



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Entwicklung von real time PCR-Methoden zur Detektion
von Lupine und Erdnuss in Lebensmitteln

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasser:	Walter Pulverer
Matrikel-Nummer:	0401152
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A474 Ernährungswissenschaften
Betreuerin:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl

Wien, Oktober 2009

Meinen Eltern ...

Danksagung

Meine ersten Worte möchte ich an Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl richten, bei der ich mich für die freundliche und kompetente Betreuung meiner Arbeit bedanken möchte.

Bei Herrn O. Univ.-Prof. Dr. Gerhard Sontag bedanke ich mich für die vielen aufbauenden Worte, die mir immer wieder zu neuen Arbeitsmut verhalfen, und seine munteren Geschichten, die stets eine angenehme und nette Abwechslung waren.

Ein weiterer Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe. Besonders bei Sabrina, Ines, Christine und Tazeen, die von Beginn an mit mir in der Arbeitsgruppe waren, möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit bedanken.

Bei meiner Freundin Silvia möchte ich mich aus tiefstem Herzen bedanken! Ohne Sie wäre ich niemals so weit gekommen. Ihre kompromisslose Unterstützung, ihr steter Beistand und ihr Willen mir zuzuhören wann immer ich einen Zuhörer brauchte, gaben mir in den letzten Jahren die nötige Kraft für das Studium. DANKE, dass es dich gibt!!!

Schlussendlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren finanzielle Unterstützung das Studium auf diese Art und Weise nicht möglich gewesen wäre. Ich danke euch, dass ihr immer ohne „wenn und aber“ für mich da wart. VIELEN, VIELEN DANK!!!

Inhaltsverzeichnis

i	Abbildungsverzeichnis.....	vii
ii	Tabellenverzeichnis	ix
iii	Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Lebensmittelunverträglichkeiten	3
2.1.1	Allgemeines.....	3
2.1.2	Lebensmittelallergien	5
2.1.2.1	Typ I - Sofortreaktion.....	5
2.1.2.2	Typ II-Reaktion.....	6
2.1.2.3	Typ III-Reaktion	6
2.1.2.4	Typ IV – Spättyp (zellvermittelte Allergie).....	7
2.1.3	Symptome bei Allergenkontakt	9
2.1.3.1	Orales Allergiesyndrom (OAS)	9
2.1.3.2	Gastrointestinale Beschwerden	9
2.1.3.3	Hautreizungen	9
2.1.3.4	Reizung der Atemwege.....	10
2.1.3.5	Anaphylaktischer Schock	10
2.1.4	Diagnostik von Lebensmittelallergien	11
2.1.5	Therapie von Lebensmittelallergien.....	11
2.1.6	Prävention von Lebensmittelallergien	12
2.1.7	Versteckte Allergene	12

2.2	Lupine.....	13
2.2.1	Allgemeines	13
2.2.2	Lupinenallergie.....	14
2.2.3	Lupinenallergene	14
2.3	Erdnuss.....	15
2.3.1	Allgemeines	15
2.3.2	Erdnussallergie.....	15
2.3.3	Erdnussallergene	16
2.4	Kreuzreaktivität Lupine-Erdnuss	16
2.5	Lebensmittelkennzeichnung	17
2.5.1	Forderung der Konsumenten.....	17
2.5.2	Geschichtliche Entwicklung der Lebensmittelkennzeichnung	17
2.5.3	Kennzeichnungspflichtige Lebensmittelzutaten	18
2.6	Überblick über Methoden zur Detektion von Allergenen.....	18
2.6.1	Desoxyribonucleinsäure (DNA)	18
2.6.1.1	Aufbau der DNA.....	18
2.6.1.2	Aufgabe der DNA.....	20
2.6.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	21
2.6.3	Real time PCR	24
2.6.3.1	SYBR Green Assay	26
2.6.3.2	Taqman Assay	26
2.6.4	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	29
2.6.5	PCR vs. ELISA.....	29

2.7	Ausgewählte Methoden zur Bestimmung von Lupine und Erdnuss in Lebensmitteln.....	30
2.7.1	Lupine	30
2.7.2	Erdnuss	31
3	Material und Methoden	33
3.1	Verwendete Geräte	33
3.2	Chemikalien und Reagenzien	34
3.3	Proben	35
3.3.1	Verwendete Lebensmittel bzw. Lebensmittelzutaten zur Überprüfung der Kreuzreaktivität	35
3.4	DNA-Extraktionsmethoden	36
3.4.1	CTAB-Extraktionsmethode.....	36
3.4.1.1	Benötigte Reagenzien.....	36
3.4.1.2	Herstellung der benötigten Lösungen	37
3.4.1.3	Durchführung der CTAB-Extraktionsmethode	38
3.4.2	DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Stool Kit.....	39
3.4.2.1	Durchführung der Extraktion mit dem QIAamp DNA Stool Kit..	39
3.4.3	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA-Extrakten	40
3.5	Gelelektrophorese.....	41
3.5.1	Benötigte Reagenzien	41
3.5.2	Herstellung der benötigten Reagenzien	41
3.5.3	Herstellung des Gels	41
3.5.4	Vorbereitung der DNA-Proben	42
3.5.5	Durchführung der Gelelektrophorese	42

3.5.6	Auswertung des Elektrophoresegels	42
3.6	Real time PCR.....	43
3.6.1	Pipettierschema für PCR-Platten	43
3.6.2	Primer und Sonden.....	43
3.6.2.1	Kriterien für das Entwerfen der Primer	44
3.6.2.2	Kriterien für das Entwerfen der Taqman-Sonden.....	44
3.6.2.3	Verwendete DNA-Sequenzen für Lupine	45
3.6.2.4	Verwendete DNA-Sequenzen für Erdnuss	45
3.6.3	Verwendete PCR-Assays	46
3.6.3.1	SYBR Green Assay	46
3.6.3.2	Taqman Assay mit iQ Supermix	47
3.6.4	Optimierung der Primerkonzentrationen und der Annealing- temperaturen.....	47
3.6.5	Test auf Kreuzreaktivität der entworfenen Primerpaare.....	49
3.6.6	Optimierung der Erdnuss-Sondenkonzentration	49
3.6.7	Optimierung der Lupine-Sondenkonzentration.....	50
3.6.8	Optimierung des Duplex-Assays	50
3.6.9	Ermittlung der Nachweisgrenze mit seriell verdünnter DNA	51
3.6.10	Ermittlung der Nachweisgrenzen in gespikten Lebensmitteln	52
3.6.11	Nachweis von Lupine in kommerziellen Lebensmitteln mittels des Singleplex-Assays	53
3.6.12	Nachweis von Lupine und Erdnuss in kommerziellen Lebensmitteln mittels des Duplex-Assays.....	53
3.6.13	Ermittlung der Detektierbarkeit von gelber und blauer Lupine	54

4 Ergebnisse	55
4.1 Probenaufarbeitung.....	55
4.1.1 Ergebnisse der Probenaufarbeitung für blaue und gelbe Lupine .	57
4.1.2 Ergebnisse der DNA-Extraktion aus kommerziell erhältlichen Lebensmitteln.....	58
4.2 Entwicklung eines Singleplex real time PCR-Assays zur Detektion von Lupine in Lebensmitteln.....	60
4.2.1 Primer und Sonden	60
4.2.2 Optimierung der Primerkonzentration und der Annealing- temperatur.....	61
4.2.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität der Lupineprimer	62
4.2.4 Optimierung der Konzentration der Lupinesonde	63
4.2.5 Optimierte Parameter für den Singleplex-Assay	64
4.2.6 Ermittlung der Nachweisgrenze mittels seriell verdünnter DNA ..	65
4.2.7 Nachweis von Lupine in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln	67
4.2.8 Ermittlung der Detektierbarkeit von gelber und blauer Lupine ...	68
4.3 Entwicklung eines Duplex-Assays zur simultanen Detektion von Lupine und Erdnuss in Lebensmitteln.....	69
4.3.1 Primer und Sonden	69
4.3.1.1 Primerpaar 1 und Sonde 1	69
4.3.1.2 Primerpaar 2 und Sonde 2	70
4.3.1.3 Primerpaar 3 und Sonde 3	71
4.3.2 Optimierung der Primerkonzentrationen und der Annealingtemperatur	71
4.3.2.1 Optimierung der Konzentration und der Annealingtemperatur von Primerpaar 1	72

4.3.2.2	Optimierung der Konzentration und der Annealingtemperatur von Primerpaar 2	74
4.3.2.3	Optimierung der Konzentration und der Annealingtemperatur von Primerpaar 3	76
4.3.3	Bestimmung der Kreuzreaktivität der Erdnussprimer	77
4.3.3.1	Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares 1	78
4.3.3.2	Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares 2	79
4.3.3.3	Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares 3	80
4.3.4	Optimierung der Erdnusssonden-Konzentration	81
4.3.5	Optimierung des Duplex-Assays	83
4.3.6	Ermittlung der Nachweisgrenze mit seriell verdünnter DNA	86
4.3.6.1	Ermittlung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays – Lupine ...	86
4.3.6.2	Ermittlung der Nachweisgrenze des Duplexassys – Erdnuss.....	87
4.3.7	Ermittlung der Nachweisgrenzen in gespikten Lebensmitteln	88
4.3.7.1	Lupine.....	88
4.3.7.2	Erdnuss.....	90
4.3.8	Nachweis von Lupine und Erdnuss in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln	91
5	Schlussbetrachtung	93
6	Zusammenfassung.....	96
7	Summary.....	97
8	Literaturnachweis.....	98

i Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Ursachen von Lebensmittelunverträglichkeiten	4
Abbildung 2-2: Übersicht über die vier Typen der immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen. [Thews et al., 2007]	8
Abbildung 2-3: Aufbau der DNA [Alberts et al., 2005]	19
Abbildung 2-4: Wasserstoffbrückenbindungen der einzelnen Basenpaare [Alberts et al., 2005]	20
Abbildung 2-5: Schema der Protein-Synthese [Alberts et al., 2005]	20
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion [Alberts et al. 2005]	23
Abbildung 2-7: Darstellung einer sigmoiden PCR-Kurve.....	24
Abbildung 2-8: Schema der Amplifizierung mit Taqman-Sonde [Yang & Rothman, 2004].....	27
Abbildung 2-9: Emissionswellenlängen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe inklusive Bereiche der Signalunterdrückung der einzelnen Quencher [www.metabion.com].....	28
Abbildung 4-1: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration der Lupineprimer und der Annealingtemperatur.....	61
Abbildung 4-2: PCR Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit den Lupineprimern gebildeten Amplifikaten.....	62
Abbildung 4-3: Gel der mit den Lupineprimern erhaltenen Amplifikate	63
Abbildung 4-4: Optimierung der Lupinensonden-Konzentration.....	64
Abbildung 4-5: Ermittlung der Effizienz mit seriell verdünnter Lupinen-DNA ...	65
Abbildung 4-6: Standardgerade der seriell verdünnten Lupinen-DNA.....	66
Abbildung 4-7: Test auf Detektierbarkeit von blauer und gelber Lupine.....	68
Abbildung 4-8: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration des Primerpaares 1 und der Annealingtemperatur.....	72

Abbildung 4-9: Graphische Darstellung der erhaltenen ct-Werte in Abhängigkeit von der Annealingtemperatur und den Primerkonzentrationen	73
Abbildung 4-10: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration des Primerpaares 2 und der Annealingtemperatur	74
Abbildung 4-11: Graphische Darstellung der erhaltenen ct-Werte in Abhängigkeit von der Annealingtemperatur und den Primerkonzentrationen	75
Abbildung 4-12: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration des Primerpaares 3 und der Annealingtemperatur	76
Abbildung 4-13: Graphische Darstellung der erhaltenen ct-Werte in Abhängigkeit von der Annealingtemperatur und den Primerkonzentrationen	77
Abbildung 4-14: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 1 erhaltenen Amplifikate	78
Abbildung 4-15: Gel der mit dem Primerpaar 2 gebildeten Amplifikate	79
Abbildung 4-16: Gel der mit dem Primerpaar 3 gebildeten Amplifikate	80
Abbildung 4-17: PCR Kurven der Optimierung der Konzentration der Erdnusssonde	81
Abbildung 4-18: PCR-Kurven für Erdnuss im nicht optimierten Duplex-Assay	83
Abbildung 4-19: PCR Kurven der Lupine nach der Optimierung des Duplex-Assays (Lupinen-DNA c = 20 ng/µl)	85
Abbildung 4-20: PCR Kurven der Erdnuss nach der Optimierung des Duplex-Assays (Erdnuss-DNA c = 20 ng/µl)	85
Abbildung 4-21: Standardgerade von seriell verdünnter Lupine-DNA	86
Abbildung 4-22: Standardgerade von seriell verdünnter Erdnuss-DNA	87
Abbildung 4-23: Standardgerade von mit Lupine gespicktem Müsli	89
Abbildung 4-24: Standardgerade von mit Erdnuss gespicktem Zwieback	90

ii Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Auf Kreuzreaktivität getestete Lebensmittel bzw. Lebensmittelzutaten für Lupine	35
Tabelle 3-2: Auf Kreuzreaktivität getestete Lebensmittel bzw. Lebensmittelzutaten für Erdnuss	36
Tabelle 3-3: Sequenzen der Primer und des Taqman für Lupine	45
Tabelle 3-4: Sequenzen der Primer und des Taqman für Erdnuss	45
Tabelle 3-5: Pipettierschema für die Optimierung der Primerkonzentrationen .	48
Tabelle 3-6: Eingesetzte Verdünnungen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen .	51
Tabelle 3-7: Zusammensetzung der gespikten Lebensmittel	52
Tabelle 4-1: Reinheit und Konzentration der für Kreuzreaktivitätstests verwendeten DNA-Extrakte.....	56
Tabelle 4-2: Reinheit und Konzentration der DNA-Extrakte aus gelber und blauer Lupine	57
Tabelle 4-3: Reinheit und Konzentration der DNA-Extrakte aus kommerziell erhältlichen Lebensmitteln	58
Tabelle 4-4: DNA-Sequenzen für die Lupinenprimer und die Lupinensonde.....	60
Tabelle 4-5: Optimierte Parameter des Singleplex-Assays.....	64
Tabelle 4-6: Ergebnis der Analyse seriell verdünnter Lupinen-DNA.....	66
Tabelle 4-7: Ergebnis der Analyse von kommerziellen Lebensmitteln.....	67
Tabelle 4-8: Charakteristika des Primerpaares 1 und der Sonde 1.....	69
Tabelle 4-9: Charakteristika des Primerpaares 2 und der Sonde 2.....	70
Tabelle 4-10: Charakteristika des Primerpaares 3 und der Sonde 3.....	71
Tabelle 4-11: Optimierte Parameter für Primerpaar 4.....	82
Tabelle 4-12: Optimierte Parameter des Singleplex-Assays für Lupine und Erdnuss.....	83
Tabelle 4-13: Parameter des optimierten Duplex-Assays	84

Tabelle 4-14: Erhaltene c_t -Werte für mit Lupine gespiktem Müsli.....	88
Tabelle 4-15: Erhaltene c_t -Werte für mit Erdnuss gespiktem Zwieback.....	90
Tabelle 4-16: Ergebnis der Analyse von kommerziellen Lebensmitteln	92

iii Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APT	Atopy Patch Test
BLAST	Basic Local Assignment Search Tool
bp	Basenpaare
C	Cytosin
c	Konzentration
C _t	Treshold cycle
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBPCFC	Double blind placebo controlled food challenge
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F-Primer	Forward-Primer
G	Guanin
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgM	Immunglobulin der Klasse M
min	Minute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OAS	Orales Allergiesyndrom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
RAST	Radioallergosorbent Test

rpm	rounds per minute
R-Primer	Reverse-Primer
RSD	relative Standardabweichung
s	Standardabweichung
sec	Sekunde
SPT	Skin Prick Test
T	Thymin
T _m	berechnete Schmelztemperatur
veg.	vegetarisch
zB	zum Beispiel

1 Einleitung und Fragestellung

Lebensmittelallergien stellen ein immer größer werdendes Problem in den industrialisierten Ländern dar. Aktuelle Zahlen gehen davon aus, dass etwa 6-8% der Kinder und ungefähr 3% der Erwachsenen an einer oder mehreren Lebensmittelallergien leiden [Burks und Ballmer-Weber, 2006].

Eigeneinschätzungen zufolge liegt die Prävalenz von Lebensmittelallergien in der europäischen Bevölkerung sogar bei 25% [Cornelisse-Vermaat et al., 2007]. Als diagnostische Möglichkeit stehen verschiedene Provokationstests zur Verfügung, wie zB Skin Prick Tests oder Double Blind Placebo Controlled Food Challenges (DBPCFC) [Asero et al., 2007 und Crevel et al., 2008]. Momentan stellt die einzige, dauerhaft wirksame Therapie die strikte Vermeidung des allergieauslösenden Lebensmittels dar. Bestehen Allergien gegen mehrere Lebensmittel, kann diese strikte Vermeidung der Lebensmittel eine Einengung des Nahrungsmittelpools und zusätzlich sogar noch das Problem der Malnutrition hervorrufen [Crevel et al., 2008].

Um den Verbrauchern das Identifizieren von Nahrungsmitteln, die allergene Inhaltsstoffe enthalten, zu erleichtern, und somit auch möglicherweise lebensbedrohliche Vorfälle bzw. Unfälle von Allergikern mit undeklarierten Allergenen in Lebensmitteln zu vermeiden, gab und gibt es sowohl national als auch international Bemühungen, die Kennzeichnung von allergenen Inhaltsstoffen auf den Verpackungen für den Endverbraucher zu regeln. Resultat dieser Bemühungen sind Richtlinien zur Lebensmittelkennzeichnung. Die aktuellste Version ist die EU-Richtlinie 2007/68/EG, sie schreibt die Kennzeichnung von 14 potentiellen allergenen Inhaltsstoffen auf Lebensmittelverpackungen zwingend und ausnahmslos vor [Richtlinie 2007/68/EG].

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollten eine auf der PCR basierende Methode zur Bestimmung von Lupine und eine Methode zur simultanen Detektion von Lupine und Erdnuss (Duplex-Assay) in Lebensmitteln entwickelt werden. Eine besondere Bedeutung kam der Entwicklung der Duplexmethode zu, da mittlerweile feststeht, dass zwischen Lupine und Erdnuss die Möglichkeit einer Kreuzallergie besteht. Es gibt dokumentierte Fälle von Erdnussallergikern, welche nach dem Verzehr von lupinehaltigen Produkten allergietypische Reaktionen bis hin zu einem anaphylaktischen Schock beobachteten [Peeters et al., 2007].

Die Lupine zählt zu jenen Lebensmittelzutaten, welche erst in die letzte Version der Richtlinie der kennzeichnungspflichtigen Lebensmittel aufgenommen wurde, da ihr allergenes Potential erst vor einigen Jahren entdeckt wurde.

Die Erdnuss zählt zu den stark allergenen Lebensmitteln und ist unter den 14 kennzeichnungspflichtigen Lebensmitteln. Im Gegensatz zu anderen Lebensmittelallergien besteht eine Allergie gegen Erdnuss ein Leben lang. Bereits minimale Mengen an Erdnussprotein (ca. 100 µg) können zu allergischen Reaktionen führen [Scaravelli et al., 2007].

In der jüngeren Vergangenheit wurden bereits einige PCR Methoden zur Bestimmung von Lupine [Scarafoni et al., 2009 und Demmel et al., 2008] oder zur Bestimmung von Erdnuss publiziert [Hird et al., 2003 und Stephan & Vieths, 2004], aber bis dato fehlt eine Methode, mit welcher beide Lebensmittelzutaten simultan detektiert werden können.

Die Methoden sollten eine hohe Spezifität, eine hohe Effizienz und niedrige Nachweisgrenzen aufweisen. Weiters sollten sie die Bestimmung von Lupine bzw. Lupine und Erdnuss in verarbeiteten Lebensmitteln ermöglichen.

2 Literaturübersicht

2.1 Lebensmittelunverträglichkeiten

2.1.1 Allgemeines

Häufig wird der Begriff „Lebensmittelallergie“ fälschlich synonym mit dem Begriff „Lebensmittelunverträglichkeit“ verwendet, allerdings ist eine allergische Reaktion und somit eine Allergie stets mit einer Immunantwort assoziiert. Bei allergieauslösenden Substanzen handelt es sich stets um Proteine.

Neben Lebensmittelallergien gibt es eine Reihe weiterer Nahrungsmittelunverträglichkeiten, welche ohne Beteiligung des Immunsystems ablaufen. Diese Unverträglichkeiten werden unter dem Begriff Lebensmittelintoleranzen zusammengefasst. Sie können von enzymatischer, pharmakologischer oder noch undefinierter Natur sein. Ein Beispiel für eine Lebensmittelintoleranz ist die Lactoseintoleranz, bei der der Körper das Enzym Lactase in unzureichenden Mengen produziert, um die zugeführte Lactose spalten zu können [Wüthrich, 2009]. Abbildung 2-1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Ursachen von Lebensmittelunverträglichkeiten.

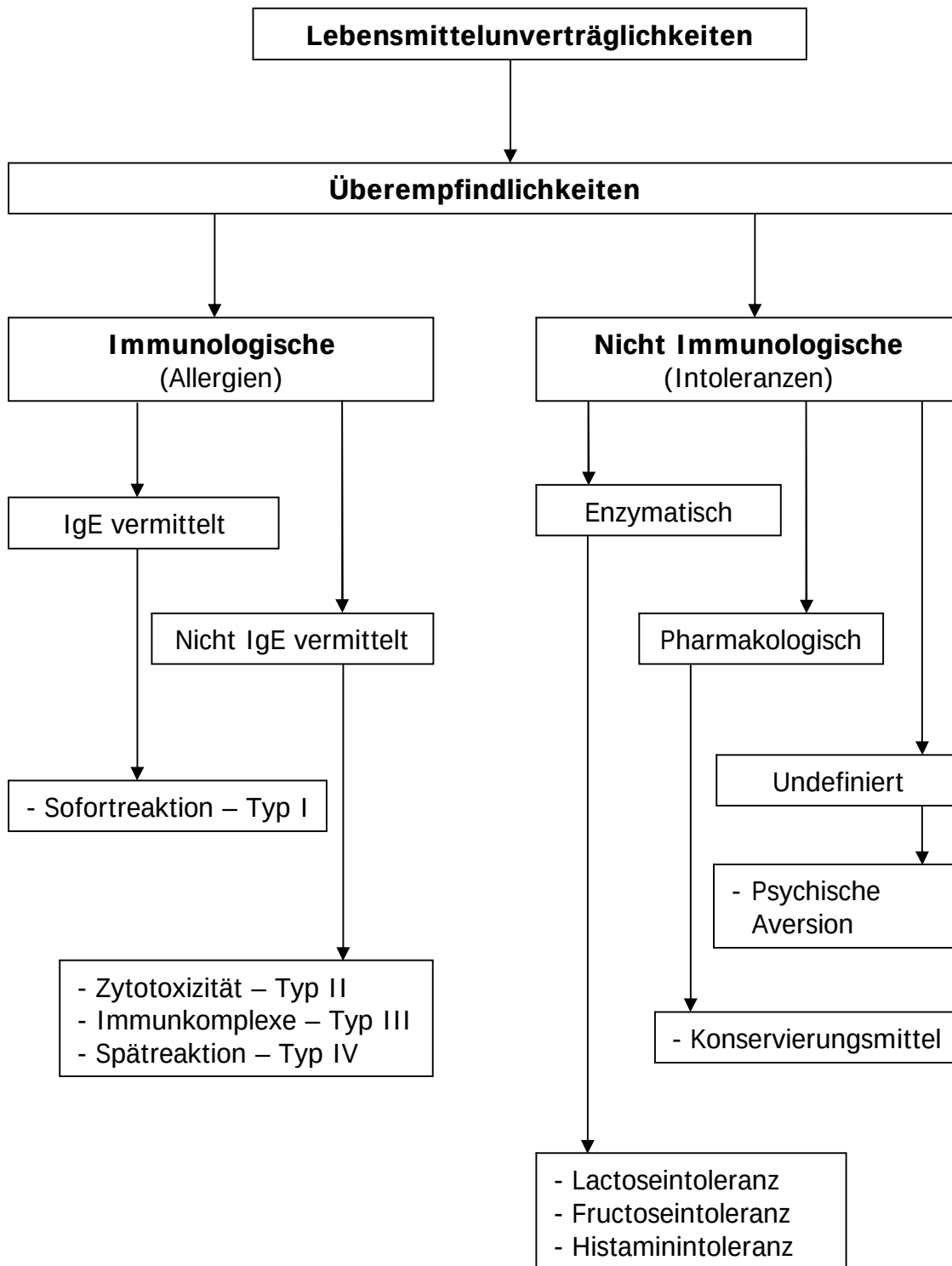


Abbildung 2-1: Ursachen von Lebensmittelunverträglichkeiten [modifiziert nach Patriarca et al., 2009]

2.1.2 Lebensmittelallergien

Bei Allergien handelt es sich laut Pschyrembel um eine „angeborene oder erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegenüber körperfremden, eigentlich unschädlichen Substanzen, die als Allergen erkannt werden“ [De Gruyter, 2002].

Im Allgemeinen handelt es sich bei einer Allergie um eine Fehlreaktion des Immunsystems. Die Erscheinungsformen der zumeist IgE vermittelten allergischen Reaktion können von milden bis hin zu lebensbedrohlichen Symptomen reichen. Voraussetzung für eine allergische Reaktion ist eine vorherige Sensibilisierung des Immunsystems, wofür ein Kontakt mit dem Allergen notwendig ist. Diese Sensibilisierung verläuft ohne Symptome, erst bei neuerlichem Kontakt mit dem Allergen kommt es zu allergischen Reaktionen [Löffler & Petrides, 1998].

Es sind vier unterschiedliche Typen von immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen bekannt (siehe Abbildung 2-2), welche im Folgenden beschrieben werden sollen [Thews et al., 2007]. Die wichtigste immunologische Überempfindlichkeitsreaktion im Zusammenhang mit Lebensmittelallergien ist die Typ I-Reaktion (Sofortreaktion).

2.1.2.1 Typ I - Sofortreaktion

Bei diesem Typ der Überempfindlichkeitsreaktion ist es wichtig, zwischen zwei Phasen, der Sensibilisierung und der Effektorphase, zu unterscheiden.

Damit es zu einer allergischen Reaktion kommt, ist eine vorherige Sensibilisierung nötig. Bei dieser Sensibilisierung reagiert der Körper beim Kontakt mit dem Allergen (= Antigen) mit einer starken Produktion von IgE's gegen die entsprechenden Antigene.

Diese produzierten IgE's heften sich an Mastzellen an, welche bereits verschiedene allergische Reaktionen auslösende Mediatoren enthalten. Dieser erste Kontakt mit dem Allergen verläuft im Allgemeinen ohne Symptome. Erst bei einem neuerlichen Kontakt mit dem Allergen, der Effektorphase, bindet dieses an die IgE's an der Oberfläche der Mastzellen, was zu einer Degranulation der

Mastzellen und somit zu einer Freisetzung der verschiedenen Mediatoren führt. Freigesetzte Mediatoren sind u. a. Histamin, Heparin, verschiedene Enzyme, chemotaktische und aktivierende Faktoren. Außerdem werden Leukotriene und Zytokine gebildet.

Aufgrund der in den Mastzellen enthaltenen, bereits präformierten Substanzen, benötigt diese Reaktion nur wenige Minuten, bis es zu Symptomen kommt. Eine Folge dieses Typs der allergischen Reaktion ist der anaphylaktische Schock, welcher lokal begrenzt sein oder den ganzen Körper betreffen kann [Thews et al., 2007 und Asero et al., 2007].

2.1.2.2 Typ II-Reaktion

Vermittelt wird dieser Reaktionstyp durch IgG und IgM. Das Immunsystem reagiert mit Opsonierung, Phagozytose bzw. mit einer Aktivierung des Komplementsystems, was zur Zytolyse der Zelle führt (zytotoxische Reaktion).

Beispiele stellen Reaktionen von Autoantikörpern gegen körpereigene Erythrozyten bzw. Thrombozyten, sowie arzneimittelinduzierte allergische Leukopenien dar. Eine bestehende Insulinresistenz kann auch auf eine Typ II-Reaktion zurückzuführen sein [Thews et al., 2007].

2.1.2.3 Typ III-Reaktion

Hervorgerufen wird dieser Reaktionstyp durch Immunkomplexe, welche nach Komplementaktivierung zu entzündlichen Reaktionen führen können. Die Symptome können lokal oder generalisiert auftreten, je nachdem, ob ein Antikörperüberschuss oder ein Antigenüberschuss besteht.

Bei einem Antikörperüberschuss treten Symptome an der Eintrittsstelle des Antigens, also lokal, auf. Beispiele für diesen Reaktionstyp sind die Farmerlunge, verursacht durch verschimmeltes Heu, oder die Vogelzüchterlunge, die nach einem Kontakt mit Exkrementen von Geflügel auftreten kann. Bekanntestes Beispiel am Menschen ist das Krankheitsbild der Zöliakie, bei welcher durch aufge-

nommenes Gliadin Darmschleimhautschäden entstehen. Die Zöliakie ist auch bekannt als „Glutenunverträglichkeit“.

Besteht ein Antigenüberschuss, kommt es zu generalisierten Reaktionen. Grund dafür ist das Zirkulieren der gebildeten Immunkomplexe im Körper [Thews et al., 2007].

2.1.2.4 Typ IV – Spättyp (zellvermittelte Allergie)

Bei diesem Typ handelt es sich um eine Kontaktallergie, an welcher die Lymphozyten beteiligt sind und dabei verschiedene Mediatoren freigegeben. Bei Allergien vom Typ IV wird noch eine weitere Einteilung in 4 Subklassen vorgenommen (IVa, IVb, IVc, IVd), je nachdem, welche T-Zellen bzw. welche Mediatoren an der Reaktion beteiligt sind.

T-Helferzellen sezernieren nach Kontakt mit einem Antigen Lymphokine, welche wiederum verschiedene Entzündungszellen und T-Lymphozyten aktivieren. Die Symptome sind erst nach mehreren Tagen, unter Umständen erst nach Wochen bemerkbar, weshalb dieser Typ der Überempfindlichkeitsreaktionen auch als „Spättyp“ bezeichnet wird.

Dem Typ IV sind Kontaktallergien mit der Haut und die akute Transplantatabstoßung zuzuordnen. Die bedeutendsten Substanzen, welche Kontaktallergien auslösen können, sind Nickelsalze („Nickelallergie“) und Gummi-Inhaltsstoffe [Thews et al., 2007 und Czarnobilska et al., 2007].

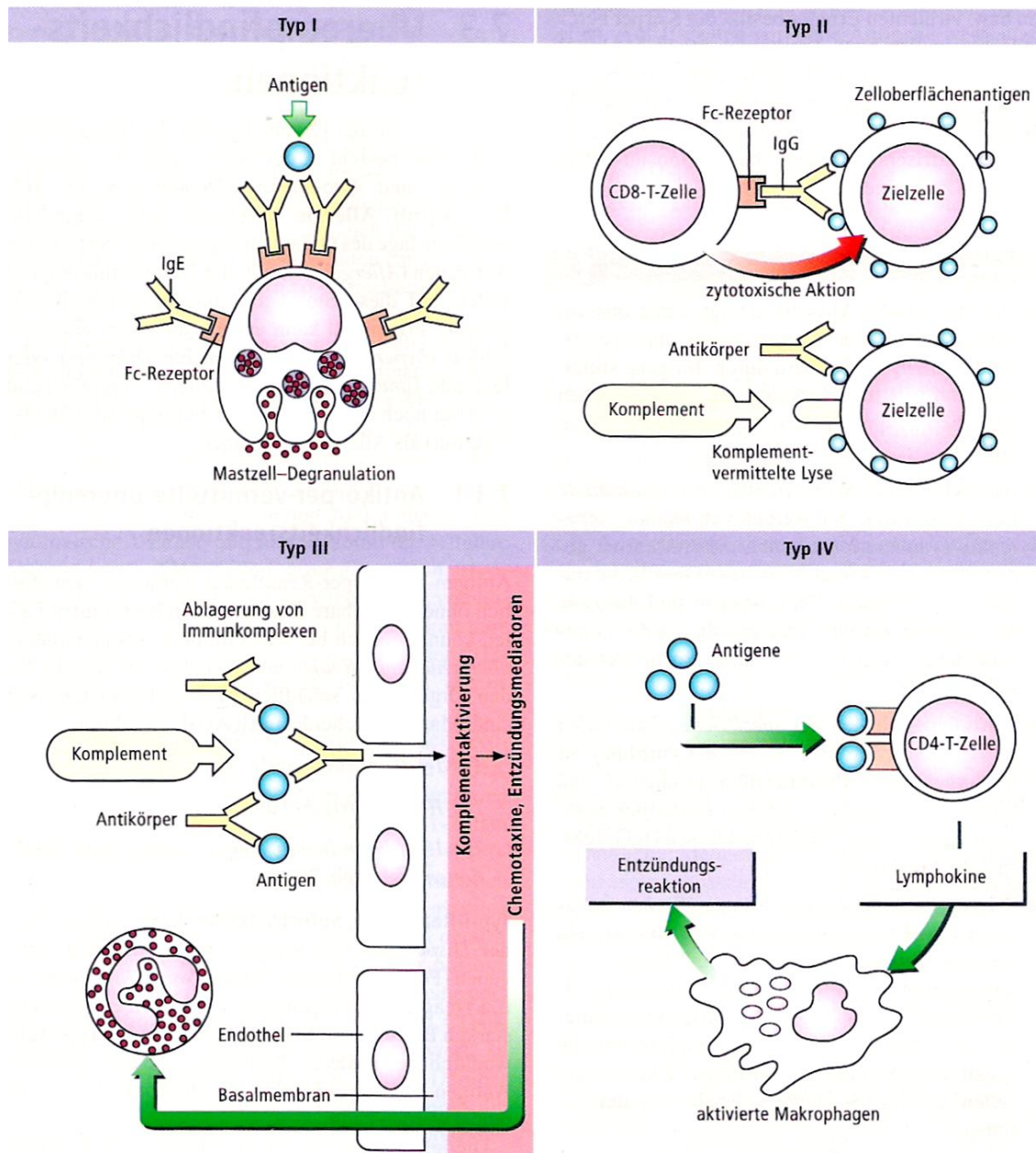


Abbildung 2-2: Übersicht über die vier Typen der immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen. [Thews et al., 2007]

2.1.3 Symptome bei Allergenkontakt

2.1.3.1 Orales Allergiesyndrom (OAS)

Das OAS ist eines der am häufigst auftretenden allergischen Krankheitsbilder bei Erwachsenen. Es ist IgE vermittelt und betrifft Lippen, Mundschleimhaut und Rachen. Auftretende Symptome sind ein Anschwellen bzw. Jucken von Lippen, Zunge, Gaumen, Rachen, Ohr und Nase. Häufig sind die Reaktionen mild und klingen innerhalb einer Stunde wieder ab. Vereinzelt kann es aber auch zu ernsteren Reaktionen mit extremen Schwellungen der Speiseröhre bis hin zu einem anaphylaktischen Schock kommen [Asero et al., 2007].

2.1.3.2 Gastrointestinale Beschwerden

Auftretende gastrointestinale Beschwerden sind ebenfalls IgE vermittelt und es kommt zu Übelkeit, Erbrechen, Abdominalschmerzen und Durchfall.

Der Zeitraum vom Kontakt mit dem Allergen bis hin zum Auftreten der ersten Symptome erstreckt sich von einigen wenigen Minuten bis hin zu zwei Stunden. Die Allergene, welche die gastrointestinalen Beschwerden hervorrufen, sind Pepsin-stabil und erreichen den Gastrointestinaltrakt somit in unmodifizierter Form [Asero et al., 2007].

2.1.3.3 Hautreizungen

Häufig kommt es bei IgE vermittelten Allergien zu Hautreizungen wie Jucken, Nesselausschlag (Urticaria), Angioödemem bis hin zu größeren Ausschlägen.

Diese Hautreizungen treten nach wenigen Minuten auf und halten einige Stunden an [Asero et al., 2007].

2.1.3.4 Reizung der Atemwege

Eine Reizung der Atemwege tritt selten als einziges Symptom auf, hängt aber ebenfalls mit IgE vermittelten Reaktionen zusammen. Als Beschwerden wären zu nennen: das Brillenhämatom, Erytheme, Juckreiz, eine verstopfte bzw. eine laufende Nase, Niesreiz, Hustenreiz, Veränderungen der Stimme und ein engendes Gefühl in der Brust [Asero et al., 2007 und Burks & Ballmer-Weber, 2006].

2.1.3.5 Anaphylaktischer Schock

Der anaphylaktische Schock ist die gefährlichste Reaktion auf Allergene und ist definiert als „ernste, lebensbedrohliche, allgemeine oder systemische Überempfindlichkeitsreaktion“. Es handelt sich dabei um eine dramatische Reaktion des Körpers, sie stellt immer einen Notfall dar.

Verursacht wird diese Reaktion durch eine plötzliche und massive Abgabe von Mediatoren aus den Mastzellen sowie aus den basophilen Zellen im ganzen Körper. Die Mediatoren werden innerhalb von Minuten, unter Umständen sogar innerhalb von Sekunden nach dem Kontakt mit einem Allergen freigesetzt.

Der anaphylaktische Schock ist eine Kombination aus Nesselausschlag (Urticaria), Hautrötung, Jucken, Übelkeit, Erbrechen, Atemnot, Bronchospasmen, Schwindel, Herzrasen, Ohnmacht oder Kollaps. Schwere Fälle können tödlich enden, leichtere Fälle sind auf einige der oben genannten Symptome limitiert [Asero et al., 2007].

2.1.4 Diagnostik von Lebensmittelallergien

Es stehen verschiedene medizinische Tests zur Feststellung einer Lebensmittelallergie zur Verfügung. Der Skin Prick Test (SPT) ist das Mittel der Wahl zur Feststellung von Allergien gegen Früchte und Gemüse. Bei diesem Test wird eine Lanzette mehrere Male in die zu testende Frucht bzw. das zu testende Gemüse gesteckt, bevor die Haut des Patienten damit durchstoichen wird. Durch entsprechende Reaktionen an der Einstichstelle kann man auf eventuelle Allergien rückschließen.

Der Atopy Patch Test (APT) funktioniert ähnlich wie der SPT. Beim APT wird das Allergen epicutan verabreicht und eventuelle Hautveränderungen werden beobachtet.

Der goldene Standard zur Feststellung einer Lebensmittelallergie ist die „double-blind placebo controlled food challenge“ (DBPCFC) [Crevel et al., 2008], welche die Grundlage zur Erstellung einer Eliminationsdiät darstellt. Bei den DBPCFC-Studien wird das vermutete Lebensmittelallergen in Lebensmittel eingearbeitet, welche vom Patienten toleriert werden. Das zubereitete Essen wird verzehrt und die Reaktion darauf beobachtet [Asero et al., 2007].

2.1.5 Therapie von Lebensmittelallergien

Am Markt sind einige Medikamente erhältlich, welche bei einer bestehenden Allergie helfen sollen, wie zum Beispiel Antihistaminika, Corticosteroide, Prostaglandin-Synthetase-Inhibitoren und Ketotifen.

Andere Medikamente sind momentan noch im Versuchsstadium, aber allen gemein ist, dass sie nur wenig erfolgsversprechend sind, oder aber enorme Nebenwirkungen mit sich bringen [Burks & Ballmer-Weber, 2006].

2.1.6 Prävention von Lebensmittelallergien

Ist eine Lebensmittelallergie erst einmal diagnostiziert, ist die einzige Möglichkeit zur Vermeidung einer allergischen Reaktion die strikte Vermeidung aller Lebensmittel, welche das symptomauslösende Allergen enthalten. Die Gefahr solcher Eliminationsdiäten besteht in der starken Einschränkung des Lebensmittelpools, was wiederum zu Malnutrition führen kann. Positiv anzumerken ist aber, dass vor allem Kleinkinder im Laufe ihrer Entwicklung bestimmten Allergien „entwachsen“ können, dazu zählen vor allem Allergien, die gegen Milch, Ei, Weizen und Sojabohnen bestehen. Im Gegensatz dazu bleiben Allergien gegen Nüsse, Fisch, Meerestiere und auch Erdnüsse ein Leben lang bestehen [Burks & Ballmer-Weber, 2006].

2.1.7 Versteckte Allergene

Bei versteckten Allergenen handelt es sich um nicht deklarierte, allergene Zutaten in Lebensmitteln, welche während des Herstellungsprozesses, zum Beispiel durch unzureichende Reinigung der Maschinen oder Kontaminationen, in die Lebensmittel gelangen können. Sowohl bei Lupine- als auch bei Erdnussallergikern sind Fälle bekannt, bei denen eine allergische Reaktion beobachtet wurde, obwohl auf dem Lebensmitteletikett weder Lupine noch Erdnuss aufgelistet war [De Las Marinas et al., 2007 und Schäppi et al., 2001].

2.2 Lupine

2.2.1 Allgemeines

Die Lupine (*L. species*) gehört zu der Familie der Leguminosen und ist somit unter anderem auch mit der Erdnuss (*A. hypogaea*) verwandt.

Es gibt züchtungsbedingt viele verschiedene Lupinenspecies, zu den bedeutendsten zählen die weiße Lupine (*L. albus*), die blaue Lupine (*L. angustifolius*), die gelbe Lupine (*L. luteus*) sowie die Anden-Lupine (*L. mutabilis*) [Demmel et al., 2008], wobei die weiße Lupine bei weitem am häufigsten kultiviert wird [Smith et al., 2004].

Gezüchtet wird die Lupine bereits seit vielen Jahrhunderten hauptsächlich in den Anden. Anfänglich hohe Alkaloidgehalte wurden ebenfalls durch Züchtung beseitigt.

Lupinensaat wird seit Jahrhunderten in der Ernährung von Mensch und Tier verwendet [EFSA, 2005] und auch heutzutage nimmt die Bedeutung der Lupine in der Humanernährung ständig zu, der Hauptgedanke dabei zielte ursprünglich auf einen Ersatz für Soja hin [Demmel et al., 2008 und Peeters et al., 2007]. Die Lupine bietet viele Vorteile, zu nennen wären hier vor allem die flexiblen Anbaubedingungen, wodurch sie für die Landwirte leichter zu handhaben ist. Des Weiteren stellt die Lupine eine billige Protein-Quelle mit günstigem Aminosäure-Profil dar [Yáñez et al., 1979].

Lupine findet immer häufiger Anwendung in Produkten wie Nudeln, Pizza oder Mehlspeisen [Rojas-Hijazo et al., 2006].

Die gelbe Lupine wird wegen ihrer Farbe auch häufig als Eiersatz verwendet [EFSA, 2005].

Ein gravierender Nachteil allerdings, welcher auch Anstoß für die vorliegende Arbeit war, ist das allergene Potential der Lupine und ihre Kreuzreaktivität mit Erdnuss (*A. hypogaea*). Es gibt dokumentierte Fälle, in denen Personen mit Erdnussallergie auch gegen lupinehaltige Lebensmittel allergische Symptome, bis hin zu einem anaphylaktischen Schock, zeigten.

Aus diesem Grund ist es besonders problematisch, wenn es zu undeklarierten Verschneidungen von Lebensmitteln mit Lupine kommt. Solche undeklarierten Verschneidungen werden aber immer wieder beobachtet, zB wurde häufig „reines Sojamehl“ mit Lupinemehl verschnitten [Demmel et al., 2008]. Außerdem wurden Spuren von Lupine in Marzipan festgestellt [Matissek, 2009].

Ein weiteres Problem in lebensmittelverarbeitenden Betrieben ist die Möglichkeit der Kreuzkontamination während des Produktionsablaufes.

2.2.2 Lupinenallergie

Eine in Großbritannien durchgeführte Studie untersuchte die Prävalenz der Lupineallergie bei Kindern. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Möglichkeit der Kreuzallergie mit Erdnuss gelegt. Die Studie ergab, dass 4% der Kinder, welche allergisch gegen Erdnuss waren, auch allergische Reaktionen gegen Lupine zeigten und 34% waren gegen Lupine sensibilisiert [Shaw et al., 2008].

Die Kreuzreaktivität von Lupine und Erdnuss wurde in zahlreichen radioimmunologischen und immunologischen Tests festgestellt [Moneret-Vautrin et al., 1999]. Die Prävalenz der Lupineallergie in der Gesamtbevölkerung ist derzeit noch unbekannt [EFSA, 2005].

Die Symptome reichen von milden, lokal begrenzten Reaktionen bis hin zur systemischen Anaphylaxie.

Ein Schwellenwert für Lupine wurde noch nicht ermittelt, allerdings gehen aktuelle Quellen von einer Dosis von 265 bis 1000 mg Lupinemehl aus, welche nötig ist, um eine allergische Reaktion hervorzurufen [EFSA, 2005].

2.2.3 Lupinenallergene

Bei den Allergenen der Lupine handelt es sich um die glykosylierten Speicherproteine α -, β -, γ - und δ -Conglutin. Die Allergene sind sehr stabil und können auch noch nach einem Autoklavierprozess bei 138 °C für 30 Minuten allergische Reaktionen hervorrufen, somit nehmen lebensmitteltechnologische Maßnahmen wenig Einfluss auf das allergene Potential der Lupine [EFSA, 2005].

2.3 Erdnuss

2.3.1 Allgemeines

Die Erdnuss (*Arachis hypogaea*) gehört zur Familie der Leguminosen und findet häufig Anwendung in Snacks, Frühstückscerealien und Schokolade. Überwiegend wird die Erdnuss dabei in gerösteter Form verwendet. In orientalischen Kulturkreisen wird die Erdnuss auch häufig in der Küche verwendet [www.foodallergens.info].

Die wichtigsten Anbauggebiete befinden sich in China, Indien, den USA, Nigeria und in Indonesien [German nut council].

2.3.2 Erdnussallergie

Die Erdnuss löst bei Allergikern für gewöhnlich lebensbedrohliche Reaktionen, wie zB einen anaphylaktischen Schock aus [Burks et al., 1999]. Die geschätzte Prävalenz der Erdnussallergie liegt zwischen 0,5% [Emmet et al., 1999] und 1,1% [Sicherer et al., 1999]. Die Sensibilisierung findet zumeist im kindlichen Alter statt und bleibt im Erwachsenenalter meist erhalten, nur 20% der Kinder mit Erdnussallergie entwachsen der Überempfindlichkeit.

Eine allergische Reaktion tritt innerhalb der ersten Minuten nach dem Kontakt auf. Die nötige Dosis für eine allergische Reaktion hängt stark vom Individuum ab, verschiedene Quellen berichten von Schwellendosen zwischen 100 µg bis 1 g Erdnussprotein [EFSA, 2004].

2.3.3 Erdnussallergene

Zurzeit sind acht verschiedene Erdnussallergene bekannt, welche zu verschiedenen Proteinfamilien gehören. Zur Proteinfamilie der Vicilline zählt Ara h 1, zur Familie der Conglutinine zählen Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7, zu den Glycininen zählen Ara h 3 und Ara h 4 und zur Profilin-Familie zählt Ara h 5. Das 8. Allergen ist Oleosin, dessen allergenes Potential erst später entdeckt wurde [Pons et al., 2002].

Die wichtigsten Allergene sind Ara h 1 und Ara h 2, die zugleich ca. 10-20% der Proteine in der Erdnuss ausmachen. Das besondere an diesen beiden Allergenen ist, dass ihre Allergenität durch einen Röstvorgang erhöht wird [EFSA, 2004].

2.4 Kreuzreaktivität Lupine-Erdnuss

Eine alleinige Allergie gegen Lupine ist durchaus möglich, häufig besteht aber auch eine Allergie gegen andere Leguminosen, speziell gegen die Erdnuss. Verschiedene Untersuchungen zeigten generelle Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen Species innerhalb der Familie der Leguminosen [Bernhisel-Broadbent & Sampson, 1989; Bernhisel-Broadbent et al., 1989; Sicherer, 2001; Mills & Shewry, 2004]. Die bedeutendste Möglichkeit einer Kreuzreaktivität in Bezug auf Lupine besteht aber mit der Erdnuss [Hefle et al., 1994; Moneret-Vautrin et al., 1999; Kanny et al., 2000; Faeste et al., 2004].

Der erste dokumentierte Fall einer allergischen Reaktion gegen Lupine im Jahr 1994 betraf eine Erdnussallergikerin. Foss und Frøkiær (2005) gehen davon aus, dass die Kreuzreaktivität auf das Protein γ -Conglutin, welches sich in der Lupine befindet, zurückzuführen ist [EFSA, 2005].

Ein weiteres Protein, welches in Verdacht steht, für die Kreuzreaktivität verantwortlich zu sein, ist 7S Globulin, welches in allen Leguminosen als Speicherprotein vorkommt [Peeters et al., 2007].

2.5 Lebensmittelkennzeichnung

2.5.1 Forderung der Konsumenten

Verbände und Konsumenten fordern eine klare Kennzeichnung aller allergenen Inhaltsstoffe, eine ständige Aktualisierung der Liste der kennzeichnungspflichtigen allergenen Zutaten auf Basis der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage und eine strenge Limitierung von Ausnahmeregelungen bezüglich der Kennzeichnungspflicht. Mit der EU Richtlinie 2007/68/EG wurde diesen Wünschen entsprochen [Mills et al., 2004].

2.5.2 Geschichtliche Entwicklung der Lebensmittelkennzeichnung

Der Grundstein für die Lebensmittelkennzeichnung wurde 1994 gelegt. Seit diesem Zeitpunkt müssen die Lebensmittelhersteller alle verwendeten Zutaten auf den Verpackungen angeben [Dahl, 2006].

Die erste weitergehende Richtlinie zur Verschärfung der Lebensmittelkennzeichnung stellte die Richtlinie 2000/13/EG dar [Richtlinie 2000/13/EG].

Mit Inkrafttreten der Richtlinie 2003/89/EG wurde mit Anhang IIIa eine Liste mit allergenen Lebensmitteln eingeführt, welche stets auf der Verpackung anzuführen sind, wenn diese im Produkt enthalten sind [Richtlinie 2003/89/EG].

Die neueste Version von Anhang IIIa, welche um zwei allergene Lebensmittelzutaten (Lupine und Weichtiere) erweitert wurde, ist in der Richtlinie 2007/68/EG zu finden [Richtlinie 2007/68/EG].

2.5.3 Kennzeichnungspflichtige Lebensmittelzutaten

Laut EU Richtlinie 2007/68/EG Anhang IIIa müssen derzeit 14 Lebensmittelzutaten inklusive Erzeugnisse daraus aufgrund ihres allergenen Potentials auf den Etiketten sichtbar deklariert werden. Bei den 14 Produkten handelt es sich um glutenhaltiges Getreide, Krebstiere, Eier, Fisch, Erdnüsse, Soja, Milch, Schalenfrüchte, Sellerie, Senf, Sesam, Schwefeldioxid in einer Konzentration von mehr als 10 mg/kg, Lupine und Weichtiere [Richtlinie 2007/68/EG].

2.6 Überblick über Methoden zur Detektion von Allergenen

Man benötigt Methoden, um prüfen zu können, ob die Kennzeichnungspflicht eingehalten wird. Zurzeit spielen vor allem Immunoassays und PCR Methoden eine große Rolle. Daneben gibt es noch RAST, Sensoren, Dipsticks etc. In den folgenden Kapiteln sollen die Polymerase Kettenreaktion und der ELISA näher erläutert werden.

2.6.1 Desoxyribonucleinsäure (DNA)

2.6.1.1 Aufbau der DNA

Die Doppelhelix-Struktur der DNA wurde 1953 von Watson und Crick mittels Röntgenbeugungsmuster aufgeklärt.

Im Einzelnen besteht ein DNA-Molekül aus zwei zueinander komplementären Einzelsträngen. Diese Einzelstränge bestehen aus vier verschiedenen Bausteinen, den Nucleotiden. Die Nucleotide sind aus einem Zucker, einem Phosphatrest und einer Base zusammengesetzt (siehe Abbildung 2-3). Im Fall der DNA besteht der Zucker aus Desoxyribose, welche mit einer Phosphatgruppe verbunden ist. Bei den vier Basen handelt es sich um Guanin (G), Cytosin (C), Adenin (A), und Thymin (T).

Diese Desoxyribonucleosidtriphosphate (Desoxyribose + Phosphat + Base) sind über kovalente Bindungen zu Ketten verknüpft. Eine Kette bildet einen Strang der DNA. Die zweite, komplementäre Kette ist über Wasserstoffbrückenbindun-

gen mit der ersten Kette verbunden. Die Wasserstoffbrücken bilden sich stets zwischen denselben Basen aus, nämlich zwischen Adenin und Thymin und Guanin und Cytosin (siehe Abbildung 2-4). Das Basenpaar A-T bietet zwei Möglichkeiten für Wasserstoffbrücken, das Basenpaar G-C drei Möglichkeiten, dadurch stellt dieses Basenpaar auch eine stärkere Form der Bindung dar. Dies ist der Grund, warum der GC-Gehalt bei dem Entwerfen von Primern und Taqman-Sonden für PCR-Anwendungen berücksichtigt werden muss (siehe Kapitel 3.6.2.1 und Kapitel 3.6.2.2) [Alberts et al., 2005].

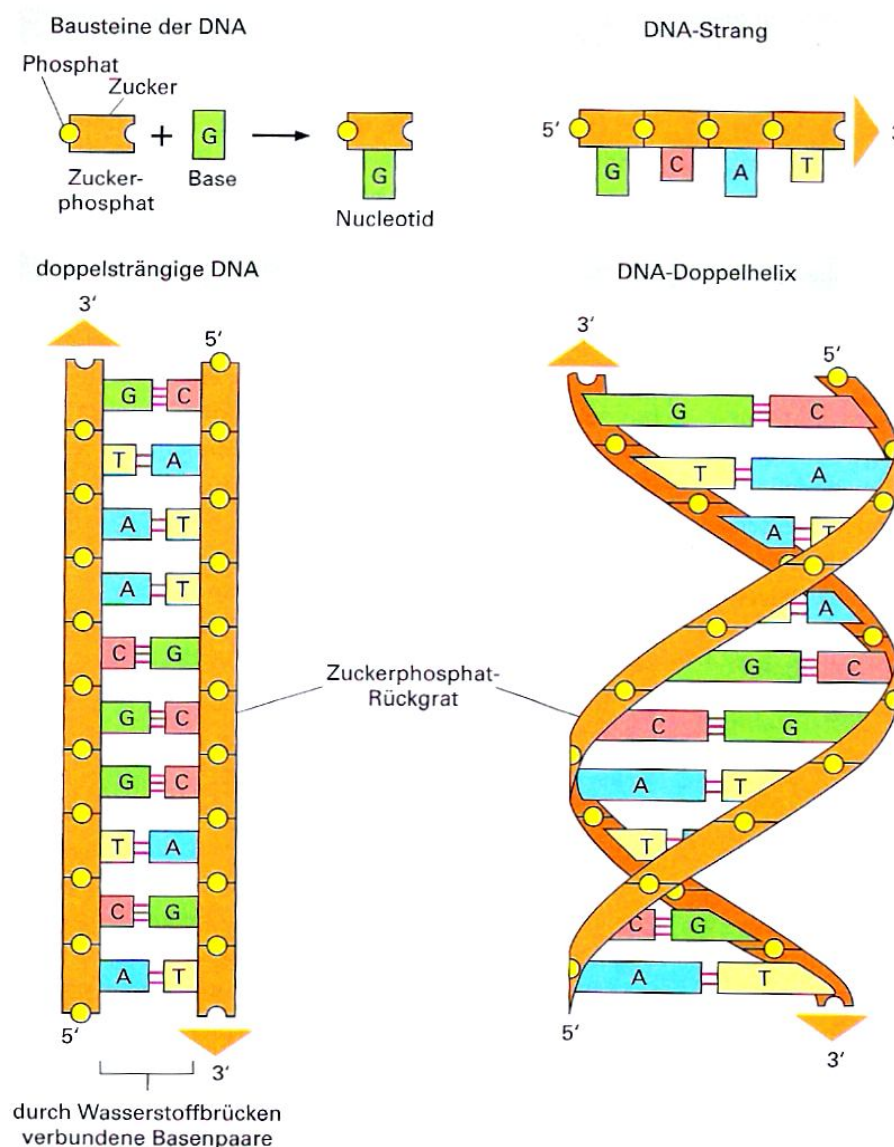


Abbildung 2-3: Aufbau der DNA [Alberts et al., 2005]

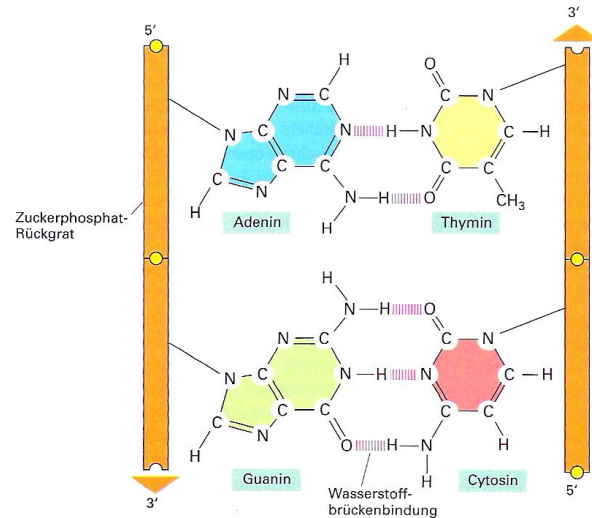
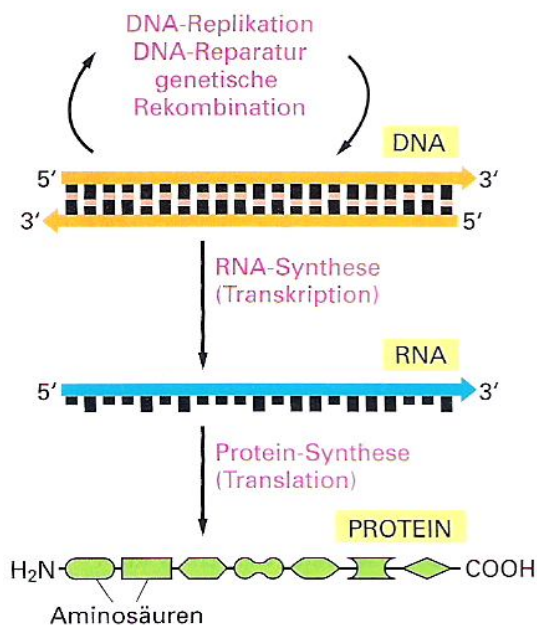


Abbildung 2-4: Wasserstoffbrückenbindungen der einzelnen Basenpaare [Alberts et al., 2005]

2.6.1.2 Aufgabe der DNA

Die DNA enthält die Erbinformation jedes Organismus. In der DNA ist die Sequenz für Proteine codiert, und mittels der Vorgänge der Genexpression werden die Informationen, welche in der DNA gespeichert sind, „übersetzt“. Der Weg von der DNA zum fertigen Protein erfolgt über mehrere Schritte, welche hier nicht näher erläutert werden sollen. Im Prinzip wird die DNA zunächst zur RNA transkribiert (Transkriptionsschritt), und aus der RNA erhält man schlussendlich



über mehrere Schritte das fertige Protein. Der Schritt von der RNA zum Protein wird als Translation bezeichnet (siehe Abbildung 2-5).

Jeweils drei Basen eines Stranges der DNA codieren für eine Aminosäure, und so kann Stück für Stück über die richtige DNA-Sequenz das gewünschte Protein zusammengesetzt werden [Alberts et al., 2005].

Abbildung 2-5: Schema der Protein-Synthese [Alberts et al., 2005]

2.6.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase Kettenreaktion können beliebige Abschnitte einzelner Gene amplifiziert werden.

Grundlage dieser Methode ist die DNA-Polymerase, welche einzelsträngige DNA kopiert. Will man den zu amplifizierenden Abschnitt einschränken, um spezifische DNA-Abschnitte zu vervielfachen, kommen Primer zur Anwendung. Primer sind kurze, zu der zu amplifizierenden DNA komplementäre DNA-Fragmente, welche an die gewünschten Stellen des Einzelstranges der DNA hybridisieren und somit die Start- bzw. Endposition darstellen. Um Primer zu entwerfen, ist es nötig, die DNA-Sequenz zu kennen.

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine äußerst empfindliche Methode, in der Theorie ist eine einzige Kopie der DNA in einer Probe nachweisbar. Im Wesentlichen besteht der gesamte Vorgang aus 3 Schritten, der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, sodass 2 Einzelstränge vorliegen; der Hybridisierung der Primer und dem Amplifikationsschritt. Ein Durchlauf aller 3 Schritte wird als Zyklus bezeichnet, und pro Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Kopien in der Probe. Daraus erklärt sich die enorme Empfindlichkeit dieser Methode.

$$\text{Anzahl der Kopien} = 2^n \text{ (theoretischer Wert)}$$

$$n \dots \text{Anzahl der Zyklen}$$

Jeder Schritt weist ein anderes Temperaturoptimum auf. Der 1. Schritt, die Denaturierung der DNA, läuft bei 95°C ab. Im 2. Schritt, dem Primerannealing, hängt die optimale Temperatur von den Primern ab, und muss somit für jedes neue Primerpaar neu ermittelt werden. Die Polymerase arbeitet bei einer Temperatur von 72 °C am effektivsten, und darum wird der 3. Schritt, die Elongation, bei dieser Temperatur durchgeführt. In einem Temperaturprogramm werden die Temperaturen, die Dauer dieser 3 Schritte und die Zahl der Zyklen zusammengefasst.

Die Vorgänge während eines PCR-Laufes sind in Abbildung 2-6 dargestellt.

Um die Amplifikate sichtbar zu machen, wird im Anschluss an die PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt, wobei die amplifizierte DNA in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt wird. Sichtbar werden die Banden durch Ethidiumbromid, welches sich in die doppelsträngige DNA einlagert und unter UV-Licht fluoresziert.

Zusätzlich zu der Polymerase und den Primern werden für eine PCR-Reaktion noch die dNTPs, also die Bausteine der DNA benötigt, welche im Lauf der Reaktion von der Polymerase zu einem DNA-Strang verknüpft werden. Um die Funktionalität der Polymerase zu gewährleisten, benötigt man schließlich noch Mg^{2+} in Form von MgCl_2 [Alberts et al., 2005 und Poms et al., 2004].

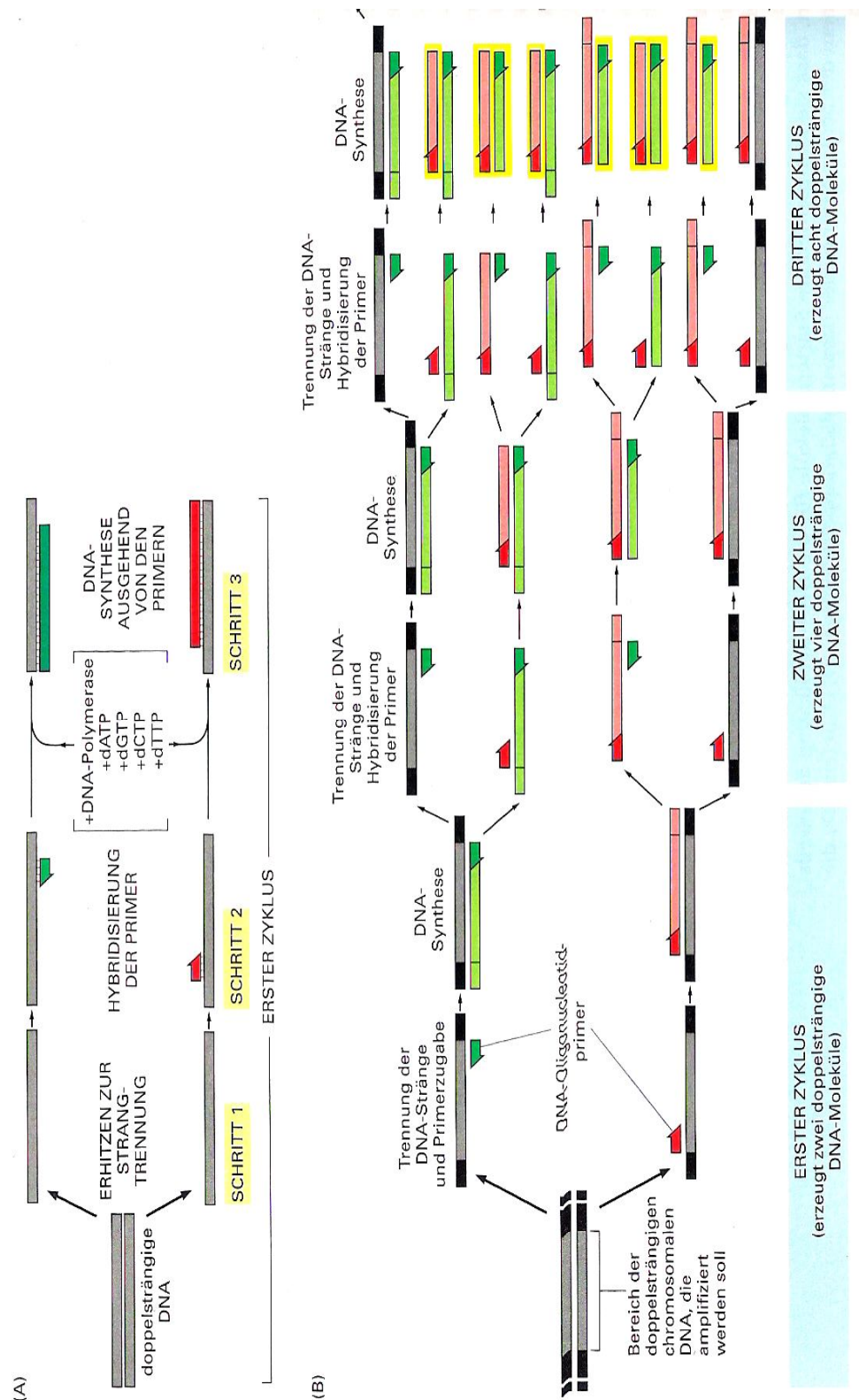


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion [Alberts et al. 2005]

2.6.3 Real time PCR

Real time PCR Anwendungen benötigen ein aufwendigeres Equipment und sind somit kostenintensiver als die herkömmliche PCR oder andere Analyseverfahren für Allergene [Poms et al., 2004].

Der Vorteil gegenüber der herkömmlichen PCR liegt in der gelfreien Detektion. Bei real time PCR Anwendungen muss zur korrekten Auswertung eine *Basislinie* gesetzt werden, um das Hintergrundsignal zu berücksichtigen. Jenen Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Basislinie kreuzt, bezeichnet man als *Threshold-Cycle* (c_t -Wert). Unterschieden werden verschiedene Detektionsverfahren, hier näher erläutert werden sollen die Detektion mit SYBR Green und die mit Taqman-Sonden.

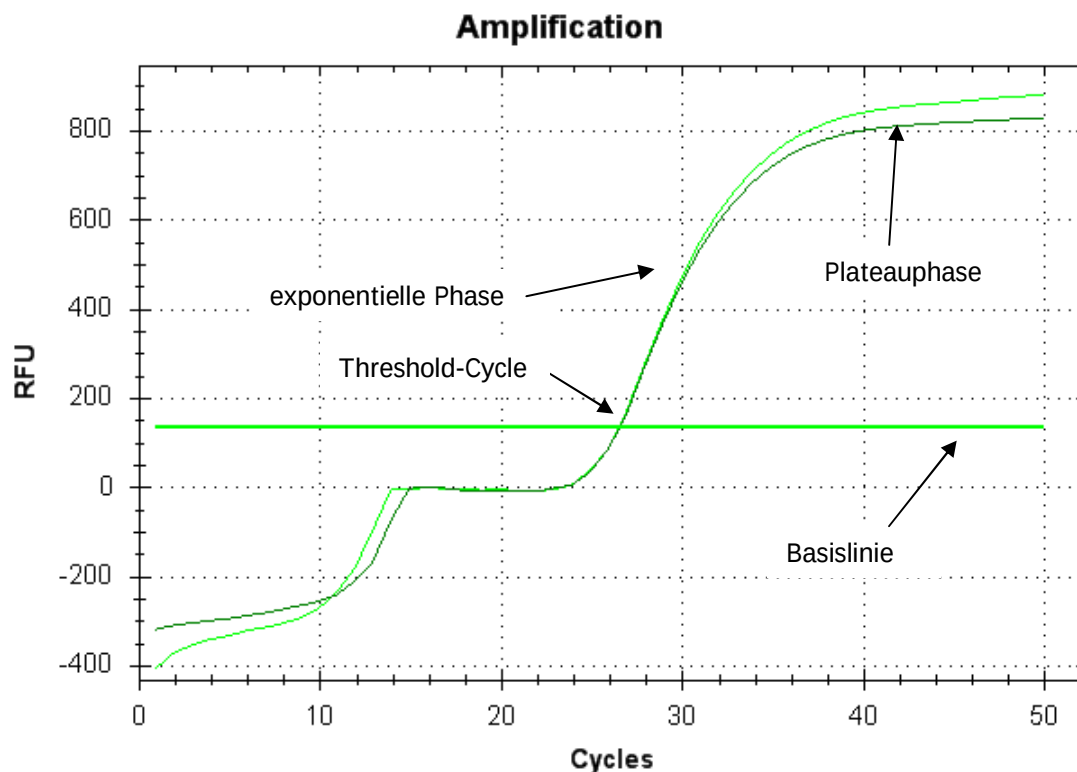


Abbildung 2-7: Darstellung einer sigmoiden PCR-Kurve

Plateauphase: in der Plateauphase kommt es zu keinem weiteren Anstieg des Signals. Grund dafür kann die Denaturierung der DNA-Polymerase sein, der Verbrauch an dNTPs bzw. Primern, oder aber auch die Bildung von inhibierenden Substanzen.

Exponentielle Phase: in der exponentiellen Phase steigt das Fluoreszenzsignal über die Basislinie und verdoppelt sich von Zyklus zu Zyklus.

Basislinie: Diese Linie kann individuell gesetzt werden, und dient dazu, das Hintergrundsignal des Fluorophors auszugleichen.

Threshold-Cycle: Gibt jenen Zyklus an, bei dem das Fluoreszenzsignal über die Basislinie steigt und in die exponentielle Phase übergeht.

Effizienz: Die Effizienz ist ein Maß dafür, wie gut eine PCR-Reaktion abgelaufen ist. 100% stellt den optimalen Wert dar, und bedeutet, dass sich die DNA bei jedem Zyklus verdoppelt hat.

Multiplex PCR (Duplex PCR): Bei dieser Methode können pro PCR-Lauf mehrere (zwei) Template detektiert werden. Voraussetzung dafür ist, dass für jedes Templat die entsprechenden Primer und Sonden vorhanden sind [Dorak, 2006].

2.6.3.1 SYBR Green Assay

Bei SYBR Green handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Ist der Farbstoff nicht in die DNA eingelagert, ist die Fluoreszenz sehr gering, nach Einlagerung in die DNA steigt die Stärke der Fluoreszenz um das 1000-fache an. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional mit der Menge an doppelsträngiger DNA und sollte sich daher nach jedem Zyklus verdoppeln.

Der Vorteil von SYBR Green liegt in der Möglichkeit, im Anschluss an den PCR-Lauf eine Schmelzkurven-Analyse durchzuführen, was mit sequenzspezifischen Farbstoffen nicht möglich ist [Dorak, 2006].

Nachteilig ist die fehlende Spezifität, da sich SYBR Green in jede Art von DNA einlagert. Sollte also aufgrund einer Kreuzreaktivität noch ein anderer Abschnitt der DNA amplifiziert werden, lagert es sich auch dort ein. Des weiteren ist SYBR Green nicht für Multiplexreaktionen geeignet. [Biorad Laboratories]. SYBR Green weist ein Absorptionsmaximum von 470 nm [Attar et al., 2005] und eine Emissionswellenlänge von 497 nm auf [Dorak, 2006].

2.6.3.2 Taqman Assay

Eine beliebte Alternative zur Detektion mit SYBR Green ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff markierten Sonden. Eine Sonde ist eine kurze DNA-Sequenz, welche zu dem zu amplifizierenden Strang komplementär ist, und innerhalb des von den Primern eingeschlossenen Abschnitts liegt. Als Taqman-Sonde wird eine DNA-Sequenz bezeichnet, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher versehen ist. Befinden sich der Fluoreszenzfarbstoff und der entsprechende Quencher in räumlicher Nähe, wird das Signal unterdrückt und ist von der optischen Einheit des PCR Gerätes nicht messbar. Das Enzym Taq-Polymerase besitzt zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine Exonucleaseaktivität, somit werden bei der Elongation der Taqman-Sonde der Farbstoff und der Quencher abgespalten, und es kommt zu einem messbaren Signal (siehe Abbildung 2-8) [Yang & Rothman, 2004].

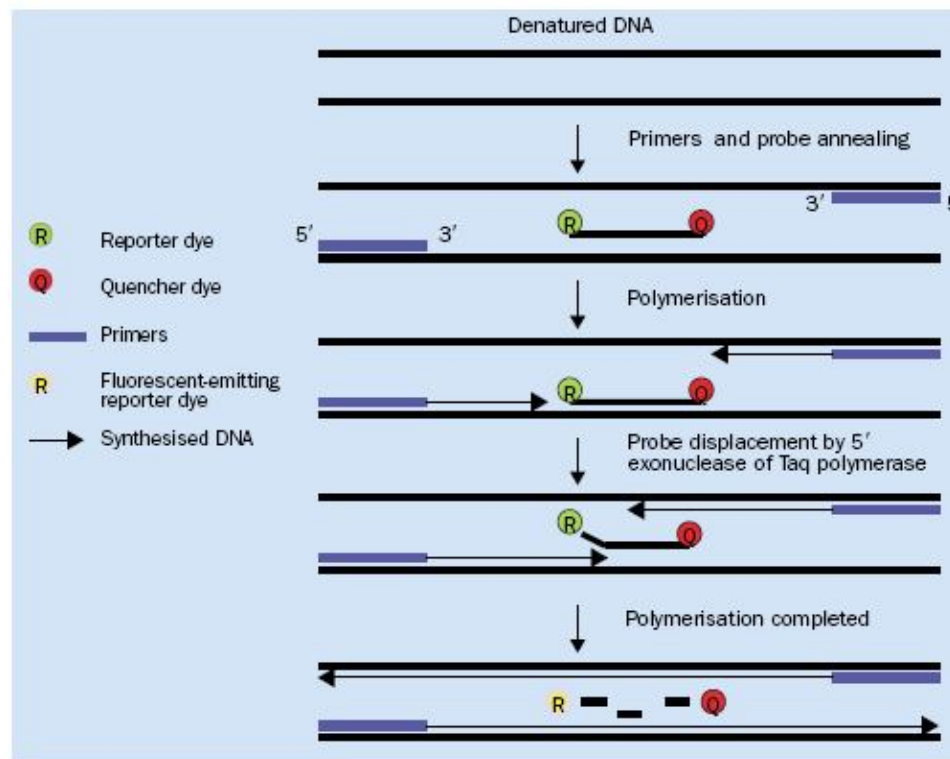


Abbildung 2-8: Schema der Amplifizierung mit Taqman-Sonde [Yang & Rothman, 2004]

Es ist eine Vielzahl von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mit passenden Quenchern bekannt, von denen jeder ein anderes Absorptionsmaximum aufweist. Verwendet man nun zwei oder mehrere Farbstoffe mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen, können verschiedene Proben parallel in einem Lauf detektiert werden [www.metabion.com].

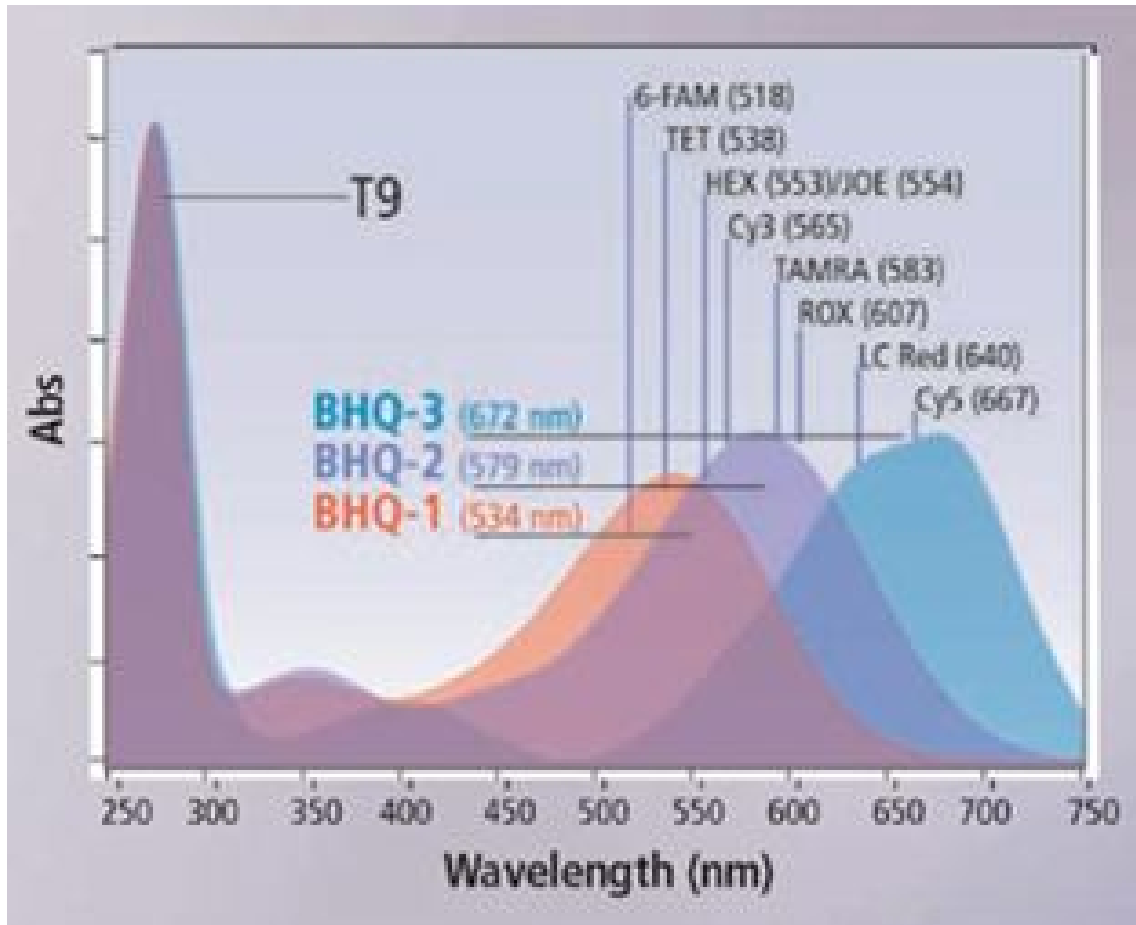


Abbildung 2-9: Emissionswellenlängen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe inklusive Bereiche der Signalunterdrückung der einzelnen Quencher [www.metabion.com]

2.6.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Enzymimmunoassays spielen zurzeit die größte Rolle in der Allergenanalytik.

Es stehen zwei Formen des ELISAs zur Verfügung, der kompetitive ELISA und der Sandwich ELISA.

Die übliche Form ist der Sandwich ELISA, bei welchem ein Antikörper an einer festen Phase, üblicherweise an einer Mikrotiterplatte, immobilisiert wird. Dieser immobilisierte Antikörper bindet spezifisch das gewünschte Protein (Antigen bzw. Allergen). Um eine Farbreaktion zu erhalten, ist ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper nötig, welcher ebenfalls spezifisch an das zu analysierende Protein bindet. Das gebundene Enzym katalysiert eine Farbreaktion, wobei die gemessene Intensität der Farbe proportional der Menge an Protein in der Probe ist [Besler, 2001].

Der Name Sandwich ELISA ergibt sich aus der Anordnung Antikörper-Antigen-Antikörper, d. h., das Antigen ist sandwichartig zwischen zwei Antikörpermolekülen eingeschlossen [Poms et al., 2004].

2.6.5 PCR vs. ELISA

Betrachtet man die Zeit, die nötig ist, PCR bzw. ELISA Methoden zu entwickeln, liegt der Vorteil eindeutig bei den PCR Methoden. Während die Produktion von Antikörpern Monate in Anspruch nimmt, benötigt die Entwicklung von auf der PCR basierten Methoden nur wenige Wochen, vorausgesetzt die DNA-Sequenz ist bekannt. Außerdem können polyklonale Antikörper nicht in beliebigen Mengen reproduzierbar hergestellt werden, Primer und Sonden hingegen sind reproduzierbar herstellbar. Laut Theorie sind die Nachweisgrenzen der PCR Methoden niedriger als jene der ELISA Methoden, darüber hinaus wird die DNA im Gegensatz zu Proteinen während der Probenaufarbeitung weniger beeinflusst.

Ein Nachteil der PCR Methoden ist, dass die Lebensmittelverarbeitung dazu führen kann, dass die DNA denaturiert und dadurch nicht amplifiziert werden kann. Ein Nachteil beider Methoden ist, dass Matrixeffekte einen starken Einfluss auf die Nachweisgrenzen haben können [Besler, 2001 und Poms et al., 2004].

2.7 Ausgewählte Methoden zur Bestimmung von Lupine und Erdnuss in Lebensmitteln

2.7.1 Lupine

Scarafoni et al. entwickelten eine PCR Methode, welche es erlaubt, 7 pg an Lupinen-DNA zu detektieren, was einer Konzentration von 0,1% Lupinenmehl in Lebensmitteln entspricht. Zu Beginn untersuchten Scarafoni et al. die Effektivität ihrer DNA-Extraktionsmethoden, indem sie Lupinenmehl, Weizenmehl und verschiedene Mischungen von Weizen- mit Lupinenmehl herstellten und daraus die DNA extrahierten. Es zeigte sich, dass Lupinenmehl gut angepasste Extraktionsmethoden benötigt, um DNA in ausreichenden Mengen zu extrahieren. Sie entwarfen ein Primerpaar, welches hochspezifisch für Lupine ist, und entwickelten eine Methode, die sich gut für die Detektion von Lupine in Bäckereiprodukten eignet [Scarafoni et al., 2009].

Demmel et al. setzten sich zum Ziel, eine PCR Methode zu entwickeln, mit welcher so viele verschiedene Lupinenspecies wie möglich detektiert werden sollten, mit einem Minimum an falsch-positiven Ergebnissen. Das Ergebnis war eine Methode, mit der die An-/Abwesenheit von 11 verschiedenen Lupinespecies spezifisch nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0,01 pg an Lupine-DNA [Demmel et al., 2008].

Holden et al. entwickelten und validierten 2005 einen Sandwich ELISA zur Detektion von Lupine in verschiedenen Lebensmittelmatriizes. Verwendet wurden ausschließlich polyklonale Antikörper. Kreuzreaktivitäten mit anderen Vertretern der Leguminosenfamilie wurden zum größten Teil ausgeschlossen, obwohl festgestellt wurde, dass der lupinenspezifische Antikörper Erdnuss, Erbsen, Soja und Linse zu einem kleinen Teil bindet [Holden et al., 2005].

2007 entwickelten Holden et al. eine weitere Lupine-spezifische Methode, unter der Verwendung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Der Test ist anwendbar auf native und prozessierte Lupine, die Nachweisgrenze liegt bei 1 µg Lupine/g Lebensmittel. Die Methode wurde auf 112 kommerziell erhältliche Lebensmittel angewendet. Die Analyse ergab, dass beim Großteil der untersuchten Lebensmittel das Ergebnis mit der Deklaration auf der Verpackung übereinstimmte, obwohl es einige Unstimmigkeiten gab, besonders bei Sojamehl und Gebäck [Holden et al., 2007].

2.7.2 Erdnuss

Hird et al. entwickelten eine PCR Methode zur Detektion von Erdnuss. Zu Beginn ihrer Arbeit untersuchten sie sieben unterschiedliche Extraktionsmethoden bezüglich ihrer Eignung. Grund dafür ist der hohe Fettgehalt der Erdnuss, welcher eine Hemmung der Taq-Polymerase hervorruft. Methoden, die die größte Menge an DNA lieferten, führten ebenfalls zu einer hohen Konzentration an PCR-Inhibitoren. In weiterer Folge verwendeten sie einen kommerziell erhältlichen Kit, welcher die geringste Menge an PCR-Inhibitoren im DNA-Extrakt lieferte.

Primer und Taqman-Sonde wurden für das Allergen Ara h 2 entworfen und mit über 30 Lebensmitteln auf Kreuzreaktivität getestet. Die entwickelte Methode wurde mit seriell verdünnter DNA und mit Erdnuss gespickten Lebensmittelmatriizes validiert und bestätigt [Hird et al., 2003].

Holzhauser und Vieths entwickelten 1999 einen kompetitiven ELISA für die Detektion von Erdnuss. Sie analysierten auch Erdnüsse die unter genau definierten Bedingungen unterschiedlich lange geröstet worden waren. Holzhauser und Vieths kamen zu dem Ergebnis, dass Röstvorgänge, wie sie in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben angewendet werden, die Proteinzusammensetzung der Erdnuss kaum verändern, und die Erdnuss nichts von ihrem allergenen Potential verliert. Lediglich bei einem starken Röstvorgang von über 40 Minuten bei 160 °C sank die Nachweisgrenze des ELISAs signifikant. Somit ist der entwickelte Test auch auf Erdnüsse anwendbar, die einem Röstvorgang unterlagen. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 50 ng Erdnussprotein/ml Extrakt [Holzhauser & Vieths, 1999].

Stephan und Vieths entwickelten für die Detektion von Erdnuss einen ELISA und eine PCR Methode. Für den Sandwich ELISA wurden ausschließlich polyklonale Antikörper verwendet, und eine Nachweisgrenze von $0,15 \pm 0,12$ ppm an Erdnussprotein ermittelt. Um die Nachweisgrenze der real time PCR zu ermitteln, wurden Schokoladeproben mit Erdnuss gespikt und analysiert, mit dem Ergebnis, dass Erdnuss in jeder Konzentration (200 und 10 ppm) in Milch- sowie in Zartbitterschokolade detektiert werden konnte. Als Negativkontrolle diente erdnussfreie Schokolade.

Beide Verfahren wurden auf 33 Lebensmittelproben angewendet. Kreuzreaktivitäten mit verwandten Pflanzenfamilien konnten bei beiden Testverfahren ausgeschlossen werden.

Um die Nachweisgrenze zu ermitteln, wurde Biskuit mit Erdnuss gespikt. Die ermittelte Nachweisgrenze der PCR Methode lag bei 2 mg Erdnuss/kg Lebensmittel [Stephan & Vieths, 2004].

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte

- Analysewaagen: Mettler AE 200
Sartorius TE1502S
- Kolbenhubpipetten: Biorad 1-10 µl
Biorad 2-20 µl
Biorad 20-200 µl
Biorad 100-1000 µl
- Vortex: Janke & Kunkel VF2
VWR W3
- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424
- pH-Meter: Metrohm 691
- Trockenschrank: Model 500, Memmert
- Photometer: Genesys 10 UV, Thermo Scientific
- Mikrowellenofen: Silva MW 1700
- Mixer: Philips HR 7621
- Elektrophoreseapparatur: Power PacTM HV Power Supply, Biorad
- Transilluminator: Herolab UVT-20M
- PCR: iQTM 5 Multicolor Real Time PCR Detection System, Biorad
- Magnetrührer: Heidolph 50300
Ikamag RCT

3.2 Chemikalien und Reagenzien

- 20 bp Molecular Ruler, Biorad
- Certified TMPCR Agarose, Biorad
- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Sigma-Aldrich
- Chloroform p.a., Roth
- DNA-Exitus plus, AppliChem
- EDTA, Merck
- Essigsäure_{konz.} p.a., Sigma-Aldrich
- Ethanol p.a., Roth
- Ethidiumbromid Lösung 10 mg/ml, Biorad
- iQ Supermix SYBR Green, Biorad
- iQ Supermix, Biorad
- Isopropanol p.a., Sigma-Aldrich
- Natriumchlorid p.a., Merck
- Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5x, Biorad
- Primer, Sigma-Aldrich
- Proteinase K from Tritirachium album, Sigma-Aldrich
- QiaAmp DNA Stool Kit, Qiagen
- RNase, Sigma-Aldrich
- Salzsäure p.a., Sigma-Aldrich
- Sodium Dodecylsulfate, Sigma
- Taqman-Sonde, Metabion
- Trisma base, Sigma-Aldrich
- Wasser für molekularbiologische Anwendungen, Fluka

3.3 Proben

Als Proben dienten kommerziell erhältliche Lebensmittel aus Supermärkten und Reformhäusern sowie Bio-Läden aus Wien.

Lupinesaat (*Lupinus species*) wurde von der Firma Saatzucht Steinach GmbH, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Als Erdnussproben dienten kommerziell erhältliche, geröstete Erdnüsse.

3.3.1 Verwendete Lebensmittel bzw. Lebensmittelzutaten zur Überprüfung der Kreuzreaktivität

In den Tabellen 3-1 und 3-2 sind alle Lebensmittel und Lebensmittelzutaten angeführt, die im Laufe dieser Arbeit für Kreuzreaktivitätstests verwendet wurden.

Tabelle 3-1: Auf Kreuzreaktivität getestete Lebensmittel bzw. Lebensmittelzutaten für Lupine

Dinkel	Kürbiskerne	Sonnenblumen
Erbsen	Leinsamen	Wachtelbohnen
Erdnuss	Linsen	Walnuss
Gerste	Reis	Weißer Bohnen
Hafer	Roggen	Weizen
Haselnuss	Schokolade	Zuckererbsen
Heldt-Bohnen	Sesam	
Hirse	Soja	

Tabelle 3-2: Auf Kreuzreaktivität getestete Lebensmittel bzw. Lebensmittelzutaten für Erdnuss

Cashewkerne	Lupine	Roggen
Dinkel	Macadamianuss	Schwarzer Sesam
Erbse	Mais	Sesam
Gerste	Mandeln	Soja
Haferflocken	Paranuss	Sonnenblumenkerne
Kichererbsen	Pekanuss	Walnuss
Kürbiskerne	Pinienkerne	Weißer Bohnen
Leinsaat	Pistazie	Weizen
Linsen	Reis	

3.4 DNA-Extraktionsmethoden

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur DNA-Extraktion angewandt. Als Standardmethode wurde die CTAB-Methode verwendet. Mit einem kommerziell erhältlichen Kit wurde jene Probe (Tiefkühlererbse) aufgearbeitet, bei der die CTAB-Methode aufgrund der Lebensmittelmatrix keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte.

3.4.1 CTAB-Extraktionsmethode

3.4.1.1 Benötigte Reagenzien

CTAB-Extraktionslösung pH 8,0

CTAB-Präzipitationslösung

1,2 M NaCl-Lösung

Chloroform p.a.

70%iger Ethanol p.a.

Isopropanol p.a.

Salzsäure p.a.

Proteinase K

RNase

3.4.1.2 Herstellung der benötigten Lösungen

CTAB-Extraktionslösung pH 8,0:

20 g/l CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)

1,4 M NaCl

0,1 M Tris

0,02 M EDTA

CTAB-Präzipitationslösung:

5 g/l CTAB

0,04 M NaCl

Die benötigten Reagenzien wurden je in einem 500 ml Kolben zusammengefügt, mit H₂O_{dd} gelöst und der Kolben bis zur Markierung mit H₂O_{dd} aufgefüllt. Der pH-Wert der CTAB-Extraktionslösung wurde mit verdünnter Salzsäure auf einen Wert von pH 8 eingestellt. Zur vollständigen Lösung des EDTA wurden die Lösungen für mehrere Stunden am Magnetrührer gerührt.

Proteinase K:

100 mg Proteinase K wurden mit 20 mg SDS und mit 4 ml 50% Glycerin/10 mM Tris-HCl, (pH 8) gemischt und am Magnetrührer gerührt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

RNAse A:

Die erhaltene Lösung (29 mg/ml) wurde mit 50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl, (pH 8) verdünnt, um eine Konzentration von 20 µg/ml zu erhalten. Die Lösung wurde aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

3.4.1.3 Durchführung der CTAB-Extraktionsmethode

Ungefähr 100 mg der zerkleinerten, homogenisierten Probe wurden mit einem Spatel in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit 500 µl CTAB-Extraktionslösung versetzt und am Vortex gründlich gemischt. Anschließend wurde das Gemisch bei 65 °C im Trockenschrank für 30 min inkubiert, wobei nach jeweils 10 min gevortext wurde. Nach der Inkubationszeit wurden 15 µl Proteinase K Lösung in das Eppendorfgefäß pipettiert, gevortext und abermals inkubiert (60 min bei 65 °C). Im Anschluss wurden 20 µl RNase Lösung zugegeben, und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert, und danach 5 min in der Tischzentrifuge bei 10000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und 1 min lang gevortext. Um die wässrige Phase abtrennen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen zu können, wurde abermals 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert.

Zu der wässrigen Phase wurden 2 Volumsteile CTAB-Präzipitationslösung pipettiert und die Lösung bei Raumtemperatur 60 min inkubiert, anschließend wurde für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat in 350 µl 1,2 M NaCl gelöst und mit 350 µl Chloroform versetzt (1 min vortexen). Bevor die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde, wurde 5 min zur Phasentrennung bei 10000 rpm zentrifugiert.

Die erhaltene wässrige Phase wurde mit 0,6 Volumsteilen Isopropanol versetzt und abermals für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in 500 µl eisgekühltem 70%igen Ethanol gelöst und kräftig gemischt.

Um die DNA zu erhalten, wurde ein letztes Mal für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Eppendorfgefäß mit dem DNA-Extrakt über Nacht zum Trocknen im Abzug stehen gelassen.

Nachdem die Flüssigkeit in dem Eppendorfgefäß verdunstet war, wurde der erhaltene DNA-Extrakt in 50 µl bzw. 100 µl H₂O_{dd} (je nachdem welche Konzentration erwartet wurde) gelöst.

Die Konzentration und die Reinheit des DNA-Extraktes wurden photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.4.3).

3.4.2 DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Stool Kit

Für diesen Kit gibt es je nach aufzuarbeitender Probe verschiedene Extraktionsprotokolle. Allen Protokollen ist gemein, dass mit so genannten Spin Columns gearbeitet wird. Bei diesen Methoden bindet die DNA an eine Silica-Gel-Membran, während andere Kontaminanten die Membran passieren. PCR-Inhibitoren werden durch die Kombination von InhibitEX, welches in Tablettenform beigelegt wird, und einem speziellen Puffer entfernt. Der große Vorteil dieser Extraktionsmethode liegt in der Zeitersparnis gegenüber der CTAB-Methode und der effektiven Entfernung von PCR-Inhibitoren, welche bei der CTAB-Methode nicht entfernt werden.

3.4.2.1 Durchführung der Extraktion mit dem QIAamp DNA Stool Kit

Ungefähr 200 mg der homogenisierten Probe wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1,6 ml des mitgelieferten ASL-Puffer überschichtet und für 1 min gevortext, bis die Flüssigkeit eine homogen aussehende Konsistenz erreicht hatte. Um am Boden des Eppendorfgefäßes ein Pellet zu erhalten, wurde das Röhrchen für 1 min zentrifugiert. 1,4 ml des erhaltenen Überstandes wurden in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Um PCR-Inhibitoren zu entfernen, wurde eine Tablette InhibitEX zu der Probe gegeben und sofort für 1 min gevortext, bis sich die Tablette vollständig gelöst hatte. Die erhaltene Suspension wurde für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit enthaltene Inhibitoren an die InhibitEX-Matrix binden konnten. Um gebundene Inhibitoren zu entfernen, wurde für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Danach wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt durchgeführt. 600 µl des Überstandes wurden zusammen mit 25 µl Proteinase K-Lösung und 600 µl AL-Puffer gründlich gevortext und für 10 min bei 70 °C inkubiert. In dieses Röhrchen wurden

nach der Inkubation 600 µl Ethanol zugegeben und gevortext. Der gesamte Inhalt des Röhrchens (ca. 1200 µl) wurde in zwei Schritten (à 600 µl) über eine QIAamp Spin Column gefiltert. Die Spin Columns wurden in Eppendorfgefäße platziert. Enthaltene DNA wurde nun an die Silica-Membran der Spin Columns gebunden. Das Filtrat konnte verworfen werden und die Spin Column wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Nach der Zugabe von 500 µl AW1-Puffer wurde zentrifugiert und das erhaltene Filtrat verworfen. Danach wurden 500 µl AW2-Puffer zugegeben und für 3 min zentrifugiert. Um letzte Spuren des AW2-Puffers zu entfernen, wurde die Spin Column in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und abermals zentrifugiert. Um die DNA nach den Waschschritten zu eluieren, wurde die Spin Column in ein neues Röhrchen platziert und mit 200 µl AE-Puffer versetzt. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die gebundene DNA eluiert werden.

3.4.3 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA-Extrakten

Ein Aliquot des DNA-Extrakts wurde zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration verwendet. Dazu wurde das Aliquot im Verhältnis 1:5 verdünnt und die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) gemessen. Zur Messung wurden Mikroküvetten verwendet, das benötigte Gesamtvolumen in der Küvette betrug 80 µl.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbierte die DNA, bei einer Wellenlänge von 280 nm Proteine.

Die Reinheit der DNA-Extrakte wurde durch das Verhältnis von A_{260}/A_{280} berechnet. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

Die Konzentration der DNA wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} * V * F$$

c...Konzentration

A_{260} ...Extinktion bei 260 nm

V...Verdünnungsfaktor (5)

F... Faktor, für doppelsträngige DNA $F = 50$

3.5 Gelelektrophorese

3.5.1 Benötigte Reagenzien

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)

Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml, Biorad

Certified PCR Agarose

20 bp Molecular Ruler, Biorad

Loading Buffer, Biorad

3.5.2 Herstellung der benötigten Reagenzien

50x TAE-Puffer:

242 g/l Tris-Base

57,1 ml Essigsäure_{konz.}

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8

Die Reagenzien wurden in einem 1000 ml Messkolben zusammengefügt, in H_2O_{dd} gelöst und bis zur Markierung mit H_2O_{dd} aufgefüllt. Damit sich EDTA vollständig löste, wurde die Lösung mittels eines Magnetrührers über Nacht gerührt.

Die erhaltene Lösung war 50-fach konzentriert und wurde direkt vor der Verwendung mit H_2O_{dd} 1:50 verdünnt.

3.5.3 Herstellung des Gels

4,5 g der Agarose wurden in 150 ml TAE-Puffer gelöst und im Mikrowellenofen erhitzt, bis die Lösung klar blieb. Bevor die Lösung zur Aushärtung in die Apparatur gegossen wurde, wurden 2,25 μ l (1,5 μ l pro 100 ml) Ethidiumbromid-

Lösung zugegeben und vermischt. Um Probenaufgabetaschen zu erhalten, wurden Kämme als Platzhalter eingesetzt. Eventuelle Luftbläschen wurden vorher mit den Kämmen entfernt.

3.5.4 Vorbereitung der DNA-Proben

Für die Gelelektrophorese mussten die Amplifikate im Verhältnis 1:1 mit dem Loading buffer versetzt werden.

3.5.5 Durchführung der Gelelektrophorese

Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in die Elektrophoresewanne gegeben, und die Wanne mit 1x TAE-Puffer gefüllt, sodass das Gel völlig mit der Flüssigkeit bedeckt war.

Anschließend wurden die Taschen des Gels mit den Proben bzw. mit den DNA-Markern gefüllt. Von dem Marker wurden je 5 µl pro Tasche verwendet, von den DNA-Proben wurden je 10 µl (inkl. Loading buffer) in die Taschen pipetiert. Die Laufzeit betrug 30 min, die Spannung 150 Volt.

3.5.6 Auswertung des Elektrophoresegels

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel auf den UV-Transilluminator gelegt und für spätere Auswertungen fotografiert.

Über die Laufweite der Banden wurde auf die Größe der amplifizierten DNA-Produkte geschlossen. Kurze DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld weiter als längere DNA-Fragmente. Der Marker dient dabei als Referenz für die Auswertung der Proben. Der Unterschied zwischen zwei aufeinander folgenden DNA-Fragmenten des Markers betrug 20 bp. Um die Auswertung zu erleichtern, enthielt der Marker bei einer Bandenlänge von 200 bp die doppelte Konzentration an DNA-Fragmenten und zeigte dort somit stärkere Fluoreszenz. Der Marker enthielt DNA-Fragmente mit Längen von 20-1000 bp.

3.6 Real time PCR

Die PCR-Ansätze wurden in 96 Well-Platten angesetzt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 25 µl. Die Platten wurden mit einer optischen Siegelfolie verschlossen. Durchgeführt wurden die PCR-Läufe in dem iCycler Thermocycler der Firma Biorad. Die Fluoreszenzstärke der Farbstoffe wurde mit der iQ 5 real time PCR Detektionseinheit gemessen.

Die Analysen wurden jeweils im Doppelansatz durchgeführt. Die verwendeten DNA-Extrakte wurden in einer Konzentration von 20 ng/µl eingesetzt.

3.6.1 Pipettierschema für PCR-Platten

Dieses Pipettierschema wurde für sämtliche PCR-Läufe verwendet. Sollten Veränderungen der Primer- bzw. Taqman-Konzentrationen nötig gewesen sein, wurde dies über das im Primermastermix enthaltene Wasser ausgeglichen. Der Primermastermix wurde direkt vor dem Ansetzen der PCR-Platten hergestellt.

iQ Supermix	12,5 µl
Primermastermix	7,5 µl
Probe	5,0 µl
Σ	25,0 µl

3.6.2 Primer und Sonden

Mit Hilfe des Programms Beacon Designer 5.1 wurden für Lupine und Erdnuss die Sonden und Primer entworfen. Um Ähnlichkeiten mit Abschnitten von anderen Genen zu vermeiden und somit Kreuzreaktivitäten mit anderen Lebensmitteln zu verhindern, wurde ein sogenannter BLAST durchgeführt. Dabei wurde die ausgewählte Sequenz des Gens mit Sequenzen von anderen Organismen abgeglichen. Nach dem Abgleich erhielt man eine Übersicht über ähnliche Sequenzen mit einer graphischen Darstellung von möglichen korrespondierenden

Basen des geblasteten DNA-Abschnitts und Sequenzen aus der Datenbank. Die für den BLAST verwendete Datenbank ist auf www.pubmed.com zu finden.

Für Primermastermixe verwendete Primer wurden vor ihrer Verwendung auf je 10 µM verdünnt, verwendete Taqman-Sonden wurden auf 1 µM verdünnt, für die weitere Verwendung aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.2.1 Kriterien für das Entwerfen der Primer

Bei dem Entwerfen von Primern müssen einige Kriterien berücksichtigt werden, welche in der folgenden Aufzählung angeführt sind.

- ✓ 18-30 Basen Länge
- ✓ 40-60 % GC-Gehalt
- ✓ Möglichst nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander
- ✓ Keine 3'-Komplementarität (Gefahr der Primer-Dimer-Bildung)
- ✓ T_m sollte zwischen 55-80 °C liegen
- ✓ 75-150 bp Amplikon-Länge optimal

3.6.2.2 Kriterien für das Entwerfen der Taqman-Sonden

So wie bei dem Entwerfen von Primern müssen auch bei dem Entwerfen von Taqman-Sonden besondere Kriterien eingehalten werden:

- ✓ 5'-Ende der Sonde in relativer Nähe des 3'-Endes des Primers
- ✓ 20-30 Basen lang
- ✓ 40-60% GC-Gehalt
- ✓ T_m 5-10 °C höher als T_m der Primer
- ✓ Quencher am 3'-Ende der Sonde
- ✓ Kein G am 5'-Ende der Sonde
- ✓ Nicht mehr als drei gleiche Basen in Folge, besonders keine G's
- ✓ Strang mit mehr C's als G's in der Sondensequenz auswählen
- ✓ Keine Komplementarität zu den Primern
- ✓ Keine Bildung von Sekundärstrukturen
- ✓ Nicht mehr als 3 C's oder G's bei den letzten 5 Basen am 3'-Ende

3.6.2.3 Verwendete DNA-Sequenzen für Lupine

In Tabelle 3-3 sind die verwendeten DNA-Sequenzen für die Primer und die Taqman-Sonden inklusive Accessionnummer für die Lupine angegeben.

Tabelle 3-3: Sequenzen der Primer und des Taqman für Lupine

Accession-number	Bezeichnung	DNA-Sequenz 5' → 3'
U15930	F-Primer	TCCCAACCATTACTTCAAATCTCG
	R-Primer	TGAAGACATTGGTGAGGAGAGAG
	Taqman	TCTTCTCCGCACTCCCAAACGC

3.6.2.4 Verwendete DNA-Sequenzen für Erdnuss

In Tabelle 3-4 sind die Bezeichnung und Accessionnummer der Allergene und die verwendeten DNA-Sequenzen für die Erdnuss angegeben.

Tabelle 3-4: Sequenzen der Primer und des Taqman für Erdnuss

Allergen Accession-number	Bezeichnung	DNA-Sequenz 5' → 3'
Ara h 1 L38853	F-Primer	CGCTGATGCTGATAACATCCTTG
	R-Primer	TGGCCCTCGTCAAGATTAAAGC
	Taqman	AGGACAAGCCACCGTGACCGTAGC
Ara h 2 AY158467	F-Primer	ACAGGAGCAACAGTTCAAGAGG
	R-Primer	CTGTCTCTGCCGCCACTTTC
	Taqman	TCCAAGTCGCAACGCTGTGGTGCC
Ara h 7 AF091737	F-Primer	AGCAGAGGGGATGACCAAGTG
	R-Primer	GGGTACTCGTCTTGCTCTTGCT
	Taqman	TTGCTCCTGCTCCACCCTTCGCCT

Fortsetzung Tabelle 3-4: Sequenzen der Primer und des Taqman für Erdnuss

Oleosin AF325918	F-Primer	TGATTAACCTTCATCCGACAGGTAC
	R-Primer	ACGTAATCCGCCATGTCTGC
	Taqman	CGCCGCTTCGCCGAGTCCAGC

3.6.3 Verwendete PCR-Assays

Es wurden je nach Aufgabenstellung zwei verschiedene PCR-Assays verwendet. Zur Ermittlung der Spezifität der Primer wurde ein SYBR Green Assay verwendet, alle anderen Analysen wurden mit dem Taqman Assay durchgeführt.

3.6.3.1 SYBR Green Assay

Das Volumen pro Well betrug 25 µl. In ein Well wurden Primer (Forward und Reverse), 12,5 µl Supermix IQ SYBR Green, 5 µl Probe (c = 20 ng/µl) und Wasser für molekularbiologische Anwendungen pipettiert.

Spezifikation des IQ SYBR Green Supermixes:

- 100 mM KCl
- 40 mM Tris-HCl, pH 8,4
- je 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 50 U/ml iTaq DNA Polymerase
- 6 mM MgCl₂
- SYBR Green I
- 20 nM Fluorescein
- Stabilisatoren

Der IQ SYBR Green Supermix wurde vor Verwendung aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.6.3.2 Taqman Assay mit iQ Supermix

Das gesamte Volumen pro Well betrug 25 µl und der Ansatz enthielt Primer (Forward/Reverse), Taqman-Sonde, 5 µl Probe ($c = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$) sowie Wasser für molekularbiologische Anwendungen.

Spezifikation des IQ Supermixes:

- 100 mM KCl
- 40 mM Tris-HCl, pH 8,4
- je 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 50 U/ml i Taq DNA Polymerase
- 6 mM MgCl_2
- Stabilisatoren

Der IQ Supermix wurde vor Verwendung aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.6.4 Optimierung der Primerkonzentrationen und der Annealingtemperaturen

Um möglichst niedrige c_t -Werte zu erhalten, wurde ein Optimierungsschritt für die Konzentrationen der Primer (Forward/Reverse) durchgeführt.

Die optimale Konzentration der Primer sowie die optimale Annealingtemperatur wurde mittels 9 verschiedener Primermastermixe bei 6 verschiedenen Annealingtemperaturen ermittelt. Die Annealingtemperaturen sind im unten angegebenen Temperaturprogramm zu finden.

Tabelle 3-5 gibt einen Überblick über die verschiedenen getesteten Primermastermixe.

Tabelle 3-5: Pipettierschema für die Optimierung der Primerkonzentrationen

Primerkonzentration Forward/Reverse (nM)	Ansatz/Well
100/100	0,25 µl Forward + 0,25 µl Reverse + 7,00 µl Wasser
100/200	0,25 µl Forward + 0,50 µl Reverse + 6,75 µl Wasser
100/300	0,25 µl Forward + 0,75 µl Reverse + 6,50 µl Wasser
200/100	0,50 µl Forward + 0,25 µl Reverse + 6,75 µl Wasser
200/200	0,50 µl Forward + 0,50 µl Reverse + 6,50 µl Wasser
200/300	0,50 µl Forward + 0,75 µl Reverse + 6,25 µl Wasser
300/100	0,75 µl Forward + 0,25 µl Reverse + 6,50 µl Wasser
300/200	0,75 µl Forward + 0,50 µl Reverse + 6,25 µl Wasser
300/300	0,75 µl Forward + 0,75 µl Reverse + 6,00 µl Wasser

Die Wells wurden wie in Kap. 3.6.1 beschrieben befüllt und die Platte in den Thermocycler gegeben.

Temperaturprogramm:

1. 3 min 95 °C
2. 10 sec 95 °C
40 sec x °C
10 sec 72 °C
3. 10 sec x' °C

x ... Temperaturgradient (62,5; 60,8; 58,9; 56,4; 54,6; 53,3 °C)

x' ... Schmelzkurve; Temperatur von 51-91 °C in 0,5 °C Schritten

Der 2. Schritt wurde 45x wiederholt.

Der 3. Schritt diente zur Ermittlung der Schmelzkurve und wurde 81x durchgeführt.

3.6.5 Test auf Kreuzreaktivität der entworfenen Primerpaare

Um die Spezifität der entworfenen Primerpaare zu ermitteln, wurden verschiedene Lebensmittel, vor allem mit Lupine und Erdnuss verwandte Produkte, auf Kreuzreaktivität getestet. Dazu wurde die DNA wie in Kap 3.4.1.3 beschrieben aus den Lebensmitteln extrahiert und mittels eines SYBR Green Assays analysiert. Die Amplifikate wurden anschließend mittels Schmelzkurvenanalyse und/oder Gelelektrophorese untersucht.

Kreuzreaktivität lag dann vor, wenn die Primer einen DNA-Abschnitt eines Lebensmittels amplifizierten, welcher in der Schmelzkurvenanalyse gleiche Schmelztemperatur aufwies, bzw. in der Gelelektrophorese das gleiche Wanderungsverhalten aufwies wie das in der Lupine bzw. Erdnuss gebildete Amplifikat. In Tabelle 3-1 bzw. Tabelle 3-2 sind die auf Kreuzreaktivität getesteten Lebensmittel/-zutaten für Lupine bzw. für Erdnuss angeführt.

3.6.6 Optimierung der Erdnuss-Sondenkonzentration

Getestet wurde bei vier verschiedenen Konzentrationen (50 nM, 75 nM, 100 nM und 200 nM) und sechs verschiedenen Annealingtemperaturen (zwischen 53,3-62,5 °C). Für diesen Optimierungsschritt wurden die in Kapitel 4.3.4 angegebenen optimalen Primerkonzentrationen verwendet. Das Pipettierschema ist in Kapitel 3.6.1 angegeben.

Temperaturprogramm:

1. 3 min 95 °C
2. 10 sec 95 °C
40 sec x °C
10 sec 72 °C

x ... Temperaturgradient (62,5; 60,8; 58,9; 56,4; 54,6; 53,3 °C)

Der 2. Schritt wurde 45x wiederholt.

3.6.7 Optimierung der Lupine-Sondenkonzentration

Die Optimierung der Lupine-Sondekonzentration wurde ebenfalls mit vier verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die optimalen Primerkonzentrationen wurden bereits von Albert Nemes im Rahmen seiner Diplomarbeit bestimmt und übernommen.

Taqman-Konzentrationen: 50 nM; 100 nM; 200 nM; 400 nM

Das Pipettierschema ist in Kapitel 3.6.1 angegeben. Für diesen Optimierungsschritt wurde das in Kapitel 3.6.6 angegebene Temperaturprogramm verwendet.

3.6.8 Optimierung des Duplex-Assays

Zur Optimierung des Duplex-Assays wurden zwei Mischungen hergestellt, welche Lupine- und Erdnuss-DNA enthielten, wobei jeweils eine der beiden Komponenten im Überschuss vorlag.

Mischung 1: Erdnuss-DNA 99%, Lupine-DNA 1%

Mischung 2: Erdnuss-DNA 1%, Lupine-DNA 99%

Es wurden jeweils 100 µl von Mischung 1 und Mischung 2 hergestellt und bis zur Verwendung im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

Getestet wurde zuerst bei einer Annealingtemperatur von 58 °C.

Um zufriedenstellende Ergebnisse im Duplex-Assay zu erhalten, mussten die Primer- bzw. Taqmankonzentrationen im Primermastermix der Singleplex-Ansätze geringfügig verändert werden.

Die Lupineprimer wurden in einem Konzentrationsbereich von 100 nM bis 300 nM variiert, die Erdnussprimer wurden in Konzentrationen von 200 nM bzw. 300 nM eingesetzt, und die Konzentration der Sonden für Lupine bzw. für Erdnuss wurde jeweils in einem Bereich von 50 nM bis 100 nM variiert. Die Annealingtemperatur wurde nicht verändert und bei 58 °C belassen. Aufgrund des

Duplex-Assays benötigt das Programm etwas mehr Zeit, um die Fluoreszenz zu messen, deshalb wurde das Programm geringfügig im 3. Teil des 2. Schrittes geändert.

Temperaturprogramm:

1. 1. 95 °C 3 min
2. 1. 95 °C 10 sec
2. 58 °C 40 sec
3. 72 °C 13 sec

Der 2. Zyklus wurde 40x durchgeführt.

3.6.9 Ermittlung der Nachweisgrenze mit seriell verdünnter DNA

DNA-Extrakte von Lupine bzw. Erdnuss ($c=20 \text{ ng}/\mu\text{l}$) wurden seriell in 1:10er Schritten bis zu einer Endverdünnung von 1:100000 verdünnt. Die Konzentrationen sind in Tabelle 3-6 zu finden.

Tabelle 3-6: Eingesetzte Verdünnungen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen

Verdünnung	Konzentration (ng/μl)	DNA-Menge / Well (ng)
1	20	100
1:10	2	10
1:100	0,2	1
1:1000	0,02	0,1
1:10000	0,002	0,01
1:100000	0,0002	0,001

Mittels folgender Formel wurde aus der Steigung der Standardgerade die Effizienz des Laufs berechnet:

$$\text{Effizienz} = (10^{\frac{1}{\text{Steigung}}} - 1) * 100$$

3.6.10 Ermittlung der Nachweisgrenzen in gespikten Lebensmitteln

Zur Validierung des Singleplex-Assays für Lupine bzw. des Duplex-Assays wurden zwei verschiedene Lebensmittelmatrizes mit Lupine und Erdnuss gespikt. Bei den verwendeten Lebensmittelmatrizes handelte es sich um kommerziell erhältlichen Zwieback und um Clever Fruchtemüsli, die sich in vorangegangenen Analysen als frei von Lupine und Erdnuss herausgestellt hatten. Gespikt wurde mit je 1% Lupine und Erdnuss (98 g Lebensmittelmatrix + 1 g Lupinesaat + 1 g Erdnuss). Von dem 1%igen Spikelevel ausgehend wurden weitere Spikelevel hergestellt. Homogenisiert wurde mit einem herkömmlichen Küchenmixer für je 20 Minuten pro Spikelevel. In Tabelle 3-7 ist die genaue Herstellung der gespikten Proben angeführt.

Tabelle 3-7: Zusammensetzung der gespikten Lebensmittel

Spike-level	Spike-konzentration	Herstellung
1	1%	98 g Lebensmittelmatrix, 1 g Lupinesaat, 1 g Erdnuss
2	0,5%	50 g Lebensmittelmatrix, 50 g Spikelevel 1
3	0,1%	90 g Lebensmittelmatrix, 10 g Spikelevel 1
4	0,05%	50 g Lebensmittelmatrix, 50 g Spikelevel 3
5	0,01%	90 g Lebensmittelmatrix, 10 g Spikelevel 3
6	0,005%	50 g Lebensmittelmatrix, 50 g Spikelevel 5
7	0,001%	90 g Lebensmittelmatrix, 10 g Spikelevel 5

Aus diesen sieben gespikten Lebensmitteln wurde die DNA mittels der CTAB-Methode (siehe Kap 3.4.1.3) extrahiert und die Extrakte bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Die Formel zur Berechnung der Effizienz befindet sich in Kapitel 3.6.9.

3.6.11 Nachweis von Lupine in kommerziellen Lebensmitteln mittels des Singleplex-Assays

Getestet wurden 10 verschiedene kommerziell erhältliche Lebensmittel, von denen eines laut Deklaration Lupine enthalten konnte, bei den anderen 9 Lebensmitteln war laut Deklaration auf der Verpackung keine Lupine enthalten.

Temperaturprogramm:

- | | | |
|----|----------|--------|
| 1. | 1. 95 °C | 3 min |
| 2. | 1. 95 °C | 10 sec |
| | 2. 61 °C | 40 sec |
| | 3. 72 °C | 10 sec |

Der 2. Zyklus wurde 40x durchgeführt.

3.6.12 Nachweis von Lupine und Erdnuss in kommerziellen Lebensmitteln mittels des Duplex-Assays

Analysiert wurden 24 verschiedene kommerziell erhältliche Lebensmittel. Die Lebensmittel wurden so gewählt, dass Produkte mit Lupine/Erdnuss, bzw. Spuren/Verdacht auf Lupine/Erdnuss und Produkte ohne Lupine/Erdnuss vertreten waren. Für die Analysen wurde das in Kapitel 3.6.1 angegebene Pipettierschema verwendet.

3.6.13 Ermittlung der Detektierbarkeit von gelber und blauer Lupine

In der Nahrungsmittelindustrie findet vorrangig die weiße Lupine (*L. albus*) Verwendung. Da aber neben der weißen Lupine auch noch gelbe (*L. luteus*) und blaue Lupine (*L. angustifolius*) erhältlich sind, wurden auch gelbe und blaue Lupinen mittels des entwickelten Singleplex-Assays hinsichtlich ihrer Detektierbarkeit getestet. Dazu wurden Samen von gelber und blauer Lupine mit der CTAB-Extraktionsmethode (siehe Kap 3.4.1.3) aufgearbeitet und bis zur Untersuchung mit dem Taqman Assay bei -20 °C eingefroren.

4 Ergebnisse

4.1 Probenaufarbeitung

Wie bereits in Kapitel 3.4 beschrieben, wurden zwei unterschiedliche Methoden zur DNA-Extraktion verwendet. Bei der CTAB-Extraktionsmethode handelte es sich um die Standardmethode, wobei fast alle Proben mit dieser Methode erfolgreich aufgearbeitet werden konnten. Lediglich Tiefkühlerbsen lieferten mit der CTAB-Methode ein schlechtes Ergebnis bezüglich der Reinheit und eine niedrige Ausbeute. Als Alternativmethode wurde der kommerziell erhältliche QIAamp DNA Stool Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Berechnung der Reinheit und der Konzentration erfolgte mit der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Methode.

In Tabelle 4.1 sind die Reinheiten und Konzentrationen der extrahierten DNA-Extrakte, die für Kreuzreaktivitätstests verwendet wurden, zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Reinheit und Konzentration der für Kreuzreaktivitätstests verwendeten DNA-Extrakte

Lebensmittel	Einwaage [mg]	Reinheit A_{260}/A_{280}	DNA-Konz. ($\mu\text{g/ml}$)	$\mu\text{g DNA/}$ 100 mg Probe
weiße Lupine	107	1,89	442,50	413,6
Pistazie	102	1,63	98,75	96,8
Leinsaat	92	1,16	39,00	42,4
Mais (Mehl)	98	1,25	28,75	29,3
Vollkornweizenmehl	110	1,88	31,00	28,2
Vollkorndinkelmehl	97	1,53	76,50	78,9
Erdnuss	106	1,92	504,50	475,9
Haferflocken	94	1,97	37,50	39,9
Tiefkühlerbsen	200	1,19	23,25	11,6
Paranuss	90	1,67	28,77	32,0
Walnuss	113	1,80	77,52	68,6
Macadamia	83	1,88	77,50	93,4
Pekanuss	98	1,72	24,69	25,2
Mandel	102	1,43	21,20	20,8
Kichererbsen	100	2,04	89,80	89,8
Linsen	106	2,03	94,50	89,2
weiße Bohnen	111	1,89	59,00	53,2
Sesam	101	1,86	99,23	98,2
schwarzer Sesam	96	1,83	124,35	129,5
Sonnenblumenkerne	89	1,66	447,00	502,2
Kürbiskerne	109	1,44	33,47	30,7
Reis	86	1,98	215,12	250,1
Gerste	115	1,76	108,50	94,3
Roggen	104	1,69	98,66	94,9
Haselnuss	107	1,42	23,87	22,3
Pinienkerne	96	1,78	31,05	32,3

Die erhaltene Menge an DNA/100 mg Probe war sehr unterschiedlich. Eine besonders hohe DNA-Ausbeute konnte aus weißer Lupine, Erdnuss und Sonnenblumenkernen erzielt werden. Probleme bei der Extraktion haben vor allem Nüsse bereitet, auch war bei Nüssen die Ausbeute an DNA/100 mg Probe gering und belief sich auf 20-68 µg/100 mg eingewogener Probe. Lediglich Pistazie und Macadamia Nüsse lieferten Werte über 90 µg/100 mg Probe. Grundsätzlich konnte aus allen Lebensmitteln DNA in ausreichenden Mengen und von ausreichender Qualität extrahiert werden, um Kreuzreaktivitätstests durchzuführen. Eine Ausnahme fand sich hierbei nur in den Tiefkühlerbsen, welche mit dem kommerziell erhältlichen Kit von Qiagen aufgearbeitet wurden, um DNA in ausreichenden Mengen zu erhalten. Mit dieser Methode wurde ein Extrakt mit 23,25 µg DNA/ml und eine ausreichend gute Qualität der DNA erreicht, wohingegen mit der CTAB-Methode nur DNA-Konzentrationen zwischen 14 und 16 µg/ml erzielt werden konnten.

4.1.1 Ergebnisse der Probenaufarbeitung für blaue und gelbe Lupine

In Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse der DNA-Extraktion für die blaue und die gelbe Lupine zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Reinheit und Konzentration der DNA-Extrakte aus gelber und blauer Lupine

Lebensmittel	Einwaage [mg]	Reinheit (A_{260}/A_{280})	DNA-Konz. (µg/ml)	µg DNA/ 100 mg Probe
gelbe Lupine	105	1,83	162,50	154,8
blaue Lupine	113	1,58	95,02	84,1

4.1.2 Ergebnisse der DNA-Extraktion aus kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

In Tabelle 4-3 sind die Resultate der DNA-Extraktion aus kommerziell erhältlichen Lebensmitteln angeführt.

Tabelle 4-3: Reinheit und Konzentration der DNA-Extrakte aus kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Lebensmittel	Einwaage [mg]	Reinheit A_{260}/A_{280}	DNA-Konz. ($\mu\text{g/ml}$)	$\mu\text{g DNA/}$ 100 mg Probe
Veg. Lupine-Reis-Laibchen	82	1,87	72,00	87,8
Veg. Lupine-Bratwurst	124	1,05	70,21	56,6
Biovitalgebäck	106	1,78	22,25	21,0
Ströck Adamsbrot	78	1,98	64,21	82,3
Lupineaufstrich Paprika	114	1,72	32,25	28,3
Lupineaufstrich Tomate	76	2,00	27,11	35,7
Haferkekse	88	1,77	130,26	148,0
Knabbergebäck „Party Club“	77	1,31	32,50	42,2
Bierstangen „Grisotti Sesamo“	99	1,36	77,91	78,7
Erdnusskrokant	103	1,23	305,49	296,6
Schneekoppe Müsli	105	1,64	198,20	188,8
Wasa Knäckebrötchen	108	1,99	58,26	54,0
Alnatura Müsliriegel	101	2,09	44,69	44,3
Zwieback	104	1,63	78,56	75,5
Clever Müsli	97	1,82	62,45	64,4

Fortsetzung von Tabelle 4-3: Reinheit und Konzentration der DNA-Extrakte aus kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Marzipanschokolade	100	1,49	82,51	82,5
Peanut Snips	93	1,70	45,06	48,5
Erdnussbutter	121	1,69	97,34	80,5
Sesam Krokant	116	1,77	132,98	114,6
Müsliriegel Apfel Nuss	98	1,83	156,70	159,9
Müsliriegel Ernie und Bert	76	2,09	32,97	43,4
Reiswaffeln	103	2,01	28,60	27,8
Knabbergeback „Kross Brödl“	94	1,23	76,0	80,9
Spar Eierwaffeln	80	2,07	23,25	29,1

Alle Lebensmittel wurden mit der CTAB-Methode (siehe Kapitel 3.4.1) aufgearbeitet. Es wurde bei allen Lebensmittelproben DNA in ausreichenden Mengen und von ausreichend hoher Reinheit erhalten. Die höchsten Ausbeuten an DNA/100 mg Probe wurden für Erdnusskrokant und das Schneekoppe Müsli erhalten. Besonders hohe Reinheiten ($2,2 > A_{260}/A_{280} > 1,8$) wurden für die veg. Lupine-Reis-Laibchen, das Adamsbrot, den Lupineaufstrich (Tomate), das Knäckebrot, den Alnatura Müsliriegel, den Erni und Bert Müsliriegel, Reiswaffeln und für die Spar Eierwaffeln erzielt.

4.2 Entwicklung eines Singleplex real time PCR-Assays zur Detektion von Lupine in Lebensmitteln

4.2.1 Primer und Sonden

Zur Entwicklung des Singleplex-Assays wurde ein Primerpaar, welches von Herrn Albert Nemes im Rahmen seiner Diplomarbeit entworfen worden war, verwendet. Die Sequenz des Gens, für das die Primer entworfen wurden, trägt die Accession-Number U15930 und codiert für das Protein „RAB16 like Dehydrin“.

Tabelle 4-4: DNA-Sequenzen für die Lupinenprimer und die Lupinensonde

Primer / Sonde	Sequenz 5' → 3'	Schmelz- temperatur	GC- Gehalt
F-Primer	TCCCAACCATTACTTCAAATCTCG	66,7 °C	42%
R-Primer	TGAAGACATTGGTGAGGAGAGAG	64,5 °C	48%
Sonde	TCTTCTCCGCACTCCCAAAACGCC	69,0 °C	58%

Die Länge des gebildeten Amplikons betrug 95 bp.

Die Taqman-Sonde war am 5'-Ende mit dem Fluorophor FAM markiert und zur Signalunterdrückung am 3'-Ende mit dem BHQ1-Quencher versehen.

Die Kriterien für das Entwerfen von Primern und Sonden sind in Kapitel 3.6.2.1 und Kapitel 3.6.2.2 festgehalten.

4.2.2 Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur

Die optimale Konzentration der Primer wurde bereits während der Diplomarbeit von Albert Nemes ermittelt.

Durchgeführt wurde dieser Optimierungsschritt mit einem SYBR Green Assay (siehe Kapitel 3.6.3.1). Um zu kontrollieren, ob das gewünschte Produkt amplifiziert wurde, wurde im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Es wurden 9 verschiedene Primerkonzentrationen und Annealingtemperaturen von 53,3 bis 62,5 °C getestet (siehe Kapitel 3.6.4).

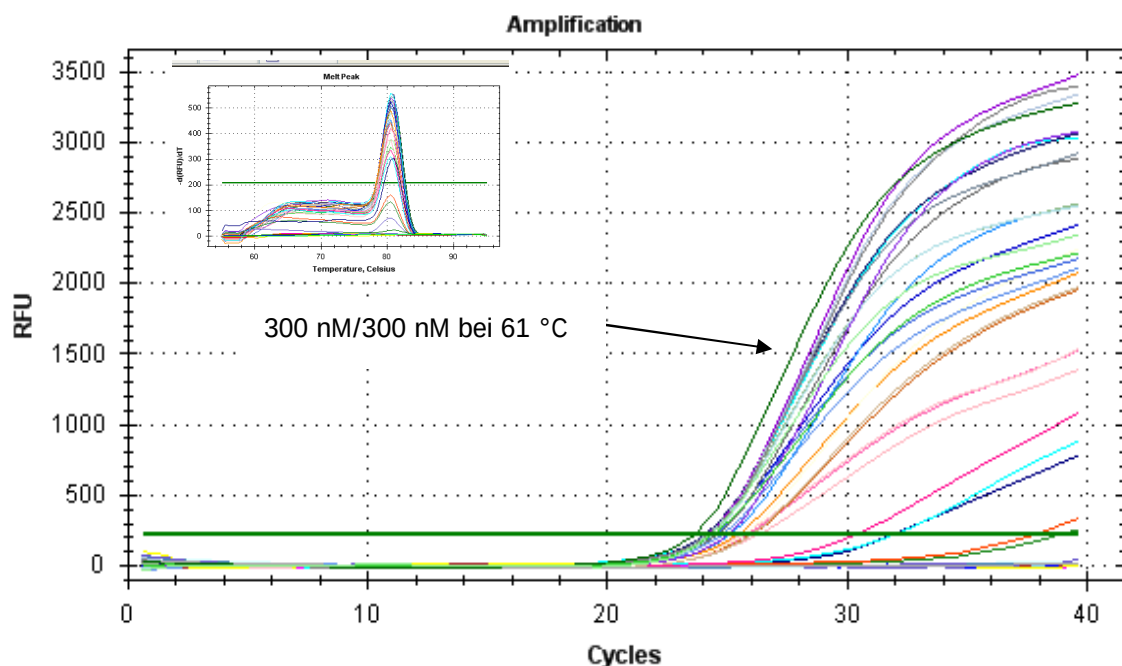


Abbildung 4-1: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration der Lupineprimer und der Annealingtemperatur

Als optimal wurden die Bedingungen festgelegt, bei denen der c_t -Wert am niedrigsten war. Es stellten sich Konzentrationen von 300 nM des F-Primers und 300 nM des R-Primers und eine Annealingtemperatur von 61 °C als optimal für den Singleplex-Assay heraus.

4.2.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität der Lupineprimer

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde ebenfalls bereits von Albert Nemes durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise ist im Kapitel 3.6.5 beschrieben. Getestet wurden 25 verschiedene Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, vor allem Hülsenfrüchte. Abbildung 4-2 zeigt die im SYBR Green Assay erhaltenen PCR-Kurven und die 1. Ableitung der Schmelzkurven.

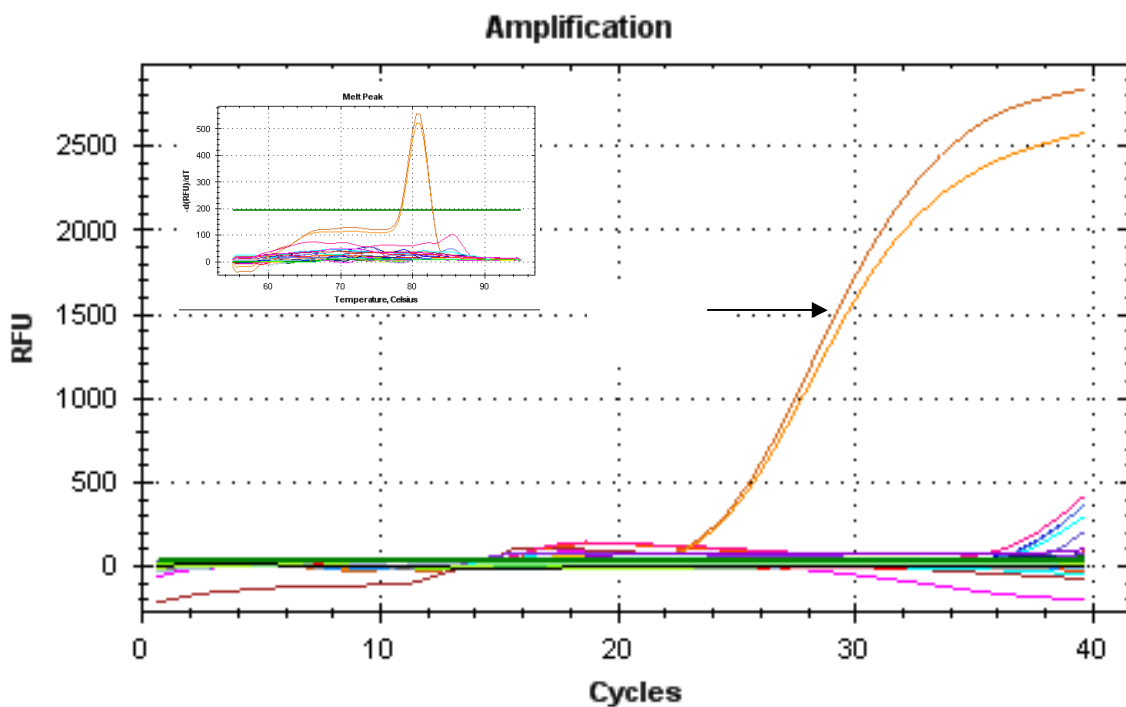


Abbildung 4-3 zeigt das Gel der mit den Lupineprimern erhaltenen Amplifikate. Sowohl die Schmelzkurvenanalyse als auch die Agarosegelelektrophorese ergaben, dass die Primer spezifisch für Lupine waren und mit keiner der getesteten Lebensmittelzutaten reagierten.

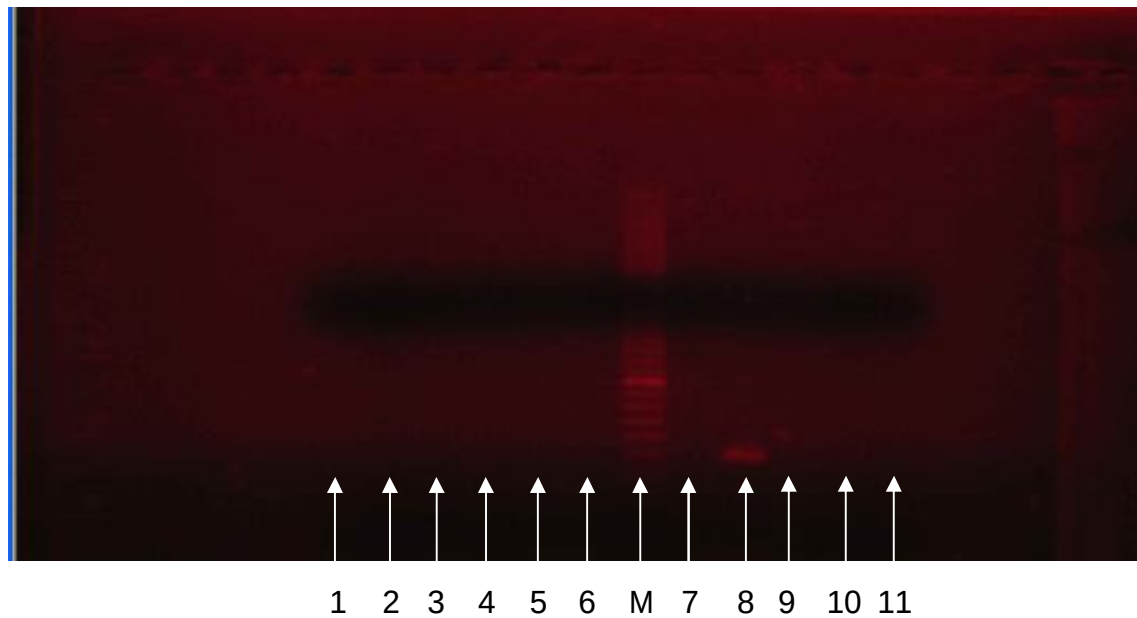


Abbildung 4-3: Gel der mit den Lupineprimern erhaltenen Amplifikate

1 Soja	4 Walnuss	7 Hafer	10 Bohnen
2 Roggen	5 Gerste	8 Lupine	11 Erdnuss
3 Erbse	6 Kürbis	9 Weizen	M Marker

4.2.4 Optimierung der Konzentration der Lupinesonde

Nachdem die Primerkonzentration und die Annealingtemperatur optimiert worden waren und Kreuzreaktivitäten mit anderen Lebensmitteln ausgeschlossen werden konnten, wurde mit der Optimierung des Taqman Assays begonnen. Die Sequenz, der Fluorophor und der Quencher der Sonde sind in Kapitel 4.2.1 angeführt.

Die Konzentration der Sonde wurde in einem Bereich von 50-200 nM variiert. In Abbildung 4-4 sind die PCR-Kurven in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration dargestellt.

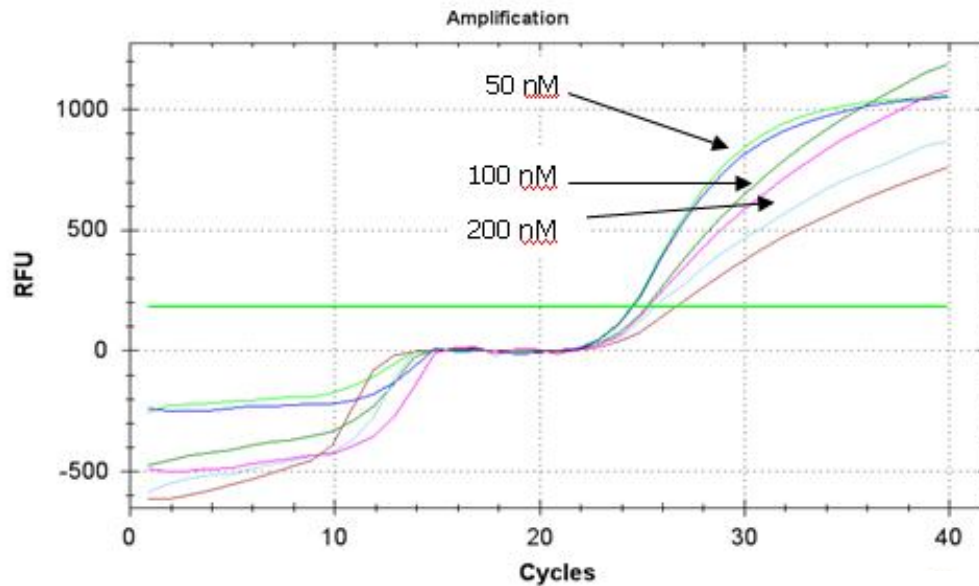


Abbildung 4-4: Optimierung der Lupinensonden-Konzentration

Der geringste c_t -Wert wurde bei einer Sondenkonzentration von 50 nM erhalten, der höchste c_t -Wert bei einer Konzentration von 200 nM.

4.2.5 Optimierte Parameter für den Singleplex-Assay

Das Ergebnis der Optimierung der Primer- und Sondenkonzentration, sowie der Annealingtemperatur ist in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Tabelle 4-5: Optimierte Parameter des Singleplex-Assays

Konzentration F-Primer	300 nM
Konzentration R-Primer	300 nM
Konzentration Sonde	50 nM
Annealingtemperatur	61 °C

Diese Parameter wurden in allen weiteren Singleplex-Assays verwendet.

4.2.6 Ermittlung der Nachweisgrenze mittels seriell verdünnter DNA

Insgesamt wurden zur Erstellung einer Standardfunktion 6 verschiedene DNA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen getestet. Ausgehend von einer DNA-Lösung mit der Konzentration von 20 ng/μl wurde in 1:10 Schritten seriell, bis zu einer Endkonzentration von 0,2 pg/μl, verdünnt (siehe Tabelle 3-6).

Abbildung 4-5 zeigt die erhaltenen PCR-Kurven. Bis zu einer Verdünnung von 1:1000 wurde bei beiden Bestimmungen des Doppelansatzes ein Anstieg des Signals beobachtet. Bei höheren Verdünnungen (1:10000 und 1:100000) wurde kein Signalanstieg erhalten. Die Nachweisgrenze lag daher bei 0,02 ng/μl.

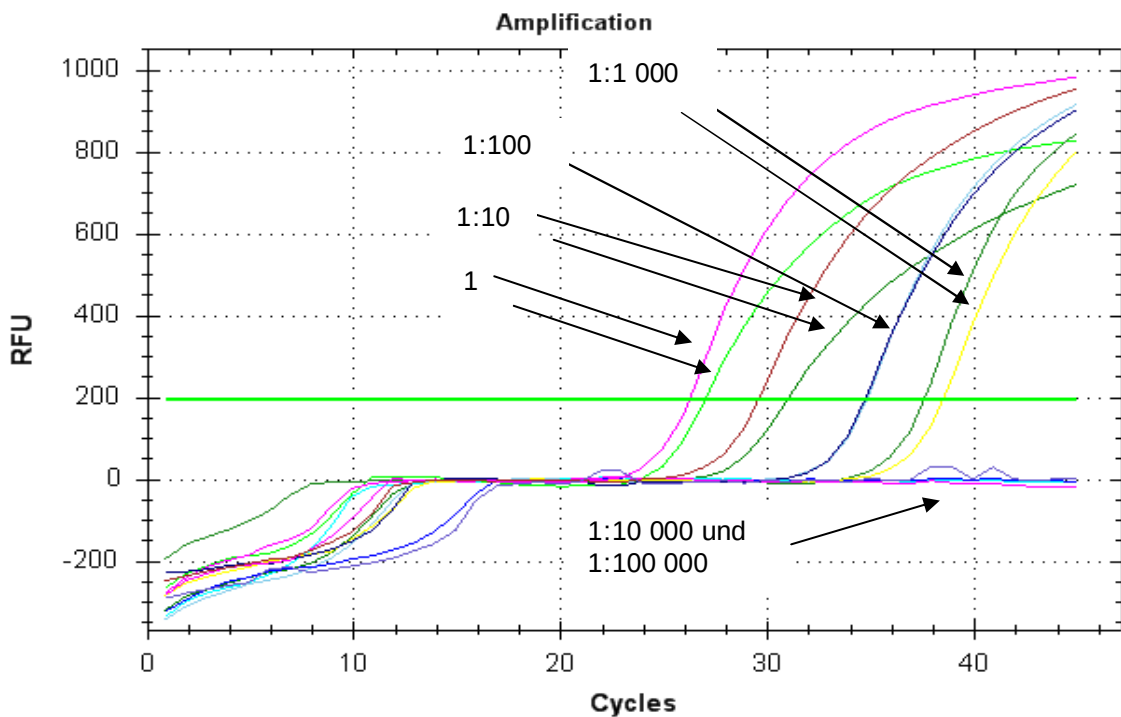


Abbildung 4-5: Ermittlung der Effizienz mit seriell verdünnter Lupinen-DNA

In Tabelle 4-6 sind die erhaltenen c_t -Werte nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4-6: Ergebnis der Analyse seriell verdünnter Lupinen-DNA

Verdünnung	Konzentration (ng/μl)	Eingesetzte Gesamtmenge [ng]	c_t -Werte (Mittelwert)
1	20	100	26,57
1:10	2	10	30,22
1:100	0,2	1	34,70
1:1 000	0,02	0,1	37,97
1:10 000	0,002	0,01	-
1:100 000	0,0002	0,001	-

- ... kein Signalanstieg beobachtet

Durch Auftragen des c_t -Wertes gegen den Logarithmus der Anfangsmenge der DNA wurde die in Abbildung 4-6 gezeigte Standardgerade erhalten.

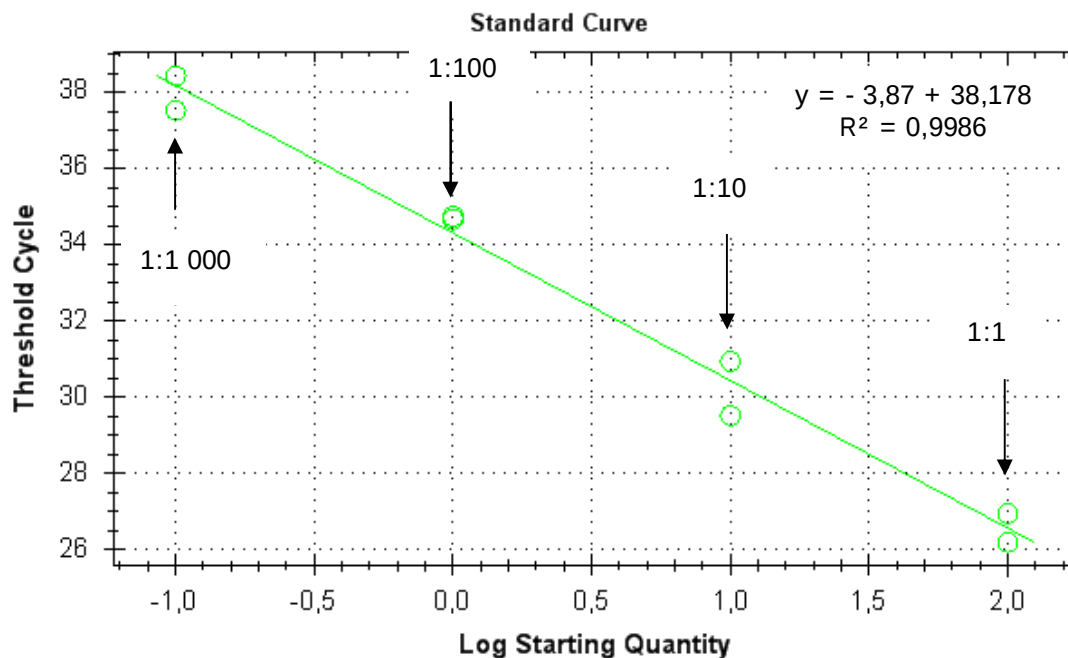


Abbildung 4-6: Standardgerade der seriell verdünnten Lupinen-DNA

Die Effizienz wurde aus der Steigung der Standardgerade berechnet und betrug 81,3 %. Der Korrelationskoeffizient, R^2 , betrug 0,9986.

4.2.7 Nachweis von Lupine in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Der entwickelte Singleplex-Assay wurde zur Bestimmung von Lupine in 10 kommerziell erhältlichen Lebensmitteln angewendet.

Die Lebensmittel wurden so gewählt, dass Lebensmittel, die laut Deklaration Spuren von Lupine enthalten konnten, und lupinefreie Lebensmittel untersucht wurden. Aufgearbeitet wurden die Lebensmittel mit der CTAB-Methode (siehe Kapitel 3.4.1.3).

Tabelle 4-7: Ergebnis der Analyse von kommerziellen Lebensmitteln

Produkt	Deklaration	Ergebnis
Biovitalgebäck	+/-	-
Haferkekse	-	-
Knabbergebäck „Party Club“	-	+
Bierstangen „Grissotti Sesamo“	-	-
Erdnusskrokant	-	-
Schneekoppe Müsli	-	-
Wasa Knäckebrot	-	-
Alnatura Müsliriegel	-	-
Zwieback	-	-
Clever Müsli	-	-

- + ... enthält Lupine bzw. positives Analyseergebnis
- ... frei von Lupine bzw. negatives Analyseergebnis
- +/- ... kann laut Deklaration Spuren von Lupine enthalten

In keinem der getesteten Lebensmittel konnten Spuren von Lupine detektiert werden, mit Ausnahme des Knabbergebäcks „Party Club“, welches laut Deklaration frei von Lupine sein sollte. Zur Absicherung dieses Analyseergebnisses wurde die Probe erneut extrahiert. Die Analyse des neuen DNA-Extraktes lieferte abermals ein positives Ergebnis für Lupine. Bei beiden DNA-Extrakten wurde ein c_t -Wert von 32 erhalten.

4.2.8 Ermittlung der Detektierbarkeit von gelber und blauer Lupine

Um die Anwendbarkeit des entwickelten Singleplex-Assays zu prüfen, wurden auch gelbe und blaue Lupine getestet. Die genaue Versuchsbeschreibung ist in Kapitel 3.6.13 zu finden.

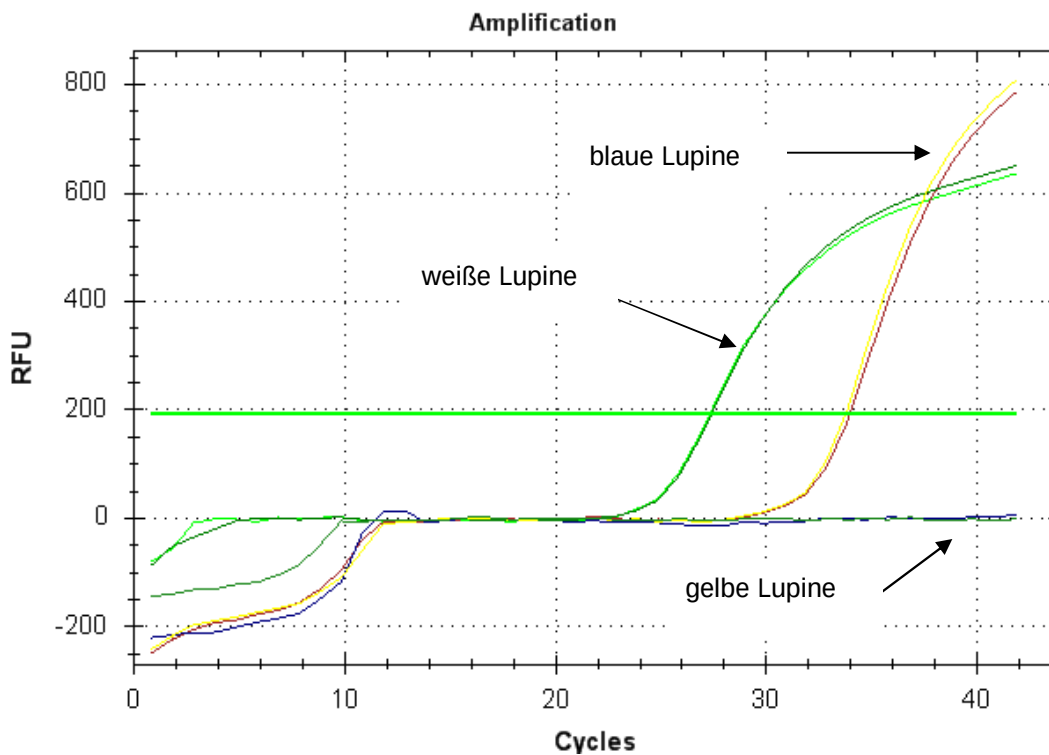


Abbildung 4-7: Test auf Detektierbarkeit von blauer und gelber Lupine

Das Ergebnis zeigte, dass der entwickelte Singleplex-Assay mit einem Unterschied von 6 Zyklen auch auf blaue Lupine anspricht. Somit ist der entwickelte Singleplex-Assay auch für blaue Lupine geeignet. Die gelbe Lupine konnte nicht detektiert werden.

4.3 Entwicklung eines Duplex-Assays zur simultanen Detektion von Lupine und Erdnuss in Lebensmitteln

Die Lupineprimer für den Duplex-Assay wurden von dem Singleplex-Assay übernommen.

Für das Entwerfen der Erdnussprimer wurden die Sequenzen von drei Genen, die für Allergene codieren, verwendet: Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 7.

4.3.1 Primer und Sonden

Mit Hilfe des Programms Beacon Designer 5.1 wurden drei Primerpaare für Erdnuss mit den drei dazugehörigen Taqman-Sonden entworfen.

Bei der Auswahl der Primer musste nicht nur darauf geachtet werden, dass die Möglichkeiten zur Primer-Dimer-Bildung und der Ausbildung von Sekundärstrukturen gering waren. Darüber hinaus mussten Reaktionen mit den Lupineprimern und der Lupinesonde vermieden werden.

4.3.1.1 Primerpaar 1 und Sonde 1

Das Primerpaar 1 war komplementär zu einem DNA-Abschnitt des Gens für Ara h 1 (Accession Number: L38853). Tabelle 4-8 zeigt die Sequenzen der entworfenen Primer und der Sonde, die Schmelztemperaturen sowie die GC-Gehalte.

Tabelle 4-8: Charakteristika des Primerpaares 1 und der Sonde 1

Primer / Sonde	Sequenz 5' → 3'	Schmelz- temperatur	GC- Gehalt
Primer F1	CGCTGATGCTGATAACATCCTTG	58,8 °C	47,8 %
Primer R1	TGGCCCTCGTCAAGATTAAAGC	59,5 °C	50,0 %
Sonde 1	AGGACAAGCCACCGTGACCGTAGC	67,6 °C	62,5 %

Die Gesamtlänge des gebildeten Amplikons betrug 99 bp.

4.3.1.2 Primerpaar 2 und Sonde 2

Das 2. Primerpaar wurde für einen Sequenzabschnitt des Allergens Ara h 2 entworfen (Accession Number: AY158467). Ein durchgeführter BLAST lieferte auch hier keine bedenklichen Übereinstimmungen mit anderen Sequenzen.

Tabelle 4-9 zeigt die Sequenzen der entworfenen Primer und der Sonde für Ara h 2.

Tabelle 4-9: Charakteristika des Primerpaares 2 und der Sonde 2

Primer / Sonde	Sequenz 5' → 3'	Schmelz- temperatur	GC- Gehalt
Primer F2	ACAGGAGCAACAGTTCAAGAGG	59,0 °C	50,0%
Primer R2	CTGTCTCTGCCGCCACTTTC	59,3 °C	60,0%
Sonde 2	TCCAAGTCGCAACGCTGTGGTGCC	69,0 °C	62,5%

Die Gesamtlänge des gebildeten Amplikons betrug 105 bp.

4.3.1.3 Primerpaar 3 und Sonden 3

Das 3. Primerpaar wurde für die Sequenz des Allergens Ara h 7 entworfen (Accession Number AF091737). Auch hier wurden keine relevanten Übereinstimmungen nach dem Sequenzabgleich mittels BLAST gefunden.

Die Sequenzen der entworfenen Primer und der Sonde sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst.

Tabelle 4-10: Charakteristika des Primerpaares 3 und der Sonde 3

Primer / Sonde	Sequenz 5' → 3'	Schmelz- temperatur	GC- Gehalt
Primer F3	AGCAGAGGGGATGACCAGTG	59,2 °C	60,0%
Primer R3	GGGTACTCGTCTTGCTCTTGC	59,3 °C	57,1%
Sonde 3	TTGCTCCTGCTCCACCCTTCGCCT	69,0 °C	62,5%

Die Länge des gebildeten Amplikons betrug 116 bp.

4.3.2 Optimierung der Primerkonzentrationen und der Annealingtemperatur

Die Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur wurde für alle drei Primerpaare vorgenommen. Die genaue Versuchsbeschreibung ist in Kapitel 3.6.4 angeführt.

4.3.2.1 Optimierung der Konzentration und der Annealingtemperatur von Primerpaar 1

In Abbildung 4-8 ist das Ergebnis des Optimierungsschrittes inklusive der 1. Ableitung der Schmelzkurven dargestellt.

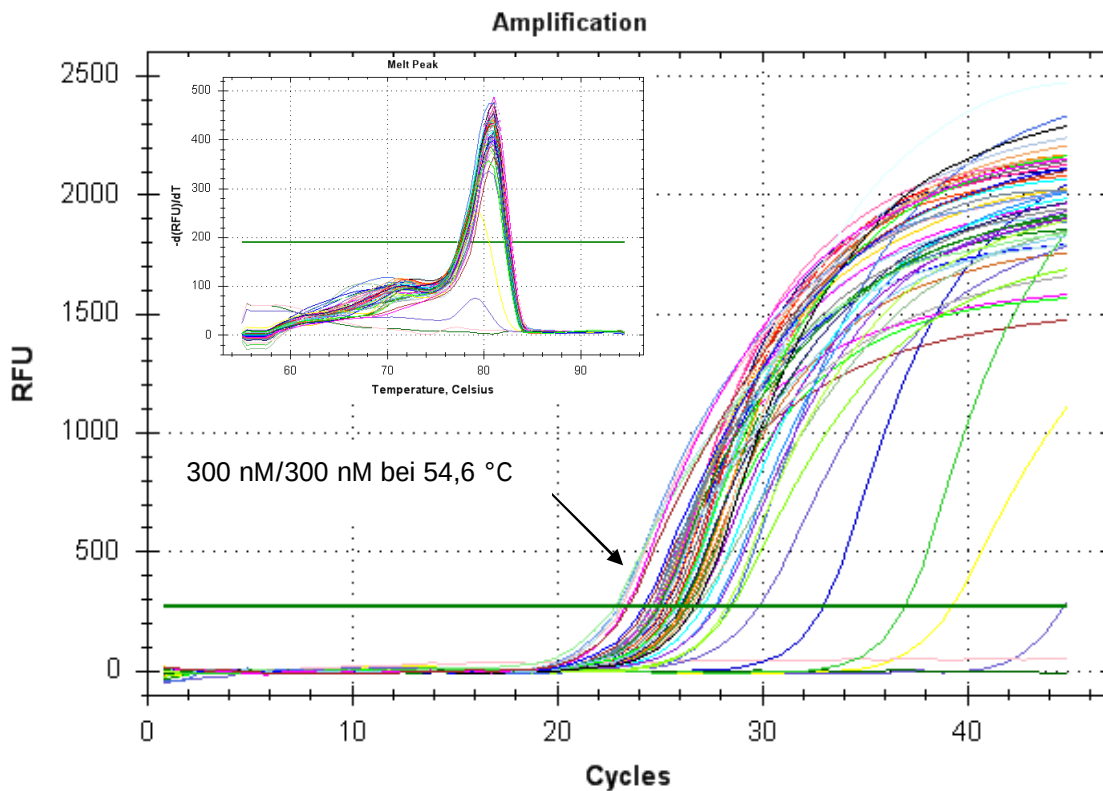


Abbildung 4-8: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration des Primerpaares 1 und der Annealingtemperatur

Der niedrigste c_t -Wert wurde bei einer Primerkonzentration von 300 nM Forward und 300 nM Reverse und einer Annealingtemperatur von 54,6 °C erhalten. Im nachfolgenden Diagramm (siehe Abbildung 4-9) sind die erhaltenen c_t -Werte gegen die Temperatur aufgetragen.

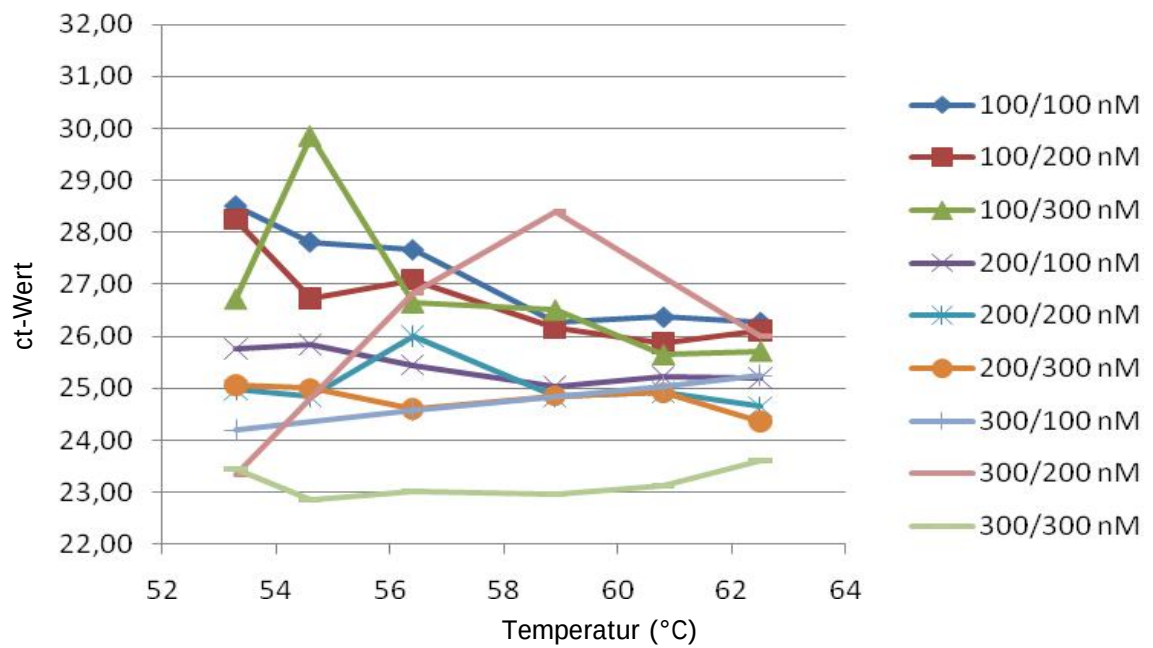


Abbildung 4-9: Graphische Darstellung der erhaltenen ct-Werte in Abhängigkeit von der Annealingtemperatur und den Primerkonzentrationen

Aus dem Diagramm kann man sehen, dass sich die c_t -Werte nur gering mit der Temperatur änderten (mit Ausnahme von 300 nM/200 nM), den größeren Einfluss auf den c_t -Wert hatte die Konzentration der Primer.

4.3.2.2 Optimierung der Konzentration und der Annealingtemperatur von Primerpaar 2

Abbildung 4-10 zeigt die Ergebnisse der Optimierungsversuche mit Primerpaar2.

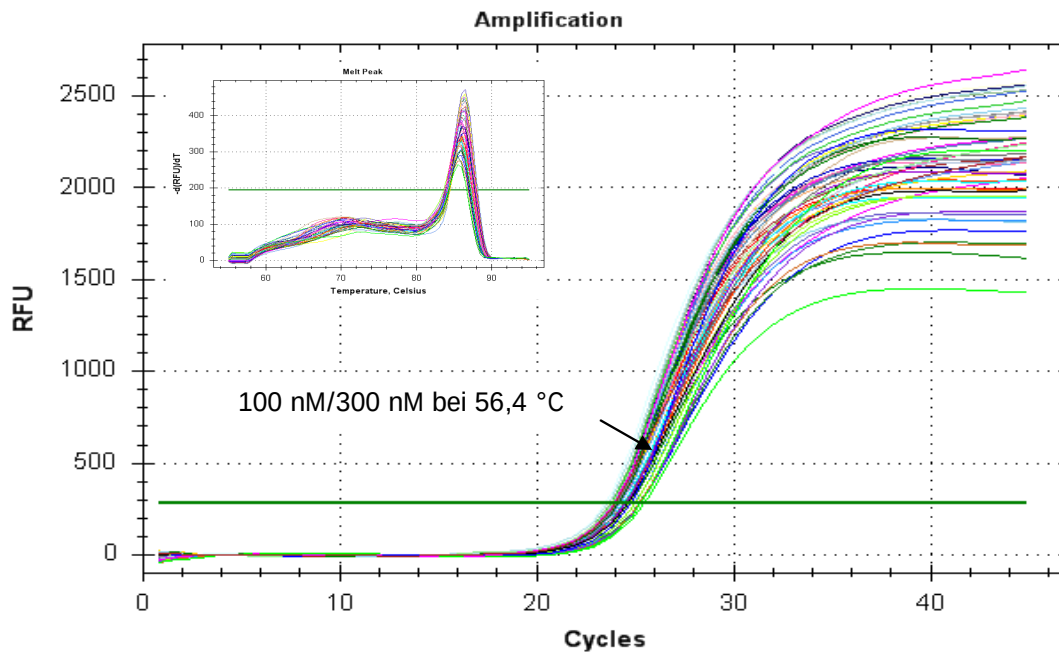


Abbildung 4-10: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration des Primerpaares 2 und der Annealingtemperatur

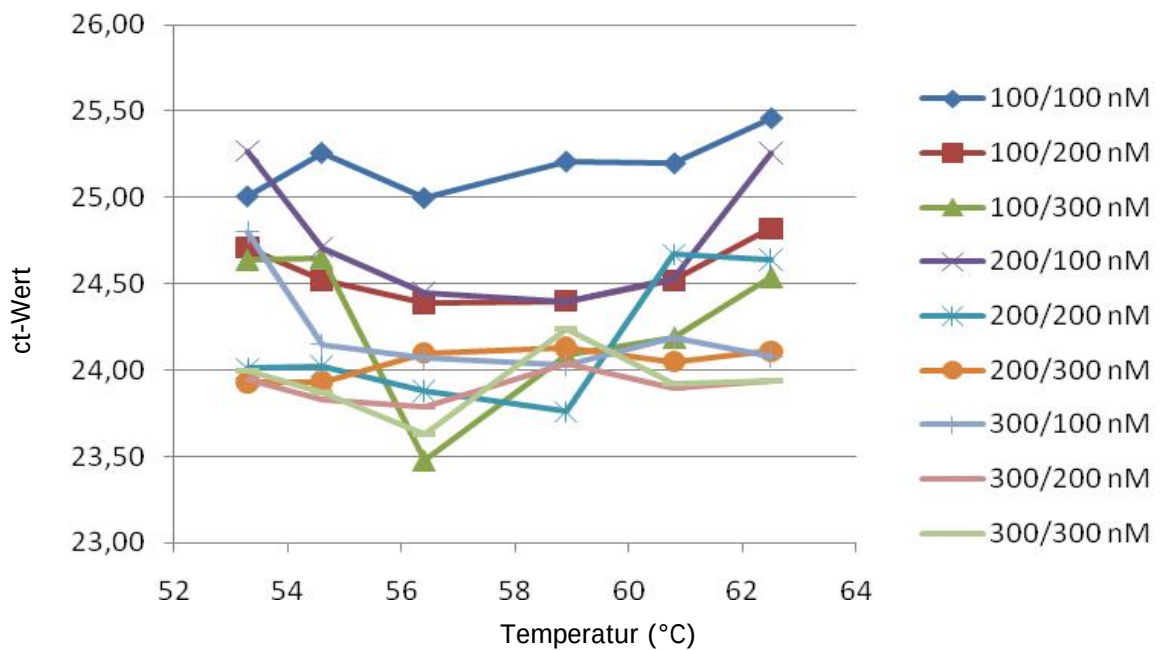


Abbildung 4-11: Graphische Darstellung der erhaltenen c_t -Werte in Abhängigkeit von der Annealingtemperatur und den Primerkonzentrationen

Wie sich aus Abbildung 4-11 erkennen lässt, hatten bei der Optimierung von Primerpaar 2 weder die Konzentration der Primer noch die Temperatur einen großen Einfluss auf die c_t -Werte. Der Unterschied zwischen dem geringsten und dem größten c_t -Wert betrug nur 2 Zyklen. Der niedrigste c_t -Wert wurde bei einer Konzentration von 100 nM Forward-Primer und 300 nM Reverse-Primer bei einer Annealingtemperatur von 56,4 °C erhalten.

4.3.2.3 Optimierung der Konzentration und der Annealingtemperatur von Primerpaar 3

In Abbildung 4-12 sind das Ergebnis der Optimierung von Primerpaar 3 und die 1. Ableitung der Schmelzkurven dargestellt.

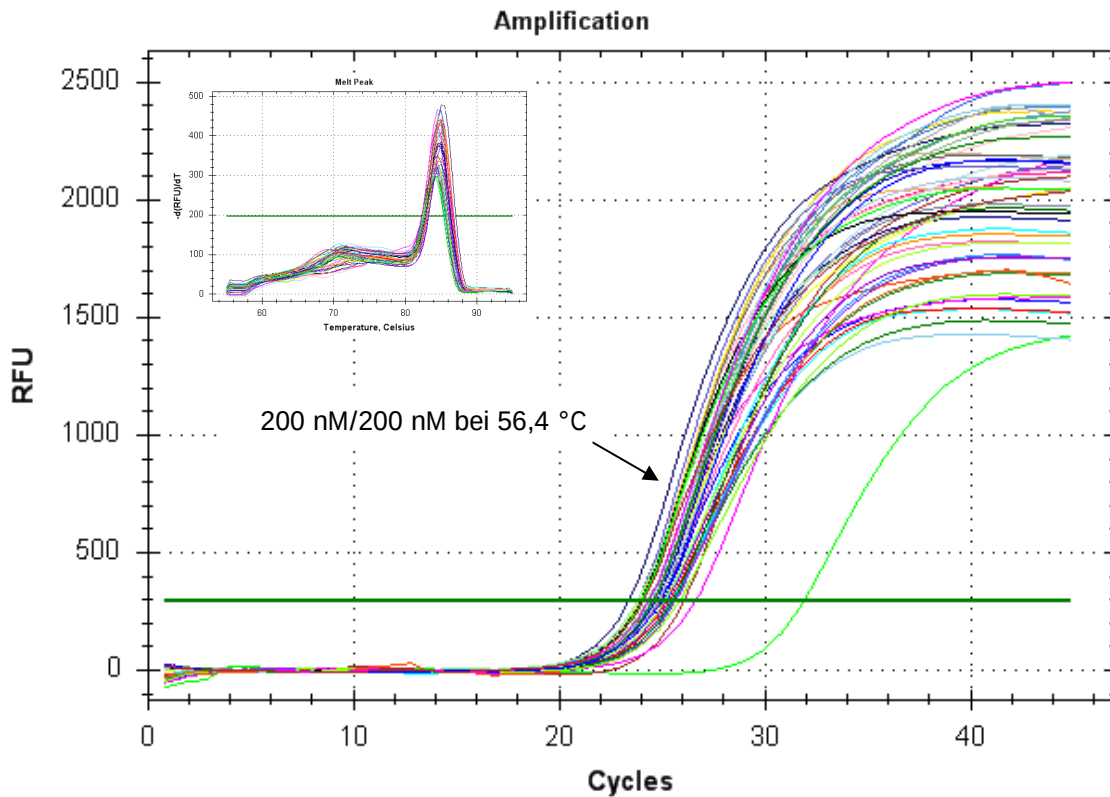


Abbildung 4-12: PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven der Optimierung der Konzentration des Primerpaares 3 und der Annealingtemperatur

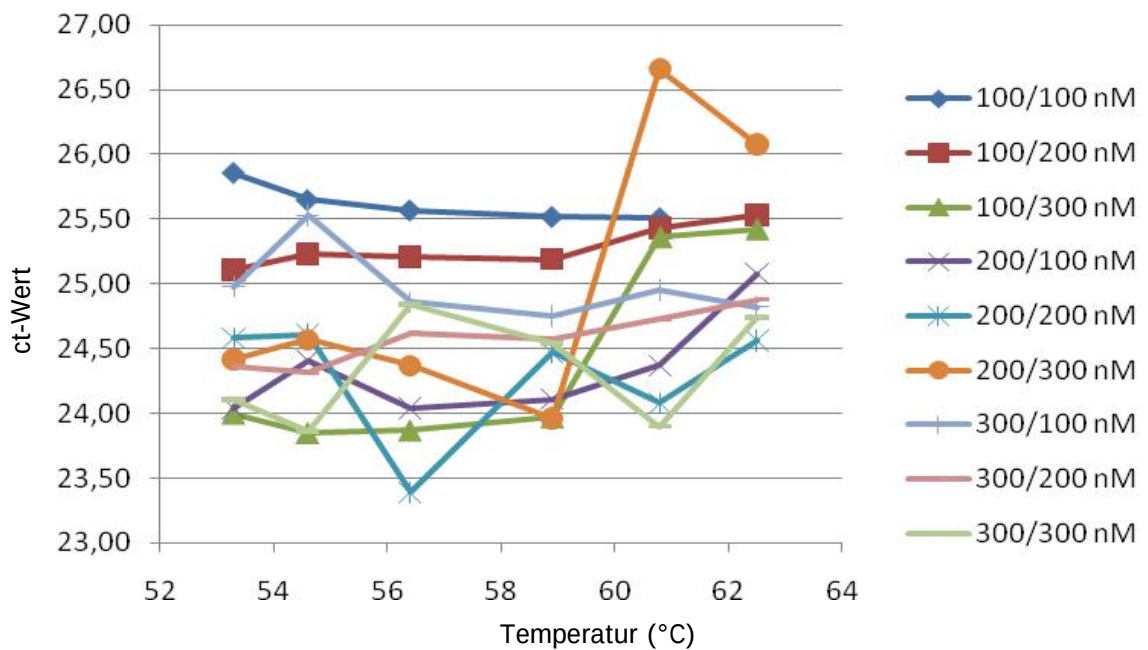


Abbildung 4-13: Graphische Darstellung der erhaltenen c_t -Werte in Abhängigkeit von der Annealingtemperatur und den Primerkonzentrationen

Die c_t -Werte änderten sich nur gering mit den veränderten Konzentrations- und Temperaturbedingungen. Der Unterschied zwischen niedrigstem und höchstem c_t -Wert betrug 3 Zyklen. Die optimale Konzentration liegt bei 200 nM Forward-Primer und 200 nM Reverse-Primer, bei einer Temperatur von 56,4 °C.

4.3.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität der Erdnussprimer

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde für jedes Primerpaar durchgeführt und in mehreren Einzelansätzen analysiert. Für die Analysen wurde der iQ SYBR Green Supermix verwendet, und im Anschluss an den Lauf wurde noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Der genaue Ablauf der Kreuzreaktivitätsbestimmung und die getesteten Lebensmittel sind in den Kapiteln 3.6.5 und 3.3.1 beschrieben.

4.3.3.1 Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares 1

Die Schmelztemperatur des in der Erdnuss gebildeten Amplifikats betrug 81,5 °C. Von allen getesteten Lebensmitteln lieferte nur Dinkel ein Amplifikat mit der gleichen Schmelztemperatur (siehe Abbildung 4-14). Um zu prüfen, ob das Ergebnis auf eine Kreuzreaktivität der Primer zurückzuführen war, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Da auf dem Agarosegel keine Bande sichtbar war, konnte eine Kreuzreaktivität des Primerpaares 1 mit Dinkel ausgeschlossen werden.

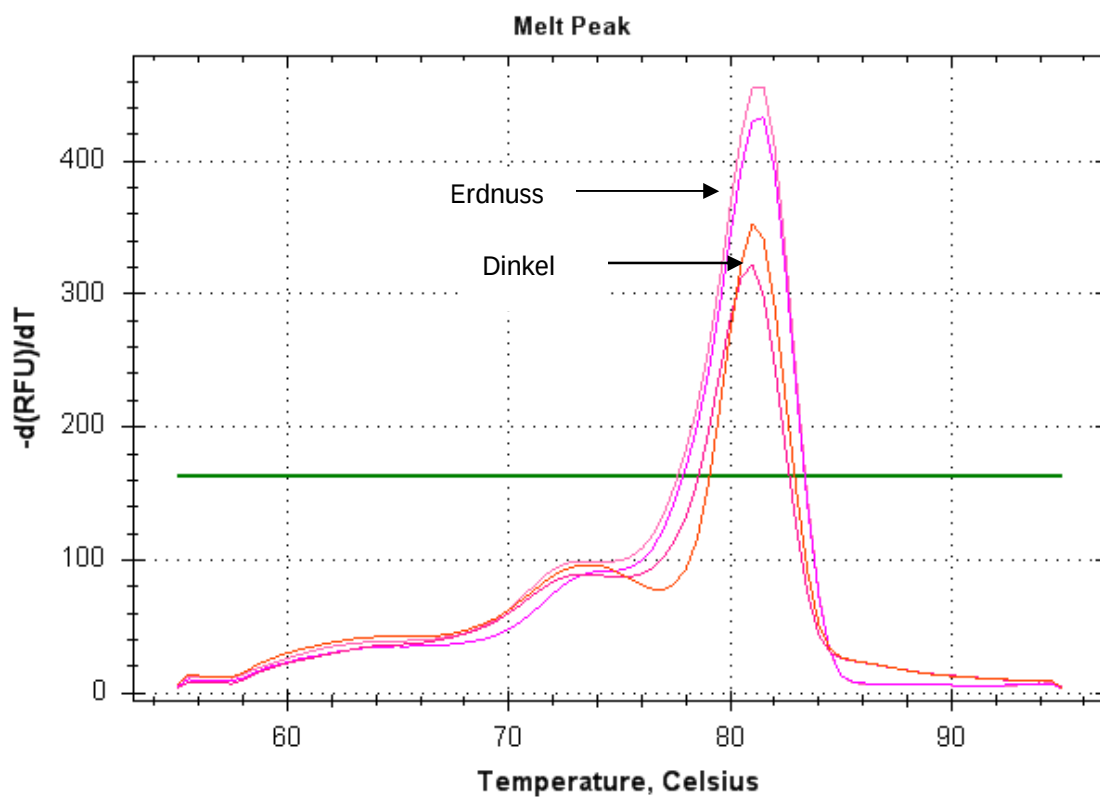


Abbildung 4-14: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 1 erhaltenen Amplifikate

4.3.3.2 Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares 2

Die Schmelztemperatur des in der Erdnuss gebildeten Amplifikats betrug 86,0 °C. Amplifikate von Pistazie, Paranuss, Kürbis, Kichererbse, Sesam, schwarzem Sesam und Gerste hatten dieselbe Schmelztemperatur. Durch Auftragen der Amplifikate auf ein Agarosegel konnte eine Kreuzreaktivität der Primer mit diesen Lebensmitteln ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 4-15 dargestellt, war nur bei Kürbis und bei Paranuss jeweils eine Bande bei ca. 220 bp sichtbar, alle anderen Proben lieferten keine Banden.

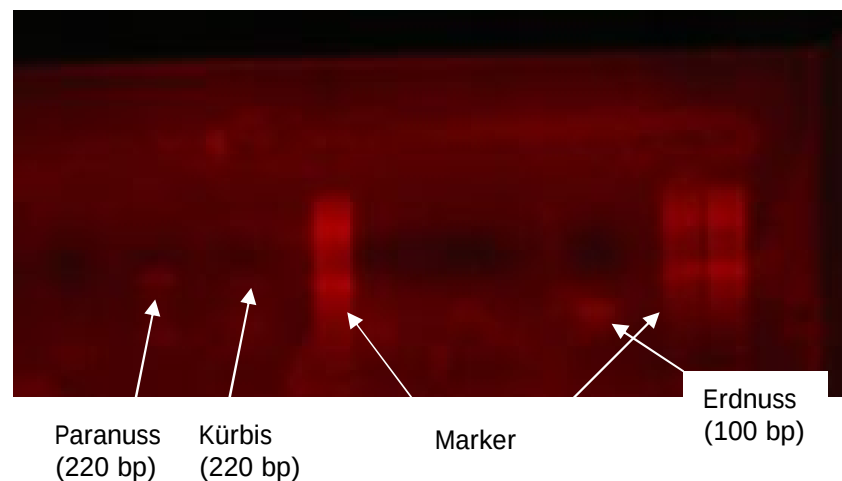


Abbildung 4-15: Gel der mit dem Primerpaar 2 gebildeten Amplifikate

4.3.3.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares 3

Die Schmelztemperatur des gewünschten Amplifikats betrug 85,0 °C. Gebildete Amplifikate von Kichererbse, Dinkel, Gerste, Pekanuss, Kürbis und Cashewkerne hatten die gleiche Schmelztemperatur. Die Amplifikate, welche die gleiche Schmelztemperatur wie Erdnuss hatten, wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 4-16). Das Amplifikat der Erdnuss hatte eine Größe von ca. 120 bp (theoretische Länge 116 bp), im Gegensatz dazu wurden für die anderen Lebensmittelproben Amplifikate mit Größen von ca. 75 bp ermittelt. Somit konnte eine Kreuzreaktivität der Primer mit den getesteten Lebensmitteln ausgeschlossen werden.

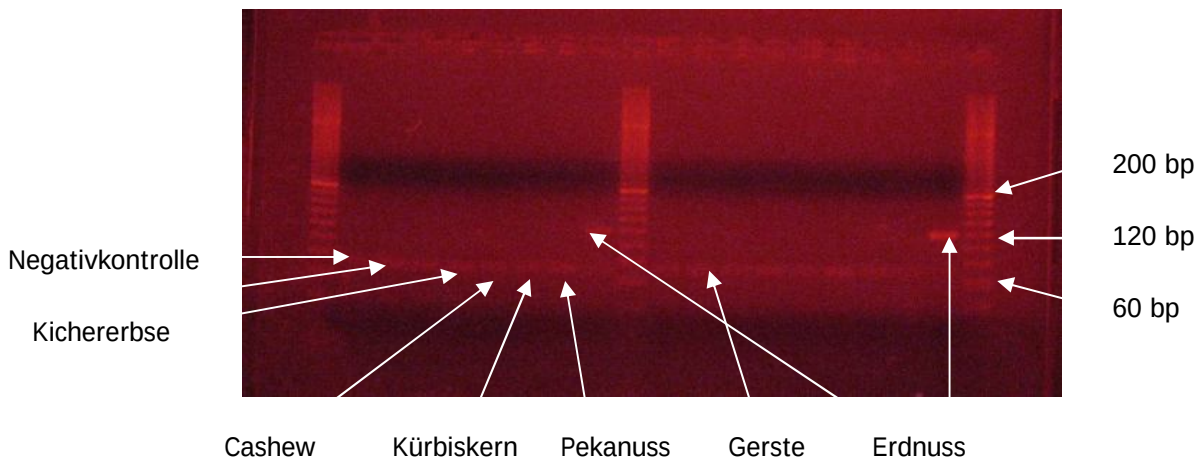


Abbildung 4-16: Gel der mit dem Primerpaar 3 gebildeten Amplifikate

Nachdem alle 3 Primerpaare auf Kreuzreaktivität getestet wurden, wurden die Ergebnisse miteinander verglichen, und die Wahl fiel auf das Primerpaar 3, welches für Ara h 7 entworfen worden war. Dieses Primerpaar wies die geringsten Unterschiede in der Schmelztemperatur zwischen Forward und Reverse-Primer auf. Außerdem passte die Annealingtemperatur des Primerpaares 3 am besten zu der Annealingtemperatur der Lupineprimer. Desweiteren zeigten die auf Kreuzreaktivität getesteten Lebensmittel mit Primerpaar 3 auf dem Gel nur Primerdimere und keine anderen Amplifikate.

4.3.4 Optimierung der Erdnusssonden-Konzentration

Nachdem die Wahl auf das Primerpaar 3 gefallen war, wurde die entsprechende Sonde bestellt. Die Sonde war am 5'-Ende mit Cy5, einem Cyan-Farbstoff, und am 3'-Ende mit dem entsprechenden Quencher, (BHQ3), markiert.

Es wurden mehrere Sonden-Konzentrationen und unterschiedliche Annealing-temperaturen getestet, ohne zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten (siehe Abbildung 4-17).

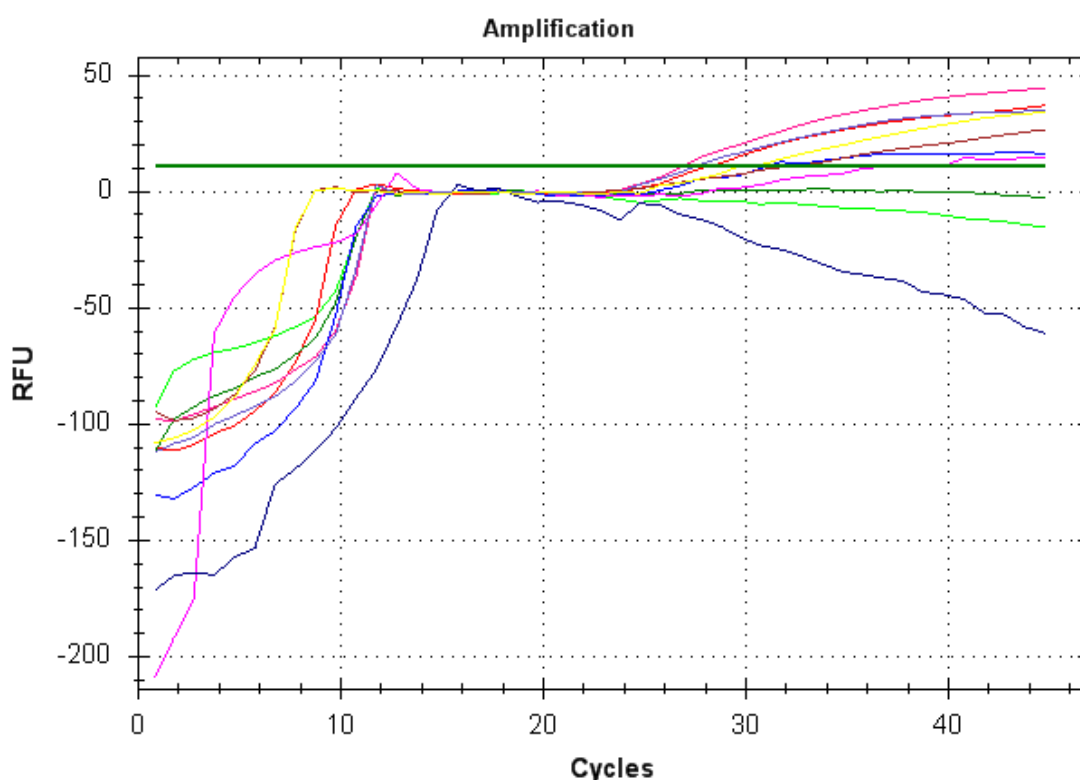


Abbildung 4-17: PCR Kurven der Optimierung der Konzentration der Erdnusssonde

Unter keinen Bedingungen wurde ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals erhalten. Getestet wurde bei Sondenkonzentrationen von 10 nM, 25 nM, 50 nM und 100 nM. Nach Rücksprache mit der Firma Metabion wurde ein Aliquot der Sonde an die Herstellerfirma zurückgesendet und einer MALDI-TOF Analyse unterzogen. Seitens Metabion hätte die Sonde funktionieren sollen.

Daraufhin wurden die von Sabrina Niedermayer im Rahmen ihrer Diplomarbeit entworfenen Primer und die Sonde für Erdnuss auf Kompatibilität mit den Lupineprimern und der Lupinesonde überprüft. Die neuen Erdnussprimer (Primerpaar 4) waren zu einer Sequenz des Gens komplementär, welches für Oleosin codiert. Bei Oleosin handelt es sich um das achte Allergen der Erdnuss. Die für Oleosin entworfenen Primer/Taqman-Sonde erwiesen sich als mit den für Lupine entworfenen Primern und der Taqman-Sonde kompatibel und wurden für die weitere Entwicklung des Duplex-Assays übernommen. Abgesichert wurde die Kompatibilität mit dem Beacon Designer, dem Programm, mit dem Primer und Sonden entworfen werden können.

Um die Spezifität der Primer zu prüfen, wurden 27 Lebensmittel auf Kreuzreaktivität getestet. Die auf Kreuzreaktivität getesteten Lebensmittel sind in Tabelle 3-2 zu finden. Zusätzlich wurde noch die Kreuzreaktivität mit Mohn untersucht. Aufgrund der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und der Agarosegelelektrophorese stellte sich heraus, dass die entworfenen Primer spezifisch für Erdnuss waren.

Die optimalen Konzentrationen der Primer sowie der Sonde und die Annealingtemperatur waren bereits von Sabrina Niedermayer ermittelt worden. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 4-11 zu finden.

Tabelle 4-11: Optimierte Parameter für Primerpaar 4

Konzentration der F-Primer	300 nM
Konzentration der R-Primer	300 nM
Konzentration der Sonde	75 nM
Annealingtemperatur	56 °C

4.3.5 Optimierung des Duplex-Assays

Da die vorangegangenen Optimierungsschritte ausschließlich im Singleplex-Assay erfolgt worden waren, war es noch notwendig, einen weiteren Optimierungsschritt für die jeweiligen Primer und Taqman-Sonden von Lupine und Erdnuss durchzuführen, da ein bloßes Übernehmen der Singleplex-Parameter (siehe Tabelle 4-12) im Duplex-Assay für Erdnuss (DNA c = 20 ng/μl) zu c_t -Werten über 28 führte (siehe Abbildung 4-18).

Tabelle 4-12: Optimierte Parameter des Singleplex-Assays für Lupine und Erdnuss

	Lupine	Erdnuss
Konzentration F-Primer	300 nM	300 nM
Konzentration R-Primer	300 nM	300 nM
Konzentration Sonde	50 nM	75 nM
Annealingtemperatur	61 °C	56 °C

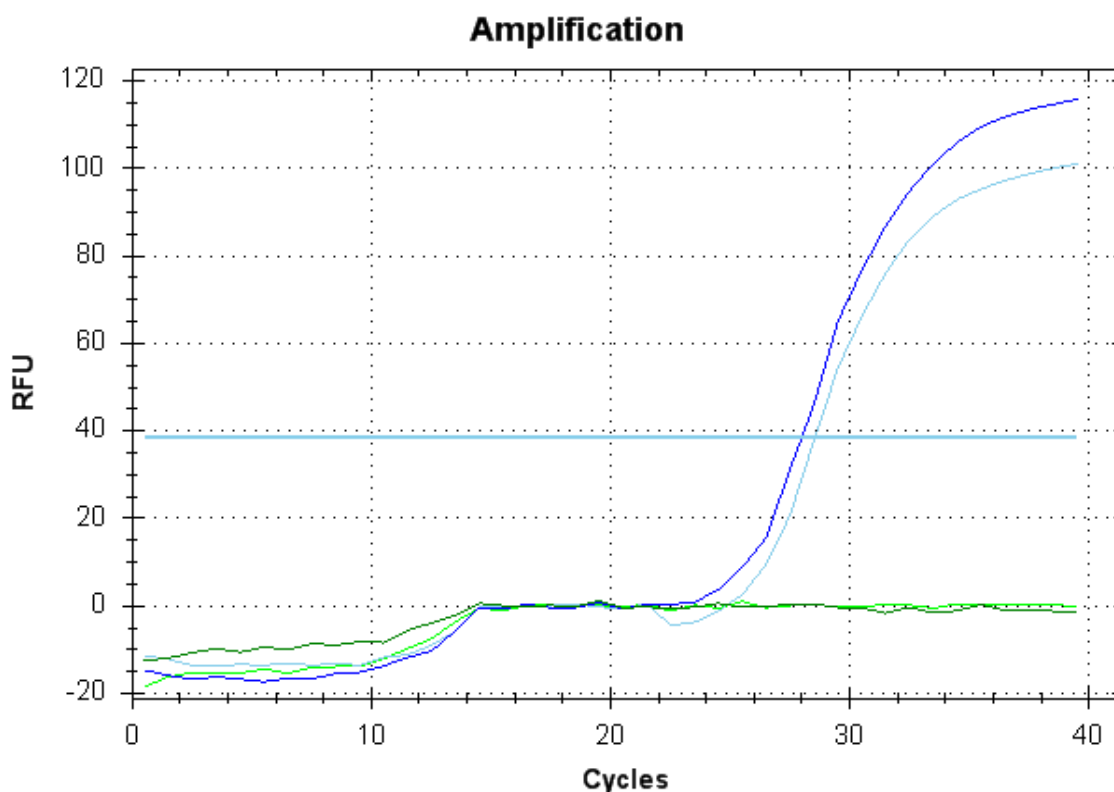


Abbildung 4-18: PCR-Kurven für Erdnuss im nicht optimierten Duplex-Assay

Ziel dieses Optimierungsschrittes war es, Lupine als auch Erdnuss zu detektieren, wobei zwei DNA-Mischungen hergestellt wurden, in denen jeweils eine DNA-Komponente im Überschuss vorlag. Für den genauen Versuchsablauf siehe Kapitel 3.6.8.

Die optimierte Konzentration der jeweiligen Primer und Taqman-Sonden im Duplex-Assay ist in Tabelle 4-13 vermerkt.

Tabelle 4-13: Parameter des optimierten Duplex-Assays

	Konzentration [nM]
F-Primer Lupine	100
R-Primer Lupine	100
Lupinesonde	50
F-Primer Erdnuss	300
R-Primer Erdnuss	300
Erdnusssonde	100

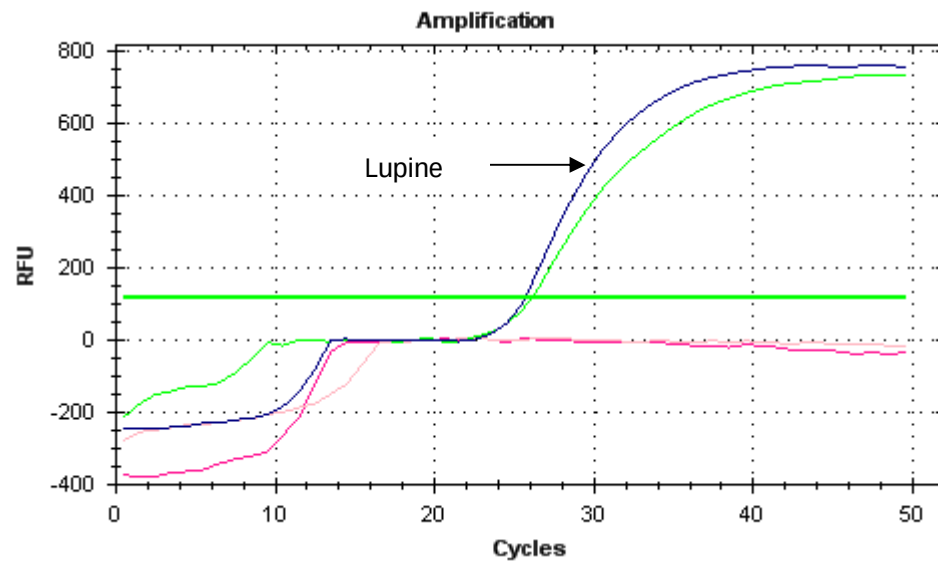


Abbildung 4-19: PCR Kurven der Lupine nach der Optimierung des Duplex-Assays (Lupinen-DNA c = 20 ng/μl)

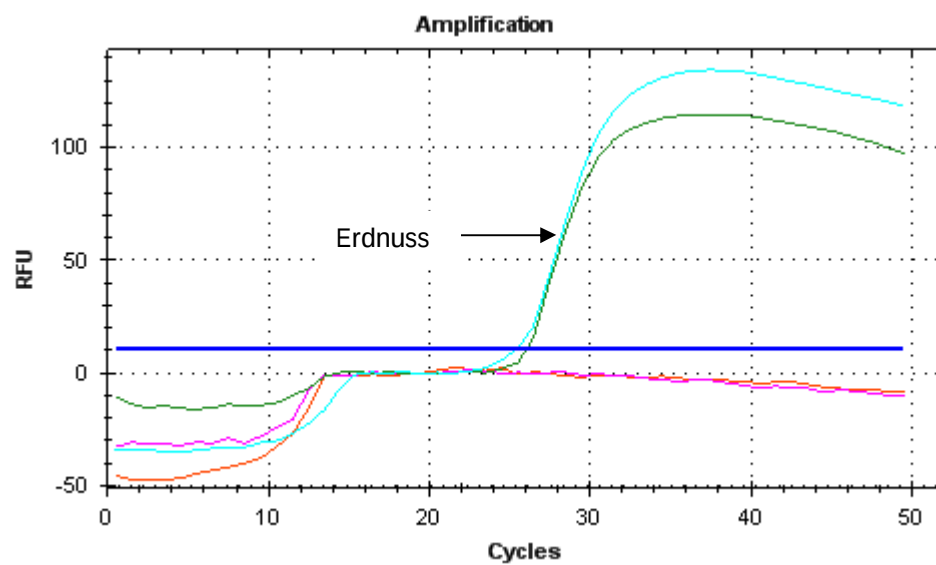


Abbildung 4-20: PCR Kurven der Erdnuss nach der Optimierung des Duplex-Assays (Erdnuss-DNA c = 20 ng/μl)

Wie in Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20 zu sehen ist, zeigten die PCR Kurven von Lupine bzw. von Erdnuss nach dem Optimierungsschritt ein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal und lieferten c_t -Werte von 25,75 für Lupine und 26,00 für Erdnuss.

4.3.6 Ermittlung der Nachweisgrenze mit seriell verdünnter DNA

Wie auch beim Singleplex-Assay wurden zum Erstellen der Standardfunktion des Duplex-Assays sechs verschieden konzentrierte DNA-Lösungen getestet. Es wurde ausgehend von einer Konzentration von 20 ng Lupine- bzw. Erdnuss-DNA/µl im Verhältnis 1:10 seriell verdünnt, bis zu einer Endkonzentration von 0,2 pg/µl. Der Versuch wurde zweimal im Duplexansatz, mit jeweils einem Templat (einmal Lupine-DNA, einmal Erdnuss-DNA), durchgeführt. Die Verdünnungen mit den dazugehörigen Konzentrationen und die genaue Versuchsbeschreibung sind im Kapitel 3.6.9 zu finden.

4.3.6.1 Ermittlung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays – Lupine

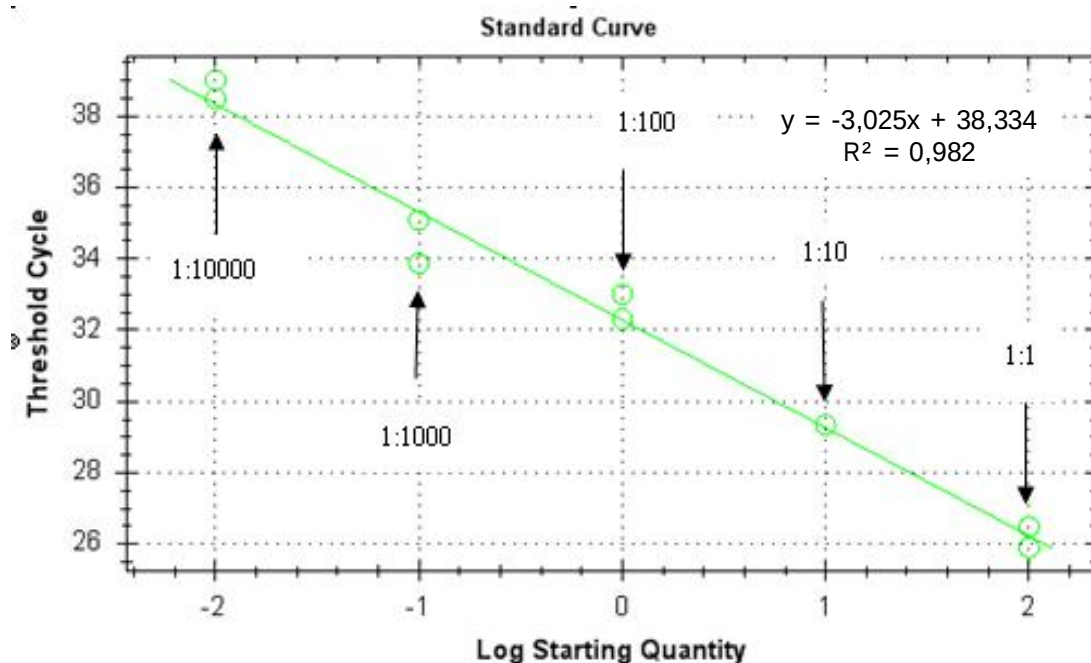


Abbildung 4-21: Standardgerade von seriell verdünnter Lupine-DNA

Abbildung 4-21 zeigt, dass bis zu einer Konzentration von 2 pg/µl eine Linearität der Standardkurve gegeben war (Korrelationskoeffizient $R^2=0,982$). Aus der Steigung der Standardgerade wurde eine Effizienz von 114,1% berechnet.

4.3.6.2 Ermittlung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays – Erdnuss

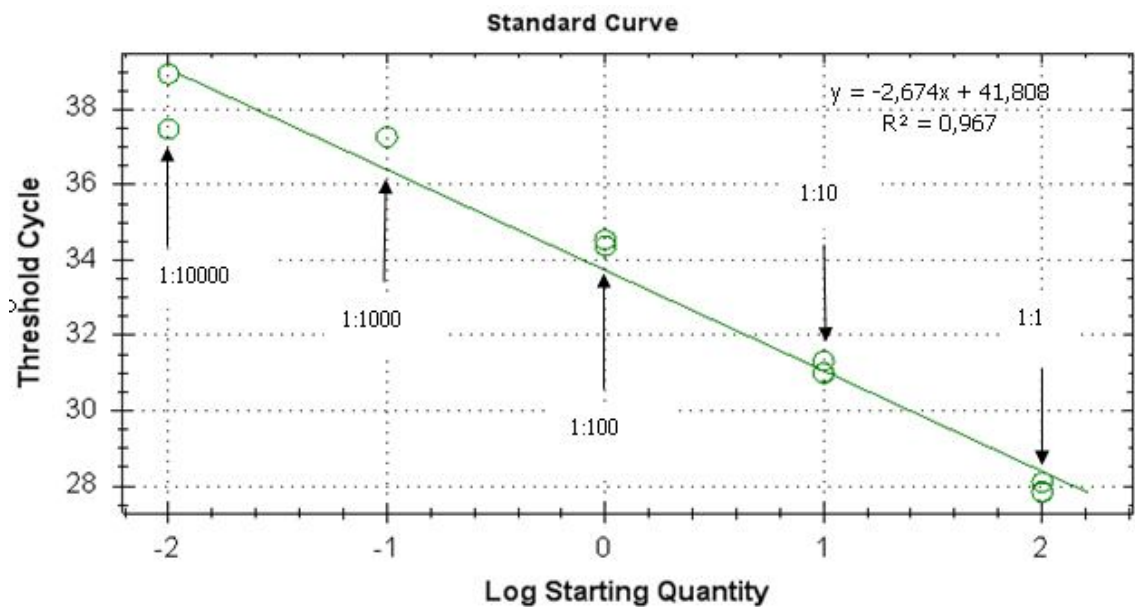


Abbildung 4-22: Standardgerade von seriell verdünnter Erdnuss-DNA

In Abbildung 4-22 ist zu sehen, dass bis zu einer Konzentration von 2 pg/μl eine Linearität der Standardkurve gegeben ist (Korrelationskoeffizient $R^2=0,967$). Die Effizienz betrug 136,8%, sie wurde aus der Steigung der Standardgerade ermittelt.

4.3.7 Ermittlung der Nachweisgrenzen in gespikten Lebensmitteln

Als nächstes wurde der optimierte Duplex-Assay mittels mit Erdnuss und Lupine gespikten Lebensmittelproben (Müsli und Zwieback) getestet. Insgesamt wurden 7 Spikelevels mit Konzentrationen von je 1%-0,001% Lupine und Erdnuss hergestellt (siehe Tabelle 3-7).

4.3.7.1 Lupine

In Tabelle 4-14 sind die erhaltenen c_t -Werte für die einzelnen Spikelevels zusammengefasst und in Abbildung 4-19 ist die Standardgerade abgebildet.

Tabelle 4-14: Erhaltene c_t -Werte für mit Lupine gespiktem Müsli

Spikelevel	c_t-Wert 1	c_t-Wert 2
1%	26,40	26,39
0,5%	27,85	27,88
0,1%	30,74	30,26
0,05%	31,26	31,38
0,01%	32,98	33,26
0,005%	-	-
0,001%	-	-

- kein Signalanstieg beobachtet

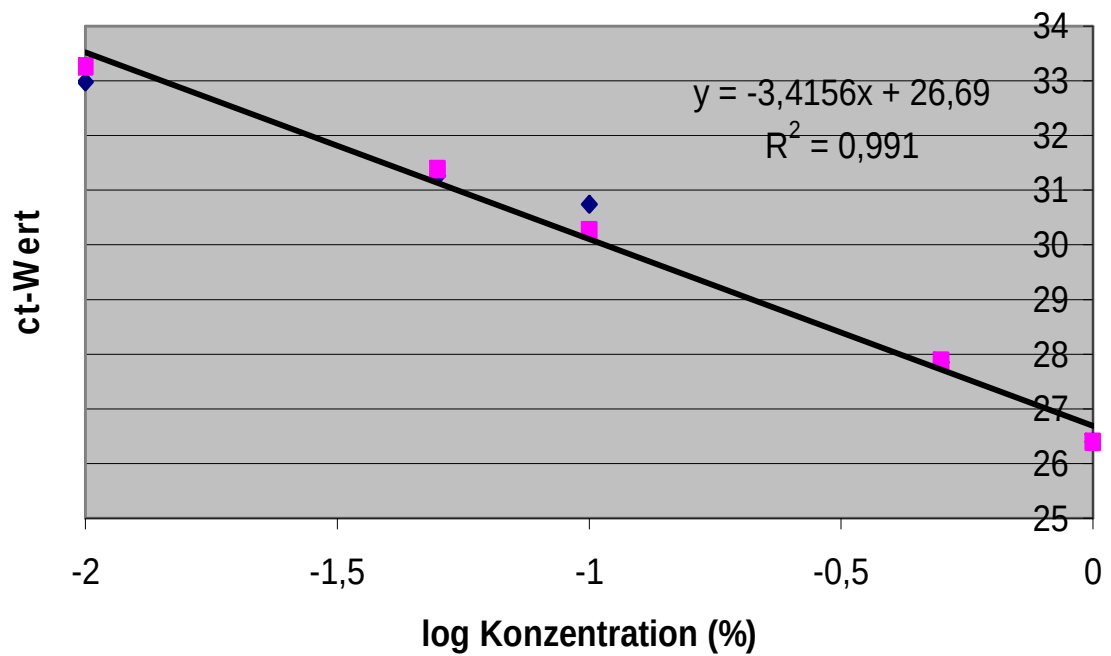


Abbildung 4-23: Standardgerade von mit Lupine gespiktem Müsli

Der Korrelationskoeffizient der Standardgerade (R^2) betrug 0,991, die Steigung -3,4156. Aus der Steigung wurde eine Effizienz von 96,2% berechnet. Lupine konnte bis zu einer Spikekonzentration von 0,01% detektiert werden, das entspricht einer Nachweisgrenze von 100 ppm.

4.3.7.2 Erdnuss

In Tabelle 4-15 sind die c_t -Werte für die einzelnen Spikelevels des mit Erdnuss gespikten Zwiebacks aufgelistet. Abbildung 4-24 zeigt die Standardgerade.

Tabelle 4-15: Erhaltene c_t -Werte für mit Erdnuss gespiktem Zwieback

Spikelevel	c_t -Wert 1	c_t -Wert 2
1%	28,05	28,31
0,5%	31,19	31,21
0,1%	32,69	32,89
0,05%	34,09	32,77
0,01%	36,00	35,30
0,005%	-	-
0,001%	-	-

- kein Signalanstieg beobachtet

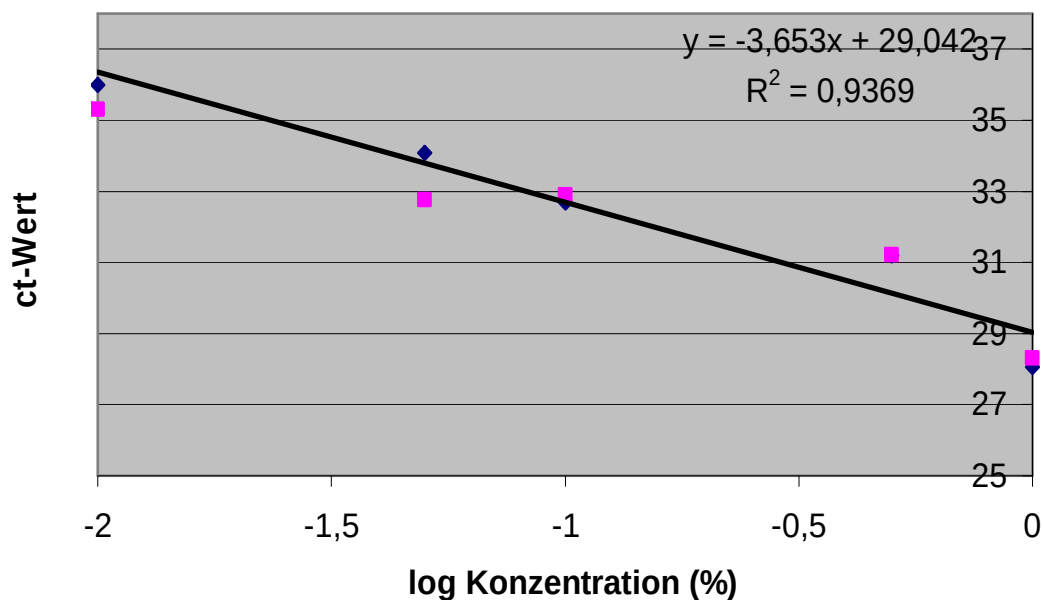


Abbildung 4-24: Standardgerade von mit Erdnuss gespiktem Zwieback

Die Standardgerade hatte einen Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0,9369 und eine Steigung von -3,653. Die Effizienz betrug 87,8%. Die Nachweisgrenze des Duplex-Assays für Erdnuss lag bei 100 mg Erdnuss/kg Lebensmittel.

4.3.8 Nachweis von Lupine und Erdnuss in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Getestet wurden insgesamt 24 kommerziell erhältliche Lebensmittel mit unterschiedlichen Deklarationen (mit/ohne Lupine/Erdnuss, Möglichkeit auf Vorhandensein von Lupine/Erdnuss). Die Details der Analyse sind in Kapitel 3.6.12 angeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-16 zusammengefasst. Lebensmittel, die Lupine bzw. Erdnuss enthielten, wurden mit „+“ gekennzeichnet, Lebensmittel ohne Lupine bzw. Erdnuss wurden mit „-“ gekennzeichnet, und bei Lebensmitteln mit der Deklaration „Kann Spuren von ... enthalten“ wurde als Symbol „+/-“ gewählt. In allen Produkten, die Lupine bzw. Erdnuss enthalten sollten, wurde mittels des entwickelten Duplex-Assays auch Lupine bzw. Erdnuss detektiert. Im Biovitalgebäck konnten laut Deklaration Spuren von Lupine enthalten sein, es wurde jedoch kein positives Signal erhalten. Die Produkte Party Club, Schneekoppe Müsli, Alnatura Müsliriegel, Apfel Nuss Müsliriegel, Ernie und Bert Müsliriegel sowie Reiswaffeln konnten Spuren von Erdnuss enthalten, tatsächlich detektiert wurde Erdnuss in Schneekoppe Müsli und in den Reiswaffeln. In dem Knabbergebäck Party Club, welches laut Deklaration keine Lupine enthalten sollte, wurde mittels des Duplex-Assays Lupine nachgewiesen. Auch mit dem Singleplex-Assay war in dieser Probe Lupine nachgewiesen worden.

Tabelle 4-16: Ergebnis der Analyse von kommerziellen Lebensmitteln

Produkt	Deklaration		Ergebnis	
	Lupine	Erdnuss	Lupine	Erdnuss
Veg. Lupine-Reis-Laibchen	+	-	+	-
Veg. Lupine-Bratwurst	+	-	+	-
Biovitalgebäck	+/-	+	-	+
Ströck Adamsbrot	+	-	+	-
Lupineaufstrich Paprika	+	-	+	-
Lupineaufstrich Tomate	+	-	+	-
Haferkekse	-	-	-	-
Knabbergebäck „Party Club“	-	+/-	+	-
Bierstangen „Grissotti Sesamo“	-	-	-	-
Erdnusskrokant	-	+	-	+
Schneekoppe Müsli	-	+/-	-	+
Wasa Knäckebrot	-	-	-	-
Alnatura Müsliriegel	-	+/-	-	-
Zwieback	-	-	-	-
Clever Müsli	-	-	-	-
Marzipanschokolade	-	-	-	-
Peanut Snips	-	+	-	+
Erdnussbutter	-	+	-	+
Sesam Krokant	-	+	-	+
Müsliriegel Apfel Nuss	-	+/-	-	-
Müsliriegel Ernie und Bert	-	+/-	-	-
Reiswaffeln	-	+/-	-	+
Knabbergebäck „Kross Brödl“	-	-	-	-
Spar Eierwaffeln	+	-	+	-

5 Schlussbetrachtung

Die Standardmethoden für die Detektion von Lebensmittelallergenen sind immunanalytische Methoden, wobei vor allem der Sandwich ELISA zu erwähnen wäre. Immer größer wird jedoch die Bedeutung von auf der Polymerase Kettenreaktion basierenden Methoden.

Während bei immunanalytischen Methoden ein Protein, im Falle von Lebensmittelallergenen meist das Allergen selbst, detektiert und nachgewiesen wird, verwendet man bei PCR basierten Methoden eine für das Lebensmittel typische DNA-Sequenz, häufig jene Sequenz, welche für ein allergenes Protein codiert.

Ziel dieser Diplomarbeit war die Entwicklung, Optimierung und Validierung eines Singleplex-Assays für Lupine sowie eines Duplex-Assays für die simultane Bestimmung von Lupine und Erdnuss in Lebensmitteln.

Der erste Teil der Diplomarbeit bestand in der Entwicklung des Singleplex-Assays zur Bestimmung von Lupine. Dazu wurden für Lupine spezifische F-Primer/R-Primer und eine Taqman-Sonde entworfen. In mehreren Schritten wurden die Primerkonzentration und die Annealingtemperatur optimiert und die Eignung der Primer mittels Kreuzreaktivitätstests überprüft. Insgesamt wurden 25 verschiedene Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe auf Kreuzreaktivität getestet. Dabei wurden Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe verwendet, welche typischerweise mit Lupine verarbeitet werden. Dabei stellte sich heraus, dass das vorliegende Primerpaar spezifisch für Lupine ist.

Nach der Optimierung der Konzentrationen der Primer (F/R) und der Taqman-Sonde wurde bei der Analyse von seriell verdünnter Lupine-DNA eine Effizienz von 81,3% erhalten. Eine Verdünnung von 1:1000 konnte mit der vorliegenden Methode noch detektiert werden, was einer Nachweisgrenze von 20 pg DNA/ μ l entspricht.

Um die Anwendbarkeit des entwickelten Singleplex-Assays zu überprüfen, wurden 10 verschiedene kommerziell erhältliche Lebensmittel untersucht. Die Le-

bensmittel wurden so gewählt, dass lupinehaltige Lebensmittel und angeblich lupinefreie vertreten waren. In Produkten, in denen der Verdacht auf Lupine bestand, wurde keine Lupine detektiert und in Produkten ohne Hinweis auf Lupine wurde ebenfalls keine Lupine nachgewiesen, mit Ausnahme des Knabbergebäcks „Party Club“. Auch nach einer wiederholten Extraktion des Knabbergebäcks konnte Lupine detektiert wurde. Der c_t -Wert betrug bei beiden Analysen 32.

Da in der Literatur bekannt ist, dass Lupine Kreuzreaktivität mit Erdnuss zeigt, wurde auch ein Duplex-Assay zur simultanen Bestimmung von Lupine und Erdnuss entwickelt, wobei die Parameter des zuvor entwickelten Singleplex-Assays für Lupine als Grundlage dienten.

Um Erdnuss detektieren zu können, wurden Primer und eine Taqman-Sonde für das Allergen Oleosin entworfen und ihre Konzentration und die Annealingtemperatur optimiert. Kreuzreaktivitätstests zeigten, dass das entworfene Primerpaar spezifisch für Erdnuss war.

Um hohe Effizienzen für beide Template (Lupine und Erdnuss) zu erzielen, war eine Optimierung nötig, bei welcher die Annealingtemperatur im Vergleich zu dem Singleplex-Assay leicht modifiziert wurde und die Konzentrationen von Primern bzw. Taqman-Sonden geringfügig verändert wurden.

Mit seriell verdünnter Lupine- bzw. Erdnuss-DNA wurde im Duplex-Assay eine Effizienz von 114,1% für Lupine und 136,8% für Erdnuss ermittelt. 1:10000 verdünnte Lupine- bzw. Erdnuss-DNA konnte noch detektiert werden, was einer Nachweisgrenze von 2 ppb entsprach. Bei der Ermittlung der Effizienz in gespikten Lebensmitteln (Zwieback, Müsli) konnte für Lupine eine Effizienz von 96,2% und für Erdnuss von 87,8% ermittelt werden.

Für die Überprüfung der Anwendbarkeit des Duplex-Assays wurden 24 kommerziell erhältliche Lebensmittel analysiert. Es wurden Lebensmittel mit, ohne und mit Verdacht auf Spuren von Lupine und/oder Erdnuss verwendet.

In allen Proben, die laut Deklaration Erdnuss bzw. Lupine enthielten, konnten diese auch nachgewiesen werden. In Proben, die angeblich frei von Erdnuss

bzw. Lupine sind, konnten diese nicht nachgewiesen werden. In Proben, bei denen ein Verdacht auf Lupine bzw. Erdnuss bestand, wurden diese in manchen Proben nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der in dieser Arbeit entwickelte Duplex-Assay zum simultanen Nachweis von Spuren von Lupine bzw. Erdnuss in Lebensmitteln geeignet ist. Durch den gleichzeitigen Nachweis der beiden Allergene in einem Well können Zeit und Kosten für Reagentien gespart werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung, Optimierung und Validierung eines PCR basierten Singleplex-Assays zur Bestimmung von Lupine in Lebensmitteln, sowie der Entwicklung, Optimierung und Validierung eines PCR basierten Duplex-Assays zur simultanen Bestimmung von Lupine und Erdnuss in Lebensmitteln. Zum Entwerfen der Primer bzw. Taqman-Sonden wurde das für ein 43 kDa schweres Protein codierende Gen (Lupine) und das für das Allergen Oleosin codierende Gen (Erdnuss) verwendet.

Nach der Optimierung der Primerkonzentrationen bzw. der Taqmankonzentrationen sowie der Annealingtemperatur wurde die Kreuzreaktivität bestimmt. Die Entscheidung, ob Kreuzreaktivität vorlag, wurde mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse und falls nötig zusätzlich mittels Gelelektrophorese getroffen. Die entworfenen Primerpaare erwiesen sich als spezifisch für Lupine bzw. für Erdnuss. Für den Duplex-Assay mussten die Primer- und Taqmankonzentrationen sowie die Annealingtemperatur geringfügig verändert werden, um für beide Template (Lupine- und Erdnuss-DNA) hohe Effizienzen zu erzielen.

Die Effizienz der entwickelten Assays wurde einerseits mit seriell verdünnter DNA (1:1 bis 1:100000) und andererseits mit gespikten Lebensmitteln untersucht. Die Effizienz des Singleplex-Assays betrug mit seriell verdünnter DNA 81,3%. Die Nachweisgrenze betrug 2 pg/µl. Für den Duplex-Assay wurde eine Effizienz von 114,1% für Lupine-DNA und 136,8% für Erdnuss-DNA erhalten. In gespikten Lebensmitteln betrug sie 96,2% für Lupine bzw. 87,8% für Erdnuss. Die Nachweisgrenze betrug jeweils 100 ppm.

Im Anschluss an die Optimierung wurden 10 kommerziell erhältliche Lebensmittel mit dem entwickelten Singleplex-Assay und 24 kommerziell erhältliche Lebensmittel mit dem Duplex-Assay analysiert. In allen Produkten, welche laut Verpackungsangabe Lupine bzw. Erdnuss enthielten wurden diese auch nachgewiesen. In lupinefreien bzw. erdnussfreien Produkten wurde diese nicht detektiert, mit Ausnahme des Knabbergebäcks „Party Club“.

7 Summary

This diploma thesis describes the development, optimization and validation of a singleplex PCR assay for the detection of potentially allergenic lupine in food and the development, optimization and validation of a duplex PCR assay for the simultaneous detection of potentially allergenic lupine and peanut in food.

The primers and Taqman probes were designed for a gene coding for a 43 kDa protein (lupine) and the sequence coding for the allergen oleosin (peanut). The concentration of primers and Taqman probes were optimized, followed by testing the method for cross reactivity with common ingredients in lupine and/or peanut containing food. The cross reactivity was determined by melt curve analysis and gel electrophoresis. The selected primers were found to be specific for lupine and peanut and did not show any cross reactivities with the tested food ingredients.

For the duplex-assay, the concentration of the primers and Taqman probes and the annealing temperature had to be optimized again to achieve high amplification efficiency for both templates (lupine and peanut DNA).

The efficiency and the limit of detection of both methods were determined with serially (1:1 to 1:100000) diluted DNA and with spiked food samples. The efficiency of the singleplex-assay in serially diluted DNA was 81,3%. The limit of detection was 2 pg/ μ l. For the duplex-assay an efficiency of 114,1% for lupine and 136,8% for peanut, respectively, in serially diluted DNA were found. The efficiency in spiked food sample was 96,2% for lupine and 87,8% for peanut. The limit of detection for peanut and lupine was 100 ppm.

The applicability of the developed methods was tested with 10 commercial foodstuffs for the singleplex-assay and with 24 commercial foodstuffs for the duplex-assay. In all products with declaration of lupine and peanut, respectively, these could be detected. For products without lupine and/or lupine negative results were obtained, except the product "party club" which yielded a positive result.

8 Literaturnachweis

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2005): Lehrbuch der molekularen Zellbiologie; 3. Auflage; Wiley-VCH: 180-186; 244; 369-373

ASERO, R.; BALLMER-WEBER, B.K.; BEYER, K.; CONTI, A.; DUBAKIENE, R.; FERNANDEZ-RIVAS, M.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; LIDHOLM, J.; MUSTAKOV, T.; OUDE ELBERINK, J.G.; PUMPHRES, R.S.H.; STHAL-SKOV, P.; van REE, R.; VLIEG-BOERSTRA, B.J.; HILLER, R.; HOURIHANE, J.O.; KOWALSKI, M.; PAPADOPOULOS, N.G.; WAL, J.M.; MILLS, E.N.C.; VIETHS, S. (2007): IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives; Mol Nutr Food Res; Volume 51: 135-147

ATTAR, M.; LING, K-H.J.; TANG-LIU, D.D-S.; NEAMATI, N.; LEE, V.H.L. (2005): Rabbit lacrimal gland: glucocorticoid modulation and the impact on androgen metabolism; Invest Ophthalmol Vis Sci; Volume 46: 4697–4706

BERNHISEL-BROADBENT, J.; SAMPSON, H.A. (1989): Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity; J Allergy Clin Immunol; Volume 83: 435-440

BERNHISEL-BROADBENT, J.; TAYLOR, S.; SAMPSON, H.A. (1989): Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity II: Laboratory correlates; J Allergy Clin Immunol; Volume 84: 701-709

BESLER, M. (2001): Determination of allergens in food; TrAC; Volume 20: 662-672

Biorad Laboratories: www.bio-rad.com (Stand: 18.07.2009)

BURKS, W.; BALLMER-WEBER, B.K. (2006): Food allergy; Mol Nutr Food Res; Volume 50: 595-603

BURKS, W.; BANNON, G.A.; SICHERER, S.; SAMPSON, H.A. (1999): Peanut-induced anaphylactic reactions; Int Arch Allergy Immunol; Volume 119: 165-172

CORNELISSE-VERMAAT, J.R.; VOORDOUW, J.; YIAKOUMAKI, V.; THEODORIDIS, G.; FREWER, L.J. (2007): Food-allergic consumers' labelling preferences: a cross-cultural comparison; Eur J Public Health; Volume 18: 115-120

CREVEL, R.W.R; BALLMER-WEBER, B.K.; HOLZHAUSER, T.; HOURIHANE, J.O.B; KNULST, A.C.; MACKIE, A.R.; TIMMERMAN, F.; TAYLOR, S.L. (2008): Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders; *Allergy*; Volume 63: 597-609

CZARNOBILSKA, E.; OBTULOWICZ, K.; WSOLEK, K.; PRZEGLAD, L.; (2007): Type IV of hypersensitivity and its subtypes; *Przegląd Lekarski*; Volume 64: 506-508

DAHL, R.; (2006): Food safety: Allergen labeling takes effect; *Environ Health Perspect*; Volume 114: 24

DE GRUYTER, W. (2002): *Psychyrembel Klinisches Wörterbuch*; 259. Auflage; Berlin New York: 43

DE LAS MARINAS, D.; COJOCARIU, Z.; ESCUDERO, R.; PARDO, N.; SANZ M.L. (2007): Anaphylaxis induced by lupine as a hidden allergen; *J Investig Allergol Clin Immunol*; Vol. 17: 277-285

DEMMELE, A.; HUPFER, C.; HAMPE, E.I.; BUSCH, U.; ENGEL, KH. (2008): Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (*Lupinus Species*) in Food; *J Agric Food Chem*; Volume 56: 4328-4332

DORAK, M.T. (2006): Real-time PCR; Verlag: Taylor & Francis: 3-11; 47-51; 139ff

EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the evaluation of lupin for labelling purposes (Request Nr. EFSA-Q-2005-086); 2005; 302: 1-11

EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes (Request Nr. EFSA-Q-2003-016) 2004; 32: 1-197

EMMETT, S.E.; ANGUS, F.J.; FRY J.S.; LEE P.N. (1999): Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other household members; *Allergy*; Volume 54: 380-385

FAESTE, C.K.; LOVIK, M.; WIKER, H.G.; EGAAS, E. (2004): A case of peanut cross-allergy to flour in hot dog bread; *Int Arch Allergy Immunol*, Volume 135: 36-39

FOSS, N.; FRÖKIÆR, H. (2005): Lupin allergenicity explored in the cholera toxin model of food allergy. Proceedings of the final conference of the EU Project Healthy-Profood "Optimised processes for preparing healthy and added value food ingredients from lupin kernels, the European protein-rich grain legume"; Arnoldi A (Ed.). Aracne publ, Rome, 185-194.

German nut council: www.erdnuss-info.de (Stand: 18.07.2009)

HEFLE, S.L.; LEMANSKE, R.F.; BUSH, R.K. (1994): Adverse reaction to lupine-fortified pasta; *Allergy Clin Immunol*; Volume 94: 167-172

HIRD, H.; LLOYD, J.; GODDIER, R.; BROWN, J.; REECE, P. (2003): Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction; *Eur Food Res Technol*; Volume 217: 265-268

HOLDEN, L.; FAESTEN, C.K.; EGAAS, E. (2005): Quantitative sandwich ELISA for the determination of lupine (*Lupinus* spp.) in foods; *J Agric Food Chem*; Volume 53: 5866-5871

HOLDEN, L.; HAUGLAND MOEN, L.; SLETTEN, G.B.G.; DOOPER, M.M.B.W. (2007): Novel polyclonal-monoclonal-based ELISA utilized to examine lupine (*Lupinus* Species) content in food products; *J Agric Food Chem*; Volume 55: 2536-2542

HOLZHAUSER, T.; VIETHS, S. (1999): Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein in complex food matrices; *J Agric Food Chem*; Volume 47: 603-611

KANNY, G.; GUERIN, L.; MONERET-VAUTRIN, D.A. (2000): Risk of serious acute asthma due to lupin flour associated with peanut allergy; *Rev Med Interne*; Volume 21: 191-194

LÖFFLER, G.; PETRIDES, P.E. (1998): *Biochemie und Pathobiochemie*; 6. Auflage; Springer Verlag: 1081

MATISSEK, R. (2009): Reinheitskontrolle von Marzipan mittels molekularbiologischer Methoden; *Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.*

Metabion International AG: www.metabion.com (Stand: 22.07.2009)

MILLS, E.N.; VALOVIRTA, E.; MADSEN C.; TAYLOR, S.L.; VIETHS, S.; ANKLAM, E.; BAUMGARTNER, S.; KOCH, P.; CREVEL, R.W.; FREWER, L. (2004): Information provision for allergic consumers - where are we going with food allergen labelling?; *Allergy*; Volume 59: 1262-1268

MILLS, E.N.C.; SHEWRY, P.R. (2004): The classification, functions and evolutionary relationships of plant proteins in relation to food allergies; In: Plant food allergens. Mills ENC and Shewry PR (Eds.). Blackwell Publishing: 24-41

MONERET-VAUTRIN, D.A.; GUERIN, L.; KANNY, G.; FLABBEE, J.; FREMONT, S.; MORISSET, M. (1999): Crossallergenicity of peanut and lupin: the risk of lupin allergy in patients allergic to peanuts; Allergy Clin Immunol; Volume 104: 883-888

PATRIARCA, G.; SCHIAVINO, D.; PECORA, V.; LOMBARDO, C; POLLASTRINI, E.; ARUANNO, A.; SABATO, V.; COLAGIOVANNI, A.; RIZZI, A.; DE PASQUALE, T.; RONCALLO, C.; DECINTI, M.; MUSUMECI, S.; GASBARRINI, G.; BUONOMO, A.; NUCERA, E. (2009): Food allergy and food intolerance: diagnosis and treatment; Intern Emerg Med; Volume 4: 11-24

PEETERS, K.A.B.M.; NORDLEE, J.A.; PENNINKS, A.H.; LINGYUN, C.; GOODMAN, R.E.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A.F.M.; HEFLE, S.L.; TAYLOR, S.L.; KNULST, A.C. (2007): Lupine allergy: Not simply cross-reactivity with peanut or soy; J Allergy Clin Immunol; Volume 120: 647-653

POMS, R.E.; KLEIN, C.L.; ANKLAM, E. (2004): Methods for allergen analysis in food: a review; Food Addit Contam; Volume 21: 1-31

PONS, L.; CHERY, C.; ROMANO, A.; NAMOUR, F.; ARTESANI, M.C.; GUÉANT, J.L. (2002): The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts; Allergy; Volume 57: 88-93

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

RICHTLINIE 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. März 2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften vom 6. Mai 2000.

RICHTLINIE 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angaben der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten. Amtsblatt der Europäischen Union vom 25. November 2003.

RICHTLINIE 2007/68/EG DER KOMMISSION vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten. Amtsblatt der Europäischen Union vom 28. November 2007.

ROJAS-HIJAZO, B.; GARCE'S, M.M.; CABALLERO, M.L.; ALLOZA, P.; MONEO, I. (2006): Unsuspected lupin allergens hidden in food; *Int Arch Allergy Immunol*; Volume 141: 47–50

SCARAFONI, A.; RONCHI, A.; DURANTI, M. (2009): A real-time PCR method for the detection and quantification of lupin flour in wheat flour-based matrices; *Food Chem*; Volume 115: 1088-1093

SCARAVELLI, E.; BROHÉE, M.; MARCHELLI, R.; van HENGEL, A.J. (2007): Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products; *Eur Food Res Technol*; Volume 227: 857-869

SCHÄPPI, G.F.; KONRAD, V.; IMHOF, D.; ETTER, R.; WÜTHRICH, B. (2001): Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures; *Allergy*; Volume 56: 1216-1220

SHAW, J.; ROBERTS, G.; GRIMSHAW, K.; WHITE, S.; HOURIHANE, J. (2008): Lupine allergy in peanut-allergic children and teenagers; *Allergy*; Volume 63: 370-373

SICHERER, S.H. (2001): Clinical implications of cross-reactive food allergens; *J Allergy Clin Immunol*; Volume 108: 881-890

SICHERER, S.H.; MUÑOZ-FURLONG, A.; BURKS, A.W.; SAMPSON, H.A. (1999): Prevalence of peanut and nut allergy in the United States of America determined by a random digit dial telephone survey; *J Allergy Clin Immunol*; Volume 103: 559-562

SMITH, W.B.; GILLIS, D.; KETTE, F.E. (2004): Lupine: a new hidden food allergen; *MJA*; Volume 181(4): 219-220

STEPHAN, O.; VIETHS, S. (2004): Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amount of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed food; *J Agric Food Chem*; Volume 52: 3754-3760

THEWS, G.; MUTSCHLER, E.; VAUPEL, P. (2007): *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*; 6. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 179-181

WEIDMANN, M.; ARMBRUSTER, K.; HUFERT, F.T. (2008): Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay für the simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus; *J Clin Virol*; Volume 42: 326-334

WÜTHRICH, B. (2009): Food allergy, food intolerance or functional disorder?; Praxis: Schweizerische Rundschau für Medizin; Volume 98(7): 375-387

www.foodallergens.info/Legal/Labelling/Labelling.html (Stand: 18.07.2009)

www.metabion.com (Stand: 17.07.2009)

YÁÑEZ, E.; GATTAS, V.; BALLESTER, D. (1979): Nutritive value of lupin and its potential as human food; Arch Latinoam Nutr; Volume 29: 510-520

YANG, S.; ROTHMAN, R.E. (2004): PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings; Lancet Infect Dis; Volume 4: 337–48

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Walter Pulverer
Geburtsdatum	23. Februar 1984
Geburtsort	Rottenmann, Steiermark
Familienstand	ledig, keine Kinder
Familie	Mutter: Marianne Pulverer Vater: Josef Pulverer

Ausbildung

seit Wintersemester 2009	Beginn der Dissertation am Austrian Institut of Technology – Seibersdorf (vormals Austrian Research Centers)
Oktober 2004- Oktober 2009	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
Juni 2003	Matura mit Schwerpunkt in Mathematik und Volkswirtschaft
1998-2003	Handelsakademie Liezen, Steiermark mit dem Schwerpunkt Wirtschaftsinformatik und Betriebsorganisation
1994-1998	Technische Hauptschule Trieben, Steiermark
1990-1994	Volksschule Trieben, Steiermark

Weiterbildung

Juni 2002	SAP Grundkurs im Ausmaß von 34 Stunden
-----------	--

Tätigkeiten

Oktober 2009- Februar 2010	Wissenschaftliches Universitätspersonal Tätigkeit als Tutor am Institut für analytische Chemie und Lebensmittelchemie
März 2009- Juni 2009	Wissenschaftliches Universitätspersonal Tätigkeit als Tutor am Institut für organische Chemie
Februar 2009- August 2009	Tätigkeit als Springer in der Firma Radlberger Getränke GmbH & Co. als Laborant in der Qualitätssicherung
Februar 2009	Praktikum bei den Austrian Research Centers in der Abteilung Toxikologie
Juni 2004- September 2004	Ferialjob bei Firma „Holz Koidl – Paletten & Kisten Erzeugung“ zur Überbrückung bis zum Beginn des Studiums
September 2003- April 2004	Präsenzdienst in Aigen/Ennstal
Juli 2003- August 2003	Ferialjob bei Firma „Holz Koidl – Paletten & Kisten Erzeugung“ zur Überbrückung bis zum Beginn des Präsenzdienstes

Wissenschaftliche Arbeiten

24.-27. August 2009	13. Österreichische Chemietage 2009, Wien Posterpräsentation: "Development of a duplex real-time PCR method to detect potentially allergenic peanut and lupine in food" [<u>W. Pulverer</u> , S. Niedermeyer, M. Cichna-Markl]
---------------------	--

Besondere Kenntnisse

Fremdsprachen:	Englisch inklusive Wirtschaftsenglisch bzw. Korrespondenz
Software:	MS Office (inkl. Access) – überdurchschnittliches Niveau
	SAP – Grundkenntnisse
	Chem Sketch (chemisches Zeichenprogramm) – gute Kenntnisse
	DGE-Ernährungsprogramm – gute Kenntnisse
	iQ5 (Software für PCR-Anwendungen [Biorad]) – sehr gute Kenntnisse
	Beacon Designer (Software für Primer- bzw. Taqman-Modellierung) – sehr gute Kenntnisse
	sowie alle gängigen Internetbrowser
	Reference Manager (Literaturverwaltung) – Grundkenntnisse
	R (Programm für statistische Auswertungen) – Grundkenntnisse
	Array Tools (Programm zur Auswertung von Microarrays) – gute Kenntnisse
Führerschein:	Klasse B
Sonstige Fähigkeiten:	Maschinschreiben mit ca. 340 Anschlägen/Minute

Hobbys

Mountainbike/Radfahren
Lesen
Wandern
gutes Essen