



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Abteilung Agrarwissenschaften und Lebensmittelwissenschaften

Bereich Lebensmitteltechnologie

WS 2012/2013-SS 2013

**Entwicklung und Validierung
eines multiplexen PCR-Systems
zum Nachweis
von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss**

zur Erlangung des Titels Master of Science

Verfasser: Kathi Rachow

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Christine Wittmann
Dr. Steffen Mergemeier

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2013-0101-1

Abstract

In Europe there are 0,3-7,5% of children and 1,4-2,4% of adults, who suffer from a food allergy. In particular hazelnut, peanut and walnut are very potent allergenic proteins. Hence, few amounts are necessary to lead to an allergic reaction like coughing, sneezing attacks, difficulties in breathing or an anaphylactic shock, which can be fatal. According to the law 2007/68/EG the food industry has to declare their products, if they contain allergenic proteins like milk, eggs, fish and soy. In total, there are 14 allergens that require a declaration. To protect the allergy sufferer against the danger, it is necessary to have very specific and highly sensitive methods. In this study a multiplex-PCR for the detection of hazelnut, walnut and peanut was developed. As a result the PCR-system is specific and doesn't show any cross-reactivities. The method is robust against temperature variations and guarantees precision between 95% and 100%. Moreover, the multiplex-PCR is very sensitive, because the limits of detection (LODs) for peanut, walnut and hazelnut are 0.9 ppm, 0.1 ppm and 0.4 ppm, respectively. With this it is also possible to detect the allergens in complex matrices as e.g. ice cream, cookies and chocolate creme. The developed multiplex-system enables the analysis of three allergens in food samples in one reaction in approximately one hour.

Danksagung

Die vorliegende Masterarbeit wurde bei der am Campus Berlin-Buch ansässigen Firma „CONGEN Biotechnologie GmbH“ angefertigt. Ich möchte mich recht herzlich bei den beiden Geschäftsführern Herrn Prof. Dr. Matthias Kuhn und Herrn Prof. Dr. Steffen Mergemeier für die Bereitstellung des Themas und der Materialien bedanken.

Für die fachliche Betreuung und die Erstkorrektur meiner Masterarbeit möchte ich zum einen Frau Prof. Dr. Christine Wittmann danken. Des Weiteren danke ich meinem Zweitbetreuer Herrn Dr. Steffen Mergemeier, der bei schwerwiegenden Problemen während der Versuchsdurchführung immer mit Rat und Tat zur Seite stand und die Zweitkorrektur meiner Arbeit übernahm. Ich möchte mich weiterhin bei Frau Dipl.-Ing. Dana Dietz bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, wenn ich Fragen oder Probleme bei der Durchführung meiner Experimente hatte.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern der Firma Congen für die stets familiäre und freundliche Atmosphäre und die praktische Einarbeitung im PCR-Labor.

Desweiteren bedanke ich mich bei meiner Familie und bei meinem Freund, die während meines Studiums immer hinter mir standen und mich tatkräftig unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Entstehung einer Nahrungsmittelallergie	5
1.2	Rechtliche Grundlagen zu allergenhaltigen Lebensmitteln	7
1.3	Erdnuss, Haselnuss und Walnuss als allergene Bestandteile	9
1.4	Detektionsmöglichkeiten von Allergenen	10
1.5	Das Prinzip der real-time PCR	13
1.6	Die PCR als Multiplex-Verfahren	15
1.7	Ziel der Arbeit	18
2	Material	19
2.1	Arbeitsgeräte und -materialien	19
2.2	Reagenzien	20
2.3	Puffer	20
2.4	Primer und Sonden	20
2.5	Proben- und Referenzmaterial	21
3	Methoden	22
3.1	Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	22
3.1.1	Herstellung einer Standardreihe aus PCR-Produkten	22
3.1.2	Temperaturprogramm für die real-time PCR	23
3.1.3	Auswertung der PCR-Ergebnisse	24
3.1.4	Spezifitätstest zum PCR-Einzelsystem Erdnuss	26
3.1.5	Durchführung der Agarosegelelektrophorese	27
3.1.6	Untersuchung des Multiplexsystems auf Primerwechselwirkungen	27
3.1.7	Sondentest im Multiplexsystem	28
3.2	Validierung des Multiplexsystems Haselnuss, Erdnuss, Walnuss	29
3.2.1	Bestimmung der Spezifität	30
3.2.2	Untersuchung auf Robustheit	30
3.2.3	Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze	31
3.2.4	Bestimmung der Richtigkeit	31
3.2.5	Untersuchung verschiedener Matrices im Multiplexsystem	32
3.2.6	Überprüfung des Multiplexkits auf verschiedenen PCR-Geräten	32
3.2.7	Vergleich der PCR-Einzelsysteme mit dem Multiplexsystem	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Spezifitätstest zum Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611)	35
4.2	Entwicklung und Optimierung der Multiplex-PCR	37
4.2.1	Untersuchung des Multiplexsystems auf Wechselwirkungen	37

4.2.2	Test der neuen Sonden von Hersteller 1 im Multiplexsystem	40
4.2.3	Untersuchung des Einzelsystems Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) auf Sensitivität	43
4.2.4	Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität	44
4.2.5	Untersuchung des Multiplexsystems auf weiteren PCR-Geräten	47
4.2.6	Optimierung der Kopienzahl des IAC-Targets im Multiplexsystem	49
4.2.7	Test der neuen Sonden von Hersteller 2 im Multiplexsystem	51
4.3	Ergebnisse zur Validierung der Multiplex-PCR	54
4.3.1	Bestimmung der Spezifität	54
4.3.2	Untersuchung auf Robustheit	57
4.3.3	Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze	58
4.3.4	Bestimmung der Richtigkeit	59
4.3.5	Untersuchung verschiedener Matrices im Multiplexsystem	61
4.3.6	Überprüfung des Multiplexkits auf verschiedenen PCR-Geräten	62
4.3.7	Vergleich der PCR-Einzelsysteme mit dem Multiplexsystem	75
5	Diskussion	78
6	Zusammenfassung	85
7	Abbildungsverzeichnis	86
8	Tabellenverzeichnis	88
9	Literatur	90
10	Anhang	96

Abkürzungsverzeichnis

ABI 7500	Thermocycler ABI 7500 von Applied Biosystems
AC	Amplifikat-Charge, PCR-Produkt
BHQ	Black Hole Quencher
bp	Basenpaare
C _p	Crossing Point, wird auch als C(t) (threshold cycle) bezeichnet
CFX	Thermocycler CFX 96 C 1000 von BioRAD
Cy5	Cyanin-5
D 82546	DNA aus der Dienstleistungsabteilung der Firma Congen
DBPCFC	double-blind placebo-controlled food challenges
DINtest	Programm zur Berechnung analytischer Grenzwerte
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DS 550	interkalierender Farbstoff, dessen Fluoreszenz bei 533-580 nm gemessen wird
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EN	Erdnuss
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FDE	Fluorescence Detection Enhancer - Fluoreszenzverstärker
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer - strahlungsfreie Energieübertragung
HN	Haselnuss
IAC	Internal Amplification Control - Interne Amplifikationskontrolle
ICM	Inhibition Control Mix
IgE	Immunglobulin E
LC 480	Light Cycler 480 II von Roche
LC 1.5	Light Cycler 1.5 von Roche
LOD	Limit of Detection – Nachweisgrenze
log	dekadischer Logarithmus
Mx 3005p	Thermocycler Mx 3005p von Agilent Technologies
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
N 235	DNA aus der Dienstleistungsabteilung der Firma Congen
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NTC	No Template Control - Negativkontrolle
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
PCR	Polymerase-Chain-Reaction - Polymerasekettenreaktion
1 ppm	parts per million – 1 mg allergener Bestandteil/pro kg Lebensmittel
PTC	Positive Template Control – Positivkontrolle
RAD 3152	Referenz-Allergen-DNA
rpm	rounds per minute
RTD 285	Referenz-Tier-DNA
Rotorgene	RotorgeneQ von Qiagen
ROX	X-Rhodamin
r ²	Korrelationskoeffizient
s	Standardabweichung
SOP	Standard Operating Procedure
SO ₂	Schwefeldioxid
St.	Standard
T	Temperatur in °C
TAE-Puffer	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure Puffer
Taq	Polymerase aus dem Mikroorganismus <i>Thermus aquaticus</i>
TE-Puffer	Puffer bestehend aus Tris-HCl und EDTA
UV	Ultraviolett
VIC	Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems
WN	Walnuss
\bar{x}	Mittelwert

1 Einleitung

In Europa leiden etwa 0,3-7,5% der Kinder und 1,4-2,4% der Erwachsenen an einer Nahrungsmittelallergie. Dabei sind die häufigsten Auslöser Getreideprodukte, Fisch, Schalentiere, Hühnerfleisch, Kuhmilch, bestimmte Obst- und Gemüsesorten sowie Erdnüsse und Baumnüsse (Steinmüller, 2009). Die Erdnuss und die zu den Baumnüssen gehörige Haselnuss und Walnuss, enthalten sehr potente Allergene. Das bedeutet, dass sie schon beim Verzehr von geringen Mengen beim Allergiker eine Reaktion hervorrufen. Zu den typischen Symptomen zählen Jucken im Hals, Husten, Hautreizungen, Niesreiz oder ein anaphylaktischer Schock, der tödlich enden kann. Der Allergiker kann sich nur davor schützen, indem er allergenhaltige Lebensmittel komplett meidet. Bei der Großproduktion von Lebensmitteln kommt es öfters vor, dass allergene Bestandteile in das Endprodukt gelangen. Dies geschieht meistens unwissentlich. Deshalb ist es wichtig diese Rückstände durch geeignete Analysemethoden in Lebensmitteln frühzeitig aufzuspüren. Einerseits kann dies durch eine korrekte Allergenkennzeichnung auf dem Produktetikett erfolgen und der Verbraucher wird beim Kauf auf die Gefahr hingewiesen. Andererseits kann ein Etikettenschwindel durch den Lebensmittelhersteller aufgedeckt werden.

1.1 Entstehung einer Nahrungsmittelallergie

Bei einer Allergie reagiert der Körper überempfindlich auf einen bestimmten Stoff. Dabei kommt es teilweise zu einer heftigen Reaktion, die mit Husten, Schnupfen, Niesreiz und Hautirritationen verbunden ist. Im Prinzip kann ein Mensch auf jede Substanz allergisch reagieren. Meistens sind jedoch tierische und pflanzliche Proteine die Ursache (Steinmüller, 2009). Typische Allergieauslöser sind Tierhaare, Sporen von Schimmelpilzen, Hausstaub (Ausscheidungen der Milben), Pollen und Lebensmittel (Brüser, 1998).

Im Folgenden soll erläutert werden wie eine Nahrungsmittelallergie entsteht. Bevor eine Person zum Allergiker wird, muss diese vorab eine so genannte Sensibilisierungsphase durchlaufen haben. Dabei spielt das Immunglobulin E (IgE) eine wichtige Rolle. Es kommt zwar nur in sehr geringen Mengen (0,1-0,3 mg/l) im Blutserum vor, aber es ist bei der Sensibilisierung entscheidend. Kommt die Person durch den Verzehr eines Lebensmittels mit dem Allergen in Kontakt, so wird dieses vom Körper fälschlicherweise als Fremdstoff erkannt und löst eine Immunantwort aus. Daraufhin werden vermehrt IgE-Antikörper gebildet, die sich an die Mastzellen anlagern. Dies ist in Abbildung 1 dargestellt.

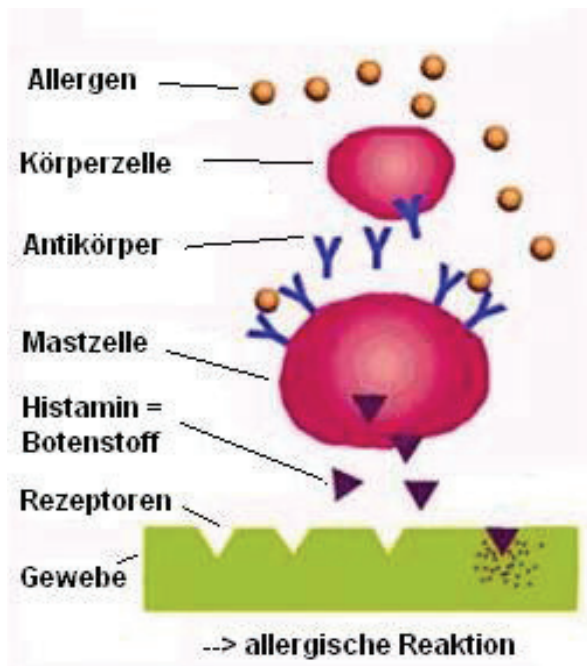


Abbildung 1: Entstehung einer Nahrungsmittelallergie, allergien.com

Die Mastzellen befinden sich in der Nase, im Mund- und Rachenraum und im Gastrointestinaltrakt. In der Sensibilisierungsphase wird allerdings noch keine allergische Reaktion ausgelöst. Erst bei wiederholtem Kontakt erkennen die bereits sensibilisierten IgE-Antikörper das Allergen (Antigen) wieder und es kommt zu einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Das heißt die Antikörper binden die Allergene an sich. Gleichzeitig entlassen die Mastzellen so genannte Mediatoren, wie zum Beispiel Histamin. Das sind Botenstoffe, die die typischen Symptome einer Allergie auslösen (Hansen, Vieluf, 1997; Steinmüller, 2009). Bei Nussallergien kommt es häufig zum Jucken im Hals, zu Niesreiz, tränenden Augen und asthmatischen Beschwerden (Brüser, 1998). Eine besonders schwer wiegende allergische Reaktion ist der anaphylaktische Schock, bei dem die Haut, der Gastrointestinaltrakt, der Kreislauf und die Atmung betroffen werden können. Im schlimmsten Fall kann dies auch mit dem Tod enden. In Deutschland ist immer häufiger der Verzehr von Erdnüssen oder erdnusshaltigen Lebensmitteln der Auslöser für einen anaphylaktischen Schock (Worm, Hompes, 2012).

Die Gründe, warum ein Mensch allergisch auf bestimmte Stoffe reagiert, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Man vermutet, dass eine Allergie zu einem gewissen Teil vererbt wird. Des Weiteren spielen die Häufigkeit des Allergenkontakts und die Menge des aufgenommenen Allergens eine Rolle (Brüser, 1998). Mit diesen beiden Faktoren hängen ebenfalls die eigenen Ernährungsgewohnheiten zusammen, denn je öfter man in Kontakt mit dem Allergen kommt, desto wahrscheinlicher kann eine Allergie auftreten. Dies ist sogar bewiesen, denn in Ländern wie

Norwegen oder Spanien, wo man häufig Fisch konsumiert, leiden die Menschen auch häufiger an einer Fischallergie (Sharp, Lopata, 2013). Eine weitere Vermutung ist, dass die in der heutigen Zeit überpraktizierten Hygienemaßnahmen, insbesondere in den eigenen vier Wänden, eine Rolle spielen. Als Beispiel sei hier genannt, dass besorgte Mütter ihre Kinder vor jeglichem Schmutz schützen wollen und täglich die Wohnung oder das Haus reinigen, und das meistens mit aggressiven Putzmitteln. Das Kind kann also kein starkes Immunsystem aufbauen, da es in einer fast sterilen Umgebung aufwächst. Es könnte somit anfälliger für Allergien sein (Steinmüller, 2009).

1.2 Rechtliche Grundlagen zu allergenhaltigen Lebensmitteln

Für einen Allergiker ist es kaum möglich durch Sehen, Riechen oder Schmecken allergene Bestandteile in Lebensmitteln aufzuspüren. Erst eine allergische Reaktion nach dem Verzehr gibt meistens den entscheidenden Hinweis (Schnadt, 2012).

Um den Verbraucher davor zu schützen, hat die Europäische Union im Jahre 2005 mit der Norm 2003/89/EG beschlossen, dass Zutaten, die eine Lebensmittelallergie oder –intoleranz auslösen können, auf dem Verpackungsetikett angegeben werden müssen. Dazu wählte man die Allergene aus, die etwa 90% aller auftretenden Lebensmittelallergien verursachen. Laut der aktuellen EU-Richtlinie 2007/68/EG sind folgende 14 Allergene deklarationspflichtig:

- glutenhaltiges Getreide (Weizen, Hafer, Gerste, Roggen, Dinkel, Kamut oder deren Hybridstämme) und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Krebstiere und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Fische und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Erdnüsse und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Sojabohnen und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Milch und daraus gewonnene Erzeugnisse (einschließlich Laktose)
- Schalenfrüchte (Mandeln, Pistazien, Haselnüsse, Walnüsse, Cashewnüsse, Pekannüsse, Macadamianüsse, Queenslandnüsse und Paranüsse) und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Sellerie und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Senf und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Sesamsamen und daraus gewonnene Erzeugnisse

- Schwefeldioxid und Sulfite in Konzentrationen von mehr als 10 mg/kg oder 10 mg/l, ausgedrückt als SO₂
- Lupinen und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Weichtiere und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Eier und daraus gewonnene Erzeugnisse

Bisher ist in der Gesetzgebung aber nur der Begriff „Zutat“ rechtlich geregelt. Das heißt, wenn eines oder mehrere der oben genannten Allergene bewusst bei der Lebensmittelproduktion hinzugefügt werden, dann muss ein Warnhinweis auf der Zutatenliste stehen. Nicht klar geregelt ist der unbewusste oder technisch unvermeidbare Eintrag von Allergenen bei der Herstellung. Die so genannte Kreuzkontamination kann schon bei der Lagerung oder dem Transport der Rohstoffe auftreten. Weitere Ursachen können aufgewirbelte Stäube während oder eine ungenügende Reinigung der Produktionslinien nach der Lebensmittelherstellung sein (Poms, Anklam, 2004).

Bei dem Begriff „Kreuzkontamination“ greift in diesem Falle aber nicht die EU-Richtlinie, sondern nur die Sorgfaltspflicht des Herstellers. Demzufolge muss er selber entscheiden, ob und wie der Verbraucher über Allergene informiert wird. Oftmals tragen die hergestellten Produkte den Warnhinweis „Kann Spuren von ... enthalten“ oder „enthält Spuren von ...“ (Richter, Rubin, Lampen, 2012).

Unverpackte Waren, wie zum Beispiel Wurst und Käse von der Supermarktheke, Brot und Brötchen vom Bäcker sowie Kantinen- und Restaurantessen, unterlagen bis November 2011 keiner Kennzeichnungspflicht, obwohl sie als Hauptauslöser für eine Aufnahme versteckter Allergene gelten, die meistens tödlich endet. Mit der Verabschiedung der Lebensmittel-Informationsverordnung EU 1169/2011 soll der Verbraucher in Zukunft eine Information über potenzielle Allergene in unverpackter Ware erhalten. Jedoch bleibt es jedem Land selbst überlassen in welcher Form dies geschieht, ob mündlich oder schriftlich. Für die Verordnung besteht eine dreijährige Umsetzungsfrist (Schnadt, 2012).

Im Gegensatz zu anderen Ländern wie die Schweiz, Neuseeland und Australien, fehlt in Deutschland bisher die Festlegung von Schwellen- und Grenzwerten für Allergene, an denen sich die Lebensmittelindustrie und letztendlich auch die Verbraucher orientieren können (Meyer, 2010). Laut Schubert-Ulrich et. al (2009) ist die Menge an Allergenen bei der eine allergische Reaktion ausgelöst wird, bei jeder Person individuell. Da keine Richtwerte für Allergengehalte in Lebensmitteln existieren, ist ein aufgedruckter Allergenhinweis auf der Verpackung nicht be-

sonders hilfreich. Der Allergiker weiß nicht, ob das Lebensmittel eine für ihn harmlose oder gefährliche Menge an allergenen Bestandteilen enthält.

1.3 Erdnuss, Haselnuss und Walnuss als allergene Bestandteile

Im Mittelpunkt dieser Arbeit sollen Walnuss, Erdnuss und Haselnuss stehen, welche oft als sogenannte „versteckte Allergene“ in der Literatur erwähnt werden (siehe Abb.2). Das bedeutet wenn ein Allergiker ein allergenhaltiges Lebensmittel verzehrt, dann ist es für ihn kaum möglich die Allergene durch Sehen, Riechen oder Schmecken zu identifizieren. Grund dafür ist einerseits, dass die Bestandteile nur in geringen Mengen in dem Lebensmittel vorkommen und andererseits der hohe Verarbeitungsgrad des Lebensmittels. Erdnuss, Walnuss und Haselnuss sind beispielsweise versteckt in Fertigprodukten, Schokoladen und Backwaren vorhanden. Demzufolge kann ein Allergiker auch nicht die Menge an allergenen Bestandteilen in dem jeweiligen Lebensmittel abschätzen. Dies kann zu einer Gefahr werden, denn schon geringste Allergenmengen reichen aus, um eine heftige allergische Reaktion auszulösen (Schnadt, 2007).



Abbildung 2: Die Allergene Erdnuss, Haselnuss und Walnuss, <http://farrp.unl.edu/web/farrp/informalltreenuts>

Die zu den Hülsenfrüchten zählende Erdnuss (*Arachis hypogaea*) wird hauptsächlich in den USA angebaut. Diese wird zu Speiseöl, Erdnussmehl oder Erdnussbutter weiterverarbeitet (Hansen, Vieluf, 1997). Von den insgesamt 11 identifizierten allergenen Proteinen in der Erdnuss werden zwei als Hauptallergene bezeichnet. Dies sind die Speicherproteine Arachin (*Ara h 1*) und Conarachin (*Ara h 2*). Das Arachin befindet sich im Proteinkörper des Erdnussamens, wohingegen das Conarachin vermutlich im Cytoplasma des Erdnussamens lokalisiert ist (Kreft, Bauer, Goerlich, 1995). Die allergenen Bestandteile der Erdnuss sind hitzestabil. Trotz Schälen, Zerkleinern oder Rösten wird die allergene Wirkung nicht verhindert (Reese, Constien, Schäfer, 2007). Hansen und Vieluf (1997) fanden heraus, dass das Rösten der Erdnüsse sogar die Allergenität steigert. Buchart (2003) stellte fest, dass Erdnüsse hochallergen sind, denn 90% der Erd-

nussallergiker reagierten allergisch auf eine Menge, die kleiner als eine Erdnuss war. Obwohl die Erdnuss zu den Hülsenfrüchten gehört, reagieren etwa 30-50% der Erdnussallergiker ebenfalls allergisch auf Baumnüsse wie Haselnuss und Walnuss, obwohl diese zu einer anderen botanischen Familie gehören (Sicherer, Burks, Sampson, 1998).

Die Haselnuss (*Corylus avellana*) gehört zu den Baumnüssen und ist weit verbreitet in der Türkei, in Italien, Spanien und den USA. Die Nüsse werden zur Dekoration von Konditorerzeugnissen oder als Zutat bei der Schokoladenherstellung eingesetzt. Weitere Anwendung finden sie bei der Herstellung von Müsli, Knabbergebäck und Eiscreme (Reese, Constien, Schäfer, 2007). Bei der Haselnuss wurden insgesamt sechs allergene Proteine identifiziert, wobei *Cor a 1.04* das Hauptallergen ist. Aufgrund der engen Verwandtschaft mit dem Birkenpollenallergen *Bet v 1*, reagieren viele Haselnussallergiker ebenfalls empfindlich auf Birkenpollen (Alvarez, Boye, 2011). Die minimale Dosis, die bei einem Allergiker zu einer milden Reaktion führt, beträgt 1-100 mg Haselnussprotein. Das entspricht 6,4 – 640 mg Haselnuss (Wensing, Penninks, Hefle et.al, 2002). Anders als bei Erdnüssen kann jedoch die Allergenität der Haselnussproteine beispielsweise durch trockenes Erhitzen bei einer Temperatur von 170°C größtenteils reduziert werden (Poms, Anklam, 2004).

Die Walnuss (*Juglans regia*) gehört ebenso wie die Haselnuss zu den Baumnüssen. Walnüsse werden häufig als Schälüsse verkauft oder dienen als Zusatz von Studentenfutter, Snacks und Eiscreme. Des Weiteren werden sie zur Dekoration von Pralinen und Torten verwendet. Bei der Walnuss wurden insgesamt vier allergene Proteine identifiziert. Die Speicherproteine *Jug r 1* und *Jug r 2* gelten als Hauptallergene (Steinmüller, 2009). Ihre allergene Wirkung wird durch hohe Temperaturen, Zugabe von Sauerstoff oder durch andere Verarbeitungsprozesse nicht vermindert (Reese, Constien, Schäfer, 2007).

1.4 Detektionsmöglichkeiten von Allergenen

Laut einer Stellungnahme der Arbeitsgruppe Nahrungsmittelallergie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAKI) sollten die Analysemethoden 1–10 mg/kg Protein beziehungsweise 10–100 mg/kg des allergenen Lebensmittels nachweisen können (Vieths, Holzhauser, Erdmann et.al, 2006). Diese Werte wurden mit Hilfe von „doppelblind-placebokontrollierten“ Provokationstestungen (DBPCFC) ermittelt. Dieser gilt als Goldstandard zur Beurteilung allergieauslösender Mengen. Dabei fand man unter anderem heraus, dass schon 100 µg Erdnuss ausreichen um eine schwache allergische Reaktion bei den Teilnehmern hervor-

zurufen (Hupfer, Busch, 2006). Allgemein lag die Konzentration, die eine Allergie auslöst, abhängig von dem Lebensmittel und dem jeweiligen Probanden, zwischen unter 1 mg und über 1 g. Aus diesem Grund müssen die Analysemethoden für Allergene sehr sensitiv, hochspezifisch und für die alltägliche Anwendung im Labor geeignet sein (Koppelman, Hefle, 2006).

Laut Meyer (2010) werden in der Allergenanalytik hauptsächlich der ELISA und die PCR angewendet. Bei dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird das Allergen mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Das allergene Protein besitzt eine bestimmte Struktur (Epitop), welche von dem Antikörper erkannt und von ihm durch eine Antikörper-Antigen-Reaktion gebunden wird (Heick, Fischer, Böpping, 2011). Im Gegensatz zum ELISA wird bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nicht ein Protein detektiert, sondern ein spezifischer DNA-Abschnitt. Meistens ist es ein Teilstück, welches die Bildung des Allergens codiert. Die PCR ist demzufolge eine indirekte Methode (Scaravelli, 2009).

Ein großes Problem bei der Allergenanalytik stellt der Verarbeitungsgrad einer Lebensmittelprobe dar, denn je mehr diese verarbeitet wurde, desto schwieriger gestaltet sich die Detektion des Allergens. In diesem Fall ist die PCR dem ELISA meistens überlegen, denn die DNA bleibt im Gegensatz zu Proteinen bei derartigen Prozessen länger stabil (Meyer, 2010).

Ebenfalls vorteilhaft ist, dass sich die PCR als Multiplex-Verfahren eignet. Das heißt, dass mehrere Allergene gleichzeitig in nur einem Vorgang detektiert werden können, was viel Zeit spart. Beim ELISA kann lediglich auf ein bestimmtes Allergen pro Test untersucht werden (Heick, Fischer, Böpping, 2011). Bisher gibt es in der Literatur nur wenig veröffentlichte Methoden zur Multiplex-PCR im Gegensatz zu PCR-Verfahren, die nur ein Allergen nachweisen können (Mafra, 2008). Das liegt zum einen daran, dass das Potential dieser Methode noch nicht weitgehend erforscht wurde (Schöringhumer, 2009). Zum anderen ist es auch sehr aufwändig und komplex ein solches System zu entwickeln (Edwards, Gibbs, 1994).

Schöringhumer et. al (2009) entwickelten und validierten eine duplex-PCR zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Haselnuss mit Hilfe von TaqMan Sonden. Die DNA von Sesam beziehungsweise Haselnuss wurde in verschiedenen Verdünnungen in der PCR eingesetzt. Dort konnte diese noch in einer Verdünnung von 1:10000 nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Konzentration von 10 pg/µl oder 50 pg. Des Weiteren wurden reine Vollkornkekse mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sesam und Haselnuss dotiert und untersucht. Dabei konnten beide Komponenten noch bei einem Gehalt von 0,005% (= 50 mg/kg) nachgewiesen werden. Die Funktionalität des PCR-Systems konnte durch Untersuchung von 30 kommerziell erhältlichen Produkten bestätigt werden.

Köppel et. al (2010) entwarfen zwei tetraplex-PCR zur Detektion von insgesamt acht Allergenen. Mit dem ersten System sollten Haselnuss, Erdnuss, Sellerie und Soja und mit dem zweiten System Sesam, Milch, Mandel und Ei detektiert werden. Viele Primer, die für diese PCR verwendet wurden, stammten aus bereits veröffentlichten singleplex-PCR-Methoden und wurden untersucht. Für die Studie wurden insgesamt 46 verschiedene Lebensmittelproben analysiert. Es konnte ein Detektionslimit von 10-50 mg/kg für Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Sesam, Sellerie und Soja erzielt werden.

Pafundo et. al (2010) entwickelten eine Multiplex-PCR zur Detektion von Haselnuss, Erdnuss, Walnuss, Mandel, Sesam und Cashewnuss. Mit dieser Methode konnten 5 pg DNA von Haselnuss, Mandel und Erdnuss bzw. 0,5 pg DNA von Cashewnuss, Walnuss und Sesam detektiert werden. Die Nachweisgrenze (LOD) für Kekse, die mit Mandeln dotiert wurden, lag zwischen 1 und 100 ppm.

Ehlert et. al (2009) entwickelten eine ligationsabhängige Sondenamplifizierung (LPA) zur Detektion von Erdnuss, Cashewnuss, Pekannuss, Pistazie, Haselnuss, Sesam, Macadamianuss, Mandel, Walnuss und Paranuss. Die Dotierung wurde nur mit einigen Allergenen durchgeführt. Das Detektionslimit lag bei 5 mg/kg.

Lange Zeit galt der ELISA als zuverlässigste Methode, da allergene Proteine noch in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnten (Poms, Anklam, 2004). Laut Engler und Blum (2007) sind heutige PCR-Methoden jedoch genauso sensitiv, denn im Laufe der Zeit haben sich die Verfahren zur DNA-Extraktion verbessert, sodass die DNA eine höhere Reinheit besitzt und somit sensitivere Ergebnisse liefert. Heutige kommerziell erwerbliche ELISA- und PCR-Testkits werden von folgenden Herstellern angeboten: Neogen, ELISA Systems, Tepnel Life Sciences und r-biopharm. In Tabelle 1 ist eine Übersicht dargestellt.

Tabelle 1: Auszug zu kommerziell erhältlichen ELISA- und PCR-Testkits zur Detektion von Erdnuss, Haselnuss und Walnuss (Boye, Godefroy, 2010)

Analyt	Methode	LOD in ppm	Name des Testkits	Hersteller
Erdnuss	ELISA	1,0	Veratox for Peanut Allergen	Neogen
	ELISA	0,5-1,0	Peanut Protein Residue	ELISA Systems
	ELISA	0,1	BIOKITS Peanut Assay	Tepnel Life Sciences
	ELISA	1,5	RIDASCREEN FAST Peanut	R-Biopharm
	PCR	< 10	SureFood Peanut PCR-ELISA	R-Biopharm
	PCR	< 10	BIOKITS Peanut PCR Mastermix	Tepnel Life Sciences

Analyt	Methode	LOD in ppm	Name des Testkits	Hersteller
Haselnuss	ELISA	1,5	RIDASCREEN FAST Hazelnut	R-Biopharm
Walnuss	ELISA	0,25	BIOKITS Walnut Assay	Tepnel Life Sciences
Walnuss	PCR	< 10	SureFood Allergen Walnut	R-Biopharm

Diese verdeutlicht, dass alle Testsysteme Nachweisgrenzen im niedrigen Detektionsbereich von 0,1-10 mg/kg besitzen. Dabei bezieht sich die Angabe, abhängig vom Hersteller, auf das Protein oder auf die Menge an allergenen Bestandteilen pro kg Lebensmittel (Schubert-Ulrich, Rudolf, Ansari et.al, 2009).

Neben der PCR und dem ELISA wurden alternative Verfahren zum Nachweis von Allergenen entwickelt. Mit Hilfe von Biosensoren konnten die allergenen Proteine von Milch, Eiern, Haselnuss, Erdnuss, Schellfisch und Sesam in Konzentrationen von 1-12,5 ppm in Lebensmittelproben detektiert werden (Yman, Eriksson, Johansson et.al, 2006). Durch die MALDI-TOF-Methode konnten Cucu, Meulenaer und Devreese (2012) die allergenen Proteine *Cor a 11* und *Cor a 9* der Haselnuss nachweisen, die zuvor durch die Maillard-Reaktion degradiert wurden. Heick, Fischer und Pöpping (2011) erarbeiteten ein Screeningverfahren für den Nachweis von Milch, Eiern, Soja, Erdnuss, Haselnuss, Walnuss und Mandel in Brot mit Hilfe der LC/MS-Methode. Das Detektionslimit lag zwischen 10-1000 ppm. Für Milch, Erdnuss und Mandel konnten noch Mengen, die kleiner als 10 ppm waren, nachgewiesen werden. Der Massenspektrometrie wird ein großes Potenzial für die Zukunft zugesprochen, denn allergene Proteine beziehungsweise Markerproteine können direkt nachgewiesen werden und es ermöglicht ein spezifisches und sensibles Multiscreening. Nachteilig ist jedoch, dass die Methode derzeit zu zeit- und kostenintensiv ist, denn sie erfordert einen hohen apparativen Aufwand und geschultes Personal (Ludwig, 2011).

1.5 Das Prinzip der real-time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde Mitte der 80er Jahre von Kerry Mullis entwickelt. Bei dieser Methode wird ein spezifischer Abschnitt auf der DNA nachgewiesen, welcher mit Hilfe des Enzyms Polymerase durch mehrere aufeinanderfolgende Zyklen vervielfältigt wird (Poms, Anklam, 2004).

Zur Vervielfältigung des DNA-Abschnittes muss ein so genannter Mastermix hergestellt werden, der alle notwendigen Bestandteile enthält. Dieser besteht aus zwei verschiedenen Oligonukleotiden (Primer), vier unterschiedlichen Desoxyribonukleotiden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), der Taq-Polymerase, einer Sonde und/oder einem Farbstoff. Alle Substanzen sind in einem Puffer gelöst. Der wichtigste Bestandteil für die PCR ist die DNA, die zuvor isoliert und aufgereinigt werden muss. Diese kann aus einem Tier, einer Pflanze, einem Mikroorganismus, etc. stammen. Die PCR ist eine temperaturabhängige Reaktion und wird daher in einem beheizbaren PCR-Gerät (Thermocycler) durchgeführt. Die Methode besteht aus drei Phasen: der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation. Diese Schritte werden als ein Zyklus zusammengefasst. Die Abbildung 3 stellt bildlich dar, was in den einzelnen Phasen der PCR abläuft.

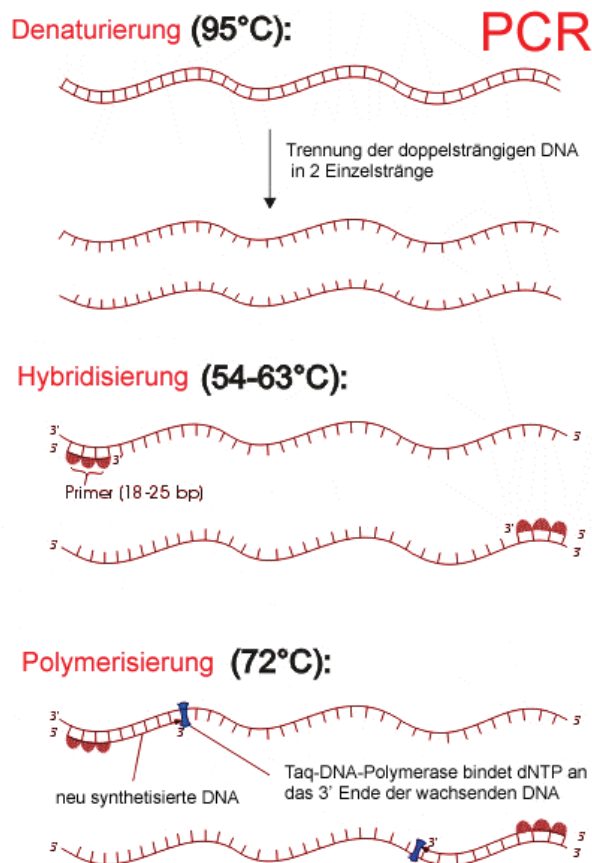


Abbildung 3: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, <http://www.egbeck.de/skripten/bilder/pcr5.gif>

1. Denaturierungsphase:

In der Denaturierungsphase wird der DNA-Doppelstrang durch hohe Temperaturen (ca. 95°C) in seine zwei Einzelstränge zerlegt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden.

2. Annealingphase (Hybridisierung):

Anschließend wird die Temperatur durch den Thermocycler verringert, sodass die Primer sich spezifisch an den DNA-Abschnitt anlagern, der kopiert werden soll. Ein Primer bindet am 3'-Ende des DNA-Einzelstrangs („forward primer“). Der andere bindet am 5'-Ende des anderen Einzelstrangs („reverse primer“). Somit wird der zu kopierende DNA-Abschnitt flankiert (Grosch, Belitz, Schieberle, 2001).

3. Elongationsphase (Polymerisierung):

Durch leichte Temperaturerhöhung durch den Thermocycler (ca. 72°C) wird die Elongationsphase eingeleitet. Das im Puffer enthaltene Magnesiumchlorid dient als Cofaktor zur Aktivierung der Taq-Polymerase (Schild, 2012). Das Enzym setzt sich gezielt an die Primer und synthetisiert die DNA-Einzelstränge in 5'-3'-Richtung. Dabei werden die beiden Einzelstränge zu einem Doppelstrang komplettiert, indem die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) komplementär eingebaut werden.

Mit diesen drei Schritten ist ein Zyklus abgeschlossen. Es folgt der zweite Zyklus, der mit der Denaturierungsphase beginnt (Grosch, Belitz, Schieberle, 2001).

1.6 Die PCR als Multiplex-Verfahren

Bei der Multiplex-PCR werden mindestens zwei DNA-Abschnitte mit einer Reaktion nachgewiesen. Das heißt, eine Probe kann auf mehrere Parameter gleichzeitig in nur einem Reaktionsgefäß untersucht werden, was Zeit und Kosten spart (Dorak, 2007).

Die Multiplex-PCR wird bereits erfolgreich zur Identifizierung von Pathogenen, zur Diagnostik von genetisch bedingten Krankheiten und für forensische Untersuchungen eingesetzt (Edwards, Gibbs, 1994).

Holland et.al (1991) beschrieb als Erstes den Nachweis der entstandenen PCR-Produkte mit Hilfe von Hydrolysesonden (TaqMan-Sonden). Eine Sonde ist ein Oligonukleotid, das aus maximal 30 Basenpaaren besteht. Sie besitzt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff, der bei Anregung mit Licht bei einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Am 3'-Ende der Sonde befindet sich ein Quencherfarbstoff der bei dem Funktionsprinzip der Sonde eine wichtige Rolle spielt.

In der Annealingphase bindet die Sonde komplementär an eine Stelle innerhalb des Ziel-DNA-Abschnittes (siehe Abbildung 4). Die Sonde wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zur

Fluoreszenz angeregt. Sind Reporter und Quencher jedoch in unmittelbarer Nähe zueinander, dann unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters (FRET-Prinzip).

Die Taq-Polymerase bildet in der Elongationsphase neue DNA-Doppelstränge unter Einbau von dNTP's. Aufgrund ihrer vorhandenen Exonuklease-Aktivität wird gleichzeitig die Sonde von ihrem Platz verdrängt, indem sie Stück für Stück in 5'-3'-Richtung abgebaut wird (siehe Abb.4, Abbau der Sonde). Der Reporterfarbstoff kann nun ungehindert sein Fluoreszenzsignal aussenden. Die Methode mit TaqMan-Sonden ist sequenzspezifisch, denn das Fluoreszenzsignal kann nur detektiert werden, wenn die Sonde spezifisch an die jeweilige Sequenz des DNA-Abschnittes gebunden hat. Andernfalls wird die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase nicht aktiviert. Somit wird nur das gewünschte PCR-Produkt detektiert. Der Thermocycler misst die Emission, wobei das Signal proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt ist (Heid, 1996; Holland, 1991).

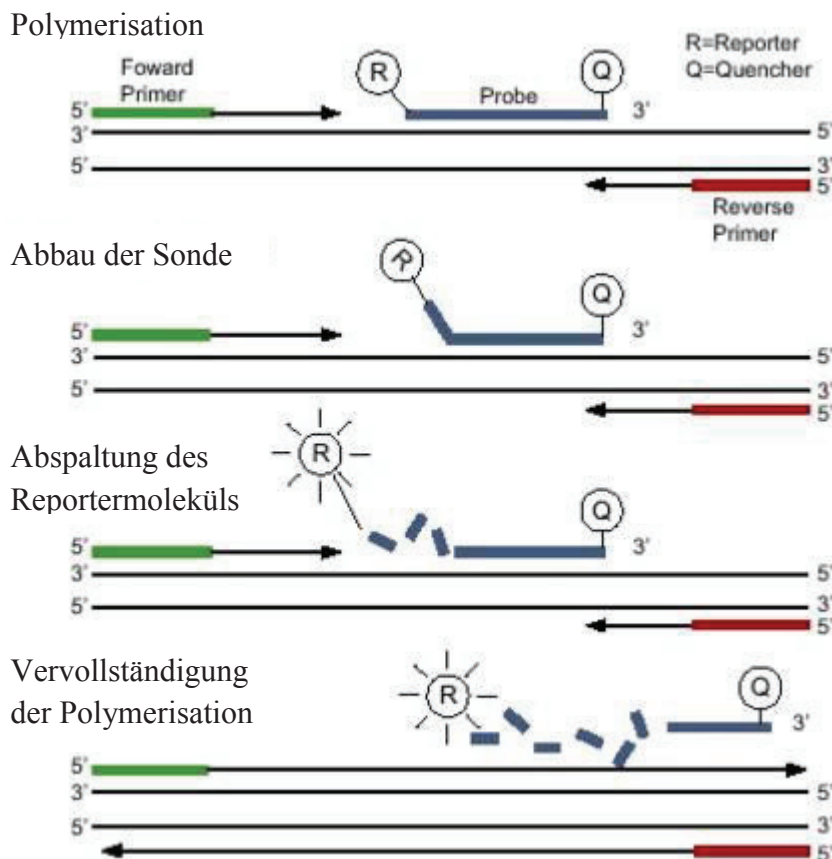


Abbildung 4: Funktionsprinzip der TaqMan-Sonden, <http://www.medizinischegenetik.de/typo3temp/pics/b1981e534d.jpg>

Der Einsatz von interkalierenden Farbstoffen (z.B. SYBR Green, EvaGreen) eignet sich um Primer-Wechselwirkungen innerhalb des PCR-Systems festzustellen. Die Farbstoffe fluoreszieren, wenn sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Sie lagern sich unspezifisch während der Elongationsphase in die Zwischenräume der entstehenden DNA-Doppelstränge ein (siehe Abb.5). Das heißt sie interkalieren ebenfalls an Stellen, wo Primerdimere (PCR-Fehlprodukte) gebildet wurden. Nach dem Ende jedes Zyklus wird das Fluoreszenzsignal durch den Thermocycler gemessen. Die Farbstoffe werden wieder freigesetzt, sobald die DNA-Doppelstränge wieder in Einzelstränge zerlegt werden. Demzufolge nimmt das Lichtsignal ab.

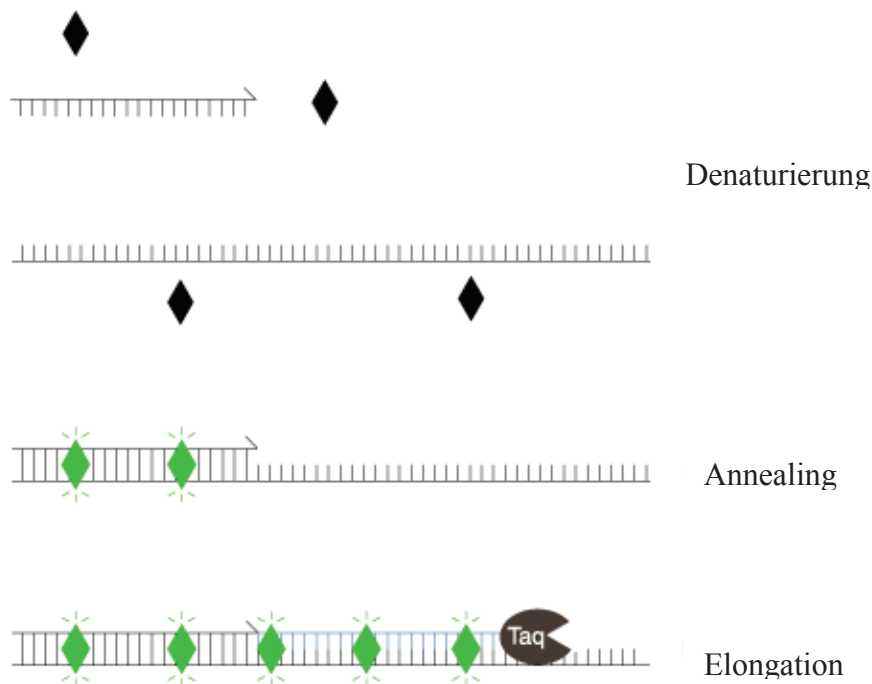


Abbildung 5: Funktionsprinzip interkalierender Farbstoffe,
http://www.b2b.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/brands/molecular-probes.gif

Eine sich an die PCR anschließende Schmelzkurvenanalyse dient zur Unterscheidung von Primerdimeren und den eigentlichen Ziel-Produkten. Dazu wird die Temperatur kontinuierlich erhöht bis die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge denaturiert werden. Dabei nimmt das Fluoreszenzsignal ab, da die Fluoreszenzfarbstoffe allmählich aus den Doppelsträngen entlassen werden (Higuchi, 1992). Die Schmelztemperatur T_m ist der Punkt, an dem die DNA zu jeweils 50% einzelsträngig beziehungsweise doppelsträngig vorliegt. Die Temperatur ist abhängig von dem Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) des PCR-Produktes und seiner Fragmentlänge. Spezifische PCR-Produkte besitzen immer eine höhere Schmelztemperatur als Primerdimere (Ririe, Rasmussen, Wittwer, 1997).

1.7 Ziel der Arbeit

Für eine Person, die auf Nahrungsmittel allergisch reagiert, können schon geringste Mengen an Allergenen gefährlich werden. Der Allergiker soll deshalb vor unzureichender oder fehlender Allergenkennzeichnung geschützt werden. Dafür benötigt die Lebensmittelindustrie sehr sensitive Methoden. Eine schnelle und kostensparende Variante ist die real-time PCR. Die in Berlin ansässige Firma Congen Biotechnologie GmbH, deren Produkte von r-biopharm vertrieben werden, hat sich auf die Allergenanalytik mittels dieser Analyseverfahren spezialisiert. Ziel dieser Masterarbeit soll die Entwicklung einer Multiplex-PCR sein, welche spezifische DNA-Abschnitte der hoch potenten Nahrungsmittelallergene Haselnuss, Erdnuss und Walnuss qualitativ nachweisen kann. Diese Methode soll hauptsächlich Zeit sparen, denn somit kann eine Lebensmittelprobe innerhalb kürzester Zeit auf diese drei Allergene untersucht werden. Als Grundlage für das Multiplexsystem dienen die PCR-Einzelsysteme Erdnuss (Primer-Nr. 2520+2611), Walnuss (Primer-Nr. 2500+2501) und Haselnuss (Primer-Nr. 2495+2496) der Firma Congen. Nach Beendigung der Entwicklungsphase soll das Multiplexsystem validiert werden.

2 Material

2.1 Arbeitsgeräte und -materialien

Die DNA-Extraktion, die Herstellung der Mastermixe und die Zugabe der DNA zum Mastermix erfolgten in getrennten Räumlichkeiten, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Vor der DNA-Extraktion wurden die Proben, je nach Beschaffungsart, mit dem Thermomixer „TM 31“ von Vorwerk oder dem Grindomix „GM 2000“ von Retsch, homogenisiert. Die anschließende Probeneinwaage erfolgte mit der Analysenwaage ($d = 0,0001 \text{ g}$) von der Firma Kern. Die benutzten Pipetten (Volumina: $< 2 \mu\text{l}$, $10\text{-}20 \mu\text{l}$, $10\text{-}100 \mu\text{l}$, $20\text{-}200 \mu\text{l}$, $100\text{-}1000 \mu\text{l}$) waren von der Firma „Rainin“ oder „pipetlite“. Es wurden gestopfte Pipettenspitzen (Volumina: $10 \mu\text{l}$, $100 \mu\text{l}$, $200 \mu\text{l}$ und $1000 \mu\text{l}$) von der Firma Mettler-Toledo (Giessen) verwendet. Es ist wichtig bei jeder Tätigkeit Handschuhe zu tragen und öfter zu wechseln um eine Kontamination der Proben mit DNA zu vermeiden. Die für die Versuche verwendeten Handschuhe „Latex Medica Examination Gloves“ wurden von der Firma Blossom bezogen.

Unter den Sicherheitswerkbänken „KR-130 S Safety“ von Kojair oder „S 2000 1.2“ von Holten wurden die Mastermixe für die PCR hergestellt. Zum Homogenisieren der Reagenzien wurde der Vortexer „Vortex-Genie 2“ von der Firma Scientific Industries benutzt. Die DNA-Zugabe erfolgte unter den Sicherheitswerkbänken „HV Mini PCR“ oder „PCR HV M/S“ von der Firma Holten. Die PCR-Versuche wurden an folgenden Geräten durchgeführt: RotorgeneQ von Qiagen, Light Cycler 480 II von Roche, CFX 96 von BioRAD, Mx3005p von Agilent Technologies und ABI 7500 von Applied Biosystems.

Für den Rotorgene wurden Tubes von der Firma Qiagen verwendet. Für den LC 480 wurden die PCR-Platten „LC 480 96 well Frame Star 480“ von 4titude (UK) benutzt. Für alle anderen Blockcycler konnten die „96 well PCR-Platten“ ebenfalls von der Firma 4titude (UK) verwendet werden. Die Platten wurden nach der Zugabe der DNA mit einer durchsichtigen Folie „MicroAmp Optical adhesive Film“ von Applied Biosystems fest verklebt und in das PCR-Gerät gesetzt.

Für die Agarosegelelektrophorese wurde eine Gelkammer von „Easy Cast Owl Separation Systems“ verwendet. Weitere notwendige Geräte waren: ein Transilluminator „Flu-O-Blu“ von Biozym, ein Spannungsgerät „Consort E 863“ und die Fotoapparatur „CMU FireCam“. Für die Agarosegelelektrophorese wurden Nitrilhandschuhe „rotiprotect nitril“ von der Firma Karl Roth GmbH (Karlsruhe) verwendet.

2.2 Reagenzien

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem firmeneigenen Testkit „SureFood[®] PREP Allergen“. Die notwendigen Reagenzien für die Herstellung der Mastermixe (PCR-Wasser, „10xPuffer1“, dNTP's, FDE, MgCl₂, DS 550, Taq-Polymerase „SureTaq Hotstart“) wurden von der Firma Congen gestellt. Für die Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurden „Ultrapure Agarose 500 g“ und „DNA-Ladder“ (100 bp) von der Firma Invitrogen bezogen. Das „Gelstar-Nucleic Acid Gel Stain“ stammte von der Firma Lonza in Rockland (USA). Zur Verdünnung von Proben-DNA's wird PCR-Wasser benutzt.

Zur Herstellung der Säulen zur Aufreinigung der PCR-Amplifikate werden 10 g Sephadex G-50 (von Pharmacia) in 150 ml TE-Puffer resuspendiert und einen Tag quellen gelassen. Bei Verwendung muss es auf Raumtemperatur erwärmt werden.

2.3 Puffer

TAE-Puffer, TE-Puffer und „6xLoading Buffer“ werden von der Firma Congen selbst hergestellt. Der so genannte „VP3“-Puffer wird ebenfalls von Congen produziert. Die genaue Zusammensetzung ist Betriebsgeheimnis. Der Puffer wird zur Herstellung der Standardreihe aus PCR-Amplifikaten und zur Verdünnung der DNA bei der Bestimmung der Richtigkeit verwendet.

2.4 Primer und Sonden

Die für das Multiplexsystem verwendeten Primer und Sonden wurden mit Hilfe des Programms „Primer Premier“ designt. Sie wurden von der Firma Congen für die Versuche zur Verfügung gestellt (siehe Tab.2 und Tab.3).

Tabelle 2: Übersicht zu den verwendeten Primern

Primer	Hersteller	firmeninterne Nr.	Sequenz
forward primer IAC	1	1713-4896	firmenintern
reverse primer IAC	1	1714-4897	firmenintern
forward primer Haselnuss	1	2495-4234	firmenintern
reverse primer Haselnuss	3	2496-3704	firmenintern
forward primer Erdnuss	3	2520-3739	firmenintern
reverse primer Erdnuss	3	2611-3882	firmenintern
forward primer Walnuss	1	2500-4082	firmenintern
reverse primer Walnuss	1	2501-4083	firmenintern

Tabelle 3: Übersicht zu den verwendeten Sonden

PCR-Komponenten	Sondenart	Hersteller	firmeninterne Nr.	Sequenz
Sonde IAC	-	4	2861-5383	firmenintern
Sonde Haselnuss	FAM-BHQ	1	2893-4368	firmenintern
	Cy5-BHQ2	1	3806-6210	firmenintern
	Cy5-BHQ2	2	3806-6266	firmenintern
Sonde Erdnuss	FAM-BHQ	3	2848-4298	firmenintern
	FAM-BHQ	1	2848-6211	firmenintern
	FAM-BHQ	2	3866-6289	firmenintern
Sonde Walnuss	FAM-BHQ	3	2589-3855	firmenintern
	ROX-BHQ2	1	3807-6212	firmenintern
	ROX-BHQ2	2	3807-6267	firmenintern

2.5 Proben- und Referenzmaterial

Die Proben-DNA, die während der Versuche benutzt wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht zu den verwendeten Proben

Probennummer	Probenart
RAD 3152, RAD 2705	Erdnuss
RAD 837	Walnuss
RAD 930	Haselnuss
RAD 2798	Maismehl
RAD 3099, RAD 3211, RAD 3479, RAD 3576, RAD 3479-3487	Quantard 0,4 ppm
RAD 3209, RAD 3578	Quantard 4 ppm
RAD 3206, RAD 3381, RAD 3563	Quantard 40 ppm
RAD 13, RAD 3560, RAD 3561	Quantard 400 ppm

Die so genannten Quantards sind firmeninternes Referenzmaterial. Diese bestehen aus einer Maismehlgrundlage, welche vorab in der PCR als negativ bewertet wurde. Es enthält folgende deklarationspflichtige Allergene, die jeweils in den Konzentrationen 0,4, 4, 40 oder 400 ppm untergemischt wurden: glutenhaltiges Getreide, Krustentiere, Ei, Fisch, Erdnuss, Soja, Milch, Nüsse (Haselnuss, Mandeln, Walnuss, Cashewnuss, Pecannuss, Paranuss, Pistazie, Macadamianuss), Sellerie, Senf, Sesam, Lupine, Mollusken. Das Probenmaterial wird im Gefrierschrank gelagert. Die DNA der Quantards konnten teilweise direkt für die Versuche eingesetzt werden. Bei Bedarf wurde die DNA mit Hilfe des „SureFood® PREP Allergen Kits“ extrahiert.

Es wurden außerdem die aus den PCR-Amplifikaten hergestellten Standardreihen von Erdnuss (AC 557), Walnuss (AC 529) und Haselnuss (AC 550) benutzt.

3 Methoden

3.1 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Das Probenmaterial wird vor dem Einwiegen homogenisiert. Bei flüssigen Proben ist ein kurzes Schütteln oder Umrühren mit einem Löffel ausreichend. Festere Materialien müssen mit dem Thermomixer oder Grindomixer bearbeitet werden. Die Aufreinigung und Isolation der DNA erfolgt mit der beigegeführten Anleitung des „SureFood® PREP Allergen Kits“ (siehe Anhang 1). Die Proben-DNA muss anschließend in einer so genannten ICM (inhibition control mix) auf inhibierende Wirkung kontrolliert werden. Eine DNA kann inhibierend wirken, wenn die Probenextraktion nicht gründlich durchgeführt wurde und beispielsweise noch Ethanolreste in der Probe vorhanden sind. Eine unverdünnte DNA kann ebenfalls inhibierend wirken (Roux, 1995). Ist das Ergebnis in Ordnung, dann kann die Proben-DNA für die Versuche verwendet werden. Sie kann bis zu 24 Stunden bei 4°C gelagert werden, ansonsten erfolgt die Aufbewahrung bei -20°C.

3.1.1 Herstellung einer Standardreihe aus PCR-Produkten

Eine Standardreihe besteht aus insgesamt fünf Einzelproben, die eine bestimmte Anzahl an Kopien eines PCR-Produktes enthalten. Der Standard 1 enthält 10 Kopien/µl und somit die niedrigste Konzentration. Die weiteren Standards enthalten eine 10fach erhöhte Anzahl an Kopien also 100 (Standard 2), 1000 (Standard 3), 10.000 (Standard 4) und 100.000 Kopien/µl (Standard 5). Das PCR-Produkt, welches mit Hilfe eines PCR-Laufs amplifiziert wird, wird anschließend über eine Sephadexsäule aufgereinigt. Dazu gibt man 650 µl der Sephadexsuspension in die Säule und zentrifugiert für 2 Minuten bei 3000 rpm. Die Säule wird mit maximal 40 µl des PCR-Produktes beladen und nochmal für 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach einer Blindwertmessung am Photometer mit PCR-Wasser erfolgt die Bestimmung des DNA-Gehaltes mit 7 µl Probe in einer Quarzküvette. Das Spektralphotometer führt eine Dreipunktmessung durch und misst bei 260, 280 und 320 nm. Sind die Messwerte größer als 1, dann muss die Probe verdünnt und erneut gemessen werden. Nach jeder Messung wird die Küvette mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Die DNA-Konzentration kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$c_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \cdot 50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (\text{Formel 1})$$

Die 50 µg/ml in der obigen Formel entsprechen der DNA-Konzentration bei einer optischen Dichte von 1, die bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt wird.

Um die notwendigen Verdünnungsstufen zur Herstellung der Standardreihe berechnen zu können, muss die ermittelte DNA-Konzentration in g/μl in Kopien/μl mit Formel 2 umgerechnet werden:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{m \cdot AG}{y \cdot M_r} \quad (\text{Formel 2})$$

m = DNA-Konzentration in g/μl

AG = 6×10^{23} Moleküle/mol

y = Anzahl der Basenpaare des PCR-Amplifikates

M_r = Molekulargewicht eines Basenpaares bei doppelsträngiger DNA = 660 g/mol

Die Probe, die anfangs etwa 10^{11} Kopien/μl enthält, wird auf 10^6 Kopien/μl mit „VP3-Puffer“ verdünnt (= Standard 6). Damit der Fehler nicht zu groß wird, sollten die Verdünnungsstufen nicht größer als 1:100 gewählt werden. Aus dem Standard 6 werden in dekadischen Verdünnungsschritten die Standards 1-5 hergestellt. Standard 0 wird für jeden Versuch frisch mit PCR-Wasser hergestellt. Um mögliche Pipettierfehler aufzudecken, werden alle Proben in einem PCR-Lauf untersucht. Die Standardreihen zu den spezifischen PCR-Produkten der Erdnuss, Walnuss und Haselnuss wurden bereits durch die Firma Congen hergestellt und konnten sofort eingesetzt werden.

3.1.2 Temperaturprogramm für die real-time PCR

Sowohl für die PCR-Einzelsysteme als auch für die Multiplex-PCR, wird eine two-step PCR mit 45 Zyklen durchgeführt. In Abhängigkeit von dem Bau der PCR-Geräte, gibt es zwei verschiedene Temperaturprogramme (siehe Tab.5).

Tabelle 5: Temperaturprogramme für die real-time PCR

Phase	Temperatur in °C	Zeit in s (kurzes Programm)	Zeit in s (langes Programm)
Initiale Denaturierung	95	60	300
Denaturierung	95	10	15
Annealing und Elongation	60	15	30
(alternativ: Melting)	60-95	-	-
Cooling	40	10	10
Zyklenzahl: 45			

Das kurze Programm gilt für Thermocycler, deren Temperatur durch Luftzufuhr geregelt wird. Dazu zählen die Geräte Rotorgene, LC 1.5 und LC 2.0. Für alle anderen Geräte (LC 480, ABI 7500, CFX, Mx 3005p) gilt das lange Temperaturprogramm. Dort wird die Temperatur über einen Heizblock geregelt. Zur Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse erfolgt am Ende der PCR die Meltingphase, wobei die Temperatur kontinuierlich von 60° auf 95°C erhöht wird. Die benötigte Zeit ist geräteabhängig.

3.1.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse

Da die PCR eine sehr sensitive Methode ist, müssen neben den Proben-DNA's verschiedene Kontrollen mitgeführt werden um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Diese sind: die Negativkontrolle (NTC), die Positivkontrolle (PTC) und die Interne Amplifikationskontrolle (IAC).

Die NTC dient zur Überprüfung der Reinheit der Mastermixreagenzien und enthält nur den Mastermix und keine Proben-DNA. Diese sollte immer negativ sein.

Mit der Positivkontrolle (PTC) wird überprüft, ob die PCR überhaupt funktioniert hat und ob beim Pipettieren in die PCR-Platte keine Fehler gemacht wurden. Die PTC enthält bereits eine bestimmte Anzahl an Kopien des spezifischen DNA-Anschnittes, aus der während der PCR weitere Kopien entstehen sollen. Demzufolge sollte diese Kontrolle immer positiv sein (Dorak, 2007; Roux, 1995).

Die IAC nimmt eine Sonderstellung ein, denn sie ist eine interne Kontrolle innerhalb des PCR-Systems. Dazu wird eine synthetische Kontroll-DNA (IAC-Target), Primer und eine Sonde bzw. ein Farbstoff mit allen anderen Reagenzien dem Mastermix beigefügt (Hoorfar, Cook, Malorny, et.al, 2003). Damit soll überprüft werden, ob inhibierende Bestandteile in der Proben-DNA vorhanden waren, die falsch negative Ergebnisse liefern. Dies können beispielsweise Polysaccharide und Polyphenole aus pflanzlichen Materialien oder Fette und Öle, die in vielen Lebensmitteln vorhanden sind, sein (Popping, Diaz-Amigo, Hoenicke, 2010). Nach Ende der PCR kann man das Ergebnis in einem separaten Detektionskanal auswerten. Die PCR wurde nicht inhibiert, wenn das IAC-Target amplifiziert wurde. Das heißt alle eingesetzten Proben, inklusive der NTC, müssen in dem Kanal positiv sein. Die PCR muss andernfalls wiederholt werden, wenn weder die Proben-DNA, noch das IAC-Target amplifiziert wurden (Edwards, Gibbs, 1994). Sind diese Kontrollen in Ordnung, dann kann die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgen. Der typische Verlauf einer Amplifikationskurve ist in Abbildung 6 dargestellt.

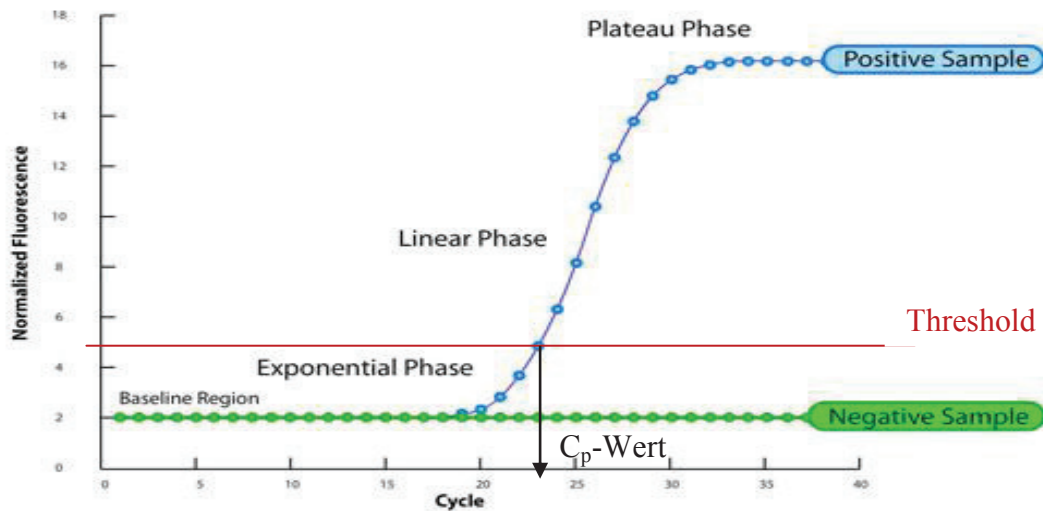


Abbildung 6: Darstellung einer Amplifikationskurve in einem Amplifikationsplot, Abbott Molecular, geändert https://www.abbottmolecular.com/static/cms_workspace/img/Landing_Pages/RealTime_PCR/typicalrealtimepcrcurve.jpg

Sie lässt sich in drei Phasen einteilen: lineare Phase, exponentielle Phase und Plateauphase. Der Kurvenverlauf ist abhängig von der Menge der PCR-Reagenzien (Primer, dNTP's), die nur in begrenzter Menge vorhanden sind. Bei der Messung des Fluoreszenzsignals durch den Thermocycler gibt es immer ein so genanntes Hintergrundrauschen, was permanent vorhanden ist. Dies ist in der Abbildung als „baseline region“ bezeichnet. Die Ziel-DNA wird in den ersten PCR-Zyklen exponentiell vervielfältigt. Das heißt im Idealfall wird die Kopienzahl der Ziel-DNA bei jedem PCR-Zyklus verdoppelt. Die Kurve nimmt als nächstes einen linearen Verlauf an, da die PCR-Reagenzien allmählich aufgebraucht werden und somit die PCR-Effizienz sinkt. Zuletzt verläuft die Kurve parallel zur x-Achse, da die Reagenzien aufgebraucht sind. Die Plateauphase ist erreicht (Busch, Konrad, 2010).

Bei der Auswertung der PCR wird der Threshold möglichst in die exponentielle Phase der Amplifikationskurve gelegt, da in diesem Bereich die PCR-Effizienz am höchsten ist. Die NTC sollte idealerweise unter dieser Linie liegen. Der entstandene Schnittpunkt zwischen Threshold-Linie und Amplifikationskurve wird als C_p -Wert bezeichnet. An diesem Punkt liegt das Fluoreszenzsignal erstmals über dem Grundrauschen. Es ist ein entscheidender Parameter bei der Auswertung der PCR-Ergebnisse. An diesem Punkt enthalten alle Proben, die man für die PCR verwendet hat, die gleiche Anzahl an DNA-Kopien. Demzufolge kann man anhand des C_p -Wertes darauf schließen, welche DNA-Konzentration eine Probe am Anfang der PCR hatte. Dabei gilt: je kleiner der C_p -Wert ist, desto höher war die DNA-Konzentration am Anfang (Heid, 1996).

3.1.4 Spezifitätstest zum PCR-Einzelsystem Erdnuss

Bevor mit der Entwicklung und Optimierung des Multiplexsystems begonnen werden kann, müssen die drei Einzelsysteme Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), Walnuss (Primer-Nr. 2500+2501) und Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496), auf denen das PCR-System basiert, validiert werden. Die Firma Congen hatte diesen Prozess bereits übernommen und fast abgeschlossen. Es stand lediglich der Spezifitätstest zum PCR-Einzelsystem Erdnuss aus, wobei das Ziel dieses Versuches die Feststellung von Querempfindlichkeiten auf das PCR-System war.

Das Pipettierschema zur Herstellung des Mastermixes ist in Tabelle 6 dargestellt. Der „Sure Master“ ist eine fertige Mischung aus „10xPuffer 1“, dNTP's, FDE und MgCl₂. Für den Spezifitätstest wird zusätzlich zur FAM-Sonde der interkalierende Farbstoff DS 550 hinzugefügt. Mit diesem kann man einerseits eine Schmelzkurvenanalyse durchführen. Andererseits kann man anhand der C_p-Werte der NTC Rückschlüsse auf Primer-Wechselwirkungen ziehen. Die Ergebnisse werden im VIC-Kanal ausgewertet. Das Gesamtvolumen des Mastermixes beträgt 20 µl. Sobald eine Komponente (z.B. DS 550) weg gelassen wird, muss das Volumen mit PCR-Wasser ausgeglichen werden.

Tabelle 6: Mastermixkomponenten für das PCR-Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611)

Komponente	Identifikationsnr.	Volumen in µl/Reaktion
PCR-Wasser	-	3,2
Sure Master	-	12,5
forward primer Erdnuss	2520-3739	1,7
reverse primer Erdnuss	2611-3882	1,7
FAM-Sonde Erdnuss	2848-4298	0,6
Taq-Polymerase	-	0,1
DS 550*	-	0,2
Gesamtvolumen		20

*nur für die Untersuchung auf Primer-Wechselwirkungen notwendig

Die Erdnuss gehört zu den Hülsenfrüchten. Deshalb werden Proben-DNA im PCR-Einzelsystem untersucht, die verwandt mit der Erdnuss sind. Das sind zum Beispiel Erbse, Bohne, Lupine und Luzerne. Des Weiteren können Proben auf Querempfindlichkeit getestet werden, die häufig in Verbindung mit der Erdnuss in einem Lebensmittel zu erwarten sind. Als Positivkontrollen werden die Standardreihe der Erdnuss, sowie Erdnuss (1:100 verdünnt) verwendet. Die Ergebnisse werden im FAM-Kanal ausgewertet.

Sobald Proben-DNA im PCR-System positiv detektiert werden, muss eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt werden. Diese gibt Aufschluss, ob das spezifische PCR-Produkt der Erd-

nuss bei weiteren Proben gebildet wurde. Ist dies der Fall, dann müssen weitere, zu den positiven Proben äquivalente Proben-DNA im Einzelsystem Erdnuss untersucht werden, da eine Querempfindlichkeit noch nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

3.1.5 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Der Gelträger und der –kamm werden in die Gelkammer eingesetzt. Zur Herstellung des Agarosegels werden 2 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 100 ml TAE-Puffer aufgefüllt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt bis eine schlierenfreie Masse entsteht. Die Masse lässt man etwas abkühlen bevor man 6 µl Gelstar in den Erlenmeyerkolben gibt und gut schwenkt. Daraufhin wird die flüssige Agarose möglichst blasenfrei in die Gelkammer gegossen. Sobald das Gel fest ist, kann man mit dem Auftragen der Proben beginnen. Man mischt durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Pipette 8 µl der Proben-DNA mit 2µl „6xLoading Buffer“ und pipettiert dies in eine Geltasche. Von dem DNA-Marker werden 8 µl verwendet. An die Gelkammer wird eine Spannung von 120 Volt für 45-60 Minuten angelegt.

3.1.6 Untersuchung des Multiplexsystems auf Primerwechselwirkungen

Die Volumina der Reagenzien für den Mastermix beruhen auf Erfahrungen der Firma Congen (siehe Tab.7) und können bei Bedarf optimiert werden. DS 550 wird zum Mastermix hinzugefügt um eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen und Primer-Wechselwirkungen festzustellen.

Tabelle 7: Mastermixkomponenten zur Untersuchung der Multiplex-PCR auf Primer-Wechselwirkungen

Komponente	Identifikationsnr.	Volumen in µl/Reaktion
PCR-Wasser	-	2,4
Sure Master	-	12,5
forward Primer Erdnuss	2520-3739	0,5
reverse Primer Erdnuss	2611-3882	0,5
FAM-Sonde Erdnuss	2848-4298	0,6
forward Primer Walnuss	2500-4082	0,5
reverse Primer Walnuss	2501-4083	0,5
FAM-Sonde Walnuss	2589-3855	0,6
forward Primer Haselnuss	2495-4234	0,5
reverse Primer Haselnuss	2496-3704	0,5
FAM-Sonde Haselnuss	2893-4368	0,6
Taq-Polymerase	-	0,1
DS 550	-	0,2
Gesamtvolumen		20

Für diesen Versuch werden Erdnuss, Walnuss und Haselnuss (jeweils 1:100 verdünnt) doppelt und die NTC vierfach bestimmt.

Anhand der obigen Tabelle erkennt man, dass die spezifischen DNA-Fragmente von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss mit FAM-gekoppelten Sonden nachgewiesen werden. Anhand der Stärke der Fluoreszenzsignale im FAM-Kanal kann anschließend entschieden werden, mit welchem Farbstoff die Sonde markiert werden soll um das spezifische Produkt des jeweiligen Allergens zukünftig nachweisen zu können. Von der Firma Congen wurde bereits festgelegt dass die Reporterfarbstoffe FAM, VIC, ROX und Cy5 für das Multiplexsystem eingesetzt werden sollen. In der Tabelle 8 sind deren Anregungs- und Emissionswellenlängenbereiche sowie deren Fluoreszenzbereich dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht zu den Reporterfarbstoffen für die Multiplex-PCR

Reporterfarbstoff für Sonde	Anregungswellenlängenbereich in nm	Emissionswellenlängenbereich in nm	Fluoreszenzbereich
FAM	465	510	grün
VIC	533	580	gelb
ROX	533	610	orange
Cy 5	618	660	rot

Entscheidend bei der Zuordnung sind die erzeugten Fluoreszenzsignalhöhen der Amplifikationskurven zu den Proben Haselnuss, Walnuss und Erdnuss. Das Allergen mit der stärksten Fluoreszenz wird im Cy5-Kanal nachgewiesen, das mit der mittleren im ROX-Kanal, und das mit der schwächsten im FAM-Kanal. Die IAC soll im VIC-Kanal detektiert werden.

3.1.7 Sondentest im Multiplexsystem

Die mit den jeweiligen Reporterfarbstoffen gekoppelten Sonden werden im Multiplexsystem untersucht. Die Mastermixkomponenten sind in Tabelle 9 aufgelistet. Bei diesem Versuch wird erstmals die IAC (Primer, Sonde, IAC-Target) zum Mastermix hinzugefügt. Laut Erfahrung der Firma Congen soll das Target zwischen dem 25. und 30.Zyklus amplifiziert werden.

Tabelle 9: Mastermixkomponenten für die Multiplex-PCR Erdnuss, Walnuss, Haselnuss inklusive IAC

Komponente	Identifikationsnr.	Volumen in µl/Reaktion
PCR-Wasser	-	1,0
Sure Master	-	12,5
forward Primer Erdnuss	2520-3739	0,5
reverse Primer Erdnuss	2611-3882	0,5
FAM-Sonde Erdnuss	2848-6211	0,6

Komponente	Identifikationsnr.	Volumen in μl /Reaktion
forward Primer Walnuss	2500-4082	0,5
reverse Primer Walnuss	2501-4083	0,5
ROX-Sonde Walnuss	3807-6212	0,6
forward Primer Haselnuss	2495-4234	0,5
reverse Primer Haselnuss	2496-3704	0,5
Cy5-Sonde Haselnuss	3806-6210	0,6
forward Primer IAC	1713-4896	0,5
reverse Primer IAC	1714-4897	0,5
VIC-Sonde IAC	2861-5383	0,6
Taq-Polymerase	-	0,1
Gesamtvolumen		20
IAC-Target		500 Kopien/Reaktion

Für den Versuch werden Erdnuss, Walnuss und Haselnuss (jeweils 1:100 verdünnt) doppelt bestimmt. Des Weiteren werden zur Überprüfung der Sensitivität des Multiplexsystems der 0,4 ppm- und der 4 ppm-Quantard mitgeführt.

3.2 Validierung des Multiplexsystems Haselnuss, Erdnuss, Walnuss

Die Firma Congen Biotechnologie GmbH besitzt ein nach DIN 17025 akkreditiertes Labor. Laut dieser Norm ist es Voraussetzung bei Einführung einer neuen Analysemethode eine Validierung durchzuführen. Als Validierung bezeichnet man den Nachweis und die Bestätigung, dass sich das jeweilige Nachweissystem für den alltäglichen Gebrauch im Labor eignet. Bei der Validierung muss geklärt werden in welchem Bereich und für welche Matrices die neue Methode tauglich ist (Wellnitz, Gluschke, 2005).

Die Validierung des Multiplexkits erfolgte mit Hilfe der firmeninternen SOP 752-01/06: Validierung von Prüfverfahren. Laut dieser Anweisung müssen folgende Parameter untersucht werden:

- Spezifität
- Robustheit
- Nachweis- und Erfassungsgrenze
- Richtigkeit
- Untersuchung verschiedener Matrices
- Überprüfung des Multiplexkits auf verschiedenen PCR-Geräten

Für die Validierung des neu entwickelten Multiplexkits wurde der Mastermix soweit zusammen gestellt, sodass nur noch die Taq-Polymerase hinzugefügt werden musste (siehe Tab.10). Somit konnten Pipettierfehler bezüglich der Mastermixherstellung von vornherein ausgeschlossen werden.

Tabelle 10: Pipettierschema zum Mastermix für die Validierung des Multiplexsystems

Komponente	Volumen in μl /Reaktion
Mastermix Peanut, Walnut, Hazelnut+IAC	19,9
Taq-Polymerase	0,1
Gesamtvolumen	20

3.2.1 Bestimmung der Spezifität

Laut Kromidas (2011) ist eine PCR-Methode spezifisch, wenn bei Anwesenheit von anderen Bestandteilen auch wirklich nur der eine, der gewünschte Bestandteil nachgewiesen werden kann. Beim Spezifitätstest werden sowohl verwandte Arten der Haselnuss und Walnuss (gehören beide zu den Baumnüssen) und der Erdnuss (gehört zu den Hülsenfrüchten) als auch häufig zu erwartende begleitende Substanzen untersucht. Die verwendeten Proben-DNA wurden aus der firmeninternen Allergen-Referenzdatenbank herausgesucht und im Multiplexsystem untersucht.

3.2.2 Untersuchung auf Robustheit

Die Robustheit gibt an wie empfindlich eine Analysemethode gegenüber Änderungen von Laborbedingungen ist. Dazu zählt zum Beispiel die Durchführung der Methode bei verschiedenen Temperaturen (Kromidas, 2011).

Die Robustheit des Multiplexsystems wird durch Variation der Temperatur für die Annealing-/Elongationsphase bestimmt. Die Temperatur soll idealerweise bei 60°C liegen. Zusätzlich dazu werden PCR-Läufe bei 59°C und bei 61°C durchgeführt. Als Proben dienen die Standards 1-3 von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss. Die Ergebnisse werden miteinander verglichen, wobei diese um maximal einen C_p -Wert voneinander abweichen dürfen. Bei der Auswertung der PCR-Läufe ist darauf zu achten, dass der „threshold“ innerhalb eines Detektionskanals immer bei demselben Wert gelegt wird.

3.2.3 Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze

An der Nachweisgrenze (LOD) werden 50% der Ergebnisse positiv und 50% negativ detektiert. An der Erfassungsgrenze kann hingegen die Analytkonzentration mit einer statistischen Sicherheit von 95% richtig positiv detektiert werden (SOP 752-01/06, 2005).

Die Nachweis- und Erfassungsgrenze wird für jedes der drei PCR-Einzelsysteme, auf dem das Multiplexsystem basiert, bestimmt. Für den Versuch sind mindestens fünf Kalibriergeraden notwendig. Diese werden durch Doppelbestimmung der Quantards 0,4, 4, 40 und 400 ppm erstellt. Mit Hilfe des Excel-Programms DINtest kann man die Nachweis- und Erfassungsgrenze nach DIN 32645 berechnen. Die Berechnung erfolgt im dekadischen Logarithmus. Das heißt, man trägt die Konzentrationen der Quantards als log-Wert und die entsprechenden C_p -Werte in die Tabelle ein. Da der Logarithmus von 0,4 ppm einen negativen Wert ergeben würde, wird der log-Wert bei allen Konzentrationen um eine Zehnerpotenz verschoben. Das heißt 0,4 ppm werden nicht zu $\log(0,4)$, sondern zu $\log(4)$, 4 ppm werden zu $\log(40)$, 40 ppm werden zu $\log(400)$ und 400 ppm werden zu $\log(4000)$. Die nach DINtest berechnete Nachweisgrenze muss anschließend zurückgerechnet werden. Dazu bildet man von dem Ergebnis den Betrag, potenziert diesen und dividiert das Ergebnis anschließend durch 10. Die Berechnung lässt sich mit Formel 3 ausdrücken:

$$\text{Nachweisgrenze in ppm} = (10^{|\log \text{Konz.}|})/10 \quad (\text{Formel 3})$$

Die Erfassungsgrenze entspricht etwa dem Doppelten der Nachweisgrenze. Die ermittelten Nachweis- und Erfassungsgrenzen für die Einzelsysteme sind jeweils Mittelwerte aus mindestens fünf Kalibriergeraden. Zur Überprüfung der nach DINtest berechneten Nachweisgrenze wird diese, abhängig vom Ergebnis, durch eine Vierfachbestimmung mit dem 0,4 ppm-Quantard oder dem 4 ppm-Quantard überprüft.

3.2.4 Bestimmung der Richtigkeit

Bei der Richtigkeit bestimmt man den prozentualen Anteil falsch positiver Proben zum Anteil bekannt negativer Proben. Dazu wird eine für das System negative DNA 20-fach bestimmt. Für diesen Versuch diente Maismehl als Probe. Dieses wird zur Herstellung der Quantards benutzt und wurde bereits durch einen PCR-Lauf als negativ bewertet.

Bei der Richtigkeit bestimmt man weiterhin den prozentualen Anteil falsch negativer Proben zum Anteil bekannt positiver Proben. Dazu wird für jedes PCR-System die negative DNA mit einer bestimmten ppm-Menge dotiert und 20-fach bestimmt. Die Dotierung erfolgt mit einem Quantard, der soweit verdünnt wird, dass die Konzentration im Bereich der Erfassungsgrenze jedes Einzelsystems liegt. Die Richtigkeit wird für alle drei PCR-Einzelsysteme einzeln bestimmt. Das heißt in jedem Detektionskanal darf maximal eine von 20 Proben falsch positiv beziehungsweise falsch negativ sein um eine statistische Sicherheit von $P=95\%$ zu erreichen.

3.2.5 Untersuchung verschiedener Matrices im Multiplexsystem

Im Gegensatz zum Spezifitätstest werden bei diesem Versuch stark prozessierte und komplexe Proben, die für das Multiplexsystem sowohl positiv als auch negativ sind, untersucht. Folgendes wurde bei diesem Versuch untersucht:

- Proben von Lebensmittelherstellern oder Analysenlaboren, die bereits von Congen untersucht wurden
- firmeninternes Referenzmaterial, wie zum Beispiel weiße Schokolade dotiert mit 20 ppm Erdnuss und
- Proben aus dem aktuellen „Allergen-Ringversuch“ von 2012.

Die Proben-DNA's wurden bereits extrahiert und konnten sofort für die PCR eingesetzt werden.

3.2.6 Überprüfung des Multiplexkits auf verschiedenen PCR-Geräten

Die Überprüfung des neuen Testkits erfolgt an allen multiplexfähigen PCR-Geräten der Firma Congen. Für jedes PCR-Einzelsystem wird eine Standardkurve erstellt. Als Proben dienen: vier NTC, die Quantards 0,4 ppm (4fach-Bestimmung), 4 ppm, 40 ppm und 400 ppm (jeweils in 2fach-Bestimmung), die Standards 0-5 von Erdnuss, Walnuss und Haselnuss, der Quantard 40 ppm (RAD 3381), und Haselnuss, Erdnuss und Walnuss in einer 1:100-Verdünnung.

Für jedes der drei PCR-Einzelsysteme, auf dem das Multiplexsystem basiert, wird eine Standardgerade erstellt. Ein Beispiel für ein Amplifikationsplot mit den Standards 1-5 ist in Abbildung 7 auf der linken Seite dargestellt. Trägt man die C_p -Werte in Abhängigkeit von der logarithmierten Kopienzahl der Standards in ein Diagramm ein, dann erhält man die dazugehörige Standardgerade (siehe Abb.7, rechts)

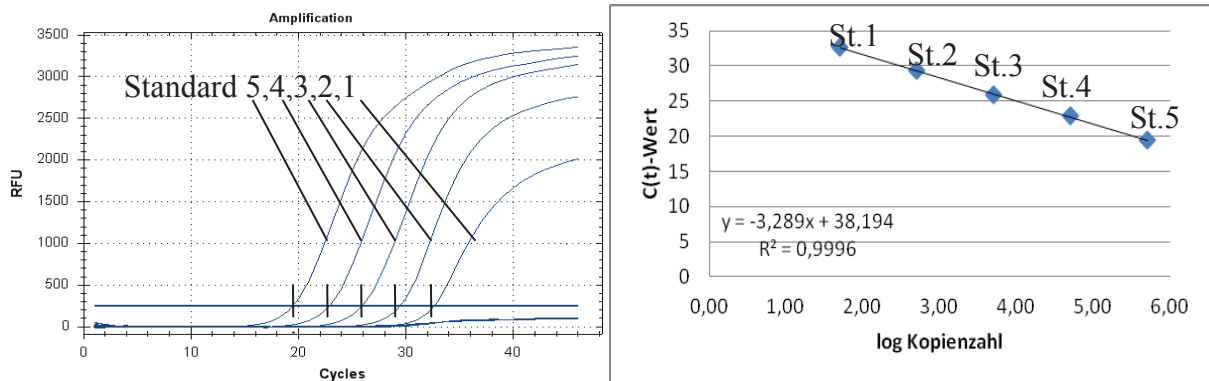


Abbildung 7: Amplifikationskurven zu einer Standardreihe (links) mit zugehöriger Standardkurve (rechts), Rachow, 2013

Die Standards enthalten eine bestimmte Anzahl an Kopien des jeweiligen PCR-Produktes, die sich um eine Zehnerpotenz unterscheiden. Deswegen weisen die Abstände zwischen den Amplifikationskurven immer den gleichen Abstand auf. Es wird angenommen, dass sich anfangs ein DNA-Molekül im Reaktionsansatz befindet (siehe Formel 4). Um eine 10fach höhere Kopienzahl zu erreichen sind etwa 3,3 Zyklen notwendig (Buschmann, Knoll, 2011).

$$10 = 1 \cdot 2^n \rightarrow n = \log(10)/\log(2) = 3,32 \quad (\text{Formel 4})$$

Als Qualitätsparameter der Standardgerade gelten der Slope und der Korrelationskoeffizient r^2 . Der Slope gibt an wie effizient die Vervielfältigung der DNA während des PCR-Laufs war. Dieses kann durch Umstellung der Formel 5 berechnet werden:

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Slope})} \quad (\text{Formel 5})$$

$$\text{Slope} = -1 \cdot (\log(10)/\log(2)) \rightarrow \text{Slope} = -3,32 \quad (\text{Formel 5.1})$$

Die 2 in der Formel 5.1 entspricht dabei einer Effizienz von 100%. Das heißt bei jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Moleküle. Der Slope muss demzufolge etwa -3,32 betragen. In der Abbildung 7 lag der Slope bei -3,289, welches einer Effizienz von 2,01 (= 100 %) entspricht.

Der Korrelationskoeffizient r^2 beschreibt die Abweichung der Messpunkte von der Standardgeraden. Dieser Wert gibt Aufschluss, ob es Pipettierfehler bei der Herstellung der Standardreihe oder beim Pipettieren der Proben in die PCR-Platte gab. Dabei gilt ein Korrelationskoeffizient von 1 als ideal. Die Standardkurve in der Abbildung 7 besitzt ein r^2 von 0,999 (Dorak, 2007).

Laut Congen soll der Korrelationskoeffizient größer als 0,98 sein und der Slope zwischen -3,2 und -3,6 liegen.

3.2.7 Vergleich der PCR-Einzelsysteme mit dem Multiplexsystem

Mit diesem Versuch soll die Frage geklärt werden, ob die Sensitivität des neu entwickelten Multiplexsystem hoch genug ist um die PCR-Einzelsysteme Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496) und Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) zukünftig im Labor ersetzen zu können. Für die PCR-Einzelsysteme Walnuss und Haselnuss existieren bereits fertige Mastermixe, die alle notwendigen Reagenzien in den entsprechenden Volumina enthalten. Es muss lediglich die Taq-Polymerase hinzugefügt werden (siehe Tab.11).

Tabelle 11: Mastermixkomponenten für die PCR-Einzelsysteme Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) und Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496)

Komponente	Volumen in μl /Reaktion
Mastermix Walnut (bzw. Mastermix Hazelnut)	19,9
Taq-Polymerase	0,1
Gesamtvolumen	20

Das Pipettierschema für den Mastermix des Erdnuss-Systems entspricht dem in Kapitel 3.1.4, wobei DS 550 nicht zugegeben wird. Das Gesamtvolumen von 20 μl wird mit PCR-Wasser ausgeglichen. Die verwendeten Proben für jeden PCR-Lauf sind: die Quantards 0,4, 4, 40 und 400 ppm, die Standards 1-5 von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss, sowie zwei für das jeweilige PCR-Einzelsystem positive Proben. Letztere können aus dem PCR-Lauf zur Untersuchung verschiedener Matrices ausgewählt werden. Folgende Proben wurden verwendet: Weiße Schokolade und Getreide (positiv auf Erdnuss), Eiscremé Malagá und Cerealien (positiv auf Walnuss), geröstete Mandeln und Mandelnougat (positiv auf Haselnuss).

Der Vergleich der PCR-Systeme erfolgt anhand der C_p -Werte, indem der Threshold bei allen PCR-Läufen so gelegt wird, dass er 5% des stärksten Fluoreszenzsignals in dem jeweiligen Detektionskanal beträgt.

4 Ergebnisse

4.1 Spezifitätstest zum Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611)

Bevor mit der Entwicklung und Optimierung des Multiplexsystems begonnen werden konnte, musste zunächst die Validierung des Einzelsystems Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) abgeschlossen werden. Der noch ausstehende Spezifitätstest wurde am Rotorgene durchgeführt. Es wurden sowohl mit der Erdnuss nah verwandte Proben als auch Proben, die häufig in Verbindung mit der Erdnuss in einem Lebensmittel zu erwarten sind, untersucht. Als Positivkontrollen wurden die Standardreihe der Erdnuss, sowie Erdnuss (1:100 verdünnt) verwendet.

Im FAM-Kanal wurden die Ergebnisse ausgewertet. Die Amplifikationskurven sind in Abbildung 8 dargestellt.

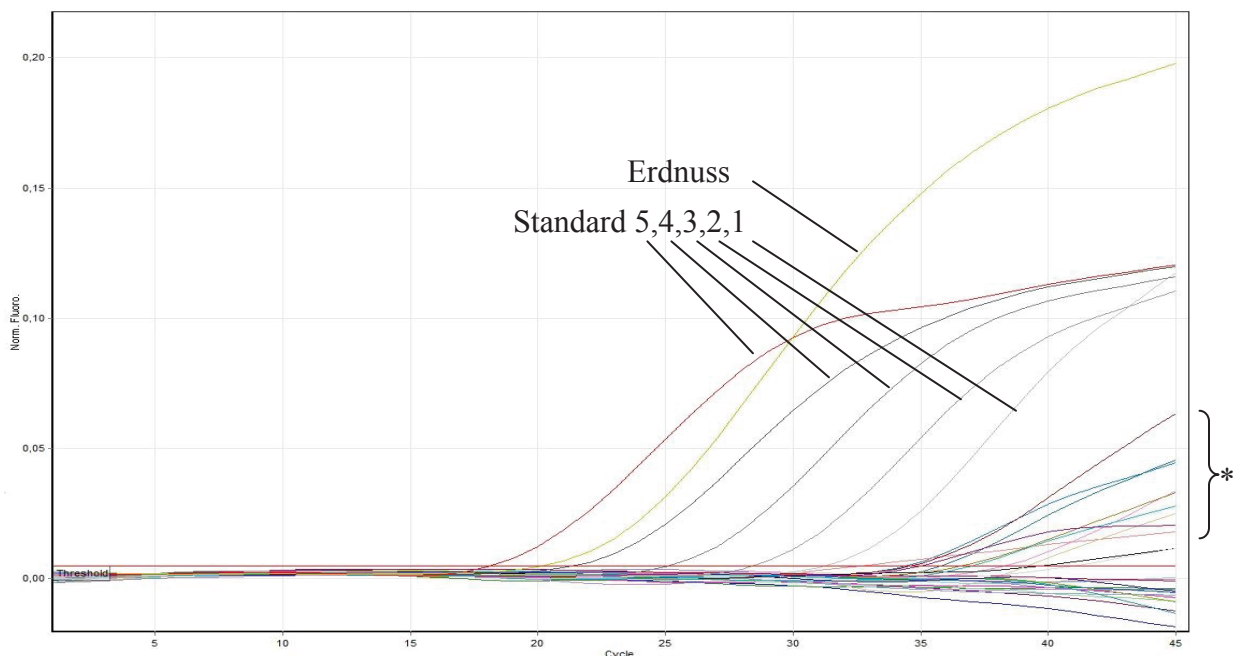


Abbildung 8: Ergebnisse des Spezifitätstests im Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), FAM-Kanal

* positive Proben: Bockshornklee, Roggen, Kamut, bittere Mandel, Sheanuss, Paranuss, Pecannuss, Macadamianuss, Cashewnuss und Pute

Man kann erkennen, dass die Standards 1-5 der Erdnuss zwischen dem 19. und 32. Zyklus amplifiziert wurden. Im 21. Zyklus wurde die Erdnussprobe amplifiziert. Ab dem 34. Zyklus wurden mehrere Proben als positiv detektiert. Diese waren: Bockshornklee, Roggen, Kamut, bittere Mandel, Sheanuss, Paranuss, Pecannuss, Macadamianuss, Cashewnuss und Pute.

Bei diesem Versuch wurde zum Mastermix zusätzlich der interkalierende Farbstoff DS 550 hinzugefügt. Anhand der C_p -Werte der NTC, die im VIC-Kanal ausgewertet wurden, konnte man auf Primer-Wechselwirkungen innerhalb des Erdnuss-Systems schließen. Die vier NTC wurden

ab dem 34.Zyklus detektiert. Da die im Erdnuss-System positiven Proben ebenfalls ab dem 34.Zyklus amplifiziert wurden (siehe Abbildung 8), konnte eine Querempfindlichkeit noch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese sollte zeigen, ob die Proben eine Querempfindlichkeit auf das Erdnuss-System aufwiesen oder eine Verunreinigung vorlag. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

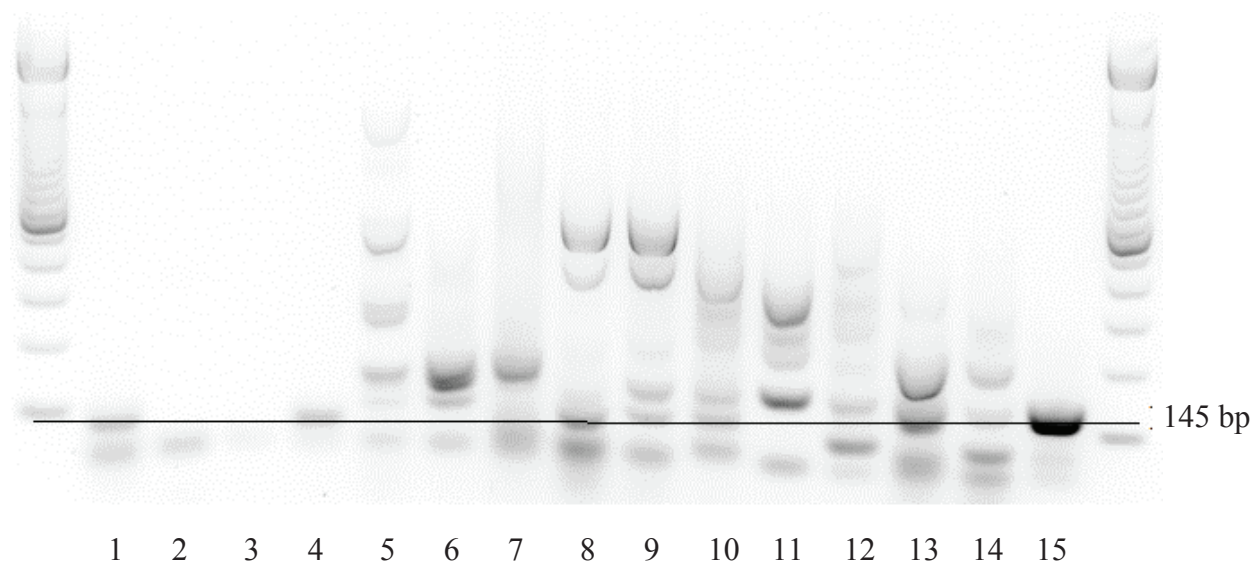


Abbildung 9: Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese zum Test der Spezifität des Einzelsystems Erdnuss, DNA-Marker: 100 bp

1-4: NTC, 5: Bockshornklee, 6: Roggen, 7: Kamut, 8: Paranuss, 9: Pecannuss, 10: Macadamianuss, 11: bittere Mandel, 12: Sheanuss, 13: Pute, 14: Cashewnuss, 15: Erdnuss

Man sieht, dass bei Paranuss (Nr.8), Pecannuss (Nr.9), Macadamianuss (Nr.10), Pute (Nr.13) und Cashewnuss (Nr.14) ein PCR-Produkt gebildet wurde, welches der Länge des Produktes der Erdnuss von 145 bp entsprach. Demzufolge konnte mit Hilfe der Gelelektrophorese eine Querempfindlichkeit der anderen Proben (Bockshornklee (Nr.5), Roggen (Nr.6), Kamut (Nr.7), bittere Mandel (Nr.11), Sheanuss (Nr.12)), ausgeschlossen werden.

Daraufhin wurden für die bei der Gelelektrophorese positiven Proben aus der firmeninternen Referenzdatenbank weitere, äquivalente DNA ausgesucht und im Einzelsystem Erdnuss auf dem Rotorgene untersucht, denn eine Querempfindlichkeit konnte noch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Ergebnisse zur Bestimmung der Spezifität des Einzelsystems Erdnuss mit weiteren Proben

Probennummer	Probenart	C _p -Werte
-	NTC	-
-	NTC	-

Probennummer	Probenart	C _p -Werte
RAD 1090	Macadamianuss 1	25,40
RAD 3041	Macadamianuss 2	-
RAD 472	Cashewnuss 1	-
RAD 1084	Cashewnuss 2	33,04
RAD 1098	Paranuss	-
RTD 285	Pute	-
RAD 1088	Pecannuss 1	34,06
RAD 3092	Pecannuss 2	35,10
RAD 2705	Erdnuss 1:100	20,16
RAD 2705	Erdnuss 1:100	20,28

Man sieht, dass von den beiden Proben-DNA der Macadamianuss und der Cashewnuss nur eine positiv im Erdnuss-Einzelsystem war. Die untersuchten Proben-DNA der Pute und der Paranuss waren negativ. Somit konnte mit der Untersuchung weiterer äquivalenter Proben eine Querempfindlichkeit von Paranuss, Macadamianuss, Cashewnuss und Pute auf das Einzelsystem Erdnuss ebenfalls ausgeschlossen werden. In der oberen Tabelle fällt jedoch auf, dass beide Pecannuss-DNA positiv waren. Diese wurden ab dem 34. beziehungsweise 35. Zyklus amplifiziert. Demzufolge konnte an dieser Stelle eine Querempfindlichkeit dieser Probe auf das Erdnuss-System noch nicht ganz ausgeschlossen werden.

4.2 Entwicklung und Optimierung der Multiplex-PCR

Als nächstes konnte mit der Entwicklung und Optimierung des Multiplexsystems zur Detektion von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss begonnen werden.

4.2.1 Untersuchung des Multiplexsystems auf Wechselwirkungen

Zunächst wurde das Multiplexsystem auf Primer-Wechselwirkungen am Rotorgene untersucht. Dazu wurden die Proben Haselnuss, Walnuss und Erdnuss (je 1:100 verdünnt) doppelt und die NTC vierfach bestimmt.

Mit Hilfe des interkaliierenden Farbstoffes DS 550, der zum Mastermix hinzugegeben wurde, konnten Rückschlüsse auf Wechselwirkungen innerhalb des Multiplexsystems gezogen werden. Dazu wurden die C_p-Werte der vier untersuchten NTC im VIC-Kanal betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

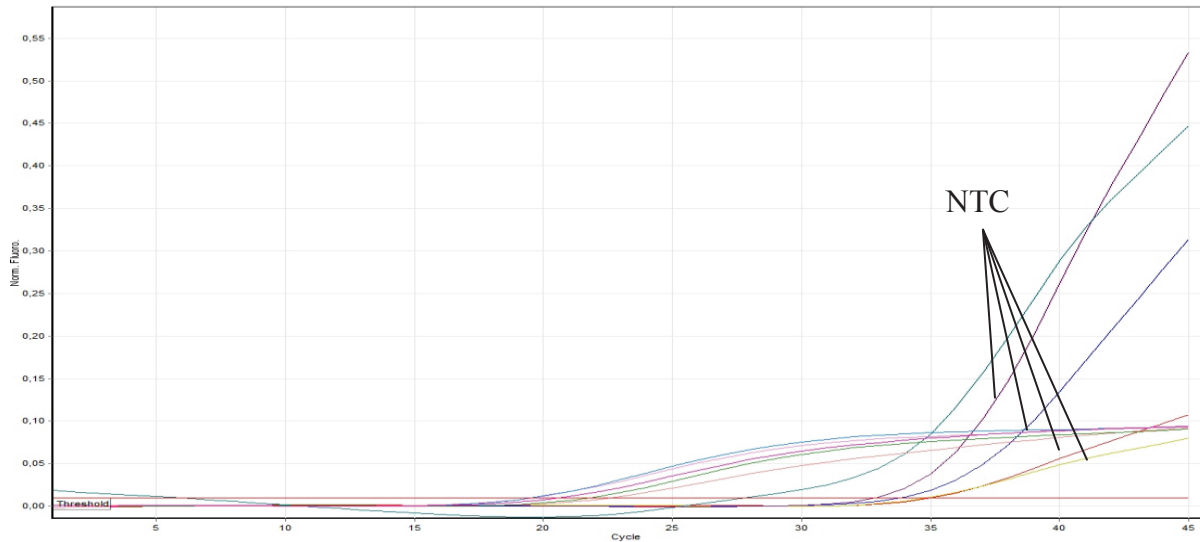


Abbildung 10: Ergebnisse zu Primer-Wechselwirkungen innerhalb des Multiplexsystems, VIC-Kanal

Anhand der Grafik kann man erkennen, dass die NTC etwa ab dem 34. Zyklus amplifiziert wurden. Weiterhin konnte mit DS 550 eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

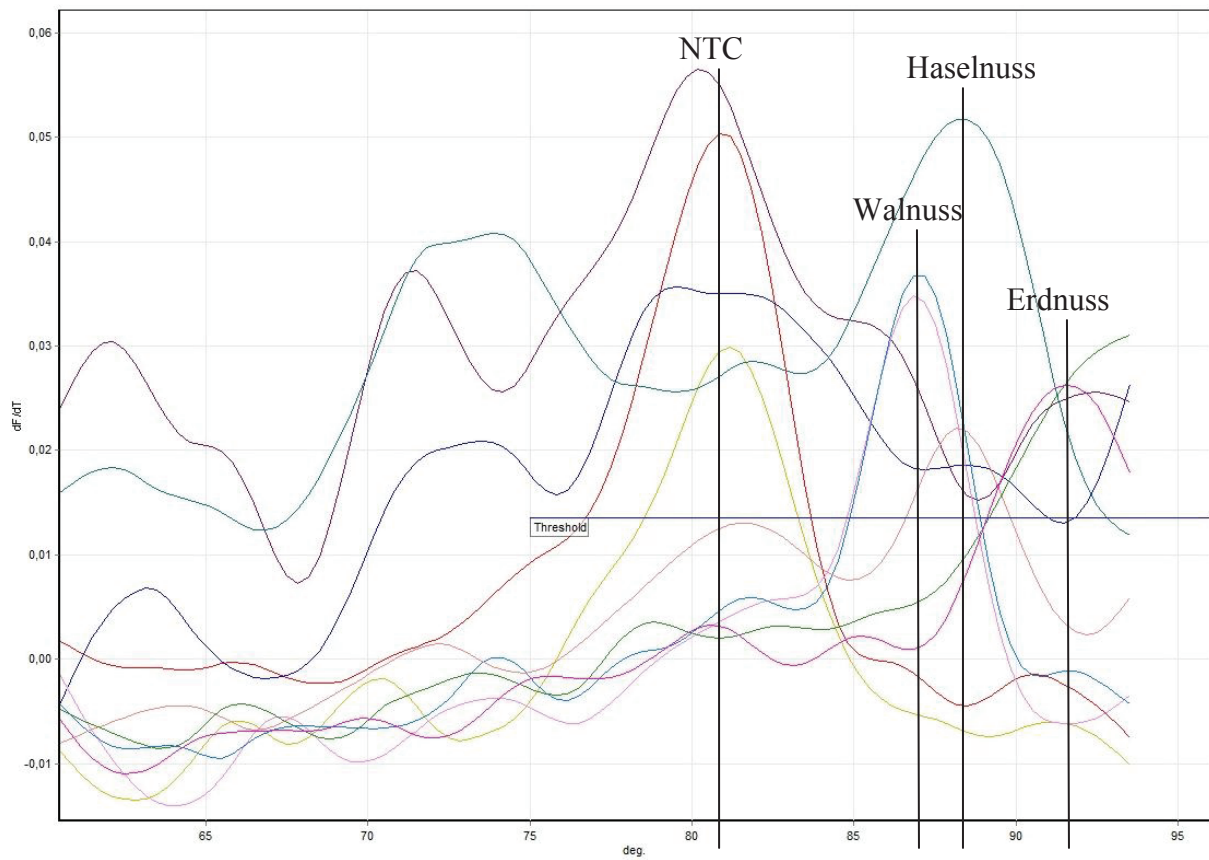


Abbildung 11: Schmelzkurvenanalyse zum Multiplexsystem Erdnuss, Walnuss, Haselnuss

Anhand der Grafik sieht man, dass die Maxima der Peaks für die PCR-Produkte der Haselnuss, Walnuss und Erdnuss bei einer bestimmten Schmelztemperatur lagen. Die Schmelztemperatur für das PCR-Produkt der Walnuss lag bei 87°C und die der Haselnuss bei 88°C . Der Schmelzpunkt für das erdnuss-spezifische Produkt lag bei 91°C . Die Schmelztemperatur der NTC war deutlich niedriger und betrug etwa 81°C .

Bei diesem Versuch wurden alle spezifischen DNA-Abschnitte der Haselnuss, Walnuss und Erdnuss mit FAM-gekoppelten Sonden nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden demzufolge im FAM-Kanal ausgewertet. Abbildung 12 zeigt die entstandenen Amplifikationskurven.

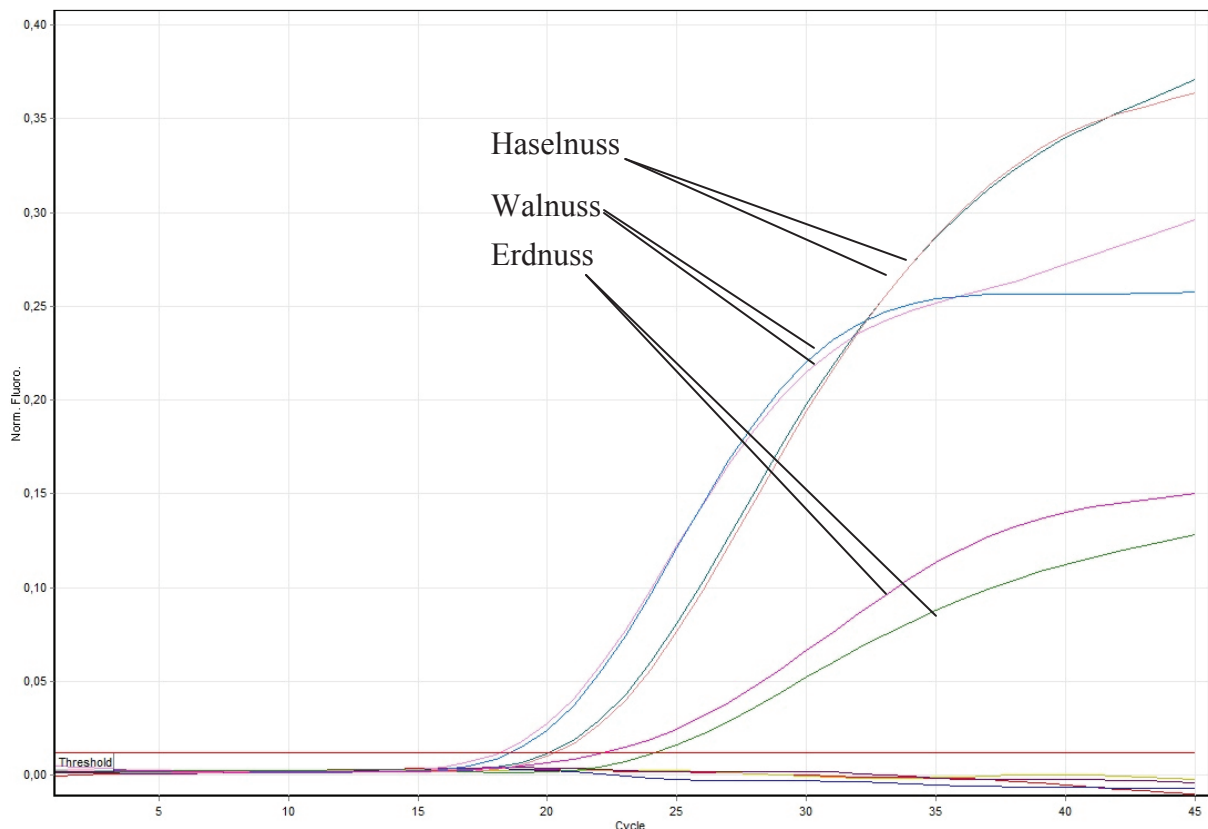


Abbildung 12: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Wechselwirkungen, FAM-Kanal

Bei den Haselnussproben wurden die stärksten Fluoreszenzsignale mit etwa 0,37 erzeugt, gefolgt von den Walnussproben mit 0,26 und 0,30. Die schwächsten Signale mit 0,12 und 0,15 lieferte die Erdnuss. Durch die Schmelzkurvenanalyse und durch die Amplifikationskurven konnte bewiesen werden, dass die spezifischen PCR-Produkte von Haselnuss, Erdnuss und Walnuss gebildet wurden. Deshalb wurde als Nächstes anhand der Höhe der Fluoreszenzsignale entschieden, dass das PCR-Produkt der Erdnuss zukünftig mit einer FAM-Sonde nachgewiesen werden soll (siehe Tab.13). Der DNA-Abschnitt der Haselnuss wird mit einer Cy5-Sonde und der Abschnitt

der Walnuss wird mit einer ROX-Sonde detektiert. Die IAC wird mit einer VIC-gekoppelten Sonde nachgewiesen.

Tabelle 13: Sonden für das Multiplexsystem und deren nachzuweisender DNA-Abschnitt

Reporterfarbstoff für Sonde	nachzuweisender DNA-Abschnitt von:
FAM	Erdnuss
VIC	IAC
ROX	Walnuss
Cy 5	Haselnuss

4.2.2 Test der neuen Sonden von Hersteller 1 im Multiplexsystem

Die mit den unterschiedlichen Reporterfarbstoffen gekoppelten Sonden (Cy5-Sonde: 3806-6210, ROX-Sonde: 3807-6212 und FAM-Sonde: 2848-6211) wurden bestellt und im Multiplexsystem am LC 480 untersucht. Zum Mastermix wurde erstmals die IAC, bestehend aus Primern, Sonde und IAC-Target, hinzugefügt. Als Proben für diesen Lauf dienten Erdnuss, Haselnuss und Walnuss (je 1:100 verdünnt), drei unterschiedliche Proben-DNA vom 0,4 ppm-Quantard und eine DNA vom 4 ppm-Quantard.

Die Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse im FAM-Kanal, in welchem das Vorhandensein der Erdnuss nachgewiesen wurde.

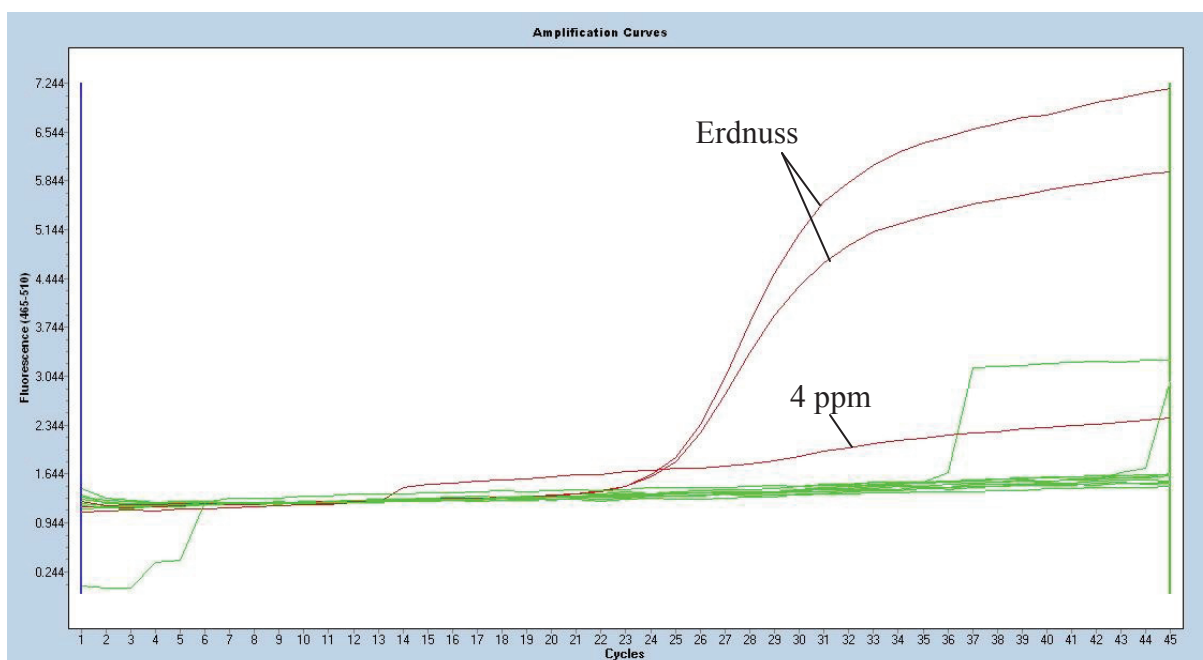


Abbildung 13: Ergebnisse zum Sondentest, FAM-Kanal

Beide Erdnussproben waren positiv. Deren C_p -Werte waren ähnlich und lagen bei etwa 23. Der Verlauf der Amplifikationskurve vom 4 ppm-Quantard war nicht ideal, aber die Probe wurde

von der Software des PCR-Gerätes als positiv gewertet. Des Weiteren wurde keiner der drei verwendeten 0,4 ppm-Quantards detektiert.

Die IAC wurde im VIC-Kanal ausgewertet. Anhand der Abbildung 14 erkennt man, dass alle Proben positiv waren. Die C_p -Werte lagen etwa bei 29. Auffallend war, dass das Fluoreszenzsignal sehr hoch ausfiel. Es erstreckte sich im Bereich zwischen 10 und 25.

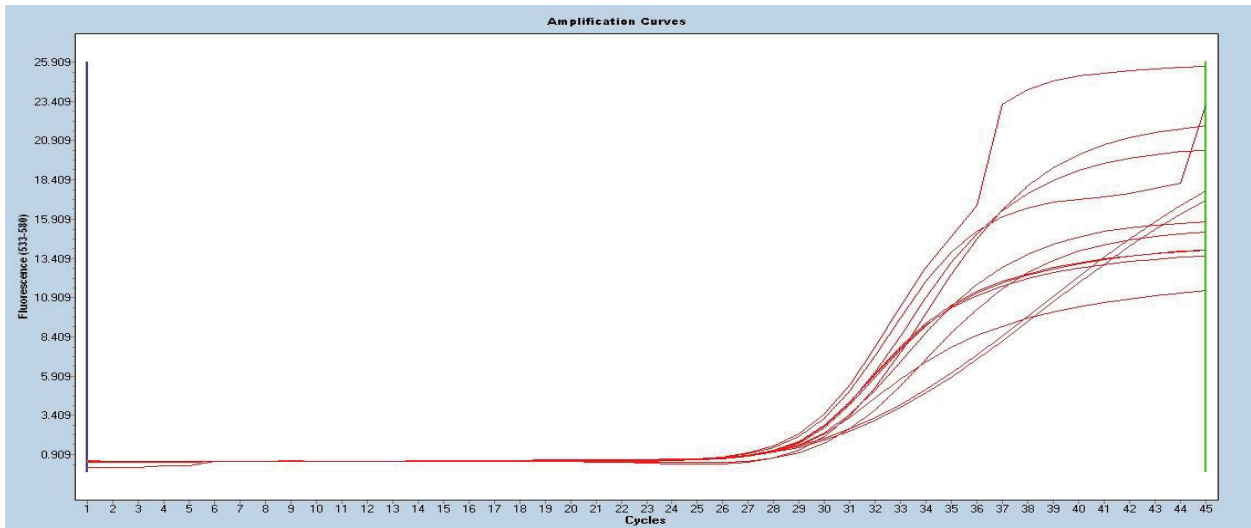


Abbildung 14: Ergebnisse zum Sondentest, VIC-Kanal

Das Vorhandensein von Walnuss wurde im ROX-Kanal ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 15 dargestellt. Es zeigt, dass die beiden Walnussproben ab dem 21. Zyklus detektiert wurden. Der 4 ppm-Quantard wurde aufgrund seiner höheren Allergenkonzentration ab dem 28. Zyklus detektiert. Die drei 0,4 ppm-Quantards wurden ab dem 30. Zyklus amplifiziert.

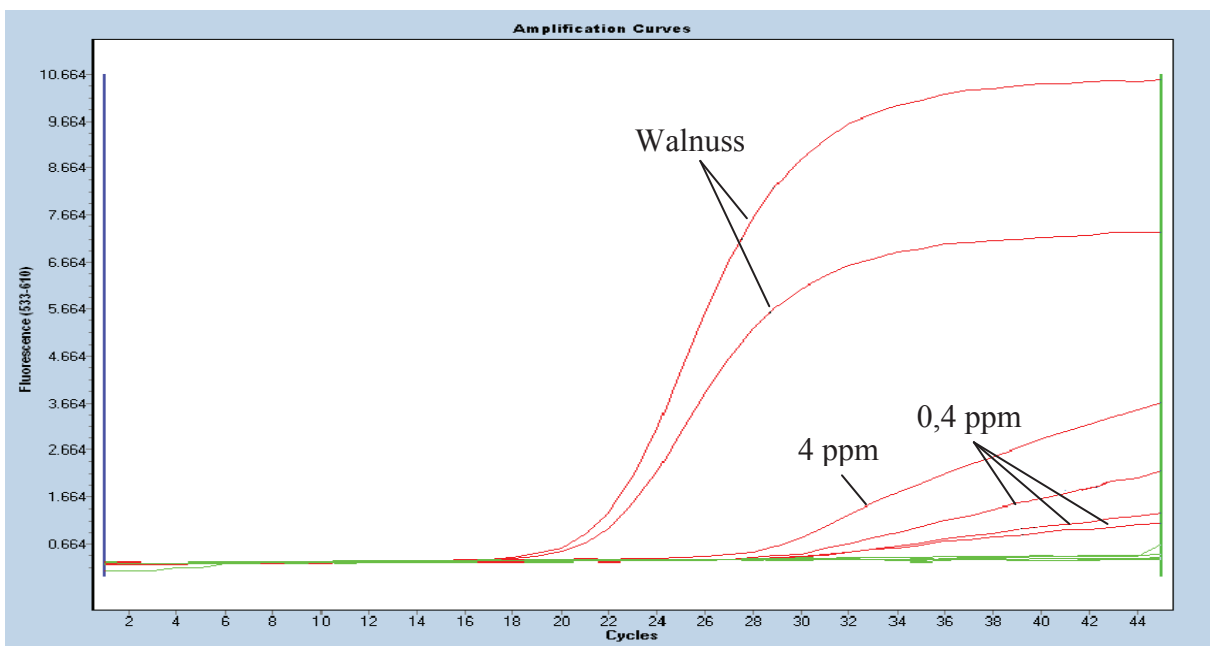


Abbildung 15: Ergebnisse zum Sondentest, ROX-Kanal

Im Cy5-Kanal wurde die Haselnuss nachgewiesen. Die beiden Haselnussproben wurden ab dem 21. Zyklus amplifiziert (siehe Abb.16). Der 4 ppm-Quantard wurde ab dem 28. Zyklus detektiert. Es wurden ebenfalls alle drei 0,4 ppm-Quantards ab dem 30. Zyklus amplifiziert.

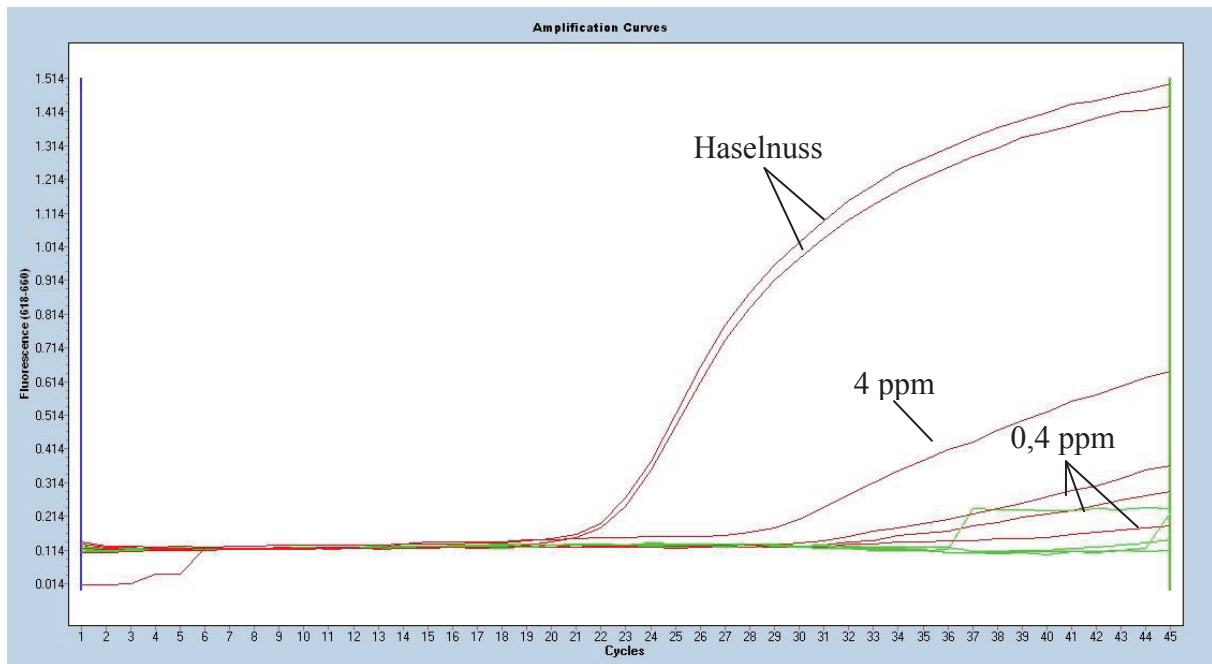


Abbildung 16: Ergebnisse zum Sondentest, Cy5-Kanal

Aufgrund der hohen Fluoreszenzsignale der IAC im VIC-Kanal wurde für die weiteren Versuche eine geringere Konzentration an IAC-Primern ($0,3 \mu\text{l}/\text{Reaktion}$) und IAC-Sonde ($0,2 \mu\text{l}/\text{Reaktion}$) für den Mastermix verwendet. Aus diesem Experiment resultierte ebenfalls, dass keiner der 0,4 ppm-Quantards im FAM-Kanal detektiert wurde. Deswegen wurde als nächstes das PCR-Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) auf dessen Sensitivität untersucht.

4.2.3 Untersuchung des Einzelsystems Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) auf Sensitivität

Der obige Versuch zeigte, dass im Multiplexsystem die 0,4 ppm im FAM-Kanal nicht detektiert wurden. Nun sollte überprüft werden, ob beim Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) gleiche Ergebnisse auftreten. Als Proben zur Untersuchung der Sensitivität dienten die Standards -2 bis 5 ($10^{-2} - 10^5$ Kopien PCR-Amplifikat/ μ l) der Erdnuss, sowie Quantards mit den Konzentrationen 0,4, 4, 40 und 400 ppm. Letztere wurden jeweils doppelt pipettiert. Der Versuch wurde auf dem LC 480 durchgeführt. Die C_p -Werte sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Ergebnisse zur Untersuchung des PCR-Einzelsystems Erdnuss auf dessen Sensitivität

Probennummer	Probenart	C_p -Werte
-	NTC	-
-	NTC	-
AC 557 Standard -2	Erdnuss Standard -2	-
AC 557 Standard -1	Erdnuss Standard -1	37,73
AC 557 Standard 0	Erdnuss Standard 0	35,34
AC 557 Standard 1	Erdnuss Standard 1	30,73
AC 557 Standard 2	Erdnuss Standard 2	27,98
AC 557 Standard 3	Erdnuss Standard 3	26,54
AC 557 Standard 4	Erdnuss Standard 4	22,95
AC 557 Standard 5	Erdnuss Standard 5	19,21
RAD 13	Quantard 400 ppm	24,00
RAD 13	Quantard 400 ppm	25,48
RAD 3206	Quantard 40 ppm	27,56
RAD 3206	Quantard 40 ppm	27,91
RAD 3209	Quantard 4 ppm	30,93
RAD 3209	Quantard 4 ppm	31,48
RAD 3211	Quantard 0,4 ppm	38,40
RAD 3211	Quantard 0,4 ppm	36,52

Man sieht, dass alle Proben im Erdnuss-System positiv waren. Auffallend war jedoch, dass der 0,4 ppm-Quantard erst ab dem 36. beziehungsweise 38. Zyklus amplifiziert wurde. Der nächsthöhere Quantard von 4 ppm wurde ab dem 31. Zyklus amplifiziert. Laut Kapitel 3.2.6 müssten die 0,4 ppm etwa drei Zyklen später, also ab dem 34. Zyklus detektiert werden. Aus diesem Grund wurden neue Proben-DNA aus dem Probenmaterial zum 0,4 ppm-Quantard mit Hilfe des „SureFood® PREP Allergen Kits“ extrahiert und erneut im Multiplexsystem untersucht.

4.2.4 Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität

Die Sensitivität des Multiplexsystems wurde mit drei neu extrahierten Proben-DNA des 0,4 ppm-Quantards auf dem LC 480 untersucht. Als Positivkontrolle wurden Haselnuss, Walnuss und Erdnuss (jeweils 1:100 verdünnt) mitgeführt. Die Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse im FAM-Kanal (Nachweis der Erdnuss).

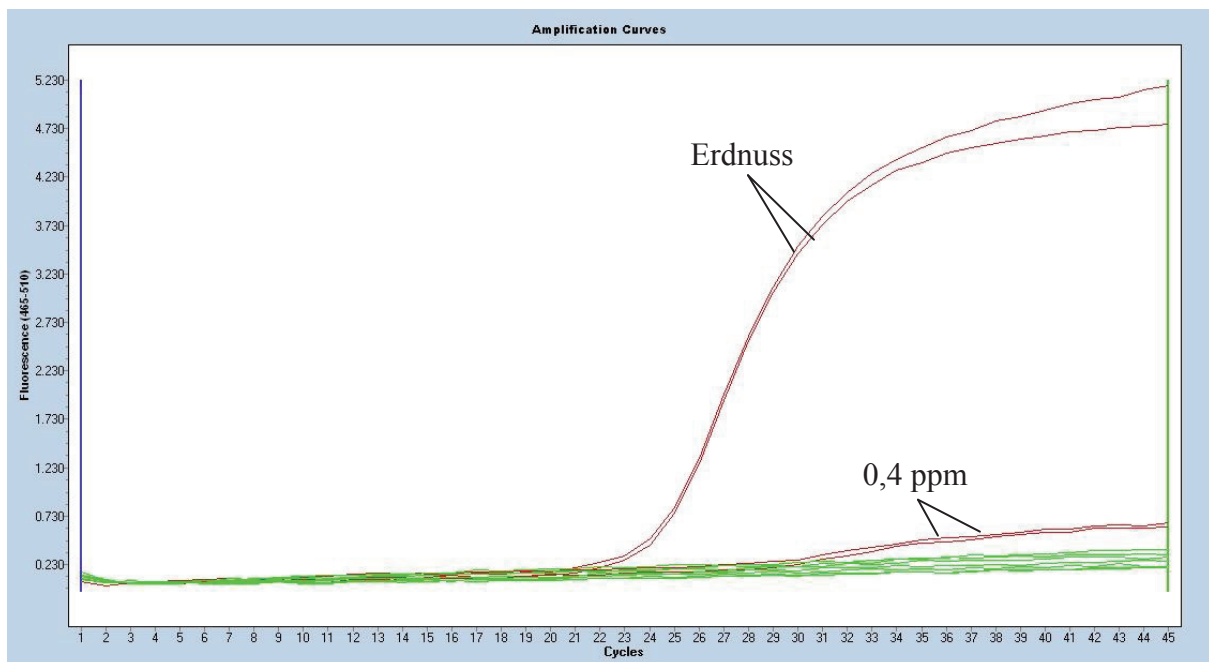


Abbildung 17: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, FAM-Kanal

Die beiden Erdnussproben wurden ab dem 21. Zyklus detektiert, jedoch fiel das Fluoreszenzsignal mit 5,2 eher niedrig aus. Weiterhin wurden zwei der drei 0,4 ppm-Quantards ab dem 30. beziehungsweise 31. Zyklus detektiert, jedoch waren die Fluoreszenzsignale, die bei etwa 0,7 lagen, ebenfalls sehr schwach. Die übereinanderliegenden Linien in der Abbildung deuten auf ein starkes Grundrauschen hin.

In der Abbildung 18 sieht man die Ergebnisse im VIC-Kanal. Das IAC-Target wurde ab dem 27. Zyklus amplifiziert. Aufgrund der Verringerung der Konzentrationen der IAC Primer und der IAC-Sonde, lagen die Fluoreszenzsignale im VIC-Kanal zwischen 1,6 und 8,0. Im vorherigen Versuch lag dieses zwischen 10 und 25 (siehe Kapitel 4.2.2).

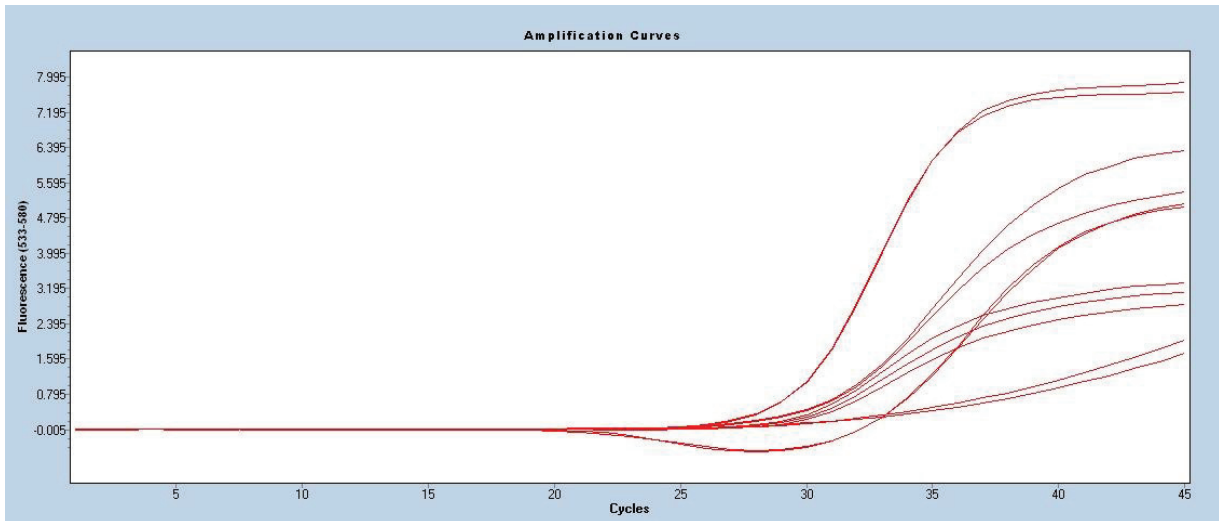


Abbildung 18: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, VIC-Kanal

Die Ergebnisse im ROX-Kanal (Nachweis der Walnuss) werden in Abbildung 19 gezeigt. Die beiden Walnussproben konnten ab dem 19. Zyklus detektiert werden. Es waren ebenfalls alle 0,4 ppm-Quantards positiv. Die C_p -Werte lagen bei 30.

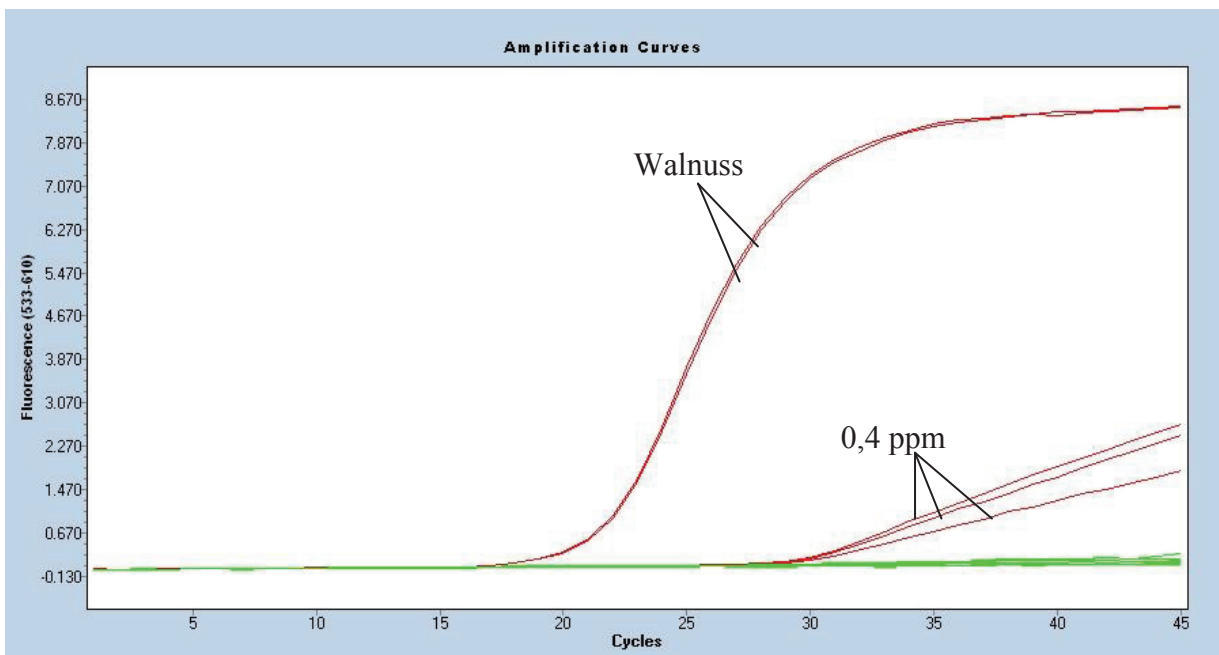


Abbildung 19: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, ROX-Kanal

Abbildung 20 zeigt die Amplifikationskurven im Cy5-Kanal (Nachweis der Haselnuss). Die C_p -Werte der Haselnussproben betragen etwa 20. In der Grafik ist deutlich zu erkennen, dass alle 0,4 ppm-Quantards etwa ab dem 31. Zyklus positiv detektiert wurden, jedoch wertete die Software des PCR-Gerätes eine Probe als negativ (grüne Amplifikationskurve).

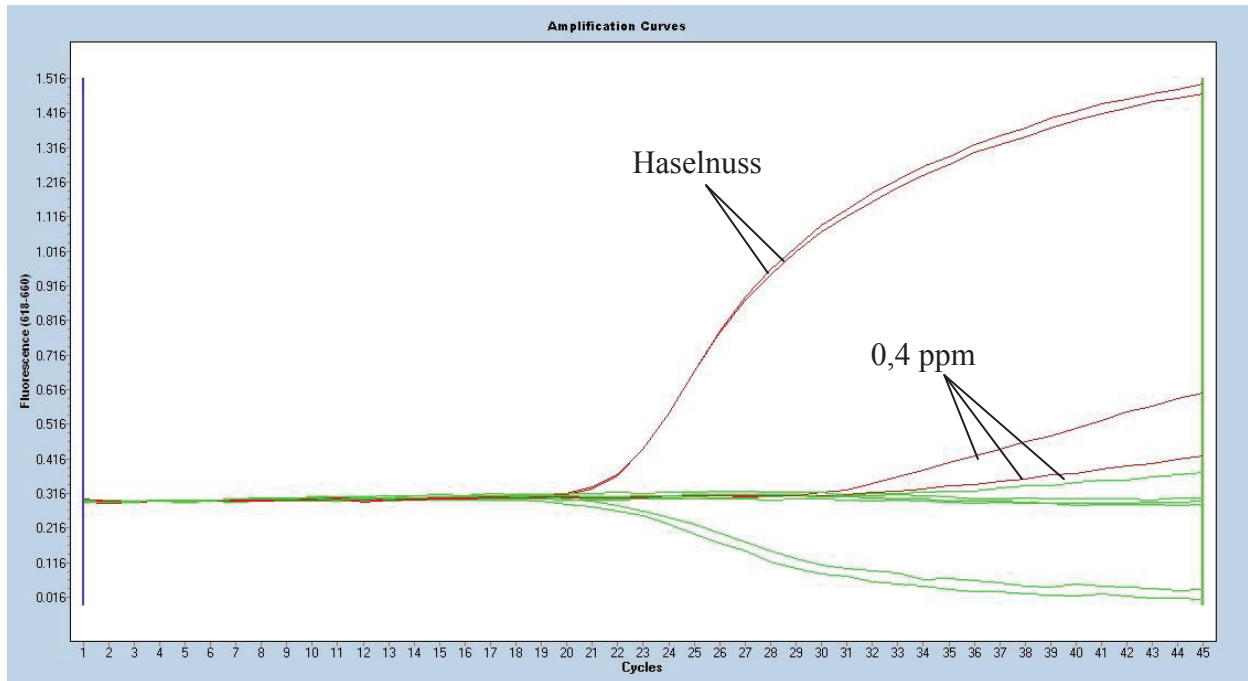


Abbildung 20: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, Cy5-Kanal

Der Versuch am LC 480 zeigte, dass die Fluoreszenzsignale im FAM-Kanal allgemein zu schwach waren. Außerdem war in diesem Detektionskanal ein starkes Grundrauschen zu erkennen. Um zu überprüfen, ob diese Beobachtungen bei anderen PCR-Geräten ebenfalls eintreten, wurde das Multiplexsystem auf zwei weiteren Thermocyclern der Firma Congen untersucht.

4.2.5 Untersuchung des Multiplexsystems auf weiteren PCR-Geräten

Das Multiplexsystem wurde auf dem ABI 7500 und dem Mx 3005p untersucht. Als Proben dienten einer der neu extrahierten 0,4 ppm-Quantards, der im vorherigen Versuch ebenfalls untersucht wurde und außerdem Haselnuss, Walnuss und Erdnuss (jeweils 1:100 verdünnt). In Abbildung 21 sind die Ergebnisse am Mx 3005p dargestellt.

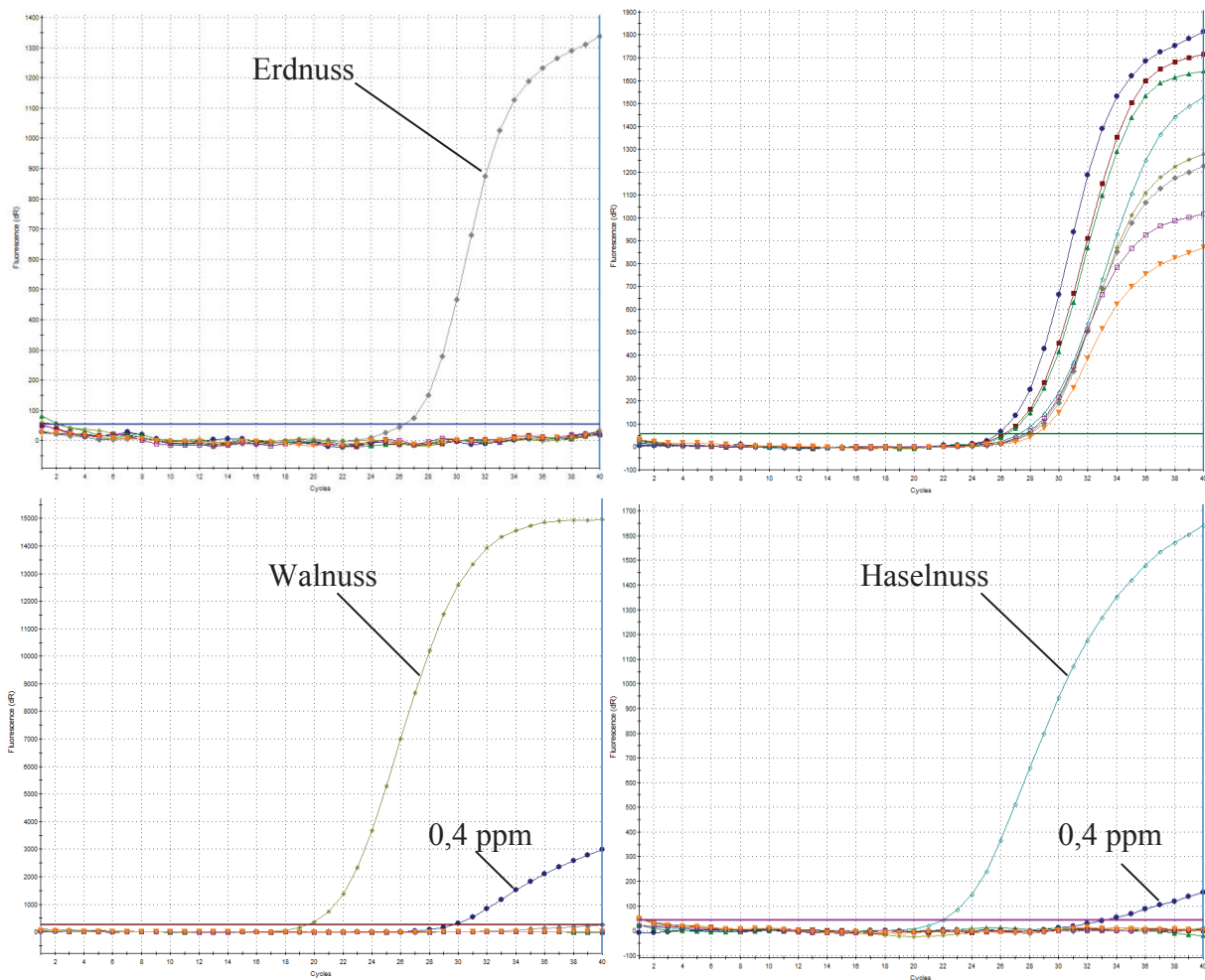


Abbildung 21: Ergebnisse zum Multiplexsystem auf dem Mx 3005p,
links oben: FAM-Kanal, recht oben: VIC-Kanal, links unten: ROX-Kanal, rechts unten: Cy5-Kanal

In der Abbildung links oben erkennt man, dass die Erdnussprobe ab dem 25. Zyklus amplifiziert wurde, aber der 0,4 ppm-Quantard war negativ. Die Abbildung daneben zeigt das Signal zum IAC-Target. Dieses wurde etwa ab dem 26. Zyklus amplifiziert. Die beiden unteren Grafiken zeigen die Ergebnisse des ROX- (links) und Cy5-Kanals (rechts). In beiden Kanälen wurden sowohl die positiven Proben Walnuss ab dem 20. Zyklus und Haselnuss ab dem 22. Zyklus als auch der 0,4 ppm-Quantard ab dem 30. Zyklus beziehungsweise 32. Zyklus detektiert.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse vom ABI 7500 dargestellt. Diese fielen ähnlich wie beim Mx 3005p aus.

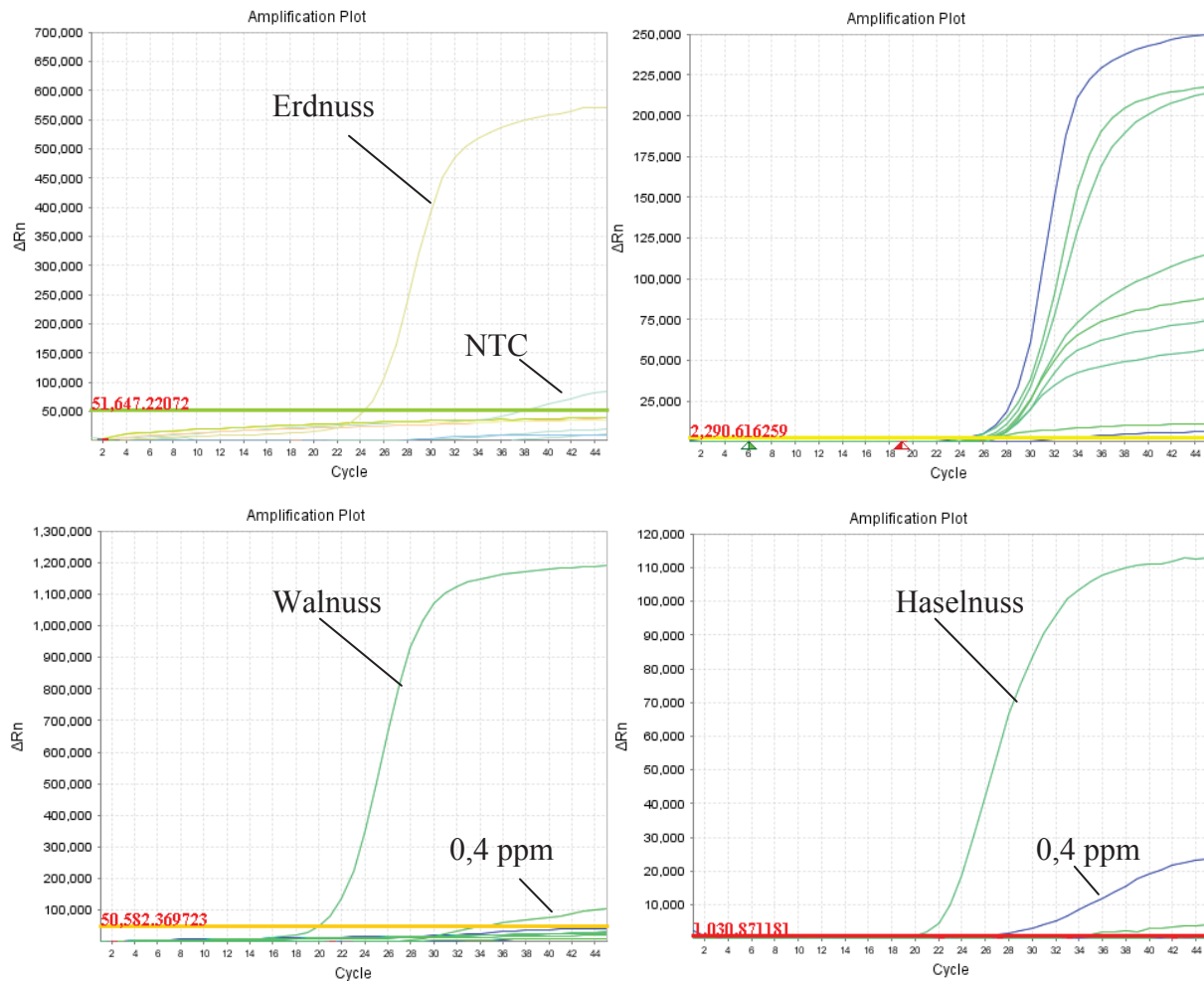


Abbildung 22: Ergebnisse zum Multiplexsystem auf dem ABI 7500

links oben: FAM-Kanal, recht oben: VIC-Kanal, links unten: ROX-Kanal, rechts unten: Cy5-Kanal

Die linke Abbildung oben zeigt die Ergebnisse im FAM-Kanal. Man erkennt, dass nur die Erdnussprobe detektiert wurde und nicht der 0,4 ppm-Quantard. Die NTC erschien ab dem 37. Zyklus. In der Abbildung oben rechts sieht man, dass die IAC ab dem 26. Zyklus positiv war. In den beiden anderen Detektionskanälen in den unteren Grafiken waren sowohl die Haselnuss als auch die Walnussprobe ab dem 20. Zyklus positiv. Der 0,4 ppm-Quantard wurde im ROX-Kanal ab dem 34. Zyklus und im Cy5-Kanal ab dem 28. Zyklus positiv detektiert

Die Versuche am ABI 7500 und Mx 3005p zeigten, dass die 0,4 ppm im FAM-Kanal nicht detektiert werden konnten. Aufgrund der schwachen Fluoreszenzsignale und des starken Grundrauschens im FAM-Kanal auf dem LC 480 im vorherigen Versuch (siehe Kapitel 4.2.4), wurde die FAM-Sonde zum Nachweis der Erdnuss noch einmal neu designt. Die anderen Sonden wur-

den bezüglich deren Sequenzen beibehalten. Alle drei Sonden wurden daraufhin bei einem anderen Hersteller (= Hersteller 2) bestellt.

4.2.6 Optimierung der Kopienzahl des IAC-Targets im Multiplexsystem

Bei dem vorherigen Versuch am Mx 3005p und ABI 7500 stellte sich heraus, dass der 0,4 ppm-Quantard im Erdnuss-System (FAM-Kanal) nicht detektiert wurde. Deswegen wurde mit diesem Experiment untersucht, ob die eingesetzte Kopienzahl des IAC-Targets einen Einfluss auf die geringere Sensitivität des PCR-Systems hat. Dazu wurden zwei Mastermixe mit 500 und 100 Kopien IAC-Target pro Reaktion hergestellt und im Multiplexsystem auf dem LC 480 untersucht. Als Proben wurden Erdnuss, Haselnuss und Walnuss in unterschiedlichen Verdünnungen (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) und die Quantards 0,4 und 4 ppm mitgeführt.

In den beiden nachfolgenden Abbildungen sind exemplarisch die Ergebnisse im FAM-Kanal (Nachweis der Erdnuss) dargestellt. In Abbildung 23 sieht man die Ergebnisse bei Zugabe von 500 Kopien IAC-Target pro Reaktion.

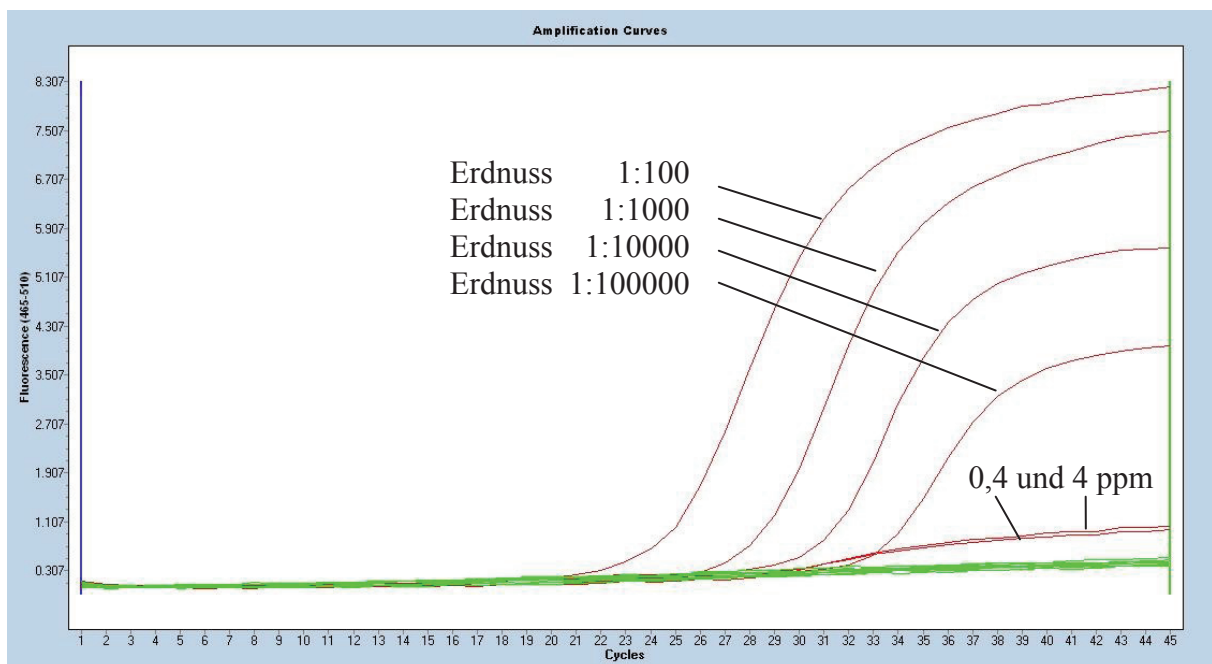


Abbildung 23: Ergebnisse zum Versuch mit 500 Kopien IAC-Target pro Reaktion, FAM-Kanal

Man kann erkennen, dass alle Erdnussproben amplifiziert wurden. Überraschenderweise wurden beide Quantards etwa ab dem 31. Zyklus amplifiziert, obwohl diese unterschiedliche Konzentrationen aufwiesen. Die Amplifikationskurven waren nahezu identisch. Der C_p -Wert lag zwischen

der 10^4 - und 10^5 -Verdünnung der Erdnussprobe. Die Fluoreszenzsignale lagen zwischen 3,5 und 8,3 bei Zugabe von 500 Kopien des Targets.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse bei Zugabe von 100 Kopien IAC-Target zum Mastermix dargestellt.

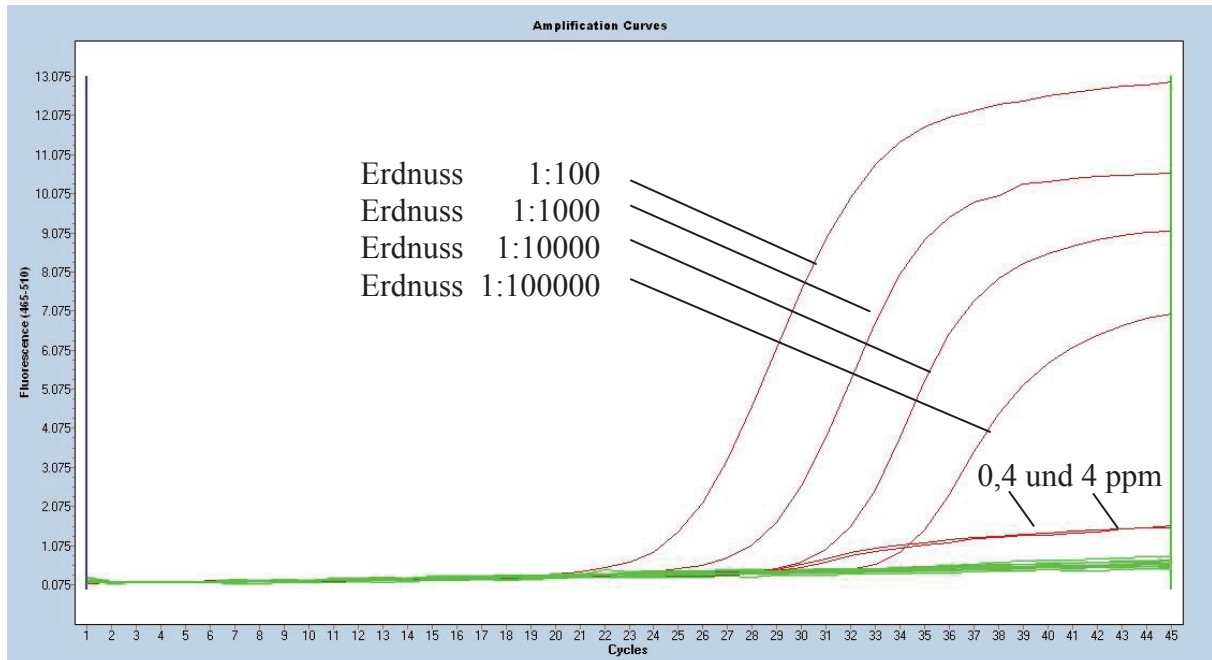


Abbildung 24: Ergebnisse zum Versuch mit 100 Kopien IAC-Target pro Reaktion, FAM-Kanal

Bei diesem Versuch hatten ebenfalls beide Quantards denselben C_p -Wert. Anders als in der oberen Abbildung wurden die Proben dieses Mal zwei Zyklen früher amplifiziert, und zwar ab dem 29. Zyklus. In der Grafik erkennt man, dass sich die Amplifikationskurven der Quantards mit der Amplifikationskurve zur 10^4 -Verdünnung der Erdnussprobe in einem Punkt schneiden. Die Signalwerte lagen zwischen 6,5 und 12,5 bei Zugabe von 100 Kopien IAC-Target.

Aus diesem Versuch resultierte, dass die Kopienzahl des IAC-Targets, die Sensitivität des Einzelsystems Erdnuss beeinflusst, denn die beiden Quantards wurden bei Zugabe von 100 Kopien IAC-Target pro Reaktion etwas früher detektiert als bei 500 Kopien pro Reaktion. Außerdem fielen die Fluoreszenzsignale fast doppelt so hoch aus wie bei Zugabe von 500 Kopien IAC-Target pro Reaktion. Deswegen wurden für die weiteren Versuche 100 Kopien IAC-Target pro Reaktion eingesetzt.

4.2.7 Test der neuen Sonden von Hersteller 2 im Multiplexsystem

Die drei beim Hersteller 2 in Auftrag gegebenen Sonden (FAM-Sonde: 3866-6289, ROX-Sonde: 3807-6267, Cy5-Sonde: 3806-6266) wurden im Multiplexsystem am LC 480 untersucht. Es sollte außerdem überprüft werden, ob die FAM-Sonde, die aufgrund schwacher Fluoreszenzsignale noch einmal neu designt wurde, bessere Ergebnisse liefert. Als Proben dienten die Quantards 0,4, 4 und 40 ppm, die Standards 1-5 der Erdnuss, sowie Haselnuss, Erdnuss und Walnuss (jeweils 1:100 verdünnt).

Die Ergebnisse vom FAM-Kanal (Nachweis der Erdnuss) sind in Abbildung 25 bis zum 35. Zyklus dargestellt.

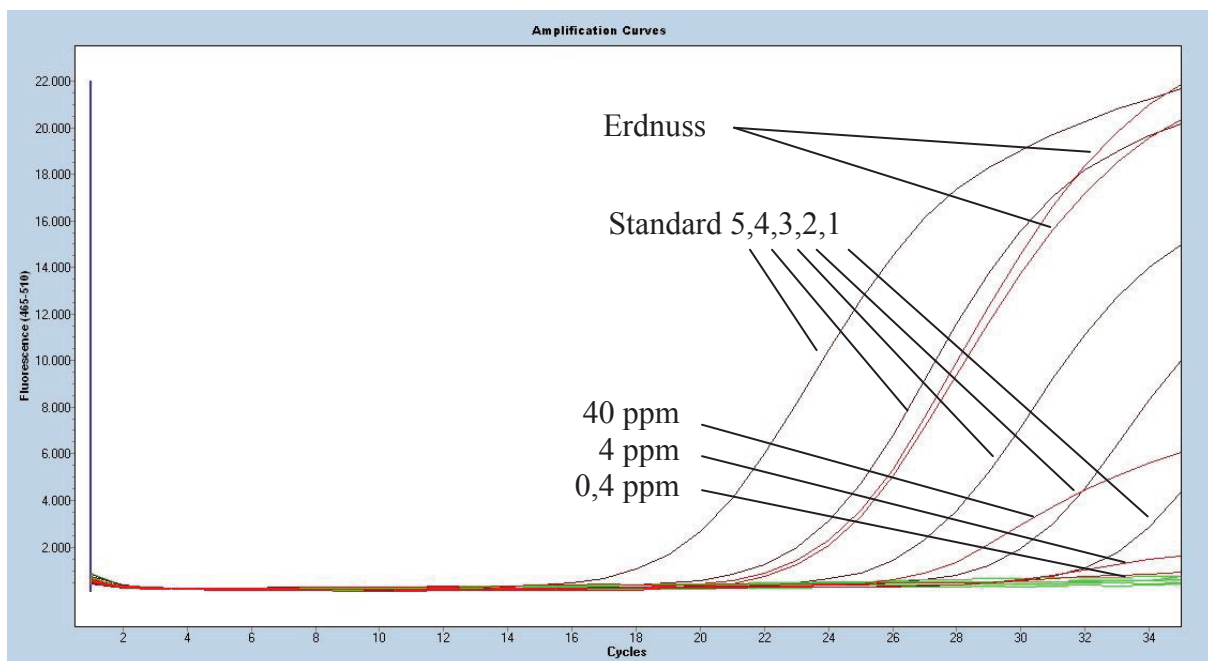


Abbildung 25: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, FAM-Kanal

Man sieht, dass die Erdnussproben ab dem 21. Zyklus detektiert wurden. Die Fluoreszenzsignale fielen dieses Mal deutlich höher aus. Vorher lagen die Signalwerte für die Erdnussprobe an demselben PCR-Gerät bei etwa 5,2 (siehe Kapitel 4.2.4). Nun lagen diese bei 20 beziehungsweise 22. Es wurden ebenfalls alle Quantards im 26. Zyklus (40 ppm), 29. Zyklus (4 ppm) und 32. Zyklus (0,4 ppm) im FAM-Kanal detektiert, wobei die Amplifikationskurve zum 0,4 ppm-Quantard knapp über dem Grundrauschen lag.

Im VIC-Kanal wurde das IAC-Target ab dem 30.Zyklus amplifiziert (siehe Abb.26). Die Fluoreszenzsignale lagen zwischen 3 und 10.

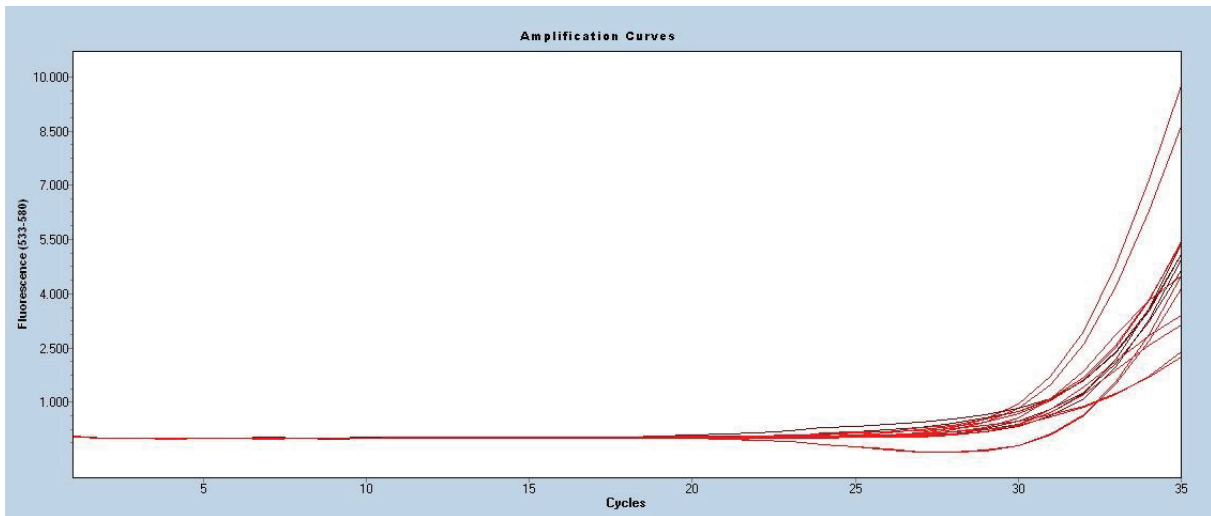


Abbildung 26: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, VIC-Kanal

Die Ergebnisse zum ROX-Kanal (Nachweis der Walnuss) sind in Abbildung 27 zu sehen.

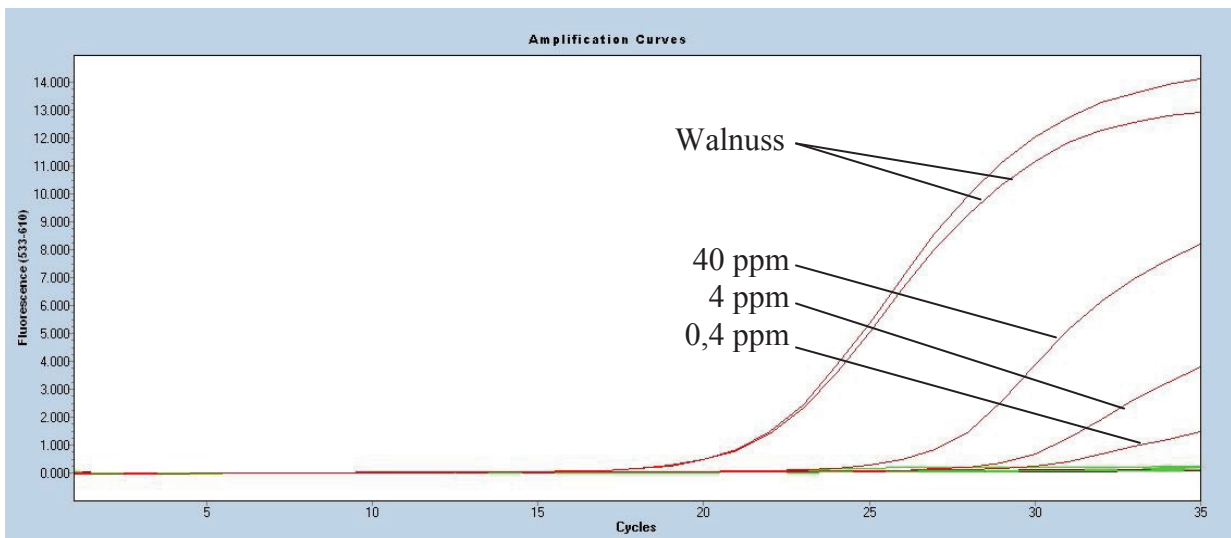


Abbildung 27: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, ROX-Kanal

Beide Walnussproben wurden ab dem 19.Zyklus amplifiziert. Des Weiteren wurden alle Quantards im 24.Zyklus (40 ppm), 27.Zyklus (4 ppm) und 30.Zyklus (0,4 ppm) positiv detektiert. Die Fluoreszenzsignale erstreckten sich zwischen 2 und 14.

Die Amplifikationskurven vom Cy5-Kanal sind in Abbildung 28 dargestellt.

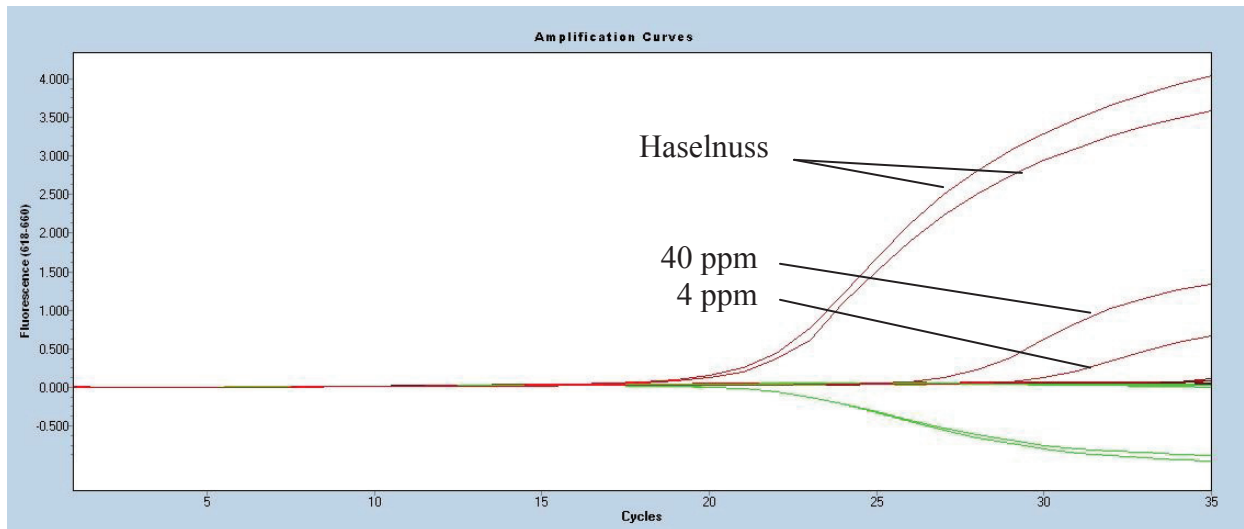


Abbildung 28: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, Cy5-Kanal

Die C_p -Werte der Haselnussproben betragen etwa 20. Die Quantards 40 und 4 ppm wurden ab Zyklus 26 beziehungsweise 29 amplifiziert. Die 0,4 ppm wurden nicht detektiert. Allgemein lagen die Fluoreszenzen zwischen 0,5 und 4. Das Multiplexsystem wurde nun soweit optimiert, dass es als Nächstes validiert werden konnte. Das endgültige Pipettierschema für die Herstellung des Mastermixes ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Optimiertes Pipettierschema zum Mastermix für die Multiplex-PCR inklusive IAC

Komponente	Identifikationsnummer	Volumen in μ l/Reaktion
PCR-Wasser	-	1,8
Sure Master	-	12,5
forward primer Erdnuss	2520-3739	0,5
reverse primer Erdnuss	2611-3882	0,5
FAM-Sonde Erdnuss	3866-6289	0,6
forward primer Walnuss	2500-4082	0,5
reverse primer Walnuss	2501-4083	0,5
ROX-Sonde Walnuss	3807-6267	0,6
forward primer Haselnuss	2495-4234	0,5
reverse primer Haselnuss	2496-3704	0,5
Cy5-Sonde Haselnuss	3806-6266	0,6
forward primer IAC	1713-4896	0,3
reverse primer IAC	1714-4897	0,3
VIC-Sonde IAC	2861-5383	0,2
Taq-Polymerase		0,1
Gesamtvolumen		20
IAC-Target		100 Kopien/Reaktion

Im Vergleich zu dem von der Firma Congen vorgeschlagenen Schema in Kapitel 3.1.6, wurden während der Versuchsphase die Konzentrationen der IAC-Primer und der IAC-Sonde, sowie die Kopienzahl des IAC-Targets optimiert. Außerdem wurde die FAM-Sonde neu designt.

4.3 Ergebnisse zur Validierung der Multiplex-PCR

4.3.1 Bestimmung der Spezifität

Der Spezifitätstest sollte zeigen, ob das Multiplexsystem Querempfindlichkeiten auf Proben, die nah verwandt mit Erdnuss, Haselnuss und Walnuss sind, aufweist. Die Versuche wurden am ABI 7500 und CFX durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden Erdnuss, Haselnuss und Walnuss (jeweils 1:100 verdünnt oder unverdünnt) mitgeführt.

Exemplarisch sollen nun die Ergebnisse für die Bestimmung der Spezifität des Multiplexsystems aus dem ersten Versuch am CFX dargestellt und erläutert werden. Die Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse zum Erdnuss-System im FAM-Kanal.

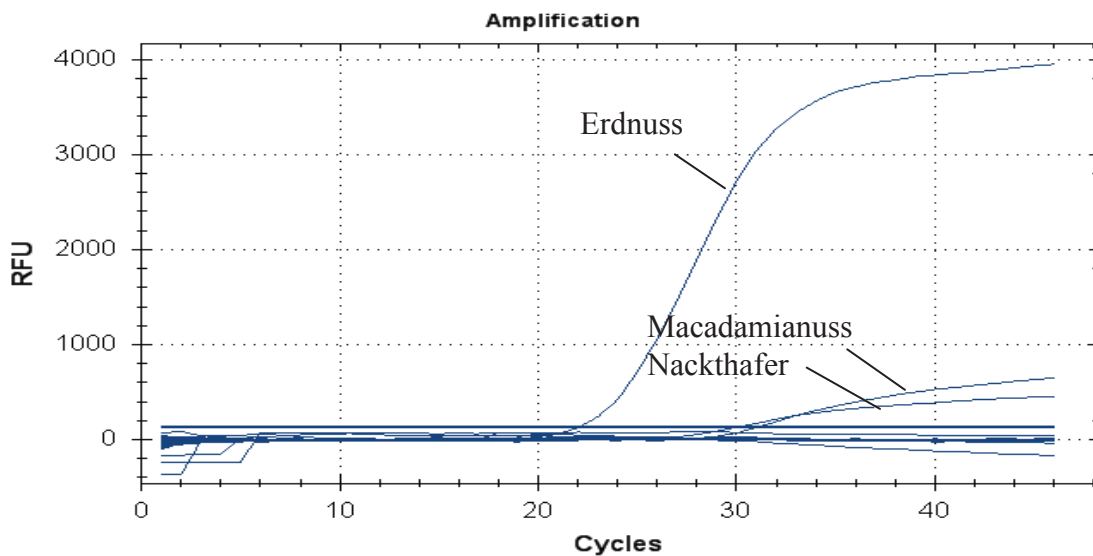


Abbildung 29: Spezifitätstest zum Multiplexsystem, FAM-Kanal

Man sieht, dass die Erdnussprobe ab dem 22. Zyklus amplifiziert wurde. Die Nackthafer- und die Macadamianussprobe wurden im Erdnuss-System ab dem 30. Zyklus positiv detektiert.

Die Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse zum Walnuss-System im ROX-Kanal.

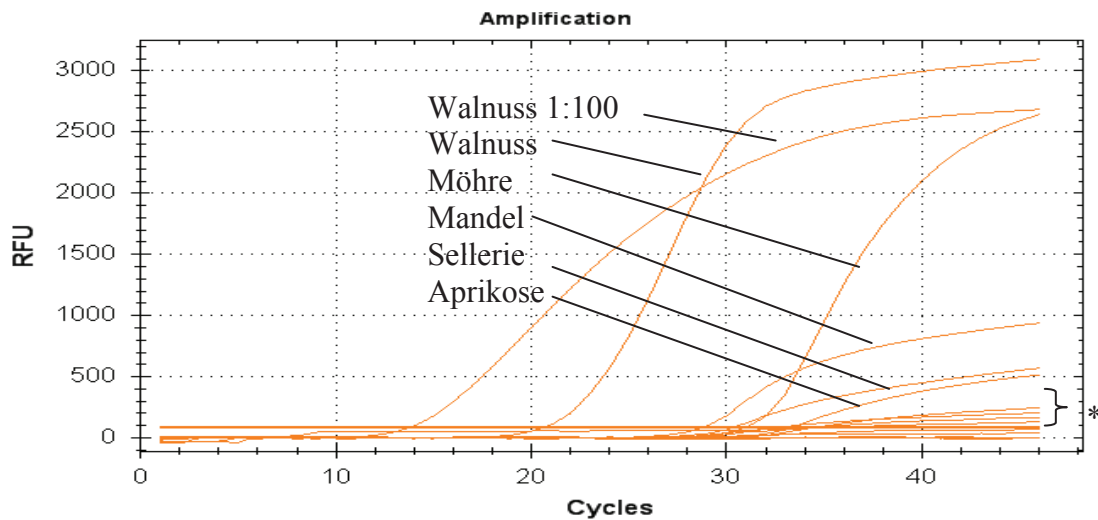


Abbildung 30: Spezifitätstest zum Multiplexsystem, ROX-Kanal
* weitere positive Proben: Soja, Rind, Geflügel, Pecannuss

Dort sieht man, dass ab dem 27. Zyklus einige Proben positiv detektiert wurden. Man erkennt in der Grafik, dass die Amplifikationskurven zu den Proben Sellerie, Aprikose, Mandel und Möhre hohe Anstiege aufwiesen. Somit waren sie stark positiv auf das PCR-System. Schwach positiv waren hingegen Soja, Rind, Geflügel und Pecannuss.

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse zum Haselnuss-System im Cy5-Kanal dargestellt

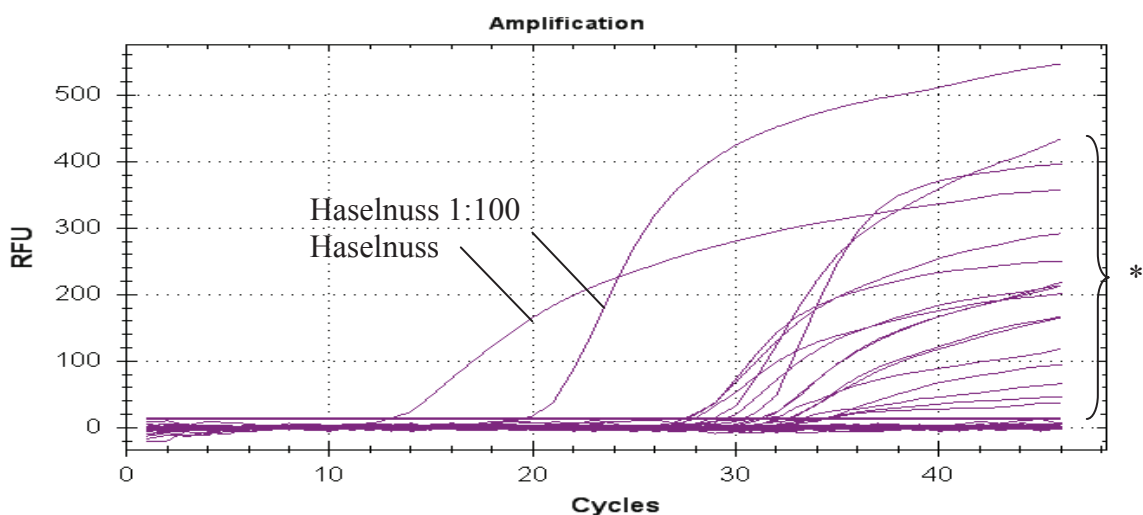


Abbildung 31: Spezifitätstest zum Multiplexsystem, Cy5-Kanal
* weitere positive Proben: Sonnenblume, Möhre, Soja, Rind, Pecannuss, Geflügel, Pistazie, Schwein, Weißklee, Aprikose, Nackthafer, Markerbse, Koriander, Cashewnuss, weiße Bohne

Man sieht, dass zahlreiche Proben positiv waren und ab dem 28.Zyklus detektiert wurden. Dazu zählen: Möhre, Sonnenblume, Soja, Rind, Pecannuss, Geflügel, Pistazie, Schwein, Weißklee, Aprikose, Nackthafer, Markerbse, Koriander, Cashewnuss und weiße Bohne.

Anhand dieses Versuches konnte noch nicht festgestellt werden, ob wirklich Querempfindlichkeiten auf das PCR-System bestanden oder eine Verunreinigung der Proben vorlag. Deshalb mussten weitere, zu den positiven Proben äquivalente DNA im Multiplexsystem untersucht werden. Eine komplette Übersicht zu den Ergebnissen befindet sich im Anhang 2. Mögliche Querempfindlichkeiten auf das Multiplexsystem konnten anhand der vorhandenen DNA-Sequenzen im Programm „Nucleotide Blast“ der amerikanischen Behörde NCBI theoretisch ausgeschlossen werden.

Als praktischer Beweis, dass die untersuchten Proben lediglich verunreinigt waren, wurde ein Versuch mit Aprikosen- und Sonnenblumenkernen durchgeführt. In Anhang 2 wird deutlich, dass mehrere Aprikosenproben im ROX-Kanal und Sonnenblumenkernproben im Cy5-Kanal positiv waren. Deshalb wurden die Kerne vorher mit Reinstwasser gewaschen und deren DNA mit Hilfe des „SureFood® PREP Allergen Kits“ extrahiert. Die Proben-DNA wurden anschließend im Multiplexsystem untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Standard 3 von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss verwendet. Die Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse des Versuches.

Tabelle 16: Spezifitätstest mit gewaschenen Sonnenblumen- und Aprikosenkernen im Multiplexsystem

		C _p -Werte		
Probennummer	Probenart	FAM	ROX	Cy5
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
RAD 3570	Aprikosenkerne	-	-	-
RAD 3571	Aprikosenkerne	-	-	-
RAD 3572	Aprikosenkerne	-	-	-
RAD 3573	Aprikosenkerne	-	-	-
RAD 3574	Sonnenblumenkerne	-	-	-
RAD 3575	Sonnenblumenkerne	-	-	-
AC 557, AC 529, AC 550 Standard 3	Standard 3 von Erdnuss, Walnuss, Haselnuss	24,68	25,20	27,07

Es ist zu erkennen, dass alle Sonnenblumen- und Aprikosen-Proben negativ waren. Somit konnte bewiesen werden, dass durch die Behandlung der Proben mit Reinstwasser vor der DNA-Extraktion Verunreinigungen beseitigt werden konnten, die bei der PCR zu einem positiven Ergebnis geführt hätten.

Im Zuge des Spezifitätstests wurden zwei weitere Pecannuss-DNA untersucht, denn beim Spezifitätstest zum PCR-Einzelsystemsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) konnte eine Querempfindlichkeit der Probe nicht ganz ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.1). Anhand der Tabelle 17 erkennt man, dass alle untersuchten Proben-DNA im Erdnuss-System, sowohl am ABI 7500 als auch am CFX, negativ waren.

Tabelle 17: Spezifitätstest der Pecannuss-DNA im Erdnuss-System

Probennummer	Probenart	PCR-Gerät	C _p -Werte
RAD 836	Pecannuss	ABI 7500	-
RAD 836	Pecannuss	CFX	-
RAD 3488	Pecannuss	CFX	-

4.3.2 Untersuchung auf Robustheit

Zur Untersuchung der Multiplex-PCR auf deren Robustheit wurden die Standards 1 (10 Kopien/μl), 2 (100 Kopien/μl) und 3 (1000 Kopien/μl) von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss im System bei einer Annealing-/Elongationstemperatur von 59°C, 60°C und 61°C untersucht. Die Versuche wurden am CFX durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Ergebnisse zur Bestimmung der Robustheit bei 59, 60 und 61°C

	C _p -Werte						PCR-System
	St.1	St.1	St.2	St.2	St.3	St.3	
T = 59°C	31,34	31,41	27,82	27,72	24,40	24,69	Erdnuss
T = 60°C	31,02	31,14	27,58	27,68	24,41	24,61	
T = 61°C	31,30	31,88	27,76	27,91	24,33	24,84	
Abweichung bei 59°C	0,32	0,27	0,24	0,04	- 0,01	0,08	
Abweichung bei 61°C	0,28	0,74	0,18	0,23	- 0,08	0,23	
T = 59°C	31,84	32,04	28,81	28,30	25,39	25,43	Walnuss
T = 60°C	32,18	32,51	29,12	28,66	25,19	25,20	
T = 61°C	31,98	32,06	28,58	28,61	25,26	25,44	
Abweichung bei 59°C	- 0,34	- 0,47	- 0,31	- 0,36	0,20	0,23	
Abweichung bei 61°C	- 0,20	- 0,45	- 0,54	- 0,05	0,07	0,24	
T = 59°C	34,13	33,83	30,75	31,01	28,01	28,11	Haselnuss
T = 60°C	33,56	34,34	31,15	30,95	27,85	27,72	
T = 61°C	33,13	33,93	31,19	31,18	28,17	28,13	
Abweichung bei 59°C	0,57	- 0,51	- 0,40	0,06	0,16	0,39	
Abweichung bei 61°C	- 0,43	- 0,41	0,04	0,23	0,32	0,41	

Man sieht, dass die durchschnittliche Abweichung zwischen 0,2 und 0,5 C_p -Werten lag. Die höchste Differenz betrug 0,74 im Erdnuss-System. Mit diesem Versuch wurde bewiesen, dass das Multiplexsystem robust gegenüber Temperaturschwankungen ist, da die Abweichung der C_p -Werte allgemein kleiner als 1 war.

4.3.3 Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweis- und Erfassungsgrenze wurden für jedes der drei PCR-Einzelsysteme, auf welches die Multiplex-PCR basiert, sieben Kalibriergeraden erstellt. Bei dem am CFX durchgeführten Versuch wurden die Quantards 0,4, 4, 40 und 400 ppm zweifach bestimmt. Die ermittelten C_p -Werte befinden sich im Anhang 3. Die mit der Software DINtest errechneten Nachweis- und Erfassungsgrenzen sind in der Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze für das Multiplexsystem

	PCR-System Erdnuss				PCR-System Walnuss				PCR-System Haselnuss			
	Nachweisgr.		Erfassungsgr.		Nachweisgr.		Erfassungsgr.		Nachweisgr.		Erfassungsgr.	
Nr.	log ppm	ppm	log ppm	ppm	log ppm	ppm	log ppm	ppm	log ppm	ppm	log ppm	ppm
1	0,055	0,1	0,111	0,1	0,168	0,1	0,335	0,2	0,527	0,3	1,053	1,1
2	0,750	0,6	1,500	3,2	0,243	0,2	0,485	0,3	0,527	0,3	1,054	1,1
3	0,280	0,2	0,561	0,4	0,182	0,2	0,364	0,2	0,614	0,4	1,228	1,7
4	0,114	0,1	0,228	0,2	0,261	0,2	0,522	0,3	0,402	0,3	0,805	0,6
5	1,499	3,2	2,998	99,5	0,067	0,1	0,135	0,1	0,507	0,3	1,013	1,0
6	0,174	0,1	0,347	0,2	0,184	0,2	0,368	0,2	0,638	0,4	1,275	1,9
7	1,337	2,2	2,674	47,2	0,083	0,1	0,167	0,1	0,691	0,5	1,383	2,4
\bar{x}		0,9		21,5		0,1		0,2		0,4		1,4
s		1,2		38,5		0,0		0,1		0,1		0,6

Das Einzelsystem Erdnuss besitzt eine Nachweisgrenze von 0,9 ppm. Die Erfassungsgrenze liegt bei 21,5 ppm. Die Nachweisgrenze des PCR-Systems Walnuss beträgt 0,1 ppm, die Erfassungsgrenze liegt bei 0,2 ppm. Die Nachweis- und Erfassungsgrenze für das PCR-System Haselnuss beträgt 0,4 ppm beziehungsweise 1,4 ppm.

An demselben PCR-Gerät wurden anschließend die ermittelten Nachweisgrenzen vom Walnuss- und Haselnussystem durch eine 4fach-Bestimmung des Quantards von 0,4 ppm überprüft. Das PCR-System Erdnuss wurde aufgrund der etwas höher liegenden Nachweisgrenze mit dem nächsthöheren Quantard von 4 ppm kontrolliert. In der Tabelle 20 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 20: C_p-Werte zur Überprüfung der Nachweisgrenze

Einzelssystem Erdnuss ^a	Einzelssystem Walnuss ^b	Einzelssystem Haselnuss ^b
28,62	32,16	31,73
29,11	31,94	31,33
28,89	32,30	32,44
29,25	31,77	32,07

a Überprüfung mit dem Quantard 4 ppm, b Überprüfung mit dem Quantard 0,4 ppm

Man sieht, dass bei allen drei Systemen die vier untersuchten Proben positiv waren. Die 4 ppm wurden ab dem 28. Zyklus im Erdnuss-System detektiert. Die 0,4 ppm wurden ab dem 31. Zyklus sowohl im Walnuss- als auch im Haselnuss-System nachgewiesen.

4.3.4 Bestimmung der Richtigkeit

Die Richtigkeit des Multiplexsystems wurde am CFX bestimmt. Zur Ermittlung des prozentualen Anteils falsch negativer Proben, wurde die negative DNA mit einer bestimmten Konzentration dotiert, welche im Bereich der Erfassungsgrenze des jeweiligen PCR-Systems liegen sollte und 20-fach bestimmt. Laut Kapitel 4.3.3 lag die Erfassungsgrenze für Walnuss bei 0,4 ppm. Deshalb wurde die Richtigkeit mit einer Dotierung von 1 ppm überprüft. Die Erfassungsgrenze für Haselnuss betrug 1,4 ppm. Demzufolge wurde die negative DNA mit 2 ppm dotiert. Da die nach DINtest errechnete Erfassungsgrenze für das Erdnuss-System 21,5 ppm betrug, wurde eine niedrigere Konzentration für die Dotierung gewählt. Als Orientierung galt die Aussage, dass die Erfassungsgrenze etwa dem Doppelten der Nachweisgrenze entspricht (siehe Kapitel 3.2.3). Da die Nachweisgrenze für das Erdnuss-System bei 0,9 ppm lag, wurde demzufolge die Richtigkeit ebenfalls mit 2 ppm überprüft. Als Positivkontrolle dienten zwei PTC. Die Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse zur Bestimmung falsch negativer Proben im Multiplexsystem.

Tabelle 21: Ergebnisse zur Bestimmung falsch negativ detektierter Proben im Multiplexsystem

Probe \ Parameter	Erdnuss ^a	Haselnuss ^a	Walnuss ^b
NTC	-	-	-
NTC	-	-	-
PTC	23,31	25,78	26,11
PTC	23,76	26,06	26,19
RAD 2798 dotiert	27,43	28,16	30,08
RAD 2798 dotiert	27,72	28,39	29,98
RAD 2798 dotiert	27,62	28,25	29,82
RAD 2798 dotiert	27,72	28,27	29,50
RAD 2798 dotiert	27,48	28,36	29,75
RAD 2798 dotiert	28,20	28,36	29,61

Probe \ Parameter	Erdnuss ^a	Haselnuss ^a	Walnuss ^b
RAD 2798 dotiert	28,11	28,00	29,54
RAD 2798 dotiert	27,81	27,86	29,80
RAD 2798 dotiert	27,76	28,74	29,85
RAD 2798 dotiert	30,32	29,07	30,02
RAD 2798 dotiert	27,83	29,55	30,73
RAD 2798 dotiert	27,47	28,29	29,84
RAD 2798 dotiert	27,58	28,38	30,02
RAD 2798 dotiert	27,68	28,42	29,61
RAD 2798 dotiert	27,43	28,49	30,01
RAD 2798 dotiert	29,08	28,29	29,85
RAD 2798 dotiert	27,56	28,47	29,87
RAD 2798 dotiert	27,44	28,57	29,94
RAD 2798 dotiert	28,07	28,24	29,61
RAD 2798 dotiert	-	29,40	29,71
falsch negative Proben	1	0	0
bekannte positive Proben	20	20	20
% falsch negative Proben	5	0	0

a Dotierung mit 2ppm, b Dotierung mit 1 ppm

Es ist zu sehen, dass bei dem Erdnuss-System ein falsch negatives Ergebnis auftrat. In den PCR-Systemen Walnuss und Haselnuss war keine der 20 Proben falsch negativ.

Zur Feststellung des prozentualen Anteils falsch positiver Proben, wurde die DNA von Maismehl (RAD 2798) 1:10 verdünnt und 20-fach bestimmt. Als positive Proben wurden der Standard 3 von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 ersichtlich.

Tabelle 22: Ergebnisse zur Bestimmung falsch positiv detektierter Proben im Multiplexsystem

Probe \ Parameter	Erdnuss	Haselnuss	Walnuss
NTC	-	-	-
NTC	-	-	-
AC 557 Standard 3	25,52	-	-
AC 529 Standard 3	-	-	27,72
AC 550 Standard 3	-	26,51	-
20 x RAD 2798 1:10	-	-	-
falsch positive	0	0	0
bekannte negative	20	20	20
% falsch positive Proben	0	0	0

Die Tabelle zeigt, dass die DNA in allen drei PCR-Einzelsystemen negativ war. Aus diesem Versuch resultiert, dass das Erdnuss-System mit einer statistischen Sicherheit von 95% und die beiden anderen Systeme mit einer statistischen Sicherheit von 100% richtig detektieren.

4.3.5 Untersuchung verschiedener Matrices im Multiplexsystem

Bei diesem Versuch, der am CFX durchgeführt wurde, sollte überprüft werden wie zuverlässig das Multiplexsystem in komplexen Lebensmittelmatrices detektieren kann. Dazu wurden sowohl positive als auch negative Proben im PCR-System untersucht. In der Tabelle 23 sind die Ergebnisse als Übersicht dargestellt.

Tabelle 23: Ergebnisse zur Untersuchung verschiedener Matrices im Multiplexsystem

Ergebnis (von Congen ermittelt)	Proben- nummer	Probenart	C _p -Werte		
			EN	WN	HN
positiv auf Haselnuss	D 82546	Nuss Nougat Creme	-	-	15,59
	D 83886	Mandeln, geröstet	-	-	27,71
	D 85075	Schokoladencreme mit 0,1% Haselnuss	-	-	21,68
	D 80581	Schokoladencreme mit 0,4% Haselnuss	-	-	20,06
	D 90469	Mandelnougat	-	-	16,69
	N 235	Abstrich vom Fußboden	-	-	28,65
positiv auf Walnuss	D 83270	Eiscremé Malagá	-	32,28	-
	RAD 2319	Cerealien	-	23,79	-
	D 83888	Tupfer	-	29,32	-
positiv auf Erdnuss	RAD 1972	Weißer Schokolade dotiert mit Erdnuss 20 ppm	30,23	-	-
	RAD 515	Keks dotiert mit 20 ppm Erdnuss	30,52	-	-
	RAD 1552	Getreide dotiert mit 10 ppm Erdnuss	32,16	-	-
	RAD 1575	Eiscreme Erdnuss	31,52	-	-
positiv auf HN, WN, EN	RAD 3007	Reiskeks dotiert mit 40 ppm Allergenen*	27,95	28,44	28,74
	RAD 1022	Spargelcremesuppe dotiert mit 40 ppm Allergenen*	28,87	26,35	28,34
negativ auf HN, WN, EN	D 82820	Tupfer Abfüllraum, Trichter	-	-	-
	D 83012	Mousse au Chocolat	-	-	-
	D 83921	Kakaobutter	-	-	-
	D 89235	Erdnuss Aroma	-	-	-
positiv auf Erdnuss	D 92354	Ringversuch 2012, Probe A: Schokolade	27,64	-	-
negativ	D 92356	Ringversuch 2012, Probe B: Schokolade	-	-	-
negativ	D 91907	Ringversuch 2012, Probe A: Backware	-	-	-
positiv auf Haselnuss	D 91909	Ringversuch 2012, Probe B: Backware	-	-	29,87

*dotiert mit in der EU deklarationspflichtigen Allergenen, u.a. Haselnuss, Walnuss, Erdnuss

Es zeigt, dass sich die von der Firma Congen ermittelten Ergebnisse zu den einzelnen Proben mit denen des Multiplexsystems decken. Bei unterschiedlichen Mengengehalten in Proben, wie es beispielsweise bei der Schokoladencreme der Fall ist, detektierte das PCR-System die Probe mit dem höheren Haselnuss-Anteil von 0,4% früher (C_p=20,06) als die mit 0,1% Haselnuss-Anteil (C_p=21,68). Weiterhin wurden beide Proben, Reiskeks und Spargelcremesuppe, mit gleichen Mengen (40 ppm) an Haselnuss, Walnuss und Erdnuss dotiert. Die Tabelle zeigt, dass die C_p-Werte in allen drei Systemen bei etwa 28 lagen. Die Probe Spargelcremesuppe wurde lediglich im Walnuss-System ab dem 26.Zyklus und somit früher detektiert.

4.3.6 Überprüfung des Multiplexkits auf verschiedenen PCR-Geräten

Das Multiplexkit wurde an folgenden multiplexfähigen PCR-Geräten der Firma Congen untersucht: Mx 3005p, CFX, ABI 7500 und LC 480. Als Proben dienen: vier NTC, die Quantards 0,4 ppm (in Vierfachbestimmung), 4 ppm, 40 ppm und 400 ppm (jeweils in Zweifachbestimmung), die Standards 0-5 von Erdnuss, Walnuss und Haselnuss, der Quantard 40 ppm mit der RAD 3381 (in Zweifachbestimmung) und Haselnuss, Erdnuss und Walnuss (jeweils 1:100 verdünnt).

Von jedem Parameter, auf welchem das Multiplexsystem basiert, wurde eine Standardkurve erstellt. Als Qualitätsparameter gelten der Slope, der zwischen -3,2 und -3,6 liegen und der Korrelationskoeffizient der größer als 0,98 sein sollte. Die C_p -Werte, sowie die daraus erstellten Standardkurven zu den Parametern sind im Anhang 4 zu finden.

In Abbildung 32 sind exemplarisch die Ergebnisse vom Versuch am ABI 7500 dargestellt.

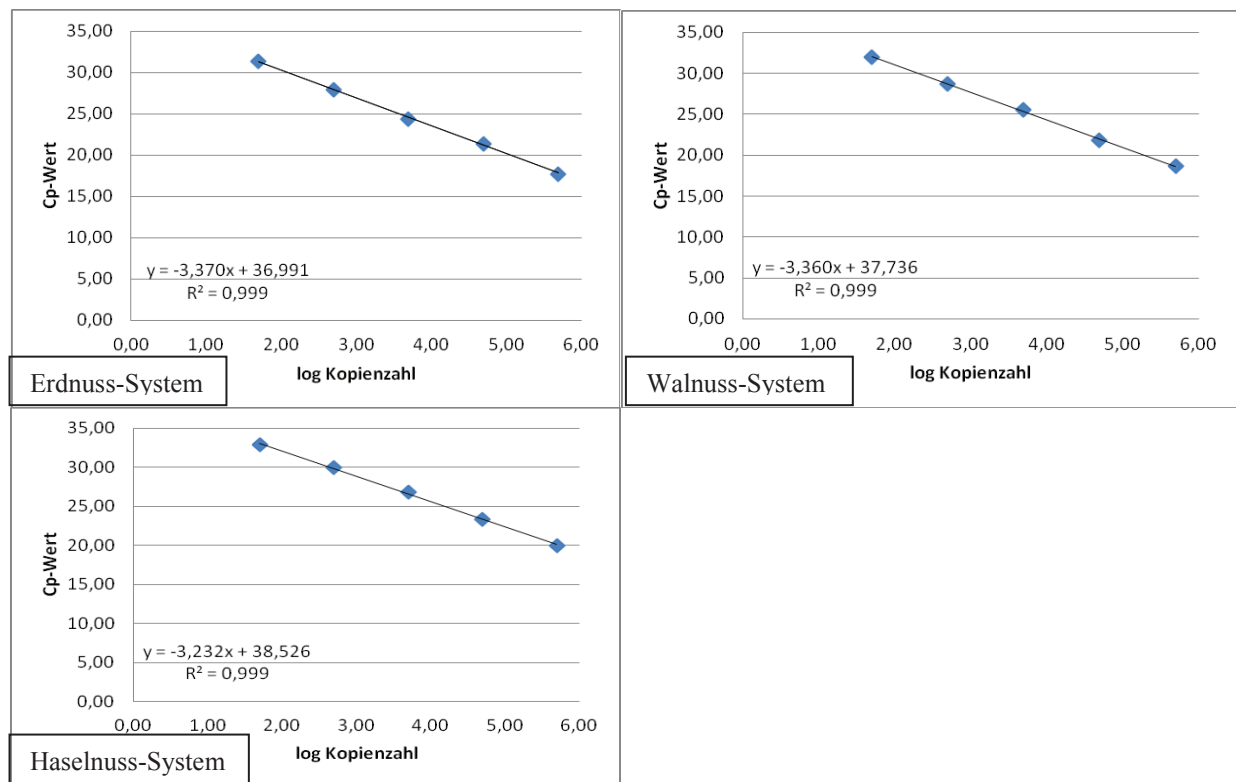


Abbildung 32: Standardkurven zur Überprüfung des Multiplexkits am ABI 7500

Der Korrelationskoeffizient lag bei allen drei Parametern bei 0,999. In Bezug auf den Slope wiesen das Erdnuss- und das Walnuss-System fast identische Werte auf. Das Ergebnis für das Haselnuss-System war mit -3,232 etwas niedriger. Diese Ergebnisse, sowie die Resultate an den anderen multiplexfähigen PCR-Geräten, sind in der Tabelle 24 noch einmal als Übersicht dargestellt.

Tabelle 24: Übersicht zu den Ergebnissen der Kitüberprüfung am ABI 7500, CFX, LC 480 und Mx 3005p

PCR-Gerät	ABI 7500	CFX	LC 480	Mx 3005p
Parameter				
Erdnuss	$r^2 = 0,999$ Slope = -3,369	$r^2 = 0,970$ Slope = -3,118	$r^2 = 0,999$ Slope = -3,167	nicht erstellbar
Walnuss	$r^2 = 0,999$ Slope = -3,360	$r^2 = 0,998$ Slope = -3,464	$r^2 = 0,999$ Slope = -3,460	$r^2 = 0,998$ Slope = -3,358
Haselnuss	$r^2 = 0,999$ Slope = -3,232	$r^2 = 0,996$ Slope = -3,049	$r^2 = 0,999$ Slope = -3,347	$r^2 = 0,999$ Slope = -3,295

Es wird deutlich, dass die Kitüberprüfung am CFX etwas schlechtere Ergebnisse lieferte als an den anderen Geräten. Beispielsweise betrug der Korrelationskoeffizient für das Erdnuss-System nur 0,970. Die Slopes vom Erdnuss- und Haselnuss-System waren mit -3,118 beziehungsweise -3,049 ebenfalls niedrig. Der Versuch zur Überprüfung des Multiplexkits wurde am CFX noch einmal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

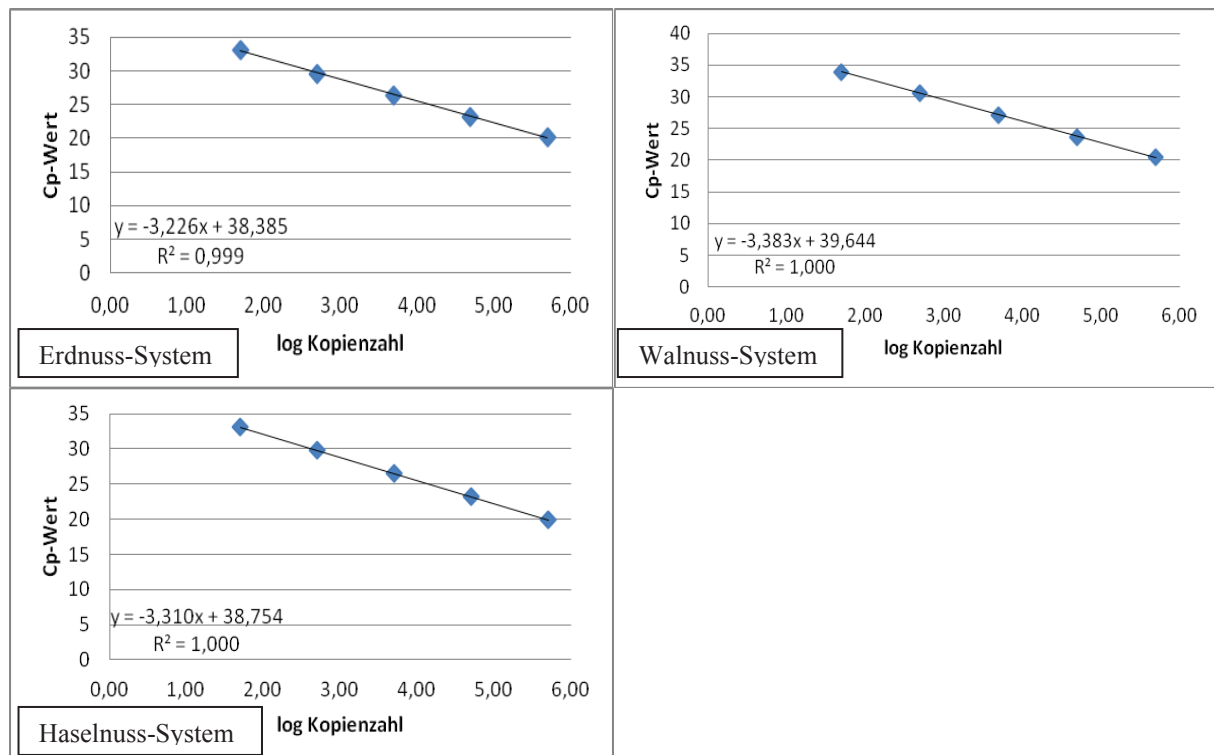


Abbildung 33: Wiederholung der Überprüfung des Multiplexkits am CFX

In der Grafik oben links sieht man, dass für das Erdnuss-System $r^2 = 0,999$ war. Der Slope, der vorher bei -3,118 lag, betrug nun -3,226. Die Standardkurve zum Haselnuss-System war ebenfalls besser. Der Slope lag bei -3,310.

Anhand der Übersicht zu den Ergebnissen der Kitüberprüfung in Tabelle 24 erkennt man ebenfalls, dass am Mx 3005p keine Standardkurve für das Erdnuss-System erstellt werden konnte. Die ermittelten C_p -Werte für diesen Versuch sind in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25: Ergebnisse zur Überprüfung des Multiplexkits am Mx 3005p, FAM-Kanal

Probennummer	Probenart	C_p -Werte
-	NTC	-
-	NTC	-
-	NTC	-
-	NTC	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,31
RAD 3578	Quantard 4 ppm	-
RAD 3578	Quantard 4 ppm	-
RAD 3563	Quantard 40 ppm	33,82
RAD 3563	Quantard 40 ppm	28,51
RAD 3381	Quantard 40 ppm	34,00
RAD 3381	Quantard 40 ppm	27,75
RAD 3560	Quantard 400 ppm	26,67
RAD 3560	Quantard 400 ppm	24,63
RAD 3152	Erdnuss 1:100	28,23
AC 557 Standard 0	Standard 0 Erdnuss	-
AC 557 Standard 1	Standard 1 Erdnuss	-
AC 557 Standard 2	Standard 2 Erdnuss	33,38
AC 557 Standard 3	Standard 3 Erdnuss	27,27
AC 557 Standard 4	Standard 4 Erdnuss	21,81
AC 557 Standard 5	Standard 5 Erdnuss	18,18

Man kann erkennen, dass die C_p -Unterschiede zwischen den Standards ungleichmäßig waren und nicht etwa drei Zyklen betragen. Insbesondere die Differenzen zwischen Standard 4 und 3 beziehungsweise 3 und 2 waren mit sechs C_p -Werten sehr groß. Außerdem wurden Standard 0 und 1 gar nicht detektiert. Bezüglich der Quantards wurde 4 ppm gar nicht und 0,4 ppm nur einmal detektiert.

Der Versuch wurde noch einmal mit einer neu verdünnten Standardreihe der Erdnuss wiederholt. Die C_p -Werte sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26: Wiederholung zur Überprüfung des Multiplexkits am Mx 3005p, FAM-Kanal

Probennummer	Probenart	C_p -Werte
-	NTC	-
-	NTC	-
-	NTC	-
-	NTC	-
RAD 3576	0,4 ppm	-
RAD 3576	0,4 ppm	-
RAD 3576	0,4 ppm	-
RAD 3576	0,4 ppm	-
RAD 3578	4 ppm	31,79
RAD 3578	4 ppm	-
RAD 3563	40 ppm	-
RAD 3563	40 ppm	34,10
RAD 3381	40 ppm	33,23
RAD 3381	40 ppm	-
RAD 3560	400 ppm	29,55
RAD 3560	400 ppm	27,38
RAD 3152	Erdnuss 1:100	28,33
AC 557 St.0	Standard 0 Erdnuss	-
AC 557 St.1	Standard 1 Erdnuss	34,99
AC 557 St.2	Standard 2 Erdnuss	-
AC 557 St.3	Standard 3 Erdnuss	31,82
AC 557 St.4	Standard 4 Erdnuss	22,20
AC 557 St.5	Standard 5 Erdnuss	21,00

Diese zeigt, dass alle vier 0,4 ppm-Quantards negativ waren. Nur einer der zwei 4 ppm-Quantards wurde detektiert. Die Quantards mit den Konzentrationen 40 ppm und 400 ppm hatten sehr hohe C_p -Werte. Das heißt, dass die 400 ppm im vorherigen Versuch ab dem 25.Zyklus und die 40 ppm ab dem 28.Zyklus detektiert wurden. Bei diesem Versuch wurden sie ab dem 27.(400 ppm) beziehungsweise ab dem 33.Zyklus (40 ppm) nachgewiesen. Außerdem wurden von den 40 ppm-Quantards nur zwei von vier Proben amplifiziert. Der C_p -Wert der Erdnussprobe war ebenfalls hoch. In den vorherigen Versuchen lag dieser statt bei 28 bei etwa 20. Die Standardreihe weist ebenfalls keine C_p -Unterschiede von etwa drei Zyklen auf. Standard 0 und 2 waren bei diesem Versuch negativ.

Um zu überprüfen, ob nur der Mx 3005p der Firma Congen diese Probleme aufweist, wurde ein Versuch am PCR-Gerät des gleichen Typs bei der Firma r-biopharm durchgeführt. Als Proben dienten die Standards 1-5 der Erdnuss, zwei PTC, zwei NTC und die Quantards 0,4, 4, 40 und

400 ppm, die jeweils doppelt bestimmt wurden. Das Temperaturprogramm wurde leicht abgeändert. Die Denaturierungsphase wurde bei 95°C für nur 1 Minute durchgeführt. Die Temperaturen und die Zeiten für die weiteren Schritte wurden beibehalten. In Abbildung 34 sind die Amplifikationskurven im FAM-Kanal (Nachweis der Erdnuss) dargestellt.

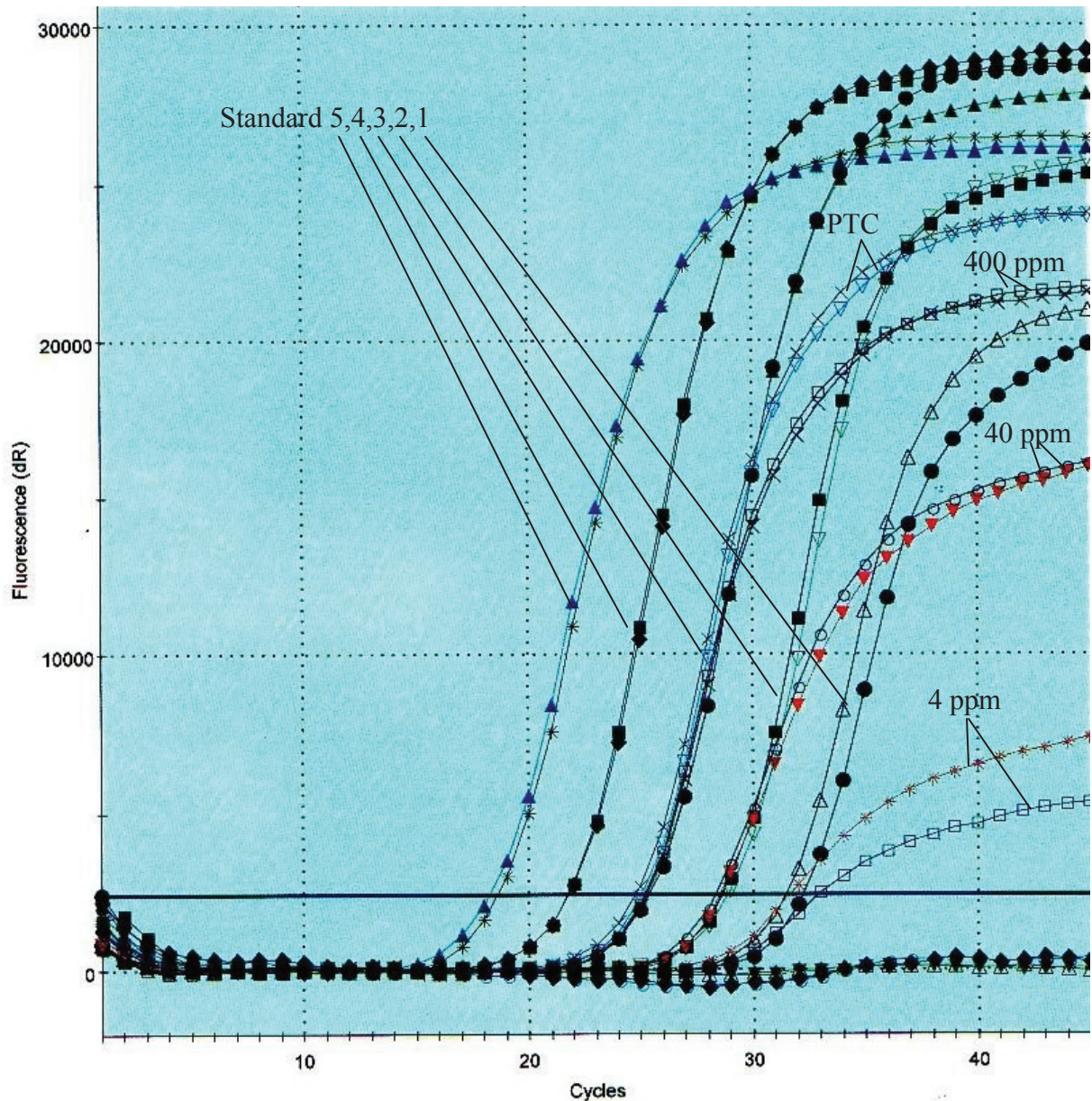


Abbildung 34: Versuch zum Multiplexsystem am Mx 3005p der Firma r-biopharm (FAM-Kanal)

Man sieht, dass die C_p -Werte der Standards etwa gleiche Abstände von etwa drei Zyklen aufweisen. Weiterhin wurden alle Quantards außer die 0,4 ppm detektiert. Die zu dem PCR-System erstellte Standardkurve zum Erdnuss-System hatte einen Slope von -3,385 und einen Korrelationskoeffizienten von 0,998.

Als Nächstes wurde das Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) untersucht, denn kommt es dort ebenfalls zu dem Ergebnis, dass keine Standardkurve erstellt werden kann, dann ist das PCR-System fehlerhaft und sollte noch einmal neu überdacht werden. Da die Standardkurve zum Erdnuss-System am CFX zufriedenstellend war (siehe Tabelle 24), wurde der Versuch sowohl an diesem Gerät als auch am Mx 3005p durchgeführt. Als Proben dienten zwei NTC, die RAD 1195 (enthält 1% Erdnuss) und die Standards 1-5 der Erdnuss.

Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse im FAM-Kanal sowohl am CFX (links) als auch am Mx 3005p (rechts).

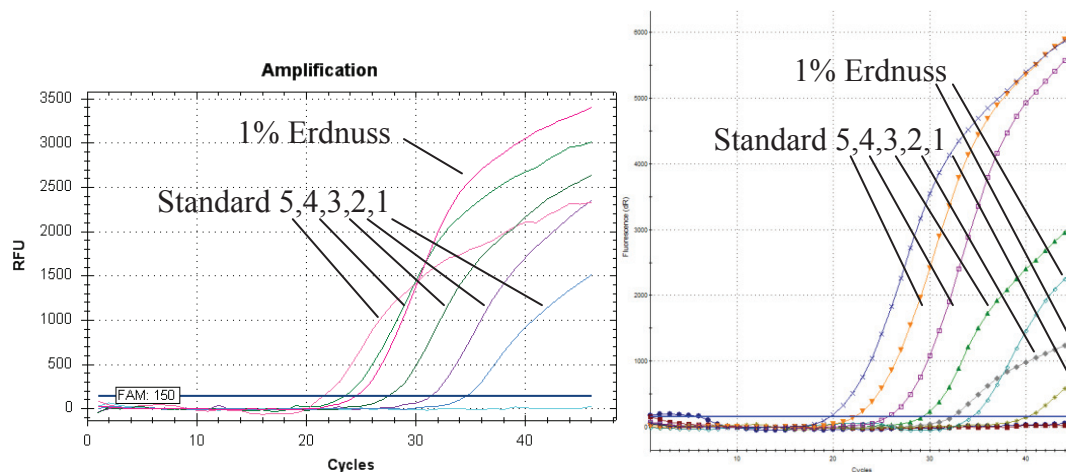


Abbildung 35: Ergebnisse zum Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) auf dem CFX (links) und auf dem Mx 3005p (rechts)

Die entstandenen Amplifikationskurven am CFX hatten einen s-förmigen Verlauf und die C_p -Werte wiesen gleichmäßige Abstände von drei Zyklen auf. Die Amplifikationskurven am Mx 3005 p hatten ebenfalls einen s-förmigen Verlauf, aber die Abstände zwischen den einzelnen Kurven waren ungleichmäßig. Insbesondere zwischen den Amplifikationskurven vom Standard 2 und 1 gab es einen großen Sprung.

Die Proben aus den PCR-Läufen wurden anschließend einer Agarosegelelektrophorese unterzogen um zu überprüfen, ob die FAM-Sonde fehlerhaft ist oder ob es innerhalb des PCR-Systems zu Primer-Wechselwirkungen kommt. Die beiden Gelbilder sind in Abbildung 36 zu sehen.

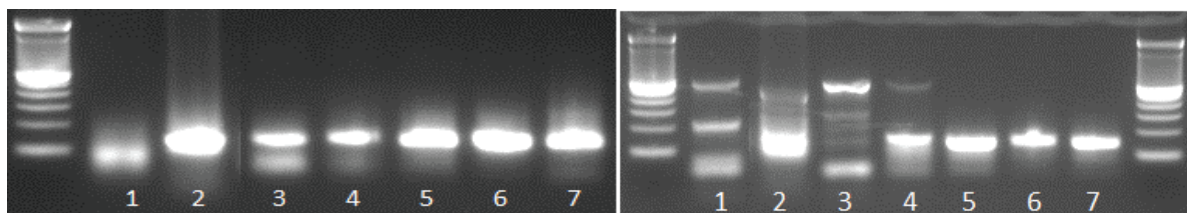


Abbildung 36: Gelelektrophorese zum Erdnussystem (Primer-Nr.2520+2611) auf dem CFX (links) und auf dem Mx 3005p (rechts), DNA-Marker: 100 bp
1: NTC, 2: RAD 1195 (1% Erdnuss), 3-7: Standardreihe Erdnuss von 1-5

In der linken Grafik ist das Gelbild mit den aufgetragenen Proben vom CFX zu sehen. Man erkennt, dass bei allen Proben das PCR-Produkt der Erdnuss von 145 bp entstanden ist. Lediglich beim Standard 1 (siehe Abbildung 36, Nr.3) haben sich Primerdimere gebildet.

Die Abbildung rechts zeigt das Gelbild vom Mx 3005p. Man sieht, dass beim Standard 1 (Nr.3) nicht das spezifische Erdnuss-Produkt gebildet wurde, sondern zwei andere PCR-Produkte. Die Produkte entsprachen einer Fragmentlänge von 80 bp und 500 bp. Außerdem waren bei der NTC (Nr.1) insgesamt drei PCR-Produkte entstanden, welche Fragmentlängen von 80 bp, 200bp und 500 bp aufwiesen.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Positionierung der Proben auf der PCR-Platte Einfluss auf die PCR hat. Dazu wurden die Standards 1-5 der Erdnuss in drei unterschiedlichen Reihen auf der Platte pipettiert und die entstandenen Amplifikationskurven miteinander verglichen. Exemplarisch sind in Abbildung 37 und Abbildung 38 die Ergebnisse aus Reihe C und D auf der PCR-Platte dargestellt.

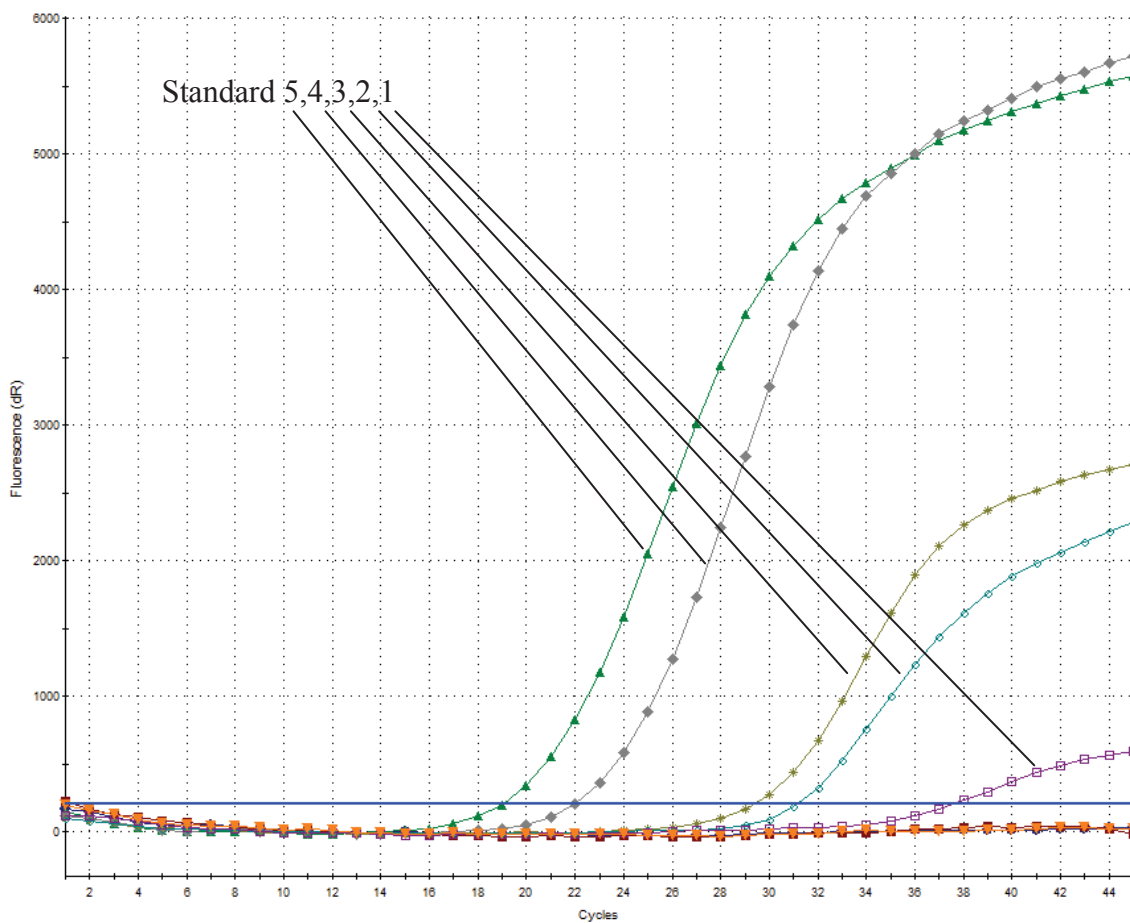


Abbildung 37: Ergebnisse zur Standardreihe der Erdnuss in Reihe C der PCR-Platte pipettiert

In der Abbildung 37 zeigen sich große Sprünge zwischen Standard 4 und 3 (Unterschied von sieben C_p -Werten) und zwischen Standard 2 und 1 (Unterschied von sieben C_p -Werten).

In der Abbildung 38 kann man sehen, dass die Amplifikationskurven der Standards 5 und 4 den gleichen C_p -Werte von 22 besaßen. Die Standards 2 und 1 hatten ebenfalls fast den gleichen C_p -Wert. Standard 2 wurde ab dem 33. Und Standard 1 ab dem 34. Zyklus detektiert.

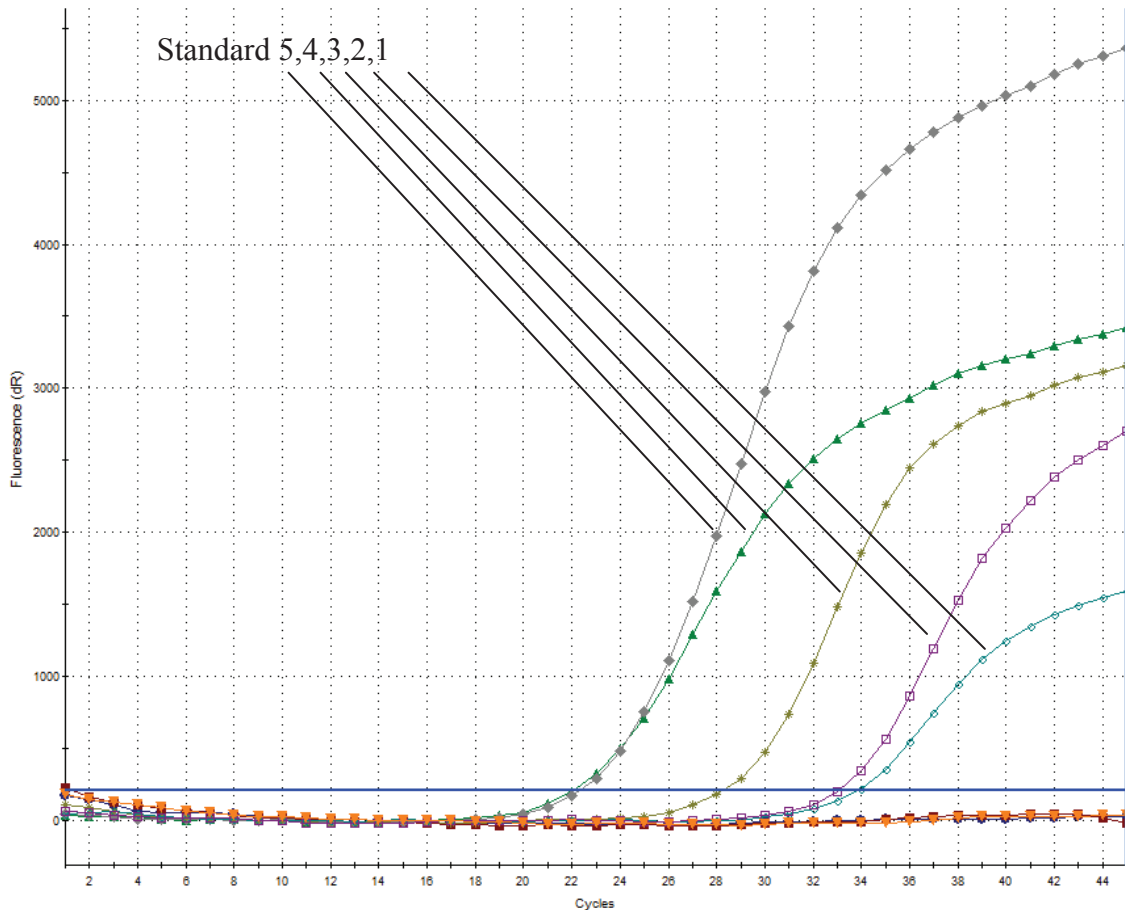


Abbildung 38: Ergebnisse zur Standardreihe der Erdnuss in Reihe D der PCR-Platte pipettiert

Zu diesem Versuch ist zu sagen, dass beide PCR-Ergebnisse völlig unterschiedlich ausfielen. Die C_p -Unterschiede zwischen den einzelnen Standards lagen nicht konstant bei etwa drei Zyklen. Demzufolge wiesen auch die erstellten Standardkurven keinen guten Slope von -3,3 auf.

Durch ein weiteres Experiment wurde das Multiplexsystem in verschiedenen PCR-Reaktionsgefäßen auf dem Mx 3005p untersucht. Diese waren:

- Tubes (8er Streifen) von nerbe plus
- elastische, randlose PCR-Platte von 4titude (wurde bisher für die Versuche verwendet)
- stabile PCR-Platte mit Rand von 4titude

Als Proben dienten die Standards 0-5 der Erdnuss. In den drei nachfolgenden Abbildungen sind die Ergebnisse aus dem FAM-Kanal (Nachweis der Erdnuss) dargestellt.

In Abbildung 39 sind die Amplifikationskurven zur Durchführung der PCR in Tubes zu finden.

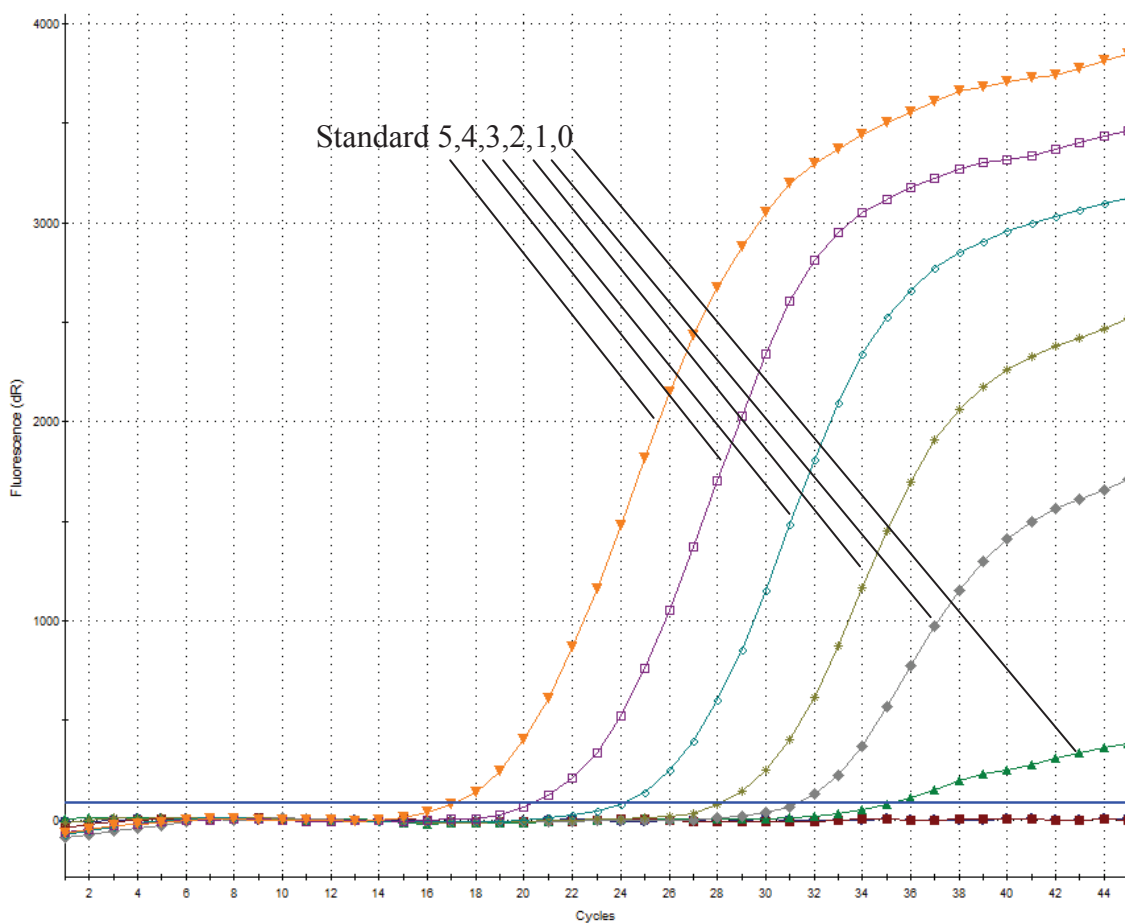


Abbildung 39: Standardreihe der Erdnuss im Multiplexsystem in Tubes

Die Grafik zeigt, dass alle Standards amplifiziert wurden. Die Standards 5-0 wurden in folgender Reihenfolge detektiert: 15., 18., 21., 25., 28., 31. Zyklus. Demzufolge lagen die Differenzen fast immer bei drei Zyklen. Die Amplifikationskurven hatten außerdem einen s-förmigen Verlauf. Lediglich die Kurve zum Standard 0 hatte nur einen schwachen Anstieg.

Die Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse zum Versuch mit der PCR-Platte, die für alle bisherigen Versuche am Mx 3005p verwendet wurde.

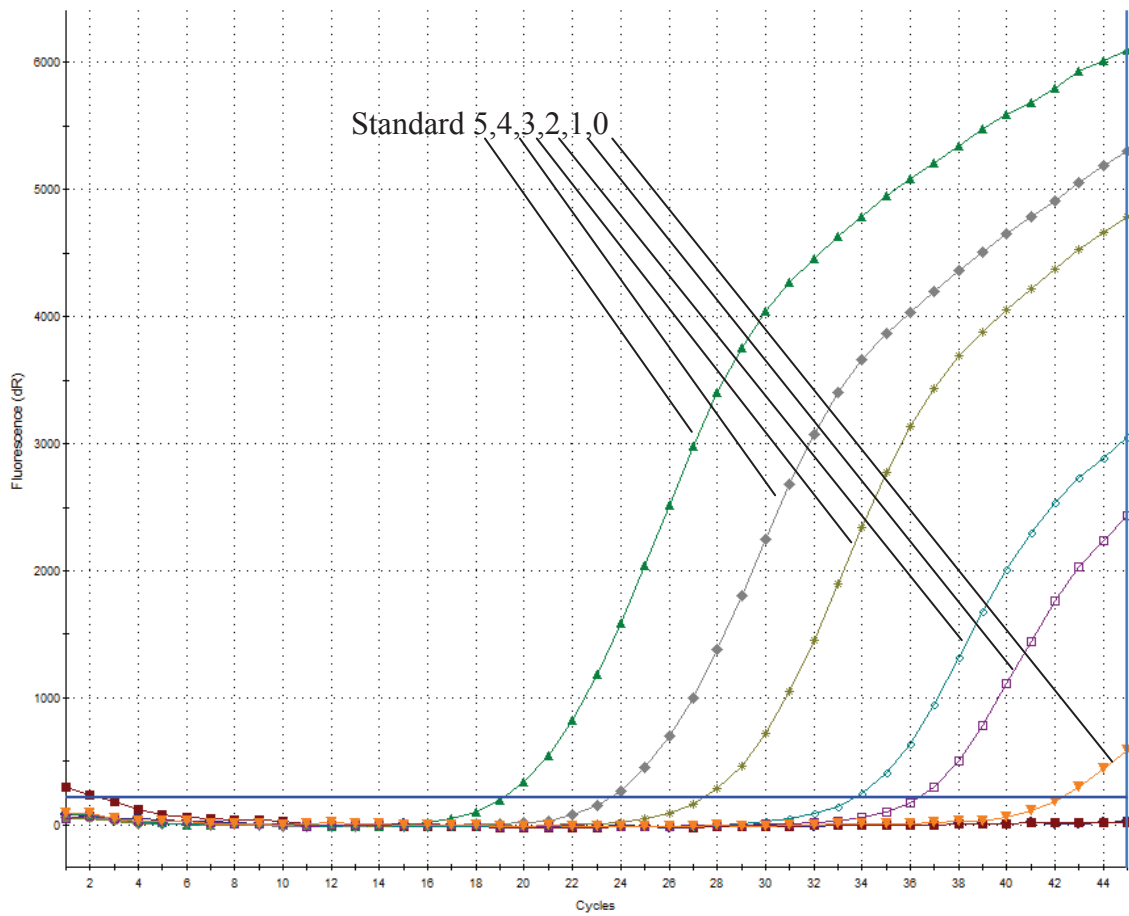


Abbildung 40: Standardreihe der Erdnuss im Multiplexsystem in elastischer, randloser PCR-Platte

Bei diesem Versuch waren ebenfalls alle Standards positiv im Multiplexsystem. Man sieht, dass die Amplifikationskurven aller Standards einen s-förmigen Verlauf hatten, jedoch sind die C_p-Unterschiede zwischen Standard 3 und 2 und Standard 1 und 0 mit jeweils etwa sechs Zyklen sehr groß.

Die Abbildung 41 zeigt den Versuch mit der stabilen PCR-Platte mit Rand von der Firma 4titude. Die Standards 5-3, die ab dem 17., 20. und 23. Zyklus detektiert wurden, wiesen noch gleichmäßige Differenzen von etwa drei Zyklen auf. Zwischen Standard 3 und 2 gab es einen etwas größeren C_p -Unterschied von vier Zyklen. Zwischen Standard 2 und 1 betrug die Differenz wieder drei C_p -Werte. Die Amplifikationskurven der Standards 1-5 wiesen einen s-förmigen Verlauf auf. Die Kurve zum Standard 0 fiel hingegen stark ab.

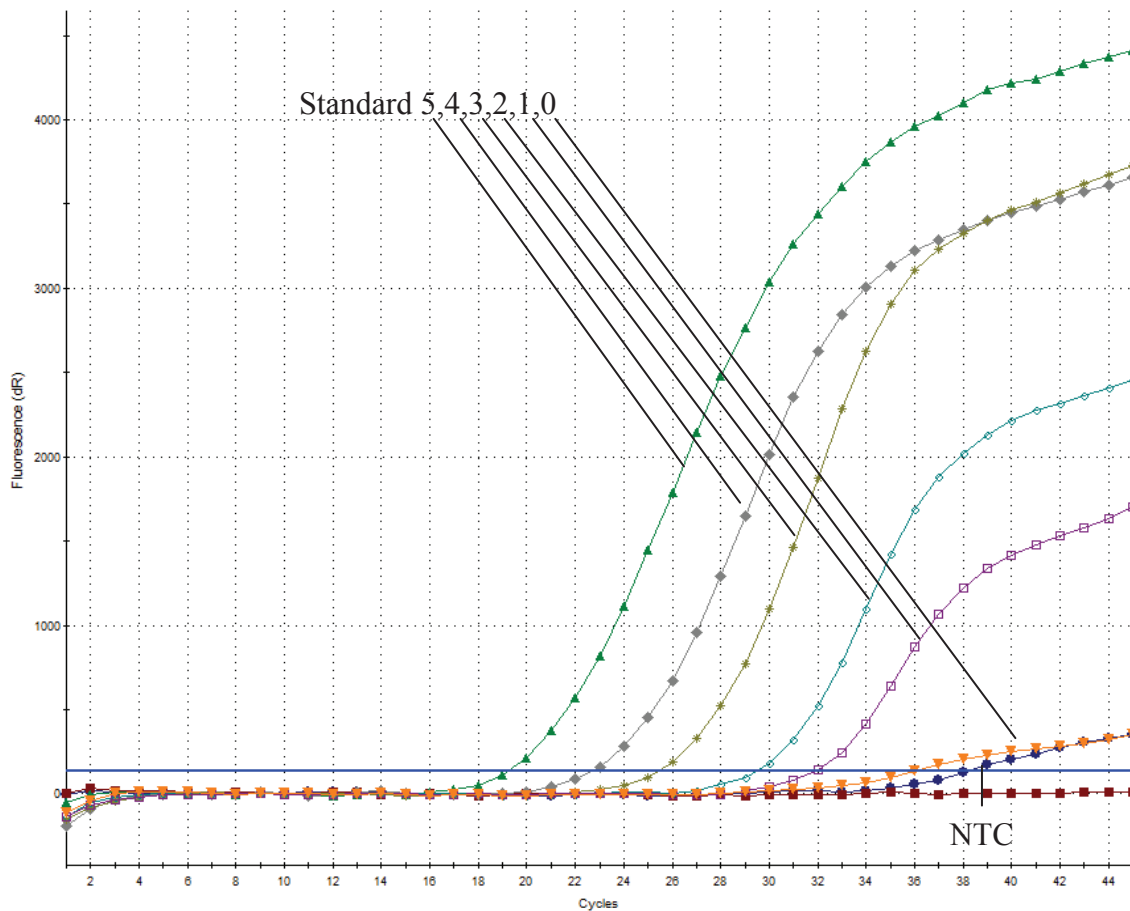


Abbildung 41: Standardreihe der Erdnuss im Multiplexsystem in stabiler PCR-Platte mit Rand

Aus diesem Experiment folgt, dass durch den Einsatz von Tubes das beste Ergebnis erzielt werden konnte, denn die Amplifikationskurven wiesen einen s-förmigen Verlauf auf und die C_p -Unterschiede lagen bei etwa drei Zyklen.

Das Einzelsystem Erdnuss wurde bei einem weiteren Versuch mit einem abgeänderten Temperaturprogramm untersucht, denn laut der Software Primer Premier beträgt die theoretische Schmelztemperatur des PCR-Produktes der Erdnuss etwa 96°C . Die Denaturierungsphase wurde anstatt bei 95°C bei 97°C für 5 Minuten durchgeführt. Die Annealingphase bei 60°C für 30 Se-

kunden und die Coolingphase bei 40°C für 1 Minute wurden beibehalten. Als Proben dienten die Standards 0-5 der Erdnuss, zwei 4 ppm-Quantards und vier NTC. Die Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse im FAM-Kanal.

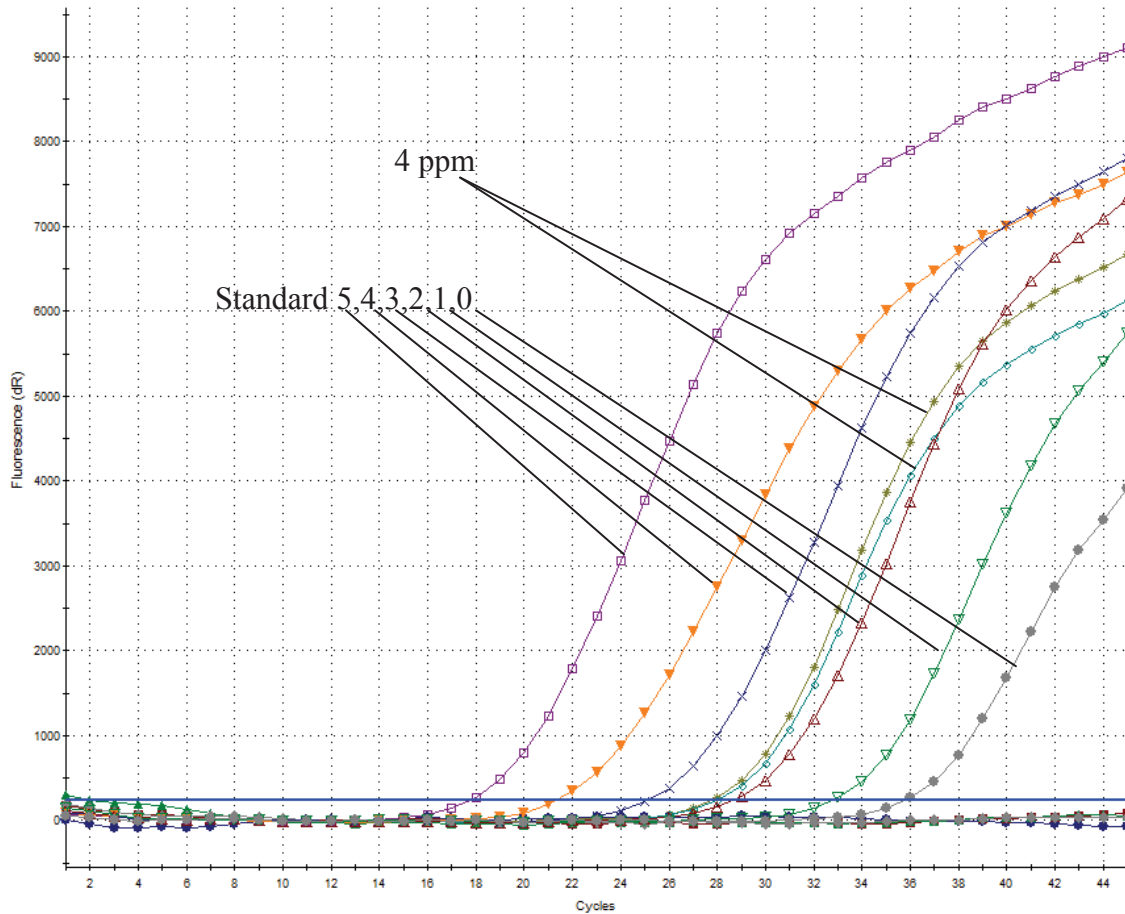


Abbildung 42: Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr. 2520+2611) am Mx 3005p mit $T_{\text{Denaturierung}} = 97^{\circ}\text{C}$

Man erkennt, dass die Standards 5-1 in folgender Reihenfolge detektiert wurden: 18., 21., 25., 29., 32. und 35. Zyklus. Die 4 ppm wurden ab dem 27. Zyklus nachgewiesen. Die zum Erdnuss-System erstellte Standardkurve hatte einen Korrelationskoeffizienten von 0,999. Der Slope von -3,659 lag geringfügig außerhalb des von Congen festgelegten Bereiches von -3,2 bis -3,6 (siehe Kapitel 3.2.6)

Die Überprüfung des Multiplexsystems am Mx 3005p wurde noch einmal mit dem gleichen Temperaturprogramm aus dem vorherigen Versuch durchgeführt. In der Tabelle 27 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 27: Ergebnisse zur Wiederholung der Kitüberprüfung am Mx 3005p bei $T_{\text{Denaturierung}} = 97^{\circ}\text{C}$

		C _p -Werte		
		FAM	ROX	Cy5
Probennummer	Probenart			
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
RAD 3576	0,4 ppm	31,33	29,82	31,72
RAD 3576	0,4 ppm	29,59	30,58	32,22
RAD 3576	0,4 ppm	30,79	30,20	31,54
RAD 3576	0,4 ppm	30,39	30,88	32,64
RAD 3578	4 ppm	29,12	27,31	28,17
RAD 3578	4 ppm	31,57	27,74	29,46
RAD 3563	40 ppm	26,51	25,26	26,51
RAD 3563	40 ppm	26,00	25,09	25,78
RAD 3381	40 ppm	25,81	23,89	25,54
RAD 3381	40 ppm	24,90	24,19	24,85
RAD 3560	400 ppm	22,31	20,83	22,03
RAD 3560	400 ppm	21,75	20,77	21,66
RAD 3152	Erdnuss 1:100	21,23	-	-
RAD 837	Walnuss 1:100	-	19,40	-
RAD 930	Haselnuss 1:100	-	-	20,07
AC 557 St.0	Std. 0 Erdnuss	34,47	35,76	-
AC 557 St.1	Std. 1 Erdnuss	31,78	31,51	30,60
AC 557 St.2	Std. 2 Erdnuss	28,81	28,43	28,99
AC 557 St.3	Std. 3 Erdnuss	24,90	25,03	25,75
AC 557 St.4	Std. 4 Erdnuss	21,49	21,62	22,68
AC 557 St.5	Std. 5 Erdnuss	16,76	18,38	19,33

Im Vergleich zur Kitüberprüfung bei einer Denaturierungstemperatur von 95°C wurden bezüglich des Erdnuss-System alle Quantards von 0,4 und 4 ppm detektiert (siehe Kapitel 4.3.6). Im Haselnuss-System waren zuvor nur zwei und nun alle 0,4 ppm-Quantards positiv. Die Korrelationskoeffizienten und Slopes der erstellten Standardkurven betragen für das Erdnuss-System 0,991 und -3,524, für das Walnuss-System 0,998 und -3,428 und für das Haselnuss-System 0,999 und -3,205.

4.3.7 Vergleich der PCR-Einzelsysteme mit dem Multiplexsystem

Der Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob das neu entwickelte Multiplexsystem, in Bezug auf die Sensitivität, die drei PCR-Einzelsysteme Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496) und Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) zukünftig im Labor ersetzen kann. Als Proben dienten die Standardreihe von Erdnuss, Walnuss und Haselnuss, die Quantards 0,4, 4, 40 und 400 ppm, sowie zwei für das jeweilige PCR-System positive Proben. Die C_p -Werte zum Multiplexsystem wurden aus den bereits durchgeführten Versuchen „Untersuchung verschiedener Matrices“ (siehe Kapitel 4.3.5) und „Überprüfung des Multiplexkits auf dem CFX“ (siehe Anhang 5) übernommen.

In der Tabelle 28 ist der Vergleich vom Einzelsystem Erdnuss mit dem Multiplexsystem dargestellt.

Tabelle 28: Vergleich des PCR-Einzelsystems Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) mit dem Multiplexsystem

PCR-System	Probennummer	Probenart	Einzelsystem	Multiplexsystem	Differenz der C_p -Werte
Erdnuss	RAD 3479	0,4 ppm	32,40	32,75*	-0,35
	RAD 3578	4 ppm	30,44	30,62*	-0,18
	RAD 3563	40 ppm	29,05	28,09*	0,96
	RAD 3561	400 ppm	24,49	24,42*	0,07
	AC 557 St.1	Standard 1 Erdnuss	33,84	31,96	1,88
	AC 557 St.2	Standard 2 Erdnuss	30,56	28,34	2,22
	AC 557 St.3	Standard 3 Erdnuss	26,48	25,04	1,44
	AC 557 St.4	Standard 4 Erdnuss	23,28	23,86	-0,58
	AC 557 St.5	Standard 5 Erdnuss	19,71	18,61	1,10
	RAD 1972	Weißer Schokolade	30,96	30,23	0,73
RAD 1552	Getreide	32,29	32,75	-0,46	

*Mittelwert aus jeweils zwei C_p -Werten

Die C_p -Unterschiede hinsichtlich der Quantards lagen unter 1. Bei der Standardreihe ergaben sich Detektionsunterschiede die etwa zwischen ein bis zwei C_p -Werten lagen. Die für das PCR-System positiven Proben wurden bei beiden PCR-Systemen im gleichen Zyklus positiv detektiert.

In Tabelle 29 sind die Ergebnisse zum Walnuss-System aufgeführt.

Tabelle 29: Vergleich des PCR-Einzelsystems Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) mit dem Multiplexsystem

PCR-System	Probennummer	Probenart	Einzel-system	Multiplex-system	Differenz der C _p -Werte
Walnuss	RAD 3479	0,4 ppm	33,57	31,48*	2,09
	RAD 3578	4 ppm	30,00	28,81*	1,19
	RAD 3563	40 ppm	27,32	26,80*	0,52
	RAD 3561	400 ppm	22,86	22,68*	0,18
	AC 529 St.1	Standard 1 Walnuss	33,21	33,44	-0,23
	AC 529 St.2	Standard 2 Walnuss	30,02	29,35	0,67
	AC 529 St.3	Standard 3 Walnuss	26,65	26,16	0,49
	AC 529 St.4	Standard 4 Walnuss	22,87	22,83	0,04
	AC 529 St.5	Standard 5 Walnuss	19,63	19,38	0,25
	D 83270	Eiscremé Malagá	33,32	32,28	1,04
	RAD 2319	Cerealien	23,64	23,79	-0,15

*Mittelwert aus jeweils zwei C_p-Werten

Man erkennt, dass die 0,4 ppm zwei Zyklen und die 4 ppm einen Zyklus früher im Multiplexsystem detektiert wurden. Die C_p-Unterschiede der beiden anderen Quantards sowie der Standards 1-5 der Walnuss waren gering und lagen unter 0,7. Bezüglich der positiven Proben wurde die Eiscremé Malagá einen Zyklus früher im Multiplexsystem detektiert. Die Cerealien waren in beiden PCR-Systemen im gleichen Zyklus positiv. Die Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse zum Haselnuss-System.

Tabelle 30: Vergleich des PCR-Einzelsystems Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496) mit dem Multiplexsystem

PCR-System	Probennummer	Probenart	Einzel-system	Multiplex-system	Differenz der C _p -Werte
Haselnuss	RAD 3479	0,4 ppm	33,82	32,02*	1,80
	RAD 3578	4 ppm	30,03	29,60*	0,43
	RAD 3563	40 ppm	28,20	27,55*	0,65
	RAD 3561	400 ppm	23,94	24,13*	-0,19
	AC 550 St.1	Standard 1 Haselnuss	34,74	32,60	2,14
	AC 550 St.2	Standard 2 Haselnuss	30,62	29,89	0,73
	AC 550 St.3	Standard 3 Haselnuss	27,12	27,00	0,12
	AC 550 St.4	Standard 4 Haselnuss	24,03	23,96	0,07
	AC 550 St.5	Standard 5 Haselnuss	20,53	20,32	0,21
	D 83886	Mandeln, geröstet	29,28	27,71	1,57
	D 90469	Mandelnougat	17,09	16,69	0,40

*Mittelwert aus jeweils zwei C_p-Werten

Im Multiplexsystem wurden Standard 1 und der 0,4 ppm-Quantard etwa zwei Zyklen früher detektiert als im Einzelsystem Haselnuss. Alle weiteren Quantards und Standards wiesen in beiden

Systemen ähnliche C_p -Werte auf. Die gerösteten Mandeln wurden 1,5 Zyklen eher detektiert. Die Ergebnisse zum Mandelnougat waren ähnlich.

Allgemein ist zu sagen, dass keine klare Tendenz zwischen dem neu entwickelten Multiplexsystem und den PCR-Einzelsystemen Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) und Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496) festzustellen war. Beispielsweise wurden die für das jeweilige PCR-System positiven Proben wie die Eiscreme Malagá und die gerösteten Mandeln im Multiplexsystem früher detektiert als in den Einzelsystemen. Wiederum wurden einige Quantards in den Einzelsystemen früher detektiert als in dem Multiplexsystem. Allgemein lagen die Differenzen zwischen einem und zwei C_p -Werten.

5 Diskussion

In Kapitel 4.2.1 wurde das Multiplexsystem mit Hilfe von DS 550 auf Primer-Wechselwirkungen untersucht. Anhand der C_p -Werte der NTC im VIC-Kanal konnte man feststellen, dass es ab dem 34.Zyklus zu Wechselwirkungen innerhalb des PCR-Systems kam. Somit konnte festgelegt werden, dass das Multiplexsystem später nur bis zum 35.Zyklus laufen soll, denn mit zunehmender Zyklenzahl wird die Wahrscheinlichkeit größer, dass es zum Fehlannealing der Primer oder zur Bildung von Primerdimeren kommt (Mühlhardt, 2009). Demzufolge bleibt einerseits die Sensitivität des PCR-Systems erhalten und andererseits wird Zeit für die Laboranalyse eingespart. Durch die anschließende Schmelzkurvenanalyse konnten die spezifischen von den unspezifischen PCR-Produkten getrennt werden. Laut Ririe, Rasmussen und Wittwer (1997) besitzen die spezifischen PCR-Produkte immer eine höhere Schmelztemperatur als Primerdimere. So war es auch bei dem Versuch zum Multiplexsystem. Die Schmelztemperatur der NTC lag mit 81°C deutlich unter den Temperaturen von Haselnuss ($88,3^\circ\text{C}$), Walnuss ($87,0^\circ\text{C}$) und Erdnuss ($91,5^\circ\text{C}$).

Das Multiplexsystem wurde inklusive der IAC in Kapitel 4.2.2 untersucht. Diese wurde im VIC-Kanal ab dem 29.Zyklus detektiert. Laut den Anforderungen der Firma Congen ist dieses Ergebnis zufriedenstellend, denn die IAC sollte zwischen dem 25. und 30.Zyklus amplifiziert werden (siehe Kapitel 3.1.7). Das Fluoreszenzsignal in diesem Detektionskanal war mit 10 – 25 am höchsten. Durch die Verringerung der Konzentrationen von IAC-Primern und IAC-Sonde lagen die Fluoreszenzsignale bei 1,6 bis 8 (siehe Kapitel 4.2.4). Dieses Ergebnis ist zufriedenstellend, denn die IAC ist nur eine Kontrollreaktion. Außerdem werden durch die geringeren Volumina für den Mastermix Kosten eingespart.

In Kapitel 4.2.3 wurde das Einzelsystem-Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) mit den Standards -2 bis 5 (10^{-2} bis 10^5 Kopien/ μl) und den Quantards 0,4, 4, 40 und 400 ppm auf dessen Sensitivität untersucht. Auffallend war, dass die 0,4 ppm im Erdnuss-System sehr spät, und zwar ab dem 37.Zyklus, detektiert wurden und nicht bereits ab dem 34.Zyklus. Mögliche Ursachen können Fehler beim Pipettieren der DNA in die PCR-Platte sein. Ein weiterer Grund könnte das Probenmaterial an sich sein, denn jede Proben-DNA ist anders. Es könnte beispielsweise sein, dass zu wenig DNA aus der Referenzprobe extrahiert wurde. Laut Heid (1996) bedeutet eine geringere DNA-Konzentration am Anfang der PCR einen höheren C_p -Wert bei der Auswertung der Ergebnisse. Eine Untersuchung des Multiplexsystems mit neu extrahierten Proben-DNA aus dem

0,4 ppm-Quantard zeigte, dass diese im FAM-Kanal ab dem 34. und 35. Zyklus detektiert wurden (siehe Kapitel 4.2.4).

In Kapitel 4.2.4 zeigte der Versuch zum Multiplexsystem am LC 480, dass das Fluoreszenzsignal der FAM-Sonde im Gegensatz zu den anderen Detektionskanälen schwach ausfiel. Außerdem war ein starkes Grundrauschen sichtbar. Ein möglicher Grund dafür könnten Fehler beim Sondendesign sein. Deswegen wurde die FAM-Sonde noch einmal neu designt. Der Versuch in Kapitel 4.2.7 zeigte, dass die Fluoreszenz durch die neue Sonde deutlich gesteigert werden konnte. Die Signalwerte zu den Erdnussproben betragen am LC 480 mit der alten FAM-Sonde etwa 5,7. Durch die neu designte Sonde (3866-6289) konnten Fluoreszenzsignale über 20 erreicht werden.

Im Erdnuss-System konnte der 0,4 ppm-Quantard sowohl am ABI 7500 als auch am Mx 3005p nicht detektiert werden (siehe Kapitel 4.2.5). Laut Jofré, Martin, Gariga, et.al (2005) kann die Sensitivität des PCR-Systems durch das IAC-Target beeinflusst werden, denn es wird genauso vervielfältigt wie die spezifischen DNA-Abschnitte von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss. Dazu sind dNTP's notwendig, die nur in limitierter Konzentration im Mastermix vorhanden sind. Das bedeutet, dass die Konkurrenzreaktion umso stärker ausfallen wird, je höher die Kopienzahl des Targets im Mastermix ist. Demzufolge werden die dNTP's schneller verbraucht sein und die PCR kommt früher zum Erliegen. Somit können im PCR-System Proben mit minimalen Gehalten an Positivmaterial, wie der 0,4 ppm-Quantard, nicht mehr detektiert werden. Mit dem anschließend getätigten Versuch wurde diese Vermutung bestätigt, denn bei Zugabe von 100 Kopien IAC-Target pro Reaktion wurden die 0,4 ppm zwei Zyklen früher amplifiziert als bei 500 Kopien. Außerdem fielen die Fluoreszenzsignale doppelt so hoch aus wie bei Zugabe von 500 Kopien pro Reaktion. Deswegen wurde für die weiteren Versuche die niedrigere Kopienzahl eingesetzt. Eine weitere Ursache, dass die 0,4 ppm im Erdnuss-System nicht detektiert wurden, ist außerdem die Nachweisgrenze. Dieses konnte laut Kapitel 4.3.3 bewiesen werden, denn die nach DINtest errechnete Nachweisgrenze für das Erdnuss-System beträgt 0,9 ppm.

In Kapitel 4.2.6 wurden die 0,4 ppm- und 4 ppm-Quantards überraschenderweise im gleichen Zyklus amplifiziert. Eine wissenschaftliche Erklärung gibt es dafür nicht. Als einzig möglicher Grund könnte die Verwechslung der DNA-Proben sein, sodass zwei 4 ppm-Quantards oder zwei 0,4 ppm-Quantards für den Versuch verwendet wurden.

Bei dem Spezifitätstest zum Multiplexsystem mussten mehrere Versuche durchgeführt werden, um Querempfindlichkeiten komplett ausschließen zu können (siehe Kapitel 4.3.1). Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, ist die PCR eine äußerst sensitive Nachweismethode. Es reichen geringe Allergenspuren aus um ein positives Ergebnis zu erzeugen. So wurden beispielsweise viele Aprikosenproben im ROX-Kanal und Sonnenblumenkernproben im Cy5-Kanal positiv detektiert (siehe Anhang 2). Durch das vorherige Behandeln von Sonnenblumen- und Aprikosenkernen mit Reinstwasser konnten anhaftende Verunreinigungen entfernt werden. Die aus den Proben extrahierten DNA waren im Multiplexsystem negativ. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Aprikosenproben mit Walnussbestandteilen und die Sonnenblumenkernproben mit Haselnussbestandteilen verunreinigt waren. Mögliche Gründe dafür können sein, dass das Probenmaterial schon während der Lagerung oder des Transportes durch andere allergenhaltige Rohstoffe kontaminiert wurde (Kreuzkontamination). Andere Kontaminationsquellen könnten die DNA-Extraktion oder die Zugabe der DNA in die PCR-Platte sein. Bei beiden Prozessen kann es zur Verschleppung der DNA kommen, wenn Tubes geöffnet und wieder geschlossen werden und DNA-Material herausspritzt oder wenn DNA an den Handschuhen hängen bleibt und die Person unwissentlich diese auf andere Proben-DNA überträgt (Roux, 1995).

Die Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze für das Erdnuss-System gestaltete sich schwierig (siehe Kapitel 4.3.3). Laut Kaiser (2013) sind mindestens sechs Kalibrierpunkte für eine Gerade notwendig um eine Aussage über die Qualität der Methode zu treffen. Diese Messpunkte sollten möglichst den gesamten Messbereich abdecken, das heißt am Anfang der Messbarkeit, in der Mitte des Arbeitsbereiches und in der Nähe des Endwertes. In dieser Arbeit wurden die Quantards 0,4, 4, 40 und 400 ppm doppelt bestimmt und deren C_p -Werte gemittelt. Somit erhielt man vier Messpunkte, die eine Kalibriergerade definierten. Da jedoch die 0,4 ppm im Erdnuss-System nicht detektiert wurden, fehlte ein Messpunkt am Anfang des Messbereiches der PCR-Methode. Die nach DINtest bestimmte Nachweisgrenze betrug 0,9 ppm. Dieser Wert scheint plausibel zu sein, denn der 0,4 ppm-Quantard wurde im Erdnuss-System oftmals nicht detektiert (siehe Kapitel 4.2.5). Das Erdnuss-System ist also weniger empfindlich als das Haselnuss- (0,4 ppm) und das Walnuss-System (0,1 ppm) auf denen die Multiplex-PCR basiert. Die nach DINtest ermittelte Erfassungsgrenze für das Erdnuss-System von 21,5 ppm ist jedoch unrealistisch. Die Standardabweichung betrug 38,5. Die Standardabweichungen der anderen beiden PCR-Systeme lagen bei maximal 1. Laut Kromidas (2011) gibt die Standardabweichung an wie weit die gemessenen Einzelwerte vom Mittelwert abweichen. Je geringer dieser Wert ist, desto

höher ist die Qualität der Messung. Das bedeutet in diesem Fall, dass die Messqualität für das Erdnuss-System viel schlechter war als für das Haselnuss- und das Walnuss-System. Die Richtigkeit des Erdnuss-System wurde mit einer Dotierung von 2 ppm (entspricht etwa dem Doppeltem der Nachweisgrenze) überprüft (siehe Kapitel 4.3.4). Es resultierte, dass nur eine Probe falsch negativ detektiert wurde und somit eine Richtigkeit von 95% erreicht wurde. Demzufolge ist eher davon auszugehen, dass die Erfassungsgrenze bei 2 ppm liegt.

Die Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems an allen multiplexfähigen PCR-Geräten in Kapitel 4.3.6 waren teilweise nicht zufriedenstellend. So lagen beispielsweise die Slopes zu den Standardkurven des Haselnuss und Erdnuss-Systems am CFX unter -3,2. Das bedeutet, dass die PCR-Effizienz unter 100% lag. Grund dafür kann zum Beispiel unsauberes Pipettieren sein. Das heißt, dass vielleicht zu wenig DNA in einzelne Wells pipettiert wurde, weil die Pipettenspitze nicht ganz geleert wurde. Eine weitere Rolle können ungünstige Reaktionsbedingungen während der PCR spielen. Deswegen wurde die Überprüfung noch einmal am CFX wiederholt. Bei diesem Versuch lagen die Slopes beziehungsweise die Korrelationskoeffizienten zwischen -3,2 und -3,6 beziehungsweise über 0,98.

Bei der Kitüberprüfung stellte sich heraus, dass die PCR am Mx 3005p nicht ohne Komplikationen ablief (siehe Kapitel 3.2.6). Für den Parameter Erdnuss konnte keine Standardkurve erstellt werden, da die C_p -Unterschiede der Standards 1-5 nicht gleichmäßig bei etwa drei Zyklen lagen. Aufgrund der Versuche zur Ursachenfindung, die im Ergebnisteil präsentiert wurden, kann man darauf schließen, dass es ein gerätetechnisches Problem ist, welches aber nur den Mx 3005p der Firma Congen betrifft. Am Mx 3005p der Firma r-biopharm konnte eine Standardgerade erstellt werden, die einen Slope von -3,385 und einen Korrelationskoeffizienten von 0,998 besaß. Die 0,4 ppm konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Dieser Versuch verlief somit erfolgreich. Eine Untersuchung des PCR-Einzelsystems Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) mit den gleichen Proben am CFX und am Mx 3005p und der anschließenden Gelelektrophorese zeigte, dass zwar alle Proben amplifiziert wurden, jedoch wiesen die Amplifikationskurven der Standards der Erdnuss am Mx 3005p ungleichmäßige C_p -Unterschiede auf. Die Gelelektrophorese zeigte, dass bei den Standards 2-5 das spezifische Produkt der Erdnuss von 145 bp entstanden ist. Beim Standard 1 hingegen wurden zwei komplett andere PCR-Produkte gebildet. Außerdem war die NTC kontaminiert, denn auch hier wurden PCR-Produkte gebildet. Laut Dorak (2007) kann die Bildung von anderen PCR-Produkten darauf hindeuten, dass die Denaturierungstemperatur zu niedrig ist

und die DNA-Stränge bei der PCR nicht vollständig aufgeschmolzen werden. Somit war dieser Versuch ein Beweis dafür, dass die Temperaturführung am Mx 3005p nicht in Ordnung ist.

Laut Schoder, Schmalwieser, Schaubberger et.al (2003) werden die besten PCR-Ergebnisse erzielt, wenn die Denaturierungstemperatur zwischen 91 und 95°C liegt. Laut dem Temperaturprogramm in Kapitel 3.1.2 soll die Denaturierungsphase für das Multiplexsystem bei 95°C durchgeführt werden. Demzufolge sollten alle PCR-Produkte eine Schmelztemperatur besitzen, die kleiner als 95°C ist. Die Schmelztemperatur eines PCR-Produktes kann nach der Wallace-Regel berechnet werden:

$$T_m \text{ in } ^\circ\text{C} = (A+T) \cdot 2 + (G+C) \cdot 4 \quad (\text{Formel 6})$$

Der Gehalt an Adenosin (A) und Thymin (T) des spezifischen PCR-Produktes wird mit zwei multipliziert und der Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) wird mit 4 multipliziert. Beide Werte werden zum Schluss addiert (siehe Formel 6) (Dorak, 2007). Laut der Software Primer Premier besitzt das Erdnuss-Produkt eine Schmelztemperatur von 96°C. Dies ist jedoch nur ein theoretischer Wert, der von dem praktischen Ergebnis meistens abweicht. Laut Kapitel 4.2.1 lag die Schmelztemperatur des Erdnuss-Produktes nämlich bei 91,5°C.

Trotzdem wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Denaturierungstemperatur auf 97°C erhöht wurde. Eine Standardkurve zum Erdnuss-System konnte erfolgreich erstellt werden. Der Slope lag bei -3,659, was einer Effizienz von 110% entspricht und r^2 betrug 0,999. Daraus kann man schließen, dass der Mx 3005p wahrscheinlich die Denaturierungstemperatur von 95°C gar nicht erreicht, sondern vielleicht nur 90°C. Laut Schoder, Schmalwieser, Schaubberger et.al (2003) weisen viele PCR-Geräte Abweichungen bezüglich des Temperaturprogramms auf. So kommt es oft zu einem Überschreiten (Overshooting) beziehungsweise Unterschreiten (Undershooting) der gewählten Denaturierungstemperatur. Es wird außerdem von Temperaturdifferenzen von Well zu Well berichtet. Dies passierte ebenfalls bei dem Versuch am Mx 3005p als die Standards 1-5 der Erdnuss in unterschiedliche Reihen der PCR-Platte pipettiert wurden. Theoretisch müssten die PCR-Ergebnisse ähnlich sein, wenn die Temperatursteuerung des PCR-Gerätes in Ordnung ist. Die beiden Amplifikationsplots sahen aber komplett verschieden aus. Die Abstände zwischen den Amplifikationskurven lagen nicht bei etwa drei Zyklen. Teilweise hatten unterschiedliche Standards gleiche C_p -Werte. Demzufolge konnten auch keine Standardgeraden erstellt werden.

Eine weitere Rolle könnte die Wahl des PCR-Reaktionsgefäßes spielen. Es stellte sich heraus, dass die Denaturierungstemperatur von 95°C beibehalten werden kann, wenn man anstatt einer PCR-Platte Tubes einsetzt. Die Amplifikationskurven der Standards 1-5, die im Multiplexsystem untersucht wurden, wiesen einen s-förmigen Verlauf und gleiche Abstände auf. Die Tubes scheinen aufgrund ihrer Gefäßwanddicke, im Gegensatz zu einer PCR-Platte, eine bessere Wärmeübertragung vom Heizblock auf den im Well befindlichen Mastermix zu gewährleisten.

Aufgrund der Tatsache, dass die Temperatursteuerung des Mx 3005p nicht in Ordnung ist, sollte man den Temperaturblock austauschen und erneuern lassen. Eine Alternative wäre, dass das Multiplexsystem auf dem Mx 3005p der Firma Congen mit einem abgeänderten Temperaturprogramm läuft. Die Denaturierungstemperatur wird auf 97°C erhöht und die anderen Temperaturschritte werden beibehalten. Die Korrelationskoeffizienten der Standardgeraden zu den drei Parametern wiesen Werte von etwa 0,99 auf. Die Slopes lagen zwischen -3,2 und -3,5. Die Werte entsprechen den Vorgaben der Firma Congen. Somit war der Versuch erfolgreich.

Der Vergleich der Einzelsysteme Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) und Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496) mit dem neu entwickelten Multiplexsystem ergab keine statistisch erfassbaren Unterschiede (siehe Kapitel 4.3.7). Einige Proben wurden in den Einzelsystemen früher detektiert und andere wiederum im Multiplexsystem. Da die C_p -Unterschiede bei maximal zwei Zyklen lagen, kann man davon ausgehen, dass das neu entwickelte PCR-System durchaus die drei PCR-Einzelsysteme Erdnuss, Haselnuss und Walnuss ersetzen kann um zukünftig eine Lebensmittelprobe auf mehrere Allergene in kürzester Zeit zu untersuchen. Dieses sollte jedoch durch mindestens zwei bis drei Versuchswiederholungen bestätigt werden, denn eine statistische Sicherheit ist aufgrund des einen durchgeführten Versuches nicht gewährleistet.

Laut Kapitel 4.3.3 betrug die Nachweisgrenze für Erdnuss 0,9 ppm, für Walnuss 0,1 ppm und für Haselnuss 0,4 ppm. Tabelle 31 zeigt einen Überblick zu den Methoden, die für die Allergenanalytik existieren und bereits in Kapitel 1.4. näher erläutert wurden.

Tabelle 31: Übersicht zu den Nachweisgrenzen publizierter Multiplex-Methoden

Methode	LOD	Quelle
Duplex-PCR für Sesam und Haselnuss	50 ppm	Schöringhumer et.al, 2009

Methode	LOD	Quelle
tetraplex-PCR für Haselnuss, Erdnuss, Sellerie, Soja und tetraplex-PCR für Sesam, Milch, Mandel, Ei	10-50 ppm	Köppel et.al, 2010
Multiplex-PCR für HN, EN, WN, Mandel, Sesam, Cashew	1-100 ppm	Pafundo et. al, 2010
Ligationsabhängige Sondenamplifizierung (LPA) für EN, Cashew, Pecannuss, Pistazie, HN, Sesam, Macadamianuss, Mandel, WN, Paranuss	5 ppm	Ehlert et. al, 2009
LC-MS für Milch, Eier, Soja, Erdnuss, Haselnuss, Walnuss, Mandel	10-1000 ppm	Heick, Fischer, Pöpping, 2011
kommerziell erhältliche PCR- und ELISA Testkits	< 10 ppm	Boye, Godefroy, 2010

Man erkennt, dass das entwickelte Multiplexsystem weitaus sensitiver ist, als die publizierten PCR-Methoden von Schöringhumer et.al (2009), Köppel et.al (2010), Pafundo et.al (2010) und Ehlert et.al (2009). Die von Heick, Fischer und Pöpping (2011) publizierte LC-MS-Methode ist mit einer Nachweisgrenze von 10-1000 ppm ebenfalls nicht so empfindlich wie die Multiplex-PCR. Das entwickelte Nachweissystem kann sehr gut mit den bereits kommerziell erhältlichen ELISA- und PCR-Testkits mithalten, da deren Nachweisgrenzen zwischen 0,1-10 ppm liegen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer Multiplex-PCR, welche die Allergene Haselnuss, Walnuss und Erdnuss innerhalb kürzester Zeit in einer Lebensmittelprobe nachweisen kann. Die PCR wurde zunächst optimiert, indem die Konzentration der IAC Primer und der IAC-Sonde verringert wurden. Es wurde außerdem die Kopienzahl des IAC-Targets verringert. Aufgrund schwacher Fluoreszenzsignale der FAM-Sonde, mit welcher das spezifische PCR-Produkt der Erdnuss nachgewiesen wird, wurde diese neu designt.

Nach der Optimierungsphase konnte das Multiplexsystem validiert werden. Das PCR-System wies im Spezifitätstest keine Querempfindlichkeiten auf. Es ist ebenfalls robust gegen Temperaturschwankungen, denn die Ergebnisse für die durchgeführten Versuche bei einer Annealingtemperatur von 59°C, 60°C und 61°C unterschieden sich in weniger als einem C_p -Wert. Bezüglich der Richtigkeit arbeitet das Multiplexsystem mit einer statistischen Sicherheit von 95-100% zuverlässig. Allgemein ist zu sagen, dass das entwickelte System sehr empfindlich ist. Das Walnuss-System ist mit einer errechneten Nachweisgrenze von 0,1 ppm das sensitivste, gefolgt vom Haselnuss-System mit 0,4 ppm. Das Erdnuss-System ist mit 0,9 ppm etwas unempfindlicher. Des Weiteren weist das Multiplexsystem die Allergene Haselnuss, Walnuss und Erdnuss in komplexen Lebensmittelproben, wie zum Beispiel Eiscreme, Keksen, Spargelcremesuppe und Schokoladencreme, nach. Weiterhin stellte sich beim Vergleich der PCR-Einzelsysteme Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) und Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496) mit dem neu entwickelten Multiplexsystem heraus, dass positive Lebensmittelproben bis zu einem C_p -Wert früher detektiert wurden als im Einzelsystem. Hinsichtlich der Standardreihen von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss und der Quantards von 0,4, 4, 40 und 400 ppm waren die Ergebnisse, bis auf einige Ausreißer, in beiden Systemen ähnlich.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das Multiplexsystem zum Nachweis von Haselnuss, Walnuss und Erdnuss zukünftig in der Routineanalytik eingesetzt werden kann um Proben schneller und effizienter zu untersuchen. Die Multiplex-PCR konnte problemlos auf den Thermocyclern ABI 7500, CFX 96, und LC 480 II ausgeführt werden. Es gab lediglich beim Mx 3005p der Firma Cogen Einschränkungen, die aber durch entsprechende Maßnahmen korrigiert werden können.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Entstehung einer Nahrungsmittelallergie, allergien.com

Abbildung 2: Die Allergene Erdnuss, Haselnuss und Walnuss,

<http://farrp.unl.edu/web/farrp/informalltreenuts>

Abbildung 3: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion,

<http://www.egbeck.de/skripten/bilder/pcr5.gif>

Abbildung 4: Funktionsprinzip der TaqMan-Sonden, <http://www.medizinische-genetik.de/typo3temp/pics/b1981e534d.jpg>

Abbildung 5: Funktionsprinzip interkalierender Farbstoffe,

http://www.b2b.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/brands/molecular-probes.gif

Abbildung 6: Darstellung einer Amplifikationskurve in einem Amplifikationsplot, Abbott Molecular, geändert

https://www.abbottmolecular.com/static/cms_workspace/img/Landing_Pages/RealTime_PCR/typicalrealtimepcrcurve.jpg

Abbildung 7: Amplifikationskurven zu einer Standardreihe (links) mit zugehöriger Standardkurve (rechts), Rachow, 2013

Abbildung 8: Ergebnisse des Spezifitätstests im Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611), FAM-Kanal

Abbildung 9: Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese zum Test der Spezifität des Einzelsystems Erdnuss, DNA-Marker 100 bp

Abbildung 10: Ergebnisse zu Primer-Wechselwirkungen innerhalb des Multiplexsystems, VIC-Kanal

Abbildung 11: Schmelzkurvenanalyse zum Multiplexsystem Erdnuss, Walnuss, Haselnuss

Abbildung 12: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Wechselwirkungen, FAM-Kanal

Abbildung 13: Ergebnisse zum Sondentest, FAM-Kanal

Abbildung 14: Ergebnisse zum Sondentest, VIC-Kanal

Abbildung 15: Ergebnisse zum Sondentest, ROX-Kanal

Abbildung 16: Ergebnisse zum Sondentest, Cy5-Kanal

Abbildung 17: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, FAM-Kanal

Abbildung 18: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, VIC-Kanal

Abbildung 19: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, ROX-Kanal

- Abbildung 20: Ergebnisse zur Untersuchung des Multiplexsystems auf Sensitivität, Cy5-Kanal
- Abbildung 21: Ergebnisse zum Multiplexsystem auf dem Mx 3005p,
- Abbildung 22: Ergebnisse zum Multiplexsystem auf dem ABI 7500
- Abbildung 23: Ergebnisse zum Versuch mit 500 Kopien IAC-Target pro Reaktion, FAM-Kanal
- Abbildung 24: Ergebnisse zum Versuch mit 100 Kopien IAC-Target pro Reaktion, FAM-Kanal
- Abbildung 25: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, FAM-Kanal
- Abbildung 26: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, VIC-Kanal
- Abbildung 27: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, ROX-Kanal
- Abbildung 28: Ergebnisse zum Test der neuen Sonden im Multiplexsystem, Cy5-Kanal
- Abbildung 29: Spezifitätstest zum Multiplexsystem, FAM-Kanal
- Abbildung 30: Spezifitätstest zum Multiplexsystem, ROX-Kanal
- Abbildung 31: Spezifitätstest zum Multiplexsystem, Cy5-Kanal
- Abbildung 32: Standardkurven zur Überprüfung des Multiplexkits am ABI 7500
- Abbildung 33: Wiederholung der Überprüfung des Multiplexkits am CFX
- Abbildung 34: Versuch zum Multiplexsystem am Mx 3005p der Firma r-biopharm (FAM-Kanal)
- Abbildung 35: Ergebnisse zum Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) auf dem CFX (links) und auf dem Mx 3005p (rechts)
- Abbildung 36: Gelelektrophorese zum Erdnussystem (Primer-Nr.2520+2611) auf dem CFX (links) und auf dem Mx 3005p (rechts), DNA-Marker: 100 bp
- Abbildung 37: Ergebnisse zur Standardreihe der Erdnuss in Reihe C der PCR-Platte pipettiert
- Abbildung 38: Ergebnisse zur Standardreihe der Erdnuss in Reihe D der PCR-Platte pipettiert
- Abbildung 39: Standardreihe der Erdnuss im Multiplexsystem in Tubes
- Abbildung 40: Standardreihe der Erdnuss im Multiplexsystem in elastischer, randloser PCR-Platte
- Abbildung 41: Standardreihe der Erdnuss im Multiplexsystem in stabiler PCR-Platte mit Rand
- Abbildung 42: Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr. 2520+2611) am Mx 3005p mit $T_{\text{Denaturierung}} = 97^{\circ}\text{C}$

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug zu kommerziell erhältlichen ELISA- und PCR-Testkits zur Detektion von Erdnuss, Haselnuss

Tabelle 2: Übersicht zu den verwendeten Primern

Tabelle 3: Übersicht zu den verwendeten Sonden

Tabelle 4: Übersicht zu den verwendeten Proben

Tabelle 5: Temperaturprogramme für die real-time PCR

Tabelle 6: Mastermixkomponenten für das PCR-Einzelsystem Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611)

Tabelle 7: Mastermixkomponenten zur Untersuchung der Multiplex-PCR auf Primer-Wechselwirkungen

Tabelle 8: Übersicht zu den Reporterfarbstoffen für die Multiplex-PCR

Tabelle 9: Mastermixkomponenten für die Multiplex-PCR Erdnuss, Walnuss, Haselnuss inklusive IAC

Tabelle 10: Pipettierschema zum Mastermix für die Validierung des Multiplexsystems

Tabelle 11: Mastermixkomponenten für die PCR-Einzelsysteme Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) und Haselnuss

Tabelle 12: Ergebnisse zur Bestimmung der Spezifität des Einzelsystems Erdnuss mit weiteren Proben

Tabelle 13: Sonden für das Multiplexsystem und deren nachzuweisender DNA-Abschnitt

Tabelle 14: Ergebnisse zur Untersuchung des PCR-Einzelsystems Erdnuss auf dessen Sensitivität

Tabelle 15: Optimiertes Pipettierschema zum Mastermix für die Multiplex-PCR inklusive IAC

Tabelle 16: Spezifitätstest mit gewaschenen Sonnenblumen- und Aprikosenkernen im Multiplexsystem

Tabelle 17: Spezifitätstest der Pecannuss-DNA im Erdnuss-System

Tabelle 18: Ergebnisse zur Bestimmung der Robustheit bei 59, 60 und 61°C

Tabelle 19: Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze für das Multiplexsystem

Tabelle 20: C_p-Werte zur Überprüfung der Nachweisgrenze

Tabelle 21: Ergebnisse zur Bestimmung falsch negativ detektierter Proben im Multiplexsystem

Tabelle 22: Ergebnisse zur Bestimmung falsch positiv detektierter Proben im Multiplexsystem

Tabelle 23: Ergebnisse zur Untersuchung verschiedener Matrices im Multiplexsystem

Tabelle 24: Übersicht zu den Ergebnissen der Kitüberprüfung am ABI 7500, CFX, LC 480 und Mx 3005p

Tabelle 25: Ergebnisse zur Überprüfung des Multiplexkits am Mx 3005p, FAM-Kanal

Tabelle 26: Wiederholung zur Überprüfung des Multiplexkits am Mx 3005p, FAM-Kanal

Tabelle 27: Ergebnisse zur Wiederholung der Kitüberprüfung am Mx 3005p bei $T_{\text{Denaturierung}} = 97^{\circ}\text{C}$

Tabelle 28: Vergleich des PCR-Einzelsystems Erdnuss (Primer-Nr.2520+2611) mit dem Multiplexsystem

Tabelle 29: Vergleich des PCR-Einzelsystems Walnuss (Primer-Nr.2500+2501) mit dem Multiplexsystem

Tabelle 30: Vergleich des PCR-Einzelsystems Haselnuss (Primer-Nr.2495+2496) mit dem Multiplexsystem

Tabelle 31: Übersicht zu den Nachweisgrenzen publizierter Multiplex-Methoden

9 Literatur

- Alvarez, P.A., Boye, J.I.: Food Production and Processing Considerations of allergenic food Ingredients: a review, *Journal of Allergy* [Online] 2011, Vol.2012, S.1-14, <http://www.hindawi.com/journals/ja/2012/746125/>, 10.09.2012
- Brüser, E.: Allergien, das Immunsystem auf Abwegen, 2.Aufl., Berlin, Stiftung Warentest, 1998
- Buchart, K.: Nahrungsmittelallergien-ein Leitfaden für Betroffene, Bozen, Studien-Verlag, 2003
- Busch, U., Konrad, R.: Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik, Berlin, Springer, 2010
- Buschmann, C., Knoll, A.: Quantitative real-time PCR, Modul0048B_qRT_PCR_Bot2_2011.pdf, 2011, 20.03.2013
- Boye, I.J., Godefroy, S.B.: Allergen Management in the Food Industry, Canada, Wiley&Jones, 10.Aufl., 2010, googlebooks.de
- Cucu, T., Meulenaer, B., Devreese, B.: MALDI-based identification of stable hazelnut protein derived tryptic marker peptides, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* [Online] 2007, Vol. 29, Nr.12, S.1821-1831, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 08.06.2013
- Dorak, T.: Real-time PCR, Abingdon, Taylor&Francis, 2007
- Edwards, M.C., Gibbs, R.A.: Multiplex PCR: advantages, development, and applications, *Genome Research* [Online] 1994, Vol.3, S.65-75, <http://genome.cshlp.org/content/3/4/S65.full.pdf>, 02.03.2013
- Engler-Blum, G. et.al: Nachweis von Allergenen in Lebensmitteln mittels immunologischer und molekularbiologischer Verfahren: Gegenüberstellung von PCR- und ELISA-Verfahren am Beispiel von Erdnuss und Haselnuss, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 2007, 103.Jahrgang, Heft 3, S.101-109

EU-Richtlinie 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:DE:PDF>, 12.02.2013

EU-Richtlinie 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angabe der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten, http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/fl_com2003-89_de.pdf, 12.12.2012

EU-Richtlinie 2007/68/EG der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:310:0011:0014:DE:PDF>, 12.12.2012

Grosch, W., Belitz, H.-D., Schieberle, P.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie mit 620 Tabellen, 5. Aufl., Berlin, Springer, 2001

Hansen, B.M., Vieluf, I.K.: Allergiepflanzen-Handbuch und Atlas, Kontaktallergene, allergische Frühreaktionen, 2. Aufl. Hamburg, Nikol Verl.-Ges., 1997

Heick, J., Fischer, M., Pöpping, B.: First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry, *J Chromatogr A* [Online] 2011, Vol. 18, Nr. 7, S. 938-943, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21227428>

Heid, C.A. et al: Real-time quantitative PCR, *Genome Research* [Online] 1996, Vol. 6, S. 986-994, <http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.full.pdf>, 02.03.2013

Higuchi, R. et al: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology* 1992, Vol. 10, S. 413-417

Holland, P.M. et al: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [Online] 1991, Vol. 88, 7276-7280, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52277/?page=2>, 12.02.2013

Hoorfar, J. et.al: Making Internal Amplification Control mandatory for diagnostic PCR, *J.Clin.Microbiol.*[Online] 2003, Vol.41, Nr.12, <http://jcm.asm.org>, 20.03.13

Hupfer, C., Busch, U.: Nachweis allergener Zutaten in Lebensmitteln, Tagungsband der Fachtagung "Lebensmittel-Intoleranzen: Allergene und Unverträglichkeiten bei Lebensmitteln", LGL, Oberschleißheim, 2006

ISO 22174:2005, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-General requirements and definitions, <http://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/181/11285340.pdf>, 2005, 20.03.2013

Jofré, A., Martin, B., Gariga, M. et. al: Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham, *Food Microbiology* [Online] 2005, Vol. 22, p.109-115, <http://xa.yimg.com/kq/groups/14971503/1129941843/name/1.pdf>, 15.04.2013

Kaiser, O. und R.: Kalibrierkurven herstellen, kontrollieren, bewerten, <http://www.institut-f-chromatographie.de/html/kalibrierkurven.html>, 2006, 20.03.2013

Koppelman, S.J., Hefle, S.L., Detecting allergens in food, CRC Press, Cambridge, Woodhead Publ., 2006

Köppel, R. et.al: two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food, *Eur Food Res Technol* 2010, Vol.230, S.367-374

Kreft, D., Bauer, R., Goerlich, R.: Nahrungsmittelallergene-Charakteristika und Wirkungsweisen, Berlin, de Gruyter , 1995

Kromidas, S.: Handbuch Validierung in der Analytik, 2.Aufl. Weinheim, Wiley-VCH, 2011

Ludwig, K.: Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln mittels real-time PCR, Masterarbeit, August 2011, unveröffentlicht

Mafra, I. et. al: Food authentication by PCR-based methods, *Eur Food Res Technol* 2008, Vol.227, S.649–665

Meyer, A.H.: Lebensmittel heute-Qualität & Recht, 1.Aufl. Hamburg, Behr's, 2010

Mühlhardt, C.: Der Experimentator-Molekularbiologie/Genomics, 6.Aufl., Heidelberg, Spektrum, 2009

Nucleotide Blast, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Pafundo, S., Gulli, M., Marmioli, N.: Multiplex real-time PCR using SYBR Green for the detection of DNA allergens in food, *Anal Bioanal Chem* 2010, Vol.396, S.1831–1839

Poms, R.E., Anklam, E.: Polymerase Chain Reaction Techniques for Food Allergen Detection; *Journal of AOAC International* 2004, Vol.87, Nr.6, S.1391-1397

Poms, R.E, Anklam, E.: Effects of Chemical, Physical, and Technological Processes on the Nature of Food Allergens, *Journal of AOAC International* 2004, Vol. 87, S.1466–1474

Popping, B., Diaz-Amigo, C., Hoenicke, K.: Molecular biological and immunological applications for food chemists, Wiley, Canada, 2010

Reese, I., Constien, A., Schäfer, C.: Richtig einkaufen bei Nahrungsmittel-Allergien: mehr Sicherheit beim Einkauf, im Restaurant und im Ausland, 1.Aufl. Stuttgart, TRIAS, 2007

Richter, K., Rubin, D., Lampen, A.: Aktuelle Aspekte zur Risikobewertung von Allergenspuren in Lebensmitteln, *Bundesgesundheitsblatt* 2012, Vol.55, S.394-401

Rejeb, B., Abbott, M., Davies, D. et.al: Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate, *Food Addit Contam* [Online] 2005, Vol. 22, Nr.8, S.709-715, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16147426>, 24.05.2013

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T.: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Anal Biochem* [Online] 1997, Vol.245, S.154-160, <http://lib.jncasr.ac.in:6060/jspui/bitstream/123456789/161/1/543929.pdf>, 24.05.2013

Roux, K.H., Optimization and troubleshooting in PCR, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* [Online] 1995, Vol.4, S.185-194, genome.cshlp.com, 21.03.2013

Scaravelli, E. et.al: the effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR, *Anal Bioanal Chem* 2009, Vol.395, S.127–137

- Schild, T.A.: Einführung in die Real-time TaqMan PCR-Technologie Version 2.1, Applied Biosystems [Online], Weiterstadt, 2012, <http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>, 15.12.2012
- Schnadt, S.: Problematik „versteckter Allergene“ in Lebensmitteln aus Sicht des allergischen Verbrauchers, *Bundesgesundheitsblatt* 2012, Vol. 55, S.385-393
- Schoder, D., Schmalwieser, A., Schauburger G., et.al: physical characteristics of six new thermocyclers, *Clinical Chemistry* [Online] 2003, Vol.49, No.6, S. 960-963, <http://www.clinchem.org/content/49/6/960.full>, 08.06.2013
- Schöringhumer, K., Redl, G., Cichna-Markl, M.: 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* 2009, Vol.57, S.2126-2134
- Schubert-Ulrich, P., Rudolf, J., Ansari, P.: Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview, *Anal Bioanal Chem* 2009, Vol. 395, S.69–81
- Sharp, M., Lopata, A.: Fish allergy: in review, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* [Online] 2013, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12016-013-8363-1#>, 11.01.2013
- Sicherer, S.H., Burks, A.W., Sampson, H.A.: Clinical Features of Acute Allergic Reactions to Peanut and Tree Nuts in Children, *Pediatrics* 1998, Vol. 102, S.61–66
- SOP 752-01/06: “Validierung von Prüfverfahren”, Congen Biotechnologie GmbH, 2005
- Steinmüller, R: Hygiene Report, Das Forum für Qualitätssicherung in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie, Nürnberg, Dr.Harnisch Verlag, 2009
- Vieths, S., Holzhauser, T., Erdmann et.al: Neue Deklarationspflicht für Nahrungsmittelallergene in Lebensmitteln, *Allergo J* 2006, Vol.15, S.114-122, <http://www.aeda.de>
- Wellmitz, J., Gluschke, M.: Leitlinie zur Methodvalidierung im BLMP, Berlin, Januar, 2005, <http://www.umweltbundesamt.de>, 25.02.2012

Wensing, M., Penninks, A.H., Hefle, et.al: The Range of Minimum Provoking Doses in Hazelnut-Allergic Patients as Determined by Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenges. *Clinical and Experimental Allergy* [Online] 2002, Vol.32, S.1757–1762, <http://www.unboundmedicine.com>, 13.12.2012

Worm, M., Hompes, S.: Das deutschsprachige Anaphylaxie-Register-aktueller Stand und Perspektiven, *Bundesgesundheitsblatt* 2012, Springer, Vol. 55, S.380-384

Yman, I.M., Eriksson, A., Johansson, M.A. et.al: Food allergen detection with biosensor immunoassays, *JAOAC Int* [Online] 2006, Vol.89, Nr.3, S.856-861, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792086>

10 Anhang

Anhang 1: Anleitung zur DNA-Extraktion

SureFood® PREP Allergen (50 Extr.)

Art.-Nr. S1012

Version 2.1

Extraktionsprotokoll

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials

Von eher repräsentativen, homogenisierten Probe werden 100 mg* in ein 2,0 ml Tube eingewogen (nicht im Kit enthalten).

2. Lyse des Ausgangsmaterials

Zugabe von 1,0-1,5 ml* Lysé Buffer (**Code L**) und 40 µl Proteinase K (**Code K**) zu der Probe. Im Anschluss die Probe gut vermischen. Inkubation bei 65°C für 60 min unter kontinuierlichem Schütteln.

* Die Einwaage kann in Abhängigkeit von den Matriceigenschaften variiert werden. Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@ir-biopharm.de.

3. Vorfiltration und Einstellung optimaler Bindungsbedingungen

Zentrifugation des Lysates für 1 min bei 12.000 rpm.

Den flüssigen Überstand in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) überführen und erneut für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugieren.

Einen klaren Spin Filter (**Code F - clear, for pre-filtration**) in ein gelbes Receiver Tube (**Code R**) einsetzen. Max. 800 µl des flüssigen Überstands auf den Filter geben.

Hinweis: In Abhängigkeit von den Matriceigenschaften kann das Volumen nach der Filtration geringer ausfallen. In diesem Fall das erhaltene Volumen einsetzen.

Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Den verwendeten Spin Filter verwerfen.

4. Bindung der Nucleinsäuren an einen Spin Filter

500 µl des Binding Buffers (**Code B**) zu dem Filtrat geben und gut vermischen.

Einen gelben Spin Filter (**Code S - yellow, for binding**) in ein neues gelbes Receiver Tube (**Code R**) setzen.

650 µl dieses Probenextrakts auf den Filter geben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.

(Restliches Filtrat nicht verwerfen!). Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Den Spin Filter in ein neues gelbes Receiver Tube (**Code R**) setzen.

650 µl des Probenextrakts auf den Filter geben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Den Spin Filter in ein neues gelbes Receiver Tube (**Code R**) setzen.

5. Aufreinigung der gebundenen Nucleinsäuren

550 µl Pre-Wash Buffer (**Code P**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

6. Trocknen des Spin Filters

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm, um Ethanolreste von dem Spin Filter zu entfernen.

7. Elution der Nucleinsäuren vom Spin Filter

Den Spin Filter in ein klares 1,5 ml Receiver Tube (**Code T**) setzen.

Zugabe von 50 µl des erwärmten Elution Buffers (**Code E**).

Inkubation bei 65°C für 3 min in einem Heizblock/Thermomix (nicht schütteln).

Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Den Spin Filter anschließend verwerfen.

Die eluierten Nucleinsäuren können direkt in die PCR eingesetzt oder bis zu 24 Stunden bei 4°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten die Nucleinsäuren bei -20°C aufbewahrt werden.

Anhang 2: Spezifitätstest zum Multiplexsystem Haselnuss, Walnuss, Erdnuss

Detektionskanal	Versuch 1		Versuch 1 w/dh.		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5	
		C(t)		C(t)		C(t)		C(t)		C(t)		C(t)
FAM (465-510 nm)	RAD 3152 1:1 Erdnuss	-	RAD 3152 1:100 Erdnuss	22,16	RAD 3152 1:100 Erdnuss	21,24	RAD 3152 1:100 Erdnuss	22,48	RAD 3152 1:100 Erdnuss	21,89		
	RAD 3236 Nackthafer	25,18	RAD 3236 Nackthafer	31,24	RAD 3236 Nackthafer	29,29	RAD 3334 Nackthafer	28,95	D 8710102 Haferflocken D 91271 Haferflocken D 80088 Haferflocken D 67162 Haferflocken	-		
	RAD 1090 Macadamia	24,09	RAD 1090 Macadamia	30,33	RAD 3041 Macadamia	-		-				
	RTD 72 1:10 Rind	12,88	RTD 72 1:10 Rind	-		-		-				
	RAD 837 1:1 Walnuss	13,52	RAD 837 1:100 Walnuss	20,30	RAD 837 1:100 Walnuss	21,13	RAD 837 1:100 Walnuss	20,52	RAD 837 1:100 Walnuss	21,27		
	RAD 1415 Mähre	16,91	RAD 1415 Mähre	30,64	RAD 2379 Mähre	-		-				
	RAD 2375 Mandel	22,38	RAD 2375 Mandel	28,43	RAD 2376 Mandel	-		-				
	RAD 2493 Sellerie	23,32	RAD 2493 Sellerie	30,04	RAD 38 Sellerie	-		-				
	RAD 3316 Soja	-	RAD 3316 Soja	31,68	RAD 53 Soja	-		-				
	RAD 1976 Aprikosenkerne	27,52	RAD 1976 Aprikosenkerne	33,02	RAD 2052 Aprikose	27,94	RAD 2053 Aprikose RAD 2054 Kerne RAD 2381 Kerne	25,61 29,91 34,08	RAD 2383 Kerne RAD 2385 Kerne RAD 2387 Kerne	35,10	RAD 3570 Aprikosenkern, gewaschen RAD 3571 Aprikosenkern, gewaschen RAD 3572 Aprikosenkern, gewaschen RAD 3573 Aprikosenkern, gewaschen	
RTD 72 1:10 Rind	-	RTD 72 1:10 Rind	33,38		-		-					
RTD 283 Geflügel	-	RTD 283 Geflügel	33,40	RTD 284 Geflügel	-		-					
RAD 836 Pecannuss	30,84	RAD 836 Pecannuss	33,88	RAD 3488 Pecannuss	37,95		-					
RAD 2962 Sonnenblume	-	RAD 2962 Sonnenblume	-	RAD 2853 Sonnenblume	32,40	RAD 2963 Sonnenblume RAD 3361 Sonnenblume RAD 3362 Sonnenblume	-				RAD 3574 Sonnenblumenkern, gew. RAD 3575 Sonnenblumenkern, gew.	
RAD 472 Cashew	-	RAD 472 Cashew	-	RAD 3150 Cashew	28,32	RAD 1232 Cashew RAD 561 Cashew	29,47					

Anhang 3: Ergebnisse zur Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze

C_p-Werte der Kalibriergeraden für das Einzelsystem Erdnuss

Probennummer	Probenart	C _p -Werte für die Kalibriergerade						
		1	2	3	4	5	6	7
-	NTC	-	-	-	-	-	-	-
-	NTC	-	-	-	-	-	-	-
RAD 3691	0,4 ppm	-	-	-	-	-	-	-
RAD 3691	0,4 ppm	-	-	-	-	-	-	-
RAD 3688	4 ppm	27,17	28,62	28,89	28,06	28,11	28,58	28,52
RAD 3688	4 ppm	27,17	29,11	29,25	27,99	28,04	28,87	28,45
RAD 3686	40 ppm	24,23	26,36	26,42	25,19	25,25	26,03	25,86
RAD 3686	40 ppm	24,40	26,19	25,84	25,35	26,05	26,02	26,82
RAD 3696	400 ppm	21,37	23,10	23,00	22,42	22,38	23,28	23,02
RAD 3696	400 ppm	21,49	23,48	23,06	22,49	22,47	23,19	24,13

C_p-Werte der Kalibriergeraden für das Einzelsystem Walnuss

Probennummer	Probenart	C _p -Werte für die Kalibriergerade						
		1	2	3	4	5	6	7
-	NTC	-	-	-	-	-	-	-
-	NTC	-	-	-	-	-	-	-
RAD 3691	0,4 ppm	33,10	32,16	32,30	31,61	32,19	32,28	31,71
RAD 3691	0,4 ppm	32,31	31,94	31,77	31,91	31,95	31,95	32,15
RAD 3688	4 ppm	29,69	28,92	29,01	28,90	28,93	29,03	29,02
RAD 3688	4 ppm	29,44	28,89	28,85	28,82	28,87	29,09	29,05
RAD 3686	40 ppm	26,21	25,97	25,79	25,87	25,75	26,03	26,00
RAD 3686	40 ppm	26,24	25,80	25,76	25,79	25,49	26,05	25,89
RAD 3696	400 ppm	22,68	22,22	22,23	22,37	22,28	22,60	22,49
RAD 3696	400 ppm	22,64	22,27	22,26	22,29	22,29	22,59	23,66

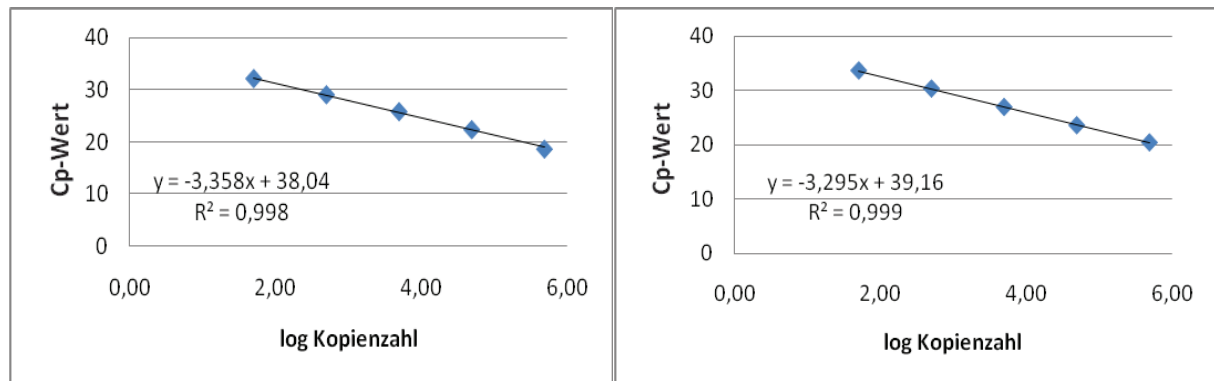
C_p-Werte der Kalibriergeraden für das Einzelsystem Haselnuss

Probennummer	Probenart	C _p -Werte für die Kalibriergerade						
		1	2	3	4	5	6	7
-	NTC	-	-	-	-	-	-	-
-	NTC	-	-	-	-	-	-	-
RAD 3691	0,4 ppm	30,69	31,73	32,44	31,61	31,83	31,71	31,73
RAD 3691	0,4 ppm	30,74	31,33	32,07	31,04	31,45	32,02	31,27
RAD 3688	4 ppm	28,00	28,44	28,44	28,20	28,05	28,16	28,07
RAD 3688	4 ppm	27,80	28,37	28,56	28,11	28,32	28,30	28,17
RAD 3686	40 ppm	25,68	26,51	26,55	25,99	25,91	26,27	26,09
RAD 3686	40 ppm	25,85	26,35	26,25	25,98	26,19	26,25	26,61
RAD 3696	400 ppm	22,21	23,09	23,30	23,14	22,97	23,21	22,93
RAD 3696	400 ppm	22,43	23,33	23,22	23,09	22,99	23,07	24,39

Anhang 4: Überprüfung des Multiplexkits an alle multiplexfähigen PCR-Geräten

Ergebnisse zur Überprüfung des Multiplexsystems am Mx 3005p

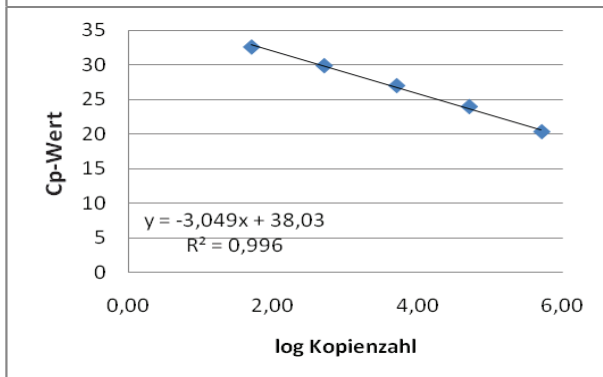
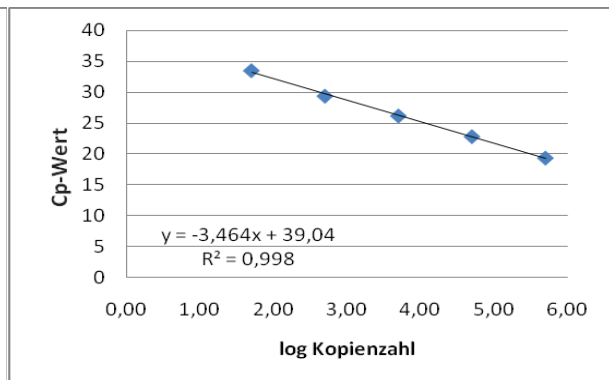
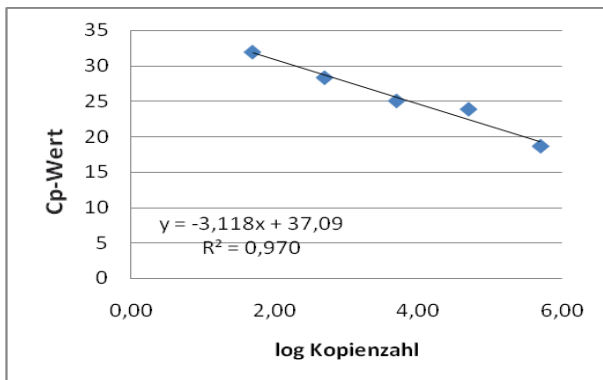
Probennummer	Probenart	C _p -Werte		
		FAM	ROX	Cy5
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	-	31,30	34,92
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	-	31,51	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	-	31,18	34,96
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,31	31,46	-
RAD 3578	Quantard 4 ppm	-	28,60	30,68
RAD 3578	Quantard 4 ppm	-	29,02	31,62
RAD 3563	Quantard 40 ppm	33,82	27,02	29,79
RAD 3563	Quantard 40 ppm	28,51	26,67	29,19
RAD 3381	Quantard 40 ppm	34,00	25,70	28,17
RAD 3381	Quantard 40 ppm	27,75	25,82	28,42
RAD 3560	Quantard 400 ppm	26,67	22,25	25,22
RAD 3560	Quantard 400 ppm	24,63	22,32	25,11
RAD 3152	Erdnuss 1:100	28,23	-	-
RAD 837	Walnuss 1:100	-	21,23	-
RAD 930	Haselnuss 1:100	-	-	22,65
AC 557 St.0	Standard 0 Erdnuss	-	35,00	-
AC 557 St.1	Standard 1 Erdnuss	-	32,14	33,60
AC 557 St.2	Standard 2 Erdnuss	33,38	29,06	30,29
AC 557 St.3	Standard 3 Erdnuss	27,27	25,84	26,94
AC 557 St.4	Standard 4 Erdnuss	21,81	22,40	23,60
AC 557 St.5	Standard 5 Erdnuss	18,18	18,68	20,47



Standardkurve zum Walnuss-System (links) und Haselnuss-System (rechts) am Mx 3005p

Ergebnisse zur Überprüfung des Multiplexsystems am CFX

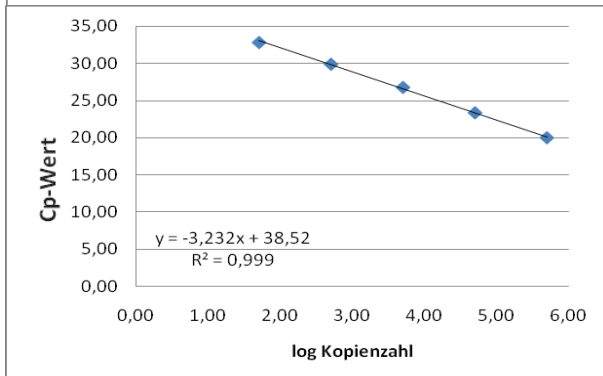
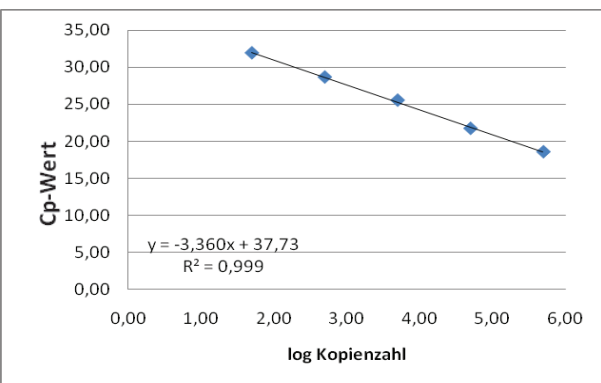
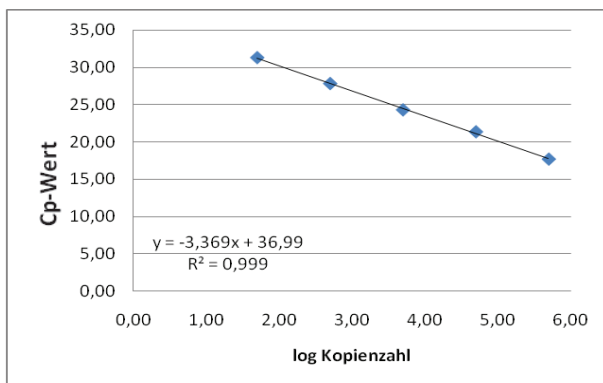
Probennummer	Probenart	C _p -Werte		
		FAM	ROX	Cy5
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,60	31,58	32,03
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,89	31,37	31,96
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	35,49	31,95	32,31
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,03	31,75	32,12
RAD 3578	Quantard 4 ppm	29,85	28,86	29,05
RAD 3578	Quantard 4 ppm	31,38	28,75	30,14
RAD 3563	Quantard 40 ppm	28,18	26,81	27,56
RAD 3563	Quantard 40 ppm	28,00	26,78	27,53
RAD 3381	Quantard 40 ppm	27,13	25,81	26,69
RAD 3381	Quantard 40 ppm	27,20	25,87	26,88
RAD 3560	Quantard 400 ppm	24,07	22,44	23,68
RAD 3560	Quantard 400 ppm	24,77	22,91	24,58
RAD 3152	Erdnuss 1:100	22,11	-	-
RAD 837	Walnuss 1:100	-	20,48	-
RAD 930	Haselnuss 1:100	-	-	20,70
AC 557 St.0	Standard 0 Erdnuss	-	-	-
AC 557 St.1	Standard 1 Erdnuss	31,96	33,44	32,60
AC 557 St.2	Standard 2 Erdnuss	28,34	29,35	29,89
AC 557 St.3	Standard 3 Erdnuss	25,04	26,16	27,00
AC 557 St.4	Standard 4 Erdnuss	23,86	22,83	23,96
AC 557 St.5	Standard 5 Erdnuss	18,61	19,38	20,32



Standardkurve zum Erdnuss-System (links oben), Walnuss-System (rechts oben) und Haselnuss-System (rechts unten) am CFX

Ergebnisse zur Überprüfung des Multiplexsystems am ABI 7500

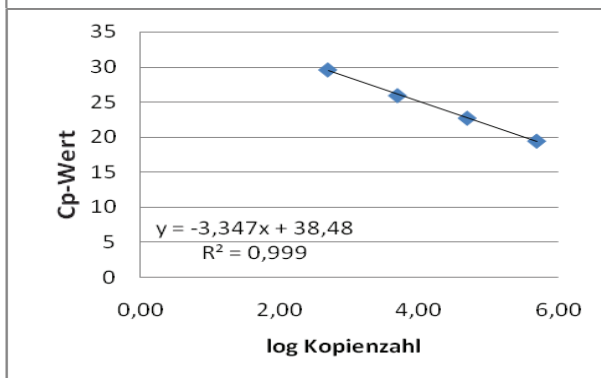
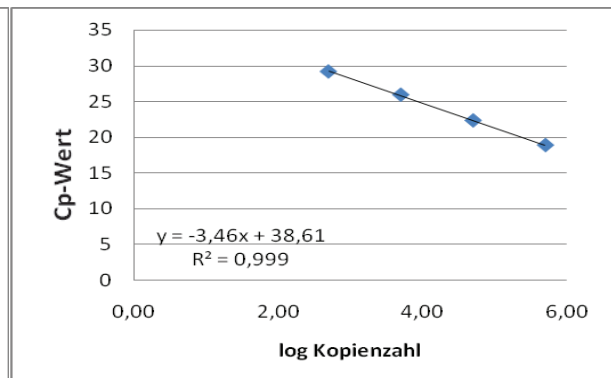
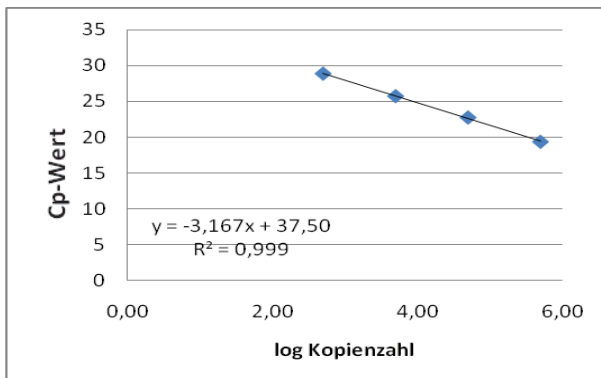
Probennummer	Probenart	C _p -Werte		
		FAM	ROX	Cy5
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	31,01	30,90	32,61
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	31,46	31,09	32,83
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,69	32,46	34,29
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,14	31,28	32,84
RAD 3578	Quantard 4 ppm	29,69	28,51	29,46
RAD 3578	Quantard 4 ppm	29,71	28,43	29,64
RAD 3563	Quantard 40 ppm	27,64	26,40	27,54
RAD 3563	Quantard 40 ppm	27,46	26,51	27,47
RAD 3381	Quantard 40 ppm	25,91	25,40	25,99
RAD 3381	Quantard 40 ppm	26,18	25,34	26,45
RAD 3560	Quantard 400 ppm	22,89	21,71	23,16
RAD 3560	Quantard 400 ppm	22,37	21,63	22,62
RAD 3152	Erdnuss 1:100	21,76	-	-
RAD 837	Walnuss 1:100	-	19,98	-
RAD 930	Haselnuss 1:100	-	-	20,94
AC 557 St.0	Standard 0 Erdnuss	33,38	-	-
AC 557 St.1	Standard 1 Erdnuss	31,34	31,94	32,85
AC 557 St.2	Standard 2 Erdnuss	27,86	28,68	29,91
AC 557 St.3	Standard 3 Erdnuss	24,33	25,56	26,78
AC 557 St.4	Standard 4 Erdnuss	21,39	21,77	23,35
AC 557 St.5	Standard 5 Erdnuss	17,72	18,60	19,97



Standardkurve zum Erdnuss-System (links oben), Walnuss-System (rechts oben) und Haselnuss-System (rechts unten) am ABI 7500

Ergebnisse zur Überprüfung des Multiplexsystems am LC 480

Probennummer	Probenart	C _p -Werte		
		FAM	ROX	Cy5
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
-	NTC	-	-	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	28,98	31,21	32,94
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	28,88	31,37	33,00
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	29,02	30,76	32,19
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	29,18	30,98	32,36
RAD 3578	Quantard 4 ppm	27,92	28,82	28,80
RAD 3578	Quantard 4 ppm	28,03	28,70	29,00
RAD 3563	Quantard 40 ppm	26,72	26,79	27,68
RAD 3563	Quantard 40 ppm	26,77	26,62	27,57
RAD 3381	Quantard 40 ppm	25,82	25,82	26,71
RAD 3381	Quantard 40 ppm	25,83	25,73	26,77
RAD 3560	Quantard 400 ppm	22,71	22,23	23,50
RAD 3560	Quantard 400 ppm	22,88	22,37	23,59
RAD 3152	Erdnuss 1:100	23,51	-	-
RAD 837	Walnuss 1:100	-	20,50	-
RAD 930	Haselnuss 1:100	-	-	19,75
AC 557 St.0	Standard 0 Erdnuss	-	34,82	34,50
AC 557 St.1	Standard 1 Erdnuss	31,15	32,58	32,52
AC 557 St.2	Standard 2 Erdnuss	28,92	29,20	29,57
AC 557 St.3	Standard 3 Erdnuss	25,76	25,94	25,93
AC 557 St.4	Standard 4 Erdnuss	22,77	22,33	22,73
AC 557 St.5	Standard 5 Erdnuss	19,36	18,87	19,48



Standardkurve zum Erdnuss-System (links oben), Walnuss-System (rechts oben) und Haselnuss-System (rechts unten) am LC 480

Anhang 5: Vergleich der Einzelsysteme mit dem Multiplexsystem

Ergebnisse zur Kitüberprüfung am CFX

Probennummer	Probenart	C _p -Werte					
		FAM	\bar{x}	ROX	\bar{x}	Cy5	\bar{x}
-	NTC	-	-	-	-	-	-
-	NTC	-	-	-	-	-	-
-	NTC	-	-	-	-	-	-
-	NTC	-	-	-	-	-	-
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,60	32,75	31,58	31,48	32,03	32,02
RAD 3576	Quantard 0,4 ppm	32,89		31,37		31,96	
RAD 3578	Quantard 4 ppm	29,85	30,62	28,86	28,81	29,05	29,60
RAD 3578	Quantard 4 ppm	31,38		28,75		30,14	
RAD 3563	Quantard 40 ppm	28,18	28,09	26,81	26,80	27,56	27,55
RAD 3563	Quantard 40 ppm	28,00		26,78		27,53	
RAD 3560	Quantard 400 ppm	24,07	24,42	22,44	22,68	23,68	24,13
RAD 3560	Quantard 400 ppm	24,77		22,91		24,58	
AC 550 St.1	Standard 1 Haselnuss	31,96	-	33,44	-	32,60	-
AC 550 St.2	Standard 2 Haselnuss	28,34	-	29,35	-	29,89	-
AC 550 St.3	Standard 3 Haselnuss	25,04	-	26,16	-	27,00	-
AC 550 St.4	Standard 4 Haselnuss	23,86	-	22,83	-	23,96	-
AC 550 St.5	Standard 5 Haselnuss	18,61	-	19,38	-	20,32	-

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift