



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Speziesdifferenzierung in Milch- und Sojamilchprodukten mittels

Real-time PCR und PCR

durchgeführt am Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie  
der Universität für Bodenkultur Wien, Abteilung Lebensmittelchemie

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Carola Kern
Matrikelnummer:	0302712
Studienrichtung /Studienzweig :	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao.Univ. Prof. Dipl-Ing. Dr. nat. techn. Helmut Mayer

Wien, im April 2010



## **Danksagung**

Zunächst möchte ich Univ.Prof. DI Dr. Helmut Mayer für die Betreuung dieser Arbeit danken. Die gute Zusammenarbeit und konstruktive Gesprächsbasis haben mich maßgeblich bei der Bewältigung der Aufgabenstellung unterstützt.

Mein Dank gilt auch den Laboranten des Institutes für Lebensmittelchemie der Universität für Bodenkultur, die uns Diplomanden bei Schwierigkeiten im Labor mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Auch meinen Kollegen im Labor sei an dieser Stelle für das ausgesprochen angenehme und herzliche Arbeitsklima gedankt. Es war mir eine Freude gemeinsam mit euch an Problemen zu kiefeln und deren Lösung zu feiern.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde und Studienkollegen, die mich durch alle Höhen und Tiefen des Studentenlebens begleitet und mir dabei immer den Rücken gestärkt haben. Speziell erwähnt seien hier diejenigen unter euch, die sich mit bewundernswerter Motivation und Akribie durch jede einzelne Seite dieser Arbeit gewühlt haben um sie zu korrigieren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir dieses Studium nicht nur ermöglicht hat, sondern mir auch stets nach Kräften unterstützend zur Seite gestanden ist.



## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturüberblick .....</b>	<b>3</b>
2.1	Milch und Milchprodukte.....	3
2.1.1	Inhaltsstoffe und ernährungsphysiologische Bedeutung .....	3
2.1.2	Herstellung von Käse .....	5
2.1.3	Allergenes Potential von Kuhmilch .....	5
2.2	Sojamilch und Sojamilchprodukte.....	7
2.2.1	Inhaltsstoffe und ernährungsphysiologische Bedeutung .....	8
2.2.2	Herstellung von Sojamilch und Sojamilchprodukten.....	8
2.3	Methoden zum Nachweis von Kuhmilch in Milchprodukten.....	9
2.3.1	Immunoassays.....	10
2.3.2	Proteinbasierte Methoden .....	12
2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	14
2.3.4	Real-time PCR .....	20
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.1	Probenmaterial.....	34
3.2	DNA-Isolierung .....	36
3.2.1	Prinzip .....	36
3.2.2	Geräte .....	36
3.2.3	Reagenzien und Lösungen.....	37
3.2.4	Durchführung.....	37
3.3	PCR.....	38
3.3.1	Prinzip .....	38
3.3.2	Geräte .....	39
3.3.3	Reagenzien und Lösungen.....	39
3.3.4	Primer .....	41

3.3.5	Durchführung .....	42
3.3.6	Thermoprotokoll .....	43
3.4	Agarosegelelektrophorese .....	43
3.4.1	Prinzip .....	43
3.4.2	Geräte .....	44
3.4.3	Reagenzien und Lösungen .....	45
3.4.4	Durchführung .....	47
3.5	Real-time PCR .....	48
3.5.1	Prinzip .....	48
3.5.2	Geräte .....	49
3.5.3	Reagenzien und Lösungen .....	49
3.5.4	Durchführung .....	50
3.5.5	Thermoprotokoll .....	52
3.5.6	Auswertung .....	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
4.1	Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmilchprodukten .....	54
4.1.1	Qualitativer Nachweis mittels PCR und Gelelektrophorese.....	54
4.1.2	Quantitativer Nachweis mittels Real-time PCR .....	61
4.2	Nachweis und Bestimmung von Kuhmilchanteilen in Sojamilchprodukten.....	90
4.2.1	Qualitativer Nachweis mittels PCR und Gelelektrophorese.....	90
4.2.2	Quantitativer Nachweis mittels Real-time PCR .....	102
<b>5</b>	<b>Schlussbetrachtung .....</b>	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>146</b>

## I **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	SYBR Green I als DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff für die Real-time PCR [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].....	21
Abbildung 2:	TaqMan® Sonden als Fluorochrome in der Real-time PCR [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].....	23
Abbildung 3:	Amplifikationskurve einer Real-time PCR [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].....	24
Abbildung 4:	Pipettierschema Real- Time- PCR.....	51
Abbildung 5:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 50°C)...	54
Abbildung 6:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)...	55
Abbildung 7:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 57°C)...	56
Abbildung 8:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 58°C)...	57
Abbildung 9:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C)...	57
Abbildung 10:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C) .....	58
Abbildung 11:	PCR zum Überprüfen eines Universalprimers für Mischkäse aus Kuh- und Schafmilch (18SpEUDIR / 18SpEUINV, Annealingtemperatur 55°C).....	60
Abbildung 12:	PCR zum Überprüfen eines Universalprimers für Mischkäse aus Kuh- und Schafmilch (TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C) .....	60
Abbildung 13:	PCR zum Überprüfen eines Universalprimers für Mischkäse aus Kuh- und Schafmilch (L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 55°C)...	61
Abbildung 14:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) .....	62
Abbildung 15:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) .....	63
Abbildung 16:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperaturen 50°C und 55°C) .....	64
Abbildung 17:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Schmelzkurvenanalyse, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) .....	66
Abbildung 18:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich von Standardgeraden bei verschiedenen	

	Annealingtemperaturen (Verdünnungen aus Probe 18, Cow Bottero 1 / 2).....	68
Abbildung 19:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Standardgerade aus einem Effizienztest mit Verdünnungen aus Probe 18 (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 20 s).....	70
Abbildung 20:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cyt Ox IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 20 s) .....	70
Abbildung 21:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Standardgerade aus einem Effizienztest mit Verdünnungen aus Probe 18 (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, verlängerte Elongationszeit).....	71
Abbildung 22:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cyt Ox IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 40 s) .....	72
Abbildung 23:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Schmelzkurvenanalyse, Cyt Ox IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 40 s) .....	73
Abbildung 24:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden ausgewertet nach $C_T$ -Werten für den speziesspezifischen Primer Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) .....	77
Abbildung 25:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden ausgewertet nach $\Delta C_T$ -Werten, speziesspezifischer Primer: Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) .....	78
Abbildung 26:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden ausgewertet nach $\Delta C_T$ -Werten, ohne M22, speziesspezifischer Primer: Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) .....	79
Abbildung 27:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Schmelzkurvenanalyse, speziesspezifischer Primer: Cow Bottero 1 / 2, Universalprimer: L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 55°C) .....	80
Abbildung 28:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C) .....	81
Abbildung 29:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 60°C) .....	81

Abbildung 30:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Temperaturversuch mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Standardgeraden ausgewertet nach $C_T$ -Werten für den speziesspezifischen Primer).....	85
Abbildung 31:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Temperaturversuch mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Standardgeraden ausgewertet nach $\Delta C_T$ -Werten)..	85
Abbildung 32:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 9 (Schaf) und Probe 18 (Kuh), (Standardgeraden, L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 60°C).....	88
Abbildung 33:	Sojaspezifische PCR (Gly 30K-6F / Gly 30K-6R, Annealingtemperatur 62°C) .....	91
Abbildung 34:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) ..	92
Abbildung 35:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 50°C) ..	93
Abbildung 36:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) ..	94
Abbildung 37:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 56°C) ..	95
Abbildung 38:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 57°C) ..	95
Abbildung 39:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 58°C) ..	96
Abbildung 40:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 51°C).....	97
Abbildung 41:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx II b, Annealingtemperatur 58°C).....	98
Abbildung 42:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 59°C).....	99

Abbildung 43:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 60°C) .....	100
Abbildung 44:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 61°C) .....	101
Abbildung 45:	PCR zum Vergleich verschiedener Universalprimer (Annealingtemperatur 55°C) .....	102
Abbildung 46:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperaturen 55°C und 56°C) .....	104
Abbildung 47:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C) .....	106
Abbildung 48:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K).....	107
Abbildung 49:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, $\Delta C_T$ aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K) ...	108
Abbildung 50:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Schmelzkurvenanalyse zu Lauf 44, Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C) .....	109
Abbildung 51:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Schmelzkurvenanalyse, Proben 0% K, 100% K, 18, Rohmilch und pasteurisierte Milch, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C) .....	110
Abbildung 52:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1/2, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 18).....	112
Abbildung 53:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, $\Delta C_T$ aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 18) .....	113
Abbildung 54:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K) .....	114
Abbildung 55:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, $\Delta C_T$ aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K) ...	115
Abbildung 56:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV, Annealingtemperatur 55°C).....	117

Abbildung 57:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 100% K (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C).....	119
Abbildung 58:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 100% K (Standardgeraden, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C).....	120
Abbildung 59:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 0% K (Standardgeraden, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C).....	122
Abbildung 60:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Amplifikationskurven, TR 03 / 04, Verdünnungen aus Probe 0% K, Annealingtemperatur 55°C).....	123
Abbildung 61:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Schmelzkurvenanalyse, TR 03 / 04, Verdünnungen aus Probe 0% K, Annealingtemperatur 55°C).....	124
Abbildung 62:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $C_T$ -Werten (Standardgeraden, Cow Bottero 1/ 2, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61).....	126
Abbildung 63:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $\Delta C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61).....	126
Abbildung 64:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben (Schmelzkurvenanalyse, Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61).....	128
Abbildung 65:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64).....	129
Abbildung 66:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64).....	129
Abbildung 67:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $\Delta C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64).....	130

Abbildung 68:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 88) .....	131
Abbildung 69:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $\Delta C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 88) .....	132
Abbildung 70:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 89) .....	133
Abbildung 71:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach $\Delta C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 89) .....	134
Abbildung 72:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben .....	136

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung von Kuhmilch im Vergleich zu Schafmilch [modifiziert nach SPREER, 2005] .....	4
Tabelle 2:	Modellkäse Wolfpassing (Camembert, überreif).....	34
Tabelle 3:	Modellkäse Sikic' Maja .....	34
Tabelle 4:	Mischungsreihe aus Kuh- und Sojamilch.....	35
Tabelle 5:	Handelsproben Sojamilchprodukte .....	35
Tabelle 6:	Geräte und Hilfsmittel für die DNA-Isolierung.....	36
Tabelle 7:	Reagenzien und Lösungen für die DNA-Isolierung .....	37
Tabelle 8:	Geräte und Hilfsmittel für die PCR.....	39
Tabelle 9:	Reagenzien und Lösungen für die PCR .....	39
Tabelle 10:	Mastermix für die PCR.....	40
Tabelle 11:	Primerpaare .....	41
Tabelle 12:	Temperatur-Zeit-Programm für die PCR .....	43
Tabelle 13:	Geräte und Hilfsmittel für die Agarosegelelektrophorese.....	44
Tabelle 14:	Reagenzien und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....	45
Tabelle 15:	Zusammensetzung des Agarosegels (2%) .....	47
Tabelle 16:	Geräte und Hilfsmittel für die Real-time PCR .....	49
Tabelle 17:	Reagenzien und Lösungen für die Real-time PCR .....	49
Tabelle 18:	Temperatur-Zeit-Programm Real-time PCR .....	52
Tabelle 19:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich der $C_T$ -Werte, Effizienz und $R^2$ (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperaturen 50°C und 55°C) .....	65
Tabelle 20:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich von mittlerem $C_T$ -Wert, Effizienz und Regression bei verschiedenen Annealingtemperaturen (Verdünnungen aus Probe 18, Cow Bottero 1 / 2).....	67
Tabelle 21:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich von $C_T$ -Wert, Effizienz und $R^2$ bei verschiedener Elongationsdauer (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C) .....	71
Tabelle 22:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, $C_T$ - und $\Delta C_T$ -Werte unter Einsatz verschiedener Universalprimer und Cow Bottero 1 / 2 als speziespezifischem Primer (Annealingtemperatur 55°C) .....	76
Tabelle 23:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, $C_T$ - und $\Delta C_T$ -Werte des Temperaturversuches mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Annealingtemperaturen 55°C, 57°C, 58°C).....	83
Tabelle 24:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, $C_T$ - und $\Delta C_T$ -Werte des Temperaturversuches mit Cow	

	Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Annealingtemperaturen 59°C und 60°C) .....	84
Tabelle 25:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Effizienztest mit dem Primerpaar L-14735 / H-15149, Verdünnungsreihe aus Probe 18 .....	86
Tabelle 26:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Effizienztest mit dem Primerpaar L-14735 / H-15149, Verdünnungsreihe aus Probe 9 .....	87
Tabelle 27:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, C <sub>T</sub> -Werte Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C.....	104
Tabelle 28:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, CT-Werte Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 56°C.....	105
Tabelle 29:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (C <sub>T</sub> - und ΔC <sub>T</sub> -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K) I .....	110
Tabelle 30:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (C <sub>T</sub> - und ΔC <sub>T</sub> -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K) II.....	111
Tabelle 31:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (C <sub>T</sub> - und ΔC <sub>T</sub> -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 18) .....	113
Tabelle 32:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (C <sub>T</sub> - und ΔC <sub>T</sub> -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K) .....	115
Tabelle 33:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (C <sub>T</sub> - und ΔC <sub>T</sub> -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K).....	116
Tabelle 34:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich von C <sub>T</sub> - Wert, Effizienz und R <sup>2</sup> bei verschiedenen Annealingtemperaturen, Verdünnungsreihe aus 100% K (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C).....	118
Tabelle 35:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich von C <sub>T</sub> -Wert, Effizienz und R <sup>2</sup> bei verschiedenen Annealingtemperaturen, Verdünnungsreihe aus 100% K (TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C).....	120
Tabelle 36:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich von C <sub>T</sub> -Wert, Effizienz und R <sup>2</sup> bei verschiedenen Annealingtemperaturen, Verdünnungsreihe aus 0% K (TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C) .....	121

Tabelle 37:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekannten Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61).....	127
Tabelle 38:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekannten Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64).....	130
Tabelle 39:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekannten Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 88).....	132
Tabelle 40:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekannten Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 89).....	134
Tabelle 41:	Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben, Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten.....	136



### III Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
C	Cytosin
CB	Cow Bottero 1 / 2
CLA	konjugierte Linolensäure
cm	Zentimeter
C <sub>T</sub>	Cycle of Threshold
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EAST	Enzyme-allergosorbent Test
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI-MS	Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
G	Guanin
HCl	Chlorwasserstoffsäure / Salzsäure
HDL	High-Density-Lipoprotein

HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgE	Immunglobulin E
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
LDL	Low-Density-Lipoprotein
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N/A	nicht nachweisbar
NaOH	Natriumhydroxid / Natronlauge
NC	Negativkontrolle
NTC	No-Template-Control
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß

RAST	Radio-allergosorbent Test
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunden
S	Svedberg
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SNP	Single-Nucleotid-Polymorphism
SSR	Species Specific Repeat
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
T <sub>M</sub>	Schmelzpunkt
TR	TR 03 / 04
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UHT	Ultrahocherhitzung
V	Volt



## **1 Einleitung und Zielsetzung**

Milch und Milchprodukte sind aufgrund ihrer ernährungsphysiologisch wertvollen Bestandteile seit jeher ein integraler Bestandteil der menschlichen Ernährung. Auch das Verfälschen von Lebensmitteln mit qualitativ minderwertigeren oder billigeren Inhaltsstoffen ist ein altbekanntes Phänomen. So kann etwa teurem Schafkäse in der Produktion billigere Kuhmilch zugesetzt werden, wodurch sich für die Produzenten finanzielle Vorteile ergeben. Der Konsument wird getäuscht und der Betrug führt zur Wettbewerbsverzerrung.

Neben wirtschaftlichen Aspekten sind aber auch weitere Faktoren zu berücksichtigen. Manche Menschen lehnen es etwa aus religiösen, ethischen oder kulturellen Beweggründen ab, Kuhmilch oder deren Produkte zu verzehren. Für andere hingegen birgt der Konsum von Kuhmilch und daraus hergestellten Produkten gar ein gesundheitliches Risiko, nämlich dann wenn die Betroffenen an einer Kuhmilchallergie leiden. Gerade für diese Patienten stellen Sojamilchprodukte oft eine attraktive Alternative zu konventionellen Milchprodukten dar.

Es ist von entscheidender Bedeutung, dass nicht nur strikte gesetzliche Regelungen zum Schutz der Verbraucher und auch der Mitbewerber existieren, sondern auch die notwendigen analytischen Verfahren zur Verfügung stehen um deren Einhaltung zu gewährleisten.

In den letzten Jahren haben DNA-basierte Methoden zur Authentizitätsprüfung von Milchprodukten aufgrund ihrer raschen und kostengünstigen Durchführbarkeit und den damit zu erzielenden niedrigen Nachweisgrenzen stark an Bedeutung gewonnen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll zunächst eine speziesspezifische PCR-Methode zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmilchkäsen optimiert werden um verlässlich zwischen verfälschten und unverfälschten Schafkäsen unterscheiden zu können. Weiters soll ein Real-time PCR-System entwickelt werden, das neben dem qualitativen Nachweis auch eine Quantifizierung des Kuhmilchanteils erlaubt. Zu diesem Zweck sollen sowohl ein rinderspezifisches Primerpaar als auch ein endogenes Kontrollsystem eingesetzt werden. Zur Untersuchung steht dabei eine aus

Schafmilchmischungskäsen verschiedener Kuhmilchanteile bestehende Modellkäsereihe zur Verfügung.

In einem zweiten Schritt soll schließlich versucht werden, die Methodik entsprechend zu adaptieren um den Nachweis von Kuhmilchanteilen auch in Sojamilchprodukten zu erlauben. Auch hierbei wird zunächst mit einer speziesspezifischen PCR mit anschließender Gelelektrophorese der erhaltenen Produkte gearbeitet um einen qualitativen Nachweis zu erbringen. Im Anschluss daran soll ein geeignetes System aus speziesspezifischem Primer für Rind und endogener Kontrolle entwickelt werden, das die Quantifizierung eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten ermöglicht. Hierfür wird zu Beginn mit einer Standardmischungsreihe aus Soja- und Kuhmilch gearbeitet. Schließlich soll die optimierte Methodik aber auch zum Nachweis und zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in handelsüblichen Sojamilchprodukten eingesetzt werden.

## **2 Literaturüberblick**

Dieser Abschnitt soll zunächst einige grundlegende Informationen zu Milch und Milchprodukten sowie Sojamilchprodukten liefern. Ihre Herstellung, Inhaltsstoffe und Relevanz in der Humanernährung werden kurz umrissen. Außerdem wird auch ein Blick auf die Mechanismen und Ursachen von Kuhmilchallergien bzw. –unverträglichkeiten geworfen.

Schließlich werden noch die verschiedenen analytischen Methoden präsentiert, die uns heute zur Verfügung stehen um einerseits Allergene in Lebensmitteln nachzuweisen oder andererseits auch Verfälschungen in Milch- und Sojamilchprodukten aufzudecken.

### **2.1 Milch und Milchprodukte**

Milch- und Milchprodukte haben in der menschlichen Ernährung Tradition. Seit Jahrtausenden sind sie Grundbestandteil unserer Nahrung [SPREER, 2005]. Der Konsum von Milch- und Milchprodukten variiert global gesehen stark von etwa 180 kg pro Kopf und Jahr in nordeuropäischen Ländern wie Island und Finnland bis zu weniger als 50 kg pro Kopf und Jahr in Japan und China. Mit einem laut Statistik Austria [2008] jährlichen Pro-Kopf-Verbrauch von etwa 125 kg an Milch- und Milchprodukten liegt Österreich im oberen Mittelfeld. Obwohl Milch- und Milchprodukte eine Vielzahl essentieller Nährstoffe enthalten, ist gerade in letzter Zeit ihr Konsum etwas zurückgegangen. Grund dafür dürften wohl Behauptungen über negative Einflüsse von Milch- und Milchprodukten auf die Gesundheit sein. Vor allem der hohe Anteil an in Milch enthaltenen gesättigten Fettsäuren ist dabei in Kritik geraten und wurde mit Gesundheitsrisiken wie Herzkrankheiten, Gewichtszunahme und Adipositas in Verbindung gebracht [HAUG et al., 2007].

#### **2.1.1 Inhaltsstoffe und ernährungsphysiologische Bedeutung**

Milch ist ein Drei-Phasen-System bestehend aus einer wässrigen Lösung von Lactose, Protein und Eiweißabbauprodukten sowie Mineralstoffen und Vitaminen. In dieser Lösung ist außerdem eine Fettfraktion enthalten, die als Emulsion in Wasser vorliegt [HEISS, 2004]. Die Zusammensetzung von Kuhmilch im Vergleich mit Schafmilch ist

in Tabelle 1 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, weist Schafmilch einen höheren Trockensubstanzanteil, bedingt durch einen höheren Eiweiß- und Fettgehalt, als Kuhmilch auf.

**Tabelle 1: Zusammensetzung von Kuhmilch im Vergleich zu Schafmilch [modifiziert nach SPREER, 2005]**

<b>Anteil in %</b>	<b>Kuhmilch</b>	<b>Schafmilch</b>
Trockensubstanz	13,0	19,3
Fett	4,0	7,3
Eiweiß	3,4	5,5
Casein	2,8	4,6
Molkenprotein	0,6	0,9
Lactose	4,8	4,8
Asche	0,7	1,0

Milch enthält eine Reihe ernährungsphysiologisch wichtiger und wertvoller Inhaltsstoffe. So enthält Vollmilch etwa 33 g Fett pro Liter, wovon etwas mehr als die Hälfte auf gesättigte Fettsäuren entfällt. Milchfett ist relativ reich an mittelkettigen Fettsäuren, die aufgrund ihres geringen molekularen Gewichtes rasch im Darm hydrolysiert und gut absorbiert werden. Gerade diesen mittelkettigen Fettsäuren werden gesundheitsfördernde Effekte wie krebspräventive Wirkung oder antivirale und antibakterielle Aktivität zugeschrieben. Neben Ölsäure und anderen einfach-ungesättigten Fettsäuren enthält Milch auch mehrfach-ungesättigte Fettsäuren wie Linolen- und  $\alpha$ -Linolensäure. Außerdem sind auch geringe Mengen an Transfettsäuren vorhanden, die natürlicherweise im Pansen von Wiederkäuern entstehen. In der Regel verschieben diese Transfettsäuren das Verhältnis von LDL zu HDL zu Gunsten des LDL und erhöhen damit, das Risiko für koronare Herzerkrankungen. Zu den Transfettsäuren zählt auch konjugierte Linolensäure (CLA), ein cis9, trans11 Isomer der Linolensäure, das bis zu 0,6% des Fettanteils der Milch ausmachen kann. Studien haben gezeigt, dass CLA in Hinblick auf ihre antikarzinogene, antithrombotische, antiatherogene und antioxidative Wirkung durchaus positiv zu beurteilen ist [ELMADFA und LEITZMANN, 2004; HAUG et al., 2007]. Vollmilch enthält außerdem etwa 32 g Protein pro Liter. Dieses Milchprotein besitzt hohe biologische Wertigkeit und ist somit eine ausgezeichnete Quelle für essentielle Aminosäuren. Andererseits können in der Milch enthaltene Proteine auch als Allergene fungieren.

Milch ist außerdem eine wichtige Quelle für Mineralstoffe wie Calcium, Phosphor, Magnesium und Zink und enthält auch Vitamin A, Riboflavin und Cobalamin [HAUG et al., 2007].

### **2.1.2 Herstellung von Käse**

Zur Herstellung von Käse werden aus Milch, standardisierter Milch, Mager- oder Buttermilch durch Säure- oder Labfällung Caseinmicellen und Fettphase gemeinsam als fester Bruch von der flüssigen Molke getrennt. Die weitere Bearbeitung der Gallerte, Formung, Pressung, Salzen, sortenspezifische Behandlungsverfahren (z.B. Pikieren bei Schimmelkäsen) sowie Lagerung und Reifung sind ebenso wesentlich für die Herstellung bestimmter Arten von Käse wie die Milchart, der Fettgehalt und die Vorbehandlung der Milch (z.B. Homogenisierung oder Pasteurisierung). Durch entsprechende Verarbeitung kann eine Vielzahl verschiedener Käsesorten hergestellt werden. Die Herstellung von Schafkäse erfolgt im Prinzip ebenso wie die Herstellung von Käse aus Kuhmilch. Allerdings erfordert sie eine vergleichsweise langsamere Vorgehensweise bei der Säuerung. Aufgrund des höheren Caseingehaltes in Schafmilch werden auch größere Mengen an Lab benötigt. Schafkäse weist im Allgemeinen feste bis harte Konsistenz auf [FOISSY, 2005; HEISS, 2004].

### **2.1.3 Allergenes Potential von Kuhmilch**

Etwa drei bis vier Prozent der Erwachsenen und sechs Prozent der Kinder leiden unter einer Form von Lebensmittelallergie. Dabei treten, durch Immunglobulin E vermittelte Mechanismen, Symptome auf, die die Haut, den Gastrointestinaltrakt oder die Atemwege betreffen. In seltenen Fällen kann dies bis zum anaphylaktischen Schock und damit zur akuten Lebensgefahr führen. Unter den acht Lebensmitteln, die für 90 Prozent der auftretenden allergischen Reaktionen verantwortlich sind, findet sich neben Erdnüssen und anderen Nüssen, Ei, Soja, Weizen, Fisch und Muscheln auch Kuhmilch [CORDLE, 2004; MILLS und BREITENEDER, 2005; SICHERER und SAMPSON, 2006].

Betroffen von einer Kuhmilchallergie sind vor allem Kinder. Die Symptome sind vielfältig und können entweder sofort über einen von Immunglobulin E abhängigen Mechanismus oder auch erst Stunden nach dem Konsum des Allergens nach Aktivierung der T-Zellen eintreten. Kuhmilch enthält mehr als 20 Proteine, die allergische Reaktionen auslösen können. Den überwiegenden Anteil der Proteine stellen die Caseine, die sich in  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Caseine differenzieren lassen, und die Molkenproteingruppe bestehend aus  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin, Bovinem Serumalbumin und Immunglobulin.  $\beta$ -Lactoglobulin, die Caseine und  $\alpha$ -Lactalbumin sind dabei die Hauptallergene. Nichtsdestotrotz können auch andere Proteine, die in geringeren Konzentrationen in der Kuhmilch zu finden sind wie etwa Bovines Serum Albumin oder Lactoferrin eine allergische Reaktion auslösen [EL-AGAMY, 2007; MONACI et al. 2006].

Es wurden verschiedene Versuche unternommen um die Allergenität von Kuhmilch zu reduzieren, zum Beispiel durch Hitzebehandlung oder enzymatischen Abbau. Nicht alle Proteine verlieren hierdurch ihr allergenes Potential. Die Allergenität von  $\alpha$ -Casein, dem hitzestabilsten Protein in Kuhmilch, kann auch durch Erhitzung auf 120°C für eine Dauer von 15 Minuten nicht wesentlich beeinflusst werden. Andere Proteine hingegen verlieren ihre Fähigkeit allergische Reaktionen auszulösen bereits bei 70 bis 80°C. All diesen Versuchen ist jedoch gemein, dass es dabei zu einer signifikanten Verminderung des ernährungsphysiologischen Wertes der Milch kommt. Eine enzymatische Behandlung von Milchprodukten führt auch zu inakzeptablen sensorischen Beeinträchtigungen. Außerdem kann eine partielle proteolytische Verdauung selbst zur Entstehung neuer antigener Substanzen führen. Zur Ernährung von Säuglingen werden daher hydrolysierte Formula-Produkte basierend auf Kuh- oder Ziegenmilchproteinen verwendet, die entweder einer partiellen oder einer weitgehenden Hydrolyse unterworfen worden sind. Weiters können Formula-Produkte auf Basis von Aminosäuren oder Soja-Formula eingesetzt werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass, obwohl Soja eine niedrigere Allergenität als Kuhmilch besitzt, bis zu 50 Prozent der Kinder, die an einer Kuhmilchproteinallergie leiden auch eine allergische Reaktion auf Soja zeigen. Außerdem können zwischen Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch Kreuzreaktionen auftreten [CORDLE, 2004, EL-AGAMY, 2007].

Der Großteil der Kinder, die eine allergische Reaktion auf Kuhmilch zeigen, verliert diese Sensibilität in den ersten Lebensjahren. Etwa 15 Prozent von ihnen bleibt sie allerdings ein Leben lang erhalten. Für sie gilt es alle Lebensmittel, die Kuhmilch enthalten, zu meiden. Daher ist es besonders wichtig alle Zutaten auch im Spurenbereich auf der Verpackung von Lebensmitteln aufzulisten um Allergiker zu schützen [MONACI et al., 2006]. Die EU- Richtlinie 2007/68/EC zielt darauf ab. Milch- und Milchprodukte gehören demnach zu den 14 potentiell allergenen Lebensmittelgruppen, deren Zusatz gekennzeichnet werden muss [EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2007].

Im Vergleich zur Milchproteinallergie ist die Laktoseintoleranz relativ harmlos. Es handelt sich hierbei um einen genetisch bedingten oder erworbenen Mangel an Laktase, der dazu führt, dass die Laktose, der Hauptzucker in der Milch nicht gespalten werden kann. Ungespaltene Laktose wird im Darm von Bakterien metabolisiert. Die entstehenden Stoffwechselprodukte führen zu einer Reihe von Symptomen, die denen einer Milchproteinallergie durchaus ähnlich sein können wie Übelkeit, Bauchschmerzen und Diarrhoe. Babys produzieren das Enzym Laktase in der Regel in ausreichender Menge, erst im Laufe der Jahre nimmt die Laktaseproduktion ab. Laktoseintoleranz ist daher unter Erwachsenen weit verbreitet, global gesehen sind 75 Prozent der Erwachsenen von einem Laktasemangel betroffen. Da meist noch eine Restaktivität der Laktase vorhanden ist, ist es nur äußerst selten nötig auf Milchprodukte gänzlich zu verzichten. Limitierte Mengen an Milch werden üblicherweise toleriert ohne Symptome hervorzurufen. Außerdem kann auf fermentierte Milchprodukte wie Joghurt oder Käse zurückgegriffen werden, deren Laktosekonzentration niedrig ist [HAUG et al., 2007; MONACI et al., 2006].

## **2.2 Sojamilch und Sojamilchprodukte**

Soja und daraus gewonnene Produkte werden bereits seit mehr als 1000 Jahren in Asien verzehrt. Zu der Vielzahl traditioneller Sojaprodukte zählen frische Sojabohnen, Sojasprossen und Sojamehl ebenso wie Sojamilch und Sojamilchprodukte wie Tofu, Okara und Yuba [GOLBITZ, 1995]. In unsere westliche Ernährungsweise haben Sojamilch und Sojamilchprodukte allerdings erst in den letzten beiden Jahrzehnten

Einzug gehalten. Grund für die wachsende Beliebtheit sind vor allem die gesundheitsfördernden Eigenschaften, die Sojaprodukten nachgesagt werden. Außerdem sind Sojamilchprodukte für laktose-intolerante Personen, Vegetarier und Milchallergiker eine geeignete Alternative zu Milchprodukten [BEASLY et al., 2001].

### **2.2.1 Inhaltsstoffe und ernährungsphysiologische Bedeutung**

Sojamilch besteht zu etwa 93 Prozent aus Wasser und enthält 2,8 g Eiweiß, 1,9 g Fett (davon 0,2 g gesättigte Fettsäuren), 1,8 g Kohlenhydrate und 1,3 g Ballaststoffe pro 100 g. Der Energiegehalt von 33 kcal pro 100 g entspricht in etwa der Hälfte des Energiegehaltes von Vollmilch [TERNES et al., 2005].

Sojaprotein verfügt über eine für pflanzliches Eiweiß ausgezeichnete biologische Wertigkeit und eine gute Komposition an Aminosäuren, die mit Ausnahme von Methionin den Bedarf an essentiellen Aminosäuren eines Menschen deckt. Außerdem weist Sojamilch einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf. Die enthaltenen Phytoöstrogene können den Serumcholesterinspiegel senken und wirken dabei vor allem auf die LDL-Rezeptoren [BEASLEY et al., 2003]. Darüber hinaus werden Sojaprodukten anti-atherogene Eigenschaften nachgesagt [FAVARO TRINDADE et al., 2001].

### **2.2.2 Herstellung von Sojamilch und Sojamilchprodukten**

Zur Herstellung von Sojamilch aus Sojabohnen werden diese zunächst in Wasser eingeweicht und fein zermahlen. Anschließend wird der so entstandene „Schlamm“ gefiltert und gekocht um natürlich enthaltene Enzyme zu inaktivieren. Der bittere bohnenartige Geschmack kann durch enzymatische Behandlung [TERNES et al., 2005] oder auch durch Milchsäurefermentation reduziert werden. Dabei werden zusätzlich auch anti-nutritive Inhaltsstoffe wie Phytinsäure entfernt [FAVARO TRINDADE et al., 2001]. Da Sojamilch und Sojamilchprodukte im Vergleich zu tierischer Milch und den daraus gewonnenen Produkten eine niedrigere Calciumkonzentration aufweisen, sollte Sojamilch mit Calcium angereichert werden [YAZICI et al., 1997]. Sojamilch kann dann als Basis für eine Vielzahl an Produkten wie Tofu, Soja-Joghurt und auf Sojabasis hergestellten Käsen dienen. Für die Herstellung von Soja-Joghurt werden üblicherweise

kommerziell erhältliche Joghurt Starterkulturen verwendet. Um die Akzeptanz durch die Konsumenten zu erhöhen und den leichten Sojabohnengeschmack zu überdecken werden oft verschiedene Aromen oder Fruchtzubereitungen zugemischt [GOLBITZ, 1995; TERNES et al., 2005].

### **2.3 Methoden zum Nachweis von Kuhmilch in Milchprodukten**

Die Authentizität von Produkten ist ein Thema, das im Lebensmittelsektor gerade in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnt. Sowohl die Lebensmittelaufsichtsbehörden als auch Lebensmittelproduzenten, der Handel und Konsumentenvertreter haben ein großes Interesse daran sicherzustellen, dass Lebensmittel korrekt gekennzeichnet sind. Vor allem Lebensmittel, die einer langen Prozedur an Verarbeitungsschritten unterzogen werden und qualitativ hochwertige, teure Premiumprodukte sind als Zielobjekte für Verfälschungen sehr beliebt [KAROUI und DE BAERDEMAEKER, 2007]. Die Verfälschung von Lebensmitteln mit qualitativ minderwertigeren bzw. billigeren Inhaltsstoffen wird bereits seit Jahrtausenden praktiziert. Da Milchprodukte schon seit jeher wichtige Handelswaren darstellten, gehörten sie wahrscheinlich auch zu den ersten Lebensmitteln, die von Verfälschungen betroffen waren. Vor allem billigere Kuhmilch wird gerne herangezogen um teurere Milcharten wie Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch zu ersetzen. In vielen Ländern in denen die klimatischen Verhältnisse für die Haltung von Rindern nicht geeignet sind, ist vor allem die Produktion von Schaf- und Ziegenmilchprodukten ein wichtiger Wirtschaftsfaktor. Neben wirtschaftlichen Aspekten, wie unlauterem Wettbewerb gegenüber sachgemäß arbeitenden Produzenten, Irreführung und Täuschung von Konsumenten und der Missachtung gesetzlich verankerter Regelungen können sich durch diese Praxis aber auch weitere Konsequenzen ergeben. Manche Konsumenten wollen Milch von bestimmten Tierarten nicht konsumieren, sei es aus religiösen, ethischen oder kulturellen Motiven. Andere hingegen dürfen bestimmte Milcharten, vor allem Kuhmilch, aus gesundheitlichen Gründen nicht konsumieren, weil sie nämlich an einer Intoleranz oder Allergie gegen Milch leiden [KOTOWICZ et al., 2007; LOPEZ-CALLEJA DIAZ et al., 2007; MAFRA et al., 2007; MAYER, 2005]. Gerade für Patienten, die keinerlei Produkte aus Kuhmilch vertragen, sind Sojamilch und deren

Produkte oft eine geeignete Alternative. Dies zeigt sich auch daran, dass auf Sojabasis hergestellte Formula-Produkte schon seit langem erfolgreich für die Ernährung von Kindern mit Kuhmilchallergie eingesetzt werden. Studien beweisen außerdem, dass die allergene Aktivität von Sojaprotein wesentlich niedriger ist als diejenige von Kuhmilchprotein [CORDLE, 2004].

Um sowohl Produzenten vor unlauterem Wettbewerb, als auch Konsumenten vor Täuschung und Irreführung, aber auch negativen gesundheitlichen Auswirkungen zu schützen, braucht es nicht nur gesetzliche Regulative, die die Kennzeichnung von Lebensmitteln und auch darin enthaltenen Allergenen vorschreiben, sondern auch zuverlässige, rasche und kostengünstige Nachweisverfahren um die Angaben zur Kennzeichnung auch überprüfen zu können.

Zu diesem Zweck steht eine ganze Reihe an analytischen Verfahren zur Verfügung. Im folgenden Abschnitt sollen diese Methoden kurz vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile erläutert werden. Der Schwerpunkt liegt dabei klar auf den DNA-basierten Methoden, die auch im Rahmen dieser Diplomarbeit eingesetzt worden sind.

Die meisten der angeführten Methoden wurden entweder zur Differenzierung von Kuhmilch von Schaf- und Ziegenmilch oder zur Bestimmung verbleibender Allergene in hypoallergener Säuglingsnahrung oder Milchersatz entwickelt [POMS et al., 2004].

### **2.3.1 Immunoassays**

Zu den Verfahren, die auf immunologischen Reaktionen beruhen, zählen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Radio-allergosorbent Test (RAST), Enzyme-allergosorbent Test (EAST) ebenso wie z.B. SDS-PAGE in Kombination mit Immunoblotting. RAST, EAST und ELISA können auch quantitative Ergebnisse liefern, wohingegen das Immunoblotting nur qualitative Aussagen zulässt [POMS et al., 2004].

### **2.3.1.1 Radio-allergosorbent Test (RAST) / Enzyme-allergosorbent Test (EAST)**

RAST und EAST werden üblicherweise zur klinischen Diagnose von Lebensmittelallergien verwendet. Sie beruhen im Prinzip darauf, dass ein Antigen oder Allergen, das an eine feste Phase gebunden ist, spezifisch humanes Immunglobulin E (IgE) bindet. Antigene, die in einer Lösung vorhanden sind, inhibieren dabei die Bindung von IgE an die immobilisierten Antigene. Zur Detektierung werden anti-IgE Antikörper eingesetzt, die mit einem radioaktiven Isotop oder einem Enzym markiert sind. Der kommerzielle Einsatz dieser Methode zur Quantifizierung von Antigenen in Lebensmitteln ist stark eingeschränkt, da hierfür Serum von allergischen Patienten benötigt wird [POMS et al., 2004]. Mittels RAST können Konzentrationen zwischen 1 und 5 mg  $\alpha$ -Lactalbumin pro kg Säuglingsnahrung nachgewiesen werden [FREMONT et al., 1996]. Auch EAST kann erfolgreich eingesetzt werden um verbleibende Allergene in Säuglingsnahrung aufzuspüren [DOCENA et al., 2002].

### **2.3.1.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Das Prinzip eines ELISA beruht darauf, dass eines der beiden Reagenzien, entweder Antikörper oder Antigen an einem Polymer, einer Membran oder einem Partikel immobilisiert wird. Anschließend wird mit einer Lösung aus der Probe und dem jeweiligen komplementären Reagens (Antikörper oder Antigen) inkubiert. Durch Bindung eines spezifischen enzymmarkierten Antikörpers und Zusatz des Substrates können mittels einer colorimetrischen Reaktion Allergene oder bestimmte Markerproteine nachgewiesen werden. Anhand einer Standardgerade, die mit Hilfe von Referenzsubstanzen erstellt wird, kann schließlich die Konzentration des Antigen-Antikörper Komplexes bestimmt werden. Man unterscheidet dabei zwischen kompetitivem ELISA und Sandwich-ELISA. Kompetitiv bedeutet, dass der Analyt und ein immobilisiertes Antigen um die Bindung an einen enzymmarkierten Antikörper konkurrieren. Enthält die Probe keinerlei Antigene, bindet der enzymmarkierte Antikörper nur an das immobilisierte Antigen und liefert hohe Absorptionsraten für das gefärbte Produkt. Die Absorption ist somit invers proportional der Menge an Antigen in der Probe. Zum Nachweis und zur Quantifizierung von Allergenen in Lebensmittel werden üblicherweise Sandwich-ELISA eingesetzt. Dabei wird der Antikörper immobilisiert, üblicherweise an einer Mikrotiterplatte. Die entsprechenden spezifischen

Proteine in der Probe werden im ersten Schritt von diesem Antikörper gebunden. Ein zweiter gegen den Analyten gerichteter Antikörper, der mit einem Enzym markiert ist, wird zugesetzt. Schließlich wird durch Zusatz des für das Enzym spezifischen Substrates ein gefärbtes Produkt erhalten. Die daraus erhaltene Absorption ist direkt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe [CATALA und PUCHADES, 2008; POMS et al., 2004].

Diese Methode eignet sich gut, wenn in kurzer Zeit viele Proben bearbeitet werden sollen. ELISA ist sehr empfindlich und spezifisch für den jeweiligen Analyten. Außerdem kann die Analyse schnell, einfach und kostengünstig durchgeführt werden und fertige Kits sind kommerziell erhältlich. Die Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten ELISA liegt bei weniger als 5 mg pro kg. Wird diese Methode bei gereiften Milchprodukten und hitzebehandelten Milchprodukten eingesetzt, ist zu beachten, dass es durch Erhitzung zur Denaturierung der Proteine kommt und auch während des Reifungsvorgangs bei Käsen tritt hydrolytischer Proteinabbau ein [CATALA und PUCHADES, 2008; MONACI et al., 2006]. Sind die Antikörper etwa gegen das hitzeempfindliche Bovine Serumalbumin gerichtet, kann dies zu falsch-negativen Resultaten bei der Untersuchung erhitzter Milchprodukte führen [MAYER, 2005]. Dieser unerwünschte Effekt kann vermieden werden indem Antikörper, die gegen Kuhmilchcaseine gerichtet sind, eingesetzt werden, da diese weniger empfindlich gegenüber Hitzebehandlungen sind. Daraus ergibt sich allerdings als Nachteil, dass Verfälschungen, die auf einem Zusatz von Molkenprotein basieren nicht erkannt werden können [LOPEZ-CALLEJA et al., 2007/c].

### **2.3.2 Proteinbasierte Methoden**

#### **2.3.2.1 Isolelektrische Fokussierung (IEF)**

Die IEF ist die Referenzmethode der EU zum Nachweis von bovinem Casein in Schaf-, Ziegen- und Büffelkäse. Da es im Zuge der Käsureifung oft zum Abbau von Caseinen kommt, basiert die Methode auf der isolelektrischen Fokussierung von  $\gamma$ -Caseinen, die durch Hydrolyse des Proteins mit Hilfe von Plasmin entstehen. Die IEF ist ein empfindliches und genaues Verfahren um festzustellen, ob der Anteil an Kuhmilch in einer Probe unter oder über dem Grenzwert von 1% liegt [MAYER, 2005]. Locci et al.

[2008] zeigten in einer Studie mit Mozzarella mit unterschiedlichen Kuhmilchanteilen, dass die IEF auch dann verlässliche Ergebnisse lieferte, wenn der Käse erhitzt worden war. Dazu verwendeten sie Mozzarella mit einem minimalen Kuhmilchanteil von 5% und benutzten diesen zum Belegen von Pizzas.

Auch für den Nachweis von Verfälschungen in Molkenproteinkäsen wie z.B. Ricotta kann die IEF eingesetzt werden, wobei bovines  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin von den Molkenproteinen von Schaf- und Ziegenmilch unterschieden werden können. Allerdings kann diese Methode beim Einsatz von erhitzter Milch oder Caseinaten zur Verfälschung von Käsen falsch-negative Resultate erbringen [MAYER, 2005].

### **2.3.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Zum Nachweis von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Formen der Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt werden. Mittels nativer PAGE kann zwischen den Molkenproteinen von Kuh-, Ziegen- und Schafmilch unterschieden werden.  $\beta$ -Lactoglobulin aus Kuhmilch wandert nämlich während der Elektrophorese schneller als andere Molkenproteinfraktionen [MAYER, 2005].

Um die Proteine auf Basis ihres Molekulargewichtes zu separieren und den Einfluss der ursprünglichen Ladung der Proteine auszuschalten, können die Proteine mit SDS (Natrium-Dodecylsulfat) behandelt werden. Das SDS denaturiert die Proteine, zerstört also ihre 3D-Struktur und verleiht den Proteinen eine starke negative Ladung. Die Anzahl der negativen Ladung hängt dabei von der Länge des Proteins ab [CLARK, 2006]. Die SDS-PAGE kann mit anderen Methoden wie Immunoblotting kombiniert werden und zählt zu den Standardmethoden um Proteine und Allergene zu trennen und zu identifizieren [POMS et al., 2004].

Kombiniert man IEF und SDS-PAGE kommt man zur 2D-Gelelektrophorese. Dabei können die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und isoelektrischen Punktes separiert werden. Dies bringt vor allem bei der Auftrennung von Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht erhebliche Vorteile. 2D-Gelelektrophorese wurde etwa erfolgreich eingesetzt um Proteine und Peptide in kommerziell erhältlichem Milchpulver zu trennen [MONACI et al., 2006].

### **2.3.2.3 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Für den Nachweis von Milchproteinen stehen verschiedene HPLC-Methoden zur Verfügung. Die meisten basieren auf Anionen- oder Kationen-Austauschchromatographie, Größenausschlusschromatographie, Gel-Permeationschromatographie oder Umkehrphasen-Chromatographie. Allen gemeinsam ist allerdings eine Nachweisgrenze, die bei weitem nicht ausreicht um Patienten mit Kuhmilchallergie vor Kontaminationen von Produkten mit Kuhmilch zu schützen [MONACI et al., 2006]. Eine Studie aus dem Jahr 2004 zeigt etwa, dass Kuhmilchverfälschungen in Ziegenmilch anhand des Molkenproteins  $\beta$ -Lactoglobulin mittels HPLC/ESI-MS (Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie) nachgewiesen werden können. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei 5% [CHEN et al., 2004]. Zum Einsatz der HPLC wird außerdem teures Equipment benötigt und die Methode ist nicht für hochverarbeitete Produkte, in denen es bereits zur Denaturierung von Proteinen gekommen ist, geeignet [MACCABIANI et al., 2005].

### **2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR zählt unter allen Methoden der Molekularbiologie mit Sicherheit zu den wichtigsten, nützlichsten und beliebtesten. Mittels PCR ist es möglich aus geringsten Mengen einer bestimmten DNA-Sequenz eine Ausbeute von einigen Mikrogramm der gewünschten Sequenz zu erzielen. Die PCR findet aufgrund ihres einfachen Prinzips und ihrer Empfindlichkeit auch ein breites Spektrum an Anwendungen zu denen die klinische Diagnostik, genetische Analyse und Gentechnologie ebenso zählen wie die Forensik [CLARK, 2006]. Empfindlichkeit, Spezifität, Einfachheit, Robustheit und Geschwindigkeit sind auch jene Eigenschaften, die die PCR im Vergleich zu Protein-basierten Methoden zur Speziesidentifizierung auszeichnen [LEVIN, 2008].

Für eine Polymerasekettenreaktion sind folgende Komponenten nötig: amplifizierbare DNA, die als Matrize dient; zwei Primer, die die Zielsequenz an beiden Enden begrenzen, eine hitzestabile DNA-Polymerase, Nucleosidtriphosphate [CLARK, 2006] und ein Puffer der für geeignete Reaktionsbedingungen sorgt.

Ein PCR-Lauf startet zunächst mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C. Dabei trennen sich die beiden Stränge der Matrizen-DNA [MÜLHARDT, 2006]. Anschließend wird die Temperatur auf etwa 50°C bis 60°C abgesenkt um den Primern die Anlagerung an die Template-DNA zu ermöglichen [CLARK, 2006]. Die optimale Temperatur für die Annealingphase richtet sich nach den verwendeten Primern. Sie wird üblicherweise 5 bis 10°C tiefer angesetzt als die Schmelztemperatur des Primerpaares. Im Zweifelsfall wird die optimale Annealingtemperatur empirisch bestimmt. Der dritte Schritt, die Elongationsphase, bringt eine Erhöhung der Temperatur auf 72°C mit sich um der DNA-Polymerase optimale Bedingungen für eine Verlängerung der Primer zur Verfügung zu stellen. Am Ende eines Zyklus ist die DNA-Menge im Idealfall verdoppelt worden und der nächste Zyklus beginnt [MÜLHARDT, 2006].

Im Folgenden sollen nun die kritischen Schritte in diesem Ablauf behandelt werden. Zu diesen gehört zunächst die Denaturierung. Alle PCR-Komponenten leiden unter der Hitze, die Polymerase wird denaturiert, Nucleotide zerfallen und Template-DNA und Primer werden depuriniert. Deswegen ist es wichtig, die Denaturierungszeit so kurz wie möglich zu halten. Ein weiterer wichtiger und kritischer Faktor ist die Annealingtemperatur. Sie richtet sich, wie bereits erwähnt, hauptsächlich nach dem eingesetzten Primerpaar. Zu niedrige Temperaturen begünstigen dabei das Auftreten unspezifischer Produkte, zu hohe Temperaturen beeinträchtigen die Empfindlichkeit der Methode. Die Elongationszeit sollte an die Länge des Amplikons angepasst werden. Bei der Verwendung von Taq-Polymerase sollte sie 0,5 bis 1 min pro kb Länge betragen. Auch die Qualität und Menge der Template-DNA sind entscheidende Faktoren. Ebenso zu berücksichtigen sind der richtige Puffer, da die DNA-Polymerase ein Aktivitätsmaximum bei einem pH oberhalb von 8 besitzt, die richtige Salzkonzentration, wobei hier vor allem auf MgCl<sub>2</sub> verwiesen werden soll, das Primerannealing, Trennung der Stränge während der Denaturierung, Produktspezifität, Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate entscheidend beeinflusst, wie auch die Nucleotidkonzentration. Zu viele dNTPs im PCR-Ansatz können eine stark inhibierende Wirkung auf die Amplifikation haben. Besonders kritisch für das Gelingen einer PCR ist auch die Wahl des richtigen Primers. Primer sollten eine Länge von 18 bis 30 Basen, einen GC-Anteil zwischen 40 und 60% und nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander enthalten. Am 3' Ende sollten ein bis maximal drei G oder C sitzen und

die Sequenz sollte natürlich möglichst spezifisch für das jeweilige Amplifikationsprodukt sein. Außerdem sollten sie eine geringe Komplementariät an ihren 3'Enden besitzen und keine Hairpin-Strukturen ausbilden. Daneben sind Faktoren wie Zyklenzahl, Primerkonzentration oder PCR-Zusätze ausschlaggebend für das Gelingen oder Misslingen einer PCR [MÜLHARDT, 2006].

### **2.3.3.1 Speziesspezifische PCR**

Da Milch somatische Zellen wie Epithelzellen und somit, wie die meisten Lebensmittel, genug DNA für die Amplifizierung enthält, kann die PCR zum Nachweis verschiedener Milcharten in Milchprodukten angewendet werden [DEULEMESTER und GIOVANNACI, 2006; LEVIN, 2008; REALE et al., 2008]. DNA ist nicht gewebsspezifisch, somit können für den Nachweis von Kuhmilch in Lebensmitteln dieselben Primer verwendet werden, die auch bei der Speziesdifferenzierung für Fleisch zum Einsatz kommen [HOLZHAUSER et al., 2006].

Für die Differenzierung von Käsen aus Kuh-, Büffel-, Ziegen- oder Schafmilch werden gerne Fragmente des mitochondrialen Genoms als Template-DNA für die Amplifizierung eingesetzt. Die Wahl dieser kurzen Zielsequenzen, die in einer Zelle vielfach vorkommen, führt dazu, dass selbst für Produkte in denen die DNA weitgehend degradiert ist, noch gute Ergebnisse erhalten werden [MACCABIANI et al., 2005]. Angesichts der Tatsache, dass DNA aus Käseproben oft thermischen Prozessen und Reifungsvorgängen unterzogen worden ist, die ihren Abbau beschleunigen, ist das ein entscheidender Vorteil der PCR gegenüber anderen Methoden [LOPEZ-CALLEJA et al., 2007/c]. DNA, die aus Käse und gekochten Milchprodukten isoliert wird, weist einen höheren Grad an Degradierung auf als zum Beispiel DNA aus pasteurisierter Milch [ZHANG et al., 2007]. Nichtsdestotrotz kann eine speziesspezifische PCR etwa auch zur Detektion von Kuhmilch in reifen und sogar überreifen Ziegen- und Schafkäsen eingesetzt werden [MAYER, 2005]. Die hohe Mutationsrate der mitochondrialen DNA führt zu einem vermehrten Auftreten von Punktmutationen. Diese Punktmutationen können dann zur Speziesunterscheidung eingesetzt werden. So gelang etwa der Nachweis von bis zu 0,1% Kuhmilchanteil in roher, pasteurisierter und auch sterilisierter Schaf- oder Ziegenmilch mit Hilfe eines Primers, der auf das

mitochondriale 12S rRNA Gen abzielt. Dieser spezifische Primer erlaubt die direkte Detektion von Kuhmilch ohne weitere komplementäre Techniken wie Sequenzierung oder PCR-RFLP [LOPEZ-CALLEJA, 2004]. Für die Speziesidentifizierung müssen die verwendeten Loci Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies zeigen, innerhalb einer Spezies hingegen, sollte möglichst wenig Variation vorliegen. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, können speziesspezifische Primer auch basierend auf Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP) entworfen werden. Die meisten Methoden zielen auf das Cytochrom b Gen, das Cytochrom Oxidase Gen oder 12S und 16S rRNA Gene ab [TOBE und LINACRE, 2008].

Auch zur Differenzierung von Rindergewebe in Fleischproben kann eine PCR basierend auf speziesspezifischen Primern eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze konnte dabei auf 0,1% Rinderanteil festgelegt werden [ILHAK und ARSLAN, 2007]. Auch die Verwendung von Gensequenzen, die für Regionen codieren in denen speziesspezifische Wiederholungen (species specific repeats / SSR) vorkommen erlaubt den Nachweis von Rindfleisch und kann dieses vom Fleisch anderer Tierarten wie Schaf oder Büffel unterscheiden [AHMED et al., 2007].

#### **2.3.3.2 Duplex- oder Multiplex-PCR**

Die Multiplex-PCR beruht auf der Idee mehrere Amplifikationen mit ein und demselben Template in einem PCR-Lauf durchzuführen. Dazu wird die entsprechende Anzahl an Primern in den Ansatz zugegeben. Zu beachten ist dabei, dass die Primer keine homologen Sequenzen amplifizieren sollten, da es ansonsten zu Fehlannealing der Primer kommt [MÜLHARDT, 2006]. So kommt z.B. eine polnische Studie zu dem Schluss, dass die Homologie zwischen den Zielregionen kleiner als 50% sein sollte. Bei größerer Homologie der Sequenzen können keine zuverlässigen Ergebnisse mehr erhalten werden [KOTOWICZ et al., 2007]. Der Nachweis der einzelnen Fragmente kann sich bei einer großen Zahl an verwendeten Primerpaaren durchaus schwierig gestalten und den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Primern und automatischen Sequenzierern erfordern [MÜLHARDT, 2006]. Für die Speziesdifferenzierung von Säugetieren können aber durchaus 38 verschiedene Primer zur Identifizierung von 18

verschiedenen Spezies im Rahmen einer Multiplex-PCR eingesetzt werden, wie eine britische Untersuchung beweist [TOBE und LINACRE, 2008].

Bottero et al. [2003] entwickelten eine Multiplex-PCR zum Nachweis von Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch in Milchprodukten. Dazu wurden Gen-Fragmente gesucht, die entscheidende Unterschiede in ihrer Sequenz aufwiesen um spezies-spezifische Amplikons von unterschiedlicher Länge zu erhalten. Die drei Primerpaare wurden schließlich mit Hilfe von Blutproben von acht Rinderrassen, 31 Ziegenrassen und 24 Schafassen auf ihre Spezifität getestet und zeigten keinerlei Unterschiede in der Erkennung innerhalb einer Spezies. Aus diesen drei Primerpaaren wurde eine Multiplex-PCR entwickelt, die einen Nachweis von 0,5% Kuhmilch in Ziegenkäsebruch erlaubt. Die Methode konnte auch erfolgreich für die Untersuchung von 19 Käseproben aus dem Handel eingesetzt werden. Die Multiplex-Ergebnisse wurden mittels Simplex-PCR und PCR-RFLP bestätigt, wobei sich vermutlich aufgrund unterschiedlicher Empfindlichkeit der Nachweisverfahren nur bei einer Probe Diskrepanzen zeigten.

Duplex-PCR-Methoden wurden erfolgreich für den Nachweis von Kuhmilch in Ziegenkäse eingesetzt. Die Nachweisgrenzen liegen dabei im Bereich von 0,1% [MAFRA et al., 2007] bis 1% [KOTOWICZ et al., 2007]. Mit wenigen Ausnahmen, die vermutlich auf die Qualität der Template-DNA zurückzuführen sind, konnten diese Methoden auch für Ziegenkäse [MAFRA et al., 2007] bzw. Ziegenmilch-Handelsproben [KOTOWICZ et al., 2007] eingesetzt werden.

Gerade für die Speziesdifferenzierung bei Milchprodukten scheint die Multiplex-PCR besonders geeignet zu sein, da hier üblicherweise nur eine beschränkte Anzahl an Tierarten involviert ist und es unwahrscheinlich ist, dass eine unbekannte Spezies enthalten ist [BOTTERO et al., 2003]. Ein großer Vorteil der Multiplex-PCR gegenüber der Simplex-PCR ist die Vermeidung von falsch-negativen Ergebnissen [KOTOWICZ, 2007]. Andererseits führt die wachsende Anzahl an Gen-Fragmenten, die in einer Multiplex-PCR nachgewiesen werden sollen, auch zu zunehmenden Problemen bei der Amplifikation der Produkte, falsch-positiven Ergebnissen und Schwierigkeiten bei der Interpretation der Banden, wenn die Detektierung mittels Gelelektrophorese durchgeführt wird [REALE et al., 2008].

### 2.3.3.3 Weitere PCR-basierte Methoden

PCR-RFLP ist ebenfalls eine Methode zur Speziesdifferenzierung in Lebensmitteln. Durch Amplifikation eines 359 bp Fragments des mitochondrialen Cytochrom b Gens mit Hilfe eines Universalprimerpaar und anschließendem Restriktionsenzymverdau konnten El-Rady und Saeyd [2006] ein speziesspezifisches Restriktionsprofil erzeugen und so die Milchen von Kuh, Büffel, Schaf und Ziege unterscheiden. Die Amplifikation einer mitochondrialen Gensequenz mit anschließendem Restriktionsenzymverdau kann auch zur Unterscheidung von Rindfleisch vom Fleisch anderer Tierarten wie Schaf oder Büffel eingesetzt werden [AHMED et al., 2007]. Bei PCR-RFLP Methoden ist grundsätzlich der große Zeit- und Arbeitsaufwand zu beachten [KHAIRALLA et al., 2007].

Auch eine semi-nested PCR konnte bereits zum Nachweis von Rinder-DNA in verschiedenen Lebens- und Futtermitteln, darunter auch Milchfutterkonzentrate, angewendet werden. Durch den Einsatz eines Primerpaares wurde primär eine 365 bp Gensequenz des mitochondrialen Cytochrom b Gens amplifiziert. Die Auswahl eines neuen forward-Primers für den zweiten Schritt führte zu einem 284 bp Amplikon. Es konnte gezeigt werden, dass der zusätzliche Einsatz des zweiten, semi-nested Primerpaares im Gegensatz zum primären Primerpaar eine erhebliche Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode bewirkte [KHAIRALLA et al., 2007]. Außerdem erhöht die Verwendung eines zweiten nested oder semi-nested Primerpaares auch die Spezifität der Methode [CLARK, 2006].

Reale et al. [2008] entwickelten eine Methode zur Differenzierung von Milch- und Milchprodukten von Kuh, Schaf, Ziege und Büffel die auf Minisequenzierung basiert. Dazu setzten sie ein Primerpaar spezifisch für die Amplifizierung des genomischen  $\kappa$ -Casein-Gens ein um für alle vier Spezies ein Produkt zu erhalten. Polymorphismen innerhalb dieser Sequenz wurden durch Minisequenzierung mit Hilfe von Extension-Primern detektiert und erlaubten die zweifelsfreie Zuordnung zur jeweiligen Spezies. Die Methodik wurde erfolgreich bei Rohmilch und pasteurisierter Milch ebenso wie bei Käseproben aus dem Handel eingesetzt und erlaubte unter Einsatz einer Verdünnungsreihe einen Nachweis von 0,1% Kuhmilch in Büffelmilch.

Natürlich sind auch fertige Kits für die Speziesdifferenzierung kommerziell erhältlich. Das bioMérieux FoodExpert-ID® System etwa basiert auch auf der Amplifizierung von DNA mittels PCR, die dann an einen Mikroarray-Chip hybridisiert wird. Eine Identifizierung von Rind kann dabei bei Konzentrationen von weniger als 1% nicht mehr verlässlich durchgeführt werden. Es eignet sich als rasche Screening-Methode mit deren Hilfe bis zu 30 Vogel-, Fisch- und Säugetierspezies differenziert werden können, wobei allerdings empfohlen wird, die erhaltenen Ergebnisse mittels Real-time PCR zu bestätigen [CHISHOLM et al., 2008].

PCR-basierte Verfahren sind zur Speziesdifferenzierung in Lebensmitteln derzeit die Methoden der Wahl, besonders dann, wenn die zu untersuchenden Lebensmitteln vielen Verarbeitungsschritten unterzogen worden sind, die zu einer Denaturierung von Proteinen führen und auch DNA fragmentieren. Diese DNA-Fragmente können mittels PCR-basierter Methoden aber immer noch nachgewiesen werden. DNA-basierte Methoden sind einfach in ihrer Anwendung, empfindlich und robust [CHISHOLM et al., 2008]. Außerdem ist die PCR eine kostengünstige Alternative etwa zu elektrophoretischen Methoden [MACCABIANI et al., 2005].

Ein wesentlicher Nachteil konventioneller PCR-Methoden ist, dass es sich um eine Endpunkt-Analyse handelt, die lediglich quantitative Resultate liefert [KOTOWICZ, 2007]. Eine digitale Analyse der Bilder von Agarosegelen erlaubt etwa lediglich eine grobe Abschätzung des Anteils an Kuhmilch [EL-RADY, 2006]. Außerdem erfordert konventionelle PCR weitere Arbeitsschritte um die amplifizierte DNA zu detektieren. Die einfachste und am weitesten verbreitete dafür geeignete Methode ist sicher die Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Färbung mit Ethidiumbromid [MÜLHARDT, 2006]. Da die Gelelektrophorese relativ zeit- und arbeitsaufwendig ist, erlaubt sie keinen hohen Durchsatz bei der Analyse der Proben [ZHANG et al., 2007].

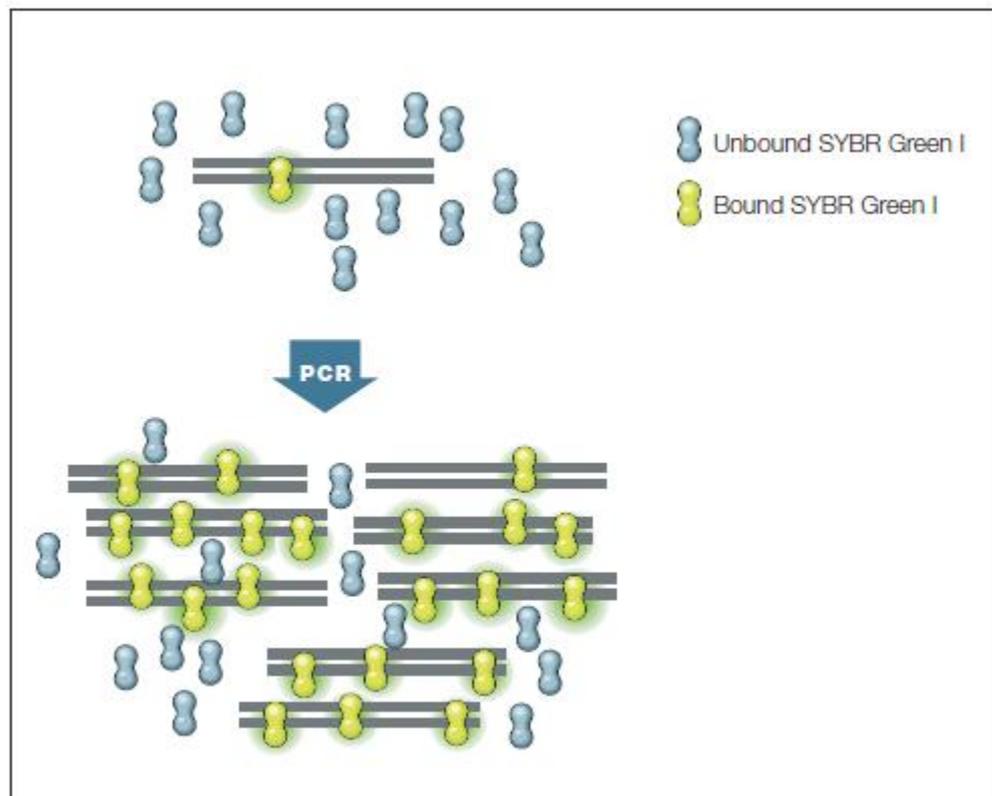
## **2.3.4 Real-time PCR**

### **2.3.4.1 Prinzip und Ablauf**

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, die als Endpunkt-Analyse die Detektion des Amplikons durch Gelelektrophorese erfordert, ermöglicht die Real-time PCR die

Anhäufung des amplifizierten Produktes in Echtzeit, also während der Reaktion, zu verfolgen. Zu diesem Zweck werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, deren Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der amplifizierten DNA wächst [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

Dafür stehen zwei grundsätzliche Konzepte zur Verfügung. Das erste basiert auf der Verwendung von Fluorochromen, die sich an doppelsträngige DNA anlagern. Dabei verändert sich ihre Konformation und das Fluoreszenzsignal nimmt zu [SAUNDERS, 2009]. Zu diesen Farbstoffen zählt SYBR Green. SYBR Green bindet nur an den „Minor Groove“ doppelsträngiger DNA und ist eine einfach einzusetzende und relativ kostengünstige Alternative zur Detektion der amplifizierten DNA während der Real-time PCR [LEVIN, 2008].

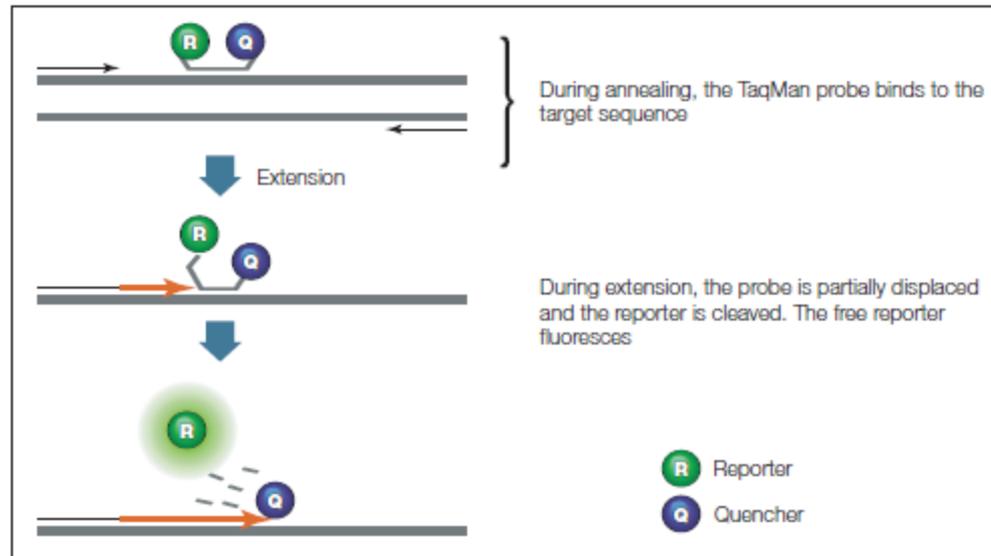


**Abbildung 1: SYBR Green I als DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff für die Real-time PCR [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]**

Außerdem liefert SYBR Green hohe Signalstärken, da jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle binden kann. Die universelle Einsetzbarkeit von SYBR Green bringt

aber auch einen maßgeblichen Nachteil mit sich. Es erlaubt nämlich keine Unterscheidung zwischen spezifischem Produkt und Artefakten [MÜLHARDT, 2006]. Andererseits ermöglicht die Verwendung von SYBR Green die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse. Anhand des Schmelzverhaltens kann das Amplikon dann identifiziert werden [LEVIN, 2008].

Um sicherzustellen, dass das richtige Fragment amplifiziert worden ist, können sequenzspezifische Fluoreszenz-Sonden wie z.B. TaqMan® Sonden eingesetzt werden [CLARK, 2006]. Dabei wird die 5'-3' Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase in Kombination mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) genutzt. Die Sonde ist ein drittes Oligonucleotid, dessen 3' Ende durch ein Didesoxynucleotid oder Phosphatgruppen blockiert ist, sodass es nicht als Primer fungieren kann. An dieses Oligonucleotid sind zwei Fluoreszenzfarbstoffe gebunden. Ein sogenannter Reporter und ein Quencher. Wird der Reporter durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, strahlt er Licht einer anderen Wellenlänge ab. Der zweite Fluorochrom (Quencher) befindet sich in unmittelbarer Nähe des Reporters. Sein Anregungsspektrum entspricht dem Emissionsspektrum des Reporters. Die Energie wird also an den zweiten Fluorochrom weitergegeben und dieser gibt wiederum Licht anderer Wellenlängen ab. TaqMan®-Sonden hybridisieren zwischen den beiden Primern an die DNA. Werden die Primer von der DNA-Polymerase verlängert, wird dank der Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase die Sonde abgebaut und Reporter und Quencher werden freigesetzt. Dadurch steigt die Intensität des vom Reporter abgegeben Lichtsignals stark an [MÜLHARDT, 2006].

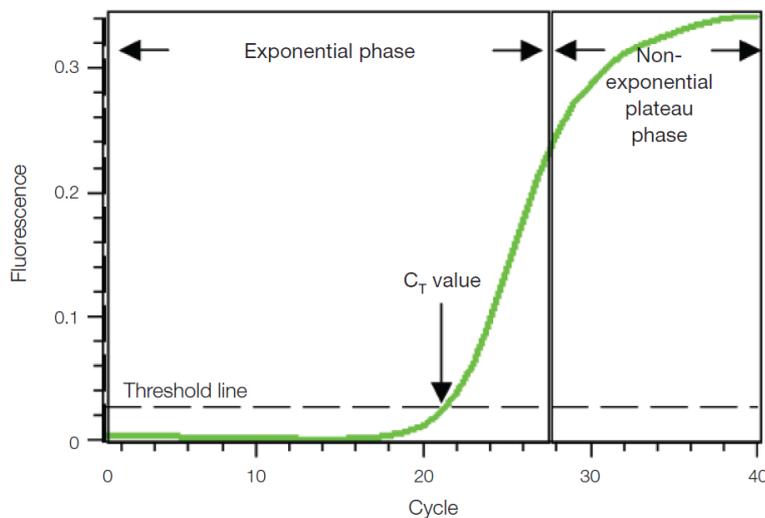


**Abbildung 2: TaqMan® Sonden als Fluorochrome in der Real-time PCR [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]**

Auf einem ähnlichen Prinzip beruhen Molecular Beacons, die durch komplementäre Sequenzen an 5' und 3' Ende Haarnadelstrukturen ausbilden. So wird gewährleistet, dass sich Reporter und Quencher eng genug beieinander befinden [MÜLHARDT, 2006]. Auch Hybridization Probes nutzen FRET. Dabei werden zwei sequenzspezifische Oligonucleotide eingesetzt, die je einen Fluoreszenzfarbstoff tragen (Donor und Akzeptor). Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe werden dabei so gewählt, dass sich das Emissionsspektrum des Donors und das Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen. Das Emissionsspektrum des Akzeptors muss sich hingegen von dem des Donors unterscheiden. Binden beide Oligonucleotide an den DNA-Strang, befinden sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe. So wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ermöglicht. Das vom Akzeptor emittierte Lichtsignal wird schließlich gemessen. Der Anstieg des Lichtsignals verhält sich proportional zur Menge an synthetisiertem Amplikon. Darüber hinaus kommen auch noch andere Konzepte wie Eclipse-Proben, Amplifluor-Primer, Scorpion-Primer, Lux-Primer oder BD QZyme-Primer zum Einsatz. Sie alle beruhen auf der Verwendung von einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen, die an Oligonucleotide gebunden sind [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Im Gegensatz zu SYBR Green erlauben spezifische Detektionssysteme wie TaqMan® Sonden die Durchführung einer Multiplex-Real-time

PCR, bei der zwei oder auch mehrere Reaktionen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden können [LEVIN, 2008]. SYBR Green hingegen ist eine kostengünstige Alternative, wenn keine Notwendigkeit für Multiplex-Ansätze besteht. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass SYBR Green im Vergleich zu TaqMan® Sonden präziser ist [TERZI et al., 2004].

Um quantitative Ergebnisse zu produzieren nutzt die Real-time PCR die Kinetik der PCR-Reaktion. Jede PCR-Reaktion kann in verschiedene Phasen geteilt werden, zunächst erfolgt eine exponentielle Wachstumsphase, die mit zunehmender Anhäufung von Produkt und somit Verknappung von Primern und Nucleotiden, Hitzeschädigung von Nucleotiden und Polymerase oder auch Anhäufung von Pyrophosphat in eine lineare Wachstumsphase und anschließend eine Plateauphase übergeht [MÜLHARDT, 2006]. Während der Wachstumsphase besteht eine quantitative Beziehung zwischen der Menge an DNA in der Probe vor dem Start der Reaktion und der Menge an PCR-Produkt in jedem beliebigen Zyklus [VAERMAN et al., 2004].



**Abbildung 3: Amplifikationskurve einer Real-time PCR [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]**

Die Exponentialphase kann noch in die Hintergrundphase und die eigentliche exponentielle Wachstumsphase unterteilt werden, wobei während ersterer das Signal der PCR noch schwächer ist als das Hintergrundsignal des Gerätes [VAERMAN et al., 2004]. Als Maß für die Quantifizierung der ursprünglich in der Probe enthaltenen

Startmenge werden die  $C_T$ -Werte herangezogen. Sie beschreiben jene Zyklenzahl in der ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird [PFAFFL, 2004], das sich deutlich vom Hintergrund abhebt [MÜLHARDT, 2006]. Amplifikationskurven werden erhalten, indem der Zuwachs an Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl in einem Diagramm aufgetragen wird [VAERMAN et al., 2004]. Der  $C_T$ -Wert ist in Abbildung 3 als Schnittpunkt zwischen Threshold line und der Amplifikationskurve zu sehen. Der  $C_T$ -Wert einer Probe wird hauptsächlich vom Anfangs-DNA-Gehalt beeinflusst. Hat die Probe einen hohen DNA-Gehalt, werden verhältnismäßig wenige Real-time PCR-Zyklen benötigt, bis das Fluoreszenzsignal so stark ist, dass es sich eindeutig vom Hintergrund abhebt. Bei Proben mit niedriger DNA-Konzentration dauert es vergleichsweise länger, bis der entsprechende Threshold erreicht ist. Diese Beziehung zwischen der Anfangs-DNA-Konzentration in einer Probe und dem  $C_T$ -Wert bildet die Basis für eine quantitative Analyse [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Da das Konzept der Real-time PCR darauf beruht, die Anhäufung des Produktes schon früh zu erkennen, nämlich dann, wenn die Amplifikation noch exponentiell abläuft und noch keinen inhibitorischen Einflüssen unterliegt, ist die Beziehung zwischen dem  $C_T$ -Wert und dem dekadischen Logarithmus der Konzentration der amplifizierten DNA-Sequenz linear [BURNS et al., 2004].

Sollen die  $C_T$ -Werte mehrerer Reaktionen miteinander verglichen werden, ist es wichtig den entsprechenden Grenzwert (Threshold) gleich zu setzen. Trägt man den dekadischen Logarithmus der Start-DNA-Konzentration gegen die korrespondierenden  $C_T$ -Werte in einem Diagramm auf, erhält man mittels linearer Regression eine Standardgerade anhand derer die  $C_T$ -Werte unbekannter Proben in DNA-Konzentrationen umgewandelt werden können [VAERMAN et al., 2004].

#### **2.3.4.2 Primerdesign und Auswahl des Amplikons**

Der Erfolg einer Real-time PCR Reaktion hängt maßgeblich von einer effizienten und spezifischen Amplifizierung des Produktes ab. Sowohl die gewählte Zielsequenz als auch die beiden Primer können hier entscheidenden Einfluss nehmen. Im Grunde genommen gelten für das Design von Primern für die Real-time PCR ähnliche Regeln wie bei der konventionellen PCR, etwa was den GC-Gehalt der Primer, das Vermeiden

von Sekundärstrukturen, das Aufeinanderfolgen gleicher Basen oder die Positionierung von G oder C an den Enden des Primers angeht [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Gen-Fragmente mit einer Länge von mehr als 200 bp anstrebt um diese im Agarosegel gut auftrennen zu können, sollen die Zielsequenzen für die Real-time PCR allerdings wesentlich kürzer gehalten werden um eine effizientere Amplifikation zu erzielen [LEVIN, 2008] und auch die Amplifikationszeiten entsprechend kurz zu halten, da längere Zielsequenzen auch längere Extensionszeiten erfordern [SULLIVAN et al., 2006]. Über die wünschenswerte Länge eines Amplikons gibt es unterschiedliche Angaben. So empfiehlt BIO-RAD in seiner Anleitung zur Real-time PCR eine Länge von 75 bis 200 bp, wobei die Amplikons nicht kürzer sein sollten um etwaige Primer-Dimere leicht vom spezifischen Produkt unterscheiden zu können [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Andere Quellen hingegen nennen extrem kurze DNA-Sequenzen von 60 bis 70 bp [LEVIN, 2008] oder generell Längen um 100 bp [LAUBE et al., 2007/a]. Uneinigkeit herrscht auch über die Verwendung von Zielsequenzen mitochondrialer oder nukleärer DNA zur quantitativen Real-time PCR. Die Vorteile mitochondrialer DNA wurden bereits bei der konventionellen PCR diskutiert. Da sie jedoch in einer Zelle vielfach vorkommen und die Zahl der Mitochondrien von Zelle zu Zelle verschieden sein kann, wird in manchen Publikationen von ihrem Einsatz abgeraten, wenn quantitative Ergebnisse erwünscht sind. Es wird darauf hingewiesen, dass die Grundlage für eine Quantifizierung „Single-copy“ Gene sein sollten [LAUBE et al., 2007/a, REALE et al., 2008]. Andere Studien hingegen beweisen den erfolgreichen Einsatz von mitochondrialen Zielsequenzen auch zur Quantifizierung [LOPEZ-CALLEJA et al., 2007/a; LOPEZ-CALLEJA et al. 2007/b; MARTIN et al., 2008; ZHANG et al., 2007]. Da der Einsatz von „Single-copy“ Genen die Empfindlichkeit der Reaktion beeinträchtigen kann, sollte auch die Verwendung von mitochondrialen Zielsequenzen für den speziesspezifischen Primer in Kombination mit nukleären Zielsequenzen für den Universalprimer in Betracht gezogen werden [LOPEZ-ANDREO, 2005].

#### **2.3.4.3 Parameter zur Evaluierung einer optimalen Real-time PCR**

Wichtige Parameter, die eine gute Real-time PCR kennzeichnen sind die Linearität der Standardgerade, deren Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) größer als 0,98 sein sollte, eine hohe

Effizienz der Amplifikation, wünschenswert sind hier Werte zwischen 90 und 105%, sowie die Konsistenz der Ergebnisse mehrerer Replikate.

Um diese Faktoren für eine bestimmte Real-time PCR zu überprüfen kann aus einer Probe mit bekannter oder unbekannter DNA-Konzentration eine Verdünnungsreihe in Zehnerstufen hergestellt werden, die dann in mehreren Replikaten analysiert wird. Im Idealfall ergeben sich aus dieser Verdünnungsreihe  $C_T$ -Werte, die sich für die aufeinander folgenden Verdünnungsstufen um je 3,32 Zyklen unterscheiden. Aus solchen Amplifikationskurven ergibt sich dann eine lineare Standardgerade. Das Bestimmtheitsmaß ist kennzeichnend dafür, wie gut die experimentell erhaltenen Daten an die lineare Regression angepasst sind. Signifikante Unterschiede zwischen den  $C_T$ -Werten von Replikaten einer Probe wirken sich negativ auf das Bestimmtheitsmaß aus [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

Die Effizienz einer PCR-Reaktion kann aus der Steigung der Standardgeraden abgeleitet werden [VAERMAN et al., 2004] und lässt sich nach folgender Gleichung berechnen  $E=10^{-1/S}$  wobei E der Effizienz und S der Steigung der Standardgeraden entspricht [PFAFFL, 2004]. Idealerweise wird die Menge an DNA in jedem Zyklus der exponentiellen Wachstumsphase verdoppelt. Aus oben angeführter Gleichung ergibt sich somit, dass die ideale Steigung der Standardgeraden -3,32 beträgt. Die Effizienz wird auch gerne in Prozent angegeben und wird dann mit folgender Gleichung bestimmt  $\% \text{Effizienz} = (E-1) \times 100\%$ . Eine Effizienz um 100% ist ein guter Indikator für ein robustes und reproduzierbares Versuchsdesign. Falsches Primerdesign oder ungünstige Reaktionsbedingungen können zu niedrigen Effizienzen führen [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Effizienzen von über 100% sind theoretisch zwar nicht plausibel [PFAFFL, 2004], können sich aber aus der Berechnung ergeben, wenn auch unspezifische Produkte wie Primer-Dimere amplifiziert werden, oder PCR-Inhibitoren im Reaktionsansatz anwesend sind [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

Es existieren noch eine Reihe weiterer Methoden um die Effizienz der PCR-Reaktion zu berechnen. Im Gegensatz zu dem relativ einfachen oben beschriebenen Verfahren, welches die eigentliche Effizienz oft überschätzt, tendieren sie dazu, die PCR-Effizienz zu unterschätzen. Zu diesen Verfahren zählen die Berechnung der Effizienz aus dem absoluten Fluoreszenzanstieg, die Berechnung innerhalb einer einzelnen Probe mit Hilfe

mathematischer Algorithmen oder die Berechnung anhand eines exponentiellen Modells, welche die geringste Varianz und höchste Genauigkeit liefert [PFAFFL, 2004]. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Verfahren sind diese Modelle wesentlich aufwendiger.

#### **2.3.4.4 Schmelzkurvenanalyse**

Verwendet man zur Detektierung des Amplikons während der PCR interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green oder Hybridization Probes, kann zur Differenzierung der PCR-Produkte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden [EDWARDS und LOGAN, 2009]. Sie dient zur Feststellung der Schmelztemperatur ( $T_M$ ), die für jedes Amplikon spezifisch ist. Dazu wird nach vollendeter Real-time PCR die Temperatur langsam erhöht und dabei das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Das Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen resultiert in einer raschen Abnahme der Fluoreszenzintensität, da sich SYBR Green wieder von der DNA löst. Als Schmelzpunkt wird jene Temperatur bezeichnet, bei der die Hälfte der DNA als Doppelstrang vorliegt [FAJARDO et al., 2008]. Die negative erste Ableitung der Fluoreszenzänderung, aufgetragen als Funktion der Temperatur, ergibt einen charakteristischen Peak beim Schmelzpunkt des Amplikons [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Da das Schmelzverhalten eines DNA-Fragmentes direkte Folge des prozentualen Anteils an CG Nucleotidpaaren ist [KNIPPERS, 2006] und auch von der Länge des Amplikons abhängt [MARTIN et al., 2008], kann die Schmelzkurvenanalyse eingesetzt werden um ein spezifisches Produkt von ebenfalls entstandenen unspezifischen Produkten wie Primer-Dimeren zu unterscheiden [EDWARDS und LOGAN, 2009].

#### **2.3.4.5 Quantifizierung**

Es stehen mehrere Konzepte zur Quantifizierung von Real-time PCR-Daten zur Verfügung. Im Wesentlichen lassen sie sich in absolute und relative Quantifizierung unterteilen. Die meisten dieser Verfahren wurden zur Quantifizierung von Expressionszuständen von Genen entwickelt. Bei allen verwendeten Methoden ist es wichtig die Real-time PCR-Ergebnisse zu normalisieren. Bei der relativen

Quantifizierung dienen Normalisatoren in erster Linie dazu, zu gewährleisten, dass die Ergebnisse von gleichen Mengen an Proben verglichen werden [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

In der Literatur finden sich verschiedene Verfahren, die auch für die quantitative Speziesdifferenzierung in Lebensmitteln angewendet werden. Dazu gehört zum Beispiel die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, die etwa bei der quantitativen Bestimmung von Rindergewebe in Lebens- und Futtermitteln [MARTIN et al., 2008], und zum quantitativen Nachweis von Roggen mittels Real-time PCR verwendet worden ist [TERZI et al., 2004]. Dazu benötigt man einerseits eine Probe und andererseits einen Kalibrator. Die  $C_T$ -Werte der Probe und des Kalibrators für die Zielsequenz werden dabei zunächst unter Verwendung eines Referenzgens normalisiert. Man erhält dabei  $\Delta C_T$ -Werte sowohl für Probe als auch Kalibrator.  $\Delta\Delta C_T$  errechnet sich schließlich aus der Differenz zwischen  $\Delta C_T$  der Probe und  $\Delta C_T$  des Kalibrators. Aus  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  ergibt sich schlussendlich das normalisierte Expressionsverhältnis [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

Andere Studien verwenden ebenfalls ein System aus einer spezifischen Zielsequenz und einer endogenen Referenz. So beschreiben Fajardo et al. [2008] eine Methode um verschiedene Wildarten in Fleischproben quantitativ nachweisen zu können. Dazu wurde eine Standardreihe aus verschiedenen Mischungsanteilen hergestellt. Zur Berechnung des jeweiligen Anteils einer spezifischen Wildart wurde folgende Formel verwendet  $C_{TCE} = C_{TEU} * C_{TCEs}/C_{TEUs}$

$C_{TCE}$  ist dabei der  $C_T$ -Wert, der der Konzentration an speziesspezifischer DNA in einer unbekannt Probe entspricht.  $C_{TEU}$  ist der Mittelwert der Standardreihen für das endogene PCR-System (entsprechend z.B. einem Universalprimer für Säugetiere oder einem Eukaryontenprimer),  $C_{TCEs}$  ist der  $C_T$ -Wert der unbekannt Probe für das speziesspezifische PCR-System (entsprechend dem Amplikon eines speziesspezifischen Primers) und  $C_{TEUs}$  ist der  $C_T$ -Wert der unbekannt Probe für das endogene PCR-System.

Ein analoges Konzept, basierend auf einem für Rinder spezifischen Primer und einem Säugetierprimer, wurde von Lopez-Calleja [2007/a] auch zum quantitativen Nachweis von Kuhmilch in Schafmilchmischungen beschrieben. All diesen Methoden ist gemein,

dass der Verwendung eines endogenen Kontrollsystems besondere Bedeutung zugeschrieben wird. Es soll in erster Linie Faktoren berücksichtigen, die die Amplifikation von DNA beeinflussen. Ohne ein solches Kontrollsystem wäre es schwierig festzustellen, ob Unterschiede, die mittels speziesspezifischem Primer detektiert werden, nicht auf Degradierung der DNA, Inhibierung der PCR oder die Menge und Qualität der DNA der Probe zurückzuführen sind. Der Vergleich der  $C_T$ -Werte von speziesspezifischem Primer und Universalprimer erlaubt es, die Ungenauigkeit zu reduzieren [LOPEZ-CALLEJA et al., 2007/a]. Außerdem gewährleistet die Normalisierung der Amplifikation von unbekanntem Proben und Standards auch eine entsprechende Reproduzierbarkeit der Methode an unterschiedlichen Tagen. Bei der Auswahl des Primerpaares für die endogene PCR-Reaktion ist zu beachten, dass die Amplifikation der Zielsequenz bei allen untersuchten Organismen mit annähernd gleicher Effizienz ablaufen sollte. Außerdem sollten speziesspezifischer und Universalprimer ebenfalls ähnliche Amplifikationseffizienzen liefern [FAJARDO et al., 2008].

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Quantifizierung analog zur Quantifizierung gentechnisch-veränderter Lebens- oder Futtermittel durchgeführt. Deswegen soll auch dieses Konzept kurz diskutiert werden.

Dafür werden üblicherweise zwei Primersysteme verwendet. Eines davon zielt auf die vorhandenen Sequenzen von genetisch-verändertem Produkt ab, das zweite soll die Gesamtmenge an vorliegender Proben-DNA repräsentieren, unabhängig davon, ob sie aus gentechnisch-verändertem Material stammt oder nicht. Um die Ergebnisse zu normalisieren wird der  $C_T$ -Wert für die endogene Kontrolle (Universalprimer) vom  $C_T$ -Wert, der für gentechnisch-modifiziertes Probenmaterial erhalten wird (spezifischer Primer) subtrahiert und es ergibt sich daraus ein  $\Delta C_T$ -Wert. Diese Analyse kann entweder in zwei getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt werden, oder als Multiplex-Real-time PCR, indem beide Zielsequenzen im gleichen Reaktionsansatz nachgewiesen werden. Aus den erhaltenen  $\Delta C_T$ -Werten und dem dekadischen Logarithmus der Konzentration der Zielsequenz wird eine lineare Kalibrationskurve erstellt. Diese Kalibrationskurve, die mit Hilfe von Standards mit bekannter Konzentration an gentechnisch-veränderter Probe erstellt wird, kann verwendet werden

um den Anteil an gentechnisch-modifiziertem Material in unbekanntem Proben zu ermitteln [BURNS et al., 2004].

#### **2.3.4.6 Anwendung der Real-time PCR im Lebensmittelbereich**

Für den Einsatz der Real-time PCR in der Lebensmittelanalytik gibt es eine Reihe an Möglichkeiten. Dazu gehört zum Beispiel der Nachweis von pathogenen Mikroorganismen oder von Bakterien, die zum Verderb von Lebensmitteln führen können. Für wirtschaftlich besonders bedeutsame Lebensmittelverderber wurden auch Kits entwickelt, die kommerziell erhältlich sind, wie etwa für Salmonellen, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria spp.* und *Listeria monocytogenes*. Weitere Anwendungsgebiete sind der Einsatz für den Nachweis bzw. die Quantifizierung gentechnisch modifizierter Organismen oder die Detektierung von Allergenen in Lebensmitteln [WISEMAN, 2009].

Real-time PCR ist auch zur Detektierung von Kuhmilch in Milchen anderer Tierarten oder Milchprodukten geeignet. Lopez-Calleja [2007/a] beschreiben eine Real-time PCR-Methode zum quantitativen Nachweis von Kuhmilch in Schafmilch. Dazu verwendeten sie ein rinderspezifisches Primerpaar, das ein mitochondriales 12S rRNA Gen-Fragment mit einer Länge von 252 bp amplifizierte und ein säugetierspezifisches Primerpaar, dessen Zielsequenz ein 428 bp langes Fragment des gleichen Gens war. Die entwickelte Methode erlaubte den quantitativen Nachweis von Kuhmilch in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10%. Dabei wurde aber auch festgehalten, dass die Proben, die aus hitzebehandelter (pasteurisierter oder UHT) Milch gewonnen worden waren, um 0,5 bis 1,8 Einheiten höhere  $C_T$ -Werte zeigten als die entsprechenden Proben aus Rohmilch. Dieser Effekt konnte sowohl für das rinderspezifische System als auch für das endogene Kontrollsystem nachgewiesen werden. Letzteres zeigte signifikant größere Differenzen zwischen hitzebehandelter Milch und Rohmilch als das rinderspezifische System. Auch die Effizienz des endogenen Kontrollsystems war aufgrund des längeren Amplikons wesentlich niedriger, wenn hitzebehandelte Milch analysiert wurde. Die Autoren hielten fest, dass die Methode nur dann eine verlässliche Quantifizierung erlaubt, wenn die technologische Behandlung der Proben bekannt ist. Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass die Be- und Verarbeitung von

Lebensmitteln einen entscheidenden Einfluss auf das Amplifikationsverhalten bei der Real-time PCR nimmt.

Auch in einer Studie zur Detektion von Rindergewebe in Lebens- und Futtermitteln wird festgehalten, dass für eine Quantifizierung von Rinderanteilen zwischen 0,1 und 10% die Wahl der richtigen Standards von entscheidender Bedeutung ist. Standards sollten aus dem gleichen Gewebe wie die zu untersuchenden Proben hergestellt worden sein und auch denselben Verarbeitungsschritten unterworfen werden [MARTIN et al., 2008]. Zum gleichen Schluss kommen auch Fajardo et al. [2008]. Sie halten fest, dass für die verlässliche Quantifizierung von Wild in hitzebehandelten oder konservierten Fleischmischungen nicht nur kurze Zielsequenzen verwendet werden müssen, sondern verweisen auch auf die Bedeutung des entsprechenden Referenzmaterials. Für Proben von verschiedenen Spezies aus unterschiedlichen Gewebsmatrizes und verschiedener Bearbeitungsstufen sollen auch unterschiedliche Kalibrationskurven zum Einsatz kommen.

Eine Publikation über den Nachweis verschiedener Spezies in Lebensmitteln mittels Real-time PCR [LAUBE et al., 2007/b] setzt sich mit einigen Faktoren, die maßgeblichen Einfluss auf die Analyse nehmen können, auseinander. Dabei wurde zunächst der Einfluss von Hitze auf die Empfindlichkeit der Real-time PCR betrachtet. Verschiedene Fleischmischungen aus Würsten, Konservendosen, Konservendosen, die für tropische Länder bestimmt sind und Ultra-hoch erhitzten Konservendosen wurden untersucht. Dabei wurde wie erwartet festgestellt, dass mit zunehmender Hitzebehandlung die Qualität der isolierten DNA abnimmt. Die Nachweisgrenze für quantitative Ergebnisse lag bei normalen Konservendosen noch bei 0,1%, für Konservendosen, die für die Tropen bestimmt sind, war sie 1% und bei Ultra-hocherhitzten Konservendosen waren überhaupt nur noch qualitative Aussagen möglich. Außerdem wurde festgestellt, dass die Ausbeute der DNA-Isolierung von der Genomgröße der jeweiligen Spezies abhängt. Eine weitere Erkenntnis stellte die Beobachtung dar, dass unterschiedliche Gewebetypen entscheidenden Einfluss auf die Quantifizierung nehmen. So konnte gezeigt werden, dass die Verwendung bestimmter Innereien einer Spezies zur Überschätzung des Fleischanteils dieser Tierart führt.

Wie jede andere Methode hat auch die Real-time PCR ihre Nachteile und Limits. Viele dieser Nachteile gelten generell für alle DNA-basierten Methoden. Abhängig vom Grad der Verarbeitung enthalten Lebensmittel oft sehr kleine Mengen oder gar keine Nukleinsäuren. Darüber hinaus können die verschiedenen Zutaten PCR-Inhibitoren enthalten, die gemeinsam mit der DNA isoliert werden und zu falsch-negativen Ergebnissen führen [LAUBE et al., 2003]. Die Ausbeute an amplifizierbarer DNA hängt also nicht nur von der Extraktions-Methode und dem Ausmaß der Fragmentierung ab, sondern auch von der Art des Probenmaterials [LOPEZ-ANDREO, 2005]. Die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle hängt zum Beispiel von der Art des Gewebes ab [FAJARDO et al., 2008]. Wird als Amplikon die Sequenz eines mitochondrialen Gens verwendet, so kann es dadurch zu Differenzen kommen. Auch die Zahl der Zellen in einer Probe kann abhängig vom Gewebe variieren [MARTIN et al., 2008]. Einen weiteren Nachteil stellen die spezifischen Fluoreszenzproben dar, die in ihrer Herstellung sehr kostenintensiv sind. Als Alternative dazu steht SYBR Green zur Verfügung, das allerdings keine Multiplex-Versuche erlaubt [FAJARDO et al., 2008].

Zu den bedeutendsten Vorteilen der Real-time PCR zählt zweifelsohne die Möglichkeit quantitative Messungen durchführen zu können. Außerdem ermöglicht sie die direkte Unterscheidung von DNA nach ihrer Herkunft ohne zusätzliche zeitaufwendige Verfahren wie Sequenzierung, Enzymverdau oder Gelelektrophorese einsetzen zu müssen [LAUBE et al., 2003]. Die Quantifizierung mittels Real-time PCR ist verlässlicher als alle Endpunkt-Methoden, die die Menge an letztlich akkumuliertem PCR-Produkt messen, da die  $C_T$ -Werte in einer Phase der Reaktion erfasst werden, in der alle Reaktionskomponenten noch im Überschuss vorliegen [MARTIN et al., 2008]. Da die Reaktionsgefäße während der gesamten Amplifikation geschlossen bleiben und keine weiteren Detektionsverfahren im Anschluss nötig sind, werden Kontaminationen und damit falsch-positive Resultate vermieden. Wie schon erwähnt, ist die Real-time PCR ein schnelles Verfahren und erlaubt daher einen hohen Durchsatz an Proben in der Routineanalytik [FAJARDO et al., 2008].

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Probenmaterial

Für den Nachweis eines Kuhmilchanteils in Schafmilchprodukten wurden Modellkäse aus zwei verschiedenen Mischungsreihen als Standards verwendet. Um auch Standards mit sehr niedrigem Kuhmilchanteil in die Analysen mit einbeziehen zu können, wurden die Proben M22 und M23 in die Wolfpassing-Standardreihe integriert.

**Tabelle 2: Modellkäse Wolfpassing (Camembert, überreif)**

<b>Probennummer</b>	<b>Kuhmilchanteil (in %)</b>	<b>Schafmilchanteil (in %)</b>
9	0	100
10	0,5	99,5
11	1	99
12	2,5	97,5
13	5	95
14	10	90
15	25	75
16	50	50
17	75	25
18	100	0

**Tabelle 3: Modellkäse Sikic' Maja**

<b>Probennummer</b>	<b>Kuhmilchanteil (in%)</b>	<b>Schafmilchanteil (in %)</b>
M22	0,1	99,9
M23	0,3	99,7

Für den Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten wurde eine Mischungsreihe aus Kuh- und Sojamilch als Standard verwendet, die bereits 2007 im Rahmen einer Diplomarbeit hergestellt worden war [KAVKA, 2008].

**Tabelle 4: Mischungsreihe aus Kuh- und Sojamilch**

<b>Probennummer</b>	<b>Kuhmilchanteil (in %)</b>	<b>Sojamilchanteil (in %)</b>
0 K	0	100
0,1 K	0,1	99,9
0,3 K	0,3	99,7
0,5 K	0,5	99,5
1 K	1	99
2,5 K	2,5	97,5
5 K	5	95
7,5 K	7,5	92,5
10 K	10	90
15 K	15	85
20 K	20	80
40 K	40	60
60 K	60	40
80 K	80	20
100 K	100	0

Zur Analyse wurden außerdem verschiedene im Handel erhältlich Sojamilchprodukte mit unbekanntem Kuhmilchanteil herangezogen.

**Tabelle 5: Handelsproben Sojamilchprodukte**

<b>Probennummer</b>	<b>Beschreibung</b>
1a	Sojadessert Vanille
1b	Sojadessert Vanille
2a	Sojadessert Schokolade
2b	Sojadessert Schokolade
3a	Sojadessert Schokolade
3b	Sojadessert Schokolade
4a	Sojadessert Vanille
4b	Sojadessert Vanille
5a	Sojajoghurt Erdbeere
5b	Sojajoghurt Erdbeere
6a	Sojagetränk
6b	Sojagetränk

## 3.2 DNA-Isolierung

### 3.2.1 Prinzip

Die Gewinnung amplifizierbarer DNA ist Voraussetzung für die Durchführung einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Die Qualität der isolierten DNA hat dabei entscheidenden Einfluss auf die anschließende Amplifikation und hängt von verschiedenen Faktoren wie der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren in der Lebensmittelmatrix sowie der durchschnittlichen Länge der DNA und dem Ausmaß an Schädigungen, das wiederum vor allem von der Art der Verarbeitung des Nahrungsmittels bestimmt wird, ab [DI BERNARDO et.al., 2007].

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die DNA aus Käse- bzw. Sojamilchprodukten mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits von Qiagen gewonnen. Dabei werden die Proben zunächst durch Zugabe von Proteinase K und einem Lysis-Puffer lysiert. Bevor das Lysat auf die Säule aufgegeben wird, werden die Pufferbedingungen so eingestellt, dass eine optimale Bindung der DNA an die Silica-Membran gewährleistet wird. Die DNA wird selektiv an die DNeasy-Membran gebunden während Verunreinigungen durch die Membran hindurch treten. Durch zwei nachfolgende Waschschrte werden verbleibende Kontaminanten und Enzyminhibitoren wie Proteine und zweiwertige Kationen entfernt. Anschließend wird die DNA mit Hilfe eines Puffers aus der Membran eluiert [QIAGEN, 2006].

### 3.2.2 Geräte

Tabelle 6: Geräte und Hilfsmittel für die DNA-Isolierung

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Reaktionsgefäße	1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Kolbenhubpipetten	Diverse Kolbenhubpipetten (20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, VWR
Waage	Feinwaage Mettler AE 163	Mettler Toledo
Pipettenspitzen	Biozym safe seal tips professional	Biozym
DNeasy Säule	DNeasy Mini Spin Column	Qiagen
Sammelröhrchen	DNeasy Collection Tubes	Qiagen

Vortex		VWR
Thermoschüttler	Mixing Block MB-102	Biozym Scientific
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
Skalpell		
Spatel		

### 3.2.3 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 7: Reagenzien und Lösungen für die DNA-Isolierung

Reagens/Lösung	Beschreibung	Hersteller
Ethanol	96- 100 %	Merck
Proteinase K		Qiagen
ATL-Puffer	Lysispuffer	Qiagen
AL-Puffer		Qiagen
AW1-Puffer	Waschpuffer	Qiagen
AW2-Puffer	Waschpuffer	Qiagen
AE-Puffer	Eluierungspuffer	Qiagen

### 3.2.4 Durchführung

#### 3.2.4.1 DNA-Isolierung aus tiefgekühltem Käse

Aus der Mitte des Käses werden mit einem sterilen Skalpell 150 mg Käseprobe entnommen und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K wird gut gevortext und anschließend vier Stunden bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert. Eine vollständige Lyse des Gewebes wird durch zwischenzeitliches kräftiges Vortexen erreicht. Nach dem Ende der Inkubationszeit wird noch einmal für 15 Sekunden gevortext. Dann werden 200 µl AL-Puffer hinzu gegeben und die Probe wird zehn Minuten bei 70°C im Thermoschüttler inkubiert. Die Probe wird mit 200 µl Ethanol versetzt und wiederum kräftig gevortext um eine homogene Lösung zu erhalten. Danach wird die Lösung rasch und vollständig auf die DNeasy-Säule, die auf ein 2 ml Sammelröhrchen aufgesetzt worden ist, pipettiert. Anschließend wird eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der Inhalt des Sammelröhrchens, das „flow-through“, wird verworfen und die DNeasy-Säule auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. 500 µl AW1- Puffer werden auf die Säule pipettiert und

neuerlich eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das „flow-through“ wird wieder verworfen und die DNeasy-Säule auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Dann werden 500 µl AW2-Puffer zugegeben und die Proben werden drei Minuten bei voller Leistung (13.200 rpm) zentrifugiert um die DNeasy-Membran zu trocknen. Das „flow-through“ wird abermals verworfen und die Säule wird auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Nun werden zum Eluieren der DNA 100 µl AE-Puffer direkt auf die DNeasy-Säule pipettiert, ohne diese jedoch mit der Pipettenspitze zu berühren. Anschließend wird eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Weitere 100 µl AE-Puffer werden auf die DNeasy- Säule aufgebracht und nach einer Inkubationszeit von einer Minute wird ein letztes Mal eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die gewonnene DNA wird kurz gevortext und schließlich aliquotiert um bei -20°C gelagert zu werden.

#### **3.2.4.2 DNA-Isolierung aus Sojamilchprodukten**

Die DNA-Isolierung aus den Sojamilchprodukten erfolgt analog zur DNA-Isolierung aus Käse. Aufgrund der unterschiedlichen Konsistenz der Sojamilchprodukte sind allerdings einige Modifikationen dieses Protokolls nötig. So werden zu Beginn mit einem Spatel anstatt 150 mg nur 75 mg Probe entnommen. Die weitere Behandlung entspricht bis zur Aufgabe der Lösung auf die DNeasy-Säule dem oben angeführten Protokoll für die DNA-Isolierung aus Käse. Nach dem Überführen der Lösung auf die DNeasy-Membran wird zehn Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert um zu gewährleisten, dass die überstehende Flüssigkeit vollständig durch die Membran tritt bevor mit den Waschschrinen (Aufgabe von AW1- und AW2-Puffer) begonnen wird. Abhängig von Konsistenz und Zusammensetzung der Probe kann es auch bei den weiteren Zentrifugationsschritten nötig sein die Zahl der Umdrehungen auf 10.000 rpm und die Zeit auf bis zu zehn Minuten zu erhöhen.

### **3.3 PCR**

#### **3.3.1 Prinzip**

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von Nucleinsäuren. Ein bestimmter Nucleinsäureabschnitt wird vervielfältigt um anschließend anderen analytischen

Methoden wie z.B. einer Gelelektrophorese zur Verfügung zu stehen [LOTTTSPEICH und ENGELS, 2006].

### 3.3.2 Geräte

Tabelle 8: Geräte und Hilfsmittel für die PCR

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Thermocycler	Hybaid PCR Sprint	genXpress
	Trio-Thermoblock	Biometra
Zentrifuge	Minizentrifuge C 1200	National Labnet Co.
	Combispin FVL 2400 N	Biosan
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica
	Vortex	VWR International
	MS 1 Minishaker	IKA Labortechnik
Kolbenhubpipetten	Diverse Kolbenhubpipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 $\mu$ l)	Gilson, VWR, Socorex
Pipettenspitzen	Biozym safe seal tips professional	Biozym
Kühlblöcke	Diverse Kühlblöcke	
Reaktionsgefäße	PCR-Reaktionsgefäße	Sigma
Sterilwerkbank	Esco® PCR Cabinet	Esco Technologies
	Captair® bio	Erlab

### 3.3.3 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 9: Reagenzien und Lösungen für die PCR

Reagens/Lösung	Beschreibung	Hersteller
DNA-Polymerase	Dynazyme DNA-Polymerase	Finnzymes
	Go Taq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Promega
Puffer	10 x Puffer für Dynazyme	Finnzymes
	Go Taq Green 5 x Puffer	Promega
dNTPs	Ultrapure dNTP-Set	Roth

Primer	Eurofins MWG GmbH
Mineralöl	Sigma
UHQ-Wasser	
DNA	In AE-Puffer gelöst

Aus den oben genannten Reagenzien werden folgende Gebrauchslösungen hergestellt:

dNTP-Mix:

Aus dem dNTP-Set1 (100mM je \*TP, pH 8,4- 8,6) wird ein dNTP-Mix aus 100 µl dATP-Lösung, 100 µl dCTP-Lösung, 100 µl dGTP-Lösung und 100 µl dTTP-Lösung sowie 600 µl sterilem UHQ-Wasser hergestellt.

Primerlösung:

Die Primer werden laut Herstellerangaben in UHQ-Wasser gelöst, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl entsteht. Diese Lösung wird in einem zweiten Verdünnungsschritt auf die in als Arbeitslösung verwendete Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt.

Die Konzentration der einzelnen Komponenten im Mastermix ist in Tabelle 10 ersichtlich und auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl zu beziehen.

**Tabelle 10: Mastermix für die PCR**

Komponente	Konzentration	Bezeichnung
DNA-Polymerase	0,5 U	Taq-DNA-Polymerase
dNTPs	200 µM je dNTP	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Puffer	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	KCl
	10 mM	Tris-HCl

Die Konzentration der Primer soll zwischen 0,2 und 1,0 µM liegen und die eingesetzte DNA-Menge kleiner als 1 µg sein.

Der Mastermix wird in folgenden Volumina hergestellt:

Mastermix Dynazyme:

7700 µl UHQ-Wasser steril  
 1000 µl 10 x Puffer für Dynazyme  
 200 µl dNTP-Mix  
 100 µl Dynazyme-Polymerase

Mastermix Go Taq:

7546 µl UHQ-Wasser steril  
 2200 µl Go Taq Green 5 x Puffer  
 220 µl dNTP-Mix  
 44 µl Go Taq-Polymerase

### 3.3.4 Primer

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden folgende Primer verwendet:

**Tabelle 11: Primerpaare**

Primer	Sequenz 5'→3'	Amplikon	Zielregion	Literatur
<i>Universalprimer für Rind und Schaf</i>				
L-14735	AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A	464 bp	Mitochondriales Cytochrom b- Gen	Wolf et al. (2000)
H-15149	GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA			
L-14841	CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA	359 bp	Mitochondriales Cytochrom b- Gen	Branciani et al. (2000)
H-15149	GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA			
18SpEUDIR	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GG	140 bp	Nukleäres 18S rRNA-Gen	Martin et al. (2008)
18SpEUINV	TAA TTT GCG CGC CTG CTG			
TR 03	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A	137 bp	Nukleäres 18S rRNA-Gen	Meyer et al. (1995)
TR 04	AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T			

*Primer spezifisch für Rind*

Cow Bottero 1	GTA CTA CTA GCA ACA GCT TA	256 bp	mitochondriales 12 S rRNA-Gen	Bottero et al. (2003)
Cow Bottero 2	GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G			
CytOx IIa	ATG GCA TAT CCC ATA CAA CTA G	651 bp	mitochondriales Cytochrom- oxidase II-Gen	Verkaar et al. (2002)
CytOxI Ib	ACT TTA GTG GGA CTA ACT CAA G			

*Universalprimer für Rind und Soja*

18SpEUDIR	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GG	140 bp	Nukleäres 18S rRNA-Gen	Martin et al. (2008)
18SpEUINV	TAA TTT GCG CGC CTG CTG			
TR 03	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A	137 bp	Nukleäres 18S rRNA-Gen	Meyer et al. (1995)
TR 04	AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T			

*Primer spezifisch für Soja*

Gly 30 K-6F	GCC ACG GGA GCC ATA GAA GC	208 bp	Torp et al. (2006)
Gly 30 K-6R	TGG CTT TGC ATC TAC CCT CTT		

**3.3.5 Durchführung**

Während des gesamten Arbeitsvorganges sind alle Reaktionsgefäße bis zum Einstellen in den Thermocycler in Kühlblöcken aufzubewahren. Außerdem wird in einer Sterilwerkbank gearbeitet um Kontaminationen über die Raumluft zu vermeiden.

Aus Mastermix und Primern wird zunächst ein Prämix entsprechend der Probenanzahl hergestellt. Für jeden PCR-Ansatz werden 22,5 µl Mastermix, 1 µl des forward-Primers und 1 µl des reverse-Primers eingesetzt. Der Prämix wird gut gevortext und 24,5 µl werden in je ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Bevor 0,5 µl DNA-Lösung für jeden PCR-Ansatz entnommen werden, werden die Reaktionsgefäße mit dem DNA-Aliquot kurz gevortext. Die DNA-Lösung wird dann direkt in den Prämix pipettiert und die Pipettenspitze durch mehrmaliges Aufziehen und Entleeren gespült. Nach dem

Pipettieren aller Ansätze werden die Reaktionsgefäße wenige Sekunden gemischt und anschließend etwa fünf bis zehn Sekunden zentrifugiert. Schließlich wird mit je zwei Tropfen Mineralöl überschichtet um etwaige Verdunstungsverluste während der PCR zu vermeiden. Das gewünschte Temperatur-Zeit-Programm wird programmiert bzw. ausgewählt, die Proben werden eingestellt und der Thermocycler gestartet.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgendem Temperatur-Zeit-Programm gearbeitet, wobei jeweils nur die Temperatur der Annealing-Phase an den verwendeten Primer angepasst wurde.

### 3.3.6 Thermoprotokoll

Tabelle 12: Temperatur-Zeit-Programm für die PCR

Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
45	95°C	1 min
	X°C	1 min
	72°C	1 min
	(+ 2 sec time increment)	
1	72°C	8 min
1	4°C	unendlich

X ... optimale Annealingtemperatur des jeweiligen Primerpaares

## 3.4 Agarosegelelektrophorese

### 3.4.1 Prinzip

Während der Gelelektrophorese wandern geladene Teilchen in einem elektrischen Feld. Die elektrophoretische Beweglichkeit, auch Mobilität genannt, wird dabei von Größe und Ladung des jeweiligen Teilchens bestimmt. Ein Gemisch aus verschiedenen Substanzen kann so in einzelne Zonen aufgetrennt werden. Da Nucleinsäuren eine gleichbleibende Ladungsdichte aufweisen, werden die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten nur durch Unterschiede in der Molekülgröße bestimmt. Die DNA-Moleküle werden also nach ihrer Größe aufgetrennt [LOTTTSPEICH und ENGELS, 2006].

### 3.4.2 Geräte

Tabelle 13: Geräte und Hilfsmittel für die Agarosegelelektrophorese

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Schraubflaschen	Schraubflaschen 2 l, 1 l, 250 ml	Simax, Pyrex, Schott
Waage	Sartorius PT 130	Sartorius AG
Mikrowelle	Typ R-207	Sharp
Wasserbad	Typ W 16	LHG-Laborgeräte
Gelgießapparatur		Hoefler
Kämme		Hoefler
Klebeband	Scotch tape	Scotch
Gelelektrophoresekammer	Hoefler Super Sub	Hoefler Pharmacia Biotech
Stromversorgung	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Kühlung	Multi Temp III	Pharmacia Biotech
Zentrifuge	Minizentrifuge C 1200	National Labnet Co.
Vortex		VWR International
Pipettenspitzen		Biozym
Kolbenhubpipette	Kolbenhubpipette 10 µl	VWR International
Reaktionsgefäße		Sigma
Magnetrührer		IKA-Labortechnik
Färbewanne		Nalgene
Membranpumpe		Millipore
Erlenmeyerkolben		Schott
Messkolben	Diverse Messkolben	Schott
Messzylinder	Diverse Messzylinder	Schott
Spatel		
UV-Transilluminator	BRL UV-Transilluminator	Gibco Life Technologies
Kamera und Schirm	Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 120	Kodak
Geldokumentations-Software	Kodak 1D 3.5	Kodak

Geldokumentationssystem	Biosens SC Series-810	genXpress
Geldokumentations-Software	Biosens	genXpress
Autoklav		Fedegari

### 3.4.3 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 14: Reagenzien und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Reagens/Lösung	Beschreibung	Hersteller
Agarose	Biozym LE Agarose	Biozym
Borsäure	Borsäure $\geq 99,8 \%$	Roth
Trishydroxymethylaminomethan	TRIS Pufferan $\geq 99,3 \%$ Buffer Grade	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA-Dinatriumsalzdi- hydrat	AppliChem
DNA-Marker	100 bp DNA-ladder	Gibco BRL
Ethidiumbromid	Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml)	Roth
Destilliertes Wasser		
UHQ-Wasser		
Bromphenolblau		Merck
Xylencyanole FF		Sigma
Ficoll	Ficoll Typ 400	Sigma
Natronlauge	NaOH, granuliert	Roth
Salzsäure	HCl, 32%	Roth
PCR- Produkte		
Ethanol	96 %	Merck

Aus den oben gelisteten Reagenzien werden folgende Lösungen hergestellt:

EDTA (0,5 M, pH 7,6):

18,61 g EDTA und 2 g NaOH werden eingewogen und in 80 ml UHQ-Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit konzentrierter NaOH auf 7,6 eingestellt, die Lösung wird im Messkolben auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

EDTA (0,5 M, pH 8):

18,61 g EDTA und 2 g NaOH werden eingewogen und in 80 ml UHQ- Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit konzentrierter NaOH auf 8 eingestellt, die Lösung wird im Messkolben auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Gelladepuffer (6 x):

25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol FF und 1,5 g Ficoll werden eingewogen und in 8,45 g UHQ- Wasser (steril) gelöst und durch Schütteln gelöst.

Marker:

25 µl des 100 bp DNA-Markers, 50 µl Gelladepuffer und 225 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6) werden gemischt.

TBE-Puffer (5 x):

54 g Trishydroxymethylaminomethan und 27,5 g Borsäure werden eingewogen. 20 ml EDTA (0,5 M, pH 8) werden zugesetzt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

TBE-Puffer (0,5 x):

100 ml TBE-Puffer (5 x) werden in einer sterilen Messur mit autoklaviertem, destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und in eine sterile Schraubflasche umgefüllt.

TE- Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6):

500 µl Tris/HCl (2 M, pH 7,6; steril) und 200 µl EDTA (0,5 M, pH 7,6; steril) werden in 100 ml UHQ-Wasser (steril) gelöst.

Tris/HCl (2 M, pH 7,6):

24,22 g Trishydroxymethylaminomethan werden in 80 ml UHQ-Wasser gelöst. Mittels konzentrierter HCl wird der pH-Wert auf 7,6 eingestellt Die Lösung wird dann auf 100 ml mit UHQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

### 3.4.4 Durchführung

Tabelle 15: Zusammensetzung des Agarosegels (2%)

Apparatur	Dimension [cm]	Geldicke [mm]	Agarose [g]	0,5 TBE-Puffer [ml]	0,5 TBE Laufpuffer [ml]
HE 99	15 x 20	4	2,4	120	1100
HE 100	20 x 25	4	4	200	955

#### 3.4.4.1 Gießen des Agarosegels

Die nötige Menge Agarose wird mit Hilfe eines Spatels in eine sterile Schraubflasche (250 ml) eingewogen und in der entsprechenden Menge TBE-Puffer suspendiert. Anschließend wird die Agarose in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Dabei wird die Lösung mehrmals kurz aufgeköcht und geschwenkt bis sie klar ist. Vor dem Gießen wird die Lösung im Wasserbad auf 50°C temperiert.

Die Gelgießform und die Kämmen werden zunächst mit Ethanol gereinigt. Die Gelträgerplatte wird an den beiden offenen Enden mit Klebeband verschlossen um ein Auslaufen der Gellösung zu vermeiden und dann im Gelgießrahmen platziert.

Die temperierte Agaroselösung wird gleichmäßig in der Gelgießform verteilt und sofort darauf die Kämmen für die Probestaschen eingesetzt. Nach einer Stunde Erstarrungszeit wird das Klebeband entfernt und das Gel samt der Trägerplatte in die mit TBE-Puffer gefüllte Apparatur eingesetzt. Schließlich werden die Kämmen entfernt. Wenn das Gel nicht sofort für eine Elektrophorese verwendet wird, kann es mit TBE-Puffer überschichtet und im Kühlschrank aufbewahrt werden.

#### 3.4.4.2 Probenvorbereitung und Probenauftrag

Die PCR-Produkte werden aus dem Thermocycler entnommen bzw. aufgetaut. In einem Reaktionsgefäß werden 2,5 µl Gelladepuffer vorgelegt und je 10 µl PCR-Produkt hinzugefügt, anschließend gut gemischt und zentrifugiert um die Lösung am Boden des Gefäßes zu sammeln.

Bei Verwendung des Enzyms „Go Taq“ kann dieser Schritt entfallen, da der „Go Taq Green Master Mix“ bereits einen blauen und einen gelben Farbstoff enthält um den

Fortschritt der Elektrophorese zu verfolgen. Der Puffer ist außerdem dicht genug um das direkte Auftragen der PCR-Amplifikate auf ein Agarosegel zu erlauben.

Bevor der Probenauftrag begonnen werden kann, wird die Kühlung auf 19°C eingestellt. In die Probenaschen werden 10 µl der Proben bzw. 5 µl des Markers aufgetragen. Die angelegte Feldstärke entspricht 5 V/cm. Für die HE 100 bedeutet das eine Spannung von 150 V bei 120 mA, für die HE 99 ergeben sich 127 V bei 120 mA. Die Dauer der Elektrophorese beläuft sich auf drei Stunden. 15 Minuten nach dem Start wird der Magnetrührer eingeschaltet um eine ausreichende Umwälzung des Puffers zu gewährleisten.

#### **3.4.4.3 Färben, Entfärben und Fotografieren des Agarosegels**

Nach der Elektrophorese wird das Agarosegel aus der Elektrophoresekammer entnommen und in einer Lösung von 70 µl Ethidiumbromid-Lösung (1%) in 700 ml autoklaviertem, destilliertem Wasser eine Stunde lang gefärbt. Der gebrauchte Laufpuffer (0,5 x TBE) wird zum 30-minütigen Entfärben des Gels verwendet.

Das entfärbte Gel wird mit Hilfe des Geldokumentationssystems und der entsprechenden Software fotografiert.

### **3.5 Real-time PCR**

#### **3.5.1 Prinzip**

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, einer Endpunkt-Methode, die die Detektierung des Produktes erst nach Ablauf der Reaktion erlaubt, ermöglicht die Real-time PCR die Amplifikation des gewünschten Produktes bereits während der Reaktion zu verfolgen. Hierfür werden Fluoreszenzfarbstoffe benötigt, deren Signal proportional zur Menge der vorhandenen DNA ist [BIORAD-LABORATORIES, 2006].

### 3.5.2 Geräte

Tabelle 16: Geräte und Hilfsmittel für die Real-time PCR

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
PC und Monitor		Benq
Thermocycler	Biorad iCycler™	Biorad Laboratories
Optik	iQ™5 Multicolor Real-time PCR Detection System	Biorad Laboratories
Software	iQ™5 Optical System Software Version 2.0	Biorad Laboratories
Zentrifuge	Galaxy Mini Centrifuge	VWR International
Kolbenhubpipetten	Diverse Kolbenhubpipetten (2, 10, 20, 100, 200 µl)	Gilson, Socorex
Pipettenspitzen	Biozym Safe Seal Tips	Biozym
Zentrifuge	Minizentrifuge C 1200	National Labnet Co.
	Combi Spin FVL 2400 N	Biosan
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica
Sterilwerkbank	Esco® PCR Cabinet	Esco Technologies
	Captair® bio	Erlab
Reaktionsgefäße	Thin-wall 8-tube strips	Biozym
Kühlblöcke		

### 3.5.3 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 17: Reagenzien und Lösungen für die Real-time PCR

Reagens/Lösung	Beschreibung	Hersteller
Mastermix	iQ™SYBR® Green Supermix, 2 x Reaktionspuffer enthält dNTPs, iTaq DNA-Polymerase, MgCl <sub>2</sub> , SYBR Green I, Fluorescein	Biorad Laboratories
Primer		Eurofins MWG GmbH
AE-Puffer		Qiagen
DNA	In AE-Puffer gelöst	
UHQ-Wasser		

Die für die Real-time PCR verwendeten Primer entsprechen den selben Primerpaaren die bereits für die PCR eingesetzt worden sind und sind in Tabelle 11 zu finden.

#### **3.5.4 Durchführung**

Um Kontaminationen aus der Raumluft zu vermeiden wird in einer Sterilwerkbank gearbeitet. Außerdem sind sämtliche Reaktionsgefäße bis zum Einstellen in den Thermocycler in Kühlblöcken aufzubewahren.

Aus den vorhandenen DNA-Lösungen werden mit AE-Puffer Verdünnungen im Verhältnis 1:10 hergestellt. Anschließend wird aus Mastermix, Primern und Wasser ein Prämix entsprechend der Probenanzahl hergestellt. Dabei werden für jeden Ansatz 12,5 µl Mastermix, 5,5 µl UHQ-Wasser, 1 µl forward-Primer und 1 µl reverse-Primer gemischt. Der so erhaltene Prämix wird nach kurzem Vortexen zu je 20 µl in die Reaktionsgefäße aliquotiert. Schließlich werden jedem Reaktionsgefäß 5 µl der 1:10 verdünnten DNA-Lösung zugesetzt. Die Analyse erfolgt dabei üblicherweise in Doppelbestimmung. Bei der Ermittlung der Effizienz der Reaktion mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus einer einzelnen Probe erfolgt die Analyse in Dreifachbestimmung.

Bei Verwendung eines speziesspezifischen Primers und eines Universalprimers wird um die Vergleichbarkeit der erhaltenen  $C_T$ -Werte zu gewährleisten folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst werden Mastermix und UHQ-Wasser entsprechend der Probenanzahl gemischt. Dann wird dieser Prämix auf eine der Anzahl der Proben entsprechenden Zahl an Reaktionsgefäßen aufgeteilt. Diesen Reaktionsgefäßen wird dann jeweils die DNA-Lösung der zu untersuchenden Probe zugefügt. Nach kräftigem Vortexen wird der Inhalt jedes dieser Gefäße wiederum auf eine der Anzahl der verwendeten Primer entsprechende Zahl an Reaktionsgefäßen verteilt. Aus forward- und reverse-Primer jedes Primerpaares wird ein Primermix hergestellt und ein entsprechendes Volumen in jedes Reaktionsgefäß pipettiert. Erst dann werden aus den Reaktionsgefäßen zwei Mal je 25 µl entnommen und in die 8-tube-strips pipettiert. Auf diese Art sollen etwaige Pipettierfehler kompensiert werden. Es soll vor allem gewährleistet werden, dass sich in allen Reaktionsgefäßen, die einer Probe zugeordnet werden können, schließlich die

gleiche Menge an DNA befindet. In Abbildung 4 ist ein entsprechendes Pipettierschema für sechs verschiedene Proben und zwei verschiedene Primer unter Berücksichtigung entsprechender Sicherheitszuschläge zu sehen. Die Kürzel CB und TR stehen dabei für die beiden verschiedenen Primerpaare Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04.

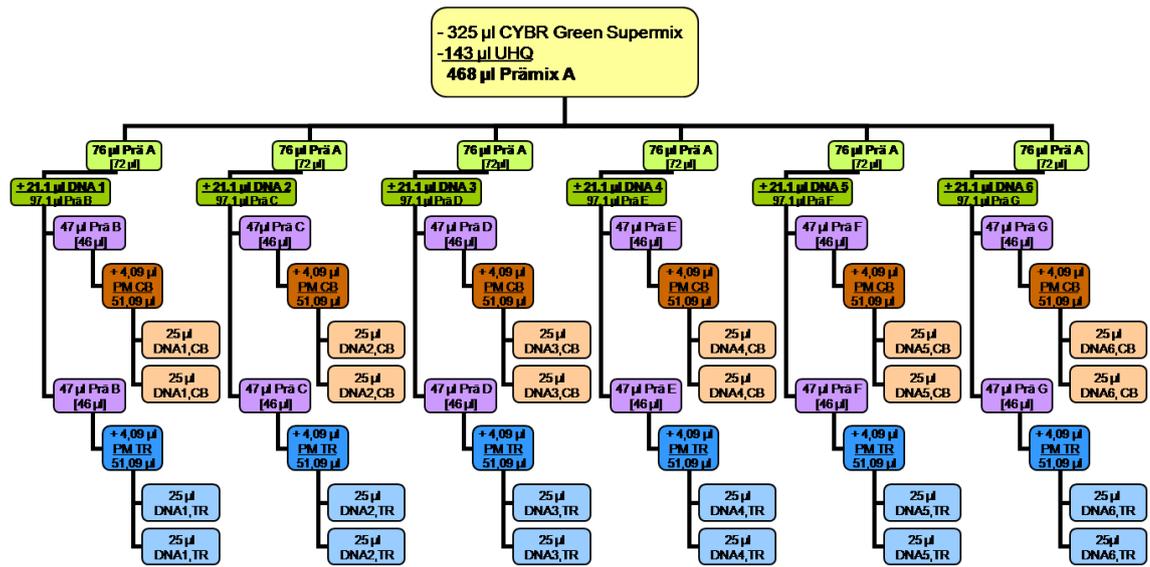


Abbildung 4: Pipettierschema Real- Time- PCR

Nach dem Pipettieren aller Ansätze werden die Reaktionsgefäße etwa fünf Sekunden lang zentrifugiert. Das gewünschte Temperatur-Zeit-Programm wird am Computer ausgewählt und den Plätzen im Thermocycler wird die entsprechende Probenbezeichnung zugewiesen. Die 8-tube-strips werden in den Cycler eingestellt, der Cycler geschlossen und das Programm gestartet.

Für die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Analysen wurde, wenn nicht anders angegeben, das in Tabelle 18 angeführte Temperatur-Zeit-Programm verwendet.

### 3.5.5 Thermoprotokoll

Tabelle 18: Temperatur-Zeit-Programm Real-time PCR

Schleife	Cycle1	Cycle 2 (45 x)			Cycle 3		Cycle 4 (~ 80 x)
Schritt	1	1	2	3	1	2	1
Temperatur	95°C	95°C	X°C	72°C	95°C	X°C	X°C – 95°C
Zeit	3 min	15 s	40 s	20 s	20 s	30 s	+ 0,5 °C/ 10 s
Daten- erfassung			PCR	Real- Time			Melt Curve

X... Annealingtemperatur des jeweiligen Primers

### 3.5.6 Auswertung

Nach vollendetem Programm wird der Schwellenwert („Threshold“) wenn nötig manuell angepasst und die daraus berechneten Daten für die weitere Verarbeitung in Microsoft Excel exportiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Schwellenwerte der Real-time PCR Läufe, wenn nicht anders angegeben, auf einen  $C_T$ -Wert von 10 festgelegt um die Ergebnisse verschiedener Läufe miteinander vergleichen zu können.

Für die Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekanntem Proben, wie sie für einige Sojamilchprodukte durchgeführt wurde, wurde ähnlich, wie für die Quantifizierung von genetisch modifizierten Organismen in Futter- oder Lebensmitteln im Handbuch des Real-time Cyclers beschrieben, vorgegangen [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Zu diesem Zweck wurden zwei Primerpaare eingesetzt, wovon eines spezifisch auf Rinder-DNA anspricht und das zweite als Universalprimerpaar für jegliche in der Probe enthaltene DNA ein Amplikon liefert. Dies ist nötig um den Kuhmilchanteil der Probe auf den Gesamt-DNA-Gehalt der Probe beziehen zu können. Somit sollen etwaige Unterschiede im DNA-Gehalt der Probe, wie sie etwa bedingt durch unterschiedliche Ausbeute bei der DNA-Isolierung auftreten können, ausgeglichen werden. Hierfür wurde folgende Formel herangezogen:  $\Delta C_T = C_T (\text{speziespezifischer Primer}) - C_T (\text{Universalprimer})$ . Mit Hilfe der Standardreihe wurde eine Standardgerade erstellt. Dazu wurden die  $\Delta C_T$ -Werte (y-Achse) gegen den dekadischen Logarithmus des Kuhmilchanteils (x-Achse) in einem Diagramm aufgetragen. Zur Erstellung der Standardgerade wurde die Trendlinienfunktion in Microsoft Excel benützt, die außerdem auch die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression liefert. Das

Bestimmtheitsmaß ist ein Indikator dafür, wie gut die lineare Regression an die Datenpunkte angepasst ist. Über die Geradengleichung wurde schließlich unter Einbeziehung der  $\Delta C_T$ -Werte der unbekanntes Proben der dekadische Logarithmus des Rinder-DNA-Gehaltes der Proben erhalten und aus diesem wurde die Konzentration des Rinder-DNA-Gehaltes und somit des Kuhmilchanteils in den vorliegenden Proben abgeleitet.

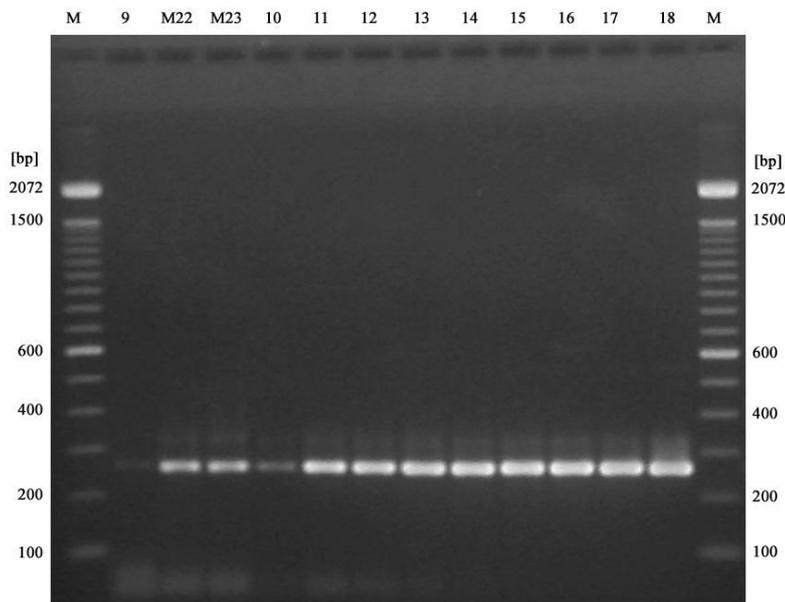
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmilchprodukten

#### 4.1.1 Qualitativer Nachweis mittels PCR und Gelelektrophorese

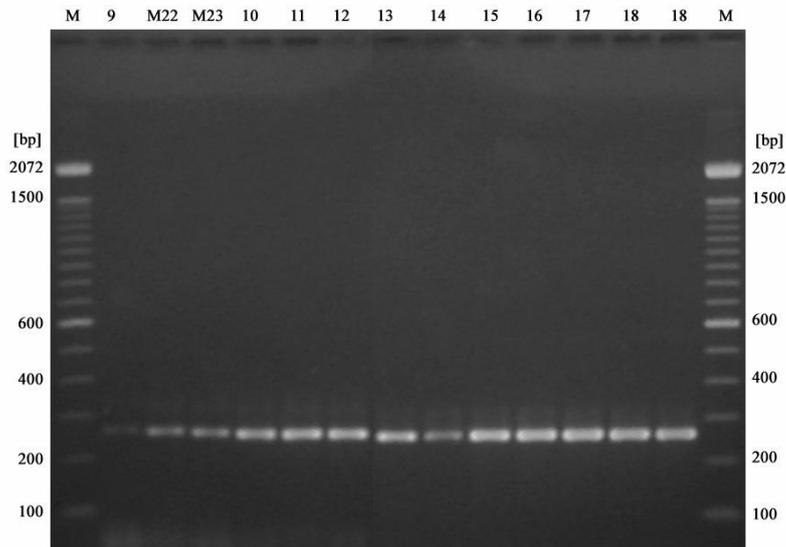
Die Bearbeitung dieser Problemstellung erfolgte zunächst unter Einsatz zweier verschiedener DNA-Polymerasen und zweier unterschiedlicher Typen von Thermocyclern. Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse wurden ausnahmslos unter Verwendung der DNA-Polymerase „Go Taq“ und des Thermocyclers „Hybaid PCR Sprint“ erzielt. Diese Kombination lieferte für die durchgeführten Untersuchungen höhere Ausbeuten an PCR-Produkten und somit stärkere Signale der einzelnen Banden sowie bessere Reproduzierbarkeit der Analysen.

Zunächst wurde mit dem für Rind spezifischen Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 gearbeitet und die optimale Annealingtemperatur für diesen Primer festgelegt. Die folgende Abbildung zeigt dabei den Beginn des Temperaturversuches bei 50°C. Dabei ist zu erkennen, dass auch für die Negativkontrolle auf Position 9, gewonnen aus reinem Schafkäse, eine schwache Bande zu sehen ist.



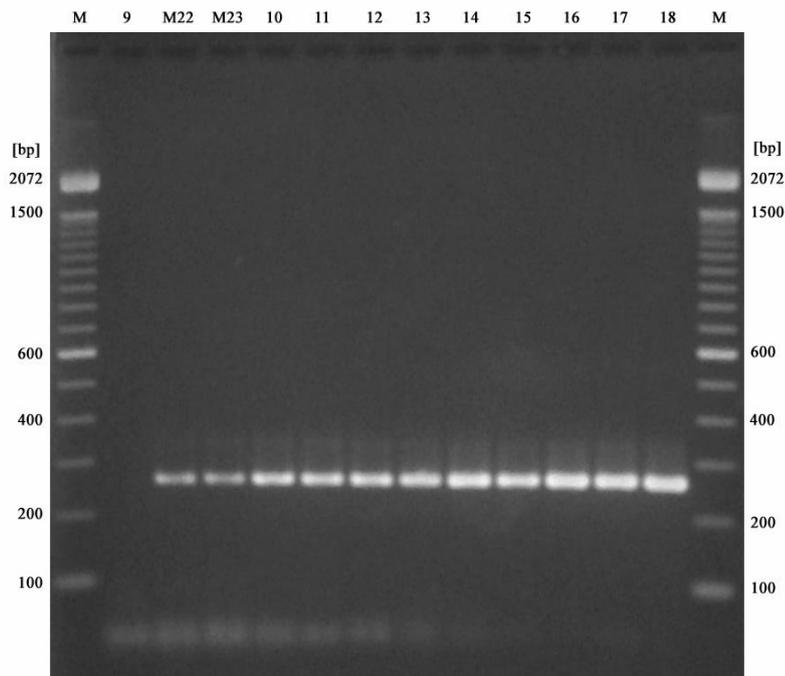
**Abbildung 5: Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 50°C)**

In weiterer Folge wurde die Annealingtemperatur gesteigert. Eine Steigerung auf bis zu 55°C reichte, wie Abbildung 6 beweist, nicht aus um diesen unerwünschten Effekt zu eliminieren.



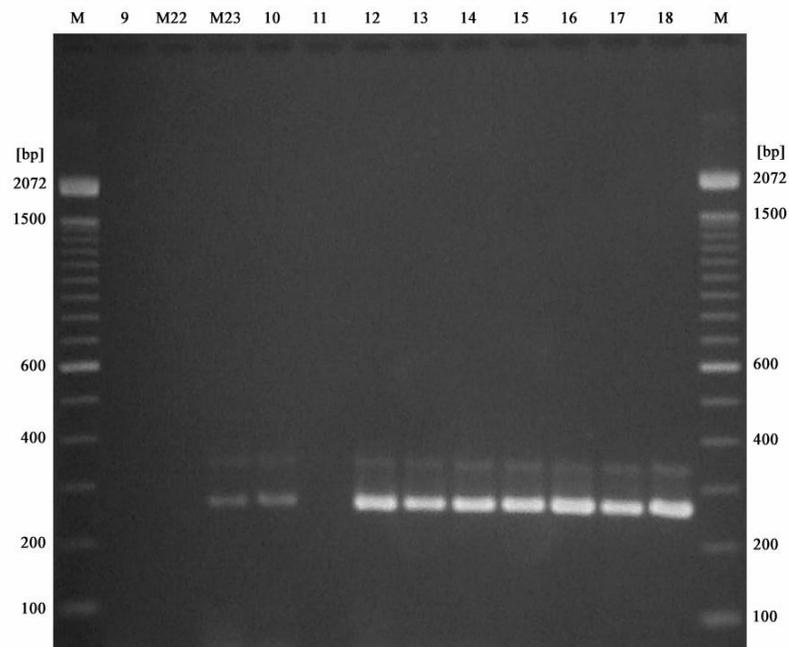
**Abbildung 6: Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**

Erst bei einem weiteren Temperaturanstieg auf 57°C konnte ein Resultat erhalten werden, das den Erwartungen entspricht und für Probe 9 keine für Rind spezifische Bande zeigt. Außerdem konnte bei dieser Temperatur eine kontinuierlich ansteigende Bandenintensität, die mit dem in der Probe enthaltenen Kuhmilchanteil in Zusammenhang steht, beobachtet werden anhand derer eine semi-quantitative Abschätzung des vorliegenden Kuhmilchanteils vorgenommen werden kann.

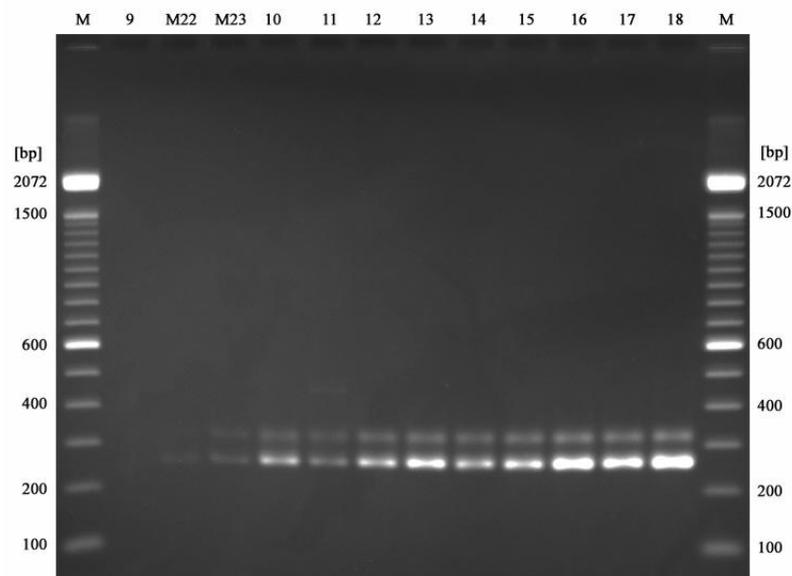


**Abbildung 7: Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 57°C)**

Eine weitere Steigerung der Temperatur auf 58°C bzw. 60°C führt zum Verlust der Empfindlichkeit der Methode wie in Abbildung 8 und Abbildung 9 zu erkennen ist. Bereits bei einer Annealingtemperatur von 58°C besteht die Gefahr das Signal für Proben mit niedrigem Kuhmilchanteil zu verlieren, wie für Position M22 (entsprechend 0,1% Kuhmilchanteil) und Position 11 (entsprechend 1% Kuhmilchanteil) zu sehen ist. Es scheint außerdem, dass der Zusammenhang zwischen der Quantität des Kuhmilchanteils und der Signalintensität der einzelnen Banden weitgehend verloren geht, was vor allem bei einer Annealingtemperatur von 60°C gut zu sehen ist.



**Abbildung 8: Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 58°C)**

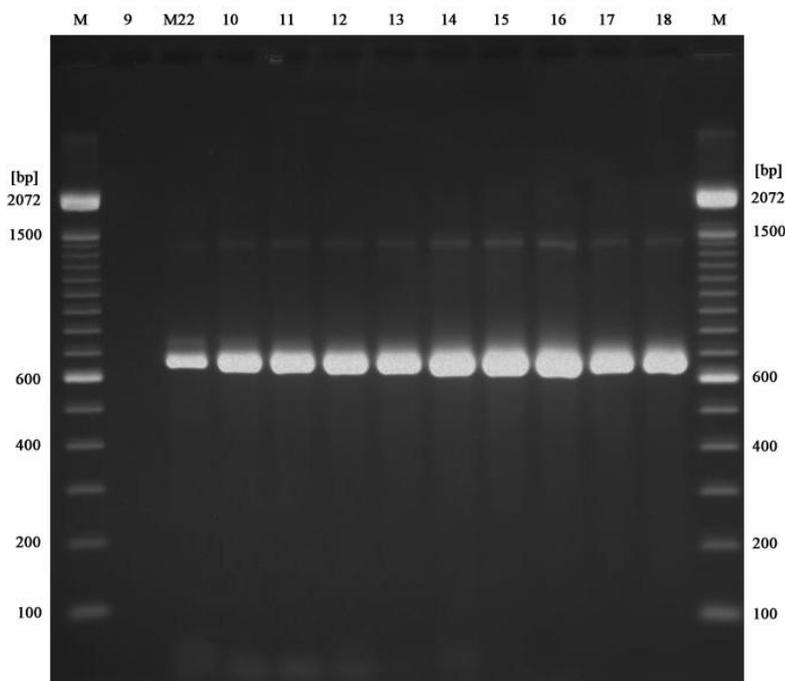


**Abbildung 9: Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C)**

Anhand der erhaltenen Resultate wird eine Annealingtemperatur von 57°C für die gegebenen Bedingungen als optimal angenommen. Da selbst in der Probe mit dem

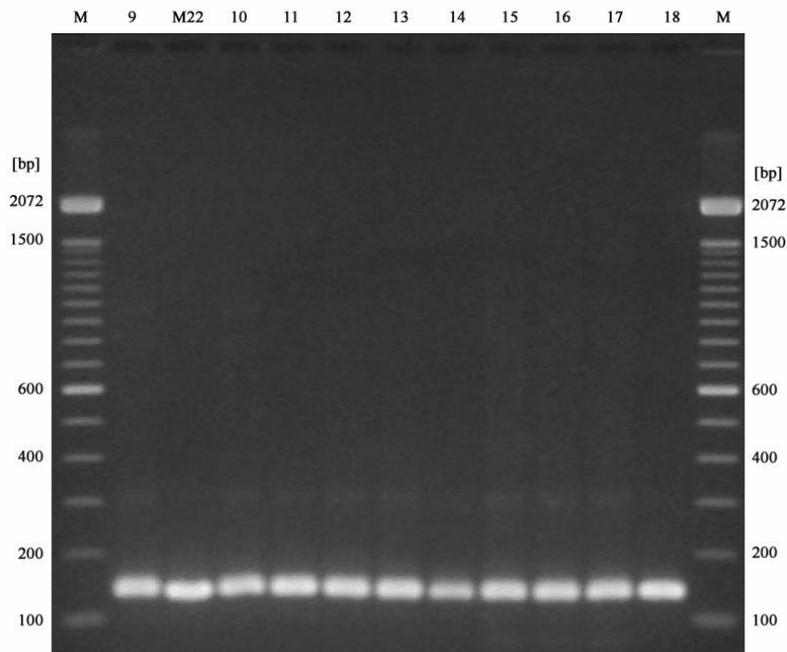
geringsten Kuhmilchanteil, nämlich M22 mit einer Konzentration von 0,1% Kuhmilch, dieser zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, wird die Nachweisgrenze der Methode zumindest mit 0,1% angenommen. Verglichen mit einer Publikation aus dem Jahre 2003 [BOTTERO et al., 2003], die die Nachweisgrenze für dieses Primerpaar in einer Multiplex-PCR bei 0,5% festlegt, konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit gezeigt werden, dass für eine Simplex-PCR selbst ein Fünftel dieser Konzentration ausreicht um einen eindeutig positiven Befund zu liefern.

In einer ähnlichen Vorgangsweise konnte für ein weiteres rinderspezifisches Primerpaar, nämlich CytOx IIa / IIb, eine optimale Annealingtemperatur von 60°C festgelegt werden, wie in Abbildung 10 zu sehen ist. Auch hier liegt die Nachweisgrenze bei 0,1%, was insbesondere aufgrund des relativ langen Amplikons von 651 bp beachtlich ist, da man im Allgemeinen davon ausgeht, dass die Amplifikation von längeren DNA-Fragmenten aus verarbeiteten Lebensmitteln wie z.B. Käse nur erschwert möglich ist [LOPEZ-CALLEJA DIAZ et al., 2007]. Aus diesem Grund wird der Verwendung von Primern, die ein kürzeres Amplikon liefern, oft der Vorzug gegeben.

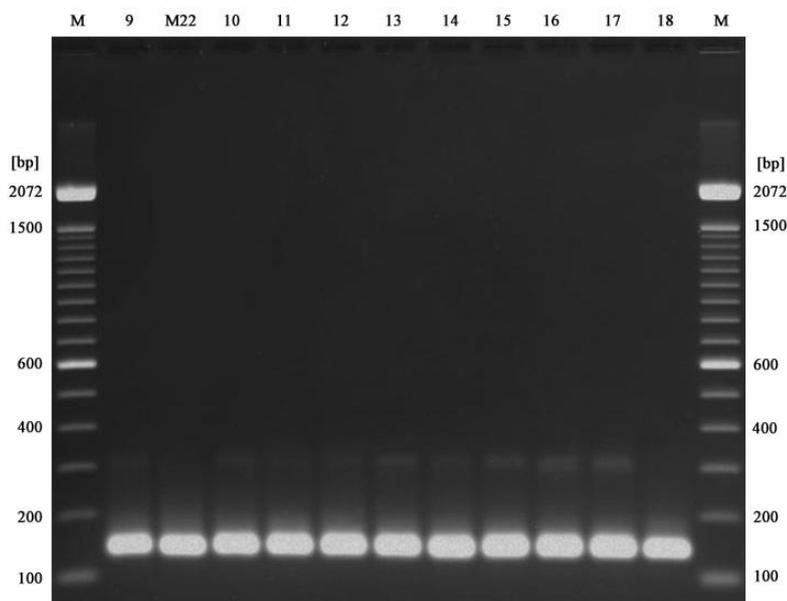


**Abbildung 10: Speziesspezifische PCR zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmischkäsen (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C)**

Mit den Primerpaaren CytOx II a / II b sowie Cow Bottero 1 / 2 konnten zwei Alternativen gefunden werden, die geeignet sind, einen Zusatz von Kuhmilch in Schafmilchprodukten qualitativ bis hin zu einer minimalen Konzentration von 0,1% Kuhmilchanteil nachzuweisen. Für die weiterführende Analyse und Quantifizierung mittels Real-time PCR wird allerdings zusätzlich ein Universalprimer benötigt, dessen Aufgabe es ist etwaige Unterschiede in der Gesamt-DNA-Konzentration unterschiedlicher Proben zu berücksichtigen. Hierfür wurden drei verschiedene Primerpaare zunächst mittels PCR und Agarosegelelektrophorese auf ihre Eignung geprüft. Zunächst wurden die beiden für Eukaryonten spezifischen Primerpaare TR 03 / 04 sowie 18SpEUDIR / 18SpEUINV getestet. Wie in Abbildung 11 und Abbildung 12 erkennbar ist, scheinen beide Primerpaare als potentielle Universalprimer geeignet zu sein, da sie alle Proben der Standardreihe mit ihren verschiedenen Anteilen von Kuh- und Schafmilch in ähnlicher Intensität anzeigen und kein kontinuierlicher Anstieg bzw. keine kontinuierliche Abnahme der Signalstärke zu beobachten ist. Das Primerpaar 18SpEUDIR / 18SpEUINV wurde in einer spanischen Publikation bereits zum Normalisieren der Ergebnisse eines rinderspezifischen Systems für die Quantifizierung mittels Real-time PCR eingesetzt. Hierbei wurde festgestellt, dass die  $C_T$ -Werte, die für dieses Primerpaar für Schaf- bzw. Rinder-DNA als Probenmaterial erhalten wurden, bei Einsatz gleicher DNA-Mengen, nämlich 10 ng, in einer vergleichbaren Größenordnung liegen [MARTIN et al., 2008]. Basierend auf diesen Ergebnissen ist zu erwarten, dass das vorliegende Primerpaar auch als endogene Kontrolle für den Gesamtgehalt an amplifizierbarer DNA in den vorliegenden Käseproben, geeignet ist.



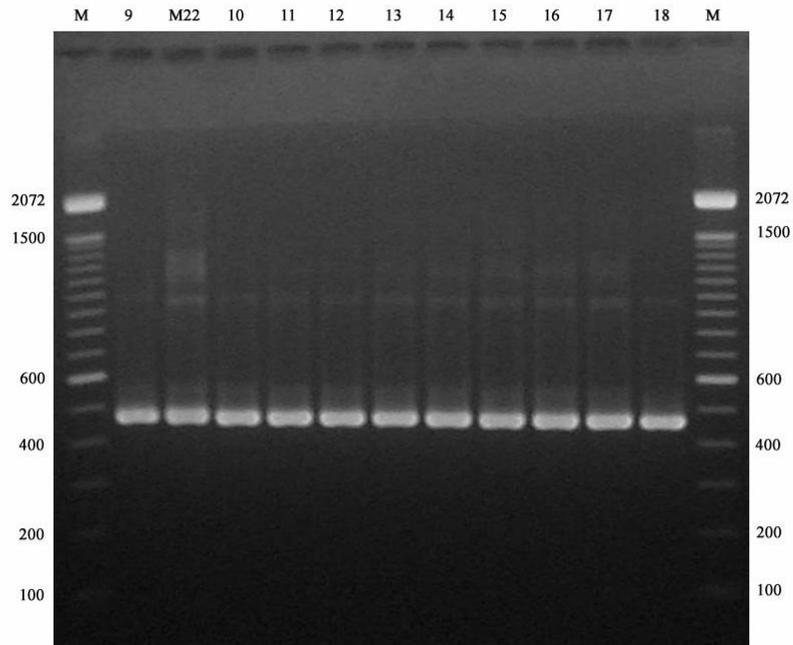
**Abbildung 11: PCR zum Überprüfen eines Universalprimers für Mischkäse aus Kuh- und Schafmilch (18SpEUDIR / 18SpEUINV, Annealingtemperatur 55°C)**



**Abbildung 12: PCR zum Überprüfen eines Universalprimers für Mischkäse aus Kuh- und Schafmilch (TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C)**

Schließlich wurde noch ein drittes Primerpaar mittels PCR und Agarosegelelektrophorese analysiert und auf seine Eignung als Universalprimer hin geprüft,

nämlich das Primerpaar L-14735 / H-15149. Wie in Abbildung 13 ersichtlich ist, scheint auch dieses Primerpaar als Universalprimer für die Real-time PCR einsetzbar zu sein. Auch hierfür werden für alle Proben der Standardreihe Banden in annähernd gleicher Intensität erhalten und es ist keine kontinuierliche Zunahme oder Abnahme der Signalstärke beobachtbar.



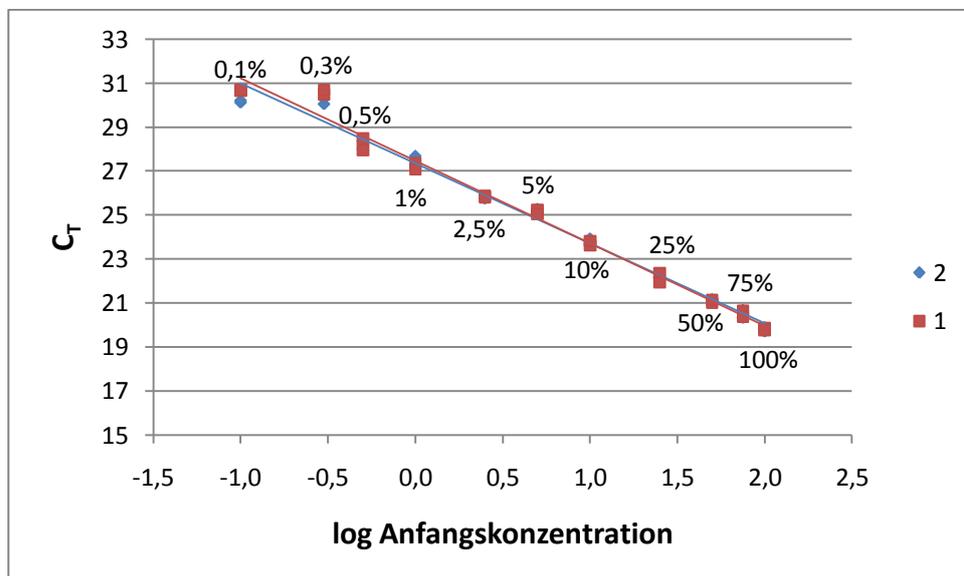
**Abbildung 13: PCR zum Überprüfen eines Universalprimers für Mischkäse aus Kuh- und Schafmilch (L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 55°C)**

#### 4.1.2 Quantitativer Nachweis mittels Real-time PCR

Anschließend an die oben präsentierten Ergebnisse die mittels PCR erzielt wurden und die im Zuge einer vorangegangenen Diplomarbeit am Institut für Lebensmittelchemie erhaltenen Resultate [WEIPPL, 2008], wurden Versuche mit den beiden speziesspezifischen Primerpaaren Cow Bottero 1 / 2 und CytOx IIa / IIb sowie den Universalprimerpaaren TR 03 / 04, 18SpEUDIR / 18SpEUINV und L-14735 / H-15149 durchgeführt.

#### 4.1.2.1 Nachweis des Kuhmilchanteils mittels Cow Bottero 1 / 2

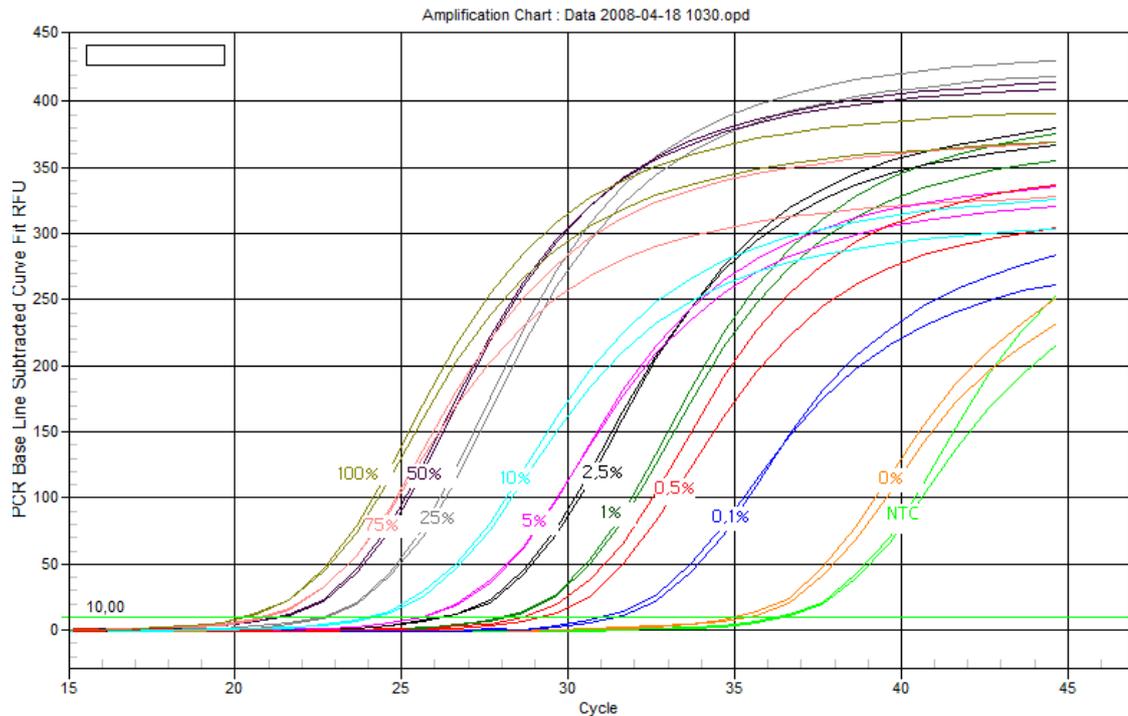
Aus den ersten Versuchen, die mit dem Primerpaar Cow Bottero 1 / Cow Bottero 2 durchgeführt wurden, ging wie in Abbildung 14 zu sehen ist, zunächst hervor, dass die Probe M23 (0,3% Kuhmilchanteil) der Standardreihe in ihrem Kuhmilchgehalt unterschätzt wird. Auch bei neuerlicher Isolierung der DNA aus dem entsprechenden Käse, zeigte sich das gleiche Ergebnis. Da sich dieser Effekt bereits bei früheren Tests mit derselben Standardreihe gezeigt hatte, war nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um eine fehlerhafte Mischung bei der Zubereitung der Modellkäse handelte. Um nicht einen systematischen Fehler innerhalb der Standardreihe zu riskieren, wurde diese Probe in weiterer Folge von den Analysen ausgeschlossen.



**Abbildung 14: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**

Mit der verbleibenden Standardreihe wurden Versuche durchgeführt um den Einfluss der Annealingtemperatur auf das Ergebnis, insbesondere auf die beiden Parameter Effizienz der Reaktion und Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Standardgeraden, die nach dem Auftragen des dekadischen Logarithmus der DNA-Ausgangskonzentration gegen die entsprechenden  $C_T$ -Werte für die jeweiligen Proben erhalten wurden, zu untersuchen.

Abbildung 15 zeigt typische Amplifikationskurven, die während eines Real-time PCR Laufes mit Cow Bottero 1 / 2 bei einer Annealingtemperatur von 55°C aufgezeichnet wurden.

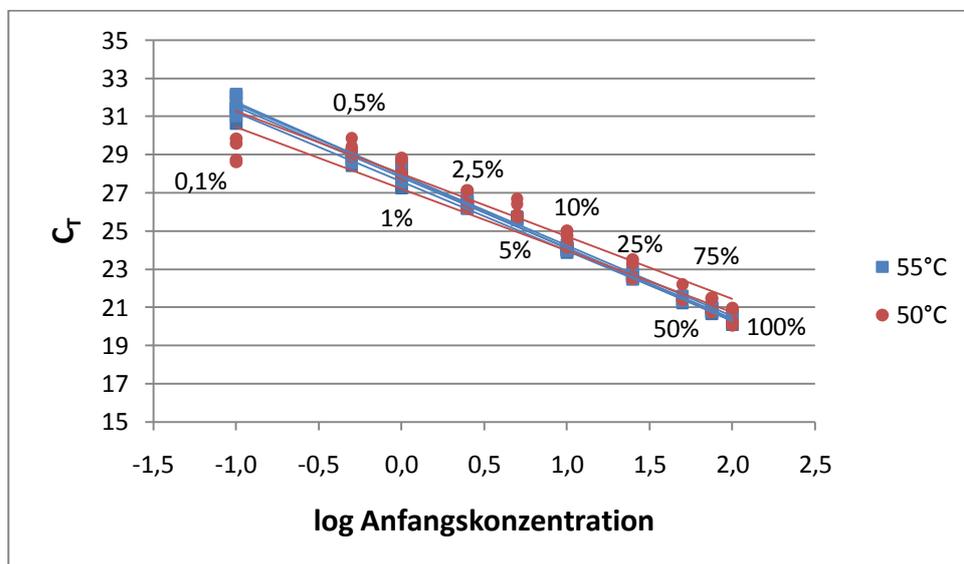


**Abbildung 15: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**

Der Vergleich von Standardgeraden, die in verschiedenen PCR-Läufen erhalten wurden, in Abbildung 16 zeigt, dass diese sowohl für eine Annealingtemperatur von 50°C als auch für eine Annealingtemperatur von 55°C bei sonst identen Bedingungen ähnlich liegen. Die Ergebnisse in blau wurden bei einer Annealingtemperatur von 55°C erhalten, in rot sind die Resultate bei einer Temperatur von 50°C zu sehen. Wie dieser Vergleich auch zeigt, liegen die  $C_T$ -Werte für die Probe M22 (0,1% Kuhmilchanteil) relativ zu den anderen Proben der Standardreihe bei einer Annealingtemperatur von 50°C niedriger als bei 55°C. Diese Beobachtung hat auch Einfluss auf die beiden Parameter Effizienz und Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, wie in Tabelle 19 zu sehen ist. Während bei den beiden Läufen, die mit einer Annealingtemperatur von 50°C durchgeführt wurden, die höheren Werte für die Effizienz der Reaktion erzielt

werden konnten, lieferten die vier Läufe bei einer Annealingtemperatur von 55°C eindeutig das bessere Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für die Standardgerade. Die Effizienz der Reaktion liegt bei dieser Annealingtemperatur knapp unter dem wünschenswerten Bereich von 90-105%. Die  $C_T$ -Werte für die Proben der Standardreihe liegen für beide Annealingtemperaturen in derselben Größenordnung. Tabelle 19 zeigt auch, dass in allen Läufen sowohl für die Negativkontrolle (Probe 9, Käse aus reiner Schafmilch) als auch die No-Template-Control (NTC) Amplikons erhalten werden, deren  $C_T$ -Werte sich allerdings deutlich von dem Standard mit dem geringsten Kuhmilchanteil (M22, 0,1% Kuhmilchanteil) abheben. In Abbildung 15 sind auch die Amplifikationsverläufe für NTC und Negativkontrolle zu sehen.

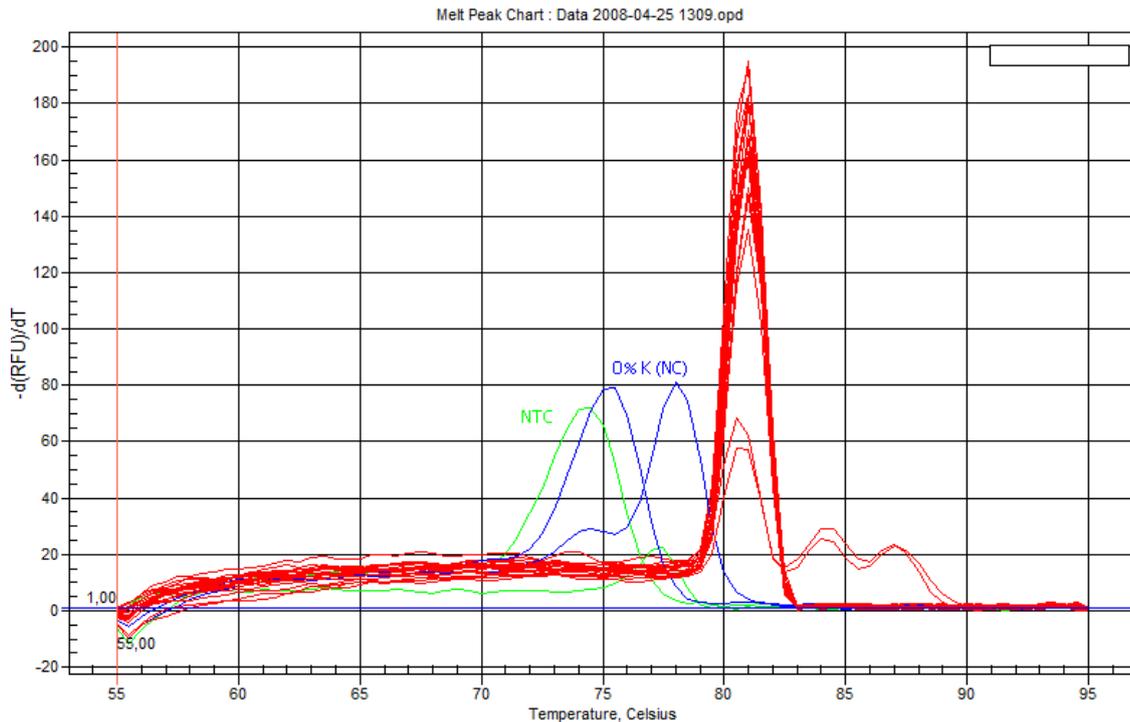
Die Schmelzkurvenanalyse am Beispiel des Real-time PCR Laufes in Abbildung 17 zeigt deutlich, dass es sich bei den Amplikons, die für Negativkontrolle und NTC erhalten worden sind um unspezifische Produkte und nicht um das für Kuh spezifische Amplikon mit 256 bp handelt. Die Kurven für Negativkontrolle und NTC sind hier in grün bzw. blau zu sehen und zeigen im Gegensatz zu den restlichen Proben der Standardreihe, die rot gefärbt sind, keinen für Rind spezifischen Peak.



**Abbildung 16: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperaturen 50°C und 55°C)**

**Tabelle 19: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich der C<sub>T</sub>-Werte, Effizienz und R<sup>2</sup> (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperaturen 50°C und 55°C)**

Annealingtemperatur Real- Time PCR- Lauf	50°C		55°C			
	3	6	5	7	8	9
18 (100% K)	20,06	20,87	20,07	20,34	20,24	20,19
18 (100% K)	20,25	20,96	20,29	20,66	20,36	20,18
17 (75% K)	20,76	21,50	20,72	21,02	20,97	20,99
17 (75% K)	20,84	21,44	20,67	20,87	20,78	20,85
16 (50% K)	21,42	22,20	21,33	21,61	21,37	21,57
16 (50% K)	21,38	22,20	21,22	21,39	21,33	21,36
15 (25% K)	22,59	23,51	22,47	22,86	22,72	22,49
15 (25% K)	22,50	23,28	22,61	22,60	22,60	22,53
14 (10% K)	24,15	24,75	23,85	24,03	23,95	23,96
14 (10% K)	24,33	25,00	24,15	24,12	24,15	24,29
13( 5% K)	25,70	26,68	25,70	25,73	25,59	25,67
13 (5% K)	25,84	26,41	25,58	25,76	25,70	25,62
12 (2,5% K)	26,20	27,14	26,54	26,72	26,33	26,40
12 (2,5% K)	26,42	27,11	26,17	26,59	26,17	26,25
11 (1% K)	27,83	28,68	27,65	28,35	28,19	27,80
11 (1% K)	28,05	28,83	27,24	27,71	28,04	27,56
10 (0,5% K)	28,89	29,42	28,41	28,81	28,57	28,65
10 (0,5% K)	29,26	29,87	29,06	29,10	29,11	28,77
M 22 (0,1% K)	28,74	29,84	31,25	31,42	31,02	32,07
M 22 (0,1% K)	28,60	29,59	30,61	31,47	31,47	32,16
9 (0% K)	33,20	33,50	33,16	34,65	35,38	35,23
9 (0% K)	33,04	34,60	36,01	33,62	35,04	35,20
NTC	-	37,91	35,87	38,60	36,32	42,50
NTC	-	38,51	36,33	34,23	36,52	37,56
Effizienz (in %)	105,9	101,8	88,8	86,2	86,5	82,6
R <sup>2</sup>	0,945	0,952	0,993	0,996	0,995	0,996



**Abbildung 17: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Schmelzkurvenanalyse, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**

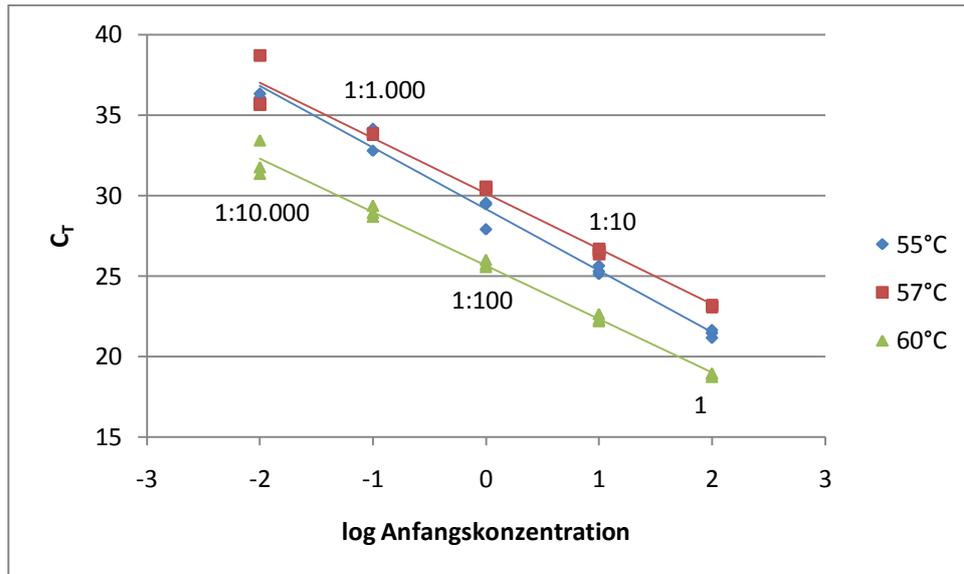
Um die Effizienz der PCR unter den gewählten Bedingungen festzustellen ohne dabei von eventuellen Unterschieden, die durch die Verwendung einer Standardreihe, die aus elf Proben aus elf verschiedenen DNA-Isolierungen gewonnen wurden, beeinträchtigt zu werden, wurden Effizienztests mit einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Dabei wurde aus der Probe 18, die aus Käse, der zu 100% aus Kuhmilch hergestellt worden war, gewonnen wurde, eine Verdünnungsreihe hergestellt. Folgende Verdünnungsstufen wurden analysiert: 1, 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1: 10.000. Die Verdünnungsstufen entsprechen dabei Kuhmilchanteilen von 0,01% (1:10.000) bis 100% (1). Die Analyse wurde dabei in dreifacher Bestimmung durchgeführt und inkludierte auch eine NTC. Nachdem bei einer Annealingtemperatur von 55°C noch immer das Problem einer falsch-positiven NTC bestand, wurde die Annealingtemperatur in weiterer Folge bis auf 60°C gesteigert. Dabei hat sich überraschenderweise gezeigt, dass sowohl Effizienz der Reaktion als auch das  $R^2$  der Standardgerade für die höchste gewählte Annealingtemperatur die besten Ergebnisse liefern. Außerdem kann bei 60°C auch keinerlei Amplikon in der NTC detektiert werden. Der Real-time PCR Lauf mit einer

Annealingtemperatur von 60°C zeigt die niedrigsten C<sub>T</sub>-Werte für die einzelnen Verdünnungsstufen. Dies ist insofern bemerkenswert als man in der Regel davon ausgeht, dass eine niedrigere Annealingtemperatur die Amplifizierung erleichtert.

**Tabelle 20: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich von mittlerem C<sub>T</sub>-Wert, Effizienz und Regression bei verschiedenen Annealingtemperaturen (Verdünnungen aus Probe 18, Cow Bottero 1 / 2)**

<b>Probe</b>	<b>C<sub>T</sub> Mittelwert +/- Standardabweichung 55°C</b>		<b>C<sub>T</sub> Mittelwert +/- Standardabweichung 57°C</b>		<b>C<sub>T</sub> Mittelwert +/- Standardabweichung 60°C</b>	
18 1	21,42	+/-0,24	23,14	+/-0,06	18,87	+/-0,11
18 1:10	25,35	+/-0,26	26,53	+/-0,16	22,38	+/-0,23
18 1:100	28,97	+/-0,92	30,48	+/-0,10	25,76	+/-0,23
18 1:1.000	33,68	+/-0,78	33,81	+/-0,04	28,99	+/-0,34
18 1:10.000	36,20	+/-0,17	36,68	+/-1,76	32,17	+/-1,10
NTC	39,52	-	N/A	-	N/A	-
Effizienz (in %)	82,4		97,4		100,1	
R <sup>2</sup>	0,986		0,979		0,991	

Der Vergleich der Standardgeraden, der bei drei verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführten Analysen in Abbildung 18 zeigt, dass die Geraden der Versuche bei 57°C und 60°C beinahe parallel liegen, wohingegen die Steigung der Gerade bei 55°C etwas davon abzuweichen scheint. Diese Beobachtung deckt sich mit der niedrigeren Reaktionseffizienz, die bei einer Annealingtemperatur von 55°C erhalten wurde.



**Abbildung 18: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich von Standardgeraden bei verschiedenen Annealingtemperaturen (Verdünnungen aus Probe 18, Cow Bottero 1 / 2)**

#### 4.1.2.2 Nachweis des Kuhmilchanteils mittels CytOx IIa / IIb

Das Primerpaar CytOx IIa / IIb ist aufgrund der Länge seines Amplikons mit 651 bp eigentlich als für die Real-time PCR nicht optimal einzustufen. Üblicherweise werden für die Real-time PCR Primerpaare eingesetzt, die ein Amplikon mit einer maximalen Länge von 200 bp erzeugen, da davon ausgegangen wird, dass die Amplifikation von längeren DNA-Abschnitten vor allem bei Proben aus verarbeiteten Lebensmitteln schwierig ist.

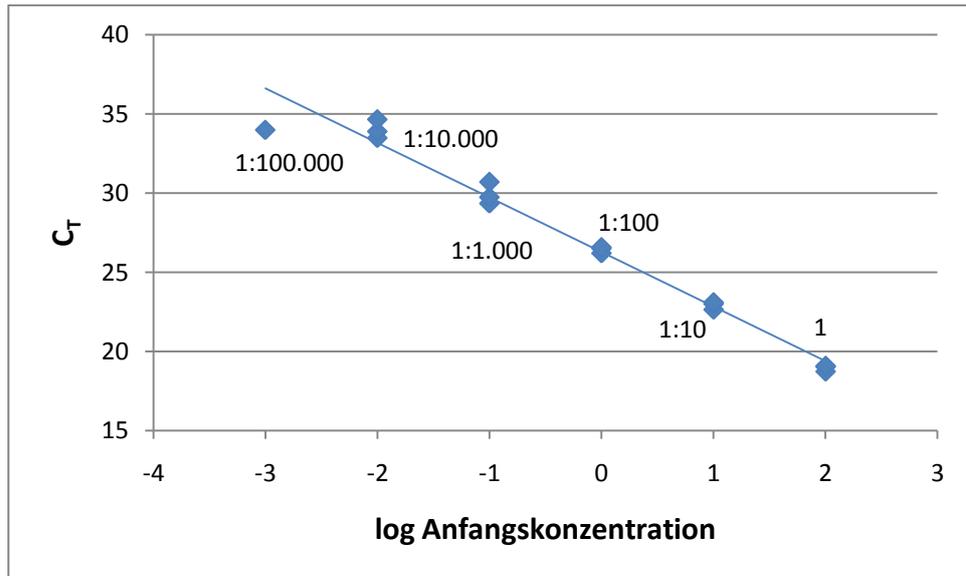
Manche Quellen empfehlen sogar den Einsatz von Primerpaaren, die ein Amplikon erzeugen, das zwischen 60 und 80 bp lang ist. Der Grund hierfür liegt in der Annahme, dass auch weitgehend abgebaute DNA noch nachgewiesen werden kann, solange die durchschnittliche Länge eines DNA-Stranges größer ist als die Länge der DNA-Sequenz, die nachgewiesen werden soll. Daraus lässt sich folgern, dass die Anzahl der intakten Zielsequenzen, die als Matrize für die Amplifizierung dienen können, umso größer ist, je kürzer das gewünschte Amplikon ist. Lange Amplikons resultieren hingegen in einer niedrigeren Effizienz des Nachweises [LEVIN, 2008].

Auch ein Absinken des pH-Wertes, wie es während der Fermentation durch Milchsäurebakterien bei der Käseherstellung passiert, führt zur Hydrolyse der

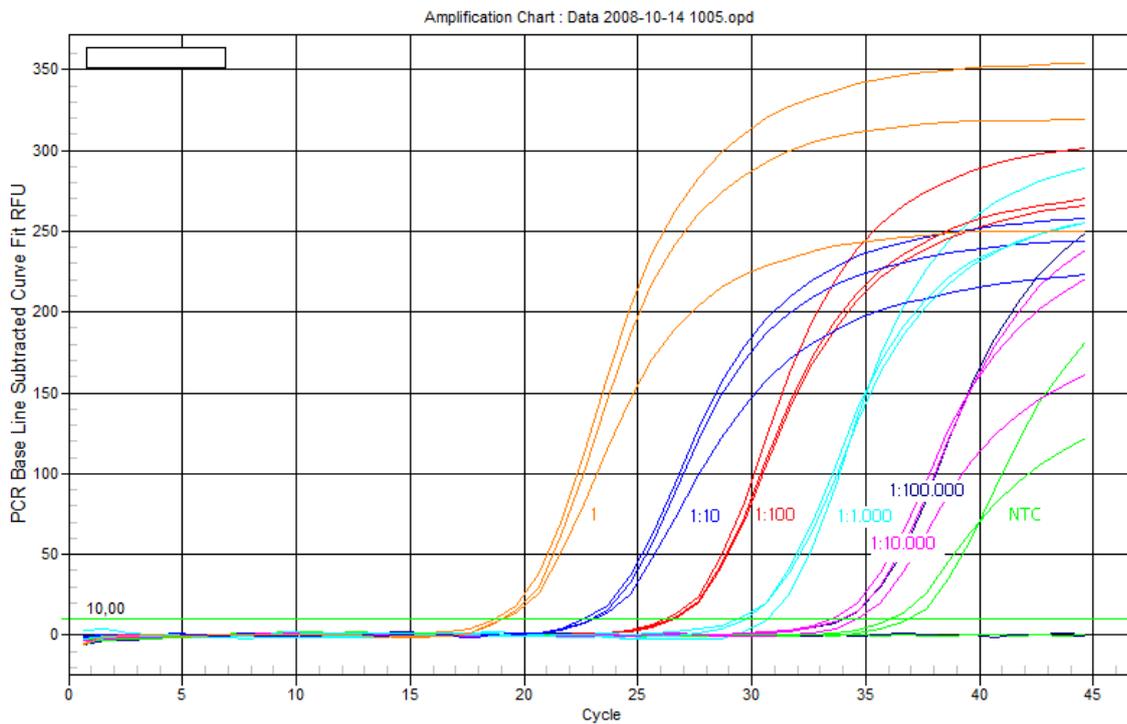
enthaltenen DNA [HOLZHAUSER et al., 2006]. Man kann also davon ausgehen, dass auch im Käse die DNA nicht mehr vollständig intakt ist, da sie Abbauvorgängen unterliegt.

Nichtsdestotrotz wurde auch das Primerpaar CytOx II a / II b im Rahmen dieser Diplomarbeit auf seine Eignung für den Einsatz in der Real-time PCR geprüft. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer Verdünnungsreihe, die analog zu der bereits zum Testen der Effizienz der Reaktion mit dem Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 verwendeten Reihe hergestellt wurde, überprüft ob unter Einsatz des Primerpaars CytOx IIa und CytOx IIb zufriedenstellende Ergebnisse im Hinblick auf Effizienz der Reaktion und  $R^2$  der Standardgerade erhalten werden können. Im Gegensatz zu den Tests mit dem Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 wurde aber eine zusätzliche Verdünnungsstufe von 1:100.000, entsprechend einem Kuhmilchanteil von 0,001%, hinzugefügt. Da sich mehrere Moleküle SYBR Green an ein Amplikon anlagern können, sollte überprüft werden, ob ein längeres Amplikon, das mehr Platz für die Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes bietet, zu einer höheren Empfindlichkeit führt.

Dabei wurde mit einer Annealingtemperatur von 60°C, die sich für die konventionelle PCR als optimal erwiesen hatte, gearbeitet. Abbildung 19 zeigt die aus dem ersten Versuch erhaltene Standardgerade, in Abbildung 20 sind die zugehörigen Amplifikationskurven dargestellt. Zu sehen ist, dass die einzelnen Datenpunkte bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 (entsprechend 0,01% Kuhmilchanteil) relativ gut auf der Geraden liegen, wohingegen in zwei Ansätzen der Dreifachbestimmung der höchsten Verdünnungsstufe 1:100.000 (entsprechend 0,001% Kuhmilchanteil) kein rinderspezifisches Amplikon nachweisbar ist, weswegen in Tabelle 21 auch keine Standardabweichung angegeben werden kann. Aufgrund der Länge des Amplikons wurde vermutet, dass die Elongationszeit von 20 Sekunden unter Umständen nicht ausreicht um eine vollständige Amplifikation in jedem Zyklus zu ermöglichen.

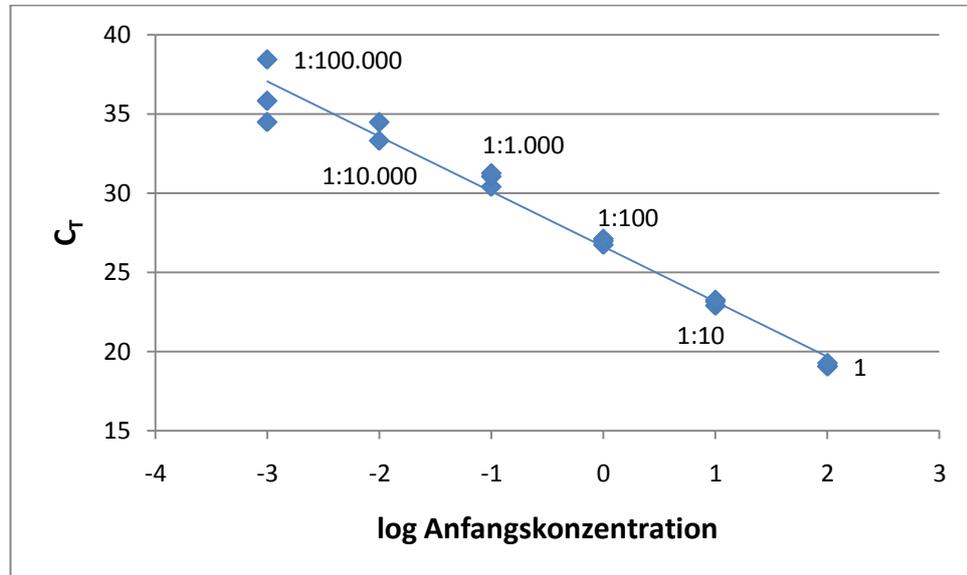


**Abbildung 19: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Standardgerade aus einem Effizienztest mit Verdünnungen aus Probe 18 (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 20 s)**



**Abbildung 20: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cyt Ox IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 20 s)**

Eine Verlängerung der Amplifikationszeit um 20 Sekunden auf insgesamt 40 Sekunden führt wie in Abbildung 21 zu sehen ist, dazu dass alle drei Replikate der höchstens Verdünnungsstufe 1:100.000 nachweisbar sind, wenn auch mit großer Streuung unter den Datenpunkten, wie die Standardabweichung von 2,011 zeigt.

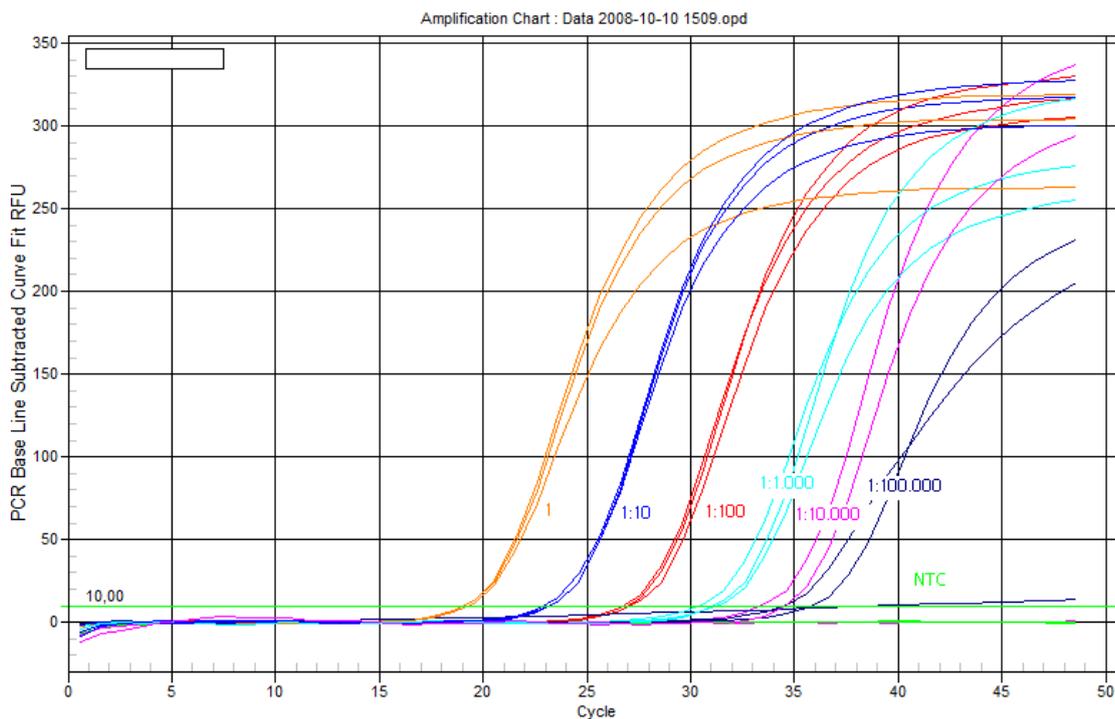


**Abbildung 21: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Standardgerade aus einem Effizienztest mit Verdünnungen aus Probe 18 (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, verlängerte Elongationszeit)**

**Tabelle 21: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich von  $C_T$ -Wert, Effizienz und  $R^2$  bei verschiedener Elongationsdauer (CytOx IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C)**

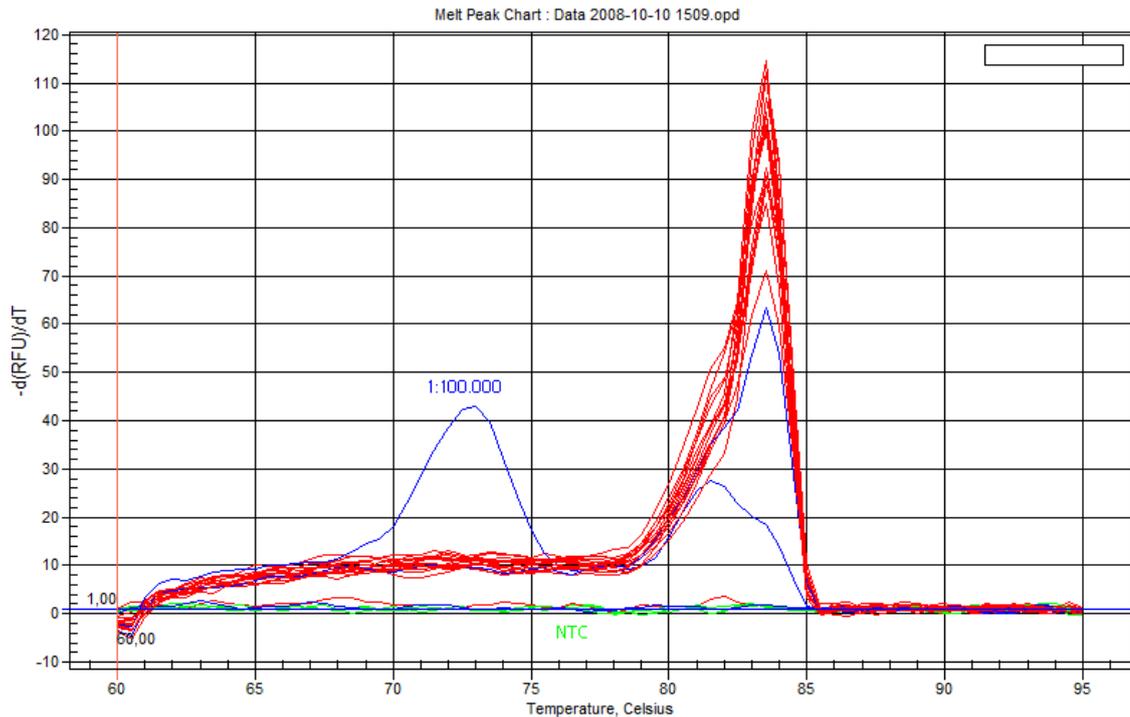
Probe	$C_T$ Mittelwert +/- Standardabweichung		$C_T$ Mittelwert +/- Standardabweichung verlängerte Elongation	
	18 1	18,95	+/- 0,19	19,14
18 1:10	22,91	+/- 0,24	23,11	+/- 0,19
18 1:100	26,43	+/- 0,20	26,95	+/- 0,19
18 1:1.000	29,93	+/- 0,70	30,91	+/- 0,44
18 1:10.000	34,01	+/- 0,59	33,90	+/- 0,83
18 1:100.000	33,98	-	36,26	+/- 2,01
NTC	36,47	+/- 0,55	N/A	-
Effizienz (in %)	94,9		94,0	
$R^2$	0,975		0,976	

Ein Blick auf die Amplifikationskurven bei verlängerter Elongationsphase in Abbildung 22 zeigt allerdings bereits, dass eines der drei Replikate der höchsten Verdünnungsstufe keinen typischen Amplifikationskurvenverlauf zeigt. Die Amplifikationskurve schneidet die auf einen Wert von 10 gesetzte Threshold-Linie zufällig in einem Bereich in dem auch die  $C_T$ -Werte der beiden anderen Replikate liegen. Der resultierende  $C_T$ -Wert für das Replikat kann bestenfalls als Artefakt bezeichnet werden.



**Abbildung 22: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cyt Ox IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 40 s)**

Die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse in Abbildung 23 zeigt außerdem, dass von den insgesamt drei Replikaten der höchsten Verdünnungsstufe nur eines auch einen für Rind spezifischen Peak zeigt. Zur besseren Ersichtlichkeit dieses Ergebnisses wurden alle anderen Verdünnungsstufen in rot eingefärbt, einzig die höchste Verdünnungsstufe 1:100.000 ist in blau zu sehen. Die grünen Linien repräsentieren die NTC.



**Abbildung 23: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Schmelzkurvenanalyse, Cyt Ox IIa / IIb, Annealingtemperatur 60°C, Elongationsdauer 40 s)**

Die Effizienz der Reaktion liegt mit 94,0% bzw. 94,9% bei beiden Elongationsphasen im wünschenswerten Bereich. Das etwas zu niedrige  $R^2$  der Standardgeraden ist vor allem durch die Streuung der Datenpunkte der höchsten Verdünnungsstufe bedingt. Gerade diese Punkte entsprechen aber, wie vorhin bereits erläutert wurde, nicht zwangsläufig auch einem für Rind spezifischen Amplikon. Entfernt man diese Punkte, erhält man für die beiden Versuche  $R^2$  von 99,4% bzw. 99,5%, die durchaus im anzustrebenden Bereich liegen. Dabei fallen allerdings auch die Effizienzen auf 84,5% bzw. 86,7% ab.

Wie aus Tabelle 21 ebenfalls hervorgeht, werden auch für die NTC teilweise  $C_T$ -Werte erhalten. Deswegen wurde in einem weiteren Versuch die Annealingtemperatur auf 61°C gesteigert. Dies führte zu einer großen Streuung der Datenpunkte, bereits bei einer Verdünnung von 1:10.000 ( $C_T$ : 37,95, Standardabweichung: 3,73), sowie einer Abnahme der Effizienz der Reaktion auf 76,3% und ist somit mit nicht wünschenswerten Folgen verbunden.

Zusammenfassend muss man wohl zur Kenntnis nehmen, dass das Primerpaar Cyt Ox IIa / IIb für die Real-time PCR aufgrund seiner Eigenschaften nicht optimal ist. Die Versuche haben gezeigt, dass bei einer Annealingtemperatur von 60°C das Temperaturmaximum erreicht ist, dennoch liefert die NTC bei dieser Temperatur unspezifische Amplifikate. Eine weitere Erhöhung der Annealingtemperatur führt zum Verlust der Empfindlichkeit. Auch die Verlängerung der Elongationsphase von 20 Sekunden auf 40 Sekunden bringt keine Erhöhung der Empfindlichkeit mit sich. Sie begünstigt einzig die Entstehung unspezifischer Produkte.

#### **4.1.2.3 Ergebnisse $\Delta C_T$ -Methode**

Um etwaige Unterschiede in der Anfangs-DNA-Konzentration unterschiedlicher Proben, wie sich etwa durch verschiedene DNA-Isolierungen oder unterschiedliches Probenmaterial ergeben können, auszugleichen, wird ein sogenanntes „Universalprimerpaar“ verwendet. Aufgabe dieses Primerpaares ist es jegliche in der Probe enthaltene DNA im gleichen Ausmaß anzuzeigen. Da man bei Käsen, die aus Kuhmilch, Schafmilch oder einem Gemisch aus beiden hergestellt wurden, davon ausgeht, dass die vorliegende DNA entweder von Kühen oder Schafen entstammt, bedeutet dies für die vorliegende Fragestellung, dass ein Universalprimerpaar gesucht wird, das zu einer Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes führt, die unabhängig davon ob die Matrize aus Kuh- oder Schaf-DNA entstammt, gleiche Effizienz zeigt. Bei gleicher DNA-Konzentration sollten die  $C_T$ -Werte für aus Kuhmilch gewonnenem Probenmaterial also möglichst denen von aus Schafmilch gewonnenem Probenmaterial entsprechen.

Bei der Suche nach einem geeigneten Primerpaar empfiehlt es sich also auf konservierte DNA-Regionen zurückzugreifen. Für die relativ nahe verwandten Spezies Rind und Schaf würde es hierbei schon ausreichen ein Primerpaar zu finden, das in einer bei Säugetieren konservierten DNA-Region angreift. Es spricht allerdings auch nichts dagegen, auf ein Primerpaar zurückzugreifen, das als Universalprimer für eukaryotische DNA verwendet werden kann.

Wie schon in Abschnitt 4.1.1 angeführt, wurden drei verschiedene Primerpaare zunächst mittels PCR auf ihre Eignung hin als Universalprimerpaar untersucht. Da das Ergebnis

der PCR zeigte, dass alle drei Primerpaare potentielle Universalprimerpaare für die Real-time PCR sein könnten, wurden diese drei Primerpaare auch mittels Real-time PCR getestet. Dabei handelte es sich um die Primer L-14735 / H-15149, TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV.

Für jedes dieser Primerpaare wurden Real-time PCR Läufe bei einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt, wobei Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischer Primer eingesetzt wurde. Die  $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte dieser Versuche sind in Tabelle 22 aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen zunächst etwas überraschend negative  $C_T$ -Werte bis zu einem Kuhmilchanteil von 25 bzw. 50%, was darauf schließen lässt, dass die Amplifikation des für Rinder spezifischen DNA-Abschnittes, der von dem Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 begrenzt wird, rascher erfolgt. Auffällig sind auch die äußerst niedrigen  $C_T$ -Werte, die für die Probe M22 für alle getesteten Universalprimer erhalten wurden. Vor allem die beiden eukaryontenspezifischen Primer TR 03 / 04 und 18 SpEUDIR / 18 SpEUINV zeigen erheblich niedrigere  $C_T$ -Werte für M22 verglichen mit den restlichen Proben. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass in der Probe M22 eine höhere DNA-Konzentration enthalten ist als in den anderen Proben. Da die Probe M22 nicht derselben Modellkäsereihe wie der Rest der Proben entstammt, ist nicht klar, ob diese höhere Konzentration auf verschiedene Herstellungsprozesse der Käse oder auf Unterschiede bei der DNA-Isolierung zurückzuführen ist. Allerdings wurde für alle DNA-Isolierungen die gleiche Methodik angewandt. Somit dürfte der Grund für das unterschiedliche Verhalten der Proben wohl im Herstellungsprozess zu finden sein. Ob dieser direkten Einfluss auf den DNA-Gehalt des Käses und somit der Probe oder indirekten Einfluss über unterschiedliches Verhalten bei der DNA-Isolierung oder Amplifizierung ausübt, konnte nicht geklärt werden. Denkbar wäre auch, dass die Proben der Wolfpassinger Modellkäsereihe einen höheren Anteil an PCR-Inhibitoren aufweisen, die auch im DNA-Isolat wiedergefunden werden können. Falls diese Theorie zutrifft, sollte der gleiche Effekt allerdings auch bei der Amplifikation mit speziesspezifischen Primern zu sehen sein.

Auch das Primerpaar L-14735 / H-15149 liefert für die Probe M22 niedrigere  $C_T$ -Werte als zu erwarten wäre. Verglichen mit den beiden anderen Universalprimerpaaren scheint L-14735 / H-15149 allerdings noch am ehesten als Universalprimer einsetzbar zu sein.

**Tabelle 22: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, C<sub>T</sub>- und  $\Delta$ C<sub>T</sub>-Werte unter Einsatz verschiedener Universalprimer und Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer (Annealingtemperatur 55°C)**

Universal- primer	TR 03 / TR 04			18 SpEUDIR / 18 SpEUIINV			L-14735 / H-15149		
	Probe	C <sub>T</sub> CB	C <sub>T</sub> UP	$\Delta$ C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> CB	C <sub>T</sub> UP	$\Delta$ C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> CB	C <sub>T</sub> UP
18 (100% K)	20,64	24,57	-4,14	20,08	23,28	-3,47	20,87	23,14	-2,41
18 (100% K)	20,73	24,98	-4,04	20,56	23,81	-2,99	21,02	23,41	-2,26
17 (75% K)	20,68	22,91	-2,08	20,89	21,97	-1,12	21,11	22,75	-1,71
17 (75% K)	21,23	22,62	-1,54	20,92	22,06	-1,09	21,19	22,88	-1,63
16 (50% K)	21,99	23,67	-1,65	21,67	22,34	-0,60	21,43	22,69	-1,39
16 (50% K)	22,11	23,62	-1,53	21,76	22,21	-0,51	21,44	22,94	-1,38
15 (25% K)	23,20	26,18	-1,44	23,02	22,14	0,96	22,85	22,15	0,91
15 (25% K)	23,23	23,08	-1,41	22,96	22,00	0,89	22,59	21,71	0,66
14 (10% K)	24,49	23,72	0,69	24,00	22,78	1,17	24,13	22,74	1,18
14 (10% K)	24,90	23,87	1,11	24,13	22,88	1,30	24,63	23,17	1,68
13 (5% K)	26,04	24,04	1,81	25,79	23,34	2,27	25,69	22,14	3,63
13 (5% K)	26,13	24,42	1,90	26,14	23,69	2,63	25,66	21,97	3,60
12 (2,5% K)	26,72	22,85	3,84	26,51	22,04	4,41	26,21	22,67	3,70
12 (2,5% K)	26,74	22,91	3,86	26,86	22,15	4,77	26,08	22,35	3,57
11 (1% K)	28,45	23,52	4,94	28,09	22,78	5,33	28,33	23,95	5,21
11 (1% K)	28,36	*	4,84	27,89	22,75	5,12	27,87	22,29	4,75
10 (0,5% K)	28,98	24,50	4,75	28,80	22,72	6,03	28,02	22,08	5,43
10 (0,5% K)	29,31	23,96	5,08	28,74	22,82	5,97	28,85	23,08	6,27
M 22 (0,1% K)	31,16	15,88	15,30	31,62	15,27	16,30	30,77	20,38	10,35
M 22 (0,1% K)	31,81	15,84	15,95	31,78	15,36	16,47	31,13	20,44	10,72
9 (0% K)	35,02	23,84	19,16	34,53	22,89	19,22	34,04	22,06	13,63
9 (0% K)	33,91	23,81	18,05	34,22	22,83	18,91	34,64	22,01	14,23
NTC	N/A	30,52	-	37,38	26,00	-	36,39	N/A	-
NTC	N/A	27,68	-	40,94	23,06	-	34,69	N/A	-

CB... Cow Bottero 1 / Cow Bottero 2

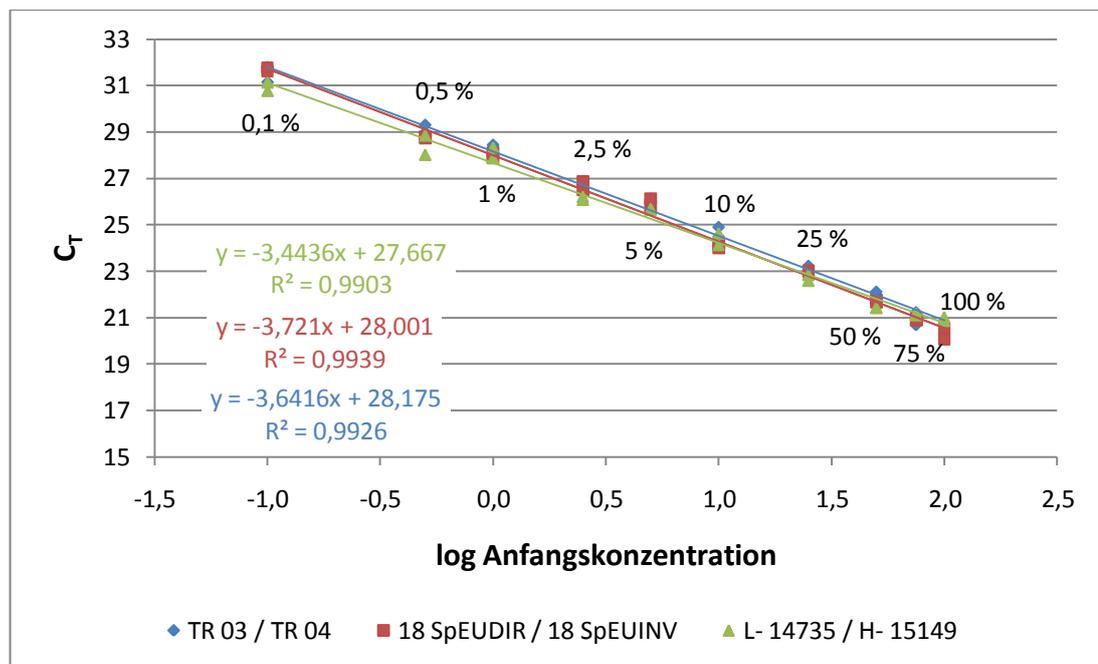
UP... Universalprimer

N/A... nicht nachweisbar

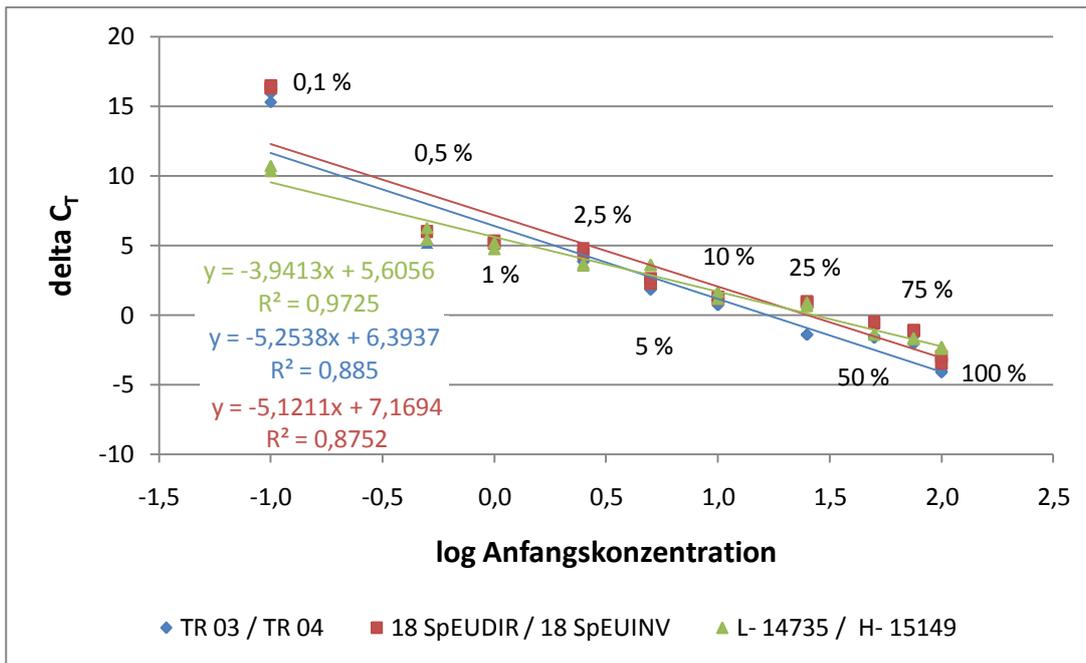
\*der entsprechende C<sub>T</sub>-Wert wurde aufgrund eines irregulären Amplifikationskurvenverlaufes nicht berücksichtigt

Um einen besseren Überblick über die Resultate zu erhalten, wurden die C<sub>T</sub>-Werte und die  $\Delta$ C<sub>T</sub>-Werte jeweils in einem Diagramm gegen den dekadischen Logarithmus der Anfangs-DNA-Konzentration eingetragen und sind in Abbildung 24 und Abbildung 25 zu sehen. Außerdem sind zum Vergleich auch die Geradengleichung der Standardgeraden und deren R<sup>2</sup> dargestellt. Die Ergebnisse, die das speziesspezifische Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 liefert, sind in den drei Läufen durchaus vergleichbar sind. Das

Bestimmtheitsmaß der Standardgeraden liegt für alle Läufe im wünschenswerten Bereich. Lediglich die Steigung der Geraden ist für die beiden Primerpaare TR 03 / TR 04 und 18 SpEUDIR / 18 SpEUINV etwas höher, woraus sich folgern lässt, dass die Synthese des speziesspezifischen Amplikons für den Lauf mit dem Universalprimer L-14735 / H-15149 im Vergleich zu den beiden anderen Läufen mit etwas höherer Effizienz abgelaufen ist. Da die Reaktionen mit speziesspezifischem Primer bzw. Universalprimer separat, also in getrennten Reaktionsgefäßen, durchgeführt wurde, dürfte es sich hierbei um einen Zufallsbefund handeln. Aus Abbildung 25 geht hervor, dass einzig die Kombination aus Cow Bottero 1 / 2 mit dem Universalprimerpaar L-14735 / H-15149 eine Standardgerade mit akzeptablem  $R^2$  liefert. Die Standardgeraden für die beiden anderen Universalprimer werden maßgeblich von den verhältnismäßig extrem niedrigen  $C_T$ -Werten für M22 beeinflusst.

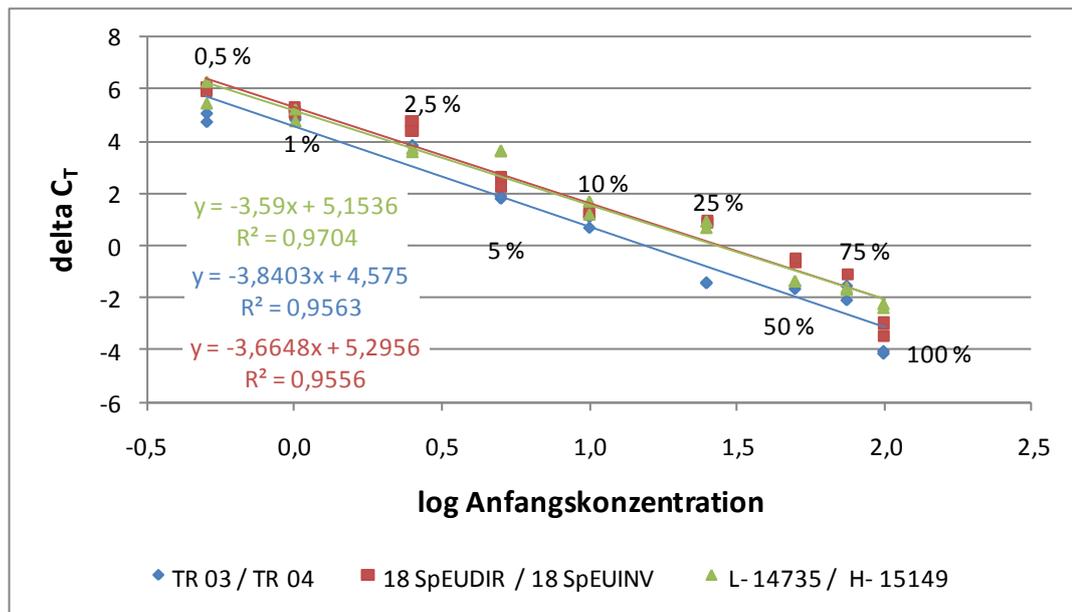


**Abbildung 24: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden ausgewertet nach  $C_T$ -Werten für den speziesspezifischen Primer Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**



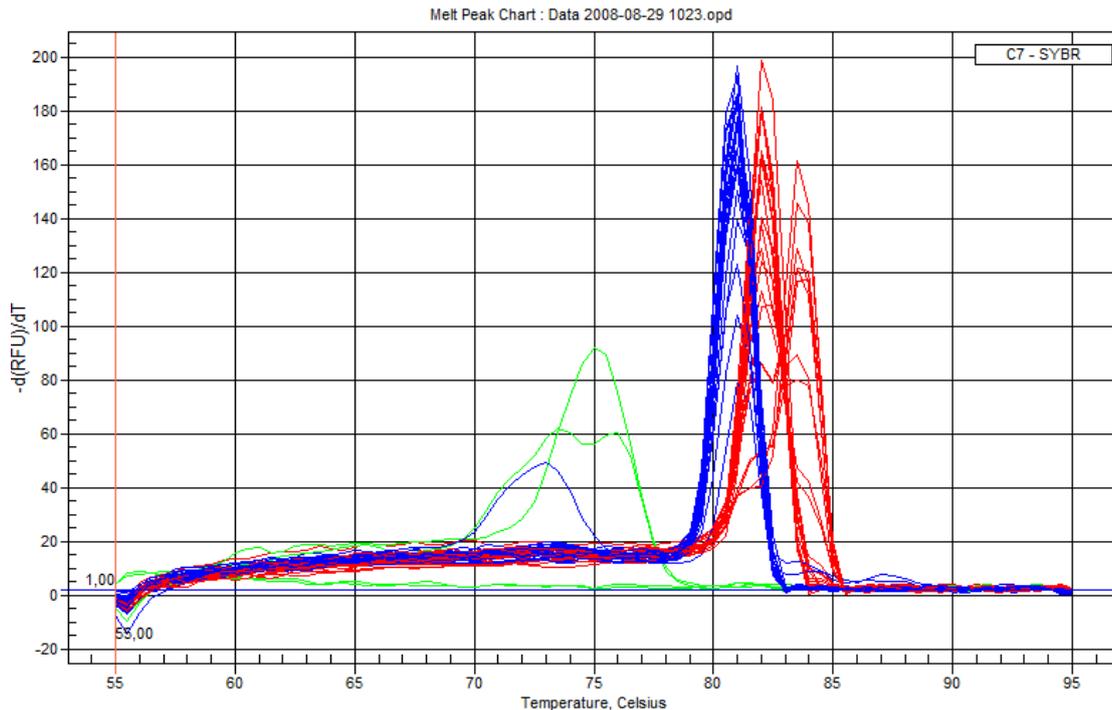
**Abbildung 25: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen**  
 (Standardgeraden ausgewertet nach  $\Delta C_T$ -Werten, speziesspezifischer Primer: Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)

Entfernt man die Probe M22 aus den Standardgeraden, ergibt sich für die Primerpaare TR 03 / 04 und 18 SpEUDIR / 18 SpEUINV zwar ein etwas besseres Bild, die besten Ergebnisse liefert aber nach wie vor das Primerpaar L-14735 / H-15149 wie in Abbildung 26 ersichtlich ist. L-14735 / H-15149 ist unter den getesteten Primerpaaren jenes, das mit den Proben aus den beiden unterschiedlichen Standardreihen Sikic Maja und Wolfpassing die besten Resultate erzielt.



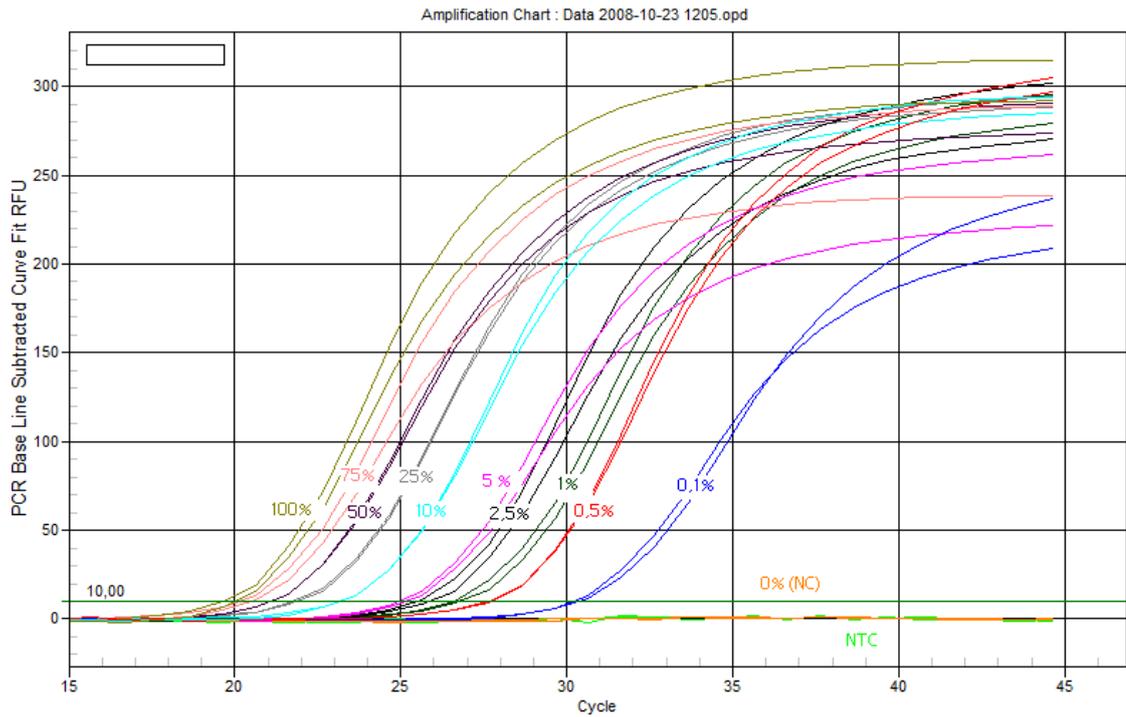
**Abbildung 26: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Standardgeraden ausgewertet nach  $\Delta C_T$ -Werten, ohne M22, speziesspezifischer Primer: Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**

Ein Blick auf die Schmelzkurvenanalyse in Abbildung 27 zeigt, dass für das Amplifikat des Universalprimerpaares L-14735 / H-15149 nicht ein einzelner Peak, sondern zwei Peaks in unmittelbarer Nähe zueinander erhalten werden. Dabei sind die Kurven für die mit Hilfe des Primerpaares Cow Bottero 1 / 2 erhaltenen Amplikons in blau zu sehen, die Kurvenverläufe für die Amplikons von L-14735 / H-15149 sind rot gefärbt und die NTC ist für beide Primerpaare in grün dargestellt. Bei genauerer Betrachtung hat sich herausgestellt, dass für eine Probe aus reinem Schafmilchkäse ein Peak bei etwa 82°C erhalten wird. Dieser Peak tritt mit zunehmendem Kuhmilchanteil im Käse immer mehr in den Hintergrund und es ist ein zweiter Peak bei etwa 83,5°C zu sehen. Alle Käse, die aus einem Gemisch aus Kuhmilch und Schafmilch hergestellt wurden, zeigen also zwei mehr oder weniger ausgeprägte Peaks. Deren Größe ist abhängig vom jeweiligen Kuh- bzw. Schafmilchanteil. Für Käse, der aus reiner Kuhmilch hergestellt wurde, ist schließlich nur noch ein Peak bei etwa 83,5°C sichtbar. Daraus lässt sich folgern, dass das Primerpaar L-14735 / H-15149 zwar sowohl für Käse aus Kuhmilch als auch für Käse aus Schafmilch ein spezifisches Amplikon liefert, dieses möglicherweise aber aufgrund verschiedener Basenabfolgen ein unterschiedliches Schmelzverhalten abhängig von der für die Amplifizierung verwendeten Matrize, zeigt.

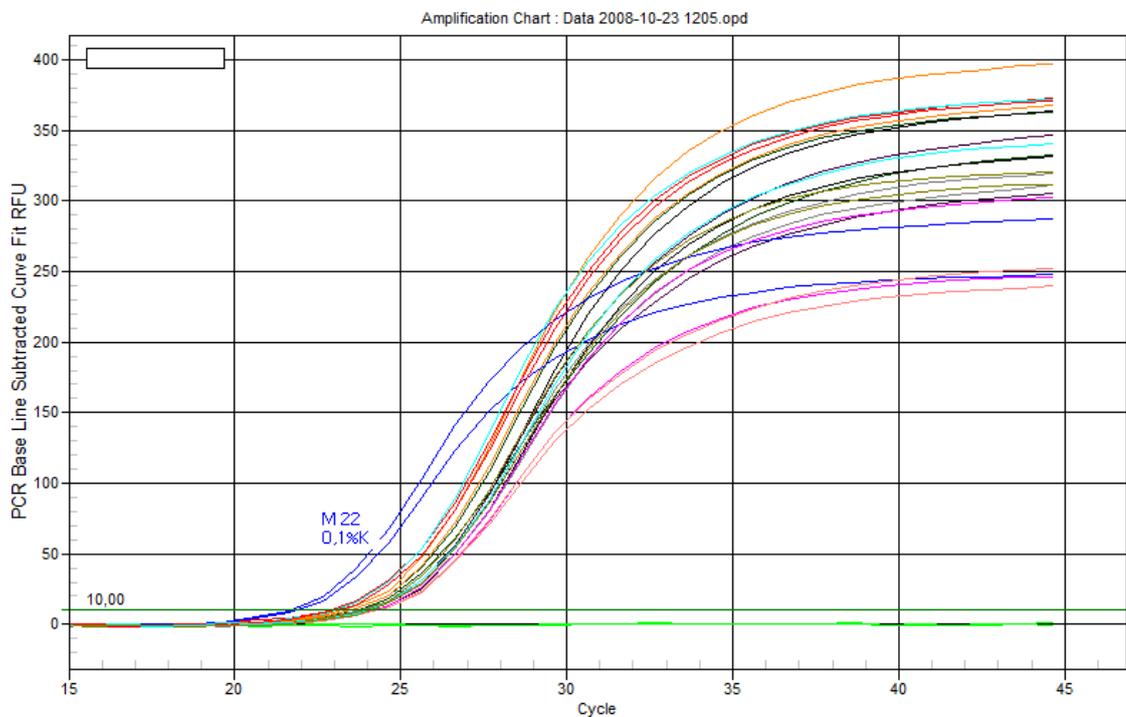


**Abbildung 27: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Schmelzkurvenanalyse, speziesspezifischer Primer: Cow Bottero 1 / 2, Universalprimer: L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 55°C)**

In weiterer Folge wurde ein Temperaturversuch mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer durchgeführt. Dabei wurde die Annealingtemperatur von 55°C auf 57°C, 58°C, 59°C und 60°C gesteigert. In Abbildung 28 und Abbildung 29 sind die Amplifikationskurven des Versuches bei 60°C zu sehen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Kurven dabei in zwei verschiedene Abbildungen entsprechend dem verwendeten Primerpaar geteilt, obwohl die Amplifikation aller Proben in einem einzigen Real-time PCR Lauf erfolgte. Die Farbkodierung in Abbildung 29 entspricht dabei derjenigen in Abbildung 28. Die Prozentangaben beschreiben den jeweiligen Anteil an Kuhmilch im Mischkäse.



**Abbildung 28: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C)**



**Abbildung 29: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen (Amplifikationskurven, L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 60°C)**

Die  $C_T$ -Werte und  $\Delta C_T$ -Werte dieses Versuches sind in Tabelle 23 und Tabelle 24 dargestellt. Aus den beiden Tabellen ist bereits zu sehen, dass die  $\Delta C_T$ -Werte mit steigender Annealingtemperatur tendenziell abnehmen. Außerdem ist festzustellen, dass bei niedrigeren Annealingtemperaturen teilweise auch für die NTC bzw. die Negativkontrolle für den speziesspezifischen Primer  $C_T$ -Werte erhalten werden, wohingegen diese Proben bei der höchsten eingesetzten Annealingtemperatur, nämlich  $60^\circ\text{C}$ , das Ergebnis „nicht nachweisbar“ liefern und somit eindeutig als negativ zu klassifizieren sind. Um einen klaren Vergleich der Resultate zu erhalten, wurden die  $C_T$ -Werte und die  $\Delta C_T$ -Werte wieder jeweils in einem Diagramm gegen den dekadischen Logarithmus der Anfangs-DNA-Konzentration eingetragen und sind in Abbildung 30 und Abbildung 31 zu sehen. Zum Vergleich sind auch die Geradengleichung der Standardgeraden und deren  $R^2$  dargestellt. Abbildung 30 zeigt, dass sich nach der Auswertung anhand der Daten, die das speziesspezifische Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 liefert, nur geringfügige Unterschiede in Lage und Steigung der Standardgeraden ergeben. Auch hier ist aber zu erkennen, dass die Standardgerade, die bei einer Annealingtemperatur von  $55^\circ\text{C}$  erhalten wurde, die höchsten  $C_T$ -Werte liefert, wohingegen eine Annealingtemperatur von  $60^\circ\text{C}$  die niedrigsten  $C_T$ -Werte ergibt. Die Steigungen der Standardgeraden sind durchwegs vergleichbar, einzig der Real-time PCR Lauf bei einer Annealingtemperatur von  $59^\circ\text{C}$  zeigt eine etwas höhere Steigung der Geraden. Somit dürfte die Reaktion hier mit etwas niedrigerer Effizienz abgelaufen sein. Aus Abbildung 31 geht hervor, dass die Standardgeraden derselben Real-time PCR Läufe etwas weiter voneinander entfernt liegen, wenn die Daten mit Hilfe der  $\Delta C_T$ -Methode ausgewertet werden. Wie bereits in der vorhergehenden Abbildung liegt auch hier die Gerade für die Annealingtemperatur von  $55^\circ\text{C}$  am höchsten und diejenige für eine Temperatur von  $60^\circ\text{C}$  liefert die niedrigsten  $\Delta C_T$ -Werte. Außerdem ist zu sehen, dass sich die Standardgeraden in ihren Steigungen kaum unterscheiden.

**Tabelle 23: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen,  $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte des Temperaturversuches mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Annealingtemperaturen 55°C, 57°C, 58°C)**

Annealing- temperatur	55°C			57°C			58°C			
	Probe	$C_T$ CB	$C_T$ UP	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ UP	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ UP	$\Delta C_T$
	18 (100% K)	20,87	23,14	-2,41	20,08	22,44	-3,21	19,85	22,89	-3,09
	18 (100% K)	21,02	23,41	-2,26	20,27	24,14	-3,02	19,91	22,99	-3,03
	17 (75% K)	21,11	22,75	-1,71	20,88	22,67	-1,88	20,65	23,20	-2,55
	17 (75% K)	21,19	22,88	-1,63	21,07	22,85	-1,69	20,65	23,20	-2,55
	16 (50% K)	21,43	22,69	-1,39	21,43	22,67	-1,19	20,98	22,97	-1,92
	16 (50% K)	21,44	22,94	-1,38	21,31	22,56	-1,31	21,08	22,83	-1,82
	15 (25% K)	22,85	22,15	0,91	22,65	23,53	-0,46	22,08	22,57	-0,40
	15 (25% K)	22,59	21,71	0,66	22,43	22,68	-0,67	22,07	22,39	-0,41
	14 (10% K)	24,13	22,74	1,18	23,66	22,02	1,35	23,42	22,48	0,82
	14 (10% K)	24,63	23,17	1,68	23,78	22,60	1,47	23,68	22,72	1,08
	13 (5% K)	25,69	22,14	3,63	25,31	22,72	2,58	25,18	22,92	2,23
	13 (5% K)	25,66	21,97	3,60	25,46	22,75	2,72	24,90	23,00	1,94
	12 (2,5% K)	26,21	22,67	3,70	26,14	22,69	3,41	25,69	23,03	2,75
	12 (2,5% K)	26,08	22,35	3,57	26,08	22,78	3,35	25,65	22,84	2,72
	11 (1% K)	28,33	23,95	5,21	27,42	22,34	5,19	27,06	22,77	4,52
	11 (1% K)	27,87	22,29	4,75	27,20	22,12	4,97	26,84	22,30	4,30
	10 (0,5% K)	28,02	22,08	5,43	27,80	21,98	5,79	27,37	22,19	5,04
	10 (0,5% K)	28,85	23,08	6,27	28,13	22,03	6,12	27,72	22,46	5,39
	M 22 (0,1% K)	30,77	20,38	10,35	30,21	20,50	9,75	30,63	20,65	10,02
	M 22 (0,1% K)	31,13	20,44	10,72	30,73	20,42	10,27	29,64	20,57	9,03
	9 (0% K)	34,04	22,06	13,63	34,23	21,70	13,77	37,22	22,58	16,61
	9 (0% K)	34,64	22,01	14,23	34,62	21,89	14,16	N/A	22,36	-
	NTC	36,39	N/A	-	N/A	N/A	-	35,49	N/A	-
	NTC	34,69	N/A	-	N/A	41,37	-	34,04	43,39	-

**Tabelle 24: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen,  $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte des Temperaturversuches mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Annealingtemperaturen 59°C und 60°C)**

Annealing- temperatur	59°C			60°C		
	Probe	$C_T$ CB	$C_T$ UP	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ UP
18 (100% K)	19,05	22,51	-3,44	19,68	23,88	-4,27
18 (100% K)	19,03	22,48	-3,46	20,03	24,02	-3,92
17 (75% K)	20,66	23,82	-3,04	20,53	24,27	-3,75
17 (75% K)	20,53	23,59	-3,17	20,14	24,28	-4,13
16 (50% K)	21,11	22,89	-1,94	21,12	23,95	-2,86
16 (50% K)	21,16	23,19	-1,88	21,06	24,00	-2,91
15 (25% K)	21,95	23,05	-1,14	21,76	23,94	-2,08
15 (25% K)	22,20	23,11	-0,89	21,87	23,74	-1,97
14 (10% K)	23,63	23,13	0,35	23,11	22,97	-0,36
14 (10% K)	23,36	23,43	0,08	23,19	23,97	-0,28
13 (5% K)	24,83	23,36	1,70	25,09	24,28	0,88
13 (5% K)	24,37	22,90	1,24	24,92	24,16	0,70
12 (2,5% K)	25,55	23,23	2,35	25,52	23,92	1,48
12 (2,5% K)	25,77	23,17	2,58	25,88	24,16	1,84
11 (1% K)	27,72	24,18	3,52	26,58	23,46	3,01
11 (1% K)	27,61	24,22	3,41	26,78	23,68	3,21
10 (0,5% K)	28,31	23,68	4,37	27,63	22,86	4,70
10 (0,5% K)	29,09	24,19	5,16	27,75	23,00	4,82
M 22 (0,1% K)	30,55	20,92	9,51	30,16	21,88	8,36
M 22 (0,1% K)	30,98	21,16	9,94	30,40	21,70	8,60
9 (0% K)	34,68	24,60	13,64	N/A	23,17	-
9 (0% K)	35,57	24,74	14,53	N/A	23,39	-
NTC	N/A	N/A	-	N/A	N/A	-
NTC	N/A	N/A	-	N/A	N/A	-

CB... Cow Bottero 1 / Cow Bottero 2

UP... Universalprimer

N/A... nicht nachweisbar

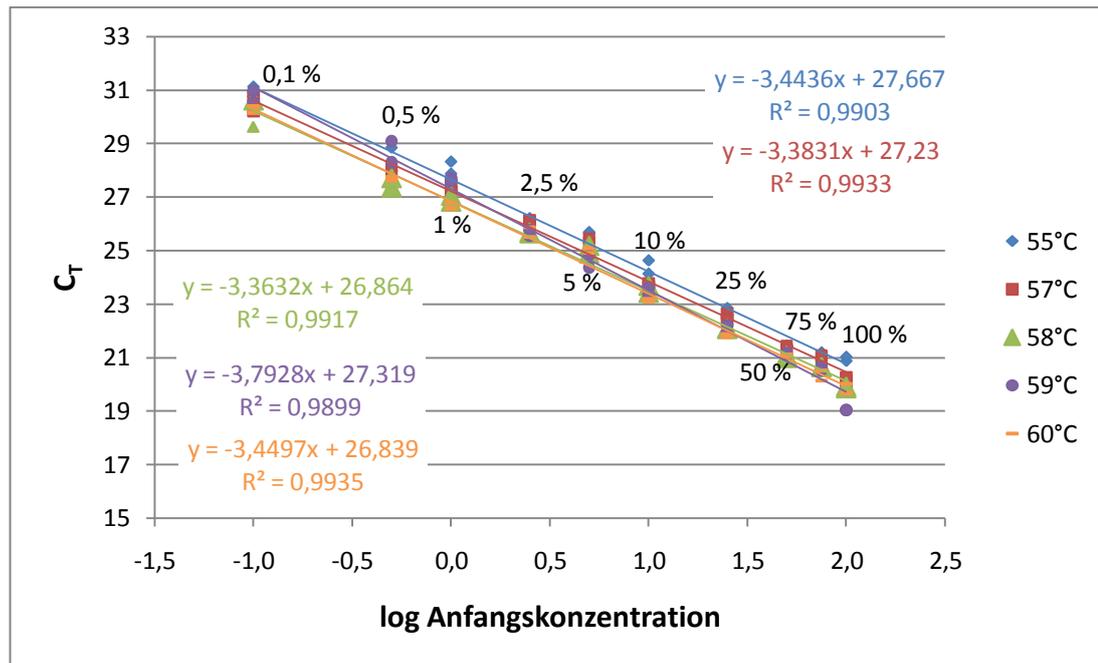


Abbildung 30: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Temperaturversuch mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Standardgeraden ausgewertet nach  $C_T$ -Werten für den speziesspezifischen Primer)

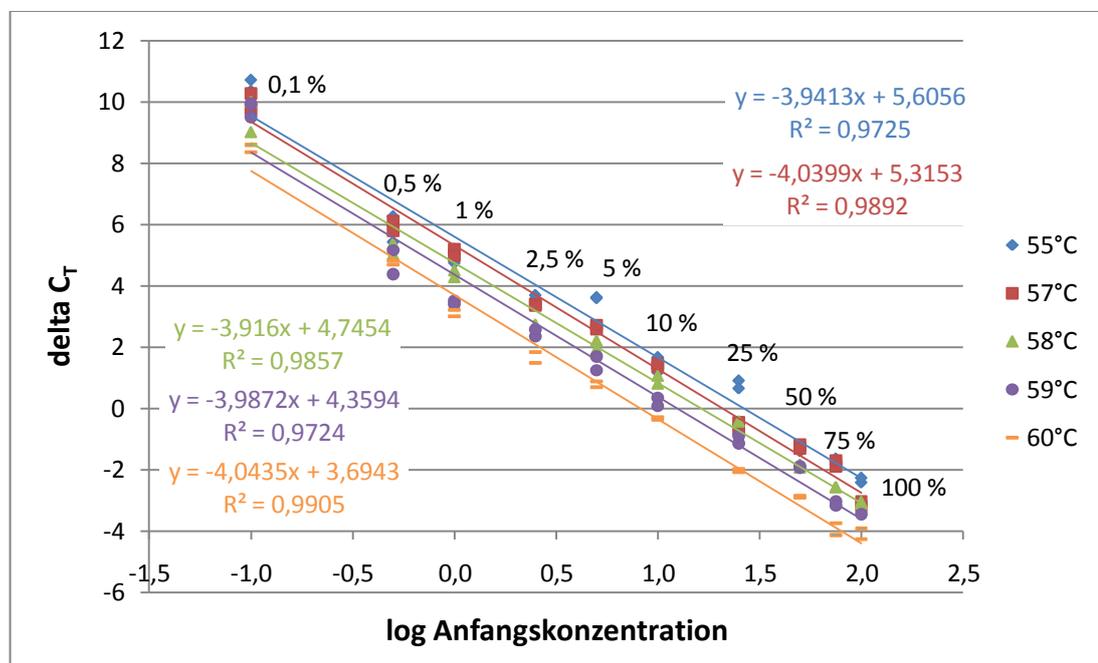


Abbildung 31: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Temperaturversuch mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer und L-14735 / H-15149 als Universalprimer (Standardgeraden ausgewertet nach  $\Delta C_T$ -Werten)

Da in den oben angeführten Ergebnissen nur die Effizienz der Reaktion des speziesspezifischen Primers aus der Steigung der Standardgeraden abgelesen werden kann, wurden auch Effizienztests mit dem als Universalprimer verwendeten Primerpaar L-14735 / H-15149 durchgeführt. Hierzu wurden sowohl aus der Probe 9, die aus reinem Schafmilchkäse isoliert wurde, wie auch der Probe 18, die ja aus reinem Kuhmilchkäse besteht, jeweils eine Verdünnungsreihe mit folgenden Verdünnungsstufen hergestellt: 1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000. Mit beiden Verdünnungsreihen wurden schließlich sowohl bei 57°C als auch bei 60°C Real-time PCR Läufe durchgeführt. Wie aus Tabelle 25 hervorgeht, liefert für die Verdünnungsreihe aus Probe 18 die Reaktion bei 60°C dabei die bessere Effizienz, wohingegen das Bestimmtheitsmaß der Standardgeraden bei 57°C definitiv besser ist. Allerdings konnten bei 57°C zwei der drei Replikate der höchsten Verdünnungsstufe 1:100.000 nicht mehr nachgewiesen werden. Da die höchste Verdünnung zumeist auch die höchste Streuung in den  $C_T$ -Werten zeigt, könnte das eine Erklärung für das bessere Ergebnis des Real-time PCR Laufes bei 57°C sein.

**Tabelle 25: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Effizienztest mit dem Primerpaar L-14735 / H-15149, Verdünnungsreihe aus Probe 18**

Annealing- temperatur	57°C		60°C	
	Probe	$C_T$ Mittelwert +/- Standardabweichung	$C_T$ Mittelwert +/- Standardabweichung	
	18 1	23,59 +/- 0,08	23,05 +/- 0,28	
	18 1:10	27,37 +/- 0,18	27,49 +/- 0,61	
	18 1:100	32,05 +/- 0,02	30,56 +/- 0,12	
	18 1:1.000	35,45 +/- 0,46	34,80 +/- 1,88	
	18 1:10.000	40,76 -	37,24 +/- 0,90	
	NTC	N/A -	N/A -	
	Effizienz (in %)	74,2	90,6	
	$R^2$	0,994	0,968	

Für die Probe 9 ergibt sich in Tabelle 26 ein ähnliches Bild. Auch hier ist die Reaktionseffizienz des Real-time PCR Laufes bei 60°C höher als bei 57°C, wohingegen die Regression der Standardgerade bei 57°C ein geringfügig besseres Ergebnis zeigt. Bei beiden Annealingtemperaturen wurden allerdings nur für zwei der drei Replikate der höchsten Verdünnungsstufe 1:10.000  $C_T$ -Werte erhalten. Für die dritte Bestimmung

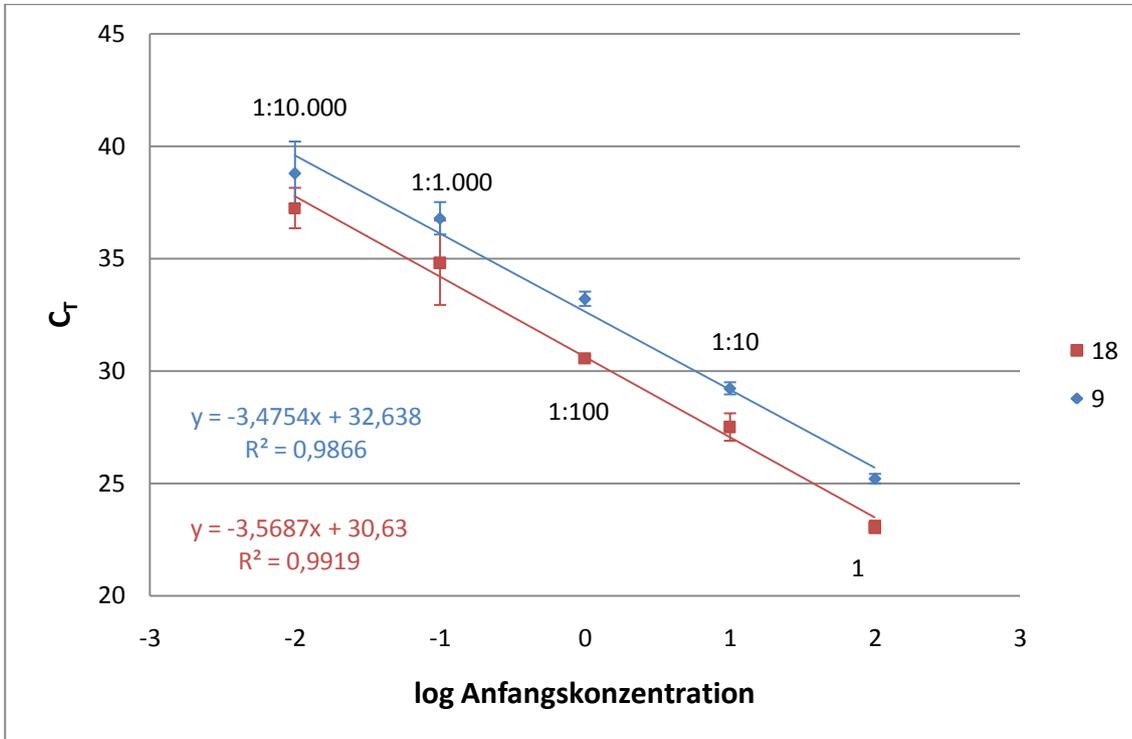
wurde das Ergebnis „nicht nachweisbar“ erhalten. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die Verdünnungsreihe aus der Schafmilchkäseprobe als auch die Verdünnungsreihe aus der Kuhmilchkäseprobe eine zufriedenstellende Reaktionseffizienz zeigt. Außerdem liegen beide Werte in vergleichbaren Größenordnungen. Will man Proben aus Mischungen verschiedener Spezies vergleichen, sollten diese vom jeweiligen Primerpaar mit ähnlicher Effizienz amplifiziert werden [FAJARDO et al., 2008]. Die mittleren  $C_T$ -Werte der jeweiligen Real-time PCR Läufe bei 60°C unterscheiden sich zwar, abhängig von der Verdünnungsstufe um zumindest 1,5  $C_T$ , dennoch kann dies nicht als hinreichender Beweis dafür angesehen werden, dass die Amplifikation für eine der beiden Verdünnungsreihen effizienter erfolgt, da die Anfangskonzentration der DNA nicht standardisiert wurde und die Bestimmungen außerdem in zwei getrennt voneinander durchgeführten Real-time PCR Läufen erfolgte.

**Tabelle 26: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Effizienztest mit dem Primerpaar L-14735 / H-15149, Verdünnungsreihe aus Probe 9**

Annealing- temperatur	57°C		60°C	
	Probe	$C_T$ Mittelwert +/- Standardabweichung	$C_T$ Mittelwert +/- Standardabweichung	$C_T$ Mittelwert +/- Standardabweichung
	9 1	24,08 +/- 0,144	25,20 +/- 0,210	
	9 1:10	27,91 +/- 0,255	29,22 +/- 0,269	
	9 1:100	32,31 +/- 0,521	33,20 +/- 0,318	
	9 1:1.000	37,34 +/- 1,324	36,78 +/- 0,721	
	9 1:10.000	40,07 +/- 0,282	38,79 +/- 1,406	
	NTC	36,43 -	N/A -	
	Effizienz (in %)	73,3	94,2	
	$R^2$	0,984	0,979	

Abbildung 32 zeigt den Vergleich der beiden Standardgeraden, die aus den Real-time PCR Läufen mit den Verdünnungsreihen aus Probe 9 und Probe 18 bei einer Annealingtemperatur von 60°C erhalten wurden. Der Mittelwert der  $C_T$ -Werte wurde dabei gegen den dekadischen Logarithmus der Anfangs-DNA-Konzentration aufgetragen. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die jeweilige Standardabweichung, die sich für die Dreifachbestimmung einer Verdünnungsstufe ergibt. Die Geradengleichungen der beiden Standardgeraden, die ebenfalls im Diagramm

dargestellt werden, zeigen eine ähnliche Steigung. Auch im Diagramm selbst ist zu sehen, dass die beiden Geraden nahezu parallel verlaufen. Daraus ergeben sich, die bereits in Tabelle 25 und Tabelle 26 dargestellten ähnlichen Reaktionseffizienzen.



**Abbildung 32: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Schafmischkäsen, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 9 (Schaf) und Probe 18 (Kuh), (Standardgeraden, L-14735 / H-15149, Annealingtemperatur 60°C)**

Die Untersuchungen mittels konventioneller PCR haben gezeigt, dass sich ein Kuhmilchanteil von bis zu 0,1 % in Schafkäse problemlos mit den beiden getesteten rinderspezifischen Primerpaaren Cow Bottero 1 / 2 und CytOx IIa / IIb nachweisen lässt. Dabei hat sich die Annealingtemperatur von 57°C als optimal für Cow Bottero 1 / 2 erwiesen. Für CytOx IIa / IIb wurde ein Temperaturoptimum von 60°C festgelegt. Anhand der Stärke der Banden ließ sich des Weiteren eine semi-quantitative Abschätzung des Kuhmilchanteils vornehmen, die allerdings nur sehr grobe Schätzungen zulässt. Es war kein Unterschied im Verhalten der Standards aus den unterschiedlichen Standardreihen (Modellkäsereihe Wolfpassing und Modellkäsereihe Sikic Maja) feststellbar.

Die anschließenden Versuche mittels Real-time PCR haben zunächst einmal gezeigt, dass die Vorversuche mit konventionellen PCR-Methoden zwar eine Indikation für die optimalen Annealingtemperaturen geben, sich diese aber wie im Falle des Primerpaares Cow Bottero 1 / 2, auch wesentlich voneinander unterscheiden können. So hat sich bei der Real-time PCR eine um 3°C höhere Annealingtemperatur von 60°C als optimal für dieses Primerpaar erwiesen. Hierbei ist zu beachten, dass für PCR bzw. Real-time PCR unterschiedliche DNA-Polymerasen eingesetzt worden sind. Außerdem unterscheiden sich auch die Mastermixe in ihren Konzentrationen der einzelnen Komponenten und schließlich ist noch anzumerken, dass für die Real-time PCR ein wesentlich strafferes Thermoprotokoll mit kürzeren Denaturierungs-, Annealings- und Elongationsphasen verwendet worden ist.

Unter den beschriebenen Bedingungen kann mittels Real-time PCR zweifelsfrei zwischen einer Schafkäseprobe mit 0,1% Kuhmilchanteil und der Negativkontrolle aus reinem Schafkäse unterschieden werden und zwar einzig durch den Einsatz eines rinderspezifischen Primerpaares. Will man diesen Kuhmilchanteil quantifizieren, so gestaltet sich die Analyse etwas schwieriger. Um etwaige Unterschiede in der Konzentration an amplifizierbarer DNA in der Probe berücksichtigen zu können, muss zusätzlich zu einem speziesspezifischen Primerpaar für Rind auch ein Universalprimerpaar verwendet werden, das als endogene Kontrolle fungieren soll. Aus den Effizienztests, die mit je einer Verdünnungsreihe aus einer Kuhmilchkäseprobe und einer Schafmilchkäseprobe durchgeführt worden sind, geht hervor, dass das Primerpaar L-14735 / H-15149 bei einer Annealingtemperatur von 60°C zufriedenstellende Reaktionseffizienzen für beide Verdünnungsreihen liefert. Kombiniert man nun Universalprimerpaar und speziesspezifischen Primer und setzt ihn für die Standardreihe, die aus den Modellkäseserien Wolfpassing und Sikic Maja zusammengestellt worden ist, ein, wird sehr schnell ein Problem dieser Methodik aufgezeigt, nämlich dass unterschiedliche Herstellungsverfahren bei der Verarbeitung von Lebensmitteln ein unterschiedliches Verhalten bei der Amplifikation der daraus gewonnenen DNA bedingen können. In einer Publikation aus dem Jahre 2008, die sich mit dem Nachweis von Rindergewebe in Lebens- und Futtermitteln auseinandersetzt, wird daher festgehalten, dass die Standardreihe, die zur Kalibrierung verwendet wird, nicht nur aus dem gleichen Gewebe gewonnen werden sollte, wie die zu analysierenden unbekannt

Proben, sondern auch demselben Verarbeitungsprozess unterzogen werden sollte [MARTIN et al., 2008].

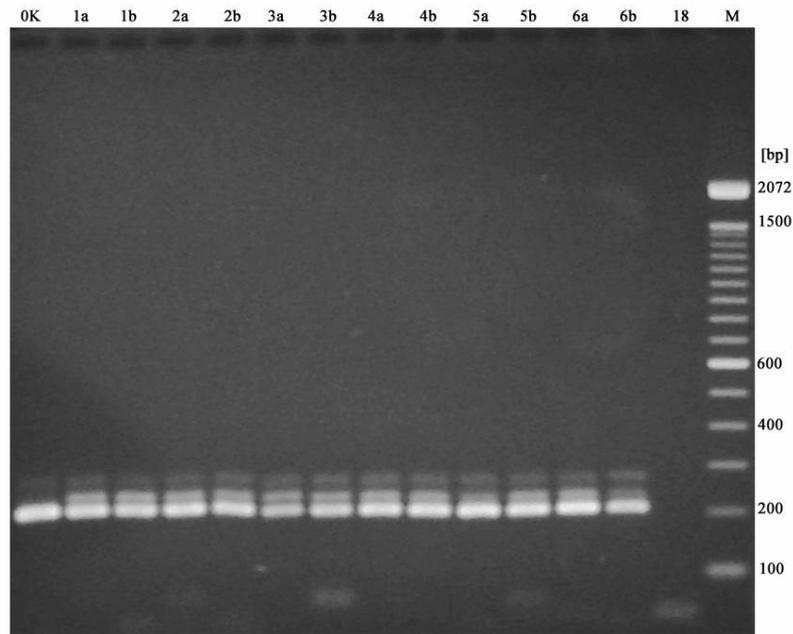
## **4.2 Nachweis und Bestimmung von Kuhmilchanteilen in Sojamilchprodukten**

### **4.2.1 Qualitativer Nachweis mittels PCR und Gelelektrophorese**

Auch für diese Aufgabenstellung wurden zu Beginn zwei verschiedene DNA-Polymerasen und zwei unterschiedliche Thermocycler Modelle eingesetzt. Die angeführten Ergebnisse wurden ausschließlich unter Verwendung der DNA-Polymerase „Go Taq“ und der Thermocycler vom Typ „Hybaid PCR Sprint“ erhalten. Wie bereits beim Nachweis von Kuhmilchbestandteilen in Schafmilchprodukten festgestellt werden konnte, lieferte diese Kombination für die durchgeführten Untersuchungen höhere Ausbeuten an PCR-Produkten und somit stärkere Signale der einzelnen Banden sowie bessere Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse.

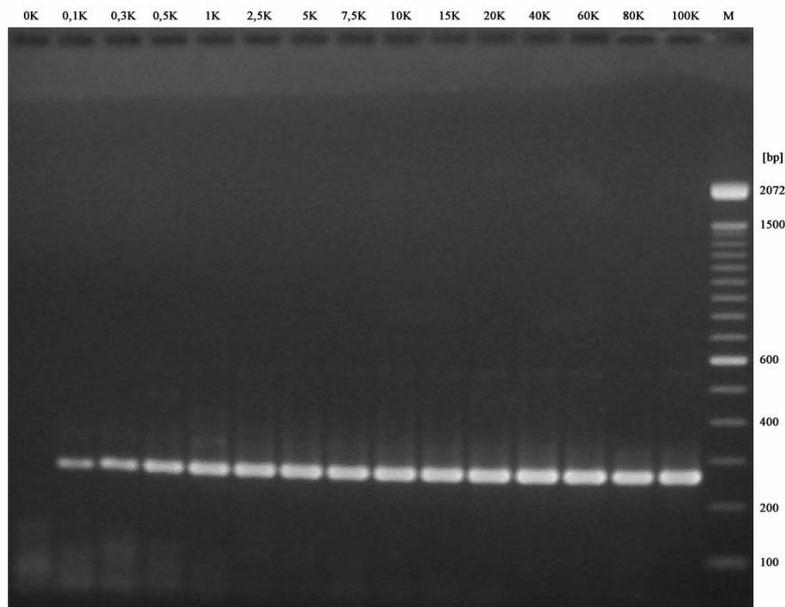
Zur Bestimmung von Kuhmilchanteilen in Sojamilchprodukten wurde eine Standardmischungsreihe aus Soja- und Kuhmilch herangezogen um zu überprüfen, ob die gewählte Methodik grundsätzlich für diese Fragestellung geeignet ist. Zusätzlich wurden auch im Handel erhältliche Sojamilchprodukte auf etwaige Kuhmilchzumischungen untersucht.

Nach der DNA-Isolierung aus den Handelsproben wurde zunächst mit Hilfe eines für Soja spezifischen Primerpaares geprüft, ob amplifizierbare DNA gewonnen werden konnte. Dabei wurde das Primerpaar Gly 30K-6F/Gly 30K-6R bei einer Annealingtemperatur von 62°C eingesetzt. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, wurde diese Voraussetzung von allen Isolaten erfüllt.



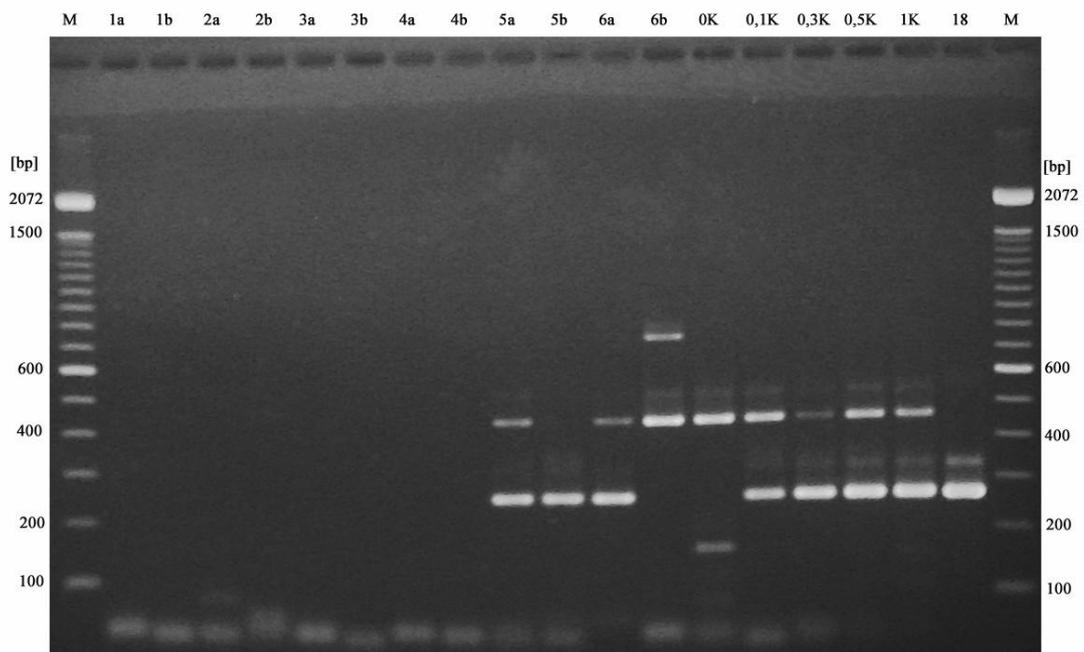
**Abbildung 33: Sojaspezifische PCR (Gly 30K-6F / Gly 30K-6R, Annealingtemperatur 62°C)**

Anschließend wurde versucht mit Hilfe des für Rind spezifischen Primerpaares Cow Bottero 1 / 2 einen qualitativen Nachweis auf Kuhmilchbestandteile zu führen. Hierbei wurde zunächst eine Mischungsreihe aus Sojamilch und Kuhmilch herangezogen um festzustellen, ob das gewählte Primerpaar für die Problemstellung grundsätzlich einsetzbar ist. Abbildung 34 zeigt, dass das Primerpaar den Nachweis von Kuhmilch in Sojamilchprodukten bei einer Annealingtemperatur von 55°C erbringen kann. Außerdem ist zu sehen, dass im Gegensatz zu den vorhin präsentierten Ergebnissen, die beim Nachweis von Kuhmilchbestandteilen in Schafmilchprodukten erhalten worden sind, auch bei einer Annealingtemperatur von 55°C keinerlei Probleme mit der Negativkontrolle (Position 0K), die in diesem Fall aus einer Probe aus 100% Sojamilch besteht, auftreten. Dieser Umstand ist wohl darauf zurückzuführen, dass die phylogenetische Verwandtschaft zwischen Rind und Schaf wesentlich enger ist als diejenige zwischen Rind und Soja.



**Abbildung 34: Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**

Es wurden dennoch einige Temperaturversuche durchgeführt um die optimale Annealingtemperatur des Primerpaares für diese Versuchsreihe festzulegen. Dabei konnte aus den Ergebnissen der Kuh-Schafmischungsreihe schon darauf geschlossen werden, dass auch für die Sojaprobe bzw. die Standards der Kuh-Sojamilchmischungsreihe die optimale Annealingtemperatur für Cow Bottero 1 / 2 im Bereich zwischen 55°C und 57°C liegen sollte. Um vergleichbare Resultate zu erhalten wurde zunächst trotzdem bei 50°C gestartet. Für diese Temperaturversuche wurden die zwölf Handelsproben sowie sechs Proben aus der Kuh-Sojamilchmischungsreihe herangezogen. Neben einer Positiv- und Negativkontrolle (aus 100% Kuhmilch bzw. 100% Sojamilch) wurden auch noch vier Proben aus der Standardreihe mit geringem Kuhmilchanteil (0,1% K, 0,3% K, 0,5% K, 1% K) verwendet, da bereits vermutet werden konnte, dass eine etwaige Kontamination der Sojamilchprodukte im Spurenbereich liegen würde.



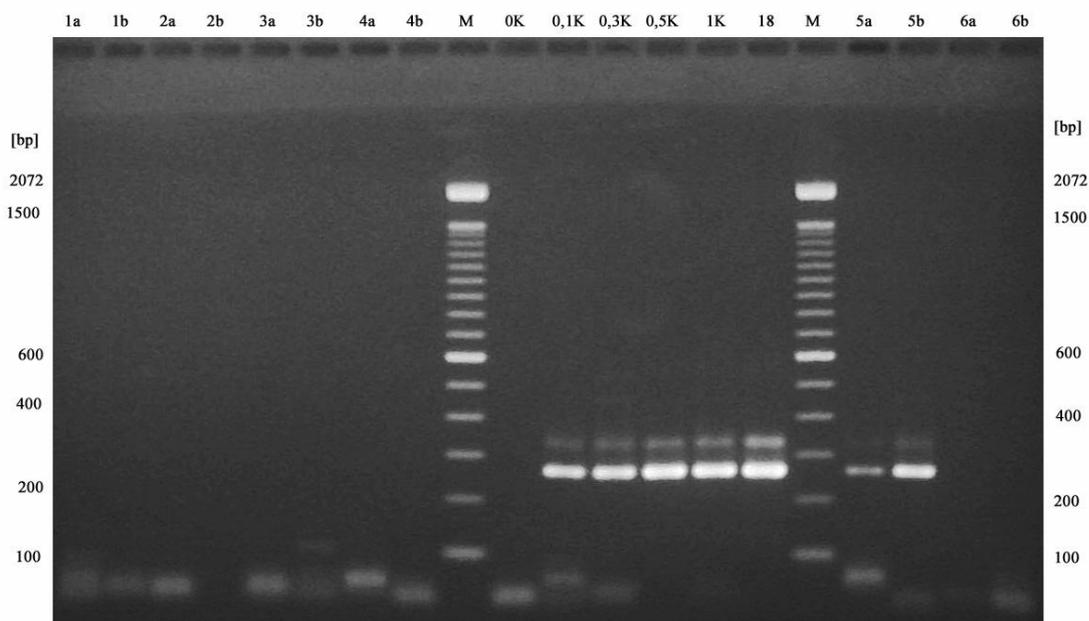
**Abbildung 35: Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 50°C)**

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, gibt es auch bei dieser relativ niedrigen Temperatur keine Probleme mit der Negativkontrolle (Position 0K) und der Anstieg der Bandenintensität bei den Standards der Kuh-Sojamischungsreihe ist gut erkennbar. Auch die Handelsproben 5a, 5b und 6a weisen eine deutliche für Kuh spezifische Bande bei 256 bp auf. Allerdings zeigt das Bild neben der spezifischen Bande für das Primerpaar bei 256 bp eine Reihe weiterer unspezifischer Banden. Vor allem im Hinblick darauf, dass dasselbe Primerpaar auch für die Real-time PCR mit dem Farbstoff SYBR Green verwendet werden soll, erscheint diese Annealingtemperatur nicht optimal.

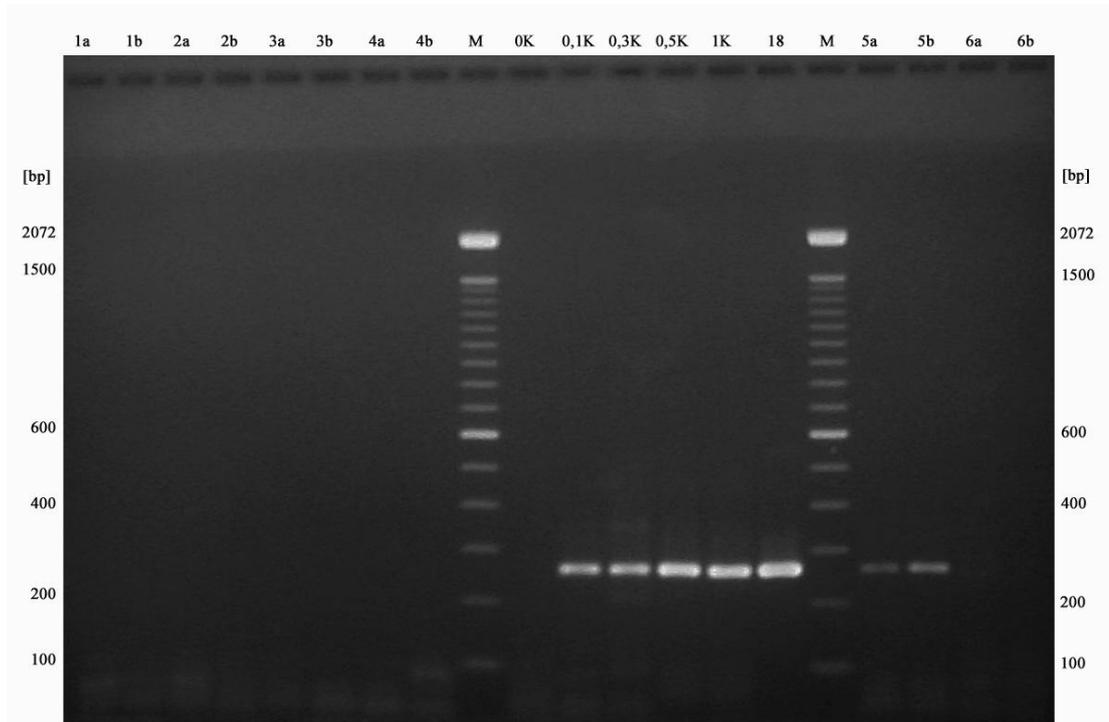
In weiterer Folge wurde die Annealingtemperatur auf 55°C, 56°C, 57°C und 58°C gesteigert. Wie die folgenden Abbildungen demonstrieren, bereitet die Amplifikation des für Kuh spezifischen Produktes bei den Standards der Kuh-Sojamischungsreihe im Temperaturbereich von 55°C bis 57°C keine Probleme. Die Annealingtemperatur von 58°C ist zu hoch gewählt und führt zum Verlust bzw. zur deutlichen Abschwächung aller Banden. Die optimale Annealingtemperatur für das Primerpaar Cow Bottero 1 / 2

liegt im Bereich von 55°C bis 56°C. Aufgrund der höheren Signalintensität ist hierbei der Temperatur von 55°C der Vorzug zu geben.

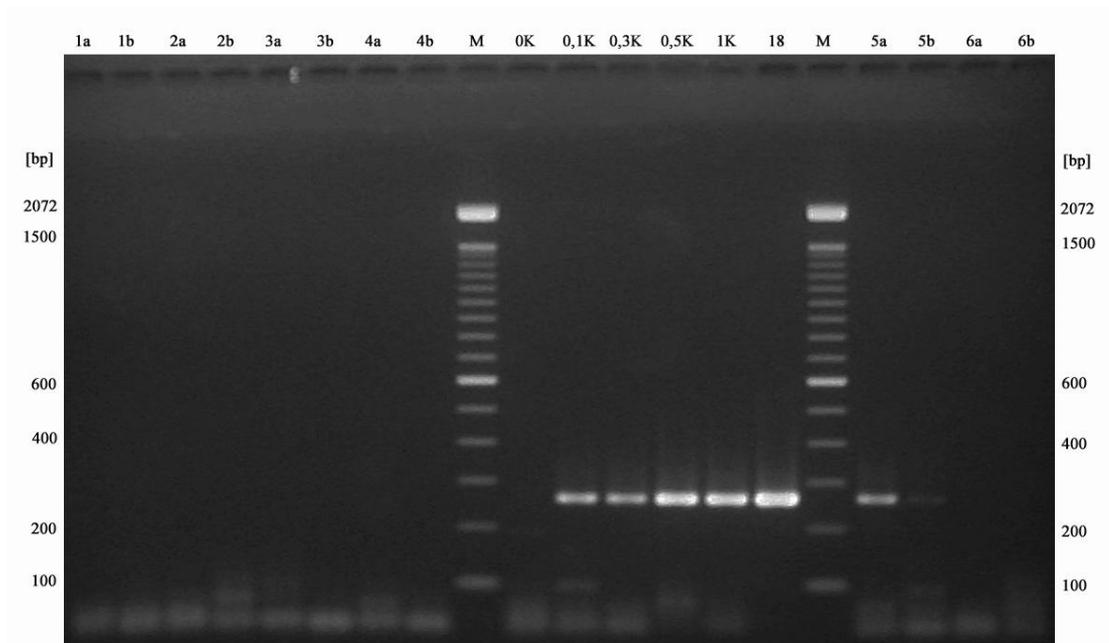
Für die Handelsproben 1a bis 4b wird, wie bereits bei 50°C, auch bei einer Annealingtemperatur von 55°C bis 57°C kein für Kuh spezifisches Amplikon erhalten. Für die Handelsproben 5a und 5b kann bei allen gezeigten Annealingtemperaturen mit Ausnahme der 58°C die für Kuh spezifische Bande bei 256 bp nachgewiesen werden. Bei 50°C ist darüber hinaus auch eine spezifische Bande bei der Handelsprobe 6a zu sehen. Diese Bande wird in sehr abgeschwächter Form auch bei einer Annealingtemperatur von 56°C erhalten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Handelsproben der Sojaprodukte 5a und 5b auf jeden Fall mit Kuhmilch kontaminiert sind. Bei der Probe 6a liegt möglicherweise eine geringfügige Kontamination vor, die mit der gewählten Methodik nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden kann.



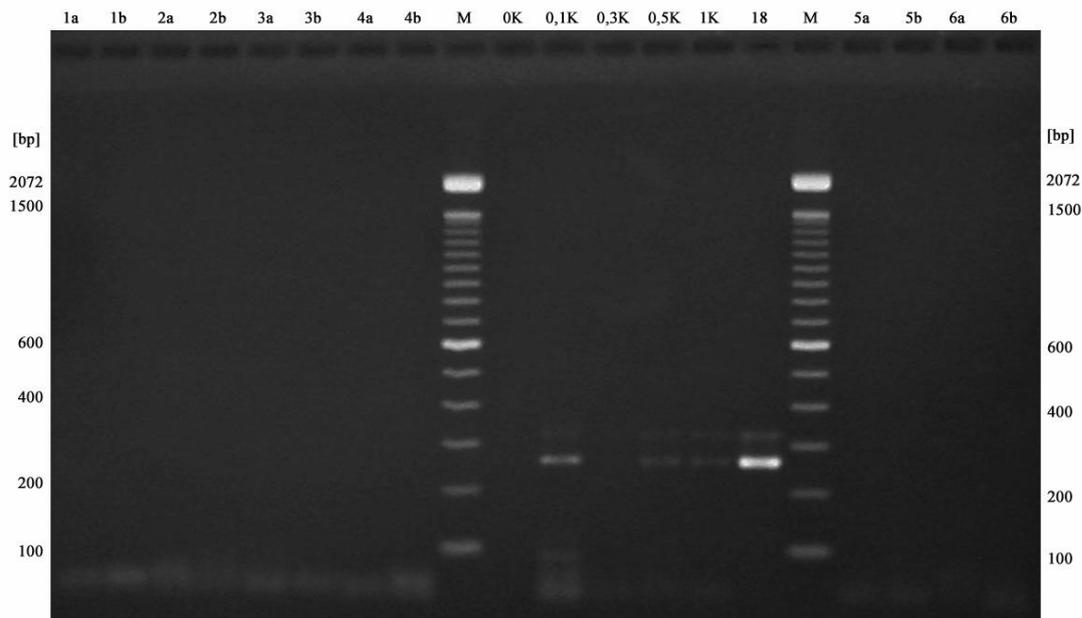
**Abbildung 36: Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**



**Abbildung 37: Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 56°C)**

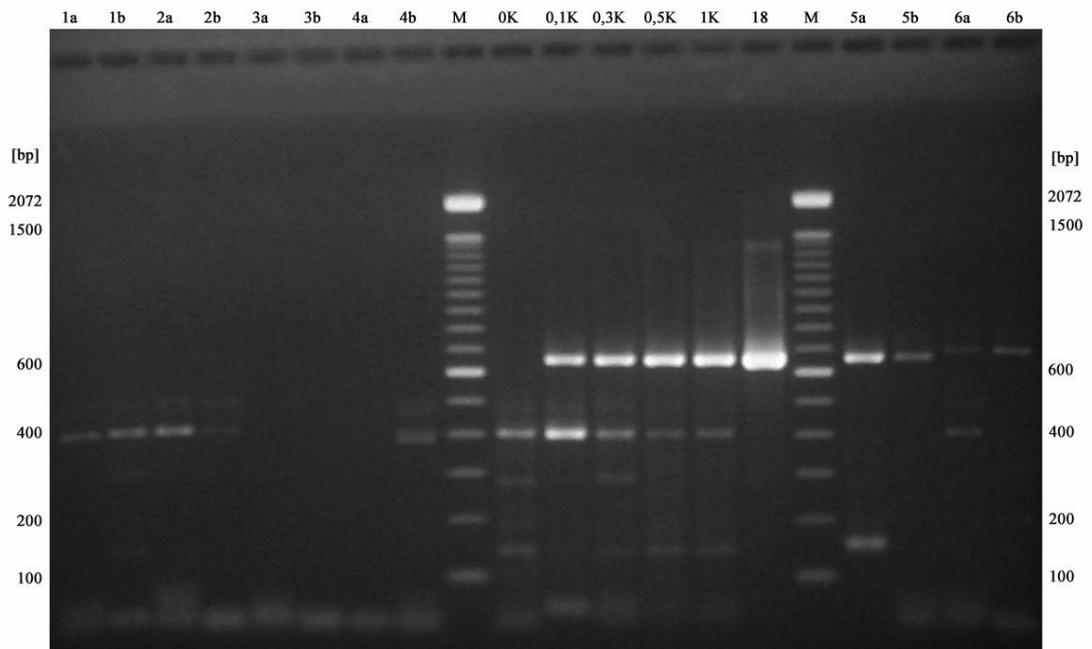


**Abbildung 38: Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 57°C)**



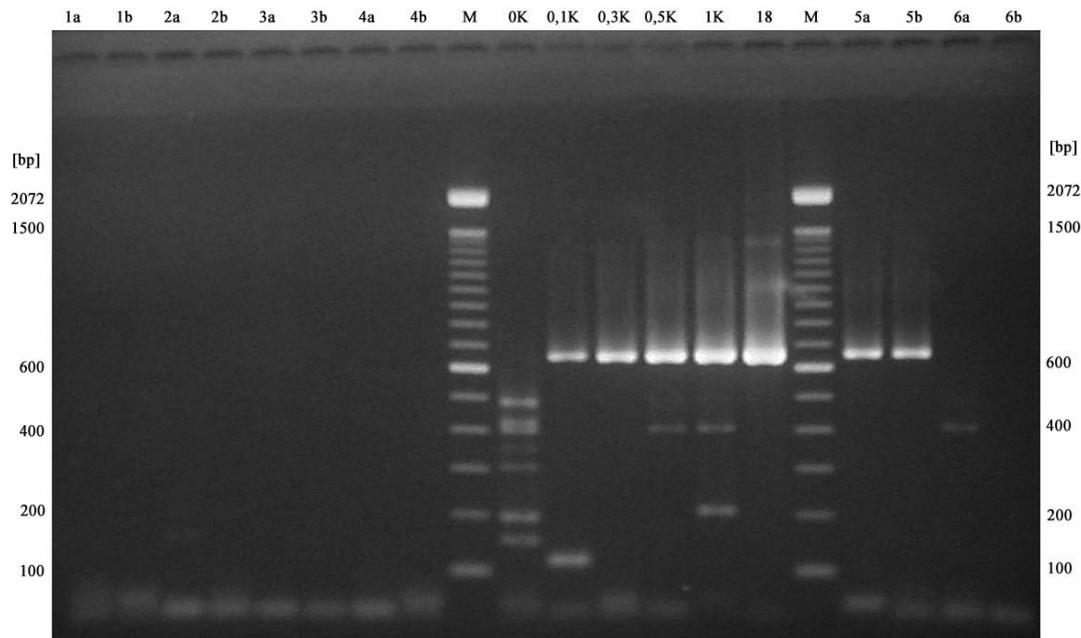
**Abbildung 39: Speziespezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 58°C)**

Um die erhaltenen Ergebnisse abzusichern wurde eine ähnliche Versuchsreihe mit dem ebenfalls für Rind spezifischen Primerpaar CytOx IIa / CytOx IIb durchgeführt. Dabei wurde mit einer Annealingtemperatur von 51°C begonnen und diese sukzessive auf bis zu 61°C gesteigert.



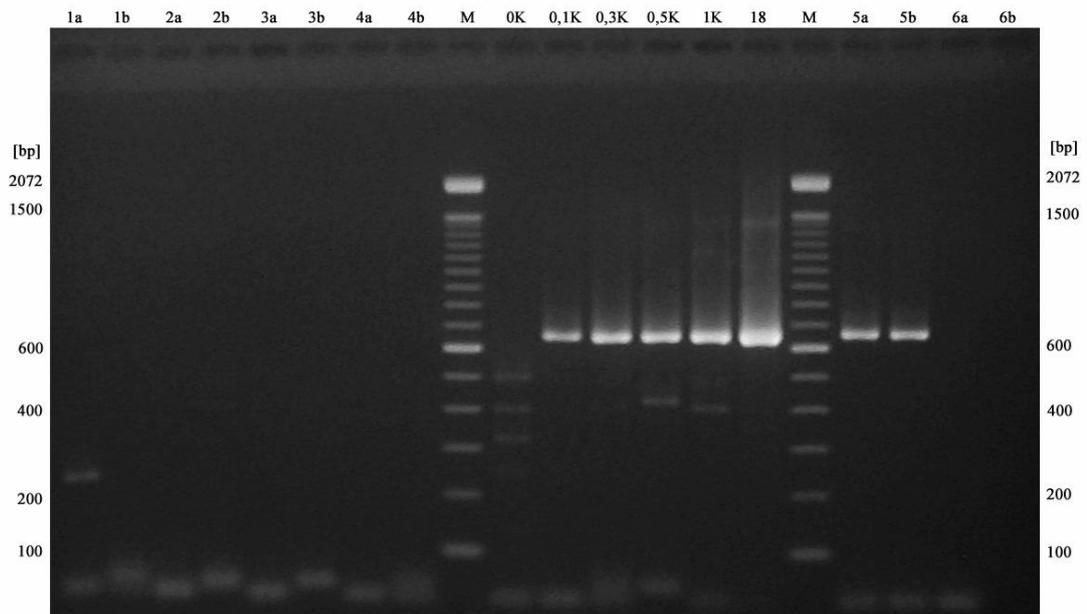
**Abbildung 40: Speziespezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 51°C)**

Wie aus Abbildung 40 hervorgeht, ist die Annealingtemperatur von 51°C deutlich zu niedrig gewählt. Es entstehen dabei eine Reihe unspezifischer Banden, sowohl bei den Standards der Kuh-Sojameschungsreihe als auch bei den Handelsproben. Trotzdem ist bereits hier zu sehen, dass in den Proben 1a bis 4b keinerlei Kuhmilchanteil nachweisbar ist. Die Proben 5a und 5b weisen eine deutliche Bande bei 651 bp auf. Bei den Proben 6a und 6b ist eine etwas darüber liegende Bande zu sehen.



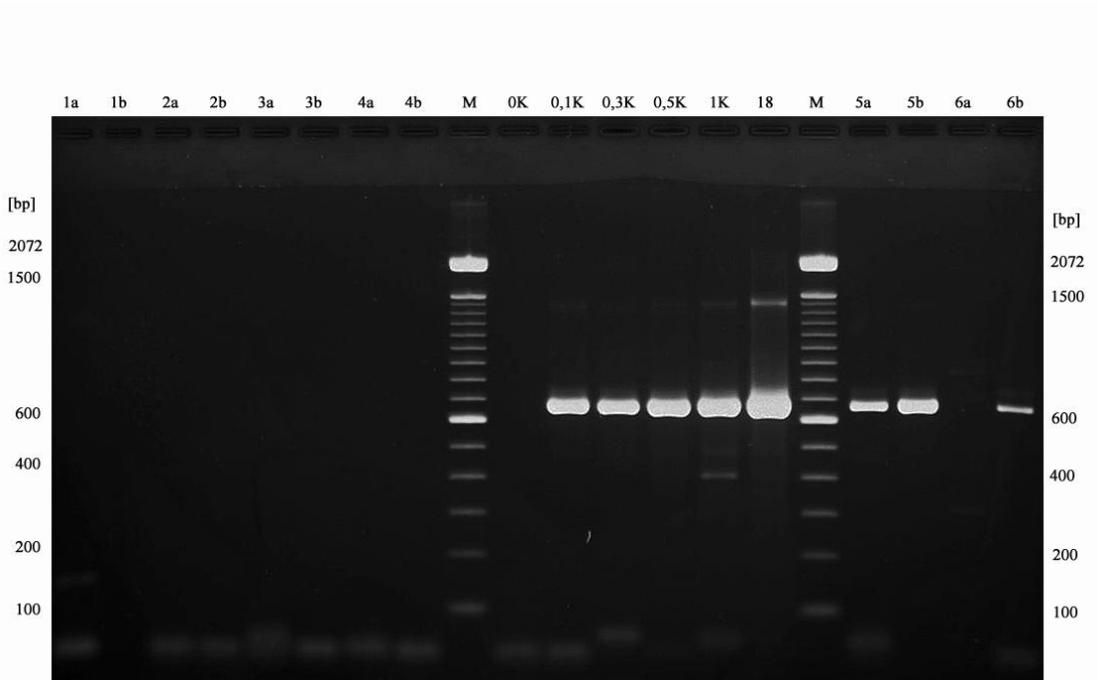
**Abbildung 41: Speziespezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx II b, Annealingtemperatur 58°C)**

Eine Steigerung der Annealingtemperatur auf 58°C reduziert die Anzahl der unspezifischen Banden bereits deutlich ohne dabei die Intensität der spezifischen Banden merklich zu beeinträchtigen. Außerdem zeigt sich eine konsistente Standardreihe deren Bandenintensitäten mit dem steigenden Anteil an Kuhmilch zunehmen. Auch bei dieser Temperatur lässt sich der positive Befund für die Proben 5a und 5b bestätigen.



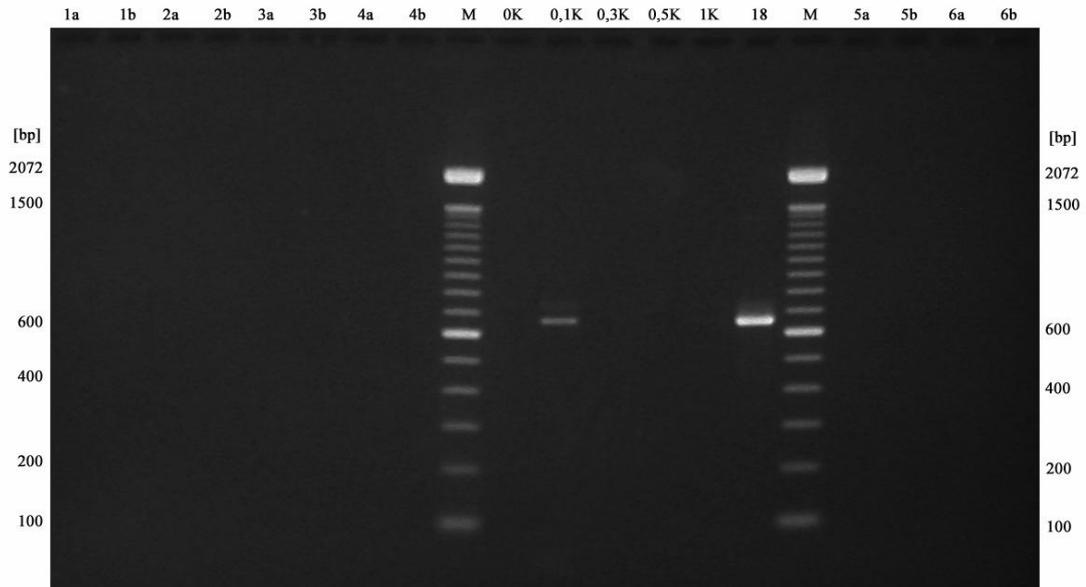
**Abbildung 42: Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 59°C)**

Ein weiterer Temperaturzuwachs um 1°C auf eine Annealingtemperatur von 59°C schwächt wiederum die Intensität der unspezifischen Banden ab ohne sich bedeutend negativ auf die Signalstärke der spezifischen Banden auszuwirken.



**Abbildung 43:Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 60°C)**

Bei einer Annealingtemperatur von 60°C lässt sich Anzahl und Intensität der unspezifischen Banden minimieren. Auch hier ist bei den Proben 1a bis 4b, im Gegensatz zu den Proben 5a und 5b, keinerlei Verfälschung mit Kuhmilch nachzuweisen. Die schwache aber dennoch gut sichtbare Bande auf Position 6b lässt darauf schließen, dass möglicherweise auch bei dieser Probe eine geringfügige Kontamination mit Kuhmilchanteilen besteht, die aber in einem Konzentrationsbereich liegt, der mittels der gewählten Methodik nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden kann.

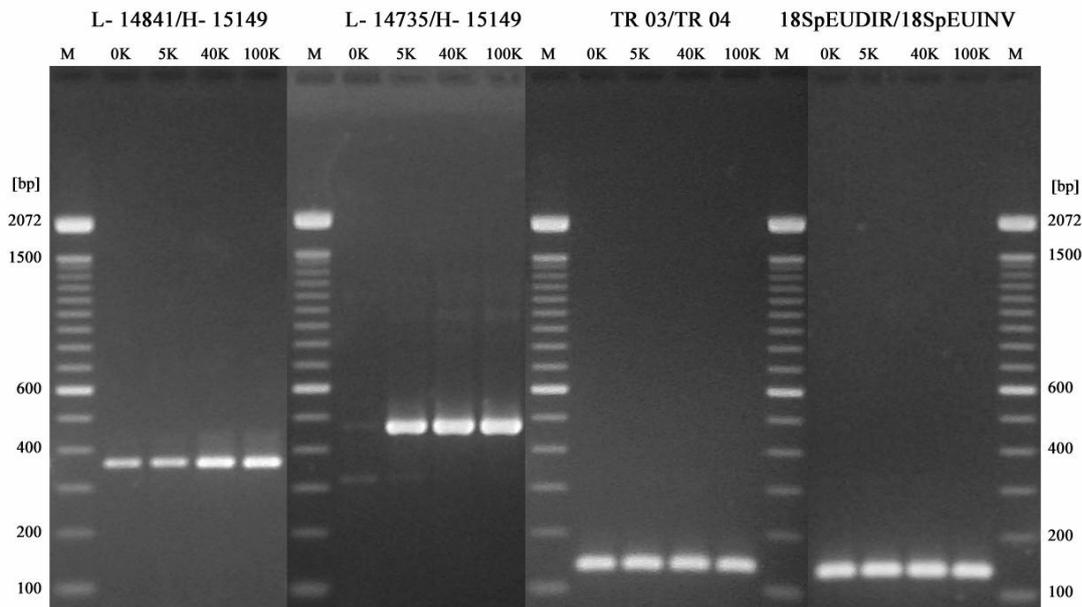


**Abbildung 44: Speziesspezifische PCR zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (CytOx IIa / CytOx IIb, Annealingtemperatur 61°C)**

Bei dem Versuch die Annealingtemperatur weiter zu steigern, gehen, wie Abbildung 44 zeigt, sämtliche unspezifische Banden sowie auch ein Teil der spezifischen Banden, sowohl bei den Standards als auch bei den Handelsproben verloren, woraus zu folgern ist, dass die gewählte Temperatur von 61°C zu hoch ist.

Die optimale Annealingtemperatur des Primerpaares CytOx IIa / CytOx IIb liegt somit im Bereich von 59°C bis 60°C. Aufgrund des weitaus weniger stark ausgeprägten Auftretens unspezifischer Banden wurde der Temperatur von 60°C der Vorzug gegeben.

Nachdem der quantitative Nachweis auf Kuhmilchbestandteile in Sojamilchprodukten mittels zweier für Rind spezifischer Primer und PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese geführt worden war, wurden als nächstes einige Vorversuche für die Real-time PCR unternommen. Ziel dabei war die Auffindung eines Universalprimerpaares, das sowohl für Kuh- als auch für Sojamilchprodukte vergleichbar ausgeprägte Signale liefert. Hierfür wurden die Primerpaare L-14841 / H-15149, L-14735 / H-15149, TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV herangezogen. Unter Verwendung von Standards mit unterschiedlichem Kuhmilchanteil wurde bei 55°C das jeweils spezifische Produkt amplifiziert und die Signalintensitäten verglichen.



**Abbildung 45: PCR zum Vergleich verschiedener Universalprimer (Annealingtemperatur 55°C)**

Wie in Abbildung 45 ersichtlich ist, zeigen die Primerpaare L-14841 / H-15149 und L-14735 / H-15149 für die Standards mit hohem Sojamilchanteil bzw. für den reinen Sojastandard auf Position 0K eine Bande mit wesentlich schwächerer Signalintensität als für die Standards mit hohem Kuhmilchanteil bzw. für den reinen Kuhmilchstandard auf Position 100K. Die beiden Primerpaare TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV zeigen hingegen für alle Standards eine spezifische Bande mit vergleichbarer Stärke und scheinen somit für weitere Analysen mittels Real-time PCR geeignet zu sein. Auch die Länge der Amplikons mit etwa 140 bp spricht für die Verwendung eines dieser beiden Primerpaare als Universalprimer für die Real-time PCR.

#### **4.2.2 Quantitativer Nachweis mittels Real-time PCR**

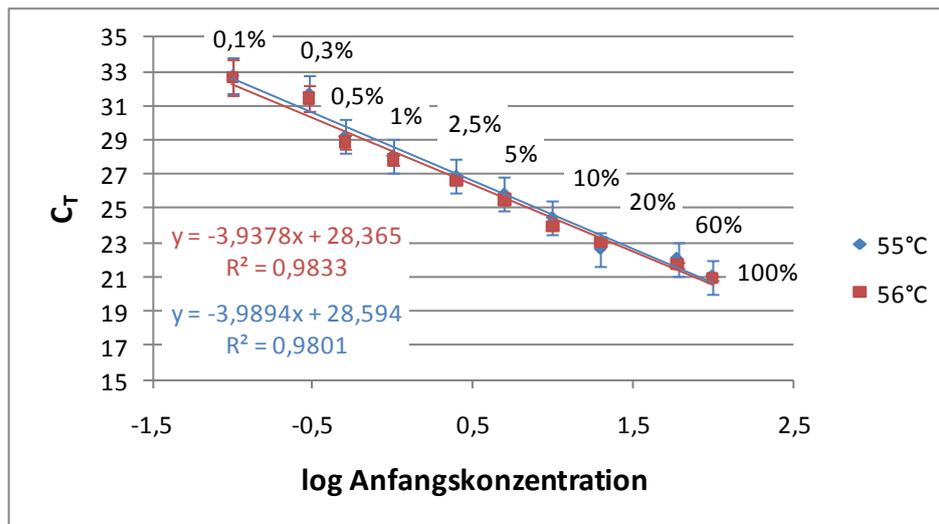
Aus den vorangegangenen Versuchen mittels PCR und Gelelektrophorese ist hervorgegangen, dass sowohl das speziesspezifische Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 als auch CytOx IIa / IIb zum Nachweis eines Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten geeignet sind. Da sich allerdings bereits bei den Untersuchungen zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmilchkäsen herausstellte, dass das Primerpaar CytOx IIa /

Iib, vermutlich aufgrund seiner Amplikongröße von 651 bp, für die Real-time PCR keine optimalen Ergebnisse liefert, wurde bei der Bearbeitung der Sojamilchprodukte darauf verzichtet Cyt Ox IIa / Iib für die Real-time PCR einzusetzen. Als Universalprimerpaare wurden TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV eingesetzt.

#### **4.2.2.1 Bestimmung des Kuhmilchanteils mittels Cow Bottero 1 / 2**

Aus den Vorversuchen mittels PCR und Gelelektrophorese wurde eine optimale Annealingtemperatur für das Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 im Bereich von 55°C bis 56°C festgelegt.

Deshalb wurde zunächst eine Versuchsreihe durchgeführt um festzustellen, ob es zwischen den beiden Annealingtemperaturen 55°C und 56°C signifikante Unterschiede bei den Ergebnissen gibt. Dazu wurden mehrere Real-time PCR Läufe mit der aus einer Mischung aus Kuh- und Sojamilch hergestellten Standardreihe mit folgenden Kuhmilchanteilen durchgeführt: 0%, 0,1%, 0,3%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 60% und 100%. Bei einer Annealingtemperatur von 55°C wurden sechs separate Real-time PCRs durchgeführt, wobei die Proben jeweils im Duplikat bestimmt wurden. Von allen erhaltenen  $C_T$ -Werten für eine Probe wurde schließlich ein Mittelwert berechnet. Diese Mittelwerte sind in Abbildung 46 zu sehen. Durch die einzelnen Datenpunkte wurde eine Standardgerade gelegt und die Standardabweichung für den jeweiligen Mittelwert als Fehlerindikator hinzugefügt. Analog dazu wurde mit den Daten, die für eine Annealingtemperatur von 56°C erhalten wurden, ebenfalls eine Standardgerade erstellt und ist im selben Diagramm zu sehen.



**Abbildung 46: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperaturen 55°C und 56°C)**

Sowohl der Verlauf der beiden Standardgeraden als auch die Parameter der Geradengleichungen demonstrieren, dass sich die beiden Standardgeraden, die aus den Daten der 55°C bzw. 56°C Versuchsreihen erstellt wurden, kaum unterscheiden. Daraus lässt sich folgern, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den beiden Annealingtemperaturen gibt.

Die  $C_T$ -Werte zu diesen Versuchen sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 zu finden.

**Tabelle 27: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten,  $C_T$ -Werte Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C**

PCR-Lauf	$C_T$ -Wert Cow Bottero 1 / 2						Mittelwert +/- Standardabweichung	
	10	11	12	13	14	22		
100% K	20,76	21,07	21,14	20,75	20,34	20,49	21,02 +/- 0,42	
100% K	20,77	21,69	21,26	21,24	21,02	21,67		
60% K	21,77	22,09	21,91	22,27	22,06	21,95	22,05 +/- 0,16	
60% K	22,22	22,10	22,31	22,08	21,97	21,93		
20% K	22,23	22,57	22,65	22,40	22,27	23,77	22,60 +/- 0,47	
20% K	22,26	22,66	22,67	22,30	22,20	23,25		
10% K	24,30	24,39	24,35	24,66	24,37	24,36	24,45 +/- 0,12	
10% K	24,32	24,40	24,55	24,63	24,55	24,48		
5% K	25,83	25,88	25,95	25,53	25,64	25,74	25,83 +/- 0,28	
5% K	25,92	25,91	25,99	26,08	25,18	26,26		
2,5% K	26,74	26,64	27,14	26,98	26,69	26,89	26,88 +/- 0,20	
2,5% K	26,96	26,79	27,21	27,11	26,90	26,54		
1% K	27,73	28,19	28,06	28,31	28,06	28,12	28,07 +/- 0,20	

1% K	28,15	28,40	28,22	27,84	27,84	27,94		
0,5% K	28,63	29,12	29,21	28,84	28,89	29,67	29,19	+/- 0,39
0,5% K	29,67	29,47	29,70	29,38	29,05	28,71		
0,3% K	31,27	31,60	30,97	31,35	31,62	31,08	31,72	+/- 0,69
0,3% K	31,91	33,62	31,71	31,90	32,11	31,48		
0,1% K	31,92	32,68	32,92	33,82	32,09	32,83	32,78	+/- 0,93
0,1% K	34,97	32,96	33,23	31,59	32,06	32,26		
0% K	N/A	37,19	36,00	36,61	N/A	34,94		
0% K	N/A	37,35	N/A	36,09	41,09	35,96	-	-
NTC	34,72	35,85	35,87	35,60	35,80	36,36		
NTC	37,38	36,72	37,59	33,60	N/A	37,42	-	-

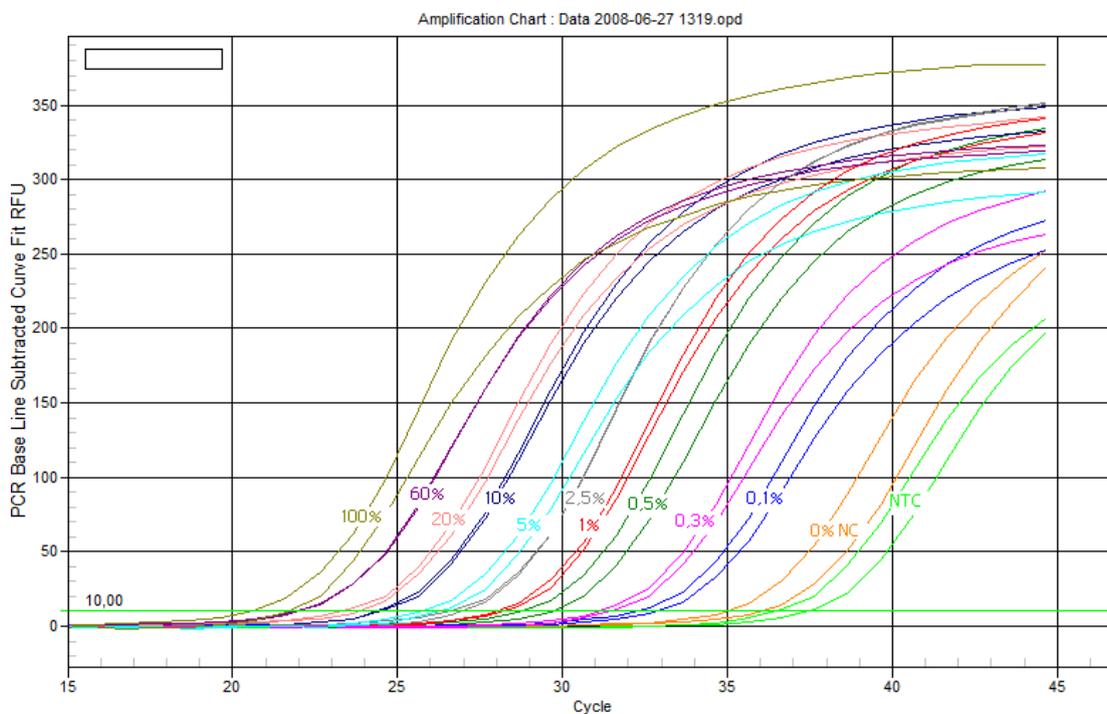
N/A... nicht nachweisbar

**Tabelle 28: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, CT-Werte Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 56°C**

PCR-Lauf	C <sub>T</sub> -Wert Cow Bottero 1 / 2					Mittelwert +/- Standardabweichung	
	15	16	17	18	21		
100% K	20,74	20,82	20,90	20,88	20,86	20,90	+/- 0,12
100% K	20,90	21,09	21,09	20,96	20,79		
60% K	21,68	21,72	21,97	21,83	21,75	21,73	+/- 0,17
60% K	21,76	21,53	21,59	21,51	21,99		
20% K	23,19	23,07	23,18	23,28	22,80	23,04	+/- 0,21
20% K	22,99	22,77	23,36	22,75	23,01		
10% K	24,05	23,68	23,97	24,00	24,03	23,99	+/- 0,12
10% K	24,05	24,03	23,94	23,94	24,16		
5% K	25,50	25,24	25,10	25,30	25,44	25,52	+/- 0,26
5% K	25,91	25,83	25,66	25,58	25,64		
2,5% K	26,57	26,74	26,92	26,47	26,60	26,60	+/- 0,26
2,5% K	26,70	26,28	26,42	26,48	26,83		
1% K	27,67	27,77	27,72	27,78	28,01	27,85	+/- 0,26
1% K	28,43	27,51	27,69	27,86	28,06		
0,5% K	29,33	28,95	28,79	29,16	28,28	28,90	+/- 0,39
0,5% K	28,51	28,77	28,83	28,73	29,64		
0,3% K	31,82	30,74	31,93	32,93	31,21	31,42	+/- 0,78
0,3% K	32,04	31,57	30,86	30,76	30,33		
0,1% K	31,67	31,82	31,80	33,67	32,81	32,62	+/- 1,04
0,1% K	34,19	34,08	31,83	32,73	31,57		
0% K	N/A	36,93	33,99	N/A	34,76		
0% K	N/A	35,66	33,89	35,63	35,49	-	-
NTC	36,04	41,73	42,58	35,53	34,55		
NTC	43,29	35,00	36,79	36,97	N/A	-	-

N/A... nicht nachweisbar

In Abbildung 47 sind die Amplifikationskurven des Real-time PCR Laufes 22, dessen  $C_T$ -Werte auch in Tabelle 27 ersichtlich sind, dargestellt. Wie bereits aus den beiden vorhergehenden Tabellen hervorgeht werden bei einer Annealingtemperatur von 55°C bzw. 56°C meist  $C_T$ -Werte sowohl für die Negativkontrolle (0%K) als auch die NTC erhalten. Die Amplifikationskurven und  $C_T$ -Werte zeigen zwar einen deutlichen Abstand zwischen den Proben der Standardreihe die tatsächlich Kuhmilchanteile enthalten und den Negativkontrollen und NTCs, dennoch kann ein derartiges Ergebnis nicht als optimal angesehen werden.

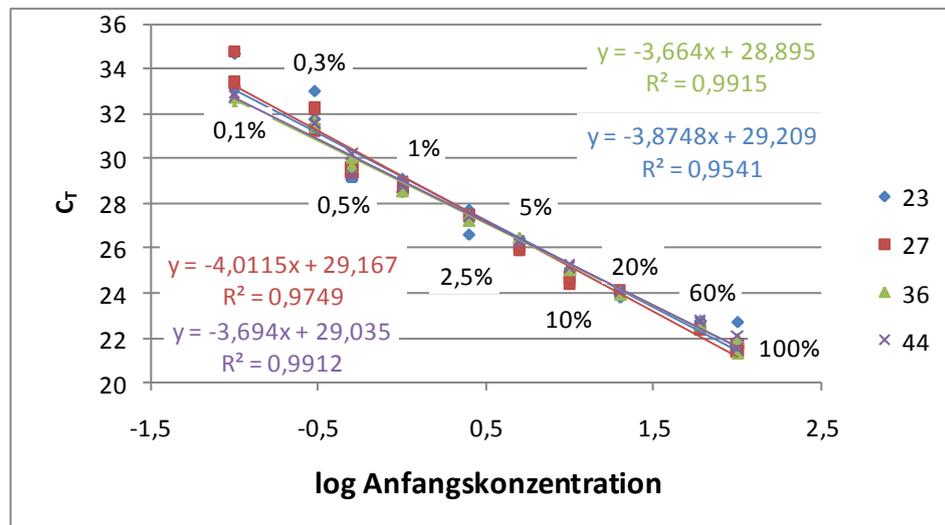


**Abbildung 47: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C)**

#### 4.2.2.2 Ergebnisse $\Delta C_T$ -Methode

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse präsentiert, die bei einer Annealingtemperatur von 55°C mit den Primerpaaren Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primer sowie TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV als Universalprimer erzielt wurden.

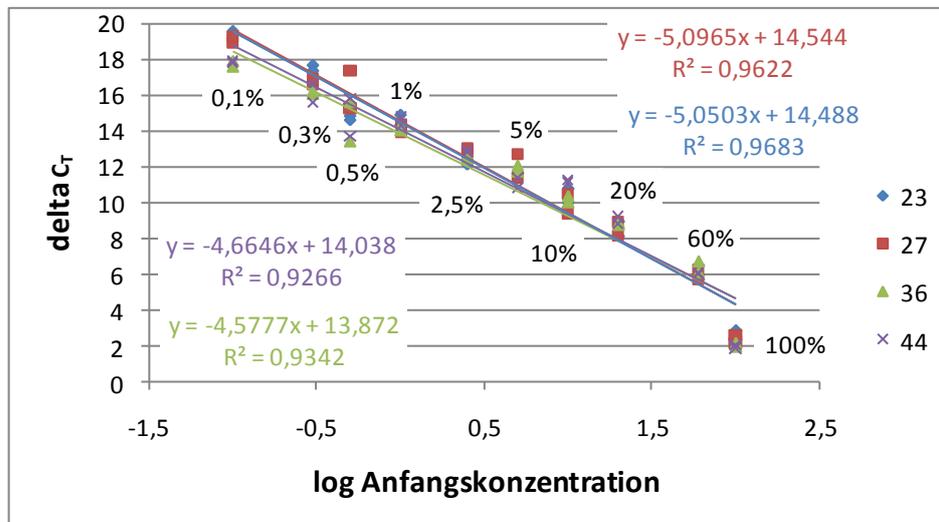
Zunächst wurde mit TR 03 / 04 als Universalprimer gearbeitet. Wie Abbildung 48 zeigt, liefern vier separate Real-time PCR Läufe, die mit den Standards 0% K, 0,1% K, 0,3% K, 0,5% K, 1% K, 2,5% K, 5% K, 10% K, 20% K, 60% K und 100% K durchgeführt werden, für den speziesspezifischen Primer Cow Bottero 1 / 2 durchaus vergleichbare Ergebnisse. Die Verläufe der Standardgeraden weichen kaum voneinander ab.



**Abbildung 48: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K)**

Werden dieselben Real-time PCR Läufe unter Berücksichtigung der erhaltenen C<sub>T</sub>-Werte für den Universalprimer ausgewertet, zeigt sich, dass die Standardgeraden auch hier sehr ähnlich liegen. Darüber hinaus lässt sich erkennen, dass der 100% K Standard aus der Reihe etwas ausreißt. 100% K liefert für den Universalprimer im Vergleich zu den anderen Standards einen hohen C<sub>T</sub>-Wert wodurch sich ein verhältnismäßig niedriger ΔC<sub>T</sub>-Wert ergibt. Der etwas höhere C<sub>T</sub>-Wert, der mit dem Universalprimerpaar erzielt wird, ließe eigentlich auf einen niedrigeren Gesamt-DNA-Gehalt in der Probe schließen. Allerdings sollte sich dieser Effekt dann auch für das speziesspezifische Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 zeigen und durch die Bildung des ΔC<sub>T</sub>-Wertes eliminiert werden.

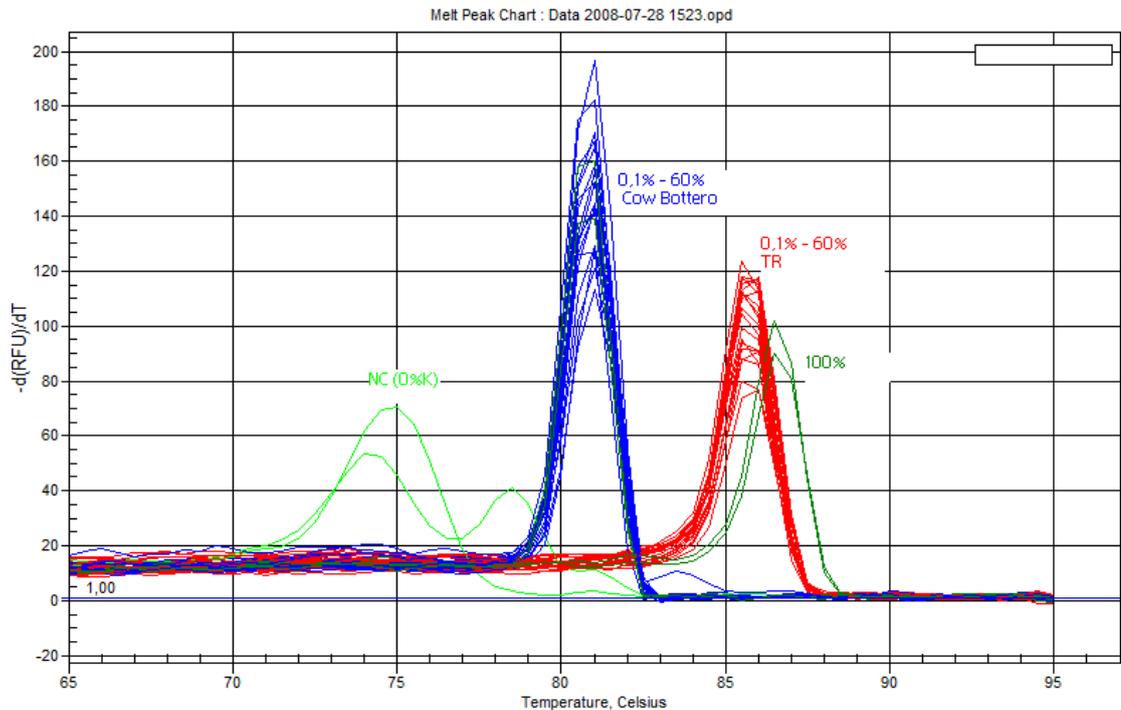
Die einzelnen C<sub>T</sub>-Werte zu den abgebildeten Real-time PCR Läufen sind in Tabelle 29 und Tabelle 30 zu finden.



**Abbildung 49: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden,  $\Delta C_T$  aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K)**

Abbildung 50 zeigt die zugehörige Schmelzkurvenanalyse zu Real-time PCR Lauf 44. Zu sehen ist, dass die Amplikons, die für die Negativkontrolle (0% K) erhalten werden und in hellgrün abgebildet sind, weder dem spezifischen Amplifikat des speziesspezifischen Primers noch dem des Universalprimers entsprechen. Der blaue Peak entspricht den Kurven, die für das Amplifikat des speziesspezifischen Primerpaares für die Standards 0,1% K bis einschließlich 60% K erhalten wurden. Der rote Peak hingegen zeigt die Kurven, die für das Amplifikat des Universalprimers, ebenfalls für die Standards 0,1% K bis einschließlich 60% K, resultierten. Die vier dunkelgrünen Linien entsprechen den Schmelzkurven für den Standard 100% K. Die beiden Kurven für den speziesspezifischen Primer sind dabei kaum ersichtlich, da sie im gleichen Bereich liegen, wie die Kurven der anderen Standards. Die Schmelzkurven für das Amplifikat des Universalprimers hingegen unterscheiden sich von denen der restlichen Standards. Die Schmelztemperatur des resultierenden Amplikons liegt etwa 1,5°C über der für diesen Primer erwarteten Temperatur, was darauf schließen lässt, dass sich das Amplikon in seiner Sequenz vermutlich nur geringfügig von den Amplikons der anderen Standards unterscheidet. Da der Standard 100% K aus derselben Kuhmilch gewonnen wurde aus der auch die anderen Standards, die aus Kuh- und Sojamilch gemischt wurden, hergestellt wurden, ist dieser Effekt unerwartet und rätselhaft

zugleich. Geht man nämlich davon aus, dass aus der aus Kuhmilch gewonnenen Rinder-DNA vom Primerpaar TR 03 / 04 ein anderes Amplifikat synthetisiert wird, so sollten sich bei den Kuh-Sojamilch-Mischungen ein Doppelpeak oder zwei eng beieinander liegende Peaks zeigen.

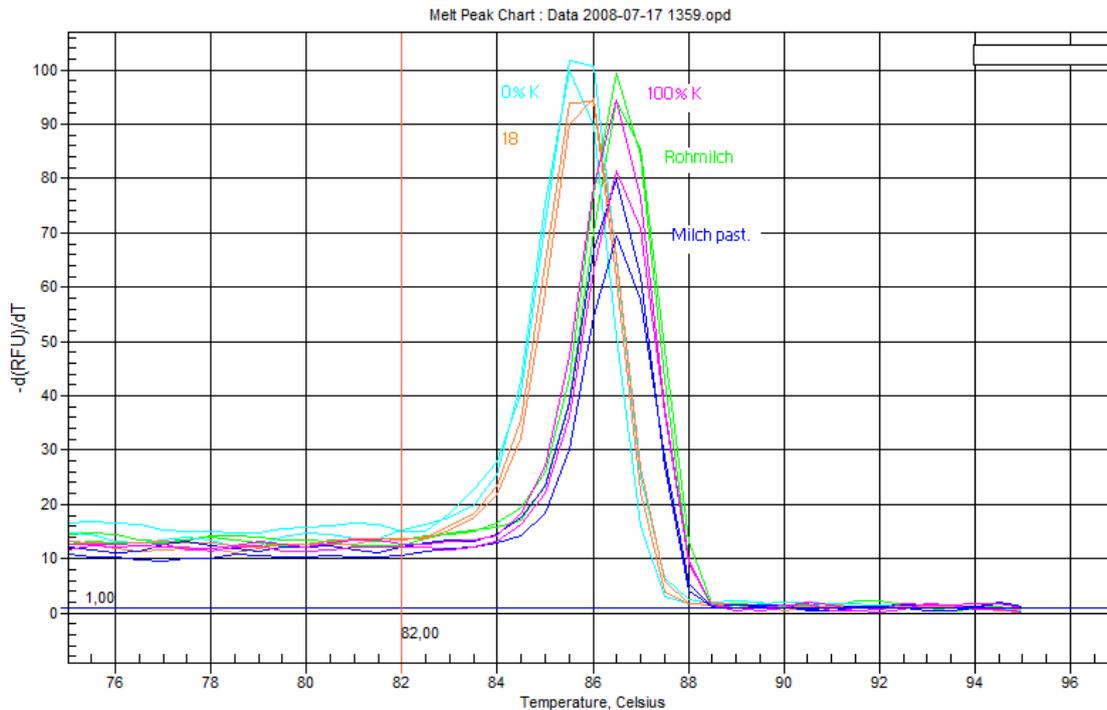


**Abbildung 50: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Schmelzkurvenanalyse zu Lauf 44, Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C)**

Um diesen Effekt genauer unter die Lupe zu nehmen, wurde ein weiterer Real-time PCR Lauf durchgeführt in dem fünf verschiedene Proben herangezogen wurden um ein Amplikon mit dem Primer TR 03 / 04 zu erhalten. Neben den bereits bekannten Standards 0% K und 100% K aus der Kuh-Sojamilchmischungsreihe und der Probe 18 aus der Kuh-Schafmischungsreihe wurden zusätzlich je ein aus Rohmilch und pasteurisierter Milch gewonnenes DNA-Isolat eingesetzt. Alle DNA-Isolierungen wurden dabei mit derselben Methode die im Abschnitt Material und Methoden beschrieben ist, ausgeführt.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 51 dargestellt. Auffällig dabei ist, dass alle aus verschiedenen Milchen gewonnene Proben dieselbe Schmelztemperatur zeigen, wohingegen die Probe 0% K, die aus reiner Sojamilch besteht, und die Probe 18, die aus

überreifem Camembert gewonnen wurde, jeweils eine etwa um 1,5°C tiefere Schmelztemperatur des Amplikons aufweisen. Erstaunlich ist, dass die Probe 18 in der Schmelzkurvenanalyse dasselbe Verhalten zeigt wie die Probe 0% K. Worauf diese Beobachtung im Detail zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden.



**Abbildung 51: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Schmelzkurvenanalyse, Proben 0% K, 100% K, 18, Rohmilch und pasteurisierte Milch, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C)**

**Tabelle 29: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten ( $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K) I**

	23			27		
	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$
100% K	21,58	19,29	2,85	21,43	19,46	2,13
100% K	22,70	19,64	2,50	21,75	18,98	2,61
60% K	22,74	17,03	5,71	22,40	16,65	5,75
60% K	22,74	16,27	6,47	22,39	16,09	6,30
20% K	23,79	14,97	8,94	24,11	15,97	8,16
20% K	24,03	15,80	8,11	24,15	15,16	8,97
10% K	25,00	14,98	9,98	24,44	14,12	10,47
10% K	24,92	14,19	10,77	24,72	15,16	9,42
5% K	26,19	14,64	11,65	26,07	14,64	11,37
5% K	26,40	14,67	11,62	25,95	13,28	12,73
2,5% K	27,69	15,02	12,12	27,43	14,58	12,87

2,5% K	26,59	14,74	12,40	27,46	14,42	13,02
1% K	28,49	14,45	14,32	28,66	14,40	14,32
1% K	29,06	13,88	14,89	28,78	14,75	13,97
0,5% K	29,27	14,30	14,83	29,38	12,10	17,37
0,5% K	29,00	14,53	14,60	29,57	14,20	15,28
0,3% K	32,98	14,69	17,67	31,27	15,18	16,58
0,3% K	31,73	15,00	17,35	32,24	14,90	16,86
0,1% K	33,18	14,34	19,57	34,79	15,17	18,93
0,1% K	34,64	14,57	19,34	33,41	14,86	19,24
0% K	N/A	15,12	-15,12	38,68	14,90	22,36
0% K	36,77	14,72	22,05	35,83	14,82	22,43

CB... Cow Bottero 1 / 2

TR...TR 03 /04

N/A...nicht nachweisbar

**Tabelle 30: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten ( $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 100% K) II**

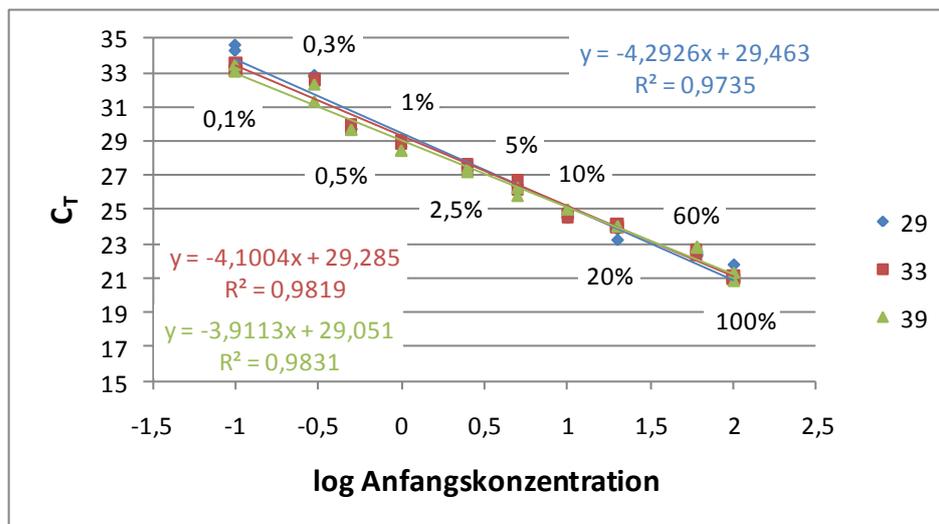
	36			44		
	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$
100% K	21,31	19,46	2,17	21,50	19,93	1,88
100% K	21,96	19,67	1,96	22,11	19,71	2,09
60% K	22,69	15,91	6,72	22,69	16,67	6,06
60% K	22,57	16,54	6,09	22,77	16,68	6,05
20% K	24,04	15,12	8,85	24,11	15,26	8,81
20% K	23,92	15,23	8,74	24,03	14,87	9,20
10% K	25,06	15,04	10,00	25,15	13,97	11,25
10% K	25,02	14,70	10,34	25,30	14,14	11,08
5% K	26,41	14,71	11,72	26,27	14,90	11,39
5% K	26,45	14,39	12,04	26,32	15,46	10,83
2,5% K	27,42	14,75	12,56	27,47	14,54	12,90
2,5% K	27,21	14,89	12,42	27,41	14,62	12,82
1% K	28,53	14,52	14,01	28,97	14,09	14,75
1% K	28,53	14,30	14,23	28,71	14,52	14,32
0,5% K	30,03	16,44	13,39	30,21	16,06	13,69
0,5% K	29,63	14,24	15,58	29,29	13,98	15,77
0,3% K	31,39	15,47	16,03	31,57	14,99	16,60
0,3% K	31,62	15,33	16,18	31,60	16,00	15,58
0,1% K	32,69	14,60	17,86	32,78	14,92	17,91
0,1% K	32,22	14,91	17,55	32,89	15,00	17,83
0% K	37,31	14,25	21,88	34,99	14,58	21,51
0% K	34,95	14,58	21,55	37,18	14,57	21,52

CB... Cow Bottero 1 / 2

TR...TR 03 /04

N/A...nicht nachweisbar

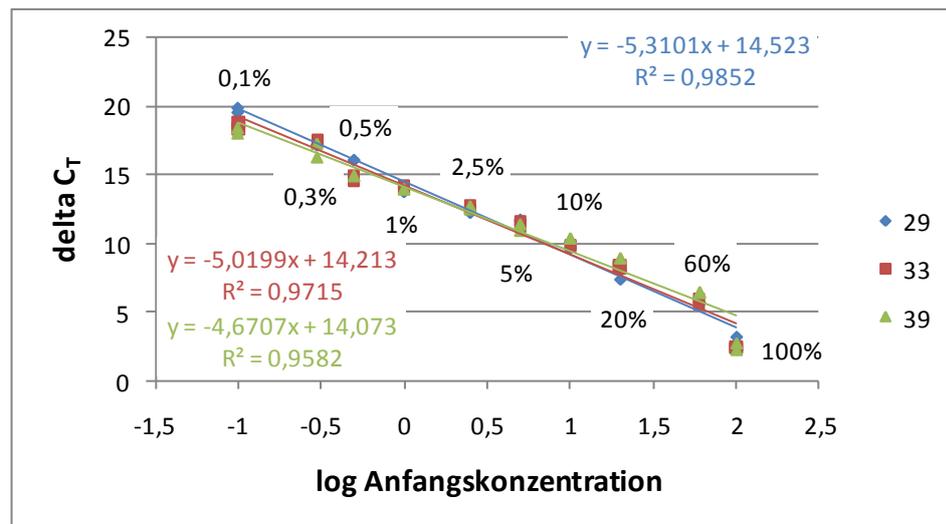
Da Probe 18 in der Schmelzkurvenanalyse das gleiche Verhalten wie die Probe 0% K zeigte, wurde der Standard 100% K durch 18 ersetzt und es wurden drei weitere Real-time PCR Läufe bei ansonsten identen Bedingungen durchgeführt. Wie in Abbildung 52 zu sehen, ist ändert der Austausch dieses Standards kaum etwas an den Standardgeraden, die bei Auswertung der Resultate nach dem speziesspezifischen Primer erhalten werden. Einzig die Steigungen der Standardgeraden wachsen, was auf eine niedrigere Effizienz der Real-time PCR Reaktion schließen lässt.



**Abbildung 52: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1/2, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 18)**

Werden die vorliegenden Daten mittels  $\Delta C_T$ -Methode ausgewertet, zeigt sich zwar immer noch eine erhebliche Differenz zwischen den  $C_T$ -Werten für den Universalprimer und in weiterer Folge auch den  $\Delta C_T$ -Werten der beiden Standards mit den höchsten Kuhmilchkonzentrationen, nämlich 18 und 60% K, die Unterschiede sind allerdings vergleichsweise geringer als zwischen den beiden Standards 100% K und 60% K wie in Abbildung 53 und Tabelle 31 zu sehen ist.

Da der Fokus dieser Arbeit ohnehin auf dem Nachweis geringer Kuhmilchanteile in Sojamilchprodukten liegt, wurde schließlich für die weiteren Analysen auf einen 100% Kuhmilch Standard gänzlich verzichtet.



**Abbildung 53: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden,  $\Delta C_T$  aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 18)**

**Tabelle 31: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten ( $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, mit Probe 18)**

	29			33			39		
	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$
18	20,88	18,71	2,22	21,12	18,49	2,50	20,81	18,26	2,28
18	21,82	18,62	3,16	20,93	18,75	2,31	21,30	18,80	2,77
60% K	22,42	16,82	5,66	22,30	16,67	5,58	22,76	16,49	6,41
60% K	22,34	16,68	5,59	22,70	16,77	5,98	22,83	16,21	6,48
20% K	23,26	15,37	7,36	23,98	15,21	8,22	24,01	14,93	8,92
20% K	23,87	16,44	7,97	24,14	16,30	8,38	24,03	15,24	8,94
10% K	25,00	14,84	10,10	24,59	14,88	9,70	25,02	15,17	10,36
10% K	24,56	14,95	9,66	24,73	14,90	9,84	25,03	14,14	10,37
5% K	26,38	14,67	11,64	26,18	15,14	11,15	25,80	14,57	10,92
5% K	26,48	14,82	11,74	26,71	14,93	11,67	26,28	15,21	11,39
2,5% K	27,28	15,29	12,23	27,65	15,15	12,74	27,20	14,70	12,48
2,5% K	27,46	14,81	12,41	27,39	14,67	12,48	27,43	14,75	12,70
1% K	29,00	14,96	14,08	29,02	14,91	14,24	28,49	14,56	13,95
1% K	28,67	14,88	13,76	28,88	14,64	14,10	28,45	14,52	13,91
0,5% K	29,69	14,16	16,07	29,60	14,79	14,62	29,69	15,55	14,88
0,5% K	29,72	13,08	16,10	29,96	15,19	14,97	29,71	14,08	14,90
0,3% K	32,75	15,65	17,15	32,55	15,74	17,41	31,36	14,91	16,24
0,3% K	32,85	15,55	17,25	32,61	14,53	17,48	32,35	15,33	17,23
0,1% K	34,61	14,82	19,91	33,16	14,74	18,35	33,11	15,28	17,97
0,1% K	34,28	14,59	19,58	33,60	14,88	18,79	33,51	15,00	18,37
0% K	37,22	15,16	22,48	37,68	15,35	22,62	35,05	14,00	20,73
0% K	37,01	14,33	22,26	35,28	14,77	20,51	35,48	14,65	21,16

Da neben TR 03 / 04 mit 18SpEUDIR / 18SpEUINV noch ein zweites potentiell Universalprimerpaar zur Verfügung stand, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, um festzustellen, welcher der beiden Primer die besseren Ergebnisse liefert. Mit TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV wurden je zwei Real-time PCR Läufe unter identen Bedingungen durchgeführt. Als speziesspezifisches Primerpaar fungierte Cow Bottero 1 / 2 bei einer Annealingtemperatur von 55°C. Die Ergebnisse sind für den Primer TR 03 / 04 in Tabelle 32 und für den Primer 18SpEUDIR / 18SpEUINV in Tabelle 33 zu finden. Aus beiden für den jeweiligen Universalprimer durchgeführten Real-time PCR Läufen wurde der Mittelwert für alle Standards für den  $C_T$ -Wert für den Primer Cow Bottero 1 / 2 sowie für den  $\Delta C_T$ -Wert berechnet. Aus diesen Mittelwerten wurden schließlich die Standardgeraden erstellt, die jeweilige Standardabweichung ist als Fehlerindikator im Diagramm zu sehen. Abbildung 54 zeigt die Auswertung nach den  $C_T$ -Werten für den speziesspezifischen Primer. Die beiden Standardgeraden verlaufen sehr ähnlich, was darauf schließen lässt, dass auch die Amplifikation des speziesspezifischen Produktes ähnlich verlaufen ist. Auffällig ist außerdem, dass die Probe 0,3% K bei allen vier Real-time PCR Läufen etwas oberhalb der Standardgeraden liegt. Dies bedeutet, dass in der Probe 0,3% K möglicherweise weniger Gesamt-DNA enthalten ist als in den anderen Proben.

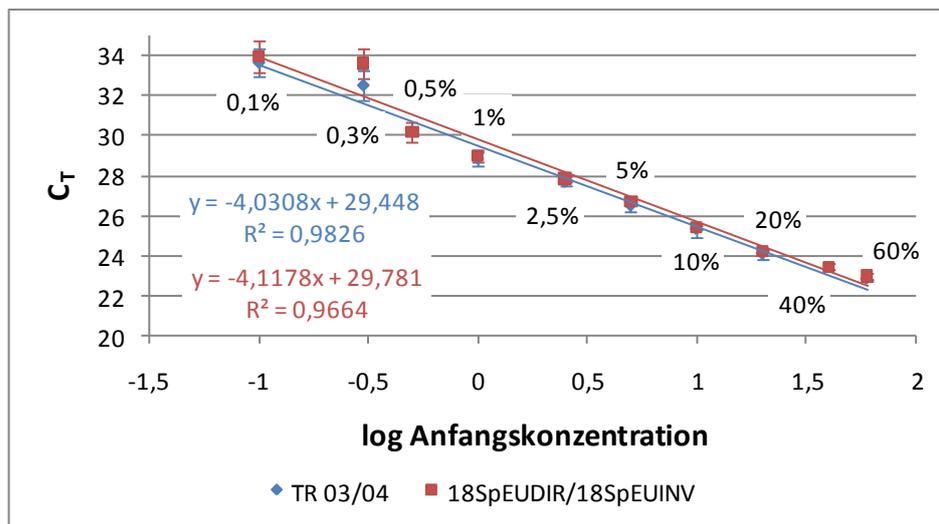
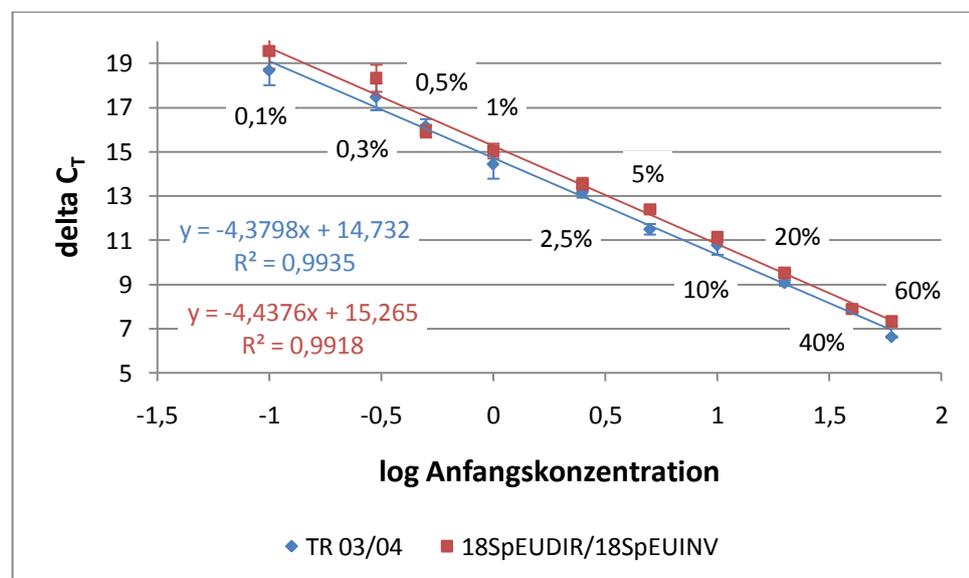


Abbildung 54: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K)

Ein Blick auf die Auswertung nach den entsprechenden  $\Delta C_T$ -Werten bestätigt diese These. Normalisiert man nämlich die  $C_T$ -Werte des speziesspezifischen Primers unter Verwendung der  $C_T$ -Werte des Universalprimers, zeigt sich, dass die Werte für die Probe 0,3% K in Richtung Standardgerade nach unten rutschen. Auch das höhere Bestimmtheitsmaß der Standardgeraden zeigt, dass die lineare Regression besser an die Datenpunkte angepasst ist. Daraus lässt sich schließen, dass es in der verwendeten Standardreihe geringe Schwankungen in der Gesamt-DNA-Konzentration der einzelnen Proben gibt und diese durch den Universalprimer berücksichtigt werden. Außerdem hat sich gezeigt, dass keiner der beiden Universalprimer wesentlich bessere Resultate liefert. TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV verhalten sich wohl auch deswegen vergleichbar, da sie am selben nukleären 18S rRNA Gen angreifen und sehr ähnliche Amplikons, die sich nur um wenige Basenpaare unterscheiden, liefern.



**Abbildung 55: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Standardgeraden,  $\Delta C_T$  aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K)**

**Tabelle 32: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten ( $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K)**

□	47			49			Mittelwert +/- Standardabweichung			
	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	$C_T$ CB		$\Delta C_T$	
60% K	22,82	15,87	6,61	22,77	15,95	6,60	22,82	+/-0,05	6,63	+/-0,03
60% K	22,89	16,55	6,68	22,79	16,39	6,62	24,08	+/-0,28	9,07	+/-0,13
20% K	23,99	15,19	8,92	24,39	14,71	9,43				

20% K	23,74	14,96	8,67	24,20	15,20	9,25				
10% K	24,87	15,65	10,15	25,51	14,05	11,16	25,31	+/-0,33	10,78	+/-0,44
10% K	25,62	13,78	10,91	25,24	14,63	10,90				
5% K	26,31	14,81	11,29	26,53	14,72	11,56	26,49	+/-0,25	11,50	+/-0,24
5% K	26,83	15,23	11,81	26,30	15,21	11,33				
2,5% K	27,72	14,02	13,29	27,42	14,63	12,82	27,66	+/-0,17	13,15	+/-0,22
2,5% K	27,70	14,84	13,27	27,82	14,56	13,23				
1% K	29,28	14,05	15,21	28,76	14,62	14,05	28,83	+/-0,34	14,45	+/-0,66
1% K	28,83	14,10	14,76	28,46	14,78	13,76				
0,5% K	30,26	13,73	16,53	30,21	14,77	15,89	30,18	+/-0,09	16,16	+/-0,32
0,5% K	30,06	13,73	16,33	30,19	13,86	15,88				
0,3% K	31,88	15,01	16,98	33,49	14,65	18,36	32,50	+/-0,73	17,49	+/-0,61
0,3% K	32,02	14,79	17,12	32,63	15,62	17,50				
0,1% K	32,72	14,88	17,75	33,66	14,96	18,71	33,64	+/-0,67	18,69	+/-0,68
0,1% K	34,31	15,05	19,34	33,90	14,93	18,95				
0% K	N/A	14,58	-	N/A	14,74	-	-	-	-	-
0% K	36,79	14,29	22,36	41,84	14,43	27,25				
NTC	39,94	30,05	9,71	N/A	29,99	-	-	-	-	-
NTC	N/A	30,42	-	N/A	29,69	-				

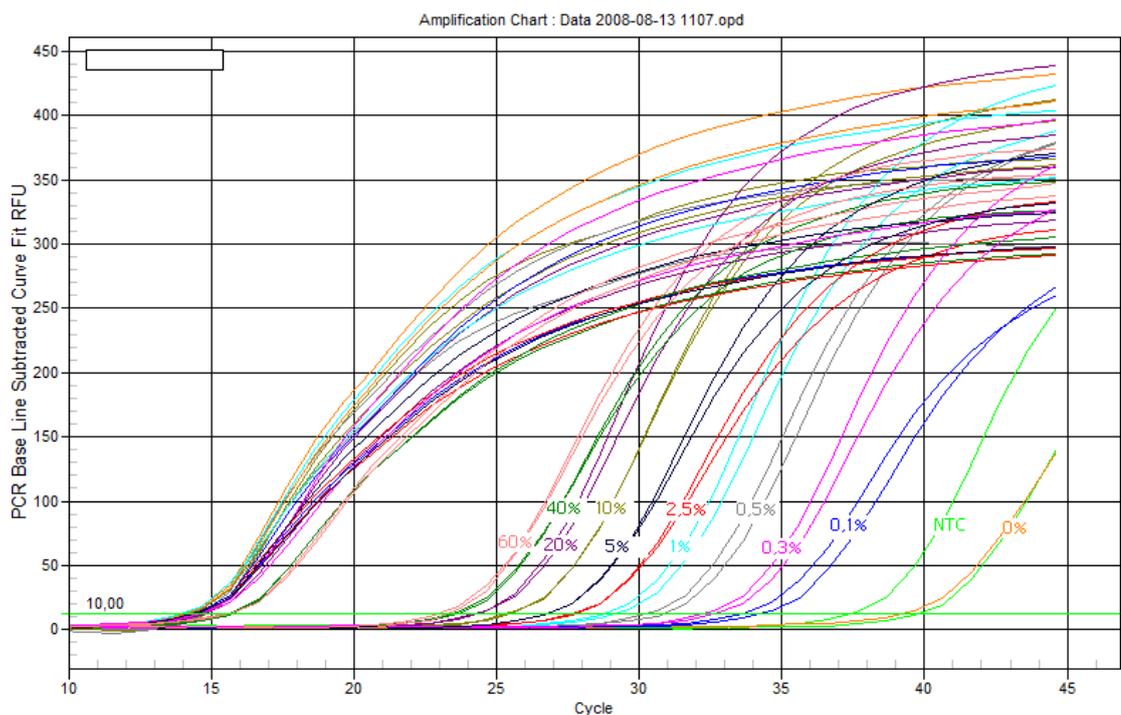
N/A... nicht nachweisbar

**Tabelle 33: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten ( $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte aus Cow Bottero 1 / 2 und 18SpEUDIR / 18SpEUNV, Annealingtemperatur 55°C, 0,1% K bis 60% K)**

	55			56			Mittelwert +/- Standardabweichung			
	$C_T$ CB	$C_T$ EU	$\Delta C_T$	$C_T$ CB	$C_T$ EU	$\Delta C_T$	$C_T$ CB		$\Delta C_T$	
60% K	22,74	15,81	7,06	22,95	15,67	7,32	23,00	+/-0,20	7,34	+/-0,21
60% K	23,09	15,57	7,41	23,20	15,61	7,56				
40% K	23,22	15,27	7,80	23,42	15,68	7,73	23,45	+/-0,15	7,90	+/-0,15
40% K	23,47	15,57	8,05	23,68	15,69	8,00				
20% K	24,24	14,57	9,46	24,20	14,62	9,52	24,25	+/-0,04	9,52	+/-0,05
20% K	24,29	14,98	9,52	24,26	14,73	9,59				
10% K	25,50	14,17	11,36	25,31	14,78	10,89	25,42	+/-0,08	11,14	+/-0,22
10% K	25,42	14,10	11,28	25,44	14,08	11,02				
5% K	26,60	13,78	12,35	26,70	14,41	12,31	26,72	+/-0,09	12,40	+/-0,11
5% K	26,81	14,70	12,57	26,76	14,36	12,38				
2,5% K	27,94	14,18	13,73	27,75	14,31	13,32	27,85	+/-0,18	13,52	+/-0,30
2,5% K	28,04	14,24	13,83	27,65	14,56	13,22				
1% K	29,40	13,84	15,48	28,74	14,06	14,74	28,99	+/-0,32	15,03	+/-0,34
1% K	28,72	13,99	14,81	29,09	13,94	15,09				
0,5% K	29,87	13,95	16,08	30,87	14,80	16,13	30,20	+/-0,49	15,93	+/-0,29
0,5% K	29,81	13,63	16,02	30,25	14,69	15,51				
0,3% K	33,52	14,54	18,73	32,20	14,53	17,60	33,62	+/-0,72	18,33	+/-0,61
0,3% K	33,71	15,04	18,92	32,65	14,66	18,05				
0,1% K	32,99	14,54	18,64	34,19	14,43	19,81	33,93	+/-0,80	19,56	+/-0,80
0,1% K	34,88	14,17	20,53	33,64	14,34	19,26				
0% K	43,13	14,14	28,90	35,24	14,03	21,17	-	-	-	-
0% K	N/A	14,32	-	39,20	14,10	25,13				
NTC	N/A	31,42	-	37,40	27,92	9,57	-	-	-	-
NTC	N/A	30,66	-	39,80	27,74	11,96				

N/A... nicht nachweisbar

Abbildung 56 zeigt die Amplifikationskurven eines Real-time PCR Laufes mit Cow Bottero 1 / 2 als speziesspezifischem Primerpaar und 18SpEUDIR / 18SpEUINV als Universalprimer. Die Kurven, die die Threshold-Linie in etwa bei einem  $C_T$ -Wert von 15 schneiden zeigen die Verläufe für den Universalprimer. Die Kurvenverläufe, die mit den Kuhmilchkonzentrationen der Proben gekennzeichnet sind, repräsentieren die Resultate für den speziesspezifischen Primer. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, zeigen auch die Negativkontrolle (0% K) sowie die NTC Amplifikationskurven, die allerdings deutlich höhere  $C_T$ -Werte aufweisen als die anderen Standards. Nichtsdestotrotz ist dies ein Hinweis darauf, dass die gewählte Annealingtemperatur von 55°C die Entstehung von unspezifischen Amplifikaten begünstigt oder zumindest ermöglicht.



**Abbildung 56: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV, Annealingtemperatur 55°C)**

Um wiederum die Effizienz der Real-time PCR unabhängig von etwaigen Unterschieden, die durch die verschiedenen Proben einer Standardreihe bedingt sein können, zu bestimmen, wurden aus den beiden Proben 0% K und 100% K Verdünnungsreihen in den Stufen 1, 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 hergestellt. Die

Effizienztests wurden für die Probe 100% K sowohl mit dem speziesspezifischen Primer Cow Bottero 1 / 2 als auch mit dem Universalprimer TR 03 / 04 durchgeführt. Für die Probe 0% K wurde lediglich der Universalprimer getestet. Für alle hierzu nötigen Real-time PCRs wurden die Proben im Triplikate analysiert und eine NTC hinzugefügt. Da die bisherigen Versuche bei 55°C gezeigt haben, dass diese Annealingtemperatur die Entstehung unspezifischer Produkte zulässt und aus den Ergebnissen der Versuche mit der Kuh-Schafmischungsreihe bereits bekannt war, dass sich die optimale Annealingtemperatur bei der Real-time PCR von der konventionellen PCR erheblich unterscheiden kann, wurden alle Tests ebenfalls mit einer Annealingtemperatur von 60°C wiederholt.

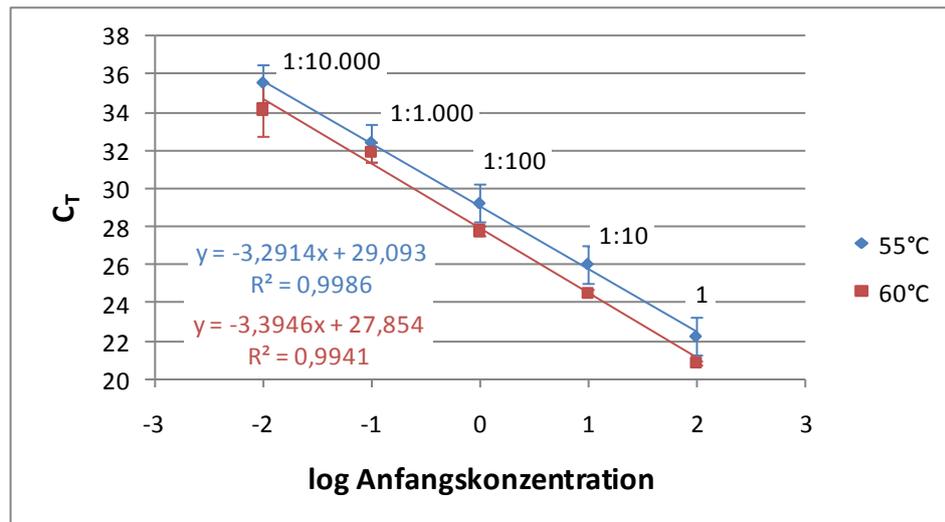
Tabelle 34 zeigt zunächst die Ergebnisse des Effizienztests für die Probe 100% K, die unter Verwendung des speziesspezifischen Primers Cow Bottero 1 / 2 bei den beiden Annealingtemperaturen 55°C und 60°C erhalten wurden. Die Werte für Effizienz und  $R^2$  wurden direkt aus den Berechnungen der Software des Thermocyclers übernommen. Beide Parameter liefern sowohl bei 55°C als auch bei 60°C durchaus akzeptable Werte. Die aus den Dreifachbestimmungen berechneten Mittelwerte zeigen wieder einen bereits bekannten Effekt, nämlich, dass die  $C_T$ -Werte bei höherer Annealingtemperatur absinken. Außerdem wird bei 60°C auch die Amplifizierung von unspezifischen Produkten unterdrückt, wie die negative NTC beweist.

**Tabelle 34: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich von  $C_T$ -Wert, Effizienz und  $R^2$  bei verschiedenen Annealingtemperaturen, Verdünnungsreihe aus 100% K (Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C)**

Probe	55°C		60°C	
	Mittelwert +/- Standardabweichung		Mittelwert +/- Standardabweichung	
100% K 1	22,26	+/- 0,54	20,88	+/- 0,09
100% K 1:10	26,04	+/- 0,57	24,54	+/- 0,15
100% K 1:100	29,23	+/- 0,41	27,79	+/- 0,24
100% K 1:1.000	32,40	+/- 1,27	31,89	+/- 0,52
100% K 1:10.000	35,54	+/- 0,38	34,18	+/- 1,37
NTC	38,09	-	N/A	-
Effizienz (in %)	100,8		95,5	
$R^2$	0,981		0,986	

N/A... nicht nachweisbar

In Abbildung 57 sind die entsprechenden Standardgeraden, die aus den Mittelwerten der  $C_T$ -Werte erhalten wurden, dargestellt. Die Standardabweichung ist dabei als Fehlerindikator zu sehen. Die beiden Standardgeraden bei den Annealingtemperaturen  $55^\circ\text{C}$  und  $60^\circ\text{C}$  zeigen ähnliche Verläufe, was auch durch die Geradengleichungen bestätigt wird. Der auffälligste Unterschied ist, wie bereits oben erwähnt, dass die  $C_T$ -Werte bei  $60^\circ\text{C}$  um etwa 1 bis 1,5 Einheiten tiefer liegen.



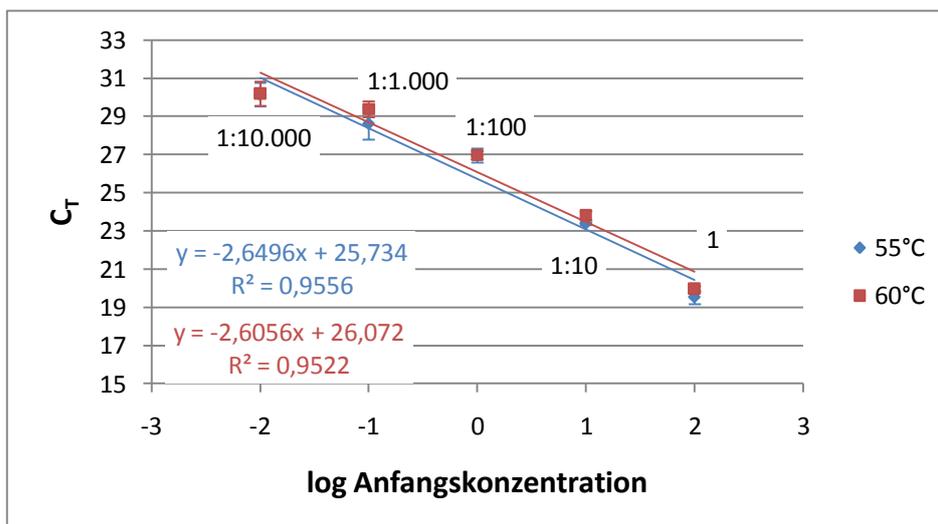
**Abbildung 57: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 100% K (Standardgeraden, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur  $55^\circ\text{C}$  bzw.  $60^\circ\text{C}$ )**

In gleicher Vorgehensweise wurde ein Effizienztest mit dem Universalprimer TR 03 / 04 durchgeführt. Tabelle 35 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs mit einer Verdünnungsreihe aus der Probe 100% K. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Resultaten scheint die Annealingtemperatur die  $C_T$ -Werte hier nicht maßgeblich zu beeinflussen. Sie liegen für  $55^\circ\text{C}$  und  $60^\circ\text{C}$  in einem vergleichbaren Bereich. Außerdem zeigen weder Effizienz noch  $R^2$  zufriedenstellende Werte.

**Tabelle 35: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich von  $C_T$ -Wert, Effizienz und  $R^2$  bei verschiedenen Annealingtemperaturen, Verdünnungsreihe aus 100% K (TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C)**

Probe	55°C		60°C	
	Mittelwert +/- Standardabweichung		Mittelwert +/- Standardabweichung	
100% K 1	19,53	+/- 0,34	19,96	+/- 0,14
100% K 1:10	23,39	+/- 0,05	23,82	+/- 0,22
100% K 1:100	26,97	+/- 0,35	26,98	+/- 0,22
100% K 1:1.000	28,63	+/- 0,84	29,39	+/- 0,41
100% K 1:10.000	30,15	+/- 0,62	30,21	+/- 0,63
NTC	31,19	-	30,65	-
Effizienz (in %)	138,5		142,0	
$R^2$	0,944		0,946	

Die zu hohe Reaktionseffizienz kommt, wie in Abbildung 58 zu sehen ist, in erster Linie durch das Abweichen der  $C_T$ -Werte der höchsten Verdünnungsstufe 1:10.000 nach unten zu Stande. Dadurch flacht die Steigung der Standardgeraden ab, wodurch sich eine höhere Reaktionseffizienz ergibt. Zu beachten ist, dass sich dieser Effekt sowohl bei 55°C als auch bei 60°C zeigt, obwohl die Verdünnungsreihen für die jeweilige Real-time PCR separat hergestellt wurden. Ein Pipettierfehler bei der Herstellung der Verdünnungen als Ursache für die Abweichung erscheint somit unwahrscheinlich.

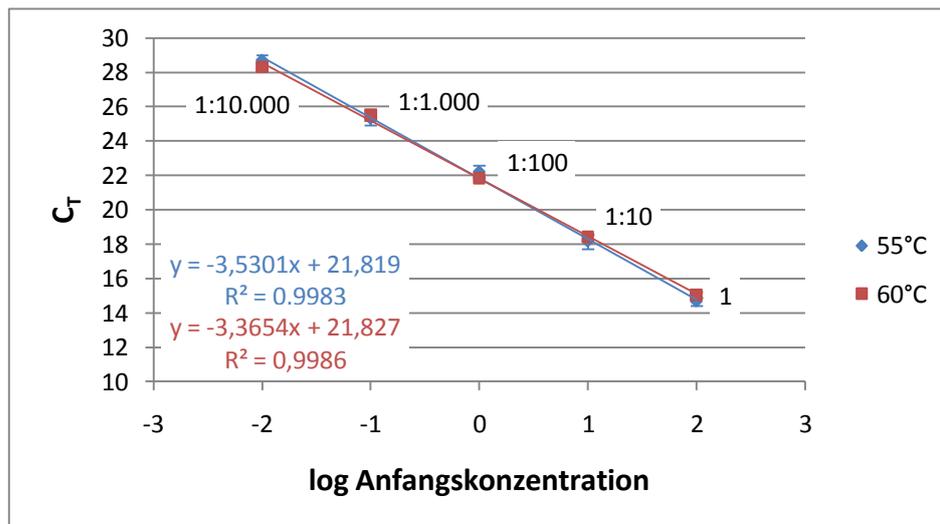


**Abbildung 58: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 100% K (Standardgeraden, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C)**

Schließlich wurde derselbe Effizienztest auch noch mit der Probe 0% K und dem Universalprimer TR 03 / 04 durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Verdünnungsstufen wie zuvor verwendet. Auch hierbei ist wieder zu sehen, dass sich die Annealingtemperatur nicht maßgeblich auf die  $C_T$ -Werte auswirkt. Abbildung 59 zeigt praktisch idente Verläufe für die beiden Standardgeraden bei 55°C und 60°C. Sowohl bei 55°C als auch bei 60°C ergeben sich für die beiden Parameter Effizienz und  $R^2$  sehr gute bzw. fast optimale Resultate.

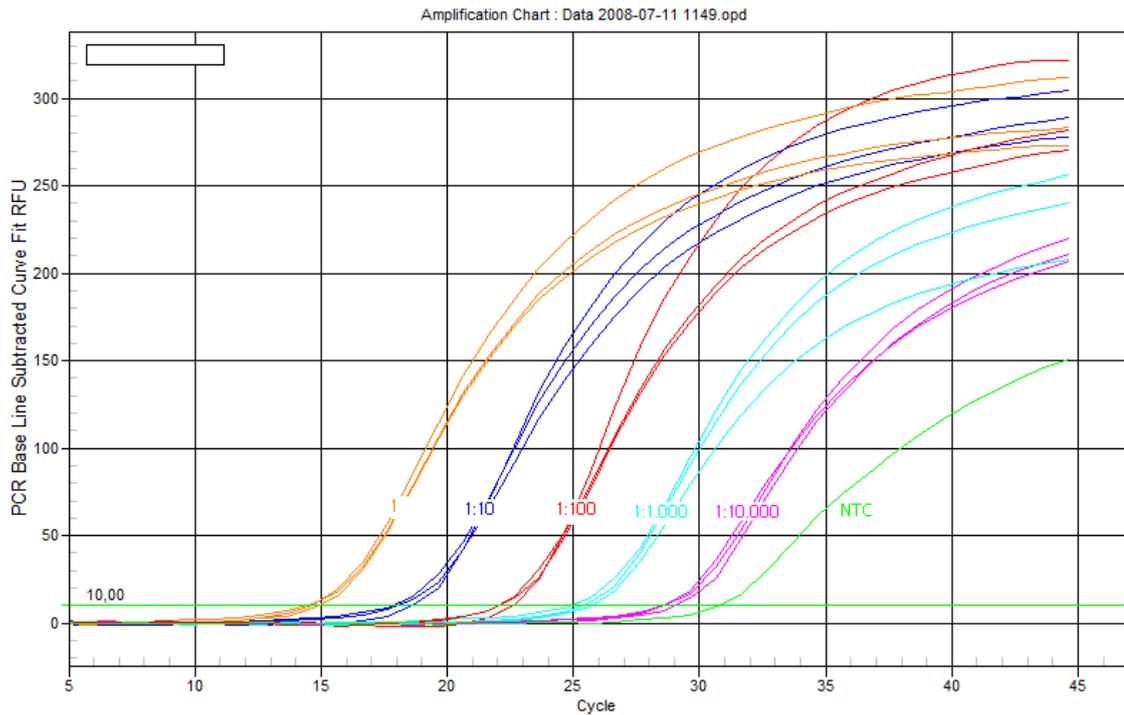
**Tabelle 36: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich von  $C_T$ -Wert, Effizienz und  $R^2$  bei verschiedenen Annealingtemperaturen, Verdünnungsreihe aus 0% K (TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C)**

Probe	55°C		60°C	
	Mittelwert +/- Standardabweichung		Mittelwert +/- Standardabweichung	
0% K 1	14,66	+/- 0,23	15,05	+/- 0,19
0% K 1:10	18,16	+/- 0,43	18,41	+/- 0,13
0% K 1:100	22,22	+/- 0,35	21,84	+/- 0,06
0% K 1:1.000	25,32	+/- 0,40	25,51	+/- 0,33
0% K 1:10.000	28,73	+/- 0,29	28,32	+/- 0,14
NTC	30,78	-	29,77	-
Effizienz (in %)	92,0		100,2	
$R^2$	0,995		0,997	



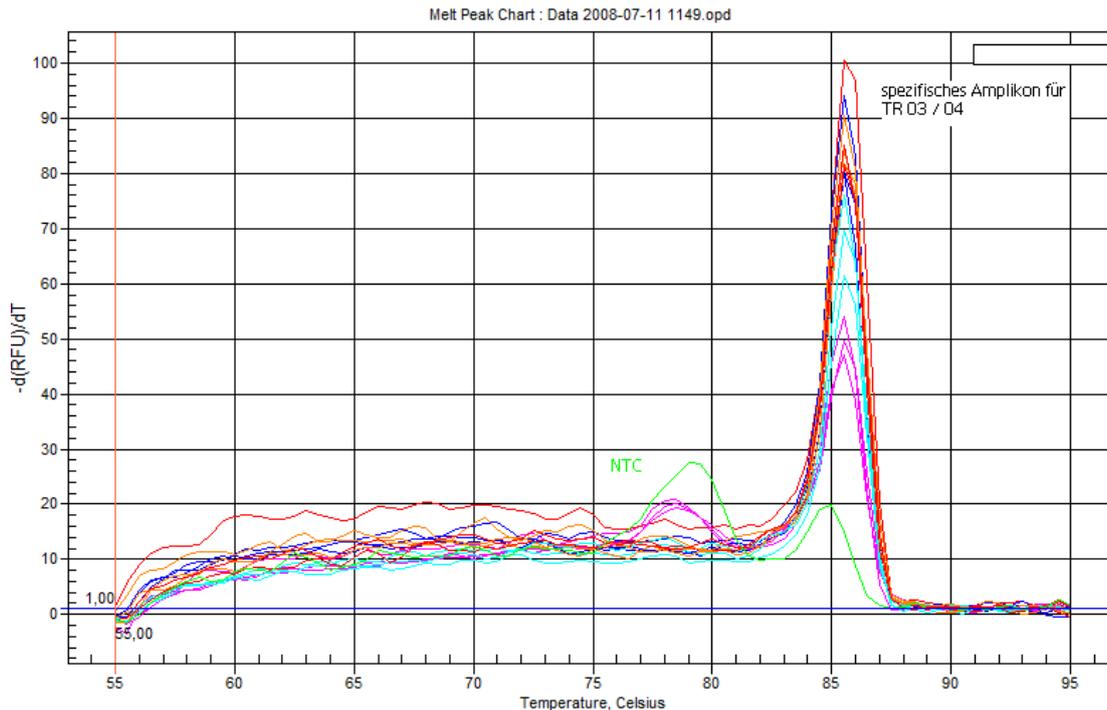
**Abbildung 59: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Vergleich der Effizienztests mit Verdünnungen aus Probe 0% K (Standardgeraden, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C bzw. 60°C)**

Wie aus Tabelle 36 und Abbildung 60 hervorgeht, reicht für den Universalprimer TR 03 / 04 eine Annealingtemperatur von 55°C oder auch 60°C nicht aus um eine negative Negativkontrolle bzw. NTC zu erhalten. Die NTC zeigt eine typische Amplifikationskurve mit nur geringer Distanz zur höchsten Verdünnungsstufe 1:10.000.



**Abbildung 60: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Amplifikationskurven, TR 03 / 04, Verdünnungen aus Probe 0% K, Annealingtemperatur 55°C)**

Der Blick auf die Schmelzkurvenanalyse in Abbildung 61 zeigt jedoch, dass es sich bei dem Amplikon nicht um ein spezifisches Produkt für den Universalprimer TR 03 / 04 handelt.



**Abbildung 61: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten (Schmelzkurvenanalyse, TR 03 / 04, Verdünnungen aus Probe 0% K, Annealingtemperatur 55°C)**

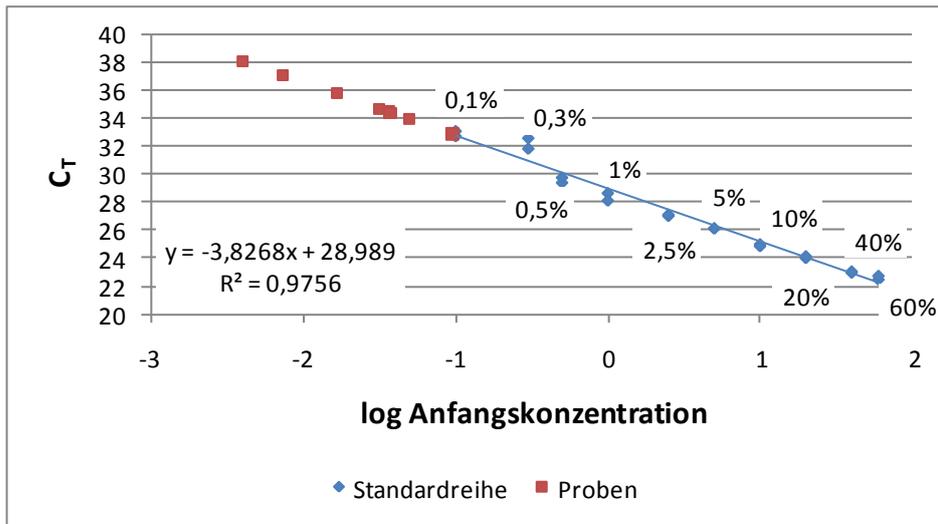
Ziel der durchgeführten Effizienztests war zu zeigen, dass sowohl für Proben aus reiner Kuhmilch sowie für Proben aus reiner Sojamilch eine ähnlich effiziente Reaktion unter Verwendung des speziesspezifischen Primers bzw. des Universalprimers durchgeführt werden kann. Dies ist von Bedeutung um zu gewährleisten, dass vergleichbare Ergebnisse erhalten werden und ist schon an anderer Stelle diskutiert worden. Die Probe 0% K liefert mit dem Universalprimer TR 03 / 04 ebenso gute Ergebnisse für die beiden Parameter Effizienz und  $R^2$  wie die Probe 100% K mit dem speziesspezifischen Primer Cow Bottero 1 / 2. Alle hierfür erhaltenen Ergebnisse liegen im wünschenswerten Bereich (Effizienz zwischen 90 und 105%,  $R^2 > 0,95$ ). Dabei ist festzustellen, dass die höhere Annealingtemperatur von 60°C für den speziesspezifischen Primer Cow Bottero 1 / 2 Vorteile bringt, während auf den Universalprimer kein maßgeblicher Einfluss beobachtet werden kann. Für die Kombination aus der Probe 100% K und dem Universalprimer TR 03 / 04 wurden wesentlich schlechtere Werte für Effizienz und  $R^2$  beobachtet. Da im Rahmen dieser Diplomarbeit allerdings versucht wird geringe Mengen von Kuhmilch in Sojamilchprodukten nachzuweisen, ist anzunehmen, dass die

nicht optimal verlaufende Amplifikation von geringen Mengen an DNA aus Kuhmilch, die Amplifikation der Gesamt-DNA in einer Probe nicht maßgeblich beeinflussen wird. Aufgabe des Universalprimers ist es ja schließlich ein Indikator für die in einer Probe insgesamt enthaltene DNA zu sein.

#### **4.2.2.3 Quantifizierung des Kuhmilchanteils unbekannter Proben**

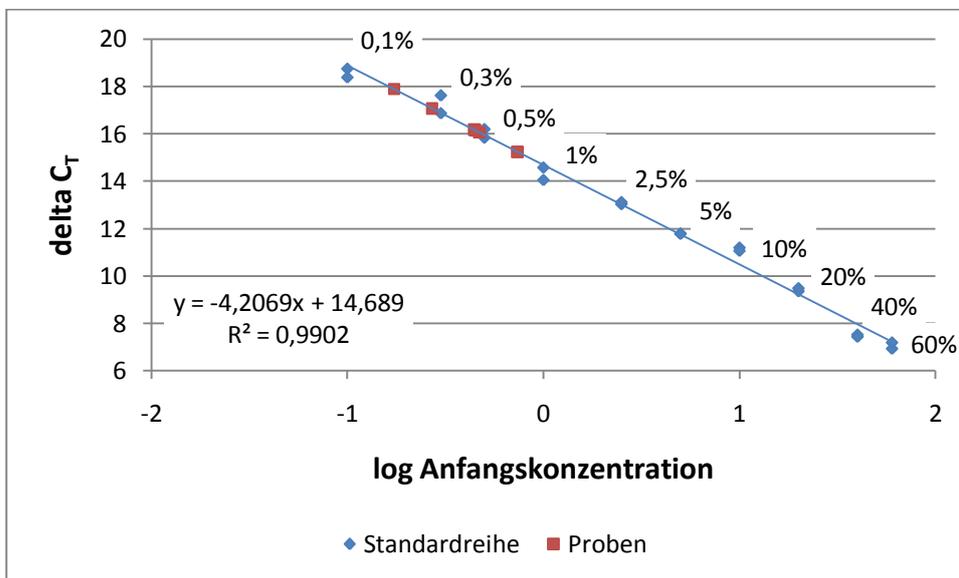
Um die Praxistauglichkeit der Methode zu testen wurde im Folgenden versucht mit den Primerpaaren TR 03 / 04 und Cow Bottero 1 / 2 sowie unter Zuhilfenahme der Standardreihe aus Kuh- und Sojamilch den Kuhmilchanteil in vier Handelsproben festzustellen. Die vier Proben wurden bereits einer speziesspezifischen PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren unterzogen. Dabei konnten für die Proben 5a und 5b zweifelsfrei Kuhmilchanteile nachgewiesen werden. Die Proben 6a und 6b lieferten allerdings teils widersprüchliche Ergebnisse. Um den Kuhmilchanteil zu quantifizieren bzw. ein eindeutiges Resultat für die beiden Proben 6a und 6b zu erhalten, wurden diese vier Proben der Analyse mittels Real-time PCR unterzogen.

Die beiden Real-time PCR Läufe 61 und 64 wurden bei einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Zunächst wurden Standardgeraden anhand der  $C_T$ -Werte des speziesspezifischen Primers erstellt, wie in Abbildung 62 und Abbildung 66 zu sehen ist. Dabei fällt auf, dass sich für die errechneten Kuhmilchkonzentrationen in den unbekanntenen Proben sehr niedrige Werte ergeben. Keine der Proben zeigt nach dieser Vorgehensweise eine Kuhmilchkonzentration von mehr als 0,3%.



**Abbildung 62: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach C<sub>T</sub>-Werten (Standardgeraden, Cow Bottero 1/ 2, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61)**

Die Auswertung nach der ΔC<sub>T</sub>-Methode führt dazu, dass die errechneten Kuhmilchkonzentrationen erheblich ansteigen, teils werden die Werte im Vergleich zur vorangegangenen Berechnung sogar verzehnfacht.



**Abbildung 63: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach ΔC<sub>T</sub>-Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1/ 2 und TR 03 /04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61)**

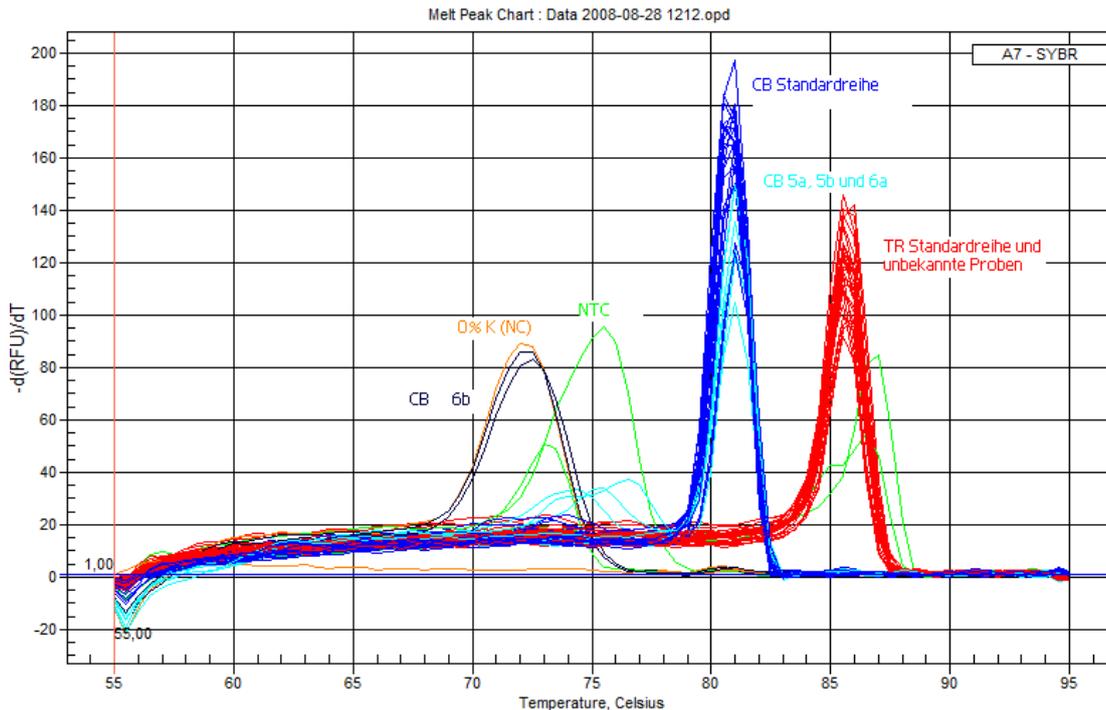
Tabelle 37 listet die dazu gehörigen  $C_T$ - und  $\Delta C_T$ -Werte auf. Die  $C_T$ -Werte für die Probe 6b wurden in den Berechnungen nicht berücksichtigt, da aus der Schmelzkurvenanalyse in Abbildung 64 hervorgeht, dass das erhaltene Amplikon nicht dem gewünschten Produkt entspricht.

**Tabelle 37: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekanntnen Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61)**

<b>Probe</b>	<b><math>C_T</math> CB</b>	<b><math>C_T</math> TR</b>	<b><math>\Delta C_T</math></b>	<b>Kuhmilchanteil in %</b>	
60% K	22,48	15,75	6,92	60	
60% K	22,74	15,37	7,18	60	
40% K	23,05	15,50	7,51	40	
40% K	22,97	15,58	7,42	40	
20% K	24,01	14,64	9,35	20	
20% K	24,14	14,69	9,47	20	
10% K	25,00	13,62	11,19	10	
10% K	24,86	13,99	11,06	10	
5% K	26,14	14,10	11,78	5	
5% K	26,14	14,62	11,78	5	
2,5% K	27,03	13,90	13,03	2,5	
2,5% K	27,11	14,09	13,12	2,5	
1% K	28,65	14,18	14,58	1	
1% K	28,12	13,96	14,05	1	
0,5% K	29,41	13,73	15,84	0,5	
0,5% K	29,77	13,41	16,20	0,5	
0,3% K	31,84	14,63	16,87	0,3	
0,3% K	32,59	15,31	17,63	0,3	
0,1% K	33,09	14,34	18,75	0,1	
0,1% K	32,73	14,34	18,39	0,1	
0% K	38,87	14,18	-	0	
0% K	N/A	14,14	-	0	
NTC	41,61	27,62	-	-	
NTC	35,50	29,11	-	-	
				nach $\Delta C_T$	nach $C_T$ CB
5a	35,80	17,93	17,89	0,17	0,02
5a	33,97	17,89	16,06	0,47	0,05
5b	32,90	17,55	15,24	0,74	0,10
5b	34,73	17,75	17,08	0,27	0,03
6a	34,47	19,46	16,17	0,44	0,04
6a	34,45	17,14	16,15	0,45	0,04
6b*	-	-	-	-	-
6b*	-	-	-	-	-

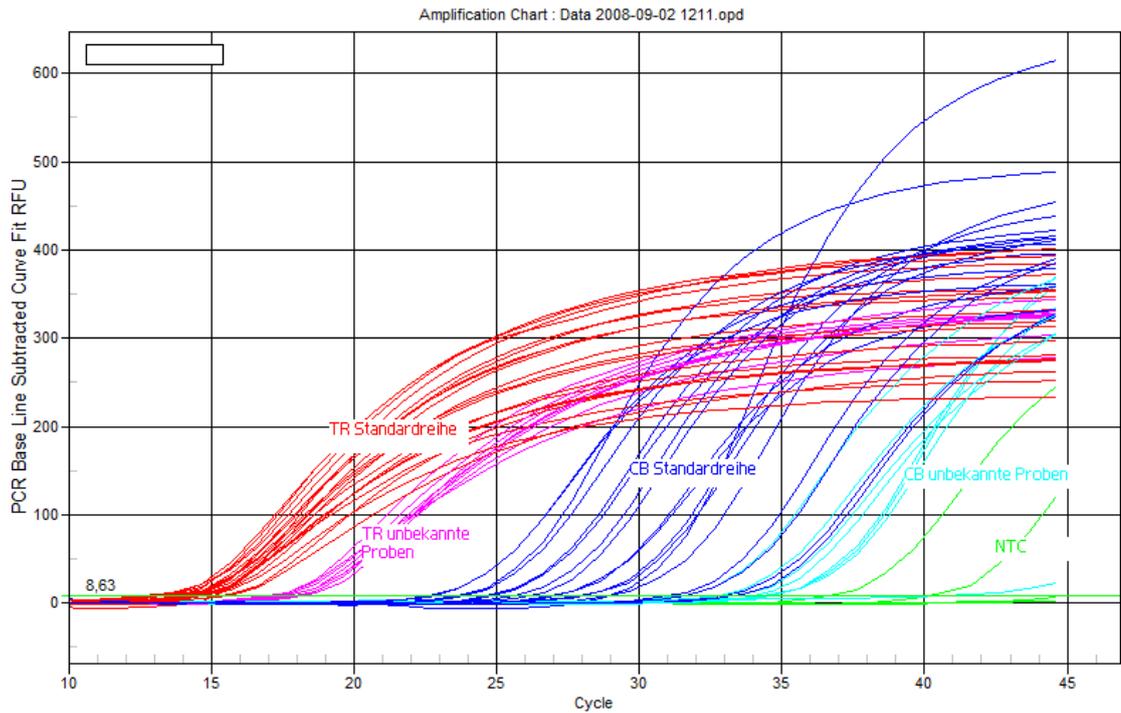
N/A... nicht nachweisbar

\* laut Schmelzkurvenanalyse kein spezifisches Produkt

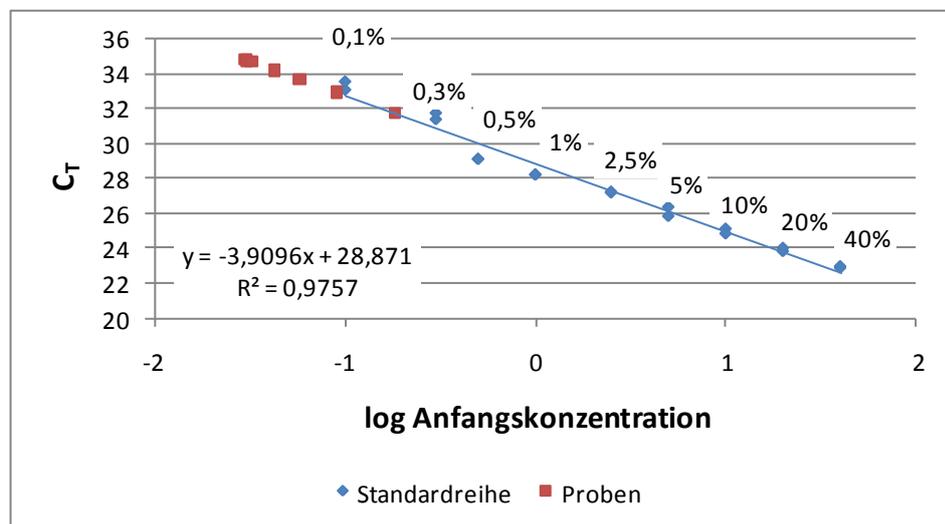


**Abbildung 64: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben (Schmelzkurvenanalyse, Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 61)**

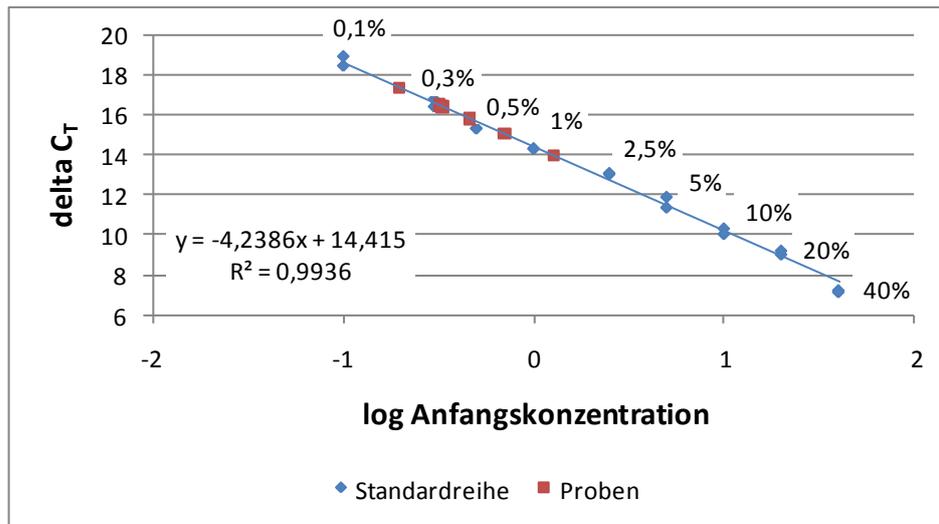
Bereits die vergleichsweise hohen  $C_T$ -Werte der unbekanntenen Proben für den Universalprimer zeigen, dass die Gesamt-DNA-Konzentration in den Handelsproben niedriger ist, als in den Proben der Standardreihen. Zum Teil ist diese Beobachtung auch darauf zurückzuführen, dass bei der DNA-Isolierung nur die Hälfte an Probe, nämlich 75 g statt den üblichen 150 g eingesetzt wurde. Geht man davon aus, dass die halbe Menge an Probe auch nur halb so viel Gesamt-DNA liefert, dürften sich die Ergebnisse allerdings nur um eine  $C_T$  Einheit unterscheiden. Die auftretenden Differenzen zwischen Standards und Proben können also nicht ausschließlich auf einer geringeren Menge an Probe, die zur DNA-Isolierung eingesetzt worden sind, beruhen und müssen daher auf andere Faktoren wie einen generell niedrigeren DNA-Gehalt, der eventuell durch Denaturierungsvorgänge während der Produktion der Sojamilchprodukte bedingt sein kann, zurückzuführen sein. In Abbildung 65 ist dieser Effekt auch gut zu erkennen. Die Amplifikationskurven der unbekanntenen Proben in pink heben sich deutlich von den Kurven der Standardreihe in rot ab.



**Abbildung 65: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben (Amplifikationskurven, Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64)**



**Abbildung 66: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach  $C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64)**



**Abbildung 67: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach  $\Delta C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64)**

**Tabelle 38: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekanntenen Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 55°C, Lauf 64)**

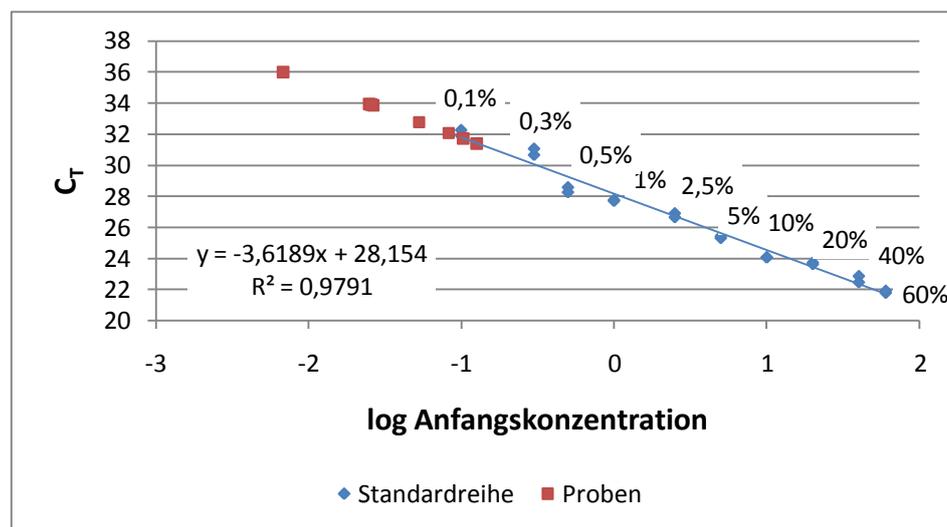
	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	Kuhmilchanteil in %
40% K	22,96	15,67	7,25	40
40% K	22,87	15,75	7,16	40
20% K	23,83	14,72	9,04	20
20% K	24,01	14,85	9,23	20
10% K	25,12	15,20	10,34	10
10% K	24,84	14,36	10,06	10
5% K	25,84	14,20	11,39	5
5% K	26,37	14,72	11,91	5
2,5% K	27,19	14,49	13,05	2,5
2,5% K	27,25	13,79	13,10	2,5
1% K	28,22	13,66	14,32	1
1% K	28,24	14,14	14,34	1
0,5% K	29,13	14,00	15,35	0,5
0,5% K	29,12	13,57	15,34	0,5
0,3% K	31,40	14,93	16,44	0,3
0,3% K	31,77	15,00	16,80	0,3
0,1% K	33,10	14,67	18,47	0,1
0,1% K	33,57	14,59	18,94	0,1
0% K	N/A	14,26	-	0
0% K	36,91	13,28	-	0
NTC	40,46	30,42	-	-
NTC	N/A	29,24	-	-

				nach $\Delta C_T$	nach $C_T$ CB
5a	33,71	17,87	15,82	0,47	0,06
5a	32,96	17,91	15,07	0,70	0,09
5b	31,74	17,67	13,96	1,28	0,18
5b	34,23	17,89	16,45	0,33	0,04
6a	34,83	18,43	16,53	0,32	0,03
6a	34,80	18,18	16,49	0,32	0,03
6b	34,70	17,30	17,41	0,20	0,03
6b	-	-	-	-	-

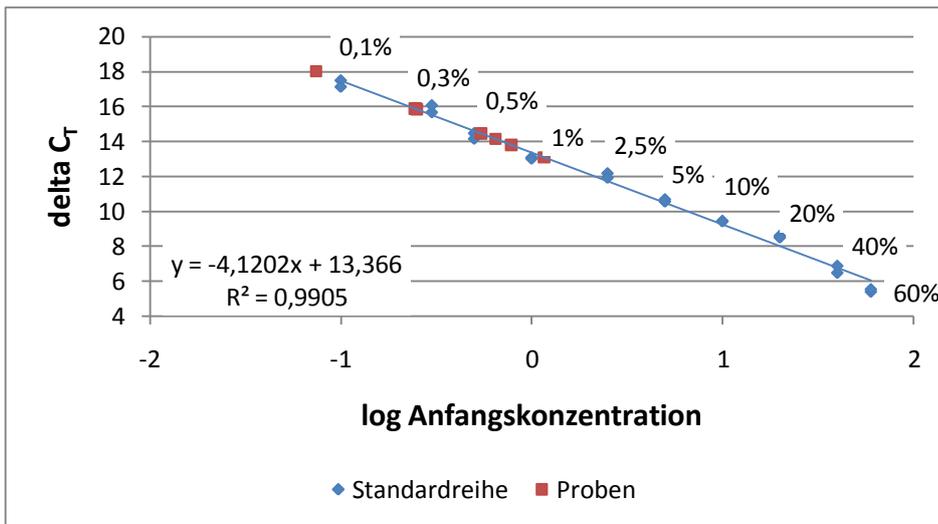
N/A... nicht nachweisbar

\* laut Schmelzkurvenanalyse kein spezifisches Produkt

Die folgenden beiden Real-time PCR Läufe 88 und 89 wurden bei einer Annealingtemperatur von 60°C durchgeführt. Ansonsten wurden idente Bedingungen wie bei den beiden oben präsentierten Versuchen verwendet.



**Abbildung 68: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach  $C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 88)**



**Abbildung 69: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach  $\Delta C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 88)**

Da eine der beiden Doppelbestimmungen für Probe 6a ein unspezifisches Amplikon lieferte, mussten die entsprechenden  $C_T$ -Werte aus der Berechnung herausgenommen werden. Auch bei einer Annealingtemperatur von 60°C zeigt sich wieder, dass die Quantifizierung mittels  $\Delta C_T$ -Methode zu einer bis zu zehnfach höheren Kuhmilchkonzentration führt im Vergleich mit einer Auswertung, die nur die Resultate für das speziesspezifische Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 berücksichtigt.

**Tabelle 39: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekanntenen Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 88)**

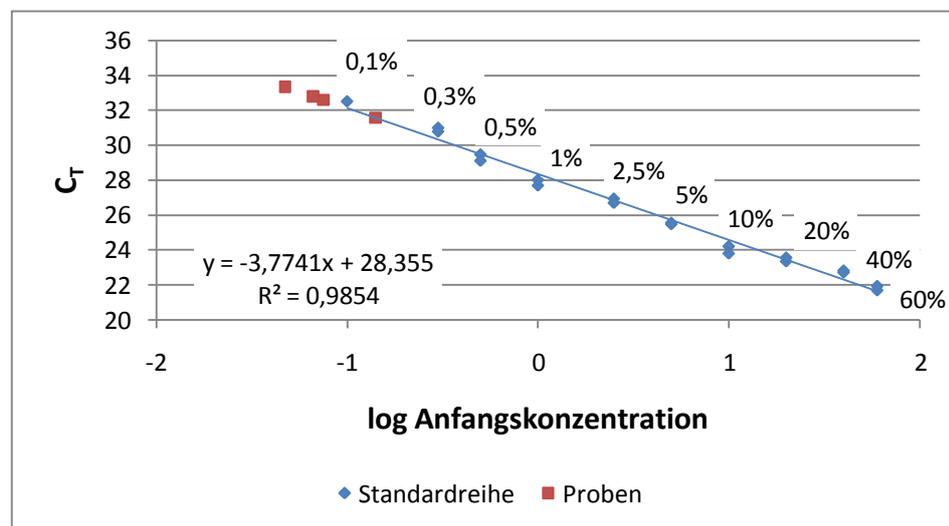
	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	Kuhmilchanteil in %
60% K	21,80	16,14	5,39	60
60% K	21,93	16,67	5,53	60
40% K	22,88	16,07	6,87	40
40% K	22,48	15,95	6,47	40
20% K	23,74	15,12	8,59	20
20% K	23,64	15,19	8,49	20
10% K	24,07	14,75	9,42	10
10% K	24,09	14,55	9,44	10
5% K	25,32	14,74	10,55	5
5% K	25,45	14,81	10,68	5
2,5% K	26,92	14,66	12,17	2,5
2,5% K	26,66	14,84	11,91	2,5
1% K	27,77	14,68	13,07	1
1% K	27,71	14,72	13,01	1
0,5% K	28,59	14,22	14,46	0,5

0,5% K	28,27	14,04	14,14		0,5
0,3% K	30,67	14,81	15,66		0,3
0,3% K	31,07	15,21	16,06		0,3
0,1% K	32,27	14,75	17,48		0,1
0,1% K	31,90	14,82	17,12		0,1
0% K	N/A	14,66	-		0
0% K	N/A	14,69	-		0
NTC	N/A	29,69	-		-
NTC	N/A	29,44	-		-
				nach $\Delta C_T$	nach $C_T$ CB
5a	32,77	18,42	14,46	0,54	0,05
5a	31,41	18,21	13,10	1,16	0,13
5b	31,73	17,72	13,81	0,78	0,10
5b	32,07	18,12	14,15	0,65	0,08
6a*	-	-	-	-	-
6a	33,86	17,89	15,88	0,25	0,03
6b	33,95	17,97	15,89	0,24	0,03
6b	33,91	18,16	15,84	0,25	0,03

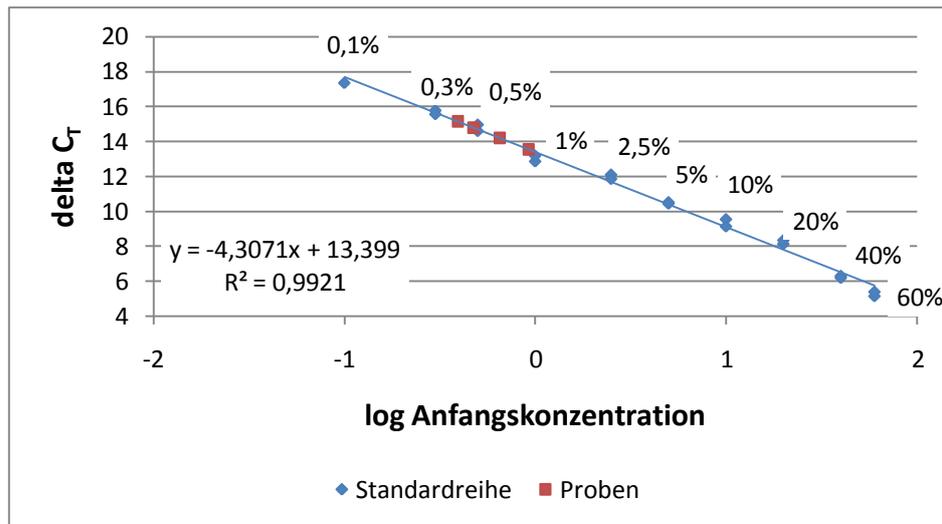
N/A... nicht nachweisbar

\* laut Schmelzkurvenanalyse kein spezifisches Produkt

Auch bei einem zweiten Real-time PCR Lauf mit 60°C als Annealingtemperatur musste eine der beiden Doppelbestimmungen für Probe 6a aufgrund eines unspezifischen Amplikons aus der Berechnung genommen werden.



**Abbildung 70: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach  $C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 89)**



**Abbildung 71: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben nach  $\Delta C_T$ -Werten (Standardgerade, Cow Bottero 1 / 2, TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 89)**

**Tabelle 40: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung des Kuhmilchanteils in unbekanntenen Proben (Cow Bottero 1 / 2 und TR 03 / 04, Annealingtemperatur 60°C, Lauf 89)**

	$C_T$ CB	$C_T$ TR	$\Delta C_T$	Kuhmilchanteil in %
60% K	21,71	16,39	5,16	60
60% K	21,95	16,70	5,41	60
40% K	22,84	16,72	6,32	40
40% K	22,73	16,32	6,21	40
20% K	23,37	15,09	8,15	20
20% K	23,58	15,35	8,36	20
10% K	24,23	14,64	9,56	10
10% K	23,82	14,70	9,15	10
5% K	25,57	14,67	10,53	5
5% K	25,49	15,40	10,45	5
2,5% K	26,95	14,88	12,11	2,5
2,5% K	26,71	14,80	11,87	2,5
1% K	27,70	14,79	12,87	1
1% K	28,03	14,88	13,19	1
0,5% K	29,48	14,90	14,96	0,5
0,5% K	29,12	14,12	14,60	0,5
0,3% K	31,00	15,15	15,78	0,3
0,3% K	30,79	15,29	15,57	0,3
0,1% K	-	-	-	0,1
0,1% K	32,51	14,91	17,35	0,1
0% K	N/A	14,80	-	0
0% K	N/A	14,79	-	0
NTC	N/A	32,68	-	-

NTC	39,35	30,83	-	-	
				nach $\Delta C_T$	nach $C_T$ CB
5a	N/A	18,44	-	-	-
5a	32,60	18,35	14,20	0,65	0,08
5b	32,81	17,92	14,79	0,48	0,07
5b	31,57	18,12	13,55	0,92	0,14
6a*	-	-	-	-	-
6a	33,36	18,05	15,15	0,39	0,05
6b	N/A	18,25	-	-	-
6b	N/A	18,30	-	-	-

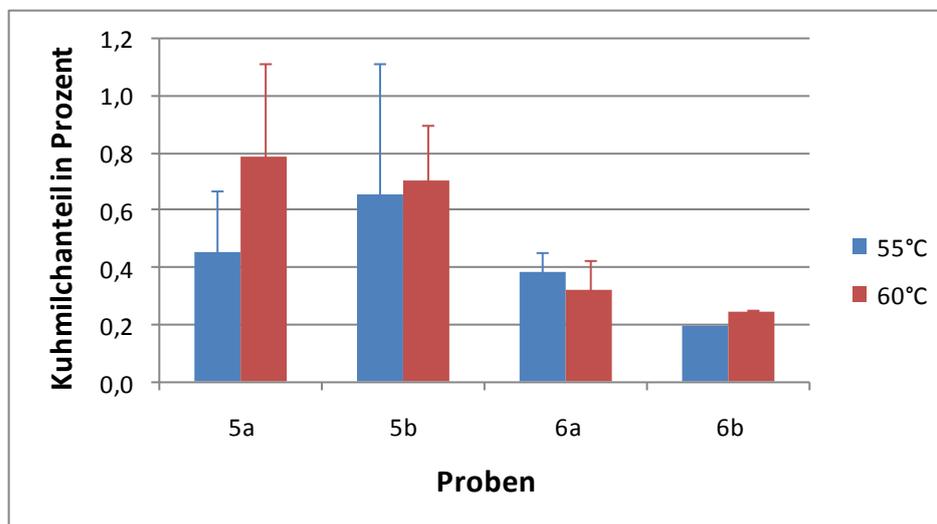
N/A... nicht nachweisbar

\* laut Schmelzkurvenanalyse kein spezifisches Produkt

Tabelle 41 zeigt noch einmal eine Zusammenfassung der Resultate die zur Quantifizierung der unbekanntenen Proben erhalten wurden. Dabei fällt auf, dass bei einer Annealingtemperatur von 60°C in den Proben generell öfter keine Kuhmilch nachgewiesen werden konnte.  $C_T$ -Werte, die durch Amplifikate zu Stande gekommen waren, die in der Schmelzkurvenanalyse keinen spezifischen Peak zeigten, wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. Wie in Tabelle 39 und Tabelle 40 zu sehen ist, führt die Annealingtemperatur von 60°C auch dazu, dass Negativkontrollen sowie NTC mit einer einzigen Ausnahme, die möglicherweise auf eine Kontamination während der Pipettiervorgänge zurückzuführen ist, nicht nachweisbar sind. In Abbildung 72 sind die Kuhmilchanteile auch graphisch dargestellt. Die jeweilige Standardabweichung ist als Fehlerindikator dargestellt. In den Proben 5a und 5b konnten zweifelsfrei Kuhmilchanteile nachgewiesen werden. Aus den erhaltenen Daten geht allerdings auch hervor, dass der Variationskoeffizient der Methode sehr hoch ist. Vor allem für die Probe 6b hat sich der Nachweis schwierig gestaltet, bei 55°C war hier bei vier Bestimmungen nur ein einziges Mal ein Kuhmilchanteil nachweisbar. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Proben 6a und 6b einen geringen Anteil an Kuhmilch enthalten. Unter den gegebenen Umständen und unter Berücksichtigung der niedrigen Gesamt-DNA-Konzentration der Proben scheint es besonders schwierig zu sein, diese geringen Konzentrationen nachzuweisen.

**Tabelle 41: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben, Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten**

	55°C				60°C			
	5a	5b	6a	6b	5a	5b	6a	6b
Kuhmilchanteil in %	0,17	0,74	0,44	0,20	0,54	0,78	0,25	0,24
	0,47	0,27	0,45	-	1,16	0,65	0,39	0,25
	0,47	1,28	0,32	-	0,65	0,48	-	-
	0,70	0,33	0,32	-	-	0,92	-	-
Mittelwert	0,45	0,65	0,38	0,20	0,79	0,71	0,32	0,25
Standardabweichung	0,22	0,46	0,07	-	0,33	0,19	0,10	<0,01
Variationskoeffizient (in %)	47,8	70,9	19,0	-	42,1	27,0	32,7	1,7



**Abbildung 72: Real-time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten, Quantifizierung unbekannter Proben**

Mittels PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese konnte ein qualitativer Nachweis von Kuhmilchbestandteilen in Sojamilchprodukten durchgeführt werden. Dabei wurden zwei verschiedene für Rind spezifische Primerpaare nämlich Cow Bottero 1 / 2 und CytOx IIa / II b verwendet, die beide unter Verwendung einer Kuh-Sojastandardreihe den Nachweis von Kuhmilch ab einer Konzentration von 0,1% Kuhmilchanteil erlauben. Bei geeigneten PCR-Bedingungen lässt sich zweifelsfrei zwischen der 0,1% K Probe der Standardreihe und der Negativkontrolle (0% K) unterscheiden. Außerdem wurden zwölf im Handel erhältliche Sojamilchprodukte mit der optimierten Methode untersucht. Dabei konnte bei acht der Proben eine

Verfälschung oder Kontamination mit Kuhmilch ausgeschlossen werden. Die beiden Proben 5a und 5b zeigten bei beiden Primerpaaren eine deutliche für Rind spezifische Bande. Die Verfälschung bzw. Kontamination dieser Probe kann mittels der verwendeten Standardreihe semiquantitativ abgeschätzt werden und dürfte etwa zwischen 0,1 und 0,5% Kuhmilchanteil liegen. Für zwei weitere Proben konnten zwar teils spezifische Banden gefunden werden, die Ergebnisse waren aber nur eingeschränkt reproduzierbar. Ein zweifelsfreier Nachweis konnte mit PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese also nicht erbracht werden. Denkbar wäre, dass hier eine Kontamination im Spurenbereich vorliegt, die im Bereich der Nachweisgrenze der Methode liegt und so fallweise positive bzw. negative Analysenergebnisse liefert. Um eine höhere Nachweisempfindlichkeit zu erzielen bzw. auch um den Kuhmilchanteil der positiven Proben quantifizieren zu können, wurde beschlossen die Proben mittels Real-Time-PCR zu analysieren. Für eine Quantifizierung nach der im Abschnitt 3.5 Real-time PCR beschriebenen Methode, wie sie auch für die Quantifizierung gentechnisch veränderter Organismen angewendet wird, ist die Auffindung eines geeigneten Universalprimerpaares unerlässlich. Die Vorversuche mittels PCR zeigten hier, dass für diesen Zweck die Primerpaare TR 03 / 04 und 18SpEUDIR / 18SpEUINV als geeignet zu klassifizieren sind. Es zeigten sich zwischen den beiden Primerpaaren bei der Real-time PCR praktisch keinerlei Unterschiede, die Entscheidung fiel schließlich auf TR 03 / 04 als Universalprimer.

Für die Analyse mittels Real-time PCR wurde aus bereits genannten Gründen nur das Primerpaar Cow Bottero 1 / 2 eingesetzt. Dieses Primerpaar erlaubt bei geeigneten Real-time PCR-Bedingungen und unter Verwendung der Proben aus der Kuh-Sojamilchmischungsreihe die zweifelsfreie Unterscheidung zwischen der Probe 0,1% K und der Negativkontrolle (0% K). Für die beiden Handelsproben 5a und 5b konnte ein Kuhmilchanteil im Bereich von 0,45 bis 0,79% (5a) bzw. 0,65 bis 0,71% (5b) festgestellt werden. Die beiden Proben 6a und 6b zeigen deutlich niedrigere Konzentrationen. Die geringe Kuhmilchkonzentration in Kombination mit der im Vergleich zur Standardreihe wohl geringeren Gesamt-DNA-Konzentration der DNA-Isolate aus den Proben dürfte hierbei dafür verantwortlich sein, dass sich der Nachweis schwierig gestaltet. So konnten für die Probe 6a nur in sechs von acht Bestimmungen auch wirklich  $C_T$ -Werte erhalten werden, für die Probe 6b verliefen gar fünf von acht

Bestimmungen negativ. Für die Probe 6a konnte schließlich eine Kuhmilchkonzentration von 0,32 bis 0,38% errechnet werden, für die Probe 6b 0,20 bis 0,25%, wobei man sich hier offenbar an der Nachweisgrenze der Methode bewegt.

Da die Rezepturen zur Herstellung von Sojamilchprodukten von den Herstellern gut gehütet werden, konnte nicht geklärt werden, worauf die Kontaminationen mit Kuhmilch zurückzuführen waren. Denkbar ist, dass sie entweder einer in Kuhmilchprodukten angezüchteten Joghurt-Starterkultur entstammen oder aber absichtlich versucht wurde durch Beimengung von Kuhmilchbestandteilen die technologischen Eigenschaften bei der Verarbeitung zu verbessern.

## 5 Schlussbetrachtung

Für den qualitativen Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafmilchkäsen wurden zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt, die beide auf mitochondriale Zielsequenzen gerichtet waren. Beide Primerpaare ermöglichen unter Einsatz einer Standardreihe aus Modellkäsen unterschiedlicher Kuhmilchanteile die qualitative Differenzierung zwischen einer Probe mit einem Kuhmilchanteil von 0,1% und einer Probe aus reinem Schafkäse. Die Nachweisgrenze der Methode wird daher mit 0,1% angenommen. Durch die Verwendung einzelner Proben einer zweiten Standardreihe, die unter anderen Bedingungen hergestellt worden war, konnte gezeigt werden, dass bei der speziesspezifischen PCR mit anschließender Gelelektrophorese praktisch keine Unterschiede im Verhalten der Proben auftreten bzw. die Detektion mittels Gelelektrophorese nicht empfindlich genug ist um etwaige Differenzen aufzuzeigen.

Die anschließende Analyse mittels Real-time PCR, deren Ziel es war den entsprechenden Kuhmilchanteil nicht nur qualitativ zu detektieren sondern auch zu quantifizieren, zeigte zunächst, dass sich die optimale Annealingtemperatur des zur Quantifizierung verwendeten Primerpaares von der zuvor mittels einfacher PCR festgelegten Temperatur um 3°C unterschied. Dabei muss angemerkt werden, dass für die Real-time PCR nicht nur eine andere Polymerase verwendet wurde und aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen im Mastermix auch andere Reaktionsbedingungen herrschten, sondern auch ein anderer Thermocycler zum Einsatz kam und ein strafferes Temperatur-Zeit-Programm mit kürzeren Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphasen zum Einsatz kam. Ebenso wie die speziesspezifische PCR erlaubte die Real-time PCR die zweifelsfreie Unterscheidung einer Probe mit 0,1% Kuhmilchanteil von einer Negativkontrolle aus reinem Schafkäse. Darüber hinaus sollten mittels dieser Methodik aber quantitative Resultate erhalten werden. Zu diesem Zweck wurde neben dem Primerpaar, das auf die rinderspezifische Zielsequenz von 256 bp abzielte, auch ein Universalprimerpaar, das auf eine mitochondriale Zielsequenz von 464 bp gerichtet war, eingesetzt. Hier zeigte sich deutlich die Problematik, die durch unterschiedlich verarbeitete Proben auftritt. Während die verschiedenen Standards aus den beiden Modellkäsereihen sich im Amplifikationsverhalten für den speziesspezifischen Primer praktisch nicht unterschieden, wurden für das Universalprimerpaar je nach Zugehörigkeit zur jeweiligen Modellkäsereihe

unterschiedliche  $C_T$ -Werte erhalten. Ginge man davon aus, dass in einer der beiden Modellkäseerihen durch die verschiedenen Verarbeitungsprozesse schlicht weniger amplifizierbare DNA vorläge, müsste dieser Effekt auch für die Ergebnisse des speziesspezifischen Primers zu beobachten sein. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das Amplikon das vom Universalprimer begrenzt wird, aufgrund seiner Länge die Effizienz der Amplifikation beeinträchtigt. Gegen diese These spricht allerdings, dass der gleiche Effekt auch unter Verwendung eines wesentlich kürzeren Universalprimerpaares (137 bp) sogar verstärkt auftritt. Unterschiedliche Verarbeitungsvorgänge bei der Lebensmittelproduktion können das Amplifikationsverhalten offenbar maßgeblich beeinflussen, weswegen die Verwendung passender Standards zur Erstellung von Kalibrationskurven von eminenter Bedeutung ist.

Dieselben Primerpaare, die für den qualitativen Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafkäsen eingesetzt wurden, konnten ebenso für die Detektierung von Kuhmilchanteilen in einer Standardmischungsreihe aus Kuh- und Sojamilch mit Hilfe einer speziesspezifischen PCR und anschließender Gelelektrophorese eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze lag dabei ebenfalls bei 0,1%. Außerdem wurden auch zwölf im Handel erhältliche Sojamilchprodukte auf eine Zumischung bzw. Kontamination mit Kuhmilch untersucht. Acht der zwölf Proben lieferten definitiv negative Resultate, für zwei Proben konnte die Anwesenheit von Kuhmilchanteilen eindeutig nachgewiesen werden, während bei zwei anderen Proben mit dieser Methode kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte.

Um eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen und die jeweiligen Anteile an Kuhmilch auch quantifizieren zu können, wurden die beiden positiven Proben ebenso wie die beiden Proben mit zweifelhaften Resultaten mittels Real-time PCR getestet. Als Standardreihe fungierte dabei wie bereits bei der speziesspezifischen PCR eine Mischungsserie aus Kuh- und Sojamilch mit bekannten Kuhmilchanteilen. Die Quantifizierung von Proben mit unbekanntem Kuhmilchanteil erfordert außerdem neben einem speziesspezifischen Primerpaar für Rind auch den Einsatz eines Universalprimerpaares, in diesem Fall ein auf eine 137 bp lange nukleäre Zielsequenz gerichteter Eukaryontenprimer. Die Real-time Ergebnisse bestätigten die Resultate für die beiden Proben, die bereits bei der vorangegangenen speziesspezifischen PCR eindeutig positiv

waren und ermöglichte ihre Quantifizierung. Für die beiden zweifelhaften Proben konnten auch mittels Real-time PCR nicht für alle Replikate ein Ergebnis erzielt werden, was darauf schließen lässt, dass man sich hier an der Nachweisgrenze der Methode bewegt hat. Der relativ hohe  $C_T$ -Wert der unbekannt Proben für den Universalprimer lässt auf einen niedrigen Gesamt-DNA-Gehalt schließen. In Kombination mit einer nur geringfügigen Kontamination mit Kuhmilch ist dieser wohl für die Probleme bei der Quantifizierung der beiden fragwürdigen Proben verantwortlich.

## **6 Zusammenfassung**

Die Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln ist in den letzten Jahren zu einer treibenden Kraft für die Entwicklung DNA-basierter Methoden zur Aufdeckung von Verfälschungen und fehlerhaften Deklarationen auf Lebensmitteln ebenso wie zum Schutz des Konsumenten vor potentiellen Gesundheitsrisiken wie Allergenen gewachsen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene spezies-spezifische PCR Systeme eingesetzt um Kuhmilchanteile in Schafkäsen und Sojamilchprodukten nachweisen zu können. Die verwendeten Primer zielten dabei auf das mitochondriale 12S rRNA Gen bzw. das mitochondriale Cytochromoxidase II Gen der Rinder ab. Beide Systeme erlaubten den qualitativen Nachweis einer minimalen Konzentration von 0,1% Kuhmilchanteil in Standardmischungskäsen aus Schaf- und Kuhmilch ebenso wie in einer Standardmischungsreihe aus Kuh- und Sojamilch. Dieselben PCR Systeme konnten auch zum qualitativen Nachweis von Kuhmilchanteilen in zwölf verschiedenen im Handel erhältlichen Sojamilchprodukten angewendet werden.

Um auch quantitative Aussagen über den enthaltenen Kuhmilchanteil in Schafkäsen und Sojamilchprodukten zu ermöglichen, wurde außerdem Real-time PCR eingesetzt. Dabei wurde SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet und mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der amplifizierten Produkte überprüft. Für den quantitativen Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafkäse wurde ein rinderspezifisches Primerpaar verwendet, das auf das mitochondriale 12S rRNA Gen des Rindes abzielt und ein 256 bp Amplikon liefert. In Kombination mit dem speziesspezifischen Primerpaar wurde auch ein Universalprimerpaar eingesetzt. Das daraus resultierende Amplikon war eine 464 bp lange Sequenz des mitochondrialen Cytochrom b Gens. Die unter Verwendung des Universalprimerpaares erzielten Ergebnisse wurden eingesetzt um die Resultate des speziesspezifischen Primerpaares zu normalisieren. Das Universalprimerpaar fungierte also als endogene Kontrolle, die den gesamten Gehalt an amplifizierbarer DNA in der Probe anzeigen sollte.

Zur Quantifizierung wurden aus Schaf- und Kuhmilch hergestellte Käse einer Mischungsreihe als Standards herangezogen, deren Kuhmilchanteil bekannt war. Für die Quantifizierung des Kuhmilchanteils in Sojamilchprodukten wurde dieselbe

rinderspezifische 256 bp lange Gensequenz als Zielregion verwendet. Der Universalprimer war auf das nukleäre 18S rRNA Gen eukaryontischer DNA gerichtet und ergab ein 137 bp Amplikon. Eine Mischungsreihe aus Kuh- und Sojamilch mit bekannten Konzentrationen der jeweiligen Komponente wurde als Standard eingesetzt. Das System lieferte verlässliche Ergebnisse und konnte so auch zur Quantifizierung des Kuhmilchanteils in den im Handel erhältlichen Sojamilchprodukten verwendet werden. Dabei wurden jene vier Proben untersucht, die bereits mittels speziesspezifischer PCR positive oder fragwürdige Resultate erzielten. Die eben beschriebene Real-time PCR Methode erlaubte die Quantifizierung des Kuhmilchanteils in allen vier Proben.

Es hat sich gezeigt, dass die Real-time PCR eine schnelle, verlässliche und empfindliche Technik zum Nachweis von Kuhmilchanteilen in Schafkäsen oder Sojamilch ist. Dabei können minimale Konzentrationen von 0,1% nachgewiesen werden.

Unter Verwendung zweier verschiedener Standardreihen hat sich gezeigt, dass es zu Problemen bei der Quantifizierung kommt. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von adäquaten Standards, die derselben Behandlung unterzogen worden sein sollen, wie die Proben, die schließlich analysiert werden.

## 7 Abstract

Authenticity assessment of dairy products has been a driving force in the development of DNA-based analytical techniques to detect commercial frauds and inaccurate food labelling and protect consumers from potential health risks such as allergens.

In this work two different species-specific PCR systems were applied to detect cow's milk in ewe's cheeses and soy milk products targeting the bovine mitochondrial 12S rRNA gene and the bovine mitochondrial Cytochrome oxidase II gene. Both systems allowed the qualitative detection of cow's milk concentrations as low as 0.1% in standard mixtures of ripened cow's and ewe's cheese as well as in standard mixtures of cow's milk and soy milk. The same PCR systems were used for the qualitative detection of cow's milk in 12 retail soy milk products.

In order to obtain quantitative results a Real-time PCR technique using a SYBR Green detection system and melting curve analysis to confirm specificity of the amplified products was applied for the detection of cow's milk in ewe's cheeses or soy milk products. For the quantitative detection of cow's milk in ewe's cheeses, bovine specific primers targeting the mitochondrial 12S rRNA gene, yielding a 256 bp amplicon, and a universal primer targeting the mitochondrial Cytochrome b gene, resulting in a 464 bp amplicon, were applied. The results of the universal primer were used to normalize the results of the species specific primer, serving as an endogenous control for the total amount of amplifiable DNA in the samples. Quantification was carried out using the standard mixtures of cow's and ewe's cheese as calibrator samples of known cow's milk concentration. For the quantification of cow's milk in soy milk products the same bovine specific 256 bp gene region was used as target sequence. The universal primer was targeting a nuclear 18S rRNA gene sequence from eukaryotic DNA, resulting in a 137 bp amplicon. Standard mixtures of cow's milk in soy milk were used as calibrator samples of known cow's milk content. The system delivered accurate results for the quantification of cow's milk in soy milk and was consequently applied to four retail soy milk products that proved or were suspected to be positive for bovine DNA using species specific PCR. Real-time PCR allowed quantification of the cow's milk concentration of all four samples.

Real-time PCR was found to be a fast, reliable and sensitive technique to detect concentrations as low as 0.1% in standard mixtures of cow's and ewe's cheese as well as standard mixtures of cow's milk and soy milk.

Differences in quantification using two types of standard mixtures of ewe's and cow's cheese showed the importance of having adequate calibrator samples subjected to the same processing and treatment as the food samples to be analyzed.

## 8 Literaturverzeichnis

- AHMED M. M. M., ABDEL-RAHMAN S. M., EL-HANAFY A. A. Application of Species-Specific Polymerase Chain Reaction and Cytochrome b Gene for Different Meat Species Authentication. *Biotechnology* 2007; 6: 426-430.
- BEASLEY S., TUORILA H., SARIS P. E. J. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 81: 159-162.
- BIO-RAD LABORATORIES. Real-time PCR Applications Guide, 2006.
- BOTTERO M. T., CIVERA T., NUCERA D., ROSATI S., SACCHI P., TURI R. M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 2003; 13: 277-282.
- BRANCIARI R., NIJMAN I. J., PLAS M. E., DI ANTONIO E., LENSTRA J. A. Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *Journal of Food Protection* 2000; 63: 408-411.
- BURNS M. J., VALDIVIA H., HARRIS N. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004; 378: 1616-1623.
- CATALA A. M., PUCHADES R. Enzyme Technique: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: SUN, D. W. *Modern Techniques for Food Authentication*. Amsterdam: Elsevier, 2008: 477-520.
- CHEN R.-K., CHANG L.-W., CHUNG Y.-Y., LEE M.-H., LING Y.-C. Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004; 18: 1167-1171.
- CHISHOLM J., CONYERS C. M., HIRD H. Species identification in food products using the bioMerieux FoodExpert-ID® system. *European Food Research and Technology* 2008; 228: 39-45.

CLARK, D. P. *Molecular Biology. Das Original mit Übersetzungshilfen.* München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2006.

CORDLE C. T. Soy Protein Allergy: Incidence and Relative Severity. *The Journal of Nutrition* 2004; 134: 1213-1219.

DEULEMESTER C., GIOVANACCI I. Detecting dairy and egg residues in food. In: KOPPELMAN S., HEFLE S. Hrsg. *Detecting allergens in food.* Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. *Biotechnology Progress* 2007; 23: 297-301.

DI BERNARDO G., DEL GAUDIO S., GALDERISI U., CASCINO A., CIPOLLARO M. Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples.

DOCENA G. H., FERNANDEZ R., CHIRDO F. G., FOSSATI C. A. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996; 51: 412-416.

EDWARDS K. J., LOGAN J. M. J. Performing Real-time PCR. In: LOGAN J., EDWARDS K., SAUNDERS N. Hrsg. *Real-time PCR. Current Technology and Applications.* Norfolk: Caister Academic Press, 2009: 85-93.

EL-AGAMY E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research* 2007; 68: 64-72.

ELMADFA I., LEITZMANN C. *Ernährung des Menschen.* 4. Auflage. Stuttgart: Ulmer, 2004.

EL-RADY A. A., SAYED M. Identification of milk source by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 2006; 14: 146-155.

EUROPÄISCHE KOMMISSION. EU-Richtlinie 2007/68/EC. 2007. Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:310:0011:01:DE:HTML> (zugegriffen am 20. Februar 2010).

FAJARDO V., GONZALEZ I., MARTIN I. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science* 2008; 79: 289-298.

FAVARO TRINDADE C. S., TERZI S. C., TRUGO L. C., DELLA MODESTA R. C., COURI S. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 2001; 51: 100-105.

FOISSY H. *Milchtechnologie*. Wien: IMB-Verlag, 2005.

FREMONT S., KANNY G., BIEBER S., NICOLAS J. P., MONERET-VAUTRIN D. A. Identification of a masked allergen, alpha-lactalbumin, in baby-food cereal flour guaranteed free of cow's milk protein. *Allergy* 1996; 51: 749-754.

GOLBITZ P. Traditional Soyfoods: Processing and Products. *The Journal of Nutrition* 1995; 125: 570-572.

HAUG A., HOSTMARK A. T., HARSTAD O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease* [online] 2007. 6: 25. Internet: <http://www.lipidworld.com/content/6/1/25> (zugegriffen 1. März 2010).

HEISS R. *Lebensmitteltechnologie*. 6. Auflage. Berlin: Springer, 2004.

HOLZHAUSER T., STEPHAN O., VIETHS S. Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. In: KOPPELMAN S., HEFLE S. *Detecting allergens in food*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006.

ILHAK O. I., ARSLAN A. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2007; 31: 159-163.

KAROUI R., DE BAERDEMAEKER J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry* 2007; 102: 621-640.

KAVKA, C. Authentizitätsnachweis von Milch- und Sojamilchprodukten mit Elektrophorese, PCR und Real-Time PCR. Diplomarbeit, Universität Wien, 2008.

KHAIRALLA K. M. S., ARADAIB I. E., BAKHIET A. O. A simple and Rapid Assay for Specific Identification of Bovine Derived Products in Biocomplex Materials. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2007; 10: 1170-1174.

KNIPPERS R. *Molekulare Genetik*. 9. Auflage Stuttgart: Thieme, 2006.

KOTOWICZ M., ADAMCZYK E. BANIA J. Application of a Duplex-PCR for detection of cow's milk in goat's milk. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2007; 14: 215-218.

LAUBE I., ZAGON J., SPIEGELBERG A., BUTSCHKE A., KROH L. W., BROLL H. Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in food. *International Journal of Food Sciences and Technology* 2007/a; 42: 9-17.

LAUBE I., ZAGON J., BROLL H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology* 2007/b; 42: 336-341.

LAUBE I., SPIEGELBERG A., BUTSCHKE A. et al. Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Science and Technology* 2003; 38: 111-118.

LEVIN R. E. DNA-based Technique: Polymerase Chain Reaction (PCR). In: SUN, D. W. *Modern Techniques for Food Authentication*. Amsterdam: Elsevier, 2008.

LOCCI F., GHIGLIETTI R., FRANCOLINO S. et al. Detection of cow milk in cooked buffalo Mozzarella used as Pizza topping. *Food Chemistry* 2008; 107: 1337-1341.

LOPEZ-ANDREO M., LUGO L., GARRIDO-PERTIERRA A., PRIETO M. I., PUYET A. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 2005; 339: 73-82.

LOPEZ-CALLEJA I., GONZALEZ I., FAJARDO V. et al. Rapid Detection of Cows' Milk in Sheeps' and Goats' Milk by a Species-Specific Polymerase Chain Reaction Technique. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 2839-2845.

LOPEZ-CALLEJA I., GONZALEZ I., FAJARDO V. et al. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *International Dairy Journal* 2007/a; 17: 729-736.

LOPEZ-CALLEJA I., GONZALEZ I., FAJARDO V. et al. Quantitative detection of goats' milk in sheeps' milk by real-time PCR. *Food Control* 2007/b; 18: 1466-1473.

LOPEZ-CALLEJA I., GONZALEZ I., FAJARDO V. HERNANDEZ P. E., GARCIA T., MARTIN R. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for the detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. *International Dairy Journal* 2007/c; 17: 87-93.

LOPEZ-CALLEJA DIAZ I., GONZALEZ ALONSO I., FAJARDO V. et al. Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. *European Food Research and Technology* 2007; 225: 345-349.

LOTTSPEICH F., ENGELS J. W. *Bioanalytik*. 2. Auflage. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2006.

MACCABIANI G., PAVONI E., TILOLA M. et al. Setting-Up a PCR-based Method for Species Identification in Milk Products. *Veterinary Research Communications* 2005; 29: 327-329.

MAFRA I., ROXO A., FERREIRA I. M. P. L. V. O. OLIVEIRA B. P. P. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cow's milk in goat's milk cheese. *International Dairy Journal* 2007; 17: 1132-1138.

MARTIN I., GARCIA T., FAJARDO V. et al. Real-time PCR for Quantitative Detection of Bovine Tissues in Food and Feed. *Journal of Food Protection* 2008; 71: 564-572.

MAYER H. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal* 2005; 15: 595-604.

MEYER R. Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the Flavr<sup>TM</sup> tomato as an example. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* 1995; 201: 583-586.

- MILLS E. N. C., BREITENEDER H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnology Advances* 2005; 23: 409-414.
- MONACI L., TREGOAT V., VAN HENGEL A. J., ANKLAM E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology* 2006; 223: 149-179.
- MÜLHARDT C. *Der Experimentator. Molekularbiologie / Genomics*. 5. Auflage. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- PFÄFFL M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004; 10: 92-95.
- POMS R. E., KLEIN C. L., ANKLAM E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* 2004; 21:1-31.
- QIAGEN. *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. 2006.
- REALE S., CAMPANELLA A., MERIGIOLI A., PILLA F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of Dairy Research* 2008; 75: 107-112.
- SAUNDERS N. A. An introduction to Real-time PCR. In: LOGAN J., EDWARDS K., SAUNDERS N. Hrsg. *Real-time PCR. Current Technology and Applications*. Norfolk: Caister Academic Press, 2009: 1-5.
- SICHERER S. H., SAMPSON H. A. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 117: 470-475.
- SPREER, E. *Technologie der Milchverarbeitung*. 8. Auflage Hamburg: Behr, 2005.
- STATISTIK AUSTRIA. Versorgungsbilanz für Rohmilch und Milchprodukte 2003 bis 2008. 2008. Internet:  
[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/land\\_und\\_forstwirtschaft/preise\\_bilanzen/versorgungsbilanzen/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/land_und_forstwirtschaft/preise_bilanzen/versorgungsbilanzen/index.html) (zugegriffen 25. Februar 2010).
- SULLIVAN D., FAHEY B., TITUS D. Fast PCR: General Considerations for Minimizing Run Times and Maximizing Throughput. *Cold Spring Harbor Protocol*

[online] 2007; doi:10.1101/pdb.prodprot24. Internet:  
<http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/citation/2007/4/pdb.prodprot24> (zugegriffen 1. März 2010).

TERNES W. Lexikon der Lebensmittel und Lebensmittelchemie. 4. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2005.

TERZI V., INFASCELLI F., TUDISCO R., RUSSO G., STANCA A. M., FACCIOLI P. Quantitative detection of *Secale cereale* by real-time PCR amplification. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 2004; 37: 239-246.

TOBE S. S., LINACRE A. M. T. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis* 2008; 29: 340-347.

TORP A. M., OLESEN A., STEN E. et al. Specific, semi-quantitative detection of the soybean allergen Gly m Bd 30K DNA by PCR. *Food Control* 2006; 17: 30-36.

VAERMAN J. L., SAUSSOY P., INGARGIOLA I. Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2004; 18: 212-214.

VERKAAR E. L. C., NIJMAN I. J., BOUTAGA K., LENSTRA J. A. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Science* 2002; 60: 365-369.

WEIPPL A. Differenzierung und Quantifizierung der Tierspezies in Käse mittels PCR und Real-Time PCR. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur Wien, 2008.

WISEMAN G. Real-time PCR: Application to Food Authenticity and Legislation. In: LOGAN J., EDWARDS K., SAUNDERS N. Hrsg. *Real-time PCR. Current Technology and Applications*. Norfolk: Caister Academic Press, 2009: 253-267.

WOLF C., BURGNER M., HÜBNER P., LÜTHY J. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: Differentiation of fish species. *LWT-Food Science and Technology* 2000; 33: 144-150.

YAZICI F., ALVAREZ V. B., HANSEN P. M. T. Fermentation and Properties of Calcium-fortified Soy Milk Yogurt. *Journal of Food Science* 1997; 62: 457-461.

ZHANG C.-L., FOWLER M. R., SCOTT N. W., LAWSON G., SLATER A. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control* 2007; 18: 1149-1158.



## **LEBENS LAUF**

Name: Carola Kern  
Geburtsdatum: 16. 10. 1984  
Geburtsort: Wiener Neustadt

## **AUSBILDUNG**

seit 10/2003 Studium Ernährungswissenschaften  
Universität Wien  
Wahlschwerpunkt: Lebensmitteltechnologie und  
Lebensmittelproduktion  
Diplomarbeit am Institut für Lebensmittelchemie, BOKU

9/1995 - 6/2003 BG Mattersburg

## **PRAKTIKA UND BISHERIGE TÄTIGKEITEN**

5/2009 - 12/2009 Heineken Group Supply Chain  
Research & Innovation  
Zoeterwoude (NL)

10/2008 - 01/2009 Universität für Bodenkultur Wien  
Tutorium „Lebensmittelauthentizität-Übungen“

11/2008 AGES Wien  
Kompetenzzentrum Biochemie

9/2007 AGES Wien  
Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene

8/2007 Medizinische Universität Wien  
Institut für medizinische Chemie

8/2006 - 12/2006 AGES Wien  
Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene

## **SPRACHKENNTNISSE**

Englisch  
Französisch  
Niederländisch