

Détection, identification et quantification des transgènes dans les aliments par amplification génique

Gilbert Berben, Éric Janssen, Frédéric Debode

Département Qualité des Productions agricoles. Centre de Recherches agronomiques de Gembloux. Chaussée de Namur, 24. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : berben@cragx.fgov.be

Reçu le 13 octobre 2000, accepté le 30 octobre 2000.

Après un bref rappel de ce qui caractérise une plante transgénique, est expliqué l'intérêt d'utiliser l'ADN comme moyen de détection de ce caractère transgénique lorsqu'il s'agit de denrées alimentaires. Les techniques actuelles de détection et d'identification des transgènes dans les aliments sont exposées tout en soulignant leurs limites par rapport aux constructions inconnues. Les techniques de détection quantitatives et les difficultés inhérentes à celles-ci sont également abordées.

Mots-clés. Organisme génétiquement modifié, OGM, transgène, aliment, étiquetage, seuil de tolérance, détection qualitative, détection quantitative, PCR.

Detection, identification and quantification of transgenes in foodstuffs by genetic amplification. After a brief outline of what defines a transgenic plant, the interest is stated of using DNA for the detection of the transgenic nature of foodstuffs. The current detection and identification techniques of transgenes in food are reviewed by stressing the limitations of the techniques if unknown constructions are used. Quantitative detection techniques are also presented with the difficulties linked to it.

Keywords. Genetically modified organism, GMO, transgene, food, feed, labelling, threshold level, qualitative detection, quantitative detection, PCR.

1. INTRODUCTION

L'autorisation de commercialisation du soja et du maïs génétiquement modifiés dans toute l'Union européenne a suscité une certaine méfiance chez le consommateur. C'est la raison pour laquelle, dans un souci de transparence, les instances européennes ont décidé de rendre obligatoire l'étiquetage de tout produit contenant des organismes génétiquement modifiés (OGM) ou fabriqué à partir de tels organismes. Toutefois, cet étiquetage n'est nécessaire que dans la mesure où le produit en question diffère substantiellement de son homologue traditionnel. Il a de plus été spécifié que la seule présence d'ADN ou de protéines transgéniques dans le produit suffit à requérir un étiquetage approprié signalant cette origine transgénique.

Évidemment, décréter de telles dispositions ne suffit pas à les rendre effectives, il faut pour cela que l'on soit en mesure d'en vérifier l'application correcte par des méthodes analytiques. Nous passerons en revue ici les techniques actuellement utilisées.

Il faut, bien sûr, d'abord pouvoir déceler ou détecter les OGM dans les aliments. En outre, il faut pouvoir les identifier pour s'assurer qu'ils relèvent de lignées

autorisées. Enfin, nous montrerons qu'il faut pouvoir quantifier cette présence, car la sensibilité des techniques de détection est parfois telle que des contaminations tout à fait mineures ne justifiant pas un étiquetage arrivent à être décelées. Depuis peu, un règlement européen a pris en compte cet aspect et prévoit, pour les cas de contamination, un seuil de tolérance de 1 % par ingrédient.

2. LE MATÉRIEL : LA PLANTE TRANSGÉNIQUE ET SES PRODUITS DÉRIVÉS

Avant de détailler les méthodes analytiques de détection, d'identification et de quantification d'OGM ou de leurs dérivés dans les aliments, il est utile de rappeler brièvement qu'une plante transgénique ne diffère de ses congénères classiques que par l'intégration dans son génome d'un morceau d'ADN généralement étranger (l'ADN transgénique) qui lui confère une nouvelle propriété jugée intéressante. C'est justement la possibilité qu'offrent les techniques du génie génétique de réaliser des modifications limitées du matériel génétique d'une variété végétale donnée en faisant appel, si

nécessaire, à de l'ADN totalement étranger à cette espèce, qui constitue une véritable révolution dans la façon de concevoir l'amélioration des plantes mais qui suscite parallèlement, surtout auprès du grand public, une certaine appréhension. Il ne faut cependant pas perdre de vue que la diffusion de toute plante modifiée de cette manière ne peut être autorisée qu'après des examens et des études de risques approfondis, qui s'effectuent au cas par cas.

Signalons au passage qu'en Europe par contre, échappent tant à la procédure d'examen de risques, qu'à l'obligation d'étiquetage, les modifications génétiques obtenues par des techniques ne relevant pas du génie génétique, telle la mutagenèse classique qui a notamment permis d'aboutir à des lignées de maïs tolérantes aux imidazolinones.

Dans les plantes dont la commercialisation est actuellement autorisée, les modifications génétiques ne portent que sur des caractéristiques ayant un intérêt agronomique (ex : la tolérance à un herbicide comme le glyphosate ou le glufosinate ammonium). Aussi, le consommateur ne perçoit-il aucun avantage des produits issus de telles plantes. Dès lors, la mention d'une origine transgénique, suite au climat actuel de débat passionnel et irrationnel, risque fort d'être perçue de façon négative. Il pourrait en aller tout autrement à l'avenir lorsque certains produits dotés de caractéristiques nouvelles et prisées par le consommateur, ne pourront s'obtenir qu'au moyen de plantes transgéniques. Il se pourrait alors que l'étiquetage de l'origine génétique précise constitue un gage d'authenticité qui pourrait être recherché.

3. LES MÉTHODES ANALYTIQUES

3.1. Détection et identification

Aujourd'hui, la nature transgénique d'un aliment ou de l'un de ses ingrédients, à base par exemple de soja ou de maïs, ne peut être déterminée qu'en étudiant soit les protéines exprimées par les transgènes, soit les transgènes eux-mêmes. Dans ce dernier cas, il s'agit, de façon plus générale, de dépister un segment de la construction transgénique intégrée dans le génome.

Il est évident que de ces deux voies, la seconde est la plus universelle. Les protéines sont en effet fort sujettes à une dénaturation ou à une dégradation dès que l'aliment subit un processus de transformation technologique comme la cuisson. L'ADN, au contraire, est une molécule assez robuste, même si par des ruptures de sa chaîne, elle finit par se dégrader également. De sorte qu'il apparaît qu'en ne cherchant que des segments d'assez petite taille (~ 200 paires de bases et moins) il reste possible de déceler des segments de transgène dans une matière alimentaire

ayant subi des traitements technologiques assez drastiques. C'est la raison pour laquelle, dans nos recherches, nous nous focalisons essentiellement sur le dépistage de segments d'ADN transgéniques (Berben *et al.*, 1999). Notre laboratoire a néanmoins participé aux deux tests circulaires de validation de trousse de détection immuno-enzymatique mises au point par la firme Strategic Diagnostics Inc. (Newark, DE, U.S.A.). Le premier test de validation date de l'automne 1998 et portait sur le soja Roundup Ready (JRC-Ispira, 1999) et le second, de l'été 2000, portait sur le maïs MON810. Par un test ELISA (Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay), ces trousse permettent la mise en évidence de la version recombinante de la protéine EPSPS (5-énol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase) conférant la tolérance au glyphosate dans le soja Roundup Ready ou la toxine Bt Cry1Ab du maïs MON810. La trousse éprouvée lors du second test circulaire sur maïs MON810 permet d'obtenir assez aisément une détection quantitative. Toutefois, ces tests sont jusqu'à présent limités à des matières non transformées. Avec des anticorps adéquats, il devrait être possible de reconnaître également des protéines dénaturées (Morgan, 2000). Évidemment, les techniques immunologiques se heurtent au fait que la protéine recherchée peut être absente (ou présente à faible teneur) dans le tissu végétal analysé et certaines plantes transgéniques n'expriment aucune protéine recombinante (ex. la tomate Flavr Savr). De toute manière, il ne peut jamais s'agir que de détection et pas d'identification de la lignée végétale transgénique. Lorsqu'il s'agit de détecter et d'identifier des transgènes dans les aliments, il s'impose de recourir à l'amplification génique par PCR (Joudrier *et al.*, 1998). Cela implique qu'il faut d'abord extraire l'ADN encore contenu dans les aliments et ensuite effectuer la réaction d'amplification génique sur une fraction de cet extrait. Enfin, le produit de la PCR est à son tour analysé par électrophorèse en gel d'agarose. La PCR consiste à multiplier, par voie enzymatique, le fragment d'ADN recherché. La détection est possible grâce à l'effet multiplicateur de la réaction (synthèse de plusieurs millions de copies du segment) qui met en évidence le morceau d'ADN recherché, pour autant qu'il soit présent dans l'extrait. Il s'agit d'une technique certes puissante mais sujette à l'inhibition par certains composés, en particulier des polysaccharides et des polyphénols, ayant pu passer de l'aliment à l'extrait et elle est fort sensible à la contamination par des produits d'amplifications antérieures. Ce dernier problème peut être évité moyennant certaines précautions lors des analyses (Orrego, 1990 ; CEN, 2000). Quant à l'inhibition, elle est en partie dépendante du processus d'extraction auquel la matrice alimentaire a été soumise, de même qu'aux différents procédés de purification que l'extrait a subis.

Pour l'extraction, la littérature récente renseigne plusieurs protocoles utilisant notamment des détergents de nature variée lors de l'étape de lyse : par ex. SDS - dodécylsulfate de sodium (Meyer, 1995) ; bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (Pietsch *et al.*, 1997). En outre, des étapes de purification plus ou moins poussées peuvent être prévues qui vont de l'extraction classique au phénol-chloroforme à l'emploi de résines commerciales: ex. Wizard de Promega (Köppel *et al.*, 1997). Une comparaison de différentes techniques est notamment faite par Zimmermann *et al.* (1998).

Nous obtenons généralement de très bons résultats au moyen d'extraits résultant d'une lyse thermique en présence de SDS 1 % suivie d'extractions au phénol-chloroforme et d'une précipitation des acides nucléiques à l'éthanol. Pour des échantillons plus récalcitrants à la PCR, un passage de l'extrait sur la résine du kit "High Pure PCR template preparation" de Roche Diagnostics s'avère souvent efficace.

Pour apprécier l'effet d'inhibition, on soumet l'extrait à une PCR au moyen d'amorces universelles pour plantes. En cas d'insuccès, il y a lieu d'améliorer la pureté de l'extrait. Signalons cependant que plusieurs dilutions de l'extrait (1, 1/10, 1/100) sont testées simultanément en PCR, car il est fréquent qu'une dilution suffise à lever l'inhibition.

En fait, les protocoles d'extraction de l'ADN sont à mettre au point par catégorie de produits (ex. huile et lécithine) et il est d'ores et déjà évident que pour certains d'entre eux on ne parviendra plus à mettre en évidence de l'ADN, c'est notamment le cas de l'huile de soja fort raffinée (Pauli *et al.*, 1998).

Le résultat de la PCR est conditionné par la nature des séquences des oligonucléotides mis en jeu comme amorces puisque ces dernières définissent le fragment qui sera amplifié. Ce choix des amorces déterminera si l'analyse effectuée relève de la détection ou de l'identification. Lorsque les amorces se cantonnent au sein d'éléments fréquemment employés dans une construction transgénique, par ex. le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, on procède à une détection de criblage car la cible visée n'est pas typique d'une construction (Pietsch *et al.*, 1997). Il faut toujours être prudent avec de telles cibles car elles ne révèlent pas forcément une origine transgénique. L'analyse s'affine davantage lorsque les amorces se situent dans des éléments distincts mais voisins au sein d'une construction, par ex. dans le promoteur et la région codante du gène d'intérêt, étant donné qu'il s'agit alors d'une cible caractérisant la construction. Quant à l'identification de la lignée végétale transgénique, elle est possible en ciblant un segment d'ADN propre à l'événement de transformation. Il faut pour cela une cible à cheval sur une des deux bordures de la construction (ex. Windels *et al.*, 1999 ; Zimmermann *et al.*, 2000).

3.2. Limites des techniques de détection

Notons encore que, si pour le soja Roundup Ready en farine, on situe en général la limite de détection à des teneurs de l'ordre de 0,01 à 0,02 % exprimées en termes de poids de matériel d'origine transgénique par rapport au poids total (ex. Van Hoef *et al.*, 1998), il est beaucoup plus difficile de se prononcer sur la limite de détection dans des matières transformées (ex. la lécithine de soja) si cette limite doit s'exprimer en termes d'une teneur transgénique retraçant en fait celle des matières premières à l'origine de la matière transformée à analyser.

Fréquemment on nous demande s'il est possible de certifier l'absence d'OGM dans une denrée alimentaire sur base des seuls tests analytiques. La réponse à cette question est non, car strictement parlant les méthodes analytiques de détection ne parviennent à retrouver que ce qui est déjà connu. En effet, il découle du principe de la technique PCR qu'un préalable essentiel à sa réalisation est la connaissance des amorces à mettre en œuvre. L'idéal à cet égard est de disposer d'informations au sujet des séquences de la construction transgénique ou, à défaut, de certains détails au moins quant au type de gène ou d'élément régulateur introduit.

Cette limitation réduit forcément la portée des techniques analytiques. Cependant, même sans informations précises, on peut toujours vérifier les résultats que livre toute une batterie de paires d'amorces se rapportant chacune à des éléments dont on sait qu'ils sont susceptibles de faire partie de la construction transgénique. De plus, pour ce genre d'opération de criblage, le groupe de M. De Loose du C.L.O. (Département Plantengenetica en -veredeling, Melle) a mis au point une technique dérivée de la PCR où seule une des deux amorces doit se situer dans un élément préalablement connu (Theuns *et al.*, 1999). Cette diminution des contraintes élargit quelque peu les possibilités de criblage mais il n'en demeure pas moins qu'à ce jour, il n'existe aucune méthode vraiment universelle pour détecter n'importe quel OGM.

Ceci ne signifie pas que les méthodes analytiques de détection et d'identification des OGM n'ont aucun intérêt. Elles constituent des moyens de vérification utiles car ce sont les OGM connus et autorisés qui sont les plus susceptibles d'être présents dans les aliments et qui doivent faire l'objet d'un étiquetage.

3.3. Le problème de la quantification

Avec l'essor des OGM, la possibilité est grande que la plupart des productions agricoles fournissent, dans un futur proche, un résultat positif aux tests de détection de modifications génétiques. En effet, même si on devait avoir recours à des filières de production séparées (transgénique et non-transgénique), il deviendrait

difficile d'obtenir des productions totalement exemptes d'OGM. Des contaminations, ne fût-ce qu'à l'état de traces, ne peuvent être exclues, soit à la récolte (ex. contaminations de la moissonneuse), soit lors des opérations de transport et de stockage, à moins de mettre en place des filières non-transgéniques totalement cloisonnées dont le coût risquerait d'être prohibitif. C'est dans cette perspective que le règlement européen 2000/49 a fixé à 1 % le seuil de tolérance en cas de contamination d'un ingrédient destiné à l'alimentation humaine. En d'autres termes, c'est la limite en dessous de laquelle, même si de l'ADN ou des protéines résultant de modifications obtenues par génie génétique devaient encore être décelées, il n'y aurait pas lieu de renseigner cette présence sur l'étiquette pour autant que cela résulte d'une contamination involontaire.

Il est donc impératif de disposer de méthodes capables de chiffrer, en routine, la teneur en ADN transgénique dans une matrice alimentaire pour savoir si l'on se trouve en dessous ou au-dessus du seuil. Certains ont déjà mis au point des méthodes de quantification de transgènes au moyen de la PCR compétitive (Stüder *et al.*, 1998 ; Hübner *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2000) mais cette technique est laborieuse et se prête mal à une application en routine (**Figure 1**). En revanche, la PCR en temps réel qui consiste à suivre le déroulement de la réaction d'amplification par une série d'artifices rendant la production du produit de la PCR proportionnelle à une émission de fluorescence (Higuchi *et al.*, 1992) offre une alternative plus crédible. En comparant alors, d'une part, la courbe reflétant la quantité de produit amplifié (c-à-d. de fluorescence émise) en fonction du nombre de cycles par rapport à celles obtenues, d'autre part, avec du matériel de référence à teneurs certifiées en OGM, il est possible de retrouver la teneur dans l'échantillon inconnu. Des essais de ce type ont déjà été menés sur la détection quantitative de transgènes (Vaïtilingom *et al.*, 1999; Pietsch, Waiblinger, 2000). Un premier test circulaire vient même d'avoir été clôturé récemment avec pour résultat un coefficient de variation de l'ordre de 25 % même pour des teneurs de 0,1 % (Lauter, 2000). Néanmoins, ce test est réalisé dans des conditions idéales sur des farines de soja (constituant monospécifique) comparables aux standards utilisés. Il ressort clairement des "Proficiency tests" menés par l'Institute of Food Research de Norwich (Howell, 2000) qu'avant de transposer la technique en routine il faut encore pas mal de mises au point (**Tableau 1**). Évidemment, dans ces derniers tests, il s'agit de mélanges d'ingrédients et l'approche quantitative y est donc beaucoup plus délicate mais pas pour autant impossible. Il n'empêche que vouloir exprimer la teneur en transgènes en termes d'un pourcentage en poids qui doit retracer la part de dérivé d'OGM dans un ingrédient est une façon d'opérer qui montrera rapidement ses limites. En effet, dès que

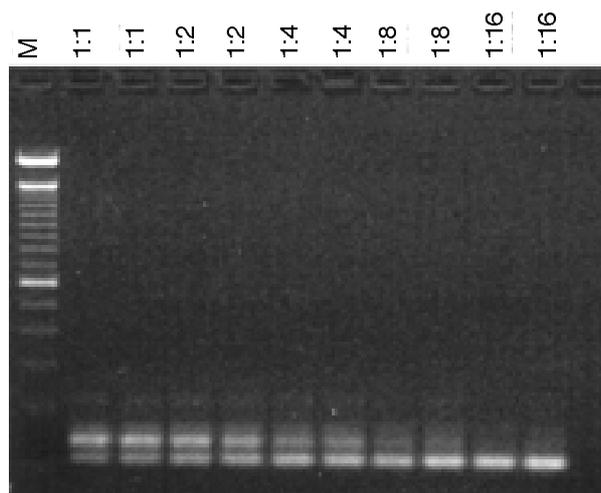


Figure 1. Quantification par PCR compétitive : deux cibles sont amplifiées, la cible transgénique recherchée (ici, la plus petite bande dans chaque piste) et le compétiteur qui sert en tant que standard interne. Ce dernier est amplifié avec les mêmes amorces que la cible transgénique mais fournit un produit de taille légèrement différente (ici, un peu plus grand). Par ailleurs, à un volume déterminé d'un extrait dont la teneur en transgènes est à quantifier, on ajoute avant PCR, des quantités variables mais connues de compétiteur (ici en dilution de deux en deux avec une répétition pour chaque dilution). Le principe de la quantification est de trouver le point d'équivalence (ici, environ la dilution 1/2) c.-à-d. la quantité de compétiteur qui a été nécessaire dans le mélange réactionnel pour obtenir une intensité identique des bandes (cible et compétiteur) après PCR, car dans ce cas on admet que les quantités de cibles et de compétiteurs étaient les mêmes avant PCR. (M = marqueur de poids moléculaire, échelle de 100 paires de bases, les bandes de 600 pb et 1500 pb sont plus intenses) — *Quantification by competitive PCR: two targets are amplified, the searched transgenic target (here the lower band in each lane) and a competitor as internal standard. This last one is amplified with the same primers as the transgenic target but yields a product with a slightly different size (here somewhat larger). To a same volume of extract in which the level of transgenic elements is to be quantified, the competitor is added in variable but known amount before PCR (here in twofold dilutions with one repetition for each dilution). Quantification by competitive PCR is done by looking for the equivalence point (here approximately at the 1/2 dilution) i.e. the quantity of competitor that was required to obtain the same band intensity for the competitor and the transgenic target after PCR. Indeed, at the equivalence point it is considered that the same amount of competitor and transgenic target were present before PCR. (M =Molecular weight marker, 100 base pairs ladder, the bands of 600 and 1500 bp are more intense).*

l'on aura recours à des hybrides d'OGM en Europe, il ne sera plus possible de discerner cet hybride d'un mélange de ses parents dans un aliment. Cela a notamment pour conséquence que si un ingrédient comprend accidentellement 0,75 % de cet hybride il ne doit pas

Tableau 1. Aperçu synthétique des résultats des cinq premiers tours du “Proficiency test” de l’IFR pour la détection quantitative du soja Roundup Ready reprenant les données rentrées par le Département Qualité des productions agricoles à chaque test — *Overview of the results of the first five rounds of the “Proficiency test” of the IFR about quantitative detection of Roundup Ready soybean with the results given for each round by the “Département Qualité des productions agricoles”.*

Tour	Date du rapport	Nbre de participants	Nbre de résultats rentrés ¹	% de soja et nature de l'échantillon	% attendu d'OGM dans le soja	Résultat du % en OGM pour l'ingrédient soja rentré par le département ²	Nbre de résultats acceptables selon l'IFR
1	Déc. 99	32	25 (19)	2 % dans farine de froment	2,21 %	Détection qualitative positive	11/19
2	Janv. 00	34	31 (19)	2 % dans farine de froment	0,48 %	0,1 à 1 %	17/19
3	Févr. 00	40	34 (21)	2 % dans farine de froment	0,22 %	< 0.1 %	8/21
4	Avr. 00	41	36 (27)	2 % dans farine de froment	1,48 %	<u>1,65 %</u>	23/27
5	Juin 00	42	33 (28)	2 % dans biscuit	1,65 %	<u>2,47 %</u>	16/28

¹ Nombre de participants ayant rentré des résultats suivi, entre parenthèses, par le nombre de résultats strictement quantitatifs (c.-à-d. excluant aussi les données semi-quantitatives telles des gammes de teneurs).

² Seuls les résultats soulignés dans cette colonne sont strictement quantitatifs et obtenus par PCR en temps réel, les autres sont soit semi-quantitatifs, soit qualitatifs. De plus les résultats soulignés se situent dans les limites considérées comme acceptables par l’IFR.

faire l’objet d’un étiquetage, alors que s’il s’agit d’une contamination par ses deux parents, chacun à concurrence de 0,75 %, il faudra étiqueter la denrée. Pourtant, dans les deux situations, la quantité absolue en transgènes est rigoureusement identique et analytiquement il est quasi impossible de distinguer dans quel cas de figure on se situe, sans compter qu’un mélange de l’hybride avec l’un ou l’autre de ses parents n’est pas non plus à exclure.

Pour conclure, notons qu’on peut critiquer que des dispositions légales soient prises sans s’assurer que leur vérification soit vraiment possible. Leur existence sert cependant de motivation puissante à trouver des solutions scientifiques dont la portée des applications dépassera certainement le seul problème des organismes génétiquement modifiés.

Remerciements

Les recherches en matière de détection qualitative sont effectuées dans le cadre du projet “Traçage et authentification des produits à base d’organismes génétiquement modifiés” financé par les Services des Affaires Scientifiques Techniques et Culturelles (Programme d’appui à la recherche pré-normative dans le secteur alimentaire) et impliquent une collaboration avec la Section Biosécurité et Biotechnologie de l’Institut scientifique de Santé publique - Louis Pasteur (Dr. W. MOENS) et le Département Génétique et Amélioration des Plantes du Centre de Recherches agronomiques de Gand - CLO (Dr. M. DE LOOSE). Les recherches en matière de détection quantitative se réalisent dans le cadre d’une convention de recherche contractuelle subventionnée avec un financement provenant de la DG4 et de la DG6 du Ministère des Classes Moyennes et de l’Agriculture

Bibliographie

- Berben G., Janssen É., François E. (1999). Use of PCR for the detection of GMO-derived food and feed products. Abstract 2076. In Hofman M. (ed.). *Ninth European Congress on Biotechnology, 11–15 July 1999. Proceedings*. CD ROM. ISBN 80521–1–5.
- CEN (2000). *Foodstuffs - Detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods. Proposal CEN/TC 275/WG 11 for adoption as first working document*. Berlin: Comité européen de Normalisation, Deutsches Institut für Normung.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh PS., Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* **10**, p. 413–417.
- Howell M. (2000). Proficiency testing of detection methods for genetically modified organisms. *Proceedings of the joint conference on GMO's in the food chain*, p. 43–47. 17-18 May, AOAC Int., Ges. Dtsch. Chem., Dtsch. Veterinärmed. Ges., Munich, Germany.
- Hübner P., Studer E., Lüthy J. (1999). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* **10**, p. 353–358.
- Joudrier P., Alary R., Gautier MF. (1998). Détection des transgènes dans les aliments issus de plantes transgéniques. *Ol. Corps Gras Lipides* **5** (4) p. 288–291.
- JRC-Ispira (1999). *JRC validates a method for the detection of genetically modified organisms*. <<http://www.food.jrc.it/publications/index.htm>>. Consulted on 12th of October 2000.
- Köppel E., Stüder E., Lüthy J., Hübner P. (1997). Detection of genetically modified food. In Amado R., Battaglia R.,

- (eds.) Authenticity and adulteration of food - the analytical approach. *Proc. Euro Food Chem. IX* **2**, p. 293–298. September 24–26. FECS event n° 220. Interlaken, Switzerland.
- Lauter FR. (2000). GMO labeling: the need for and status of GM-DNA quantification. *Cereal Foods World*, September, p. 427–428.
- Meyer R. (1995). Nachweis gentechnologisch veränderter Pflanzen mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) am Beispiel der Flavr Savr™-Tomate. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, p. 583–586.
- Morgan M. (2000). Detection methods for modified proteins of genetically modified organisms. *Proceedings of the joint conference on GMO's in the food chain*, p. 34–37, 17–18 May, AOAC Int., Ges. Dtsch. Chem., Dtsch. Veterinärmed. Ges., Munich, Germany.
- Orrego C. (1990). Organizing a laboratory for PCR work. In Innis MA., Gelfand DH., Sninsky JJ., White TJ. (eds.) *PCR Protocols – a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, p. 446–454.
- Pauli U., Liniger M., Zimmermann A. (1998). Detection of DNA in soybean oil. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **207**, p. 264–267.
- Pietsch K., Waiblinger HU., Brodmann P., Wurz A. (1997). Screeningsverfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **93**, p. 35–38.
- Pietsch K., Waiblinger HU. (2000). Quantification of genetically modified soybeans in food with the Lightcycler system. 7p. In Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K. (eds.) *Rapid cycle real-time PCR- Methods and applications*. Berlin: Springer Verlag. ISBN 3-540-66736-9, in press.
- Stüder E., Rhyner C., Lüthy J., Hübner P. (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **207**, p. 207–213.
- Theuns I., Windels P., De Buck S., Depicker A., Messens K., Van Bockstaele E., De Loose M. (1999). Techniques to detect and identify genetically modified plants. Abstract ECB9/0047, July 11–15. 9th European Congress on Biotechnology, Brussels.
- Väitilingom M., Pijnenburg H. Gendre F., Brignon P. (1999). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.* **47**, p. 5261–5266.
- Van Hoef AMA., Kok EJ., Bouw E., Kuiper HA., Keijer J. (1998). Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food Addit. Contam.* **15**, p. 767–774.
- Windels P., Theuns I., Dendauw J., Depicker A., Van Bockstaele E., De Loose M. (1999). Development of a line specific GMO detection method: a case study. *Meded. Fac. Landbouwwet. Univ. Gent* **64**, p. 459–462.
- Zimmermann A., Lüthy J., Pauli U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **207**, p. 81–90.
- Zimmermann A., Lüthy J., Pauli U. (2000). Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm. Wiss. Technol.* **33**, p. 210–216.

(22 ref.)