

Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie

WS 2013/14

**Entwicklung und Anwendung einer Real Time PCR-Methode
zum Nachweis von genetisch modifizierten Pflanzen auf Basis des
35S-Promotors**

Bachelorarbeit

urn:nbn:de:gvb:519-thesis 2014-0103-0

Verfasser: Arne Gerhardt

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Christine Wittmann

Prof. Dr. sc. agr. Heidrun Schniedewind

Neubrandenburg, 27.02.2014

Abstract

The theme of genetically modified plants regarding to the feed and food industry have become more and more important in the recent years. In relation to that, the feed industry is a far larger market within the European Union. However, both industries show similar trends. This and associated legal regulations demonstrate a need of detection ways. As a result various methods have been established. Many refer to applications of the real-time PCR, which is subject of this work. The development and application of a real-time PCR method was performed to meet qualitative and quantitative statements in relation to GMO. Using the 35S-Promoter, soy, corn and feed samples could be detected qualitatively. Furthermore unknown Samples could be identified as Roundup Ready soy. In case of highly processed food DNA preparation methods have to be adapted. According to that experiments regarding to soy-based food did not yield. Neither 35S nor GM1 amplifications led to a positive result. The quantitative analysis of unknown soy samples refers to an absolute and a relative method. The first one was performed using a calibration curve. The last one is based on the $\Delta\Delta C_t$ -method. Despite a certain deviation both methods showed comprehensible trends and results. The content of GMO referring to soy samples could be determined using the GM1 sequence and the 35S-promoter.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Genetisch modifizierte Pflanzen	1
1.1.1	Gesetzliche Regelungen, Anbau und Nutzen von GVO	1
1.1.2	Eigenschaften genetisch modifizierter Pflanzen	3
1.2	Protein- und Nukleinsäure-Analytik	7
1.2.1	Nicht-PCR-basierte Methoden und weiterführende Analytik	7
1.2.2	PCR-basierte Methoden	11
1.2.2.1	Standard-PCR	11
1.2.2.2	Die Real Time PCR und die <i>TaqMan</i> TM -Technologie	13
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.2	Methoden	19
2.2.1	Extraktion der pflanzlichen DNA	19
2.2.2	Reinheit und Konzentration extrahierter DNA	21
2.2.3	Reaktionsbedingungen	24
2.2.4	Qualitativer Nachweis des 35S-Promotors und Probenidentifizierung	27
2.2.5	Möglichkeiten der Quantifizierung	29
3	Ergebnisse	32
3.1	Real Time PCR	32
3.1.1	Qualitativer Nachweis des 35S-Promotors und Probenidentifizierung	32
3.1.1.1	Einfluss des MgCl ₂ auf Messergebnisse	32
3.1.1.2	35S-spezifische Nachweise	34
3.1.2	Quantifizierung mit der Real Time PCR	38
3.1.2.1	Absolute Quantifizierung über Kalibrationsgeraden	38
3.1.2.2	Relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode	40
4	Diskussion	43
5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	50
7	Tabellenverzeichnis	58
8	Abbildungsverzeichnis	59
9	Gleichungsverzeichnis	59
	Erklärung über die eigenständige Anfertigung dieser Arbeit	
	Anlagenverzeichnis Anlagen siehe CD	

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikro-Liter
35S-F	35S Forward Primer
35S-R	35S Reverse Primer
35S-TMP	35S Sonde
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
AGPase	ADP-Glucose Pyrophosphorylase
AT	Annealing-Temperatur
BART	Bioluminescent Real Time Reporter
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringensis</i>
c	Konzentration
C _t	Threshold Cycle Number
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNA	Desoxyribonuclein Acid
ds	doppelsträngig
EC	European Comission
ELISA	Ezyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPSPS	5-Enolpyrovyl-shikimat-3-phosphat-Synthase
ERM	European Reference Material
EU	Europäische Union
fg	Femto-Gramm
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GDCh	Gesellschaft Deutscher Chemiker
GV	Genetisch/gentechnisch verändert
GVO/GMO	Genetisch veränderte/modifizierte Organismen
ha	Hektar
IKB	Institut Kirchhoff Berlin
LAMP	loop-mediated isothermal DNA amplification
LFA	Lateral Flow Assay
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ng	Nano-Gramm
NIR	Near Infrared
nm	Nano-Meter
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pico-Gramm
Pre-MM	Pre-Mastermix (Voransatz)
PSTVd	Potato spindle tuberviroid
RR	Roundup Ready™
SSC	Natrium-Citrat-Puffer
TAMRA	Tetramethylrhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TNOS	Terminator der Nopalinsynthase-Sequenz
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Genetisch modifizierte Pflanzen

1.1.1 Gesetzliche Regelungen, Anbau und Nutzen von GVO

Der Anteil gentechnisch veränderter Lebensmittel in der EU ist im Vergleich zum Weltanteil eher gering. Seit den neunziger Jahren ist der Einsatz der Gentechnik vor Allem in den USA, aber auch in weiten Teilen Südamerikas sowie in Afrika tendenziell steigend. EU-Importe von Futtermitteln mit GVO-Hintergrund zeigen jedoch ebenfalls einen deutlichen Anstieg (Sturma et al., 2011). Grundlage für die genannten Fakten sind innerhalb der Europäischen Union im Bezug auf die Entwicklung und dem Umgang mit genetisch modifizierten Organismen eine Reihe von gesetzliche Vorschriften und Richtlinien (Barbau-Piednoir et al., 2010). In der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 ist das Inverkehrbringen genetisch veränderter Lebens- und Futtermittel, oder diese, die aus genetisch veränderten Erzeugnissen bestehen, geregelt. Entsprechende weiterführende Durchführungsbestimmungen sind in der Verordnung (EG) Nr. 641/2004 festgehalten. Zulassungsverfahren folgen der Richtlinie 2001/18/EG, worin allgemeine Verpflichtungen für Inverkehrbringer im Sinne eines Vorsorgeprinzips festgelegt wurden [Richtlinie 2001/18/EG]. Regelungen innerhalb der Europäischen Gemeinschaft bezüglich der Rückverfolgbarkeit dieser Erzeugnisse wurden mit der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 getroffen. Unabhängig vom Vorsatz „genetisch verändert“ müssen auch solche Lebens- oder Futtermittel amtlichen Kontrollen unterliegen. Die bereits genannten Verordnungen geben Verweise auf die Verordnung (EG) Nr. 882/2004, nach der ein Referenzlabor der Kommission (Ispra, Italien) besteht. In den letzten Jahren enthalten immer mehr Lebensmittelverpackungen- bzw. -etiketten die Aufschrift „ohne Gentechnik“. Grundlage für die Implementierung eines solchen Siegels für Lebensmittel war das Inkrafttreten des EG-Gentechnik-Durchführungsgesetzes. Voraussetzung zur Etablierung eines Produktes mit derartiger Kennzeichnung ist der §3 [EGGenTDurchfG, 2008]. Demnach ist unter Anderem vorgeschrieben, dass beispielsweise Zusatzstoffe oder Aromen laut Artikel 12 und 13 der VO (EG) Nr. 1829/2003 mit dem entsprechendem Hintergrund der Gentechnik nicht in den Siegel-gekennzeichneten Lebensmitteln verarbeitet sein dürfen. In Deutschland gibt es das Gesetz zur Regelung der Gentechnik. Darüberhinaus ist seit dem Erscheinen dieses Gesetzes (1990) eine „Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit“ tätig [GenTG (1990), zuletzt geändert 07.08.2013]. In der Landwirtschaft bedient man sich seit Längerem der Gentechnik. Transgene Pflanzen sind in den letzten Jahren mehr und mehr in den Fokus

geraten. Trotz mangelnder Akzeptanz und teilweise unklaren Auswirkungen auf die Umwelt sind die Vorteile für deren Anwender eindeutig und vor Allem wirtschaftlicher Natur (Sturma et al., 2011). Genmodifikationen bezüglich *Bt*-Toxinen (*Bt*-Proteinen, siehe Punkt 1.1.2) beruhen auf der Anpassung des Codongebrauchs an Pflanzen und wurden beispielsweise in Mais (*Bt*-Mais), Kartoffeln, Baumwolle oder Tomaten etabliert (Kempken, Kempken; 2004). Es gibt ca. 170 natürlich vorkommende *Bt*-Proteine mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum (Spelsberg et al. [1], 2013).

Tab. 1: Anbau von GV-Mais in der EU in ha, 2007-2013 (Spelsberg et al. [2], 2013)

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Spanien	75.148	79.269	76.057	76.575	97.325	116.306	136.962
Portugal	4.500	4.851	5.094	4.868	7.723	9.278	8.171
Tschechien	5.000	8.380	6.480	4.680	5.090	3.080	*2.800
Polen	320	3.000	3.000	3.000*	3.900	4.000*	-
Slowakei	900	1.900	875	1.248	760	189	*100
Frankreich	21.147	-	-	-	-	-	-
Deutschland	2.685	3.171	-	-	-	-	-
Rumänien	350	7.146	3.244	822	588	217	*834
Summe	109.847	107.717	94.750	91.193	115.386	133.679	148.867

* Schätzungen

Bt-Mais der Linie MON810 ist eine der am häufigsten verwendeten Maissorten auf der Welt (siehe Tabelle 1). Spanien hat bis heute in Europa die größten Anbauflächen (Spelsberg et al. [2], 2013). Frankreich und Deutschland (2008 und 2009) haben jedoch entgegen der europäischen Bestimmungen Anbauverbote erlassen. Heutzutage (2013) beträgt die Anbaufläche in der EU 150.000 Hektar (Spelsberg et al. [1], 2013). Eine große Relevanz bezüglich des GVO-Anbaus weltweit hat Soja (Spelsberg [4] et al., 2011) (Sturma et al., 2011). Seit 1997 wird Roundup Ready™-Soja (Wirkstoff: Glyphosat, siehe Punkt 1.1.2) in den USA und später auch in Südamerika angebaut (siehe Abbildung 1). Der Einsatz von GV-Soja ist im Futtermittelsektor als Proteinreiche Nährstoffquelle, aber auch im Lebensmittelbereich, von Bedeutung. Auch Europa ist mit großen Importmengen als Verbraucher beteiligt. Es werden jährlich 35-40 Millionen Tonnen genetisch verändertes, zumeist herbizidresistentes Soja, eingeführt (Spelsberg [4] et al., 2011). Der Import belief sich

2006 dabei jährlich auf 16 Millionen Tonnen Sojabohnen sowie 20 Millionen Tonnen Soja-Schrot (Stand 2006) (Zagon et al., BfR, 2006).

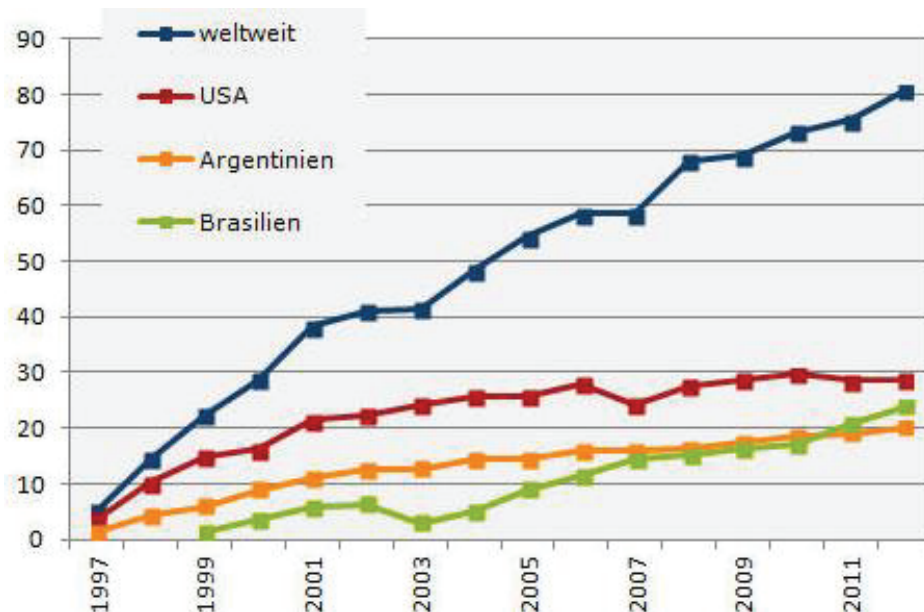


Abb. 1: Anbaufläche GV-Soja in Millionen Hektar (Spelsberg [3] et al., 2013)

Im Jahr 2006 bildeten GV-Sojabohnen mehr als die Hälfte der Welterzeugung an Soja mit nachfolgend steigender Tendenz (siehe Abbildung 1) (Spelsberg [3] et al., 2013) (Zagon et al., BfR, 2006). Sojaextraktionsschrot wird vorwiegend in Mischfuttermitteln eingesetzt und stellte 2006 das am meisten genutzte Futtermittel dar (Zagon et al., BfR, 2006).

1.1.2 Eigenschaften genetisch modifizierter Pflanzen

Durch die Gentechnik ist es möglich, neue Eigenschaften auf Zielorganismen zu übertragen. Es können dabei nicht nur pflanzliche Gene verwendet werden, sondern auch Gene aus Pilzen, Bakterien oder Tieren. Dafür werden häufig Änderungen an Promotoren und Terminatoren von Genen vorgenommen, um diese dem Zielorganismus, der Pflanze, anzupassen. Durch derartige Modifizierungen werden beispielsweise toxische Stoffwechselprodukte oder Allergene durch den genetischen Einfluss auf den Metabolismus der Pflanze reduziert oder vermieden. Weiterhin ist die Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegen Pflanzenschädlinge, die Steigerung der Produktqualität sowie der biologischen Effizienz der Pflanzen von Bedeutung (Kempken, Kempken: 2004) (Sturma et al., 2011). Herbizidresistenzen haben im Bezug auf Gentechnik bei Pflanzen die größte Relevanz (Brunnert, 2002). Der Konzern Monsanto brachte 1971 das universell wirkende Blatt-Herbizid Glyphosat auf den Markt, was unter dem Handelsnamen Roundup Ready (N-

Phosphonomethyl-Glycin) erhältlich ist. Im Metabolismus der betreffenden Pflanzen wird durch dieses Herbizid der Shikimat-Syntheseweg durch Inhibierung der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) blockiert. Folglich wird die Synthese von beispielsweise aromatischen Aminosäuren verhindert (Padgett, 1995). Weiterhin haben Insektenresistenzen eine entscheidende Bedeutung. *Bacillus thuringiensis* ist beispielsweise ein sporenbildendes Bodenbakterium, das bei der Sporulation δ -Endotoxine bildet. Diese Proteine sind für bestimmte Insekten unverträglich bzw. giftig. Pflanzensorten mit dieser Eigenschaft erhalten für gewöhnlich das Kürzel *Bt*, was deren Genmodifikation im Bezug auf die genannte Gen-Sequenz aus *Bacillus thuringiensis* kennzeichnet (Kempken, Kempken; 2004) (Sturma et al., 2011) (Höfte, Whiteley; 1989). Im Intestinaltrakt von Insekten werden die kristallinen Proteine gelöst und in ihre aktive Form umgewandelt. Durch Bindung an spezifische Darmrezeptoren führt dies zu einer Zerstörung der Epithelzellen (English, Slatin; 1992) (Lee et al., 2003). Außerdem kann durch genetische Veränderungen bzw. Gen-Regulierungen beispielsweise mit einer antisense-RNA aus Bakterien die Intensität der Ausprägung eines Merkmals – eines Proteins, Peptids oder Aminosäure – herabgesetzt werden, indem auf Stoffwechselwege des Ethylens während der Reifung ein limitierender Einfluss ausgeübt wird (Mizuno et al., 1984). Die Reifeperiode und somit auch die Haltbarkeit werden demnach verlängert. Die Einsatzmöglichkeiten der genetischen Einflussnahme auf verschiedene Genausprägungen von Pflanzen sind sehr unterschiedlich und umfassen verschiedene Bereiche bzw. Absichten der Erzeuger (Menrad et al., 2003). Durch Übertragung eines nicht allergen wirkenden Albumin-Gens kann zum Beispiel eine Steigerung des Gesamtproteingehaltes erreicht werden (Kartoffel, Maniok). Eine erhöhte Stärkeakkumulation wird durch die Übertragung eines mutierten AGPase-Gens aus *E. coli* hervorgerufen (Kartoffel). Für Pflanzen der Ölgewinnung (Raps, Sonnenblumen) wurden Verfahren eingesetzt, die durch Veränderungen im Fettsäureprofil einen erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aufweisen. Weitere Methoden zur Steigerung ernährungsphysiologischer Eigenschaften zielen beim Reis darauf ab, beispielsweise den Eisengehalt bzw. dessen Verfügbarkeit zu erhöhen. Dafür wurde ein Ferritin-Gen aus *Phaseolus vulgaris* sowie eines Phytase-Gens aus *Aspergillus fumigatus* verwendet. Das führt zu einer Überexpression eines Cystein-reichen Proteins, wobei die Aminosäure Cystein für ein erhöhtes Absorptionsvermögen (Eisen) sorgt (Menrad et al., 2003) (Hoffman, 1997). Für die Ausprägung von Genen sind Promotoren essenziell. Sie liegen vor dem betreffenden Genabschnitt, von dem die Transkription ausgeht. Promotoren, die näherungsweise 30-100 Nukleotide lang sein können, liegen unmittelbar vor dem Transkriptionsstart. Promotoren

werden auch als Boxen bezeichnet. Bei Eukaryonten gibt es zum Beispiel die CCAAT- (40 bis -100 Nukleotide) und die TATA-Box (-30 Nukleotide). Aufgrund der Stellung werden sie mit einem negativen Vorzeichen, sowie mit der Anzahl der Nukleotide versehen. Während einige Promotoren in fast allen Gewebeschichten zu finden sind, weisen einige eine Gewebe- oder Zellspezifität auf. Das Ende der Transkription wird durch einen Terminator bestimmt, der in unmittelbarer Nähe als Transkriptionsstop dient. Unter den Steuerungssignalen bzw. -Sequenzen gibt es außerdem noch sogenannte Enhancer und Silencer. Diese sind oftmals weit vom Promotor entfernt, können jedoch teilweise mit dem erstgenannten überlappen. Enhancer steigern die Expressionshäufigkeit von Genen, während Silencer das Gegenteil bewirken (Kempken, Kempken; 2004) (Steinbiß, 1995). Tabelle 2 zeigt Promotoren, die zu gentechnischen Zwecken häufig verwendet werden.

Tab. 2: Einige Promotoren bei genetisch veränderten Pflanzen (Menrad et al., 2003; Hoffmann, 1997)

Promotor	Herkunft	Wirkung auf Genexpression
35S (35S RNA Transkript)	Blumenkohl-Mosaikvirus CaMV (Cauliflower mosaic virus)	starke Expression
35S-Adh 1 intron 1 (35S RNA Transkript und 1. Intron des Adh 1-Gens)	CaMV (Cauliflower mosaic virus), Mais	verbesserte Expression in einkeimblättrigen Pflanzen
nos/ocs (Promotor der Nopalinsynthase)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , Ti-Plasmid	schwache Expression
rbcS	Reis, Tomate	lichtinduzierbare Expression
rol C (Promotor des ORF 12-Gens)	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Expression nachfolgender Gene in embryonem und Leitgewebe

Die Gensequenz des 35S Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower mosaic virus, CaMV 35S) ist in den meisten genetisch modifizierten Pflanzen vertreten. Diese ermöglicht eine effiziente Transkription der nachfolgenden Gensequenzen (Kempken, Kempken: 2004). Laut Kempken, Kempken (2004) ist dieser Promotor besonders zur Erzeugung

herbizidresistenter Pflanzen geeignet (siehe Abbildung 2) (Menrad et al., 2003) (Kempken, Kempken: 2004). Der CaMV 35S-Promotor ist einer der wichtigsten Screening-spezifischen Primer für PCR basierte Methoden. Die Tabelle 3 zeigt lediglich eine geringe Auswahl an modifizierten Pflanzen, die diesen Sequenzabschnitt aufweisen (Kempken, Kempken: 2004).

Tab. 3: Einige mit dem 35S-Promotor detektierbare Organismen (Barbau-Piednoir et al., 2010)

GVO	Sorten (% GVO)	Referenzen
Sojabohnen	A 2704-12 (100%) GTS40-3-2 (5 %) Roundup Ready™ (100%)	Barbau-Piednoir et al., 2010 Barbau-Piednoir et al., 2010 „diese Arbeit“, Abschnitt 2.1
Mais	Bt (4,89 %) (ERM) Mon 810 MON 863 T25	„diese Arbeit“, Abschnitt 2.1 Barbau-Piednoir et al., 2010 Barbau-Piednoir et al., 2010 Barbau-Piednoir et al., 2010
Raps	T45 (1%) Topas 19/2 (100%)	Barbau-Piednoir et al., 2010 Barbau-Piednoir et al., 2010
Reis	LL62 (100%)	Barbau-Piednoir et al., 2010
Baumwolle	MON 531 (100%) MON 15985 (100%)	Barbau-Piednoir et al., 2010 Barbau-Piednoir et al., 2010

(Bezeichnungen nach Barbau-Piednoir et al., 2010)

Generell kann die DNA einer transgenen Pflanze durch die Abbildung 2 verbildlicht werden, in der die GVO-charakteristische Sequenz beispielhaft an einer Sojabohne dargestellt ist. Der von der übrigen Pflanzen-DNA (grün) eingegrenzte Bereich (gelb) beginnt mit dem besagten 35S-Promotor (P-35S) (IKB, 2011).



Abb. 2: Charakterisierung der DNA einer transgenen Pflanze am Beispiel einer GV-Sojabohne (IKB, 2011)

Der CTP-Abschnitt beschreibt eine Sequenz des chloroplastidären Transitpeptids. Der CP4 EPSPS-Bereich kennzeichnet die beabsichtigte genetische Modifikation. Es handelt sich

demnach um Glyphosat-resistentes Soja (Roundup Ready™). Abschließend fungiert der NOS-Terminator (T-NOS) als finale Steuersequenz (IKB, 2011).

1.2 Protein- und Nukleinsäure-Analytik

1.2.1 Nicht-PCR-basierte Methoden und weiterführende Analytik

Für Eine Standard-PCR kommt routinemäßig eine Endpunkt-Analyse der PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid als Fluorophor unter UV-Licht in Frage. Eine solche Methode weist in etwa eine Empfindlichkeit von ca. 10^{10} Molekülen auf, entsprechend einer Fragmentlänge von 500 bp (Konrad, Busch, 2010). Generell bietet eine elektrophoretische Trennung in der Praxis vielfältige Analysemöglichkeiten, um Teilchen mit entsprechender Ladung in einem elektrischen Gleichstromfeld aufzutrennen (Geckeler, Eckstein; 1998). Laut Geckeler und Eckstein (1998) unterteilt man grundsätzlich in Zonenelektrophorese (ZE), Isotachophorese (ITP) und die Isoelektrische Fokussierung (IEF). Weiterhin differenziert man in trägerfreie Elektrophorese, Dünnschicht- oder Gelelektrophorese. Bei allen Varianten bewegen sich die Moleküle bzw. Partikel aufgrund ihrer Ladung und Masse mit unterschiedlicher, spezifischer Geschwindigkeit zum entgegengesetzten Pol des elektrischen Feldes. Diese Wanderungsgeschwindigkeit ist charakteristisch für das jeweilige Molekül (Geckeler, Eckstein; 1998).

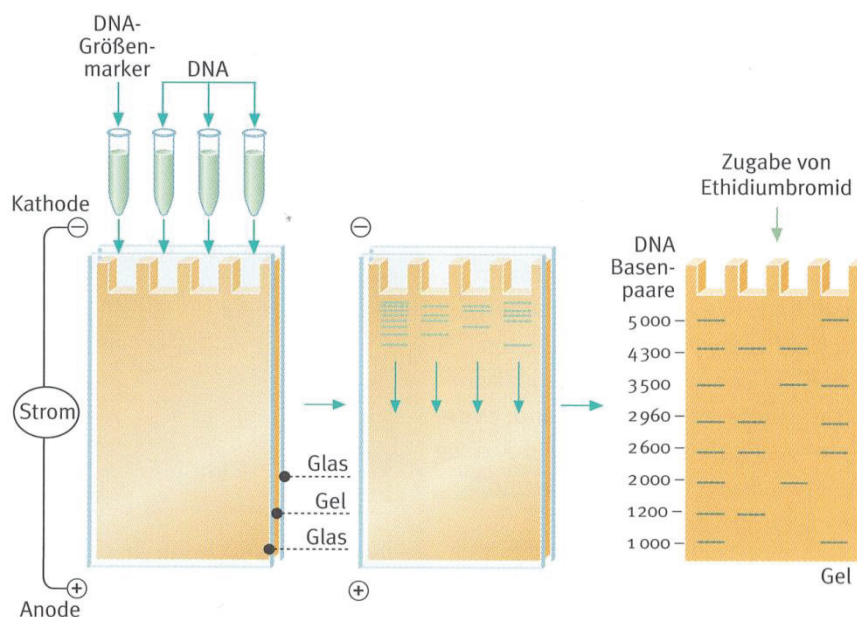


Abb. 3: Prinzip der Gelelektrophorese (Renneberg, 2009)

Sie ist unter Anderem abhängig von der Partikelgröße, der Art bzw. Konzentration sowie pH-Wert des verwendeten Puffers, Art des Trägermaterials oder von der Feldstärke. Die Gelelektrophorese kann als DNA-Sequenzanalyse verwendet werden (siehe Abbildung 3) (Geckeler, Eckstein; 1998) (Renneberg, 2009). Dazu wird die Proben-DNA durch Restriktionsenzyme in Fragmente geteilt. Diese können laut Abbildung 3 in dem Gel innerhalb des elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode wandern (Zagon et al., BfR, 2006) (Matissek, Steiner, Fischer, 2010) (Renneberg, 2009). Nukleinsäuren sind innerhalb eines bestimmten, relativ großen, pH-Bereiches negativ geladen. Um diese Eigenschaft während der Analyse sicherzustellen, werden Puffer eingesetzt. Die negative Ladung wird durch die Zucker-Phosphat-Verbindung gewährleistet, so dass tendenziell mit steigender Fragmentlänge die negative Ladung zunimmt. Das Verhältnis von Molekulargewicht zur Ladung bleibt jedoch konstant (Matissek, Steiner, Fischer, 2010). Eine Trennung erfolgt aufgrund der Molekülgröße bzw. des Molekulargewichtes. Standardmischungen aus Nukleinsäure-Fragmenten bekannter Länge sollten parallel zum Versuch im selben Gel laufen (Marker) (Matissek, Steiner, Fischer, 2010) (Renneberg, 2009). Die Abbildung 4 zeigt die Sichtbarmachung von DNA-Fragmenten in einem Gel mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht. Die Taschen am oberen Rand der Abbildung symbolisieren den Startpunkt. Am rechten und linken Rand befinden sich die Marker. Proben wurden dazwischen mit Bezeichnungen versehen. Dieser Versuch diente dem Nachweis von GV-Soja. Die angezeigten Banden, zum Beispiel der Proben, stehen für GVO-spezifische Fragmente, hier ist es der unter Anderem der 35S-Promotor (Zagon, BfR, 2007).

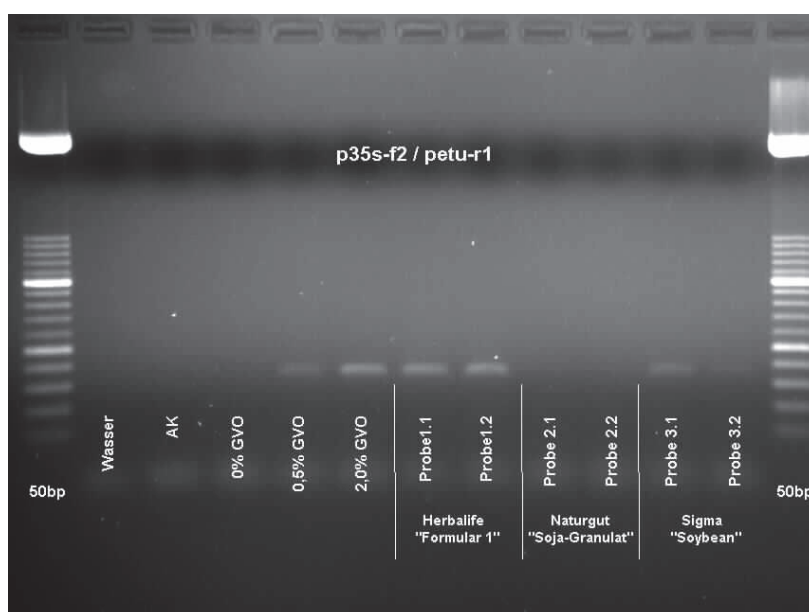


Abb. 4: Ergebnis einer Gel-Elektrophorese am Beispiel GV-Soja (Zagon, BfR, 2007)

Im Gegensatz zu Agarose-Gelen eignen sich Polyacrylamid-Gele in Form einer besseren Auflösung für kleinere DNA-Fragmente bis 1000 bp. Weiterhin haben sie eine höhere Kapazität. Der Trennbereich wird hierbei durch die Acrylamid-Konzentration festgelegt (Mülhardt, 2006) (Matissek, Steiner, Fischer, 2010) (Rehm, 2002). Das Blotting oder „Blotting“ ist eine weitere spezifische Nachweismethode, die angewandt wird, um DNA oder RNA – Fragmente oder Proteine auf eine Blotfolie bzw. Membran zu übertragen. (Geckeler, Eckstein; 1998). Eine frühe Methode des Blottens wurde 1975 von E. M. Southern etabliert. Dieses nach ihm benannte Verfahren (Southern Blot) dient der Übertragung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen auf eine Cellulose–Nitrat–Membran. Die Vorgehensweise dieses Verfahrens schildert E. M. Southern (1975) detailliert in seiner Publikation über den Nachweis von mittels Gelelektrophorese getrennten DNA-Fragmenten (Southern, 1975). Ausgehend von dieser Grundform wurden weitere Verfahren abgeleitet, wie der Western oder der Northern Blot (Mülhardt, 2006) (Renneberg, 2009). Weiterhin kann die sogenannte Dot-Blot-Technik als ein Schnelltest eingesetzt werden. DNA, RNA oder auch Proteinproben werden ohne vorherige Gelelektrophorese auf eine Membran übertragen und anschließend detektiert. Die zu untersuchenden Proben werden punktförmig (engl. dot = Punkt / Fleck) auf einen Träger aufgetropft. Analog zur Southern-, Northern- oder Western-Blot-Technik wird geprüft, ob die gesuchten DNA- oder RNA-Sequenzen oder Proteine in der Probe vorhanden sind (Hauk, 2013). Die Dot-Blot-Technik wurde beispielsweise eingesetzt, um das Kartoffelspindelknollen-Viroid (PSTVd, Potato spindle tuberviroid) nachzuweisen (Vassilakos et al., 2012). Ein weiteres Verfahren ist die Kapillar-Elektrophorese, bei der die Gelmatrix in eine Kapillare von 20-100 µm Durchmesser gegossen wird. Aufgrund der Oberflächenvergrößerung durch Kapillaren und somit einer besseren Wärmeabfuhr können 20-80-fach höhere Spannungen angelegt werden, was die Analyse erheblich beschleunigt. Durch zusätzliche Fluoreszenzmarkierung von DNA-Fragmenten können äußerst geringe Mengen von bis zu 10 fg detektiert werden. Weiterhin ist die Kapillar-Gel-Elektrophorese auch auf Mikrochips anwendbar, die aus Glas bestehen und kleine Kanäle beinhalten. In diesen Kanälen befinden sich Kammern zum Mischen, Farbstoff zur DNA-Detektion, sowie Polymere zur Auftrennung. Es erfolgt anschließend eine Laserdetektion sowie die Darstellung in einem Elektropherogramm (Mülhardt, 2006). Figeys und Pinto (2000) beschrieben ausführlich die Funktionsweise der Lab-on-a-Chip-Technologie und deren Standpunkt innerhalb der analytischen Chemie. Diese Technologie gehört zu einer Reihe von sogenannten Biochips. Solche basieren nicht allein auf elektrophoretischen Prinzipien. Gryadunov et al. (2011) beschreiben einen Biochip zum GVO-Nachweis. Mit dem eingesetzten Hydrogel-

Oligonukleotid-Biochip ist es möglich, Lebens- und Futtermittelproben nach Aufschluss bzw. Extraktion auf 10 verschiedene transgene Elemente, wie zum Beispiel 35S-Promotorsequenzen, zu testen. Darüberhinaus gibt es Microarrays, sogenannte Streifen-Technologien, bei denen sich eine bestimmte Anzahl von Sonden auf engstem Raum befindet. Die Anordnung der Sonden erstreckt sich auf ein definiertes Raster, das eine Fläche von einigen Mikrometern annimmt. Bei Probenkontakt geht diese eine Wechselwirkung mit den Sonden ein. Diese kann gemessen werden (Müller, Röder, 2004). Protein-spezifische GVO-Nachweise können weiterhin mit Hilfe eines ELISA-Testes durchgeführt werden. Die direkte ELISA-Methode bezieht sich auf das Adsorbieren von Antikörpern an Mikrotiterplatten, die als Trägeroberflächen dienen. Die Testsuspension enthält Antigene, die spezifisch an die Antikörper binden und zu einem Komplex reagieren. Diese Antigene sind beim ELISA-Test vorrangig Proteine. Nach einem Waschvorgang und anschließender Inkubation enzymmarkierter Antikörper binden diese an freie Bindungsstellen. Damit einhergehende Farbreaktionen stellen entsprechende Indikatoren dar. Als Beispiel bewirkt die alkalische Phosphatase durch Phosphatabspaltung eine messbare Färbung (Hallmann et al., 2007) (Waiblinger, 2010). Der Test auf genetische Veränderung bezieht sich hierbei zumeist auf den Nachweis GVO-spezifischer Proteine, demnach ein Nachweis des Phänotyps der transgenen Pflanze. Für die Roundup Ready Sojabohnen beispielsweise betrifft diese Nachweisteknik das Protein CP4 EPSPS (siehe Abschnitt 1.1.2). Auch die transgene Maissorte MON810 (Cry1Ab-Protein) konnte nachgewiesen werden. Dabei wurde bei der Validierung im Fall von Sojamehl eine Sensitivität von 0,1-0,3% erreicht (Stave, 2002) (Waiblinger, 2010).

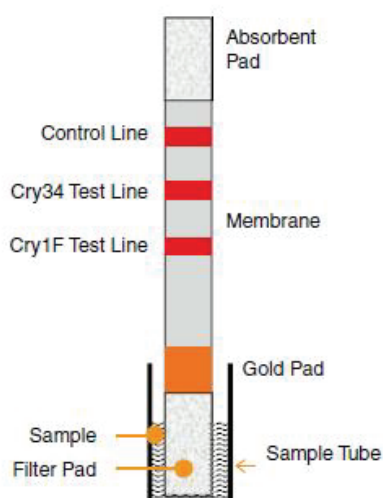


Abb. 5: LFA zum Nachweis von Cry1F- und Cry34-Proteinen (Sojabohne) (Waiblinger, 2010)

In Anlehnung an diesen Methodentyp wurde in Form eines Lateral-Flow-Assays ein Schnelltest etabliert (siehe Abbildung 5), der allerdings eine höhere Nachweisgrenze (0,1-1,0%) hat. Dennoch finden solche Tests im Bezug auf GVO vor Allem in der Landwirtschaft Anwendung. Der Teststreifen laut Abbildung 5 beruht auf dem Prinzip der Wanderung der Probe durch die Kapillarwirkung, sowie der gleichzeitigen biochemischen Reaktion von Antigen und Antikörper. Eine flüssige Probe wird dabei auf den Filterpad gegeben. Kolloidales Gold am Anfang der Laufstrecke ist gekoppelt mit dem benötigten Antikörper für das betreffende Protein. Dieses wandert nach erster Komplexbildung mit dem Antikörper-Goldkonjugat entlang der Laufstrecke bis zur Testlinie. In diesem Bereich kommt es zur sichtbaren Sandwich-Komplexbildung mit Protein-spezifischen Antikörpern (Anklam et al., 2002) (Stave, 2002). Laut Notomi et al. (2000) kann zur Amplifikation von Nukleinsäuren ein weiteres Verfahren, loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP), angewandt werden. Dabei wird kein Programm mit wechselnden Temperaturen benötigt. Somit ist diese Methode in einem einzigen Schritt durchzuführen. Die Dauer bezieht sich auf einen Zeitraum von weniger als einer Stunde. Als Ergebnis liegt die vervielfältigte DNA der Ziel-Sequenz in sogenannter Stamm-Schleifen-Form vor (Notomi et al., 2000). Diese Methode wurde beispielsweise genutzt, um über das *phoP*-Gen - eine Transkriptions-regulatorische Gensequenz (Groisman, 1989) - *Salmonella*-Spezies in Lebensmittelproben zu identifizieren (Xuefei Li et al., 2009).

1.2.2 PCR-basierte Methoden

1.2.2.1 Standard-PCR

Die PCR ermöglicht im Allgemeinen die exponentiell ablaufende Vermehrung eines speziellen DNA-Abschnittes unter katalytischer Wirkung der *Taq*-Polymerase. Sie bildet somit unter Anderem eine essentielle Grundlage für nachfolgende Verfahren (Mülhardt, 2006). Die *Taq*-Polymerase wurde aus dem gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt (Chmiel, 2006). Für die Durchführung dieser Methode sind nur wenige DNA-Moleküle als Ausgangsprodukt (Template-DNA) notwendig. Das Standardprogramm zur Durchführung einer PCR setzt sich aus den Schritten Denaturierung, Annealing, und Elongation zusammen (siehe Abbildung 6) (Chmiel, 2006). Die Reaktionen sind daher vor Allem temperaturabhängig und werden heutzutage in Thermocyclern, auch PCR-Block genannt, durchgeführt. Der Start der PCR wird durch den ersten Schritt, der Denaturierung, vollzogen. Dabei wird die Template-DNA durch einen

thermischen Einfluss von gewöhnlich 94-95°C aufgetrennt. Das Vorhandensein von Primern und Oligonukleotiden in ausreichender Menge ist für die nun folgenden Schritte essentiell. Primer sind Oligonukleotide, die komplementär zu gegenüberliegenden Basen an das Ende eines Einzelstranges binden. Des Weiteren wird vorausgesetzt, dass die zu amplifizierende Sequenz bekannt ist, so werden spezifische Primer für die jeweiligen Sequenzen eingesetzt (Müller, 2001) (Mülhardt, 2006).

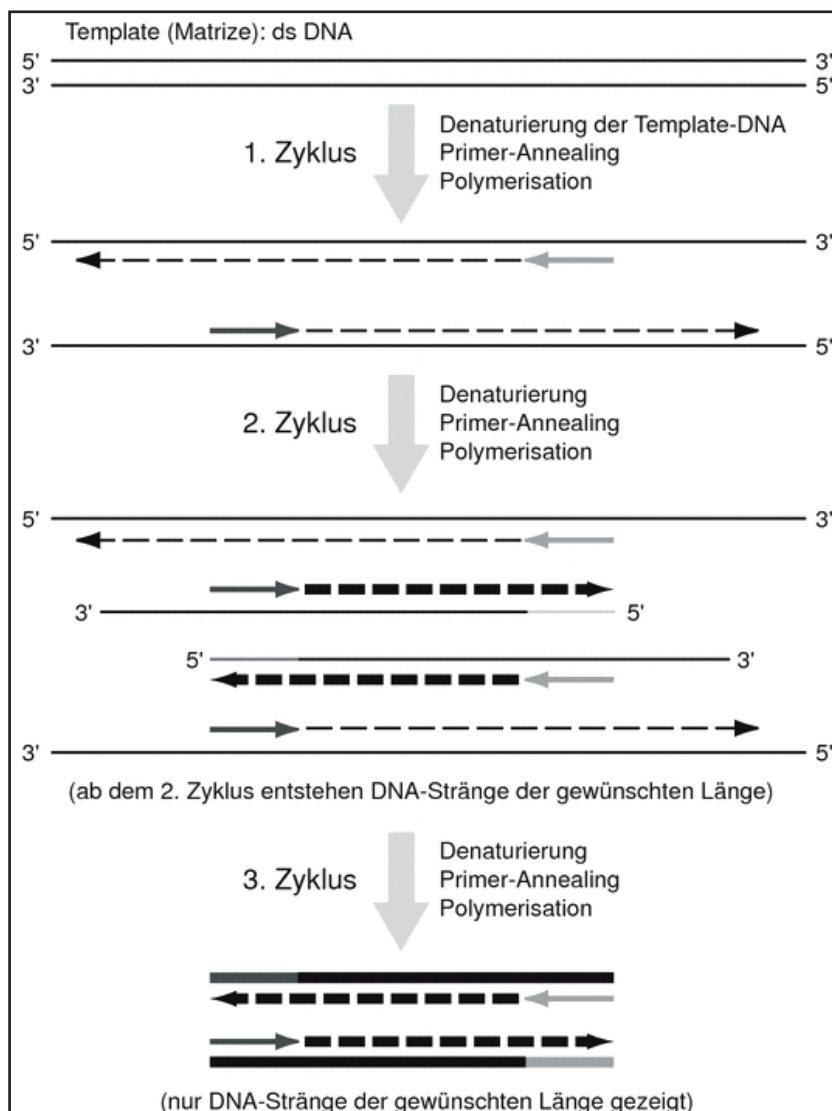


Abb. 6: Prinzip einer Standard-PCR (Nowrousian, 2005)

Bei einer anschließenden Temperatur von beispielsweise 55°C binden zuvor hinzugefügte Primer an den Einzelsträngen (Annealing) (Chmiel, 2006) (Mülhardt, 2006). Der Elongationschritt bei 72°C wird durch die thermostabile *Taq*-Polymerase realisiert, die die Verknüpfungsreaktion zum Einzelstrang komplementärer Oligonukleotide in Syntheserichtung ausgehend von den Primern katalysiert (Mülhardt, 2006). Dieser Vorgang wird in

der Abbildung 6 Polymerisation genannt. Ein Zyklus besteht jeweils aus den beschriebenen drei Schritten (Chmiel, 2006). Aus diesem Verfahren entstand eine Reihe von Abwandlungen, die je nach Verwendungszweck angepasst wurden (Müller, 2001).

1.2.2.2 Die Real Time PCR und die *TaqMan*TM-Technologie

Die Bestimmung von GVO mittels PCR-Methoden stützt sich auf die Real Time PCR, wobei auch quantitative Aussagen getroffen werden können. Für eine quantitative PCR in Echtzeit (Real Time qPCR) werden in der Praxis Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Diese Fluorophore sind intercalierende Substanzen (z.B. Ethidiumbromid, SYBR® Green I, siehe auch Tabelle 4), das heißt sie lagern sich in die doppelsträngige DNA ein (Müller, 2001). Durch deren Fluoreszenz wird eine quantitative Erfassung des ds PCR – Produktes ermöglicht (Renneberg, 2009) (Tevfik Dorak, 2006).

Tab. 4: Einige Fluorophore und deren Extinktionen und Emissionen

Fluorophor	Extinktion (nm)	Emission (nm)	Fluorophor	Extinktion (nm)	Emission (nm)
ALEXA 430	430	545	FAM	488	518
CascadeBlue	400	425	HEX	466	556
Cy3	550	570	6-TAMRA	555	580
Cy5	649	670	TET	488	538
JOE	527	548	SYBRGreen	488	520

(nach Müller, 2001; Konrad, Busch, 2010)

In der Tabelle 4 sind einige Fluoreszenzfarbstoffe vermerkt und entsprechende Extinktions- und Emissionsmaxima angegeben. Eine häufig verwendete Detektionsmethode stellt die Applikation des Fluorophors SYBR® Green zum Template dar. Es ist weiterhin eine gesundheitszuträglichere Alternative zum erbgutverändernden Ethidiumbromid. Die SYBR® Green-Detektionsmethode beschreibt den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green, wobei dessen Moleküle sich in die Doppelhelix der DNA einlagern (intercalieren) und bei Anregung durch kurzwelliges Licht (siehe Tabelle 4, 488 nm) längerwelliges Licht emittieren (520 nm). Im Gegensatz zum Ethidiumbromid bindet SYBR® Green nur an dsDNA (Müller, 2001). Um die nicht gewünschten Amplifikate zu identifizieren, führt man in der Praxis eine Schmelzkurvenanalyse durch. Mittels einer kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur

trennen sich dabei die DNA-Stränge entsprechend ihrer Länge. Längere Doppelstrangmoleküle, also das beabsichtigte Amplifikationsprodukt, schmelzen bzw. trennen sich bei höheren Temperaturen auf. SYBR® Green-Fluorophore wird wieder frei. Die Abnahme der Fluoreszenz kann über die Temperaturerhöhung gemessen werden und ist produktspezifisch (Konrad, Busch, 2010) (Renneberg, 2009) (Tevfik, Dorak, 2006). Für alle Anwendungen der Real-Time PCR-Analytik spielt der C_t -Wert eine tragende Rolle. Er beschreibt die Zyklenzahl, bei der die Summe der Fluoreszenzsignale erstmals über ein gewisses Grundrauschen hinweg ermittelt bzw. detektiert werden können (siehe Abbildung 7). Die Linie, die den Wert über den Graphen festlegt, wird Threshold genannt. Es gilt dabei, dass die Standardabweichung der gemessenen Fluoreszenzsignale die des Grundrauschens um das 10-fache übertrifft. Der C_t -Wert ist unter Anderem vom DNA-Gehalt des Templates, der Reaktionseffizienz und der Detektionssensitivität abhängig. Je eher der C_t -Wert erreicht ist, desto größer war die Ausgangsprobenmenge bzw. die Kopienzahl des Templates (Konrad, Busch, 2010) (Tevfik Dorak, 2006).

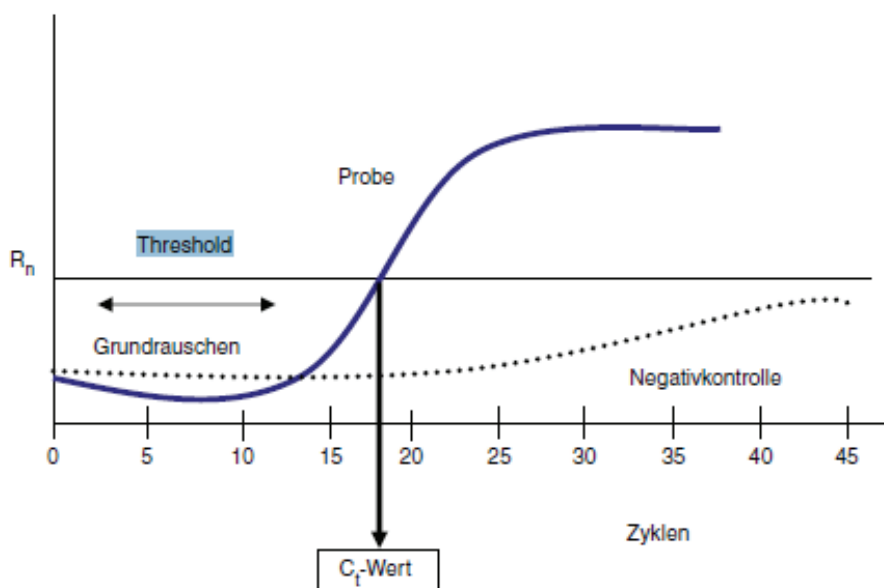


Abb. 7: Graphische Darstellung des C_t -Wertes (Konrad, Busch, 2010)

Der Schnittpunkt zwischen Threshold und Graph ergibt den C_t -Wert, der für die Beschaffenheit des Templates charakteristisch ist (Konrad, Busch, 2010) (Tevfik Dorak, 2006). Im Feld der Real-Time-PCR-Analytik wird weiterhin der Einsatz von Hybridisierungssonden praktiziert. Dieser beruht auf dem physikalischen Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Dabei wird ein Fluoreszenz-Molekül (Donor-Fluorophor/Reporter) durch eine externe Lichtquelle zunächst angeregt. Die Strahlung entspricht der optimalen Wellenlänge des Moleküls, was nachfolgend Licht emittiert, das

einer längeren Wellenlänge entspricht und um einen bestimmten Betrag verschoben ist. Dieser Vorgang wird Stoke's Shift genannt. Die Energie wird demzufolge auf ein weiteres Fluoreszenz-Molekül (Quencher/Akzeptor) übertragen, der sich in räumlicher Nähe befindet. Der Quencher „löscht“ wiederum das Signal des Donors, das vom Real-Time-Thermo-Cycler detektiert wird (Konrad, Busch, 2010) (Mackay, 2007) (Tevfik Dorak, 2006). Diesem Prinzip folgt auch die in dieser Arbeit angewandte *TaqMan*TM-Technologie (siehe Abbildung 9). Dabei kommen spezielle Sonden zum Einsatz, sogenannte fluorogene Sonden, die eine spezifische Bindung mit dem entstehenden Amplifikat eingehen (Zagon et al., BfR, 2006) (Müller, 2001).

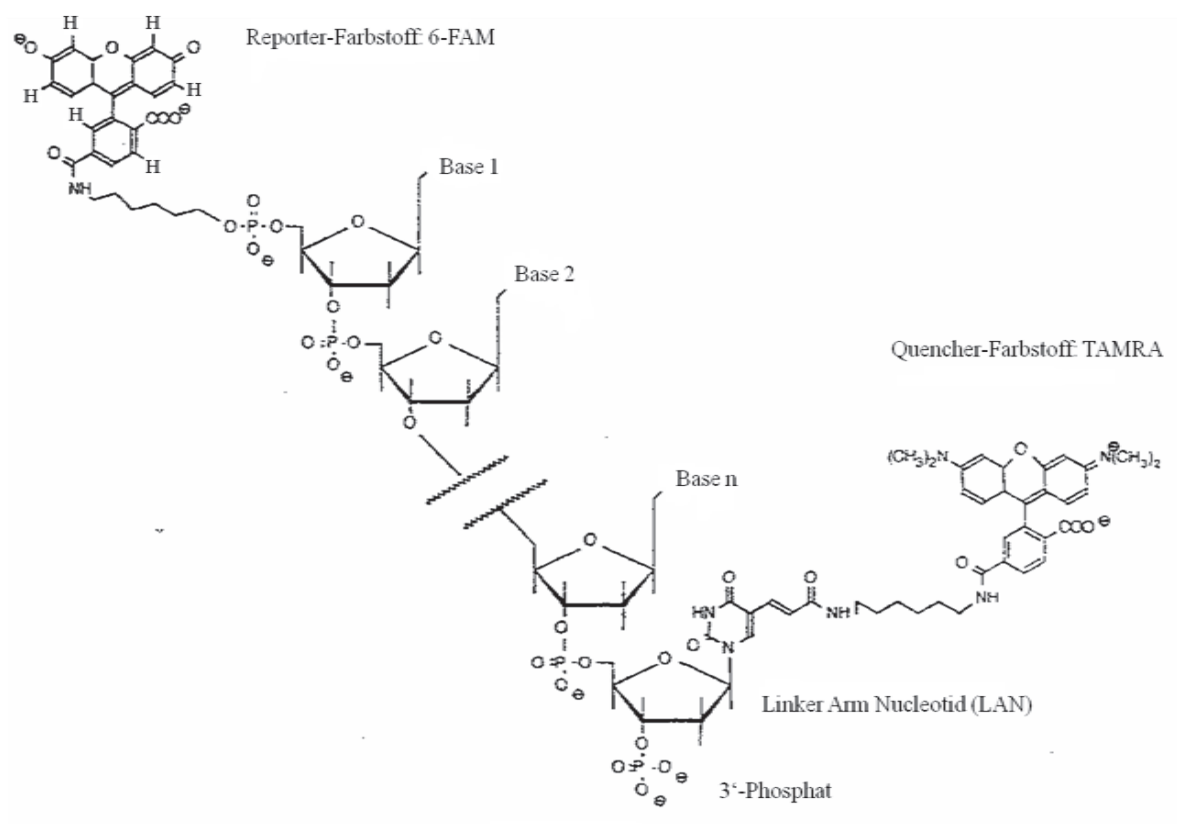


Abb. 8: Darstellung einer *TaqMan*TM-Sonde (nach Zagon et al., BfR, 2006; GDCh, 2010, siehe Anlage 9, CD)

Die Abbildung 8 zeigt die in dieser Arbeit verwendete *TaqMan*TM-Sonde. An dem 3'-Ende einer spezifischen Sequenz befindet sich ein Quencher-Molekül in Form des Farbstoffes TAMRA (Tetramethylrhodamin). Am entgegengesetzten Ende befindet sich der Farbstoff 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) (Zagon et al., BfR, 2006) (GDCh; 2010, siehe Anlage 9, CD). Der PCR-Vorgang (siehe Abbildung 9) beginnt PCR-typisch mit einem Schmelzen (Denaturieren, Schritt 1) der DNA bei 95°C. Das nun vorliegende ds Molekül dient als

Matrize für die Primer und Sonden, die sich an spezifische Sequenzen anlagern. Im Gegensatz zu einer Standard-PCR verlaufen die nachfolgenden Schritte eines Zyklus bei beispielsweise 60°C (siehe Abbildung 9). Folglich wird nach dem Annealing kein separater Elongationsschritt von 72°C (Vgl. Abschnitt 1.2.2.1, Abbildung 6) eingeleitet. Im Schritt 3 der Abbildung 9 ist die Verlängerung der Einzelstränge dargestellt. Dabei wird die Sonde verdrängt (Tevfik Dorak, 2006) (Zagon et al., BfR, 2006).

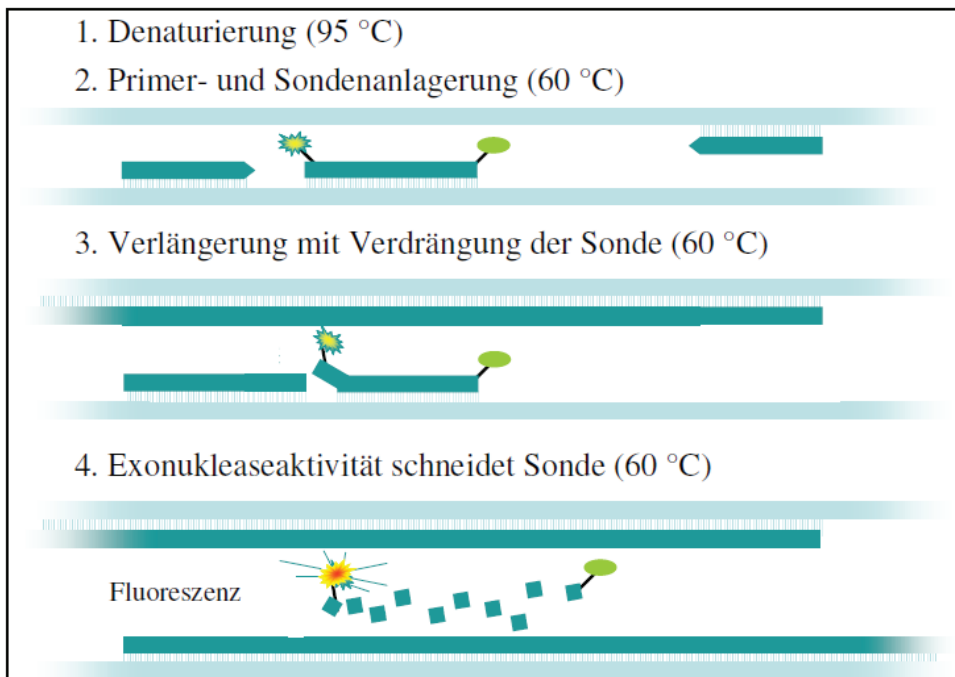


Abb. 9: Prinzip der TaqMan™-Technologie (Zagon et al., BfR, 2006)

Die Exonukleaseaktivität zerschneidet nun die Sonde, wodurch Reporter und Quencher ihre räumliche Nähe zueinander verlieren. Die Unterdrückung des Reporter-Signals durch den Quencher, in diesem Fall TAMRA, geht verloren, so dass 6-FAM bei der in der Tabelle 4 angegebenen Wellenlänge von 518 nm Strahlung emittiert, die vom Real Time PCR-Gerät detektiert wird. Die Zunahme der Fluoreszenz wird in einem Fluoreszenzintensitäts-Zyklenzahl-Diagramm dargestellt (Müller, 2001) (Tevfik Dorak, 2006) (Zagon et al., BfR, 2006).

2 Material und Methoden

2.1 Material

Zur Durchführung der Real-Time-PCR im Hinblick auf qualitative Untersuchungen wurden Proben sowohl mit bekanntem als auch mit unbekanntem GVO-Gehalt amplifiziert. Bekannt war eine *Bt*-Mais Probe, entsprechend einer 4,89%-prozentigen GVO-Probe (EC-ERM *Bt*-Mais, Geel, Belgien, siehe Anlage 10, CD und Literaturverzeichnis: BVL). Nicht standardisiertes Material wurde in Form gemahlener Sojabohnen (100% GVO) mehrfach extrahiert und verwendet. Weiterhin kamen Laborproben zum Einsatz, deren Herkunft und genetische Varietät zunächst unbekannt war. Darunter waren Sojaprobe, die in dieser Arbeit die Bezeichnung Laborprobe Soja 1 und Laborprobe Soja 2 tragen. Darüberhinaus wurden die Futtermittel Soja-Extraktionsschrot und Mastschweinfutter (Mischfutterwerk HaGe, Art.-Nr. 300000064, Neubrandenburg, Deutschland; siehe Anlage 1, CD) analysiert. Für die Quantifizierung anhand von Soja wurde als zertifizierte Standardprobe eine Blank-Probe (Referenzmaterial) herangezogen (EC-ERM, Sample No. 6741, Roundup ReadyTM Soya, Geel, Belgien, siehe Anlage 10, CD). Diese wurde zusammen mit der Sojamehlprobe aus Sojabohnen (100% GVO, USA) zu einem Standard gemischt. Quantifiziert wurden Laborprobe Soja 1 und Laborprobe Soja 2, die als Sojaprobe mit zunächst unbekannter Konzentration vorlagen. Gleiches galt für das Futtermittel Sojaextraktionsschrot (Mischfutterwerk HaGe, Art.-Nr. 300000064, Neubrandenburg, Deutschland; siehe Anlage 1, Teil A, CD). Im Bezug auf prozessierte Lebensmittel wurde ein Soja-Pudding-Dessert aufbereitet (siehe Anlage 5, CD). Für die Extraktion der Proben-DNA wurde der Sure Food PREP Plant – Kit (Art. No. S1002, Fa. CONGEN Biotechnologie GmbH) eingesetzt. Dessen Zusammensetzung spiegelt die Tabelle 5 wieder.

Tab. 5: Reagenzien des Extraktions-Kits (Fa. CONGEN Biotechnologie GmbH)

Reagenz	Applikation pro Probe
Wasch-Puffer	2-3 x 550 µl
Pre-WaschPuffer	550 µl
Bindungs-Puffer	200 µl
Lyse-Puffer	400 µl
Elutions-Puffer	100 µl
Proteinase K	20 µl

Vergleichend wurde ein weiterer Extraktions-Kit, MasterPure™ DNA Purification Kit (Cat. No. MCD85201, siehe Anlage 11, CD), zur Aufbereitung der Proben benutzt (Fa. Epicentre Biotechnologies, Madison, USA). Die Tabelle 6 zeigt dessen Inhalt.

Tab. 6: Reagenzien des Extraktions-Kits MasterPure™ (Fa. Epicentre Biotechnologies, Madison, USA)

Reagenz	Applikation pro Probe /
TE-Puffer	35 µl
Ethanol	70 %
Isopropanol	500 µl
T & C - Lyse-Puffer	300 µl
MPC Protein Fällungsreagenz	175 µl
Proteinase K	1 µl

Für die PCR-Ansätze wurde kein Kit verwendet, sondern alle Reagenzien gesondert zusammengestellt. Die Taq-DNA-Polymerase (peqGOLD 'Hot' Taq-DNA-Polymerase, siehe Anlage 12, CD) und der dazugehörige Reaktionspuffer (Y) sowie das MgCl₂ (25mmol) der Fa. PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) wurde zusammen mit einem dNTP-Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 25 µmol) (Fermentas – Life Science, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Hamburg) verwendet.

Tab. 7: Primer; Sonden und deren Sequenzen und Konzentrationen

Primer/Sonden	Konzentration	Sequenz
35S-F	20 mmol	GCC TCT GCC GAC AGT GGT
35S-R	20 mmol	AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTTC
35S-TMP	-	6FAM-CAA AGA TGG ACC CCA CCC ACG--TMR
GM1-F	20 mmol	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC
GM1-R	20 mmol	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC
GM1-Sonde	-	6FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC--TMR
RR-F	20mmol	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA
RR-R	20mmol	GAG CCA TGT TGT TAA TTT GTG CC
RR-Sonde	-	6FAM-CAA GCT GAC TCT AGC AGA TCT TTC—TMR

Die verwendeten TaqMan™-Sonden und Primer wurden von der Fa. TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert und bereitgestellt. Die Produktbeschreibung sowie Primersequenz (siehe auch Anlage 13, CD) sind in der Tabelle 7 hinterlegt.

Im Zuge der Extraktion kam ein Wasserbad der GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Typ Nr. 1002, Burgwedel, Deutschland) sowie eine Mini-Spin-Zentrifuge der Fa. Eppendorf (Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. Zur photometrischen Reinheitsprüfung der DNA-Proben wurde ein Spektralphotometer MULTISKAN GO der Fa. Thermo Fisher Scientific Oy (Vantaa, Finnland) mit der dazugehörigen Software „ScanIt RE for Multiskan GO 3.2“ benutzt. Proben wurden mit Hilfe der dazugehörigen µdrop-Platte (siehe Abbildung 10, Abschnitt 2.2.2) vermessen. Zur Aufbereitung verwendeter Chemikalien kamen Mischapparaturen für Reagenzgefäße (Vortexer, Fa. Heidolph; Schwabach, Deutschland) zum Einsatz. Die Real Time PCR wurde mit einem Thermocycler C1000 (CFX96™ Real-Time System) der Fa. BIO-RAD (München, Deutschland) durchgeführt. Die Einstellungen des Temperaturprogrammes, Echtzeit-Dokumentationen sowie in dieser Arbeit dargestellten Diagramme wurden mit der dazugehörigen Software, Bio-Rad CFX Manager, vorgenommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion der pflanzlichen DNA

Food PREP Plant Kit. Für die Aufbereitung mit dem Sure Food PREP Plant-Kit wurde im Wesentlichen dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Dieser Kit ist laut Hersteller für die Extraktion pflanzlicher DNA aus Nahrungs- sowie aus Futtermitteln geeignet. Im Bezug auf eine Einwaage von 50 mg homogenisierter Probe in ein Eppendorf-Tube wird ein Lyse-Puffer (400 µl, siehe Tabelle 5) zugesetzt, der einen chemischen Zellaufschluss bewirken soll. Durch die Applikation von Proteinase K wird weiterhin ein biologischer (enzymatischer) Aufschluss eingeleitet, der nach kurzem Vortexen für eine Stunde bei 65°C im Wasserbad fortgesetzt wurde. Das entstandene Lysat wird in einem Receiver-Tube befindlichen Spin-Filter bei 13000 U/min (2 Minuten) zentrifugiert. Der Überstand wird in einen neuen Spin-Filter und dazugehörigem Receiver-Tube nochmals bei 13000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Durch diese Schritte soll eine mechanische Abtrennung von Störfaktoren, wie Farbpigmente oder grobe Pflanzenbestandteile, in Form einer Vorfiltration erfolgen. Aus diesem Grund wird der Spin-Filter im nächsten Schritt verworfen. Durch Zugabe des Bindungspuffers und anschließendem Vortexen ergeben sich verbesserte Bindungsbedingungen der Nukleinsäuren

für folgende Schritte. Durch Überführen der trüben Lösung in einen weiteren Spin-Filter (+ Receiver-Tube) Wird die beschriebene Bindung der zunächst noch unreinen DNA an den Filter gewährleistet. Durch erneutes Zentrifugieren (13000 U/min, 2 Minuten) werden flüssige Bestandteile des Ansatzes über das Filtrat entfernt und die DNA verbleibt im Filter. Durch mehrmalige Waschvorgänge wird die DNA von letzten Störfaktoren weitestgehend befreit. Sollten nach Überprüfung der Reinheit (siehe Punkt 2.2.2) noch Verunreinigungen angezeigt werden, kann über die Anzahl der beschriebenen Waschvorgänge eine erhöhte Reinheit erzielt werden. Eine zu hohe Anzahl dieser Vorgänge kann jedoch auch zu Probenverlusten führen. Nach dem Waschen wird der Spin-Filter getrocknet und in ein klares Receiver-Tube gesetzt. Nach Zugabe von erwärmten Elutionspuffer (65°C) und einer Inkubation (3min) wird die DNA aus dem Spin-Filter gelöst. Erneute Zentrifugation bei 13000 U/min (2 min) bewirkt die Ansammlung der DNA am Gefäßboden. Sie verbleibt bei 4°C als für die Real Time-PCR geeignete Probe im Receiver-Tube bis zur Verwendung.

MasterPure™ DNA Puification Kit. Basierend auf einer Einwaage von 5 mg (Empfehlung des Herstellers: 1-5 mg) wurden 300 µl „Tissue and Cell“ – Lyse-Puffer, sowie 1 µl Proteinase K zur Probe unter Vortexen (10 Sekunden) appliziert. Nach Inkubation im Wasserbad bei 65°C für 15 Minuten und zwischenzeitlichem Vortexen des Ansatzes wurden die Probe auf Eis gelegt. Zur Proteinfällung wurden weiterhin 175 µl MPC Protein Fällungsreagenz gegeben. Der Ansatz wurde gründlich durchmischt. Eine Zentrifugation für 10 Minuten (13000 U/min) lässt ein Pellet entstehen, was im Anschluss verworfen wird. Der Überstand wird mit 500 µl Isopropanol versetzt und durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wird der Überstand verworfen. Zurück bleibt ein Pellet, dass zweifach mit Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet wird. Die Applikation des TE-Puffers löst die DNA, die Probe steht somit zur PCR-Untersuchung bereit. Verwendete Proben und jeweilige Extraktions-Kits sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Für das Soja-Dessert, das eine flüssige Konsistenz aufwies, wurde aufgrund des vermuteten niedrigen DNA-Gehaltes eine Einwaage von 70 mg festgelegt. Da dieses Lebensmittel bereits größtenteils aufgeschlossen vorlag, wurde der Lysis-Puffer verdünnt (1:2) eingesetzt. Die Proteinfällung (MPC) wurde zweifach durchgeführt.

2.2.2 Reinheit und Konzentration extrahierter DNA

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit dem Spektralphotometer. Die Beschaffenheit der PCR-Matrize ist einflussreicher Parameter im Bezug auf die Aussagekraft einer PCR. Ein Kriterium für die Reinheit einer DNA-Probe ist das Verhältnis der optischen Dichte von 260 nm zu 280 nm (Müller 2001). Die aromatischen Ringe der 4 Basen der Nukleinsäure sind für eine Absorption verantwortlich. Zur Nukleinsäurebestimmung (DNA oder RNA) wird ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm gemessen. Als Qualitätskriterium wird das OD_{260/280nm}-Verhältnis der extrahierten Probe herangezogen (Pöpping, Unterberger, 2010). Zur Bestimmung des Quotienten (OD_{260/280nm}) wurde die µDrop Platte des Spektralphotometers verwendet (siehe Abbildung 10).



Abb. 10: µdrop Platte des Spektralphotometer MULTISKAN GO (Fa. Thermo Fisher Scientific Oy; Vantaa, Finnland, siehe Anlage 14, CD)

Ist dieser Quotient im Bereich von 1,8-2,0, so kann laut Angaben des Herstellers von einer guten Qualität der Probe ausgegangen werden. Der Bereich unterhalb der angegebenen Spanne soll für eine Anwesenheit von Proteinen stellvertretend sein. Oberhalb des Verhältnisses (> 2) kann von Kontaminationen, wie beispielsweise Phenolen, ausgegangen werden. Eine Kontamination bzw. Rückstände können erkannt werden, indem das OD_{260/230nm}-Verhältnis gebildet wird. Dieses Verhältnis sollte 2 betragen, wobei leichte Abweichungen toleriert werden (Thermo Fisher Scientific, 2011, siehe Anlage (CD)). Um Hintergrundsignale auszublenden, wird diesem Verhältnis ein weiterer Wert zugefügt, sodass sich für den Quotienten zunächst folgendes Verhältnis ergibt (*Background Subtraction*):

$$\left(\frac{Abs_{260} - Abs_{320}}{Abs_{280} - Abs_{320}} \right) \quad \text{Gl. I}$$

(Thermo Fisher Scientific, 2011, siehe Anlage 14, CD)

Da es sich um eine spektralphotometrische Messung handelt, gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz, in der die Schichtdicke der Küvette einfließt. Diese beträgt im Vergleich zu einer normalen Küvette (z.B. 10 mm) nur 0,51 mm. Dadurch verringert sich auch das Volumen der aufzutragenden Probe laut Hersteller auf 2 µl. Tatsächlich wurde nur jeweils 1 µl Pro Applikationskreis (siehe Abbildung 10) pipettiert. Die Genauigkeit der Messungen kann in einem Intervall von wenigen ng bis zu tausenden ng angenommen werden. Zu Messzwecken wurden jeweils mindestens Doppelmessungen durchgeführt. In der beschriebenen Applikationsform berechnet sich die DNA-Konzentration unter der Berücksichtigung, dass eine optische Dichte von 1 eine Konzentration von 50 ng/µl besitzt, folgendermaßen (Thermo Fisher Scientific, 2011, siehe Anlage (CD)):

$$c_{DNA} \left(\frac{ng}{\mu l} \right) = ABS_{260nm} * 50 \frac{ng}{\mu l} * \frac{10}{0,51} = ABS_{260nm} * 50 \frac{ng}{\mu l} * 19,6 \quad \text{Gl. II}$$

(Thermo Fisher Scientific, 2011, siehe Anlage 14, CD)

In Anbetracht der optischen Weglänge muss ein Multiplikationsfaktor von 20 laut Hersteller in die Berechnung einfließen. Tatsächlich betrug dieser 19,6 (Thermo Fisher Scientific, 2011, siehe Anlage 14, CD). Die durch die beschriebenen Gleichungen ermittelten Werte bildeten die Grundlage für spätere Ausgangskonzentrationen als Voraussetzung für Verdünnungsreihen, sowie Probenverdünnungen.

Da ein Real Time-PCR-System bestehend aus Primern und Sonden (TaqMan™) verwendet wurde, ist aufgrund der Sequenzspezifität der PCR-Reagenzien eine gewisse Menge unspezifischer Nukleinsäuren, die zu einem zu hohen oder zu niedrigen OD-Verhältnis führen, nicht zwangsläufig hinderlich für die spätere Amplifizierung, wie sich in dieser Arbeit herausstellte. Mehrfache Extraktionen einzelner Proben mit dem SureFood PREP Plant Kit zeigten zum Teil unterschiedlich Werte, wie zum Beispiel im Fall der Sojabohne (USA, Extrakt 1,2, und 4, siehe Tabelle 8). Demnach schwanken die Konzentrationswerte von 94,95 ng/µl (Extrakt 2) bis 229,5 ng/µl (Extrakt 4) trotz gleicher Einwaage an Ausgangsmaterial. Die extrahierten Proben zeigen hinsichtlich der verwendeten Extraktions-Kits deutliche Unterschiede. Anhand einer 100%igen GVO-Probe (Sojabohne, USA) sollten unter Verwendung der unter Punkt 2.2.1 beschriebenen Extraktionsmethoden vermutete Unterschiede bezüglich photometrisch bestimmter Konzentration und Reinheit festgestellt werden. Mit dem MasterPure DNA Purification Kit extrahierte DNA (Sojabohne, USA) zeigte mit 639 ng/µl eine deutlich höhere Konzentration gegenüber der Probe, die mit dem Sure Food Prep Plant Kit extrahiert wurde (108,5 ng/µl).

Tab. 8: Konzentrationen und Reinheit der Proben

Extrahierte Proben	Konzentration (c in ng/μl) (Mittelwert)	Verhältnis OD _{260/280nm} (Mittelwert)	siehe Abschnitt, Abb./etc.	Extraktions-Kit
Parameter für qualitative Nachweise (35S) (Abschnitt 3.2.2)				
Sojabohne (USA) 1	108,50	2,07	3.2.1.1,	SureFood
Sojabohne (USA) 2	94,95	1,95	3.2.1.2	
Sojabohne (USA) 3	639,00	2,05	3.2.1.2	MasterPure™
Soja-Extraktionsschrot	143,00	1,97	3.2.1.2	SureFood
Schweinmastfutter	70,90	2,33	3.2.1.2	
Laborprobe Soja 1	88,50	1,76	3.2.1.2	
Laborprobe Soja 2	116,50	1,90	3.2.1.2	
<i>Bt</i> -Mais 4,89% ERM	32,3	3,13	3.2.1.2	
Soja Dessert	232,25	1,90	3.2.1.2	MasterPure™
Parameter für quantitative GVO-Nachweise (Abschnitt 3.2.3)				
Sojabohne (USA) 4	229,5	1,90	3.2.3	SureFood
10 % Std.	136,0	1,70	3.2.3	
Laborprobe Soja 1	289,0	1,83	3.2.3	
Laborprobe Soja 2	305,0	1,55	3.2.3	
Soja-Extraktionsschrot	269,0	1,79	3.2.3	

Auch nach Wiederholung des Aufschlusses konnte lediglich eine gemessene Konzentration von 229,5 ng/μl bei gleicher Vorgehensweise festgestellt werden. Das zeigte weiterhin Schwankungen innerhalb dieser Methode (Sure Food Prep Plant Kit). Diese können mit einer inhomogenen Mischung der gemahlenen Sojaprobe einhergehen, da die Verteilung des genetischen Materials innerhalb des Sojamehls schwanken kann. Die Reinheit der gemessenen Proben wies keine großen Unterschiede auf. Im ersten Fall (Sure Food Prep Plant Kit) betrug sie 2,07, bei der Probe, die mit dem MasterPure DNA Purification Kit extrahiert wurde, betrug sie 2,05. Verschiedene Literaturquellen widersprechen sich hinsichtlich der Interpretation der Messergebnisse. In diesem Fall wurde die Version des Geräte-Herstellers herangezogen. Diese besagt, dass der gemessene Quotient innerhalb der Spanne von 1,8-2,0 mit einer guten Qualität der Probe im Bezug auf die Reinheit der DNA korreliert. Beide

Proben befinden sich nur unwesentlich oberhalb dieser Spanne und somit noch innerhalb eines akzeptablen Bereiches. Der Grund dafür kann laut Hersteller durch das Auftreten von phenolischen Verbindungen gesehen werden (Thermo Fisher Scientific, 2011). Im Fall der *Bt*-Mais-Probe war eine Amplifizierung des Templates trotz mangelnder Reinheit möglich (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Die angegebene Konzentration laut Tabelle 8 beträgt 32,3 ng/µl, was im Vergleich zu allen anderen Proben unrealistisch scheint. Auch das OD_{260/280nm}-Verhältnis von 3,13 zeigt ein eher untypisches Verhalten. Die Probe müsste demnach Verunreinigungen beinhalten, die laut Angaben des Geräteherstellers auf phenolische Verbindungen zurückzuführen wären.

2.2.3 Reaktionsbedingungen

Die Verwendung Soja-spezifischer Sequenzen erfolgte zum Einen als Kontrolle der Anwesenheit von Soja-DNA (GM1) und zum Anderen zur Bestätigung der genetischen Veränderung (RR-Soja). Die GM1-Primer wurden des Weiteren zur relativen Quantifizierung bzw. zur Berechnung des GVO-Anteils zusammen mit den 35S-Primern verwendet. Grundlage für die Zusammenstellung der Reagenzien (siehe Tabelle 9 und 10) war das Datenblatt zur „peqGOLD 'Hot' Taq-DNA-Polymerase“ (siehe Anlage 12, CD) sowie die Quelle Zagon et al. (BfR, 2006, S.49). Die dort angegebenen Parameter wurden den verfügbaren Reagenzien angepasst.

Tab. 9: Zusammensetzung des Pre-Mastermixes (Pre-MM)

Reagenzien	Applikationsvolumen pro Ansatz (µl)
Hot-Start-Polymerase (peqGOLD 'Hot')	0,125
(TAQ DNA Polymerase (Eurofins))	(0,125)
Reaktionspuffer Y	2,5
dNTPs	1
(MgCl ₂ , optional)	(1)
Reinstwasser	15,375 (14,375)
Summe pro Ansatz:	19 µl

() = Variationsparameter

Um Applikationen in die Kavitäten (25 µl pro Ansatz/Kavität) der PCR-Mikrotiterplatten zu erleichtern, wurden Vorlösungen (z.B. Pre-Mastermix, Mastermix, siehe Tabelle 9 und 10) angesetzt.

Tab. 10: Zusammensetzung des Mastermixes (Pre-MM + Primer und Sonden)

Reagenzien	Applikationsvolumen pro Ansatz (µl)
Pre-MM	19
Primer Forward	0,375
Primer Reverse	0,375
Sonde	0,25
Probe	5
Summe pro Ansatz:	25 µl

Einer bestimmten Menge Pre-MM wurde die entsprechende korrespondierende Menge an Primern und Sonden hinzugefügt (siehe Tabelle 10). Durch Variation verschiedener Parameter wurde versucht, die Qualität der Detektionen zu verbessern. Daher variieren die PCR-Ansätze unter der Vermutung der Einflussnahme solcher Parameter auf die Messung. Um den Einfluss des $MgCl_2$ auf die PCR zu untersuchen, wurden Ansätze sowohl mit, als auch ohne zusätzliche Applikation von $MgCl_2$, im Hinblick auf die Fragestellung einer ausreichenden Konzentration im Reaktionspuffer Y, hergestellt (siehe Tabelle 11).

Tab. 11: Verdünnungsreihe der US-Sojabohne (mit und ohne $MgCl_2$)

US-Sojabohne-Standard	Konz. (ng/µl)	Masse _{DNA} in 5µl Applikationsvolumen
Std. 1	21,7	108,5
Std. 2	10,85	54,25
Std. 3	7,232	36,16
Std. 4	5,425	27,125
Std. 1 _(MgCl₂)	21,7	108,5
Std. 2 _(MgCl₂)	10,85	54,25
Std. 3 _(MgCl₂)	7,232	36,16
Std. 4 _(MgCl₂)	5,425	27,125

Dafür wurden Versuche mit RR-Primern durchgeführt, um anhand der Kurvenqualität im Fluoreszenz (RFU)-Zyklen-Diagramm Aussagen zu tätigen sowie die Vermutung, es handle sich um RR-Soja, zu bestätigen. Die Probe der US-Sojabohne, aufbereitet mit dem SureFood PREP Plant- Kit, wurde dazu verdünnt eingesetzt. Die Konzentrationen der Standards (1-4) war sowohl bei Applikationen ohne sowie mit 1µl 25mM MgCl₂-Lösung für eine bessere Vergleichbarkeit identisch (siehe Tabelle 11). Für den Versuch kam das Temperaturprotokoll III (siehe Anlage 4, CD) zum Einsatz.

Die Temperaturprogramme des Thermocyclers konnten modifiziert werden, um Temperatureinflüsse durch den Einsatz eines Gradienten zu beurteilen (Anlage 3 und 4, CD). Diese Einflüsse könnten wahrscheinlich Auswirkungen auf die spätere Qualität der Quantifizierung haben. An dieser Stelle war bekannt, dass bei schwankenden Annealing-Temperaturen trotzdem eine Qualitative Aussage bezüglich des Vorhandenseins des spezifischen Genabschnittes getroffen werden kann. Deshalb wurden diese Versuche unter Berücksichtigung zuletzt genannter Fakten durchgeführt. Die Temperaturprotokolle I und II repräsentieren diese Vorgehensweise Anlage 3, CD).

Tab. 12: Bedeutung eines Gradienten für die Messungen

Reihen-Bezeichnung der Mikrotiterplatte (siehe Anlage 2, CD)	T-Protokoll I (T in °C)	T-Protokoll II (T in °C)
A	65,000	65,000
B	62,857	63,571
C	60,714	62,143
D	58,571	60,714
E	56,429	59,286
F	54,286	57,857
G	52,143	56,429
H	50,000	55,000

In der Tabelle 12 ist die Schrittweise Erhöhung der Temperatur der Kavitäten von Reihe H bis A dargestellt. Der Einsatz eines Gradienten beruft sich an dieser Stelle auf die Vermutung, dass unter Anderem eine Abhängigkeit zwischen AT und End-Fluoreszenz-Intensität besteht.

Weiterhin konnte die Anzahl der Zyklen während der Amplifizierung aufgestockt werden, sofern die Kurvenverläufe ein eindeutigeres Bild vermuten ließen. Die Grundeinstellung belief sich auf einen vorgesehenen Wert von 45 Zyklen.

2.2.4 Qualitativer Nachweis des 35S-Promotors und Probenidentifizierung

Im Zuge der qualitativen Bestimmung des 35S-Promotors wurden aufbauend weitere Einflussfaktoren berücksichtigt und Auswirkungen dokumentiert. Vermutungen bezüglich verschiedener Zusammenhänge zwischen Fluoreszenzintensität (Endwert), Kurvenverlauf und Ct-Werten wurden simultan zur qualitativen Analyse untersucht. Zunächst wurde das Extrakt 2 der Sojabohne (USA, siehe Tabelle 8, Abschnitt 2.2.2) in abgestuften Verdünnungen appliziert (siehe Tabelle 13). Dabei wurde versucht, die von Waiblinger et al. (2008) beschriebene Nachweisgrenze von 10 Genom-Kopien in der qualitativen Analyse zu gewährleisten. Mit der Prüfung des in dieser Quelle angeführten LOD soll eine Aussage zur Sensitivität des verwendeten PCR-Gerätes unter Berücksichtigung der verwendeten Parameter - Reaktionsansätze, Temperaturprotokolle etc. - getroffen werden.

Tab. 13: Konzentrationen und Annealing-Temperaturen verwendeter Proben (Sojabohne, USA, Extrakt 1)

Probe Nr.	c in ng/μl	mDNA pro Applikations-Volumen (ng/5μl)	Kopienzahlen	AT
1	25	125	100.000	63,57
2	2,5	12,5	10.000	62,14
3	0,25	1,25	1.000	60,71
4	0,025	0,125	100	59,29
5	0,0025	0,0125	10	57,86

Weiterhin wurde die in Abschnitt 2.1 beschriebene *Bt*-Mais-Probe in den Verdünnung 1:10 (entspricht 0,489 %) untersucht. Weitere qualitative Nachweise folgen der Tabelle 14. Die Verdünnungen wurden so angesetzt, dass eine Konzentrationsspanne, gegeben durch den Hersteller der Polymerase von 100-500 ng pro 50μl Gesamtansatz berücksichtigt wurde (siehe Datenblatt peqGOLD „Hot“ *Taq*-DNA-Polymerase).

Tab. 14: Proben zum qualitativen Nachweis des 35S-Promotors

Zielkonzentration 35 ng/μl, entspricht 175 ng pro 5μl Applikationsvolumen	
Probe (Abkürzung)	Verdünnung
NTC	-
Sojabohne, USA, Extrakt 3(Sb. Extr. 3)	1:90,9
Mastschweinfutter (MSF)	1:10,1
Soja-Extraktions-Schrot (SoEx)	1: 20,5
Laborprobe Soja 1 (Soja 1)	1:12,6
Laborprobe Soja 2 (Soja 2)	1:16,6

Bezogen auf einen Ansatz von 25μl ist diese Spanne auf 50-250 ng pro Ansatz zu verringern, sodass eine Template-DNA-Gesamtmasse von 175 ng errechnet. Letztendlich wurden die zunächst unbekannten Proben (Sb. Extr. 3, Soja 1, Soja 2, MSF, SoEx) auf deren Identität untersucht, indem 10-fach-Verdünnungen angefertigt und diese unter den Bedingungen des Temperaturprotokolls I (siehe Anlage 3, CD) amplifiziert wurden. Als Lebensmittelprobe wurde das Soja-Dessert (siehe Anlage 5, CD) unter Einfluss des Temperaturprotokolls IV amplifiziert, um das Produkt auf genetische Veränderung im Bezug auf den 35S-Promotor zu prüfen.

2.2.5 Möglichkeiten der Quantifizierung

Absolute Quantifizierung. Die absolute quantitative Bestimmung des GVO-Gehaltes beruht auf der Erstellung von Kalibrationsgeraden (Standardkurven). Anhand dieser Kalibrierung können entsprechende Kopienzahlen ermittelt werden. Zum Erstellen der Gerade muss die Ausgangskonzentration einer Stammlösung bekannt sein. Diese wird durch die in Punkt 2.2.2 beschriebene photometrische Messung ermittelt. Die Berechnungen der Kopienzahlen berufen sich auf die Verfahrensweise Laut Zagon et al. (BfR, 2006). Demnach wurde basierend auf einer Genomgröße (Soja) das Molekulargewicht bestimmt (siehe Gleichung III). Die Konstante 660 berücksichtigt, dass die DNA doppelsträngig ist.

$$M = 1,13 * 10^9 \text{Bp} * 660 \quad \text{Gl. III}$$

$$M = 7,5 * 10^9 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

(Zagon et al., BfR, 2006)

Ein Genomäquivalent Soja entsprechend einer Kopie ergibt sich aus dem Quotienten der Molekülmasse und der Avogadro-Konstante (siehe Gleichung IV).

$$1 \text{ Kopie} = \frac{7,5 * 10^9 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{6,02 * 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}} \approx 1,25 * 10^{-14} \text{g} \quad \text{Gl. IV}$$

$$1 \text{ Kopie} = 1,25 \text{ pg}$$

(Zagon et al., BfR, 2006)

Über eine Verhältnisgleichung lässt die Kopienzahl für 100 ng errechnen. 100 ng ergeben demnach eine Kopienzahl von 80.000 (Zagon et al., BfR, 2006). Auf Grundlage dieser Berechnung lässt sich die Ausgangskopienzahl eines Templates bestimmen. Anhand der photometrisch bestimmten Konzentration lässt sich die Kopienzahl errechnen, die der Ausgangsprobe entspricht. Aufgrund einer Applikation von 5 µl Probelösung (Template) muss die Konzentration dem Applikationsvolumen angepasst werden. Um eine zur Erstellung der Standardkurve geeignete Kopienzahl zu erhalten, werden die jeweiligen Verdünnungen zunächst auf 100.000 Kopien bezogen. Ausgehend von diesem Höchstwert werden Verdünnungen erstellt, die in Tabelle 15 dargestellt sind.

Tab. 15: Standards zur Erstellung der Kalibrationsgeraden

Ausgangskonzentration des Stammextrakts (Sojabohne USA, Extrakt 4, 100% GVO) [c = 229,5 ng/μl]			
Standard	Anzahl der Kopien	Log ₁₀ (Kopien)	Verdünnung
Extrakt 4	183.600	5,3	1:1,84
Std. I	100.000	5,0	
Std. II	50.000	4,7	1:2
Std. III	10.000	4,0	1:5
Std. IV	1.000	3,0	1:10
Std. V	100	2,0	1:10
Std. VI	10	1,0	1:10
Std. VII	5	0,7	1:2

Durch Regressionsrechnung erhält man in einem Koordinatensystem durch den Logarithmus der Kopienzahlen (X-Achse) eine Funktionsgerade im Ct-Log₁₀(Kopien)-Diagramm, anhand deren Gleichung die Konzentration einer Unbekannten errechnet wird (siehe Gleichung V).

$$y = mx + n$$

$$x = \frac{(y - n)}{m}$$

Gl. V

Für die Berechnung des GVO-Anteils benötigt man zum Einen die Kopienzahl einer Probe, die durch einen für die Pflanzenart typischen Primer (für Soja: GM1-Sequenz, siehe Gleichung VI, K_P) ermittelt wird, und zum Anderen die Kopienzahl eines GVO-spezifischen Primers (für Soja: 35S-Promotorsequenz, siehe Gleichung VI, K_{GVO}) derselben Probe.

$$\% \text{ GVO} = \frac{K_{GVO} * 100}{K_P}$$

Gl. VI

P = Pflanzenspezifische Sequenz, z.B. GM1; K_{GVO} = Anzahl der Kopien für GVO-Sequenz

Durch das in Gleichung V dargestellte, zu bildende Verhältnis erfolgt die prozentuale Angabe des GVO-Anteils (% GVO). Dabei werden für die Berechnung die Kopienzahlen der jeweiligen Probe herangezogen. Verdünnungen von Proben können dabei außer Acht gelassen werden, da sich die Berechnung jeweils auf eine 10-fach-Verdünnung bezieht und lediglich das Verhältnis der Kopienzahlen entscheidet.

Relative Quantifizierung. Die relative Quantifizierung geschieht unter Verwendung eines Standards, zu der eine Messprobe ins Verhältnis gesetzt wird ($\Delta\Delta Ct$ -Methode). Dafür benötigt werden ein Standard sowie eine Probe, die jeweils mit Pflanzen-spezifischen und GVO-spezifischen Primern amplifiziert werden. Wichtigster Parameter ist hierbei der jeweilige Ct-Wert. Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit eines Standards, der aus einer bekannten 100%igen GVO-Probe hergestellt werden kann. In diesem Fall wurde ein Standard aus der Sojabohne (USA, gemahlen, 100% GVO, 4,7 mg) und dem ERM (0% Soja, blank, 46,6 mg) hergestellt (GVO-Gehalt Standard = 8,9866 %, siehe Tabelle 16).

Tab. 16: Beispiel zur Berechnung des GVO-Gehaltes (GDCh, 2010; siehe Anlage 9, CD)

Standard/ Probe	Ct GM1	Ct 35S	Mittelwert Ct GM1	Mittelwert Ct 35S	ΔCt GM1	ΔCt 35S	$\Delta\Delta Ct$	GVO- Gehalt (%)
Standard (S)	22,0 22,0	34,2 34,2	22,0	34,2	4,31 (P – S)	-1,7 (P – S)	- 6,01	8,9866
Probe (P)	26,13 26,13	32,5 32,5	26,13	32,5				64%

(nach GDCh, 2010; siehe Anlage 9, CD)

Der Standard sowie eine zunächst unbekannte Probe wurden jeweils in einer Doppelbestimmung auf GM1 und 35S untersucht. Durch Mittelwert- und Differenzbildung kann der GVO-Anteil einer unbekannten im Bezug auf den Standard ermittelt werden (nach GDCh, 2010; siehe Anlage 9, CD). Die Beispielrechnung (siehe Tabelle 16) bestätigt die Vorgehensweise. Die folgende Gleichung beschreibt die rechnerische Ermittlung des GVO-Gehaltes unter Einbeziehung des $\Delta\Delta Ct$ – Wertes.

$$\%GVO = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Gl. VII

(IKB, 2011)

Unter den Anlagen befindet sich zusätzlich eine Praktikumsanleitung zur GVO-Quantifizierung mit der *TaqMan*TM-Technologie auf Basis des 35S-Promotors.

3 Ergebnisse

3.1 Real Time PCR

3.1.1 Qualitativer Nachweis des 35S-Promotors und Probenidentifizierung

3.1.1.1 Einfluss des $MgCl_2$ auf Messergebnisse

Bei der Amplifizierung wurde das Temperaturprotokoll III (siehe Anlage 4) verwendet, da bei diesem Versuch eine konstante Annealing-Temperatur erforderlich ist, um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die im Punkt 2.2.3.1 beschriebene Einflussnahme des $MgCl_2$ zeigt die Abbildung 11. Es ist zu erkennen, dass die erstellte Nullkontrolle (NTC) nicht über die automatisch erstellte Gerade (Threshold-Cycle), die die Wendepunkte der Graphen beschreibt, hinausgeht. Das spricht generell dafür, dass durch den Einsatz von Sonden nur spezifische Sequenzen indirekt über die Fluoreszenz detektiert werden. Weiterhin wurden im Bezug auf die Standards RR-spezifische Primer und Sonden verwendet.

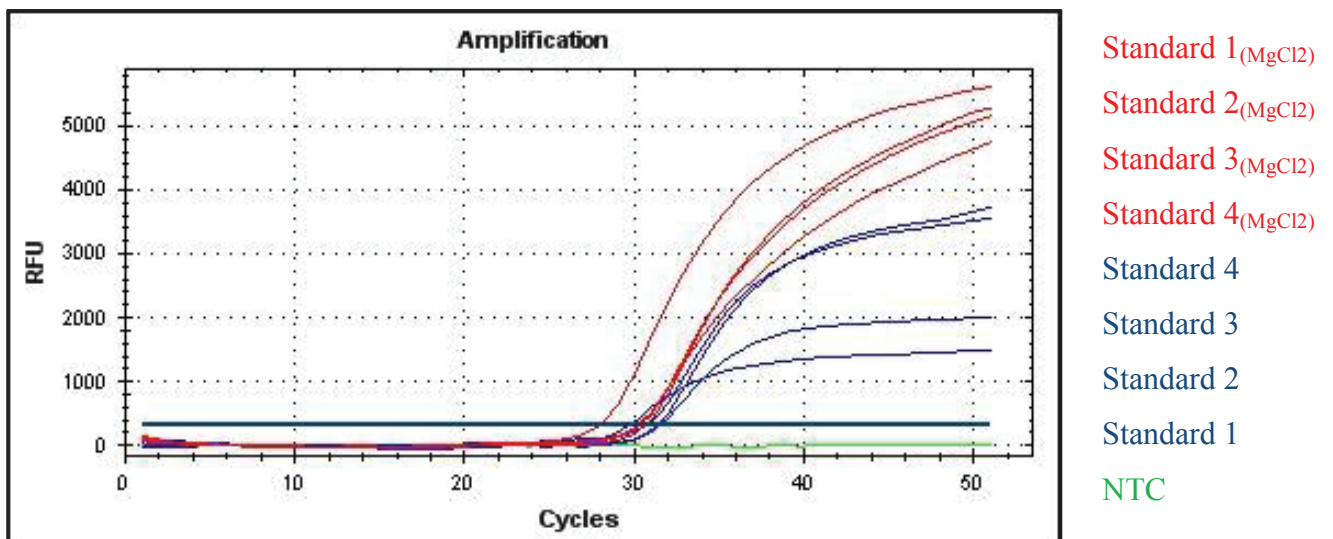


Abb. 11: PCR-Verlauf mit (rot) und ohne (blau) Zusatz von $MgCl_2$ (1 μ l pro Ansatz)

Anhand der Ct-Werte (siehe Tabelle 17) kann kein bedeutender kausaler Zusammenhang erkannt werden. Sie variieren nur geringfügig. In der Abbildung 11 sind die Ergebnisse in einem RFU-Zyklen-Diagramm dargestellt. Die Legende beschreibt die Graphen der Standards (US-Sojabohne) farblich markiert in der Reihenfolge abnehmender Fluoreszenz-Endwerte. Allerdings bewirkt die Zugabe von $MgCl_2$ vor Allem bei Proben höherer Konzentrationen

(Std. 1 + MgCl₂, Std. 1) einen drastischen Anstieg der Fluoreszenzintensität (> 5000 RFU, < 2000 RFU) im Bezug auf den Endwert. Dieses Verhalten kann ist laut Abbildung 11 auf alle 4 Standards übertragbar. Die beschriebene Intensität stieg beim Standard 1 um ca. 4000 RFU.

Tab. 17: C_t-Werte der Standards sowie NTC

Std. Nr.	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	NTC
Ct-Wert	28,03	30,70	30,37	30,22	k.A.
Std. Nr.	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	
Ct-Wert	29,78	31,52	30,75	31,33	

farbliche Darstellung, siehe Legende: Abbildung 11

Des Weiteren lässt sich insgesamt ein umgekehrt proportionales Verhältnis diesbezüglich feststellen. Je höher die Konzentration der Standards mit MgCl₂, desto höher ist die Intensität und je höher die Konzentration der Standards ohne eine zusätzliche Applikation von MgCl₂, desto geringer ist die Fluoreszenzintensität. Das Kurven-Verhalten ist aufgrund von Erkenntnissen dieser Arbeit auch auf Ansätze mit anderen Primern, wie 35S- oder RR-Primer übertragbar. Aufgrund der aufgezeigten Abhängigkeit wurde die MgCl₂-Konzentration in Folgeversuchen um 1 µl (c = 25mmolar) erhöht. Durch Verwendung von RR-Primern und Sonden konnte eine Identifizierung des vorliegenden Sojamaterials zugunsten der Sorte Roundup Ready™ getroffen werden. Aufgrund der Spezifität der TaqMan-Sonden ist diese Identifizierung als sicher einzustufen. Generell wird in den USA vorwiegend RR-Soja angebaut, was statistisch für das Ergebnis spricht und die getroffene Vermutung belegt. Laut Müller (2001) fungiert das MgCl₂ als Co-Faktor der Polymerase. Dieses Salz dissoziiert in Lösung. Magnesium-Ionen beeinflussen die Enzymaktivität. Sie bilden einen löslichen Komplex mit den betreffenden Nukleotiden, die ein für die Polymerase erkennbares Substrat bilden. Darüberhinaus wird die Schmelztemperatur der DNA erhöht (Müller, 2001). Diese Faktoren beeinflussen die Ergebnisse der PCR erheblich, was auch die Versuche laut Abbildung 11 zeigen.

3.1.1.2 35S-spezifische Nachweise

Das Extrakt der Sojabohne (USA, 100 % GVO) konnte laut Abschnitt 3.2.1.1 als RR-Soja identifiziert werden. Für weitere Betrachtungen wurden Temperaturprotokolle mit Gradienten erstellt, um für die spätere Quantifizierung eine bestmögliche Annealing-Temperatur verwenden zu können. Die im folgenden Diagramm (Abbildung 12) dargestellten Graphen stehen stellvertretend für die Proben der Tabelle 13 (Abschnitt 2.2.4). Demnach konnte das Extrakt 1 der Sojabohne mit 35S spezifischen Primern und der entsprechenden Sonde wie zu erwarten nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die AT der Proben ergibt sich im Abgleich mit den Graphen kein ausreichend kausaler Zusammenhang. Im Konzentrationsbereich von 10-5 ng/µl liegen die Ct-Werte sehr dicht beieinander (Probe 3 und 4). Es ist außerdem auffällig, dass diese Proben im Bezug auf die End-Fluoreszenz-Intensität die höchsten Werte erreichten. Diese Tatsache lässt sich vermutlich damit begründen, dass der Gehalt des Ansatzes im Bezug auf die Sonden hier am effektivsten ausgenutzt wird.

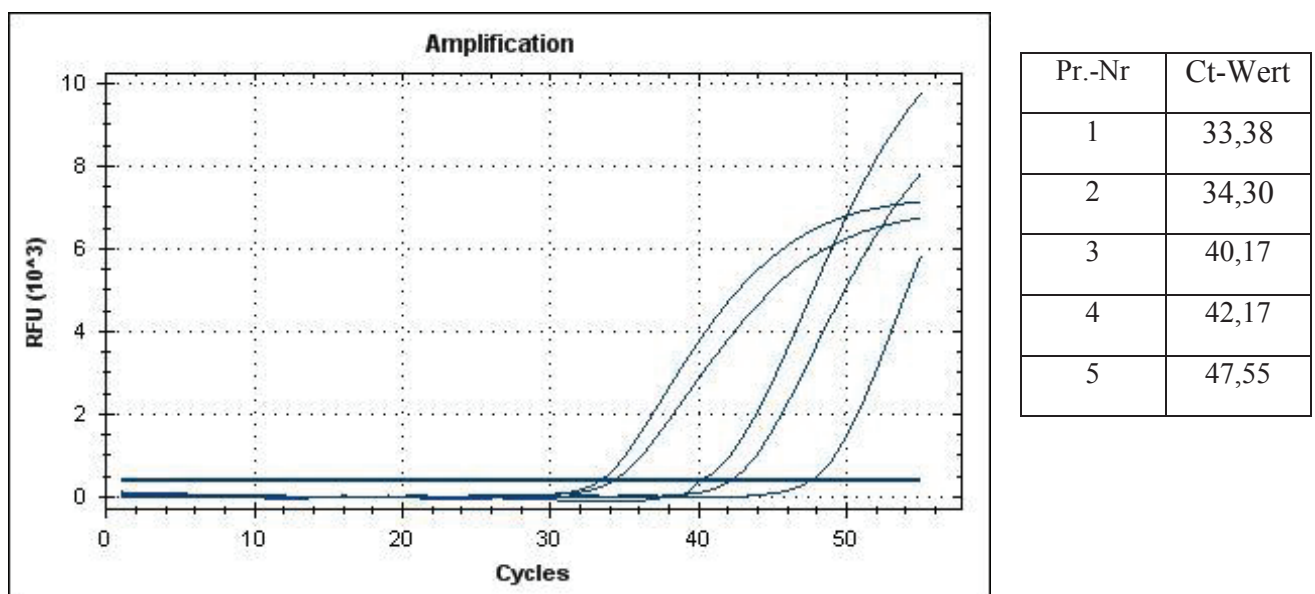
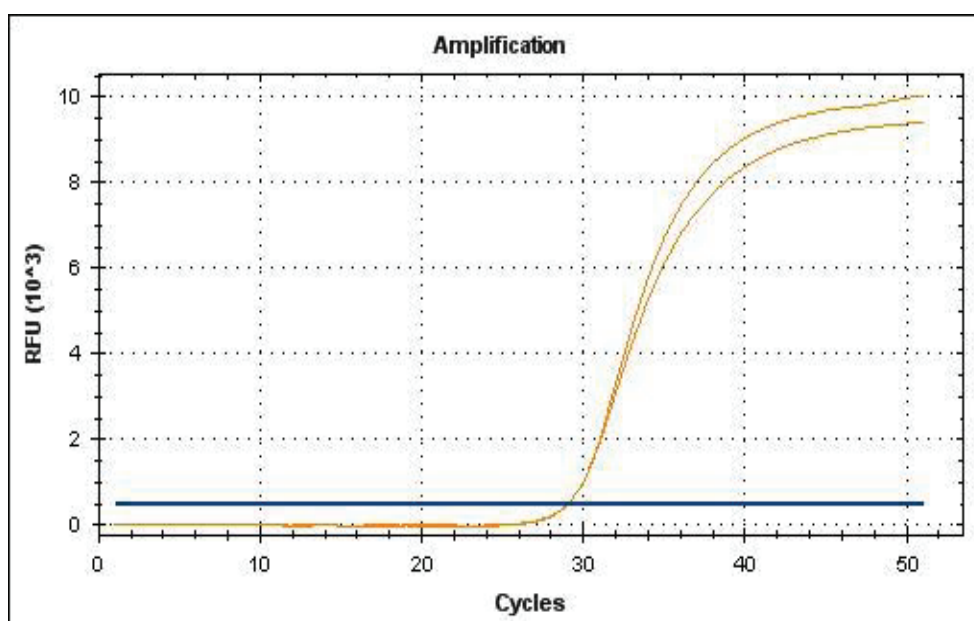


Abb. 12: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklenzahl (Sojabohne, USA, RR, Extrakt 2)

Höhere Template-Konzentrationen bedeuten in diesem Fall, dass aufgrund der höheren Ausgangsmenge an DNA viele Sondenmoleküle gebunden werden. Es erfolgt ein schneller Anstieg über den Threshold hinaus, was durch einen niedrigen C_t -Wert zum Ausdruck kommt. Die geringere End-Fluoreszenz-Intensität lässt sich mit den schneller verbrauchten Sondenmolekülen begründen, so dass der Graph sich asymptotisch seiner maximalen Fluoreszenzintensität korrelierend den verbrauchten Sonden nähert. Niedrigere

Konzentrationen (Probe 5) und zugleich ein höherer C_t -Wert bedeutet hingegen, dass an dieser Stelle die Template-Menge der limitierende Faktor in dieser Hinsicht ist. Demnach ist die Konzentration des Templates in dieser Betrachtung ausschlaggebend. Es stellt sich heraus, dass mit abnehmender Konzentration die C_t -Werte größer werden. Die Probe 1 hat daher den niedrigsten C_t -Wert. Umgekehrt besitzt die Probe 5 mit der niedrigsten Konzentration den höchsten C_t -Wert. Damit wurde der Sachverhalt laut Literatur bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit des C_t -Wertes (Abschnitt 1.2.2.2) bestätigt (siehe Konrad, Busch, 2010; Tevfik Dorak, 2006). Der C_t -Wert ist demnach eine konzentrationsabhängige charakteristische Größe. Diese Eigenschaft wird für die spätere absolute quantitative Analyse ausgenutzt (siehe Abschnitt 3.1.2). Lediglich die Abstände werden für diese Betrachtung in Abstufungen von 10-fach-Verdünnungen berücksichtigt, um der logarithmischen Skalierung zum Erstellen einer Funktionsgerade zu entsprechen. Weiterhin konnte die Bestimmungsgrenze von 10 Kopien laut Waiblinger et al. (2008) mit der Probe 5 (siehe Abbildung 12) im Bezug auf GVO (35S-Promotor) erreicht werden.

Die Abbildung 13 zeigt den Fluoreszenzverlauf einer *Bt*-Mais-Probe in Abhängigkeit der Zyklenzahl. Demnach ist die Amplifizierung dieser DNA mit 35S-spezifischen Primern und dazugehöriger Sonde als erfolgreich anzusehen und ein Anzeichen für eine korrekt durchgeführte Probenaufbereitung sowie -applikation.

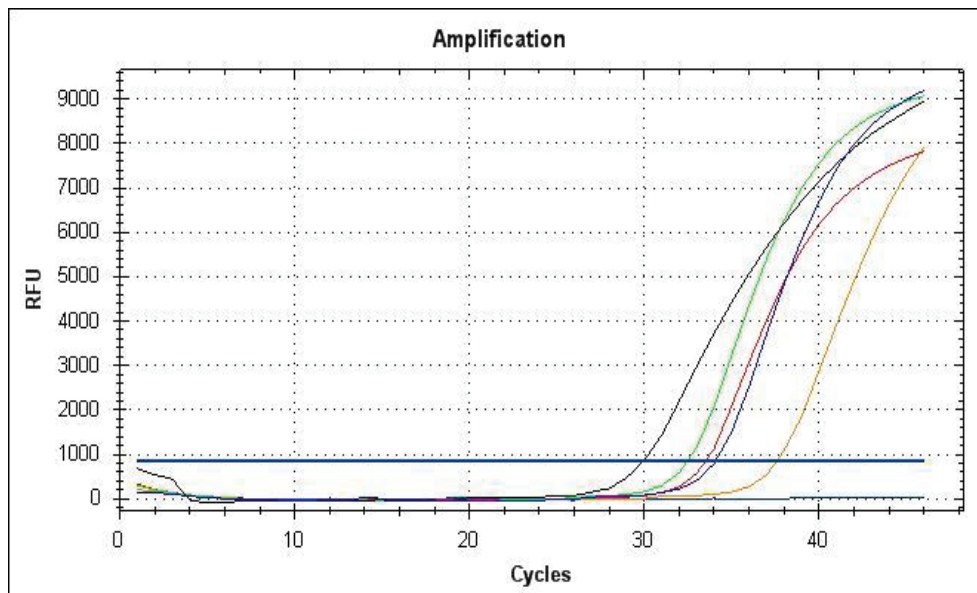


Ct-Wert	AT
29,09	65,00
29,11	62,86

Abb. 13: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklen-Anzahl (*Bt*-Mais, 35S)

Diese Doppelbestimmung beweist rein optisch eine gute Reproduzierbarkeit, was auch die Ct-Werte von 29,09 und 29,11 belegen. Geringe Unterschiede bestehen in der Fluoreszenz-Intensität am Ende der Messungen. Diese könnten durch Verwendung des Temperaturprotokolles II (siehe Anlage 3, CD) und dem entsprechenden Gradienten (55-65°C) eintreten. Die entsprechenden Temperaturen sind neben dem Diagramm gekennzeichnet. Die Probe mit dem Fluoreszenzwert von 10.000 nach 50 Zyklen (obere Funktion) und einer AT von 62,86°C spricht für die Annahme, dass sich die optimale Annealing-Temperatur unterhalb von 63°C befinden könnte. Partielle Unterschiede im Konzentrationsbereich der applizierten DNA-Lösung können ebenso zu dieser geringen Differenz führen. Im Hinblick auf eine quantitative Analyse ist daher lediglich eine konstante AT in allen betreffenden Kavitäten der Mikrotiterplatte (siehe Anlage 2, CD) zu gewährleisten.

35S-spezifische Nachweise der Proben laut Tabelle 14 (Abschnitt 2.2.4) werden durch die Abbildung 14 verdeutlicht. Es konnten alle applizierten Proben nachgewiesen werden. Die Sojabohne (USA, RR, Extrakt 3) wurde mit dem MasterPure™ DNA Purification Kit extrahiert (siehe Abbildung 14, schwarz). Trotz der Verdünnung auf eine Konzentration von 175 ng pro 5µl DNA-Lösung, die zum Ansatz hinzugegeben wurde, sind anhand der C_t-Werte deutliche Abweichungen zu erkennen, was für unterschiedliche GVO-Gehalte spricht.



Pr.-Nr.	Ct-Wert
NTC	-
Sb. Extr. 4	30,01
SMF	32,50
SoEx	33,54
Soja 1	34,11
Soja 2	37,61

Abb. 14: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklen-Anzahl

Die Spanne ist allerdings nicht so groß, wie bei den Amplifizierungen der RR-Sojabohne (USA, Extrakt 2, siehe Abbildung 12), die höchstwahrscheinlich ein sehr ähnliche Menge an 35S-Sequenzen besitzen und Konzentrationsabstufungen aufweisen. Aufgrund

unterschiedlicher Proben-DNA mit folglich unterschiedlichem 35S-Sequenz-Vorkommen sind diese C_t -Wert-Differenzen (siehe Abbildung 14) zu erklären. Im Fall des Mastschweinfutters ($C_t = 32,50$) ist laut Artikeldeklaration ein GVO-Anteil (Soja) von 11,8 % enthalten, was den höheren C_t -Wert gegenüber Sojaextraktionsschrot ($C_t = 33,54$) belegen könnte (siehe Anlage 1, CD). Letzteres hat einen Rohproteingehalt von 42,5 %. Extraktionsschrot fällt im Zuge der Herstellung von Soja-Milch als Abfall an. Auf diesem Wege werden Sojabohnen mechanisch zerkleinert und mehrfach thermisch behandelt, wodurch ein Teil der DNA – vor Allem bei Dampfteinwirkung – zerstört wird. Der Faseranteil von 7 % ist wahrscheinlich der Bestandteil, der am Meisten DNA einschließt. Beim Mastschweinfutter handelt es sich um eine Mischung, die in ihrer Gesamtheit dampferhitzt wurde. Innerhalb dieser Umgebung zwischen anderen Komponenten wie zum Beispiel einem höheren Fettanteil (5%) könnte die betreffende DNA in höherem Maße verschont worden sein. Sojaextraktionsschrot hat nur einen Fettanteil von ca. 1 %, wodurch der Schutz der Futtermittelmatrix vor der Dampferhitzung nicht derart gegeben sein müsste. Dieser Einfluss könnte die Ergebnisse der Abbildung 14 begründen. Diese Proben konnten anhand der Ergebnisse laut Anlage 6 (Teil A, CD) per GM1-Test als Sojaprobe identifiziert werden. Dabei wurde ein Sojaanteil der 2 Futtermittel laut Artikeldeklaration bestätigt. Darüberhinaus handelt es sich in allen Fällen um RR-Soja (siehe Anlage 6, Teil B, CD).

Amplifizierungen bezüglich des Soja-Desserts (siehe Anlage 5, CD) auf Basis des GM1 sowie des 35S-Promotors konnten in dieser Arbeit nicht erreicht werden. Trotz der Messungen bezüglich der Konzentration des Extraktes und einem DNA-Gehalt von 223,25 ng/ μ l waren diese Messungen negativ. Auch das $OD_{260/280nm}$ -Verhältnis von 1,9 bewegt sich innerhalb eines akzeptablen Bereiches. Die Fluoreszenz kam nicht über den Threshold hinaus, sodass keine C_t -Werte entstehen konnten. Laut Angaben des Produktherstellers ist das Produkt frei von gentechnisch veränderten Pflanzen bzw. GV-DNA, sodass das Ergebnis im Bezug auf den 35S-Promotor als richtig einzustufen ist. Ein Doppelversuch mit GM1-Primern und – Sonden brachte allerdings auch keine Ergebnisse. Laut Artikeldeklaration enthält das Produkt einen Anteil von 6,4 % geschälter Sojabohnen. Dieser geringe Anteil ist bereits ein prozessiertes Zwischenfabrikat, was Wasch- und Quellvorgängen ausgesetzt wurde. Zu berücksichtigen wäre außerdem, dass eine Pasteurisation oder Dampfbehandlung bzw. Dampfkochen des Zwischenfabrikats sowie einer Pasteurisation des späteren Lebensmittels stattgefunden haben. Die DNA wurde demzufolge mehrfach thermisch behandelt. Dieser Einfluss kann die Ergebnisse dieses Versuches begründen. Es ist außerdem möglich dass der Einsatz von geschälten Sojabohnen einen Homogenisierungsschritt bedingt. In solchen

Apparaturen können Partikel so fein zerkleinert werden, dass die DNA selbst zerstört wird. Partikelgrößen von bis zu 30 µm und kleiner können dabei erreicht werden (Sielaff, 1995/1996). Im Gegensatz dazu werden während der photometrischen Konzentrations- und Reinheitsprüfung allerdings realistische Werte erreicht, was dazu führt, dass auch über einem fehlerhaften Reaktionsansatz diskutiert werden muss. Dieser Fakt scheint jedoch unrealistisch, da alle anderen applizierten und amplifizierten Proben repräsentative Ergebnisse erzielen.

3.1.2 Quantifizierung mit der Real Time PCR

3.1.2.1 Absolute Quantifizierung über Kalibrationsgeraden

Die Standards unter Verwendung von GM1-Primern und –Sonden zeigen wie zu erwarten mit fallender Konzentration ($\log_{10}(\text{Kopien})$ bzw. Anzahl der Kopien) ansteigende C_t -Werte. Beim 5. Standard ($\log_{10}(1.000) = 2,00$) kann allerdings von einer Fehlmessung ausgegangen werden, da dieser keinen korrelierenden C_t -Wert ergab und 100 Kopien des Genomäquivalents sicher angezeigt werden sollten (siehe Abbildung 15). Des Weiteren lässt die Amplifizierung der letzten beiden Standards (10 und 5 Kopien) darauf schließen, dass in diesem Bereich die Nachweisgrenze des Systems erreicht ist. Der Standard 6 müsste demnach einen niedrigeren C_t -Wert haben, als der Standard 7. Die Abstufung der C_t -Werte ist an dieser Stelle nicht mehr gegeben. Allerdings sind die Werte sich so ähnlich, dass sie für die Quantifizierung anhand der Gerade keinen Nachteil ergeben. Auch in diesem Versuch wurde die Nachweisgrenze wie in Abbildung 12 (Abschnitt 3.1.1.2) erreicht.

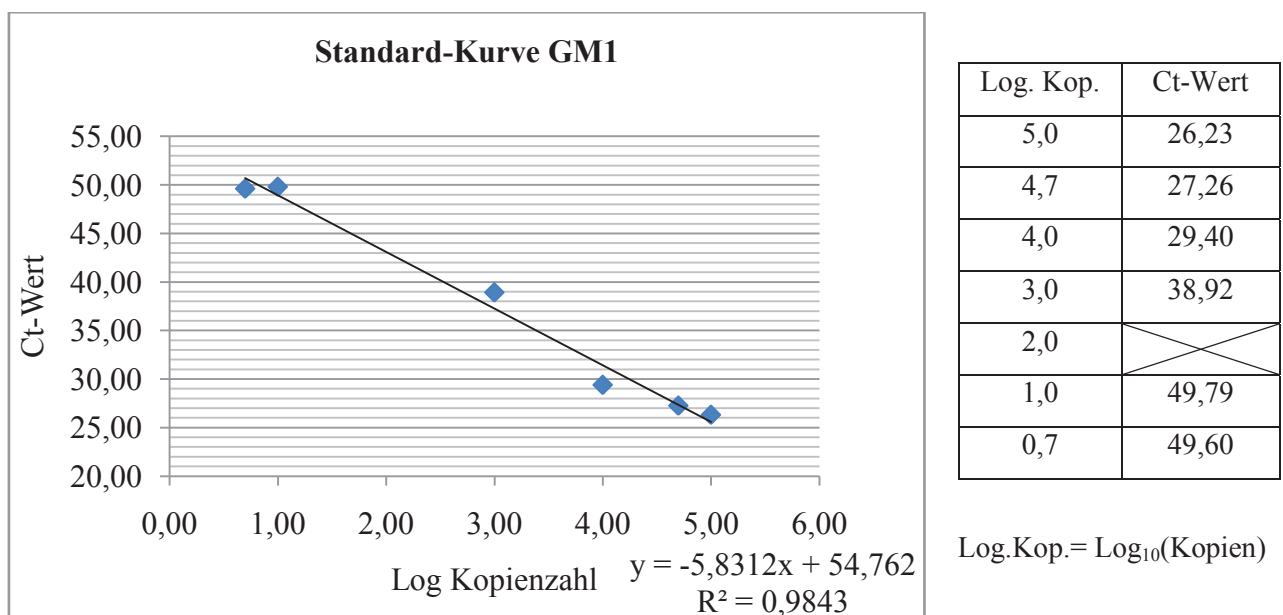


Abb. 15: Kalibrationsgerade GM1 im C_t -Wert- $\log_{10}(\text{Kopien})$ -Diagramm

Die Fehlmessung (Standard 5) ist möglicherweise mit einem fehlerhaften Ansatz zu begründen. Der betreffende Standard wurde zur Erstellung der Kalibrationsgerade nicht berücksichtigt. Es ergibt sich im Gesamten die in der Abbildung 15 dargestellte Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,9843$, was für einen deutlichen linearen Zusammenhang spricht. Die dazugehörige Gleichung lautet $y = -5,8312x + 54,762$. Die Berechnung erfolgte laut Gleichung V (Abschnitt 2.2.5). Die 35S-Gerade wird durch die Gleichung $y = -3,0148x + 41,081$ beschrieben und besitzt einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,9471$ (siehe Abbildung 16). Der letzte Standard scheint jedoch fraglich. Er müsste einen wesentlich höheren C_t -Wert haben, als der Standard 5. Dennoch ergibt sich unter dessen Einbeziehung in die Regressionsrechnung ein akzeptabler Korrelationskoeffizient. Außerdem ist er im Fall einer Probe mit ähnlichem GVO-Gehalt (5-10 Kopien) als wichtig anzusehen, um die Spanne der C_t -Werte zu erweitern und diesen möglichen Probenwert mit einzubeziehen. Der 10-Kopien-Standard brachte kein Ergebnis, was eine unsichere Amplifizierung im Bereich der Nachweisgrenze belegt. Je niedriger die Konzentration an DNA, desto schwieriger ist die korrekte Herstellung von Ansätzen sowie die Amplifizierung der DNA. Alle Volumen-bezogenen Laborgeräte (Pipetten) weisen darüberhinaus eine gewisse Fehlertoleranz auf, die in der Summe zu geringen Abweichungen führen kann. Diese kann sich bei gleichbleibender Arbeitsweise auch auf die Messergebnisse auswirken.

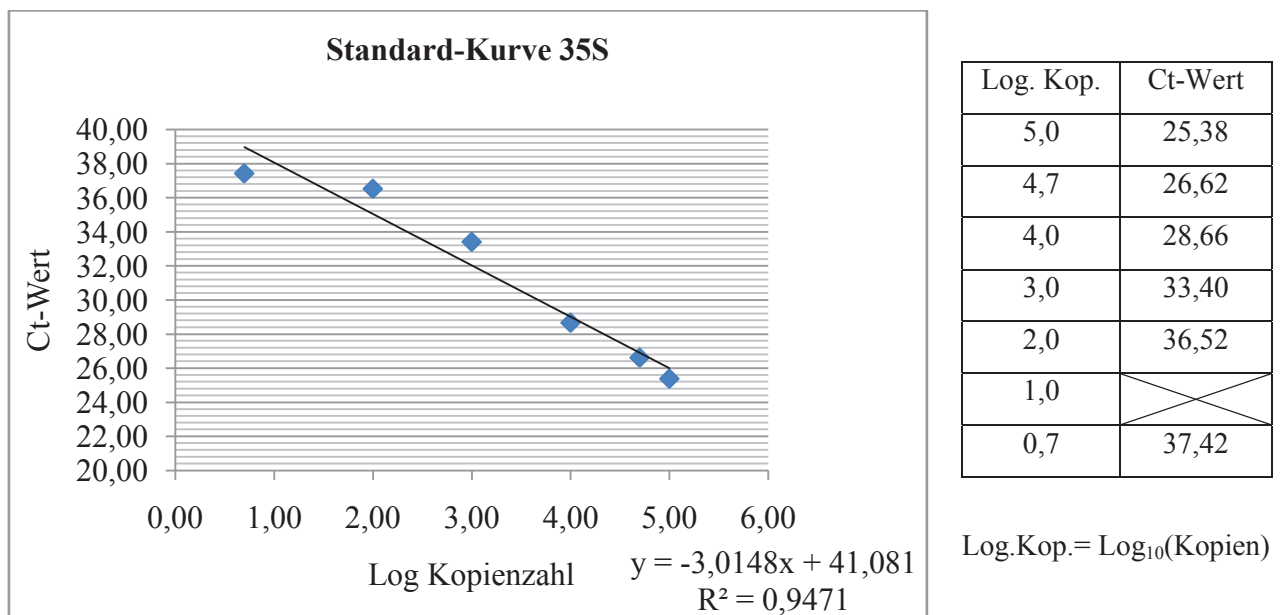


Abb. 16: Kalibrationsgerade 35S im C_t -Wert- $\text{Log}_{10}(\text{Kopien})$ -Diagramm

Es bleibt generell anzumerken, dass die verwendeten 35S-Sequenzen in Form von Primern und Sonden nicht nur auf Soja ansprechen. Im Fall von Mischungen verschiedener Proben (Schweinemastfutter) liefern die Ergebnisse der Quantifizierung unter Verwendung von

GM1-spezifischen Sonden nur begrenzt aussagekräftige Ergebnisse, da die nicht-GVO-DNA von zum Beispiel Mais nicht berücksichtigt wurde. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung. Detaillierte Messwerte zeigt die Anlage 8 (CD). Auch der hergestellte Standard wurde vermessen. Es ergibt sich dabei eine Abweichung von 2,3 %. Das ist möglicherweise mit einem Probenverlust während der Aufbereitung verbunden. Die RR-Soja-Laborprobe 2 hat einen sehr niedrigen GVO-Gehalt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Fehlmessung. Andererseits wurden alle vermessenen Proben 1:10 verdünnt, sodass das eigentliche Extrakt einen 10-fach höheren Gehalt hat (0,6 %). Insgesamt kann ein Zurückrechnen unter Einbeziehung eines Verdünnungsfaktors entfallen, da es sich ausschließlich und in beiden Fällen (35S und GM1) um eine 10-fache Verdünnung der Proben handelt und lediglich das Verhältnis entscheidet. Den höchsten GVO-Gehalt weist die RR-Soja-Laborprobe auf.

Tab. 18: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung

Proben	Kopien GM1	Kopien 35S	% GVO
Soja 1	83983,67	7837,49	9,33
Soja 2	35749,07	22,68	0,06
Soja-Extraktionsschrot	80691,19	6092,96	7,55
8,97%-Standard	70496,61	4700,93	6,67

Das Soja-Extraktionsschrot besitzt laut Anlage 1 (CD) einen Rohfaser-Gehalt von 7 %. Möglicherweise ist vor Allem dieser Anteil ausschlaggebend für gebundene DNA, die erst nach einem Aufschluss frei vorlag. In dieser Hinsicht scheint der Wert (7,55 %) repräsentativ. Grundsätzlich können aufgrund einer partiellen Inhomogenität des Soja-Ausgangsmaterials Abweichungen bezüglich der Probennahme entstehen. Für eine sichere Bestimmung wäre mehr als eine Doppelbestimmung sowie mehr als eine Extraktion erforderlich.

3.1.2.2 Relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Der für diese Variante der Quantifizierung hergestellte Standard entsprach laut Einwaage einem GVO-Gehalt von 8,97 %. Die Konzentrationen der Soja-Laborproben sind an dieser Stelle als Unbekannte Proben zu werten. Dabei errechnete sich der GVO-Gehalt anhand der C_t -Werte im Fall der Laborprobe 1 mit 7,597 % und bei der Laborprobe 2 mit 0,007 %. Der zuletzt genannte Wert stützt sich allerdings lediglich auf eine Messung mit dem in der Anlage

8 (CD) dargestellten Ct-Wert von 39,14. Der andere Wert kam während der gesamten Amplifikations-Zeit nicht über den sogenannten Threshold hinaus und liefert somit kein verwertbares Ergebnis bzw. keinen Ct-Wert. Da bei dieser Probe der GVO-Gehalt im Bezug auf den 35S-Promotor sehr niedrig zu sein scheint, ist die Glaubwürdigkeit des Ergebnisses fraglich. Laut der durchgeführten Messung ist der Anteil an GVO demnach sehr gering.

Tab. 19: Ergebnisse der relativen Quantifizierung

Probe	Laborprobe Soja 1	Laborprobe Soja 2	SojaExtraktionsschrot
GVO-Anteil %	7,597	0,007	6,998

Die Probe des Sojaextraktionsschrotes ergab 6,998 % GVO. Nach der Artikeldeklaration (Anlage 1, CD) besteht das Ausgangsprodukt aus 42,5 % Rohprotein, 1,5 % Fett und 7 % Rohfaser. Da Fett und Rohprotein durch die Extraktion fast vollständig entfernt worden sein sollten, verbleibt der Faser-Anteil, der noch ganze Zellen beinhaltet, als Träger der DNA. Da dieses Produkt nur aus genetisch veränderten Sojabohnen besteht, müsste der Anteil an GVO folglich sehr hoch sein. Es handelt sich jedoch um ein Extraktionsprodukt, das auf dem Weg der Verarbeitung Substanzverluste erfahren hat, die mit hoher Wahrscheinlichkeit DNA-Verluste bedeuten. Bei der Herstellung von Sojamilch fällt dieses Extraktionsschrot als Nebenprodukt während eines Siebvorganges an. Die Verarbeitung beinhaltet Schritte der mechanischen sowie thermischen Behandlung. Zudem wurde es als Futtermittel im Zuge der Haltbarmachung dampferhitzt, was den zuvor genannten Fakt unterstützt. Somit scheint der errechnete Anteil von 6,998 % unter Berücksichtigung genannter Fakten plausibel.

Im Vergleich zwischen absoluter und relativer Quantifizierung ergeben sich im Bezug auf die untersuchten Proben die in Tabelle 20 dargestellten Abweichungen. In allen vermessenen Proben wurden mit der absoluten Quantifizierung höhere GVO-Gehalte ermittelt. Um weitere Zusammenhänge zu verdeutlichen, ist die Anzahl der durchgeführten Messungen nicht ausreichend. Trotzdem ist eine Ähnlichkeit bezüglich der Höhe der Werte ersichtlich. Sie weisen zueinander erkennbare Differenzen auf, die mit beiden Quantifizierungsmethoden verdeutlicht worden sind.

Tab. 20: Vergleich zwischen absoluter und relativer Quantifizierung

Probe	Laborprobe Soja 1	Laborprobe Soja 2	SojaExtraktionsschrot
absolute Quantifizierung (GVO-Gehalt in %)	9,332	0,063	7,551
relative Quantifizierung (GVO-Gehalt in %)	7,597	0,007	6,998
Abweichung (%)	1,735	0,056	0,553

Um eine statistische Sicherheit zu gewährleisten, müssten jedoch Messungen durchgeführt werden, die im Bezug auf beide Methoden jeweils über die hier durchgeführten Untersuchungen hinausgehen. Auffällig ist dennoch, dass der Wert der prozentualen Abweichung mit dem Gesamt-GVO-Gehalt steigt. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass steigende GVO-Gehalte eine größere Messungenauigkeiten hervorrufen.

4 Diskussion

Wie sich in dieser Arbeit herausstellte, ist es im Vergleich zu einer herkömmlichen PCR vorteilhaft, dass das sich Temperaturprogramm für das Annealing sowie für den Schritt der Elongation auf eine Temperatur von 59 oder 60°C beschränkt. Wichtig ist für das *TaqMan*TM-System, dass die Temperatur für beide Schritte konstant ist. Laut der amtlichen Methodensammlung (§64 LFGB [1], L 00.00-118, 2008) werden für diese beiden Schritte 54°C und 72°C angegeben. Auch die Anzahl der Zyklen ist geringer (40). So zeigte sich, dass eine Zyklenzahl von 40 laut § 64 LFGB im Bezug auf diese Methode im praktischen Teil dieser Arbeit oftmals nicht ausreichte (siehe Abschnitt 3.1.1.2, Abbildung 12). Vor Allem im Bereich der Nachweisgrenze benötigt das hier entwickelte Verfahren eine höhere Anzahl von Zyklen und somit mehr Zeit, als die in der amtlichen Sammlung beschriebene Detektionsmethode (§64 LFGB [1], L 00.00-118, 2008). Die *TaqMan*-Technologie zeigt außerdem, dass höchstwahrscheinlich zufällig entstandene Primer-Dimere keinen signifikanten Einfluss auf die Messung haben, da die Sonden eine hohe Sequenzspezifität besitzen und Fluoreszenzsignale mit höchster Wahrscheinlichkeit als Sonden-spezifisch zu werten sind. Diese Tatsache stellt in dieser Hinsicht eine Erweiterung bzw. Verbesserung im Vergleich zu unspezifischen Detektionen, wie zum Beispiel SYBR®Green-Detektionen, dar. Im Bezug auf SYBR® Green-Assays beschreiben Mbongolo Mbella et al. (2011) eine Auswahl an Methoden, die zur Detektion von genetisch veränderten Sojabohnen, Mais, Raps, Reis, Baumwolle, Zuckerrohr sowie Kartoffeln etabliert wurden. Dabei sind für alle Methoden dieselben Reaktionsbedingungen geltend. Barbau-Piednoir et al. (2010) schilderten die Detektion von 35S- sowie TNOS-Sequenzen im Bezug auf den Einsatz einer SYBR® Green-Methode mit demselben Ziel. Bei den angewandten Verfahren ist jedoch eine Schmelzkurvenanalyse notwendig, um unspezifische Sequenzen zu identifizieren, was die Dauer der Untersuchung verlängert und eine Auswertung im Vergleich mit dem *TaqMan*TM-Verfahren erschwert. Andere als das in dieser Arbeit verwendete Verfahren sind oftmals nicht derart sensitiv. Im Vergleich zwischen der Real Time PCR und einer Dot-Blot-Technik ergab sich laut Vassilakos et al. (2012) die Erkenntnis, dass die Anwendung der Real Time-PCR zur Detektion des PSTVd zehn Mal so sensitiv erfolgt, wie mit der Dot-Blot-Hybridisierung (Vassilakos et al., 2012). Kiddle et al. (2012) beschreiben weiterhin den Einsatz einer LAMP-Methode zum GVO-Nachweis. Es wird dabei ein Detektionssystem verwendet, dass das Vorhandensein GVO-spezifischer DNA in Echtzeit anzeigt. Derartige Real Time-Methoden fasst man unter dem Begriff BART (bioluminescent real time reporter) zusammen. Dafür verantwortlich ist in diesem Fall der Stoff Luziferin, der unter Energieverbrauch und unter

Mithilfe des Enzyms Luziferase ein Fluoreszenzsignal erzeugt. In Kopplung mit der LAMP-Methode erschließt sich die Bezeichnung LAMP-BART, die gegenwärtig an Aktualität gewinnt. Mit dem von den Autoren beschriebenen Verfahren ist eine Art Schnelltest möglich, der direkt auf dem Feld durchgeführt werden kann (Kiddle et al., 2012). Die qualitativen Nachweise innerhalb der Versuche laut Abschnitt 3.1.1 erfolgten problemlos. Es wäre gegebenenfalls anzustreben, im Sinne einer Multiplex PCR mehrere Detektionen miteinander zu verknüpfen, was einen Zeitvorteil liefern könnte. Gryadunov et al. (2011) schildern weiterhin die Verwendung eines Mikrochips. Mit dieser Technik wird eine Alternative zu Primer-Kombinationen einer Multiplex Real Time PCR aufgezeigt. Dieser Biochip enthält 22 fixierte Oligonukleotidfragmente, die für GVO-spezifische Sequenzen codieren. Dadurch werden sowohl Event- als auch Konstrukt-spezifische Nachweise ermöglicht. Die Sequenzen betreffen die Pflanzen Soja, Mais, Kartoffel und Reis. Zum Beweis wurden Multiplex Real Time-PCRs durchgeführt, um die Funktion des Chips zu prüfen (Gryadunov et al., 2011). Ein alternatives NIR-Spektroskopie-Verfahren wurde zur Unterscheidung von RR- und konventioneller Soja durch Roussel et al. (2001) beschrieben. Für gewöhnlich werden mit diesem Verfahren Prognosen über Feuchtigkeit, Protein-, Faser-, Öl- sowie Stärkegehalt getroffen. Das Verfahren wurde demnach zu einer GVO-Analyse weiterentwickelt. Im Bezug auf einen Datenpool mit Probenanzahlen von ca. 8000 ergibt sich mit dieser Methode eine Genauigkeit von 93 % (Ahmed, 2002) (Roussel et al., 2001). Der Vergleich mit Abschnitt 3.1.1 beweist, dass jegliches Vorhandensein der 35S-Sequenz detektierbar ist, sofern sie unversehrt nach der Extraktion im Template vorliegt. Dies deutet auf eine höhere Genauigkeit im Vergleich zur vorher genannten Methode hin. Im Gegensatz zum TaqMan™-Verfahren ist die NIR-Methode jedoch weniger zeitaufwendig, da eine Probenaufbereitung entfällt. Es werden ganze Bohnen verwendet, indem diese in Messzellen appliziert werden. Außerdem ist der Kostenfaktor geringer. Von Nachteil ist, dass keine Probenkomponenten identifiziert werden und somit eine große Menge an Proben für eine Kalibrierung verwendet werden, um eine Event-spezifische Analyse zu gewährleisten. Auch diesbezüglich ist das entwickelte Verfahren im Bezug auf eine qualitative und quantitative Analyse variabler. Des Weiteren kann die NIR-Methode nicht genauer sein als die, die zur Erstellung der Kalibration notwendige Referenzmethode. Des Weiteren ist die genannte Prozedur für jede GV-Pflanze gesondert durchzuführen (Ahmed, 2002) (Roussel et al., 2001). Ein weiteres Verfahren, dem das beschriebene TaqMan™-Prinzip ähnelt, ist das Molecular-Beacon-System. Ähnlich dem in dieser Arbeit praktizierten TaqMan™-Verfahren besitzen Molecular Beacons endständig einen Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff sowie ein Quencher-Molekül (Müller, 2001) (Tyagi,

Kramer, 1996). Die Abbildung 17 zeigt den Aufbau eines Molecular Beacons. Tyagi und Kramer (1996) entwickelten dieses Verfahren, welches prinzipiell aufgrund der Sequenzspezifität auch auf GVO angewendet werden könnte.

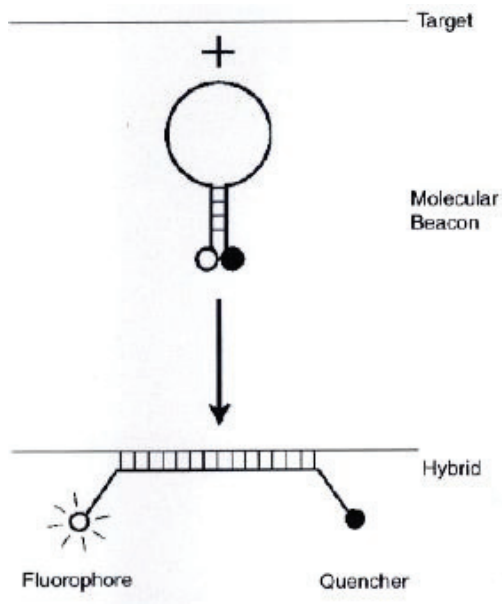


Abb. 17: Prinzip der Molecular Beacons (Tyagi, Kramer, 1996)

Im Gegensatz zu Hybridisierungs sonden sind diese Molecular Beacons nicht an die Sondenabsplattung für die Erzeugung eines Signals gebunden. Vielmehr besitzen die Enden des Moleküls zueinander komplementäre Basen, durch deren Zusammenschluss, sofern in Lösung befindlich, ein Schleifenförmiges Molekül entsteht. Nach Anlagerung an die jeweilige Zielsequenz lösen Molecular Beacons ihre Schleifenstruktur auf und es entsteht ein messbares Fluoreszenzsignal (Müller, 2001) (Tevfik Dorak, 2006). Ein ähnliches Prinzip stellt das Scorpion-System dar. Scorpion-Moleküle bilden eine charakteristische Haarnadelstruktur aus und besitzen ebenfalls ein Fluorophor sowie einen Quencher. Im Gegensatz zu Molecular Beacons besitzen diese Moleküle zusätzlich einen Blocker sowie eine 3'-Sequenz, die an den Quencher anschließen. Die in der Schleife eingeschlossene Sequenz bindet an die komplementäre Zielsequenz. Durch die dabei eintretende Trennung von Fluorophor und Quencher wird der erstgenannte angeregt und ein messbares Signal entsteht (Müller, 2001) (Tevfik Dorak, 2006) (Bustin, Nolan, 2004). Scorpion-Primer-Systeme sind darüberhinaus für eine absolute Quantifizierung anhand von Standards geeignet. Auch in dieser Arbeit ist die Quantifizierung per Kalibrationsgerade als erfolgreich anzusehen. Für genauere Aussagen könnten Mehrfachmessungen durchgeführt werden, um die absolute Reproduzierbarkeit der Methode zu stützen. Terry et al. (2002) beschreiben die Anwendung der *TaqMan*TM-Technologie, Scorpion- und einer SYBR®Green-Methode zur Detektion von GV-Soja sowie

die Quantifizierung mit den genannten Methoden. Im Vergleich zwischen *TaqMan*TM und Scorpion-Primer- System zeigten sich jedoch leichte Abweichungen (siehe Tabelle 21) (Terry et al., 2002).

Tab. 21: Vergleich der Quantifizierung anhand von *TaqMan*TM-Sonden und Scorpion-Primern (Terry et al., 2002)

Baked sample	Actual % GMO soya relative to total soya	Calculated % GMO relative to total soya	
		TaqMan probes	Scorpion primers
1	1.0	1.4 ± 0.50	0.6 ± 0.38
2	0.1	0.3 ± 0.32	0.2 ± 0.22

Die Untersuchung von Terry et al. (2002) verdeutlicht in beiden Fällen Abweichungen bezüglich eingesetzter und ermittelter Konzentrationen. Die Ergebnisse der *TaqMan*TM-Methode treffen laut diesen Ergebnissen die eingesetzten Ausgangskonzentrationen besser. Beide Konzentrationen (1-0,1%-Standard) wurden jedoch im Bezug auf den GVO-Gehalt leicht übertroffen. Ergebnisse des Scorpion-Verfahren zeigen laut Tabelle 21 nur schwache Tendenzen. Für die Scorpion-Methode spricht, dass sie wahrscheinlich eine bessere Reproduzierbarkeit aufgrund der geringeren Standardabweichungen der Ergebnisse liefert (Terry et al., 2002). Diese Tatsachen belegen die Eignung der in dieser Arbeit angewandten Methode zur Quantifizierung anhand von Standardreihen. Generelle Grenzen des entwickelten Verfahrens im Bezug auf die Verwendung der CaMV 35S-Sequenz wären laut § 64 LFGB im Fall von Gurken zu sehen, da der CaMV mit dem Gurken-Mosaikvirus übereinstimmt. Ansonsten bestehen keine Gemeinsamkeiten genetisch veränderter Pflanzen mit dem CaMV 35S gegenüber nicht-GVO. Es wird eine hohe Selektivität für Screening-Verfahren gewährleistet (§ 64 LFGB [2] - L 00.00-118, 2008). Fraglich scheinen im Zuge der Untersuchung die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung zu sein (siehe Abschnitt 2.2.2). So wurden Unterschiede innerhalb mehrerer Extraktionen desselben Ausgangsmaterials festgestellt. Die photometrische Methode ist lediglich eine Variante der DNA-Konzentrationsbestimmung und steht eng im Zusammenhang mit der Reinheit der Probe sowie weiteren Faktoren wie der verwendeten Extraktionsmethode. Laut Pöpping und Unterberger (2010) besteht ein Nachteil im Messen doppelsträngiger DNA. Störfaktoren wie organische Komponenten beeinflussen das Messergebnis erheblich. Außerdem kann dieses Detektionssystem nicht zwischen DNA und RNA unterscheiden. Bestimmungsmethoden mit Fluoreszenzfarbstoffen sind in diesem Fall vorteilhafter, da sie nach Bindung mit der DNA

Fluoreszenzsignale erzeugen, die gemessen werden können. Diese Quantifizierung ist sensitiver im Bezug auf geringere DNA-Mengen und erfolgt über eine Eichgerade (Pöpping, Unterberger, 2010). Im Fall des Soja-Desserts müsste eine Detektion bezüglich des GM1-Genabschnittes möglich sein. Versuche dieser Arbeit zeigten, dass dies mit den aufgeführten Extraktionsmethoden nicht der Fall war. Folglich konnte auch die 35S-Sequenz mit dem System nicht nachgewiesen werden. Zwar wurden gute Reinheits- und Konzentrationswerte erzielt, jedoch war eine Amplifizierung unter den genannten Bedingungen nicht möglich. Diesbezüglich ist möglicherweise eine Kühlung während der Extraktion vorteilhaft, um eine wahrscheinliche Enzymaktivität, möglicherweise durch Nukleasen, zu verringern (Pöpping, Unterberger, 2010). Greiner et al. (2005) beschreiben in ihrer Studie eine qualitative und quantitative Detektion von genetisch modifiziertem Mais und Soja aus brasilianischen, kommerziell erhältlichen Lebensmitteln. Dazu zählten im Fall von Mais beispielsweise Backwaren, Maismehl, Polenta sowie Tortilla Chips. Für Soja betrifft dies Lebensmittel wie Soja-Drinks, Tofu-Produkte und weitere. Es konnten Abweichungen bezüglich der verwendeten Extraktionsmethode im Vergleich mit dieser Arbeit festgestellt werden. Zur Isolierung wurde an dieser Stelle der Wizard™-DNA-Isolation-Kit benutzt. Des Weiteren erfolgte eine Inkubation nach Zugabe von Proteinase K über Nacht bei 65°C. Auch die verlängerte Inkubationszeit könnte im Vergleich vorteilhafter sein, um vorhandenes Material aufzuschließen. Außerdem wird hier eine größere Ausgangsprobenmenge eingesetzt, was eine erfolgreiche Isolierung wahrscheinlicher macht (Greiner et al., 2005). Ergebnisse der genannten Studie zeigen, dass dennoch Schwierigkeiten bezüglich der Detektion auf Basis prozessierter Lebensmittel bestehen, was für die nicht erfolgte Amplifikation des Soja-Desserts innerhalb dieser Arbeit spricht. Mit dem Grad der Prozessierung pflanzlichen Materials wird folglich eine Detektion erschwert, sodass im Falle des Vorhandenseins von GV-DNA-Sequenzen sensitivere und sicherere Extraktionsmethoden verwendet werden müssten. James et al. (2003) beschreiben weiterhin die Ausgangsprobenmenge als kritischen Faktor im Bezug auf eine Multiplex Real Time PCR. In dieser Arbeit konnten ebenfalls Aussagen zur Sensitivität des verwendeten Systems getroffen werden. Es wurde nachgewiesen, dass eine Nachweisgrenze im Bereich um 5-10 Kopien besteht. Ergebnisse in diesen Bereichen sind laut Abschnitt 3.1.1.2 (siehe Abbildung 12, Probe 5, 10 Kopien) und 3.1.2.1 (siehe Abbildung 15 und 16, 5 und 10 Kopien) als positiv zu werten. Laut Waiblinger (GDCh, 2010, siehe Anlage 15, CD) entsprechen 10 Kopien einem ungefähren GVO-Gehalt von 0,02 %. Des Weiteren bestätigen Waiblinger et al. (2008) diese Nachweisgrenze. Jedoch wird an dieser Stelle angemerkt, dass die Berechnung der Kopienzahl eine gewisse

Fehlerquelle in sich birgt. Sie weisen darauf hin, dass ihre Ergebnisse auf Grundlage einer Kopie-Berechnung wahrscheinlich als Schätzungen zu werten sind (Waiblinger et al., 2008). Durch die in dieser Arbeit belegte SONDENSPEZIFITÄT der *TaqMan*TM-Technologie ist nicht zwingend ein strikt homogenes Template in Form eines DNA-Reinextraktes notwendig. Ferner ermöglicht dieser Sachverhalt eine simultane Detektion mehrerer Sequenzabschnitte und somit Pflanzenarten. Die Technologie GVO-spezifischer Sonden ließe sich durch Kombination verschiedener Primer zu einer Multiplex PCR weiterentwickeln. Die 35S-Sequenz ist eine Virus-spezifische DNA-Sequenz. Solche Sequenzen wurden mithilfe einer Multiplex-PCR im Kontext der *TaqMan*TM-Technologie durch Li et al. (2013) durchgeführt. Sie untersuchten 3 Früchte auf das Vorhandensein dreier verschiedener Viren (Lin et al., 2013). Weitere Forschungen sowie Entwicklungen auf diesem Gebiet wurden beispielsweise durch James et al. (2003) im Falle von Mais, Soja und Raps durchgeführt. Im Sinne dieser Untersuchungen ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten der *TaqMan*TM-Technologie in der Lebensmittelindustrie, vor Allem aber in deren Peripherie, beispielsweise der Rohstoff-Forschung oder Komponenten-Analyse.

5 Zusammenfassung

Genetisch veränderte Pflanzen sind in den vergangenen Jahren mehr und mehr in den Fokus der Lebens- und Futtermittelindustrie geraten. Trotz eines verhältnismäßig geringen Anteils ist der GVO Anteil bezüglich Lebensmitteln innerhalb der EU gering. Im Futtermittelsektor ist im Gegensatz dazu ein stärkerer Trend vorhanden. Diese steigenden Tendenzen sowie damit einhergehende gesetzliche Regelungen belegen einen Bedarf an Nachweisverfahren. Dahingehend wurden zahlreiche Methoden etabliert. Viele beziehen sich auf Anwendungen der Real Time PCR, die Gegenstand dieser Arbeit ist. Die Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode erfolgte über die qualitative, sowie die Quantitative Bestimmung von GVO anhand des 35S-Promotors. Soja-, Mais-, sowie Futtermittelproben konnten qualitativ nachgewiesen werden. Unbekannte Proben konnten weiterhin als RR-Soja identifiziert werden. Jedoch bedarf die Anwendung dieser Methode im Bezug auf prozessierte Lebensmittel einer Anpassung der Aufbereitungsmethoden. Dies wurde durch den Versuch der Amplifizierung eines Lebensmittels auf Soja-Basis deutlich. Weder 35S- noch GM1-Amplifizierungen führten zu einem Ergebnis. Die quantitative Analyse unbekannter Sojaprobe n bezieht sich auf die Anwendung einer absoluten auf Basis einer Kalibrationsgerade sowie einer relativen Methode unter Berücksichtigung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Trotz Unterschieden weisen beide Methode nachvollziehbare Tendenzen sowie Ergebnisse auf. Es konnte der GVO-Gehalt von Sojaprobe n und eines Futtermittels anhand der GM1-Sequenz und des 35S-Promotors bestimmt werden.

6 Literaturverzeichnis

[EGGenTDurchfG, 2008] Gesetz zur Durchführung der Verordnungen der Europäischen Gemeinschaft auf dem Gebiet der Gentechnik und über die Kennzeichnung ohne Anwendung gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel (EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz - EGGenTDurchfG), EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz vom 22. Juni 2004 (BGBl. I S. 1244), zuletzt geändert durch die Bekanntmachung vom 27. Mai 2008 (BGBl. I S. 919)

[GenTG (1990), zuletzt geändert 07.08.2013]. Gesetz zur Regelung der Gentechnik (20.06.1990). "Gentechnikgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBl. I S. 2066), das durch Artikel 4 Absatz 14 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist"

[Richtlinie 2001/18/EG] Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und Rates über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates, vom 12. März 2001

[VO (EG) Nr. 1829/2003] Verordnung (EG) Nr. 1829/ 2003 des Europäischen Parlaments und Rates über Genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel, vom 22. September 2003

[VO (EG) Nr. 1830/2003] des Europäischen Parlaments und Rates 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, vom 22. September 2003

[VO (EG) Nr. 641/2004] Verordnung 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 veränderten Materials, zu dem die Risikobewertung befürwortend ausgefallen ist, vom 6. April 2004

[VO (EG) Nr. 882/2004] Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmung über Tiergesundheit und Tierschutz, vom 29. April 2004

Ahmed, F. E.: Detection of genetically modified organisms in foods. TRENDS in Biotechnology (29/5), S. 215-223, Mai 2002

Amtliche Sammlung § 64 LFGB [1] - L 00.00-118, Anhang B: Screening-Verfahren zum Nachweis genetisch modifizierter Pflanzen-DNA (CaMV-35S-Promotor), B 1.7.3 Temperatur-Zeit-Programm, Juni 2008

Amtliche Sammlung § 64 LFGB [2] - L 00.00-118, Anhang B: Screening-Verfahren zum Nachweis genetisch modifizierter Pflanzen-DNA (CaMV-35S-Promotor), B 1.2.2.1 (Allgemeines) - B 1.2.2.2 (Theoretisch), Juni 2008

Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., Van den Eede, G.. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. European Food Research and Technology 214, S. 3–26, 2002

Barbau-Piednoir, E.; Lievens, A.; Mbongolo-Mbella, G.; Roosens, N.; Sneyers, M.; Leunda-Casi, A.; Van den Bulcke, M.: SYBR® Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. European Food Research and Technology 230, S. 383 – 393, Springer-Verlag, 2010

Brunnert, H.-J.: Quantitative Nachweismethoden für Proteine und DNA aus gentechnisch veränderten Organismen in Lebensmitteln. Fachbereich Biochemie. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 24. Juni 2002

Busch, U. (Hrsg.): Molekularbiologische Methoden der Lebensmittelanalytik – Grundlegende Methoden und Anwendungen. 1. Auflage (2. September 2010). Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2010

Bustin, S. A.; Nolan, T.: A-Z of Quantitative PCR. 1. Auflage. La Jolla: International University Line, 2004

BVL: BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTEL-SICHERHEIT, [Version: 10.12.2012]: [Reference Materials for GMO Detection], [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/nachweis_kontrollen/referenzmaterialien.html], Stand: [17.01.2014] → Diese Quellenangabe weicht von der üblichen Darstellungsweise ab, entspricht jedoch den Forderungen, die das BVL auf seiner Internetpräsenz an Nutzer entsprechender Daten stellt.

Chmiel, H.: Bioprozesstechnik. 2. Auflage. München: Elsevier, 2006

English, L.; Slatin, S. L.; Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22. S. 1-7, 1992

Figeys, D.; Pinto, D.: Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences. *Analytical Chemistry* 72 (9), S. 330A–335A, 1. Mai 2000

Geckeler, K. E.; Eckstein, H.: Bioanalytische und biochemische Labormethoden. 1. Auflage. Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1998

Greiner, R.; Konietzny, U.; Villavicencio, A. L. C. H.: Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control* (16), S. 753-759, 2005

Groisman, E. A.; Chiao, E.; Lipps, C. J.; Heffron, F.: Salmonella typhimurium phoP virulence gene is a transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, S. 7077-7081, 10. Mai 1989

Gryadunov, D. A.; Getman, I. A.; Chizova, S. I.; Mikhailovich, V. M.; Zasedatelev, A. S.; Romanov, G. A.: Identification of Plant-Derived Genetically Modified Organisms in Food and Feed Using a Hydrogel Oligonucleotide Microchip. *Molecular Biology* (2011) 45, S. 894 – 903, 11. April 2011

Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; von Tiedemann, A.: Phytomedizin – Grundwissen Bachelor. 2. Auflage. Stuttgart : Verlag Eugen Ulmer KG, 2007

Hauk, A.: Die Dot-Blot-Technik. *Biologie Unserer Zeit* 1/2013 (43), S. 20, Wiley-Verlag, Weinheim, © 2013

Hoffmann, T.: Gentransfer bei höheren Pflanzen. In: Oldenbach, W. (Hrsg.); Diepenbrock, W.: Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. 1. Auflage. Berlin: Parey Buchverlag, S. 275-323, 1997

Höfte, H.; Whiteley, H. R.: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 53 (2), S. 242-252, Juni 1989

IKB (Institut Kirchhoff Berlin GmbH): Aktuelle Kurzinformationen zu genetisch verändertem Soja - Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) Soja. www.institut-kirchhoff.de/de/Download/Kundeninfoblatt_GVO_Soja.pdf. Vertreten durch: Dr. E.

Kirchhoff, Dr. Jutta Kunert-Kirchhoff, Inhaltlicher Verantwortlicher: Norbert Pletz. Institut Kirchhoff Berlin GmbH, Albestr. 3-4, 12159 Berlin, Mai 2011

James, D.; Schmidt, A.-M.; Wall, E.; Green, M.; Masri, S.: Reliable Detection of Genetically Modified Maize, Soybean, and Canola by Multiplex PCR Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, S. 5829-5834, 2003

Kempken, F.; Kempken, R.: *Gentechnik bei Pflanzen*. 2. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 2004

Kiddle, G.; Hardinge, P.; Buttigieg, N.; Gandelman, O.; Pereira, C.; McElgunn, C. J.; Rizzoli, M.; Jackson, R.; Appleton, N.; Moore, C.; Tisi, L. C.; Murray, J. A. H.: GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *Research Article, BMC Biotechnology* 12 (15), 30 April 2012

Konrad, R.; Busch, U.: PCR und Real-Time PCR (Kapitel 4). in: Busch, U.: *Molekularbiologische Methoden der Lebensmittelanalytik – Grundlegende Methoden und Anwendungen*. 1. Auflage (2. September 2010). Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2010

Lee, M. K.; Walters, F. S.; Hart, H.; Palekar, N.; Chen J.-S.: The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab-Endotoxin *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8), S. 4648-4657, 08. Mai 2003

Lin, L.; Li, R.; Bateman, M.; Mock, R.; Kinard, G.: Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic Viroid. *European Journal of Plant Pathogen* 137, S. 797-804, 26. September 2013

Mackay, I. M.: *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterisation*. 1. Auflage. Norfolk: Caister Academic Press, 2007

Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M.: *Lebensmittelanalytik*. 4. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010

Mbongolo Mbella, E. G.; Lievens, A.; Barbau-Piednoir, • Elodie; Sneyers, M.; Leunda-Casi, A.; Roosens, N. Van den Bulcke, M.: SYBR_Green qPCR methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. *European Food Research and Technology* 232, S. 485–496, 7. Januar 2011

Menrad, K.; Gaisser, S.; Hüsing, B.; Menrad, M.: Gentechnik in der Landwirtschaft, Pflanzenzucht und Lebensmittelproduktion – Stand und Perspektiven. Auflage 2003. Heidelberg: Physika-Verlag, 2003

Mizuno, T.; Chou, M.-J.; Inouye, M.: A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). Biochemistry. Proceedings of the National Academy of Sciences USA (81), S. 1966-1970, April 1984

Mülhardt, C: Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. 5. Auflage. Heidelberg: Springer Verlag, 2006

Müller, H.-J.: PCR – Polymerase - Kettenreaktion. 1. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2001

Müller, H.-J.; Röder, T.: Microarrays. 1. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Juli 2004

Notomi, T.; Okayama, H. Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28, Nr.12, 15. April 2000

Nowrousian, M. (Hrsg.: Kück, U.): Praktikum der Molekulargenetik. Kapitel 4 – PCR – Analytik. 4.1 Das Prinzip der PCR. 5. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005

Padgett, S. R.; Kolacz, K. H.; Delannay, X.; Re, D. B.; La Vallee, B. J.; Tinius, C. N.; Rhodes, W. K.; Otero, Y. I.; Barry, G. F.; Eichholtz, D. A.; Pescke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N. B.; Kishore, G. M.: Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Science 35: S. 1451-1461, 1995

Pöpping, B.; Unterberger, C.: Extraktion von DNA. in: Busch, U. (Hrsg.): Molekularbiologische Methoden der Lebensmittelanalytik – Grundlegende Methoden und Anwendungen. 1. Auflage (2. September 2010). Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2010

Rehm, H.: Der Experimentator – Proteinbiochemie/Proteomics. 4. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002

Renneberg, Reinhard (Illustrationen von Darja Süßbier): Bioanalytik für Einsteiger. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009

Roussel, S. A.; Hardy, C. L.; Hurburgh, C. R.; Rippke, G. R.: Detection of Roundup Ready™ Soybeans by Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* (55/10), S. 1425-1430, 2001

Sielaff, H: Fleischtechnologie. Auflage 1996. Hamburg: Behr's Verlag, 1995/ 1996

Southern, E. M.: Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* (1975) 98, S. 503-517, 3. März 1975

Spelsberg, G. [1] (Verantwortlicher Redakteur und Projektleiter); Baron, H.; Fuhrmann, S.; Poetschke, A. (*i-bio* Information Biowissenschaften): MON810-Mais: Der lange Weg zur zweiten Zulassung, <http://www.transgen.de/anbau/deutschland/227.doku.html>. Transparenz Gentechnik. Herausgeber: Forum Bio- und Gentechnologie – Verein zur Förderung der gesellschaftlichen Diskussionskultur e.V., 27. September 2013

Spelsberg, G. [2] (Verantwortlicher Redakteur und Projektleiter); Baron, H.; Fuhrmann, S.; Poetschke, A. (*i-bio* Information Biowissenschaften): Grüne Gentechnik in der EU: Spanien, Portugal und sonst kaum etwas. http://www.transgen.de/anbau/flaechen_international/643.doku.html. Transparenz Gentechnik. Herausgeber: Forum Bio- und Gentechnologie – Verein zur Förderung der gesellschaftlichen Diskussionskultur e.V., 12. November 2013

Spelsberg, G. [3] (Verantwortlicher Redakteur und Projektleiter); Baron, H.; Fuhrmann, S.; Poetschke, A. (*i-bio* Information Biowissenschaften): Gentechnisch veränderte Sojabohnen: Anbauflächen weltweit, http://www.transgen.de/anbau/flaechen_international/201.doku.html. Transparenz Gentechnik. Herausgeber: Forum Bio- und Gentechnologie – Verein zur Förderung der gesellschaftlichen Diskussionskultur e.V., 08. März 2013

Spelsberg, G. [4] (Verantwortlicher Redakteur und Projektleiter); Baron, H.; Fuhrmann, S.; Poetschke, A. (*i-bio* Information Biowissenschaften): Neu-Zulassung von gentechnisch veränderten Sojabohnen: Herbizid Glyphosat unter Druck, <http://www.transgen.de/aktuell/1648.doku.html>. Transparenz Gentechnik. Herausgeber: Forum Bio- und Gentechnologie – Verein zur Förderung der gesellschaftlichen Diskussionskultur e.V., 15. November 2011

Stave, J. W.: Protein Immunoassay Methods for Detection of Biotech Crops: Applications, Limitations, and Practical Considerations. *Journal of AOAK International* (85 Nr.3), S. 780-786, 2002

Steinbiß, H.-H.: Transgene Pflanzen. 1. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1995

Sturma, D.; Lanzerath, D.; Heinrichs, B. (Herausgeber); Tambornino, L.: Gentechnik in der Lebensmittelproduktion – Naturwissenschaftliche, rechtliche und ethische Aspekte. 1. Auflage. Freiburg: Verlag Karl Alber, 2011

Terry, C. F.; Shanahan, D. J.; Ballam, L. D.; Harris, N.; McDowell, D. G.; Parkes, H. C.: Real-Time Detection of Genetically Modified Soya Using Lightcycler and ABI 7700 Platforms with TaqMan, Scorpion, and SYBR Green I Chemistries. Journal of AOAC International (85/4), S. 938-944, 25. Januar 2002

Tevfik Dorak, M.: Real-Time PCR. ISBN: 978-0-41537734-8. ASIN: B00DHPBCKC. © 2006 Taylor & Francis Group. New York: Taylor and Francis – Verlag, 2006

Tyagi, S.; Kramer, F. R.: Molecular Beacons: Probest hat Fluoresce upon Hybridization. Nature Biotechnology (14), S. 303-308, März 1996

Vassilakos, N; Kektsidou, O.; Papaeythimiou, Maria; Varveri, C.: Comparison of direct-RT-PCR and dot-blot hybridization for the detection of Potato spindle tuber viroid in natural host plant species. European Journal of Plant Pathogen (2012) 134, S. 859-864, Springer Verlag, 31 July 2012

Waiblinger, H.-U.: Die Untersuchung auf gentechnische Veränderungen („GVO-Analytik“). in: Busch, U. (Hrsg.): Molekularbiologische Methoden der Lebensmittelanalytik – Grundlegende Methoden und Anwendungen. 1. Auflage (2. September 2010). Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2010

Waiblinger, H.-U.; Ernst, B.; Anderson, A.; Pietsch, K.: Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products. European Food Research and Technology 226: S. 1221-1228, 2008

Xuefei Li, Shu Zhang, Hongwei Zhang, Lihuai Zhang, Haitao Tao, Jia Yu, Wenjie Zheng, Chenghu Liu, Dan Lü, Rong Xiang, Yin Liu: A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples. International Journal of Food Microbiology 133, Nr.3, S. 252-258, 15 August 2009

Zagon, J.: BfR-Jubiläum - Gentechnik in Lebens- und Futtermitteln; Produktidentität, Rückverfolgbarkeit und Neuartige Lebensmittel. Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: 9. November 2007

Zagon, J.; Crnogorac, G.; Kroh, L.; Lahrssen-Wiederholt; Broll, H.: Nachweis von gentechnisch veränderten Futtermitteln – Eine Studie zur Anwendbarkeit von Verfahren aus der Lebensmittelanalytik. Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: BfR-Wissenschaft, 05/2006

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Anbau von GV-Mais in der EU in ha, 2007-2013 (Spelsberg et al. [2], 2013)
Tab. 2	Einige Promotoren bei genetisch veränderten Pflanzen (Menrad et al., 2003; Hoffmann, 1997)
Tab. 3	Einige mit dem 35S-Promotor detektierbare Organismen (Barbau-Piednoir et al., 2010)
Tab. 4	Einige Fluorophore und deren Extinktionen und Emissionen
Tab. 5	Reagenzien des Extraktions-Kits (Fa. CONGEN Biotechnologie GmbH)
Tab. 6	Reagenzien des Extraktions-Kits MasterPure™ (Fa. Epicentre Biotechnologies, Madison, USA)
Tab. 7	Primer; Sonden und deren Sequenzen und Konzentrationen
Tab. 8	Konzentrationen und Reinheit der Proben
Tab. 9	Zusammensetzung des Pre-Mastermixes (Pre-MM) [I]
Tab. 10	Zusammensetzung des Mastermixes (Pre-MM + Primer und Sonden)
Tab. 11	Verdünnungsreihe der US-Sojabohne (mit und ohne MgCl ₂)
Tab. 12	Bedeutung eines Gradienten für die Messungen
Tab. 13	Konzentrationen und Annealing-Temperaturen verwendeter Proben (Sojabohne, USA, Extrakt 1)
Tab. 14	Proben zum qualitativen Nachweis des 35S-Promotors
Tab. 15	Standards zur Erstellung der Kalibrationsgeraden
Tab. 16	Beispiel zur Berechnung des GVO-Gehaltes (GDCh, 2010; siehe Anlage 9, CD)
Tab. 17	C _t -Werte der Standards sowie NTC
Tab. 18	Ergebnisse der absoluten Quantifizierung
Tab. 19	Ergebnisse der relativen Quantifizierung
Tab. 20	Vergleich zwischen absoluter und relativer Quantifizierung
Tab. 21	Vergleich der Quantifizierung anhand von TaqMan™-Sonden und Scorpion-Primern (Terry et al., 2002)

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Anbaufläche GV-Soja in Millionen Hektar (Spelsberg [3] et al., 2013)
- Abb. 2 Charakterisierung der DNA einer transgenen Pflanze am Beispiel einer GV-Sojabohne (IKB, 2011)
- Abb. 3 Prinzip der Gelelektrophorese (Renneberg, 2009)
- Abb. 4 Ergebnis einer Gel-Elektrophorese am Beispiel GV-Soja (Zagon, BfR, 2007)
- Abb. 5 LFA zum Nachweis von Cry1F- und Cry34-Proteinen (Sojabohne) (Waiblinger, 2010)
- Abb. 6 Prinzip einer Standard-PCR (Nowrousian, 2005)
- Abb. 7 Graphische Darstellung des C_t -Wertes (Konrad, Busch, 2010)
- Abb. 8 Darstellung einer TaqManTM-Sonde (nach Zagon et al., BfR, 2006; GDCh, 2010, siehe Anlage 9, CD)
- Abb. 9 Prinzip der TaqManTM-Technologie (Zagon et al., BfR, 2006)
- Abb. 10 μ Drop Platte des Spektralphotometer MULTISKAN GO (Fa. Thermo Fisher Scientific Oy; Vantaa, Finland, siehe Anlage (CD))
- Abb. 11 PCR-Verlauf mit (rot) und ohne (blau) Zusatz von $MgCl_2$ (1 μ l pro Ansatz)
- Abb. 12 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklenzahl (Sojabohne, USA, RR, Extrakt 2)
- Abb. 13 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklen-Anzahl (*Bt*-Mais, 35S)
- Abb. 14 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklen-Anzahl
- Abb. 15 Kalibrationsgerade GM1 im C_t -Wert- \log_{10} (Kopien)-Diagramm
- Abb. 16 Kalibrationsgerade 35S im C_t -Wert- \log_{10} (Kopien)-Diagramm
- Abb. 17 Prinzip der Molecular Beacons (Tyagi, Kramer, 1996)

9 Gleichungsverzeichnis

- Gl. I Gleichung zur Berechnung des $OD_{260/280nm}$ -Quotienten
- Gl. II Gleichung zur Berechnung der DNA-Konzentration
- Gl. III Gleichung zur Berechnung der molaren Masse (Soja-DNA)
- Gl. IV Gleichung zur Berechnung eines Genomäquivalents bzw. der Masse einer Kopie
- Gl. V Gleichung zur Berechnung der Kopienzahl laut Funktionsgerade
- Gl. VI Gleichung zur Berechnung des GVO-Anteils (absolute Quantifizierung)
- Gl. VII Gleichung zur Berechnung des GVO-Anteils ($\Delta\Delta C_t$ -Methode)

Erklärung über die eigenständige Anfertigung dieser Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Studienarbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Anlagenverzeichnis (Anlagen siehe CD)

Anlage 1	Artikeldeklaration der Futtermittel Teil A: Hipro Sojaextraktionsschrot Teil B: Alleinfuttermittel für Mastschweine
Anlage 2	Belegungsplan und Darstellung einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten Teil A: Belegungsplan Teil B: Darstellung einer Mikrotiterplatte
Anlage 3	Temperaturprotokolle des Thermo-Light-Cyclers (I und II)
Anlage 4	Temperaturprotokolle des Thermo-Light-Cyclers (III und IV)
Anlage 5	Informationen zum Dessert auf Soja-Basis
Anlage 6	Sojaidentifizierung mit GM1- und RR- Primern und -Sonden Teil A: Identifizierung von Proben (GM1) Teil B: Identifizierung von Proben (RR)
Anlage 7	Relative Quantifizierung: Ct-Werte, Kopienzahlen und Berechnung der GVO-Gehalt der Proben
Anlage 8	Standards, Proben und Funktionswerte zur absoluten Quantifizierung Teil A: Standards und deren Funktionswerte Teil B: Funktionswerte und Berechnung der GVO-Gehalte
Anlage 9	Konzentrationen und Reinheit der Proben
Anlage 10	ERM, Referenzmaterial
Anlage 11	masterpure-dna-purification-kit
Anlage 12	Datenblatt peqGOLD 'Hot' Taq-DNA-Polymerase
Anlage 13	Primer und Sonden, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Anlage 14	Thermo Fisher Scientific, µdrop plate
Anlage 15	Waiblinger, GDCh, Multiplex-real time PCR
Anlage 16	Praktikumsanleitung <i>TaqMan</i> TM -Quantifizierung