



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Entwicklung und Anwendung von ELISAs und PCR
Methoden zur Detektion von Sesam und braunem Senf
in Lebensmitteln

Verfasserin

Martina Wolny

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, Juli 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 190 406 423

Studienrichtung lt. Studienblatt: Lehramtsstudium UF Mathematik UF Chemie

Betreuerin: Ao. Univ-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Ao. Univ-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl, die mir diese Arbeit ermöglichte, für ihre fachliche Unterstützung bei der praktischen Arbeit und ihre gleichsam engagierte und kompetente Betreuung bei der Erstellung meiner Diplomarbeit. Sie fand stets Zeit für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Weiters möchte ich mich bei Dipl.-Ing. Dr. Angelika Petrasch von der Universität für Bodenkultur Wien bedanken, dass sie mir die Herstellung der Modelllebensmittel im Technikum der Boku ermöglicht und mich in die Verwendung der Geräte eingeführt hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt Dr. Fatima Tazeen Husain, die mir ihr Wissen über die Praxis der PCR und der ELISAs weitergegeben hat, Mag. Christina Ecker sowie Mag. Anna Ertl, welche mich bei der Durchführung der ELISAs mit Ratschlägen und hilfreichen Tipps begleiteten und Elisabeth Habla für ihre Unterstützung bei der Probenextraktion gegen Ende meiner praktischen Arbeit.

Danke auch an alle anderen Mitglieder unserer Arbeitsgruppe, mit denen fachlicher Austausch zu jeder Zeit möglich war, die für gute Stimmung sorgten und die bei den Arbeiten anfallenden Wartezeiten und Mittagspausen sehr kurzweilig gestalteten.

Meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mir das Studium ermöglicht und mich während des gesamten Studiums unterstützt haben, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lebensmittelallergien	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Einteilung von Lebensmittelunverträglichkeiten	1
1.1.3	Wirkungsmechanismus	2
1.1.4	Symptome.....	2
1.1.5	Methoden zur Feststellung einer Lebensmittelallergie	2
1.1.5.1	Krankengeschichte	3
1.1.5.2	Skin Prick Test	3
1.1.5.3	<i>In vitro</i> Diagnostik	3
1.1.5.4	Provokationstest	3
1.2	Lebensmittelallergene	3
1.2.1	Kennzeichnungspflicht von allergenen Lebensmitteln in der EU.....	4
1.2.2	Problematik der Schwellendosis	5
1.2.3	Versteckte Allergene	5
1.2.4	Einfluss der Temperaturbehandlung und Verarbeitung auf Allergene	5
1.3	Methoden zum Nachweis von allergenen Lebensmitteln wie Senf und Sesam.....	8
1.3.1	Nachweismethoden mit humanem IgE	8
1.3.1.1	<i>In vivo</i> Nachweis – Skin Prick Test	8
1.3.1.2	<i>In vitro</i> Nachweis – RAST und EAST Inhibition	8
1.3.2	Immunoblotting / Western blotting	9
1.3.3	Double immunodiffusion	9
1.3.4	Rocket Immuno-Elektrophorese (RIE)	9
1.3.5	Immunochemische Assays – ELISA, RIA, LIA und FIA.....	10
1.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR) und real time PCR	10
1.3.7	Vor- und Nachteile von ELISAs und PCR Methoden	10
1.4	Senf.....	11
1.4.1	Allgemeines.....	11
1.4.2	Bekannte Allergene in weißem und braunem Senf.....	12
1.4.3	Senfallergien.....	12
1.5	Sesam	13
1.5.1	Allgemeines.....	13
1.5.2	Bekannte Allergene	13
1.5.3	Sesamallergien	14
1.6	Bereits bestehende Methoden zum Nachweis von Senf und Sesam	14
2	Zielsetzung	17
3	Theoretischer Hintergrund	19
3.1	Polymerasekettenreaktion	19
3.1.1	Prinzip	19
3.1.2	Temperaturen der PCR Schritte	19
3.1.3	Reaktionskomponenten	20
3.1.3.1	DNA Polymerasen.....	20
3.1.3.2	Puffer.....	20
3.1.3.3	Mg ²⁺ - Ionen	20
3.1.3.4	Nukleotide	21
3.1.3.5	Primer	21
3.1.3.6	PCR Beschleuniger	21

3.1.3.7	DNA Lösung	21
3.1.4	Real time PCR.....	21
3.1.5	Detektionsmöglichkeiten.....	22
3.1.5.1	DNA Interkalatoren.....	22
3.1.5.2	Templat spezifische Oligonukleotidsonden	23
3.1.5.2.1	Taq Man Sonde.....	23
3.1.5.2.2	Weitere Varianten von Sonden.....	24
3.1.6	Auswertung	29
3.1.6.1	Wichtige Parameter	29
3.2	Immunoassays	30
3.2.1	Antikörper	30
3.2.1.1	Aufbau und Bindung	30
3.2.1.2	Antikörperherstellung.....	31
3.2.2	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	32
3.2.2.1	Enzyme.....	32
3.2.2.2	Substrate	33
3.2.2.3	Praktische Durchführung eines ELISAs	33
3.2.2.3.1	Wichtige Schritte	33
3.2.2.3.2	Kompetitiver ELISA - Versuchsablauf	34
3.2.2.3.3	Sandwich ELISA – Versuchsablauf	35
3.2.2.4	Quantitative Auswertung.....	36
4	Ergebnisse und Diskussion.....	37
4.1	Entwicklung einer real time PCR Methode zur Detektion von braunem Senf	37
4.1.1	Probenaufarbeitung	37
4.1.2	Primer und Sonden.....	38
4.1.3	Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur	39
4.1.4	Kreuzreaktivitätstests mit Sybr Green.....	42
4.1.5	Kreuzreaktivitätstests mit der Taq Man Sonde	45
4.1.6	Sequenzierung der PCR Produkte von Primerpaar 9	49
4.1.7	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse des PCR Produkts von Primerpaar 9 ...	50
4.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
4.2	Bestimmung von Sesam in Modelllebensmitteln und kommerziell erhältlichen Produkten.....	50
4.2.1	Verwendete Methoden	50
4.2.1.1	Real time PCR Methode zur Detektion von Sesam	50
4.2.1.2	Sandwich ELISA zur Detektion von Sesam	51
4.2.1.3	Kompetitiver ELISA zur Detektion von Sesam	52
4.2.2	Anwendung der Methoden auf kommerziell erhältliche Lebensmittel.....	52
4.2.2.1	Probenaufarbeitung	52
4.2.2.2	Durchführung der PCR.....	52
4.2.2.2.1	Inhibitionskontrolle	53
4.2.2.3	Durchführung der ELISAs	53
4.2.2.4	Vergleich der mittels PCR und den ELISAs erhaltenen Ergebnisse.....	54
4.2.3	Anwendung der Methoden auf Modelllebensmittel	57
4.2.3.1	Herstellung der Modelllebensmittel	57
4.2.3.2	Analyse von geröstetem Sesam und Sesammehl	57
4.2.3.3	Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze der ELISAs in Lebensmittelmatrizes	59
4.2.3.4	Analyse von Sesambrot und Sesamkeksen	60
4.2.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	66

5	Experimentelles	67
5.1	DNA Extraktion	67
5.1.1	Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Methode	67
5.1.2	QIAamp DNA Mini Kit	68
5.2	DNA Konzentrationsbestimmung	68
5.2.1	Photometrische DNA Konzentrationsbestimmung	68
5.2.2	DNA Konzentrationsabschätzung mittels Agarosegelelektrophorese	69
5.2.2.1	Herstellung des Agarosegels	69
5.2.2.2	Durchführung der Agarosegelelektrophorese	69
5.2.2.3	Konzentrationsabschätzung.....	69
5.3	Real time PCR Methoden.....	70
5.3.1	Reagenzien	70
5.3.2	Geräte	70
5.3.3	Pipettierschema	71
5.3.4	Real time PCR Methode zum Nachweis von braunem Senf.....	71
5.3.4.1	PCR Methode mit Sybr Green	72
5.3.4.2	Schmelzkurvenanalyse	72
5.3.4.3	Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur	72
5.3.4.4	PCR Methode mit Taq Man Sonde	73
5.3.4.5	Kreuzreaktivitätstests	73
5.3.4.6	Kreuzreaktivitätstests unter Verwendung von PP9 mit anschließender HRM ...	74
5.3.5	Real time PCR Methode zum Nachweis von Sesam.....	74
5.3.5.1	Untersuchung von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln	75
5.3.5.2	Analyse von Modelllebensmitteln und geröstetem Sesam.....	76
5.3.5.3	Inhibitionskontrolle	76
5.3.5.4	Erstellen einer Standardfunktion	76
5.4	PCR Produkt Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit	76
5.5	DNA Sequenzierung	77
5.6	Proteinextraktion aus Sesamsamen und Lebensmitteln	77
5.7	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay	77
5.8	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Bestimmung von Sesam	78
5.8.1	Kompetitiver ELISA	79
5.8.2	Sandwich ELISA.....	79
5.8.3	Erstellung einer Kalibrierfunktion	80
5.8.4	Bestimmung der Nachweisbarkeit von geröstetem Sesam und Sesammehl	80
5.8.5	Bestimmung von Sesam in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln und Modelllebensmitteln.....	80
5.9	Herstellung der Modelllebensmittel	81
5.9.1	Zutaten für die Modelllebensmittel	81
5.9.2	Herstellung der Mehlmischungen	82
5.9.3	Brot.....	84
5.9.3.1	Brotrezept	84
5.9.3.2	Brotherstellung	85
5.9.4	Kekse.....	86
5.9.4.1	Keksrezept.....	86
5.9.4.2	Keksherstellung.....	86
5.10	Rösten von Sesam	87
5.11	Chemikalien	88
5.12	Geräte	89
6	Schlussbetrachtung.....	91

7	Zusammenfassung	93
8	Abstract	95
9	Anhang	97
9.1	Abkürzungsverzeichnis	97
9.2	Tabellenverzeichnis.....	98
9.3	Abbildungsverzeichnis	100
9.4	Literaturverzeichnis.....	102
10	Lebenslauf	107

1 Einleitung

1.1 Lebensmittelallergien

1.1.1 Definition

Eine Lebensmittelallergie ist eine abnormale immunologische Reaktion des Körpers auf ein normalerweise toleriertes Lebensmittel oder einen Lebensmittelbestandteil. Die Ursachen für die Fehlreaktion sind unklar. Aus der Definition ergibt sich eine klare Abgrenzung zu anderen, durch Lebensmittel verursachte Reaktionen, an denen das Immunsystem nicht beteiligt ist. Die Einteilung von Lebensmittelunverträglichkeiten ist in Kapitel 1.1.2 näher beschrieben.

In der westlichen Welt leiden bereits etwa 4 % der Bevölkerung an einer Lebensmittelallergie, wobei der Anteil bei Kindern mit 6-8 % deutlich höher liegt als jener bei Erwachsenen mit etwa 2 %. Dies inkludiert, dass Allergien bei Kindern oft mit der Zeit durch entwickelte Toleranzen verschwinden. Die Lebensmittel, die 80 % der Allergien auslösen, sind Eier, Milch, Erdnüsse, Soja, Nüsse, Krustentiere, Fisch und Weizen. Als Gründe für die steigende Allergikerkzahl werden der Konsum neuer vielfältiger Lebensmittel, der Einsatz neuer Verarbeitungsmethoden und auch die steigende Hygiene in Industrieländern gesehen. Insbesondere die frühkindliche Entwicklung dürfte bei der Entstehung einer Allergie eine Rolle spielen, da sowohl der Verdauungstrakt als auch das Immunsystem erst nach der Geburt ausreifen und deren Wechselwirkung entscheidend für die Entwicklung einer Toleranz von Lebensmitteln ist. Wichtig für die Bildung von Toleranzen sind die sekretorischen Antikörper, Immunglobuline A (IgA), die vor der ausreichenden körpereigenen Bildung über die Muttermilch aufgenommen werden müssen. Außerdem unterstützt IgA die Ausbildung der Darmbarriere. In Entwicklungsländern ist die Allergiehäufigkeit unter Kindern deutlich geringer. Es konnte festgestellt werden, dass bei diesen die sekretorische Immunität wahrscheinlich auch wegen des häufigeren Kontakts zu stimulierenden Mikroorganismen viel früher fertig ausgebildet ist. [Taylor, 2006 ; Maleki, 2004 ; Poms und Anklam, 2004b ; Brandtzaeg, 2008]

1.1.2 Einteilung von Lebensmittelunverträglichkeiten

Lebensmittelunverträglichkeiten werden nach ihrer Wirkungsweise und ihrem Mechanismus eingeteilt. Primär werden toxische und nicht toxische Reaktionen unterschieden. Erreger von toxischen Reaktionen führen in allen Menschen zu diesen, während nicht toxische Unverträglichkeiten vom Individuum abhängen. Bei den nicht toxischen Reaktionen wird zwischen immunologischen und nicht immunologischen Reaktionen, sogenannten Intoleranzen, unterschieden. Durch das Immunsystem ausgelöste Allergien können in Immunglobulin E (IgE) vermittelte und nicht IgE vermittelte unterteilt werden. IgE ist ein vom Immunsystem gebildeter Antikörper (AK), der normalerweise nur in geringen Mengen produziert wird. Im Falle einer IgE vermittelten Lebensmittelallergie sind die IgE Konzentrationen im Körper erhöht. Beim Vorliegen einer Lebensmittelallergie muss das auslösende Lebensmittel strikt vermieden werden, während bei einer Intoleranz die Lebensmittelmenge nur stark eingeschränkt werden muss. Lebensmittelintoleranzen können metabolische Ursachen haben, wie die Laktoseintoleranz, die durch das Fehlen des Enzyms β -Galaktosidase verursacht wird, pharmakologisch durch unspezifische Mediatorenausschüttung (vor allem Histamin) hervorgerufen werden (z.B. durch den Verzehr von Erdbeeren oder Schokolade) oder es kann durch unbekannte Mechanismen eine idiosynkratische Antwort des Körpers verursacht werden. Oft mit einer Allergie verwechselt wird eine Histamin Vergiftung. Die Menge an Histamin, die zu dieser toxischen Reaktion führt, ist

meist bei an Histamin Intoleranz leidenden Menschen geringer als bei gesunden Menschen. Bei der Histamin Vergiftung kommt es nach der Einnahme von Histamin durch den Verzehr von Thunfisch, Makrelen, Mahi-Mahi, anderen Fischen oder auch Käse zu Symptomen wie bei einer Allergie. Die Reaktion ist aber nicht durch das Immunsystem vermittelt und daher keine Allergie. [Untersmayr und Jensen-Jarolim, 2006 ; Taylor, 2006]

1.1.3 Wirkungsmechanismus

Bei Allergien können vier Typen unterschieden werden. Typ 1 Allergien sind IgE vermittelt, während alle anderen Typen nicht IgE vermittelt sind. Typ 2 und Typ 3 Allergien werden durch andere Antikörperklassen hervorgerufen und Typ 4 Allergien sind Zell vermittelt. Bei Lebensmittelallergien treten vor allem die sofort einsetzenden Typ 1 Allergien und verspätet einsetzende, durch Immunzellen vermittelte Reaktionen auf.

IgE vermittelte Reaktionen

Bei diesen unmittelbaren Hypersensitivitäten werden in einem ersten Schritt, der Sensibilisierung, IgE Antikörper gegen das Allergen gebildet und an der Oberfläche von Mastzellen oder basophilen Leukozyten gebunden. Bei diesem Erstkontakt mit einem Allergen treten keine Symptome auf. Bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Lebensmittelallergen kann es durch Bindung des Allergens zur Quervernetzung zweier an den Mastzellen oder Basophilen gebundenen IgE Molekülen kommen. Dies führt zur Zellmembrandisruption und zur Ausschüttung von Histamin und anderen Entzündungsmediatoren, die die Symptome einer allergischen Reaktion auslösen.

Zell vermittelte verspätete Hypersensitivität

Die Reaktion tritt meist 6 bis 24 Stunden nach Verzehr des Lebensmittels auf. Es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen Lebensmittelallergenen und sensibilisierten T-Lymphocyten, welche die Ausschüttung von Cytokinen und Lymphokinen stimulieren. An diesem Allergietyp sind keine Antikörper beteiligt. [Taylor, 2006 ; GEO Themenlexikon]

1.1.4 Symptome

Die durch Allergien ausgelösten Symptome sind vielfältig und variieren zwischen milden lokalen und schweren, das gesamte Herz-Kreislaufsystem betreffenden Symptomen. Es können die Haut betreffende Rötung, Schwellung und Juckreiz auftreten oder es kann im Mund die Zunge oder die Mundschleimhaut anschwellen, was auch als orales Allergiesyndrom bezeichnet wird. Diese milden Symptome sind sehr häufig. Symptome des Gastrointestinaltrakts sind Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall. Häufig sind auch die Atemwege von einer Allergie betroffen. Dies macht sich mit Asthma und Rhinitis bemerkbar. Selten tritt ein das Herz-Kreislaufsystem betreffender anaphylaktischer Schock auf, der tödlich sein kann. Zur Behandlung der Symptome werden meist Epinephrin oder Antihistamine verabreicht. [Taylor, 2006]

1.1.5 Methoden zur Feststellung einer Lebensmittelallergie

Zur Diagnose werden die Krankengeschichte, Skin Prick Tests, *in vitro* Diagnostik und Provokationstests herangezogen. Es können auch familiäre Vorbelastungen in die Betrachtungen miteinbezogen werden, da das Allergierisiko steigt, wenn Geschwister, ein Elternteil oder beide Eltern eine Allergie haben. Das Allergierisiko erhöht sich von 5-15 % beim Fehlen eines allergischen Familienmitglieds auf 50-70 %, wenn beide Eltern die selbe Allergie haben. [Ring et al., 2001 ; GEO Themenlexikon]

Wurde eine Lebensmittelallergie festgestellt, dann besteht die einzige wirkungsvolle Behandlung in der Eliminierung der Lebensmittel aus dem Speiseplan. Die meisten vorhandenen Medikamente sind nur zur akuten Behandlung geeignet. Die Vermeidung einer

Lebensmittelzutat kann einerseits schwierig sein und andererseits, wenn dadurch viele Nahrungsmittel nicht mehr konsumiert werden dürfen, zu einer schlechten Ernährung und daraus resultierend zu einer Unterversorgung des Körpers führen. Als problematisch kann sich auch das Auftreten einer Kreuzallergie auf verwandte Lebensmittel (z.B. Erdnuss – Sesam) oder auch zwischen Pollen und Lebensmitteln (z.B. Birkenpollen – Apfel) herausstellen. Es muss jedes Individuum auf jedes allergene Lebensmittel einzeln getestet werden, um eine Kreuzallergie feststellen zu können. [Burks und Ballmer-Weber, 2006 ; Taylor, 2006]

1.1.5.1 Krankengeschichte

Auf einen Lebensmittelverzehr folgende Reaktionen oder Krankheiten, die auf eine Allergie hindeuten, werden notiert, wobei die Zeit nach der Nahrungsaufnahme sowie die Menge des Lebensmittels entscheidend sind. Die Führung von Diät Tagebüchern ist hilfreich. Es besteht die Möglichkeit, in der Diät nacheinander Lebensmittel zu eliminieren, um die Ursache festzustellen und Allergie auslösende Lebensmittel zu vermeiden. [Ring et al., 2001]

1.1.5.2 Skin Prick Test

Skin Prick Tests sind reproduzierbar und werden oft verwendet, um Patienten, die eine Typ 1 Allergie vermuten, zu screenen. Dabei werden dem Patienten ein verdünnter Lebensmittelextrakt sowie eine Positivkontrolle (meist Histamin) und eine Negativkontrolle (Salze) intrakutan injiziert. Die Reaktion erfolgt durch Bildung einer Schwellung mit umliegender Rötung und gilt als positiv, falls der Durchmesser dieser zumindest 3 mm größer ist als jener der Negativkontrolle. Somit können mit Hilfe dieser Tests IgE vermittelte Lebensmittelallergien ausgeschlossen werden. Ein positiver Test bedeutet aber nicht unbedingt eine auftretende Allergie bei Verzehr des Lebensmittels, da in diesem Fall die Verdauung und Resorption eine wichtige Rolle spielen. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

1.1.5.3 In vitro Diagnostik

Hierbei wird das Serum eines Individuums auf die Bildung spezifischer IgE Antikörper hin untersucht. Diese Tests werden ebenfalls zum Screening möglicher Typ 1 Allergien verwendet. Die Methode ist unter den analytischen Nachweismethoden (siehe Kapitel 1.3.1.2) beschrieben. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

1.1.5.4 Provokationstest

Krankengeschichte und positive Skin Prick Tests ermöglichen oft eine eindeutige Diagnose von Lebensmittelallergien. Um diese zu bestätigen, werden nach einer Diät, bei der das allergieauslösende Lebensmittel abgesetzt wurde und der Patient wieder symptomfrei ist, allergische Reaktionen durch gezielte Gabe des Lebensmittels provoziert. Dies sollte nur unter Überwachung erfolgen. Solche Studien, single oder noch besser double-blind placebo-controlled food challenges, gelten als der „goldene Standard“ zur Diagnose von lebensmittelallergischen Reaktionen. Die Tests sind mit einem gewissen Risiko verbunden, da Patienten auf unterschiedliche Allergenmengen verschieden reagieren. Es kann durchaus zur Auslösung schwerer allergischer Reaktionen kommen, die dann direkt mit Antihistaminen, Glucocorticosteroiden, Bronchodilatoren oder Epinephrin behandelt werden müssen. [Ring et al., 2001]

1.2 Lebensmittelallergene

Bei Lebensmittelallergenen handelt es sich um Proteine. Körperfremde Proteine können nur zu allergischen Reaktionen führen, wenn sie in ausreichender Menge im Lebensmittel vorhanden sind und die Lebensmittelverarbeitungs- bzw. zubereitungsprozesse intakt überstehen. Außerdem müssen sie gegen die Abbaumechanismen des Verdauungstraktes resistent sein und in aktiver Form über die Mukosa aufgenommen werden. Manche Allergene können durch ihre Funktion die Aufnahme über die Darmschleimhaut erhöhen und dadurch Immun-

reaktionen verstärken. Im Falle einer IgE vermittelten Allergie wird nicht das ganze Protein als Antigen (AG) von einem IgE erkannt, sondern bestimmte Aminosäuresequenzen, sogenannte Epitope, die an den AK binden können. Dabei kann es sich um die tatsächliche Aminosäureabfolge in der Primärstruktur handeln (lineare Epitope) oder um auf Grund der Faltung und dreidimensionalen Struktur des Proteins benachbarte Aminosäuresequenzen (nicht lineare oder Konformationsepitope). Ein Allergen kann verschiedene Epitope aufweisen, wobei es zur Allergieauslösung zumindest über zwei gleiche Epitope verfügen muss, die zur Querverknüpfung von IgE führen. Auch Haptene, die nur an große Moleküle (z.B. Proteine) konjugiert zu einer Immunantwort führen, können Epitope bilden, wobei noch nicht ganz geklärt ist, warum diese überhaupt allergische Reaktionen auslösen, da sie nicht über die für eine IgE Quervernetzung nötige Polyvalenz verfügen. [Bredehorst und David, 2001 ; Mills et al., 2007]

1.2.1 Kennzeichnungspflicht von allergenen Lebensmitteln in der EU

Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union beschlossen am 20. März 2000 auf Vorschlag der Kommission die Richtlinie 2000/13/EG zur einheitlichen Kennzeichnung, dem Aussehen von Lebensmittelverpackungen und der Werbung für solche Produkte. Unter anderem beinhaltet diese die verpflichtende Kennzeichnung verschiedener Zutaten. Die Liste der kennzeichnungspflichtigen Lebensmittelinhaltsstoffe wurde in der Richtlinie 2003/89/EG vom 10. November 2003 hinsichtlich jener Lebensmittel, die häufig unerwünschte Reaktionen auslösen oder sogar zum Auftreten schwerer allergischer Reaktionen führen, um Anhang IIIa erweitert. Diese Liste möglicher Lebensmittelallergene wurde um eine Reihe von Produkten, die vorläufig von der Kennzeichnungspflicht ausgenommen wurden, in der Richtlinie 2005/26/EG vom 21. März 2005 und in deren Änderung vom 3. Oktober 2005 ergänzt. Diese zeitlich begrenzten Ausnahmen wurden nach mehreren Gutachten in der Richtlinie 2007/68/EG vom 27. November 2007 endgültig von der Kennzeichnungspflicht befreit. Damit ist nun folgende Liste von Lebensmittelszutaten kennzeichnungspflichtig:

Anhang IIIa der Richtlinie 2007/68/EG

„ANHANG IIIa

Zutaten gemäß Artikel 6 Absätze 3a, 10 und 11

1. Glutenthaltige Getreide (d. h. Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut oder deren Hybridstämme) und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
 - a) Glukosesirupe auf Weizenbasis einschließlich Dextrose ⁽¹⁾;
 - b) Maltodextrine auf Weizenbasis ⁽¹⁾;
 - c) Glukosesirupe auf Gerstenbasis;
 - d) Getreide zur Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke.
2. Krebstiere und daraus gewonnene Erzeugnisse.
3. Eier und daraus gewonnene Erzeugnisse.
4. Fische und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
 - a) Fischgelatine, die als Träger für Vitamin- oder Karotinoidzubereitungen verwendet wird;
 - b) Fischgelatine oder Hausenblase, die als Klärhilfsmittel in Bier und Wein verwendet wird.
5. Erdnüsse und daraus gewonnene Erzeugnisse.
6. Sojabohnen und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
 - a) vollständig raffiniertes Sojabohnenöl und -fett ⁽¹⁾;
 - b) natürliche gemischte Tocopherole (E306), natürliches D-alpha-Tocopherol, natürliches D-alpha-Tocopherolazetat, natürliches D-alpha-Tocopherolsukzinat aus Sojabohnenquellen;

- c) aus pflanzlichen Ölen aus Sojabohnen gewonnene Phytosterine und Phytosterinester;
- d) aus Pflanzenölsterinen gewonnene Phytostanolester aus Sojabohnenquellen.

7. Milch und daraus gewonnene Erzeugnisse (einschließlich Laktose), außer

- a) Molke zur Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke;

b) Lactit.

8. Schalenfrüchte, d. h. Mandeln (*Amygdalus communis* L.), Haselnüsse (*Corylus avellana*), Walnüsse (*Juglans regia*), Kaschunüsse (*Anacardium occidentale*), Pekannüsse (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), Paranüsse (*Bertholletia excelsa*), Pistazien (*Pistacia vera*), Makadamianüsse und Queenslandnüsse (*Macadamia ternifolia*) und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer

- a) Schalenfrüchte für die Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke.

9. Sellerie und daraus gewonnene Erzeugnisse.

10. Senf und daraus gewonnene Erzeugnisse.

11. Sesamsamen und daraus gewonnene Erzeugnisse.

12. Schwefeldioxid und Sulphite in Konzentrationen von mehr als 10 mg/kg oder 10 mg/l, ausgedrückt als SO₂.

13. Lupinen und daraus gewonnene Erzeugnisse.

14. Weichtiere und daraus gewonnene Erzeugnisse.“

(1) Und daraus gewonnene Erzeugnisse, soweit das Verfahren, das sie durchlaufen haben, die Allergenität, die von der EFSA für das entsprechende Erzeugnis ermittelt wurde, aus dem sie gewonnen wurden, wahrscheinlich nicht erhöht.

1.2.2 Problematik der Schwellendosis

Bereits geringste Mengen eines Lebensmittelallergens können zu allergischen Reaktionen führen. So kann bereits das Berühren kontaminierter Gegenstände oder das Öffnen von Lebensmittelpackungen allergische Reaktionen auslösen. Die Dosis ist aber vom Individuum und dem Allergen abhängig. In mehreren Studien wurde versucht, eine allgemeine Schwellendosis festzustellen. Die Untersuchungen ergaben, dass in einigen Fällen Mengen von unter 1 mg, in anderen erst Mengen über 1 g an allergenem Protein zu allergischen Reaktionen führen. Somit existiert keine generelle Schwellendosis. Dies erschwert das Festlegen von Richtlinien für Nachweismethoden. Bei der Frage, wie sensitiv eine Methode sein sollte, gibt es daher eine generelle Übereinkunft, dass die Nachweisgrenze zwischen 1 und 100 ppm (mg allergenes Protein/kg Lebensmittel) liegen sollte. [Taylor, 2006 ; Poms und Anklam, 2004b]

1.2.3 Versteckte Allergene

Allergene, die in einem Lebensmittel nicht enthalten sein sollten oder nicht erwartet werden können, werden als versteckte Allergene bezeichnet. Sie treten auf Grund von Kontaminationen bei der Lagerung, dem Transport, der Verarbeitung durch unzureichende Reinigung der Verarbeitungsgeräte oder durch bei der Verarbeitung entstandene Neoallergene (siehe Kapitel 1.2.4) auf. Mitunter werden rohe teure Zutaten durch billigere verarbeitete ersetzt, die nicht auf der Verpackung aufscheinen. Bei dieser falschen Kennzeichnung oder auch bei unzureichenden Kennzeichnungen, wie „Gewürze“, die keine Auskunft über tatsächlich enthaltene Bestandteile liefern, könnten ebenfalls versteckte Allergene im Lebensmittel vorliegen, welche für Allergiker ein großes Problem darstellen. [Poms und Anklam, 2004b]

1.2.4 Einfluss der Temperaturbehandlung und Verarbeitung auf Allergene

Lebensmittel werden unterschiedlichen Verarbeitungsprozessen ausgesetzt. Die Gründe reichen von der Erhöhung der Qualität, Verbesserung des Geschmacks und der Konsistenz,

Verlängerung der Haltbarkeit durch Inaktivieren von Mikroben und Toxinen bis zum gezielten Einsatz, um die Allergenität mancher Lebensmittel zu reduzieren.

Lebensmittelallergene weisen die Gemeinsamkeit auf, dass sie gegenüber den Proteasen und sauren Bedingungen des menschlichen Verdauungstrakts stabil sind, weshalb sie überhaupt als Allergene wirksam werden. Bei Verarbeitungsprozessen, insbesondere den verschiedensten Temperaturbehandlungen, muss dies aber nicht unbedingt der Fall sein. Bei der Nahrungsmittelverarbeitung können Epitope unverändert bleiben, verändert oder zerstört werden, oder sogar neu gebildet werden. Im Allgemeinen lässt sich daher keine Aussage über die Veränderung der Allergenität durch die Verarbeitung treffen. Selten besteht eine Lebensmittelallergie nur auf verarbeitete Produkte. Ein Beispiel dafür ist eine allergische Reaktion auf gekochten Fisch, nicht aber auf rohen Fisch.

Meist werden durch Verarbeitungsprozesse vorhandene nichtlineare Epitope durch Konformationsänderung eliminiert und/oder neue Konformationsepitope gebildet, wodurch Neoallergene entstehen, während lineare Epitope eher dazu neigen, nicht verändert zu werden, wodurch die Allergenität erhalten bleibt. Eine Möglichkeit, lineare Epitope zu zerstören, bietet eine enzymatische Hydrolyse, mit der jedoch oft eine unerwünschte Konsistenz- und Geschmacksveränderung des Lebensmittels einhergeht. Daher wird diese Methode selten herangezogen.

Jede Behandlung zeigt auf verschiedene Allergene eine unterschiedliche Wirkung durch Epitopveränderung oder deren Erkennungsmöglichkeit durch Maskieren oder Demaskieren von Epitopen. Somit muss der Einfluss der Verarbeitung auf Proteinstrukturen und dadurch auf Allergene für jedes Allergen mit geeigneten Methoden untersucht werden. Hinzu kommt, dass nicht ausschließlich der Verarbeitungsprozess und das Allergen, sondern auch die vorhandenen Lebensmittelmatrixen die Allergenität beeinflussen können und daher eine entscheidende Rolle spielen.

Bei den Verarbeitungsprozessen unterscheidet man thermische und nicht thermische Methoden, es kann aber auch eine Einteilung nach physikalischen, chemischen und biochemischen Prozessen erfolgen. Zu den thermischen Prozessen zum Trocknen oder Kochen zählen Rösten, Mikrowellenerhitzen, Backen, Kochen, Druckkochen, Blanchieren und Dampfgaren. Zu den nicht thermischen Prozessen gehören Bestrahlung (γ -Strahlung), Ultrafiltration, Mahlen, Räuchern, Salzen, Einlegen, Keimung, Fermentation und genetische Veränderung. Neben der Temperatur sind auch auftretende pH-Werte und die Ionenstärke entscheidend. Im Folgenden sind einige Prozesse und ihr Einfluss auf bestimmte Lebensmittelallergene näher beschrieben.

Hitzebehandlung

Bei der Hitzebehandlung können je nach Temperatur unterschiedliche Veränderungen in Proteinen stattfinden. Dazu gehört der Verlust an Sekundärstruktur, Disulfidbrückenspaltung, Neuankordnungen von Disulfidbrückenbindungen, intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, Aggregatbildung und chemische Modifikation. Zu den chemischen Veränderungen zählen vor allem die bei der Reaktion der Aminogruppen der Proteine mit Zuckern gebildeten Maillard Produkte. Neben der Maillardreaktion laufen auch Reaktionen mit oxidierten Lipiden, reaktiven Sauerstoffspezies und Polyphenolen ab. Bei der Strukturänderung können neue allergene Epitope durch Entfaltung oder Freiwerden vorher blockierter Proteinseitenketten entstehen oder bestehende Konformationsepitope zerstört werden. Außerdem werden Proteine meist weniger löslich. Dies erschwert den anschließenden Nachweis. Viele Studien beschäftigen sich ausschließlich mit löslichen Extrakten und lassen die möglicherweise erhalten bleibende Allergenität der unlöslichen Komponenten außer Acht.

Geröstete Haselnuss weist je nach Rösttemperatur eine erhalten bleibende oder reduzierte Allergenität auf und gekochter Sellerie zeigt in verschiedenen Untersuchungen sowohl reduzierte als auch mitunter erhöhte Allergenität. Konformationsepitope des Kirschallergens

Proteine werden durch die Maillardreaktion und auch durch enzymatische Bräunungsreaktionen zerstört. Manche Fischproteine zeigen ebenfalls eine reduzierte Allergenität. Geröstete Erdnuss hingegen zeigt eine erhöhte Allergenität; diese wurde eingehend studiert. Beim Rösten wird das Erdnussallergen Ara h 1 kovalent quervernetzt und modifiziert. Es bildet irreversibel Komplexe, die das Protein weniger löslich und stabiler gegen Verdauungsenzyme machen. In Ara h 2 hingegen erhöht sich beim Rösten die Trypsin Inhibitor Aktivität. Daraus resultiert nicht nur die Resistenz von Ara h 2 gegenüber dem Trypsinabbau, sondern zusätzlich wird auch Ara h 1 vor dem Abbau geschützt. Nach dem Braten und Kochen von Erdnuss zeigt sich jedoch eine verringerte Allergenität.

Lebensmittelallergene werden häufig auf Grund ihres Temperaturverhaltens in hitzestabile, teilstabile und hitzelabile Proteine eingeteilt. Thermolabile Proteine entfalten sich meist bei erhöhter Temperatur, während thermostabile Proteine sich nur teilweise oder gar nicht entfalten oder beim Abkühlen rückfalten. Ebenfalls zu den thermostabilen Proteinen zählen rheomorphe Proteine, die nahezu unverändert bleiben, da sie Regionen mit ungeordneter Struktur und hoher Mobilität aufweisen.

Fermentation

Die Fermentation durch Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen, wobei eine Vielzahl von Mikroorganismen zur Verfügung stehen, reduziert die Allergenität bei manchen Sojaprodukten, beeinflusst die Allergenität von Milch aber kaum.

Proteolyse

Der enzymatische Abbau von Proteinen führt zum Teil zu zerstörten Epitopen. Im Falle, dass die Epitopstruktur bekannt ist, kann eine spezifische Protease gesucht und verwendet werden, um das Epitop anzugreifen. Für Soja wurden Proteasen gefunden, die die Allergenität des Lebensmittels reduzieren.

Ultrafiltration

Pfirsich Allergene behalten ihre Allergenität bei Hitzebehandlung. Wird im Anschluss aber ein Ultrafiltrationsschritt durchgeführt, so ist die Herstellung eines hypoallergen Safts möglich. Damit gehen aber sensorische Veränderungen einher, die in Kauf genommen werden müssen.

Strahlung

Gammastrahlen werden vor allem für Kräuter, Gewürze und Tee zur Konservierung verwendet, da Enzyme und Mikroorganismen inaktiviert werden können. Proteine verändern bei Bestrahlung ihre Sekundär- und Tertiärstruktur und somit ihre Löslichkeit auf Grund von Aggregation, Fragmentation und Aminosäuremodifikation und möglicherweise auch die Allergenität. Sellerie bildet bei Bestrahlung Neoallergene und auch bestrahlter Weizen zeigte eine erhöhte Allergenität. Im Gegensatz dazu konnte bei Eiern durch kombinierte Anwendung mit Erhitzen die Allergenmenge reduziert werden. Ebenfalls eine reduzierte Allergenität weisen bestrahlte Milch und Shrimps auf.

Genetische Modifikation

Rekombinante DNA Methoden werden ebenfalls zur Eliminierung von Allergenen eingesetzt. Dabei wird die Genexpression von Proteinen durch Insertion oder Löschung von DNA Segmenten oder durch spezifische Mutationen verändert. Auch bei dieser Modifikation ergibt sich oft das Problem der Bildung von Neoallergenen.

Im Allgemeinen behalten allergene Lebensmittel ihre Allergenität, mit der Ausnahme von frischen Früchten und Gemüse. Nicht-allergene Lebensmittel werden trotz kombinierter gezielter Anwendung von Verarbeitungsprozessen meist nicht erhalten. Aber zumindest die Her-

stellung hypoallergener Lebensmittel ist vor allem in fermentierten und hydrolysierten Produkten sowie durch Ultrahocherhitzen, genetische Modifikation und das Maskieren von Epitopen möglich. [Maleki, 2004 ; Mills et al., 2007 ; Poms und Anklam, 2004a ; Sathe et al., 2005]

1.3 Methoden zum Nachweis von allergenen Lebensmitteln wie Senf und Sesam

Die Anforderungen an analytische Methoden für den Nachweis von Lebensmittelallergenen sind recht hoch. Sie müssen sensitiv, robust, spezifisch und gut validiert sein, um Allergene in Spuren in komplexer Matrix nachweisen zu können. Es müssen aber nicht notwendigerweise die Allergene selbst detektiert werden, sondern oft wird von der Anwesenheit charakteristischer Proteine oder der DNA auf das Vorliegen von Allergenen geschlossen. Daher ist es hilfreich, wenn die Auswirkungen von Verarbeitungsprozessen auf ein Allergen bekannt sind. Probleme, die sich durch die Verarbeitung ergeben können, beruhen oft auf der durch Strukturänderung des Allergens beeinflussten AK-AG Erkennung, die in vielen Methoden genutzt wird. Dies kann einen Einfluss auf die Signalintensität und die Sensitivität der Methode haben und auch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Da die Methoden vor allem zur Kontrolle von Lebensmitteln und deren richtiger Etikettierung herangezogen werden, ist eine leichte Handhabung für nicht ausgebildetes Personal hilfreich. Für die Industrie wäre eine Methode zur kontinuierlichen Überwachung ideal. In diesem Abschnitt sind einige Methoden, die sich zum Nachweis von Lebensmittelallergenen eignen, beschrieben. [Sathe et al., 2005 ; Baumgartner et al., 2007 ; Poms und Anklam, 2004b]

1.3.1 Nachweismethoden mit humanem IgE

1.3.1.1 *In vivo* Nachweis – Skin Prick Test

Das Allergen bzw. ein Extrakt aus einem potentiell allergenen Lebensmittel wird in die Haut eines sensibilisierten Individuums injiziert und führt zu IgE Bildung und Quervernetzung. Es kommt zur Schwellung und Rötung der Haut. Durch Auswertung dieser Merkmale kann die Reaktion messbar gemacht werden. Somit kann auf das Vorhandensein und die Menge des Allergens in dem Extrakt geschlossen werden. Ein großer Nachteil dieser Methode ist das Risiko, das für die allergische Testperson besteht, insbesondere, wenn dieser ein Extrakt unbekannter Allergenkonzentration injiziert wird. Ein weiterer Nachteil besteht darin, Erwachsene zu finden, die als Testpersonen geeignet sind. Diese müssen ausreichend sensitiv auf das Allergen reagieren. Des Weiteren muss eine positive allergische Reaktion in der Haut noch nicht bedeuten, dass das Lebensmittel nach Verzehr ebenfalls zu dieser Reaktion führt. Die entscheidenden Proteinabschnitte könnten im Verdauungstrakt abgebaut oder nicht intakt aufgenommen werden, wodurch keine allergische Reaktion auftreten würde. Die Methode wird daher eher selten genutzt. [Hamilton, 2006]

1.3.1.2 *In vitro* Nachweis – RAST und EAST Inhibition

Das Allergen kann kompetitiv die Bindung von spezifischem IgE an ein an eine feste Phase gebundenes Allergen inhibieren. Der Radioallergosorbent Test (RAST) oder auch der später entwickelte Enzymallergosorbent Test (EAST) basieren darauf. Es wird die spezifische Bindung des humanen IgE an das entsprechende Allergen genutzt und zur Detektion der Antikörper ein kommerziell erhältlicher radioaktiv markierter (oder enzymmarkierter), gegen humanes IgE gerichteter AK verwendet. Die Konkurrenzreaktion zwischen Analyt-Allergen und Festphasen-Allergen führt zu einem konzentrationsabhängigen Signal und ermöglicht die Quantifizierung. Für diesen Test gibt es kommerziell erhältliche Allergosorbents sogar mit Mischungen von Lebensmittelallergenen. Dies ermöglicht das Screening von vor allem Kindern, um Sensitivitäten gegen Lebensmittel zu bestätigen. Polyklonale AK aus Tieren oder

definierte monoklonale AK können humanes IgE ersetzen. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, Kreuzreaktivitäten zwischen allergenen Proteinen von Lebensmitteln und auch Pollen festzustellen und zu quantifizieren. Außerdem ermöglicht die Verwendung von humanem IgE den Nachweis von für Allergiker relevanten Allergenen. Der Nachteil ist die Notwendigkeit einer ausreichenden Menge an gereinigtem spezifischen humanen IgE, der im Serum nur in geringer Menge enthalten ist. Weiters variieren diese AK in ihrer Spezifität je nach Individuum. Dies führt zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit. Falls eine radioaktive Markierung gewählt wird, ergibt sich daraus die Notwendigkeit des Vorhandenseins des nötigen Speziallabors mit Lizenz und fachlich spezialisiertem Personal. Dies fällt im Falle des EASTs weg. [Hamilton, 2006 ; Baumgartner et al., 2007]

1.3.2 Immunoblotting / Western blotting

Fast immer wird Immunoblotting in Verbindung mit der Natriumdodecylsulphatpolyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierenden Bedingungen verwendet. Die Methode wird häufig für qualitative und halbquantitative Aussagen herangezogen, wie zur Allergenidentifikation und Allergendetektion und zu Kreuzreaktivitätsuntersuchungen in Lebensmitteln. Immunoblotting dient zur Analyse komplexer Proteinmischungen, wobei die Trennung dieser auf Grund ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld erfolgt. Für Proteine mit ähnlicher Molekularmasse besteht die Möglichkeit einer zweidimensionalen Elektrophorese, bei der diese nach unterschiedlichem isoelektrischen Punkt getrennt werden. Die Detektion erfolgt dann durch Färbung. Alternativ kann eine Detektion über radioaktiv- oder enzymmarkierte AK nach Transfer auf eine Membran erfolgen. Früher wurden meist humane Antiseren verwendet, nun werden meist entsprechende AK in Tieren hergestellt. Diese bieten den Vorteil, dass die mit gereinigten Lebensmittelallergenen hergestellten polyklonalen oder monoklonalen AK monospezifisch sind, im Gegensatz zu den meist nicht monospezifischen, im Allgemeinen je nach Allergiker verschiedenen in Antiseren enthaltenen AK. Nachteile dieser Methode sind der Zeitbedarf und die benötigte Ausstattung sowie das ausgebildete Personal. [Van Ree et al., 2006 ; Baumgartner et al., 2007]

1.3.3 Double immunodiffusion

Die 1948 von Ouchterlony entwickelte Methode ist nur qualitativ und weist meist eine niedrige Sensitivität auf. Sie eignet sich aber trotzdem zur Detektion von Lebensmittelallergenen, insbesondere zum Screening, um mögliche Kreuzreaktivitäten festzustellen. Zur Bestimmung wird ebenfalls die Wechselwirkung zwischen AK und AG in Lösung genutzt. Antigene, Antiseren und unbekannte Proben werden in verschiedene Kavitäten gegeben und diffundieren radial aus diesen durch ein Agarosegel. Sobald die Antigene mit Antikörpern in Kontakt kommen, bildet sich ein unlöslicher, erkennbarer AG-AK Komplex. [Baumgartner et al., 2007]

1.3.4 Rocket Immuno-Elektrophorese (RIE)

Bei der RIE wird die Antigenlösung in Löcher einer Antiserum enthaltenden Agar Platte hinzugefügt. Die Löcher befinden sich in einer Reihe und normal dazu wird ein elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern im Feld durch das Gel, wobei sie durch Reaktion mit den AK sichtbare Schweife („rockets“) erzeugen. Das Visualisieren erfolgt über Coomassie Blau Färbung oder Immunofärbung. Die Länge eines „rockets“ ist umso größer, je größer die Antigenmenge ist. Nachteile sind die aufwendige Gelvorbereitung und Immunfärbung. [Baumgartner et al., 2007]

1.3.5 Immunochemische Assays – ELISA, RIA, LIA und FIA

Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)

Große Vorteile dieser Methode sind die mögliche Automatisierung, woraus die Möglichkeit des Screenings sowie ein hoher Probendurchsatz resultiert. ELISAs werden deshalb und auf Grund der Spezifität und Sensitivität der Reaktion häufig in Lebensmitteluntersuchungen eingesetzt. Es werden bereits ELISA Kits zum Verkauf angeboten. Für die Methode werden spezielle monoklonale oder polyklonale Antikörper benötigt, die in Tieren hergestellt werden. Diese werden im Sandwich ELISA an einer Platte gebunden und können ihrerseits AG binden. Die Detektion erfolgt über einen zweiten, gegen das AG gerichteten enzymmarkierten AK, der ein Substrat in ein gefärbtes Produkt umwandelt. Alternativ kann der Assay kompetitiv durchgeführt werden, wobei eine Konkurrenzreaktion wie beim EAST auftritt.

Weitere immunochemische Assays

Radioimmunoassays (RIAs) verwenden eine radioaktive Markierung und Fluoreszenz-immunoassays (FIAs) oder allgemein Luminoimmunoassays (LIAs) detektieren fluoreszierende anstatt farbiger Verbindungen. [Baumgartner et al., 2007]

1.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) und real time PCR

Die PCR wird vor allem zur Detektion von Mikroorganismen und zur Authentizitätsprüfung von genetisch modifizierten Organismen verwendet. Der Einsatz zur Detektion von Lebensmittelallergenen nimmt in den letzten Jahren jedoch ebenfalls zu. PCR Methoden sind spezifische und sehr sensitive Detektionsmöglichkeiten, aber dabei wird nicht das Allergen oder allgemein ein Protein nachgewiesen, sondern ein DNA Stück. Im Prinzip wird ein spezifischer DNA Abschnitt, der durch zwei Oligonukleotide begrenzt wird, mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase vervielfältigt. Das Produkt kann mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht und identifiziert werden. Dies ergibt die Möglichkeit einer qualitativen bzw. mit passendem Standard halbquantitativen Bestimmung. Die real time PCR nutzt zusätzlich eine spezifische, meist fluoreszierende DNA Sonde, deren Fluoreszenz durch bestimmte Mechanismen gequenchet wird, sodass das Signal proportional zur PCR Produktmenge ist. Dies ermöglicht einerseits eine Produktverifikation und andererseits eine Quantifizierung, ohne eine Gelelektrophorese durchführen zu müssen. Die real time PCR ist eine schnelle, leicht zu handhabende Methode, die eine quantitative Aussage ermöglicht. Die PCR ist wie der ELISA als Screeningmethode geeignet, aber im Vergleich dazu teurer. Problematisch sind Matrixkomponenten von Lebensmitteln, die oft als Inhibitoren wirken und somit die Amplifikationseffizienz verringern. Außerdem ist die DNA Amplifikation nur eine indirekte Methode zur Allergendetektion, da das Vorhandensein der DNA nicht mit der Existenz der Allergene gleichzusetzen ist und umgekehrt die DNA durch Verarbeitungsprozesse zerstört sein könnte, die Allergene aber immer noch intakt vorliegen. Andererseits werden auch in vielen AK basierten Methoden nicht die Allergene, sondern oft andere Proteine bzw. Epitope nachgewiesen. [Poms und Anklam, 2004b]

1.3.7 Vor- und Nachteile von ELISAs und PCR Methoden

Ein ELISA ist eine relativ schnelle, leicht zu handhabende Methode, für die eine einfache Ausstattung benötigt wird, weshalb sie billiger ist als die PCR. Von Nachteil kann die Verwendung von polyklonalen AK sein, da diese nicht in beliebiger Menge in genau definierter Zusammensetzung herstellbar sind. Das Problem lässt sich durch die Wahl monoklonaler AK beheben. Dabei ergibt sich aber eine stärkere Beeinflussung des ELISAs durch Matrixeffekte. Außerdem kann es passieren, dass jenes Epitop, gegen das die AK gerichtet sind, bei der Lebensmittelverarbeitung zerstört wurde und das Allergen nicht mehr detektiert werden kann, eine allergene Wirkung jedoch weiter besteht. Meist werden AK gar

nicht so entwickelt, dass sie gegen allergene Epitope gerichtet sind, sondern gegen andere Proteine des Lebensmittelbestandteils. Das bedeutet, dass der Nachweis indirekt erfolgen muss und nur das Vorhandensein des allergenen Lebensmittels und nicht dessen Allergenität widerspiegelt. Trotzdem wird dem ELISA noch eher die Fähigkeit zugesprochen, direkte Rückschlüsse auf die Allergenität zu ermöglichen als der PCR, da diese nicht Proteine, sondern DNA nachweist.

Für die PCR benötigt man eine spezielle Ausstattung. Dafür können im Gegensatz zu einem ELISA die Reagenzien in beliebiger Menge in gleicher Qualität hergestellt werden. Ähnlich wie bei einem ELISA handelt es sich um eine indirekte Nachweismethode, bei der jedoch das Vorhandensein der entsprechenden Lebensmittel DNA an Stelle eines Proteins nachgewiesen wird. Da sich die DNA aber im Allgemeinen bei Verarbeitungsprozessen anders verhält als Proteine, ist ein direkter Schluss auf die Allergenität eines Lebensmittels mitunter problematisch. Die DNA ist bis zu Temperaturen von 120 °C stabil, wird bei niedrigem pH - Wert (< 4) fragmentiert und kann enzymatisch abgebaut werden. Außerdem erschwert die Verarbeitung von Lebensmitteln manchmal erheblich die Extraktion der DNA in ausreichender Menge und Reinheit. Wie bei einem ELISA wirken Matrixkomponenten störend auf den Nachweis. Die PCR ist Arten spezifisch einsetzbar, aber nicht, um zwischen Produkten einer Art (z.B. Hühnerei und Hühnerfleisch) unterscheiden zu können. Dies wäre mit ELISA Methoden möglich.

Ein Problem, das für beide Methoden besteht, ist, dass keine Referenzmaterialien verfügbar sind, weshalb die Quantifizierung in Lebensmitteln nicht exakt möglich ist. Dies liegt an der Vielfalt von Matrixkomponenten und den unterschiedlichen Verarbeitungsprozessen, denen Lebensmittel unterzogen werden. [Holzhauser et al., 2006 ; Poms und Anklam, 2004b]

1.4 Senf

1.4.1 Allgemeines

Senf gehört zur Ordnung Brassicales und zur Familie der Brassicaceae, die aus etwa 3200 Arten und 375 Gattungen besteht. Es gibt drei Arten von Senf: weißen Senf, braunen Senf und schwarzen Senf. [Rancé, 2003]

Weißer Senf, lateinisch *Sinapis alba*, kommt ursprünglich aus den Gebieten Vorderasiens bis Indien und wird vor allem in Deutschland und Holland angebaut. Es ist die in Europa am häufigsten als Lebensmittelzutat verwendete Senfart. Die einjährigen Pflanzen blühen hellgelb und entwickeln in Schoten ihre Samen, die recht eiweißreich sind. Die Samen enthalten Sinalbin, das in Glucose und p-Hydroxybenzylsenföl gespalten wird, welches den scharfen Geschmack ausmacht. Deshalb wird Senf neben seiner Verwendung als Speisesenf auch zum Würzen, in Saucen und in Gewürzmischungen verwendet. Weißer Senf wird aber auch wegen seiner stabilisierenden Wirkung und Einsetzbarkeit als Bindemittel geschätzt. Dadurch handelt es sich bei Senf oft um ein verstecktes Allergen. [Lieberei et al., 2007 ; Shim und Wanasundara, 2008]

Schwarzer Senf, lateinisch *Brassica nigra*, stammt vermutlich aus dem Mittelmeerraum, wird aber auf der ganzen Welt angebaut, wobei die Kultivierung schwieriger ist als jene der anderen Arten. Die Blüten sind etwas kleiner als die des weißen Senfs und die Samen enthalten Sinigrin, welches in Allylsenföl und Sinapin, einen Bitterstoff, gespalten wird. Ersteres schmeckt sehr scharf, weshalb sich schwarzer Senf ebenfalls zum Würzen eignet. Die Samen werden vor allem zur Speisesenfherstellung genutzt, finden aber auch medizinischen Einsatz. [Lieberei et al., 2007 ; Katzer, 2011]

Brauner Senf, lateinisch *Brassica juncea*, stammt aus Indien und dem mittleren Osten. Er ist wie schwarzer Senf auf Grund des Glycosids Sinigrin recht scharf. Obwohl die Schärfe etwas geringer ist als jene des schwarzen Senfs, wird dieser bevorzugt angebaut, da sich die Ernte leichter maschinell durchführen lässt. Die dunkel- bis hellbraunen Samen werden wie jene des

schwarzen Senfs zur Speisesenferstellung und in der Medizin verwendet. [Lieberei et al., 2007 ; Katzer, 2011]

1.4.2 Bekannte Allergene in weißem und braunem Senf

Bisher wurden vier Proteine des weißen Senfs und ein Protein des braunen Senfs als Allergene identifiziert.

Allergene in weißem Senf

Das Hauptallergen Sin a 1 ist ein Samenspeicherprotein der 2S Albumin Proteinfamilie, der Napine, mit einem niedrigen Molekulargewicht von 14,1 kDa. Es besteht aus zwei Polypeptidketten, die aus 39 bzw. 88 Aminosäuren bestehen und über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es ist ein thermostabiles Protein, das ebenfalls eine Stabilität gegenüber dem Abbau durch Trypsin und anderen proteolytischen Enzymen aufweist. Zur besseren immunologischen Charakterisierung wurde Sin a 1 bereits auch rekombinant hergestellt. Dies ermöglicht vielleicht die Entwicklung einer spezifischen Allergie Behandlung. [González de la Pena und Monsalve, 1996 ; Rancé, 2003]

Neben Sin a 1 wurde noch Sin a 2, ein 11S Globulin mit einer Molekularmasse von 51 kDa, als Allergen identifiziert. Das Protein ist salzlöslich und wie Sin a 1 ein Samenspeicherprotein. [Sirvent et al., 2009]

Außerdem konnten Sin a 3, ein aus 92 Aminosäuren bestehendes, der nsLTP (non specific liquid transfer protein) Familie angehörendes Protein, sowie Sin a 4, ein aus 131 Aminosäuren aufgebautes Protein der Profilin Familie, als Allergene gefunden werden. [Sirvent et al., 2009]

Allergene in braunem Senf

Das Hauptallergen Bra j 1 ist ein 2S Albumin. Zur Strukturaufklärung wurde die 2S Albumin Fraktion von braunem Senf untersucht. Bei der Isolierung von Bra j 1 mit Hilfe von AK gegen Sin a 1 können fünf isoallergene Fraktionen erhalten werden, wobei Bra j 1E die am häufigsten vorkommende ist. Die Struktur dieser Proteinfraktion wurde aufgeklärt. Es handelt sich um ein aus zwei Ketten bestehendes Protein. Eine Kette besteht aus 37, die andere aus 92 Aminosäuren. Die Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Die Aminosäuresequenz ist jener von Sin a 1 ähnlich. Diese strukturelle Ähnlichkeit erklärt auch die Kreuzreaktivität zwischen den beiden Senfsorten. [Monsalve et al., 1993]

1.4.3 Senfallergien

Senfallergien treten sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern mitunter bereits vor dem dritten Lebensjahr auf und können je nach Individuum und Dosis auch zu einem schweren anaphylaktischen Schock führen. Unter den Gewürzen löst Senf am häufigsten und die schwersten Allergien aus. Die größte Häufigkeit von Senfallergien besteht in Frankreich, das sowohl der größte europäische Senfhersteller als auch Konsument ist. Bei Kindern ist die Senfallergie sogar die vierthäufigste nach Allergien auf Eier, Erdnüsse und Kuhmilch, verläuft aber meist mit weniger schwerwiegenden Symptomen. Einige Studien bestätigen die Allergenität und zeigen auch, dass nicht alle gegenüber Senf sensibilisierten Personen tatsächlich eine Allergie aufweisen. Es sollte also auch zur Bestätigung einer Senfallergie, wie bei allen Allergien, eine orale Studie in Form einer single oder double-blind placebo-controlled food challenge durchgeführt werden.

Eine genauere Untersuchung der Senfallergene ergab, dass diese stabil gegenüber Hitze und enzymatischem Abbau sind, weshalb sich ihre Allergenität bei der Verarbeitung nicht stark verändert. Die häufige Verwendung von Senf als Gewürz, insbesondere in Mischungen, erschwert es Allergikern, Senf in Nahrungsmitteln zu vermeiden.

Außerdem sollten sich Senfallergiker auch auf andere Kreuzblütengewächse testen lassen, da durchaus eine Kreuzallergie zu diesen bestehen kann. Eine Studie unter 38 vorwiegend

erwachsenen Menschen, von denen ~60 % allergische Reaktionen bei einer double-blind placebo-controlled food challenge zeigten, waren ~40 % auf zumindest einen weiteren Vertreter der Kreuzblütengewächse allergisch. Ansonsten sind Kreuzreaktivitäten zwischen Senf und anderen Brassicaceae eher selten, mit Ausnahme einer Kreuzreaktivität zu Kreuzkrautpollen. Des Weiteren konnten Kreuzhypersensitivitäten zu einigen Früchten und Gemüse, insbesondere zu Vertretern der Rosaceae Familie, festgestellt und die bestehende Kreuzallergie zu Pfirsich und Melone durch Strukturähnlichkeiten mit den Allergenen Sin a 3 und Sin a 4 erklärt werden. Kreuzreaktivitäten zwischen braunem und weißem Senf wurden bei *in vitro* Tests festgestellt und eine Kreuzreaktivität zwischen braunem und schwarzem Senf besteht auf Grund positiver Skin Prick Tests wahrscheinlich ebenfalls. [EFSA, 2004 ; Morisset et al., 2003 ; Rancé, 2003 ; Rancé und Dutau, 2000 ; Figueroa et al., 2005]

1.5 Sesam

1.5.1 Allgemeines

Sesam, lateinisch *Sesamum indicum*, gehört zur Ordnung der Lamiales und der Familie der Pedaliaceae. Sesam kommt ursprünglich aus dem Gebiet um den indischen Ozean, Ostafrika oder Indien und wird auch heute in Indien, China und Myanmar in großen Mengen angebaut. Die Pflanze ist einjährig, hat weiße bis weinrote fünfzählige unsymmetrische Blüten und bildet gelbliche bis dunkelbraune Samen. Diese bestehen aus 48-53 % Öl, 15-22 % Eiweiß und ungefähr 10 % Kohlenhydraten. Es werden sowohl die Samen als auch das daraus gewonnene Öl, welches einen hohen Linolsäuregehalt aufweist, als Lebensmittel verwendet. Der bei der Ölherstellung anfallende, sehr eiweißreiche Presskuchen wird als Viehfutter oder auch wegen seiner für den Menschen gut passenden Aminosäurezusammensetzung der Proteine nach weiterer Verarbeitung als Nahrungsmittel verwendet. Sesam wird in vielen Lebensmitteln eingesetzt, unter anderem in Brot, Crackern, Chips, Dressings, Burgern, sowie der chinesischen, orientalischen und südamerikanischen Küche. [Lieberei et al., 2007 ; Pastorello et al., 2001]

Zur Detektion von Sesam in Lebensmitteln werden auch schon kommerziell erhältliche Kits angeboten. Diese detektieren entweder Sesamproteine (BioKits Sesame protein test Kit for the qualitative and quantitative determination of sesame in food products by enzyme immunoassay, Tepnel Biosystems) oder DNA (SureFood® Allergen Sesame real time PCR - Kit for the qualitative detection of DNA from sesame, Congen Biotechnologie).

1.5.2 Bekannte Allergene

Von Sesam sind bereits sieben Proteine bekannt, die Allergien auslösen können:

Das Hauptallergen Ses i 1 von weißen Sesamsamen mit einer Molekularmasse von 9 kDa gehört zur Gruppe der 2S Albumine. Die 2S Albumine machen mit den 11S Globulinen gemeinsam 80-90 % der Proteine in Sesamsamen aus. Ses i 1 besteht aus einer kleinen und einer großen Untereinheit. Es zeigt viele Ähnlichkeiten zu den 2S Albuminen von Paranuss, Rizinussamen und der Sonnenblume. Das Protein zeigt eine thermische Stabilität bis zu Temperaturen von 90 °C im neutralen oder sauren Milieu. Ses i 1 ist gegenüber dem Abbau im Gastrointestinaltrakt sehr stabil, was mit Hilfe von *in vitro* Modellsystemen erforscht wurde. Somit behält es seine Allergenität sowohl bei einer Hitzebehandlung als auch nach dem Verzehr. Die Untersuchung hinsichtlich Sequenzen, die von IgE erkannt werden, ergab zumindest neun lineare Epitope, die aber im Vergleich untereinander keine generellen Struktur motive zeigten. [Leduc et al., 2006 ; Moreno et al., 2005 ; Pastorello et al., 2001 ; Wolff et al., 2004]

Ses i 2 gehört ebenfalls zur Speicherproteinfamilie der 2S Albumine und hat eine Molekularmasse von 7 kDa. Es ist eine Untereinheit eines 14 kDa 2S Albumins. Eine Studie ergab, dass dieses Protein von fast allen Seren der Testpersonen erkannt wurde, und somit handelt es sich auch dabei um ein Hauptallergen. [Leduc et al., 2006 ; Wolff et al., 2003]

Bei Ses i 3, einem Protein mit einer Molekularmasse von 45 kDa, handelt es sich um ein Mitglied der drittwichtigsten Samenspeicherproteinfamilie, der 7S Globuline, wobei es zu der Untergruppe der Vicilin ähnlichen Globuline zählt. Das 7S Globulin besteht aus zumindest acht Polypeptidketten, die nicht durch Disulfidbrücken untereinander verbunden sind. [Leduc et al., 2006 ; Orruno und Morgan, 2007]

Die Allergene Ses i 4 mit 17 kDa und Ses i 5 mit 15 kDa gehören zu den Oleosinen, die in Ölkörpern vorkommen. Diese Allergene können einen anaphylaktischen Schock auslösen und sind oft der Grund für negative Skin Prick Tests trotz bestehender Allergie gewesen, da in den verwendeten Extrakten Oleosine fehlten. [Leduc et al., 2006]

Zwei weitere Allergene, die in Sesamsamen identifiziert wurden, sind Ses i 6 und Ses i 7. Es handelt sich um 11S Globuline, also ebenfalls um Speicherproteine. [Beyer et al., 2007]

1.5.3 Sesamallergien

Die Anzahl der Sesamallergiker, insbesondere unter den Kindern, stieg in den letzten Jahren. Dies liegt unter anderem am erhöhten Konsum von Produkten, die Sesam enthalten. Dies resultiert auch aus der häufigeren Verwendung von Sesam als Lebensmittelzusatzstoff, unter anderem auch in vielen Gluten freien Nahrungsmitteln. Mit der steigenden Häufigkeit dieser Lebensmittelallergie erhöht sich auch die Zahl der Fälle einer schweren Allergie. Insbesondere in Israel ist die Zahl an Sesamallergien stark gestiegen. Die Allergie tritt meist bereits im Alter von 2 Jahren oder davor auf und ist besonders bei Kindern, die eine atopische Dermatitis aufweisen, verbreitet. Im Gegensatz zu Allergien gegen Eier, Kuhmilch oder Soja, die mit der Zeit verloren gehen, entwickeln nur wenige Sesamallergiker eine Toleranz gegenüber Sesam. Während die Studien aus Israel ergaben, dass die meisten Sesamallergien IgE vermittelt sind, zeigten andere Untersuchungen keine spezifische IgE Bildung trotz allergischer Reaktionen der Testpersonen in double-blind placebo-controlled food challenge Tests, woraus sich folgern lässt, dass Sesamallergien auch nicht IgE vermittelt sein können. Sowohl IgE vermittelte als auch nicht IgE vermittelte Allergien können zu einem anaphylaktischen Schock führen. Besonders auf Sesam achten sollten auch Erdnussallergiker, da häufig eine Kreuzallergie zu Sesam besteht. Eine mögliche Ursache dafür könnte die große Sequenzhomologie eines IgE bindenden Epitops von Ses i 3 zu dem Erdnussallergen Ara h 1 sein. Andere strukturelle Ähnlichkeiten bestehen vor allem zwischen Ses i 1 und den 2S Albuminen anderer Pflanzen, weshalb Kreuzallergien nicht ausgeschlossen sind. [Beyer et al., 2002 ; Cohen et al., 2007 ; Aaronov et al., 2008 ; Levy und Danon, 2001 ; Pajno et al., 2000]

1.6 Bereits bestehende Methoden zum Nachweis von Senf und Sesam

Brezizinski (2006) veröffentlichte eine real time PCR Methode zur Detektion von Sesam in Lebensmitteln. Als Ziel DNA wurde eine Sequenz des für 2S Albumin kodierenden Gens verwendet und passende Primer sowie eine Taqman Sonde entworfen. Es konnte keine Kreuzreaktivität zu einigen anderen häufig in Lebensmitteln verwendeten Samen und Nüssen sowie Erdnuss festgestellt werden. Die Nachweisgrenze lag bei 5 pg DNA von Sesamsamen. In mit Sesamsamen gespickten Weizen Crackern lag die Nachweisgrenze bei 50 mg Sesam/kg Cracker. [Brezizinski, 2006]

Schöringhumer und Cichna-Markl (2007) beschreiben die Entwicklung einer real time PCR Methode zur Detektion von Sesam. Es wurden Primerpaare für das für das Hauptallergen Ses i 1 kodierende Gen entworfen und zusätzlich eine Molecular Beacon Sonde für das

Primerpaar, das in Sybr Green Kreuzreaktivitätstests die besten Ergebnisse erzielt hatte. Die Methode zeigte keine Kreuzreaktivität zu siebzehn getesteten Lebensmittelinhaltsstoffen und konnte in allen neun getesteten kommerziell erhältlichen Produkten, die Sesam enthielten, mit Ausnahme von Sesamöl, diesen nachweisen. Die Untersuchung von Lebensmitteln, die Sesam in Spuren enthalten könnten oder laut Deklaration nicht enthielten, ergab negative Ergebnisse. [Schöringhumer und Cichna-Markl, 2007]

Lee et al. (2008) entwickelten und validierten einen Sandwich ELISA für die Detektion von Senf in Lebensmitteln. Dazu wurden Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen und einem Schaf mit einer Mischung aus weißem, braunem und orientalischem Senf hergestellt. Die optimierten ELISAs hatten eine Nachweisgrenze von 1 ppm (μg Senfsamen/ml) (ELISA mit Schaf AK) und 3 ppm (ELISA mit Kaninchen AK). Es wurden 109 übliche Lebensmittel und Lebensmittelbestandteile, andere Brassicaceae eingeschlossen, auf Kreuzreaktivität getestet, und nur Raps zeigte eine Kreuzreaktivität, was mit der 94 % Sequenzähnlichkeit der 2S Albumin Samenspeicherproteine von Senf und Raps erklärt wird. Zur Validierung wurden Frankfurter mit Spikelevels von 0 bis 1000 ppm Senfmehl untersucht. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindung von $95,3 \% \pm 10,7 \%$. Von den untersuchten 15 Lebensmitteln, die laut Deklaration Senf enthielten, konnte dieser nur in zweien nicht detektiert werden. Dies wird mit der Reduktion der Löslichkeit und Extrahierbarkeit der Senfproteine durch die Verarbeitung erklärt. Von 14 Proben, die keinen Senf enthalten sollten, zeigten drei einen positiven Nachweis. Diese trugen die Beschriftung „spices“ oder „natural flavoring“, weshalb Senf tatsächlich enthalten sein konnte. [Lee et al., 2008]

Mustorp et al. (2008) entwickelten real time PCR Methoden zur Detektion von Sellerie, Senf und Sesam in Lebensmitteln. Es wurden jeweils Primer und Sonden entworfen. Für Sellerie wurde die Sellerie Manitol Dehydrogenase als Target gewählt. Es ergab sich eine gute Sensitivität und hohe Effizienz für die Amplifikation. Außerdem wurde keine Kreuzreaktivität zu den getesteten Pflanzen festgestellt. Die Reproduzierbarkeit und Nachweisbarkeit in spiking Versuchen war gut. Bei der für Sesam entwickelten PCR Methode zeigte sich ebenfalls eine hohe Spezifität. Dazu wurden Primer für ein Gen entworfen, das für 2S Albumin, eines der Hauptallergene von Sesam, kodiert. Die Effizienz war hoch und die Methode ist zum Nachweis von Sesam in gespikten Lebensmitteln geeignet. Für Senf wurden Primer und Sonden für das Sin a 1 Gen, das für das Hauptallergen von *Sinapis alba* kodiert, entwickelt. Das Gen zeigt viele Homologien zu Genen der anderen Senfarten, aber auch zu anderen Brassicaceae. Kreuzreaktivitätstests ergaben positive Signale für die getesteten Kreuzblütengewächse Brokkoli, Chinakohl, Kohl und Radieschen. Die Effizienz und Sensitivität der Methode, die über Standardkurven erhalten wurde, ist gut, aber die Methode ist nicht spezifisch, sondern detektiert eine Gruppe nah verwandter, für allergene Proteine kodierende Gene. [Mustorp et al., 2008]

Shim und Wanasundara (2008) entwickelten einen ELISA zur Detektion von weißem Senf. Dazu wurde das Hauptallergen Sin a 1 von weißem Senf nach Isolierung chromatographisch und durch Elektroelution gereinigt. Mit Hilfe dieses Extrakts wurden polyklonale Antikörper durch Immunisieren von Kaninchen hergestellt. Die AK zeigten eine hohe Spezifität für weißen Senf, wiesen aber eine geringe Kreuzreaktivität mit einem Rapsprotein auf. Es wurden mit den Antigenen und Antikörpern Kalibrierkurven für einen Sandwich ELISA und einen kompetitiven indirekten ELISA erstellt, wobei sich eine Nachweisgrenze von $0,3 \mu\text{g}$ Sin a 1/ml für den Sandwich ELISA und $2,0 \mu\text{g/ml}$ für den kompetitiven indirekten ELISA ergaben. Der sensitivere Sandwich ELISA wurde weiter entwickelt und optimiert. Die entwickelte Methode war gut geeignet, um Sin a 1 Mengen in Extrakten zu bestimmen. [Shim und Wanasundara, 2008]

Schöringhumer et al. (2009) entwickelten eine duplex real time PCR Methode zur Detektion von Sesam und Haselnuss. Zur Wahl der Primer und Sonden wurde für Sesam das für das Hauptallergen Ses i 1 kodierende Gen und zum Nachweis von Haselnuss das für das Hauptallergen Cor a 1 kodierende Gen herangezogen. Die mit den spezifischen Primerpaaren entwickelte duplex real time PCR Methode wurde mit 25 Lebensmittelinhaltsstoffen auf Spezifität getestet und zeigte keine Kreuzreaktivität zu diesen. Die Nachweisgrenze, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt wurde, lag bei 50 pg Sesam und 50 pg Haselnuss DNA. Die Bestimmung von mit Sesam und Haselnuss gespickten Keksen war bis zu einem Spikelevel von je 0,0005 % möglich. Weiters wurden dreißig kommerziell erhältliche Lebensmittel, die Sesam und/oder Haselnuss laut Kennzeichnung enthalten, enthalten können oder nicht enthalten sollten, untersucht. In allen Produkten, die Sesam bzw. Haselnuss enthalten oder nicht enthalten sollen, konnte dies bestätigt werden. Von jenen, die Sesam in Spuren beinhalten können, ergab keine Probe ein positives Ergebnis und bei Haselnuss wurde in drei von sieben solcher Produkte Haselnuss nachgewiesen. [Schöringhumer et al., 2009]

Fuchs et al. (2010) stellten eine real time PCR Methode zur Detektion von weißem Senf vor. Hierzu wurden sieben Primerpaare und Sonden entworfen und getestet. Die Primer und Sonden, die für das für *Sinapis alba* MADS D kodierende Gen entworfen wurden, erwiesen sich als spezifisch für weißen Senf. Die untersuchten 67 Lebensmittelbestandteile, darunter 12 Kreuzblütengewächse, brachten negative Ergebnisse bei Kreuzreaktivitätstests. Die mittels Verdünnungsreihe bestimmte Nachweisgrenze der Methode lag bei 1 pg weißer Senf DNA/ μ l, dies entspricht 5 pg DNA von weißem Senf. Zur Validierung wurde die Methode zur Analyse von Modelllebensmitteln (Würsteln) herangezogen. Die Nachweisgrenze lag bei 10 mg weißer Senf/kg Würstel. Außerdem wurden kommerziell erhältliche Lebensmittel mit der Methode analysiert, wobei alle mit Senf gekennzeichneten Produkte einen positiven Nachweis ergaben und in einem von sieben nicht mit Senf gekennzeichneten Lebensmittel sowie in einem von vier Produkten, die Senf in Spuren enthalten können, dieser detektiert wurde. [Fuchs et al., 2010]

Husain et al. (2010) beschrieben die Entwicklung und Validierung eines indirekten kompetitiven ELISAs zur Detektion von Sesam in Lebensmitteln. Die Antikörper wurden nach dem Immunisieren von Hennen aus Hühnereidotter gewonnen. Die Methode wurde optimiert und im Anschluss auf auftretende Kreuzreaktivitäten untersucht. Von 13 getesteten Lebensmittelinhaltsstoffen zeigte Schokolade eine geringe Kreuzreaktivität. Es wurden Matrixeffekte festgestellt, weshalb in weiteren Versuchen die Proteinstandardlösungen stets durch Verdünnen des Sesamextrakts mit einem Extrakt der jeweiligen sesamfreien Matrix hergestellt wurden. Weiters wurden mit Sesamproteinen und mit Sesam gespickte Lebensmittel, bei unterschiedlichen Temperaturen gerösteter Sesam und 28 kommerziell erhältliche Lebensmittel analysiert. Die Nachweisgrenze lag bei 5 mg Sesamprotein/kg Lebensmittel in Knäkebrot, Cerealien und Snacks bzw. 11 mg/kg in frischem Brot. Die Bestimmungsgrenze lag bei 30 mg Sesamprotein/kg Lebensmittel bzw. 49 mg/kg. [Husain et al., 2010]

Redl et al. (2010) entwickelten einen Sandwich ELISA zur Detektion von Sesam in Lebensmitteln. Für den Nachweis wurden Hühner Antikörper und Kaninchen Antikörper durch Immunisieren mit Proteinextrakten hergestellt. Es wurden 19 Lebensmittelinhaltsstoffe, die häufig in sesamhaltigen Produkten verwendet werden, auf Kreuzreaktivität untersucht und dabei keine Kreuzreaktivität festgestellt. Zur Validierung wurden Vollkornbrot, Weißbrot, Toast und Snacks mit Sesamprotein und auch mit Sesamsamen gespickt und analysiert. Die Nachweisgrenze lag bei 0,5 mg Sesamprotein/kg in Vollkornbrot bzw. Toast und 0,3 mg Sesamprotein/kg Snacks. Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,6 mg Sesamprotein/kg Vollkornbrot, 0,8 mg/kg Toast und 1,4 mg/kg Snacks. [Redl et al., 2010]

2 Zielsetzung

In der westlichen Welt leidet ein immer größerer Anteil der Bevölkerung an Lebensmittelallergien. Diese werden damit zu einem nicht zu vernachlässigenden Gesundheitsproblem. Davon betroffene Menschen können sich nur schützen, indem sie die Allergie auslösenden Lebensmittel vollständig meiden. Dazu ist es nötig, dass Lebensmittel entsprechend gekennzeichnet werden. Dies ist insbesondere in Bezug auf versteckte Allergene, die durch Kontamination im Verarbeitungsprozess oder Transport auftreten können, und durch den Einfluss von Verarbeitungsprozessen auf die Allergenität bestimmter Lebensmittelbestandteile schwierig.

In der EU besteht die Kennzeichnungspflicht für 14 verschiedene Lebensmittelgruppen, die häufig zu Allergien führen. Die Richtlinie schreibt vor, dass diese Lebensmittelzutaten auch dann auf der Verpackung aufscheinen müssen, wenn sie in geringsten Spuren enthalten sein könnten, da die Schwellendosen für Lebensmittelallergene nicht bekannt sind. Um die richtige Kennzeichnung von Lebensmitteln auch überprüfen zu können, müssen spezifische und ausreichend sensitive Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Diese Methoden müssen ausreichend validiert und auf ihre Anwendbarkeit getestet sein.

Im Zuge dieser Diplomarbeit sollten spezifische Primer und Sonden für potentiell allergenen braunen Senf entworfen werden, um eine real time PCR Methode zum Nachweis dieser Senfart zu entwickeln. Die Methode sollte mit anderen, in Kombination mit Senf häufig auftretenden Lebensmittelzutaten, insbesondere mit anderen Kreuzblütengewächsen, auf Kreuzreaktivitäten getestet werden.

Weiters sollte die Anwendbarkeit von drei bereits in unserer Arbeitsgruppe entwickelten und publizierten Methoden zum Nachweis von Sesam, der ebenfalls zu den in der EU kennzeichnungspflichtigen Lebensmittelzutaten zählt, miteinander verglichen werden. Bei den Methoden handelt es sich um einen Nachweis auf DNA Ebene mittels real time PCR sowie auf Proteinebene mittels eines Sandwich ELISAs und eines kompetitiven ELISAs. Hierzu sollten einerseits kommerziell erhältliche Lebensmittel, die mit „Kann Spuren von Sesam enthalten“ gekennzeichnet sind, und andererseits Modelllebensmittel zur Analyse herangezogen werden. Die Untersuchung der kommerziellen Lebensmittel sollte zeigen, in wie vielen auf diese Art gekennzeichneten Lebensmitteln sich Sesam nachweisen lässt, um daraus Schlüsse über die Notwendigkeit der meist vorsorglichen Deklaration von allergenen Inhaltsstoffen ziehen zu können. Als Modelllebensmittel sollten Brote und Kekse mit bekannter Sesamkonzentration unter definierten Bedingungen hergestellt und Sesam unterschiedlich stark geröstet werden, um die Analysemethoden im Hinblick auf ihre Nachweisgrenzen und Wiederfindungen miteinander vergleichen zu können.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Polymerasekettenreaktion

3.1.1 Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro* DNA Amplifikation. Sie wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, wofür er 1993 den Nobelpreis erhielt. Dazu wird eine Doppelstrang DNA (dsDNA) denaturiert, und an die Einzelstränge werden passende Oligonukleotide angelagert, die den zu amplifizierenden Abschnitt der DNA begrenzen. Dies ist nur möglich, wenn die DNA Sequenz bekannt ist. Zur Strangsynthese wird außerdem noch das Enzym DNA Polymerase benötigt, welches den zweiten Strang, beginnend bei den spezifischen Oligonukleotiden, auch Primer genannt, aus freien Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) auf Grund ihrer 5'-3' DNA Polymeraseaktivität synthetisiert. Nach diesem Elongationsschritt ist ein Zyklus beendet und der nächste beginnt mit der Denaturierung. In der Theorie ergibt sich pro Zyklus eine Verdopplung der DNA Templatmoleküle und somit eine exponentielle Vermehrung, die in der Praxis jedoch meist nicht bzw. nur in einem bestimmten Bereich der Amplifizierung zu erreichen ist. So zeigt sich sowohl am Beginn einer PCR sowie nach einer gewissen Zyklenanzahl ein geringerer Vervielfachungsfaktor. Üblicherweise werden etwa 25 bis 40 Zyklen durchgeführt. Die dabei in ausreichender Menge amplifizierte Templat DNA kann im Anschluss analysiert werden. Dies erfolgt häufig mittels Agarosegelelektrophorese, wobei die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wird. Eine Quantifizierung kann dabei über einen externen oder internen Standard erfolgen oder man nutzt dazu die real time PCR (siehe Kapitel 3.1.4), bei der meist bis zu 50 Zyklen durchgeführt werden, dafür aber die anschließende Agarosegelelektrophorese entfallen kann. [Müller, 2001; Mülhardt, 2006; Brown, 2002]

3.1.2 Temperaturen der PCR Schritte

Sehr wichtig für den Mechanismus der PCR sind die Temperaturen der einzelnen Schritte. Diese müssen in einem Zyklus mehrmals verändert werden, wozu man ein passendes Gerät, einen Thermocycler, benötigt.

Die Denaturierung erfolgt bei 94-95 °C und sollte mit Ausnahme eines ersten, etwa 3-5 minütigen Denaturierungsschritts nur solange angehalten werden, dass eine vollständige Spaltung der dsDNA erfolgen kann, wofür einige Sekunden meist ausreichen. Längere Verweilzeiten bei dieser hohen Temperatur beeinflussen auf Dauer die Reaktionskomponenten negativ.

Im Schritt der Primeranlagerung, auch Annealingschritt genannt, muss die Temperatur so gewählt werden, dass eine optimale Hybridisierung ermöglicht wird. Zu hohe Temperaturen führen zu keiner Bindung und somit zu keiner Strangsynthese, während zu niedrige Temperaturen zu Fehlpaarungen und daraus resultierend zur Vervielfältigung anderer DNA Abschnitte und somit zur Bildung unspezifischer Produkte führen. Die richtige Annealingtemperatur sollte etwas unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen, welche über deren Nukleotidzusammensetzung abgeschätzt werden kann (vgl. Formel (1) und (2)). Diese Berechnung erfolgt direkt mit zum Primer Design entwickelten Programmen. Die optimale Annealingtemperatur wird nach dieser Abschätzung experimentell bestimmt. Dafür bieten sich besonders Geräte an, die einen Temperaturgradienten ermöglichen.

Für die DNA Synthese kann entweder die Temperatur des Annealingschritts beibehalten werden oder es wird eine Temperatur zwischen 70 und 74 °C gewählt, die im Bereich des Aktivitätsmaximums der Polymerasen liegt. [Müller, 2001; Brown, 2002]

Berechnung der Annealingtemperatur für Oligonukleotide bis 15 Basen

$$T_m = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T) \quad (1)$$

Berechnung der Annealingtemperatur für Oligonukleotide von 20 bis 70 Basen

$$T_m = 81,5 + 16,6 \left(\log[J^+] \right) + 0,4 (\% G + C) - (600/B) - 0,63 (\% FA) \quad (2)$$

A...Adenin, C...Cytosin, G...Guanin, T...Thymin (jeweils Anzahl dieser Basen), B... Anzahl der Basen

FA...Formamid, J^+ ...Konzentration monovalenter Kationen

3.1.3 Reaktionskomponenten

3.1.3.1 DNA Polymerasen

Ursprünglich musste die Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt wieder dem Reaktionsmix zugesetzt werden, da sie bei der hohen Temperatur ebenfalls denaturiert wurde. Als Lösung dieses Problems wurden Polymerasen aus hitzestabilen Bakterienstämmen isoliert. Daher kommen nun ausschließlich hitzestabile Polymerasen zum Einsatz. Im Folgenden sind einige Polymerasen näher beschrieben.

Taq Polymerase

Diese Polymerase stammt aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* und war die erste hitzestabile Polymerase, die isoliert wurde. Ihr Aktivitätsmaximum liegt bei 74 °C und pH > 8. Sie zeigt im Vergleich mit anderen üblichen Polymerasen die mit Abstand größte Syntheserate, weshalb sie oft bevorzugt eingesetzt wird. Außerdem verfügt das Enzym über eine 5'-3' Exonukleaseaktivität.

Pfu Polymerase

Die aus *Pyrococcus furosus* stammende Polymerase hat im Unterschied zur Taq Polymerase eine höhere Temperaturstabilität und verfügt neben der 5'-3' Exonukleaseaktivität auch über eine 3'-5' Exonukleaseaktivität. Dies ermöglicht einen Korrekturmechanismus, wodurch die Fehlerrate deutlich reduziert wird.

Tth Polymerase

Die Polymerase wird aus *Thermus thermophilus* Bakterien isoliert und zeigt im Unterschied zur Taq Polymerase eine hohe reverse Transkriptase Aktivität. Somit kann die Polymerase für die PCR und für die cDNA Synthese eingesetzt werden, woraus sich in reverse Transkriptase PCR Läufen anstatt der Verwendung zweier Enzyme, der Polymerase und der reversen Transkriptase, die Möglichkeit der Verwendung der Tth Polymerase ergibt.

[Mülhardt, 2006]

3.1.3.2 Puffer

Meist kommt ein Tris-HCl Puffer zum Einsatz, dessen pH-Wert aber relativ stark mit steigender Temperatur sinkt. Aus diesem Grund wird meist ein pH-Wert zwischen 8,55 und 9,0 verwendet, um auch bei höheren Temperaturen einen optimalen Wert für die Polymeraseaktivität zu gewährleisten. [Mülhardt, 2006]

3.1.3.3 Mg^{2+} - Ionen

Magnesiumionen werden zur DNA Synthese benötigt, da Nukleotide erst als Komplex mit diesen Ionen als Enzymsubstrat wirken können und die Polymeraseaktivität davon abhängt. Je nach Polymerase wird $MgCl_2$ oder $MgSO_4$ eingesetzt, wobei die Konzentration im Bereich von 1 bis 2,5 mM liegen sollte. Die nötige Konzentration hängt von der Konzentration anderer Reaktionskomponenten, wie der dNTPs, des freien bei der PCR gebildeten Pyrophosphats oder des vorliegenden EDTAs, ab, da diese freie Mg^{2+} - Ionen einfangen, und

kann bei schlechten PCR Ergebnissen ebenfalls optimiert werden. Sonst bieten sich fertig erhältliche PCR-Mixe mit bekannter Mg^{2+} - Ionen Konzentration sowie dNTP-Konzentration an. [Müller, 2001]

3.1.3.4 Nukleotide

Die vier dNTPs, Desoxyadenosintriphosphat, Desoxythymidintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat und Desoxycytidintriphosphat, bilden mit Mg^{2+} - Ionen das Substrat für die Polymerase. Bei der Verknüpfung einer Base mit ihrer komplementären Base gemäß der Basenpaarung Adenin (A) – Thymin (T) und Guanin (G) - Cytosin (C) werden Pyrophosphat und Wasser abgespalten. Die dNTPs sollten möglichst geringe Modifikationen aufweisen, um die DNA Vermehrung zu begünstigen. Die optimale Konzentration hängt von der Mg^{2+} - Ionen Konzentration, den Primern sowie der Amplifikatlänge und der PCR Zyklenzahl ab, wobei sich für Amplifikate bis 20 kb Länge eine Konzentration von 200 – 600 μM je Nukleotid empfiehlt. [Müller, 2001]

3.1.3.5 Primer

Die als Primer dienenden Oligonukleotide sollten neben ihrer Eigenschaft, das Amplifikat zu begrenzen, einige Kriterien erfüllen, was das Finden und Auswählen passender Primer zu einer nicht zu unterschätzenden Aufgabe macht. Die Primer sollten folgende Kriterien erfüllen:

Ein Primer sollte eine Länge von 12 bis 50 Basen haben.

Ein GC-Gehalt von 50-60 % sollte vorhanden sein.

Die Schmelztemperatur sollte zwischen 50 und 65 °C liegen.

Die Primer sollten keine 3' Komplementarität zeigen.

Primersequenzen sollten keine oder nur geringe Sekundärstrukturen aufweisen.

In der Sequenz sollen nicht mehr als drei Gs oder Cs hintereinander liegen.

Die Spezifität der Primer für das Templat sollte mittels des Basic Local Alignment Search Tool überprüft werden.

Das Amplikon sollte 75 bis 200 bp Länge haben, ebenfalls einen GC-Gehalt von 50-60 % aufweisen und möglichst keine Sekundärstruktur aufweisen.

Die Primerkonzentration sollte so hoch gewählt werden, dass eine gute Ausbeute erzielt wird, aber nicht zu hoch, da dies zu Fehlpaarungen führen kann. Die ideale Konzentration sollte bei der PCR Optimierung experimentell bestimmt werden. [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001]

3.1.3.6 PCR Beschleuniger

Als Zusätze, um die PCR Spezifität zu erhöhen und die PCR zu beschleunigen, kommen unter anderem Formamid, Dimethylsulfoxid, Tween-20 und Glycerin häufig zum Einsatz. Die Konzentration dieser Substanzen darf aber nicht zu hoch gewählt werden, da sie sonst im Gegenteil die PCR hemmen und somit als unerwünschte Inhibitoren wirken. [Müller, 2001]

3.1.3.7 DNA Lösung

Die eingesetzte Lösung sollte eine gute Reinheit aufweisen, sonst muss eine Aufreinigung noch vor der PCR stattfinden. Die eingesetzte Menge kann von 10 fg DNA bis 200 ng DNA reichen. Es sollte aber darauf geachtet werden, dass keine Inhibitoren, wie z.B. EDTA, in der Probelösung enthalten sind und die Lösung nicht ungewollt mit Templat DNA kontaminiert ist. [Müller, 2001]

3.1.4 Real time PCR

Im Gegensatz zur PCR, bei der die Detektion erst nach der Reaktion meist mittels Agarosegelelektrophorese erfolgt, kann die gebildete Produktmenge bei der real time PCR in

Echtzeit mitverfolgt werden. Dies wird durch fluoreszierende Moleküle, sogenannte Sonden, ermöglicht. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist proportional der Amplifikatmenge und kann unter Verwendung eines Thermocyclers mit Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzdetektionseinheit in jedem Zyklus gemessen werden. Die Detektion erfolgt nach Anregung bei passender Wellenlänge bei höherwelligeren Emissionswellenlängen, die je nach Fluorophor variieren. Somit erhält man während der PCR Signalkurven, die zur Auswertung herangezogen werden können, und benötigt keine Gelelektrophorese im Anschluss an die Reaktion. Daraus ergeben sich die Vorteile der Zeitersparnis und Kontaminationsreduktion bei der Messung durch abgeschlossene Systeme. Bei der real time PCR kann sowohl eine rein qualitative als auch eine quantitative Analyse mit guter Genauigkeit durchgeführt werden. Ob die PCR wie gewünscht verläuft und keine Kontaminationen vorliegen, kann während der Messung durch Ansatz einer Positivkontrolle (PC), die nur das gewünschte Templat als Probelösung enthält, und einer Negativkontrolle (NC), die anstatt einer DNA Lösung nur Wasser enthält, mitverfolgt werden. Um eine real time PCR durchführen zu können, braucht man neben der instrumentellen Ausstattung auch ein geeignetes Fluorophor. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten, die Verwendung eines mit dsDNA interkalierenden Farbstoffs oder den Einsatz eines sequenzspezifischen, mit einem Fluorophor gekoppelten Oligonukleotides. Dabei wird oft das Prinzip der Fluoreszenzquenchung genutzt, um ein für die Amplifikatmenge spezifisches Signal erst zu ermöglichen. Eine Übersicht über die möglichen Varianten von Sonden und ihre Funktionsmechanismen gibt das folgende Kapitel. [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001]

3.1.5 Detektionsmöglichkeiten

3.1.5.1 DNA Interkalatoren

Interkalatoren, wie Sybr Green I oder Eva Green, sind kleine Moleküle, die in dsDNA eingebaut werden können. Gebunden zeigen sie andere Eigenschaften und ermöglichen eine Detektion, wobei in jedes DNA Molekül mehrere Moleküle eingelagert werden können. Dies resultiert in einer hohen Signalstärke.

Sybr Green I

Sybr Green kann als unspezifische Markerverbindung verwendet werden. Ungebunden zeigt es eine geringe Fluoreszenz bei der Anregung. In Gegenwart von dsDNA lagert es sich in diese ein und durch die Bindung wird das Fluoreszenzsignal stark erhöht. Somit ist das Fluoreszenzsignal ein Maß für die Menge an Doppelstrang DNA. Während eines PCR Laufs steigt die DNA Menge durch Amplifikation und somit auch das Fluoreszenzsignal. Ein Vorteil dieses Fluorophors ist, dass er universell einsetzbar und preiswerter ist als andere Sonden. Durch die unspezifische Bindung ergibt sich aber ein großer Nachteil: ein Fluoreszenzsignal kann auch durch Primerdimerbildung oder unspezifische, für den Nachweis unerwünschte Nebenprodukte auftreten, da jegliche dsDNA zu einem Signal führt. Somit kann ein hohes Fluoreszenzsignal nicht gleichzeitig als positiver Nachweis gewertet werden, es sei denn, die Primer sind absolut spezifisch, Primerdimere werden nicht gebildet und es kommt zu keiner Fehlpaarung. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, oder die Spezifität bei der Entwicklung der Methode zu überprüfen, bietet eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird die Temperatur im Thermocycler schrittweise erhöht und die Abnahme des Fluoreszenzsignals auf Grund der Spaltung der dsDNA verfolgt. Primerdimere und verschieden lange, beziehungsweise unterschiedlich zusammengesetzte DNA Stränge, schmelzen bei unterschiedlichen Temperaturen. In einem Diagramm der ersten Ableitung der Signalkurve gegen die Temperatur sind bei den Schmelztemperaturen Peaks erkennbar. Trotz dieser Möglichkeit der Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten, die mitunter nicht ausreicht, ist es nötig, auch noch spezifische Marker einsetzen zu können.

Insbesondere für Multiplex Analysen, bei denen verschiedene DNA Template durch mehrere Primerpaare gleichzeitig in einem PCR Lauf amplifiziert und detektiert werden sollen, ist dies unumgänglich, da sonst zwischen Einzelsignalen nicht unterschieden werden kann. [BioRad Laboratories, 2006]

Tabelle 3.1 Anregungs- und Emissionswellenlänge von Sybr Green I [aus Müller, 2001]

Fluorophor	Anregungswellenlänge (nm)	Emissionswellenlänge (nm)
Sybr Green I	488	520

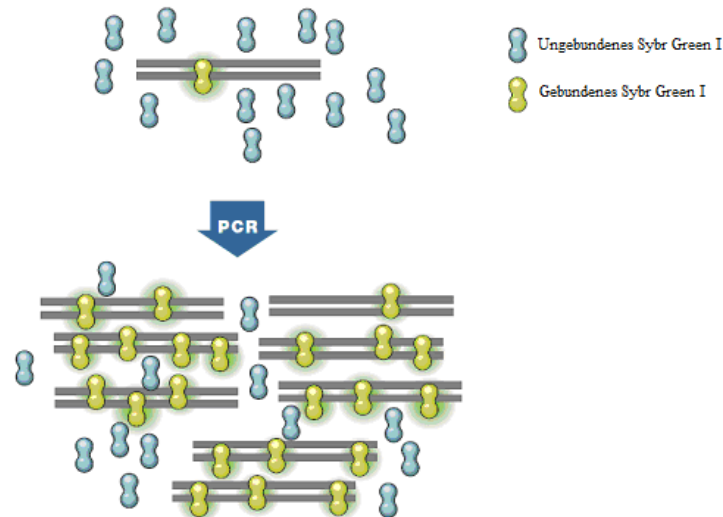


Abbildung 3.1 Sybr Green Assay – stark ansteigendes Fluoreszenzsignal durch Amplifikation [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

3.1.5.2 Templat spezifische Oligonukleotidsonden

3.1.5.2.1 Taq Man Sonde

Das Konzept der Taq Man Sonde ist eine der am häufigsten eingesetzten spezifischen Fluoreszenzmethoden. Wie bei allen anderen Sondenarten handelt es sich um ein spezifisches Oligonukleotid, welches mit einem Fluorophor markiert ist, dessen Fluoreszenz auf eine gewisse Art gequencht wird, sodass das Fluoreszenzsignal nur durch Aufhebung des Quenchmechanismus durch Anwesenheit des DNA Templates auftritt. Mögliche Fluorophore und passende Quencher sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3.2 angeführt. Bei der Taq Man Sonde hat das Oligonukleotid eine komplementäre Sequenz zu einem Teilstück des zu amplifizierenden DNA Stranges. An seinem 5' Ende ist die Sonde mit einem Fluorophor und am 3' Ende mit einem Quencher Molekül markiert. Solange die Sonde intakt vorliegt, wird auf Grund der Nähe des Quenchers trotz Anregung des Fluorophors keine Fluoreszenz gemessen. Im Annealingschritt hybridisiert außer den Primern auch die Sonde an den passenden DNA Einzelstrangabschnitt. Die Polymerase, die über eine 5' Exonukleaseaktivität verfügen muss, stößt bei der Strangsynthese auf das 5' Ende der Sonde und baut diese ab. Dadurch werden Fluorophor und Quencher getrennt. Dies wiederum führt zu einem Fluoreszenzsignal, welches die DNA Menge widerspiegelt. Die großen Vorteile einer Taq Man Sonde oder auch anderer Sonden beruhen auf der Spezifität und der Möglichkeit der Multiplex Analyse durch Wahl verschiedener Fluorophore für die Sonden. Nachteile gegenüber Sybr Green sind die höheren Kosten und der Design Aufwand. Bei der Wahl der Primer muss auch die Sonde bereits in die Überlegungen miteinbezogen werden, da diese auf

dem durch die Primer begrenzten DNA Teilstück liegen muss. Zudem muss sie folgende Kriterien erfüllen:

Die Schmelztemperatur sollte um 5 bis 10 °C höher sein als jene der Primer.

Die Sonde sollte eine Länge von weniger als 30 Nukleotiden haben.

Die Sequenz sollte einen GC-Gehalt von 30-80 % aufweisen.

Es wird bevorzugt jener Strang gewählt, welcher mehr Cs als Gs aufweist.

Am 5' Ende sollte kein G liegen, da dieses als Fluoreszenzquencher wirken kann.

[BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001]

Tabelle 3.2 Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie mögliche Fluoreszenzquencher einiger Fluorophore
[zusammengestellt aus BioRad Laboratories, 2006 und Müller, 2001]

Fluorophor	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- wellenlänge (nm)	Mögliche Quencher
FAM	488	518	BHQ1
HEX	466	556	BHQ1, BHQ2
Cy 5	649	670	BHQ2, BHQ3

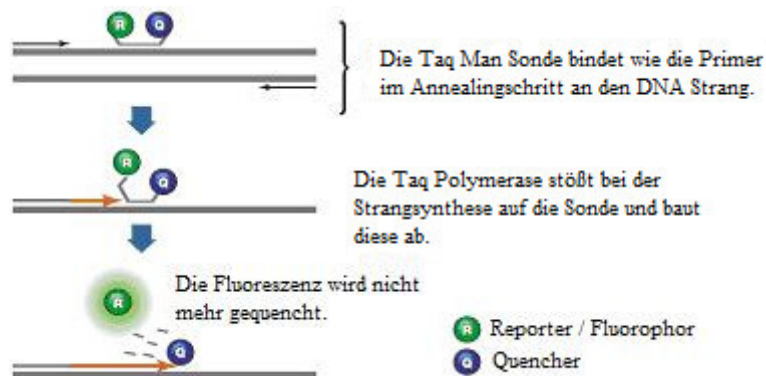


Abbildung 3.2 Prinzip einer Taq Man PCR [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

3.1.5.2.2 Weitere Varianten von Sonden

Molecular Beacons

Molecular Beacons sind wie Taq Man Sonden spezifische Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluorophor und am 3' Ende mit einem Quencher markiert sind. Die Oligonukleotide bilden eine stabile Haarnadelstruktur aus, die auf Grund von fünf bis sechs komplementären Nukleotiden an den beiden Enden zusammengehalten wird. Durch diese Sekundärstruktur wird auch die Nähe zwischen Fluorophor und Quencher bewirkt, sodass keine Fluoreszenz messbar ist, solange die Sonde ungebunden in dieser Struktur vorliegt. Bei der Bindung an den DNA Strang geht die Sekundärstruktur der Sonde verloren und die Fluoreszenz wird nicht mehr gequencht. Im Elongationsschritt wird die Sonde von der DNA abgespalten, sie bleibt aber intakt, da Polymerasen ohne 5' Exonukleaseaktivität zum Einsatz kommen. Die Sonde bildet wieder die stabile Haarnadelstruktur aus und die Fluoreszenz wird gequencht. Das Fluoreszenzsignal kann daher nur im Annealingschritt gemessen werden und steigt mit der Menge an amplifizierter DNA. Ein großer Vorteil der Molecular Beacon Sonde ist, dass die Haarnadelstruktur nur bei exakt passender Sequenz aufgeht und eine Hybridisierung an den DNA Strang ermöglicht. [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001]

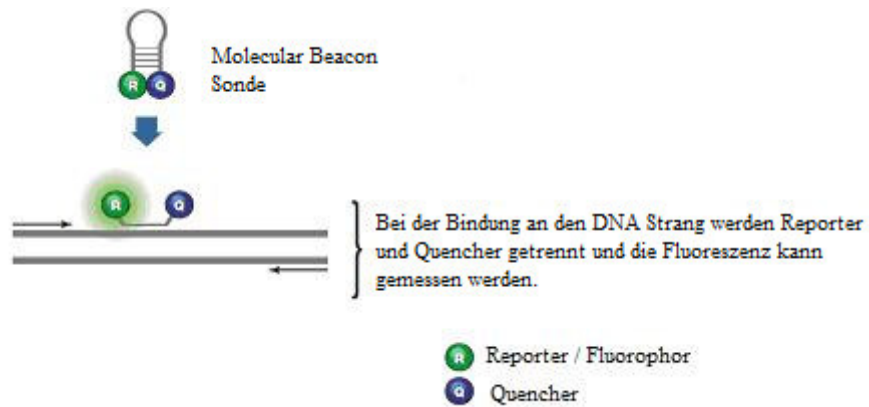


Abbildung 3.3 Prinzip einer Molecular Beacon Sonde [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]



Abbildung 3.4 Prinzip einer Molecular Beacon Sonde an Hand eines Beispiels [Müller, 2001]

Hybridization probe

Bei dieser Variante kommen zwei spezifische Oligonukleotide, die an benachbarte DNA Sequenzen mit einem Abstand von ein bis fünf Nukleotiden binden, zum Einsatz. Die Oligonukleotide sind beide mit Fluorophoren markiert, wobei das Emissionsspektrum des ersten, am 3' Ende des Oligonukleotides gebundenen, mit dem Anregungsspektrum des zweiten, am 5' Ende des anderen Oligonukleotides gebundenen, überlappen muss. Solange die Sondenteile ungebunden sind, wird Fluoreszenz des angeregten ersten Fluorophors ausgesandt, aber nicht als Signal aufgezeichnet, da bei einer Wellenlänge des Emissionsspektrums des zweiten Fluorophors gemessen wird. Bei der Bindung an die DNA kommen die Fluorophore in räumliche Nähe und somit wird das zweite Fluorophor über den Mechanismus des Fluoreszenzresonanzenergietransfers angeregt. Dies führt zu einem Signal, das proportional zur Amplikonmenge ist. Im Elongationsschritt werden die Sonden vom DNA Strang verdrängt bzw. abgebaut. [BioRad Laboratories, 2006]

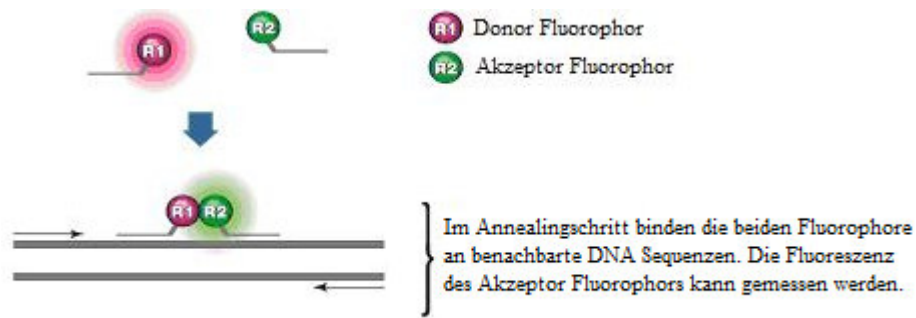


Abbildung 3.5 Prinzip einer Hybridization probe [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

Eclipse probe

Das spezifische Oligonukleotid wird am 3' Ende mit einem Fluorophor und am 5' Ende mit einem Quencher und einem „Minor groove“ (kleine Furche der DNA) Binder (MGB) versehen. In ungebundener Form wird die Fluoreszenz auf Grund der Konformation der Sonde gequencht. Im Annealingschritt wird die Sonde mittels des MGB an die DNA gebunden. Die damit einhergehende Konformationsänderung führt zu einer Trennung des Fluorophors vom Quencher und somit zu einem Fluoreszenzsignal. [BioRad Laboratories, 2006]

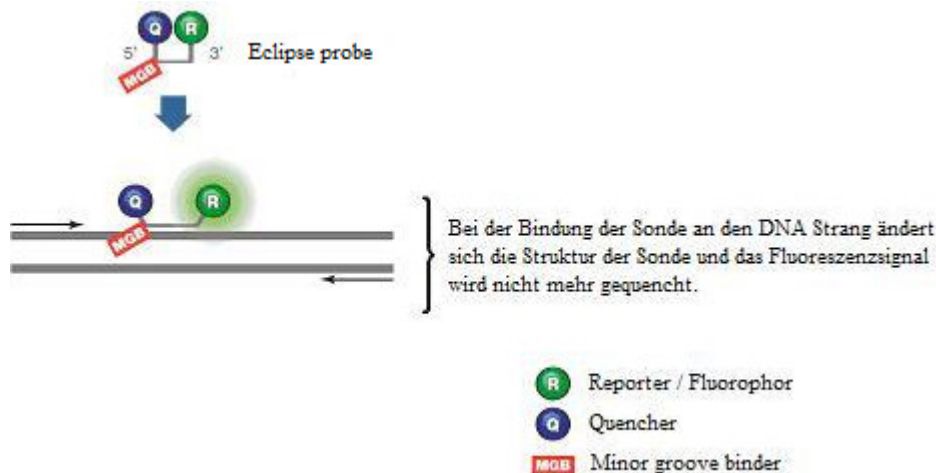


Abbildung 3.6 Prinzip einer Eclipse probe [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

Amplifluor primer

In dieser Methode kommt ein universeller Primer, Uni Primer, zum Einsatz. Außerdem muss einer der spezifischen Primer am 5' Ende über eine bestimmte Sequenz, Z-Sequenz genannt, verfügen, die mit jener am 3' Ende des Uni Primers übereinstimmt. Der Uni Primer selbst ist ähnlich aufgebaut wie eine Molecular Beacon Sonde mit einer stabilen Haarnadelstruktur, an deren 5' Ende ein Fluorophor und am 3' Ende ein Quencher gebunden sind. Im ersten PCR Zyklus bindet der Primer mit Z-Struktur und wird erweitert, wodurch im 2. Zyklus mit Hilfe des anderen spezifischen Primers ein komplementärer Strang, der auch die Komplementärsequenz der Z-Struktur enthält, geschaffen wird. Dies ermöglicht im nächsten Zyklus eine Bindung des Uni Primers, der dann verlängert wird. Im darauffolgenden Zyklus wird der Komplementärstrang zum verlängerten Uni Primer synthetisiert, wobei die Haarnadelstruktur geöffnet wird und die bisher gequenchte Fluoreszenz gemessen werden kann. Diese steigt mit der Menge des Amplifikats. [BioRad Laboratories, 2006]

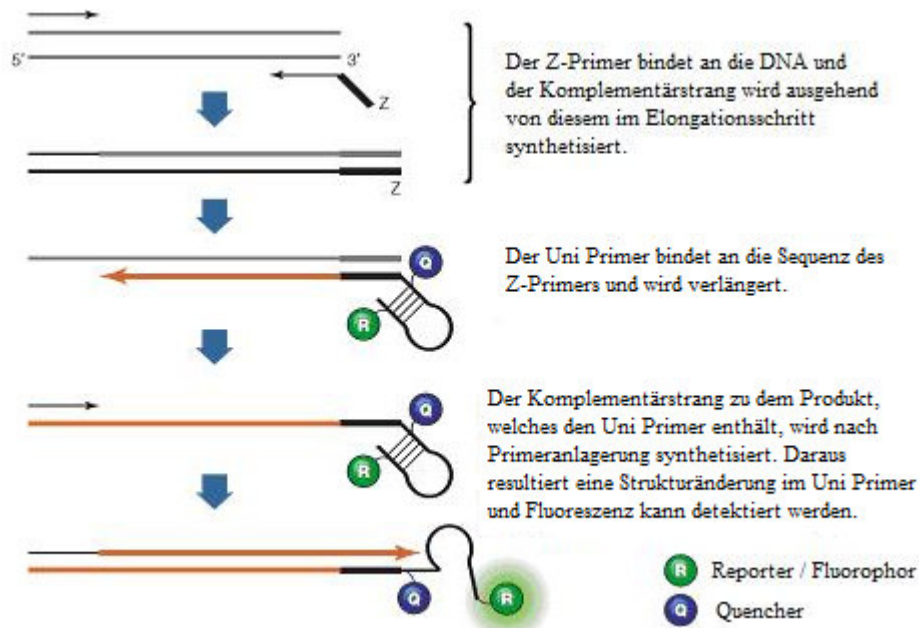


Abbildung 3.7 Prinzip eines Amplifluor Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

Scorpions primer

Es werden nur zwei Primer benötigt, da ein Primer gleichzeitig als Sonde fungiert. Dafür verfügt er über eine stabile Haarnadelstruktur mit einem Fluorophor am 5' Ende und einem Quencher am 3' Ende, wobei die Haarnadelsequenz komplementär zu einem Stück des Amplikons sein muss. Außerdem enthält die Sonde ein PCR Blockermolekül am 3' Ende des Quenchers, um eine Synthese des Komplementärstranges vom 3' Primer aus durch die Polymerase über dieses hinaus zu verhindern. Im ersten Zyklus wird die Sondensequenz verlängert. Auf dem geschaffenen Strang befindet sich nun die Komplementärsequenz der Haarnadelschleife. In der nächsten Annealingphase bindet der Scorpions Primer intra-molekular. Die damit einhergehende Trennung des Fluorophors und Quenchers führt zu einem Fluoreszenzsignal proportional zur Amplifikatmenge. [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001]

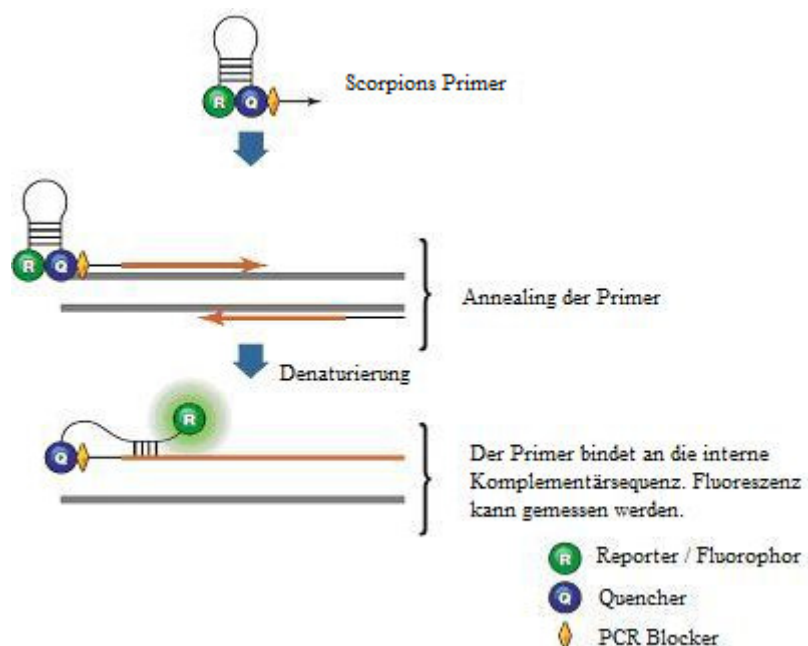


Abbildung 3.8 Prinzip eines Scorpions Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

LUX Primer

Bei dieser Variante dient ebenfalls einer der Primer als Sonde. Er trägt ein Fluorophor nahe dem 3' Ende und verfügt über eine Haarnadelstruktur. Die Sekundärstruktur wirkt dabei als Fluoreszenzquencher. Nach der Bindung an den DNA Strang und erfolgter Verlängerung kann das Fluoreszenzsignal des in die dsDNA eingebauten Fluorophors gemessen werden. [BioRad Laboratories, 2006]

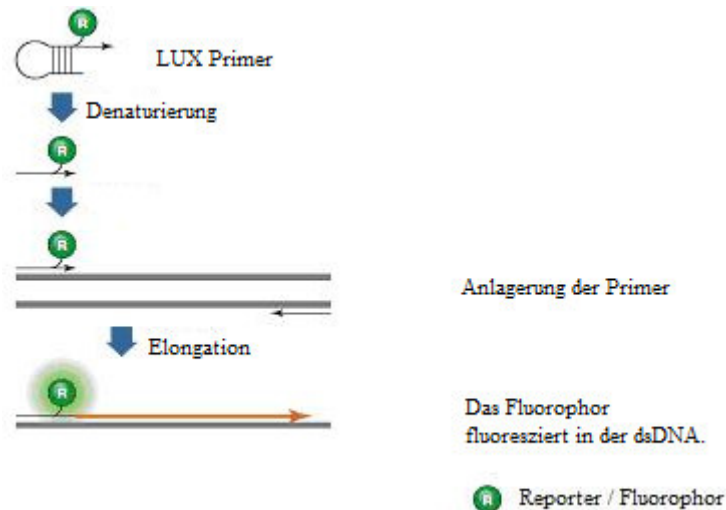


Abbildung 3.9 Prinzip eines LUX Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

BD QZyme

Neben den Primern, von denen einer über eine zymogene Verlängerung, die für katalytische DNA kodiert, verfügen muss, wird ein universelles Oligonukleotid mit Fluorophor an seinem 5' Ende und Quencher am 3' Ende benötigt. Im ersten Zyklus der PCR bindet der zymogene Primer und wird verlängert. Im zweiten Zyklus wird die dazu komplementäre Sequenz mit der katalytischen DNA Region geschaffen, an welche das markierte Oligonukleotid bindet und gespalten wird. Daraus resultiert eine Trennung des Fluorophors und Quenchers und somit ein Fluoreszenzsignal, das mit der Menge an Amplifikat steigt. [BioRad Laboratories, 2006]

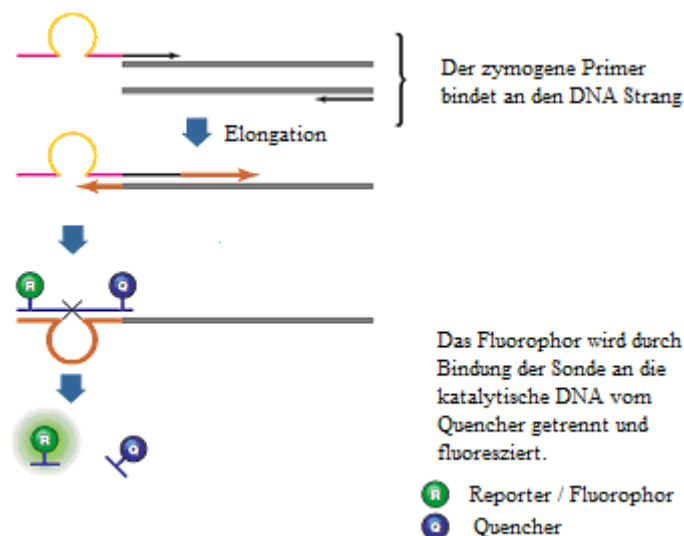


Abbildung 3.10 Prinzip einer PCR unter Verwendung eines zymogenen Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]

3.1.6 Auswertung

Die Signalkurve eines real time PCR Experiments zeigt eine exponentielle Phase, in der die DNA Menge sich in jedem Zyklus verdoppelt, und eine Plateau Phase, in der die Kurve abflacht. Diese Reaktionsverlangsamung wird durch die limitiert vorhandene Reagenzienmenge, die steigende Menge an hindernden Pyrophosphaten oder gewünschten DNA Amplikons, welche zu häufigeren Fehlhybridisierungen führen, und die durch die häufigen Temperaturänderungen abgenützte Polymerase herbeigeführt.

Die ersten Zyklen werden meist auch aus der exponentiellen Phase ausgeschlossen, da auf Grund geringer Templatmenge die Wahrscheinlichkeit, dass sich Primer, Polymerase und Templat treffen und die Reaktion wie in der Theorie abläuft, noch gering ist. Außerdem wird in den ersten Zyklen das zur Produktmenge proportionale Fluoreszenzsignal von einem gewissen Grundsignal überlagert.

Der Zyklus, in dem das Hintergrundfluoreszenzsignal überschritten wird, wird als Threshold cycle, c_t , bezeichnet. Dieser c_t -Wert hängt von der ursprünglich vorliegenden Templat Menge ab. Liegt am Beginn der PCR viel Templat in der Probe vor, wird die Fluoreszenz früher über den Grundwert steigen und somit erhält man einen niedrigen oder auch frühen c_t -Wert. Bei wenig vorliegendem Templat wird dieser Wert bei gleichen Reaktionsbedingungen dementsprechend höher sein und auch als später c_t bezeichnet. Die Betrachtung des c_t -Wertes ermöglicht zusätzlich zur qualitativen Aussage, Signal über der Hintergrundfluoreszenz oder nicht, auch bereits eine halbquantitative Aussage. In der Theorie ergäbe sich, bei bekannter Verdopplungsrate, auch bereits eine quantitative Aussage. In der Praxis ist die Erstellung einer Kalibrierfunktion nötig. Dabei wird der c_t -Wert gegen den Logarithmus der DNA Menge oder Konzentration von Standardlösungen aufgetragen. Mit Hilfe der dabei erhaltenen Kalibriergeraden kann auf die DNA Menge bzw. Konzentration unbekannter Proben rückgerechnet werden. In Abbildung 3.11 ist das Fluoreszenzsignal einer Positiv- und einer Negativkontrolle zu sehen. Das Fluoreszenzsignal der Positivkontrolle steigt über das Grundsignal, das durch die Threshold Linie begrenzt wird. [BioRad Laboratories, 2006; Mülhardt, 2006]

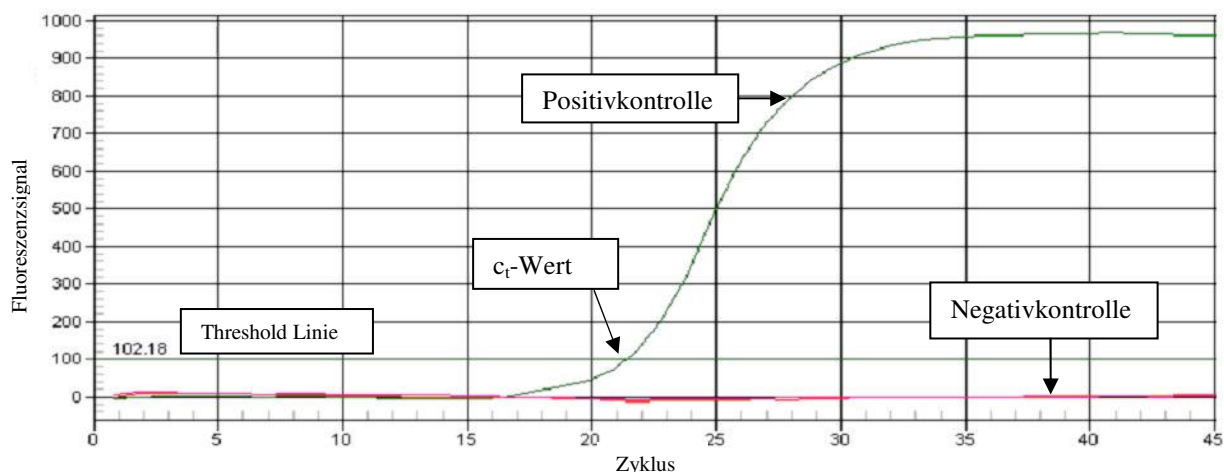


Abbildung 3.11 Positivkontrolle und Negativkontrolle eines PCR Laufs

3.1.6.1 Wichtige Parameter

Korrelationskoeffizient r bzw. R^2

Der Koeffizient ist ein Maß dafür, wie genau die experimentellen Daten sich durch lineare Regression beschreiben lassen. Idealerweise würde er den Wert 1 erreichen. Experimentell sollte $r > 0,990$ bzw. $R^2 > 0,980$ gelten, um die Linearität und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen für die Auswertung gewährleisten zu können.

Amplifikationseffizienz

Die Effizienz E einer PCR Reaktion wird mit Hilfe der Steigung k der Kalibriergerade nach Formel (3) berechnet. Idealerweise ergibt sich eine Effizienz von 2 durch Verdopplung der Produktmenge je Zyklus. Unter Berücksichtigung dieses theoretisch idealen Falles, der 100 % Effizienz entspricht, kann die Amplifikationseffizienz für jede PCR auch in Prozent nach Formel (4) angegeben werden.

$$E = 10^{-1/k} \quad (3)$$

$$E_{\%} = (E-1) \cdot 100 \% \quad (4)$$

[BioRad Laboratories, 2006]

3.2 Immunoassays

Der Ursprung der Immunoassays liegt in einem 1959 von Yalow & Berson entwickelten Assay, in dem ein radioaktiv markiertes Antigen zum Einsatz kam, weshalb diese Art Assay auch als Radioimmunoassay bekannt wurde. Es wurden eine Vielzahl von verschiedenen Assaytypen (siehe Kapitel 1.3.5) entwickelt, die alle eine Gemeinsamkeit haben – die Ausnutzung der spezifischen Wechselwirkung zwischen Antigen (AG) und Antikörper (AK). [Clifford, 1985]

3.2.1 Antikörper

3.2.1.1 Aufbau und Bindung

Antikörper sind lösliche Immunglobuline (Ig) und zählen zu den Glykoproteinen. Es können fünf Hauptklassen unterschieden werden: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Diese Einteilung erfolgt auf Grund der verschiedenen Struktur. Außerdem kommen diesen Antikörperklassen verschiedene Funktionen zu. Im Folgenden ist der Aufbau des IgG näher erläutert. Durch Untersuchung des AKs mit reduzierendem 2-Mercaptoethanol unter Harnstoffzugabe und andererseits Fragmentierung durch Proteasen (Papain, Pepsin) konnte die Struktur des IgG aufgeklärt werden. Der Antikörper besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten. Die Bezeichnung wurde so gewählt, da es sich um Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa bzw. 50 bis 70 kDa handelt. Die Ketten sind über kovalente Disulfidbrücken zwischen Cystein-Resten verbunden. Auf Grund der entstehenden Form werden AK in schematischen Abbildungen meist mit einem „Y“-förmigen Symbol bezeichnet.

Die Ketten lassen sich in Untereinheiten, Domänen, unterteilen, wobei manche Domänen konstant bleiben, während andere in ihrer Aminosäuresequenz variieren. Man unterscheidet somit konstante und variable Domänen. Eine schwere Kette des IgG besteht aus drei konstanten und einer variablen Domäne und eine leichte Kette aus je einer konstanten und variablen Domäne. In den variablen Domänen gibt es je drei Segmente mit nochmals erhöhter Variabilität. Diese hypervariablen Regionen einer schweren und einer leichten Kette bilden ein Paratop. Ein IgG Molekül verfügt über zwei Paratope. Der schematische Aufbau eines IgG Moleküls ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

Paratope können passende Antigene bzw. bestimmte Regionen dieser Proteine binden. Die Bindungsstellen eines Antigens werden Epitope genannt. Diese Bindung basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen, Van-der-Waals Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen. Obwohl keine kovalente Bindung ausgebildet wird, ist die Antigen-Antikörper Bindung auf Grund der Vielzahl der Wechselwirkungen sehr stark. Da nur passende Epitope zu einer Bindung des AKs führen, ist die Bindung spezifisch und eignet sich daher hervorragend für Analysenzwecke. [Aigner und Neumann, 1997 ; Luttmann et al., 2004 ; Raem et al., 2007]

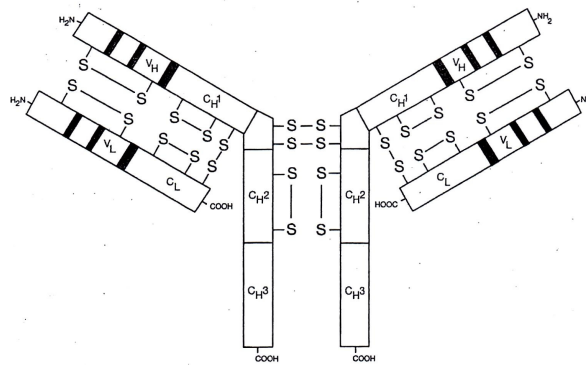


Abbildung 3.12 Schematische Struktur eines IgG Moleküls [Aigner und Neumann, 1997]

3.2.1.2 Antikörperherstellung

Für den Einsatz in Analysemethoden müssen AK in ausreichender Menge hergestellt werden. Die Gewinnung von AK ist verschieden, je nachdem, ob man polyklonale oder monoklonale AK einsetzen will, wobei dies von der Anwendung abhängt. Bei polyklonalen Antikörpern handelt es sich um eine AK-Mischung. Diese verschiedenen AK können, aber müssen nicht gegen das gleiche Epitop gerichtet sein, aber sie erkennen alle eine bestimmte Substanz. Monoklonale AK stammen von demselben B-Zell Klon. Sie erkennen daher alle das gleiche Epitop eines Antigens. Alternativ können AK gentechnologisch hergestellt werden. Dann spricht man von rekombinanten AK. In dieser Diplomarbeit kamen polyklonale AK zum Einsatz, weshalb deren Herstellung im Folgenden eingehender beschrieben wird.

Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Gewinnung polyklonaler AK erfolgt durch Immunisierung einer Tierspezies, wobei häufig Kaninchen, Mäuse, Hühner, Ziegen oder Schafe verwendet werden. Um eine Immunantwort des Organismus hervorzurufen, wird dem Tier ein Antigen injiziert. Meist handelt es sich bei dem Antigen um Proteine, es sind aber auch Peptide möglich. Das Antigen sollte in ausreichend reiner Form vorliegen, sodass eine spezifische AK-Herstellung gewährleistet wird. Im Falle eines Proteins ist somit die vorherige Reinigung ein wichtiger Schritt. Beim Einsatz von synthetischen Peptiden ist die Reinheit gewährleistet, dafür muss berücksichtigt werden, dass die Immunogenität meist geringer ist als die von Proteinen, womit die zur Immunisierung nötige Antigenmenge höher ist. Außerdem kann die Spezifität des gegen Peptide gerichteten AK für den Einsatz bei Proteinen bei zu kurzer Peptidlänge verloren gehen. Der AK erkennt dann verschiedene Proteine, die alle die Peptidsequenz enthalten.

Nach Wahl des Antigens wird dieses meist mit einem Adjuvans, das eine Immunantwort provozieren soll, dem Tier in bestimmter Menge injiziert. Dieser Primärimmunisierung, bei der im Organismus vorwiegend IgM gebildet werden, folgt im Abstand von ein paar Wochen eine weitere Immunisierung. Die Immunantwort verläuft schneller und es werden vorwiegend IgG gebildet. Diese Booster Immunisierung wird meist mit weniger Antigen durchgeführt und kann auch ohne Adjuvans erfolgen. Danach wird dem Tier Blut abgenommen, wobei sich die AK in der Serumphase befinden. Oft wird regelmäßig Blut entnommen, um dieses auf spezifische AK hin zu untersuchen, und bei nicht ausreichender oder keiner AK-Bildung das Tier einer weiteren Booster Immunisierung unterzogen. Hat man Blut mit ausreichender AK-Menge erhalten, so wird das Serum daraus gewonnen.

Das polyklonale Antiserum kann eventuell weiter aufgereinigt werden, um möglichst standardisierte AK (IgG) zu erhalten. Im Fall von Hühnern werden die AK aus dem Eidotter

isoliert. Man erhält eine IgY Fraktion (Y von yolk – Dotter). [Aigner und Neumann, 1997 ; Luttmann et al., 2004]

3.2.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Bei einem ELISA wird die spezifische Bindung zwischen AG und AK genutzt und mit einer enzymatischen Reaktion zur Auswertung kombiniert. Enzymimmunoassays zählen zu den heterogenen Immunoassays. Bei dieser Art Immunoassay muss die gebundene Fraktion des Analyten von der ungebundenen noch vor der Messung getrennt werden. Dies wäre bei einem homogenen Immunoassay nicht nötig. Es werden zwei Verfahren unterschieden, der kompetitive Enzymimmunoassay und der Sandwichassay, bei dem es sich um einen nicht kompetitiven Assay handelt. Beim kompetitiven ELISA findet eine Konkurrenzreaktion zwischen Analyt-AG und enzymmarkiertem Standard-AG statt, da die AK im Überschuss zugegeben werden. Nach Abtrennung der ungebundenen AG kann eine Enzymreaktion, die ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt, zum Nachweis dienen. Das Messsignal ist bei dieser Methode indirekt proportional zur Analytkonzentration. Im Gegensatz dazu werden die Analyt-AG im Sandwich ELISA in zwei Schritten zwischen zwei spezifischen AK gebunden, wobei der zweite mit einem Enzym markiert ist. Der Nachweis des Analyten erfolgt ebenfalls über eine enzymatische Reaktion, wobei das Messsignal in diesem Fall im direkten Verhältnis zur Analytkonzentration steht. Statt für den Einsatz spezielle AG bzw. AK mit einem Enzym zu markieren, kann auch eine indirekte Methode gewählt werden. Dabei kommen enzymmarkierte AK, die gegen eine Tierspezies und somit gegen die eingesetzten AK gerichtet sind, zum Einsatz. Diese bieten den Vorteil, kommerziell erhältlich zu sein und müssen nicht für eine konkrete Anwendung hergestellt werden. [Aigner und Neumann, 1997]

3.2.2.1 Enzyme

Als Markerenzyme werden oft die Meerrettich Peroxidase, die alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm und die β -Galaktosidase aus *Escherichia coli* verwendet. Diese drei Enzyme erfüllen für den Einsatz in Immunoassays wichtige Kriterien. Sie wandeln Substrate spezifisch in leicht detektierbare, meist farbige, stabile Produkte um, lassen sich gut an AK binden, wobei die Konjugate stabil gelagert werden können, und sind in genügender Menge gereinigt verfügbar. Bei der Wahl des Markerenzym spielt die Überlegung möglicher aktivitätshemmender Verbindungen eine Rolle. So sollte bei Verwendung der alkalischen Phosphatase der Einsatz von Chelatbildnern vermieden werden, da diese für ihre Aktivität freie Zink- und Magnesiumionen benötigt. Azide wiederum hemmen die Peroxidaseaktivität oder können Kopplungsreaktionen negativ beeinflussen. Die Bindung der Enzyme an AK oder AG ist im Folgenden für die anfangs erwähnten drei Enzyme beschrieben.

Meerrettich Peroxidase

Die Peroxidase wird aus Meerrettich isoliert. Sie hat einen Kohlenhydratanteil von mehr als 20 % und eine niedrige Molekularmasse von ca. 44 kDa. Aus diesen Gründen wird zur Bindung die Periodat Methode herangezogen. Die Kopplung erfolgt durch Reaktion der Aminogruppe des AK oder AG bei pH~9,5 mit Aldehydgruppen der Peroxidase, die durch Oxidation der Kohlenhydratreste mit Periodat gebildet wurden. Die entstehenden Schiffschen Basen werden mit Natriumborhydrid zu sekundären Aminen reduziert. Die so hergestellten Konjugate können nach chromatographischer Reinigung in Kaliumphosphatpuffer mit BSA bei Temperaturen $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Alkalische Phosphatase

Das Enzym mit einer Molekularmasse von ca. 140 kDa wird aus Kälberdarm isoliert. Als Kopplungsreagenz wird Glutardialdehyd eingesetzt, dessen zwei Aldehydgruppen bei pH~6,8

jeweils mit freien Aminogruppen von AK bzw. AG und Enzym reagieren. Die Reaktion kann in einem Schritt durchgeführt werden oder aus Gründen der Kontrollierbarkeit in zwei Schritten. Nach chromatographischer Reinigung werden die Konjugate bei 4 °C in Tris/HCl Puffer gelagert.

β -Galaktosidase

Die aus *Escherichia coli* stammende β -Galaktosidase hat ein Gesamtmolekulargewicht von 445,2 kDa und verfügt über mehrere freie Thiolgruppen, die im leicht sauren bis neutralen Milieu mit Maleinimidgruppen Thioether bilden. Somit muss zur Verknüpfung des Enzyms mit einem AK oder AG diesem zuvor eine Maleinimidgruppe eingeführt werden. Dies erfolgt durch Reaktion einer freien Aminogruppe des Proteins mit einer aktivierten Esterverbindung des Maleinimids. Die Lagerung des Konjugats erfolgt nach chromatographischer Reinigung bei -20 °C in Natriumphosphatpuffer mit Bovinem Serum Albumin (BSA) und Natriumazid. [Luttmann et al., 2004]

3.2.2.2 Substrate

Als Substrat für obige drei Enzyme kommen verschiedene Verbindungen, die farbige Endprodukte bilden, in Frage. Es können aber auch fluorimetrische oder luminometrische Endprodukte bestimmt werden. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über mögliche Substrate. [Luttmann et al., 2004]

Tabelle 3.3 Enzyme und mögliche chromogene Substrate [nach Luttmann et al., 2004]

ABTS = 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat; oNPG = o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid; oPD = o-Phenylendiamin; pNPP = p-Nitrophenylphosphat; TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

Enzym	pH Optimum	Substrat	Messwellenlänge (nm) / nach Zugabe der Stopplösung
Meerrettich Peroxidase	5-7	H ₂ O ₂ /ABTS	405 / Zitronensäure + NaN ₃
		H ₂ O ₂ /oPD	490 / H ₂ SO ₄
		H ₂ O ₂ /TMB	370 bzw. 450 / H ₂ SO ₄
Alkalische Phosphatase	9-10	pNPP	405 / NaOH
β -Galaktosidase	6-8	oNPG	405 / Na ₂ CO ₃

3.2.2.3 Praktische Durchführung eines ELISAs

3.2.2.3.1 Wichtige Schritte

Coaten

Mit Coaten bezeichnet man den ersten Schritt bei einem ELISA, in dem die feste Phase, eine Polystyrol Platte mit 96 Vertiefungen, mit dem AK oder AG verknüpft wird. Dazu wird eine AK bzw. AG Lösung in einem Puffer in die Kavitäten gegeben und für 10 bis 18 Stunden meist im Kühlschrank inkubiert. Als Puffer werden meist PBS oder Natriumcarbonatpuffer verwendet. Zur optimalen Bindung können einige Parameter in diesem Schritt optimiert werden: die AK bzw. AG Konzentration, die Inkubationszeit und die Temperatur, bei der inkubiert wird. [Luttmann et al., 2004]

Blocken

Im Coatingschritt werden nicht alle möglichen Plätze an der Wand einer Vertiefung mit AK bzw. AG belegt. Um eine unspezifische Adsorption der weiteren Proteinreagenzien, seien es Analytmoleküle oder zugesetzte AK oder AG, zu verhindern, werden diese durch Zugabe

einer Proteinlösung, die die eigentliche Nachweisreaktion nicht stört, besetzt. In diesem Blockschritt werden meist Casein- oder BSA-Lösungen in PBS oder TBS verwendet. [Luttmann et al., 2004]

Waschen

Zwischen den einzelnen Schritten ist es nötig, die ungebundene Fraktion von der gebundenen zu trennen. Die in den Kavitäten befindliche Lösung wird entfernt und es wird mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Dies kann automatisiert in einer dafür vorgesehenen Waschapparatur erfolgen. Nach dem Waschschrift verbleiben jeweils nur die an den Plattenwänden gebundenen AK bzw. AG oder deren Komplexe für weitere Reaktionen in den Vertiefungen. Als Waschpuffer kann PBS, PBS mit Detergenz oder auch nur Wasser zum Einsatz kommen. Nach dem Waschen wird die Platte trocken geschlagen. [Luttmann et al., 2004]

Inkubation mit Antigenen, Antikörpern oder enzymmarkierten Antikörpern

Die AG bzw. AK werden als Lösung verdünnt in Puffer in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Als Puffer wird derselbe wie im Blockschrift verwendet. Bei der Verdünnung der AK sollte darauf geachtet werden, dass diese in der Reaktion je nach Einsatz im Überschuss oder Unterschuss vorliegen müssen und die Konzentration dementsprechend gewählt wird. Die Inkubation erfolgt meist bei Raumtemperatur für 15-60 Minuten. [Key, 2007]

Substratzugabe

Sobald die Verknüpfung mit einem mit Markerenzym gekoppelten AK bzw. AG erfolgt ist, kann das passende Substrat zugegeben werden. Das gefärbte Produkt der Farbreaktion kann photometrisch vermessen werden. Optional kann vor der Messung eine Stopplösung zugegeben werden, die das Enzym denaturiert und somit die enzymatische Reaktion zum Stillstand bringt. [Key, 2007]

3.2.2.3.2 Kompetitiver ELISA - Versuchsablauf

Der kompetitive ELISA kann sowohl zum Nachweis niedermolekularer Analyte als auch größerer Moleküle verwendet werden. Im Folgenden soll der Ablauf eines kompetitiven ELISAs mit Coating-AG und indirekter Markierung, veranschaulicht durch Abbildung 3.13, im Prinzip beschrieben werden.

Die Platte wird mit AG gecoatet und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach dem Waschen erfolgt die Zugabe der Blocklösung, die nach entsprechender Inkubationszeit durch einen Waschschrift entfernt wird. Es folgt die Zugabe der Analytlösung (Analyt-AG) und die Inkubation mit einem gegen das AG gerichteten ersten AK. Nach dem Waschen wird ein zweiter, gegen den ersten AK gerichteter, enzymmarkierter AK zugegeben, inkubiert und im Anschluss die Platte gewaschen. Durch Zugabe eines Substrats findet die enzymatische Farbreaktion statt. Es entsteht ein gefärbtes Produkt (P). Die Reaktion kann mit einer Stopplösung beendet und dann das Produkt photometrisch vermessen werden. [Key, 2007 ; Luttmann et al., 2004]

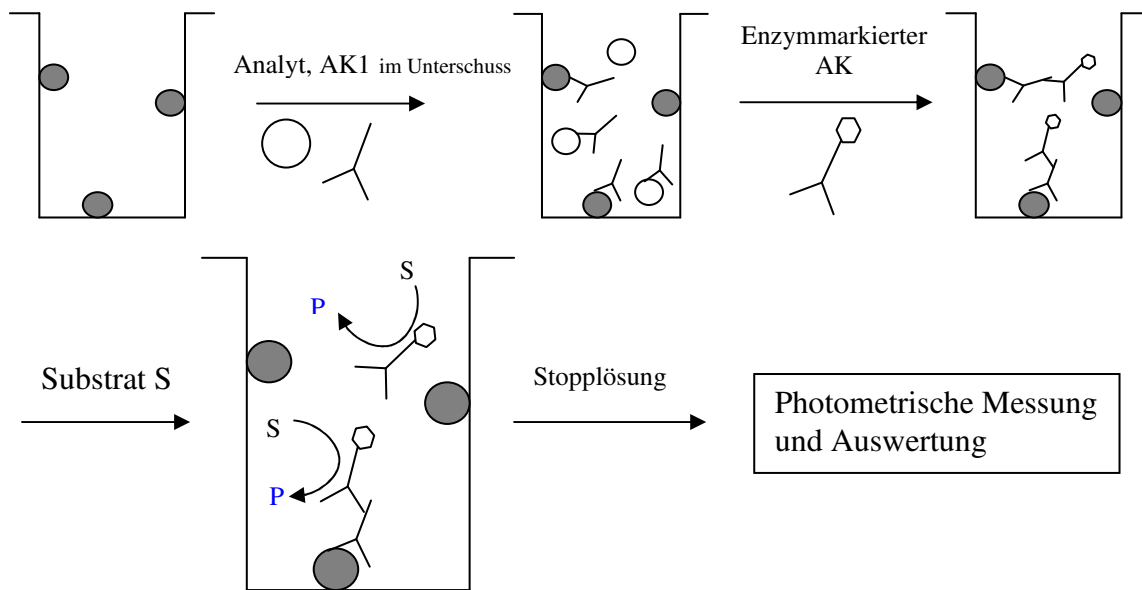


Abbildung 3.13 Schematischer Ablauf eines kompetitiven ELISAs mit indirekter Detektion

3.2.2.3.3 Sandwich ELISA – Versuchsablauf

Bei einem Sandwich ELISA braucht der Analyt zumindest zwei unterschiedliche Epitope und eine Größe, die eine sterisch ungehinderte Bindung zweier AK ermöglicht, weshalb es sich bei dem Analyten um Proteine und andere Makromoleküle handeln muss. Der Ablauf eines Sandwich ELISAs mit indirekter Markierung läuft nach dem hier vorgestellten Schema ab. Zur Veranschaulichung dient Abbildung 3.14.

Die ELISA Platte wird mit Antikörpermolekülen gecoatet und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Danach wird die Platte gewaschen und freie Adsorptionsstellen geblockt. Nach neuerlichem Waschen erfolgt die Inkubation mit Analyt-AG. Es wird gespült und dann ein zweiter gegen das AG gerichteter AK (AK2) zugegeben. Nach entsprechender Inkubationszeit und dem Waschschrift erfolgt die Zugabe eines gegen AK2 gerichteten enzymmarkierten AK. Nach diesem Inkubationsschritt und neuerlichem Spülen wird Substrat zugegeben, das in ein farbiges Produkt (P) umgewandelt wird und photometrisch gemessen werden kann. [Key, 2007 ; Luttmann et al., 2004]

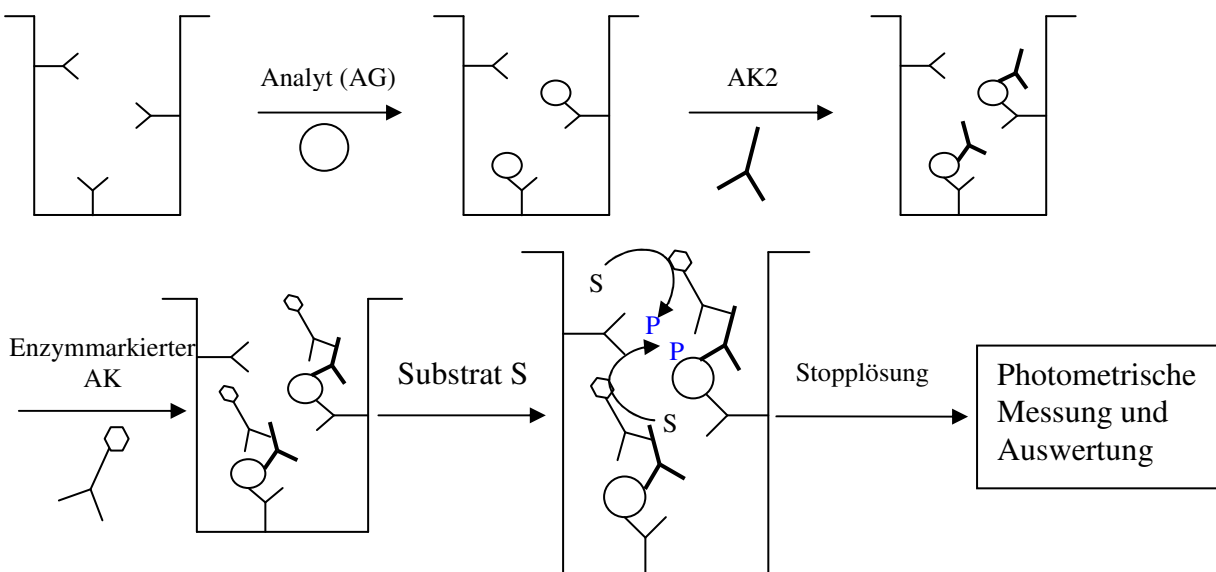


Abbildung 3.14 Schematischer Ablauf eines Sandwich ELISAs mit indirekter Detektion

3.2.2.4 Quantitative Auswertung

Zur Bestimmung der Analytkonzentration in einer Probe wird eine Kalibrierkurve erstellt. Das erhaltene Messsignal wird gegen die Konzentration aufgetragen. Durch die Punkte wird mit entsprechender Software eine sigmoide Kurve gelegt. Die erhaltene Kalibrierfunktion kann zur Auswertung herangezogen werden. Abbildung 3.15 zeigt typische Kurven für den kompetitiven bzw. den Sandwich Assay.

Ob ein Wert überhaupt zur Quantifizierung herangezogen werden kann, wird mit Hilfe der Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) und der Bestimmungsgrenze (LOQ, limit of quantification) festgestellt. Liegt ein Messwert unter der Nachweisgrenze, wird er als negativ betrachtet. Liegt das Messsignal zwischen der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze, ist dieser als positiv zu sehen, aber eine Quantifizierung ist nicht möglich. Nur Messwerte, die über der Bestimmungsgrenze liegen, können zur Quantifizierung herangezogen werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze zu bestimmen. Eine Abschätzung beruht darauf, den Leerwert mehrmals zu messen und von den Werten den Mittelwert und die Standardabweichung zu bestimmen. Da das Signal-Rausch-Verhältnis für die Nachweisgrenze 3 und für die Bestimmungsgrenze 10 sein sollte, ergibt sich folgende Berechnung:

$$\text{LOD} = \bar{x} \pm 3 \cdot s$$

$$\text{LOQ} = \bar{x} \pm 10 \cdot s$$

$\bar{x}$... Mittelwert der Leerwertmessungen

s ... Standardabweichung der Leerwertmessungen

$\pm$... Rechenzeichen je nach Assaytyp (+: im Sandwich ELISA; -: im kompetitiven ELISA)

[Polifke, 2007]

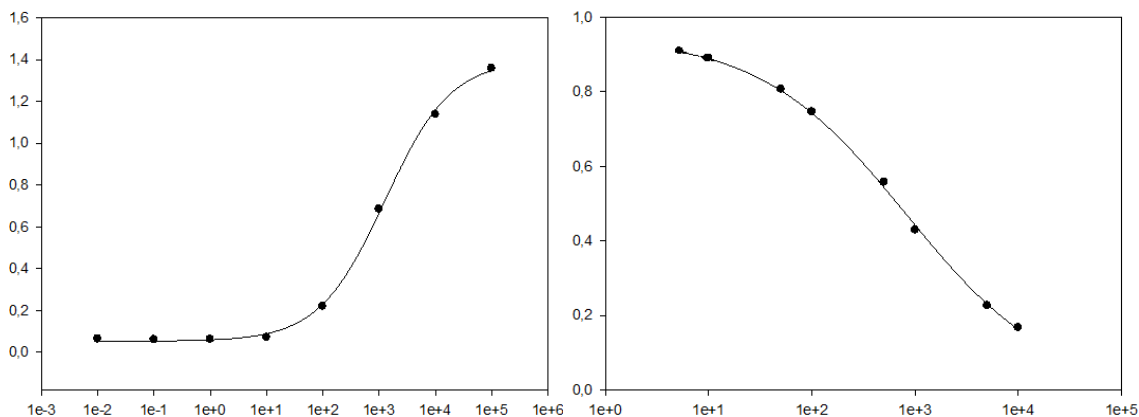


Abbildung 3.15 Kalibrierkurve eines Sandwich ELISAs bzw. eines kompetitiven ELISAs

(Extinktion aufgetragen gegen den Logarithmus der Proteinkonzentration)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung einer real time PCR Methode zur Detektion von braunem Senf

4.1.1 Probenaufarbeitung

Aus den Samen von braunem Senf sowie aus jenen der anderen beiden Arten, schwarzem und weißem Senf, und 45 weiteren Kräutern, Gewürzen und Gemüsearten, die häufig gemeinsam mit Senf als Lebensmittelzutat auftreten, wurde die DNA mit Hilfe der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen CTAB Methode extrahiert. Es wurden stets zumindest drei Extraktionen pro Lebensmittel parallel durchgeführt. Das Extraktionsprotokoll wurde für manche Matrices durch Erhöhen des Extraktionslösungsvolumens oder Verlängerung der Inkubationszeit leicht verändert, um bessere Reinheiten und höhere DNA Konzentrationen zu erhalten. Die Konzentration und Reinheit der Extrakte wurde mittels photometrischer Messung bestimmt (siehe Kapitel 5.2.1). Bei manchen Lebensmittelzutaten konnte die gewünschte Mindestkonzentration von 20 ng/µl und/oder die entsprechende Reinheit auch nach mehrmaligen Versuchen nicht erreicht werden. In diesen Fällen wurden dann Extrakte mit einer Konzentration > 10 ng/µl (in Ausnahmen auch darunter) und Reinheiten zwischen 1,4 und 2,3 zur Analyse mittels PCR verwendet. Je nach Konzentration wurde auf 20 oder 10 ng/µl verdünnt, um die Extrakte in der PCR einsetzen zu können. In Tabelle 4.1 sind die erhaltenen Reinheiten und Konzentrationen von jeweils einem Extrakt eines Lebensmittels angeführt. Bei Kurkuma, Ingwer, Muskatnuss, Dille und Estragon waren mehrere Extraktionen notwendig, um die Konzentration von 10 ng/µl zu erreichen, und bei der Extraktion von Piment konnte nicht einmal diese Konzentration erreicht werden. Aus Zimt konnte mit der CTAB Extraktionsmethode keine DNA isoliert werden, da es zu keiner Phasentrennung kam.

Tabelle 4.1 Konzentrationen und Reinheiten der DNA Extrakte verschiedener Gewürze und Gemüse

„*“... Werte zweier Extrakte des Lebensmittels angegeben, da auch jene mit zu niedriger Konzentration verwendet wurden; „-“... kein Extrakt erhalten

Lebensmittel	Konzentration (ng/µl)	Reinheit
Brauner Senf	133	1,9
Weißer Senf	246	1,9
Schwarzer Senf	115	1,8
Raps	393	1,9
Kurkuma	18	1,4
Majoran	53	1,9
Schnittsellerie	50	1,8
Radieschen	50	1,7
Dille	13	2,0
Kümmel	120	1,6
Kreuzkümmel	69	2,0
Knollensellerie	91	1,9
Ingwer*	9 / 28	2,0 / 1,8
Muskatnuss*	6 / 14	2,1 / 2,7
Oregano	66	1,8
Petersilie	37	1,8
Schnittlauch	151	1,9
Estragon	15	1,7
Piment	9	1,6

Lebensmittel	Konzentration (ng/μl)	Reinheit
Zimt	-	-
Liebstockel	58	1,6
Koriander	117	1,6
Thymian	36	1,9
Bohnenkraut	17	2,0
Cardamon	21	1,9
Schwarzer Pfeffer	14	1,9
Rosmarin	27	1,8
Anis	273	1,9
Lorbeer	52	1,8
Brokkoli	427	2,0
Kohlrabi	158	2,0
Karfiol	52	1,9
Chinakohl	113	1,9
Kohl	13	2,1
Kraut (Weißkohl)	75	2,0
Pak choi	102	2,1
Speiserübe	118	2,1
Kren	1074	2,0
Fenchel	127	1,6
Bockshornklee	125	1,9
Bohnenkraut	91	1,9
Soja (Keimlinge)	188	2,0
Paprika	416	1,8
Chili	204	1,8
Weizen (Körner)	604	1,8
Sesam	153	2,0
Lupine (Mehl)	254	1,6
Mohn	40	nicht bestimmt

4.1.2 Primer und Sonden

Zur Entwicklung der real time PCR Methode mussten spezifische Primer und Sonden entworfen werden. Dazu wurde online in Nukleotiddatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) nach bekannten DNA Sequenzen von braunem Senf gesucht und diese mittels der BLAST (basic local alignment search tool) Funktion auf mögliche Sequenzähnlichkeiten zu anderen bekannten Genabschnitten überprüft. Sequenzen mit zu großer Ähnlichkeit zu anderen pflanzlichen Organismen, insbesondere anderen Brassicaceae, wurden gleich verworfen. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte nach verschiedenen Strategien. Zuerst wurde nach Sequenzen ohne Homologie zu verwandten Pflanzen gesucht („Methode 1“). In einer weiteren Methode („Methode 2“) wurde nach Sequenzen mit geringer Homologie gesucht, um Primer und Sonden innerhalb der Regionen ohne übereinstimmende Nukleotidsequenz zu entwerfen, und in einer dritten Methode wurden ebenfalls Sequenzen mit geringer Homologie herangezogen, Primer und Sonden aber in Regionen gesucht, die große Unterschiede aufwiesen. Diese letzte „Methode 3“ soll am Beispiel der Gensequenz der *Brassica juncea* Chitinase Gen Promoter Region mit der Accession Nummer AY714982 veranschaulicht werden. Abbildung 4.1 zeigt das schematische BLAST Ergebnis dieser Sequenz, wobei zu jeder Sequenzüberschneidung auch die genauen Sequenzen angegeben werden. In der Abbildung ist repräsentativ dafür der

Sequenzvergleich von braunem Senf („Query“) und Raps („Subject“) dargestellt. Es gibt einige große Sequenzunterschiede, die zur Primerwahl geeignet sind.

Für auf Grund der BLAST Ergebnisse in Frage kommende Sequenzen wurden Primer und Sonden mit Hilfe der Software Beacon Designer 7.0 nach den entsprechenden Kriterien entworfen (siehe Kapitel 3.1.3.5 und 3.1.5.2.1). Bei der Suche nach passenden Primern und Sonden musste „Methode 1“ zum Finden von DNA Sequenzen verworfen werden, da keine den Kriterien entsprechenden Primer und Sonden für die meist kurzen Gensequenzen gefunden werden konnten. Somit wurden Primer und Sonden nach „Methode 2“ und „Methode 3“ gesucht und auf diese Art zehn verschiedene Primerpaare und dazu passende Sonden entwickelt. Für Primerpaar 3 wurde ein zweiter vorwärts Primer zum gleichen rückwärts Primer und zur gleichen Sonde entworfen. Dieses Primerpaar wird mit 3n bezeichnet. Die Sequenzen der Primer und Sonden sind in Kapitel 5.3.4 zu finden. Die Sondensequenzen sind nur angegeben, wenn die Sonden tatsächlich verwendet wurden, da die Untersuchungen zuerst unter Verwendung von Sybr Green durchgeführt wurden.

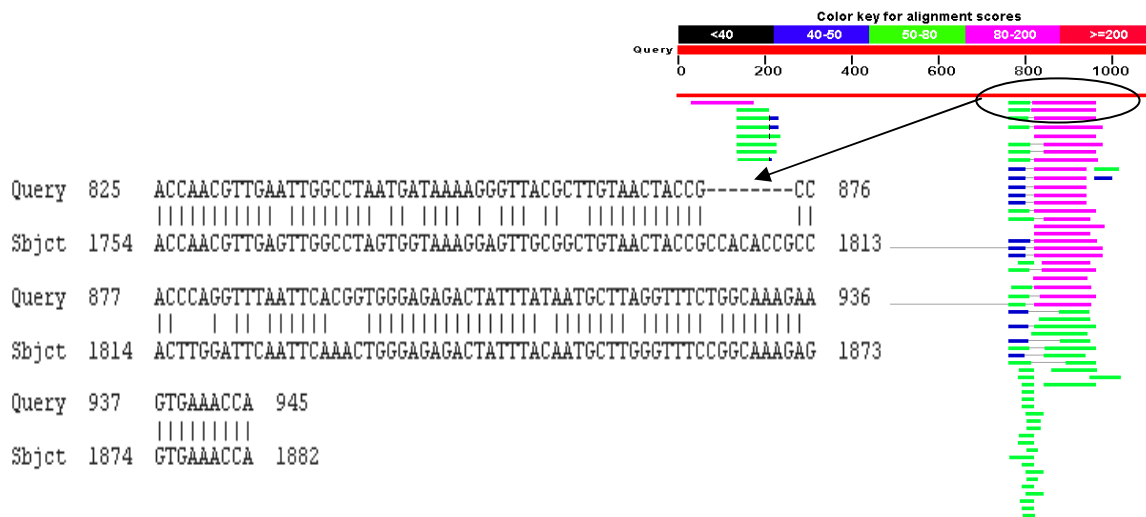


Abbildung 4.1 BLAST Ergebnis für die *Brassica juncea* Chitinase Gen Promotor Region mit Vergleich der Sequenzen für braunen Senf (Query) und Raps (Sbjct)

4.1.3 Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur

Die Primer wurden, wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, verdünnt und somit in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 10 µM für den Reaktionsansatz verwendet. Nach einem ersten PCR Lauf mit Sybr Green (siehe Kapitel 5.3.4.1) unter nicht optimierten Bedingungen mit einer Annealingtemperatur von 60,3 °C und einer Primerkonzentration von 200 nM für beide Primer und anschließender Schmelzkurvenanalyse (siehe Kapitel 5.3.4.2), um die Amplifikation des gewünschten Produkts zu überprüfen, wurden die Parameter, wie in Kapitel 5.3.4.3 beschrieben, optimiert. Die Optimierung wurde ab dem zweiten Primerpaar nur bei drei Temperaturen (61,5 °C, 58,4 °C und 54,1 °C) und mit für beide Primer gleichen Konzentrationen (100 nM, 200 nM und 300 nM) durchgeführt.

Primertest

Bei den Primerpaaren 5, 6, 7 und 8 kam es nicht nur bei der Positivkontrolle, sondern auch bei der Negativkontrolle zu einem Signalanstieg. Bei den Primerpaaren 5 und 6 konnte mittels Schmelzkurvenanalyse festgestellt werden, dass die gebildeten PCR Produkte nicht die gewünschten Schmelztemperaturen aufwiesen. Ursachen für den Signalanstieg könnten die Bildung von Primerdimeren oder möglicherweise existierende Sekundärstrukturen der Primer sein. Durch eine nachträgliche Untersuchung der Sekundärstruktur der Primer mit einer online

Software des Instituts für Theoretische Chemie der Universität Wien zur Faltungsüberprüfung von RNA (rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi) wurde bei diesen Primern eine starke Neigung zur Ausbildung von Sekundärstrukturen festgestellt. Dies könnte somit die Ursache für den erhaltenen Signalanstieg bei der Negativkontrolle sein. Bei Primerpaar 5 wies die 1. Ableitung der Schmelzkurve außerdem zwei Peaks auf. Dies deutet darauf hin, dass Sekundärstrukturen vorliegen. Die Amplifikations- und Schmelzkurven für Primerpaar 5 und 6 sind in den Abbildungen 4.2 und 4.3 zu sehen. Bei den Primerpaaren 7 und 8 wiesen die bei den Negativkontrollen gebildeten Produkte den gleichen Schmelzpunkt auf wie jene des gewünschten Produkts. Obwohl eine Kontamination vermutet worden war, wurden die PCR Bedingungen für die Primerpaare optimiert und Kreuzreaktivitätstests mit Sybr Green durchgeführt. Da die Kontamination trotz Verwendung anderer Aliquote der Reagenzien nicht behoben werden konnte, wurden diese zwei Primerpaare (PP7 und PP8) nicht für weitere Versuche verwendet.

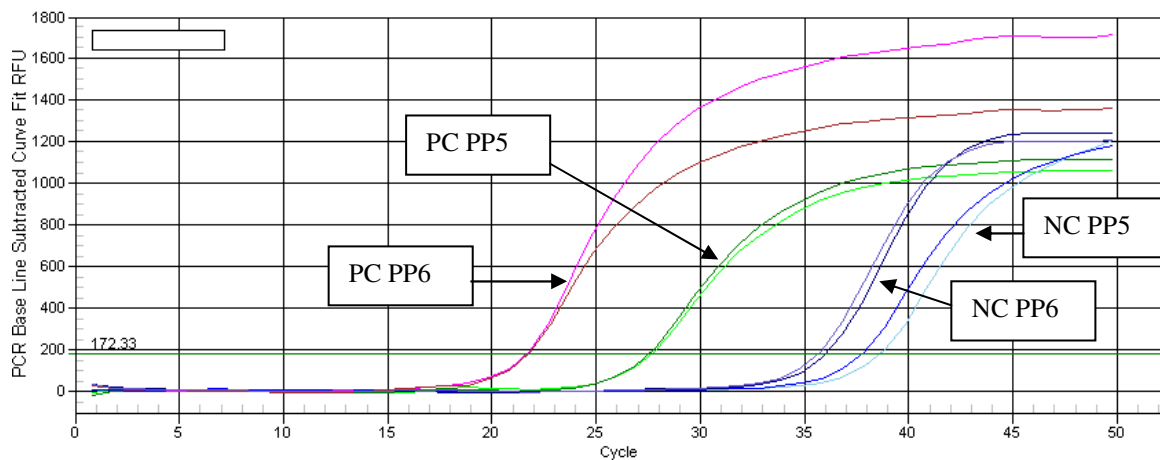


Abbildung 4.2 PCR Kurven der Primerpaare 5 und 6

(PC... Positivkontrolle; NC... Negativkontrolle; PP... Primerpaar)

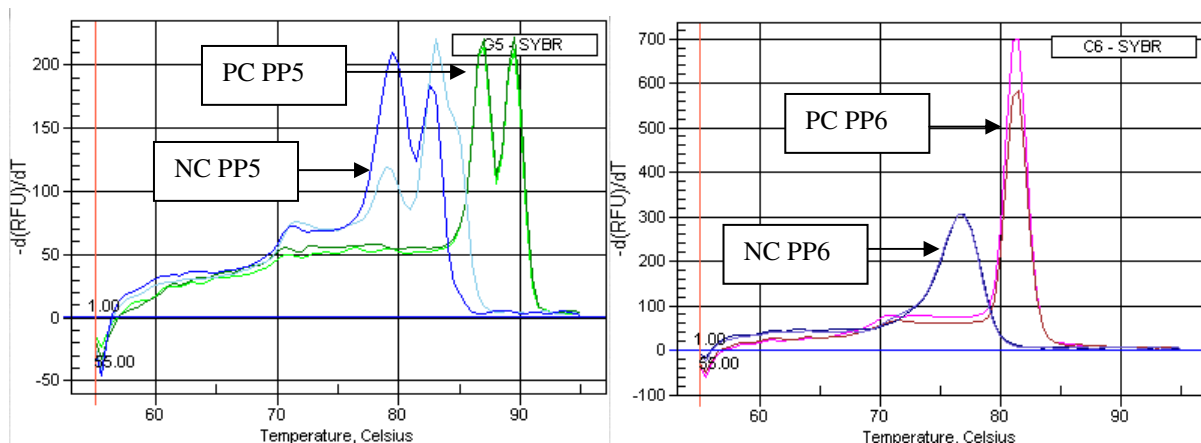


Abbildung 4.3 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit den Primerpaaren 5 und 6 erhaltenen Produkte

(PC... Positivkontrolle; NC... Negativkontrolle; PP... Primerpaar)

Feststellung der optimalen Primerkonzentration und Annealingtemperatur

Die bei verschiedenen Primerkonzentrationen und Annealingtemperaturen erhaltenen c_t -Werte wurden miteinander verglichen, indem die Zyklenzahl gegen die Temperatur aufgetragen wurde, um möglicherweise existierende Ausreißer festzustellen. Die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen die Ergebnisse für die Primerpaare 1 und 6. Bei sehr ähnlichen c_t -Werten (zum Beispiel bei Primerpaar 9 siehe Abbildung 4.6) wurde die höhere

Annealingtemperatur gewählt, da niedrigere Temperaturen stärker zu unspezifischer Primerbindung führen. Die sich daraus ergebenden optimalen Bedingungen sind für alle Primerpaare in Tabelle 4.2 angeführt und wurden jeweils für die weiteren Reaktionen verwendet.

Tabelle 4.2 Optimierte Primerkonzentration und Annealingtemperatur der Primerpaare (PP)

PP-Nummer	Primerkonzentration (je Primer, nM)	Annealingtemperatur (°C)
1	200	55,9
2	300	58,4
3	300	58,4
3n	300	58,4
4	300	58,4
6	300	58,4
7	300	61,5
8	300	58,4
9	100	61,5
10	300	58,4

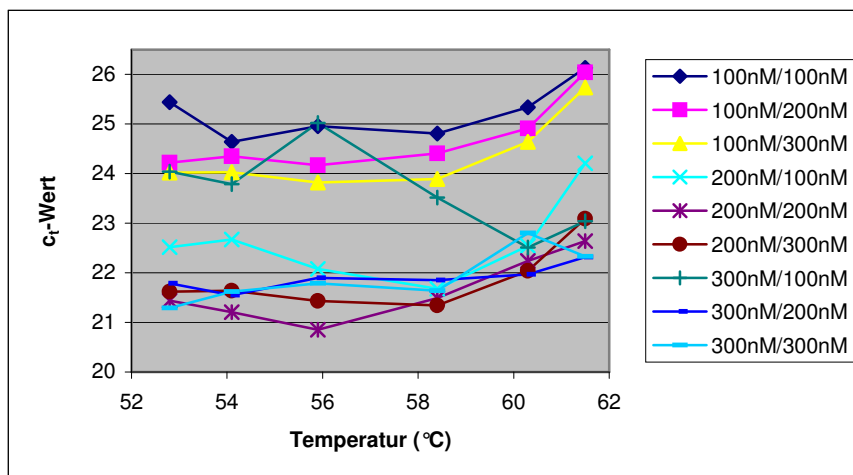


Abbildung 4.4 Temperatur- und Primerkonzentrationsabhängige c_t-Werte für Primerpaar 1

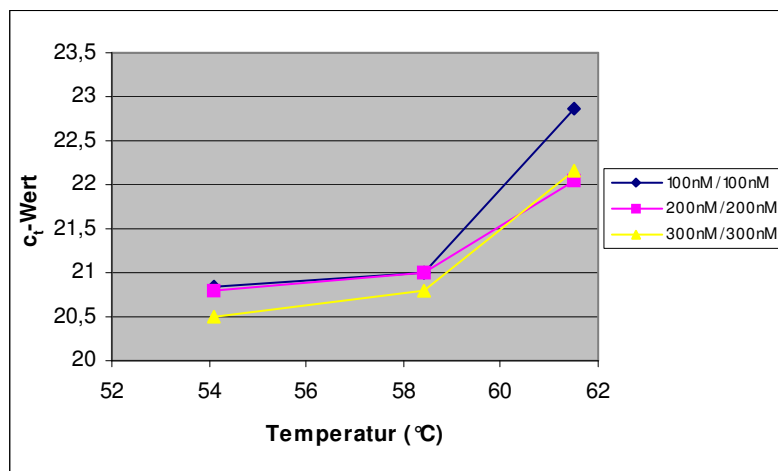


Abbildung 4.5 Temperatur- und Primerkonzentrationsabhängige c_t-Werte für Primerpaar 6

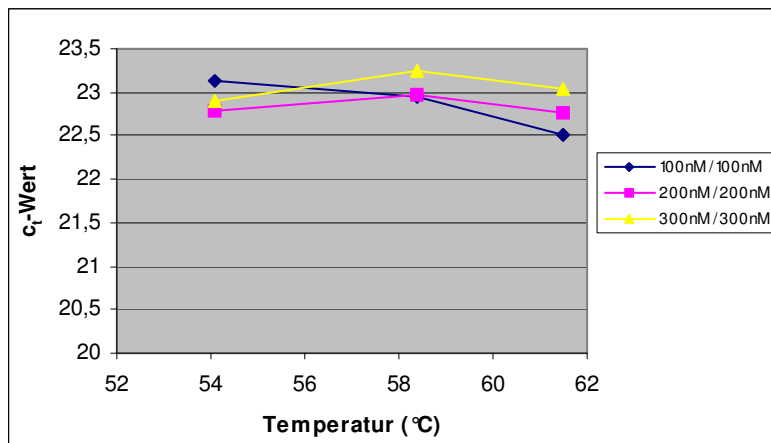


Abbildung 4.6 Temperatur- und Primerkonzentrationsabhängige c_t -Werte für Primerpaar 9

4.1.4 Kreuzreaktivitätstests mit Sybr Green

Die optimierten Primerpaare, PP1-PP4 und PP6-PP10, wurden auf ihre Spezifität für braunen Senf mittels Kreuzreaktivitätstests untersucht. Bei diesen Tests wurde wie in Kapitel 5.3.4.4 beschrieben vorgegangen und somit das in Tabelle 5.1 angegebene Pipettierschema sowie das in Tabelle 5.3 angeführte Temperaturprotokoll verwendet. Für jedes zu testende Primerpaar wurde dazu die optimierte Annealingtemperatur und Primerkonzentration (siehe Tabelle 4.2) verwendet. Da es bei manchen Lebensmittelzutaten nicht möglich war, DNA Extrakte mit einer Mindestkonzentration von 20 ng/µl zu erhalten (siehe Kapitel 4.1.1), wurde das Pipettierschema für DNA Lösungen mit einer Konzentration von 10 ng/µl leicht abgeändert (siehe Kapitel 5.3.4.3). Für Extrakte mit einer Konzentration < 10 ng/µl wurde genauso vorgegangen. In diesen Reaktionsansätzen war somit die DNA Menge zu niedrig, qualitative Informationen konnten trotzdem erhalten werden. Um eine Aussage über bestehende Kreuzreaktivitäten treffen zu können, wurde auch eine Schmelzkurve im Anschluss an einen PCR Lauf erstellt. Ein Fluoreszenzanstieg wurde nur dann als positiv gewertet, wenn die Schmelztemperatur ident mit jener des PCR Produkts von braunem Senf war oder nur um 0,5 °C davon abwich. Zusätzlich zur Betrachtung der Schmelztemperaturen wurden auch die c_t -Werte für die Abschätzung einer möglichen Kreuzreaktivität genutzt. Wenn die c_t -Werte für die getesteten Lebensmittel wesentlich höher sind als die der Positivkontrolle, würde es zu keinem Fluoreszenzanstieg kommen, wenn das Lebensmittel nur als Zutat in einem Produkt vorläge. Eine bestehende Kreuzreaktivität zu weißem oder schwarzem Senf stellt kein Problem dar, da die PCR Methode dann zwar keinen spezifischen Nachweis von braunem Senf, aber eventuell den der drei Senfarten ermöglichen würde. Die Ergebnisse der Kreuzreaktivitätstests sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Abbildungen 4.7 bis 4.9 zeigen ausgewählte PCR Kurven und 1. Ableitungen der Schmelzkurven, die bei diesen Analysen erhalten wurden. Für das Primerpaar 9 sind die Ergebnisse der Kreuzreaktivitätstests im Folgenden genauer erläutert. Für dieses und für Primerpaar 3 wurden im Anschluss an die Analyse die passenden Sonden bestellt.

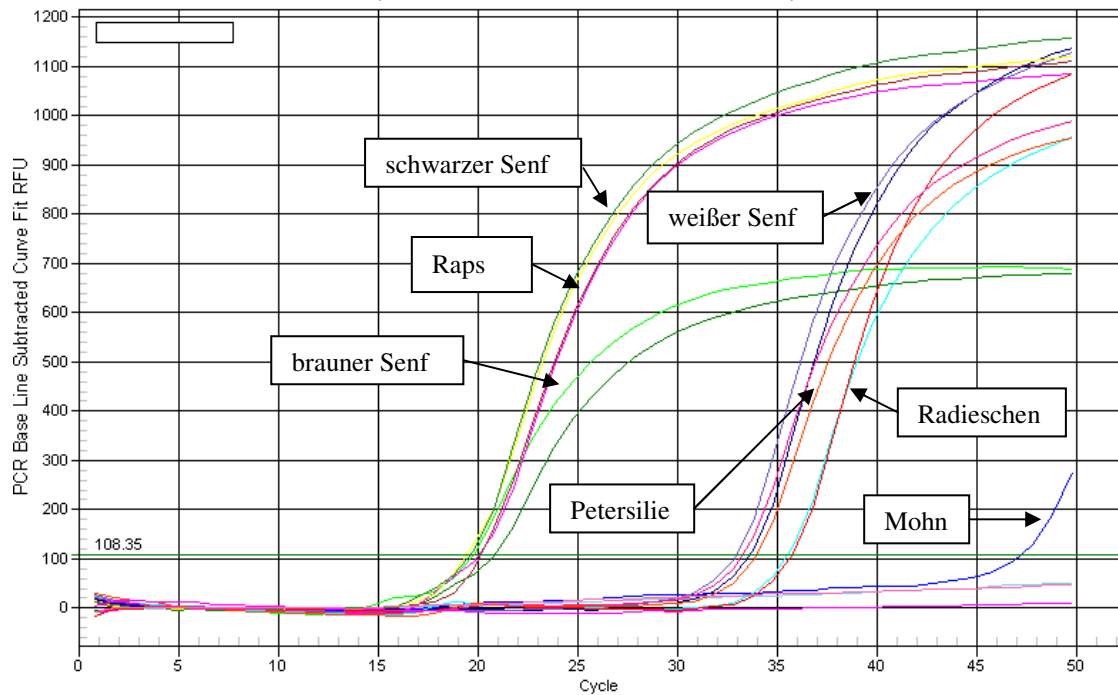


Abbildung 4.7 PCR Kurven eines Kreuzreaktivitätstests für Primerpaar 10

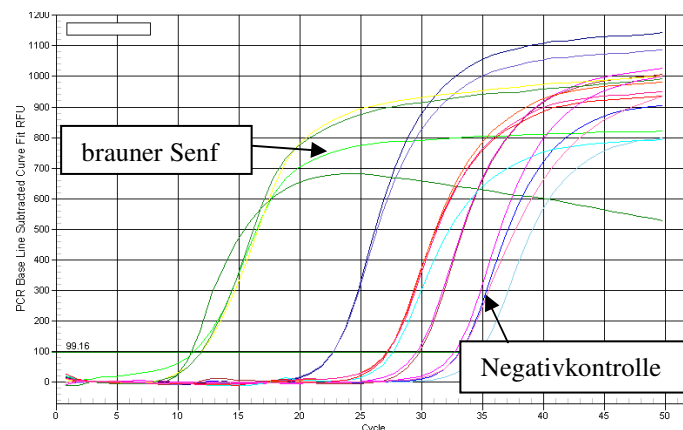


Abbildung 4.8 PCR Kurven eines Kreuzreaktivitätstests für Primerpaar 7

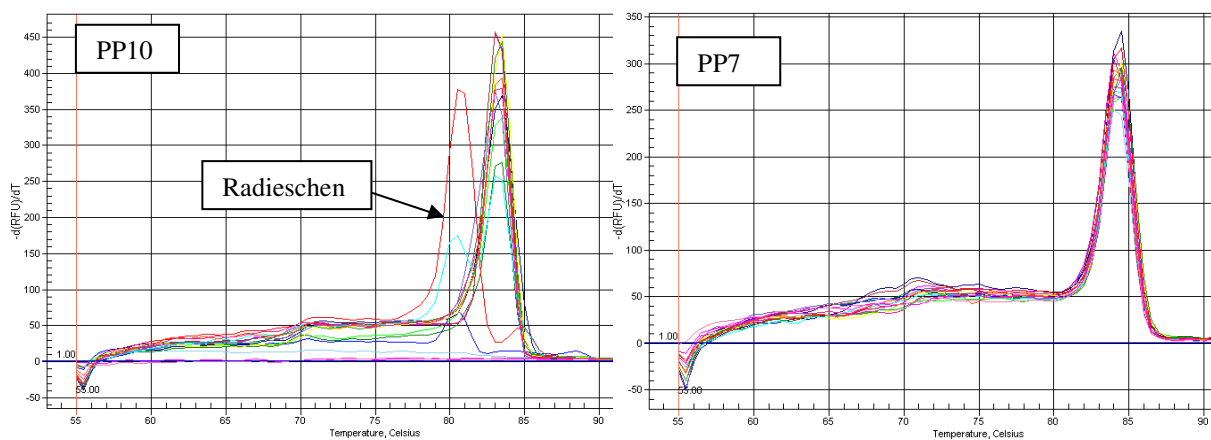


Abbildung 4.9 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit Primerpaar (PP) 10 und 7 erhaltenen Produkte

Primerpaar 9

Der erste Kreuzreaktivitätstest erfolgte mit DNA aus Mohn, Raps, Radieschen und weißem und schwarzem Senf (siehe Abbildung 4.10). Für schwarzen und braunen Senf wurden die gleichen c_t -Werte erhalten und die Produkte wiesen den gleichen Schmelzpunkt auf. Für weißen Senf wurde ein höherer c_t -Wert erhalten und bei Radieschen kam es bei einer von zwei Bestimmungen zu einem Signalanstieg. Der Signalanstieg bei Raps erfolgte erst nach Zyklus 40 und konnte somit vernachlässigt werden und bei Mohn wurde kein Signalanstieg beobachtet. Auf Grund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde das Primerpaar 9 auch noch mit DNA aus Kümmel, Kreuzkümmel, Knollensellerie, Ingwer, Majoran, Muskatnuss, Schnittlauch, Anis, Oregano, Petersilie, Dille, Bohnenkraut, Koriander, Thymian, Liebstöckel, Lupine, Schnittsellerie und Estragon getestet. Die hierbei erhaltenen PCR Kurven sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Bei Petersilie, Thymian, Liebstöckel, Knollensellerie, Estragon und Kreuzkümmel wurden Signalanstiege beobachtet, die c_t -Werte waren jedoch um mindestens 10 Zyklen höher als der von braunem Senf. Alle anderen getesteten Lebensmittel ergaben ein negatives Ergebnis.

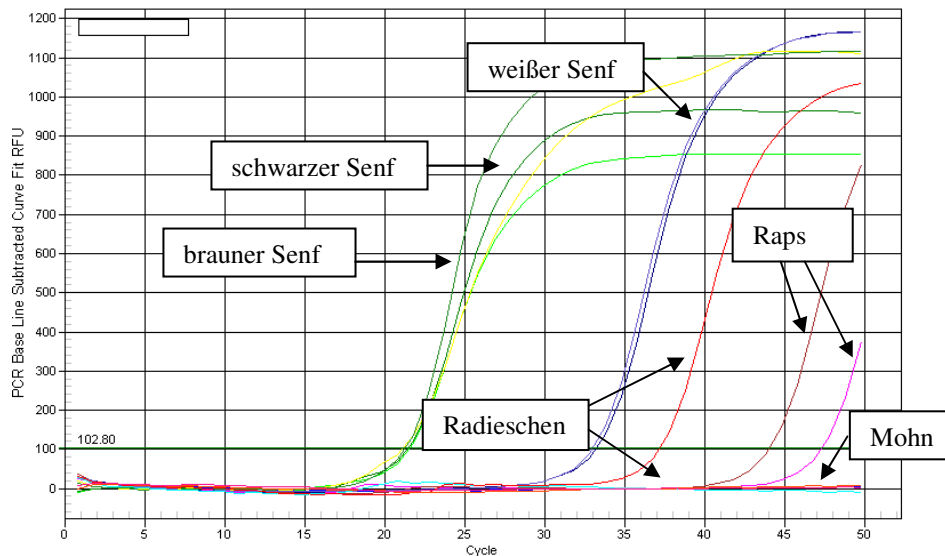


Abbildung 4.10 PCR Kurven des ersten Kreuzreaktivitätstests mit Primerpaar 9

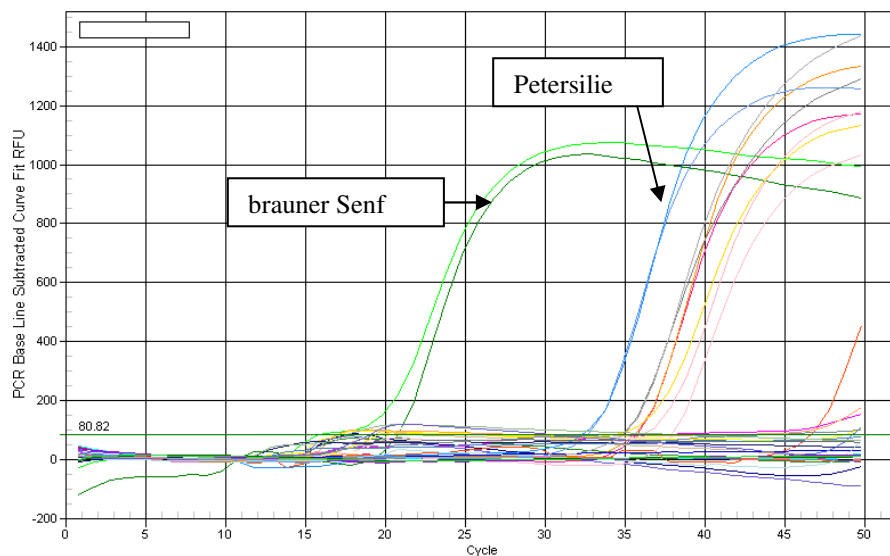


Abbildung 4.11 PCR Kurven eines weiteren Kreuzreaktivitätstests mit Primerpaar 9

4.1.5 Kreuzreaktivitätstests mit der Taq Man Sonde

Für zwei der insgesamt zehn entworfenen Primerpaare wurden Taq Man Sonden bestellt. Diese wurden in einem PCR Lauf mit Positiv- und Negativkontrolle auf ihre Funktionsfähigkeit getestet und dann für erneute Kreuzreaktivitätsuntersuchungen verwendet. Es wurden das in Kapitel 5.3.4.3 angeführte Pipettierschema und das in Tabelle 5.3 angeführte dreistufige Temperaturprotokoll verwendet.

Primerpaar 3

Bei den Kreuzreaktivitätstests konnte trotz der zusätzlichen Spezifität der Sonde weder für das zuerst gewählte Primerpaar noch für das durch andere Wahl des vorwärts Primers leicht veränderte Primerpaar (PP3n) ein spezifischer Nachweis von braunem Senf ermöglicht werden. Schwarzer Senf und Raps führten zu ähnlichen c_t -Werten wie der braune Senf. Auf Grund dieser eindeutig bestehenden Kreuzreaktivität zu Raps wurden die Primerpaare 3 und 3n nicht weiter getestet.

Primerpaar 9

Es wurden mit der Taq Man Sonde erneut Mohn, Raps, Radieschen, Petersilie, weißer und schwarzer Senf getestet. Die erhaltenen PCR Kurven sind in Abbildung 4.12 zu sehen. Die Signalanstiege der DNA Extrakte von schwarzem und braunem Senf erfolgten bei ähnlichen c_t -Werten, von weißem Senf und Petersilie sehr spät. Bei Radieschen wurde in einem Ansatz, bei Raps und Mohn jedoch in keinem der beiden Ansätze ein Signalanstieg beobachtet. Durch eine Wiederholung des Versuchs, bei dem es bei Radieschen zu keinem Signalanstieg kam, konnte eine Kreuzreaktivität mit Radieschen ausgeschlossen werden. Für Chinakohl (siehe Abbildung 4.13) und Pak choi (siehe Abbildung 4.14) wurde aber eine Kreuzreaktivität ermittelt. Die c_t -Werte unterscheiden sich nur um etwa einen Zyklus (Chinakohl) bzw. zwei bis drei Zyklen (Pak choi).

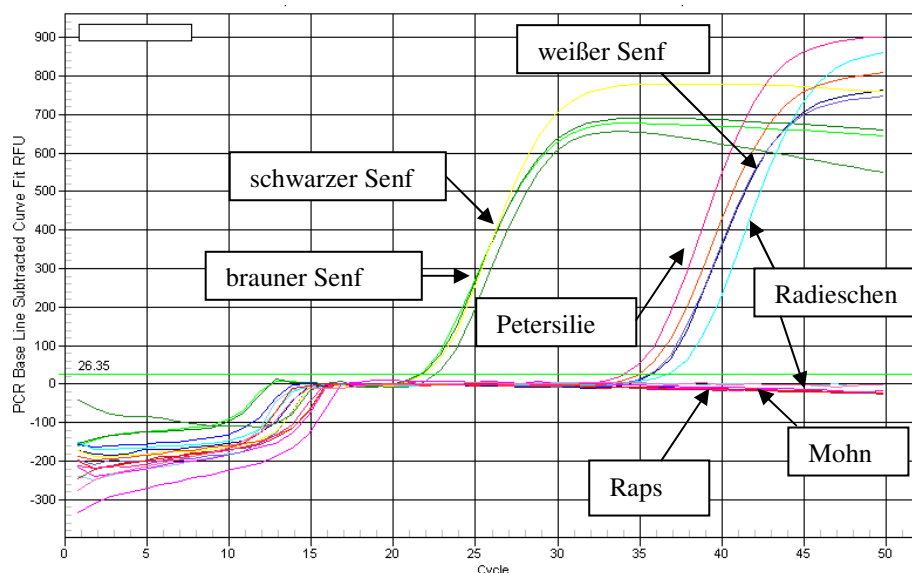


Abbildung 4.12 PCR Kurven eines Taq Man Assays zur Kreuzreaktivitätsuntersuchung von Primerpaar 9 (1)

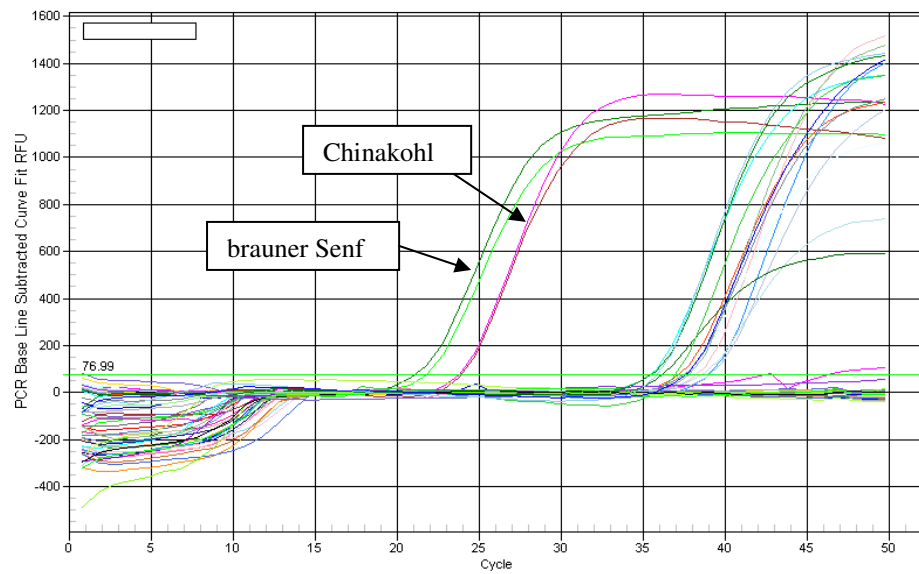


Abbildung 4.13 PCR Kurven eines Taq Man Assays zur Kreuzreaktivitätsuntersuchung von Primerpaar 9 (2)

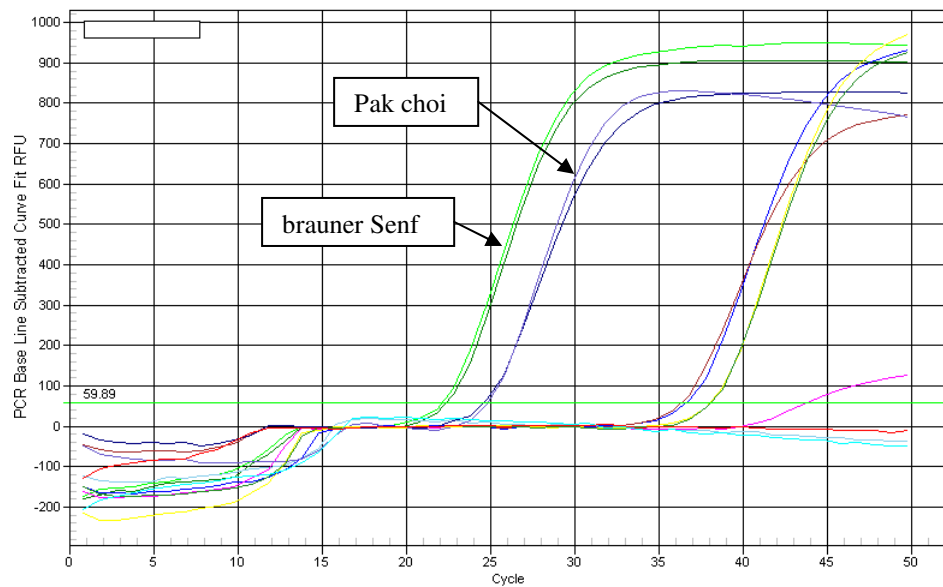


Abbildung 4.14 PCR Kurven eines Taq Man Assays zur Kreuzreaktivitätsuntersuchung von Primerpaar 9 (3)

Tabelle 4.3 Übersicht über die bei Kreuzreaktivitätsuntersuchungen erhaltenen c_t-Werte

Angabe der c_t-Werte als Mittelwert aus zwei Ansätzen; „#“... Fluoreszenzanstieg innerhalb von 40 Zyklen nur bei einem der zwei Ansätze; „-“... kein Fluoreszenzanstieg innerhalb von 40 Zyklen; „*“... Fluoreszenzanstieg innerhalb von 40 Zyklen, aber Schmelzpunkt des gebildeten Produkts unterschied sich um ≥ 1 °C von jenem der Positivkontrolle; „n.g.“... nicht getestet; „PP“... Primerpaar

Name	PP1	PP2	PP3	PP3n	PP4	PP6	PP7	PP8	PP9	PP10	PP3 mit Sonde	PP3n mit Sonde	PP9 mit Sonde
Brauner Senf	22,02	20,97	22,13	20,99	20,28	20,65	12,71	12,75	21,61	20,36	22,88	21,80	21,66
Weißer Senf	24,82	*	*	*	22,94	*	23,65	23,12	34,20	33,31	33,31	33,41 [#]	35,66
Schwarzer Senf	n.g.	n.g.	n.g.	20,85	n.g.	18,68	13,01	12,27	22,40	19,57	19,57	21,93	22,21
Raps	*	21,86	*	20,79	*	17,99	30,61	29,25	—	20,14	20,14	23,41	—
Kurkuma	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	37,62 [#]
Majoran	38,20	*	*	n.g.	39,41	*	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	—
Schnittsellerie	*	34,00	*	n.g.	*	32,77	n.g.	n.g.	—	n.g.	36,12	35,10	38,66 [#]
Radieschen	n.g.	19,16	*	*	23,91	*	28,36	28,29	38,23 [#]	35,67	—	—	—
Dille	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	37,68
Kümmel	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	—
Kreuzkümmel	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	36,14 [#]	n.g.	n.g.	n.g.	37,20 [#]
Knollensellerie	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	37,09	n.g.	n.g.	36,03 [#]	n.g.	n.g.	n.g.	—
Ingwer	n.g.	n.g.	32,06	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	—
Muskatnuss	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	39,06 [#]
Oregano	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	—
Petersilie	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	33,04	33,63	n.g.	n.g.	34,48
Schnittlauch	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	*	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	—
Estragon	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	38,88	n.g.	n.g.	35,37	n.g.	n.g.	n.g.	36,59
Piment	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Zimt	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Liebstockel	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	37,26 [#]	n.g.	n.g.	n.g.	—
Koriander	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	—
Thymian	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	37,90	n.g.	n.g.	n.g.	38,29 [#]
Bohnenkraut	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	—	n.g.	n.g.	n.g.	—
Cardamon	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	—

Name	PP1	PP2	PP3	PP3n	PP4	PP6	PP7	PP8	PP9	PP10	PP3 mit Sonde	PP3n mit Sonde	PP9 mit Sonde
Schwarzer Pfeffer	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	38,47 [#]
Rosmarin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	36,70 [#]
Anis	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	28,17	27,96	–	n.g.	n.g.	n.g.	–
Lorbeer	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Brokkoli	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	30,39	31,94	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Kohlrabi	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	24,01	25,40	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	36,47
Karfiol	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	29,39	31,77	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	39,05 [#]
Chinakohl	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	27,45	28,84	26,70	n.g.	n.g.	n.g.	23,90
Kohl	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	35,74
Kraut (Weißkohl)	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	39,01 [#]
Pak choi	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	23,61	n.g.	n.g.	n.g.	24,77
Speiserübe	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	36,41 [#]
Kren	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	38,10
Fenchel	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Bockshornklee	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Soja	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Paprika	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Chili	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Weizen	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Sesam	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–
Lupine	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	–	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Mohn	*	–	*	*	*	*	34,95	31,94	–	–	–	37,30 [#]	–
Negativkontrolle	–	–	*	*	–	–	33,90	32,27	–	–	–	–	–

4.1.6 Sequenzierung der PCR Produkte von Primerpaar 9

Die mit Primerpaar 9 entwickelte real time PCR Methode zeigte trotz Verwendung der spezifischen Sonde Kreuzreaktivitäten zu schwarzem Senf, Chinakohl und Pak choi. Um insbesondere Kreuzreaktivitäten zu den letzten beiden genannten Lebensmitteln auszuschalten und die Methode spezifisch für braunen oder zumindest braunen und schwarzen Senf zu machen, sollten die Primer oder die Sonde geringfügig verändert werden. Da keine Sequenz-überschneidung mit Chinakohl und Pak choi in der online Nukleotiddatenbank aufschien, sollten die PCR Produkte sequenziert werden, damit Unterschiede in den Sequenzen ersichtlich würden. Zum Sequenzieren wurde das Service von VBC-Biotech in Anspruch genommen (siehe Kapitel 5.5). Um die nötige Konzentrationsabschätzung der PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese machen zu können, wurden die PCR Produkte, wie in Kapitel 5.4 beschrieben, mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Die Agarosegelelektrophorese wurde, wie in Kapitel 5.2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Nach dem Sichtbarmachen im UV-Licht wurde das Gel fotografiert (siehe Abbildung 4.15). Die Konzentration der PCR Produkte wurde auf 4 ng/µl geschätzt. Tabelle 4.4 zeigt die bei der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen. Die bestehenden Unterschiede liegen im Bereich der bereits entworfenen Sonde und sind so gering, dass eine spezifischere Wahl der Primer oder der Sonde nicht versucht wurde.

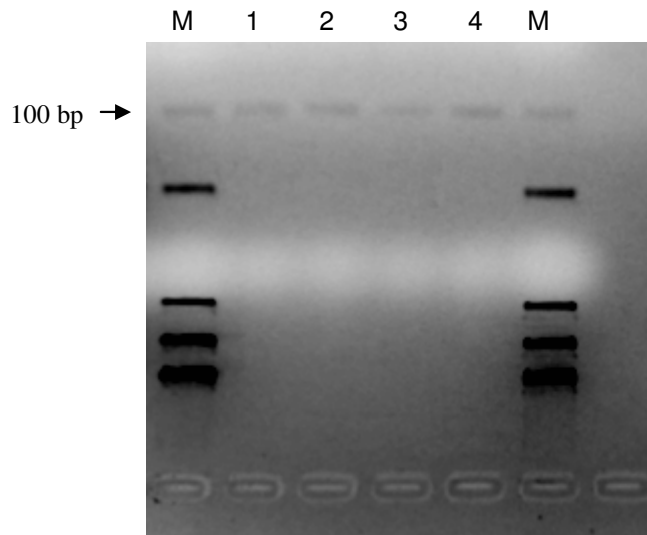


Abbildung 4.15 Foto des Agarosegels zur Konzentrationsabschätzung der PCR Produkte

M...DNA-molecular weight marker (100 bp – 2 ng/µl, 200 bp – 4 ng/µl, 500 bp – 10 ng/µl, 700 bp – 14 ng/µl, 1000 bp – 20 ng/µl) ; 20 µl aufgetragen
1...brauner Senf; 2...Pak choi; 3...Chinakohl; 4...schwarzer Senf ; jeweils 10 µl aufgetragen

Tabelle 4.4 Ergebnis der Sequenzierung der PCR Produkte

(Y... C oder T; R... A oder G)

PCR Produkt	Sequenz
brauner Senf vorwärts	CCGCC-CCCAGGTTTAATTCACGGTGGGAGAGACTATTTAT AATGCTTAGGTTTCTGGCAAAGAAGTGA
Pak choi vorwärts	CCGCC-CCCAGGTTTA ^Y TTACGGTGGGAGAGACTATTTAT AATGCTTAGGTTTCTGGCAAAGAAGTG
Chinakohl vorwärts	CCGCC ^A CCCAGGTTTA-TTC ^R CGGTGGGAGAGACTATTTAT AATGCTTAGGTTTCTGGCAAAGAAGTG
schwarzer Senf vorwärts	CCGCC-CCCAGGTT ^Y AATTCACGGTGGGAGAGACTATTTAT AATGCTTAGGTTTCTGGCAAAGAAGTG

PCR Produkt	Sequenz
brauner Senf rückwärts	GTCTCTCCCACCGTGAATTAAACCTGGTGGCGGTAGTTA CAAGCGTAACCCCTTTTATCATTAGGCCA
Pak choi rückwärts	GTCTCTCCCACCGTGAATTAAACCTGGTGGCGGTAGTTA CAAGCGTAACCCCTTTTATCATTAGGCCA
Chinakohl rückwärts	T AGTCTCTCCCACCGTGAATTAAACCTGGTGGCGGTAGTTA CAAGCGTAACCCCTTTTATCATTAGGCCA
schwarzer Senf rückwärts	GTCTCTCC - ACCGTGAATT RA- CCTGGTGGCGGTAGTTA CAAGCGTAACCCCTTTTATCATTAGGCCA

4.1.7 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse des PCR Produkts von Primerpaar 9

Um zwischen den PCR Produkten von braunem Senf, Chinakohl und Pak choi trotz ähnlicher c_t -Werte bei den real time Experimenten mit Sonde und nur geringen Sequenzunterschieden vielleicht doch unterscheiden zu können, wurde eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM) durchgeführt. Dazu wurde, wie in Kapitel 5.3.4.6 beschrieben, ein zweistufiges Temperaturprogramm verwendet und eine PCR mit Eva Green mit 40 Zyklen zur Produktamplifikation durchgeführt, bevor die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse angeschlossen wurde. Die erhaltenen Schmelzkurven waren für braunen Senf, Chinakohl und Pak choi nahezu ident. Eine geringe Abweichung wurde für schwarzen Senf erhalten, der auch mitgetestet wurde. Somit ermöglicht auch die PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse keinen spezifischen Nachweis von braunem Senf.

4.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnten mehrere Primerpaare entworfen werden, die sich zur Detektion von braunem Senf in einer PCR Methode eignen, aber keines davon zeigte eine Spezifität für braunen Senf. Insbesondere Raps und die beiden anderen Senfarten wiesen eine Kreuzreaktivität auf. Auch die Kreuzblütengewächse Chinakohl und Pak choi führten zu Signalanstiegen. Die Kreuzreaktivitäten konnten, trotz verschiedener Ansätze, die Spezifität der PCR Methode zu erhöhen, nicht eliminiert werden. Die Kreuzreaktivität beruht auf ähnlichen DNA Sequenzen der Brassicaceae, die teilweise in den Nukleotiddatenbanken noch nicht aufscheinen. Die Unvollständigkeit der Datenbanken erschwert die Suche nach spezifischen Primern und kann auch als Ursache für die falsch vermutete Spezifität der entworfenen Primer gesehen werden.

4.2 Bestimmung von Sesam in Modelllebensmitteln und kommerziell erhältlichen Produkten

4.2.1 Verwendete Methoden

4.2.1.1 Real time PCR Methode zur Detektion von Sesam

Die im Zuge dieser Diplomarbeit verwendete real time PCR Methode zur Detektion von Sesam ist ein Teil der von Schöringhumer et al. 2009 entwickelten duplex PCR Methode zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Haselnuss. Die Primer und Sondensequenzen sowie das verwendete Pipettierschema und Protokoll sind in Kapitel 5.3.5 zu finden.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR Methode wurde eine Standardfunktion, wie in Kapitel 5.3.5.4 beschrieben, erstellt. Die PCR Kurven der Verdünnungsreihe und die erstellte Standardfunktion sind in den Abbildungen 4.16 und 4.17 zu sehen. Der Ansatz, der noch zu einem Signal führte, war die 1:10000 Verdünnung des Sesam DNA Extrakts, er hatte eine Konzentration von 2 pg/μl. Dies entspricht einer Absolutmenge von 10 pg DNA. Die Amplifikationseffizienz betrug 103,4 % bei einem Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,988$.

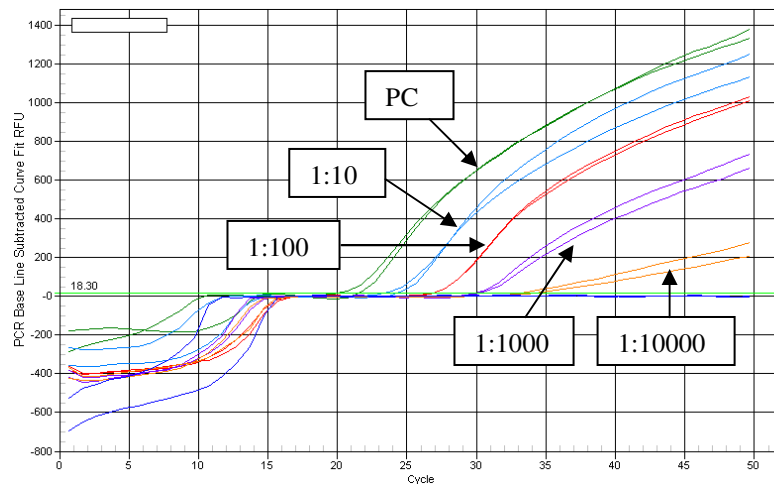


Abbildung 4.16 PCR Kurven einer Verdünnungsreihe eines Sesamextrakts

PC...Positivkontrolle

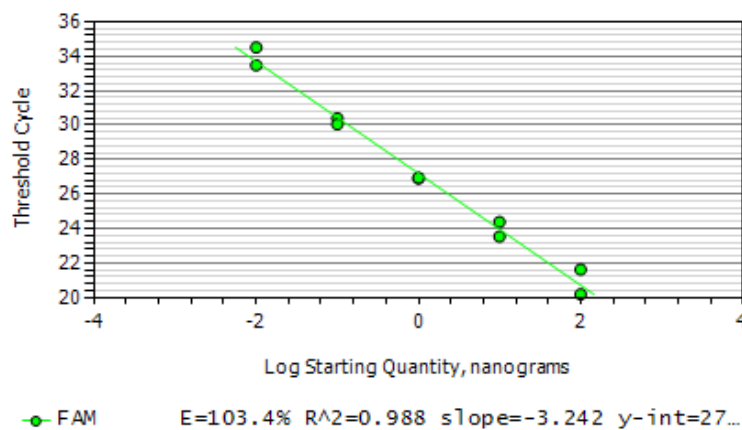


Abbildung 4.17 Standardkurve der real time PCR Methode zur Detektion von Sesam

4.2.1.2 Sandwich ELISA zur Detektion von Sesam

Der verwendete Sandwich ELISA wurde von Gerda Redl im Zuge ihrer Diplomarbeit entwickelt und nach weiterer Validierung publiziert (Redl et al., 2010). Der Ablauf ist in Kapitel 5.8.2 näher beschrieben. Für die Erstellung einer Kalibrierfunktion wurden Sesamstandards mitgemessen. Dazu wurden Sesamproteinextrakte mit zuvor bestimmter Konzentration (siehe Kapitel 5.7) passend verdünnt. Es wurden die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) durch mehrmalige Messung von Blindwerten in PBS bestimmt (siehe Kapitel 5.8.3). Die Messungen ergaben einen LOD von 6,97 ng Sesamprotein/ μ l. Unter Berücksichtigung der Einwaage bei der Proteinextraktion ergibt sich daraus ein LOD von 0,17 mg Sesamprotein/kg Lebensmittel. Der LOQ lag bei 27,09 ng/ μ l, dies entspricht 0,68 mg Sesamprotein/kg Lebensmittel. Um erhaltene Konzentrationen in mg Sesamprotein/kg Lebensmittel auf mg Sesam/kg Lebensmittel umzurechnen, wurden diese mit einem Umrechnungsfaktor von 5,5 (Redl et al., 2010) multipliziert. Somit ergab sich ein LOD von 0,94 mg Sesam/kg Lebensmittel, sowie ein LOQ von 3,74 mg Sesam/kg Lebensmittel.

4.2.1.3 Kompetitiver ELISA zur Detektion von Sesam

Der kompetitive ELISA wurde von Fatima Tazeen Husain im Zuge ihrer Dissertation 2011 entwickelt (Husain et al., 2010) und, wie in Kapitel 5.8.1 beschrieben, durchgeführt. Als Standard wurde ein Proteinextrakt von Sesam herangezogen, dessen Konzentration mittels Bradford Assay (siehe Kapitel 5.7) bestimmt wurde. Die in Kapitel 5.8.3 beschriebene Art der Bestimmung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze für den kompetitiven ELISA ergab einen LOD von 87,07 ng Sesamprotein/ μ l bzw. 2,18 mg Sesamprotein/kg Lebensmittel. Die Bestimmungsgrenze lag bei 532,69 ng/ μ l, dies entspricht einem LOQ von 13,32 mg Sesamprotein/kg Lebensmittel. Der LOD lag somit bei 11,99 mg Sesam/kg Lebensmittel und der LOQ bei 73,26 mg Sesam/kg Lebensmittel. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs waren demnach höher als jene des Sandwich ELISAs.

4.2.2 Anwendung der Methoden auf kommerziell erhältliche Lebensmittel

Die real time PCR Methode, der Sandwich ELISA und der kompetitive ELISA sollten zum Nachweis von Sesam in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln eingesetzt werden, die mit „Kann Spuren von Sesam enthalten“ bzw. „Wird in Betrieben, die auch Sesamprodukte herstellen, hergestellt“ gekennzeichnet waren.

4.2.2.1 Probenaufarbeitung

Aus 45 verschiedenen kommerziell erhältlichen Lebensmitteln wurde mit der CTAB Methode (siehe Kapitel 5.1.1) DNA extrahiert und, wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, photometrisch ihre Reinheit und Konzentration bestimmt. Die Liste der analysierten Lebensmittel ist in Kapitel 5.3.5.1 zu finden. Teilweise musste das Extraktionsprotokoll bezüglich der Probeneinwaage, des Volumens der Extraktionslösung und der Inkubationszeiten verändert werden, um höhere Konzentrationen und bessere Reinheiten zu erhalten. Da die Extrakte von Nuss- und Kokoskeksen weder eine ausreichende Konzentration noch Reinheit aufwiesen, wurde aus diesen Lebensmitteln die DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit (siehe Kapitel 5.1.2) extrahiert. Damit konnten höhere Konzentrationen und Reinheiten im Bereich von 1,2 bis 1,3 erzielt werden. Die Reinheit der meisten Extrakte lag jedoch im Bereich von 1,9 bis 2,1.

Aus den Lebensmitteln wurden außerdem, wie in Kapitel 5.6 beschrieben, Proteine extrahiert. Bei der Proteinextraktion aus Knäckebröten, den Vollreis Waffeln und den Ofen Chips wurde die Einwaage von 10 g Probe auf die Hälfte reduziert, bei gleichem Volumen an Extraktionslösung, da sonst nach dem Zentrifugieren keine flüssige Phase erhalten werden konnte. Außerdem wurde mehrmals in der Tischzentrifuge bei 10000 rpm zentrifugiert und zweimal filtriert, bevor die Extrakte aliquotiert und aufgehoben wurden.

4.2.2.2 Durchführung der PCR

Fast alle bei der Probenaufarbeitung erhaltenen Extrakte wiesen die Mindestkonzentration von 20 ng/ μ l auf. Bei Extrakten, die eine Konzentration < 20ng/ μ l aufwiesen, wurde im Supermix die Wassermenge reduziert und dafür das Volumen an DNA Lösung im Reaktionsansatz erhöht.

Die bei der PCR erhaltenen Ergebnisse waren für fast alle getesteten Lebensmittel negativ. Abbildung 4.18 zeigt ein PCR Ergebnis für einige getestete Lebensmittel, wobei nur die DNA Extrakte eines Lebensmittels zu einem Fluoreszenzanstieg führten. Für alle Lebensmittel-extrakte, die zu einem negativen Nachweis führten, wurde eine Inhibitionskontrolle durchgeführt, um ausschließen zu können, dass das negative Ergebnis durch die Anwesenheit inhibierender Matrixkomponenten verursacht wurde. Die Ergebnisse der PCR sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

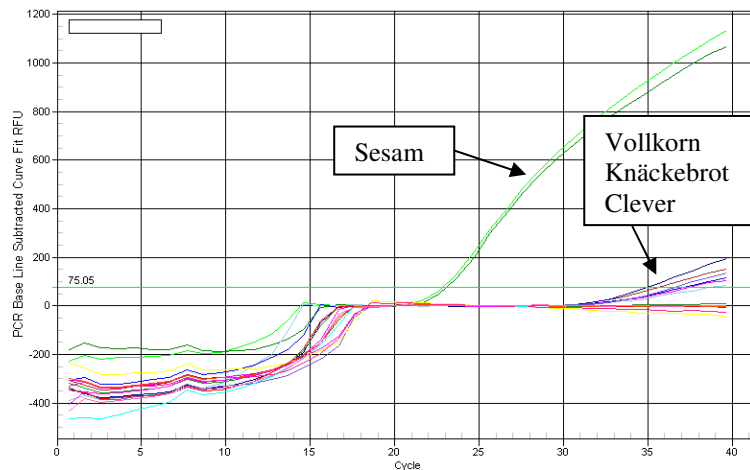


Abbildung 4.18 PCR Kurven zur Sesamdetektion in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

4.2.2.2.1 Inhibitionskontrolle

Für die Inhibitionskontrolle wurde jedem Ansatz die gleiche Sesam DNA Menge wie der Positivkontrolle zugefügt. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 5.3.5.3 zu finden. Abbildung 4.19 zeigt, dass sich die für die Proben erhaltenen c_t -Werte nicht wesentlich von jenem der Positivkontrolle unterscheiden. Daher konnte eine Beeinflussung der real time PCR Methode durch Matrixkomponenten ausgeschlossen werden.

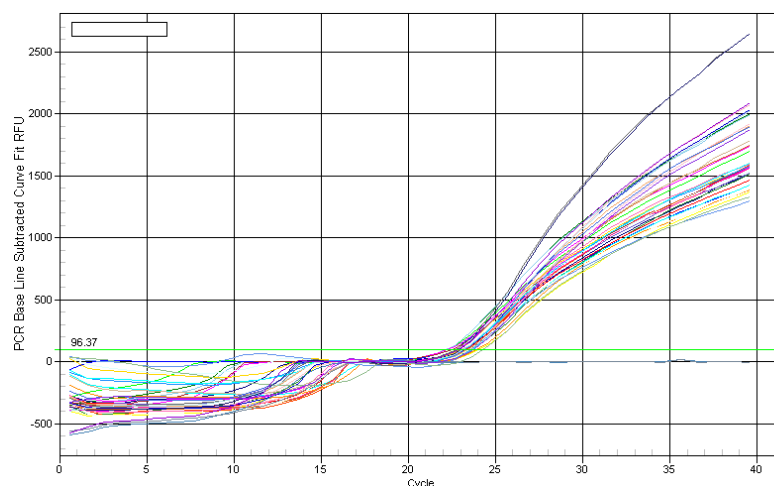


Abbildung 4.19 Inhibitionskontrolle kommerziell erhältlicher Lebensmittel

4.2.2.3 Durchführung der ELISAs

Im Sandwich ELISA wurden die Proteinextrakte 1:5 verdünnt eingesetzt und dreimal parallel analysiert. Für die Auswertung wurde eine Kalibrierkurve mit Hilfe von acht Standardlösungen, die auf der Platte mitbestimmt wurden, erstellt. Lebensmittel, die ein messbares Signal lieferten, wurden zumeist ein zweites Mal extrahiert und untersucht und zusätzlich mit dem kompetitiven ELISA gemessen. Die Abbildungen 4.20 und 4.21 zeigen Kalibrierkurven für die beiden ELISAs. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 zu finden.

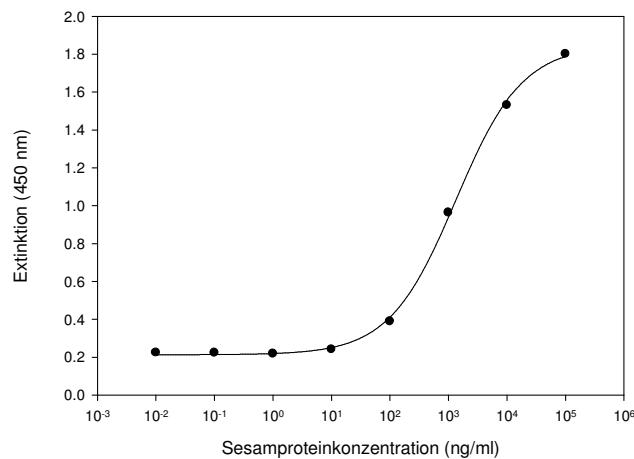


Abbildung 4.20 Kalibrierkurve des Sandwich ELISAs zur Detektion von Sesam

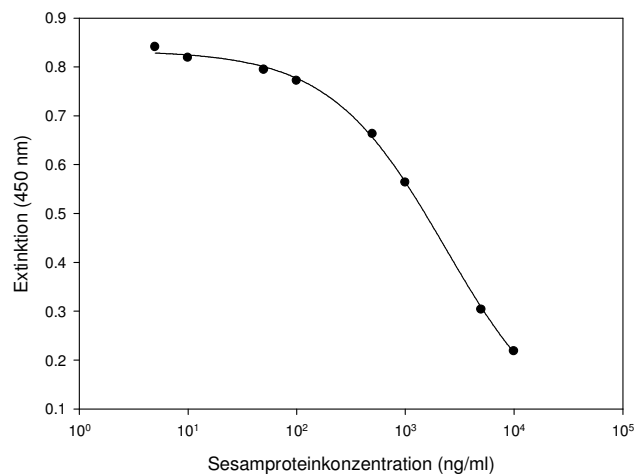


Abbildung 4.21 Kalibrierkurve des kompetitiven ELISAs zur Detektion von Sesam

4.2.2.4 Vergleich der mittels PCR und den ELISAs erhaltenen Ergebnisse

In der folgenden Tabelle 4.5 sind die mit der PCR Methode und den ELISAs erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Einige Lebensmittel ergaben Sesamkonzentrationen über der Nachweisgrenze, aber kleiner der Bestimmungsgrenze und wenige lagen über der Bestimmungsgrenze. Für diese wurde eine weitere Analyse oder sogar eine erneute Extraktion durchgeführt. Die Ergebnisse dabei bestätigten größtenteils die erhaltenen Werte. Bei einigen Produkten waren die Sesamkonzentrationen bei mehrmaligen Analysen manchmal $< \text{LOD}$ und manchmal $< \text{LOQ}$ bzw. $< \text{LOQ}$ und $> \text{LOQ}$ und erlaubten somit keine eindeutige Aussage. Einige Lebensmittel wurden auch mit dem kompetitiven ELISA analysiert. Da der kompetitive ELISA tendenziell höhere Werte lieferte und alle getesteten Lebensmittel messbare Signale gaben, wurde angenommen, dass große Matrixeffekte auftreten. Dies hatte auch schon Fatima Tazeen Husain in ihrer Dissertation festgestellt. Im Unterschied zur von Fatima Tazeen Husain validierten Methode wurde in der vorliegenden Diplomarbeit die Kalibrierkurve mit Proteinextrakten aus Sesam erstellt, und nicht durch Zuspiken von Sesamprotein zu den Proteinextrakten aus sesamfreien Lebensmitteln. Da die Matrixzusammensetzung der Lebensmittel vielfältig und nicht genau bekannt ist, konnten keine passenden Leerwertmessungen gemacht werden, um die Matrixeffekte zu bestätigen. Es wurden daher keine weiteren kommerziell erhältlichen Lebensmittel mit dem kompetitiven ELISA getestet.

Tabelle 4.5 Ergebnisse der Analyse kommerziell erhältlicher Lebensmittel mittels PCR und zwei ELISAs

„+“... Fluoreszenzanstieg bei der PCR; „-“... kein Signalanstieg innerhalb von 40 Zyklen;
 „/“... trennt Ergebnisse von an verschiedenen Tagen durchgeführten Analysen des gleichen Extrakts;
 „;“... trennt Ergebnisse verschiedener Extrakte; „< LOD“... unter der Nachweisgrenze; „< LOQ“... unter der Bestimmungsgrenze; „n.g.“... nicht getestet; „*“... Ergebnis wurde als Ausreißer betrachtet. Die mit den ELISAs gefundenen Sesamkonzentrationen sind die Mittelwerte aus drei Parallelbestimmungen.

[LOD/LOQ (mg Sesam/kg Lebensmittel): Sandwich ELISA 0,94 / 3,74; kompetitiver ELISA 11,99 / 73,26]

Lebensmittel	PCR (c _t -Wert)	Sandwich ELISA (mg Sesam/kg Lebensmittel)	Kompetitiver ELISA (mg Sesam/kg Lebensmittel)
Apfelkekse	–	47/< LOQ*/42	191
Dinkelkekse	–	15/13	523
Mulina Bianco Ciocchini	–	< LOD	n.g.
Meringue Noisettes Kekse	–	< LOD	n.g.
Crème Coco Kekse	–	< LOD	n.g.
Vollkorn Knäckebrot Clever Charge 1	+ (36,69)	267/315/145 ; 165	655 ; 485
Vollkorn Knäckebrot Clever Charge 2	+ (36,28)	510 ; 286	1993
Vollkorn Knäckebrot Clever Charge 3	+ (35,84)	479 ; 330	1993
TUC Classic	–	< LOD	n.g.
TUC Paprika	–	< LOD	n.g.
Vollreis Waffeln	–	< LOD	n.g.
Farfalline Blätterteiggebäck	–	< LOD	n.g.
Finn Crisp Coriander	–	< LOD	n.g.
Finn Crisp Multigrain Charge 1	–	6/6/5 ; 5	121 ; 99
Finn Crisp Multigrain Charge 2	–	< LOD	n.g.
Finn Crisp Original	–	< LOD	n.g.
Pizza Snack Mediterraneo	–	< LOQ/4	320
Ofen Chips sour cream	–	< LOD	n.g.
Gold fischli Original	–	< LOD	n.g.
Grissini Torinesi	–	< LOD	n.g.
Reiswaffeln mit Joghurt	–	< LOQ/< LOD/< LOQ ; < LOD	213 ; 139
Reiswaffeln mit Milchschokolade	–	< LOD	n.g.
Pumpnickel	–	< LOD	n.g.
Baby Kekse	–	< LOD	n.g.
Vollkorn Reiswaffeln	–	< LOD	n.g.
Müsli Riegel Cranberry	–	< LOD	n.g.
Müsli Riegel Erdbeer Joghurt	–	< LOD	n.g.

Lebensmittel	PCR (c_t -Wert)	Sandwich ELISA (mg Sesam/kg Lebensmittel)	Kompetitiver ELISA (mg Sesam/kg Lebensmittel)
Müsli Riegel Schoko-Haselnuss	–	7/< LOD*/7 ; <LOD	303 ; 209
Müsli Riegel Waldbeere	–	17/< LOQ*/19	153
Bio Knäckebrot	–	235 ; 131	2135
Fruchtgebäck Erdbeer	–	< LOQ ; < LOQ	211
Orange Fruchtschnitte	–	< LOD	n.g.
Beere Fruchtschnitte	–	< LOD	n.g.
Müsli Fruchtschnitte	–	< LOD	n.g.
Krümelmonsterkekse	–	< LOQ/< LOD/< LOQ ; < LOD	169 ; 99
Mini Cracker salted	–	< LOD	n.g.
Sticks	–	< LOQ ; < LOQ	352
Biscuit Classic	–	< LOD	n.g.
Biscuit Fibre	–	< LOD	n.g.
Roggen dünn	–	< LOD	n.g.
Mjölknäckebrot	–	< LOQ ; < LOQ	670
Mehrkorn Knäckebrot	–	< LOD	n.g.
Vollkorn Knäckebrot	–	14 ; 8	597
Meistersinger Feine Nürnberger Oblaten Lebkuchen	–	< LOD	n.g.
Bake Rolls Bacon	–	78/< LOD*/46	183
Bake Rolls Garlic	–	< LOD	n.g.
Bake Rolls Onion	–	< LOD	n.g.
Weizengebäck „Brötchen“	–	< LOD	n.g.
„Brötchen“ gebacken	–	< LOD	n.g.

Für 44 von 45 Produkten wurde in der PCR ein negatives Ergebnis erhalten, nur bei einem Produkt (Vollkorn Knäckebrot Clever) kam es zu einem Signalanstieg innerhalb von 40 Zyklen. Von diesem Produkt wurden zwei weitere Chargen analysiert, auch diese führten zu einem positiven Ergebnis.

Mit dem Sandwich ELISA wurde in 13 Fällen ein positives Ergebnis erhalten, mit dem kompetitiven ELISA in allen 15 untersuchten Produkten. In 8 Produkten lag die Sesamkonzentration über der Bestimmungsgrenze des Sandwich ELISAs und in 15 über der Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs.

Nur in einem Produkt (Vollkorn Knäckebrot Clever) führten alle drei Methoden zu einem positiven Ergebnis. Die Ursache für die geringe Zahl an positiven Ergebnissen bei der PCR liegt in der höheren Nachweisgrenze der eingesetzten PCR Methode.

Bei einem Produkt (Müsli Riegel Schoko-Haselnuss) konnte im ersten Extrakt Sesam detektiert werden, im zweiten allerdings nicht. Die schlechte Reproduzierbarkeit ist wahrscheinlich auf eine Inhomogenität des Probenmaterials zurückzuführen.

In einem Produkt (Finn Crisp Multigrain) konnte in einer Charge mit dem Sandwich ELISA Sesam nachgewiesen werden, in einer weiteren Charge jedoch nicht.

Für die Produkte Reiswaffeln mit Joghurt und Krümelmonsterkekse wurde kein eindeutiges Ergebnis erhalten. Sesam könnte in Spuren in diesen Produkten enthalten sein. Ein Produkt (Pizza Snack) wies eine Sesamkonzentration nahe der Bestimmungsgrenze auf.

Die mit den beiden ELISAs ermittelten Sesamkonzentrationen variierten sehr stark. Es ist anzunehmen, dass Matrixeffekte beim kompetitiven ELISA die Ursache dafür sind.

4.2.3 Anwendung der Methoden auf Modelllebensmittel

4.2.3.1 Herstellung der Modelllebensmittel

Der für die Herstellung der Modelllebensmittel verwendete Sesam stammte von der Firma Farmgold. Außerdem wurde bei einer Sesamölpresse Sesammehl bezogen, das sonst vor allem als Futtermittel verkauft wird. Weitere Abnehmer sind Personen, die unter einer Weizenunverträglichkeit leiden, weshalb die Qualität zur Lebensmittelherstellung geeignet war. Es wurde Sesam bei verschiedenen Temperaturen für 10 Minuten geröstet (siehe Kapitel 5.10), um die Nachweisbarkeit nach der Temperaturbehandlung zu überprüfen. Abbildung 4.22 zeigt den verwendeten unbehandelten, gemahlenen und gerösteten Sesam sowie das Sesammehl.

Außerdem wurden Sesambrote und Sesamkekse mit 0, 10, 25, 50, 75 und 100 mg Sesam pro kg Lebensmittel, wie in Kapitel 5.9 beschrieben, hergestellt. Zur Herstellung wurde Weizenmehl mit gemahlenem Sesam gemischt und passend mit weiterem Sesammehl verdünnt, da das gekaufte Sesammehl sich als schlecht nachweisbar erwies (siehe Kapitel 4.2.3.2). Die Zusammensetzung der Mehlmischungen ist in den Tabellen 5.11 bzw. 5.12 zu finden. Zur Herstellung der Brote wurde der gesamte Teig verwendet. Dies erwies sich im Nachhinein als Nachteil, da der unbehandelte Brotteig nicht als Vergleich untersucht werden konnte. Um dies auszugleichen, wurden die verwendeten Mehlmischungen analysiert. Bei den Keksen wurde ein Teil des Teiges zur Analyse aufgehoben. Somit konnte ein Vergleich vor und nach der Temperaturbehandlung angestellt werden.



Abbildung 4.22 Sesam (1), gemahlener Sesam (2), Sesammehl (3) und gerösteter Sesam (4)

4.2.3.2 Analyse von geröstetem Sesam und Sesammehl

Aus bei unterschiedlichen Temperaturen geröstetem Sesam und dem Sesammehl wurde DNA mit der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen CTAB Methode extrahiert. Trotz mehrmaliger Versuche war es nicht möglich, aus dem bei 250 °C gerösteten Sesam DNA zu extrahieren. Die Konzentrationen und Reinheiten der anderen Extrakte sind in Tabelle 4.6 angegeben. Die Extrakte wurden in einer Konzentration von 20 ng/µl in der real time PCR Methode eingesetzt und die erhaltenen Kurven und c_t -Werte mit jenen von ungeröstetem Sesam verglichen.

Die erhaltenen Amplifikationskurven sind in Abbildung 4.23 zu sehen. Die c_t -Werte, die für die Extrakte aus geröstetem Sesam erhalten wurden, unterschieden sich um maximal einen

Zyklus von jenem, der für den DNA Extrakt aus unbehandeltem Sesam erhalten wurde. Somit kann DNA aus für 10 min bei bis zu 200 °C geröstetem Sesam mit der real time PCR genauso gut nachgewiesen werden wie DNA aus unbehandeltem Sesam. DNA aus Mehl lieferte trotz Temperaturbehandlung während der Herstellung einen nur um einen Zyklus von der Positivkontrolle abweichenden c_t -Wert.

Tabelle 4.6 Konzentration und Reinheit der DNA Extrakte aus Sesam

Sesam (Rösttemperatur °C)	Konzentration (ng/μl)	Reinheit
Sesammehl	93	2,0
Sesam (0)	86	2,1
Sesam (100)	56	2,0
Sesam (150)	71	2,0
Sesam (200)	58	1,9

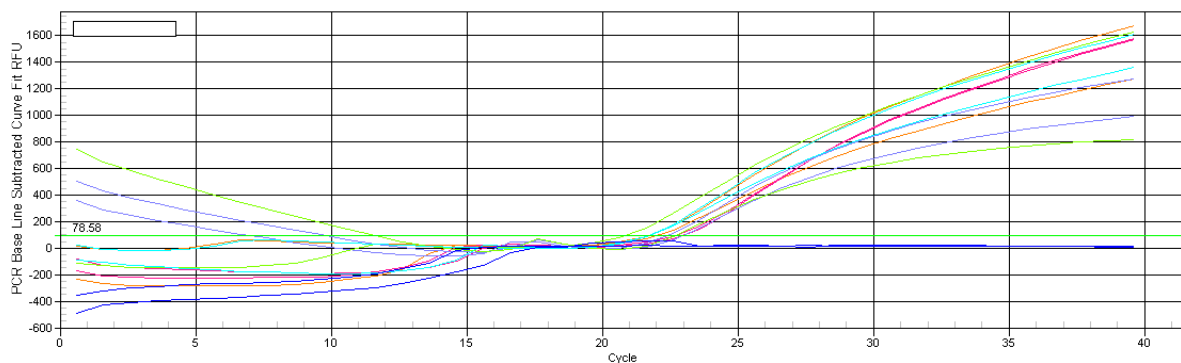


Abbildung 4.23 PCR Kurven für Sesam, Sesammehl und gerösteten Sesam

Orange: ungerösteter Sesam; rosa: Sesammehl; blauviolett: bei 100 °C gerösteter Sesam;
hellgrün: bei 150 °C gerösteter Sesam; hellblau: bei 200 °C gerösteter Sesam; dunkelgrün:
Positivkontrolle; blau: Negativkontrolle

Zusätzlich zu der Untersuchung mit der real time PCR erfolgte eine Analyse mit dem Sandwich ELISA. Dazu wurde von den aus den Proben erhaltenen Proteinextrakten (siehe Kapitel 5.6) die Konzentration mittels Bradford Assay bestimmt (siehe Kapitel 5.7). Somit konnte mit den Extrakten eine Verdünnungsreihe hergestellt und mit dem Sandwich ELISA gemessen werden, um eine Kalibrierfunktion (siehe Kapitel 5.8.3) zu erstellen. Die erhaltenen Kurven sind in den Abbildungen 4.24 und 4.25 zu sehen. Bei dem bei 100 °C, 150 °C und 200 °C gerösteten Sesam ist der Kurvenverlauf jenem von unbehandeltem Sesam sehr ähnlich, die Kalibrierfunktionen waren sogar leicht nach niedrigeren Konzentrationen verschoben. Die Kalibrierfunktionen für bei 250 °C geröstetem Sesam und für Sesammehl waren hingegen nach höheren Konzentrationen verschoben. Daraus kann geschlossen werden, dass das Rösten von Sesam für 10 Minuten bei Temperaturen bis 200 °C keinen negativen Einfluss auf die Detektierbarkeit der Proteine hat, eine Temperatur von 250 °C diese aber zum Teil denaturiert. Das gekaufte Sesammehl wurde bei der Herstellung ebenfalls hitzebehandelt und ermöglichte wegen der schlechten Nachweisbarkeit auf Proteinebene keinen Einsatz in der Herstellung der Modelllebensmittel.

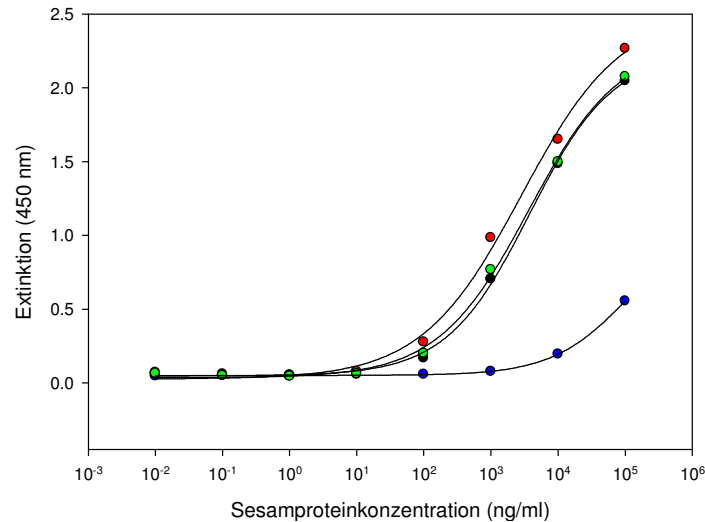


Abbildung 4.24 Kalibrierfunktion von Sesam, Sesammehl und geröstetem Sesam

schwarz: Sesam; blau: Sesammehl; rot: bei 100 °C gerösteter Sesam; grün: bei 150 °C gerösteter Sesam

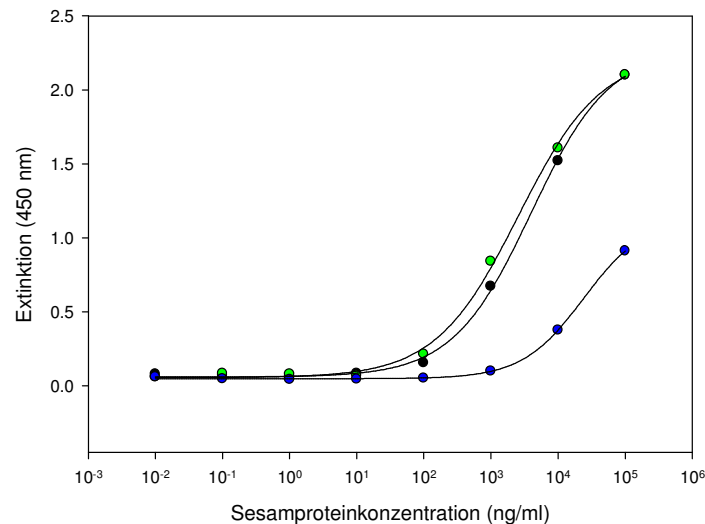


Abbildung 4.25 Kalibrierfunktion von Sesam und geröstetem Sesam

schwarz: Sesam; grün: bei 200 °C gerösteter Sesam; blau: bei 250 °C gerösteter Sesam

4.2.3.3 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze der ELISAs in Lebensmittelmatrizes

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze in den Lebensmittelmatrizes Brot, Keksteig und Keksen wurden aus den Modelllebensmitteln, die keinen Sesam enthielten, jeweils mit der in Kapitel 5.6 beschriebenen Methode Proteine extrahiert. Unter Verwendung der Messergebnisse aus wiederholten Dreifachbestimmungen mittels der ELISAs wurden die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze berechnet und in mg Sesamprotein/kg Lebensmittel umgerechnet.

Sandwich ELISA

Für die Lebensmittelmatrizes Brot, Keksteig und Kekse ergaben sich die in Tabelle 4.7 zu findenden Werte. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze in Brot und Keksen liegen im Bereich der in PBS bestimmten LOD und LOQ (siehe Kapitel 4.2.1.2). Im unverarbeiteten Teig liegen die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze deutlich höher. Dies deutet auf einen Einfluss der Lebensmittelmatrix hin.

Tabelle 4.7 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze des Sandwich ELISAs in unterschiedlichen Matrices

Lebensmittelmatrix	mg Sesamprotein / kg Lebensmittel		mg Sesam / kg Lebensmittel	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Brot	0,14	0,34	0,77	1,87
Keksteig	3,00	3,99	16,5	21,95
Kekse	0,29	0,64	1,60	3,52

Kompetitiver ELISA

Für den kompetitiven ELISA wurden ebenfalls die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze in Brot, Keksteig und Keksen bestimmt, sie sind in Tabelle 4.8 zu finden. Im Unterschied zum Sandwich ELISA lagen die Nachweis- und Bestimmungsgrenze in allen Matrices höher als die in PBS ermittelten Werte (siehe Kapitel 4.2.1.3). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs waren stets höher als jene des Sandwich ELISAs.

Tabelle 4.8 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs in unterschiedlichen Matrices

Lebensmittelmatrix	mg Sesamprotein / kg Lebensmittel		mg Sesam / kg Lebensmittel	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Brot	4,29	8,69	23,60	47,80
Keksteig	13,45	21,91	73,98	120,51
Kekse	6,63	12,60	36,47	69,30

4.2.3.4 Analyse von Sesambrot und Sesamkeksen

Aus Sesambrot, Sesammehlmischungen, Sesamkeksen und Keksteig wurde die DNA mittels der CTAB Methode (siehe Kapitel 5.1.1) extrahiert. Die Konzentration und Reinheit der Extrakte wurden photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 5.2.1), sie sind repräsentativ für je einen Extrakt in den Tabellen 4.9 und 4.10 angeführt. Die Reinheiten lagen alle im Bereich von 1,7 bis 2,0. Die Extrakte wurden auf eine Konzentration von 20 ng/µl zum Einsatz in der real time PCR Methode verdünnt. Die PCR wurde für jeden Extrakt im Doppelansatz durchgeführt und es wurden meist zwei verschiedene Extrakte untersucht. Abbildung 4.26 zeigt die PCR Kurven einer Analyse der Extrakte aus Keksen und Keksteigen. Die bei der PCR erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 4.11 und 4.12 angegeben.

Aus den Modelllebensmitteln wurden auch mit der in Kapitel 5.6 beschriebenen Methode Proteine extrahiert. Die Extrakte wurden 1:5 und 1:10 verdünnt im Sandwich ELISA und im kompetitiven ELISA eingesetzt. Zur Auswertung wurde jene Verdünnung gewählt, deren Extinktion näher dem Wendepunkt der sigmoiden Kalibrierfunktion lag. Mit Hilfe der Kalibrierfunktion wurde die Konzentration der quantifizierbaren Signale berechnet und mit dem Korrekturfaktor von 5,5 multipliziert, um eine Angabe in mg Sesam/kg Lebensmittel zu ermöglichen. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind für Brot und Mehl in Tabelle 4.11 und für Keksteig und Kekse in Tabelle 4.12 angegeben.

Tabelle 4.9 Konzentration und Reinheit der DNA Extrakte aus Sesambrot und Mehl

(Zusammensetzung der Mehlmischungen (Mehl 1 - Mehl 5) ist in Tabelle 5.11 zu finden)

Sesamkonzentration (mg/kg Brot)	Konzentration (ng/µl)	Reinheit	Mehlmischungen	Konzentration (ng/µl)	Reinheit
0	141	1,8			
10	169	1,8	Mehl 5	516	1,8
25	191	1,9	Mehl 4	535	1,8
50	160	1,8	Mehl 3	563	1,8
75	167	1,9	Mehl 2	567	1,8
100	186	1,8	Mehl 1	520	1,8

Tabelle 4.10 Konzentration und Reinheit der DNA Extrakte aus Sesamkeksen und Teigen

Sesamkonzentration (mg/kg Keks)	Konzentration (ng/μl)	Reinheit	Sesamkonzentration (mg/kg Teig)	Konzentration (ng/μl)	Reinheit
0	23	1,8	0	187	1,9
10	32	1,8	10	187	1,9
25	33	1,8	25	190	1,9
50	45	1,9	50	213	1,9
75	34	1,9	75	149	1,9
100	37	1,9	100	149	2,0

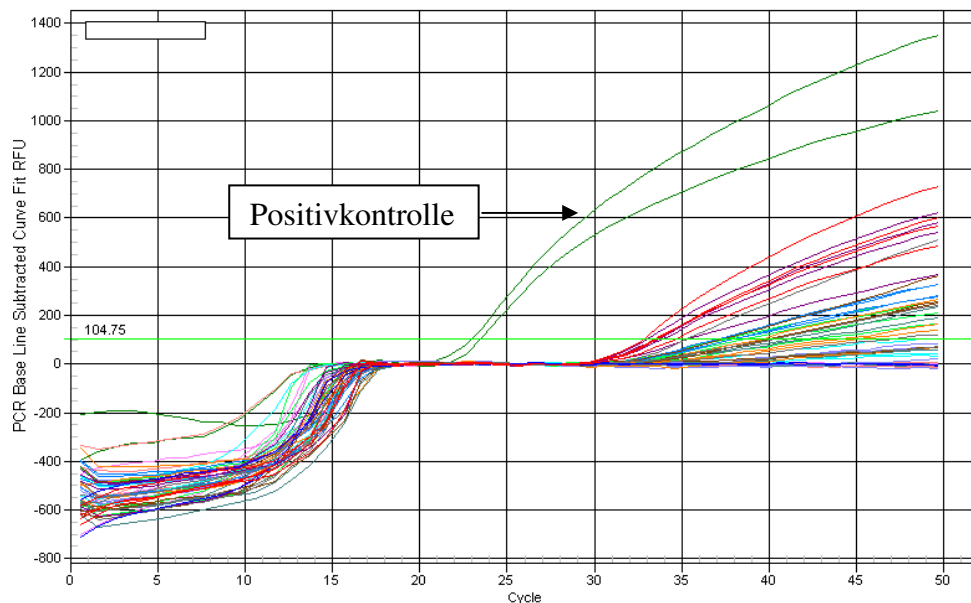


Abbildung 4.26 PCR Kurven der Untersuchung von DNA Extrakten aus Sesamkeksen und Sesamteigen

Tabelle 4.11 PCR Ergebnisse für die Sesammehlmischungen und Brote

„/“... trennt c_t -Werte zweier Ansätze; „–“... kein Anstieg des Fluoreszenzsignals innerhalb von 45 Zyklen;
 „*“... Messung erfolgte an einem anderen Tag

Sesamkonzentration (mg/kg)	Gemessener c_t -Wert	
Mehl	1. Extrakt	2. Extrakt
Mehl 5: 16,6	– / –	– / –
Mehl 4: 41,5	– / –	– / –
Mehl 3: 83,1	39,28 / –	38,42 / 39,82
Mehl 2: 124,6	34,51 / 36,35	34,53 / 36,41
Mehl 1: 166,8	34,16 / 37,51	35,70 / 38,80*

Brot Extraktion Tag 1	1. Extrakt	1. Extrakt*	2. Extrakt	2. Extrakt*
0	– / –	– / –	– / –	– / –
10	– / –	– / –	– / –	– / –
25	– / –	– / –	44,11 / –	41,67 / –
50	42,64 / –	39,25 / –	– / –	40,08 / 44,40
75	43,36 / 39,8	42,86 / 39,08	39,78 / 40,33	37,92 / 34,77
100	41,07 / –	38,64 / 37,34	42,98 / 37,72	41,27 / 37,11

Brot Extraktion Tag 2	3. Extrakt
0	– / –
10	– / –
25	37,9 / –
50	36,84 / 39,46
75	36,75 / 40,76
100	39,05 / 35,22

Tabelle 4.12 PCR Ergebnisse für die Keksteige und Kekse

„–“ ... kein Anstieg des Fluoreszenzsignals innerhalb von 45 Zyklen

Sesamkonzentration (mg/kg)	Gemessener c_t -Wert	
Teig	1. Extrakt	2. Extrakt
0	– / –	– / –
10	– / –	– / –
25	38,77 / 42,79	37,56 / 40,15
50	37,47 / 37,17	38,02 / 38,01
75	33,96 / 35,52	33,71 / 33,11
100	34,77 / 33,55	33,67 / 32,85
Kekse	1. Extrakt	
0	– / –	
10	– / –	
25	42,18 / –	
50	39,73 / 44,14	
75	37,46 / 40,12	
100	40,46 / 35,33	

In den Lebensmitteln, die keinen Sesam enthielten, konnte keiner nachgewiesen werden. In keiner der Matrices konnte eine Konzentration von 10 mg Sesam pro kg Lebensmittel detektiert werden. Die nächsthöhere Sesamkonzentration führte mit Ausnahme des Keksteiges zu keinem oder nur einem Signalanstieg in vier bzw. zwei Ansätzen. Sowohl bei den Sesammehlmischungen als auch beim Keksteig wurde mit steigender Sesamkonzentration ein niedrigerer c_t -Wert erhalten. Bei den verarbeiteten Lebensmitteln ist dieser Trend auf Grund der hohen c_t -Werte und der stark schwankenden Ergebnisse nur bedingt erkennbar. Mit abnehmender Sesamkonzentration wurde eine sinkende Anzahl an Anstiegen des Fluoreszenzsignals beobachtet. Aus diesem Grund wurde aus den Broten ein zweites Mal die DNA extrahiert und erneut mittels PCR analysiert. Auf Grund der Ähnlichkeit der Ergebnisse konnten Fehler bei der Extraktion ausgeschlossen werden. Im Keksteig konnte Sesam ab einer Konzentration von 25 mg/kg detektiert werden, in den Keksen erst ab einer Konzentration von 50 mg/kg.

Der Nachweis war im Keksteig und in den Keksen besser möglich als in den Mehlmischungen und den Broten. Für die am Tag 1 erhaltenen Extrakte aus dem 75 mg/kg Brot wurden zum Teil frühere Signalanstiege festgestellt als für die aus dem 100 mg/kg Brot erhaltenen Extrakte. Dies war bei den Extrakten, die am zweiten Tag gewonnen wurden, nicht erkennbar und könnte auf eine Inhomogenität im Probenmaterial hindeuten. Das Mehl 2, welches zur Herstellung des 75 mg/kg Brots verwendet wurde, lieferte ähnliche c_t -Werte wie Mehl 1, aus dem das 100 mg/kg Brot hergestellt wurde. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Konzentration im Mehl 2 zu hoch lag.

In den Broten konnte Sesam ab einer Konzentration von 10 mg/kg detektiert und ab einer Konzentration von 50 mg/kg quantitativ bestimmt werden. Die Wiederfindung lag jedoch nur zwischen 7 und 21 %.

Für das 75 mg/kg Sesambrot wurde mit dem Sandwich ELISA eine höhere Sesamkonzentration ermittelt als für das 100 mg/kg Brot.

Obwohl beim kompetitiven ELISA die Nachweisgrenze in den Broten bei 24 mg/kg, die Bestimmungsgrenze bei 48 mg/kg lag, konnten in den Broten erst Sesamkonzentrationen von 75 mg Sesam/kg detektiert werden und 100 mg Sesam/kg quantifiziert werden. Auf Grund der höheren Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs war es nicht möglich, festzustellen, ob die Sesamkonzentration im 75 mg/kg Brot zu hoch war.

Tabelle 4.13 Ergebnisse der Analyse des 1. Extrakts der Brote mit dem Sandwich ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg) 1. Extraktion	Gefundene Konzentration (mg/kg)			Wiederfindung (%)		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
0	< LOD	< LOD	< LOD	–	–	–
10	< LOQ	< LOQ	< LOQ	–	–	–
25	< LOQ	2,5	< LOQ	–	10	–
50	4,4	6,8	5,2	9	14	10
75	11,0	15,5	10,7	15	21	14
100	9,3	13,0	7,3	9	13	7

Tabelle 4.14 Ergebnisse der Analyse des 1. Extrakts der Brote mit dem kompetitiven ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg) 1. Extraktion	Gefundene Konzentration (mg/kg)			Wiederfindung (%)		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
0	< LOD	< LOD	< LOD	–	–	–
10	< LOD	< LOD	< LOD	–	–	–
25	< LOD	< LOD	< LOD	–	–	–
50	< LOQ	< LOQ	< LOD	–	–	–
75	113,5	60,3	< LOQ	151	80	–
100	91,9	122,1	< LOD	92	122	–

Die für die 2. Extrakte erhaltenen Ergebnisse (siehe Tabelle 4.15 und 4.16) sind mit jenen, die für die 1. Extrakte erhalten wurden, gut vergleichbar. Die Wiederfindung lag zwischen 9 und 26 %. Die zu hohe Sesamkonzentration für das 75 mg/kg Brot konnte bestätigt werden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs waren deutlich höher als die des Sandwich ELISAs.

Tabelle 4.15 Ergebnisse der Analyse des 2. Extrakts der Brote mit dem Sandwich ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg) 3. Extraktion	Gefundene Konzentration (mg/kg)		Wiederfindung (%)	
	1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung
0	< LOD	< LOD	–	–
10	< LOQ	< LOQ	–	–
25	5,1	2,6	20	11
50	9,8	4,7	20	9
75	19,1	14,8	25	20
100	16,5	12,0	17	12

Tabelle 4.16 Ergebnisse der Analyse des 2. Extrakts der Brote mit dem kompetitiven ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg) 2. Extraktion	Gefundene Konzentration (mg/kg)		Wiederfindung (%)	
	1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung
0	< LOD	< LOD	–	–
10	< LOD	< LOD	–	–
25	< LOD	< LOQ	–	–
50	< LOD	< LOQ	–	–
75	< LOQ	63,9	–	85
100	118,6	< LOQ	119	–

Die Ursache für die zu hohen gefundenen Konzentrationen im 75 mg/kg Brot könnte einerseits ein Fehler bei der Brotherstellung, ein Fehler in der Herstellung der entsprechenden Mehlmischung oder eine auftretende Inhomogenität der Mehlmischung sein. Aus diesem Grund wurden die Mehlmischungen ebenfalls mit der PCR Methode und den zwei ELISAs untersucht. Die Tabellen 4.17 und 4.18 zeigen, dass die Wiederfindungen der ELISAs deutlich zu hoch waren. Die Wiederfindungen des kompetitiven ELISAs waren höher als die des Sandwich ELISAs, was auf Matrixeffekte schließen lässt. Trotz der zu hohen Werte ist zu erkennen, dass die gefundenen Konzentrationen mit steigender Sesamkonzentration zunehmen.

Die Sesammehlmischung, aus der das Brot mit einer Konzentration von 75 mg Sesam/kg hergestellt wurde (Sesamkonzentration 124,6 mg/kg), lieferte mit dem Sandwich ELISA nur bei einer von drei an verschiedenen Tagen durchgeführten Analysen ein höheres Signal als die höchste Konzentration, beim kompetitiven ELISA bei zwei der drei Messungen. Es konnte daher nicht eindeutig festgestellt werden, ob der Fehler bereits in der Mehlmischung vorlag.

Tabelle 4.17 Ergebnisse der Analyse der Extrakte der Mehlmischungen mit dem Sandwich ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg)	Gefundene Konzentration (mg/kg)			Wiederfindung (%)		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Mehl 5: 16,6	37,3	32,0	33,3	225	193	200
Mehl 4: 41,5	95,2	83,2	84,3	229	200	202
Mehl 3: 83,1	195,5	153,7	161,2	235	185	194
Mehl 2: 124,6	663,8	212,6	254,4	533	171	204
Mehl 1: 166,8	450,4	223,1	303,6	270	134	182

Tabelle 4.18 Ergebnisse der Analyse der Extrakte der Mehlmischungen mit dem kompetitiven ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg)	Gefundene Konzentration (mg/kg)			Wiederfindung (%)		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Mehl 5: 16,6	130,0	191,4	57,6	783	1153	347
Mehl 4: 41,5	260,6	183,9	146,8	628	443	354
Mehl 3: 83,1	384,8	269,7	214,6	463	325	258
Mehl 2: 124,6	562,9	424,7	342,2	452	341	275
Mehl 1: 166,8	571,6	426,6	338,9	343	256	203

Im Fall der Kekse wurden sowohl die Keksteige als auch die gebackenen Kekse analysiert. Die mit den Sandwich ELISA in den Keksen ermittelten Konzentrationen kamen den tatsächlichen Konzentrationen sehr nahe (siehe Tabelle 4.19). Die Wiederfindung des Sandwich

ELISAs lag zwischen 78 und 131 %. Beim Teig waren die gefundenen Konzentrationen jedoch ungefähr um einen Faktor 3 zu hoch. Dies kann an einer Beeinflussung der Messung durch die rohen Zutaten im Keksteig oder, wie bei den Mehlmischungen, vielleicht wieder am Weizenmehl selbst liegen. Dies kann auch aus der deutlich höheren Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze im Teig geschlossen werden. Die Nachweisgrenze des kompetitiven ELISAs lag im Keksteig bei 73,98, die Bestimmungsgrenze bei 120,51 mg Sesam/kg Lebensmittel und für den Sandwich ELISA bei 16,5 bzw. 21,95 mg Sesam/kg Lebensmittel (siehe Tabellen 4.7 bzw. 4.8). Im Unterschied zum Sandwich ELISA wurden mit dem kompetitiven ELISA sowohl für den Keksteig als auch für die Kekse zu hohe Wiederfindungen erhalten (siehe Tabelle 4.20). Eine mögliche Ursache für die zu hohen Wiederfindungen in den unverarbeiteten Modelllebensmitteln könnte eine Kreuzreaktivität des AKs mit einem temperaturlabilen Protein sein, die nach der Temperaturbehandlung nicht mehr auftritt.

Tabelle 4.19 Ergebnisse der Analyse der Keksteig- und Keksextrakte mit dem Sandwich ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg)	Gefundene Konzentration (mg/kg)		Wiederfindung (%)	
	1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung
Kekse				
0	< LOD	< LOD	–	–
10	8,4	11,3	84	113
25	28,2	32,6	113	131
50	38,9	45,9	78	92
75	59,9	69,7	80	93
100	83,8	117,0	84	117
Teig				
0	15,6	20,4	–	–
10	47,3	49,4	317	290
25	98,4	105,9	331	342
50	167,3	179,1	303	318
75	221,9	229,7	275	279
100	267,5	305,3	252	285

Tabelle 4.20 Ergebnisse der Analyse der Keksteig- und Keksextrakte mit dem kompetitiven ELISA

Sesamkonzentration Soll (mg/kg)	Gefundene Konzentration (mg/kg)		Wiederfindung (%)	
	1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung
Kekse				
0	< LOD	< LOD	–	–
10	75,8	< LOQ	785	–
25	147,9	100,0	592	399
50	201,3	162,0	403	323
75	257,9	243,6	344	324
100	348,6	334,6	349	333
Teig				
0	33,6	24,0	–	–
10	84,9	60,0	513	360
25	169,2	134,4	543	441
50	267,4	235,0	468	422
75	335,6	318,0	403	392
100	368,9	390,5	335	367

4.2.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von den drei Analysenmethoden erwies sich der Sandwich ELISA als die sensitivste Methode und daher am besten geeignet, die Sesamkonzentration quantitativ zu bestimmen. Beim Vergleich der in unterschiedlichen Matrices bestimmten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Sandwich ELISAs ergaben sich für PBS, Brot und Kekse etwa gleiche Werte. Nur im Keksteig lagen der LOD und LOQ deutlich höher. Der kompetitive ELISA wies bereits in PBS eine deutlich höhere Nachweisgrenze auf als der Sandwich ELISA. In den anderen Lebensmittelmatrices lagen die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs stets höher, am höchsten waren sie im Keksteig.

Während in den Keksen die Temperaturbehandlung nur einen geringen Effekt auf die Nachweisbarkeit von Sesam hatte, führten die längere Backzeit und die kurzfristig höhere Backtemperatur der Brote zu einer geringeren Wiederfindung des Sandwich ELISAs. Bei dem kompetitiven ELISA konnte auf Grund der höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei den Broten diesbezüglich keine Aussage getroffen werden. Die Analyse der Kekse ergab mit dieser Methode zu hohe Konzentrationen, was auf Matrixeffekte schließen lässt. Bei beiden Modelllebensmitteln zeigte sich, dass die mit dem Sandwich ELISA ermittelten Konzentrationen in den unverarbeiteten Zutaten, Mehl oder fertigen Teigmischungen, zu hoch waren. Dies gilt auch für den kompetitiven ELISA.

Auch bei der PCR waren die für den Keksteig ermittelten c_t -Werte etwas niedriger als jene für die Kekse. Bei den Mehlmischungen und den Broten war dies ebenfalls der Fall.

5 Experimentelles

5.1 DNA Extraktion

5.1.1 Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Methode

Reagenzien

CTAB-Extraktionslösung

20 g/l CTAB

1,4 M NaCl

0,1 M Tris

0,02 M EDTA

pH 8,0 mit HCl eingestellt

Es wurden 500 ml Lösung hergestellt, wobei zum besseren Lösen des EDTAs am Heizrühr Tisch leicht erwärmt wurde. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

CTAB-Präzipitationslösung

5 g/l CTAB

0,04 M NaCl

Es wurden 500 ml Präzipitationslösung hergestellt und diese bei Raumtemperatur gelagert.

Proteinase K Lösung

Zu 100 mg Proteinase K wurden 5 mg SDS zugefügt und diese dann in 4 ml 50 % Glycerin, 10 mM Tris (pH 8) Lösung gelöst. Die fertige Proteinase K Lösung wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

RNAse Lösung

Die RNAse Stocklösung wurde mit 50 % Glycerin, 10 mM Tris (pH 8) Lösung verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Chloroform

NaCl Lösung 1,2 M

Isopropanol

Ethanol 70 %, eisgekühlt

Durchführung

Die Probe wurde im Mörser oder im Mixer zerkleinert und homogenisiert. Davon wurden 100 mg in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen, 500 μl CTAB-Extraktionslösung hinzugefügt und mittels Vortex gut gemischt. Die Mischung wurde eine halbe Stunde bei 65°C im Trockenschrank inkubiert, wobei alle 10 Minuten erneut durchgemischt wurde. Im Anschluss wurden 15 μl Proteinase K Lösung hinzugefügt, gemischt und eine Stunde bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 μl RNAse Lösung und Durchmischen wurde das Gefäß 2 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wurde 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 200 μl Chloroform versetzt. Am Vortex wurde 1 Minute gemischt und danach wieder 5 Minuten bei 10000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit zwei Volumsteilen CTAB-Präzipitationslösung gemischt. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 350 μl NaCl Lösung gelöst. Nach Zugabe von 350 μl Chloroform wurde 1 Minute gemischt und im Anschluss 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und mit 0,6 Volumsteilen Isopropanol versetzt. Nach weiteren

5 Minuten Zentrifugierens bei 10000 rpm wurde der Überstand verworfen und 500 µl eiskaltes Ethanol hinzugefügt. Nach dem Durchmischen und 5-minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand verworfen und der DNA Extrakt über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Der Extrakt wurde dann in 50 µl Wasser (water for cell biology - H₂O_{cb}) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.1.2 QIAamp DNA Mini Kit

Reagenzien

Im Kit enthalten:

- QIAamp Mini spin columns
- 2 ml Reaktionsgefäße
- Puffer AL
- Puffer ATL
- Puffer AW1
- Puffer AW2
- Proteinase K

Weiters wurden benötigt:

- RNase Lösung (c=20 mg/ml)
- Ethanol (96-100 %)
- H₂O_{cb}
- 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße

Durchführung

Es wurden 25 mg der zerkleinerten Probe in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 180 µl ATL Puffer versetzt. Nach der Zugabe von 20 µl Proteinase K Lösung wurde durchmischt und für 2 Stunden bei 56 °C inkubiert. Dann wurden 20 µl RNase Lösung hinzugefügt, gemischt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl AL Puffer zugegeben und nach gutem Durchmischen 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol zugesetzt und gründlich am Vortex für 15 Sekunden gemischt. Diese Mischung wurde vollständig auf eine QIAamp Mini spin column, die sich in einem 2 ml Auffanggefäß befand, überführt. Es wurde 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, die spin column in ein neues Auffanggefäß platziert und das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 500 µl AW1 Puffer wurde erneut 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und das Auffanggefäß gegen ein neues getauscht. Danach wurden 500 µl AW2 Puffer auf die spin column pipettiert und bei 14000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Nach neuerlichem Wechseln des Auffanggefäßes und Verwerfen des alten wurde wieder bei 14000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Nun wurde die spin column in ein 1,5 ml Auffanggefäß gesteckt, 200 µl H₂O_{cb} hinzugefügt und 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die spin column wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß gegeben und der Elutionsschritt wiederholt. Beide Filtrate wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.2 DNA Konzentrationsbestimmung

5.2.1 Photometrische DNA Konzentrationsbestimmung

Die Extinktion des 1:5 verdünnten DNA Extrakts wurde in Mikroküvetten bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentration wurde mit Hilfe der Formel (5) berechnet. Außerdem wurde die Reinheit unter Zuhilfenahme der Formel (6) bestimmt. Extrakte mit Konzentrationen > 20 ng/µl und Reinheiten zwischen 1,8 und 2,0 wurden für den weiteren Gebrauch aufgehoben.

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \cdot f \cdot v \quad (5)$$

A_{260} ...Extinktion bei 260 nm
f...f=50 für doppelsträngige DNA
v...Verdünnungsfaktor

$$\text{Reinheit} = \frac{A_{260}}{A_{280}} \quad (6)$$

A_{260} ...Extinktion bei 260 nm
 A_{280} ...Extinktion bei 280 nm

5.2.2 DNA Konzentrationsabschätzung mittels Agarosegelelektrophorese

5.2.2.1 Herstellung des Agarosegels

Reagenzien

50x TAE Puffer
242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA
pH 8

Der 50x TAE Puffer wurde nach Mischen der Reagenzien und pH Einstellung mit bidestilliertem Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) auf 1000 ml aufgefüllt. Daraus wurde durch eine 1:50 Verdünnung 1x TAE Puffer hergestellt.

Ethidiumbromid Lösung (10 mg/ml)

Durchführung

Zur Herstellung des 3 % Ethidiumbromid-hältigen (w/v) Agarosegels wurden 4,5 g Agarose mit 150 ml 1x TAE Puffer gemischt und im Mikrowellenherd erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte (~5 Minuten), wobei mehrmals umgeschwenkt wurde, um ein Übergehen zu vermeiden. Dann wurden 2,25 μl Ethidiumbromid Lösung zugegeben, durchmischt und die Lösung luftblasenfrei in die Gelgießapparatur gefüllt. Eventuell aufgetretene Luftblasen wurden mit dem Kamm entfernt. Dann wurde der Kamm in die Vorrichtung gesteckt und etwa eine Stunde bis zum Erhärten des Gels gewartet.

5.2.2.2 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Reagenzien

1x TAE Puffer
5x Nucleic Acid Sample Loading Buffer
Die Lösung wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{cb}}$ 1:5 verdünnt.
Molecular Weight Marker als Vergleichssubstanz
20 bp Marker (eventuell)

Es wurden 10 μl der Probe mit 10 μl 1x Nucleic Acid Sample Loading Buffer gemischt. Davon wurden 10 μl auf das Gel aufgetragen. Außerdem wurden 10 μl des Molecular Weight Markers und 10 μl eines 20 bp Markers aufgebracht. Das Gel wurde in die Elektrophoresewanne gestellt, diese mit 1x TAE Puffer befüllt und die Elektroden angeschlossen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt. Nach etwa 45 bis 60 Minuten wurde sie beendet und die Banden am UV Transilluminator sichtbargemacht und fotografiert.

5.2.2.3 Konzentrationsabschätzung

Die Bandenintensität der Probe konnte mit jenen des Molecular Weight Markers verglichen werden. Somit konnte mit Hilfe der bekannten Konzentrationen der Referenz auf die Konzentration der Probe geschlossen werden.

5.3 Real time PCR Methoden

5.3.1 Reagenzien

Supermix

iQ Sybr Green Supermix

Der iQ Sybr Green Supermix von BioRad hat folgende Zusammensetzung:
100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,4 mM je dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 50 units/ml iTaq DNA Polymerase, 6 mM MgCl₂, Sybr Green I, 20 nM Fluorescein und Stabilisatoren.

iQ Supermix

Der iQ Supermix von BioRad enthält 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,4 mM je dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 units/ml iTaq DNA Polymerase, 6 mM MgCl₂ und Stabilisatoren.

Rotor Gene Probe PCR Kit

Der Rotor Gene Probe PCR Kit wurde bei Qiagen bestellt. Der Supermix für einen PCR Lauf mit Sonde am Rotor Gene PCR Gerät enthält neben der HotStarTaq Plus DNA Polymerase den Rotor Gene Probe PCR Buffer und einen Mix der Nukleotide.

HRM Kit

Der EpiTect HRM PCR Master Mix von Qiagen beinhaltet die HotStarTaq Plus DNA Polymerase, einen EpiTect HRM PCR Buffer (mit Eva Green) und den nötigen dNTP Mix.

Primer

Alle Primer (Reinheit „reversed phase Chromatographie“) wurden von Sigma Aldrich bezogen. Die bestellten Primer wurden nach Lieferung in der angegebenen Menge H₂O_{cb} gelöst, sodass sie eine Konzentration von 100 µM aufwiesen. Im Anschluss wurden sie aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für den weiteren Einsatz wurden die Primer 1:10 verdünnt.

Taq Man Sonden

Die Taq Man Sonden wurden, am 5' Ende mit dem Fluorophor FAM markiert und am 3' Ende mit dem Black hole quencher 1 (BHQ1) versehen, bei Metabion bestellt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC und zur Qualitätskontrolle wurde eine MALDI-Massenspektrometrie durchgeführt, deren Spektrum mit dem Synthesereport mitgeliefert wurde. Die lyophilisiert gelieferten Sonden wurden in dem im Synthesereport angegebenen Volumen H₂O_{cb} gelöst und dann 1:10 auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt. Die Lagerung erfolgte nach Aliquotieren bei -20 °C.

5.3.2 Geräte

Thermocycler

iQ 5 Multicolor Real time PCR Detection System (BioRad)

Rotor Gene Q (Qiagen)

PCR Platten und Reaktionsgefäße

Für das iQ 5 Gerät wurden 96 well PCR Platten verwendet. Diese wurden nach dem Pipettieren mit einer Klebefolie verschlossen.

Bei einem PCR Lauf am Rotor Gene Q Gerät wurden verschließbare 0,2 ml Einzelreaktionsgefäße verwendet. Diese wurden im Rotor platziert und alle weiteren Positionen des Rotors mit leeren Gefäßen aufgefüllt.

5.3.3 Pipettierschema

Der Pipettierschritt erfolgte in einem Raum, in dem keine DNA Extraktionen durchgeführt wurden. Die Arbeitsfläche wurde vor Beginn des Pipettierens stets mit DNA Exitus Spray gereinigt.

Für alle PCR Läufe wurde ein Gesamtvolumen von 25 µl pro PCR Ansatz (siehe Tabelle 5.1) pipettiert. Der Primermix enthielt die zwei Primer in passender Konzentration in H₂O_{cb}. Der Mastermix wurde durch Mischen der Primer mit der Sonde und H₂O_{cb} erhalten.

Jede Untersuchung wurde im Doppelansatz durchgeführt.

Tabelle 5.1 Reaktionsansatz für PCR Läufe

	Volumen (µl)
Supermix	12,5
Primermix/Mastermix	7,5
DNA Lösung/H ₂ O _{cb}	5,0

5.3.4 Real time PCR Methode zum Nachweis von braunem Senf

Primer und Taq Man Sonden

Die Primer und Sonden wurden mit Hilfe des Programms Beacon Designer 7.0 für ausgewählte DNA Sequenzen entworfen. Dazu wurden einige Kriterien berücksichtigt, die für Primer bzw. Sonden gelten sollten (siehe Kapitel 3.1.3.5 und 3.1.5.2.1), wobei als GC-Gehalt 40-60 % als Richtwert verwendet wurde.

In Tabelle 5.2 sind die Primerpaare (PP) und Taq Man Sonden angeführt, die für den Nachweis von braunem Senf getestet wurden. Die Taq Man Sonden waren am 5' Ende mit dem Fluorophor FAM und am 3' Ende mit dem Quencher BHQ1 markiert.

Tabelle 5.2 Sequenzen und Schmelztemperaturen der entworfenen Primerpaare und Sonden zur Detektion von braunem Senf

Tm... Schmelztemperatur; PP-Nr.... Primerpaarnummer; v... vorwärts; r... rückwärts

PP-Nr.	Accession-number	Name	Sequenz (5'-3')	Tm (°C)	Produktlänge (bp)
1	EF470566	1v	ATCGTCGATACTAATGATGAGTGG	57,0	134
		1r	GCAACCTCCGCCATTTCAAG	58,1	
2	GU222694	2v	GGTCGAACCATCGTTTCTAACAAC	59,4	93
		2r	AATCACCCCTTTCTAGCGTATCTG	59,1	
3	DQ359129	3v	GCGACGCCAAGCTGATTCTC	60,1	135
		3r	CGGCGGTGGATGATTTCTGC	60,1	
		3n v	CACCGCTTCATCGTCGCAG	59,6	91
		Sonde	ATCCTTCTCGGCGGCGGCTGCTA	69,0	
4	GU230157	4v	GATTGCGTTTTTCCAAAGACGATAG	58,0	150
		4r	TGAGATAATCTCTCGGCAAGACTC	58,7	
5	DQ359129	5v	TCCACCCGAGCTTTCTCCG	59,4	125
		5r	CTCGTTCATCGGCGAGAATCAG	60,0	
6	DQ359129	6v	GAATCTAGGTCCGTTTCCCGAAG	59,5	149
		6r	GTTCCATTGCGAGTTGTGCTT	58,3	
7	X73032	7v	TCCGAACGGTATGGGTTAACG	58,4	82
		7r	AATGTGACCGGGACTGTCAAC	58,8	
8	X73032	8v	AAATTTCTTTGGCTGTTCTGTTC	57,6	135
		8r	CCAAGTGTACTGAAGGTAGTGAAC	58,0	

PP-Nr.	Accession-number	Name	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	Produktlänge (bp)
9	AY714982	9v	GGCCTAATGATAAAAGGGTTACGC	59,0	101
		9r	CACTTCTTTGCCAGAAACCTAAGC	59,5	
		Sonde	ACCGCCACCCAGGTTTAATTCACG	64,4	
10	AY714982	10v	ACTTCATCTTCCATCGTATCAAGC	57,9	149
		10r	CTGGGCCACACTATCTCTAGC	57,9	

5.3.4.1 PCR Methode mit Sybr Green

Pipettierschema und Protokoll

Es wurde das Pipettierschema aus Kapitel 5.3.3 verwendet (siehe Tabelle 5.1), wobei der iQ Sybr Green Supermix und die optimale Zusammensetzung des Primermix für jedes Primerpaar verwendet wurden (siehe Kapitel 5.3.4.3). Als Temperaturprogramm wurde ein dreistufiger Zyklus gewählt, wobei die Annealingtemperatur ebenfalls in einem Optimierungsschritt (siehe Kapitel 5.3.4.3) ermittelt wurde. Es wurden 50 Zyklen (d.h. 2. Schritt 50 mal wiederholt) durchgeführt.

Tabelle 5.3 Temperaturprotokoll der PCR Methode zur Detektion von braunem Senf

x... optimale Annealingtemperatur abhängig von den verwendeten Primern (siehe Tabelle 4.2)

	Dauer	Temperatur (°C)
1. Schritt	3 min	95
2. Schritt: Zyklus	20 s	95
	40 s	x
	10 s	72

5.3.4.2 Schmelzkurvenanalyse

Bei jedem PCR Lauf mit Sybr Green als Fluorophor wurde im Anschluss an diesen eine Schmelzkurve erstellt. Dabei wurde die Temperatur in 0,5 °C Schritten ausgehend von 50 °C erhöht und das abnehmende Fluoreszenzsignal gegen die Temperatur aufgetragen. Die Software liefert außer dieser Funktion auch die erste Ableitungsfunktion der Schmelzkurve, woraus sich die Schmelztemperaturen bei den Peaks ablesen lassen.

5.3.4.3 Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur

Die optimale Konzentration der Primer sowie die optimale Annealingtemperatur wurden in einem PCR Lauf bestimmt. Hierzu wurde über die PCR Platte ein Temperaturgradient mit Temperaturen von 52 °C bis 62 °C (52,0 °C; 52,8 °C; 54,1 °C; 55,9 °C; 58,4 °C; 60,3 °C; 61,5 °C; 62,0 °C) gelegt. Die höchste und niedrigste Temperatur wurden nicht zur Optimierung herangezogen. Als Konzentration für die Primer wurden 100 nM, 200 nM und 300 nM im Reaktionsansatz sowohl für den Vorwärtsprimer als auch für den Rückwärtsprimer in allen möglichen Kombinationen bei jeder zu testenden Temperatur zur Optimierung herangezogen. Die in Tabelle 5.4 angeführten Volumina wurden zur Herstellung der verschiedenen Primermixe verwendet. Je Ansatz wurden 7,5 µl Primermix benötigt. Die Konzentrationen der Primer sind in Bezug auf das Gesamtvolumen von 25 µl je Reaktionsansatz zu betrachten.

Tabelle 5.4 Pipettierschema zur Herstellung der Primermixe

(P_v...Primer vorwärts, P_r...Primer rückwärts)

Konzentration je Primer (nM)	100/100	100/200	100/300	200/100	200/200	200/300	300/100	300/200	300/300
P _v (µl)	0,25	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50	0,75	0,75	0,75
P _r (µl)	0,25	0,50	0,75	0,25	0,50	0,75	0,25	0,50	0,75
H ₂ O _{cb} (µl)	7,00	6,75	6,50	6,75	6,50	6,25	6,50	6,25	6,00

Im Falle einer Konzentration von 10 ng DNA/µl anstatt von 20 ng/µl wurden bei der Herstellung des Primermix 5 µl Wasser durch DNA Lösung ersetzt, woraus sich bei doppeltem Volumen und halber Konzentration die gleiche Menge an DNA ergab.

5.3.4.4 PCR Methode mit Taq Man Sonde

Pipettierschemata und Protokolle

Es wurde das Pipettierschema aus Kapitel 5.3.3 verwendet (siehe Tabelle 5.1), wobei als Supermix der iQ Supermix verwendet wurde. Der Mastermix enthielt die Primer in den bereits optimierten (siehe Kapitel 5.3.4.3) Konzentrationen und die Sonde in einer Konzentration von 100 nM, auf den 25 µl Reaktionsansatz bezogen.

Tabelle 5.5 Mastermixzusammensetzung für PP3

Komponente	Volumen (µl)
P _v	0,75
P _r	0,75
Sonde	0,25
H ₂ O _{cb}	5,75

Tabelle 5.6 Mastermixzusammensetzung für PP9

Komponente	Volumen (µl)
P _v	0,25
P _r	0,25
Sonde	0,25
H ₂ O _{cb}	6,75

Als Temperaturprogramm wurde das in Tabelle 5.3 angegebene Programm verwendet, wobei die für das jeweilige Primerpaar optimale Annealingtemperatur eingestellt wurde (siehe Tabelle 4.2).

5.3.4.5 Kreuzreaktivitätstests

Es wurden Kreuzreaktivitätsuntersuchungen mit folgenden Lebensmittelbestandteilen durchgeführt:

Weißer Senf	Kümmel	Zimt
Schwarzer Senf	Kreuzkümmel	Liebstockel
Raps	Ingwer	Koriander
Kurkuma	Muskatnuss	Thymian
Majoran	Oregano	Bohnenkraut
Schnittsellerie	Petersilie	Cardamon
Radieschen	Schnittlauch	Schwarzer Pfeffer
Dille	Estragon	Rosmarin

Knollensellerie	Piment	Anis
Brokkoli	Lorbeer	Paprika
Kohlrabi	Speiserübe	Chili
Karfiol	Kren	Weizen
Chinakohl	Fenchel	Sesam
Pak choi	Bockshornklee	Lupine
Kohl	Bohnenkraut	Mohn
Kraut (Weißkohl)	Soja	

Aus den Proben wurde mittels der CTAB Extraktionsmethode (siehe Kapitel 5.1.1) die DNA extrahiert und als DNA Lösung mit einer Konzentration von 20 ng/µl eingesetzt.

Die Kreuzreaktivitätstests wurden mit den Sybr Green Methoden und zum Teil auch mit den Taq Man Methoden durchgeführt. Im Falle der Sybr Green Methoden wurde stets ein Protokoll mit Schmelzkurvenanalyse gewählt.

5.3.4.6 Kreuzreaktivitätstests unter Verwendung von PP9 mit anschließender HRM

Die Extrakte mancher Proben wurden zusätzlich am Thermocycler Rotor Gene Q untersucht, um eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse anschließen zu können. Das Pipettierschema blieb unverändert zu jenem der Sybr Green Methode, es wurde jedoch der HRM Kit als Supermix verwendet. Das Temperaturprogramm wurde leicht modifiziert:

Tabelle 5.7 Protokoll für den Rotor Gene Q

	Dauer	Temperatur (°C)
1. Schritt	5 min	95,0
2. Schritt: Zyklus	10 s	95,0
	20 s	61,5

Es wurden 40 Zyklen durchgeführt und eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM) angeschlossen. Bei der HRM wurde die Temperatur, im Unterschied zu der bereits in Kapitel 5.3.4.2 beschriebenen Schmelzkurvenanalyse, ausgehend von 65 °C in 0,1 °C Schritten erhöht.

5.3.5 Real time PCR Methode zum Nachweis von Sesam

Zum Nachweis von Sesam wurden die Primer- und Sondensequenzen der von Schöringhumer et al. 2009 entwickelten duplex Methode verwendet.

Tabelle 5.8 Sequenz der Primer und Taq Man Sonde zur Detektion von Sesam

Name	Sequenz (5'-3')	Tm (°C)	Produktlänge (bp)
Primer Ses i vorwärts	TGAGGAACGTGGACGAGAG	56,5	117
Primer Ses i rückwärts	CCCTAGCCCTCTGGTAAACC	57,1	
Taq Man Sonde Ses i	FAM-CACCCTCCTGCTGCTGCTGCC-BHQ1	66,5	

Pipettierschema und Protokoll

Es wurde das Pipettierschema aus Kapitel 5.3.3 verwendet (siehe Tabelle 5.1), wobei als Supermix der iQ Supermix verwendet wurde. Für den Mastermix kamen die beiden Primer in einer Konzentration von 500 nM und die Taq Man Sonde in einer Konzentration von 200 nM

zum Einsatz. Als Temperaturprogramm wurde ein zweistufiger Zyklus verwendet. Es wurden 40-50 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 5.9 Mastermixzusammensetzung zur Detektion von Sesam

Komponente	Volumen (µl)
P _v	1,25
P _r	1,25
Sonde	0,50
H ₂ O _{cb}	4,50

Tabelle 5.10 Temperaturprotokoll für die real time PCR zur Detektion von Sesam

	Dauer	Temperatur (°C)
1. Schritt	3 min	95,0
2. Schritt: Zyklus	10 s	95,0
	25 s	54,0

5.3.5.1 Untersuchung von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Es wurden Lebensmittel, die mit „Kann Spuren von Sesam enthalten“ gekennzeichnet waren, mit der real time PCR Methode untersucht. Dazu wurde aus den Lebensmitteln mittels der CTAB Methode (siehe Kapitel 5.1.1) oder dem QIAamp DNA Mini Kit (siehe Kapitel 5.1.2) DNA extrahiert. Die DNA Extrakte wurden auf 20 ng/µl verdünnt in der PCR eingesetzt. Jede Probe wurde im Doppelansatz untersucht.

Liste der untersuchten Lebensmittel

Al natura:

Apfelkekse
Dinkelkekse

Barilla:

Mulina Bianco Ciocchini

Biscuiterie suisse:

Meringue Noisettes
Crème Coco

Clever:

Vollkorn Knäckebrot

De Beukelaer:

TUC Classic
TUC Paprika

Delvita:

Vollreis Waffeln

Farfalline:

Blätterteiggebäck

Finn Crisp:

Coriander
Multigrain
Original

Forno Domiani:

Pizza Snack Mediterraneo

Funny-frisch

Ofen Chips sour cream

Gold fischli Original:

Gold fischli Original

Grisini:

Grisini Torinesi

Hagemann:

Reiswaffeln mit Joghurt
Reiswaffeln mit Milch-
schokolade

Harry:

Pumpernickel

HIPP:

Baby Kekse

Ja natürlich:

Vollkorn Reiswaffeln

Knusperone:

Müsliriegel Cranberry

Kornland:

Müsli Riegel Erdbeer Joghurt
Müsli Riegel Schoko-Haselnuss
Müsli Riegel Waldbeere

Natur aktiv:

Bio Knäckebrot
Bio Weizengebäck

Pâtissier Suisse:

Fruchtgebäck Erdbeer

SchneeKoppe:

Orange Fruchtschnitte
Beere Fruchtschnitte
Müsli Fruchtschnitte

Sesamstraße:

Krümelsonsterkekse

Sunsnacks:

Mini Cracker salted
Sticks

Wasa:

Biscuit Classic
Biscuit Fibre
Roggen dünn
Mjöl

Mehrkorn

Vollkorn

Wicklein:

Meistersinger Feine
Nürnberger Oblaten
Lebkuchen

7 Days:

Bake Rolls Bacon
Bake Rolls Garlic
Bake Rolls Onion

5.3.5.2 Analyse von Modelllebensmitteln und geröstetem Sesam

Aus den hergestellten Modelllebensmitteln, Broten und Keksen (Herstellung siehe Kapitel 5.9) und dem bei unterschiedlichen Temperaturen gerösteten Sesam (siehe Kapitel 5.10) wurde die DNA mit Hilfe der CTAB Methode (siehe Kapitel 5.1.1) extrahiert und auf eine Konzentration von 20 ng/μl verdünnt. Jede Probe wurde im Doppelansatz untersucht.

5.3.5.3 Inhibitionskontrolle

Für die Inhibitionskontrolle wurde in jedes Loch der PCR Platte 1 μl einer Sesamstandardlösung mit 100 ng/μl pipettiert. Die Platte wurde über Nacht stehen gelassen, wobei das Wasser verdunstete. Nun wurde genauso wie bei den anderen PCR Läufen verfahren.

5.3.5.4 Erstellen einer Standardfunktion

Durch Verdünnen eines Senfextrakts mit H₂O_{cb} wurde eine Standardreihe mit folgenden DNA Konzentrationen hergestellt: 20 ng/μl; 2 ng/μl; 0,2 ng/μl; 0,02 ng/μl; 0,002 ng/μl; 0,0002 ng/μl. Diese wurden auf einer Platte jeweils im Doppelansatz aufgetragen und die c_t-Werte ermittelt, welche gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen wurden, um eine Standardfunktion zu erhalten.

Nachweisgrenze und Effizienz

Die Nachweisgrenze und Effizienz der real time PCR Methode wurden mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Die Verdünnung, die bei beiden Bestimmungen gerade noch einen Fluoreszenzsignalanstieg lieferte, wurde als Nachweisgrenze betrachtet. Die Effizienz wurde mittels Formel (4) aus Kapitel 3.1.6.1 berechnet.

5.4 PCR Produkt Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit

Reagenzien

Im Kit enthalten

QIAquick spin columns

2 ml collection tubes

Puffer EB

Puffer PE

Puffer PB (Dieser Puffer wurde mit einem pH Indikator versetzt, der bei einem pH ≤ 7,5 eine Gelbfärbung herbeiführt.)

Durchführung

Es wurden 50 μl des PCR Produkts mit 250 μl PB Puffer gemischt und überprüft, ob eine Gelbfärbung vorlag. In diesem Fall musste der pH-Wert nicht korrigiert werden. Diese Lösung wurde auf eine QIAquick spin column, welche in ein 2 ml Auffanggefäß gesteckt wurde, transferiert. Danach wurde eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das 2 ml Auffanggefäß wurde geleert und die QIAquick spin column erneut in dieses platziert. Zum Waschen wurden 0,75 ml PE Puffer zupipettiert und erneut eine Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Inhalts des Auffanggefäßes wurde die QIAquick spin column erneut hineingesteckt und eine weitere Minute zentrifugiert. Dann wurde die spin column in ein sauberes 1,5 ml Auffanggefäß platziert, zur Elution 50 μl Puffer EB zugegeben und eine Minute zentrifugiert. Die so gereinigte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.5 DNA Sequenzierung

Für die DNA Sequenzierung wurde das Service von VBC-Biotech (www.vbc-biotech.at) genutzt. Dazu wurde eine Probelösung mit einer Mindestkonzentration von 14 fmol/µl benötigt. Für die Sequenzierung mussten die Probelösung und die passenden Primer mit einer Mindestkonzentration von 10 pmol/µl eingeschickt werden. Die Mindestmenge an DNA, die für eine Sequenzierreaktion benötigt wurde, betrug 80 bis 100 fmol und für die Primer 10 pmol pro Reaktion, wobei die geschickte Menge für drei Reaktionen ausreichend sein sollte. Zur Konzentrationsangabe sollte eine Bestimmung mittels Agarosegelelektrophorese herangezogen werden (siehe Kapitel 5.2.2).

5.6 Proteinextraktion aus Sesamsamen und Lebensmitteln

Reagenzien

Extraktionslösung

6,06 g Tris

11,69 g NaCl

Tris und NaCl wurden in etwa 900 ml H₂O_{bidest} gelöst und ein pH-Wert zwischen 8,15 und 8,25 mittels HCl eingestellt. Dann wurde die Lösung mit H₂O_{bidest} auf 1 l aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

Durchführung

Es wurden 10 g der im Mörser oder Mixer zerkleinerten Probe mit 50 ml Extraktionslösung versetzt und 2 Minuten mittels Ultraturrax homogenisiert. Die Mischung wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Kühlzentrifuge bei 4000 rpm und 20 °C eine halbe Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Schwarzbandfilter filtriert, in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und in einer Tischzentrifuge bei 10000 rpm weitere 5 Minuten zentrifugiert. Nach einer zweiten Filtration wurde der Extrakt aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.7 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay

Reagenzien

PBS

Brilliant Blue G

1 mg/ml BSA (Bovines Serum Albumin) Lösung in PBS

95 % Ethanol

85 % Phosphorsäure

Bradford stock solution

100 ml 95 % Ethanol

200 ml 85 % Phosphorsäure

350 mg Brilliant Blue G

Nach Mischen der Reagenzien wurde die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

Bradford working solution

425 ml H₂O_{bidest}

15 ml 95 % Ethanol

30 ml 85 % Phosphorsäure

30 ml Bradford stock solution

Die Lösung wurde durch ein Schwarzbandfilter filtriert und in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur gelagert.

Durchführung

Aus der 1 mg/ml BSA Lösung wurden Verdünnungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 500 µg/ml; 250 µg/ml; 200 µg/ml; 150 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 20 µg/ml; 10 µg/ml.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben unverdünnt, 1:10, 1:50 und 1:100 in PBS verdünnt eingesetzt. 100 µl Standard bzw. Probelösung wurden in Halbmikroküvetten pipettiert und mit 1 ml Bradford working solution gemischt. Nach einer Wartezeit von 5 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardlösungen konnte eine Kalibrierfunktion erstellt werden, welche verwendet wurde, um die Konzentration der Probe zu berechnen. Von der Probe wurde jene Verdünnung zur Auswertung herangezogen, die im linearen Kalibrierbereich lag.

5.8 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Bestimmung von Sesam

Reagenzien

PBS

Waschpufferkonzentrat

9,36 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

74,76 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

51,0 g NaCl

30 ml Tween 20

Zur Herstellung wurden die Natriumhydrogenphosphate, Natriumchlorid und Tween 20 in bidestilliertem Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Waschpuffer

30 ml Waschpufferkonzentrat (eventuell gebildeter Bodensatz wurde im Ultraschallbad gelöst) wurden mit 1,8 l bidestilliertem Wasser gemischt.

Coating Puffer

1,59 g Na_2CO_3

2,93 g NaHCO_3

0,2 g NaN_3

Die Natriumverbindungen wurden in etwas H_2O gelöst und dann auf 1 l mit bidestilliertem H_2O aufgefüllt. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Blocklösung

Bei der Blocklösung handelte es sich um eine 2 % (w/v) Caseinlösung, die stets in der benötigten Menge frisch hergestellt wurde. Casein wurde mit PBS Puffer versetzt und 15 Minuten zum Lösen gerührt. Dann wurde durch ein Schwarzbandfilter filtriert.

Citratpuffer

46,04 g KH_2Citrat

0,10 g Sorbinsäure

Citrat und Sorbinsäure wurden in H_2O gelöst, auf 1 l mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und der Puffer bei 4 °C gelagert.

Entwicklerlösung

0,375 g Tetramethylbenzidin wurden in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst und 20 ml Methanol zugegeben. Die fertige Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei 4 °C gelagert.

Substratlösung

25 ml Citratpuffer wurden mit 500 µl Entwicklerlösung und 100 µl 1 % H_2O_2 Lösung kurz vor Gebrauch gemischt.

Stopplösung
0,5 M H₂SO₄

Geräte

Platten

Als Reaktionsgefäße dienten 96 Kavitäten auf Mikrotiterplatten. Jede Kavität fasste ein Volumen von 300 µl.

Mehrkanalpipette

Für die Zugabe von Reagenzien, die allen Kavitäten zugesetzt werden mussten, wurde eine 8-Kanalpipette verwendet.

Waschapparatur

Jeder Waschschrift wurde mit der Waschapparatur durchgeführt. Jede Kavität wurde vier Mal mit Waschpuffer gewaschen, wobei das Gerät dazwischen die Lösung wieder absaugte. Die Platten wurden im Anschluss zusätzlich noch auf einem Blatt Küchenrolle trocken geklopft.

Rütteltisch

Während jedes Inkubationsschritts wurden die Platten auf dem Rütteltisch platziert.

5.8.1 Kompetitiver ELISA

Benötigte Antikörper

Polyklonaler, aus Hühnereidotter extrahierter und mittels Ammonsulfatfällung gereinigter IgY, gegen Sesam gerichtet

Enzymmarkierter Kaninchen-anti-Huhn AK (Anti IgY)

Durchführung

Als erstes wurde die Platte gecoatet. Hierzu wurde ein Sesamproteinextrakt mit einer Konzentration von 14,8 mg/ml 1:9000 mit Coating Puffer verdünnt und 200 µl in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platten wurden abgedeckt über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Nach dieser mindestens 16-stündigen Inkubationszeit wurde die Platte gewaschen und 300 µl Blocklösung pro Kavität hinzugefügt. Es erfolgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt. Nach einem Waschschrift wurden 50 µl/Kavität Proteinlösung (Sesamstandard oder Probe, jeweils im Dreifachansatz) und danach 100 µl/Kavität IgY, 1:10000 in PBS verdünnt, zugegeben. Nun wurde für 45 min inkubiert und danach gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl/Kavität Anti IgY, 1:30000 in PBS verdünnt. Nach einem Inkubationsschritt von einer Stunde und einem Waschschrift wurden 200 µl/Kavität Substratlösung zupipettiert. Nach 10 bis 15 Minuten wurde 100 µl/Kavität Stopplösung zugegeben. Danach erfolgte eine photometrische Messung bei 450 nm im Microplate Reader.

5.8.2 Sandwich ELISA

Benötigte Antikörper

Polyklonaler, aus Hühnereidotter extrahierter und mittels Ammonsulfatfällung gereinigter IgY, gegen Sesam gerichtet

Polyklonaler, aus Kaninchenblutserum gewonnener IgG, gegen Sesam gerichtet

Enzymmarkierter Ziegen-anti-Kaninchen AK (Anti IgG)

Durchführung

Für den Coatingschritt wurde IgY 1:25000 mit PBS verdünnt. In jede Kavität wurden 200 µl pipettiert. Die Platten wurden für mindestens 16 Stunden (über Nacht) in den Kühlschrank

gestellt. Danach wurde gewaschen und nach Zugabe von 300 µl/Kavität Blocklösung wurde eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 100 µl Proteinlösung (Sesamstandard oder Probe, jeweils im Dreifachansatz) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Es wurde gewaschen und 200 µl IgG, 1:5000 mit PBS verdünnt, pro Kavität zupipettiert. Nach weiteren 30 Minuten und einem Waschschrift wurden 200 µl/Kavität Anti IgG, 1:60000 in PBS verdünnt, zugefügt und eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 200 µl/Kavität Substrat zugegeben und ca. 4 bis 6 Minuten inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Kavität gestoppt. Im Anschluss erfolgte eine photometrische Messung bei 450 nm im Microplate Reader.

5.8.3 Erstellung einer Kalibrierfunktion

Auf jeder Platte wurden 8 Standardlösungen im Dreifachansatz aufgetragen. Mit den dadurch erhaltenen Extinktionswerten wurde unter Zuhilfenahme des Programms Sigma Plot eine sigmoide Kalibrierfunktion erstellt. Die Proteinstandardlösungen wurden durch entsprechendes Verdünnen eines Sesamproteinextrakts mit einer Konzentration von 14,8 mg/ml mit PBS hergestellt. Für den kompetitiven ELISA wurden Standardlösungen mit folgenden Konzentrationen gewählt: 10000 ng/ml; 5000 ng/ml; 1000 ng/ml; 500 ng/ml; 100 ng/ml; 50 ng/ml; 10 ng/ml und 5 ng/ml. Im Sandwich ELISA kamen Standardlösungen mit Konzentrationen von 100000 ng/ml; 10000 ng/ml; 1000 ng/ml; 100 ng/ml; 10 ng/ml; 1 ng/ml 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml zum Einsatz.

Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze in PBS und verschiedenen Matrices (Brot, Keksteig, Kekse) wurden mehrmals Leerwerte gemessen. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden mit Hilfe einer Kalibrierfunktion in Konzentrationen umgerechnet und anschließend in Masse Sesam pro Masse des Lebensmittels angegeben. Die genaue Berechnung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze ist in Kapitel 3.2.2.4 zu finden.

5.8.4 Bestimmung der Nachweisbarkeit von geröstetem Sesam und Sesammehl

Aus bei verschiedenen Temperaturen (siehe Kapitel 5.10) geröstetem Sesam und von einer Sesamölpresse bezogenem Sesammehl wurden Proteinextrakte, wie in Kapitel 5.6 beschrieben, gewonnen. Von den Extrakten wurde die Sesamkonzentration, wie in Kapitel 5.7 beschrieben, mittels Bradford Assay bestimmt. Zur Untersuchung wurden Verdünnungen jedes Extrakts mit folgenden Konzentrationen erstellt: 100000 ng/ml; 10000 ng/ml; 1000 ng/ml; 100 ng/ml; 10 ng/ml; 1 ng/ml; 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml. Die verdünnten Extrakte wurden mit dem Sandwich ELISA analysiert und Kalibrierfunktionen erstellt.

5.8.5 Bestimmung von Sesam in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln und Modelllebensmitteln

Zum Nachweis von Sesam mit den beiden ELISAs wurden aus den Proben (kommerziell erhältlichen Lebensmitteln (siehe Kapitel 5.3.5.1), Mehlmischungen, Brot, Keksteig und Keksen) zuerst die Proteine extrahiert (siehe Kapitel 5.6). Die Proteinlösungen wurden, 1:5 oder 1:10 verdünnt, im kompetitiven und im Sandwich ELISA (siehe Kapitel 5.8) eingesetzt, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Zur Auswertung wurde eine Kalibrierfunktion, wie in Kapitel 5.8.3 beschrieben, erstellt.

5.9 Herstellung der Modelllebensmittel

Die Modelllebensmittel wurden im Technikum der Universität für Bodenkultur Wien hergestellt. Die zur Verfügung gestellten, bereits erprobten Rezepte für Brot und Kekse wurden für die Zielsetzung, Modelllebensmittel mit definiertem Sesamgehalt herzustellen, angepasst.

Geräte

Moisture Analyzer Sartorius MA30

Gärschrank und Backofen (MANZ)

Waagen

Sartorius Max 12 kg; d = 0,1 g

Sartorius Max 220g; d = 0,1 mg

Küchenmaschine

Knetter Major titanium (Kenwood)

Mikrowellenherd Whirlpool (Talent)

Mörsermühle

Stoppuhr, Thermometerstab, Backformen, Backblech, verschiedene Schüsseln, Löffeln, Teigschaber



Abbildung 5.1 Backform



Abbildung 5.2 Küchenmaschine



Abbildung 5.3 Backofen und Gärschrank



Abbildung 5.4 Mörsermühle

5.9.1 Zutaten für die Modelllebensmittel

Mehl

Type W480 glatt, Goldkind Weizenmehl

Hefe

Saf-instant

Salz

Gustosal Speisesalz, fein jodiert

Zucker

Agrana Feinkristallzucker

Ascorbinsäure

Anna Gold (Neuber Ges.m.b.H)

Trennwachs („flüssiges Backpapier“)

Boeson Trennwax flüssig aktiv, BIB – Ulmer Spatz

Staubzucker

Agrana Wiener Zucker

Dextrose

Masterfoods Austria

Fett

Bellasan Delikatess Margarine 70 % Fett, NEG Nahrungsmittelerzeugungsges.m.b.H.

Natriumhydrogencarbonat

Natron (Speisesoda), Kotanyi

5.9.2 Herstellung der Mehlmischungen

Sesammehl mit gewünschter Sesamkonzentration wurde durch Mischen von Weizenmehl mit gemahlenem Sesam und anschließendem Verdünnen erzeugt.

Um zu geringe Einwaagen zu vermeiden, wurde zuerst ein Premix (Premix 1) mit höherer Konzentration hergestellt. Dazu wurden Sesamkörner mit dem Mixer zerkleinert. Der erhaltene Sesamschrot wurde im passenden Verhältnis mit Weizenmehl eine Stunde in der Mörsermühle vermischt. Aus diesem Premix wurden durch Verdünnen mit Weizenmehl ein weiterer Premix (Premix 2) und das Mehl mit dem höchsten Sesamgehalt erhalten. Alle weiteren Mischungen wurden durch Verdünnen des Premix 2 hergestellt. Jede Mischung wurde in der Mörsermühle eine Stunde homogenisiert. Die Einwaagen sowie die sich ergebenden Sesamkonzentrationen, bezogen auf die Mehlmasse bzw. auf die Brot-/Keksteigmasse, sind den Tabellen 5.11 und 5.12 zu entnehmen.

Tabelle 5.11 Einwagen und sich ergebende Sesamkonzentrationen für die Sesammelmischungen zur Herstellung der Sesambrote

Premix 1 (Soll: 10 g Sesam / kg Brotteig)	Masse in g	mg Sesam / kg Mehl	mg Sesam / kg Brotteig
Sesammasse Einwaage	16,5		
Weizenmehl Einwaage	979,0	16617,2	10000,7
Premix 2 (Soll: 1 g Sesam / kg Brotteig)			
Premix 1 Einwaage	100,0		
Weizenmehl Einwaage	900,0	1661,7	1000,1
Mehl 1 (Soll: 100 mg Sesam / kg Brotteig)			
Premix 1 Einwaage	11,0		
Weizenmehl Einwaage	1089,0	166,8	100,0
Mehl 2 (Soll: 75 mg Sesam / kg Brotteig)			
Premix 2 Einwaage	84,0		
Weizenmehl Einwaage	1036,0	124,6	75,0
Mehl 3 (Soll: 50 mg Sesam / kg Brotteig)			
Premix 2 Einwaage	51,0		
Weizenmehl Einwaage	969,0	83,1	50,0
Mehl 4 (Soll: 25 mg Sesam / kg Brotteig)			
Premix 2 Einwaage	26,0		
Weizenmehl Einwaage	1014,0	41,5	25,0
Mehl 5 (Soll: 10 mg Sesam / kg Brotteig)			
Premix 2 Einwaage	11,0		
Weizenmehl Einwaage	1089,0	16,6	10,0
Mehl 6 (Soll: 0 mg Sesam / kg Brotteig)		0,0	0,0

Tabelle 5.12 Einwaagen und sich ergebende Sesamkonzentrationen für die Sesammehlmischungen zur Herstellung der Sesamkekse

Premix 1	Masse in g	mg Sesam / kg Keksteig
Sesammasse Einwaage	16,5	
Weizenmehl Einwaage	979,0	7872,6
Premix 2		
Premix 1 Einwaage	100,0	
Weizenmehl Einwaage	900,0	787,3
Mehl 1 (Soll: 100 mg Sesam / kg Keksteig)		
Premix 1 Einwaage	11,4	
Weizenmehl Einwaage	884,2	100,0
Mehl 2 (Soll: 75 mg Sesam / kg Keksteig)		
Premix 2 Einwaage	42,7	
Weizenmehl Einwaage	405,1	75,0
Mehl 3 (Soll: 50 mg Sesam / kg Keksteig)		
Premix 2 Einwaage	28,4	
Weizenmehl Einwaage	419,4	50,0
Mehl 4 (Soll: 25 mg Sesam / kg Keksteig)		
Premix 2 Einwaage	14,2	
Weizenmehl Einwaage	433,6	25,0
Mehl 5 (Soll: 10 mg Sesam / kg Keksteig)		
Premix 2 Einwaage	11,4	
Weizenmehl Einwaage	884,2	10,0
Mehl 6 (Soll: 0 mg Sesam / kg Keksteig)		0

5.9.3 Brot

Es sollten Brote mit folgenden sechs Sesamkonzentrationen hergestellt werden: 0, 10, 25, 50, 75 und 100 mg Sesam pro kg Brotteig. Dazu wurde Sesammehl mit passender Sesamkonzentration verwendet (siehe Tabelle 5.11).

5.9.3.1 Brotrezept

Für die Brotherstellung wurde ein Rezept nach ICC-Standard Nr. 131 herangezogen.

Tabelle 5.13 Brotrezept nach ICC Standard Nr. 131

Zutat	Masse (g)
Weizenmehl (mit 14 % Wassergehalt)	1000
Trockene Hefe	18
Salz	15
Zucker	18,6
Ascorbinsäure	0,05
Wasser	607

Der Wassergehalt des verwendeten Weizenmehls wurde in einer Doppelbestimmung (siehe Tabelle 5.14) ermittelt und die Mehl- und Wassermenge diesbezüglich korrigiert.

Tabelle 5.14 Wassergehalt des verwendeten Weizenmehls und daraus errechnete benötigte Mehlmasse

Trockensubstanz (%)	Wassergehalt (%)	benötigte Mehlmasse (g)
86,24	13,760	
86,53	13,470	
	13,615	995,543

Benötigte Lösungen

Zucker-Salz-Ascorbinsäurelösung

30 g Salz, 30 g Zucker und 0,1 g Ascorbinsäure wurden in 800 ml Wasser gelöst. Die Lösung reichte stets für die Herstellung zweier Brotteige.

Zuckerlösung

20 g Zucker wurden in 380 g Wasser gelöst. Die Lösung wurde kurz vor ihrem Gebrauch zur Herstellung der Hefe Suspension im Mikrowellenherd auf 35 °C erhitzt.

Hefe Suspension

Zur Herstellung wurden 72 g warme Zuckerlösung mit 18 g trockener Hefe versetzt und 10 Minuten stengelassen. Im Anschluss wurde die Suspension umgerührt und musste innerhalb der nächsten 5 Minuten verwendet werden, weshalb die Herstellung immer kurz vor Gebrauch erfolgte.

Somit ergaben sich die in Tabelle 5.15 angeführten Zutatenmengen zur Herstellung der Brote.

Tabelle 5.15 Benötigte Zutatenmengen zur Brotherstellung

Zutaten	Masse in g
Zucker-Salz-Ascorbinsäurelösung	430,05
Hefe Suspension	90,0
Wasser	138,6
Mehl	995,5
Gesamtmasse Teig	1654,15

5.9.3.2 Brotherstellung

Wasser, die Zucker-Salz-Ascorbinsäurelösung und die Hefe Suspension wurden im Knetter (Küchenmaschine mit Knethaken) vermischt. Dann erfolgte die Zugabe des Mehls. Es wurde 75 Sekunden lang bei niedriger Geschwindigkeit geknetet.

Der Teig wurde nach kurzer Rast in drei etwa gleich große Teile geteilt, zu Kugeln gerollt und in Schüsseln in die Fermentationskammer gestellt. Dort wurde er bei 30 °C und 85 % Feuchtigkeit für 30 Minuten belassen.

Im Anschluss wurde der Teig mit einem Nudelwalker etwa rechteckig ausgerollt, gefalten und in die Form eines Zylinders gerollt (siehe Abbildung 5.5). So wurde er in eine mit Trennwachs besprühte Backform gelegt und diese wurde für weitere 50 Minuten in die Fermentationskammer gestellt.



Abbildung 5.5 Ausrollen, Falten und Einrollen des Brotteiges, bevor er in die Backform kam

Danach wurde die Backform mit Teig in den auf 230 °C vorgeheizten Backofen gestellt. Zu Beginn der Backzeit wurde einmalig Wasserdampf zugeführt und die Backtemperatur auf 180 °C reduziert. Die Backzeit betrug 30 Minuten.

Nach dem Backen wurden die Brote auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur weiteren Verwendung wurde stets einer der drei Laibe mit dem Mixer zerkleinert. Die Brotlaibe und die zerkleinerten Brote wurden bei –20 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

5.9.4 Kekse

Es wurden Kekse mit folgenden sechs Sesamkonzentrationen hergestellt: 0, 10, 25, 50, 75 und 100 mg Sesam pro kg Keksteig. Dazu wurde Sesammehl mit passender Sesamkonzentration verwendet (siehe Kapitel 5.9.2)

5.9.4.1 Keksrezept

Die benötigte Menge Mehl wurde bezüglich des vorliegenden Wassergehalts im Weizenmehl (siehe Tabelle 5.14) korrigiert.

Tabelle 5.16 Grundrezept für die Kekse

Zutat	Masse (g)
Weizenmehl (14 % Wassergehalt)	225
Wasser	16
Fett	64
Staubzucker	130
Natron	2,5
Dextroslösung	33
Salz	2,1

Tabelle 5.17 Vom Grundrezept abweichende Mehl- und Wassermengen

Korrigierte Mengen	Masse in g
Mehl (13,6 % Wassergehalt)	223,9
Wasser	17,1

Benötigte Lösungen

Dextroslösung

Zur Herstellung wurden 8,9 g Dextrose in 150 ml Wasser gelöst. Die Menge war für die Herstellung von zumindest vier Keksteigen ausreichend.

5.9.4.2 Keksherstellung

Fett, Staubzucker, Salz und Natriumhydrogencarbonat wurden mit der Küchenmaschine (K-Haken) 3 Minuten auf Stufe 1 gerührt, wobei jede Minute die sich an der Innenwand der

Schüssel abgesetzten Zutaten abgekratzt wurden. Dann erfolgte die Zugabe der Dextrose-lösung und des Wassers. Es wurde 1 Minute auf Stufe 1 gerührt, der Rand abgekratzt und eine weitere Minute auf Stufe 2 gerührt. Nach Zugabe des Mehls bzw. der passenden Mehlmischung (siehe Tabelle 5.12) wurde 2 Minuten auf Stufe 2 geknetet und zwischendurch wieder der Rand der Schüssel abgekratzt.

Nach Fertigstellung des Teiges wurde dieser in einem verschließbaren Plastikgefäß für 15 Minuten im Kühlraum bei 4 °C rasten gelassen.

Danach wurde der Teig zwischen Backpapier mit Hilfe eines Nudelwalkers mit Abstand-haltern auf eine Dicke von 3 mm ausgerollt und Kekse mit einem runden Keksausstecher ausgestochen (siehe Abbildung 5.6). Der überschüssige Teig wurde entfernt und ebenfalls zur weiteren Analyse aufgehoben. Die Lagerung des Teiges erfolgte bei -20 °C.

Die Kekse wurden im auf 180 °C vorgeheizten Backrohr für 15 Minuten gebacken. Nach dem Abkühlen erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

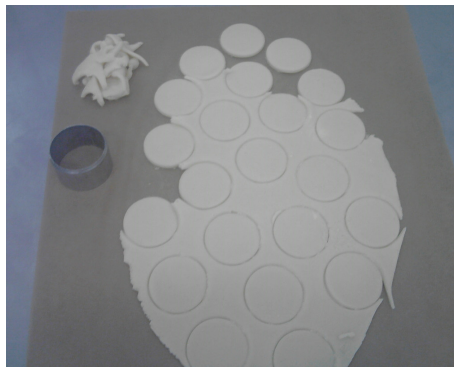


Abbildung 5.6 Ausstechen der Kekse und Entfernen des überschüssigen Teiges

5.10 Rösten von Sesam

Sesamsamen wurden bei vier verschiedenen Temperaturen (100 °C; 150 °C; 200 °C und 250 °C) geröstet. Das Rösten wurde im Backofen des Technikums der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt. Dazu wurden etwa 50 g Sesamsamen in einer Backform eingewogen und für 10 Minuten bei der gewünschten Temperatur in den vorgeheizten Backofen gestellt.

5.11 Chemikalien

2-Propanol, zur Analyse (Merck)
Brilliant Blue G (Sigma)
BSA: Bovines Serum Albumin (Sigma)
Casein von Kuhmilch, technisch rein (Sigma)
Certified PCR Agarose (BioRad)
Chloroform, zur Analyse (Merck)
CTAB: Cetyltrimethylammoniumbromid (Sigma)
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, zur Analyse (Roth)
DMSO: Dimethylsulfoxid (Sigma)
DNA Exitus Plus IFTM (Bio Chemika AppliChem)
DNA Exitus SprayTM (AppliChem GmbH)
EDTA: TitriplexIII®, zur Analyse (Merck)
Essigsäure, zur Analyse (Rotipuran Roth)
Ethanol absolut, zur Analyse (AustAlco Österr. Alkoholhandels GmbH)
Ethidiumbromid Lösung (BioRad)
Glycerin, zur Analyse wasserfrei (Roth)
Kaliumdihydrogencitrat (Fluka)
Methanol (VWR)
Natriumazid, reinst (Merck)
Natriumbicarbonat (Sigma)
Natriumcarbonat (Sigma)
Natriumchlorid, zur Analyse (Roth)
Ortho Phosphorsäure 85 % (Merck)
Proteinase K von Tritirachium album (Sigma)
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
Qiaquick PCR Purifikation Kit (Qiagen)
Salzsäure 37 % rauchend (Merck)
Schwefelsäure 95-97 % (Merck)
SDS: Natriumdodecylsulfat (Serva Sigma)
Natriumphosphat monobasisch Dihydrat (Merck)
Sorbinsäure (Sigma)
TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma)
Tris: Trizma® base (Sigma)
Tween®20: Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Sigma)
Wasser (H₂O_{cb}) frei von Endotoxinen, ultrafiltriert und autoklaviert (Sigma)

5.12 Geräte

Immuno Wash (BioRad, Model 1575)
iQ 5 Multicolor Real-time PCR Detection System (BioRad)
Kühlzentrifuge (Sigma, 4K10)
Microplate Reader (BioRad, Model 680XR)
Mikrowellenherd (Silva)
Mixer (Kenwood, 400W)
pH-Meter (Metrohm, 691)
Photometer (Genesys, 10uv)
Power Pac (BioRad, HV)
Rotor Gene Q (Qiagen)
Rütteltisch (IKA MTS 2/4 digital)
Schwingmühle (Treff Retsch, MM2000)
Trockenschrank (Mettler)
Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 103H)
Ultraturax (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, T25)
Vortex (VWR, VV3; IKA, VF2)
Waage (Sartorius Talent, TE 214S)
Zentrifuge (Eppendorf, 5424)
Pipetten
BioRad (0,5-10µl; 2-20µl; 20-200µl; 100-1000µl)
Brand Transferpette 8 (20-200µl)
Eppendorf (100-1000µl; 1000µl-5000µl)
VWR (50-250 µl)
Spitzen
Brand Plastibrand Pipette Tips (0,5-10µl; 2-20µl; 5-200µl; 50-1000µl)
PCR Platten BioRad iCycler PCR Plates 96 well
PCR Reaktionsgefäße Qiagen PCR Tubes 0,2 ml
VWR (0,1-10µl; 2-200µl; 50-1000µl; 1000-5000µl)
Reaktionsgefäße
Roth Reaktionsgefäße 2ml
UV Einmal-Küvetten Plastibrand (Mikro, Halbmikro) Brand
VWR Micro Centrifuge for high g-force 1,5 ml
VWR Super Clear Centrifuge Tubes 15 ml

6 Schlussbetrachtung

In der westlichen Welt wurde in den letzten Jahren ein Anstieg an Lebensmittelallergien beobachtet. Personen, die an einer Lebensmittelallergie leiden, müssen die Aufnahme der allergieauslösenden Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe strikt vermeiden. Um den Lebensmittelallergikern das Auffinden von allergenen Lebensmitteln zu erleichtern, hat die Europäische Kommission eine Richtlinie zur Kennzeichnung von 14 allergenen Lebensmitteln und daraus hergestellten Produkten herausgegeben. Um die korrekte Deklaration der im Handel befindlichen Produkte überprüfen zu können, werden analytische Methoden benötigt. Dabei kommen vor allem ELISAs, bei denen Allergene oder andere für das Lebensmittel charakteristische Proteine detektiert werden, und PCR Methoden, bei denen die DNA des Lebensmittels, meist das für ein allergenes Protein kodierende Gen, nachgewiesen wird, zum Einsatz.

Zu den innerhalb der EU zu kennzeichnenden Lebensmitteln zählen unter anderem Senf und Sesam. Zum Nachweis von weißem Senf wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Cichna-Markl bereits eine PCR Methode und zur Detektion von Sesam eine PCR Methode und zwei ELISAs entwickelt.

Im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit sollte eine PCR Methode zur Detektion von braunem Senf entwickelt werden. Außerdem sollte die Anwendbarkeit der in der Arbeitsgruppe entwickelten Methoden zur Detektion von Sesam (einer PCR Methode, eines Sandwich und eines kompetitiven ELISAs) miteinander verglichen werden. Dazu sollten sesamhaltige Modelllebensmittel hergestellt und analysiert werden. Weiters sollten kommerziell erhältliche Produkte, die eventuell Spuren von Sesam enthalten könnten, analysiert werden.

Um eine real time PCR Methode für braunen Senf entwickeln zu können, wurden sechs Gene ausgewählt und für diese insgesamt zehn Primerpaare entworfen. Diese wurden bezüglich ihrer Konzentration und Annealingtemperatur optimiert. Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden 45 Lebensmittelzutaten untersucht, wobei die bei der real time PCR erhaltenen Produkte einer Schmelzpunktanalyse unterzogen wurden. Für zwei Primerpaare wurden dazu passende Taq Man Sonden bestellt und erneut Kreuzreaktivitätstests durchgeführt. Keine der PCR Methoden war spezifisch für braunen Senf, Kreuzreaktivitäten bestanden vor allem zu anderen Kreuzblütengewächsen, wie Raps, schwarzem und weißem Senf, Chinakohl, Pak choi und Radieschen.

Zum Vergleich der drei Methoden zur Detektion von Sesam wurden diese einerseits zum Testen von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln und andererseits zum Nachweis von Sesam in Modelllebensmitteln eingesetzt. Die Nachweisgrenze des Sandwich ELISAs lag bei 0,17 mg Sesamprotein pro kg Lebensmittel und die Bestimmungsgrenze bei 0,68 mg Sesamprotein pro kg Lebensmittel. Für den kompetitiven ELISA wurde eine Nachweisgrenze von 2,18 mg Sesamprotein pro kg Lebensmittel und eine Bestimmungsgrenze von 13,38 mg Sesamprotein pro Lebensmittel ermittelt. Die Nachweisgrenze der PCR Methode betrug 10 pg Sesam DNA.

45 Lebensmittel, die laut Kennzeichnung Spuren von Sesam enthalten könnten, wurden mit der PCR und dem Sandwich ELISA untersucht. Bei der PCR wurde in 44 der 45 verschiedenen Produkte ein negatives Ergebnis erhalten. Mit dem Sandwich ELISA konnte in 13 Lebensmitteln Sesam detektiert werden und in acht Produkten lag die gefundene Konzentration über der Bestimmungsgrenze. Mit dem kompetitiven ELISA wurden nur 15 Produkte untersucht und in allen wurden Sesamkonzentrationen über der Bestimmungsgrenze gemessen. Für zwei Produkte konnte kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden. Nur in einem Produkt konnte Sesam mit allen drei Methoden detektiert werden. Dieses Ergebnis konnte mit der Untersuchung zweier weiterer Chargen dieses Lebensmittels bestätigt werden.

Des Weiteren wurden Sesam, der zehn Minuten bei verschiedenen Temperaturen geröstet wurde, und Sesammehl analysiert. Sesam, der bei 100, 150 bzw. 200 °C geröstet wurde, konnte sowohl mit der PCR Methode als auch mit dem Sandwich ELISA gut detektiert werden. Sesam, der bei 250 °C geröstet wurde, wurde mit dem ELISA deutlich schlechter nachgewiesen. Die Analyse mittels PCR war nicht möglich, da die DNA mit der CTAB Methode nicht extrahiert werden konnte. Für Sesammehl wurde bei der PCR etwa der gleiche c_t -Wert erhalten wie für die Positivkontrolle, während beim Sandwich ELISA die Kalibrierfunktion nach höheren Konzentrationen verschoben war.

Außerdem wurden Modelllebensmittel (Brote und Kekse) mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Sesam sowie sesamfreie Produkte hergestellt und mit der PCR Methode sowie den beiden ELISAs analysiert. Es wurden auch die Mehlmischungen, die zur Herstellung der Brote verwendet wurden, und die Keksteigmischungen analysiert.

Bei den unverarbeiteten Produkten wurden mit steigenden Sesamkonzentrationen niedrigere c_t -Werte beobachtet. Bei den verarbeiteten Produkten war dieser Trend ebenfalls ersichtlich, nur waren die c_t -Werte generell höher und streuten sehr.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Sandwich ELISAs lag in den Matrices Brot und Keks im Bereich der in PBS bestimmten Werte. Für den Keksteig ergaben sich höhere Werte. Beim kompetitiven ELISA lag die Nachweisgrenze generell höher als beim Sandwich ELISA, im Keksteig war die Nachweisgrenze am höchsten.

In Broten betrug die mittlere Wiederfindung des Sandwich ELISAs 14,2 % und in Keksen 98,5 %. Die in den Keksen mit dem kompetitiven ELISA gefundenen Werte lagen deutlich über den tatsächlichen Sesamkonzentrationen. Für die Mehlmischungen und den Keksteig wurden ebenfalls zu hohe Werte ermittelt. Es ist anzunehmen, dass die zu hohen Werte auf Matrixeffekte zurückzuführen sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Entwicklung einer spezifischen real time PCR Methode für Lebensmittel, wie braunen Senf, die einer großen Pflanzenfamilie, wie den Brassicaceae, angehören und viele nahe Verwandte aufweisen, aufwendig und durchaus schwierig ist. Trotz des mitunter großen Aufwands eignen sich real time PCR Methoden, wie jene zur Detektion von Sesam, zum Nachweis von Allergenen und bieten eine Alternative oder Ergänzung zu den ELISA Methoden. Neben der Verarbeitung hat auch die Lebensmittelmatrix einen entscheidenden Einfluss auf die Nachweisbarkeit.

7 Zusammenfassung

Da in der westlichen Welt in den letzten Jahren die Zahl an Lebensmittelallergikern stark gestiegen ist, hat die Europäische Kommission eine Richtlinie zur Kennzeichnung von 14 allergenen Lebensmitteln und daraus hergestellten Produkten herausgegeben. Um die korrekte Deklaration überprüfen zu können, werden analytische Methoden, wie ELISAs und PCR Methoden, welche die Detektion von Spuren dieser Bestandteile ermöglichen, benötigt.

Im Zuge dieser Diplomarbeit sollte eine PCR Methode zur Detektion von braunem Senf entwickelt werden. Außerdem sollten bereits bestehende Methoden zur Detektion von Sesam – eine PCR Methode, ein Sandwich und ein kompetitiver ELISA – bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf Modelllebensmittel und kommerzielle Produkte verglichen werden.

Um eine real time PCR Methode für braunen Senf zu entwickeln, wurden zehn Primerpaare entworfen und optimiert. Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden 45 Lebensmittelzutaten mittels PCR und anschließender Schmelzpunktanalyse auf Kreuzreaktivität getestet. Mit zwei Primerpaaren wurden Taq Man Assays entwickelt. Es erwies sich jedoch keine der entwickelten PCR Methoden als spezifisch für braunen Senf. Kreuzreaktivitäten traten vor allem mit Raps, schwarzem und weißem Senf, Chinakohl, Pak choi und Radieschen auf.

Um die Anwendbarkeit einer PCR Methode und zweier ELISAs zur Detektion von Sesam vergleichen zu können, wurden kommerziell erhältliche Lebensmittel, die laut Deklaration Spuren von Sesam enthalten konnten, und Modelllebensmittel analysiert. Die Nachweisgrenze des Sandwich ELISAs lag bei 0,17 mg Sesamprotein pro kg Lebensmittel und die Bestimmungsgrenze bei 0,68 mg Sesamprotein pro kg Lebensmittel. Beim kompetitiven ELISA betrugen die Nachweis- und Bestimmungsgrenze 2,18 und 13,38 mg Sesamprotein pro kg Lebensmittel. Bei der PCR konnte eine Absolutmenge von 10 pg Sesam DNA detektiert werden.

In einem der 45 Lebensmittel, die mit „Kann Spuren von Sesam enthalten“ gekennzeichnet waren, konnte Sesam mittels PCR nachgewiesen werden. In zwei weiteren Chargen dieses Produkts wurden ebenfalls Spuren von Sesam detektiert. Mit dem Sandwich ELISA wurde Sesam in 13 Produkten nachgewiesen. In acht Produkten lagen die Messwerte über der Bestimmungsgrenze. Mit dem kompetitiven ELISA wurden nur 15 Produkte analysiert, für alle wurde eine Sesamkonzentration über der Bestimmungsgrenze ermittelt.

Des Weiteren wurde Sesammehl und bei verschiedenen Temperaturen für zehn Minuten gerösteter Sesam analysiert. Mit Ausnahme des bei 250 °C gerösteten Sesams konnte der temperaturbehandelte Sesam gleich gut detektiert werden wie der unverarbeitete Sesam. Für das Sesammehl wurde bei der PCR etwa der gleiche c_t -Wert erhalten wie für die Positivkontrolle, während die Nachweisbarkeit mit dem Sandwich ELISA herabgesetzt war.

Außerdem wurden Modelllebensmittel (Brote und Kekse) mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Sesam sowie sesamfreie Produkte hergestellt und mit der PCR Methode sowie den beiden ELISAs analysiert. Es wurden auch die Mehlmischungen, die zur Herstellung der Brote verwendet wurden, und die Keksteigmischungen analysiert.

Bei den unverarbeiteten Produkten wurden mit steigenden Sesamkonzentrationen niedrigere c_t -Werte beobachtet. Bei den verarbeiteten Produkten war dieser Trend ebenfalls ersichtlich, nur waren die c_t -Werte generell höher und streuten sehr.

Die Nachweisgrenze des Sandwich ELISAs war in Brot und Keksen in etwa gleich der in PBS bestimmten. Nur in Keksteig war die Nachweisgrenze höher. Beim kompetitiven ELISA ergaben sich für alle Matrizes höhere LODs und LOQs als in PBS.

Für die Mehlmischungen und den Keksteig wurden zu hohe Werte ermittelt. Es ist anzunehmen, dass die zu hohen Wiederfindungen auf Matrixeffekte zurückzuführen sind.

8 Abstract

In the western world the number of food allergies increased in the last decades. The European Commission therefore published a list of 14 allergenic food ingredients which have to be declared on food packages. Mustard and sesame are on this list. There is a need for analytical methods that allow the detection of traces of allergens, e.g. ELISAs and PCR methods, to verify correct labelling of allergenic food products.

One aim of the present diploma thesis was to develop a real time PCR method for the detection of brown mustard. In addition, three already existing methods for the detection of sesame, a PCR method, a sandwich ELISA and a competitive ELISA, should be compared with regard to their applicability to model foods and commercial food products.

In order to develop a real time PCR method for brown mustard, ten primer pairs were designed and optimised. 45 food ingredients were tested for cross-reactivity by PCR and melt temperature analysis. With two primer pairs Taq Man assays were developed. However, none of the real-time PCR methods was found to be specific for brown mustard. Most PCR methods showed cross-reactivity with rapeseed, black and white mustard, Chinese cabbage, Pak choi and radish.

In order to compare the applicability of one PCR method and two ELISAs for the detection of sesame, commercially available foods which were labelled with “may contain traces of sesame” as well as model foods were analysed. The limit of detection (LOD) of the sandwich ELISA was 0,17 mg sesame protein/kg food, the limit of quantification (LOQ) 0,68 mg/kg. The LOD and LOQ of the competitive ELISA were 2,18 mg/kg and 13,38 mg/kg, respectively. The LOD of the PCR method was 10 pg of sesame DNA.

With the PCR method sesame was detected in one out of 45 commercial food products that were labelled with “may contain traces of sesame”. Sesame was detected in two further batches of the same product. With the sandwich ELISA sesame was detected in 13 products. In eight of these food samples the sesame concentration was > LOQ. With the competitive ELISA only 15 products were analysed. Sesame was detected in all of them.

In addition, sesame flour and sesame roasted at different temperatures for ten minutes were analysed with the PCR method and the sandwich ELISA. DNA could not be isolated from sesame roasted at 250 °C. The sensitivity of the sandwich ELISA for sesame roasted at 250 °C was lower than that for unroasted sesame. With the exception of sesame roasted at 250 °C, roasted sesame could be detected with the PCR method and the ELISAs with the same sensitivity as unroasted sesame. Sesame flour resulted in nearly the same c_t value as the positive control.

Model foods (bread, cookies, flour and dough) with five different sesame concentrations, as well as samples not containing sesame were analysed with all three methods.

In the case of unprocessed products, higher sesame concentrations resulted in lower c_t values. The same trend was observed for processed foods, however, the c_t values were generally higher.

In bread and cookies the LOD of the Sandwich ELISA was similar to the LOD in PBS. Only in dough the LOD was higher. In all matrices the LOD of the competitive ELISA was higher than in PBS.

In general, the sesame concentrations found in flour mixtures and doughs were higher than the theoretical concentrations. The high recoveries are probably caused by matrix effects.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AG	Antigen
AK	Antikörper
BHQ1	Black hole quencher 1
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
c _t	Threshold cycle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang DNA
EAST	Enzymallergosorbent Test
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FAM	Fluorescein
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
G	Guanin
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
H ₂ O _{cb}	Wasser für Zellbiologie
HRM	Hochauflösende Schmelzkurve
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y (in Hühnereidottern)
kb	Kilobasen
LIA	Luminoimmunoassay
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAST	Radioallergosorbent Test
RIA	Radioimmunoassay
RIE	Rocket Immuno - Elektrophorese
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
T _m	Schmelztemperatur

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Anregungs- und Emissionswellenlänge von Sybr Green I [aus Müller, 2001].....	23
Tabelle 3.2 Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie mögliche Fluoreszenzquencher einiger Fluorophore [zusammengestellt aus BioRad Laboratories, 2006 und Müller, 2001]	24
Tabelle 3.3 Enzyme und mögliche chromogene Substrate [nach Luttmann et al., 2004].....	33
Tabelle 4.1 Konzentrationen und Reinheiten der DNA Extrakte verschiedener Gewürze und Gemüse	37
Tabelle 4.2 Optimierte Primerkonzentration und Annealingtemperatur der Primerpaare	41
Tabelle 4.3 Übersicht über die bei Kreuzreaktivitätsuntersuchungen erhaltenen c_t -Werte	47
Tabelle 4.4 Ergebnis der Sequenzierung der PCR Produkte.....	49
Tabelle 4.5 Ergebnisse der Analyse kommerziell erhältlicher Lebensmittel mittels PCR und zwei ELISAs.....	55
Tabelle 4.6 Konzentration und Reinheit der DNA Extrakte aus Sesam	58
Tabelle 4.7 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze des Sandwich ELISAs in unterschiedlichen Matrices	60
Tabelle 4.8 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze des kompetitiven ELISAs in unterschiedlichen Matrices	60
Tabelle 4.9 Konzentration und Reinheit der DNA Extrakte aus Sesambrot und Mehl.....	60
Tabelle 4.10 Konzentration und Reinheit der DNA Extrakte aus Sesamkeksen und Teigen ..	61
Tabelle 4.11 PCR Ergebnisse für die Sesammehlmischungen und Brote.....	61
Tabelle 4.12 PCR Ergebnisse für die Keksteige und Kekse	62
Tabelle 4.13 Ergebnisse der Analyse des 1. Extrakts der Brote mit dem Sandwich ELISA	63
Tabelle 4.14 Ergebnisse der Analyse des 1. Extrakts der Brote mit dem kompetitiven ELISA	63
Tabelle 4.15 Ergebnisse der Analyse des 2. Extrakts der Brote mit dem Sandwich ELISA	63
Tabelle 4.16 Ergebnisse der Analyse des 2. Extrakts der Brote mit dem kompetitiven ELISA	64
Tabelle 4.17 Ergebnisse der Analyse der Extrakte der Mehlmischungen mit dem Sandwich ELISA....	64
Tabelle 4.18 Ergebnisse der Analyse der Extrakte der Mehlmischungen mit dem kompetitiven ELISA..	64
Tabelle 4.19 Ergebnisse der Analyse der Keksteig- und Keksextrakte mit dem Sandwich ELISA.....	65
Tabelle 4.20 Ergebnisse der Analyse der Keksteig- und Keksextrakte mit dem kompetitiven ELISA...	65
Tabelle 5.1 Reaktionsansatz für PCR Läufe	71
Tabelle 5.2 Sequenzen und Schmelztemperaturen der entworfenen Primerpaare und Sonden zur Detektion von braunem Senf	71
Tabelle 5.3 Temperaturprotokoll der PCR Methode zur Detektion von braunem Senf.....	72
Tabelle 5.4 Pipettierschema zur Herstellung der Primermixe.....	73
Tabelle 5.5 Mastermixzusammensetzung für PP3	73
Tabelle 5.6 Mastermixzusammensetzung für PP9	73
Tabelle 5.7 Protokoll für den Rotor Gene Q	74
Tabelle 5.8 Sequenz der Primer und Taq Man Sonde zur Detektion von Sesam.....	74
Tabelle 5.9 Mastermixzusammensetzung zur Detektion von Sesam	75
Tabelle 5.10 Temperaturprotokoll für die real time PCR zur Detektion von Sesam	75
Tabelle 5.11 Einwaagen und sich ergebende Sesamkonzentrationen für die Sesammehlmischungen zur Herstellung der Sesambrote	83
Tabelle 5.12 Einwaagen und sich ergebende Sesamkonzentrationen für die Sesammehlmischungen zur Herstellung der Sesamkekse	84
Tabelle 5.13 Brotrezept nach ICC Standard Nr. 131	84
Tabelle 5.14 Wassergehalt des verwendeten Weizenmehls und daraus errechnete benötigte Mehlmasse	85
Tabelle 5.15 Benötigte Zutatenmengen zur Brotherstellung	85

Tabelle 5.16 Grundrezept für die Kekse	86
Tabelle 5.17 Vom Grundrezept abweichende Mehl- und Wassermengen	86

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Sybr Green Assay – stark ansteigendes Fluoreszenzsignal durch Amplifikation [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]	23
Abbildung 3.2 Prinzip einer Taq Man PCR [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]	24
Abbildung 3.3 Prinzip einer Molecular Beacon Sonde [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]	25
Abbildung 3.4 Prinzip einer Molecular Beacon Sonde an Hand eines Beispiels [Müller, 2001] ...	25
Abbildung 3.5 Prinzip einer Hybridization probe [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]...	26
Abbildung 3.6 Prinzip einer Eclipse probe [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]	26
Abbildung 3.7 Prinzip eines Amplifluor Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert] ...	27
Abbildung 3.8 Prinzip eines Scorpions Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]	27
Abbildung 3.9 Prinzip eines LUX Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]	28
Abbildung 3.10 Prinzip einer PCR unter Verwendung eines zymogenen Primers [aus BioRad Laboratories, 2006, modifiziert]	28
Abbildung 3.11 Positivkontrolle und Negativkontrolle eines PCR Laufs	29
Abbildung 3.12 Schematische Struktur eines IgG Moleküls [Aigner und Neumann, 1997] ...	31
Abbildung 3.13 Schematischer Ablauf eines kompetitiven ELISAs mit indirekter Detektion	35
Abbildung 3.14 Schematischer Ablauf eines Sandwich ELISAs mit indirekter Detektion	35
Abbildung 3.15 Kalibrierkurve eines Sandwich ELISAs bzw. eines kompetitiven ELISAs ..	36
Abbildung 4.1 BLAST Ergebnis für die <i>Brassica juncea</i> Chitinase Gen Promotor Region mit Vergleich der Sequenzen für braunen Senf und Raps	39
Abbildung 4.2 PCR Kurven der Primerpaare 5 und 6	40
Abbildung 4.3 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit den Primerpaaren 5 und 6 erhaltenen Produkte	40
Abbildung 4.4 Temperatur- und Primerkonzentrationsabhängige c_t -Werte für Primerpaar 1	41
Abbildung 4.5 Temperatur- und Primerkonzentrationsabhängige c_t -Werte für Primerpaar 6	41
Abbildung 4.6 Temperatur- und Primerkonzentrationsabhängige c_t -Werte für Primerpaar 9	42
Abbildung 4.7 PCR Kurven eines Kreuzreaktivitätstests für Primerpaar 10	43
Abbildung 4.8 PCR Kurven eines Kreuzreaktivitätstests für Primerpaar 7	43
Abbildung 4.9 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit Primerpaar (PP) 10 und 7 erhaltenen Produkte	43
Abbildung 4.10 PCR Kurven des ersten Kreuzreaktivitätstests mit Primerpaar 9	44
Abbildung 4.11 PCR Kurven eines weiteren Kreuzreaktivitätstests mit Primerpaar 9	44
Abbildung 4.12 PCR Kurven eines Taq Man Assays zur Kreuzreaktivitätsuntersuchung von Primerpaar 9 (1)	45
Abbildung 4.13 PCR Kurven eines Taq Man Assays zur Kreuzreaktivitätsuntersuchung von Primerpaar 9 (2)	46
Abbildung 4.14 PCR Kurven eines Taq Man Assays zur Kreuzreaktivitätsuntersuchung von Primerpaar 9 (3)	46
Abbildung 4.15 Foto des Agarosegels zur Konzentrationsabschätzung der PCR Produkte ...	49
Abbildung 4.16 PCR Kurven einer Verdünnungsreihe eines Sesamextrakts	51
Abbildung 4.17 Standardkurve der real time PCR Methode zur Detektion von Sesam	51
Abbildung 4.18 PCR Kurven zur Sesamdetektion in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln	53
Abbildung 4.19 Inhibitionskontrolle kommerziell erhältlicher Lebensmittel	53
Abbildung 4.20 Kalibrierkurve des Sandwich ELISAs zur Detektion von Sesam	54
Abbildung 4.21 Kalibrierkurve des kompetitiven ELISAs zur Detektion von Sesam	54
Abbildung 4.22 Sesam, gemahlener Sesam, Sesammehl und gerösteter Sesam	57
Abbildung 4.23 PCR Kurven für Sesam, Sesammehl und gerösteten Sesam	58
Abbildung 4.24 Kalibrierfunktion von Sesam, Sesammehl und geröstetem Sesam	59

Abbildung 4.25 Kalibrierfunktion von Sesam und geröstetem Sesam	59
Abbildung 4.26 PCR Kurven der Untersuchung von DNA Extrakten aus Sesamkeksen und Sesamteigen.....	61
Abbildung 5.1 Backform.....	81
Abbildung 5.2 Küchenmaschine	81
Abbildung 5.3 Backofen und Gärschrank	81
Abbildung 5.4 Mörsermühle	81
Abbildung 5.5 Ausrollen, Falten und Einrollen des Brotteiges	86
Abbildung 5.6 Ausstechen der Kekse und Entfernen des überschüssigen Teiges	87

9.4 Literaturverzeichnis

Aaronov, D., Tasher, D., Levine, A., Semekh, E., Serour, F. und Dalal, I., 2008. Natural history of food allergy in infants and children in Israel. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 101:637-640

Aigner, A. und Neumann, S., 1997. Immunchemie Grundlagen, Anwendungen, Perspektiven. Gustav Fischer Verlag, 1-28

Baumgartner, S., Krska, R. und Welzig, E., 2007. Detecting allergens in foods. in: Mills, E. N. C., Wichers, H. und Hoffmann-Somerguber, K. Managing allergens in food. *CRC Press Woodhead Publishing*, 228-250

Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G. und Sampson, H. A., 2002. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: Seed storage proteins as common food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110:154-159

Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L. und Sampson, H. A., 2007. Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119:1554-1556

BioRad Laboratories, 2006. Real-time PCR Applications Guide

Brandtzaeg, P., 2008. Fehllarm im Darm. Wie Nahrungsmittelallergien entstehen. in: *Spektrum der Wissenschaft Dossier* 3/08 Immunabwehr, 46-54

Bredehorst, R. und David, K., 2001. What establishes a protein as an allergen? *Journal of Chromatography B*, 756:33-40

Brezezinski, J. L., 2006. Detection of sesame seed DNA in foods using real-time PCR. *Journal of Food Protection*, 70:1033-1036

Brown, T. A., 2002. Die Polymerasekettenreaktion (PCR). in: *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 199-214

Burks, W. und Ballmer-Weber, B. K., 2006. Food allergy. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50:595-603

Clifford, M. N., 1985. The history of immunoassays in food analysis. in: Morris, B. A., Clifford, M. N. Immunoassays in food analysis. Elsevier applied science publishers, London and New York, 3-8

Cohen, A., Goldberg, M., Levy, B., Leshno, M. und Katz, Y., 2007. Sesame food allergy and sensitization in children: the natural history and long-term follow-up. *Pediatric Allergy and Immunology*, 18:217-223

EFSA, 2004. Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für diätetische Produkte, Ernährung und Allergien auf Ersuchen der Kommission bezüglich einer Mitteilung durch IFF betreffend Senfsesamöl gemäß Artikel 6 Absatz 11 der Richtlinie 2000/13/EG (Frage Nr. EFSA-Q-2004-128)

- Figuerola, J., Blanco, C., Dumpiérrez, A. G., Almeida, L., Ortega, N., Casillo, R., Navarro, L., Pérez, E., Gallego, M. D. und Carrillo, T., 2005. Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods. *Allergy*, 60:48-55
- Fuchs, M., Cichna-Markl, M. und Hochegger, R., 2010. Development and validation of a real-time PCR method for the detection of white mustard (*Sinapis alba*) in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:11193-11200
- GEO Themenlexikon, 2007, in 20 Bänden. Band 9 Medizin und Gesundheit Diagnose, Heilkunst, Arzneien. Bibliographisches Institut Mannheim 41-43
- González de la Pena, M. A. und Monsalve, R. I., 1996. Expression in *Escherichia coli* of Sin a 1, the major allergen from mustard. *European Journal of Biochemistry*, 237:827-832
- Hamilton, R. 2006. Allergen-specific human IgE antibody-based analysis of food. in: Koppelman S. J., Hefle S. L. Detecting allergens in foods. *CRC Press Woodhead Publishing*, 79-97
- Holzhauser, T., Stephan, O. und Vieths, S., 2006. Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. in: Koppelman S. J., Hefle S. L. Detecting allergens in foods. *CRC Press Woodhead Publishing*, 125-143
- Husain, F. T., Bretbacher, I. E., Nemes, A. und Cichna-Markl, M., 2010. Development and validation of an indirect competitive enzyme linked-immunosorbent assay for the determination of potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:1434-1441
- Katzer, G. Gernot Katzers Gewürzseiten http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/Bras_nig.html Stand 27.5.2011
- Key, G., 2007. Labormethoden ELISA/EIA/FIA. in: Raem, A. M. und Rauch, P. Immunoassays. 1. Auflage Elsevier, München, Spektrum akademischer Verlag, 51-69
- Leduc, V., Moneret-Vautrin, D. A., Tzen, J. T. C., Morisset, M., Guerin, L. und Kanny, G., 2006. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy*, 61:349-356
- Lee, P.-W., Hefle, S. L. und Taylor, S. L., 2008. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of mustard in foods. *Journal of Food Science*, 73:62-68
- Levy, Y. und Danon, Y. L., 2001. Allergy to sesame seed in infants. *Allergy*, 56:193-194
- Lieberei, R., Franke, W. und Reisdorff, C., 2007. Nutzpflanzenkunde, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 146, 147, 340, 341
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. und Myrtek, D., 2004. Der Experimentator Immunologie. Elsevier Spektrum akademischer Verlag, 1-23, 35-40, 103-118

- Maleki, S. J., 2004. Food processing: effects on allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4:241-245
- Mills, E. N. C., Sancho, A. I., Moreno, J. und Kostyra H., 2007. The effects of food processing on allergens. in: Mills, E. N. C., Wichers, H. und Hoffmann-Sommergruber, K. Managing allergens in food. *CRC Press Woodhead Publishing* , 117-133
- Monsalve, R. I., Gonzales de la Pena, M. A., Menendez-Arias, L., Lopez-Otin, C., Villalba, M. und Rodriguez, R., 1993. Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen Bra j 1E: detection of an allergenic epitope. *Biochemical Journal*, 293:625-632
- Moreno, F. J., Maldonado, B. M., Wellner, N. und Mills, E. N. C., 2005. Thermostability and in vitro digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). *Biochemica et Biophysica Acta* 1752:142-153
- Morisset, M., Moneret-Vautrin, D. A., Maadi, F., Frémont, S., Guénard, L., Croizier, A. und Kanny, G., 2003. Prospective study of mustard allergy: first study with double-blind placebo-controlled food challenge trials (24 cases). *Allergy*, 58:295-299
- Mülhardt, C., 2006. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). in: Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics Elsevier, München, Spektrum akademischer Verlag, 80-110
- Müller, H.-J., 2001. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1-12, 57-73
- Mustorp, S., Engdahl-Axelsson, C., Svensson, U. und Holck, A., 2008. Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. *European Food Research and Technology*, 226:771-778
- Orruno, E. und Morgan, M. R. A., 2007. Purification and characterisation of the 7S globulin storage protein from sesame (*Sesamum indicum* L.). *Food Chemistry*, 100:926-934
- Pajno, G. B., Passalacqua, G., Magazzu, G., Barberio, G., Vita, D. und Canonica, G. W., 2000. Anaphylaxis to sesame *Allergy*, 55:199-201
- Pastorello, E. A., Varin, E., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Trambaioli, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., Rivolta, F., Robino, A., Calamari, A. M., Lacava, L. und Conti, A., 2001. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *Journal of Chromatography B*, 756:85-93
- Polifke, T. und Rauch, P., 2007. in: Raem, A. M. und Rauch, P., Immunoassays. 1. Auflage Elsevier, München, Spektrum akademischer Verlag, 275-291
- Poms, R. E. und Anklam, E., 2004a. Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens. *Journal of AOAC International* 87:1466-1474
- Poms, R. E. und Anklam, E., 2004b. Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Journal of AOAC International* 87:1391-1397

Raem, A. M., Goldmann, C. und Brandt, B., 2007. Einführung in Immunoassays. in: Raem, A. M. und Rauch, P. Immunoassays. 1. Auflage Elsevier, München, Spektrum akademischer Verlag 1-18

Rancé, F. und Dutau, G., 2000. Mustard allergy in children. *Allergy*, 55:496-500

Rancé, F., 2003. Mustard allergy as a new food allergy. *Allergy*, 58:287-288

Redl, G., Husain, F. T., Bretbacher, I. E., Nemes, A. und Cichna-Markl, M., 2010. Development and validation of a sandwich ELISA for the determination of potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398:1735-1745

Richtlinie 2000/13/EG <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:109:0029:0042:DE:PDF>

Richtlinie 2003/89/EG
http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/fl_com2003-89_de.pdf

Richtlinie 2005/26/EG http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/oj/2005/l_075/l_07520050322de00330034.pdf

Richtlinie 2005/63/EG <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:258:0003:0003:DE:PDF>

Richtlinie 2007/68/EG <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2007L0068:20090528:DE:PDF>

Ring, J., Brockow, K. und Behrendt, H., 2001. Adverse reactions to foods. *Journal of Chromatography B*, 756:3-10

Sathe, S. K., Teuber, S. S., Roux, K. H., 2005. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnical Advances*, 23:423-429

Schöringhumer, K. und Cichna-Markl, M., 2007. Development of a real-time PCR method to detect potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10540-10547

Schöringhumer, K., Redl, G. und Cichna-Markl, M., 2009. Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6):2126-2134

Shim, Y.-Y. und Wanasundara, J. P. D., 2008. Quantitative detection of allergenic protein Sin a 1 from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seeds using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:1184-1192

Sirvent, S., Palomares, O., Vereda, A., Villalba, M., Cuesta-Herranz, J. und Radriguez, R., 2009. nsLTP and profilin are allergens in mustard seeds: cloning, sequencing and recombinant production of Sin a 3 and Sin a 4. *Clinical & Experimental Allergy*, 39:1929-1936

Taylor, S., 2006. The nature of food allergy in: Koppelman S. J., Hefle S. L. Detecting allergens in foods. CRC Press Woodhead Publishing, 3-20

Untersmayr, E. und Jensen-Jarolim, E., 2006. Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacology & Therapeutics*, 112:787-798

Van Ree, R., Akkerdaas, J. und Zuidmeer, L., 2006. Immunoblotting in allergen detection. in: Koppelman S. J., Hefle S. L. Detecting allergens in foods. CRC Press Woodhead Publishing, 98-108

Wolff, N., Cogan, U., Admon, A., Dalal, I., Katz, Y., Hodos, N., Karin, N. und Yannai, S., 2003. Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. *Food and Chemical Toxicology*, 41:1165-1174

Wolff, N. , Yannai, S., Karin, N., Levy, Y., Reifen, R., Dalal, I. und Cogan, U., 2004. Identification and characterization of linear B-cell epitopes of β -globulin, a major allergen of sesame seeds. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114:1151-1158

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martina Wolny
Geburtsdatum	29. November 1986, Wien
Familie	Vater: Mag. Dr. Christian Wolny Mutter: Mag. Dr. Renate Wolny Geschwister: Brigitte und Sabine Wolny

Ausbildung

September 1993 - Juni 1997	Volksschule St. Ursula Wien Mauer
September 1997 – Juni 2005	GRG 13 Wenzgasse Wien
Seit Oktober 2005	Universität Wien Lehramtsstudium Chemie und Mathematik

Tätigkeiten

Oktober 2010 – Juni 2011	Wissenschaftliches Universitätspersonal Tätigkeit als Tutorin am Institut für Analytische Chemie „Lebensmittelanalytisches Praktikum für Ernährungswissenschaftler“
März 2011 – Juni 2011	Wissenschaftliches Universitätspersonal Tätigkeit als Tutorin am Institut für Organische Chemie „Chemische Übungen für Biologen und Ernährungswissenschaftler“

Wissenschaftliche Arbeiten

7-14. Juli 2010	10 th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Zagreb (im Rahmen von CEEPUS). Vortrag: „The problem of primer design in the development of a real-time PCR method for <i>Brassica juncea</i> “
-----------------	--

