

Probleme bei der Anwendung der 35S- und NOS-PCR für die GVO-Analytik = Problems with the application of the 35S- and NOS-PCR for GMO analysis

Autor(en): **Stadler, Markus / Hübner, Philipp / Eugster, Albert**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **89 (1998)**

Heft 3

PDF erstellt am: **14.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983146>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Probleme bei der Anwendung der 35S- und NOS-PCR für die GVO-Analytik

Problems with the Application of the 35S- and NOS-PCR for GMO Analysis

Key words: GMO, False positives, Labelling of food, PCR

Markus Stadler und Philipp Hübner

Universität Bern, Departement für Chemie und Biochemie,
Labor für Lebensmittelchemie, Bern

Albert Eugster

Kantonales Laboratorium Aargau, Aarau

Einleitung

Die eidgenössische Lebensmittelverordnung (LMV) regelt seit dem 1. Juli 1995 die Zulassung und die Deklaration von gentechnisch veränderten Lebensmitteln. Unter diese Gesetzgebung fallen *Lebensmittel, Zusatzstoffe und Verarbeitungshilfsstoffe, die gentechnisch veränderte Organismen sind oder daraus gewonnen wurden*. Diese Stoffe müssen mit dem Hinweis «GVO-Erzeugnis» gekennzeichnet sein (Art. 22 Abs.1^k); nicht unter die Deklarationspflicht fallen Erzeugnisse, die vom Organismus abgetrennt und vom Erbmaterial gereinigt sind (z. B. chemisch definierbare Stoffe). Die Schweizer Behörden haben nach ausführlicher Begutachtung die «Roundup Ready™»-Sojabohne von der Firma Monsanto im Dezember 1996 als erstes GVO-Lebensmittel für den Schweizer Markt zugelassen (1). Gleichzeitig hat das Bundesamt für Gesundheit für den Vollzug der eingangs erwähnten LMV die sogenannte Screening-Methode (2) für verbindlich erklärt. Diese Methode weist zwei in gentechnisch veränderten Pflanzen oft verwendete genetische Elemente nach: den 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus und den NOS-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*. Ein Lebensmittel, welches «Roundup Ready™»-Soja-DNA enthält, muss mit «GVO-Erzeugnis» deklariert werden, wenn ein positiver Nachweis des 35S-Promotors mit der offiziellen Methode erfolgt ist.

Der Nachweis für «Roundup Ready™»-Soja-DNA hingegen muss mit spezifischen Nachweismethoden (3, 4) erbracht werden.

In unseren Laboratorien haben wir im vergangenen Jahr mehrere hundert Proben bezüglich ihres GVO-Gehalts untersucht. Die dabei aufgetretenen Probleme bei der Anwendung der offiziellen Methode und Wege zu deren Lösung sind Gegenstand dieser Veröffentlichung.

Material und Methoden

Probenmaterial

Als Probenmaterial wurden verschiedene in unseren Labors untersuchte Sojabohnen- und Mehlmischungen verwendet (siehe Tabelle 1). Als Positivkontrolle diente «Roundup Ready™»-Sojabohnen-DNA (*Glycine max* var «Roundup Ready™»), als Negativkontrollen konventionelle Sojabohnen (*Glycine max*).

Tabelle 1. Untersuchte Proben.

Probenbezeichnung	Spezifikation
LMC396	Sojamehl
LMC400	Sojanüsse
LMC406	Maismehl, Stärke, Backtriebmittel
LMC407	Mehl (Mais, Weizen, Soja), Stärke, Backtriebmittel
LMC408	Sojamehl, Stärke, Salz

DNA-Extraktion und -Reinigung

Die Proben wurden gemäss SLMB Kapitel 52B aufgearbeitet (5). 300 mg der zerkleinerten Probe wurden abgewogen und in einem sterilen 2,0-ml-Eppendorfröhrchen mit 860 µl Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA und 1% [w/v] Natrium-dodecyl-sulfat [SDS]) versetzt. Zur Mischung wurden 100 µl einer 5-M-Guanidin-Hydrochloridlösung (Nr. G-3272, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) und 40 µl (20 mg/ml) Proteinase-K-Lösung (Nr. 24 568, E. Merck, Darmstadt) gegeben, das Reaktionsgemisch durch Vortexen gemischt und bei 55–60 °C für mindestens 3 Stunden auf einem Thermomixer geschüttelt. Nach der Verdauung wurden die Proben bei 14 500 × g während 10 Minuten zentrifugiert, 450 µl der wässrigen Phase wurden zu 1 ml Wizard™ DNA-Purification Resin (Nr. A 767C, Promega, Madison, WI, USA) gegeben und vorsichtig, durch mehrmaliges Kippen der Röhrchen, gemischt. Nach dem Wizard™-DNA-Aufarbeitungsprotokoll wurde die gereinigte DNA mit 50 µl 70 °C heissem Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0) eluiert.

Oligonukleotide

Die PCR-Primer wurden durch Microsynth (Schmidheini, CH-9436-Balgach) auf einem DNA-Synthesizer hergestellt. Die gelieferten Primer wurden darauf im Labor aliquotiert, lyophilisiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die DNA-Sequenzen der verwendeten Primer sind beschrieben (2, 5, 6).

Polymerase-Kettenreaktion und Analyse der DNA-Amplifikate

5 μl der unverdünnten oder 1:10 verdünnten DNA-Lösung wurden zu 45 μl Reaktionsmischung für die PCR gegeben. Die Amplifikation der pflanzlichen DNA mit den Primerpaaren 35S-1/35S-2 und NOS-1/NOS-3 wurde in einem Endvolumen von 50 μl in 0,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen nach folgenden Standardbedingungen ausgeführt: 1 \times Reaktionspuffer (Promega); 2,0 $\mu\text{g/ml}$ Bovines Serumalbumin (Nr. A-8022, Sigma); 2,5 mM Magnesiumchlorid; 0,2 mM Mischung der vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP); je 0,5 μM der beiden Primer; 1 Unit *Taq* DNA Polymerase (Promega). Die Amplifikation erfolgte in 40 Vervielfältigungszyklen: vorgängig ein Denaturierungsschritt bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 Minuten, dann $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 36 Sekunden, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 72 Sekunden und $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 84 Sekunden. Am Schluss erfolgte ein Extensionsschritt bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 Minuten gefolgt von einer 1minütigen Abkühlung auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Progene Thermal Cycler (Techne, Princeton, NY, USA).

Die Amplifikationsprodukte (20 μl) wurden mittels Elektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel (MP-Agarose, Boehringer Mannheim) in Tris-Borat Puffer (0,5xTBE: 0,045 M Tris-Borate, 0,001 M EDTA, pH 8,0) (7) aufgetrennt und durch Färben mit Ethidiumbromid im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

Restriktionsanalyse

35S-PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym *Xmn*I verdaut, indem 15 μl der amplifizierten DNA-Lösung mit 10 units des Restriktionsenzym für 2 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurde. Die Verdauung der NOS-PCR-Produkte mit dem Enzym *Nsi*I wurde analog durchgeführt (5). Die Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte in einem 2%-MS-Agarosegel (Boehringer Mannheim).

DNA-Sequenzanalyse

PCR-Produkte wurden auf einem 0,8%-Agarosegel aufgetrennt und mittels QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus dem Gel gereinigt. Die Menge isolierter PCR-Produkte wurde auf einem 0,8%-Agarosegel mit Hilfe eines Mengenstandards (Gibco BRL, Life Technologies AG, Basel) abgeschätzt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden zusammen mit den jeweiligen PCR-Primern zur DNA-Sequenzanalyse eingeschickt (Microsynth, Balgach, Schweiz). Die

Sequenzanalyse erfolgte auf einem DNA-Sequencer (Abi Prism Modell 377) mittels mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxyribonukleotiden.

Biocomputer-Analyse

Die DNA-Sequenzen der untersuchten 35S- und NOS-PCR-Produkte wurden mit der Datenbank «GenEmbl» (Release 52,0) mit Hilfe des Programms FASTA (GCG, Wisconsin, USA) verglichen. Der paarweise Vergleich mit der DNA-Sequenz des in die «Roundup Ready™» Soja eingeführten Transgens erfolgte mit dem Programm GAP (GCG).

Resultate und Diskussion

Auftreten von falsch positiven Signalen bei der 35S- und bei der NOS-PCR

Das Auftreten von Fehlbanden bei der PCR ist meistens klar ersichtlich, weil sich die Fehlbanden deutlich von den gewünschten Fragmenten in ihrer Grösse unterscheiden. Fehlbanden bei der PCR haben ihre Ursache darin, dass die verwendeten Primer neben den Zielsequenzen noch andere Sequenzen spezifisch erkennen (sogenannte «secondary sites»), was zur Amplifikation unerwünschter Produkte führen kann. Durch Erhöhung der Hybridisierungsstringenz (z. B. höhere Hybridisierungstemperatur) können Fehlbanden bei der PCR-Analyse unterdrückt werden, wenn die Primer nicht vollständig komplementär zu solchen «secondary sites» sind. In diesem Fall spricht man auch von Fehlpaarungen («mismatches») zwischen PCR-Primern und «priming sites». Die für die Deklaration von «Roundup Ready™» enthaltenden Lebensmittel verbindliche Methode wurde mit DNA aus verschiedenen Pflanzen getestet, ohne dass Fehlbanden festgestellt wurden (6). Hingegen wurden bei der Methodenvorprüfung im Rahmen der Subkommission 29a des Schweizerischen Lebensmittelbuches Störbanden bei der 35S-PCR bemerkt (8). Kürzlich haben wir neben den bereits bekannten Störbanden bei der 35S-PCR ebenfalls Störbanden bei der NOS-PCR beobachtet, wobei in beiden Fällen die Störbanden kaum von den jeweiligen gewünschten Fragmenten zu unterscheiden waren, so dass leicht falsch positive Analysenresultate entstanden. Typische Ergebnisse aus Routineuntersuchungen sind in Abbildung 1 gezeigt. Selbst die Erhöhung der Annealing-Temperatur von 54 °C auf 60 °C führte zu keiner Abnahme der 35S-Fehlbande, was darauf hinweisen könnte, dass die Homologie zwischen den PCR-Primern und oben beschriebenen «secondary sites» sehr hoch ist. Gerade im Hinblick auf die künftige Entwicklung der Markteinführung von GVO-Lebensmitteln weltweit (siehe z. B. (9)) ist das Erkennen von Fehlbanden bei der offiziellen 35S- und NOS-PCR wichtig.

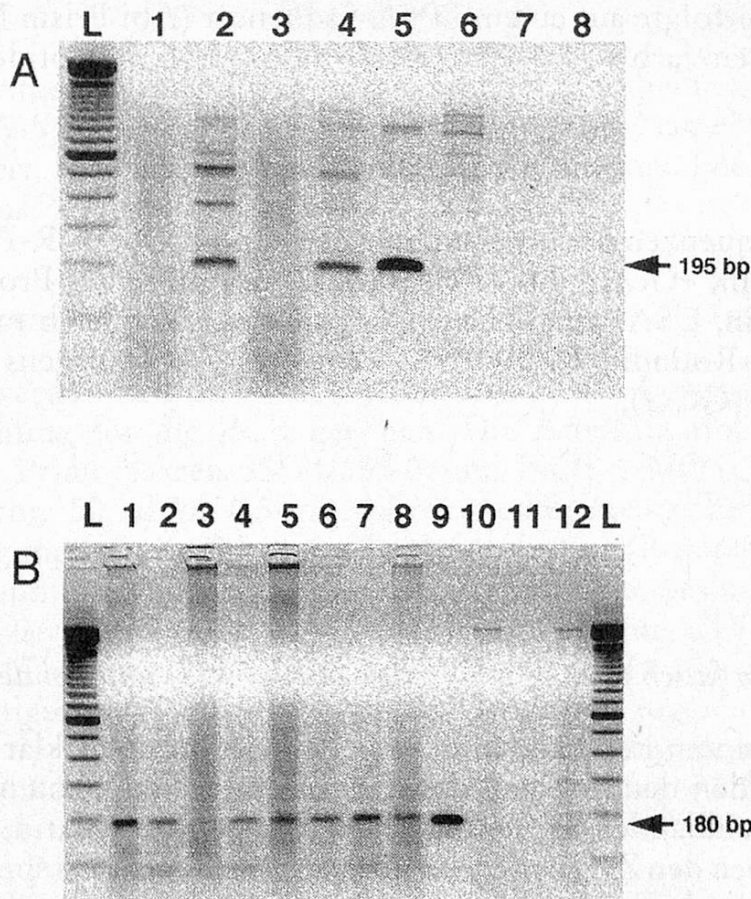


Abb. 1. A. Falsch positive 35S-PCR-Signale
 Die Templat-DNA der Probe LMC400 wurde entweder unverdünnt (Spuren 1 und 3) oder 1:10 verdünnt (Spuren 2 und 4) in der PCR eingesetzt (Doppelbestimmung). Die Kontrollen waren: «Roundup Ready™» Soja-DNA (Spur 5), konventionelle Soja-DNA (Spur 6), DNA-Isolations-Negativkontrolle (Spur 7) und PCR-Negativkontrolle (Spur 8). Das gesuchte 35S-PCR Produkt ist 195 bp lang. Die PCR in den Spuren 1 und 3 ist gehemmt, da entweder zuviel Templat-DNA eingesetzt wurde oder PCR-Inhibitoren in der isolierten DNA-Lösung vorhanden sind.

B. Falsch positive NOS-PCR-Signale
 Die Templat-DNA der Proben LMC396, LMC406, LMC407 und LMC408 wurden entweder unverdünnt (Spuren 1, 3, 5 und 7) oder 1:10 verdünnt (Spuren 2, 4, 6 und 8) für die NOS-PCR eingesetzt. Als Kontrolle dienten «Roundup Ready™» Soja-DNA (Spur 9), konventionelle Soja-DNA (Spur 10), DNA-Isolations-Negativkontrolle (Spur 11) und PCR Negativ-Kontrolle (Spur 12). L = 100 bp Leiter. Das NOS-PCR-Produkt ist 180 bp lang.

Erkennen von Störbanden bei der 35S- und bei der NOS-PCR

Da sich die oben beschriebenen Störbanden kaum von den gewünschten Fragmenten mittels Gelelektrophorese unterscheiden lassen, ist für die Erkennung von Fehlbanden ein zusätzlicher Arbeitsschritt unumgänglich. Bereits in der ursprünglichen Publikation (6) sowie in der offiziellen Methode (2) wird auf die Möglichkeit hingewiesen, die korrekten Amplikons durch Restriktionsanalyse zu bestätigen.

Die Restriktionsanalyse des 35S-PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym *XmnI* (siehe Abb. 2A) sowie diejenige des NOS-PCR-Amplikons mit dem Enzym *NsiI* (siehe Abb. 2B) erlauben in der Tat sehr wirkungsvoll die Erkennung von falsch positiven Befunden. Von März 1997 bis April 1998 wurden auf diese Weise in unseren Untersuchungslaboratorien 48 von 81 35S-PCR-Signale und 14 von 16 NOS-PCR-Signale als falsch positiv identifiziert (Total 62 von 97 oder 64%!). Mit der 35S-PCR wurden total 232, mit der NOS-PCR 82 Lebensmittelproben untersucht (siehe Tabelle 2).

Der Arbeitsaufwand für eine Restriktionsanalyse ist um einiges kleiner als für eine Southernhybridisierung (DNA-DNA-Hybridisierung mit einer markierten spezifischen Sequenz) und die Spezifität der Restriktionsanalyse ist u. E. mit der DNA-DNA-Hybridisierung vergleichbar. Neben spezifischer Restriktionsanalyse und spezifischer DNA-DNA-Hybridisierung bieten sich Bisbenzimid-PEG-Gelelektrophorese, welche eine Auftrennung bezüglich A+T-Gehalts ermöglicht (10), sowie SSCP-PCR (11, 12) zur Identifikation von Fehlbanden an.

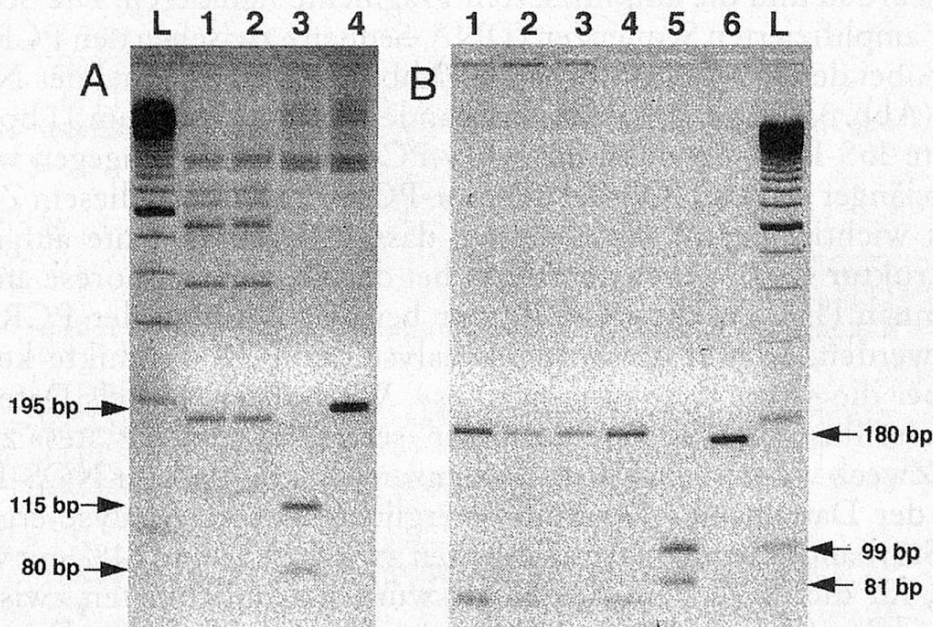


Abb. 2. A. Restriktionsanalyse von 35S-PCR-Amplikons mit *XmnI*
 1: Probe LMC400A; 2: LMC400B; 3: «Roundup Ready™»-Soja-DNA; 4: «Roundup Ready™»-Soja-DNA (unverdaut). L: 100 bp-Leiter.
 B. Restriktionsanalyse von NOS-PCR-Amplikons mit *NsiI*
 1: Probe LMC396; 2: LMC406; 3: LMC407; 4: LMC408; 5: «Roundup Ready™» Soja-DNA; 6: «Roundup Ready™» Soja-DNA (unverdaut). L = 100 bp Leiter.

DNA-Sequenzanalyse der Störbanden

Obwohl mit oben beschriebener Restriktionsanalyse die Anwesenheit von Störbanden aufgedeckt wurde und somit falsch positive Befunde vorliegen, interessierte uns, woher diese Störbanden stammen. Zu diesem Zweck wurde je eine 35S- und eine NOS-PCR-Störbande isoliert, gereinigt und einer DNA-Sequenzanalyse unterworfen. Diese beiden Sequenzanalysen zeigten eindeutig, dass sowohl

Tabelle 2. Untersuchungsstatistik von März 1997 bis April 1998

Befund	35S-PCR		NOS-PCR	
	Labor A	Labor B	Labor A	Labor B
Positiv	28	5	0	2
Falsch positiv*	10	38	5	9
Negativ	90	61	0	66
Total	128	104	5	77

* Falsch positive Befunde wurden bei Produkten mit folgenden Bezeichnungen gefunden: Soja (-bohnen, -mehl, -flocken, -griess, -schrot, -schalen, -klösse, -mahlzeit, -dessert, -drink, -teigwaren, Tofu, Yasoya, Säuglingsnahrung), Mais (-mehl, -dunst, -griess, Polenta).

bei der 35S- als auch bei der NOS-PCR-Störbande jeweils beide PCR-Primer eingebaut wurden und die amplifizierten Fragmente flankieren. Die Sequenzähnlichkeit der amplifizierten Sequenzen (DNA-Sequenz zwischen den PCR-Primern) betrug 39% bei der 35S-PCR-Störbande (Abb. 3A) und 31% bei der NOS-PCR-Störbande (Abb. 3B). Die 35S-PCR-Störbande war mit 184 bp um 11 bp kürzer als das korrekte 35S-PCR-Produkt, die NOS-PCR-Störbande hingegen war mit 188 bp um 8 bp länger als das NOS-Terminator-PCR-Produkt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, darauf hinzuweisen, dass DNA-Fragmente aufgrund ihrer Sekundärstruktur (z. B. gebeugte DNA) bei der Gelelektrophorese anormal migrieren können (13). Da die PCR-Primer bei der Synthese der PCR-Produkte eingebaut werden, erlaubt die Sequenzanalyse der PCR-Produkte keine Rückschlüsse über die «secondary priming sites». Wir hofften, mittels Datenbankvergleichen Aufschluss über die Sequenz dieser «secondary priming sites» zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Sequenzen der 35S- und der NOS-PCR-Störbande mit der Datenbank «GenEmbl» verglichen. Diese Analyse ergab für die 35S-PCR-Störbandensequenz Ähnlichkeiten zwischen 57 und 61% mit vier DNA-Sequenzen, für die NOS-PCR-Störbande wurden Ähnlichkeiten zwischen 59% und 64% mit ebenfalls vier DNA-Sequenzen gefunden. Nach dem Datenbankvergleich bleibt somit die Herkunft dieser Störbanden weiterhin ungeklärt. Dies kann teilweise dadurch erklärt werden, dass die DNA-Datenbanken vergleichsweise wenige pflanzliche Sequenzen enthalten, insbesondere von kommerziellen Nutzpflanzen.

Schlussfolgerung

Die Deklarationspflicht für zugelassene GVO-Lebensmittel (in der Schweiz zur Zeit «Roundup Ready™» Soja und «Maximizer» Mais) wird im Vollzug mit der offiziellen BAG-Screeningmethode überprüft. Sowohl die 35S- als auch die NOS-PCR können dabei falsch positive Resultate erzeugen, welche durch Störbanden

A**35S-2**GATAGTGGGATTGTGCGTCAT.....GGA

|||||

gaggaagggctcttgcaaggatagtgqgattgtgqgcatccttacgtc

TCTGGGTTTATGGGTATTGGTCGTGGAGTTTGGCTATGGTTTTGGTGCTC

||| ||| | ||| | | ||| |

agtggagatatcacatcaatccacttgcttgaagacgtgggtggaacgt

XmnI

TTTCTCTTCTCCCCTACCGCGCGTGAATTTGG..CCGGGGTTCGGTGCT

||||| ||| | | ||| | | ||| |

cttcttttccacgatgctcctcgtgggtgggggtccatcttgggacca

ATGATGTTTTGGTGGTGTGGTGTGTTGGAAATATGGGTTTCG..GTGATG

|| | | | | | | | | | | | | | | | |

ctgtcggcagaggcatcttcaacgatggcctttcctttatcgcaatgagc

35S-1GCATTTGTAGGAGC

|||||

gcatttqtaggagccaccttccttttccactatcttcacaataaagtgac**B**TTATCCTA

|||||

gatccccgatctagtaacatagatgacaccgcgcgataatttatccta

NOS-3GTTTGC GCGCTACAGAATTTAAATAAGTCTCAATTATTAGAATGTTCAAT

||||| ||| | | ||| | | |

gtttgcgcgctatattttgttttctatcgcgattaaatgtataattgcg

TAATTTAAGAAATTGAATGCTGGCAGAATTCACATGTGCACTGTGCACAC

| | | | | | | | | | | | | | | |

ggactctaatacataaaaaccatctcataaataacgt.....catgc*NsiI*

ACAACAGCACAAAATGAGGAATATTCATGCCAATGTATAAAAAGTAGCAT

| ||| | | | | | | | | | | | |

attacatgttaattattacatgcttaacgtaattcaacagaaattatg**NOS-1**TTCAGGACATCAAGACCGCAACAGGATTC

| | | | | | | | | | | | | | | |

ataatcatcgcaagaccgcaacaggattcaatcttaagaaactttattg

Abb. 3. DNA-Sequenzvergleiche der Störbandensequenzen mit den entsprechenden Zielsequenzen

A = 35S-PCR Produkt der Probe LMC400 (oben) und 35S-Promotor der «Roundup Ready™» Soja (unten)

B = NOS-PCR Produkt der Probe LMC396 (oben) und NOS-Terminator der «Roundup Ready™» Soja (unten)

ähnlicher Grösse hervorgerufen werden. Diese Störbanden können durch eine selektive Restriktionsanalyse eindeutig identifiziert werden, so dass wir vorschlagen, alle nach der offiziellen Methode gefundenen positiven 35S- und NOS-PCR-Amplikons mit einer solchen Restriktionsanalyse zu bestätigen.

Dank

Wir möchten uns bei den Mitgliedern der Subkommission 29a des Schweizerischen Lebensmittelbuches für Hinweise auf in ihren Laboratorien aufgetretene Probleme im Zusammenhang mit der Anwendung der offiziellen Methode bedanken.

Zusammenfassung

Das Auftreten von Störbanden bei der 35S- und der NOS-PCR kann zu falsch positiven Befunden bei der Überprüfung der Deklarationspflicht für GVO enthaltende Lebensmittel führen. Störbanden, die in unserem Labor bei Routineuntersuchungen aufgefallen waren, wurden durch eine selektive Restriktionsanalyse mit geringem Arbeitsaufwand sicher identifiziert. Die DNA-Sequenzanalyse von zwei solcher Störbanden ergab geringe Ähnlichkeiten mit den Zielsequenzen (35S-Promotor bzw. NOS-Terminator), die Herkunft der Störbanden konnte jedoch durch Datenbankvergleiche nicht abgeklärt werden.

Résumé

Lors de l'analyse de routine avec PCR 35S et NOS dans le cadre du contrôle de la déclaration «OGM» de denrées alimentaires, nous avons observé dans nos laboratoires la présence de bandes artificielles. Par analyse de restriction sélective, les bandes artificielles pouvaient être identifiées avec certitude. L'analyse de la séquence d'ADN de deux bandes artificielles sélectionnées a révélé de faibles similarités par rapport aux séquences-cible correspondantes (promoteur 35S et terminateur NOS). L'origine des bandes artificielles ne pouvait même pas être révélée par comparaison entre des banques de données.

Summary

During routine analysis in our laboratory we observed the appearance of artefacts using the 35S- and the NOS-PCR for the survey of GMO labelling of food. Clearly, restriction analysis of the artefact bands was found to unambiguously identify false positives. DNA sequence analysis of two such artefact bands revealed low similarities with the corresponding target sequences (35S-promoter and NOS-terminator, respectively). However, data bank searches could not indicate the origin of these artefact bands.

Literatur

1. *anonym*: Verfügung des Bundesamtes für Gesundheit betreffend des Gesuchs der Monsanto (Suisse) AG. Schweizerisches Handelsamtsblatt **251**, 8069 (1997).

2. Qualitativer Nachweis des 35S-Promoters und des NOS-Terminators zur Identifizierung von gentechnisch veränderten Pflanzen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR); 10. Januar 1997; vom BAG verteilt.
3. Meyer, R. and Jaccaud, E.: Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-tolerant soybeans. Authenticity and Adulteration of Food – the Analytical Approach. Proceedings of Euro Food Chem IX, FECS event No. 220 (eds. Amadò, R. and Battaglia, R.), 1, 23–28. Druckerei Sailer, Winterthur 1997.
4. Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J. und Hübner, P.: Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne «Roundup Ready». Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **88**, 164–175 (1997).
5. Lüthy, J., Brodmann, P., Bühler, H.P., Deru, J.-Y., Eugster, A., Gafner, J.L., Hemmer, W., Hübner, P. et al.: Kapitel 52B: Molekularbiologische Methoden. Schweizerisches Lebensmittelbuch (ed. Bundesamt für Gesundheit). Eidg. Druck- und Materialzentrale, Bern 1998.
6. Pietsch, K., Waiblinger, U., Brodmann, P. und Wurz, A.: Screeningverfahren zur Identifizierung «gentechnisch veränderter» pflanzlicher Lebensmittel. Dtsch. Lebensm.-Rundsch. **93**, 35–38 (1997).
7. Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York 1989.
8. Brodmann, P., Eugster, A., Hübner, P., Meyer, R., Pauli, U., Vögeli, U. und Lüthy, J.: Nachweis gentechnisch veränderter «Roundup ReadyTM» Sojabohnen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Methodenvorprüfung im Rahmen der Subkommission 29a des Schweizerischen Lebensmittelbuches. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **88**, 722–731 (1997).
9. Hemmer, W.: Foods derived from genetically modified organisms and detection methods, 1–61. Agency BATS, Basel 1997.
10. Müller, M., Kruse, L., Tabrett, A.M. and Barbara, D.J.: Detection of a single base exchange in PCR-amplified DNA fragments using agarose gel electrophoresis containing bisbenzimidazole-PEG. Nucleic Acids Res. **25**, 5125–6 (1997).
11. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics **5**, 874–9 (1989).
12. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gelelectrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 2766–70 (1989).
13. Hagermann, P.J.: Sequence-directed curvature of DNA. Annu. Rev. Biochem. **59**, 755–781 (1990).

Albert Eugster
Kantonales Laboratorium Aargau
Kunsthauseweg 24
CH-5000 Aarau

Markus Stadler
Dr. Philipp Hübner
Labor für Lebensmittelchemie
Universität Bern
Departement für Chemie und Biochemie
Freiestrasse 3
CH-3012 Bern