Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich: Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang: Lebensmitteltechnologie

Wintersemester 2019/2020

Entwicklung und Validierung von Primersystemen zur Authentifizierung von Mollusca als potentiell allergene Zutat

Bachelorarbeit

Verfasser: Anna-Lena Splinter

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

Dr. Jutta Zagon

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2020-0107-8

Abgabedatum: 20.02.2020

Abstract

About 4% of the population suffer from food allergies. Often small amounts of a foodstuff are enough to trigger symptoms. Depending on age and trigger, the allergy progresses very differently. In the case of a food allergy, the immune system reacts to actually harmless proteins as if they were foreign bodies. Symptoms such as itching and swelling of the mucous membranes of the mouth and throat, gastrointestinal complaints and even anaphylactic reactions can occur. Molluscs were included in the list of allergens subject to declaration in 2007. The declaration of allergens is laid down in Regulation (EU) No. 178/2002 and is mandatory for all EU member states.

One detection method for allergens is the PCR (polymerase chain reaction) method. PCR is a DNA-based analysis method in which specific DNA sequences are duplicated and analysed. It is characterized by high specificity, sensitivity and robustness. A primer pair is required, which consists of a forward primer and a reverse primer. Primers are short sequences, 20-50 bases, which mark the starting point for the polymerase and are produced synthetically. For the development of these primer pairs, DNA sequences from the animal species Helix pomatia (Roman snail) are first searched for in the gene database of NCBI. The online software Primer3Plus is then used to develop a primer pair. The DNA sequence to be amplified is matched with the NCBI gene database. If it is specific for the animal species or strain, the primer pair is tested for functionality and optimal annealing temperature using the endpoint PCR method. The optimal forward and reverse primer concentration, specificity, lower detection limit (LOD) and efficiency are determined by the real-time PCR method. Finally, the developed primer system is tested in a realistic product.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **5**

1 Einleitung **8**

2 Stand der Wissenschaft und Technik **9**

2.1 DNA 9

2.2 Allergische Reaktion 10

2.3 Nachweismethoden für Allergene 12

2.4 Rechtliche Bestimmungen bezüglich Nahrungsmittelallergenen 15

2.5 Mollusken 18

2.5.1 Wirtschaftliche Bedeutung von Mollusken in der menschlichen Ernährung 18

2.5.2 Molluskenallergene und Kreuzreaktionen 19

3 Material und Methoden **20**

3.1 Versuchsplanung, Projektübersicht 20

3.2 Versuchsdurchführung 21

3.2.1 DNA Extraktion 21

3.2.1.1 Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)- Methode 21

3.2.1.2 NucleoSpin® Food Kit-Methode 22

3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration 23

3.2.2 Primerdesign 25

3.2.3 Optimierung der Annealing-Temperatur mittels Endpunkt-PCR 26

3.2.4 Real-Time-PCR 29

3.2.4.1 Optimierung der Forward- und Reverseprimerkonzentration 29

3.2.4.2 Spezifitätstest 30

3.2.4.3 Bestimmung des Limit of detection und der Effizienz 34

4 Ergebnisse **35**

4.1 DNA Extraktion 35

4.2 Primerdesign 35

4.3 PCR Ergebnisse 39

4.3.1 Optimierung der Annealingtemperatur mittels Endpunkt PCR 39

4.3.2 Real-Time-PCR 42

4.3.2.1 Optimierung der Forward- und Reverseprimerkonzentration 42

4.3.2.2 Spezifitätstest 44

4.3.2.3 Bestimmung des Limit of detection und der Effizienz 50

5 Diskussion 55

6 Zusammenfassung 60

7 Literatur 62

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 68

9 Anlagen 70

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin
AK	Arbeitskontrolle
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
C	Cytosin
ca.	circa
CT	Cycle Threshold
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
G	Guanin
g	Erdschwerebeschleunigung
h	Stunden
H2O	Wasser
IgE	Immunglobulin E
IQWiG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen

Lambert Beer´sches Gesetz: $E=\varepsilon \cdot d \cdot c$

E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
d	Schichtdicke
c	Konzentration
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LMKV	Lebensmittelkennzeichnungsverordnung
LMIDV	Lebensmittelinformations-Durchführungsverordnung
LMIV	Lebensmittelinformations-Verordnung
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTC	Non Template Control (Negativkontrolle)
PCR	Polymerasekettenreaktion
ppm	parts per million
ROX	5-Carboxy-Rhodamin-X
T	Thymin

TBE	TRIS-Borat-EDTA
Tm	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
UV	Ultraviolettstrahlung
WHO	World Health Organization
UV-VIS	Ultraviolettstrahlung- Visible (sichtbar)

1 Einleitung

An einer Nahrungsmittelallergie leiden etwa 4% der Bevölkerung. Um Beschwerden auszulösen, reichen schon kleine Mengen eines Lebensmittels, welches das Allergen enthält, aus. Je nach Alter und Auslöser verläuft die Allergie sehr unterschiedlich. Bei einer Nahrungsmittelallergie reagiert das Immunsystem auf eigentlich harmlose Eiweiße, als wären sie Fremdkörper. Dabei können Symptome wie Juckreiz und Schwellungen der Mund- und Rachenschleimhaut, Magen-Darm-Beschwerden und sogar anaphylaktische Reaktionen auftreten. (IQWiG, 2017)
Da diese Beschwerden die Lebensqualität eines Menschen, welcher an einer Lebensmittelallergie leidet, dramatisch einschränken können, besteht in Deutschland eine Kennzeichnungspflicht. Diese Pflicht besteht in allen europäischen Mitgliedsländern seit dem Dezember 2014 und gilt für verpackte und unverpackte Lebensmittel. Dieses wird in der europäischen Lebensmittelinformationsverordnung vorgeschrieben. Insgesamt gibt es zurzeit 14 Zutaten, welche als Allergen gekennzeichnet werden müssen. Diese sind glutenhaltige Getreide (namentlich Weizen, Roggen, Gerste, Hafer oder deren Hybridstämme), Krebstiere (wie Krebse, Garnelen, Krabben, Hummer), Eier, Fische, Erdnüsse, Soja, Milch (einschließlich Laktose), Schalenfrüchte (namentlich Mandeln, Haselnüsse, Walnüsse, Kaschunüsse, Pecannüsse, Paranüsse, Pistazien, Macadamianüsse, Queenslandnüsse), Sellerie, Senf, Sesamsamen, Schwefeldioxid und Sulfite (ab 10 mg pro kg oder l), Süßlupinen und Weichtiere (zum Beispiel Schnecken, Muscheln, Tintenfisch etc.).

Erst kürzlich wurden Weichtiere und Weichtiererzeugnisse in die Liste der kennzeichnungspflichtigen Allergene aufgenommen. Daher gibt es bisher keine publizierte Methode zum Nachweis dieser.
Das Ziel dieser Bachelorarbeit ist daher, die Entwicklung und Validierung von Primersystemen zur Authentifizierung von Mollusca. Damit soll später ein Real-Time PCR-Verfahren entwickelt werden, um mögliche Molluskenallergene in verarbeiteten Lebensmitteln nachzuweisen und somit den Verbraucher durch eine richtige Deklaration zu schützen. Dafür werden, mit Hilfe von online DNA-Datenbanken, spezifische DNA-Abschnitte ermittelt und auf diese ein Primerpaar entwickelt. Diese werden dann in der Endpunkt PCR-Methode getestet und in der Real-Time PCR-Methode optimiert und validiert.
Ziel ist es mindesten, ein Primerpaar, welches möglichst viele Arten detektiert, zu entwickeln und in der Real-Time-PCR-Methode zu validieren.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 DNA

Alle Eukaryoten besitzen einen Zellkern, in welchem sich die DNA (Desoxyribonukleinsäure) befindet. Die DNA bildet in ihrem natürlichen Zustand eine Doppelhelix. Diese besteht aus zwei Nukleotidsträngen, welche antiparallel zueinander verlaufen und über Wasserstoffbrücken nichtkovalent miteinander verbunden sind. Die Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich zwischen Adenin (A) und Thymin (T), sowie Guanin (G) und Cytosin (C). Diese werden als komplementäre Basen bezeichnet. Verknüpft ist jede Base mit einer Desoxyribose, einem Zuckermolekül, welche miteinander über Phosphatgruppen verbunden sind. Ein Nukleotid, ein DNA-Grundbaustein, besteht also aus einer Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe. Die Enden der DNA-Stränge werden als 5' und 3'- Enden bezeichnet. Dabei ist das freie Phosphatende das 5' und das freie Hydroxylende das 3'- Ende. Die Anzahl der Basenpaare (bp) oder Nukleotide (nt) sind ein Maß für die Länge eines DNA-Abschnittes (lecturio), (Alphey, L., 1998), (Biologie-Schule).

Die DNA wird außerdem als genetischer Fingerabdruck bezeichnet, das heißt, jede Spezies hat spezifische DNA Abschnitte durch welche sie detektierbar sind. Dieses kann unter anderem durch eine PCR erfolgen (Bayerischer Rundfunk).

2.2 Allergische Reaktion

In Deutschland leiden 20-30 Millionen Menschen an einer Allergie. In ganz Europa sind es sogar in etwa 60 Millionen Menschen und die Tendenz ist steigend. Die WHO geht davon aus, dass Allergien eine ernst zu nehmende Gesundheitsgefährdung, mit nahezu pandemischen Ausmaßen, werden können. Mediziner haben bereits mehr als 20000 Allergene entdeckt, weshalb aufwendige Tests nötig sind, um jene Allergene zu finden, die bei einer Person zu den Beschwerden führen. Leidet man unter einer Allergie, so reagiert das körpereigene Immunsystem überempfindlich auf körperfremde Substanzen (Allergene), welche eigentlich harmlos sind. Die Beschwerden können in sehr unterschiedlicher Intensität auftreten. Manchmal sind diese nur leicht, jedoch können sie auch sehr belastend sein und das Alltagsleben eines Menschen stark einschränken. Im schlimmsten Fall kann eine starke allergische Reaktion lebensbedrohlich werden. Häufig kommt es an den Atemwegen, der Haut und den Schleimhäuten zu einer allergischen Reaktion, welche meistens sofort auftritt. Bei einer allergische Reaktion reagieren die Körperstellen, die unmittelbaren Kontakt zum Allergieauslöser haben. Die Entwicklung und der Ablauf einer allergischen Reaktion ist in der Abbildung 1 dargestellt. Beim ersten Kontakt mit einem Allergen produzieren die Zellen des Immunsystems gegen diese, eigentlich harmlosen Fremdeiweiße, Antikörper des Immunglobulin-E-Types (IgE). Diese Antikörper binden sich an Mastzellen, welche sich dort ansiedeln, wo häufig Kontakt mit Allergenen besteht. Der ganze Vorgang wird als Sensibilisierung bezeichnet. Kommt es nun zu einem erneuten Kontakt mit diesem Allergen, so setzen die Mastzellen chemische Stoffe frei. Darunter das Gewebshormon Histamin und andere Entzündungsbotenstoffe. Durch diese Stoffe weiten sich schlagartig die Gefäße und weitere allergische Reaktionen werden ausgelöst. Durch das schlagartige Weiten der Gefäße sinkt der Blutdruck plötzlich und der Kreislauf kann zusammenbrechen. Dadurch können lebenswichtige Organe nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Hierbei spricht man von einem anaphylaktischen Schock (IQWiG, 2017), (Burchard, H. J., 2019), (Zuberbier, T., 2019).

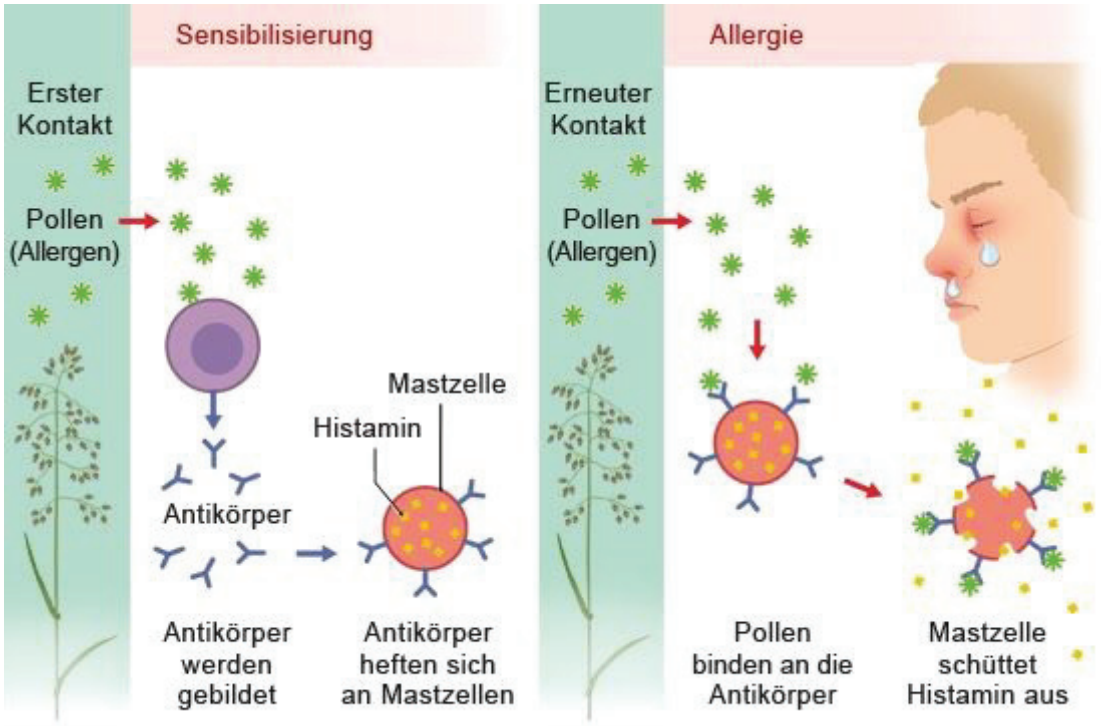

Abbildung 1: Darstellung der Entwicklung und des Ablaufes einer allergischen Reaktion (IQWiG, 2017)

2.3 Nachweismethoden für Allergene

Schon kleinste Mengen von einem Allergen reichen aus um Beschwerden bei einer Person, die unter einer Allergie leidet, auszulösen. Um diese Personen zu schützen ist es, unter anderem in der Lebensmittelindustrie, wichtig und auch verpflichtend, Allergene in der Zutatenliste zu deklarieren.

Um die richtige Deklaration zu gewährleisten und zu kontrollieren gibt es mehrere Methoden allergene Zutaten zu ermitteln. Die Methoden hierfür müssen hochspezifisch sein, da eventuell zwischen phylogenetisch engen Verwandten differenziert werden muss. Zudem sollten die Nachweisgrenzen in etwa im niedrigen ppm-Bereich liegen, sodass bei empfindlichen Allergikern gerade noch eine Reaktion ausgelöst werden kann (Hupfer, C.; Busch, U.).

Die verschiedenen Methoden der Allergenanalytik lassen sich in Protein-basierte und DNA-basierte Methoden einteilen. Eine Protein-basierte Methode ist der quantitative ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)-Test. Dieser beruht dabei auf die Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein Antigen, welches ein Protein oder eine Proteinfraktion eines allergenen Lebensmittels sein kann. Der experimentelle Aufbau ist, je nach Art des ELISA-Tests, unterschiedlich. Dabei ist die einfachste Version die Fixierung des zu untersuchenden Antigens auf einer festen Oberfläche. Dabei wird diese Immobilisierung auf einer 96- oder 384-Well-Platte durchgeführt, welche die Proteine passiv bindet. Mit Hilfe einer Konjugation an ein Enzym wird der geeignete Antikörper vorbereitet. Dieses wird zur Probe hinzugegeben und somit wird dem Antikörper die Bindung des Antigens ermöglicht. Durch nachfolgende Waschschritte kann Material, welches unspezifisch an das Antigen gebunden ist, entfernt werden. Als Letztes wird dem Gemisch ein Substrat für das Enzym hinzugegeben, sodass eine enzymatische Reaktion, zwischen dem in der Lösung vorliegenden Substrat und dem an den Antikörper gekoppelten Enzym, stattfinden kann.

Dadurch wird ein Farbwechsel, eine Fluoreszenz oder Lumineszenz, die zum Bestimmen der Menge an Zielanalyt in der jeweiligen Probe dienen, genutzt (Cell Signaling Technology), (Hupfer, C.; Busch, U.).

Eine weitere protein-basierende Methode ist die MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry, Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie), welche auf dem Prinzip der Massenspektroskopie beruht. Dieses massenspektrometrische Verfahren bietet wesentliche

Vorteile, wie zum Beispiel sehr kurze Analysenzeiten, einfache Bedienung und Automatisierbarkeit, sowie hohe Empfindlichkeit und Präzision.

Hierfür werden zuerst die Peptide chromatographisch abgetrennt. Dieses kann durch eine Flüssigkeitschromatographie oder eine Kapillarelektrophorese erfolgen. Für die Analyse wird ein Analyt, zusammen mit einer im 103- bis 105-fachen molaren Überschuss vorliegenden Matrix, auf einen zumeist metallischen Probenträger, in flüssiger Form, aufgebracht und getrocknet. Die kristalline Oberfläche wird im Hochvakuum der Ionenquelle kurzen Laserpulsen ausgesetzt, deren Energie durch die entsprechende Matrix absorbiert wird. Die explosionsartige Ablösung von Clustern der Kristalloberfläche und die Ionisation der Analyt- und der Matrixmoleküle erfolgt nach der Relaxation im Kristallgitter. Dabei entstehen meist einfach geladene Molekül-Ionen. In einem starken elektrischen Feld werden die Ionen beschleunigt. Dadurch kann im Vakuum die Flugzeit der Analyten bestimmt werden. Diese wird durch die Masse und den Ionisierungsgrad der Proteine beeinflusst. Es lassen sich die unterschiedlichen Massen der einzelnen Analyten bestimmen und als Gesamtspektrum darstellen. Im System ist eine Referenzdatenbank integriert, mit welcher die ermittelten Spektren verglichen werden. Dank neuer Algorithmen kann der Software-basierte Abgleich automatisiert und ohne Zeitverlust erfolgen. Da in diesen Datenbanken bis jetzt noch wenige Informationen über Allergeneproteine vorliegen, ist diese Methode erst noch in der Entwicklung für den Nachweis von Proteinen. Zudem ist es für die Überprüfung, ob sich in einem Lebensmittel ein Allergen befindet, nebensächlich welches Protein es genau ist (Bibliothek Uni-Halle), (Platthaus, 2003), (Lauer, F.; Diehn, S.; Seifert, S.; Kneipp, J.; Sauerland, V.; Barahona, C.; Weidner, S., 2018).

Eine DNA-basierte Analysemethode ist die PCR (Polymerasekettenreaktion)- Methode. Bei dieser werden spezifische DNA-Sequenzen dupliziert und analysiert. Sie zeichnet sich durch hohe Spezifität, Sensitivität und Robustheit aus (R-Biopharm). Man unterscheidet zwischen zwei Methoden, die klassische Endpunkt-PCR und die Real-Time-PCR. Bei beiden Methoden laufen dieselben Schritte, welche als Zyklen bezeichnet werden, für die DNA Vervielfältigung ab. Als Erstes wird die isolierte DNA mit verschiedenen Reagenzien, welche Nukleotide, eine ganz bestimmte Polymerase und spezifische Primer enthalten, versetzt. Primer sind kurze Sequenzen , 20-50 Basen, welche den Startpunkt für die Polymerase markieren und synthetisch hergestellt werden. Man benötigt zwei Startmoleküle, einen Forward-Primer und einen Reverse-Primer. Am Anfang der spezifischen Sequenz, des 3’→5’ DNA-Stranges, lagert sich der Forward-Primer an. Dieser wird mit Hilfe der DNA-Polymerase in die 5’→3’ Richtung verlängert. Die

Synthese-Richtung 5'→3' bezieht sich auf die Orientierung eines neu entstandenen DNA-Fragmentes. Im Gegensatz dazu lagert sich der Reverse-Primer gleichzeitig am Ende der spezifischen Sequenz des 5'→3' DNA-Stranges an und wird dort, mittels der DNA-Polymerase, in der 5'→3' Richtung verlängert (Ableitner, O., 2018).

Da die PCR eine thermozyklische Reaktion ist, laufen währenddessen mehrere Zyklen, mit sich immer wiederholenden thermischen Bedingungen, ab. In jedem Zyklus wiederholen sich die Reaktionsschritte Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Primer-Anlagerung (Annealing) und Primer-Verlängerung (Elongation) (Biologie-Schule).

Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf 94°C-96°C erhitzt. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und die DNA-Doppelstränge in zwei komplementäre Einzelstränge getrennt. Die DNA wird im ersten Zyklus oft für längere Zeit erhitzt (Initialisierung), damit sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben. Mittels einer längeren anfänglichen Erhitzungsphase müssen manche Polymerasen aktiviert werden. Um danach eine Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern, wird schnell heruntergekühlt. Als Nächstes erfolgt der Primer-Anlagerungs-Schritt (Annealing). Während diesem Schritt lagern sich der Forward- und der Reverse-Primer an die jeweils dazugehörigen Ziel-Sequenzen an. Dabei sind die Basen in den Primern und die der Zielsequenzen komplementär zueinander. Befindet sich keine Ziel-Sequenz auf einem DNA-Strang, so können sich die Primer nicht anlagern und es entstehen keine PCR-Produkte. Jedes Primerpaar benötigt eine optimale Temperatur, welche meistens zwischen 52°C und 65°C liegt. Wählt man eine zu niedrige Temperatur, so können sich die Primer unter Umständen auch an nicht 100%ig komplementäre Sequenzen anlagern und so zu unspezifischen Produkten („Geisterbanden") führen. Bei einer zu hohen Temperatur ist die thermische Bewegung der Primer möglicherweise so groß, dass sie sich nicht richtig anheften können und es somit zu gar keiner oder nur ineffizienten Produktbildungen kommt. Als Letztes folgt der Elongationsschritt (Verlängerung). Bei diesem verlängert die Polymerase den Primer mit Hilfe der in der Lösung vorliegenden Nukleotiden (dNTPs). Dadurch bildet sich das zweite komplementäre DNA-Fragment. Die Synthese-Richtung des DNA-Stranges ist immer vom 5'-Ende zum 3'-Ende. Die entstandenen DNA-Fragmente sind komplementär zueinander. Bei der Real-Time-PCR erfolgen diese Schritte in einem Gerät, welches einen Thermocycler und einen Fluoreszenz-Analysator kombiniert. Dem DNA-Gemisch wird ein zunächst inaktiver Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, welcher durch den Beginn der DNA-Vervielfältigung aktiv

wird. Ein Beispiel für einen solchen Farbstoff ist SYBR Green, welcher sich in die DNA einlagert. Bei jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen, welches in Echtzeit geschieht. Aus diesen Messungen lässt sich auf die Menge der amplifizierten DNA schließen. Zudem lässt sich anhand der Schmelzkurve erkennen, ob die verwendete DNA einen entsprechenden Reinheitsgrad besitzt und ob die Primer wirklich nur auf die gewünschte DNA-Sequenz reagieren (Biologie-Seite), (McLennan, A.; Bates, A.; Turner, P., 2013),(Pflanzenforschung).

Bei der Endpunkt-PCR, der klassischen PCR, erfolgen diese Schritte in einem Thermocycler. Die Maschine erhitzt und kühlt, die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße, auf die spezifischen Temperaturen der einzelnen Schritte. Die nun in Vielzahl entstandenen Kopien sind mit dem bloßen Auge nicht sichtbar. Daher schließt sich nun die Gelelektrophorese an. Hierbei wird ein Teil aus den Reaktionsgefäßen entnommen, in welchem sich die Kopien befinden, und mit Hilfe von beispielsweise Bromphenolblau eingefärbt. Dieses wird nun in die Taschen eines Agarosegels hinein pipettiert und anschließend eine elektrische Spannung an das Gel gelegt. Zudem wurde eine DNA-Leiter für die spätere Auswertung in eine der Taschen pipettiert. Da die isolierte DNA negativ geladen ist, versucht sie nun zum positiven Pol zu gelangen. Das Agarosegel ist gelatineartig und es kann sich als engmaschiges Netz vorgestellt werden, durch welches die DNA-Stücke hindurch gelangen müssen. Je kleiner die Stücke sind, desto leichter und schneller kommen sie voran. Nach ca. einer Stunde Laufzeit kann man das Ergebnis unter UV-Licht sichtbar machen. Durch den zugesetzten Farbstoff erkennt man auf dem Agarosegel eine Bande. Mit Hilfe der DNA-Leiter lässt sich nun die ungefähre Länge der DNA-Sequenz ablesen, um somit zu beurteilen, ob man die gewünschte Sequenz vervielfältigt hat (Newton, C.R.; Graham, A., 1994), (MVZ Labor Ravensburg).

2.4 Rechtliche Bestimmungen bezüglich Nahrungsmittelallergenen

Seitdem die Verordnung (EU) Nr. 178/2002 etabliert wurde, herrscht europaweit ein einheitliches Lebensmittelrechtssystem. Durch diese Verordnung wurden auch die Funktionen und die Einrichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit geregelt. Daher ist das Zusammenarbeiten dieser europäischen Behörde mit nationalen Behörden, um die Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten, geebnet. Hauptziele dieser Verordnung sind der Schutz der Verbraucherinteressen sowie die Wahrung und Sicherung der Gesundheit und des menschlichen Lebens. Diese Verordnung (EU) Nr. 178/2002 wurde auf nationaler Ebene seit

2005 im Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) umgesetzt.

In Deutschland wurden die rechtlichen Grundlagen der Kennzeichnung von Zutaten und der Etikettierung von Lebensmitteln in der Lebensmittelkennzeichnungsverordnung (LMKV) vorgeschrieben. Diese Verordnung wurde am 13. Dezember 2014 durch die Lebensmittel-Informationsverordnung (LMIV) ersetzt. Die LMIV schreibt eine Allergenkennzeichnungpflicht von verpackten und unverpackten Lebensmitteln, in allen europäischen Mitgliedsländern, verpflichtend vor. Außerdem regelt sie auch EU-weit einheitlich, wie Allergene auf dem Etikett verpackter Lebensmittel angegeben werden müssen. Bei loser Ware dürfen die Nationalstaaten die Art und Weise der Allergeninformation individuell regeln. Dieses hat Deutschland mit der Lebensmittelinformations-Durchführungs-Verordnung (LMIDV) getan. Zudem wird mit der LMIDV geregelt, welche Sanktionen die amtliche Überwachung verhängen darf, wenn gegen diese Informationspflichten verstoßen wird. Die Kennzeichnung der Allergene können bei verpackten Waren auf dem Etikett an verschiedenen Stellen stehen. Im Zutatenverzeichnis müssen die derzeit insgesamt 14 Allergene gekennzeichnet werden. Dieses muss durch einen speziellen Schriftsatz hervorgehoben werden, beispielsweise durch Fettdruck oder Unterstreichung. Lebensmittel die keine Zutatenliste besitzen, wie zum Beispiel Wein, müssen einen zusätzlichen Hinweis besitzen, etwa "enthält Schwefel".

Die 14 kennzeichnungspflichtigen Allergene sind:

- Glutenhaltige Getreide, namentlich Weizen (wie Dinkel und Khorasan-Weizen), Roggen, Gerste, Hafer oder deren Hybridstämme
- Krebstiere wie Krebse, Garnelen, Krabben, Hummer etc.
- Eier
- Fisch
- Erdnüsse
- Soja
- Milch (einschließlich Laktose)

- Schalenfrüchte, namentlich Mandeln, Haselnüsse, Walnüsse, Kaschunüsse, Pecannüsse, Paranüsse, Pistazien, Macadamianüsse, Queenslandnüsse
- Sellerie
- Senf
- Sesamsamen
- Schwefeldioxid und Sulfite (ab 10 mg pro kg oder l)
- Süßlupinen
- Weichtiere (zum Beispiel Schnecken, Muscheln, Tintenfisch etc.)

(Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft)

Während der industriellen Verarbeitung können einige Zutaten so stark verändert werden, dass sie ihr allergenes Potential verlieren. Diese sind dann von der Kennzeichnungspflicht befreit. Unter anderem gehört Glukosesirup aus Weizenstärke oder Schalenfrüchte (z.B. Nüsse) für Destillate von Spirituosen dazu.

Bei unverpackten Lebensmitteln, wie zum Beispiel in Restaurants und Bäckereien, müssen schriftliche Informationen über Allergene, vor dem Kaufabschluss, in deutscher Sprache zugänglich sein (Lämmel,S.; Maschkowski G., 2017).
Diese Allergenkennzeichnung der Lebensmittel erleichtert den Alltag eines Allergikers. Vor allem bei Fertiggerichten können Verbraucher nun durch eine Blick auf die Zutatenliste schließen, welche Zutaten tatsächlich verwendet wurden. Jedoch ist der unerwünschte und unbeabsichtigte Eintrag von Allergenen in das Endprodukt nicht geregelt. Dadurch, dass in großen Produktionshallen mehrere Produkte teilweise gleichzeitig produziert werden oder aber verschiedene Produkte auf der gleichen Linie laufen, ist es nicht möglich Verunreinigung mit Stäuben zu verhindern. Zudem kann es bei der Lagerung zu Kreuzkontaminationen mit Allergenen kommen, deren Rohstoff keine Zutat des Lebensmittels ist. Daher sichern sich die Hersteller, aus Gründen der Produkthaftung, oft mit dem Hinweis, „Kann Spuren von [Allergen] enthalten“, ab. Dadurch wird die Produktvielfalt für einen Allergiker, bei dem schon eine sehr geringe Menge ausreicht, um eine allergische Reaktion auszulösen, stark eingeschränkt (Weber, W., 2019), (Neymeyer, H., 2010).

2.5 Mollusken

2.5.1 Wirtschaftliche Bedeutung von Mollusken in der menschlichen Ernährung

Mollusken oder auch Weichtiere genannt bilden einen arten- und formenreichen Tierstamm innerhalb der Eumetazoa (Gewebetiere). Sie kommen im Meer, auf dem Festland und im Süßwasser vor. Eines der bedeutsamsten Merkmale von fast allen Mollusken ist die Schale. Jedoch tritt die primär einteilige Schale mit ihrem typischen dreischichtigen Aufbau nur bei den Conchifera (Schalenweichtieren) auf (Biologie-Seite).

Bedeutend für die menschliche Ernährung sind drei Klassen. Die Gruppe der Bivalvia (Muschel), die der Gastropoda (Schnecken) und die der Cephalopoda (Kopffüßler). (Irion, R., 2015)Einer Statistik der Food and Agriculture Organization (FAO) der Vereinten Nationen von 2017 zufolge, lag die Produktion von Mollusken in Europa bei 1091129 Tonnen und in Deutschland bei 16976 Tonnen. Der Verbrauch von Mollusken in 2013 lag in Deutschland bei 28987 Tonnen, welches 0,35 kg/Kopf/Jahr entsprach. In ganz Europa wurden 1446306 Tonnen verzehrt, welches einem pro Kopf- und Jahr-Verbrauch von 1,95 kg entsprach (FAO).

Der Verzehr von Weichtieren variiert lokal sehr stark. Dieser ist in Küstenregionen und im Süden Europas bedeutend höher. Somit lag der pro Kopf-Verbrauch in Spanien für das Jahr 2013 bei 7,1 kg (FAO).

Mit zu den bedeutendsten Muschelarten zählen die Auster, die Miesmuschel, die Jakobsmuschel, die Kammmuschel, Grünlippmuschel, sowie die Venus- und Herzmuschel. In Deutschland werden von der Gattung der *Caphalopoden* vor allem der Kalmar (*Loliginoidea*), der Sepia (*Sepioidea*) und der Oktopus (*Octapoda*) verzehrt (Fischinformationszentrum, 2015).

In der Gattung der Gastropoda gehören die Arten *Helix pomatia, Helix aspersa, Helix lucorum* und die Achatschnecke zu den bedeutendsten essbaren Schnecken.

2.5.2 Molluskenallergene und Kreuzreaktionen

Das Hauptallergen von Mollusken ist das Muskelfaserprotein Tropomyosin. Dieses ist hitzestabil und wird somit beim Erhitzen von molluskenhaltigen Produkten nicht unschädlich gemacht. Zudem ist es wahrscheinlich, dass noch weitere, nicht charakterisierte Allergene, vorhanden sind. Eine Überlegenheit der Reaktivität gegen Meeresfrüchte, im Allgemeinen oder gegen einzelne Arten, ist in Regionen zu erwarten, in welchen diese Nahrungsmittel gewöhnlich verzehrt werden. Dementsprechend sind gerade Menschen, die in Küstenregionen leben, am häufigsten betroffen. Auf den Kanarischen Inseln zählen Meeresfrüchte an erster Stelle zu den Auslösern einer Nahrungsmittelallergie (GALAB).

Desweiteren ergibt sich aus einer möglichen Kreuzallergie eine weitere Problematik. Diese werden auch Kreuzreaktionen genannt. Dabei reagiert der Körper mit einer allergischen Reaktion auf Substanzen, die ähnliche Stoffe enthalten wie das bereits bekannte Allergen.

Auch bei Mollusken können Kreuzreaktionen auftreten, da das Eiweiß Tropomyosin auch in anderen Organismengruppen vorkommt. Strukturell ähnliche Tropomyosine besitzen vor allem Krebstiere wie Garnelen, aber auch Milben (Hausstaub) und Schaben (Allergy guide), (Zuberbier, 2016).

Daher können bei sensibilisierten Personen ebenfalls Symptome hervorgerufen werden. Dieses ist auch umgekehrt möglich, sodass Personen mit einer Hausstaub-Allergie auf Mollusken reagieren können. Es wird als das Milben-Krustazeen-Mollusken Syndrom bezeichnet. Eine Kreuzreaktion kann spontan auftreten und entwickelt sich nicht zwingend. Jedoch ist eine erhöhte Aufmerksamkeit bei dem Kontakt mit diesen Tiergruppen ratsam, da die Proteine der Krebstiere ebenfalls hochallergen sind und schwere allergische Reaktionen verursachen können (Kütting, B., 2001).

Es besteht keine Gefahr durch den Verzehr von Fisch, da zwischen Fischen und Mollusken keine Kreuzallergie besteht. Allergische Reaktionen können jedoch durch den Fischparasiten Anisakis simplex ausgelöst werden. Zwischen diesem und Mollusken bestehen Kreuzreaktionen, welche auf Tropomyosin basieren können (Neymeyer, H., 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsplanung, Projektübersicht

Die verwendeten Materialien, Chemikalien, Primersysteme und Proben sind den Anlagen 1, 2, 3 und 4 zu entnehmen.

Im nachfolgenden Fließschema ist die Projektübersicht dargestellt.

DNA Extraktion → CTAB-Methode und NucleoSpin® Food Kit-Methode

↓

Primerentwicklung → NCBI-Gendatenbank, Primer3Plus

↓

Primeroptimierung → Annealingtemperatur (Endpunkt-PCR), Primertitration (RT-PCR)

↓

Spezifitätstests → mindestens 30 verschiedene Spezien (RT-PCR)

↓

Limit of detection und die Effizienz → mittels Verdünnungsreihe (RT-PCR)

↓

Test in einem realitätsgetreuen Produkt → selbst entwickeltes Produkt (RT-PCR

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 DNA Extraktion

3.2.1.1 Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)- Methode

Die Extraktion der DNA ist eine wichtige Vorarbeit für das Gelingen einer PCR. Hierbei ist es wichtig, dass die gewonnene DNA eine bestimmte Qualität besitzt.

Eine Methode für die Extraktion ist die Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Methode, welche auf der DIN EN ISO 21571:2013-08 [1] basiert. Diese ist für Lebens- und Futtermittel, Saatgut sowie Tier- und Pflanzenarten anwendbar. Diese Art der DNA Extraktion umfasst einen thermischen Lyeschritt in Anwesenheit von CTAB. Danach folgen mehrere Extraktionsschritte zur Abtrennung von Kontaminationen, wie zum Beispiel Eiweißen und Polysacchariden. Für die Entfernung der Eiweiße ist die Behandlung der Proben mit Proteinase K notwendig. Die RNA wird durch die Zugabe von RNase degradiert, da diese die nachfolgenden analytischen Prüfungen stören kann. Bei stärkereichen Proben, wie zum Beispiel Proben mit einem hohen Getreideanteil oder Mais, kann optional ein Alpha-Amylaseschritt, für die Verbesserung der Extraktionseffizienz, eingefügt werden. Durch das Hinzufügen von Natriumchlorid werden denaturierte Eiweiße und Polysaccharide, zusammen mit CTAB, abgetrennt. Währenddessen bleibt die Nukleinsäure jedoch gelöst. Zur weiteren Abtrennung der DNA von CTAB- und Polysaccharid-/ Eiweiß-Komplexen wird Chloroform verwendet. Abschließend wird die DNA mit Isopropanol präzipitiert.

Als Erstes werden 200 mg der homogenisierten Probe in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Dieser wird nun 1000 µl CTAB-Extraktionspufferlösung, welche auf 65°C erwärmt wurde, hinzupipettiert und alles gründlich gemischt, sodass die Probe vollständig benetzt ist. Als Nächstes werden 20 µl RNase A-Lösung vorsichtig beigemischt, alles gründlich durchmischt und für 10 Minuten bei 65°C schüttelnd inkubiert. Danach werden

10 µl Proteinase K-Lösung hinzu pipettiert, gründlich gemischt und für 30 Minuten bei 65°C schüttelnd inkubiert. Nun wird das Ganze für 10 Minuten bei 14.500 x g zentrifugiert und danach der Überstand in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Diesem werden nun, unter dem Abzug, 400 µl ReadyRed™-Lösung (gefärbte Chloroform-Isoamylalkohol Lösung) zur Phasenunterscheidung hinzu pipettiert und für 30 Sekunden gründlich gemischt. Anschließend wird die Probe für 5 Minuten bei 14.500 x g zentrifugiert und danach die obere wässrige Phase in

ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Jetzt werden 2 Volumenanteile CTAB-Präzipitationslösung hinzugegeben und alles gründlich gemischt. Es erfolgt eine Inkubation, für 60 Minuten bei Raumtemperatur, ohne zu schütteln. Danach wird die Probe 15 Minuten bei 14.500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die nun präzipitierte DNA wird in 350 µl Natriumchlorid-Lösung vollständig gelöst. Nun werden 350 µl ReadyRed™-Lösung hinzugegeben und für 30 Sekunden gründlich gemischt. Die Probe wird dann für 10 Minuten bei 14.500 x g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 0,8 Volumenanteile Isopropanol hinzugefügt und der Inhalt wird durch mehrmaliges Umdrehen des Reaktionsgefäßes gleichmäßig gemischt. Das Ganze wird dann über Nacht in den Kühlschrank, bei 4°C, gestellt. Am nächsten Tag erfolgt eine Zentrifugation bei 14.500 x g für 30 Minuten und der dadurch entstandene Überstand wird verworfen. Es muss stets darauf geachtet werden, dass beim Verwerfen des Überstandes nicht aus Versehen das Pellet mit verworfen wird. Als Nächstes werden 500 µl Ethanol-Lösung (σ = 70%) in das Gefäß pipettiert und alles, durch Umdrehen des Gefäßes, gut gemischt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 14.500 x g für 10 Minuten und der Überstand wird vorsichtig verworfen. Im letzten Schritt wird das DNA-Pellet für 3-5 Minuten im Eppendorfcup Trockner (Concentrator) unter Vakuum getrocknet und dann die DNA in 30 µl Reinstwasser gelöst (Zagon, J., 2017).

3.2.1.2 NucleoSpin® Food Kit-Methode

Eine andere Methode zur Extraktion von DNA ist die NucleoSpin® Food Kit-Methode, mit Hilfe einer Silikamembran.

Hierbei wird die DNA mit Lyse-Puffern freigesetzt, welche chaotrope Salze, denaturierende Substanzen und Detergentien enthalten. Um eine optimale Bindung der DNA an die Silikamembran zu ermöglichen, wird der klare Überstand mit Bindungspuffern und Ethonal versetzt. Eventuell vorhandene PCR-Inhibitoren werden in zwei Waschschritten, mit unterschiedlichen Puffern, entfernt. Mit einem Elutionspuffer wird die DNA von der Membran eluiert und ist sofort einsatzbereit.

Als Erstes werden 200 mg der homogenisierten Probe in ein 2-ml-Reaktionsgefäß eingewogen. Nun werden 550 µl des Lysepuffers (Puffer CF), welcher auf 65°C vorgewärmt wurde, hinzu pipettiert und gründlich gemischt, bis die Probe vollständig benetzt ist. Danach werden 20 µl

RNase A-Lösung vorsichtig beigemischt und 10 Minuten bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden 10 µl Proteinase K-Lösung hinein pipettiert, gleichmäßig durchmischt und für 30 Minuten bei 65°C schüttelnd inkubiert. Als Nächstes erfolgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 14.500 x g. Von dem dadurch entstandenen klaren Überstand werden 300 µl in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach werden 300 µl Puffer C4 und 200 µl Ethanol (96%-100%) hinzu pipettiert und für 30 Sekunden mit einem Vortexmischer gemischt. Hiernach wird die im Kit enthaltene Säule in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß platziert und 750 µl der Probenmischung auf die Säule gegeben. Dieses wird nun für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugiert und dann das sich dadurch angesammelte Eluat verworfen. Ist dieses erfolgt, werden 400 µl Puffer CQW auf die Säule gegeben, für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugiert und das Eluat wird verworfen. Als Nächstes werden 700 µl Puffer C5 auf die Säule pipettiert und dieses für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Nachdem das Eluat verworfen wurde, werden nun 200 µl Puffer C5 auf die Säule gegeben und dieses für 2 Minuten, bei maximaler g-Zahl, zentrifugiert. Das entstandene Eluat wird wieder verworfen und die Säule wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zum Schluss werden 100 µl erwärmter Puffer CE (70°C) mittig auf die Silikamembran pipettiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Die extrahierte DNA Lösung kann direkt verwendet und bei -20°C aufbewahrt werden.

3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Nach der DNA-Extraktion erfolgt die photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration, sowie der Qualität, mit Hilfe des NanoDrop™ ND-1000. Dieses ist ein UV-VIS Spektrometer, deren Spektrum einen Bereich von 220 nm - 750 nm abdeckt. Das durchschnittliche Absorptionsmaximum der Nukleotide liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm (SelectScience). Mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes kann die Nukleinsäurekonzentration, durch die gemessene Extinktion, berechnet werden. Das Gesetz beschreibt die Abschwächung der Intensität einer Strahlung, in Bezug zu deren Anfangsintensität, bei dem Durchgang durch ein Medium, mit einer absorbierenden Substanz, in Abhängigkeit von der Konzentration der absorbierenden Substanz und der Schichtdicke. Die Gleichung ist $E=\varepsilon \cdot d \cdot c$.

Die Bestimmung der Qualität der DNA erfolgt durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die Berechnungen und die Auswertung erfolgen mittels des Computerprogramms NanoDrop™-ND 1000. In der Abbildung 2 ist exemplarisch eine Abbildung vom Aufbau dieses Programms dargestellt .

Für die Messung werden als Erstes 2 µl DNA-freies Wasser auf die Messlinse pipettiert und der Arm für die Messung gesenkt. Somit erfolgt die Initialisierung. Als Nächstes wird die Linse gesäubert und 2 µl der Flüssigkeit auf die Linse pipettiert, in welcher die extrahierte DNA gelöst ist. Dadurch wird der Nullpunkt eingestellt. Zum Schluss wird die Linse erneut gesäubert und 1,5 µl-2 µl der Probe auf die Messlinse pipettiert. Nach der Senkung des Probenarms erfolgt die Probenmessung. Zwischen jeder Messung muss die Messlinse und der Probenarm gesäubert werden.

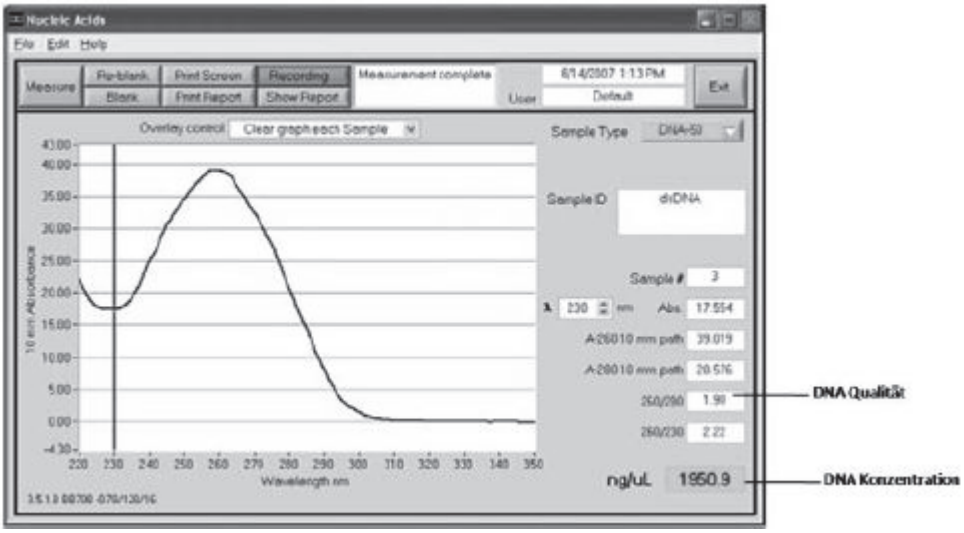

Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Extinktionskurve des NanoDrop™ ND-1000-Programmes (Neymeyer, H., 2010)

3.2.2 Primerdesign

Für den Nachweis von spezifischen DNA's, unter anderem von Allergenen, ist es notwendig eine spezifische DNA-Sequenz zu ermitteln. Anhand dieser werden dann Primerpaare entwickelt, welche dort binden und somit das Amplifizieren dieser Sequenz ermöglichen.

Zudem sind für die Entwicklung einige Regeln zu beachten. Die Primer sollten etwa 18-25 Nukleotide lang sein, damit die Primer spezifisch sind. Außerdem sollten sie einen GC-Gehalt (Guanin, Cytosin) von 40%-60% aufweisen. Um das Ausbilden von Sekundärstrukturen, wie zum Beispiel Haarnadelstreifen, zu verhindern, sollte eine Abfolge von ≥4 gleicher Basen, vor allem von G's, vermieden werden. Besonders ist darauf zu achten, dass in den letzten fünf Nukleotiden des 3'- Endes maximal zwei G oder C Basen vorkommen, da sonst die Gefahr unspezifischer Amplifikationsprodukte zunimmt. Zudem dürfen die Primer nicht zueinander komplementär sein, da es sonst durch Hybrisierung zur Primer Dimerisierung kommt. Ein weiterer Faktor, auf den zu achten ist, ist die Schmelztemperatur, welche zwischen 55°C und 70°C liegen sollte. Ist diese zu niedrig, nimmt die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu und bei einer höheren Temperatur binden Primer unspezifischer an die Matrize.

Für das Finden geeigneter spezifischer DNA-Sequenzen wurde mit der online Gendatenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) gearbeitet. Hierfür wurde auf der entsprechenden Seite der Bereich Nucleotide ausgewählt und nun nach Ergebnissen für ein 18S-Gen der Schneckenart Helix pomatia gesucht. Nachdem man eine geeignete Sequenz gefunden hat, wurde diese ausgewählt und durch das Auswählen von FASTA wird die Sequenz in Basenschreibweise angezeigt. Dieses wird nun in eine Primersoftware übertragen. In dieser wird automatisch eine Auswahl an verschiedenen Primerpaaren erstellt. Außerdem können die Parameter des Primerdesigns manuell verändert werden, sodass die erstellten Primer den gewünschten Anforderungen entsprechen. In dieser Arbeit wird dafür das Programm Primer3Plus verwendet, dieses ist ein kostenloses Online-Programm. Aus den vorgeschlagenen Primerpaaren ist nun eines zu wählen und es kann zum Online-Primer3Manager des Programms exportiert werden. Dort werden einem nochmal das Primerpaar, eventuell die Sonde und das Amplifikat dargestellt. Als Letztes wird das BLAST Programm des National Center for Biotechnolgy Information (NCBI) genutzt. Es dient dem Vergleich experimentell ermittelter DNA- oder Aminosäuresequenzen mit bereits in der Datenbank bestehender Sequenzen. Es

werden hierbei ähnliche Sequenzabschnitte verschiedener Nukleinsäuresequenzen untereinander verglichen. Außerdem werden über ein mathematisches Algorithmusmodell Wahrscheinlichkeiten berechnet, welche angeben, wie signifikant die Übereinstimmung zwischen diesen Sequenzen ist. Zudem kann man bestimmte Spezien ausschließen, wenn es erwünscht ist, dass das Primerpaar dort ebenfalls bindet. In dieser Arbeit wurde der Bereich Gastropoden ausgeschlossen. Wird dieser Bereich nicht ausgeschlossen, so erhält man mittels der BLAST-Funktion, Sequenzen von Spezien, welcher mit der Ausgewählten Ähnlichkeiten besitzen. Damit man diese auf bestehende Homologien überprüfen kann wird ein Alignment erstellt. Alignment bedeutet übersetzt so viel wie „Ausrichtung auf einer Linie“. Darunter ist in der Biologie das Sequenzalignment, also der Vergleich verschiedener biologischer Sequenzen wie Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen zu verstehen. Dafür wurden die Sequenzen des BLAST-Ergebnisses in das Programm UGENE exportiert. Dort wurde mit den Spezien des oberen Bereiches ein Alignment erstellt (Hansen, A., 2001).

3.2.3 Optimierung der Annealing-Temperatur mittels Endpunkt-PCR

Durch die Optimierung der Annealing- Temperatur wurde zudem die Funktionalität der Primer geprüft. Es wurden 3 Primerpaare bei 5 verschiedenen Temperaturen getestet. Zwei Primerpaare wurden für das 18S Gen der Leitart *Helix Pomatia* und 1 Primerpaar wurde für das 18S RNA-Gen der Leitart Mytilus edulis entwickelt. Aufgrund von Lieferverzögerungen wurden die Systeme für *Helix Pomatia* mit der artverwandten *Helix lucorum* getestet.

Neben den Proben werden in jeder PCR eine Positivkontrolle und eine NTC mitgeführt. In der Positivkontrolle wird ein Universal 18S Primerpaar verwendet, um zu prüfen ob die DNA überhaupt amplifizierbar ist. In der NTC wird anstelle der DNA, DNA-freies Wasser pipettiert, um mögliche Verunreinigungen des Wassers, der Primerpaare und des sogenannten Mastermixes auszuschließen. Als Erstes werden alle Reagenzien für den Mastermix unter der Sterilbank in ein Reaktionsgefäß nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle1: Exemplarische Darstellung der verwendeten Excel-Tabelle zur Berechnung der Mastermixzusammensetzung

	Number of samples:	7	Reserve [%]:	5	Controls:	0
Mix:	Component	Storage conc.	Final conc.	Vol. per Sample [µL]		Total Vol. [µl]
	Water			6,75		**49,6**
	Universal Mastermix	2	1	12,50		**91,88**
		25	0	0,00		
	DMSO [%]	100	0	0,00		
		1	0	0,00		
		2,5	0	0,00		
	Primer 1 [µM]	20	0,3	0,38		**2,756**
	Primer 2 [µM]	20	0,3	0,38		**2,756**
		5	1	0,00		**0,000**
	Mastermix Volume			20,00		
	DNA [nM]	5	25	5,00		-
	Total			25,00		147

Für den, in der Tabelle 1 benannten, Mastermix wurde der Takyon™ Low Rox Mastermix verwendet. In diesem befinden sich eine thermostabile DNA-Polymerase und die Bausteine der DNA, die Desoxyribonukleosidtriphosphate oder kurz dNTPs.

Da die Nukleinsäurekonzentration der extrahierten Helix lucorum-DNA 5 ng/µl beträgt, muss diese nicht weiter verdünnt werden. Bei höheren DNA-Konzentrationen wäre eine Verdünnung

sinnvoll, da es ausreichend ist mit Konzentration bis 100 ng/µl zu arbeiten. Die maximale Zugabemenge der DNA beträgt 5 µl. Unter einer anderen Sterilbank werden nun der Mastermix und die DNA, wie gelb unterlegt in Tabelle 1 zu sehen, in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Mit Hilfe dieser Excel-Tabelle können die jeweiligen Mengen für jede Probenanzahl, DNA Konzentrationen und Primerkonzentrationen berechnet werden.

Zum Schluss werden bei einer Endpunkt-PCR die befüllten PCR-Reaktionsgefäße in einem Thermocycler, an den entsprechenden Orten, für die ausgewählte Temperatur, platziert. Für die Optimierung der Annealingtemperatur wurden die Temperaturen so gewählt, dass sie sowohl 4°C über, als auch unter dem Optimum von 60°C liegen. Demzufolge waren die gewählten Temperaturen 56,1°C, 58,2°C, 60,4°C, 62,5°C und 64,4°C. Sind diese Einstellungen alle erfolgt, so wird der Prozess gestartet, beginnend mit dem Erhitzungsschritt bei 94°C für ca. 10 Minuten. Als Nächstes folgen drei Schritte, die Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C, das Primerannealing für 30 Sekunden mit den jeweiligen festgelegten Temperaturen und die Elongation für 30 Sekunden bei 72°C. Diese werden 45-mal wiederholt. Als Letztes findet für 6 Minuten eine finale Elongation bei 72°C statt und danach werden die PCR-Produkte auf 4°C heruntergekühlt.

Da die PCR-Produkte im Reaktionsgefäß nicht sichtbar sind, erfolgt die Auswertung bei einer klassischen PCR mittels Agarosegelelektrophorese. Die Trennung erfolgt nach Größe der DNA-Fragmente, wie im Abschnitt 2.3 beschrieben. Als Erstes erfolgt die Herstellung eines 2%igen Agarosegels. Hierfür werden 3 g Agarose eingewogen und dieses mit 150 ml Elektrophoresepuffer (0,5x TBE-Puffer) gemischt. Damit sich die Agarose in der Flüssigkeit löst, wird das Gemisch mit Hilfe einer Mikrowelle erhitzt, bis die Flüssigkeit klar ist. Nun wird der Gelschlitten im Gießstand montiert, so dass die Öffnungen verschlossen sind. Anschließend wird die Agarosegellösung vorsichtig hineingegossen, und falls vorhanden, Luftblasen entfernt. Nun wird ein Kamm an der äußeren Aussparung eingesetzt und das Ganze zum Aushärten stehen gelassen. Sobald dieses erfolgt ist kann das Gel aus der Apparatur herausgenommen und in die Elektrophoresekammer platziert werden. Diese Kammer ist bis zur Markierung mit 0,5x TBE-Puffer befüllt. Zu diesem werden 30 µl Ethidiumbromid dazu pipettiert.

Währenddessen können je 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl eines Gelladepuffers, zum Beispiel Bromphenolblau, versetzt werden. Außerdem benötigt man zur Bestimmung der Größe des DNA-Fragments noch eine DNA-Leiter. Für diese wurden 3 µl des 50 bp Längenstandards, 7 µl DNA-freies Wasser und 2 µl des Gelladepuffers in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Zum Schluss

wurden in die Taschen 12 µl der jeweiligen Gemische pipettiert und die Gelelektrophorese, durch Anlegen einer Spannung, gestartet. Es wird das Programm ausgewählt, bei dem zunächst für eine Minute eine Spannung von 300 V, bei maximaler Stromstärke, angelegt ist und dieses danach auf 150 V bei maximaler Stromstärke herunterregelt. Nach ca. 1 Stunde ist dieses abgeschlossen und das Ergebnis kann in einer UV-Kammer sichtbar gemacht werden.

3.2.4 Real-Time-PCR

3.2.4.1 Optimierung der Forward- und Reverseprimerkonzentration

Die Optimierung der Forward- und Reverseprimerkonzentration erfolgte mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode. Hierfür wurde wieder mittels der Excel-Tabelle die Zusammensetzung des Mastermixes berechnet. Die Konzentration der verwendeten *Helix lucorum* betrug 77 ng/µl. In dem Versuch wurde mit einer Konzentration von 100 ng/µl gearbeitet und dementsprechend wurden 1,30µl DNA und 23,70 µl pipettiert. Es wurden jeweils 3 verschiedene Forward- und Reverseprimerkonzentrationen getestet und somit ergaben sich 9 verschiedene Mastermixes, wie in Abbildung 3 dargestellt.

Forward-Primerkonzentration / Reverse-Primerkonzentration	50 nM	300 nM	600 nM
50 nM	Mastermix 1	Mastermix 2	Mastermix 3
300 nM	Mastermix 4	Mastermix 5	Mastermix 6
600 nM	Mastermix 7	Mastermix 8	Mastermix 9

Abbildung 3: Darstellung der Primermatrix für die Primeroptimierung

Als Erstes erfolgt das Erstellen der verschiedenen Mastermixe unter einer Sterilbank. Bei der Real-Time-PCR wird, anstelle des Takyon™ Low Rox Mastermixes, der SYBR® Green Mastermix verwendet. Dieses ist zusätzlich mit einem inaktivem Fluoreszenzfarbstoff (SYBR® Green) versetzt.

Unter einer anderen Sterilbank werden nun die Mastermixe zusammen mit der DNA auf einer 96-Well-Platte vorgelegt und diese mit einer Folie verschlossen. Damit sich die ganze

Flüssigkeit unten im Well befindet, wird die Platte für ca. 3 Sekunden zentrifugiert. Neben den Proben wird zu dem eine NTC mitgeführt, welche anstelle der DNA, DNA-freies Wasser (PCR-Wasser), enthält. Die Platte wird nun in das Real-Time-PCR-Gerät eingelegt und am Computer werden die Einstellungen getätigt. Hierbei wird die Plattenbelegung angegeben und der Temperaturverlauf wird festgelegt. Dabei erfolgt ein 10-minütiger Erhitzungsschritt bei 95°C. Danach erfolgen 45-fache Wiederholungen des 15 s Denaturierungschrittes bei 95°C und des 1-minütigen Annealingschrittes bei 62°C. Der ganze Prozess dauert ca.1 Stunde und 50 Minuten. Während dieser Zeit misst das Gerät die Floureszenz und man erhält als Ergebnis die DNA-Vervielfältigung in Echtzeit.

3.2.4.2 Spezifitätstest

Auch der Spezifitätstest erfolgte mittels Real-Time-PCR. Daher ist der Ablauf ähnlich dem im Punkt 3.2.4.1 erklärten Ablauf. Hierbei wurden lediglich, aufgrund von zwei verschiedenen DNA-Konzentrationen, nur zwei Mastermixe verwendet. In diesem wurde mit einer Forwardprimerkonzentration von 600 nM und einer Reverseprimerkonzentration von 300 nM gearbeitet. Aufgrund des vorherigen Versuches eignete sich dieses Konzentrationsverhältnis am besten für das weitere Verfahren.

Für das Testen der Spezifität wurde mit 2 DNA-Konzentrationen gearbeitet, mit 10 ng/µl und 50 ng/µl. Dafür wurde die Konzentration zunächst bei allen auf 10 ng/µl eingestellt. Somit musste für eine Konzentration von 10 ng/µl 1µl zum Mastermix und für eine Konzentration von 50 ng/µl 5 µl pipettiert werden. Das Gesamtvolumen beträgt 25 µl. Aus den nachfolgenden Tabellen 2 und 3 sind die Proben, die jeweilige Konzentration und die Verdünnung zu entnehmen.

Tabelle 2: Auflistung der, für den ersten Spezifitätstests, verwendeten Proben, deren Konzentration, sowie die Verdünnung

Probenname	Konzentration	Verdünnung
Gestreifte Weinbergschnecke (*Helix Lucorum*)	77	2 µl DNA+13,4 µl H2O
Große Achatschnecke (*Achatina fulica*)	123	1,5 µl DNA+16,95 µl H2O
Meeresschnecken	13	10 µl DNA+3 µl H2O

(*Buccinum humphreysianum*)		
Tiefseecallops (*Placopecten magellanicus*)	50	3 µl DNA+112 µl H2O
Miesmuschel (*Mytilus edulis*)	689	1 µl DNA+67,9 µl H2O
Pazifische Austern (*Crassostrea Gigas - Fines de Claires*)	3056	1 µl DNA+304,6 µl H2O
Mexikanisce Vieraugenkrake (*Octopus maya*)	37	4 µl DNA+10,8 µl H2O
Kap Hoffnung Tintenfisch (*Loligo reynaudii*)	45	3 µl DNA+10,5 µl H2O
Gewöhnlicher Tintenfisch (*Sepia officinalis*)	13	10 µl DNA+3 µl H2O
Königskrabbe (*Paralithodes camtschaticus*)	459	1 µl DNA + 44,9 µl H2O
Chinesische Wollhandkrabbe (*Eriocheir sinensis*)	32,3	5 µl DNA+11,15 µl H2O
White Tiger Garnele (*Litopenaeus vannamei*)	215	1 µl DNA+20,5 µl H2O
Eismeergarnele (*Pandalus borealis*)	250,1	1 µl DNA+24,01 µl H2O
Seehecht (*Merluccius merluccius*)	200	1 µl DNA+19 µl H2O
Seelachs (*Pollachius virens*)	262	1 µl DNA+ 25,2 µl H2O
Schwein	635	1 µl DNA+62,5 µl H2O
Huhn	111	1,5 µl DNA + 15,15 µl H2O
Rind	92,3	1,5 µl DNA + 12,345 µl H2O
Weizen	177	1 µl DNA+16,7 µl H2O
Maismehl	169	1 µl DNA+15,9 µl H2O
Soja	497,6	1 µl DNA + 48,76 µl H2O

Wanderheuschrecke (*Migrantis Praecepero Lcustae*)	672,7	1 µl DNA + 66,27 µl H2O
Kurzflügelgrille (*Gryllodes Sigillatus*)	2543,9	1 µl DNA + 253,39 µl H2O

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Proben, deren Konzentration, sowie die Verdünnung für den zweiten Spezifitätstest und für das Testen der Amplifizierbarkeit

Probenname	Konzentration in µl/ng	Verdünnungen
Erbse (*Pisum salvum*)	398,8	1 µL DNA + 38,88 µl H2O
Dinkel (*Triticum spelta*)	1846,3	1 µL DNA+ 183,63 µl H2O
Raps (*Brassica napus*)	187,8	1 µL DNA+ 17,78 µl H2O
Grünlippmuschelmehl (*Perna canaliculus*)	6081,4	1 µL DNA+ 607,14 µl H2O
Lamm	1058	1 µL DNA+ 104,8 µl H2O
Pferd	736,5	1 µL DNA+ 72,65 µl H2O
Hase	938,4	1 µL DNA+ 92,84 µl H2O
Ziege	1063,4	1 µL DNA+ 105,34 µl H2O
Braune Venusmuschel (*Callista chione*)	79	2 µL DNA+ 13,8 µl H2O
Meerscheidmuschel	635,7	1 µL DNA+ 62,57 µl H2O
Moschuskrake (*Eledone moschata*)	119,1	12 µL DNA+ 21,8 µl H2O
Amerikanischer Hummer (*Homarus americanus*)	70,8	2 µL DNA+12,16 µl H2O
Spirulina-Alge (*Spirulina*)	1209	1 µL DNA+ 119,9 µl H2O
Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*)	544,3	1 µL DNA+ 53,43 µl H2O

große pazifische Schwimmkrabbe (*Portunus pelagicus*)	945,3	1 µL DNA+ 93,53 µl H2O
Nordseegarnele (*Crangon crangon*)	1329,1	1 µL DNA+ 131,91 µl H2O
Helix pomatia	81	2 µL DNA+ 14,2 µl H2O
Helix aspersa	545,8	1 µL DNA+ 53,58 µl H2O
ob amplifizierbar:		
Königskrabbe (*Paralithodes camtschaticus*)	459	1 µL DNA+ 44,9 µl H2O
Rind	1126,1	1 µL DNA+ 111,61 µl H2O
Meeresschnecke (*Buccium humphreysianum*)	13	10 µL DNA+ 3 µl H2O
Chinesische Wollhandkrabbe (*Eriocheir sinensis*)	32,3	5 µL DNA+ 11,15 µl H2O
White Tiger Garnele (*Litopenaeus vannamei*)	215	1 µL DNA+ 20,5 µl H2O
Eismeergarnele (*Pandalus borealis*)	250,1	1 µL DNA+ 24,01 µl H2O
Pazifische Auster *(Crassostrea Gigas*)	3056	schon verdünnt
Seehecht (*Merluccius merluccius*)	200	1 µL DNA+ 19 µl H2O
Kurzflügelgrille (*Gryllodes Sigillatus*)	2543,9	1 µL DNA+ 253,39 µl H2O
Schwein	635	1 µL DNA+ 62,5 µl H2O
Kap Hoffnung Tintenfisch (*Loligo reynaudii*)	45	3 µL DNA+ 10,5 µl H2O

Es wurden insgesamt zwei Spezifitätstests durchgeführt. Beim zweiten Spezifitätstest (Tabelle 3) wurden außerdem nochmal Proben auf deren Amplifizierbarkeit getestet, da deren CT-Werte

sehr hoch waren. Zudem kamen nun die Lieferungen der *Helix pomatia* und der *Helix aspersa* an, welche auch getestet wurden. Für beide DNA-Konzentrationen wurde pro Spezies eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nachdem der Mastermix und die DNA's in die 96-Well-Platte pipettiert wurden, wird die Platte zentrifugiert und in das Real-Time-PCR Gerät eingelegt. Das Programm wird gestartet und verläuft wie im Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben.

3.2.4.3 Bestimmung des Limit of detection und der Effizienz

Die Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus der PCR entspricht meist nicht der Realität. Daher wird durch die Effizienzberechnung der Vervielfältigungsfaktor bestimmt. Durchschnittlich liegt dieser Faktor zwischen 1,6 und 1,7. Mit Hilfe der Effizienzberechnung wird gezeigt, wie nahe ein Real-Time-PCR-System diesem Verdopplungsfaktor kommt. Eine Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus tritt bei einer Effizienz von 100% ein.

Die Nachweisgrenze, auch bezeichnet als limit of detection (LOD), ist die niedrigste DNA Konzentration, bei welcher noch ein Signal in der Real-Time-PCR zu sehen ist. Unterhalb dieses Wertes ist es, mit diesen Primern und der DNA-Sequenz, in der Real-Time PCR nicht mehr möglich diese Spezies zu detektieren. Dieser Grenzwert ist sehr wichtig, da bereits geringe Mengen eines Allergens ausreichen, um bei einem Allergiker eine Reaktion auszulösen.

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe können die Effizienz und die untere Nachweisgrenze (LOD) bestimmt werden. Da es noch keine Angaben über die Genomgröße von *Helix pomatia* gibt, wird die Verdünnungsreihe in der Einheit µl/ng hergestellt. Die Anfangskonzentration wurde auf 10 µl/ng eingestellt und dann eine 10-fach Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 0,00001 µl/ng hergestellt. Für jede Verdünnungsstufe wird eine 10-fach Bestimmung durchgeführt. Der Ablauf entspricht dem in Abschnitt 3.2.4.1 Beschriebenen. Es wurde die Zusammensetzung des Mastermixes mit der Excel-Tabelle, welche in Tabelle 1 dargestellt ist, berechnet und hergestellt. Von diesem wurden jeweils 24 µl und 1µl der verdünnten DNA in die Wells der 96-Well-Platte pipettiert. Diese wurde anschließend wieder zentrifugiert, in das Gerät eingelegt und das System gestartet.

4 Ergebnisse

4.1 DNA Extraktion

Die DNA Extraktionsmethode NucleoSpin® Food-Kit ist leichter anzuwenden, da die ganzen benötigten Reagenzien bereits im Kit vorhanden sind und nicht noch extra hergestellt werden müssen. Zudem ist die ganze Methode auch deutlich schneller, da sie weniger Schritte und Wartezeiten beinhaltet. Jedoch erhält man mit der CTAB-Methode deutlich größere Menge an DNA. Zudem ist die Methode sicherer, da es gerade bei den Weichtieren öfter zu einem negativen Ergebnis mit der Food-Kit Methode gekommen ist. Dadurch musste man die DNA-Extraktion bei einigen Arten mit der CTAB-Methode wiederholen. Dementsprechend ging ein wenig Zeit verloren, da man doppelt DNA extrahieren musste. Die Ergebnisse beider Extraktionsmethoden sind der Anlage 9 zu entnehmen.

4.2 Primerdesign

Das *Helix-Po*-Primersystem wurde, wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben, entwickelt. Die Leitart dieses Systems ist *Helix pomatia*. Mit Hilfe der Gendatenbank von NCBI wurde das 18S RNA-Gen als Zielgen der Primerentwicklung gefunden. Dieses ist ein Multi copy Gen. Dieses bedeutet, dass es in mehr als vier Kopien vorliegt. Die verwendete DNA-Sequenz ist in der NCBI Gendatenbank unter folgendem Kürzel zu finden: GU784811.1.

Mit Hilfe der kostenlosen Software, Primer3Plus, wurden die Forward- und Reverseprimer, die Sonde und das Amplifikat ermittelt. Diese sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Außerdem wird die jeweilige Schmelztemperatur und deren prozentualer GC-Gehalt angegeben.

Tabelle 4: Darstellung des Primerdesign-Ergebnisses

	5´-3´	**TM °C/ GC%**
Forward	CTCTCTCGGTCGAAGCCATC	59,9/60
Reverse	AATAGGGTAGCGGCCAATCG	60,2/55
Rev.comp.	CGATTGGCCGCTACCCTATT	
Sonde	ATGAAGCGCCGCCCCGACCG	64,5/75
Amplc= 66 bp	CTCTCTCGGTCGAAGCCATCTAAATGGTGCGGCGGAGTA AGCAAGAACTGATGAAACGCAATGTCTCCTCTATTTGTCG GTCGGGGACCGCATGAAGCGCCGCCCCGACCGATTGGCC GCTACCCTATT	

Mit Hilfe der BLAST-Funktion von NCBI wurde die DNA-Sequenz mit denen der Datenbank verglichen. Dabei wurde die Tierklasse Gastropoda ausgeschlossen, da das Primerpaar nicht spezifisch an die DNA der Art *Helix pomatia* binden soll, sondern auch eine Amplifikation von der DNA anderer Schneckenarten wünschenswert ist. Bei diesem Abgleich wurden keine relevanten Übereinstimmungen entdeckt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Primersystem geeignet wäre um die Spezies *Helix pomatia* zu detektieren. Somit kann dieses Primersystem bestellt und auf deren Funktionalität getestet werden.

Außerdem wurde für das Primersystem ein Alignment mit den DNA-Sequenzen der Arten gemacht, welchen bei der BLAST-Funktion, ohne den Ausschluss von *Gastropoda*, im oberen Bereich erschienen sind. Aufgrund der Länger des Amplifikates, ist das Ergebnis des Alignment in drei Teile aufgespalten. Die, für das Alignment verwendeten, DNA-Sequenzen sind der Abbildung 4 zu entnehmen. In den Abbildungen 4,5 und 6 ist gut zu erkennen, dass zwischen den *Helix-Arten* eine hohe Übereinstimmung der Sequenzen besteht. Am Beispiel der Art *Achatian fulica*, welches ebenfalls eine Schnecke ist, ist zu erkennen, dass es dort wenige

übereinstimmende Basen entlang der DNA-Sequenz gibt. Dadurch lässt sich auch erklären, weshalb die entwickelten *Helix pomatia*-Primersysteme bei dieser Schneckenart zu keiner Amplifikation geführt haben.

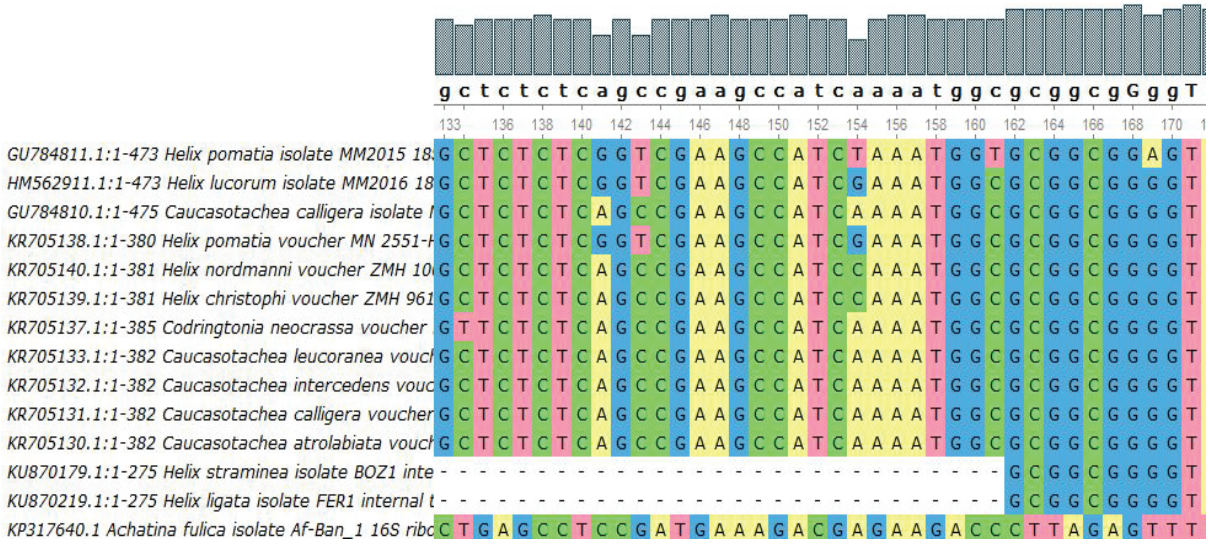

Abbildung 4: Erster Teil des Alignments für das *HEL*-Primersystem

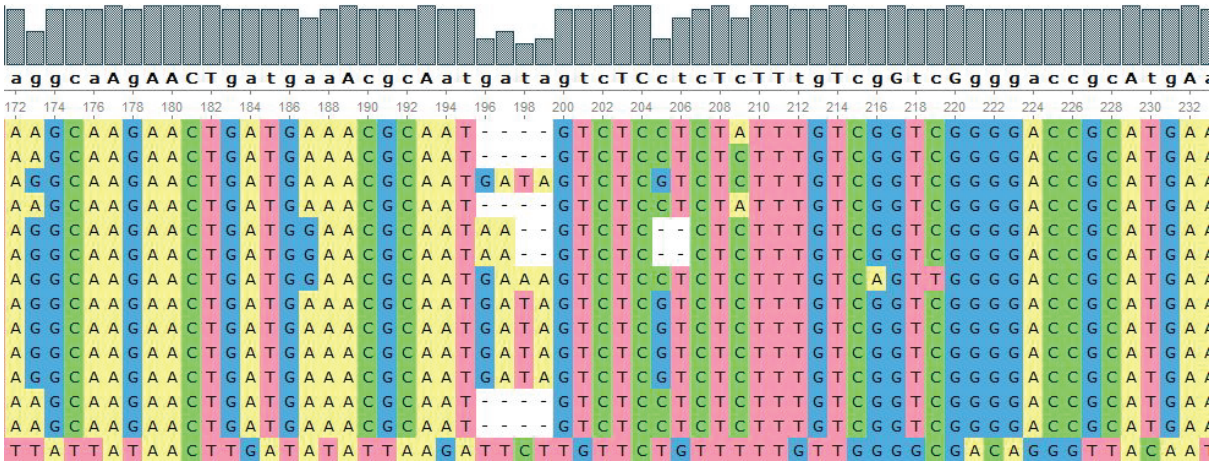

Abbildung 5: Zweiter Teil des Alignments für das *HEL*-Primersystem

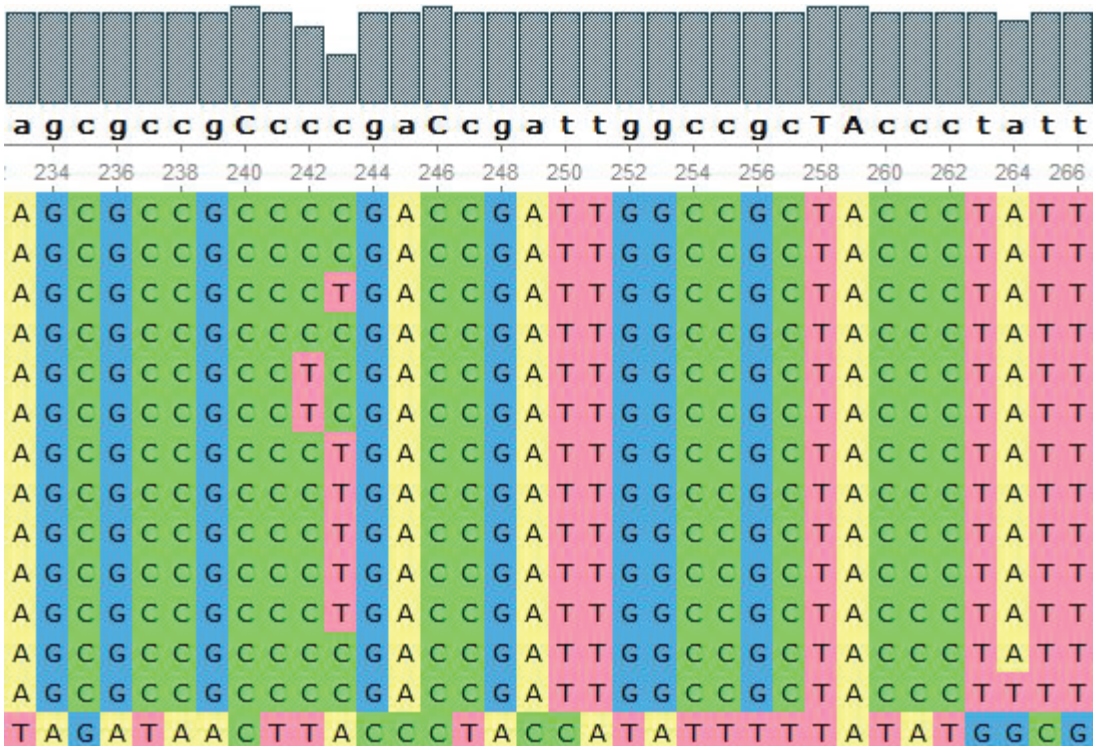

Abbildung 6: Dritter Teil des Alignments für das *HEL*-Primersystem

4.3 PCR Ergebnisse

4.3.1 Optimierung der Annealingtemperatur mittels Endpunkt PCR

Der erste Schritt nach der Entwicklung der Primer ist es, diese auf deren Funktionalität zu testen. Zusammen mit diesem Schritt wurde auch getestet, welche Annealingtemperatur die deutlichsten Banden im Gel hervorruft und somit optimal ist. Zudem wurden die *Helix pomatia* - Systeme mit einer weiteren Landlungenschneckenart und das *Lopho*-System mit zwei weiteren *Bivalvia* (Muscheln)-Arten getestet. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die entstandenen PCR-Produkte dargestellt.

Die Abbildung 7 stellt die Ergebnisse der Prüfung der Primer auf Funktionalität und optimalen Annealingtemperatur dar. Auf diesem Gelbild ist zu erkennen, dass bei beiden *Helix pomatia* - Primersystemen, bei jeder Temperatur, jeweils eine klar abzugrenzende Bande entstanden ist. Beim *HEL*-System kann man anhand des DNA-Ladders ablesen, dass die entstandenen Amplifikate ungefähr auf der Höhe der zu erwartenden Länge, von 75 bp, liegen. Daraus lässt sich schließen, dass das Primerpaar an den vorgesehenen Stellen gebunden hat und somit die richtige DNA-Sequenz amplifiziert wurde. Zudem kann man erkennen, dass die bei 62,5°C entstandene Bande ein wenig klarer und dicker ist. Dementsprechend wurde die optimale Annealingtemperatur für dieses Primerpaar auf 62,5°C festgelegt. Bei dem *Helix-Po*-System sind ebenfalls, bei allen Temperaturen, klar abzugrenzende Banden entstanden. Jedoch stimmt die Länge, die man anhand der DNA-Ladder ablesen kann, nicht mit der erwarteten Länge von 66 bp überein. Abzulesen ist eine Länge zwischen 100 bp und 150 bp. Vermutlich läge auch bei diesem Primersystem die optimale Annealingtemperatur bei 62,5°C. Da es sich dabei um 18S Systeme handelt, ist es schwierig über die Arbeitskontrolle (AK) und Positivkontrolle (+) eine Aussage zutreffen, da diese sehr empfindlich sind und schnell mit anderen Substanzen reagieren können.

Im letzten Abschnitt des Geles sieht man die Ergebnisse des *Lopho*-Systems. Diese zeigen bei keiner Temperatur klar abzugrenzende Banden. Es sind eine Art Schlieren über die komplette Länge des Gels entstanden. Zudem kann man am unteren Ende bei allen Temperaturen und bei der Arbeitskontrolle (AK) leichte Banden erkennen. Dieses sind vermutlich die Primer. Es lässt sich schlussfolgern, dass dieses System sich nicht an der extrahierten DNA binden und somit diese nicht amplifiziert werden konnte.

Temperaturen	Proben:	Master Mix:	Primer:
1 56,1°C	Für HEL und Helix Po	Takyon LowRox	HEL 18S
2 58,2°C	*Helix lucorum* - C19267	EUK 202	Helix Pomatia 18S
3 60,4°C	Für Lopho		Lopho uni - 18S
4 62,5°C	*Mytilus edulis* - C19081		
5 64,4°C			

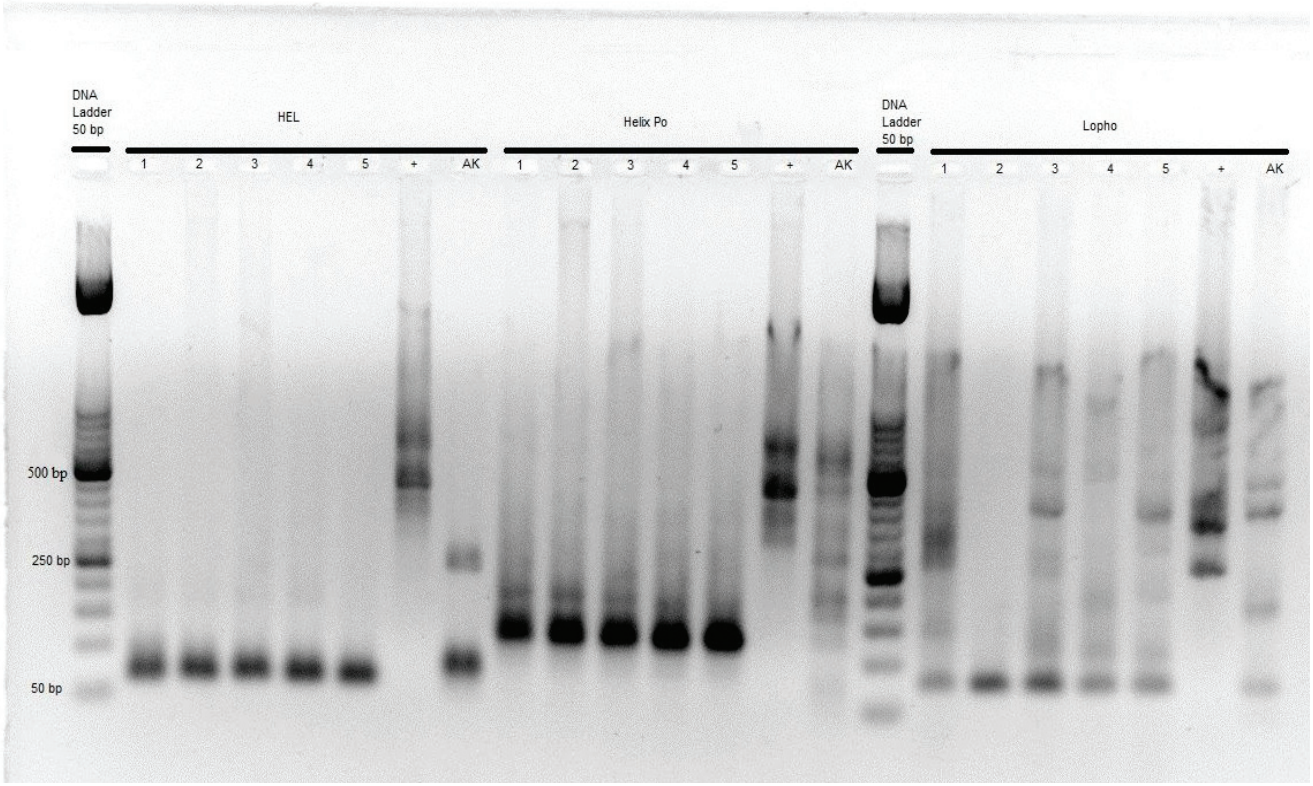

Abbildung 7: Gelbild für das Testen der Funktionalität und der optimalen Annealingtemperatur der Primersysteme

In der Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese eines weiteren Versuches dargestellt. Die Systeme wurden auf deren Funktionalität mit weiteren Arten getestet. Es ist bei allen Systemen zu erkennen, dass keine klar abzugrenzenden Banden entstanden sind. Somit bindet das *Lopho*-Primerpaar nicht spezifisch, werder an der Leitart, noch an artverwandten Spezien. Daher werden mit diesem System keine weiteren Versuche durchgeführt. Die beiden *Helix pomatia*-Systeme können nicht spezifisch an der DNA der Achatschnecke binden, jedoch an der von *Helix lucorum*. Dieses ist eine artverwandte Spezies der Leitart *Helix pomatia*. Mit dieser konnte das System zu diesem Zeitpunkt, aufgrund von Lieferverzögerungen, nicht getestet werden.

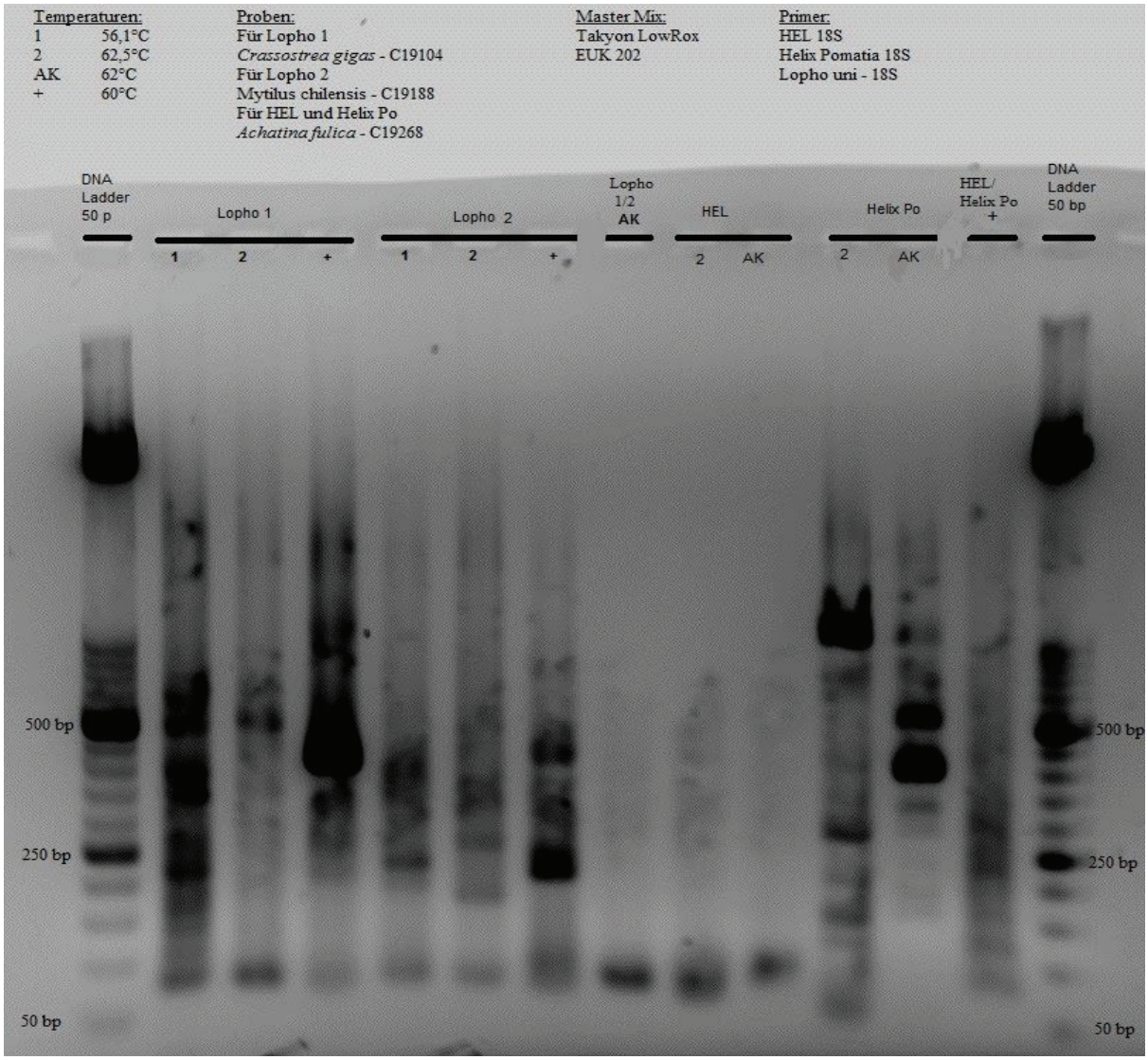

Abbildung 8: Gelbild für den Funktionalitätsversuch der Primersysteme mit weiteren Spezien

4.3.2 Real-Time-PCR

4.3.2.1 Optimierung der Forward- und Reverseprimerkonzentration

Nach dem erfolgreichen Testen der *Helix pomatia*-Primersysteme, auf deren Funktionalität und der Festlegung der optimalen Annealingtemperatur, können nun weitere Parameter festgelegt werden, wie die Optimierung der Forward- und Reverseprimerkonzentrationen. Es wurden für beide Systeme jeweils neun verschiedene Mastermixansätze, entsprechend der Primermatrix (Abbildung 3) aus Kapitel 3.2.4.1, hergestellt. Die Ergebnisse für das *HEL*-System sind in der Abbildung 9 dargestellt. Es werden die CT-Werte für jede Primerkonzentration-Zusammensetzung in der Matrix dargestellt. Der CT-Wert (threshold cycle) gibt den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve an und ist eine theoretische Größe. Dieses ist vor allem für die Quantifizierung von DNA-Molekülen während einer Real-Time-PCR von Bedeutung. Anhand dieses Wertes kann eine Aussage über das beste Forward- und Reverseprimer Verhältnis getroffen werden. Je niedriger dieser Wert ist, desto früher konnten die Primer an das DNA Fragment binden und desto früher beginnt die Vervielfältigung dieser. Dementsprechend benötigt man weniger Zyklen, um den gewünschten Stoff, wie zum Beispiel ein Allergen, zu detektieren.

Der geringste CT-Wert bei dem *HEL*-Primersystem (Abbildung 9) entsteht bei einer Forward-Primerkonzentartion von 600 nM und einer Reverse-Primerkonzentration von 50 nM. Bei diesem Konzentrationsverhältnis ergab sich ein CT-Wert von 14,128. Dieser ist recht niedrig, woraus sich schließen lässt, dass sich das Primerpaar schnell und gut an die DNA-Fragmente binden konnte. Da der Verbrauch der einzelnen Primern bei diesen Konzentrationen sehr unterschiedlich ist und die CT-Werte nicht gravierend auseinander liegen, wurde sich für eine Forward-Primerkonzentration von 600 nM und einer Reverse-Primerkonzentration von 300 nM entschieden. Somit ist der Verbrauch beider Primer effizienter.

Forward-Primerkonzentration / Reverse-Primerkonzentration	50 nM	300 nM	600 nM
50 nM	16,89	14,825	14,128
300 nM	17,246	Undetermined	14,163
600 nM	15,67	14,181	14,187

Abbildung 9: Ergebnisse der Primerkonzentrationsoptimierung für das *HEL*-Primersystem

Im Gegensatz zum *HEL*-Primersystem ist der niedrigste CT-Wert beim *Helix-PO*-System 16,892 und ergibt sich bei einer Forward- und Reverseprimerkonzentration von 600 nM. (Abbildung 10) Es wurde sich so entschieden, die Versuche mit dem *HEL*-System fortzusetzen, da die CT-Werte bei dem *Helix-Po*-System höher sind und es somit nach mehr Zyklen erst zu einer Vervielfältigung der DNA-Sequenz kommt. Die Rohdaten der Primertitration sind in der Anlage 5 dargestellt.

Forward-Primerkonzentration / Reverse-Primerkonzentration	50 nM	300 nM	600 nM
50 nM	20,226	18,756	17,268
300 nM	18,491	17,45	17,007
600 nM	18,799	17,084	16,892

Abbildung 10: Ergebnisse der Primerkonzentrationsoptimierung für das *Helix-PO*-Primersystem

4.3.2.2 Spezifitätstest

Damit in einem Lebensmittel ein bestimmtes Allergen detektiert werden kann, benötigt man spezifische Primerpaare. Diese sollten lediglich nur an einer spezifischen DNA-Sequenz dieses Allergens binden, damit dieses amplifiziert werden und es somit zu einem Signal kommen kann.

Um die Spezifität des *HEL*-Primerpaares zu testen wurden zwei Tests mit der extrahierten DNA verschiedener Spezien durchgeführt. Dieses erfolgte, wie in Abschnitt 3.2.4.2 beschrieben, mittels Real-Time PCR. In den Abbildungen 11, 12 und 13 sind die Ergebnisse des ersten Spezifitätstests dargestellt. In diesem wurde das *HEL*-Primersystem, mit den in der Tabelle 2 aufgelisteten Spezien, getestet. In der Abbildung 11 sind alle Spezien, außer *Helix lucorum*, dargestellt. Zu erkennen ist, dass das Primerpaar an alle DNA's binden konnte und es somit bei beiden DNA-Konzentrationen (10 ng und 50 ng) zu einer Amplifikation gekommen ist. Jedoch beginnt diese im Durchschnitt bei einem CT-Wert von 35,059.

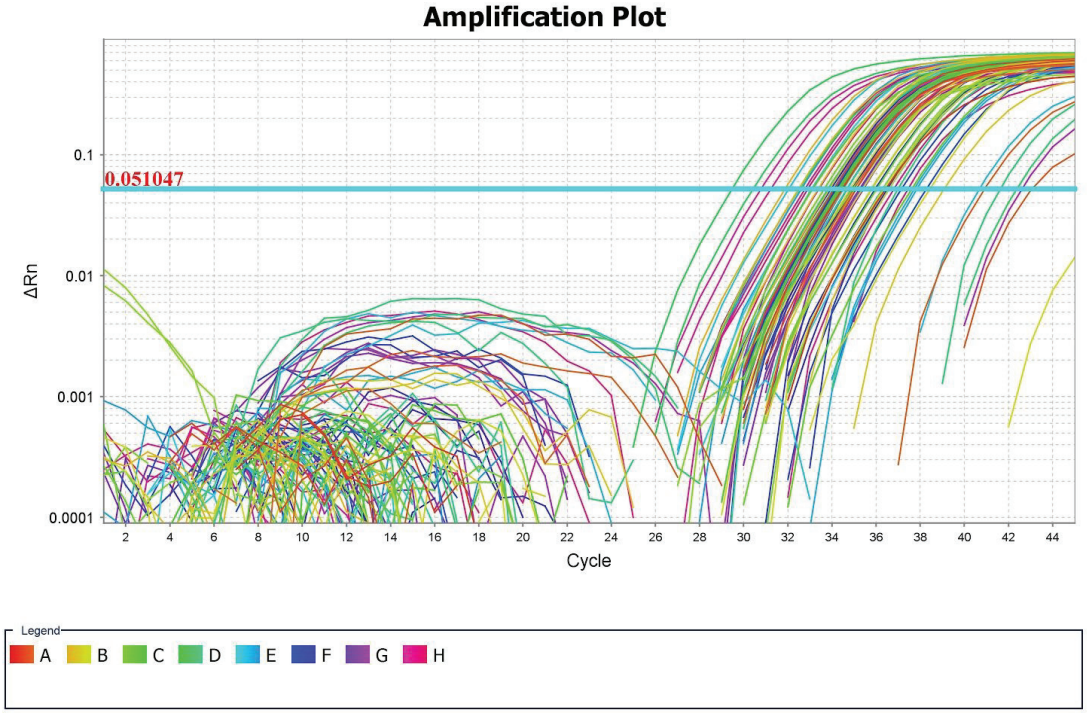

Abbildung 11: Darstellung der Ergebnisse aller Spezien, außer Helix lucorum, des 1.Spezifitätstests mit der Real-Time-PCR

In der Abbildung 12 wird das Ergebnis der Real-Time-PCR mit der Spezies *Helix lucorum* dargestellt. Auch bei dieser wurde eine Doppelbestimmung mit zwei Konzentrationen (10 ng und 50 ng) durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass die geringe DNA-Konzentration zu einem höheren CT-Wert führt. Bei der DNA-Konzentration von 50 ng/µl liegt der CT-Wert bei 14,157 und bei 10 ng/µl bei 16,880. Somit wird die DNA-Sequenz bei 50 ng/µl ab dem 14. Zyklus und bei 10 ng/µl ab dem 17. Zyklus amplifiziert. Zusammenfassend ist zu sagen, dass diese Werte deutlich geringer, als die der anderen getesteten Spezien, sind. Um diesen deutlichen Unterschied zu unterstreichen wurden alle Graphen in der Abbildung 13 zusammengefügt. In dieser ist deutlich zu erkennen, dass die Amplifikation der *Helix lucorum* DNA deutlich früher beginnt als die der anderen Spezien. Somit kann man, obwohl die DNA jeder Spezie amplifiziert wurde, von einer Spezifität des *HEL*-Primerpaares sprechen. Die Rohdaten zu diesem Versuch befinden sich in der Anlage 6.

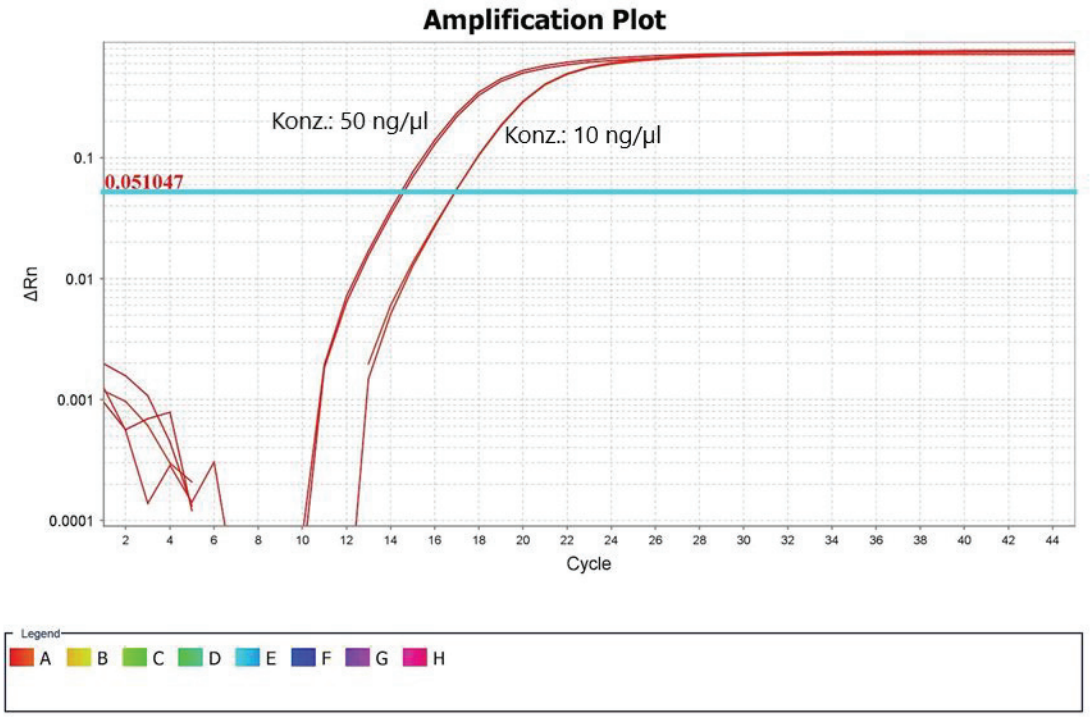

Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse der Art *Helix lucorum*, des 1.Spezifitätstests mit der Real-Time-PCR

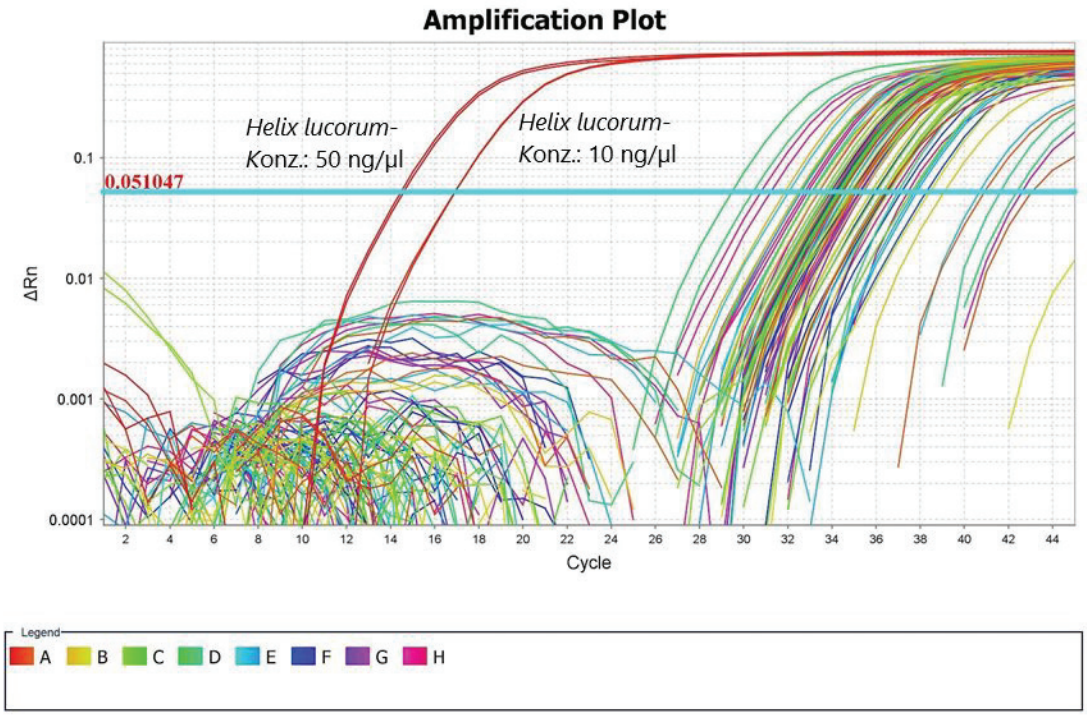

Abbildung 13: Darstellung der Real-Time-PCR Ergebnisse von alle getesteten Spezien

Die Spezifität des Primersystems wurde in einem weiteren Versuch, mit weiteren Spezien, getestet. Außerdem wurde elf Spezien aus dem ersten Test mit einem Universalen 18S-Gen-Primersystem auf deren Amplifizierbarkeit erneut getestet. Dieses wurde aufgrund der hohen CT-Werte so entschieden. Es wurden die Arten gewählt, welche bei beiden DNA-Konzentrationen einen CT-Wert aufwiesen, der höher als 35 war. Die für den Versuch verwendeten DNA's sind der Tabelle 3 zu entnehmen. In der Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Real-Time PCR dargestellt. Es ist zuerkennen, dass die Arten *Helix pomatia* und *Helix aspersa* sehr früh amplifiziert werden. Die *Helix pomatia* DNA ergab bei einer Konzentration von 50 ng/µl einen CT-Wert von 15,171 und bei einer Konzentration von 10 ng/µl einen CT-Wert von 17,905. Die Amplifikation der *Helix aspersa* DNA begann etwas später, bei einem CT-Wert von 22,489 (DNA-Konz. 50 ng/µl) und einem von 25,464 (DNA-Konz. 10 ng/µl). Außerdem beginnt die Amplifikation der anderen Spezien, wie bei dem ersten Spezifitätstest, deutlich später bei einem durchschnittlichen CT-Wert von 34,274. Dadurch lässt sich nach diesen beiden Spezifitätstests schlussfolgern, dass dieses Primersystem für die *Helix*-Arten spezifisch ist. Das System kann bezüglich der Zyklen angepasst werden, indem man die Anzahl der Zyklen auf 30 minimiert. Somit werden die restlichen Spezien nicht detektiert oder erst so spät, dass es unerheblich ist.

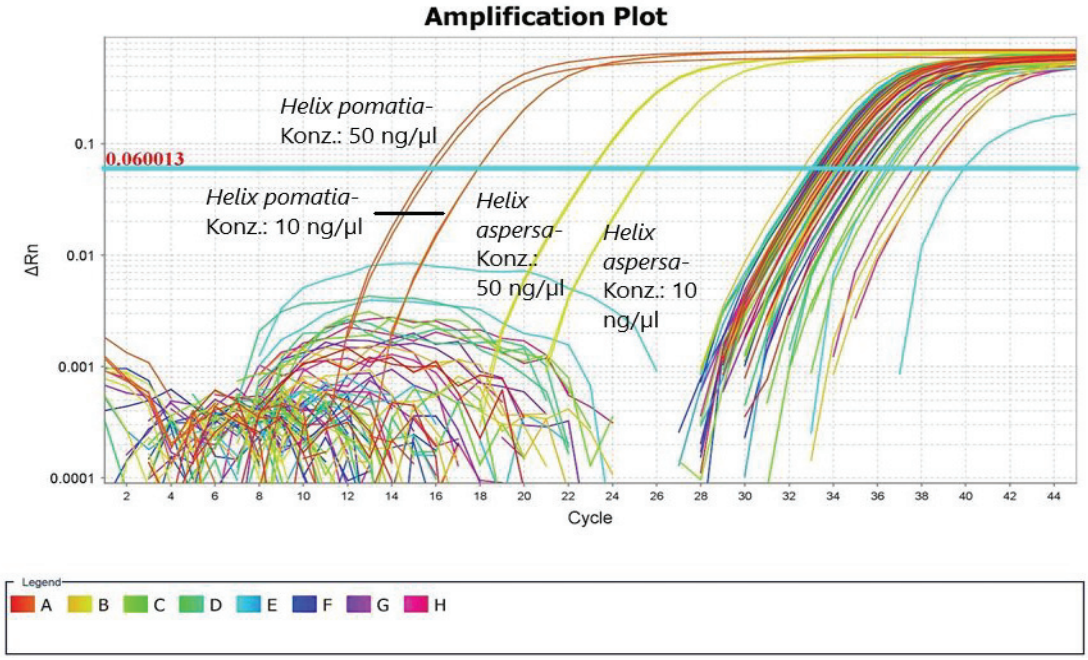

Abbildung 14: Darstellung der Real-Time-PCR Ergebnisse des 2. Spezifitätstest, von allen getesteten Spezien

In der Abbildung 15 sind die Ergebnisse, des Amplifikationstestes der elf ausgewählten Spezien mit einem universalen 18S-Gen-Primersystem, dargestellt. Aus diesem Diagramm ist abzuleiten, dass jede DNA der Spezien amplifizierbar ist. Diese werden durch dieses Primersystem deutlich früher amplifiziert, als mit dem *HEL*-Primersystem. Zudem beginnt die Amplifikation dieser Spezien vor der Amplifikation der NTC. Das es auch bei der NTC-Probe zu einer Amplifikationskurve gekommen ist, ist nicht verwunderlich und kein Zeichen für ein unreines Arbeiten, da es sich bei diesen Primersystemen um 18S-Gen Systemen handelt und diese sehr empfindlich sind. Hinzu kommt, dass die DNA-Polymerase, welche in dem Mastermix enthalten ist, aus dem Heißwasserbakterium Thermus aquaticus gewonnen wird. Die Rohdaten des zweiten Spezifitätstests und des Amplifizierbarkeitstests der elf Proben sind in der Anlage 7 in tabellenform dargestellt. Die Ergebnisse der beiden Spezifitätstests und des Tests auf Amplifizierbarkeit sprechen für die Spezifität des entwickelten Primersystems.

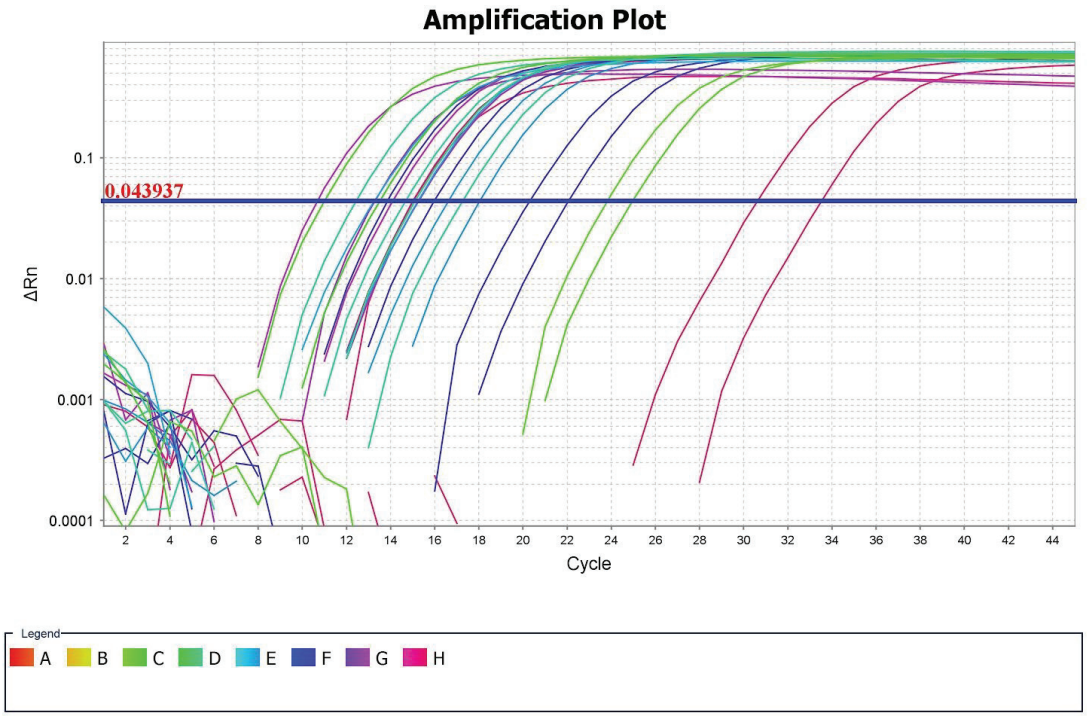

Abbildung 15: Darstellung des Real-Time-PCR Ergebnisses von elf Proben, ob sie amplifizierbar sind

Außerdem wurde für die Entwicklung eines realitätsnahen Produktes, für das Testen des Primersystems an diesem, die Amplifizierbarkeit des Gemüsebrühepulvers der Lidl Eigenmarke Kania getestet. Dieser Versuche wurde sowohl mit dem *HEL*-Primersystem, als auch mit dem universellen 18S-Gen-Primersystem durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die extrahierte DNA amplifizierbar ist. Zudem ist zu erkennen, dass die Amplifikation mit dem *HEL*-Primersystem bei einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl beim durchschnittlich 33ten und bei einer Konzentration von 10 ng/µl beim 33ten Zyklus beginnt. Wird nun die Anzahl der Zyklen, wie in Abschnitt 4.3.2.2 überlegt, auf 30 minimiert, kann die DNA der Gemüsebrühe mit dem Primersystem nicht mehr amplifiziert werden. Somit kommt es dann zu keiner Detektion. Die Gemüsebrühe ist also für den Versuch geeignet. Die Rohdaten dieses Versuches sind in der Anlage 4 dargestellt.

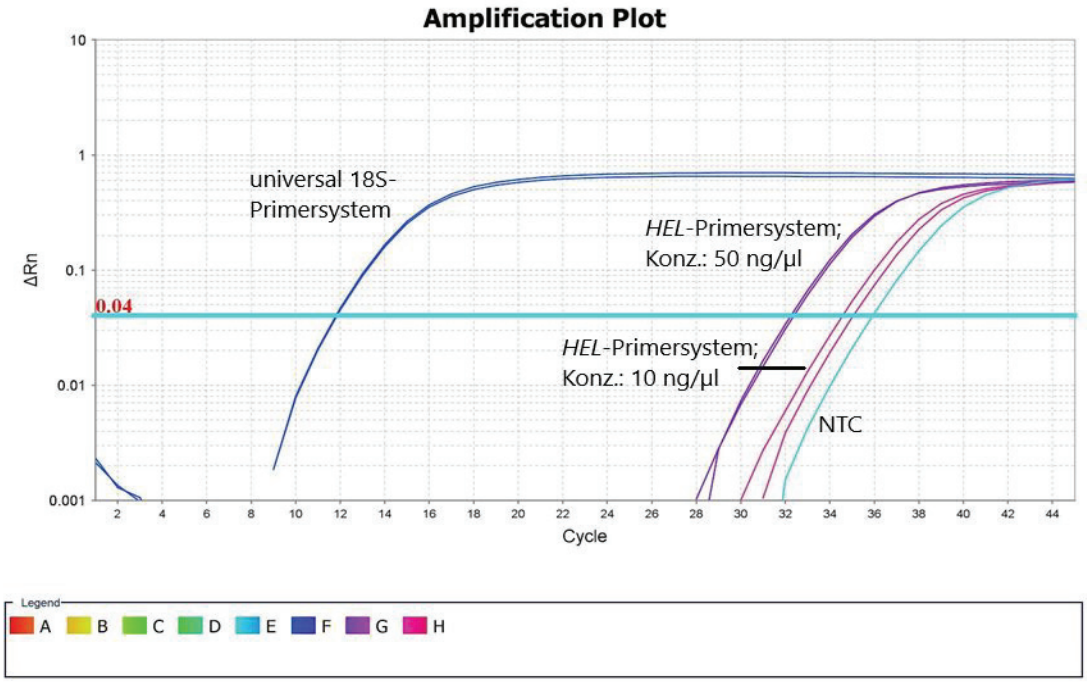

Abbildung 16: Ergebnisse der Amplifizierbarkeit der Gemüsebrühe-DNA mittels einem universalen 18S- und dem *HEL*-Primersystems

4.3.2.3 Bestimmung des Limit of detection und der Effizienz

Bei Allergikern reicht oftmals schon eine sehr geringe Mengen des Allergens aus, um eine allergische Reaktion auszulösen. Daher ist es notwendig, dass ein Primersystem, welches Allergene in Lebensmitteln detektieren soll, bereits bei sehr geringen Mengen dieses Allergens anschlägt. Um dies zu überprüfen wurde die unterste Nachweisgrenze (LOD) bestimmt, welches wie in Punkt 3.2.4.3 beschrieben erfolgte.

Außerdem entspricht die Verdopplung der Amplifikate, während eines PCR Zykluses, meist nicht der Realität. Daher wurde, mit Hilfe einer Verdünnungsreihe, die Effizienz des RT-PCR-Systems berechnet. Diese gibt an, wie nahe das jeweilige System dem Verdopplungsfaktor kommt. Die Verdünnungsreihe entspricht der des LOD-Versuches.

Die Ergebnisse von allen Konzentrationen für die Ermittlung der Nachweisgrenze sind in der Abbildung 17 dargestellt. Aus dieser ist deutlich zu erkennen, dass bei den Konzentrationen von 10 ng/µl und 1 ng/µl die Streuung der Graphen sehr gering ist. Dies spricht dafür, dass die DNA von *Helix pomatia* in dieser Konzentration von dem Primersystem detektiert wird. Jedoch ist bei einer Bestimmung mit der DNA-Konzentration von 10 ng/µl ein Fehler unterlaufen. Dadurch kam es in dem Diagramm zu den untypischen Strichen im oberen Bereich.

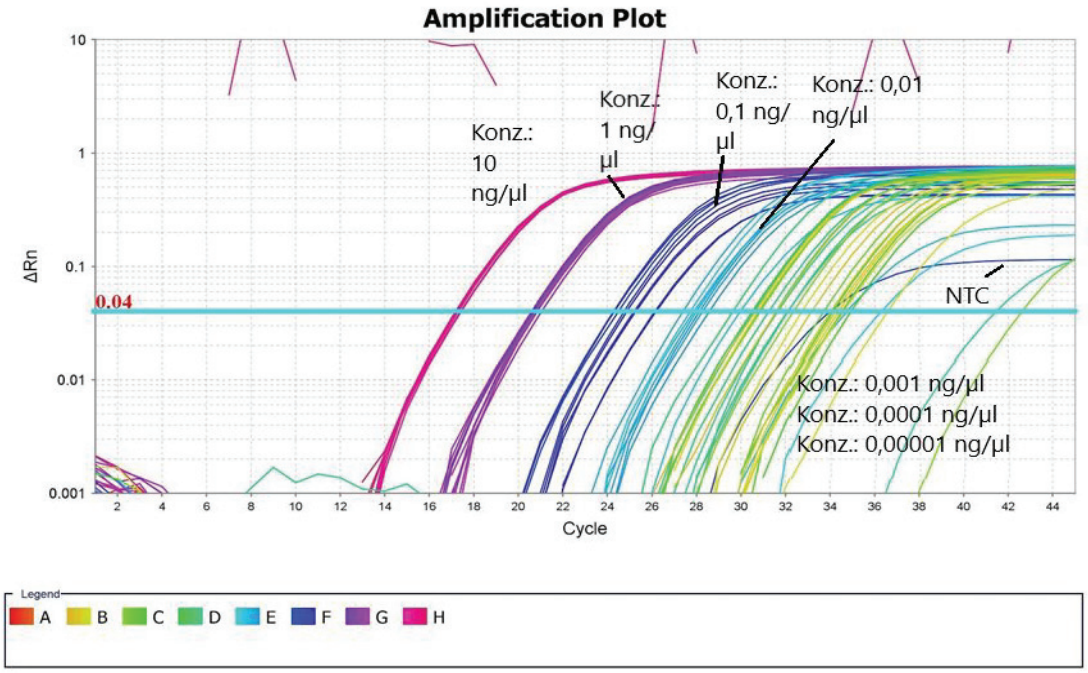

Abbildung 17: Darstellung aller Ergebnisse des LOD-Versuches

Da die Streuung der Graphen ab einer DNA-Konzentration von 0,1 ng/µl zunimmt, wurden die Ergebnisse der einzelnen Konzentrationen in zwei Diagrammen dargestellt. In der Abbildung 18 sind die Konzentrationen 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,1 ng/µl und 0,01 ng/µl dargestellt. Es lässt sich nun erkennen, dass es bei einer Konzentration von 0,1 ng/µl, die Streuung der Graphen beginnt und es einen Ausreißer gibt. Bei einer Konzentration von 0,01 ng/µl nimmt die Streuung der Graphen zu und es gibt zwei Ausreißer. Zudem ist zuerkennen, dass die Amplifikation der DNA-Sequenz, mit abnehmender DNA-Konzentration, später beginnt.

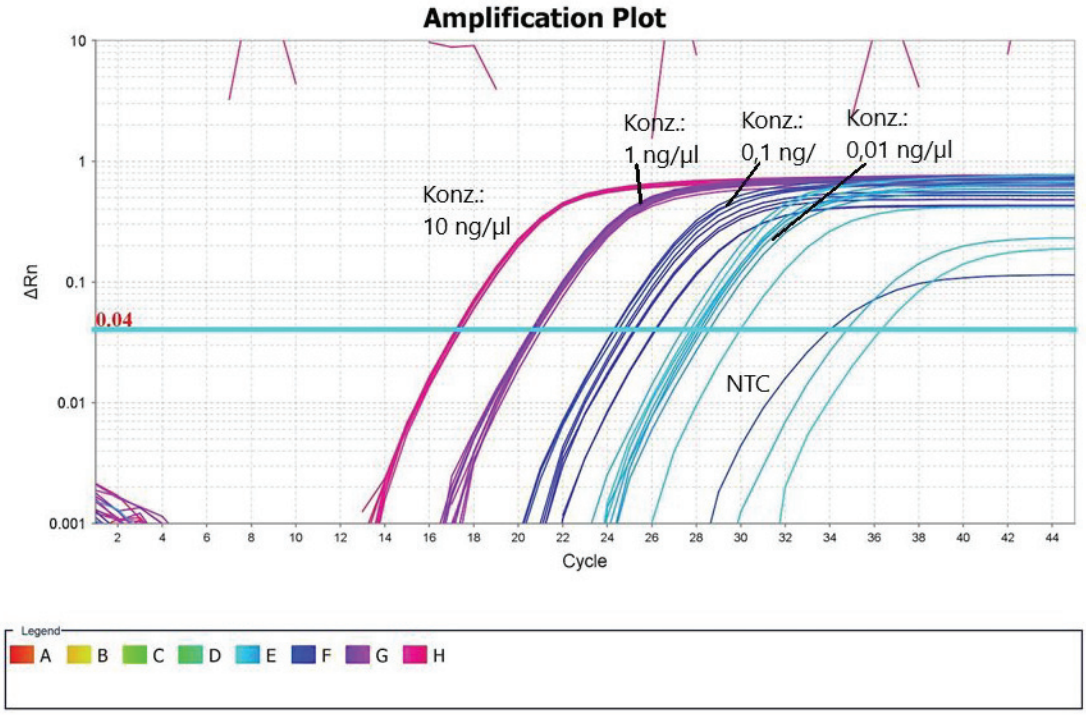

Abbildung 18: Darstellung der ersten vier DNA-Konzentrationen des LOD-Versuches

In der Abbildung 19 sind die DNA-Konzentrationen 0,001 ng/µl, 0,0001 ng/µl und 0,00001 ng/µl dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Streuung bei den unterschiedlichen Konzentrationen sehr stark ist. Daher ist bei diesen DNA-Konzentrationen nicht mehr davon auszugehen, dass die DNA der *Helix pomatia* in einem Lebensmittel nachgewiesen werden kann. Da die Streuung der Graphen bei einer Konzentration von 0,1 ng/µl beginnt, liegt dort die Nachweisgrenze. Die Rohdaten der Ergebnisse des LOD-Tests sind der Anlage 8 zu entnehmen.

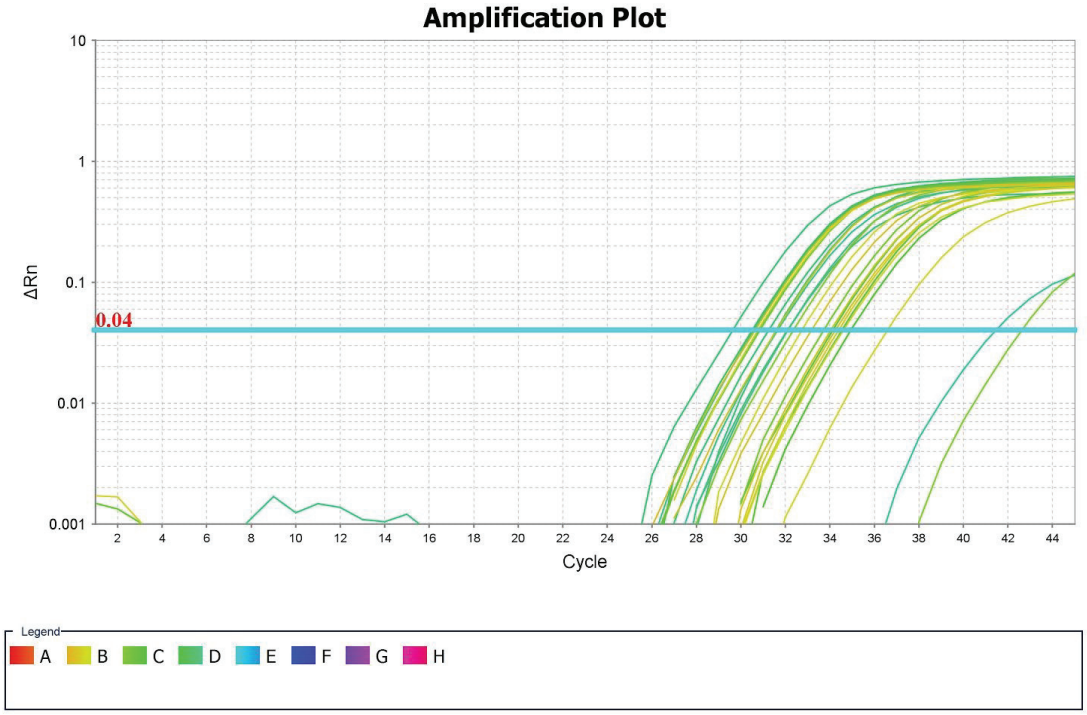

Abbildung 19: Darstellung der letzten drei DNA-Konzentrationen des LOD-Versuches

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse des LOD-Tests dargestellt, aus welchen nun, mit Hilfe des CT-Werts und der dekadischen Logarithmen der DNA-Konzentration, eine Regressionsgerade, zur Beurteilung der Effizienz, erstellt wird.

Tabelle 5: Ergebnis der PCR zur Bestimmung der Effizienz

DNA-Konzentration	MW CT	log 10 der DNA-Konzentration
10 ng/µl	17,281	1
1 ng/µl	20,758	0
0,1 ng/µl	25,938	-1
0,01 ng/µl	29,691	-2
0,001 ng/µl	32,321	-3
0,0001 ng/µl	34,249	-4
0,00001 ng/µl	33,285	-5

Die Effizienz in Prozent wird durch die folgende Gleichung berechnet: $(10^{-1/m}-1) \times 100$. Indem man die Steigung der Regressionsgeraden (m) in die Gleichung einsetzt, lässt sich die Effizienz dieses Systems berechnen. Daraus ergab sich eine Effizienz von 120,62% bei einem Korrelationskoeffizient R2 bei 0,912. Da in der Regel eine Effizienz zwischen 90 und 110 % als vertretbar gilt, ist der erreichte Wert von 120,62% zu hoch. Zudem ist ein weiterer Parameter zur Beurteilung der PCR-Effizienz der R2-Wert. Dieser ist ein statistischer Begriff, der angibt, wie gut ein Wert einen anderen Wert vorhersagen kann. Ein R2-Wert > 0,995 bietet große Sicherheit bei der Korrelation von zwei Werten, somit ist der erreichte Wert zu niedrig. In der Abbildung 20 ist die ermittelte Regressionsgerade und deren Geradengleichung abgebildet.

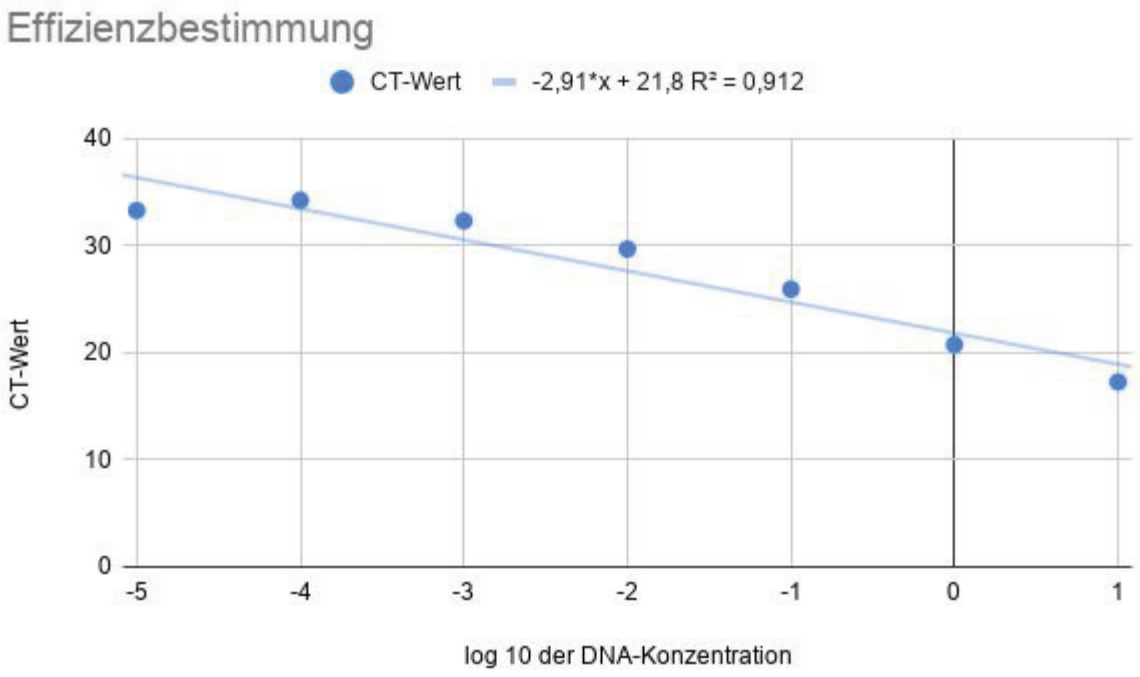

Abbildung 20: Regressionsgerade des *HEL*-Primersystems zur Bestimmung der Effizienz

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit, ein Primersystem zu entwickeln und validieren, um Mollusca als potentiell allergene Zutat in Lebensmitteln zu authentifizieren, ist erreicht. Ein solches System zu entwickeln ist sehr wichtig, da Weichtiere, auf Grundlage einer Stellungnahme der EFSA, 2007 in die Liste der deklarationspflichtigen Allergene aufgenommen wurden.

Die Molluskenallergie macht 20% aller Meeresfrüchte-Allergiefälle aus, darunter reagieren 0,1% der Kinder und 2% der Erwachsenen auf Mollusken hypersensibel. (Neymeyer, H., 2010), (EFSA, 2006)

Außerdem können Kreuzreaktionen auftreten, da das Molluskenallergen Tropomyosin auch in anderen Organismengruppen vorkommt. Strukturell ähnliche Tropomyosine besitzen vor allem Krebstiere wie Garnelen, aber auch Milben (Hausstaub) und Schaben.

Daher können bei sensibilisierten Personen ebenfalls Symptome hervorgerufen werden. Dieses ist auch umgekehrt möglich, sodass Personen mit einer Hausstaub-Allergie auf Mollusken reagieren können. Es wird als das Milben-Krustazeen-Mollusken Syndrom bezeichnet. Eine Allergie kann die Lebensqualität einer betroffenen Person stark mindern. Daher ist eine genaue Deklaration der im Lebensmittel enthaltenen Allergene unumgänglich, um Verbraucher ausreichend zu schützen. Damit man eine richtige Deklaration gewährleisten und kontrollieren kann, benötigt es sensible reproduzierbare Nachweismethoden zur Detektion von Allergenen in Lebensmitteln. Dabei ist es sehr wichtig, dass diese sehr sensibel sind, da sich somit Kreuzkontaminationen in niedrigen ppm-Bereichen genauer detektieren lassen. Standardisierte Verfahren zum Nachweis von Allergenen existieren zurzeit nur für Erdnuss, Haselnuss und Sellerie. Für den Nachweis von Mollusken mit Hilfe der PCR-Methode existieren derzeit nur kommerzielle Testkits, wie das SureFood® ALLERGEN Molluscs Kit von R-Biopharm AG (R-Biopharm).

Daher besteht das Ziel, die derzeitigen Lücken, hinsichtlich der Analytik extrem artenreicher Allergengruppen, zu schließen. Es ist erforderlich neue Verfahren zu entwickeln, um eine vollständige Warenkontrolle, entlang der Handelswege bis zum Endprodukt, zu ermöglichen und die Kennzeichnungspflicht zu überprüfen. (BfR)

Für den Nachweis von Allergenen mittels der Real-Time-PCR-Methodik sind spezifisch bindende Primerpaare unabdingbar. Ein solches Primersystem, zur Authentifizierung von Mollusca als potentiell allergene Zutat zu entwickeln, war das Ziel dieser wissenschaftliche

Arbeit. Es wurde sich hierbei auf die Entwicklung eines Primersystems für die Spezies *Helix pomatia* konzentriert. Die Entwicklung eines Primersystems, welches die gesamten Arten des Tierstammes der Mollusken abdeckt, würde den Umfang einer Bachelorarbeit überschreiten.

Der erste Schritt für die Entwicklung von Primerpaaren ist das Suchen nach DNA-Sequenzen in Gendatenbanken. Hierfür wurden die Gendaten von NCBI verwendet. Bei dieser Suche kamen lediglich zwei Ergebnisse heraus. Somit war die Auswahl gering, da bereits auf einer der Sequenzen ein Primerpaar entwickelt wurde. Die Primerpaarentwicklung auf diese Sequenz erfolgte mittels des Online-Programmes Primer3Plus, bei welchem das Primerpaar mit den optimalsten Bedingungen (Länge, Schmelztemperatur und GC-Gehalt) ausgewählt wurde.

Eine weitere Grundvoraussetzung für das Gelingen der Versuche war die Extraktion hochqualitativer und inhibitorfreier DNA. Dieses erfolgte mit Hilfe der BfR interne CTAB-Extraktionsmethode und NucleoSpin® Food Kit-Methode. Hierbei kam es zu einigen Schwierigkeiten. Zum Kennenlernen beider Methoden wurden diese beide jeweils einmal durchgeführt. Aufgrund der Zeitersparnis wurde sich für nächste Extraktionen für die NucleoSpin® Food Kit-Methode entschieden. Hierbei kam heraus, dass diese Methode für die DNA -Extraktion von Molluskenarten keine verlässliche Methode darstellt. Somit mussten manche Proben nach der Extraktion mit dem NucleoSpin® Food Kit-Methode, aufgrund von einer unzureichenden DNA-Konzentration und -Qualität, erneut mit der CTAB-Methode extrahiert werden. Dadurch kam es zu einem Verlust von Zeit.

Die Probleme bei der DNA-Extraktion aus Mollusken sind wohlmöglich die schleimige , viskose Konsistenz der Proben während der Extraktion entstanden. Außerdem ist es für eine gut gelingende Extraktion am besten Muskelfleisch zu verwenden. Dieses ist jedoch schwer zu erkennen. Die DNA-Extraktion erwies sich zudem bei den Fischen als schwierig.

Nach der Extraktion wurden die bestellten Primer mittels Endpunkt-PCR getestet und die PCR-Produkte durch eine gelelektrophoretische Auftrennung sichtbar gemacht. Bei dieser wurde sichtbar, dass bei dem *Lopho*-Primersystem, sowohl bei der Leitart *Mytilus edulis*, als auch bei der getesteten Art *Crassostrea gigas*, keine klar abzugrenzenden Banden entstanden sind. Daher ist davon auszugehen, dass dieses Primerpaar nicht spezifisch an der entsprechenden DNA-Sequenz binden kann und dieses somit unbrauchbar ist. Somit wurden mit diesem Primerpaar keine weiteren Versuche durchgeführt und es wurde verworfen. Die beiden Primersysteme für die Art *Helix pomatia* wiesen klar abzugrenzende Banden bei dem Versuch

mit der Art *Helix lucorum* auf. Daher ist davon auszugehen, dass diese spezifisch an der DNA-Sequenz binden konnten. Bei der Primertitration, mit Hilfe der Real-Time-PCR kam heraus, dass es beim *HEL*-Primersystem zu einer früheren Amplifikation kommt. Dieses bedeutet, dass weniger Zyklen zur Detektion dieser Art notwendig sind. Für die Detektion ist es ausreichend ein funktionierendes Primersystem zu entwickeln. Dementsprechend wurden lediglich mit dem *HEL*-Primersystem weitere Versuche durchgeführt. Die Optimierung dieses Primerpaares ergab eine optimale Annealingtemperatur von 62°C und eine Primerkombination von 600 nM Forwardprimer und 300 nM Reverseprimer bei einem CT-Wert von 14,163. Hiernach konnten die Versuche, wie die Ermittlung der Spezifität, die Ermittlung des LOD und der Effizienzbestimmung durchgeführt werden.

Es wurden zwei Spezifitätstests durchgeführt, bei welchen insgesamt 41 Arten getestet wurden. Diese umfassten die Bereiche der Nutztiere und -pflanzen, der *Bivalvia*, der *Pisces*, der *Cephalopoda*, der *Eucarida*, der *Lophotrochozoa* und der Insekten. Diese Tests führten zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Aufgrund von sehr hohen CT-Werten beim ersten Spezifitätstest mancher Arten, musste die Amplifizierbarkeit dieser, mit einem universellen 18S-Gen Primersystem, getestet werden. Dieses zeigte, dass die getesteten Arten amplifizierbar und somit die Ergebnisse des Spezifitätstest verwendbar sind. Die Amplifikation der Arten *Helix pomatia*, *Helix lucorum* und *Helix aspersa* erfolgte, mit einem durchschnittlichen CT-Wert von 18,678, deutlich vor den anderen getesteten Arten. Diese besitzen einen durchschnittlichen CT-Wert von 34,667. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das entwickelte System für die spezifische Detektion der *Helix-Arten* geeignet ist. Zudem wäre eine Minderung der Anzahl der Zyklen auf 30 sinnvoll, da somit die restlichen Spezien nicht detektiert werden oder erst so spät, dass es unerheblich ist.

Anschließend konnte ein LOD von 0,1 ng/µl bestimmt werden, da bei dieser DNA-Konzentration die Streuung der Graphen beginnt. Um die Streuung der Graphen zu minimieren, sollte die Verdünnungsreihe anstelle von DNA-freiem Wasser mittels einer Hintergrund-DNA erstellt werden. Dafür würde sich die DNA der Art Litopenaeus vannamei eignen, da diese beim Spezifitätstest des *HEL*-Systems erst sehr spät amplifiziert wird. Dieser Versuch konnte, aufgrund von Lieferverzögerungen des Primersystems und dem dadurch entstandenen Zeitmangel, nicht mehr durchgeführt werden.

Durch die Verdünnungsreihe und den dazugehörigen CT-Werten des LOD-Versuches konnte eine Effizienz von 120,62%, bei einem Korrelationskoeffizient R2 bei 0,912, berechnet werden.

Diese beiden Werte liegen außerhalb des tolerierbaren Bereiches. Die Effiezienz sollte zwischen 90% und 110% liegen und der Korrelationskoeffizient sollte eine Wert von > 0,995 erreichen (ThermoFisherScientific). Diese Werte lassen sich durch die große Streuung der LOD-Ergebnisse erklären. Daher sollte sie, bei einem erneuten Versuch, mit Hilfe einer Hintergrund-DNA, im akzeptierten Bereich liegen. Außerdem sollte bei einem neuen Versuch überlegt werden, die Verdünnungsreihe so auszulegen, dass es mindestens drei Konzentrationen über der Konzentration von 1 ng/µl gibt. Dadurch beginnt die Streuung in der Verdünnungsreihe zu einem späteren Zeitpunkt.

Für eine genaue Beurteilung, ob die untere Nachweisgrenze ausreichend ist, sollte noch ein Versuch durchgeführt werden der auf den ppm-Bereich schließen lässt. Jedoch gibt es nur wenige Informationen über die niedrigste Dosis von Weichtierallergenen, die eine klinische Reaktion auslösen kann. Während einer doppelblinden, placebokontrollierten Nahrungsmittelprovokationsstudie mit getrockneten Schnecken wurden Reaktionen im Bereich von wenigen hundert Milligramm beobachtet (EFSA, 2006). (BfR)

Ein möglicher Versuch, um herauszufinden, bis zu welchem ppm-Bereich das Primersystem noch in der Lage ist die DNA von *Helix pomatia* zu detektieren, ist das Erstellen eines realitätsnahen Produktes. Dafür kann Gemüsebrühepulver der Lidl-Eigenmarke Kania verwendet werden, da die davon extrahierte DNA vom Primersystem ebenfalls sehr spät detektiert wird. Den Versuch kann das Gemüsebrühepulver mit einer bestimmten Menge Wasser zu einer Paste angerührt werden. Von dieser werden 9 g mit 1g *Helix pomatia*-Fleisch mit Hilfe eines Mixers vermischt. Aus diesem Gemisch wird 1 g entnommen und dieses mit 9 g der Gemüsebrühepaste erneut vermengt. Somit besitzt dieses Gemisch eine Konzentration an *Helix pomatia* von 0,1 g/10 g. Von diesem Gemisch wird wieder 1 g entnommen und mit 9 g der Gemüsebrühepaste vermischt. Das Ganze wird so lange wiederholt bis man bei einer Konzentration von 0,0001 g/ 10g angelangt ist. Diese entspricht einer Konzentration von 10 mg/ kg und liegt somit in einem ppm-Bereich von 10. Von den jeweiligen Konzentrationsschritten wird die DNA extrahiert und diese auf deren Amplifizierbarkeit mittels dem universalen 18S-Gen Primersystem und dem entwickelten Primersystem getestet. Die letzte amplifizierbare Konzentration ist die Nachweisgrenze im ppm-Bereich. Aufgrund von Lieferverzögerungen des Primerpaares und den dadurch entstandene Zeitmangel konnte dieser Versuch nicht mehr durchgeführt werden.

Aufgrund der erlangten Ergebnisse lässt sich darauf schließen, dass dieses Primersystem die *Helix*-Arten detektiert und somit als ein solches System etabliert werden kann. Jedoch sollten für

eine solche Aussagen die beschriebenen Versuche noch durchgeführt werden. Außerdem sollte noch die Wiederholbarkeit getestet werden. Dafür sollte eine DNA-Extraktion, je 4 Extraktionen an zwei verschiedenen Tagen und eine PCR von 8 Proben, an zwei unterschiedlichen Tagen, durchgeführt werden. Ein weiterer Faktor der geprüft werden sollte ist die Reproduzierbarkeit. Dabei wird das Primersystem in mehreren Labors, mit mehreren Prüfern und mehreren Geräten getestet (Ringversuch) (Zagon, J., 2010).

6 Zusammenfassung

Etwa 4% der Bevölkerung leiden an einer Nahrungsmittelallergie. Dafür reichen oft schon kleine Mengen eines Lebensmittels, um Beschwerden auszulösen. Je nach Alter und Auslöser verläuft die Allergie sehr unterschiedlich. Bei einer Nahrungsmittelallergie reagiert das Immunsystem auf eigentlich harmlose Eiweiße, als wären sie Fremdkörper. Dabei können Symptome wie Juckreiz und Schwellungen der Mund-und Rachenschleimhaut, Magen-Darm-Beschwerden und sogar anaphylaktische Reaktionen auftreten.
Die Deklaration von Allergenen ist in der Verordnung (EU) Nr. 178/2002 festgeschrieben und für alle EU Mitgliedsstaaten verpflichtend. Weichtiere (Mollusken) wurden erst kürzlich in die Liste der deklarationspflichtigen Allergene aufgenommen. Daher gibt es für diesen Tierstamm noch keine publizierte Nachweismethode mittels der Real-Time PCR. Deswegen befasst sich diese Arbeit mit der Entwicklung und Validierung von Primersystemen zur Authentifizierung von Mollusca als potentiell allergene Zutat.

Primer sind kurze Sequenzen , 20-50 Basen, welche den Startpunkt für die Polymerase markieren und synthetisch hergestellt werden. Man benötigt zwei Startmoleküle, eine Forward-Primer und einen Reverse-Primer. Für die Entwicklung dieser Primerpaare werden zunächst DNA-Sequenzen von der Art *Helix pomatia* (Weinbergschnecke) in der Gendatenbank von NCBI gesucht. Auf diese wird, mit Hilfe von der online Software Primer3Plus, ein Primerpaar entwickelt. Die DNA-Sequenz, welche amplifiziert werden soll, wird mit der Gendatenbank von NCBI abgeglichen. Ist diese spezifisch für die Tierart oder den Tierstamm, wird das Primerpaar, mittels der Endpunkt-PCR-Methode, auf deren Funktionalität und der optimalen Annealingtemperatur getestet. Die optimale Forward- und Reverseprimerkonzentration, die Spezifität, die untere Nachweisgrenze (LOD) und die Effizienz werden durch die Real-Time-PCR-Methode bestimmt. Die PCR ist eine DNA-basierte Analysemethode, bei welcher spezifische DNA-Sequenzen dupliziert und analysiert werden. Sie zeichnet sich durch hohe Spezifität, Sensitivität und Robustheit aus. Man unterscheidet zwischen zwei Methoden, die klassische Endpunkt-PCR und die Real-Time-PCR. Bei beiden Methoden laufen dieselben Schritte, welche als Zyklen bezeichnet werden, für die DNA Vervielfältigung ab. Jedoch erfolgt die klassische Endpunkt-PCR in einem Thermocycler und die Darstellung der PCR-Produkte erfolgt mittels Gelelektrophorese. Die Real-Time-PCR findet in einem Gerät statt, welches einen Thermocycler und einen Fluoreszenz-Analysator kombiniert. Dem DNA-Gemisch wird zunächst ein inaktiver Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, welcher durch den Beginn der

DNA-Vervielfältigung, aktiv wird. Bei jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen, welches in Echtzeit geschieht. Aus diesen Messungen lässt sich auf die Menge der amplifizierten DNA schließen.

Zum Abschluss soll das entwickelte Primersystem in einem realitätsnahem Produkt getestet werden.

7 Literatur

Ableitner, O.: Einführung in die Molekularbiologie. 2.Auflage. Berlin: Springer Spektrum, 2018.

Allergy guide: Weichtiere/Mollusken [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.allergy-guide.com/allergien/nahrungsmittelallergien-unvertraeglichkeiten/weichtiere-mollusken

Alphey, L.: DNA-Sequenzierung. 1.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1998.

Hansen, A.: Bioinformatik- Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, Birkhäuser Verlag Basel, Boston,Berlin, 2001

Bayerischer Rundfunk: 1. Der genetische Fingerabdruck [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter:
https://www.br.de/telekolleg/faecher/biologie/biologie-11-gentechnik114.html

Bibliothek Uni-Halle: Grundlagen der Massenspektrometrie in der Peptid- und Proteinanalytik [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter
https://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/07/07H112/t3.pdf

Biologie-Schule: Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: http://www.biologie-schule.de/desoxyribonukleinsaeure-dna.php

Biologie-Schule: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: http://www.biologie-schule.de/polymerase-kettenreaktion-pcr.php

Biologie-Seite: Polymerase-Kettenreaktion [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.biologie-seite.de/Biologie/Polymerase-Kettenreaktion

Biologie Seite: Weichtiere [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.biologie-seite.de/Biologie/Weichtiere

Burchard, H. J:: Allergien, 2019 [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://www.planet-wissen.de/gesellschaft/krankheiten/allergien/index.html

Bundesinstitut für Risikobewertung: Bessere Allergenkennzeichnung von Lebensmitteln für Verbraucher: Schwellenwerte können derzeit noch nicht zuverlässig festgelegt werden, 2009 [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/bessere_allergenkennzeichnung_von_lebensmitteln_fuer_verbraucher.pdf

Bundesinstitut für Risikobewertung: Entwicklung und Validierung neuer Methoden für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Fischen, Krebs- und Weichtieren sowie Insekten als potentielle Lebensmittelallergene (AQUALLERG-ID) [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://www.bfr.bund.de/de/entwicklung_und_validierung_neuer_methoden_fuer_den_qualitativen_nachweis_und_die_quantitative_bestimmung_von_fischen__krebs__und_weichtieren_sowie_insekten_als_potentielle_lebensmittelallergene__aquallerg_id_-241847.html

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Allergenkennzeichnung ist Pflicht, 2019 [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Lebensmittelallergien und Unverträglichkeiten [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.in-form.de/wissen/allergien-lebensmittel/

Cell Signaling Technology: Überblick über den Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://www.cellsignal.de/contents/_/overview-of-enzyme-linked-immunosorbent-assay-(elisa)/elisa-educational

Newton, C.R.; Graham, A.: PCR. 2. Auflage. Heidelberg,Berlin,Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1994

FAO: Consumption of Fish and Fishery Products [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: http://www.fao.org/fishery/statistics/global-consumption/en

Forum Bio- und Getreidetechnologie: DNA [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.transgen.de/lexikon/1589.dna.html

Fischinformationszentrum: Muscheln. Hamburg: 2015. [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://www.fischinfo.de/images/Lexikon/MUSCHELN.pdf

GALAB: Weichtiere/Mollusken [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.galab.de/de/lebensmittel/allergene_weichtiere.php

Hupfer, C.; Busch, U.: Nachweis allergener Zutaten in Lebensmitteln, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL).Oberschleißheim [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter:

https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/kennzeichnung/allergene/allergene_lebensmittel/doc/nachweis_allergene.pdf

Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen: Allergien, 2017 [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.gesundheitsinformation.de/allergien.2570.de.html

Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen: Nahrungsmittelallergie, 2017 [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.gesundheitsinformation.de/nahrungsmittelallergie.2297.de.html

Irion, R.: Meeresfrüchte, 2015 [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://www.alles-zur-allergologie.de/Allergologie/Artikel/4023/Allergen,Allergie/Meeresfrüchte/

Kütting, B.; Brehler, R.: Das Milben-Krustazeen-Mollusken-Syndrom. Springer-Verlag, 2001

Lauer, F.; Diehn, S.; Seifert, S.; Kneipp, J.; Sauerland, V.; Barahona, C.; Weidner, S.: Sind einzelne Pollenkörner mittels Massenspektrometrie eindeutig identifizierbar?, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), 2018 [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://www.bam.de/Content/DE/Paper-des-Monats/2018/Umwelt/2018-11-01-paper-des-monats-umwelt.html

Lecturio: Die Desoxyribonukleinsäure-Aufbau, Organisation und verschiedene Arten der DNA [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.lecturio.de/magazin/dna/

Lämmel,S.; Maschkowski G.: Allergenkennzeichnung [online]. Bundeszentrum für Ernährung, 2017 [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.bzfe.de/inhalt/allergenkennzeichnung-1878.html

MVZ Labor Ravensburg: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter:
https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekular biologischen-methoden/polymerase/

McLennan, A.; Bates, A.; Turner, P.; White, M.: Molekularbiologie. 1.Auflage. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2013

Neymeyer, H.: Entwicklung und Validierung von mollusken-spezifischen Real-Time PCR Systemen zur Detektion von Allergenen in Lebensmittel. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 2010

Pflanzenforschung: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter:
https://www.pflanzenforschung.de/de/themen/lexikon/polymerase-kettenreaktion-pcr-227

R-Biopharm: PCR in der Allergenanalytik: Ein kontroverses Thema [online], [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter:
https://food.r-biopharm.com/de/news/pcr-in-der-allergenanalytik-ein-kontroverses-thema/

R-Biopharm: SureFood® ALLERGEN Molluscs [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter: https://food.r-biopharm.com/de/produkte/surefood-allergen-molluscs-2/

SelectScience: NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer by Thermo Fisher Scientific [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter:
https://www.selectscience.net/products/nanodrop-1000-spectrophotometer/?prodID=79482

ThermoFisherScientific: Real-Time PCR: C_t-Wert verstehen [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter:

https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html

Weber, W.: Allergene in Lebensmitteln [online]. Institut für Produktqualität, 2019 [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter:

https://www.produktqualitaet.com/de/lebensmittel/allergene.html

Zagon, J.: Entwicklung innovativer Schnelltests zum Nachweis von Lebensmittelallergenenin der Produktentwicklung-und kontrolle mittels PCR, 2010 [online], [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter:
https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/entwicklung_innovativer_schnelltests_zum_nachweis_von_lebensmittelallergenen.pdf

Zagon, J.: DNA-Extraktionsverfahren mit CTAB nach DIN EN ISO 21571:2013-08. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung, 2017

Zuberbier, T.: Was passiert bei einer Allergie in meinem Körper?, 2019 [online]. ECARF, [Zugriff am 13.02.2020]. Verfügbar unter:

https://www.ecarf.org/info-portal/allgemeine-allergie-infos/was-passiert-bei-einer-allergie-in-meinem-koerper/

Zuberbier, T.: Krebs-und Weichtierallergie [online]. ECARF, 2016 [Zugriff am 19.12.2019]. Verfügbar unter: https://www.ecarf.org/info-portal/allergien/krebs-und-weichtierallergie/

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Entwicklung und des Ablaufes einer allergischen Reaktion 11

Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Extinktionskurve des NanoDrop™ ND-1000-Programmes 24

Abbildung 3: Darstellung der Primermatrix für die Primeroptimierung 29

Abbildung 4: Erster Teil des Alignments für das *HEL*-Primersystem 37

Abbildung 5: Zweiter Teil des Alignments für das *HEL*-Primersystem 37

Abbildung 6: Dritter Teil des Alignments für das *HEL*-Primersystem 38

Abbildung 7: Gelbild für das Testen der Funktionalität und der optimalen Annealingtemperatur der Primersysteme 40

Abbildung 8: Gelbild für den Funktionalitätsversuches der Primersysteme mit weiteren Spezien 41

Abbildung 9: Ergebnisse der Primerkonzentrationsoptimierung für das *HEL*-Primersystem 42

Abbildung 10: Ergebnisse der Primerkonzentrationsoptimierung für das *Helix-PO*-Primersystem 43

Abbildung 11: Darstellung der Ergebnisse aller Spezien, außer *Helix lucorum*, des 1.Spezifitätstests mit der Real-Time-PCR 44

Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse der Art Helix lucorum, des 1.Spezifitätstests mit der Real-Time-PCR 45

Abbildung 13: Darstellung der Real-Time-PCR Ergebnisse von alle getesteten Spezien 46

Abbildung 14: Darstellung der Real-Time-PCR Ergebnisse des 2. Spezifitätstest, von allen getesteten Spezien 47

Abbildung 15: Darstellung des Real-Time-PCR Ergebnisses von elf Proben, ob sie amplifizierbar sind 48

Abbildung 16: Ergebnisse der Amplifizierbarkeit der Gemüsebrühe-DNA mittels einem universalen 18S- und dem *HEL*-Primersystems 49

Abbildung 17: Darstellung aller Ergebnisse des LOD-Versuches 50

Abbildung 18: Darstellung der ersten vier DNA-Konzentrationen des LOD-Versuches 51

Abbildung 19: Darstellung der letzten drei DNA-Konzentrationen des LOD-Versuches 52

Abbildung 20: Regressionsgerade des *HEL*-Primersystems zur Bestimmung der Effizienz 54

Tabelle1: Exemplarische Darstellung der verwendeten Excel-Tabelle zur Berechnung der Mastermixzusammensetzung 27

Tabelle 2: Auflistung der, für den ersten Spezifitätstests, verwendeten Proben, deren Konzentration, sowie die Verdünnung 30

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Proben, deren Konzentration, sowie die Verdünnungfür den zweiten Spezifitätstest und für das Testen der Amplifizierbarkeit 32

Tabelle 4: Darstellung des Primerdesign-Ergebnisses 36

Tabelle 5: Ergebnis der PCR zur Bestimmung der Effizienz 53

9 Anlagen

Anlage 1: Liste der verwendeten Proben 71

Anlage 2: Liste der verwendeten Chemikalien 76

Anlage 3: Liste der verwendeten Materialien 78

Anlage 4: Liste der verwendeten Primer 79

Anlage 5: Rohdaten Primertitration 80

Anlage 6: Rohdaten des ersten Spezifitätstests 81

Anlage 7: Rohdaten des zweiten Spezifitätstests und des Amplifizierbarkeitstests der elf Proben 87

Anlage 8: Rohdaten des LOD-Tests und des Testes ob die DNA der Gemüsebrühe amplifizierbar ist 94

Anlage 9: Ergebnisse der beiden DNA-Extraktionsmethoden 101

Anlage 1: Liste der verwendeten Proben

Probenname	lateinische Bezeichnung	Probenherkunft
Gestreifte Weinbergschnecke	*Helix Lucorum*	Escal, Metro Cash & Carry Deutschland GmbH, Nonnendammallee 135, 13599 Berlin
Große Achatschnecke	*Achatina fulica*	Escal S.A. - 6 rue de la Minoterie - F-67000 Strasbourg, Metro Cash & Carry Deutschland GmbH, Nonnendammallee 135, 13599 Berlin
Meeresschnecken	*Buccinum humphreysianum*	Frischeparadies
Tiefseecallops	*Placopecten magellanicus*	USA, gefangen im Nordwestatlantik (FAO 21), mare seafood Metro Cash & Carry Deutschland GmbH, Nonnendammallee 135, 13599 Berlin
Miesmuschel	*Mytilus edulis*	FROSTA FAO-27 Nordost-Atlantik
Pazifische Austern	*Crassostrea Gigas - Fines de Claires*	Frischeparadies
Mexikanisce Vieraugenkrake	*Octopus maya*	FAO 31 - Mittlerer Westatlantik, Alles Fisch & C. S.R.L., Chioggia (VE), Italien
Kap Hoffnung Tintenfisch	*Loligo reynaudii*	FAO 47 - Südostatlantik, Alles Fisch & C. S.R.L., Chioggia (VE), Italien

Gewöhnlicher Tintenfisch	*Sepia officinalis*	FAO 34 - Mittlerer Ostatlantik, Alles Fisch & C. S.R.L., Chioggia (VE), Italien
Königskrabbe	*Paralithodes camtschaticus*	Kaufland, Junckerstraße 26. 16816 Neuruppin
Chinesische Wollhandkrabbe	*Eriocheir sinensis*	Wolfgang Schröder; Gahlberg 2; 14715 Havelaue OT Strodehne; Tel.: 033875/30737; 0160-6818388; www.fischerei-schroeder.eu
White Tiger Garnele	*Litopenaeus vannamei*	Aquakultur, Ecuador, Importeur: Alles Fisch & C. S.R.L., Chioggia (VE), Italien
Eismeergarnele- Shrimps "wild catch"	*Pandalus borealis*	FROSTA FAO-21 Nordwest-Atlantik
Seehecht	*Merluccius merluccius*	FROSTA FAO-27 Nordost-Atlantik
Seelachs	*Pollachius virens*	FROSTA FAO-27 Nordost-Atlantik
Hausschwein	*Sus scrofa domesticus*	Fleischerei "Bachhuber" Berlin
Huhn	*Gallus gallus domesticus*	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und lebensmittelsicherheit
Rind	*Bos taurus*	EURL-AP Gembloux BE
Weizen	*Triticum*	dm Drogerie Markt

Maismehl	*Zea mays*	T.T. Baits Thomas Tschernich Äußere Trennenloher Straße 29 91058 Erlangen www.ttbaits.de
Soja	*Glycine max*	Handel
Wanderheuschrecke	*Migrantis Praecepero Lcustae*	Insekten-Express - Jörg Zöller - Scharfenberger Str. 26 - 13505 Berlin
Kurzflügelgrille	*Gryllodes Sigillatus*	Insekten-Express - Jörg Zöller - Scharfenberger Str. 26 - 13505 Berlin
Erbse	*Pisum salvum*	Sachsen-Anhalt, Freilanderbse (Priv. Garten)
Dinkel	*Triticum spelta*	Reformhaus Quentin GmgH; Kaiserin-Augusta-Str. 78; 12103 Berlin
Raps	*Brassica napus*	Landesamt für Landwirschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern, Pflanzenschutzdienst
Grünlippmuschelmehl	*Perna canaliculus*	Common Baits Christian Schellhammer Danbachstraße 53-55 72348 Rosenfeld Email: info@common-baits.de

Lamm	*Ovis gmelini aries*	Öz-Gida Supermarkt Hauptstr. 16 Berlin 10827
Pferd	*Equus*	Roß-Schlächterei Alfred Bredel Feldstr. 32; 13585 Berlin
Hase	*Leporidae*	Hase Argentino geti wilba GmbH & Co D-27421 Bremervorde
Ziege	*Capra aegagrus hircus*	Ziegenkäserei Karolienhof 16766 Flatow
Braune Venusmuschel	*Callista chione*	Frischeparadies
Meerscheidmuschel	*Ensis ensis*	Frischeparadies
Moschuskrake	*Eledone moschata*	Mittelmeer, Metro Cash & Carry Deutschland GmbH, Nonnendammallee 135, 13599 Berlin
Amerikanischer Hummer	*Homarus americanus*	Wolfgang Schröder; Gahlberg 2; 14715 Havelaue OT Strodehne; Tel.: 033875/30737; 0160-6818388; www.fischerei-schroeder.eu
Spirulina-Alge	*Spirulina*	T.T. Baits Thomas Tschernich Äußere Trennenloher Straße 29 91058 Erlangen www.ttbaits.de

Mehlkäfer	*Tenebrio molitor*	Mantidendealer, Zaandamer Str. 5, 12359 Berlin
große pazifische Schwimmkrabbe	*Portunus pelagicus*	Allergieprojekt
Nordseegarnele	*Crangon crangon*	
Weinbergschnecke	*Helix pomatia*	
gefleckte Weinbergschnecke	*Helix aspersa*	
Gemüsebrühenpulver		Kania-Lidl

Anlage 2: Liste der verwendeten Chemikalien

Agarosegel-Lösung (2%)	3 g Agarose in 150 mL TBE-Puffer (0,5 x)
Bromphenolblau-Lösung	10 g/L Bromphenolblau, 400 g/L Saccharose
CTAB-Extraktionspuffer (pH 8,0)	10g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
	40,91g NaCl
	50ml 1M TrisCl
	20ml 0,5M Na2EDTA
	pH 8 mit verdünnter HCL einstellen
	ad 500ml Wasser
	(20g/l CTAB; 1,4M NaCl; Tris 0,1M, Na2EDTA 20mM, pH 8,0)
CTAB-Präzipitationslösung	0,5g CTAB
	0,234g NaCl
	ad 100ml Wasser
	(5g/l CTAB, 0,04M NaCl)
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Längenstandard	50bp Ladder DNA Molecular Weight Marker XIII Roche Diagnostics

Lysispuffer	50mM Tris-HCL, pH 7,5, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1% SDS, 0,2-0,4 mg/ml Proteinase K
Mastermix	ABsolute™QPCR SYBR®Green Rox Mix, Thermo Scientific
NucleoSpin® Food	MACHEREY NAGEL GmbH & Co. KG
Proteinase K (20mg/ml)	
ReadyRed™ Chloroform : Isoamylalkohol (24:1)	Appligene MP Biomedicals, Ohio
Reinstwasser aus Milli-Q-Anlage	Merck KGaA, Darmstadt
Reinstwasser aus Milli-Q-Anlage	VWR International GmbH
RNase A (40mg/ml)	
Takyon™ Low ROX Probe MasterMix UNG	Eurogentec Deutschland GmbH
TBE-Puffer 0,5x	45 mM Tris/Borsäure, 1 mM Na2-EDTA, pH = 8,0
Tris-Lösung 1 M	12,11 g Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan in ca. 80 ml Wasser lösen, mit 25%iger HCL auf einen pH-Wert von 8 einstellen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen

Anlage 3: Liste der verwendeten Materialien

Agarose Molecular Biology Grade	Eurogentec Deutschland GmbH
Analysenwaage MC 210 S	Sartorius AG, Göttingen
B.Braun Einmal-Skalpelle	Aesculap AG
Concentrator 5301	Eppendorf AG
F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate	Thermo Fisher Scientific GmbH
Folie	MicroAmp, Splash Free 96-Well Base, Applied Biosystems
Mastercyclergradient	Eppendorf AG
MAXI Geltrocknungsrahmen	Carl Roth GmbH & Co. KG
MAXI Kämme (26 Zähne)	Carl Roth GmbH & Co. KG
pH-Meter 765 calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.
Primer Express Software Version 3.0	Copyright 2004, Applied Biosystems
QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific GmbH
Reaktionsgefäße	1,5- und 2ml, Eppendorf
ThermoMixer® C	Eppendorf AG
Thermomixer 5436	Eppendorf AG
VARIA 1 Elektrophorese-Kammer	Carl Roth GmbH & Co. KG
Vortexer MS1 Minishaker	Carl Roth GmbH & Co. KG
Vortexer REAX 1	Heidolph Instruments Labortechnik

Vortex V1-Plus	Biosan Laboratories Inc.
Wattestäbchen	
Zentrifuge	Megafuge 1.0: Thermo Scientific
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG

Anlage 4: Liste der verwendeten Primer

Primer	Sequenz 5 → 3’	Amplifikat	Leitart
Lopho Uni 18S- F *Lopho* Uni 18S- R	TCCGGAGAGGGAGCATGA GCCAGGAGTGGGTAATTTGC	75	*Mytilus edulis*
HEL 18S- F *HEL* 18S- R	TAATGAGCGCCGCTGAGATT GCGCTGCTCATGCTCGTA	65	*Helix pomatia*
HELIX PO 18S- F *HELIX PO* 18S- R	CTCTCTCGGTCGAAGCCATC AATAGGGTAGCGGCCAATCG	66	*Helix pomatia*

Anlage 5: Rohdaten Primertitration

Sample Name	Target Name	Re-porter	CT	Ct Mean	Ct Threshold	Tm1	Tm2	Tm3
Hel	Hel 50 fwd. 50 rev.	SYBR	16,890	16,890	0,040	82,211		
Hel	Hel 300 fwd. 50 rev.	SYBR	14,825	14,825	0,040	82,308		
Hel	Hel 600 fwd. 50 rev.	SYBR	14,128	14,128	0,041	82,211		
Hel Po	Hel 50 fwd. 50 rev.	SYBR	20,226	20,226	0,040	83,282		
Hel Po	Hel 300 fwd. 50 rev.	SYBR	18,756	18,756	0,040	84,257		
Hel Po	Hel 600 fwd. 50 rev.	SYBR	17,268	17,268	0,041	83,769		
Hel	Hel 50 fwd. 300 rev.	SYBR	17,246	17,246	0,040	82,308		
Hel	Hel 300 fwd. 300 rev.	SYBR	Undetermined		0,078	74,124	85,718	90,492
Hel	Hel 600 fwd. 300 rev.	SYBR	14,163	14,163	0,072	82,698		
Hel Po	Hel 50 fwd. 300 rev.	SYBR	18,491	18,491	0,040	83,867		
Hel Po	Hel 300 fwd. 300 rev.	SYBR	17,450	17,450	0,078	84,062		
Hel Po	Hel 600 fwd. 300 rev.	SYBR	17,007	17,007	0,072	84,257		
Hel	Hel 50 fwd. 600 rev.	SYBR	15,670	15,670	0,045	82,503		
Hel	Hel 300 fwd. 600 rev.	SYBR	14,181	14,181	0,070	82,698		
Hel	Hel 600 fwd. 600 rev.	SYBR	14,187	14,187	0,072	82,795		
Hel Po	Hel 50 fwd. 600 rev.	SYBR	18,799	18,799	0,045	84,257		
Hel Po	Hel 300 fwd. 600 rev.	SYBR	17,084	17,084	0,070	84,159		
Hel Po	Hel 600 fwd. 600 rev.	SYBR	16,892	16,892	0,072	84,257		
NTC	Hel 300 fwd. 300 rev.	SYBR	34,773	34,773	0,078	80,652		
NTC	Hel 300 fwd. 300 rev.	SYBR	Undetermined	34,773	0,078	76,755	81,431	62,920

Anlage 6: Rohdaten des ersten Spezifitätstests

Sample Name	Target Name	Reporter	CT	Ct Mean	Ct SD	Ct Threshold	Tm1	Tm2	Tm3
Helix lurorum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	14,221	14,157	0,091	0,040	82,799		
Helix lurorum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	14,093	14,157	0,091	0,040	82,799		
Helix lurorum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	16,892	16,880	0,016	0,051	83,093		
Helix lurorum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	16,869	16,880	0,016	0,051	82,897		
Sepia officinalis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,971	35,021	1,343	0,040	81,233		
Sepia officinalis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,072	35,021	1,343	0,040	81,918		
Sepia officinalis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,042	34,549	0,717	0,051	82,212	79,764	
Sepia officinalis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,056	34,549	0,717	0,051	79,764		
Huhn	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	42,523	41,506	1,438	0,040	79,177		
Huhn	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	40,489	41,506	1,438	0,040	78,688		
Huhn	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,954	34,669	0,403	0,051	79,764		
Huhn	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,384	34,669	0,403	0,051	79,862		
Achatina fulica	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	31,497	31,796	0,422	0,040	82,506		

Achatina fulica	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,095	31,796	0,422	0,040	82,114		
Achatina fulica	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,861	33,601	0,368	0,051	82,408		
Achatina fulica	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,341	33,601	0,368	0,051	82,408	79,960	
Paralithodes camtschaticus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	38,674	37,434	1,754	0,040	78,883		
Paralithodes camtschaticus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	36,194	37,434	1,754	0,040	79,960		
Paralithodes camtschaticus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,348	35,558	0,297	0,051	79,862		
Paralithodes camtschaticus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,767	35,558	0,297	0,051	79,960		
Rind	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	38,047	38,047		0,040	80,352		
Rind	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	Undetermined	38,047		0,040	78,688		
Rind	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,292	35,549	1,051	0,051	79,960		
Rind	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,806	35,549	1,051	0,051	79,764		
Buccinum humphreysianum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,530	34,604	0,105	0,040	79,960		
Buccinum humphreysianum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,678	34,604	0,105	0,040	79,862		
Buccinum humphreysianum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,390	35,002	1,962	0,051	79,960		
Buccinum humphreysianum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,615	35,002	1,962	0,051	80,156		

Eriocheir sinensis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,424	35,539	0,162	0,040	79,667		
Eriocheir sinensis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,654	35,539	0,162	0,040	80,254		
Eriocheir sinensis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,756	36,668	1,290	0,051	79,960		
Eriocheir sinensis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	37,580	36,668	1,290	0,051	79,667		
Weizen	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,735	33,211	0,672	0,040	80,156		
Weizen	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,686	33,211	0,672	0,040	79,960		
Weizen	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,323	34,269	0,076	0,051	79,862		
Weizen	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,215	34,269	0,076	0,051	79,862		
Placopecten magellanicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	29,092	29,557	0,658	0,040	82,799		
Placopecten magellanicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	30,023	29,557	0,658	0,040	82,114		
Placopecten magellanicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,467	33,126	0,931	0,051	82,016		
Placopecten magellanicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,784	33,126	0,931	0,051	82,310		
Litopenaeus vannamei	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	41,980	41,604	0,532	0,040	79,373		
Litopenaeus vannamei	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	41,228	41,604	0,532	0,040	80,058	84,855	87,303
Litopenaeus vannamei	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,956	36,605	0,496	0,051	79,862		

Litopenaeus vannamei	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,254	36,605	0,496	0,051	80,058		
Maismehl	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,991	34,560	0,610	0,040	82,114	79,667	74,772
Maismehl	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,128	34,560	0,610	0,040	82,408	79,764	
Maismehl	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,644	34,463	0,256	0,051	79,960		
Maismehl	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,282	34,463	0,256	0,051	79,471		
Mytilus edulis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,717	33,119	0,568	0,040	80,058		
Mytilus edulis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,520	33,119	0,568	0,040	79,960		
Mytilus edulis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,554	34,276	3,222	0,051	79,373		
Mytilus edulis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	31,998	34,276	3,222	0,051	80,156		
Pandalus borealis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	Undetermined	40,255		0,040	74,967		
Pandalus borealis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	40,255	40,255		0,040	79,373		
Pandalus borealis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	37,683	37,748	0,091	0,051	79,471		
Pandalus borealis	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	37,812	37,748	0,091	0,051	79,667		
Soja	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,241	32,479	0,337	0,040	79,862		
Soja	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,717	32,479	0,337	0,040	80,058		

Soja	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,004	34,329	0,459	0,051	79,862		
Soja	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,654	34,329	0,459	0,051	79,764		
Crassostrea gigas	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	37,886	35,841	2,891	0,040	79,275		
Crassostrea gigas	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,797	35,841	2,891	0,040	79,764		
Crassostrea gigas	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	37,096	35,619	2,089	0,051	78,981		
Crassostrea gigas	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,142	35,619	2,089	0,051	79,960		
Merluccius merluccius	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	36,134	35,009	1,590	0,040	79,960		
Merluccius merluccius	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,885	35,009	1,590	0,040	80,352		
Merluccius merluccius	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,929	35,413	0,729	0,051	79,764		
Merluccius merluccius	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,898	35,413	0,729	0,051	79,764		
Migrantis Praecepero Lcustae	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	36,118	36,011	0,151	0,040	79,569		
Migrantis Praecepero Lcustae	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,905	36,011	0,151	0,040	78,785		
Migrantis Praecepero Lcustae	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,907	34,373	0,659	0,051	79,862		
Migrantis Praecepero Lcustae	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,839	34,373	0,659	0,051	79,764		
Octopus maya	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,117	32,994	1,241	0,040	82,408		

Octopus maya	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,872	32,994	1,241	0,040	81,820		
Octopus maya	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,297	35,252	0,064	0,051	82,212		
Octopus maya	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,207	35,252	0,064	0,051	79,862		
Pollachius virens	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,023	34,670	0,499	0,040	79,667		
Pollachius virens	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,317	34,670	0,499	0,040	79,960		
Pollachius virens	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,036	34,749	0,406	0,051	80,254		
Pollachius virens	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,461	34,749	0,406	0,051	80,254		
Gryllodes Sigillatus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,012	37,573	6,449	0,040	79,960		
Gryllodes Sigillatus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	42,133	37,573	6,449	0,040	79,373		
Gryllodes Sigillatus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,138	34,245	0,151	0,051	79,960		
Gryllodes Sigillatus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,352	34,245	0,151	0,051	79,471		
Loligo reynaudii	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	30,401	30,617	0,304	0,040	82,310		
Loligo reynaudii	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	30,832	30,617	0,304	0,040	82,310		
Loligo reynaudii	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,102	33,423	0,960	0,051	82,016		
Loligo reynaudii	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,745	33,423	0,960	0,051	82,310	79,764	

Schwein	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	36,410	36,706	0,419	0,040	79,471		
Schwein	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	37,002	36,706	0,419	0,040	79,275	86,226	
Schwein	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,576	33,245	0,947	0,051	80,058		
Schwein	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,914	33,245	0,947	0,051	79,764		
NTC	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,540	32,784	0,346	0,040	80,058		
NTC	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,028	32,784	0,346	0,040	79,862		

Anlage 7: Rohdaten des zweiten Spezifitätstests und des Amplifizierbarkeitstests der elf Proben

Sample Name	Target Name	Reporter	CT	Ct Mean	Ct SD	Ct Threshold	Tm1	Tm2	Tm3
Pisum salvum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,418	33,692	0,388	0,040	79,780		
Pisum salvum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,966	33,692	0,388	0,040	79,390		
Pisum salvum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,485	33,381	0,148	0,060	79,780		
Pisum salvum	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,276	33,381	0,148	0,060	80,170		
Callista chione	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,065	34,666	0,565	0,040	79,975		
Callista chione	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,267	34,666	0,565	0,040	79,877		

Callista chione	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,849	33,760	0,127	0,060	79,877		
Callista chione	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,670	33,760	0,127	0,060	79,780		
Helix pomatia	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	15,054	15,171	0,165	0,040	82,508		
Helix pomatia	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	15,288	15,171	0,165	0,040	82,411		
Helix pomatia	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,905	17,905	0,001	0,060	82,606		
Helix pomatia	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,904	17,905	0,001	0,060	82,508		
Triticum spelta	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,067	33,979	0,124	0,040	79,682		
Triticum spelta	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,892	33,979	0,124	0,040	80,267		
Triticum spelta	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,257	32,925	0,470	0,060	80,267		
Triticum spelta	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,592	32,925	0,470	0,060	80,364		
Meerscheidmusch el	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	37,553	37,719	0,235	0,040	79,487		
Meerscheidmusch el	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	37,885	37,719	0,235	0,040	79,877		
Meerscheidmusch el	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,477	34,203	0,387	0,060	80,072		
Meerscheid-muschel	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,930	34,203	0,387	0,060	80,072		
Helix aspersa	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	22,458	22,489	0,045	0,040	80,364		

Helix aspersa	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	22,521	22,489	0,045	0,040	80,364		
Helix aspersa	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	25,486	25,464	0,031	0,060	80,462		
Helix aspersa	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	25,443	25,464	0,031	0,060	80,462		
Brassica napus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,588	33,736	0,209	0,040	79,780		
Brassica napus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,884	33,736	0,209	0,040	79,682	83,775	
Brassica napus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,603	33,353	0,353	0,060	79,975		
Brassica napus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,104	33,353	0,353	0,060	79,877		
Eledone moschata	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	36,215	35,919	0,419	0,040	82,411		
Eledone moschata	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,622	35,919	0,419	0,040	82,411		
Eledone moschata	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,563	36,180	0,542	0,060	80,267		
Eledone moschata	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,797	36,180	0,542	0,060	80,170		
Paralithodes camtschaticus	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	23,818	23,818		0,044	79,877		
Paralithodes camtschaticus	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	25,534	25,534		0,065	79,877		
Crassostrea gigas	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	10,976	10,976		0,044	79,975		

Crassostrea gigas	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	14,020	14,020		0,065	79,877		
Perna canaliculus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,997	34,284	0,406	0,040	79,877		
Perna canaliculus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,572	34,284	0,406	0,040	80,072		
Perna canaliculus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,565	33,742	0,251	0,060	80,364		
Perna canaliculus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,920	33,742	0,251	0,060	80,170		
Homarus americanus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,061	35,031	0,043	0,040	79,975		
Homarus americanus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,001	35,031	0,043	0,040	79,975		
Homarus americanus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,128	33,893	0,333	0,060	80,072		
Homarus americanus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,658	33,893	0,333	0,060	80,072		
Rind	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	15,104	15,104		0,044	80,754		
Rind	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,824	17,824		0,065	80,754		
Merluccius merluccius	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	12,425	12,425		0,044	79,975		
Merluccius merluccius	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	15,216	15,216		0,065	79,975		

Lamm	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	39,206	37,528	2,373	0,040	79,780	83,677	
Lamm	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	35,851	37,528	2,373	0,040	79,975		
Lamm	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,994	33,219	0,318	0,060	80,072		
Lamm	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,444	33,219	0,318	0,060	80,170		
Spirulina	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,602	34,156	0,631	0,040	84,749	79,682	
Spirulina	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,709	34,156	0,631	0,040	79,975		
Spirulina	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,649	33,320	0,465	0,060	79,877	84,847	
Spirulina	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,991	33,320	0,465	0,060	79,975		
Buccium humphreysianum	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	13,265	13,265		0,044	79,780		
Buccium humphreysianum	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	15,776	15,776		0,065	79,975		
Gryllodes Sigillatus	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	16,612	16,612		0,044	80,657		
Gryllodes Sigillatus	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	18,570	18,570		0,065	80,657		
Pferd	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,060	33,700	0,509	0,040	79,975		

Pferd	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,341	33,700	0,509	0,040	79,877		
Pferd	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,371	33,275	0,136	0,060	80,170		
Pferd	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,179	33,275	0,136	0,060	80,072		
Tenebrio molitor	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,782	34,383	0,564	0,040	79,975		
Tenebrio molitor	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,984	34,383	0,564	0,040	79,682		
Tenebrio molitor	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,623	33,358	0,374	0,060	79,877		
Tenebrio molitor	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,094	33,358	0,374	0,060	80,072		
Eriocheir sinensis	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	20,326	20,326		0,044	79,682		
Eriocheir sinensis	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	22,620	22,620		0,065	79,877		
Schwein	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	13,858	13,858		0,044	80,559		
Schwein	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	16,519	16,519		0,065	80,559		
Hase	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,822	34,506	0,446	0,040	79,877		
Hase	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,190	34,506	0,446	0,040	82,021	79,877	

Hase	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,330	33,479	0,210	0,060	79,975		
Hase	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,627	33,479	0,210	0,060	80,170		
Portunus pelagicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,771	33,262	0,720	0,040	79,682		
Portunus pelagicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,752	33,262	0,720	0,040	79,877		
Portunus pelagicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,358	33,454	0,136	0,060	79,975		
Portunus pelagicus	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,550	33,454	0,136	0,060	80,072		
Litopenaeus vannamei	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	13,252	13,252		0,044	79,877		
Litopenaeus vannamei	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	15,824	15,824		0,065	79,877		
Pollachius virens	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	10,653	10,653		0,044	79,877		
Pollachius virens	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	14,620	14,620		0,065	79,780		
Ziege	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	34,510	33,980	0,749	0,040	79,877		
Ziege	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,451	33,980	0,749	0,040	79,682		
Ziege	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,306	33,351	0,064	0,060	80,170		

Ziege	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,397	33,351	0,064	0,060	79,975		
Crangon crangon	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	37,000	37,419	0,593	0,040	79,877	76,077	
Crangon crangon	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	37,839	37,419	0,593	0,040	79,975		
Crangon crangon	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,822	33,916	0,133	0,060	80,170		
Crangon crangon	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,010	33,916	0,133	0,060	80,072		
Pandalus borealis	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	14,977	14,977		0,044	80,462		
Pandalus borealis	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	15,535	15,535		0,065	80,559		
NTC	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,395	33,395		0,040	79,780		
NTC	Universal 18S 300 fwd. 300 rev.- 50ng	SYBR	30,643	30,643		0,044	80,267		

Anlage 8: Rohdaten des LOD-Tests und des Testes ob die DNA der Gemüsebrühe amplifizierbar ist

Sample Name	Target Name	Reporter	CT	Ct Mean	Ct SD	Ct Threshold	Tm1	Tm2	Tm3
NTC	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	30,592	30,592		0,040	80,164		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	30,653	33,285	1,874	0,040	80,457		

Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	31,612	33,285	1,874	0,040	80,262		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,182	33,285	1,874	0,040	79,775		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,046	33,285	1,874	0,040	79,775		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,255	33,285	1,874	0,040	79,385		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,396	33,285	1,874	0,040	79,580		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	30,778	33,285	1,874	0,040	80,262		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,569	33,285	1,874	0,040	78,801		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,752	33,285	1,874	0,040	79,580		
Helix pomatia 0,00001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,610	33,285	1,874	0,040	78,995		
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,383	34,249	3,711	0,040	82,502		
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	42,545	34,249	3,711	0,040	78,606		
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	Undetermined	34,249	3,711	0,040	62,922		
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,739	34,249	3,711	0,040	82,210	79,872	
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	30,864	34,249	3,711	0,040	80,457		

Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	Undetermined	34,249	3,711	0,040	62,727		
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	30,817	34,249	3,711	0,040	82,795	80,164	
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,553	34,249	3,711	0,040	82,113	79,483	74,709
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,141	34,249	3,711	0,040	82,210	79,775	
Helix pomatia 0,0001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,947	34,249	3,711	0,040	82,015		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	30,532	32,321	3,503	0,040	82,795		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	Undetermined	32,321	3,503	0,040	0,000		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	29,653	32,321	3,503	0,040	83,087		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	31,259	32,321	3,503	0,040	82,308		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	31,586	32,321	3,503	0,040	82,210		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,076	32,321	3,503	0,040	81,723		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	32,113	32,321	3,503	0,040	82,210		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	30,599	32,321	3,503	0,040	82,795		
Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	31,657	32,321	3,503	0,040	82,308		

Helix pomatia 0,001ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	41,413	32,321	3,503	0,040	81,041		
NTC	Uni-Primer 300 fwd. 300 rev. 50 ng	SYBR	36,505	36,505		0,060	80,359	73,735	
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	36,242	29,691	3,153	0,040	81,333		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	27,735	29,691	3,153	0,040	83,184		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	29,958	29,691	3,153	0,040	82,113		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,741	29,691	3,153	0,040	81,820		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	27,882	29,691	3,153	0,040	80,944		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	27,409	29,691	3,153	0,040	83,184		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	28,001	29,691	3,153	0,040	82,600		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	28,262	29,691	3,153	0,040	82,405		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	28,557	29,691	3,153	0,040	82,405		
Helix pomatia 0,01ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	28,119	29,691	3,153	0,040	82,600		
Gemuesebruehe (C20003)	Uni-Primer 300 fwd. 300 rev. 50 ng	SYBR	12,369	12,343	0,036	0,060	79,677		
Gemuesebruehe (C20003)	Uni-Primer 300 fwd. 300 rev. 50 ng	SYBR	12,317	12,343	0,036	0,060	79,775		

Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	33,992	25,938	2,904	0,040	80,749		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	24,504	25,938	2,904	0,040	82,600		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	24,294	25,938	2,904	0,040	82,892		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	24,755	25,938	2,904	0,040	82,502		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	26,080	25,938	2,904	0,040	81,626		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	25,177	25,938	2,904	0,040	82,113		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	24,867	25,938	2,904	0,040	82,308		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	26,146	25,938	2,904	0,040	82,308		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	24,326	25,938	2,904	0,040	82,600		
Helix pomatia 0,1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	25,237	25,938	2,904	0,040	82,210		
Gemuesebruehe (C20003)	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	32,976	33,047	0,100	0,067	81,918		
Gemuesebruehe (C20003)	Hel 600 fwd. 300 rev.- 50 ng	SYBR	33,117	33,047	0,100	0,067	82,015		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,659	20,758	0,134	0,040	83,087		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,716	20,758	0,134	0,040	82,892		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,604	20,758	0,134	0,040	83,184		

Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,731	20,758	0,134	0,040	82,989		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	21,044	20,758	0,134	0,040	82,892		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,850	20,758	0,134	0,040	82,697		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,619	20,758	0,134	0,040	83,184		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,692	20,758	0,134	0,040	82,892		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,813	20,758	0,134	0,040	82,697		
Helix pomatia 1ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	20,854	20,758	0,134	0,040	82,502		
Gemuesebruehe (C20003)	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	34,581	34,819	0,337	0,040	79,580	81,333	69,936
Gemuesebruehe (C20003)	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	35,057	34,819	0,337	0,040	79,580		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,408	19,680	7,587	0,040	83,476		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	41,270	19,680	7,587	0,040	64,481		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,438	19,680	7,587	0,040	83,476		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,285	19,680	7,587	0,040	83,574		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,226	19,680	7,587	0,040	83,379		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,179	19,680	7,587	0,040	83,476		

Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,245	19,680	7,587	0,040	83,282		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,287	19,680	7,587	0,040	83,379		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,280	19,680	7,587	0,040	83,282		
Helix pomatia 10ng	Hel 600 fwd. 300 rev.- 10ng	SYBR	17,179	19,680	7,587	0,040	83,282		

Anlage 9: Ergebnisse der beiden DNA-Extraktionsmethoden

Code	Name	Extraktionsmethode und -menge
AK1		CTAB - 0
AK2		CTAB - 0
C19188-1	*Mytilus chilensis*- Miesmuscheln ohne Schale	CTAB - 1364
C19188-2		CTAB - 2502
C19108-1	Japanische Kammmuschel vllt. auch Jakobsmuschel - *Scallops - Patinopecten yessoensis*	CTAB - 520
C19108-2		CTAB - 359
C19104-1	Pazifische Austern - *Crassostrea Gigas - Fines de Claires*	CTAB - 5300
C19104-2		CTAB - 3056
C19113-1	Meerscheidemuschel	CTAB - 722
C19113-2		CTAB - 1174
C19250-1	*Paralithodes camtschaticus*- Königskrabbe	CTAB - 1843
C19250-2		CTAB - 459
AK1		Kit - 0
AK2		Kit - 0
C19082-1	Muscheln "Zucht" (*mytilus chilensis*)	Kit - 15

C19082-2		Kit - 110
C19110-1	Meermandel - Fasolari - IT *Callisla chione*	Kit - 3
C19110-2		Kit - 3
C19111-1	Herzmuschel - *Cerastoderma edule*	Kit - 8
C19111-2		Kit - 28
C19112-1	Meeresschnecken - *Buccinum humphreysianum*	Kit - 4
C19112-2		Kit - 2
C19103-1	Teppichmuschel - *Vongole Veraci (Palourdes) Tapes decussatus*	Kit - 169
C19103-2		Kit - 343

Code	Name	Extraktionsmethode und -menge
AK1		Kit - 0
AK2		Kit - 2
C19110-1	Meermandel - Fasolari - IT *Callisla chione*	Kit - 9
C19110-2		Kit - 78
C19111-1	Herzmuschel - *Cerastoderma edule*	Kit - 66
C19111-2		Kit - 12

C19112-1	Meeresschnecken - *Buccinum humphreysianum*	Kit - 11
C19112-2		Kit - 13

Code	Name	Extraktionsmethode und -menge
AK		Kit - 1
C19081-1	Muscheln (*Mytilus edulis*)	Kit -857
C19081-2		Kit -689
C19255-1	*Sepia officinalis*-Gewöhnlicher Tintenfisch	Kit -1
C19255-2		Kit-13
C19262-1	*Ensis directus*- Amerikanisce Schwertmuschel	Kit -2
C19262-2		Kit - 4
C19264-1	*Callista chione*-Braune Venusmuschel	Kit - 18
C19264-2		Kit - 24
C19265-1	*Ruditapes philippinarum*-Japanische Teppichmuschel	Kit - 55
C19265-2		Kit - 28

C19267-1	*Helix lucorum*-Weinbergschnecke	Kit - 5
C19267-2		Kit - 5
C19268-1	*Achatina fulica*- Achatschnecke	Kit - 206
C19268-2		Kit - 123
AK		Kit - 2
C19257-1	*Octopus maya*-Mexikanisce Vieraugenkrake	Kit - 37
C19257-2		Kit - 4
C19258-1	*Eledone moschata*- Moschuskrake	Kit - 3
C19258-2		Kit - 3
C19260-1	*Loligo reynaudii*-Kap Hoffnung Tintenfisch	Kit - 14
C19260-2		Kit - 45
C19263-1	*Doryteuthis gahi, synm: Loligo gahi*-Patagonischer Tintenfisch	Kit - 31
C19263-2		Kit - 120
C19266-1	*Placopecten magellanicus*-Tiefseecallops	Kit - 39
C19266-2		Kit - 50

C19267-1	*Helix lucorum*-Weinbergschnecke	Kit - 77
C19267-2		Kit - 118
C19088-1	*Merluccius merluccius* - Seehecht	Kit - 2
C19088-2		Kit - 2
C19089-1	*Pollachius virens* - Seelachs	Kit - 5
C19089-2		Kit - 4
C19259-1	*Litopenaeus vannamei* - White Tiger Garnele	Kit - 4
C19259-1		Kit - 2
C16182-1	Bio Weizen 16117 gemahlen	Kit - 177
C16182-2		Kit - 479
C15101-1	Maismehl	Kit - 14
C15101-2		Kit - 6
C19088-1	*Merluccius merluccius* - Seehecht	CTAB - 134
C19088-2		CTAB - 200
C19089-1	*Pollachius virens* - Seelachs	CTAB - 358
C19089-2		CTAB - 262

C19258-1	*Eledone moschata* - Moschuskrake, Moscardini	CTAB - 155
C19258-2		CTAB-119
C19259-1	*Litopenaeus vannamei*-White Tiger Garnele	CTAB - 215
C19259-2		CTAB - 397
C15101-1	Maismehl	CTAB - 181
C15101-2		CTAB - 169
C19356-1	*Helix pomatia*	Kit - 81
C19356-2		Kit - 247
C19356-3		Kit - 348
C19356-4		Kit - 441
20001-1	*Helix aspersa*	Kit - 545
20001-2		Kit - 791
20001-3		Kit - 481
20001-4		Kit - 581
C20002	Gemüsebrühe	Kit - 20

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Arbeit übereinstimmt.

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift