

VEREIN
DEUTSCHER
INGENIEURE

Monitoring der Wirkungen gentechnisch
veränderter Organismen (GVO)
Immunochemischer Nachweis von insektiziden
Bt-Proteinen gentechnisch veränderter Kulturpflanzen aus
Bodenproben und Pflanzenmaterial aus Ernterückständen

Monitoring the effects of
genetically modified organisms (GMO)
Immunochemical detection of insecticidal Bt proteins from
genetically modified crops in soil samples and plant residues

VDI 4330
Blatt 11 / Part 11

Ausg. deutsch/englisch
Issue German/English

Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.

The German version of this standard shall be taken as authoritative. No guarantee can be given with respect to the English translation

Inhalt	Seite	Contents	Page
Vorbemerkung	2	Preliminary note.....	2
Einleitung.....	2	Introduction.....	2
1 Anwendungsbereich	3	1 Scope	3
2 Normative Verweise	3	2 Normative references	3
3 Begriffe	3	3 Terms and definitions	3
4 Abkürzungen	5	4 Abbreviations	5
5 Sicherheit	5	5 Safety	5
6 Materialliste	5	6 List of materials	5
6.1 Geräte und Ausrüstungen.....	5	6.1 Apparatus and equipment.....	5
6.2 Reagenzien.....	6	6.2 Reagents.....	6
7 Durchführung	6	7 Performance	6
7.1 Probenahmen von landwirtschaftlich genutzten Flächen (Bodenproben, Ernterückstände).....	6	7.1 Sampling arable land (soil samples, harvest residues).....	6
7.2 Probentransport, -aufarbeitung und -lagerung.....	7	7.2 Transporting, preparing and storing samples.....	7
7.3 Extraktion der Bt-Proteine aus Bodenproben und Pflanzenmaterial.....	7	7.3 Extraction of Bt proteins from soil samples and plant material.....	7
7.4 Nachweis von Bt-Proteinen mittels immunochemischer Verfahren.....	8	7.4 Detection of Bt proteins using immunochemical methods.....	8
7.5 Datenerfassung und -analyse.....	9	7.5 Data collection and analysis.....	9
8 Abschließende Bemerkungen	10	8 Closing remarks	10
Schrifttum.....	11	Bibliography.....	11

VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (TLS)
Fachbereich Biodiversität, GVO-Monitoring und Risikomanagement

VDI-Handbuch GVO-Monitoring
VDI-Handbuch Biotechnologie

Vorbemerkung

Der Inhalt dieser Richtlinie ist entstanden unter Beachtung der Vorgaben und Empfehlungen der Richtlinie VDI 1000.

Alle Rechte, insbesondere die des Nachdrucks, der Fotokopie, der elektronischen Verwendung und der Übersetzung, jeweils auszugsweise oder vollständig, sind vorbehalten.

Die Nutzung dieser Richtlinie ist unter Wahrung des Urheberrechts und unter Beachtung der Lizenzbedingungen (www.vdi.de/richtlinien), die in den VDI-Merkblättern geregelt sind, möglich.

Allen, die ehrenamtlich an der Erarbeitung dieser Richtlinie mitgewirkt haben, sei gedankt.

Eine Liste der aktuell verfügbaren Blätter dieser Richtlinienreihe ist im Internet abrufbar unter www.vdi.de/4330.

Einleitung

Mit der europäischen Richtlinie über die absichtliche Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in die Umwelt (2001/18/EG) und der Entscheidung des Rates vom 03. Oktober 2002 über Leitlinien zur Ergänzung des Anhangs VII dieser Richtlinie wird ein Monitoring zur Überwachung von Anbau und Verbreitung von GVO zwingend vorgeschrieben. Eine Vergleichbarkeit der Erhebungen kann jedoch nur dann gewährleistet werden, wenn hierbei validierte und standardisierte Prüfverfahren Einsatz finden. Im Rahmen der Richtlinien VDI 4330 ff. werden daher methodenspezifische Richtlinienblätter für einen Einsatz im GVO-Monitoring veröffentlicht.

Bt-Proteine im Sinne dieser Richtlinie sind insektizide Proteine aus *Bacillus thuringiensis* (Bt), z. B. Cry-Proteine und deren Derivate, die in gentechnisch veränderten Pflanzen (sogenannte Bt-Pflanzen) exprimiert werden.

In der Literatur sind eine Reihe von Extraktionsmethoden und immunochemische Verfahren für den Nachweis von Bt-Proteinen in Böden und Pflanzenresten beschrieben [1 bis 7].

Bei Böden unterscheiden sich die Methoden vor allem in den verwendeten Puffersystemen und in den Nachweisgrenzen. Head et al. entwickelten einen „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) – mit einer Nachweisgrenze von $3,7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ Boden – mit dem Cry1Ac-Proteine aus transgener Baumwolle in Bodenproben nachgewiesen werden konnten [1]. Mit sensitiveren, bereits beschriebenen Nachweisverfahren (Nachweisgrenze $0,2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ bis $0,4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ Untersuchungsmaterial) konnten Cry1Ab-

Preliminary note

The content of this standard has been developed in strict accordance with the requirements and recommendations of the standard VDI 1000.

All rights are reserved, including those of reprinting, reproduction (photocopying, micro copying), storage in data processing systems and translation, either of the full text or of extracts.

The use of this standard without infringement of copyright is permitted subject to the licensing conditions (www.vdi.de/richtlinien) specified in the VDI Notices.

We wish to express our gratitude to all honorary contributors to this standard.

A catalogue of all available parts of this series of standards can be accessed on the Internet at www.vdi.de/4330.

Introduction

The EU Directive on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms (2001/18/EC) and the Council decision of 2002-10-03 establishing guidance notes supplementing Annex VII of this directive prescribe compulsory monitoring of the cultivation and spread of GMOs. However, comparability of the data collected can be achieved only if validated and standardised test procedures are used. The Association of German Engineers (VDI) is therefore publishing a set of standards describing specific methods for GMO monitoring as part of the standards VDI 4330 et seq.

In the context of this standard, Bt proteins are insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Bt), such as Cry proteins and their derivatives, which are expressed in genetically modified plants (known as “Bt plants”).

The literature describes a range of extraction methods and immunochemical procedures for detecting Bt proteins in soil and in plant residues [1 to 7].

The methods for soil differ mainly in terms of the buffer systems used and the detection limits. Head et al. developed an enzyme-linked immunosorbent assay, or ELISA (detection limit $3,7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ soil), which could detect Cry1Ac proteins from transgenic cotton in soil samples [1]. More sensitive detection methods already described (detection limit $0,2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ to $0,4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ research material) were able to detect Cry1Ab proteins from soil and plant residues of transgenic maize [4; 5].

Proteine aus Boden und aus Pflanzenresten von transgenem Mais nachgewiesen werden [4; 5].

Verschiedene Verfahren für den Nachweis von Bt-Proteinen in Pflanzenmaterial unterscheiden sich hauptsächlich in der Zerkleinerung des Probenmaterials. Neben klassischen Mörser- und Pistill-Verfahren [5] werden verschiedene Geräte (z.B. Kugelmühle, Mikrohomogenisator) verwendet, um einen vollständigen Aufschluss des Materials zu erhalten, z.B. [6; 7].

1 Anwendungsbereich

Die Richtlinie beschreibt das grundsätzliche Vorgehen bei und die nötigen Anforderungen an Methoden zur Extraktion und zur qualitativen und quantitativen Bestimmung mit immunchemischen Verfahren zum Nachweis von Bt-Proteinen aus Resten gentechnisch veränderter Pflanzen, wie sie nach Feldernten aufgefunden werden, und Bodenproben, die mit solchen Pflanzen in Kontakt gekommen sind. Die Spezifität der Verfahren für die Bt-Proteine richtet sich nach der Spezifität der verwendeten immunchemischen Agenzien (Antikörper). Immunreaktive Abbauprodukte werden unter Umständen miterfasst, was eine direkte Feststellung der biologischen, z.B. insektiziden Aktivität solcher Proteine nicht erlaubt. Abhängig von der Spezifität des jeweiligen immunchemischen Nachweises können *a priori* Kreuzreaktionen mit natürlichen Bt-Proteinen, wie sie von in Böden vorkommenden *Bacillus-thuringiensis*-Stämmen gebildet werden könnten, nicht ausgeschlossen werden.

Notwendige Grundlagen zum Verständnis dieser Richtlinie sind in der Richtlinie VDI 4330 Blatt 1 dargelegt.

2 Normative Verweise

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieser Richtlinie erforderlich:

DIN ISO 10381-1:2003-08 Bodenbeschaffenheit; Probenahme; Teil 1: Anleitung zur Aufstellung von Probenahmeprogrammen (ISO 10381-1:2002)

VDI 4330 Blatt 1:2006-10 Beobachtungen ökologischer Wirkungen gentechnisch veränderter Organismen; Gentechnisch veränderte Pflanzen; Grundlagen und Strategien

The various methods used to detect Bt proteins in plant material differ mainly in terms of how the sample material is macerated. In addition to the traditional pestle and mortar methods [5], various devices are used (e.g. ball mill, micro-homogeniser) to ensure complete maceration of the material, e.g. [6; 7].

1 Scope

This standard describes the basic procedure and the requirements of methods based on immunochemical detection for the extraction and qualitative and quantitative determination of Bt proteins from genetically modified plant residues found on the field after harvesting, and soil samples which have come into contact with these plants. The specificity of the methods for the Bt proteins depends on the specificity of the immunochemical agents (antibodies) used. In some circumstances, immunoreactive degradation products may also be detected, which prevents the immediate detection of the biological, e.g. insecticidal activity of these proteins. Depending on the specificity of the immunochemical detection concerned, *a priori* cross reactions with naturally occurring Bt proteins, such as those produced by *Bacillus thuringiensis* strains present in soil, cannot be ruled out.

The standard VDI 4330 Part 1 presents the necessary fundamentals for the understanding of this standard.

2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this standard:

DIN ISO 10381-1:2003-08 Soil quality; Sampling; Part 1: Guidance on the design of sampling programmes (ISO 10381-1:2002)

VDI 4330 Blatt 1:2006-10 Monitoring the ecological effects of genetically modified organisms; Genetically modified plants; Basic principles and strategies