



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln mittels
hochauflösender Schmelzkurvenanalyse“

verfasst von / submitted by

Michaela Wildbacher, BSc

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

Wien, 2023 / Vienna 2023

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

UA 066 659

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

Masterstudium Lebensmittelchemie UG

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei meiner Betreuerin Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl bedanken, dass Sie mich in ihrem Team aufgenommen und bei allen Anliegen unterstützt hat. Durch ihre Betreuung konnte ich viel Neues lernen.

Weiters möchte ich mich bei Katharina Pühringer für die Einführung und stetige Unterstützung bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern der AGES, Mag. Rupert Hochegger und Dr. Stefanie Dobrovolny vom Institut für Lebensmittelsicherheit Wien, für die Bereitstellung der Insekten DNA-Extrakte und Primer bedanken, ohne die die Durchführung diese Masterarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein weiteres Dankeschön gilt unseren Kooperationspartnern Assoc.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Barbara Siegmund der Universität Graz, und Dr. Thomas Rühmer vom Amt der Steiermärkischen Landesregierung, A10 Land- und Forstwirtschaft, Referat Versuchsstation Obst- und Weinbau Haidegg, welche Äpfel, Apfelsaft und Apfelmost zur Verfügung gestellt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner gesamten Studienzeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Insekten	7
1.1.1	Insekten als Lebensmittel.....	8
1.1.2	Identifizierung von Insekten in Lebensmitteln	9
1.2	Äpfel	11
1.2.1	Zusammensetzung des Apfels	11
1.2.2	Nicht DNA basierte Analysemethoden verschiedener Apfelsorten	12
1.2.3	DNA basierte molekulare Marker Systeme	13
1.2.4	Simple sequence repeat (SSR) Marker	13
1.2.5	Einsatz von SSRs zur Bestimmung der Authentizität von Lebensmitteln.....	14
2	Ziele	15
3	Theorie.....	16
3.1	Fluorimetrie.....	16
3.2	Agarosegelelektrophorese	16
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
3.3.1	Prinzip der PCR	17
3.3.2	Real-time PCR (qPCR)	19
3.4	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM).....	20
3.4.1	Evaluierung von HRM Ergebnissen.....	22
4	Experimenteller Teil	24
4.1	Sauberkeit.....	24
4.2	Proben	24
4.2.1	Insektenproben	24
4.2.2	Apfelproben.....	25
4.3	DNA-Extraktion.....	27
4.3.1	Optimierung	27
4.3.2	Hauptprotokoll	27
4.4	Konzentrationsbestimmung der DNA-Extrakte.....	28
4.5	PCR HRM Analyse	29
4.5.1	Primerpaare.....	29
4.5.2	PCR HRM am Rotorgene.....	30
4.5.3	PCR HRM Optimierung am Quantstudio	32
4.6	Agarosegelelektrophorese	33

5	Ergebnisse und Diskussion	34
5.1	Unterscheidung von Insektenspezies	34
5.1.1	PCR HRM mit zwei Primern (Ins_fw, Ins_rev)	34
5.1.2	Verbesserung der Amplifikation durch MgCl ₂ Zugabe	36
5.1.3	Unterscheidung zum Verzehr zugelassener und nicht zugelassener Spezies	39
5.1.4	Optimierung der Amplifikation	41
5.1.5	PCR HRM Analyse zur Unterscheidung von Heimchenproben von Kurzflügelgrille und Wüstenheuschrecke	42
5.1.6	Einsatz artifizierter Sequenzen zur Änderung der Schmelzkurven von Heimchenproben.....	44
5.1.7	PCR HRM mit artifizierter Sequenz unter Einsatz von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_rev_2)	45
5.1.8	Überprüfung der Länge der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese	50
5.1.9	Unterscheidbarkeit der Insektenspezies mit drei Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw/rev_1)	52
5.1.10	Optimierung der Primerkonzentrationen	54
5.1.11	PCR HRM mit optimiertem Primerset aus vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1)	57
5.1.12	Einsatz artifizierter Sequenzen in erhöhter Konzentration.....	58
5.1.13	Einsatz neuer Primer zur Änderung der Schmelzkurven der Wanderheuschrecke	62
5.1.14	Optimierte PCR HRM Methode mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1).....	65
5.1.15	Optimierte PCR HRM Methode aller nicht zum Verzehr zugelassenen Spezies	67
5.1.16	Optimierte PCR HRM Methode aller zum Verzehr zugelassenen Spezies	69
5.2	Unterscheidung von Apfelsorten	71
5.2.1	Überprüfung der Eignung noch nicht getesteter Primerpaare	71
5.2.2	Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte der Blattextrakte	80
5.2.3	Anwendbarkeit der PCR HRM auf Äpfel und apfelhaltige Lebensmittel.....	89
5.2.4	Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte von Fruchtfleisch, Saft und Most	104
6	Conclusio	108
7	Materialien	110
7.1	Chemikalien und Kits	110
7.2	Verbrauchsmaterialien.....	110
7.3	Instrumente.....	111
7.4	Software	111
7.5	Webserver	111

8	Quellen	112
9	Anhang.....	116
9.1	Abstract	116
9.2	Zusammenfassung.....	117
9.3	Abkürzungsverzeichnis	118
9.4	Liste der Tabellen	119
9.5	Liste der Abbildungen.....	120
9.6	Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Extrakte	127
9.7	Liste der Primerpaare, die zur Differenzierung von Apfelsorten mittels PCR HRM verwendet wurden	130

1 Einleitung

Ein Lebensmittel gilt als authentisch, wenn das Produkt mit den Angaben auf dem Etikett übereinstimmt und es frei von Verfälschungen ist (Abbas et al., 2018; EuropeanCommission(a)). Die Kennzeichnung von Lebensmitteln ist wichtig, um Verbraucher zu informieren, welche Art von Produkten sie kaufen und konsumieren. Es existieren EU-weite Vorschriften für die Kennzeichnung, Aufmachung und Werbung von Lebensmitteln. Eine Initiative des Europäischen Parlaments hat festgestellt, dass vor allem bestimmte Produkte wie Olivenöl, Fisch, Honig, Milchprodukte und Fleisch Ziel betrügerischer Aktivitäten sind (EuropeanCommission(b)).

Die Rechtsgrundlage zu Bekämpfung von Lebensmittelverfälschungen ist in Artikel 8 der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 ("Allgemeines EU-Lebensmittelrecht") geregelt. Für einige besonders häufig von Betrug betroffene Lebensmittel, wie z.B. Olivenöl, Wein, Fruchtsäfte und Honig gibt es spezifische Vorschriften zur Überprüfung der Authentizität. Für andere Produkte existieren noch keine Richtlinien, weshalb die Beurteilung der Lebensmittel und die Sicherstellung der Einhaltung der gesetzlichen Vorschriften eine Schwierigkeit darstellt (EuropeanCommission(a); Spink & Moyer, 2011).

Verfälschungen betreffen häufig Angaben der Zusammensetzung, Art, Sortenreinheit, geografische Herkunft und Herstellungsmethode der Produkte. Um den Betrug und die Verfälschung von Lebensmitteln aufzudecken, werden verschiedene Methoden zu Authentizitätsprüfungen angewendet. Es existiert eine Reihe von analytischen Methoden, welche Produkte hinsichtlich deren Zusammensetzung, Reinheit, Herkunft und Herstellung unter die Lupe nehmen. Vor allem im Fall von verarbeiteten Produkten kann die Analytik eine Herausforderung darstellen und manche Fragestellungen können kaum oder bisher noch gar nicht beantwortet werden (Abbas et al., 2018). Es werden also empfindliche Analysemethoden zur Überprüfung der Lebensmittel benötigt. DNA-basierte Methoden spielen aufgrund der Stabilität der DNA eine immer größere Rolle im Nachweis von Verfälschungen. Die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (High Resolution Melting, HRM), welche auf dem Schmelzverhalten doppelsträngiger DNA basiert, stellt eine Methode zur Kontrolle der Lebensmittelsicherheit dar und diente in dieser Masterarbeit der Unterscheidung von Spezies und Sorten (Druml & Cichna-Markl, 2014).

In dieser Masterarbeit sollte die Authentizität von Lebensmitteln mittels PCR HRM Analyse überprüft werden. In einer Fragestellung sollten Insekten, welche aufgrund der Zulassung neuer Spezies aktuell stark in den Medien vertreten sind unterschieden werden. Ein weiteres Ziel war die Differenzierung von Apfelsorten.

1.1 Insekten

In den letzten Jahren erhielten Insekten als Nahrungs- und Futtermittel zunehmend Aufmerksamkeit. Aufgrund steigender Kosten für tierisches Eiweiß, Nahrungsunsicherheit, Umweltbewusstsein der Bevölkerung und Bevölkerungswachstum stehen alternative Proteinquellen im Vergleich zu konventionellen Nutztieren hoch im Kurs (Huis et al., 2013).

Der Verzehr von Insekten wird als Entomophagie bezeichnet und wurde bereits in der biblischen Literatur erwähnt. In vielen Teilen der Welt ist der Verzehr von Insekten zur heutigen Zeit kein neues Konzept. Mindestens zwei Milliarden Menschen weltweit verzehren regelmäßig Insekten, wobei 2111 Insektenarten in der Literatur als essbar geführt werden (Stand April 2017) (Huis et al., 2013; Jongema). Die am häufigsten zum Konsum genutzten Insektengruppen sind Käfer, Raupen, Bienen, Wespen, Ameisen, Heuschrecken, Grillen, Zikaden, Blatt- und Pflanzenzikaden, Schuppeninsekten und echte Käfer, Termiten, Libellen und Fliegen (Huis et al., 2013).

In großen Teilen der westlichen Gesellschaft stellt die Entomophagie jedoch bis heute noch ein Tabu-Thema dar. Insekten werden hier als Belästigung angesehen und können als Krankheitsüberträger fungieren (Rozin & Fallon, 1987). Die Einbindung von Insekten in die Nahrung bietet jedoch ökologische als auch ernährungsbezogene Vorteile im Vergleich zum Konsum von bereits domestizierten Tieren. Die Ernährung der wachsenden Weltbevölkerung wird zwangsläufig hohen Druck auf bereits begrenzte Ressourcen wie Land, Wasser und Energie ausüben, weshalb alternative Lösungen gefragt sind. Insekten weisen eine hohe Futterumwandlungseffizienz auf. Das ist die Fähigkeit, Futter in eine erhöhte Körpermasse umzuwandeln (Huis et al., 2013). Grillen benötigen beispielsweise weniger als zwei Kilogramm Futter pro Kilogramm Körpergewichtszunahme (Collavo et al., 2005). Im Vergleich dazu benötigen Hühner zweieinhalb, Schweine fünf und Rinder zehn Kilogramm Futtermittel (Smil, 2002). Die Verwertung der Tiere spielt auch eine Rolle, da nur rund 55 Prozent eines Huhns, beziehungsweise 40 Prozent eines Rinds verzehrt werden können, verglichen mit einer Grille, welche zu rund 80 Prozent verwertet werden kann. Weiters emittieren Insekten kaum Treibhausgase und Ammoniak, sie benötigen weniger Wasser als beispielsweise die Rinderaufzucht und stellen ein geringes Risiko für die Übertragung zoonotischer Infektionen dar (Huis et al., 2013).

Neben den ökologischen Vorteilen sollte man auch einen Blick auf nährwertbezogene Aspekte werfen. Aufgrund der Vielzahl an Arten, unterschiedlichen Metamorphosestadien, Lebensräumen und Ernährungsweisen variieren die Nährwerte essbarer Insekten sehr stark (Huis et al., 2013). Eine Studie untersuchte Proteingehalte von Insekten und ermittelte Proteingehalte von 13 bis 77 Prozent in der Trockenmasse (Chen et al., 2008). Nichtsdestotrotz weisen Insekten einen hohen Proteingehalt auf, wodurch sie bei der Erhöhung des Proteingehalts der Nahrung eine wichtige Alternative zu anderen tierischen Proteinen darstellen können (Huis et al., 2013). Essbare Insekten stellen auch eine wichtige Fettquelle dar. Sie sind reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und enthalten häufig die essenzielle Linolsäure und α -Linolensäuren (Womeni et al., 2009). Die Zusammensetzung von ungesättigten Omega-3- und -6-Fettsäuren in Mehlwürmern ist beispielsweise vergleichbar mit denen in Fisch und ist höher als in Rindern und Schweinen (Huis et al., 2013). Insekten gelten ebenfalls als gute Eisen- und Zinkquelle, wodurch Eisenmangel, welche eine der weltweit verbreitetsten Ernährungsstörungen darstellt, entgegengewirkt werden könnte (FAO/WHO, 2001). Sie sind außerdem ballaststoffreich, wobei die mengenmäßig häufigste Faser in Insekten das Chitin ist (Huis et al., 2013). Insekten werden entweder wild geerntet oder in einer domestizierten Umgebung aufgezogen und anschließend entweder gefriergetrocknet, sonnengetrocknet oder gekocht. Es ist möglich, sie als ganzes Insekt oder in gemahlener Form zu verzehren, als auch Extrakte aus Eiweiß, Fett oder Chitin zu verwenden (Huis et al., 2013).

1.1.1 Insekten als Lebensmittel

In der EU unterliegt die Insektenaufzucht als menschliches Nahrungsmittel der Europäischen Novel Foods Regulation (Regulation (EC) No.258/97) (Huis et al., 2013). Bisher wurden erst vier Insektenspezies als Nahrungsmittel zugelassen, der gelbe Mehlwurm (*Tenebrio molitor*) im Mai 2021, die Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) im November 2021, das Heimchen (*Acheta domesticus*) im Februar 2022 und der Buffalowurm (*Alphitobius diaperinus*) im Januar 2023. Die Anträge für die Zulassung der tropischen Hausgrille, der Honigbienendrohnbrut und der Larve der schwarzen Soldatenfliege sind eingereicht und werden geprüft (EuropeanCommission(c)).

Der Mehlwurm ist das erste in der EU zum Verzehr zugelassene Insekt. Der Begriff bezieht sich auf die Larvenform von *Tenebrio molitor*, welche zur Familie der *Tenebrionidae* (Finsterkäfer) zählt. Heutzutage ist der Mehlwurm in allen Regionen der Welt vertreten, ursprünglich stammt die Insektenspezies jedoch aus dem östlichen Mittelmeerraum. Als Novel Food ist der Mehlwurm als ganzes getrocknetes Insekt oder als Pulver des getrockneten Insekts erhältlich. Larven des *Tenebrio molitor* enthalten einen durchschnittlichen Rohproteingehalt von 58,4 g pro 100 g Insekt. Diese Werte sind aufgrund des hohen Nicht-Protein-Stickstoffs, hervorgerufen durch den hohen Chitingehalt, leicht erhöht, da die Messung mit der Kjeldahl-Methode auf einem Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor von 6,25 basiert. Für den gelben Mehlwurm wurde ein Umrechnungsfaktor von 4,76 vorgeschlagen, womit der wahre Rohproteingehalt bei 44,5 g pro 100 g Insekt liegt (Turck, Castenmiller et al., 2021).

Die Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) gehört zur Familie der Feldheuschrecken (*Acrididae*) und ist in gefrorener, getrockneter oder Pulverform erhältlich. Diese Insektenart ist in weiten Regionen der Erde präsent, darunter Australien, Asien, Afrika und Europa. Der Energiewert von *L. migratoria* beträgt durchschnittlich 690 kJ pro 100 g in getrockneter, 2250 kJ pro 100 g in gefrorener und 2350 kJ pro 100 g Pulverform. Der Rohproteingehalt liegt beim getrockneten Tier bei 14,4 g pro 100 g, beim gefrorenen Tier bei 48,6 g pro 100 g und beim pulverisierten Tier bei 55,0 g pro 100 g. Diese Werte könnten aufgrund des hohen Nicht-Protein-Stickstoffs, hervorgerufen durch den hohen Chitingehalt, wie bereits am Beispiel des Mehlwurms erklärt, leicht erhöht sein. Der wahre Proteingehalt liegt laut European Food Safety Authority (EFSA) etwa 15% darunter. Im Protein der Wanderheuschrecke sind alle essenziellen Aminosäuren im Rahmen der von der Food and Agriculture Organisation (FAO) empfohlenen Mengen vorhanden. In der Pulverform der *L. migratoria* stellen Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Alpha-Linolensäure den größten Anteil an Fettsäuren dar. Das Fettsäureprofil zeigt 38,2 % gesättigte, 39,9 % ungesättigte und 21,9 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren auf, mit einem Transfettsäuregehalt von 0,4 % (Turck, Castenmiller, et al., 2021).

Das Heimchen (*Acheta domesticus*), oder auch Hausgrille genannt, gehört der Familie der Echten Grillen (*Gryllidae*) an. Seit Anfang 2022 kann es in blanchierter gefrorener-, blanchierter gefriergetrockneter- und gefriergetrockneter gemahlener Form vermarktet werden. Gefrorenes Heimchen enthält im Schnitt 15,1 g Rohprotein pro 100 g, beziehungsweise 60,3 g pro 100 g in getrockneter Form. Auch bei diesem Novel Food liegt der wahre Rohprotein Wert etwa 11 % unter diesen Berechnungen. Alle essenziellen Aminosäuren, inklusive der schwefelhaltigen Aminosäuren, sind in ähnlicher oder höherer Menge enthalten als von der FAO empfohlen. Palmitinsäure, Linolsäure und Ölsäure stellen die Hauptfettsäuren von *A. domesticus* dar. Durchschnittlich machen gesättigte, einfach ungesättigte Fette und mehrfach ungesättigte Fettsäuren 40,8 %, 28,9 % beziehungsweise 30,3

% der gesamten Fettsäuren aus. Der Transfettsäuregehalt der Hausgrille liegt bei 0,6 % (Turck, Bohn, et al., 2021).

Der Begriff Buffalowurm bezieht sich auf die Larvenform des Glänzendschwarzen Getreideschimmelkäfers (*Alphitobius diaperinus*), welcher der Familie der Schwarzkäfer (*Tenebrionidae*) angehört. Als Novel Food zulässig ist der Buffalowurm in gefrorener und gefriergetrockneter Form als Ganzes, in Form einer Paste oder eines Pulvers. Die gefrorene Paste eines Buffalowurms in Verwendung als Novel Food enthält im Schnitt 18,5 g Rohprotein pro 100 g und getrocknetes Pulver weist 61,0 g Rohprotein pro 100 g auf. Auch der Buffalowurm weist einen hohen Chitingehalt auf, weshalb der Proteingehalt, wie bereits erwähnt wurde, überschätzt wird. Nach Anpassung enthält eine gefrorene Paste des Buffalowurms 14,4 g Rohprotein pro 100 g und getrocknetes Pulver 47,5 g Rohprotein pro 100 g. Das Protein der Larve des *A. diaperinus* enthält ebenfalls alle essenziellen Aminosäuren. Die Hauptfettsäuren dieses Novel Foods stellen die Ölsäure, Linolsäure und Palmitinsäure dar. Durchschnittlich enthalten die Larven des Glänzendschwarzen Getreideschimmelkäfers 34,5 % gesättigte-, 33,2 % einfach ungesättigte-, 32,4 % mehrfach ungesättigte- und 0,8 % Transfettsäuren (Turck, Bohn, et al., 2022).

1.1.2 Identifizierung von Insekten in Lebensmitteln

Es existieren bereits PCR-Tests im Singleplex- und Multiplex-Format zur Identifizierung von Insekten. Die Anzahl der nachweisbaren Insekten ist jedoch noch gering, da nur eine geringe Zahl an Nachweismethoden für Insekten in Lebensmitteln existiert. Hier ist es wichtig, dass die entsprechende Methode in der Lage ist, stark verarbeitete Lebensmittel zu analysieren. Oftmals ist das entworfene Primersystem nicht optimal für verarbeitete Produkte, da es meist zu lange PCR-Produkte bildet (Hillinger et al., 2023).

Köppel et al. haben eine Multiplex-Echtzeit-PCR-Methode zum allgemeinen Nachweis von Insekten-DNA und speziell zur Identifizierung des Mehlwurms, der Wanderheuschrecke und des Heimchens entwickelt. Es wurden 15 weitere Insektenspezies, Pflanzenspezies und weitere Tierspezies auf Kreuzreaktivität überprüft. Zusätzlich wurden mit Insekten-DNA versetzte Hamburger und Kekse und zahlreiche Produkte aus dem Handel, welche keine Insekten-DNA enthalten sollten, analysiert. Die Primer für die drei im Fokus der Studie stehenden Insektenspezies zeigten keine Kreuzreaktivität zu anderen Insekten- und Pflanzenspezies und kaum Kreuzreaktivität zu anderen Tierspezies. Im Handel erhältliche Produkte führten teilweise zu positiven Ergebnissen, welche jedoch nur auf Spuren von Insekten-DNA hinweisen, wodurch die Kontamination der Produkte mit Insekten-DNA vernachlässigt werden kann. Das entworfene PCR-System ist zur Unterscheidung der getesteten Insektenspezies und Analyse verschiedener Lebensmittel, welche möglicherweise mit Insekten-DNA kontaminiert sind, geeignet. Die quantitativen Ergebnisse müssen jedoch mit Vorsicht interpretiert werden (Köppel et al., 2019).

Eine Studie von Hillinger et. al befasste sich mit Methoden der Barcode-Sequenzierung, um Insektenspezies in Lebensmitteln zu differenzieren. Ein sogenannter „Barcode“ besteht aus konservierten Regionen an beiden Enden und einem variablen Teil zwischen den Primerbindungsstellen, die für die Unterscheidung der Arten wichtig sind. Es wurden relative kurze PCR-Produkte von einer Länge von 200 Basenpaaren (bp) verwendet, um Insektenarten in stark verarbeiteten Lebensmitteln zu unterscheiden. In der Studie von 2023 wurde das DNA-Barcoding mit Next Generation Sequencing kombiniert, um die Effizienz der Methode zu steigern. Diese Methode

ermöglicht es, eine große Anzahl von Spezies gleichzeitig zu erfassen und über Referenzsequenzen zu identifizieren. Vier forward und drei reverse Primer wurden auf ihre Amplifikationseffizienz getestet und ein Primer Paar (Fwd-I-3, Rev-I-1) wurde aufgrund der Länge seiner PCR-Produkte als optimal angesehen. Die Anwendbarkeit der neuartigen DNA-Metabarcodingmethode wurde durch die Analyse einzelner DNA-Extrakte aus Referenzproben, neun hitzebehandelten Modelllebensmitteln sowie DNA-Extrakten aus 38 im Handel erhältlichen Lebensmitteln untersucht. Die Analyse der getesteten Proben zeigte, dass die Methode zur Identifizierung von Insekten geeignet ist. Ein limitierender Faktor dieser Methode ist der Mangel an Sequenziergeräten in Laboren, weshalb in dieser Masterarbeit die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse die Methode der Wahl war (Hillinger et al., 2023). Das von Hillinger et. al verwendete Primerpaar wurde in dieser Masterarbeit auf seine Anwendbarkeit auf die PCR HRM Analyse getestet.

1.2 Äpfel

Der Apfel (*Malus*) ist eine Gattung der Unterfamilie der *Maloideae* (Kernobstgewächse), gehört zur Familie der *Rosaceae* (Rosengewächse), Tribus *Pyreae* und zählt heute aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung und seines Reichtums an Nährstoffen zu den wichtigsten Nutz- und Kulturpflanzen. Im Jahr 2018 lagen Äpfel mit einer weltweiten Produktion von 86 Millionen Tonnen an zweiter Stelle der produzierten Obstsorten. Seit dem Jahr 2000 ist die weltweite Apfelproduktion um 51,1 % gestiegen, verglichen dazu betrug das Wachstum der Weltbevölkerung 25,8 %. Der Kulturapfel *Malus x domestica* Borkh. kann Temperaturen zwischen -30 °C bis zu 40 °C standhalten und wird in 96 Ländern angebaut (Lubic, 2003; März, 2012; Vasylieva & Harvey, 2021).

Die Geschichte des Apfels reicht lange zurück, schon vor 65 bis 70 Millionen Jahren wuchsen Äpfel in Südostasien. Man nimmt an, dass der heutige Kulturapfel dem asiatischen Wildapfel (*Malus sieversii*) entstammt. Im 16. Jahrhundert wurde der Apfel zum ersten Mal zum Verkauf angebaut und bekam dadurch eine wirtschaftliche Bedeutung. Die gezielte Züchtung und Kreuzung von Apfelsorten begannen erst im 19. Jahrhundert. Hier entstanden durch Züchtung der „alten“ Apfelsorten, welche bereits vor der gezielten Züchtung existierten, „neue“ Sorten (März, 2012).

Das Genom des *Malus domestica* besteht aus 17 Chromosomen, die meisten sind diploid ($2n = 34$) oder auch triploid ($3n = 51$) (Hanke & Flachowsky, 2017).

Pyreae gehören zur Pflanzenfamilie der *Rosaceae*. Die meisten *Rosaceae* besitzen jedoch haploide Chromosomenzahlen von sieben, acht oder neun Chromosomen. Eine genomweite Duplikation hat beim Kulturapfel zu einem Übergang von neun auf 17 Chromosomen geführt (Velasco et al., 2010).

1.2.1 Zusammensetzung des Apfels

Der Nährwert und der Anteil der im Apfel vorhandenen Nährstoffe ist abhängig von der Sorte und äußeren Faktoren wie Klima, Bodenbeschaffenheit, Düngung und Erntetermin. Ein Apfel besteht zum größten Teil aus Wasser (85,3 %) und weist im Schnitt einen Energiegehalt von 50 kcal pro 100 g auf. Fructose macht mit etwa 5738 mg pro 100 g Apfel den größten Anteil der Kohlenhydrate aus, gefolgt von Saccharose, Glucose, Stärke und Sorbit (März, 2012).

Die unverdaulichen Kohlenhydrate, auch Ballaststoffe genannt, kommen in Form von Cellulose, Hemicellulosen, Pektine, polymeren Fructanen, Pflanzengummis und Pflanzenschleimen vor (März, 2012). Die Zusammensetzung der Ballaststoffe in der Trockenmasse von Äpfeln liegt bei 40 % wasserunlöslicher Cellulose, 19 % wasserlöslicher Hemicellulose, 15 % Lignin, 9 % wasserunlöslichem Pektin und 4 % wasserunlöslicher Hemicellulose (McKee & Latner, 2000). Der viskose Zellwandbestandteil Pektin hat für den Apfel eine wichtige Bedeutung. Hochveresterte Pektine (Veresterungsgrad über 70 %) werden in der Industrie als Gelbildner eingesetzt, gering veresterte Pektine übernehmen häufig die Funktion eines Geliermittels, beispielsweise in energiereduzierten Lebensmitteln. Pektin wird im oberen Gastrointestinaltrakt aufgrund fehlender Enzyme nicht abgebaut, wodurch seine physiologische Wirkung im Dünndarm entsteht. Der am stärksten im Apfel vertretene Ballaststoff Cellulose ist für den Menschen aufgrund des fehlenden Enzyms D-Glucosidase ebenfalls unverdaulich und begünstigt dadurch die Darmperistaltik (Grosch et al., 2007; März, 2012). Vitamine zählen zu den organischen Bestandteilen des Apfels und müssen vom Menschen mit der Nahrung aufgenommen werden. Der Apfel ist reich an Vitaminen, am stärksten vertreten ist das Vitamin C, welches in Konzentrationen von 2 - 25 mg pro 100 g vorkommt. Weitere wasserlösliche

Vitamine des Apfels sind Vitamin B2, B6, B1, Nicotinamid, Pantothensäure, Biotin und Folsäure. Die fettlöslichen Vitamine A, E und K kommen ebenfalls vor (März, 2012).

Mineralstoffe wie Kalzium, Magnesium, Phosphor, Chlorid, Natrium und Kalium runden den Nährstoffreichtum des Apfels ab. Besonders Kalium, welches wichtig für das Nerven- und Muskelgewebe ist, ist reichlich im Apfel vorhanden (Grosch et al., 2007; März, 2012).

Neben den Kohlenhydraten haben auch die Fruchtsäuren einen großen Einfluss auf das Aroma des Apfels. Apfelsäure macht den größten Anteil der organischen Säuren im Apfel aus, gefolgt von der Chinasäure und Zitronensäure. Säuregehalt und Zusammensetzung sind von Standort, Klima und Sorte abhängig. Zusätzlich beeinflussen Aromastoffe den Geschmack der Früchte, dessen Einzelkomponenten auch nach längerer Lagerung gut erhalten bleiben (März, 2012).

Zu den wichtigsten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen des Apfels zählen Glucosinolate, Sulfide, Carotinoide (vor allem β -Carotin), Phytosterine, Phytinsäure und Polyphenole. Für den Menschen sind vor allem die Carotinoide und Polyphenole aufgrund ihrer antioxidativen und immunstabilisierenden Wirkung von Interesse (Kahle et al., 2011; März, 2012).

1.2.2 Nicht DNA basierte Analysemethoden verschiedener Apfelsorten

Die Analyse und der Vergleich der chemischen Zusammensetzung verschiedener Apfelsorten kann künftig bei der Wahl von Apfelgenotypen helfen, jene mit hoher Qualität und geeigneten Verarbeitungseigenschaften für Apfelprodukte zu wählen. Inhaltsstoffe wie Monosaccharide, organische Säuren, Aminosäuren, phenolische Verbindungen und Fettsäuren stehen dabei im Fokus (Wu et al., 2007).

Eine Studie hat sich 2019 mit der Untersuchung des Polyphenolmusters und des Gehalts an Zucker und organischen Säuren beschäftigt, um herauszufinden, welche Apfelsorten am besten zur Apfelsaftherstellung geeignet sind. Die kommerziellen Apfelsorten Idared, Jonagold, Granny Smith als auch eine autochthone Sorte aus Bosnien Herzegowina wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie (HPLC-MS) analysiert. Traditionelle und kommerzielle Apfelsorten weisen laut Analysen unterschiedliche Zucker- und Säuregehalte, als auch Unterschiede im Gesamtpolyphenolgehalt von Fruchtfleisch und Schale auf (Akagić et al., 2019).

Eine weitere Studie beschäftigte sich ebenfalls mit der Analyse der Inhaltsstoffe von acht Apfelsorten. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt an einen Ultraviolett-detektor (HPLC-UV) wurden die Zucker, die organischen Säuren und Phenole analysiert, während der Gehalt an Fettsäuren mittels Gaschromatographie gekoppelt an einen Flammenionisationsdetektor (GC-FID) ermittelt wurde. Aufgrund der Ergebnisse konnten Apfelsorten ausgewählt werden, welche sich besonders für die Herstellung von Säften eignen (Granny Smith und Orin), als auch jene, welche sich aufgrund des hohen Gehalts an biologisch aktiven Substanzen besonders gut für den direkten Verzehr eignen (Golden Delicious, Fuji, Ralls, Qinguan) (Wu et al., 2007).

Die Analyse flüchtiger aromatischer Verbindungen verschiedener Apfelsorten liefert ebenfalls Informationen, welche für künftige Züchtungsprogramme von Bedeutung sein können. Eine Studie von Yang et al. beschäftigte sich mit der Zusammensetzung und Konzentration flüchtiger Verbindungen in 40 Apfelsorten. Die Analyse mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in Kombination mit Gaschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie (GC-MS) konnte 78 flüchtige Verbindungen in 40 Sorten nachweisen, wobei acht Verbindungen in allen Sorten vorhanden waren. Aus den stark variierenden Aromaprofilen der verschiedenen Sorten kann nützliche Information hinsichtlich Züchtung und Verbesserung von Apfelaroma gewonnen werden (Yang et al., 2021).

1.2.3 DNA basierte molekulare Marker Systeme

Für die Analyse genetischer Variationen zwischen Individuen einer Population oder zwischen Populationen einer Art, als auch zur Unterscheidung unterschiedlicher Sorten und Gattungen, können molekulare Marker Systeme eingesetzt werden (Moe et al., 2012). DNA basierte molekulare Marker Systeme haben sich vor allem für die Charakterisierung von Apfelsorten als wichtig erwiesen (Baric et al., 2020). Die erste auf der DNA basierte Methode stellte die Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Methode dar, welche auf Southern-Blots basiert. Die zweite Generation molekularer Methoden basierte auf der PCR, wobei mehrere Molekulare Marker Systeme bekannt sind (Moe et al., 2012):

- Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)
- Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs)
- Simple Sequence Repeats (SSR)
- Inter-SSR (ISSR)

Zur Identifizierung der Apfelsorten in dieser Masterarbeit wurden SSR-Marker eingesetzt.

1.2.4 Simple sequence repeat (SSR) Marker

Simple sequence repeats werden als kurze repetitive Abschnitte, mit einer Länge von ein bis fünf Nukleotiden im Genom definiert. Sie codieren nicht für ein Protein und werden als Marker zur Feststellung der Abstammung und Nachweis einer Monozygotie verwendet (Gianfranceschi et al., 1998; RÖMPP, 2002).

Die Analyse von SSR-Markern ist die am häufigsten angewandte Technik, wenn es um die Analyse von DNA aus Pflanzen- oder Tiergewebe zur Charakterisierung der genetischen Vielfalt geht. Die Analytik von SSR-Markern kann robust und reproduzierbar durchgeführt werden, hat ein Potential für hohe Probendurchsätze und ist automatisierbar, einfach und kostengünstig (Akin et al., 2021; Baric et al., 2020; Silfverberg-Dilworth et al., 2006). SSR-Marker sind in pflanzlichen Genomen häufig zu finden und gleichmäßig verteilt. Weiters sind sie hypervariabel und kodominant (Gianfranceschi et al., 1998). Die erste Methode, welche zum Nachweis von polymorphen Mikrosatelliten entwickelt wurde, stammt von Weber und May (1998). Hier wurden die SSRs während dem Annealing der PCR-Amplifikation von einem speziellen Primerpaar flankiert (Gianfranceschi et al., 1998). Im Anschluss an die PCR wurden zunächst hochauflösende Gele zur Auswertung eingesetzt. Diese werden heutzutage beispielsweise durch den Einsatz einer HRM ersetzt, wie es in dieser Masterarbeit der Fall war. Die HRM benötigt keine weiteren manuellen Schritte, wodurch Kontaminationen vermieden werden können (Heo et al., 2019).

1.2.5 Einsatz von SSRs zur Bestimmung der Authentizität von Lebensmitteln

Genotypen domestizierter Äpfel sind hoch heterozygot, wodurch technische Herausforderungen bei der Genomsequenzierung auftreten. Gleichzeitig führt diese Eigenschaft zu einer großen Auswahl an Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs), welche zur Identifizierung herangezogen werden können (Velasco et al., 2010). In den letzten Jahren konnten bedeutende Fortschritte im Bereich der Apfelgenetik aufgrund des Einsatzes von SSR-Markern gemacht werden (Silfverberg-Dilworth et al., 2006).

Heo et. al konnten 2019 13 koreanische Apfelsorten durch Anwendung von SSRs mittels PCR HRM Analyse unterscheiden. Als Probenmaterial dienten die Blätter der Äpfel. Von ursprünglich 16 SSR-Markern wurden acht zur Differenzierung der Apfelsorten ausgewählt. In dieser Studie wurden 35 apfelsortenspezifische Profile erhalten und mit einer Kombination aus nur drei SSR-Markern konnten alle 13 Apfelsorten unterschieden werden (Heo et al., 2019).

In einer Studie von Ioannis et al. 2014 wurde versucht, mit fünf SSR-Markern sechs süße Kirscharten mittels PCR HRM Analyse voneinander zu unterscheiden. Ein einziger Marker war nötig, um alle sechs Kirscharten zu differenzieren (Ioannis et al., 2014).

2018 wurde in einer Studie versucht, Olivensorten anhand von Blättern als auch Olivenöl mittels PCR HRM Analyse zu unterscheiden. Es war eine Auswahl von sechs SSR-Markern erforderlich, um zehn Olivensorten durch Verwendung von DNA aus Blättern zu identifizieren. Zur Identifizierung von Olivenöl Proben wurden dieselben SSR-Marker angewandt. Schmelzkurven von Blatt- und Ölproben derselben Sorten, welche im Labor hergestellt wurden, wurden miteinander verglichen und führten zu überzeugenden Ergebnissen. Die Analyse von kommerziell erhältlichen Olivenölen führte jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Der spezifische Anteil der einzelnen Olivensorten, welche zur Herstellung der kommerziell erhältlichen Olivenöle verwendet wurde, war auf dem Etikett nicht deklariert, wodurch die Überprüfung der Ergebnisse nicht möglich war (Gomes et al., 2018).

2 Ziele

Die Authentizität eines Lebensmittels ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal und deren Überprüfung hat eine große Bedeutung für die Aufklärung von Lebensmittelbetrug. Ein Lebensmittel gilt dann als authentisch, wenn das Produkt mit den Angaben auf dem Etikett übereinstimmt und keine falschen Angaben hinsichtlich der Zusammensetzung, Sortenreinheit, geografischen Herkunft oder Herstellung vorliegen. Zahlreiche Methoden zur Prüfung der Authentizität eines Produkts kommen zum Einsatz, um Verbraucher vor fälschlicher Ware zu schützen, wobei der Gebrauch von DNA basierten Methoden aufgrund der Stabilität der DNA steigt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM) zur Unterscheidung und zur Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln einzusetzen. Die PCR HRM Analyse basiert auf dem Schmelzverhalten doppelsträngiger DNA. Diese Masterarbeit befasste sich mit der Differenzierung von Insektenspezies und Apfelsorten.

Insekten als Nahrungs- und Futtermittel rückten in den letzten Jahren immer häufiger in den Fokus. Durch die Zulassung von vier Spezies zum Verzehr in der EU, mit der aktuellsten Zulassung des Buffalowurms im Januar 2023, sind Insekten auf unserem Teller ein aktuelles Thema. Die Zahl der nachweisbaren Insekten ist aufgrund der derzeit noch geringen Zahl von Nachweismethoden für Insekten in Lebensmitteln gering. Eine Studie befasste sich mit der Methode der Barcode-Sequenzierung von Insekten, um diese zu unterscheiden. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Primer, welche zuvor zur Barcode-Sequenzierung eingesetzt wurden, dafür geeignet sind, Insektenspezies mittels PCR HRM Analyse zu differenzieren. Vier in der EU zum Verzehr zugelassene Insektenspezies sollten untereinander, als auch von weiteren nicht zugelassenen Spezies unterschieden werden können. In weiterer Folge sollten auch in kommerziellen Produkten mit Insektenanteil die enthaltene Insektenspezies identifiziert werden können. Falls erforderlich, sollte die Unterscheidbarkeit der Insektenspezies durch Optimierung bzw. durch Kombination verschiedener Primer verbessert werden.

In einer früheren Masterarbeit wurden Primer aus der Literatur, die auf Mikrosatelliten abzielen, zur Unterscheidung von Apfelsorten mittels PCR HRM Analyse herangezogen. Hierfür wurde die DNA aus Blättern extrahiert. In dieser Arbeit sollten weitere Primer zur Unterscheidung der Apfelsorten mittels PCR HRM getestet werden. Weiters stellte sich die Frage, ob PCR HRM Methoden geeignet sind, Apfelsorten auch in Lebensmittelproben zu unterscheiden. Hierfür sollte die DNA aus Apfelschale und -fruchtfleisch, als auch von verschiedenen Apfelmus-, Apfelsaft- und Mostproben, extrahiert und analysiert werden.

3 Theorie

Zur Unterscheidung von Insektenpezies wurden PCR HRM Analysen mit DNA-Extrakten, die von Kooperationspartnern von der AGES zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen der Extrakte wurden in der AGES bestimmt.

Aus den Äpfeln und Apfelprodukten wurde die DNA extrahiert und ihre Konzentration mittels Fluorimetrie bestimmt. Die DNA-Extrakte wurden PCR HRM Analysen unterzogen und die erhaltenen Schmelzkurven wurden analysiert. Zur Sicherstellung des Erhalts der erwünschten PCR-Produkte wurden die PCR-Produkte der Äpfel und Apfelprodukte einer Agarosegelelektrophorese unterzogen.

3.1 Fluorimetrie

Die Fluorimetrie ist eine Methode zur Bestimmung der DNA-Konzentration der Extrakte. Hierfür wird ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet, welcher selektiv an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet, da die DNA selbst nicht fluoresziert. Durch die Einlagerung des Farbstoffes in die Doppelhelix der DNA nimmt die Fluoreszenz zu, wobei das Signal proportional zur DNA-Konzentration ist (Matissek & Fischer, 2021).

Das Signal wird mit einem Fluorimeter gemessen. Bei der Messung wird die Analytlösung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und der Farbstoff gibt anschließend Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Diese Veränderung wird mit dem Fluorimeter detektiert. Durch Messung von Standardlösungen mit bekannter Konzentration und Erstellung einer Kalibriergerade kann die Konzentration ermittelt werden. Vorteile dieser Methode sind unter anderem die hohe Selektivität, mit welcher der Farbstoff an die dsDNA bindet und ihre Empfindlichkeit, da DNA-Konzentrationen bis in den pg/mL Bereich gemessen werden können, wobei die Nachweisgrenze abhängig von dem verwendeten Assay ist (Mülhardt, 2013).

3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese dient der Trennung von gelösten und geladenen Teilchen und findet in einem elektrophoretischen System statt. Dieses besteht aus einem Trennmedium, im Fall der Agarosegelelektrophorese aus einem Agarosegel und einer Elektrolytlösung, und einem Stromversorger, der elektrophoretischen Kammer. Diese Kammer besitzt an ihren Enden eine Anode und eine Kathode, welche von der Elektrolytlösung kontaktiert werden. Die Probe, welche geladene Teilchen wie z.B. DNA enthält, wird in die Geltaschen des Gels vorgelegt. Wird eine Spannung angelegt, wandern die geladenen Teilchen zur gegensätzlich geladenen Elektrode. Die Geschwindigkeit der Teilchen ist abhängig von Partikelgröße und -ladung (Barasinski & Garnweitner, 2022; Michov, 1996). Agarosegele sind nicht toxisch, chemisch inert und einfach herzustellen. Sie weisen große Poren auf, weshalb sie sich gut zur Trennung von Partikeln hoher Massen eignen. Zur Trennung von DNA werden in der Regel Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,6 % - 3 % verwendet, welche einen Porendurchmesser von 150 nm aufweisen (Matissek & Fischer, 2021; Michov, 1996).

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion, englisch polymerase chain reaction, ist eine Methode, die eine große Anzahl an Kopien eines bestimmten DNA-Fragments herstellen kann (McPherson & Møller, 2000).

3.3.1 Prinzip der PCR

Die PCR kann in drei Schritte eingeteilt werden. Zuerst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA, darauf folgt die Anlagerung der Primer, auch Annealing genannt. Die Elongation schließt den Zyklus ab. Die Sensitivität der PCR ist schon ab einer Durchführung von 25 Zyklen gegeben, wobei bei einer Real-time PCR bis zu 50 Zyklen durchgeführt werden (Müller & Prange, 2016).

Jede PCR wird mit einem ein bis fünf-minütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C begonnen, um die dsDNA komplett zu denaturieren. Dies erhöht die Anlagerungseffizienz der Oligonukleotide im zweiten Schritt des Zyklus.

Die einzelnen Zyklen starten jeweils mit einer Denaturierung der dsDNA von einigen Sekunden, um einzelsträngige DNA (ssDNA) zu erhalten. An die 3'-Enden der ssDNA lagern sich im zweiten Schritt des Zyklus, dem Annealing, die Primer an. Jedes Oligonukleotidpaar weist eine optimale Anlagerungstemperatur auf, welche vorab bestimmt wird. Eine zu niedrige Annealingtemperatur kann zu unspezifischen PCR-Produkten führen, bei einer zu hohen Temperatur kann keine Anlagerung stattfinden.

Der letzte Schritt des Zyklus, die Elongation, wird bei 72 °C durchgeführt. Das ist die optimale Temperatur für die Taq-DNA-Polymerase, dem Enzym, welches die Nukleotide einbaut. Die Dauer der Elongation wird von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Templats bestimmt, wobei etwa 60 Sekunden für 1000 bp benötigt werden.

Nach etwa 40 - 50 Zyklen erfolgt ein finaler Extensionsschritt. Fünf bis 15 Minuten lang werden bei 72 °C partiell verlängerte Produkte vervollständigt, um unspezifische Fragmente zu vermeiden (Müller & Prange, 2016).

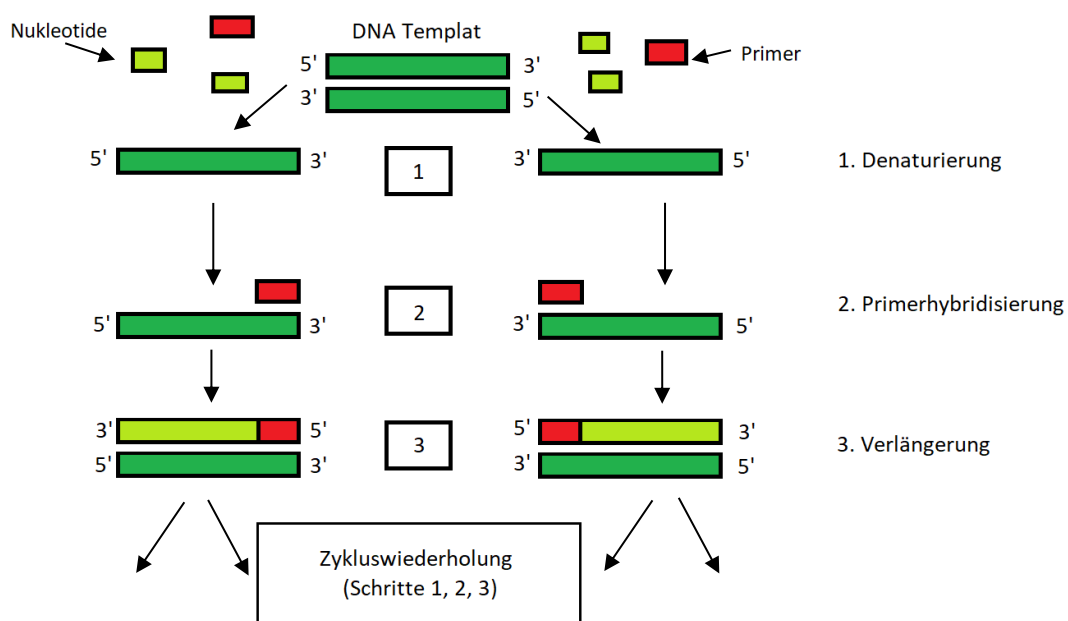


Abbildung 1: Ablauf einer PCR

DNA-Polymerase

Um den DNA-Strang gemäß der Regelung für die Basenpaarung von Watson und Crick zu verlängern (A zu T und G zu C), wählt die Polymerase das richtige Nukleotid aus, welches dem Primer hinzugefügt werden muss. Die Synthese eines DNA-Strangs wird durch die Polymerase immer in 5' → 3' katalysiert. Es existieren auch DNA-Polymerasen, welche über eine sogenannte „proofreading – Aktivität“ verfügen. Dies beschreibt eine 3' → 5' – Exonuklease-Aktivität, welche prüft, ob dem Strang die richtige Base hinzugefügt wurde und entfernt im Fall eines Fehlers die falsche Base.

Geht es um die Auswahl der richtigen DNA-Polymerase, so müssen Effizienz und Genauigkeit der Enzyme beachtet werden (McPherson & Møller, 2000).

Die weitaus am häufigsten eingesetzte DNA-Polymerase ist die thermostabile Taq-DNA-Polymerase, welche aus dem thermostabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Ein relativ geringer Preis, Robustheit und hohe Prozessivität stützen den Erfolg des Enzyms, jedoch gibt es viele Polymerasen auf dem Markt, welche über eine höhere Prozessivität, geringere Fehlerhäufigkeiten und größere Toleranz gegenüber Pufferschwankungen verfügen. Weiters besitzt die Taq-DNA-Polymerase keine 3' → 5' – Exonuklease-Aktivität, wodurch es zu fehlerbehafteten Amplifikationen kommen kann (Müller & Prange, 2016).

Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide, oder auch Primer genannt, sind DNA-Sequenzen, welche komplementär zum zu amplifizierenden DNA-Strang gebaut sind. Sie markieren den Startpunkt der Elongation. In den meisten Fällen werden zwei Primer mit unterschiedlicher Sequenz, ein „forward“ und ein „reverse“ Primer, benötigt, welche sich an die komplementären Stränge des Templates anlagern (McPherson & Møller, 2000).

Primer für bekannte DNA-Sequenzen sind über verschiedene Software einfach zu konstruieren. Sie sollten 15 bis maximal 50 Basen lang sein, wobei Längen von 20 bis 35 Basen eine hohe Spezifität gewähren. Repetitive Sequenzen derselben Nukleotide, drei oder mehr Guanin beziehungsweise Cytosin Basen am 3' Ende, als auch Sequenzen am 3' Ende, welche eine Basenpaarung mit sich selbst oder einem anderen Primer ermöglichen, sollten vermieden werden. Letzteres könnte zur Bildung von Primer-Dimeren führen, welche ausgezeichnete Matrizen für weitere Amplifikationen darstellen und welche somit die PCR dominieren können (McPherson & Møller, 2000; Müller & Prange, 2016).

„Forward“ und „Reverse“ Primer sollten in der gleichen Konzentration vorliegen, wobei Konzentrationen von 0,05 µM – 0,8 µM eingesetzt werden. Der Einsatz zu geringer Oligonukleotidkonzentrationen führt zu geringeren Ausbeuten, bei Einsatz zu hoher Mengen kann es zu Fehlpaarungen und zunehmender Primer-Dimer-Bildung kommen (McPherson & Møller, 2000; Müller & Prange, 2016).

Nukleotide

Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) werden von der Polymerase laut der Basenpaarungsregel als Komplex mit Mg²⁺-Ionen an das 3' Ende des zu synthetisierenden Stranges angehängt. Dabei kommt es zur Abspaltung von Pyrophosphat und Wasser (Müller & Prange, 2016).

Puffer

Um in vitro ein optimales Milieu für die Polymerase zu schaffen, werden PCR-Puffer eingesetzt. Jeder Puffer enthält Cl⁻-Ionen, Mg²⁺-Ionen und dNTPs.

Magnesiumchlorid wird, je nach Art der Polymerase, in Form von MgCl_2 oder MgSO_4 eingesetzt und dient als Cofaktor für die DNA-Polymerase. Die Enzymaktivität der Polymerase, die Ausbeute der PCR und die Schmelztemperatur der dsDNA sind von der Mg^{2+} -Ionen Konzentration abhängig. Welche Konzentration benötigt wird, ist unter anderem abhängig von der Konzentration der Reaktionskomponenten, wie z.B. den dNTPs, mit welchen Mg^{2+} -Ionen einen Komplex bilden. Üblich sind Konzentrationen von 1,0 μM bis 2,5 μM , wobei eine zu niedrige Konzentration zu einer geringen Ausbeute führen und zu hohe Konzentrationen zur Bildung unspezifischer Produkte beitragen können (Müller & Prange, 2016).

DNA-Templat

Als Templat für die PCR kann eine Vielzahl von DNA-Arten verwendet werden. Genomische DNA, mitochondriale DNA (mtDNA), komplementäre DNA (cDNA) und viele mehr kommen zum Einsatz. Die Voraussetzung für eine funktionierende Amplifikation ist die Reinheit und Intaktheit der Matrize. Die Menge der eingesetzten DNA ist abhängig von ihrer Größe und kann von 10 fg bis zu 100 ng variieren (McPherson & Møller, 2000; Müller & Prange, 2016).

3.3.2 Real-time PCR (qPCR)

Die Real-time PCR ist eine Methode, die es ermöglicht, den Prozess der Amplifikation in Echtzeit zu überwachen (Müller & Prange, 2016).

Im Vergleich zu anderen PCR-Methoden weist die qPCR einen großen dynamischen Bereich auf und hat aufgrund des bekannten Amplifikationsprofils eine deutlich höhere Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Etwaige Verunreinigungen oder PCR inhibitorische Stoffe können durch die Echtzeit-Überwachung der Amplifikation leicht identifiziert werden (Wilhelm & Pingoud, 2003).

Die Detektion basiert auf Fluoreszenzsignalen. Kurzwelliges Licht regt Fluorophore an, welche daraufhin höher welliges Licht abstrahlen. Diese Emission wird anschließend gemessen (Müller & Prange, 2016).

Einfach einzusetzen und häufig genutzt werden interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe. Das bekannteste Beispiel ist das mutagene Ethidiumbromid, welches dem PCR-Mix hinzugefügt wird. Wird der Farbstoff in doppelsträngige DNA eingebaut, fluoresziert dieser. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional mit der Menge an dsDNA (McPherson & Møller, 2000). Ethidiumbromid bindet jedoch auch an einzelsträngige DNA, weshalb sich SYBRGreen als Interkalator durchgesetzt hat, da dieser Farbstoff ausschließlich an dsDNA bindet (Müller & Prange, 2016). Trotz seiner Popularität weist SYBRGreen auch Einschränkungen auf, wie eine begrenzte Farbstoffstabilität und farbstoffabhängige Hemmung der PCR. Eine Alternative stellt der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen dar. Dieser soll sowohl eine höhere Stabilität und Sensitivität als auch eine geringere Hemmung der PCR als SYBRGreen aufweisen. EvaGreen kann unter Sättigungsbedingungen eingesetzt werden und somit stärkere Fluoreszenzsignale erzeugen. Aufgrund dieser Vorteile gegenüber dem Farbstoff SYBRGreen kann EvaGreen auch in der HRM eingesetzt werden (Navarro et al., 2015).

Interkalatoren können natürlich nicht zwischen dem korrekten Produkt und PCR-Artefakten unterscheiden. Daher sollten sie in PCRs verwendet werden, deren Bedingungen optimiert wurden, um sicherzustellen, dass nur erwünschte Produkte erzeugt werden (McPherson & Møller, 2000). Um spezifische DNA-Sequenzen zu detektieren, gibt es verschiedene Arten von fluoreszierenden Sonden, welche jedoch kostenintensiver sind als Interkalatoren (Navarro et al., 2015).

3.4 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)

Da die DNA eine hohe Stabilität gegenüber hohen Temperaturen, Druck und chemischen Behandlungen, welche bei der Verarbeitung von Lebensmitteln eingesetzt werden, aufweist, eignen sich DNA-basierte Methoden zur Kontrolle der Lebensmittelsicherheit und Erkennung von Lebensmittelverfälschungen. Die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse ist eine fortgeschrittene Form der Schmelzkurvenanalyse und eignet sich zur Unterscheidung nah verwandter Arten und Sorten, sowie zur Überprüfung der PCR-Produkte der qPCR (Druml & Cichna-Markl, 2014; Sakaridis et al., 2013). Die HRM Analyse gilt als wichtiges Instrument im Bereich der Analyse von Mutationen oder zur Genotypisierung (Jaakola et al., 2010).

Die HRM basiert auf langsamer Erhöhung der Temperatur ($0,1^{\circ}\text{C}/2\text{s}$) nach dem letzten PCR-Zyklus, um eine Dissoziation der DNA-Stränge zu erreichen. Im Vergleich zur traditionellen Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur bei der HRM in sehr geringen Schritten erhöht, wodurch man nicht nur die Schmelztemperatur, sondern das gesamte Schmelzprofil eines Amplikons erhält. Als Schmelztemperatur (T_m) wird jene Temperatur bezeichnet, bei der 50 % der DNA einzelsträngig vorliegt. T_m ist sowohl abhängig von der Länge des DNA-Strangs als auch von dem Gehalt an Guanin-Cytosin- beziehungsweise Adenin-Thymin-Basenpaaren. Bei höherem Guanin-Cytosin Gehalt ergibt sich eine vergleichsweise höhere T_m , da Guanin-Cytosin-Basenpaare durch drei Wasserstoffbrückenbindungen gebunden sind. Adenin-Thymin-Basenpaare sind nur durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen gebunden und weisen daher eine geringere Stabilität auf (Druml & Cichna-Markl, 2014). Schon wenige Basenpaare Unterschied in der Sequenz verändern die Form der Schmelzkurve (Jaakola et al., 2010). Am Ende der HRM wird das Fluoreszenzsignal (F) gegen die Temperatur (T) in einem Graphen aufgetragen (Druml & Cichna-Markl, 2014).

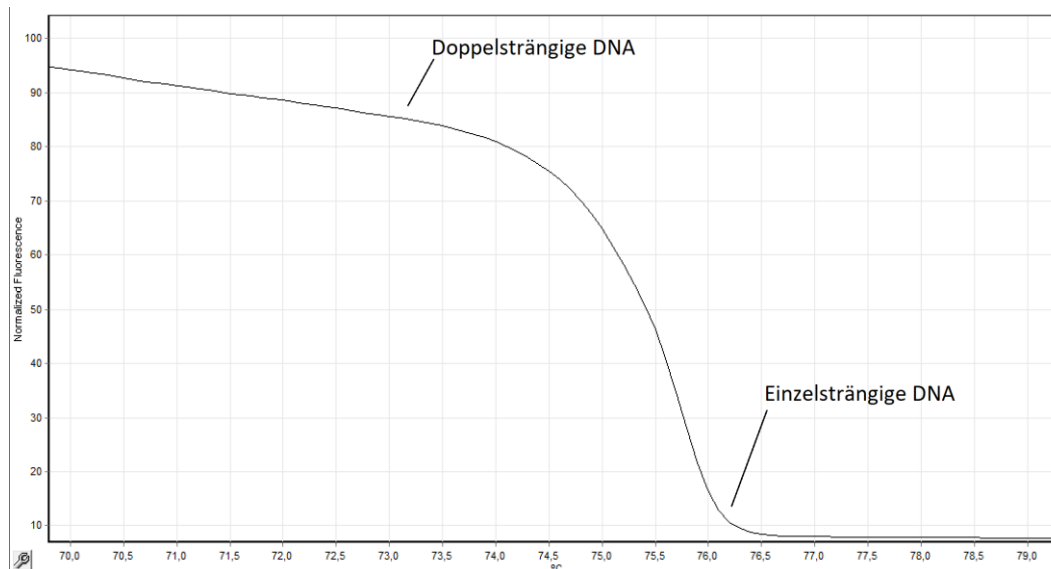


Abbildung 2: HRM Kurve, Fluoreszenz wird gegen Temperatur aufgetragen

In Kapitel 3.3.2 wurde der Einsatz der interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe beschrieben, welcher eine Voraussetzung für die HRM darstellt. Das zu Beginn der HRM hohe Fluoreszenzsignal ist durch die große Menge an dsDNA bedingt. Durch die Dissoziation der DNA, hervorgerufen durch die steigende Temperatur, wird der Interkalator freigesetzt und das Fluoreszenzsignal sinkt im Laufe der Messung. Der häufige Einsatz von SYBRGreen in der traditionellen Schmelzkurvenanalyse dient der Überprüfung

der Länge und Reinheit der PCR-Produkte. Mit dem Farbstoff EvaGreen und der HRM ist es möglich, geringe Sequenzabweichungen, wie zum Beispiel den Austausch einzelner Basen, zu unterscheiden (Druml & Cichna-Markl, 2014).

Um reproduzierbare Schmelzkurven zu erhalten, sind optimierte PCR-Bedingungen erforderlich. Das Amplikon sollte nicht aus mehr als 300 bp bestehen, da die Länge des Amplikons einen Einfluss auf die Sensitivität der HRM hat. Die DNA muss rein und von hoher Integrität sein. Um reproduzierbare Schmelzkurven zu erhalten, müssen unspezifische PCR-Produkte vermieden werden und verschiedene Proben sollten in ähnlicher Konzentration eingesetzt werden, um ähnliche Ct-Werte zu erhalten (Druml & Cichna-Markl, 2014). Die $MgCl_2$ Konzentration muss ebenfalls optimiert werden, da sie das Schmelzverhalten der dsDNA beeinflusst (Vossen et al., 2009).

Im Gegensatz zu anderen Methoden wird die HRM Analyse im selben Röhrchen wie die PCR durchgeführt, wodurch eine Kontamination vermieden wird und keine Reinigung und Trennung erforderlich ist. Es handelt sich um eine schnelle Methode, wodurch sie auch für einen hohen Probendurchsatz geeignet ist. Im Vergleich zu anderen Methoden, wie zum Beispiel Sequenzieretechniken, ist die HRM eine günstige Methode (Druml & Cichna-Markl, 2014). Die HRM-Analyse kann auch als Screeningmethode vor dem Sequenzieren eingesetzt werden, sodass nicht notwendige Sequenzierungen vermieden und Kosten gespart werden. Zusätzlich stellt die HRM-Analyse eine attraktive Alternative zur Agarosegelelektrophorese dar, welche zur Überprüfung von PCR-Ergebnissen dienen kann. Das Hantieren mit toxischen Chemikalien wie Ethidiumbromid wird dadurch vermieden und das Schmelzen ist weniger zeitintensiv als eine Elektrophorese. Liefert die HRM Analyse keine eindeutigen Ergebnisse, können die PCR-Produkte im Anschluss noch einer Gelelektrophorese unterzogen werden, da es sich bei der HRM um ein zerstörungsfreies Verfahren handelt (Vossen et al., 2009).

3.4.1 Evaluierung von HRM Ergebnissen

Es gibt mehrere Möglichkeiten, HRM Ergebnisse zu evaluieren und darzustellen.

Schmelzkurven:

Das Auftragen der Fluoreszenz (F) gegen die Temperatur (T) führt zur Bildung der Schmelzkurve (Abbildung 3). In dieser Ansicht kann aus dem Wendepunkt die Schmelztemperatur (T_m) ermittelt werden. Wird die negative Ableitung der Fluoreszenz ($-dF/dT$) gegen die Temperatur aufgetragen, kann der Wendepunkt aus dem Peakmaximum abgelesen werden (Abbildung 4) (Druml & Cichna-Markl, 2014).

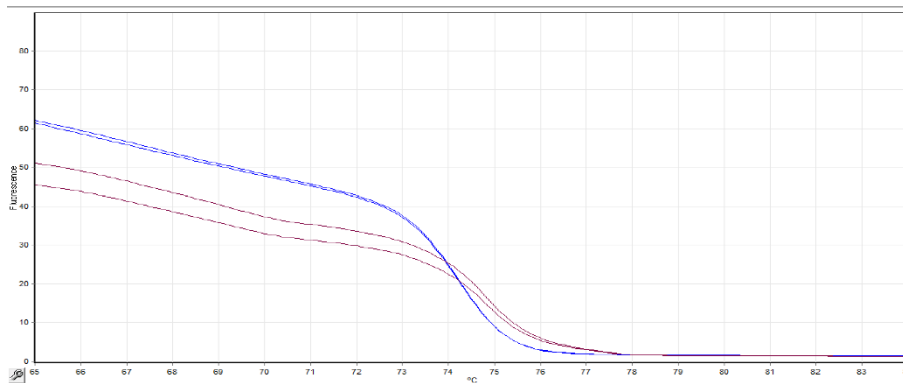


Abbildung 3: Schmelzkurven erhalten durch Auftragen der Fluoreszenz gegen die Temperatur

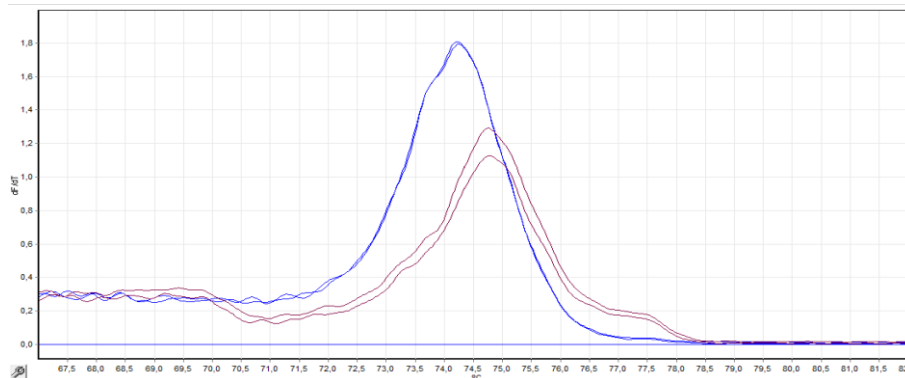


Abbildung 4: Schmelzkurven erhalten durch Auftragen der negativen Ableitung der Fluoreszenz gegen Temperatur

Normalisierte Schmelzkurve

Proben unterscheiden sich in ihrer Fluoreszenzintensität. Durch Normalisierung der Schmelzkurven zwischen 100 % (vollständig hybridisiert) und 0 % (vollständig einzelsträngig) werden diese Unterschiede entfernt. Dadurch sind Schmelzübergänge leichter zu vergleichen (Abbildung 5) (Farrar, 2017).

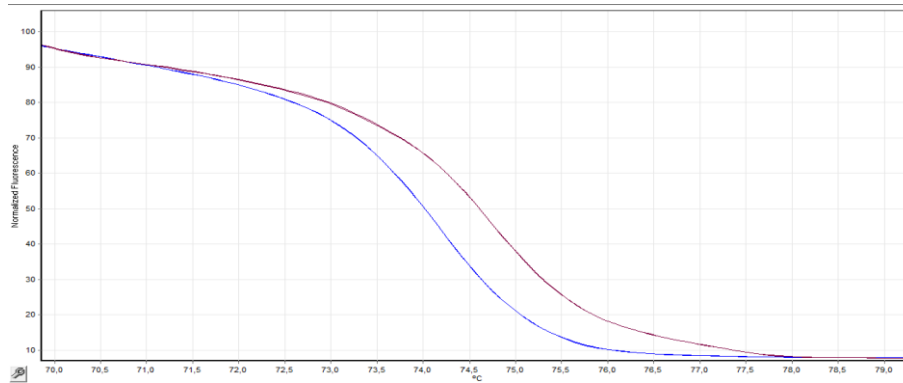


Abbildung 5: Normalisierte Schmelzkurven

Difference Plots

Um kleine Unterschiede zwischen Schmelzkurven hervorzuheben, werden Difference Plots erstellt. Hier wird die Differenz zwischen einer Referenzkurve und einer oder mehreren Schmelzkurven aufgetragen (Abbildung 6) (Druml & Cichna-Markl, 2014).

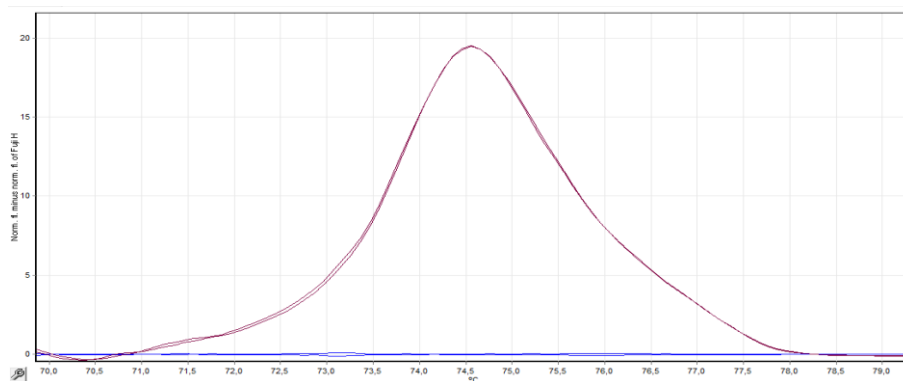


Abbildung 6: Difference Plots

Unterscheidung von Homozygoten und Heterozygoten aufgrund des Schmelzkurvenverlaufs

Die HRM-Analyse kann zur Unterscheidung von Homozygoten und Heterozygoten herangezogen werden. Homozygote Proben bilden ähnliche Schmelzkurvenformen, welche sich nur in ihrer Schmelztemperatur unterscheiden. Heterozygote Proben weisen unterschiedliche Schmelzkurvenverläufe auf. Dies ist bedingt durch die Bildung zweier Homoduplexe, dessen Sequenzen ident sind, und zweier Heteroduplexe, dessen Stränge mindestens eine Fehlpaarung aufweisen. Heteroduplexe schmelzen aufgrund dieser Fehlpaarung im Vergleich zu Homoduplexen bei niedrigerer Temperatur (Druml & Cichna-Markl, 2014; Farrar, 2017).

In dieser Masterarbeit wurde versucht, durch gezielte Bildung solcher Heteroduplexe, die Schmelzkurvenform der PCR-Produkte für Insektenspezies zu verändern, um diese besser von anderen Spezies zu unterscheiden. Dafür wurden artifizielle Sequenzen entworfen, welche sich nur um wenige Basen von der Sequenz der betreffenden Spezies unterscheiden. Diese Oligonukleotide bilden Heteroduplexe mit den DNA-Einzelsträngen der betreffenden Spezies und führen zu einer Änderung des Schmelzkurvenverlaufs.

4 Experimenteller Teil

4.1 Sauberkeit

Um DNA-Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurden alle Flächen vor Arbeitsbeginn gründlich mit DNA-Exitus gereinigt und Workstations wurden nach Benutzung 30 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt. DNA haltiges Material durfte nur in bestimmte Räume mitgenommen werden, um eine Kontamination anderer Substanzen (z.B. Mastermix) mit DNA zu vermeiden. Arbeit mit Amplikons durfte nur in einem separaten Labor erfolgen und Amplikons wurden in einem gesonderten Gefrierschrank gelagert. Zusätzlich wurden in den verschiedenen Laboren jeweils eigene Labormäntel getragen.

4.2 Proben

4.2.1 Insektenproben

Bei den Insektenproben handelte es sich um DNA-Extrakte von zugelassenen (P-028, P-039, P-044, P-049, P-050, P-067, P-087) und nicht zugelassenen (P-002, P-003, P-004, P-005, P-006, P-008, P-011, P-012, P-015, P-030, P-031, P-042, P-054, P-059) Insektenspezies, als auch um DNA-Extrakte aus Lebensmitteln mit Insektenanteil (P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134) (Tabelle 1). Die Extrakte wurden von der AGES zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Liste der Insekten DNA-Extrakte, Einwaage und Konzentration

Probennr.	Probe	Einwaage [g]	Konzentration [ng/μL]
P-002	Gryllus bimaculatus, Mittelmeer-Feldgrille	1,0	481,5
P-003	Musca domestica, Terflys/Krullfliegen	1,0	148,0
P-004	Gryllodes sigillatus, Kurzflügelgrille	0,8	356,8
P-005	Gryllus assimilis, Steppengrillen	1,0	3,6
P-006	Bruchus maculatus, Bohnenkäfer	<0,1	34,8
P-008	Rhynchophorus ferrugineus, Sagowurm	1,0	439,5
P-011	Schistocerca gregaria, Wüstenheuschrecke	0,7	186,1
P-012	Lucilia sericata, Goldfliegen	0,1	264,5
P-015	Drosophila hydei, Fruchtfliege	<0,1	17,2
P-028	Tenebrio molitor, Mehlwurm	<0,1	116,2
P-030	Hermetia illucens, Soldatenfliegenlarven	0,6	0,9
P-031	Galleria melonella, Made der Wachsmotte	1,0	485,2
P-039	Acheta domesticus, Heimchen	<0,1	3,1
P-042	Zophobas atratus, Zophobas	1,0	45,2
P-044	Locusta migratoria, Wanderheuschrecke	0,2	121,1
P-049	Alphitobius diaperinus, Buffalowurm	0,5	82,9
P-050	Heuschrecken, blanchiert & gefriergetrocknet (Locusta migratoria)	0,6	250,8
P-054	Cicadidae, Zikade	0,9	1170,2
P-059	Bombyx mori, Seidenraupe	0,4	132,8

P-067	Tenebria molitor, Mehlwurm	1,0	580,1
P-087	Acheta domesticus, Heimchen	1,0	3,8
P-089	Fusilli mit Grillenmehl (A. domesticus)	1,0	349,1
P-090	Grille frittiert (A. domesticus)	1,0	3,8
P-094	Fertigmischung Rote Rüben Risotto mit Insektenprotein (A. diaperinus)	1,0	137,4
P-095	Fertigmischung Brownie Cake Mix mit Insektenprotein (A. diaperinus)	1,0	89,2
P-096	Fertigmischung Hafer-Laibchen-Mix mit Insektenprotein (A. diaperinus)	1,0	258,0
P-098	Gewürzte Heimchen Tomate	1,0	1504,3
P-099	Gewürzte Heimchen geräuchert	1,0	1003,4
P-102	ZIRP Bar Sour Cherry, Riegel (A. diaperinus)	1,0	123,1
P-103	ZIRP Bar Apple Strudel, Riegel (A. diaperinus)	1,0	169,2
P-104	ZIRP Bar Apricot, Riegel (A. diaperinus)	1,0	88,2
P-116	Protein Shake mit Buffalo Insekt (Erdbeere)	1,0	657,4
P-122	Erdnusscreme mit Buffalo Insekt	1,0	290,3
P-125	"Dschungelade", Edelbitterschokolade mit gerösteten Mehlwürmern (T. molitor)	1,0	42,9
P-126	"Dschungelade", Vollmilchschokolade mit gerösteten Mehlwürmern (T. molitor)	1,0	28,4
P-132	Cricket Cracker, Tomate & Oregano (A. domesticus)	1,0	104,7
P-133	Cricket Cracker, Rosmarin & Thymian (A. domesticus)	1,0	178,2
P-134	Cricket Cracker, Kurkuma & geräucherte Paprika (A. domesticus)	1,0	268,6

4.2.2 Apfelproben

Bei den Apfelproben handelte es sich um 13 verschiedene Sorten von Äpfeln, zehn sortenreinen Apfelsäften verschiedener Sorten und 13 sortenreinen Mostproben verschiedener Sorten, zur Verfügung gestellt von der Versuchsstation für Obst- und Weinbau Haidegg. Zusätzlich wurden 16 Apfelmus und Apfel-Fruchtmus Proben in lokalen Supermärkten erworben.

Tabelle 2: Liste der Apfel-, Saft- und Mostproben vom Standort Haidegg

Sorte	alt/neu	Frucht	Saft	Most
Bohnapfel	alt	-	-	ja
Braeburn	neu	ja	ja	ja
Cox Orange	alt	ja	ja	ja
Elstar	neu	ja	ja	ja
Fuji	neu	ja	-	-
Gala	neu	ja	-	-
Golden Delicious		ja	-	-
Goldparmäne	alt	ja	ja	ja
Gravensteiner	alt	ja	-	ja
Idared		ja	-	-
Ilzer Rose	alt	ja	ja	ja
Jonathan	alt	-	-	ja
Kronprinz Rudolf	alt	ja	ja	ja
Lavantaler Bananenapfel	alt	-	ja	ja
McIntosh	alt	-	ja	ja
Roter Boskop	alt	ja	-	ja
Schafnase	alt	-	ja	ja
Steirischer Maschanzka	alt	ja	-	-
Ananas Renette	alt	-	ja	-

Tabelle 3: Liste der Apfelmusproben

Produkt	Marke/Firma	Apfelsorte
Apfelmus	efko	Golden Delicious
Apfelmus	Billa	Golden Delicious
Apfelmus	JA! Natürlich	Golden Delicious
Apfelmus	Spar	Golden Delicious
Apfelmus	Zurück zum Ursprung	Golden Delicious
Apfelmus	Clever	Golden Delicious
Apfelmus	JA! Natürlich	Topaz
Apfelmus	Machland	keine Angabe
Apfelmus	efko PUR	keine Angabe
Apfelmus	Sweet Valley	keine Angabe
Apfelmus + Birne	Spar	keine Angabe
Apfelmus + Mango	Spar	keine Angabe
Apfelmus + Mango	JA! Natürlich	keine Angabe
Apfelmus + Mango	BIO Natura	keine Angabe
Apfelmus + Banane	BIO Natura	keine Angabe
Apfelmus + Banane	JA! Natürlich	keine Angabe

4.3 DNA-Extraktion

4.3.1 Optimierung

Zur Optimierung der Extraktion aus Äpfeln wurden Äpfel der Sorte Gala verwendet. Hierbei wurde jeweils aus 150 mg Kern, Schale und Fruchtfleisch im Doppelansatz DNA extrahiert und getestet, ob die Zugabe von Polyvinylpyrrolidon (PVP) zum PL 2 Puffer in einer Konzentration von 0,5 % (m/v) zu höheren DNA-Konzentrationen im erhaltenen Extrakt führt.

Die Extraktion der DNA aus Fruchtfleisch der Sorten Gala und Elstar wurde zusätzlich mit einer PVP-Konzentration im PL 2 Puffer von 1 % und 2 % und Zusatz von 25 µL Proteinase K getestet.

Bei der Extraktion aus Saft und Apfelmusproben wurde aufgrund geringer Ausbeute zusätzlich eine höhere Probeneinwaage verwendet. Für zwei Saftproben (Cox Orange, Goldparmäne) wurde zusätzlich ein Probenvolumen von 2500 µL und für zwei Apfelmusproben (Clever, Spar) wurden 500 mg und 1000 mg Probe eingesetzt.

Die Extraktion aller Saftproben wurde außerdem ohne den Lyse Schritt durchgeführt. Die Extraktion startete ab der Zugabe des PC Puffers. Ziel war eine Erhöhung der DNA-Konzentration in den Extrakten.

4.3.2 Hauptprotokoll

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden zu Beginn alle Arbeitsflächen mit DNA-Exitus gereinigt und die Äpfel wurden mit destilliertem Wasser gewaschen.

Aus allen Äpfeln und apfelhaltigen Lebensmitteln wurde die DNA im Einfachansatz extrahiert.

Die Apfelschale und das Fruchtfleisch wurden mit einem Skalpell zerkleinert und jeweils 150 mg wurden in ein 2 mL FastPrep Lysing Matrix Tube eingewogen.

Für die Extraktion der DNA aus Saft und Most Proben wurde standardmäßig ein Volumen von 500 µL verwendet und für Apfelmus Proben wurden 150 mg Probenmaterial eingewogen. Um eine höhere DNA-Ausbeute zu erzielen, wurden für zwei Apfelsaftproben zusätzlich Ansätze mit 2500 µL und für zwei Apfelmusproben Ansätze mit 500 mg und 1000 mg durchgeführt.

Dem 2 mL FastPrep Lysing Matrix Tube wurden zwei ¼“ Ceramic Sphere Kugeln hinzugefügt.

Die DNA-Extraktion wurde mit dem DNA Extraktions Kit (Nucleo Spin Plant II Kit, Macherey Nagel) durchgeführt. PL 2 Puffer, PL 3 Puffer, PC Puffer, RNase A und Proteinase K wurden gemäß dem Kit Protokoll hergestellt. Dem PL 2 Puffer wurde PVP hinzugefügt, um eine 0,5 %ige Lösung (PVP-Lösung) zu erhalten. Den Proben wurde 900 µL des PVP haltigen PL 2 Puffers zugegeben und die Proben wurden anschließend mithilfe des MP Geräts homogenisiert.

Tabelle 4: Programm Setup für das MP Gerät

Geschwindigkeit	Adapter	Zeit	Lyse Matrix	Quantität	Zyklen	Zeit Pause
6,0 m/s	QuickPrep	40 s	M	160 mg	3	300 s

Die Proben wurden abzentrifugiert und die Ceramic Sphere Kugeln wurden vorsichtig entfernt.

Für die Zelllyse wurden den Proben 30 µL RNase A hinzugefügt, 15 s puls gevortext und am Thermoschüttler bei 65 °C und 600 Umdrehungen pro Minute (rpm) für zwei Stunden inkubiert. In 30 min Intervallen wurden die Ansätze abgespinnt und gevortext. Für Optimierungsversuche wurde nach der Zugabe von RNase A 25 µL Proteinase K hinzugefügt.

Anschließend wurde 225 µL PL 3 Puffer hinzupipettiert, die Proben wurden 15 s puls gevortext und für 5 min auf Eis gegeben. Anschließend wurden sie in der Zentrifuge (Mini Spin plus Eppendorf Zentrifuge) für eine Minute bei 11.000 relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf) abzentrifugiert.

Das Lysat wurde auf die NucleoSpin® Filter Säule (violetter Ring) mit Collection Tube überführt und 2 min bei 11.000 rcf zentrifugiert. Der klare Durchfluss wurde in ein 5 mL Eppendorfgefäß überführt und der Filter wurde verworfen. Zur Einstellung der DNA-Bindungsbedingungen wurden den Ansätzen 1350 µL PC Puffer hinzugefügt und 15 s puls gevortext.

Anschließend wurde die DNA an die NucleoSpin® Plant II Column (grüner Ring) gebunden. Maximal 700 µL der Probe wurde aufgegeben und bei 11.000 rcf für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die gesamte Probenlösung auf der Säule war. Um die Silica Membran zu waschen, wurden 400 µL PW 1 Puffer aufgegeben und bei 11.000 rcf für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 700 µL PW 2 Puffer aufgegeben und bei 11.000 rcf für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Weitere 200 µL PW 2 Puffer wurden auf die Säule aufgegeben und es wurde 2 min bei 11.000 rcf zentrifugiert, um die Silica-Membran komplett zu trocknen. Der Durchfluss wurde erneut verworfen.

Die NucleoSpin® Plant II Column wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß gegeben und 50 µL PE Puffer, welcher bereits auf 65 °C vorgewärmt wurde, wurde direkt auf die Membran pipettiert. Die Tubes wurden für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 1 min bei 11.000 rcf zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde mit einem neuen Eppendorfgefäß wiederholt, um ein zweites Eluat zu erhalten. Die DNA-Konzentration der Extrakte wurde bestimmt und die Extrakte wurden bis zur PCR bei -20 °C gelagert.

4.4 Konzentrationsbestimmung der DNA-Extrakte

Die Konzentrationen DNA-Extrakte aus Insekten wurden in der AGES photometrisch (QIAxpert, Qiagen, Deutschland) bestimmt.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Extrakte der Äpfel und Apfelproben erfolgte fluorimetrisch mit dem Qubit™ 4 Fluorimeter (Invitrogen Thermo Fisher Scientific). Für die Bestimmung wurde das Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit verwendet. Hierfür wurde die Qubit Working Solution laut Anleitung aus dem Qubit Farbstoff und dem Qubit Puffer im Verhältnis 1:200 hergestellt. 190 µL bzw. 198 µL Working Solution wurde in Qubit™ Assay Gefäße vorgelegt und je 10 µL Standard bzw. 2 µL DNA-Extrakt wurden hinzupipettiert. Die Ansätze wurden 2 -3 s gevortext und nach 2 min mit dem Qubit Fluorimeter vermessen.

Die DNA-Extrakte wurden bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

4.5 PCR HRM Analyse

4.5.1 Primerpaare

Das Primerpaar für die Vervielfachung des Templats der DNA der Insekten-DNA-Extrakte (Ins_rev und Ins_fw siehe Tabelle 9) wurde von der AGES zur Verfügung gestellt. Die optimierte Anlagerungstemperatur dieses Primerpaars wurde in der AGES ermittelt und betrug 58 °C.

Es wurden zwei Heim_AS_rev Primer und ein Heim_AS_fw Primer (siehe Tabelle 12), als auch zwei Wander_AS_fw Primer (siehe Tabelle 16) entworfen und bei der Firma Sigma bestellt. Alle Primer wurden so entworfen, dass die Schmelztemperaturen wie die der Ins_fw und Ins_rev Primer bei etwa 58 °C liegen.

Weiters wurden artifizielle Sequenzen entworfen, deren Sequenz sich von der Sequenz des Heimchens nur um wenige Basen unterscheidet (siehe Tabelle 11). Diese Oligonukleotide wurden ebenfalls bei Sigma bestellt.

Die Website RNA Fold wurde genutzt, um zu überprüfen, ob die entworfenen Primer Sekundärstrukturen ausbilden. Mithilfe der Website Oligoanalyzer wurde getestet, ob die Primer untereinander Homo- oder Heterodimere bilden.

Die Primer Heim_AS und Wander_AS wurden abgespinnt und nach Herstellerangabe unter einer PCR-Workstation mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM gebracht. Für 20 Minuten lang wurden die Primer alle 5 min gevortext und gekippt. 10 µL Aliquote wurden bei -20 °C gelagert.

Die Primerpaare für die Äpfel und Apfelproben wurden von Mina Micic im Verlauf ihrer Masterarbeit „Analyse von Mikrosatelliten mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse zur Diskriminierung von steirischen Apfelsorten“ aus der Datenbank „HiDRAS“ und aus der Literatur gewählt und bei der Firma Merck bestellt. In Micic's Masterarbeit wurde die DNA aus Blättern extrahiert (Micic, 2022). Vier weitere Primerpaare aus Micic's Masterarbeit wurden in der vorliegenden Masterarbeit getestet (siehe 5.2.1.).

Für die noch zu testenden Primer wurde die theoretische Schmelztemperatur auf der Website OligoCalc berechnet und die Anlagerungstemperatur wurde am QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) optimiert. Die Primer wurden in der PCR in einer Konzentration von 0,2 µM eingesetzt.

Vor der Verwendung wurden die 100 µM Aliquote der Primer für Insekten und Äpfel auf 10 µM verdünnt.

4.5.2 PCR HRM am Rotorgene

Die Durchführung der PCR HRM war für die Spezies- und Sortendifferenzierung dieselbe, einzig die Zusammensetzung des Mastermix variierte aufgrund unterschiedlicher Anzahl oder Konzentration an Primern und der Zugabe von MgCl_2 in einer Konzentration von 2 mM bei der Analyse der Insekten.

Die PCR HRM Analyse der DNA-Extrakte wurde am Rotor Gene Q (Qiagen) im Doppelansatz durchgeführt.

Die Komponenten für den Mastermix, Primer und DNA-Extrakte wurden zu Beginn 30 s puls gevortext. Der Mastermix wurde in einem speziellen Labor unter einer PCR-Workstation (VWR) vorbereitet und die Zugabe der DNA-Extrakte erfolgte in einem anderen Raum, ebenfalls unter einer PCR-Workstation. Die PCR-Workstations wurden vor jeder Verwendung 30 min mit UV-Licht bestrahlt und mit DNA-Exitus gereinigt.

Als Mastermix wurde das kommerzielle Type-It HRM PCR Kit von Qiagen gewählt. Ein Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 μL und setzte sich aus 18 μL Reaktionsmix und 2 μL DNA-Extrakt, bzw. im Fall einer No Template Control (NTC), welche keine DNA enthält, aus 2 μL RNase freiem Wasser zusammen. Der Reaktionsmix setzte sich aus 2x Type-It HRM PCR Mastermix, RNase freiem Wasser und Primer in gewünschter Konzentration zusammen. In der finalen Version der Insekten PCR wurden die Ins_fw und Ins_rev Primer (Tabelle 9) und die Heim_AS_fw und Heim_AS_rev_1 Primer (Tabelle 12) in einer Konzentration von 0,4 μM und der Wander_AS_fw_1 Primer (Tabelle 16) in einer Konzentration von 0,8 μM eingesetzt. Bei der PCR HRM Analyse zur Unterscheidung der Apfelsorten wurden die Primer in einer Konzentration von 0,2 μM eingesetzt. Standardmäßig wurden DNA-Extrakte mit einer Konzentration über 2,5 ng/ μL auf diese Konzentration verdünnt, Extrakte, deren Konzentration darunter lag oder nicht messbar war, wurden unverdünnt eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde in Strip Tubes mit Deckel (Strip Tubes, 0,1 mL, Qiagen) pipettiert.

Tabelle 5: Finale Zusammensetzung der Reaktionsmixes (2x Type-It HRM PCR Master Mix)

Reaktionsmix Insekten	μL	Reaktionsmix Äpfel	μL
RNase free water	1,44	RNase freies Wasser	7,2
2x Type-It HRM PCR Master Mix	10	2x Type-It HRM PCR Master Mix	10
Primer Ins_fw 10 μM	0,8	Primer fw 10 μM	0,4
Primer Ins_rev 10 μM	0,8	Primer rev 10 μM	0,4
Primer Heim_AS_fw 10 μM	0,8	DNA-Extrakt	2
Primer Heim_AS_rev_1 10 μM	0,8	Gesamt	20,0
Primer Wander_AS_fw_1 10 μM	1,6		
MgCl 25 mM	1,76		
DNA-Extrakt	2		
Gesamt	20,00		

Das Temperaturprogramm begann mit einem Denaturierungsschritt der DNA und der Aktivierung der Polymerase für 5 min bei 95 °C. Der darauffolgende Zyklus bestand aus drei Schritten und wurde 50 Mal wiederholt. Er startete mit 15 s Denaturierung bei 94 °C, darauf folgte die Anlagerung, welche 30 s dauerte. Die Temperatur bei diesem Schritt war abhängig vom eingesetzten Primerpaar. Der Zyklus wurde beendet mit einer Elongation, wofür die Temperatur 30 s bei 72 °C gehalten wurde. Anschließend erfolgte die finale Elongation für 10 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden dann für 1 min bei 95 °C denaturiert und die getrennten Stränge wurden bei 40 °C für 1 min hybridisiert.

Auf die PCR folgte die HRM, bei der die Temperatur von 65 °C bis 95 °C um 0,1 °C pro Sekunde gesteigert wurde.

Tabelle 6: Temperaturprogramm für die PCR HRM Analyse (Typelt Mastermix)

Schritt		Zeit	Temperatur	Wiederholung	
Halten 1	Denaturierung, Aktivierung der Polymerase	5 min	95°C		
Zyklus 1	Denaturierung	15 s	94°C	Anzahl der Zyklen: 50	
	Anlagerung	30 s	variabel		
	Elongation	30 s	72°C		
Halten 2	Finale Elongation	10 min	72°C		
Halten 3	Denaturierung	1 min	95°C		
Halten 4	Strang Hybridisierung	1 min	40°C		
HRM	HRM	-	65 - 95°C	0,1°C/s	

Die Ergebnisse wurden mit der Rotor Gene Q Software 2.3.1 (Qiagen) ausgewertet. Zur Unterscheidung verschiedener Sorten und Spezies wurden Schmelzkurven und normalisierte Schmelzkurven herangezogen. Zur Normalisierung der Schmelzkurven wurden manuell zwei Normalisierungsbereiche, leading range und trailing range, ausgewählt.

2x PyroMark PCR Mastermix

Für den Versuch eine bessere Amplifikation und infolgedessen wiederholbarere Schmelzkurven für Extrakte der Saft-, Most- und Apfelmusproben zu erhalten, wurde für eine PCR HRM Analyse der 2x PyroMark PCR Mastermix eingesetzt. Die Vorbereitung der PCR HRM Analyse war dieselbe, allein das Temperaturprogramm und die Komponenten und Zusammensetzung des Reaktionsmix änderten sich:

Tabelle 7: Finale Zusammensetzung des Mastermix (PyroMark)

Reaktionsmix PyroMark	µL
RNase freies Wasser	4,2
2x PyroMark PCR Master Mix	10
10x CoralLoad Concentrate	2
20x EvaGreen Dye	1
Primer 10 µM fw	0,4
Primer 10 µM rev	0,4
DNA-Extrakt	2
Gesamt	20,0

Tabelle 8: Temperaturprogramm für die PCR HRM Analyse (PyroMark Mastermix)

Schritt		Zeit	Temperatur	Wiederholung	
Halten 1	Denaturierung, Aktivierung der Polymerase	15 min	95°C		
Zyklus 1	Denaturierung	30 s	94°C	Anzahl der Zyklen: 50	
	Anlagerung	30 s	variabel		
	Elongation	30 s	72°C		
Halten 2	Finale Elongation	10 min	72°C		
Halten 3	Denaturierung	1 min	95°C		
Halten 4	Strang Hybridisierung	1 min	40°C		
HRM	HRM	-	65 - 95°C	0,05°C/s	

4.5.3 PCR HRM Optimierung am Quantstudio

Am Quantstudio 5 gibt es im Gegensatz zum Rotorgene Q Thermocycler die Option, mehrere Anlagerungstemperaturen in einem Lauf zu verwenden. Daher wurde der Quantstudio 5 dafür genutzt, die optimale Anlagerungstemperatur der noch zu testenden Apfel Primer zu bestimmen. Für jedes Primerpaar wurden vier Anlagerungstemperaturen getestet. Auf der Website OligoCalc wurden die Schmelztemperaturen für reverse und forward Primer berechnet. Aus diesen wurde der Mittelwert berechnet und diese Temperatur wurde als höchste zu testende Temperatur festgelegt. Die nächstniedrigere Temperatur lag 2 °C darunter, die beiden weiteren Temperaturen lagen jeweils 1,5 °C tiefer. Für die Optimierung der Anlagerungstemperaturen wurden DNA-Extrakte der Sorte Golden Delicious und Fuji im Doppelansatz verwendet (2,5 ng/μL), welche von Mina Micic aus Blättern extrahiert wurden. Mastermix und Temperaturprogramm entsprachen dem der Durchführung am Rotorgene, mit dem Unterschied, dass bei der HRM die Temperatur um 0,5 °C pro Sekunde erhöht wurde. Der Reaktionsmix wurde beim Quantstudio 5 in 0,2 mL PCR-Gefäße pipettiert, welche aufgrund des fehlenden Rotors der Thermocyclers vor dem Beginn der PCR HRM Analyse abgespinnt werden mussten. Die Ergebnisse wurden mit der QuantStudio™ Design & Analysis Software 1.4.3 (Thermo Fisher Scientific) ausgewertet und für jedes Primerpaar wurde die optimale Anlagerungstemperatur bestimmt.

4.6 Agarosegelelektrophorese

Um festzustellen, wie lange die gebildeten PCR-Produkte waren und somit abzuschätzen, ob die erwünschten Produkte erhalten wurden, wurde mit ausgewählten PCR-Produkten eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Vorbereitung des 10xTBE Puffers: 108 g Trizma-Base und 55 g Borsäure wurden in 750 mL destilliertem Wasser gelöst, 7,5 g EDTA wurden hinzugefügt und mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Der Puffer sollte einen pH-Wert um 8,3 haben.

Um einen 0,5xTBE Puffer zu erhalten, wurde der 10xTBE Puffer verdünnt (50 mL 10xTBE mit nukleasefreiem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt).

3 g Agarose wurde in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 100 mL 0,5xTBE Puffer auf einer Heizplatte unter Rühren und mit Uhrglasdeckel zum Kochen gebracht. Nach 15 bis 30 Minuten hat sich eine klare Flüssigkeit gebildet, welche anschließend in einen Gelcaster mit eingesetztem Kamm gegossen wurde. Nach 30 bis 45 Minuten war das Gel ausgehärtet. Der 6X Loading Dye Roti-Load DNA-orange 1 (mit Glycerin) wurde mit nukleasefreiem Wasser im Verhältnis 1:3 verdünnt (2X Loading Dye). Als Marker wurde die Low Molecular Weight (LMW) DNA Ladder verwendet und mit nukleasefreiem Wasser 1:4 verdünnt. Für die Probenverdünnung wurde in alle Tubes 3,5 µL des 2X Loading Dye vorgelegt und jeweils 3,5 µL der Amplikons hinzugefügt. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Gelkammer überführt, welche mit 0,5xTBE Puffer befüllt wurde, sodass das Gel bedeckt war. Die Geltaschen wurden mit jeweils 6 µL Marker oder verdünnten Proben befüllt. Nach Positionieren des Deckels wurde die Gelkammer an das Power Supply Gerät angeschlossen und auf 80 Volt eingestellt. Sobald die orange Färbefront etwa 0,5 cm vor Ende des Gels angekommen war (90 – 120 min), wurde das Gel in eine Dose mit 75 mL Färbelösung gelegt und 30 min lang im Dunklen gelagert. Die Färbelösung wurde aus 150 mL destilliertem Wasser und 45 µL 1000XGelRed NucleicStain hergestellt und musste nach Anwendung an drei Mal zwei Gelen neu hergestellt werden. Anschließend wurde das Gel zum Entfärben 30 min lang im Dunklen in destilliertes Wasser eingelegt. Danach wurde das Gel auf dem Herolab Transilluminator positioniert und unter UV-Licht fotografiert. Zur Nachbearbeitung und Beschriftung des Gels wurde das Programm Inkscape verwendet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Unterscheidung von Insektenspezies

5.1.1 PCR HRM mit zwei Primern (Ins_fw, Ins_rev)

Elf von der AGES zur Verfügung gestellte DNA-Extrakte von Insekten wurden in einer PCR HRM Analyse mit einem ebenfalls von Kooperationspartnern in der AGES entworfenen Primerpaar (Ins_fw, Ins_rev) aus der Studie von Hillinger et al. „Development of a DNA Metabarcoding Method for the Identification of Insects in Food“ getestet [Mittelmeer-Feldgrille (P-002), Kurzflügelgrille (P-004), Wüstenheuschrecke (P-011), Made der Wachsmotte (P-031), Mehlwurm (P-028), Schwarze Soldatenfliege (P-030), Heimchen (P-039), Zophobas (P-042), Wanderheuschrecke (P-044), Buffalowurm (P-049), Seidenraupe (P-059)]. Die Probenauflistung ist in Kapitel 4.2.1 (Tabelle 1) zu finden. Die Analysebedingungen, sprich das Temperaturprogramm der PCR HRM Analyse, wurden dem Type-It Mastermix angepasst (siehe Tabelle 6). Die Primer wurden in einer Konzentration von 0,4 µM eingesetzt.

Tabelle 9: Primerpaar Ins_fw und Ins_rev mit Sequenz und optimierter Anlagerungstemperatur

Primername	Sequenz 5' → 3'	Interne Primerbezeichnung	Optimierte Anlagerungstemperatur
16S_10_fwd_SHR	TWACGCTGTTATCCCTAAGG	Ins_fw	58,0 °C
16S_rev_SH1	GACGAGAAGACCCTATAGA	Ins_rev	

Die Zusammensetzung des Reaktionsmix für den ersten Test der Primer ist in Tabelle 10 aufgelistet:

Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsmix mit 2 Primern

Reaktionsmix	µL
RNase freies Wasser	6,4
2x Typelt HRM PCR Master Mix	10
Primer Ins_fw 10 µM	0,8
Primer Ins_rev 10 µM	0,8
DNA-Extrakt	2
Gesamt	20,0

In Abbildung 7 sind die Amplifikationskurven der elf getesteten Spezies und deren Farbcodierung zu sehen. Alle DNA-Extrakte wurden auf 2,5 ng/µL verdünnt eingesetzt, mit Ausnahme der Probe Schwarze Soldatenfliege (P-030), da die Konzentration des DNA-Extrakts mit 0,9 ng/µL unter 2,5 ng/µL lag. Diese Probe wurde unverdünnt eingesetzt.

Die Ct-Werte (17 -23) für die Proben Kurzflügelgrille (P-004), Wüstenheuschrecke (P-011), Heimchen (P-039) und Buffalowurm (P-049) als auch die Höhe der Fluoreszenzsignale waren zufriedenstellend. Für Heimchen (P-039) wurde ein erhöhtes Startsignal beobachtet, was auf eine Verunreinigung des Extrakts mit einer fluoreszierenden Verbindung hindeuten könnte.

Die restlichen Proben [Mittelmeer-Feldgrille (P-002), Mehlwurm (P-028), Schwarze Soldatenfliege (P-030), Made der Wachsmotte (P-031), Zophobas (P-042), Wanderheuschrecke (P-044), Seidenraupe (P-059)] wurden mit Ct-Werten ab 23 und einem, im Vergleich zu den anderen Proben, deutlich

geringeren Fluoreszenzsignal, nicht optimal amplifiziert. Die Amplifikationskurven waren sehr flach und wiesen nicht die typische Form auf.

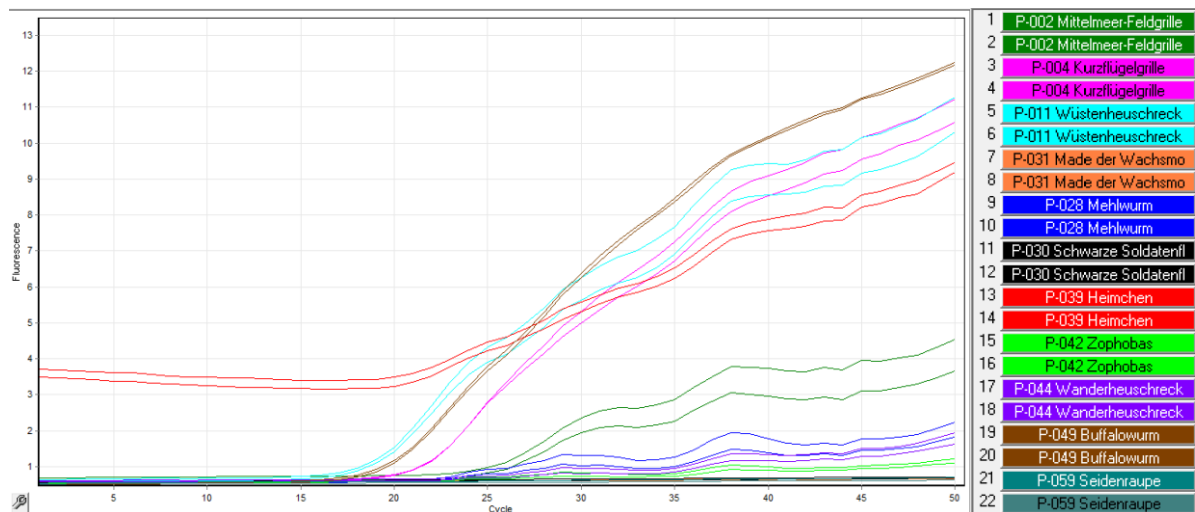


Abbildung 7: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev für die Proben P-002, P-004, P-011, P-031, P-028, P-030, P-039, P-042, P-044, P-049, P-059.

In Abbildung 8 sind die normalisierten Schmelzkurven der getesteten Spezies in derselben Farbcodierung dargestellt. Trotz vermeintlich nicht optimaler Amplifikation wiesen die im Doppelansatz erhaltenen PCR-Produkte einen identen Schmelzverlauf auf. Die Proben Schwarze Soldatenfliege (P-030) und Seidenraupe (P-059) waren schwer unterscheidbar, was jedoch angesichts dessen, dass beide Insektenspezies nicht zum Verzehr in der EU zugelassen sind, kein großes Problem darstellt. Die Schmelzkurven der Proben Wüstenheuschrecke (P-011) und Heimchen (P-039) ähnelten sich auch stark. Heimchen (P-039) ist in der EU zum Verzehr zugelassen. Daher wurden Versuche unternommen, um die Unterscheidbarkeit von Wüstenheuschrecke (P-011) und Heimchen (P-039) zu verbessern. Weiters wurde versucht, die Ursache für das erhöhte Fluoreszenzsignal, welches bei niedriger Zykluszahl für Heimchen erhalten wurde, zu finden.

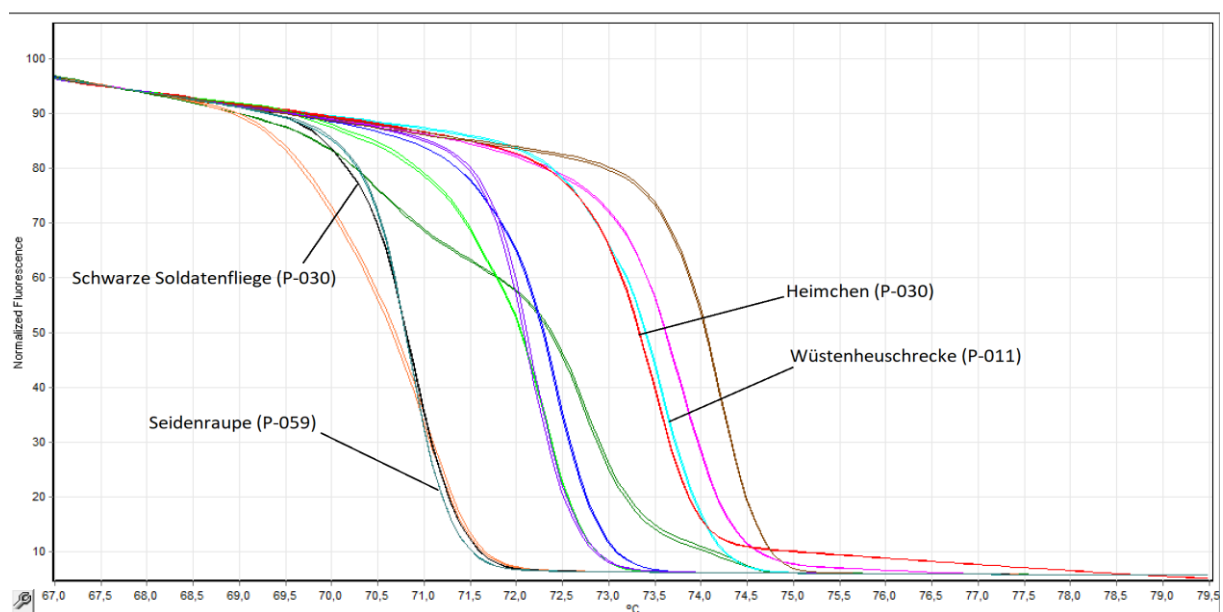


Abbildung 8: Erhaltene normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev für die Proben P-002, P-004, P-011, P-031, P-028, P-030, P-039, P-042, P-044, P-049, P-059.

5.1.2 Verbesserung der Amplifikation durch MgCl_2 Zugabe

Durch Zugabe von MgCl_2 wurde versucht, die Amplifikationseffizienz zu verbessern. Eine PCR HRM Analyse der im vorigen Lauf schlecht amplifizierten Spezies [Mittelmeer-Feldgrille (P-002), Mehlwurm (P-028), Schwarze Soldatenfliege (P-030), Made der Wachsmotte (P-031), Zophobas (P-042), Wanderheuschrecke (P-044), Seidenraupe (P-059)] ohne Zusatz von MgCl_2 und mit Zugabe von 1 mM bzw. 2 mM MgCl_2 zum Reaktionsmix wurde durchgeführt (Abbildung 9). Proben ohne Zusatz von MgCl_2 im Reaktionsmix sind hellblau, Proben mit 1 mM MgCl_2 pink und Proben mit 2 mM MgCl_2 grün dargestellt. Die dargestellten Amplifikationskurven zeigen einen eindeutigen Trend. Höhere MgCl_2 Konzentrationen führten zu einer besseren Amplifizierbarkeit der DNA in den Extrakten. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren PCR HRM Analysen von Insektenproben dem Reaktionsmix 2 mM MgCl_2 zugefügt.

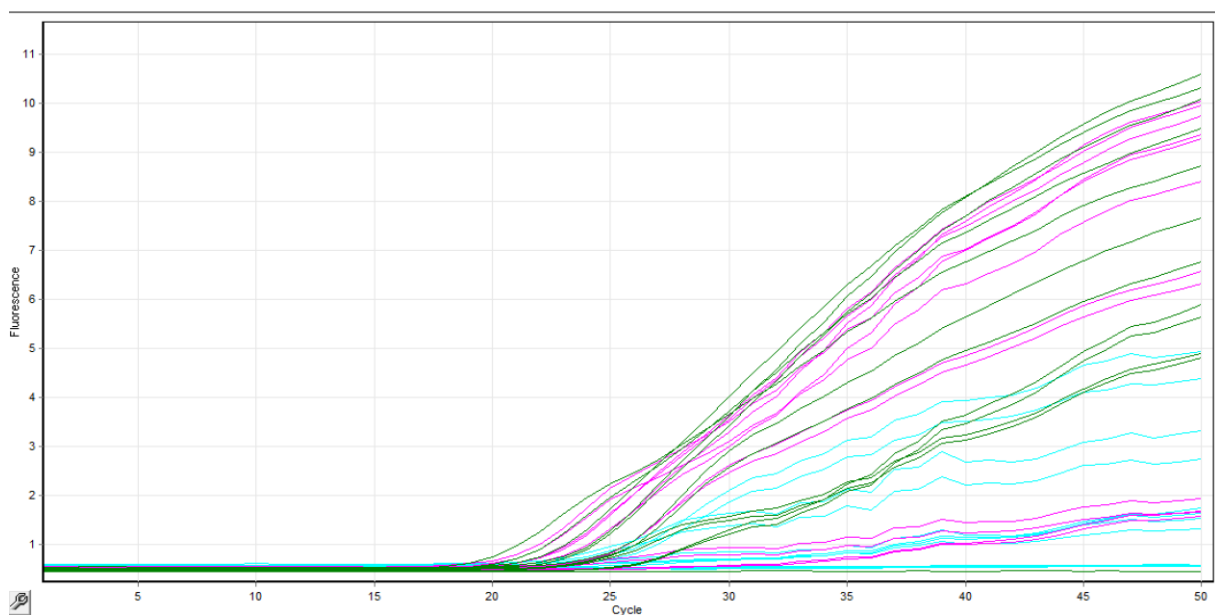


Abbildung 9: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev für die Proben P-002, P-028, P-031, P-042, P-044, P-059. Kein Zusatz von MgCl_2 (hellblau), Zusatz von 1 mM MgCl_2 (pink), Zusatz von 2 mM MgCl_2 (grün).

Als nächstes wurden die Extrakte aller zum Verzehr zugelassenen Spezies und Extrakte von Lebensmitteln, welche diese zugelassenen Spezies beinhalten, getestet [Mehlworm (P-028), Heimchen (P-039), Wanderheuschrecke (P-044), Buffalowurm (P-049), Heuschrecken blanchiert & gefriergetrocknet (*Locusta migratoria*) (P-050), Mehlworm (P-067), Heimchen (P-087), Fusilli mit Grillenmehl (*A. domesticus*) (P-089), Grille frittiert (*A. domesticus*) (P-090), Fertigmischung Rote Rüben Risotto mit Insektenprotein (*A. diaperinus*) (P-094), Fertigmischung Brownie Cake Mix mit Insektenprotein (*A. diaperinus*) (P-095), Fertigmischung Hafer-Laibchen-Mix mit Insektenprotein (*A. diaperinus*) (P-096), Gewürzte Heimchen Tomate (P-098), Gewürzte Heimchen geräuchert (P-099) ZIRP Bar Sour Cherry, Riegel (*A. diaperinus*) (P-102), ZIRP Bar Apple Strudel, Riegel (*A. diaperinus*) (P-103), ZIRP Bar Apricot, Riegel (*A. diaperinus*) (P-104), Protein Shake mit Buffalo Insekt (Erbeere) (P-116), Erdnusscreme mit Buffalo Insekt (P-122), "Dschungelade", Edelbitterschokolade mit gerösteten Mehlwürmern (*T. molitor*) (P-125), "Dschungelade", Vollmilchschokolade mit gerösteten Mehlwürmern (*T. molitor*) (P-126), Cricket Cracker Tomate & Oregano (*A. domesticus*) (P-132), Cricket Cracker Rosmarin & Thymian (*A. domesticus*) (P-133), Cricket Cracker Kurkuma & geräucherte Paprika (*A. domesticus*) (P-134)]. Von Heimchen (P-039) wurde ein zweites Aliquot derselben Probe getestet,

um herauszufinden, ob das erhöhte Startsignal bei der Amplifikation an einer Kontamination des Extrakts liegen könnte. In Abbildung 10 ist die Farbcodierung der PCR HRM Analyse zu sehen.

Durch Zusatz von 2 mM MgCl₂ wurden für alle Extrakte die typischen Amplifikationskurven und ein angemessenes Fluoreszenzsignal erhalten (Abbildung 11). Das Signal der Aliquote der Heimchen Extrakte (P-039) war wieder zu Beginn der Amplifikation erhöht. Dasselbe Problem trat bei den Proben Grillen (P-087) und Grillen frittiert (P-090) auf. Bei den Proben Heimchen (P-087) und Grille frittiert (P-090) handelt es sich ebenfalls um Lebensmittel, die laut Deklaration Heimchen enthielten, daher wurde angenommen, dass der Extrakt Heimchen (P-039) nicht kontaminiert war. Das erhöhte Startsignal könnte möglicherweise auf Proben dieser Insektenspezies zurückzuführen sein.

1	P-028 Mehlwurm	17	P-089 Fusilli mit Grillenmehl	33	P-103 ZIRP Bar Apple Stru
2	P-028 Mehlwurm	18	P-089 Fusilli mit Grillenmehl	34	P-103 ZIRP Bar Apple Stru
3	P-039 Heimchen alt	19	P-090 Grille frittiert	35	P-104 ZIRP Bar Apricot
4	P-039 Heimchen alt	20	P-090 Grille frittiert	36	P-104 ZIRP Bar Apricot
5	P-044 Wanderheuschreck	21	P-094 Rote Rüben Risotto	37	P-116 Protein Shake Buffal
6	P-044 Wanderheuschreck	22	P-094 Rote Rüben Risotto	38	P-116 Protein Shake Buffal
7	P-049 Buffalowurm	23	P-095 Brownie Cake Mix	39	P-122 Erdnusscreme Buffal
8	P-049 Buffalowurm	24	P-095 Brownie Cake Mix	40	P-122 Erdnusscreme Buffal
9	P-039 Heimchen neu	25	P-096 Hafer Laibchen Mix	41	P-125 Dschungelade Edel
10	P-039 Heimchen neu	26	P-096 Hafer Laibchen Mix	42	P-125 Dschungelade Edel
11	P-050 Heuschrecken	27	P-098 Gewürzte Heimchen	43	P-126 Dschungelade Vollm
12	P-050 Heuschrecken	28	P-098 Gewürzte Heimchen	44	P-126 Dschungelade Vollm
13	P-067 Mehlwurm	29	P-099 Gewürzte Heimchen	45	P-132 Cricket Cracker Tom
14	P-067 Mehlwurm	30	P-099 Gewürzte Heimchen	46	P-132 Cricket Cracker Tom
15	P-087 Grillen	31	P-102 ZIRP Bar Sour Cherr	47	P-133 Cricket Cracker Ros
16	P-087 Grillen	32	P-102 ZIRP Bar Sour Cherr	48	P-133 Cricket Cracker Ros
				49	P-134 Cricket Cracker Kurk
				50	P-134 Cricket Cracker Kurk

Abbildung 10: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit Primerpaar Ins_fw und Ins_rev

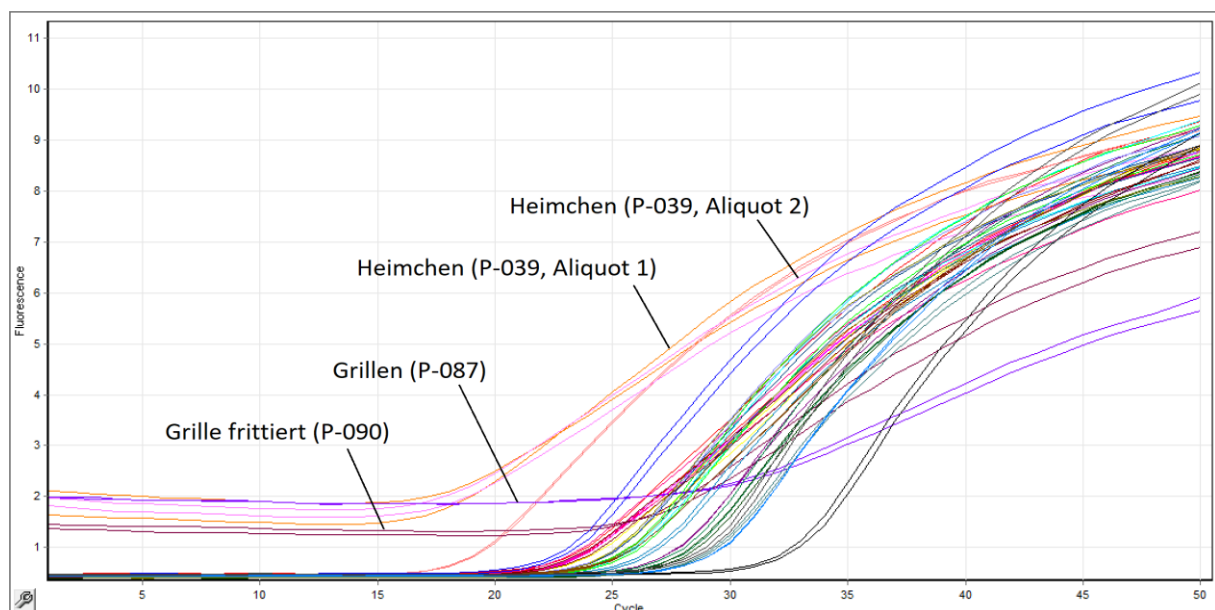


Abbildung 11: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-039, P-044, P-049, P-039, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134

In Abbildung 12 sind die Schmelzkurven der Extrakte in normalisierter Ansicht dargestellt. Die Kurven der vier zugelassenen Insektenspezies und die dazugehörigen Lebensmittel waren klar voneinander zu unterscheiden. Die Schmelzkurven einzelner Proben derselben Spezies wiesen denselben Kurvenverlauf auf und waren nur leicht verschoben. Nur bei den Proben Grillen (P-087) und Grille frittiert (P-090) wies die Schmelzkurve nach dem Wendepunkt einen abweichenden Verlauf auf, wofür möglicherweise das erhöhte Startsignal dieser Proben verantwortlich war.

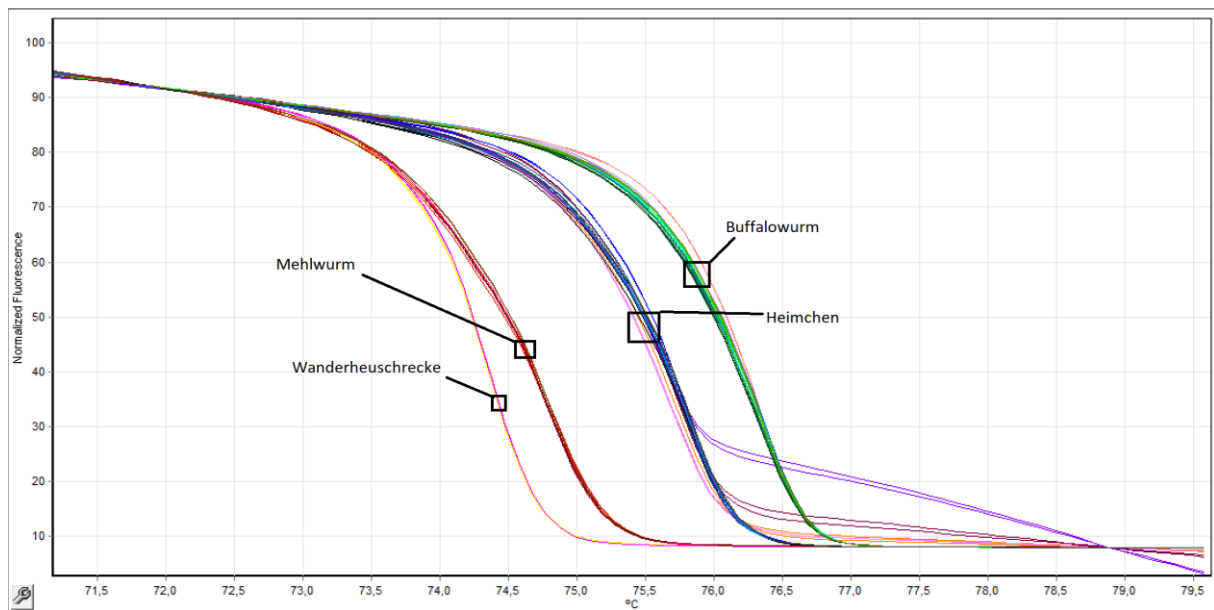


Abbildung 12: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-039, P-044, P-049, P-039, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134

5.1.3 Unterscheidung zum Verzehr zugelassener und nicht zugelassener Spezies

In der folgenden PCR HRM Analyse wurden alle in der EU nicht zum Verzehr zugelassenen Insektenspezies zusammen mit den vier zugelassenen Spezies getestet. Anstelle des Heimchens (P-039) wurde die Lebensmittelprobe Gewürzte Heimchen (P-098), welche zu einer typischen Amplifikationskurve geführt hatte, verwendet. In Abbildung 13 ist die Farbcodierung dieses Laufs zu sehen.

In Abbildung 14 sind die Amplifikationskurven dargestellt. Auffällig ist, dass die Probe Steppengrille (P-015), genau wie Heimchen (P-039), Grillen (P-087) und Grille frittiert (P-090) in der vorigen Analyse, ein erhöhtes Startsignal aufwies. Die Ct-Werte der meisten Proben lagen im Bereich von 15 – 27 und die Amplifikationskurven hatten die typische Form. Die Ct-Werte der Extrakte der Fliegenproben (P-003, P-012, P-015) lagen mit über 35 in einem sehr hohen Bereich und das Fluoreszenzsignal war im Vergleich zu den restlichen Proben relativ niedrig.

1	P-028 Mehlwurm	13	P-011 Wüstenheuschreck	25	P-005 Steppengrillen
2	P-028 Mehlwurm	14	P-011 Wüstenheuschreck	26	P-005 Steppengrillen
3	P-044 Wanderheuschreck	15	P-030 Schwarze Soldatenfl	27	P-006 Bohnenkäfer
4	P-044 Wanderheuschreck	16	P-030 Schwarze Soldatenfl	28	P-006 Bohnenkäfer
5	P-049 Buffalowurm	17	P-031 Made der Wachsmo	29	P-008 Sagowurm
6	P-049 Buffalowurm	18	P-031 Made der Wachsmo	30	P-008 Sagowurm
7	P-098 Gewürzte Heimchen	19	P-042 Zophobas	31	P-012 Goldfliegen
8	P-098 Gewürzte Heimchen	20	P-042 Zophobas	32	P-012 Goldfliegen
9	P-002 Mittelmeer-Feldgrille	21	P-059 Seidenraupe	33	P-015 Fruchtfliege
10	P-002 Mittelmeer-Feldgrille	22	P-059 Seidenraupe	34	P-015 Fruchtfliege
11	P-004 Kurzflügelgrille	23	P-003 Terflys/Krullfliegen	35	P-054 Zikade
12	P-004 Kurzflügelgrille	24	P-003 Terflys/Krullfliegen	36	P-054 Zikade

Abbildung 13: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit Primerpaar Ins_fw und Ins_rev

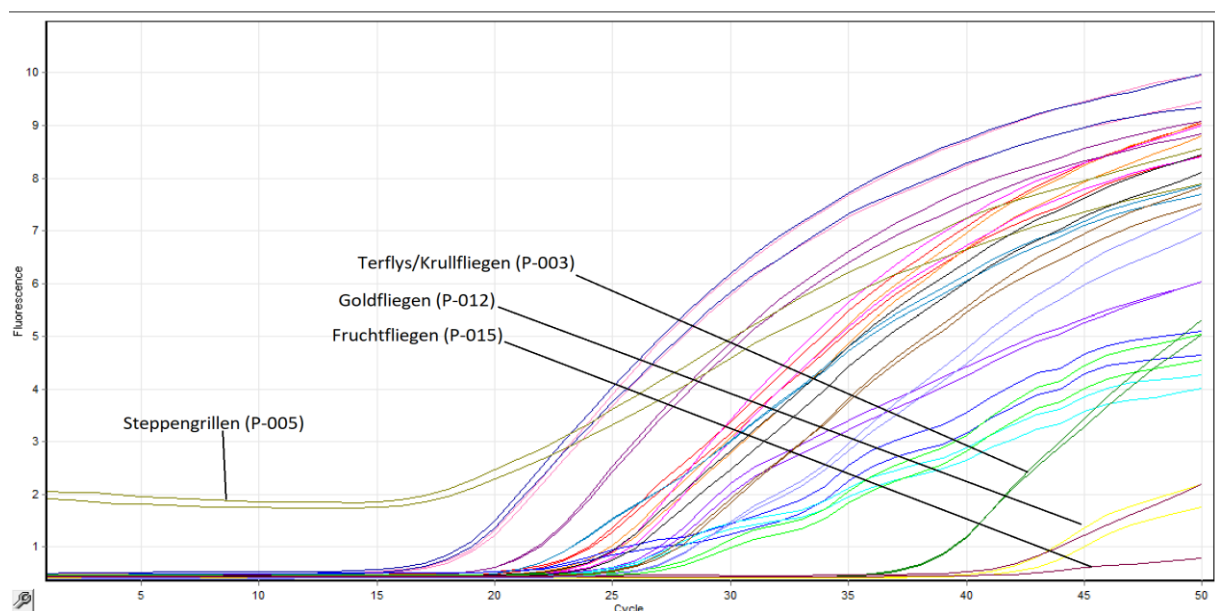


Abbildung 14: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-044, P-049, P-098, P-002, P-004, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054

In Abbildung 15 sind die Schmelzkurven in normalisierter Ansicht dargestellt. Alle Doppelbestimmungen, mit Ausnahme von Fruchtfliegen (P-015), waren wiederholbar. Eine Doppelbestimmung der Probe Fruchtfliegen (P-015) wurde nur sehr gering amplifiziert, was zu einem

abweichenden Schmelzverhalten des erhaltenen PCR-Produkts führte. Buffalowurm (P-049) und Mehlwurm (P-028) konnten eindeutig von den restlichen Spezies unterschieden werden. Die Schmelzkurven von Gewürzte Heimchen (P-098) lagen sehr nahe an den Kurven von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011). Die Schmelzkurven von Wanderheuschrecke (P-044) konnten nur schwer von den Kurven der Proben Terflys/Krullfliegen (P-003), Bohnenkäfer (P-006) und Zophobas (P-042) unterschieden werden.

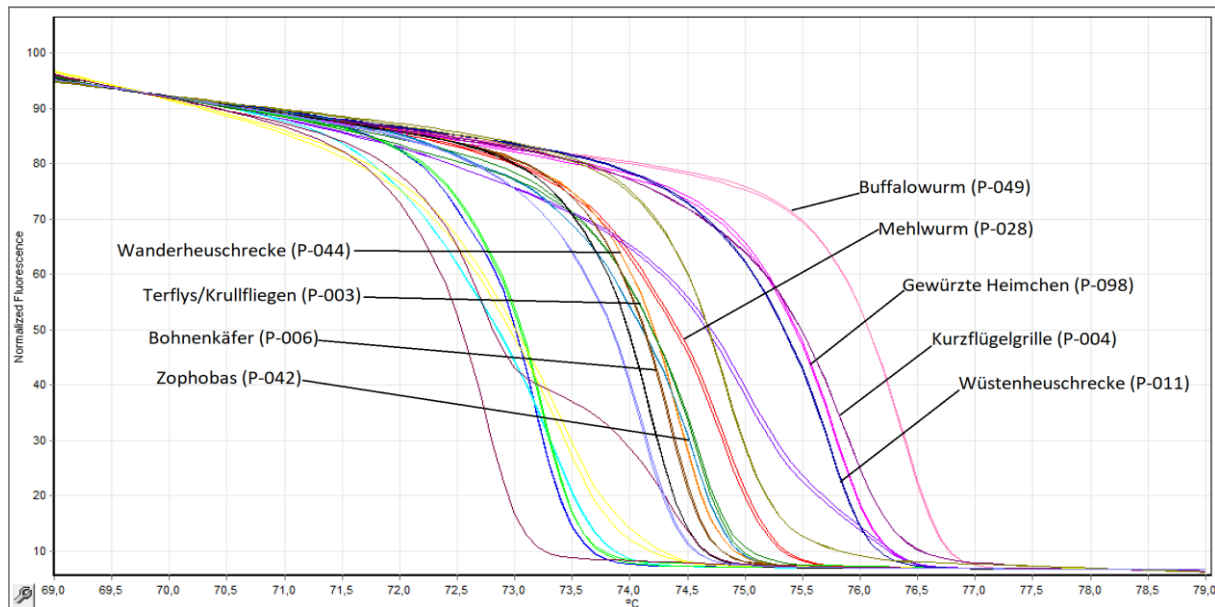


Abbildung 15: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-044, P-049, P-098, P-002, P-004, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054

5.1.4 Optimierung der Amplifikation

Im folgenden Lauf wurde getestet, ob das erhöhte Startsignal bei der Amplifikation gewisser Heimchenproben und der Probe Steppengrillen (P-005) aufgrund einer geringen Verdünnung der DNA-Extrakte aufgetreten ist. Die Extrakte dieser Proben wiesen nämlich eine geringe DNA-Konzentration auf, weshalb sie für die PCR kaum verdünnt wurden. In Abbildung 16 sind die Amplifikationskurven dieses Laufs zu sehen. Heimchen (P-039) wurde wie zuvor in einer Konzentration von 2,5 ng/μL (rot), in einer 1:50 Verdünnung (blau), in einer 1:100 Verdünnung (grün) und in einer 1:500 Verdünnung (schwarz) eingesetzt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die höheren Verdünnungen zu einer typischen Amplifikationskurve geführt haben. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte, die für die verdünnten Extrakte erhalten wurden, wiesen denselben Kurvenverlauf auf, wie die auf 2,5 ng/μL verdünnte Probe. Daher wurden für alle folgenden Versuche Heimchen (P-039), Steppengrillen (P-005), Grillen (P-087) und Grille frittiert (P-090) in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt.

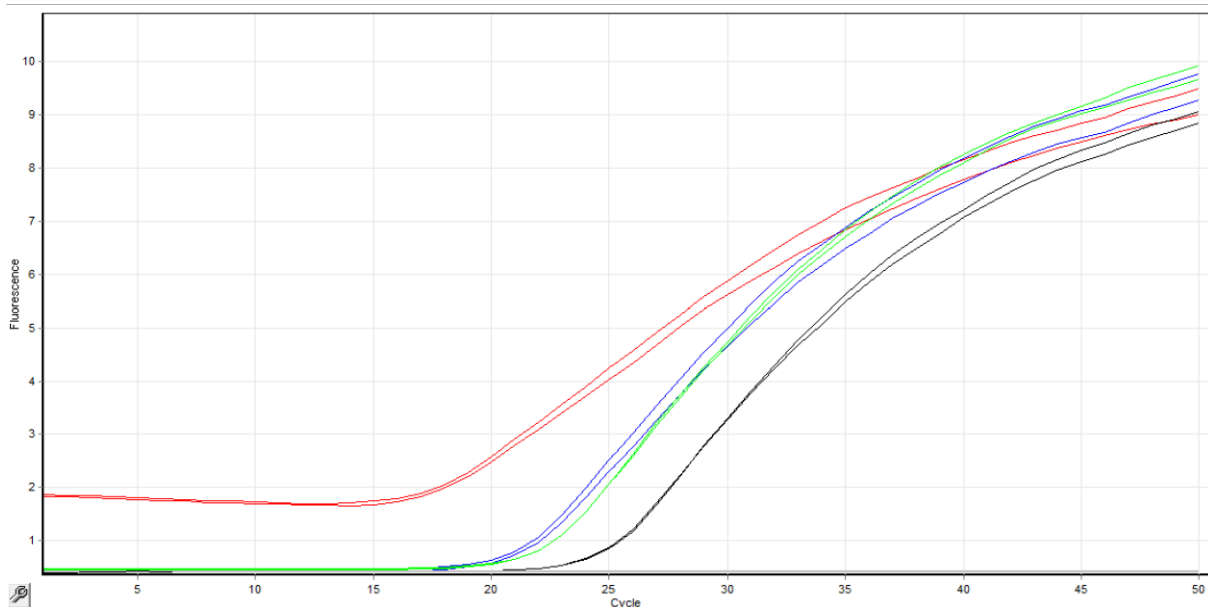


Abbildung 16: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Probe P-039 in einer Konzentration von 2,5 ng/μL (rot), 1:50 Verdünnung (blau), 1:100 Verdünnung (grün) und 1:500 Verdünnung (schwarz)

5.1.5 PCR HRM Analyse zur Unterscheidung von Heimchenproben von Kurzflügelgrille und Wüstenheuschrecke

Als nächstes wurde geprüft, ob alle Lebensmittel, die laut Deklaration Heimchen enthielten, von den Insektenspezies Kurzflügelgrille und Wüstenheuschrecke unterschieden werden konnten. DNA-Extrakte von Produkten, die Heimchen enthielten, wurden im Doppelansatz, Extrakte von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) im 4-fach Ansatz analysiert.

Weiters wurden die Schmelzkurven der Extrakte von Wanderheuschrecke (P-044) und Heuschrecken (P-050) (beide *Locusta migratoria*) mit den Schmelzkurven der Extrakte von Terflys/Krullfliegen (P-003), Bohnenkäfer (P-006), Sagowurm (P-008) und Zophobas (P-042) verglichen. Wanderheuschrecke (P-044) und die Extrakte, die zu ähnlichen Schmelzkurven geführt haben, wurden im 4-fach Ansatz analysiert. Die Amplifikation hatte bei allen Extrakten gut funktioniert, einzig der Ct-Wert von Terflys/Krullfliegen (P-003) war mit über 35 relativ hoch.

In Abbildung 17 ist die Farbcodierung dieser Analyse zu sehen, Abbildung 18 zeigt die normalisierten Schmelzkurven. Wie bereits in einer früheren Analyse festgestellt wurde, lagen die Schmelzkurven von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) sehr nahe an den Kurven der Extrakte der Proben, welche Heimchen enthielten und konnten nicht eindeutig unterschieden werden (Abbildung 15).

Die Schmelzkurven der Extrakte, welche laut Deklaration Heimchen enthielten, lagen sehr eng beieinander. Die Kurve von Gewürzte Heimchen geräuchert (blau) (P-099) fiel auf, da sie leicht verschoben war. Sie wies jedoch denselben Kurvenverlauf wie die restlichen Extrakte mit Heimchenanteil auf.

Die Kurven der zwei Extrakte der Wanderheuschrecke (P-044, P-050) überlappten vollständig. Diese Schmelzkurven konnten nur schwer von den Kurven von Terflys/Krullfliegen (P-003) unterschieden werden. Die Schmelzkurve der Probe Bohnenkäfer (P-006) wies denselben Kurvenverlauf wie die Extrakte der Wanderheuschrecke auf, war jedoch leicht zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Da für die einzelnen Replikate der Extrakte von Bohnenkäfer (P-006) und Wanderheuschrecke (P-044) exakt überlappende Schmelzkurven erhalten wurden, reicht der geringe Unterschied aus, um die Spezies Bohnenkäfer und Wanderheuschrecke zu unterscheiden.

1	P-039 Heimchen	13	P-132 Cricket Cracker Tom	25	P-011 Wüstenheuschreck	37	P-008 Sagowurm
2	P-039 Heimchen	14	P-132 Cricket Cracker Tom	26	P-011 Wüstenheuschreck	38	P-008 Sagowurm
3	P-087 Grillen	15	P-133 Cricket Cracker Ros	27	P-003 Terflys/Krullfliegen	39	P-042 Zophobas
4	P-087 Grillen	16	P-133 Cricket Cracker Ros	28	P-003 Terflys/Krullfliegen	40	P-042 Zophobas
5	P-069 Fusilli mit Grillenmehl	17	P-134 Cricket Cracker Kurk	29	P-003 Terflys/Krullfliegen	41	P-042 Zophobas
6	P-069 Fusilli mit Grillenmehl	18	P-134 Cricket Cracker Kurk	30	P-003 Terflys/Krullfliegen	42	P-042 Zophobas
7	P-090 Grille frittiert	19	P-004 Kurzflügelgrille	31	P-006 Bohnenkäfer	43	P-044 Wanderheuschreck
8	P-090 Grille frittiert	20	P-004 Kurzflügelgrille	32	P-006 Bohnenkäfer	44	P-044 Wanderheuschreck
9	P-098 Gewürzte Heimchen	21	P-004 Kurzflügelgrille	33	P-006 Bohnenkäfer	45	P-044 Wanderheuschreck
10	P-098 Gewürzte Heimchen	22	P-004 Kurzflügelgrille	34	P-006 Bohnenkäfer	46	P-044 Wanderheuschreck
11	P-099 Gewürzte Heimchen	23	P-011 Wüstenheuschreck	35	P-008 Sagowurm	47	P-050 Heuschrecken
12	P-099 Gewürzte Heimchen	24	P-011 Wüstenheuschreck	36	P-008 Sagowurm	48	P-050 Heuschrecken
						49	P-050 Heuschrecken
						50	P-050 Heuschrecken

Abbildung 17: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit Primerpaar Ins_fw und Ins_rev

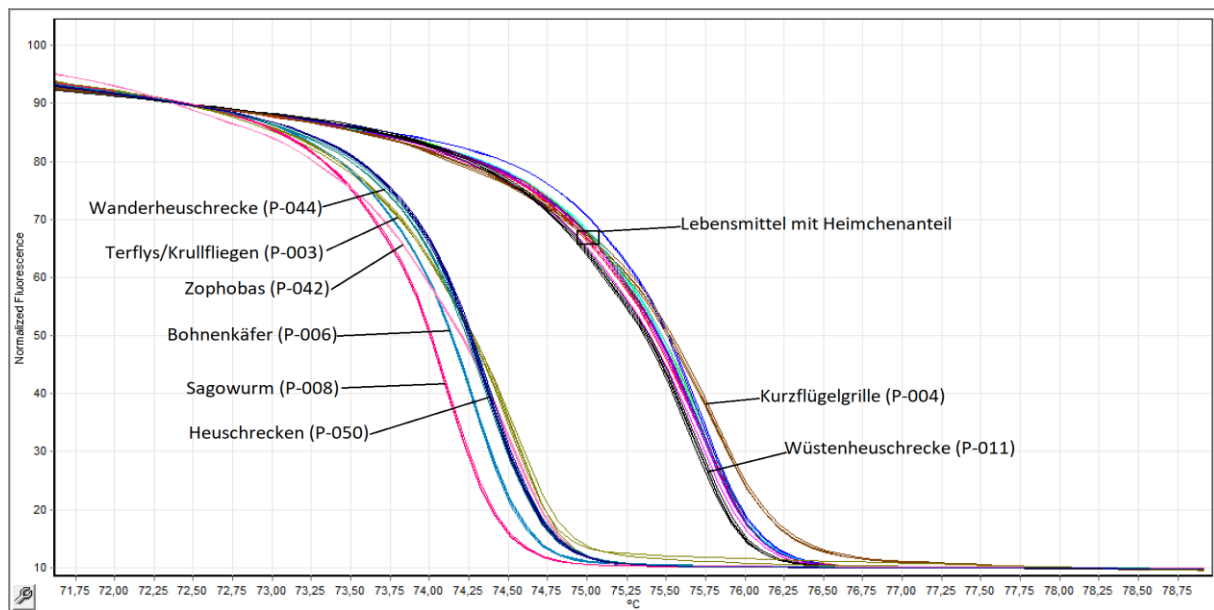


Abbildung 18: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-039, P-044, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011, P-003, P-006, P-008, P-042, P-044, P-050

5.1.6 Einsatz artifizierter Sequenzen zur Änderung der Schmelzkurven von Heimchenproben

Um die Extrakte, welche Heimchen enthalten, von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) besser unterscheiden zu können, wurde der Versuch unternommen, durch eine Heteroduplexbildung die Schmelzkurven der Proben mit Heimchenanteil zu verändern. Hierfür wurden Oligonukleotide entworfen, deren Sequenz sich nur wenige Basen von der DNA-Sequenz des Heimchens unterscheidet. Heim_AS1 unterscheidet sich um vier Basen, Heim_AS2 unterscheidet sich um zwei Basen von der DNA-Sequenz des Heimchens.

Tabelle 11: Heimchen Sequenz und artifizelle Sequenzen. Primerbindungsstellen der Heimchensequenz: dick gedruckt. Unterschiede der DNA-Sequenzen von Heimchen und artifizellen Sequenzen sind in rot und grün dargestellt.

Heimchen Sequenz	Sequenz 5' → 3'
Heimchen	TTACGCTGTTATCCCTAAGG TATCTTTATCTTCATTCCATAATACAGGATCAATTAACCAATCATCATAGTTAAACATAAAGAAGTTAAATTATCTCTGTCACCCCAACCAAATACAATATATTAAATCTATAAAAAACCACCAAACATAAATTTCAATATAATAATATTAAGATCTATAGGGTCTTCGTC
Artifizielle Sequenzen	Sequenz 5' → 3'
Heim_AS1	TATCTTTATCTTCATTCCATAATACAGGATCAATTAACCAATCATCATAGTTAAACATAAAGAA GTTAAATTACCTCTTGTCACCCCAACCAAATACAATATATTAACATCTATAAAAAACCACCAAACATAAATTTCAATATAATAATATTAAGA
Heim_AS2	TATCTTTATCTTCATTCCATAATACAGGATCAATTAACCAATCATCATAGTTAAACATAAAGAA GTTAAATTACCTCCGTCACCCCAACCAAATACAATATATTAACATCTATAAAAAACCACCAAACATAAATTTCAATATAATAATATTAAGA

Zuerst wurde versucht, die artifizellen Sequenzen inklusive der Primerbindungsstellen zu bestellen, jedoch konnten diese aufgrund ihrer Länge nicht synthetisiert werden. Daher wurden Primer entworfen, welche an die artifizellen Sequenzen binden. Es wurden ein forward (Heim_AS_fw) und zwei verschiedene reverse Primer (Heim_AS_rev_1 und Heim_AS_rev_2) entworfen (siehe Tabelle 12), deren Anlagerungstemperaturen denen der beiden Insekten Primer gleichen. Reverse Primer 1 bildet ein um sieben Basen längeres Produkt als reverse Primer 2.

Tabelle 12: Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_rev_2 und ihre Sequenz

Primer Name	Sequenz 5' → 3'
Heim_AS_fw	CAGGATCAATTAACCAATCATC
Heim_AS_rev_1	TTGAAATTTATGTTTGGTGGTTTT
Heim_AS_rev_2	TTATGTTTGGTGGTTTTTTATAGAT

5.1.7 PCR HRM mit artifizieller Sequenz unter Einsatz von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_rev_2)

In der folgenden PCR HRM Analyse wurden DNA-Extrakte der Spezies Heimchen (P-039), Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) in Doppelbestimmung analysiert. Die Extrakte wurden einer PCR HRM Analyse mit verschiedenen Primerkombinationen und der Zugabe einer artifiziellen Sequenz unterzogen (1.: Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1 mit artifizieller Sequenz 1; 2.: Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1 mit artifizieller Sequenz 2; 3.: Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_2 mit artifizieller Sequenz 1; 4.: Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_2 mit artifizieller Sequenz 2).

Die Primer wurden in einer Konzentration von 0,4 µM eingesetzt, die artifiziellen Sequenzen (5 ng/µL) wurden in einer 1:1.500.000 Verdünnung eingesetzt. Als Kontrolle wurden NTCs mit verschiedenen Primer- und Oligonukleotidkombinationen analysiert (NTC mit artifizieller Sequenz Heim_AS1 unter Einsatz von Heim_AS_rev_1, Heim_AS_fw, Ins_rev und Ins_fw Primer; NTC mit artifizieller Sequenz Heim_AS2 unter Einsatz von Heim_AS_rev_1, Heim_AS_fw, Ins_rev und Ins_fw Primer; NTC mit artifizieller Sequenz Heim_AS1 unter Einsatz von Heim_AS_rev_2, Heim_AS_fw, Ins_rev und Ins_fw Primer; NTC mit artifizieller Sequenz Heim_AS2 unter Einsatz von Heim_AS_rev_2, Heim_AS_fw, Ins_rev und Ins_fw Primer). Der Reaktionsmix wurde aus der in Tabelle 13 angegebenen Komponenten zusammengestellt:

Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermix und Reaktionsmix (vier Primer)

Mastermix	µL	Reaktionsmix	µL
RNase freies Wasser	1,32	Mastermix	16
2x Type-It HRM PCR Master Mix	11	DNA-Extrakt	2
Primer 10 µM Ins_fw	0,88	Oligo Heim_AS1/AS2	2
Primer 10 µM Ins_rev	0,88	Gesamt	20
Primer 10 µM Heim_AS_fw	0,88		
Primer 10 µM Heim_AS_rev_1/2	0,88		
MgCl ₂ 25 mM	1,76		
Gesamt	17,6		

In Abbildung 19 sind die Amplifikationskurven dargestellt. Die Ct-Werte der Proben wiesen mit Werten von 17 – 21 auf eine gute Amplifikation hin. NTCs sollten üblicherweise nicht zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führen, da in diesem Lauf den NTCs jedoch die entworfenen artifiziellen Sequenzen hinzugefügt wurden, führen sie zu einem Anstieg des Signals. Der relativ hohe Ct-Wert von über 30 kann durch eine geringe DNA-Konzentration erklärt werden, da die NTCs keine Proben DNA enthalten, sondern nur die stark verdünnten artifiziellen Sequenzen. Dennoch wurden sie amplifiziert, wodurch die Funktionalität der Heim_AS Primer bestätigt wurde. Bei den Proben Kurzflügelgrille (P-004) (rosa Farbtöne) und Wüstenheuschrecke (P-011) (blaue Farbtöne) war kein großer Unterschied im Fluoreszenzsignal zwischen den beiden Heim_AS_rev Primern zu erkennen. Die Heimchen-Extrakte (P-039) als auch die NTCs wiesen einen Unterschied zwischen den verschiedenen Primerkombinationen auf. Der Einsatz von Heim_AS_rev_1 führte zu höheren Fluoreszenzsignalen als der von Heim_AS_rev_2.

1	P-039 AS1 rev1	9	P-004 AS1 rev1	17	P-011 AS1 rev1	25	NTC AS1 rev1
2	P-039 AS1 rev1	10	P-004 AS1 rev1	18	P-011 AS1 rev1	26	NTC AS1 rev1
3	P-039 AS2 rev1	11	P-004 AS2 rev1	19	P-011 AS2 rev1	27	NTC AS2 rev1
4	P-039 AS2 rev1	12	P-004 AS2 rev1	20	P-011 AS2 rev1	28	NTC AS2 rev1
5	P-039 AS1 rev2	13	P-004 AS1 rev2	21	P-011 AS1 rev2	29	NTC AS1 rev2
6	P-039 AS1 rev2	14	P-004 AS1 rev2	22	P-011 AS1 rev2	30	NTC AS1 rev2
7	P-039 AS2 rev2	15	P-004 AS2 rev2	23	P-011 AS2 rev2	31	NTC AS2 rev2
8	P-039 AS2 rev2	16	P-004 AS2 rev2	24	P-011 AS2 rev2	32	NTC AS2 rev2

Abbildung 19: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1/2) und artifiziiellen Sequenzen in 1:1.500.000 Verdünnung

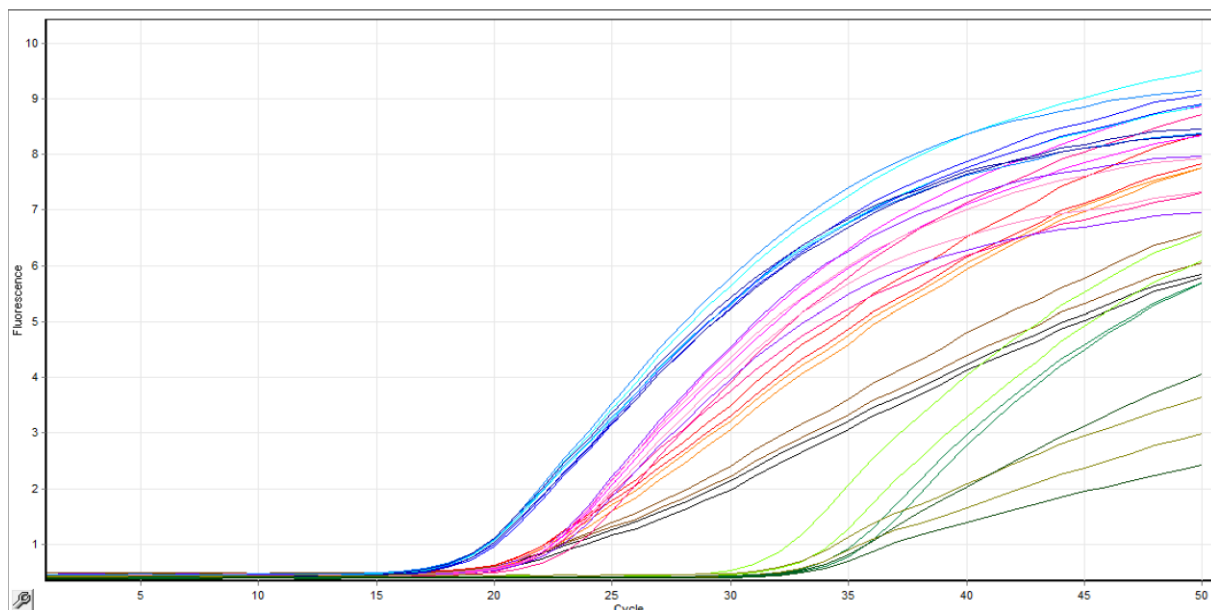


Abbildung 20: Amplifikation unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1/2) mit Proben P-039, P-004, P-011 und Zusatz artifiziieller Sequenz 1 bzw. 2 in einer 1:1.500.000 Verdünnung

In Abbildung 21 sind die Schmelzkurven der Proben in normalisierter Ansicht dargestellt. Die Schmelzkurven der Proben Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) veränderten sich nicht, im Vergleich zur PCR HRM Analyse ohne Zugabe artifiziieller Sequenzen. Die Zugabe der artifiziiellen Sequenzen und der Einsatz von verschiedenen Primerkombinationen hatte keinen Einfluss auf das Schmelzverhalten.

Im Gegensatz dazu veränderte sich die Form der für Heimchen (P-039) erhaltenen Schmelzkurven, sie waren von den für Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) erhaltenen Schmelzkurven gut zu unterscheiden. Erwartungsgemäß hätten die artifiziiellen Sequenzen die Schmelzkurven leicht verändern sollen und jeweils zu unterschiedlichen Kurven führen sollen. In Abbildung 21 ist jedoch zu erkennen, dass der Einsatz der verschiedenen artifiziiellen Sequenzen zu denselben Schmelzkurven führte. Der hervorgerufene Unterschied wurde demnach von den verschiedenen Heim_AS_rev Primern erzeugt. Heim_AS_rev_2 führte, im Vergleich zu Heim_AS_rev_1, zu stärker abweichenden Kurven, verglichen mit den ursprünglichen Schmelzkurven.

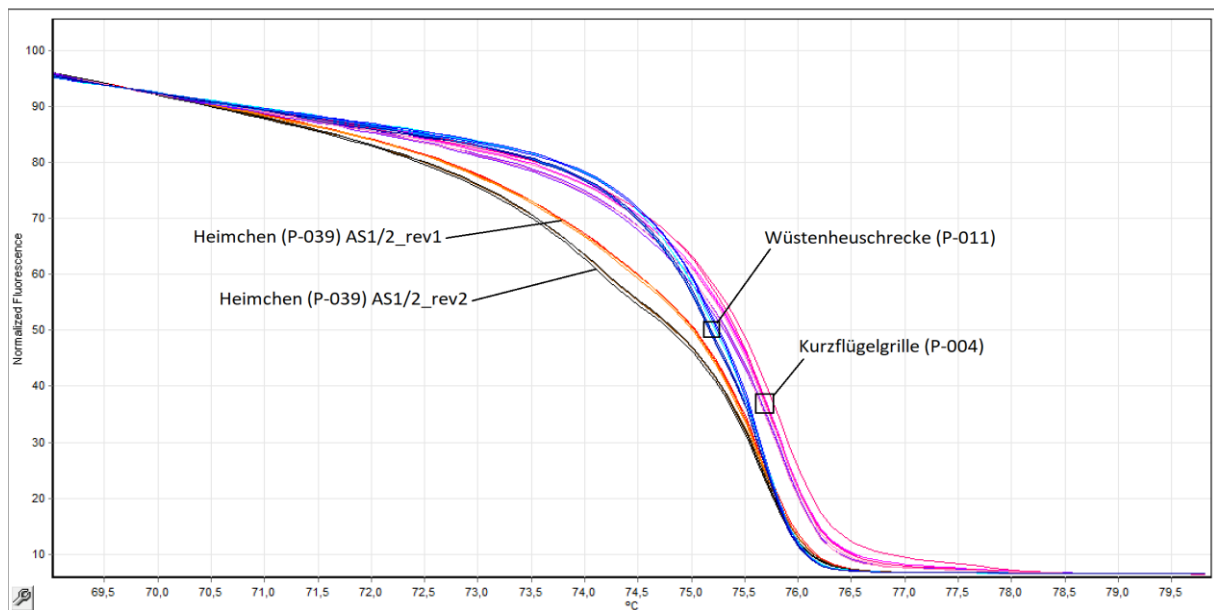


Abbildung 21: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1/2) mit Proben P-039, P-004, P-011 und Zusatzartificialer Sequenz 1 bzw. 2 in einer 1:1.500.000 Verdünnung

Um zu überprüfen, ob die Veränderung der Schmelzkurven nur durch den Zusatz der Primer Heim_AS_fw und Heim_AS_rev_1/2 hervorgerufen wurde, wurden die DNA-Extrakte von Heimchen (P-039), Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) mit und ohne Zusatz der artifiziellen Sequenz 1 eingesetzt. Allen anderen Wells wurde neben dem Reaktionsmix und DNA-Extrakt standardmäßig AS1 in der 1:1.500.000 Verdünnung zugesetzt. Die artifizielle Sequenz 2 wurde in dieser Analyse nicht verwendet, da beide Sequenzen zu denselben Schmelzkurven geführt haben. Da Primer Heim_AS_rev_1 im Vergleich zu Primer Heim_AS_rev_2 zu höheren Fluoreszenzsignalen in der Amplifikation geführt hatte, wurde dieser Primer zur weiteren Verwendung gewählt. Der Einfluss der zusätzlichen Primer auf Lebensmittelproben wurde exemplarisch mit den Proben Fusilli mit Grillenmehl (P-089) und Cricket Cracker Kurkuma Paprika (P-134) getestet. Zusätzlich wurden in dieser Analyse die drei restlichen zum Verzehr zugelassenen Insektenspezies [Mehlwurm (P-028), Wanderheuschrecke (P-044), Buffalowurm (P-049)] und weitere nicht zugelassene Spezies (P-002, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054) analysiert. In Abbildung 22 ist die Farbcodierung der Analyse zu sehen.

In Abbildung 23 sind die Schmelzkurven in normalisierter Ansicht dargestellt. Der Zusatz der artifiziellen Sequenz führte bei Heimchen (P-039), Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) zu geringen Verschiebungen der Schmelzkurven, der Kurvenverlauf blieb jedoch derselbe. Die Hypothese, dass die zusätzlichen Primer zu einer Änderung der Schmelzkurven führen, wurde bestätigt. Der Einsatz der zusätzlichen Primer und eines Oligonukleotids führte zu unterschiedlich starken Veränderungen der Kurven der beiden Lebensmittelproben [Fusilli mit Grillenmehl (P-089), Cricket Cracker Kurkuma Paprika (P-134)]. In Abbildung 18 überlappten die Schmelzkurven der Lebensmittelproben fast vollständig mit denen der unverarbeiteten Heimchenprobe (P-039), mit dem Einsatz von vier Primern war dies nicht mehr der Fall (Abbildung 23).

Auf die Schmelzkurven der Extrakte der Proben ohne Heimchenanteil hatte der Zusatz der artifiziellen Sequenz 1 und der Einsatz von vier Primern keinen Einfluss.

1	P-039 Heimchen	17	P-030 Schwarze Soldatenfl	33	P-006 Bohnenkäfer
2	P-039 Heimchen	18	P-030 Schwarze Soldatenfl	34	P-006 Bohnenkäfer
3	P-039 ohne AS1	19	P-031 Made der Wachsmo	35	P-008 Sagowurm
4	P-039 ohne AS1	20	P-031 Made der Wachsmo	36	P-008 Sagowurm
5	P-004 Kurzflügelgrille	21	P-042 Zophobas	37	P-012 Goldfliegen
6	P-004 Kurzflügelgrille	22	P-042 Zophobas	38	P-012 Goldfliegen
7	P-004 ohne AS1	23	P-044 Wanderheuschreck	39	P-015 Fruchtfliege
8	P-004 ohne AS1	24	P-044 Wanderheuschreck	40	P-015 Fruchtfliege
9	P-011 Wüstenheuschreck	25	P-049 Buffalowurm	41	P-054 Zikade
10	P-011 Wüstenheuschreck	26	P-049 Buffalowurm	42	P-054 Zikade
11	P-011 ohne AS1	27	P-059 Seidenraupe	43	P-089 Fusilli mit Grillenmehl
12	P-011 ohne AS1	28	P-059 Seidenraupe	44	P-089 Fusilli mit Grillenmehl
13	P-002 Mittelmeer-Feldgrille	29	P-003 Terflys/Krullfliegen	45	P-134 Cricket Cracker Kurk
14	P-002 Mittelmeer-Feldgrille	30	P-003 Terflys/Krullfliegen	46	P-134 Cricket Cracker Kurk
15	P-028 Mehlwurm	31	P-005 Steppengrillen	47	NTC AS1
16	P-028 Mehlwurm	32	P-005 Steppengrillen	48	NTC AS1

Abbildung 22: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) und artifizeller Sequenz 1 in einer 1:1.500.000 Verdünnung

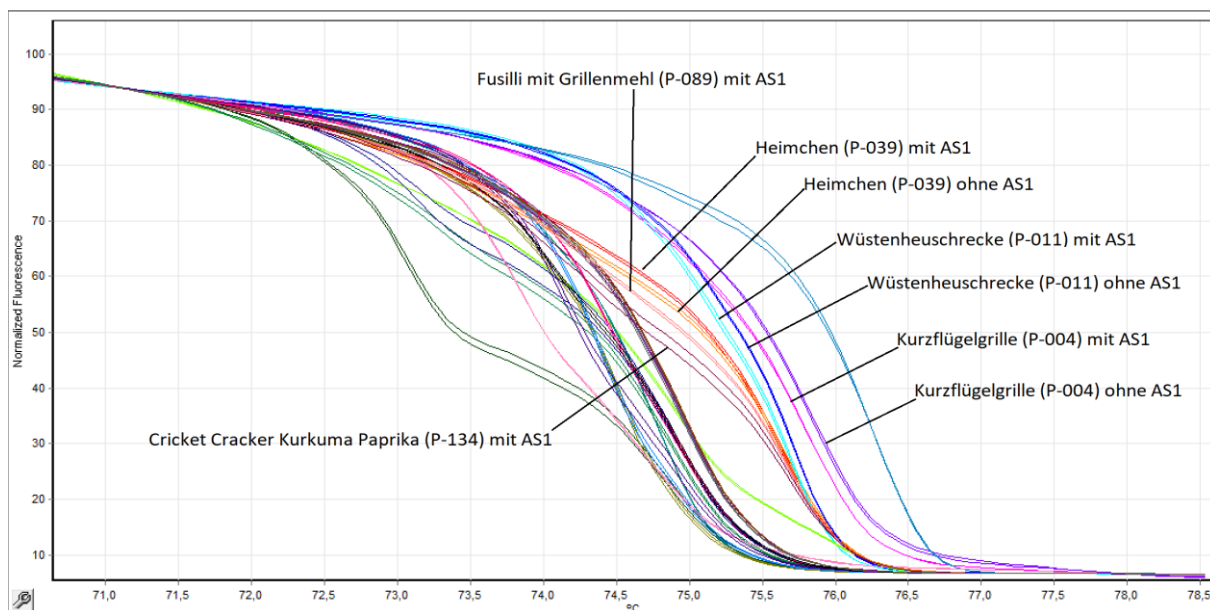


Abbildung 23: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-004, P-011, P-028, P-044, P-049, P-002, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054 und Zusatz artifizeller Sequenz 1 in einer 1:1.500.000 Verdünnung

Diese Analyse (Abbildung 23) wurde ohne artifizelle Sequenz wiederholt, mit Zusatz zwei weiterer Lebensmittelproben, die Heimchen enthalten [Gewürzte Heimchen Tomate (P-098), Cricket Cracker Rosmarin Thymian (P-133)]. Die Schmelzkurven der Proben verhielten sich ohne Einsatz der artifizellen Sequenz 1 gleich, wie in der PCR HRM Analyse unter Einsatz der artifizellen Sequenz (Abbildung 23). In Abbildung 24 sind exemplarisch nur die Schmelzkurven von Kurzflügelgrille (P-004) (pink), Wüstenheuschrecke (P-011) (blau), Heimchen (P-039) (rot), Fusilli mit Grillenmehl (P-089) (braun), Gewürzte Heimchen Tomate (P-098) (olivgrün), Cricket Cracker Rosmarin Thymian (P-133) (hellgrün) und Cricket Cracker Kurkuma Paprika (P-134) (dunkelgrün) in normalisierter Ansicht dargestellt. Die Schmelzkurven der Lebensmittelproben wichen von denen der reinen Insektenspezies unterschiedlich stark ab.

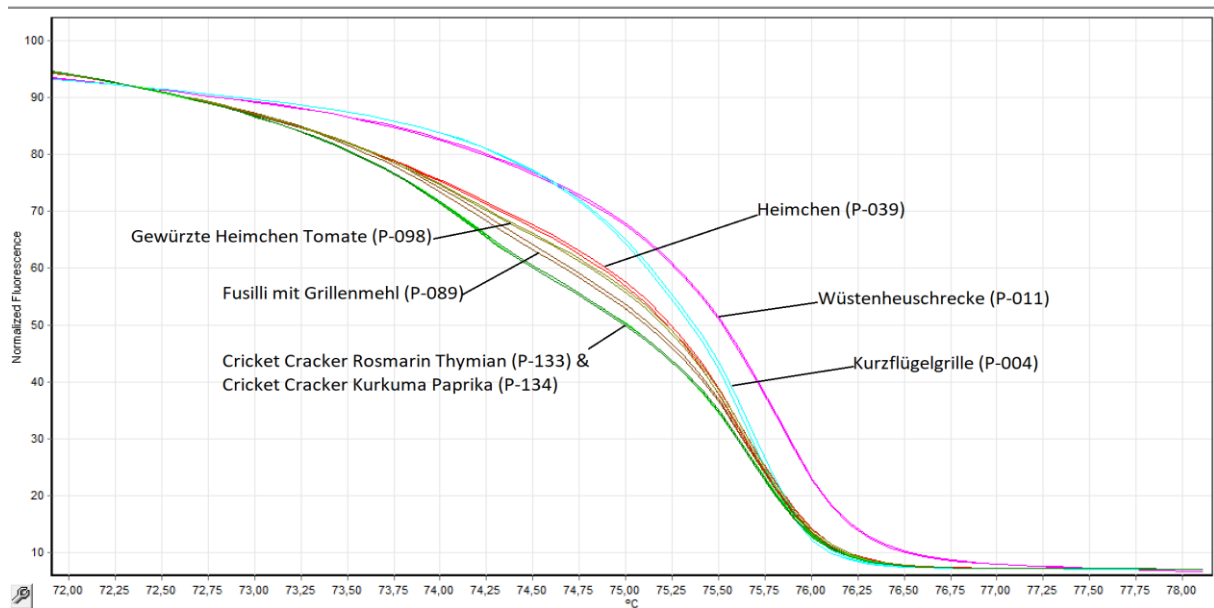


Abbildung 24: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-004, P-011, P-039, P-089, P-098, P-133, P-134

In Abbildung 25 sind die ersten negative Ableitungen der Schmelzkurven von Kurzflügelgrille (P-004) (pink), Wüstenheuschrecke (P-011) (blau), Heimchen (P-039) (rot), Fusilli mit Grillenmehl (P-089) (braun), Gewürzte Heimchen Tomate (P-098) (olivgrün), Cricket Cracker Rosmarin & Thymian (P-133) (hellgrün) und Cricket Cracker Kurkuma & geräucherte Paprika (P-134) (dunkelgrün) dargestellt. In dieser Ansicht war bei den Heimchen und Lebensmittelproben, welche Heimchen enthalten, ein zweiter Peak bei 74,3 °C erkennbar, der je nach Probe unterschiedlich stark ausgeprägt war.

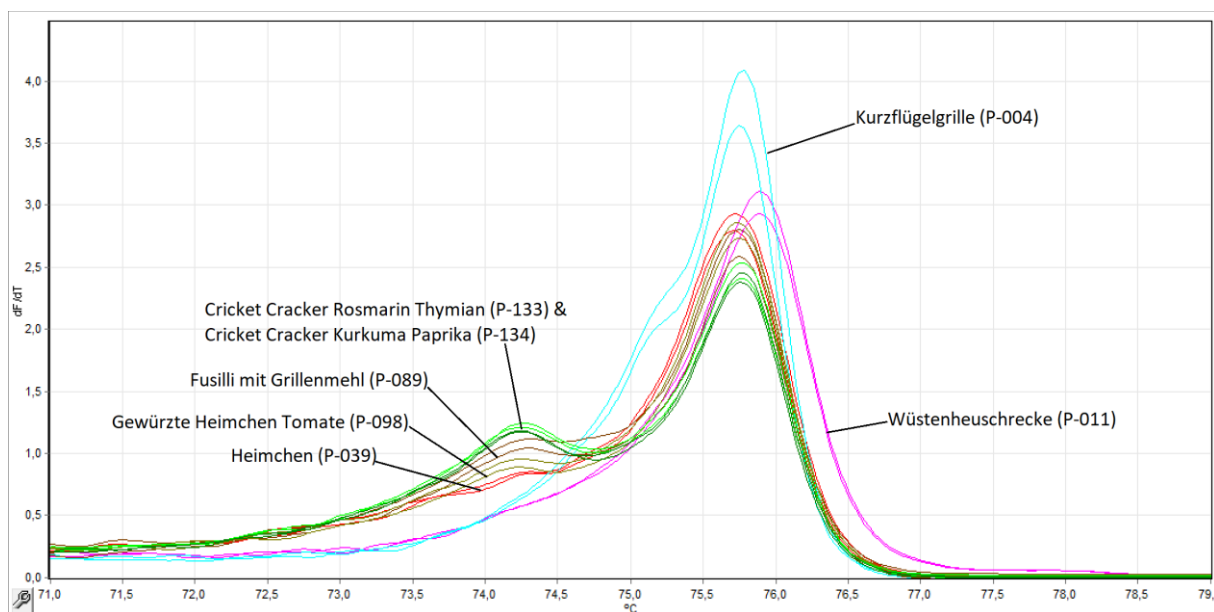


Abbildung 25: Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-004, P-011, P-039, P-089, P-098, P-133, P-134

5.1.8 Überprüfung der Länge der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

Um eine Information über die Länge der erhaltenen PCR-Produkte zu bekommen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. PCR-Produkte, die für die Proben Heimchen (P-039), Fusilli mit Grillenmehl (P-089), Gewürzte Heimchen Tomate (P-098), Cricket Cracker Rosmarin & Thymian (P-133), Cricket Cracker Kurkuma & geräucherte Paprika (P-134), Kurzflügelgrille (P-004), Wüstenheuschrecke (P-011), Schwarze Soldatenfliegen (P-030), Terflys/Krullfliegen (P-003), Fruchtfliege (P-015) und Seidenraupe (P-059) unter verschiedenen Primerkombinationen, mit und ohne Einsatz von artifiziellen Sequenzen erhalten wurden, wurden auf Gele aufgetragen. Weiters wurden NTCs mit Zusatz der artifiziellen Sequenzen verwendet. In Tabelle 14 und 15 sind die Beladungsschemen der Gele zu sehen. Ist nur die Probennummer angegeben, wurden in der PCR HRM Analyse zwei Primer (Ins_rev, Ins_fw) eingesetzt. Ist im Anschluss an die Probennummer Rev1 bzw. Rev2 angegeben, wurden vier Primer eingesetzt (Ins_rev, Ins_fw, Heim_AS_fw und je nach Angabe Heim_AS_rev_1 oder Heim_AS_rev_2). Weiters ist angegeben, ob die artifizielle Sequenz 1 (AS1) bzw. die artifizielle Sequenz 2 (AS2) hinzugefügt wurde.

Gel 1:

In Lane 10 wurde die falsche Probe pipettiert (Goldfliege (P-012) statt P-089_rev1_AS1)

Tabelle 14: Beladungsschema von Gel 1

1	LMW DNA Ladder	7	P-039_Rev2_AS2	13	P-133	19	NTC_Rev1_AS2
2	P-039	8	P-089	14	P-133_Rev1	20	NTC_Rev2_AS1
3	P-039_Rev1	9	P-089_Rev1	15	P-134	21	NTC_Rev2_AS2
4	P-039_Rev1_AS1	10	P-012	16	P-134_Rev1	26	LMW DNA Ladder
5	P-039_Rev1_AS2	11	P-098	17	P-134_Rev1_AS1		
6	P-039_Rev2_AS1	12	P-098_Rev1	18	NTC_Rev1_AS1		

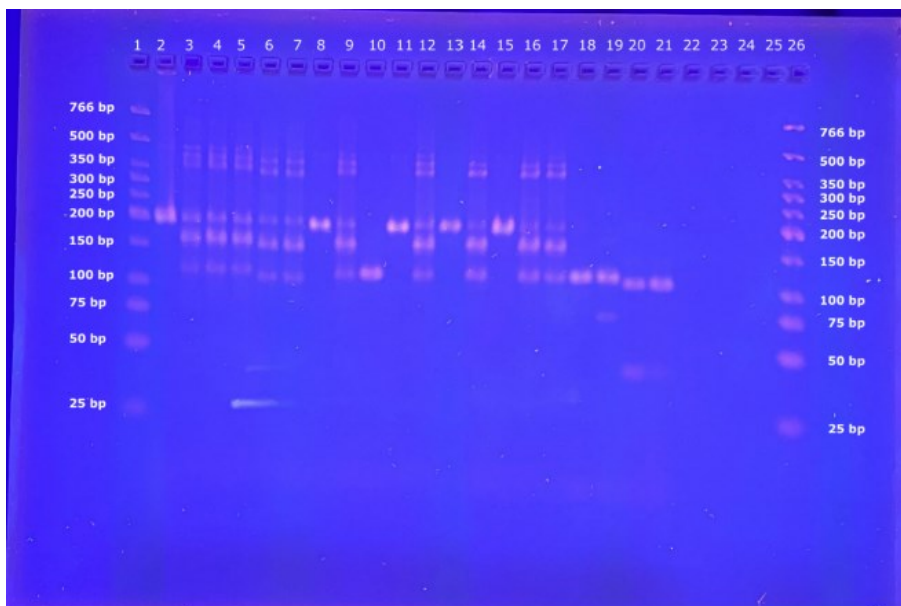


Abbildung 26: Foto von Gel 1. Beladungsschema siehe Tabelle 14

Auf Gel 1 ist klar zu erkennen, dass der Zusatz des Primerpaars Heim_AS bei unverarbeiteten Heimchenprodukten und Lebensmittelproben, welche Heimchen beinhalten, zu mehreren Produkten verschiedener Länge geführt hat (Lane 3 – 17).

In Lane 18 – 21 sind die PCR-Produkte der NTCs unter Verwendung verschiedener Heim_AS reverse Primer zu sehen. Die NTCs mit denselben reverse Primern führten unabhängig von der artifizialen Sequenz zu Produkten derselben Länge. Die Länge der Produkte der beiden reverse Primer war leicht unterschiedlich. Heim_AS_rev_1 erzeugte, wie zu erwarten war, minimal längere Produkte (um sieben Basen länger) als Heim_AS_rev_2 (Kapitel 5.1.6).

Die Unterschiede in den Schmelzkurven basieren auf den unterschiedlichen Längen der PCR-Produkte (Abbildung 21). Dadurch wird die Annahme, dass der Zusatz der Primer zu einer Verschiebung der Schmelzkurven führte, erneut bestätigt.

Die artifizialen Sequenzen wurden, wie in der PCR HRM Analyse zu sehen war, amplifiziert (Lane 18 – 21), hatten jedoch keinen Einfluss auf das Verhalten der Schmelzkurven. Die PCR-Produkte der artifizialen Sequenz 1 und 2 wiesen unter Verwendung derselben Primerkombination dieselbe Länge auf (Lane 18 und 19, Lane 20 und 21).

Gel 2:

Tabelle 15: Beladungsschema von Gel 2

1	LMW DNA Ladder	8	P-011	15	P-030_Rev1	22	P-015_Rev1_AS1
2	P-004	9	P-011_Rev1	16	P-030_Rev1_AS1	23	P-059
3	P-004_Rev1	10	P-011_Rev1_AS1	17	P-003	24	P-059_Rev1
4	P-004_Rev1_AS1	11	P-011_Rev1_AS2	18	P-003_Rev1	25	P-059_Rev1_AS1
5	P-004_Rev1_AS2	12	P-011_Rev2_AS1	19	P-003_Rev1_AS1	26	LMW DNA Ladder
6	P-004_Rev2_AS1	13	P-011_Rev2_AS2	20	P-015		
7	P-004_Rev2_AS2	14	P-030	21	P-015_Rev1		

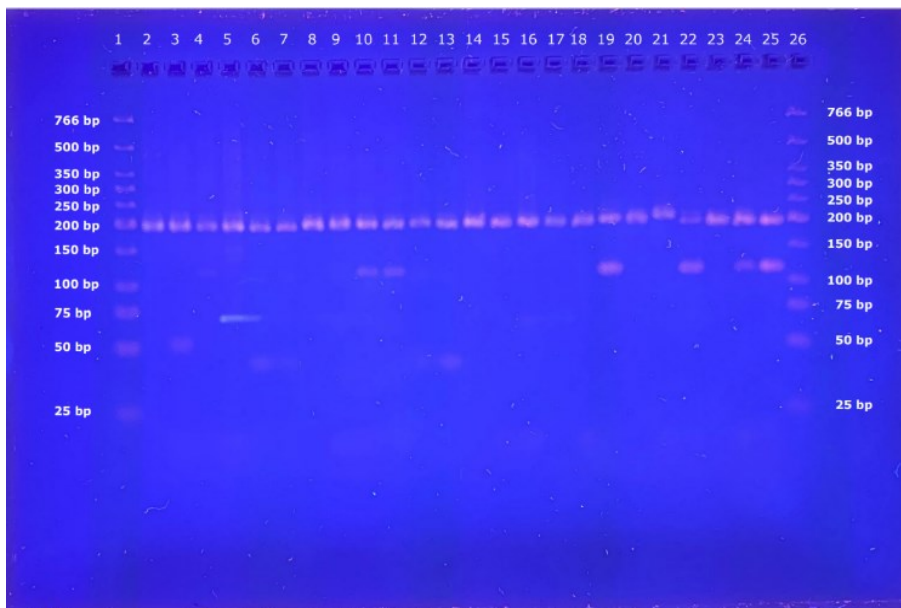


Abbildung 27: Foto von Gel 2. Beladungsschema siehe Tabelle 15.

Auf Gel 2 wurden PCR-Produkte von Insektenspezies aufgetragen, an deren Sequenzen die Heim_AS Primer nicht binden sollten. Die Ergebnisse des Gels bestätigten diese Annahme. Die Zugabe des Heim_AS Primerpaars führte nicht zur Bildung weiterer Produkte unterschiedlicher Länge.

5.1.9 Unterscheidbarkeit der Insektenspezies mit drei Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw/rev_1)

Um diese PCR HRM Methode mit zusätzlichen Primern zu optimieren und den Aufwand bzw. Kosten zu reduzieren, wurde in einer Analyse die Wirksamkeit einer Kombination aus drei Primern getestet. Der Einsatz von nur drei Primern könnte eventuell zu einer Reduktion der Unterschiede in den Schmelzkurven, die für die verschiedenen Lebensmittelproben mit Heimchenanteil beobachtet wurden, führen.

Ein Ansatz enthielt jeweils Ins_fw, Ins_rev und entweder Heim_AS_fw oder Heim_AS_rev_1 Primer in einer Konzentration von 0,4 µM. Zur Überprüfung der Unterscheidbarkeit wurden die Spezies Heimchen (P-039), Fusilli mit Grillenmehl (P-089), Cricket Cracker Rosmarin & Thymian (P-133), Cricket Cracker Kurkuma & geräucherte Paprika (P-134), Wanderheuschrecke (P-044), Buffalowurm (P-049), Fertigmischung Hafer-Laibchen-Mix mit Insektenprotein (A. diaperinus) (P-096), Kurzflügelgrille (P-004), Wüstenheuschrecke (P-011) und Soldatenfliegenlarven (P-030) analysiert.

In Abbildung 28 sind die Schmelzkurven der für die Proben P-039, P-089, P-133, P-134, P-004 und P-011 erhaltenen Produkte in normalisierter Ansicht dargestellt. Schmelzkurven von P-039, P-089, P-133 und P-134 unter Verwendung des Mastermixes mit Heim_AS_fw sind in Grüntönen, unter Verwendung des Mastermixes mit Heim_AS_rev_1 in Rot- und Brauntönen dargestellt. Die Schmelzkurven von Kurzflügelgrille (P-004) sind in Pinktönen und die Kurven von Wüstenheuschrecke (P-011) in Blautönen dargestellt.

Der Einsatz verschiedener Primer hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die Schmelzkurven der Spezies Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011).

Die Kombination aus drei Primern, welche auch Heim_AS_rev_1 beinhaltete, führte, im Vergleich zur Durchführung ohne diesen Primer, zu keiner Änderung der Schmelzkurven der Heimchenproben.

Die Änderung der Schmelzkurven beruhte auf dem Zusatz des Heim_AS_fw Primers (grün).

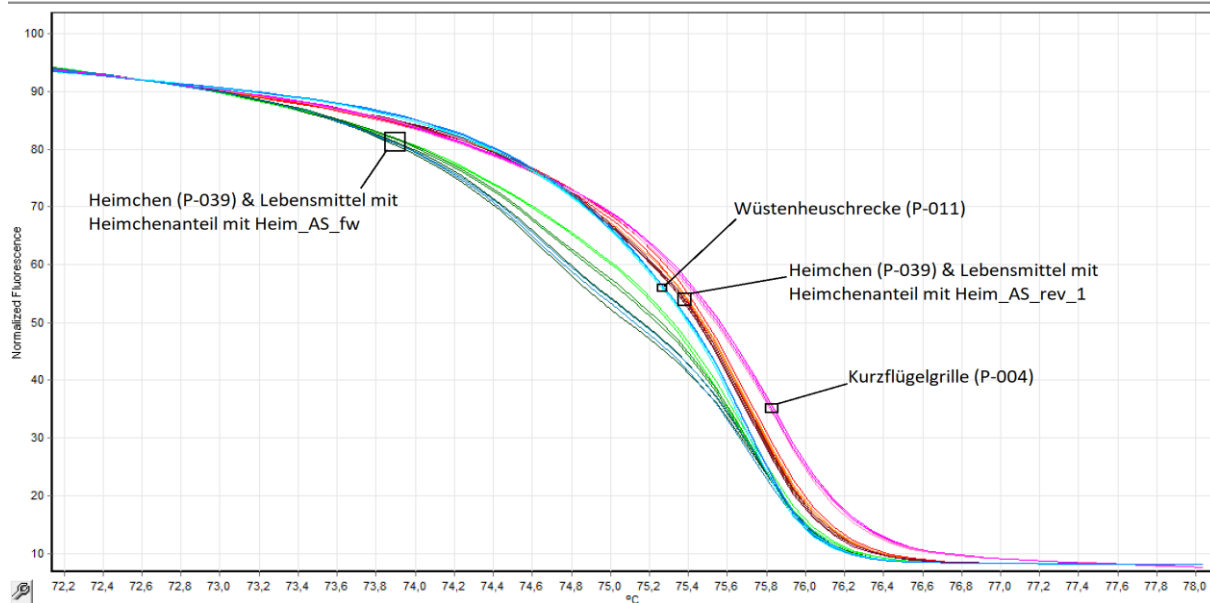


Abbildung 28: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw/rev_1) mit Proben P-039, P-089, P-133, P-134, P-004, P-011

In Abbildung 29 ist die erste negative Ableitung der Schmelzkurven der Proben, welche Heimchen enthalten, zu sehen. Die Kurven unter Einsatz von Heim_AS_fw sind in Grüntönen, unter Einsatz von Heim_AS_rev_1 in Rot- und Brauntönen dargestellt. Der Zusatz des Heim_AS_fw Primers führte zu einem zweiten Peak bei einer Temperatur von 74,7 °C, der je nach Probe unterschiedlich stark ausgeprägt war. Dieser zweite Peak führte zu einer veränderten Schmelzkurve in normalisierter Ansicht und ermöglicht die Unterscheidung der Heimchenproben von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011). Heim_AS_rev_1 führte nicht zur Bildung dieses zweiten Peaks.

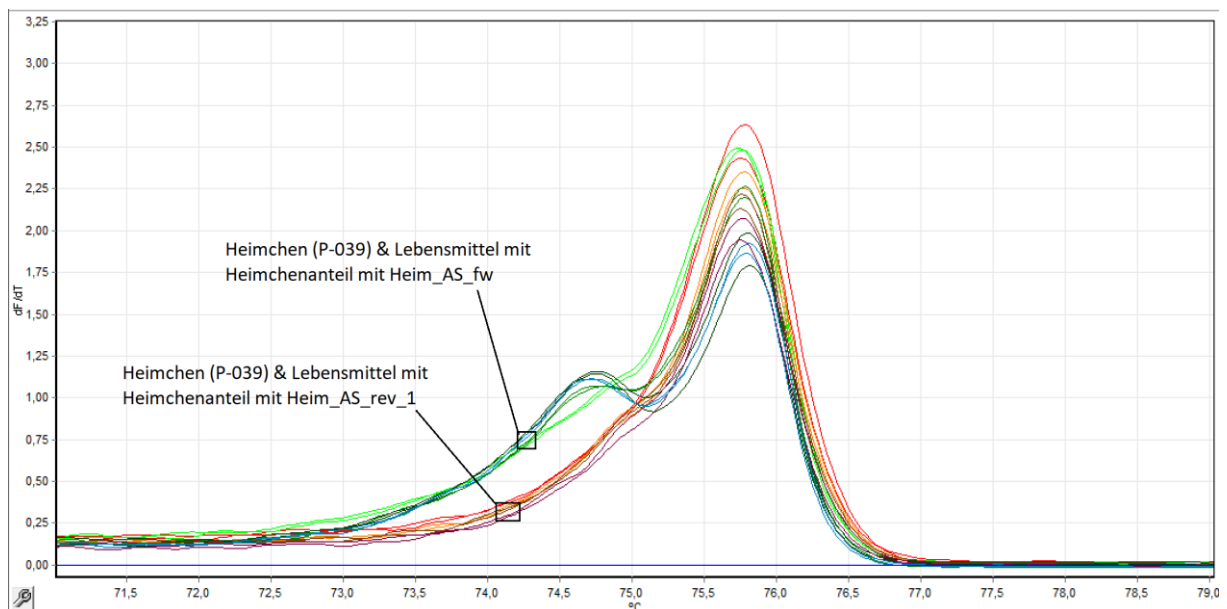


Abbildung 29: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw/rev_1) mit Proben P-039, P-089, P-133, P-134

5.1.10 Optimierung der Primerkonzentrationen

Um die Streuung der Schmelzkurven der Heimchenprodukte so gering wie möglich zu halten, wurde versucht, Primer Heim_AS_fw in geringerer Konzentration einzusetzen. In dieser PCR HRM Analyse wurden die Insekten Primer in einer Konzentration von 0,4 μM eingesetzt. Der Heim_AS_fw Primer wurde in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,2 μM und 0,4 μM zugesetzt. Die Proben Heimchen (P-039), Fusilli mit Grillenmehl (P-089), Cricket Cracker Tomate Oregano (P-134), Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) wurden analysiert. Die Farbcodierung ist in Abbildung 30 zu sehen. Heimchenproben mit einer Heim_AS_fw Primerkonzentration von 0,1 μM sind in Grüntönen, von 0,2 μM in Rot- und Brauntönen und von 0,4 μM in Grautönen dargestellt.

In Abbildung 31 sind die Schmelzkurven in normalisierter Ansicht dargestellt. Je geringer die Konzentration des Heim_AS_fw Primers war, desto ähnlicher waren die Schmelzkurven der Produkte, die mit den Primern Ins_fw und Ins_rev erhalten wurden. Bei geringerer Heim_AS_fw Konzentration streuten die Schmelzkurven der Heimchenproben untereinander weniger.

1 P-039_Heimchen_0,1	9 P-089_Fussili_0,2	17 P-134_Cracker_0,4
2 P-039_Heimchen_0,1	10 P-089_Fussili_0,2	18 P-134_Cracker_0,4
3 P-039_Heimchen_0,2	11 P-089_Fussili_0,4	19 P-004_Kurzflügelgrille_0,1
4 P-039_Heimchen_0,2	12 P-089_Fussili_0,4	20 P-004_Kurzflügelgrille_0,1
5 P-039_Heimchen_0,4	13 P-134_Cracker_0,1	21 P-004_Kurzflügelgrille_0,2
6 P-039_Heimchen_0,4	14 P-134_Cracker_0,1	22 P-004_Kurzflügelgrille_0,2
7 P-089_Fussili_0,1	15 P-134_Cracker_0,2	23 P-004_Kurzflügelgrille_0,4
8 P-089_Fussili_0,1	16 P-134_Cracker_0,2	24 P-004_Kurzflügelgrille_0,4
		25 P-011_Wüstenheuschrecke
		26 P-011_Wüstenheuschrecke
		27 P-011_Wüstenheuschrecke
		28 P-011_Wüstenheuschrecke
		29 P-011_Wüstenheuschrecke
		30 P-011_Wüstenheuschrecke

Abbildung 30: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 μM) und Heim_AS_fw (0,1 μM , 0,2 μM , 0,4 μM)

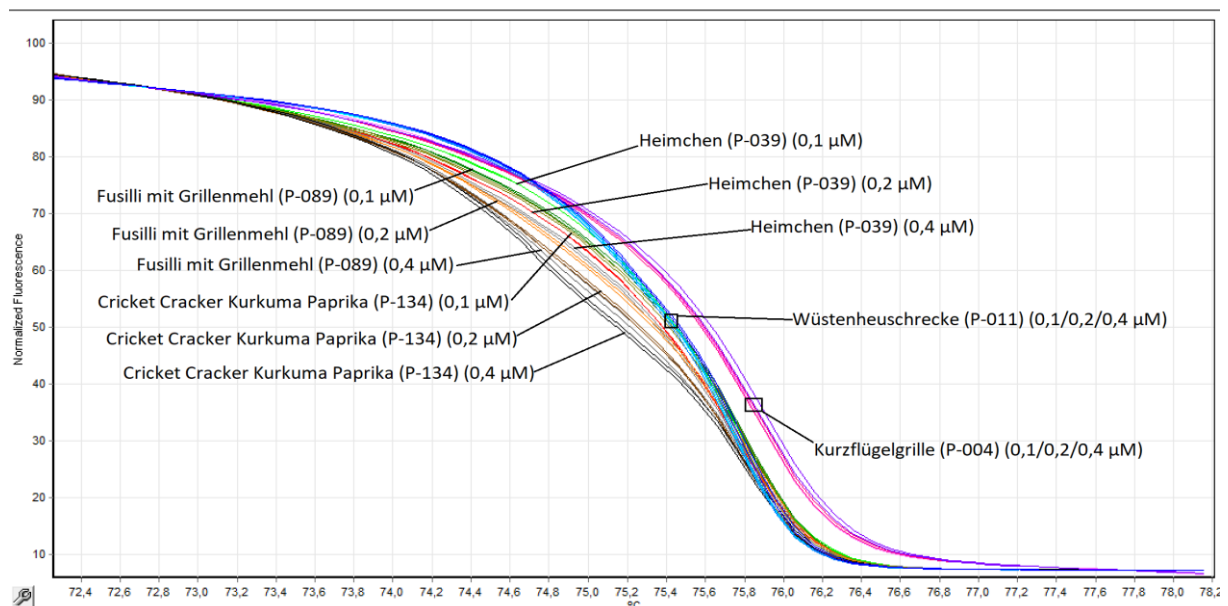


Abbildung 31: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 μM) und Heim_AS_fw (0,1 μM , 0,2 μM , 0,4 μM) mit Proben P-039, P-089, P-134, P-004, P-011

In Abbildung 32 ist die erste negative Ableitung der Schmelzkurven der Proben, welche Heimchen beinhalten, zu sehen. Der zweite Peak bei 74,7 °C wurde mit höherer Heim_AS_fw Konzentration größer und führte auch zu größeren Streuungen zwischen den Heimchenproben.

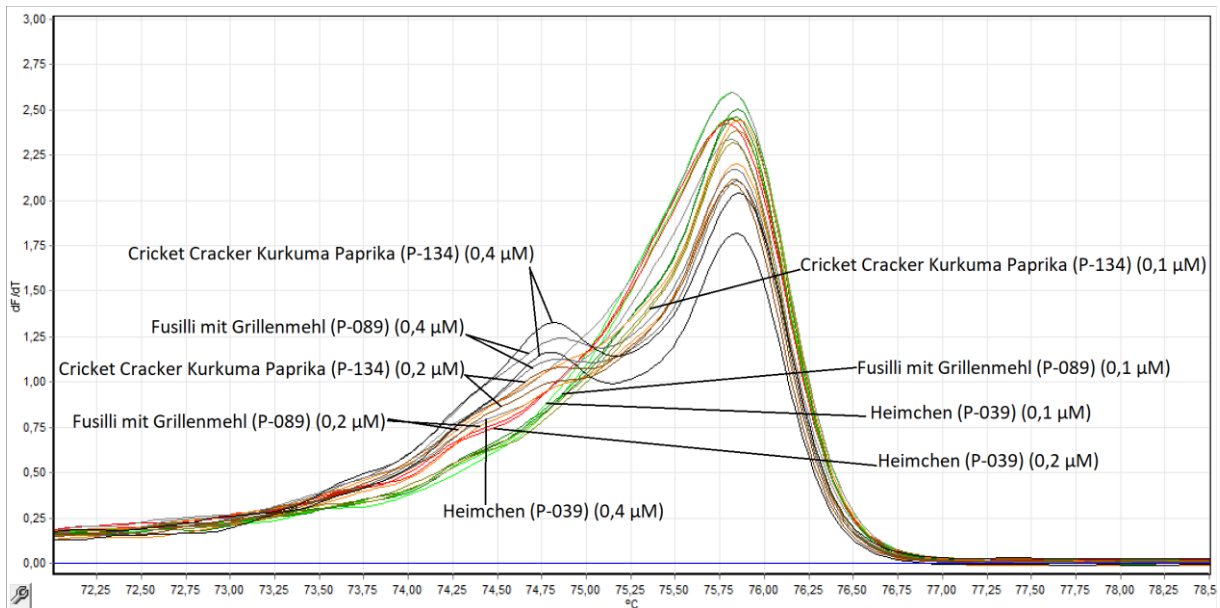


Abbildung 32: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Heim_AS_fw (0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM) mit Proben P-039, P-089, P-134, P-004, P-011

Aufgrund der Ergebnisse dieser PCR HRM Analyse wurde eine Primerkonzentration von 0,2 µM für Heim_AS_fw als optimal betrachtet. Die Schmelzkurven der Produkte streuten weniger als mit einer Konzentration von 0,4 µM, dennoch waren die Kurven von denen der Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) zu unterscheiden.

Um zu überprüfen, ob der Einsatz von drei Primern in unterschiedlichen Konzentrationen einen Einfluss auf die Streuung aller Lebensmittelextrakte mit Heimchenanteil hat, wurde eine PCR HRM Analyse von Heimchen (P-039) und allen Extrakten von Lebensmitteln, welche Heimchen beinhalten, analysiert. Cricket Cracker Tomate & Oregano (P-132) und Gewürzte Heimchen geräuchert (P-099) wurden zuvor nur mit den Primern Ins_fw und Ins_rev getestet. Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) wurden ebenfalls analysiert. Der Reaktionsmix beinhaltete drei Primer: Ins_rev und Ins_fw in einer Konzentration von 0,4 µM und Heim_AS_fw in einer Konzentration von 0,2 µM. Diese Bedingungen haben sich als optimal herausgestellt. In Abbildung 33 ist die Farbcodierung der Analyse zu sehen.

In Abbildung 34 sind die normalisierten Schmelzkurven dargestellt. Die Schmelzkurven von Cricket Cracker Tomate & Oregano (P-132) wichen am stärksten von Heimchen (P-039) ab. Die Schmelzkurven von Gewürzte Heimchen geräuchert (P-099) haben sich im Vergleich zu den anderen Lebensmittelproben nach höheren Temperaturen verschoben und lagen näher an Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011). Als nächstes wurde geprüft, ob durch eine Primerkonzentration von 0,4 µM des Heim_AS_fw Primers eine bessere Unterscheidung der Probe Gewürzte Heimchen geräuchert (P-099) von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) möglich ist.

1	P-039 Heimchen	9	P-098 Gewürzt Tomate		
2	P-039 Heimchen	10	P-098 Gewürzt Tomate		
3	P-87 Grillen	11	P-099 Gewürzt geräuchert	17	P-134 Cracker Kur. Pa.
4	P-87 Grillen	12	P-099 Gewürzt geräuchert	18	P-134 Cracker Kur. Pa.
5	P-089 Fussili	13	P-132 Cracker Tom. Or.	19	P-004 Kurzflügelgrille
6	P-089 Fussili	14	P-132 Cracker Tom. Or.	20	P-004 Kurzflügelgrille
7	P-090 Grille frittiert	15	P-133 Cracker Ros. Thy.	21	P-011 Wüstenheuschreck
8	P-090 Grille frittiert	16	P-133 Cracker Ros. Thy.	22	P-011 Wüstenheuschreck

Abbildung 33: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 μ M) und Heim_AS_fw (0,2 μ M)]

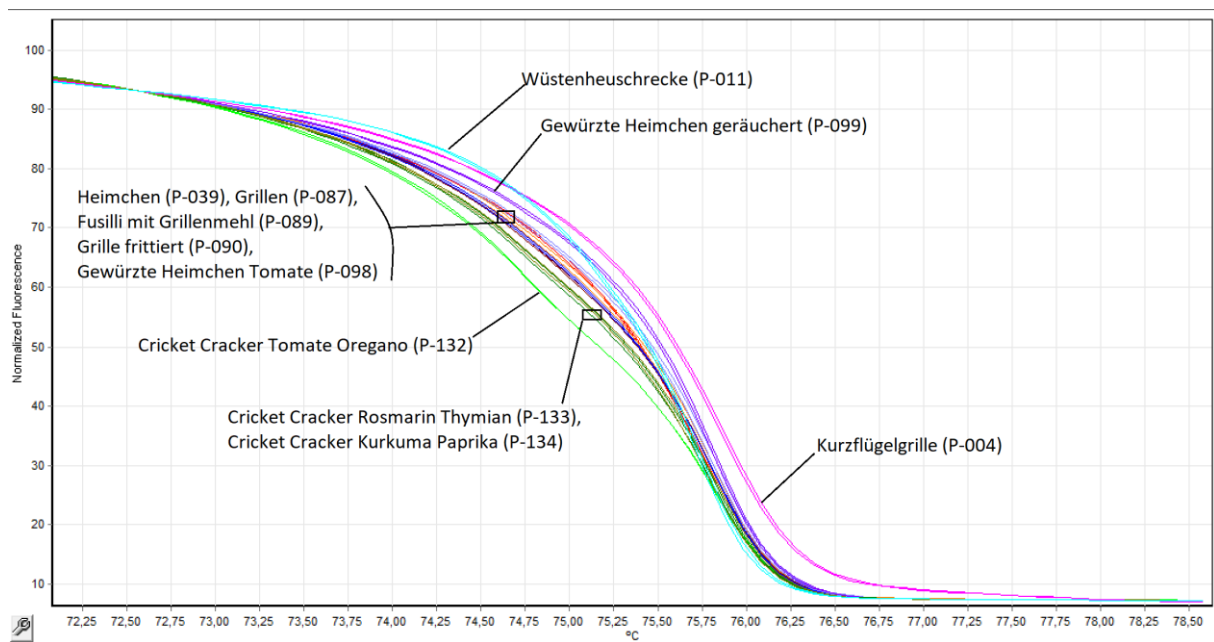


Abbildung 34: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 μ M) und Heim_AS_fw (0,2 μ M)] mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011

5.1.11 PCR HRM mit optimiertem Primerset aus vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1)

Aufgrund der stärkeren Abweichung der Schmelzkurven der Extrakte von Cricket Cracker Tomate & Oregano (P-132) und Gewürzte Heimchen geräuchert (P-099), wurde geprüft, ob die Analyse aller Heimchenprodukte mit vier Primern (Ins_rev, Ins_fw, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_fw) in einer Konzentration von 0,4 μ M die Streuung der Schmelzkurven reduzieren könnte.

In Abbildung 35 sind die Schmelzkurven in normalisierter Ansicht dargestellt. Die Farbcodierung gleicht der in Abbildung 33. Durch die Kombination der vier Primer und der höheren Konzentration der Heim_AS Primer waren die Schmelzkurven der Heimchenproben, im Vergleich zur Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 μ M), Heim_AS_fw (0,2 μ M)] in Abbildung 34, besser von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) zu unterscheiden. Einzig die Schmelzkurven von Cricket Cracker Tomate & Oregano (P-132) wichen stark von den Kurven der restlichen Heimchenprodukte ab und deren Doppelbestimmung waren nicht wiederholbar. Da die Doppelbestimmung bei den anderen Proben zu annähernd überlappenden Schmelzkurven führte, wurde davon ausgegangen, dass die Abweichungen der Schmelzkurven von Cricket Cracker Tomate & Oregano (P-132) ihren Ursprung in der Probe haben (z.B.: Kontamination des Extrakts, Verunreinigung, Störkomponenten in der Probe).

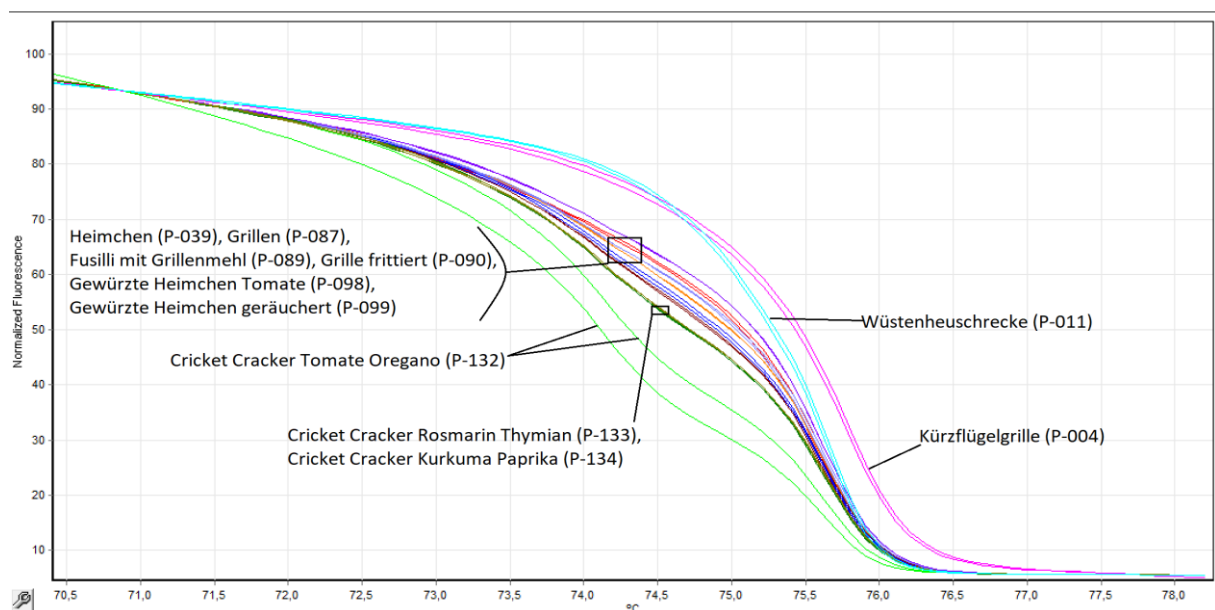


Abbildung 35: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011

5.1.12 Einsatz artifiziieller Sequenzen in erhöhter Konzentration

In Kapitel 5.1.7 wurde der Einfluss der artifiziiellen Sequenzen auf die Veränderung der Schmelzkurvenverläufe der PCR-Produkte von Proben mit Heimchenanteil beschrieben. Die Zugabe der artifiziiellen Sequenzen in einer 1:1.500.000 Verdünnung hatte keinen Einfluss auf die Schmelzkurvenverläufe. Als nächstes wurde geprüft, ob eine höhere Konzentration der artifiziiellen Sequenzen einen größeren Einfluss auf die Schmelzkurven der PCR-Produkte mit Heimchenanteil hat. Heimchen (P-039) wurde mit derselben Kombination aus vier Primern und Zugabe der artifiziiellen Sequenzen 1 bzw. 2 in einer 1:15.000 Verdünnung analysiert. In Abbildung 36 sind die Schmelzkurven in normalisierter Ansicht dargestellt. Sowohl der Zusatz von AS 1 als auch der von AS 2 führte zu einer Änderung des Schmelzkurvenverlaufs.

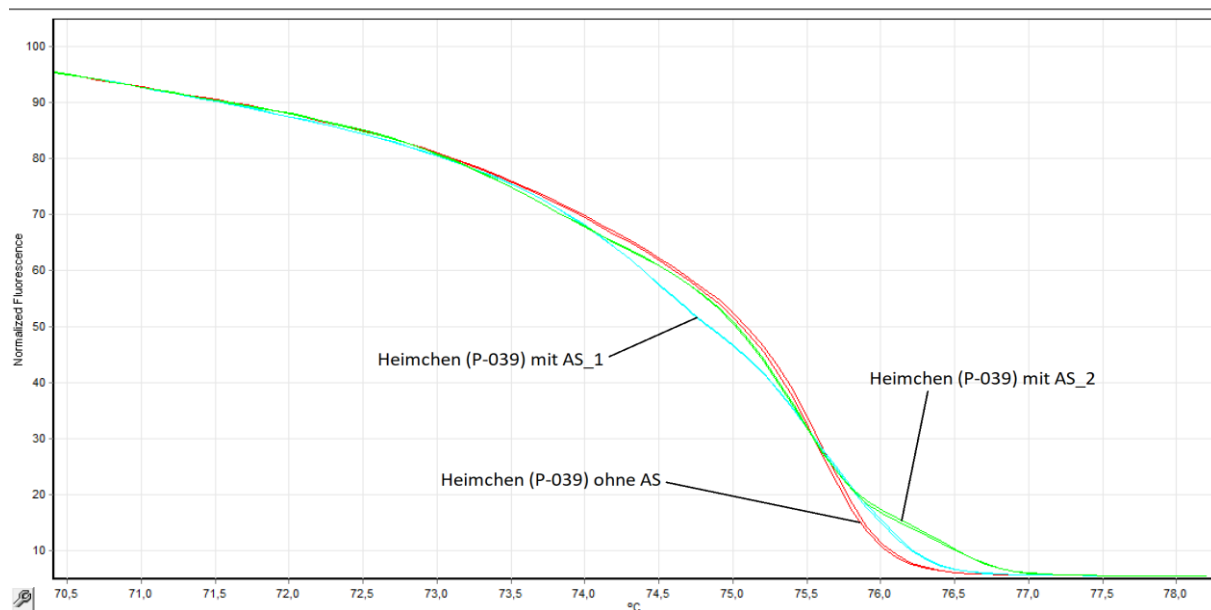


Abbildung 36: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Probe P-039 und Zusatz artifiziieller Sequenz 1 bzw. 2 in 1:15.000 Verdünnung. Heimchen (P-039) ohne artifiziielle Sequenz ist in rot, Heimchen (P-039) mit Zugabe von AS_1 ist in blau und Heimchen (P-039) mit Zugabe von AS_2 ist in grün dargestellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle Extrakte von Lebensmitteln, welche Heimchen beinhalten, Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) mit vier Primern und dem Zusatz der artifiziiellen Sequenzen in einer 1:15.000 Verdünnung analysiert. In den folgenden Abbildungen sind die Schmelzkurven dargestellt. Heimchenprodukte sind in Rot- und Brauntönen, Kurzflügelgrille (P-004) in grün und Wüstenheuschrecke (P-011) in blau dargestellt.

Abbildung 37 zeigt die Schmelzkurven unter Zugabe der artifiziiellen Sequenz 1 in normalisierter Ansicht. Der Verlauf der Schmelzkurven der Heimchenproben änderte sich durch die Zugabe der artifiziiellen Sequenz. Die Kurven waren eindeutig von den Kurven von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) zu unterscheiden. Der Einsatz des Oligonukleotids in einer 1:15.000 Verdünnung hatte aber eine stärkere Streuung der Schmelzkurven der Heimchenprodukte untereinander zur Folge als der Einsatz in einer 1:1.500.000 Verdünnung (Vergleich siehe Abbildung 24).

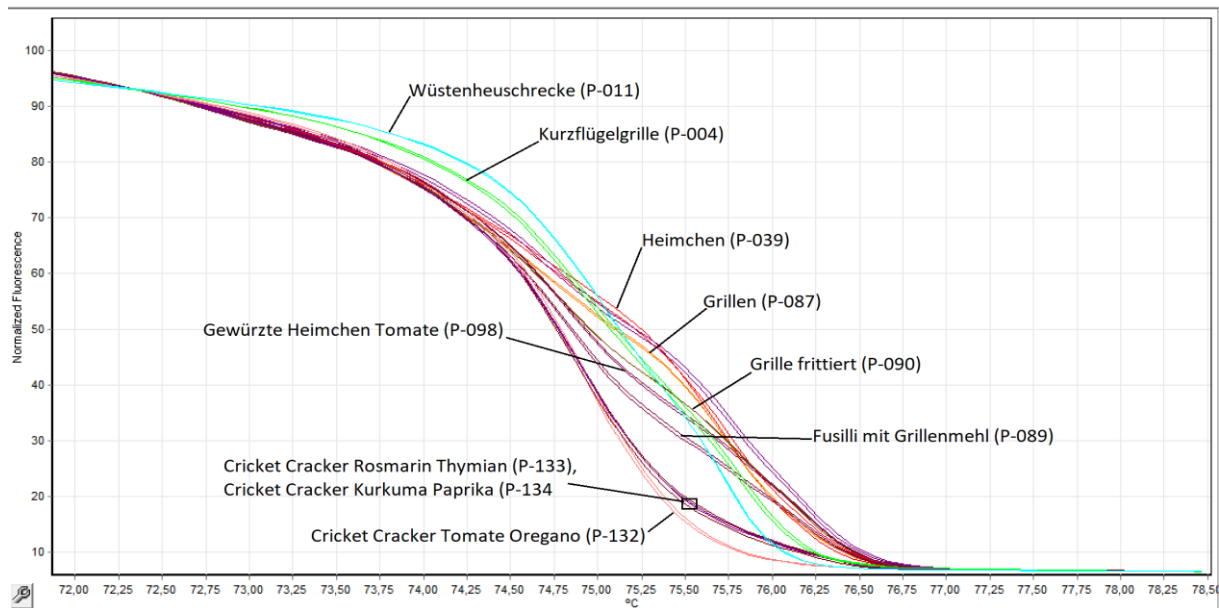


Abbildung 37: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatzartifizeller Sequenz 1 in 1:15.000 Verdünnung

In Abbildung 38 ist die starke Streuung der ersten negativen Ableitung Schmelzkurven der einzelnen Heimchenproben zu erkennen. Die Zugabe der artifizeller Sequenz 1 führte zu uneinheitlich stark ausgeprägten Peaks der Proben. Die Schmelzkurven waren kaum vergleichbar.

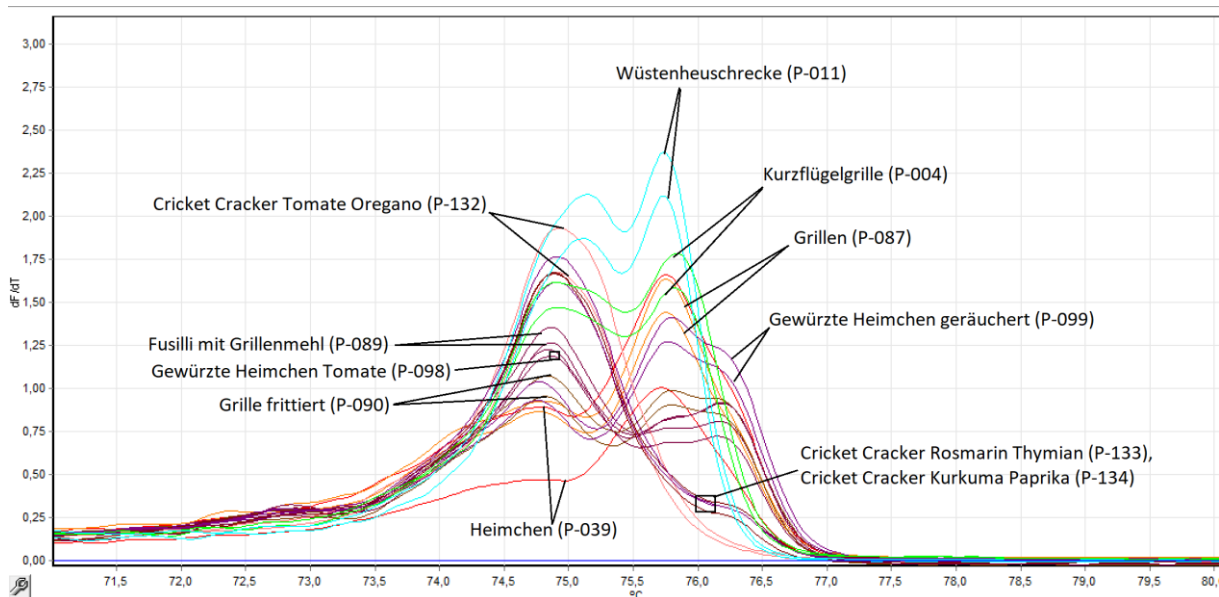


Abbildung 38: Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatzartifizeller Sequenz 1 in 1:15.000 Verdünnung

In Abbildung 39 sind die Schmelzkurven unter Zugabe der artifiziellen Sequenz 2 in normalisierter Ansicht dargestellt. Der Zusatz des Oligonukleotids führte zu einer Änderung des Kurvenverlaufs der PCR-Produkte, verglichen mit dem Ansatz mit Zugabe der artifiziellen Sequenz 1 (Abbildung 37), aber auch verglichen mit dem Ansatz ohne Zugabe einer artifiziellen Sequenz (Abbildung 24). Die Kurven der Proben, welche Heimchen enthielten, näherten sich den Kurven der Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) etwas an, waren aber gut von ihnen zu unterscheiden. Die Schmelzkurven der einzelnen Heimchenproben streuten und kreuzten sich teilweise.

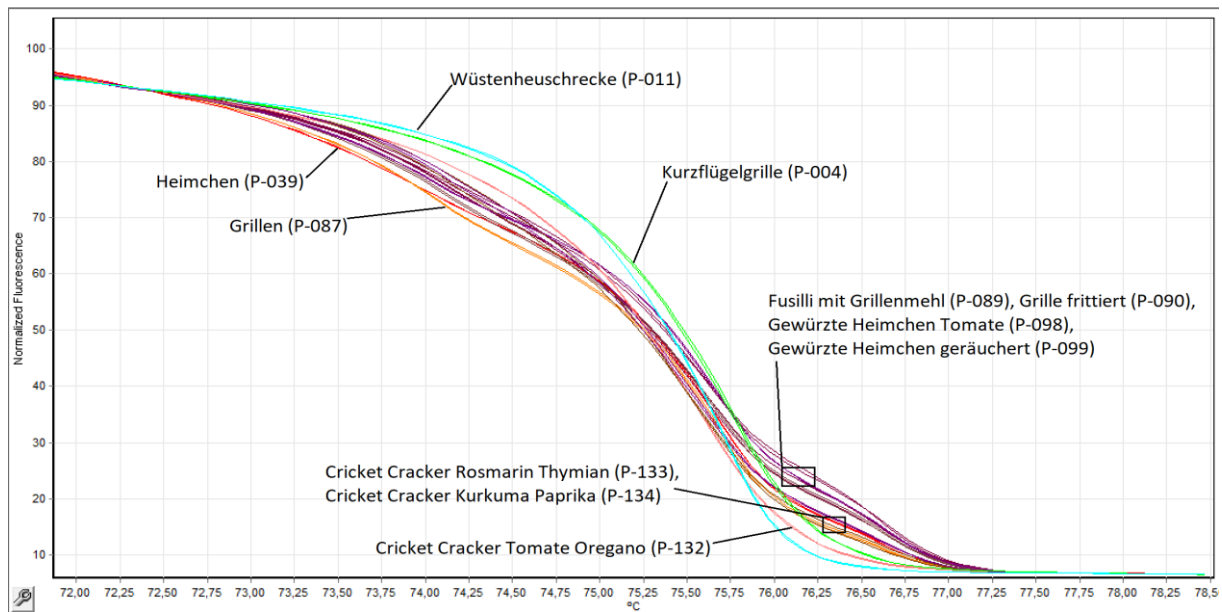


Abbildung 39: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatz artifizieller Sequenz 2 in 1:15.000 Verdünnung

In Abbildung 40 ist die erste negative Ableitung der Schmelzkurven unter Zugabe der artifiziellen Sequenz 2 dargestellt. Der Zusatz des Oligonukleotids bewirkte die Bildung eines zusätzlichen dritten Peaks bei 76,7 °C, der unterschiedlich stark ausgeprägt war. Die Schmelzkurven streuten weniger stark als die Kurven unter Zugabe der artifiziellen Sequenz 1 und konnten gut von den Kurven der Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011) unterschieden werden.

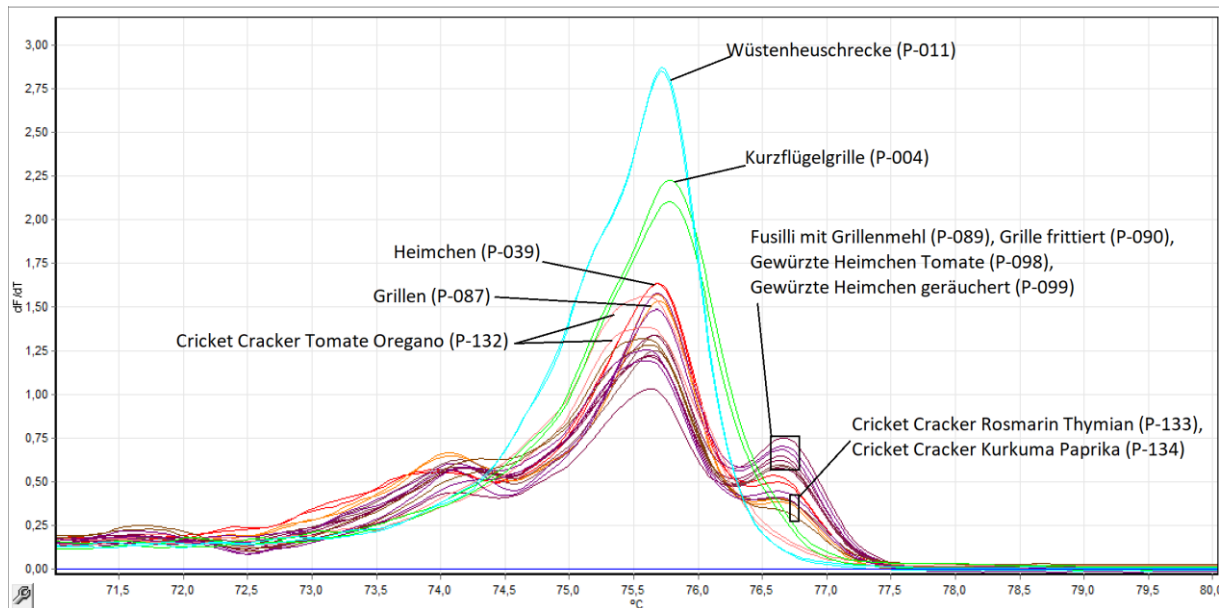


Abbildung 40: Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatz artifiziieller Sequenz 2 in 1:15.000 Verdünnung

Der Einsatz der artifiziiellen Sequenzen hatte zu einer Änderung des Schmelzkurvenverhaltens geführt. Die Artifiziielle Sequenz 2 eignete sich aufgrund der geringeren Streuung der Schmelzkurven besser zu Unterscheidung der Heimchenprodukte von Kurzflügelgrille (P-004) und Wüstenheuschrecke (P-011). Der Einsatz der vier Primer ohne Einsatz von Oligonukleotiden führte ebenfalls zu einer Änderung der Schmelzkurven und einer deutlicheren Unterscheidung der Proben. Aufgrund des Mehraufwands durch die Zugabe der artifiziiellen Sequenzen, der stärkeren Streuung der Heimchenprodukte untereinander und des vergleichbaren Ergebnisses wurde vom Einsatz der artifiziiellen Sequenzen in nachfolgenden Analysen jedoch abgesehen.

5.1.13 Einsatz neuer Primer zur Änderung der Schmelzkurven der Wanderheuschrecke

Die Schmelzkurven von Wanderheuschrecke (P-044) lagen unter Verwendung der Primer Ins_fw und Ins_rev Nahe an den Kurven der Proben Zophobas (P-042), Terflys/Krullfliegen (P-003), Bohnenkäfer (P-006), Sagowurm (P-008) und Zikade (P-054) (siehe Abbildung 18). Aufgrund der erfolgreichen Änderung der Schmelzkurven der Proben, welche Heimchen enthielten, durch Zugabe eines weiteren Primerpaars, welches zur Differenzierung schwer unterscheidbarer Spezies geführt hat, wurde diese Strategie ebenfalls auf Wanderheuschrecke (P-044) angewandt. Zwei forward Primer, welche an die DNA-Sequenz der Wanderheuschrecke binden sollten, wurden zur besseren Unterscheidung der Spezies entworfen (Tabelle 16). Die Primer wurden so entworfen, dass die Anlagerungstemperatur bei 58 °C liegt.

Tabelle 16: Wander_AS_fw_1, Wander_AS_fw_2 und ihre Sequenz

Primer Name	Sequenz 5' → 3'
Wander_AS_fw_1	CAAATTATGGATCAAATAACATAAA
Wander_AS_fw_2	GATTTTATAATGAAGAGTTTAATTATTC

In einer ersten Analyse wurde eine Kombination aus fünf Primern (Ins_rev, Ins_fw, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_fw, Wander_AS_fw_1 bzw. Wander_AS_fw_2) in einer Konzentration von 0,4 µM getestet. Analysiert wurden die Proben Wanderheuschrecke (P-044) und Spezies, deren Schmelzkurven denen der Wanderheuschrecke ähnelten [Zophobas (P-042), Terflys/Krullfliegen (P-003), Bohnenkäfer (P-006), Sagowurm (P-008), Zikade (P-054)]. Der Zusatz der Wander_AS_fw_1 bzw. 2 Primer hatte keinen Einfluss auf das Schmelzverhalten der getesteten Spezies.

Um zu überprüfen, ob die neu entworfenen Primer an die DNA-Sequenz der Wanderheuschrecke binden und um deren Annealingtemperatur zu optimieren, wurde eine PCR HRM Analyse im Quantstudio durchgeführt. In dieser PCR HRM Analyse wurden zwei Primer, Ins_rev und jeweils Wander_AS_fw_1 bzw. Wander_AS_fw_2, bei zwei Anlagerungstemperaturen (54 °C und 58 °C) mit dem Extrakt der Wanderheuschrecke (P-044) getestet. 58 °C ist die optimale Anlagerungstemperatur der Ins_rev und Ins_fw Primer, mit welcher alle PCR HRM Analysen durchgeführt wurden. Um zu überprüfen, ob eine niedrigere Anlagerungstemperatur besser für den Einsatz der Wander_AS_fw Primer geeignet ist, wurde auch eine Temperatur von 54 °C gewählt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 0,4 µM eingesetzt.

In Abbildung 41 sind die Amplifikationskurven durch Einsatz der Ins_rev und Wander_AS_fw_1 der Probe zu sehen. Die Kombination der zwei Primer führte zur Bildung eines Produktes, wodurch bestätigt wird, dass der Primer Wander_AS_fw_1 an die Sequenz der Wanderheuschrecke bindet. Der Ct-Wert lag bei einer Anlagerungstemperatur von 58 °C geringfügig niedriger als bei 54 °C.

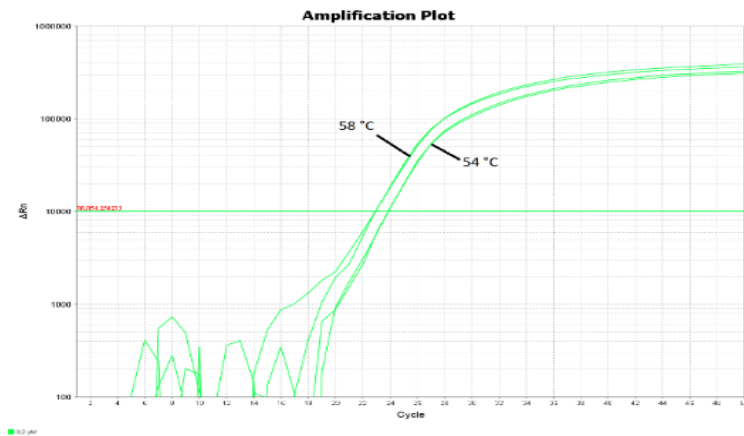


Abbildung 41: Amplifikation unter Verwendung von zwei Primern (Ins_rev, Wander_AS_fw_1) mit Probe P-044 bei 58 °C und 54 °C

In Abbildung 42 sind die Amplifikationskurven der Probe durch Einsatz der Ins_rev und Wander_AS_fw_2 Primer zu sehen. Die Kombination der zwei Primer führte zur Bildung eines Produktes, wodurch bestätigt wurde, dass der Primer Wander_AS_fw_2 ebenfalls an die Sequenz der Wanderheuschrecke bindet. Die Ct-Werte der Amplifikation lagen bei beiden Temperaturen bei 23,6.

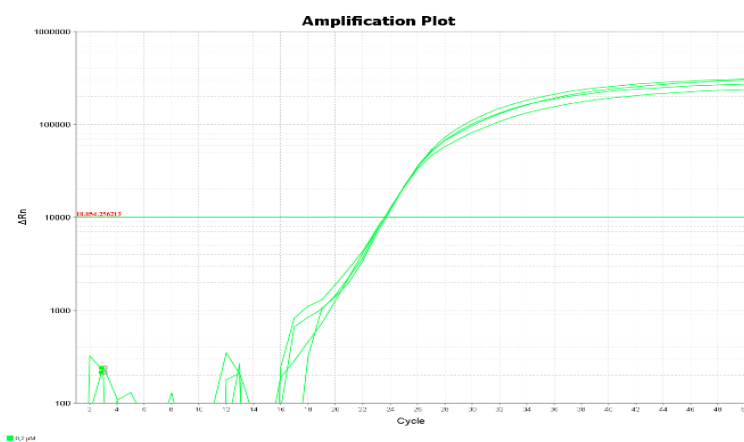


Abbildung 42: Amplifikation unter Verwendung von zwei Primern (Ins_rev, Wander_AS_fw_2) mit Probe P-044 bei 58 °C und 54 °C

Da mit beiden Primerkombinationen Produkte erhalten wurden, wurde als nächstes geprüft, ob der Zusatz des Wander_AS_fw_1 bzw. Wander_AS_fw_2 Primers zu einer Änderung des Schmelzkurvenverlaufs des Produkts für die Wanderheuschrecke und damit zu einer besseren Unterscheidung von anderen Spezies führte.

In der folgenden Analyse kam eine Kombination aus drei Primern zum Einsatz, die Wanderheuschrecke (P-044) amplifizieren sollten. Die Primer Ins_rev und Ins_fw kamen in einer Konzentration von 0,4 µM zum Einsatz. Der Primer Wander_AS_fw_1 bzw. Wander_AS_fw_2 wurde in Konzentrationen von 0,4 µM, 0,6 µM und 0,8 µM zugesetzt.

In Abbildung 43 sind die Schmelzkurven unter Verwendung des Wander_AS_fw_1 Primers in normalisierter Ansicht dargestellt. Die rote Schmelzkurve entstand durch den Einsatz von Wander_AS_fw_1 in einer Konzentration von 0,4 µM, die orangefarbige Kurve durch Einsatz von 0,6 µM und die braune Schmelzkurve durch Einsatz von 0,8 µM des Primers. Der Einsatz von 0,6 µM und

0,8 μM des Wander_AS_fw_1 Primers führte im Vergleich zum Einsatz von 0,4 μM des Wander_AS_fw_1 zur Änderung der Schmelzkurven.

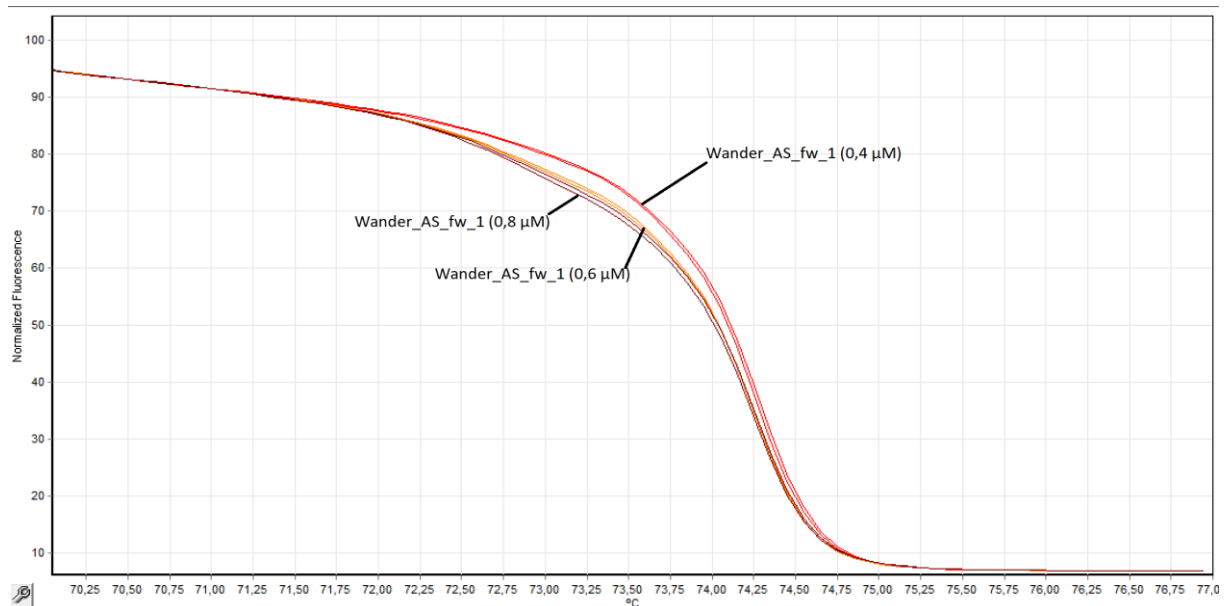


Abbildung 43: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 μM) und Wander_AS_fw_1 (0,2 μM , 0,4 μM , 0,6 μM)] mit Wanderheuschrecke (P-044)

In Abbildung 44 sind die Schmelzkurven unter Verwendung des Wander_AS_fw_2 Primers in normalisierter Ansicht dargestellt. Die verschiedenen Konzentrationen des Wander_AS_fw_2 Primers sind in unterschiedlichen Blautönen dargestellt. Die Schmelzkurven überlappten vollständig. Es kam zu keiner Änderung der Schmelzkurven durch eine erhöhte Primerkonzentration. Die Schmelzkurven wiesen denselben Verlauf auf wie in Abbildung 12, ohne Einsatz der Wander_AS Primer.

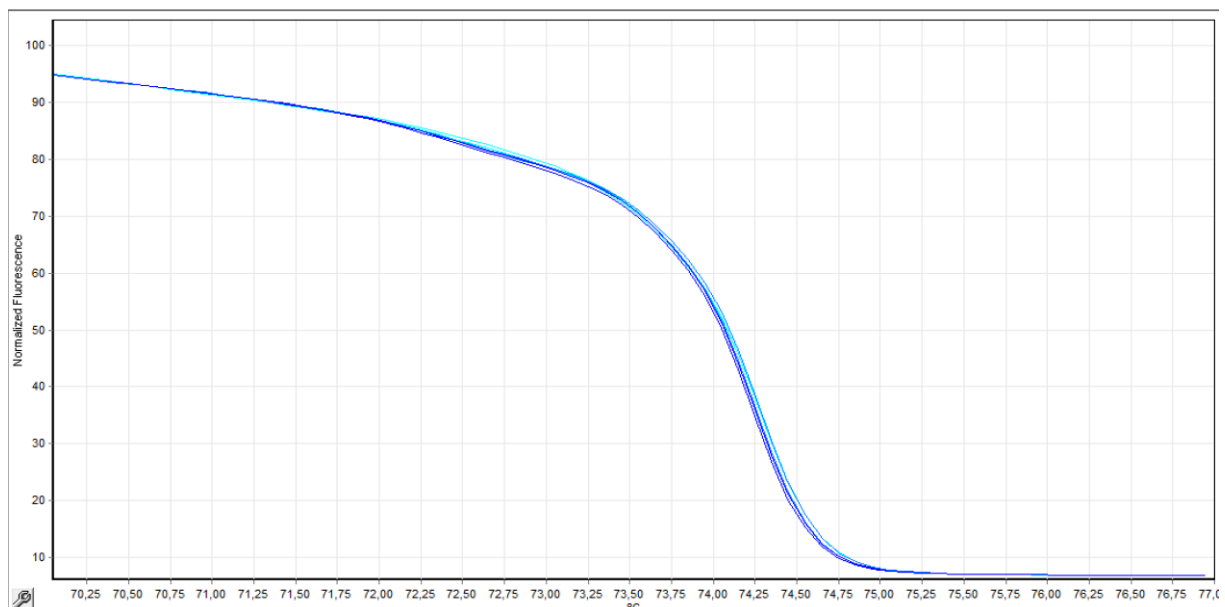


Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 μM) und Wander_AS_fw_2 (0,2 μM , 0,4 μM , 0,6 μM)] mit Wanderheuschrecke (P-044)

Aufgrund der Ergebnisse dieser PCR HRM Analyse wurde in nachfolgenden Analysen der Wander_AS_fw_1 Primer in einer Konzentration von 0,8 μM eingesetzt. Wander_AS_fw_2 wurde nicht mehr eingesetzt, da dieser Primer keinen Einfluss auf den Verlauf der Schmelzkurven hatte.

5.1.14 Optimierte PCR HRM Methode mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1)

Basierend auf den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Analysen wurde eine Kombination aus fünf Primern getestet. Ins_rev, Ins_fw, Heim_AS_rev_1 und Heim_AS_fw wurden in einer Konzentration von 0,4 µM und Wander_AS_fw_1 in einer Konzentration von 0,8 µM eingesetzt. Analysiert wurden Wanderheuschrecke (P-044) und Spezies, deren Schmelzkurven denen von Wanderheuschrecke ähnelten [Zophobas (P-042), Terflys/Krullfliegen (P-003), Bohnenkäfer (P-006), Sagowurm (P-008), Zikade (P-054)]. Um zu überprüfen, ob der Zusatz eines fünften Primers einen Einfluss auf die Schmelzkurven der Heimchenproben hat, wurden alle Extrakte, welche Heimchen enthalten, zusätzlich getestet [Heimchen (P-039), Grillen (P-087), Fusilli mit Grillenmehl (P-089), Grille frittiert (P-090), Gewürzte Heimchen Tomate (P-098), Gewürzte Heimchen geräuchert (P-099), Cricket Cracker Tomate & Oregano (P-132), Cricket Cracker Rosmarin Thymian (P-133), Cricket Cracker Kurkuma Paprika (P-134)].

Die Amplifikation der Terflys/Krullfliegen (P-003) hat kaum funktioniert und führte zu abweichenden Schmelzkurven. Ein Replikat des Cricket Crackers Tomate & Oregano (P-132) führte nicht zu einem Signalanstieg. Daher werden die Schmelzkurven dieser Proben nicht gezeigt.

In Abbildung 45 ist die Farbcodierung zu sehen, in Abbildung 46 sind die Schmelzkurven in normalisierter Ansicht dargestellt. Die Schmelzkurven der Extrakte, welche Heimchen enthielten, blieben im Vergleich zur PCR HRM mit vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_fw) unverändert (siehe Abbildung 35), einzig Cricket Crackers Tomate & Oregano (P-132) unterschied sich sehr stark von den restlichen Proben. Diese Probe war bereits in vorigen Analysen auffällig, daher wurde davon ausgegangen, dass der Extrakt Störkomponenten oder Verunreinigungen enthielt.

Die Schmelzkurve von Wanderheuschrecke (P-044) hat sich durch die Zugabe von Wander_AS_fw_1 in einer Konzentration von 0,8 µM verändert. Unter Einsatz von zwei Primern (Ins_fw, Ins_rev) glich die Schmelzkurve der Wanderheuschrecke (P-044) am stärksten der Kurve des Bohnenkäfers (P-006) (siehe Abbildung 15). Diese Proben waren nun eindeutig zu unterscheiden. Unter den aktuellen Bedingungen (Abbildung 46) lag die Schmelzkurve von Zophobas (P-042) der Kurve der Wanderheuschrecke am nächsten. Die Schmelzkurven waren dennoch unterscheidbar, daher wurde dieses Primersatz bestehend aus fünf Primern zur Unterscheidung der Insektenspezies genutzt.

1	P-044 Wanderheuschreck	13	P-054 Zikade	25	P-090 Grille frittiert
2	P-044 Wanderheuschreck	14	P-054 Zikade	26	P-090 Grille frittiert
3	P-042 Zophobas	15	P-004 Kurzflügelgrille	27	P-098 Gewürzt Tomate
4	P-042 Zophobas	16	P-004 Kurzflügelgrille	28	P-098 Gewürzt Tomate
5	P-003 Terflys/Krullfliegen	17	P-011 Wüstenheuschreck	29	P-099 Gewürzt geräuchert
6	P-003 Terflys/Krullfliegen	18	P-011 Wüstenheuschreck	30	P-099 Gewürzt geräuchert
7	P-006 Bohnenkäfer	19	P-039 Heimchen	31	P-132 Cracker Tom. Or.
8	P-006 Bohnenkäfer	20	P-039 Heimchen	32	P-132 Cracker Tom. Or.
9	P-008 Sagowurm	21	P-87 Grillen	33	P-133 Cracker Ros. Thy.
10	P-008 Sagowurm	22	P-87 Grillen	34	P-133 Cracker Ros. Thy.
11	P-028 Mehlwurm	23	P-089 Fussili	35	P-134 Cracker Kur. Pa.
12	P-028 Mehlwurm	24	P-089 Fussili	36	P-134 Cracker Kur. Pa.

Abbildung 45: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1)

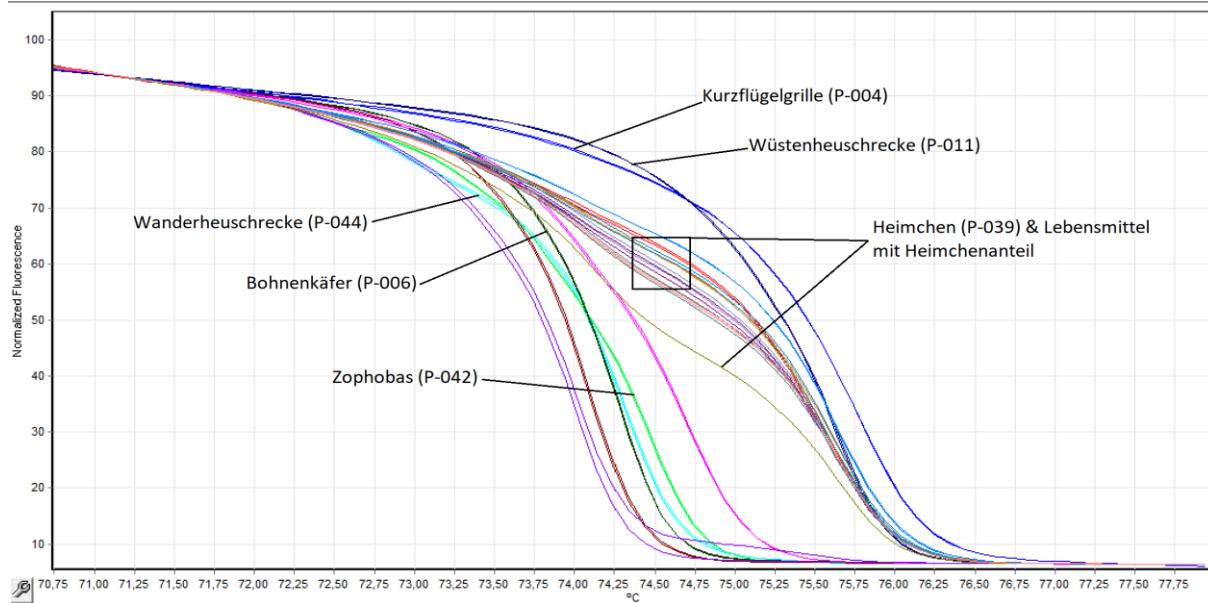


Abbildung 46: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von fünf (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-044, P-042, P-003, P-006, P-008, P-028, P-054, P-004, P-011, P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134

5.1.15 Optimierte PCR HRM Methode aller nicht zum Verzehr zugelassenen Spezies

Im folgenden Lauf wurde mit dem aus fünf Primern bestehenden Primerset alle in der EU nicht zugelassenen Insektenspezies analysiert. Terflys/Krullfliegen (P-003) wurde aufgrund der schlechten Amplifikation (Kapitel 5.1.14) im 4-fach Ansatz getestet.

In Abbildung 47 ist die Farbcodierung zu sehen, die Amplifikationskurven der Proben sind in Abbildung 48 dargestellt. Das Startsignal der Steppengrillen (P-005) war erhöht, da fehlerhaft keine 1:50 Verdünnung des DNA-Extrakts eingesetzt wurde. Diese Probe wurde im nächsten Lauf wiederholt.

Der Ct-Wert der Terflys/Krullfliegen (P-003) Replikate lag mit über 35 wieder sehr hoch und das Fluoreszenzsignal war sehr niedrig. Die Schmelzkurven der 4-fach Bestimmungen streuten sehr stark, weshalb sie in Abbildung 49 nicht dargestellt sind. Die Amplifikation der Goldfliegen (P-012) und Fruchtfliegen (P-015) hat nicht funktioniert.

1 P-050 Wanderheuschreck	13 P-031 Made der Wachsmo	25 P-005 Steppengrillen
2 P-050 Wanderheuschreck	14 P-031 Made der Wachsmo	26 P-005 Steppengrillen
3 P-044 Wanderheuschreck	15 P-042 Zophobas	27 P-006 Bohnenkäfer
4 P-044 Wanderheuschreck	16 P-042 Zophobas	28 P-006 Bohnenkäfer
5 P-002 Mittelmeer-Feldgrille	17 P-059 Seidenraupe	29 P-008 Sagowurm
6 P-002 Mittelmeer-Feldgrille	18 P-059 Seidenraupe	30 P-008 Sagowurm
7 P-011 Wüstenheuschreck	19 P-003 Terflys/Krullfliegen	31 P-012 Goldfliegen
8 P-011 Wüstenheuschreck	20 P-003 Terflys/Krullfliegen	32 P-012 Goldfliegen
9 P-030 Schwarze Soldatenfliege	21 P-003 Terflys/Krullfliegen	33 P-015 Fruchtfliege
10 P-030 Schwarze Soldatenfliege	22 P-003 Terflys/Krullfliegen	34 P-015 Fruchtfliege
11 P-030 Schwarze Soldatenfliege	23 P-003 Terflys/Krullfliegen	35 P-054 Zikade
12 P-030 Schwarze Soldatenfliege	24 P-003 Terflys/Krullfliegen	36 P-054 Zikade
		37 P-049 Buffalowurm
		38 P-049 Buffalowurm
		39 P-004 Kurzflügelgrille
		40 P-004 Kurzflügelgrille

Abbildung 47: Farbcodierung der PCR HRM Analyse aller nicht zum Verzehr zugelassenen Spezies mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1)

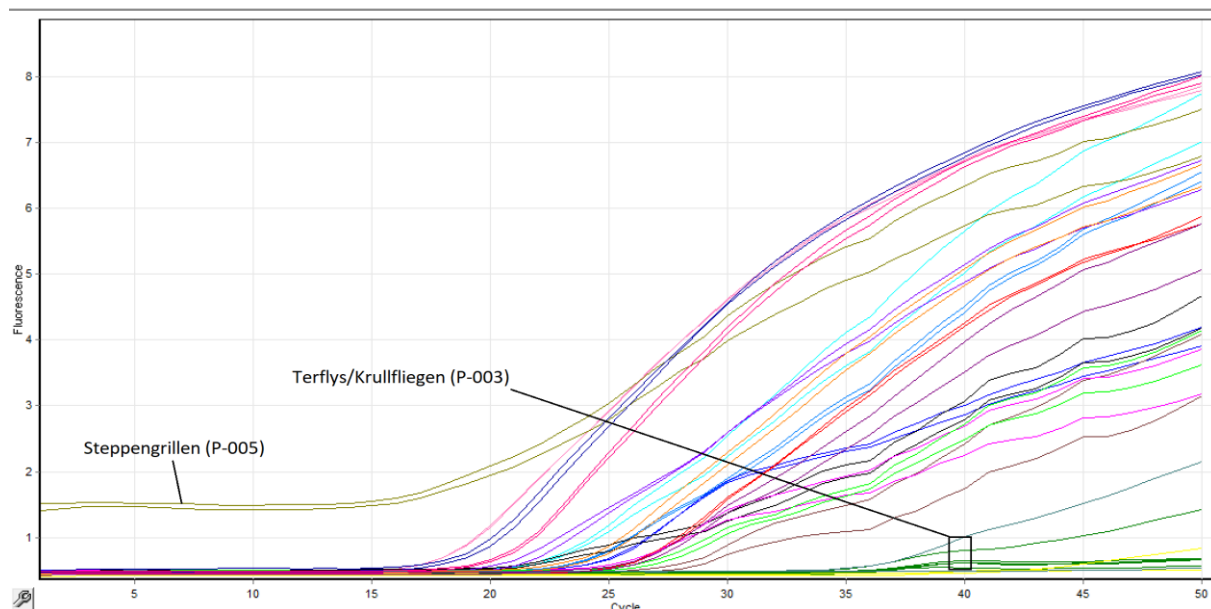


Abbildung 48: Amplifikation unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-050, P-044, P-002, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054, P-049, P-004

In Abbildung 49 sind die Schmelzkurven in normalisierter Ansicht dargestellt. Schwarze Soldatenfliege (P-003), Goldfliegen (P-012) und Fruchtfliegen (P-015) sind ausgenommen, da ihre Amplifikation nicht funktioniert hat. Die Schmelzkurven der Doppelbestimmungen der einzelnen Spezies waren sehr

wiederholbar, mit Ausnahme von Seidenraupe (P-059) (hellgrün). Diese Probe wurde im nächsten Lauf im 4-fach Ansatz analysiert, um ihre Wiederholbarkeit zu prüfen.

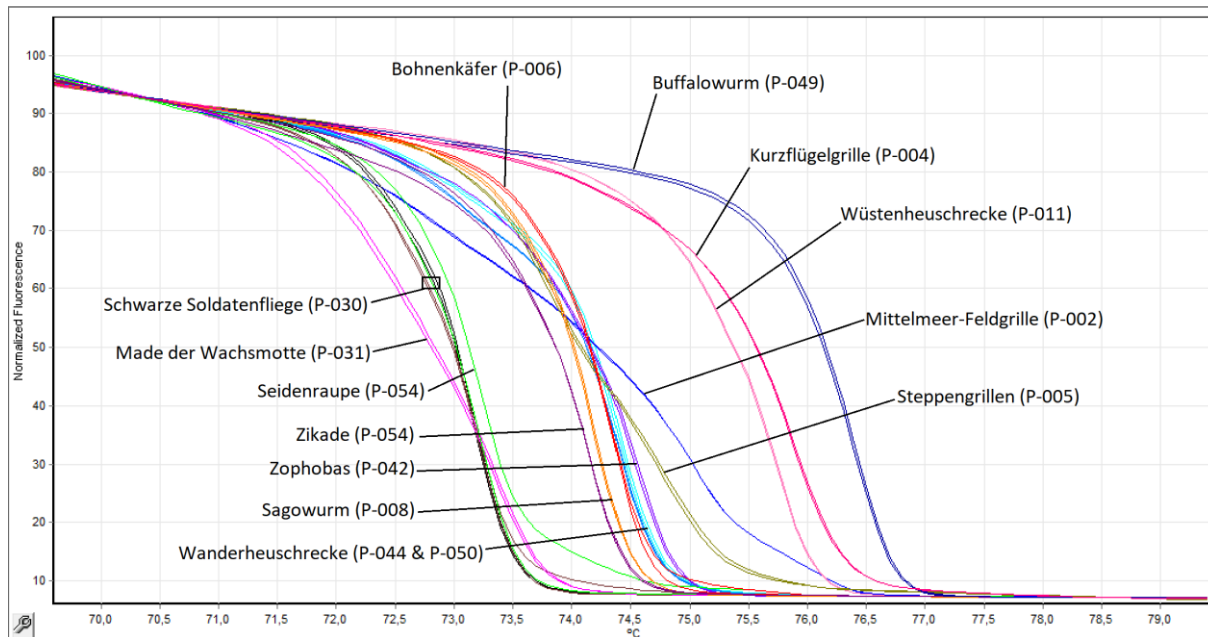


Abbildung 49: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-050, P-044, P-002, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-005, P-006, P-008, P-054, P-049, P-004

5.1.16 Optimierte PCR HRM Methode aller zum Verzehr zugelassenen Spezies

In diesem Lauf wurden alle in der EU zugelassenen Insektenspezies und die zugehörigen Lebensmittel mit den finalen Bedingungen, dem Primerset aus fünf Primern, getestet. Zusätzlich wurden Steppengrillen (P-050), Bohnenkäfer (P-006), Zophobas (P-042) und Seidenraupe (P-059) im 4-fach Ansatz analysiert, um ihre Wiederholbarkeit zu prüfen.

Die Farbcodierung der Analyse ist in Abbildung 50 zu sehen, in Abbildung 51 sind die Amplifikationskurven der Proben dargestellt. Ein Replikat von Wanderheuschrecke (P-044) führte zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Da diese Probe in allen anderen Analysen erfolgreich amplifiziert wurde, könnte hier ein Pipettierfehler vorliegen. Die restlichen Proben wurden erfolgreich amplifiziert.

Die Steppengrillen (P-005) wiesen durch die 1:50 Verdünnung eine typische Amplifikationskurve auf. Das Fluoreszenzsignal der Proben unter Verwendung von fünf Primern war jedoch niedriger als jenes mit den ursprünglichen zwei Primern (Ins_fw, Ins_rev) (Abbildung 14).

1 P-028 Mehlwurm	17 P-094 Rote Rüben Risotto	33 P-116 Protein Shake Buffal	49 P-134 Cricket Cracker Ku.
2 P-028 Mehlwurm	18 P-094 Rote Rüben Risotto	34 P-116 Protein Shake Buffal	50 P-134 Cricket Cracker Ku.
3 P-039 Heimchen	19 P-095 Brownie Cake Mix	35 P-122 Erdnusscreme Buffal	51 P-049 Buffalowurm
4 P-039 Heimchen	20 P-095 Brownie Cake Mix	36 P-122 Erdnusscreme Buffal	52 P-049 Buffalowurm
5 P-044 Wanderheuschreck	21 P-096 Hafer Laibchen Mix	37 P-125 Dschungelade Edel	53 P-005 Steppengrillen
6 P-044 Wanderheuschreck	22 P-096 Hafer Laibchen Mix	38 P-125 Dschungelade Edel	54 P-005 Steppengrillen
7 P-050 Wanderheuschreck	23 P-098 Gewürzte Heimchen	39 P-126 Dschungelade Vollm	55 P-006 Bohnenkäfer
8 P-050 Wanderheuschreck	24 P-098 Gewürzte Heimchen	40 P-126 Dschungelade Vollm	56 P-006 Bohnenkäfer
9 P-067 Mehlwurm	25 P-099 Gewürzte Heimchen	41 P-132 Cricket Cracker To.	57 P-006 Bohnenkäfer
10 P-067 Mehlwurm	26 P-099 Gewürzte Heimchen	42 P-132 Cricket Cracker To.	58 P-006 Bohnenkäfer
11 P-087 Grillen	27 P-102 ZIRP Bar Sour Cherr	43 P-132 Cricket Cracker To.	59 P-042 Zophobas
12 P-087 Grillen	28 P-102 ZIRP Bar Sour Cherr	44 P-132 Cricket Cracker To.	60 P-042 Zophobas
13 P-089 Fusilli	29 P-103 ZIRP Bar Apple Stru	45 P-132 Cricket Cracker To.	61 P-042 Zophobas
14 P-089 Fusilli	30 P-103 ZIRP Bar Apple Stru	46 P-132 Cricket Cracker To.	62 P-042 Zophobas
15 P-090 Grille frittiert	31 P-104 ZIRP Bar Apricot	47 P-133 Cricket Cracker Ro.	63 P-059 Seidenraupe
16 P-090 Grille frittiert	32 P-104 ZIRP Bar Apricot	48 P-133 Cricket Cracker Ro.	64 P-059 Seidenraupe
			65 P-059 Seidenraupe
			66 P-059 Seidenraupe

Abbildung 50: Farbcodierung der PCR HRM Analyse aller zum Verzehr zugelassenen Spezies mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1)

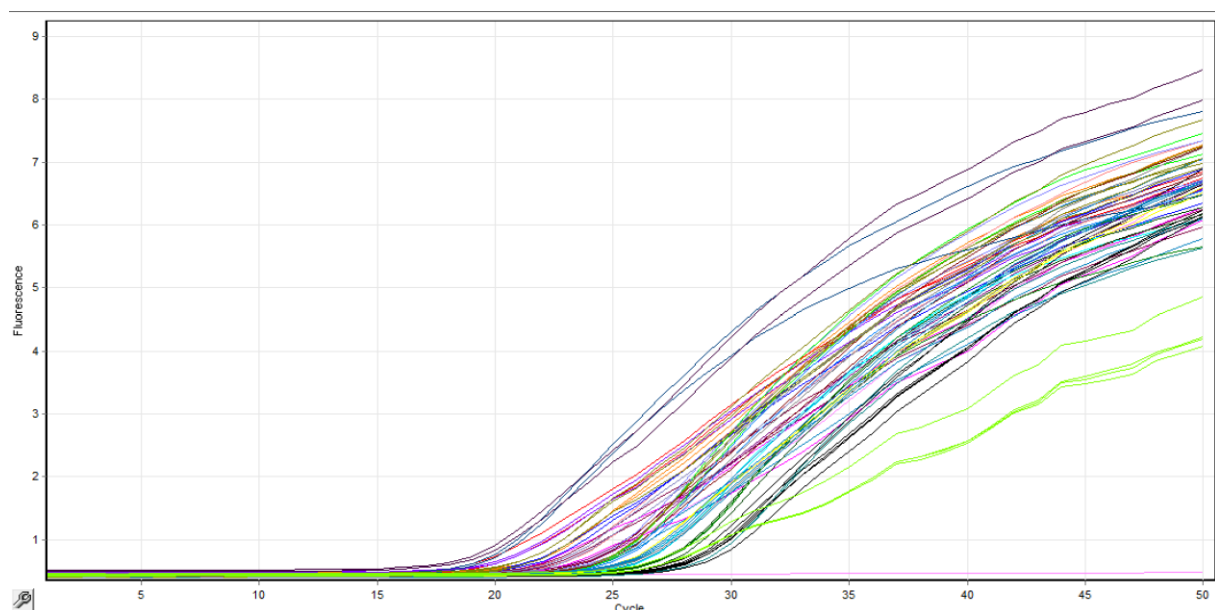


Abbildung 51: Amplifikation unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-028, P-039, P-044, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134, P-049, P-005, P-006, P-042, P-059

In Abbildung 52 sind die normalisierten Schmelzkurven dargestellt. Die vier in der EU zum Verzehr zugelassenen Spezies waren deutlich voneinander zu unterscheiden. Wanderheuschrecke (P-044, P-050) waren aufgrund der Zugabe des Wander_AS_fw_1 Primers auch von Bohnenkäfer (P-006) und Zophobas (P-042) zu unterscheiden. Die Kurven der 4-fach Bestimmungen von Steppengrillen (P-005), Bohnenkäfer (P-006), Zophobas (P-042) und Seidenraupe (P-059) überlappten und waren wiederholbar.

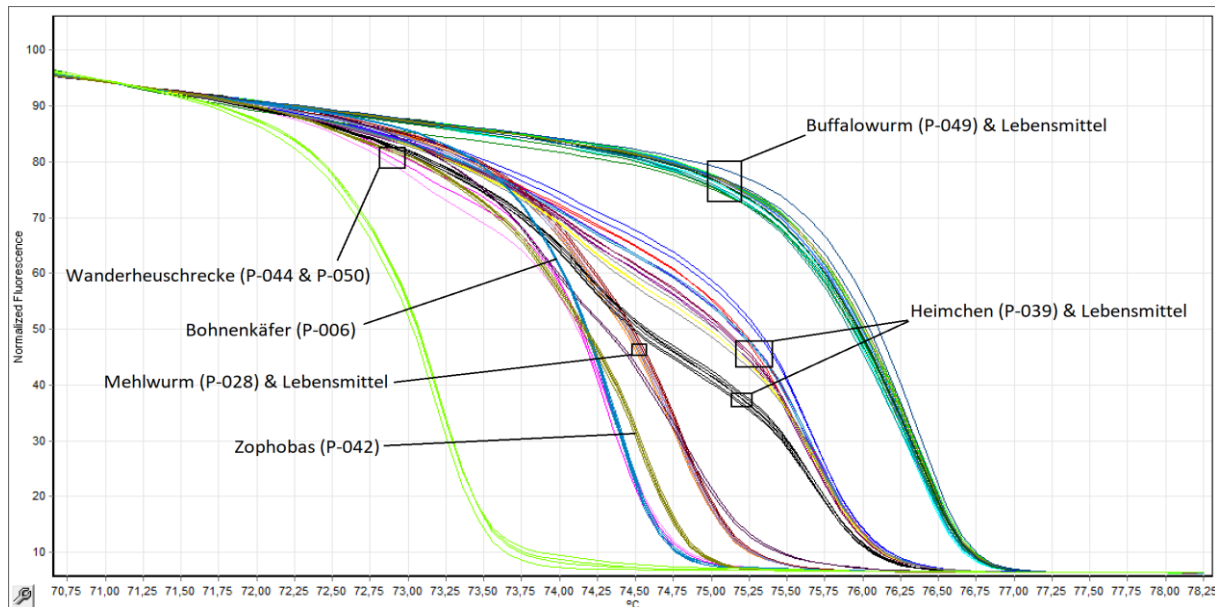


Abbildung 52: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-028, P-039, P-044, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134, P-049, P-005, P-006, P-042, P-059

5.2 Unterscheidung von Apfelsorten

5.2.1 Überprüfung der Eignung noch nicht getesteter Primerpaare

Vier noch nicht getestete Primerpaare aus einer früheren Masterarbeit (Tabelle 25), welche sich mit der Differenzierung von Apfelsorten beschäftigte, wurden in dieser Arbeit getestet (Micic 2022).

Die Anlagerungstemperaturen wurden am Quantstudio 5 mit DNA-Extrakten aus Blättern der Apfelsorten Golden Delicious und Fuji im Doppelansatz optimiert. Hierfür wurden jeweils vier Anlagerungstemperaturen getestet (siehe Kapitel 4.5.3). Die optimale Anlagerungstemperatur sollte zu typischen Amplifikationskurven führen, ohne Bildung unspezifischer Produkte in Proben oder NTCs.

Die Wahl der optimalen Anlagerungstemperatur wird anhand des Primerpaars 05g8 erklärt.

In Abbildung 53 sind die Amplifikationskurven für Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 55,1 °C zu sehen. Der Ct-Wert lag zwischen 32 und 33, die Kurven hatten eine typische Form und die NTCs führten zu keinem Signalanstieg.

In Abbildung 54 sind die Amplifikationskurven der beiden Sorten bei einer Anlagerungstemperatur von 56,6 °C aufgetragen. Der Ct-Wert lag bei dieser Temperatur zwischen 36 und 37, die Kurven hatten die typische Form und für die NTCs wurde kein Fluoreszenzanstieg erhalten.

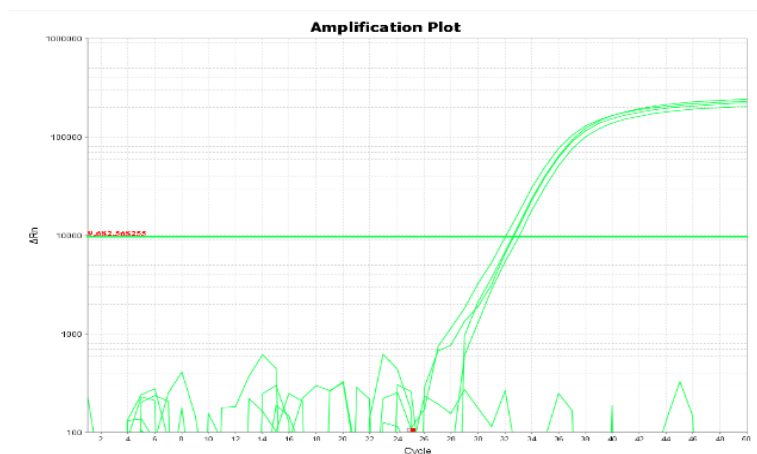


Abbildung 53: Amplifikation mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 55,1 °C

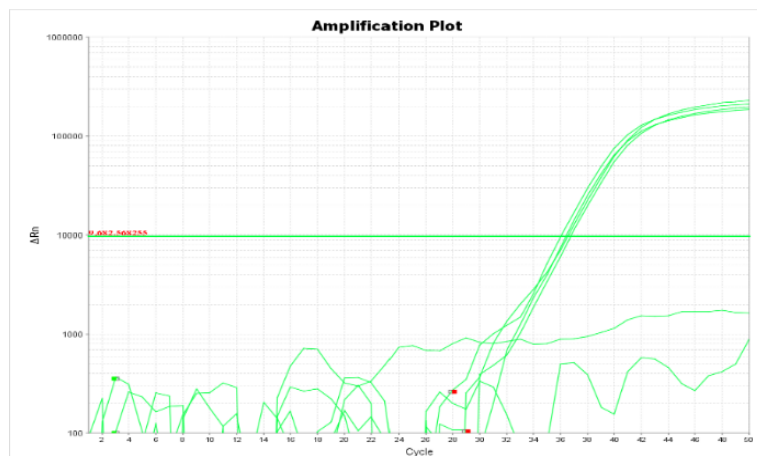


Abbildung 54: Amplifikation mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 56,6 °C

In Abbildung 55 und 56 sind die Schmelzkurven für Golden Delicious in grün und von Fuji in rot zu sehen. Die Peaks der PCR-Produkte beider Apfelsorten liegen bei etwa 78,4 °C und waren nicht voneinander zu unterscheiden.

Aufgrund des geringeren Ct-Werts bei der Anlagerungstemperatur von 55,1 °C, wurde diese Temperatur als optimale Anlagerungstemperatur angesehen.

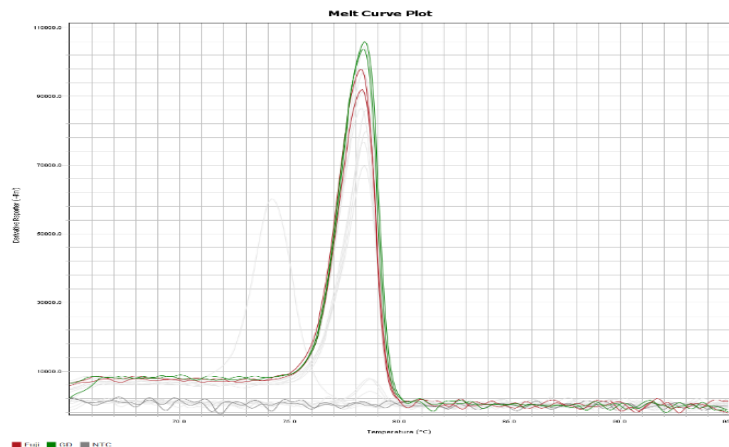


Abbildung 55: Schmelzkurven mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 55,1 °C

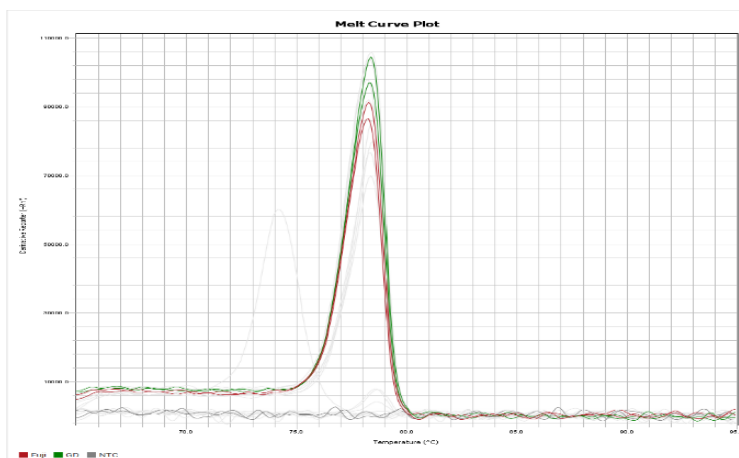


Abbildung 56: Schmelzkurven mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 56,6 °C

Primerpaar 01a6 wird als Beispiel für ein Primerpaar verwendet, welches keine optimalen Ergebnisse in der PCR HRM Analyse erzielt hat.

In Abbildung 57 sind die Amplifikationskurven der Sorten Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 49,9 °C zu sehen. Die Ct-Werte der Sorte Fuji lagen mit 39 bis 40 etwas niedriger als die Ct-Werte der Sorte Golden Delicious (41 bis 42). Generell waren die Ct-Werte, die mit diesem Primerpaar bei der niedrigsten Anlagerungstemperatur erhalten wurden, relativ hoch. Auch bei einer Anlagerungstemperatur von 51,4 °C lagen die Ct-Werte bei 39 bis 42 (Abbildung 58). Die NTCs führten bei beiden getesteten Anlagerungstemperaturen zu keinem Signalanstieg.

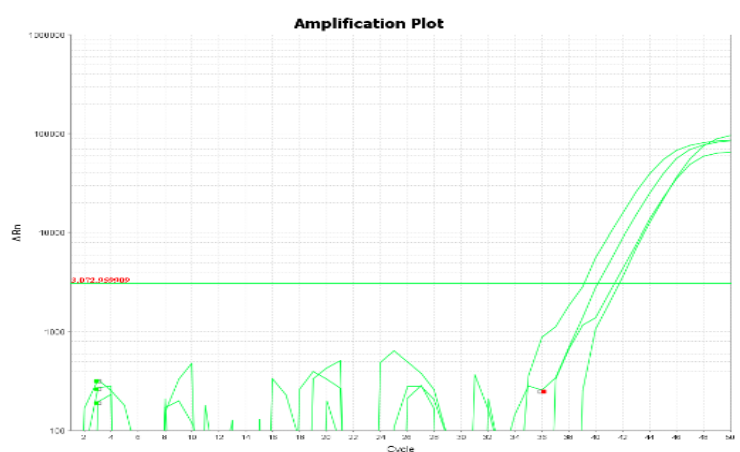


Abbildung 57: Amplifikation mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 49,9 °C

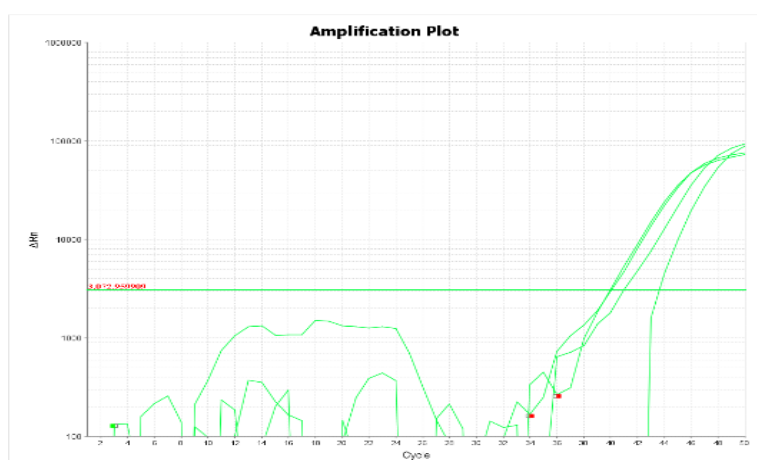


Abbildung 58: Amplifikation mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 51,4 °C

Die Schmelzkurven von Golden Delicious sind wieder in grün, die Kurven der Sorte Fuji in rot dargestellt. In Abbildung 59 sieht man die Schmelzkurven beider Sorten bei einer Anlagerungstemperatur von 49,9 °C. Für Golden Delicious wurden zwei Peaks beobachtet. Das Peakmaximum lag bei 82,1 °C, ein zweiter Peak trat bei etwa 85 °C auf. Die Probe Fuji führte je nach Replikat zu zwei bis drei Peaks. Das Maximum des ersten Peaks lag bei beiden Replikaten bei 77,2 °C, der zweite Peak lag bei 82 °C und der letzte Peak war nur bei einem Replikat ausgeprägt und hatte sein Maximum bei 85,2 °C.

Bei der nächsthöheren Anlagerungstemperatur (51,4 °C, Abbildung 60) wies ein Replikat von Golden Delicious einen Hauptpeak bei 78,2 °C auf, einen weiteren Peak bei 82,1 °C und einen dritten Peak bei 84,5 °C. Das zweite Replikat zeigte nur zwei Peaks, bei 82,0 °C und 84,5 °C. Die Schmelzkurven der Proben der Sorte Fuji wiesen drei Peaks auf, einen Hauptpeak bei 77,2 °C und zwei kleinere Peaks bei 81,9 °C und etwa 85 °C.

Mit dem Primerpaar 01a6 wurde bei allen getesteten Temperaturen ein hoher Ct-Wert für beide Apfelsorten erhalten. Zusätzlich variierte die Anzahl der Peaks innerhalb der Doppelbestimmungen der Sorten und zwischen den beiden getesteten Anlagerungstemperaturen und waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Obwohl dieses Primerpaar als nicht geeignet schien, wurde es in einer PCR HRM Analyse mit allen DNA-Extrakten bei einer Anlagerungstemperatur von 49,9 °C getestet.

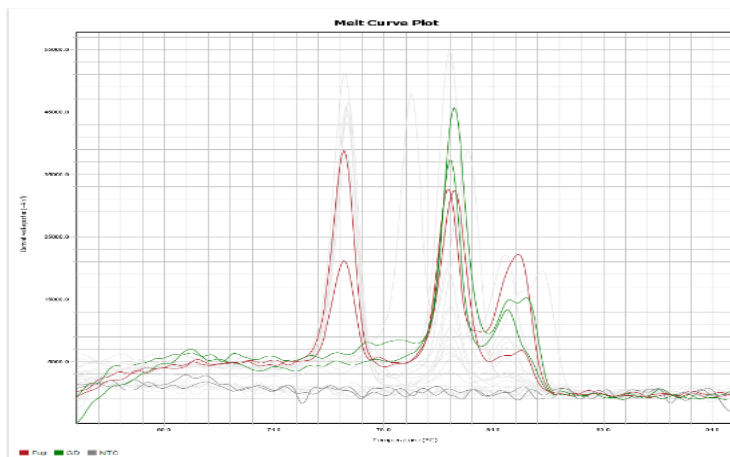


Abbildung 59: Schmelzkurven mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 49,9 °C

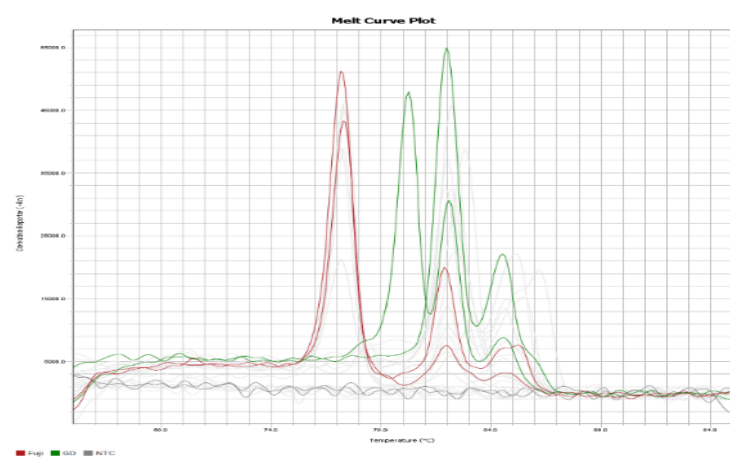


Abbildung 60: Schmelzkurven mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 51,4 °C

In Tabelle 17 sind die in dieser Masterarbeit getesteten Primerpaare aufgelistet.

Tabelle 17: Getestete Primerpaare mit Sequenz und optimierter Anlagerungstemperatur

Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Optimierte Anlagerungstemperatur [°C]
CH02h11a fw rev	CGTGGCATGCTTATCATTTG CTGTTTGAACCGCTTCCTTC	55,4
23g4 fw rev	TTTCTCTCTTTTCCCAACTC AGCCGCCTTGCATTAAATAC	55,0
05g8 fw rev	CGGCCATCGATTATCTTACTCTT GGATCAATGCACTGAAATAAACG	51,4
01a6 fw rev	AGGATTGCTGGAAAAGGAGG TTAGACGACACTTGTCTT	49,9

In einer früheren Masterarbeit konnten 21 Apfelsorten unter Einsatz von drei Primerpaaren unterschieden werden. Das Primerpaar CH01g12 ermöglichte eine Unterscheidung von mehr als 90 % der getesteten Sorten. Die restlichen 10 % konnten mit den Primerpaaren CH02b10 und CH02d11 differenziert werden (Tabelle 18) (Micic, 2022).

Tabelle 18: Primerpaare zur Differenzierung der Apfelsorten aus Masterarbeit von Mina Micic (Micic, 2022): Primerpaare mit Sequenz und optimierter Anlagerungstemperatur.

Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Optimierte Anlagerungstemperatur [°C]
CH01g12 fw rev	CCCACCAATCAAAAATCACC TGAAGTATGGTGGTGCCTTC	57,4
CH02b10 fw rev	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	56,4
CH02d11 fw rev	AGCGTCCAGAGCAACAGC AACAAAAGCAGATCCGTTGC	57,4

Die vier Primerpaare, deren optimale Anlagerungstemperatur in dieser Masterarbeit ermittelt wurde, wurden zur PCR HRM Analyse der DNA-Extrakte, die von Mina Micic aus Blättern hergestellt worden waren, verwendet. Zu den untersuchten Sorten gehören McIntosh, Lavantaler Bananenapfel, Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne, Gravensteiner, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Ilzer Rose, Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Sommer Maschanzka, Ananas Renette, Kanada Renette, Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared und Braeburn. Die Farbcodierung für diese Blattproben wurde aus Micic's Masterarbeit übernommen. Somit werden die Schmelzkurven neuer Apfelsorten in blauen Nuancen dargestellt, alte Sorten, für die Blätter von zwei verschiedenen Standorten (Haidegg, Wagersbach) verfügbar waren, in rosa Nuancen und alte Sorten, für die Blätter nur von einem Standort (Haidegg) verfügbar waren, in grauen Farbtönen. Die Proben und NTCs wurden jeweils im Doppelansatz analysiert.

1 Golden Delicious H	13 Jonathan (H)	25 Idared (H)	37 Kanada Renette (H)	49 Ananas Renette (W)
2 Golden Delicious H	14 Jonathan (H)	26 Idared (H)	38 Kanada Renette (H)	50 Ananas Renette (W)
3 Fuji H	15 Goldparmäne (H)	27 Ilzer Rose (H)	39 Sommer Maschanzka (H)	51 MC Intosh (W)
4 Fuji H	16 Goldparmäne (H)	28 Ilzer Rose (H)	40 Sommer Maschanzka (H)	52 MC Intosh (W)
5 Gala (H)	17 Gravensteiner (H)	29 Roter Boskoop (H)	41 Ananas Renette (H)	53 Ilzer Rose (W)
6 Gala (H)	18 Gravensteiner (H)	30 Roter Boskoop (H)	42 Ananas Renette (H)	54 Ilzer Rose (W)
7 MC Intosh (H)	19 Elstar (H)	31 Schafnase (H)	43 Sommer Maschanzka (W)	55 Steirischer Maschanzka (H)
8 MC Intosh (H)	20 Elstar (H)	32 Schafnase (H)	44 Sommer Maschanzka (W)	56 Steirischer Maschanzka (H)
9 Lavantaler Bananenapfel (H)	21 Steirischer Maschanzka (H)	33 Cox Orange (H)	45 Kanada Renette (W)	57 Goldparmäne (W)
10 Lavantaler Bananenapfel (H)	22 Steirischer Maschanzka (H)	34 Cox Orange (H)	46 Kanada Renette (W)	58 Goldparmäne (W)
11 Bohnapfel (H)	23 Kronprinz Rudolf (H)	35 Braeburn (H)	47 Lavantaler Bananenapfel (H)	59 Kronprinz Rudolf (W)
12 Bohnapfel (H)	24 Kronprinz Rudolf (H)	36 Braeburn (H)	48 Lavantaler Bananenapfel (H)	60 Kronprinz Rudolf (W)

Abbildung 61: Farbcodierung der PCR HRM Analysen der Apfelblätter

Primerpaar CH02h11a

Mit dem Primerpaar CH02h11a konnten die Schmelzkurven grob in drei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 62). Golden Delicious, Fuji, Gala, Gravensteiner, Braeburn und Ananas Renette hoben sich im Bereich von 76 °C bis 78°C von den anderen Sorten ab. Die Schmelzkurven der anderen zwei Gruppen schnitten oder „trennten“ sich im Bereich um 77,4 °C. Eine Gruppe bilden McIntosh, Bohnapfel, Jonathan, Elstar, Ilzer Rose, Kanada Renette und Sommer Maschanzka, die andere Gruppe besteht aus Lavantaler Bananenapfel, Goldparmäne, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Idared, Roter Boskoop, Schafnase und Cox Orange.

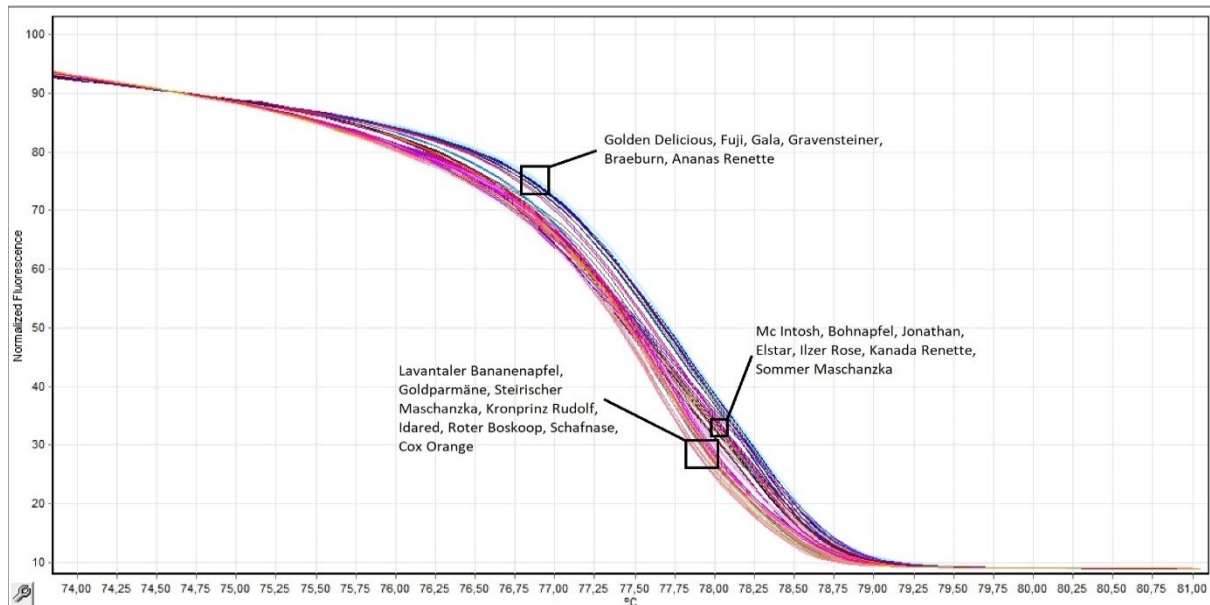


Abbildung 62: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH02h11a erhaltenen PCR-Produkte der Proben Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared, Braeburn, McIntosh (H,W), Lavantaler Bananenapfel (H,W), Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne (H,W), Gravensteiner, Steirischer Maschanzka (H,W), Kronprinz Rudolf (H,W), Ilzer Rose (H,W), Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Kanadarenette W, Sommer Maschanzka (H,W), Ananasrenette (H,W). H = Haidegg, W = Wagersbach

Primerpaar 23g4

Primerpaar 23g4 führte zu einigen individuellen Schmelzkurven (Abbildung 63). Die Schmelzkurven der Sorten Bohnapfel, Gala, Ilzer Rose und Gravensteiner konnten klar von allen anderen Kurven unterschieden werden. Die restlichen Sorten konnten in drei Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe bildeten die Schmelzkurven der Sorten Golden Delicious, Jonathan und Elstar. Die zweite Gruppe stellten McIntosh, Goldparmäne, Idared, Roter Boskoop und Kanada Renette dar und die größte Gruppe bestand aus Fuji, Lavantaler Bananenapfel, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Schafnase, Cox Orange, Braeburn, Sommer Maschanzka und Ananas Renette.

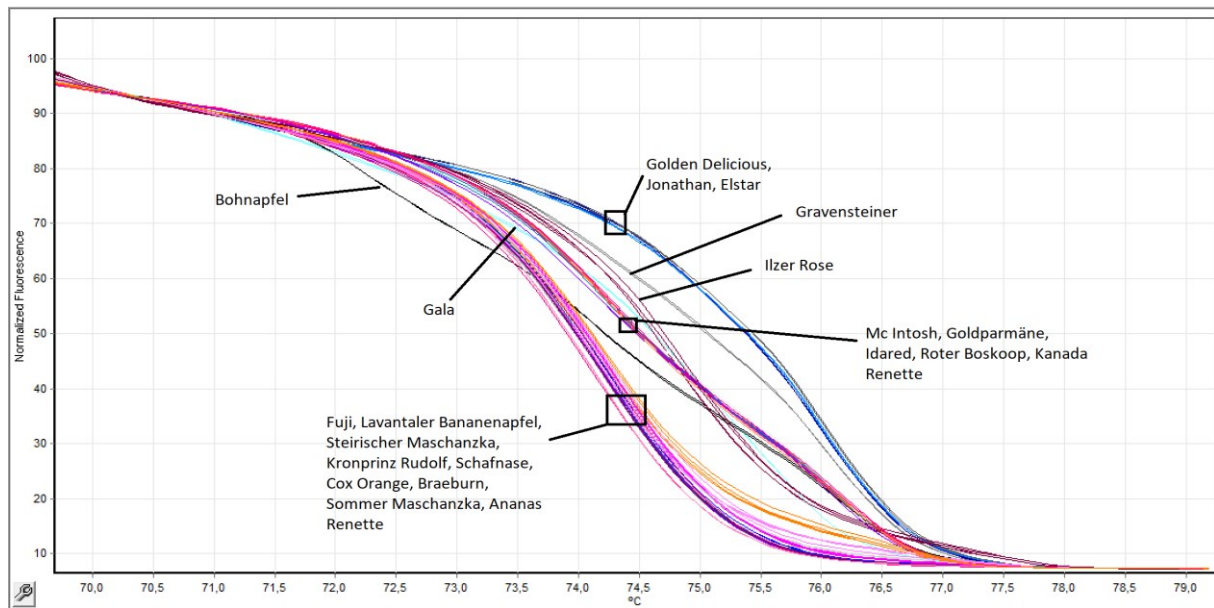


Abbildung 63: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared, Braeburn, McIntosh (H,W), Lavantaler Bananenapfel (H,W), Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne (H,W), Gravensteiner, Steirischer Maschankza (H,W), Kronprinz Rudolf (H,W), Ilzer Rose (H,W), Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Kanadarenette W, Sommer Maschankza (H,W), Ananasrenette (H,W). H = Haidegg. W = Wagersbach

Primerpaar 05g8

Mit dem Primerpaar 05g8 konnten die Schmelzkurven der Sorten Goldparmäne, Gravensteiner und Braeburn von den restlichen Sorten gut unterschieden werden (Abbildung 64). Eine Gruppe bestehend aus den Sorten Golden Delicious, Fuji, Elstar, Kronprinz Rudolf und Ilzer Rose grenzte sich gut von den anderen Sorten ab. Die Kurven der restlichen Apfelsorten lagen eng beieinander, konnten aber aufgrund eines leicht unterschiedlichen Kurvenverlaufs in drei weitere Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe bildeten McIntosh, Bohnapfel, Jonathan, Roter Boskoop und Schafnase. Die zweite Gruppe bestand aus Gala, Lavantaler Bananenapfel, Steirischer Maschankza, Idared, Kanada Renette und Ananas Renette und die dritte Gruppe bildeten Cox Orange und Sommer Maschankza.

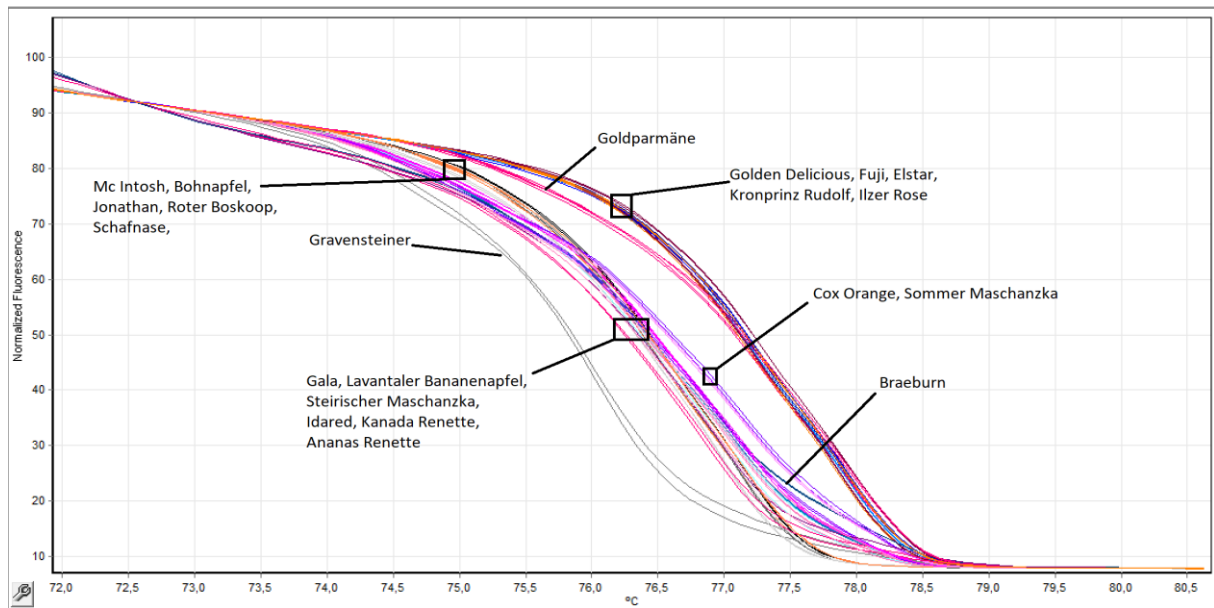


Abbildung 64: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 05g8 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared, Braeburn, McIntosh (H,W), Lavantaler Bananenapfel (H,W), Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne (H,W), Gravensteiner, Steirischer Maschanka (H,W), Kronprinz Rudolf (H,W), Ilzer Rose (H,W), Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Kanadarenette W, Sommer Maschanka (H,W), Ananasrenette (H,W). H = Haidegg. W = Wagersbach

Primerpaar 01a6

Die Amplifikation mit dem Primerpaar 01a6 führte wie bereits besprochen zu hohen Ct-Werten. Die DNA wurde nicht ausreichend vervielfältigt, weshalb die Schmelzkurven der Doppelbestimmungen der Proben meist nicht wiederholbar waren. In Abbildung 65 sind zur besseren Darstellung der schlechten Wiederholbarkeit der Schmelzkurven der Replikate nur die Kurven der Sorten Fuji, Lavantaler Bananenapfel und Bohnapfel dargestellt. Dieses Primerpaar ist nicht dafür geeignet, die verschiedenen Sorten zu unterscheiden.

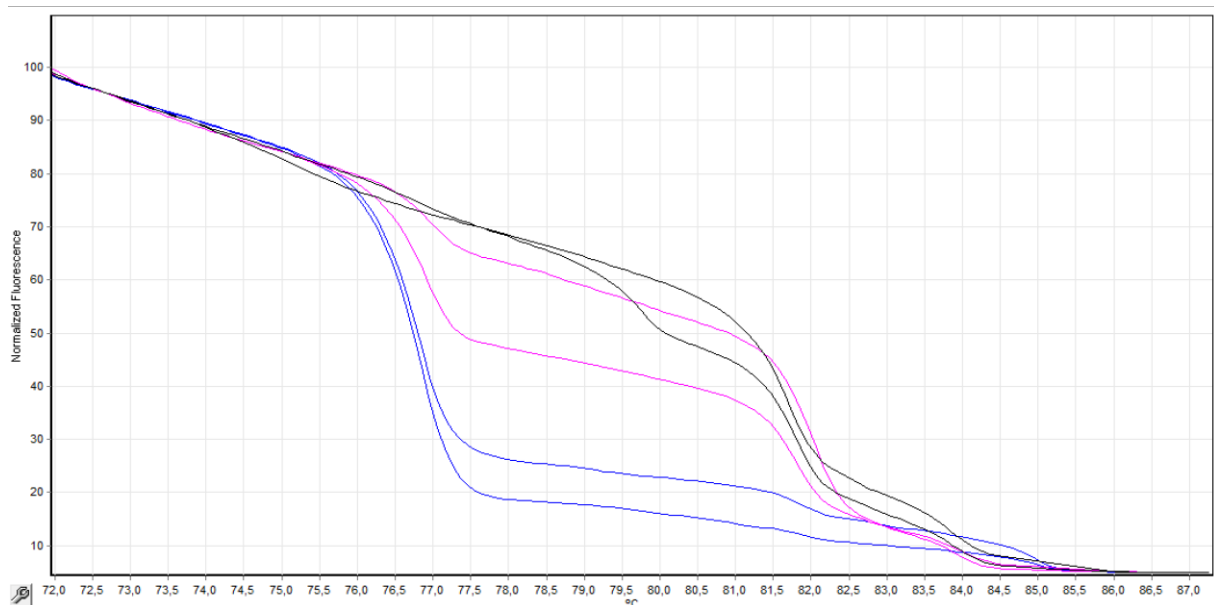


Abbildung 65: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 01a6 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Fuji (blau), Lavantaler Bananenapfel (pink), Bohnapfel (schwarz)

Ziel war es, zu testen, ob eines dieser vier noch nicht getesteten Primerpaare in der Lage ist, die wenigen Apfelsorten, welche mit Primerpaar CH01g12 nicht unterscheidbar waren, zu differenzieren, um die 21 Apfelsorten mit einem Set aus nur zwei Primerpaaren unterscheiden zu können. Das Primerpaar 05g8 stellte sich als vielversprechend heraus, jedoch konnten die Sorten Lavantaler Bananenapfel und Sommer Maschanzka nicht ausreichend sicher voneinander unterschieden werden, da die Schmelzkurven der beiden Standorte (Haidegg und Wagersbach) nicht vollständig überlappten (siehe Abbildung 66). Es wurde somit kein Primerpaar gefunden, welches mit Primerpaar CH01g12 kombiniert die 21 Apfelsorten unterscheiden konnte.

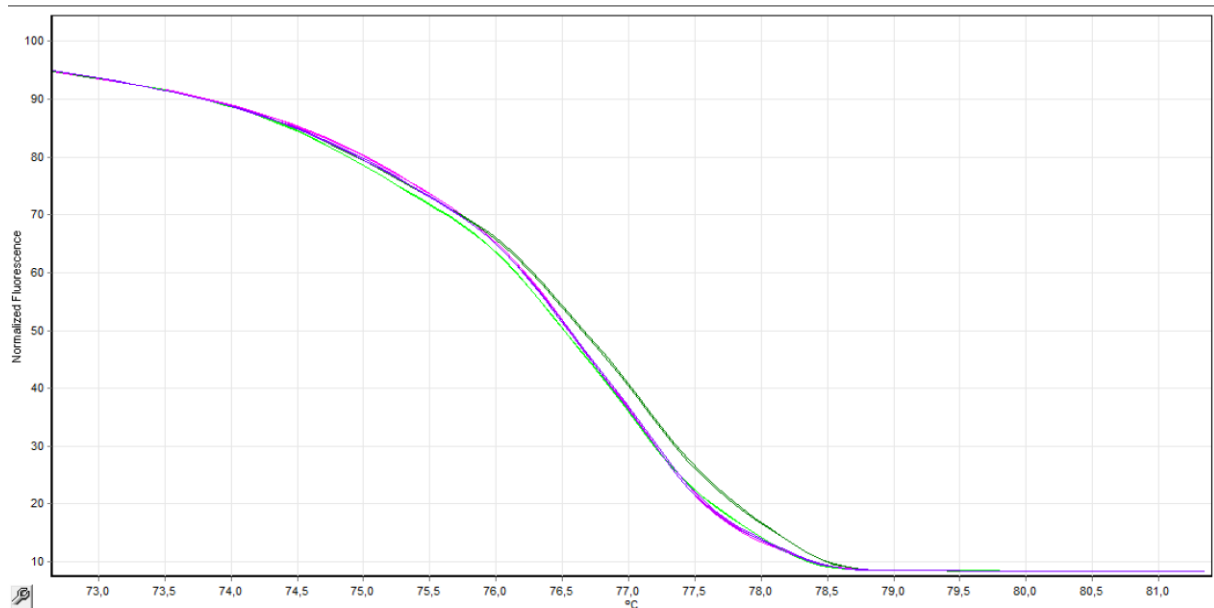


Abbildung 66: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 05g8 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Lavantaler Bananenapfel Standort H: pink, Lavantaler Bananenapfel Standort W: violett, Sommer Maschanzka Standort H: dunkelgrün, Sommer Maschanzka Standort W: hellgrün. H = Haidegg. W = Wagersbach

5.2.2 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte der Blattextrakte

In einer früheren Bachelorarbeit („Identification of apple varieties by high resolution melting (HRM) analysis– agarose gel electrophoresis for facilitating HRM data interpretation“ von Pegah Mirshahi) wurden die PCR-Produkte der Blattextrakte mit den Primerpaaren aus Micic’s Masterarbeit einer Gelelektrophorese unterzogen. Für die in dieser Arbeit getesteten Primerpaare (05g8, 23g4, CH02h11a) und weitere sieben Primerpaare aus Micic’s Masterarbeit (CH02g09, CH01f12, GD103, CH04C07, CH01f09, CH01h01, Hi02f12) wurde noch keine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese wurden im Zuge dieser Masterarbeit durchgeführt. Primerpaar 01a6 war ausgenommen, da dieses Primerpaar nicht geeignet für die PCR HRM Analyse war.

Aufgrund der einheitlichen PCR HRM Ergebnisse für beide Standorte, an denen Blattproben genommen worden waren, wurden für die Gelelektrophorese nur PCR-Produkte des Standorts Haidegg verwendet, mit Ausnahme der Sorte Kanada Renette, für welche PCR-Produkte der Blätter des Standorts Wagersbach verwendet wurden. Im Anhang (Tabelle 25) ist die Liste der Primerpaare mit Sequenz und optimierter Anlagerungstemperatur zu sehen.

Die Sorten Ananasrenette, Cox Orange, Goldparmäne, Ilzer Rose, Jonathan, Kronprinz Rudolf, Lavantaler Bananenapfel, McIntosh, Schafnase, Steirischer Maschanzka, Braeburn, Elstar, Fuji, Gala, Golden Delicious und Idared besitzen diploide Chromosomensätze. Bohnapfel, Gravensteiner, Kanada Renette, Roter Boskoop und Sommer Maschanzka sind Sorten, welche einen triploiden Chromosomensatz aufweisen. Mittels Agarosegelelektrophorese sollte festgestellt werden, wieviele Allele die Sorten für einen bestimmten Mikosatelliten-Marker jeweils aufweisen.

PCR-Produkte des Primerpaars 05g8

In Abbildung 67 sind die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit Primerpaar 05g8 abgebildet. Die diploiden Sorten Goldparmäne, Ananas Renette und Braeburn wiesen zwei Banden bei etwa 120 bp und 150 bp auf, was bedeutet, dass diese Sorten zwei Allele aufweisen.

Die Sorte Gravensteiner führte zu einer stark ausgeprägten Bande bei etwa 90 bp und noch zwei bis drei schwächere Banden bei 140 bp und 300 bp. Gravensteiner ist eine triploide Sorte, dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein.

Für die Sorte McIntosh wurde ein sehr kurzes PCR-Produkt bei etwa 55 bp erhalten. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit dem Ergebnis der PCR HRM Analyse, bei der eine höhere Schmelztemperatur ermittelt wurde. Daher wurden diese PCR-Produkte in späterer Gelelektrophorese erneut aufgetragen (siehe Abbildung 91). Bei der zweiten Analyse des PCR-Produkts von McIntosh wurde eine Bande bei etwa 140 bp erhalten. Dieses Ergebnis stimmt deutlich besser mit den PCR HRM Ergebnissen überein als das Auftreten einer Bande bei 50 bp.

Die Bande der Sorte Cox Orange war auf dem Gel kaum erkennbar, obwohl in der PCR HRM Analyse eine Schmelzkurve zu sehen war. Hier ist ein Fehler beim Befüllen der Geltaschen passiert, es wurde ein PCR-Produkt eingesetzt, welches in der PCR nicht zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führte. Die restlichen Sorten (Lavantaler Bananenapfel, Bohnapfel, Jonathan, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Ilzer Rose, Roter Boskoop, Schafnase, Sommer Maschanzka, Kanada Renette, Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared) zeigten eine Bande bei etwa 125 bp – 130 bp. In der PCR HRM Analyse führten die PCR-Produkte von Golden Delicious, Fuji, Elstar, Kronprinz Rudolf und Ilzer Rose zu identen Schmelzkurven, welche sich von den Kurven der PCR-Produkte der Sorten Lavantaler Bananenapfel, Bohnapfel, Jonathan, Steirischer Maschanzka, Roter Boskoop, Schafnase, Sommer Maschanzka, Kanada Renette, Gala und Idared trotz der ähnlichen Länge der Produkte unterschieden.

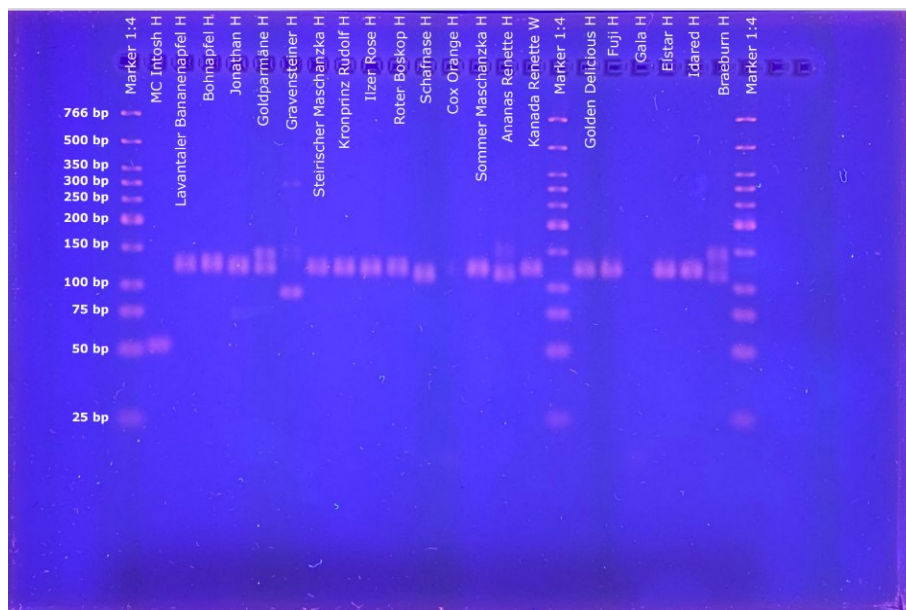


Abbildung 67: Foto eines Gels der mit Primerpaar 05g8 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskoop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars 23g4

In Abbildung 68 ist das Gel der PCR-Produkte des Primerpaars 23g4 zu sehen.

Die Produkte der Sorten McIntosh, Bohnapfel, Goldparmäne, Roter Boskoop, Kanada Renette und Idared führten zu zwei deutlichen Banden bei etwa 88 bp und 70 bp. McIntosh, Goldparmäne und Idared besitzen diploide Chromosomensätze und Bohnapfel, Roter Boskoop und Kanada Renette triploide Chromosomensätze. Die PCR-Produkte von McIntosh, Goldparmäne, Roter Boskoop, Kanada Renette und Idared führten in der PCR HRM zu identen Schmelzkurven, während Bohnapfel einen anderen Kurvenverlauf aufwies.

Die Sorte Gala besitzt möglicherweise auch zwei Allele, jedoch war die Bande des kürzeren PCR-Produktes (ca. 70 bp) nur sehr schwach ausgeprägt.

Die Sorten Lavantaler Bananenapfel, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Ilzer Rose, Schafnase, Cox Orange, Sommer Maschanzka, Ananas Renette, Fuji und Braeburn zeigten eine Bande bei etwa 70 bp. Mit Ausnahme von Ilzer Rose wiesen diese Sorten in der PCR HRM Analyse denselben Kurvenverlauf auf. Die restlichen Sorten (Jonathan, Gravensteiner, Golden Delicious, Elstar) zeigten eine Bande bei etwa 88 bp. Auch die PCR-Produkte dieser Sorten führten in der PCR HRM Analyse zu identen Schmelzkurven, mit Ausnahme der Sorte Gravensteiner.

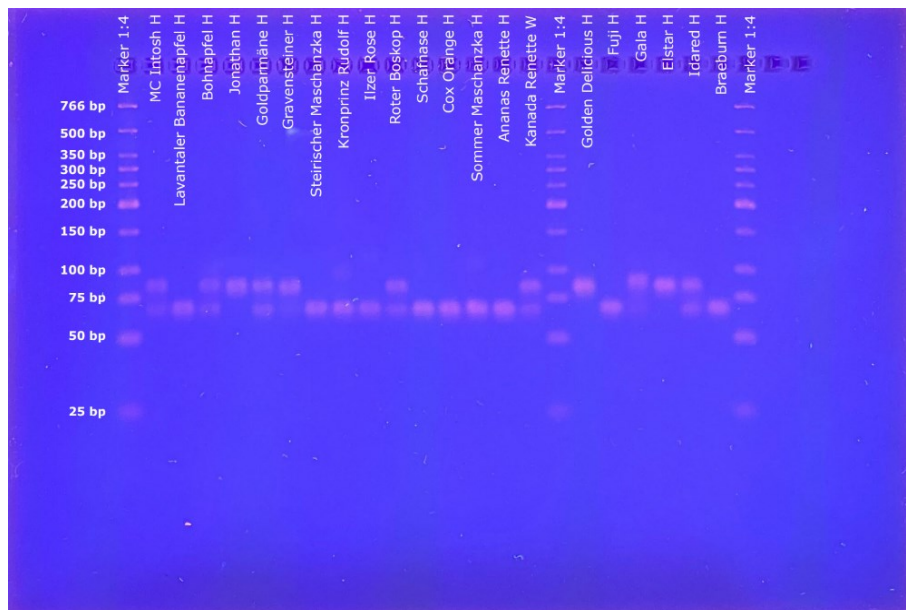


Abbildung 68: Foto eines Gels der mit Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars CH02h11a

In Abbildung 69 ist das Gel der PCR-Produkte des Primerpaars CH02h11a zu sehen.

Die Sorten Lavantaler Bananenapfel, Jonathan, Goldparmäne, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Sommer Maschanzka und Idared zeigten zwei Banden bei etwa 140 bp und 105 bp. McIntosh und Bohnapfel führten zu PCR-Produkten mit Längen von 140 bp und 120 bp. Die restlichen Sorten (Gravensteiner, Ilzer Rose, Ananas Renette, Kanada Renette, Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared, Braeburn) zeigten eine Bande bei 140 bp.

In der PCR HRM Analyse der Extrakte der Blätter unter Verwendung des Primerpaars CH02h11a konnten die Kurven in drei Gruppen unterteilt werden. Diese Gruppen ähnelten einander stark, was mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese übereinstimmt, da alle Sorten ein bis zwei Banden im Bereich von 130 bp – 150 bp aufweisen.

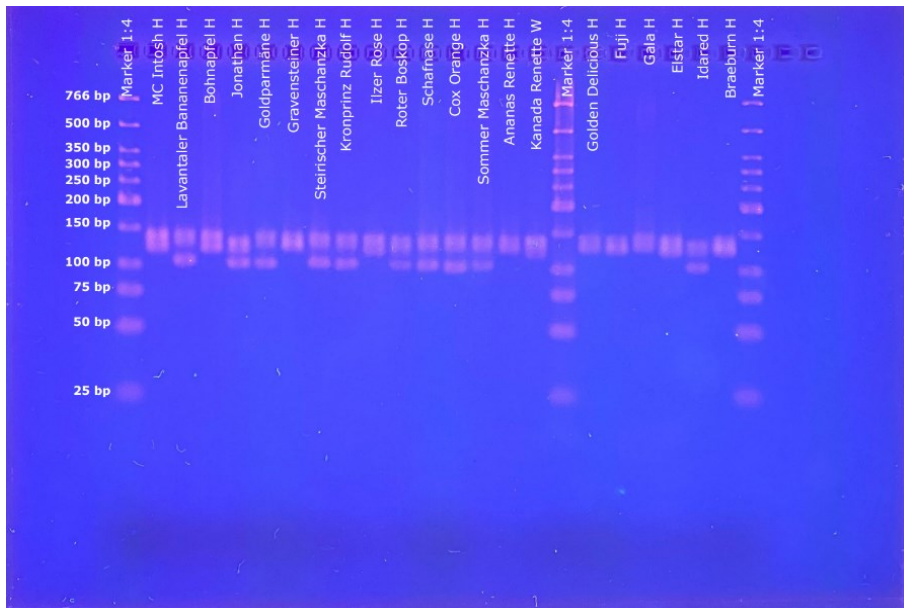


Abbildung 69: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH02h11a erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars CH02g09

In Abbildung 70 sind die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit Primerpaar CH02g09 abgebildet.

Die PCR-Produkte der Sorten Gravensteiner und Kronprinz Rudolf (125 bp und 110 bp), Jonathan, Roter Boskoop, Kanada Renette und Elstar (125 bp und 150 bp), Cox Orange (120 bp und 100 bp) führten zu zwei Banden, gleichbedeutend mit zwei Allelen. Die Sorten McIntosh, Lavantaler Bananenapfel, Bohnapfel, Schafnase, Fuji, Gala, Idared, Braeburn (110 bp), Goldparmäne (140 bp), Steirischer Maschanzka, Ilzer Rose, Sommer Maschanzka, Golden Delicious (125 bp) zeigten nur eine Bande.

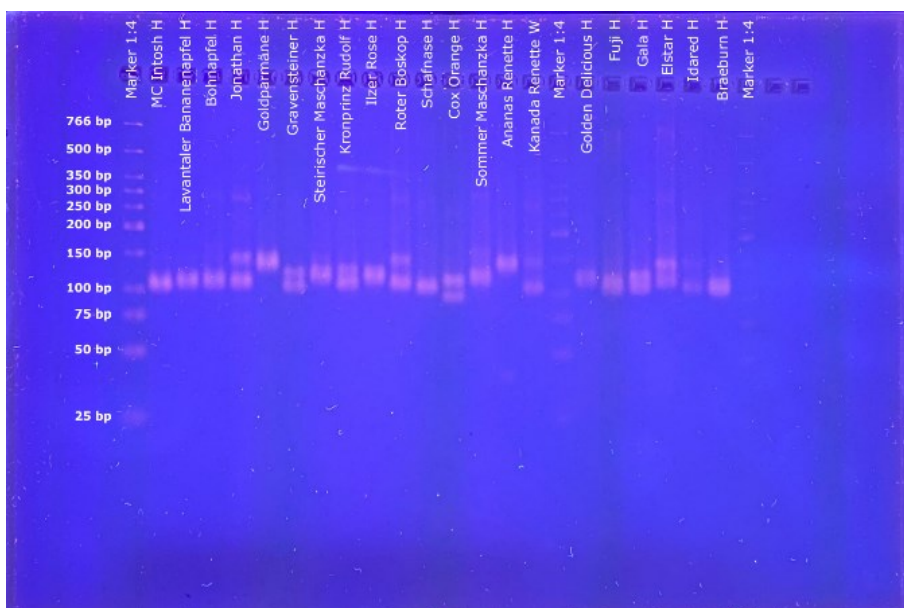


Abbildung 70: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH02g09 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars CH01f12

In Abbildung 71 ist das Gel der PCR-Produkte des Primerpaars CH01f12 zu sehen. Zusätzlich wurde das PCR-Produkt der Sorte McIntosh in der letzten Lane unter Verwendung des Primerpaars 05g8 noch einmal aufgetragen. Die Sorte McIntosh unter Verwendung des Primerpaars 05g8 führte auch auf diesem Gel zu einem kurzen PCR-Produkt von 50 bp.

Für alle Sorten wurden unter Verwendung des Primerpaars CH01f12 zwei Banden im Bereich von 150 bp – 170 bp erhalten. Die Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars CH01f12 hatten einen relativ ähnlichen Verlauf, was sich mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese deckt.

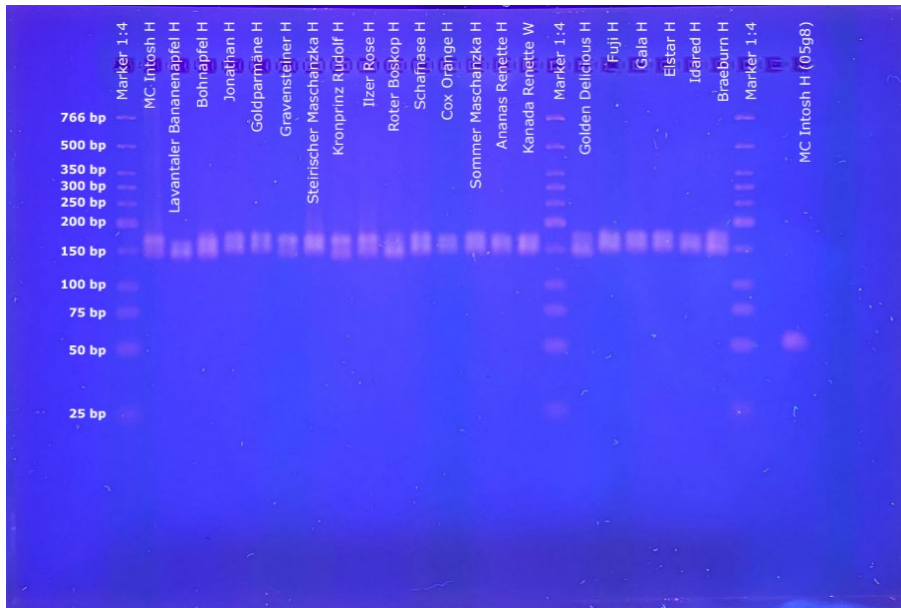


Abbildung 71: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH01f12 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars GD103

In Abbildung 72 sind die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit Primerpaar GD103 dargestellt.

Die PCR-Produkte der Sorten Lavantaler Bananenapfel, Goldparmäne, Steirischer Maschanzka, Roter Boskoop, Cox Orange, Sommer Maschanzka, Kanada Renette, Golden Delicious, Fuji, Gala und Elstar führten zu zwei Banden bei etwa 80 bp und 110 bp. Diese Sorten besitzen zwei Allele und wiesen in der PCR HRM Analyse, mit Ausnahme von Kanada Renette, ähnliche Schmelzkurven auf. Die Sorten McIntosh, Jonathan, Ananas Renette, Idared und Braeburn zeigten eine Bande bei etwa 100 bp und wiesen idente Schmelzkurven auf. Die PCR-Produkte der Sorten Bohnapfel, Gravensteiner, Kronprinz Rudolf und Schafnase führten zu einer Bande bei etwa 90 bp. Gravensteiner und Kronprinz Rudolf wiesen idente Schmelzkurven auf, die Kurven von Bohnapfel und Schafnase wichen jedoch ab.

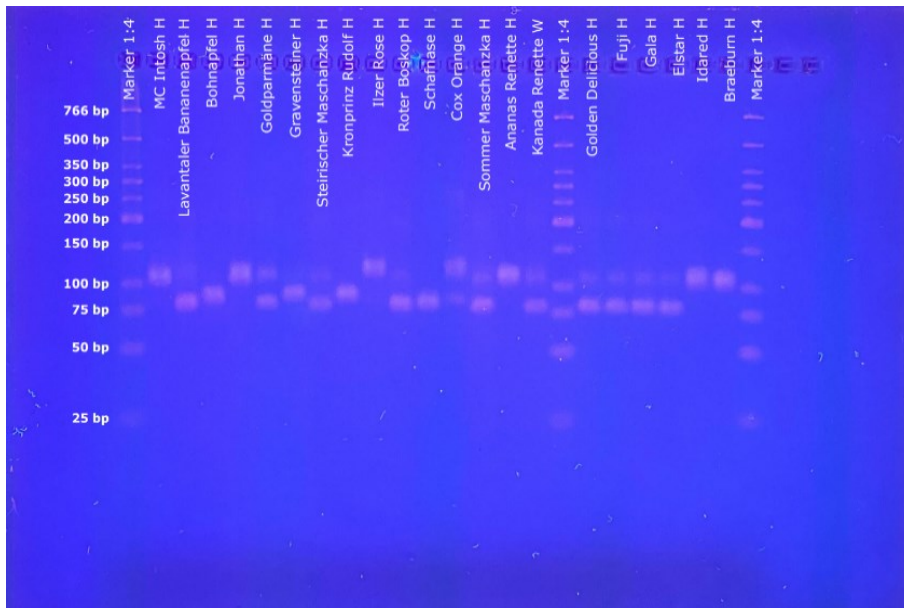


Abbildung 72: Foto eines Gels der mit Primerpaar GD103 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars CH01f09

In Abbildung 73 ist das Gel der PCR-Produkte des Primerpaars CH01f09 zu sehen.

Für alle Sorten wurden zwei eng beieinander liegende Banden im Bereich von 130 bp – 150 bp erhalten. In der PCR HRM Analyse (Micic, 2022) wiesen die Produkte aller Sorten idente Kurven auf, mit Ausnahme der Sorten Cox Orange und Braeburn, als auch die Sorten Kronprinz Rudolf, Idared und Jonathan. Damit stimmen die Ergebnisse der Gelelektrophorese, in der die meisten Sorten Produkte derselben Länge zeigten, mit denen der PCR HRM Analyse überein.

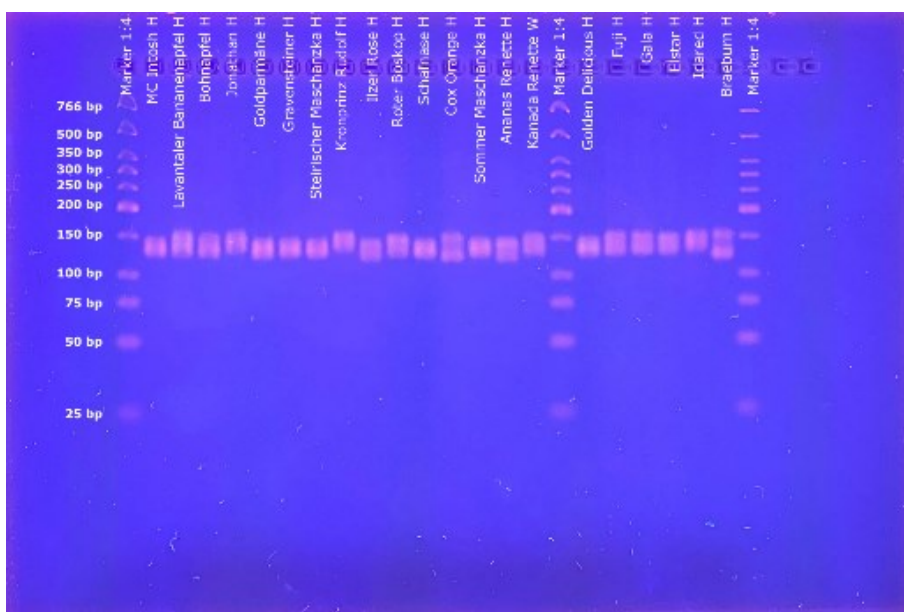


Abbildung 73: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH01f09 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars CH04c07

In Abbildung 74 sind die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit Primerpaar CH04c07 zu sehen. Zusätzlich wurde in der letzten Lane das PCR-Produkt von McIntosh unter Verwendung des Primerpaars 05g8 aufgetragen. Im Unterschied zu den vorher gezeigten Ergebnissen (Abbildung 67 und 71) wurde hier das PCR-Produkt des zweiten Replikats aufgetragen.

Die Sorten Goldparmäne, Gravensteiner, Golden Delicious und Elstar zeigten unter Verwendung des Primerpaars CH04c07 jeweils zwei Banden bei etwa 100 bp und 120 bp. Die PCR-Produkte der Sorten Ilzer Rose, Sommer Maschanzka, Kanada Renette und Fuji führten ebenfalls zu zwei Banden bei 110 bp und 140 bp. Das bestätigt das Vorhandensein von zwei Allelen. Die Sorten McIntosh, Bohnapfel, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Gala und Ananas Renette zeigten eine Bande bei etwa 110 bp. Lavantaler Bananenapfel, Jonathan, Idared und Braeburn führten zu einer Bande bei etwa 120 bp. In der PCR HRM Analyse zeigte vor allem die Gruppe aus Golden Delicious, Gala und Elstar charakteristische Schmelzkurven, die restlichen Kurven lagen enger beieinander.

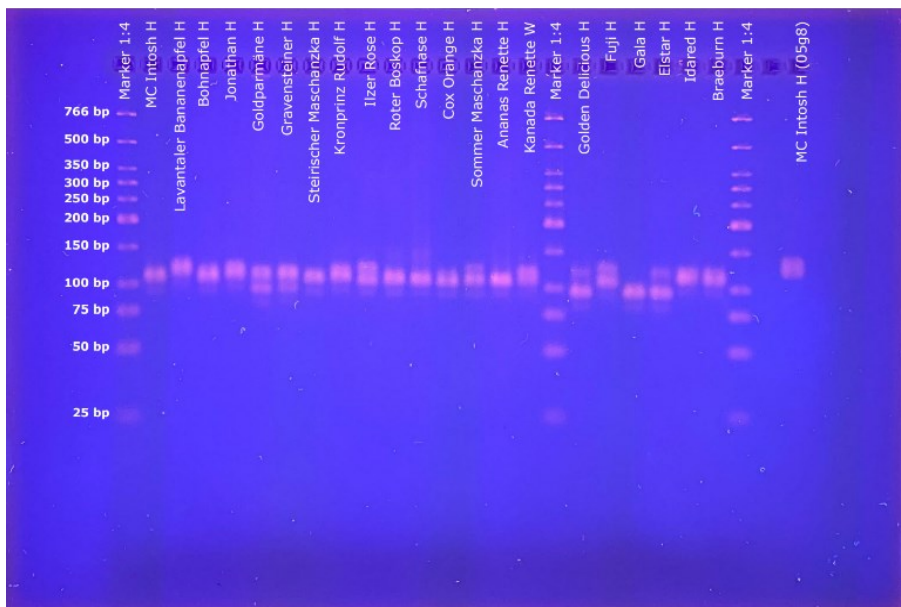


Abbildung 74: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH04c07 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskoop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars CH01h01

In Abbildung 75 ist das Gel der PCR-Produkte des Primerpaars CH01h01 zu sehen.

Die Sorten Lavantaler Bananenapfel, Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne, Gravensteiner, Roter Boskoop, Cox Orange, Kanada Renette, Gala, Idared und Braeburn zeigten zwei Banden bei etwa 120 bp und 150 bp. Diese Sorten besitzen zwei Allele und vor allem Cox Orange und Roter Boskoop führten zu charakteristischen Schmelzkurven in der PCR HRM Analyse (Micic, 2022). Die restlichen Sorten (McIntosh, Steirischer Maschanzka, Kronprinz Rudolf, Ilzer Rose, Schafnase, Sommer Maschanzka, Ananas Renette, Golden Delicious, Fuji, Elstar) zeigten nur eine Bande bei etwa 120 bp. Diese Sorten wiesen auch in der PCR HRM Analyse idente Schmelzkurven auf.

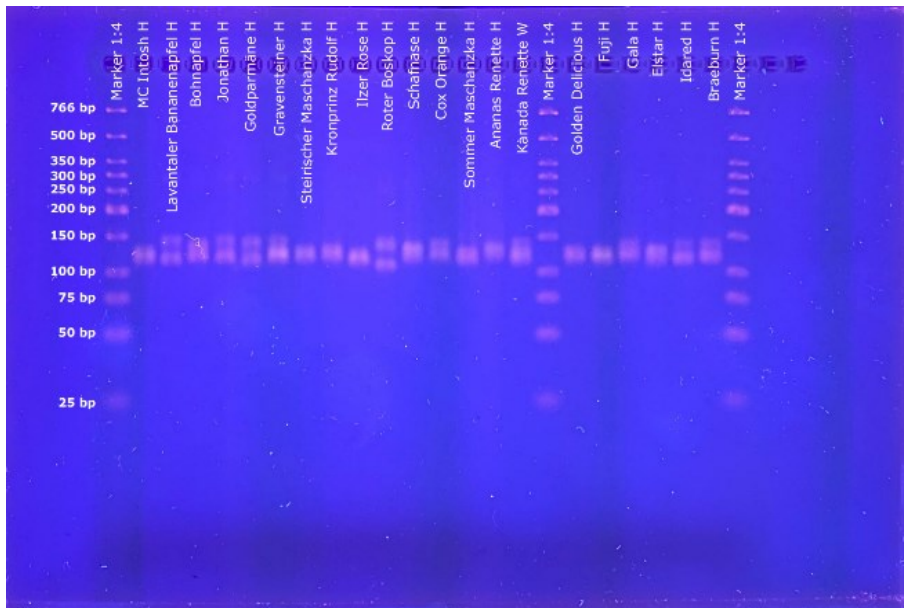


Abbildung 75: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH01h01 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

PCR-Produkte des Primerpaars Hi02f12

In Abbildung 76 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit Primerpaar Hi02f12 abgebildet.

Für alle Sorten wurden zwei sehr eng beieinander liegende Banden im Bereich von 130 bp – 150 bp erhalten. Die PCR-Produkte scheinen in etwa dieselbe Länge zu haben, einige sind um maximal zehn Basenpaare verschoben. Die Schmelzkurven der Produkte waren ident, mit Ausnahme von Golden Delicious, welche denselben Kurvenverlauf aufwies, jedoch minimal zu höheren Temperaturen verschoben war (Micic,2022).

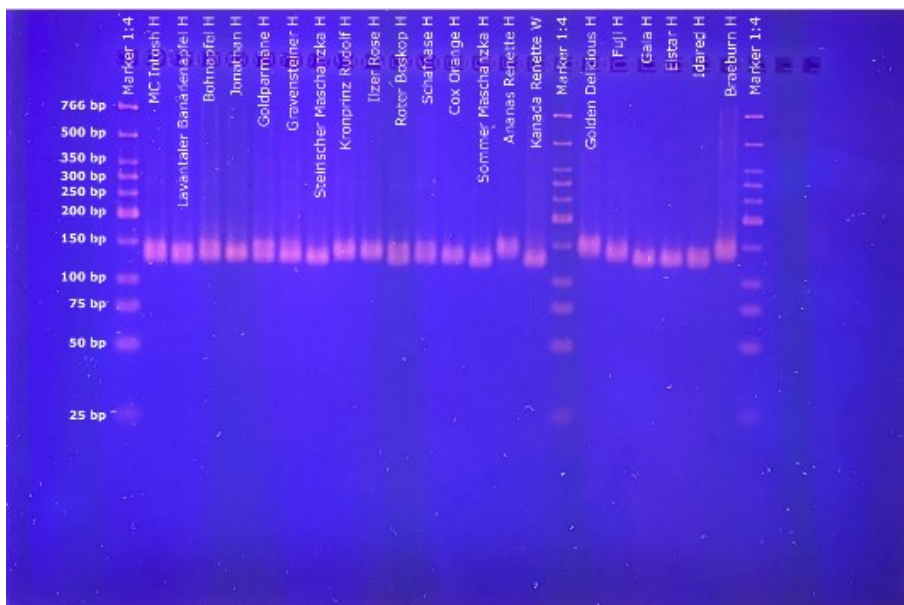


Abbildung 76: Foto eines Gels der mit Primerpaar Hi02f12 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für diploide Sorten ein oder zwei Banden erhalten wurden, was auf das Vorhandensein von einem oder zwei Allelen hinweist. Aus der Zahl der erhaltenen Banden kann geschlossen werden, dass triploide Sorten ein, zwei oder drei Allele aufwiesen. Generell stimmten die Ergebnisse der Gelelektrophorese gut mit den PCR HRM Ergebnissen überein.

5.2.3 Anwendbarkeit der PCR HRM auf Äpfel und apfelhaltige Lebensmittel

Ziel dieser Arbeit war es auch, die DNA aus Fruchtfleisch und Schale von Äpfeln, als auch von Lebensmitteln, welche aus Äpfeln gewonnen wurden, zu extrahieren (Tabelle 2 und 3). Da zur Extraktion bisher Blätter verwendet worden waren, sollte die DNA-Extraktion optimiert werden. Diese DNA-Extrakte sollten zur Unterscheidung der Apfelsorten mithilfe der PCR HRM Analyse verwendet werden.

5.2.3.1 DNA-Extraktion und fluorimetrische Konzentrationsbestimmung

Extraktionsoptimierung

Die Extraktionsmethode wurde mit Äpfeln der Sorte Gala optimiert (siehe 4.3.1). Für die Optimierung der Extraktion mit der Apfelsorte Gala wurde der Einfluss von PVP in einer Konzentration 0,5 % im PL2 Puffer auf die erhaltene DNA-Konzentration und die Ct-Werte der Extrakte in der PCR HRM Analyse untersucht. Die Zugabe von PVP zum PL2 Puffer führte nicht zu einer Erhöhung der DNA-Konzentration der Extrakte (Abbildung 77) und hatte keinen Einfluss auf die Ct-Werte der Extrakte in der PCR HRM. PVP wurde dennoch standardmäßig bei der DNA-Extraktion aus dem Fruchtfleisch, der Schale oder apfelhaltigen Lebensmitteln dem PL2 Puffer zum Zweck der Entfernung von Polyphenolen zugefügt. Die Extraktion der DNA aus Fruchtfleisch der Sorten Gala und Elstar wurde zusätzlich mit einer PVP-Konzentration im PL 2 Puffer von 1 % und 2 % und Zusatz von Proteinase K getestet. Auch diese Optimierungsversuche führten nicht zu einer Erhöhung der DNA-Konzentration und hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Ct-Werte der Extrakte in der PCR HRM Analyse.

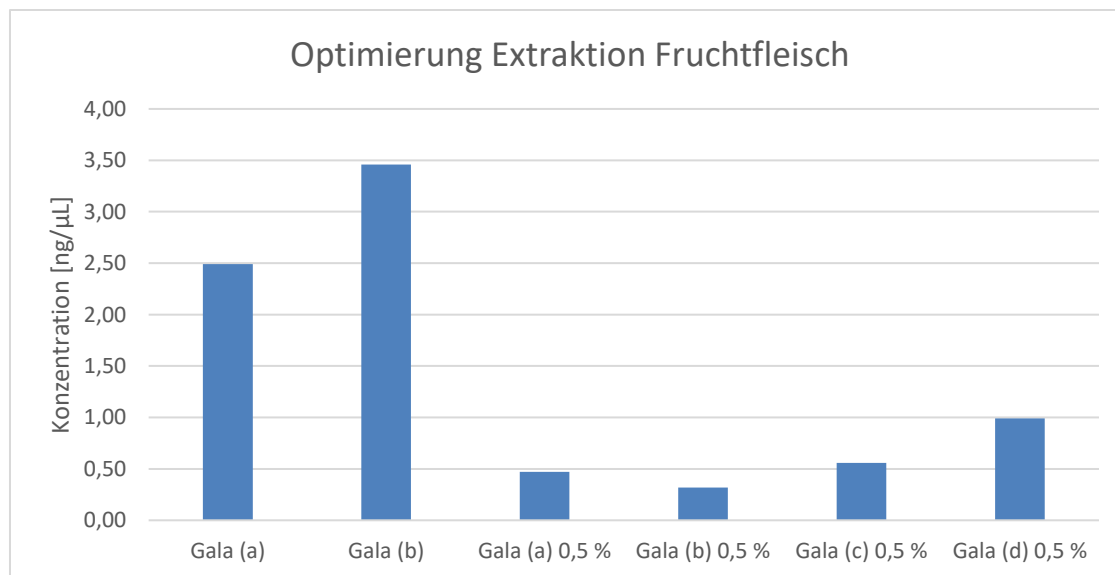


Abbildung 77: Einfluss der PVP-Zugabe auf die DNA-Konzentration der DNA-Extrakte aus Fruchtfleisch. Sorte Gala, Elution 1, % = PVP % im PL2 Puffer, (a) = Replik 1, (b) = Replik 2, (c) = Replik 3, (d) = Replik 4

DNA-Konzentrationen der Extrakte aus Fruchtfleisch und Schale

Aus allen Proben wurde die DNA, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, im Einfachansatz extrahiert. Die Extraktion aus den Sorten Braeburn, Elstar, Gala, Fuji und Cox Orange fand im Doppelansatz statt. In Abbildung 78 und 79 ist zu erkennen, dass die DNA-Konzentrationen der Extrakte aus Schalen deutlich höher war als die der Extrakte aus Fruchtfleisch. Die DNA-Konzentrationen der ersten Eluate, erhalten aus Schalen, lagen zwischen 2,41 ng/μL (Goldparmäne) und 58 ng/μL (Steirischer Maschanzka). Die DNA-Konzentration der ersten Eluate aus Fruchtfleisch lagen zwischen 0,138 ng/μL (Ilzer Rose) und 1,84 ng/μL (Steirischer Maschanzka). Die DNA-Konzentration des zweiten Eluate erhalten aus Schalen, betrug zwischen 5,28 ng/μL (Ilzer Rose) und 46,2 ng/μL (Idared). Die DNA-Konzentration der zweiten Eluate aus Fruchtfleisch lag zwischen 0,097 ng/μL (Gravensteiner) und 2,61 ng/μL (Goldparmäne). Erkennbar ist, dass Sorten, für welche eine vergleichsweise hohe DNA-Konzentration im ersten Eluat ermittelt wurde (Bsp.: Steirischer Maschanzka Schale), im zweiten Eluat vergleichsweise niedrigere DNA-Konzentrationen aufzeigten und umgekehrt (Bsp.: Braeburn Schale). Das Extraktionsprotokoll könnte eventuell im Schritt der DNA Elution optimiert werden, indem man die Tubes für eine längere Zeit bei 65 °C inkubiert (Kapitel 4.3.2), um für alle Sorten konstant eine höhere DNA-Konzentration im ersten Eluat zu erhalten.

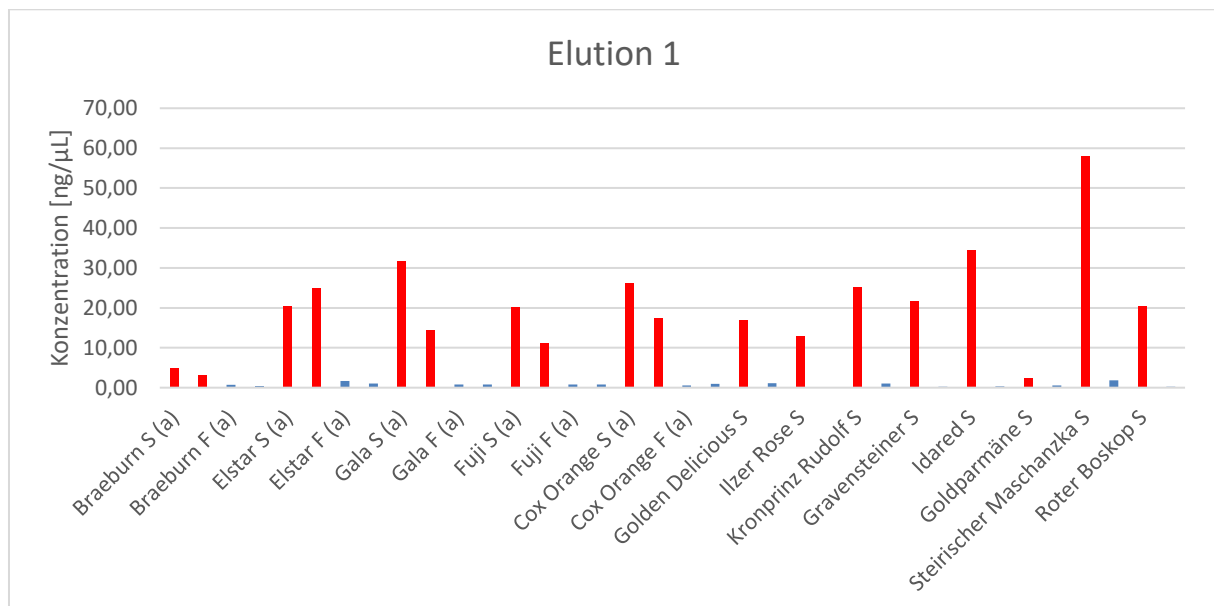


Abbildung 78: DNA-Konzentration der DNA-Extrakte aller Sorten für welche Früchte verfügbar waren (Braeburn, Elstar, Gala, Fuji, Cox Orange, Golden Delicious, Ilzer Rose, Kronprinz Rudolf, Gravensteiner, Idared, Goldparmäne, Steirischer Maschanzka, Roter Boskoop). S = Schale (rot), F = Fruchtfleisch (blau), Eluat 1

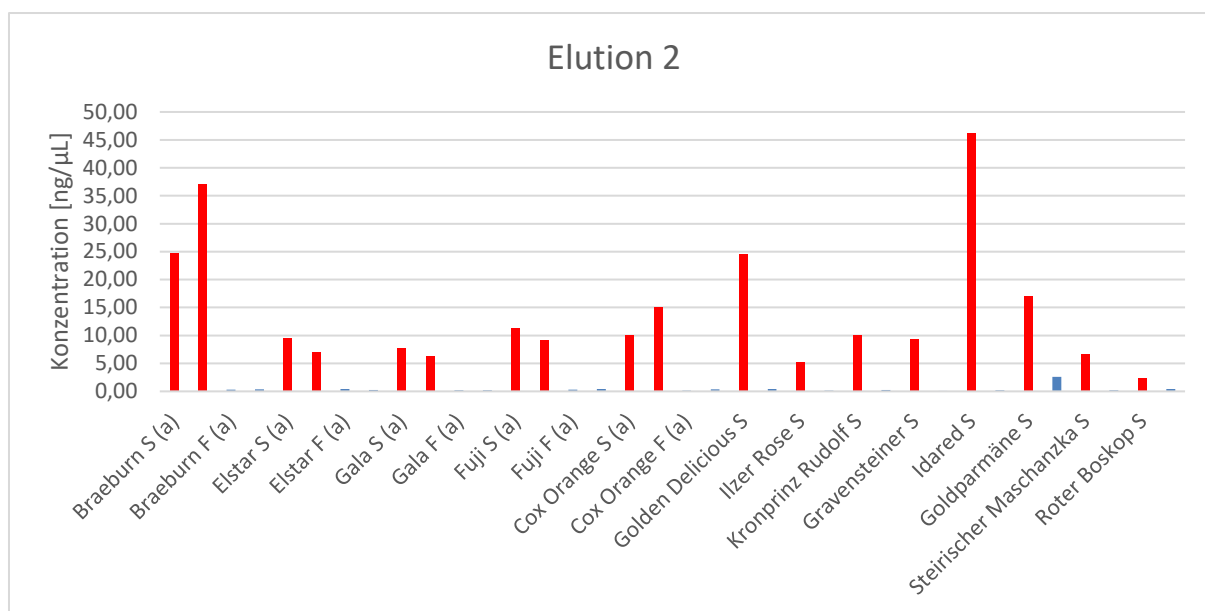


Abbildung 79: DNA-Konzentrationen der DNA-Extrakte aller Sorten (Braeburn, Elstar, Gala, Fuji, Cox Orange, Golden Delicious, Ilzer Rose, Kronprinz Rudolf, Gravensteiner, Idared, Goldparmäne, Steirischer Maschanzka, Roter Boskoop). S = Schale (rot), F = Fruchtfleisch (blau), Eluat 2

DNA-Konzentrationen der Extrakte von Saft-, Most- und Apfelmusproben

DNA wurde aus Saft-, Most- und Apfelmusproben isoliert (Tabelle 2 und 3). Der Großteil der Extrakte wies eine sehr geringe DNA-Konzentration auf (0,054 – 0,535 ng/μl) oder enthielt nicht genügend DNA, um die Konzentration fluorimetrisch zu erfassen. Nur für fünf Apfelsaftproben (Lavantaler Bananenapfel, Kronprinz Rudolf, Ananas Renette, Elstar und Goldparmäne) wurden DNA-Extrakte mit einer Konzentration über der Bestimmungsgrenze erhalten. DNA-Extrakte aus sechs (Kronprinz Rudolf, Ilzer Rose, Bohnapfel, Cox Orange, Gravensteiner und Lavantaler Bananenapfel) der 13 Mostproben hatten eine DNA-Konzentration über der Bestimmungsgrenze. Die DNA-Konzentration von Extrakten aus 13 Apfelmusproben lag unter der Bestimmungsgrenze des Kits. DNA-Extrakte aus Apfelmus von Clever aus Golden Delicious Äpfeln und JA! Natürlich aus Topaz Äpfeln wiesen im ersten Eluat eine geringe, dennoch messbare DNA-Konzentration auf. Für die Extrakte von JA! Natürlich Apfelmus + Banane konnten in beiden Eluaten eine DNA-Konzentration gemessen werden. Die ermittelten DNA-Konzentration sind im Anhang in Tabelle 23 und 24 angegeben.

Aufgrund der geringen DNA-Konzentrationen der Extrakte wurde versucht die DNA-Konzentration durch Erhöhung des Probenvolumens bzw. der Einwaage zu steigern (siehe 4.3.1). Die Erhöhung des Volumens von 500 mL auf 2500 mL bei der Extraktion von Saftproben, beziehungsweise die Erhöhung der Einwaage von 150 mg auf 500 mg bzw. 1000 mg bei der Extraktion von Apfelmusproben, führten zu keiner deutlichen Verbesserung der DNA-Ausbeute. Der erhöhte Arbeitsaufwand aufgrund des größeren Volumens bzw. der erhöhten Einwaage welches in mehreren Schritten auf das Säulchen aufgetragen werden musste, stand nicht in Relation zu dem erhaltenen Ergebnis. Daher wurde die Extraktion der DNA für alle Saft- und Mostproben mit 500 mL und der Apfelmusproben mit 150 mg durchgeführt.

Zusätzlich wurde aus Saftproben die DNA ohne den Lyseschnitt extrahiert. Somit startete die Extraktion mit dem Schritt der Zugabe des PC Puffers (siehe 4.3.2). Diese Adaption der Extraktionsbedingungen führte ebenfalls zu keiner höheren Ausbeute.

Die Konzentrationen aller DNA-Extrakte sind im Anhang in Tabelle 21 bis 24 aufgelistet.

5.2.3.2 Eignung von DNA-Extrakten auf Apfelschalen und Fruchtfleisch zur Unterscheidung von Apfelsorten mittels PCR HRM

Die Unterscheidung der Apfelsorten mit DNA-Extrakten aus Blättern wurde in der Masterarbeit von Mina Micic (Micic, 2022) erfolgreich durchgeführt. Mit einem Set aus drei Primerpaaren konnten 21 Apfelsorten identifiziert und unterschieden werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob zur Unterscheidung von Apfelsorten DNA-Extrakte aus Schale, Fruchtfleisch und apfelhaltigen Lebensmitteln herangezogen werden können und ob die Probenmatrix einen Einfluss auf die erhaltenen Schmelzkurven hat.

Zur Anwendbarkeit der erhaltenen DNA-Extrakte wurde mit den Extrakten der Sorten Elstar, Gala, Fuji, Cox Orange und Braeburn eine PCR HRM Analyse durchgeführt.

Da sich das Primerpaar CH01g12 in der Masterarbeit von Mina Micic als gut geeignet zur Amplifikation der DNA und Unterscheidung der Apfelsorten erwiesen hatte, wurde dieses Primerpaar für die Untersuchung der Anwendbarkeit gewählt. DNA-Extrakte aus Blättern und Schalen wurden auf 2,5 ng/μL verdünnt, Extrakte aus Fruchtfleisch wurden aufgrund der geringen DNA-Konzentration unverdünnt eingesetzt. In Abbildung 80 sind zur besseren Übersicht beispielhaft nur die Schmelzkurven der Sorte Gala in normalisierter Ansicht dargestellt. Für Extrakte der Sorten Elstar, Fuji, Cox Orange und Braeburn wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Die Kurven für DNA aus Blatt sind in grün, aus Schale blau (Replikat 1 hellblau, Replikat 2 dunkelblau) und aus Fruchtfleisch in rötlichen Tönen (Replikat 1 orange, Replikat 2 rot) dargestellt. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte der Extrakte aus Blatt und Schale überlappten vollständig. Die Kurven der Produkte der Extrakte aus Fruchtfleisch waren im Vergleich zu den Kurven der Produkte aus Blatt und Schalen zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Die Kurven der Replikate der Produkte aus Fruchtfleisch waren stark verschoben. Als nächstes wurde geprüft, ob der Einfluss der Probenmatrix, der bei Fruchtfleisch beobachtet wurde, durch Verdünnung der DNA-Extrakte reduziert werden konnte.

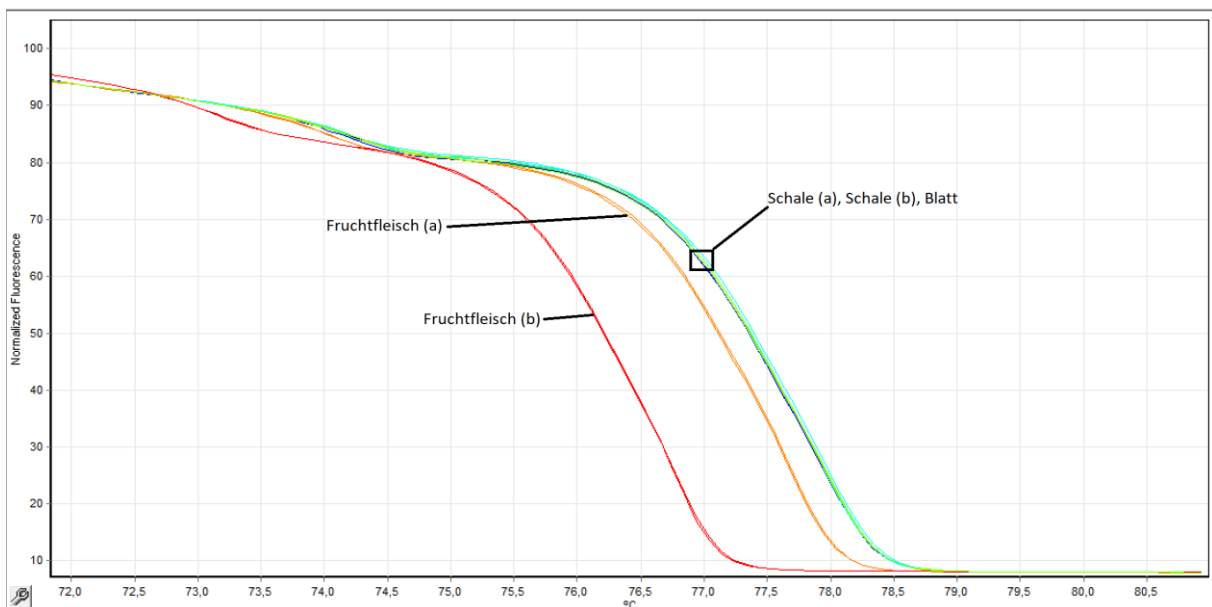


Abbildung 80: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) = orange, Fruchtfleisch (b) = rot, Schale (a) = hellblau, Schale (b) = dunkelblau, Blatt = grün, (a) = Replikat 1, (b) = Replikat 2

Dazu wurde eine PCR HRM Analyse mit Extrakten aus Fruchtfleisch im unverdünnten Zustand, 1:5 und 1:10 verdünnt durchgeführt. Als Referenz wurden Extrakte aus Blättern eingesetzt. Diese PCR HRM Analyse wurde mit den Sorten Gala und Cox Orange und dem Primerpaar CH01g12 durchgeführt. In Abbildung 81 werden beispielhaft die Ergebnisse für die Sorte Gala gezeigt. Man kann erkennen, dass es durch eine Verdünnung Matrixeffekte deutlich reduziert werden konnten, dennoch überlappten die Schmelzkurven für DNA aus Fruchtfleisch und Blatt nicht vollständig. Daher wurden weitere Versuche unternommen, den Einfluss der Matrix zu reduzieren.

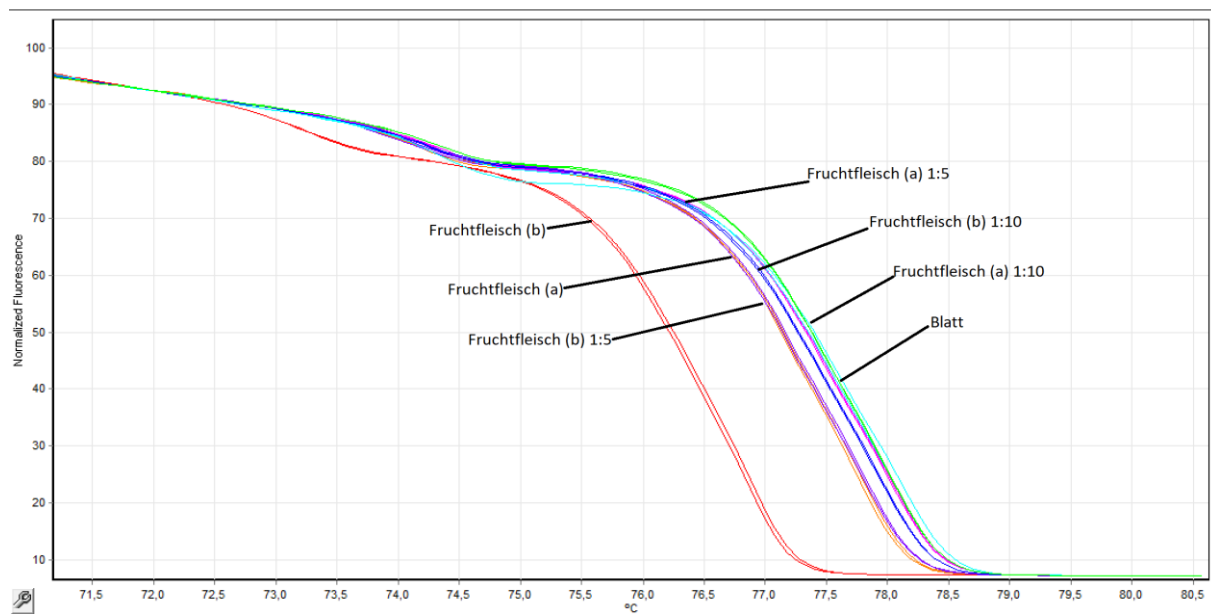


Abbildung 81: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) = orange, Fruchtfleisch (b) = rot, Fruchtfleisch (a) 1:5 = pink, Fruchtfleisch (b) 1:5 = violett, Fruchtfleisch (a) 1:10 = hellblau, Fruchtfleisch (b) 1:10 = dunkelblau, Blatt = grün, (a) = Replik 1, (b) = Replik 2

In einem weiteren Versuch wurden DNA-Extrakte aus Blättern und Schalen mit dem Elutionspuffer (PE Puffer), statt mit destilliertem Wasser, auf 2,5 ng/μL verdünnt. Diese PCR HRM Analyse wurde mit den Sorten Elstar, Gala, Fuji und Cox Orange und dem Primerpaar CH01g12 durchgeführt. Exemplarisch sind in Abbildung 82 nur die Schmelzkurven der Sorte Gala in normalisierter Ansicht dargestellt. Die Verdünnung der Blatt- bzw. Schalenextrakte mit PE Puffer führte zu keiner Reduktion der Matrixeffekte, verglichen zur Verdünnung der Extrakte mit destilliertem Wasser (Abbildung 81).

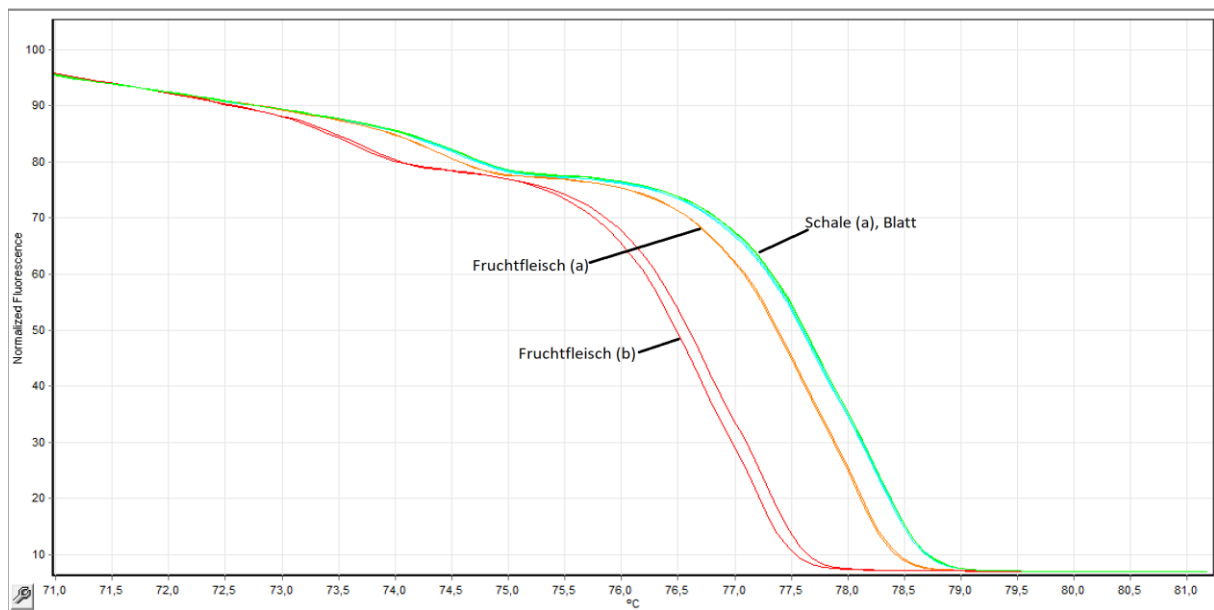


Abbildung 82: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Blatt und Schale wurde mit PE Puffer verdünnt. Fruchtfleisch (a) = orange, Fruchtfleisch (b) = rot, Schale (a) = hellblau, Schale (b) = dunkelblau, Blatt = grün, (a) = Replik 1, (b) = Replik 2

Als nächstes wurde versucht, die DNA-Extraktion zu adaptieren, um eventuell vorhandene Störkomponenten bei der Extraktion effizienter entfernen zu können. Bei der Extraktion aus Fruchtfleisch der Sorten Gala und Elstar kamen statt einem PL 2 Puffer mit 0,5 %-iger PVP-Konzentration, Konzentrationen von 1 % und 2 % zum Einsatz. Zusätzlich wurde jeweils 25 mL Proteinase K zugesetzt (siehe 4.3.2).

Diese Extrakte wurden einer PCR HRM Analyse mit dem Primerpaar CH01g12 unterzogen. Als Referenz dienten DNA-Extrakte aus Blättern, die unter Verwendung eines PL 2 Puffers mit 0,5 % PVP und ohne (nur Replik 1 aus obigen Versuchen – Abbildung 80 und 81) bzw. mit Proteinase K Zusatz gewonnen worden waren. Die Ct-Werte der Extrakte beider Sorten zeigten durch Erhöhung der PVP-Konzentration oder Zugabe von Proteinase K bei der Extraktion keinen einheitlichen Trend. In Abbildung 83 sind exemplarisch die Ergebnisse für Gala gezeigt. Eine Erhöhung der PVP-Konzentration und die Zugabe von Proteinase K führten bei Gala zu einer Annäherung der Schmelzkurven im Vergleich zum ersten Replikat des DNA-Extrakt aus Fruchtfleisch (ohne Proteinase K), dennoch wurde keine vollständige Überlappung erzielt.

Bei den Extrakten der Sorte Elstar kam es zu einer starken Verschiebung der Schmelzkurven unter Zusatz von 2 % PVP, 1 % PVP plus Proteinase K und 2 % PVP plus Proteinase K bei der DNA-Extraktion. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Sorten wurde geprüft, ob der Zusatz von PVP bzw. Proteinase K bei der DNA-Extraktion auch bei PCR HRM Analysen mit einem anderen Primerpaar (23g4) zu Verschiebungen in den Schmelzkurven führt.

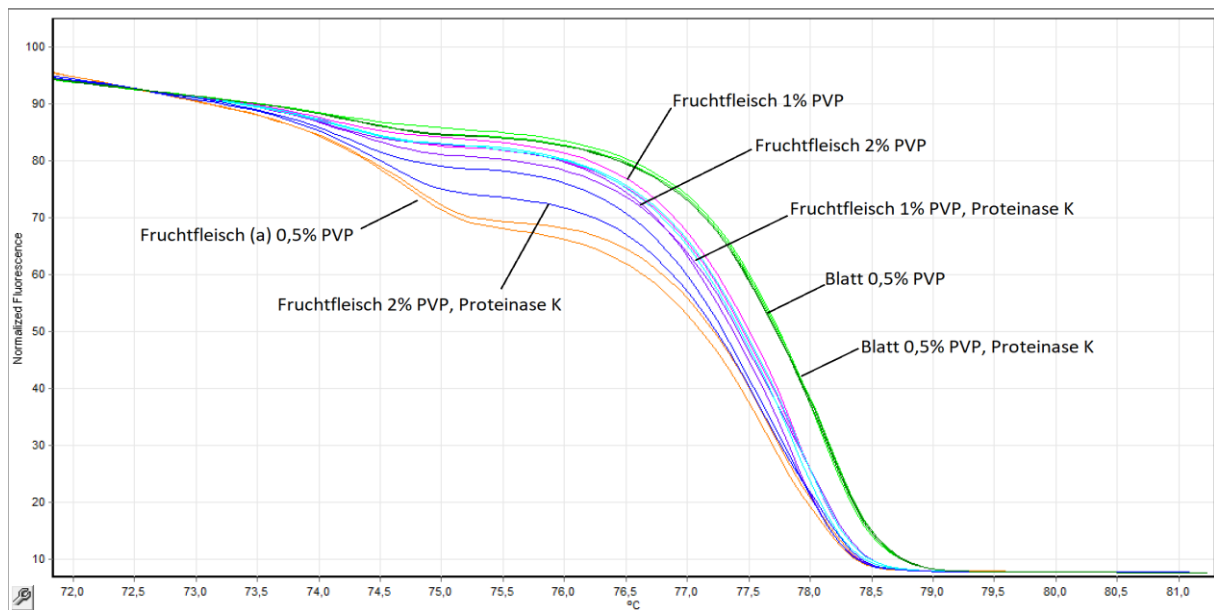


Abbildung 83: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) 0,5% PVP = orange, Fruchtfleisch 1% PVP = pink, Fruchtfleisch 2% PVP = violett, Fruchtfleisch 1% PVP + Proteinase K = hellblau, Fruchtfleisch 2% PVP + Proteinase K = dunkelblau, Blatt = hellgrün, Blatt + Proteinase K = dunkelgrün, (a) = Replik 1

Die Durchführung einer PCR HRM Analyse mit Primerpaar 23g4 zeigte erneut keine einheitlichen Ergebnisse für Gala und Elstar. In Abbildung 84 sind die Schmelzkurven für die Sorte Gala zu sehen. Eine Erhöhung der PVP-Konzentration und Zugabe von Proteinase K führte zu nahezu identen Schmelzkurven der Extrakte des Fruchtfleisches verglichen mit den Schmelzkurven der Extrakte aus Blättern.

Bei der Sorte Elstar hingegen hatten die Bedingungen bei der Extraktion (PVP-Konzentration, mit/ohne Proteinase K) einen starken Einfluss auf das Schmelzverhalten der PCR-Produkte (Abbildung 85). Ein klarer Trend konnte dabei nicht festgestellt werden.

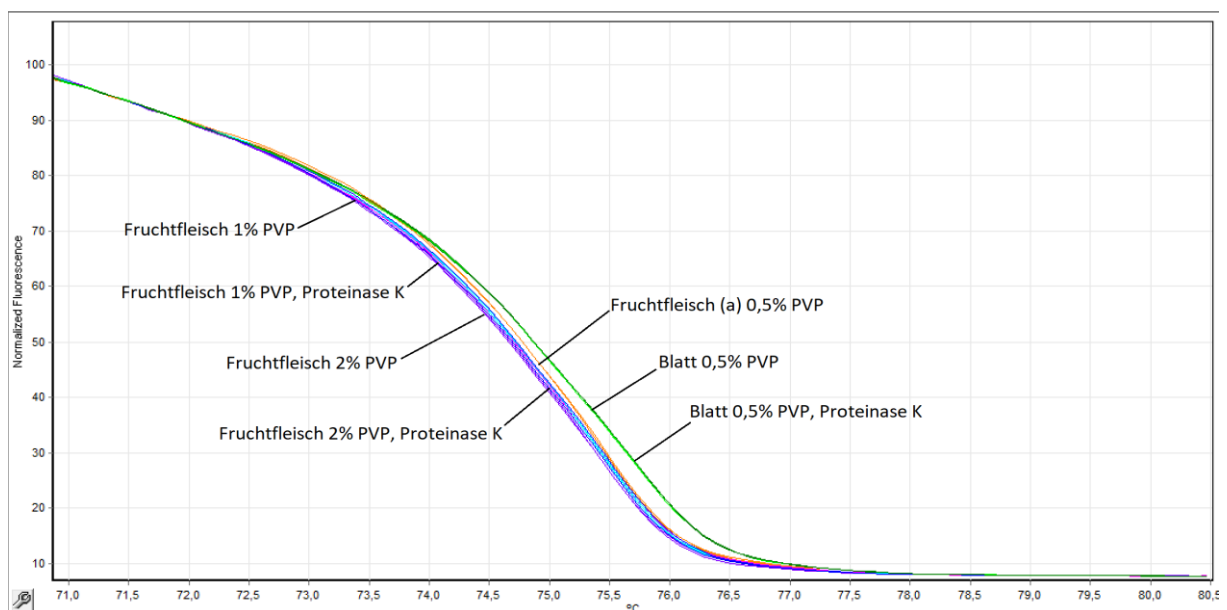


Abbildung 84: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) 0,5% PVP = orange, Fruchtfleisch 1% PVP = pink, Fruchtfleisch 2% PVP = violett, Fruchtfleisch 1% PVP + Proteinase K = hellblau, Fruchtfleisch 2% PVP + Proteinase K = dunkelblau, Blatt = hellgrün, Blatt + Proteinase K = dunkelgrün, (a) = Replik 1

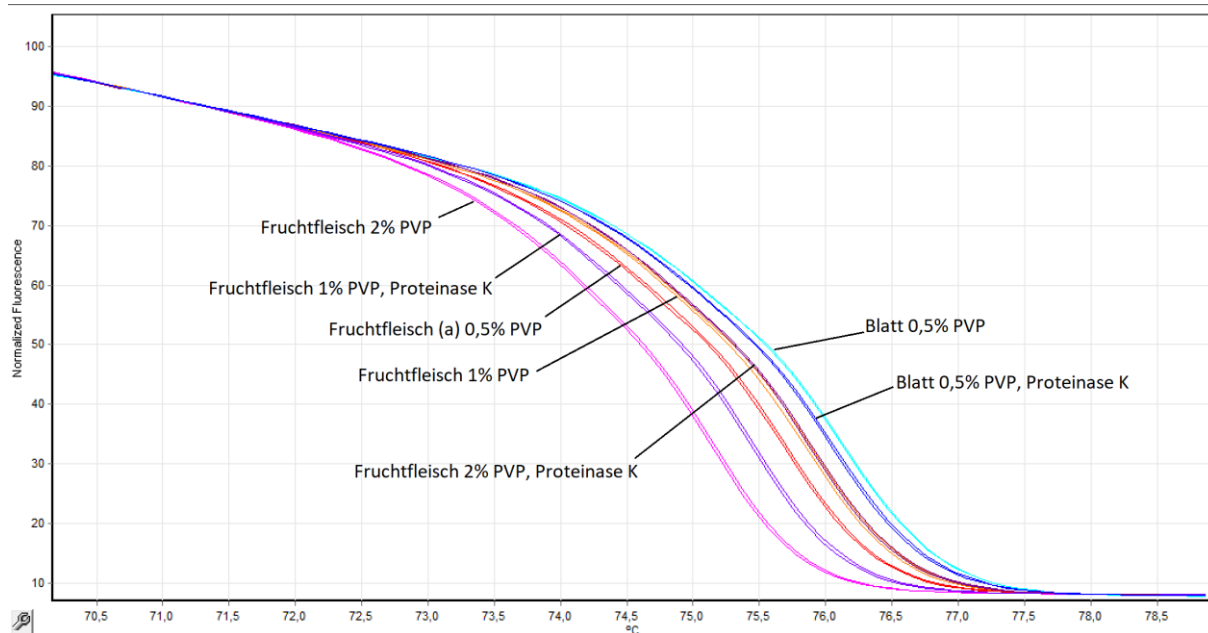


Abbildung 85: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Elstar. Fruchtfleisch (a) 0,5% PVP = rot, Fruchtfleisch 1% PVP = orange, Fruchtfleisch 2% PVP = pink, Fruchtfleisch 1% PVP + Proteinase K = violett, Fruchtfleisch 2% PVP + Proteinase K = braun, Blatt = hellblau, Blatt + Proteinase K = dunkelblau, (a) = Replikat 1

Aufgrund der uneinheitlichen PCR HRM Ergebnisse, die durch eine Erhöhung der PVP-Konzentration und der Zugabe von Proteinase K bei der DNA-Extraktion aus Fruchtfleisch von verschiedenen Apfelsorten erhalten wurden, wurde die DNA-Extraktion aus Fruchtfleisch der anderen Sorten laut Protokoll (siehe 4.3.2) mit einer Zugabe von 0,5% PVP zum PL2 Puffer und ohne Zusatz von Proteinase K durchgeführt.

5.2.3.3 Identifizierung und Unterscheidung der Apfelsorten in Saft- und Mostproben

In dieser Arbeit sollte auch geprüft werden, ob Extrakte von Apfelprodukten, wie Saft- und Mostproben, geeignet sind, um Apfelsorten mittels PCR HRM Analyse zu unterscheiden.

Zunächst wurde mit Apfelsorten, von denen DNA-Extrakte aus Blättern, Äpfeln, Apfelsaft und Most vorhanden waren, einer PCR HRM Analyse mit dem Primerpaar CH01g12 durchgeführt. Dies traf auf die Sorten Braeburn, Cox Orange, Elstar, Goldparmäne, Ilzer Rose und Kronprinz Rudolf zu. In Abbildung 86 sind die Amplifikationskurven der Proben zu sehen. Die Kurven der Extrakte aus Blättern sind in grün, aus Fruchtfleisch in rot, aus Saftproben in orange und aus Mostproben in blau dargestellt. Die Konzentrationen der DNA-Extrakte der Saft- und Mostproben waren sehr gering, bzw. teilweise nicht messbar (siehe Tabelle 23). Dies spiegelt sich in den Amplifikationskurven wider. Die DNA von nur fünf Extrakten (Braeburn, Elstar, Goldparmäne, Ilzer Rose) aus Saftproben und nur einem Extrakt (Ilzer Rose) aus Mostproben wurden vervielfältigt und deren Ct-Werte lagen alle über 35.

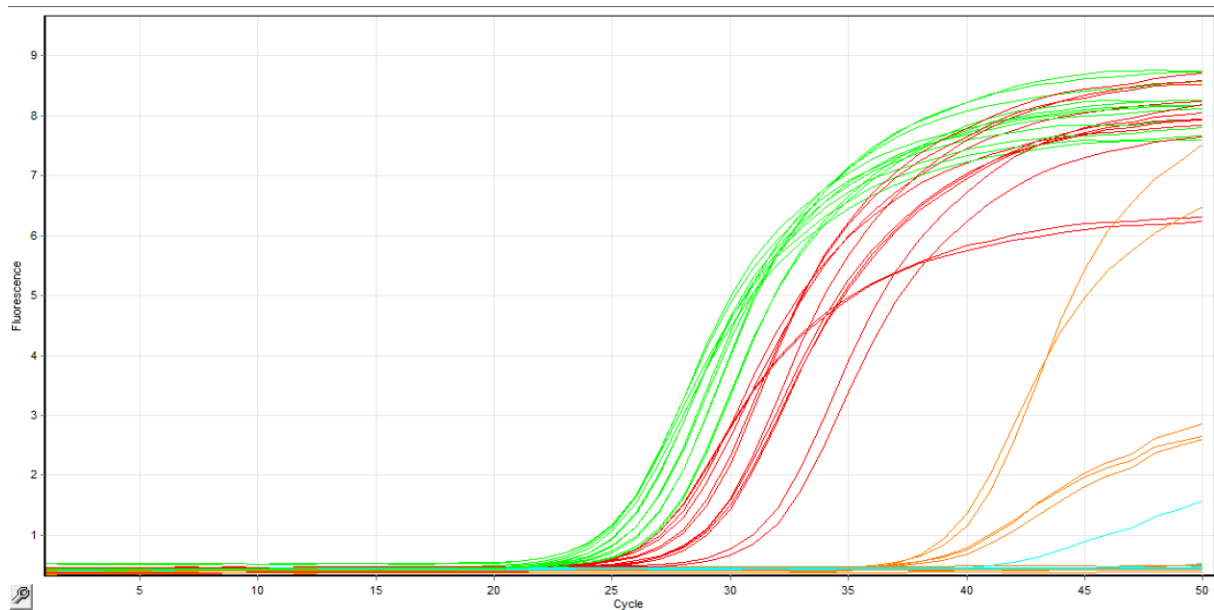


Abbildung 86: Amplifikationskurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 für DNA-Extrakte aus Blättern (grün), Fruchtfleisch (rot), Saft- (orange) und Mostproben (blau) der Sorten Braeburn, Cox Orange, Elstar, Goldparmäne, Ilzer Rose und Kronprinz Rudolf. DNA-Extrakte aus Saftproben der Sorte Braeburn, Elstar, Goldparmäne und Ilzer Rose (orange) sowie der DNA-Extrakt aus einer Mostprobe (Ilzer Rose, blau) führten zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals, wobei die CT-Werte relative hoch und die erhaltenen Fluoreszenzsignale teilweise sehr niedrig waren.

Die Schmelzkurven der erhaltenen PCR-Produkte zeigten keinen einheitlichen Trend. Beispielhaft sind in Abbildung 87 die Schmelzkurven der Sorte Ilzer Rose dargestellt, da nur für diese Sorte PCR-Produkte für Blatt, Fruchtfleisch, Saft und Most erhalten worden waren. Die Kurven des DNA-Extrakts aus Blatt sind in grün, aus Fruchtfleisch in rot, aus Saft in orange und aus Most in blau. Die Schmelzkurven für Blatt und Fruchtfleisch waren wie zu erwarten leicht verschoben. Die Schmelzkurve für den Saft ähnelte stark der für das Blatt erhaltenen Kurve, daher könnte der Saft der Ilzer Rose in dieser isolierten Ansicht der richtigen Sorte zugeordnet werden. Dieses Ergebnis könnte auf die, im Vergleich zu anderen Proben, relativ gute Amplifikation der DNA aus dieser Saftprobe zurückzuführen sein. Die Schmelzkurve des Mosts wies im Vergleich zu den anderen Schmelzkurven eine komplett andere Form auf, daher war eine Sortenzuordnung nicht möglich. Sowohl der hohe Ct-Wert als auch der Schmelzkurvenverlauf deuten auf die Bildung eines unspezifischen PCR-Produkts hin.

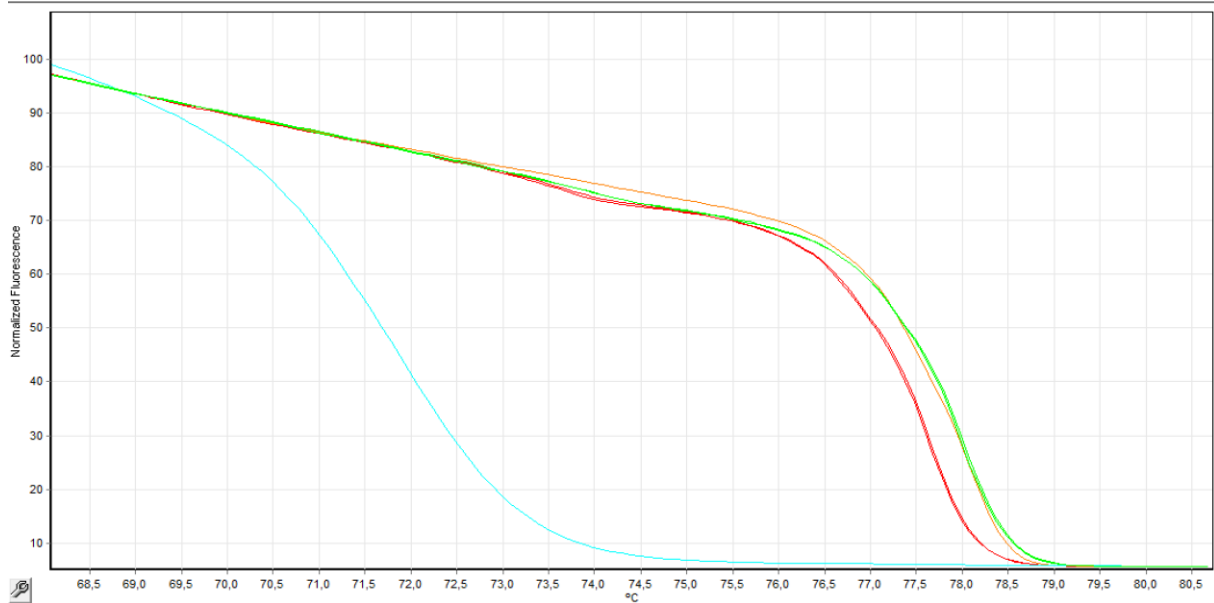


Abbildung 87: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 für DNA-Extrakte aus Blättern (grün), Fruchtfleisch (rot), Saft (orange) und Most (blau) der Sorte Ilzer Rose

In Abbildung 88 sind die Schmelzkurven für die Sorte Braeburn dargestellt (Blatt grün, Fruchtfleisch rot, Saft orange). Der DNA-Extrakt des Mosts führte zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte der Extrakte aus Blatt und Fruchtfleisch waren wie zu erwarten leicht verschoben, die Kurven für das PCR-Produkt für die Saftprobe zeigte ein komplett anderes Schmelzverhalten, weshalb eine richtige Bestimmung der Sorte in dieser Saftprobe nicht möglich war. Die Sorte Braeburn war nicht zu identifizieren.

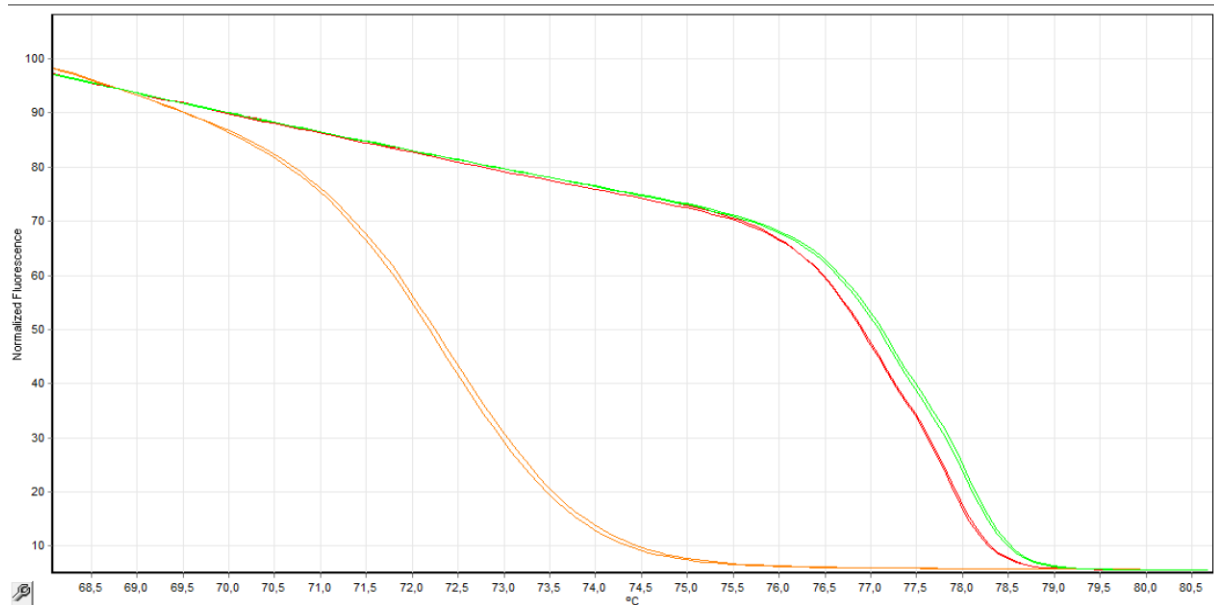


Abbildung 88: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 für DNA-Extrakte aus Blättern (grün), Fruchtfleisch (rot) und Saft (orange) der Sorte Braeburn

Die PCR HRM Analyse der Apfelsorten, von denen Blätter, Äpfel, Saft- und Mostproben verfügbar waren (Braeburn, Cox Orange, Elstar, Goldparmäne, Ilzer Rose, Kronprinz Rudolf), wurde auch mit dem Primerpaar 05g8 durchgeführt, um die Anwendbarkeit der DNA-Extrakte mit einem anderen Primerpaar zu prüfen. Bei der PCR wurde nur für zwei Saftproben (Elstar, Kronprinz Rudolf), aber für keine Mostprobe ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet.

Aufgrund der schlechten Amplifizierbarkeit, welche höchstwahrscheinlich auf die geringe DNA-Konzentration in den Extrakten zurückzuführen ist, wurden die Extraktionsbedingungen adaptiert. Aus allen Säften wurde die DNA ohne den Lyseschritt extrahiert (siehe 4.3.2). Für Säfte der Sorte Cox Orange und Goldparmäne wurde zusätzlich das 5-fache Probenvolumen (2500 µL) für die Extraktion mit Lyse eingesetzt. Diese Adaptionen führten jedoch zu keiner Erhöhung der DNA-Konzentration der Extrakte (siehe Tabelle 23). Zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit wurde wieder das Primerpaar 05g8 verwendet. Einzig der DNA-Extrakt aus der Saftprobe der Sorte McIntosh führte zu einem PCR-Produkt. Beide Replikate wurden gut amplifiziert und führten zu wiederholbaren Schmelzkurven.

Die bislang eingesetzten Primerpaare CH01g12 und 05g8 führten laut Agarosegel zu längeren PCR-Produkten (siehe Bachelorarbeit von Pegah Mirshahi). Da die Herstellung von Apfelsaft und Most zu einer Degradierung der DNA führen könnte, wurde die PCR HRM Analyse auch mit dem Primerpaar CH02b03b durchgeführt, mit dem kürzere PCR-Produkte von 75 bp – 110 bp erhalten worden waren (Bachelorarbeit von Pegah Mirshahi). Die PCR HRM Analyse wurde mit allen Extrakten aus Saft- und Mostproben durchgeführt, die mit dem Extraktionsprotokoll erhalten wurden (siehe 4.3.2). Als Referenz wurden, wenn von dieser Sorte vorhanden, DNA-Extrakte aus Fruchtfleisch verwendet. Die Amplifikation war nur bei Elstar Saft für beide Replikate und Goldparmäne Saft für ein Replikat erfolgreich, die Ct-Werte lagen jedoch über 43. Die daraus resultierenden Schmelzkurven waren nicht zur Identifizierung der Sorte geeignet.

Die PCR HRM Analyse wurde bislang mit dem Type-It Mastermix durchgeführt. Als nächstes wurde geprüft, ob mit dem PyroMark Mastermix bessere Ergebnisse erzielt werden können. Dazu wurden die DNA-Extrakte aus Blättern, Fruchtfleisch, Saft- und Mostproben der Sorten Braeburn, Cox Orange, Elstar, Goldparmäne, Ilzer Rose und Kronprinz Rudolf einer PCR HRM mit dem Primerpaar CH02b03b unterzogen, welches, wie bereits oben beschrieben, zu relativ kurzen PCR-Produkten führen sollte. Von zehn Apfelsaftproben wurden drei (Schafnase, McIntosh, Ananas Renette) und von 13 Mostproben wurden zwei Proben amplifiziert (Braeburn, Ilzer Rose).

In Abbildung 89 sind die Schmelzkurven der Sorten Ilzer Rose (Fruchtfleisch rot, Most orange) und Braeburn (Fruchtfleisch dunkelblau, Most hellblau) dargestellt, da nur für diese beiden Sorten eine Schmelzkurve für Fruchtfleisch erhalten wurde. Die Schmelzkurven der Extrakte aus Most waren im Vergleich zu denen der Extrakte aus Fruchtfleisch für beide Sorten nach niedriger Temperatur verschoben, wiesen jedoch denselben Kurvenverlauf auf.

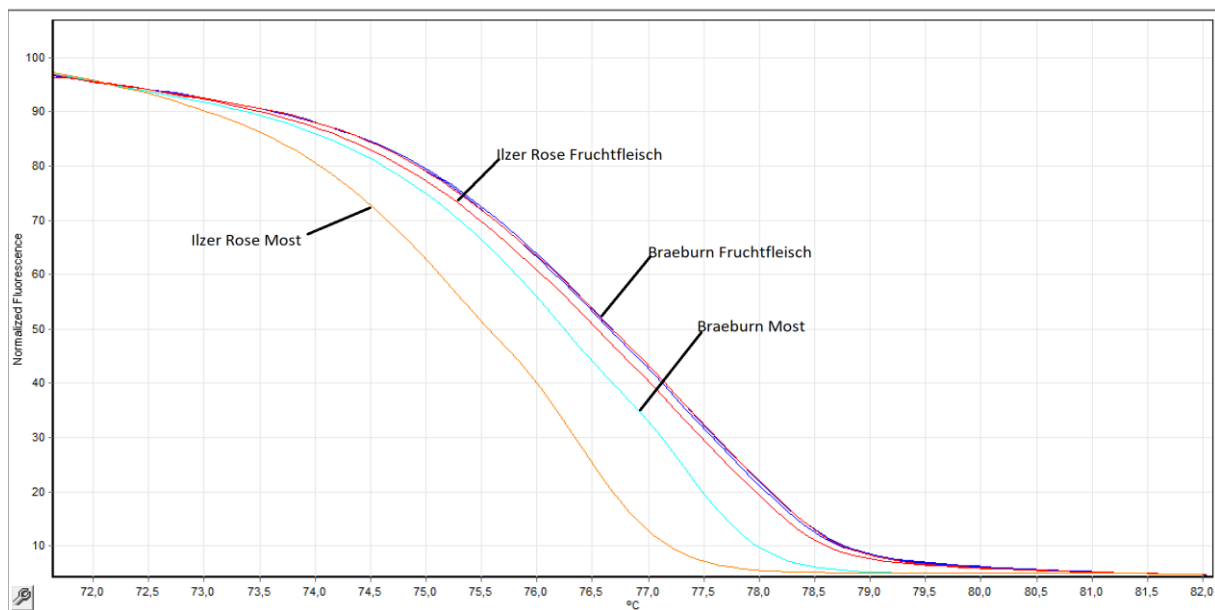


Abbildung 89: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH02b03b und PyroMark Mastermix von Ilzer Rose Fruchtfleisch (rot), Ilzer Rose Most (orange), Braeburn Fruchtfleisch (dunkelblau) und Braeburn Most (hellblau)

Durch die Verwendung des PyroMark Mastermixes war die Amplifikation im Vergleich zum Type-It Mastermix bei mehreren Proben erfolgreich. Dennoch konnte keine zuverlässige Amplifikation aller Proben erzielt werden, weshalb nicht mit dem PyroMark Mastermix weitergearbeitet wurde.

5.2.3.4 Identifizierung und Unterscheidung der Apfelsorten in Apfelmus

Es wurden auch die Extrakte von Apfelmusproben in einer PCR HRM Analyse mit Primerpaar CH01g12 analysiert. Die Extrakte der Apfelmusproben wurden wie die der Säfte und Moste unverdünnt eingesetzt. Ausnahme waren zwei Extrakte (Spar Golden Delicious 1000 mg Einwaage, Clever Golden Delicious 1000 mg Einwaage), welche zusätzlich in einer 1:5 Verdünnung getestet wurden, um herauszufinden, ob eine Verdünnung der Proben zu Schmelzkurven führt, welche näher an den Kurven der DNA-Extrakte aus Blättern liegen. Da sechs der 16 Apfelmusproben laut Deklaration aus der Sorte Golden Delicious hergestellt wurden, wurde jeweils ein DNA-Extrakt aus Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz in der Analyse mitgeführt. Im Fall der Proben efko Golden Delicious, Billa Golden Delicious, JA! Natürlich Golden Delicious, Spar Golden Delicious, Spar Golden Delicious 500mg, Spar Golden Delicious 1000mg, Zurück zum Ursprung Golden Delicious, efko PUR, Sweet Valley, Spar Apfelmus + Birne, Spar Apfelmus + Mango, JA! Natürlich Apfelmus + Mango, BIO Apfelmus + Mango und BIO Apfelmus + Banane führten beide Replikate zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Bei den Proben Spar Golden Delicious 1000 mg 1:5, Clever Golden Delicious, Clever Golden Delicious 500 mg, Machland, JA! Natürlich Apfelmus, JA! Natürlich Apfelmus + Banane wurde ein Signalanstieg nur für ein Replikat erhalten. Bei den Proben Clever Golden Delicious 1000 mg und Clever Golden Delicious 1000 mg 1:5 führte keines der beiden Replikate zu einer Amplifikation. Im Vergleich zu den Saft- und Mostproben konnte bei weniger DNA-Extrakten aus Apfelmusproben die DNA-Konzentration bestimmt werden, dennoch war die Amplifikation erfolgreicher.

Für viele Proben waren die Schmelzkurven der beiden Replikate unterschiedlich, wiesen jedoch einen ähnlichen Kurvenverlauf auf. Proben, welche laut Deklaration aus der Apfelsorte Golden Delicious hergestellt wurden, wiesen einen ähnlichen Kurvenverlauf auf wie DNA-Extrakte aus Blatt und Fruchtfleisch der Sorte Golden Delicious, waren jedoch verschoben (Abbildung 90).

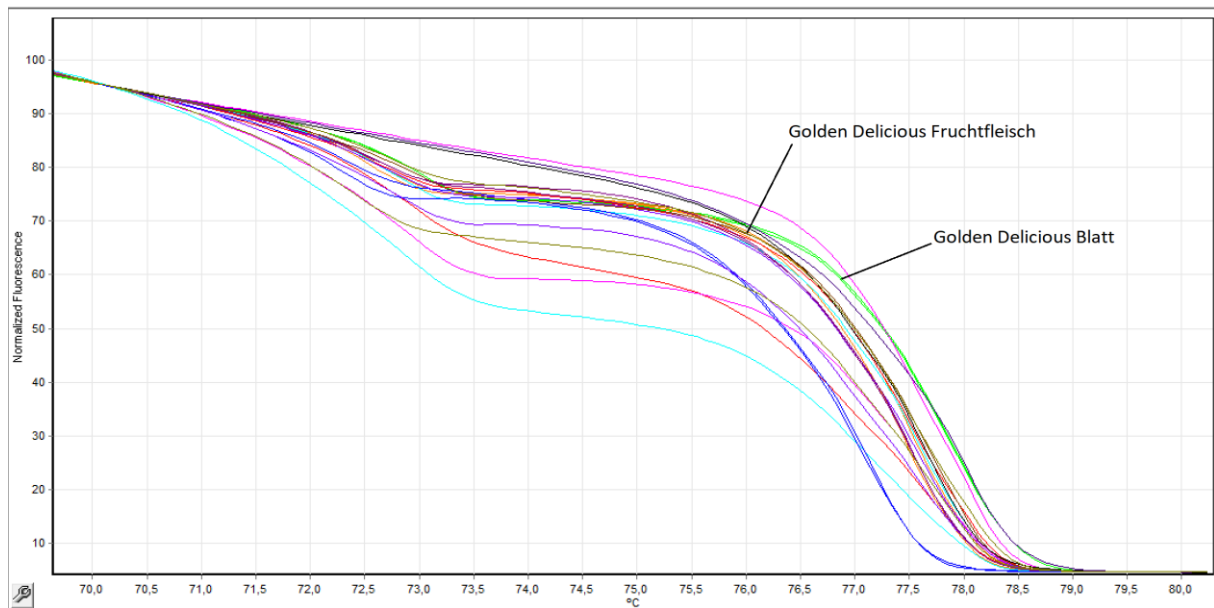


Abbildung 90: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz. (Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa = hellblau, JA! Natürlich = pink, Spar = königsblau, Spar 500 mg Einwaage = violett, Spar 1000 mg Einwaage = magenta, Spar 1000 mg Einwaage 1:5 = dunkelblau, Clever = braun, Clever 500 mg = schwarz, Zurück zum Ursprung = olivgrün)

Beispielhaft sind in Abbildung 91 nur die Schmelzkurven von drei Apfelmusproben, die laut Deklaration aus Äpfeln der Sorte Golden Delicious hergestellt wurden, und die Kurven von Extrakten aus Blatt und Fruchtfleisch von Golden Delicious, dargestellt. In dieser Abbildung ist die schlechte Wiederholbarkeit der Doppelbestimmungen gut erkennbar.

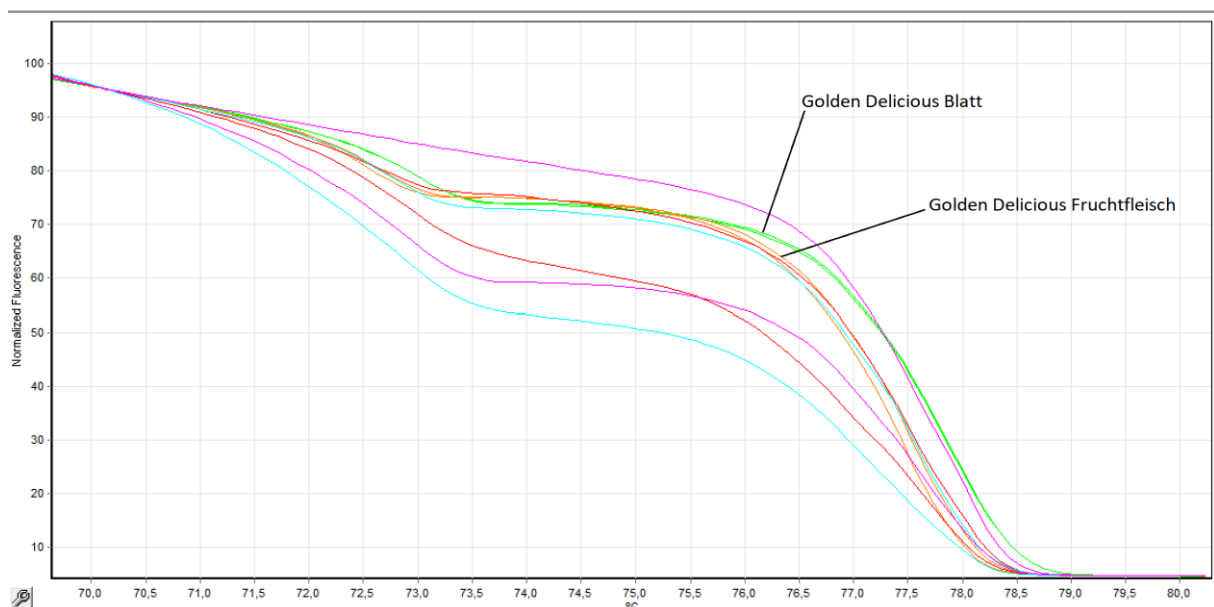


Abbildung 91: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz, ausgewählte Proben (Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa = hellblau, JA! Natürlich = pink)

Extrakte von Apfelmusproben, welche keine Sortenkennzeichnung aufweisen, als auch Musproben, welche Mischungen aus Apfelmus und einem weiteren Frucht- oder Nussmus waren, verhielten sich ähnlich. Auch bei ihnen waren die Schmelzkurven der Replikate teils verschoben und viele Kurven ähnelten denen

der Extrakte aus Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch. Es wäre daher möglich, dass Golden Delicious einen Hauptanteil der verwendeten Apfelsorten in den nicht sortenreinen Apfelmusproben ausmacht, oder eine Sorte verwendet wurde, welche mit Primerpaar CH01g12 nicht gut von Golden Delicious unterschieden werden kann.

Die Extrakte wurden auch einer PCR HRM Analyse mit dem Primerpaar CH02b03 unterzogen, welches zu kürzeren PCR-Produkten führt (Kapitel 5.2.3.3). Im Fall der Proben efko Golden Delicious, Billa Golden Delicious, JA! Natürlich Golden Delicious, Spar Golden Delicious, Spar Golden Delicious 500mg, Spar Golden Delicious 1000mg, Spar Golden Delicious 1000mg 1:5, Clever Golden Delicious, Zurück zum Ursprung Golden Delicious, efko PUR, Sweet Valley, Spar Apfelmus + Birne, Spar Apfelmus + Mango, BIO Apfelmus + Mango und BIO Apfelmus + Banane und JA! Natürlich Apfelmus + Banane führten beide Replikate zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Bei den Proben Clever Golden Delicious 500 mg, Clever Golden Delicious 1000 mg, Machland und JA! Natürlich Apfelmus + Mango wurde ein Signalanstieg nur für ein Replikat erhalten. Bei den Proben Clever Golden Delicious 1000 mg 1:5 und Apfelmus JA! Natürlich führte keines der beiden Replikate zu einer Amplifikation. Die Amplifikation hat mit diesem Primerpaar im Vergleich zum Primerpaar CH01g12 weder besser, noch schlechter funktioniert. Die Schmelzkurven beider Replikate der Apfelmusproben, die laut Deklaration aus Golden Delicious Äpfeln hergestellt worden waren, waren jedoch ähnlicher und waren im Vergleich zu den Golden Delicious DNA-Extrakten aus Blatt und Fruchtfleisch weniger stark verschoben. In Abbildung 92 sind alle Schmelzkurven der Apfelmusproben, welche aus Äpfeln der Sorte Golden Delicious hergestellt wurden, als auch die Kurven der Golden Delicious DNA-Extrakten aus Blatt und Fruchtfleisch, in normalisierter Ansicht dargestellt.

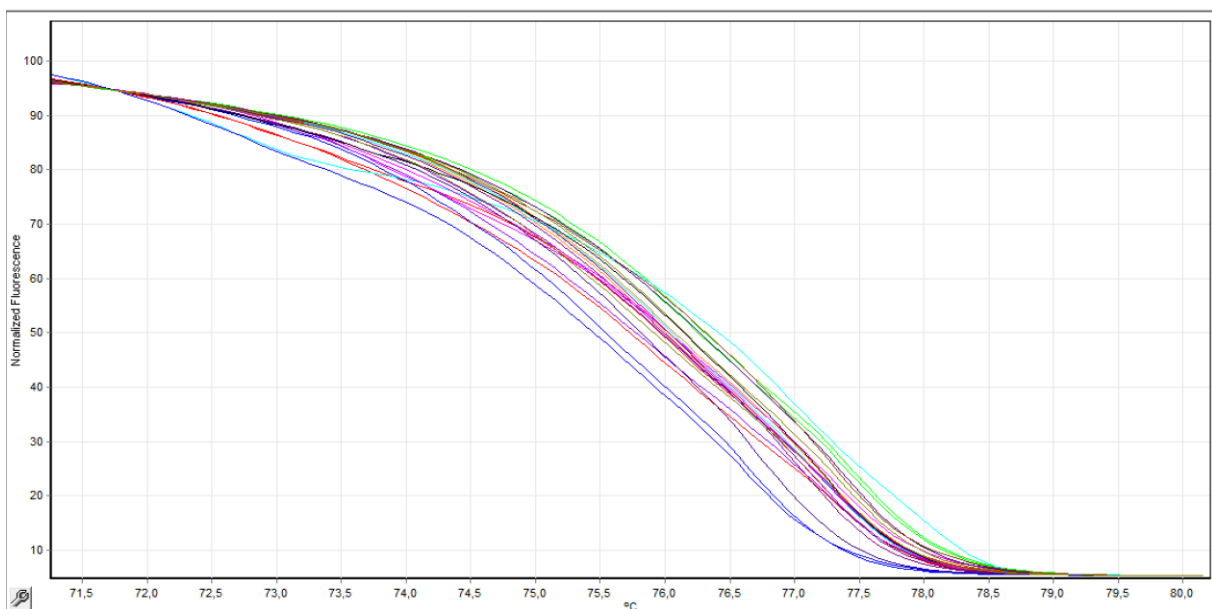


Abbildung 92: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH02b03b der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz. Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa = hellblau, JA! Natürlich = pink, Spar = königsblau, Spar 500 mg Einwaage = violett, Spar 1000 mg Einwaage = magenta, Spar 1000 mg Einwaage 1:5 = dunkelblau, Clever = braun, Clever 500 mg = schwarz, Zurück zum Ursprung = olivgrün

Beispielhaft sind in Abbildung 93 wieder nur die Schmelzkurven von drei Apfelmusproben, welche laut Deklaration aus Äpfeln der Sorte Golden Delicious hergestellt wurden (efko, Billa, JA! Natürlich) und die Kurven von Blatt- und Fruchtfleischextrakten von Golden Delicious, dargestellt. In dieser Abbildung

ist erkennbar, dass die Amplifikation mit Primerpaar CH02b03b zu Produkten geführt hat, welche wiederholbarere Schmelzkurven erzeugten. Die Schmelzkurven der Produkte lagen im Vergleich mit Primerpaar CH01g12 näher an den Kurven der Extrakte aus Blatt und Fruchtfleisch.

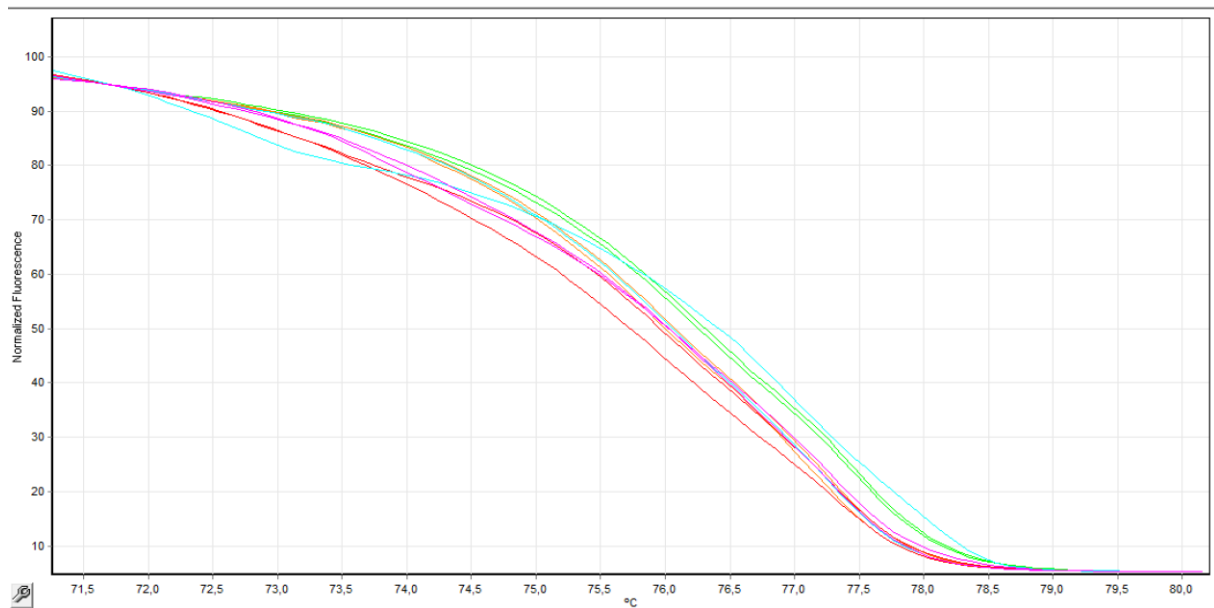


Abbildung 93: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH02b03b der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz, ausgewählte Proben (Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa = hellblau, JA! Natürlich = pink)

Extrakte von Apfelmusproben, welche keine Sortenkennzeichnung aufwiesen, als auch Musproben, welche Mischungen aus Apfelmus und einem weiteren Fruchtmus waren, verhielten sich auch mit Primerpaar CH02b03b ähnlich zu den Kurven der sortenreinen Proben. Für die beiden Replikate wurden ähnlichere Schmelzkurven erhalten als mit dem Primerpaar CH01g12.

5.2.4 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte von Fruchtfleisch, Saft und Most

Mit den PCR-Produkten der PCR HRM Analyse von Fruchtfleisch-, Saft- und Mostproben der Sorten Braeburn, Cox Orange, Elstar, Goldparmäne, Ilzer Rose und Kronprinz Rudolf mit Primerpaar CH01g12 wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Ziel der Gelelektrophorese war es, zu überprüfen, ob für die Extrakte aus Fruchtfleisch, Saft- und Mostproben Produkte der richtigen Länge erhalten wurden.

Gel 1:

Tabelle 19: Beladungsschema von Gel 1. Proben, bei denen die Amplifikation nicht funktioniert hat, wurden mit einem „x“ gekennzeichnet. Die Abkürzung „FF“ steht für „Fruchtfleisch“.

1	LMW DNA Ladder	7	Cox Orange FF	13	Elstar FF	19	Goldparmäne FF
2	Braeburn FF	8	Cox Orange Saft x	14	Elstar Saft x	20	Goldparmäne Saft
3	Braeburn Saft	9	Cox Orange Saft x	15	Elstar Saft	21	Goldparmäne Saft x
4	Braeburn Most x	10	Cox Orange Most x	16	Elstar Most x	22	Goldparmäne Most x
5	Braeburn Most	11	Cox Orange Most x	17	Elstar Most x	23	Goldparmäne Most x
6	Braeburn Blatt	12	Cox Orange Blatt	18	Elstar Blatt	24	Goldparmäne Blatt

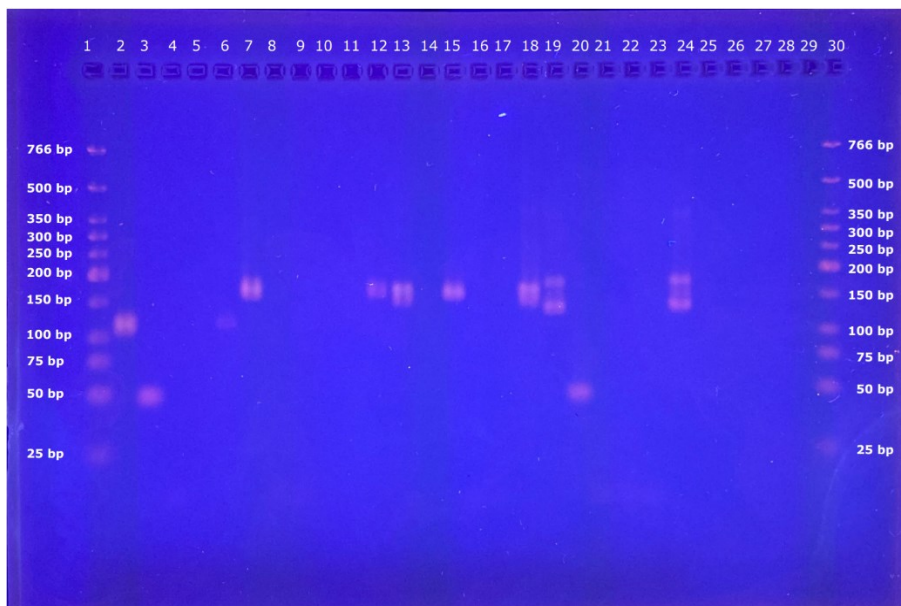


Abbildung 94: Foto von Gel 1. Beladungsschema siehe Tabelle 19

Braeburn

Das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Fruchtfleisch (Lane 1) hatte annähernd dieselbe Länge wie das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Blatt (Lane 6). Der DNA-Extrakt aus Saft (Lane 3) führte zu kürzeren PCR-Produkten als die DNA-Extrakte aus Fruchtfleisch und Blatt, das erklärt den stark abweichenden Schmelzkurvenverlauf (Abbildung 88). Für beide Replikate aus Most (Lane 4 & 5) wurden keine Banden erhalten. Für das Replikat aus Most (Lane 5) wurde bei der PCR nur ein minimaler Anstieg des Fluoreszenzsignals erhalten.

Cox Orange

Das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Fruchtfleisch (Lane 7) hatte annähernd dieselbe Länge wie das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Blatt (Lane 12). Die PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Saft und Most (Lane 8 – 11) sind auf dem Gel nicht als Bande erkennbar, was mit dem Ergebnis der PCR übereinstimmt, da diese Proben nicht zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals geführt haben.

Elstar

Das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Fruchtfleisch (Lane 13) hatte annähernd dieselbe Länge wie das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Blatt (Lane 18). PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Fruchtfleisch und Blatt führten zu zwei nahe aneinander liegenden Banden.

PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Saft (Lane 15) führte zu einem PCR-Produkt mit derselben Länge wie die PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Blatt und Fruchtfleisch, dies war auch an der Schmelzkurve erkennbar. Die Kurve hatte keine komplett andere Form, sondern ähnelte den Kurven der PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Blatt und Fruchtfleisch. Bei dem PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Saft (Lane 15) ist eindeutig nur eine Bande auf dem Gel erkennbar, was die leicht abweichenden Schmelzkurve erklären könnte. Die restlichen Saft- und Mostproben führten weder zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals bei der PCR noch zu Banden am Gel (Lane 14, 16, 17).

Goldparmäne

Das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Fruchtfleisch (Lane 19) hatte annähernd dieselbe Länge wie das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Blatt (Lane 24). Hier sind eindeutig zwei Banden zu erkennen. Der Saft (Lane 20) führt zu kürzeren PCR-Produkten als Fruchtfleisch und Blatt, das erklärt den stark abweichenden Schmelzkurvenverlauf. Die restlichen Saft- und Mostproben (Lane 21 – 23) führten weder zu einem Signalanstieg bei der PCR, noch waren Banden am Gel erkennbar.

Gel 2:

Auf Lane 1 – 17 sind PCR-Produkte eines anderen Laufs aufgetragen.

Tabelle 20: Beladungsschema von Gel 2. Proben, bei denen die Amplifikation nicht funktioniert hat, wurden mit einem „x“ gekennzeichnet. Die Abkürzung „FF“ steht für „Fruchtfleisch“.

18	Ilzer Rose FF	24	Kronprinz Rudolf FF	30	LMW DNA Ladder
19	Ilzer Rose Saft	25	Kronprinz Rudolf Saft		
20	Ilzer Rose Saft x	26	Kronprinz Rudolf Saft x		
21	Ilzer Rose Most x	27	Kronprinz Rudolf Most x		
22	Ilzer Rose Most	28	Kronprinz Rudolf Most x		
23	Ilzer Rose Blatt	29	Kronprinz Rudolf Blatt		

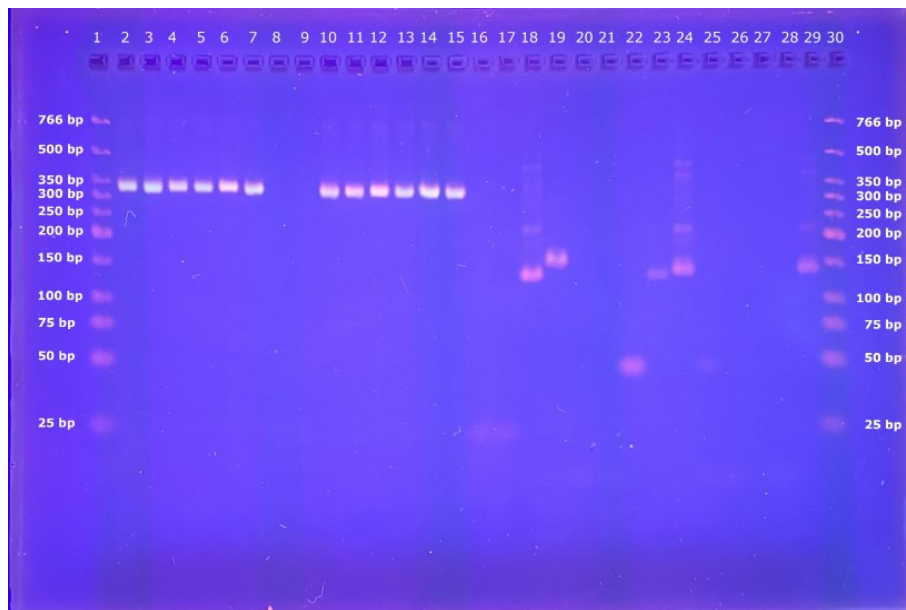


Abbildung 95: Foto von Gel 2. Beladungsschema siehe Tabelle 20

Ilzer Rose

Das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Fruchtfleisch (Lane 18) hatte annähernd dieselbe Länge wie das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Blatt (Lane 23). Bei Fruchtfleisch ist eine weitere Bande zu erkennen (bei etwa 200 bp), welche beim Blatt nicht sichtbar ist. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte aus Blatt und Fruchtfleisch ähnelten sich, waren jedoch nicht ident. Die Saftprobe (Lane 19) führte zu einem etwas längeren PCR-Produkt als Blatt und Fruchtfleisch. Der Schmelzkurvenverlauf ähnelte sehr dem Kurvenverlauf des Blatts. Die Mostprobe (Lane 22) führte zu einem kürzeren PCR-Produkt als Blatt, Fruchtfleisch und Saft. Das ist auch an der stark unterscheidbaren Form der Schmelzkurve zu erkennen. Die restlichen Replikate der Saft- und Mostproben (Lane 20 & 21) wurden weder amplifiziert, noch sind sie auf dem Gel erkennbar.

Kronprinz Rudolf

Das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Fruchtfleisch (Lane 24) hatte annähernd dieselbe Länge wie die das PCR-Produkt des DNA-Extrakts aus Blatt (Lane 29). Bei Fruchtfleisch und Blatt sind vier Banden erkennbar (bei etwa 400 bp, 350 bp, 200 bp und 240 bp). Die DNA eines Replikats des DNA-Extrakts aus Saft (Lane 25) wurde minimal amplifiziert. Es war keine Schmelzkurve erkennbar, jedoch war auf dem Gel die Bande eines PCR-Produkts zu erkennen, welches kürzer als die PCR-Produkte der Extrakte aus Blatt und Fruchtfleisch war.

Die anderen Replikate der Saft- und Mostproben (Lane 26 – 28) wurden weder amplifiziert, noch waren sie auf dem Gel erkennbar.

Zusammenfassung:

Die PCR-Produkte der Extrakte aus Fruchtfleisch und Blatt, welche mit dem Primerpaar CH01g12 erhalten wurden, waren bei allen Apfelsorten etwa gleich lang. Das erklärt die ähnlichen oder teilweise nur leicht verschobenen Schmelzkurven dieser Proben.

PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Saft wiesen teilweise einen ähnlichen Schmelzkurvenverlauf (Elstar, Ilzer Rose), teilweise einen stark unterscheidbaren Schmelzkurvenverlauf (Braeburn, Goldparmäne) auf. Das lässt sich mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese erklären: wenn die Schmelzkurven ähnlich waren, wurden laut Agarosegelelektrophorese PCR-Produkte ähnlicher Länge

erhalten. Stark unterschiedliche Schmelzkurven waren auf eine unterschiedliche Länge der PCR-Produkte zurückzuführen. Für die meisten Mostproben wurde bei der PCR kein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet, noch waren Banden am Gel zu sehen. Nur für Most aus Ilzer Rose wurden PCR-Produkte erhalten, diese waren jedoch kürzer als die von Blatt, Fruchtfleisch und Saft. Das führte zu den stark abweichenden Schmelzkurvenverläufen.

6 Conclusio

Das Ziel dieser Masterarbeit war es, zu untersuchen, ob PCR HRM Methoden geeignet sind, Spezies und Sorten in ursprünglicher und verarbeiteter Form zu unterscheiden. Bezüglich der Spezies Unterscheidung befasste sich diese Arbeit mit Insekten, bezüglich der Sorten Unterscheidung mit Äpfeln.

Unterscheidung von Insektenspezies

Zur Verfügung gestellte DNA-Extrakte von Insekten als auch von Lebensmitteln, welche Insekten enthalten, wurden mittels PCR HRM Analyse untersucht. Im besonderen Fokus standen die vier zum Verzehr in der EU zugelassenen Spezies (Mehlwurm, Wanderheuschrecke, Heimchen, Buffalowurm). Die Verwendung eines Primerpaares, welches zuvor in der NGS eingesetzt wurde (Ins_fw, Ins_rev), erwies sich als erfolgreich und führte zu wiederholbaren Schmelzkurven. Für das zum Verzehr zugelassene Heimchen wurden Schmelzkurven erhalten, die teilweise schwer von den Kurven der Kurzflügelgrille und Wüstenheuschrecke unterschieden werden konnten. Für eine eindeutige Identifizierung wurden artifizielle Sequenzen entworfen, welche durch Heteroduplex Bildung zur Änderung des Schmelzkurvenverlaufs von DNA-Extrakten aus Heimchen und Lebensmitteln, welche Heimchen beinhalten, führen sollten. Aufgrund fehlender Primerbindungsstellen dieser Oligonukleotide wurden neue Heimchen Primer entworfen (Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_rev_2). Die Kombination von vier Primern (Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Ins_fw, Ins_rev) und Zusatz einer artifiziellen Sequenz führten zur Änderung der Schmelzkurven der DNA-Extrakte mit Heimchenanteil. Diese Änderung war jedoch auf den Einsatz der neu hinzugefügten Primer zurückzuführen. Diese Strategie der Änderung der Schmelzkurven durch den Zusatz weiterer Primer wurde ebenfalls genutzt, um die Schmelzkurven der Wanderheuschrecke leicht zu verändern, um auch diese eindeutig von den restlichen Spezies unterscheiden zu können. Der zusätzliche Einsatz des Primers Wander_AS_fw_1 führte zu einem veränderten Schmelzkurvenverlauf, womit die Schmelzkurven aller vier zum Verzehr zugelassenen Insektenspezies von den Kurven der restlichen getesteten Spezies unterschieden werden konnten.

Hinsichtlich des Einsatzes der PCR HRM Methode in der Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln, welche Insekten enthalten, sollten weitere verarbeitete Produkte in die Analysen miteinbezogen werden. Für Wanderheuschrecke wurden keine Lebensmittelproben und für Mehlwurm nur zwei Proben analysiert. Als Folge des Einsatzes von fünf Primern streuten die Schmelzkurven der Lebensmittelproben, welche Heimchen enthielten, teilweise stark. Wäre dies bei Lebensmittelproben von Wanderheuschrecken ebenso der Fall, könnte dies zu Überlappungen der Kurven mit denen von anderen Insektenspezies führen.

Da die Schmelzkurven der Lebensmittel mit Heimchenanteil umso stärker streuten, je mehr Primer zum Einsatz kamen, wäre eine Überlegung, weitere Primer zu entwerfen und diese auf ihre Auswirkungen auf die Schmelzkurven zu testen. Möglicherweise könnten andere Primer, welche an die Sequenz des Heimchens binden, zu geringerer Streuung der Kurven führen.

Nichtsdestotrotz hat diese PCR HRM Methode großes Potential als Screening Methode für die in der EU zugelassenen Insektenspezies.

Unterscheidung von Apfelsorten

Zunächst wurden vier noch nicht getestete Primerpaare auf ihre Fähigkeit der Differenzierung von 21 Apfelsorten mit DNA-Extrakten aus Blättern getestet. Drei von vier Primerpaaren eigneten sich gut zur Unterscheidung, konnten jedoch keines der drei Primerpaare aus dem Primerset, welches es ermöglicht, die 21 Sorten zu differenzieren, ersetzen. Um die Anwendbarkeit der PCR HRM Methoden auf Lebensmittel zu testen, wurde neben Fruchtfleisch und Schale die DNA ebenfalls aus Apfelsäften, Most- und Apfelmusproben extrahiert. DNA-Extrakte der Schale wiesen die höchste DNA-Konzentration, DNA-Extrakte aus Fruchtfleisch eine etwas niedrigere Konzentration auf. Aus den Saft-, Most- und Apfelmusproben konnte kaum DNA extrahiert werden.

Die Ergebnisse aus der PCR HRM Analysen der DNA-Extrakte, welche aus der Schale gewonnen wurden, stimmten mit denen der Extrakte aus Blättern überein, die Schmelzkurven der DNA-Extrakte aus Fruchtfleisch führten zu einem ähnlichen Kurvenverlauf, waren jedoch leicht verschoben. Die PCR HRM Analysen der Lebensmittel lieferten kaum verwertbare Ergebnisse. Die DNA vieler Proben konnte nicht amplifiziert werden, da die DNA-Konzentration im Extrakt zu gering war. Die Schmelzkurven der erhaltenen PCR-Produkte stimmten nicht mit denen der Extrakte aus Blatt, Schalen und Fruchtfleisch überein und waren in den Doppelbestimmungen nicht wiederholbar. Der Einsatz eines Primerpaars, welches kürzere PCR-Produkte bildete, konnte die Ergebnisse für Extrakte aus Apfelmus leicht verbessern, führte dennoch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen.

In verarbeiteten Apfelprodukten stellt das Fruchtfleisch meist den Hauptbestandteil dar. Um zufriedenstellende PCR HRM Ergebnisse zu erhalten, wäre es zuerst notwendig, die DNA-Extraktion aus Fruchtfleisch zu optimieren. Es sollte eine Methode zur Extraktion genutzt oder entwickelt werden, welche zu hohen DNA-Konzentrationen im Extrakt führt. Diese Methode könnte die DNA-Ausbeute für verarbeitete Produkte erhöhen und somit zu verwertbaren Schmelzkurven führen. Da die in dieser Masterarbeit angewandte Extraktionsmethode bei Schale und Blatt zu ausreichend hohen DNA-Konzentrationen im Extrakt führte, wäre es möglich, dass in Fruchtfleisch und vor allem in verarbeiteten Produkten nicht ausreichend DNA hoher Integrität für eine PCR HRM Analyse vorhanden ist.

Bevor diese PCR HRM Methode also zur Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln, welche Apfelanteile aufweisen, eingesetzt werden kann, muss ein optimales DNA-Extraktionsprotokoll gefunden werden.

Aufgrund der in dieser Masterarbeit präsentierten Ergebnisse hat die PCR HRM Analytik großes Potential zum Einsatz in der Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln. Kann ausreichend DNA aus den Lebensmitteln extrahiert werden, können durch den Einsatz geeigneter Primer wiederholbare Ergebnisse erzielt werden. Für den Einsatz der Methode in der Routine zur Authentizitätsprüfung ist noch viel Arbeit im Bereich DNA-Extraktion und der Analyse einer größeren Zahl von Proben, vor allem von stark verarbeiteten Lebensmitteln, notwendig. Ist eine Methode optimiert, stellt die PCR HRM Analyse eine einfache, schnelle und kostengünstige Alternative zu anderen DNA basierten Analysemethoden dar.

7 Materialien

7.1 Chemikalien und Kits

Agarose High Resolution	Carl Roth GmbH + Co. KG
Borsäure	Merck
CoralLoad Concentrate 10x	Qiagen
DNA-ExitusPlus™	IF PanReac AppliChem ITW Reagents
EDTA Dinatrium, Dihydrat	Merck
EvaGreen Dye 20x	Qiagen
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Low Molecular Weight DNA Ladder	New England BioLabs GmbH
2x Type-It® HRM PCR Kit	Qiagen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich
Primer	Merck, Sigma-Aldrich
2x PyroMark PCR Master Mix	Qiagen
Nucleo Spin Plant II Kit	Macherey-Nagel
RNase A (Ribonuclease A)	Macherey-Nagel
ROTI®Load DNA-orange 1 (with Glycerol)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Proteinase K	Macherey-Nagel
RNase freies Wasser	Qiagen
Qubit™ 1x ds DNA HS Assay Kit	Invitrogen Thermo Fisher Scientific
Trizma-Base (T1503)	Sigma-Aldrich

7.2 Verbrauchsmaterialien

FastPrep Lysing Matrix Tubes	2 mL	MP Biomedicals, LLC
Filter Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips	Sarstedt
	0.5-20 µL	
	2-20 µL	
	20-200 µL	
	100-1000 µL	
MicroAmp™ Optical	200 µL	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
8-Tube Strip		Invitrogen Thermo Fisher Scientific
Qubit™ Assay Gefäß		Qiagen
Strip Tubes und Deckel	100 µL	Sarstedt
Falcon Tubes	50 mL	
Eppendorf Tubes	1.5 mL	
	2.0 mL	
	5.0 mL	
¼“ Ceramic Sphere		MP Biomedicals, LLC

7.3 Instrumente

Fluorimeter	Qubit™ 4.0 Fluorimeter	Thermo Fisher Scientific
Gel Caster	Sub-Cell GT Gel Caster	Bio-Rad Laboratories
Gel Kamm	Sub-Cell® GT MP comb 26-well and 30-well (1.5 mm thick)	Bio-Rad Laboratories
Kolbenhubpipetten	0.5-10 µL 2-20 µL 20- 200 µL 100- 1000 µL	Eppendorf
MP Gerät	MP Biomedicals FastPrep-24™ 5G	Thermo Fisher Scientific
PCR Working Station	PCR Workstation	VWR
Power Supply	PowerPac HV Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Skalpell		Braun™
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermocycler	Rotor Gene Q Series	Qiagen
Thermocycler	QuantStudio 5	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
Transilluminator	UVT-20 M	Herolab
Vortex Mixer	Classic Advanced	VELP Scientifica
Vortex Mixer	VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co KG
Vortex Mixer	VV3	VWR
Zentrifuge	Mini Spin Plus	Eppendorf
Zentrifuge	Galaxy mini	VWR
Zentrifuge	Mini Star Silverline	VWR

7.4 Software

Inkscape vector graphics designer 1.1	Inkscape Community
Microsoft Office 365 Apps for Students (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft
QuantStudio 5 Design & Analysis Software 1.4.3	Thermo Fisher Scientific
Rotor Gene Q Series Software 2.3.1	Qiagen

7.5 Webserver

OligoAnalyzer	https://eu.idtdna.com/calc/analyzer
OligoCalc	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
RNAfold WebServer	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi

8 Quellen

- Abbas, O., Zadavec, M., Baeten, V., Mikuš, T., Lešić, T., Vulić, A., Prpić, J., Jemeršić, L., & Pleadin, J. (2018). Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry*, 246, 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007>
- Akagić, A., Vranac, A., Gaši, F., Drkenda, P., Spaho, N., Oručević Žuljević, S., Kurtović, M., Musić, O., Murtić, S., & Hudina, M. (2019). Sugars, acids and polyphenols profile of commercial and traditional apple cultivars for processing [Article]. *Acta Agriculturae Slovenica*, 113(2), 239-250. <https://doi.org/10.14720/aas.2019.113.2.5>
- Akin, M., Poljuha, D., Eydurán, S. P., Ercisli, S., & Radunic, M. (2021). SSR Based Molecular Characterization of Local Fig (*Ficus carica* L.) Germplasm in Northeastern Turkey [Article]. *Erwerbs-Obstbau*, 63(4), 388. <https://doi.org/10.1007/s10341-021-00596-0>
- Barasinski, M., & Garnweitner, G. (2022). Aufreinigung von Nano- und Submikronpartikeln durch präparative Gelelektrophorese. *Chemie ingenieur technik*. <https://doi.org/10.1002/cite.202200134>
- Baric, S., Storti, A., Hofer, M., Guerra, W., & Dalla Via, J. (2020). Molecular Genetic Identification of Apple Cultivars Based on Microsatellite DNA Analysis. I. The Database of 600 Validated Profiles [Article]. *Erwerbs-Obstbau*, 62(2), 117-118. <https://doi.org/10.1007/s10341-020-00483-0>
- Chen, X., Feng, Y., Zhang, H., & Chen, Z. (2008). Review of the nutritive value of edible insects. *Forest Insects as Food: Humans Bite Back*, 85-92.
- Collavo, A., Glew, R., Huang, Y. S., Chuang, L.-T., Bosse, R., & Paoletti, M. (2005). House cricket small scale farming. In: Paoletti, M. G. (Ed), *Ecological Implications of Minilivestock* (Vol. 1, pp. 515-540). CRC Press.
- Druml, B., & Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chem*, 158, 245-248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>
- EuropeanCommission(a). *Food Fraud*. Retrieved 09.05.2023 from https://knowledge4policy.ec.europa.eu/food-fraud-quality/topic/food-fraud_en
- EuropeanCommission(b). *Food authenticity and quality*. Retrieved 04.04.2023 from https://joint-research-centre.ec.europa.eu/scientific-activities-z/food-authenticity-and-quality_en
- EuropeanCommission(c). *Union list of novel foods*. Retrieved 05.01.2023 from https://food.ec.europa.eu/safety/novel-food/authorisations/union-list-novel-foods_en#2021.
- FAO/WHO. (2001). *Codex Alimentarius: Joint FAO/WHO Food Standards Programme*. Retrieved 12.05.2023 from <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., & Gessler, C. (1998). Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple [Article]. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(8), 1069. <https://doi.org/10.1007/s001220050841>
- Gomes, S., Breia, R., Carvalho, T., Carnide, V., & Martins-Lopes, P. (2018). Microsatellite High-Resolution Melting (SSR-HRM) to Track Olive Genotypes: From Field to Olive Oil [Article]. *Journal of Food Science*, 83(10), 2415-2423. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14333>
- Grosch, W., Schieberle, P., & Belitz, H. D. (2007). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. (6. Aufl.). Springer. 319-320, 869
- Hanke, M.-V., & Flachowsky, H. (2017). *Obstzüchtung und wissenschaftliche Grundlagen*. Springer. 181-182. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54085-5>
- Heo, S., Kim, C., & Chung, Y. S. (2019). High-resolution melting analysis for identification of apple cultivars using simple sequence repeat markers. *Plant Biotechnology Reports*, 13(4), 338. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00539-y>
- Hillinger, S., Saeckler, J., Domig, K. J., Dobrowolny, S., & Hochegger, R. (2023). Development of a DNA Metabarcoding Method for the Identification of Insects in Food [Article]. *Foods*, 12(5), 1086. <https://doi.org/10.3390/foods12051086>

- Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO Forestry Paper*, 5-40, 67-79, 107-109.
- Ioannis, G., Alik, X., Filippou, A., Konstantinos, K., Athanasios, T., & Panagiotis, M. (2014). Microsatellite high-resolution melting (SSR-HRM) analysis for identification of sweet cherry rootstocks in Greece [Article]. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 12(1), 160-163. <https://doi.org/10.1017/S1479262113000403>
- Farrar, J.S., Wittwer, C. T. (2017). High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. In Patrinos, G. P. (Ed.), *Molecular Diagnostics* (Vol. 3, pp. 79-102). Academic Press.
- Jaakola, L., Suokas, M., & Häggman, H. (2010). Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chemistry*, 123(2), 494-500. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.069>
- Jongema, Y. *List of edible insects of the world*. Retrieved 09.05.2023 from <https://www.wur.nl/en/research-results/chair-groups/plant-sciences/laboratory-of-entomology/edible-insects/worldwide-species-list.htm>
- Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., Hecker, D., Huemmer, W., Ackermann, M., & Richling, E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *European Journal of Nutrition*, 50(7), 507-522. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0157-0>
- Köppel, R., Schum, R., Habermacher, M., Sester, C., Piller, L. E., Meissner, S., & Pietsch, K. (2019). Multiplex real-time PCR for the detection of insect DNA and determination of contents of *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria* and *Achaeta domestica* in food. *European Food Research and Technology*, 245(3), 559-567. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-03225-5>
- Lubic, J. J. (2003). Taxonomic Classification and Brief History. In Ferree, D.C., Warrington I. J. (Ed.), *Apples: Botany, Production and Use* (Vol. 27, pp. 1).
- März, L. (2012). *Das Apfelhandbuch: Wissenswertes rund um den Apfel* (1. Aufl. ed.). Diplomica Verlag. 1-4, 77-91
- Matissek, R., & Fischer, M. (2021). *Lebensmittelanalytik* (7. Aufl. ed.). Springer Berlin Heidelberg. 271, 294. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-63409-7>
- McKee, L. H., & Latner, T. A. (2000). Underutilized sources of dietary fiber: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(4), 285-304. <https://doi.org/10.1023/A:1008144310986>
- McPherson, M. J., & Møller, S. G. (2000). *PCR*. CRC Press. 1-7, 26-34, 51, 108. <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=53951&site=ehost-live>
- Michov, B. (1996). *Elektrophorese : Theorie und Praxis*. De Gruyter. 1, 67. <https://doi.org/10.1515/9783110819427>
- Micic, M. (2022). *Analyse von Mikrosatelliten mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse zur Diskriminierung von steirischen Apfelsorten*. Universität Wien. Wien. <https://ubdata.univie.ac.at/AC16709368>
- Moe, K. T., Kwon, S. W., & Park, Y. J. (2012). Trends in genomics and molecular marker systems for the development of some underutilized crops [Review]. *Genes and Genomics*, 34(5), 451-466. <https://doi.org/10.1007/s13258-012-0049-1>
- Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics* (7. Aufl. ed.). Springer Berlin Heidelberg. 43. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34636-1>
- Müller, H.-J., & Prange, D. R. (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (2. Aufl. ed.). Springer Berlin Heidelberg. 2-7, 66, 77
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*, 439, 232-233. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- RÖMPP, T. (2002). *Mikrosatelliten RÖMPP*. <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-13-02351>
- Rozin, P., & Fallon, A. (1987). A Perspective on Disgust. *Psychological review*, 94, 23-41. <https://doi.org/10.1037//0033-295X.94.1.23>
- Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2013). High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo

- dairy products. *International Dairy Journal*, 28(1), 32-35.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.006>
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C. L., Van de Weg, W. E., Van Kaauwen, M. P. W., Walser, M., Kodde, L. P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C. E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C., & Patocchi, A. (2006). Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes*, 2(4), 202-224.
<https://doi.org/10.1007/s11295-006-0045-1>
- Smil, V. (2002). Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 305-311.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00504-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00504-X)
- Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the Public Health Threat of Food Fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), 157-163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x>
- Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., . . . Knutsen, H. K. (2021). Safety of frozen and dried formulations from whole house crickets (*Acheta domesticus*) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [Note]. *EFSA Journal*, 19(8), Article e06779.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6779>
- Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., . . . Knutsen, H. K. (2022). Safety of frozen and freeze-dried formulations of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus* larva) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [Article]. *EFSA Journal*, 20(7), Article e07325. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7325>
- Turck, D., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., . . . Knutsen, H. K. (2021). Safety of frozen and dried formulations from migratory locust (*Locusta migratoria*) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [Article]. *EFSA Journal*, 19(7), Article e06667.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6667>
- Turck, D., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., . . . Knutsen, H. K. (2021). Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 19(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6343>
- Vasylieva, N., & Harvey, J. (2021). Production and trade patterns in the world apple market. *Innovative Marketing*, 17(1), 16.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S. K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., . . . Viola, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(10), 833-839.
<https://doi.org/10.1038/ng.654>
- Vossen, R. H. A. M., Aten, E., Roos, A., & den Dunnen, J. T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 30(6), 860-866.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/humu.21019>
- Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*, 4, 1121.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200300662>
- Womeni, H., Linder, M., Tiencheu, B., Mbiapo, F., Villeneuve, P., Fanni, J., & Parmentier, M. (2009). Oils of insects and larvae consumed in Africa: Potential sources of polyunsaturated fatty acids. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 16, 230-235. <https://doi.org/10.1051/ocl.2009.0279>

- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars [Article]. *Food Chemistry*, 103(1), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.030>
- Yang, S., Hao, N., Meng, Z., Li, Y., & Zhao, Z. (2021). Identification, comparison and classification of volatile compounds in peels of 40 apple cultivars by HS–SPME with GC–MS [Article]. *Foods*, 10(5), Article 1051. <https://doi.org/10.3390/foods10051051>

9 Anhang

9.1 Abstract

Food authenticity serves as an important quality criterion in the fight against food adulteration.

In this master thesis, the applicability of polymerase chain reaction and high resolution melting (PCR HRM) in food authenticity testing was investigated for insects as an example of species differentiation and, apples as an example of variety differentiation.

Insect species approved for consumption in the EU (yellow mealworm, migratory locust, house cricket, lesser mealworm) could be distinguished from numerous other species with, primers previously used for next-generation sequencing (NGS). However, melting curves of house cricket were similar to those of tropical house cricket and desert locust. In addition, migratory locust was difficult to distinguish from cowpea weevil, terfly, and zophobas. Using a primerset consisting of five primers (two primers used for NGS plus three newly designed primers), all species of interest could be distinguished.

Differentiation of apple varieties was investigated by analyzing extracts of peel, pulp, apple juice, cider, and puree using PCR HRM based on primers targeting microsatellites. Melting curves of extracts from peel behaved the same as melting curves of extracts from leaf, but curves of extracts of pulp were shifted. For most samples, PCR-products could not be obtained, most probably due to low DNA concentration of the extracts and partial DNA degradation by food processing.

In general, PCR HRM has great potential for food authentication but has yet to be validated with respect to its applicability for highly processed foods.

9.2 Zusammenfassung

Die Authentizität von Lebensmitteln dient als wichtiges Qualitätskriterium im Kampf gegen das weltweite Problem der Lebensmittelverfälschung.

In der vorliegenden Masterarbeit wurde die Anwendbarkeit der Polymerase-Kettenreaktion gekoppelt mit der Hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (PCR HRM) in der Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln getestet, für Insekten als Beispiel einer Speziesunterscheidung, und für Äpfel exemplarisch für eine Sortenunterscheidung.

Die vier zum Verzehr in der EU zugelassenen Insektenpezies (Mehlwurm, Wanderheuschrecke, Heimchen, Buffalowurm) konnten mit einem zuvor zum Next-Generation Sequencing (NGS) verwendeten Primerpaar eindeutig von zahlreichen anderen Spezies unterschieden werden. Die Schmelzkurven des Heimchens ähnelten aber stark den Schmelzkurven der Kurzflügelgrille und Wüstenheuschrecke, die Kurven der Wanderheuschrecke waren schwer von den Kurven des Bohnenkäfers, der Krullfliegen und Zophobas zu unterscheiden. Mit Hilfe eines Primersets, bestehend aus den Primern, die in der NGS verwendet wurden, und drei neu entworfenen Primern konnten die Spezies voneinander unterschieden werden.

Die Unterscheidbarkeit von Apfelsorten wurde mittels PCR HRM, basierend auf Primern, welche auf Mikrosatelliten abzielten, und DNA-Extrakten aus Schale, Fruchtfleisch, Apfelsaft, Apfelmus und Apfelmus geprüft. Schmelzkurven der Extrakte aus Schalen verhielten sich gleich wie Schmelzkurven der Extrakte aus Blättern. Kurven von Extrakten aus Fruchtfleisch wiesen dieselbe Kurvenform wie Extrakte aus Schalen auf, waren jedoch teilweise stark verschoben. Die Amplifikation der meisten Apfelsaft-, Apfelmus- und Apfelmusproben war aufgrund der geringen DNA-Konzentration der Extrakte und der teilweisen Degradierung der DNA als Folge der Verarbeitungsprozesse nicht möglich. Die PCR HRM hat generell großes Potential zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln, sie muss jedoch noch hinsichtlich ihres Einsatzes auf stark verarbeitete Lebensmittel validiert werden.

9.3 Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
AFLP	amplified fragment length polymorphism
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ct	Schwellenzyklus (threshold cycle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dsDNA	doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphate
EFSA	European Food Safety Authority
FF	Fruchtfleisch
fg	Femtogramm
FID	Flammenionisationsdetektor
fw	forward
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
HiDRAS	high-quality disease resistant apples for a sustainable agriculture
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
HRM	hochauflösendes Schmelzen (high resolution melting)
LMW	low molecular weight
mg	Milligramm
MS	Massenspektrometrie
ng	Nanogramm
NGS	next generation sequencing
nm	Nanometer
NTC	no template control
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pg	Picogramm
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qPCR	Quantitative PCR (real time PCR)
RAPD	random amplified polymorphic DNA
rcf	relative Zentrifugalkraft (relative centrifugal force)
rev	reverse
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per Minute)
SNP	single nucleotid polymorphism
SPME	Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraktion)
ssDNA	einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
SSR	simple sequence repeat
T	Thymin
Tm	Schmelztemperatur
UV	Ultraviolett

9.4 Liste der Tabellen

Tabelle 1: Liste der Insekten DNA-Extrakte, Einwaage und Konzentration	24
Tabelle 2: Liste der Apfel-, Saft- und Mostproben vom Standort Haidegg	26
Tabelle 3: Liste der Apfelmusproben	26
Tabelle 4: Programm Setup für das MP Gerät	27
Tabelle 5: Finale Zusammensetzung der Reaktionsmixes (2x Type-It HRM PCR Master Mix)	30
Tabelle 6: Temperaturprogramm für die PCR HRM Analyse (TypeIt Mastermix)	31
Tabelle 7: Finale Zusammensetzung des Mastermix (PyroMark)	31
Tabelle 8: Temperaturprogramm für die PCR HRM Analyse (PyroMark Mastermix)	32
Tabelle 9: Primerpaar Ins_fw und Ins_rev mit Sequenz und optimierter Anlagerungstemperatur	34
Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsmix mit 2 Primern.....	34
Tabelle 11: Heimchen Sequenz und artifizielle Sequenzen. Primerbindungsstellen der Heimchensequenz: dick gedruckt. Unterschiede der DNA-Sequenzen von Heimchen und artifiziellen Sequenzen sind in rot und grün dargestellt.	44
Tabelle 12: Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Heim_AS_rev_2 und ihre Sequenz.....	44
Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermix und Reaktionsmix (vier Primer)	45
Tabelle 14: Beladungsschema von Gel 1	50
Tabelle 15: Beladungsschema von Gel 2	51
Tabelle 16: Wander_AS_fw_1, Wander_AS_fw_2 und ihre Sequenz	62
Tabelle 17: Getestete Primerpaare mit Sequenz und optimierter Anlagerungstemperatur	74
Tabelle 18: Primerpaare zur Differenzierung der Apfelsorten aus Masterarbeit von Mina Micic (Micic, 2022): Primerpaare mit Sequenz und optimierter Anlagerungstemperatur.	75
Tabelle 19: Beladungsschema von Gel 1. Proben, bei denen die Amplifikation nicht funktioniert hat, wurden mit einem „x“ gekennzeichnet. Die Abkürzung „FF“ steht für „Fruchtfleisch“.	104
Tabelle 20: Beladungsschema von Gel 2. Proben, bei denen die Amplifikation nicht funktioniert hat, wurden mit einem „x“ gekennzeichnet. Die Abkürzung „FF“ steht für „Fruchtfleisch“.	105
Tabelle 21: Ermittelte DNA-Konzentrationen der Optimierung der Extraktion aus Schale, Fruchtfleisch und Kern der Sorte Gala. (a) = Replikat 1. (b) = Replikat 2. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats. – = kein 2. Eluat erhalten.....	127
Tabelle 22: Ermittelte DNA-Konzentrationen von Schale und Fruchtfleisch aller Apfelsorten. (a) = Replikat 1. (b) = Replikat 2. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats...	127
Tabelle 23: Ermittelte DNA-Konzentrationen von Saft- und Mostproben. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats. Too Low = DNA-Konzentration liegt unter der Bestimmungsgrenze des Kits.....	128
Tabelle 24: Ermittelte DNA-Konzentrationen der Apfelmusproben. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats. Too Low: DNA-Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Kits.	129
Tabelle 25: Liste der Primerpaare, deren Apfelblätter PCR-Produkte in Gelelektrophoresen analysiert wurden	130

9.5 Liste der Abbildungen

Abbildung 1: Ablauf einer PCR	17
Abbildung 2: HRM Kurve, Fluoreszenz wird gegen Temperatur aufgetragen.....	20
Abbildung 3: Schmelzkurven erhalten durch Auftragen der Fluoreszenz gegen die Temperatur	22
Abbildung 4: Schmelzkurven erhalten durch Auftragen der negativen Ableitung der Fluoreszenz gegen Temperatur	22
Abbildung 5: Normalisierte Schmelzkurven	23
Abbildung 6: Difference Plots.....	23
Abbildung 7: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev für die Proben P-002, P-004, P-011, P-031, P-028, P-030, P-039, P-042, P-044, P-049, P-059.	35
Abbildung 8: Erhaltene normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev für die Proben P-002, P-004, P-011, P-031, P-028, P-030, P-039, P-042, P-044, P-049, P-059.	35
Abbildung 9: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev für die Proben P-002, P-028, P-031, P-042, P-044, P-059. Kein Zusatz von MgCl ₂ (hellblau), Zusatz von 1 mM MgCl ₂ (pink), Zusatz von 2 mM MgCl ₂ (grün).	36
Abbildung 10: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit Primerpaar Ins_fw und Ins_rev	37
Abbildung 11: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-039, P-044, P-049, P-039, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134	37
Abbildung 12: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-039, P-044, P-049, P-039, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134	38
Abbildung 13: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit Primerpaar Ins_fw und Ins_rev	39
Abbildung 14: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-044, P-049, P-098, P-002, P-004, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054	39
Abbildung 15: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-028, P-044, P-049, P-098, P-002, P-004, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054.....	40
Abbildung 16: Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Probe P-039 in einer Konzentration von 2,5 ng/μL (rot), 1:50 Verdünnung (blau), 1:100 Verdünnung (grün) und 1:500 Verdünnung (schwarz)	41
Abbildung 17: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit Primerpaar Ins_fw und Ins_rev	42
Abbildung 18: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung des Primerpaars Ins_fw und Ins_rev mit Proben P-039, P-044, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011, P-003, P-006, P-008, P-042, P-044, P-050.....	43
Abbildung 19: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1/2) und artifiziellen Sequenzen in 1:1.500.000 Verdünnung	46
Abbildung 20: Amplifikation unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1/2) mit Proben P-039, P-004, P-011 und Zusatz artifizieller Sequenz 1 bzw. 2 in einer 1:1.500.000 Verdünnung.....	46
Abbildung 21: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1/2) mit Proben P-039, P-004, P-011 und Zusatz artifizieller Sequenz 1 bzw. 2 in einer 1:1.500.000 Verdünnung	47

Abbildung 22: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) und artifizieller Sequenz 1 in einer 1:1.500.000 Verdünnung.....	48
Abbildung 23: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-004, P-011, P-028, P-044, P-049, P-002, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054 und Zusatz artifizieller Sequenz 1 in einer 1:1.500.000 Verdünnung	48
Abbildung 24: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-004, P-011, P-039, P-089, P-098, P-133, P-134.....	49
Abbildung 25: Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-004, P-011, P-039, P-089, P-098, P-133, P-134	49
Abbildung 26: Foto von Gel 1. Beladungsschema siehe Tabelle 14	50
Abbildung 27: Foto von Gel 2. Beladungsschema siehe Tabelle 15.	51
Abbildung 28: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw/rev_1) mit Proben P-039, P-089, P-133, P-134, P-004, P-011.....	53
Abbildung 29: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw/rev_1) mit Proben P-039, P-089, P-133, P-134.....	53
Abbildung 30: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Heim_AS_fw (0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM)	54
Abbildung 31: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Heim_AS_fw (0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM) mit Proben P-039, P-089, P-134, P-004, P-011	54
Abbildung 32: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Heim_AS_fw (0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM) mit Proben P-039, P-089, P-134, P-004, P-011	55
Abbildung 33: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Heim_AS_fw (0,2 µM)].....	56
Abbildung 34: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Heim_AS_fw (0,2 µM)] mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011	56
Abbildung 35: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011	57
Abbildung 36: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Probe P-039 und Zusatz artifizieller Sequenz 1 bzw. 2 in 1:15.000 Verdünnung. Heimchen (P-039) ohne artifizielle Sequenz ist in rot, Heimchen (P-039) mit Zugabe von AS_1 ist in blau und Heimchen (P-039) mit Zugabe von AS_2 ist in grün dargestellt.	58
Abbildung 37: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatz artifizieller Sequenz 1 in 1:15.000 Verdünnung	59
Abbildung 38: Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatz artifizieller Sequenz 1 in 1:15.000 Verdünnung	59
Abbildung 39: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatz artifizieller Sequenz 2 in 1:15.000 Verdünnung	60

Abbildung 40: Schmelzkurven unter Verwendung von vier Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1) mit Proben P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134, P-004, P-011 und Zusatz artifizierter Sequenz 2 in 1:15.000 Verdünnung	61
Abbildung 41: Amplifikation unter Verwendung von zwei Primern (Ins_rev, Wander_AS_fw_1) mit Probe P-044 bei 58 °C und 54 °C	63
Abbildung 42: Amplifikation unter Verwendung von zwei Primern (Ins_rev, Wander_AS_fw_2) mit Probe P-044 bei 58 °C und 54 °C	63
Abbildung 43: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Wander_AS_fw_1 (0,2 µM, 0,4 µM, 0,6 µM)] mit Wanderheuschrecke (P-044)	64
Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von drei Primern [Ins_fw und Ins_rev (0,4 µM) und Wander_AS_fw_2 (0,2 µM, 0,4 µM, 0,6 µM)] mit Wanderheuschrecke (P-044)	64
Abbildung 45: Farbcodierung der PCR HRM Analyse mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1)	65
Abbildung 46: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von fünf (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-044, P-042, P-003, P-006, P-008, P-028, P-054, P-004, P-011, P-039, P-087, P-089, P-090, P-098, P-099, P-132, P-133, P-134	66
Abbildung 47: Farbcodierung der PCR HRM Analyse aller nicht zum Verzehr zugelassenen Spezies mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1)	67
Abbildung 48: Amplifikation unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-050, P-044, P-002, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-003, P-005, P-006, P-008, P-012, P-015, P-054, P-049, P-004	67
Abbildung 49: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-050, P-044, P-002, P-011, P-030, P-031, P-042, P-059, P-005, P-006, P-008, P-054, P-049, P-004	68
Abbildung 50: Farbcodierung der PCR HRM Analyse aller zum Verzehr zugelassenen Spezies mit fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1)	69
Abbildung 51: Amplifikation unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-028, P-039, P-044, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134, P-049, P-005, P-006, P-042, P-059	69
Abbildung 52: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von fünf Primern (Ins_fw, Ins_rev, Heim_AS_fw, Heim_AS_rev_1, Wander_AS_fw_1) mit Proben P-028, P-039, P-044, P-050, P-067, P-087, P-089, P-090, P-094, P-095, P-096, P-098, P-099, P-102, P-103, P-104, P-116, P-122, P-125, P-126, P-132, P-133, P-134, P-049, P-005, P-006, P-042, P-059	70
Abbildung 53: Amplifikation mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 55,1 °C	71
Abbildung 54: Amplifikation mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 56,6 °C	71
Abbildung 55: Schmelzkurven mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 55,1 °C	72
Abbildung 56: Schmelzkurven mit Primerpaar 05g8 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 56,6 °C	72
Abbildung 57: Amplifikation mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 49,9 °C	73
Abbildung 58: Amplifikation mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 51,4 °C	73

Abbildung 59: Schmelzkurven mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 49,9 °C.....	74
Abbildung 60: Schmelzkurven mit Primerpaar 01a6 mit Proben Golden Delicious und Fuji bei einer Anlagerungstemperatur von 51,4 °C.....	74
Abbildung 61: Farbcodierung der PCR HRM Analysen der Apfelblätter	75
Abbildung 62: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH02h11a erhaltenen PCR-Produkte der Proben Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared, Braeburn, McIntosh (H,W), Lavantaler Bananenapfel (H,W), Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne (H,W), Gravensteiner, Steirischer Maschanzka (H,W), Kronprinz Rudolf (H,W), Ilzer Rose (H,W), Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Kanadarenette W, Sommer Maschanzka (H,W), Ananasrenette (H,W). H = Haidegg. W = Wagersbach	76
Abbildung 63: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared, Braeburn, McIntosh (H,W), Lavantaler Bananenapfel (H,W), Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne (H,W), Gravensteiner, Steirischer Maschanzka (H,W), Kronprinz Rudolf (H,W), Ilzer Rose (H,W), Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Kanadarenette W, Sommer Maschanzka (H,W), Ananasrenette (H,W). H = Haidegg. W = Wagersbach	77
Abbildung 64: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 05g8 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Golden Delicious, Fuji, Gala, Elstar, Idared, Braeburn, McIntosh (H,W), Lavantaler Bananenapfel (H,W), Bohnapfel, Jonathan, Goldparmäne (H,W), Gravensteiner, Steirischer Maschanzka (H,W), Kronprinz Rudolf (H,W), Ilzer Rose (H,W), Roter Boskoop, Schafnase, Cox Orange, Kanadarenette W, Sommer Maschanzka (H,W), Ananasrenette (H,W). H = Haidegg. W = Wagersbach	78
Abbildung 65: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 01a6 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Fuji (blau), Lavantaler Bananenapfel (pink), Bohnapfel (schwarz).....	78
Abbildung 66: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 05g8 erhaltenen PCR-Produkte der Proben Lavantaler Bananenapfel Standort H: pink, Lavantaler Bananenapfel Standort W: violett, Sommer Maschanzka Standort H: dunkelgrün, Sommer Maschanzka Standort W: hellgrün. H = Haidegg. W = Wagersbach	79
Abbildung 67: Foto eines Gels der mit Primerpaar 05g8 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskoop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	81
Abbildung 68: Foto eines Gels der mit Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskoop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	82
Abbildung 69: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH02h11a erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskoop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	83
Abbildung 70: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH02g09 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H,	

Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	83
Abbildung 71: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH01f12 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	84
Abbildung 72: Foto eines Gels der mit Primerpaar GD103 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	85
Abbildung 73: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH01f09 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	85
Abbildung 74: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH04c07 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	86
Abbildung 75: Foto eines Gels der mit Primerpaar CH01h01 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	87
Abbildung 76: Foto eines Gels der mit Primerpaar Hi02f12 erhaltenen PCR-Produkte von Blättern der Sorten McIntosh H, Lavantaler Bananenapfel H, Bohnapfel H, Jonathan H, Goldparmäne H, Gravensteiner H, Steirischer Maschanzka H, Kronprinz Rudolf H, Ilzer Rose H, Roter Boskop H, Schafnase H, Cox Orange H, Sommer Maschanzka H, Ananas Renette H, Kanada Renette W, Golden Delicious H, Fuji H, Gala H, Elstar H, Idared H, Braeburn H. H = Haidegg. W = Wagersbach	87
Abbildung 77: Einfluss der PVP-Zugabe auf die DNA-Konzentration der DNA-Extrakte aus Fruchtfleisch. Sorte Gala, Elution 1, % = PVP % im PL2 Puffer, (a) = Replikat 1, (b) = Replikat 2, (c) = Replikat 3, (d) = Replikat 4.....	89
Abbildung 78: DNA-Konzentration der DNA-Extrakte aller Sorten für welche Früchte verfügbar waren (Braeburn, Elstar, Gala, Fuji, Cox Orange, Golden Delicious, Ilzer Rose, Kronprinz Rudolf, Gravensteiner, Idared, Goldparmäne, Steirischer Maschanzka, Roter Boskoop). S = Schale (rot), F = Fruchtfleisch (blau), Eluat 1.....	90
Abbildung 79: DNA-Konzentrationen der DNA-Extrakte aller Sorten (Braeburn, Elstar, Gala, Fuji, Cox Orange, Golden Delicious, Ilzer Rose, Kronprinz Rudolf, Gravensteiner, Idared, Goldparmäne, Steirischer Maschanzka, Roter Boskoop). S = Schale (rot), F = Fruchtfleisch (blau), Eluat 2	91
Abbildung 80: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) = orange, Fruchtfleisch (b) = rot, Schale (a) = hellblau, Schale (b) = dunkelblau, Blatt = grün, (a) = Replikat 1, (b) = Replikat 2	92

Abbildung 81: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) = orange, Fruchtfleisch (b) = rot, Fruchtfleisch (a) 1:5 = pink, Fruchtfleisch (b) 1:5 = violett, Fruchtfleisch (a) 1:10 = hellblau, Fruchtfleisch (b) 1:10 = dunkelblau, Blatt = grün, (a) = Replik 1, (b) = Replik 2.....	93
Abbildung 82: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Blatt und Schale wurde mit PE Puffer verdünnt. Fruchtfleisch (a) = orange, Fruchtfleisch (b) = rot, Schale (a) = hellblau, Schale (b) = dunkelblau, Blatt = grün, (a) = Replik 1, (b) = Replik 2	94
Abbildung 83: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar CH01g12 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) 0,5% PVP = orange, Fruchtfleisch 1% PVP = pink, Fruchtfleisch 2% PVP = violett, Fruchtfleisch 1% PVP + Proteinase K = hellblau, Fruchtfleisch 2% PVP + Proteinase K = dunkelblau, Blatt = hellgrün, Blatt + Proteinase K = dunkelgrün, (a) = Replik 1	95
Abbildung 84: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Gala. Fruchtfleisch (a) 0,5% PVP = orange, Fruchtfleisch 1% PVP = pink, Fruchtfleisch 2% PVP = violett, Fruchtfleisch 1% PVP + Proteinase K = hellblau, Fruchtfleisch 2% PVP + Proteinase K = dunkelblau, Blatt = hellgrün, Blatt + Proteinase K = dunkelgrün, (a) = Replik 1	95
Abbildung 85: Normalisierte Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 23g4 erhaltenen PCR-Produkte der Sorte Elstar. Fruchtfleisch (a) 0,5% PVP = rot, Fruchtfleisch 1% PVP = orange, Fruchtfleisch 2% PVP = pink, Fruchtfleisch 1% PVP + Proteinase K = violett, Fruchtfleisch 2% PVP + Proteinase K = braun, Blatt = hellblau, Blatt + Proteinase K = dunkelblau, (a) = Replik 1	96
Abbildung 86: Amplifikationskurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 für DNA-Extrakte aus Blättern (grün), Fruchtfleisch (rot), Saft- (orange) und Mostproben (blau) der Sorten Braeburn, Cox Orange, Elstar, Goldparmäne, Ilzer Rose und Kronprinz Rudolf. DNA-Extrakte aus Saftproben der Sorte Braeburn, Elstar, Goldparmäne und Ilzer Rose (orange) sowie der DNA-Extrakt aus einer Mostprobe (Ilzer Rose, blau) führten zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals, wobei die CT-Werte relative hoch und die erhaltenen Fluoreszenzsignale teilweise sehr niedrig waren.....	97
Abbildung 87: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 für DNA-Extrakte aus Blättern (grün), Fruchtfleisch (rot), Saft (orange) und Most (blau) der Sorte Ilzer Rose .	98
Abbildung 88: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 für DNA-Extrakte aus Blättern (grün), Fruchtfleisch (rot) und Saft (orange) der Sorte Braeburn	98
Abbildung 89: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH02b03b und PyroMark Mastermix von Ilzer Rose Fruchtfleisch (rot), Ilzer Rose Most (orange), Braeburn Fruchtfleisch (dunkelblau) und Braeburn Most (hellblau)	100
Abbildung 90: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz. (Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa = hellblau, JA! Natürlich = pink, Spar = königsblau, Spar 500 mg Einwaage = violett, Spar 1000 mg Einwaage = magenta, Spar 1000 mg Einwaage 1:5 = dunkelblau, Clever = braun, Clever 500 mg = schwarz, Zurück zum Ursprung = olivgrün)	101
Abbildung 91: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH01g12 der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz, ausgewählte Proben (Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa = hellblau, JA! Natürlich = pink)	101
Abbildung 92: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH02b03b der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz. Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa	

= hellblau, JA! Natürlich = pink, Spar = königsblau, Spar 500 mg Einwaage = violett, Spar 1000 mg Einwaage = magenta, Spar 1000 mg Einwaage 1:5 = dunkelblau, Clever = braun, Clever 500 mg = schwarz, Zurück zum Ursprung = olivgrün	102
Abbildung 93: Normalisierte Schmelzkurven unter Verwendung von Primerpaar CH02b03b der sortenreinen Apfelmusproben aus Golden Delicious mit Golden Delicious Blatt und Fruchtfleisch als Referenz, ausgewählte Proben (Golden Delicious Blatt = hellgrün, Golden Delicious Fruchtfleisch = orange, efko = rot, Billa = hellblau, JA! Natürlich = pink)	103
Abbildung 94: Foto von Gel 1. Beladungsschema siehe Tabelle 19	104
Abbildung 95: Foto von Gel 2. Beladungsschema siehe Tabelle 20	106

9.6 Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Extrakte

Tabelle 21: Ermittelte DNA-Konzentrationen der Optimierung der Extraktion aus Schale, Fruchtfleisch und Kern der Sorte Gala. (a) = Replikat 1. (b) = Replikat 2. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats. – = kein 2. Eluat erhalten

Sorte	Probe	PVP [%]	Einwaage [g]	CE1 [ng/μl]	CE2 [ng/μl]
Gala	Schale (a)	0,5	0,1500	5,47	-
Gala	Schale (b)	0,5	0,1504	5,69	-
Gala	Fruchtfleisch (a)	0,5	0,1521	0,47	-
Gala	Fruchtfleisch (b)	0,5	0,1498	0,317	-
Gala	Kern (a)	0,5	0,1520	55,0	-
Gala	Kern (b)	0,5	0,1500	56,2	-
Gala	Schale (a)	0	0,1510	43,4	-
Gala	Schale (b)	0	0,1498	43,0	-
Gala	Fruchtfleisch (a)	0	0,1517	2,49	-
Gala	Fruchtfleisch (b)	0	0,1494	3,46	-
Gala	Kern (a)	0	0,1494	70,60	-
Gala	Kern (b)	0	0,1511	56,0	-
Gala	Schale (a)	0,5	0,1512	18,8	2,82
Gala	Schale (b)	0,5	0,1493	16,9	2,55
Gala	Fruchtfleisch (a)	0,5	0,1499	0,557	0,21
Gala	Fruchtfleisch (b)	0,5	0,1495	0,991	0,138
Gala	Kern (a)	0,5	0,1505	97,8	22,0
Gala	Kern (b)	0,5	0,1515	72,6	42,0

Tabelle 22: Ermittelte DNA-Konzentrationen von Schale und Fruchtfleisch aller Apfelsorten. (a) = Replikat 1. (b) = Replikat 2. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats.

Sorte	Probe	PVP [%]	Proteinase K	Einwaage [g]	CE1 [ng/μl]	CE2 [ng/μl]
Braeburn	Schale (a)	0,5	nein	0,1508	4,76	24,80
Braeburn	Schale (b)	0,5	nein	0,1509	3,06	37,10
Braeburn	Fruchtfleisch (a)	0,5	nein	0,1508	0,708	0,284
Braeburn	Fruchtfleisch (b)	0,5	nein	0,1492	0,434	0,378
Elstar	Schale (a)	0,5	nein	0,1520	20,50	9,61
Elstar	Schale (b)	0,5	nein	0,1505	25,00	7,10
Elstar	Fruchtfleisch (a)	0,5	nein	0,1511	1,680	0,437
Elstar	Fruchtfleisch (b)	0,5	nein	0,1525	1,060	0,238
Gala	Schale (a)	0,5	nein	0,1506	31,80	7,76
Gala	Schale (b)	0,5	nein	0,1500	14,40	6,31
Gala	Fruchtfleisch (a)	0,5	nein	0,1520	0,818	0,220
Gala	Fruchtfleisch (b)	0,5	nein	0,1514	0,777	0,204
Fuji	Schale (a)	0,5	nein	0,1514	20,10	11,30
Fuji	Schale (b)	0,5	nein	0,1512	11,10	9,08
Fuji	Fruchtfleisch (a)	0,5	nein	0,1520	0,780	0,285
Fuji	Fruchtfleisch (b)	0,5	nein	0,1508	0,829	0,400
Cox Orange	Schale (a)	0,5	nein	0,1516	26,20	10,10
Cox Orange	Schale (b)	0,5	nein	0,1506	17,50	15,00
Cox Orange	Fruchtfleisch (a)	0,5	nein	0,1503	0,553	0,157

Cox Orange	Fruchtfleisch (b)	0,5	nein	0,1508	0,968	0,353
Elstar	Fruchtfleisch	1	nein	0,1523	0,917	0,422
Elstar	Fruchtfleisch	2	nein	0,1530	1,09	0,299
Elstar	Fruchtfleisch	1	ja	0,1565	1,85	0,196
Elstar	Fruchtfleisch	2	ja	0,1490	1,53	0,485
Gala	Fruchtfleisch	1	nein	0,1533	0,488	0,221
Gala	Fruchtfleisch	2	nein	0,1533	0,354	0,267
Gala	Fruchtfleisch	1	ja	0,1531	0,436	0,218
Gala	Fruchtfleisch	2	ja	0,1523	0,589	0,283
Golden Delicious	Schale	0,5	nein	0,1532	17,0	24,6
Golden Delicious	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1517	1,13	0,40
Ilzer Rose	Schale	0,5	nein	0,1496	12,8	5,28
Ilzer Rose	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1527	0,138	0,148
Kronprinz Rudolf	Schale	0,5	nein	0,1506	25,1	10,1
Kronprinz Rudolf	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1516	1,03	0,229
Gravensteiner	Schale	0,5	nein	0,1500	21,7	9,30
Gravensteiner	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1496	0,276	0,097
Roter Boskop	Schale	0,5	nein	0,1527	20,4	2,31
Roter Boskop	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1496	0,205	0,417
Steirischer Maschanzka	Schale	0,5	nein	0,1498	58,0	6,70
Steirischer Maschanzka	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1537	1,84	0,194
Goldparmäne	Schale	0,5	nein	0,1535	2,41	17,1
Goldparmäne	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1520	0,568	2,61
Idared	Schale	0,5	nein	0,1482	34,4	46,2
Idared	Fruchtfleisch	0,5	nein	0,1500	0,300	0,171

Tabelle 23: Ermittelte DNA-Konzentrationen von Saft- und Mostproben. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats. Too Low = DNA-Konzentration liegt unter der Bestimmungsgrenze des Kits.

Produkt	Sorte	Volumen [µL]	CE1 [ng/µl]	CE2 [ng/µl]	Anmerkung
Saft	Ilzer Rose	500	Too Low	Too Low	
Saft	Schafnase	500	Too Low	Too Low	
Saft	McIntosh	500	Too Low	Too Low	
Saft	Lavantaler Bananenapfel	500	0,0560	Too Low	
Saft	Kronprinz Rudolf	500	0,0810	Too Low	
Saft	Ananas Renette	500	0,0720	Too Low	
Saft	Elstar	500	0,0540	Too Low	
Saft	Braeburn	500	Too Low	Too Low	
Saft	Goldparmäne	500	0,0810	Too Low	
Saft	Cox Orange	500	Too Low	Too Low	
Most	Kronprinz Rudolf	500	0,0610	Too Low	
Most	Ilzer Rose	500	0,0520	Too Low	
Most	Bohnappel	500	0,0640	Too Low	
Most	Braeburn	500	Too Low	Too Low	
Most	Cox Orange	500	0,0610	Too Low	
Most	Goldparmäne	500	Too Low	Too Low	
Most	Gravensteiner	500	0,0670	Too Low	
Most	Jonathan	500	Too Low	Too Low	

Most	Lavantaler Bananenapfel	500	0,0830	Too Low	
Most	McIntosh	500	Too Low	Too Low	
Most	Roter Boskoop	500	Too Low	Too Low	
Most	Schafnase	500	Too Low	Too Low	
Most	Elstar	500	Too Low	Too Low	
Saft	Ilzer Rose	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Schafnase	500	0,070	Too Low	Keine Lyse
Saft	McIntosh	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Lavantaler Bananenapfel	500	0,074	Too Low	Keine Lyse
Saft	Kronprinz Rudolf	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Ananas Renette	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Elstar	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Braeburn	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Goldparmäne	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Cox Orange	500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Goldparmäne	2500	Too Low	Too Low	Keine Lyse
Saft	Cox Orange	2500	0,131	Too Low	Keine Lyse

Tabelle 24: Ermittelte DNA-Konzentrationen der Apfelmusproben. CE1 = Konzentration des 1. Eluats. CE2 = Konzentration des 2. Eluats. Too Low: DNA-Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Kits.

Produkt	Marke/Firma	Sorte	Volumen [µL]	CE1 [ng/µl]	CE2 [ng/µl]
Apfelmus	efko	Golden Delicious	0,1529 g	Too Low	Too Low
Apfelmus	Billa	Golden Delicious	0,1534 g	Too Low	Too Low
Apfelmus	JA! Natürlich	Golden Delicious	0,1528 g	Too Low	Too Low
Apfelmus	Spar	Golden Delicious	0,1555	Too Low	Too Low
Apfelmus	Zurück zum Ursprung	Golden Delicious	0,1582	Too Low	Too Low
Apfelmus	Clever	Golden Delicious	0,1518	Too Low	Too Low
Apfelmus	Machland	keine Angabe	0,1575	Too Low	Too Low
Apfelmus	efko PUR	keine Angabe	0,1571	Too Low	Too Low
Apfelmus	Sweet Valley	keine Angabe	0,1562	Too Low	Too Low
Apfelmus	Spar	Golden Delicious	0,4990	Too Low	Too Low
Apfelmus	Spar	Golden Delicious	1,0070	Too Low	0,121
Apfelmus	Clever	Golden Delicious	0,5420	Too Low	Too Low
Apfelmus	Clever	Golden Delicious	1,0017	0,07	0,17
Apfelmus	JA! Natürlich	Topaz	0,1499	0,104	Too Low
Apfelmus + Birne	Spar	keine Angabe	0,1532	Too Low	Too Low
Apfelmus + Mango	Spar	keine Angabe	0,1533	Too Low	Too Low
Apfelmus + Mango	JA! Natürlich	keine Angabe	0,1534	Too Low	Too Low
Apfelmus + Mango	BIO Natura	keine Angabe	0,1532	Too Low	Too Low
Apfelmus + Banane	BIO Natura	keine Angabe	0,1516	Too Low	Too Low
Apfelmus + Banane	JA! Natürlich	keine Angabe	0,1522	0,535	0,08

9.7 Liste der Primerpaare, die zur Differenzierung von Apfelsorten mittels PCR HRM verwendet wurden

Tabelle 25: Liste der Primerpaare, deren Apfelblätter PCR-Produkte in Gelelektrophoresen analysiert wurden

Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Interne Primerbezeichnung	Optimierte Anlagerungstemperatur [°C]
Hi02f12 fw rev	ACATGGCCGAAGACAATGAC CAACCTTTATCCCTCCATCTTTC	c	57.6
CH01h01 fw rev	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	h	57.5
CH01f09 fw rev	ATGTACATCAAAGTGTGGATTG GGCGCTTTCCAACACATC	l	52.9
CH04c07 fw rev	GGCCTTCCATGTCTCAGAAG CCTCATGCCCTCCACTAACA	m	57.0
GD103 fw rev	CGGCGAGAAAAAAAACAATG GGATAACCGTCCCCCTCTTC	n	57.0
CH01f12 fw rev	CTCCTCCAAGCTTCAACCAC GCAAAAACCACAGGCATAAC	o	58.5
CH02g09 fw rev	TCAGACAGAAGAGGAACTGTATTG CAAACAAACCAGTACCGCAA	p	59.5
CH02h11a fw rev	CGTGGCATGCTTATCATTTG CTGTTTGAACCGCTTCCTTC	q	55,4
23g4 fw rev	TTTCTCTCTTTTCCCAACTC AGCCGCCTTGCAATTAATAC	r	55,0
05g8 fw rev	CGGCCATCGATTATCTTACTCTT GGATCAATGCACTGAAATAAACG	s	55,1