	Tier gefüttert mit gv-Mais	keine Kennzeichnung von tierischen Produkten, wie z.B. Eier, Milch, Fleisch	Erwägungsgrund 16 der VO (EG) Nr. 1829/2003
6 Produkte, die „mit Hilfe“ eines GVO hergestellt sind	Enzym, Vitamin oder Aminosäure als Zusatzstoff, produziert von einem konventionellen Mikroorganismus aus einem gv-Substrat (z.B. gv-Mais). gv-Substrat ist im Endprodukt nicht enthalten	keine Kennzeichnung	
7 Produkte, die „mit Hilfe“ eines GVO hergestellt sind	Enzym, Vitamin oder Aminosäure als Zusatzstoff, produziert von gv-Mikroorganismus aus einem konventionellen Substrat (z.B. Mais). gv-Mikroorganismus ist im Endprodukt nicht enthalten	Der Kennzeichnungsstatus von Fermentationsprodukten ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird erwartet, dass die EU-Kommission in Übereinstimmung mit VO (EG) Nr. 1829/2003, Artikel 48 bis zum Herbst 2005 dazu abschließend Stellung nimmt.	

gv: gentechnisch verändert

* Derzeit (Juni 2005) ist kein transgenes Tier in der EU zur Lebensmittelproduktion zugelassen.

Die Anforderungen an die Form der Kennzeichnung von Futtermitteln sind im Art. 25 der VO (EG) Nr. 1829/2003 [1] beschrieben. Die Kennzeichnung ist deutlich sichtbar, lesbar und unauslöschlich auf einem Begleitpapier oder gegebenenfalls auf der Verpackung, dem Behältnis oder einem daran befestigten Etikett vorzunehmen.

Für Futtermittel bzw. Futtermittelbestandteile, die einen GVO enthalten oder aus einem GVO bestehen, hat die Kennzeichnung mit den Worten „genetisch veränderter [Bezeichnung des Organismus]“ unmittelbar nach dem spezifischen Namen des Futtermittels zu erfolgen (siehe Tab. 2).

Futtermittel bzw. -bestandteile, die aus GVO hergestellt wurden, müssen mit den Worten „aus genetisch verändertem [Bezeichnung des Organismus] hergestellt“ gekennzeichnet werden (siehe Tab. 2).

Zusätzlich ist bzw. sind der bzw. die GVO-spezifische(n) Erkennungsmarker schriftlich mitzuteilen (Art. 4 der VO (EG) Nr. 1830/2003 [3]), wenn das Futtermittel bzw. dessen Bestandteile GVO im Sinne der Richtlinie 2001/18/EG [5] ist bzw. sind oder solche enthalten. Die Mitteilungspflicht der Erkennungsmarker gilt nicht für verarbeitete, nicht mehr vermehrungsfähige gentechnisch veränderte Materialien.

Fermentationsprodukte, die nach der Herstellung mit Hilfe eines GVO diesen GVO noch enthalten, sind kennzeichnungspflichtig (siehe Tab. 2). Der Geltungsbereich der VO (EG) 1829/2003 für Fermentationsprodukte von GVO aus geschlossenen Anlagen ist von Seiten der Europäischen Kommission noch nicht abschließend geklärt. Eine Entscheidung wird im Herbst 2005 erwartet. In Deutschland gelten die Fermentationsprodukte derzeit als nicht kennzeichnungspflichtig.

2. Unterschiede zwischen Futtermitteln und Lebensmitteln mit Auswirkungen auf die Überwachung der VO (EU) Nr. 1830/2003

- Bis zur Umsetzung der VO (EG) Nr. 1829/2003 wurde nicht zwischen konventionellen Futtermitteln und gentechnisch veränderten Futtermitteln differenziert. Für die Futtermittelproduktion wurden bis dahin auch Ausgangsprodukte verwendet, die aufgrund ihres Gehaltes an GVO oder daraus hergestellten Materialien in der Lebensmittelproduktion nicht eingesetzt wurden (z.B. RoundupReady[®] Soja). Aus diesem Grund wird in zahlreichen Futtermitteln ein anderer Konzentrationsbereich an GVO erwartet und festgestellt als in Lebensmitteln.

- Unterschiede in der Produktion von Futtermitteln und Lebensmitteln sind bei der Beurteilung der Zufälligkeit oder technischen Unvermeidbarkeit von GVO oder daraus hergestellten Materialien in Futtermitteln zu berücksichtigen.

- Sämtliche in Futtermitteln zugesetzte Enzyme gelten, anders als bei Lebensmitteln, als Zusatzstoffe.

- Das Spektrum an Pflanzenarten, welches bezüglich GVO und daraus hergestellten Materialien in Lebens- und Futtermitteln zu überwachen ist, unterscheidet sich teilweise (z.B. Baumwolle).
- Für Futtermittel ist ein anderes Spektrum an GVO zugelassen als für Lebensmittel.
- Die Pflanzenteile, die zur Lebens- und Futtermittelherstellung eingesetzt werden, unterscheiden sich teilweise (z.B. Maispflanzen, Raps- und Sojaextraktionsschrote sowie Zuckerrübenschnitzel als Neben- und Abfallprodukte der Lebensmittelherstellung).
- In der Futtermittelherstellung werden andere Verarbeitungs- und Prozessierungsverfahren (z.B. Melassierung zur Pelletierung, Extrudation, Herstellung von Extraktionsschroten) eingesetzt.

Diese Aspekte haben Auswirkungen auf die Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln und sind für die Probenauswahl, die Probenvorbereitung, die Analysenstrategie und die Bewertung der Analyseergebnisse zu berücksichtigen.

3. Probenahmeverfahren zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

3.1 Probenahmeverfahren von Futtermitteln

Für Futtermittel gilt die Futtermittel-Probenahme- und Analyseverordnung [6]. Die dort vorgesehenen Probenmengen reichen für eine repräsentative quantitative GVO-Analytik von Futtermitteln mit Ganzkornmaterial nicht aus.

Eine Empfehlung der EU-Kommission für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkt oder in Produkten im Kontext der VO (EG) Nr. 1830/2003 liegt vor [9].

Bis zum Vorliegen einer umsetzbaren europäischen Vorschrift erfolgt die Probenahme nach erwähnter Futtermittel-Probenahme- und Analyseverordnung [6] unter Berücksichtigung des GVO-Orientierungsrahmens zur Überwachung des Herstellens, Behandelns, Verwendens und Inverkehrbringens von Futtermitteln im Zusammenhang mit gentechnisch veränderten Organismen [14].

3.2 Übersicht über GVO-Probenahmeverfahren aus anderen Bereichen

Folgende, im Zusammenhang mit der Probenahme von GVO-haltigem Material stehende Konzepte sind nicht explizit auf die Beprobung von Futtermitteln ausgerichtet bzw. befinden sich im Entwurfstadium (Anmerkungen sind kursiv markiert):

- **EU-Richtlinie 98/53/EG:** zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten [7].
- *nicht anwendbar, da GVO keine Kontaminanten darstellen*
- **PrEN ISO 21568: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Sampling** (siehe Tab. 3):
- *befindet sich derzeit in grundlegender Überarbeitung; für die Anwendbarkeit auf Futtermittel können derzeit keine Aussagen gemacht werden*
- **SLMB (Schweizerisches Lebensmittelbuch) [8] :**
- *gilt für Lebensmittel*
- *wesentliche Aspekte wurden bei der Erarbeitung der PrEN ISO 21568 (siehe Tab. 3) berücksichtigt*
- **2004/787/EG: Empfehlung der Kommission für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von genetisch veränderten Organismen und von aus genetisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkt oder in Produkten im Kontext der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 [9]**
- *in der vorgelegten Fassung für die Praxis zu aufwendig*
- **ISTA rules** (<http://www.seedtest.org>):
- *gelten für Saatgut*
- **GIPSA**
(<http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area=home&subject=landing&topic=landing>):
- *bezieht sich auf Saatgut bzw. die Beprobung von Ganzkornmaterial*
- **Methodensammlung der BLAG: Probennahme von Pflanzenmaterial des Unterausschuss Methodenentwicklung des Bund/Länderausschusses Gentechnik (BLAG)** (<http://www.lag-gentechnik.de>):
- *beinhaltet Vorschriften für die Probenahme von Pflanzenmaterial zum Nachweis transgener Sequenzen in einzelnen Pflanzen oder kleinen Pflanzenpopulationen, zur Bestätigung der eingeführten transgenen Sequenzen sowie zur Prüfung auf Verunreinigungen durch GVO (letzter Punkt zur Zeit in Bearbeitung)*

Weitere Literatur zur Probenahme:

- **Kruse (2001):** Probenahmepläne zur Nachprüfung der Verunreinigung von konventionellem Saatgut und GVO-Saatgut. VDLUFA-Schriftenreihe 57, Teil 2, 562-567
- **Lischer (2001):** Sampling Procedures to Determine the Proportion of Genetically Modified Organisms in Raw Materials, Part I: Correct Sampling, Good Sampling Practise. Mitt. Lebensm. Hyg. 92, 290-304
- **Lischer (2001):** 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

4. Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

4.1 Analyseverfahren und -methoden

Durch eine gentechnische Modifikation unterscheidet sich ein gv-Organismus in mindestens einer Eigenschaft von seiner ursprünglichen Form. Prinzipiell stehen für den Nachweis gentechnischer Veränderungen folgende Analysemöglichkeiten zur Verfügung:

- auf Ebene der Erbinformation (DNA) wird die gentechnische Veränderung direkt nachgewiesen,
- auf Proteinebene wird ein aufgrund der gentechnischen Veränderung gebildetes Protein nachgewiesen,
- auf physiologischer Ebene wird die neue Eigenschaft nachgewiesen, die den gv-Organismus von dem konventionellen Organismus unterscheidet (z.B. Resistenz gegenüber einem Herbizid)

Für den Nachweis von GVO oder daraus hergestellten Materialien sind zwar einige Nachweisverfahren auf Proteinebene verfügbar wie z.B. prEN ISO 21572 - ELISA-Verfahren für Roundup Ready® Soja (siehe Tab. 3), doch haben sich in der Praxis Nachweisverfahren auf Genomebene durchgesetzt, die auf der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basieren.

Als Voraussetzung für den PCR-Nachweis muss amplifizierbare DNA in der Probe vorhanden sein, und die DNA-Sequenz der nachzuweisenden gentechnischen Veränderung muss zumindest teilweise bekannt sein.

Zur Bestimmung der gentechnischen Veränderung wird eine für die gentechnische Veränderung charakteristische DNA-Sequenz nachgewiesen.

Folgende Nachweise sind möglich (siehe Abb. 1):

1. Screeninguntersuchung:

Mit dieser Untersuchung werden DNA-Abschnitte (z.B. Promotoren oder Terminatoren) nachgewiesen, die in einer Vielzahl von gentechnisch veränderten Organismen vorkommen.

2. Genspezifischer Nachweis:

Mit dieser Untersuchung wird ein Genabschnitt nachgewiesen (z.B. Resistenzgen), der in verschiedenen gentechnisch veränderten Organismen (auch artübergreifend) vorkommen kann.

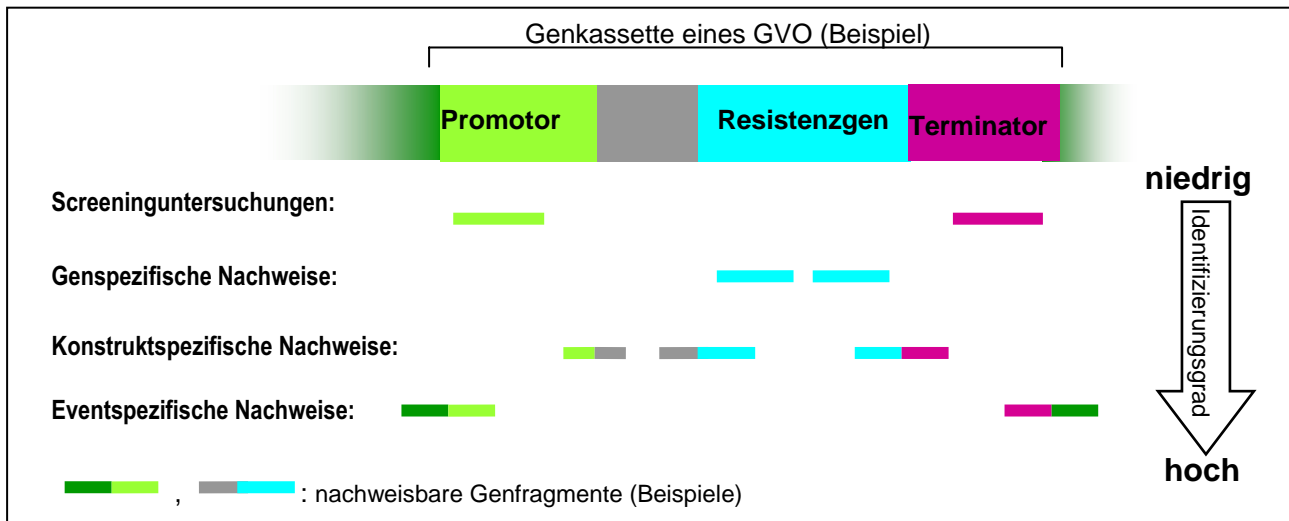
3. Konstruktspezifischer Nachweis:

Mit dieser Untersuchung wird eine Genkassette nachgewiesen, die dem Organismus eine neue Eigenschaft vermittelt und in unterschiedlichen gentechnisch veränderten Organismen (auch artübergreifend) vorkommen kann.

4. Eventspezifischer Nachweis:

Mit dieser Untersuchung wird der Integrationsort der Genkassette in das Genom des Empfängerorganismus nachgewiesen.

Abb. 1: Beispiel eines gentechnisch veränderten DNA-Abschnitts einer Pflanze: Lokalisation von nachweisbaren Genfragmenten und Identifizierungsgrad der verschiedenen Nachweisverfahren



Der Identifizierungsgrad der genannten Nachweisverfahren nimmt in absteigender Reihenfolge zu und ist bei den eventspezifischen Verfahren am größten.

4.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgt gemäß EN ISO 21571: Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Nukleinsäureextraktion (siehe Tab. 3).

Matrixabhängig sind geeignete Zerkleinerungs- und Homogenisierungsverfahren anzuwenden (z.B. Schlagmühle, Kugelmühle). Es ist zu berücksichtigen, dass der Zerkleinerungs- bzw. Vermahlungsgrad der Probenpartikel einen Einfluss auf die Extrahierbarkeit von genetischem Material hat.

4.3 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion muss sicherstellen, dass DNA in ausreichender Menge und Qualität für die PCR zur Verfügung steht.

Die Extraktion erfolgt gemäß EN ISO 21571: Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Nukleinsäureextraktion (siehe Tab. 3).

Als Standardmethoden zur DNA-Isolation aus Futtermitteln werden die CTAB-Methode aus EN ISO 21571 (siehe Tab. 3) oder aus § 64 LFGB L 00.00-31 (siehe 4.5) und die Wizard-Methode [8] empfohlen. Zudem wird auf die VDLUFA-Verbandsmethode „Nachweis tierischer Bestandteile - PCR Methode“ [12] sowie auf eine von der EU veröffentlichte Methode zur Extraktion von DNA aus Pflanzengewebe (siehe Tab. 4) hingewiesen.

Kommerziell erhältliche Kits können bei nachgewiesener Eignung alternativ verwendet werden.

Neben der DNA-Extraktionsmethode haben verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die Ausbeute und Reinheit der extrahierten DNA aus der Untersuchungsprobe:

- Pflanzenspezies
- DNA-Gehalt des Pflanzengewebes
- Verarbeitungsgrad des Futtermittels (Eliminierung/ Degradierung der DNA, siehe 5.1)
- Zusammensetzung des Futtermittels (die Extraktion störende Matrices, siehe 4.8.3 und 5.2)
- Partikelgrößenverteilung in der Probe

4.4 Analysensysteme – qualitative und quantitative Verfahren

4.4.1 Konventionelle PCR

Qualitative Nachweise werden standardmäßig mit konventioneller PCR durchgeführt. Anschließend werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte (Amplifikate) nach Ethidiumbromid-Färbung im UV-Licht nachgewiesen. Es erfolgt ein Längenvergleich der PCR-Produkte von Proben, Kontrollen und einem Längenmarker. Positive Ergebnisse sind zu bestätigen. Geeignete Verfahren hierfür sind Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer spezifischen DNA-Sonde, Restriktionsanalyse oder DNA-Sequenzierung des PCR-Produktes.

4.4.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR eignet sich zum qualitativen und quantitativen Nachweis gentechnischer Veränderungen. Durch die Verwendung einer DNA-Sonde erfolgt eine Bestätigung des PCR-Produktes bereits während der Amplifikation. Eine relative Quantifizierung ist möglich, indem die Kopienzahl aus dem GVO-Nachweis mit der Kopienzahl eines ziertaxonspezifischen Gens ins Verhältnis gesetzt wird (Bestimmung des Anteils gentechnisch veränderter DNA an ziertaxonspezifischer DNA).

Mit Hilfe geeigneter Standards ist auch eine absolute Quantifizierung möglich.

4.5 Allgemeine Methodenübersicht

4.5.1 Europäische Standards

Die europäischen Standards zur Lebensmitteluntersuchung können zur Untersuchung von Futtermitteln nach Validierung angewendet werden (siehe Tab. 3). Bereitgestellte Methoden zur Bestimmung von GVO und daraus hergestellten Materialien, die unter den Artikel 47 der VO (EG) Nr. 1829/2003 [1] fallen, sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 3: Europäische Standardmethoden (Stand 30.06.2004)

(Quelle: <http://www.cenorm.be/CENORM/BusinessDomains/TechnicalCommitteesWorkshops/CENTechnicalCommittees/WP.asp?param=6256&title=CEN/TC%20275>)

Project reference	Title
EN ISO 21571	Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction (ISO/DIS 21571)
EN ISO 21569	Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods (ISO/DIS 21569)
prEN ISO 21570	Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods (ISO/DIS 21570:2003)
prEN ISO 21568	Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Sampling (ISO/DIS 21568)
prEN ISO 24276	Foodstuffs - Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions (ISO/DIS 24276:2002)
DIN EN ISO 21572:2004	Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Proteinverfahren

Tab. 4: Von der EU-Kommission veröffentlichte oder genannte Methoden zur Bestimmung von GVO und daraus hergestelltem Material, die unter den Artikel 47 der VO (EG) Nr. 1829/2003 fallen (Stand 31.03.2005)

(Quelle: <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>)

Event	Anmelder	eingereicht	Titel
-	Monsanto	18/04/2004	A Recommended Procedure for DNA Extraction from Plant Tissues <i>Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences</i>
NK603 Mais	Monsanto	18/04/2004	A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready Corn NK603 <i>Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences</i>
MON 863 Mais	Monsanto	18/04/2004	A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for YieldGard Rootworm Corn MON 863 <i>Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences</i>
GT73 Raps	Monsanto	18/04/2004	A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready Canola RT73 <i>Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences</i>
GA21 Mais	Monsanto	18/04/2004	A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready Corn GA21 <i>Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences</i>
531 Baumwolle	Monsanto	18/04/2004	A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for Bollgard Cotton 531 <i>Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences</i>
1445 Baumwolle	Monsanto	18/04/2004	A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready Cotton 1445 <i>Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences</i>
Bt 11 Mais	Syngenta	22/04/2004	Validation of a GM detection method Bt11 in sweet maize
GS 40/90 Raps	Bayer	22/04/2004	Block et al. (2003). Eur Food Res Technol 216: 421-427 Zeitler et al. (2002). Eur Food Res Technol 214: 346-351
MS8, Rf3, MS8xRf3 Raps	Bayer	22/04/2004	James et al. (2003). J. Agric. Food Chem. 51: 5829-5834
T25x MON810 Mais	Pioneer	22/04/2004	Chiueh, L-C., Chen, Y-L., Yu, J-H. & Shih, D.Y-C. (2001). Food and Drug Analysis, 9: 50

4.5.2 Nationale Standards nach § 64 LFGB [13]

L 00.00-31 (Juli 2001): Screeningverfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln durch den Nachweis von DNA-Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Organismen vorkommen.

L 15.05-1 (Mai 2002): Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais (*Zea mays* L.) mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Restriktionsanalyse oder Hybridisierung des PCR-Produktes.

L 23.01.22-1 (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.

L 24.01-1 (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.

L 25.03.01-1 (November 1999): Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Tomaten durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde oder Restriktionsanalyse des PCR-Produktes.

4.5.3 Methoden zum Nachweis von transgenen Kulturpflanzen und zur Untersuchung von Saatgut - Methodensammlung des Bund/Länderausschusses Gentechnik (BLAG)

<http://www.lag-gentechnik.de>

- PCR-Nachweis der pSSUAra/bar-Genkassette in transgenen Kulturpflanzen
- PCR-Nachweis der p35S/pat-Genkassette in transgenen Kulturpflanzen
- PCR-Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in pFMV/CTP2/EPSPS - Genkassette transgenen Pflanzen
- PCR-Nachweis der p35S-nptII-Übergangssequenz, der pNapin-BayTe-Übergangssequenz und des *p/sC*-Gens
- Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen

Auf eine zu erstellende Methodensammlung gemäß § 28 a GenTG [10] wird hingewiesen.

4.6 Empfehlung von Methoden zum Nachweis von GVO und daraus hergestellten Materialien in Futtermitteln

Grundsätzlich wird für die Futtermittelanalytik die Verwendung von offiziellen europäischen (siehe 4.5.1) und nationalen (siehe 4.5.2) Methoden empfohlen. Ein limitierender Faktor für die Methodenvvalidierung und -durchführung ist die derzeitige unzureichende Verfügbarkeit

von zertifiziertem Referenzmaterial (siehe 4.7.1). Teilweise kann hier auf kommerzielle Testsysteme zurückgegriffen werden.

Zur Zeit zu empfehlende Methoden zum qualitativen Nachweis von GVO und daraus hergestellten Materialien in Futtermitteln sind in Anlage B angegeben. In Anlage C werden quantitative Methoden empfohlen, welche sich auch zum qualitativen Nachweis eignen.

4.7 Sicherung der Analysenqualität

4.7.1 Referenzmaterial

Bislang sind von einigen wenigen GVO zertifizierte Referenzmaterialien in Form von Mehlen oder DNA erhältlich (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Zertifizierte Referenzmaterialien (Stand 30.06.2005)

(Quellen: [IRMM Institute for Reference Material and Measurements, Geel, Belgien:](http://www.irmm.jrc.be/html/homepage.htm)

<http://www.irmm.jrc.be/html/homepage.htm>

[AOCS American Oil Chemists' Society: http://www.aocs.org/tech/crm](http://www.aocs.org/tech/crm)

[FLUKA, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Deutschland:](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Fluka___Riedel_Home/Analytical/Food_Analysis.html#GMO)

[http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Fluka___Riedel_Home/Analytical/Food_Analysis.html#GMO\)](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Fluka___Riedel_Home/Analytical/Food_Analysis.html#GMO)

gv-Pflanze	Material	% GVO Soll-Gehalt (relativ)	Eignung als Referenzmaterial zur		Bezugsquelle
			qualitativen Analyse	quantitativen Analyse	
Soja					
RR™ Soja	Bohnen-Mehl	0	X	X	IRMM und FLUKA
		0,1	X	X	
		0,5	X	X	
		1	X	X	
		2	X	X	
		5	X	X	
Mais					
Bt-176* Bt-11* MON 810* GA21 NK603	Korn-Mehl	0	X	X	IRMM und FLUKA*
		0,1	X	X	
		0,5	X	X	
		1	X	X	
		2	X	X	
		5	X	X	
GA21 NK603 CBH-351	DNA		X		FLUKA
Raps					
RT 73	Rapssamen	100		X	AOCS
RT73 OXY235 LibertyLink Falcon® MS8xRf3	DNA		X		FLUKA
Baumwolle					
Roundup Ready	Mehl	100		X	AOCS
Bollgard		100		X	
Bollgard II		100		X	
Bollgard/ Roundup Ready		100		X	
Bollgard II/ Roundup Ready		100		X	

4.7.2 Kontrolluntersuchungen

Material mit bekanntem Anteil der nachzuweisenden gentechnischen Veränderung sollte in einem für die Überwachung relevanten Konzentrationsbereich mitanalysiert werden.

Folgende Kontrollen sind durchzuführen:

- Extraktionsblindprobe (mindestens eine pro 10 Proben)
- positive Extraktionskontrolle (in regelmäßigen Zeitabständen)
- no template control NTC ("Wasserkontrolle")
- positive PCR-Kontrolle
- negative PCR-Kontrolle (DNA ohne gentechnische Veränderung)
- Amplifikationskontrolle

Pro Probe ist mindestens eine doppelte Extraktion durchzuführen.

Für quantitative Analysen sollten von jedem DNA-Extrakt mindestens zwei Konzentrationen untersucht werden, um eine Hemmung der Amplifikation festzustellen. Für Analysen im Schwellenwertbereich sollten durch Zweifachbestimmung jeder Konzentration insgesamt acht Analysenwerte pro Probe ermittelt werden.

4.7.3 Ringversuche und Laborvergleichsuntersuchungen

Eine regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen wird empfohlen. Diese werden gegenwärtig durchgeführt von:

- Arbeitskreis PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA - Untersuchung von Futtermitteln
- ISTA – Untersuchung von Saatgut
- USDA/GIPSA – Untersuchungen von Mehlen
- kommerzielle Laborvergleichsuntersuchungen (z.B. GEMMA)

Vom AK PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA bisher durchgeführte Laborvergleichsuntersuchungen von Futtermitteln:

- Ringversuch zum Nachweis gentechnischer Veränderungen mit Hilfe der PCR (4 Maismehlproben), 2000
- Ringversuch zum Nachweis gentechnischer Veränderungen mit Hilfe der PCR (3 Maismehlproben, 3 Sojaextraktionsschrote, 3 Rapsproben), 2001
- Ringversuch 331 M zum qualitativen und quantitativen Nachweis gentechnisch veränderter Bestandteile in Mischfuttermitteln mit Hilfe der PCR (3 sojahaltige Mischfutterproben, 3 maishaltige Mischfutterproben), 2004

4.8 Auswertung und Beurteilung der Messergebnisse

4.8.1 Auswertung der Messergebnisse bei der qualitativen Bestimmung

Gemäß EN ISO 21569 (siehe Tab. 3) müssen die erhaltenen Ergebnisse einschließlich der Kontrollen eindeutig sein und zu den erwarteten Ergebnissen führen, sonst ist das Verfahren zu wiederholen. Das PCR-Ergebnis ist entweder

- positiv, wenn ein spezifisches Amplifikat nachgewiesen wurde und sämtliche Kontrollreaktionen die erwarteten Ergebnisse liefern oder
- negativ, wenn kein spezifisches Amplifikat nachgewiesen wurde und sämtliche Kontrollreaktionen die erwarteten Ergebnisse liefern.

Positive PCR-Ergebnisse sind gemäß 4.4.1 zu bestätigen.

Die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) bei qualitativen Verfahren ist gemäß prEN ISO 24276 (siehe Tab. 3) die niedrigste Konzentration / der niedrigste Gehalt des Analyten, die/ der zuverlässig nachgewiesen, jedoch nicht unbedingt quantifiziert werden kann.

Die Nachweisgrenze ist laborintern für die Methode anhand geeigneter Materialien zu ermitteln, z. B. mit 0,1 % IRMM-Referenzmaterial (siehe Tab. 5).

4.8.2 Auswertung der Messergebnisse bei der quantitativen Bestimmung

Bei der Angabe von quantitativen Messergebnissen ist die Messunsicherheit des Messverfahrens zu berücksichtigen. Die Messunsicherheit muss laborintern für jede Probe separat ermittelt werden. Dazu sind ausreichende Mehrfachmessungen an der Probe vorzunehmen (mindestens 3).

Das Ergebnis ist als Mittelwert mit Messunsicherheit anzugeben. Gleichzeitig sind die Freiheitsgrade und die statistische Sicherheit festzuhalten. Im Allgemeinen wird die statistische Sicherheit von 95% als ausreichend angesehen.

$$x = \bar{x} \pm \Delta\bar{x} \quad (P = 95\%, f = n - 1)$$

$$\Delta\bar{x} = \pm \frac{t(P, f) \cdot s}{\sqrt{n}}$$

x = Messergebnis, \bar{x} = Mittelwert, $\Delta\bar{x}$ = Messunsicherheit, P = statistische Sicherheit, f = Freiheitsgrade,
 n = Anzahl der Messungen, s = Standardabweichung, t = Wert für $n - 1$ aus der t - Tabelle

Die Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ) ist gemäß prEN ISO 24276 (siehe Tab. 3) bei analytischen Verfahren die niedrigste Menge oder Konzentration des Analyten in der Probe, die mit einem annehmbaren Grad an Präzision und Genauigkeit quantitativ bestimmt werden kann.

Die Bestimmungsgrenze ist der Konzentrationswert, bei dem der relative Fehler einen vorgegebenen Wert (üblicherweise 33 %) unterschreitet.

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze erfolgt laborintern für jede Probe:

$$\text{LOQ}(\%) = \frac{\text{geringste quantifizierbare DNA - Kopienzahl des GVO - Standards} \cdot 100}{\text{Kopienzahl des ziertaxonspezifischen Gens in der Probe}}$$

Wird bei der Quantifizierung einer Probe der LOQ unterschritten, ist das Ergebnis qualitativ mit probenspezifischer Nachweisgrenze anzugeben (siehe Tab. 7).

Die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) ist derjenige kleinste Gehalt eines Analyten in der Probe, der zuverlässig nachgewiesen werden kann (prEN ISO 24276, siehe Tab. 3).

Die Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgt laborintern für jede Probe:

$$\text{LOD}(\%) = \frac{\text{geringste, zuverlässig nachweisbare DNA - Kopienzahl des GVO - Standards} \cdot 100}{\text{Kopienzahl des ziertaxonspezifischen Gens in der Probe}}$$

4.8.3 Anmerkungen

Verschiedenheiten in Aufbau und Struktur der Untersuchungsmatrix (z.B. die unterschiedliche Verteilung von Genom-Kopien in der Pflanze [11] oder die unterschiedliche Extrahierbarkeit von DNA aus Futtermitteln (siehe 4.3)) können Auswirkungen auf die quantitative Bestimmung haben.

Bei quantitativen Analysen kann eine Unter- oder Überschätzung der relativen Gehalte an gentechnisch veränderten Bestandteilen erfolgen, wenn die PCR-Amplifikate für Transgen und Referenzgen abweichende Größen haben.

Des Weiteren können unzureichend abtrennbare Störsubstanzen (Inhibitoren) im Futtermittel (z.B. Mineralfuttermittel und Vormischungen) die Analytik nachteilig beeinflussen.

4.8.4 Anforderungen an den Prüfbericht

Im Prüfbericht werden neben den verwendeten Prüfmethode(n) bzw. den nachgewiesenen Genabschnitten die Untersuchungsergebnisse wie folgt angegeben (siehe Tab. 6 und 7).

Tab. 6: Prüfbericht für qualitative Messergebnisse

zieltaxon spezifisches Gen	Transgen	Ergebnisformulierung	Zusätzliche Angaben im Prüfbericht
nachgewiesen	nicht nachgewiesen	In der vorliegenden Probe wurde für die Spezies X keine gentechnische Veränderung Y nachgewiesen.	LOD*
nachgewiesen	nachgewiesen	In der vorliegenden Probe wurde für die Spezies X eine gentechnische Veränderung Y nachgewiesen.	LOD*
nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen	In der vorliegenden Probe wurde für die Spezies X keine DNA nachgewiesen.	

LOD (limit of detection), * methodenspezifisch

Tab. 7: Prüfbericht für quantitative Messergebnisse

zieltaxon spezifisches Gen	Transgen	Bemerkung	Ergebnisformulierung	zusätzliche Angaben im Prüfbericht
nachgewiesen	nicht nachgewiesen		In der vorliegenden Probe wurde für die Spezies X keine gentechnische Veränderung Z nachgewiesen.	LOD*
nachgewiesen	nachgewiesen		In der vorliegenden Probe wurden für die Spezies X Y (\pm Messunsicherheit) % gv-Linie Z bestimmt.	LOQ*
nachgewiesen	nachgewiesen	DNA-Gehalt für eine Quantifizierung zu gering (< LOQ)	In der vorliegenden Probe wurde für die Spezies X eine gentechnische Veränderung Z nachgewiesen. Eine Quantifizierung war aufgrund probenspezifischer Eigenschaften nicht möglich.	LOD*
nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen		In der vorliegenden Probe wurde für die Spezies X keine DNA nachgewiesen.	

LOD (limit of detection) oder LOQ (limit of quantification), * probenspezifisch

5. Empfehlungen zur Futtermittelauswahl

Aufgrund der derzeitigen analytischen Möglichkeiten (siehe 4.) wird zur Überwachung der gesetzlichen Bestimmungen bei der Auswahl der zu untersuchenden Futtermittel die Berücksichtigung folgender Kriterien empfohlen.

5.1 Einfluss des Verarbeitungsgrades

Verschiedene Schritte bei der Herstellung und Verarbeitung von Futtermitteln können Auswirkungen auf die GVO-Analytik haben.

Hochaufgereinigte Futtermittelkomponenten wie z.B. Maiskleber oder Sojaöl enthalten häufig zu wenig oder keine DNA für eine qualitative und quantitative Untersuchung. Gleiches gilt für stark verarbeitete Futtermittelkomponenten, die aufgrund physikalischer, chemischer oder fermentativer Faktoren einem DNA-Abbau ausgesetzt waren.

Aus diesem Grund wird empfohlen, möglichst unverarbeitete pflanzliche Rohstoffe zu untersuchen.

Im Einzelfall ist zu prüfen, welche Untersuchungen aufgrund des Verarbeitungsgrades des Futtermittels möglich sind.

5.2 Einfluss der Zusammensetzung

Folgende Aspekte sind zur Auswahl der Untersuchungsprobe, der Analysenstrategie und der Ergebnisbewertung zu berücksichtigen:

- In Mischfuttermitteln mit mehreren Einzelkomponenten einer Spezies ist kein Bezug der nachgewiesenen Genkopien auf eine dieser Futtermittelkomponenten möglich, da das Analysenergebnis sich jeweils auf den Gehalt der Spezies-DNA in der Gesamtprobe

bezieht. Aus diesem Grund kann kein Rückschluss auf die Einhaltung des Schwellenwertes pro eingesetzte Futtermittelkomponente erfolgen.

- Für manche gv-Linien stehen nur konstruktsspezifische Nachweissysteme zur Verfügung, die mehrere gv-Linien einer Pflanzenspezies oder aber pflanzenübergreifend gv-Konstrukte mehrerer Pflanzenspezies erfassen können. So sind beispielsweise beim Nachweis der p35S-pat-Genkassette mit den PCR-Primersystemen T25- F7/T25-R3 und CaMV-F/pac3-R neben anderen gleichzeitig die gv-Maislinien T25 und T14, die gv-Rapslinie GS40/90 und die gv-Zuckerrübenlinie T120-7 nachweisbar (siehe Anlage A).

Im Einzelfall ist zu prüfen, welche Untersuchungen aufgrund der Zusammensetzung des Mischfuttermittels und der zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren möglich sind (siehe Anlage G).

Für die Untersuchung eines Mischfuttermittels ist weiterhin zu berücksichtigen: In Abhängigkeit des Anteils einer Futtermittelkomponente im Mischfuttermittel variiert die Nachweisgrenze bzw. Bestimmungsgrenze ihres gentechnisch veränderten Anteils. Liegt die analytische Bestimmungsgrenze dadurch über dem für eine Futtermittelkomponente zu prüfenden Schwellenwert, so ist eine Aussage über die Einhaltung des Schwellenwertes nicht möglich.

Zur Überwachung von Mischfuttermitteln wird die Untersuchung der jeweiligen Einzelfuttermittel (Futtermittelausgangserzeugnisse) empfohlen.

5.3 Gentechnisch veränderte Pflanzenspezies in Futtermitteln und geeignete Nachweisverfahren

Die nachstehend aufgeführten Futtermittelbestandteile stellen einen Auszug aus der Positivliste für Einzelfuttermittel (Futtermittelausgangserzeugnisse) dar (Stand 6/2004; <http://www.dlg.org/de/landwirtschaft/futtermittelnet/positivliste/index.html>) und beinhalten Produkte aus Getreidekörnern und Ölsaaten, Knollen und Wurzeln, wirtschaftseigene Grobfuttermittel und Grünfütterprodukte.

5.3.1 Soja

Mögliche Futtermittelbestandteile aus Soja: Sojabohnen (ggf. dampferhitzt), -schalen, -kuchen, -extraktionsschrot dampferhitzt (ggf. aus geschälter Saat), -proteinkonzentrat, -proteinisolat

Als gv-Soja ist derzeit die in der EU zugelassene Roundup Ready[®] Soja-Linie (GTS 40-3-2) im Handel. Für die anderen, weltweit bekannten gv-Linien stehen momentan keine spezifischen Nachweismethoden zur Verfügung.

Screening-Methoden: 35S-Promotor und NOS-Terminator

Spezifischer Nachweis: Roundup Ready[®] (GTS 40-3-2)

Untersuchungsmöglichkeiten zum Nachweis von gv-Soja in Einzel- und Mischfuttermitteln sind in Anlagen D und G dargestellt, Nachweismethoden siehe 4.5 und Anlagen B und C.

5.3.2 Mais

Mögliche Futtermittelbestandteile aus Mais: Maispflanzen, Maisgrünmehl, Maiskörner, -flocken, -kleinflocken aufgeschlossen, -nachmehl, -futtermehl, -kleie, -stärke, -quellstärke; Maiskleber, -kleberfutter; Maiskeime, -keimkleie, -keimkuchen, -keimextraktionsschrot.

Screening-Methoden: 35S-Promotor und NOS-Terminator

Spezifischer Nachweis: Für eine begrenzte Anzahl der weltweit bekannten gv-Maislinien stehen derzeit qualitative Nachweisverfahren zur Verfügung. Für die meisten in der EU zugelassenen gv-Maislinien gibt es eventspezifische quantitative Methoden.

Untersuchungsmöglichkeiten zum Nachweis von gv-Mais in Einzel- und Mischfuttermitteln sind in Anlagen E und G dargestellt, Nachweismethoden siehe 4.5 und Anlagen B und C.

5.3.3 Raps

Mögliche Futtermittelbestandteile aus Raps: Rapssaat, -schalen, -kuchen, -extraktionsschrot (ggf. teilextrahiert).

Screening-Methoden:

Zum Screening von gv-Raps in Futtermitteln wird empfohlen, die vier in gv-Raps derzeit bekannten konstruktsspezifischen gv-Elemente p35S-pat, pSSUAra-bar, pFMV-epsps und p35S-nptII zu überprüfen (siehe Anlage F).

Ein 35S-Screening in rapshaltigem Probenmaterial wird nicht empfohlen. Da Brassicaceae wie Raps auf natürlichem Wege mit dem Cauliflowermosaik-Virus (CaMV) befallen sein können, dessen 35S-Genabschnitt in einer gv-Pflanze enthalten ist, muss bei Nachweis der 35S-Sequenz im Futtermittel ein natürlicher Befall durch ein CaMV-spezifisches Testsystem ausgeschlossen werden.

Spezifischer Nachweis: Zur Identifizierung der einzelnen Linien wurde bislang von der EU lediglich eine Methode für die quantitative Bestimmung der Rapslinie GT73 zur Verfügung gestellt. Zum Nachweis der Linien GS40/90 und MS8xRF3 liegen Veröffentlichungen vor (siehe Tab. 4).

Referenzmaterialien und Kontrollproben sind bislang kommerziell kaum erhältlich.

Untersuchungsmöglichkeiten zum Nachweis von gv-Raps in Einzelfuttermitteln sind in Anlage F dargestellt, Nachweismethoden siehe 4.5 und Anlagen B und C.

5.3.4 Baumwolle

Mögliche Futtermittelbestandteile aus Baumwolle: Baumwollsaat, -saatkuchen, -saatextraktionsschrot.

Öle der beiden gv-Baumwolllinien IPC 531 und RRC 1445 sind in der EU seit 1998 in Lebensmitteln zugelassen. Quantitative Nachweismethoden sind für diese Linien veröffentlicht (siehe Tab. 4).

Referenzmaterialien und Kontrollproben sind bislang kommerziell kaum erhältlich.

5.3.5 Zuckerrübe

Mögliche Futtermittelbestandteile aus Zuckerrübe: Rübenblätter, (Zucker-) Rübenkleinteile, -zucker, -melasse (ggf. teilentzuckert), -nassschnitzel, -pressschnitzel, -trockenschnitzel, -melasseschnitzel.

Referenzmaterialien stehen noch nicht zur Verfügung.

Screening-Methoden: Zum Screening von gv-Zuckerrüben in Futtermitteln wird empfohlen, die derzeit bekannten konstruktsspezifischen Nachweisverfahren für p35S-pat und pFMV-epsps zu verwenden (siehe Anlage A).

Spezifischer Nachweis: Referenzmaterialien und Kontrollproben sind bislang kommerziell kaum erhältlich.

Nachweismethoden siehe 4.5 und Anlagen B und C.

5.3.6 Kartoffel

Mögliche Futtermittelbestandteile aus Kartoffeln: Kartoffelflocken, -stärke, -quellstärke, -feinfaserstärke, -eiweiß, -fruchtwasser eingedickt, -pülpe, -schalen.

Screening-Methoden: Zum Screening von gv-Kartoffeln in Futtermitteln wird empfohlen, das Nachweisverfahren für das nptII-Gen anzuwenden (siehe Anlage A).

Spezifischer Nachweis: Referenzmaterialien und Kontrollproben sind bislang kommerziell nicht erhältlich.

Nachweismethoden siehe 4.5 und Anlagen B und C.

6. Glossar

Amplifikation: Vervielfältigung; hier: Vervielfältigung eines Genabschnittes durch die PCR; das PCR-Produkt wird auch als Amplifikat bezeichnet.

Event: Bezeichnung für eine spezifische und für einen gentechnisch veränderten Organismus (GVO) charakteristische Insertion eines Genkonstruktes.

Genauigkeit: Ausmaß der Übereinstimmung zwischen einem Untersuchungsergebnis und dem anerkannten Referenzwert.

Gentechnisch verändertes Futtermittel: gemäß VO 1829/2003, Art. 2, Punkt 7 Futtermittel, die GVO enthalten, daraus bestehen oder hergestellt werden.

gv: gentechnisch verändert

GVO: „Organismus: jede biologische Einheit, die fähig ist, sich zu vermehren oder genetisches Material zu übertragen.“ und „Genetisch veränderter Organismus (GVO): ein Organismus mit Ausnahme des Menschen, dessen genetisches Material so verändert worden ist, wie es auf natürliche Weise durch Kreuzen und/oder natürliche Rekombination nicht möglich ist.“ gemäß Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG Art. 2 Punkt 1 und 2 [5]

Konstrukt: Genkassette, die eine Fähigkeit an den Organismus vermittelt und in unterschiedlichen gentechnisch veränderten Organismen (auch artübergreifend) vorkommen kann.

Linie: Unter einer Linie (hier: Pflanzenlinie) versteht man eine Sorte oder Cultivar (lat. cultus = angebaut, varietas = Abart) einer Pflanzenart, die sich in mindestens einem maßgebenden Merkmal von anderen Sorten oder Cultivaren unterscheidet.

LOD (limit of detection, Nachweisgrenze): Die Nachweisgrenze ist gemäß prEN ISO 24276 (siehe Tab. 3) bei qualitativen Verfahren die niedrigste Konzentration oder der niedrigste Gehalt des Analyten, die/der zuverlässig nachgewiesen werden kann.

LOQ (limit of quantification, Bestimmungsgrenze): Der Grenzwert für die Quantifizierung ist gemäß prEN ISO 24276 (siehe Tab. 3) bei analytischen Verfahren die niedrigste Menge oder Konzentration des Analyten in der Probe, die mit einem annehmbaren Grad an Präzision und Genauigkeit quantitativ bestimmt werden kann.

Präzision: Ausmaß für die Übereinstimmung zwischen voneinander unabhängigen Untersuchungsergebnissen einer Probe, die unter festgesetzten Bedingungen erhalten wurden.

Spezifität: Die Eigenschaft eines Verfahrens, ausschließlich auf die/den festgelegte(n) Eigenschaft oder Analyten zu antworten.

Transgen: Als Transgen bezeichnet man ein Gen, das mittels gentechnischer Methoden in das Genom eines Organismus (damit gentechnisch veränderter Organismus) eingefügt wurde.

Zieltaxon: systematische Gruppe, zu der ein GVO gehört. Taxon meint hier normalerweise die Spezies, kann aber auch ein Taxon höheren oder niedrigeren Grades sein.

7. Literatur

- [1] **VO (EG) Nr. 1829/2003:** Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel. Amtsblatt der Europäischen Union L 268/1 vom 18.10.2003
- [2] **VO (EG) Nr. 65/2004:** Verordnung (EG) Nr. 65/2004 der Kommission vom 14. Januar 2004 über ein System für die Entwicklung und Zuweisung spezifischer Erkennungsmarker für genetisch veränderte Organismen. Amtsblatt der Europäischen Union L 10/5 vom 16.01.2004
- [3] **VO (EG) Nr. 1830/2003:** Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG. Amtsblatt der Europäischen Union L 268/24 vom 18.10.2003
- [4] **VO (EG) Nr. 641/2004:** Verordnung (EG) Nr. 641/2004 der Kommission vom 6. April 2004 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich des Antrags auf Zulassung neuer genetisch veränderter Lebensmittel und Futtermittel, der Meldung bestehender Erzeugnisse und des zufälligen oder technisch unvermeidbaren Vorhandenseins genetisch veränderter Materialien, zu dem die Risikobewertung befürwortend ausgefallen ist. Amtsblatt der Europäischen Union L 102/14 vom 07.04.2004
- [5] **Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG:** Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 106/1 vom 17.04.2001
- [6] **Futtermittel-Probenahme- und Analyseverordnung:** Verordnung über Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Futtermittelüberwachung vom 15. März 2000. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2000 Teil I Nr. 10, S. 226 vom 22. März 2000, geändert am 21. März 2003 durch Bundesgesetzblatt Jahrgang 2003 Teil I Nr. 12, S. 429 vom 03. April 2003, geändert am 27. April 2004 durch Bundesgesetzblatt Jahrgang 2004 Teil I Nr. 21, S. 856 vom 12. Mai 2004, zuletzt geändert am 10. November 2004 durch Bundesgesetzblatt Jahrgang 2004 Teil I Nr. 59, S. 2827 vom 17. November 2004
- [7] **EU-Richtlinie 98/53/EG:** Richtlinie 98/53/EG der Kommission vom 16. Juli 1998 zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 201/93 vom 17.07.1998
- [8] **Schweizerisches Lebensmittelbuch (SLMB),** Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit der Schweiz. Eidgenössische Drucksachen-Materialzentrale, Bern (CD-ROM 2002)
- [9] **2004/787/EG:** Empfehlung der Kommission vom 4. Oktober 2004 für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkt oder in Produkten im Kontext der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 (2004/787/EG). Amtsblatt der Europäischen Union L 348/18 vom 24.11.2004
- [10] **GenTG:** Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG). BGBl. I vom 16. Dezember 1993, S. 2066, zuletzt geändert durch Gesetz zur Neuordnung des Gentechnikrechts vom 21. Dezember 2004 (BGBl. I S. 186, 2005)
- [11] **Trifa, Y. und Zhang, D. (2004):** DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO quantification. *J. Agric. Food Chem.* 52(5): 1044-1048
- [12] **VDLUFA-Verbandsmethode „Nachweis tierischer Bestandteile - PCR Methode“,** Nr. 29.1, VDLUFA-Methodenbuch Bd. III, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, 5. Erg.-Lfg., VDLUFA-Verlag
- [13] **Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB,** Beuth Verlag GmbH, Berlin
- [14] **GVO-Orientierungsrahmen zur Überwachung des Herstellens, Behandelns, Verwendens und Inverkehrbringens von Futtermitteln im Zusammenhang mit gentechnisch veränderten Organismen,** erstellt von den zuständigen Behörden des Bundes und der Länder, Stand 20.08.2005

8. Übersicht Internetadressen

8.1 EU-Ebene

- **Europäisches Gemeinschaftsregister:**
http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
- **Übersicht über die in der Europäischen Union zugelassenen gentechnisch veränderten (GV) Lebensmittel**
http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/258-97-ec_authorized_en.pdf
- **Übersicht über die in der EU zugelassenen genetisch veränderten Futtermittel**
http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/2001-18-ec_authorized_en.pdf
- **Übersicht über die in der EU in der Zulassung befindlichen gentechnisch veränderten Lebensmittel**
http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/258-97-ec_pending_authos_en.pdf
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/catindex_de.html
- **Übersicht über die in der EU in der Zulassung befindlichen gentechnisch veränderten Futtermittel**
http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/2001-18-ec_pending_authos_en.pdf
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/catindex_de.html
- **Informationen zur europäischen Gesetzgebung:**
http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/gmfood/legisl_de.htm
- **Standing Committee on the Food Chain and Animal Health Section: Genetically Modified Food and Feed and Environmental Risk**
http://europa.eu.int/comm/food/committees/regulatory/modif_genet/index_en.htm
- **Standing Committee on the Food Chain and Animal Health Section: General Food Law**
http://europa.eu.int/comm/food/committees/regulatory/scfcah/general_food/index_en.htm
- **Homepage der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA**
<http://www.efsa.eu.int>
- **Analytik**
Homepage des Community Reference Laboratory (CRL)
<http://gmo-crl.jrc.it>
Homepage des European Network of GMO Laboratories
<http://engl.jrc.it>
Homepage des Joint Research Centre
<http://www.jrc.cec.eu.int>
JRC GMO Training Courses
<http://gmotraining.jrc.it>
JRC GMO Methods Database
<http://biotech.jrc.it/methodsdatabase.htm>

8.2 Nationale Ebene

- **Homepage des Robert-Koch-Institutes**
<http://www.rki.de>
- **Homepage des Bundesinstituts für Risikobewertung**
<http://www.bfr.bund.de>
- **Homepage der Biologischen Bundesanstalt**
<http://www.bba.de>
- **Homepage der Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel**
<http://www.bfa-ernaehrung.de/Bfe-Deutsch/Information/Gentechnik.htm>
- **Homepage der Bundesregierung**
<http://www.bundesregierung.de/>
- **Homepage des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft**
<http://www.verbraucherministerium.de>
- **Homepage des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit**
<http://www.bmu.de>
- **Homepage des Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)**
<http://www.bvl.bund.de>
- **Homepage des Umweltbundesamtes**
<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten/daten/bsg/index.htm>
- **Homepage des Unterausschusses Methodenentwicklung der Bund-/ Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik**
<http://www.lag-gentechnik.de>

8.3 Sonstige

- **agbios**
<http://www.agbios.com>
- **gmo-watch**
<http://www.gmo-watch.org>
- **ISAAA-Homepage (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)**
<http://www.isaaa.org>
- **Homepage von TransGen**
<http://www.transgen.de>
- **Homepage von bioSicherheit**
<http://www.biosicherheit.de>

9. Anmerkungen

Es wird vorgeschlagen, regelmäßig einen Informationsaustausch zwischen Vertretern der Überwachung und der Analytik bezüglich Gentechnik in Futtermitteln in Deutschland zu pflegen.

Das vorliegende Konzept erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Angaben erfolgen ohne Gewähr.

Alle Angaben und Internetadressen entsprechen dem Stand vom 30.06.2005.

Anlagen

- A:** Screeningelemente und Konstrukte in gentechnisch veränderten Pflanzen
- B:** Qualitative Methoden zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Futtermitteln (konventionelle PCR)
- C:** Quantitative Methoden zur Bestimmung von gentechnischen Veränderungen in Futtermitteln (Real-Time PCR)
- D:** Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Soja-Einzel-futtermitteln
- E:** Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Mais-Einzel-futtermitteln
- F:** Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Raps-Einzel-futtermitteln
- G:** Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Mischfuttermitteln

Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

Arbeitspapier des AK PCR-Analytik der FG Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Stand: 30.06.2005

Anlage A

Screeningelemente und Konstrukte in gentechnisch veränderten Pflanzen

Fruchtart	Bezeichnung der gentechnisch veränderten Linie	Name	Unternehmen	Screening-Tests				Konstrukt-spezifische Nachweise					
				p35S	pActin	T-nos	nptII	p35S-pat	pFMV-EPSPS	p35S-nptII	pSSU-Ara-bar		
Mais	T14	LibertyLink	Aventis, AgrEvo	X				X					
	T25	LibertyLink	Aventis, AgrEvo	X				X					
	Bt176, Event 176	Maximizer, NatureGard, KnockOut	Novartis, Ciba Seeds, Syngenta	X									
	Bt11	Sandoz Seeds, YieldGard, Attribute	Northrup King, Novartis, Syngenta	X		X							
	MON810	MaisGard, YieldGard	Monsanto	X									
	GA21	Roundup Ready	Monsanto, DeKalb		X	X							
	MS3	InVigor, SeedLink	Plant Genetics Systems	X		X							
	MS6	InVigor	Aventis, AgrEvo	X		X							
	CBH-351	StarLink	AgrEvo, Aventis	X		X							
	Event 676, 678, 680		Pioneer	X				X ?					
	B16, DLL25		DeKalb	X									
	DBT418	Bt-Xtra, DeKalBt	DeKalb	X									
	DBT418-DK566		DeKalb	Keine Informationen (pat- und cryIIa-Gen vorhanden)									
	DLL25-DK566		DeKalb	Keine Informationen (pat-Gen vorhanden)									
	MON80100, MON801		Monsanto	X		X	X						
	MON802, 805, 830, 831	YieldGard	Monsanto	X		X	X						
	MON809		Pioneer, Monsanto	X		X	X						
	MON832		Monsanto	X		X	X						
	MON863	MaxGard, YieldGard Rootworm	Monsanto	X		X	X				X		
	NK603	Roundup Ready	Monsanto	X	X	X							
	TC1507	Herculex	Dow Agrosience, Pioneer, Mycogen	X				X					
	MON810 x T25		Pioneer	X		X		X					
	Raps	23-198, 23-18-17, pCGN3828-212/86-16, pCGN3828-212/86-23	Laurical	Calgene	X			X				X	
Falcon GS40/90			AgrEvo, Aventis	X				X					
GT200 (RT200)		Roundup Ready	Monsanto							X			
GT73, RT73		Roundup Ready	Monsanto							X			
HCN10		Independence, LibertyLink	AgrEvo, Aventis	X			X	X					
HCN92 (Topas 19/2)		Innovator, LibertyLink	AgrEvo, Aventis	X			X	X					
Liberator L62 (pHoe6/Ac)			AgrEvo, Aventis	X				X					
MPS961, 962, 963, 964, 965		Phytaseed	BASF				X***						
MS1xRF1 (PGS1)		InVigor, SeedLink	Plant Genetics Systems			X	X					X	
MS1xRF2 (PGS2)		InVigor, SeedLink	Plant Genetics Systems			X	X					X	
MS8, RF3, MS8xRF3		InVigor, SeedLink	Plant Genetics Systems			X*						X	
OXY235		Westar	Rhone Poulenc										
PHY23			Plant Genetics Systems	X		X						X ?	
PHY14, PHY35, PHY36			Plant Genetics Systems			X						X	
T45 (HCN28)		Excel, LibertyLink	AgrEvo, Aventis	X				X					
Soja		GTS 40-3-2	Roundup Ready	Monsanto	X		X						
		A2704-12, A2704-21, A5547-35, W62, W98	LibertyLink	AgrEvo, Aventis	X		X ?		X ?				
	A5547-127, GU262	LibertyLink	AgrEvo, Aventis	X				X					
	Event 260-05, G94-1, G94-19, G-168	Optimum	DuPont	X		X							
	T120-7	LibertyLink	AgrEvo, Aventis	X			X	X					
Rübe	# 77 (GTSB77)	Roundup Ready	Monsanto	X						X			
	H7-1		Monsanto							X			
	T252		Aventis	X				X					
Kartoffel	ATBT04-6, ATBT04-27, ATBT04-30, ATBT04-31, ATBT04-36	Atlantic lines, New Leaf	Monsanto	X		X	X				X		
	RBMT15-101, SEMT15-02, SEMT15-15, SEMT15-07, HLMT15-3, HLMT15-15, HLMT15-46	Hi-Lite lines, New Leaf, Russet Burbank lines, Shepody lines, Y lines	Monsanto			X	X						
	RBMT21-129, RBMT21-152, RBMT21-350	New Leaf, Plus lines, Russet Burbank lines	Monsanto			X	X						
	RBMT22-082, RBMT22-186, RBMT22-238, RBMT22-262	New Leaf, Plus lines, Russet Burbank lines	Monsanto			X	X						
	SPBT02-5, SPBT02-7	New Leaf, Superior lines	Monsanto	X		X	X**				X		
	IEH 92-527-1		Amylogene			X	X						
	Bt6, Bt10, Bt12, Bt16, Bt17, Bt23		Monsanto	X		X	X				X		
	tBK50-13, tBK50-66	Apriori, Apropos	Avebe			X	X						
	Event 1445, Event 1698	Roundup Ready	Monsanto	X		X	X		X ?	X			
	Event 15985	Bollgard II	Monsanto	X		X	X						
Baumwolle	Event 19-51A		DuPont										
	Event 31807, 31808, 31707, 31803, Event 531, Event 757, Event 1076	BXN-Bollgard	Monsanto, Calgene	X			X						
		Bollgard, Ingard cotton	Monsanto	X			X						
	BG4740		Monsanto	Keine Information (nitrilase- u. cryIIa-Gen vorhanden)									
	BXN	BXN	Monsanto, Calgene	X		X							
	China cotton 1	Guokang	Chinese Academy of Agricultural	Keine Information									
	China cotton	Zhongmian	unbekannt	Keine Information									
	China cotton 3	American DPL	unbekannt	Keine Information									
	LLcotton25		X		X								

X* partiell
X** nur in SPBT02-7
X*** wahrscheinlich nur MPS965

Die Zusammenstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Angaben erfolgen ohne Gewähr.

Anlage B

Qualitative Methoden zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Futtermitteln (konventionelle PCR)

Nachweis einer Sequenz aus dem maisspezifischen Invertase-Gen (Kontroll-PCR)					
1	IVR1-F / IVR1-R	IVR1-F: 5'- CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C -3' IVR1-R: 5'- GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C -3'	226 Bp	Denaturierung der DNA: 12 min bei 95 °C * 42 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 64 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Literatur (siehe unten) [B4, B 9]
Nachweis einer konservierten Chloroplasten-Leu-tRNA-Sequenz (Kontroll-PCR)					
2	A1 / A2	A1: 5'- CGA AAT CCG TAG ACG CTA CG -3' A2: 5'- GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC -3'	Mais: 531 Bp Raps: 384 Bp Zuckerrübe: 644 Bp	Denaturierung der DNA: 3 min bei 94 °C 35 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 60 °C 2 min bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	[B7, B10]
	c / d	siehe A1 / A2	500 - 600 Bp	Denaturierung der DNA: 4 min bei 94 °C 25-35 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 55 °C 2 min bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C	[B2]
Nachweis einer Sequenz aus dem sojaspezifischen Lectin-Gen (Kontroll-PCR)					
3	GM03 / GM04	GM03: 5'- GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C -3' GM04: 5'- GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG -3'	118 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C * 35 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 60 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 3 min bei 72 °C	[B1, B8, B11]
Nachweis einer Sequenz aus dem rapsspezifischen pep-Gen (Kontroll-PCR) (Phosphoenolpyruvate-Carboxylase-Gen)					
4	PEP3-5 / PEP3-6	PEP3-5: 5'- GCT AGT GTA GAC CAG TTC TTG -3' PEP3-6: 5'- CAC TCT TGT CTC TTG TCC TC -3'	248 Bp	Denaturierung der DNA: 15 min bei 95 °C * 35 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 58 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C	[B14]
Nachweis einer in Eukaryonten hochkonservierten 18S-rRNA-Sequenz (Kontroll-PCR)					
5	EU + / EU -	EU +: 5'- AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T -3' EU -: 5'- TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A -3'	136 Bp	Denaturierung der DNA: 3 min bei 95 °C 30 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 60 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C	[B7]

Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotorsequenz (Screening-Test)

6	35S-1 / 35S-2	35S-1: 5'- GCT CCT ACA AAT GCC ATC A -3' 35S-2: 5'- GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA -3'	195 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C * 35 Zyklen: 20 s bei 95 °C 40 s bei 54 °C 40 s bei 72 °C Elongation: 3 min bei 72 °C	Xmn I: 115 Bp + 80 Bp	[B1]
				Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C * 40 Zyklen: 20 s bei 95 °C 40 s bei 54 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 3 min bei 72 °C	Xmn I: 115 Bp + 80 Bp	[B2]
7	35S-cf3 / 35S-cr4	35S-cf3: 5'- CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG -3' 35S-cr4: 5'- TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C -3'	123 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C * (3 min bei 95 °C) 50 Zyklen: 25 s bei 95 °C 30 s bei 62 °C 45 s bei 72 °C Elongation: 7 min bei 72 °C		[B2, B11]
8	35S F / 35S R	35S F: 5'- CCT ACA AAT GCC ATC ATT GCG -3' 35S R: 5'- GGG TCT TGC GAA GGA TAG TG -3'	207 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 94 °C * 50 Zyklen: 25 s bei 95 °C 30 s bei 62 °C 45 s bei 72 °C Elongation: 7 min bei 72 °C		[B3]

Terminatorsequenz des Nopalinsynthesegens aus *Agrobacterium spec.* (Screening-Test)

9	NOS-1 / NOS-3	NOS-1: 5'- GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG -3' NOS-3: 5'- TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA -3'	180 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C * 35 Zyklen: 20 s bei 95 °C 40 s bei 54 °C 40 s bei 72 °C Elongation: 3 min bei 72 °C	Nsi I: 96 Bp + 84 Bp	[B1]
10	HA-nos118f / HA-nos118r	HA-nos118f: 5'- GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG -3' HA-nos118r: 5'- GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC -3'	118 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C * (3 min bei 95 °C) 50 Zyklen: 25 s bei 95 °C 30 s bei 62 °C 45 s bei 72 °C Elongation: 7 min bei 72 °C		[B2, B11]

Spezifische Cauliflower Mosaic Virus Sequenz

11	CaMV 1 / CaMV 2	CaMV 1: 5'- GCG TAY ACA ACA AGT CAG CAA ACA -3' CaMV 2: 5'- TCC TGG AGA TTA TTA CTC GGG TAG A -3'	383 Bp	Denaturierung der DNA: 3 min bei 96 °C (Taq DNA Polymerase) 40 Zyklen: 30 s bei 96 °C 60 s bei 65 °C Elongation: 3 min bei 72 °C		[B3]
12	CRT F / CRT R	CRT F: 5'- CCA GAA GAA CAT TGG GTC AAT GC -3' CRT R: 5'- ATA GCT GAC AGA AGT TGT TGC CG -3'	191 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 94 °C * 50 Zyklen: 25 s bei 95 °C 30 s bei 62 °C 45 s bei 72 °C Elongation: 7 min bei 72 °C		[B3]

Nachweis einer Mais Bt176 Sequenz

Übergang vom CDPK-Promotor in den aminoterminalen Sequenzbereich des synthetischen cryIA(b)-Gens

13	Cry03 / Cry04	Cry03: 5'- CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT -3' Cry04: 5'- GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT -3'	211 Bp	Denaturierung der DNA: 12 min bei 95 °C * 38 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 63 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Hae III: 162 Bp + 49 Bp Taq I: 168 Bp+ 22 Bp+ 21 Bp Dde I: 128 Bp+ 72 Bp+11 Bp	[B4]
14	Cry05 / Cry06	Cry05: 5'- CCG CAG CCG ATC CAA CAA TG -3' Cry06: 5'- GCT GAT GTC GAT GGG GGT GTA G -3'	134 Bp	Denaturierung der DNA: 12 min bei 95 °C * 45 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 64 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Dde I: 71 Bp + 63 Bp	[B4]
15	btsyn-bf1 / btsyn-br1	btsyn-bf1: 5'- TCG ACA TCA GCC TGA GCC TG -3' btsyn-br1: 5'- TGG TTG ATC AGC TGC TCG ATC -3'	151 Bp	Denaturierung der DNA: 12 min bei 95 °C * 38 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 62 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 6 min bei 72 °C	Ban I: 100 Bp + 51 Bp Isoschizomer Bsh NI: 100 Bp + 51 Bp	[B4]

Nachweis einer Mais Bt11 Sequenz

Übergang vom Intron IVS2 in die pat-Gensequenz

16	IVS2-2 / PAT-B	IVS2-2: 5'- CTG GGA GGC CAA GGT ATC TAA T -3' PAT-B: 5'- GCT GCT GTA GCT GGC CTA ATC T -3'	189 Bp	Denaturierung der DNA: 12 min bei 95 °C * 38 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 64 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Hinf I: 116 Bp + 73 Bp DNA-Sonde 5'- TAT CTg TCT CAg ggg CAg ACT C -3'	[B4]
----	----------------	---	--------	--	---	------

Nachweis einer Mais T25/T14 Sequenz

Übergang vom CaMV-Terminator in die pat-Gensequenz

17	T25-F7 / T25-R3	T25-F7: 5'- ATG GTG GAT GGC ATG ATG TTG -3' T25-R3: 5'- TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CC -3'	209 Bp	Denaturierung der DNA: 12 min bei 95 °C * 40 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 64 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Hinf I: 121 Bp + 88 Bp Mwo I: 141 Bp + 68 Bp	[B4]
18	40 / 42	40: 5'- ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C -3' 42: 5'- CCC AAC CTT TGA TGC CTA TGT G -3'	386 Bp	40 Zyklen: 30 s bei 94 °C 30 s bei 60 °C 2 min bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C		[B5]

Spezifische Mais T25 Sequenz

Nachweis des T25-spezifischen Integrationsortes

19	369 / 370	369: 5'- TGC TCT GCT TGA CCT TGG TTG C -3' 370: 5'- CTG ATG CGG TAT TTT CTC CTT ACG -3'	549 Bp	40 Zyklen: 30 s bei 94 °C 30 s bei 60 °C 2 min bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C		[B5]
----	-----------	--	--------	---	--	------

Spezifische Mais T14 Sequenz

Nachweis des T14-spezifischen Integrationsortes

20	367 / 368	367: 5'- CAT GCC GCT GAA ATC ACC AG -3' 368: 5'- TCC AGC AAT CCT TGC ACC TTC -3'	171 Bp	40 Zyklen: 30 s bei 94 °C 30 s bei 60 °C 2 min bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C		[B5]
----	-----------	---	--------	---	--	------

Spezifische Mais MON810 Sequenz

Übergang vom Mais-Genom in den CaMV-Promotor (event-spezifisch)

21	VW01 / VW03	VW01: 5'-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CG -3' VW03: 5'- TCC ATC TTT GGG ACC ACT GTC G -3'	170 Bp	Denaturierung der DNA: 12 min bei 95 °C * 40 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 64 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Hae III: 126 Bp + 44 Bp Mwo I: 109 Bp + 61 Bp	[B4]
----	--------------------	--	--------	--	--	------

Nachweis einer Mais GA21 Sequenz

Übergang vom OTP zum EPSPS-Gen

22	GA21 1-5' / GA21 1-3'	GA21 1-5': 5'- ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG -3' GA21 1-3': 5'- TCT CCT TGA TGG GCT GCA -3'	270 Bp	Denaturierung der DNA: 3 min bei 95 °C 40 Zyklen: 60 s bei 95 °C 60 s bei 57 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 7 min bei 72 °C		[B6]
----	------------------------------	---	--------	--	--	------

Nachweis einer Mais CBH-351 Sequenz (StarLink)

Übergang vom CaMV-Promotor zum cry9C-Gen

23	CM03 / CBH02	CM03: 5'- CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA -3' CBH02: 5'- GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT -3'	170 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C 40 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 60 °C 30 s bei 72 °C Elongation: 7 min bei 72 °C		[B6]
----	---------------------	--	--------	---	--	------

Nachweis einer Roundup Ready Soja Sequenz

Übergang vom CaMV-Promotor zur *Petunia hybrida* Chloroplasten-Transit-Signal-Sequenz

24	p35S-f2/ petu-r1	p35S-f2: 5'- TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G -3' petu-r1: 5'- TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T -3'	172 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C * 35 - 40 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 62 °C 25 s bei 72 °C Elongation: 3 min bei 72 °C	Hybridisierungssonde H-35s-ar1: 5'- Fl-ggg TCT TgC gAA gGA TAg Tg -3'	[B2,B8]
----	-------------------------	--	--------	--	---	---------

Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate-resistenten transgenen Pflanzen

Übergang vom Promotor des Feigenwurz Mosaik Virus (pFMV), Chloroplasten- Transitpetidsequenz des EPSPS-Gens (CTP2) und dem EPSPS-Gen (CP4-EPSPS)

25	UAM-1/UAM-2	UAM-1: Die Primersequenzen sind vertraulich! UAM-2: Anfragen sind an den UA Methodenentwicklung zu richten.	Raps 494 Bp Zuckerrübe 482 Bp	Denaturierung der DNA: 15 min bei 95 °C (Hot Start) 40 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 60-65 °C 80 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Bgl II Raps: 131 Bp + 363 Bp Zuckerrübe: 131 Bp + 351 Bp	[B7]
----	--------------------	--	--	---	--	------

Nachweis der pSSUAra-bar-Genkassette

Übergang vom Promotor des Gens für die Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase aus *Arabidopsis thaliana* (pSSUAra) und aus dem bar-Gen

26	PGS-bar-A2/ PGS-bar-B2	PGS-bar-A2: 5'- GAA GTT GAC CGT GCT TGT CT -3' PGS-bar-B2: 5'- CAA GTC CAC CAG GCA AGT AA -3'	Rapslinien MS1/RF1 MS1/RF2 624 Bp MS8/RF3 454 Bp	Denaturierung der DNA: 15 min bei 95 °C (Hot Start) 40 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 54 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	MS1/RF1 und MS1/RF2 Hind III: 357 Bp + 267 Bp MS8/RF3 Hind III: 187 Bp + 267 Bp	[B12]
----	-------------------------------	--	---	--	--	-------

Nachweis der p35S-pat-Genkassette

Übergang vom 35S-Promotor des CaMV und dem pat-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes*

27	CaMV-F / pac3-R	CaMV-F: 5'- ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C -3' pac3-R: 5'- CCC AAC CTT TGA TGC CTA TGT G -3'	370 Bp	Denaturierung der DNA: 3 min bei 94 °C 35 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 60 °C 120 s bei 72 °C Elongation: 10 min bei 72 °C	Sal I: 60 Bp + 310 Bp Eco RV: 140 Bp + 230 Bp	[B13]
----	-----------------	--	--------	---	--	-------

Nachweis der p35S-nptII-Übergangssequenz

Übergang vom 35S-Promotor des CaMV und dem nptII-Gen aus dem *E. coli*- Transposon Tn5

28	NPTa / 35S-X	NPTa: 5'- GTC CCT TCC CGC TTC AGT GAC AAC GTC -3' 35S-X: 5'- ACG TTC CAA CCA CGT CTT CA -3'	Laurat-Raps 554 Bp Trierucin-Raps ca. 450 Bp	Denaturierung der DNA: 15 min bei 95 °C* 35 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 55-60 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C	Laurat-Raps Eco RI: 264 Bp + 290 Bp Trierucin-Raps Pst I: 100 Bp + 350 Bp	[B14]
----	--------------	--	---	--	--	-------

Nachweis der pNapin-BayTe-Übergangssequenz in transgenem Raps mit veränderter Fettsäurezusammensetzung

Übergang zwischen dem Napin-Gen-Promotor aus *Brassica rapa* und dem Thioesterase-Gen aus *Umbellularia californica* (Lorbeer)

29	napin5'-F / BayTe-R	napin5'-F: 5'- TGT CAC GCC AGG ACA TGA GCT ACA -3' BayTe-R: 5'- GGC CAT CAC GAG CCA ACA TTA CAG -3'	Laurat-Raps 314 Bp	Denaturierung der DNA: 15 min bei 95 °C* 35 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 58-65 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C	Laurat-Raps Nde I 140 Bp + 210 Bp	[B14]
----	---------------------	--	-----------------------	--	--------------------------------------	-------

Nachweis des plsC-Gens in transgenem Raps mit veränderter Fettsäurezusammensetzung

Gen für die Acylglycerol-3-phosphate-acyltransferase 8 (plsC) aus *Limnanthes douglasii* aus dem Trierucin-Raps

30	LPAAT-F / LPAAT-R	LPAAT-F: 5'- CCG CAA CAG GAG ACA ACT AAA -3' LPAAT-R: 5'- TAT TGG GAG ATG TGA CTG AAG -3'	Trierucin-Raps 603 Bp	Denaturierung der DNA: 15 min bei 95 °C* 35 Zyklen: 60 s bei 94 °C 60 s bei 55-60 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C	Trierucin-Raps Bam HI 346 Bp + 257 Bp	[B14]
----	-------------------	--	--------------------------	--	--	-------

Nachweis des nptII-Gens (Screening-Test)

Gen für die Neomycinphosphotransferase (nptII)

31	TN5-1 / TN5-2	TN5-1: 5'- GGA TCT CCT GTC ATC T -3' TN5-2: 5'- GAT CAT CCT GAT CGA C -3'	173 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95 °C* 35 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 50 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 6 min bei 72 °C	Rsa I: 136 Bp + 37 Bp	[B1]
32	APH2 short / APH2 reverse	APH2 short: 5'- CTC ACC TTG CTC CTG CCG AGA -3' APH2 reverse: 5'- CGC CTT GAG CCT GGC GAA CAG -3'	215 Bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 94 °C* 35 Zyklen: 30 s bei 94 °C 60 s bei 60 °C 60 s bei 72 °C Elongation: 3 min bei 72 °C	Rsa I: 122 Bp + 93 Bp	[B1]

Nachweis einer B33-Inv-Kartoffel -Sequenz

Gen für die Hygromycinphosphotransferase

33	B1 / B2	B1: 5'- CGC CGA TGG TTT CTA CAA -3' B2: 5'- GGC GTC GGT TTC CAC TAT -3'	839 Bp	Denaturierung der DNA: 4 min bei 94 °C 25-35 Zyklen: 30 s bei 95 °C 30 s bei 55 °C 120 s bei 72 °C Elongation: 5 min bei 72 °C	Hybridisierungssonde: 5'- GGC CCA TTC GGA CCG CAA GGA ATC G -3'	[B10]
----	---------	--	--------	---	---	-------

Die Zusammenstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Angaben erfolgen ohne Gewähr.

Literatur zu Anlage B:

- [B1] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: L 00.00-31 Screening zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln durch den Nachweis von DNA-Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Organismen vorkommen. (Juli 2001)
- [B2] Entwurf: Europäische Norm (ISO/DIS 21569): Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods (NAL GM Nr 67-01, prEN ISO 21569:2001)
- [B3] Ch. Wolf, M. Scherzinger, A. Wurz, U. Pauli, P. Hübner u. J. Lüthy: Detection of Cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promotor screening results. Eur Food Res Technol (2000) 210: 367-372
- [B4] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: L 15.05-1 Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais (*Zea mays* L.) mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Restriktionsanalyse oder Hybridisierung des PCR-Produktes (Mai 2002)
- [B5] N. Hess, A. Ulrich und T. Hoffmann: Insertionsortspezifische Nachweisverfahren für transgene Pflanzenlinien unter Anwendung der inversen PCR. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 8 (2002), S. 626-633
- [B6] LIH-CHING CHIUEH, YEN-LING CHEN and Daniel YANG-CHIH SHIH: Study on the Detection Method of Six Varieties of Genetically Modified Maize and Processed Foods. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 10, No. 1, 2002, S.25-33
- [B7] Methodensammlung des LAG: PCR-Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate-resistenten transgenen Pflanzen. Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG, März 2002 <http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/methodensammlung/SOPROUNDUP.PDF>
- [B8] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: L 23.01.22-1 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 (März 1998)
- [B9] B.Ehlers, E. Strauch, M. Goltz, D. Kubsch, H. Wagner, H. Maidhof, J. Bendiek, B. Appel und H.-J. Buhk: Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. Bundesgesundheitsblatt 1997, Nr. 4, S. 118-121
- [B10] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: L 24.01-1 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 (Januar 1997)
- [B11] EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE: Training Course on The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. User Manual, Session 9, Qualitative Detection of MON810 Maize, Bt-176 Maize and Roundup Ready Soybean by PCR (<http://gmotraining.jrc.it>)
- [B12] Methodensammlung des BLAG: PCR-Nachweis der pSSUAra / bar - Genkassette in transgenen Kulturpflanzen <http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/methodensammlung/BAR.PDF>
- [B13] Methodensammlung des BLAG: PCR-Nachweis der pSSUAra / bar - Genkassette in transgenen Kulturpflanzen <http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/methodensammlung/BAR.PDF>
- [B14] Methodensammlung des BLAG: PCR-Nachweis der p35S-nptII-Übergangssequenz, der Napin-BayTe-Übergangssequenz und des pls-Gens in transgenem Raps mit veränderter Fettsäurezusammensetzung <http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/methodensammlung/ok-laurical-raps.pdf>

Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

Arbeitspapier des AK PCR-Analytik der FG Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Stand: 30.06.2006

Anlage C

Quantitative Methoden zur Bestimmung von gentechnischen Veränderungen in Futtermitteln (real-time PCR)

Sojaspezifisches Nachweissystem im Lectin-Gen						
1	GM1-F	5'-CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC-3'	74 bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	600 nmol/l	pr74 EN ISO 21570
	GM1-R	5'-GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC-3'			600 nmol/l	
	Probe GM1	5'-FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC-TAMRA-3'			120 nmol/l	
	Lectin-F	5'-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3'	81 bp	45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C	900 nmol/l	pr74 EN ISO 21570
	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'			100 nmol/l	
Maisspezifisches Nachweissystem im hmgA-Gen						
2	ZM1-F	5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'	129 bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	300 nmol/l	pr74 EN ISO 21570
	ZM1-R	5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'			300 nmol/l	
	Probe ZM1	5'-VIC-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-TAMRA-3'			160 nmol/l	
				45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C		
	Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotorsequenz (Screening-Test)					
	3	35S-F	5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT-3'	82 bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	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'	100 nmol/l			
				45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C		
	Konstrukt spezifisches Nachweissystem für Soja der Linie GTS 40-3-2 (Roundup Ready™)					
	4	RR1-F	5'-CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA-3'	74 bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	600 nmol/l
RR1-R		5'-GAG CCA TGT TGT TAA TTT GTG CC-3'	600 nmol/l			
Probe RR1		5'-FAM-CAA GCT GAC TCT AGC AGA TCT TTC-TAMRA-3'	125 nmol/l			
5	GTS 40-3-2-F	5'-GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT-3'	83 bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	900 nmol/l	pr74 EN ISO 21570
	GTS 40-3-2-R	5'-GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C-3'			900 nmol/l	
	GTS 40-3-2-TMP	5'-FAM-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG-TAMRA-3'			100 nmol/l	
				45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C		
	Konstrukt spezifisches Nachweissystem für Mais der Linie Bt176					
	6	CRY2-F	5'-CCC ATC GAC ATC AGC CTG AGC-3'	129 bp	Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	300 nmol/l
CRY2-R		5'-CAG GAA GGC GTC CCA CTG GC-3'	300 nmol/l			
Probe BTSYN		5'-FAM-ATG TCC ACC AGG CCC AGC ACG - TAMRA-3'	160 nmol/l			
				45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C		
	Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Roundup Ready® Canola RT73					
	7	RT73 primer 1	5'- CCA TAT TGA CCA TCA TAC TCA TTG CT -3'	108 bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	150 nmol/l
RT73 primer 2		5'- GCT TAT ACG AAG GCA AGA AAA GGA -3'	150 nmol/l			
RT73 probe		5'-FAM- TTC CCG GAC ATG AAG ATC ATC CTC CTT -TAMRA-3'	50 nmol/l			
				45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C		
	Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Roundup Ready® Cotton 1445					
	8	1445 primer 1	5'- GGA GTA AGA CGA TTC AGA TCA AAC AC -3'	87 bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C *	150 nmol/l
1445 primer 2		5'- ATC GAC CTG CAG CCC AAG CT -3'	150 nmol/l			
1445 probe		5'-FAM- ATC AGA TTG TCG TTT CCC GCC TTC AGT TT -TAMRA-3'	50 nmol/l			
				45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C		

Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Bollgard® Cotton 531

9	531 primer 1	5'- TCC CAT TCG AGT TTC TCA CGT -3'	72 bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C * 45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 55°C	150 nmol/l	http://gmo-crl.jrc.it
	531 primer 2	5'- AAC CAA TGC CAC CCC ACT GA -3'			150 nmol/l	
	531 probe	5'-FAM- TTG TCC CTC CAC TTC TTC TC -TAMRA -3'			50 nmol/l	

Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for YieldGard® Rootworm Corn MON 863

10	MON863 primer 1	5'- GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C -3'	84 bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C * 45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C	150 nmol/l	http://gmo-crl.jrc.it
	MON863 primer 2	5'- TGT TAC GGC CTA AAT GCT GAA CT -3'			150 nmol/l	
	MON863 probe	5'-FAM- TGA ACA CCC ATC CGA ACA AGT AGG GTC A -TAMRA -3'			50 nmol/l	

Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Roundup Ready® Corn GA 21

11	GA 21 primer 1	5'- CTT ATC GTT ATG CTA TTT GCA ACT TTA GA -3'	112 bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C * 45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C	150 nmol/l	http://gmo-crl.jrc.it
	GA 21 primer 2	5'- TGG CTC GCG ATC CTC CT -3'			150 nmol/l	
	GA 21 probe	5'-FAM- CAT ATA CTA ACT CAT ATC TCT TTC TCA A -TAMRA -3'			50 nmol/l	

Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Maize Bt11

12	Bt113JFor primer	5'- GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA -3'	? bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C * 50 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C	750 nmol/l	http://gmo-crl.jrc.it
	Bt113JRev primer	5'- TGC AAG AAT CCC TCC ATG AG -3'			750 nmol/l	
	Bt113JFT FAM probe	5'-FAM- AAA TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA -TAMRA -3'			250 nmol/l	

Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Maize NK603

13	NK 603 primer 1	5'- ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA -3'	108 bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C * 45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C	150 nmol/l	http://gmo-crl.jrc.it
	NK 603 primer 2	5'- AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T -3'			150 nmol/l	
	NK 603 probe	5'-FAM- TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC -TAMRA -3'			50 nmol/l	

Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Maize TC1507

14	MaiY-F1	5'- TAG TCT TCG GCC AGA ATG G -3'	58 bp	2 min bei 50°C Denaturierung der DNA: 10 min bei 95°C * 45 Zyklen: 15 s bei 95°C 60 s bei 60°C	300 nmol/l	http://gmo-crl.jrc.it
	MaiY-R3	5'- CTT TGC CAA GAT CAA GCG -3'			300 nmol/l	
	MaiY-S1	5'-FAM- TAA CTC AAG GCC CTC ACT CCG -TAMRA -3'			150 nmol/l	

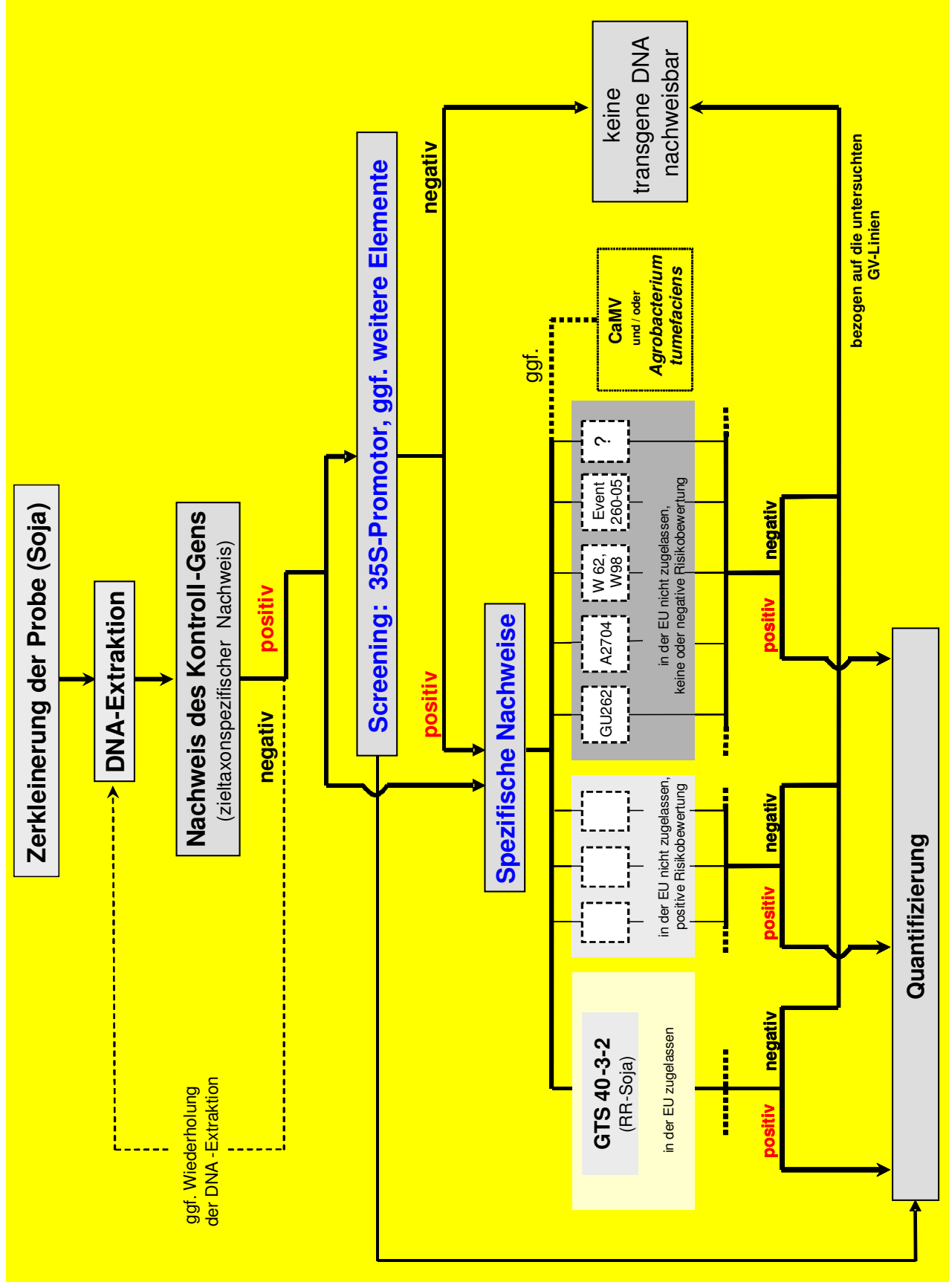
Die Zusammenstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Angaben erfolgen ohne Gewähr.

Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

Arbeitspapier des AK PCR-Analytik der FG Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Stand: 30.06.2005

Anlage D

Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Soja-Einzelfuttermitteln

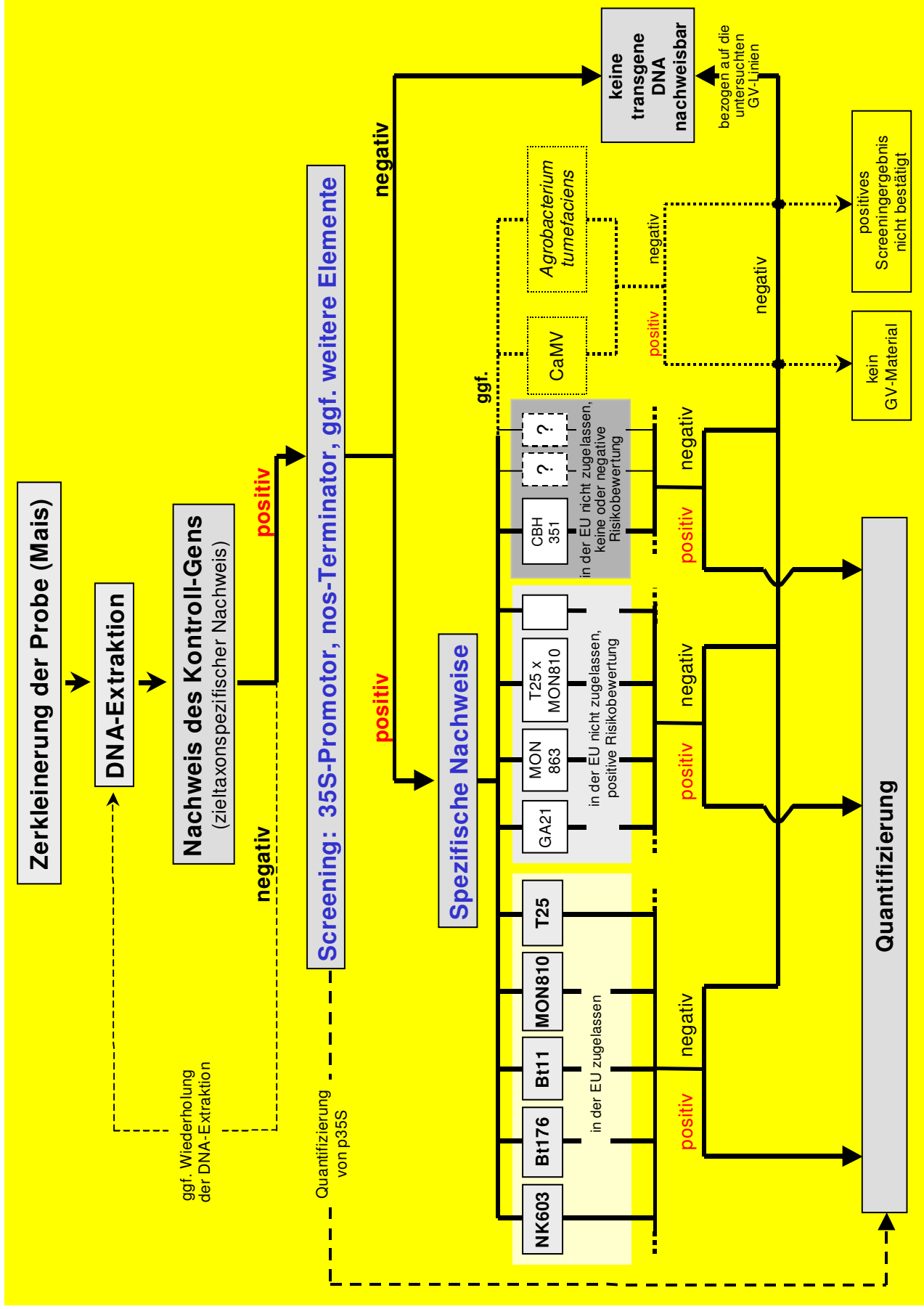


Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

Arbeitspapier des AK PCR-Analytik der FG Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Stand: 30.06.2005

Anlage E

Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Mais-Einzelfuttermitteln

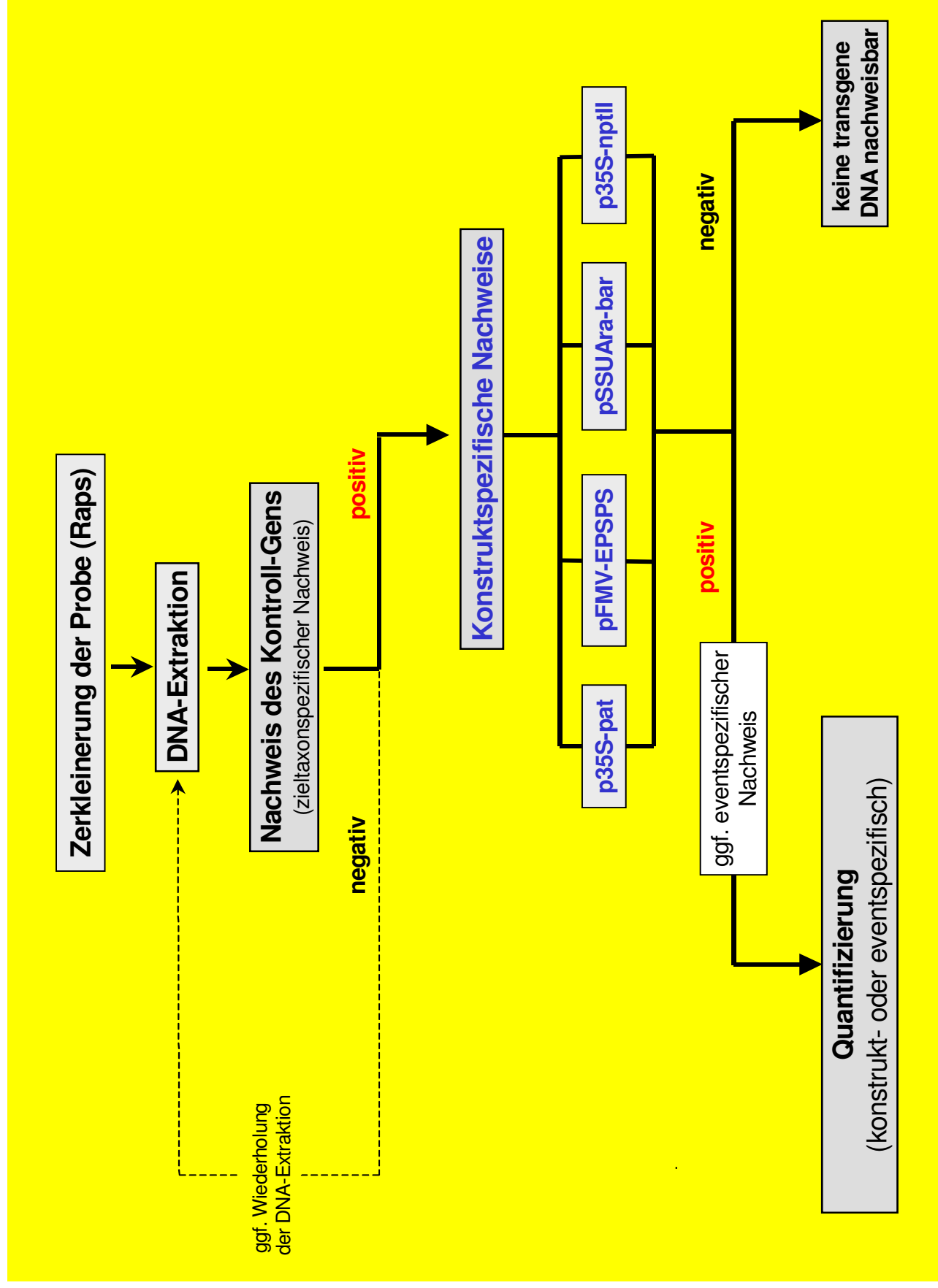


Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

Arbeitspapier des AK PCR-Analytik der FG Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Stand: 30.06.2005

Anlage F

Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Raps-Einzelfuttermitteln

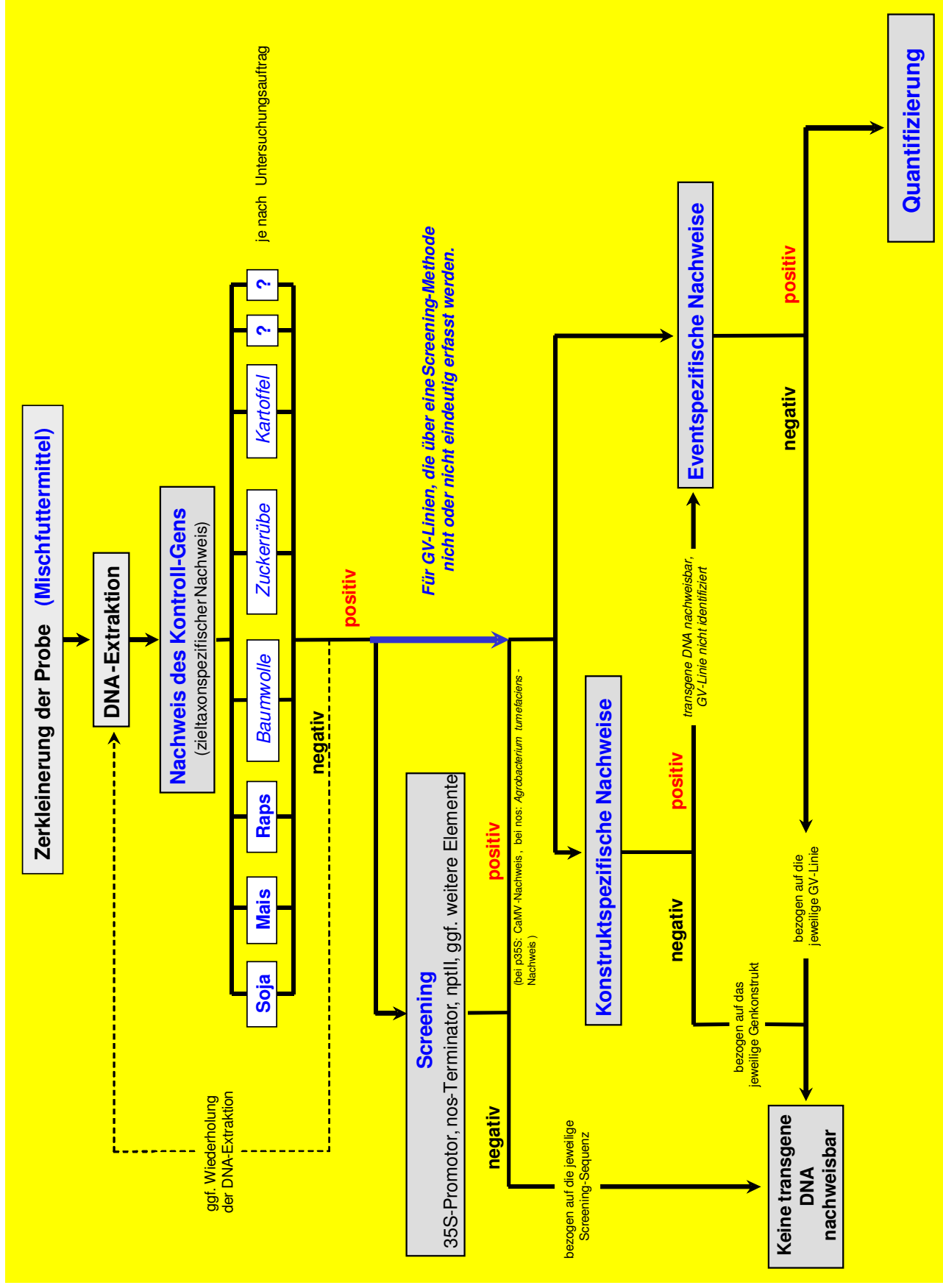


Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln

Arbeitspapier des AK PCR-Analytik der FG Futtermittel des Verbandes Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Stand: 30.06.2005

Anlage G

Schema zum Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Mischfuttermitteln





91058 **Erlangen**
Eggenreuther Weg 43
Telefon: 09131/764-0



85764 **Oberschleißheim**
Veterinärstraße 2
Telefon: 089/31560-0



97082 **Würzburg**
Luitpoldstraße 1
Telefon: 0931/41993-0



80538 **München**
Pfarrstraße 3
Telefon: 089/2184-0

www.lgl.bayern.de

Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131/764-0
Telefax: 09131/764-102

Internet: www.lgl.bayern.de
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

Druck: Print Com, Erlangen

ISBN 978-3-939652-05-2

ISBN 978-3-939652-22-9

(Print Ausgabe)

(Online Ausgabe)