



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Entwicklung von Real Time PCR-Methoden zur Bestimmung von  
Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Verfasserin:	Caroline Leidinger
Matrikel-Nummer:	0140247
Studienrichtung (lt. Studien- blatt):	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl Univ.-Prof. Dr. Gerhard Sontag

Wien, Jänner 2009

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl und Herrn Univ.-Prof. Dr. Gerhard Sontag herzlichst für die kompetente und freundliche Betreuung bedanken. VIELEN DANK

Bei Univ.-Prof. Dr. Emmerich Berghofer und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Bereitstellung von Proben und deren Hilfestellung bei der Herstellung verschiedener Modelllebensmittel bedanken.

Weiters möchte ich mich bei all meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für die gemeinsame fröhliche, lustige und bereichernde Zeit bedanken.

All meinen Freunden: vielen, vielen Dank für Eure Unterstützung und Freundschaft!

Schlussendlich möchte ich mich bei meiner Familie aus ganzem Herzen bedanken, die mich in meiner Studienzeit immer ohne „wenn und aber“ unterstützte und stärkte. VIELEN DANK

# I INHALTSVERZEICHNIS

<b>I INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>II ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>III TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>X</b>
<b>1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Allergien.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Ursachen von Allergien .....	3
2.1.2 Unverträglichkeitsreaktionen auf Lebensmittel .....	3
2.1.3 Lebensmittelallergie versus Lebensmittelintoleranz und Pseudoallergie .....	5
2.1.4 Häufigkeit von Lebensmittelallergien .....	6
2.1.5 Symptomatik der Lebensmittelallergie .....	7
2.1.6 Diagnostik der Lebensmittelallergie .....	9
2.1.7 Therapie von Lebensmittelallergien .....	9
2.1.8 Allgemeine Allergieprävention.....	10
<b>2.2 Lebensmittelallergene.....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Allgemeines .....	11
2.2.2 Einfluss der Verarbeitung auf die Allergenität von Lebensmitteln.....	12
2.2.3 Problematik der versteckten Allergene .....	13
2.2.4 Gesetzliche Regelung der Lebensmittelkennzeichnung .....	14
2.2.4.1 Europäische Lebensmittelkennzeichnung .....	14
2.2.4.2 Lebensmittelkennzeichnung in Österreich.....	17
<b>2.3 Mandel (Prunus dulcis) .....</b>	<b>18</b>
2.3.1 Allgemeines .....	18
2.3.2 Mandelallergie .....	19
2.3.3 Mandelallergene .....	19
<b>2.4 Haselnuss (Corylus avellana).....</b>	<b>20</b>
2.4.1 Allgemeines .....	20
2.4.2 Haselnussallergie .....	21
2.4.3 Haselnussallergene .....	21

<b>2.5 Walnuss (<i>Juglans regia</i>)</b> .....	<b>22</b>
2.5.1 Allgemeines.....	22
2.5.2 Walnussallergie.....	22
2.5.3 Walnussallergene .....	23
<b>2.6 Weintraube (<i>Vitis vinifera</i>)</b> .....	<b>24</b>
2.6.1 Allgemeines.....	24
2.6.2 Weintraubenallergie .....	24
2.6.3 Weintraubenallergene .....	25
<b>2.7 Ausgewählte Methoden zur Bestimmung von allergenen Lebensmitteln</b> .....	<b>25</b>
2.7.1 Allgemeines.....	25
2.7.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	26
2.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	27
2.7.4 Real Time Polymerase Kettenreaktion .....	29
2.7.4.1 Detektionsmethoden.....	29
2.7.4.2 Duplex-Assay.....	31
<b>2.8 Übersicht über publizierte Methoden zur Bestimmung von Mandel, Haselnuss und Walnuss in Lebensmitteln</b> .....	<b>32</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1 Verwendete Geräte</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2 Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3 Proben</b> .....	<b>38</b>
3.3.1 Kommerziell erhältliche Lebensmittel .....	38
3.3.2 Herstellung von Modelllebensmitteln .....	38
3.3.2.1 Rösten von Mandeln.....	39
3.3.2.2 Krokant .....	39
3.3.2.3 Nussalternativgetränk.....	40
3.3.2.4 Marmorkuchen mit Nussalternativgetränk (Rezeptur 2).....	42
3.3.2.5 Nougat .....	42
<b>3.4 DNA-Isolierung</b> .....	<b>45</b>
3.4.1 DNA-Extraktion mittels der CTAB-Methode.....	45
3.4.2 DNA-Extraktion unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kits .....	46
3.4.3 DNA-Extraktion mittels des DNeasy® Plant Mini Kits .....	47
3.4.4 Kombination der CTAB-Methode und des DNeasy® Plant Mini Kits .....	48
3.4.5 DNA-Isolierung aus Traubensaft .....	49
<b>3.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen</b> .....	<b>49</b>
<b>3.6 Agarosegelelektrophorese</b> .....	<b>50</b>
3.6.1 Herstellung des Agarosegels .....	50
3.6.2 Durchführung der Gelelektrophorese .....	51

<b>3.7 Real Time PCR .....</b>	<b>51</b>
3.7.1 Real Time PCR mit iQ SYBR <sup>®</sup> Green (SYBR Green-Assay) .....	51
3.7.2 Real Time PCR mit der TaqMan Sonde (TaqMan-Assay) .....	52
3.7.3 Verwendete Mastermixe.....	52
3.7.3.1 iQ <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix 2x .....	52
3.7.3.2 iQ <sup>™</sup> Supermix 2x .....	53
3.7.4 Pipettierschema.....	53
3.7.5 Primer und Sonden .....	53
3.7.5.1 Design der Primer und TaqMan Sonden .....	53
3.7.5.2 Optimierung der Primerkonzentration .....	55
3.7.5.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität der entworfenen Primerpaare .....	56
3.7.6 Optimierung des Singleplex-Assays zur Detektion von Mandel .....	58
3.7.6.1 Optimierung der Konzentration der TaqMan Sonden .....	58
3.7.6.2 Optimierung der Annealingtemperatur der Mandelprimer .....	59
3.7.7 Optimierung des Duplex-Assays .....	60
3.7.7.1 Erhöhung der TaqDNA Polymerase-Konzentration.....	60
3.7.7.2 Erhöhung der Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )-Konzentration .....	61
3.7.7.3 Erhöhung der dNTPs-Konzentration.....	61
3.7.7.4 Erhöhung der Konzentration von MgCl <sub>2</sub> und dNTPs .....	61
3.7.7.5 Erhöhung der Konzentration der Mandel-Primer und der TaqMan Sonde .....	61
3.7.8 Erstellen der Kalibrierfunktion und Ermittlung der Effizienz.....	62
3.7.9 Herstellung von DNA-Lösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Mandel- und Haselnuss-DNA .....	63
3.7.10 Bestimmung der Kreuzreaktivität des optimierten Duplex-Assays .....	64
<b>3.8 Reproduzierbarkeit der Singleplex- und Duplex-Methode .....</b>	<b>65</b>
<b>3.9 Bestimmung der Nachweisgrenze der Singleplex- und Duplex-Methode .....</b>	<b>65</b>
<b>3.10 Nachweis von Haselnuss und/oder Mandel in Modelllebensmitteln und kommerziell erhältlichen Lebensmitteln .....</b>	<b>66</b>
3.10.1 Anwendung des Singleplex-Assays bei gerösteten Mandeln .....	66
3.10.2 Nachweis von Mandel und Haselnuss in Modelllebensmitteln mit dem Duplex- Assay .....	67
3.10.3 Nachweis von Haselnuss und/oder Mandel in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln .....	67
3.10.3.1 Nachweis von Mandel mittels des Singleplex-Assays .....	68
3.10.3.2 Nachweis von Mandel und Haselnuss unter Verwendung des Duplex-Assays .....	68
<b>3.11 Inhibitionskontrolle .....</b>	<b>68</b>
3.11.1 Inhibitionskontrolle der mittels des Singleplex-Assays amplifizierten Proben von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln .....	68

3.11.2 Inhibitionskontrolle der mittels des Duplex-Assays amplifizierten Proben der Modelllebensmittel und kommerziell erhältlichen Lebensmittel .....	69
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1 Entwicklung einer Singleplex Real Time PCR-Methode zur Bestimmung von potentiell allergener Mandel (<i>Prunus dulcis</i>) in Lebensmitteln.....</b>	<b>70</b>
4.1.1 Primer und Sonden .....	70
4.1.2 Optimierung der Primerkonzentration .....	71
4.1.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität .....	73
4.1.4 Optimierung der Annealingtemperatur .....	79
4.1.5 Optimierung der Konzentration der TaqMan Sonde .....	80
4.1.6 Erstellen der Kalibrierfunktion und Ermittlung der Effizienz .....	80
4.1.7 Reproduzierbarkeit .....	82
4.1.8 Bestimmung der Nachweisgrenze .....	84
4.1.9 Anwendung der PCR-Methode auf geröstete Mandeln .....	85
4.1.10 Nachweis von Mandeln in kommerziell erhältlichen Lebensmittelproben .....	86
4.1.11 Inhibitionskontrolle .....	88
<b>4.2 Entwicklung einer Duplex Real Time PCR zur Bestimmung von potentiell allergenen Mandeln und Haselnüssen in Lebensmitteln .....</b>	<b>89</b>
4.2.1 Primer und TaqMan Sonden .....	89
4.2.2 Kreuzreaktivität der verwendeten Mandel- und Haselnussprimer .....	90
4.2.3 Erstellen der Kalibrierfunktion und Ermittlung der Effizienz .....	91
4.2.4 Optimierung des Duplex-Assays .....	92
4.2.4.1 Erhöhung der TaqDNA Polymerase-Konzentration .....	93
4.2.4.2 Erhöhung der Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )-Konzentration .....	94
4.2.4.3 Erhöhung der dNTP-Konzentration .....	95
4.2.4.4 Erhöhung der MgCl <sub>2</sub> - und dNTP-Konzentration .....	97
4.2.4.5. Erhöhung der Primer- und TaqMan Sonden-Konzentration .....	99
4.2.5 Bestimmung der Kreuzreaktivität des optimierten Assays .....	99
4.2.6 Ermittlung der Effizienz des Duplex-Assays .....	102
4.2.7 Amplifikation von Mandel- und Haselnuss-DNA in unterschiedlichen Mandel/Haselnuss-DNA Mischungen .....	104
4.2.8 Reproduzierbarkeit .....	106
4.2.9 Bestimmung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays .....	109
4.2.10 Nachweis von Mandel und Haselnuss in Modelllebensmitteln .....	110
4.2.11 Anwendung des Duplex-Assays auf kommerziell erhältliche Lebensmittel .....	112
4.2.12 Inhibitionskontrolle von Modelllebensmitteln und kommerziell erhältlichen Lebensmitteln .....	114

<b>4.3 Entwurf spezifischer Primer und Sonden für die Detektion von Walnuss (Juglans regia) mittels einer Real Time PCR-Methode</b> .....	<b>115</b>
4.3.1 Primer und Sonden .....	115
4.3.2 Optimierung der Primerkonzentration .....	115
4.3.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität .....	116
4.3.4 Neuentwicklung eines Primerpaares für die Detektion von Walnuss.....	123
4.3.5 Optimierung der Primerkonzentration des neu entwickelten Primerpaares.....	125
4.3.6 Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares Jug r 1-1 <sub>neu</sub> .....	126
<b>4.4 Entwurf spezifischer Primer und Sonden für die Detektion von Traube (Vitis vinifera) mittels Real Time PCR</b> .....	<b>129</b>
4.4.1 Primer und Sonden .....	129
4.4.2 Optimierung der Primerkonzentration .....	129
4.4.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität der Primer .....	131
4.4.4 DNA-Isolierung aus Traubensaft.....	135
<b>5. SCHLUSSBETRACHTUNG</b> .....	<b>136</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>139</b>
<b>7. SUMMARY</b> .....	<b>140</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>141</b>

## II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Auslöser von Lebensmittelunverträglichkeiten [modifiziert nach SCHÖLL und JENSEN-JAROLIM, 2006] .....	4
Abbildung 2: Fluoreszenzsignal, ausgelöst durch SYBR <sup>®</sup> Green I.....	30
Abbildung 3: Prinzip der Detektion mit einer TaqMan Sonde. ....	31
Abbildung 4: Schmelzkurven der mit Primerpaar 1 gebildeten PCR-Produkte; (1) Schmelzkurve; (2) 1. Ableitung der Schmelzkurve .....	72
Abbildung 5: Schmelzkurven der mit Primerpaar 2 gebildeten PCR-Produkte; (1) Schmelzkurve; (2) 1. Ableitung der Schmelzkurve .....	73
Abbildung 6: Schmelzkurven der mit Primerpaar 1 gebildeten PCR-Produkte .....	74
Abbildung 7: Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte.....	75
Abbildung 8: Real Time PCR mit SYBR Green von DNA-Extrakten verschiedener Lebensmittel, Primerpaar 2 .....	76
Abbildung 9: Schmelzkurven der mit Primerpaar 2 gebildeten PCR-Produkte .....	76
Abbildung 10: Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte.....	77
Abbildung 11: Gel der mit dem Primerpaar 1 (2-10) und Primerpaar 2 (12-20) erhaltenen PCR- Produkte .....	77
Abbildung 12: Gel der mit Primerpaar 1 (2-5) und 2 (6-9) erhaltenen PCR-Produkte .....	78
Abbildung 13: Real Time PCR zur Optimierung der Annealingtemperatur .....	79
Abbildung 14: Real Time PCR Analyse von seriell verdünnter Mandel-DNA .....	81
Abbildung 15: Standardfunktion seriell verdünnter Mandel-DNA .....	81
Abbildung 16: Standardfunktionen seriell verdünnter Mandel- und Haselnuss-DNA.....	91
Abbildung 17: Einfluss der TaqDNA Polymerase-Konzentration auf die Amplifikation von Haselnuss-DNA.....	93
Abbildung 18: Einfluss der TaqDNA Polymerase Konzentration auf die Amplifikation von Mandel-DNA.....	94
Abbildung 19: Einfluss der MgCl <sub>2</sub> -Konzentration auf die Amplifikation von Mandel-DNA .....	95
Abbildung 20: Einfluss der dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Haselnuss-DNA.....	96
Abbildung 21: Einfluss der dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Mandel-DNA .....	96
Abbildung 22: Einfluss der MgCl <sub>2</sub> - und dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Haselnuss-DNA.....	97
Abbildung 23: Einfluss der MgCl <sub>2</sub> - und dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Mandel- DNA.....	98
Abbildung 24: Schmelzkurven der gebildeten PCR-Produkte.....	100
Abbildung 25: Gel der mit dem optimierten Duplex-Assay erhaltenen PCR-Produkte .....	100
Abbildung 26: Gel der mit dem optimierten Duplex-Assay erhaltenen PCR-Produkte .....	101
Abbildung 27: Kreuzreaktivitätstest mit dem Duplex-Assay .....	102

Abbildung 28: Standardfunktionen seriell verdünnter Mandel- und Haselnuss-DNA .....	103
Abbildung 29: Schmelzkurven der mit Primerpaar 1 gebildeten PCR-Produkte .....	117
Abbildung 30: Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte .....	118
Abbildung 31: Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte .....	118
Abbildung 32 : Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 2 gebildeten PCR-Produkte .....	119
Abbildung 33: Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte .....	120
Abbildung 34: Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte .....	120
Abbildung 35: Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 3 gebildeten PCR-Produkte .....	121
Abbildung 36: Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte .....	122
Abbildung 37: Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte .....	122
Abbildung 38: Sequenzvergleich von Accession No. U66866 (Walnuss) und AY192569 (Pekannuss) .....	124
Abbildung 39: Schmelzkurven der mit Primerpaar Jug r 1-1 <sub>neu</sub> gebildeten PCR-Produkte .....	126
Abbildung 40: Gel der mit Primerpaar Jug r 1-1 <sub>neu</sub> erhaltenen PCR-Produkte.....	127
Abbildung 41: Gel der mit Primerpaar Jug r 1-1 <sub>neu</sub> erhaltenen PCR-Produkte.....	128
Abbildung 42: Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte .....	132
Abbildung 43: Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte .....	132
Abbildung 44: Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte .....	133
Abbildung 45: Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte .....	133
Abbildung 46: Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte .....	134
Abbildung 47: Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte .....	135

### III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Symptome von Lebensmittelallergien.....	8
Tabelle 2: Proteinstabilität nach einer Hitzebehandlung des Lebensmittels.....	13
Tabelle 3: Kommerziell erhältliche Lebensmittel.....	38
Tabelle 4: Rezepturen für Krokant.....	39
Tabelle 5: Rezepturen für Nussalternativgetränke.....	41
Tabelle 6: Rezeptur Marmorkuchen.....	42
Tabelle 7: Rezepturen für Nougat.....	43
Tabelle 8: Allergene, deren Sequenz zum Entwurf der Primer verwendet wurden.....	54
Tabelle 9: Master-Mixe.....	55
Tabelle 10: Lebensmittel, die auf Kreuzreaktivität getestet wurden.....	57
Tabelle 11: Master-Mixe zur Optimierung der TaqMan Sonden-Konzentration.....	59
Tabelle 12: Master-Mix für den Duplex-Assay.....	60
Tabelle 13: Master-Mixe für den Singleplex-Assay.....	62
Tabelle 14: Master-Mixe für den Duplex-Assay.....	63
Tabelle 15: Master-Mix für den Duplex-Assay.....	64
Tabelle 16: Müslimischungen.....	66
Tabelle 17: Verwendete Methoden zur DNA-Extraktion aus Modelllebensmittelproben.....	67
Tabelle 18: Entworfenen Primer und TaqMan Sonden, Mandel.....	70
Tabelle 19: Einfluss der Konzentration des Primerpaares 1 auf den Ct-Wert.....	71
Tabelle 20: Einfluss der Konzentration des Primerpaares 2 auf den Ct-Wert.....	72
Tabelle 21: Einfluss der TaqMan-Konzentration auf den Ct-Wert.....	80
Tabelle 22: Reproduzierbarkeit des TaqMan-Assays; Singleplex.....	83
Tabelle 23: Bestimmung der Nachweisgrenze, Singleplex-Assay.....	85
Tabelle 24: Einfluss der Röstbedingungen auf den Ct-Wert.....	86
Tabelle 25: Untersuchung kommerziell erhältlicher Lebensmittel (1).....	87
Tabelle 26: Untersuchung kommerziell erhältlicher Lebensmittel (2).....	88
Tabelle 27: Primer und TaqMan Sonden für den Duplex-Assay.....	89
Tabelle 28: In den Singleplex-Assays optimierte Konzentration der Primer und TaqMan Sonden .....	90
Tabelle 29: Ct-Werte für seriell verdünnter Mandel- und Haselnuss-DNA im Duplex-Assay.....	92
Tabelle 30: Ct-Werte für DNA-Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzungen an Mandel- und Haselnuss-DNA; Duplex-Assay.....	105
Tabelle 31: Reproduzierbarkeit des Duplex-Assays, Mandel.....	107
Tabelle 32: Reproduzierbarkeit des Duplex-Assays, Haselnuss.....	108
Tabelle 33: Bestimmung der Nachweisgrenze, Mandel-Assay.....	109
Tabelle 34: Bestimmung der Nachweisgrenze, Haselnuss-Assay.....	109

Tabelle 35: Ausbeute und Reinheit der aus Modelllebensmitteln extrahierten DNA.....	110
Tabelle 36: Anwendung des Duplex-Assays auf Modelllebensmittel (Rezepturen siehe Kapitel 3.3.3).....	111
Tabelle 37: Ergebnis für Nougat Rezeptur 3 .....	112
Tabelle 38: Bestimmung von Mandel und Haselnuss in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln .....	113
Tabelle 39: Entworfenen Primer und TaqMan Sonden, Walnuss.....	115
Tabelle 40: Einfluss der Primer Konzentration auf den Ct-Wert.....	116
Tabelle 41: Neu entworfene Primer und TaqMan Sonde, Walnuss .....	125
Tabelle 42: Einfluss der Konzentration des neuen Primerpaares auf den Ct-Wert.....	125
Tabelle 43: Schmelztemperaturen der gebildeten Produkte.....	127
Tabelle 44: Entworfenen Primer und Sonden .....	129
Tabelle 45: Einfluss der Konzentration des Primerpaares 1 auf den Ct-Wert.....	130
Tabelle 46: Einfluss der Konzentration des Primerpaares 2 und 3 auf den Ct-Wert.....	131

## IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C	Cytosin
Ct	Threshold cycle
Da	Dalton
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
dNTPs	Deoxynucleosidtriphosphat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
G	Guanin
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
HDL	High Density Lipoprotein
IgE	Immunglobulin E
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Kettenreaktion
ppm	parts per million
rpm	rounds per minute
RSD	relative Standardabweichung
s	Standardabweichung
T	Thymin
T <sub>m</sub>	berechnete Schmelztemperatur

## 1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Lebensmittelallergien sind ein wichtiges Gesundheitsproblem in Industriestaaten. Die Zahl der in Europa lebenden Patienten, die an einer Allergie leiden, steigt stetig an. Zur Zeit liegt die Prävalenz von Lebensmittelallergikern bei Erwachsenen bei etwa 3% und bei Kindern zwischen 6 und 8% [BURKS und BALLMER-WEBER, 2006].

Die einzige effektive Therapie einer Lebensmittelallergie stellt die strikte Eliminierung des Lebensmittels aus dem Speiseplan dar. Um den Verbrauchern das Identifizieren dieser Allergene in Lebensmittelprodukten zu erleichtern und die Gefahr von versteckten Allergenen zu minimieren, wurde sowohl auf EU-Ebene als auch auf nationaler Ebene die Richtlinie zur Lebensmittelkennzeichnung modifiziert. In der EU-Richtlinie 2007/68/EG wurde eine Liste veröffentlicht, welche 14 potentiell allergene Lebensmittelzutaten und deren Erzeugnissen beinhaltet, die zukünftig zwingend auf dem Etikett eines Lebensmittels angeführt werden müssen.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollten Methoden zur Detektion von Mandel, Haselnuss, Walnuss und Traube entwickelt werden, da diese bevorzugt als Zutaten in verschiedensten komplexen Lebensmittelprodukten verwendet werden und als potentiell allergene Lebensmittel schwerwiegende Symptome in sensibilisierten Personen mit einem hohen Risiko einer Anaphylaxie auslösen können. Aus diesem Grund zählen oben genannte Lebensmittel, mit Ausnahme der Traube, zu den deklarationspflichtigen Lebensmitteln. Zur Kontrolle der Kennzeichnungspflicht müssen selektive und empfindliche Analysemethoden entwickelt werden, wie die auf der Real Time Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierenden, welche diesen Anforderungen gerecht werden und als schnelle, spezifische Methoden mit hoher Präzision Anwendung finden.

In den letzten Jahren wurde intensiv an der Entwicklung von auf der Polymerase Kettenreaktion basierenden Methoden zur Bestimmung von Haselnuss [HOLZHAUSER et al., 2000; ARLORIO et al., 2007] oder Walnuss [BREZNA et al., 2006] geforscht. Obwohl Mandeln zu den beliebtesten Nüssen gehören und weltweit an erster Stelle in der Nuss-Produktion stehen, ist bis jetzt noch keine Real Time PCR-Methode zu deren Bestimmung publiziert worden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer Real Time PCR-Methode zur Detektion von potentiell allergenen Mandeln mittels eines Singleplex-Assays sowie einer Duplex Real Time PCR-Methode, die die gleichzeitige Bestimmung von Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln ermöglicht. Weiters sollte die Spezifität dieser Methoden geprüft und möglichst niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden. Mit diesen Methoden sollten kommerziell erhältliche Lebensmittel und Modelllebensmittel analysiert werden. Abschließend sollten die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden auf ihre Anwendungsfähigkeit bezüglich des Nachweises der spezifischen Allergene nach verschiedenen Verarbeitungsschritten der Lebensmittel überprüft werden.

Außerdem sollten für die Walnuss und Traube Primerpaare entworfen werden, die für weitere Entwicklungen von Singleplex- oder Duplex-Assays mittels einer Real Time PCR-Methode verwendet werden können.

## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Allergien**

#### **2.1.1 Ursachen von Allergien**

Die Zahl der allergischen Erkrankungen, wie z.B. der Lebensmittelallergien, nimmt besonders in den Industrieländern zu und sie entwickeln sich zu einem weltweit verbreiteten Problem. Es gibt Hinweise darauf, dass der Anstieg dieser Erkrankungen auf genetische und umweltrelevante Faktoren zurückzuführen ist [SHIMADA et al., 2005]. In der Wissenschaft wird auch die sogenannte „Hygiene-Theorie“ diskutiert, welche besagt, dass für die Frühprägung des Immunsystems aus Bakterien stammende Polysaccharide von großer Bedeutung sind und somit eine sterile Umgebung zur Fehlentwicklung des Immunsystems führen kann [GRIMM, 2006].

#### **2.1.2 Unverträglichkeitsreaktionen auf Lebensmittel**

Für eine Lebensmittelunverträglichkeit gibt es eine Vielzahl an möglichen Ursachen [SCHÖLL und JENSEN-JAROLIM, 2006]. Unter diesem Begriff fasst man alle unerwünschten und unerwarteten Reaktionen nach dem Verzehr von Lebensmitteln oder Lebensmittelbestandteilen zusammen [BINDER, 2005]. In Abbildung 1 sind die Auslöser von Unverträglichkeitsreaktionen auf Lebensmittel aufgelistet.

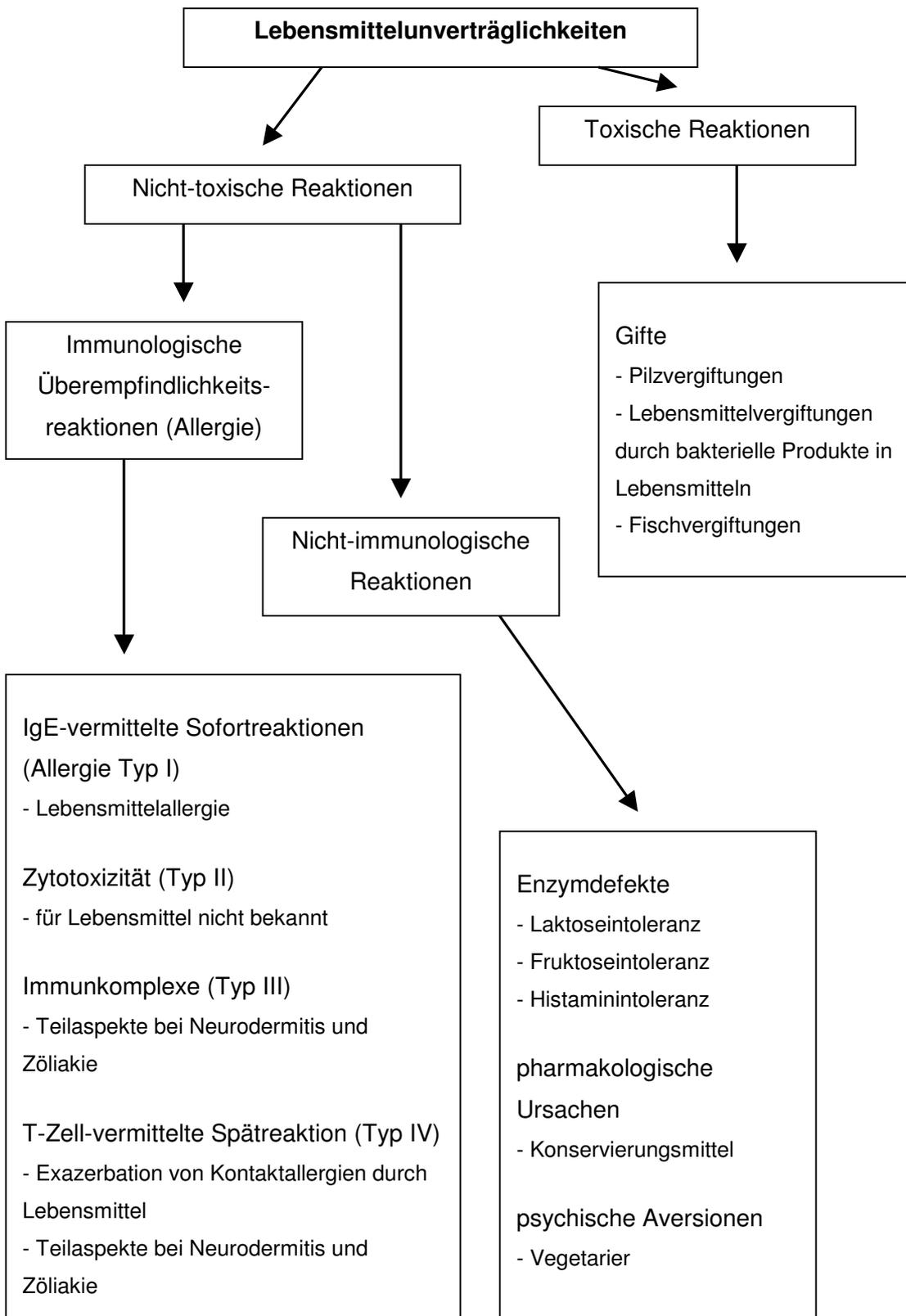


Abbildung 1: Auslöser von Lebensmittelunverträglichkeiten [modifiziert nach SCHÖLL und JENSEN-JAROLIM, 2006]

### 2.1.3 Lebensmittelallergie versus Lebensmittelintoleranz und Pseudoallergie

Die Lebensmittelallergie ist eine immunologische Reaktion, welche durch den Verzehr eines Lebensmittels ausgelöst wird. Diese Reaktion kann auch schon nach dem Verzehr einer sehr geringen Menge eines Lebensmittels auftreten [BURKS und BALLMER-WEBER, 2006]. Für manche Lebensmittel liegt die allergieauslösende Dosis im Milligrammbereich oder sogar darunter. Oft reicht nur das Einatmen von Dämpfen und Sprühtröpfchen aus, um lebensbedrohliche Symptome auszulösen [LORENZ et al., 2001]. Die Lebensmittelbestandteile, die eine Allergie auslösen, zählen zur Gruppe der Proteine.

Innerhalb einer Lebensmittelallergie unterscheidet man zwischen der IgE-vermittelten und der nicht IgE-vermittelten Allergie:

- *IgE-vermittelte Lebensmittelallergie:* Die Voraussetzung für das Entstehen dieses Allergietyps ist ein vorangegangener Kontakt mit dem Allergen, welcher zu einer Aktivierung des Immunsystems und zur Bildung von IgE-Antikörpern führt. Dieser Prozess wird als Sensibilisierung bezeichnet. Mögliche Ursachen dafür sind eine genetische Disposition und eine gestörte Funktion der gastrointestinalen Schleimhautbarriere. Außerdem können die Menge und das allergische Potential des aufgenommenen Allergens die Sensibilisierung beeinflussen [BINDER, 2005]. Die gebildeten, für das jeweilige Lebensmittel spezifischen IgE-Antikörper binden mittels Fc-Rezeptoren an die Oberfläche von Mastzellen und basophilen Zellen. Erreichen die Lebensmittelallergene bei einem neuerlichen Kontakt mit dem Lebensmittel mehrere dieser IgE-Antikörper, kommt es zur Degranulation der Vesikel-Inhalte Histamin, Prostaglandine und Leukotriene. Dadurch kommt es zur Erweiterung der Blutgefäße, zur Kontraktion der glatten Muskulatur und zur Schleimbildung [BURKS und BALLMER-WEBER, 2006; MILLS et al., 2003].

- *Nicht IgE-vermittelte Lebensmittelallergie*: Hierbei handelt es sich um eine verzögert auftretende Immunreaktion, deren Mechanismus noch unklar ist [BINDER, 2005].

Die Pseudoallergie und die Lebensmittelintoleranz zählen zu den nicht allergischen Lebensmittelunverträglichkeiten [BINDER, 2005]. Bei diesen Reaktionen werden keine Antikörper gebildet. Diese Unverträglichkeiten führen zu Symptomen, die denen einer Allergie ähnlich sind, wobei diese erst nach einigen Stunden auftreten. Außerdem können als Auslöser nicht nur Proteine, sondern auch andere Substanzen fungieren. Typische Verursacher von Pseudoallergien sind Substanzen wie Aromastoffe, Salizylate und Benzoate natürlicher Herkunft, verschiedene Konservierungsmittel, Azofarbstoffe und biogene Amine. Es sind meist größere Mengen der Substanz notwendig, um Beschwerden auszulösen. Die Lebensmittelintoleranzen beruhen meistens auf einem angeborenen oder erworbenen Enzymdefekt, wobei als Beispiele die Laktoseintoleranz, Histaminintoleranz und Fruktosemalabsorption anzuführen sind [BURKS und BALLMER-WEBER, 2006].

### **2.1.4 Häufigkeit von Lebensmittelallergien**

Die Zahl der Patienten, die an Lebensmittelunverträglichkeiten leiden, steigt stetig an. Viele Personen vermuten, dass sie unter einer Lebensmittelallergie leiden, wobei der Nachweis einer echten Nahrungsmittelallergie mit einer Antikörper-vermittelten Reaktion mittels einer ausführlichen allergologischen Diagnostik nur bei etwa 1% der Bevölkerung erbracht wird [SCHÖLL und JENSEN-JAROLIM, 2006; CONSTIEN, 2005]. In fast allen Altersklassen treten allergische Erkrankungen auf.

Lebensmittelallergien entstehen häufig in den ersten Lebensjahren, wobei bei einigen Formen die meisten Kinder der Allergie „entwachsen“. In den USA sind etwa 6% der Kinder im Alter von 1 bis 3 Jahren von einer Lebensmittelallergie betroffen. Etwa 2,5% der Neugeborenen weisen im ersten Lebensjahr eine

Allergie gegen Kuhmilch auf, 80% dieser Kinder verlieren bis zum 5. Lebensjahr diese Lebensmittelallergie. Weiters reagieren etwa 1,5% der Kinder allergisch auf Eier und 0,5% auf Erdnüsse [SAMPSON, 2003]. In Europa leiden Schätzungen zufolge etwa 1,3-8,0% der Kinder an einer Lebensmittelallergie [LORENZ et al., 2001]. Es ist bekannt, dass folgende Lebensmittel die typischen allergischen Reaktionen im Säuglings- und Kindesalter auslösen: Ei, Milch, Erdnuss, Weizenmehl und Soja [SICHERER, 2002].

Lebensmittelallergien treten bei Erwachsenen weniger häufig auf als im Kindesalter. Erwachsene reagieren häufig allergisch auf Erdnüsse, Nüsse und Meeresfrüchte. Eine Lebensmittelallergie gegen Früchte und Gemüse ist weit verbreitet, verläuft aber in den meisten Fällen harmlos [SICHERER, 2002]. Es ist bekannt, dass etwa 2% der Erwachsenen in den USA auf Lebensmittel allergisch reagieren. Eine Untersuchung in den USA ergab, dass etwa 1,3% der Erwachsenen an einer Nuss- und Erdnussallergie leiden [SAMPSON (a), 1999]. In Europa leiden Schätzungen zufolge etwa 0,3-2,4% der Erwachsenen an einer Lebensmittelallergie [LORENZ et al., 2001]. In einer Studie gaben 12% von 17280 befragten Erwachsenen aus 15 Ländern an, an einer Lebensmittelallergie zu leiden. Auslöser für Symptome im Respirationstrakt waren in Norwegen, Schweden und Deutschland die Haselnuss, in Island, Belgien, Irland und Italien verschiedene Früchte und in der USA die Erdnuss. Die unterschiedliche Prävalenz von Lebensmittelallergien in verschiedenen Ländern ist auf unterschiedliche Essgewohnheiten, kulturelle und soziale Einflüsse sowie genetisch bedingte Faktoren zurückzuführen [SICHERER, 2002].

### **2.1.5 Symptomatik der Lebensmittelallergie**

Lebensmittelallergene können eine Vielzahl an klinischen Symptomen auslösen, wobei unterschiedlichste Organsysteme betroffen sind (siehe Tabelle 1) [EFSA, 2004]. Diese allergischen Reaktionen können nach wenigen Sekunden oder mehreren Stunden auftreten. Bei Erwachsenen tritt am

häufigsten das orale Allergiesyndrom auf, welches entweder harmlos oder auch lebensbedrohlich verlaufen kann [ASERO et al., 2007].

Die gefährlichste allergische Reaktion ist der anaphylaktische Schock, welcher immer einen medizinischen Notfall darstellt. Dabei treten gastrointestinale, respiratorische und die Haut betreffende Symptome auf. Außerdem geht in manchen Fällen die Anaphylaxie mit kardiovaskulären Beschwerden wie Hypotonie, Herzrhythmusstörungen, Schwindel und Kollaps einher und kann sogar bis zum Tod führen [ASERO et al., 2007].

Tabelle 1: Symptome von Lebensmittelallergien

<b>Organsystem</b>	<b>Klinische Merkmale</b>
Respirationstrakt	Asthma Rhinitis
Gastrointestinaltrakt	Orales Allergiesyndrom Diarrhoea Obstipation Bauchschmerzen, Blähungen Breachreiz, Übelkeit, Erbrechen Koliken Gastro-Ösophagealer Reflux Enteropathien
Haut	Urticaria Atopische Dermatitis Angioödem
Augen	Konjunktivitis Tränende Augen
Zentrales Nervensystem	Kopfschmerzen Aufmerksamkeitsdefizit Hyperaktivitätsstörungen
Generalisierte Symptome	Anaphylaxie

### **2.1.6 Diagnostik der Lebensmittelallergie**

Das Kernstück der Allergie-Diagnostik ist die umfassende und ausführliche Anamnese. Hilfreich dazu ist oft ein über 4 Wochen geführtes Tagebuch, in dem neben Tagesablauf und Ernährung auch Art und Ausmaß der Symptome festgehalten werden [RIEDL-SEIFERT, 2005]. Außerdem werden die Menge an spezifischen IgE im Serum bestimmt und Haut-Prick-Tests und Atopie-Patch-Tests durchgeführt [BINDER, 2005]. Doch diese Tests und die Anwesenheit von spezifischen IgE-Antikörpern im Blut reichen nicht aus, um eine Lebensmittelallergie sicher zu diagnostizieren [ASERO et al., 2007]. Zur endgültigen Diagnose sollte eine Lebensmittelprovokation nach dem „goldenen Standard“, d.h. doppel-blind, placebo-kontrollierte Studien, durchgeführt werden. Erst nach eindeutiger Diagnose einer Lebensmittelallergie durch diese Provokation können eventuell notwendige Diättempfehlungen ausgesprochen werden [BINDER, 2005].

### **2.1.7 Therapie von Lebensmittelallergien**

Eines der wichtigsten Ziele einer Allergie-Behandlung ist, dass die Lebensqualität der Patienten nicht durch unnütze Diäten verschlechtert wird. Daher ist eine genaue und korrekte Diagnose unumgänglich [ASERO et al., 2007]. Wurde eine Lebensmittelallergie diagnostiziert, ist die strikte Eliminierung des Lebensmittels aus dem Speiseplan die einzig effektive Therapie. Sind mehrere Lebensmittel über einen längeren Zeitraum betroffen, kann dies zu einer Unterversorgung der Person an verschiedenen Nährstoffen führen. Außerdem werden verschiedene Medikamente eingesetzt und Immuntherapien durchgeführt, doch diese erbringen noch keine herausragenden therapeutischen Ergebnisse. Eine weitere wichtige Maßnahme stellt die Aufklärung und Schulung von Lebensmittelallergikern dar [BURKS und BALLMER-WEBER, 2006]. Eine Ernährungsberatung sowie ein individuelles Gespräch mit einem Allergologen können die ernährungsbedingte Umstellungsphase stark verkürzen und es können viele nützliche Tipps für ein

beschwerdefreies Leben erhalten werden [MÖRIBAUER und REISELHUBER, 2004].

### **2.1.8 Allgemeine Allergieprävention**

Angesichts der steigenden Häufigkeit von Allergien und den weitgehend fehlenden Therapieansätzen gewinnt die Allergieprävention besonders an Bedeutung. In Deutschland wurde im Rahmen des „Aktionsbündnisses Allergieprävention“ eine evidenzbasierte Leitlinie zur Primär- und Sekundärprävention entwickelt [SCHÄFER und BOROWSKI, 2004]. Diese Empfehlungen wurden nach einem hohen methodischen Standard entwickelt und erstmalig in Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachverbände (AWMF) publiziert [ZWIEAUER, 2006]. Insgesamt wurden 323 Studien bewertet und in die Leitlinie aufgenommen. Nahezu alle Studien konnten eine signifikante Reduktion der Anzahl an atopischen Neuerkrankungen belegen. Dies zeigt, dass Allergieprävention möglich ist [SCHÄFER und BOROWSKI, 2004].

Es wurden folgende Primär- und Sekundärempfehlungen erstellt [SCHÄFER und BOROWSKI, 2004]:

#### 1) bei familiärer Vorbelastung (Risikokind):

- ausschließliches Stillen von mindestens 4 Monaten; ist dies nicht möglich, Gabe hypoallergener Säuglingsnahrung
- nur nach Abwägung der Gefahren der Mangelernährung ist die Vermeidung potenter Nahrungsmittelallergene in der mütterlichen Diät und während der Stillzeit vertretbar
- keine Beikost vor dem 4. Lebensmonat
- keine allgemeine Diät zur Allergieprävention
- keine Anschaffung von felltragenden Tieren
- Vermeidung der Katzenhaltung
- Reduktion der Hausstaubmilbenallergenbelastung
- Vermeidung eines schimmelpilzfördernden Klimas

- Vermeidung der Aktiv- und Passivtabakrauchexposition (auch während der Schwangerschaft)

2) ohne familiäre Vorbelastung (kein Risikokind):

- ausschließliches Stillen von mindestens 4 Monaten
- keine Beikost vor dem 4. Lebensmonat
- keine allgemeine Diät zur Allergieprävention
- keine Einschränkungen bei der Haustierhaltung
- Vermeidung eines schimmelpilzfördernden Klimas
- Vermeidung der Aktiv- und Passivtabakrauchexposition (auch während der Schwangerschaft)

## **2.2 Lebensmittelallergene**

### **2.2.1 Allgemeines**

Wissenschaftler suchen schon lange nach gemeinsamen Merkmalen von Allergenen, die sie von nicht-allergenen Proteinen unterscheiden. Prinzipiell ist eine allergische Reaktion auf jedes in Lebensmitteln vorkommende Protein denkbar. Allgemein betrachtet verursachen etwa 8 Nahrungsmitteltypen (Erdnüsse, Nüsse, Weizen, Sojabohnen, Meeresfrüchte, Fische, Milch und Eier) den Großteil aller Lebensmittelallergien [SCHÖLL und JENSEN-JAROLIM, 2006; MILLS et al., 2003].

Generell ist sehr wenig über die Faktoren bekannt, welche die Allergenität eines Proteins bestimmen. Es dürfte eine stabile drei-dimensionale Struktur des Proteins für das Auslösen von Allergien verantwortlich sein. Es wurden sowohl glykosylierte als auch unglykosylierte Proteine als Allergene identifiziert. Außerdem spielt die Stabilität der Proteine während der verschiedenen Verarbeitungsprozesse von Lebensmitteln und den Verdauungsprozessen im Gastrointestinaltrakt eine Rolle. Allerdings ist zu betonen, dass auch labile

Proteine, welche empfindlich gegenüber einem Enzymabbau sind, als potente Allergene auftreten können. Ein weiterer Faktor stellt das Vorhandensein großer Mengen dieser Proteine im Nahrungsangebot dar [BREDEHORST und DAVID, 2001; EFSA, 2004].

Die bereits identifizierten Lebensmittelallergene gehören den verschiedensten Proteinfamilien an. Dazu zählen hydrolytische und nicht hydrolytische Enzyme, Enzyminhibitoren, Transportproteine, regulatorische Proteine und Speicherproteine [VIETHS, 2005]. Außerdem ist ersichtlich, dass diese Allergene ausschließlich drei strukturell verwandten Protein-Superfamilien zuzuordnen sind [MILLS et al., 2003]. Dazu zählen die

- Prolamin Superfamilie (Prolamin-Speicherproteine, nsLTP (non specific lipid transfer proteins),  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren, 2S Albumine)
- Cupine (speziell die 11S und 7S Globulin-Speicherproteine)
- Cystein Protease.

### **2.2.2 Einfluss der Verarbeitung auf die Allergenität von Lebensmitteln**

Allgemein ist es schwierig vorherzusehen, wie technologische Prozesse die Allergenität von Lebensmitteln beeinflussen und welche Effekte dadurch hervorgerufen werden [EFSA, 2004]. Während der Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln kann deren Allergenität durch verschiedenste Parameter verändert werden. Durch Verarbeitungsschritte wie Hitzebehandlung, enzymatische Hydrolyse oder Fermentation kann die Struktur des Proteins verändert werden. Dabei werden die bestehenden Epitopstrukturen entweder inaktiviert, zerstört oder umgebaut. Es werden entweder neue Epitope gebildet oder kritische Epitope können eine verbesserte Position einnehmen. Die Allergenität kann daher entweder gleich bleiben, niedriger werden oder auch steigen [BESLER et al., 2001]. In Tabelle 2 sind Lebensmittel aufgelistet, die nach einer Hitzebehandlung entweder ihr allergenes Potential beibehalten oder verlieren.

Tabelle 2: Proteinstabilität nach einer Hitzebehandlung des Lebensmittels

hitzestabil	teilweise stabil	labil
Milch	Sojabohne	Früchte aus der Familie
Ei	Getreide	der <i>Rosaceae</i>
Fisch	Sellerie	Karotten
Erdnüsse und deren Erzeugnisse	Nüsse und deren Erzeugnisse	und deren Erzeugnisse

Quelle: [EFSA, 2004]

Eine umfangreiche und informative Studie zeigte, dass das Rösten von rohen Haselnüssen bei 140 °C für 40 min die Allergenität des Haselnussallergens Cor a 1.04 signifikant reduzierte [HANSEN et al., 2003]. Im Gegensatz dazu stieg in Untersuchungen mit dem Erdnussallergen Ara h 1 die Allergenität von Erdnüssen durch das Rösten stark an [MALEKI et al., 2000]. Andererseits wurde dieser Effekt bei Temperaturen von 100-120 °C, bei denen keine Maillard-Reaktion stattfindet, nicht beobachtet. Dies zeigt, dass unterschiedliche Verarbeitungsschritte die Allergenität von Erdnüssen unterschiedlich beeinflussen [BEYER et al., 2002].

### 2.2.3 Problematik der versteckten Allergene

Versteckte Allergene sind für den Verbraucher nicht erkennbare Bestandteile in Lebensmitteln, die eine Allergie auslösen können. Entweder gelangen diese durch eine (unbeabsichtigte) Kontamination während der Herstellung oder des Transportes in das Produkt oder sie sind generell als Zutat vorhanden. Schon kleine Mengen dieser versteckten Allergene können schwerwiegende klinische Symptome auslösen und stellen somit ein erhebliches Gesundheitsrisiko für Lebensmittelallergiker dar. Folgende Nahrungsmittel haben eine besondere Bedeutung als versteckte Allergene, da sie ein großes allergenes Potential aufweisen: Erdnüsse, Sojabohnen, Baumnüsse (inklusive Haselnüsse, Mandeln, Walnüsse, Pekannüsse, Paranüsse sowie Cashewkerne), Milch, Ei, Sellerie, Sesam, Senf und Meeresfrüchte (Fisch und Schalentiere). Diese

allergenen Lebensmittel werden häufig in der Gastronomie und Lebensmittelindustrie eingesetzt. Dies erschwert für den Lebensmittelallergiker den unbedenklichen Verzehr von Fertigprodukten und Mahlzeiten, die Außer-Haus konsumiert werden [LORENZ et al., 2001; KOCH, 2006].

## **2.2.4 Gesetzliche Regelung der Lebensmittelkennzeichnung**

Die Kennzeichnung von Lebensmitteln wird immer wichtiger, da den KonsumentInnen ein zunehmend größer werdendes Nahrungsangebot zur Verfügung steht. Die Lebensmittelkennzeichnung wird sowohl auf EU-Ebene als auch auf nationaler Ebene gesetzlich geregelt.

### **2.2.4.1 Europäische Lebensmittelkennzeichnung**

Die Europäische Kommission legte mit dem „Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit“ vom 12. Januar 2000 die Leitlinie ihrer neuen Lebensmittelpolitik fest. Es wurde die Anforderung gestellt, dass nur sichere Lebensmittel in den Verkehr gebracht werden dürfen. Zur Risikobewertung und Risikokommunikation wurde eine unabhängige europäische Lebensmittelbehörde (EFSA) errichtet. Außerdem beinhaltet das Weißbuch einen umfassenden Aktionsplan, mit dem die Rechtsvorschriften gestaltet wurden. Diese neuen Regelungen sollten zu einer verbesserten Verbraucheraufklärung hinsichtlich der Eigenschaften und der Zusammensetzung eines Produktes führen [KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN, 2000].

Die rechtliche Grundlage der Lebensmittelkennzeichnung auf EU-Ebene bildet die „Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. März 2000 zur Angleichung von Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie Werbung hierfür“ [RICHTLINIE 2000/13/EG]. Durch die Änderung dieser Richtlinie im Jahr 2003 wurde explizit die Allergenkennzeichnung berücksichtigt

und erbrachte somit mehr Sicherheit für AllergikerInnen. Die Richtlinie 2003/89/EG schreibt ab 25. November 2005 vor, dass alle Einzelzutaten von zusammengesetzten Zutaten, die eine Lebensmittelallergie oder -intoleranz auslösen können, auf jeden Fall auf dem Etikett angegeben werden müssen, unabhängig von ihrem Anteil im Lebensmittel [RICHTLINIE 2003/89/EG].

In weiterer Diskussion standen bestimmte Zutaten oder Erzeugnisse, die laut Lebensmittelhersteller nach bestimmten Produktionsprozessen kein allergenes Potential besitzen. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) überprüfte diese hoch verarbeiteten Erzeugnisse und anhand dieser Ergebnisse trat die Richtlinie 2005/26/EG der EU-Kommission in Kraft. Die untersuchten Lebensmittel und Erzeugnisse müssen nicht mehr gekennzeichnet werden, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass sie noch ein allergenes Potential besitzen und diese sind bis zum 25. November 2007 aus Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG ausgeschlossen [RICHTLINIE 2005/26/EG].

Nach weiteren Überprüfungen wurde die „Richtlinie 2007/68/EG der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten“ eingeführt. Auf Grundlage der EFSA-Gutachten und anderer Informationen kann angenommen werden, dass bestimmte Erzeugnisse der kennzeichnungspflichtigen Zutaten bei empfindlichen Personen keine unerwünschten Reaktionen hervorrufen. Somit wurde der Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG entsprechend geändert [RICHTLINIE 2007/68/EG].

In der folgenden Liste sind sowohl die zu kennzeichnenden, möglicherweise allergieauslösenden Zutaten sowie auch die jeweiligen Zutaten, die von der Etikettierungspflicht ausgenommen sind, angeführt. Die Liste umfasst 14 Nahrungsmittelzutaten mit den jeweiligen Erzeugnissen und Ausnahmen [RICHTLINIE 2007/68/EG]:

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

- a) Molke zur Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke;
  - b) Lactit.
- Schalenfrüchte, d.h. Mandeln (*Amygdalus communis L.*), Haselnüsse (*Corylus avellana*), Walnüsse (*Juglans regia*), Kaschunüsse (*Anacardium occidentale*), Pekannüsse (*Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch*), Paranüsse (*Bertholletia excelsa*), Pistazien (*Pistacia vera*), Makadamianüsse und Queenslandnüsse (*Macadamia ternifolia*) und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
    - a) Schalenfrüchte für die Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke.
  - Sellerie und daraus gewonnene Erzeugnisse.
  - Senf und daraus gewonnene Erzeugnisse.
  - Sesamsamen und daraus gewonnene Erzeugnisse.
  - Schwefeldioxid und Sulphite in Konzentrationen von mehr als 10 mg/kg oder 10 mg/l, ausgedrückt als SO<sub>2</sub>.
  - Lupinen und daraus gewonnene Erzeugnisse.
  - Weichtiere und daraus gewonnene Erzeugnisse.

#### **2.2.4.2 Lebensmittelkennzeichnung in Österreich**

In Österreich bestehen viele gesetzliche Verordnungen, die Vorgaben zur korrekten Lebensmittelkennzeichnung beinhalten. Dazu zählen die Zusatzstoffverordnung, Fertigpackungsverordnung, Nährwertkennzeichnungsverordnung, Farbstoffverordnung und die Verordnung von Süßungsmitteln. Die mittlerweile mehrfach geänderte Lebensmittelkennzeichnungsverordnung

(LMKV) stammt aus dem Jahr 1994. Außerdem ist auf nationaler Ebene der Codex Alimentarius Austriacus für die Lebensmittelkennzeichnung von Bedeutung [WEISS, 2004].

Zur Umsetzung der EU-Richtlinie 2003/89/EG wurde in Österreich die Lebensmittelkennzeichnungsverordnung im April 2005 novelliert und somit die EU-Richtlinie in nationales Recht umgesetzt [BGBl II Nr.111, 2005].

## **2.3 Mandel (*Prunus dulcis*)**

### **2.3.1 Allgemeines**

Die ursprüngliche Heimat des Mandelbaums liegt wahrscheinlich im subtropischen China und in Vorderasien. Er wird seit vielen Jahrtausenden in warmen, gemäßigten Zonen wie im Orient, im Mittelmeergebiet und in Südeuropa kultiviert [KRIST et al., 2008]. Je nach Bittermandelölgehalt unterscheidet man zwischen bitteren Mandeln und süßen Mandeln. In Letzteren ist über 50% Öl enthalten und diese werden außer zum Backen auch zur Herstellung von Marzipan und Mandelöl verwendet [LIEBEREI und REISDORFF, 2007]. Die Bedeutung der süßen Mandeln zeigt sich in der vielseitigen Verwendung der ganzen, gemahlenden oder gerösteten Kerne in Kuchen, Torten, Schokolade und Pralinen.

Bittere Mandeln sind durch ihren Gehalt an Amygdalin (bis 5%) giftig. Die entstehende Blausäure kann durch einen Verzehr größerer Mengen von bitteren Mandeln gesundheitsschädlich wirken, bei Kindern liegt die letale Dosis bei 6-10 Mandeln [ROTH und KORMANN, 2000]. Die Mandel wird von der US Food and Drug Administration (FDA) als eine sehr gute Quelle für Vitamin E, Mangan, Magnesium, Kupfer, Phosphor, Ballaststoffe, Riboflavin und Protein beschrieben [CHEN et al., 2006].

### 2.3.2 Mandelallergie

Der Verzehr von Mandeln kann kardiovaskulären Erkrankungen und dem Entstehen einer Insulinresistenz entgegenwirken. Trotz dieser positiven Effekte auf die Gesundheit kann der Konsum von Mandeln bei manchen Menschen zu schwerwiegenden allergischen Reaktionen und zum Tod führen [CHEN et al., 2006].

Sicherer et al. zeigten anhand einer Telefonumfrage, an der 3 Millionen Amerikaner mit einer Lebensmittelallergie teilgenommen haben, dass etwa 10% eine Mandelallergie aufwiesen [SICHERER et al., 1999]. Außerdem entstehen bei Patienten mit einer Sensibilisierung auf Baumpollen, ähnlich wie bei der Haselnuss, allergische Reaktionen auf Mandeln [SENTI et al., 2000]. Pasini et al. und Poltronieri et al. berichteten, dass mehrere Patienten nach dem Verzehr von Mandeln an lebensbedrohlichen Symptomen und Anaphylaxien litten [PASINI et al., 2000; POLTRONIERI et al., 2002].

### 2.3.3 Mandelallergene

Insgesamt wurden bereits 4 Mandelallergene identifiziert: ein 2S Albumin, Pru du Amandin (Almond Major Protein, AMP), ein Conglutin  $\gamma$  und ein Profilin (Pru du 4) [TAWDE et al., 2006; GAUR et al., 2008].

Amandin ist das Hauptspeicherprotein der Mandel, es hat ein Molekulargewicht von  $427,3 \pm 47,6$  kDa. Es besitzt eine oligomere Form (12 Polypeptide/Mol), zählt zur 11S Legumin-Familie der Samenproteine und ist wasserlöslich [SATHE et al., 2002; GAUR et al., 2008]. Amandin ist das bedeutendste Allergen, auf welches Mandelallergiker reagieren. Roux et al. quantifizierten AMP in kommerziell erhältlichen mandelhaltigen Produkten. Dabei beobachteten sie, dass die Nachweisbarkeit dieses Allergens in wässrigen Lösungsmittel-Extrakten weder durch Rösten, Blanchieren noch durch Autoklavieren der Mandeln vermindert wurde. Es zeigte sich, dass AMP

ein gutes Markerprotein für immunologische Analysen darstellt, da es etwa 70% des wasserlöslichen Gesamtproteinanteils der Mandel ausmacht und hitzestabil ist [ROUX et al., 2001].

In der Arbeit von Tawde et al. wurde das Allergen Profilin (Pru du 4) charakterisiert und beschrieben. Profilin ist ein kleines (12-16 kDa), ubiquitäres Protein, welches als Allergen in Pollen, Gemüse, Früchten, Samen, Nüssen und Latex vorkommt. Es weist oft eine Kreuzreaktivität mit dem Pollen-Profilin auf, da eine hohe Sequenzhomologie besteht und gemeinsame IgE-Epitope vorhanden sind [TAWDE et al., 2006].

## **2.4 Haselnuss (*Corylus avellana*)**

### **2.4.1 Allgemeines**

Der in Europa bis nach Kleinasien weit verbreitete Haselnussstrauch gehört zur Familie der *Betulaceae* und diente schon in frühesten Zeiten mit seinen ölhaltigen Samen als Nahrungsmittel [LIEBEREI und REISDORFF, 2007]. Er wächst von der Ebene bis zu einer Höhe von 1700 m und es sind 15 Arten sowie tausende Hybride von Nordamerika über Europa, Nordafrika bis Asien bekannt. Die vom Handel bevorzugte Haselnuss wird die „Lambertsnuss“ (*C. maxima*) genannt. Das gewonnene Haselnussöl variiert je nach Anbaugebiet, Röstvorgang und Gewinnungsmethode in seiner Fettsäurezusammensetzung. Den Hauptteil der enthaltenen Fettsäuren machen die Ölsäure und Linolsäure aus, gefolgt von Palmitinsäure und Stearinsäure [KRIST et al., 2008]. Neben dem Rohverzehr der Nüsse dienen diese gemahlen als Zutaten bei der Herstellung von Backwaren, Speiseeis und Süßigkeiten [LIEBEREI und REISDORFF, 2007].

### **2.4.2 Haselnussallergie**

Die Haselnussallergie zählt zu den wichtigsten Lebensmittelallergien, etwa 0,1-0,5% der europäischen Bevölkerung sind davon betroffen. Diese Allergie ist oft mit einer Pollinose auf frühblühende Bäume (Birke, Hasel, Erle, Hainbuche und Eiche) assoziiert, da eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Allergenen der Haselnuss und denen der Baumpollen besteht. Zur häufigsten klinischen Manifestation zählt das orale Allergiesyndrom. Andererseits werden aber allergische Reaktionen durch die Haselnuss auch bei Patienten, bei denen keine assoziierte Baumpollenallergie diagnostiziert wurde, ausgelöst. Dabei treten Symptome wie Urticaria, Asthma, Angioödem, Erbrechen, Durchfall und/oder ein anaphylaktischer Schock auf [SENTI et al., 2000; BEYER et al., 2002; POMS et al., 2004].

### **2.4.3 Haselnussallergene**

Das Hauptallergen Cor a 1 (18 kDa) der Haselnuss weist aufgrund einer hohen Strukturhomologie mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1 eine Kreuzreaktivität auf. Weiters wurden insgesamt vier Cor a 1-Isoformen in Haselpollen (Cor a 1.01, Cor a 1.02 und Cor a 1.03) und in der Haselnuss (Cor a 1.04) identifiziert. Das Haselnussallergen Cor a 2 mit einem Molekulargewicht von 14 kDa zeigt eine Kreuzreaktivität mit dem Birken-Profilin Bet v 2 [PASTORELLO et al., 2002; POMS et al., 2004].

Zu den Allergenen, welche keine Homologien mit Pollenproteinen aufweisen, zählen das Lipidspeicherprotein Cor a 8 (9 kDa) und das 11S Globulin-ähnliche Samenspeicherprotein Cor a 9 (40 kDa) [BEYER et al., 2002; SCHOCKER et al., 2004]. Lauer et al. identifizierten das Haselnuss-Vicillin Cor a 11 aufgrund seiner IgE-Bindungsfrequenz und seinem allergenen Potential als ein Nebenallergen [LAUER et al., 2004].

## **2.5 Walnuss (*Juglans regia*)**

### **2.5.1 Allgemeines**

Der Walnussbaum gehört zur Familie der *Juglandaceae* und ist von Südeuropa über Zentralasien bis China heimisch. In Nordamerika ist die Schwarznuss (*Juglans nigra*) heimisch, welche runde, fast pfirsichgroße Früchte erzeugt [LIEBEREI und REISDORFF, 2007]. Hauptlieferanten der Walnussfrüchte sind Frankreich, Italien, Türkei, Griechenland und der Iran. Auch unter günstigen klimatischen Bedingungen dauert es etwa 15 Jahre, bis ein Walnussbaum viele Früchte trägt [KRIST et al., 2008].

Der Samen besteht zu über 60% aus Öl [LIEBEREI und REISDORFF, 2007]. Durch Pressen der Samen wird ein beliebtes Speiseöl gewonnen, welches einen hohen Anteil an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren besitzt. Durch den Verzehr von Walnussöl wird der Triglyceridspiegel im Blut gesenkt und der HDL-Cholesterinspiegel erhöht. Dies führt zu einem positiven Effekt auf den Lipidstoffwechsel und senkt somit das Arterioskleroserisiko. Außerdem besitzt das Walnussöl auch eine fungizide und desinfizierende Wirkung [KRIST et al., 2008] und einen besonders hohen Gehalt an den Vitaminen B<sub>6</sub>, E und K und den Mineralstoffen Magnesium und Phosphor [VOLLMER et al., 1995]. Die Walnuss wird in Bäckereien und in der Küche vielseitig in süßen und salzigen Gerichten verwendet, vor allem in Kuchen, Backwaren, Torten, Schokoladen und Salaten [ROTH und KORMANN, 2000].

### **2.5.2 Walnussallergie**

Neben den positiven Effekten auf die Gesundheit kann der Verzehr von Walnuss bei manchen Menschen allergische Symptome hervorrufen. Dabei treten häufig das orale Allergiesyndrom, Konjunktivitis, generalisierte Urtikaria und Schluckbeschwerden auf. In schwerwiegenden Fällen können auch anaphylaktische Reaktionen ausgelöst werden [SENTI et al., 2000].

Fleischer et al. zeigten anhand einer Studie, an der 278 Nussallergiker im Alter zwischen 3 und 21,6 Jahren teilnahmen, dass von 101 Patienten mit einer akuten Reaktion 35 (30%) auf Walnuss allergisch reagierten. Von den allergischen Reaktionen löste die Walnuss 38% der milden (Hautsymptome und/oder orale Symptome), 17% der moderaten (Symptome im Gastrointestinaltrakt und/oder am oberen Respirationstrakt oder in allen 3 Organsystemen) und 30% der schwerwiegenden (Symptome im unteren Respirationstrakt und/oder kardiovaskuläre Symptome oder in allen 4 Organsystemen) Reaktionen aus [FLEISCHER et al., 2005].

### **2.5.3 Walnussallergene**

In der Walnuss wurden bereits vier Allergene identifiziert. Dazu zählen ein 2S Albumin (Jug r 1), ein Vicillin-ähnliches Protein (Jug r 2, 7S Protein), ein Lipidtransportprotein (Jug r 3) und ein Legumin-ähnliches Protein (Jug r 4, 11S Protein) [ASERO et al., 2004].

Das Allergen Jug r 1 gehört zur Familie der Samenspeicherproteine, genauer zur 2S Albumin-Familie, das Molekulargewicht liegt bei 15-16 kDa. Die Aminosäuresequenz von Jug r 1 stimmt zu 46% mit der Sequenz des Hauptallergens Ber e 1 der Paranuss überein. Das Vicillin-ähnliche Allergen der Walnuss wurde als Jug r 2 bezeichnet und besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 44 bis 48 kDa. Obwohl die Sequenz von Jug r 2 zu 70% mit der Sequenz des Erdnuss-Vicillins Ara h 1 übereinstimmt, besteht keine Kreuzreaktivität zwischen dem Walnussprotein und dem homologen Erdnussprotein [POMS et al., 2004; EFSA, 2004].

In der Walnuss konnten keine Bet-v-1-ähnlichen Allergene gefunden werden, daher besteht bei Walnussallergikern nur in seltenen Fällen eine gleichzeitige Sensibilisierung auf Birkenpollen [SENTI et al., 2000].

## **2.6 Weintraube (*Vitis vinifera*)**

### **2.6.1 Allgemeines**

Die Weintraube ist eine Beere von weltwirtschaftlicher Bedeutung. Die Rebe gehört zu der Familie der *Vitaceae* und zählt zu den ältesten Kulturpflanzen Europas. Bereits die Griechen und Römer pflegten den Weinbau und infolge des Anbaus in den unterschiedlichsten Klimaten entwickelten sich in Europa zahlreiche Sorten. Die Beeren werden für die Wein-, Sekt-, Weinbrand- und Weinessigherstellung verwendet und zunehmender Beliebtheit erfreut sich alkoholfreier Traubensaft. Außerdem werden die Beeren als Tafeltrauben verzehrt und in südlichen Ländern durch Trocknung Rosinen gewonnen. Für Speisezwecke lässt sich aus den Samen Traubenkernöl gewinnen, welches wegen des nussartigen Geschmacks gerne verwendet wird [LIEBEREI und REISDORFF, 2007].

### **2.6.2 Weintraubenallergie**

Weintrauben und daraus hergestellte Weine können bei sensiblen Personen allergische Reaktionen auslösen. In der Literatur wurden einige durch den Verzehr von Trauben und Wein ausgelöste allergische Symptome beschrieben. In manchen Fällen handelt es sich dabei um eine assoziierte Kirsch- und Pfirsichallergie [PASTORELLO et al., 2003].

Rodríguez et al. berichteten von 14 Kindern, die auf frische Weintrauben und Traubensaft allergisch reagierten. Dabei wurde bei sechs Kindern das orale Allergiesyndrom ausgelöst, vier Kinder erlitten einen anaphylaktischen Schock, zwei bekamen ein Angioödem, ein Kind bekam einen Nesselausschlag und ein weiteres Kind reagierte mit einem Angioödem und Nesselausschlag [RODRÍGUEZ et al., 2004]. In einer weiteren Untersuchung reagierten elf Patienten allergisch auf Weintrauben und drei Patienten auf Wein. Bei zwei Patienten wurde das orale Allergiesyndrom ausgelöst, die restlichen Personen

zeigten Symptome wie Urticaria, Angioödem, Hypotonie, Asthma, Symptome im Gastrointestinaltrakt und einen anaphylaktischen Schock [PASTORELLO et al., 2003]. Caiaffa et al., García-Robaina et al. und Vaswani et al. berichteten in weiteren Studien von durch den Verzehr von Weintrauben und Wein ausgelösten Anaphylaxien [CAIAFFA et al., 2003; GARCÍA-ROBAINA et al., 2001; VASWANI et al., 1999].

### **2.6.3 Weintraubenallergene**

Pastorello et al. charakterisierten als Hauptallergene die Endochitinase 4A (Chitinase Class I Protein) und ein Lipidtransportprotein (Vit v 1), welches Homologien und somit eine Kreuzreaktivität mit dem Pfirsich-Lipidtransportprotein aufweist. Außerdem wurde ein Taumatin-ähnliches Protein (24 kDa) als ein Nebenallergen der Weintraube identifiziert, dieses zeigt Homologien mit dem Taumatin-ähnlichen Kirschallergen [PASTORELLO et al., 2003].

Das Hauptallergen Vit v 1 besitzt ein Molekulargewicht von 9 kDa, ist höchstwahrscheinlich thermostabil und resistent gegenüber enzymatischem Abbau [ASERO et al., 2000].

## **2.7 Ausgewählte Methoden zur Bestimmung von allergenen Lebensmitteln**

### **2.7.1 Allgemeines**

Zur Detektion von Allergenen in Lebensmitteln sind leistungsstarke analytische Methoden notwendig, die kleinste Mengen von Allergenen spezifisch nachweisen können und sowohl schnell, robust als auch kostengünstig sind [BESLER, 2001]. Jedoch können Kreuzreaktivitäten, Matrixeffekte und die Lebensmittelverarbeitung die Analyse von Allergenen in Lebensmitteln

erschweren. Es besteht allgemein die Übereinstimmung, dass die Nachweisgrenze der Methoden zwischen 1 und 100 ppm (mg Allergen kg<sup>-1</sup> Lebensmittel) liegen sollte [POMS et al., 2004; KIENING et al., 2005].

Immunanalytische Verfahren stellten in der Vergangenheit die Methoden der Wahl dar. Entweder wird das allergene Protein oder ein Marker, welcher auf die Anwesenheit des gesuchten Lebensmittels hindeutet, detektiert. Protein-basierende Methoden sind der Radio Allergosorbent Test (RAST), der Enzyme Allergosorbent Test (EAST), die Rocket Immunelectrophorese (RIE), der Immunoblot und der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) [POMS et al., 2004; BESLER, 2001].

Mittlerweile gewinnen auch molekularbiologische Verfahren in der Analytik von Lebensmittelallergenen zunehmend an Bedeutung. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) weist die Anwesenheit spezifischer DNA-Fragmente nach und mittels der Real Time PCR kann eine höhere Spezifität erreicht werden [BURGMAIER-THIELERT et al., 2006; POMS et al., 2004].

### 2.7.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist die meist verwendete Methode in der Lebensmittelindustrie und von offiziellen Lebensmittelkontrollstellen zur Detektion versteckter Allergene in Lebensmitteln. Es werden zwei ELISA-Formate für die Quantifizierung der Allergene angewendet: der Sandwich-ELISA und der kompetitive ELISA.

Der **Sandwich-ELISA** wird am häufigsten zur Detektion von Antigenen verwendet. Dabei werden Antikörper an eine feste Phase immobilisiert, um freie Antigene (Allergene) in der Probe zu binden. Diese gebundenen Antigene werden durch einen zweiten proteinspezifischen, enzymmarkierten Antikörper nachgewiesen und befinden sich somit „sandwich-artig“ zwischen den beiden Antikörpern. Das Enzym am zweiten Antikörper katalysiert die Umwandlung eines farblosen Substrats in ein gefärbtes Produkt. Es wird eine photometrische Messung durchgeführt, das Signal ist direkt proportional zur Konzentration des

Analyts [POMS et al., 2004; BESLER, 2001]. Mit dieser Methode können Nachweisgrenzen von 0,5 bis 0,2 µg/g erreicht werden [HOLZHAUSER und VIETHS, 1999; AKKERDAAS et al., 2004; KIENING et al., 2005].

Der **kompetitive ELISA** wird bevorzugt zur Detektion von kleineren Proteinen verwendet. Diese Methode basiert auf an einer festen Phase immobilisierten Antigenen, zu denen der Proteinextrakt des Lebensmittels und die Antikörper zugegeben werden. Danach wird ein enzymmarkierter Antikörper eingesetzt, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Nach Substratzugabe katalysiert der enzymmarkierte Antikörper eine Farbreaktion, die man durch Denaturierung des Enzyms stoppt. Befindet sich kein Analyt im Proteinextrakt, zeigt der enzymmarkierte Antikörper maximale Bindungskapazität zum Festphasen-gebundenen Antigen. Daraus resultiert eine hohe Enzymkonzentration, welche zu einer hohen optischen Dichte führt. Das Messsignal ist indirekt proportional zur Konzentration des Analyten. In verschiedenen Studien wurde eine Nachweisgrenze bis zu 0,5 µg/g erreicht [POMS et al., 2004; ROUX et al., 2001].

### **2.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Noch vor wenigen Jahren wurden in der Allergenanalytik aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit hauptsächlich ELISAs eingesetzt. Mittlerweile zeigt sich, dass auch mit PCR-Methoden in Kombination mit geeigneten DNA-Extraktionsverfahren eine vergleichbare Empfindlichkeit erreicht werden kann [BURGMAIER-THIELERT et al., 2006].

Bei der Polymerase Kettenreaktion wird ein spezifisches DNA-Fragment (Templat) mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase amplifiziert. Zwei Oligonukleotide (Primer Forward und Primer Reverse) stellen den jeweiligen Startpunkt für die Doppelstrangsynthese dar. Außerdem werden Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) als Bausteine für die neu entstehenden DNA-

Stränge benötigt. Pufferlösungen, welche Magnesiumchlorid enthalten, sollen die optimalen Bedingungen für die DNA-Polymerase schaffen.

Die PCR besteht aus 25-50 zyklischen Wiederholungen mehrerer aufeinanderfolgender Schritte [POMS et al., 2004; MÜLHARDT, 2006]:

- **Denaturierung:** Zuerst wird der DNA-Doppelstrang auf 95°C erhitzt, um die Stränge voneinander zu trennen.
- **Annealing:** Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt und es können sich die Primer, die zur Zielsequenz komplementäre Basen aufweisen, an die Einzelstränge anlagern. Die Temperatur dieses Schrittes liegt etwa 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primer, normalerweise zwischen 50 und 60°C.
- **Elongation** (Kettenverlängerung): Schließlich füllt die thermostabile DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit neuen Nukleotiden auf, beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers. Dieser Schritt wird üblicherweise bei 72°C durchgeführt.

Anschließend werden die amplifizierten Produkte mittels einer Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Unter Verwendung fluoreszierender Farbstoffe können die entstehenden DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

Ein häufiges Problem stellt die aufwändige und teure Probenvorbereitung dar, da man nicht aus allen Lebensmitteln ausreichend reine DNA isolieren kann. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die Proben, die verwendeten Master-Mixe, die Primer und die Sonden nicht mit der nachzuweisenden DNA kontaminiert werden [WILHELM und PINGOUD, 2003; MÜLHARDT, 2006].

## 2.7.4 Real Time Polymerase Kettenreaktion

Die Real Time PCR stellt eine Erweiterung der herkömmlichen PCR dar. Die Besonderheit dieser Methode ist, dass der Prozess der Amplifikation durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenztechniken in „Echtzeit“ beobachtet werden kann. Die Real Time PCR ist eine robuste und schnelle Methode. Durch die verschlossenen Wells ist das Risiko einer Kontamination im Thermocycler sehr gering. Generell ist der apparative Aufwand bei der Real Time PCR sehr groß [WILHELM und PINGOUD, 2003; MÜLHARDT, 2006].

Zur Quantifizierung wird die Zyklenzahl (Ct-Wert) verwendet, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrundwert abhebt. Man legt eine Basislinie (Schwellenwert), bei der sich die Kurven noch im exponentiellen Bereich befinden und ermittelt, nach wievielen Zyklen die Kurven jeweils diese Linie erreichen. Dieser Wert entspricht dem Ct-Wert und erlaubt Rückschlüsse darauf, welche Menge an DNA in der Probe vorhanden war. Der Ct-Wert ist umso niedriger, je höher die Ausgangskonzentration der DNA war. Wenn das Fluoreszenzsignal nicht über den Schwellenwert steigt, wurde es als negatives Ergebnis gewertet [WILHELM und PINGOUD, 2003; POMS et al., 2003; MÜLHARDT, 2006].

### 2.7.4.1 Detektionsmethoden

Die zur Menge der amplifizierten PCR-Produkte proportionalen Fluoreszenzsignale entstehen entweder durch interkalierende Farbstoffe oder durch sequenz-spezifische Oligonucleotid-Sonden [WILHELM und PINGOUD, 2003].

Die Nutzung von **interkalierenden Farbstoffen** (SYBR<sup>®</sup> Green I) ist die einfachste Möglichkeit, um PCR-Produkte sichtbar zu machen. Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die doppelsträngige DNA ein. Die Zunahme der Templat-DNA Menge korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz von

Zyklus zu Zyklus. Der Vorteil ist die universale Verwendbarkeit und die relativ hohe Signalstärke. Daraus resultiert aber auch ein großer Nachteil: man kann nicht zwischen dem gewünschten Produkt und Artefakten unterscheiden [MÜLHARDT, 2006].

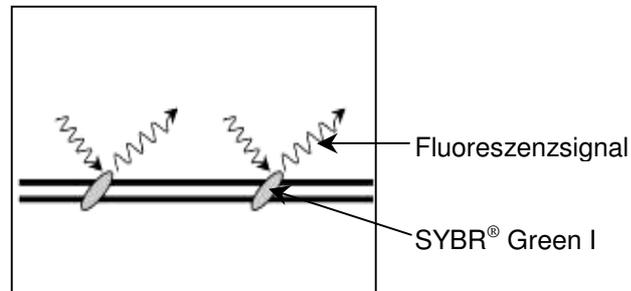


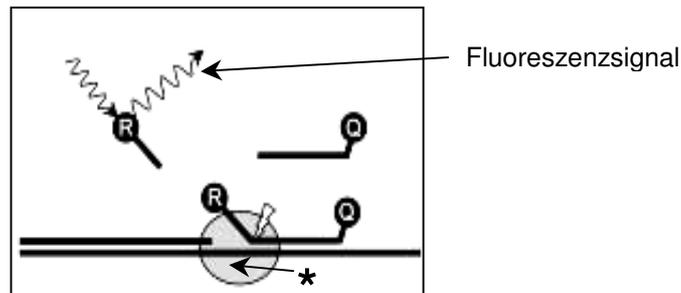
Abbildung 2: Fluoreszenzsignal, ausgelöst durch SYBR® Green I

Quelle: [nach WILHELM und PINGOUD, 2003]

Nach einer abgelaufenen Real Time PCR besteht die Möglichkeit, eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Mit dieser Analyse kann auf unspezifische Amplifikationsprodukte oder Primer-Dimere getestet werden. Durch langsames Erhöhen der Schmelztemperatur (von 55 auf 95°C) wird die DNA bei einem spezifischen Schmelzpunkt wieder in die beiden Einzelstränge zerlegt. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme gemessen. Diese Schmelztemperaturen charakterisieren die amplifizierten Sequenzen und können mit der Positivkontrolle verglichen werden [WILHELM und PINGOUD, 2003].

Für einen sequenzspezifischen Nachweis können mit einem Fluorophor markierte Oligonukleotid-Sonden verwendet werden. Die **TaqMan Sonde** wird so entworfen, dass sie sich im Bereich des DNA-Abschnittes anlagert, der amplifiziert werden soll. Sie trägt an einem Ende einen fluoreszierenden Farbstoff (Reporter) und am anderen Ende einen Quencher, der die Fluoreszenz unterdrückt. Wenn die TaqDNA-Polymerase, die auch eine 5´-3´-Exonuclease-Aktivität besitzt, während der Synthese des Gegenstranges die Sonde am 5´-Ende abbaut, werden Quencher und Reporter voneinander getrennt und ein Reporter-Fluoreszenzsignal kann gemessen werden. Bei

jedem Zyklus nimmt die Konzentration an „freien“ Reporter-molekülen und somit auch das Fluoreszenzsignal zu. Ist keine Targetsequenz vorhanden, bleibt die TaqMan Sonde in Takt und durch die räumliche Nähe mit dem Quencher wird das Fluoreszenzsignal nicht detektiert [WILHELM und PINGOUD, 2003; BUSTIN und NOLAN, 2004].



**Abbildung 3:** Prinzip der Detektion mit einer TaqMan Sonde.

Der gekennzeichnete Bereich (\*) symbolisiert die hydrolytische Auftrennung der Sonde durch die TaqDNA-Polymerase. Erklärung: R, Reporter; Q, Quencher; Quelle: [nach WILHELM und PINGOUD, 2003].

#### 2.7.4.2 Duplex-Assay

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde auch ein Duplex-Assay zur Bestimmung von Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln entwickelt. Ein Duplex-Assay stellt eine PCR-Variante dar, bei der gleichzeitig zwei spezifische DNA-Sequenzen im selben Reaktionsansatz amplifiziert werden. Dies bedeutet, dass in einem Reaktionsansatz zwei spezifische Primerpaare und TaqMan Sonden enthalten sind. Somit wird erreicht, dass in einem Lebensmittelprodukt gleichzeitig zwei Allergene detektiert werden können. Ein Duplex-Assay hilft Zeit und Kosten zu sparen, besonders wenn eine große Anzahl an Analysen durchzuführen ist. Die Etablierung eines Duplex-Assays ist jedoch zeitaufwendiger als die eines Singleplex-Assays, da mehrere Optimierungsschritte notwendig sind, um eine optimale Amplifikation beider DNA-Sequenzen zu gewährleisten. Außerdem ist oft die Einstellung folgender Parameter für eine erfolgreiche Reaktion von Bedeutung: die relative Konzentration der Primerpaare, die PCR-Puffer-

Konzentration, die Konzentration der einzelnen Nukleotide, die Magnesiumchlorid-Konzentration und das Temperaturprofil der PCR-Reaktion [SCHOLZ et al., 2001].

## **2.8 Übersicht über publizierte Methoden zur Bestimmung von Mandel, Haselnuss und Walnuss in Lebensmitteln**

Zum Nachweis von allergenen Lebensmitteln werden hauptsächlich immunologische und molekularbiologische Methoden verwendet. Die folgenden Punkte zeigen eine Auswahl an bestehenden Arbeiten zur Detektion von potentiell allergener Mandel, Haselnuss und Walnuss.

- **Venkatachalam et al.** (2002) untersuchten mittels eines kompetitiven ELISAs unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen Amandin (Mandelprotein) den Einfluss verschiedener Verarbeitungsschritte (Rösten, Blanchieren, Autoklavieren und Mikrowellenerhitzung) auf die Allergenität von Mandelproteinen. Dabei zeigte sich, dass das Mandelprotein Amandin stabil und sehr gut mittels des ELISAs detektierbar war. Der eingesetzte ELISA erwies sich als eine empfindliche (Nachweisgrenze: 5-37 ppm Mandelprotein), robuste und spezifische Methode zur Detektion der Mandel [VENKATACHALAM et al., 2002].
- **Scheibe et al.** (2001) publizierten eine Immunoblot-Technik zur Detektion von potentiell allergenem Mandel- und Haselnussprotein in Schokolade. Die Proteine der Probe wurden mittels einer SDS-Elektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese Membran wurde mit Patientenseren inkubiert. Um die Antigene zu detektieren, wurde die Membran mit polyklonalen Antiseren aus Kaninchen gegen Haselnuss- oder Mandelprotein inkubiert und mit einer Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Es bestand keine Kreuzreaktivität

zwischen den Haselnuss-/Mandelproteinen und Milch-, Kakao- und Erdnussproteinen. Die Schokolade wurde mit Mandel und Haselnuss gespickt (0,005-5%) und mittels der entwickelten Immunoblot-Technik mit Kaninchen-Antiserum analysiert. Diese Methode erlaubt einen Nachweis von 0,5 mg Mandel- und Haselnussprotein pro 100 g Schokolade (= 5 µg/g). Weiters wurden 83 Schokoladenproben, die gekennzeichnet waren kein Haselnuss- und Mandelprotein zu enthalten, mittels dieser Immunoblot-Technik untersucht. Dabei konnte eine Haselnussprotein-Konzentration von 1 mg/100 g in 60 Proben und eine Mandelprotein-Konzentration von 1 mg/100 g in 51 Proben detektiert werden [SCHEIBE et al., 2001].

- **Rejeb et al.** (2003) entwickelten einen kompetitiven ELISA zur Detektion von Haselnuss. Es konnte keine Kreuzreaktivität mit insgesamt 39 Lebensmitteln festgestellt werden. In gespickten Lebensmitteln (1; 2,5; 5 bzw. 10 µg Haselnussproteine/g) betrug die Wiederfindung zwischen 64 und 83% in Schokoladen und zwischen 78 und 98% in anderen Matrices. Die Nachweisgrenze betrug 0,45 µg Haselnussproteine/g Probe [REJEB et al., 2003].
- **Piknová et al.** (2008) entwickelten eine Real Time PCR-Methode zur Detektion von Haselnuss in Lebensmitteln. Das verwendete Primerpaar wurde anhand der Gen-Sequenz (Hsp1) eines Haselnussproteins entworfen. Die Nachweisgrenze dieser Methode lag bei 13 pg Haselnuss-DNA. Es wurden die Lebensmittel Erdnuss, Mandel, Walnuss, Pistazie, Cashew und Maroni auf Kreuzreaktivität getestet. Keines dieser Lebensmittel wies eine Kreuzreaktivität mit dem entworfenen Primerpaar auf. Um die Anwendbarkeit dieser PCR-Methode zu testen, wurden 20 kommerziell erhältliche Lebensmittel untersucht und mit den Ergebnissen, die mit einem ELISA erhalten wurden, verglichen. Die Ergebnisse beider Methoden waren vergleichbar und stimmten mit der Produktkennzeichnung überein [PIKNOVÁ et al., 2008].

- **Kiening et al.** (2005) publizierten einen Sandwich-ELISA zur Detektion von Haselnuss und Erdnuss in Lebensmitteln, basierend auf der Verwendung poly- und monoklonaler Antikörper. Die Analysenzeit betrug rund 30 min. Es wurden 19 Lebensmittel (z.B. Mandel, Paranuss, Cashew, Kokosnuss, Makadamia, Grüne Bohne, Pekannuss, Sesam, Sojabohne, Walnuss und Sonnenblumenkerne) auf Kreuzreaktivität getestet. Im Erdnuss-Assay zeigten alle eine Kreuzreaktivität  $< 2 \times 10^{-4}\%$  (2 ppm) außer Makadamia, Sojabohne, Haselnuss und Pinienkerne. Im Haselnuss-Assay wies nur die Walnuss eine Kreuzreaktivität von  $> 2 \times 10^{-4}\%$  (2 ppm) auf. Die Wiederfindung in allen getesteten Lebensmitteln lag zwischen 86 und 127% und es ergab sich eine Nachweisgrenze von 0,2-1,2 mg/kg Haselnuss und Erdnuss [KIENING et al., 2005].
- **Arlorio et al.** publizierten 2007 eine Arbeit über die Entwicklung von zwei Real Time PCR-Methoden zum Nachweis von Haselnuss (*Corylus* spp.) in Lebensmitteln. In der ersten Methode wurde SYBR Green zur Detektion verwendet, in der zweiten eine Haselnuss-spezifische TaqMan Sonde, welche anhand der Sequenz des Allergens Cor a 1.04 entworfen wurde. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng Haselnuss-DNA absolut. Außerdem wurden in dieser Arbeit auch verschiedene DNA-Extraktionsmethoden verglichen und diskutiert [ARLORIO et al., 2007].
- **Yano et al.** (2007) publizierten eine qualitative Methode zur Detektion von Walnuss in verarbeiteten Lebensmitteln unter Verwendung einer konventionellen PCR. Es wurde ein Primerpaar basierend auf das Chloroplast maturase (matK) Gen (Accession No. AF118027) der Walnuss entworfen. Die DNA der untersuchten Lebensmittel wurde mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) und dem Genomic-Tip 20/G (Qiagen) extrahiert. Mit dem entworfenen Primerpaar wurden Kiwi, Sojabohne, Mandel, Cashew, Makadamia, Pistazien, Haselnuss, Paranuss und Pekannuss auf Kreuzreaktivität getestet, wobei die Pekannuss mit dem Primerpaar kreuzreagierte. Durch Sequenzierung

der PCR-Produkte, welche in der Walnuss und in der Pekannuss gebildet worden waren, wurden Unterschiede in der Basenabfolge entdeckt und diese bei einem neuerlichen Primerdesign ausgenützt. Die Nachweisgrenze dieser PCR-Methode liegt bei 0,5 pg (=10 ppm) Walnuss-DNA. Um die Anwendbarkeit dieser Methode zu testen, wurden zehn kommerziell erhältliche Lebensmittel untersucht. In zwei Produkten war laut Hersteller Walnuss enthalten, diese konnte auch nachgewiesen werden. In den restlichen Proben, in denen Walnuss nicht enthalten war, wurde diese nicht detektiert [YANO et al., 2007].

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Verwendete Geräte

- Analysenwaage: AT 400, Mettler
- Kolbenhubpipetten: 0,5-10 µl, BioRad  
2-20 µl, BioRad  
20-200 µl, BioRad  
100-1000 µl, BioRad
- Vortex: Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
- Zentrifugen: Modell 5413, Laborpartner  
4 K 10 mit Rotor 11140, Sigma
- pH-Meter: Metrohm 691
- Trockenschrank: Model 500, Memmert
- Photometer: Genesys 10UV, Thermo Scientific
- Mikrowellenofen: Modell MW 1700, Silva Austria
- Küchenmixer: Typ MM 2000, Retsch
- Backofen: Manz
- Universal-Küchenmaschine: Alexanderwerk
- Induktionskochplatte: Laser 2000
- Ultra-Turrax T50: Janke & Kunkel, IKA- Labortechnik
- Kugelmühle Retsch MM 2000
- SLC 6000 Sorvall Evolution FIBERLite, Piramoon Technologies
- Rührgerät Baerwerk

#### PCR

- iCycler, BioRad
- iQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR Detection System, BioRad

### Agarosegelelektrophorese

- Power Pac™ HV Power Supply, BioRad
- Transilluminator 312 nm: Herolab UVT-20 M

## 3.2 Chemikalien und Reagenzien

- Certified™ PCR Agarose, BioRad
- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Sigma-Aldrich
- Chloroform ≥99%, Roth
- dNTPs 10 mM each, Promega
- DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen
- EDTA, Titriplex III, Merck
- Ethidiumbromid Lösung 10 mg/ml, BioRad
- Ethanol, Roth
- GOTaq® DNA Polymerase (5 units/μl), Promega
- Isopropanol 99,5%, Sigma-Aldrich
- iQ™ Supermix 2x, BioRad
- iQ™ SYBR® Green Supermix 2x, BioRad
- Natriumchlorid, Sigma-Aldrich, Merck
- Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5x, BioRad
- Primer, Sigma-Aldrich
- Proteinase K from tritirachium album, Sigma-Aldrich
- QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen
- RNase, Sigma-Aldrich
- TaqMan Sonden, Metabion
- Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) Trizma® base, Sigma-Aldrich
- 20 bp Buffer, BioRad

### 3.3 Proben

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden sowohl kommerziell erhältliche Lebensmittel als auch Modelllebensmittel analysiert.

#### 3.3.1 Kommerziell erhältliche Lebensmittel

Alle Lebensmittel wurden in lokalen Supermärkten gekauft. Sie können in drei Produktgruppen unterteilt werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Kommerziell erhältliche Lebensmittel

<i>Lebensmittel</i>	<i>Verwendetes Symbol</i>
Lebensmittel, die Mandel und/oder Haselnuss enthalten	+
Lebensmittel mit dem Hinweis: Kann Spuren von Mandel und/oder Haselnuss enthalten	+/-
Lebensmittel, die keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Mandel und Haselnuss enthalten	-

#### 3.3.2 Herstellung von Modelllebensmitteln

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität für Bodenkultur wurden Mandeln unter exakt kontrollierten Bedingungen geröstet und Krokant, ein Nussalternativgetränk, ein Marmorkuchen und verschiedene Nougats als Modelllebensmittel unter kontrollierten Bedingungen hergestellt.

### 3.3.2.1 Rösten von Mandeln

Etwa 50 g ungeschälter Mandeln wurden direkt in eine Brotbackform eingewogen und in einem Backofen (Manz) bei Ober- und Unterhitze geröstet. Die gewählte Temperatur betrug 130 °C, 150 °C bzw. 170 °C, die Röstzeit 5 min, 10 min bzw. 15 min. Die gerösteten Mandeln wurden verkostet, Röstgeschmack, Geruch und Farbe wurden notiert.

### 3.3.2.2 Krokant

Folgende Krokantmischungen wurden hergestellt:

Tabelle 4: Rezepturen für Krokant

	Krokant							
	Rezeptur 1		Rezeptur 2		Rezeptur 3		Rezeptur 4	
	%	g	%	g	%	g	%	g
Haselnüsse geschält	25,0	125,0	25,0	125,0	5,0	12,50	5,0	12,50
Mandeln geschält	-	-	-	-	5,0	12,50	5,0	12,50
Walnüsse	-	-	-	-	5,0	12,50	5,0	12,50
Cashewkerne	-	-	-	-	5,0	12,50	5,0	12,50
Erdnüsse geschält	-	-	-	-	5,0	12,50	5,0	12,50
Zucker	75,0	375,0	37,5	187,5	37,5	93,75	37,5	93,75
Honig	-	-	37,5	187,5	37,5	93,75	37,5	93,75
Summe	100,0	500,0	100,0	500,0	100,0	250,00	100,0	250,00

Für die Krokantherstellung wurden im ersten Schritt die Nüsse als Zutaten vorbereitet. Es wurden 1100 g ganze Haselnüsse eingewogen und auf einem Backblech im Backofen (Manz) mit Ober- und Unterhitze bei 180 °C für 15 min geröstet. Die abgekühlten Haselnüsse wurden in einem Sieb von ihrer Schale getrennt und mit einer Universal-Küchenmaschine (Alexanderwerk), die eine grobe Walze enthielt, zerkleinert. Danach wurden etwa 720 g Erdnüsse eingewogen und die Erdnüsse für 18 min bei 180 °C geröstet. Anschließend

wurden sie ebenfalls von ihrer Schale getrennt und mit der Universal-Küchenmaschine zerkleinert. Im nächsten Schritt wurden etwa 310 g ganze Mandeln eingewogen und für 2 min blanchiert. Die Mandeln wurden händisch geschält, an der Luft getrocknet und ebenfalls mit der Küchenmaschine zerkleinert. Danach wurden je 50 g Walnüsse und Cashewkerne eingewogen und in der Küchenmaschine zerkleinert. Nach jedem Zerkleinerungsschritt wurde die Universal-Küchenmaschine mit einer Bürste gründlich gereinigt.

Für die weitere Durchführung wurde eine Induktionskochplatte (Laser 2000) verwendet. Den Rezepturen von Tabelle 4 folgend wurden vier verschiedene Krokantmischungen hergestellt. Zucker und/oder Honig wurden in einem Induktionskochtopf eingewogen und bis zur Schmelze erhitzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Karamell nicht zu dunkel wurde, da dies den Geschmack negativ beeinflussen würde. Danach wurden die verschiedenen Mengen an Nüssen zugegeben und kurz auf der Kochplatte durchmischt. Die fertige Krokantmischung wurde auf ein befettetes Backpapier geleert und mit Hilfe eines zweiten befetteten Backpapiers und einem Nudelholz zu einer 1 cm hohen Schicht ausgewalkt. Das getrocknete Krokant wurde mit der Universal-Küchenmaschine zerkleinert, anschließend in eine Kunststoffolie eingeschweißt und bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.3.2.3 Nussalternativgetränk**

Zu Beginn wurden etwa 750 g Haselnüsse im Backofen (Manz) bei 180°C Ober- und Unterhitze für 20 min geröstet. Danach wurden diese mit Hilfe eines Siebes von ihrer Schale getrennt und mit der Küchenmaschine unter Verwendung des kleinsten Reibeinsatzes zerkleinert.

Tabelle 5: Rezepturen für Nussalternativgetränke

	<b>Nussalternativgetränk</b>			
	<b>Rezeptur 1</b>		<b>Rezeptur 2</b>	
	%	g	%	g
Haselnüsse geschält	25,0	500,0	12,5	250,0
Mandel geschält	-	-	12,5	250,0
Wasser	75,0	1500,0	75,0	1500,0
Summe	100,0	2000,0	100,0	2000,0

- Rezeptur 1:

Es wurden 1500 g Wasser in einem Induktionskochtopf auf einer Induktionskochplatte (Laser 2000) bis 55°C erhitzt und dann mit 500 g gerösteten, geschälten und zerkleinerten Haselnüssen vermischt. Diese Mischung wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax T50 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) bei 6000 U/min für 5 min vermengt und zerkleinert. Danach wurde der Kochtopf wieder auf die Platte gestellt, bei Stufe 5 auf 85°C erhitzt, dann auf Stufe 1 zurückgeschaltet, der Temperaturanstieg mit Hilfe eines Thermometers beobachtet und bei 90°C für 5 min konstant gehalten.

- Rezeptur 2:

Zuerst wurden 1500 g Wasser in einem Induktionskochtopf auf einer Induktionskochplatte bis 55°C erhitzt. Danach wurden jeweils 250 g geröstete, geschälte und zerkleinerte Haselnüsse und Mandeln eingewogen, zum Wasser dazugegeben und mit dem Ultra-Turrax T50 für 5 min zerkleinert und vermischt. Anschließend wurde der Kochtopf wieder auf die Platte gestellt, bei Stufe 10 auf 70°C und bei Stufe 5 auf 90°C erhitzt. Diese Temperatur wurde für 5 min mit Stufe 1 gehalten.

Die hergestellten Mischungen wurden mit dem Gerät Sorvall Evolution RC für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 3.3.2.4 Marmorkuchen mit Nussalternativgetränk (Rezeptur 2)

Tabelle 6: Rezeptur Marmorkuchen

	Marmorkuchen	
	Menge	Einheit
Butter	200	g
Zucker	200	g
Vanillinzucker	1	Packung
Eier	4	Stück
Rumaroma	4	Tropfen
Mehl	500	g
Backpulver	1	Packung
Nussalternativgetränk (Rezeptur 2)	125	ml
Kakao	1	Esslöffel

Zuerst wurden 200 g Butter eingewogen, mit der Küchenmaschine schaumig gerührt, nach und nach wurden 200 g Zucker, 1 Packung Vanillinzucker, 4 Eidotter und Rumaroma dazugegeben und gut gerührt. Das Mehl wurde mit dem Backpulver vermischt und abwechselnd mit 125 ml Nussalternativgetränk (Rezeptur 2) in den Teig eingerührt. Danach wurde das geschlagene Eiweiß vorsichtig unter den Teig gehoben und etwa 2/3 des Teiges wurde auf drei befettete, bemehlte Backformen aufgeteilt. Zum letzten Drittel des Teiges wurde 1 Esslöffel Kakao dazugemischt und ebenfalls auf die 3 Formen verteilt. Der Marmorkuchen wurde im Backofen (Manz) bei 180°C Ober- und Unterhitze für 40 min gebacken. Der ausgekühlte Kuchen wurde verpackt, beschriftet und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3.2.5 Nougat

Die Nougatherstellung wurde von meinem Kollegen Albert Nemes durchgeführt. Es wurden fünf verschiedene Rezepturen verwendet (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Rezepturen für Nougat

	Nougat									
	Rezeptur 1		Rezeptur 2		Rezeptur 3		Rezeptur 4		Rezeptur 5	
	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Haselnüsse	35,3	1927,5	17,5	950,0	17,5	950,5	9,2	500,0	35,3	1927,5
Mandeln	-	-	17,5	950,0	-	-	4,6	250,0	-	-
Walnüsse	-	-	-	-	17,5	950,0	9,2	500,0	-	-
Cashewkerne	-	-	-	-	-	-	4,6	250,0	-	-
Erdnüsse	-	-	-	-	-	-	9,2	500,0	-	-
Zucker	24,7	1350,0	24,9	1350,0	24,9	1350,0	24,9	1350,0	24,7	1350,0
Magermilch- Pulver	14,7	800,0	14,7	800,0	14,7	800,0	14,8	800,0	-	-
Sojapulver	-	-	-	-	-	-	-	-	14,7	800,0
Sonnenblumenöl	11,7	638,0	11,7	638,0	11,7	638,0	9,8	528,8	11,7	638,0
Kakaobutter	13,5	735,0	13,5	735,0	13,5	735,0	13,6	735,0	13,5	735,0
Lecithin	-	2,5	-	2,5	-	2,5	-	2,5	-	2,5
Kochsalz	0,1	5,0	0,1	5,0	0,1	5,0	0,1	5,0	0,1	5,0
Summe	100,0	5458,0	100,0	5430,5	100,0	5430,5	100,0	5421,3	100,0	5458,0

Im ersten Schritt wurden die verwendeten Nüsse abgewogen, im Backrohr bei 180 °C Ober- und Unterhitze geröstet und danach mit dem Alexanderwerk zerkleinert. Die Haselnüsse wurden für 21 min, Mandeln für 15 min, Walnüsse für 20 min, Cashewkerne für 7 min und die Erdnüsse für 20 min geröstet. Nur bei den Erdnüssen wurde vor dem Zerkleinern die Schale entfernt. Anschließend wurden die Zutaten (Nüsse, Zucker, Magermilchpulver, Sojapulver und Kochsalz) nach der jeweiligen Rezeptur (siehe Tabelle 7) abgewogen und mit Hilfe des Rührgeräts (Baer-Werk) für 2 min auf Stufe 1 vermischt. Danach wurden Kakaobutter, Sonnenblumenöl und Lecithin abgewogen, in einem Kochtopf bei geringer Hitze verflüssigt und zum Gemisch im Baer-Werk langsam zugeführt. Das fertige Gemisch wurde für weitere 5 min auf höherer Stufe geknetet und nacheinander in zwei Chargen in eine Kugelmühle überführt. Nach einem 45-minütigen Mahlvorgang wurde das fertige Nougat in 250 ml Gläsern abgefüllt, fest verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Analysen mittels PCR wurden nur die letzten beiden abgefüllten Gläser einer Rezeptur verwendet.

Dieser Herstellungsvorgang wurde für alle fünf Rezepturen angewendet. Als erstes wurde das Nougat nach Rezeptur 5 hergestellt, darauf folgten die Rezepturen 1 bis 4. Der Mahlvorgang der Rohmasse wurde in der Kugelmühle kontinuierlich durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Kugelmühle zwischen den jeweiligen Nougatherstellungen nicht gereinigt wurde und somit eine minimale Restmenge des vorangegangenen Nougats noch in der Mühle vorhanden war.

### 3.4 DNA-Isolierung

#### Reagenzien:

*Proteinase K:* 100 mg Proteinase K + 4 ml 50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 8;

Die Lösung wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

*RNAse A:* Die von Sigma erhaltene Stocklösung (29 mg/ml) wurde mit 50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 8 verdünnt, um eine Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  zu erhalten. Die Lösung wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Etwa 5 g der Lebensmittel wurden in einem Küchenmixer oder in einer Kugelmühle fein zerkleinert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zur DNA-Extraktion gelagert. Stark wasserhaltige Lebensmittel (z.B. Traube, Kiwi, Birne, Apfel) wurden entweder lyophilisiert oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefroren.

#### **3.4.1 DNA-Extraktion mittels der CTAB-Methode**

100 mg der fein zerkleinerten Probe wurden in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit 500  $\mu\text{l}$  CTAB-Extraktionslösung (20 mg/ml CTAB; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris; 0,02 M EDTA; mit HCl pH 8 eingestellt) gründlich vermischt und für 30 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank inkubiert. Jeweils nach 10 min wurde das Reaktionsgefäß geschüttelt. Danach wurden 15  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Lösung zugegeben, das Gefäß gevortext und die Lösung im Trockenschrank bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 1 bis 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 20  $\mu\text{l}$  RNAse A-Lösung dazupipettiert, das Gefäß geschüttelt und die Mischung 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in der Tischzentrifuge bei 10000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform versetzt und kräftig

gevoertext. Zur Phasentrennung wurde 5 min zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 2 Volumenteile CTAB-Präzipitationslösung (5 g/l CTAB; 0,04 M NaCl) hinzugegeben, gründlich gemischt und bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Anschließend wurde für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat in 350 µl 1,2 M NaCl-Lösung gelöst. Danach wurden 350 µl Chloroform dazupipettiert und das Gefäß kräftig geschüttelt. Es wurde wieder für 3 min zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 0,6 Volumenteile Isopropanol dazupipettiert. Anschließend wurde die Mischung für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 µl eiskaltem 70%igen Ethanol versetzt und kräftig gemischt. Nach 3 min Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig vom Pellet getrennt, dieses im Trockenschrank bei 37°C getrocknet und abschließend in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst. Die extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### **3.4.2 DNA-Extraktion unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kits**

Im QIAamp® DNA Mini Kit sind folgende Puffer enthalten:

AL Puffer; ATL Puffer; AW1 Puffer; AW2 Puffer; AE Puffer

25-50 mg der zerkleinerten Probe wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen und 180 µl des ATL Puffers dazupipettiert. Danach wurden 20 µl der Proteinase K-Lösung dazugegeben, gut vermischt und im Trockenschrank bei 56°C für 1-3 Stunden oder über Nacht inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Eppendorfgefäß wenn möglich einige Male gut geschüttelt. Anschließend wurde die Mischung kurz zentrifugiert, 20 µl der RNase A-Lösung dazugegeben und gut vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurden 200 µl AL Puffer dazupipettiert, gut geschüttelt und bei 70°C im Trockenschrank für 10 min inkubiert. Danach wurde wieder kurz zentrifugiert, 200 µl Ethanol zur Probe dazugegeben und kräftig vermischt. Im nächsten Pipettierschritt wurde der Probenmix vorsichtig in die QIAamp Spin Säule, die

sich in einem 2 ml Auffanggefäß befand (beides im Kit vorhanden), überführt, verschlossen und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die QIAamp Spin Säule wurde in ein neues Auffanggefäß plziert und das Gefäß mit dem Filtrat verworfen. Im anschließenden Waschvorgang wurden 500 µl AW1 Puffer dazupipettiert, bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und die Säule wieder in ein neues Gefäß platziert und das Filtrat verworfen. Der zweite Waschvorgang wurde mit 500 µl AW2 Puffer durchgeführt und bei 10000 rpm für 3 min zentrifugiert. Abschließend wurde die QIAamp Spin Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß platziert, 200 µl AE Puffer dazugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde in die selbe Säule rückgeführt und der Elutionsschritt wiederholt. Die extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei –20°C aufbewahrt.

### **3.4.3 DNA-Extraktion mittels des DNeasy® Plant Mini Kits**

Im DNeasy® Plant Mini Kit sind folgende Puffer enthalten:

AP1 Puffer; AP2 Puffer; AP3/E Puffer; AW Puffer; AE Puffer

Zuerst wurden etwa 50 mg der zerkleinerten Probe in ein Eppendorfgefäß eingewogen, dazu 400 µl AP1 Puffer und 20 µl RNase A-Lösung pipettiert und kräftig vermischt. Zur Lyse wurde der Probenmix für 10 min im Trockenschrank bei 65°C inkubiert und zwischendurch 2 bis 3 Mal geschüttelt. Danach wurden zum Lysat 130 µl AP2 Puffer pipettiert, vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Präzipitationsschritt wurde der Mix für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und das Lysat in eine QIAshredder Mini Spin Säule (im Kit vorhanden), die in einem 2 ml Auffanggefäß platziert war, pipettiert. Weiters wurde für 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert, das Filtrat in ein neues Eppendorfgefäß überführt und anschließend wurden 1,5 Volumen an AP3/E Puffer dazugegeben und das klare Lysat durch Aufziehen der Pipette durchmischt. Daraus wurden 650 µl in eine DNeasy Mini Spin Säule (im Kit vorhanden), welche in einem 2 ml Auffanggefäß platziert war, pipettiert, für 1 min bei 10000 zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Anschließend wurde das

noch vorhandene Lysat in selbige Säule pipettiert und der Durchgang wiederholt. Für den nachfolgenden Waschvorgang wurde die DNeasy Mini Spin Säule in ein neues 2 ml Auffanggefäß plaziert, 500 µl AW Puffer dazupipettiert und für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, der Waschvorgang wiederholt und zum Trocknen der Membran für 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Für den Elutionsschritt wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß plaziert und 100 µl AE Puffer direkt auf die Membran pipettiert. Es folgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Mischung für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Elutionsschritt wiederholt. Die beiden Eluate wurden zusammengeführt und bei -20°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

### **3.4.4 Kombination der CTAB-Methode und des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kits**

50-100 mg der zerkleinerten Probe wurden in ein Eppendorfgefäß eingewogen, 500 µl CTAB-Extraktionslösung dazupipettiert und gründlich gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 65°C im Trockenschrank wurde der Probenmix mit 15 µl der Proteinase K-Lösung versetzt und für 90 min bei 65°C im Trockenschrank stehen gelassen. Während der Inkubation wurde das Gefäß mehrmals geschüttelt. Anschließend wurden 20 µl der RNase A-Lösung dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei Raumtemperatur wurde für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt, für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die folgenden Schritte wurden mit dem DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit ab dem Präzipitationsschritt durch Zugabe des AP2 Puffers durchgeführt. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.4.3 beschrieben.

### **3.4.5 DNA-Isolierung aus Traubensaft**

Zur Extraktion von DNA aus Traubensaft wurden 3 verschiedene Methoden angewendet [SAVAZZINI und MARTINELLI, 2006].

- 1) Präzipitation mit NaCl: 1,5 ml einer 1,2 M NaCl-Lösung wurden mit 13,5 ml Traubensaft gut vermischt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 1 bis 2 Wochen gelagert.
- 2) Präzipitation mit Na-Acetat: 2,1 ml einer 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5.2) wurde mit 12,9 ml Traubensaft gut geschüttelt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 2 Wochen gelagert.
- 3) Präzipitation mit 2-Propanol: 7 ml 2-Propanol wurden mit 10 ml Traubensaft vermischt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 2 Wochen aufbewahrt.

Nach der angegebenen Präzipitationszeit wurden die Proben bei Raumtemperatur für 15 min bei 2500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 750  $\mu\text{l}$  CTAB-Extraktionslösung gut vermischt. Anschließend wurde die CTAB-Methode wie unter 3.4.1 beschrieben durchgeführt.

### **3.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen**

Ein Aliquot der isolierten DNA, die je nach Extraktionsmethode in Wasser oder Puffer gelöst vorlag, wurde in einer UV-Mikroküvette mit dem jeweiligen Lösungsmittel verdünnt. Das Gesamtvolumen in der Mikroküvette betrug 80  $\mu\text{l}$ . Anschließend wurde die DNA-Konzentration durch die Messung der Extinktion bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) mit einem Spektrophotometer bestimmt.



### **3.6.2 Durchführung der Gelelektrophorese**

Das Agarosegel wurde in eine Elektrophoresewanne, welche mit einem 1x TAE Puffer befüllt wurde, plaziert und eine 1:5 Verdünnung der 5x Stocklösung des Nucleic Acid Sample Loading Buffer (BioRad) hergestellt. 10 µl des PCR-Produktes wurde mit 10 µl des 1x Nucleic Acid Sample Loading Buffer vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Um die Größe der PCR-Produkte ermitteln zu können, wurde auch ein 20 bp Marker aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit einem 1x TAE Puffer bei 150 V durchgeführt. Abschließend wurden die DNA-Banden mit Hilfe eines UVT-20M Transilluminators sichtbar gemacht und das Gel photographiert.

### **3.7 Real Time PCR**

Die PCR wurde in 96 Well Platten (BioRad) und einem Gesamtvolumen von 25 µl mit dem Gerät iCycler Thermocycler (BioRad) durchgeführt, welches mit dem iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System ausgestattet war. Alle DNA-Proben wurden im Doppelansatz analysiert. Für alle PCR-Reaktionen wurde bidestilliertes und autoklaviertes Wasser verwendet. Die in der PCR eingesetzten DNA-Proben wurden durch Verdünnen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf eine Konzentration von 20 ng/µl gebracht. Außerdem wurden auf jeder Platte zwei Negativkontrollen und zwei Positivkontrollen mitgetestet.

#### **3.7.1 Real Time PCR mit iQ SYBR<sup>®</sup> Green (SYBR Green-Assay)**

Jedes Well wurde mit 12,5 µl iQ SYBR<sup>®</sup> Green Supermix von BioRad, der optimierten Menge Primer Forward und Primer Reverse, 5 µl DNA Probe (c=20 ng/µl) und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> befüllt.

### 3.7.2 Real Time PCR mit der TaqMan Sonde (TaqMan-Assay)

Jede Reaktion enthielt 12,5 µl iQ™ Supermix von BioRad, die entsprechende optimierte Menge des Primer Forward, Primer Reverse und der TaqMan Sonde, 5 µl DNA Probe (c=20 ng/µl) und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

### 3.7.3 Verwendete Mastermixe

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Supermixe, die alle für die Real Time PCR notwendigen Reagenzien enthalten, verwendet. Der als Master-Mix bezeichnete Mix wurde aus Einzelkomponenten zusammengemischt und enthielt den Primer Forward, Primer Reverse und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Im TaqMan-Assay wurde zum Master-Mix noch zusätzlich die TaqMan Sonde pipettiert. In den Versuchsschritten, in denen die Konzentration der TaqPolymerase, des MgCl<sub>2</sub> und der dNTPs im Master-Mix erhöht wurde, wurde eine entsprechend geringere Menge an H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eingesetzt.

#### 3.7.3.1 iQ™ SYBR® Green Supermix 2x

Der iQ™ SYBR® Green Supermix 2x wurde von der Firma BioRad geliefert und vor allem für die Optimierungsschritte der Real Time PCR verwendet. Dieser Mix beinhaltet 100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 0,4 mM von jedem dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 50 units/ml der hitzestabilen TaqDNA Polymerase; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; SYBR Green I und 20 nM Fluorescein. Die TaqDNA Polymerase wird bei der Real Time PCR durch den initialen Denaturierungsschritt von 3 min bei 95°C aktiviert. Der iQ SYBR® Green Supermix wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.7.3.2 iQ™ Supermix 2x

Der iQ™ Supermix 2x wurde bei der Firma BioRad gekauft und für die Real Time PCR verwendet. Dieser Mix enthält 100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 1,6 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 50 units/ml der TaqDNA Polymerase und 6 mM MgCl<sub>2</sub>. Der iQ Supermix wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.7.4 Pipettierschema

Die PCR-Platten wurden nach folgendem Pipettierschema befüllt:

- ✓ 12,5 µl iQ™ SYBR Green® Supermix (Sybr Green-Assay) bzw. iQ™ Supermix (TaqMan-Assay)
- ✓ 7,5 µl Master-Mix
- ✓ 5 µl DNA-Probe

### 3.7.5 Primer und Sonden

#### 3.7.5.1 Design der Primer und TaqMan Sonden

Mit Hilfe von BLAST wurden die Sequenzen der verwendeten Allergene (siehe Tabelle 8) auf Homologien mit anderen bekannten biologischen Sequenzen überprüft. Die Primer und TaqMan Sonden wurden unter Verwendung der Software Beacon Designer 7.0 von Premier Biosoft International (Palo Alto, USA) entworfen. Die Primer mit einer Länge zwischen 18 und 30 Basenpaaren (bp) wurden so konzipiert, dass deren Schmelztemperatur zwischen 50 und 80°C lag. Weiters wurde darauf geachtet, dass diese ein Amplikon mit einer Produktlänge von 75 bis 150 bp bilden. Der GC-Gehalt sollte 40 bis 60% betragen und es sollten möglichst nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander gereiht vorkommen. Die Sonden mit einer Länge von 20 bis

30 bp wurden so entworfen, dass ihre Schmelztemperatur, verglichen mit der Schmelztemperatur der Primer, um ungefähr 10°C höher lag. Der GC-Gehalt sollte auch zwischen 40 bis 60% liegen. Außerdem sollten nicht mehr als drei gleiche Nukleotide in Folge vorkommen. Weiters sollte keine Komplementarität zu den Primern bestehen [MÜLHARDT, 2006]. Die Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich und die TaqMan Sonden von der Firma Metabion International AG synthetisiert.

Die erhaltenen Primer und TaqMan Sonden wurden in dem von der Synthesefirma angeführten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst, dadurch wurde eine 100 µM Lösung erhalten. Diese wurde aliquotiert und als Urlösung bei -20°C aufbewahrt. Falls nicht anders angegeben, wurde diese Urlösung zur Durchführung der PCR 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt, um eine 10 µM Lösung zu erhalten.

In der Tabelle 8 sind die Allergene, deren Sequenzen zum Entwurf der Primer verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 8: Allergene, deren Sequenz zum Entwurf der Primer verwendet wurden.

Lebensmittel	Allergene	NCBI Accession No.
Mandel ( <i>Prunus dulcis</i> )	Amandin	X78119
Haselnuss ( <i>Corylus avellana</i> )	Cor a 1	Z72440
Walnuss ( <i>Juglans regia</i> )	Jug r 1	U66866
	Jug r 2	AF066055
Traube ( <i>Vitis vinifera</i> )	Chitinase class I Protein	U97521

Die für den Duplex-Assay verwendeten Haselnuss-Primer und die TaqMan Sonde wurden im Rahmen einer früheren Dissertation entwickelt und optimiert [SCHÖRINGHUMER, 2008].

Die Mandel-Primer und die Sonde wurden an die bereits vorhandenen Haselnuss-Primer und die TaqMan Sonde angepasst. Weiters wurden diese

mittels der Software Beacon Designer 7.0 auf etwaige Homologien oder Überlappungen mit bekannten Gensequenzen getestet.

### 3.7.5.2 Optimierung der Primerkonzentration

Um die ideale Primerkonzentration für den PCR-Assay zu ermitteln, wurden die Primer in Konzentrationen von 100, 200 und 400 nM getestet. Durch die Kombination verschiedener Konzentrationen des Primer Forward und Primer Reverse der jeweiligen Primerpaare wurden mehrere Master-Mixe hergestellt. Als Supermix wurde der iQ SYBR Green verwendet. In folgender Tabelle sind die verschiedenen Master-Mixe aufgelistet.

Tabelle 9: Master-Mixe

<b>Primerkonzentration</b>	<b>Master-Mix</b>
100 nM Primer Forward 100 nM Primer Reverse	0,25 µl Forward + 0,25 µl Reverse + 7 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
100 nM Primer Forward 200 nM Primer Reverse	0,25 µl Forward + 0,5 µl Reverse + 6,75 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
100 nM Primer Forward 400 nM Primer Reverse	0,25 µl Forward + 1 µl Reverse + 6,25 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
200 nM Primer Forward 100 nM Primer Reverse	0,5 µl Forward + 0,25 µl Reverse + 6,75 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
200 nM Primer Forward 200 nM Primer Reverse	0,5 µl Forward + 0,5 µl Reverse + 6,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
200 nM Primer Forward 400 nM Primer Reverse	0,5 µl Forward + 1 µl Reverse + 6 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
400 nM Primer Forward 100 nM Primer Reverse	1 µl Forward + 0,25 µl Reverse + 6,25 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
400 nM Primer Forward 200 nM Primer Reverse	1 µl Forward + 0,5 µl Reverse + 6 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
400 nM Primer Forward 400 nM Primer Reverse	1 µl Forward + 1 µl Reverse + 5,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

**SYBR Green-Assay:** Nach Herstellung der Master-Mixe wurden die Wells nach dem Pipettierschema, welches in Kapitel 3.7.4 beschrieben ist, befüllt.

Nach Einsetzen der befüllten Wells in den iQ Thermocycler wurde folgendes PCR Programm verwendet:

1. 3 min.....95 °C
2. 30 s.....95 °C
3. 30 s.....54 °C
4. 10 s.....72 °C
5. 10 s.....55 °C

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 45x wiederholt. Im Laufe dieses Programms (Schritt 5) wurde auch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dieser Schritt wurde 81x wiederholt und die Temperatur stieg von 55 °C in 0.5 °C-Sprüngen auf 95 °C an.

### **3.7.5.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität der entworfenen Primerpaare**

Um auf Kreuzreaktivität der Primerpaare mit anderen Lebensmitteln zu testen, wurde die DNA mit Hilfe der Extraktionsmethoden, die in Kapitel 3.4 beschrieben sind, extrahiert und die Reinheit und Konzentration der DNA bestimmt. Die DNA-Extrakte wurden bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. In der folgenden Tabelle sind jene Lebensmittel aufgelistet, die mit den Primern von Mandel, Haselnuss, Walnuss oder Traube auf Kreuzreaktivität getestet wurden.

Tabelle 10: Lebensmittel, die auf Kreuzreaktivität getestet wurden.

	Gesamtanzahl	Lebensmittel
Mandel	22	Reis, Weizen, Hafer, Dinkel, Roggen, Soja, Haselnuss, Walnuss, Sonnenblumenkerne, Sesam, Erdnuss, Cashewkerne, Avocado, Birne, Apfel, Pfirsich, Pflaume, Erdbeere, Himbeere, Banane, Traube, Schokolade
Haselnuss	16	Sesam, Paranuss, Sonnenblumenkerne, Erdnuss, Walnuss, Reis, Soja, Honig, Mohn, Schokolade, Weizen, Kartoffel, Mandel, Mais, Apfel, Kirsche
Walnuss	23	Haselnuss, Mandel, Cashewkerne, Erdnuss, Sesam, Pekannuss, Paranuss, Sonnenblumenkerne, Weizen, Roggen, Dinkel, Hafer, Reis, Soja, Traube, Banane, Apfel, Birne, Pflaume, Pfirsich, Erdbeere, Himbeere, Schokolade
Traube	21	Reis, Hafer, Banane, Dinkel, Mandel, Birne, Pfirsich, Pflaume, Apfel, Erdbeere, Himbeere, Kiwi, Papaya, Avocado, Mango, Ananas, Sesam, Walnuss, Sonnenblumenkerne, Haselnuss, Erdnuss

- Durchführung der Real Time PCR

Für die entworfenen Primerpaare wurde jeweils ein Master-Mix mit entsprechender Primerkonzentration hergestellt. Der PCR-Assay wurde mit dem iQ SYBR Green Supermix durchgeführt.

**Mandel:** Zum Testen der Mandel-Primerpaare auf Kreuzreaktivität mit anderen Lebensmitteln wurden diese in Konzentrationen von 200 nM für den Primer Forward und 200 nM für den Primer Reverse eingesetzt.

**Walnuss:** Die zwei Primerpaar des Allergens Jug r 1 der Walnuss wurden in Konzentrationen von 200 nM Jug r 1 Forward und 400 nM Jug r 1 Reverse

eingesetzt. Das Primerpaar Jug r 2 wurde in der Konzentration von 400 nM Jug r 2 Forward und 200 nM Jug r 2 Reverse eingesetzt.

**Traube:** Die drei entworfenen Primerpaare wurden jeweils in einer Konzentration von 200 nM Primer Forward und 400 nM Primer Reverse zum Testen auf Kreuzreaktivität eingesetzt.

Das Pipettierschema und das PCR Programm sind in Kapitel 3.7.5.2 beschrieben. Zur weiteren Analyse wurden die amplifizierte Produkte mittels einer Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 3.6) aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe des UV-Transilluminators sichtbar gemacht und anschließend photographiert.

### **3.7.6 Optimierung des Singleplex-Assays zur Detektion von Mandel**

In den weiteren Versuchen wurde das Mandel-Primerpaar Pru 1-1 Forward / Reverse mit jeweils einer Konzentration von 200 nM eingesetzt. Für die Haselnuss betrug laut Schöringhumer die optimale Konzentration für den Primer Forward 300 nM und für den Primer Reverse 100 nM [SCHÖRINGHUMER, 2008].

#### **3.7.6.1 Optimierung der Konzentration der TaqMan Sonden**

Mittels eines TaqMan-Assays wurde die Sondenkonzentration der Mandel in Konzentrationen von 50, 100 und 200 nM getestet. Dazu wurden Master-Mixe hergestellt, in denen das Volumen an  $H_2O_{dd}$  dementsprechend variiert wurde, so dass das Gesamtvolumen von 7,5  $\mu$ l konstant blieb (siehe Tabelle 11). Als DNA-Probe wurde eine Mandel-DNA-Lösung mit einer Konzentration von 20 ng/ $\mu$ l eingesetzt.

Tabelle 11: Master-Mixe zur Optimierung der TaqMan Sonden-Konzentration

Konzentration TaqMan Sonde	Master-Mix
50 nM	0,125 µl TaqMan + 0,5 µl Forward + 0,5 µl Reverse + 6,375 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
100 nM	0,25 µl TaqMan + 0,5 µl Forward + 0,5 µl Reverse + 6,25 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
200 nM	0,5 µl TaqMan + 0,5 µl Forward + 0,5 µl Reverse + 6 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

Die Wells wurden wie folgt befüllt:

- ✓ 12,5 µl iQ Supermix (TaqMan-Assay)
- ✓ 7,5 µl Master-Mix
- ✓ 5 µl DNA-Probe

Das PCR Programm lautete:

1. 3 min.....95°C
2. 10 s.....95°C
3. 25 s.....54°C

Die Schritte 2 und 3 wurden 40x wiederholt.

### 3.7.6.2 Optimierung der Annealingtemperatur der Mandelprimer

Die optimale Annealingtemperatur für das Primerpaar Pru 1-1 Forward / Reverse wurde durch Anlegen eines Temperaturgradienten (54°C; 55,8°C; 58,3°C; 60,2°C; 61,4°C und 61,9°C) ermittelt. Es wurde wie in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben ein TaqMan-Assay mit der ermittelten optimalen Sondenkonzentration von 200 nM durchgeführt.

### 3.7.7 Optimierung des Duplex-Assays

Zur Optimierung des Duplex-Assays wurden TaqDNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs in verschiedenen Konzentrationen dem Master-Mix (siehe Tabelle 12) zugefügt. Damit das Gesamtvolumen des Master-Mix von 7,5 µl konstant blieb, wurde das Volumen des H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> je nach zugesetztem Volumen an TaqDNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs variiert.

Tabelle 12: Master-Mix für den Duplex-Assay

<b>Master-Mix</b>
0,5 µl M Forward (Mandel Pru 1-1 Forward)
0,5 µl M Reverse (Mandel Pru 1-1 Reverse)
0,5 µl M TaqMan (Mandel Pru 1-1 TaqMan Sonde)
0,75 µl H Forward (Haselnuss Cor a 1 Forward )
0,25 µl H Reverse (Haselnuss Cor a 1 Reverse )
0,5 µl H TaqMan (Haselnuss Cor a 1 TaqMan Sonde)
4,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

Als DNA-Proben wurden eine Mandel-Haselnuss-DNA Mischung (MH) mit 99% Mandel-DNA und 1% Haselnuss-DNA sowie eine Haselnuss-Mandel-DNA Mischung (HM) mit 99% Haselnuss-DNA und 1% Mandel-DNA eingesetzt. Das Pipettierschema und der TaqMan-Assay sind in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben.

#### 3.7.7.1 Erhöhung der TaqDNA Polymerase-Konzentration

In diesem Versuch wurde die Konzentration der TaqDNA Polymerase um 0,3 units/µl erhöht. Dazu wurde die TaqDNA Polymerase-Lösung (5 units/µl, BioRad) 1:10 verdünnt, um daraus 0,6 µl zum Master-Mix zu pipettieren. Die Durchführung und das PCR Programm des TaqMan-Assays sind in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben.

### **3.7.7.2 Erhöhung der Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)-Konzentration**

Im für die PCR benötigten Gesamtvolumen von 25 µl sind bereits 3 mM MgCl<sub>2</sub> enthalten. Die Konzentration von MgCl<sub>2</sub> wurde erhöht, indem 0,5 bzw. 1 µl einer 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (BioRad) zum Master-Mix zugegeben wurden. Anschließend wurde die Real Time PCR gemäß Kapitel 3.7.6.1 durchgeführt.

### **3.7.7.3 Erhöhung der dNTPs-Konzentration**

Die Konzentration der dNTPs im iQ Supermix beträgt 0,8 mM. Um den Assay zu optimieren, wurden 5 nM und 10 nM dNTPs dazugegeben. Für den Versuch wurde eine 1:1 verdünnte 40 mM dNTPs-Lösung (BioRad) verwendet, diese wurde nochmals 1:1 verdünnt und daraus wurden 0,5 µl und 1 µl entnommen. Es wurde der TaqMan-Assay wie in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben durchgeführt.

### **3.7.7.4 Erhöhung der Konzentration von MgCl<sub>2</sub> und dNTPs**

In diesem Versuch wurde die Konzentration von MgCl<sub>2</sub> und der dNTPs erhöht. Dazu wurden in einem Reaktionsgemisch 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 nM dNTPs eingesetzt, d.h. dass jeweils 0,5 µl einer 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (BioRad) und einer 1:1 verdünnten 40 mM dNTPs-Lösung (BioRad) zum Master-Mix pipettiert wurden. Der verwendete TaqMan-Assay ist in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben.

### **3.7.7.5 Erhöhung der Konzentration der Mandel-Primer und der TaqMan Sonde**

Bei diesem Versuch wurde die Konzentration der Primer und der TaqMan Sonde von 200 nM auf 400 nM erhöht. Es wurden Verdünnungsreihen von 1:10, 1:100; 1:1000 und 1:10000 einer Mandel-DNA-Lösung und einer Haselnuss-DNA-Lösung hergestellt und ein TaqMan-Assay durchgeführt. Es

wurden das in Kapitel 3.7.6.1 beschriebene Pipettierschema und PCR Programm verwendet.

### 3.7.8 Erstellen der Kalibrierfunktion und Ermittlung der Effizienz

- Singleplex-Assay

Um die Nachweisgrenze der entwickelten Real Time PCR-Methode für Mandel zu ermitteln, wurden von einem DNA-Extrakt der Mandel ( $c = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) Verdünnungen von 1:1 bis 1:10000 hergestellt und mit diesen ein TaqMan-Assay (siehe Kapitel 3.7.6.1) durchgeführt. Dazu wurde ein Master-Mix (siehe Tabelle 13) hergestellt. Die Effizienz des Haselnuss-Assays wurde bereits in der Arbeit von Schöringhumer ermittelt [SCHÖRINGHUMER, 2008].

Tabelle 13: Master-Mixe für den Singleplex-Assay

<b>Master-Mix</b>
0,5 $\mu\text{l}$ M Forward
0,5 $\mu\text{l}$ M Reverse
0,5 $\mu\text{l}$ M TaqMan
6 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

- Duplex-Assay

Es wurden ebenfalls Mandel- und Haselnuss-DNA-Proben in Verdünnungsschritten von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 und zwei Master-Mixe (siehe Tabelle 14) hergestellt. Mit diesen Verdünnungen wurde ein TaqMan-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 3.7.6.1).

Tabelle 14: Master-Mixe für den Duplex-Assay

<b>Master-Mix 1</b>	<b>Master-Mix 2</b>
0,5 µl M Forward	1 µl M Forward
0,5 µl M Reverse	1 µl M Reverse
0,5 µl M TaqMan	1 µl M TaqMan
0,75 µl H Forward	0,75 µl H Forward
0,25 µl H Reverse	0,25 µl H Reverse
0,5 µl H TaqMan	0,5 µl H TaqMan
4,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	3 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

### **3.7.9 Herstellung von DNA-Lösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Mandel- und Haselnuss-DNA**

Ausgehend von Mandel- und Haselnuss-DNA-Lösungen ( $c = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) wurden Mischungen mit folgenden Mandel- zu Haselnuss-DNA-Verhältnissen hergestellt: 99,8:0,2; 98:2; 95:5; 90:10; 75:25; 50:50; 25:75; 10:90; 5:95; 2:98 und 0,2:99,8. Um z.B. eine 50:50 Mischung herstellen zu können, wurden 50 µl der Haselnuss-DNA-Lösung mit 50 µl der Mandel-DNA-Lösung vermischt. Die Zusammensetzung des folgenden Master-Mixes (siehe Tabelle 15) wurde für alle weiteren Duplex-Assays verwendet.

Tabelle 15: Master-Mix für den Duplex-Assay

<b>Master-Mix</b>
1 µl M Forward
1 µl M Reverse
1 µl M TaqMan
0,75 µl H Forward
0,25 µl H Reverse
0,5 µl H TaqMan
3 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

Die Durchführung der Real Time PCR erfolgte wie in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben, lediglich die Schritte 2 und 3 des PCR Programms wurden 50x wiederholt.

### **3.7.10 Bestimmung der Kreuzreaktivität des optimierten Duplex-Assays**

Getestet wurden die DNA-Extrakte von Mandel, Haselnuss, Reis, Weizen, Hafer, Dinkel, Roggen, Soja, Walnuss, Erdnuss, Cashewkernen, Pekannuss, Paranuss, Mais, Gerste, Sesam, Banane, Apfel, Sonnenblumenkernen, Birne, Mohn, Erdbeere, Lupine und Schokolade. Diese Bestimmung wurde mit dem SYBR Green-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 3.7.5.2).

In der zweiten Versuchsreihe wurde ein TaqMan-Assay durchgeführt. Als Proben wurden Mandel-, Haselnuss und Kirsche-DNA eingesetzt. Die Herstellung des Master-Mixes ist in Kapitel 3.7.9 beschrieben. Weiters wurden das Pipettierschema sowie das PCR Programm von Kapitel 3.7.6.1 übernommen, nur die Schritte 2 und 3 wurden 50x wiederholt.

### **3.8 Reproduzierbarkeit der Singleplex- und Duplex-Methode**

**Tag 1** Um die Reproduzierbarkeit der beiden Methoden zu testen, wurde ein kommerziell erhältliches Nuss-Müsli, welches Mandel und Haselnuss enthielt, im 4-fach Ansatz mittels der CTAB-Methode (siehe 3.4.1) aufgearbeitet und die Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA ermittelt. Danach wurde die Müsli-DNA im 3-fach Ansatz und Positiv- und Negativkontrolle im Doppelansatz mittels einer Real Time PCR mit TaqMan Sonde amplifiziert.

Die Durchführung des TaqMan-Assays ist in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben. Die Schritte 2 und 3 des PCR Programms wurden im Singleplex-Assay 40x und im Duplex-Assay 50x wiederholt.

**Tag 2** Die Versuchsdurchführung wurde am darauffolgenden Tag wiederholt.

### **3.9 Bestimmung der Nachweisgrenze der Singleplex- und Duplex-Methode**

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden zwei Müslis, die laut Hersteller keine Mandel und Haselnuss enthielten, mit je 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005% und 0,001% an zerkleinerten Mandeln und Haselnüssen gespickt und mit einer Real Time PCR im 4-fach Ansatz analysiert. Die Proben wurden, wie in Tabelle 16 angegeben, eingewogen und fein homogenisiert.

Tabelle 16: Müslimischungen

<b>%-Anteil</b>	<b>Mischung</b>
0,5	9,90 g Produkt + 0,05 g Mandel + 0,05 g Haselnuss
0,1	9,98 g Produkt + 0,01 g Mandel + 0,01 g Haselnuss
0,05	9,00 g Produkt + 1,00 g von der Mischung 0,5%
0,01	9,00 g Produkt + 1,00 g von der Mischung 0,1%
0,005	9,00 g Produkt + 1,00 g von der Mischung 0,05%
0,001	9,00 g Produkt + 1,00 g von der Mischung 0,01%

Aus diesen Mischungen wurde mit Hilfe der CTAB-Methode (siehe 3.4.1) die DNA extrahiert, ihre Konzentration und Reinheit ermittelt und die DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Analyse gelagert.

Für die Real Time PCR wurden die in Kapitel 3.8 angegebenen Master-Mixe, das Pipettierschema und das PCR Programm angewendet.

### **3.10 Nachweis von Haselnuss und/oder Mandel in Modelllebensmitteln und kommerziell erhältlichen Lebensmitteln**

#### **3.10.1 Anwendung des Singleplex-Assays bei gerösteten Mandeln**

Die DNA der gerösteten Mandeln (siehe 3.3.2) wurde unter Verwendung der CTAB-Methode extrahiert (siehe 3.4.1). Anschließend wurde deren Konzentration und Reinheit bestimmt und bis zur Real Time PCR bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Es wurde das wie in Kapitel 3.8 angegebene PCR Programm angewendet.

### 3.10.2 Nachweis von Mandel und Haselnuss in Modelllebensmitteln mit dem Duplex-Assay

Krokant, Nussalternativgetränke, Marmorkuchen und Nougats wurden unter genau vorgegebenen Bedingungen hergestellt (siehe 3.3.3). Die DNA der Proben wurde mit den Extraktionsmethoden, die in Kapitel 3.4 beschrieben sind, extrahiert (siehe Tabelle 17) und deren Konzentration und Reinheit gemäß Kapitel 3.5 bestimmt.

Tabelle 17: Verwendete Methoden zur DNA-Extraktion aus Modelllebensmittelproben

<b>Probe</b>	<b>Extraktionsmethode</b>
Krokant	CTAB-Methode
Nussalternativgetränk	CTAB-Methode; QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit; DNeasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit
Marmorkuchen	CTAB-Methode
Nougat	CTAB-Methode; Kombination der CTAB-Methode und des DNeasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit

Anschließend wurde ein TaqMan-Assay (siehe Kapitel 3.8) durchgeführt.

### 3.10.3 Nachweis von Haselnuss und/oder Mandel in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Zur Bestimmung von Haselnuss und/oder Mandel in Lebensmitteln wurden Müslis, Cornflakes, Müsliriegel und Süßwaren wie Kekse, Kuchen und Schokoladen untersucht. Insgesamt wurden 27 Produkte getestet. Mit Hilfe der CTAB-Methode wurde die DNA extrahiert und ihre Reinheit und Konzentration ermittelt. Dieses Prozedere ist in den Kapiteln 3.4.1 und 3.5 genau beschrieben.

### **3.10.3.1 Nachweis von Mandel mittels des Singleplex-Assays**

Es wurde die DNA aus 27 kommerziell erhältlichen Produkten mittels eines TaqMan-Assays analysiert. Bei 8 Proben wurde eine DNA-Konzentration  $< 20$  ng/ $\mu$ l ermittelt, daher wurde das Volumen des H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> im Master-Mix reduziert, um ein größeres Volumen an Proben-DNA einsetzen zu können. Das PCR Programm ist in Kapitel 3.8 angegeben.

### **3.10.3.2 Nachweis von Mandel und Haselnuss unter Verwendung des Duplex-Assays**

Es wurden 15 kommerziell erhältliche Lebensmittel mit dem entwickelten Duplex-Assay analysiert. Einige Produkte enthielten Mandel und/oder Haselnuss, bei manchen wurde darauf hingewiesen, dass Mandel und/oder Haselnuss enthalten sein könnte. Außerdem wurden Produkte getestet, bei denen Mandel und/oder Haselnuss auf der Verpackung nicht angeführt waren. Zur Analyse wurde die in Kapitel 3.8 beschriebene PCR-Methode angewendet.

## **3.11 Inhibitionskontrolle**

Für die Inhibitionskontrolle wurden jene Produkte herangezogen, in denen keine Haselnuss und/oder Mandel detektiert werden konnte.

### **3.11.1 Inhibitionskontrolle der mittels des Singleplex-Assays amplifizierten Proben von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln**

Es wurde jeweils 1  $\mu$ l einer konzentrierten Mandel-DNA-Probe ( $c= 100$  ng/ $\mu$ l) in ein Well pipettiert und die Platte für 3 Stunden bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen gelassen. Nachdem die vorgelegte konzentrierte Mandel-

DNA-Probe getrocknet war, wurde in diese Wells die jeweilige Menge an iQ Supermix, Master-Mix und Probe pipettiert. Anschließend wurde das in Kapitel 3.8 angegebene PCR Programm angewendet.

### **3.11.2 Inhibitionskontrolle der mittels des Duplex-Assays amplifizierten Proben der Modelllebensmittel und kommerziell erhältlichen Lebensmittel**

Es wurden jeweils 1  $\mu$ l Mandel-DNA-Probe (c=100 ng/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l Haselnuss-DNA-Probe (c=100 ng/ $\mu$ l) in ein Well vorgelegt und die Platte bei Raumtemperatur für 3 Stunden getrocknet. Zur Amplifizierung der Proben wurde der TaqMan-Assay wie in 3.8 beschrieben durchgeführt. Zur Analyse wurde die in Kapitel 3.8 beschriebene PCR-Methode angewendet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Entwicklung einer Singleplex Real Time PCR-Methode zur Bestimmung von potentiell allergener Mandel (*Prunus dulcis*) in Lebensmitteln

#### 4.1.1 Primer und Sonden

Zur Entwicklung eines Singleplex-Assays zur Detektion von Mandel in Lebensmitteln wurden 2 Primerpaare und dazu passende TaqMan Sonden mit Hilfe des Programms Beacon Designer 7.0 entworfen.

Da ein weiteres Ziel der Diplomarbeit die Entwicklung eines Duplex-Assays zur gleichzeitigen Bestimmung von Mandel und Haselnuss war, sollten die Mandelprimer und TaqMan Sonden mit Haselnussprimern und einer TaqMan Sonde, mit denen bereits ein Singleplex-Assay in unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden war, kompatibel sein. Der genaue Vorgang des Entwurfs der Primer und Sonden ist in Kapitel 3.7.5.1 beschrieben.

Tabelle 18: Entworfenene Primer und TaqMan Sonden, Mandel

Primer und TaqMan Sonde	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	GC in %	Produktgröße (bp)
Pru 1-1 Forward	CCAAATCATCCAGGTAAGGG	53.5	50.0	116
Pru 1-1 Reverse	CTTGTTGTTGCCTCTCCTG	53.9	52.6	
Pru 1-1 TaqMan	FAM- TCCTGTTGTCGCTCCTCGTGCT- BHQ1	64.6	59.1	
Pru 1-2 Forward	GACTTTCGAAGAGTCTCAGC	54.0	50.0	147
Pru 1-2 Reverse	CTCCCTTGTTGTCTTCCTTG	54.0	50.0	
Pru 1-2 TaqMan	TTCCTGCTGCTGCTCTTGTTGGC	64.8	56.5	

In Tabelle 18 sind die Sequenzen der entworfenen Primer und TaqMan Sonden angegeben. Das Primerpaar Pru 1-1 bildet ein Produkt mit einer Länge von 116 Basepaaren (bp), wogegen das Primerpaar Pru 1-2 ein Produkt mit einer Länge von 147 bp entstehen lässt.

#### 4.1.2 Optimierung der Primerkonzentration

Um die Primerkonzentration für den PCR-Assay zu optimieren, wurden die Primer in Konzentrationen von 100, 200 und 400 nM getestet. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.7.5.2 beschrieben. Als optimale Primerkonzentration wurde die Konzentration betrachtet, mit der der niedrigste Ct-Wert erhalten wurde.

- Primerpaar 1 : Pru 1-1 Forward / Reverse

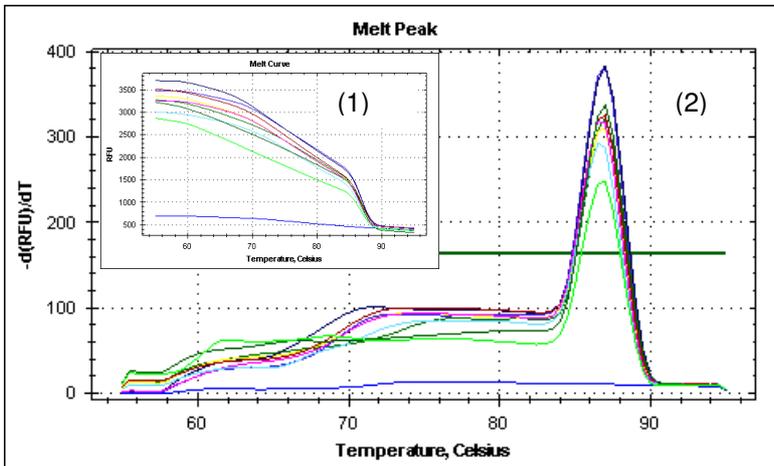
Tabelle 19: Einfluss der Konzentration des Primerpaares 1 auf den Ct-Wert

Primerpaar 1		
Pru 1-1 Forward [nM]	Pru 1-1 Reverse [nM]	Ct-Wert
100	100	25,48
100	200	25,96
100	400	25,03
200	100	25,67
200	200	24,15
200	400	24,29
400	100	24,51
400	200	24,36
400	400	24,75

In Tabelle 19 sind die mit den verschiedenen Primerkonzentrationen erhaltenen Ct-Werte aufgelistet. Der niedrigste Ct-Wert (24,15) wurde bei einer Konzentration des Forward und des Reverse Primers von 200 nM festgestellt.

## Ergebnisse

Die aufgenommenen Schmelzkurven (Abbildung 4) der PCR-Produkte beweisen, dass das gewünschte Amplifikat (Schmelztemperatur 86,5-87°C) gebildet wurde.



**Abbildung 4:** Schmelzkurven der mit Primerpaar 1 gebildeten PCR-Produkte; (1) Schmelzkurve; (2) 1. Ableitung der Schmelzkurve

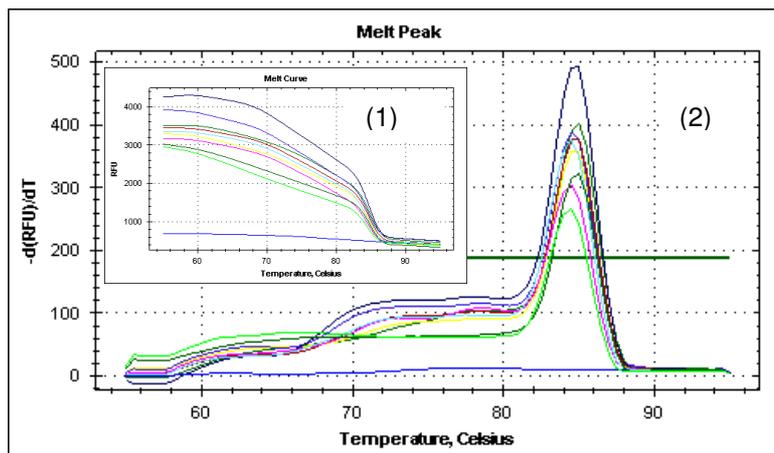
- Primerpaar 2: Pru 1-2 Forward / Reverse

**Tabelle 20:** Einfluss der Konzentration des Primerpaares 2 auf den Ct-Wert

<b>Primerpaar 2</b>		
Pru 1-2 Forward [nM]	Pru 1-2 Reverse [nM]	Ct-Wert
100	100	26,40
100	200	25,46
100	400	29,81
200	100	25,50
200	200	24,02
200	400	27,14
400	100	23,93
400	200	24,93
400	400	23,96

In Tabelle 20 sind die Ct-Werte einer Mandel-DNA-Probe, welche bei verschiedenen Primerkonzentrationen amplifiziert wurde, aufgelistet.

Daraus ergibt sich, dass die ideale Primerkonzentration 200 nM beträgt (Ct-Wert: 24,02). Der Schmelzpunkt des gewünschten Amplifikats lag bei 84,5-85 °C (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Schmelzkurven der mit Primerpaar 2 gebildeten PCR-Produkte; (1) Schmelzkurve; (2) 1. Ableitung der Schmelzkurve

#### 4.1.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Als nächstes wurde getestet, ob die entworfenen Primerpaare spezifisch für Mandel sind. Dazu wurden die DNA-Extrakte von Reis, Weizen, Hafer, Dinkel, Roggen, Soja, Haselnuss, Walnuss, Sonnenblumenkernen, Erdnuss, Cashewkernen, Sesam, Avocado, Birne, Apfel, Pfirsich, Pflaume, Erdbeere, Himbeere, Banane, Traube und Schokolade mittels des Singleplex-Assays analysiert (siehe Kapitel 3.7.5.3). Danach wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.6 beschrieben.

- Primerpaar 1: Pru 1-1 Forward / Reverse

Aus den Schmelzkurven der gebildeten PCR-Produkte (Abbildung 6) ergibt sich, dass das in Roggen amplifizierte Produkt die gleiche Schmelztemperatur (87,0°C) hat, wie das in der Mandel gebildete Amplifikat. Dies lässt auf eine Kreuzreaktivität des Primerpaars 1 mit Roggen schließen.

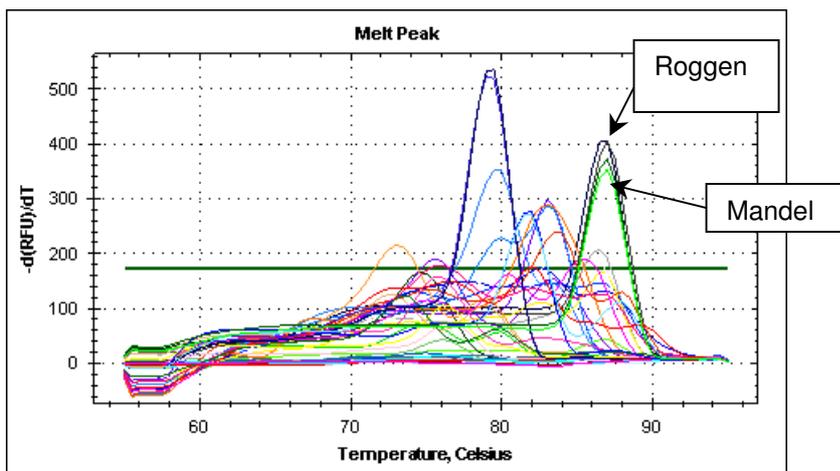


Abbildung 6: Schmelzkurven der mit Primerpaar 1 gebildeten PCR-Produkte

Die Elektrophorese der PCR-Produkte auf einem Agarosegel (Abbildung 6), die mit Primerpaar 1 gebildet wurden, liefert auf Grund der Übereinstimmung der DNA-Banden von Roggen und Mandel ebenfalls einen Hinweis, dass das Primerpaar 1 mit Roggen eine Kreuzreaktivität aufweist dargestellt.

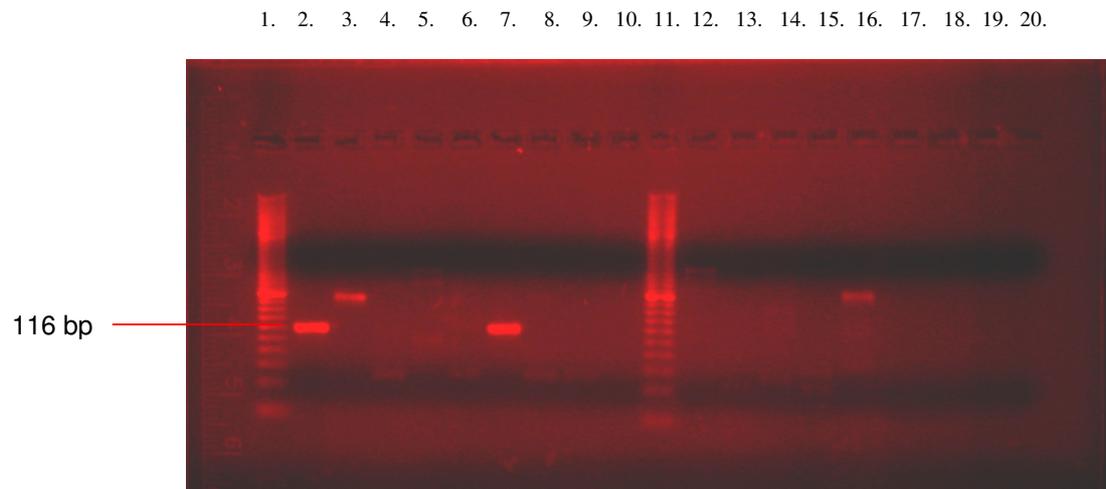
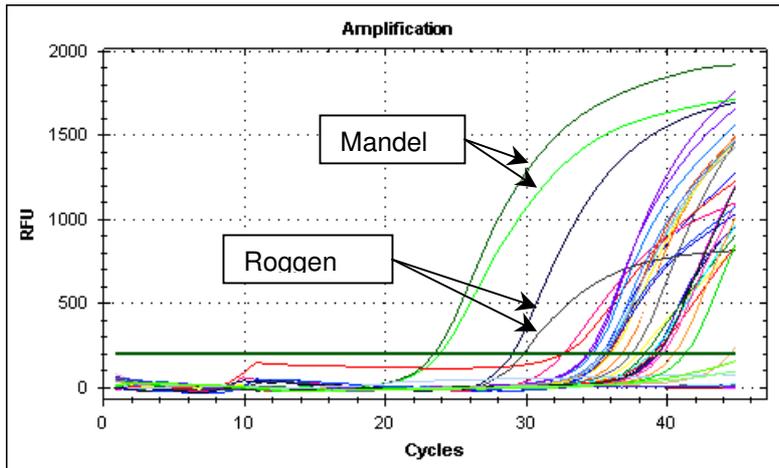


Abbildung 7: Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Mandel; 3. Reis; 4. Weizen; 5. Hafer; 6. Dinkel; 7. Roggen; 8. Soja; 9. Haselnuss; 10. Negativkontrolle; 11. 20 bp Marker; 12. Avocado; 13. Walnuss; 14. Sonnenblumenkerne; 15. Erdnuss; 16. Cashewkerne; 17. Birne; 18. Apfel; 19. Pfirsich; 20. Traube

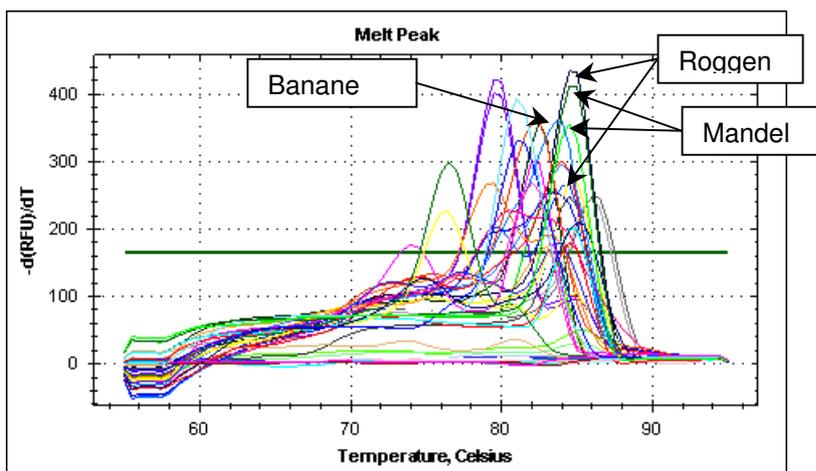
- Primerpaar 2: Pru 1-2 Forward / Reverse

In Abbildung 8 sind die mit dem Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Kurven dargestellt. Für die Mandel-DNA wurden Ct-Werte von 23,87 und 23,42 erhalten. Weiters wurde auch bei Roggen nach weniger als 30 Zyklen ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet (Ct-Werte: 29,01 und 29,78).



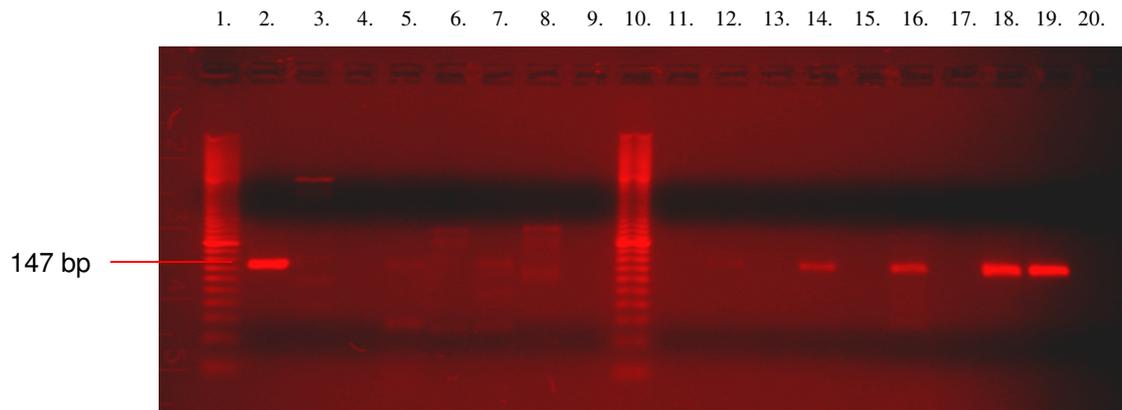
**Abbildung 8:** Real Time PCR mit SYBR Green von DNA-Extrakten verschiedener Lebensmittel, Primerpaar 2

Die Analyse der Schmelzkurven (Abbildung 9) zeigt, dass im Schmelzbereich der Mandel auch PCR-Produkte aus anderen Lebensmitteln aufgeschmolzen werden. Die PCR-Produkte der Mandel sowie des Roggens weisen einen identen Schmelzpunkt (84,5°C) auf. Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte von Banane (85,0°C) und Cashewkerne (84,0°C) unterscheiden sich nur geringfügig von jenen der Mandel.



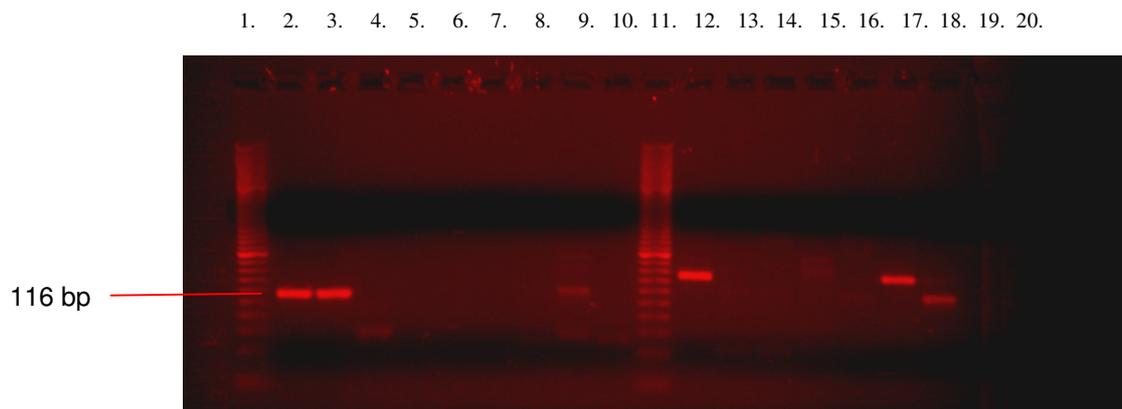
**Abbildung 9:** Schmelzkurven der mit Primerpaar 2 gebildeten PCR-Produkte

Im Gel (Abbildung 10) wanderten die PCR-Produkte des Roggens und der Banane mit dem Primerpaar 2 gleichweit wie das PCR-Produkt der Mandel. Roggen bildet zusätzlich mit dem Primerpaar 1 ein DNA-Produkt, welches die gleiche Größe aufweist, wie das in der Mandel gebildete Produkt (Abbildung 11).



**Abbildung 10:** Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Mandel; 3. Sesam; 4. Schokolade; 5. Walnuss; 6. Sonnenblumenkerne; 7. Erdnuss; 8. Cashewkerne; 9. Birne; 10. 20 bp Marker; 11. Apfel; 12. Pfirsich; 13. Pflaume; 14. Erdbeere; 15. Himbeere; 16. Banane; 17. Traube; 18. Roggen; 19. Mandel; 20. Negativkontrolle



**Abbildung 11:** Gel der mit dem Primerpaar 1 (2-10) und Primerpaar 2 (12-20) erhaltenen PCR-Produkte

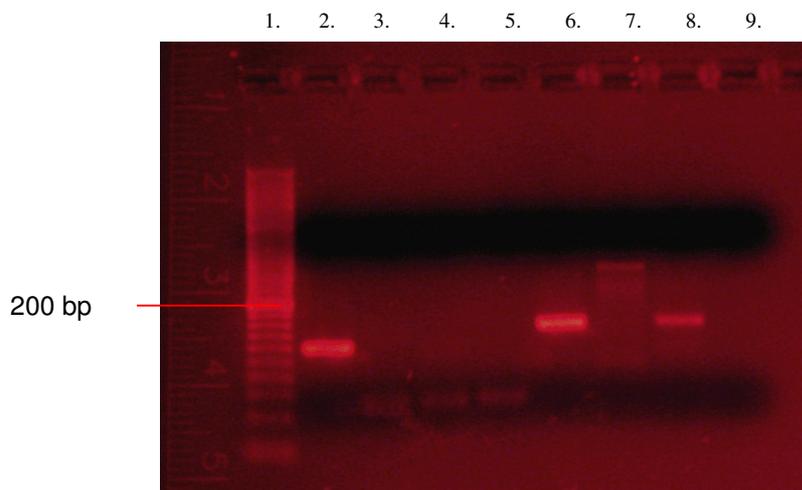
1. 20 bp Marker; 2. Mandel; 3. Roggen; 4. Sesam; 5. Schokolade; 6. Pflaume; 7. Erdbeere; 8. Himbeere; 9. Banane; 10. Negativkontrolle; 11. 20 bp Marker; 12. Mandel; 13. Reis; 14. Weizen; 15. Hafer; 16. Dinkel; 17. Roggen; 18. Soja; 19. Haselnuss; 20. Avocado

## Ergebnisse

---

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Primerpaar 1 mit Roggen und Primerpaar 2 mit Roggen und Banane kreuzreagiert.

Um überprüfen zu können, ob die Ergebnisse eventuell auf eine Kontamination der getesteten DNA-Extrakte mit Mandel-DNA zurückzuführen sind, wurde die DNA aus Roggen und Banane ein weiteres Mal extrahiert und Kreuzreaktivitätsprüfungen mit beiden Primerpaaren unterzogen. Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die gebildeten Produkte nach ihrer Größe getrennt und mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht. Das Gel ist in Abbildung 12 zu sehen.



**Abbildung 12:** Gel der mit Primerpaar 1 (2-5) und 2 (6-9) erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Mandel; 3. Roggen; 4. Banane; 5. Negativkontrolle; 6. Mandel; 7. Roggen; 8. Banane; 9. Negativkontrolle

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt, dass das Primerpaar 1 spezifisch für Mandel ist, da mit anderen Produkten sowie auch mit der Negativkontrolle keine Bandenübereinstimmung zu erkennen ist. Somit wurde die eventuell vorhandene Kreuzreaktivität mit Roggen widerlegt. Die zuvor erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine Kontamination des Roggen-Extrakts mit Mandel-DNA hin.

Das PCR-Produkt, das in der Mandel mit dem Primerpaar 2 gebildet wurde, wanderte gleich weit wie das in der Banane gebildete Produkt. Das im Roggen gebildete Produkt wanderte weniger weit und war daher nicht mit dem in der Mandel gebildeten Produkt ident. Das Primerpaar 2 ist daher nicht spezifisch für die Mandel, da die Banane eine Kreuzreaktivität mit diesem Primerpaar aufweist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Primerpaar 1 (Pru 1-1) zur Entwicklung des Singleplex-Assays verwendet.

#### 4.1.4 Optimierung der Annealingtemperatur

In den vorangegangenen PCR-Assays wurde eine Annealingtemperatur von 54,0°C verwendet. In diesem Versuch wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten getestet, ob durch Änderung der Annealingtemperatur niedrigere Ct-Werte erreicht werden können. Die genaue Durchführung des Experiments ist in Kapitel 3.7.6.2 beschrieben.

In Abbildung 13 sind die bei verschiedenen Annealingtemperaturen erhaltenen PCR-Kurven dargestellt.

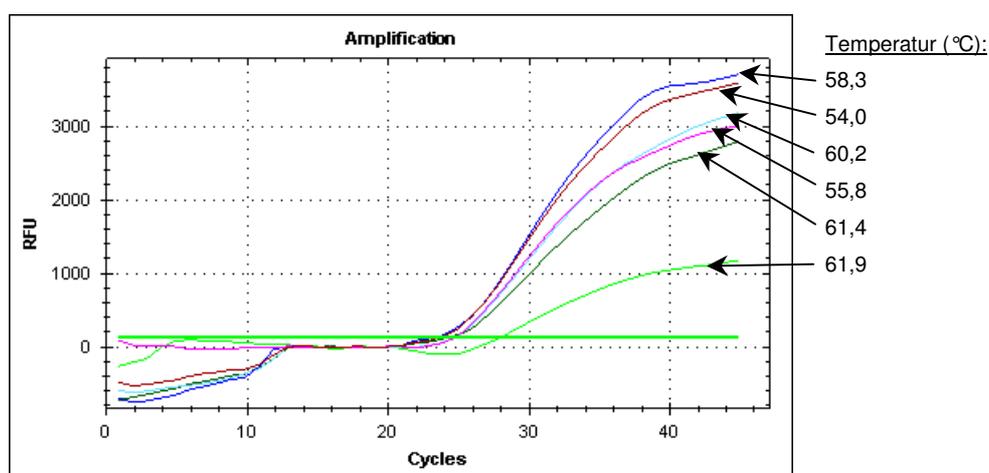


Abbildung 13: Real Time PCR zur Optimierung der Annealingtemperatur

Wie aus der Versuchsreihe hervorgeht hat die Annealingtemperatur im Bereich von 54.0-58.3°C keinen großen Einfluss auf den Ct-Wert. Daher wurde die Annealingtemperatur von 54.0°C beibehalten.

#### 4.1.5 Optimierung der Konzentration der TaqMan Sonde

Als nächstes wurde die Konzentration der TaqMan Sonde optimiert. Getestet wurden Konzentrationen von 50, 100 und 200 nM. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben. Die optimale Konzentration der TaqMan Sonde wurde anhand des niedrigsten Ct-Werts ermittelt. In Tabelle 21 sind die bei den unterschiedlichen Sondenkonzentrationen erhaltenen Ct-Werte angegeben.

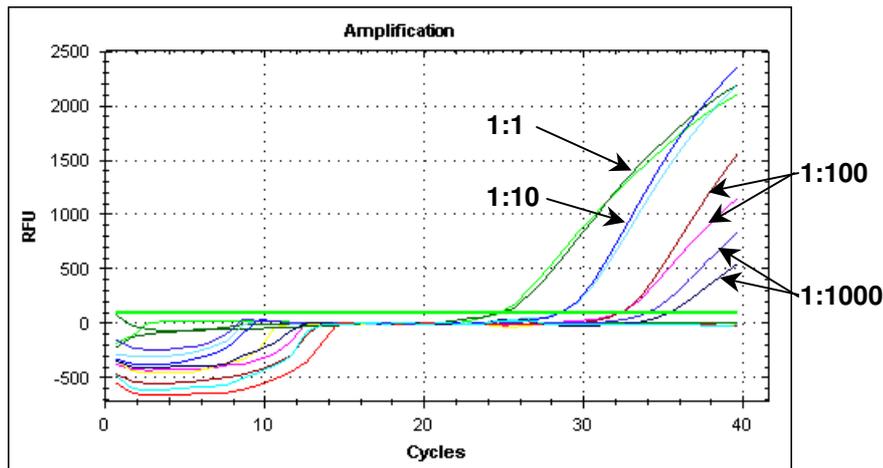
Tabelle 21: Einfluss der TaqMan-Konzentration auf den Ct-Wert

TaqMan [nM]	Ct-Wert	
50	28,75	28,12
100	27,73	27,56
200	27,05	27,13

Der niedrigste Ct-Wert wurde mit einer Sondenkonzentration von 200 nM (Tabelle 21) erhalten. Somit wurde diese TaqMan-Konzentration für die folgenden Versuchen ausgewählt.

#### 4.1.6 Erstellen der Kalibrierfunktion und Ermittlung der Effizienz

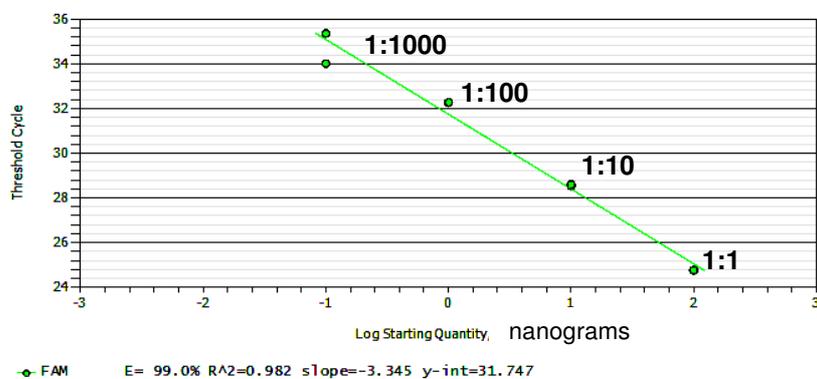
Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der entwickelten Real Time PCR-Methode wurde von einem DNA-Extrakt der Mandel eine Verdünnung von 1:1 bis 1:10000 hergestellt. Diese Proben wurden im TaqMan-Assay analysiert. Die Durchführung der Real Time PCR ist in Kapitel 3.7.8 beschrieben. Dabei wurden folgende Kurven erhalten (Abbildung 14):



**Abbildung 14:** Real Time PCR Analyse von seriell verdünnter Mandel-DNA

Es ist zu erkennen, dass bei höheren Mandel-DNA-Konzentrationen niedrigere Ct-Werte erhalten wurden. Bei einer Verdünnung von 1:10000 konnte kein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Mit der entwickelten Methode können 100 pg/ $\mu$ l Mandel-DNA bzw. 500 pg Mandel-DNA absolut nachgewiesen werden.

In Abbildung 15 ist die erhaltene Standardgerade dargestellt. Es wurde der Ct-Wert gegen die DNA-Menge in ng aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient,  $R^2$ , betrug 0,982 und zeigte somit eine gute Korrelation der Konzentration der Mandel-DNA und der Ct-Werte. Die Steigung der Standardgerade betrug  $-3,345$ , was einer Effizienz von 99,0% entspricht.



**Abbildung 15:** Standardfunktion seriell verdünnter Mandel-DNA

#### **4.1.7 Reproduzierbarkeit**

Um die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zu testen, wurde an zwei unterschiedlichen Tagen die DNA eines Nuss-Müslis, welches Mandel als Zutat enthielt, als Probe im 4-fach Ansatz mittels der CTAB-Methode extrahiert. Mit der isolierten DNA wurde ein TaqMan-Assay in einer 4-fach Bestimmung durchgeführt. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.8 beschrieben.

Tabelle 22: Reproduzierbarkeit des TaqMan-Assays; Singleplex

erster Tag								alle Extrakte		
Extrakt	Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Ct-Wert			Mittelwert Ct	s	RSD (%)	Mittelwert Ct	s	RSD (%)
1	1,7	25,77	25,49	25,47	25,58	0,17	0,66	25,77	0,61	2,36
2	1,6	27,03	26,73	26,91	26,89	0,15	0,56			
3	1,6	25,35	25,70	25,56	25,54	0,18	0,69			
4	1,8	25,48	25,69	25,69	25,62	0,12	0,47			
Mittelwert Ct Gesamt					25,91					
zweiter Tag								alle Extrakte		
Extrakt	Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Ct-Wert			Mittelwert Ct	s	RSD (%)	Mittelwert Ct	s	RSD (%)
1	1,5	24,71	27,61	25,15	25,82	1,56	6,05	25,50	0,82	3,23
2	1,4	24,44	25,11	25,54	25,03	0,55	2,21			
3	1,5	26,14	25,83	25,66	25,88	0,24	0,94			
4	1,6	25,12	25,70	25,00	25,27	0,37	1,48			
Mittelwert Ct Gesamt					25,50					
<b>Interday</b>								25,64	0,15	0,59

88

Ergebnisse

Das Ergebnis der Versuchsreihe (Tabelle 22) demonstriert, dass unabhängig von der Extraktion und vom Tag, an dem der TaqMan-Assay durchgeführt wurde, die Daten sehr gut reproduzierbar waren. Die erhaltenen Ct-Werte lagen im Mittel zwischen 25,03 und 26,89. Die relativen Standardabweichungen waren im Intraday-Versuch mit 2,36 und 3,23% und im Interday-Versuch mit 0,59% sehr niedrig.

### **4.1.8 Bestimmung der Nachweisgrenze**

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden zwei Produkte (Müslis), die laut Hersteller keine Mandel und Haselnuss enthielten, mit 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005% und 0.001% zerkleinerten Mandeln und Haselnüssen gespikt. Diese Proben wurden fein homogenisiert, die DNA mittels der CTAB-Methode extrahiert und die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt. Das Prozedere dieser Schritte ist in Kapitel 3.4.1 und 3.5 angeführt. Danach wurde ein TaqMan-Assay im 4-fach Ansatz durchgeführt. Die genaue Durchführung dazu ist in Kapitel 3.9 beschrieben.

In Tabelle 23 sind die erhaltenen Ct-Werte aufgelistet. Der Nachweis der Mandel-DNA gelang in beiden Produkten im 4-Fach Ansatz bis zu einem Mandel-Anteil von 0,05%. Bei einem %-Anteil von 0,01 wurden beim ersten Produkt in allen 4 Bestimmungen und beim zweiten Produkt in drei von vier Bestimmungen ein positives Ergebnis erhalten. In beiden Produkten wurde ab Konzentrationen  $\leq 0,005\%$  nur mehr in zwei von vier Bestimmungen ein positives Ergebnis erhalten.

Tabelle 23: Bestimmung der Nachweisgrenze, Singleplex-Assay

% - Anteil	Produkt 1				Produkt 2			
	Ct-Wert				Ct-Wert			
0,5	29.67	30.47	30.24	30.20	30.79	30.76	30.38	29.64
0,1	35.70	34.62	34.59	34.54	34.86	34.73	35.14	35.78
0,05	34.88	34.47	35.55	34.97	37.62	33.84	35.15	35.78
0,01	35.84	34.40	36.55	36.80	37.72	38.96	36.76	/
0,005	38.40	45.18	/	/	37.27	37.39	/	/
0,001	40.03	45.73	/	/	38.22	37.18	/	/
Mandel	23.92	23.63	23.59					

Erklärung: / Signal überschritt nicht den Schwellenwert

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Mandel mittels der entwickelten Methode bis zu einer Konzentration von 0,01% in beiden Produkten nachgewiesen werden konnte.

#### 4.1.9 Anwendung der PCR-Methode auf geröstete Mandeln

Roux et al. stellten in ihrer Untersuchung fest, dass Mandelproteine stabil gegenüber Verarbeitungsschritten wie Rösten, Blanchieren, Autoklavieren und Mikrowellenerhitzung sind [ROUX et al., 2001]. Diese Ergebnisse wurden in einer Arbeit von Venkatachalam et al. bestätigt. [VENKATACHALAM et al., 2002]. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Mandeln durch die Verarbeitung ihre Allergenität nicht verlieren. Deshalb ist es wichtig, dass die PCR-Methode den Nachweis von gerösteten Mandeln ermöglicht.

In diesem Versuch wurde der Singleplex-Assay auf Mandeln, welche bei verschiedenen Temperaturen geröstet worden waren (siehe 3.10.1), angewandt. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 24: Einfluss der Röstbedingungen auf den Ct-Wert

Röstdauer	Rösttemperatur					
	130 °C		150 °C		170 °C	
	Ct-Wert					
5 min	23.98	23.92	24.27	24.33	23.58	23.60
10min	24.67	24.47	24.41	24.33	25.10	25.72
15 min	24.32	24.27	24.86	24.62	26.47	26.68

In diesem Versuch wurde auch DNA aus ungerösteter Mandel als Positivkontrolle mitgetestet. Bei der Doppelbestimmung wurden Ct-Werte von 24,38 und 24,61 erhalten. Aus Tabelle 24 geht hervor, dass für DNA aus Mandeln, welche mit einer Temperatur von 130 °C und 150 °C geröstet worden waren, ähnliche Ct-Werte erhalten werden. Auch nach einer Rösttemperatur von 170 °C für 5 min wurde die Mandel-DNA gleich gut amplifiziert. Nur bei einer Rösttemperatur von 170 °C und einer Röstdauer von 10 und 15 min wurden etwas höhere Ct-Werte von 25,10 und 25,72 bzw. 26,47 und 26,68 ermittelt.

Damit konnte bestätigt werden, dass durch das Rösten der Mandel für 5, 10 und 15 min bei 130, 150 und 170 °C der Nachweis von Mandel mittels der entwickelten Real Time PCR-Methode nicht verschlechtert wird.

#### 4.1.10 Nachweis von Mandeln in kommerziell erhältlichen Lebensmittelproben

Die entwickelte und validierte Methode wurde auf kommerziell erhältliche Lebensmittel angewendet. Insgesamt wurden 27 Produkte, welche in lokalen Supermärkten gekauft wurden, untersucht. Die Lebensmittel wurden mittels der CTAB-Methode extrahiert und die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt. Die Durchführung ist in Kapitel 3.4.1 und 3.5 genau beschrieben. Einige der Lebensmittel enthielten Mandeln (+), bei manchen wurde darauf hingewiesen, dass Mandel enthalten sein kann (+/-). Es wurden auch Produkte getestet, bei denen Mandel auf der Packung nicht angeführt war (-). Danach wurden die Proben mittels der entwickelten Methode analysiert. Der TaqMan-Assay ist in Kapitel 3.10.3.1 beschrieben.

In den Tabellen 25 und 26 sind die untersuchten Proben aufgelistet. Weiters sind die Art der Deklaration, die DNA-Konzentration, die Reinheit und die erhaltenen Ct-Werte angegeben.

Tabelle 25: Untersuchung kommerziell erhältlicher Lebensmittel (1)

Probe	c DNA		Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Deklara- -tion Mandel	Ergebnis	Ct-Werte	
	[ng/µl]	[ng/g]					
Flakes Mandel-Nuss	139,0	100,7	1,6	+ (10%)	+	25.98	25.37
Kekse mit Mandeln	22,0	17,5	1,5	+ (9%)	+	29.24	29.16
Nussmüsli	164,3	110,9	1,8	+ (9%)	+	26.10	25.19
Haselnuss-Riegel	207,8	151,6	1,6	+	+	28.27	28.52
Mandelkekse	30,5	19,8	1,4	+ (10%)	+	27.93	27.92
Mandelhörnchen	185,0	97,9	1,5	+ (6%)	+	26.70	26.19
Mandel-Nuss Splitter	157,3	70,5	1,3	+ (25%)	+	27.01	26.92
Nuss-Mandel-Kuchen	8,1	5,2	1,1	+	+	30.88	31.30
Schoko-Mandel-Kuchen	7,8	5,6	2,3	+	+	30.86	30.53
Schoko-Banane-Riegel	105,0	80,8	1,6	+	+	33.81	33.48
Mandel-Honig-Riegel	10,8	7,4	1,5	+ (51%)	+	33.79	36.37
Dinkel Flakes	33,5	22,6	1,6	+/-	-	/	/
Wellness Flakes	33,25	33,6	1,5	+/-	-	/	/
Flakes	78,6	64,9	1,6	+/-	-	/	/
Zuckergebäck	30,0	22,6	1,7	+/-	-	/	/
Dinkel Kekse	15,75	11,7	2,0	+/-	-	/	/
Feingebäck	10,3	8,8	1,2	+/-	-	/	/
Schokokornkeks	16,0	12,1	1,5	+/-	-	/	/
Schokolade 50% Kakao	19,8	10,2	1,2	+/-	-	/	/
Schokolade 60% Kakao	24,5	9,4	1,4	+/-	-	/	/
Schokolade 80% Kakao	9,0	6,1	1,7	+/-	-	/	/
Schokolade 75% Kakao	52,5	75,0	1,6	+/-	-	/	/
Schokokonfekt	12,3	7,2	2,1	+/-	-	/	/

Erklärung: (+) mandelhältiges Produkt, (+/-) Produkt war deklariert mit „Kann Spuren von Nüssen“ bzw. „Kann Spuren von Mandeln“ enthalten, (-) Produkt ohne Deklaration von Mandel, / Signal überschreitet nicht den Schwellenwert

Tabelle 26: Untersuchung kommerziell erhältlicher Lebensmittel (2)

Probe	c DNA		Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Deklara- -tion Mandel	Ergebnis	Ct-Werte	
	[ng/μl]	[ng/g]					
Müsliriegel Traube	42,8	32,2	1,7	-	-	/	/
Knuspermüsli	38,0	25,2	2,0	-	-	/	/
Müsliriegel Haselnuss	215,2	153,7	1,7	-	-	/	/
Nuss Zuckergebäck	145,2	125,2	1,6	-	-	/	/

Erklärung: (-) Produkt ohne Deklaration von Mandel, / Signal überschritt nicht den Schwellenwert

In jenen Proben (Tabelle 25 und 26), in denen laut Hersteller Mandel enthalten war, konnte diese auch nachgewiesen werden. In Produkten, die einen Hinweis trugen, dass Mandel enthalten sein könnte, lagen die Ct-Werte unter dem Schwellenwert. In den mandelfreien Proben konnte diese auch nicht nachgewiesen werden.

#### 4.1.11 Inhibitionskontrolle

Das Ziel dieses Versuches war, festzustellen, ob die Lebensmittelproben, in denen mit dem Singleplex-Assay keine Mandel nachgewiesen werden konnte, auch wirklich als Negativ-Proben gelten. Die genaue Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 3.11.1 beschrieben.

Für alle Proben wurde in der Inhibitionskontrolle ein positives Ergebnis erhalten, was darauf schließen lässt, dass die zuvor erhaltenen negativen Ergebnisse nicht auf eine Hemmung der TaqDNA Polymerase durch Lebensmittelbestandteile zurückzuführen waren.

## 4.2 Entwicklung einer Duplex Real Time PCR zur Bestimmung von potentiell allergenen Mandeln und Haselnüssen in Lebensmitteln

### 4.2.1 Primer und TaqMan Sonden

Für den Duplex-Assay zur gleichzeitigen Bestimmung von Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln wurden die Mandelprimer und die TaqMan Sonde des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Singleplex-Assays verwendet. Die für den Duplex-Assay eingesetzten Haselnuss-Primer und die TaqMan Sonde wurden im Rahmen einer Dissertation entworfen und deren Konzentration optimiert [SCHÖRINGHUMER, 2008]. In Tabelle 27 sind die entworfenen Primer und TaqMan Sonden dargestellt.

Tabelle 27: Primer und TaqMan Sonden für den Duplex-Assay

Primer und TaqMan Sonde	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Produktgröße (bp)
Pru 1 Forward	CCAAATCATCCAGGTAAGGG	53.5	
Pru 1 Reverse	CTTGTTGTTGCCTCTCCTG	53.9	116
Pru 1 TaqMan	FAM- TCCTGTTGTCGCTCCTCGTGCT-BHQ1	64.6	
Cor a 1 Forward	ACTACATAAAGCAAAAGGTTGAAG	54.8	
Cor a 1 Reverse	TCGTAATTGATTTTCTCCAGTTTG	54.9	109
Cor a 1 TaqMan	Cy5- CGGACAAAGCATCGCCTTCAATCA-BHQ2	63.1	

Die Mandelprimer waren zuvor im Rahmen der Entwicklung des Singleplex-Assays in Konzentrationen von 100, 200 und 400 nM mit Hilfe einer Primermatrix getestet worden. Die genaue Optimierung der Mandelprimer und der TaqMan Sonde ist in den Kapiteln 3.7.5.1 und 3.7.5.3 beschrieben. In Tabelle 28 sind die Konzentrationen der Primer und TaqMan Sonden

aufgelistet, die sich in den jeweiligen Singleplex-Assays als optimal herausgestellt hatten.

Tabelle 28: In den Singleplex-Assays optimierte Konzentration der Primer und TaqMan Sonden

<b>Primer und TaqMan Sonde</b>	<b>Mandel (Pru 1)</b>	<b>Haselnuss (Cor a 1)</b>
Primer Forward	200 nM	300 nM
Primer Reverse	200 nM	100 nM
TaqMan Sonde	200 nM	200 nM

#### **4.2.2 Kreuzreaktivität der verwendeten Mandel- und Haselnussprimer**

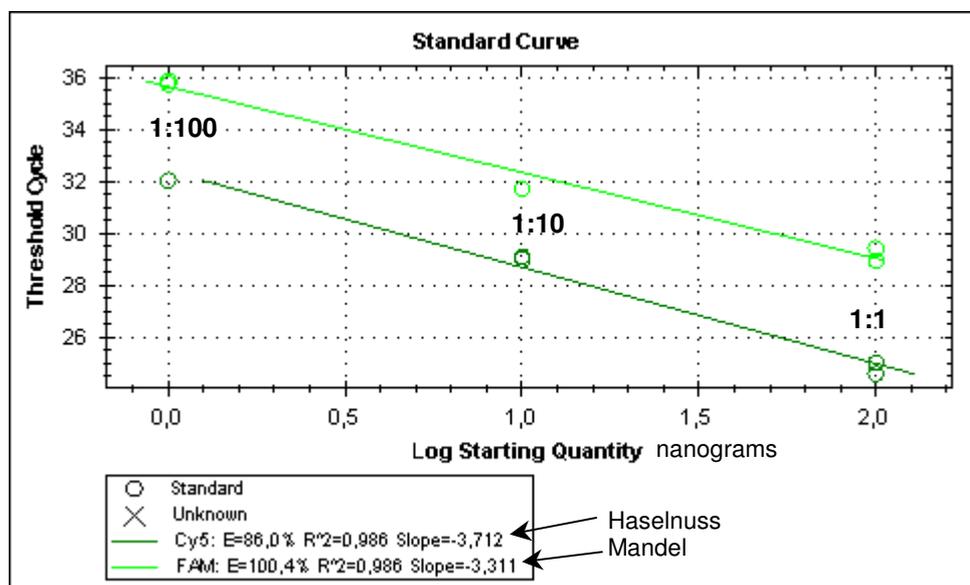
Die Mandel-Primerpaare waren bereits im Rahmen dieser Diplomarbeit auf die Kreuzreaktivität mit Reis, Weizen, Hafer, Dinkel, Roggen, Soja, Haselnuss, Walnuss, Sonnenblumenkernen, Erdnuss, Cashewkernen, Sesam, Avocado, Birne, Apfel, Pfirsich, Pflaume, Erdbeere, Himbeere, Banane, Traube und Schokolade getestet worden. Das genaue Prozedere dazu ist in Kapitel 3.7.5.4 beschrieben. Die Haselnuss-Primerpaare waren in der Dissertation von Schöringhumer auf die Kreuzreaktivität mit Sesam, Paranuss, Sonnenblumenkernen, Erdnuss, Walnuss, Reis, Soja, Honig, Mohn, Schokolade, Weizen, Kartoffel, Mandel, Mais, Apfel und Kirsche getestet worden [SCHÖRINGHUMER, 2008].

Die vorangegangenen Versuche zur Kreuzreaktivitätsbestimmung ergaben, dass unter den angewendeten Bedingungen beide Primerpaare keine Kreuzreaktivität mit den getesteten Lebensmitteln aufweisen.

### 4.2.3 Erstellen der Kalibrierfunktion und Ermittlung der Effizienz

Sowohl für Mandel als auch für Haselnuss war in den Singleplex-Assays bis zu 500 pg Mandel- bzw. Haselnuss-DNA eine hohe Korrelation zwischen den Ct-Werten und der DNA-Menge beobachtet worden. Die Korrelationskoeffizienten,  $R^2$ , der Regressionsgeraden betragen 0,982 für Mandel (siehe Kapitel 4.1.6) und 0,993 für Haselnuss [SCHÖRINGHUMER, 2008]. Die Steigungen der Standardgeraden für Mandel und Haselnuss liegen bei  $-3,345$  und  $-3,33$ , was Amplifikationseffizienzen von 99,0 und 99,6% entspricht.

Die Effizienz und Nachweisgrenze des Duplex-Assays wurde mit seriell verdünnter Mandel- und Haselnuss-DNA (Verdünnungen von 1:1 bis 1:10000) bestimmt, wobei entweder Mandel- oder Haselnuss-DNA in den Wells enthalten war. Die Durchführung des Experiments ist in Kapitel 3.7.6.3 beschrieben.



**Abbildung 16:** Standardfunktionen seriell verdünnter Mandel- und Haselnuss-DNA

In Abbildung 16 sind die Standardgeraden des Duplex-Assays dargestellt. Sowohl für Mandel als auch für Haselnuss wurde ein Korrelationskoeffizient,  $R^2$ ,

von 0,986 erhalten. Die Steigungen der Regressionsgeraden für Mandel und Haselnuss betragen  $-3,31$  und  $-3,71$ . Die Effizienz des Assays für Mandel mit 100,4% war sehr gut, doch für Haselnuss lag die Effizienz nur bei 86,0%.

Tabelle 29: Ct-Werte für seriell verdünnter Mandel- und Haselnuss-DNA im Duplex-Assay

	<b>Mandel-Assay</b>		<b>Haselnuss-Assay</b>	
	Ct-Werte		Ct-Werte	
Mandel	28.94	29.43		
Haselnuss			24.58	25.01
1:10	31.71	35.82*	29.11	28.99
1:100	35.75	35.87	32.04	/
1:1000	/	/	/	/
1:10000	/	/	/	/

Erklärung: / Signal überschritt nicht den Schwellenwert, \* wurde als Ausreisser gewertet.

Aus der Tabelle 29 ist zu erkennen, dass unter Verwendung des nicht optimierten Duplex-Assays sowohl Mandel-DNA als auch Haselnuss-DNA nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 nachgewiesen werden konnte.

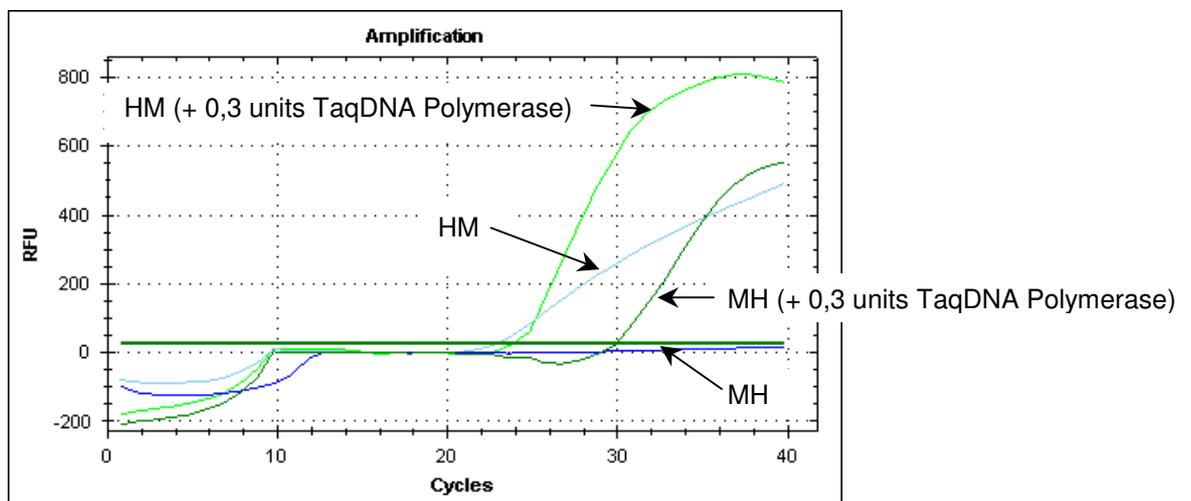
Diese Ergebnisse erforderten den Assay zu optimieren, um dadurch die Nachweisgrenze zu senken.

#### 4.2.4 Optimierung des Duplex-Assays

Zur Optimierung wurde in mehreren Versuchsreihen die Konzentration von  $MgCl_2$ , der TaqDNA Polymerase und der dNTPs erhöht. Es wurden 2 Mischungen, 99% Mandel- und 1% Haselnuss-DNA (in der Folge als MH bezeichnet) und 1% Mandel- und 99% Haselnuss-DNA (in der Folge als HM bezeichnet), hergestellt, mittels des Duplex-Assays analysiert und der Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Amplifizierbarkeit untersucht. Die genaue Durchführung der Versuchs ist in Kapitel 3.7.7 beschrieben.

#### 4.2.4.1 Erhöhung der TaqDNA Polymerase-Konzentration

Als erstes wurde der Einfluss der TaqDNA Polymerase-Konzentration auf die Amplifikation von Mandel- und Haselnuss-DNA untersucht. Dazu wurde ein Teil der Bestimmungen mit dem kommerziell erhältlichen iQ Supermix durchgeführt (die TaqDNA Polymerase-Konzentration betrug damit 0,625 units/well), bei einem Teil der Bestimmungen wurde die TaqDNA Polymerase-Konzentration um 0,3 units/well erhöht.

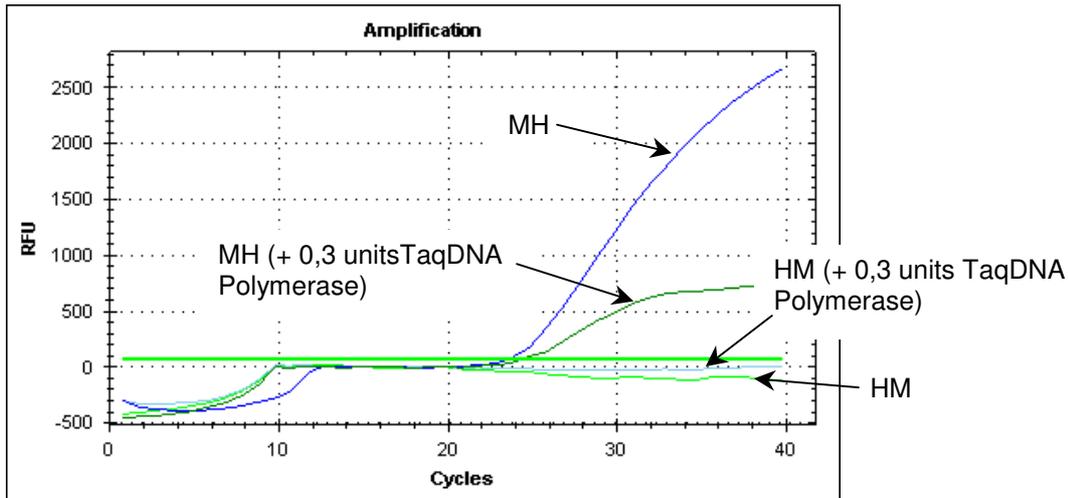


Erklärung: HM.....DNA-Probe: 99% Haselnuss-DNA, 1% Mandel-DNA

MH.....DNA-Probe: 99% Mandel-DNA, 1% Haselnuss-DNA

**Abbildung 17:** Einfluss der TaqDNA Polymerase-Konzentration auf die Amplifikation von Haselnuss-DNA

In den Abbildungen 17 und 18 ist zu erkennen, dass die Zugabe von 0,3 units TaqDNA Polymerase/well die Amplifikation der Haselnuss-DNA verbessert und die der Mandel-DNA verschlechtert.



Erklärung: MH.....DNA-Probe: 99% Mandel-DNA, 1% Haselnuss-DNA  
 HM.....DNA-Probe: 99% Haselnuss-DNA, 1% Mandel-DNA

**Abbildung 18:** Einfluss der TaqDNA Polymerase Konzentration auf die Amplifikation von Mandel-DNA

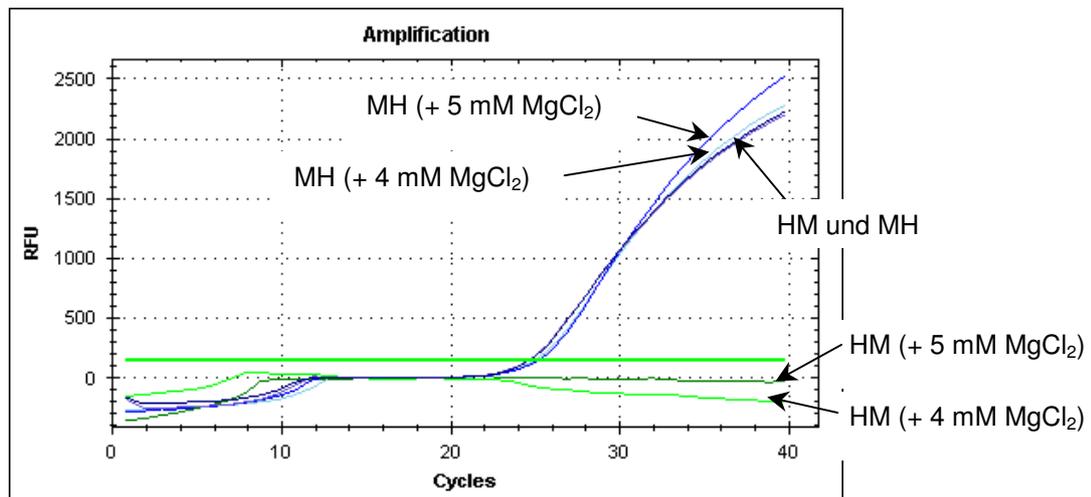
Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die Zugabe von 0,3 units TaqDNA Polymerase/well keine niedrigeren Ct-Werte erhalten wurden und die Mandel-DNA generell schlechter amplifiziert wurde. Mandel-DNA in einer Mischung von 1% Mandel-DNA und 99% Haselnuss-DNA wurde nicht amplifiziert. Daher wurde bei den folgenden Versuchen die TaqDNA Polymerase-Konzentration nicht erhöht.

#### 4.2.4.2 Erhöhung der Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)-Konzentration

Im kommerziell erhältlichen iQ Supermix sind 3 mM MgCl<sub>2</sub> enthalten. Zur Optimierung des Duplex-Assays mit MgCl<sub>2</sub> wurde die Konzentration im Reaktionsansatz auf 4 mM bzw. 5 mM MgCl<sub>2</sub> erhöht. Die genaue Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 3.7.7.2 angeführt.

Durch die Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurden im Haselnuss-Assay steilere PCR-Kurven erhalten. Im Mandel-Assay (Abbildung 19) ist zu erkennen, dass die Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration bei einem Überschuss an Mandel-

DNA (MH) keinen Einfluss auf den Verlauf der PCR-Kurven hatte, bei einem Überschuss an Haselnuss-DNA (HM) durch die Zugabe von  $MgCl_2$  jedoch die Amplifikation der Mandel-DNA verhindert wurde.



Erklärung: MH.....DNA-Probe: 99% Mandel-DNA, 1% Haselnuss-DNA

HM.....DNA-Probe: 99% Haselnuss-DNA, 1% Mandel-DNA

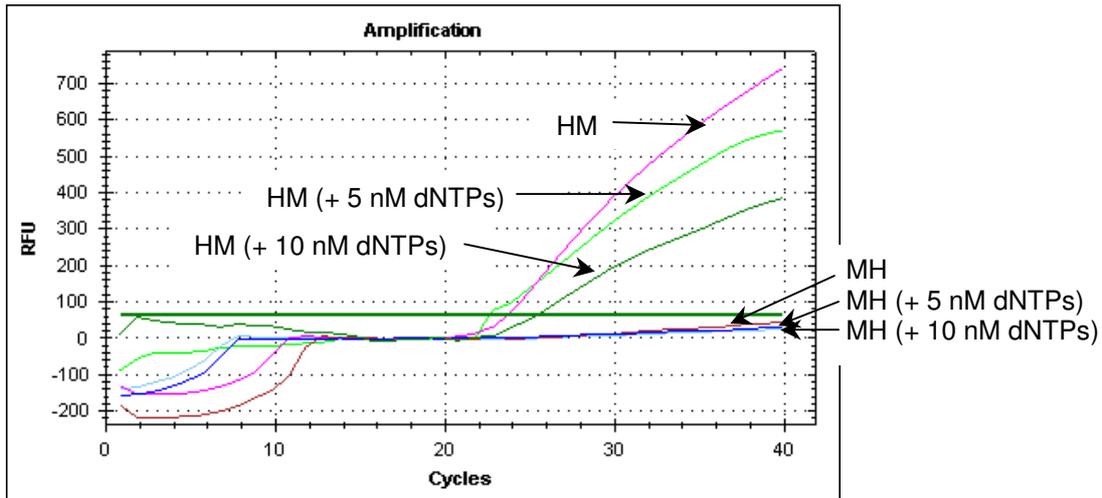
**Abbildung 19:** Einfluss der  $MgCl_2$ -Konzentration auf die Amplifikation von Mandel-DNA

Dieses Ergebnis führte zu dem Entschluss, die  $MgCl_2$ -Konzentration nicht zu erhöhen.

#### 4.2.4.3 Erhöhung der dNTP-Konzentration

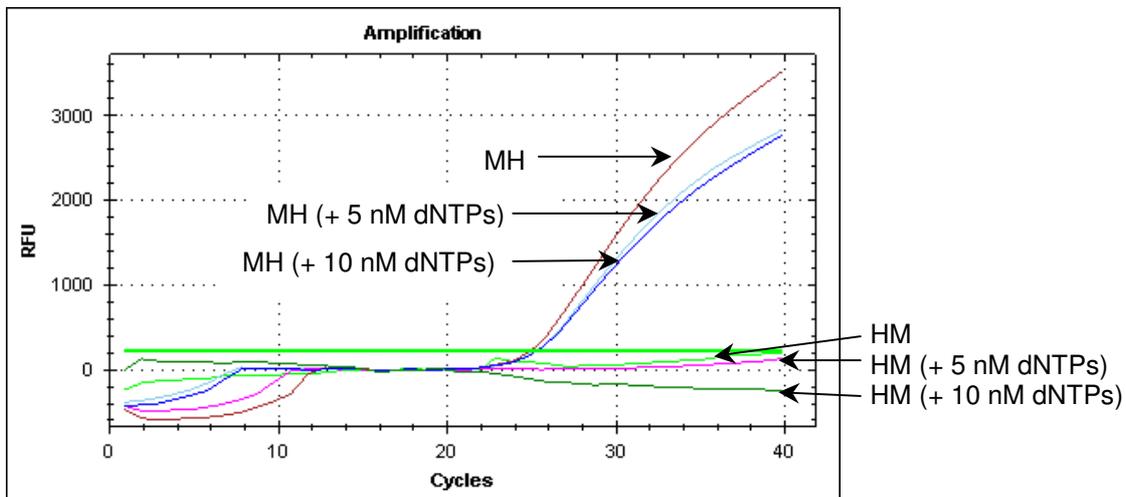
Im verwendeten iQ Supermix sind 0,8 mM dNTPs enthalten. In dieser Versuchsreihe wurden 5 nM bzw. 10 nM dNTPs zum Reaktionsansatz dazugegeben. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.7.7.3 beschrieben. In den Abbildungen 20 und 21 sind die jeweiligen Amplifikationskurven dargestellt.

## Ergebnisse



Erklärung: HM.....DNA-Probe: 99% Haselnuss-DNA, 1% Mandel-DNA  
MH.....DNA-Probe: 99% Mandel-DNA, 1% Haselnuss-DNA

**Abbildung 20:** Einfluss der dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Haselnuss-DNA



Erklärung: MH.....DNA-Probe: 99% Mandel-DNA, 1% Haselnuss-DNA  
HM.....DNA-Probe: 99% Haselnuss-DNA, 1% Mandel-DNA

**Abbildung 21:** Einfluss der dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Mandel-DNA

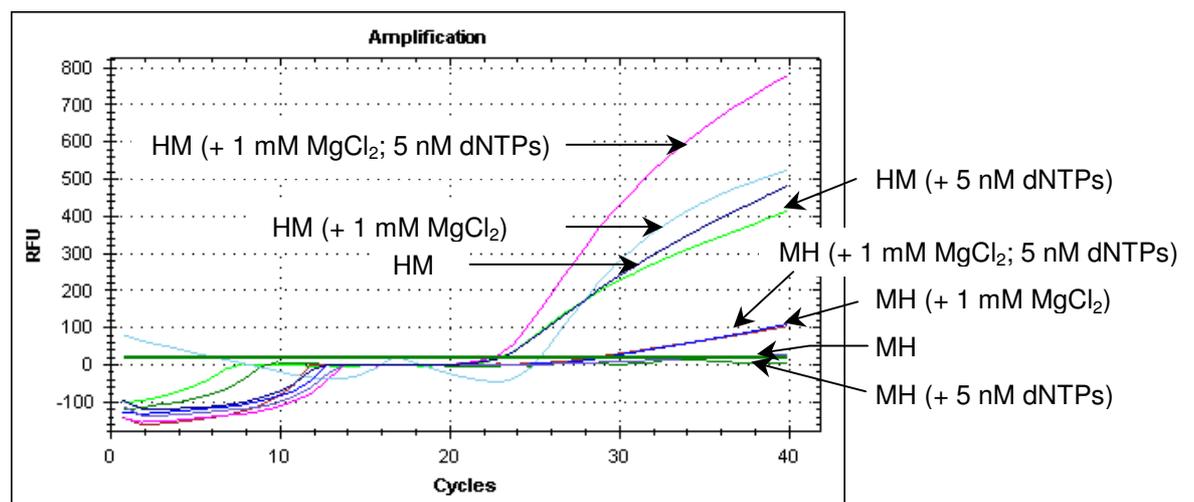
Aus den Abbildungen 20 und 21 geht hervor, dass sowohl die Mandel-DNA als auch die Haselnuss-DNA, wenn sie im Überschuss vorliegen, ohne Erhöhung

der dNTP-Konzentration besser amplifiziert werden. In den Fällen, in denen die jeweilige DNA im Unterschuss vorlag (MH im Haselnuss-Assay bzw. HM im Mandel-Assay), hatte die dNTP-Konzentration keinen Einfluss auf die Amplifikation.

#### 4.2.4.4 Erhöhung der $MgCl_2$ - und dNTP-Konzentration

Als nächstes wurde geprüft, ob die gleichzeitige Erhöhung der  $MgCl_2$ - und der dNTP-Konzentration eine Verbesserung des PCR-Kurvenverlaufs mit sich bringt. Dem Reaktionsgemisch wurden 1 mM  $MgCl_2$  und 5 nM dNTPs dazugegeben. Die Durchführung dazu ist in Kapitel 3.7.7.4 beschrieben.

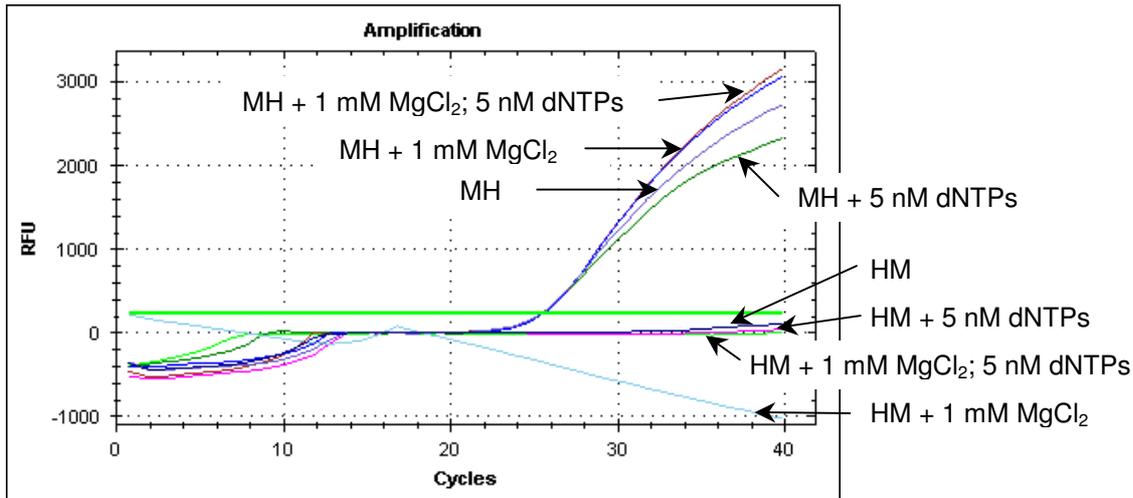
Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Real Time PCR-Kurven des Haselnuss-Assays und des Mandel-Assays.



Erklärung: HM.....DNA-Probe: 99% Haselnuss-DNA, 1% Mandel-DNA

MH.....DNA-Probe: 99% Mandel-DNA, 1% Haselnuss-DNA

**Abbildung 22:** Einfluss der  $MgCl_2$ - und dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Haselnuss-DNA



Erklärung: MH.....DNA-Probe: 99% Mandel-DNA, 1% Haselnuss-DNA  
 HM.....DNA-Probe: 99% Haselnuss-DNA, 1% Mandel-DNA

**Abbildung 23:** Einfluss der MgCl<sub>2</sub>- und dNTP-Konzentration auf die Amplifikation von Mandel-DNA

Bei einem Überschuss von Haselnuss-DNA (HM) bewirkt der Zusatz von 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 nM dNTPs einen Anstieg der Amplifikationskurven (Abbildung 22), während bei 1% Haselnuss- und 99% Mandel-DNA nur ein sehr niedriger Kurvenanstieg zu beobachten ist. Im Mandel-Assay (Abbildung 23) wurde durch den Zusatz von 5 nM dNTPs und 1 mM MgCl<sub>2</sub> keine Verbesserung der Amplifikation erreicht.

Da in den vorangegangenen Optimierungsversuchen im Haselnuss- und Mandel-Assay keine Verbesserungen erzielt werden konnten, wurde auf eine Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>- und dNTPs-Konzentration und der TaqDNA Polymeraseaktivität bei der weiteren Methodenentwicklung verzichtet. Daher wurden die folgenden Versuche mit dem kommerziell erhältlichen iQ Supermix (BioRad) durchgeführt.

#### **4.2.4.5. Erhöhung der Primer- und TaqMan Sonden-Konzentration**

Schöringhumer hatte in ihrer Dissertation [SCHÖRINGHUMER, 2008] die Effizienz eines Duplex-Assays zur Bestimmung von Sesam und Haselnuss durch Erhöhung der Primer- und TaqMan Sonden-Konzentration gesteigert. Deshalb wurde als nächstes der Einfluss der Konzentration der Mandelprimer und der TaqMan Sonde auf die Amplifizierbarkeit der Mandel-DNA im Duplex-Assay untersucht.

Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, dass die Amplifizierbarkeit der Mandel-DNA durch Erhöhung der Primer- und Sonden-Konzentration signifikant erhöht werden konnte. Daher wurden alle folgenden Versuche mit einer Primer- und TaqMan Sonden-Konzentration von 400 nM durchgeführt.

#### **4.2.5 Bestimmung der Kreuzreaktivität des optimierten Assays**

Die DNA-Extrakte von 26 Lebensmitteln wurden mit dem optimierten Duplex-Assay auf Kreuzreaktivität getestet. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.7.10 beschrieben.

Es wurde die DNA von Mandel, Haselnuss, Reis, Weizen, Hafer, Dinkel, Roggen, Soja, Walnuss, Erdnuss, Cashewkernen, Pekannuss, Paranuss, Mais, Gerste, Sesam, Banane, Apfel, Sonnenblumenkernen, Birne, Mohn, Erdbeere, Himbeere, Lupine und Schokolade mittels der CTAB-Methode extrahiert. Die Kirsche wurde mit dem QIAmp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (siehe Kapitel 3.4.2) extrahiert. Danach wurde ein SYBR Green-Assay (siehe Kapitel 3.7.5.2) durchgeführt.

Abbildung 24 zeigt das Ergebnis der Schmelzkurven der gebildeten PCR-Produkte. Der Schmelzpunkt des in der Haselnuss gebildeten Produkts beträgt 80.0°C, der des in der Mandel gebildeten Produkts 87.5°C. Ähnliche Schmelztemperaturen weisen das in der Gerste (80°C) und in der Soja (87°C)

## Ergebnisse

gebildete Produkt auf. Dieses Ergebnis könnte auf eine eventuelle Kreuzreaktivität dieser Lebensmittel hindeuten.

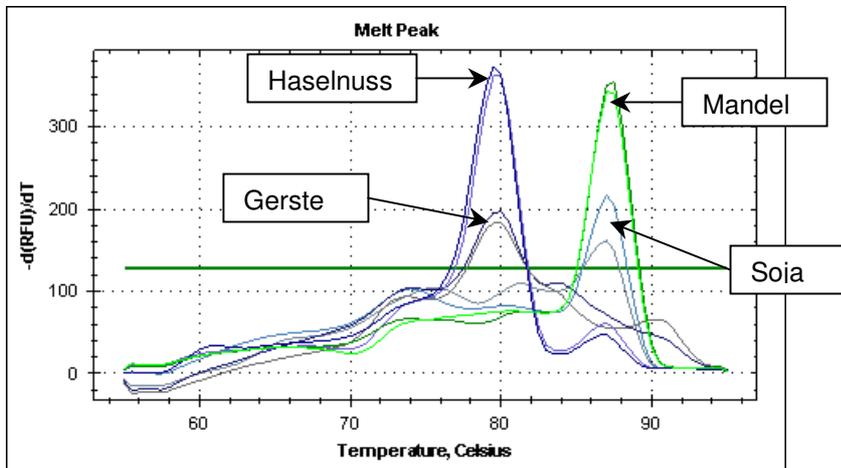


Abbildung 24: Schmelzkurven der gebildeten PCR-Produkte

Aus dem Gel (Abbildung 25) ist zu erkennen, dass Soja ein in der Größe ähnliches Produkt wie die Haselnuss bildet und das Amplikon der Gerste auf gleicher Höhe mit der DNA-Bande der Mandel liegt.

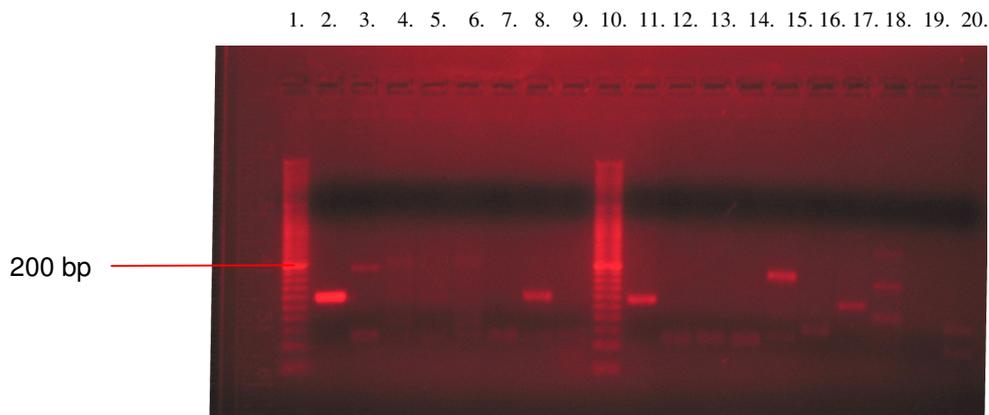
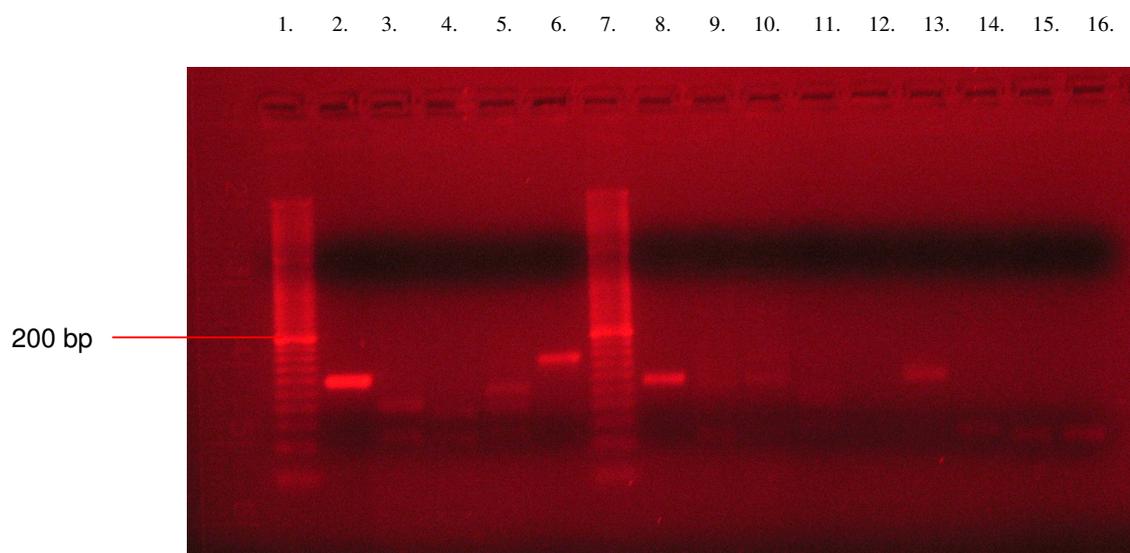


Abbildung 25: Gel der mit dem optimierten Duplex-Assay erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Mandel; 3. Reis; 4. Weizen; 5. Hafer; 6. Dinkel; 7. Roggen; 8. Soja; 9. Walnuss; 10. 20 bp Marker; 11. Haselnuss; 12. Erdnuss; 13. Cashewkerne; 14. Pekannuss; 15. Paranuss; 16. Mais; 17. Gerste; 18. Sesam; 19. Schokolade; 20. Negativkontrolle

Nach diesem Versuch wurde die DNA von Soja und Gerste nochmals extrahiert und mit dem Duplex-Assay analysiert. Zusätzlich wurden noch weitere Lebensmittel (u.a. Lupine, Birne, Apfel, Kirsche und Mohn) auf Kreuzreaktivität getestet.

Das in Abbildung 26 dargestellte Gel veranschaulicht, dass in der Kirsche ein DNA-Produkt gebildet wurde, das sich in der Größe nicht von dem in der Mandel gebildeten Amplifikat unterscheidet.



**Abbildung 26:** Gel der mit dem optimierten Duplex-Assay erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Mandel; 3. Soja; 4. Banane; 5. Sonnenblumenkerne; 6. Mohn; 7. 20 bp Marker; 8. Haselnuss; 9. Gerste; 10. Lupine; 11. Birne; 12. Apfel; 13. Kirsche; 14. Himbeere; 15. Erdbeere; 16. Negativkontrolle

Anschließend wurde aus der Kirsche die DNA ein weiteres Mal extrahiert (siehe Kapitel 3.4.3) und mit einem Duplex-Assay im 4-fach Ansatz analysiert. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.7.10 beschrieben.

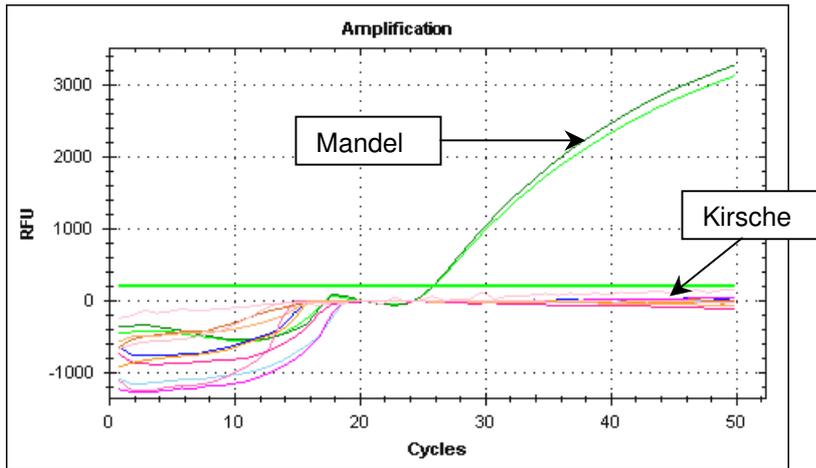
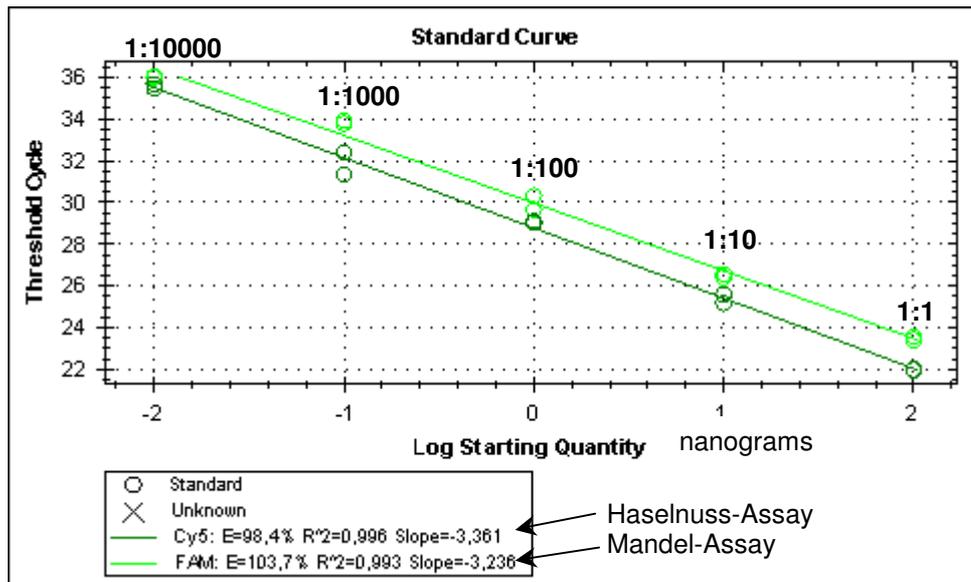


Abbildung 27: Kreuzreaktivitätstest mit dem Duplex-Assay

Abbildung 27 beweist, dass der optimierte Duplex-Assay keine Kreuzreaktivität mit der Kirsche aufweist.

#### 4.2.6 Ermittlung der Effizienz des Duplex-Assays

Zur Ermittlung der Effizienz des optimierten Duplex-Assays wurden Mandel- und Haselnuss-DNA-Proben in Verdünnungsschritten von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 hergestellt. In den Wells wurde entweder Mandel- oder Haselnuss-DNA als Probe pipettiert. Die Durchführung ist in Kapitel 3.7.8 beschrieben.



**Abbildung 28:** Standardfunktionen seriell verdünnter Mandel- und Haselnuss-DNA

In Abbildung 28 sind die Standardgeraden des Mandel- und Haselnuss-Assays im Duplex-Ansatz dargestellt. In beiden Fällen gelang der Nachweis bis zu einer Verdünnung 1:10000 (10 pg/μl bzw. 50 pg absolut). Die Korrelationskoeffizienten,  $R^2$ , der Regressionsgeraden betragen 0,993 für Mandel und 0,996 für Haselnuss. Die Steigungen für Mandel und Haselnuss liegen bei  $-3,236$  und  $-3,361$ . Daraus ergab sich eine sehr gute Effizienz für Mandel mit 103,7% und für Haselnuss mit 98,4%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Erhöhung der Mandel-Primer- und der TaqMan Sonden-Konzentration von 200 nM auf 400 nM die Effizienz verbessert und somit der Duplex-Assay optimiert werden konnte. In den folgenden Versuchsreihen wurden diese optimierten Bedingungen angewendet.

#### **4.2.7 Amplifikation von Mandel- und Haselnuss-DNA in unterschiedlichen Mandel/Haselnuss-DNA Mischungen**

Um herauszufinden, ob die Amplifizierungseffizienz des Duplex-Assays in Anwesenheit beider Proben (Mandel- und Haselnuss-DNA) vermindert wird, wurden DNA-Lösungen in unterschiedlichen Volums-Verhältnissen mit dem optimierten Duplex-Assay getestet: 99,8:0,2; 98:2; 95:5; 90:10; 75:25; 50:50; 25:75; 10:90; 5:95; 2:98 und 0,2:99,8 Mandel- zu Haselnuss-DNA. Die Durchführung ist in Kapitel 3.7.9 beschrieben. In Tabelle 30 sind die erhaltenen Ct-Werte aufgelistet.

Tabelle 30: Ct-Werte für DNA-Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzungen an Mandel- und Haselnuss-DNA; Duplex-Assay

	Mandel-Assay		Haselnuss-Assay	
	Ct-Wert		Ct-Wert	
%	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Haselnuss-DNA			22,92 23,17	23,98 23,68
Mandel-DNA	23,11 22,49	22,14 23,22		
99.8 M 0.2 H	22,29 22,06	22,63 22,62	37,99 39,39	/ /
98 M 2 H	23,11 22,48	22,05 22,11	38,12 38,04	/ /
95 M 5 H	24,08 23,96	25,01 24,98	28,56 29,67	29,77 30,07
90 M 10 H	25,41 26,38	/ <sup>*</sup> 26,01	28,29 28,23	28,01 28,12
75 M 25 H	25,90 24,63	39,28 39,53	26,18 26,21	25,47 26,27
50 M 50 H	33,28 33,49	32,79 33,08	23,88 23,86	23,93 23,99
75 H 25 M	37,22 36,51	31,15 31,82	23,46 23,35	23,17 24,10
90 H 10 M	40,06 45,55	/ 46,03	23,17 23,18	23,33 23,00
95 H 5 M	41,76 44,57	/ 46,61	22,95 23,03	23,03 23,03
99.8 H 0.2 M	42,35 43,98	/ /	23,03 22,78	22,80 23,29

Erklärung: / Signal überschritt nicht den Schwellenwert; \* wurde als Ausreisser gewertet.

Aus diesem Versuch geht hervor, dass im Mandel-Assay mit Abnahme der Mandel-DNA Konzentration eine starke Zunahme der Ct-Werte einherging. Im Gegensatz dazu führte im Haselnuss-Assay eine Abnahme der Haselnuss-DNA Konzentration bis zu einem Verhältnis von 50:50 nur zu einer geringen Änderung des Ct-Werts.

Im Mandel-Assay wurde bis zu einem Mischungsverhältnis von 75% Haselnuss-DNA zu 25% Mandel-DNA in 4 von 4 Bestimmungen ein positives Ergebnis erhalten, bei 90% Haselnuss-DNA zu 10% Mandel-DNA und 95% Haselnuss-DNA zu 5% Mandel-DNA zumindestens in 3 von 4 Fällen.

Im Haselnuss-Assay wurde bis zu einem Mischungsverhältnis von 95% Mandel-DNA zu 5% Haselnuss-DNA in allen 4 Bestimmungen ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet, bei Verhältnissen von 98% Mandel-DNA zu 2% Haselnuss-DNA und 99,8% Mandel-DNA zu 0,2% Haselnuss-DNA nur noch in 2 von 4 Bestimmungen.

### **4.2.8 Reproduzierbarkeit**

Um die Reproduzierbarkeit der Duplex-Methode zu ermitteln, wurde aus einem Nuss-Müsli jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen die DNA extrahiert (CTAB-Methode) und mittels des Duplex-Assays analysiert. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.8 beschrieben.

Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 31 für Mandel und in Tabelle 32 für Haselnuss dargestellt. Unabhängig von der Extraktion und vom Tag der Durchführung des Duplex-Assays wurden ähnliche Ct-Werte erhalten. Die Ct-Werte für Mandel lagen im Bereich von 27,12 bis 29,94 und für Haselnuss im Bereich von 26,10 bis 27,25. Daraus ergibt sich für den Mandel-Assay eine Intraday Reproduzierbarkeit von 2,32 bzw. 1,26% und eine Interday Reproduzierbarkeit von 4,22%. Für den Haselnuss-Assay liegt die Intraday Reproduzierbarkeit zwischen 1,12 und 0,63% und die Interday Reproduzierbarkeit bei 0,66%.

Tabelle 31: Reproduzierbarkeit des Duplex-Assays, Mandel

Mandel-Assay; erster Tag								alle Extrakte		
Extrakt	Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Ct-Wert		Mittelwert Ct	s	RSD (%)	Mittelwert Ct	s	RSD (%)	
1	2,0	27,89	27,73	27,76	27,79	0,09	0,31	27,68	0,64	2,32
2	1,9	27,22	27,48	28,78	27,83	0,84	3,00			
3	1,9	27,18	28,67	28,14	28,00	0,76	2,70			
4	2,0	27,28	26,50	27,57	27,12	0,55	2,04			
Mittelwert Ct Gesamt		27,68								
Mandel-Assay; zweiter Tag								alle Extrakte		
Extrakt	Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Ct-Wert		Mittelwert Ct	s	RSD (%)	Mittelwert Ct	s	RSD (%)	
1	1,8	28,87	28,83	29,02	28,91	0,10	0,35	29,39	0,37	1,26
2	1,8	29,11	29,32	29,35	29,26	0,13	0,45			
3	1,9	29,60	29,40	29,94	29,65	0,27	0,92			
4	2,0	29,76	29,78	29,65	29,73	0,07	0,24			
Mittelwert Ct Gesamt		29,39								
<b>Interday</b>							28,53	1,20	4,22	

Tabelle 32: Reproduzierbarkeit des Duplex-Assays, Haselnuss

Haselnuss-Assay; erster Tag								alle Extrakte		
Extrakt	Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Ct-Wert			Mittelwert Ct	s	RSD (%)	Mittelwert Ct	s	RSD (%)
1	2,0	26,61	26,98	26,72	26,77	0,19	0,71	26,77	0,30	1,12
2	1,9	26,73	26,45	27,12	26,77	0,34	1,26			
3	1,9	26,83	26,99	26,78	26,87	0,11	0,41			
4	2,0	26,69	26,10	27,20	26,66	0,55	2,06			
Mittelwert Ct Gesamt					26,77					
Haselnuss-Assay; zweiter Tag								alle Extrakte		
Extrakt	Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Ct-Wert			Mittelwert Ct	s	RSD (%)	Mittelwert Ct	s	RSD (%)
1	1,8	27,17	26,98	26,9	27,02	0,14	0,51	27,02	0,17	0,63
2	1,8	27,17	27,07	26,67	26,97	0,26	0,98			
3	1,9	26,90	26,97	26,86	26,91	0,06	0,21			
4	2,0	27,09	27,20	27,25	27,18	0,08	0,30			
Mittelwert Ct Gesamt					27,02					
							<b>Interday</b>	26,89	0,18	0,66

#### 4.2.9 Bestimmung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays

Es wurden zwei Müslis, die laut Hersteller keine Mandel und Haselnuss enthielten, mit 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005% bzw. 0.001% an zerkleinerten Mandeln und Haselnüssen versetzt, gut homogenisiert, die DNA extrahiert und mit dem Duplex-Assay im 4-fach Ansatz analysiert. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.9 beschrieben.

Tabelle 33: Bestimmung der Nachweisgrenze, Mandel-Assay

% - Anteil	Produkt 1				Produkt 2			
	Ct-Werte				Ct-Werte			
0,5	29.04	28.85	30.05	29.65	30.49	30.19	30.74	30.07
0,1	42.99	45.76	43.32	43.06	36.15	35.09	35.89	35.49
0,05	37.47	43.38	40.41	43.07	35.21	35.18	35.11	37.02
0,01	40.48	36.26	36.95	36.08	35.85	36.60	36.17	35.94
0,005	37.99	38.30	36.68	36.32	39.27	35.01	36.44	35.09
0,001	37.51	35.95	34.78	36.47	39.37	35.64	35.82	39.07

Tabelle 34: Bestimmung der Nachweisgrenze, Haselnuss-Assay

% - Anteil	Produkt 1				Produkt 2			
	Ct-Wert				Ct-Wert			
0,5	27.57	26.84	30.70	28.67	29.94	29.37	29.47	29.07
0,1	/	39.24	35.18	39.93	32.04	32.22	32.13	32.31
0,05	43.24	42.99	44.73	41.83	33.49	32.79	33.71	35.16
0,01	36.27	37.52	46.94	37.06	35.28	36.58	36.37	35.26
0,005	36.47	36.33	38.00	36.37	39.43	41.43	39.28	41.27
0,001	40.25	43.34	40.25	40.39	43.65	39.33	36.73	39.81

Erklärung: / wurde als Ausreisser gewertet

In Tabelle 33 und 34 sind die Ct-Werte, die mit den gespikten Proben erhalten wurden, angegeben. Diese unterliegen zwar gewissen Schwankungen, aber es ist klar ersichtlich, dass Mandel und Haselnuss in allen Proben bis zu einer Konzentration von 0,001% nachgewiesen werden konnte.

#### 4.2.10 Nachweis von Mandel und Haselnuss in Modelllebensmitteln

Verschiedene Modelllebensmittel (Krokant, zwei Nussalternativgetränke, ein Marmorkuchen und fünf verschiedene Nougats) wurden unter genau definierten Bedingungen hergestellt. Die jeweilige Rezeptur und die Durchführung sind in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

In der Tabelle 35 sind die Proben und die Extraktionsmethoden, mit denen diese aufgearbeitet wurden, aufgelistet und die jeweils erhaltene DNA-Konzentration und Reinheit angegeben.

**Tabelle 35:** Ausbeute und Reinheit der aus Modelllebensmitteln extrahierten DNA

Probe	Extraktions- methode	c DNA		Reinheit
		[ng/μl]	[ng/gProbe]	[A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]
Krokant Rezept 1	CTAB	32,5	21,2	1,9
Krokant Rezept 2	CTAB	18,5	15,0	1,9
Krokant Rezept 3a	CTAB	31,8	23,0	1,9
Krokant Rezept 3b	CTAB	35,3	24,3	1,8
Haselnuss-Mandel-Milch (Nussalternativgetränk)	CTAB kombiniert mit DNeasy Plant Mini Kit	25,0	0,3	0,7
Haselnuss-Milch (Nussalternativgetränk)	CTAB kombiniert mit DNeasy Plant Mini Kit	22,5	0,3	0,8
Marmorkuchen mit Haselnuss-Mandel-Milch	CTAB	59,0	45,4	1,9
Nougat Rezept 1	CTAB	23,3	12,2	1,4
Nougat Rezept 2	CTAB	25,8	12,9	1,5
Nougat Rezept 3	CTAB	17,8	14,1	1,5
Nougat Rezept 4	CTAB kombiniert mit DNeasy Plant Mini Kit	21,0	20,0	1,7
Nougat Rezept 5	CTAB	272,3	191,7	1,8

Aus den Nussalternativgetränken konnte die DNA nur sehr schwer extrahiert werden. Selbst durch wiederholte Anwendung der Extraktionsmethoden konnte die DNA nicht in ausreichender Konzentration und Reinheit erhalten werden, um sie mittels Real Time PCR amplifizieren zu können. Die DNA-Extraktion aus Nougat machte ebenfalls Schwierigkeiten, was wahrscheinlich an seinem hohen Fettgehalt lag. Schlussendlich konnte die DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit gewonnen werden.

Somit konnten alle Modelllebensmittel, mit Ausnahme der Nussalternativgetränke, mit dem Duplex-Assay untersucht werden. Die Durchführung ist in Kapitel 3.10.2 beschrieben. In Tabelle 36 sind die erhaltenen Ct-Werte zusammengefasst.

**Tabelle 36:** Anwendung des Duplex-Assays auf Modelllebensmittel (Rezepturen siehe Kapitel 3.3.3)

Probe	Gehalt	Ct-Werte			
		Mandel		Haselnuss	
Krokant Rezept 1	+(25%)/-	/	/	26.11	26.14
Krokant Rezept 2	+(25%)/-	/	/	23.98	23.95
Krokant Rezept 3a	+(5%)/+(5%)	28.59	28.56	27.60	27.94
Krokant Rezept 3b	+(5%)/+(5%)	27.91	27.66	26.84	26.06
Marmorkuchen	+/+	/	/	/	/
Nougat Rezept 1	+(35%)/-	/	/	/	/
Nougat Rezept 2	+(18%)/+(18%)	25.22	25.29	/	/
Nougat Rezept 3	+(18%)/-	26.50	25.84	21.75	21.57
Nougat Rezept 4	+(9%)/+(5%)	27.67	26.91	27.93	24.97
Nougat Rezept 5	+(35%)/-	/	/	22.67	22.63
Mandel	-/+	22.67	22.70	/	/
Haselnuss	+/-	/	/	22.40	22.80
Negativkontrolle	-	/	/	/	/

Erklärung: / Signal überschritt nicht den Schwellenwert; + Probe, welche Mandel bzw. Haselnuss enthält; - Probe, welche keine Mandel bzw. Haselnuss enthält

In jenen Proben, die Mandel und/oder Haselnuss enthielten, wurden Mandel und/oder Haselnuss nachgewiesen. Bei den anderen Proben wurde kein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet. Eine Ausnahme stellt Nougat Rezeptur 3 dar. In dieser Probe wurde Mandel-DNA nachgewiesen, welche aber laut Rezeptur nicht enthalten war (siehe 3.3.3.4). Die Detektion von Mandel-DNA im Nougat Rezeptur 3 lässt sich dadurch erklären, dass die bei der Herstellung des Nougat verwendete Kugelmühle Spuren von Nougat der Rezeptur 2 enthielt und somit die nächste Charge, eben Nougat Rezept 3, mit Mandel „verunreinigt“ wurde. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde diese Probe noch einmal mit dem Duplex-Assay im 3-fach Ansatz analysiert.

Tabelle 37: Ergebnis für Nougat Rezeptur 3

Probe	Ct-Werte		
	Mandel		
Nougat Rezept 3	25.42	24.42	25.00
Negativkontrolle	/	/	

Erklärung: / Signal überschritt nicht den Schwellenwert

Aus Tabelle 37 ist zu erkennen, dass Mandel auch bei der neuerliche Analyse in Nougat Rezeptur 3 nachgewiesen werden konnte und somit der Verdacht bestätigt wurde, dass diese Charge mit Mandel „verunreinigt“ war.

Die Ergebnisse zeigen, dass der entwickelte Duplex-Assay die Bestimmung von Mandel und Haselnuss in stark verarbeiteten Lebensmitteln wie Krokant, Marmokuchen und Nougat ermöglicht.

#### **4.2.11 Anwendung des Duplex-Assays auf kommerziell erhältliche Lebensmittel**

Mit dem optimierten Duplex-Assay wurden 15 verschiedene kommerziell erhältliche Lebensmittel analysiert. Manche Produkte enthielten Mandel

und/oder Haselnuss als Zutat. Bei anderen Produkten war ein Hinweis auf der Verpackung zu finden, dass Mandel und/oder Haselnuss im Produkt enthalten sein könnte. Weiters wurden Produkte getestet, bei denen Mandel und/oder Haselnuss auf der Verpackung nicht angeführt waren. Die Durchführung des Duplex-Assays ist in Kapitel 3.10.3.2 beschrieben.

**Tabelle 38:** Bestimmung von Mandel und Haselnuss in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Proben	c DNA		Reinheit [A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ]	Deklaration		Ergebnis	
	[ng/µl]	[ng/g]		Mandel	Hasel-nuss	Mandel	Hasel-nuss
Flakes Mandel-Nuss	139,0	100,7	1,6	+ (10%)	+	+	+
Nussmüsli	164,3	110,9	1,8	+ (9%)	+ (4%)	+	+
Haselnuss-Riegel	207,8	151,6	1,6	+	+ (29%)	+	+
Mandel-Nuss Splitter	157,3	70,5	1,3	+ (25%)	+ (25%)	+	+
Kekse mit Mandeln	22,0	17,5	1,5	+ (9%)	+/-	+	-
Mandelkekse	30,5	19,8	1,4	+ (10%)	+/-	+	-
Mandelhörnchen	185,0	97,9	1,5	+ (6%)	+/-	+	-
Schoko-Banane-Riegel	105,0	80,8	1,6	+	+/-	+	-
Dinkel Kekse	348,8	256,4	1,9	+/-	+/-	-	-
Wellness Flakes	33,3	33,6	1,5	+/-	+/-	-	-
Flakes	78,6	64,9	1,6	+/-	+/-	-	-
Müsliriegel Traube	42,8	32,2	1,7	-	+	-	+
Riegel Haselnuss	215,2	153,7	1,7	-	+ (7%)	-	+
Nuss Zuckergebäck	145,2	125,2	1,6	-	+	-	+
Knuspermüsli	38,0	25,2	2,0	-	-	-	-
Mandel	82,5	75,0	2,0	+	-	+	-
Haselnuss	120,5	96,4	1,9	-	+	-	+
Negativkontrolle	-	-	-	-	-	-	-

Erklärung: (+) mandelhältiges Produkt, (+/-) Produkt war deklariert mit „Kann Spuren von Nüssen“ bzw. „Kann Spuren von Mandeln“ enthalten, (-) Produkt ohne Deklaration von Mandel, / Signal überschritt nicht den Schwellenwert

In den Lebensmitteln, die Mandel und/oder Haselnuss enthielten, wurden diese auch detektiert. Bei den Proben, die gemäß Deklaration Mandel und/oder

Haselnuss enthalten könnten, wurde ein negatives Ergebnis erhalten. In jenen Lebensmitteln, auf deren Verpackung kein Hinweis auf Haselnuss und/oder Mandel angeführt war, konnten diese nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 38).

### **4.2.12 Inhibitionskontrolle von Modelllebensmitteln und kommerziell erhältlichen Lebensmitteln**

Um sicher zu gehen, dass es sich nicht um falsch negative Ergebnisse handelt, wurde bei jenen Proben, für die ein negatives Ergebnis erhalten worden war, eine Inhibitionskontrolle durchgeführt. Insgesamt wurden 17 Proben getestet. Die genaue Durchführung ist unter 3.11.2 beschrieben.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass alle Proben, die mit dem Duplex-Assay nicht amplifiziert wurden, als Negativ-Proben definiert werden können. Das negative Ergebnis war nicht auf eine Inhibition der TaqDNA Polymerase durch Lebensmittelbestandteile zurückzuführen.

### 4.3 Entwurf spezifischer Primer und Sonden für die Detektion von Walnuss (*Juglans regia*) mittels einer Real Time PCR-Methode

#### 4.3.1 Primer und Sonden

Zur Detektion von Walnuss mittels einer Real Time PCR-Methode wurden insgesamt 3 Primerpaare mit dem Programm Beacon Designer 7.0 entworfen. Diese sind in Tabelle 39 aufgelistet. Die genaue Anleitung zum Entwurf der Primer und der TaqMan Sonden ist in Kapitel 3.7.5.1 beschrieben.

Tabelle 39: Entworfenene Primer und TaqMan Sonden, Walnuss

Primer und TaqMan Sonde	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Produktgröße (bp)
Jug r 1-1 Forward	AGATCGACGAGGACATTGAC	55.2	
Jug r 1-1 Reverse	TAGTACTGGCAGTGGTTGAG	54.6	94
Jug r 1-1 TaqMan	TTTGCTGGCGTTGAATCTGCTCCC	65.1	
Jug r 1-2 Forward	CCCTTTTGTTCGTAGCCAAC	55.4	
Jug r 1-2 Reverse	CTTGGGTTGTCAATGTCCTC	54.4	82
Jug r 1-2TaqMan	CCTTCCGCACCACCATAACAACCA	64.3	
Jug r 2 Forward	GAGAACAGTATCGCCAATGC	55.0	
Jug r 2 Reverse	GCTCCCTTTCTTCTTGACTTC	54.8	129
Jug r 2 TaqMan	CTCTTCTAACCGCTCCTCGCACCT	65.0	

#### 4.3.2 Optimierung der Primerkonzentration

Um die ideale Primerkonzentration für den PCR-Assay zu ermitteln, wurden die Primer in Konzentrationen von 100, 200 und 400 nM getestet. Durch die Kombination verschiedener Konzentrationen des Primer Forward und Primer

Reverse der jeweiligen Primerpaare wurden mehrere Master-Mixe hergestellt und für die Amplifikation der Walnuss-DNA mittels einer Real Time PCR verwendet. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.7.5.3 erklärt.

In der folgenden Tabelle sind die erhaltenen Ct-Werte des PCR-Assays aufgelistet. Jene Kombination der Primer, die den niedrigsten Ct-Wert ergab, wurde als optimale Konzentration ausgewählt. Dies führte zu dem Ergebnis, dass Primerpaar 1 (Jug r 1-1 Forward / Reverse) und 2 (Jug r 1-2 Forward / Reverse) mit einer optimalen Konzentration von 200 nM für den Primer Forward und 400 nM für den Primer Reverse eingesetzt wurde. Für das Primerpaar 3 (Jug r 2 Forward / Reverse) wurde eine optimale Konzentration von 400 nM für den Primer Forward und 200 nM für den Primer Reverse ermittelt.

Tabelle 40: Einfluss der Primer Konzentration auf den Ct-Wert

Primerpaar 1			Primerpaar 2			Primerpaar 3		
Primer Forward [nM]	Primer Reverse [nM]	Ct-Wert	Primer Forward [nM]	Primer Reverse [nM]	Ct-Wert	Primer Forward [nM]	Primer Reverse [nM]	Ct-Wert
100	100	26,16	100	100	27,99	100	100	25,20
100	200	24,76	100	200	26,59	100	200	24,89
100	400	24,68	100	400	26,08	100	400	24,64
200	100	24,88	200	100	26,95	200	100	23,92
200	200	24,35	200	200	25,76	200	200	23,85
200	400	23,89	200	400	25,59	200	400	23,59
400	100	24,80	400	100	26,18	400	100	23,84
400	200	24,43	400	200	25,60	400	200	23,09
400	400	24,10	400	400	25,86	400	400	24,29

#### 4.3.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Um zu testen, ob die Primerpaare spezifisch für Walnuss sind, wurden folgende Lebensmittel mit jedem Primerpaar mittels einer Real Time PCR auf Kreuzreaktivität getestet: Haselnuss, Mandel, Cashewkerne, Erdnuss, Sesam, Pekannuss, Paranuss, Sonnenblumenkerne, Weizen, Roggen, Dinkel, Hafer,

Reis, Soja, Traube, Banane, Apfel, Birne, Pflaume, Pfirsich, Erdbeere, Himbeere und Schokolade. Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.7.5.3 und 3.6 beschrieben.

- Primerpaar 1: Jug r 1-1 Forward / Reverse

In der Abbildung 29 sind die Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 1 gebildeten PCR-Produkte dargestellt. Die Schmelztemperatur des in der Walnuss gebildeten Produkts (86.0°C) unterscheidet sich von denen der in den anderen Lebensmitteln gebildeten Produkte.

Das in der Pekannuss gebildete Produkt wies jedoch eine Schmelztemperatur von 84.5°C auf. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass Pekannuss mit diesem Primerpaar kreuzreagiert. Daher wurde dieses Ergebnis mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

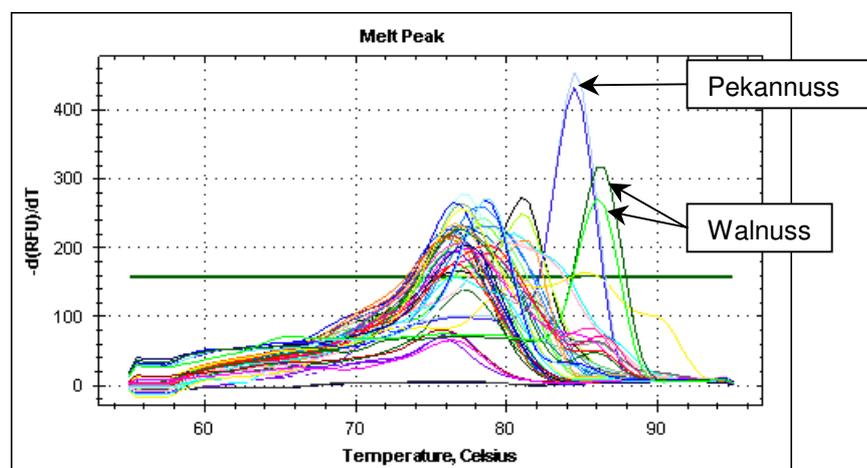
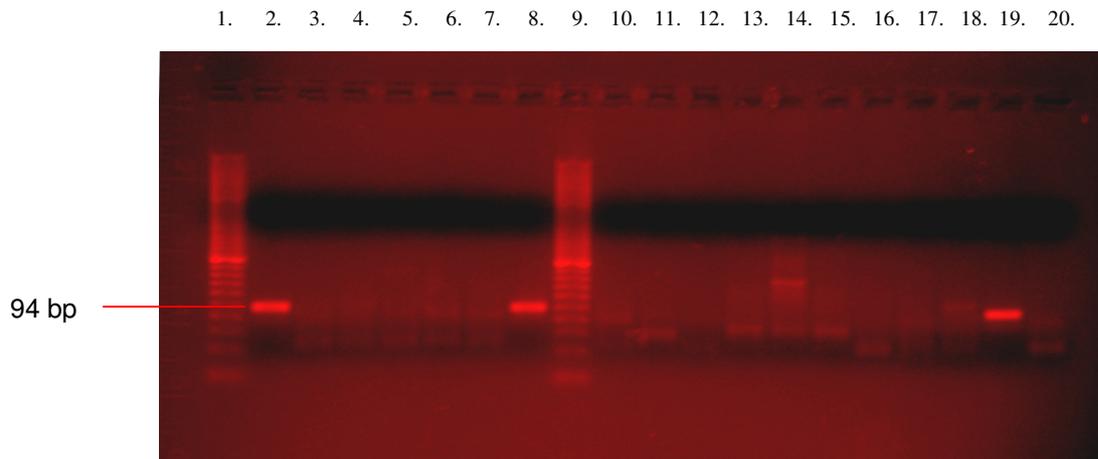


Abbildung 29: Schmelzkurven der mit Primerpaar 1 gebildeten PCR-Produkte

In Abbildung 30 und 31 sind die DNA-Banden der amplifizierten Produkte zu erkennen. Das Primerpaar 1 bildet mit Walnuss-DNA ein Produkt mit einer Länge von 94 bp. Die DNA-Bande bei der Pekannuss liegt auf derselben Höhe wie die der Walnuss-DNA. Bei allen anderen Produkten wurde kein Amplikon mit der Länge von 94 bp gebildet.

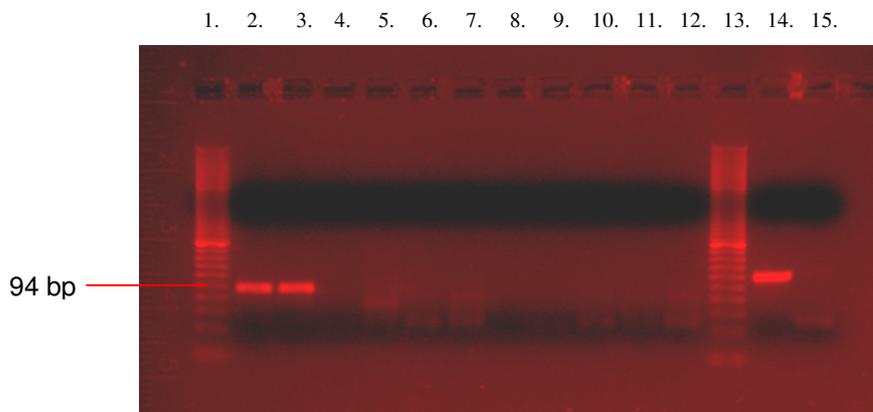
## Ergebnisse

---



**Abbildung 30:** Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Haselnuss; 4. Mandel; 5. Cashewkerne; 6. Erdnuss; 7. Sesam; 8. Pekannuss; 9. 20 bp Marker; 10. Paranuss; 11. Sonnenblumenkerne; 12. Schokolade; 13. Weizen; 14. Roggen; 15. Dinkel; 16. Hafer; 17. Reis; 18. Soja; 19. Walnuss; 20. Negativkontrolle



**Abbildung 31:** Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Pekannuss; 4. Traube; 5. Banane; 6. Apfel; 7. Birne; 8. Pflaume; 9. Pfirsich; 10. Erdbeere; 11. Himbeere; 12. Negativkontrolle; 13. 20 bp Marker; 14. Mandel; 15. Negativkontrolle

Das Ergebnis dieser Versuche lässt darauf schließen, dass die Pekannuss mit dem Primerpaar 1 eine Kreuzreaktivität aufweist und diese Primer somit nicht spezifisch für die Walnuss sind.

- Primerpaar 2: Jug r 1-2 Forward / Reverse

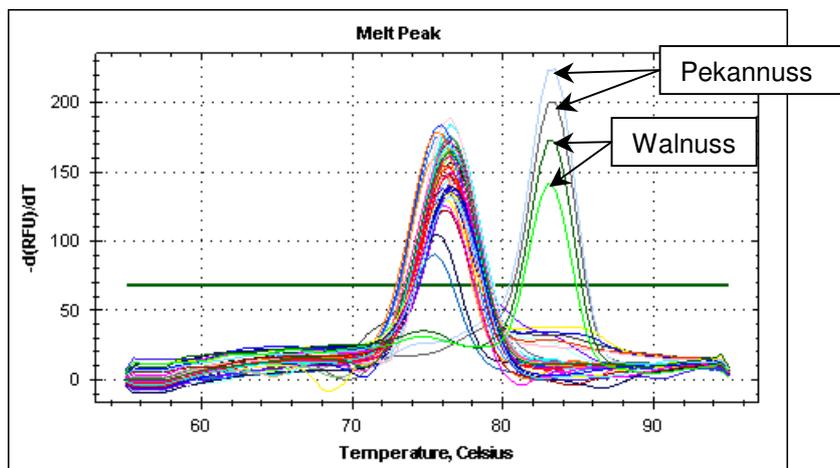


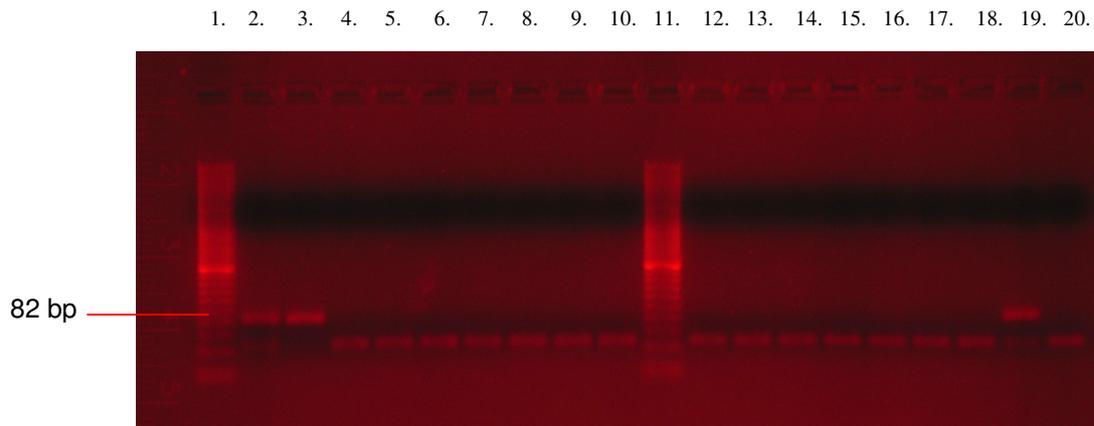
Abbildung 32 : Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 2 gebildeten PCR-Produkte

Das mit dem Primerpaar 2 in der Walnuss gebildete PCR-Produkt hat einen Schmelzpunkt von 83.0°C. Das PCR-Produkt der Pekannuss war das einzige Produkt, das einen ähnlichen Schmelzpunkt (83.5°C) aufwies (siehe Abbildung 32). Dieses Ergebnis weist auf eine Kreuzreaktivität der Pekannuss mit dem Primerpaar 2 hin. Daher wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um eine Information über die Produktgröße zu erhalten.

In den Abbildungen 33 und 34 sind die DNA-Banden der amplifizierten Produkte zu sehen. Die Walnuss bildet mit dem Primerpaar 2 ein Produkt mit einer Länge von 82 bp. Diese Gele beweisen, dass in der Pekannuss ein DNA-Produkt gebildet wird, das sich in der Größe nicht von dem in der Walnuss gebildeten Amplifikat unterscheidet. Die Pekannuss weist damit auch eine Kreuzreaktivität mit dem Primerpaar 2 auf. In den anderen Lebensmitteln wurden mit dem Primerpaar 2 keine PCR-Produkte gebildet. Dieses Primerpaar ist also nicht spezifisch für die Walnuss.

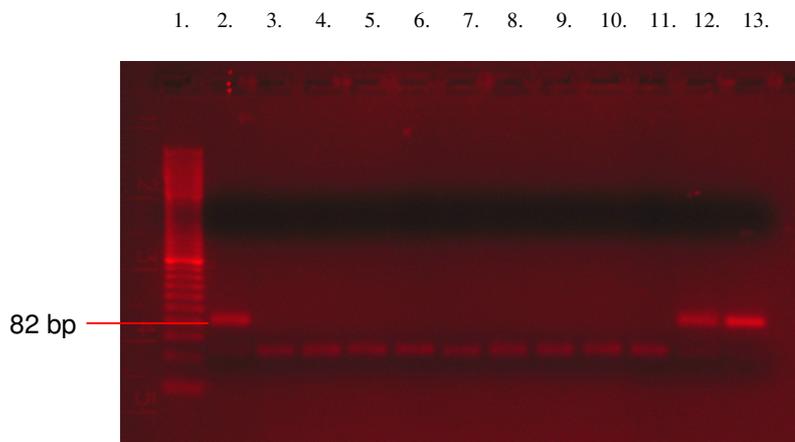
## Ergebnisse

---



**Abbildung 33:** Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Pekannuss; 4. Haselnuss; 5. Mandel; 6. Cashewkerne; 7. Erdnuss; 8. Sesam; 9. Paranuss; 10. Sonnenblumenkerne; 11. 20 bp Marker; 12. Schokolade; 13. Weizen; 14. Roggen; 15. Dinkel; 16. Hafer; 17. Reis; 18. Soja; 19. Walnuss; 20. Negativkontrolle



**Abbildung 34:** Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Traube; 4. Banane; 5. Apfel; 6. Birne; 7. Pflaume; 8. Pfirsich; 9. Erdbeere; 10. Himbeere; 11. Negativkontrolle; 12. Walnuss; 13. Pekannuss

- Primerpaar 3: Jug r 2 Forward / Reverse

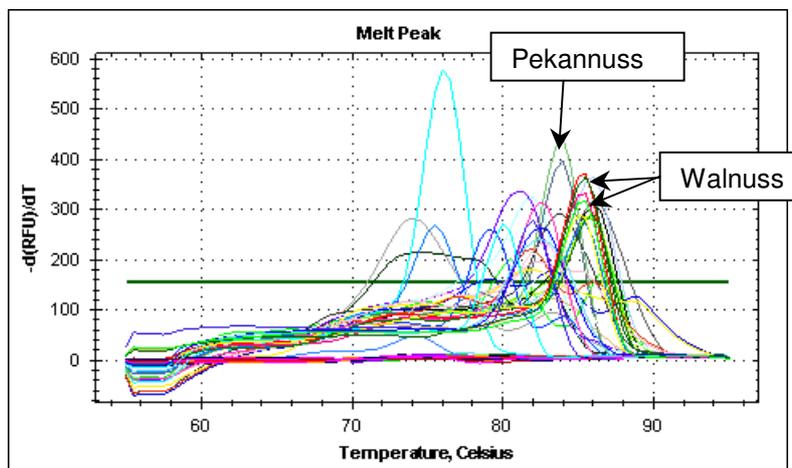


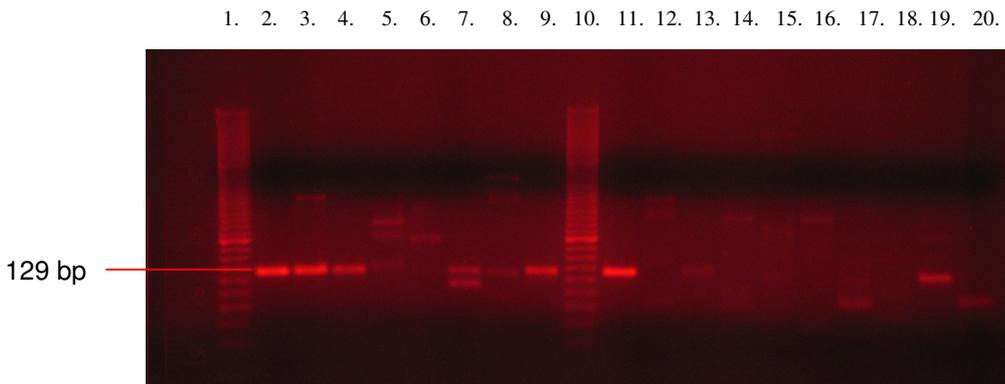
Abbildung 35: Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 3 gebildeten PCR-Produkte

In Abbildung 35 sind die Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 3 amplifizierten Produkte abgebildet. Das PCR-Produkt der Walnuss weist einen Schmelzpunkt von 85.5°C auf, ähnlich verhält sich das Produkt der Haselnuss mit einem Schmelzpunkt zwischen 85.0-86.0°C. Auch die Schmelzpunkte der PCR-Produkte der Pekannuss (86.0°C), der Paranuss (85.5-86.0°C) und der Banane (85.5°C) liegen in diesem Temperaturbereich.

In den folgenden Abbildungen sind die DNA-Banden der amplifizierten Produkte, welche mittels Agarosegelelektrophorese erhalten wurden, zu sehen. Das Amplifikationsprodukt der Walnuss hat eine Länge von 129 bp.

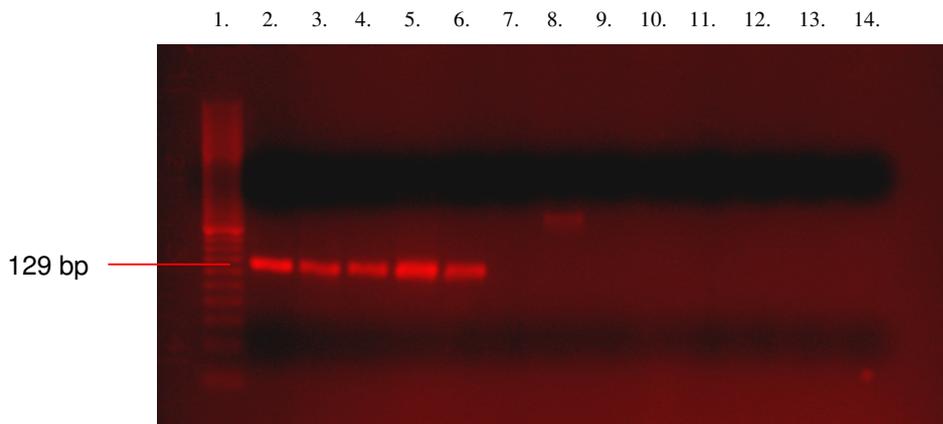
## Ergebnisse

---



**Abbildung 36:** Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Pekannuss; 4. Haselnuss; 5. Mandel; 6. Cashewkerne; 7. Erdnuss; 8. Sesam; 9. Paranuss; 10. 20 bp Marker; 11. Walnuss; 12. Sonnenblumenkerne; 13. Schokolade; 14. Weizen; 15. Roggen; 16. Dinkel; 17. Hafer; 18. Reis; 19. Soja; 20. Negativkontrolle



**Abbildung 37:** Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Paranuss; 4. Haselnuss; 5. Pekannuss; 6. Banane; 7. Apfel; 8. Birne; 9. Pflaume; 10. Pfirsich; 11. Erdbeere; 12. Himbeere; 13. Traube; 14. Negativkontrolle

In den Abbildungen 36 und 37 ist zu erkennen, dass die DNA-Banden der Pekannuss, Haselnuss, Erdnuss, Paranuss, Banane und des Sesams auf einer Höhe mit der DNA-Bande der Walnuss liegen.

Diese Produkte weisen mit dem Primerpaar 3 eine Kreuzreaktivität auf und daher können diese Primer nicht für einen spezifischen Nachweis der Walnuss eingesetzt werden.

Um ausschließen zu können, dass die in der Pekannuss gebildeten PCR-Produkte auf eine Kontamination mit Walnuss zurückzuführen waren, wurden alle Primerpaare noch einmal auf Kreuzreaktivität mit Pekannuss getestet. Aus den dabei erhaltenen Ergebnissen konnte eine Kontamination mit Walnuss-DNA ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keines der entworfenen Primerpaare spezifisch für den Nachweis der Walnuss war und sie daher für die Entwicklung einer Real Time PCR-Methode nicht eingesetzt werden können.

#### **4.3.4 Neuentwicklung eines Primerpaares für die Detektion von Walnuss**

Nach den oben beschriebenen Kreuzreaktivitätstests wurde ein neuer Primer Forward (Jug r 1-1<sub>neu</sub>) anhand der Sequenz des Allergens Jug r 1-1 (NCBI Accession No. U66866) entwickelt, d.h. zum Primer Jug r 1-1 Reverse wurde ein dazu passender Primer Jug r 1-1<sub>neu</sub> Forward gesucht. Dazu wurde zuerst mittels BLAST in der Pekannuss nach mit Jug r 1-1 ähnlichen Sequenzen gesucht. Eine ähnliche Sequenz wies das Gen mit der Accession No. AY192569 auf.

In der folgenden Auflistung (Abbildung 38) ist der Sequenzvergleich beider Gene (Accession No. U66866 und AY192569) dargestellt. Der unterstrichene Teil zeigt den Sequenzabschnitt, zu dem der „alte“ Primer Jug r 1-1 Forward komplementär war. Man sieht, dass sich in diesem Abschnitt die Sequenz in der Walnuss und in der Pekannuss nicht unterscheiden. Daher wurde die Position des „neuen“ Primer Jug r 1-1<sub>neu</sub> Forward soweit verschoben, dass dieser an einer Position ansetzt, an der die Sequenzen nicht identisch sind.

## Ergebnisse

```

Query 1 TAGCAGCTCTCCTTGTAGCCCTTTTGTTCGTAGCCAACGCCGCTGCCTTCCGCACCACCA 60
      |
Sbjct 11 TAGCAGCTCTCCTTGTAGCCCTTTTGTTCGTAGCCAACGCCGCTGCCTTCCGCACCACCA 70

      *Forward Primer
      >
Query 61 TAACAACCATGGAGATCGACGAGGACATTGACAACCCAAGGC GGCGAGGCGAGGGCTGCC 120
      |
Sbjct 71 TAACAACCATGGAGATCGACGAGGACATTGACAACCCGAGAAGGCGAGGCGAGAGCTGCC 130

      TaqMan Sonde
      <
Query 121 GGGAGCAGATTCAACGCCAGCAAAACCTCAACCACTGCCAGTACTACCTGAGGCAGCAAA 180
      |
Sbjct 131 GGAACAGATTCAACGCCAGCAATACTCAATCGCTGCCAGGACTACCTGAGGCAGCAAT 190

Query 181 GCCGGTCAGGGGTTATGATGAAGACAACCAGCGGCAGCATTTCAGGCAGTGTGCCAGC 240
      |
Sbjct 191 GCCGGTCAGGGGTTATGATGAAGACAACCAGCGGCAGCATTTCAGGCAGTGTGCCAGC 250

Query 241 AGCTGAGTCAGATGGACGAGCAGTCCAGTGTGAGGGGTTGAGGCAGGTGGT GAGGCGGC 300
      |
Sbjct 251 AGCTGAGTCAGATGGAGGAGCAGTCCAGTGTGAGGGGTTGAGGCAGGCGGTGAGGCAGC 310

Query 301 AGCAGCAGCAGCAGGGTCTCCGGGTTAGGAAATGGAGGAGATGGTGCAGTCTGCTAGGG 360
      |
Sbjct 311 AGCAGCAGGAGGAGGGTATCCGGGTTAGGAAATGGAGGAGATGGTGCAGTGTCTAGTG 370

Query 361 ACTTGCCAAATGAATGCGGTATCAGCAGCCAGCGCTGTGAAATTCGCAGAAGCTGTTCT 420
      |
Sbjct 371 ACTTGCCAAAAGAATGCGGCATCAGCAGCCGGAGCTGTGAAATTCGCAGAAGCTGTTCT 430

Query 421 AG 422
      |
Sbjct 431 AG 432

```

### Abbildung 38: Sequenzvergleich von Accession No. U66866 (Walnuss) und AY192569 (Pekannuss)

Erklärung:

Query = Walnuss (Accession No. U66866)

Sbjct = Pekannuss (Accession No. AY192569)

\* Forward Primer = Primer Jug r 1-1<sub>neu</sub> Forward: 5' → 3': **ACATTGACAACCCAAGGC**

° Reverse Primer = Primer Jug r 1-1 Reverse: **TAGTACTGGCAGTGGTTGAG**

„alte Primer“ = Jug r 1-1 Forward: AGATCGACGAGGACATTGAC

Das neue Primerpaar und die TaqMan Sonde sind in der Tabelle 41 aufgelistet.

**Tabelle 41:** Neu entworfene Primer und TaqMan Sonde, Walnuss

Primer und TaqMan Sonde	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Produkt- größe (bp)
Jug r 1-1 <sub>neu</sub> Forward	ACATTGACAACCCAAGGC	52.8	
Jug r 1-1 <sub>neu</sub> Reverse	TAGTACTGGCAGTGGTTGAG	54.6	82
Jug r 1-1 <sub>neu</sub> TaqMan	TGCTGGCGTTGAATCTGCTCCC	64.1	

#### 4.3.5 Optimierung der Primerkonzentration des neu entwickelten Primerpaares

Mittels eines SYBR Green-Assays wurde die optimale Konzentration der neu entwickelten Primer bestimmt. Dazu wurden die Primer in Konzentrationen von 100, 200 und 400 nM getestet. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.7.5.3 beschrieben.

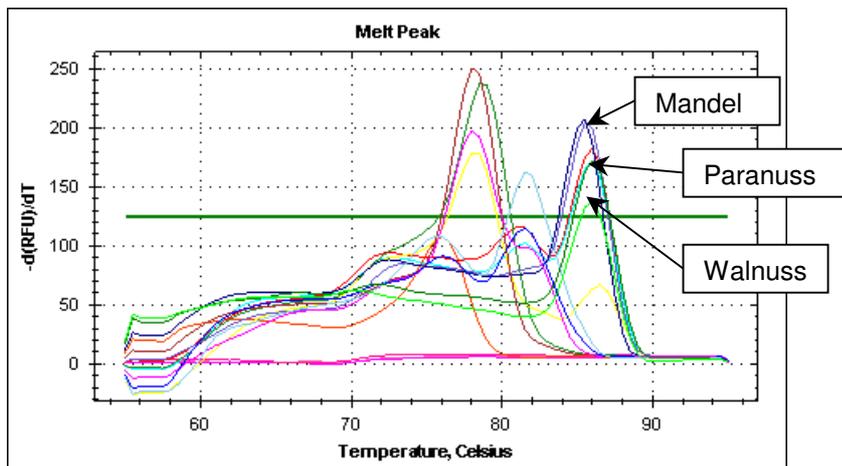
**Tabelle 42:** Einfluss der Konzentration des neuen Primerpaares auf den Ct-Wert

Primerpaar Jug r 1-1 <sub>neu</sub>		
Primer Forward [nM]	Primer Reverse [nM]	Ct-Wert
100	100	26,20
100	200	25,57
100	400	24,84
200	100	25,47
200	200	24,70
200	400	24,42
400	100	25,51
400	200	24,69
400	400	24,31

Der niedrigste Ct-Wert (24,70) wurde erhalten, wenn die Konzentration des Forward und des Reverse Primers 200 nM betrug (siehe Tabelle 42).

### 4.3.6 Bestimmung der Kreuzreaktivität des Primerpaares Jug r 1-1<sub>neu</sub>

Es wurden die DNA-Extrakte von Pekannuss, Mandel, Haselnuss, Sesam, Cashewkernen, Erdnuss und Paranuss auf Kreuzreaktivität mit dem neu entworfenen Primerpaar getestet. Die Proben wurden mittels Real Time PCR analysiert und die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Dieser Versuch wurde genau wie in Kapitel 3.7.5.4 und 3.6 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 39:** Schmelzkurven der mit Primerpaar Jug r 1-1<sub>neu</sub> gebildeten PCR-Produkte

Die Schmelztemperaturen sind in Tabelle 43 zusammengefasst. Dieses Ergebnis deutet auf eine eventuell bestehende Kreuzreaktivität von Mandel und Paranuss mit dem Primerpaar Jug r 1-1<sub>neu</sub> hin.

Tabelle 43: Schmelztemperaturen der gebildeten Produkte

Probe	Schmelztemperatur in °C	
Walnuss	86,0	86,0
Pekannuss	/	81,5
Mandel	85,5	85,5
Paranuss	86,0	86,0

Erklärung: / Signal überschritt nicht den Schwellenwert

In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass die DNA-Bande der Paranuss auf gleicher Höhe der DNA-Bande der Walnuss liegt. Das in der Mandel gebildete Produkt unterschied sich jedoch im Wanderungsverhalten vom in der Walnuss gebildeten Produkt.

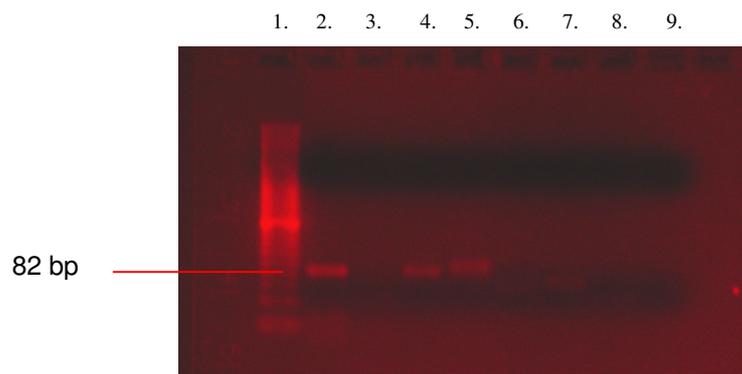
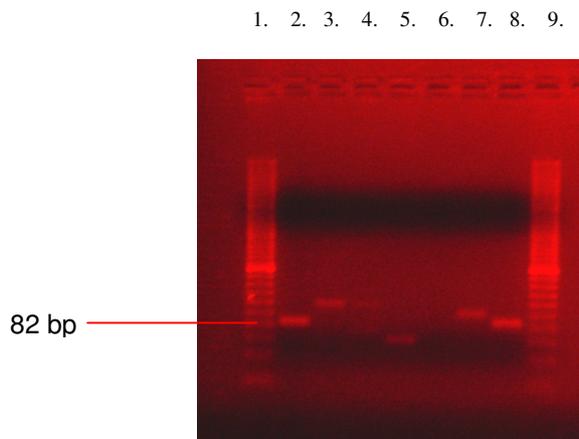


Abbildung 40: Gel der mit Primerpaar Jug r 1-1<sub>neu</sub> erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Pekannuss; 4. Paranuss; 5. Mandel; 6. Haselnuss; 7. Erdnuss; 8. Cashewkerne; 9. Negativkontrolle

Daraus ergibt sich, dass das neu entworfene Primerpaar eventuell eine Kreuzreaktivität mit der Paranuss hat. Zur endgültigen Absicherung wurde die DNA aus Walnuss, Paranuss, Pekannuss, Haselnuss und Mandel noch einmal extrahiert und einer Kreuzreaktivitätstestung unterzogen.



**Abbildung 41:** Gel der mit Primerpaar Jug r 1-1<sub>neu</sub> erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Walnuss; 3. Paranut; 4. Pekannuss; 5. Haselnuss; 6. Negativkontrolle; 7. Mandel; 8. Walnuss; 9. 20 bp Marker

Das Gel, welches in Abbildung 41 dargestellt ist, zeigt, dass das in der Walnuss gebildete Produkt aus 82 bp besteht.

In keinem der auf Kreuzreaktivität untersuchten Lebensmittel wurde ein Produkt dieser Größe gebildet. Es kann daraus geschlossen werden, dass das neu entworfene Primerpaar Jug r 1-1<sub>neu</sub> doch spezifisch für Walnuss ist.

## 4.4 Entwurf spezifischer Primer und Sonden für die Detektion von Traube (*Vitis vinifera*) mittels Real Time PCR

### 4.4.1 Primer und Sonden

In Tabelle 44 sind die Primerpaare aufgelistet, die zum Nachweis eines Genabschnitts des Allergens Chitinase class I Protein entworfen wurden. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.7.5.1 beschrieben.

Tabelle 44: Entworfenene Primer und Sonden

Primer und TaqMan Sonde	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Produkt- größe (bp)
Chit 1 Forward	GAAGTGTGGGTGTGCCTCAG	58.9	117
Chit 1 Reverse	ACCGAGCTACCACTTGAATCAC	58.9	
Chit 1 TaqMan	CCGATTGGCAACCGTCACCGCAGT	68.8	
Chit 2 Forward	GCCTATGTTGCAGTAAGTACGG	57.7	100
Chit 2 Reverse	GAAACCGAGCTACCACTTGAATC	58.4	
Chit 2 TaqMan	CCGATTGGCAACCGTCACCGCAGT	68.8	
Chit 3 Forward	GCAGTGGCTCAGAACTGTGG	59.3	126
Chit 3 Reverse	CGAGCTACCACTTGAATCACAAG	58.4	
Chit 3 TaqMan	CCGATTGGCAACCGTCACCGCAGT	68.8	

### 4.4.2 Optimierung der Primerkonzentration

Zur Optimierung der Primerkonzentration wurde jedes Primerpaar in Konzentrationen von 100, 200 und 400 nM getestet. Das genaue Prozedere ist in Kapitel 3.7.5.3 beschrieben.

- Primerpaar 1: Chit 1 Forward / Reverse

In Tabelle 45 sind die mit den verschiedenen Primerkonzentrationen erhaltenen Ct-Werte aufgelistet. Die optimale Konzentration für den Primer Forward betrug 200 nM und die für den Primer Reverse 400 nM, da unter diesen Bedingungen der niedrigste Ct-Wert (26.27) erhalten wurde.

Tabelle 45: Einfluss der Konzentration des Primerpaares 1 auf den Ct-Wert

<b>Primerpaar 1</b>		
Primer Forward [nM]	Primer Reverse [nM]	Ct-Wert
100	100	28,65
100	200	28,66
100	400	27,04
200	100	26,75
200	200	27,14
200	400	26,27
400	100	26,62
400	200	26,60
400	400	26,38

- Primerpaar 2 und 3: Chit 2 und Chit 3 Forward / Reverse

Die Ct-Werte, welche mit verschiedenen Konzentrationen der Primerpaare 2 und 3 erhalten wurden, sind in Tabelle 46 aufgelistet. Der niedrigste Ct-Wert (27,09 bzw. 25,30) wurde erhalten, wenn die Konzentration des Primer Forward 200 nM und des Reverse 400 nM betrug.

Tabelle 46: Einfluss der Konzentration des Primerpaares 2 und 3 auf den Ct-Wert

Primerpaar 2			Primerpaar 3		
Primer Forward [nM]	Primer Reverse [nM]	Ct-Wert	Primer Forward [nM]	Primer Reverse [nM]	Ct-Wert
100	100	28,52	100	100	28,21
100	200	28,26	100	200	26,01
100	400	27,38	100	400	26,35
200	100	28,31	200	100	27,51
200	200	27,78	200	200	25,71
200	400	27,09	200	400	25,30
400	100	27,94	400	100	25,94
400	200	27,14	400	200	26,93
400	400	27,44	400	400	25,67

#### 4.4.3 Bestimmung der Kreuzreaktivität der Primer

Die DNA folgender Lebensmittel wurde auf Kreuzreaktivität mit den Trauben-Primerpaaren untersucht: Reis, Hafer, Banane, Dinkel, Mandel, Birne, Pfirsich, Pflaume, Apfel, Erdbeere, Himbeere, Kiwi, Papaya, Avocado, Mango, Ananas, Sesam, Walnuss, Sonnenblumenkernen, Haselnuss und Erdnuss. Es wurde eine Real Time PCR und zur weiteren Analyse der PCR-Produkte eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die experimentellen Details sind in den Kapiteln 3.7.5.3 und 3.6 beschrieben.

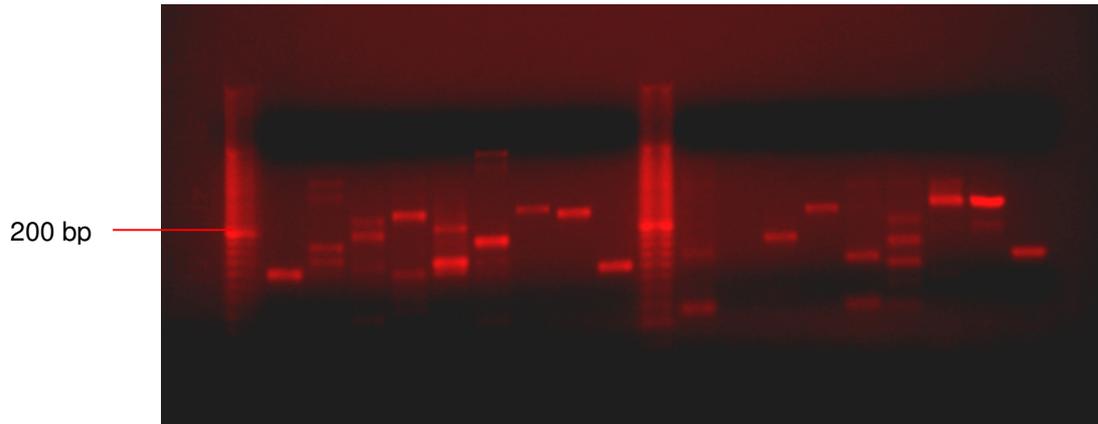
- Primerpaar 1: Chit 1 Forward / Reverse

Bei der Schmelzkurvenanalyse wurde für das in der Traube gebildete Produkt eine Schmelztemperatur von 85,0°C ermittelt. Die in Reis und Ananas gebildeten Produkte wiesen Schmelztemperaturen von 84,5°C und 85,5°C auf.

## Ergebnisse

---

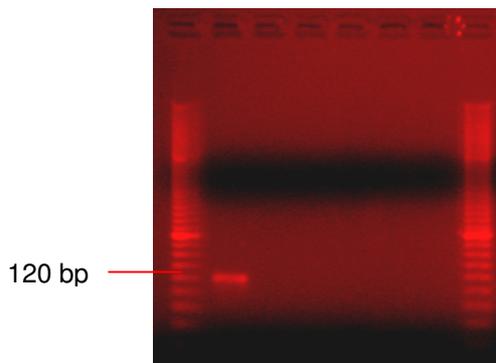
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20.



**Abbildung 42:** Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Traube; 3. Reis; 4. Hafer; 5. Banane; 6. Dinkel; 7. Mandel; 8. Birne; 9. Kiwi; 10. Papaya; 11. 20 bp Marker; 12. Avocado; 13. Mango; 14. Ananas; 15. Sesam; 16. Walnuss; 17. Sonnenblumenkerne; 18. Haselnuss; 19. Erdnuss; 20. Traube

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.



**Abbildung 43:** Gel der mit Primerpaar 1 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Traube; 3. Pfirsich; 4. Pflaume; 5. Apfel; 6. Erdbeere; 7. Himbeere; 8. 20 bp Marker

In den Abbildungen 42 und 43 sind die Agarosegele mit den PCR-Produkten, die mit Primerpaar 1 gebildet wurden, dargestellt. Das Primerpaar 1 bildet in der Traube ein Amplifikationsprodukt mit einer Länge von 117 bp, aber auch unspezifische DNA-Banden in vielen Lebensmitteln. Daher kann das Primerpaar 1 nicht für die spezifische Detektion von Traube eingesetzt werden.

- Primerpaar 2: Chit 2 Forward / Reverse

Die Schmelzkurvenanalyse ergab, dass das in der Traube gebildete Produkt einen Schmelzpunkt von 84.0°C, das in der Avocado von 83.5°C und das in der Banane gebildete Produkt von 80.5°C und 84.0°C hatten.

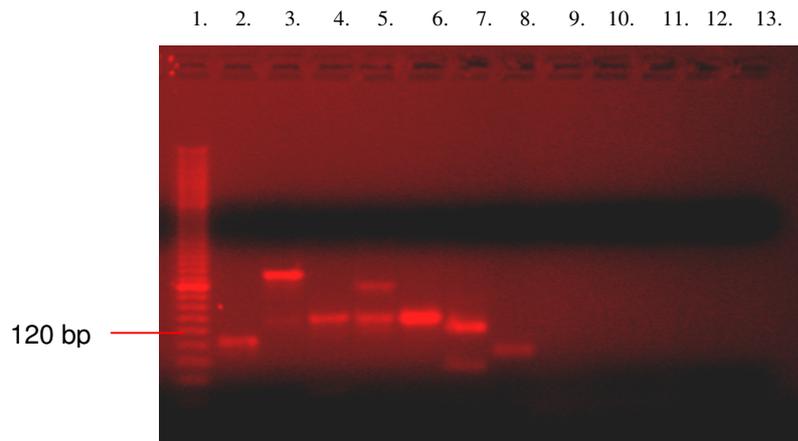


Abbildung 44: Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Traube; 3. Reis; 4. Hafer; 5. Banane; 6. Dinkel; 7. Mandel; 8. Birne; 9. Pfirsich; 10. Pflaume; 11. Apfel; 12. Erdbeere; 13. Himbeere

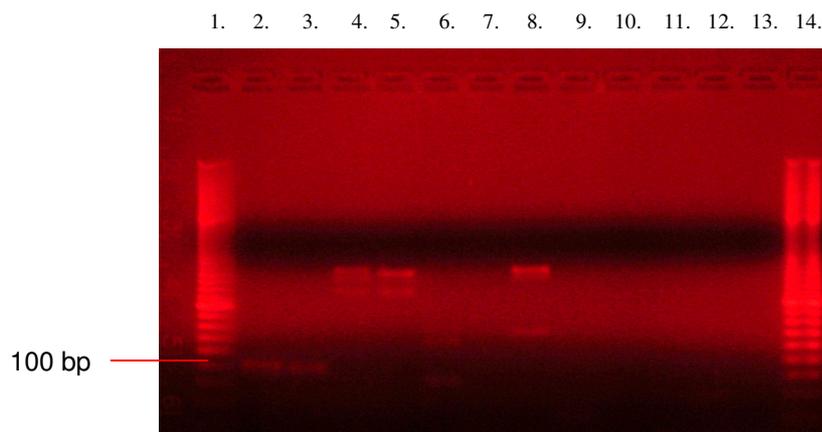


Abbildung 45: Gel der mit Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Traube; 3. Papaya; 4. Avocado; 5. Sesam; 6. Walnuss; 7. Sonnenblumenkerne; 8. Haselnuss; 9. Erdnuss; 10. Kiwi; 11. Mango; 12. Ananas; 13. Negativkontrolle; 14. 20 bp Marker

In den Abbildungen 44 und 45 sind die DNA-Banden der Produkte dargestellt, welche mit dem Primerpaar 2 amplifiziert wurden. In der Traube wurde ein Produkt aus 100 bp gebildet. Die PCR-Produkte, die in der Avocado und der Banane gebildet wurden, unterschieden sich im Wanderungsverhalten von dem in der Traube gebildeten Produkt. Das Primerpaar 2 ist also spezifisch für die Traube.

- Primerpaar 3: Chit 3 Forward / Reverse

Die Schmelzkurvenanalyse ergab, dass Mandel, Haselnuss und Ananas-DNA mit dem Primerpaar 3 Produkte mit gleichem Schmelzpunkt (84,0°C) bilden. Zu klären war also mittels Agarosegelelektrophorese, ob eine Kreuzreaktivität vorliegt.

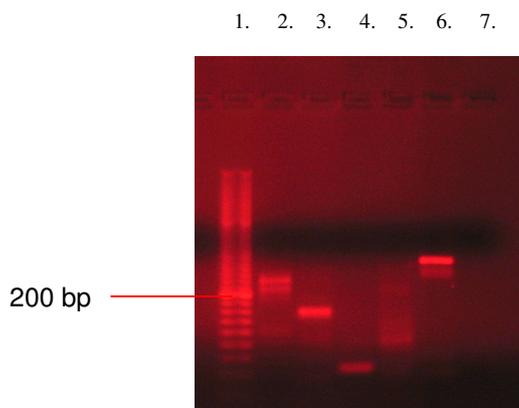
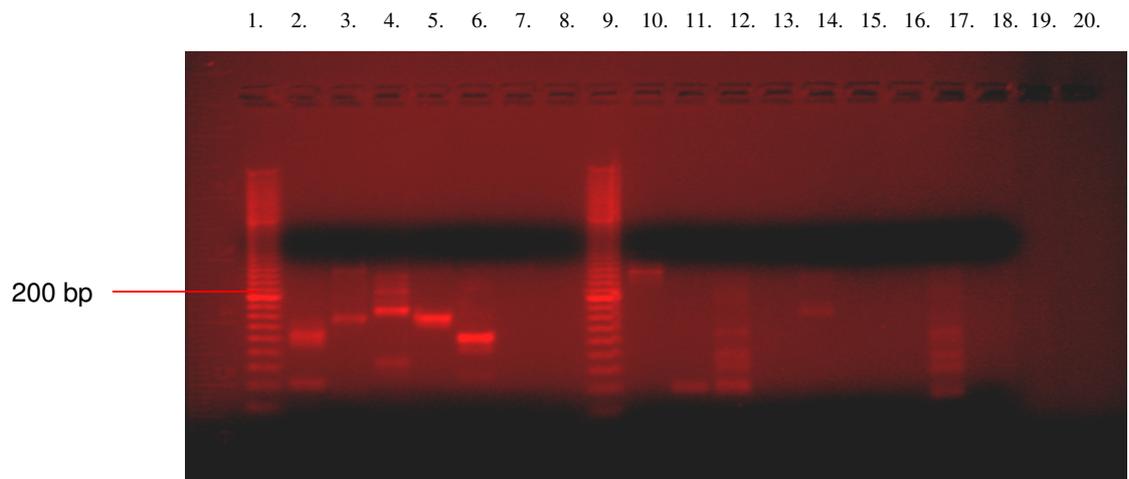


Abbildung 46: Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Reis; 3. Hafer; 4. Banane; 5. Dinkel; 6. Mandel; 7. Negativkontrolle



**Abbildung 47:** Gel der mit Primerpaar 3 erhaltenen PCR-Produkte

1. 20 bp Marker; 2. Sesam; 3. Walnuss; 4. Sonnenblumenkerne; 5. Haselnuss; 6. Erdnuss; 7. Birne; 8. Pfirsich; 9. 20 bp Marker; 10. Ananas; 11. Mango; 12. Avocado; 13. Pflaume; 14. Apfel; 15. Erdbeere; 16. Himbeere; 17. Dinkel; 18. Negativkontrolle

In den Abbildungen 46 und 47 sind die DNA-Banden der Produkte, die mit dem Primerpaar 3 amplifiziert wurden, zu sehen. Mit diesem Primerpaar werden in vielen Lebensmitteln unspezifische DNA-Banden gebildet. In Sesam und Erdnuss weisen die PCR-Produkte eine ähnliche Größe (126 bp) auf wie das in der Traube gebildete Produkt. Das Primerpaar 3 ist daher für eine spezifische Detektion der Traube nicht geeignet.

#### 4.4.4 DNA-Isolierung aus Traubensaft

Die DNA-Extraktion aus Traubensaft stellte sich als relativ schwierig heraus. Es wurde versucht, die DNA mittels der in Kapitel 3.4.5 beschriebenen Präzipitationsmethoden in Kombination mit der CTAB-Methode zu gewinnen. Mit keiner der angewendeten Extraktionsmethoden konnte jedoch DNA ausreichender Menge und Qualität isoliert werden.

## 5. SCHLUSSBETRACHTUNG

In der Analytik von Lebensmittelallergenen werden immunanalytische Methoden, wie z.B. der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), am häufigsten angewendet. Eine noch untergeordnete Rolle spielen auf der Polymerasekettenreaktion basierende Methoden. Bei diesen Methoden wird anstelle eines Proteins ein spezifischer DNA-Abschnitt detektiert.

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war die Entwicklung, Optimierung und Validierung eines Singleplex-Assays zur Bestimmung von Mandel und eines Duplex-Assays zur gleichzeitigen Bestimmung von Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln.

Als erstes wurde ein Singleplex-Assay zur Bestimmung von Mandel ausgearbeitet. Dazu wurde ein Primerpaar und eine TaqMan Sonde, basierend auf der Gensequenz des Allergens Amandin, entwickelt. Die Primer grenzen jenen Abschnitt der DNA-Sequenz ein, der mittels PCR amplifiziert wird. Nach der Optimierung der Primerkonzentration wurden die Primer auf Kreuzreaktivität mit 22 Lebensmitteln getestet. Dabei stellte sich heraus, dass dieses Primerpaar spezifisch für Mandel war und mit keinem der getesteten Lebensmittel eine Kreuzreaktivität zeigte. Zur Ermittlung der Effizienz des entwickelten Assays wurde Mandel-DNA seriell von 1:1 bis zu 1:10000 verdünnt. Die Effizienz des Assays betrug 99,0%, die Nachweisgrenze 500 pg Mandel-DNA.

Um die Anwendbarkeit des Singleplex-Assays zu überprüfen, wurden 27 kommerziell erhältliche Lebensmittel untersucht. Manche dieser Lebensmittel enthielten Mandel, andere trugen einen Hinweis, dass Mandel im Produkt enthalten sein könnte. Auf einer weiteren Gruppe von Lebensmitteln war kein Hinweis auf ein Vorhandensein von Mandel zu finden. In allen Produkten, die Mandel enthielten, konnte diese nachgewiesen werden. In Produkten, die keinen Hinweis auf Spuren von Mandel enthielten, wurde diese nicht detektiert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass durch die Verarbeitung von Lebensmitteln ihre Allergenität verändert werden kann. Andererseits könnte durch die Verarbeitung die DNA so stark denaturiert werden, dass der Nachweis des spezifischen Genabschnittes mittels PCR nicht mehr möglich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher auch geprüft, ob die entwickelte Methode den Nachweis von gerösteten Mandeln ermöglicht. Dazu wurden Mandeln unterschiedlich lang bei verschiedenen Temperaturen geröstet. Anschließend wurde die DNA extrahiert und mittels des Mandel-Assays analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte Methode den Nachweis von gerösteten Mandeln ermöglicht.

Nach der Entwicklung und Validierung des Singleplex-Assays wurde ein Duplex-Assay zur gleichzeitigen Bestimmung von Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln entwickelt. Ein Duplex-Assay stellt eine PCR-Variante dar, bei der gleichzeitig zwei spezifische DNA-Sequenzen im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert werden. Dadurch können in einem Produkt zwei potentiell allergene Lebensmittel detektiert werden. Die Entwicklung eines Duplex-Assays ist allerdings zeitaufwendiger als die eines Singleplex-Assays, da mehrere Optimierungsschritte notwendig sind, um eine optimale Amplifikation beider DNA-Sequenzen zu gewährleisten.

Die Mandel-Primer des Singleplex-Assays wurden an Haselnuss-Primer, welche im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation entworfen worden waren, angepasst. Nachdem verschiedene Parameter, u.a. die Konzentration der Primerpaare und der TaqMan Sonde, optimiert worden waren, konnte sowohl für Mandel-DNA als auch für Haselnuss-DNA eine Nachweisgrenze von 50 pg erreicht werden. Die ermittelte Effizienz des Duplex-Assays betrug für Mandel 103,7% und für Haselnuss 98,4%. Der Duplex-Assay stellte sich als spezifisch für Mandel bzw. Haselnuss heraus, mit 25 getesteten Lebensmitteln wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

Um die Anwendbarkeit des entwickelten Duplex-Assays zu demonstrieren, wurden verschiedene mandel- bzw. haselnusshältige Modelllebensmittel (Krokant, Nougat, Marmorkuchen) und 15 kommerziell erhältliche Lebensmittel

analysiert. In allen Produkten, die Mandel und/oder Haselnuss enthielten, konnten diese nachgewiesen werden. In allen anderen wurden diese nicht detektiert. Nur in einer Nougatmischung, die laut Rezeptur keine Mandel enthielt, konnte diese - aufgrund einer vorangegangenen maschinellen Verunreinigung mit Spuren von mandelhältigem Nougat - nachgewiesen werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung einer Real Time PCR ist das Vorhandensein von DNA in ausreichender Konzentration ( $c = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) und Reinheit. Die CTAB-Methode erwies sich als einfache und kostengünstige Methode zur Extraktion von DNA aus Lebensmitteln mit einem geringen Wassergehalt. Im Gegensatz dazu stellte sich die DNA-Extraktion aus Früchten und flüssigen Proben (z.B. Traubensaft) als schwierig heraus. In diesen Fällen wurde versucht, die verwendeten Extraktionsmethoden untereinander zu kombinieren und zu optimieren, so dass es schlussendlich doch gelang, aus den meisten der untersuchten Lebensmittel DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit zu isolieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch jeweils ein spezifisches Primerpaar zur Detektion von Walnuss und Traube entwickelt. Basierend auf diesen Primerpaaren sollte es möglich sein, Real Time PCR-Methoden zum Nachweis von Walnuss bzw. Traube zu entwickeln.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in dieser Diplomarbeit entwickelten Real Time PCR-Methoden den Nachweis von Spuren an potentiell allergenen Mandeln und/oder Haselnüssen in Lebensmitteln ermöglichen. Die Real Time PCR wird in Zukunft in der Allergenanalytik zunehmend an Bedeutung gewinnen und sollte verstärkt als unabhängige Methode eingesetzt werden, um Ergebnisse, die mit anderen Methoden, wie z.B. mit ELISAs, erhalten wurden, zu validieren.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Diplomarbeit beschreibt die Entwicklung, Optimierung und Validierung einer Singleplex Real Time PCR-Methode zur Bestimmung von potentiell allergener Mandel und einer Duplex Real Time PCR-Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln.

Zum Entwurf der Primer und TaqMan Sonden wurden die Gensequenzen der Allergene Cor a 1 und Amandin herangezogen. Nach der Optimierung der Primerkonzentration wurden die Primer auf Kreuzreaktivität mit Lebensmitteln, die entweder selbst allergische Reaktionen auslösen können oder deren Proteine eventuell Homologien mit den untersuchten Analyten (Allergenen) aufweisen, getestet. Die ausgewählten Primer erwiesen sich als spezifisch für Mandel- bzw. Haselnuss-DNA und zeigten mit keinem der untersuchten Lebensmittel eine Kreuzreaktivität.

Die Effizienz und die Nachweisgrenze der entwickelten Real Time PCR-Methoden wurden mittels seriell (1:1 bis 1:10000) verdünnter Mandel- und/oder Haselnuss-DNA ermittelt. Die Effizienz der Singleplex-Methode betrug 99.0%. Nach einer weiteren Optimierung der Konzentration der Mandel-Primer und der Taqman Sonde wurde auch mit dem Duplex-Assay eine sehr gute Effizienz (Mandel-Assay 103,7%, Haselnuss-Assay 98,4%) erreicht. Die Nachweisgrenze des optimierten Duplex-Assays betrug 50 pg Mandel- bzw. Haselnuss-DNA.

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Real Time PCR-Methoden zu prüfen, wurden unter genau definierten Bedingungen hergestellte Modelllebensmittel (Krokant, Nougat und Marmorkuchen) und kommerziell erhältliche Lebensmittel analysiert. In allen kommerziellen Produkten, bei denen Mandel und/oder Haselnuss auf der Verpackung deklariert war, wurden diese nachgewiesen. Bei der Analyse der Produkte, die laut Verpackungsangabe keine Mandel und/oder Haselnuss enthielten, wurde in allen Fällen ein negatives Ergebnis erhalten.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden außerdem spezifische Primerpaare zur Bestimmung von potentiell allergener Walnuss und Traube entworfen.

## 7. SUMMARY

This diploma thesis describes the development, optimization and validation of a singleplex real time PCR method allowing the determination of potentially allergenic almond and a duplex real time PCR method allowing the simultaneous determination of almond and hazelnut in food.

For the design of the primer pairs and Taqman probes, the genes coding for two major allergenic proteins, Cor a 1 and amandin, were selected. After the optimization of the primer concentration, the primers were tested for cross-reactivity with common food ingredients from almond and/or hazelnut containing foods. The selected primers proved to be specific for almond and hazelnut and did not show any cross-reactivity with the food ingredients tested in the present work.

The efficiency and the limit of detection of the developed real time PCR methods were determined by serially (from 1:1 to 1:10000) diluting almond and/or hazelnut DNA. The efficiency of the singleplex assay was 99.0%. A number of optimization steps had to be carried out to increase the efficiency of the duplex assay. After optimizing the concentration of the almond primers and the TaqMan probe the efficiency of the duplex assay was 103,7% for almond and 98,4% for hazelnut. The limit of detection of the optimized duplex assay was 50 pg of hazelnut and almond DNA.

The applicability of the developed real time PCR assays to determine hazelnut and/or almond in food was investigated by analysing model foods which had been prepared under exactly defined conditions and by analysing commercial foodstuffs. In the products which were declared to contain hazelnut and/or almond these could be detected. For products which didn't have any information on containing hazelnut and/or almond negative results were obtained.

A further topic of the diploma thesis was the design of specific primer pairs for potentially allergenic walnut and grape.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

AKKERDAAS J H, WENSING M, KNULST A C, STEPHAN O, HEFLE S L, AALBERSE R C, VAN REE R. A novel approach for the detection of potentially hazardous pepsin stable hazelnut proteins as contaminants in chocolate-based food. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 7726–7731.

ARLORIO M, CERETI E, COISSON J D, TRAVAGLIA F, MARTELLI A. Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control* 2007; 18: 140-148.

ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES S C, GAUTIER M F, CIURANA C L, VERBEEK E, MOHAMMADI T, KNUL-BRETTLOVA V, AKKERDAAS J H, BULDER I, AALBERSE R C, VAN REE R. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 20-32.

ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, AMATO S. Walnut-induced anaphylaxis with cross-reactivity to hazelnut and brazil nut. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 358-360.

ASERO R, BALLMER-WEBER B, BEYER K, CONTI A, DUBAKIENE R, FERNANDEZ-RIVAS M, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, LIDHOLM J, MUSTAKOV T, ELBERINK J, PUMPHREY R, SKOV P, VAN REE R, VLIEGBOERSTRA B, HILLER R, HOURIHANE J, KOWALSKI M, PAPADOPOULOS N, WAL J-M, MILLS C, VIETHS S. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 135-147.

BESLER M. Determination of allergens in foods. *Trends Anal Chem* 2001; 20: 662-672.

BEYER K, GRISHINA G, BARDINA L, GRISHIN A, SAMPSON H A. Identification of an 11S globulin as a major food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 517-523.

BGBL. II Nr. 111. Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen, mit der die Lebensmittelkennzeichnungsverordnung 1993 – LMKV geändert wird 2005. Quelle: <http://www.sbg.ac.at/ver/links/bgbl/2005b111.pdf> (Stand: 19.9.2008)

BINDER C. Ernährungsdiagnostik und –therapie bei Lebensmittelunverträglichkeiten im Überblick. Ernährungs-Umschau 2005; 52: 411-413.

BREDEHORST R, DAVID K. What establishes a protein as an allergen? J Chromatogr B 2001; 756: 33-40.

BREŽNÁ B, HUDECOVÁ L, KUČHTA T. A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of walnuts in food. Eur Food Res Technol 2006; 223: 373-377.

BURGMAIER-THIELERT E, ENGLER-BLUM G, RAISS C. Nachweis von allergenen Lebensmitteln mittels immunologischen und molekularbiologischen Methoden – Gegenüberstellung von PCR- und ELISA-Verfahren am Beispiel von Erdnuss und Haselnuss. Lebensmittelchemie 2006; 60(1): 150.

BURKS W, BALLMER-WEBER K. Food allergy. Mol Nutr Food Res 2006; 50: 595-603.

BUSTIN S A, NOLAN T. Chemistries. In: A-Z of quantitative PCR (Bustin S A, Hrsg). International University Line 2004; 219-220, 244-246.

CAIAFFA M F, TURSI A, MACCHIA L. Grape anaphylaxis. J Investig Allergol Clin Immunol 2003; 13: 211-212.

CHEN C-Y, LAPSLEY K, BLUMBERG J. A nutrition and health perspective on almonds. J Sci Food Agric 2006; 86: 2245-2250.

CONSTIEN A. Strategien für das Beratungsgespräch mit "Allergiepateinten". Ernährungs-Umschau 2005; 10: 414-415.

EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes (Request Nr. EFSA-Q-2003-016) 2004; 32: 1-197.

FLEISCHER D M, CONOVER-WALKER M K, MATSUI E C, WOOD R A. The natural history of tree nut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 1087-1093.

GARCÍA-ROBAINA J, TORRE-MORÍN F, SÁNCHEZ-MACHÍN I, SÁNCHEZ-MONGE R, BARBER D, LOMBARDERO M, Anaphylaxis induced by exercise and wine. *Allergy* 2001; 56: 357-358.

GAUR V, SETHI D, SALUNKE D. Purification, identification and preliminary crystallographic studies of Pru du amandin, an allergenic protein from *Prunus dulcis*. *Acta Cryst* 2008; 64: 32-35.

GRIMM P. Kennzeichnung von Allergenen. *Ernährungs-Umschau* 2006; 53: 59-60.

HANSEN K, BALLMER-WEBER B K, LÜTTKOPF D, SKOV P S, WÜTHRICH B, BINDSLEV-JENSEN C, VIETHS S, POULSEN L K. Roasted hazelnuts – allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy* 2003; 58: 132-138.

HOLZHAUSER T, VIETHS S. Quantitative sandwich ELISA for determination of traces of hazelnut (*Corylus avellana*) protein in complex food matrixes. *J Agric Food Chem* 1999; 47(10): 4209–4218.

HOLZHAUSER T, WANGORSCH A, VIETHS S. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes. *Eur Food Res Technol* 2000. 211: 360-365.

KIENING M, NIESSNER R, DRS E, BAUMGARTNER S, KRŠKA R, BREMER M, TOMKIES V, REECE P, DANKS C, IMMER U, WELLER M G. Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 3321-3327.

KOCH S. Allergiedeklaration: Rezepturallergene und Kreuzkontaminationen. Ernährungs-Umschau 2006; 53: 146-148.

KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN: Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit, Brüssel, 12. Januar 2000, KOM (1999) 719 endg.

KRIST S, BUCHBAUER G, KLAUSBERGER C. Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle. Springer Verlag, Wien, 2008; 148-155, 269-275, 457-463.

LAUER I, FOETISCH K, KOLARICH D, BALLMER-WEBER B K, CONTI A, ALTMANN F, VIETHS S, SCHEURER S. Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. Biochem J 2004; 383: 327-334.

LIEBEREI R, REISDORFF C. Nutzpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2007; 169-171, 222-225.

LORENZ A R, REESE G, HAUSTEIN D, VIETHS S. Versteckte Allergene in Lebensmitteln – noch immer ein Problem. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2001; 44: 666-675.

MALEKI S J, CHUNG S Y, CHAMPAGNE E T, RAUFMAN J P. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. J Allergy Clin Immunol 2000, 106: 763–768.

MILLS E N C, MADSEN C, SHEWRY P R, WICHERS H J. Food allergens of plant origin – their molecular and evolutionary relationship. Trends in Food Science & Technology 2003; 14: 145-156.

MÖRIXBAUER A, REISELHUBER S. Lebensmittelunverträglichkeiten. In: Nicht alles ist eine Allergie (Kammer für Arbeiter und Angestellte für Oberösterreich, Hrsg). Linz, 2004; 10-20.

MÜLHARDT C. Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006; 80-90, 105-110.

PASINI G, SIMONATO B, GIANNATTASIO M, GEMIGNANI C, CURIONI A. IgE-binding to almond proteins in two CAP-FEIA-negative patients with allergic symptoms to almond as compared to three CAP-FEIA-false-positive subjects. *Allergy* 2000; 55: 955-958.

PASTORELLO E A, VIETHS S, PRAVETTONI V, FARIOLI L, TRAMBAIOLI C, FORTUNATO D, LÜTTKOPF D, CALAMARI M, ANSALONI R, SCIBILIA J, BALLMER-WEBER B K, POULSEN L K, WÜTRICH B, HANSEN K S, ROBINO A M, ORTOLANI C, CONTI A. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 563-570.

PASTORELLO E A, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ORTOLANI C, FORTUNATO D, GIUFFRIDA M G, PERONO GARAFFO L, CALAMARI A M, BRENNAN O, CONTI A. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 350-359.

PIKNOVÁ L, PANGALLO D, KUČHTA T. A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of hazelnuts in food. *Eur Food Res Technol* 2008; 226: 1155-1158.

POLTRONIERI P, CAPPELLO M S, DOHMAE N, CONTI A, FORTUNATO D, PASTORELLO E A, ORTOLANI C, ZACHEO G. Identification and characterisation of the IgE-binding proteins 2S albumin and conglutin gamma in almond (*Prunus dulcis*) seeds. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 97-104.

POMS R E, KLEIN C L, ANKLAM E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam* 2004; 21: 1-31.

REJEB S B, ABBOTT M, DAVIES D, QUERRY J, CLÉROUX C, STRENG C, DELAHAUT P, YEUNG J M. Immunochemical-based method for detection of hazelnut proteins in processed foods. *J AOAC Internat* 2003; 86: 557-563.

RICHTLINIE 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. März 2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften vom 6. Mai 2000.

RICHTLINIE 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angaben der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten. Amtsblatt der Europäischen Union vom 25. November 2003.

RICHTLINIE 2005/26/EG der Kommission vom 21. März 2005 zur Erstellung eines Verzeichnisses von Lebensmittelzutaten oder Stoffen, die vorläufig aus Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG ausgeschlossen werden. Amtsblatt der Europäischen Union vom 20. März 2005.

RICHTLINIE 2007/68/EG DER KOMMISSION vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten. Amtsblatt der Europäischen Union vom 28. November 2007.

RIEDL-SEIFERT R. Die Diagnostik steht und fällt mit der Anamnese. *ÄP Dermatologie Allergologie* 2005; 1: 22-24.

RODRÍGUEZ A, MATHEU V, TRUJILLO M J, MARTÍNEZ M I, BAEZA M L, BARRANCO R, FRUTOS C, ZAPATERO L. Grape allergy in paediatric population. *Allergy* 2004; 59: 362-370.

ROTH L, KORMANN K. Ölpflanzen. *Ecomed, Landsberg*, 2000; 71-72, 97-98.

ROUX K, TEUBER S, ROBOTHAM J, SATHE S. Detection and stability of the major almond allergen in foods. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2131-2136.

SAMPSON H A. (a) Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 717-728.

SAMPSON H A. (b) Food allergy. Part 2: Diagnosis and management. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 981-989.

SAMPSON H A. Food allergy. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 540-547.

SATHE S K, WOLF W, ROUX K H, TEUBER S S, VENKATACHALAM M, SZE-TAO K. Biochemical characterization of Amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis* L.). J Agric Food Chem 2002; 50: 4333-4341.

SAVAZZINI F, MARTINELLI L. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. Anal Chim Acta 2006; 563: 274-282.

SCHÄFER T, BOROWSKI C. Leitlinie Allergieprävention. Ernährungs-Umschau 2004; 51: 361-364.

SCHEIBE B, WEISS W, RUEFF F, PRZYBILLA B, GÖRG A. Detection of trace amounts of hidden allergens: hazelnut and almond proteins in chocolate. J Chromatogr B 2001; 756: 229-237.

SCHOCKER F, LÜTTKOPF D, SCHEURER S, PETERSEN A, CISTERÓ-BAHIMA A, ENRIQUE E, MIGUEL-MONCÍN M S, AKKERDAAS J, REE R, VIETHS S, BECKER W-M. Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: A new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. J Allergy Clin Immunol 2004; 113: 141-147.

SCHOLZ S, LÜTTICKE S, ROHRER C. Optimierung einer Multiplex-PCR. Industrie-Applikationen Biospektrum 2001; 01: 78-79.

SCHÖLL I, JENSEN-JAROLIM E. Die physiologische gastrische Verdauung schützt vor Nahrungsmittelallergien. Ernährung aktuell 2006; 2: 9-12.

SCHÖRINGHUMER K. Anwendung von molekularbiologischen Verfahren zur Herstellung und Bestimmung von Biomolekülen. Dissertation Universität Wien 2008.

SENTI G, BALLMER-WEBER B K, WÜTHRICH B. Nüsse, Samen und Kerne aus allergologischer Sicht. Schweiz Med Wochenschr 2000; 130: 1795-1804.

SHIMADA J, YANO H, MIZUMACHI K. Trends in food allergy research. Sci Technol Trends 2005; 16: 26-35.

SICHERER S H. Food allergy. The Lancet 2002; 360: 701-710.

SICHERER S H, MUNOZ-FURLONG A, BURKS A W, SAMPSON H A. Prevalence of peanut and nut allergy in the United States of America determined by a random digit dial telephone survey. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 559-562.

TAWDE P, VENKATESH Y, WANG F, TEUBER S S, SATHE S K, ROUX K H. Cloning and characterization of profilin (Pru du 4), a cross-reactive almond (*Prunus dulcis*) allergen. J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 915-922.

VASWANI S K, CHANG B W, CAREY R N, HAMILTON R G. Adult onset grape hypersensitivity causing life threatening anaphylaxis. Ann Allergy Asthma Immunol 1999; 83: 25-26.

VENKATACHALAM M, TEUBER S S, ROUX K H, SATHE S K. Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins. J Agric Food Chem 2002; 50: 3544-3548.

VIETHS S. Was macht ein Lebensmittel allergen? Neues zu den strukturellen und biologischen Grundlagen. Lebensmittelchemie 2005; 59: 102.

VOLLMER G, JOSST G, SCHENKER D, STURM W, VREDEN N. Die Inhaltsstoffe – Obst essen ist und bleibt gesund. In: Lebensmittelführer 1: Inhalte, Zusätze, Rückstände (Vollmer G, Hrsg). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995; 100-105.

WEISS W. Neue Regelungen für Allergene und zusammengesetzte Zutaten in der europäischen Lebensmittelkennzeichnung. Ernährung aktuell 2004; 3: 5-7.

WILHELM J, PINGOUD A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Chem Bio Chem 2003; 4: 1120-1128.

YANO T, SAKAI Y, UCHIDA K, NAKAO Y, ISHIHATA K, NAKANO S, YAMADA T, SAKAI S, URISU A, AKIYAMA H, MAITANI T. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction. Biosci Biotechnol Biochem 2007; 71: 1793-1796.

ZWIEAUER K. Allergieprävention. In: Österreichischer Allergiebericht (Verein Altern mit Zukunft, Hrsg). Wien, 2006; 21-24.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

Adresse Caroline Leidinger  
Stadl 47  
A-4090 Engelhartszell

Geburtsdatum 13.12.1982 in Ried i. Innkreis

Familie Vater: Peter Leidinger  
Mutter: Hildegard Leidinger  
Schwester: Petra Leidinger

## AUSBILDUNG

---

seit Jänner 2005 **Universität Wien**  
2. Studienabschnitt Ernährungswissenschaften

Oktober 2002 – **Universität Wien**  
Jänner 2005 1. Studienabschnitt Ernährungswissenschaften

Oktober 2001 – **Universität für Bodenkultur**  
März 2004 Lebensmittel- und Biotechnologie

August 1997 – **BORG Bundesoberstufenrealgymnasium Grieskirchen**  
Juni 2001 ORG mit besonderer Berücksichtigung der musischen  
Ausbildung

September 1993 – **Hauptschule St. Aegidi**  
Juni 1997

September 1989 – **Volksschule Engelhartszell**  
Juni 1993

## **BERUFSERFAHRUNG**

---

1. Oktober – **Wissenschaftliches Universitätspersonal**  
28. Februar 2009 Tätigkeit als Tutorin am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie
1. März – **Wissenschaftliches Universitätspersonal**  
31. Juli 2008 Tätigkeit als Tutorin am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie
25. Jänner 2007 **Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung (AKE), A-1090 Wien**  
*Studentische Aushilfe/Praktikantin*  
Mitwirkung beim Nutrition Day 2007
28. August - 22. September 2006 **Krankenhaus St. Franziskus Grieskirchen**  
*Praktikantin*  
Mitarbeit im Arbeitsgebiet der Diätologen (Klinische Beratungs- und Therapietätigkeit, BIA, eigenverantwortliche Erstellung von Beratungsbroschüren)  
Gemeinschaftsverpflegung im Krankenhaus (Qualitätskontrolle, Lagerhaltung, Hygiene)
8. August – 2. September 2005 **Ritterbräu Privatbrauerei Neumarkt**  
*Praktikantin*  
Labor, Qualitätskontrolle  
Produktion, Gär- und Lagerkeller, Fass- und Flaschenabfüllung
30. August – 26. September 2004 **Efko Frischfrucht und Delikatessen GmbH**  
*Praktikantin*  
Produktionsbereich (Rohwarenaufbereitung, Abfüllung, Verpackung, usw.)
18. August – 19. September 2003 **Reinholdungsverband Schärding und Umgebung**  
*Praktikantin*  
Labor (Probenentnahme, Probenanalyse, Protokollführung, usw.)

August 2002      **Kinderfreunde Ferien und Freizeit Gemeinnützige GmbH**  
*Praktikantin*  
Gemeinschaftsverpflegung

## **WISSENSCHAFTLICHES ARBEITEN**

---

28. – 30. Mai      **Österreichische Lebensmittelchemikertage 2008**, Eisenstadt  
2008              Pflanzliche Lebensmittel – Wein, Obst, Gemüse – Qualität und  
Sicherheit  
Posterpräsentation: Bestimmung von potentiell allergenen Mandeln  
(Prunus dulcis) mittels Real Time PCR [C. Leidinger, K.  
Schöringhumer, M. Cichna-Markl]

25. April 2008    **Vienna Research Platform of Nutrition and Food Sciences**  
**(VRPNFS)**  
New aspects in quality and biofunctionality of foods  
Universität Wien, Department of Nutritional Sciences  
Posterpräsentation: Development of a Real Time PCR method to  
determine potentially allergenic almonds in food [C. Leidinger, K.  
Schöringhumer, M. Cichna-Markl]

## **SONSTIGE INFORMATIONEN**

---

**Sprachkenntnisse**      Deutsch: Muttersprache  
Englisch: fließend  
Französisch, Spanisch: Grundkenntnisse

**IT Skills**              Microsoft Office Programme  
SPSS

**Hobbies**              Sport (Laufen, Bergwandern, Radfahren, Volleyball)  
Lesen  
Reisen

**Sonstiges**              Mitgliedschaft ÖGE  
Mitgliedschaft VEÖ