



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Authentizitätsprüfung von Granatapfelprodukten mittels
DNA-Barcoding“

verfasst von / submitted by

Andrea Pichler, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2020 / Vienna 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl für die Möglichkeit bedanken, meine Masterarbeit am Institut für Analytische Chemie durchzuführen. Ich habe in ihr eine exzellente Betreuerin gefunden, die mich jederzeit mit ihrem Rat und mit neuen Ideen unterstützt hat und in deren Arbeitsgruppe ich mich sehr wohl gefühlt habe.

Vielen Dank der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, vor allem bei Stefanie Dobrovolny, Alexandra Wanka und Katja Zappe für die Einschulung in die praktische Arbeitsweise, bei Antonio, Christina und Magdalena für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Partner und meinen Freunden danke ich für ihre grenzenlose Unterstützung.

Abstract

Pomegranates are fruits rich in anthocyanins and other polyphenols, which are known for their health benefits. A high product demand combined with limitations in production and a short harvest season lead to increasing prices for pomegranates. Therefore, pomegranate products become interesting for economically motivated adulteration and cheaper plant species are used as bulking and diluting agents. These adulterations can be detected with DNA based methods such as polymerase chain reaction (PCR) combined with high resolution melting analysis (HRM).

To develop a PCR-HRM method for the detection of adulteration in pomegranate products, DNA was extracted from fresh plants and food products. For DNA extraction, a method with cetyltrimethylammonium bromide and three commercial DNA kits were tested and a commercial plant kit (in the presence of 0.5 % (w/v) polyvinylpyrrolidone) was selected as suitable extraction method.

Since DNA in foodstuff is often highly degraded, short fragments (length approx. 100 bp) of common DNA-barcoding regions were targeted and 12 primer pairs were designed. Three primer pairs, targeting the *rpoC1* gene and *rbcL* gene of chloroplast DNA, were able to amplify the DNA of commercially used plant species. PCR products with different melting behavior were obtained for almost all tested plant extracts. By combining primers in duplex assays, it was possible to distinguish pomegranate from species commonly used for adulteration, while PCR products obtained for different pomegranate cultivars resulted in identical melting curves.

The next step was the analysis of commercial food products declared as containing pomegranate. However, due to DNA denaturation and matrix influences, the PCR products obtained for processed food resulted in differed melting curves than those obtained for fresh material.

By analysing mixtures of pomegranate juice and juices from other species (95:5, 90:10, 75:25 or 50:50 (w/w)) the developed methods where validated.

Zusammenfassung

Granatäpfel sind Früchte, die reich an Anthocyanen und anderen Polyphenolen sind und denen eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen wird. Eine hohe Produktnachfrage, Limitierungen in der Produktion und eine kurze Erntesaison führen zu einem Preisanstieg für Granatäpfel. Daher sind Granatapfelprodukte für wirtschaftlich motivierte Verfälschungen interessant und billigere Pflanzenspezies werden zum Strecken eingesetzt. Solche Verfälschungen können mit DNA-basierten Methoden, wie der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) kombiniert mit hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (high resolution melt analysis, HRM) nachgewiesen werden.

Für die Entwicklung einer geeigneten PCR-HRM-Methode zur Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten wurde zunächst DNA aus Pflanzen und aus Lebensmitteln extrahiert. Für die DNA-Extraktion wurden eine Methode mit Cetyltrimethylammoniumbromid und drei kommerzielle DNA-Kits getestet und ein kommerzielles Pflanzen-Kit (in Gegenwart von 0,5 % (v/w) Polyvinylpyrrolidon) als geeignete DNA-Extraktionsmethode gewählt.

Da die DNA in Lebensmitteln oft stark degradiert vorliegt, wurden kurze Fragmente (Länge ca. 100 bp) von bekannten DNA-Barcode-Regionen als Templat verwendet und 12 Primerpaare entworfen. Mit drei Primerpaaren in der *rpoC1*-Region und der *rbcL*-Region des Plastidengenoms konnte die DNA von kommerziell eingesetzten Pflanzenarten amplifiziert werden. Die PCR-Produkte für alle getesteten Spezies konnten anhand ihres Schmelzprofils unterschieden werden. Durch die Kombination von Primern zu Duplex-Assays war es möglich, die Amplikons für Granatapfel von Amplikons für Spezies, die häufig zur Verfälschung eingesetzt werden, zu unterscheiden, während die Amplikons, die für verschiedene Granatapfelproben erhalten wurden, idente Schmelzkurven ergaben.

Als nächstes wurden granatapfelhaltige Lebensmittel analysiert. Aufgrund von DNA-Denaturierung und Matrixeinflüssen zeigten die PCR-Produkte für verarbeitete Lebensmittel ein anderes Schmelzverhalten als solche für frisches Pflanzenmaterial.

Durch die Analyse von Mischungen aus Granatapfelsaft und Säften von anderen Spezies (95:5, 90:10, 75:25 oder 50:50 (w/w)) wurden die Methoden validiert.

1	Einleitung	1
1.1	Granatapfel	1
1.2	Verfälschung	3
1.3	DNA-Barcoding	5
1.4	Ziel der Masterarbeit	7
2	Theoretischer Hintergrund	8
2.1	Desoxyribonukleinsäure (DNA)	8
2.2	Ablauf der PCR-HRM Analyse	9
2.3	Isolieren der DNA	10
2.4	Konzentration und Reinheit der DNA	12
2.5	Amplifikation der DNA	13
2.6	Entwerfen der Primer	18
2.7	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)	19
2.8	Gelelektrophorese	20
3	Experimentelles	21
3.1	Arbeiten mit DNA	21
3.2	Proben	21
3.3	DNA-Extraktion	22
3.4	UV-VIS Spektroskopische und fluorometrische Messungen	27
3.5	Die PCR-HRM Analyse	27
3.6	Gelelektrophorese	34
4	Ergebnisteil	35
4.1	Optimierung der DNA-Extraktion	35
4.2	Entwerfen der Primer und Ergebnisse des Primer-Screenings	42
4.3	PCR-HRM Analyse mit dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0	70
4.4	PCR-HRM Analyse mittels Duplex Assays	77
4.5	Abschätzung der Länge der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese	87
4.6	Validierung der entwickelten Singleplex Assays	89
4.7	Verminderung der Selektivität der Primer für Granatapfel	97

5	Zusammenfassung und Diskussion	100
6	Anhang I: Probenübersicht	I
7	Anhang II: Materialien	V
7.1	Chemikalien	V
7.2	Gebrauchsmaterialien	VI
7.3	Software und Webserver	VI
7.4	Equipment und Messgeräte	VII
8	Anhang III: Verzeichnis	VIII
8.1	Abkürzungsverzeichnis	VIII
8.2	Physikalische Größen und Einheiten	IX
8.3	Abbildungsverzeichnis	X
8.4	Tabellenverzeichnis	XIII
8.5	Literaturverzeichnis	XV

1 Einleitung

1.1 Granatapfel

Der Granatapfel hat eine stark rote Farbe und besitzt einen sauren, leicht adstringenten Geschmack. Die Nachfrage nach Granatäpfeln und Produkten, die Granatapfel enthalten, steigt stetig an. Ein wesentlicher Grund dafür ist der hohe Anteil an Vitaminen, Mineralien, Polyphenolen und Antioxidantien. Deshalb wird dem Granatapfel eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen. Er soll antimikrobiell wirken, den Blutdruck reduzieren und das Risiko für Krankheiten wie Diabetes, Krebs, Atherosklerose und Herz-Kreislaufkrankungen minimieren. ¹⁻⁵

1.1.1 Taxonomie

Die Taxonomie des Granatapfels ist in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Taxonomie des Granatapfels ⁶

Taxonomische Stufe	Deutsche Bezeichnung	Lateinische Bezeichnung
Domäne /Dominium	Eukaryoten	<i>Eukaryota</i>
Reich/Regnum	Pflanzen	<i>Plantae</i>
Stamm/Phylum	Gefäßpflanzen	<i>Tracheophyta</i>
Klasse/Classis	Bedecktsamer	<i>Magnoliopsida</i>
Ordnung/Ordo	Myrtenartige	<i>Myrtales</i>
Familie/Familia	Weiderichgewächse	<i>Lythraceae</i>
Gattung/Genus	Granatapfel	<i>Punica</i>
Art/Species	Granatapfel	<i>Punica granatum</i>

Der Genus *Punica* enthält zwei Spezies, *Punica granatum* und *Punica protupunica*, letztere gilt als ungenießbar. Weltweit sind über 500 Granatapfelsorten bekannt, die sich in Aussehen, Geschmack und Erntezeitpunkt unterscheiden. ^{1,3}

1.1.2 Anbau und Morphologie

Der Granatapfel wird auf jedem Kontinent außer der Antarktis kultiviert. Die Hauptanbaugebiete liegen in den Tropen und Subtropen, vor allem im mediterranen Raum, Georgien, dem Iran, China und Indien. ^{1,3}

Granatäpfel wachsen auf Bäumen, die bis zu neun Meter hoch werden. Durchschnittlich erreichen sie eine Höhe von drei bis vier Metern und ähneln einem Strauch. Die Bäume sind sehr langlebig, erzeugen jedoch nach 15 Jahren keine Früchte mehr. Der Baum trägt sowohl männliche als auch weibliche Geschlechtsmerkmale. Die Früchte werden in den Monaten September bis Dezember geerntet. ¹

Die Granatapfelfrucht ist kugelförmig und besitzt einen Durchmesser von 5-18 cm. Außen ist sie von einer ledrigen Haut umgeben. Im Inneren unterteilen dünne Membranen die Frucht in Kammern. In den Kammern befinden sich die Granatapfelkerne. Ein Kern besteht aus einem Samen und einem, den Kern umhüllenden, Samenmantel (Arillus). Nur der Samenmantel mit Samen kann vom Menschen verspeist werden, er ist sehr saftig und hat einen süß bis sauren, leicht adstringenten Geschmack.



Abbildung 1: Aufbau der Granatapfelfrucht

1.1.3 Inhaltsstoffe

Der essbare Anteil des Granatapfels besteht zum größten Teil aus Wasser, Kohlenhydraten und Ballaststoffen (siehe Abbildung 2). Zu den sekundären Pflanzenstoffen in Granatäpfeln zählen Anthocyane, Catechine, sowie Rutin und Quercetin. Außerdem sind die Elektrolyte Natrium und Kalium, die Mineralien Kalzium, Kupfer, Phosphor, Magnesium, Eisen und Zink, sowie Vitamin C, Vitamin K und Vitamin E, sowie Vitamin B in Spuren enthalten. Die Inhaltsstoffe von Granatäpfeln haben ein hohes antioxidatives Potential, sollen sich positiv auf die Gesundheit auswirken und eine entzündungshemmende und antikarzinogene Wirkung haben. ^{1,3,7}

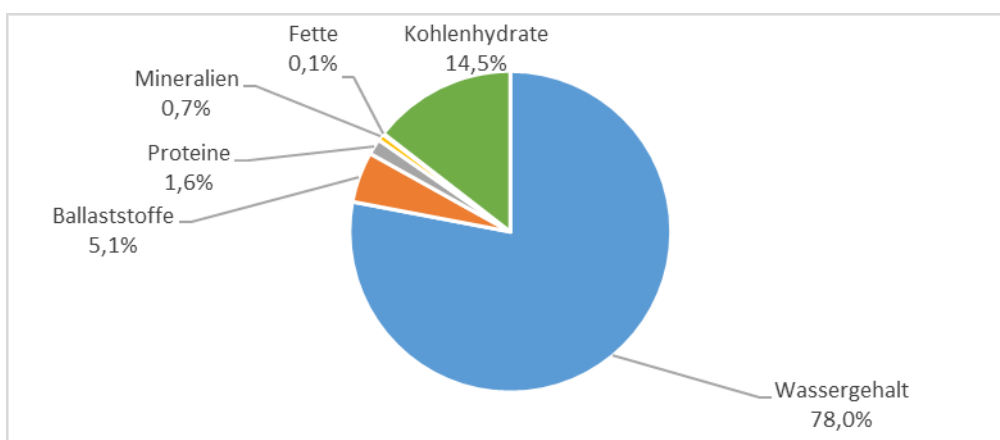


Abbildung 2: Nährwerte für 100 g Granatapfel (essbarer Anteil) ⁷

1.1.4 Lebensmittelproduktion

Granatäpfel werden frisch, getrocknet oder gemahlen verkauft. Außerdem werden sie zu Lebensmittelprodukten weiterverarbeitet. Diese sind hauptsächlich Saft, Konzentrat, Sirup, Konfitüre und Essig.³

Vor allem der Konsum von Fruchtsäften ist in Europa sehr beliebt. Säfte mit einem Fruchtanteil von 100 % werden als hochwertige Produkte zu entsprechenden Preisen verkauft und sind somit besonders anfällig für Verfälschung.⁸

Das Bewerben von Granatäpfeln als Superfrucht führt zu einer erhöhten Nachfrage. Limitierungen in der Produktion und eine kurze Erntesaison treiben den Preis für Granatäpfel allerdings in die Höhe und machen das Verfälschen von Granatapfelprodukten interessant.^{9,10}

1.2 Verfälschung

Lebensmittel im Handel haben die Anforderung nicht nur sicher, sondern auch authentisch zu sein. Daher ist es notwendig, Analyseverfahren zu entwickeln, die Verunreinigungen und Verfälschungen detektieren können.¹¹

1.2.1 Verfälschung im österreichischen Rechtssystem

Die Verfälschung von Lebensmitteln in Österreich ist im Bundesgesetz BGBl. I Nr. 13/2006 als Gesetz über Sicherheitsanforderungen und weitere Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände und kosmetische Mittel zum Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher (LMSVG) definiert.¹²

§ 5. BGBl. I Nr. 13/2006 definiert Verfälschung und Verminderung von Lebensmitteln in Österreich: „Es ist verboten, Lebensmittel, die verfälscht oder wertgemindert sind, ohne dass dieser Umstand deutlich und allgemein verständlich kenntlich gemacht ist, in Verkehr zu bringen.“ (§ 5 Abs. 1 Z. 2)¹²

„Lebensmittel sind verfälscht, wenn ihnen wertbestimmende Bestandteile, deren Gehalt vorausgesetzt wird, nicht oder nicht ausreichend hinzugefügt oder ganz oder teilweise entzogen wurden, oder sie durch Zusatz oder Nichtentzug wertvermindernder Stoffe verschlechtert wurden, oder ihnen durch Zusätze oder Manipulationen der Anschein einer besseren Beschaffenheit verliehen oder ihre Minderwertigkeit überdeckt wurde, oder wenn sie nach einer unzulässigen Verfahrensart hergestellt wurden.“ (§ 5 Abs. 5 Z. 3)¹²

„Lebensmittel sind wertgemindert, wenn sie nach der Herstellung, ohne dass eine weitere Behandlung erfolgt ist, eine erhebliche Minderung an wertbestimmenden Bestandteilen oder ihrer spezifischen, wertbestimmenden Wirkung oder Eigenschaft erfahren haben, soweit sie nicht für den menschlichen Verzehr ungeeignet sind.“ (§ 5 Abs. 5 Z. 4)¹²

1.2.2 Verfälschung von Granatapfelprodukten

Durch das Zusetzen von anderen Pflanzenspezies können die Farbe und der Geschmack von Granatapfelprodukten positiv beeinflusst werden, oder das Produkt gestreckt und somit Kosten gespart werden. Die verwendeten Pflanzen haben eine ähnliche Zusammensetzung, Farbe oder Geschmack wie Granatäpfel.^{9,10}

Apfel (*Malus domestica*)^{9,13} und Pfirsich (*Prunus persica*)¹⁰ bieten sich aufgrund ihres geringen Preises als Verfälschungsadditiva an. Traube (*Vitis vinifera*)^{9,10,13} und Aronia (*Aronia melanocarpa*)^{9,13} eignen sich aufgrund ihrer Farbe zum Verfälschen von roten Lebensmittelprodukten.^{9,10} Auch Rote Beete (*Beta vulgaris*) wird zum Verfälschen von Granatapfelprodukten eingesetzt, da das vorhandene Betanin eine starke, rote Färbung bewirkt.¹⁴

Weitere Spezies, die zum Verfälschen von Granatapfelprodukten verwendet werden, sind die Birne (*Pyrus communis*)¹³, die Pflaume (*Prunus domestica*)¹³, der schwarze Holunder (*Sambucus nigra*)⁹, die Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus*)⁹ und die großfruchtige Moosbeere (*Vaccinium macrocarpon*)⁹, die auch als Cranberry bekannt ist.

1.2.3 Detektion von Verfälschungen

Die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten wurde bereits in diversen Studien untersucht. Vardin *et al.* verwendeten 2007 FTIR (Fouriertransformation-Infrarotspektroskopie), um eine Verfälschung von Granatapfelsaftkonzentrat mit Traubensaftkonzentrat zu detektieren.¹⁵

Zhang *et al.* untersuchten 2009 45 Fruchtsäfte mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, High-performance liquid chromatography) gekoppelt mit einem PDA-Detektor (Photodiodenzeile, photo diode array) oder einem RI-Detektor (Brechungsindexdetektor, refractive index detector). In der Studie wurden die Profile von Anthocyanen, Polyphenolen, Zuckern, organischen Säuren und Aminosäuren bestimmt und mit einer Datenbank verglichen, um eventuelle Verfälschungen zu detektieren. Prolin galt dabei als Indikator für Verfälschungen mit Trauben, Apfelsäure deutete auf eine Verfälschung mit Apfel, Birne, Traube, Kirsche, Pflaume oder Aronia hin. Über die Bestimmung von Anthocyanen können Additiva wie Aronia, Heidelbeeren oder Brombeeren nachgewiesen werden.¹³

2011 wurden von Ehling *et al.* mittels HPLC und MS (Massenspektrometrie) organische Säuren in verschiedenen Fruchtsäften bestimmt, um ihre Authentizität zu überprüfen. Zur Detektion von Verfälschungen wurden die Verhältnisse der Konzentrationen der Säuren herangezogen.¹⁶

2014 untersuchten Nuncio *et al.* die Verfälschung von Granatapfelsaft durch Traubensaft oder Pfirsichsaft. Dafür wurden mittels HPLC Unterschiede im Gehalt an organischen Säuren, Zuckern, Prolin und flüchtigen Komponenten bestimmt. Der Gehalt an Mineralien wurde mittels AAS (Atomabsorptionsspektrometrie) und AES (Atomemissionsspektroskopie) ermittelt.¹⁰

Tezcan *et al.* untersuchten 2013 mittels MEKC-LIF (Mizellare elektrokinetische Chromatographie - Laserinduzierte Fluoreszenz, micellar electrokinetic chromatography - laser induced fluorescence) die Verfälschung von Granatapfelsaft mit Apfelsaft. Das Aminosäuren-Profil für Granatapfelsaft wurde mit dem für Apfelsaft verglichen und geeignete Marker bestimmt.¹⁷

1.3 DNA-Barcoding

Auch DNA-basierte Methoden wurden für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten verwendet. DNA bietet den Vorteil, stabil zu sein. Ein weiterer Vorteil ist, dass die DNA nicht von äußeren Parametern wie Wetterverhältnissen und Umwelteinflüssen beeinflusst wird. Eine geeignete DNA-basierte Methode, um Verfälschungen zu detektieren, ist das DNA-Barcoding. DNA-Barcoding bezeichnet eine schnelle und einfache taxonomische Zuordnung von Lebewesen, basierend auf molekularbiologischen Methoden. Um DNA-Barcoding zu betreiben, werden Regionen gesucht, die einfach amplifiziert werden können, eine hohe Variabilität enthalten und von universellen Regionen flankiert werden. Die verwendeten Primer werden für die universellen Regionen entworfen und können an die DNA aus verschiedenen Spezies binden. Das DNA-Templat, welches amplifiziert wird, soll spezifisch sein, um die Identifizierung der verschiedenen Spezies zu ermöglichen.^{11,18,19}

1.3.1 DNA-Barcoding bei Pflanzen

Für Pflanzen gibt es noch keine universelle Barcode-Region. Zu den am häufigsten eingesetzten Barcode-Regionen für die Analyse von Pflanzen zählen die codierenden Regionen *rbcl* und *matK*, der Spacer *trnH-psbA* und die ITS-Region der ribosomalen DNA, jedoch wurden auch andere Regionen für verschiedene taxonomische Zuordnungen verwendet.^{19–23}

Für die Unterscheidung von Pflanzenspezies kann das Plastidengenom verwendet werden. Von Vorteil ist die einfache genetische Struktur, zudem ist es durch den ringförmigen Aufbau sehr stabil. Außerdem ist das Plastidengenom variabel, haploid und wird uniparental vererbt.^{24,25}

Um mögliche Barcode-Regionen im Plastidengenom zu finden, scannten Dong *et al.* 2012 das gesamte Chloroplastengenom von 12 verschiedenen Gattungen von Bedecktsamern, darunter

Eukalypten (*Eucalyptus*), Tabak (*Nicotiana*), Reis (*Oryza*), Pappeln (*Populus*) und Nachtschatten (*Solanum*). Die Region mit der höchsten Variabilität war ycf1-a, gefolgt von trnK, rpl32-trnL, trnH-psbA, trnS^{UGA}-trnG^{UCC}, petA-psbJ, rps16-trnQ, ndhC-trnV, ycf1-b, ndhF, rpoB-trnC, psbE-petL und rbcL-accD. Durch die hohe Variabilität der ycf1-Region ist diese allerdings nicht als Barcode-Region geeignet, da keine universellen Primer gefunden werden konnten. ²⁴

In einer Studie des Consortium for the Barcode of Life (CBOL) aus dem Jahr 2019 wurden 907 DNA-Sequenzen von Pflanzen verglichen, um eine geeignete Barcode-Region für Landpflanzen zu finden. Dabei wurden die Universalität, die Qualität der Sequenzierung und das Diskriminierungspotenzial von den häufig verwendeten Loci trnH-psbA, psbK-psbI, matK, rbcL atpF-atpH, rpoB und rpoC1 miteinander verglichen. Das größte Diskriminierungspotenzial für Landpflanzen zeigten trnH-psbA (69 %) und psbK-psbI (68 %), gefolgt von matK (66 %) und rbcL (61 %) und rpoC1 mit dem geringsten Diskriminierungspotenzial von 43 %. ¹⁹

Als Ergebnis der Studie wurde eine Empfehlung für matK und rbcL ausgesprochen, da diese bezüglich der Universalität, der Qualität der Sequenzierung und des Diskriminierungspotenziales überzeugten. Allerdings zeigte matK aufgrund von repetitiven Einheiten Probleme bei der Amplifikation der DNA. ^{18,19,21,24}

Neben den Regionen der Plastiden-DNA wird der internal transcribed spacer der ribosomalen DNA als Barcode-Region verwendet. ²⁶

1.3.2 DNA-Barcoding bei Lebensmitteln

Es ist eine Herausforderung, verarbeitete Lebensmittelprodukte auf ihre Authentizität zu überprüfen. Bei dem Herstellungsprozess von Lebensmitteln führen hohe Temperaturen und ein saurer pH-Wert zu einer Fragmentierung der DNA. Daher eignen sich kurze DNA-Fragmente der stabilen Plastiden-DNA zur Authentizitätsüberprüfung von Lebensmitteln. ^{8,27}

Ortola-Vidal *et al.* identifizierten 2007 mittels molekularbiologischer Methoden Verfälschungen in Lebensmitteln. Dabei wurden Pflanzengattungen in Lebensmitteln mittels PCR (polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion) und Pyrosequenzierung identifiziert. DNA wurde mittels einer modifizierten Extraktionsmethode basierend auf Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) aus Jogurts und Marmeladen extrahiert. Für die PCR wurden Primer für die rbcL-Region verwendet. Mittels Pyrosequenzierung konnten Apfel, Banane, Grapefruit, Pfirsich und Erdbeere nach dem Genus unterschieden werden. Allerdings war eine Unterscheidung innerhalb derselben Gattung wie z.B. von Pfirsich, Aprikose oder Pflaume nicht möglich. ²⁸

Die Authentizität von Lebensmitteln mittels DNA-Barcoding wurde 2013 von Faria *et al.* untersucht. In der Studie wurde ein Assay für den Locus trnL verwendet, um Orange, Mango, Pfirsich, Birne und Ananas in Fruchtsäften nachzuweisen. Alle fünf Arten ließen sich mittels HRM-Analysen unterscheiden.⁸

Zhang *et al.* verwendeten 2019 DNA-Barcoding, um die Authentizität von 91 kommerziellen Gewürzen zu überprüfen. Dabei verwendeten sie Sequenzen der Loci ITS2 und psbA-trnH.²⁹

1.3.3 DNA-Barcoding und Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten

Die Variabilität des Chloroplastengenoms vom Granatapfel wurde von Hajjahmadi *et al.*, 2013 untersucht. Sie verglichen die Loci petA-psaJ, trnC-trnD, trnH-psbA, ITS, rbcL und matK. Da die Loci psbE-petL in der petA-psaJ Region, trnH-psbA und ITS besonders variabel waren, besaßen sie ein hohes intraspezifisches Unterscheidungspotenzial.²⁵

Mariesci *et al.* detektierten 2016 mittels SCAR-(Sequence Characterized Amplified Region) Marker die Verfälschung von Granatapfelsäften mit anderen Früchten wie Aronia, Apfel, schwarzer Holunder oder Traube. Bei der Studie konnten Verfälschungen mit einem Anteil von 1 % an fremden Fruchtsäften detektiert werden.⁹

1.4 Ziel der Masterarbeit

Der Granatapfel wird als gesundheitsfördernde Superfrucht beworben. Die steigende Nachfrage beeinflusst den Kaufpreis und macht das Verfälschen von Granatapfelprodukten interessant. Die Zugabe von nicht deklarierten Additiva wird als Verfälschung bezeichnet und ist gesetzlich verboten. Daher besteht die Notwendigkeit, Verfälschungen zu detektieren. Eine Möglichkeit, Verfälschungen mit anderen Pflanzenarten nachzuweisen, ist das DNA-Barcoding mittels PCR-HRM Analysen.

Ziel dieser Studie war es, die DNA-Extraktion aus Granatapfel zu optimieren und geeignete Barcode-Regionen zu finden, die es ermöglichten, Verfälschungen in Granatapfelprodukten nachzuweisen. Zuerst sollten Primer entworfen werden, mit denen geeignete Barcode-Regionen von Granatapfel und von Spezies, die zum Verfälschen eingesetzt werden, mittels PCR amplifiziert werden können. Aufgrund eines unterschiedlichen Schmelzverhaltens der jeweiligen PCR-Produkte sollten die verschiedenen Spezies nachgewiesen werden können. Gleichzeitig sollten die PCR-Produkte verschiedener Granatapfelsorten dasselbe Schmelzverhalten zeigen. Die entwickelten PCR-HRM Assays sollten für die Detektion von Verfälschungen in Lebensmitteln getestet werden. Zuletzt sollten die Nachweisgrenze und die Selektivität der Assays durch Analysen von Mischungen aus Granatapfelsaft und Säften von Spezies, die zum Verfälschen eingesetzt werden, bestimmt werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Die DNA ist der Träger der Erbinformation bei den Eukaryoten, während bei den Prokaryoten neben der DNA auch die RNA ein möglicher Träger der Erbinformation ist (z.B. Retroviren). Die DNA setzt sich aus Desoxynukleotiden zusammen. Desoxynukleotide bestehen aus einer der DNA-Nukleinbasen (Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin), dem Zucker Desoxyribose und einem Phosphatrest. Die einzelnen Nukleotide werden, wie in Abbildung 3 dargestellt, über Phosphodiesterbindungen verknüpft und bilden Polymere aus. Die Phosphatgruppe ist Träger einer negativen Ladung. Zucker und Phosphat sind strukturgebend, während die Abfolge der Basen entlang des Nukleotidstranges die genetische Information trägt. Codierende Abschnitte der Nukleotidsequenzen dienen bei der Transkription als Vorlage für die Messenger-RNA und bestimmen bei der Proteinsynthese die Sequenz der Aminosäuren. ^{30–32}

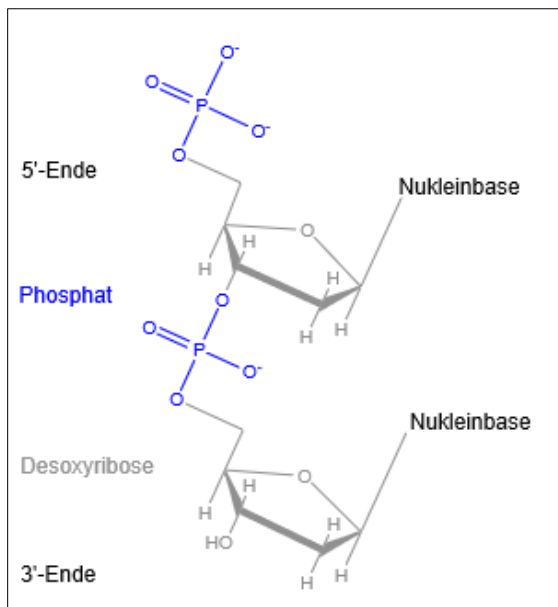


Abbildung 3: Aufbau der DNA

Die DNA setzt sich aus zwei komplementären Strängen zusammen, die antiparallel verlaufen und eine Doppelhelix bilden. Zwischen den beiden Strängen bilden komplementäre Basenpaare Wasserstoffbrücken aus und eine Helixstruktur entsteht. Wie in Abbildung 4 dargestellt, bilden Guanin und Cytosin ein komplementäres Basenpaar mit drei Wasserstoffbrücken und Adenin und Thymin ein komplementäres Basenpaar mit zwei Wasserstoffbrücken. Die Basen werden in Purin- (Adenin und Guanin) und Pyrimidinbasen (Thymin und Cytosin) eingeteilt. Die DNA-Doppelhelix besitzt zwei Vertiefungen, eine große Furche (Breite: 1-2 nm) und eine kleine Furche (Breite: 0,6 nm). Die genomische DNA der eukaryontischen Zellen liegt im Zellkern vor. In Eukaryoten gibt es zudem noch ringförmige

DNA-Moleküle in den Mitochondrien und bei Pflanzen zusätzlich in den Plastiden. Die in Pflanzen enthaltene Plastiden-DNA ist 120000-160000 Basenpaare lang und codiert unter anderem für ribosomale Proteine und einen Teil der Proteine des Photosynthesesystems.³⁰⁻³³

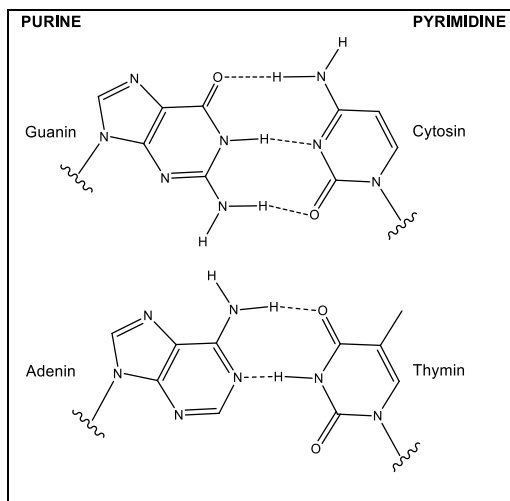


Abbildung 4: Komplementäre Nukleinbasen der DNA

2.2 Ablauf der PCR-HRM Analyse

Eine einfache und kostengünstige Methode des DNA-Barcodings ist eine PCR-HRM Analyse. Durch die HRM-Analyse wird die DNA dabei nicht beschädigt und kann für weitere Untersuchungen verwendet werden.^{11,18,19}

Der Arbeitsablauf der PCR-HRM Analyse ist in Abbildung 5 dargestellt, die einzelnen Schritte werden in den Kapiteln 2.3 – 2.5 im Detail erklärt. Um eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse durchzuführen, wird DNA aus Proben organischen Ursprungs extrahiert und ihre Konzentration und Reinheit bestimmt. Anschließend wird die Zielsequenz der DNA mittels einer PCR vervielfältigt und das Schmelzverhalten der PCR-Produkte durch eine HRM-Analyse untersucht. Das Schmelzverhalten der Template ist dabei unter anderem abhängig von der Länge und Sequenz der DNA.

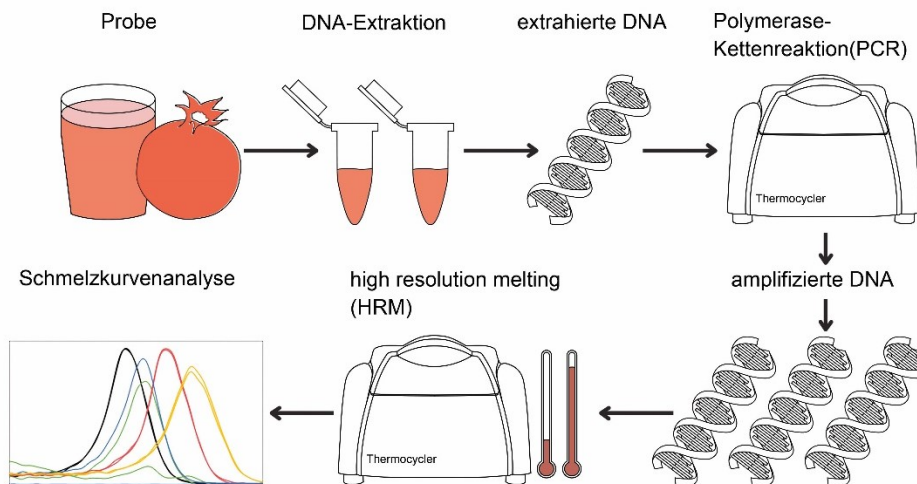


Abbildung 5: Arbeitsablauf für die DNA-Extraktion und PCR-HRM Analyse

2.3 Isolieren der DNA

Grundvoraussetzung für eine PCR-HRM Analyse ist kontaminationsfreie DNA von hoher Integrität und Reinheit. Störsubstanzen wirken sich negativ auf die Zelllyse aus, degradieren die DNA oder inhibieren die Polymerase. Störfaktoren sind Matrixkomponenten wie Fette, Zucker, Proteine und sekundäre Inhaltsstoffe, die die DNA-Extraktion erschweren. Zudem wirken sich organische Lösungsmittel wie Phenol und Ethanol, Proteine, Fette, Zucker oder Salze inhibitorisch auf die PCR aus.^{11,27,34}

Um reine DNA zu erhalten, werden feste Proben zunächst homogenisiert. Die homogenisierte oder flüssige Probe wird lysiert, dann werden inhibitorische Substanzen entfernt und die DNA aufgereinigt.²⁷

2.3.1 Lyse

Um DNA zu isolieren, ist ein Zellaufschluss notwendig. Dieser kann physikalisch, chemisch oder biologisch erfolgen. Chemisch werden Zellen durch Verwendung von Detergenzien lysiert, welche die Oberflächenspannung der Zellen minimieren. Die Lyse kann auch durch den Zusatz von Säuren, Basen, Lösungsmitteln, Chelatbildnern oder chaotropen Reagenzien erfolgen. Bei der biologischen Lyse spielen Autolyse und die Zugabe von Enzymen und Phagen eine Rolle. Für die Lyse von Pflanzenzellen eignen sich die Detergenzien Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) oder Natriumlaurylsulfat (SDS).^{27,35}

Zum Schutz der DNA vor Abbau durch Enzyme ist eine Inhibierung von Nukleasen notwendig. Die Degradierung der DNA wird minimiert, indem bei niedrigen Temperaturen gearbeitet wird oder Nukleasen (DNasen) durch Zusatz von Chelatbildnern wie z.B. EDTA inhibiert werden.²⁷

2.3.2 DNA-Extraktion

Um Störkomponenten zu entfernen und DNA zu extrahieren, werden die Löslichkeit, die Ladung und die Größe der DNA ausgenutzt. Dabei gibt es verschiedene Methoden, um DNA zu extrahieren.²⁷

2.3.2.1 CTAB-Methode

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ist ein kationisches Detergens, das zur Präzipitation von Nukleinsäuren eingesetzt wird. CTAB bildet bei einer geringen NaCl-Konzentration von $< 0,6$ M einen unlöslichen Komplex mit Nukleinsäuren. Matrixkomponenten bleiben in Lösung und können entfernt werden. Durch Erhöhen der NaCl-Konzentration auf $> 0,6$ M löst sich der Komplex wieder. Außerdem bildet CTAB bei höheren Konzentrationen Komplexe mit Proteinen, Polysacchariden und sekundären Inhaltsstoffen aus. Um diese Komplexe zu entfernen, wird eine Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol durchgeführt. Chloroform wird verwendet, um Proteine zu denaturieren und die Phasentrennung zwischen der wässrigen und organischen Phase zu erleichtern. Die denaturierten Proteine fallen in der Interphase zwischen der wässrigen Phase und der organischen Phase aus, während die DNA in der wässrigen Phase gelöst ist. Isoamylalkohol dient zur Unterdrückung einer Schaumbildung und unterstützt die Bildung einer Interphase. Die DNA bleibt in wässriger Phase und wird durch Zugabe von Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen. Für die CTAB-Methode wird ein Extraktionspuffer mit TRIS/EDTA und Chloroform verwendet. Der Puffer stellt den pH-Wert auf 7,5 - 8,0 ein. Anschließend werden Alkohole wie Isopropanol oder Ethanol verwendet, um DNA aus salzhaltigen, wässrigen Lösungen zu präzipitieren. DNA fällt aus und bildet einen unlöslichen Niederschlag. Dieser kann mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen werden, um mitgefällte Salze zu entfernen.^{27,36,37}

2.3.2.2 Auf Silikagel basierende Verfahren / Adsorptionschromatographie

Nukleinsäuren binden in Gegenwart hochkonzentrierter, chaotroper Salze wie Natriumperchlorat, Natriumiodid oder Guanidiniumsalze an Silikaoberflächen. Dafür wird beispielsweise ein 6 M Natriumiodid-Puffer verwendet. Im gebundenen Zustand kann die DNA durch Waschen mit alkoholhaltigen Puffern (z.B. Ethanol) gereinigt werden. Die DNA ist reversibel an die Silikaoberfläche gebunden und kann mit Wasser oder einem Puffer (z.B. TRIS-EDTA Puffer) eluiert werden. Dieses Prinzip ist die Grundlage vieler kommerzieller DNA-Kits.^{32,37,38}

2.3.2.3 Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Polyvinylpyrrolidon ist ein weißes, hygroskopisches Pulver. Das Polymer besteht aus Pyrrolidoneinheiten (Abbildung 6) und kann starke Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

Es spielt vor allem bei der Extraktion von DNA aus pflanzlichen Proben eine Rolle und wird verwendet, um Polyphenole zu entfernen. PVP bildet Wasserstoffbrücken mit Polyphenolen aus und ermöglicht so eine Abtrennung von der DNA. Die zugesetzte Menge an PVP beträgt bis zu 5 % (w/v). Ein zu hoher PVP-Gehalt kann einen negativen Einfluss auf die Reinheit der DNA und die DNA-Ausbeute haben.^{39–41}

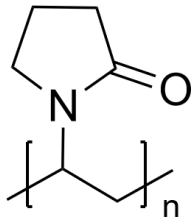


Abbildung 6: Struktur einer Pyrrolidoneinheit

2.4 Konzentration und Reinheit der DNA

Die Konzentration und Reinheit des DNA-Extraktes kann mittels UV-VIS Spektroskopie bestimmt werden. Auch fluorometrische Messungen eignen sich zur Bestimmung der DNA-Konzentration.

2.4.1 Messung der Extinktion

Um die Konzentration und Reinheit zu bestimmen, wird das DNA-Extrakt im Spektrometer mit elektromagnetischer Strahlung bestrahlt.

2.4.1.1 Konzentrationsbestimmung

DNA kann mit elektromagnetischer Strahlung wechselwirken und die Intensität des Lichts schwächen. Die Abschwächung der elektromagnetischen Welle wird als Extinktion gemessen und ist proportional zu der DNA-Konzentration. Die aromatischen Ringe der vier Nukleinbasen der DNA können elektromagnetische Strahlung absorbieren. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz wird mit der gemessenen Extinktion A die DNA-Konzentration ermittelt; dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ an doppelsträngiger DNA.^{27,36,37}

Ein Nachteil der spektrometrischen Bestimmung ist, dass neben doppelsträngiger DNA auch einzelsträngige DNA Licht bei 260 nm absorbiert und somit einen Einfluss auf die Messung der DNA-Konzentration hat. Außerdem beeinflussen Störkomponenten, wie z.B. organische Komponenten, die Extinktion, falls sie elektromagnetisches Licht ebenfalls bei 260 nm absorbieren.²⁷

2.4.1.2 Bestimmung der Reinheit

Über das Verhältnis A_{260}/A_{280} kann eine Verunreinigung des DNA-Extraktes mit Proteinen nachgewiesen werden. Aromatische Aminosäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Bei reiner DNA liegt das Verhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,8-2,0. Neben Proteinen absorbieren auch Phenol und phenolische Verbindungen bei dieser Wellenlänge.^{27,36,37}

Kontaminationen mit Salz, Peptiden oder Polysacchariden können durch das Verhältnis der Extinktion A_{260}/A_{230} festgestellt werden. Dieses Verhältnis soll höher als 1,8 sein.²⁷

2.4.2 Fluoreszenzmessung

Bei der Fluoreszenzmessung wird die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Dieser bindet gezielt an doppelsträngiger DNA und absorbiert im gebundenen Zustand Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dadurch werden Valenzelektronen angeregt und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge bei der Relaxation in den Grundzustand. Die Intensität der Strahlung ist direkt proportional zur DNA-Konzentration. Ein Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie gegenüber der Absorptionsspektroskopie ist, dass das Fluoreszenzsignal spezifisch für doppelsträngige DNA ist. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen eine schwache Eigenfluoreszenz, erst durch die Interaktion mit der DNA nimmt die Fluoreszenz zu und das Emissionsmaximum verschiebt sich. Die Fluoreszenzspektroskopie zeigt im Vergleich zur UV-VIS Spektroskopie eine bessere Sensitivität.²⁷

2.5 Amplifikation der DNA

2.5.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden Nukleotidsequenzen kopiert. Dieser Vorgang wird Amplifikation genannt und findet *in vitro* statt. Bereits geringe Mengen an DNA können so vervielfältigt und analysiert werden. Das Prinzip der PCR basiert auf dem Enzym DNA-Polymerase, welches ein neues DNA-Templat komplementär zu einem einzelsträngigen DNA-Abschnitt synthetisieren kann.^{32,42}

2.5.2 Komponenten für die PCR

2.5.2.1 DNA-Templat

Die DNA, die als Vorlage für die in der PCR kopierte DNA-Sequenz dient, wird DNA-Templat genannt. Diese DNA soll möglichst rein und intakt sein. Substanzen, die die Polymerase hemmen, wie z.B. Polyphenole, können zu einem falsch negativen Ergebnis führen.

Kontamination mit fremder DNA kann zu einem PCR-Produkt führen und so ein falsch positives Ergebnis vorgetäuscht werden.⁴³

2.5.2.2 Primer

Primer sind synthetische DNA-Oligonukleotide, welche an das Templat hybridisieren. Primer werden verwendet, weil die DNA-Polymerase nur an doppelsträngiger DNA ansetzen kann. Die Polymerase synthetisiert, ausgehend vom 3'-Ende der Primer, den neuen DNA Doppelstrang.^{42,43}

Für die PCR wird ein Primerpaar verwendet, das gegenläufig orientiert ist und den DNA-Abschnitt, der amplifiziert werden soll, begrenzt. Primer werden im Überschuss zum PCR-Ansatz dazugegeben, die Konzentration liegt bei Verwendung von Taq-Polymerasen in der Größenordnung um 0,5 µM.^{32,42,43}

2.5.2.3 Polymerase

Das Enzym Polymerase synthetisiert, ausgehend vom gebundenen Primer, DNA vom 5' zum 3' Ende.^{32,42,43}

Hitzestabile Polymerase

Hitzestabile Polymerasen, wie die Taq-Polymerase, ermöglichen eine thermisch induzierte Amplifikation. Die Taq-Polymerase wird aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72 °C. Sie zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität und Robustheit aus und hat eine 5'-3' Exonukleaseaktivität. Die Taq-Polymerase hat keine 3'-5' Exonukleaseaktivität und somit findet kein Korrekturlesen (proofreading) statt. Beim proofreading werden falsch eingebaute Desoxynukleotide erkannt und entfernt.^{42,43}

Hot start Polymerase

Die hot start Polymerase wird verwendet, um die Synthese unspezifischer Nebenprodukte zu verhindern. Die Enzymaktivität wird unterdrückt, damit die DNA-Polymerase nicht vor der eigentlichen PCR DNA synthetisiert. Die Polymerase ist durch einen monoklonalen Antikörper oder chemisch inhibiert und wird erst durch Erhöhung der Temperatur aktiviert. Die Aktivierung erfolgt bei Temperaturen ab 95 °C.⁴²⁻⁴⁴

2.5.2.4 Desoxyribonukleosid-Triphosphat (dNTP)

Desoxynukleosid bezeichnet die Einheit aus einer Nukleinbase und Desoxyribose. Desoxyribonukleosid-Triphosphate bestehen aus einer DNA-Nukleinbase, Desoxyribose und drei Phosphatgruppen. Ihr Aufbau ist in Abbildung 7 dargestellt. Phosphorylierte Nukleoside

werden auch als Nukleotide bezeichnet. Die dNTP's werden von der Polymerase unter Abspaltung von Pyrophosphat und Wasser in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Für 20 Kilobasen (kb) werden 200-600 μM an dNTP's verwendet.^{30,32,43}

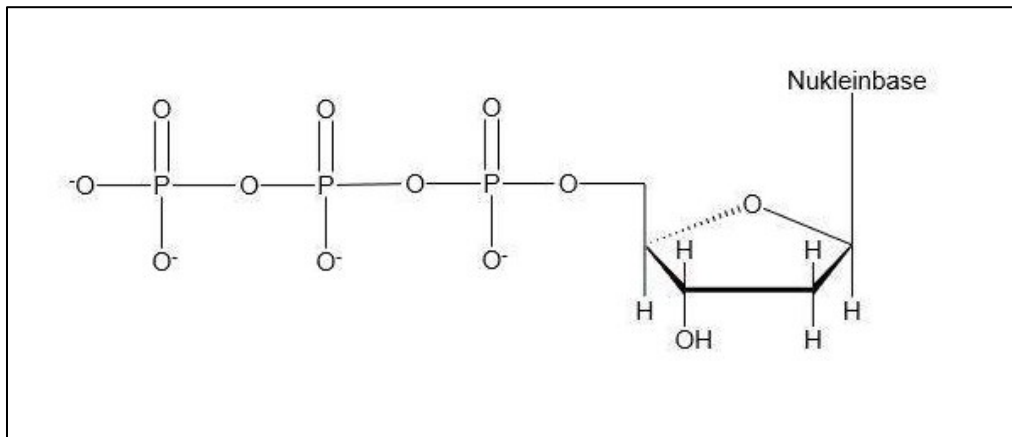


Abbildung 7: Aufbau der Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP's)

2.5.2.5 Puffer

Eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von 8 wird verwendet, da dort das Aktivitätsmaximum der Polymerase liegt. Der PCR-Puffer enthält Ionen wie Mg^{2+} und Cl^- und dNTP's.^{32,43}

Mg^{2+} Ionen

Magnesiumionen sind metabolische Cofaktoren der DNA-Polymerase und beeinflussen die Enzymaktivität. Sie bilden einen löslichen Komplex mit Nukleotiden, der als Substrat für die Polymerase dient. Außerdem haben sie einen Einfluss auf die Schmelztemperatur der DNA. Sie werden meist in einer Konzentration von 1,0 - 2,5 mM verwendet. Eine hohe Mg^{2+} Konzentration führt zu einer hohen Ausbeute, aber erhöht auch die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten.^{32,43}

2.5.2.6 Negativkontrolle (no template control, NTC)

Um eventuelle Kontaminationen der Reagenzien mit DNA zu erkennen, wird eine Negativkontrolle verwendet. Die PCR wird ohne DNA-Templat angesetzt und soll zu keinem Anstieg der Amplifikationskurve führen. Wird ein PCR-Produkt gebildet, deutet dies auf eine Verunreinigung der Reagenzien mit DNA hin.⁴³

2.5.2.7 Positivkontrolle

Die Positivkontrolle besteht aus DNA einer Probe, die bereits erfolgreich amplifiziert wurde. Sie dient als Kontrolle für eine funktionierende PCR.⁴³

2.5.3 PCR Ablauf

Die PCR kann vollautomatisch in einem Thermocycler durchgeführt werden. Dieser bietet einen temperierbaren Reaktionsraum; die Temperatur und Zeit, sowie die Anzahl an Zyklen können individuell eingestellt werden. Anforderungen an den Thermocycler sind eine schnelle Heiz- und Kühlrate, die über den gesamten Heizblock uniform ist und eine hohe Temperaturgenauigkeit.^{42,43}

2.5.3.1 PCR-Zyklus

Ein PCR-Zyklus besteht aus der thermischen Denaturierung, der Primer-Hybridisierung und der Elongation. Wiederholt man die drei Schritte zyklisch, so wird das Templat exponentiell amplifiziert. Die Anzahl der Zyklen hängt von der Menge an eingesetzter DNA ab und beträgt meistens zwischen 25-50 Zyklen. Eine zu hohe Anzahl an Zyklen steigert die Anzahl an unspezifischen DNA-Fragmenten, die amplifiziert werden.^{42,43}

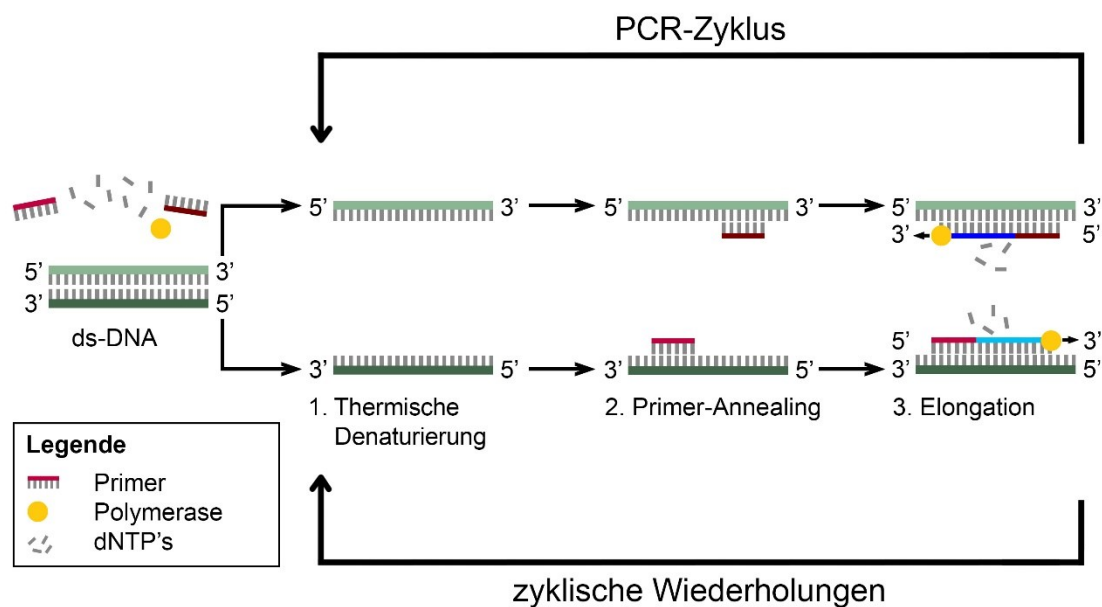


Abbildung 8: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus

Die Amplifikation der DNA ist aber nur im Idealfall exponentiell. Am Beginn der PCR wird zunächst nur wenig DNA amplifiziert, da nur eine geringe Menge an DNA-Templat vorliegt und die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Amplifikation gering ist. Erst mit steigender Zykluszahl liegt mehr DNA vor und die Amplifikation ist nun annähernd exponentiell. Da die Reagenzien limitiert zur Verfügung stehen und die Menge an PCR-Produkt stetig steigt, sinkt die Amplifikationsrate wieder ab und die Amplifikationskurve erreicht ein Plateau.³²

1.) Thermische Denaturierung

Doppelsträngige DNA wird thermisch bei 90-95 °C zu Einzelsträngen aufgeschmolzen und dabei Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der DNA-Stränge gelöst. Zu Beginn der PCR erfolgt ein mehrminütiger Denaturierungsschritt, während der Zyklen reichen einige Sekunden aus.^{32,42,43}

2.) Primer-Hybridisierung

Primer binden am 5' und 3' Ende des zu amplifizierenden Bereichs. Die Temperatur wird so angepasst, dass die Primer spezifisch an die komplementäre Sequenz binden können.^{42,43}

3.) Elongation

Die DNA-Polymerase verlängert den DNA-Strang in Anwesenheit freier dNTPs, ausgehend von den Primern, in 3' Richtung. Die Temperatur wird auf die Temperatur des Aktivitätsmaximums der Polymerase eingestellt. Die Elongationszeit wird an die Länge des Templates angepasst.^{42,43,45}

Nach dem letzten Zyklus kann durch einen bis zu 10 Minuten langen Polymerisationsschritt sichergestellt werden, dass alle synthetisierten DNA-Stränge vervollständigt werden.^{42,43}

2.5.4 Real time PCR

Bei der real time PCR wird die Bildung von PCR-Produkten in Echtzeit erfasst. Die PCR-Produkte werden mit Sonden oder mit Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen. Bei den Fluoreszenzfarbstoffen handelt es sich um Moleküle, welche in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA interkalieren. Dadurch erhöht sich das Fluoreszenzsignal oder die Wellenlänge des emittierten Lichts ändert sich im gebundenen Zustand und kann so vom Hintergrund unterschieden werden. Somit kann die Konzentration an doppelsträngiger DNA spezifisch gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt. Im Gegensatz zu Sonden interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch in jede Art von doppelsträngiger DNA, auch in Primer-Dimere oder unspezifische PCR-Produkte. Daher muss die Spezifität der Primer mittels Elektrophorese oder mittels Schmelzkurvenanalyse festgestellt werden.^{32,42,45}

Für die real time PCR wird unter anderem der Farbstoff SYBR Green verwendet. SYBR Green wird bei 488 nm angeregt und emittiert bei 520 nm.^{11,43,46,47}

2.5.5 Multiplexing

Beim Multiplexing werden in einer PCR-Analyse mehrere Primerpaare eingesetzt. In dieser Masterarbeit sollte durch Multiplexing der Primerpaare das Unterscheidungspotenzial der HRM-Analysen zwischen den Amplikons für Granatapfel und für andere Pflanzenspezies erhöht werden, indem Heteroduplexe gebildet werden, die sich in ihrem Schmelzverhalten unterscheiden.^{46,48}

2.6 Entwerfen der Primer

Primer sind synthetische DNA-Oligonukleotide, welche komplementär zur Templat-Sequenz sind und den DNA-Abschnitt, der amplifiziert werden soll, begrenzen. Besonders die Primersequenz am 3' Ende soll komplementär zum DNA-Templat sein, da dort die Polymerase ansetzt.⁴²

Die Länge der verwendeten Oligonukleotide soll zwischen 16-50 Basenpaaren liegen, wobei für kurze DNA-Template kürzere Primer mit bis zu 28 Basenpaaren verwendet werden. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer hängt unter anderem von der Länge und Sequenz der Primer ab und lässt sich über Formel 1 abschätzen. Idealerweise besitzen die Oligonukleotide eines Primerpaares ähnliche Schmelztemperaturen, die im Bereich von 50 °C bis 62 °C liegen. Die Annealingtemperatur für Primer liegt etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur, sollte aber experimentell optimiert werden.^{42,43,49}

$$T_m = 4\text{ °C} \cdot (G + C) + 2\text{ °C} \cdot (A + T)$$

Formel 1: Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur (T_m) für Primer^{42,43}

Komplementäre Sequenzen innerhalb und zwischen den Oligonukleotiden eines Primerpaares sollten vermieden werden, da durch Homo- oder Heterodimere unspezifische Nebenprodukte entstehen können.^{42,43,49}

Der Guanin-Cytosin-Gehalt der Primer soll zwischen 40 und 60 % liegen. Außerdem sollen Primer nicht mit einem Thymin enden, da sonst häufig Basenfehlpaarungen auftreten. Repetitive Einheiten von Guanin oder Cytosin am 3' Ende des Primers sollen vermieden werden.^{42,49}

2.7 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)

Bei der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse wird doppelsträngige DNA durch Temperaturerhöhung zu einzelsträngiger DNA aufgeschmolzen. Die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der doppelsträngigen DNA beginnen sich zu lösen, bis die DNA einzelsträngig vorliegt. Durch Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in doppelsträngige DNA interkaliert, kann das Schmelzen der DNA als Abnahme des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Die abnehmende Fluoreszenz wird als Funktion der Temperatur gemessen und als Schmelzkurve dargestellt.^{11,45–47,50}

HRM ist eine einfache und kostengünstige Methode, die mit einer PCR kombiniert werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, dass das PCR-Produkt intakt bleibt und nach der Analyse weiter untersucht werden kann. Voraussetzung für eine PCR-HRM Analyse ist ein Thermocycler mit entsprechender Hochauflösung und ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff.^{11,46,47,51}

Um auch kurze PCR-Produkte nachweisen zu können, ist es notwendig, einen Überschuss an Fluoreszenzfarbstoff einzusetzen. Herkömmliche Fluoreszenzfarbstoffe, wie SYBR Green, inhibieren die PCR unter diesen Bedingungen (> 50 ng). Daher werden sättigende Farbstoffe wie Eva Green verwendet, die auch bei hohen Konzentrationen nicht hemmend auf die DNA-Polymerase wirken.^{11,43,46,47}

Die Länge des Amplikons beeinflusst die Sensitivität der HRM-Analyse. Daher sollte das Amplikon nicht länger als 300 bp sein. Je länger das Amplikon, umso geringer ist der Einfluss einzelner Unterschiede in der Sequenz auf das Schmelzverhalten des PCR-Produktes.¹¹

Das Schmelzprofil des PCR-Produkts hängt vom Guanin-Cytosin Gehalt, von der Länge und von der Sequenz des DNA-Fragmentes ab. Die Wechselwirkung zwischen Guanin-Cytosin ist mit drei Wasserstoffbrücken stabiler als bei Adenin-Thymin mit zwei Wasserstoffbrücken. Daher ist die Schmelztemperatur eines Templates mit einem hohen Anteil an Guanin und Cytosin höher. Die Schmelztemperatur ist definiert als die Temperatur, bei der 50 % der DNA zu Einzelsträngen denaturiert ist. Misst man die Abnahme des Fluoreszenzsignales beim Schmelzen, ist die Schmelztemperatur als Wendepunkt der abnehmenden Fluoreszenz sichtbar. Da die Schmelztemperatur unter anderem von der Länge und Sequenz des PCR-Produktes abhängt, lassen sich mit HRM-Analysen bereits geringe Unterschiede in der Sequenz und Länge der PCR-Produkte feststellen.^{11,45–47,51}

2.7.1 Darstellung der Schmelzkurven

Für die Auswertung werden die Messpunkte zu Schmelzkurven gefittet. Um die Schmelzkurven vergleichen zu können, werden die Daten prozessiert.

2.7.1.1 Normalisieren

Um Schmelzkurven zu vergleichen und auszuwerten, wird das Fluoreszenzsignal normalisiert. Da die absolute Fluoreszenz bei verschiedenen Analysen variiert, ist es notwendig, das Fluoreszenzsignal zu normieren. Dazu wird für jede Analyse das Signal der doppelsträngigen DNA auf 100 % gesetzt, das Signal für einzelsträngige DNA am Ende des Schmelzvorganges auf 0 %.^{11,46,50}

2.7.1.2 Kurven überlagern

Um Unterschiede zwischen Schmelzkurven besser darzustellen, werden die Kurven im hohen und niedrigen Temperaturbereich überlagert. So können Temperaturvariationen zwischen den einzelnen Messungen ausgeglichen und Unterschiede besser erkannt werden.⁴⁶

2.7.1.3 Schmelzprofile

Eine Möglichkeit, Unterschiede im Fluoreszenzsignal darzustellen und das Hintergrundsignal zu reduzieren, ist die 1. Ableitung mit einem Savitzky-Golay Polynom. Die Darstellung als negative 1. Ableitung zeigt den Wendepunkt im Fluoreszenzsignal als Kurvenmaximum und erleichtert die Bestimmung der Schmelztemperatur.^{46,50}

2.7.1.4 Differenz-Plots

Um die Kurvenform von HRM-Daten zu analysieren und kleine Unterschiede im Kurvenverlauf darzustellen, eignen sich Differenz-Plots. In Differenz-Plots werden die Unterschiede der Schmelzkurven bezüglich einer Referenzkurve dargestellt. Diese Art der Darstellung wird häufig für die Unterscheidung von homo- und heterozygoten Proben verwendet.^{46,50}

2.8 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese kann die Größe von Nukleinsäurefragmenten abgeschätzt werden. Bei der Gelelektrophorese werden geladene Teilchen nach ihrer Größe aufgetrennt. Geladene Teilchen wandern im elektrischen Feld zum entsprechenden Gegenpol und werden proportional zu ihrer Ladung angezogen. Diesem Effekt entgegen wirkt der Siebeffekt des Gels oder Trägermaterials. Um DNA-Moleküle zu trennen, wird häufig Agarose verwendet.^{32,52}

2.8.1 Agarose Gelelektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen hergestellt wird. Gele aus Agarose sind großporig und eignen sich daher für die Analyse von DNA-Molekülen. Die Agarosekonzentration wird so angepasst, dass die erwarteten Fragmentgrößen aufgelöst werden können. Agarose wird in Wasser durch Temperaturerhöhung gelöst und geliert beim Abkühlen. Die Proben werden mit einem Ladepuffer in die Taschen des Gels eingebracht. Durch Anlegen einer Spannung von 50-150 V wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Durch die Poren im Agarosegel können kleine DNA-Fragmente schneller diffundieren als große und werden räumlich aufgetrennt.^{32,52}

Zur Größenbestimmung der Nukleinsäurefragmente wird ein Größenstandard verwendet. Diese kommerziellen Marker bestehen aus DNA-Fragmenten mit einer definierten Länge. Für die Detektion der DNA werden Fluoreszenzfarbstoffe, wie Ethidiumbromid oder GelRed, verwendet. GelRed erzielt eine ähnliche Sensitivität wie Ethidiumbromid, ist allerdings nicht membrangängig und somit weniger gesundheitsgefährdend als Ethidiumbromid.^{32,52}

3 Experimentelles

3.1 Arbeiten mit DNA

Beim Arbeiten mit DNA war es wichtig, Kontaminationen durch Fremd-DNA zu vermeiden. Daher wurden Oberflächen und Laborutensilien mit DNA-Exitus-Spray gereinigt. Um das Risiko einer unbeabsichtigten Kontamination zu minimieren, wurden die Arbeitsschritte auf drei Laboratorien (A, B und C) aufgeteilt. In Labor A wurde die DNA extrahiert. Labor B war frei von DNA, es diente dazu, den PCR Mastermix vorzubereiten. In Labor C wurde die DNA zum Mastermix hinzugefügt. Die Abzüge in den Laboren B und C wurden mit DNA-Exitus-Spray und UV-Licht dekontaminiert. Für die Aufbewahrung von DNA-Kits wurde ein DNA-freier Kühlschrank verwendet, DNA-Extrakte, Proben und PCR-Produkte wurden in einem weiteren Kühlschrank aufbewahrt.

3.2 Proben

Die untersuchten Proben wurden von Märkten oder Supermärkten in Österreich, Deutschland, Italien und Belgien bezogen. Pflanzenproben wurden mit einem Mörser und Stößel, einer Kugelmühle oder einem Tissue Disruptor homogenisiert und anschließend die DNA extrahiert. Die verwendeten Proben sind im Anhang I (Seite I) aufgelistet. Sie sind in Granatapfelproben (Gr.), Pflanzenproben von Spezies, die häufig zur Verfälschung verwendet werden und Lebensmittelproben eingeteilt.

Für die Validierung der PCR-HRM Assays wurde DNA aus Mischungen von verschiedenen Proben extrahiert. Für eine Mischung aus Traube und Granatapfel im Verhältnis 1:1 (w/w) wurden Granatapfel und Traube getrennt homogenisiert, jede Probe in gleicher Menge eingewogen und anschließend DNA extrahiert. Mischungen aus Granatapfelsaft und Fruchtsaft von Spezies, die zur Verfälschung eingesetzt werden, wurden im Verhältnis 95:5, 90:10, 75:25 oder 50:50 (w/w) hergestellt. Dafür wurden die Fruchtsäfte im entsprechenden Verhältnis eingewogen und anschließend die DNA extrahiert.

3.3 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden die kommerziellen DNA-Kits QIAamp® DNA Mini Kit, NucleoSpin® Plant II Mini Kit und NucleoSpin® Plant II Midi Kit, sowie die CTAB-Methode verwendet (siehe Tabelle 2). Um die DNA-Extraktion zu optimieren, wurden Parameter wie die Einwaage, die Art der Homogenisierung, die Lysedauer, das Puffersystem, die Zugabe von Proteinase K und die PVP-Konzentration variiert.

Tabelle 2: Getestete Extraktionsmethoden

Abkürzung	Name	Hersteller
Kit 1	QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen
CTAB	CTAB-Extraktion	
Kit 2	NucleoSpin® Plant II Kit Midi	Macherey-Nagel
Kit 3	NucleoSpin® Plant II Kit	Macherey-Nagel

3.3.1 DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Mini Kit

0,0250 g der homogenisierten Probe wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß eingewogen. Für die Lyse wurden 3,60 mg PVP in 180 µL ATL Puffer gelöst, mit 20 µL Proteinase K (600 mAU/mL) zur Probe aufgegeben und gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Thermomixer bei 56 °C für 135 Minuten bei 1400 rpm Schüttelfrequenz. Zusätzlich wurde das Lysat in Zeitabständen von 30 Minuten gevortext. Am Ende der Inkubation wurde das Lysat zentrifugiert, 20 µL Ribonuklease A (c=20-40 mg/mL) hinzugefügt, gevortext und bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert. Dann wurden 200 µL AL-Puffer hinzugegeben, gevortext und für 10 Minuten bei 70 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Ethanol (96 %) hinzugefügt, das Lysat im Tube gevortext und kurz zentrifugiert. Das Lysat wurde auf eine QIAamp Mini Spin Column mit einem 2 mL Reaktionsgefäß aufgetragen und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Um die an die Säule gebundene DNA aufzureinigen, wurden 500 µL AW 1 Puffer auf die Säule aufgetragen und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Anschließend wurde die Säule mit 500 µL AW 2 Puffer beladen und für 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert.

Dieser Waschschrift wurde wiederholt und anschließend die Säule für 1 Minute bei 14000 rpm in der Zentrifuge getrocknet.

Für die Elution der DNA wurde die Säule auf ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben, mit 100 µL AE Puffer versetzt, bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die extrahierte DNA wurde bei -20 °C gelagert. Wurde bei der Lyse ein Volumen über 1,5 mL erreicht, wurde das Lysat auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt.

3.3.1.1 Optimierung der DNA-Extraktion

Um die DNA-Extraktion zu optimieren, wurden folgende Parameter für Granatapfelproben (Gr. 01) verändert:

- 1.) Variation der Einwaage (0,0250 g, 0,1000 g, 0,1250 g, 0,3000 g oder 0,5000 g)
- 2.) Zum Homogenisieren der Probe wurde der Mörser mit Stößel oder die Kugelmühle mit Plastik- oder Eisenkugeln getestet
- 3.) Das Volumen an Lysepuffer wurde verändert (180 µL ATL Puffer + 20 µL Proteinase K oder 900 µL ATL Puffer + 100 µL Proteinase K)
- 4.) Die Lysedauer wurde verändert (135 min, 240 min, Lyse über Nacht)
- 5.) Feste Bestandteile wurden nach der Lyse abzentrifugiert

3.3.2 DNA-Extraktion mittels der CTAB-Methode

Für die CTAB-Methode wurden folgende Pufferlösungen hergestellt:

- 1.) 1x Extraktionspuffer

Der Extraktionspuffer enthielt 0,02 M EDTA, 0,1 M TRIS, 2 % (w/v) CTAB und 1,4 M NaCl. Für die Herstellung des Puffers wurden in einem 1000 mL Becherglas 7,44 g EDTA, 12,10 g TRIS, 20,00 g CTAB und 81,90 g NaCl eingewogen und die Reagenzien in 800-900 ml Wasser unter Rühren bei 50 °C aufgelöst. Mit 4 M Salzsäure wurde der pH-Wert der Lösung auf 8,0 eingestellt und in einem Messkolben überführt. Mit Wasser wurde der Puffer auf 1000 mL aufgefüllt.

- 2.) Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 (v/v) gemischt.

- 3.) Präzipitationslösung

Für die Präzipitationslösung wurden 0,5000 g CTAB und 0,2340 g NaCl in 100 mL Wasser aufgelöst.

- 4.) 10x RNase-Puffer

Der RNase-Puffer bestand aus 3 M NaCl, 0,1 M TRIS und 0,05 M EDTA. Für die Herstellung des RNase-Puffers wurden in einem 100 mL Becherglas 17,60 g NaCl, 1,21 g TRIS und 1,86 g EDTA eingewogen und in 80 mL Wasser aufgelöst. Mit 4 M Salzsäure wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und der Puffer im Messkolben auf 100 mL aufgefüllt.

Extraktion der DNA

2,0000 g Probe wurden in ein 50 mL Reaktionsgefäß eingewogen und mit 10 mL 1x Extraktionspuffer und 80 µL Proteinase K versetzt. Die Lyse erfolgte im Trockenschrank bei 50 °C für 6 Stunden. Für eine bessere Lyse wurden die Proben bei einer Schüttelfrequenz von 300 rpm geschüttelt. Das Lysat wurde im Kühlschrank gelagert.

Für die DNA-Extraktion wurden in einem 2 mL Reaktionsgefäß 600 µL Chloroform/Isoamylalkohol vorgelegt, 1 mL des Lysats aufgegeben und für 30 Sekunden gevortext. Dann wurde das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 14600 rpm zentrifugiert. In einem 2 mL Reaktionsgefäß wurden 1320 µL CTAB Präzipitationslösung vorgelegt und 660 µL des Überstands aufgegeben. Das Reaktionsgefäß wurde einmal invertiert und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 14600 rpm. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen.

Die RNase A Lösung wurde auf 10 mg/mL verdünnt. 450 µL 1,2 M Natriumchloridlösung und 50 µL RNase-Puffer wurden gemischt und 5 µL RNase A (10 mg/mL) aufgegeben, dann wurden 505 µL dieses Gemisches zum Rückstand gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 56 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler wurde das Extraktionsgemisch kurz abzentrifugiert, 500 µL Chloroform/Isoamylalkohol aufgegeben und gevortext. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 14600 rpm. In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 400 µL Isopropanol vorgelegt und 400 µL des wässrigen Überstands aufgegeben. Das Reaktionsgefäß wurde einmal invertiert und für 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 14600 rpm. Der Überstand wurde abgegossen und zum Rückstand 500 µL Ethanol (70 % (v/v)) pipettiert. Das Gemisch wurde für 30 Sekunden gevortext, dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 14600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgehoben und der Rückstand im Thermomixer für 5 Minuten bei 60 °C mit offenem Deckel getrocknet.

100 µL RNase freies Wasser wurden zum Rückstand gegeben und im Thermomixer für 20 Minuten bei 70 °C und 1000 rpm Schüttelfrequenz gelöst. Das DNA-Extrakt wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.3 DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin® Plant II Midi Kit

Für die DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin® Plant II Midi Kit wurden 0,4000 g homogenisierte Probe auf zwei 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt und:

- a) je 850 µL PL1 Puffer und 12,5 µL RNase A aufgegeben, gemischt und für 150 Minuten bei 65 °C und 600 rpm Schüttelfrequenz im Thermomixer inkubiert.
- b) je 750 µL PL2 Puffer und 12,5 µL RNase A aufgegeben, gemischt und für 150 Minuten bei 65 °C und 600 rpm Schüttelfrequenz im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden je 100 µL PL3 Puffer aufgegeben, gemischt und für 5 Minuten auf Eis oder in einer Kühlbox gekühlt.

Das Lysat beider Reaktionsgefäße wurde auf einen NucleoSpin® Filter Midi aufgetragen und für 10 Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 2,3 mL PC Puffer gemischt und für 30 Sekunden gevortext. Falls das Eluat einen weißen Niederschlag bildete, wurde der Überstand abgehoben, bevor er mit PC Puffer gemischt wurde. Das Gemisch wurde auf einer NucleoSpin® Plant II Midi Säule gegeben und für 2 Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

Um die DNA aufzureinigen, wurde 1 mL PW1 Puffer auf die Säule aufgetragen, für 2 Minuten bei 4500 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Dann wurden 3 mL PW2 Puffer aufgegeben, die Säule für 2 Minuten bei 4500 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurde 1 mL PW2 Puffer aufgegeben, die Säule für 8 Minuten bei 4500 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Um die Säule zu trocknen, wurde sie auf ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben und für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert.

Der PE Puffer wurde auf 65 °C erwärmt und 100 µL auf die Säule aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 65 °C wurde die DNA durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 4500 g eluiert. Anschließend wurden ein zweites Mal 100 µL PE Puffer auf die Säule aufgetragen und der letzte Schritt wiederholt. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.3.1 Optimierung der DNA-Extraktion

Um die DNA-Extraktion zu optimieren, wurden folgende Parameter verändert:

- 1.) PL1 und PL2 Lysepuffer wurden getestet
- 2.) Mischen der Probe durch vortexen oder invertieren
- 3.) Lyse und DNA-Extraktion im Thermomixer und Wasserbad oder Trockenschrank

3.3.4 DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin® Plant II Kit

Für die DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin® Plant II Kit wurden 0,1000 g homogenisierte Probe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß eingewogen. Für Lebensmittelproben wurde nach der Optimierung der Methode eine Probenmenge von 0,3000 g und die doppelte Menge an PL2 Puffer, RNase A, PL3 Puffer und PC Puffer verwendet.

Für die Zellyse wurden:

- a) 400 µL PL1 Puffer und 10 µL RNase A aufgegeben, gemischt und für 150 Minuten bei 65 °C und 600 rpm Schüttelfrequenz im Thermomixer inkubiert.
- b) 300 µL PL2 Puffer und 10 µL RNase A aufgegeben, gemischt und für 150 Minuten bei 65 °C und 600 rpm Schüttelfrequenz im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 75 µL PL3 Puffer aufgegeben, gemischt und für 5 Minuten auf Eis oder in einer Kühlbox gekühlt.

Das Lysat wurde auf einen NucleoSpin® Filter aufgetragen und für 2 Minuten bei 11000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 450 µL PC Puffer gemischt und gevortext. Falls das Eluat einen weißen Niederschlag bildete, wurde der Überstand abgehoben, bevor er mit PC Puffer gemischt wurde. 700 µL dieses Gemisches wurden auf eine NucleoSpin® Plant II Säule gegeben und für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Dieser letzte Schritt wurde so lange wiederholt, bis das gesamte Volumen auf die Säule aufgetragen war. Um die DNA aufzureinigen, wurden 400 µL PW1 Puffer aufgegeben, für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Dann wurden 700 µL PW2 Puffer aufgegeben, für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurden 200 µL PW2 Puffer aufgegeben, für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Um die Säule zu trocknen, wurde sie auf ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert.

Der PE Puffer wurde auf 65 °C erwärmt und 25 µL auf die Säule aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 65 °C im Thermomixer wurde die DNA durch Zentrifugation für 1 Minute bei 11000 g eluiert. Anschließend wurden ein zweites Mal 25 µL PE Puffer auf die Säule aufgetragen und die Elution wiederholt. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.4.1 Optimierung der DNA-Extraktion

Um die DNA-Extraktion zu optimieren, wurden folgende Parameter verändert:

- 1.) Lysepuffer PL1 und PL2 wurden getestet
- 2.) Variation der PVP-Konzentration (0,0 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 % (w/v))
- 3.) Verwendung von 20 µL Proteinase K
- 4.) Homogenisieren der Probe mit dem Tissue Disruptor

3.4 UV-VIS Spektroskopische und fluorometrische Messungen

3.4.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde das Fluorometer Qubit™ 4 mit dem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit verwendet. Das Kit eignete sich, um DNA-Mengen von 0,2-100 ng zu bestimmen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte über eine Zweipunktkalibrierung mit 2 Standardlösungen S1 und S2. Für die Qubit™ Arbeitslösung wurden pro Probe 199 µL Qubit™ Puffer und 1 µL Qubit™ Farbstoff gemischt. 190 µL der Arbeitslösung wurden mit 10 µL des Standards in einem Qubit™ Assay Reaktionsgefäß gemischt. 1-20 µL des DNA-Extraktes wurden mit 180–199 µL Arbeitslösung in einem Qubit™ Assay Reaktionsgefäß gemischt, sodass das Endvolumen 200 µL betrug. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde die DNA-Konzentration bestimmt.

3.4.2 Bestimmung der Reinheit der DNA

Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, wurde das Spektrometer Nanodrop 2000c verwendet. Es wurden je 1,0 µL des DNA-Extraktes auf den Messplatz des Nanodrop Spektrometers pipettiert und ein Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 220-250 nm aufgezeichnet. Um Störsignale zu unterdrücken, erfolgte eine Hintergrundkorrektur mit dem entsprechenden Elutionspuffer für die jeweilige Extraktionsmethode. Die Messungen wurden im Doppelansatz durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, wurde das Verhältnis A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} bestimmt. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8-2,0 liegen. Das Verhältnis A_{260}/A_{230} sollte höher als 1,8 sein. ^{27,36,37}

3.5 Die PCR-HRM Analyse

Für die PCR wurde das EpiTect® HRM PCR Kit verwendet. Dieses enthielt RNase freies Wasser und 2x EpiTect HRM Mastermix mit HotStar Taq® Plus DNA-Polymerase, MgCl₂, dNTPs und EvaGreen® als Fluoreszenzfarbstoff.

Für die PCR wurden die DNA-Extrakte auf 0,1 ng/µL verdünnt. Jedes DNA-Extrakt wurde im Doppelansatz analysiert.

Die Primer wurden von Sigma Aldrich synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in RNase freiem Wasser gelöst ($c = 100 \mu\text{M}$) und für die PCR auf $c = 10 \mu\text{M}$ verdünnt. Die Annealing-Temperatur und die geeignete Primerkonzentration wurden experimentell optimiert. Dabei wurde eine Primerkonzentration von $c = 0,2 \mu\text{M}$ (Ansatz 1) und $c = 0,4 \mu\text{M}$ (Ansatz 2) getestet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR-HRM Analyse

Komponente	Volumen für Ansatz 1 [μL]	Volumen für Ansatz 2 [μL]
HRM Master Mix (2x)	10,0	10,0
Forward Primer (c = 10 μ M)	0,4	0,8
Reverse Primer (c = 10 μ M)	0,4	0,8
RNase freies Wasser	7,2	6,4
DNA (c = 0,1 ng/ μ L)	2,0	2,0

3.5.1.1 Multiplexing

Beim Multiplexing wurden in einer PCR-Analyse zwei Primerpaare kombiniert. Dabei wurde eine Primerkonzentration von c = 0,4 μ M verwendet und der Reaktionsansatz, wie in Tabelle 4 beschrieben, pipettiert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für das Multiplexing

Komponente	Volumen für Ansatz 2 [μL]
HRM Master Mix (2x)	10,0
Forward Primer 1 (c = 10 μ M)	0,8
Reverse Primer 1 (c = 10 μ M)	0,8
Forward Primer 2 (c = 10 μ M)	0,8
Reverse Primer 2 (c = 10 μ M)	0,8
RNase freies Wasser	4,8
DNA (c = 0,1 ng/ μ L)	2,0

3.5.2 Thermocycler und Temperaturprogramm für die PCR-HRM

Die PCR wurde an den Thermocyclern Rotor-Gene Q von Qiagen und QuantStudio 5 von ThermoFisher Scientific durchgeführt. Durch die Verwendung von EvaGreen als Fluoreszenzfarbstoff konnte die HRM direkt nach der PCR durchgeführt werden.

3.5.2.1 QuantStudio 5

Die Annealing-Temperatur für die Primer wurde durch PCR-Läufe am QuantStudio 5 optimiert. Für die PCR-HRM Analysen wurden verschließbare 0,2 mL Reaktionsgefäße verwendet. Am QuantStudio 5 konnten bis zu 6 Annealing-Temperaturen gleichzeitig eingestellt werden. Das Temperaturprogramm für die PCR ist in Tabelle 5 aufgelistet. Die Amplifikations- und Schmelzkurven wurden mit der Software QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.5 ausgewertet.

Tabelle 5: Temperaturprogramm für Analysen am Thermocycler QuantStudio 5

	T[°C]	Zeitdauer	
Initialisierung	95	5 min	
Denaturierung	95	10 sec	} 50 Zyklen
Annealing	Gradient	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Finale Elongation	72	10 min	
Denaturierung	95	1 min	
Hybridisierung	40	1 min	
HRM	65 - 95	0,05 °C / s	

3.5.2.2 Rotor-Gene Q

Für Analysen mit dem Rotor-Gene Q Thermocycler wurde die PCR in Strip-Reaktionsgefäßen mit Deckel angesetzt. Für jedes Primerpaar wurde die entsprechende Annealing-Temperatur verwendet (siehe Tabelle 46). Die Amplifikations- und Schmelzkurven wurden mit der Rotor-Gene Q Software 2.3.1 von ThermoFisher Scientific analysiert.

Tabelle 6: Temperaturprogramm für Analysen am Thermocycler Rotor-Gene Q

	T[°C]	Zeitdauer	
Initialisierung	95	5 min	
Denaturierung	95	10 sec	} 50 Zyklen
Annealing	*	30 s	
Extension	72	30 s	
Finale Elongation	72	10 min	
Denaturierung	95	1 min	
Hybridisierung	40	1 min	
HRM	65 - 95	0,1 °C / 2s	

3.5.3 Entwerfen der Primer

Für Regionen, die in der Literatur als Barcode-Loci für Pflanzen genannt wurden (siehe Kapitel 1.3), wurden anhand von Sequenzen aus einer Datenbank Primer entworfen. Für das Entwerfen der Primer wurden DNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank verwendet, die entsprechenden Accession Numbers sind in Kapitel 3.5.3.1 aufgelistet. Die Sequenzen wurden aus der NCBI Datenbank im Dateiformat fasta exportiert. Mit der Software Mega7 wurde ein Alignment der Sequenzen mit dem Programm ClustalW durchgeführt, um geeignete Regionen für Primer zu finden. Die Primer wurden mit dem Programm PyroMark Assay Design 2.0 entworfen. Dieses Programm wies den Primern Score-Werte zu, die bewerteten, wie gut die gewählten Primer sich für die PCR eigneten.

Die Primer wurden so gewählt, dass sie in einem konservierten Sequenzabschnitt für verschiedene Pflanzenarten lagen und gleichzeitig einen hohen Score-Wert aufwiesen.

Mit dem Webserver Oligo Calc⁵³ wurde die Schmelztemperatur der Primer bei einer Salzkonzentration von 50 mM berechnet, um die Annealing-Temperatur abschätzen zu können. Außerdem wurden anhand des Webserver RNAfold⁵⁴ mögliche störende Sekundärstrukturen der DNA berechnet. Mit dem Webserver OligoAnalyzer⁵⁵ wurde die wahrscheinliche Anzahl der Homo- und Heterodimere berechnet.

Mittels Screening wurden Primer ausgewählt, die für Granatapfel und für häufig zur Verfälschung verwendete Spezies zu PCR-Produkten führten, die sich in ihrem Schmelzverhalten unterschieden.

3.5.3.1 Accession Numbers der Sequenzen für das Entwerfen der Primer

In Tabelle 7 bis Tabelle 11 sind die Accession Numbers aufgelistet, die für das Entwerfen der entsprechenden Primer (siehe Kapitel 4.2) verwendet wurden.

Tabelle 7: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die ITS-Region verwendet wurden

Lateinischer Name	Deutscher Name	Accession Number
<i>Punica granatum</i>	Granatapfel	JX911337.1, JQ740191.1 JX911341.1, JX911355.1 JX911352.1, JX911353.1 JX911338.1, JX911354.1 JX911350.1, JX911346.1 JX911347.1, JX911348.1 JQ740193.1, JX911339.1 JQ740192.1, JX911356.1
<i>Beta vulgaris</i>	Rote Beete	KP748082.1, KP748141.1 KP748145.1, KP748080.1
<i>Citrus sinensis</i>	Orange	GQ225856.1, JQ990165.1 FJ641942.1, FJ641940.1
<i>Daucus carota</i>	Karotte	AY552527.1, MF185182.1 MF185152.1
<i>Malus domestica</i>	Apfel	KU288707.1, MH633845.1 MH633847.1, MH633851.1 MH633848.1, EU150074.1
<i>Prunus avium</i>	Vogelkirsche	HQ332169.1, HQ332168.1 HQ332167.1, AF318737.1 EF211081.1, HM856805.1
<i>Prunus cerasus</i>	Sauerkirsche	AF318729.1, EF211080.1 KX711739.1
<i>Prunus domestica</i>	Pflaume	AF318713.1
<i>Prunus persica</i>	Pfirsich	DQ006272.1, DQ006273.1 DQ006275.1, DQ006276.1 DQ003549.1, DQ006274.1 DQ003548.1
<i>Pyrus communis</i>	Birne	JQ392467.1, JQ392466.1 EU150087.1, EU150012.1 EU150011.1, EU150010.1
<i>Ribes rubrum</i>	Rote Johannisbeere	AF426321.1, AF426323.1
<i>Sambucus nigra</i>	Schwarzer Holunder	DQ521258.1, KJ188949.1
<i>Vaccinium corymbosum</i>	Amerikanische Heidelbeere	AY274570.1 AF419778.1
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Großfrüchtige Moosbeere (Cranberry)	FJ010588.1 AF382730.1
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Europäische Heidelbeere	KM209458.1, GU361894. AF382732.1

Tabelle 8: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die *psbE-petL*-Region verwendet wurden

Bezeichnung	Accession Number
<i>Punica granatum</i> cultivar Bihaste	JX463059.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Veshik Malas	JX463060.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Shirin Ferdos	JX463061.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Shirin Kashmar	JX463062.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Meikhosh Nazok Shahrababak	JX463063.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Bihasteye Sangam Shirin	JX463064.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Anbari Kashan	JX463065.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Poost Sefid Shirin	JX463066.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Jangalhayeh Sefid	JX463067.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Jangalhayeh Asalem	JX463068.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Jangalhayeh Homeyeh Gorgan	JX463069.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Jangalhayeh Noor Ta Mahmood Abad	JX463070.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Jangalhayeh Gheshlagh	JX463071.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Ghermez Zinati	JX463072.1
<i>Punica granatum</i> cultivar Shirin Poost Nazok Darjazin	JX463073.1

Tabelle 9: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die *rbcL*-Region verwendet wurden

Lateinischer Name	Deutscher Name	Accession Number
<i>Punica granatum</i>	Granatapfel	JQ730670.1, JQ730671.1 JQ730672.1, HG765073.1 HG765074.1, HG765075.1 HG765076.1, L10223.1 KY988325.1, JQ025080.1 GQ436656.1
<i>Aristotelia chilensis</i>	Maqui Beere	AF307903.1, AF291939.1
<i>Aronia melanocarpa</i>	Schwarze Apfelbeere	JQ391240.1, MG247813.1
<i>Beta vulgaris</i>	Rote Beete	AY270065.1, JN890993.1
<i>Citrus sinensis</i>	Orange	AB505951.1, GQ436746.1
<i>Daucus carota</i>	Karotte	KJ204327.1, KM360751.1
<i>Malus domestica</i>	Apfel	KM360872.1, MH536583.1
<i>Morus nigra</i>	Schwarze Maulbeere	GU145572.1, JX571868.1
<i>Prunus avium</i>	Vogelkirsche	MG248789.1, MG247971.1
<i>Prunus domestica</i>	Pflaume	MG249824.1, HQ235431.1
<i>Prunus persica</i>	Pfirsich	JF943754.1, AF411493.1
<i>Pyrus communis</i>	Birne	JQ391389.1, JQ391382.1
<i>Ribes rubrum</i>	Rote Johannisbeere	HQ590241.1, KM360958.1
<i>Sambucus nigra</i>	Schwarzer Holunder	KJ773864.1, MG224155.1
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Großfrüchtige Moosbeere (Cranberry)	L12625.2, MG221374.1
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Europäische Heidelbeere	HF572812.1, KF163411.1
<i>Vitis vinifera</i>	Traube	KY593930.1, KY593929.1

Tabelle 10: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die *rpoC1*-Region verwendet wurden

Lateinischer Name	Deutscher Name	Accession Number
<i>Punica granatum</i>	Granatapfel	GQ436186.1, JN114994.1
<i>Prunus persica</i>	Pfirsich	GQ436128.1, JN114992.1
<i>Vitis vinifera</i>	Traube	JN115008.1
<i>Daucus carota</i>	Karotte	EU531582.1, HQ593968.1
<i>Ribes rubrum</i>	Rote Johannisbeere	HQ594108.1, FJ395751.1
<i>Sambucus nigra</i>	Schwarzer Holunder	FJ395837.1, KC584909.1
<i>Sambucus canadensis</i>	Kanadischer Holunder	HQ594124.1

Tabelle 11: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die *trnH-psbA*-Region verwendet wurden

Lateinischer Name	Deutscher Name	Accession Number
<i>Punica granatum</i>	Granatapfel	JQ730676.1, JQ730675.1 JQ730674.1, JX463058.1 JX463057.1, JX463056.1 JX463055.1, JX463054.1 JX463053.1, JX463052.1 JX463051.1, JX463050.1 JX463049.1, JX463048.1 JX463047.1, JX463046.1 JX463045.1, JX463044.1
<i>Beta vulgaris</i>	Rote Beete	KP747741.1, KP747747.1
<i>Citrus sinensis</i>	Orange	KY488167.1
<i>Daucus carota</i>	Karotte	HQ596665.1
<i>Malus domestica</i>	Apfel	J395455.1
<i>Prunus avium</i>	Vogelkirsche	MF431607.1
<i>Prunus domestica</i>	Pflaume	FN675833.1
<i>Prunus cerasus</i>	Sauerkirsche	HQ188758.1
<i>Prunus persica</i>	Pfirsich	JN046657.1, GQ435268.1 JN046658.1, KP095862.1 MF096954.1, JN046660.1 KP095861.1
<i>Pyrus communis</i>	Birne	JQ390743.1
<i>Ribes rubrum</i>	Rote Johannisbeere	AY138108.1
<i>Sambucus nigra</i>	Schwarzer Holunder	KC584960.1, HG765013.1
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Europäische Heidelbeere	HF572793.1
<i>Vitis vinifera</i>	Traube	HQ108335.1, HQ108334.1 HQ108333.1, HQ108332.1 HQ108331.1, HQ108329.1 HQ108328.1, HQ108327.1 HQ108321.1, HQ108322.1 KY612264.1, KY612265.1 KY612266.1, HQ108320.1 KY612263.1, HQ656475.1 FR726094.1, FR726029.2

Tabelle 12: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die trnL-Region verwendet wurden

Lateinischer Name	Deutscher Name	Accession Number
<i>Punica granatum</i>	Granatapfel	AY905482.1 AY905483.1
<i>Vitis vinifera</i>	Traube	EF179097.1 KJ722642.1 KJ722641.1 KJ722625.1
<i>Malus domestica</i>	Apfel	JX122471.1 KF486660.1
<i>Prunus persica</i>	Pfirsich	JQ034183.1 AF348560.1

3.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in der BioRad Mini Sub GT Kammer durchgeführt. 50x TAE Puffer wurde im Verhältnis 1:50 zu 1x TAE Puffer verdünnt. Für ein 2 % (w/v) Agarosegel wurden 2,00 g Agarose in 100 mL 1x TAE Puffer erhitzt, bis eine klare Lösung vorlag. 10 µL des Fluoreszenzfarbstoffes GelRed wurden zu der Lösung gegeben. Die Agaroselösung wurde in den Gelschlitten gegossen und mit einem Gelkamm die Taschen geformt. Nach 30 Minuten war das Gel fest und der Kamm konnte entfernt werden. Das Gel wurde in eine Laufkammer überführt und diese mit 1x TAE Puffer befüllt. Die Taschen wurden mit PCR-Produkten beladen. Als Ladepuffer wurde 5x Nucleic Acid Sample Loading Buffer von BioRad verwendet. 5 µL PCR-Produkt und 1,25 µL Ladepuffer wurden gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine 25 bp DNA Ladder von ThermoFisher Scientific verwendet. 0,9 µL der DNA Ladder wurden mit 0,9 µL Wasser und 0,5 µL Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als zweiter Größenmarker wurden 5 µL des Quick-Load Purple 1kb Plus DNA Ladder von BioLabs aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für eine Stunde bei 120 V durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über einen UV-Transilluminator bei 312 nm.

4 Ergebnisteil

4.1 Optimierung der DNA-Extraktion

Um eine effiziente Amplifikation der DNA zu ermöglichen, war eine hohe Qualität und Reinheit der extrahierten DNA ein wesentlicher Aspekt. Für die Extraktion von DNA aus frischen Pflanzenproben und Lebensmitteln wurden drei kommerzielle DNA-Kits und die CTAB-Methode getestet und optimiert. Dabei gestaltete sich die DNA-Extraktion aus polyphenolreichen Pflanzen, wie z.B. dem Granatapfel schwierig (siehe Kapitel 1.1.3). Auch die Extraktion der DNA aus Lebensmitteln ist mit Schwierigkeiten verbunden (siehe Kapitel 1.3.2). Die experimentelle Durchführung und eine Auflistung der optimierten Parameter sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

4.1.1 Optimierung der DNA-Extraktion aus Granatäpfeln

Um die DNA-Extraktion aus Granatäpfeln zu optimieren, wurden das QIAamp® DNA Mini Kit (Kit 1), die CTAB-Methode (CTAB), das NucleoSpin® Plant II Midi Kit (Kit 2) und das NucleoSpin® Plant II Kit (Kit 3) getestet. Die DNA-Extraktion aus einer Probe wurde als Einzelbestimmung durchgeführt und die Konzentration fluorometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.4.1). Die Reinheit der DNA wurde mittels UV-VIS Spektroskopie im Doppelansatz bestimmt (siehe Kapitel 3.4.2).

4.1.1.1 Optimierung der DNA-Extraktion mit Kit 1 (QIAamp DNA Mini Kit)

Die DNA wurde mit Kit 1 nach dem in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Protokoll aus Granatäpfeln extrahiert. Um die DNA-Extraktion zu verbessern, wurden verschiedene Parameter, wie in Tabelle 13 beschrieben, optimiert.

Tabelle 13: Veränderung der Parameter zur Verbesserung der DNA-Extraktion mit Kit 1

Methode	Abweichung vom Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.3.1)
Kit 1A	Standardprotokoll (Homogenisieren mit Mörser und Stößel)
Kit 1B	Kugelmühle mit Eisenkugeln zum Homogenisieren
Kit 1C	Kugelmühle mit Eisenkugeln und Lysepuffer zum Homogenisieren, Lyse mit fünffacher Menge an Reagenzien, 1/5 des Lysates auf Säule aufgetragen
Kit 1D	Kugelmühle mit Plastikkugeln zum Homogenisieren
Kit 1E	Kugelmühle mit Plastikkugeln und Lysepuffer zum Homogenisieren, Lyse mit fünffacher Menge an Reagenzien, 1/5 des Lysates auf Säule aufgetragen
Kit 1F	Nach der Lyse wurden die festen Bestandteile abzentrifugiert
Kit 1G	Lyse mit fünffacher Menge an Reagenzien, 1/5 des Lysates auf Säule aufgetragen

Die höchste DNA-Ausbeute wurde mittels der Methode Kit 1A erzielt (2,68 ng/μL). Die Verhältnisse A_{260}/A_{280} ($> 0,81$) und A_{260}/A_{230} ($> 0,43$), die für die mit Kit 1 erhalten DNA-Extrakte ermittelt wurden, lassen auf Verunreinigungen des DNA-Extraktes schließen (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Konzentration (c_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel 01 (Probe Gr. 01) mit Kit 1 extrahierten DNA (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Die Details der angewandten Extraktionsmethode sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die höchste DNA-Ausbeute ist rot markiert, nicht ermittelte Werte sind mit einem Minus gekennzeichnet

Probe	Methode	Einwaage [g]	Lysedauer	c_{DNA} [ng/μL]	$A_{260}/280$	$A_{260}/230$
Gr. 01	Kit 1A	0,0245	135 min	1,03	-	-
Gr. 01	Kit 1B	0,0249	135 min	0,956	-	-
Gr. 01	Kit 1C	0,1250	135 min	0,506	-	-
Gr. 01	Kit 1D	0,0246	135 min	0,588	-	-
Gr. 01	Kit 1E	0,1246	135 min	0,888	-	-
Gr. 01	Kit 1G	0,1250	135 min	0,684	-	-
Gr. 01	Kit 1A	0,0999	135 min	2,68	0,99	0,49
Gr. 01	Kit 1A	0,2999	135 min	1,20	0,87	0,69
Gr. 01	Kit 1A	0,5004	135 min	1,00	0,95	0,43
Gr. 01	Kit 1F	0,1001	135 min	1,55	1,24	0,48
Gr. 01	Kit 1F	0,2995	135 min	0,562	0,81	0,93
Gr. 01	Kit 1F	0,5000	135 min	0,762	0,86	0,61
Gr. 01	Kit 1A	0,1001	über Nacht	0,948	-	-
Gr. 01	Kit 1C	0,1003	über Nacht	0,408	-	-
Gr. 01	Kit 1A	0,2996	über Nacht	0,306	-	-
Gr. 01	Kit 1C	0,3001	über Nacht	0,462	-	-
Gr. 01	Kit 1A	0,1000	240 min	0,758	-	-
Gr. 01	Kit 1C	0,0998	240 min	0,368	-	-
Gr. 01	Kit 1A	0,3003	240 min	0,662	-	-
Gr. 01	Kit 1C	0,2999	240 min	0,736	-	-

4.1.1.2 Optimierung der DNA-Extraktion mittels der CTAB-Methode

Die DNA wurde mit der CTAB-Methode nach dem in Kapitel 3.3.2 angegebenen Protokoll aus Granatapfelkernen, sowie aus Blättern und aus der Schale eines Granatapfels extrahiert. Für das DNA-Extrakt aus den Granatapfelkernen (Probe Gr. 01), welches mittels der CTAB-Methode gewonnen wurde, lassen die Verhältnisse A_{260}/A_{280} (1,61) und A_{260}/A_{230} (2,35) auf eine hohe Reinheit des DNA-Extraktes schließen, allerdings war die DNA-Konzentrationen des Extraktes mit 0,850 ng/μL sehr gering (siehe Tabelle 15). Bei der DNA-Extraktion aus den

Blättern des Granatapfels 11 wurden eine hohe Konzentration (3,82 ng/μL) und Reinheit erreicht, allerdings spielen die Blätter des Granatapfels in Lebensmittelprodukten keine Rolle.

Tabelle 15: Konzentration (c_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel 01 (Probe Gr. 01) und aus den Blättern und der Schale von Granatapfel 11 (Probe Gr. 11) mit der CTAB-Methode extrahierten DNA (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6)

Probe	Einwaage [g]	c_{DNA} [ng/μL]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Gr. 01	2,0029	0,850	1,61	2,35
Gr. 11 Blatt	0,2665	3,82	1,31	0,84
Gr. 11 Schale	1,5050	0,174	1,51	2,16

4.1.1.3 Optimierung der DNA-Extraktion mit Kit 2 (NucleoSpin Plant II Kit Midi)

Die DNA wurde mit Kit 2 nach dem in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Protokoll aus Granatäpfeln extrahiert. Außerdem wurde DNA aus Granatapfelkonfitüre B extrahiert (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Um die DNA-Extraktion zu verbessern, wurden verschiedene Parameter, wie in Tabelle 16 beschrieben, optimiert.

Tabelle 16: Veränderung der Parameter zur Verbesserung der DNA-Extraktion mit Kit 2

Methode	Abweichung vom Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.3.3)
Kit 2A	Standardprotokoll (Lyse im Thermomixer, Inkubation im Wasserbad)
Kit 2B	Lyse und Inkubation im Trockenschrank (Invertierung des Gefäßes alle 20 Minuten)
Kit 2C	Lyse und Inkubation im Trockenschrank (Vortexen des Gefäßes alle 20 Minuten)

Das DNA-Extrakt aus der Probe Granatapfel 02, welches mittels der Methode Kit 2C und dem Lysepuffer PL2 erhalten wurde, wies mit 4,46 ng/μL die höchste DNA-Konzentration auf (siehe Tabelle 17). DNA-Extrakte, die aus Granatäpfeln erhalten wurden, wiesen für die Methode Kit 2C niedrigere A_{260}/A_{280} -Verhältnisse ($> 1,25$) auf, als das Extrakt, welches mittels der CTAB-Methode erhalten wurde (1,61). Jedoch waren die A_{260}/A_{280} -Verhältnisse höher als jene der Extrakte, die mit Kit 1 erhalten wurden ($> 0,81$). Bezüglich der A_{260}/A_{230} -Verhältnisse der DNA-Extrakte wurde kein deutlicher Unterschied zwischen Kit 2 ($> 0,37$) und Kit 1 ($> 0,43$) festgestellt.

Tabelle 17: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel 02 (Probe Gr. 02) und Granatapfelkonfitüre B (Probe Konf. B) mit Kit 2 extrahierten DNA (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Die Details der angewandten Extraktionsmethode sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die höchste DNA-Ausbeute ist rot markiert

Probe	Methode	Lyse-puffer	Einwaage [g]	C_{DNA} [ng/ μ L]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Gr. 02	Kit 2A	PL1	0,1997 + 0,2001*	3,02	1,32	0,54
Gr. 02	Kit 2A	PL2	0,1999 + 0,1996*	0,774	1,46	0,37
Konf. B	Kit 2A	PL1	0,2006 + 0,2003*	0,0258	0,95	0,63
Konf. B	Kit 2A	PL2	0,1995 + 0,2006*	0,0200	0,96	0,45
Gr. 02	Kit 2B	PL1	0,4012	3,66	1,27	0,63
Gr. 02	Kit 2B	PL2	0,4009	3,20	1,42	0,86
Gr. 02	Kit 2C	PL1	0,3990	3,42	1,35	0,87
Gr. 02	Kit 2C	PL2	0,3995	4,46	1,25	0,81

* Die Lyse fand in 2 Tubes statt

4.1.1.4 Optimierung der DNA-Extraktion mit Kit 3 (NucleoSpin Plant II Kit)

Die DNA wurde mit Kit 3 nach dem in Kapitel 3.3.4 angegebenen Protokoll aus Granatäpfeln extrahiert. Wie in Tabelle 18 beschrieben, wurden verschiedene Parameter verändert, um die DNA-Extraktion zu verbessern.

Tabelle 18: Veränderung der Parameter zur Verbesserung der DNA-Extraktion mit Kit 3

Methode	Abweichung vom Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.3.4)
Kit 3A	Standardprotokoll
Kit 3B	Mit 20 μ L Proteinase K lysiert
Kit 3C	Mit dem Tissue Disruptor und Puffer homogenisiert
Kit 3D	Mit dem Tissue Disruptor im trockenen Zustand homogenisiert

Die Methode Kit 3A führte zu DNA-Extrakten mit der höchsten DNA-Konzentration, sie betrug 14,7 ng/ μ L für Granatapfel 01 (siehe Tabelle 19). Bei Granatapfelproben führte die Extraktion mittels der Methode Kit 3A und dem Lysepuffer PL2 zu einem geringeren A_{260}/A_{280} -Verhältnis ($> 0,91$) und A_{260}/A_{230} -Verhältnis ($> 0,40$) als die CTAB-Methode ($A_{260}/A_{280} = 1,61$; $A_{260}/A_{230} = 2,35$). Die Zugabe von Proteinase K bei der Methode Kit 3B resultierte in keiner eindeutigen Verbesserung der Extraktionsausbeute. Durch die Zugabe von 2,0 % (w/v) PVP nahm die Extraktionsausbeute ab (siehe Tabelle 19). Da PVP verwendet wurde, um den Polyphenolgehalt im Extrakt zu reduzieren (siehe Kapitel 2.3.2.3), wurde als nächster Schritt die optimale PVP-Konzentration für die DNA-Extraktion mit Kit 3 ermittelt.

Tabelle 19: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatäpfeln (Proben Gr. 01, Gr. 02, Gr. 11) mit Kit 3 extrahierten DNA (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Die Details der angewandten Extraktionsmethode sind in Tabelle 18 zusammengefasst und der PVP-Gehalt des Lysepuffers (C_{PVP}) wurde variiert. Die höchste DNA-Ausbeute ist rot markiert, nicht ermittelte Werte sind mit einem Minus gekennzeichnet

Probe	Methode	Lyse-puffer	Einwaage [g]	C_{PVP} [%]	C_{DNA} [ng/ μ L]	$A_{260}/280$	$A_{260}/230$
Gr. 01	Kit 3A	PL1	0,0998	0	6,90	1,08	0,80
Gr. 01	Kit 3A	PL2	0,0995	0	14,7	1,21	0,85
Gr. 01	Kit 3A	PL1	0,1004	2,0	1,07	0,85	0,59
Gr. 01	Kit 3A	PL2	0,0994	2,0	1,63	0,91	0,40
Gr. 02	Kit 3A	PL1	0,1001	0	6,85	1,17	0,96
Gr. 02	Kit 3A	PL1	0,1003	2,0	0,459	0,88	0,51
Gr. 02	Kit 3A	PL2	0,1005	0	10,5	1,29	0,93
Gr. 02	Kit 3A	PL2	0,0998	2,0	1,79	0,96	0,44
Gr. 11	Kit 3A	PL1	0,1008	0	1,66	-	-
Gr. 11	Kit 3A	PL2	0,1001	0	4,00	-	-
Gr. 02	Kit 3B	PL1	0,0995	0	3,96	1,18	0,80
Gr. 02	Kit 3B	PL1	0,1003	2,0	1,33	0,83	1,02
Gr. 02	Kit 3B	PL2	0,1002	0	3,88	1,43	0,48
Gr. 02	Kit 3B	PL2	0,0998	2,0	1,91	1,03	0,44
Gr. 11	Kit 3B	PL1	0,0994	0	2,33	-	-
Gr. 11	Kit 3B	PL2	0,1001	0	5,50	-	-
Gr. 02	Kit 3C	PL2	0,3532	0,5	0,218	-	-
Gr. 02	Kit 3D	PL2	0,2938	0,5	1,29	-	-

4.1.2 Optimierung der PVP-Konzentration für die DNA-Extraktion mit Kit 3

Für die DNA-Extraktion mittels der Methode Kit 3A wurde die Konzentration von PVP im Lysepuffer optimiert. Die PVP-Konzentration im Lysepuffer PL2 betrug 0 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 % oder 2,0 % (w/v). DNA wurde aus Granatapfel und aus granatapfelhaltigen Lebensmitteln extrahiert.

4.1.2.1 Optimierung der PVP-Konzentration für Granatapfelproben

Bei der DNA-Extraktion aus Granatapfel mit Kit 3 war durch die Zugabe von PVP zum Lysepuffer eine Verringerung der Ausbeute zu erkennen (siehe Tabelle 20). Während bei der DNA-Extraktion ohne PVP eine DNA-Konzentration von 1,43 ng/ μ L erreicht wurde, betrug die DNA-Konzentration mit 2,0 % (w/v) PVP-Gehalt im Lysepuffer 1,03 ng/ μ L. Durch die Zugabe von PVP konnte die Reinheit der DNA-Extrakte nicht erhöht werden. Die Werte für A_{260}/A_{280} lagen zwischen 0,94 und 1,43 und für A_{260}/A_{230} zwischen 0,42 und 0,54 (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Konzentration (c_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel (Probe Gr. 02) mit Kit 3 extrahierten DNA (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Der PVP-Gehalt des Lysepuffers PL2 (c_{PVP}) wurde variiert

Probe	Lyse-puffer	Einwaage [g]	c_{PVP} [%]	c_{DNA} [ng/ μ L]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Gr. 02	PL2	0,1002	0	3,88	1,43	0,48
Gr. 02	PL2	0,1005	0,5	1,62	1,11	0,46
Gr. 02	PL2	0,1000	1,0	1,68	0,94	0,54
Gr. 02	PL2	0,1005	1,5	1,48	1,12	0,42
Gr. 02	PL2	0,0998	2,0	1,91	1,03	0,44

4.1.2.2 Optimierung der PVP-Konzentration für granatapfelhaltige Lebensmittelproben

Für die Optimierung der PVP-Konzentration wurde DNA aus den Proben Granatapfelkonfitüre A (Konf. A), Granatapfelkonfitüre B (Konf. B), Granatapfelsaft C (Saft C) und Granatapfelsaft E (Saft E) mit Kit 3 extrahiert. Die Konzentration der aus den Lebensmitteln extrahierten DNA war generell sehr gering und betrug maximal 0,0482 ng/ μ L. Die Zugabe von PVP zum Lysepuffer PL2 führte zu keiner drastischen Erhöhung der Reinheit und DNA-Konzentration (siehe Tabelle 21). Für die Granatapfelkonfitüre B wurde die höchste DNA-Konzentration bei einer PVP-Konzentration von 1,5 % (w/v) erzielt (0,0482 ng/ μ L), für die Granatapfelkonfitüre A bei einer PVP-Konzentration von 2,0 % (w/v) (0,0180 ng/ μ L). Bei dem Granatapfelsaft C führte eine PVP Konzentration von 0,5 % (w/v) mit 0,0055 ng/ μ L und bei dem Granatapfelsaft E eine PVP-Konzentration von 1,5 % (w/v) mit 0,0083 ng/ μ L zu geringfügig höheren DNA-Konzentrationen.

Tabelle 21: Konzentration (c_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus granatapfelhaltigen Konfitüren (Proben Konf. A, Konf. B) und Granatapfelsäften (Proben Saft C, Saft E) mit Kit 3 extrahierten DNA (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Der PVP-Gehalt des Lysepuffers PL2 (c_{PVP}) wurde variiert

Probe	Lyse-puffer	Einwaage [g]	c_{PVP} [%]	c_{DNA} [ng/ μ L]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Konf. A	PL2	0,0998	0	0,0162	1,10	0,42
Konf. A	PL2	0,1004	0,5	0,0164	1,11	0,39
Konf. A	PL2	0,0999	1,0	0,0172	1,20	0,39
Konf. A	PL2	0,1007	1,5	0,0182	1,16	0,36
Konf. A	PL2	0,0998	2,0	0,0180	1,16	0,35
Konf. B	PL2	0,1005	0	0,0194	0,99	0,45
Konf. B	PL2	0,0996	0,5	0,0362	1,02	0,37
Konf. B	PL2	0,1009	1,0	0,0296	1,01	0,39
Konf. B	PL2	0,1004	1,5	0,0482	1,05	0,37
Konf. B	PL2	0,0994	2,0	0,0280	1,02	0,36
Saft C	PL2	0,0998	0	0,0050	1,53	0,56
Saft C	PL2	0,1005	0,5	0,0055	1,15	0,55
Saft C	PL2	0,1010	1,0	< NWG	1,20	0,54
Saft C	PL2	0,0995	1,5	0,0050	1,34	0,53
Saft C	PL2	0,0998	2,0	0,0052	1,42	0,53
Saft E	PL2	0,0991	0	0,0058	1,44	0,53
Saft E	PL2	0,0999	0,5	0,0081	1,10	0,54
Saft E	PL2	0,0994	1,0	0,0083	1,18	0,54
Saft E	PL2	0,0993	1,5	0,0051	1,31	0,52
Saft E	PL2	0,0990	2,0	0,0055	1,37	0,56

4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Optimierung der DNA-Extraktion

Die DNA-Extrakte, welche mittels der CTAB-Methode erhalten wurden, wiesen zwar die höchste Reinheit auf (siehe Kapitel 4.1.1.2), die Extrakte aus Granatapfel, welche mit Kit 3 (NucleoSpin Plant II Kit) erhalten wurden, zeigten jedoch die höchsten DNA-Konzentrationen (siehe Kapitel 4.1.1.4). Daher wurden alle weiteren DNA-Extraktionen mit Kit 3 durchgeführt.

Bei den DNA-Extraktionen aus Granatapfel mit Kit 3 und dem Lysepuffer PL2 war durch Zugabe von PVP eine Verringerung der Ausbeute zu erkennen (siehe Tabelle 20). Für die DNA-Extraktionen aus Lebensmittelprodukten zeigte sich kein eindeutiger Einfluss von PVP auf die Reinheit und Konzentrationen der DNA (siehe Tabelle 21). Da PVP verwendet wurde, um den Polyphenolgehalt im DNA-Extrakt zu senken (Moslemi *et al.*, 2013; Lade *et al.*, 2014), wurde für weitere DNA-Extraktionen ein PVP Gehalt von 0,5 % (w/v) festgelegt.^{39,41}

Da die DNA-Extraktionsausbeute aus Lebensmitteln sehr gering war (siehe Tabelle 21), wurde die Einwaage auf 0,3000 g erhöht und das zweifache Volumen an Extraktionspuffer verwendet (siehe Kapitel 3.3.4).

4.2 Entwerfen der Primer und Ergebnisse des Primer-Screenings

Für das Entwerfen der Primer wurden bereits bekannte DNA-Barcoding-Regionen des Plastidengenoms und die ITS-Region verwendet (siehe Kapitel 1.3). Basierend auf den Sequenzen der Datenbank NCBI wurden Primer entworfen. In Abbildung 9 ist dargestellt, wie viele Sequenzen für das Plastidengenom von Granatapfel am 11.12.2018 in der Datenbank NCBI zugänglich waren und somit für das Entwerfen der Primer verwendet werden konnten.

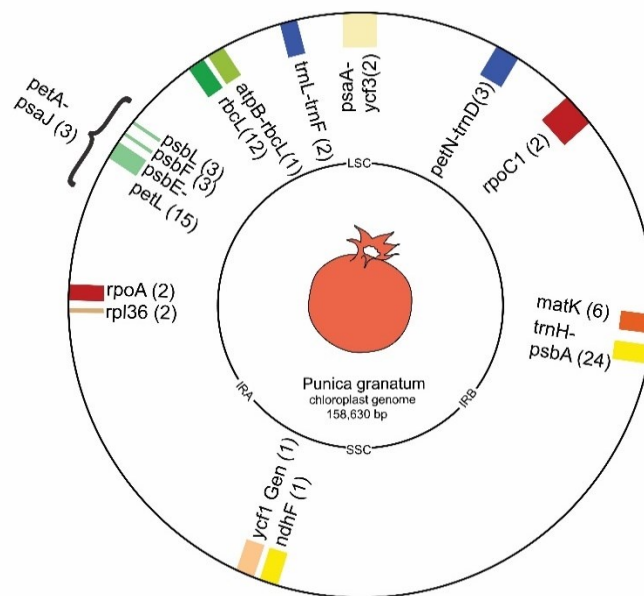


Abbildung 9: Sequenzen des Plastidengenoms für Granatapfel in der Datenbank NCBI (11.12.2018) ⁵⁶

Mittels Screening wurden Primerpaare, bestehend aus einem forward Primer (fw.) und einem reverse Primer (rev.) gesucht, welche sich für die Authentizitätsprüfung von Granatapfelprodukten eignen. Für jeden Primer wurden, wie in Kapitel 3.5.3 näher beschrieben, die Schmelztemperatur (T_M), mögliche Sekundärstrukturen und mögliche Bindungsstellen für Homodimere bestimmt. Außerdem wurde die Anzahl an möglichen Bindungsstellen für Heterodimere zwischen Primern eines Primerpaares bestimmt, ein Score-Wert als Qualitätsmerkmal für die jeweiligen Primerpaare angegeben und ein Sequenzalignment für verschiedene Zielspezies mit der dazugehörigen Accession Number für die Datenbanksuche erstellt. Weiters ist die Annealingtemperatur ($T_{\text{Annealing}}$), die für das Primerscreening verwendet wurde, angegeben (siehe Tabelle 47).

4.2.1 ITS

In der ITS-Region gab es zwischen den Pflanzenspezies, die in Tabelle 7 aufgelistet sind, große Sequenzunterschiede, aber auch sehr konservierte Abschnitte. Trotzdem wurden keine Primer gefunden, die einen variablen Abschnitt der Sequenzen flankierten und mit denen man mittels PCR-HRM Analysen die Ziel-Spezies unterscheiden konnte. Deshalb wurden Primer für die Granatapfelsequenzen aus der Datenbank (siehe Tabelle 7) entworfen (ITS 1.0, ITS 5.0 und ITS 6.0). Zusätzlich wurden Primer entworfen, die zu einem unspezifischen PCR-Produkt für verschiedene Pflanzenspezies führen sollten (ITS U1 und ITS U2), um alle Pflanzenspezies gemeinsam nachweisen zu können.

4.2.1.1 ITS 1.0 Primer

Die Eigenschaften des ITS 1.0 Primerpaares sind in Tabelle 22 aufgelistet und die möglichen Sekundärstrukturen in Abbildung 10 dargestellt. Dieses Primerpaar wurde für die Granatapfelsequenzen aus der Datenbank, deren Accession-Numbers in Tabelle 7 aufgelistet sind, entworfen und war nur zur Granatapfelsequenz vollständig komplementär, nicht aber zu den Sequenzen anderer Pflanzenspezies (siehe Tabelle 7). Tabelle 23 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für Granatapfel im Templatbereich. Aufgrund der hohen Anzahl an Unterschieden in der Basenabfolge zu den Sequenzen anderer Pflanzenspezies konnte nur für die Granatapfelsequenzen ein sinnvolles Alignment erstellt werden.

Tabelle 22: Eigenschaften des ITS 1.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikon- länge	Score	Homo- dimere	Hetero- dimere
ITS 1.0 fw.	GTCGCCCCAAAACCTCCAC	61,6			max. 2	max. 3
ITS 1.0 rev.	TAGCGGCCACGCACCCC	61,8	70	85	max. 4	

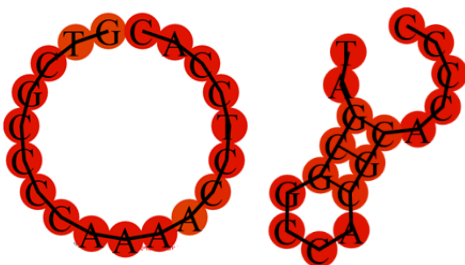


Abbildung 10: Sekundärstruktur für den ITS 1.0 forward und den ITS 1.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 23: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS 1.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben

Templatbereich			
Accession Number	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
JX911337.1	GTCGCCCCAAAACCTCCAC	GCCCTCGTCATCCATCCCTCGG	GGGGTGCCTGGCCGCTA
JX911355.1		GGGGGATGAGGG	
JX911338.1			
JX911354.1			
JX911350.1			
JX911346.1			
JX911347.1			
JX911348.1			
JQ740193.1			
JX911339.1			
JX911356.1			
JQ740191.1	GTCGCCCCAAAACCTCCAC	GCCCTCGTCATCCATCCCTCGG GGGGGATGAGGGG	GGGGTGCCTGGCCGCTA
JX911341.1	GTCG A CCCCAAAACCTCCAC	GCCCT A GTCATCCATCCCTCGG GGGGGATGAGGG	GGGGTGCCTGGCCGCTA
JX911352.1	GTCGCCCCAAAACCTCCAC	GCCCTCGTCATCCATCCCTCGG GGGG T ATGAGGG	GGGGTGCCTGGCCGCTA
JX911353.1	GTCGCCCCAAAACCTCCAC	GCCCTCGTCATCCATCCCTCGG GGGGGATGAGGG	GGGGTGCCTGGCCGCTA A
JQ740192.1	GTCGCCCCAAAACCTCCAC	GCCCTCGTCATCCATCCCTCGG GGGGGATGAGGGG	GGGGTGCCTGGCCGCTA

Das Primerscreening (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer Annealing-Temperatur von 57 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Das ITS 1.0 Primerpaar sollte nur für Granatapfel zu PCR-Produkten führen, es wurden jedoch auch Amplikons für Apfel und Pfirsich gebildet (siehe Abbildung 11). Diese Amplikons wurden jedoch erst sehr spät gebildet und die Mehrfachbestimmungen ein und derselben Probe führten zu PCR-Produkten mit unterschiedlichem Schmelzverhalten. Durch eine weitere Optimierung der Annealing-Temperatur und des MgCl₂-Gehalts könnte die Spezifität der Primer für DNA aus Granatapfel eventuell weiter erhöht werden. Der auf dem ITS 1.0 Primerpaar basierende PCR-HRM Assay wurde jedoch nicht weiter optimiert, da mit den Primerpaaren rbcL 1.0, rbcL 2.0 und rpoC1 1.0 eine Unterscheidung von verschiedenen Pflanzenspezies möglich war (siehe Kapitel 4.3).

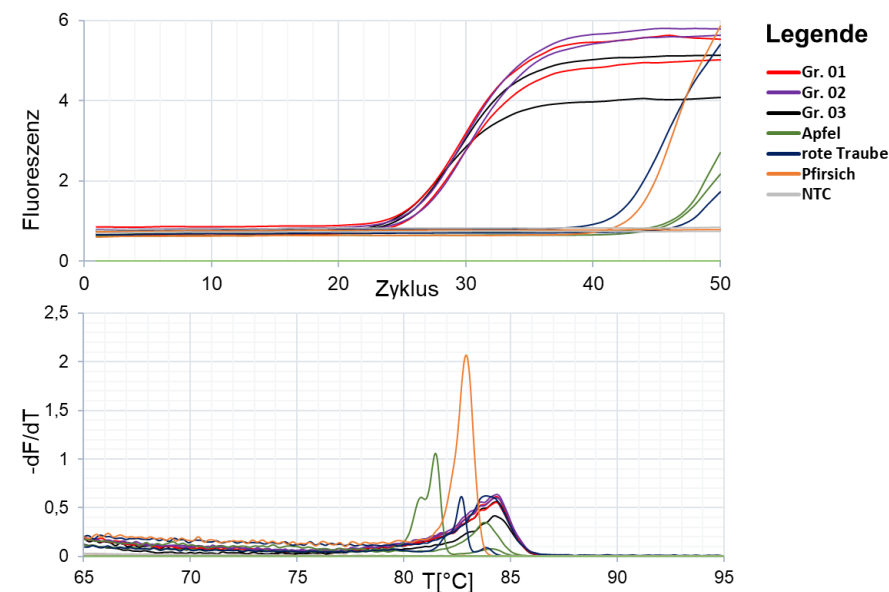


Abbildung 11: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS 1.0

4.2.1.2 ITS 5.0 Primer

Die Eigenschaften des ITS 5.0 Primerpaares sind in Tabelle 24 beschrieben. Abbildung 12 zeigt die möglichen Sekundärstrukturen. Dieses Primerpaar wurde für die Granatapfelsequenzen aus der Datenbank, deren Accession-Numbers in Tabelle 7 aufgelistet sind, entworfen und war nur zur Granatapfelsequenz vollständig komplementär, nicht aber zu den Sequenzen anderer Pflanzenspezies (siehe Tabelle 7). Tabelle 25 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für Granatapfel im Templatbereich. Aufgrund der hohen Anzahl an Unterschieden in der Basenabfolge zu den Sequenzen anderer Pflanzenspezies konnte nur für die Granatapfelsequenzen ein sinnvolles Alignment erstellt werden.

Tabelle 24: Eigenschaften des ITS 5.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikon -länge	Score	Homo- dimere	Hetero- dimere
ITS 5.0 fw.	GCGCGGTGGCGGCAGTAC	65,3			max. 4	max. 4
ITS 5.0 rev.	CCTGACCTGGGGTCGCGTTA	64,6	102	82	max. 4	

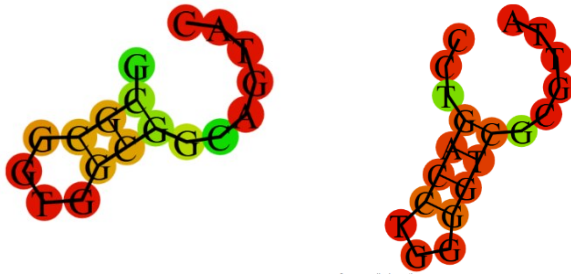


Abbildung 12: Sekundärstruktur für den ITS 5.0 forward und ITS 5.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 25: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS 5.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben

Templatbereich			
Accession Number	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
JX911337.1	GCGCGGTGGCGGCAGTAC	ATGGCCCCTCGGGCATCCGTC	TAACGCGACCCCAGGTCAGG
JQ740191.1		CGGAGCCGTC-CCTTCCGCGTT	
JX911341.1		GCTCGGTGGCCTTCCATCCAAA	
JX911352.1			
JX911338.1			
JX911354.1			
JX911350.1			
JX911346.1			
JX911347.1			
JX911348.1			
JQ740193.1			
JX911339.1			
JQ740192.1			
JX911356.1			
JX911355.1	GCGCGGTGGCGGCAGTAC	ATGGCCCCTCGGGCATCCGTC	TAACGCGACCCCAGGTCAGG
		CGGAGCCGTC-CCTTCCGCGTT	
		GCTCGGTGGCCTTCCATCCAAA	
JX911353.1	GCGCGGTGGCGGCAGTAC	TGGCCCCTCGGGCATCCGTCC	TAACGCGACCCCAGGTCAGG
		GGAGCCGTC-CCTTCCGCGTT--	
		-GC—TCGGTGGCCTT-CCATCC	
		AAA	

Das Primerscreening (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer optimierten Annealing-Temperatur von 57 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Das ITS 5.0 Primerpaar sollte nur für Granatapfel zu PCR-Produkten führen, es wurden jedoch auch Amplikons für Aronia, Heidelbeere, rote Traube und Pfirsich gebildet (siehe Abbildung 13). Da sich diese Amplikons in ihrem Schmelzverhalten nicht von den Amplikons für Granatapfel unterschieden, war dieses Primerpaar nicht dafür geeignet, eine Verfälschung von granatapfelhaltigen Lebensmitteln zu detektieren.

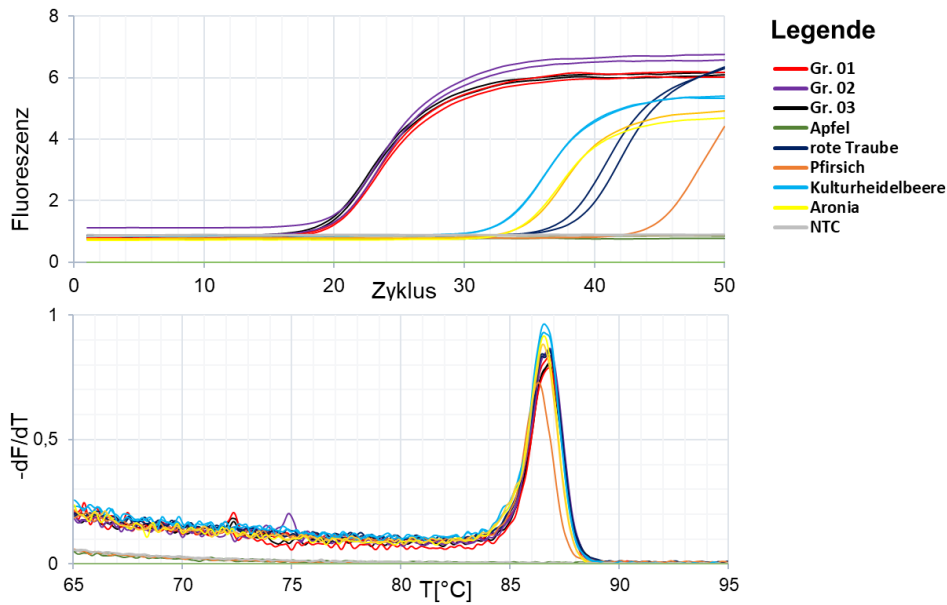


Abbildung 13: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS 5.0

4.2.1.3 ITS 6.0 Primer

Die Eigenschaften des ITS 6.0 Primerpaares sind in Tabelle 26 aufgelistet und die möglichen Sekundärstrukturen in Abbildung 14 dargestellt. Dieses Primerpaar wurde für die Granatapfelsequenzen aus der Datenbank, deren Accession-Numbers in Tabelle 7 aufgelistet sind, entworfen und war nur zur Granatapfelsequenz vollständig komplementär, nicht aber zu den Sequenzen anderer Pflanzenspezies (siehe Tabelle 7). Tabelle 27 zeigt das Ergebnis des Alignments der Granatapfelsequenzen im Templatbereich. Aufgrund der großen Zahl an Unterschieden in der Basenabfolge zu den Sequenzen anderer Pflanzenspezies konnte nur für die Granatapfelsequenzen ein sinnvolles Alignment erstellt werden.

Tabelle 26: Eigenschaften des ITS 6.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikon -länge	Score	Homo- dimere	Hetero- dimere
ITS 6.0 fw.	GGCCTCCCGTGGCACACC	65,3			max. 4	max. 4
ITS 6.0 rev.	CGTCGCTCCCGTGCTCCTTT	64,6	54	79	max. 2	

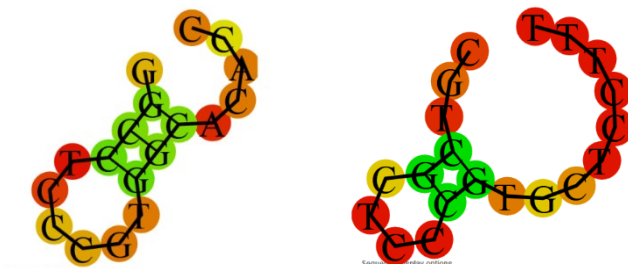


Abbildung 14: Sekundärstruktur für den ITS 6.0 forward und ITS 6.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 27: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS 6.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben

Accession Number	Templatbereich		
	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
JX911337.1	GGCCTCCCGTGGCACACC	GCTGCGGCTGGCCCAA	AAAGGAGCACGGGAGCGACG
JQ740191.1			
JX911341.1			
JX911355.1			
JX911353.1			
JX911338.1			
JX911354.1			
JX911350.1			
JX911346.1			
JX911347.1			
JX911348.1			
JQ740193.1			
JX911339.1			
JQ740192.1			
JX911356.1			
JX911352.1	GGCCTCCCGTGGCACACC	G■TGC■GG■TGGCCCAA	AAAGGAGCACGGGAGCGACG

Das Primerscreening (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer optimierten Annealing-Temperatur von 57 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Mit dem ITS 6.0 Primerpaar wurden nicht nur für Granatapfel, sondern auch für andere Spezies, wie Aronia, Heidelbeere, rote Traube und Pfirsich PCR-Produkte erhalten (siehe Abbildung 15). Da sich diese Amplikons nicht im Schmelzverhalten von den Amplikons für Granatapfel unterschieden, war dieses Primerpaar nicht dafür geeignet, eine Verfälschung von granatapfelhaltigen Lebensmitteln zu detektieren.

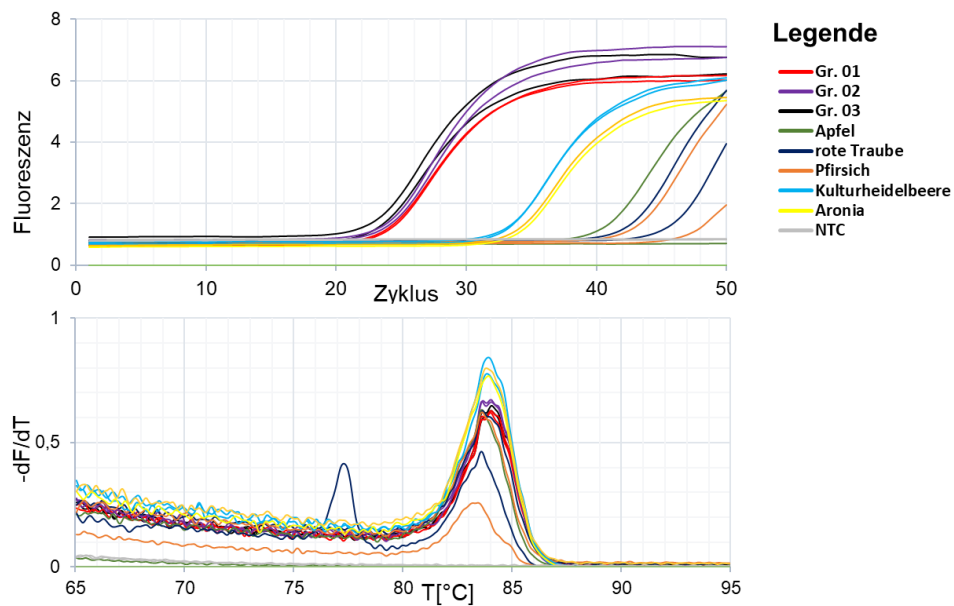


Abbildung 15: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS 6.0

4.2.1.4 ITS U1 Primer

Die Eigenschaften des ITS U1 Primerpaares sind in Tabelle 28 aufgelistet und die möglichen Sekundärstrukturen in Abbildung 16 dargestellt. Das ITS U1 Primerpaar wurde universell für die Sequenzen aus der Datenbank, deren Accession-Numbers in Tabelle 7 aufgelistet sind, entworfen. Tabelle 29 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für Granatapfel und andere Pflanzenspezies im Templatbereich.

Tabelle 28: Eigenschaften des ITS U1 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
ITS U1 fw.	GAACGTAGCGAAATGCG ATACT	60,1			max. 4	max. 3
ITS U1 rev.	ACTCGATGGTTCACGGG ATTC	61,2	57	94	max. 4	

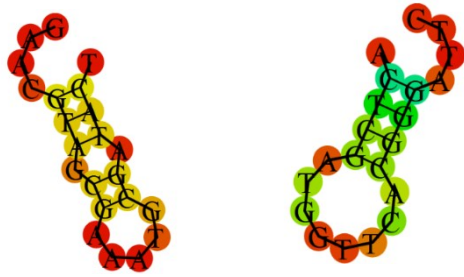


Abbildung 16: Sekundärstruktur für den ITS U1 forward und den ITS U1 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴⁾)

Tabelle 29: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS U1 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 7) für diese Spezies

Templatbereich			
Spezies	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	GAACGTAGCGAAATGCGATACT	TGGTGTGAATTGCA	GAATCCCGTGAACCATCGAG
<i>Beta vulgaris</i>			T
<i>Citrus sinensis</i>			
<i>Daucus carota</i>			
<i>Prunus avium</i>			
<i>Prunus cerasus</i>			
<i>Prunus domestica</i>			
<i>Prunus persica</i>			
<i>Ribes rubrum</i>			
<i>Sambucus nigra</i>			
<i>Vaccinium corymbosum</i>			
<i>Vaccinium macrocarpon</i>			
<i>Vaccinium myrtillus</i>			
<i>Pyrus communis</i>	GAACGTAGCGAAATGCA ^A ATACT	TGGTGTGAATTGCA	GAATCCCGTGAACCATCGAG
			T
<i>Malus domestica</i>	GAACGTAGCGAAATGCGATACT	TGGTGTGAATTGCA	GAATCCCGTGAACCATCGAG
			T
Ausnahme: MH633851.1	GA ^G CGTAGCGAAATGCGATACT	TGGTGTGAATTGCA	GAATCCCGTGAACCATCGAG
			T

Das Primerscreening (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Das ITS U1 Primerpaar führte für alle getesteten Spezies zu PCR-Produkten, diese zeigten ein nahezu einheitliches Schmelzverhalten (siehe Abbildung 17). Das ITS U1 Primerpaar hat daher das Potenzial, ein universelles Primerpaar für verschiedene Pflanzenspezies zu sein. Die experimentellen Bedingungen für diesen Assay wurden jedoch nicht weiter optimiert, da

mit den Primerpaaren rbcL 1.0, rbcL 2.0 und rpoC1 1.0 eine Unterscheidung von verschiedenen Pflanzenspezies möglich war (siehe Kapitel 4.3).

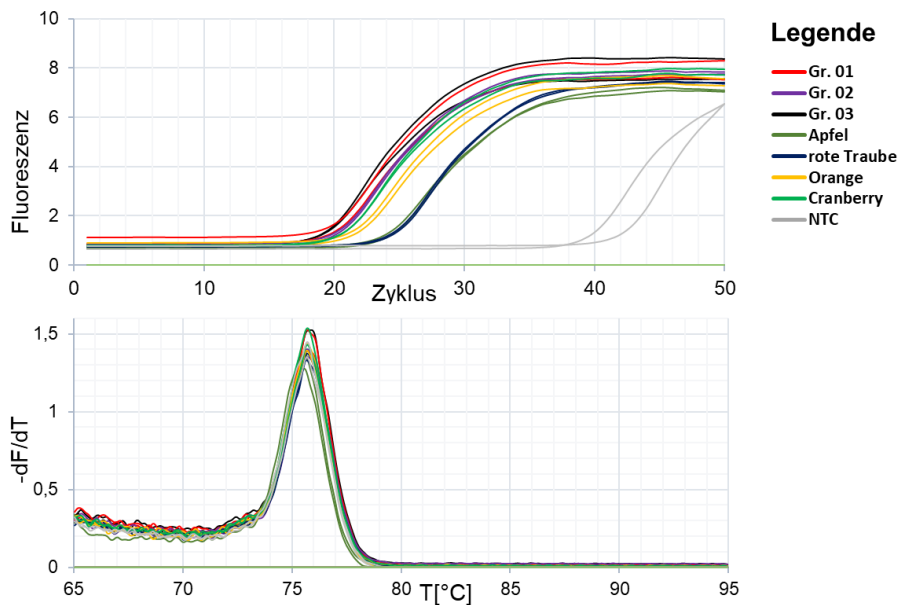


Abbildung 17: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS U1

4.2.1.5 ITS U2 Primer

In Tabelle 30 sind die Eigenschaften des ITS U2 Primerpaares zusammengefasst. Abbildung 18 zeigt die möglichen Sekundärstrukturen der Primer. Das ITS U2 Primerpaar wurde universell für die Sequenzen entworfen, deren Accession-Numbers in Tabelle 7 aufgelistet sind. Tabelle 31 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für Granatapfel und für andere Pflanzenspezies im Templatbereich.

Tabelle 30: Eigenschaften des ITS U2 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
ITS U2 fw.	GATGAAGAACGTAGCGA AATG	57,5			max. 4	max. 5
ITS U2 rev.	AACTTGCGTTCAAGGAC TCG	58,5	78	70	max. 4	

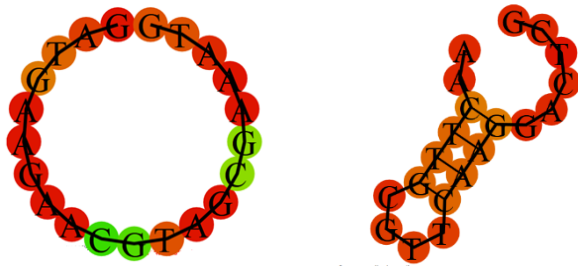


Abbildung 18: Sekundärstruktur für den ITS U2 forward und den ITS U2 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 31: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS U2 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 7) für diese Spezies

Templatbereich			
Spezies	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	GATGAAGAACGTAGCGAAATG	CGATACTTGGTGTGAA TTGCAGAATCCCGTG AACCAT	CGAGTCCTTGAACGCAAGTT
Ausnahme: JQ740192.1	GATGAAGAACGTAGCGAAATG	CGATACTTGGTGTGAA TTGCAGAATCCCGTG AACCAT	CGAGTCCTTGA ^T CGCAAGTT
<i>Beta vulgaris</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Daucus carota</i> <i>Prunus avium</i> <i>Prunus cerasus</i> <i>Prunus domestica</i> <i>Prunus persica</i> <i>Ribes rubrum</i> <i>Vaccinium corymbosum</i> <i>Vaccinium macrocarpon</i> <i>Vaccinium myrtillus</i>	GATGAAGAACGTAGCGAAATG	CGATACTTGGTGTGAA TTGCAGAATCCCGTG AACCAT	CGAGTC ^T TTGAACGCAAGTT
<i>Malus domestica</i>	GATGAAGAACGTAGCGAAATG	CGATACTTGGTGTGAA TTGCAGAATCCCGTG AACCAT	CGAGTC ^T TTGAACGCAAGTT
Ausnahme: MH633851.1	GATGAAGA ^G CGTAGCGAAATG	CGATACTTGGTGTGAA TTGCAGAATCCCGTG AACCAT	CGAGTC ^T TTGAACGCAAGTT
<i>Pyrus communis</i>	GAT ^G AAGAACGTAGCGAAATG	C ^A ATACTTGGTGTGAA TTGCAGAATCCCGTG AACCAT	CGAGTC ^T TTGAAC ^A CAAGTT
<i>Sambucus nigra</i>	GATGAAGAACGTAGCGAAATG	CGATACTTGGTGTGAA TTGCAGAATCCCGTG AACCAT	CGAGT ^T TTGAACGCAAGTT

Das Screening der Primer (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Alle untersuchten Spezies führten zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Auch für die NTC wurde ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet, allerdings war der Ct-Wert wesentlich höher (Ct-Wert > 35) (siehe Abbildung 19). Die experimentellen Bedingungen für diesen Assay

wurden nicht weiter optimiert, da mit den Primerpaaren rbcL 1.0, rbcL 2.0 und rpoC1 1.0 eine Unterscheidung von verschiedenen Pflanzenspezies möglich war (siehe Kapitel 4.3).

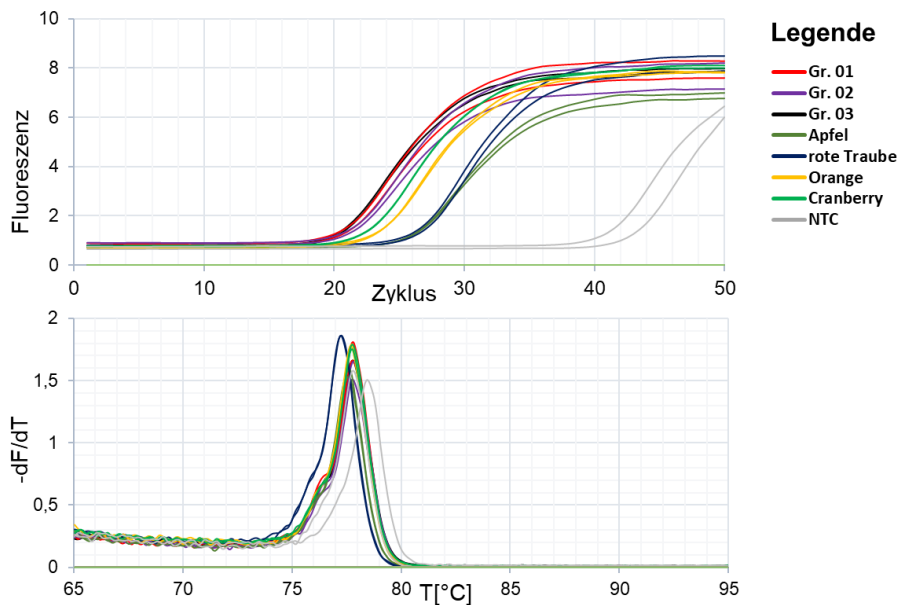


Abbildung 19: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS U2

4.2.2 *psbE-petL*

Die Sequenzen für verschiedene Granatapfelsorten wiesen Unterschiede in der *psbE-petL*-Region auf (siehe Tabelle 33). Daher wurde untersucht, ob für diese Region Primer entworfen werden können, die es ermöglichen, verschiedene Granatapfelsorten zu unterscheiden.

4.2.2.1 *psbE-petL* 2.0 Primer

Die Eigenschaften des *psbE-petL* 2.0 Primerpaares sind in Tabelle 31 aufgelistet und die möglichen Sekundärstrukturen sind in Abbildung 20 dargestellt. Dieses Primerpaar wurde für die Granatapfelsequenzen aus der Datenbank, deren Accession-Numbers in Tabelle 8 aufgelistet sind, entworfen. Tabelle 33 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für verschiedene Granatapfelsorten im Templatbereich.



Abbildung 20: Sekundärstruktur für den psbE-petL 2.0 forward und den psbE-petL 2.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 32: Eigenschaften des psbE-petL 2.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
psbE-petL 2.0 fw.	CTTTATTCTTTTCTTATTG CTTGTTG	58,4			max. 2	max. 6
psbE-petL 2.0 rev.	CGAGGCCAATAATGGAG AGAA	59,5	112	70	max. 4	

Tabelle 33: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 8) im Templatbereich für das Entwerfen des psbE-petL 2.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben

Templatbereich			
Accession Number	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
JX463059.1	CTTTATTCTTTTCT	ATGGGGG GT GATCATG-TATG-ACCAT TCA-	TTCTCTCCATT
JX463060.1	TATTGCTTGTTG	TATCTAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAGATTTCT	ATTGGCCTCG
JX463061.1	CTTTATTCTTTTCT	AGGGGG T GACACATAGT TGAACCAT TCA-	TTCTCTCCATT
JX463062.1	TATTGCTTGTTG	TAACTAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAGATTTCT	ATTGGCCTCG
JX463063.1	CTTTATTCTTTTCT	ATG TA TAAACATG-TAT GTACCATAT TCA-	TTCTCTCCATT
JX463064.1	TATTGCTTGTTG	TATCTAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAGATTTCT	ATTGGCCTCG
JX463065.1	CTTTATTCTTTTCT	ATG TA GAAACATGCTATAGACCATA TCA-	TTCTCTCCATT
JX463066.1	TATTGCTTGTTG	TATCTAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAGATTTCT	ATTGGCCTCG
JX463067.1	CTTTATTCTTTTCT	ATGG AG CAACATAGT TGTACCA ATTCA-	TTCTCTCCATT
JX463068.1	TATTGCTTGTTG	TATCTAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAGATTTCT	ATTGGCCTCG
JX463070.1			
JX463071.1			
JX463069.1	CTTTATTCTTTTCT	G GGCA AAAAGTAGT TATATTAAAA CA	TTCTCTCCATT
	TATTGCTTGTTG	ATATACAAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAGATTTCT	ATTGGCCTCG
JX463072.1	CTTTATTCTTTTCT	ACGTAG AATCATGTA TGTACCA	TTCTCTCCATT
	TATTGCTTGTTG	TTCAA TATCTAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAG	ATTGGCCTCG
		GTTTCT	
JX463073.1	CTTTATTCTTTTCT	ATGGGGG--GTGATCATG-TATGACCATTCA-	TTCTCTCCATT
	TATTGCTTGTTG	TATCTAATTTATCAAATTTCTGTAGTATAAGATTTCT	ATTGGCCTCG

Das Primerscreening (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer optimierten Annealing-Temperatur von 57 °C und einer optimierten Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Bei der auf dem Primerpaar psbE-petL 2.0 basierenden PCR-HRM Analyse wurde nur ein geringer Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet (siehe Abbildung 21). Die PCR-Produkte für verschiedene Granatapfelsorten ließen sich nicht über ihr Schmelzverhalten unterscheiden und wiesen eine sehr niedrige Schmelztemperatur auf. Die Amplikons für Apfel, rote Traube, Pfirsich, Kulturheidelbeere und Aronia zeigten ein sehr ähnliches Schmelzverhalten wie die NTC (Schmelztemperatur bei 69 °C). Möglicherweise handelte es sich dabei um Primerdimere. Da der PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar psbE-petL 2.0 keine Unterscheidung von PCR-Produkten für Granatapfelsorten oder für Spezies, die für Verfälschungen eingesetzt werden, ermöglichte, wurden keine weiteren Experimente durchgeführt.

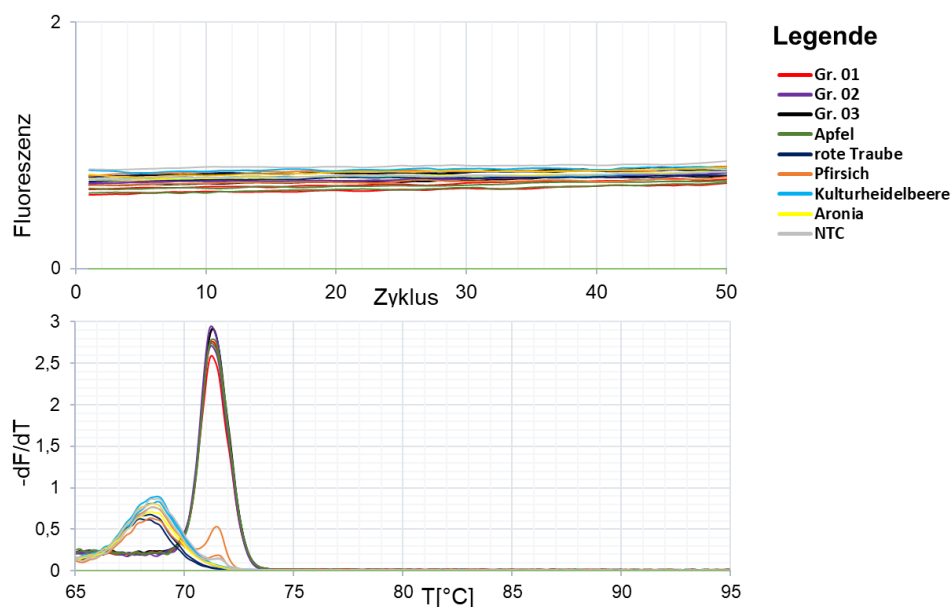


Abbildung 21: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar psbE-petL 2.0

4.2.3 *rbcL*

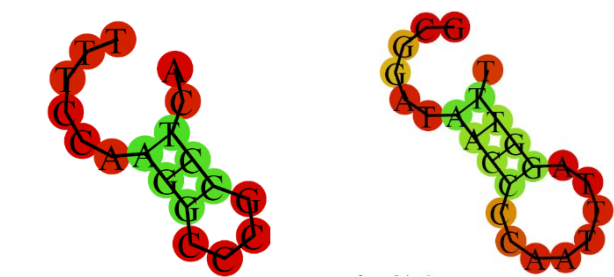
Die für Verfälschungen relevanten Pflanzenarten zeigten in der *rbcL*-Region Unterschiede in der Basenabfolge. Die entworfenen Primer sollten die Unterscheidung von Granatapfel und Pflanzenspezies, die häufig zur Verfälschung von Granatapfelprodukten eingesetzt werden, ermöglichen.

4.2.3.1 *rbcL* 1.0 Primer

In Tabelle 34 sind die Eigenschaften des *rbcL* 1.0 Primerpaares zusammengefasst. Abbildung 22 zeigt die möglichen Sekundärstrukturen. Das *rbcL* 1.0 Primerpaar sollte es ermöglichen, für Granatapfel und andere Pflanzenspezies PCR-Produkte zu erhalten, die sich in ihrem Schmelzverhalten unterscheiden. Dafür wurden die Sequenzen, deren Accession-Numbers in Tabelle 8 aufgelistet sind, verwendet. Tabelle 35 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für Granatapfel und für andere Pflanzenspezies im Templatbereich. Das *rbcL* 1.0 Primerpaar führte zu PCR-Produkten für Granatapfel, die sich in ihrem Schmelzverhalten von den PCR-Produkten für Spezies, die häufig zur Verfälschung eingesetzt werden, unterscheiden. Die Ergebnisse der PCR-HRM Analyse basierend auf dem *rbcL* 1.0 Primerpaar sind in Kapitel 4.3 angegeben. Zur Optimierung der Annealing-Temperatur wurde ein Temperaturgradient angelegt (siehe Kapitel 3.5.2.1). Die optimale Annealing-Temperatur betrug 59 °C und die optimale Primerkonzentration lag bei 0,4 µM.

*Tabelle 34: Eigenschaften des *rbcL* 1.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere*

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
<i>rbcL</i> 1.0 fw.	TTTCCAAGGCCCGCCTC A	58,4			4	
<i>rbcL</i> 1.0 rev.	GCGGATAACCCCAATTT AGGTTT	60,9	105 bp	81	4	4



*Abbildung 22: Sekundärstruktur für den *rbcL* 1.0 forward und *rbcL* 1.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold⁵⁴)*

Tabelle 35: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 9) im Templatbereich für das Entwerfen des rbcL 1.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 9) für diese Spezies

Templatbereich			
Spezies	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Vitis vinifera</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Ribes rubrum</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	CGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Vaccinium macrocarpon</i> L12625.2	TTTCCAAGGACCTCCT CA	CGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTAGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCGGC
<i>Vaccinium macrocarpon</i> MG221374.1	TTTCCAAGGACCTCCT CA	CGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTAGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCGGC
<i>Vaccinium myrtillus</i>	TTTCCAAGGACCTCCT CA	CGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTAGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCGGC
<i>Beta vulgaris</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	CGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTAGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Citrus sinensis</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	CGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTGG GATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Aristotelia chilensis</i>	TTTCCAAGGCCCGCC CA	TGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Aronia melanocarpa</i> MG247813.1	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Aronia melanocarpa</i> JQ391240.1	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Morus nigra</i> JX571868.1	TTTCCAAGGACCTCCT CA	TGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Sambucus nigra</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Malus domestica</i> <i>Pyrus communis</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTTTGGG ATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Prunus avium</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGG GATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC
<i>Prunus domestica</i>	TTTCCAAGGCCCGCC TCA	TGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATT GAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGG GATGTACTATT	AAACCTAAATTGGGGTT ATCCGC

4.2.3.2 rbcL 2 Primer

Die Eigenschaften der rbcL 2 Primer sind in Tabelle 36 aufgelistet, die möglichen Sekundärstrukturen sind in Abbildung 22 ersichtlich. Die rbcL 2 Primer wurden entworfen, um Granatapfel und andere Pflanzenspezies aufgrund des Schmelzverhaltens der PCR-Produkte unterscheiden zu können. Für das Entwerfen des rbcL 2.0 Primerpaares wurden die Sequenzen, deren Accession-Numbers in Tabelle 8 aufgelistet sind, verwendet. Tabelle 37 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für Granatapfel und für andere Pflanzenspezies im Templatbereich. Da an der Bindungsstelle des reverse Primers Unterschiede zwischen den Sequenzen für die verschiedenen Pflanzenspezies auftraten, wurden entsprechende Primer entworfen und als rbcL 2.1 rev. und rbcL 2.2 rev. bezeichnet. Die auf dem Primerpaar rbcL 2.0 basierenden PCR-HRM Analysen führten zu einem unterschiedlichen Schmelzverhalten der PCR-Produkte für Granatapfel und andere Pflanzenspezies (siehe Kapitel 4.3). Die Ergebnisse für die PCR-HRM Assays basierend auf den Primern rbcL 2.1 rev. und rbcL 2.2 rev. sind in Kapitel 4.7 angegeben. Der PCR-HRM Assay wurde experimentell optimiert und eine Annealing-Temperatur von 59 °C und eine Primerkonzentration von 0,4 µM erwiesen sich als optimal.

Tabelle 36: Eigenschaften der rbcL 2 Primer: Sequenz des forward (fw.) Primers und der reverse (rev.) Primer, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere, Unterschiede in den Sequenzen der reverse Primer sind fett gedruckt

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
rbcL 2.0 fw.	TACTGATATCTTGGCAG CATT	55,4			6	
rbcL 2.0 rev.	GTACCAGTAGAAGATT CAGC	56,4	96 bp	54	4	5
rbcL 2.1 rev.	GTACCAGTAGAAGATT CGGC	58,4	96 bp	-	4	5
rbcL 2.2 rev.	GTACCAGTAGAAGATT CCGC	58,4	96 bp	-	4	5

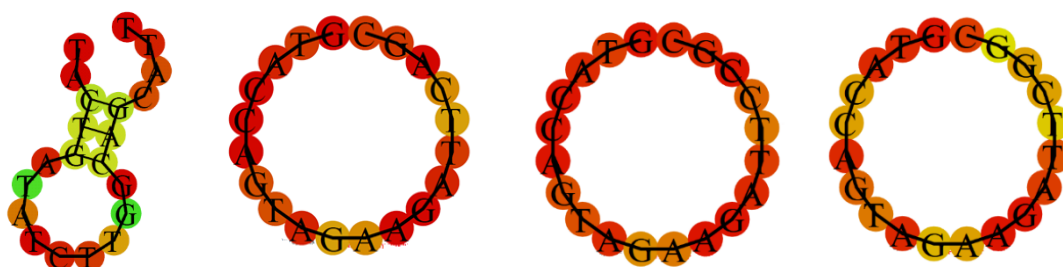


Abbildung 23: Sekundärstruktur für den rbcL 2.0 forward, den rbcL 2.0 reverse, den rbcL 2.1 reverse und den rbcL 2.2 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 37: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 9) im Templatbereich für das Entwerfen des *rbcl* 2.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 9) für diese Spezies

Templatbereich			
Spezies	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCTG GAGTTCCGCCTGAGGAAGCA GGGGCTGCAGTAGCC	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Vitis vinifera</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCTG GAGTTCCACCAGGAAGCA GGGGCAGCGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Ribes rubrum</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	TCGAGTAACTCCTCAACCTGG AGTTCCACCTGAGGAAGCAG GGGCAGCGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Vaccinium macrocarpon/ Vaccinium myrtillus</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCGG GAGTTCCACCTGAAGGAAGCA GGGGCAGCGTAGCT	GCAGAACTCTTCTACTGGTAC
<i>Beta vulgaris</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCTG GAGTTCCACCAGGAAGCA GGGGCTGCAGTAGCT	GCAGAACTCTTCTACTGGTAC
<i>Citrus sinensis</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCGG GAGTTCCACCAGGAAGCG GGGGCTGCAGTAGCT	GCAGAACTCTTCTACTGGTAC
<i>Aristotelia chilensis</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCTG GAGTTCCGCCTGAGGAAGCG GGGGCAGCGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Aronia melanocarpa</i> MG247813.1	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCTG GAGTTCCACCTGAAGGAAGCA GGGGCAGCGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Aronia melanocarpa</i> JQ391240.1	TACTGATATCTTGGCAGCATT	TCGAGTAACTCCTCAACCTGG AGTTCCACCTGAGGAAGCAG GGGCAGCGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Morus nigra</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	TCGAGTAACTCCTCAACCTGG AGTTCCACCTGAAGGAAGCAG GGGCTGCAGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Sambucus nigra</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	CCGAGTAACTCCTCAACCTG GAGTTCCACCTGAAGGAAGCA GGGGCAGCAGTAGCT	GCAGAACTCTTCTACTGGTAC
<i>Malus domestica/ Pyrus communis</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	TCGAGTAACTCCTCAACCTGG AGTTCCACCTGAGGAAGCAG GGGCAGCGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC
<i>Prunus avium/ Prunus domestica</i>	TACTGATATCTTGGCAGCATT	TCGAGTAACTCCTCAACCTGG AGTTCCACCTGAAGGAAGCAG GGGCAGCGTAGCT	GCTGAATCTTCTACTGGTAC

4.2.4 *rpoC1*

In der *rpoC1*-Region gab es eine große Variabilität zwischen den verschiedenen Pflanzenarten. Basierend auf den Sequenzen, deren Accession-Numbers in Tabelle 10 aufgelistet sind, wurden Primer entworfen, die zu PCR-Produkten für Granatapfel und für Spezies, die zur Verfälschung eingesetzt werden, führen sollten. Die Amplikons für unterschiedliche Pflanzenspezies sollten sich in ihrem Schmelzverhalten unterscheiden.

4.2.4.1 *rpoC1 1 Primer*

Die Eigenschaften der *rpoC1 1* Primer sind in Tabelle 38 aufgelistet und die möglichen Sekundärstrukturen in Abbildung 24 dargestellt. Die *rpoC1 1* Primer wurden zur Unterscheidung der Amplikons für Granatapfel von den Amplikons für andere Pflanzenarten entworfen. Tabelle 39 zeigt das Ergebnis des Alignments für den Templatbereich. Da die Sequenzen an der Bindungsstelle des forward Primers einen Unterschied in der Basenfolge aufwiesen, wurde der Primer *rpoC1 1.1 fw.* entworfen. Die PCR-HRM Analyse basierend auf dem *rpoC1 1.0* Primerpaar führte zu PCR-Produkten für Granatapfel und für weitere Pflanzenspezies, die sich in ihrem Schmelzverhalten unterschieden. Die Ergebnisse für die PCR mit den *rpoC1 1.0* Primern sind in Kapitel 4.3, die Ergebnisse für die PCR mit dem *rpoC1 1.1* Primer in Kapitel 4.7 angegeben. Das Primerscreening (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer optimierten Annealing-Temperatur von 59 °C und einer optimierten Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt.

Tabelle 38: Eigenschaften der rpoC1 1 Primer: Sequenz der forward (fw.) Primer und des reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere. Unterschiede in den Sequenzen der forward Primer sind fett gedruckt

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikon- länge	Score	Homo- dimere	Hetero- dimere
<i>rpoC1 1.0 fw.</i>	GCAATAGAGCTTTTCCAGACA TT	59,2			4	
<i>rpoC1 1.0 rev.</i>	CCCGAATTTTACTCTTAGCAA CT	59,2	91	80	4	4
<i>rpoC1 1.1 fw.</i>	GCAATAGAACTTTTCCAGACA TT	57,6	91	-	3	3

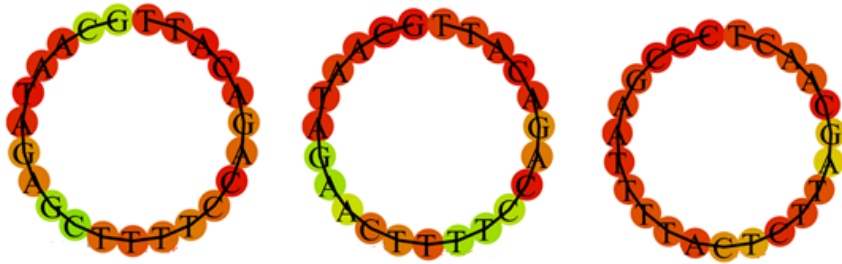


Abbildung 24: Sekundärstruktur für den *rpoC1* 1.0 forward, den *rpoC1* 1.1 forward und den *rpoC1* 1.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 39: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 10) im Templatbereich für das Entwerfen des *rpoC1* 1.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 10) für diese Spezies

Templatbereich			
Spezies	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	GCAATAGAGCTTTT CCAGACATT	TGTAATTCGTGGGCTAATTAGACAACATC TTGCTTCGAACATAGG	AGTTGCTAAGAGTAAAA TTCGGG
<i>Prunus persica</i>	GCAATAGAGCTTTT CCAGACATT	TGTAATTCG GGTT TAATTAGACAACAT T TTGCTTCGAATATAGG	AGTTGCTAAGAGTAAAA TTCGGG
<i>Vitis vinifera</i>	GCAATAGAG A CTTTTC CAGACATT	T TAATTCG GG CTAATTAGACAACAT C TTGCTTCGAACATAGG	AGTTGCTAAGAGT C AAA TTCG A G
<i>Daucus carota</i>	GCAATAGAGCTTTT CCAGACATT	TGTAATTCGT AG CTAATTAGACAACA GC TTGCTTCGAATATAGG	AGTTGCTAAGAGTAAAA TTCGGG
<i>Ribes rubrum</i> HQ594108.1	GCAATAGAGCTTTT CCAGACATT	TGTAATTCGTGG C TAATTAGACAACAT C TTGCTTCGAATATAGG	AGTTGCTAAGAGTAAAA TTCGGG
<i>Ribes rubrum</i> FJ395751.1	GCAATAGAGCTTTT CCAGACATT	TGTAATTCGTGG C TAATTAGACAACAT C TTGCTTCGAACAT C GG	AGTTGCTAAGAGTAAAA TTCGGG
<i>Sambucus nigra</i> FJ395751.1	GCAATAGAG A CTTTTC CAGACATT	TGTAATTCGTGG C TAATTAGACA C CAT C TTGCTTCGAACATAGG	AGTTGCTAAGAGTAAAA TTCGGG
<i>Sambucus canadensis</i>	GCAATAGAG A CTTTTC CAGACATT	TGTAATTCGTGG C TAATTAGACA C CAT C T CGCTTCGAACATAGG	AGTTGCTAAGAGTAAAA TTCGGG

4.2.5 *trnH-psbA*

In der *trnH-psbA*-Region gab es eine große Sequenzvariabilität zwischen den verschiedenen Pflanzenarten. Die entworfenen Primer sollten zu einem unterschiedlichen Schmelzverhalten der PCR-Produkte für Granatapfel und Traube führen.

4.2.5.1 *trnH-psbA* 3.0 Primer

Die Eigenschaften des *trnH-psbA* 3.0 Primerpaares sind in Tabelle 40 aufgelistet und die möglichen Sekundärstrukturen in Abbildung 25 dargestellt. Das *trnH-psbA* 3.0 Primerpaar wurde für die Unterscheidung zwischen PCR-Produkten für Granatapfel und Traube entworfen. Tabelle 41 zeigt das Ergebnis des Alignments der Sequenzen für Granatapfel und

Traube im Templatbereich. Die Sequenzen der anderen Pflanzenarten, deren Accession-Numbers in Tabelle 11 aufgelistet sind, zeigten eine hohe Variabilität zur Granatapfelsequenz und wiesen in mindestens einer Bindungsstelle des Primerpaares drei oder mehr unterschiedliche Basen auf. Daher sind diese im Alignment in Tabelle 41 nicht angegeben.

Tabelle 40: Eigenschaften des *trnH-psbA* 3.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
<i>trnH-psbA</i> 3.0 fw.	TTATTGCTCCTTTACTTT CAAA	52,7			3	
<i>trnH-psbA</i> 3.0 rev.	TCGAAGCTCCATCTACAA AT	54,3	94 bp	68	4	3

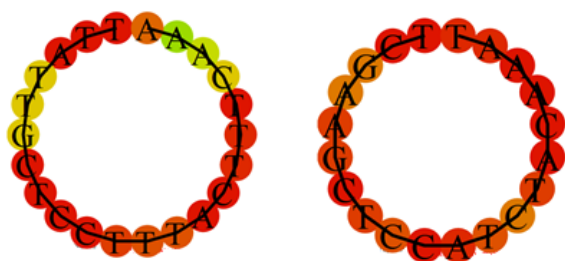


Abbildung 25: Sekundärstruktur für den *trnH-psbA* 3.0 forward, und den *trnH-psbA* 3.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 41: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 11) im Templatbereich für das Entwerfen des *trnH-psbA* 3.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 11) für diese Spezies

Spezies	Templatbereich		
	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	TTATTGCTCCTTTACTTTCAAA	TCAAAAACCTCGTATATATA CACTTAGACTAAGATCAA AGTCTTATCTTATCC	ATTTGTAGATGGAGCTTCGA
außer KP095861	TTATTGCTCCTTTACTTTCAAA	TCAAAAACCTCGTATATATA CACTAGACTAAGATCAA AGTCTTATCTTATCC	ATTTGTAGATGGAGCTTCGA
<i>Vitis vinifera</i>	TTATTGCTCCTTTACATTCAAA	---AACTCGTAACA--- ---C TAAGACGGAA--- ---ATCTTATCC	ATTTTAGATGGAGCTTCAA

Die Amplifikation der Template wurde bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Bei der PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar *trnH-psbA* 3.0 wurden PCR-Produkte erhalten, allerdings wichen die Amplifikationskurven stark vom idealen Kurvenverlauf ab. Obwohl das Primerpaar basierend

auf Sequenzen für Traube und Granatapfel entworfen wurde, zeigte auch ein PCR-Produkt für die Apfelprobe eine Schmelzkurve, welche nicht von der Schmelzkurve für Granatapfel unterschieden werden konnte.

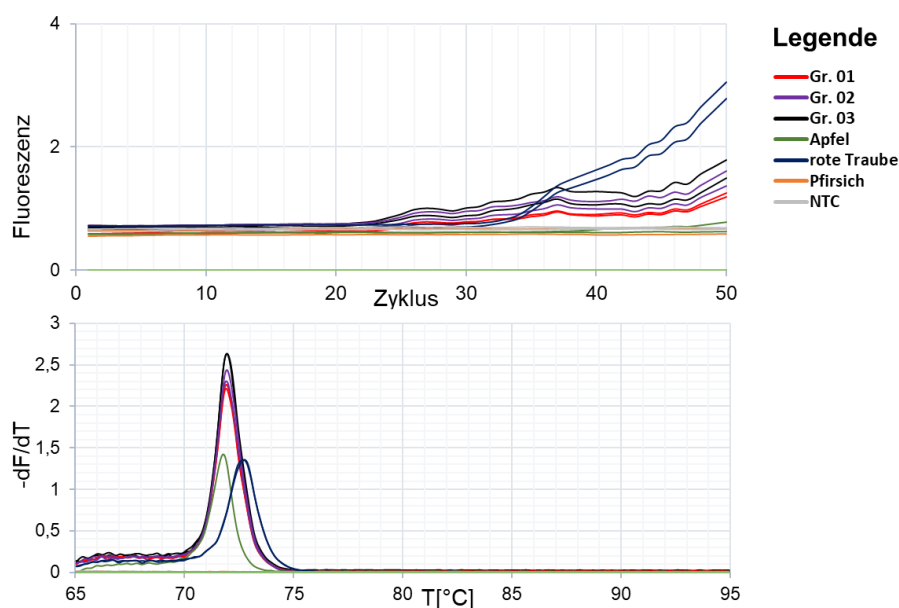


Abbildung 26: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *trnH-psbA* 3.0

4.2.6 *trnL*

In der *trnL*-Region wiesen die Pflanzenspezies eine große Variabilität auf. Deshalb wurden Primer entworfen, die eine Detektion von Verfälschungen mit Apfel, Traube oder Pfirsich ermöglichen sollten.

4.2.6.1 *trnL* 2.0 Primer

In Tabelle 42 sind die Eigenschaften des *trnL* 2.0 Primerpaares zusammengefasst. Mögliche Sekundärstrukturen sind in Abbildung 27 dargestellt. Das Ergebnis des Alignments der Sequenzen, deren Accession-Numbers in Tabelle 12 aufgelistet sind, ist für den Templatbereich in Tabelle 43 aufgelistet.

Tabelle 42: Eigenschaften des *trnL* 2.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
trnL 2.0 fw.	TTTCTTTTTTGAAAATCC AAGA	51,1			4	
trnL 2.0 rev.	TGACTTGGTTCTATGTCA ATT	53,4	89 bp	59	4	5

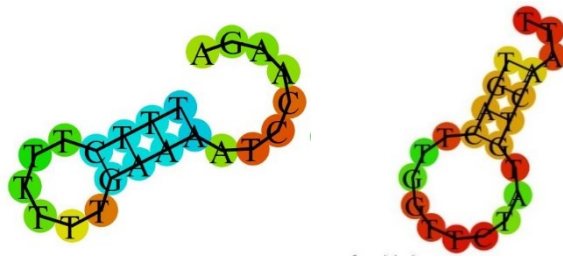


Abbildung 27: Sekundärstruktur für den trnL 2.0 forward, und den trnL 2.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴⁾)

Tabelle 43: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 12) im Templatbereich für das Entwerfen des trnL 2.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 12) für diese Spezies

Templatbereich			
Spezies	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	TTTCTTTTTTGAAAATCCAAGA	AAGAATGC----GGCCTGGG TAAGACTTTT-----AATA CCTTTTTTCGTCTTT-----TT	AATTGACATAGAACCAAGTCA
<i>Vitis vinifera</i>	TTTCTTTTTTGAAATCCAAGA	AACTCCA---CGTCCTGGAT AACTCTTTGTTTGTAAATAC AATACCTTTTCGTCTTTTAA TTT--TT	AATTGACATAGACCAAGTCA
<i>Malus domestica</i>	ATTCTTTTTTGAAATCCAAGA	AATCTATAGATCCTGTA TAACTTTTCT----- AATACCTTTTCGTCTTTCTAA TTGACT	AATTGACATAGACCAAGTCC
<i>Prunus persica</i>	GTTCTTTTTTGAAATCCAAGA	AATCTATACAGGGCCTGTA TAACTCTTTGT-----AATA CTTTTTCGTCTTTCT	AATTGACATAGACCAAGTCC

Das Screening der Primer (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Die PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar trnL 2.0 führte zu PCR-Produkten, allerdings wichen die Amplifikationskurven stark vom idealen Kurvenverlauf ab (siehe Abbildung 28). Für Apfel, Traube und Pfirsich wurden hohe Ct-Werte erhalten. Außerdem war die Wiederholbarkeit des Assays schlecht und Mehrfachbestimmungen ein und derselben Probe führten zu PCR-Produkten mit unterschiedlichem Schmelzverhalten. Die Detektion von Verfälschungen eines granatapfelhaltigen Produkts mit Apfel war mit dem trnL 2.0 Primerpaar nicht möglich, weshalb die experimentellen Bedingungen für diesen Assay nicht weiter optimiert wurden.

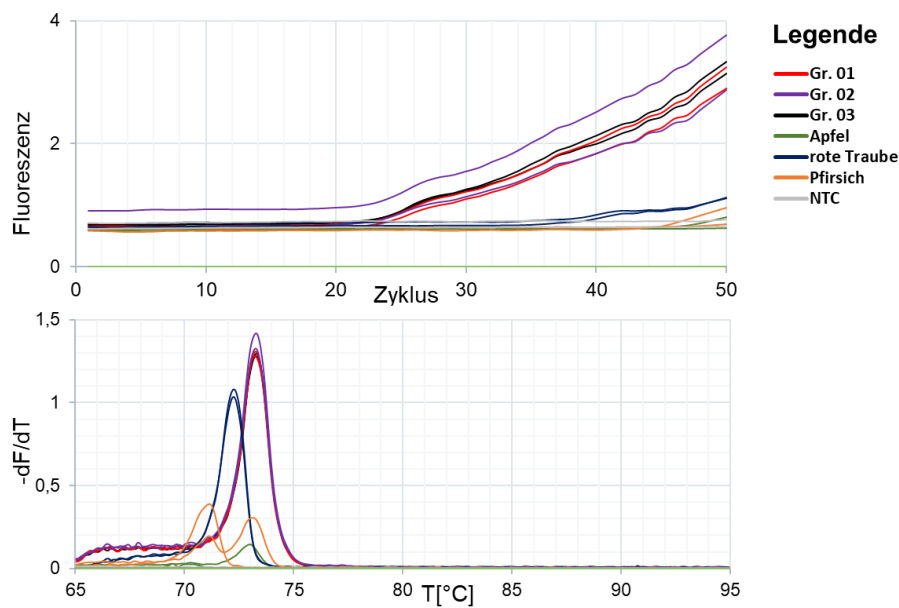


Abbildung 28: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar trnL 2.0

4.2.6.2 trnL 5.0 Primer

Die Eigenschaften des trnL 5.0 Primerpaares sind in Tabelle 44 aufgelistet, die möglichen Sekundärstrukturen in Abbildung 29 dargestellt. Das trnL 5.0 Primerpaar wurde entworfen, um zu prüfen, ob Lebensmittel Granatapfel enthalten. Das Ergebnis des Alignments ist für den Templatbereich in Tabelle 45 aufgelistet, die Sequenzen der Pflanzenarten, deren Accession-Numbers in Tabelle 12 aufgelistet sind, zeigen eine hohe Variabilität zu den Granatapfelsequenzen.

Tabelle 44: Eigenschaften des trnL 5.0 Primerpaares: Sequenz des forward (fw.) und reverse (rev.) Primers, Schmelztemperatur T_M , Amplikonlänge, Score-Wert und Anzahl der maximalen Bindungen für Homo- und Heterodimere

Primer	Sequenz	T_M [°C]	Amplikonlänge	Score	Homo-dimere	Hetero-dimere
trnL 5.0 fw.	CCCTTTGATTCCTTAAC TTT	54,7			4	
trnL 5.0 rev.	ATTAGACTTGTGTTAATA GAAAA	53,3	103 bp	50	4	5

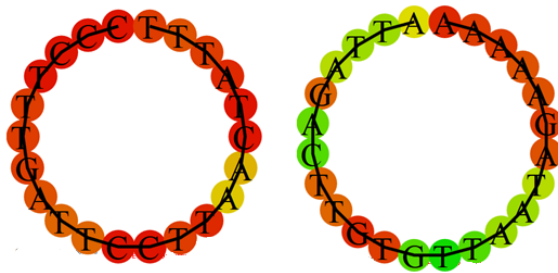


Abbildung 29: Sekundärstruktur für den trnL 5.0 forward, und den trnL 5.0 reverse Primer (ermittelt mit RNAfold ⁵⁴)

Tabelle 45: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 12) im Templatbereich für das Entwerfen des trnL 5.0 Primerpaares, Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben, der Speziesname steht für alle Accession Numbers (siehe Tabelle 12) für diese Spezies

Templatbereich			
Spezies	Bindungsstelle für den forward Primer		Bindungsstelle für den reverse Primer
<i>Punica granatum</i>	CCCTTTGATTCC TTAACTATTT	ATCTTA-----ATGTTTCTTATTCATT CTA-----TTCTTTCAGAAAGGTATGCAAGCGGATATTCT	TTTTTCTATTAA CACAAGTCTAAT
<i>Vitis vinifera</i>	C TACTTGACTCC TAACTATTT	ATCCT-----ATCTA----- TCCTCTCTTT GC AGA AATTT-----	TTTTTCTCTTATC ACAAGTCTTGT
<i>Malus domestica</i>	CCGCTTGACTC CTAAATATTT	ATTTTCATTTATCATTTTGTAGCGATTCAAATAAAAAATTC GTATATTTATCATTCACTCTCATTCTACTCTTTCTTTTCAC AAATGGATCTGAGCGAAA---	TTTTTCTCTTATC ACAAGCTTGT
<i>Prunus persica</i>	ACGCTTGACTCC CTAAATATTT	ATCTT---TTATCATTTTGTAGCGA TTCAAAA----- ATTGCTTATGTTTCTCATTCACTCTA-----CTCTTTCA CAAACGGA TCTGAGCGGAAA---	TTTTTCTCTTATC ACAAGCTCTGT

Das Primerscreening (siehe Kapitel 3.5.3) mittels PCR-HRM Analyse wurde bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt. Bei der PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar trnL 5.0 wurde fast kein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet (siehe Abbildung 30). Die PCR-Produkte zeigten keine eindeutigen Unterschiede in ihrem Schmelzverhalten und ermöglichten keine Detektion von Verfälschungen, weshalb die experimentellen Bedingungen für diesen Assay nicht weiter optimiert wurden.

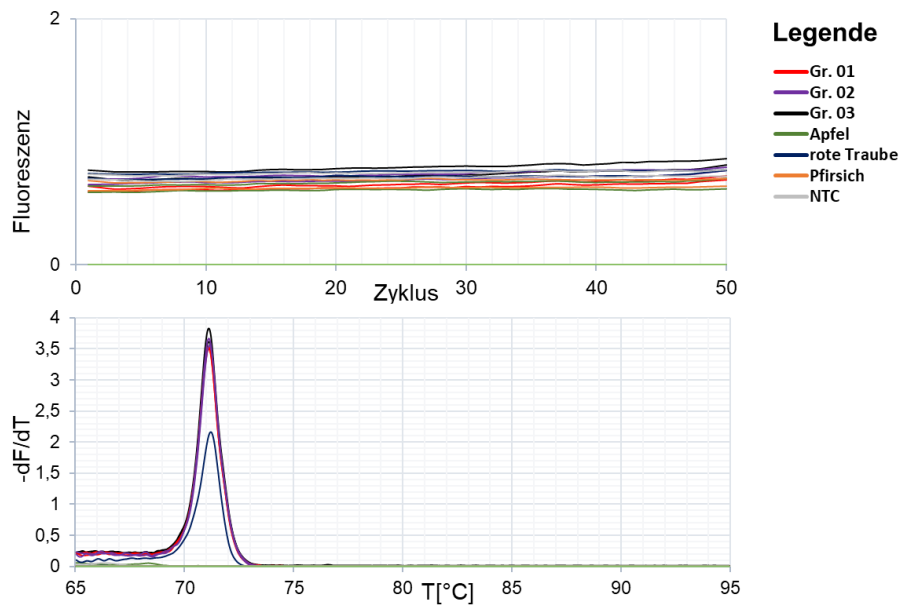


Abbildung 30: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar trnL 5.0

4.2.7 Zusammenfassung der Auswahlkriterien für die verwendeten Primer

Um mittels PCR-HRM Analyse Verfälschungen in granatapfelhaltigen Lebensmittelprodukten zu detektieren, wurden Primer in sechs Barcode-Regionen entworfen (siehe Tabelle 46). Die Primerpaare wurden auf ihr Potenzial getestet, zu PCR-Produkten zu führen, die sich in ihrem Schmelzverhalten je nach Pflanzenart unterschieden. In Tabelle 47 sind die Resultate des Primerscreenings zusammengefasst.

Tabelle 46: Entworfen forward (fw.) und reverse (rev.) Primer mit Amplikonlänge, Schmelztemperatur (T_M) und Annealingtemperatur ($T_{\text{Annealing}}$)

Locus	Primer	Primer Sequenz	Amplikonlänge	T_M [°C]	$T_{\text{Annealing}}$ [°C]
ITS	ITS 1.0 fw.	GTCGCCCCAAAACCTCCAC	70	61,6	57 ⁺
	ITS 1.0 rev.	TAGCGGCCACGCACCCC		61,8	
	ITS 5.0 fw.	GCGCGGTGGCGGCAGTAC	102	65,3	62 [*]
	ITS 5.0 rev.	CCTGACCTGGGGTCGCGTTA		64,6	
	ITS 6.0 fw.	GGCCTCCCGTGGCACACC	54	65,3	62 [*]
	ITS 6.0 rev.	CGTCGCTCCCGTGCTCCTTT		64,6	
	ITS U1 fw.	GAACGTAGCGAAATGCGATACT	57	60,1	55 ⁺
	ITS U1 rev.	ACTCGATGGTTCACGGGATTC		61,2	
	ITS U2 fw.	GATGAAGAACGTAGCGAAATG	78	57,5	55 ⁺
	ITS U2 rev.	AACTTGCGTTCAAGGACTCG		58,5	
psbE-petL	psbE-petL 2.0 fw.	CTTTATTCTTTTCTTATTGCTTGTTG	112	58,4	57 [*]
	psbE-petL 2.0 rev.	CGAGGCCAATAATGGAGAGAA		59,5	
rbcL	rbcL 1.0 fw.	TTTCCAAGGCCCGCCTCA	105	58,4	59 [*]
	rbcL 1.0 rev.	GCGGATAACCCCAATTTAGGTTT		60,9	
	rbcL 2.0 fw.	TACTGATATCTTGGCAGCATT	96	55,4	59 [*]
	rbcL 2.0 rev.	GTACCAGTAGAAGATTCAGC		56,4	
	rbcL 2.1 rev.	GTACCAGTAGAAGATTCGGC			
	rbcL 2.2 rev.	GTACCAGTAGAAGATTCCGC			
rpoC1	rpoC1 1.0 fw.	GCAATAGAGCTTTTCCAGACATT	91	59,2	59 [*]
	rpoC1 1.1 fw.	GCAATAGAACTTTTCCAGACATT		57,6	
	rpoC1 1.0 rev.	CCCGAATTTTACTCTTAGCAACT		59,2	
trnH-psbA	trnH-psbA 3.0 fw.	TTATTGCTCCTTTACTTTCAAA	94	52,7	50 ⁺
	trnH-psbA 3.0 rev.	TCGAAGCTCCATCTACAAAT		54,3	
trnL	trnL 2.0 fw.	TTTCTTTTTTGAAAATCCAAGA	89	51,1	50 ⁺
	trnL 2.0 rev.	TGACTTGTTCTATGTCAATT		53,4	
	trnL 5.0 fw.	CCCTTTGATTCTTAATACTATTT	103	54,7	50 ⁺
	trnL 5.0 rev.	ATTAGACTTGTTGTTAATAGAAAAA		53,3	

+ Annealing-Temperatur wurde aufgrund der theoretischen Schmelztemperatur bestimmt

* Annealing-Temperatur wurde experimentell optimiert

Tabelle 47: Auflistung der entworfenen Primer und Übersicht des Primerscreenings

Locus	fw. Primer	rev. Primer	Resultat der PCR-HRM Analyse
ITS	ITS 1.0 fw.	ITS 1.0 rev.	Für Apfel, Traube und Pfirsich wurde erst bei hoher Zykluszahl ein Anstieg des Fluoreszenzsignals erhalten (Ct-Wert > 36)
	ITS 5.0 fw.	ITS 5.0 rev.	Für alle getesteten Pflanzenspezies (außer Granatapfel) wurde erst bei hoher Zykluszahl ein Anstieg des Fluoreszenzsignals erhalten (Ct-Wert > 28), mittels HRM war keine Unterscheidung zwischen Granatapfel und anderen Pflanzenspezies möglich
	ITS 6.0 fw.	ITS 6.0 rev.	Für alle getesteten Pflanzenspezies (außer Granatapfel) wurde erst bei hoher Zykluszahl ein Anstieg des Fluoreszenzsignals erhalten (Ct-Wert > 30), mittels HRM war nicht immer eine Unterscheidung zwischen Granatapfel und anderen Pflanzenspezies möglich
	ITS U1 fw.	ITS U1 rev.	Das Templat für Granatapfel und für Pflanzenspezies, die für Verfälschungen relevant sind, wurde amplifiziert, eine Unterscheidung der Spezies mittels HRM war nicht möglich
	ITS U2 fw.	ITS U2 rev.	Das Templat für Granatapfel und Pflanzenspezies, die für Verfälschungen relevant sind, wurde amplifiziert, eine Unterscheidung der Spezies mittels HRM war nur teilweise möglich
psbE-petL	psbE-petL 2.0 fw.	psbE-petL 2.0 rev.	Es wurde kaum ein Anstieg der Amplifikationskurven beobachtet, die PCR-Produkte wiesen eine geringe Schmelztemperatur auf, eine Unterscheidung der Granatapfelsorten mittels HRM war nicht möglich
rbcL	rbcL 1.0 fw.	rbcL 1.0 rev.	PCR-HRM Assay eignet sich möglicherweise für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten
	rbcL 2.0 fw.	rbcL 2.0 rev. rbcL 2.1 rev. rbcL 2.2 rev.	PCR-HRM Assay eignet sich möglicherweise für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten
rpoC1	rpoC1 1.0 fw. rpoC1 1.1 fw.	rpoC1 1.0 rev.	PCR-HRM Assay eignet sich möglicherweise für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten
trnH-psbA	trnH-psbA 3.0 fw.	trnH-psbA 3.0 rev.	Es wurde kaum ein Anstieg der Amplifikationskurven beobachtet, die PCR-Produkte wiesen eine niedrige Schmelztemperatur auf, eine Unterscheidung der getesteten Spezies mittels HRM war nicht möglich
trnL	trnL 2.0 fw.	trnL.2.0 rev.	Es wurde ein geringer Anstieg der Amplifikationskurven beobachtet, die PCR-Produkte wiesen eine niedrige Schmelztemperatur auf, eine Unterscheidung der getesteten Spezies mittels HRM war nicht möglich
	trnL 5.0 fw.	trnL.5.0 rev.	Es wurde kaum ein Anstieg der Amplifikationskurven beobachtet, die PCR-Produkte wiesen eine niedrige Schmelztemperatur auf, eine Unterscheidung der getesteten Spezies mittels HRM war nicht möglich

4.3 PCR-HRM Analyse mit dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0

Zur Detektion von Verfälschungen in granatapfelhaltigen Lebensmitteln wurden PCR-HRM Analysen mit dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0 durchgeführt. Das Temperaturoptimum der Primer lag bei 59 °C, die optimale Primerkonzentration bei 0,4 µM.

4.3.1 PCR-HRM Analysen mit DNA-Extrakten aus Pflanzenproben

Mittels auf dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0 basierenden PCR-HRM Assays wurde untersucht, ob sich die PCR-Produkte für Pflanzenspezies, die zur Verfälschung eingesetzt werden, in ihrem Schmelzverhalten von den Schmelzkurven der PCR-Produkte für Granatapfel unterschieden. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse für die PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0 dargestellt. Das rbcL 1.0 Primerpaar führte zu PCR-Produkten für alle getesteten Spezies. Die Schmelztemperaturen der Amplikons für rote Johannisbeere, Nektarine, Orange, Karotte, Pflaume und Sauerkirsche waren um mindestens 0,9 °C höher als die Schmelztemperaturen der Amplikons für Granatapfel. Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte für weiße und blaue Trauben, sowie Aronia wichen um + 0,6 °C von den Schmelztemperaturen der Amplikons für Granatapfel ab. Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte sind in Tabelle 48 angegeben.

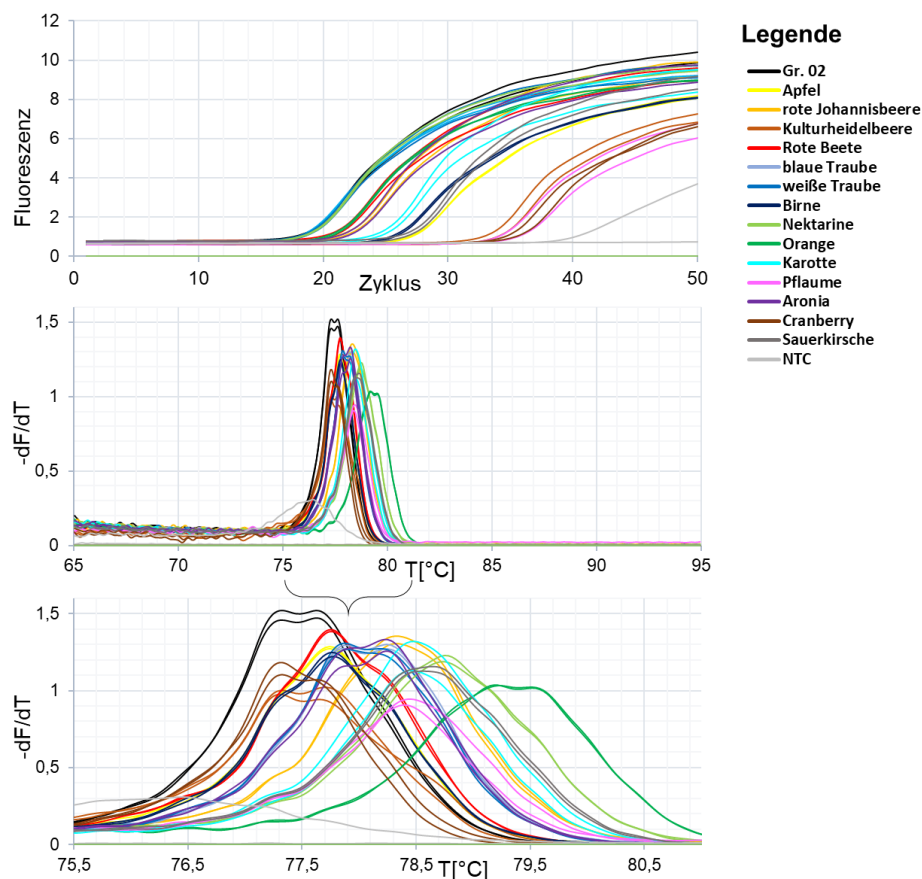


Abbildung 31: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse für den auf dem Primerpaar rpoC1 1.0 basierenden PCR-HRM Assay dargestellt. Das rpoC1 1.0 Primerpaar führte zu PCR-Produkten für alle getesteten Spezies. Die PCR-Produkte für Apfel, Kulturheidelbeere, Birne, Nektarine, Karotte, Pflaume, Aronia und Sauerkirsche unterschieden sich im Schmelzverhalten von dem der Amplikons für Granatapfel. Die Schmelztemperaturen der Amplikons für diese Spezies waren um mindestens 1,1 °C niedriger als die Schmelztemperatur der Amplikons für Granatapfel (siehe Tabelle 48). Bei der Doppelbestimmung des DNA-Extraktes aus Cranberry wurden PCR-Produkte mit unterschiedlichem Schmelzverhalten gebildet, daher sind zwei Schmelztemperaturen angegeben.

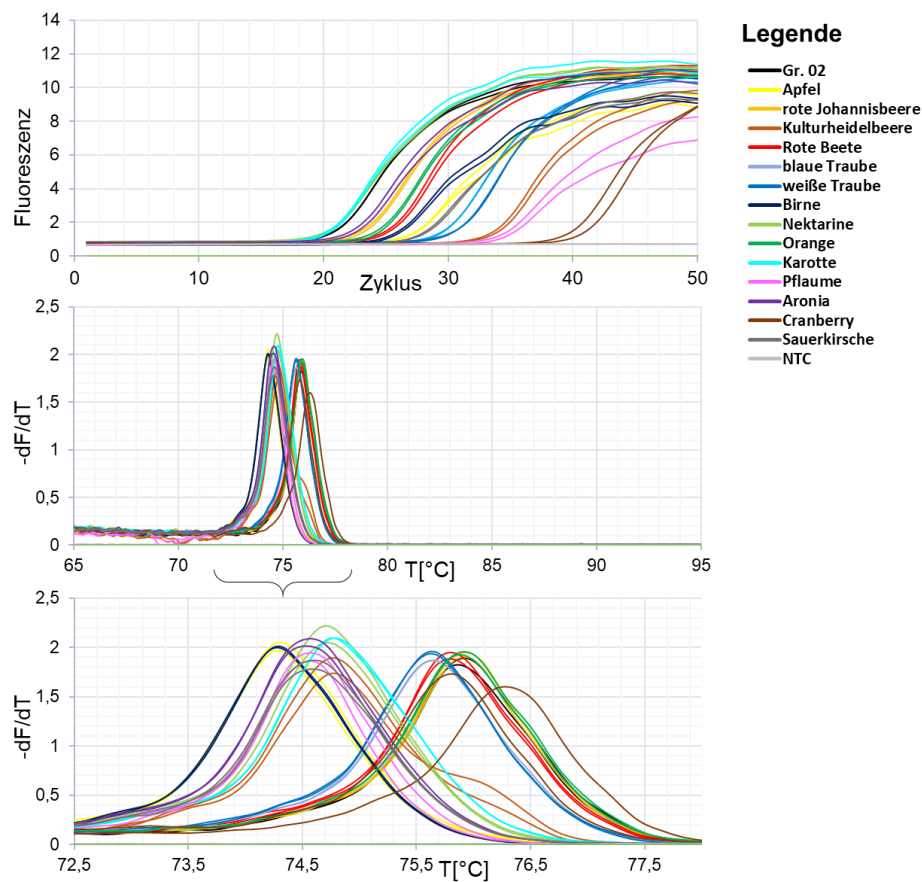


Abbildung 32: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse für die PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 2.0 dargestellt. Das *rbcl* 2.0 Primerpaar führte zu PCR-Produkten für alle getesteten Spezies. Die PCR-Produkte für Apfel, Rote Beete, Birne, Nektarine, Orange und Sauerkirsche zeigten abweichende Schmelztemperaturen, mit einem Unterschied von mindestens 0,7 °C bezüglich der Schmelztemperatur der Amplikons für Granatapfel (siehe Tabelle 48). Bei der Doppelbestimmung der DNA-Extrakte aus Pflaume und Sauerkirsche wurden PCR-Produkte mit unterschiedlichem Schmelzverhalten gebildet, daher sind je zwei Schmelztemperaturen aufgelistet. Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte für rote Johannisbeere, Karotte und Aronia wichen mit 0,5 °C nur geringfügig von der Schmelztemperatur der Amplikons für Granatapfel ab.

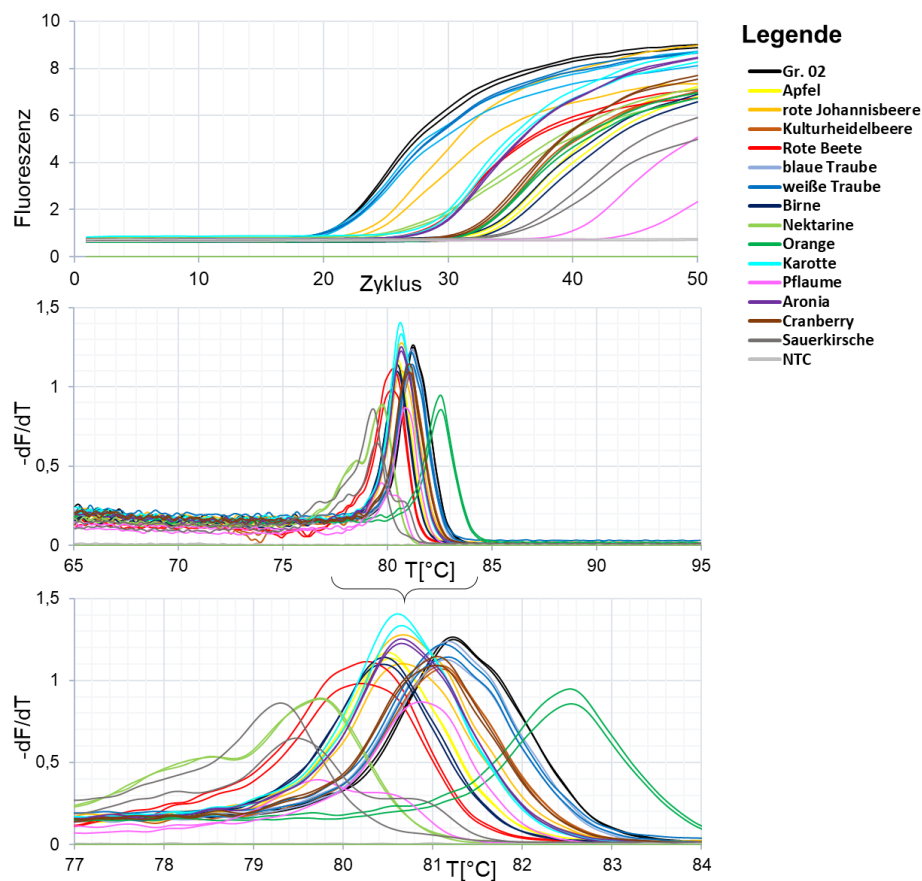


Abbildung 33: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 2.0

In Tabelle 48 sind die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte für verschiedene Pflanzenspezies aufgelistet.

Tabelle 48: Schmelztemperaturen der Amplikons für die PCR-Analysen basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0, Schmelztemperaturen mit einem Unterschied von mehr als 0,5 °C bezüglich der Schmelztemperatur der Amplikons für Granatapfel sind fett gedruckt (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6)

Primer	rbcL 1.0	rpoC1 1.0	rbcL 2.0
	T _M [°C]	T _M [°C]	T _M [°C]
Granatapfel	77,5	75,9	81,2
Apfel	77,8	74,3	80,5
Rote Johannisbeere	78,4	75,9	80,7
Kulturheidelbeere	77,5	74,8	81,1
Rote Beete	77,8	75,8	80,2
Blaue Traube	78,1	75,6	81,2
Weißer Traube	78,1	75,6	81,2
Birne	77,8	74,3	80,5
Nektarine	78,8	74,7	79,7
Orange	79,4	75,9	82,5
Karotte	78,5	74,8	80,7
Pflaume	78,4	74,6	80,1 / 80,9
Aronia	78,0	74,6	80,7
Cranberry	77,5	75,8 / 76,3	81,0
Sauerkirsche	78,6	74,6	79,3 / 79,5

4.3.2 PCR-HRM Analysen mit DNA-Extrakten aus verschiedenen Granatapfelproben

Um zu testen, ob PCR-Produkte für verschiedene Granatapfelproben dasselbe Schmelzverhalten aufweisen, wurde DNA aus zehn Granatäpfeln extrahiert, die sich in ihrer Sorte und/oder in ihrem Herkunftsland unterschieden (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6).

Mit dem PCR-HRM Assay, der auf dem Primerpaar rbcL 1.0 basierte, wurden für die verschiedenen Granatapfelproben PCR-Produkte mit einem identen Schmelzverhalten erhalten (siehe Abbildung 34).

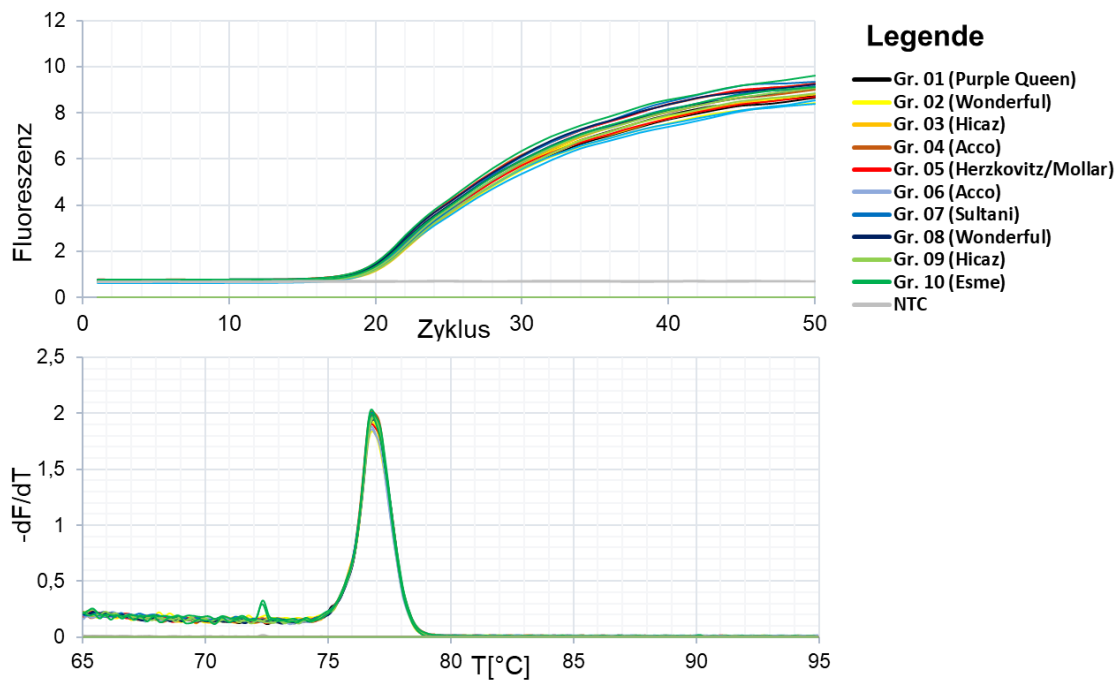


Abbildung 34: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Granatapfelproben (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 1.0

Auch mit den auf dem Primerpaar *rpoC1* 1.0 oder *rbcl* 2.0 basierenden PCR-HRM Assays wurden für verschiedene Granatapfelproben PCR-Produkte mit identem Schmelzverhalten erhalten (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36).

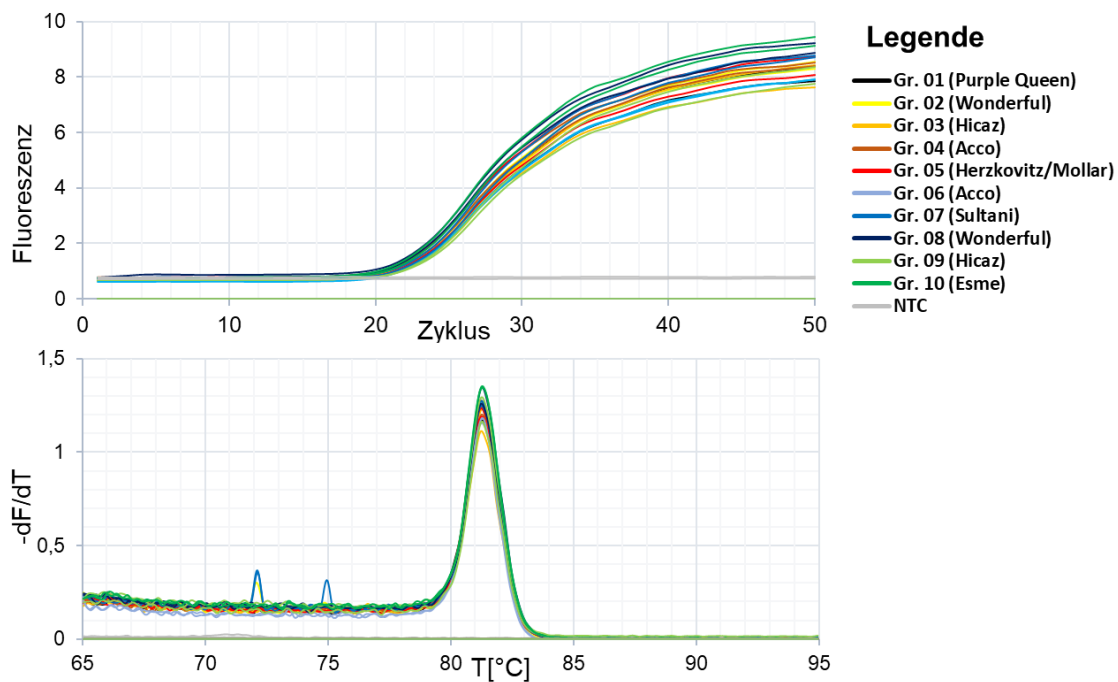


Abbildung 35: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Granatapfelproben (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rpoC1* 1.0

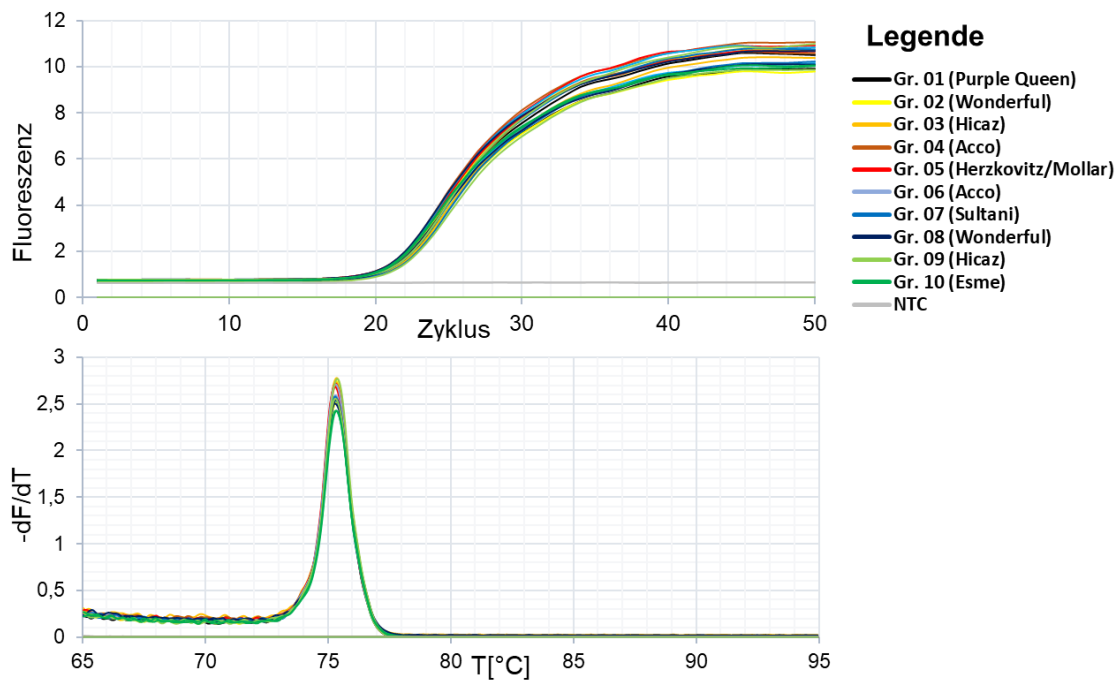


Abbildung 36: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Granatapfelproben (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 2.0

4.3.3 PCR-HRM Analysen mit DNA-Extrakten aus granatapfelhaltigen Lebensmitteln

Um die Anwendbarkeit der Assays auf granatapfelhaltige Lebensmittel zu untersuchen, wurden Versuche mit den Primerpaaren rbcL 1.0 und rpoC1 1.0 durchgeführt.

Das Primerpaar rbcL 1.0 führte zu Amplikons für Granatapfelkonfitüre A und B, während im Fall des Granatapfelsaftes C für eines der beiden Duplikate ein Ct-Wert von über 45 erhalten wurde (siehe Abbildung 37).

Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte für Granatapfelkonfitüre A und B waren im Vergleich zu der Schmelztemperatur der PCR-Produkte für Granatapfel um 0,4 °C niedriger.

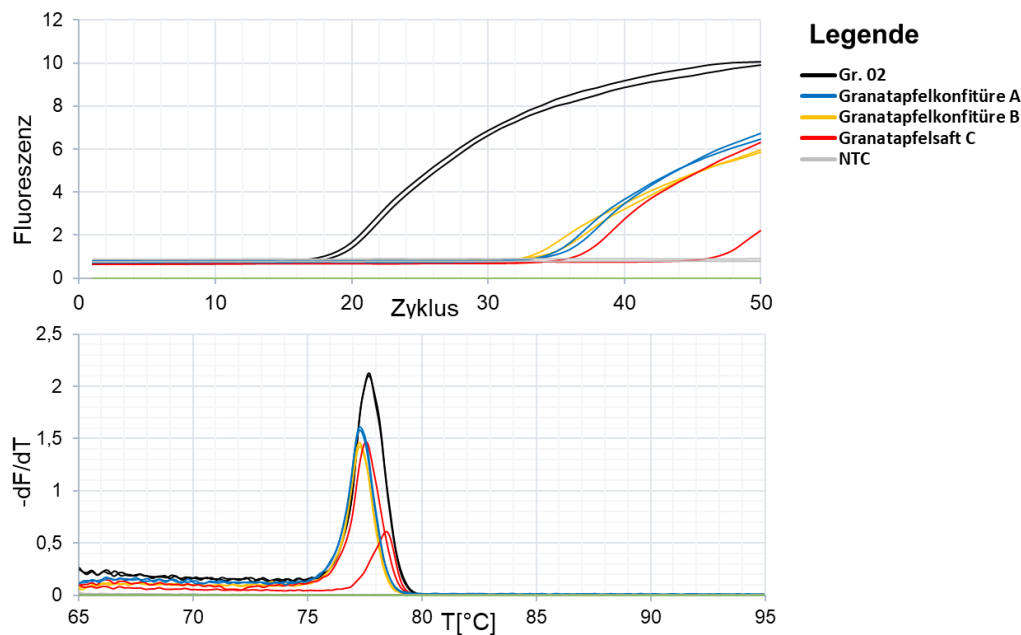


Abbildung 37: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus granatapfelhaltigen Lebensmitteln (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rbcL* 1.0

Die PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar *rpoC1* 1.0 führte zu einem PCR-Produkt für Granatapfelkonfitüre A und B, während im Fall von Granatapfelsaft C nur eines der beiden Duplikate zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führte. Die Schmelztemperatur der PCR-Produkte für Granatapfelkonfitüre A und B war um 0,3 °C niedriger als die Schmelztemperatur der Amplifikate für Granatapfel.

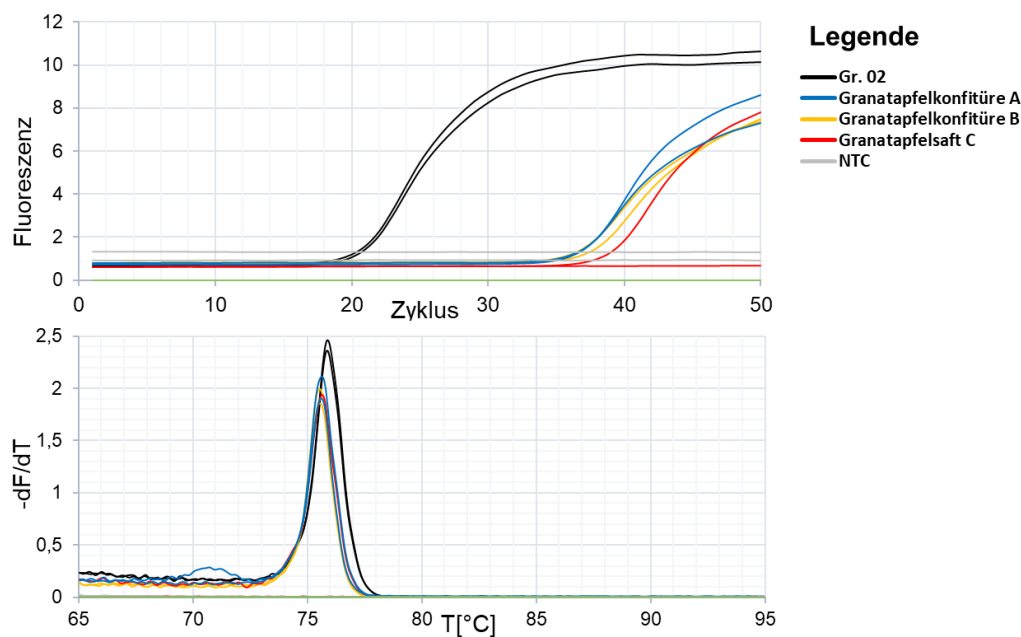


Abbildung 38: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus granatapfelhaltigen Lebensmitteln (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rpoC1* 1.0

4.3.4 Zusammenfassung für die PCR-HRM Analysen mit dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0

Die Primerpaare rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0 führten zu PCR-Produkten für Pflanzenspezies, die zur Verfälschung von granatapfelhaltigen Lebensmitteln eingesetzt werden. Mit dem auf dem rbcL 1.0 Primerpaar basierten Assay konnte Granatapfel von roter Johannisbeere, blauer und weißer Traube, Nektarine, Orange, Karotte, Pflaume, Aronia und Sauerkirsche unterschieden werden. Der auf dem Primerpaar rpoC1 1.0 basierte PCR-HRM Assay ermöglichte die Unterscheidung von Granatapfel und Apfel, Kulturheidelbeere, Birne, Nektarine, Karotte, Pflaume, Aronia und Sauerkirsche. Mit dem Primerpaar rbcL 2.0 war es möglich, Granatapfel von Apfel, Roter Johannisbeere, Roter Beete, Birne, Nektarine, Orange, Karotte und Aronia zu unterscheiden. Die PCR-Produkte für alle getesteten Spezies, außer für Cranberry, zeigten in mindestens einem der drei Assays eine Abweichung der Schmelztemperatur von $\pm 0,5$ ° C im Vergleich zu der Schmelztemperatur der Amplikons für Granatapfel (siehe Tabelle 48).

Für Granatapfelproben, die sich entweder in ihrer Sorte und/oder in ihrem Herkunftsland unterschieden, wurden mit jedem der drei Assays PCR-Produkte erhalten, die ein identes Schmelzverhalten zeigten. Die PCR-Produkte, die für die Lebensmittelproben erhalten wurden, unterschieden sich in ihrem Schmelzverhalten geringfügig vom Schmelzverhalten der Produkte, die für Granatapfel erhalten wurden. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf Matrixeffekte zurückzuführen, da Substanzen, die bei der DNA-Extraktion nicht entfernt wurden, das Schmelzverhalten der Amplikons beeinflussen können.

4.4 PCR-HRM Analyse mittels Duplex Assays

Als nächstes wurde geprüft, ob durch Kombinationen von zwei Primerpaaren in einem Duplex Assay (siehe Kapitel 3.5.1.1) das Diskriminierungspotenzial zwischen Granatapfel und anderen Pflanzenspezies erhöht werden konnte. Diese Versuche wurden bei einer Annealing-Temperatur von 59 °C und einer Primerkonzentration von 0,4 µM durchgeführt.

4.4.1 Anwendung der Duplex Assays auf DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies

Der Duplex Assay mit den Primerpaaren rbcL 1.0 und rpoC1 1.0 führte, wie in Abbildung 39 dargestellt, zu Amplikons für verschiedene, für Verfälschungen relevante Pflanzenspezies. Die PCR-Produkte, die mit dem Duplex Assay erhalten wurden, unterschieden sich nicht nur in ihrer Schmelztemperatur, sondern auch in der Form der Schmelzkurven.

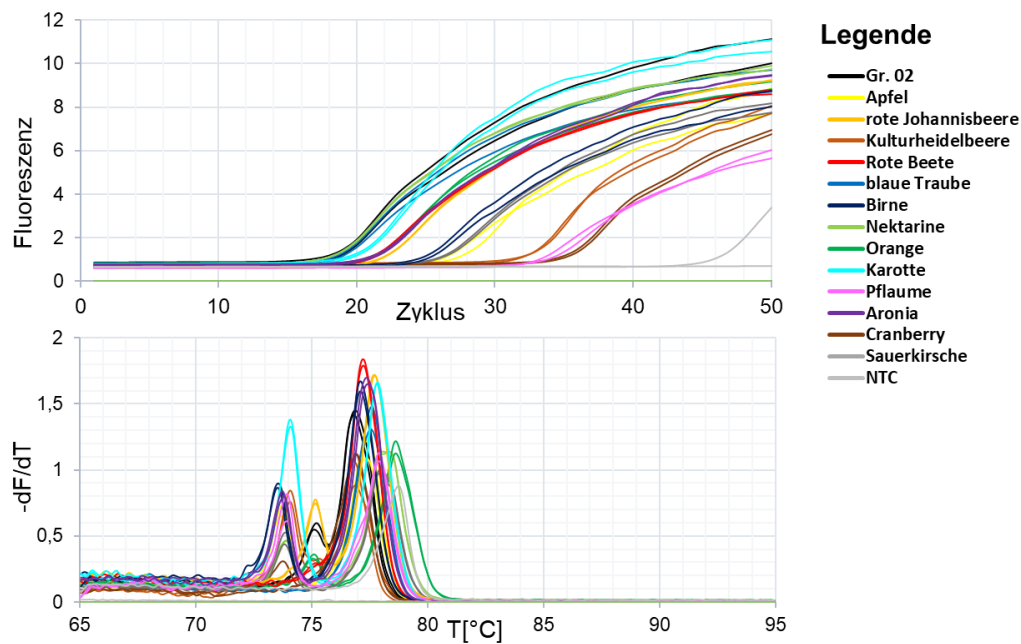


Abbildung 39: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rpoC1* 1.0

Um Unterschiede im Kurvenverlauf der Schmelzkurven zu verdeutlichen, wurden die Messwerte als Differenz-Plots bezüglich der Schmelzkurven für Granatapfel dargestellt (siehe Abbildung 40). Die PCR-Produkte für die zur Verfälschung eingesetzten Spezies zeigten in ihrem Schmelzverhalten Abweichungen vom Schmelzverhalten der PCR-Produkte, die für Granatapfel erhalten wurden.

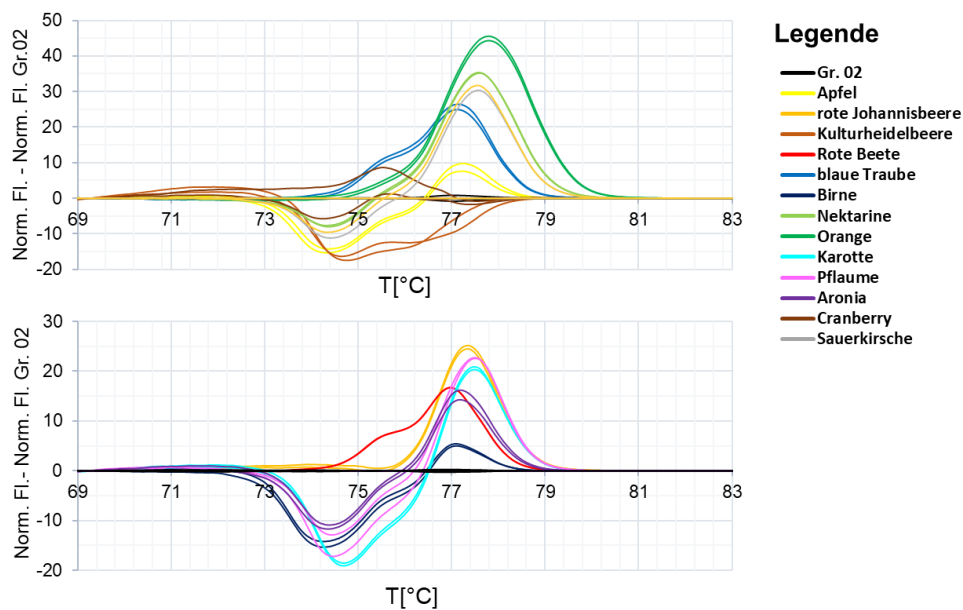


Abbildung 40: Differenz-Plots für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rpoC1* 1.0

Der Duplex Assay mit den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0 führte, wie in Abbildung 41 ersichtlich, zu PCR-Produkten für Pflanzenspezies, die für Verfälschungen von granatapfelhaltigen Produkten relevant sind. Die PCR-Produkte für alle getesteten Pflanzenspezies unterschieden sich nicht nur in ihrer Schmelztemperatur, sondern auch in der Form der Schmelzkurven. Da die beiden Primerpaare für dasselbe Gen entworfen wurden und der Abstand zwischen den Templaten im Größenbereich von 250 bp lag, konnten zusätzlich längere PCR-Produkte gebildet werden, die bei einer höheren Temperatur schmolzen.

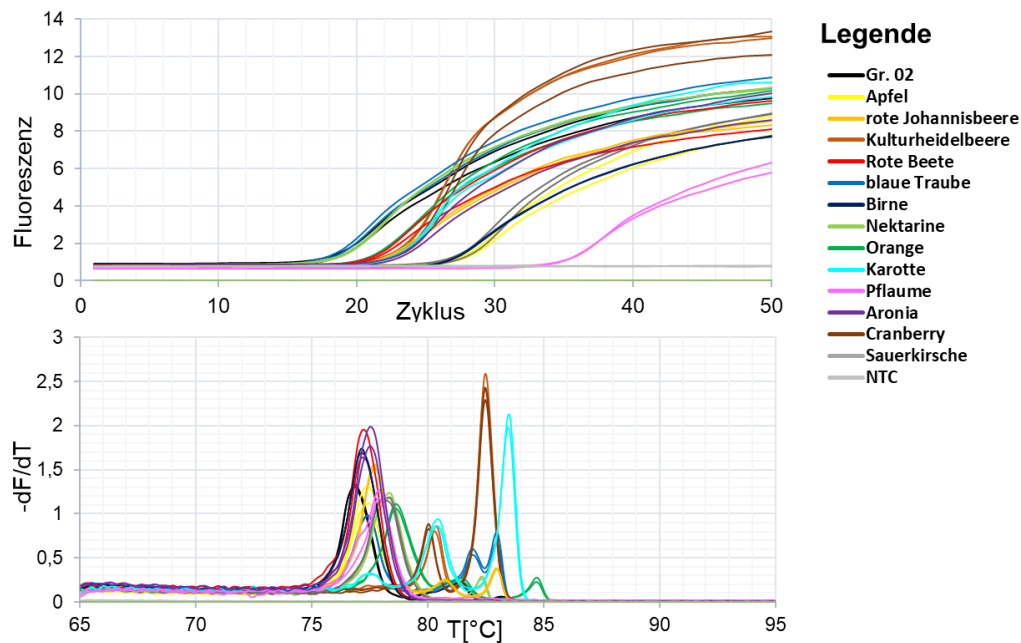


Abbildung 41: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0

Um Unterschiede im Kurvenverlauf der Schmelzkurven zu veranschaulichen, wurden Differenz-Plots erstellt. Als Referenz dienten die für die Granatapfel-Amplikons erhaltenen Schmelzkurven. Es ist ersichtlich, dass mit diesem Assay Granatapfel von allen anderen untersuchten Pflanzenspezies unterschieden werden konnte (siehe Abbildung 42).

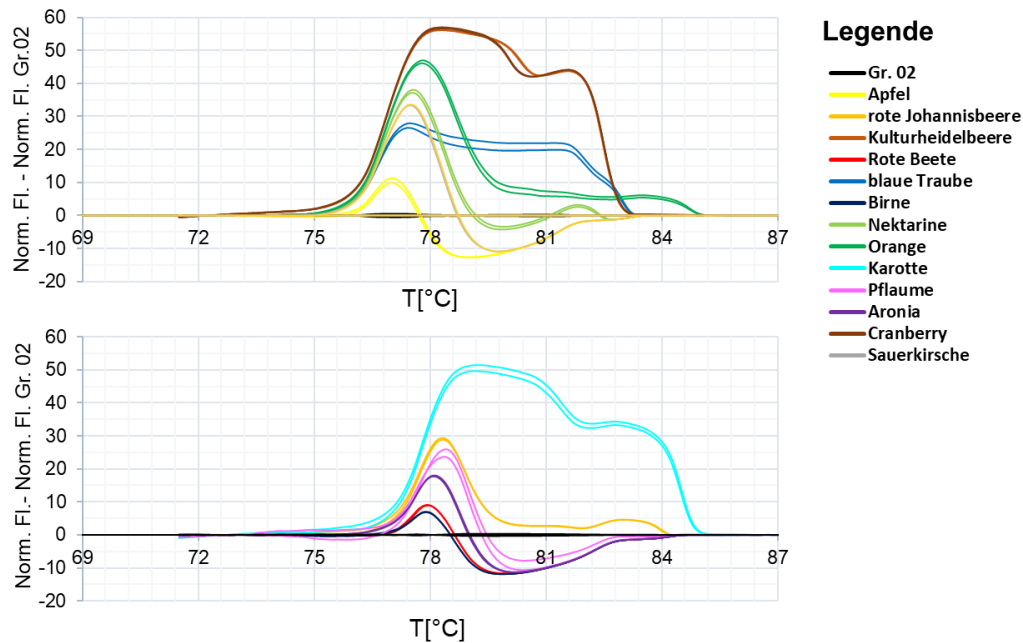


Abbildung 42: Differenz-Plots für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcL* 1.0 und *rbcL* 2.0

Der Duplex Assay mit den Primerpaaren *rbcL* 2.0 und *rpoC1* 1.0 führte, wie in Abbildung 43 ersichtlich, zu PCR-Produkten für Pflanzenspezies, die für die Verfälschung von granatapfelhaltigen Produkten relevant sind. Die Ergebnisse diesen Assays zeigten, dass viele PCR-Produkte ein sehr ähnliches Schmelzverhalten aufwiesen. Für Granatapfel, Heidelbeere, Traube und Cranberry wurde ein zweiter Peak bei einer Schmelztemperatur von 81 °C erhalten. Die PCR-Produkte für Nektarine, Apfel und Sauerkirsche zeigten ein sehr ähnliches Schmelzverhalten mit einer Schmelztemperatur von 74 °C.

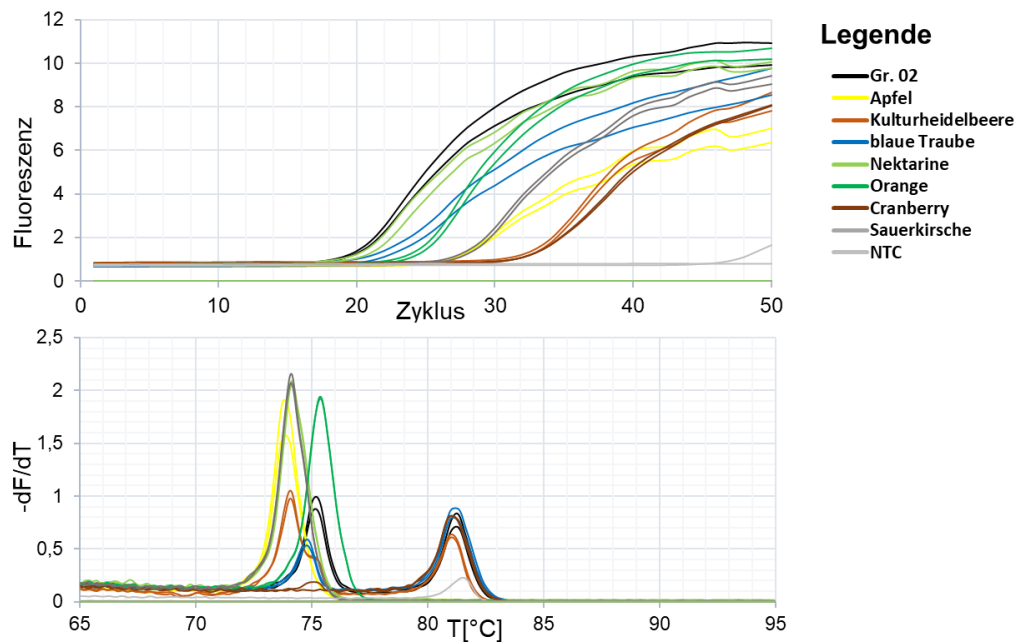


Abbildung 43: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rpoC1* 1.0 und *rbcL* 2.0

Die Ergebnisse der HRM-Analyse wurden als Differenz-Plot bezüglich der Schmelzkurven für Granatapfel dargestellt. Die untersuchten Pflanzenspezies führten zu PCR-Produkten, deren Schmelzverhalten vom Schmelzverhalten der Amplikons für Granatapfel abwich (siehe Abbildung 44).

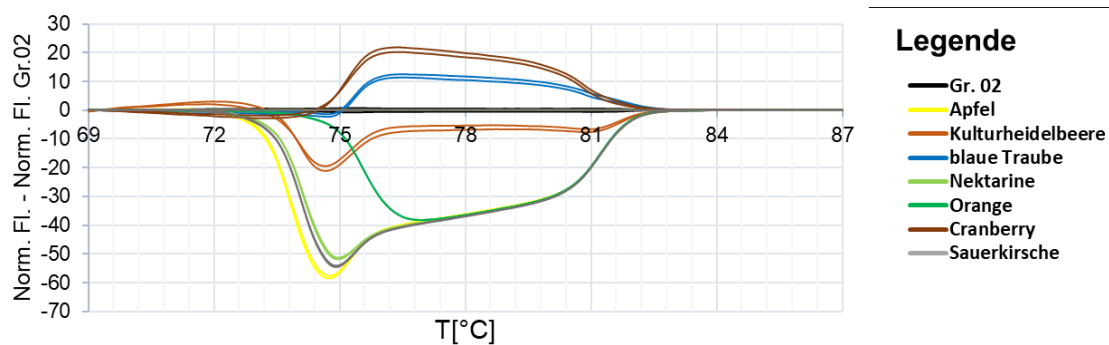


Abbildung 44: Differenz-Plot für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rpoC1* 1.0 und *rbcL* 2.0

4.4.2 Anwendbarkeit der Duplex Assays auf eine Granatapfel-Trauben-Mischung

Als nächstes wurde untersucht, ob die entwickelten Duplex Assays es ermöglichten, Traube als mögliche Verfälschung in einer Mischung aus Granatapfel und Traube zu detektieren. Dazu wurde Granatapfel Gr. 02 mit blauer Traube im Verhältnis 1:1 (w/w) gemischt (siehe Kapitel 3.2).

Der Duplex Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rpoC1* 1.0 führte zu PCR-Produkten für Granatapfel 02, für blaue Traube und für die Mischung von blauer Traube und Granatapfel 02. Das Schmelzverhalten der PCR-Produkte für die Mischung aus blauer Traube und Granatapfel unterschied sich vom Schmelzverhalten der PCR-Produkte für Granatapfel 02 und blaue Traube (siehe Abbildung 45).

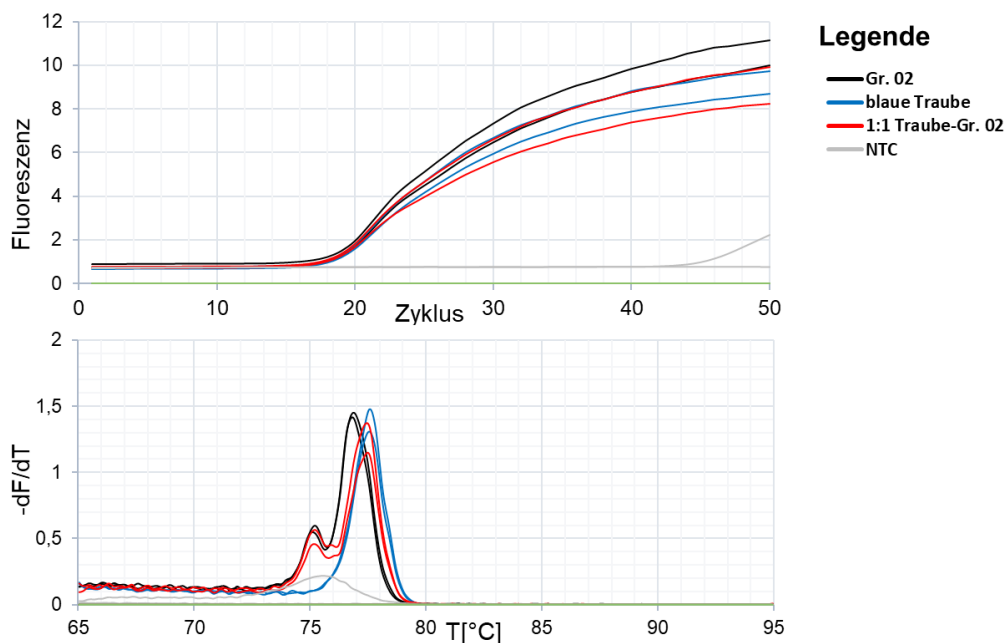


Abbildung 45: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Traube und Granatapfel (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rpoC1* 1.0

Der Duplex Assay mit den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rbcl* 2.0 führte zu Amplikons für Granatapfel 02, blaue Traube und für die Mischung aus blauer Traube und Granatapfel 02. Das Schmelzverhalten der PCR-Produkte für die Mischung aus blauer Traube und Granatapfel unterschied sich vom Schmelzverhalten der PCR-Produkte für Granatapfel 02 und blaue Traube (siehe Abbildung 46).

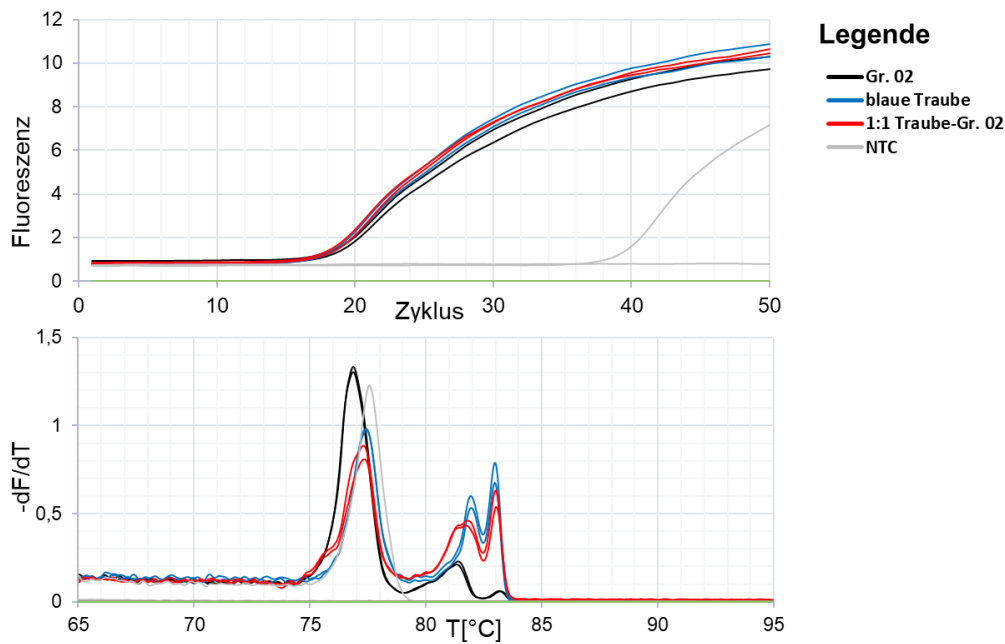


Abbildung 46: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Traube und Granatapfel (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rbcl* 2.0

Der Duplex Assay mit den Primerpaaren *rpoC1* 1.0 und *rbcl* 2.0 führte zu Amplikons für Granatapfel 02, blaue Traube und für die Mischung aus blauer Traube und Granatapfel 02. Das Schmelzverhalten der PCR-Produkte war für alle drei Proben sehr ähnlich und somit war keine Unterscheidung zwischen den getesteten Pflanzenarten möglich (siehe Abbildung 47).

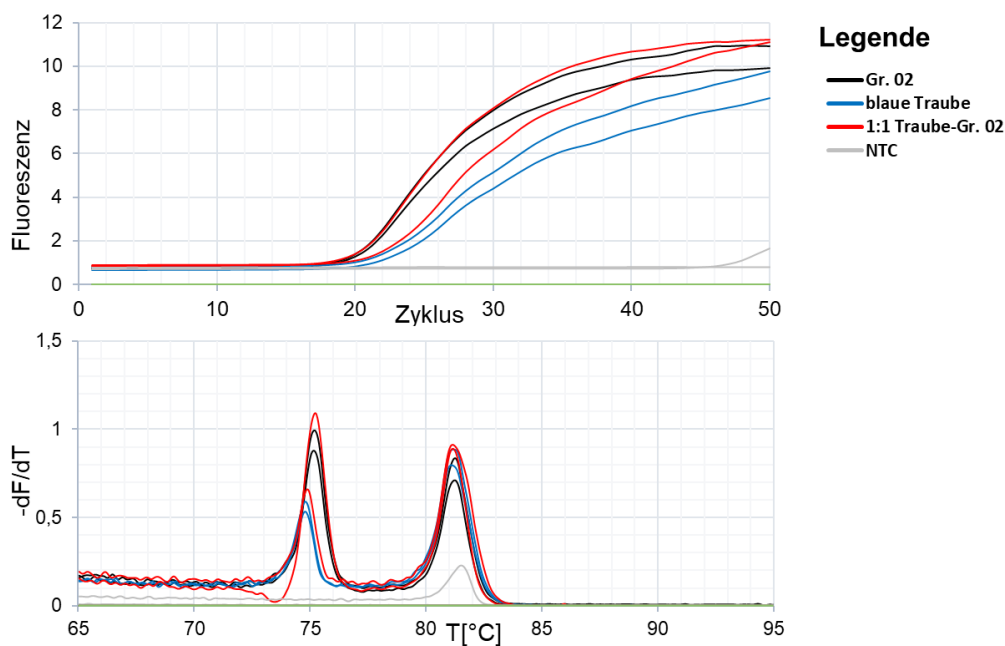


Abbildung 47: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Traube und Granatapfel (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6), Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rpoC1* 1.0 und *rbcl* 2.0

4.4.3 Anwendbarkeit der Duplex Assays auf granatapfelhaltige Lebensmittelproben

Als nächstes wurde die Anwendbarkeit der Duplex Assays auf kommerzielle, granatapfelhaltige Lebensmittel untersucht. Dazu wurden verschiedene Konfitüren und Säfte analysiert.

In Abbildung 48 sind die Amplifikationskurven und Schmelzprofile der PCR-HRM Analyse mit einem Duplex Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rpoC1* 1.0 dargestellt. Die Amplifikationskurven für Granatapfel 02 zeigten bei einem Ct-Wert von 15 einen Anstieg des Fluoreszenzsignales, die für Granatapfelsaft A bei einem Ct-Wert von 22. Für Lebensmittelproben wurde ein Ct-Wert > 30 erzielt. Für keines der Lebensmittelprodukte wurden Schmelzkurven erhalten, die mit denen für Granatapfel ident waren.

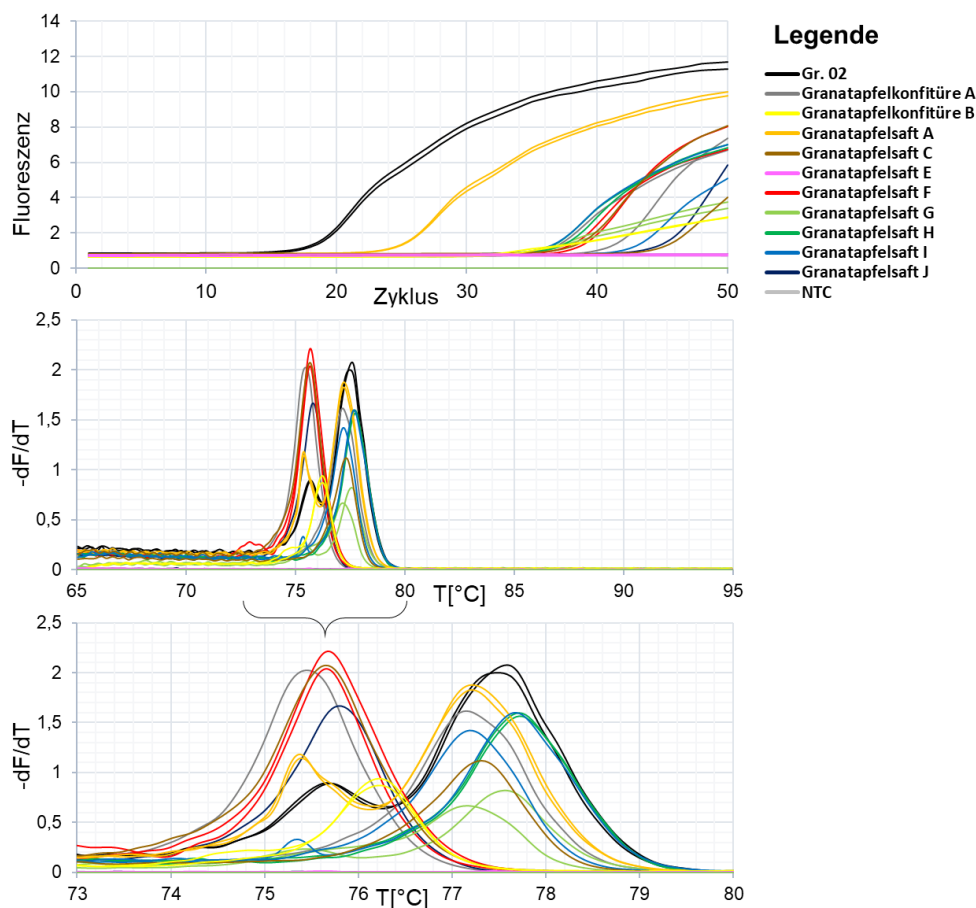


Abbildung 48: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Lebensmitteln, Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rpoC1* 1.0

In Abbildung 49 sind die Amplifikationskurven und Schmelzprofile der PCR-HRM Analyse mit den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rbcl* 2.0 dargestellt. Die Amplifikationskurven für Granatapfel

02 zeigten bei einem Ct-Wert von 15 einen Anstieg des Fluoreszenzsignales, die Amplifikationskurven für Granatapfelsaft A bei einem Ct-Wert von 22. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte für Granatapfelsaft A zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Schmelzkurven für Granatapfel 02. Die Amplifikationskurven für die weiteren Lebensmittelproben stiegen erst bei einer sehr hohen Zykluszahl (Ct-Wert > 31) an. Bei der Doppelbestimmung ein und derselben Probe wurden für Granatapfelkonfitüre A, Granatapfelsaft F und Granatapfelsaft I PCR-Produkte erhalten, die sich in ihrem Schmelzverhalten unterschieden und vom Schmelzverhalten der Amplikons für Granatapfel 02 abwichen.

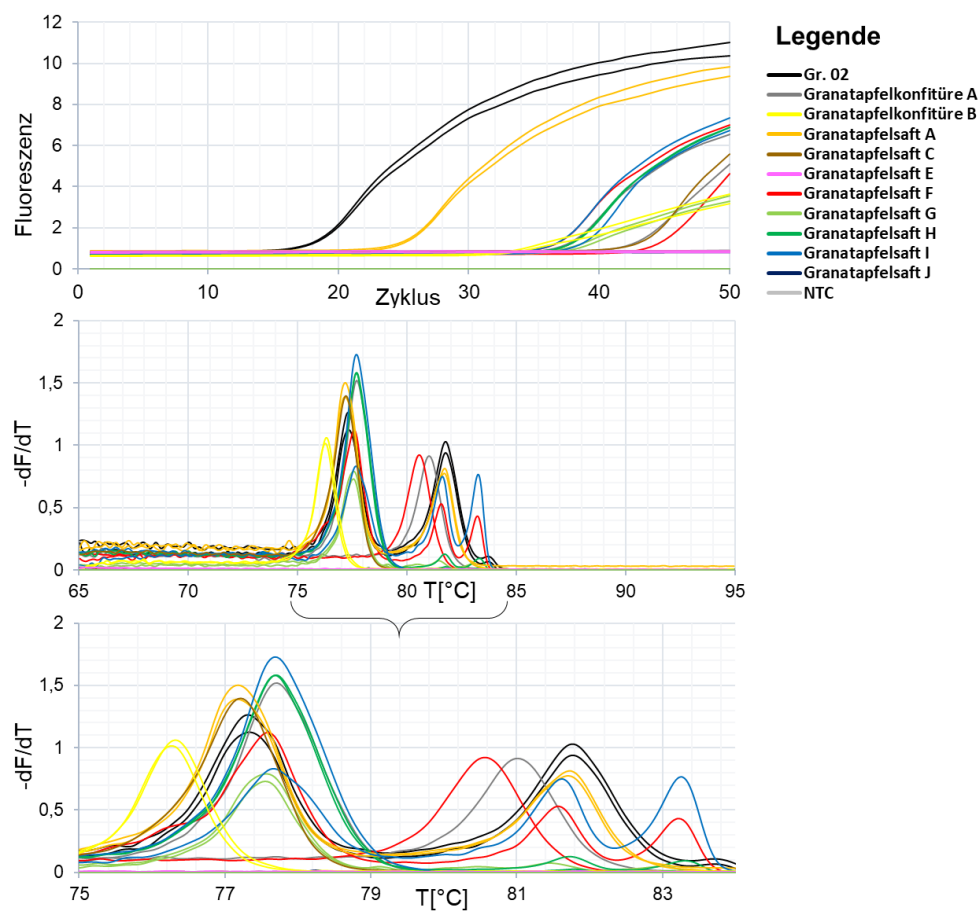


Abbildung 49: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Lebensmitteln, Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren *rbcl* 1.0 und *rbcl* 2.0

4.4.4 Zusammenfassung der PCR-HRM Analyse mit kombinierten Primerpaaren

Mit den Duplex Assays war es möglich, das Diskriminierungspotenzial zwischen Granatapfel und Spezies, die zur Verfälschung von granatapfelhaltigen Lebensmitteln eingesetzt werden, zu erhöhen. Bei der Analyse einer Mischung aus Granatapfel und blauer Traube im Verhältnis 1:1 (w/w) wurden PCR-Produkte erhalten, die sich im Schmelzverhalten von den Produkten, die für Granatapfel oder blaue Traube erhalten wurden, unterschieden.

Die PCR-HRM Analyse von DNA-Extrakten aus Lebensmitteln mit einer Kombination der Primerpaare rbcL 1.0 und rpoC1 1.0 sowie rbcL 1.0 und rbcL 2.0 führte zu PCR-Produkten für alle getesteten Lebensmittel. Die PCR-Produkte für die getesteten, granatapfelhaltigen Lebensmittelproben zeigten nicht dasselbe Schmelzverhalten wie die für Granatapfel erhaltenen Amplikons. Mögliche Gründe dafür sind unter anderem eine Verfälschung der Lebensmittelprobe mit Fremd-DNA, Fragmentierung der DNA bei der Lebensmittelprozessierung oder Matrixeffekte, die das Schmelzverhalten beeinflusst haben.

4.5 Abschätzung der Länge der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Um die bei den PCR-HRM Analysen erhaltenen Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurde als nächstes die Länge der PCR-Produkte, die in den oben beschriebenen Versuchen erhalten worden waren (siehe Tabelle 49), mittels Gelelektrophorese untersucht.

Tabelle 49: Aufgabeschema für das in Abbildung 50 dargestellte Gel

	Probe	Primer	Verweis zu der entsprechenden PCR-HRM Analyse
1	Marker	-	-
2	Gr. 02	rbcL 1-0	Abbildung 31
3	Blaue Traube	rbcL 1-0	Abbildung 31
4	Cranberry	rbcL 1-0	Abbildung 31
5	Gr. 02	rpoC1 1-0	Abbildung 32
6	Blaue Traube	rpoC1 1-0	Abbildung 32
7	Cranberry	rpoC1 1-0	Abbildung 32
8	Gr. 02	rbcL 2-0	Abbildung 33
9	Blaue Traube	rbcL 2-0	Abbildung 33
10	Cranberry	rbcL 2-0	Abbildung 33
11	Granatapfelkonfitüre B	rbcL 1-0	Abbildung 37
12	Granatapfelsaft C	rbcL 1-0	Abbildung 37
13	Granatapfelkonfitüre A	rbcL 1-0	Abbildung 37
14	Granatapfelkonfitüre B	rpoC1 1-0	Abbildung 38
15	Granatapfelsaft C	rpoC1 1-0	Abbildung 38
16	Granatapfelkonfitüre A	rpoC1 1-0	Abbildung 38
17	Blaue Traube	rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	Abbildung 45
18	1:1 Traube - Gr. 02	rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	Abbildung 45
19	Blaue Traube	rbcL 1.0 und rbcL 2.0	Abbildung 46
20	1:1 Traube - Gr. 02	rbcL 1.0 und rbcL 2.0	Abbildung 46
21	Gr. 02	rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	Abbildung 39
22	Cranberry	rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	Abbildung 39
23	Granatapfelsaft C	rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	Abbildung 48
24	Granatapfelkonfitüre B	rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	Abbildung 48
25	Gr. 02	rbcL 1.0 und rbcL 2.0	Abbildung 41
26	Cranberry	rbcL 1.0 und rbcL 2.0	Abbildung 41
27	Granatapfelsaft C	rbcL 1.0 und rbcL 2.0	Abbildung 49
28	Granatapfelkonfitüre B	rbcL 1.0 und rbcL 2.0	Abbildung 49
29	Marker	-	-
30	-	-	-

Die Lage der erhaltenen Banden (siehe Abbildung 50) lässt darauf schließen, dass die PCR-Produkte eine Länge von 100 bis 150 bp hatten. Es ist ersichtlich, dass keine Primer-Dimere gebildet worden waren. Für Cranberry wurde mit dem auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0 basierenden Duplex Assay (Lane 26) ein PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 400 bp erhalten. Für blaue Traube (Lane 19) und für die Mischung aus Traube und Granatapfel (Lane 20) wurde mit dem auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0 basierenden Duplex Assay je eine zusätzliche, schwache Bande erhalten, die auf die Bildung eines längeren PCR-Produkts hinweist.

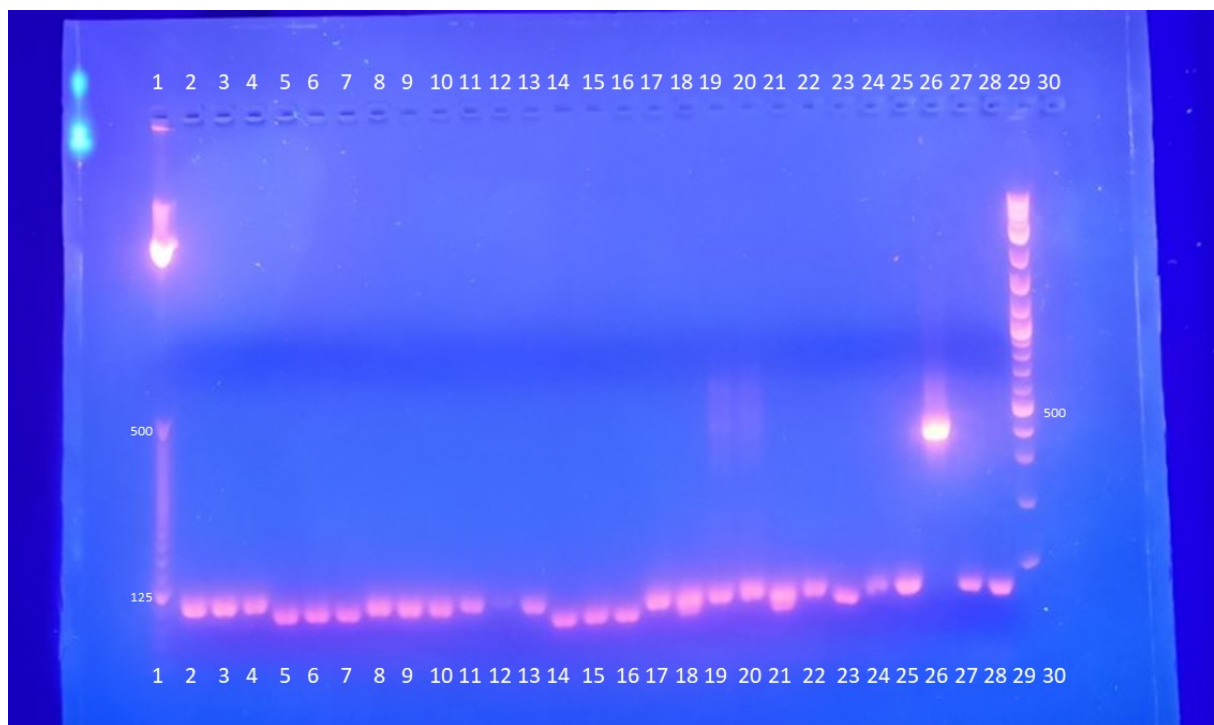


Abbildung 50: Abschätzung der Länge der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese, das Beladungsschema ist in Tabelle 49 angegeben

4.6 Validierung der entwickelten Singleplex Assays

Um die auf dem Primerpaar *rbcl* 1.0 oder *rpoC1* 1.0 basierenden PCR-HRM Assays zu validieren, wurden DNA-Extrakte aus Fruchtsäften von Spezies, die häufig zur Verfälschung von granatapfelhaltigen Lebensmitteln eingesetzt werden, untersucht. Mischungen aus Granatapfelsaft und verschiedenen Fruchtsäften wurden analysiert, um die Selektivität und Nachweisgrenze der Assays zu bestimmen.

Die optimale Annealing-Temperatur für die Primerpaare wurde experimentell für eine Mischung aus Granatapfel und blauer Traube (1:1, w/w) bestimmt und betrug 55 °C. Die optimale Primerkonzentration lag bei 0,4 µM.

4.6.1 PCR-HRM Analyse von DNA-Extrakten aus Fruchtsäften basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 1.0 oder *rpoC1* 1.0

Es wurden je drei kommerzielle Säfte (A, B, C) von Spezies ausgewählt, die häufig zur Verfälschung von granatapfelhaltigen Lebensmitteln verwendet werden. Die Fruchtsäfte sind in Kapitel 6 (Seite II) aufgelistet, es handelt sich um Säfte mit einem Fruchtanteil von 100 %, mit Ausnahme von den Pfirsichsäften, die einen Pfirsichanteil zwischen 25 - 50 % aufwiesen (siehe Tabelle 52). Die extrahierte DNA wurde mittels PCR-HRM Assays basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 1.0 oder *rpoC1* 1.0 untersucht.

Die Ergebnisse der PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 1.0 sind in Abbildung 51 dargestellt. Die für die beiden Granatapfelsäfte erhaltenen Amplikons wiesen eine Schmelztemperatur von 77,5 °C auf. Es wurden PCR-Produkte für alle drei Apfelsäfte (A,B,C) erhalten. Die PCR-Produkte schmolzen bei einer Temperatur von 78,0 °C. Diese war somit um 0,5 °C höher als die Schmelztemperatur der Amplikons für die Granatapfelsäfte A und B. Für die Traubensäfte A und C wurden keine PCR-Produkte erhalten. Die Amplifikationskurven für Traubensaft B zeigten erst bei einem Ct-Wert > 35 einen Anstieg und die Schmelzkurven der entsprechenden Amplikons wichen stark voneinander ab. Die DNA-Extrakte aus den Pfirsichsäften A, B und C führten zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignales. Bei der Doppelbestimmung des DNA-Extraktes aus Pfirsichsaft A wurden PCR-Produkte mit einem unterschiedlichen Schmelzverhalten gebildet. Die Amplikons für Pfirsichsaft B und Pfirsichsaft C schmolzen bei 78,8 °C und waren somit gut von den Amplikons für Granatapfelsaft unterscheidbar. Die PCR-HRM Analyse führte auch für die Rote Beete Säfte zu PCR-Produkten, die bei 78,0 °C schmolzen. Das Schmelzprofil, das für Rote Beete Saft A erhalten wurde, wies einen zusätzlichen Peak bei 79,4 °C auf. Die PCR-HRM Analyse führte zu PCR-Produkten für Aroniasaft A. Für Aroniasaft C wurde nur für ein Duplikat eine Amplifikationskurve erhalten. Für Aroniasaft B wurden keine PCR-Produkte erhalten.

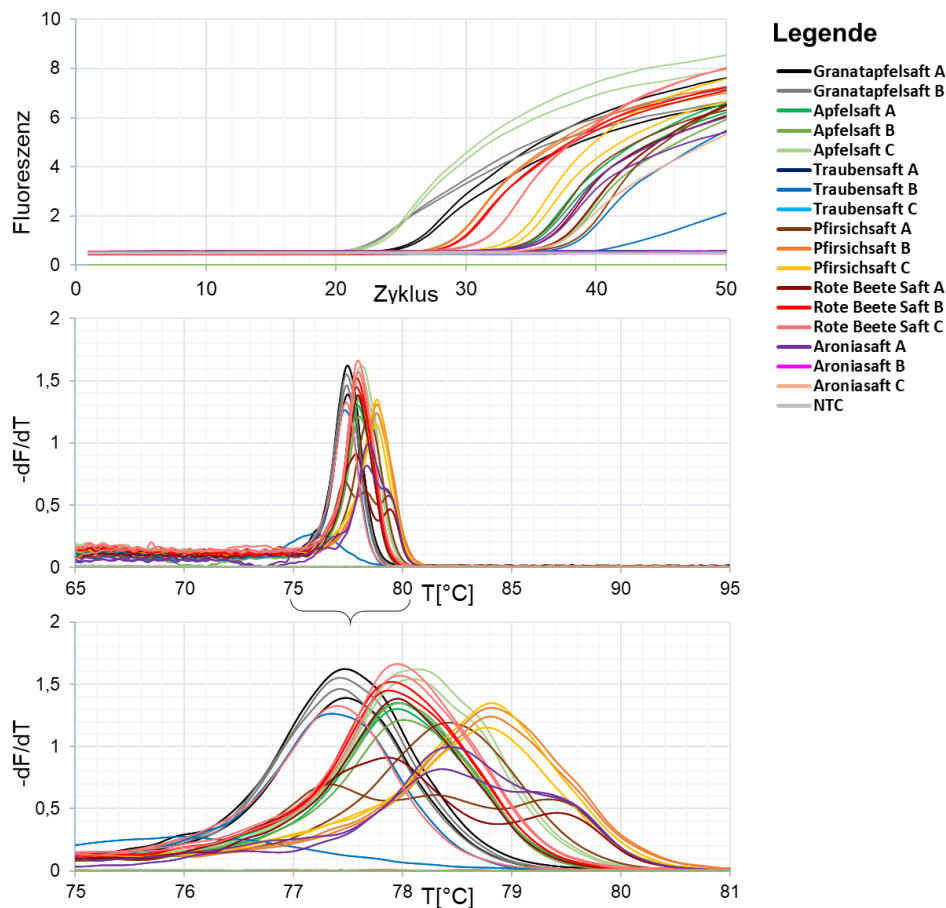


Abbildung 51: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Fruchtsäften (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 1.0

Die Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Fruchtsäften basierend auf dem Primerpaar *rpoC1* 1.0 sind in Abbildung 52 dargestellt. Die PCR-HRM Analyse führte zu PCR-Produkten für die Granatapfelsäfte A und B, welche einheitlich bei 75,9 °C schmolzen. Die für die Apfelsäfte A, B und C erhaltenen PCR-Produkte schmolzen bei 74,6 °C, damit war die Schmelztemperatur um 1,3 °C niedriger als für Amplikons, die für die Granatapfelsäfte erhalten wurden. Die PCR-HRM Analyse führte zu keinem eindeutigen Ergebnis für DNA-Extrakte aus Traubensaft A, das Fluoreszenzsignal der Amplifikationskurven für Traubensaft B und C stieg jeweils nur in einem Ansatz an. Es wurden PCR-Produkte für die Pfirsichsäfte A, B und C erhalten. Diese schmolzen bei einer Temperatur von 74,8 °C. Dadurch unterschied sich die Schmelztemperatur dieser Amplikons von der Schmelztemperatur der PCR-Produkte für die Granatapfelsäfte A und B um 1,1 °C. Die PCR-HRM Analyse führte auch zu PCR-Produkten für die Rote Beete Säfte A, B und C, die bei 76,0 °C schmolzen und somit nicht von den Amplikons für die Granatapfelsäfte unterscheidbar waren.

Der Assay führte zu PCR-Produkten für Aroniasaft A; für Aroniasaft B wurde nur für ein Duplikat eine Amplifikationskurve erhalten. Für DNA aus Aroniasaft C wurde kein PCR-Produkt erhalten.

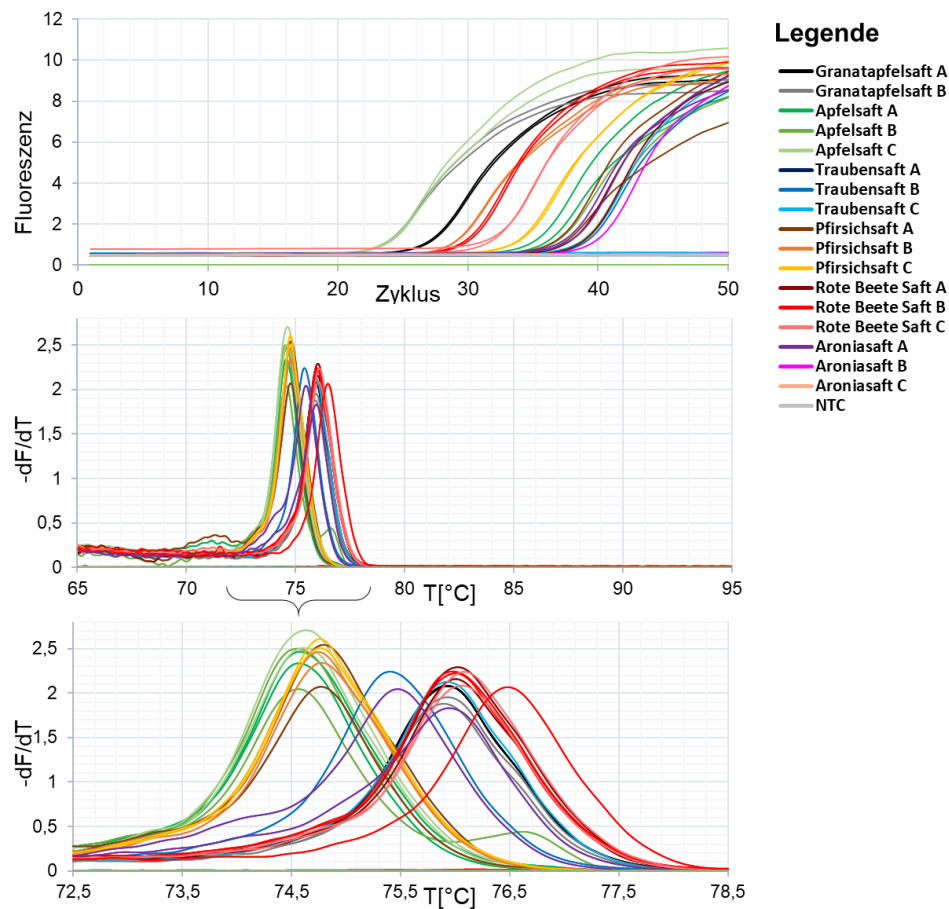


Abbildung 52: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Fruchtsäften (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0

4.6.2 Validierung der auf dem Primerpaar *rbcL* 1.0, *rpoC1* 1.0 oder *rbcL* 2.0 basierenden PCR-HRM Assays für den Nachweis von Apfelsaft in Granatapfelsaft

Die Nachweisgrenze der PCR-HRM Assays basierend auf dem Primerpaar *rbcL* 1.0, *rpoC1* 1.0 oder *rbcL* 2.0 wurde anhand von Mischungen aus Granatapfelsaft und Apfelsaft bestimmt. Apfelsaft wurde verwendet, da Apfel eine Spezies ist, die häufig für Verfälschungen von Lebensmitteln eingesetzt wird und die bisherigen PCR-HRM Analysen zu einer Bildung der PCR-Produkte für Apfelsaft führten (siehe Abbildung 51 und Abbildung 52). Der Anteil an Apfelsaft A in den Mischungen betrug 5 %, 10 %, 25 % oder 50 % (w/w)) (siehe Kapitel 3.2).

Die auf dem *rbcL* 1.0 Primerpaar basierende PCR-HRM Analyse führte zu Amplikons für Granatapfelsaft A, für die Mischungen von Apfel- und Granatapfelsaft und für Apfelsaft A (siehe Abbildung 53). Bei der Doppelbestimmung des DNA-Extraktes aus reinem Apfelsaft wurden PCR-Produkte mit unterschiedlichen Amplifikations- und Schmelzkurven gebildet. Alle Mischungen führten zu PCR-Produkten, die ein identes Schmelzverhalten aufwiesen wie die für Granatapfelsaft erhaltenen Amplikons. Selbst bei einem Apfelsaftanteil von 50 % konnte keine Verfälschung des Granatapfelsaftes detektiert werden.

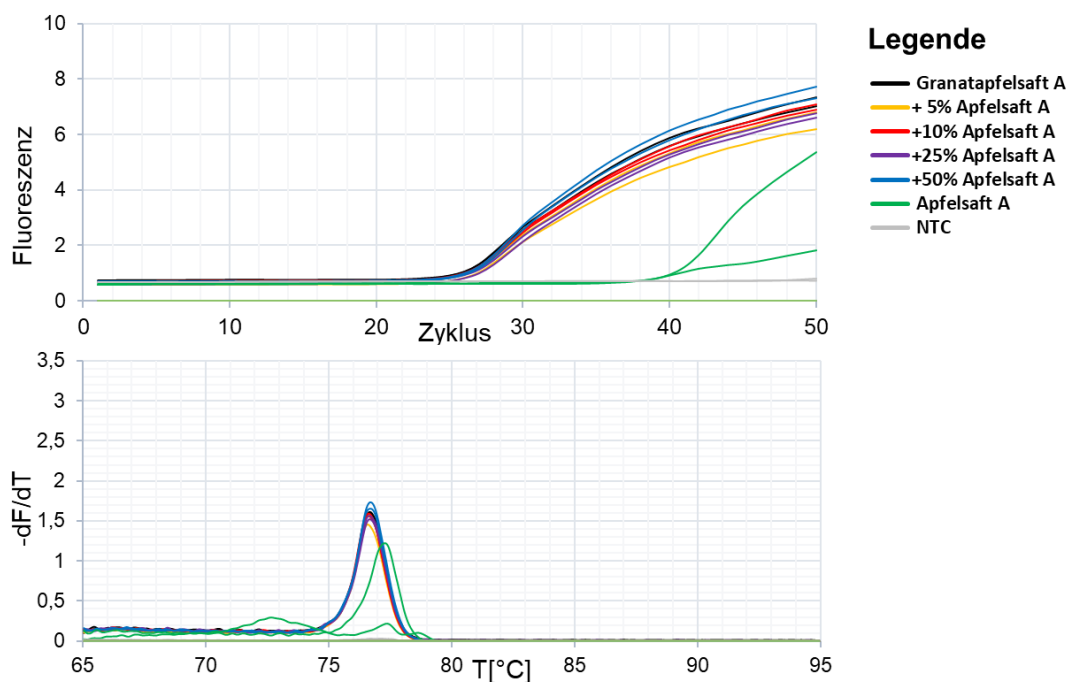


Abbildung 53: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Granatapfelsaft und Apfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Bestimmung der Nachweisgrenze für den PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rbcL* 1.0

Auch der auf dem Primerpaar rpoC1 1.0 basierte PCR-HRM Assay führte für die getesteten Mischungen zu Amplikons, die sich im Schmelzverhalten nicht von den PCR-Produkten, die für Granatapfelsaft erhalten wurden, unterschieden (siehe Abbildung 54). Ein Mischungsverhältnis von 50 % (w/w) Apfelsaft und Granatapfelsaft wurde bei der Schmelzkurvenanalyse nicht als Verfälschung detektiert.

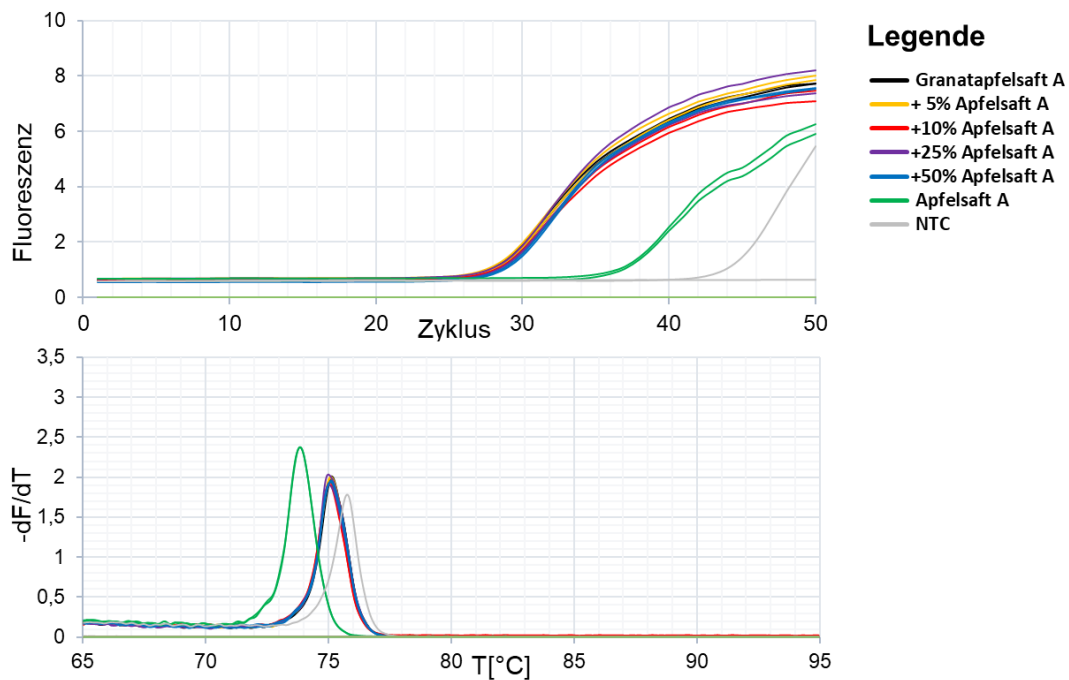


Abbildung 54: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Granatapfelsaft und Apfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Bestimmung der Nachweisgrenze für den PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0

Die Detektion von Apfelsaft in den getesteten Mischungen war auch mit dem auf dem Primerpaar rbcL 2.0 basierten PCR-HRM Assay nicht möglich, da sich die für die Mischungen erhaltenen PCR-Produkte in ihrem Schmelzverhalten nicht von den Amplikons, die für Granatapfelsaft erhalten wurden, unterschieden (siehe Abbildung 55). Folglich konnte durch die PCR-HRM-Methode basierend auf dem Primerpaar rbcL 2.0 keine Verfälschung von Granatapfelsaft mit Apfelsaft nachgewiesen werden.

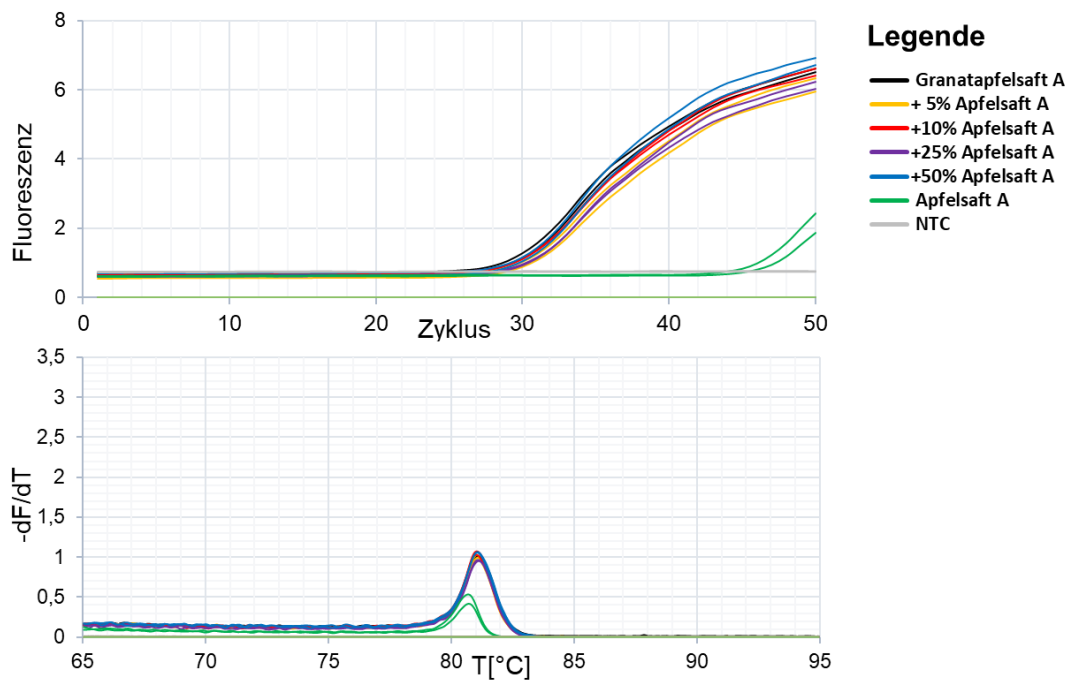


Abbildung 55: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Granatapfelsaft und Apfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6). Bestimmung der Nachweisgrenze für den PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 2.0

Da bei der PCR-HRM Analyse mit dem Primerpaar *rbcl* 1.0, *rpoC1* 1.0 oder *rbcl* 2.0 keine Verfälschung von Granatapfelsaft mit 50 % (w/w) Apfelsaft nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die Primer sich nicht an die aus Apfelsaft extrahierte DNA anlagerten, sobald auch Granatapfel-DNA im Ansatz vorlag, oder dass der Gehalt an Plastiden-DNA in DNA-Extrakten aus Apfelsaft deutlich niedriger war als in Extrakten aus Granatapfelsaft. Dies zeigt sich auch im höheren Ct-Wert (> 32) der Amplikons für Apfelsaft im Vergleich zum Granatapfelsaft (> 22).

4.6.3 Validierung der auf dem Primerpaar *rbcl* 1.0, *rpoC1* 1.0 oder *rbcl* 2.0 basierten PCR-HRM Assays für den Nachweis von Pfirsichsaft und Rote Beete Saft in Granatapfelsaft

Um zu überprüfen, ob mit den jeweiligen Primerpaaren eine Verfälschung von Granatapfelsaft mit Pfirsichsaft oder Rote Beete Saft detektiert werden konnte, wurde je eine Mischung von Granatapfelsaft A mit 50 % (w/w) Pfirsichsaft B oder 50 % (w/w) Rote Beete Saft B hergestellt. Mischungen von Granatapfelsaft mit Traubensaft und Aroniasaft wurden nicht untersucht, da diese Spezies erst bei einer sehr hohen Zykluszahl zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führten und die PCR-Produkte kein eindeutiges Schmelzverhalten aufwiesen (siehe Kapitel 4.6.1).

Bei der PCR-HRM Analyse basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0 waren die Schmelzkurven der PCR-Produkte für die Mischungen mit einem 50 % (w/w) Anteil an Pfirsichsaft oder Rote Beete Saft ident mit den Schmelzkurven der Amplikons für Granatapfelsaft (siehe Abbildung 56). Somit konnte keine Verfälschung von Granatapfelsaft mit Rote Beete Saft oder Pfirsichsaft nachgewiesen werden.

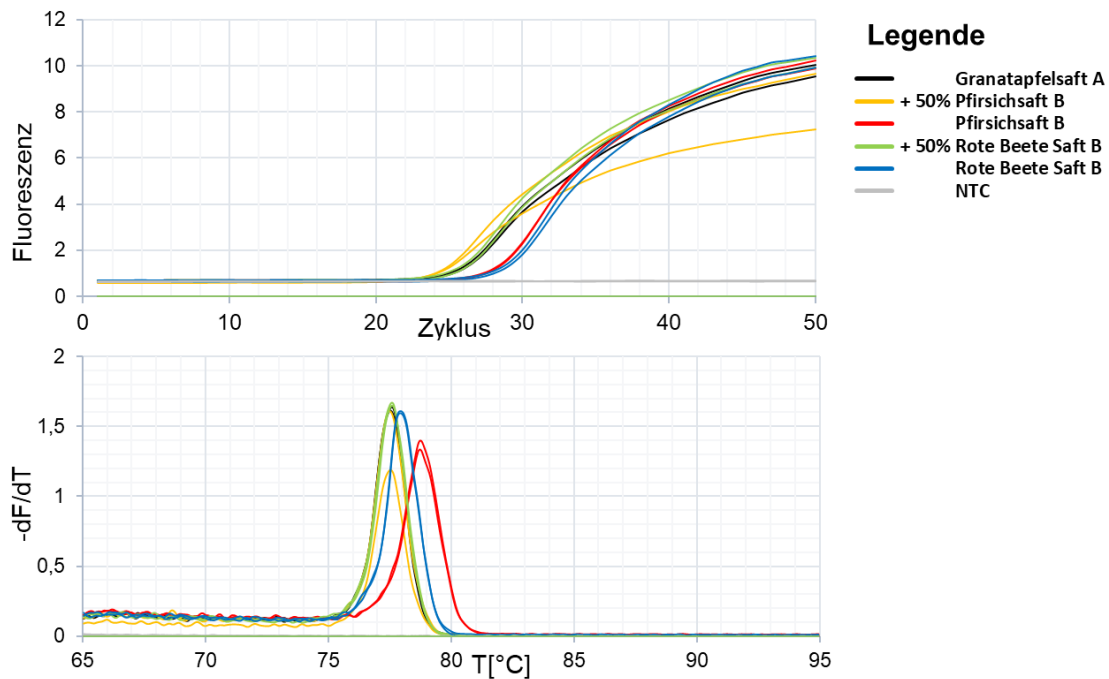


Abbildung 56: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Pfirsich oder Rote Beete Saft mit Granatapfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0

Weder der auf dem Primerpaar rpoC1 1.0 basierende Assay noch der auf dem Primerpaar rbcL 2.0 basierende Assay führte für die getesteten Mischungen zu PCR-Produkten, deren Schmelzverhalten sich von den PCR-Produkten für reinen Granatapfelsaft unterschied (siehe Abbildung 57 und Abbildung 58).

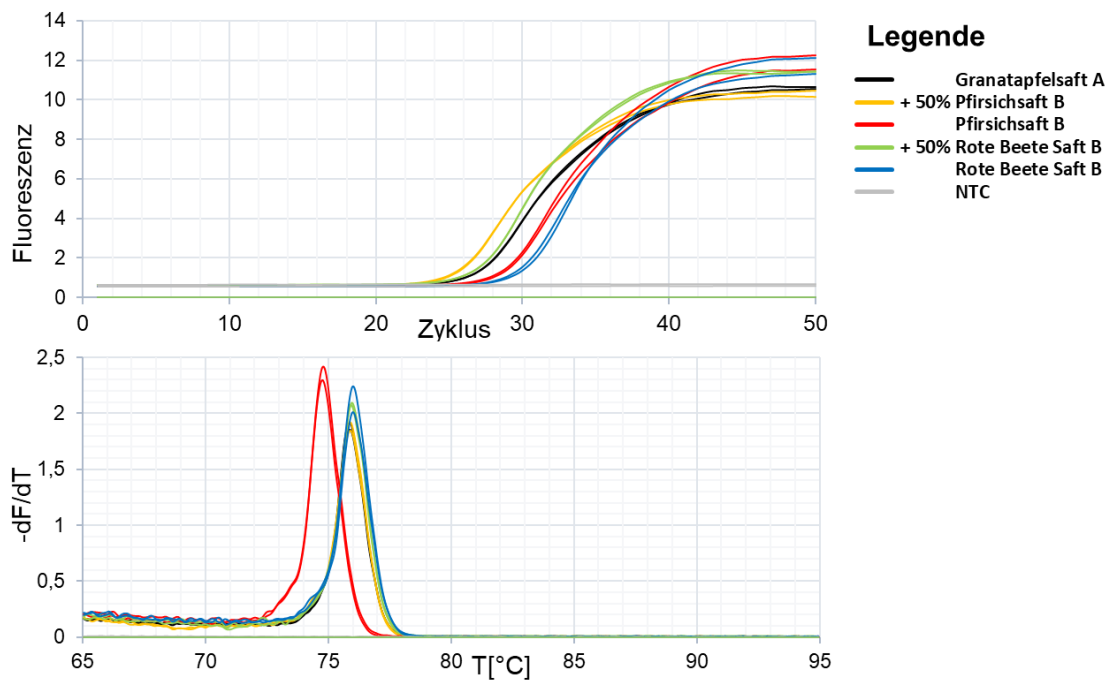


Abbildung 57: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Pfirsich oder Rote Beete Saft mit Granatapfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rpoC1* 1.0

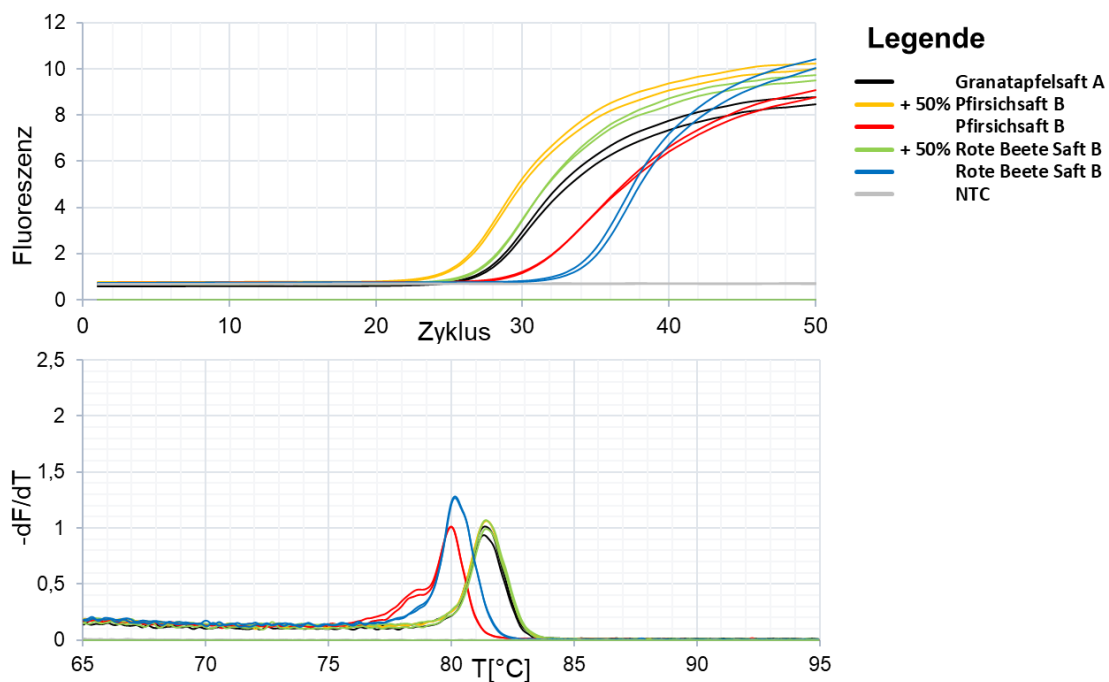


Abbildung 58: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Pfirsich oder Rote Beete Saft mit Granatapfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar *rbcl* 2.0

4.6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse für die PCR-HRM Analysen von Fruchtsäften

Die PCR-HRM Analysen mit dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0 führten nur teilweise zu einer erfolgreichen Amplifikation für Trauben- und Aroniasaft. Die für Pfirsichsaft, Rote Beete Saft und Apfelsaft erhaltenen PCR-Produkte zeigten einen anderen Schmelzkurvenverlauf als die für Granatapfel erhaltenen Produkte (siehe Kapitel 4.6.1).

Für Mischungen mit einem 50 % (w/w) Anteil von Apfel-, Pfirsich-, oder Rote Beete Saft wurde ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet, allerdings zeigten die PCR-Produkte dasselbe Schmelzverhalten wie die Schmelzkurven der Amplikons für Granatapfelsaft (siehe Kapitel 4.6.2 und 4.6.3).

Diese Resultate deuteten darauf hin, dass die Primerpaare rbcL 1.0, rpoC1 1.0 und rbcL 2.0 selektiv für Granatapfel sind.

4.7 Verminderung der Selektivität der Primer für Granatapfel

Durch den Einbau von Mismatch Basen wurde versucht, die Selektivität der Primer für Granatapfel zu reduzieren. Diese Primer wurden in einer PCR-HRM Analyse mit 50 % (w/w) Mischungen aus Granatapfelsaft und Säften anderer Pflanzenarten getestet.

Der Primer rpoC1 1.1 forward wurde komplementär zu den Sequenzen für Traube entworfen (siehe Tabelle 39) und enthielt eine Mismatch Base bezüglich der Granatapfelsequenz (siehe Tabelle 38). Die PCR-HRM Analyse mit dem Primer rpoC1 1.1 forward, in Kombination mit dem Primer rpoC1 1.0 reverse, führte zu keiner Amplifikation für Traubensaft (siehe Abbildung 59). Die Amplikons der Mischungen mit einem 50 % (w/w) Anteil an Traubensaft, Apfelsaft, Pfirsichsaft oder Rote Beete Saft zeigten dasselbe Schmelzverhalten wie die PCR-Produkte für Granatapfelsaft A. Die Amplifikationskurven für Granatapfelsaft A stiegen vor den anderen Amplifikationskurven bei einem Ct-Wert von 21 an.

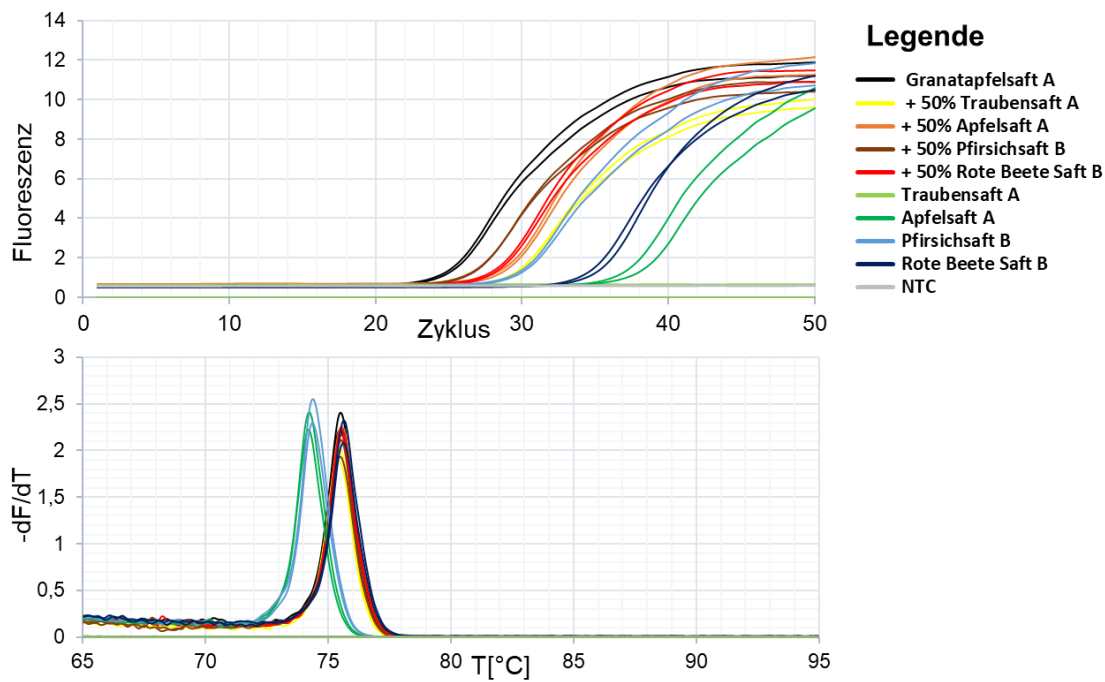


Abbildung 59: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf den Primern rpoC1 1.1 fw. und rpoC1 1.0 rev.

Der Primer rbcL 2.1 reverse enthielt eine Mismatch Base bezüglich der Granatapfelsequenz (siehe Tabelle 36) und sollte die Affinität für die Rote Beete Sequenz erhöhen (siehe Tabelle 37). Er wurde mit dem Primer rbcL 2.0 forward kombiniert. Die Amplifikationskurven für Granatapfelsaft A zeigten noch vor den anderen Amplifikationskurven bei einem Ct-Wert von 22 einen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Die PCR-Produkte der Mischungen mit einem 50 % (w/w) Anteil an Traubensaft, Apfelsaft, Pfirsichsaft oder Rote Beete Saft zeigten dasselbe Schmelzverhalten wie die Amplikons für Granatapfelsaft A (siehe Abbildung 60).

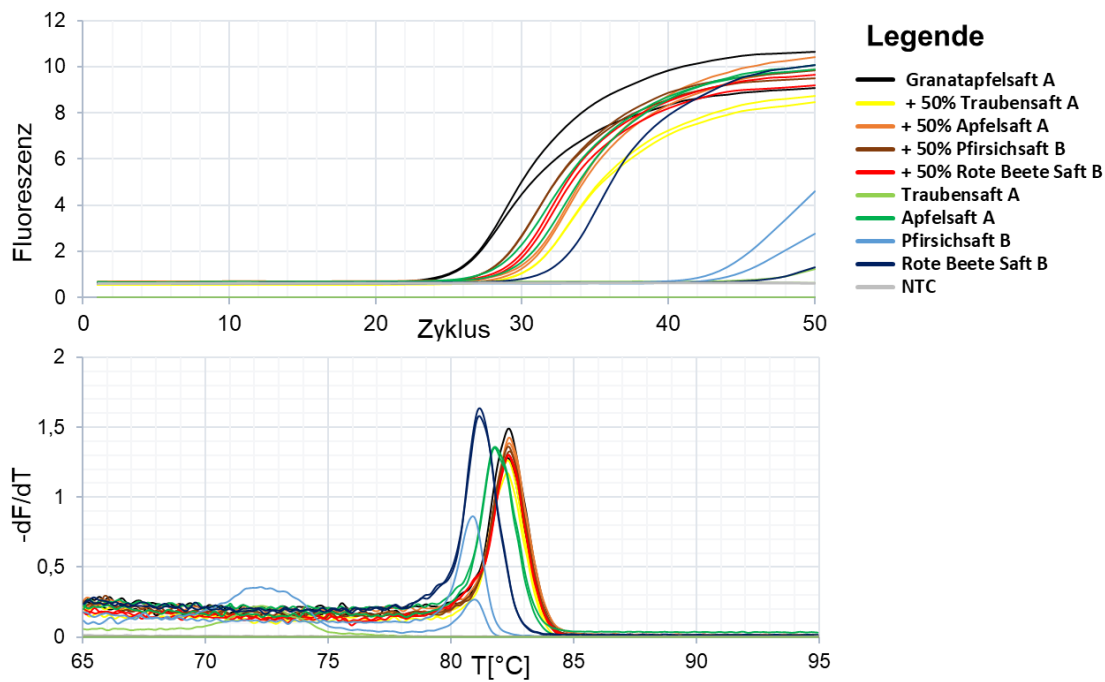


Abbildung 60: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf den Primern *rbcl* 2.0 fw. und *rbcl* 2.1 rev.

Der *rbcl* 2.2 Primer war komplementär zur Sequenz der großfruchtigen Moosbeere, der Heidelbeere und der Orange (siehe Tabelle 37) und enthielt eine Mismatch Base bezüglich der Granatapfelsequenz (siehe Tabelle 36). Bei der PCR-HRM-Analyse wurde der Primer *rbcl* 2.2 reverse mit dem Primer *rbcl* 2.0 forward kombiniert. Für Granatapfelsaft A wurde ein Ct-Wert von 22 erhalten. Die PCR-Produkte der Mischungen mit einem 50 % (w/w) Anteil an Traubensaft, Apfelsaft, Pfirsichsaft oder Rote Beete Saft zeigten dasselbe Schmelzverhalten wie die Amplikons für Granatapfelsaft A (siehe Abbildung 61).

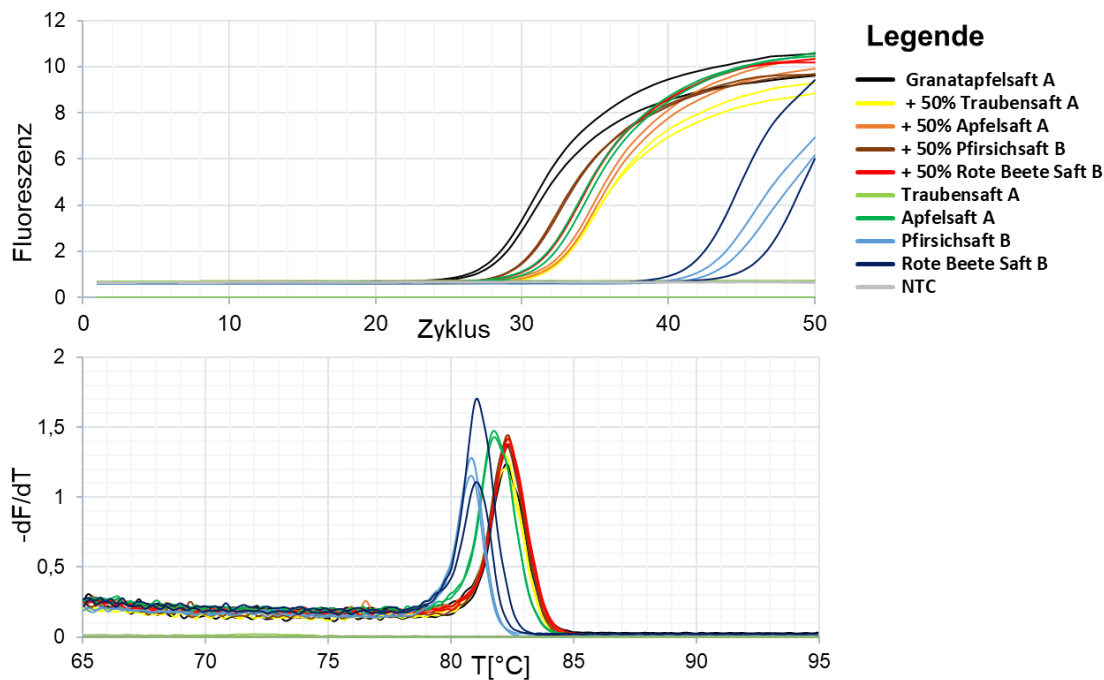


Abbildung 61: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelsaft (für Informationen zu den Proben siehe Kapitel 6); PCR-HRM Assay basierend auf den Primern *rbcl* 2.0 fw. und *rbcl* 2.2 rev.

4.7.1 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Verminderung der Selektivität der Primer für Granatapfel

Durch die Einführung einer Mismatch Base in die Primersequenz konnte die Selektivität für andere Pflanzenspezies nicht erhöht werden. Mögliche Gründe dafür werden in Kapitel 5 diskutiert.

5 Zusammenfassung und Diskussion

Die hohe Nachfrage nach Granatapfelprodukten und der damit verbundene Preisanstieg führen dazu, dass diese anfällig für Verfälschungen sind. Dabei werden unter anderem günstigere Pflanzenspezies verwendet, um granatapfelhaltige Lebensmittel zu strecken. Um Verfälschungen nachzuweisen und die Spezies der Verfälschung zu identifizieren, bieten sich DNA-basierte Methoden an. In dieser Arbeit wurden Primer für Barcode-Regionen verwendet, um eine Methode zur Detektion von Verfälschungen in granatapfelhaltigen Lebensmitteln zu entwickeln. Dabei waren DNA-Extrakte von hoher Qualität und Reinheit und geeignete Primer essenziell.

Zunächst wurde die Extraktion von DNA aus Granatäpfeln optimiert. Die DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin Plant II Kit von Macherey Nagel, dem Lysepuffer PL2 mit 0,5 % (w/w) PVP und einer Lysedauer von 2,5 Stunden wurde als geeignete Methode gewählt (siehe Kapitel 4.1).

Für die PCR-HRM Analysen wurden 12 Primerpaare für 5 verschiedene Regionen des Granatapfel-Plastidengenoms und der ITS-Region entworfen. Die verwendeten Regionen wurden in der Literatur als geeignete Barcode-Loci für Pflanzen beschrieben. Mittels Screening wurden die Primerpaare *rbcL* 1.0, *rpoC1* 1.0 und *rbcL* 2.0 als geeignete Primer für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelprodukten gewählt, da sie selektiv für verschiedene Pflanzenspezies waren (siehe Kapitel 4.2).

Die PCR-HRM Assays basierend auf dem Primerpaar *rbcL* 1.0, *rpoC1* 1.0 oder *rbcL* 2.0 wurden auf Spezies angewandt, welche zur Verfälschung von Lebensmitteln verwendet werden. Die PCR-HRM Analysen führten zu PCR-Produkten für die getesteten Spezies. Die Amplikons für Apfel, Rote Johannisbeere, Kulturheidelbeere, Rote Beete, blauer und weißer Traube, Birne, Nektarine, Orange, Karotte, Pflaume, Aronia und Sauerkirsche zeigten bei der Analyse mit mindestens einem Primerpaar eine abweichende Schmelztemperatur von den Amplikons für Granatapfel. Eine Ausnahme bildeten die Amplikons für Cranberry, welche dasselbe Schmelzverhalten wie die Amplikons für Granatapfel aufwiesen (siehe Kapitel 4.3.1). Mittels einer Kombination der Primerpaare in einem Duplex Assay konnte das Diskriminierungspotenzial der Schmelzkurven zwischen den PCR-Produkten für Granatapfel und Pflanzenspezies, die für Verfälschungen relevant sind, erhöht werden (siehe Kapitel 4.4.1).

Die PCR-HRM Assays basierend auf dem Primerpaar *rbcL* 1.0, *rpoC1* 1.0 oder *rbcL* 2.0 führten bei der Analyse von DNA-Extrakten aus zehn verschiedenen Granatapfelproben zu PCR-Produkten, die ein identes Schmelzverhalten aufwiesen (siehe Kapitel 4.3.2).

Für granatapfelhaltige Lebensmittel wurden mit den PCR-HRM Assays basierend auf dem Primerpaar *rbcL* 1.0, *rpoC1* 1.0 oder *rbcL* 2.0 hohe Ct-Werte über 30 erhalten. Die Schmelztemperatur für granatapfelhaltige Lebensmittel unterschied sich um maximal 0,4 °C von der Schmelztemperatur der Amplikons für reinen Granatapfel. Da die Probenmatrix einen Einfluss auf das Schmelzverhalten haben kann, war dies möglicherweise der Grund für die Verschiebung der Schmelzpeaks. Auch eine Verfälschung der Lebensmittelproben kann nicht ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.3.3).

Im nächsten Schritt wurde DNA aus Fruchtsäften von Spezies, die zur Verfälschung eingesetzt werden, extrahiert. Die Duplex Assays führten nur teilweise zu einer Amplifikation für Trauben- und Aroniasaft. Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte für Apfel-, Pfirsich- und Rote

Beete Saft unterschieden sich um mindestens 0,5 °C von der Schmelztemperatur der Amplikons für reinen Granatapfelsaft (siehe Kapitel 4.6.1).

Für die Validierung der PCR-HRM Assays wurden Mischungen aus Granatapfelsaft und Apfelsaft im Verhältnis 95:5, 90:10, 75:25 oder 50:50 (w/w) erstellt. Die PCR-HRM Analyse mit dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0 führte zu PCR-Produkten für die untersuchten Mischungen. Allerdings zeigten diese dasselbe Schmelzverhalten wie die Amplikons für Granatapfel. Auch die PCR-Produkte für Mischungen mit einem Anteil an 50 % (w/w) Pfirsichsaft oder Rote Beete Saft zeigten dasselbe Schmelzverhalten wie die PCR-Produkte für Granatapfelsaft. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die PCR-HRM Analysen mit dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0 eine erhöhte Selektivität für die Sequenz von Granatapfel hatten oder dass der Gehalt an Plastiden-DNA in Granatapfelsaft höher war als in anderen Fruchtsäften (siehe Kapitel 4.6.2 und 4.6.3).

Um die Selektivität der Primer für Granatapfelprodukte zu verringern, wurden Mismatch Basen bezüglich der Granatapfelsequenz eingebaut. Die PCR-HRM Analyse mit dem Primer rpoC1 1.1, rbcL 2.1 oder rbcL 2.2 führte zu PCR-Produkten für die Mischungen von Granatapfelsaft mit einem Anteil von 50 % (w/w) Traubensaft, Apfelsaft, Pfirsichsaft oder Rote Beete Saft. Die Amplikons zeigten dasselbe Schmelzverhalten wie die Amplikons für Granatapfelsaft (siehe Kapitel 4.7). Daher sind die Primer nicht zur Detektion einer potenziellen Verfälschung geeignet.

Die Ergebnisse der Validierungsversuche zeigten, dass für den Granatapfelsaft A niedrigere Ct-Werte erhalten wurden als für andere Fruchtsäfte (siehe Kapitel 4.6). Auch mit den Primern, die eine Mismatch Base enthielten, wurden für den Granatapfelsaft A die niedrigsten Ct-Werte erhalten (siehe Kapitel 4.7). Da die Nachweisgrenze und Spezifität der entwickelten PCR-HRM-Methoden nur anhand von einer Granatapfelsaftprobe (Granatapfelsaft A) bestimmt wurden, ist eine umfangreichere Validierung mit mehr Proben sinnvoll. Zudem könnten Primer in der rbcL- und rpoC1-Region mit Mismatch Basen an einer anderen Position oder mit mehreren Mismatch Basen die Spezifität der Primer für Granatapfel senken.

6 Anhang I: Probenübersicht

Tabelle 50: Übersicht der Granatapfelproben

Probe	Bezeichnung	Sorte	Ursprungsland
Gr. 01	Granatapfel (Purple Queen)	Purple Queen	Marokko
Gr. 02	Granatapfel (Wonderful)	Wonderful	Israel
Gr. 03	Granatapfel (Hicaz)	Hicaz	Türkei
Gr. 04	Granatapfel (Acco)	Acco	Türkei
Gr. 05	Granatapfel (Herzkovitz/Mollar)	Herzkovitz/Mollar	unbekannt
Gr. 06	Granatapfel (Acco)	Acco	Spanien
Gr. 07	Granatapfel (Sultani)	Sultani	Türkei
Gr. 08	Granatapfel (Wonderful)	Wonderful	Spanien
Gr. 09	Granatapfel (Hicaz)	Hicaz	Türkei
Gr. 10	Granatapfel (Esme)	Esme	Türkei
Gr. 11	Granatapfel aus Auer, Blätter und Frucht	unbekannt	Italien

Tabelle 51: Übersicht der Pflanzenspezies, die zum Verfälschen verwendet werden

Bezeichnung	Zusatzinformation
Apfel	gefroren
Rote Johannisbeere	gefroren
Kulturheidelbeere	gefroren
Rote Beete	gefroren
Blaue Traube	frisch
Weißer Traube	frisch
Birne	frisch
Nektarine	frisch
Orange	frisch
Karotte	frisch
Pflaume	getrocknet
Aronia	gefroren
Cranberry	gefroren
Sauerkirsche	getrocknet
Pfirsich	konserviert

Tabelle 52: Übersicht der Lebensmittelproben

Probe	Bezeichnung	Marke	Fruchtgehalt
Granatapfel-konfitüre A	Granatapfelkonfitüre	Schätze des Orients	50 % Granatapfel
Granatapfel-konfitüre B	Frucht Pur 75 % Granatapfel	Allos	75 % Granatapfel
Granatapfelsaft A	Granatapfelsaft aus 100 % reiner Frucht	Spar Premium	100 % Granatapfel
Granatapfelsaft B	Granatapfel Pur (II)	Spar Premium	100 % Granatapfel
Granatapfelsaft C	Nettare di Melagrana	Alce nero	65 % Granatapfel
Granatapfelsaft D	Granatapfel – direkt gepresst		
Granatapfelsaft E	Granatapfelsirup	Darbo	32 % Granatapfel
Granatapfelsaft F	Rubin Garden Granatapfelsaft	Rubin Garden	100 % Granatapfel
Granatapfelsaft G	Granatapfelsaft 100 %	Red More	100 % Granatapfel
Granatapfelsaft H	100 % Fruchtsaft aus Granatapfel	Jala	100 % Granatapfel
Granatapfelsaft I	100 % reiner Granatapfel	Obsthof Retter	100 % Granatapfel
Granatapfelsaft J	Frubiotta succo 100 % Biologico Melagrana	D'Alessandro Confetture	100 % Granatapfel
Apfelsaft A	Apfelsaft naturtrüb	DM Bio	100 % Apfelsaft
Apfelsaft B	Apfelsaft BIO	Zurück zum Ursprung	100 % Apfelsaft
Apfelsaft C	Apfelsaft Golden Delicious	Stift Kloster Neuburg	100 % Apfelsaft
Aroniasaft A	Aroniasaft	Obsthof Retter	100 % Aroniasaft
Aroniasaft B	Aroniasaft	DM Bio	100 % Aroniasaft
Aroniasaft C	Aronia 100 % Direktsaft	Aronia Original	100 % Aroniasaft
Pfirsichsaft A	happy day Pfirsich	Rauch	50 % Pfirsichmark
Pfirsichsaft B	Pfirsichnektar	Happy fruits	50 % Pfirsichpüree
Pfirsichsaft C	Pfirsichgetränk Peach	Spar	25 % Pfirsichmark
Rote Beete Saft A	Bio Rote Rübe	Spar Naturpur	100 % Rote Rübensaft
Rote Beete Saft B	Rote Beete Saft	DM Bio	100 % Rote Bete Saft
Rote Beete Saft C	Rote Rübensaft	Zurück zum Ursprung	100 % Rote Rübensaft
Traubensaft A	Traubensaft rot	Spar	100 % Traubensaft
Traubensaft B	Traubensaft naturtrüb	DM Bio	100 % Traubensaft
Traubensaft C	happy day Rote Traube	Rauch	100 % Traubensaft

Tabelle 53: Ergebnisse der fluorometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA-Extrakten, die mit dem NucleoSpin Plant II Kit erhalten wurden

Probe	1. Extraktion c_{DNA} [ng/μL]	2. Extraktion c_{DNA} [ng/μL]	3. Extraktion c_{DNA} [ng/μL]	4. Extraktion c_{DNA} [ng/μL]
Gr. 01	6,52	-	-	-
Gr. 02	1,62	4,12	-	-
Gr. 03	10,8	-	-	-
Gr. 04	5,36	-	-	-
Gr. 05	3,70	-	-	-
Gr. 06	2,80	-	-	-
Gr. 07	3,12	-	-	-
Gr. 08	3,80	-	-	-
Gr. 09	3,46	-	-	-
Gr. 10	3,10	-	-	-
Granatapfelkonfitüre A	0,0164	0,0130	-	-
Granatapfelkonfitüre B	0,0362	-	-	-
Granatapfelsaft A	< NWG	0,0358	0,0344	-
Granatapfelsaft B	< NWG	-	-	-
Granatapfelsaft C	0,0055	-	-	-
Granatapfelsaft D	0,0404	-	-	-
Granatapfelsaft E	0,0081	-	-	-
Granatapfelsaft F	< NWG	0,0370	-	-
Granatapfelsaft G	0,0158	-	-	-
Granatapfelsaft H	< NWG	-	-	-
Granatapfelsaft I	< NWG	-	-	-
Granatapfelsaft J	< NWG	< NWG	-	-
Apfelsaft A	0,0544	0,0318	-	-
Apfelsaft B	< NWG	-	-	-
Apfelsaft C	0,0250	-	-	-
Pfirsichsaft A	< NWG	-	-	-
Pfirsichsaft B	< NWG	-	-	-
Pfirsichsaft C	< NWG	-	-	-
Rote Beete Saft A	< NWG	-	-	-
Rote Beete Saft B	< NWG	-	-	-
Rote Beete Saft C	< NWG	-	-	-
Aroniasaft A	< NWG	-	-	-
Aroniasaft B	< NWG	-	-	-
Aroniasaft C	< NWG	-	-	-
Traubensaft A	0,0114	0,0472	0,0270	-
Traubensaft B	< NWG	-	-	-
Traubensaft C	< NWG	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 53

Probe	1. Extraktion c _{DNA} [ng/μL]	2. Extraktion c _{DNA} [ng/μL]	3. Extraktion c _{DNA} [ng/μL]	4. Extraktion c _{DNA} [ng/μL]
Apfel	0,0384	0,0362	0,0528	0,0298
Rote Johannisbeere	0,510	-	-	-
Kulturheidelbeere	0,702	1,34	-	-
Rote Beete	0,0750	0,0534	0,126	-
Blaue Traube	0,874	-	-	-
Weiße Traube	0,498	-	-	-
Birne	0,0366	0,0192	-	-
Nektarine	0,372	0,189	-	-
Orange	0,244	0,936	-	-
Karotte	5,90	-	-	-
Pflaume	0,0294	0,075	0,126	-
Aronia	0,834	-	-	-
Cranberry	0,248	0,302	0,232	-
Sauerkirsche	0,0300	0,532	-	-
Holunder (Triebe)	11,4	-	-	-
Pfirsich	0,0228	0,0129	0,0122	-
Granatapfelsaft 02 + 50 % Pfirsichsaft B	< NWG	-	-	-
Granatapfelsaft 02 + 50 % Rote Beete Saft B	< NWG	-	-	-
Granatapfelsaft 02 + 50 % Traubensaft A	0,0284	-	-	-
Granatapfelsaft 02 + 50 % Apfelsaft A	0,0304	-	-	-
Granatapfelsaft 02 + 25 % Apfelsaft A	0,0448	-	-	-
Granatapfelsaft 02 + 10 % Apfelsaft A	0,0208	-	-	-
Granatapfelsaft 02 + 05 % Apfelsaft A	0,0306	-	-	-

7 Anhang II: Materialien

7.1 Chemikalien

Name	Hersteller
25 bp DNA Ladder	ThermoFisher Scientific
Absolutes Ethanol	Merck Sigma-Aldrich
Agarose	Merck Sigma-Aldrich
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck Sigma-Aldrich
DNA ExitusPlus™ IF	PanReac AppliChem
Epitect® HRM PCR Kit	Qiagen
Essigsäure	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck Sigma-Aldrich
GelRed™	Biotium
Isopropanol	Merck Sigma-Aldrich
Milli-Q Wasser	
Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5x	BioRad
NucleoSpin Plant II Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plant II Midi Kit	Macherey-Nagel
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Merck Sigma-Aldrich
Primer Oligonukleotide	Merck Sigma-Aldrich
Proteinase K-Lösung	Qiagen
QiAamp®DNA Mini Kit	Qiagen
Qubit™ ds DNA HS Kit	ThermoFisher Scientific
Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder	BioLabs
RNase freies Wasser	Qiagen
Salzsäure (HCl)	VWR
TRIS base	Merck Sigma-Aldrich

7.2 Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Gefärbte Reaktionsgefäße (0,2 mL)	VWR
einzelne PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	BioRad
Pipetten-Filterspitzen (0,5-20 µL)	Sarstedt
Pipetten-Filterspitzen (1-20 µL)	Brand
Pipetten-Filterspitzen (5-200 µL)	Brand
Pipetten-Filterspitzen (50-1000 µL)	Brand
Qubit Assay Reaktionsgefäße (0,5 mL)	ThermoFisher Scientific
Strip-Reaktionsgefäße mit Deckel (0,1 mL)	Qiagen
Reaktionsgefäße (0,65 mL)	VWR
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	VWR
Reaktionsgefäße (2,0 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 mL)	VWR
Reaktionsgefäße (50 mL)	VWR

7.3 Software und Webserver

Name	Unternehmer / Entwickler
ChemiDraw Ultra	PerkinElmer
Excel	Microsoft
Mega7	Sudhir Kumar
NCBI	National Institutes of Health
OligoAnalyzer	Integrated DNA Technologies, Inc.
OligoCalc	Northwestern University
Photoshop	Adobe
PyroMark Assay Design 2.0	Qiagen
QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.5	ThermoFisher Scientific
RNAfold WebServer	Universität Wien
Word	Microsoft

7.4 Equipment und Messgeräte

Name	Hersteller
Analytische Waage AE 2000	Mettler
Analytische Waage TE214S	Sartorius
Diverse Pipetten (10-100)	Biorad
Diverse Pipetten (10-1000 µL)	Eppendorf
Diverse Pipetten (10-5000 µL)	Gilson
Gelkamm	BioRad
Kreisschüttler 3005	GFL
Kugelmühle MM 2000	Retsch
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma
Mikroentrifuge Galaxy Mini	VWR
Mikrozentrifuge MiniStar	VWR
Mini Sub Celln GT Elektrophoresezelle	BioRad
Mörser und Stößel	Haldenwanger Berlin
NanoDrop 200c Spektrometer	ThermoFisher Scientific
Netzteil PowerPac HV	BioRad
PCR Workstation Pro	VWR
QuantStudio 5 Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific
Qubit™ 4 Fluorometer	ThermoFisher Scientific
RotorGene Q Thermocycler	Qiagen
Skalpel	Braun
Skalpel	Swann-Morton
Spatel aus Stahl	
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tissue Disruptor FastPrep-24™	MP Biomedicals
Trockenschrank UE 500	Memmert
Ultraschallbad Sonorex Super AK103H	Bandelin
UVT-20M Transilluminator 312nm	Herolab
Vortex Schüttler Genie 2	Scientific industries
Vortex Schüttler classic	VELP Scientifica
Vortex Schüttler VV3	VWR
Zentrifuge 5424	Eppendorf

8 Anhang III: Verzeichnis

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
%	Prozent
3'	3' Ende des DNA-Stranges
5'	5' Ende des DNA-Stranges
A	Adenin
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abs.	Absatz
AES	Atomemissionsspektroskopie
BGBI	Bundesgesetzblatt
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Cl	Chlor
Ct-Wert	cycle threshold / Schwellenwert-Zyklus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
fw.	forward / vorwärts
G	Guanin
Gr.	Granatapfelprobe
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
HRM	Hochauflösendes Schmelzen
Konf.	Konfitüre
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
LMSVG	Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz
max.	maximal
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie
Mg	Magnesium
Mismatch	Abweichende Base zur Referenzsequenz
MS	Massenspektrometrie
Na	Natrium
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Nr.	Nummer
NTC	Negativkontrolle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzung	Erklärung
PDA	Photodiodenzeile
PL1/PL2	Lysepuffer des NucleoSpin Plant II Kit
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rev.	reverse / rückwärts
RI	Brechungsindex
RNase A	Ribonuklease A
S1/S2	Standard 1 /2
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetate-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

8.2 Physikalische Größen und Einheiten

Abkürzung	Erklärung
A	Extinktion
kb	Kilobasen
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
c-	Zenti-
g	Gramm
h	Stunden
L	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/L)
m-	Milli-
μ-	Mykro-
min	Minuten
mol	Stoffmenge
n-	Nano-
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
T	Temperatur
T _{Annealing}	Annealingtemperatur
T _M	Schmelztemperatur
V	Volt

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Granatapfelfrucht	2
Abbildung 2: Nährwerte für 100 g Granatapfel (essbarer Anteil) ⁷	2
Abbildung 3: Aufbau der DNA	8
Abbildung 4: Komplementäre Nukleinbasen der DNA.....	9
Abbildung 5: Arbeitsablauf für die DNA-Extraktion und PCR-HRM Analyse	10
Abbildung 6: Struktur einer Pyrrolidoneinheit	12
Abbildung 7: Aufbau der Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP's).....	15
Abbildung 8: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus	16
Abbildung 9: Sequenzen des Plastidengenoms für Granatapfel in der Datenbank NCBI (11.12.2018) ⁵⁸	42
Abbildung 10: Sekundärstruktur für den ITS 1.0 forward und den ITS 1.0 reverse Primer	43
Abbildung 11: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS 1.0	45
Abbildung 12: Sekundärstruktur für den ITS 5.0 forward und ITS 5.0 reverse Primer	46
Abbildung 13: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS 5.0	47
Abbildung 14: Sekundärstruktur für den ITS 6.0 forward und ITS 6.0 reverse Primer	48
Abbildung 15: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS 6.0	49
Abbildung 16: Sekundärstruktur für den ITS U1 forward und den ITS U1 reverse Primer	50
Abbildung 17: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS U1	51
Abbildung 18: Sekundärstruktur für den ITS U2 forward und den ITS U2 reverse Primer	52
Abbildung 19: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar ITS U2.....	53
Abbildung 20: Sekundärstruktur für den psbE-petL 2.0 forward und den psbE-petL 2.0 reverse Primer	54
Abbildung 21: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar psbE-petL 2.0.....	55
Abbildung 22: Sekundärstruktur für den rbcL 1.0 forward und rbcL 1.0 reverse Primer	56
Abbildung 23: Sekundärstruktur für den rbcL 2.0 forward, den rbcL 2.0 reverse, den rbcL 2.1 reverse und den rbcL 2.2 reverse Primer	58
Abbildung 24: Sekundärstruktur für den rpoC1 1.0 forward, den rpoC1 1.1 forward und den rpoC1 1.0 reverse Primer	61
Abbildung 25: Sekundärstruktur für den trnH-psbA 3.0 forward, und den trnH-psbA 3.0 reverse Primer	62
Abbildung 26: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar trnH-psbA 3.0.....	63
Abbildung 27: Sekundärstruktur für den trnL 2.0 forward, und den trnL 2.0 reverse Primer	64
Abbildung 28: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar trnL 2.0	65
Abbildung 29: Sekundärstruktur für den trnL 5.0 forward, und den trnL 5.0 reverse Primer	66
Abbildung 30: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für verschiedene Granatapfelproben (Gr.) und Pflanzenspezies ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar trnL 5.0	67

Abbildung 31: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0	70
Abbildung 32: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0	71
Abbildung 33: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 2.0	72
Abbildung 34: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Granatapfelproben ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0	74
Abbildung 35: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Granatapfelproben ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0	74
Abbildung 36: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Granatapfelproben ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 2.0	75
Abbildung 37: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus granatapfelhaltigen Lebensmitteln ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0	76
Abbildung 38: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus granatapfelhaltigen Lebensmitteln ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0	76
Abbildung 39: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	78
Abbildung 40: Differenz-Plots für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rpoC1 1.0.....	78
Abbildung 41: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0.....	79
Abbildung 42: Differenz-Plots für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0	80
Abbildung 43: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rpoC1 1.0 und rbcL 2.0	81
Abbildung 44: Differenz-Plot für DNA-Extrakte aus verschiedenen Pflanzenspezies , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rpoC1 1.0 und rbcL 2.0	81
Abbildung 45: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Traube und Granatapfel , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	82
Abbildung 46: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Traube und Granatapfel , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0	83
Abbildung 47: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Traube und Granatapfel , Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rpoC1 1.0 und rbcL 2.0	83
Abbildung 48: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Lebensmitteln, Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rpoC1 1.0	84
Abbildung 49: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Lebensmitteln, Duplex PCR-HRM Assay basierend auf den Primerpaaren rbcL 1.0 und rbcL 2.0.....	85
Abbildung 50: Ergebnis der Abschätzung der Länge von den PCR-Produkten mittels Gelelektrophorese, das Beladungsschema ist in Tabelle 49 angegeben	88
Abbildung 51: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Fruchtsäften ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0	90

Abbildung 52: Amplifikationskurven und Schmelzprofile, sowie vergrößerte Schmelzpeaks für DNA-Extrakte aus Fruchtsäften ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0.....	91
Abbildung 53: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Granatapfelsaft und Apfelsaft . Bestimmung der Nachweisgrenze für den PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0.....	92
Abbildung 54: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Granatapfelsaft und Apfelsaft . Bestimmung der Nachweisgrenze für den PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0	93
Abbildung 55: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Granatapfelsaft und Apfelsaft . Bestimmung der Nachweisgrenze für den PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 2.0.....	94
Abbildung 56: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Pfirsich oder Rote Beete Saft mit Granatapfelsaft ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0	95
Abbildung 57: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Pfirsich oder Rote Beete Saft mit Granatapfelsaft ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rpoC1 1.0.....	96
Abbildung 58: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für DNA-Extrakte aus Mischungen von Pfirsich oder Rote Beete Saft mit Granatapfelsaft ; PCR-HRM Assay basierend auf dem Primerpaar rbcL 2.0	96
Abbildung 59: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelsaft ; PCR-HRM Assay basierend auf den Primern rpoC1 1.1 fw. Und rpoC1 1.0 rev.	98
Abbildung 60: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelsaft ; PCR-HRM Assay basierend auf den Primern rbcL 2.0 fw. und rbcL 2.1 rev.	99
Abbildung 61: Amplifikationskurven und Schmelzprofile für die Detektion von Verfälschungen in Granatapfelsaft ; PCR-HRM Assay basierend auf den Primern rbcL 2.0 fw. und rbcL 2.2 rev.	100

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie des Granatapfels ⁶	1
Tabelle 2: Getestete Extraktionsmethoden	22
Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR-HRM Analyse	28
Tabelle 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für das Multiplexing	28
Tabelle 5: Temperaturprogramm für Analysen am Thermocycler QuantStudio 5	29
Tabelle 6: Temperaturprogramm für Analysen am Thermocycler Rotor-Gene Q	29
Tabelle 7: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die ITS-Region verwendet wurden ...	31
Tabelle 8: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die psbE-petL-Region verwendet wurden	32
Tabelle 9: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die rbcL-Region verwendet wurden ..	32
Tabelle 10: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die rpoC1-Region verwendet wurden	33
Tabelle 11: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die trnH-psbA-Region verwendet wurden	33
Tabelle 12: Accession Numbers, die für das Entwerfen der Primer für die trnL-Region verwendet wurden .	34
Tabelle 13: Veränderung der Parameter zur Verbesserung der DNA-Extraktion mit Kit 1	35
Tabelle 14: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel (Probe Gr. 01) mit Kit 1 extrahierten DNA	36
Tabelle 15: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel 01 (Probe Gr. 01) und aus den Blättern und der Schale von Granatapfel 11 (Probe Gr. 11) mit der CTAB-Methode extrahierten DNA	37
Tabelle 16: Veränderung der Parameter zur Verbesserung der DNA-Extraktion mit Kit 2	37
Tabelle 17: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel 02 (Probe Gr. 02) und Granatapfelkonfitüre B (Probe Konf. B) mit Kit 2 extrahierten DNA	38
Tabelle 18: Veränderung der Parameter zur Verbesserung der DNA-Extraktion mit Kit 3	38
Tabelle 19: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatäpfeln (Proben Gr. 01, Gr. 02, Gr. 11) mit Kit 3 extrahierten DNA	39
Tabelle 20: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus Granatapfel (Probe Gr. 02) mit Kit 3 extrahierten DNA	40
Tabelle 21: Konzentration (C_{DNA}) und Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) der aus granatapfelhaltigen Konfitüren (Proben Konf. A, Konf. B) und Granatapfelsäften (Proben Saft C, Saft E) mit Kit 3 extrahierten DNA	41
Tabelle 22: Eigenschaften des ITS 1.0 Primerpaares	43
Tabelle 23: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS 1.0 Primerpaares	44
Tabelle 24: Eigenschaften des ITS 5.0 Primerpaares	45
Tabelle 25: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS 5.0 Primerpaares	46
Tabelle 26: Eigenschaften des ITS 6.0 Primerpaares	47
Tabelle 27: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS 6.0 Primerpaares	48

Tabelle 28: Eigenschaften des ITS U1 Primerpaares	49
Tabelle 29: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS U1 Primerpaares	50
Tabelle 30: Eigenschaften des ITS U2 Primerpaares	51
Tabelle 31: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 7) im Templatbereich für das Entwerfen des ITS U2 Primerpaares	52
Tabelle 32: Eigenschaften des psbE-petL 2.0 Primerpaares	54
Tabelle 33: Alignment der Granatapfelsequenzen (siehe Tabelle 8) im Templatbereich für das Entwerfen des psbE-petL 2.0 Primerpaares	54
Tabelle 34: Eigenschaften des rbcL 1.0 Primerpaares.....	56
Tabelle 35: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 9) im Templatbereich für das Entwerfen des rbcL 1.0 Primerpaares	57
Tabelle 36: Eigenschaften der rbcL 2 Primer	58
Tabelle 37: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 9) im Templatbereich für das Entwerfen des rbcL 2.0 Primerpaares	59
Tabelle 38: Eigenschaften der rpoC1 1 Primer	60
Tabelle 39: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 10) im Templatbereich für das Entwerfen des rpoC1 1.0 Primerpaares	61
Tabelle 40: Eigenschaften des trnH-psbA 3.0 Primerpaares	62
Tabelle 41: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 11) im Templatbereich für das Entwerfen des trnH- psbA 3.0 Primerpaares	62
Tabelle 42: Eigenschaften des trnL 2.0 Primerpaares	63
Tabelle 43: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 12) im Templatbereich für das Entwerfen des trnL 2.0 Primerpaares	64
Tabelle 44: Eigenschaften des trnL 5.0 Primerpaares	65
Tabelle 45: Alignment der Sequenzen (siehe Tabelle 12) im Templatbereich für das Entwerfen des trnL 5.0 Primerpaares	66
Tabelle 46: Entworfen forward (fw.) und reverse (rev.) Primer mit Amplikonlänge, Schmelztemperatur (T_M) und Annealingtemperatur ($T_{Annealing}$).....	68
Tabelle 47: Auflistung der entworfenen Primer und Übersicht des Primerscreenings	69
Tabelle 48: Schmelztemperaturen der Amplikons für die PCR-Analysen basierend auf dem Primerpaar rbcL 1.0, rpoC1 1.0 oder rbcL 2.0.....	73
Tabelle 49: Aufgabeschema für das in Abbildung 50 dargestellte Gel	87
Tabelle 50: Übersicht der Granatapfelproben.....	I
Tabelle 51: Übersicht der Pflanzenspezies, die zum Verfälschen verwendet werden	I
Tabelle 52: Übersicht der Lebensmittelproben	II
Tabelle 53: Ergebnisse der fluorometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA-Extrakten, die mit dem NucleoSpin Plant II Kit erhalten wurden	III

8.5 Literaturverzeichnis

- (1) Kahramanoglu, I.; Usanmaz, S. Pomegranate Production and Marketing; CRC Press: Boca Ration, 2016; 1–20.
- (2) Beaulieu, J. C.; Stein-Chisholm, R. E. HS-GC–MS Volatile Compounds Recovered in Freshly Pressed 'Wonderful' Cultivar and Commercial Pomegranate Juices. *Food Chem.* 2016, **190**, 643–656. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.005>.
- (3) Ergun, M. Pomegranate. In *Tropical and Subtropical Fruits*; Siddiq, M., Ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2012; 529–548. <https://doi.org/10.1002/9781118324097.ch27>.
- (4) D. Rymon. Mapping Features of the Global Pomegranate Market. *Acta Hortic.* 2011, **890**, 599–601. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.890.84>.
- (5) Basu, A.; Penugonda, K. Pomegranate Juice: A Heart-Healthy Fruit Juice. *Nutr. Rev.* 2009, **67**, 49–56. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00133.x>.
- (6) Catalogue of Life: 2019 Annual Checklist: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/eeefeef80bc4e5f0475a5379c45c69d22> (30.11.2019).
- (7) Bakhru, H. K. Foods That Heal: The Natural Way to Good Health.; Orient Paperbacks: Delhi, 1990; 75–79.
- (8) Faria, M. A.; Magalhães, A.; Nunes, M. E.; Oliveira, M. B. P. P. High Resolution Melting of TrnL Amplicons in Fruit Juices Authentication. *Food Control* 2013, **33**, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.020>.
- (9) Marieschi, M.; Torelli, A.; Beghé, D.; Bruni, R. Authentication of Punica Granatum L.: Development of SCAR Markers for the Detection of 10 Fruits Potentially Used in Economically Motivated Adulteration. *Food Chem.* 2016, **202**, 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.011>.
- (10) Nuncio-Jáuregui, N.; Calín-Sánchez, Á.; Hernández, F.; Carbonell-Barrachina, Á. A. Pomegranate Juice Adulteration by Addition of Grape or Peach Juices: Pomegranate Juice Adulteration. *J. Sci. Food Agric.* 2014, **94**, 646–655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6300>.
- (11) Druml, B.; Cichna-Markl, M. High Resolution Melting (HRM) Analysis of DNA – Its Role and Potential in Food Analysis. *Food Chem.* 2014, **158**, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>.
- (12) Rechtsinformationssystem des Bundes (RIS): <https://www.ris.bka.gv.at/eli/bgbl/I/2006/13>(13.12.2019).
- (13) Zhang, Y.; Krueger, D.; Durst, R.; Lee, R.; Wang, D.; Seeram, N.; Heber, D. International Multidimensional Authenticity Specification (IMAS) Algorithm for Detection of Commercial Pomegranate Juice Adulteration. *J. Agric. Food Chem.* 2009, **57**, 2550–2557. <https://doi.org/10.1021/jf803172e>.
- (14) Ghasempour, Z.; Alizadeh Khaled-Abad, M.; Vardast, M. R.; Rezazad Bari, M.; Moghaddas Kia, E. Fabrication of Betanin Imprinted Polymer for Rapid Detection of Red Beet Adulteration in Pomegranate Juice. *Polym. Bull.* 2019, **76**, 1793–1805. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2444-5>.
- (15) Vardin, H.; Tay, A.; Ozen, B.; Mauer, L. Authentication of Pomegranate Juice Concentrate Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Food Chem.* 2008, **108**, 742–748. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.027>.
- (16) Ehling, S.; Cole, S. Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 2229–2234. <https://doi.org/10.1021/jf104527e>.

- (17) Tezcan, F.; Uzaşçı, S.; Uyar, G.; Öztekin, N.; Erim, F. B. Determination of Amino Acids in Pomegranate Juices and Fingerprint for Adulteration with Apple Juices. *Food Chem.* 2013, *141*, 1187–1191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.017>.
- (18) Fazekas, A. J.; Kuzmina, M. L.; Newmaster, S. G.; Hollingsworth, P. M. DNA Barcoding Methods for Land Plants. In *DNA Barcodes*; Kress, W. J., Erickson, D. L., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; Vol. 858, 223–252. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_11.
- (19) CBOL Plant Working Group. A DNA Barcode for Land Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, *106*, 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>.
- (20) Hollingsworth, P. M.; Li, D.-Z.; van der Bank, M.; Twyford, A. D. Telling Plant Species Apart with DNA: From Barcodes to Genomes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2016, *371*, 20150338. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0338>.
- (21) Yu, J.; Xue, J.-H.; Zhou, S.-L. New Universal MatK Primers for DNA Barcoding Angiosperms. *J. Syst. Evol.* 2011, *49*, 176–181. <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00134.x>.
- (22) Newmaster, S. G.; Fazekas, A. J.; Steeves, R. A. D.; Janovec, J. Testing Candidate Plant Barcode Regions in the Myristicaceae. *Mol. Ecol. Resour.* 2008, *8*, 480–490. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02002.x>.
- (23) de Vere, N.; Rich, T. C. G.; Trinder, S. A.; Long, C. DNA Barcoding for Plants. In *Plant Genotyping*; Batley, J., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1245, 101–118. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_8.
- (24) Dong, W.; Liu, J.; Yu, J.; Wang, L.; Zhou, S. Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLOS ONE* 2012, *7*, e35071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035071>.
- (25) Hajiahmadi, Z.; Talebi, M.; Sayed-Tabatabaei, B. E. Studying Genetic Variability of Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Based on Chloroplast DNA and Barcode Genes. *Mol. Biotechnol.* 2013, *55*, 249–259. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9676-2>.
- (26) Álvarez, I. Ribosomal ITS Sequences and Plant Phylogenetic Inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2003, *29*, 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2).
- (27) Pöpping, B.; Unterberger, C. Extraktion von DNA. In *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*; Busch, U., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; 19–34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10716-0_3.
- (28) Ortola-Vidal, A.; Schnerr, H.; Rojmyr, M.; Lysholm, F.; Knight, A. Quantitative Identification of Plant Genera in Food Products Using PCR and Pyrosequencing® Technology. *Food Control* 2007, *18*, 921–927. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.04.013>.
- (29) Zhang, M.; Shi, Y.; Sun, W.; Wu, L.; Xiong, C.; Zhu, Z.; Zhao, H.; Zhang, B.; Wang, C.; Liu, X. An Efficient DNA Barcoding Based Method for the Authentication and Adulteration Detection of the Powdered Natural Spices. *Food Control* 2019, *106*, 106745. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106745>.
- (30) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Gatto, G. J.; Stryer, L. Stryer Biochemie; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2018; 127–162. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8_4.
- (31) Koch, H.-G.; Brix, J.; Heinrich, P. C. Nucleinsäuren – Struktur Und Funktion. In *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*; Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014; 130–148. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_10.

- (32) Mülhardt, C. Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; 13–45, 47–80, 81–114. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34636-1>.
- (33) Knippers, R. Eine kurze Geschichte der Genetik; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2012; 217–232. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2914-8_21.
- (34) Wilson, I. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 3741–3751.
- (35) Genomic DNA from Plant user manual : https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNAPlant_NSPlantII.pdf (30.11.2019).
- (36) Río Bártulos, C.; Tappe, H.; Rothhämel, S. Allgemeine Methoden. In *Gentechnische Methoden*; Jansohn, M., Rothhämel, S., Eds.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2012; 1–36. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2430-3_1.
- (37) Río Bártulos, C.; Tappe, H.; Rothhämel, S. Isolierung von DNA. In *Gentechnische Methoden*; Jansohn, M., Rothhämel, S., Eds.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2012; 95–134. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2430-3_3.
- (38) Nagori, R.; Purohit, S. D. An Improved Method for DNA Isolation from Polyphenols Rich Leaf Samples of *Annona Squamosa* L. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2012, 21, 140–143. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0075-0>.
- (39) Lade, B. D.; Patil, A. S.; Paikrao, H. M. Efficient Genomic DNA Extraction Protocol from Medicinal Rich *Passiflora Foetida* Containing High Level of Polysaccharide and Polyphenol. *SpringerPlus* 2014, 3. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-457>.
- (40) Fischer, F.; Bauer, S. Polyvinylpyrrolidon. Ein Tausendsassa in Der Chemie. *Chem. Unserer Zeit* 2009, 43, 376–383. <https://doi.org/10.1002/ciuz.200900492>.
- (41) Maryam, M.; Mehdi, Z.; Younes, S.; Gholamreza, B. K. Optimization of DNA Extraction and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis of Pomegranate (*Punica Granatum* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 2013, 12, 5252–5257. <https://doi.org/10.5897/AJB12.511>.
- (42) Schmidt, H.; Rothhämel, S. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In *Gentechnische Methoden*; Jansohn, M., Rothhämel, S., Eds.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2012; 135–171. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2430-3_4.
- (43) Müller, H.-J.; Prange, D. R. PCR - Polymerase-Kettenreaktion; Springer Spektrum: Berlin Heidelberg, 2016; 1–15, 49–54, 65–76, 97–105.
- (44) Mäde, D. Molekularbiologische Speziesdifferenzierung. In *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*; Busch, U., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; 121–141. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10716-0_9.
- (45) Konrad, R.; Busch, U. PCR und Real-Time PCR. In *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*; Busch, U., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; 35–47. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10716-0_4.
- (46) Farrar, J. S.; Wittwer, C. T. High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. In *Molecular Diagnostics*; Patrinos, G. P., Ed.; Elsevier, 2017; 79–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00006-7>.
- (47) Vossen, R. H. A. M. Genotyping DNA Variants with High-Resolution Melting Analysis. In *Genotyping*; White, S. J., Cantsilieris, S., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2017; Vol. 1492, 17–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6442-0_2.
- (48) Xanthopoulou, A.; Ganopoulos, I.; Kalivas, A.; Osathanunkul, M.; Chatzopoulou, P.; Tsaftaris, A.; Madesis, P. Multiplex HRM Analysis as a Tool for Rapid Molecular

- Authentication of Nine Herbal Teas. *Food Control* 2016, 60, 113–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.021>.
- (49) Chuang, L.-Y.; Cheng, Y.-H.; Yang, C.-H. Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction. *Biotechnol. Lett.* 2013, 35, 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.
- (50) Chagné, D. Application of the High-Resolution Melting Technique for Gene Mapping and SNP Detection in Plants. In *Plant Genotyping*; Batley, J., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1245, 151–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_11.
- (51) Madesis, P.; Ganopoulos, I.; Tsaftaris, A. Microsatellites: Evolution and Contribution. In *Microsatellites*; Kantartzi, S. K., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 1006, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_1.
- (52) Dechert, U. Gelelektrophoresen. In *Gentechnische Methoden*; Jansohn, M., Rothhämel, S., Eds.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2012; 37–93. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2430-3_2.
- (53) Oligo Calc: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> (30.11.2019).
- (54) RNAfold: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> (30.11.2019).
- (55) OligoAnalyzer: <https://eu.idtdna.com/site/home/country> (30.11.2019).
- (56) Khan, A. L.; Asaf, S.; Lee, I.-J.; Al-Harrasi, A.; Al-Rawahi, A. First Reported Chloroplast Genome Sequence of *Punica Granatum* (Cultivar Helow) from Jabal Al-Akhdar, Oman: Phylogenetic Comparative Assortment with *Lagerstroemia*. *Genetica* 2018, 146, 461–474. <https://doi.org/10.1007/s10709-018-0037-8>.