



universität
wien

MASTERARBEIT

Vergleich kommerzieller DNA-Isolierungsmethoden zur
Speziesidentifizierung in Käse mittels Real-Time PCR

Verfasserin

Nicole Kaar, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer: Ao.Univ. Prof. Dipl-Ing. Dr. nat. techn. Helmut Mayer

Univ. f. Bodenkultur, DLWT

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Univ.Prof. DI Dr. Helmut Mayer für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Dabei haben mich die gute Zusammenarbeit und die konstruktiven Gespräche bei der Bewältigung der Aufgabenstellung unterstützt.

Mein Dank gilt auch der Laborantin Iris Biedermann, die mir bei Schwierigkeiten im Labor mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Auch meinen Kollegen im Labor sei an dieser Stelle für das ausgesprochen angenehme und herzliche Arbeitsklima gedankt.

Das größte Dankeschön geht an meine Familie und Freunde, die mich durch alle Höhen und Tiefen des Studentenlebens begleitet und mir dabei immer den Rücken gestärkt haben. Insbesondere bin ich meinen Eltern dankbar, da sie mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern mir auch stets nach Kräften unterstützend zur Seite gestanden haben.

Speziell erwähnt sei hier auch noch mein Freund Sebastian, der sich mit bewundernswerter Motivation durch jede einzelne Seite dieser Arbeit gewühlt hat, um sie zu korrigieren. Nur durch unser gegenseitiges Motivieren war es mir möglich, das Studium so schnell und gut abzuschließen. Denn er hat immer an mich geglaubt und mir ständig Mut zugesprochen, was mir als eine große Stütze diente.

Abstract

Food authenticity has increasingly acquired importance due to the increasing problem of adulteration of dairy products and the lack of declaration. Therefore consumers have to be protected against mislabeling and fraud. Especially high quality compounds of dairy products get replaced by cheap quality compounds. Hereby ovine and caprine products get adulterated with cheaper bovine milk. DNA-based methods, which can detect very small amounts of DNA, have been developed and therefore play an important role in species identification. In this thesis a species-specific PCR was applied for the qualitative detection of bovine milk in different cheeses, whereas a Real-Time PCR was used for quantification. Primers were used targeting the bovine mitochondrial 12S ribosomal RNA gene obtaining a 256 bp amplified fragment. Real-Time PCR used a fluorescence detection system working with SYBR Green I as dye using the melting-curve analysis for improving the specificity. To evaluate the optimal DNA isolation method, two isolation kits, namely DNeasy Blood & Tissue kit and Wizard DNA Clean-Up system, were compared and discussed. Both, a photometric absorption measurement and also the Real-Time PCR showed that the Wizard method led to a higher DNA quality and quantity. In the Wizard method different elution volumes were used, whereat a two-time elution in 50 µl AE-buffer was found to be the ideal volume. Two standard series were used to quantify unknown samples, which both showed outliers, which had to be excluded of the series. Wolfpassing series showed more stable data, but the general DNA concentration was lower according to the photometric absorption results. By quantifying the unknown samples with the Wolfpassing series, it was shown that this series was not compatible with the samples. This was supported by comparing the two standard series, because the Wolfpassing series was shifted above, leading to different percentages of cow milk with the same C_t value of the sample. In contrast, the Bryndza series led to more accurate results, but by comparing it with the first unknown samples, it was shown, that no standard existed to quantify samples with very low amounts of cow milk. All the other samples showed lower cow milk percentages as detected by isoelectric focusing. These findings emphasize on the one hand the use of adequate standards, which are equivalent to the samples, and on the other hand the high fluctuation of the Real-Time PCR method results comparing them to the results of the isoelectric focusing method.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis	
II.	Tabellenverzeichnis	
III.	Abkürzungsverzeichnis	
1.	Problemstellung und Ziel der Arbeit	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1.	Milch- und Milchprodukte	2
2.1.1.	Kuhmilch	3
2.1.1.1.	Zusammensetzung und ernährungsphysiologische Bedeutung	3
2.1.1.2.	Milchverarbeitung und Käseherstellung	5
2.1.1.3.	Allergenes Potential von Kuhmilch	6
2.1.2.	Ziegen- und Schafmilch	8
2.1.2.1.	Zusammensetzung und ernährungsphysiologische Bedeutung	8
2.1.2.2.	Allergenes Potential von Ziegen- und Schafmilch	9
2.2.	Nachweismethoden von Kuhmilch-DNA in Milchprodukten	10
2.2.1.	Immunologische Nachweismethoden	11
2.2.1.1.	Radio-allergosorbent Test (RAST) / Enzymo-allergosorbent Test (EAST)	12
2.2.1.2.	Rocket immuno-electrophoresis (RIE)	13
2.2.1.3.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	13
2.2.2.	Elektrophoretische und Chromatographische Methoden	14
2.2.2.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	15
2.2.2.2.	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	16
2.2.2.3.	High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	17
2.2.3.	DNA-basierte Nachweismethoden	18
2.2.3.1.	Polymerasekettenreaktion	18
2.2.3.2.	Speziesspezifische PCR	20
2.2.3.3.	Duplex- und Multiplex-PCR	21
2.2.3.4.	weitere PCR-basierte Methoden	22
2.2.4.	Real-Time PCR	24
2.2.4.1.	Prinzip	24
2.2.4.2.	Primerdesign und Amplikonauswahl	28
2.2.4.3.	Real-Time PCR Ergebnisse und Interpretation	29
2.2.4.4.	Quantifizierung	33
2.2.4.5.	Anwendung der Real-Time PCR im Lebensmittelbereich	34
2.3.	DNA-Isolierungsmethoden	37
2.3.1.	Prinzip	37

2.3.2. Vergleich verschiedener DNA-Isolierungsmethoden.....	39
3. Material und Methoden.....	41
3.1. Probenmaterial.....	41
3.1.1. Standardreihe.....	41
3.1.2. Handelsproben.....	42
3.2. DNA-Isolierung.....	44
3.2.1. Wizard-Methode.....	44
3.2.1.1. Prinzip.....	44
3.2.1.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien.....	45
3.2.1.3. Herstellung der Lösungen.....	45
3.2.1.4. Durchführung.....	46
3.2.1.4.1. Extraktion und Lyse.....	46
3.2.1.4.2. Wizard DNA Clean-Up System.....	47
3.2.2. Qiagen-Methode.....	49
3.2.2.1. Prinzip.....	49
3.2.2.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien.....	49
3.2.2.3. Durchführung.....	50
3.2.3. DNA-Ausbeute und –Qualität.....	51
3.2.3.1. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien.....	51
3.2.3.2. Durchführung.....	51
3.2.3.3. Berechnung der DNA-Konzentration bzw. DNA-Ausbeute.....	52
3.2.4. Anwendung.....	52
3.3. PCR.....	53
3.3.1. Prinzip.....	53
3.3.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien.....	53
3.3.3. Herstellung der Lösungen.....	54
3.3.4. Primer.....	55
3.3.5. Durchführung.....	55
3.3.6. Thermoprotokoll.....	56
3.4. Agarosegelelektrophorese.....	57
3.4.1. Prinzip.....	57
3.4.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien.....	57
3.4.3. Herstellung der Lösungen.....	59
3.4.4. Durchführung.....	60
3.4.4.1. Gelherstellung.....	60
3.4.4.2. Probenvorbereitung und Probenauftragung.....	61
3.4.4.3. Färben, Entfärben, und Fotografieren des Gels.....	61

3.5. Real-Time-PCR.....	62
3.5.1. Prinzip.....	62
3.5.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien.....	63
3.5.3. Durchführung.....	64
3.5.4. Thermoprotokoll.....	65
3.5.5. Auswertung.....	65
4. Ergebnisse und Diskussion.....	66
4.1. Empirische Bestimmung der optimalen Isolierungsmethode.....	66
4.1.1. Vergleich kommerzieller Isolierungsmethoden: Wizard vs. Qiagen.....	67
4.1.1.1. Photometrische Absorptionsmessung.....	67
4.1.1.2. Quantifizierung mittels Real-Time PCR.....	69
4.1.2. Vergleich verschiedener Eluivolumina in der Wizard-Methode.....	72
4.1.2.1. Photometrische Absorptionsmessung.....	72
4.1.2.2. Quantifizierung mittels Real-Time PCR.....	74
4.2. Evaluierung der Standardreihen.....	78
4.2.1. Photometrische Absorptionsmessung.....	78
4.2.1.1. Winter(Z)-Bryndza.....	78
4.2.1.2. Wolfpassing und Negativkontrollen.....	79
4.2.2. Qualitativer Nachweis des Kuhmilchanteils und empirische Bestimmung des optimalen Temperaturprogrammes mittels PCR und Gelelektrophorese.....	80
4.2.2.1. Winter(Z)-Bryndza.....	80
4.2.2.2. Wolfpassing-Reihe.....	83
4.2.3. Quantitativer Nachweis des Kuhmilchanteils mittels Real-Time PCR.....	86
4.2.3.1. Winter(Z)-Bryndza.....	86
4.2.3.2. Wolfpassing.....	91
4.3. Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben.....	95
4.3.1. Photometrische Absorptionsmessung.....	95
4.3.2. Qualitativer Nachweis des Kuhmilchanteils und empirische Bestimmung des optimalen Temperaturprogrammes mittels PCR und Gelelektrophorese.....	96
4.3.3. Quantitativer Nachweis des Kuhmilchanteils mittels Real-Time PCR.....	100
4.3.3.1. Vergleich mit Winter(Z)-Bryndza als Standardreihe.....	100
4.3.3.2. Vergleich mit Wolfpassing als Standardreihe.....	108
4.3.3.3. Vergleich der Standardgeraden.....	118
5. Schlussbetrachtung.....	122
6. Zusammenfassung.....	126
7. Literaturverzeichnis.....	127

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	SYBR Green I als Fluorochrom in der Real-Time PCR.....	25
Abbildung 2:	TaqMan-Sonden, Molecular Beacon, und Hybridisierungssonden als Fluorochrom in der Real-Time PCR.....	27
Abbildung 3:	Amplifikationskurve einer Real-Time PCR.....	30
Abbildung 4:	Standardkurve einer Real-Time PCR.....	32
Abbildung 5:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven [Wizard, CB 1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	70
Abbildung 6:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven [Qiagen, CB 1/2, Annealingtemperatur 62°C]	71
Abbildung 7:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Eluervolumina.....	77
Abbildung 8:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 59°C [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero 1 / Cow-Bottero 2].....	80
Abbildung 9:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 60°C [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2].....	81
Abbildung 10:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 61°C [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2].....	82
Abbildung 11:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 62°C [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2].....	82
Abbildung 12:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 60°C [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2].....	83
Abbildung 13:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 61°C [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2].....	84
Abbildung 14:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 62°C [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2].....	80
Abbildung 15:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Versuchen mit 3,8% [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	88
Abbildung 16:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Versuchen ohne 3,8% [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	89
Abbildung 17:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich aller Ansätze ohne 3,8% [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	89

Abbildung 18:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	90
Abbildung 19:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Versuchen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	92
Abbildung 20:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich aller Ansätze [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	93
Abbildung 21:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	93
Abbildung 22:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Schmelzkurvenanalyse [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	94
Abbildung 23:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 59°C [Handelsproben, Cow-Bottero1/2].....	97
Abbildung 24:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 60°C [Handelsproben, Cow-Bottero1/2].....	98
Abbildung 25:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 61°C [Handelsproben, Cow-Bottero1/2].....	99
Abbildung 26:	Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 62°C [Handelsproben, Cow-Bottero1/2].....	99
Abbildung 27:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben - Gruppe 1 – Amplifikationskurve [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	102
Abbildung 28:	Vergleich der Kuhmilchanteil-Ergebnisse der Gruppe 1 [IEF, Bryndza, Wolfpassing].....	110
Abbildung 29:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben – Gruppe 1 – Amplifikationskurven [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	111
Abbildung 30:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben – Gruppe 1 – Schmelzkurvenanalyse [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	112
Abbildung 31:	Vergleich der Kuhmilchanteil-Ergebnisse der Gruppe 2 [IEF, Bryndza, Wolfpassing].....	115
Abbildung 32:	Vergleich der Kuhmilchanteil-Ergebnisse der Gruppe 3 [IEF, Bryndza,	

	Wolfpassing].....	118
Abbildung 33:	Vergleich der Winter(Z)-Bryndza- und Wolfpassing-Standardreihe – Gruppe 1.....	119
Abbildung 34:	Vergleich der Winter(Z)-Bryndza- und Wolfpassing-Standardreihe – Gruppe 2.....	120
Abbildung 35:	Vergleich der Winter(Z)-Bryndza- und Wolfpassing-Standardreihe – Gruppe 3.....	121

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Winter (Z)-Bryndza – Kuhmilchanteil laut Hersteller bzw. mit IEF korrigiert.....	41
Tabelle 2:	Wolfpassing – Kuhmilchanteil laut Hersteller.....	42
Tabelle 3:	Negativproben – 100%Ziegenmilch und 100% Schafmilch.....	42
Tabelle 4:	Probengruppe 1 – Kuhmilchanteil laut IEF.....	43
Tabelle 5:	Probengruppe 2 – Kuhmilchanteil laut IEF.....	43
Tabelle 6:	Probengruppe 3 – Kuhmilchanteil laut IEF.....	43
Tabelle 7:	Geräte und Hilfsmittel für DNA-Isolierung (Wizard).....	45
Tabelle 8:	Reagenzien und Lösungen für DNA-Isolierung (Wizard).....	45
Tabelle 9:	Vergleich verschiedener Eluervolumina.....	48
Tabelle 10:	Geräte und Hilfsmittel für DNA-Isolierung (Qiagen).....	49
Tabelle 11:	Reagenzien und Lösungen für DNA-Isolierung (Qiagen).....	50
Tabelle 12:	Geräte und Hilfsmittel für Photometermessung.....	51
Tabelle 13:	Geräte und Hilfsmittel für PCR.....	53
Tabelle 14:	Reagenzien und Lösungen für PCR.....	54
Tabelle 15:	Mastermix-Zusammensetzung für PCR.....	54
Tabelle 16:	Mastermix-Herstellung.....	55
Tabelle 17:	Rinderspezifisches Primerpaar.....	55
Tabelle 18:	Pipettierschema für PCR.....	56
Tabelle 19:	Temperatur-Zeit-Programm für PCR.....	56
Tabelle 20:	Geräte und Hilfsmittel für Agarosegelelektrophorese.....	57
Tabelle 21:	Reagenzien und Lösungen für Agarosegelelektrophorese.....	58
Tabelle 22:	Zusammensetzung des 2%igen Agarosegels.....	61
Tabelle 23:	Geräte und Hilfsmittel in Real-Time PCR.....	63
Tabelle 24:	Reagenzien und Lösungen in Real-Time PCR.....	63
Tabelle 25:	Pipettierschema für Real-Time PCR.....	64
Tabelle 26:	Temperatur-Zeit-Programm für Real-Time PCR.....	65
Tabelle 27:	Absorptionsmessung – Vergleich der DNA-Ausbeute und –Reinheit mittels Photometer zwischen Qiagen- und Wizard-Methode.....	68
Tabelle 28:	Absorptionsmessung – Vergleich der DNA-Ausbeute und –Reinheit zwischen den Photometern U-2000 und U-2900.....	69
Tabelle 29:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen Wizard und Qiagen.....	69
Tabelle 30:	Absorptionsmessung – Abhängigkeit der DNA-Ausbeute und –Qualität von	

	unterschiedlichen Eluivolumina.....	73
Tabelle 31:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Eluivolumina.....	76
Tabelle 32:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der Geradengleichungen bei verschiedenen Eluivolumina.....	77
Tabelle 33:	Absorptionsmessung – Winter(Z)-Bryndza-Standardreihe.....	78
Tabelle 34:	Absorptionsmessung – Wolfpassing-Standardreihe.....	79
Tabelle 35:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	87
Tabelle 36:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	91
Tabelle 37:	Absorptionsmessung – Handelsproben.....	95
Tabelle 38:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 1 – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	101
Tabelle 39:	C_t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil in % aller Ansätze in Gruppe 1 [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	101
Tabelle 40:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 2 – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	103
Tabelle 41:	C_t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 2 [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	105
Tabelle 42:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 3 – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	106
Tabelle 43:	C_t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 3 [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	107
Tabelle 44:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 1 – Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope	

	zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	108
Tabelle 45:	C _t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 1 [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	109
Tabelle 46:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 2 – Vergleich der C _t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	113
Tabelle 47:	C _t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 2 [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	114
Tabelle 48:	Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 3 – Vergleich der C _t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	116
Tabelle 49:	C _t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 3 [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C].....	117

III. Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Absorption bei 260nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280nm
Abb	Abbildung
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw	beziehungsweise
ca	circa
CB	Cow Bottero
CLA	conjugated linoleic acid
C _t	Cycle of threshold
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cytB	Cytochrom B
cytO	Cytochrom Oxidase
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
E	Effizienz
EAST	Enzymo-allergosorbent test
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EU	Europäische Union
EW	Einwaage
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FS	Fettsäure
g	Beschleunigung
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GH	Wachstumshormon
GMO	Genetisch modifizierter Organismus
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgE	Immunglobulin E
IP	Isoelektrischer Punkt

Kap	Kapitel
kg	Kilogramm
Konz	Konzentration
LDL	Low Density Lipoprotein
mA	Megaampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
nm	nanometer
nM	nanomolar
NTC	no-template-control
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
ÖGE	Österreichische Gesellschaft für Ernährung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	pikogramm
pmol	pikomol
R ²	Bestimmtheitsmaß
RAST	radio-allergosorbent test
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RIE	Rocket immuno-electrophoresis
RPM	revolutions per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	slope (=Kurvenabstand)
S	Steigung der Standardgeraden
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
STABW	Standardabweichung
t	Tonnen
Tab	Tabelle
TBE	Trishydroxymethylaminomethan
TM	Schmelztemperatur

UHQ	ultra high quality
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vo	Verordnung
Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent

1. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Milch und Milchprodukte nehmen aufgrund ihrer ernährungsphysiologischen Einzigartigkeit einen immer wichtigeren Stellenwert ein. So liefern sie neben einer bedeutenden Menge an hochwertigem Protein und leicht verdaulichen Fetten auch eine Reihe an essentiellen Nährstoffen.

Immer häufiger kommt es zu Verfälschungen von Lebensmitteln mit qualitativ minderwertigeren oder billigeren Inhaltsstoffen. Nicht selten wird den teuren Schaf- und Ziegenmilchprodukten billigere Kuhmilch zugesetzt, was zur Täuschung des Konsumenten und somit zu Wettbewerbsverzerrungen führt. Dadurch entstehen nicht nur gesundheitliche Risiken, die sich in allergischen Reaktionen oder Unverträglichkeiten äußern können, sondern es ist auch deshalb problematisch, da manche Menschen den Kuhmilchkonsum aus verschiedensten religiösen, ethischen, oder kulturellen Beweggründen ablehnen.

Neben diversen gesetzlichen Regelungen zum Schutz des Verbrauchers vor Täuschung und Irreführung werden auch zuverlässige und kosteneffektive Nachweisverfahren benötigt, damit möglichst geringe Spuren an Kuhmilch nachgewiesen werden können. Zusätzlich zu den immunologischen, elektrophoretischen, und chromatographischen Methoden haben vor allem die DNA-basierten Methoden immer stärker an Bedeutung gewonnen. Diese zeichnen sich durch ihre rasche, einfache, und kostengünstige Durchführbarkeit aus, wobei gleichzeitig sehr niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden können.

Im Rahmen dieser Masterarbeit soll zunächst eine optimale DNA-Isolierungsmethode gefunden werden, damit eine möglichst reine und hochwertige DNA aus der komplexen Käsematrix extrahiert werden kann. Neben dem Vergleich kommerzieller Isolierungskits soll anschließend die exakte Isolierungsmethode anhand verschiedener Versuche mit unterschiedlichen Eluivolumina optimiert werden. Danach soll eine speziesspezifische PCR-Methode zum Kuhmilch-Nachweis in Schaf- und Ziegenmilchkäsen empirisch bestimmt werden, wobei das Ziel eine verlässliche Unterscheidung zwischen verfälschten und unverfälschten Schaf- bzw. Ziegenkäsen ist.

Zuletzt soll anhand bekannter Käseproben ein Real-Time PCR-System entwickelt werden, das neben dem qualitativen Nachweis auch eine Quantifizierung des Kuhmilchanteils ermöglicht. Hierzu sollen zwei verschiedene Standardreihen verwendet werden, wobei auf mögliche Unterschiede zu achten ist.

2. Literaturübersicht

In diesem Abschnitt wird zuerst auf die grundlegende Thematik Milch- und Milchprodukte eingegangen. Dabei wird sowohl bei Kuh- als auch Ziegen- bzw. Schafmilch auf die Zusammensetzung, die ernährungsphysiologische Bedeutung, das allergene Potential, und die verschiedenen Herstellungs- und Verarbeitungsmöglichkeiten ein Blick geworfen.

Schließlich werden diverse Nachweismethoden von Kuhmilch-DNA in Milchprodukten präsentiert, wobei neben der Erläuterung der immunologischen, elektrophoretischen, und chromatographischen Methoden vor allem auf die DNA-basierten Methoden wie PCR und Real-Time PCR eingegangen wird. Zuletzt werden verschiedene DNA-Extraktionsmethoden diskutiert.

2.1. Milch- und Milchprodukte

Die Bezeichnung „Milch“ definiert sich als die aus den Milchdrüsen weiblicher Tiere abgesonderte Flüssigkeit, die alle wichtigen Nährstoffe für die Ernährung der Nachkommen enthält [EBERMANN, 2008]. Milch galt schon immer als Hauptnahrungsquelle und somit -energielieferant für Säugetiere. Während der frühe Mensch anfänglich seinen Calciumbedarf hauptsächlich in Form von calciumreichen Pflanzen decken konnte, kam es, nachdem erstmals Getreide zur Hauptnahrungsquelle wurde, zu einem drastischen Abfall der Calcium-Aufnahme. Erst durch die Domestizierung von Tieren übernahm Milch eine dominante Rolle in der Calcium-Versorgung des Menschen. Während Milch- und Milchprodukte in westlichen Ernährungsempfehlungen eine entscheidende Rolle spielen, wird, weltweit gesehen, vor allem in fernöstlichen Ländern nur wenig Milch konsumiert.

Ihre Bedeutung in den Industrieländern verdankt Milch vor allem ihrer hohen Nährstoffdichte und dem damit verbundenen Gehalt an vielen essentiellen Nährstoffen. So liefern Milchprodukte der amerikanischen Bevölkerung ca. 70% des täglichen Calcium-, 16% des Magnesium-, 18% des Vitamin-B12-, 15% des Zink-, und 25% des Riboflavinbedarfs, während Milch- und Milchprodukte beinahe alleine zur Deckung des Vitamin-D-Bedarfs zuständig sind [WEAVER, 2010].

In den letzten 50 Jahren hat der Milchproduktkonsum in Österreich, mit Ausnahme des Käsekonsums, stetig abgenommen. Österreicher konsumieren mehr als 50% ihres täglich aufgenommenen Calciums in Form von Milchprodukten, wobei auch der Jodgehalt zum Großteil über sie abgedeckt wird. Dieser hohe Jodgehalt, der jedoch starken Jahreszeitenschwankungen unterliegt, ist in der immer häufigeren Anwendung von Jodzusätzen im Futter von Kühen begründet. Österreich lag 2006 mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 92,5 kg Milch im EU-Durchschnitt von 92,7 kg. Zu diesem Verbrauch zählen nicht nur Trinkmilch, sondern auch andere Milchprodukte, mit Ausnahme von Käse, Obers, Rahm,

und Butter. Obwohl der Milchkonsum seit einigen Jahren als konstant betrachtet wird, war der Verbrauch in den 50er/60er Jahren weitaus höher. Gleichzeitig kam es jedoch zu einer Steigerung des Käse- und Obers-Konsums, wobei 2006 der Pro-Kopf-Verbrauch von Käse bei 18,4 kg lag.

Sowohl die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) als auch die Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE) empfehlen einen täglichen Verzehr von zwei bis drei Portionen an Milchprodukten, wobei diese Empfehlung laut Österreichischem Ernährungsbericht 2008 von keiner Altersgruppe in Österreich erreicht werden konnte [ELMADFA et al., 2009].

2.1.1. Kuhmilch

Österreich produzierte im Jahr 2009 3.230.000 t Kuhmilch und erreichte damit ein Plus von 1,1% gegenüber dem Vorjahr. Dabei wurde der Großteil, nämlich 83,9%, der Kuhmilch weiterverarbeitet. 2009 wurden etwa 532.000 Milchkühe in Österreich gehalten, wobei die Jahresmilchleistung je Tier um 0,1% gegenüber dem Jahre 2008 zunahm [STATISTIK AUSTRIA]. Im Jahr 2010 erlebte die österreichische Rohmilchproduktion ebenso ein leichtes Plus von 0,9%. Zusätzlich stieg die Anzahl der Milchkühe in Österreich um 0,3%, während die Milchleistung je Tier um 0,5% zunahm. Nur 9,3% der Milch wurden dabei als Futter für Kälber und andere Haustiere verwendet [LANDWIRTSCHAFTSKAMMER ÖSTERREICH].

2.1.1.1. Zusammensetzung und ernährungsphysiologische Bedeutung

Milch ist eine neutrale bis schwach saure Suspension aus Eiweiß und Fettkügelchen, die in protein-, laktose-, und salzhaltigem Wasser schwimmen. Kuhmilch setzt sich neben 83-87% Wasser aus 3-5% Fett, 3-3,5% Eiweiß, 4-5% Kohlenhydrate, und 1% Mineralstoffe und Vitamine zusammen, wobei die prozentuellen Anteile stark von der Rasse, vom Futter, und von der Haltung abhängen. Da es beim Melkvorgang zur Ausschüttung des Hypophysenhormons Oxytocin kommt, welches zur Vergrößerung der Permeabilität von Membranen in den Drüsen und somit zum Übergang von höher molekularen Proteinen und auch Fetten in die Milch führt, ändert sich die Milchezusammensetzung während des gesamten Melkvorgangs [EBERMANN, 2008].

Milchprodukte liefern einen beträchtlichen Anteil der täglich empfohlenen Fettzufuhr, wobei bei österreichischen Erwachsenen rund 15-20% des Gesamtfetts in Form von Milchprodukten konsumiert

wird [ELMADFA et al., 2009]. Das Milchfett findet man in Form von Fetttropfchen, sogenannten Fettmicellen, vor, die sich in einer Wasser-Emulsion befinden. Eine Membran, die aus Glykoproteinen, Cholesterin, polaren Fetten, und Enzymen besteht, umgibt diese Micellen. Sie ist sehr instabil und kann auch schon beim Pumpen oder Abkühlen der Milch beschädigt werden [EBERMANN, 2008].

Die chemische Fettzusammensetzung ist ebenso sowohl von der Tierspezies als auch von der Rasse abhängig und sehr komplex [SOYEURT und GENGLER, 2008]. So findet man in Kuhmilch über 60 verschiedene Fettsäuren (FS), wobei die Ölsäure und Palmitinsäure mit je einem Anteil von 28%, gefolgt von der Stearinsäure und Myristinsäure mit je einem Anteil von 11%, zu den Hauptfettsäuren zählen. Das Vorkommen von Buttersäure mit 3% und weiteren niederen FS zählt zu den typischen Charakteristika von Kuhmilch. Buttersäure kommt dabei nur im Milchfett vor, weshalb ihr Vorkommen sehr häufig zum Milchnachweis verwendet wird [EBERMANN, 2008]. Milchfett besteht zu 70% aus gesättigten FS, 25% einfach ungesättigten FS, und nur 5% mehrfach ungesättigten FS. Da gesättigte Fettsäuren häufig mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko in Verbindung gebracht werden, wird schon seit Langem versucht, die Milchfettzusammensetzung positiv zu modifizieren. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass nicht nur das Futter, sondern auch die genetische Komponente eine entscheidende Rolle in der Milchfettzusammensetzung spielt [SOYEURT und GENGLER, 2008].

Zusätzlich findet man im Milchfett etwa 2-4% trans-Fettsäuren, wobei der Großteil davon in Form von konjugierten Linolsäuren (CLA), die im Kuh-Pansen durch Mikroorganismen gebildet werden, vorkommt [ELMADFA et al., 2009]. Der CLA-Gehalt der Milch unterliegt großen Schwankungen, wobei gezeigt werden konnte, dass Milch aus Weidehaltung in höheren Lagen weit mehr CLA aufweist als Milch von Flachland-Kühen [COLLEMB et al., 2002]. Konjugierte Linolsäuren führen neben der Hemmung des Krebszell-Wachstums und einer Verbesserung des Glukosestoffwechsels bzw. der Insulinwirkung auch zu einer verminderten Entzündungsreaktion. Zusätzlich zeigen CLA auch eine antiatherogene Wirkung auf, was sich in einer Senkung der Triglyzeride und der LDL-Konzentration bzw. in einer Erhöhung des guten HDL-Cholesterins im Blut äußert [ROCHE, 2001]. Viele Milchproduzenten suchen nach Möglichkeiten, den CLA-Anteil in Milchprodukten zu erhöhen, damit der Konsument von deren positiven Wirkungen profitiert. Dabei kann die CLA-Konzentration der Milch durch veränderte Fütterung mit Ölsaaten oder Linolensäure-angereicherten Pflanzen gesteigert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass den Tieren synthetische Mixturen aus CLA-Isomeren verabreicht werden [SORENSEN et al., 2008].

Bei den Milchproteinen unterscheidet man zwischen Molkeproteinen und Caseinen, wobei Letztere etwa 80% und somit die Hauptmenge der Milchproteine ausmachen. Caseine, welche sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrem Molekulargewicht unterscheiden, werden in 4 Gruppen

eingeteilt: α 1-Casein, α 2-Casein, β -Casein, und κ -Casein. Sie können durch Gel-Elektrophorese getrennt und somit zur Tierspeziesidentifizierung herangezogen werden, wobei mit ihrer Hilfe auch Aussagen über die Rinderrasse getroffen werden können. Zu den Molkeproteinen zählen die Albumine und Globuline, die neben Laktose, diversen Immunoglobulinen, sowie mehreren Enzymen wichtige Bestandteile der Molke ausmachen. β -Laktoglobuline können dabei ebenso zur Speziesidentifizierung verwendet werden [MONACI et al., 2006].

Das Hauptkohlehydrat Laktose, das 4,8% der Kuhmilch ausmacht, gibt der Milch und den Milchprodukten deren Süßkraft. Des Weiteren enthält die Milch geringe Mengen an Glukose und Oligosaccharide. Bezüglich der Vitamine findet man die fettlöslichen Vitamine A, D, und E vor allem im Rahm. Im Gegensatz dazu bleiben die wasserlöslichen Vitamine B und C zu über 90% in der Molke vorhanden. Größere Mengen findet man vor allem von Pantothersäure, Riboflavin, Vitamin A, Vitamin E, und Vitamin C. Zusätzlich sind alle essentiellen Mineralstoffe und Spurenelemente in Milch enthalten, wobei Kalium, Calcium, Natrium, Magnesium, Phosphat, Citrat, und Chlorid als Hauptvertreter zu nennen sind [EBERMANN, 2008].

2.1.1.2. Milchverarbeitung und Käseherstellung

Da Milchprodukte aufgrund verschiedener Inhaltsstoffe nur zeitlich begrenzt haltbar sind, wird praktisch die gesamte im Handel ankommende Milch durch Pasteurisieren, Sterilisieren, Trocknen, oder Säuren haltbar gemacht. Konservierungsmittel dürfen hingegen nicht zugesetzt werden. Aus Rohmilch können sowohl fermentierte Milchprodukte wie Sauerrahm, Joghurt, oder Käse als auch nicht-fermentierte Produkte wie Milch, Obers, oder Buttermilch hergestellt werden. Butter nimmt dabei eine Zwischenstellung ein, da sie sowohl aus gesäuertem als auch nicht-gesäuertem Rahm hergestellt werden kann. Da Rohmilch aus hygienischen Gründen eher als problematisch angesehen wird, spielt der Rohmilchkonsum nur eine untergeordnete Rolle [EBERMANN, 2008].

Nachdem der Fettgehalt durch Entrahmung mittels Zentrifuge auf einen bestimmten Prozentsatz eingestellt wurde, wird die Rohmilch im Hochdruckhomogenisator bei bis zu 350 bar und bis zu 75°C homogenisiert. Durch das Aufbrechen der Fettmicellen-Membranen und der damit verbundenen Homogenisierung der Milch kommt es zu vielen technologischen Vorteilen. Erst nach anschließender Pasteurisation bzw. Sterilisation kann die Milch in den Handel und somit an Kunden verkauft werden. Pasteurisation ist gesetzlich vorgeschrieben, wobei die Kurzzeiterhitzung (71-74°C für 30-40 Sekunden) als gebräuchlichste Methode gilt [EBERMANN, 2008].

Zur Käseherstellung, die als Konservierungsmöglichkeit der Milch gilt, wird gesäuerte Milch verwendet, die durch Abpressen der Molke erzeugt wird. Als erstes Produkt entsteht Frischkäse, der als Topfen oder Quark konsumiert werden kann. Des Weiteren kann dieser Frischkäse weiteren Fermentations- und Reifungsschritten unterzogen werden. Der Käse besteht hauptsächlich aus Casein, Fett, und Wasser, wobei während des Fermentationprozesses Casein und Fett teilweise abgebaut werden und gleichzeitig typische Aromastoffe entstehen. Zusätzlich kommt es während der Fermentation und Lagerung aufgrund des Trocknungsprozesses zum Absinken des Wassergehaltes. Casein wird durch Zusatz von Säuren, säurebildenden Bakterien, oder Zusatz von Lab ausgefällt, wobei sich innerhalb einiger Stunden ein zunehmend stabiles Caseingel bildet. Dieses wird anschließend mit rotierenden Messern geschnitten. Zur weiteren Reifung werden spezielle Kulturen von Mikroorganismen, die zum Käsebruch führen, verwendet. Nach dem Pressen in eine geeignete Form erhält man den frischen Käse, der als grüner Käse bezeichnet wird. Zuletzt werden die Käselaike mit trockenem Kochsalz eingerieben oder in 20%ige Kochsalzlösung eingetaucht. Dabei kommt es zur Verfestigung der Käsestruktur, zur Käserindenbildung, und zur Konservierung aufgrund des Absinkens der Wasseraktivität [EBERMANN, 2008].

2.1.1.3. Allergenes Potential von Kuhmilch

Kuhmilchproteinallergie ist eine der häufigsten Nahrungsmittelallergien und betrifft 2-6% aller Kinder, wobei die höchste Prävalenz bei den unter 1-Jährigen zu finden ist. Während die Kuhmilchallergie bei 50% der betroffenen Kinder innerhalb des ersten Lebensjahres verschwindet, so wächst sie bis zu einem Alter von 5 Jahren bei 80-90% der erkrankten Kinder aus. Viele Eltern diagnostizieren Kuhmilchproteinallergie bei ihren Kindern selbst, wobei diese Diagnose etwa viermal häufiger gestellt wird, als es der tatsächlichen Prävalenz entspricht. Dadurch verordnen Eltern ihren Kindern häufig unnötige Diätpläne, die letztendlich zu einer gestörten Ernährungsbalance führen, was zu erheblichen Nährstoffmängeln führen kann [CAFFARELLI et al., 2010].

Bei Kuhmilchallergie unterscheidet man zwischen einer IgE-vermittelten Reaktion, die innerhalb von 30 Minuten nach Aufnahme der Kuhmilch auftritt, und einer nicht-IgE-vermittelten Reaktion, die erst Stunden bis Tage nach der Allergenaufnahme Symptome verursacht. Erstere äußert sich in akuter Nesselsucht, akutem Angioödem, vermehrtem Keuchen, Schnupfen, trockenem Husten, Erbrechen, Kehlkopfödem, akutem Asthma, und letztendlich auch im anaphylaktischen Schock. Bei der verspäteten Reaktion kommt es vor allem zu atopischer Dermatitis, chronischem Durchfall, Blut im Stuhl, Reflux, chronischem Erbrechen, Wachstumsstörungen, Proteinmangel mit Hypoalbuminämie,

und zu Enterocolitis-Symptomen. Die Diagnose ist sehr schwer zu stellen und es existiert bis jetzt noch kein sicherer diagnostischer Test [CAFFARELLI et al., 2010].

Zu den Allergenen, die eine Kuhmilchallergie auslösen können, zählen neben verschiedenen Caseinen vor allem β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin. Dabei übernimmt das β -Lactoglobulin eine entscheidende Rolle als Milchallergen. Durch eine entsprechende enzymatische oder physikalische Behandlung kann die Allergenität des β -Lactoglobulins modifiziert werden. Eine Erhitzung bei 80-100°C für 15 Minuten führt zu einer starken Reduzierung von β -Lactoglobulin, wobei jedoch meist eine Rest-Allergenität zurück bleibt [TOMOTAKE et al., 2009].

Es gibt eine große Vielfalt an Alternativen für Kuhmilchallergiker. Als Beispiel ist hier das hochgradige Hydrolysat zu nennen, wobei 10% der Kinder auch auf dieses nicht vertragen. In diesem Produkt wird das darin enthaltene Kuhmilcheiweiß so stark in kleine Bruchstücke aufgespaltet bzw. hydrolysiert, dass es in der Regel gut von Kuhmilch-Allergikern vertragen wird. Soja-Produkte sollten nicht vor dem sechsten Lebensmonat aufgenommen werden, da sie vor allem gastrointestinale Symptome verursachen können. Eine weitere Alternative stellen die nicht-allergen Aminosäuremischungen dar, die jedoch aufgrund ihrer hohen Kosten und der geschmacklichen Beeinträchtigung nur selten zur Anwendung kommen. Insbesondere sollten Kinder mit gastrointestinalen Reaktionen und Blutarmut, schlechtem Wachstum, oder Hypoalbuminämie diese Aminosäuremischungen erhalten und danach langsam auf hochgradiges Hydrolysat umgestellt werden.

Bezüglich Säuglingsmilch auf Reisbasis als Kuhmilchalternative liegen sehr unterschiedliche Studienergebnisse vor. So fanden australische Forscher heraus, dass diese Reisallergene als wirkende Allergene sehr häufig im Enterocolitis-Syndrom involviert waren, während italienische Kinder mit Kuhmilchallergie Säuglingsnahrung auf Reisbasis sehr gut tolerierten [CAFFARELLI et al., 2010].

Ziegenmilch wird im Vergleich zu Kuhmilch als weniger allergen eingestuft, wobei dies auf den niedrigeren Gehalt an α s1-Casein, das ebenso eines der Hauptallergene der Kuhmilch darstellt, zurückzuführen ist [TOMOTAKE et al., 2009].

2.1.2. Ziegen- und Schafmilch

In den letzten Jahren sind Ziegen- und Schafmilch immer populärer geworden und deren Produkte werden mittlerweile schon in vielen Supermärkten angeboten. Jedoch ist die Bedeutung von Ziegen- und Schafmilch in der österreichischen Milchindustrie gering, da sie nur 0,3% bzw. 0,4% der gesamten Milchproduktion in Österreich ausmachen. Nichtsdestotrotz stieg die Ziegenmilchproduktion zwischen 2004 und 2006 um 12% [ELMADFA et al., 2008].

2009 wurden 9.200 t Schaf- bzw. 17.900 t Ziegenmilch produziert, wobei ein Produktionsplus von 15,7% bzw. 4,2% gegenüber dem Vorjahr erreicht werden konnte. Beide Milchsorten werden zum Großteil für die menschliche Ernährung eingesetzt, während nur ein geringer Teil für andere Zwecke wie zur Verfütterung an Tiere oder zur Herstellung von Kosmetika benutzt wird [STATISTIK AUSTRIA]. Im Jahr 2010 konnte erneut ein Produktionsplus von 2,7% bei Schafmilch und 4,5% bei Ziegenmilch erreicht werden. Die Anzahl der gehaltenen Milchschafe stieg dabei ebenso minimal um 0,3%. Die größte prozentuelle Steigerung findet sich bei Milchziegen. So wurden 2010 um 4,3% mehr Tiere gehalten als noch im Jahr davor [LANDWIRTSCHAFTSKAMMER ÖSTERREICH].

2.1.2.1. Zusammensetzung und ernährungsphysiologische Bedeutung

Ziegen- und Schafmilch ähneln der Kuhmilch-Zusammensetzung im Wesentlichen, jedoch werden ihnen zusätzlich Vorteile gutgeschrieben, die zum Teil nur schwer wissenschaftlich haltbar sind [ELMADFA et al., 2009]. Beide Milchsorten enthalten eine höhere Zahl an kleinen Fettkügelchen, welche durch die fettabbauenden Enzyme besser angreifbar sind und somit leichter verdaut werden können [TOMOTAKE et al., 2006]. Zusätzlich weisen sie einen höheren Anteil an kurz- und mittelkettigen Fettsäuren auf, die direkt ohne vorherige Emulgierung durch Gallensalze absorbiert werden können und somit bei Menschen mit Fettverdauungsstörungen zum Einsatz kommen können [ELMADFA et al., 2009].

Zu diesem Ergebnis kamen auch *Tomotake et al.*, die einen weitaus höheren prozentuellen Anteil an Caprinsäure und Caprylsäure in Ziegenmilch nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu fand man in Ziegenmilch geringere Mengen an Palmitinsäure, die als Hauptfettsäure im Kuhmilchfett gilt [TOMOTAKE et al., 2006].

In Schafmilch findet man zudem höhere Konzentrationen an konjugierter Linolsäure. Aufgrund ihres höheren Fettgehaltes weisen Schaf- und Ziegenmilch höhere Mengen an fettlöslichen Vitaminen auf,

wobei der Vitamin A-Gehalt in Ziegenmilch doppelt und der Vitamin D Gehalt 1,5mal so hoch ist wie in Kuhmilch. Gleichzeitig weisen sowohl Schaf- als auch Ziegenmilch weitaus höhere Vitamin E-Konzentrationen als Kuhmilch auf. In Schafmilch findet man zusätzlich etwa 1,5mal soviel Calcium wie in den beiden anderen Milchsorten. Proteine können aufgrund ihrer feineren Gerinnung in Schaf- und Ziegenmilch besser abgebaut werden und zeichnen sich somit durch ihre leichte Verdaulichkeit aus. Bezüglich des Laktosegehaltes findet man in den drei Milcharten keine Unterschiede, weshalb Schaf- bzw. Ziegenmilch ebenso nicht für Menschen mit Laktoseintoleranz geeignet sind [ELMADFA et al., 2009].

2.1.2.2. Allergenes Potential von Ziegen- und Schafmilch

Sehr häufig werden Ziegen- und Schafmilch als gute Alternative für Kuhmilchallergiker gesehen. Hierbei ist Vorsicht geboten, da dies nur bei Allergien gegen spezifische Kuhmilchproteine zutrifft [ELMADFA et al., 2009].

Nichtsdestotrotz zeigen einige Studien ein verringertes allergenes Potential von Ziegenmilch im Vergleich zu Kuhmilch. Dies ist auf die niedrigere α 1-Casein-Konzentration in der Ziegenmilch zurückzuführen. Obwohl das β -Lactoglobulin das Hauptallergen der Kuhmilch ausmacht, übernimmt das α 1-Casein ebenso eine wichtige allergene Rolle. Denn die Allergenität des β -Lactoglobulins kann durch spezifische Behandlungen eliminiert bzw. reduziert werden, während das α 1-Casein relativ unempfindlich gegenüber äußeren Einflüssen ist und somit nur schwer zerstört werden kann [TOMOTAKE et al., 2006].

Eine Ziegen- oder Schafmilch-Allergie kommt sehr selten vor, kann jedoch bei einzelnen Patienten auftreten, auch wenn diese auf Kuhmilch keine allergene Reaktion zeigen. Bei den bisher bekannten Fällen wurde die allergische Reaktion sowohl mittels Haut-Prick-Test, als auch mittels IgE-Konzentrationsmessung nachgewiesen [MARTÌN et al., 2004; ALONSO-LEBRERO et al., 2008].

2.2. Nachweismethoden von Kuhmilch-DNA in Milchprodukten

Die Speziesidentifikation spielt sowohl im Futtermittel- als auch im Lebensmittelbereich eine entscheidende Rolle. Da die Nachfrage nach qualitativ hochwertigen Produkten immer mehr im Steigen ist und gleichzeitig immer häufiger lebensmittelbedingte Erkrankungen wie beispielsweise Dioxin-Kontaminationen auftreten, nimmt eine korrekte Deklaration eine immer wichtigere Stellung ein [BOTTERO, 2010]. Da Milch und Milchprodukte schon seit jeher als wichtige Handelsware galten, gehörten sie wahrscheinlich zu den ersten Produkten, bei denen es zu Verfälschungen kam. Insbesondere werden dabei hochwertige Komponenten von Milchprodukten durch minderwertige Bestandteile ersetzt. Dabei kommt es nicht nur zur Täuschung und Irreführung des Konsumenten und Missachtung von gesetzlichen Regelungen, sondern auch zu Wettbewerbsverzerrungen zwischen den Milchproduzenten selbst [MAYER, 2005].

Sehr häufig werden dabei Ziegen-, Büffel-, oder Schafmilchprodukte mit billigerer Kuhmilch verfälscht, was zu schwerwiegenden Folgen führen kann. Zu diesen zählen nicht nur gesundheitliche Risiken, die sich in allergischen Reaktionen oder Unverträglichkeiten äußern können, sondern es können damit ethische, religiöse, oder kulturelle Konflikte entstehen. [KOTOWICZ et al., 2007]. Des Weiteren wird immer häufiger Ziegenmilch selbst in ihrer Zusammensetzung gefälscht, indem sie mit billigerer Schafmilch gemischt wird [LÓPEZ-CALLEJA DIAZ et al., 2007].

Dabei ist Ziegenmilch in sehr vielen Ländern von besonderer Bedeutung, da in diesen Ländern oft keine optimalen Klimabedingungen zur Kuhzucht herrschen und diese somit auf die Ziegenmilchproduktion angewiesen sind [MAYER, 2005]. Ein heutzutage besonders häufig verfälschtes Produkt ist der italienische Mozzarella, da dieser ursprünglich aus Milch vom Wasserbüffel hergestellt wird. Mittlerweile gibt es viele Nachahmer, die dafür billigere Kuhmilch verwenden [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005]. Praktisch gesehen findet man zwar nur geringe Nährstoff-Unterschiede zwischen Kuh- und Büffelmilch, jedoch liegen einzelne Nährstoffe in höheren Konzentrationen in Büffelmilch vor. Der Hauptanreiz zur Verfälschung liegt jedoch darin, dass Büffelmilchprodukte zu einem weitaus höheren Preis vermarktet werden können [DE et al., 2010].

Sowohl die Lebensmittelaufsichtsbehörden, die Lebensmittelproduzenten, der Handel, als auch die Konsumenten zeigen großes Interesse an korrekt gekennzeichneten Lebensmitteln [KOTOWICZ et al., 2007].

Bei einer Analyse von Milch und Milcherzeugnissen konnte die sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft in 70% der untersuchten Büffel-, in 11% der Ziegen-, und in 16% der Schafprodukte rinderspezifische DNA nachweisen, wobei eine entsprechende Deklaration mit Hinweis auf die

Verarbeitung von Kuhmilch nicht aufzufinden war. Die unmittelbar benachbarte Haltung von Rindern sowie die gleichzeitige Gewinnung und Verarbeitung von Kuhmilch können als Kontaminanten im Herstellungsprozess in Betracht gezogen werden. Zusätzlich kann durch Einsatz von Zusatz- und Hilfsstoffen aus bzw. mit Anteilen von Kuhmilch, wie z.B. Kälberlab, detektierbare Rinder-DNA eingetragen werden [KROWAS, 2008].

Da die Transparenz im Lebensmittelsektor immer mehr an Bedeutung gewinnt, gibt es europaweit schon einige gesetzliche Regelungen, die sich mit der korrekten Deklaration beschäftigen. Die Authentizität der aus Milch hergestellten Produkte ist mit dem Hintergrund des Schutzes der Verbraucher vor Täuschung und Irreführung analytisch zu bestätigen. Eine nicht deklarierte Verarbeitung von Kuhmilch in Produkten, die als Schaf-, Ziegen-, oder Büffelmilch vermarktet werden, ist gemäß Artikel 16 der EU Basisverordnung als Irreführung und Täuschung des Verbrauchers einzuordnen [VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002]. Milch und Milcherzeugnisse anderer Tierarten finden hingegen im EU-Hygienerecht Berücksichtigung, jedoch weicht diese im Vergleich zu den Regelungen von Kuhmilcherzeugnissen in einigen Punkten ab [KROWAS, 2008].

Zum Zweck der Erfüllung der gesetzlichen Vorgaben werden zuverlässige, genaue, schnelle, und kostengünstige Nachweisverfahren benötigt, damit schon möglichst geringe Mengen an Verfälschungen nachgewiesen werden können. Bei den aktuellen analytischen Nachweismethoden unterscheidet man zwischen immunologischen, elektrophoretischen, chromatographischen, und DNA-basierten Methoden. Im folgenden Abschnitt werden diese Methoden kurz vorgestellt, miteinander verglichen, und ihre Vor- und Nachteile erläutert. Dabei liegt der Schwerpunkt klar auf den DNA-basierten Methoden, die sich mit der PCR und der Real-Time PCR beschäftigen. Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde ebenfalls hauptsächlich mit diesen Methoden gearbeitet.

2.2.1. Immunologische Nachweismethoden

Zu den immunologischen Nachweisverfahren zählen sowohl Radio-Allergosorbent Test (RAST), Enzymo-Allergosorbent Test (EAST), Rocket Immuno-Electrophoresis (RIE), Immunoblotting als auch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Während RIE und Immunoblotting nur qualitative oder semiquantitative Ergebnisse liefern, dienen RAST, EAST und ELISA als quantitative Methoden. Nur die ELISA-Technik wird aufgrund ihrer hohen Präzision, ihrer einfachen Handhabung, und ihres guten Potentials zur Standardisierung als Routinemethode in der Lebensmittelanalytik empfohlen [POMS et al., 2004].

Immunologische Nachweismethoden arbeiten mit Antikörpern, die häufig aus Tieren gewonnen werden und gegen spezifische Allergene wirken. Durch Kreuzreaktionen der Antikörper mit der Lebensmittelmatrix kann es jedoch zu falsch-positiven Resultaten kommen. Eine Ausnahme dabei stellt SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting dar, da dabei die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt werden [VAN HENGEL, 2007].

Diese immunologischen Methoden sind in der Speziesidentifizierung nur bedingt anwendbar, da es durch die hocherhitzten Produkte zur Proteindenaturierung kommen kann [PETER et al., 2004]. Des Weiteren reagieren immunologische Techniken weniger sensitiv und sind bei Proben mit komplexer Matrix nicht anwendbar [DE et al., 2010].

2.2.1.1. Radio-allergosorbent Test (RAST) / Enzymo-allergosorbent Test (EAST)

RAST oder EAST dienen hauptsächlich dem Allergen-spezifischen IgE-Nachweis. Dabei werden sie sehr häufig in In-vitro-Tests zur klinischen Diagnose einer Lebensmittelallergie eingesetzt. Neben Säuglingsnahrung wurden sie bereits vor allem zum Allergennachweis in Erdnuss-, Soja-, und Haselnussprodukten verwendet [BESLER, 2001].

Jedoch existieren nur sehr wenige Publikationen, die RAST zum quantitativen Allergennachweis einsetzen, wobei die dabei gefundene Nachweisgrenze bei 1 mgkg^{-1} liegt. Das Prinzip beider Methoden beruht darauf, dass ein Antigen oder Allergen, welches an einer festen Phase gebunden ist, spezifisch an ein humanes Immunglobulin E (IgE) bindet. Anschließend können die Antigene, die in der Probelösung vorhanden sind, die Bindung von IgE mit den festen Antigenen inhibieren. Danach werden sogenannte Anti-IgE Antikörper entweder mit Isotopen (RAST) wie z.B. dem ^{125}I oder mit Enzymen (EAST) wie z.B. Horseradish Peroxidase markiert. Nach Hinzufügen von spezifischen Substraten, die entweder die Farbe ändern oder Licht emittieren, um die gebundenen IgE-Antikörper detektieren zu können, wird ein Gammazähler oder ein Spektrophotometer zur Messung der gebundenen IgE verwendet. Die Anwendung dieser Methode zur Quantifizierung von Antigenen in Lebensmitteln ist stark limitiert, da dabei menschliches Serum von allergischen Patienten benötigt wird [POMS et al., 2004].

RAST wurde zur Semiquantifizierung von Kuhmilchallergenen wie α -Lactalbumin in Säuglingsnahrung eingesetzt. Dabei konnte bereits $1 \text{ } \mu\text{g}$ α -Lactalbumin in 1 g Nahrung detektiert werden [BESLER, 2001].

2.2.1.2. Rocket immuno-electrophoresis (RIE)

RIE wird mit einem Antikörper besetzten Gel durchgeführt, wobei die zu analysierenden Antigene Komplexe mit den Antikörpern bilden. An der Höhe der entstehenden bergförmigen Immunkomplexe kann die Menge an gebundenen Antigenen abgelesen werden. Der Einsatz der RIE zur Allergendetektion in Lebensmitteln ist sehr selten. Jedoch konnten bereits sowohl Ei-, Milch-, Haselnuss-, als auch Erdnussproteine mittels RIE in diversen Nahrungsmitteln nachgewiesen werden. Ebenso konnten mithilfe einer RIE Erdnussproteine in Schokolade und anderen Lebensmitteln entdeckt werden, wobei sich die RIE-Methode als äußerst exakt, spezifisch, und empfindlich erwies [BESLER, 2001].

Nichtsdestotrotz wird RIE aufgrund der aufwendigen und arbeitsintensiven Gelherstellung und Arbeitsprozedur nur sehr selten angewandt [POMS et al., 2004].

2.2.1.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA zählt zu den gebräuchlichsten Techniken sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch in Lebensmitteluntersuchungsanstalten [VAN HENGEL, 2007]. Dabei handelt es sich um ein Nachweisverfahren, welches im Gegenteil zum Radioimmunassay (RIA) nicht mit einer Radioaktivitätsmessung, sondern mit einer enzymatischen Farbreaktion misst. Das Prinzip von ELISA beruht darauf, dass Allergene oder spezifische Markerproteine durch eine colorimetrische Reaktion, gefolgt von einer Bindung mit einem spezifischen Enzym-markierten Antikörper, detektiert werden. Antikörper oder Antigene werden dabei an einem Polymer, einer Membran, oder einem Partikel immobilisiert und anschließend mit der Probe und dem jeweiligen komplementären Reagens inkubiert. Danach kommt es zur Bindung eines spezifischen Enzym-markierten Antikörpers und zum Zusatz des Substrates. Daraufhin können die Allergene oder bestimmte Markerproteine nachgewiesen werden, wobei die Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes mittels einer Standardgerade durch Referenzstandards bestimmt werden kann [POMS et al., 2004].

Man unterscheidet zwischen kompetitiver ELISA und Sandwich-ELISA, wobei Zweitere am häufigsten angewandt wird. Die kompetitive ELISA wird bevorzugt zur Detektion von relativ kleinen Proteinen verwendet, wobei sowohl der Analyt als auch ein festes Antigen um die Bindung an einen Enzym-markierten Antikörper konkurrieren. Befinden sich in der Probe keinerlei Antigene, so kommt es nur zur Bindung des Enzym-markierten Antikörpers an das feste Antigen. Dabei werden hohe Absorptionsraten geliefert, wobei die Absorption indirekt proportional zu der Menge an Antigenen in

der Probe ist. Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits eine Vielzahl an Lebensmittelallergenen mit einer Nachweisgrenze von bis zu $0,4 \mu\text{gkg}^{-1}$ nachgewiesen werden. In der Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper verwendet, wobei beide Antikörper aufgrund einer möglichen gegenseitigen Behinderung an unterschiedlichen Stellen am Antigen binden müssen. Im ersten Schritt werden nach einer Inkubationszeit spezifische Proteine aus der Probe durch die ersten Antikörper, die sogenannten coating-Antikörper, die meist auf einer Mikrotiterplatte befestigt sind, gebunden. Nach dem Waschen wird im zweiten Schritt der entstandene Protein-Antikörper-Komplex durch die protein-spezifischen, Enzym-markierten Antikörper gebunden und es bildet sich ein sogenannter Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Von diesem Komplex erhält die Methode auch ihren Namen, da das Antigen zwischen den Antikörpern wie in einem Sandwich vorliegt. Erst nach einem erneuten Waschvorgang kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden. Anschließend wird ein für das Enzym spezifisches Substrat hinzugefügt und ein gefärbtes Produkt wird sichtbar. Dieses Enzym, welches z.B. der alkalischen Phosphatase entspricht, befindet sich auf dem zweiten Antikörper, dem sogenannten detection-Antikörper. Die durch den Farbumschlag bedingte Absorption ist der Antigen-Konzentration in der Probe proportional [POMS et al., 2004].

Die ELISA-Methode, die auf die Bildung von Antikörpern gegen Kuhmilch-Immunglobuline basiert, wird von einigen Autoren zur Speziesidentifizierung in Käse nicht empfohlen, da sie den Zusatz von erhitzter Milch oder Kuhmilch-Caseinaten nicht detektieren kann. Hingegen erwies sich ELISA mit der spezifischen Antikörperproduktion gegen kuhmilchspezifische γ -Caseine als gute Möglichkeit zur Differenzierung [MAYER, 2005]. Im Gegensatz dazu kamen *López-Calleja et al.* zu dem Ergebnis, dass ein Kuhmilchnachweis in Käse ebenso spezifisch und exakt durch indirekte ELISA erfolgen kann wie durch eine herkömmliche PCR. Dabei wurden spezifische monoklonale Antikörper (AH4) gegen rinderspezifisches β -Casein verwendet [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007d].

Song et al. konnten ebenfalls mithilfe einer indirekten ELISA den Kuhmilchanteil in Ziegenmilch quantifizieren. Dabei wurde eine Nachweisgrenze von 2% erreicht, wobei zwischen Rohmilch und hitzebehandelter Milch kein Unterschied gefunden wurde [SONG et al., 2011].

2.2.2. Elektrophoretische und chromatographische Nachweismethoden

Zu den elektrophoretischen und chromatographischen Nachweismethoden zählen sowohl Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), Isoelektrische Fokussierung (IEF), als auch High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Die elektrophoretischen Methoden sind aufgrund der

möglichen Protein-Denaturierung bei hoch verarbeiteten Lebensmitteln nur limitiert anzuwenden [PETER et al., 2004].

Sowohl die Hitzebehandlung, als auch die allgemeine komplexe Zusammensetzung von Milch und Milchprodukten machen die Identifizierung mittels dieser Methoden schwierig. Chromatographische Methoden sind empfindlicher und exakter, jedoch benötigt deren Durchführung weit mehr Zeit und Arbeit [DE et al., 2010].

2.2.2.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode, die auf das Auftrennen von Molekülen, insbesondere von Nukleinsäuren und Proteinen basiert. Dabei können verschiedene Formen der PAGE zum Allergennachweis in Lebensmittel eingesetzt werden. Die native PAGE gibt Aufschluss über Molkeproteine in Kuh-, Ziegen-, und Schafmilch. Dabei wandert während der Elektrophorese das β -Lactoglobulin in der Kuhmilch schneller als andere Molkeproteine [MAYER, 2005].

SDS-PAGE dient als Standardmethode zur Protein/Allergen-Differenzierung und –Identifizierung. Natrium dodecyl sulphate (SDS) denaturiert und ummantelt dabei die Proteine und gibt ihnen dadurch eine stark negative Ladung. Daraufhin werden die Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes getrennt. Diese Proteine werden anschließend auf eine Membran transferiert und mittels Radioisotop- oder Enzym-markierten Antikörpern nachgewiesen. Die individuellen Banden repräsentieren dabei je ein spezifisches Protein. SDS-PAGE und Immunoblotting mit menschlichen IgE-Antikörpern werden hauptsächlich zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Allergene eingesetzt, obwohl diese Methode mittlerweile auch sehr häufig zum qualitativen Nachweis von potentiell allergenen Lebensmittelkomponenten bis zu einer Nachweisgrenze von 5mgkg^{-1} verwendet wird. Der Nachteil dieser Methode liegt in der zeitaufwendigen Prozedur und in der Abhängigkeit vom verwendeten Human-Serum. Wurde jedoch erstmals ein Allergen charakterisiert, so können die Antikörper auch im Tiermodell nachgezüchtet werden und ersetzen somit die Verwendung von menschlichem Serum [POMS et al., 2004].

UREA-PAGE stellt eine der ältesten Elektrophorese-Techniken zur Speziesdifferenzierung in Milchprodukten dar. Dabei kann α S1-Casein als Marker für den Kuhmilchnachweis verwendet werden. Aufgrund der hohen proteolytischen Aktivität ist diese Methode für Käse nicht optimal. Denn eine Vielzahl an Abbauprodukten des Caseins, die eine ähnliche elektrophoretische Mobilität wie das

α S1-Casein aufweisen, können das Ergebnis verfälschen. Im Gegensatz dazu kommt es in Milch zu fast keinen proteolytischen Veränderungen, weshalb sich UREA-PAGE hier als mögliche Methode zur Speziesidentifizierung eignet [MAYER, 2005].

2.2.2.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) zählt zu den elektrophoretischen Methoden, in der die Proteine auf Basis ihres Isoelektrischen Punktes (IP) aufgetrennt werden. Diese Auftrennung geschieht somit aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten, denn je nach Umgebungs-pH tragen die einzelnen Aminosäuren (AS) der Proteine positive oder negative Ladungen. Der Isoelektrische Punkt (IP) entspricht dabei dem pH-Wert, an dem die Summe aller Ladungen eines Proteins Null ergibt. Erreicht ein Molekül diesen pH-Wert im Medium, so verschwindet dessen elektrophoretische Beweglichkeit, so dass es dort liegen bleibt. Proteine zeigen eine starke Variation in ihrem IP, wobei er normalerweise zwischen einem pH von 3 und 12 liegt. Befindet sich der pH-Wert unter dem IP eines Proteins, so wandert dieses in Richtung der Kathode, während pH-Werte über dem IP zu einer Bewegung des Proteins in Richtung Anode führen. Dabei übernimmt ein stabiler, linearer pH-Gradient einen essentiellen Stellenwert [GARFIN D.E., 2003].

Seit 1992 dient IEF in der Europäischen Union als Referenzmethode zum Nachweis von bovinem Casein in Schaf-, Ziegen-, und Büffelkäse. Diese Methode basiert auf der Isoelektrischen Fokussierung der γ -Caseine, die durch Hydrolyse von Käseproteinen mit Plasmin entstehen. Dabei kann klar zwischen den bovinen γ 2- und γ 3-Caseinen und dem γ -Casein der Schafmilch differenziert werden. Nichtsdestotrotz kann mit dieser Methode keine Differenzierung zwischen Ziegen- und Schafmilch erreicht werden. Die IEF als EU-Referenzmethode wird als qualitative Methode angewandt, wobei Referenzproben mit 0% und 1% Kuhmilch verwendet werden. Sie zählt zu den sehr genauen und empfindlichen Verfahren, wobei die Nachweisgrenze von Kuhmilchanteilen bei 1% liegt [MAYER, 2005].

Locci et al. kamen bei der Analyse von Büffelmozzarella zu dem Ergebnis, dass ein Kuhmilchanteil von 5% auch dann noch nachzuweisen ist, wenn der Käse einer starken Erhitzung unterzogen wurde. Dabei wurde mit der IEF, basierend auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von kuhspezifischem und büffelspezifischem γ 2- und γ 3-Casein, gearbeitet [LOCCI et al., 2008].

Der größte Nachteil solcher elektrophoretischer Techniken liegt in der Zweideutigkeit bzw. Unklarheit der Ergebnisinterpretation, da das Proteinprofil einer einzelnen Spezies oft ein komplexes Bandmuster

aufweist und schon geringste Mengen an Fremd-Protein zu Überlappungen der speziesspezifischen Banden führen können [LÓPEZ-CALLAJA et al., 2007b].

2.2.2.3. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ist ein Flüssigkeitschromatographie-Verfahren, das einerseits Substanzen trennen und sie andererseits auch identifizieren und quantifizieren kann. Die zu untersuchende Substanz wird dabei mit dem Laufmittel, das hier als mobile Phase fungiert, durch eine Trennsäule, die die stationäre Phase enthält, gepumpt [BORDIN et al., 2001]. Zur Analyse der unterschiedlichen Molkeproteine wird häufig die HPLC verwendet [LOCCI et al., 2008]. Um Milchproteine nachzuweisen, gibt es eine Reihe an unterschiedlichen HPLC-Verfahren. Die meisten Methoden basieren dabei auf Anionen- bzw. Kationen-Austausch-Chromatographie, Größenausschlusschromatographie, Gel-Permeationschromatographie, oder Umkehrphasen-Chromatographie [MONACI et al., 2006].

Bordin et al. konnten mithilfe der Umkehrphasen-HPLC die 7 hauptsächlich vorkommenden Milchproteine, zu denen sowohl κ -, α S2-, α S1-, und β -Casein, als auch α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A und B zählen, trennen und quantifizieren. Zur exakten Identifikation jedes einzelnen Proteins wurden dabei Daten der Retentionszeit, des Peakfläche-Ratios, und des UV-Spektrums herangezogen [BORDIN et al., 2001]. Die relativ hohe und ungenaue Nachweisgrenze der einzelnen HPLC-Methoden führt dazu, dass diese Methoden nicht zum Schutz vor Kontaminationen in Schaf- bzw. Ziegenmilchprodukten bei Patienten mit Kuhmilchallergie eingesetzt werden können [MONACI et al., 2006]. Jedoch wird die HPLC-Analyse des para- κ -Caseins zur Differenzierung von Schafmilch und Ziegenmilch empfohlen [MAYER, 2005].

Enne et al. konnten mithilfe einer HPLC-Methode kuhmilchspezifisches β -Lactoglobulin sowohl in Rohmilch, als auch in Käse mit einer Nachweisgrenze von 0,5% nachweisen. Dabei konnte die europäische gesetzliche Nachweisgrenze von 1% unterschritten werden [ENNE et al., 2005].

2.2.3. DNA-basierte Nachweismethoden

Die DNA-basierten Methoden werden in Polymerasekettenreaktion (PCR) und in Real-time PCR eingeteilt. Diese Techniken bieten eine gute Alternative in der Speziesdifferenzierung, da sie aufgrund der stabilen DNA-Struktur auch noch in hochoverhitzten Proben anwendbar sind. Sie identifizieren dabei hoch sensibel und exakt und zeichnen sich zusätzlich durch ihre einfache Durchführung aus [PETER et al., 2004]. Andererseits sind sie jedoch nicht in der Lage, die spezifischen Komponenten nachzuweisen, die zur allergischen Reaktion führen. Des Weiteren gibt es Lebensmittel wie z.B. Eier, die zwar hohe Mengen an Protein, jedoch niedrige DNA-Konzentrationen aufweisen. Hierfür wären die DNA-basierten Methoden nicht ideal. Die genetische Variabilität innerhalb einer Spezies beeinflusst zusätzlich das quantitative Ergebnis der DNA-basierten Methoden, aber auch der Protein-basierten Methoden [VAN HENGEL, 2007].

Milch enthält sehr viele somatische Zellen, die mit einer Menge von 10^4 bis 10^7 Zellen/ml als gute Nukleinsäurequelle dienen und somit für die DNA-basierte Analyse gut verwendet werden können [DE et al., 2010]. Zu diesen somatischen Zellen, die genomische DNA enthalten, zählen sowohl die Leukozyten als auch die Epithelzellen, wobei Erstere in höheren Mengen enthalten sind. Obwohl diese somatischen Zellen die Käseverarbeitung überstehen, gibt es nur wenige Methoden, um deren genomische DNA nach der Käseherstellung zu isolieren [LÓPEZ-CALLAJA et al., 2005]. Die Konzentration von somatischen Zellen kann durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst werden, wobei das Alter, die Laktationsphase, Stress, die Jahreszeit, und vor allem die Eutergesundheit, sowie das Auftreten von Mastitis eine entscheidende Rolle spielen [BOTTERO und DALMASSO, 2010].

Sowohl die DNA-Stabilität bei hohen Temperaturen, die Spezies-spezifische DNA-Region, als auch die leichte Verfügbarkeit von kleinen DNA-Mengen machen die DNA-basierten Nachweismethoden zu einer guten Identifizierungsmethode in Milchprodukten [DE et al., 2010]. Dabei liegt die Nachweisgrenze gemäß Herstellerangaben bei verwendeten PCR-Kits zwischen 0,1% und 1% [KROWAS, 2008].

2.2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR zählt zu den am weitesten verbreiteten molekularbiologischen Techniken zur Identifikation von Tierarten in Lebensmitteln, was sich wahrscheinlich durch den geringen Zeit- und Materialaufwand erklärt. Mit der PCR ist es möglich, aus geringsten Mengen an DNA eine hohe Ausbeute der gewünschten Sequenz zu erzielen. Durch ihr einfaches Prinzip und ihre hohe Empfindlichkeit kann die

PCR in diversen Anwendungen wie genetischer Analyse, Gentechnologie, oder im Bereich der Forensik angewandt werden [KROWAS, 2008]. Zur Speziesidentifikation findet man in der Literatur hauptsächlich Daten zur Anwendung an Fleisch und Fisch, während Informationen bezüglich der Anwendung an Milchprodukten nur sehr selten zu finden sind [LÓPEZ-CALLAJA et al., 2005].

Zu den essentiellen Bestandteilen, die man für eine PCR braucht, zählen eine amplifizierbare DNA, die als Matrize dient, eine thermostabile DNA-Polymerase, 2 passende Oligonukleotidprimer, Nukleotide, und ein Puffer, der für optimale Reaktionsbedingungen sorgt [MÜLHARDT, 2006].

Die PCR besteht aus drei Schritten, wobei diese als Denaturierungs-, Annealings-, und Elongationsschritt bezeichnet werden. In der Denaturierungsphase kommt es bei etwa 90°C zu einer Strangtrennung der Template-DNA. Zur Denaturierung kann es dabei schon ab 70°C kommen, wobei alle Komponenten unter der Hitze leiden. Während die Polymerase denaturieren kann, zerfallen die Nukleotide, und DNA und Primer werden depuriniert. Deshalb sollte diese erste Phase möglichst kurz gehalten werden, wobei schon eine Dauer von 5 Sekunden als ausreichend empfunden wird [MÜLHARDT, 2006]. Bei einem hohen GC-Gehalt der Template-DNA kann die Denaturierungsdauer erhöht werden [HANDBUCH INVITROGEN, 2008].

Anschließend wird die Temperatur auf etwa 50-60°C gesenkt, damit es zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA kommen kann. Die Annealingtemperatur richtet sich dabei hauptsächlich nach den Primern, die man verwendet. Heutzutage existieren diverse Programme, die die Schmelztemperatur einer gewünschten Sequenz kalkulieren und somit die Errechnung erleichtern. Prinzipiell sollte die Annealingtemperatur 5-10°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen. Für Details zur richtigen Primerauswahl vgl. Kapitel 2.2.4.1.

Nach der Erhöhung der Temperatur auf etwa 70°C, welche als Temperaturoptimum der Taq-Polymerase gilt, kommt es zur Verlängerung der Primer [MÜLHARDT, 2006]. Dabei verlängern die Primer bis zu 100 Basen pro Sekunde [HANDBUCH INVITROGEN, 2008]. Es entsteht wiederum eine doppelsträngige DNA, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Für eine erfolgreiche PCR ist die Nukleotidqualität und -konzentration entscheidend. Die Elongationszeit hängt stark von der Länge des erwarteten Produktes ab. Theoretisch kommt es während eines Zyklus zu einer Verdopplung der DNA, wohingegen der durchschnittliche Multiplikationsfaktor je Zyklus in der Praxis nur bei ca. 1,55 bis 1,6 liegt.

Neben der Templatemenge und dem Puffer spielen vor allem auch die Salz- und MgCl₂-Konzentrationen eine entscheidende Rolle. Da Mg²⁺ das Primerannealing, die Strangtrennung, die Produktspezifität, die Bildung von Primerdimeren, und die Fehlerquote beeinflusst, sollte für jede

PCR die optimale Konzentration ermittelt werden. Dafür existieren verschiedene Empfehlungen. Während *Mülhardt* eine Konzentration von 0,5 bis 2,5 mM empfiehlt, liegt die ideale Mg^{2+} -Konzentration laut *Invitrogen* zwischen 3 und 6 mM, wobei es vor allem in Form von Magnesiumchlorid oder Magnesiumsulfat hinzugefügt werden soll [HANDBUCH INVITROGEN, 2008; MÜLHARDT, 2006]. Daneben sind Faktoren wie die Zyklenanzahl und die Auswahl der richtigen DNA-Polymerase und PCR-Zusätze für eine erfolgreiche PCR ausschlaggebend [MÜLHARDT, 2006].

2.2.3.2. Speziesspezifische Polymerasekettenreaktion

Tierspezifische Universalprimer wurden erstmals vor einigen Jahren aus Sequenzen des mitochondrialen 16s rRNA-Gens entwickelt. Der dafür verantwortliche Anlass lag in der BSE-Krise und der damit verbundenen Suche nach einer passenden Methode zur Speziesidentifizierung. Als Marker zur genetischen Identifizierung zwischen verschiedenen Spezies nimmt das nukleare Gen der 5S ribosomale RNA (5S rRNA) einen hohen Stellenwert ein, da dieses in höheren Eukaryonten in eine Spezies-spezifische Struktur konvertiert [BOTTERO und DALMASSO, 2010].

Cross et al. entwickelten dazu eine multiplexe PCR-Methode, mit der sie basierend auf dieser 5S rRNA Gensequenz, vier Austern-Spezies identifizieren konnten [CROSS et al., 2006]. Speziesspezifische Primer können auf Basis von Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) entworfen werden. *Bottero et al.* identifizierten mit derartigen Primern sowohl Kuhmilch als auch Büffelmilch in Käseprodukten mittels Duplex-PCR, wobei die Amplifikationsbedingungen bei beiden Proben ident waren. Dabei wurden die Primer auf Basis des mitochondrialen Cytochrom B-Gens (cytB) mithilfe der Gen-Datenbank entwickelt, wobei beide Primer speziesspezifisch reagierten. Bei der Entwicklung von speziesspezifischen Primern spielen neben dem cytB-Gen ebenso das Cytochrom Oxidase-Gen (cytO), aber auch das 12S und 16S rRNA-Gen eine entscheidende Rolle [BOTTERO et al, 2002].

Wie durch Analysen gezeigt werden konnte, führte die Anwendung der PCR mit Kuh-spezifischen Primern zu einem erfolgreichen Speziesnachweis in Käse. Des Weiteren konnte mit Hilfe dieser Methode die Zugabe von Kuhmilch-Caseinaten in Schaf- und Ziegenkäse nachgewiesen werden [MAYER, 2005].

2.2.3.3. Duplex- und Multiplex-PCR

Das Prinzip der Multiplex-PCR beruht darauf, dass in einem einzigen PCR-Lauf mehrere Amplifikationen mit ein und demselben DNA-Template durchgeführt werden. Dazu muss eine dementsprechende Anzahl an Primern hinzugefügt werden, wobei die einzelnen Primer keine homologen Sequenzen amplifizieren dürfen, da es ansonsten leicht zum Fehlannealing der Primer oder auch der Produkte kommen kann. Leider bereitet die Multiplex-PCR trotz allem einige Probleme, weshalb man einige Zeit in die Optimierung der PCR-Bedingungen investieren muss [MÜLHARDT, 2006]. Mithilfe der Multiplex-PCR können jedoch in einem einzigen Schritt diverse Spezies unterschieden werden [DALMASSO et al, 2011]. Da nur eine begrenzte Anzahl an verschiedenen Tierspezies wie Kuh, Schaf, Ziege, oder Büffel zur Milchproduktion verwendet werden, dient die Multiplex-PCR hierbei als gute Methode zur Speziesidentifikation [BOTTERO und DALMASSO, 2010]. Sie ermöglicht dabei einen gleichzeitigen Nachweis von Kuh-, Ziegen-, und Schaf-DNA [BOTTERO et al., 2003].

Problematisch dabei ist der Unterschied in der Amplikonlänge, denn diese sollten sich zwischen 40 bp und 50 bp unterscheiden, damit die einzelnen Banden in der Gel-Elektrophorese erkennbar gemacht werden können [BOTTERO und DALMASSO, 2010]. Um den Nachweis zu erleichtern, sollten sich die amplifizierten Fragmente in ihrer Länge voneinander differenzieren. Dieses Problem könnte umgangen werden, indem man beispielsweise fluoreszenzmarkierte Primer verwendet und die PCR-Produkte auf einem automatischen Sequencer trennt [MÜLHARDT, 2006]. Ein weiteres Problem stellt die Hitzebehandlung der Proben dar, denn durch die DNA-Fragmentation können nun nur mehr 4 bis 5 Spezies zum gleichen Zeitpunkt identifiziert werden. [BOTTERO und DALMASSO, 2010].

Die Duplex-PCR ist eine bewährte, schnelle, und sensitive Methode zum gleichzeitigen Nachweis von Kuh- und Ziegenmilch in Käse [MAFRA et al, 2007]. *Kotowicz et al.* entwickelten eine Duplex-PCR-Methode zum Speziesnachweis von Kuhmilch in Ziegenmilch. Die Methode erwies sich als spezifisch und sensitiv, wobei eine Nachweisgrenze von weniger als 1% erreicht werden konnte. Durch die gleichzeitige Anwendung von mitochondrialen Primerpaaren für Ziegen- und Kuh-DNA konnten falsch-negative Resultate vermieden werden [KOTOWICZ, 2007]. Des Weiteren konnten auch schon Kuhmilchanteile mit einer Nachweisgrenze von 0,1% mittels Duplex-PCR detektiert werden. Dieser geringe Prozentbereich wird zwar auch mittels Multiplex-PCR erreicht, jedoch bedeutet diese niedrige Grenze in der Duplex-PCR eine Verbesserung der Methode, da die Sensitivität der Multiplex-PCR weitaus geringer ist [MAFRA et al., 2007].

Bottero et al. detektierten hingegen bei gleicher Methode und identen Primern nur bis zu einer Nachweisgrenze von 0,5% Kuhmilch-DNA, während *Rea et al.* nur bis zu 1% Kuhmilchanteil nachweisen konnten [BOTTERO et al, 2003, REA et al., 2001].

2.2.3.4. weitere PCR-basierte Methoden

Eine weitere Methode zur Speziesidentifizierung stellt PCR-RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) dar, die dem Prinzip der SNP-Analyse sehr nahe steht. Dabei wird die DNA mittels Restriktion-Endonuklease verdaut. Mit dieser Methode kann die Sequenz des mitochondrialen 12s rRNA-Gens genutzt werden, um eng verwandte Spezies zu differenzieren. Dabei wird sehr häufig eine Kombination von Enzymen eingesetzt. Die Sekundärkonfirmation kann dabei die Verdauung der PCR-Produkte durch die Restriktions-Endonuklease verhindern [BOTTERO und DALMASSO, 2010]. Mithilfe der PCR-RFLP können auch auf Basis des mitochondrialen cytB-Gens sowohl Büffel- als auch Kuhmilch identifiziert werden [ABDEL-RAHMAN und AHMED, 2007].

Eine weitere Möglichkeit zur Speziesidentifizierung stellt die Mini-Sequenzierung dar. *Bottero et al.* entwickelten diese zur Speziesdifferenzierung in Thunfischkonserven. Das Prinzip der Mini-Sequenzierung liegt darin, ganz bestimmte, genau definierte Mutationen mit relativ geringem Aufwand nachzuweisen. Die Technik ist genau so präzise und zuverlässig wie das Sequenzieren und kann auch sofort interpretiert werden [BOTTERO et al, 2007]. Die Mini-Sequenzierungs-Methode wurde auch bereits schon zur Differenzierung von Milch- und Milchprodukten von Kuh, Schaf, Ziege, und Büffel verwendet. Polymorphismen wurden dabei mit Hilfe von Extension-Primern nachgewiesen und ermöglichten somit die genaue Spezieszuordnung. Neben Rohmilch und pasteurisierter Milch wurde diese Methode auch bei Käseproben eingesetzt und etablierte sich mit einer Nachweisgrenze von 0,1% zu einer exakten Nachweismethode von Kuhmilch in Büffelmilch [REALE et al., 2008].

Die nested-PCR eignet sich insbesondere für sehr geringe Mengen an amplifizierbarer DNA, wobei es zu zwei hintereinander ablaufenden PCR-Durchgängen kommt. Während der ersten PCR wird das erwünschte DNA-Amplikon erzeugt. Dieses Produkt wird als Template für eine zweite Amplifikation mit anderen Primern verwendet. Die falschen Amplifikationsprodukte der ersten PCR können durch die Auswahl der richtigen Primer somit hinwegselektiert werden [MÜLHARDT, 2006].

Die semi-nested-PCR-RFLP, die auf Basis des 12S rRNA Gens analysiert, erwies sich dabei als zuverlässige Methode zur Speziesidentifizierung von Hummer in gesalzene Fischprodukten. Dabei

konnte durch den zusätzlichen Einsatz eines zweiten Primerpaares eine durchaus höhere Empfindlichkeit und Spezifität der Methode erzielt werden [ZHANG et al, 2007].

All diese konventionellen PCR-Methoden basieren nicht auf Fluoreszenzreaktionen und es handelt sich dabei um keine Endpunkt-Analysen. Erst mithilfe einer digitalen Analyse der Bilder mit Agarosegelen kann eine grobe Abschätzung des Kuhmilchanteils getroffen werden. Des Weiteren muss die amplifizierte DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Prinzipiell erlaubt die PCR nur qualitative Aussagen, wobei mit Einbeziehung von internationalen Standards semiquantitative Ergebnisse möglich sind. Die Gelelektrophorese ist relativ zeit- und arbeitsaufwendig und erschwert dadurch einen Lauf mit hoher Probenanzahl [POMS et al, 2004].

Eine exaktere Quantifizierung kann nur durch die Real-Time PCR oder eine PCR-ELISA-Methode ermöglicht werden, wobei auf Weitere nicht genauer eingegangen wird.

2.2.4. Real-Time PCR

Durch die Real-Time PCR, die auch als quantitative Echtzeit-PCR bezeichnet wird, wird die DNA-Konzentration im Gegensatz zur konventionellen PCR nach jedem Zyklus mittels Fluoreszenzmarker gemessen. Diese Fähigkeit, der Reaktion während der exponentiellen Phase zu folgen, ermöglicht die präzise Detektion und dadurch exakte Ergebnisse [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007]. Die Real-Time PCR benötigt somit keine weiteren post-PCR Schritte und ermöglicht zusätzlich eine gleichzeitige Analyse einer Vielzahl an Proben [DALMASSO et al., 2011]. Sie benötigt zwar teurere Laborausstattung, jedoch zeichnet sie sich durch ihre extrem präzise und weniger arbeitsaufwendige Methodik aus [POMS et al, 2004]. Die Real-Time PCR weist einige zusätzliche Vorteile zur konventionellen PCR auf. Zu diesen zählen einerseits die Fähigkeit, den PCR-Prozess von Anfang an zu verfolgen und die DNA-Menge nach jedem Zyklus exakt zu messen, und andererseits der größere dynamische Nachweisbereich und das geringere Kontaminationsrisiko im Vergleich zur konventionellen PCR [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007b].

2.2.4.1. Prinzip

Die Real-Time PCR entspricht einer Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der konventionellen Polymerasekettenreaktion beruht. Sie führt theoretisch ebenso zur DNA-Verdopplung je Zyklus. Auch sie läuft in 3 Schritten ab, wobei die Zyklenzahl meist bei etwa 40 liegt. Auf die entsprechenden Schritte wurde bereits in Kapitel 2.2.3.1. eingegangen.

Die Real-Time PCR ermöglicht jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA. Diese Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenzmessungen, wobei entsprechende Fluoreszenzmarker in die DNA eingebaut werden, damit die DNA-Konzentration nach jedem Zyklus basierend auf der abgegebenen Fluoreszenz gemessen werden kann. Dabei verhält sich ein Anstieg des Fluoreszenzsignals direkt proportional zur DNA-Menge. Eine korrekte Quantifizierung ist jedoch nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich, da nur in dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen [INVITROGEN, 2008].

Es existieren eine Vielzahl an unterschiedlichen Fluoreszenznachweis-Technologien, wobei alle auf die Bildung eines Fluoreszenzsignals, die zur DNA-Menge proportional ist, basieren. Zu den drei hauptsächlich eingesetzten Fluoreszenznachweissystemen zählen der Einsatz von DNA-bindenden Farbstoffen wie z.B. SYBR Green I, der Einsatz von Fluoreszenzprimern wie z.B. dem Amplifluor Primer oder LUX Fluorogenic Primer, und der Einsatz von fluoreszierenden Sonden wie z.B.

TaqMan-Sonden, Scorpions, oder Molecular Beacons. Am häufigsten werden dabei DNA-bindende Farbstoffe wie beispielsweise SYBR Green I, die auch als Fluorochrome bezeichnet werden, eingesetzt (siehe Abb.1). Dabei kommt es durch das Anlagern des Farbstoffes in kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA zu deren Konfigurationsänderung und einem daraus resultierenden Fluoreszenzsignal-Anstieg [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007]. Zusätzlich liefert SYBR Green eine hohe Signalstärke, da immer mehrere Farbstoffmoleküle ein DNA-Molekül binden können [MÜLHARDT, 2006].

Die Problematik dieser Methode liegt in der geringen Spezifität, da der Farbstoff an jegliche doppelsträngige DNA bindet und somit nicht nur die gewünschte Zielsequenz detektiert. Dadurch können Primer-Dimere, aber auch unechte Amplifikationsprodukte zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal führen. Ein gutes Primerdesign und der Einsatz von qualitativen Reagenzien kann zur Vermeidung solcher nicht-spezifischer Produkte eingesetzt werden [INVITROGEN, 2008].

Während der Nachweis mit Sonden zwar spezifisch, aber weniger sensitiv abläuft, zeichnet sich die SYBR Green-Methode durch ihre hohe Sensitivität, jedoch geringe Spezifität aus. Die Spezifität kann jedoch durch die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse, die eine spezifische Amplikonidentifikation ermöglicht (siehe Kapitel 2.2.4.3), verbessert werden. Solch eine Schmelzkurvenanalyse ist nur in den Nachweissystemen möglich, in denen das Fluorophor mit der DNA assoziiert bleibt [INVITROGEN, 2008].

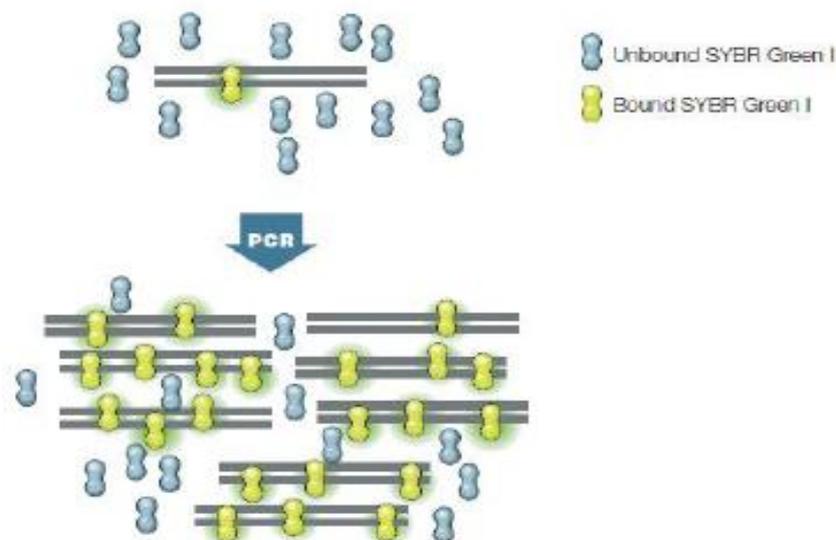


Abbildung 1. SYBR Green I als Fluorochrom in der Real-Time PCR [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]

Das Primer-basierte Nachweissystem ermöglicht einen hoch spezifischen und gleichzeitig sehr empfindlichen DNA- und RNA-Nachweis. Dabei bindet ein Farbstoff an die spezifischen PCR-Primer, was zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Amplifluor-Primer besitzen sowohl ein Fluorophor als auch einen Quencher am selben Primer. Dieser Primer nimmt anschließend eine Haarnadel-Konfiguration ein, die das Fluorophor näher an den Quencher heranbringt. Das Fluoreszenzsignal wird durch die Entfaltung der Primer und die dadurch hervorgerufene Trennung von Fluorophor und Quencher erhöht. LUX Fluorogenic Primer bestehen aus einem nicht-markierten Primer und einem mit einem Fluorophor markierten Primer, wobei sich das Fluorophor nahe dem 3'Ende der Haarnadel-Struktur befindet. Diese Haarnadel-Konfiguration erzeugt das Fluoreszenzsignal, ohne den Quenching-Rest zu trennen. Wird der Primer in die doppelsträngige DNA eingebaut, so kann das Fluorophor befreit werden, was sich in einem signifikanten Fluoreszenzanstieg widerspiegelt. LUX Primer können gut mit einer Schmelzkurvenanalyse kombiniert werden [INVITROGEN, 2008].

Durch den Einsatz von sequenzspezifischen Fluoreszenz-Sonden wie z.B. TaqMan Sonden kann die DNA hoch empfindlich und spezifisch nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz werden sie aufgrund ihres komplexen Designs und ihrem damit verbundenen hohen Preis seltener eingesetzt [INVITROGEN, 2008]. Die TaqMan-Sonde besteht aus einem Primer, an dessen einem Ende ein Reporter und am anderen Ende ein Quencher-Fluoreszenzfarbstoff bindet. Dabei unterdrückt der Quencher die Emission des Reporters [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007]. Den Quencher findet man in unmittelbarer Nähe zum Reporter, wobei sein Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des Reporters entspricht. Das Wirkungsprinzip basiert auf der Nutzung der 5'Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase in Kombination mit dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Dabei wird Energie von einem Molekül auf ein anderes übertragen. Die Sonde kann durch die Blockierung ihres 3'Endes durch ein Didesoxynukleotid oder eine Phosphatgruppe nicht als Primer fungieren [MÜLHARDT, 2006]. TaqMan-Sonden hybridisieren mit dem komplementären DNA-Strang, wobei sie bei der Elongation durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut werden (siehe Abb.2). Dies führt zu einer Freisetzung von Reporter und Quencher, was wiederum zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt [DALMASSO et al., 2011].

TaqMan-Sonden sind aufgrund ihres ständigen Signalwechsels durch das Binden und Freisetzen des Fluorophors nicht gut mit einer Schmelzkurvenanalyse kombinierbar. Dies ist jedoch aufgrund ihrer erhöhten Spezifität weniger von Nöten [INVITROGEN, 2008]. Nichtsdestotrotz werden in der klinischen Diagnose hauptsächlich diese fluoreszierenden Sonden verwendet. Dies lässt sich auf deren Fähigkeit, zwischen spezifischen und nicht-spezifischen Zielsequenzen unterscheiden zu können, zurückführen [DURTSCHI et al., 2007]. Im Gegensatz zu SYBR-Green ermöglichen TaqMan-Sonden

die Durchführung einer Multiplex-Real-Time PCR, bei der gleichzeitig mehrere Reaktionen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden können [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

Molecular Beacons basieren auf ein ähnliches Prinzip, denn diese Sonden können durch ihre komplementären Sequenzen am 5' und 3' Ende eine charakteristische Haarnadelstruktur ausbilden (siehe Abb.2). Der Reporter wird normalerweise durch die räumliche Nähe des Quenchers gehemmt. Kommt es nun jedoch zur Anlagerung der Sonde an eine komplementäre DNA-Region, so wird dieser Abstand zwischen Quencher und Reporter erhöht, was sich in einer erhöhten Fluoreszenz messen lässt. Sowohl Molecular Beacons als auch Scorpion-Primer sind eine Weiterentwicklung des TaqMan-Prinzips [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007].

Hybridisierungssonden arbeiten mit zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die je einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Dabei werden die Farbstoffe so gewählt, dass das Emissionsspektrum des Donors und das Anregungsspektrum des Akzeptors sich überlappen. Beide hybridisieren in geringem Abstand zueinander an die komplementäre DNA und ermöglichen damit eine Fluoreszenzübertragung vom Donor auf den Akzeptor. Damit wird ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermöglicht (siehe Abb.2). Letztendlich wird das emittierte Lichtsignal vom Akzeptor gemessen, wobei sich dessen Anstieg proportional zur DNA-Menge verhält. Sowohl TaqMan- als auch Hybridisierungssonden benötigen neben den Primern am 5'- und am 3'-Ende des DNA-Fragments ebenso einen spezifischen, fluoreszenzmarkierten Primer, der innerhalb der Sequenz liegt. Diese fluoreszenzmarkierten Primer sind jedoch nur begrenzt haltbar [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007].

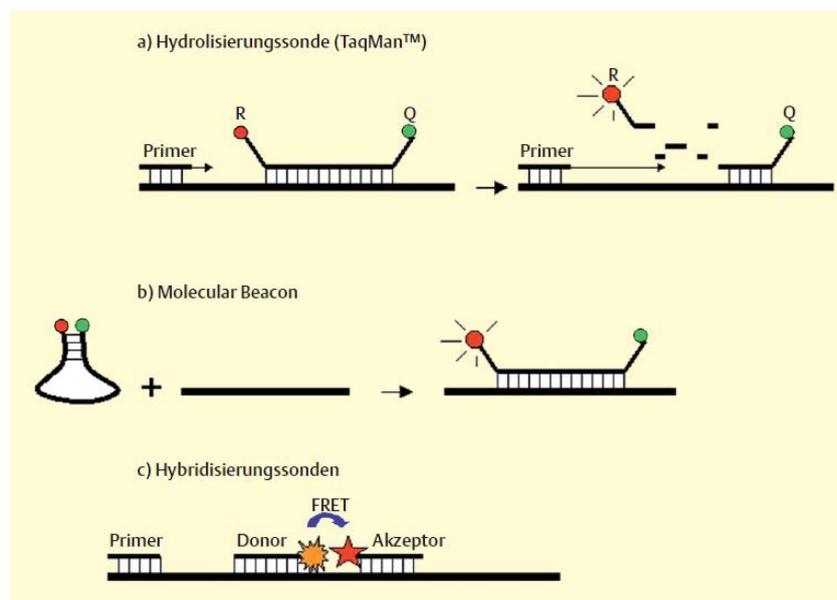


Abbildung 2. TaqMan-Sonden, Molecular Beacon, und Hybridisierungssonden als Fluorochrome in der Real-Time PCR [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007]

2.2.4.2. Primerdesign und Amplikonauswahl

Die Wahl eines guten Primer-Designs ist einer der wichtigsten Parameter in einer erfolgreichen Real-Time PCR. Die optimale Primerkonzentration liegt zwischen 50 und 500nM. Primer sollten aus 18-24 Nukleotiden bestehen, was zu einem optimalen Annealingschritt führt. Sie sollen für eine Zielsequenz spezifisch sein und gleichzeitig keine internen sekundären Strukturen aufweisen [INVITROGEN, 2008]. Die am häufigsten verwendeten PCR- und Real-Time PCR-Primer bestehen meistens aus 1-30 Basen, wobei sie einen Anteil von 40-60% Guanidin und Cytosin aufweisen [MÜLHARDT, 2006].

Ein hoher GC-Gehalt führt zur Bildung von stabilen Imperfekthybriden, während ein hoher AT-Gehalt den Schmelzpunkt von perfekt zusammenpassenden Hybriden herabsetzt. Wenn möglich, so sollte das 3' Ende des Primers reich an GC-Basen sein, was zu einer Verbesserung der Annealingphase führt [INVITROGEN, 2008]. Dabei sollte der Primer nicht mehr als 4 gleiche Basen nacheinander enthalten, damit eine Fehlhybridisierung und Leserasterverschiebung vermieden werden kann. Die Schmelztemperatur sollte etwa 55-80°C betragen, damit eine ausreichend hohe Annealingtemperatur möglich ist [MÜLHARDT C., 2006].

Ebenso spielt die Auswahl des richtigen DNA-Templates eine entscheidende Rolle in der PCR. Dabei wird sehr häufig die mitochondriale DNA bevorzugt verwendet, da sie einige Vorteile im Gegensatz zur nuklearen DNA aufweist. Da die mitochondriale DNA in einer Vielzahl an Zellkopien vorliegt, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit, die manchmal in sehr kleinen Mengen vorliegenden spezifischen Sequenzen zu detektieren. Zusätzlich erhöht sich die Chance, DNA-Fragmente sogar noch nach Denaturierungs-Prozessen zu amplifizieren [BOTTERO und DALMASSO, 2010]. Dabei weist das *cytB*-Gen eine sehr hohe Diversität an Regionen zwischen den einzelnen Spezies auf, weshalb es sehr gerne zur Speziesidentifizierung herangezogen wird [PETER et al, 2004]. Die meisten qualitativen Methoden arbeiten mit dieser mitochondrialen DNA, da diese eine hohe Empfindlichkeit aufweist. Um eine speziesspezifische DNA quantifizieren zu können, werden mitochondriale Gene alleine als Molekularmarker nicht immer empfohlen. Die Kopienanzahl der mitochondrialen Gene pro Zelle variiert stark in den unterschiedlichen Spezies, aber auch zwischen den einzelnen Individuen bzw. zwischen den einzelnen Geweben, von denen die DNA entnommen wird [BOTTERO und DALMASSO, 2010].

Diese mitochondriale DNA-Variabilität kann durch entsprechende Maßnahmen eingeschränkt werden. *Lopparetti et al.* entwickelten dazu eine Real-Time PCR, in der Zusatz von Kuhmilch zu Büffelkäse nachgewiesen werden konnte. Dabei analysierten sie neben dem mitochondrialen *cytB*-Gen, welches zur Quantifizierung von Kuhmilch-DNA beitrug, auch das nukleare Wachstumshormon (GH) Gen, welches als universeller Referenzmarker eingesetzt wurde [LOPPARELLI et al., 2007].

Pro Real-Time PCR Reaktion sollten zwischen 10 und 1000 Kopien einer Template-Nukleinsäure verwendet werden, was in etwa 100 pg bis 1 µg genomischer DNA entspricht. Ein Überschuss an DNA bringt auch ein erhöhtes Kontaminationsrisiko mit sich und reduziert gleichzeitig die Effizienz [INVITROGEN, 2008].

Während man für die Amplikonlänge in der konventionellen PCR oft eine Länge von mehr als 200 bp anstrebt, damit diese dann besser im Agarosegel aufgetrennt werden können, sollte die Zielsequenz für die Real-Time PCR wesentlich kürzer sein [LEVIN, 2008]. Bezüglich der Amplikonlänge gibt es unterschiedliche Empfehlungen, wobei sie prinzipiell nicht zu lange sein darf, da ansonsten die Effizienz der Real-Time PCR sinkt und durch längere Zielsequenzen auch längere Extensionszeiten erforderlich werden. *Invitrogen* empfiehlt in seinem Handbuch zur Real-Time PCR eine Amplikonlänge von 80 bis maximal 250 bp [INVITROGEN, 2008]. Im Gegensatz dazu gibt *BIO-RAD* in seiner Anleitung zur Real-Time PCR die Empfehlung von einer Länge von 75 bis nur 200 bp. Dabei sollte das Amplikon nicht kürzer gewählt werden, da es ansonsten schwierig ist, etwaige Primerdimere von spezifischen Produkten zu unterscheiden [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

Mouillesseaux et al. zeigten, dass durch eine Veränderung der Amplikonlänge von 50 bp auf 75 - 100 bp sowohl die Spezifität aufgrund einer höheren Schmelztemperatur des Amplikons, aber auch die Empfindlichkeit der Detektion verbessert werden konnten. Des Weiteren ermöglichte eine höhere Schmelztemperatur eine bessere Differenzierung von spezifischen Produkten, unspezifischen Produkten, und Primerdimeren [MOUILLESSEAUX et al., 2003].

2.2.4.3. Real-Time PCR Ergebnisse und Interpretation

Um die Ergebnisse interpretieren zu können, müssen zuerst wichtige Parameter erläutert werden. Die Basislinie der Real-Time PCR entspricht dem Signallevel, das während der Anfangszyklen der PCR, normalerweise zwischen den Zyklen 3 bis 15, auftritt, wobei auf diesem Level nur wenig Veränderung des Fluoreszenzsignals zu erkennen ist. Diese Basislinie sollte bei jedem PCR-Lauf empirisch bestimmt werden, wobei dies entweder durch den Benutzer selbst oder aber automatisiert ablaufen kann. Die Basislinie sollte einerseits über der Hintergrund-Fluoreszenz liegen, andererseits jedoch noch unter dem Wert, an dem das Signal stark zu steigen beginnt [INVITROGEN, 2008].

Die sogenannte Threshold-Linie bedeutet den Level, an dem erstmals das Signal signifikant über der kalkulierten Basislinie liegt. Dabei unterstützt es die Hervorhebung des Amplifikations-Signals von der Hintergrund-Fluoreszenz. Üblicherweise stellt die Real-Time PCR-Software den Threshold

automatisch auf etwa die 10fache Standardabweichung des Fluoreszenzwertes der Basislinie. Diese Threshold-Linie lässt sich jedoch auch manuell verändern, damit einzelne Werte miteinander verglichen werden können [INVITROGEN, 2008].

Der „threshold-cycle“ (C_T -Wert) entspricht der Zyklenanzahl, an der das fluoreszierende Signal erstmals den Threshold kreuzt und somit die Fluoreszenz erstmalig über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Dieser C_T -Wert, der den Anfang der exponentiellen Phase der Kurve beschreibt, wird zur Quantifizierung der DNA-Konzentration verwendet. Vergleicht man C_T -Werte zweier Proben, so erhält man Informationen bezüglich der DNA-Konzentration der Probe vor der Amplifikation. Will man C_T -Werte mehrerer Reaktionen miteinander vergleichen, so ist es wichtig, dass man die entsprechende Threshold-Linie gleich setzt [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007].

Die Real-Time PCR lässt sich in mehrere Phasen einteilen. Während in der Startphase die DNA-Menge noch begrenzt vorliegt, so erreicht sie in der Plateauphase einen so hohen Anstieg, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und damit die PCR hemmen. Zwischen Startphase und Plateauphase liegt die exponentielle Phase. In dieser exponentiellen Wachstumsphase, die sich in der Anhäufung der Fluoreszenz und somit der Produkte äußert, verdoppelt sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen. Der Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung verwendet [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007].

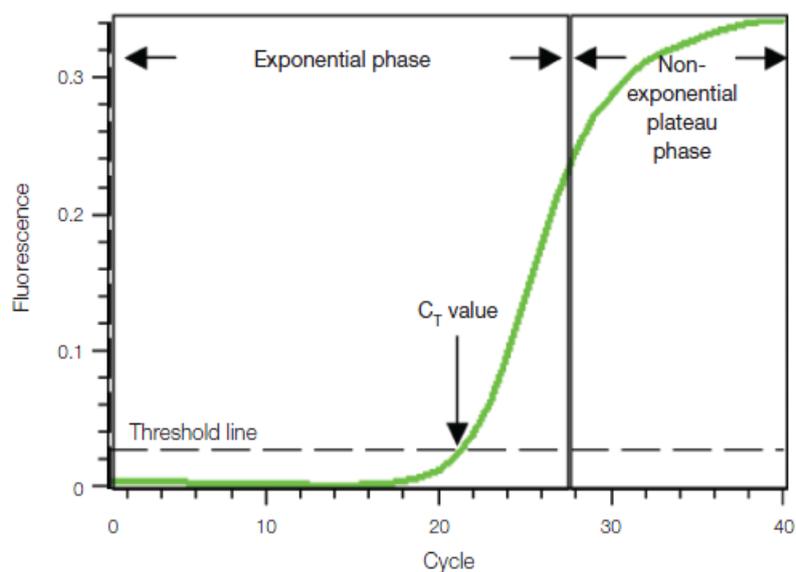


Abbildung 3. Amplifikationskurve einer Real-Time PCR [BIORAD LABORATORIES, 2006]

Abb. 3. zeigt eine Amplifikationskurve, wobei die x-Achse der Zyklenanzahl und die y-Achse der gemessenen Fluoreszenz entsprechen. Dabei ist die gemessene Fluoreszenz der amplifizierten DNA-Menge proportional.

Neben der Amplifikationskurve erhält man in der Real-Time PCR noch eine Standardkurve. Diese Kurve entsteht mittels linearer Regression durch Auftragen des dekadischen Logarithmus der Start-DNA-Konzentrationen gegen die dazugehörigen C_t -Werte. Dabei werden meist bekannte Template-Konzentrationen verwendet, um anschließend den C_t -Wert unbekannter Proben ablesen zu können [INVITROGEN, 2008].

Um die Real-Time PCR anhand verschiedener Faktoren überprüfen zu können, muss aus einer Probe mit bekannter oder unbekannter Konzentration eine Verdünnungsreihe in Zehnerstufen hergestellt werden [BIORAD LABORATORIES, 2006]. Des Weiteren gibt die Standardkurve Auskunft bezüglich Bestimmtheitsmaß, Effizienz, slope, und y-intercept-Wert [INVITROGEN, 2008].

Das Bestimmtheitsmaß beschreibt, wie gut Daten in die Standardkurve passen. Somit reflektiert es die Linearität der Standardkurve. Im Idealfall liegt es bei 1, wobei Werte von 0,999 als maximale Werte in der Real-Time PCR angesehen werden [INVITROGEN, 2008]. Das Bestimmtheitsmaß kann vor allem durch große Unterschiede zwischen den C_t -Werten von Replikaten negativ beeinflusst werden [BIORAD LABORATORIES, 2006].

Die Effizienz kann aus der Steigung der Standardgeraden abgeleitet werden, wobei eine Effizienz von 100% einem Zyklenabstand von 3,32 entspricht. Dies würde eine 100%ige Verdopplung der DNA nach jedem Zyklus bedeuten, was wie bereits erwähnt, nur in der Theorie möglich ist. Die Effizienz kann mittels folgender Gleichung berechnet werden: $E = 10^{-1/S}$

wobei E der Effizienz und S der Steigung der Standardgeraden entspricht [INVITROGEN, 2008].

Da die Effizienz gerne in Prozent angegeben wird, muss folgende Umrechnung angewendet werden:

$$\% \text{ Effizienz} = (E - 1) \times 100$$

Sowohl die Länge, das Auftreten von Sekundärstrukturen, oder der GC-Gehalt des Amplikons können die Effizienz beeinflussen. Des Weiteren verschlechtern nicht-optimale Reagenzien-Konzentrationen, aber auch die Enzymqualität die Effizienz, wobei diese dann oft unter 90% liegt [BIORAD LABORATORIES, 2006]. Im Gegenteil dazu führen PCR-Inhibitoren zu einer erhöhten Effizienz von mehr als 110%. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sollte die Effizienz immer zwischen 90% und 110% liegen, was einem Zyklenabstand von -3,58 bis -3,1 entsprechen würde.

Der y-intercept-Wert korreliert mit dem theoretischen Nachweislimit bzw. dem erwarteten C_t -Wert bei der geringsten möglichen DNA-Menge. Obwohl die Real-Time PCR prinzipiell in der Lage ist, auch nur eine einzige DNA-Kopie nachzuweisen, so findet man in der Literatur als niedrigstes DNA-Level meist eine Anzahl von 10 Kopien, die mittels Real-Time PCR noch detektiert werden können. Somit ist die Nützlichkeit des y-intercept-Wertes als direkte Messung der Empfindlichkeit limitiert. Nichtsdestotrotz erweist sich der Wert beim Vergleichen verschiedener Amplifikationssysteme als äußerst nützlich [INVITROGEN, 2008].

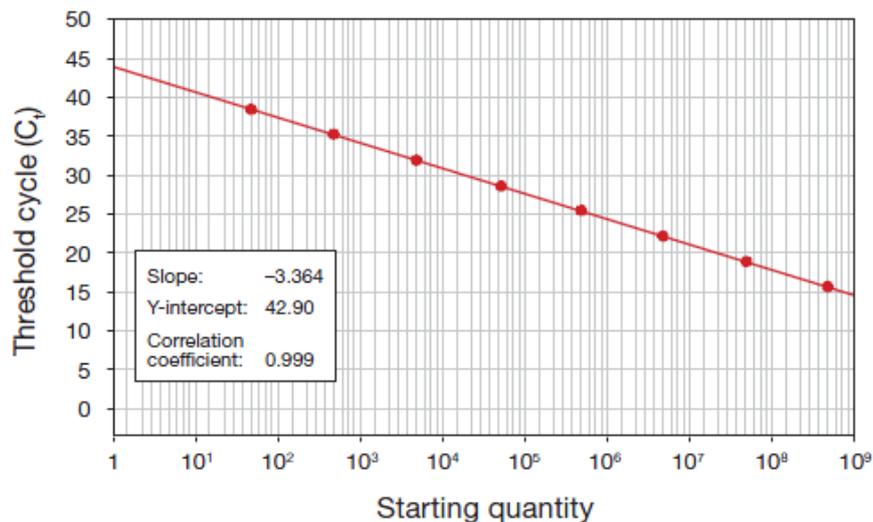


Abbildung 4. Standardkurve einer Real-Time PCR [INVITROGEN, 2008]

Abb. 4. zeigt eine Standardkurve, wobei die x-Achse der Start-Konzentration der DNA und die y-Achse dem dazugehörigen C_t -Wert entsprechen.

Um die Spezifität der Real-Time PCR zu erhöhen, muss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Sie dient dabei der Feststellung der Schmelztemperatur (TM), die für jedes Amplikon spezifisch ist. Dabei misst sie die Fluoreszenz-Veränderung zu dem Zeitpunkt, zu dem doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen geschmolzen wird. Dies resultiert bei eingebauten Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität, da sich der Marker wieder von der DNA lösen kann. Die Schmelzkurvenanalyse ist eine gute Möglichkeit, die Reaktionsspezifität zu erhöhen. Da die TM der Nukleotide stark von der Amplikonlänge, dem GC-Gehalt, und dem Auftreten von Basenfehlstellungen abhängt, können verschiedene PCR-Produkte aufgrund ihrer Schmelzcharakteristika gut unterschieden werden [INVITROGEN, 2008].

Die negative erste Ableitung der Fluoreszenzänderung kann als Funktion der Temperatur aufgetragen werden und ergibt somit einen charakteristischen Peak beim Schmelzpunkt des Amplikons [BIORAD

LABORATORIES, 2006]. Durch die Schmelzkurvenanalyse können Primer-Dimere identifiziert werden, da diese eine niedrigere T_M als das Amplikon aufweisen. Das Auftreten von Primer-Dimeren tritt am häufigsten in no-template controls (NTCs) auf, weshalb mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse der NTCs zwischen Primerdimeren und einer Kontamination unterschieden werden kann [INVITROGEN, 2008].

2.2.4.4. Quantifizierung

Man unterscheidet in der Real-Time PCR zwischen absoluter und relativer Quantifizierung. Um Ergebnisse quantifizieren zu können, müssen sie zuerst normalisiert werden. Dabei ist zu gewährleisten, dass vor allem bei der relativen Quantifizierung zur Normalisierung die Ergebnisse immer von gleichen Mengen an Proben verglichen werden [BIORAD LABORATORIES, 2006].

Die absolute Quantifizierung erlaubt eine exakte Bestimmung der Vervielfältigungsanzahl, wobei diese Methode zu den arbeitsintensiven und schwierigen Quantifizierungsverfahren zählt. Sie benötigt neben einer sorgfältigen Planung eine hoch exakte Standardkurve. Um eine absolute Quantifizierung durchzuführen, muss mithilfe eines einzelnen Templates einer bekannten Konzentration eine Standardkurve generiert werden, an der man jede Konzentration zu deren spezifischen C_t -Wert ablesen kann. Die unbekannte Probe wird danach mit der Standardkurve verglichen, wobei ein exakter Wert abgelesen werden kann [INVITROGEN, 2008]. Dazu muss eine Verdünnungsreihe erstellt werden, die eine Berechnung des Zielgens aus den unbekanntenen Proben ermöglicht [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007].

Die relative Quantifizierung hingegen benötigt zwar immer noch eine sorgsame Planung, jedoch dient diese Methode nur zur Bestimmung der relativen Menge. Hierfür wird eine interne Kontrolle, die einem Gen-Transkript entsprechen kann, benötigt [INVITROGEN, 2008]. Die Zielgen-Expression wird mit diesem Referenzgen normalisiert, indem die Signale des Referenzgens zum Ausgleich von Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA verwendet werden. Da die Effizienz in der Praxis oft schwankt, sollte zur Auswertung einer relativen Quantifizierung immer eine Effizienzkorrektur erstellt werden. Neben der Effizienz spielt auch die richtige Wahl der internen Kontrolle eine entscheidende Rolle. Dabei sollte das ideale interne Kontrollgen leicht zu detektieren sein, während sich seine Expression während des Zellzyklus, zwischen den Zelltypen, oder als Antwort auf eine experimentelle Behandlung wie Stress, Medikamente, etc. nicht variieren darf. Zu den am häufigsten verwendeten Referenzgenen zählen verschiedene ribosomale RNA-Gene wie beispielsweise 18S und 28S rRNA-Gene, aber auch andere Gene wie z.B. das β -Aktin-mRNA-, oder das Ubiquitinin-Gen. Heute verwendet man zusätzlich eine neue Generation von Referenzgenen wie

beispielsweise das β -2-Mikroglobulin- oder Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-Gen (HPRT). Um valide Daten zu erhalten, sollte immer eine Normalisierung des Zielgens mit mindestens drei unabhängigen Referenzgenen durchgeführt werden [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007].

Diese Methode findet vor allem in Genexpressionsstudien eine hohe Anwendung, wobei hauptsächlich mittels ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$, und Standardkurve quantifiziert wird. Eine relative Quantifizierung mittels ΔC_t dient dabei als Basisform. Der C_t eines erwünschten Gens wird sowohl in einer Testprobe als auch in einer Kalibrationsprobe abgelesen. Die Differenz davon ergibt das ΔC_t . Diese Methode inkludiert keine Normalisierung und auch keine Standardkurve zur Effizienz-Korrektur. Somit wird davon ausgegangen, dass dieselbe Menge an Template in beiden Reaktionen vorhanden ist und die Probenqualität ident ist. Zusätzlich wird die Amplifikationseffizienz beider Proben als äquivalent angesehen. Während die ΔC_t -Methode keine Normalisierung miteinbezieht, verwendet die $\Delta\Delta C_t$ -Methode eine oder mehrere Referenzgene zur Normalisierung der Variabilität. Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode gehört zu den sehr beliebten Techniken und bedeutet eine Verbesserung der ΔC_t -Methode. Hierbei werden die Ziel-Gene sowohl in der Testprobe als auch in der Kalibrationsprobe in Relation zu einem Normalisierungs-Gen- C_t derselben Proben adjustiert. Man erhält dadurch ΔC_t -Werte sowohl für die Probe als auch für den Kalibrator. Der $\Delta\Delta C_t$ wird schließlich aus der Differenz zwischen ΔC_t der Probe und ΔC_t des Kalibrators errechnet. Aus $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ergibt sich anschließend das normalisierte Expressionsverhältnis [BIO-RAD LABORATORIES, 2006]. Die dritte Methode zur relativen Quantifizierung erfolgt mittels Standardkurve. Diese basiert auf der C_t -Differenz zwischen dem Ziel-Gen in der Testprobe und der Kalibrationsprobe, normalisiert zu dem Referenzgen- C_t und adjustiert zur Minuten-Effizienz-Variation [INVITROGEN, 2008].

2.2.4.5. Anwendung der Real-Time PCR im Lebensmittelbereich

Da die Real-Time PCR eine kontinuierliche Verfolgung der Nukleinsäure-Amplifikation während einer PCR ermöglicht, wird diese Methode sehr gerne in verschiedenen Bereichen zum DNA-Nachweis eingesetzt. Häufig findet sie auch in der Diagnostik genetisch bedingter Erkrankungen Verwendung [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007]. Im Lebensmittelsektor gibt es einen großen Anwendungsbereich für die Real-Time PCR. So dient sie dem Nachweis biologischer Kontaminanten wie Pilzen, Pathogenen, Bakterien, Transgenen, und Allergenen. Ein weiteres Anwendungsgebiet stellt der Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) dar. Sehr häufig findet die Real-Time PCR auch Anwendung im Allergen-Nachweis [PAFUNDO et al., 2010].

Dabei wird der nicht-spezifische Farbstoff SYBR Green I, der eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA aufweist, sehr gerne zur Analyse der Schmelztemperatur von PCR-Amplikons eingesetzt.

Pafundo et al. entwickelten eine Multiplex-Real-Time PCR basierend auf dem Einsatz von SYBR GreenER, mit deren Hilfe sie sechs allergene Zielsequenzen identifizieren konnten. Da von den allergenen Proteinen mittels SYBR Green Analyse anfangs nur die Haselnuss-Sequenz identifiziert werden konnte, entwickelten die Autoren einen modifizierten SYBR GreenER-Farbstoff, mit dem nun neben der Haselnuss-Sequenz, auch noch die Mandel-, Cashewnuss-, Erdnuss-, Walnuss-, Sesam-, und Pistazien-Sequenzen identifiziert werden konnten. Dabei bestand das Untersuchungsmaterial neben Nüssen, Saaten, und Pflanzen auch aus Keksen, Schokolade, und Kräckern. Nach der Durchführung einer Simplex-PCR wurden sowohl eine Multiplex-, als auch eine Real-Time PCR/SYBR GreenER durchgeführt. Die Empfindlichkeit der Real-Time Multiplex-PCR wurde anschließend mittels äquimolarer Mixturen von DNA-Extrakten aus sechs verschiedenen Nuss-Spezies evaluiert. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass die Nachweisgrenze für Mandeln, Haselnüsse, und Erdnüsse bei 5 pg liegt, während bei Cashewnüssen, Walnüssen, und Sesam bis zu 0,5 pg detektiert werden können. Diese Werte ähneln den Ergebnissen anderer Studien, die diese Nachweisgrenzen jedoch nur mit einer Simplex-PCR erreichen konnten. Mithilfe dieser Methode konnte nicht nur das Hauptallergen, sondern auch Spuren an weiteren Allergenen identifiziert werden. So fand man z.B. in Kräckern aus Sesam auch Spuren von Haselnuss, Walnuss, und Mandeln, was sich auch in der Deklaration mittels „Kann Spuren von Nüssen enthalten“ bestätigte. Die Autoren haben bereits um ein Europäisches Patent dieser Methode als „Methode zum Allergennachweis“ angesucht [PAFUNDO et al., 2010].

Köppel et al. entwickelten und validierten ebenso zwei quantitative Multiplex Real-Time PCR-Methoden zum simultanen DNA-Nachweis von Erdnuss, Haselnuss, Sellerie, Soja, Ei, Milch, Mandeln, und Sesam. Zuerst wurde die Spezifität der einzelnen PCR-Systeme mittels Single SYBR Green-Farbstoffen demonstriert. Dies war nötig, um unspezifische Produkte in der Schmelzkurvenanalyse zu detektieren. Erst danach kamen TaqMan-Sonden zum Einsatz. Die Methoden wiesen eine hohe Spezifität und Empfindlichkeit auf, wobei eine Nachweisgrenze von 0,01% erreicht werden konnte. Da in Eiern und Milch eine niedrigere DNA-Konzentration aufzufinden war, lag deren Empfindlichkeit etwas niedriger. Des Weiteren konnte eine Kreuzreaktion zwischen Aprikosen und Mandeln gefunden werden. Inhibierende Matrices hingegen zeigten keine störenden Wirkungen auf die DNA-Amplifikation. Mit diesen Multiplex-Real-Time PCR-Methoden konnte eine Empfindlichkeit im selben Bereich wie durch eine einfache Real-Time PCR-Methode von 10-50 mg pro Kilogramm Erdnuss, Haselnuss, Mandel, Sojabohne, oder Sesam erreicht werden [KÖPPEL et al., 2010].

Die Real-Time PCR wird auch sehr gerne zur Speziesidentifizierung in Milchprodukten angewendet. *Dalmasso et al.* identifizierten mithilfe einer Real-Time PCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden sowohl Kuh- als auch Büffelmilch auf Basis des mitochondrialen *cytB*-Gens, wobei eine Nachweisgrenze von bis zu 2% erreicht werden konnte. Diese Methode hat sich auch schon in diversen Studien zur Identifizierung von Polymorphismen, die für gewisse Krankheiten verantwortlich sind, bestätigt. Dabei kam es sowohl in Milch- als auch in Blutproben zur DNA-Bestimmung. In Bezug auf komplexe Lebensmittel bringt diese Methode einige Vorteile mit sich. So ermöglicht sie eine simultane Detektion von zwei Spezies, eine Identifikation von eng verwandten Spezies, sowie eine große Zeitersparnis. Dadurch gilt sie als gute Alternative zur PCR-RFLP in komplexen Lebensmitteln [DALMASSO et al., 2011].

López-Calleja et al. entwickelten mithilfe einer Real-Time PCR-Technik basierend auf dem mitochondrialen 12 rRNA-Gen eine Methode zur Differenzierung von Ziegenmilch in Schafmilch. Dabei wurden sowohl Ziegen-spezifische Primer, die ein 171 bp Fragment amplifizierten, als auch ein Säugetier-spezifisches Primerpaar zur Amplifizierung eines 119 bp Fragments verwendet. Das säugetierspezifische PCR-System fungierte dabei als endogene Kontrolle. Unter Verwendung von fluoreszierenden TaqMan-Sonden, die spezifisch an die Ziegen-spezifischen bzw. Säugetier-spezifischen DNA-Fragmente hybridisierten, konnten die C_t -Werte miteinander verglichen werden. In Kombination dazu, wurden Referenzstandards mit einem bekannten Ziegengehalt verwendet, die eine genaue Prozentangabe von Ziegenmilch in den Proben in einem Bereich von 0,6% bis 10% ermöglichte [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007c].

In einer weiteren Studie beschrieben *López-Calleja et al.* eine Real-Time PCR zum quantitativen Nachweis von Kuhmilch in Schafmilch. Hierzu verwendeten sie neben rinderspezifischen Primern, die ein mitochondriales 12S rRNA Gen-Fragment mit der Länge von 252 bp amplifizierten, auch ein säugetierspezifisches Primerpaar, dessen Zielsequenz bei 428 bp lag. Mithilfe dieser Methode konnte ein quantitativer Nachweis von Kuhmilch in einem Konzentrationsbereich von 0,5% bis 10% erreicht werden. Zusätzlich entdeckte man, dass hitzebehandelte Milchproben um 0,5 bis 1,8 Einheiten höhere C_t -Werte als die entsprechenden Rohmilchproben aufwiesen. Diesen Effekt sah man sowohl für das rinderspezifische System als auch für das endogene Kontrollsystem, wobei vor allem im Kontrollsystem noch größere Differenzen zwischen hitzebehandelter Milch und Rohmilch auftraten. Ebenso ergab sich eine wesentlich niedrigere Effizienz im endogenen Kontrollsystem, wobei dies auf das längere Amplikon zurückzuführen ist. In beiden Studien kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass eine verlässliche Quantifizierung nur möglich ist, wenn die technologische Behandlung der Milch bekannt ist. Mit diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln einen entscheidenden Einfluss auf das Real-Time Ergebnis ausüben kann [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007b].

Die Real-Time PCR weist einige Vorteile gegenüber anderen DNA-basierten Nachweismethoden auf. So kann im Gegensatz zur konventionellen PCR eine große Anzahl an Proben gleichzeitig analysiert werden. Zusätzlich kann die Fluoreszenz während des PCR-Prozesses gemessen werden, was eine Echtzeit-Analyse ermöglicht. Die dadurch ermöglichte Quantifizierung mittels Real-Time PCR ist verlässlicher als alle anderen Endpunkt-Methoden, da die PCR-Produkte dann gemessen werden, wenn noch alle Reaktionskomponenten im Überschuss vorliegen. Des Weiteren erübrigt sich der Einsatz von post-PCR-Schritten wie Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung. Dies erspart nicht nur Zeit, sondern auch Arbeit. Zusätzlich ist das Kontaminationsrisiko minimiert, und das Risiko des Auftretens falsch-positiver Reaktionen verringert [RODRIGUEZ et al., 2004]. Die quantitative Real-Time PCR zeichnet sich durch ihre Einfachheit, Schnelligkeit, ihre hohen Spezifität, und ihre hohe Empfindlichkeit aus [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007c].

2.3. DNA-Isolierungsmethoden

Um DNA quantifizieren zu können, muss sie zuerst aus den Proben extrahiert werden. Prinzipiell wird die DNA-Qualität durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Neben dem Vorliegen von PCR-Inhibitoren in der Lebensmittelmatrix spielen auch das Ausmaß der DNA-Zerstörung und die durchschnittliche Fragmentlänge eine entscheidende Rolle. So führt übermäßige Erhitzung zu einer hohen Fragmentierung von hochmolekularer DNA, während sich durch physikalische oder chemische Behandlungen meist zufällige DNA-Strangbrüche zeigen. Beides führt letztendlich zu einer Reduktion der Fragmentlänge. Zusätzlich reagiert die DNA sehr empfindlich auf Säuren und Basen [PEANO et al., 2004].

2.3.1. Prinzip

Jede DNA-Isolierungsmethode basiert auf einem Zellaufschluss und einem anschließenden Reinigungsprozess, bei dem unerwünschte Begleitstoffe der isolierten DNA abgetrennt werden. Diese Schritte sind nötig, um eine qualitativ hochwertige DNA zur weiteren Quantifizierung zu erhalten. Der Zellaufschluss erfolgt dabei entweder durch mechanische, chemische, oder thermische Behandlung. Zu den Reinigungsschritten zählen die DNA-Fällung, Bindung an Silikaoberflächen, oder die Anionenaustauschchromatographie [MATISSEK et al., 2010].

Die Art des Zellaufschlusses hängt stark vom Untersuchungsmaterial ab. Durch einen unterschiedlichen Zellwandaufbau und das unterschiedliche Vorliegen der DNA in den einzelnen Materialien, muss für jedes Material eine spezifische Isolierungsmethode entworfen werden. Festes Material muss zunächst mechanisch zerkleinert werden, damit die Zellverbände brechen und dem Lysepuffer eine größere Angriffsoberfläche zur Verfügung steht. Dabei kommt es häufig auch zur DNA-Stück-Zerkleinerung. Ein Zellaufschluss kann sowohl durch thermische Behandlung, als auch durch Verwendung von Puffern durchgeführt werden. Diese enthalten häufig wirksame Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB). Zum Teil werden auch Proteasen eingesetzt [MATISSEK et al., 2010].

Die CTAB-Methode verwendet zum Zellaufschluss CTAB im Lysepuffer, welches mit den Proteinen und Kohlehydraten Komplexe bildet und dadurch die Freisetzung der DNA aus den Zellen erleichtert. Damit die DNA in Lösung bleibt, wird ein Lysepuffer mit hoher Salzkonzentration verwendet. Anschließend wird zentrifugiert, wobei Zellrückstände und denaturierte Proteine entfernt werden. Danach kommt es zur Behandlung mit organischen Lösungsmitteln wie Phenol oder Chloroform, damit die Lösung von den restlichen Proteinen und auch DNA-abbauenden Enzymen befreit wird. Dabei werden die störenden Bestandteile zusammen mit der organischen Phase entfernt. Bei der CTAB-Methode wird anschließend ein Präzipitationspuffer hinzugefügt, der jedoch eine niedrigere Salzkonzentration aufweist. Hierbei kommt es zur DNA-Fällung durch Komplexbildung mit dem Detergenz. Nach der Zentrifugation wird der wässrige Überstand abgetrennt und die DNA wird erneut in NaCl gelöst. Nach erneuter Reinigung mit Chloroform wird die DNA mit Isopropanol ausgefällt. Häufig wird danach ein Waschvorgang mit 70%igem Ethanol durchgeführt, damit weitere Substanzen entfernt werden können [MATISSEK et al., 2010].

Die Phenol-Chloroform-Extraktion stellt eine effektive Methode dar, die gleichzeitig auch hohe Ausbeuten erzielen kann. Problematisch dabei ist die Nutzung von toxischen Chemikalien und auch das höhere Risiko eines DNA-Carryovers verglichen mit anderen Methoden [INVITROGEN, 2008].

Andere Methoden nutzen die Möglichkeit der DNA-Bindung an Silikaoberflächen. Dabei erfolgt die DNA-Bindung in Gegenwart chaotroper Salze oder Alkohole. Der Bindungsmechanismus ist jedoch noch nicht exakt geklärt, wobei die Bindung wahrscheinlich auf zwischenmolekulare Kräfte wie elektrostatische Anziehung oder Wasserstoffbrückenbindung beruht [MATISSEK et al., 2010].

Silikabasierte Methoden zeichnen sich durch ihre schnelle und einfache Durchführbarkeit aus. Überdies wird bei dieser Methode auf Phenol verzichtet und die DNA-Reinheit ist besser. Gleichzeitig ist sie jedoch auch mit höheren Kosten und einer geringeren Ausbeute verbunden [INVITROGEN, 2008].

2.3.2. Vergleich verschiedener DNA-Isolierungsmethoden

Obwohl eine große Anzahl an verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden im Schrifttum bereits beschrieben wurde, beschäftigen sich nur wenige Publikationen mit dem Vergleich der einzelnen Verfahren.

Peano et al. verglichen vier verschiedene Extraktionsmethoden, wobei sowohl qualitative als auch quantitative Daten evaluiert wurden. Von diesen Isolierungsmethoden wurden folgende miteinander verglichen: Wizard (Promega), DNeasy Plant Minikit, QIAamp DNA Stool Minikit, und Nucleo Spin Food (Macherey-Nagel). Dabei wurden die Zellbestandteile von Mais- und Sojaprodukten zuerst lysiert, während anschließend die DNA an eine Membran-Gel-Matrix gebunden und dann laut Herstellerangaben nach dem Waschen eluiert wurde. Zur DNA-Quantifizierung wurde eine PCR-Methode mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Reinheit der DNA wurde dabei mittels Photometer gemessen, wobei ein UV-Absorptions-Quotient bei 260/280 nm durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde zur DNA-Quantifizierung ebenso eine Real-Time PCR angewendet. Die Ergebnisse demonstrierten, dass der QIAamp DNA Stool Minikit und der Wizard-Extraktionskit die höchste DNA-Ausbeute aus Lebensmittel mit einfacher Matrix wie beispielsweise Saaten oder Mehl lieferten, während der Nucleo Spin Food Kit (Macherey-Nagel) die höchste Ausbeute in komplexen Lebensmittel wie Tacos, Tofu, oder Kräckern erbrachte. Des Weiteren kam diese Studie zu dem Ergebnis, dass unterschiedliche Lebensmittelbehandlungen die DNA-Qualität stark beeinflussen können [PEANO et al., 2004].

Zimmermann et al. hingegen evaluierten neun kommerzielle und nicht-kommerzielle DNA-Extraktionsmethoden, wobei neben der DNA-Qualität und -Quantität auch das Arbeitszeitausmaß und die Kosten miteinbezogen wurden. Neben den häufig verwendeten kommerziellen Kits wie Wizard-, DNeasy-, und Nucleon Phopure-Kit, wurden auch Verfahren wie die CTAB-Methode, die eine billige Alternative zu den kommerziellen Kits darstellt, die Chelex100-Methode, die als Standardprotokoll in der forensischen Analyse gilt, ROSE und Alkali, die sich als einfache und schnelle Methoden auszeichnen, und ROSEX und AlkaliX, die eine Kombination zweier Methoden darstellen, miteinander verglichen. Die DNA-Quantifizierung erfolgte dabei mittels UV-Messung, wobei ebenso ein A_{260}/A_{280} -Quotient herangezogen wurde. Des Weiteren wurde sowohl für die DNA-Quantifizierung als auch -Qualifizierung eine PCR-Methode angewandt.

Prinzipiell lassen sich die Methoden in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe zählen neben der CTAB-Methode die drei kommerziellen Methoden Wizard, DNeasy, und Nucleon Phytopure, während die zweite Gruppe aus Chelex100, ROSE, ROSEX, Alkali, und AlkaliX bestand. Die erste Gruppe lieferte zwar nur eine geringe DNA-Ausbeute von weniger als 20%, während einfachere

Methoden wie ROSE, Alkali, oder Chelex100 weit höhere Ausbeuten mit mehr als 70% aufwiesen. Gleichzeitig jedoch erzielte die erste Gruppe eine weitaus höhere DNA-Qualität. Des Weiteren konnte im Speziellen in Tofu mithilfe der Wizard-Methode die niedrigste Nachweisgrenze erzielt werden, während mit den DNeasy-Kits ein 10fach schlechteres Ergebnis erreicht wurde. Die Nucleon Phytopure- und AlkaliX-Methoden konnten in Tofu nur 1 µg - 100 ng an DNA nachweisen, was sie für den DNA-Nachweis in Tofu ungeeignet macht. Die CTAB-Methode lieferte eine Nachweisgrenze von 10 ng, während die Chelex100 10 - 100 ng DNA nachweisen konnte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam man auch bei der Untersuchung von Sojamehl. Auch hier erreichte die Wizard-Methode die niedrigste Nachweisgrenze von 1ng und somit die beste DNA-Qualität, während die anderen Extraktionsmethoden nur ein Limit von 10 ng oder gar 100 ng aufweisen konnten. Zusätzlich wurden auch der Zeitaufwand und die Kosten der einzelnen Methoden miteinander verglichen. Wie erwartet, gehörten die kommerziellen Kits (Wizard, DNeasy, Nucleon Phytopure) zu den teuersten Verfahren, während andere Methoden wie CTAB, AlkaliX und ROSEX zwischen 16 und 54mal billiger waren. Zusätzlich benötigten Erstere einen weitaus größeren Zeitaufwand, wobei dies auf die langen Inkubationszeiten zurückzuführen ist [ZIMMERMANN et al., 1998].

Chapela et al. entdeckten während der Evaluierung von vier verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden in Thunfischprodukten, dass nicht nur das Produkt, also der Thunfisch, selbst einen Einfluss auf die optimale Isolierungsmethode ausübt, sondern dass ebenso das Milieu, in dem sich das Produkt befindet, eine entscheidende Rolle spielt. So erhielt man einerseits in Thunfischdosen in Öl oder Essig die exaktesten Resultate mit der CTAB-Methode, während für Thunfisch in Salzlake die Wizard-Technik die ideale Isolierung darstellte. Im Gegensatz dazu erreichte man mithilfe der Genomic Prep-Methode die besten Ergebnisse in Thunfisch mit Tomatensauce. Des Weiteren lieferte die Wizard-Methode erneut die höchste DNA-Qualität [CHAPELA et al., 2007].

Da bereits eine Vielzahl an Studien mit dem Wizard DNA Clean-Up System als DNA-Extraktionsmethode Erfolg in der Speziesidentifizierung in Milchprodukten verzeichnen konnten, [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007a; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007b; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007c; LÓPEZ-CALLEJA DÌAZ et al., 2007; PAFUNDO et al., 2010] wird diese als hauptsächliche DNA-Extraktionsmethode in der vorliegenden Masterarbeit verwendet. Daneben werden jedoch auch noch weitere kommerzielle Isolierungsmethoden angewandt und miteinander verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Probenmaterial

Für den Nachweis des Kuhmilchanteils in Schafmilch- und Ziegenmilchprodukten wurden zwei Modelkäse als Standard verwendet. Dabei kam neben der Winter(Z)-Bryndza-Reihe, auch die aus einer Mischungsreihe hergestellte Wolfpassing-Reihe zum Einsatz. Tab. 1 zeigt den Kuhmilchanteil der Winter(Z)-Bryndza-Reihe in %, der laut Hersteller enthalten war. Zusätzlich wird der Kuhmilchanteil in %, der mit der Isoelektrischen Fokussierung nachgewiesen wurde, angegeben. Tab. 2 zeigt den Kuhmilchanteil der Wolfpassing-Reihe. Die 21 Handelsproben wurden anhand dieser Standardreihen analysiert.

Da alle bereits vorhandenen Negativproben falsch-positive Ergebnisse lieferten und somit einen gewissen Kuhmilchanteil aufwiesen, wurden eine 100% Schafmilch und eine 100% Ziegenmilch aus dem Lehr- und Forschungszentrum Francisco Josephinum in Wieselburg als Negativproben verwendet (siehe Tab.3).

3.1.1. Standardreihe

Mithilfe der EU-Referenzmethode, der Isoelektrischen Fokussierung, wurde der Kuhmilchanteil in % errechnet. Dabei musste die „0 % Probe“ korrigiert werden [MAYER et al., 2008].

Tabelle 1: Winter(Z)-Bryndza – Kuhmilchanteil laut Hersteller bzw. mit IEF korrigiert

Nr.	Kuh (%) laut Hersteller	Kuh (%) laut IEF
10 Z	100%	90%
1 Z	80%	80,76%
2 Z	70%	71,14%
3 Z	60%	61,52%
4 Z	55%	56,71%
5 Z	50%	51,9%
6 Z	45%	47,09%
7 Z	40%	42,28%
8 Z	30%	32,66%
9 Z	20%	23,04%
11 Z	?	3,8%

Die einzelnen Standards wurden je nach erwartetem Kuhmilchanteil mit den jeweiligen Handelsproben gemischt.

Tabelle 2: Wolfpassing-Reihe – Kuhmilchanteil laut Hersteller

Nr.	Kuhmilchanteil in %	Beschreibung
Negativprobe	0%	100% Ziegenmilch, 100% Schafmilch
10	0,5%	Wolfpassing
11	1%	Wolfpassing
12	2,5%	Wolfpassing
13	5%	Wolfpassing
14	10%	Wolfpassing
15	25%	Wolfpassing
16	50%	Wolfpassing
17	75%	Wolfpassing
18	100%	Wolfpassing

Tabelle 3: Negativproben – 100% Ziegenmilch und 100% Schafmilch

Nr.	Kuhmilchanteil in %	Beschreibung
S	0%	100% Schafmilch
Z	0%	100% Ziegenmilch

3.1.2. Handelsproben

Die Handelsproben wurden in 3 Gruppen eingeteilt, damit sie exakter mit der entsprechenden Standardreihe analysiert werden konnten. Die Gruppe 1 bestand dabei aus den Proben 11, 17, und 19, die laut IEF einen Kuhmilchanteil von 0 bis 7% aufwiesen (siehe Tab. 4). Die 2. Gruppe bestand aus den Handelsproben 8, 4, 16, 6, 14, 1, 5, 20, und 13, wobei deren Kuhmilchanteil laut IEF zwischen 50 und 72% lag (siehe Tab. 5). Zur dritten Gruppe zählten die Handelsproben 12, 3, 10, 15, 7, 9, 21, 2, und 18, wobei diese einen Kuhmilchanteil von 73 bis 91% hatten (siehe Tab. 6).

Tabelle 4: Gruppe 1 - Kuhmilchanteil laut IEF

Nr.	Kuh (%) laut IEF
11	0%
17	3%
19	7%

Tabelle 5: Gruppe 2 – Kuhmilchanteil laut IEF

Nr.	Kuh (%) laut IEF
8	50%
4	50%
16	61%
6	64%
14	64%
1	69%
5	70%
20	71%
13	72%

Tabelle 6: Gruppe 3 – Kuhmilchanteil laut IEF

Nr.	Kuh (%) laut IEF
12	73%
3	75%
10	76%
15	77%
7	80%
9	82%
21	84%
2	91%
18	91%

3.2. DNA-Isolierung

Um eine Polymerasekettenreaktion erfolgreich durchführen zu können, musste die zu amplifizierende DNA zuerst isoliert werden. Dabei übernimmt die Qualität der DNA eine entscheidende Rolle. Diese hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren, der durchschnittlichen DNA-Länge, und dem Verarbeitungsgrad des Nahrungsmittels ab [DI BERNANDO et al., 2007]. Das exakte DNA-Isolierungs-Prinzip und weitere Einflussfaktoren wurden bereits in Kapitel 2.3. erläutert.

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde die DNA aus Käse- bzw. Milchproben sowohl mit Hilfe des „DNeasy Blood and Tissue Kits“ von Qiagen, als auch mit dem „Wizard DNA Clean-Up System“ von Promega isoliert und gereinigt.

3.2.1. Wizard-Methode

3.2.1.1. Prinzip

Um eine entsprechende DNA-Lösung zum Auftragen auf das Wizard DNA Clean-Up System zu erhalten, mussten die Proben zuerst mittels eines Extraktionspuffers, einer Guanidin-Hydrochlorid-Lösung, und einer Proteinase K lysiert werden. Nach einer Inkubation über Nacht im Thermoschüttler, wurden nach Abkühlung auf Raumtemperatur 0,5 ml Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, wobei der wässrige Überstand der DNA-Lösung entsprach. Nach dem Auftragen auf die Säule wurde die DNA selektiv an die Membran gebunden, wobei Verunreinigungen durch die Membran hindurch gespült wurden. Durch den anschließenden Waschvorgang mit 80%igem Isopropanol wurden verbleibende Kontaminationen und Inhibitoren entfernt. Mit Hilfe eines AE-Puffers wurde im letzten Schritt die DNA aus der Membran eluiert [PROMEGA, 2010].

3.2.1.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien

Tabelle 7: Geräte und Hilfsmittel für die DNA-Isolierung (Wizard)

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Gummistoppel	steril	
Kolbenhubpipetten	20 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson, VWR
Pipettenspitzen	Biozym Safe Seal-Tips professional	Biozym
Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Skalpell		
Spritzhülse	Syringe Barrels (3 cc)	Promega
Thermoschüttler	Mixing Block MB-102	Biozym Scientific
Membranpumpe	Vakuum	Millipore
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica
Waage	Feinwaage Mettler AE 163	Mettler Toledo
Wizard Minisäule	Wizard Minicolumns	Promega
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
Messzylinder		

Tabelle 8: Reagenzien und Lösungen für die DNA-Isolierung (Wizard)

Reagenz/Lösung	Beschreibung	Hersteller
AE-Puffer	Eluierungspuffer	Qiagen
Chloroform		
EDTA	0,5 M EDTA, pH 8	GIBCO BRL
Guanidin-Hydrochlorid		LOBA-Chemie, Wien-Fischamend
Isopropanol	100%	
NaCl	150 mM	
Proteinase K	20 mg/ml	Qiagen
SDS	10% Sodium Dodecyl Sulfate	Lonza
Tris-HCl	siehe Kapitel 3.4.3.	
Wizard DNA Clean-Up Harz		Promega

3.2.1.3. Herstellung der Lösungen

Aus den oben aufgelisteten Reagenzien wurden folgende Gebrauchslösungen hergestellt. Dabei wurden die Lösungen immer für mehrere Ansätze angefertigt.

Extraktionspuffer

Damit nicht für jede einzelne Probe ein eigener Puffer hergestellt werden musste, wurden immer 20 ml Extraktionspuffer vorgefertigt. Um einen entsprechenden Extraktionspuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS; pH 8) herzustellen, wurden folgende Lösungen verwendet:

- 80 µl 0,5 M EDTA,
- 2000 µl 10%ige SDS
- 600 µl 5 M NaCl
- 200 µl 1M Tris HCl
- 17120 µl UHQ-Wasser

Guanidin-Hydrochlorid

Um eine 5 M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung herzustellen, wurden 477,70 mg/ml eingewogen.

80%ige Isopropanol-Lösung

Eine 100%ige Isopropanol-Lösung wurde verdünnt, um eine 80%ige Waschlösung zu erhalten. Hierzu wurden folgende Lösungen verwendet:

- 16 µl 100%ige Isopropanol
- 4 µl UHQ-Wasser

3.2.1.4. Durchführung

Die Wizard-Extraktionsmethode bestand aus zwei Teilen. Während mit Hilfe des Extraktionspuffers, dem Guanidin-Hydrochlorid, und der Proteinase K die Proben zuerst extrahiert und lysiert wurden, kam es nach anschließender Chloroform-Entproteinierung zum eigentlichen Waschvorgang und der Eluierung mittels Wizard DNA Clean-Up System.

3.2.1.4.1. Extraktion und Lyse

Um die DNA aus den Käseproben zu extrahieren, wurde mit zwei Methoden gearbeitet. In der ersten, ursprünglichen, Methode wurden mit einem mit Ethanol abgeflamnten, autoklavierten Skalpell aus einem frischen Teil des Käses 200 mg Probe entnommen und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 860 µl Extraktionspuffer, 100 µl Guanidin-Hydrochlorid-Lösung, und 20 µl Proteinase K. In der zweiten, modifizierten, Methode wurden 2 g Käse eingewogen, die anschließend mit 8,6 ml Extraktionspuffer homogenisiert wurden. Diese Modifikation wurde aufgrund der großen Inhomogenität der Käseproben eingeführt. Von diesem Extraktions-Käse-Gemisch wurden 1060 µl entnommen und mit 100 µl Guanidin-Hydrochlorid-Lösung und 20 µl Proteinase K vermengt. Für die Milchproben wurde 1 ml Probe in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach vollständigem Einfrieren wurden die Milchproben mit Paraffin bedeckt und gefriergetrocknet.

Danach wurden alle Proben über Nacht im Thermoschüttler bei 55°C und 60 rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben erstmals auf Raumtemperatur gekühlt und anschließend mit 500 µl Chloroform versetzt. Dies diente der Eiweiß-Entfernung. Nach Zentrifugation bei 15000 x g für eine Dauer von 10 Minuten entstand ein wässriger Überstand, der der DNA-Lösung entsprach. Diese gewonnene DNA-Lösung kam auf ein Volumen von etwa 1000 µl. Laut Herstellerangaben sollten davon jedoch nur 500 µl weiterverwendet werden. In dieser Arbeit wurde modifizierte Methode für die meisten Handelsproben angewandt, während bei den Standardreihen beide 500 µl Anteile verwendet wurden, was einen Doppelansatz ermöglichte. Dadurch erhielt man am Schluss die doppelte DNA-Menge, mit der weitergearbeitet wurde.

Diese Extraktion und Lyse der Proben wurde aus erfolgreichen Publikationen zur DNA-Extraktion aus Käse verwendet [LOPÉZ-CALLEJA et al., 2005 und ZIMMERMANN et al., 1998].

3.2.1.4.2. Wizard DNA Clean-Up System (Promega A7280)

Während der Zentrifugation wurden 1 ml des Wizard DNA Clean-Up Harzes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Dabei sollte das Harz vor Benutzung gut geschüttelt und im Falle von Kristallbildung auf etwa 37°C für 10 Minuten erhitzt werden. Das Harz musste daraufhin auf 25-30°C gekühlt werden, bevor es benutzt wurde. Anschließend wurden 500 µl der DNA-Lösung in die Reaktionsgefäße mit dem Harz hinzugefügt. Hierbei war zu beachten, dass 1ml Harz eine maximale Bindungskapazität von 20 µg DNA aufwies. Gleichzeitig wurde eine Vakuumpumpe aufgebaut. Dabei wurde eine Spritzhülse auf die Wizard-Minisäule aufgebracht und diese über einen sterilen Gummistoppel mit einer Vakuumpumpe verbunden. Nach mehrfachem Umschwenken der Harz/DNA-

Lösung wurde dieses in die Spritzhülse pipettiert. Durch das Anlegen eines Vakuums wurde die Lösung durch die Säule transportiert. Nach Entfernen des Vakuums wurden 2 ml 80%iges Isopropanol in die Spritzhülse pipettiert. Dies diente zum Waschen der Säule, um verbleibende Kontaminationen und Inhibitoren zu entfernen. Danach wurde erneut Vakuum angelegt, wobei die gesamte Isopropanol-Lösung durch die Säule hindurchgesaugt wurde. Nach dem vollständigen Transport der Lösung durch die Säule wurde das Harz durch weiteres Anlegen von Vakuum von maximal 30 Sekunden getrocknet. Die Spritzhülse wurde danach entfernt und die Minisäule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten zentrifugiert, damit das restliche Isopropanol entfernt werden konnte. Die Säule wurde erneut in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und danach wurden 50 µl warmer (65-70°C) AE-Puffer auf die Säule pipettiert. Nach einer Minute Wartezeit wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 20 Sekunden zentrifugiert. Dabei wurde die DNA eluiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, woraufhin zuletzt das Gesamtvolumen bei 100 µl lag.

Um die Wizard-Methode zu optimieren, wurde mit unterschiedlichen Eluervolumina gearbeitet (siehe Tab. 9). Neben dem einmaligen Eluieren in 50 µl und dem zweimaligen Eluieren in 50 µl wurde auch der Versuch mit einmaligen 100 µl, zweimaligen 100 µl, und einmaligen 200 µl durchgeführt. Gleichzeitig wurde die DNA-Ausbeute zwischen einem Einfachansatz und einem Doppelansatz verglichen. Da der wässrige Überstand nach Hinzufügen von Chloroform und anschließendem Zentrifugieren in etwa 1000 µl DNA-Lösung entsprach, konnten im Prinzip zwei Anteile zu je 500 µl DNA-Lösung entnommen werden. Während beim Einfachansatz nur 500 µl weiter verwendet wurden, können beim Doppelansatz beide 500 µl-Anteile verwendet werden, was einem Anteil von 100% entsprach. Nach Entfernen der Mini-Säule wurde die DNA bei -20°C gelagert.

Tabelle 9: Vergleich verschiedener Eluervolumina

Isolierung	Eluervolumina	Wiederholung	Endvolumen
W1	50 µl	1x	50 µl
W2	50 µl	2x	100 µl
W3	50 µl	nur 1. Eluat	50 µl
W3	50 µl	nur 2. Eluat	50 µl
W4	100 µl	1x	100 µl
W4	100 µl	2x	200 µl
W5	200 µl	1x	200 µl
W6	50 µl	2x2 (Doppelansatz)	200 µl
W7	50 µl	2x2 (Doppelansatz)	200 µl

3.2.2. Qiagen-Methode

3.2.2.1. Prinzip

Die Proben werden durch Zugabe von Proteinase K und einem Lysispuffer lysiert. Dabei sind die Pufferbedingungen so einzustellen, dass eine optimale Bindung der DNA an die Silica-Membran gewährleistet werden kann. Nach dem Auftragen des Lysats auf die Säule wird die DNA selektiv an der DNeasy-Membran gebunden, wohingegen Verunreinigungen durch die Membran hindurch treten. Durch zweimaliges Waschen mit den Puffern AW1 und AW2 werden die restlichen Verunreinigungen und Enzyminhibitoren, wie beispielsweise Proteine, entfernt. Im Anschluss wird die DNA mit Hilfe eines AE-Puffers aus der Membran eluiert.

DNeasy Blood & Tissue Kits werden für eine schnelle Isolation von DNA wie genomischer, viraler, oder mitochondrialer DNA, konzipiert. Die DNA kann dabei sowohl aus frischem als auch gefrorenem tierischen Geweben oder auch Zellen, Hefen, oder Bakterien isoliert werden [QIAGEN, 2006].

3.2.2.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien

Tabelle 10: Geräte und Hilfsmittel für DNA-Isolierung (Qiagen)

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Säule	DNeasy Mini Spin Column	Qiagen
Kolbenhubpipetten	20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, VWR
Pipettenspitzen	Biozym Safe Seal-Tips professional	Biozym
Reaktionsgefäße	1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Sammelröhrchen	DNeasy Collection Tubes	Qiagen
Skalpell		
Spatel		
Thermoschüttler	Mixing Block MB-102	Biozym Scientific
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica
Waage	Feinwaage Mettler AE 163	Mettler Toledo
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
Messzylinder		

Tabelle 11: Reagenzien und Lösungen für DNA-Isolierung (Qiagen)

Reagenz/Lösung	Beschreibung	Hersteller
AE-Puffer	Eluierpuffer	Qiagen
AL-Puffer		Qiagen
ATL-Puffer	Lysispuffer	Qiagen
AW1-Puffer	Waschpuffer	Qiagen
AW2-Puffer	Waschpuffer	Qiagen
Ethanol	96-100%	Merck
Proteinase K	20mg/ml	Qiagen

3.2.2.3. Durchführung

Mit Hilfe eines sterilen Skalpell wurden aus der Mitte des Käses 150 mg Käseprobe entnommen und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden daraufhin 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K hinzugefügt und gut gevortext. Danach wurde für vier Stunden bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert. Dabei wurde zwischendurch kräftig gevortext, damit eine vollständige Lyse des Gewebes ermöglicht werden konnte. Nach der Inkubation wurde nochmals für 15 Sekunden gevortext, bevor im Anschluss 200 µl AL-Puffer hinzu gegeben wurden und die Proben erneut für 10 Minuten in den Thermoschüttler, jedoch bei einer Temperatur von 70°C, gestellt wurden. Danach wurden die Proben mit 200 µl Ethanol versetzt und alles wurde gevortext, um eine homogene Lösung zu erhalten. Daraufhin wurde die Lösung rasch und vollständig auf die DNeasy-Säule, die auf einem Sammelröhrchen platziert war, pipettiert. Nach Zentrifugation bei 8.000 rpm wurde der Inhalt des Sammelröhrchens, das „flow-through“ verworfen und die DNeasy-Säule auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Nach dem Pipettieren von 500 µl AW1-Puffer auf die Säule wurde erneut für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das „flow-through“ wurde erneut verworfen und die Säule auf ein neues Sammelröhrchen überführt. Dann wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule pipettiert und es wurde erneut für 3 Minuten bei voller Leistung (13.200 rpm) zentrifugiert. Dabei kam es zur Trocknung der DNeasy-Membran. Danach konnte das „flow-through“ abermals verworfen werden und die Säule wurde auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Zum Eluieren der DNA wurden 100 µl AE-Puffer direkt auf die Säule pipettiert. Dabei durfte die Säule nicht mit der Pipettenspitze berührt werden. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 8.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Erneut wurden 100 µl AE-Puffer auf die DNeasy-Säule aufgebracht und nach einer Minute Inkubationszeit wurde eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Danach konnte die Säule verworfen werden und die gewonnene DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.3. DNA-Ausbeute und –Qualität

Die DNA-Ausbeute bzw. -Qualität kann durch diverse Methoden analysiert werden. Bevor die DNA mittels PCR/Gelelektrophorese oder Real-Time PCR untersucht wird, kommt zuerst die photometrische Messung, die auf der Messung der Absorption basiert, zur Anwendung. Hierzu werden lediglich ein Spektrophotometer mit UV-Lampe, UV-durchlässige Küvetten, und die DNA-Lösung benötigt. Diese Methode zeichnet sich somit durch ihre leichte Handhabung, ihre Schnelligkeit, und durch ihren geringen Kostenaufwand aus. Dazu wird bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge die DNA am stärksten Licht absorbiert [WILFINGER et al., 1997].

Die DNA ist nicht das einzige Molekül, das bei 260 nm UV-Licht absorbieren kann. Insbesondere RNA, aber auch aromatische AS, beeinflussen deshalb das Ergebnis. Ebenso führt Guanidin zu einer erhöhten 260 nm Absorption [ADAMS, 2003].

3.2.3.1. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien

Tabelle 12: Geräte und Hilfsmittel für Photometermessung

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Kolbenhubpipetten	10 µl, 1000 µl	Gilson, VWR
Küvetten	Präzisions-Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL ®	Hellma
Pipettenspitzen	Biozym Safe Seal-Tips professional	Biozym
Reaktionsgefäße	1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Spektrophotometer	U-2000	HITACHI
	U-2900	HITACHI
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica

3.2.3.2. Durchführung

In ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 495 µl UHQ-Wasser vorgelegt und daraufhin 5 µl DNA-Lösung hinzugefügt. Somit wurde eine 1:100 Verdünnung erstellt, wobei auch mit einer 1:10 bzw. 1:50 Verdünnung gearbeitet wurde. Anschließend wurde gut gevortext und das ganze in Quarzglas-Küvetten überführt. Neben den Proben wurde immer ein Blindwert erstellt. Dazu wurden 5 µl AE-

Puffer mit 495 µl UHQ-Wasser vermischt. Die befüllten Küvetten wurden dann in das Photometer gestellt und nach einem Nullabgleich wurden die jeweiligen Absorptionen aufgezeichnet.

3.2.3.3. Berechnung der Konzentration bzw. DNA-Ausbeute

Um von der A_{260} auf die DNA-Konzentration zu kommen, musste folgende Formel angewandt werden:

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 50\text{ng/}\mu\text{l}$$

Dabei entsprach eine A_{260} von 1 einer DNA-Menge von 50 µg/ml. Um die gesamte DNA-Ausbeute zu errechnen, musste mit dem Gesamtvolumen multipliziert werden:

$$\text{DNA-Ausbeute (ng)} = \text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} * \text{Gesamtvolumen (}\mu\text{l)}$$

Um die DNA-Reinheit überprüfen zu können, wurde der A_{260}/A_{280} -Quotient herangezogen. Dieser sollte im Idealfall zwischen 1,7 und 2 liegen, wobei niedrigere Werte auf Kontaminanten hindeuten. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die nicht-Nukleinsäure Absorption von A_{320} zu subtrahieren.

$$\text{DNA-Reinheit} = A_{260}/A_{280}$$

$$\text{DNA-Reinheit} = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

[WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION KIT - LITERATUR]

3.2.4. Anwendung

In dieser Masterarbeit wurden im ersten Abschnitt die Qiagen- und die Wizardmethode angewandt und miteinander verglichen. Dabei wurde sowohl eine photometrische Absorptionmessung, die Aufschluss bezüglich der DNA-Reinheit gab, als auch eine Real-Time PCR zur exakten Quantifizierung durchgeführt. Während sowohl die Winter(Z)-Bryndza-Käsereihe, als auch alle Handelsproben mit der Wizard-Methode neu isoliert wurden, so wurde die Wolfpassing-Reihe aus bereits isolierten DNA-Lösungen mit Hilfe von Qiagen-Kits verwendet. Die beiden Negativproben wurden ebenso mittels Wizard DNA Clean-Up System extrahiert.

3.3. PCR - Polymerasekettenreaktion

Die PCR zählt zu den am weitesten verbreiteten molekularbiologischen Techniken zur Speziesidentifizierung in Lebensmittel. Sie zeichnet sich durch ihr einfaches Prinzip, ihre hohe Empfindlichkeit, und den geringen Zeit- und Materialaufwand aus [KROWAS, 2008].

3.3.1. Prinzip

Mit der PCR ist es möglich, aus geringsten DNA-Mengen eine möglichst hohe Ausbeute der gewünschten Sequenz zu erzielen. Sie dient dabei der Amplifizierung von Nukleinsäuren, wobei dabei ein bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigt und dieser anschließend mittels post-PCR Schritten wie beispielsweise einer Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird [POMS et al, 2004].

3.3.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien

Tabelle 13: Geräte und Hilfsmittel für PCR

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Kolbenhubpipetten	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, VWR
Kühlblöcke	diverse Kühlblöcke	
Pipettenspitzen	Biozym Safe Seal-Tips professional	Biozym
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Reaktionsgefäße	
Sterilbank	Esco® PCR Cabinet	Esco Technologies
	Captair® bio	Erlab
Thermocycler	C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica
Zentrifuge	Minizentrifuge C1200	National Labnet Co.
	Combispin FVL 2400 N	Biosan

Tabelle 14: Reagenzien und Lösungen für PCR

Reagenz/Lösung	Beschreibung	Hersteller
DNA-Polymerase	Go Taq DNA-Polymerase (5U/µl)	Promega
dNTPs	Ultrapure dNTP-Set	Roth
Primer		Eurofins MWG GmbH
Puffer	Go Taq Green 5 x Puffer	Promega
UHQ-Wasser		

3.3.3. Herstellung von Lösungen

Aus den oben aufgelisteten Reagenzien wurden folgende Gebrauchslösungen hergestellt:

dNTP-Mix

100 µl dATP-, 100 µl dCTP-, 100 µl dGTP-, und 100 µl dTTP-Lösung wurden mit 600 µl sterilem UHQ-Wasser versetzt.

Primer

Die Primer wurden laut Anweisung des Herstellers in UHQ-Wasser gelöst. Dabei entstand eine Lösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl. Durch einen zweiten Verdünnungsschritt wurde die Konzentration auf 10 pmol/µl verdünnt.

Mastermix

Die Zusammensetzung bzw. Konzentration der einzelnen Komponenten im Mastermix ist in Tab. 15 ersichtlich. Tab. 16 gibt Auskunft bezüglich der Komponenten für die Mastermix-Herstellung.

Tabelle 15: Mastermix-Zusammensetzung für PCR

Komponente	Konzentration	Bezeichnung
DNA-Polymerase	5 U/µl	Go Taq DNA-Polymerase
dNTPs	200 µM je dNTP	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Puffer	1,5 mM	MgCl ₂
	50 mM	KCl
	10 mM	Tris-HCl
Bezogen auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl / Reaktionsgefäß		
Empfohlene Primerkonzentration von 0,2-1 µM		
Empfohlene DNA-Menge: < 1 µg (50 pg Plasmid-DNA oder 50 ng genomische DNA)		

Tabelle 16: Mastermix-Herstellung

Menge	Bezeichnung
7546 µl	Steriles UHQ-Wasser
2200 µl	Go Taq Green 5 x Puffer
220 µl	dNTP-Mix
44 µl	Go Taq DNA-Polymerase

3.3.4. Primer

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden immer folgende Primer verwendet.

Tabelle 17: Rinderspezifisches Primerpaar

Primer	Sequenz 5' - 3'	Amplikon	Zielregion	Literatur
Cow Bottero 1	GTA CTA CTA GCA ACA GCT TA	256 bp	mitochondriales 12S rRNA-Gen	Bottero et al. (2003)
Cow Bottero 2	GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G			

3.3.5. Durchführung

Die Reaktionsgefäße mussten während des gesamten Arbeitsvorgangs bis zum Einstellen in den Thermocycler in Kühlblöcken aufbewahrt werden. Des Weiteren wurden alle wichtigen Schritte in einer Sterilwerkbank durchgeführt, um das Kontaminationsrisiko über die Raumluft möglichst gering zu halten.

Aus dem bereits vorgefertigten Mastermix und den Primern wurde zunächst ein sogenannter Prämix entsprechend der Probenanzahl hergestellt. Dabei war ein gewisser Pipettierverlust mit einzuberechnen. Das entsprechende Pipettierschema ist in Tab. 18 dargestellt.

Der Prämix wurde gut gevortext und 24,5 µl davon wurden in je ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die DNA-Lösung ebenso gut gevortext wurde, wurden davon 0,5 µl für jeden PCR-Ansatz in den Prämix pipettiert. Dabei wurde die Pipettenspitze durch mehrmaliges Aufziehen und Entleeren gespült. Nachdem alle Reaktionsgefäße pipettiert wurden, musste diese nochmals für wenige Sekunden gevortext und anschließend zentrifugiert werden. Das gewünschte Temperatur-Zeit-

Programm wurde programmiert, die Proben wurden in den Thermocycler eingestellt, und das Programm wurde gestartet.

Tabelle 18: Pipettierschema für PCR

Polymerasekettenreaktion	
Komponente	Volumen
Mastermix	22,5 µl
Primer 1, 10µM	1 µl
Primer 2, 10µM	1 µl
DNA-Menge	0,5 µl
Reaktionsvolumen	25 µl

3.3.6. Thermoprotokoll

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgendem Temperatur-Zeit-Programm gearbeitet:

Tabelle 19: Temperatur-Zeit-Programm für PCR

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit	Zeit Inc.
1	95°C	5 Minuten	0
45	95°C	1 Minute	0
	X°C	1 Minute	0
	72°C	1 Minute	2 sec
1	72°C	8 Minuten	0
1	4°C	unendlich	0

X...optimale Annealingtemperatur des jeweiligen Primerpaares

Dabei wurde für X mit folgenden Temperaturen gearbeitet: 59°C, 60°C, 61°C, 62°C

3.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient als einfache und effektive Methode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten von 0,5 bis 25 kb Länge [MÜLHARDT, 2006].

3.4.1. Prinzip

Während der Elektrophorese wandern geladene Teilchen in einem elektrischen Feld, wobei die elektrophoretische Beweglichkeit, die auch als Mobilität bezeichnet wird, von der Größe und der Ladung des jeweiligen Teilchens abhängig ist. Mit dieser Methode kann ein Gemisch aus verschiedenen Substanzen in einzelne Zonen aufgetrennt werden. Aufgrund der gleich bleibenden Ladungsdichte der Nukleinsäuren, spielen hierbei nur die Molekülgrößen eine entscheidende Rolle für die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten. Die DNA-Moleküle werden somit nur anhand ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt. Nach einer festgelegten Wanderungszeit wird die Position der DNA-Moleküle im Gel mittels anschließender Färbung mit Ethidiumbromid und Betrachtung unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht [MÜLHARDT, 2006].

3.4.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien

Tabelle 20: Geräte und Hilfsmittel für Agarosegelelektrophorese

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Autoklav		Fedegari
Erlenmayerkolben	Diverse Kolben	Schott
Gel-Dokumentationssoftware	Kodak 1D 3.5	Kodak
Gel-Dokumentationssystem	Biosens SC Series-810	genXpress
Gelelektrophoresekammer	Hoefer Super Sub	Hoefer Pharmacia Biotech
Gelgießapparatur		Hoefer
Färbewanne		Plast Team
Kamera und Schirm	Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 120	Kodak
Kämme		Hoefer
Klebeband	Scotch tape	Scotch

Kolbenhubpipetten	Kolbenhubpipette 10 µl	VWR International
Kühlung	Multi Temp III	Pharmacia Biotech
Magnetrührer		IKA-Labortechnik
Membranpumpe	Absaugpumpe	Millipore
Messzylinder	Diverse Messzylinder	Schott
Mikrowelle	Typ R-207	Sharp
Pipettenspitzen		Biozym
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Reaktionsgefäße	Sigma
Schraubflaschen	Schraubflaschen 2 l, 1 l, 250 ml	Simax, Pyrex, Schott
Spatel		
Stromversorgung	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
UV-Transilluminator	BRL UV-Transilluminator	Gibco Life Technologies
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica
Waage	Sartorius PT 130	Sartorius AG
Wasserbad	Typ W 16	LHG-Laborgeräte
Zentrifuge	Minizentrifuge C 1200	National Labnet Co.

Tabelle 21: Reagenzien und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

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

3.4.3. Herstellung von Lösungen

Aus den oben aufgelisteten Reagenzien wurden folgende Gebrauchslösungen hergestellt:

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

18,61 g EDTA wurden zusammen mit 2 g NaOH eingewogen und in 80 ml UHQ-Wasser gelöst. Dabei wurde mit konzentrierter NaOH ein pH-Wert von 7,6 eingestellt. Nach Befüllung des Messkolbens auf 1000 ml kam es zur Autoklavierung.

EDTA (0,5M, pH 8)

18,61 g EDTA wurden zusammen mit 2 g NaOH eingewogen und in 80 ml UHQ-Wasser gelöst. Dabei wurde mit konzentrierter NaOH ein pH-Wert auf 8 eingestellt. Nach Befüllung des Messkolbens auf 1000 ml kam es zur Autoklavierung.

Gelladepuffer (6x)

25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol FF, und 1,5 g Ficoll wurden genau eingewogen und in 8,45 g UHQ-Wasser durch mehrfaches Schütteln gelöst.

Marker

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

TBE-Puffer (5x)

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

TBE-Puffer (0,5x)

100 ml des TBE-Puffers (5x) wurden in einer sterilen Mensur mit autoklaviertem, destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und in eine sterile Schraubflasche gefüllt.

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

500 µl sterile Tris-HCl (2 M, pH 7,6) und 200 µl sterile EDTA-Lösung (0,5 M, pH 7,6) wurden in 100 ml sterilem UHQ-Wasser gelöst.

Tris-HCl (2 M, pH 7,6)

24,22 g Trishydroxymethylaminomethan wurden in 80 ml UHQ-Wasser gelöst, wobei mit Hilfe von konzentrierter HCl ein pH-Wert von 7,6 eingestellt wurde. Nach Auffüllen der Lösung mit UHQ-Wasser auf 100 ml kam es zur Autoklavierung.

3.4.4. Durchführung

Der erste Schritt bestand aus der Agarosegellvorbereitung, wobei für diesen Schritt mindestens zwei Stunden eingeplant werden musste. Anschließend konnten die PCR-Proben aufgetragen werden und die Elektrophorese konnte gestartet werden. Nach einer Laufzeit von drei Stunden musste das Gel zum Sichtbarwerden der Banden gefärbt, entfärbt, und fotografiert werden.

3.4.4.1. Gelherstellung

Je nach Apparatur wurde die entsprechende Menge an Agarose mit Hilfe eines Spatels in eine sterile 250 ml Schraubflasche exakt eingewogen und mit der passenden 0,5 x TBE-Puffer-Menge suspendiert (siehe Tab. 22). In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit der HE100-Apparatur gearbeitet, weshalb genau 4 g Agarose eingewogen wurden. Die Agarose wurde anschließend in der Mikrowelle langsam erwärmt und geschmolzen. Dazu blieb der Deckel halbgeschlossen und es wurde des Öfteren umgeschwenkt. Erst nachdem die gesamte Agarose gelöst vorlag wurde sie für 30 Minuten ins 50°C warme Wasserbad gestellt. Währenddessen konnten bereits sowohl die Gelgießform als auch die Kämme mit Ethanol vorgereinigt werden. Die Gelträgerplatte wurde an beiden Enden mit einem Klebeband verschlossen, damit das Auslaufen der Gellösung verhindert werden konnte. Danach wurde die Platte in den Gelgießrahmen platziert. Nach einer halben Stunde wurde die temperierte Agaroselösung gleichmäßig in der Gelgießform verteilt und sofort die Kämme für die Probestaschen eingesetzt. Nach 60 Minuten Erstarrungszeit konnte das Klebeband entfernt werden und nachdem die Kämme entfernt wurden, konnte das Gel mitsamt der Trägerplatte entweder in die mit TBE-Puffer gefüllte Apparatur eingesetzt werden oder sie wurde mitsamt der Kämme mit TBE-Puffer benetzt und im Kühlschrank bis zum Gebrauch gelagert.

Tabelle 22: Zusammensetzung des 2%igen Agarosegels

Apparatur	Dimension (cm)	Geldicke (mm)	Agarose (g)	0,5 TBE-Puffer (ml)	0,5 TBE Laufpuffer (ml)
HE99	15x20	4 mm	2,4 g	120 ml	1100 ml
HE100	20x25	4 mm	4 g	200 ml	955 ml

3.4.4.2. Probenvorbereitung und Probenauftragung

Nachdem die PCR-Produkte aus dem Thermocycler genommen wurden, wurden sie entweder bei -20°C gelagert und vor dem Weiterverbrauch aufgetaut, oder sie wurden sofort direkt für die Gelelektrophorese weiterverwendet. Dazu mussten die Proben zuerst gut gevortext und zentrifugiert werden. Da der „Go Taq Green Mastermix“, der in dieser Arbeit verwendet wurde, bereits sowohl einen grünen als auch blauen Farbstoff enthielt und damit der Fortschritt der Elektrophorese verfolgt werden konnte, musste den Proben kein Gelladepuffer hinzugefügt werden. Des Weiteren wies der Puffer eine entsprechende Dichte auf, womit ein direktes Auftragen der PCR-Produkte ermöglicht wurde. Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, wurde das Wasser in der Elektrophorese-Apparatur abgesaugt und diese anschließend mit 955 ml TBE-Puffer befüllt. Beim Einsetzen des Gels in die Apparatur musste auf Luftblasenfreiheit geachtet werden. Nach dem Einschalten der Kühlung auf 19°C wurden $10\ \mu\text{l}$ der Proben bzw. $5\ \mu\text{l}$ des Markers in die Probentaschen aufgetragen. Die Apparatur wurde geschlossen und eine entsprechende Feldstärke von $5\ \text{V/cm}$ wurde angelegt. Dies entsprach für die HE100-Apparatur einer Spannung von $150\ \text{V}$ bei $50\text{-}55\ \text{mA}$. Die Laufzeit der Gelelektrophorese belief sich auf drei Stunden, wobei 15 Minuten nach dem Start der Magnetprüher zur ausreichenden Umwälzung des Puffers eingeschaltet werden musste.

3.4.4.3. Färben, Entfärben, und Fotografieren des Gels

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und in eine Färbelösung, bestehend aus $700\ \mu\text{l}$ destilliertem Wasser und $70\ \mu\text{l}$ Ethidiumbromid-Lösung (1%), zum Färben der Banden für eine Stunde eingebracht. Daraufhin wurde das Gel in dem von der Elektrophorese-Apparatur stammenden Laufpuffer (0,5 x TBE) für 30 Minuten entfärbt. Zuletzt wurde das entfärbte Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems und der entsprechenden Software fotografiert. Dabei war zu beachten, dass das Gel in zwei Teile geschnitten, dass es anschließend luftblasenfrei in die Fotoapparatur eingelegt, und dann bei unterschiedlichen Wellenlängen fotografiert wurde. Das Fotografieren des Gels musste sofort nach der Entfärbung erfolgen, da die Ethidiumfluoreszenz der Nukleinsäuren nicht beständig war.

3.5. Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wird auch als Echtzeit-PCR bezeichnet, wobei sie im Gegensatz zur konventionellen PCR, die eine Detektion des Produktes erst nach Ablauf der PCR-Reaktion erlaubt, die DNA-Konzentration nach jedem Zyklus mittels Fluoreszenzmarker misst. Des Weiteren weist die Real-Time PCR einige Vorteile gegenüber der konventionellen PCR auf. So erspart man sich weitere post-PCR Schritte, um die DNA sichtbar zu machen, während eine gleichzeitige Analyse einer Vielzahl an Proben möglich ist. Zusätzlich wird aufgrund der geschlossenen Reaktionsgefäße das Kontaminationsrisiko minimiert [DALMASSO et al., 2011].

3.5.1. Prinzip

Prinzipiell entspricht die Real-Time PCR einer Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der konventionellen PCR beruht. So führt sie theoretisch ebenso zu einer DNA-Verdopplung je Zyklus. Jedoch ermöglicht sie zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA, wobei diese Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessungen geschieht [INVITROGEN, 2008].

Obwohl eine Vielzahl an Fluoreszenznachweissystemen existieren, wurde in dieser Arbeit nur mit dem Einsatz von DNA-bindenden Farbstoffen wie SYBR Green gearbeitet. SYBR Green lagert sich dabei in die kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA an und führt zu deren Konfigurationsänderung [HOLZAPFEL und WICKERT, 2007]. Die in der DNA eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe geben im Gegensatz zu den in der Lösung frei befindlichen SYBR Green Molekülen eine 1000-fach höhere Fluoreszenz ab, weshalb die Menge an gebildeter DNA dem Fluoreszenz-Signal proportional ist [BIORAD-LABORATORIES, 2006].

3.5.2. Verwendete Geräte, Hilfsmittel, und Reagenzien

Tabelle 23: Geräte und Hilfsmittel in Real-Time PCR

Gerät/Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Kolbenhubpipetten	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, VWR
Kühlblöcke		
Optik	iQ TM 5 Multicolor Real-time PCR Detection System	Biorad Laboratories
PC und Monitor		
Pipettenspitzen	Biozym Safe Seal Tips	Biozym
Reaktionsgefäße	PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos	Biozym
Software	iQ TM 5 Optical System Software Version 2.0	Biorad Laboratories
Sterilwerkbank	Esco [®] PCR Cabinet	Esco Technologies
Thermocycler	Biorad iCycler TM	Biorad Laboratories
Vortex	Vortex-Mixer Wizard	Velp Scientifica
Zentrifuge	Minizentrifuge C 1200	National Labnet Co.

Tabelle 24: Reagenzien und Lösungen in Real-Time PCR

Reagens/Lösung	Beschreibung	Hersteller
Mastermix	iQ TM SYBR [®] Green Supermix	Biorad Laboratories
Primer	Cow Bottero 1 und 2	Eurofins MWG GmbH
AE-Puffer		Qiagen
UHQ-Wasser		
DNA-Away-Spray		
Oberflächendesinfektionsmittel	Hände-Desinfektionsmittel	BODE Sterilium classic pure

Die in der Real-Time PCR verwendeten Primer entsprachen demselben Primerpaar, das bereits in der PCR eingesetzt und in Kapitel 3.3.4 beschrieben wurde.

3.5.3. Durchführung

Während der gesamten Durchführung mussten folgende Schritte eingehalten und erfüllt werden: Während des gesamten Arbeitsvorgangs wurde in einer Sterilwerkbank gearbeitet, damit Kontaminationen aus der Raumluft vermieden werden konnten. Des Weiteren wurden sämtliche Reaktionsgefäße bis zum Einstellen in den Thermocycler in Kühlblöcken aufbewahrt. Die Deckel der PCR-Strips durften nicht berührt oder beschriftet werden und es mussten immer die gleichen Pipetten verwendet werden, wobei diese von Zeit zu Zeit auf ihre Genauigkeit überprüft werden mussten. Da die Gefäße nicht autoklaviert wurden, war deren saubere Aufbewahrung essentiell. Die sterile Arbeitsbank musste vor Gebrauch 30 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt werden, wobei sie zusätzlich vor und nach jedem Gebrauch mittels DNA-Away-Spray gereinigt werden musste. Zusätzlich waren während der gesamten Arbeit immer sterile Handschuhe zu tragen, die mit einem Oberflächendesinfektionsmittel desinfiziert wurden.

Aus den vorhandenen DNA-Lösungen wurden 1:10 Verdünnungen mit AE-Puffer hergestellt. Dazu wurden 90 µl AE-Puffer mit 10 µl DNA-Lösung verdünnt. Daneben wurde ein Prämix aus Supermix, Primern, und Wasser entsprechend der Probenanzahl angefertigt. Ein entsprechender Pipettierverlust war dabei mit einzukalkulieren. Dabei wurden für jeden Ansatz 12,5 µl Supermix, 5,5 µl UHQ-Wasser, 1 µl forward-Primer, und 1 µl reverse-Primer gemischt. Nach kurzem Vortexen und anschließendem Zentrifugieren wurden je 20 µl Prämix in die Reaktionsgefäße aliquotiert. Schließlich wurden 5 µl der 1:10 verdünnten DNA-Lösung in jedes Reaktionsgefäß pipettiert (siehe Tab. 25).

Tabelle 25: Pipettierschema für Real-Time PCR

Real-Time PCR	
Komponente	Volumen
Supermix	12,5 µl
UHQ-Wasser, steril	5,5 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
DNA-Menge, 1:10 verdünnt	5 µl
Reaktionsvolumen	25 µl

Nachdem alle Ansätze pipettiert wurden, mussten die PCR-Reaktionsgefäße kurz durch leichtes Klopfen auf der Arbeitsfläche gemischt und für ca. 5 Sekunden auf leichter Stufe zentrifugiert werden. Das gewünschte Temperatur-Zeit-Programm wurde auf dem PC ausgewählt, während den Plätzen im

Thermocycler die entsprechende Probenbezeichnung und –konzentration zugewiesen wurde. Nach dem Einstellen der Strips wurde der Cycler geschlossen und das Programm gestartet.

3.5.4. Thermoprotokoll

In der vorliegenden Arbeit wurde immer mit folgendem Temperatur-Zeit-Programm gearbeitet:

Tabelle 26: Temperatur-Zeit-Programm für die Real-Time PCR

Schleife	Cycle 1	Cycle 2 (45x)		Cycle 3		Cycle 4 (67x)
Schritt	1	1	2	1	2	1
Temperatur	95°C	95°C	62°C	95°C	62°C	62 - 95°C
Zeit	3min	10s	40s	20s	30s	+ 0,5°C / 10s
Datenerfassung			Real-Time			Melt Curve

3.5.5. Auswertung

Nach der Vollendung des Programms wurde der Schwellenwert, auch Threshold genannt, manuell angepasst, damit die einzelnen Daten miteinander vergleichbar waren. Die daraus berechneten Daten wurden zur Weiterverarbeitung in Microsoft Excel exportiert. In der vorliegenden Masterarbeit wurde ein Schwellenwert von 20 festgelegt.

Um die Effizienz der PCR unter den gewählten Bedingungen zu evaluieren, wurden Effizienztests mit einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Dazu wurden folgende Verdünnungsstufen erstellt und analysiert: 1 (100%), 1:10 (10%), 1:100 (1%), 1:1000 (0,1%), und eine 1:10000 (0,01%). Im ersten Abschnitt wurde dabei immer mit der Standardprobe 10Z gearbeitet. Die dabei erhaltene Effizienz, aber auch das Bestimmtheitsmaß und der slope wurden anschließend für die Interpretation der Ergebnisse herangezogen.

Im 2.Abschnitt wurde sowohl die Winter(Z)-Bryndza-Käsereihe als auch die Wolfpassing-Reihe analysiert. Neben der qualitativen Bestimmung mittels konventioneller PCR und Gelelektrophorese wurde auch eine Real-Time PCR zur Quantifizierung durchgeführt. Danach wurden die erhaltenen C_T-Werte ins Microsoft Excel exportiert und weiterverwendet.

Im 3.Teil wurde über die Geradengleichung letztendlich unter Einbeziehung der C_T-Werte der unbekanntenen Proben der dekadische Logarithmus des rinderspezifischen DNA-Anteils der Proben gewonnen. Aus diesem wurde schließlich die Konzentration des Kuhmilch-Anteils in den vorliegenden Proben abgeleitet.

4. Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Teile, wobei im 1. Abschnitt verschiedene kommerzielle DNA-Isolierungsmethoden evaluiert und miteinander verglichen werden. Anschließend wird der Fokus auf das Eluivolumen bei Anwendung des Wizard DNA Clean-Up Systems gelegt, wobei die Ergebnisse mit unterschiedlichen Eluivolumina sowohl qualitativ mittels Absorptionsmessung, als auch quantitativ mittels Real-Time PCR erhalten und diskutiert werden.

Im 2. Abschnitt wird genauer auf die Standardreihen, die Winter(Z)-Bryndza- und die Wolfpassing-Standardreihe eingegangen. Dabei wird mit Hilfe der konventionellen PCR das richtige Temperaturprogramm gefunden. Anschließend werden die Standardreihen mittels Mehrfachansätzen evaluiert, wobei auch die Negativproben untersucht werden.

Im 3. Abschnitt wird eine Handelsproben-Quantifizierung durchgeführt. Auch hier wird erneut mittels konventioneller PCR das optimale Temperaturprogramm überprüft. Im Anschluss wird ein Real-Time PCR-Lauf mit den Handelsproben und den jeweiligen Standardreihen durchgeführt. Damit kann die rinderspezifische DNA-Menge der Handelsproben quantitativ bestimmt werden.

4.1. Empirische Bestimmung der optimalen Isolierungsmethode

Da die Käseproben eine komplexe Matrix aufweisen, muss zuerst eine optimale DNA-Isolierungsmöglichkeit gefunden werden. Dazu werden folgende DNA-Isolierungsverfahren angewendet und verglichen:

- DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen-Methode)
- Wizard DNA Clean Up System (Wizard-Methode)

Nachdem die ideale Isoliermethode empirisch bestimmt wurde, werden zusätzlich unterschiedliche Eluivolumina untersucht. Neben der Absorptionsmessung wird dabei immer auch eine Real-Time PCR durchgeführt. Zur Evaluierung der kommerziellen Kits wird dabei mit der Probe 10Z aus der Winter(Z)-Bryndza-Reihe gearbeitet, da diese den höchsten rinderspezifischen DNA-Gehalt aufweist.

4.1.1. Vergleich kommerzieller Isolierungsmethoden: Wizard vs. Qiagen

4.1.1.1 Photometrische Absorptionsmessung

Nach der jeweiligen DNA-Extraktion, die in Kapitel 3.2. exakter beschrieben wurde, wird mit Hilfe des Photometers die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Während der A_{260}/A_{280} -Quotient Aufschluss bezüglich der DNA-Reinheit gibt, kann auch eine absolute DNA-Ausbeute errechnet werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass die DNA-Absorptionsmessung nur eine ungefähre DNA-Ausbeute errechnet und aus diesen Werten nur grobe Schlüsse gezogen werden können.

Tab. 27 zeigt, dass zwar der durchschnittliche A_{260}/A_{280} -Quotient der Qiagen-DNA bei $1,79 \pm 0,7$ liegt, was einen guten Wert darstellt, dass es jedoch bei den einzelnen Werten große Abweichungen gibt. Auf Basis der Ergebnisse der unterschiedlichen Eluiervolumina (siehe Kapitel 4.1.2.) werden bei der Wizard-Methode nur die letzten Durchführungen, bei denen nicht nur beide Anteile verwendet wurden, sondern auch zweimal mit je 50 μ l AE-Puffer eluiert wurde, mit einbezogen. Denn nur diese entsprechen einem 100%igen Anteil und können somit besser mit der Qiagen-DNA verglichen werden. Dabei liegt der durchschnittliche A_{260}/A_{280} -Quotient bei $1,87 \pm 0,2$, was einer Variation von nur 13% entspricht, wohingegen die Werte der Qiagen-Proben eine Variation von 39% aufweisen. Des Weiteren kann das Problem der zu niedrigen A_{260}/A_{280} -Quotienten, die als Indiz für das Vorliegen von Kontaminanten gelten, durch die Wizard-Methode eliminiert werden. Obwohl es einige Ausreißer gibt, deuten die Qiagen-Resultate aufgrund ihrer niedrigen A_{260}/A_{280} -Quotienten auf eine schlechtere DNA-Reinheit im Vergleich zur Wizard-Dann hin.

Die absolute DNA-Ausbeute liegt bei der Qiagen-Methode zwischen 7000 ng und 21400 ng, wobei eine durchschnittliche Ausbeute von 12950 ± 5211 ng mit einer Variation von 40% erreicht werden konnte. Die Wizard-Methode hingegen liefert weitaus höhere DNA-Ausbeuten in einem Bereich von 19000 ng bis 29000 ng, was einer durchschnittlichen Ausbeute von 23600 ± 3975 ng und einer Variation von nur 17% entspricht. Bei diesen Ergebnissen ist insbesondere die fast doppelt so hohe absolute DNA-Ausbeute durch die Wizard-Methode erkennbar.

Tabelle 27: Absorptionsmessung - Vergleich der DNA-Ausbeute und -Reinheit mittels Photometer zwischen Qiagen- und Wizard-Methode

Isolierung	EW	Verdünnung	Anteil	Gesamtvolumen	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Konzentration	Absolute Ausbeute
Qiagen	150 mg	1:10	100%	200 µl	0,071	0,052	1,37	35,5 ng/µl	7100 ng
	150 mg	1:100	100%	200 µl	0,007	0,002	3,5	35 ng/µl	7000 ng
	150 mg	1:10	100%	200 µl	0,200	0,180	1,11	100 ng/µl	20000 ng
	150 mg	1:10	100%	200 µl	0,214	0,194	1,10	107 ng/µl	21400 ng
	150 mg	1:100	100%	200 µl	0,010	0,005	2,00	50 ng/µl	10000 ng
	150 mg	1:100	100%	200 µl	0,017	0,009	1,89	85 ng/µl	17000 ng
	150 mg	1:100	100%	200 µl	0,010	0,005	2,00	50 ng/µl	10000 ng
	150 mg	1:50	100%	200 µl	0,018	0,013	1,38	45 ng/µl	9000 ng
	150 mg	1:100	100%	200 µl	0,013	0,007	1,86	65 ng/µl	13000 ng
	150 mg	1:100	100%	200 µl	0,015	0,009	1,67	75 ng/µl	15000 ng
							1,79 ± 0,7		12950 ± 5211 ng
Wizard	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,026	0,016	1,63	130 ng/µl	26000 ng
	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,023	0,012	1,92	115 ng/µl	23000 ng
	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,019	0,009	2,11	95 ng/µl	19000 ng
	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,029	0,018	1,61	145 ng/µl	29000 ng
	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,021	0,010	2,10	105 ng/µl	21000 ng
							1,87 ± 0,2		23600 ± 3975 ng

Neben der 1:100 Verdünnung werden auch 1:10 bzw. 1:50 Verdünnungen hergestellt und gemessen. Dabei können jedoch keine Unterschiede bezüglich der Ergebnisse beobachtet werden, weshalb im Anschluss nur mehr mit der 1:100 Verdünnung gearbeitet wird. Damit kann DNA-Lösung eingespart werden, da für die anderen Verdünnungen weit mehr DNA-Lösung verbraucht wird. Des Weiteren werden auch unterschiedliche Spektrophotometer verwendet. Neben dem älteren Model U-2000 wird auch das neue U-2900 Spektrophotometer verwendet. Auch hier können keine großen Abweichungen erkannt werden (siehe Tab. 28).

Tabelle 28: Absorptionsmessung - Vergleich der DNA-Ausbeute und –Reinheit zwischen den Photometern U-2000 und U-2900

Photometer U-2000					Photometer U-2900				
A ₂₆₀	A ₂₈₀	Konz.	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Absolute Ausbeute	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Konz.	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Absolute Ausbeute
0,019	0,010	95 ng/µl	1,9	19000 ng	0,016	0,009	80 ng/µl	1,78	16000 ng
0,017	0,010	85 ng/µl	1,7	17000 ng	0,017	0,010	85 ng/µl	1,70	17000 ng

4.1.1.2. Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Neben der DNA-Reinheit wird auch die exakte DNA-Quantität analysiert. Hierzu wird sowohl für die Qiagen-, als auch für die Wizard-Isolierungen eine Real-Time PCR durchgeführt. Um die DNA-Reinheit zu evaluieren, wird eine Standardgerade mit einer 100%, 10%, 1%, 0,1%, und eine 0,01% Verdünnung hergestellt.

Tabelle 29: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der C_t-Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen Wizard und Qiagen

Probe	C _t -Mittelwert ± Standardabweichung Wizard	C _t -Mittelwert ± Standardabweichung Qiagen
100%	17,58 ± 0,049	18,84 ± 0,053
10%	20,99 ± 0,059	22,34 ± 0,135
1%	24,53 ± 0,679	25,50 ± 0,130
0,1%	28,36 ± 0,227	26,32 ± 0,161
0,01%	21,33 ± 0,49	26,59 ± 0,264
E	86,2%	246,2%
R ²	0,996	0,864
s	-3,703	-1,854

Tab. 29 zeigt, dass der C_T -Mittelwert der 100% Probe mit Hilfe der Wizard-Isolierung um 1,3 Einheiten niedriger liegt. Dies bedeutet ein früheres Ansteigen der Amplifikationskurve und somit eine höhere absolute Menge an DNA. Des Weiteren weisen eine Effizienz von 246,2% und ein slope von -1,854 auf ein eindeutiges Ergebnis hin. Denn während bei der Wizard-Reihe der Kurvenabstand zwischen 3,4 und 3,9 liegt, können solche Werte in der Qiagen-Reihe nur zwischen den ersten Kurven (100%, 10%, 1%) erreicht werden. Dieses Ergebnis wird anhand mehrfacher Wiederholungen beider Reihen bestätigt, wobei in diesem Abschnitt das Ergebnis nur an diesem einen Beispiel verdeutlicht wird.

Abb. 5 zeigt die Amplifikationskurve der mit Wizard isolierten Probe 10Z. Diese weist mit einer Effizienz von 86,2%, einem Bestimmtheitsmaß von 0,996 und einem Kurvenabstand von -3,703 ein relativ gutes Ergebnis auf. Dabei können die einzelnen Kurven sehr gut getrennt dargestellt werden. In den Real-Time PCR-Lauf wurde ebenso eine Non-Template-Control (NTC) integriert. Wie in Abb. 5 erkennbar ist, liefern auch die NTCs Amplikons, wobei sich deren C_T -Werte deutlich von dem Standard mit dem geringsten Kuhmilchanteil abheben. Dasselbe Phänomen tritt auch im Qiagen-Versuch auf, wobei sich auch hier der C_T -Wert der NTC stark von dem Standard mit dem geringsten Kuhmilchanteil abgrenzt (siehe Abb. 6).

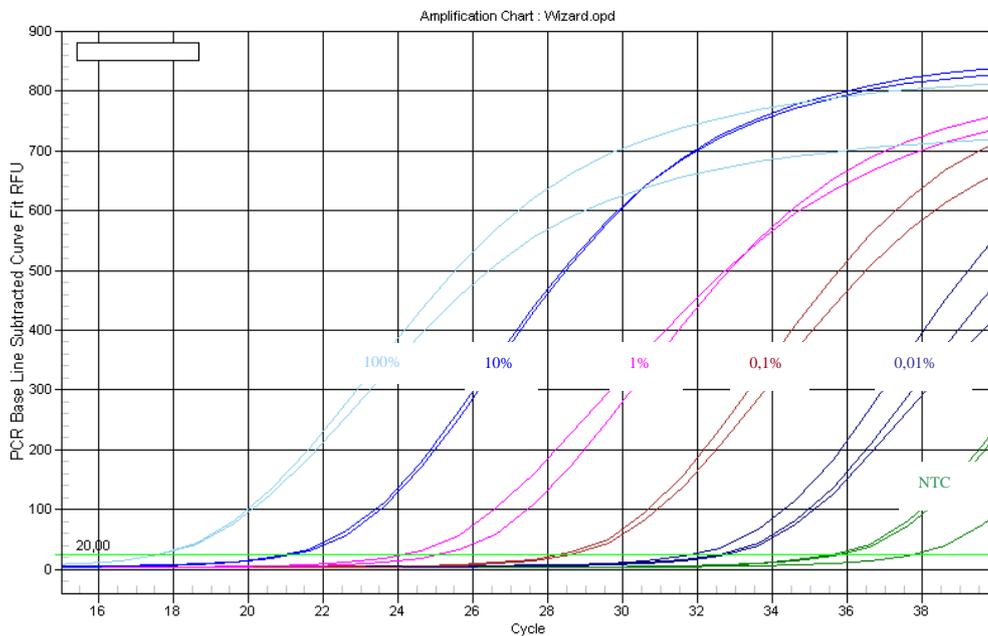


Abbildung 5: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven [Wizard]

Im Gegensatz dazu kann man in Abb. 6 erkennen, dass mit Qiagen isolierte Proben nur bis zu einem Kuhmilchanteil von 1% quantifiziert werden können. Zwischen der 0,1% und der 0,01% Verdünnung kann mit Hilfe dieser Methode nicht unterschieden werden. Dies äußert sich auch im fast identen C_T -Mittelwert von $26,32 \pm 0,161$ für die 0,1% Verdünnung und $26,59 \pm 0,264$ für die 0,01% Verdünnung.

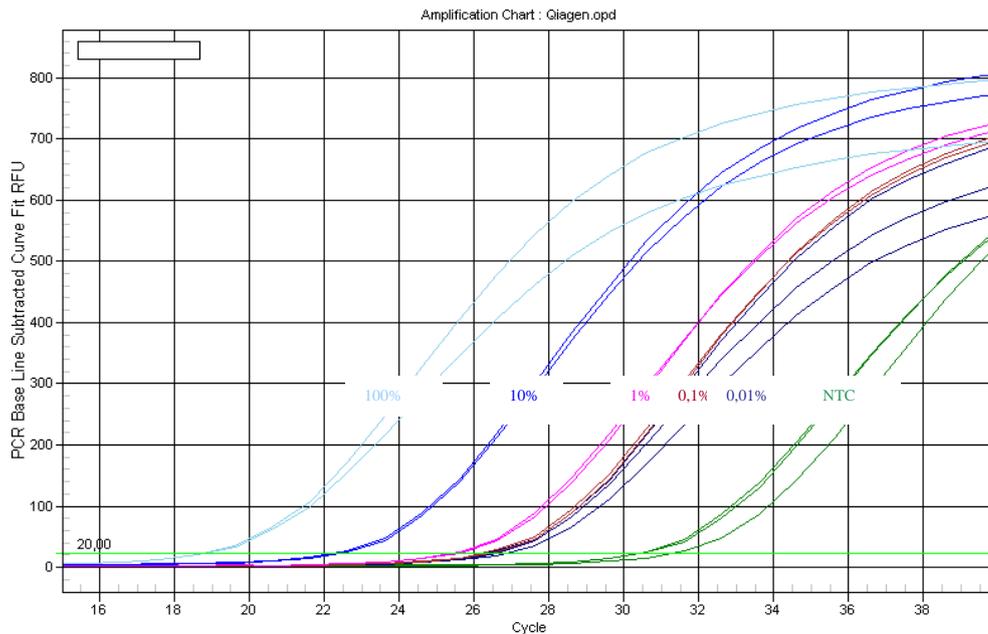


Abbildung 6: Qiagen - Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven [Qiagen]

Sowohl die photometrische Absorptionsmessung als auch die Real-Time PCR-Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Wizard-Methode die bessere Methode zur DNA-Extraktion in Käse ist. Deshalb wird ab diesem Zeitpunkt nur mehr mit der Wizard-Methode gearbeitet.

Eine Vielzahl an Studien, die bereits mit der Wizard-Methode als DNA-Extraktionsmethode Erfolg in der Speziesidentifizierung in Käse verzeichnen konnten, bestätigen diese Ergebnisse [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007a; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007b; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007c; LÓPEZ-CALLEJA DÍAZ et al., 2007; PAFUNDO et al., 2010].

4.1.2. Vergleich verschiedener Eluervolumina in der Wizard-Methode

Nach der Bestimmung der optimalen Isolierungskits soll nun auch noch die Isoliermethode optimiert werden. Gemäß Hersteller soll die DNA dabei mit 50 µl warmem Wasser oder AE-Puffer eluiert werden. Um eine größere DNA-Menge zu erhalten, wird jedoch im Rahmen dieser Arbeit mit unterschiedlichen Eluervolumina gearbeitet. Neben dem herstellergemäßen einmaligen Eluieren in 50 µl wird auch zweimal mit 50 µl eluiert, wobei sowohl das 1. als auch das 2. Eluat analysiert werden. Des Weiteren wird auch mit 100 µl eluiert, zweimal mit 100 µl, und einmal mit 200 µl. Zuletzt wird der Versuch unternommen, beide anfälligen DNA-Anteile zu je 500 µl aus dem wässrigen Überstand nach der Chloroform-Entproteinierung zu verwerten, um damit ein Gesamtvolumen von 200 µl zu erreichen. Auch hierzu wird erneut die DNA-Reinheit und –Konzentration mittels photometrischer Absorptionsmessung überprüft, während die DNA-Quantifizierung mit Hilfe der Real-Time PCR evaluiert wird.

4.1.2.1. Photometrische Absorptionsmessung

Die Absorption wird erneut bei 260 nm und 280 nm gemessen. Während der A_{260}/A_{280} -Quotient Aufschluss bezüglich der DNA-Reinheit gibt, kann zusätzlich eine absolute DNA-Ausbeute errechnet werden. Auch hier ist wieder zu erwähnen, dass die DNA-Absorptionsmessung keine exakte DNA-Quantifizierung darstellt. Sie gibt nur ungefähre Ergebnisse, denn sie misst nicht nur die rinderspezifische DNA, sondern die Gesamt-DNA bzw. andere Verbindungen, die bei dieser Wellenlänge Licht absorbieren.

Tab. 30 zeigt, dass fast alle A_{260}/A_{280} -Quotienten mit wenig großen Abweichungen im Idealbereich von 1,7 bis 2 liegen. Auffällig dabei sind sowohl die Messung des 2. Eluats (W3) als auch die der einmaligen 200 µl Eluierung (W7), denn beide weisen einen A_{260}/A_{280} -Quotienten von 3 auf. Ebenso hervorstechend ist der Quotient der W9-Isolierung, die eine andere Käse-Einwaage von 300 mg aufweist. Ein Quotient von 1,46 ist dabei ein Indiz für größere Kontaminationen.

Tabelle 30: Absorptionsmessung - Abhängigkeit der DNA-Ausbeute bzw. -Qualität von unterschiedlichen Eluivolumina

Bezeichnung	Beschreibung	EW	Verdünnung	Anteil	Gesamt-Volumen	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Konzentration	Absolute Ausbeute
W1	1x50	200 mg	1:100	50%	50 µl	0,020	0,012	1,67	100 ng/µl	5000 ng
W1	1x50	200 mg	1:100	50%	50 µl	0,018	0,009	2,00	90 ng/µl	4500 ng
W2	1.Eluat	200 mg	1:100	50%	50 µl	0,021	0,009	2,33	105 ng/µl	5250 ng
W3	2.Eluat	200 mg	1:100	50%	50 µl	0,006	0,002	3,00	30 ng/µl	1500 ng
W4	2x50	200 mg	1:100	50%	100 µl	0,023	0,014	1,64	115 ng/µl	11500 ng
W5	1x100	200 mg	1:100	50%	100 µl	0,027	0,016	1,69	135 ng/µl	13500 ng
W6	2x100	200 mg	1:100	50%	200 µl	0,024	0,013	1,85	120 ng/µl	24000 ng
W7	1x200	200 mg	1:100	50%	200 µl	0,006	0,002	3,00	30 ng/µl	6000 ng
W8	2x2x50	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,026	0,016	1,63	130 ng/µl	26000 ng
W8	2x2x50	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,023	0,012	1,92	115 ng/µl	23000 ng
W8	2x2x50	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,019	0,009	2,11	95 ng/µl	19000 ng
W8	2x2x50	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,029	0,018	1,61	145 ng/µl	29000 ng
W8	2x2x50	200 mg	1:100	100%	200 µl	0,021	0,010	2,10	105 ng/µl	21000 ng
W9	2x2x50	300 mg	1:100	100%	200 µl	0,035	0,024	1,46	175 ng/µl	35000 ng

Das einmalige Eluieren in 50 µl AE-Puffer (W1), was der Hersteller-Empfehlung entspricht, führt in etwa zu einer absoluten DNA-Ausbeute von 5000 ng bzw. einer Konzentration von 100 ng/µl. Spült man die Säule erneut mit 50 µl, so können alleine im 2. Eluat (W3) in etwa 1500 ng DNA bzw. eine Konzentration von 30 ng/µl nachgewiesen werden. Das Kombinieren beider Eluate in einem anderen Versuch (W4) hingegen erreicht eine absolute DNA-Ausbeute von 11500 ng. Sowohl das einmalige Eluieren (W5) als auch das zweimalige Eluieren (W6) in 100 µl führt zu relativ hohen Mengen an absoluter DNA. Eine Ausnahme dazu stellt das einmalige Eluieren in 200 µl (W7) dar, da hier nur eine Konzentration von 30 ng/µl bzw. eine absolute Ausbeute von nur 6000 ng erreicht wird. Des Weiteren wird auch der Versuch gestartet, eine Probe mit 300mg Käse-Einwaage zu analysieren (W9). Die photometrische Absorptionsmessung weist auf eine höhere DNA-Ausbeute von 35000 ng hin. Auffallend ist hier jedoch der niedrige A_{260}/A_{280} -Quotient von nur 1,46, was auf mögliche Kontaminationen hindeuten kann. Die erhöhte Absorption kann sich möglicherweise in diesen Kontaminationen begründen.

Werden nun beide Anteile der DNA-Lösung aus dem wässrigen Überstand entnommen und weiterverwendet, so entspricht dies einem Anteil von 100% aus dem entsprechend eingewogenen Käse. Diese Werte können aufgrund ihres Gesamt-Eluierolumens mit den Qiagen-Werten verglichen werden. Die A_{260}/A_{280} -Quotienten werden mit dieser Methode immer stabiler und auch die absolute Ausbeute wird deutlich höher in einem Bereich von 19000 ng bis 29000 ng. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieses zweimalige Eluieren in Kombination mit dem Verwenden beider Anteile, die ideale Methode darstellt (siehe Tab. 30).

4.1.2.2. Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Neben der DNA-Reinheit wird auch die exakte DNA-Quantität mittels Real-Time PCR analysiert. Um die Effizienz der PCR unter den gewählten Bedingungen zu evaluieren, werden Effizienztests mit einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Dazu werden folgende Verdünnungsstufen erstellt und analysiert: 1, (100%), 1:10 (10%), 1:100 (1%), 1:1000 (0,1%), und eine 1:10000 (0,01%) Verdünnung. Wie in Tab. 31 erkennbar, findet man beinahe idente C_t -Werte in den Gruppen W1 und W2. Wurde hingegen noch ein zweites Mal mit 50 µl eluiert, so kann auch noch in diesem 2. Eluat (W3) eine beträchtliche DNA-Menge gefunden werden. Ein C_t -Wert von 20,27 der 100% Probe entspricht zwar einer weitaus geringeren DNA-Konzentration im Vergleich zu den beiden ersten Eluaten (C_t -Wert von 16,81 und 17,02), jedoch können in diesem 2. Eluat noch Amplifikationskurven aufgetrennt werden. Hervorstechend dabei ist jedoch die C_t -Differenz zwischen der 0,01% und der 0,1% Verdünnung, denn diese beträgt nur -1,47, obwohl der ideale Kurvenabstand -3,32 entspricht. Dies lässt darauf schließen,

dass aufgrund der geringeren DNA-Menge eine Unterscheidung zwischen der 1:1000 und der 1:10000 Verdünnung nicht mehr möglich ist.

Bei zweimaligem Eluieren mit 50 µl AE-Puffer (W4) wird mit der höchsten Konzentration (=100%) ein C_t -Wert von 17,5 erreicht. Die 100% Amplifikationskurve schneidet den Threshold um etwa 0,5 Einheiten später, wobei sich dies durch die größere Volumsverdünnung erklären lässt. Mit dieser Methode erreicht man jedoch relativ gute Parameter. So liegt die Effizienz bei 92,20%, was im optimalen Bereich von 90% bis 110% liegt. Zusätzlich wird ein Bestimmtheitsmaß von 0,996 und ein slope von -3,524 erreicht.

W5 weist ein zu W4 identes Endvolumen auf, weshalb sich beide Methoden ideal vergleichen lassen. Anhand der erhaltenen C_t -Werte kann erkannt werden, dass sich das größere Volumen, das zum einmaligen Eluieren verwendet wird, nachteilig auf das Ergebnis auswirkt. Denn es ist nicht nur eine geringere DNA-Konzentration in der Probe aufzufinden, was sich im höheren C_t -Wert der 100% Amplifikationskurve widerspiegelt (17,5 vs. 18), sondern es kann auch kein Unterschied mehr zwischen der 0,1% und der 0,01% Verdünnung gesehen werden. Diese Erkenntnis ist darin begründet, dass zwischen beiden Verdünnungen nur eine Differenz von -0,85 liegt. Ebenso weisen eine Effizienz von 131,90 % bzw. ein slope von - 2,737 auf eine schlechtere DNA-Qualität hin. Denn eine Effizienz von über 110 % ist ein deutliches Indiz für das Vorliegen hoher Konzentrationen an PCR-Inhibitoren, die möglicherweise durch das größere Eluervolumen aus der Säule mit herausgelöst wurden.

Vergleicht man hingegen W6 und W7, so kann auch hier erkannt werden, dass durch die Verwendung einer größeren Eluiermenge trotz gleichen Endvolumens unterschiedliche Ergebnisse vorliegen. Auch in diesem Vergleich ist der C_t -Wert der 100% Probe von W7 um fast eine Einheit erhöht, was einer geringeren DNA-Menge entspricht. Eine Effizienz von nur 83,10% weist darauf hin, dass die Reagenzkonzentration möglicherweise nicht optimal bzw. die Enzymqualität schlecht ist.

Um eine möglichst hohe DNA-Ausbeute zu erreichen, wird der Versuch unternommen, beide DNA-Lösungsanteile nach der Entproteinierung zu verwenden (W8). Ein mittlerer C_t -Wert der 100% Probe von 17,58 mit einer Effizienz von 86,2% und einem R^2 von 0,996 weist auf eine gleich gute DNA-Konzentration und -Qualität, so wie sie in W4 erreicht werden konnte, hin. Zusätzlich erkennt man, dass der durchschnittliche C_t -Wert der 100% Probe um 1,2 bis 2 Einheiten unter den Werten von W6 und W7 liegt, obwohl alle drei Gruppen dasselbe Endvolumen von 200 µl aufweisen (siehe Tabelle 31).

Des Weiteren wurde die Käse-Einwaage von 200 mg auf 300 mg erhöht. Obwohl die photometrische Messung auf eine höhere DNA-Ausbeute hinweist (siehe Tab. 30), kann dies mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR nicht bestätigt werden. Denn trotz der erhöhten Einwaage kann nur eine geringe DNA-Konzentration aufgefunden werden (C_t -Wert = 18,56). Dies deutet auf eine mögliche Kapazitätsauslastung des Wizard-Harzes hin, wobei die maximale Bindekapazität von 1 ml Wizard-Harz generell bei 20 µg DNA liegt.

Tabelle 31: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Eluivolumina

Bezeichnung	C_t -Mittelwert \pm Standardabweichung								
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
	1 x 50 = 50 μl	1. Eluat = 50 μl	2. Eluat = 50 μl	2 x 50 = 100 μl	1 x 100 = 100 μl	2 x 100 = 200 μl	1 x 200 = 200 μl	2 x 2 x 50 = 200 μl	2 x 2 x 50 = 200 μl (300mg)
100% (1)	16,81 \pm 0,027	17,02	20,27 \pm 0,050	17,50 \pm 0,329	18,00 \pm 0,072	18,73 \pm 0,210	19,50 \pm 0,012	17,58 \pm 0,049	18,56 \pm 0,083
10% (1:10)	20,22 \pm 0,029	20,42 \pm 0,276	23,46 \pm 0,153	20,73 \pm 0,040	21,48 \pm 0,273	22,40 \pm 0,518	23,16 \pm 0,099	20,99 \pm 0,059	21,88 \pm 0,031
1% (1:100)	23,84 \pm 0,335	24,40 \pm 0,151	27,26 \pm 0,665	25,02 \pm 0,024	24,88 \pm 0,092	26,26 \pm 0,195	27,12 \pm 0,209	24,53 \pm 0,679	25,96 \pm 0,049
0,1% (1:1000)	27,57 \pm 0,392	27,76 \pm 0,377	30,95 \pm 0,073	28,19 \pm 0,075	27,99 \pm 0,396	29,20 \pm 0,515	29,97 \pm 0,336	28,36 \pm 0,227	29,59 \pm 0,111
0,01% (1:10000)	31,08 \pm 0,186	31,51 \pm 0,226	32,42 \pm 0,324	31,38 \pm 0,502	28,84 \pm 0,615	31,26 \pm 0,519	34,95 \pm 0,608	32,33 \pm 0,490	32,85 \pm 0,095
E	89,7%	88,2%	106,3%	92,2%	131,9%	108,5%	83,1%	86,2%	88,5%
R²	0,998	0,998	0,980	0,996	0,961	0,982	0,992	0,996	0,999
s	-3,595	-3,642	-3,180	-3,524	-2,737	-3,133	-3,807	-3,703	-3,631

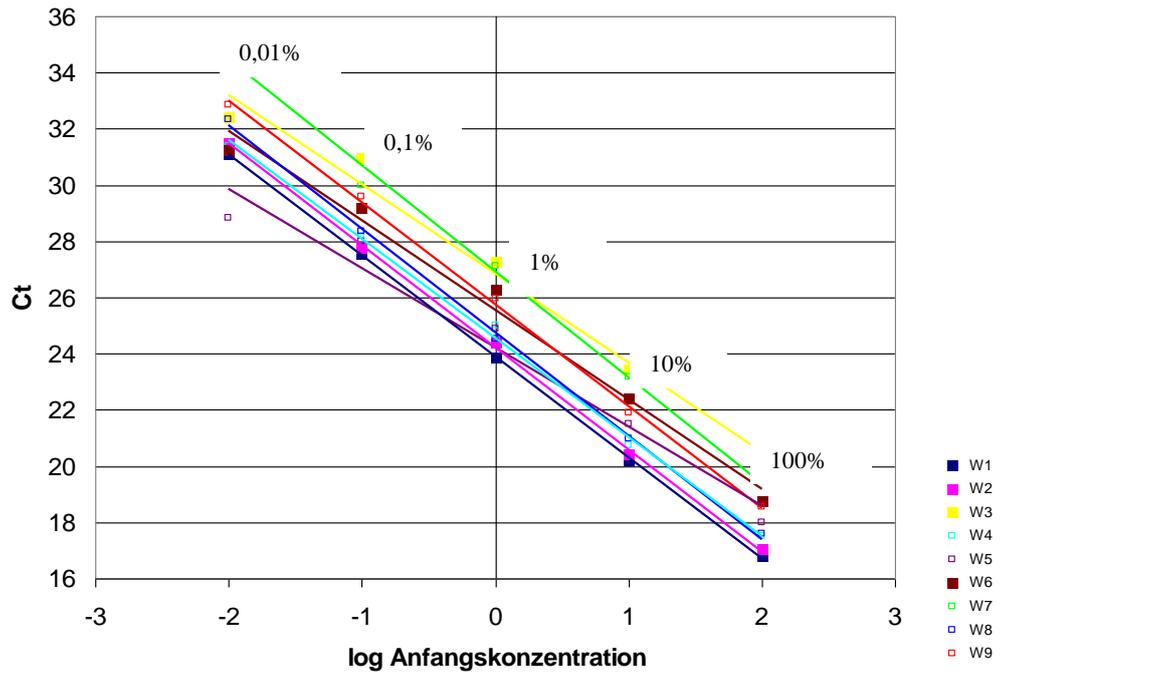


Abbildung 7: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Eluivolumina

Abb. 7 zeigt den Vergleich der jeweiligen Standardgeraden, die in den verschiedenen PCR-Läufen erhalten werden. Dabei kann beobachtet werden, dass der C_t -Wert der 100% Proben von W3, in dem nur das 2. Eluat gemessen wird, am höchsten ist, was der geringsten DNA-Konzentration entspricht. Im Gegensatz dazu findet man den höchsten C_t -Wert der 0,01% Verdünnung in der Probe, bei der einmalig mit 200 μ l eluiert wurde (W7). Bei Betrachtung der Geradengleichung ist in W7 ebenso die steilste Steigung zu erkennen. Dies wird durch den vergleichsweise hohen 0,01% C_t -Wert erklärt, was auf eine sehr geringe DNA-Konzentration hindeutet. Des Weiteren lässt sich in Abbildung 7 eine gewisse Parallelität der Geraden von W1, W2, W4, W8, und W9 erkennen. Dies kann zusätzlich in den Steigungen der Geradengleichungen abgelesen werden, da diese ähnliche Werte aufweisen. Tab. 32 zeigt, dass W5 eine weitaus niedrigere Geradensteigung aufweist. Dies liegt an den beinahe identen 0,1% und 0,01% Verdünnungen.

Tabelle 32: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der Geradengleichungen bei verschiedenen Eluivolumina

W1	$-3,589x + 23,904$
W2	$-3,632x + 24,222$
W3	$-3,179x + 26,872$
W4	$-3,522x + 24,564$
W5	$-2,819x + 24,238$
W6	$-3,186x + 25,57$
W7	$-3,771x + 26,94$
W8	$-3,687x + 24,758$
W9	$-3,629x + 25,768$

4.2. Evaluierung der Standardreihen

Neben der Winter(Z)-Bryndza-Reihe wird auch die Wolfpassing-Reihe als mögliche Standardreihe analysiert. Des Weiteren werden auch die Negativkontrollen Z1 und S1, die einer 100%igen Ziegen- bzw. Schafmilch entsprechen, untersucht. Zur Evaluierung der Standardreihen wird sowohl eine Absorptionsmessung mittels Photometer, eine konventionelle PCR mit anschließender Gelelektrophorese zum qualitativen Nachweis des Kuhmilchanteils, als auch eine Real-Time PCR zum quantitativen Nachweis des Kuhmilchanteils durchgeführt.

4.2.1. Photometrische Absorptionsmessung

4.2.1.1. Winter(Z)-Bryndza

Tab. 33 zeigt eine relativ gleichmäßige Absorptionsmessung der einzelnen Proben. Der A_{260}/A_{280} -Quotient liegt dabei meist unter dem idealen Bereich von 1,7 bis 2, was auf mögliche Kontaminationen hinweisen kann. Die ungefähre Konzentration liegt dabei zwischen 100 ng/ μ l und 140 ng/ μ l, während die absolute DNA-Ausbeute zwischen 20000 und 28000 ng liegt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in allen Proben zirka dieselbe Menge an DNA vorhanden ist, wobei nicht nur die rinderspezifische DNA gemessen wird. Dies ermöglicht einen guten Vergleich der einzelnen Proben und weist auf keine großen Ausreißer hin.

Tabelle 33: Absorptionsmessung – Winter(Z)-Bryndza-Standardreihe

Bezeichnung	Verdünnung	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Konzentration	Absolute Ausbeute
11Z	1:100	0,021	0,012	1,75	105 ng/ μ l	21000 ng
9Z	1:100	0,028	0,019	1,47	140 ng/ μ l	28000 ng
8Z	1:100	0,025	0,015	1,67	125 ng/ μ l	25000 ng
7Z	1:100	0,021	0,012	1,75	105 ng/ μ l	21000 ng
6Z	1:100	0,028	0,019	1,47	140 ng/ μ l	28000 ng
5Z	1:100	0,026	0,018	1,44	130 ng/ μ l	26000 ng
4Z	1:100	0,020	0,012	1,67	100 ng/ μ l	20000 ng
3Z	1:100	0,024	0,017	1,41	120 ng/ μ l	24000 ng
2Z	1:100	0,024	0,015	1,60	120 ng/ μ l	24000 ng
1Z	1:100	0,024	0,015	1,60	120 ng/ μ l	24000 ng
10Z	1:100	0,026	0,017	1,53	130 ng/ μ l	26000 ng

4.2.1.2 Wolfpassing-Standardreihe und Negativkontrollen

Tab. 34 zeigt die jeweils gemessene Absorption bei 260 und 280 nm, den A_{260}/A_{280} -Quotienten, die DNA-Konzentration, und die absolute DNA-Ausbeute. Hierbei lassen sich weitaus niedrigere Absorptionen als mit der Winter(Z)-Bryndza Käsereihe erkennen. Da die Wolfpassing-Reihe mit der Qiagen-Methode isoliert wurde, wird auch anhand dieser Ergebnisse die weitaus niedrigere DNA-Ausbeute bestätigt. Dabei liegt die Konzentration zwischen 5 ng/ μ l und 20 ng/ μ l, während die absolute Ausbeute zwischen 1000 und 4000 ng liegt. Die Negativkontrollen wurden hingegen mittels Wizard-Methode isoliert, weshalb auch sie eine größere Konzentration von 85 bis 120 ng/ μ l bzw. eine absolute Ausbeute von 8500 bis 12000 ng vorweisen.

Tabelle 34: Absorptionsmessung – Wolfpassing-Standardreihe

Bezeichnung	Verdünnung	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Konzentration	Absolute Ausbeute
Z1	1:100	0,024	0,012	2	120 ng/ μ l	12000 ng
S1	1:100	0,017	0,009	1,89	85 ng/ μ l	8500 ng
10	1:100	0,005	0,003	1,67	15 ng/ μ l	3000 ng
11	1:100	0,004	0,002	2	10 ng/ μ l	2000 ng
12	1:100	0,006	0,002	3	10 ng/ μ l	2000 ng
13	1:100	0,003	0,002	1,5	10 ng/ μ l	2000 ng
14	1:100	0,005	0,004	1,25	20 ng/ μ l	4000 ng
15	1:100	0,002	0,001	2	5 ng/ μ l	1000 ng
16	1:100	0,004	0,002	2	10 ng/ μ l	2000 ng
17	1:100	0,006	0,004	1,5	20 ng/ μ l	4000 ng
18	1:100	0,003	0,001	3	5 ng/ μ l	1000 ng

Anhand dieser photometrischen Ergebnisse lässt sich schon vermuten, dass beide Standardreihen nicht miteinander verglichen werden können, da sie sehr unterschiedliche DNA-Konzentrationen bzw. – Ausbeuten aufweisen.

4.2.2. Qualitativer Nachweis des Kuhmilchanteils und empirische Bestimmung des optimalen Temperaturprogramms mittels PCR und Gelelektrophorese

4.2.2.1. Winter(Z)-Bryndza

Um die optimale Temperatur für den Primer empirisch festzulegen, wird mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen gearbeitet. Abb. 8 zeigt den Beginn der Temperaturversuche bei 59°C. Dabei lässt sich bei der Negativprobe eine Bande erkennen, weshalb die Temperatur gesteigert werden muss.

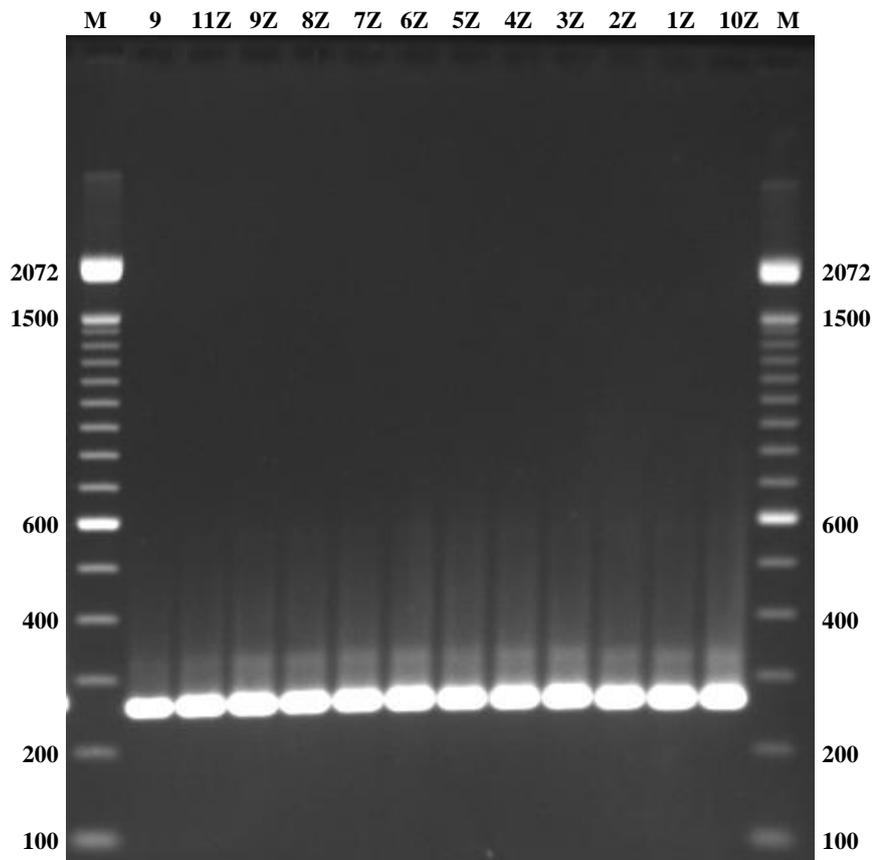


Abbildung 8: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 59°C
[Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2]

Eine Annealingtemperatur von 60°C reicht dabei aus, um diese falsch-positive Bande zu eliminieren. Des Weiteren zeigt Abb. 9 das Auftreten einer kontinuierlichen Bandenintensität, die mit dem in der Probe enthaltenen Kuhmilchanteil übereinstimmt. Dies ermöglicht eine semi-quantitative Abschätzung des vorliegenden Kuhmilchanteils.

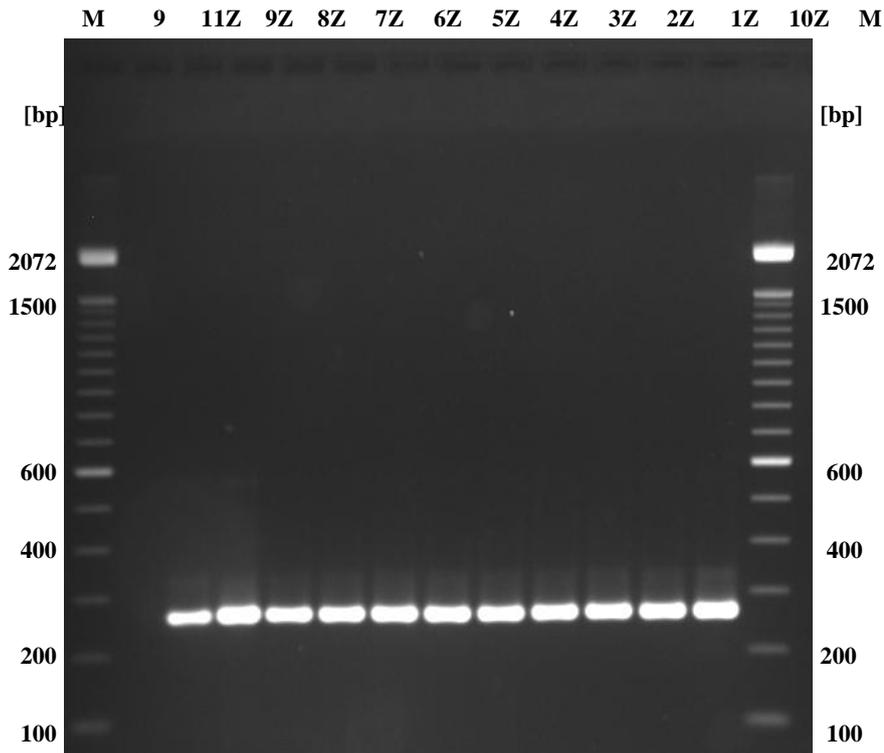


Abbildung 9: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 60°C
[Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2]

Eine Steigung auf 61°C führt erneut zu einer Eliminierung der falsch-positiven Bande, wobei das erhaltene Bild verzerrte Banden aufweist (siehe Abb. 10). Zusätzlich scheint die kontinuierliche Bandenintensität zu verschwinden.

Eine weitere Steigung der Temperatur auf 62°C führt hingegen zum Verlust der Empfindlichkeit der Methode (siehe Abb. 11). Überdies scheint der Zusammenhang zwischen der Quantität des Kuhmilchanteils und der Signalintensität der einzelnen Banden völlig verloren zu gehen.

Anhand dieser Resultate wird eine Annealingtemperatur von 60°C als optimale Temperatur angenommen.

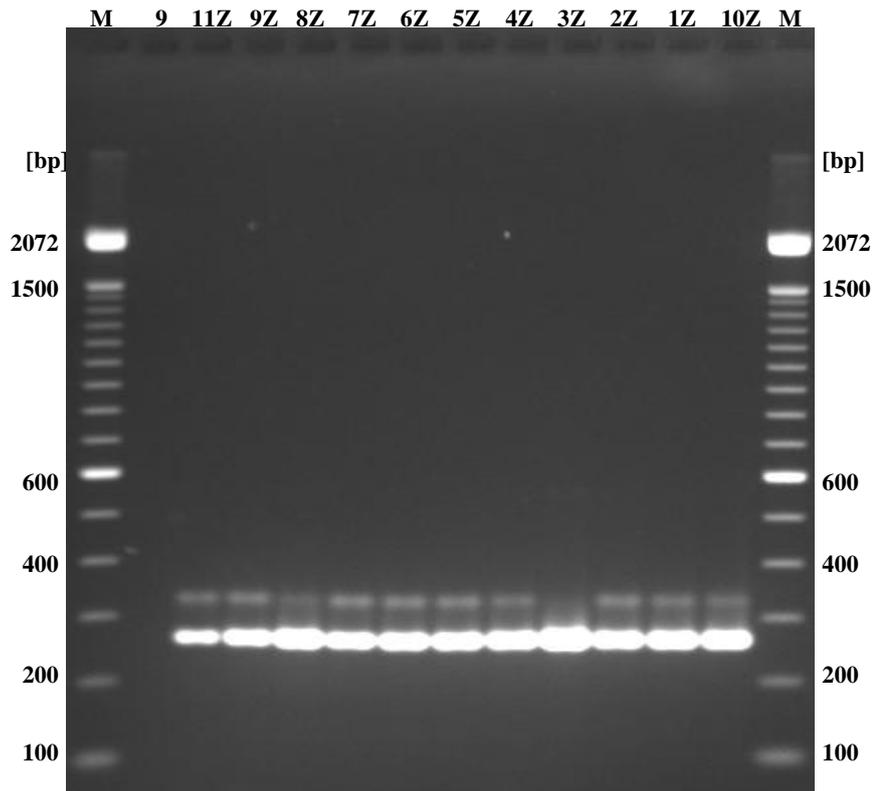


Abbildung 10: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 61°C
[Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2]

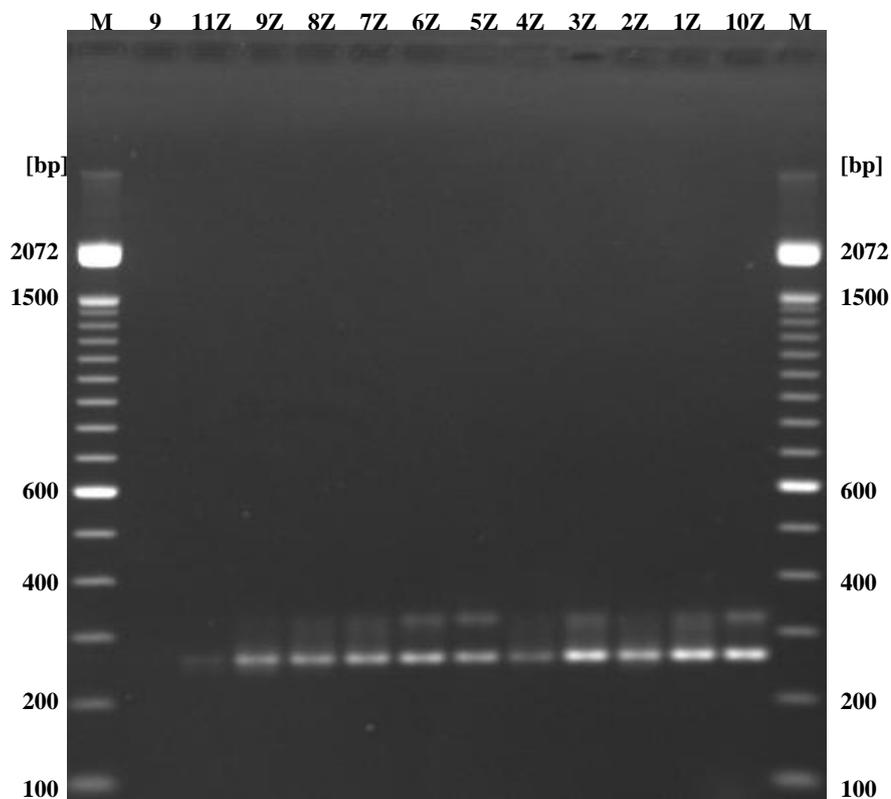


Abbildung 11: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 62°C
[Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2]

4.2.2.2. Wolfpassing-Reihe

Auch bei der Wolfpassing-Reihe wird mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen gearbeitet. Neben der Wolfpassing-Reihe werden auch die zwei Negativkontrollen, eine 100% Ziegen- und eine 100% Schafmilch untersucht. Abb. 12 zeigt den Beginn der Temperaturversuche bei 60°C. Dabei ist das Auftreten einer kontinuierlichen Bandenintensität, die mit dem in der Probe enthaltenen Kuhmilchanteil übereinstimmt, leicht zu erkennen. Dies ermöglicht eine semi-quantitative Abschätzung des vorliegenden Kuhmilchanteils.

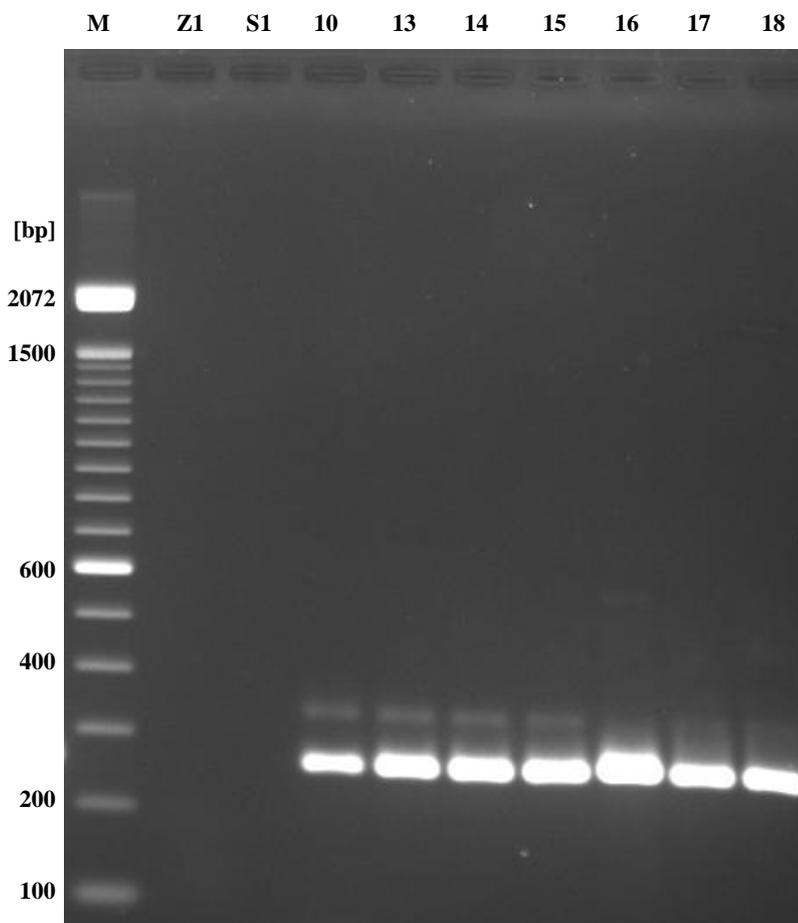


Abbildung 12: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 60°C
[Wolfpassing, Cow-Bottero1/2]

Die etwas stärkere und hervorstechende Probennummer 16 lässt sich durch die größere Konzentrierung erklären, da schon während des Auftragens ein erkennbar geringeres Volumen beobachtet werden konnte. Des Weiteren geben beide Negativproben keine falsch-positiven Ergebnisse.

Wie in Abb. 13 erkennbar ist, führt eine weitere Steigung der Temperatur auf 61°C zum Verlust der Empfindlichkeit der Methode. Trotzdem scheint der Zusammenhang zwischen der Quantität des Kuhmilchanteils und der Signalintensität der einzelnen Banden noch vorhanden zu sein.

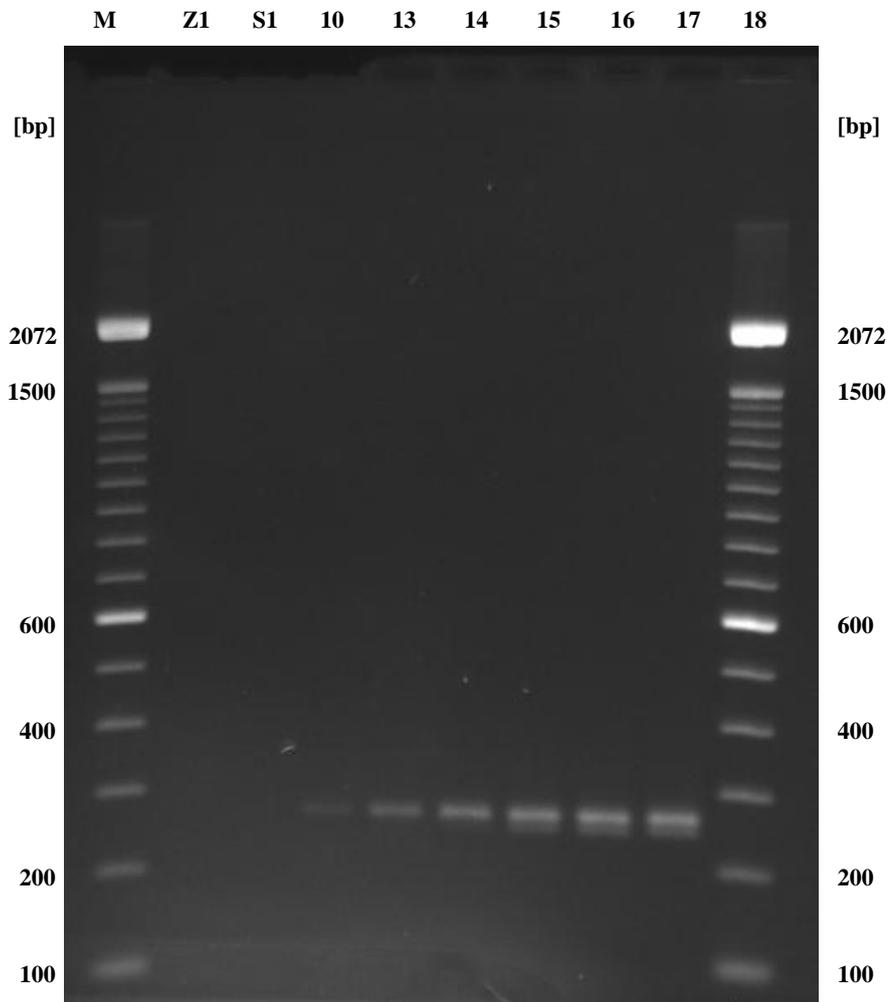


Abbildung 13: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 61°C
[Wolfpassing, Cow-Bottero1/2]

Dieser Empfindlichkeitsverlust äußert sich bei einer Temperatursteigerung auf 62°C noch stärker, da bei dieser Temperatur gar keine Banden mehr sichtbar sind (siehe Abb. 14).

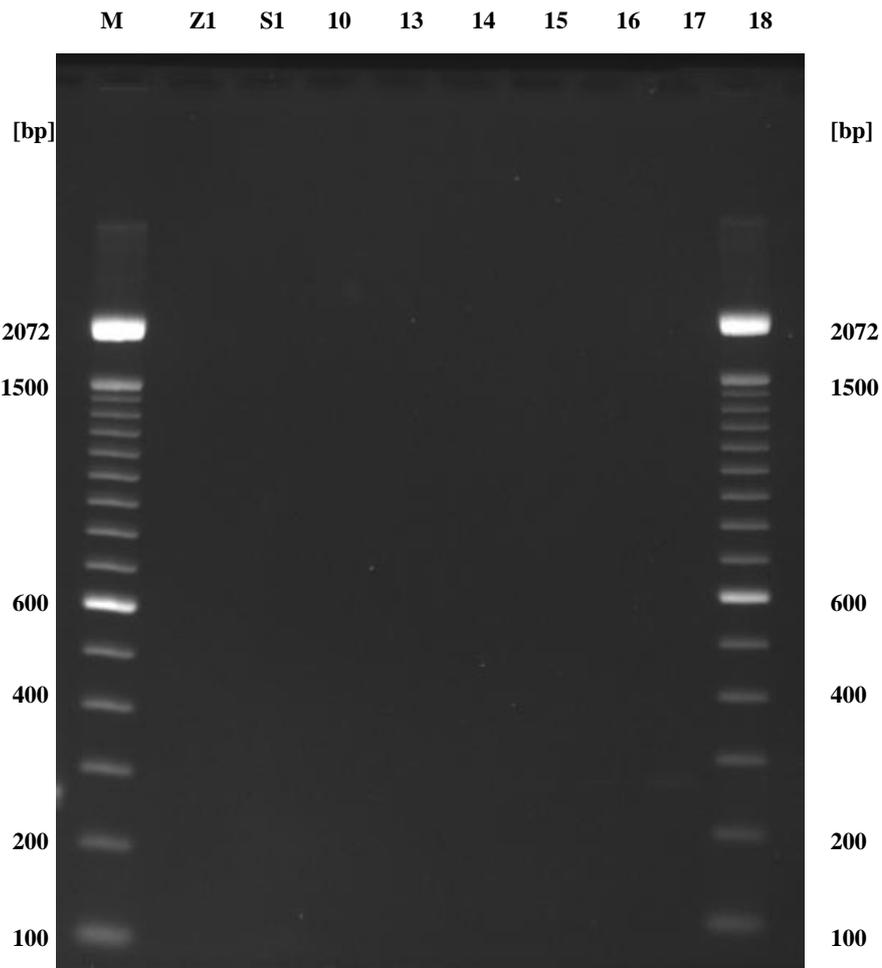


Abbildung 14: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 62°C
 [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2]

Anhand dieser Resultate wird für die bestehenden Bedingungen ebenso eine Annealingtemperatur von 60°C als optimale Temperatur angenommen.

4.2.3. Quantitativer Nachweis des Kuhmilchanteils mittels Real-Time PCR

4.2.3.1. Winter(Z)-Bryndza

Prinzipiell werden 3 Versuche mit je 4 Ansätzen durchgeführt. Tab. 35 zeigt die C_t -Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung der einzelnen Versuche. Dabei stechen insbesondere die 3,8% und die 90% Probe mit einer größeren Standardabweichung von 0,19 bzw. 0,18 hervor.

Des Weiteren findet man in Tab. 35 Informationen bezüglich der Parameter Effizienz, Bestimmtheitsmaß, und slope. Hierbei wird auch der Versuch gestartet, die 3,8% Probe aus der Berechnung zu entfernen, um genauere Daten bzw. aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Dabei ist zu erkennen, dass die Effizienz im 1. Versuch von 69,5% auf 156,6% steigt. Ebenso verringert sich das Bestimmtheitsmaß bei Weglassen der 3,8% Probe. Der Kurvenabstand verringert sich beinahe um das Doppelte (-4,365 vs. -2,444). Diese Veränderungen können in allen durchgeführten Versuchen beobachtet werden. Während die C_t -Differenz zwischen der 3,8% und der 23,04% Probe relativ groß ist (4,37), so findet man insbesondere zwischen den Proben 47,09% und 56,71% fast idente C_t -Mittelwerte. Dies lässt darauf schließen, dass eine Unterscheidung zwischen diesen Kuhmilchanteilen nicht möglich ist.

Tabelle 35: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

	C_t-Mittelwert \pm Standardabweichung						
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Mittelwert aller Ansätze
3,8%	24,08 \pm 0,23		23,99 \pm 0,21		24,21 \pm 0,11		24,09 \pm 0,19
23,04%	19,68 \pm 0,06		19,62 \pm 0,12		19,84 \pm 0,05		19,72 \pm 0,12
32,66%	19,15 \pm 0,14		19 \pm 0,04		19,14 \pm 0,17		19,12 \pm 0,14
42,28%	18,82 \pm 0,8		18,79 \pm 0,07		18,92 \pm 0,13		18,84 \pm 0,10
47,09%	18,59 \pm 0,07		18,58 \pm 0,10		18,67 \pm 0,11		18,61 \pm 0,10
51,90%	18,63 \pm 0,03		18,59 \pm 0,08		18,68 \pm 0,05		18,63 \pm 0,06
56,71%	18,65 \pm 0,12		18,47 \pm 0,12		18,63 \pm 0,17		18,59 \pm 0,15
61,52%	18,48 \pm 0,08		18,47 \pm 0,10		18,48 \pm 0,09		18,48 \pm 0,08
71,14%	18,47 \pm 0,13		18,29 \pm 0,11		18,44 \pm 0,09		18,39 \pm 0,13
80,76%	18,14 \pm 0,11		18,09 \pm 0,13		18,17 \pm 0,05		18,13 \pm 0,10
90%	18,3 \pm 0,04		18,03 \pm 0,09		17,97 \pm 0,17		18,06 \pm 0,18
	mit 3,8%	ohne 3,8%	mit 3,8%	ohne 3,8%	mit 3,8%	ohne 3,8%	
E	69,5%	156,6%	69,2%	147,1%	67,1%	122,4%	
R²	0,953	0,895	0,963	0,935	0,964	0,93	
s	-4,365	-2,444	-4,38	-2,546	-4,487	-2,881	

Abb. 15 zeigt die Standardgeraden aller drei Versuche, wobei die 3,8% Probe inkludiert ist. Dabei lassen sich bezüglich der Geraden keine großen Unterschiede erkennen. Unter Betrachtung der Geradengleichungen lässt sich auch eine ähnliche Steigung der Geraden erkennen. Prinzipiell deutet alles darauf hin, dass der C_t -Wert der 3,8% Probe die Gerade stark nach oben verschiebt, während sie zwischen den anderen Werten weitaus flacher verlaufen würde.

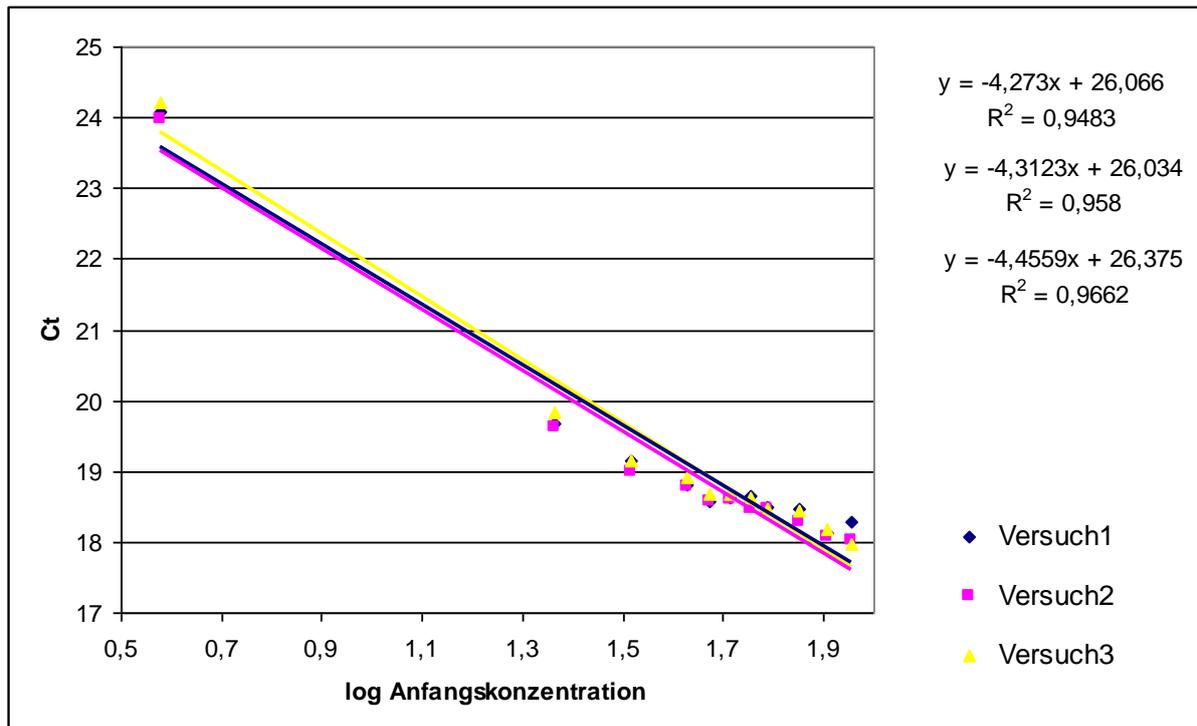


Abbildung 15: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Versuchen mit 3,8% [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Exkludiert man hingegen die 3,8% Probe, so lässt sich eine gewisse Diversität der Geraden erkennen (siehe Abb. 16). Während die Standardgeraden des 1. und 2. Versuchs relativ parallel verlaufen, so weist die 3. Gerade eine stärkere Steigung auf. Dies lässt sich auch in der Geradengleichung beobachten. Die Steigung ist aufgrund der fehlenden Verzerrung durch die 3,8% Probe weitaus niedriger als in Abb. 15.

Hervorstechend sind dabei die hohen C_t -Werte der 23,04% Probe. Diese liegen alle oberhalb der Standardgeraden. Der extrem hohe Wert im Versuch 3 führt letztendlich auch zur erhöhten Geradensteigung. Dies lässt vermuten, dass die 23,04% Probe möglicherweise weniger Kuhmilchanteil aufweist als laut IEF nachgewiesen wurde (siehe Abb. 16).

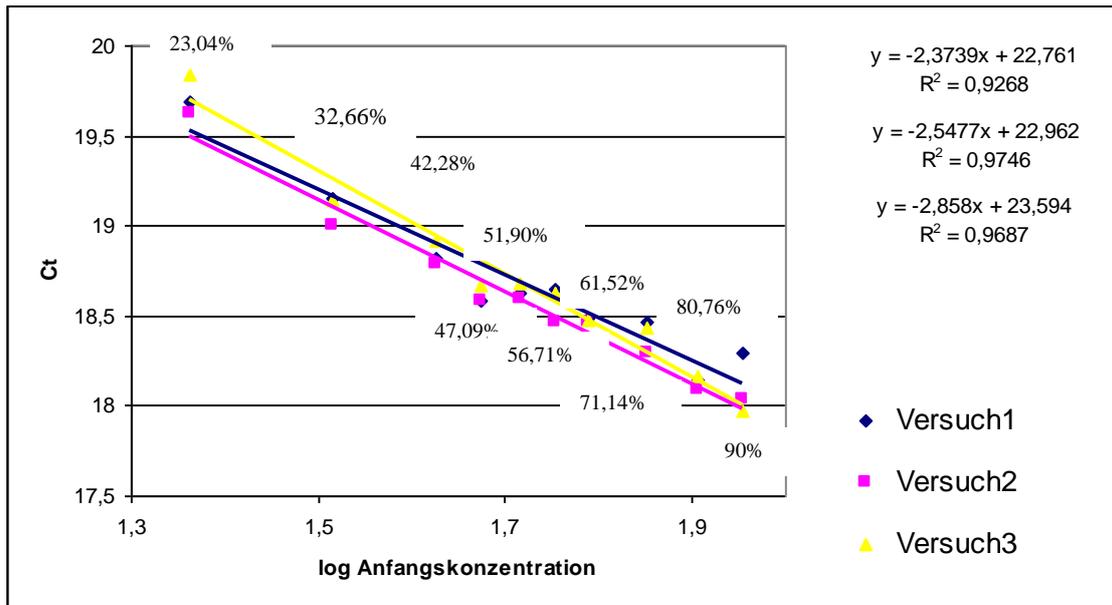


Abbildung 16: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Versuchen ohne 3,8% [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Abb. 17 zeigt die Ergebnisse alle Ansätze und deren gemeinsame Standardgerade. Jedoch wird hier ebenso die 3,8% Probe exkludiert, da sie die Gerade verzerren würde. Auch in dieser Darstellung lässt sich erkennen, dass die 23,04% Probe in fast allen Ansätzen oberhalb der Standardgerade liegt. Dies bestätigt die Vermutung, dass diese Probe wahrscheinlich einen geringeren Kuhmilchanteil besitzt. Des Weiteren weist die 90% Probe relativ hohe Abweichungen der einzelnen Ansätze auf. Auch in dieser Abbildung kann zwischen den 47,09% und 56,71% Proben nicht unterschieden werden.

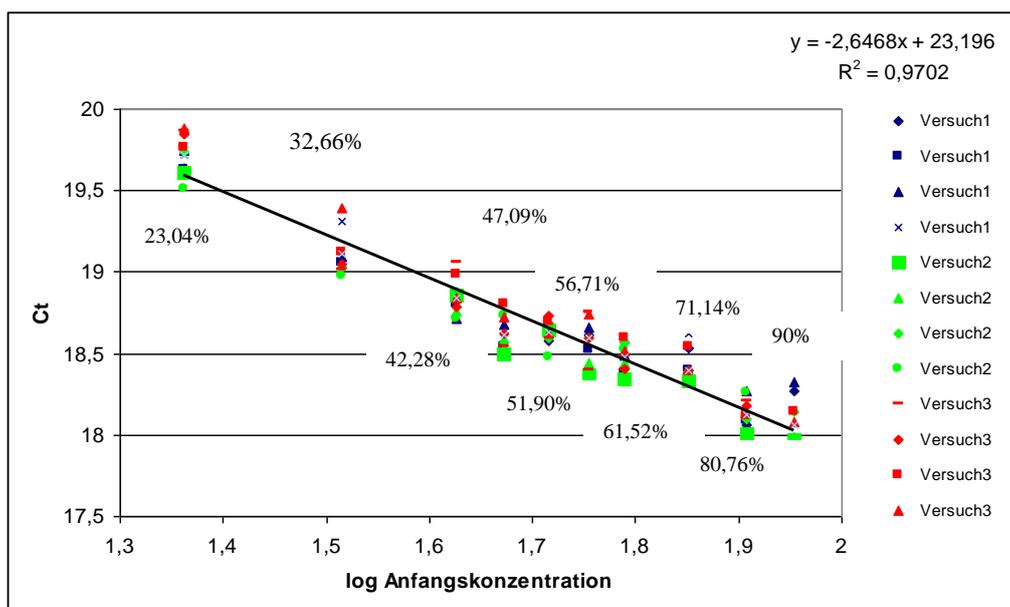


Abbildung 17: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich aller Ansätze ohne 3,8% [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Abb. 18 zeigt die einzelnen Amplifikationskurven, wobei die beste Differenzierung zwischen der 3,8% Probe und den restlichen Proben möglich ist. Anhand dieser Grafik lässt sich keine Unterscheidung zwischen den anderen Proben machen.

Des Weiteren wird in diesen Real-Time PCR-Lauf ebenso eine Negativprobe, die aus 100% Ziegenmilch besteht, integriert. Diese Negativkontrolle liefert ebenso Amplikons, jedoch sind deren C_t -Werte deutlich von dem Standard mit dem geringsten Kuhmilchanteil abgegrenzt.

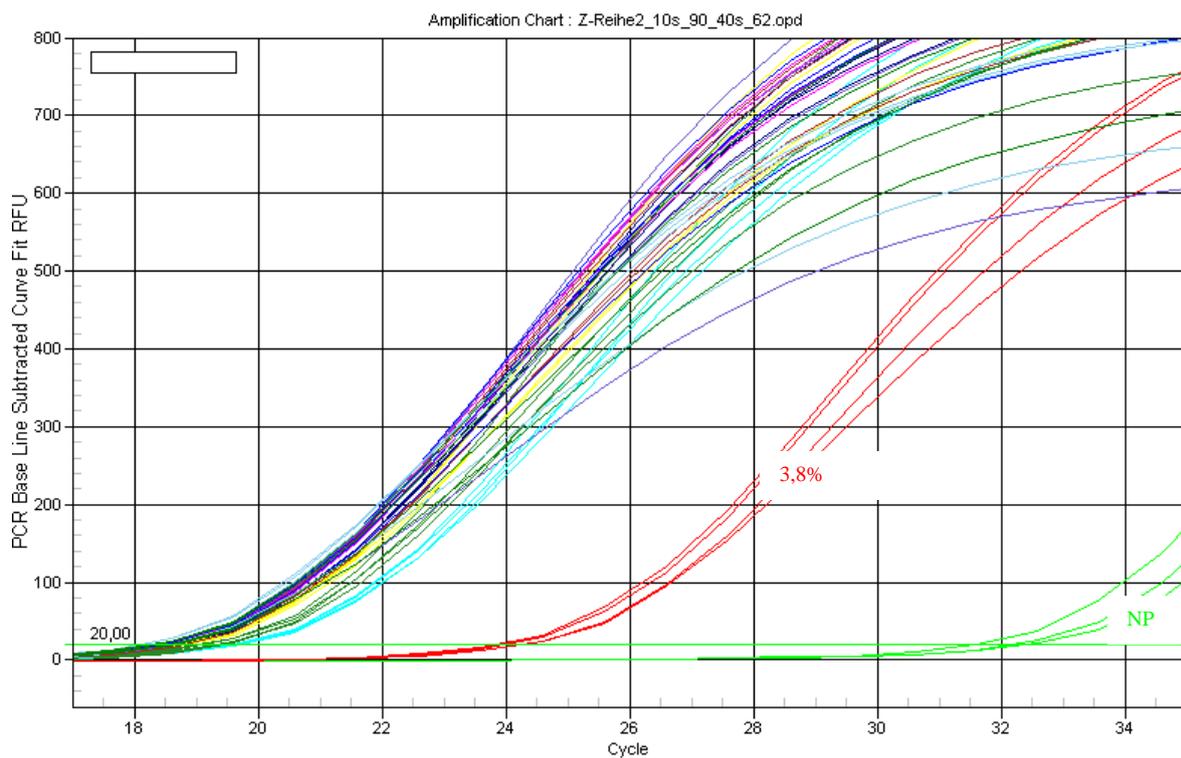


Abbildung 18: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

4.2.3.2. Wolfpassing

Mit der Wolfpassing-Standardreihe werden 2 Versuche mit je 4 Ansätzen durchgeführt. Dabei kann in beiden Real-Time PCR-Läufen eine Effizienz von über 85% erreicht werden, wobei dies ein wenig unter dem optimalen Bereich von 90 bis 110% liegt. Eine zu niedrige Effizienz deutet auf eine schlechte Enzymqualität bzw. eine suboptimale Reagenzkonzentration hin. Dies äußert sich auch im Kurvenabstand von -3,740 bzw. -3,651, der im Idealfall bei -3,32 liegen sollte. Ein Bestimmtheitsmaß von 0,986 bzw. 0,989 zeigt, dass die Daten gut zur Standardkurve passen und reflektiert somit die Linearität der Standardkurve. Bezüglich der einzelnen Proben gibt es bei keiner Probe extreme Ausreißer (siehe Tab. 36).

Tabelle 36: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

	C_t-Mittelwert \pm Standardabweichung		
	Versuch 1	Versuch 2	Mittelwert aller Ansätze
0,5%	28,61 \pm 0,26	27,03 \pm 0,13	27,90 \pm 0,86
1%	27,67 \pm 0,30	26,22 \pm 0,05	27,04 \pm 0,80
2,5%	26,39 \pm 0,22	24,90 \pm 0,29	25,65 \pm 0,83
5%	25,66 \pm 0,37	24,34 \pm 0,16	25,08 \pm 0,74
10%	23,89 \pm 0,10	22,55 \pm 0,20	23,30 \pm 0,74
25%	22,12 \pm 0,10	20,85 \pm 0,13	21,48 \pm 0,69
50%	21,07 \pm 0,14	19,98 \pm 0,16	20,53 \pm 0,60
75%	20,77 \pm 0,29	19,39 \pm 0,10	20,18 \pm 0,77
100%	20,42 \pm 0,20	18,93 \pm 0,19	19,68 \pm 0,82
E	85,1%	87,90%	
R²	0,986	0,989	
s	-3,740	-3,651	

Abb. 19 präsentiert die beiden Standardgeraden, die eine gute Parallelität aufweisen. Dies kann auch anhand der Steigungen in den Geradengleichungen beobachtet werden. Hervorstechend dabei ist die 5% Probe, denn während alle anderen Proben auf der Gerade liegen, findet man deren C_t -Werte immer oberhalb der Standardgerade. Dies würde wie bei der 23,04% Probe der Winter(Z)-Bryndza-Reihe einen niedrigeren tatsächlichen Kuhmilchanteil bedeuten.

Gleichzeitig wird in Abb. 19 klar, dass im 2. Versuch alle C_t -Werte um denselben Wert niedriger liegen als im ersten Versuch und dementsprechend in diesem Versuch der Anteil der rinderspezifischen DNA höher liegt.

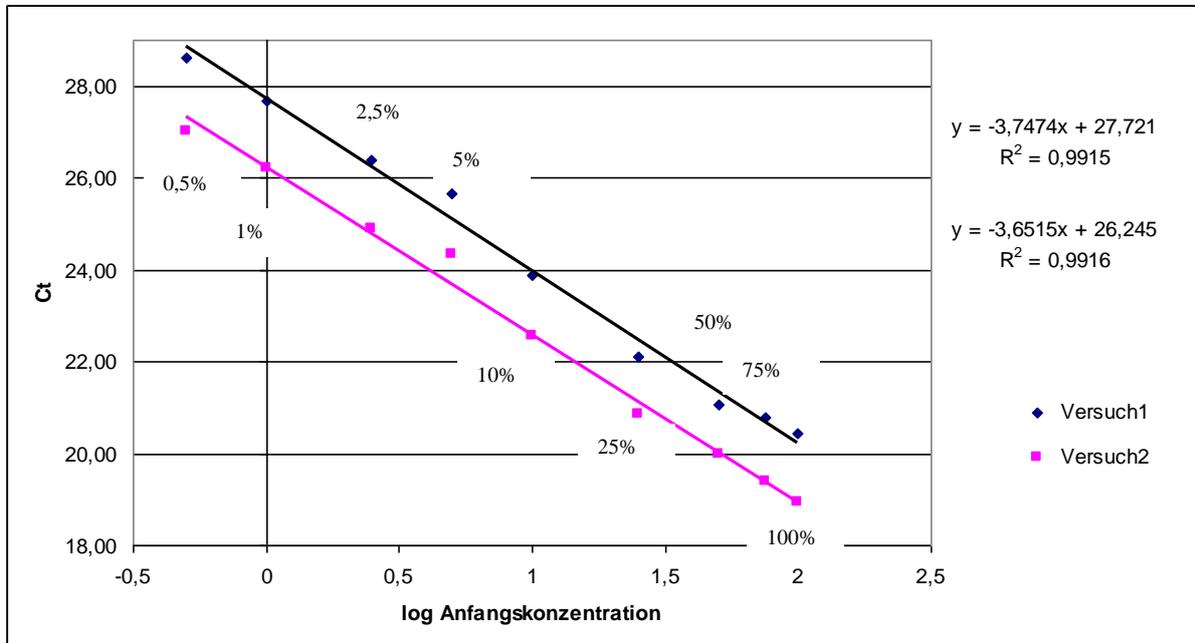


Abbildung 19: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich der Standardgeraden bei verschiedenen Versuchen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Abb. 20 zeigt die Ergebnisse aller 8 Ansätze und deren gemeinsame Standardgerade. Diese Darstellung bestätigt ebenso, dass tendenziell die 5% Probe oberhalb der Standardgerade liegt. Während sich fast alle Ansätze des ersten Versuchs oberhalb der Gerade befinden, so liegen die des zweiten Versuchs alle unterhalb der Standardgerade.

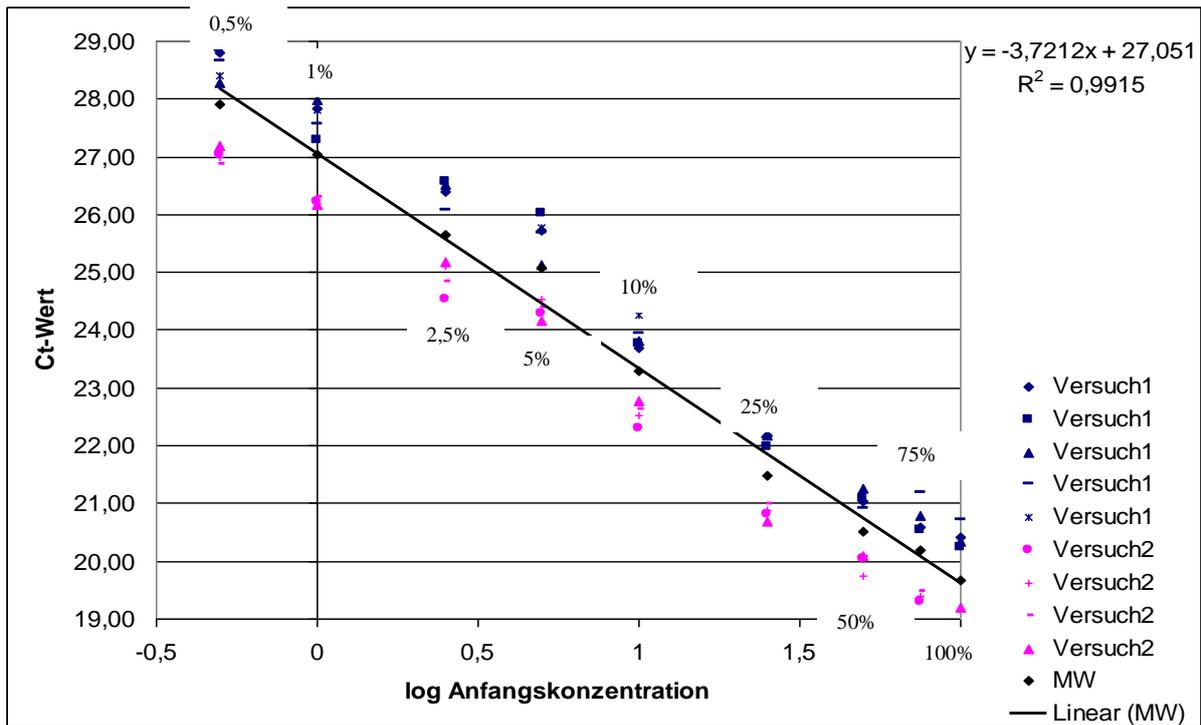


Abbildung 20: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Vergleich aller Ansätze
 [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

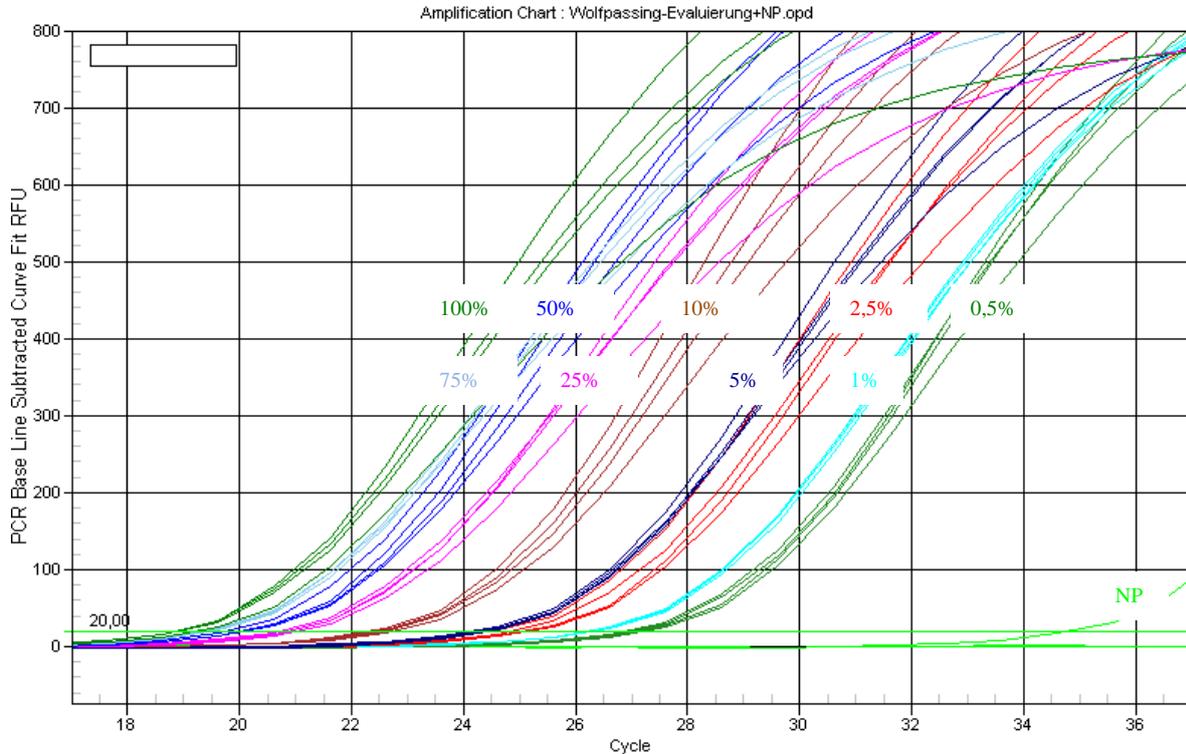


Abbildung 21: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Amplifikationskurven
 [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Abb. 21 zeigt die einzelnen Amplifikationskurven, wobei in dieser Grafik die einzelnen Amplikons schön aufgetrennt werden könnten.

Auffallend dabei ist der fast idente Kurvenverlauf der 2,5% und der 5% Probe. Auch dies lässt darauf schließen, dass der tatsächliche Kuhmilchanteil der 5% Probe geringer ist. Des Weiteren wird in diesen Real-Time PCR-Lauf eine Negativkontrolle, die aus 100% Ziegenmilch besteht, integriert. Diese Negativprobe liefert ebenso Amplikons, jedoch sind deren C_t -Werte deutlich von dem Standard mit dem geringsten Kuhmilchanteil abgegrenzt.

Die Schmelzkurvenanalyse in Abb. 22 zeigt ebenso deutlich, dass es sich bei den Amplikons der Negativprobe um unspezifische Produkte und nicht um das für Kuh spezifische Amplikon handelt. Die Kurven der einzelnen Wolfpassing-Standards sind dabei als grüne Peaks zu erkennen, während die der Negativkontrolle rot gefärbt vorliegen. Dabei wird deutlich, dass die Negativkontrollen keinen für Rind spezifischen Peak aufweisen.

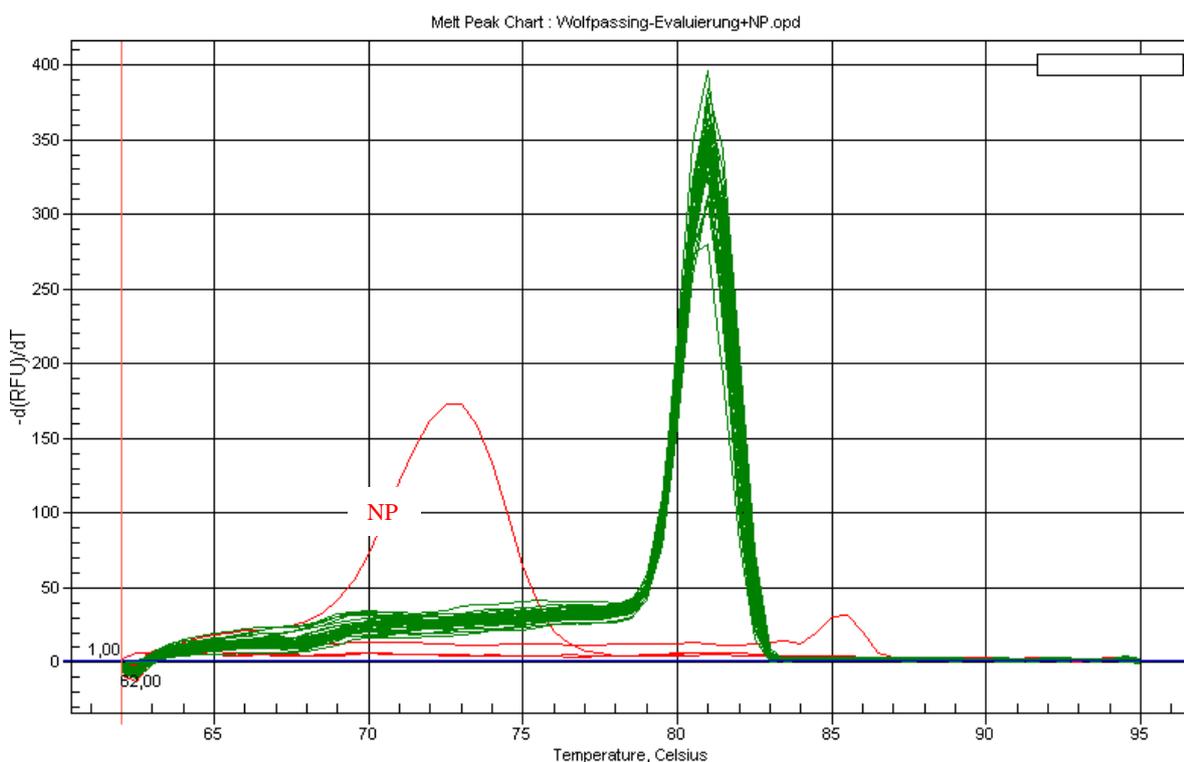


Abbildung 22: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Käseproben – Schmelzkurvenanalyse
[Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

4.3. Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben

Prinzipiell werden die Handelsproben auf Basis des erwarteten Kuhmilchanteils laut IEF in 3 Gruppen eingeteilt (siehe Kapitel 3.1.2.). Nach der Absorptionsmessung mittels Photometer wird ebenso eine konventionelle PCR mit anschließender Gelelektrophorese zum qualitativen Nachweis bzw. zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur durchgeführt. Anschließend wird eine exaktere Quantifizierung mit Hilfe einer Real-Time PCR durchgeführt.

4.3.1. Photometrische Absorptionsmessung

Tab. 37 zeigt die jeweils gemessene Absorption bei 260 und 280 nm, den A_{260}/A_{280} -Quotienten, die Konzentration, und die absolute DNA-Ausbeute der einzelnen Handelsproben.

Tabelle 37: Absorptionsmessung - Handelsproben

Bezeichnung	Verdünnung	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Konzentration	Absolute Ausbeute
11	1:100	0,027	0,019	1,42	135 ng/ μ l	13500 ng
17	1:100	0,020	0,012	1,67	100 ng/ μ l	10000 ng
19	1:100	0,020	0,012	1,67	100 ng/ μ l	10000 ng
8	1:100	0,022	0,014	1,57	110 ng/ μ l	11000 ng
4	1:100	0,029	0,019	1,53	145 ng/ μ l	14500 ng
16	1:100	0,017	0,010	1,7	85 ng/ μ l	8500 ng
6	1:100	0,021	0,013	1,62	105 ng/ μ l	10500 ng
14	1:100	0,016	0,010	1,6	80 ng/ μ l	8000 ng
1	1:100	0,020	0,013	1,54	100 ng/ μ l	10000 ng
5	1:100	0,020	0,012	1,67	100 ng/ μ l	10000 ng
20	1:100	0,023	0,016	1,44	115 ng/ μ l	11500 ng
13	1:100	0,020	0,011	1,82	100 ng/ μ l	10000 ng
12	1:100	0,021	0,013	1,62	105 ng/ μ l	10500 ng
3	1:100	0,022	0,014	1,57	110 ng/ μ l	11000 ng
10	1:100	0,021	0,013	1,62	105 ng/ μ l	10500 ng
15	1:100	0,017	0,010	1,7	85 ng/ μ l	8500 ng
7	1:100	0,019	0,011	1,73	95 ng/ μ l	9500 ng
9	1:100	0,026	0,015	1,73	130 ng/ μ l	13000 ng
21	1:100	0,014	0,009	1,56	70 ng/ μ l	7000 ng
2	1:100	0,020	0,012	1,67	100 ng/ μ l	10000 ng
18	1:100	0,021	0,011	1,91	105 ng/ μ l	10500 ng

Während der Großteil der Proben einen A_{260}/A_{280} -Quotienten im Idealbereich zwischen 1,6 und 2 aufweist, so liegen die Konzentrationen zwischen 70 ng/ μ l und 145 ng/ μ l bzw. die absolute DNA-Ausbeute zwischen 7000 ng und 14500 ng. Dies weist auf eine unterschiedliche DNA-Menge in den Proben hin. So weisen insbesondere die Proben 11, 4, und 9 eine relativ hohe DNA-Ausbeute auf, während die Proben 16, 14, 15, 7, und 21 eine deutlich niedrigere DNA-Menge beinhalten.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den Absorptionmessungen der Standardgeraden, so lässt sich erkennen, dass die Handelsproben mit einer Konzentration von 70 bis 145 ng/ μ l weitaus besser zur Bryndza-Reihe mit einer Konzentration von 100 bis 140 ng/ μ l passen als zur Wolfpassing-Reihe mit einer Konzentration von nur 5 bis 20 ng/ μ l.

4.3.2. Qualitativer Nachweis des Kuhmilchanteils und empirische Bestimmung des optimalen Temperaturprogramms mittels PCR und Gelelektrophorese

Um das optimale Temperaturprogramm für die unbekanntenen Proben zu erhalten, wird mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen gearbeitet. Neben den 21 Handelsproben werden auch zwei Negativkontrollen, eine 100% Ziegen- und eine 100% Schafmilch analysiert.

Abb. 23 zeigt den Beginn der Temperaturversuche bei 59°C. Dabei ist zum Teil ein Auftreten einer kontinuierlichen Bandenintensität, die mit dem in der Probe enthaltenen Kuhmilchanteil übereinstimmen soll, zu erkennen. Dadurch ist eine teilweise semi-quantitative Abschätzung des vorliegenden Kuhmilchanteils möglich. Insbesondere die Banden 11, 17 und 19 weisen dabei eine schwächere Bande als die anderen Proben auf. Die hervorstechenden Banden der Proben 5, 20, 13, 3, 10 und 21 zeigen hingegen etwas stärkere Banden.

Des Weiteren weist die 100% Ziegenmilch eine falsch-positive Bande auf, weshalb die Annealingtemperatur gesteigert werden muss. Ebenso lässt sich bei der zweiten Negativprobe, der 100% Schafmilch, eine ganz leichte Bande erkennen (siehe Abb. 23).

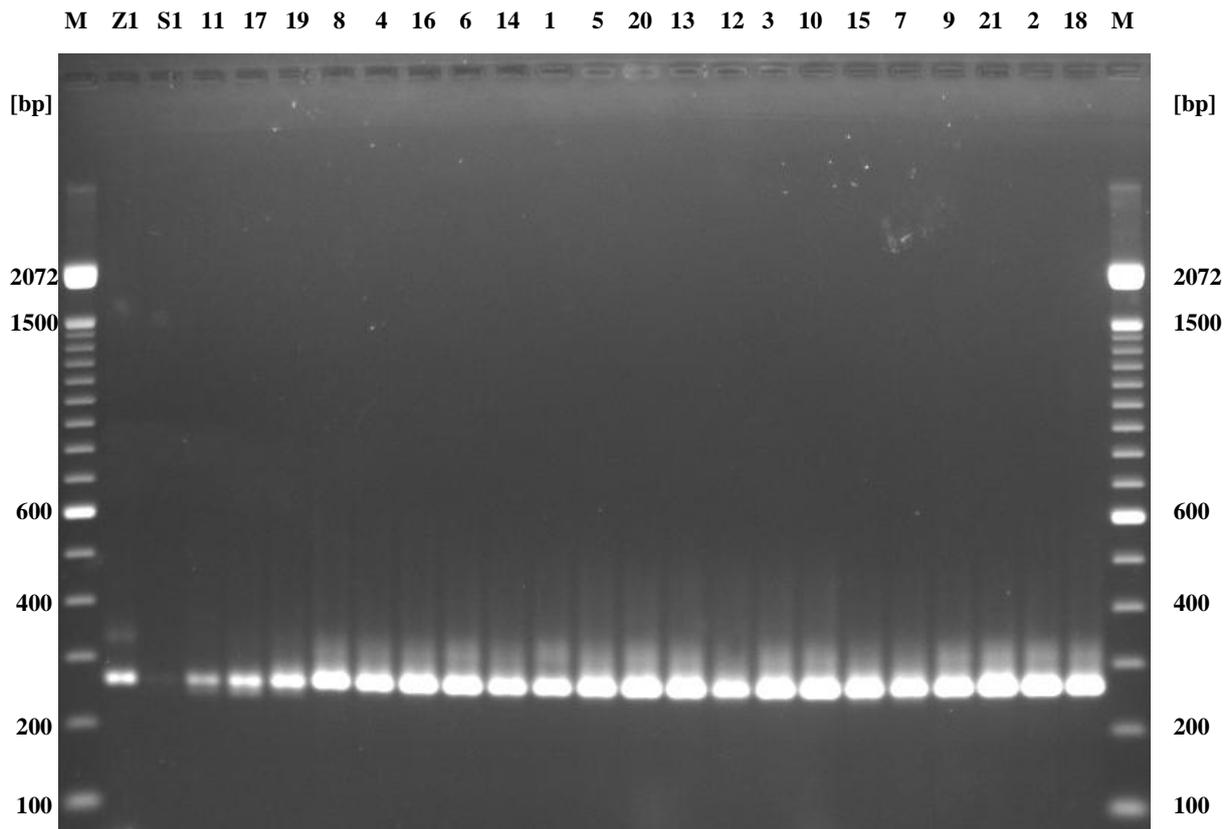


Abbildung 23: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 59°C
[Handelsproben, Cow-Bottero1/2]

Eine Steigung auf 60°C reicht dabei nicht aus, um die falsch-positiven Banden der Negativproben zu eliminieren. Die hervorstechenden Proben 8 und 21 lassen sich erneut in der höheren Konzentrierung erklären, die auch schon während des Auftragens im verringerten PCR-Volumen erkennbar war (siehe Abb. 24).

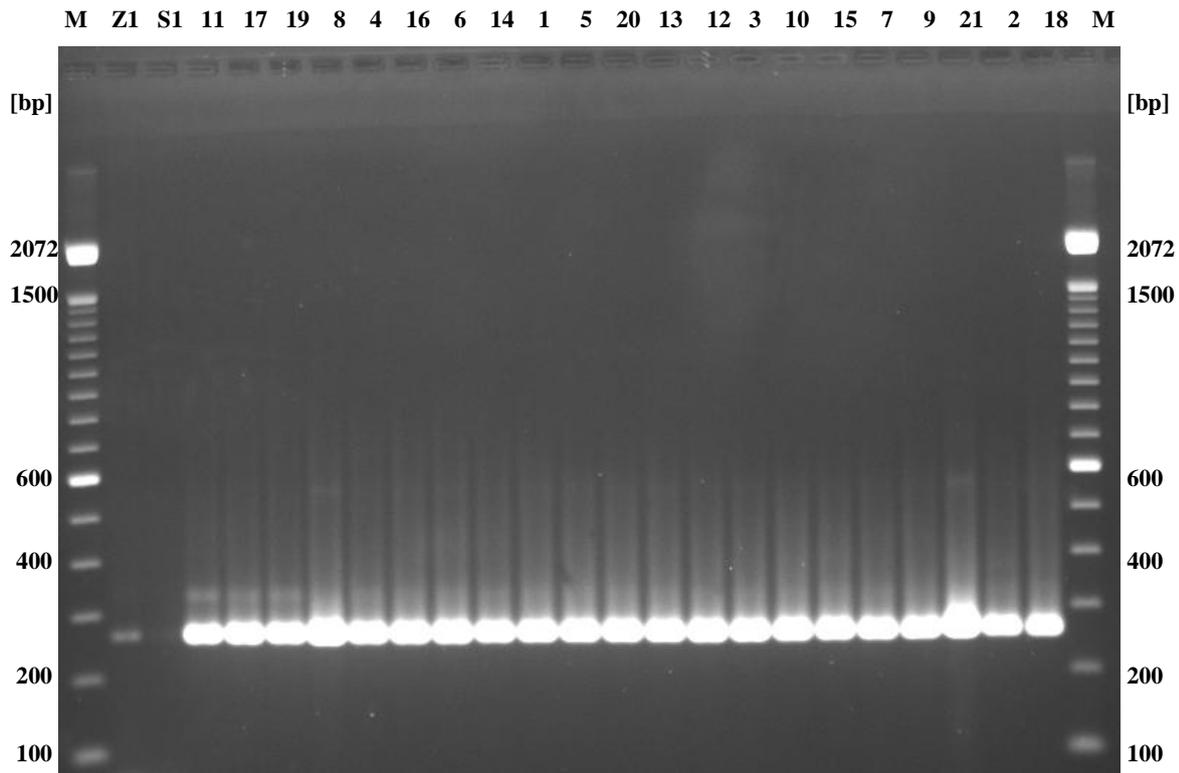


Abbildung 24: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 60°C
[Handelsproben, Cow-Bottero1/2]

Eine weitere Steigung auf 61°C führt zwar zur Eliminierung der Schafmilch-Bande, jedoch bleibt noch immer eine leichte Ziegenmilch-Bande erhalten. Des Weiteren kann auch in Abb. 25 keine wirkliche kontinuierliche Bandenintensität beobachtet werden. Dies kann auch bedeuten, dass die Proben keinen steigenden Kuhmilchanteil aufweisen. Die Probennummern 6, 5, 13, und 21 weisen jedoch etwas stärkere Banden auf, was auf einen höheren Kuhmilchanteil hindeutet.

Bei einer Annealingtemperatur von 62°C kommt es zum starken Empfindlichkeitsverlust, weshalb die Gefahr besteht, dass Proben mit niedrigem Kuhmilchanteil falsch-negative Ergebnisse liefern. So liefern insbesondere die Proben 11, 17 und 19 nur mehr sehr schwache Banden.

Anhand dieser erhaltenen Resultate wird für die bestehenden Bedingungen eine Annealingtemperatur von 60°C bzw. 61°C als optimale Temperatur angenommen. Da sich die leicht falsch-positive Bande der 100% Ziegenmilch auch in mehrfachen Durchführungen nicht eliminieren lässt, deutet dies auf eine mögliche minimale Verunreinigung der Ursprungs-DNA hin.

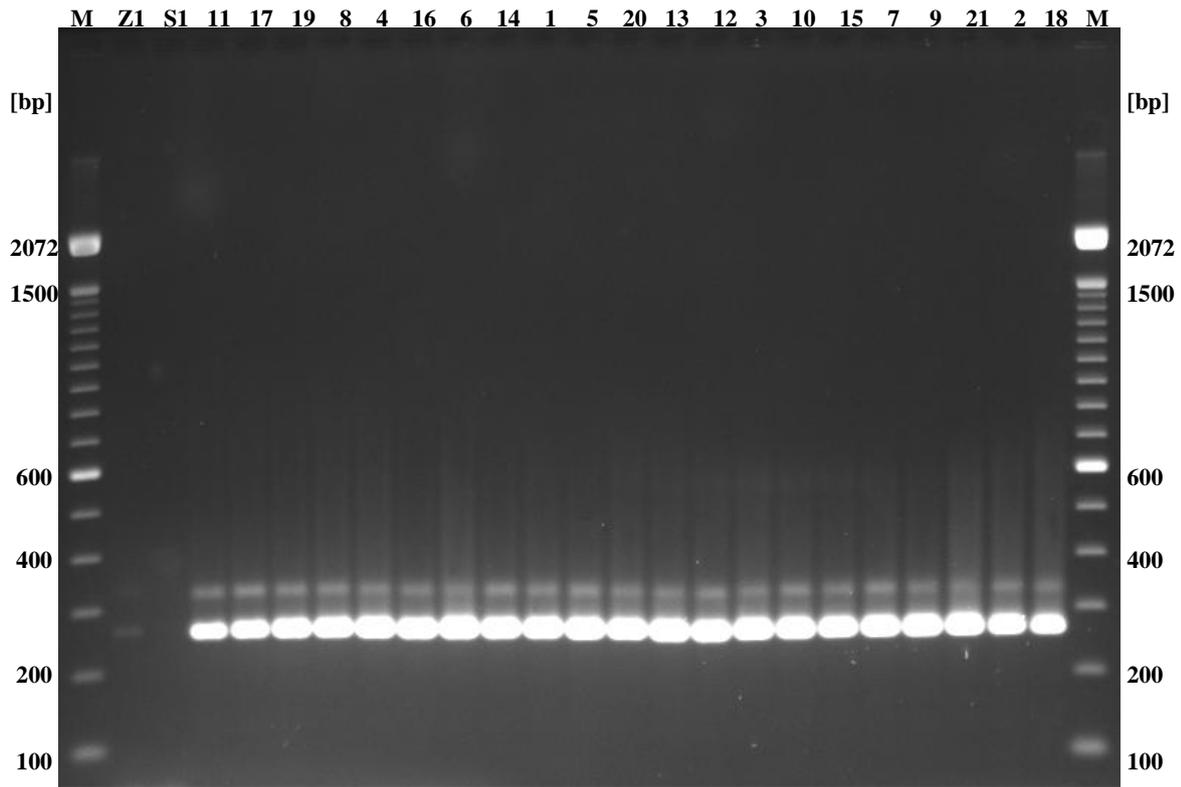


Abbildung 25: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 61°C
[Handelsproben, Cow-Bottero1/2]

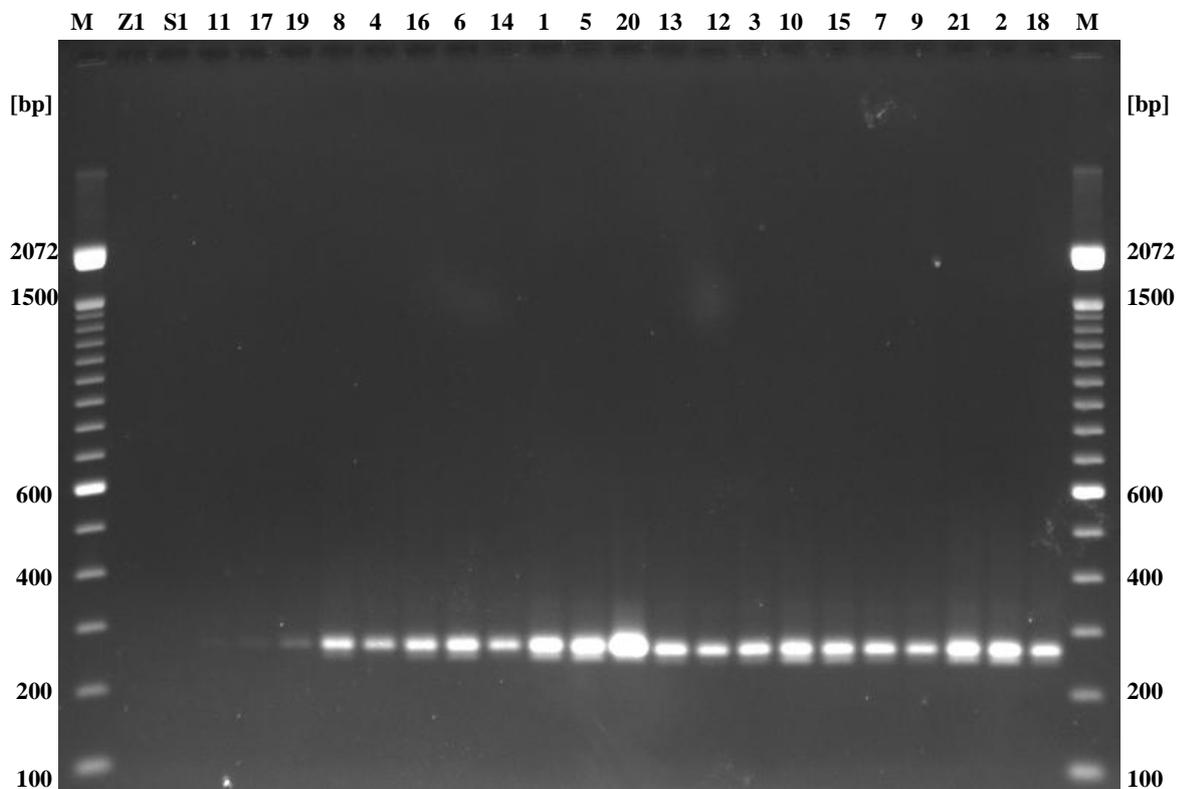


Abbildung 26: Speziesspezifische PCR zum Nachweis des Kuhmilchanteils bei einer Annealingtemperatur von 62°C
[Handelsproben, Cow-Bottero1/2]

4.3.3. Quantitativer Nachweis des Kuhmilchanteils mittels Real-Time PCR

Um den exakten Kuhmilchanteil quantifizieren zu können, wird eine Real-Time PCR durchgeführt. Dabei wird sowohl die Winter(Z)-Bryndza-Reihe als auch die Wolfpassing-Reihe als Standardreihe herangezogen. Hierzu werden die Handelsproben in 3 Gruppen eingeteilt und mit der entsprechenden Standardreihe evaluiert.

Die Proben werden immer im Dreifachansatz analysiert, während die Standards im Doppelansatz angesetzt werden. Während die erste Probengruppe mit Hilfe der normalen Isolierungsmethode mit einer Einwaage von 200 mg extrahiert wurde, so kam bei der zweiten und dritten Probengruppe aufgrund der großen Inhomogenität der Käseproben die modifizierte Methode mit einer Einwaage von 2 g zur Anwendung.

4.3.3.1. Vergleich mit Winter(Z)-Bryndza als Standardreihe

In der ersten Probengruppe werden 2 Versuche durchgeführt, wobei dabei mit zwei unterschiedlichen Isolierungen gearbeitet wird. Tab. 38 zeigt sowohl die C_t -Mittelwerte, als auch den daraus errechneten Prozent-Mittelwert der ersten drei Proben. Diese lässt man mit einer NTC, zwei Negativkontrollen Z1 und S1, und den drei Bryndza-Standards laufen. Da bei den Proben 11, 17, und 19 ein sehr geringer Kuhmilchanteil von 0 bis 7% erwartet wird, gibt es nur wenige Bryndza-Standards, die für diesen Bereich verwendet werden können. Dabei kommen die Bryndza-Standards mit einem Kuhmilchanteil von 3,8% bis 32,66% zur Anwendung.

Während beide NTCs im ersten Versuch einen C_t -Wert aufweisen, der sich jedoch stark von dem Standard bzw. der Probe mit dem geringsten Kuhmilchanteil abgrenzt, wird im 2. Versuch nur ein Amplikon erhalten. Ebenso erscheinen auch Werte für die Negativproben, wobei auch diese mit einem großen Abstand zu den Standards bzw. Proben auftreten. In beiden Versuchen kann ein Bestimmtheitsmaß von über 0,99 erreicht werden, jedoch liegt die Effizienz bei unter 50%. Dies liegt am großen Abstand der Standards, denn bei Weglassen der 3,8% Probe kann die Effizienz bis auf 75% erhöht werden, wobei auch dieser Wert noch im suboptimalen Bereich liegt. Außerdem würden bei Weglassen dieses Standards alle Proben außerhalb des Standardbereichs liegen, was zu ungenauen Ergebnissen führt.

Tabelle 38: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 1 - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr	Versuch 1 (1.Isolierung)		Versuch 2 (2. Isolierung)	
	C_t -Mittelwert STABW	%-Mittelwert STABW	C_t -Mittelwert STABW	%-Mittelwert STABW
11	26,94 ± 0,12	1,96% ± 0,10%	26,92 ± 0,07	1,85% ± 0,06%
17	24,25 ± 0,16	5,65% ± 0,35%	24,53 ± 0,25	4,90% ± 0,50%
19	22,41 ± 0,26	11,69% ± 1,24%	22,73 ± 0,53	10,26% ± 2,10%
NTC	36,46 ± 0,34		37,56; N/A	
Z1	36,50 ± 3,50		37,79 ± 5,28	
S1	35,92; N/A		33,91; N/A	
11Z	25,26 ± 0,03		25,17 ± 0,03	
9Z	20,60 ± 0,04		20,58 ± 0,16	
8Z	19,84 ± 0,06		19,94 ± 0,10	
E	48,2%		49,9%	
R ²	0,999		0,997	
s	-5,854		-5,685	

Prinzipiell passen die C_t -Mittelwerte bzw. Prozent-Mittelwerte beider Versuche gut zusammen. So weist die Probennummer 11 einen durchschnittlichen Kuhmilchanteil von 1,9% auf, obwohl dieser laut IEF weniger als 0,5% sein sollte. Auch die Proben 17 und 19 liegen mit einem durchschnittlichen Kuhmilchanteil von 5,27% bzw. 10,97% über dem Kuhmilchanteil, der mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung bei 3% bzw. 7% liegt (siehe Tab. 39).

Tabelle 39: C_t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil in % aller Ansätze in Gruppe 1 [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr.	C_t -Mittelwert	Durchschnittlicher Kuhmilchanteil in %	Kuhmilchanteil in % laut IEF
11	26,93 ± 0,09	1,90% ± 0,09%	< 0,5%
17	24,39 ± 0,24	5,27% ± 0,56%	3%
19	22,57 ± 0,42	10,97% ± 1,73%	7%

Bei Betrachtung der Amplifikationskurven lässt sich eine schöne Auftrennung der Kurven erkennen. Abb. 27 zeigt, dass die Probe 11 deutlich unter der 3,8%-Kurve zu finden ist, während sich die Proben 17 und 19 zwischen den 3,8% und 23,04% Standards befinden. Des Weiteren lassen sich Amplikons der NTCs, aber auch der Negativproben erkennen. Diese grenzen sich jedoch deutlich von den Standards bzw. Proben mit dem geringsten Kuhmilchanteil ab.

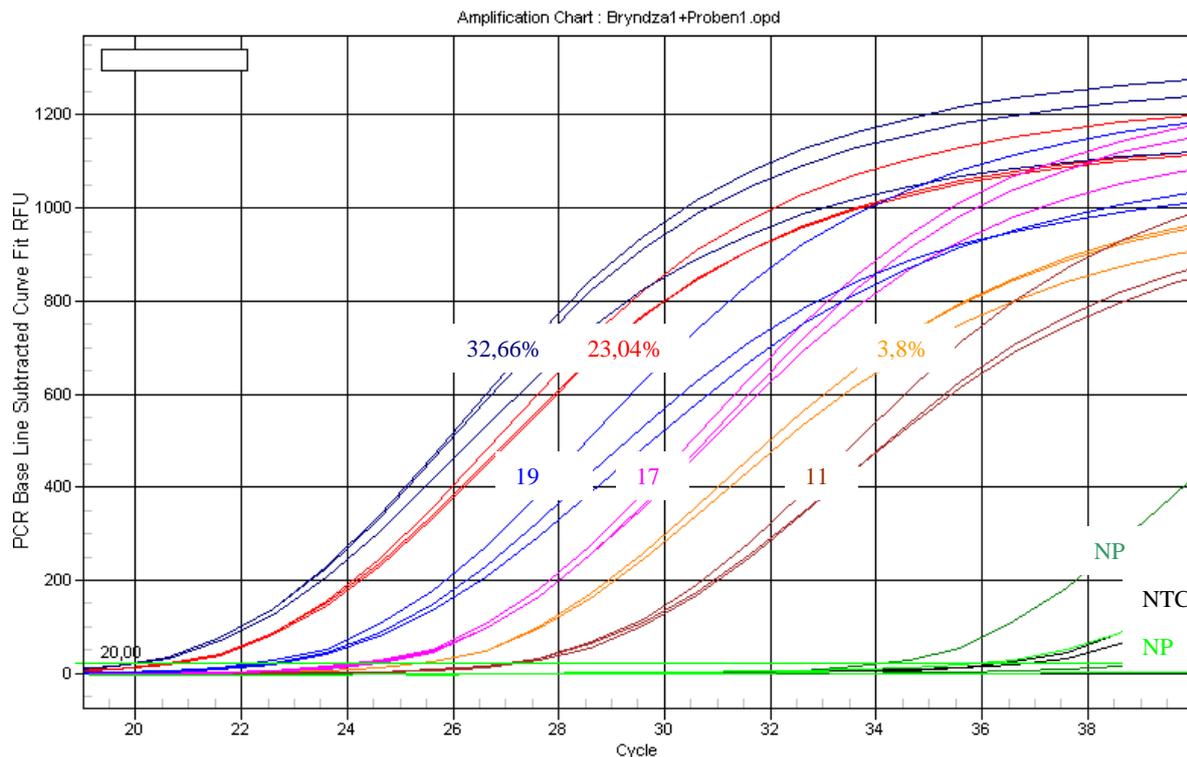


Abbildung 27: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 1 – Amplifikationskurven [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Buttero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass für die ersten unbekanntes Proben die Bryndza-Reihe als Standardreihe nicht ideal ist, da sie entweder zu einer Verzerrung der Standardgeraden durch Miteinbeziehen des 3,8% Standards führt oder alle drei Proben bei Entfernung dieses Standards außerhalb des Standardbereichs liegen. Dies führt letztendlich dazu, dass keine exakten Aussagen bezüglich des Kuhmilchanteils getroffen werden können.

In der zweiten Probengruppe werden vier Versuche durchgeführt, wobei dabei mit drei unterschiedlichen Isolierungen gearbeitet wird. Tab. 40 zeigt sowohl die C_t -Mittelwerte, als auch den daraus errechneten Prozent-Mittelwert der zweiten Probengruppe. Die neun Handelsproben werden zusammen mit einer NTC, zwei Negativkontrollen Z1 und S1, und der Bryndza-Standardreihe analysiert. Da die Proben laut IEF einen Kuhmilchanteil von 50 bis 72% aufweisen sollen, werden die Bryndza-Standards im Bereich von 23,04% bis 90% gewählt.

Tabelle 40: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 2 - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr	Versuch 1 (1.Isolierung)		Versuch 2 (1. Isolierung)		Versuch 3 (2. Isolierung)		Versuch 4 (2. Isolierung)	
	C_t -Mittelwert \pm STABW	%-Mittelwert \pm STABW						
8	19,85 \pm 0,11	16,59% \pm 1,66%	19,99 \pm 0,11	15,86% \pm 1,44%	20,44 \pm 0,18	17,47% \pm 2,11%	19,70 \pm 0,09	17,06% \pm 1,03%
4	20,23 \pm 0,01	11,99% \pm 0,14%	20,25 \pm 0,06	12,78% \pm 0,66%	20,63 \pm 0,13	15,40% \pm 1,32%	19,78 \pm 0,02	16,13% \pm 0,27%
16	19,45 \pm 0,08	23,23% \pm 1,48%	19,70 \pm 0,04	20,23% \pm 0,75%	19,92 \pm 0,15	24,60% \pm 2,31%	19,11 \pm 0,01	25,99% \pm 0,21%
6	18,83 \pm 0,07	39,61% \pm 2,32%	18,73 \pm 0,11	45,26% \pm 4,07%	19,84 \pm 0,05	25,78% \pm 0,81%	18,61 \pm 0,01	36,94% \pm 0,25%
14	20,55 \pm 0,11	09,17% \pm 0,86%	20,53 \pm 0,03	10,11% \pm 0,28%	20,84 \pm 0,10	13,40% \pm 0,86%	19,93 \pm 0,07	14,50% \pm 0,69%
1	19,92 \pm 0,05	15,58% \pm 0,69%	19,92 \pm 0,22	16,94% \pm 3,18%	20,65 \pm 0,13	15,16% \pm 1,28%	19,54 \pm 0,11	19,21% \pm 1,58%
5	19,24 \pm 0,02	27,86% \pm 0,59%	19,26 \pm 0,05	29,08% \pm 1,19%	19,67 \pm 0,17	29,06% \pm 3,39%	18,65 \pm 0,03	35,95% \pm 0,86%
20	19,56 \pm 0,25	21,50% \pm 4,50%	19,53 \pm 0,26	23,53% \pm 4,78%	19,98 \pm 0,28	23,75% \pm 4,48%	18,99 \pm 0,24	28,46% \pm 4,57%
13	18,85 \pm 0,32	39,36% \pm 10,57%	18,88 \pm 0,12	40,00% \pm 4,09%	18,96	46,06	18,62 \pm 0,51	37,96% \pm 13,43%
8Z	19,08 \pm 0,16		19,19 \pm 0,11		19,46 \pm 0,11		18,84 \pm 0,13	
7Z	18,68 \pm 0,08		18,72 \pm 0,07		19,05 \pm 0,12		18,39 \pm 0,08	
5Z	18,41 \pm 0,03		18,44 \pm 0,14		18,68		17,95 \pm 0,13	
3Z	18,40 \pm 0,23		18,50 \pm 0,03		18,70 \pm 0,002		18,01 \pm 0,12	
2Z	18,31 \pm 0,11		18,26 \pm 0,06		18,42 \pm 0,05		17,79 \pm 0,08	
1Z	17,9 \pm 0,09		17,93 \pm 0,07		18,04 \pm 0,09		17,50 \pm 0,05	
10Z	17,81 \pm 0,10		17,92 \pm 0,13		17,84 \pm 0,02		17,30 \pm 0,05	
E	134%		129,4%		93,3%		103,2%	
R ²	0,898		0,925		0,953		0,941	
s	-2,708		-2,773		-3,494		-3,247	

Obwohl die Proben von Gruppe 2 laut IEF einen Kuhmilchanteil zwischen 50 und 74% aufweisen sollen, ergibt die Real-Time PCR mit der Winter(Z)-Bryndza Käsereihe als Standardreihe ganz andere Ergebnisse. Negativ hervorstechend ist dabei die Probennummer 13, denn ihre Standardabweichung des prozentuellen Mittelwertes ist weitaus höher als die der anderen Proben. Während die meisten Proben nur geringe Abweichungen aufweisen, so ergibt sich bei dieser Probe bei jedem durchgeführten Versuch eine hohe Standardabweichung. Mit einer Abweichung von bis über 13% bzw. einer Variation von bis zu 35% deuten diese Ergebnisse auf eine starke Inhomogenität der Probe 13 hin.

Auch die Probe 20 weist etwas höhere Abweichungen im Vergleich zu den anderen Proben auf, da auch sie in jedem Versuch eine Standardabweichung von über 4% hat. Gleichzeitig ist auch ein gewisser Unterschied zwischen den beiden Isolierungen zu beobachten. So ergeben sowohl Versuch 1 als auch Versuch 2 einen zu geringen Kurvenabstand von nur ca. -2,7, während in der 2. Isolierung Werte von bis zu -3,49 erreicht werden können. Ebenso scheint die Effizienz in den letzten Versuchen besser zu sein, da sie in einem Bereich von 90 bis 110% liegt. Sowohl eine Effizienz von 134% im Versuch 1, als auch eine Effizienz von 129,4% deuten auf PCR-Inhibitoren hin. Dies äußert sich auch in einem niedrigeren Bestimmtheitsmaß.

Vergleicht man die einzelnen Werte der unterschiedlichen Versuche, so weicht die Probe 6 im Versuch 3 als einzige stark von den anderen ab. Während bei den anderen Durchführungen ein Kuhmilchanteil von etwa 40% nachgewiesen werden kann, kann im 3. Versuch nur ein Anteil von etwa 25% bestimmt werden. Betrachtet man die einzelnen Standards, so sind hier keine großen Ausreißer erkennbar (siehe Tab. 40).

Tab. 41 zeigt die durchschnittlichen C_t -Werte bzw. Kuhmilchanteile der einzelnen Proben aus allen Ansätzen und zum Vergleich dazu den Kuhmilchanteil, der mit Hilfe der IEF nachgewiesen werden konnte.

Vergleicht man die Kuhmilchanteile, die mittels Real-Time PCR nachgewiesen wurden mit denen der IEF, so fallen insbesondere die Proben 14, 1, und 20 auf, denn mit deren Ausnahme kann ein leichter Aufwärts-Trend erkannt werden. Jedoch liegen alle nachgewiesenen Kuhmilchanteile weit unter dem prozentuellen Kuhmilchanteil laut IEF.

Tabelle 41: C_t-Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 2
[Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr.	C _t -Mittelwert	Durchschnittlicher Kuhmilchanteil in %	Kuhmilchanteil in % laut IEF
8	20,00 ± 0,31	16,75% ± 1,51%	50%
4	20,22 ± 0,30	14,07% ± 1,89%	50%
16	19,54 ± 0,34	23,51% ± 3,05%	61%
6	19,00 ± 0,52	36,90% ± 7,68%	64%
14	20,46 ± 0,35	11,79% ± 2,39%	64%
1	20,01 ± 0,44	16,72% ± 2,32%	69%
5	19,20 ± 0,54	30,49% ± 7,20%	70%
20	19,52 ± 0,48	24,31% ± 6,96%	71%
13	18,83 ± 0,29	40,84% ± 7,69%	72%

Wie in Tab. 42 erkennbar ist, liefert auch die dritte Probengruppe unterschiedliche Resultate bezüglich des Kuhmilchanteils. Hierzu werden erneut Bryndza-Standards im Bereich von 32,66% und 90% gewählt. Während die Proben laut IEF einen Kuhmilchanteil zwischen 73 und 91% aufweisen, ergeben sich in der Real-Time PCR erneut niedrigere Werte. Des Weiteren ist auch hier keine wachsende Tendenz zu erkennen. Besonders negativ auffallend ist hier erneut die letzte Probe, wobei es sich dieses Mal um die Probennummer 18 handelt. Insbesondere fällt sie im ersten Versuch mit einer Standardabweichung von ca. 27% auf. Prinzipiell findet man jedoch in der gesamten Gruppe höhere Abweichungen als in der Probengruppe 2.

Weiteres ist ein etwas besseres Bestimmtheitsmaß in der 2. Isolierung erkennbar.

Überraschenderweise findet man jedoch zwischen der ersten und der zweiten Isolierung starke Differenzen. Während bei der Probennummer 12 die zweite Isolierung mehr als den doppelten Kuhmilchanteil nachweist (20% vs. 45%), findet man in der Probe 7 einen ebenso fast doppelt so hohen Kuhmilchanteil in der 2. Isolierung (20% vs. 35%). Im Gegensatz dazu sinkt der Anteil in Probe 10 von etwa 70% im 1. Versuch auf nur mehr 40-45% im 2. Versuch. Auch in Probe 15 verdoppelt sich der Kuhmilchanteil beinahe (20% vs. 37%). Die Proben 9 und 21 hingegen weisen überhaupt sehr unterschiedliche Ergebnisse auf. Prinzipiell passen nur zwei der neun Proben, die Probennummer 3 und 2, gut zueinander (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 3 - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr	Versuch 1 (1.Isolierung)		Versuch 2 (1. Isolierung)		Versuch 3 (2. Isolierung)		Versuch 4 (2. Isolierung)	
	C_t -Mittelwert \pm STABW	%-Mittelwert \pm STABW						
12	20,06 \pm 0,07	21,70% \pm 0,97%	20,68 \pm 0,05	18,16% \pm 0,69%	18,39 \pm 0,17	44,92% \pm 5,77%	18,49 \pm 0,16	45,64% \pm 5,02%
3	18,69 \pm 0,06	50,71% \pm 1,94%	19,13 \pm 0,16	54,97% \pm 5,89%	18,10 \pm 0,21	55,88% \pm 8,51%	18,49 \pm 0,13	45,46% \pm 4,07%
10	18,21 \pm 0,07	67,94% \pm 2,85%	18,74 \pm 0,04	72,12% \pm 2,16%	18,48 \pm 0,17	41,96% \pm 5,45%	18,48 \pm 0,11	45,78% \pm 3,59%
15	19,97 \pm 0,02	22,91% \pm 0,25%	20,63 \pm 0,01	18,78% \pm 0,17%	19,64 \pm 0,10	37,25% \pm 2,65%	18,78 \pm 0,26	37,30% \pm 7,40%
7	19,88 \pm 0,39	24,81% \pm 5,82%	20,62 \pm 0,10	18,99% \pm 1,31%	18,77 \pm 0,13	33,84% \pm 3,32%	18,83 \pm 0,06	35,43% \pm 1,67%
9	18,58 \pm 0,07	54,25% \pm 2,35%	19,14 \pm 0,12	54,29% \pm 4,41%	18,94 \pm 0,07	15,16% \pm 1,28%	18,99 \pm 0,13	31,76% \pm 2,85%
21	18,70 \pm 0,20	50,48% \pm 6,37%	19,67 \pm 0,03	37,25% \pm 0,82%	19,67 \pm 0,17	29,71% \pm 1,49%	18,21 \pm 0,09	55,82% \pm 3,56%
2	18,55 \pm 0,10	55,15% \pm 3,41%	19,39 \pm 0,01	45,31% \pm 0,41%	18,15 \pm 0,14	53,78% \pm 5,84%	18,46 \pm 0,26	47,19% \pm 9,07%
18	18,85 \pm 1,21	52,43% \pm 26,99%	19,23 \pm 0,21	51,14% \pm 7,61%	18,07	56,88	18,99 \pm 0,27	32,05% \pm 6,35%
8Z					18,83 \pm 0,06		18,92 \pm 0,05	
7Z	19,05 \pm 0,05		19,57 \pm 0,17		18,38 \pm 0,03		18,53 \pm 0,07	
5Z	18,62 \pm 0,12		19,12 \pm 0,02		18,29 \pm 0,04		18,39 \pm 0,04	
3Z	18,24 \pm 0,07		18,86 \pm 0,16		17,97 \pm 0,04		18,14 \pm 0,001	
2Z	18,17		18,87 \pm 0,06		17,74		17,77 \pm 0,07	
1Z	18,00 \pm 0,001		18,53 \pm 0,15		17,55 \pm 0,02		17,72 \pm 0,01	
10Z			18,46 \pm 0,18		17,49			
E	85,3%		103,7%		115,1%		106,9%	
R ²	0,941		0,891		0,974		0,960	
s	-3,734		-3,237		-3,007		-3,168	

Tab. 43 zeigt die durchschnittlichen C_T -Werte bzw. Kuhmilchanteile der einzelnen Proben aus allen Ansätzen und zum Vergleich dazu den Kuhmilchanteil, der mit Hilfe der IEF nachgewiesen werden konnte. Prinzipiell kann anhand dieser Tabelle kein Aufwärtstrend erkannt werden. Die Proben 15 und 7 fallen dabei durch ihren niedrigeren Kuhmilchanteil auf. Alle Werte liegen jedoch unter den Kuhmilchanteil-Werten der IEF. Des Weiteren findet man aufgrund der großen Streuung der einzelnen Werte eine große Standardabweichung. Diese Abweichung ist erneut in den Proben 3 und 2 am geringsten, während sie insbesondere in der Probe 18 mit einer Standardabweichung von über 16% besonders hoch ist (siehe Tab. 43).

Tabelle 43: C_T -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 3

[Winter(Z)-Bryndza, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr.	C_T-Mittelwert	Durchschnittlicher Kuhmilchanteil in %	Kuhmilchanteil in % laut IEF
12	19,41 ± 1,04	32,60% ± 13,71%	73%
3	18,60 ± 0,39	51,75% ± 6,07%	75%
10	18,48 ± 0,23	56,95% ± 13,95%	76%
15	19,51 ± 0,88	29,06% ± 9,34%	77%
7	19,52 ± 0,82	28,27% ± 7,63%	80%
9	18,91 ± 0,23	42,50% ± 12,57%	82%
21	18,68 ± 0,65	49,33% ± 8,55%	84%
2	18,62 ± 0,49	51,13% ± 7,01%	91%
18	18,82 ± 0,59	46,53% ± 16,54%	91%

Aufgrund der eng zusammen liegenden C_T -Werte werden die Amplifikationskurven der zweiten und dritten Probengruppe nicht dargestellt. Die stark schwankenden Werte zwischen den einzelnen Isolierungen deuten auf eine starke Inhomogenität des Käses hin.

4.3.3.2. Vergleich mit Wolfpassing als Standardreihe

In der ersten Probengruppe werden erneut zwei Versuche durchgeführt, wobei diese aus zwei unterschiedlichen Isolierungen stammen. Tab. 44 zeigt dabei die C_t -Mittelwerte mit dem daraus errechneten durchschnittlichen Kuhmilchanteil in %. Dabei werden auch eine NTC, zwei Negativkontrollen Z1 und S1, und vier Wolfpassing-Standards im Bereich zwischen 0,5% und 25% analysiert.

Dabei kann kein C_t -Wert für die NTC beobachtet werden, während die Negativproben serwohl einen C_t -Wert aufweisen. Dieser liegt jedoch weit über dem C_t -Wert der Proben bzw. Standards mit dem geringsten Kuhmilchanteil. Auch in diesen beiden Versuchen kann ein Bestimmtheitsmaß von über 0,99 erreicht werden, wobei auch eine Effizienz von 87,5% bzw. 84,5% erreicht werden konnte. Mit einem slope von -3,663 bzw. -3,760 liegt der Kurvenabstand dabei in einem akzeptablen Bereich. Prinzipiell lassen sich zwischen den beiden Durchführungen kleine Unterschiede bezüglich der C_t -Mittelwerte bzw. Prozent-Mittelwerte erkennen. So weisen die Proben 11 und 19 im 2. Versuch weniger Kuhmilchanteil in % auf, während in der Probe 17 ein etwas höherer prozentueller Anteil nachgewiesen wird (siehe Tab. 44).

Tabelle 44: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 1 - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr	Versuch 1 (1. Isolierung)		Versuch 2 (2. Isolierung)	
	C_t -Mittelwert STABW	± %	C_t -Mittelwert STABW	± %
11	25,46	± 0,26	26,17	± 0,40
17	23,04	± 0,15	23,40	± 0,08
19	21,31	± 0,44	21,94	± 0,69
NTC	N/A		N/A	
Z1	33,62 ± 0,382		N/A	
S1	33,90		34,68	
10	27,12 ± 0,03		27,62 ± 0,26	
11	26,64 ± 0,03		27,08 ± 0,12	
14	22,81 ± 0,03		23,13 ± 0,03	
15	21,03 ± 0,11		21,48 ± 0,16	
E	87,5%		84,5%	
R^2	0,990		0,992	
s	-3,663		-3,760	

Fasst man nun alle Ansätze zusammen, so erhält man für die Probennummer 11 einen durchschnittlichen Kuhmilchanteil von 1,64%. Dieser stimmt mit dem Wert, der mit Hilfe der Bryndza-Reihe evaluiert wurde und 1,9% Kuhmilchanteil entsprach, sehr gut überein und liegt auch in diesem Fall über dem Anteil, der laut IEF enthalten sein soll. Die Probe 17 liegt mit der Wolfpassing-Reihe als Standard mit einem durchschnittlichen Anteil von 8,07% ebenso etwas über dem Wert, der mit Hilfe der Bryndza-Reihe gefunden wurde. Die größte Differenz lässt sich jedoch in Probe 19 erkennen. Während mit Hilfe der Bryndza-Reihe ein Wert von 10,97% Kuhmilchanteil errechnet wurde, lässt sich mit Hilfe der Wolfpassing-Reihe ein Anteil von 22,63% nachweisen (siehe Tab. 45).

Tabelle 45: C_t-Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 1 [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr.	C_t-Mittelwert	Durchschnittlicher Kuhmilchanteil in %	Kuhmilchanteil in % laut IEF
11	25,82 ± 0,50	1,64% ± 0,31%	< 0,5%
17	23,22 ± 0,22	8,07% ± 0,57%	3%
19	21,62 ± 0,62	22,63% ± 6,44%	7%

Abb. 28 zeigt den grafischen Vergleich der Ergebnisse der ersten Probengruppe. Dabei ist gut zu erkennen, dass der Kuhmilchanteil, der laut IEF gemessen wurde, in allen Fällen niedriger liegt als beim Nachweis mittels Real-Time PCR. Während in der Probe 11 der Kuhmilchanteil bei beiden Standardreihen beinahe ident ist, unterscheidet er sich bei Probe 17. Die Probe Nummer 19 hingegen liefert einen mehr als doppelt so hohen Kuhmilchanteil als mit der Bryndza-Reihe bzw. verdreifacht sich im Vergleich zum Wert der IEF.

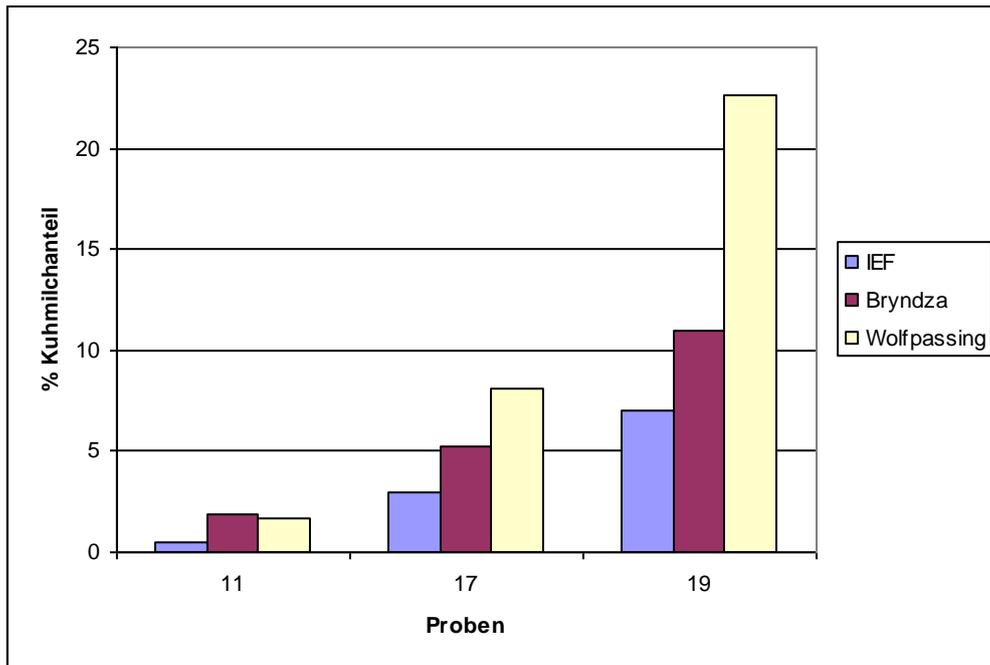


Abbildung 28: Vergleich der Kuhmilchanteil-Ergebnisse der Gruppe 1 [IEF, Bryndza, Wolfpassing]

Abb. 29 zeigt die Amplifikationskurven des Laufs mit der Wolfpassing-Standardreihe, wobei die Probennummer 11 im Bereich des 1% Standards auftritt. Während die Probe 17 im Bereich des 10% Standards zu erkennen ist, so findet man die Probe 19 in der Nähe des 25% Standards. Des Weiteren lassen sich Amplikons der NTC, aber auch der Negativproben erkennen. Diese grenzen sich jedoch deutlich von den Standards bzw. Proben mit dem geringsten Kuhmilchanteil ab.

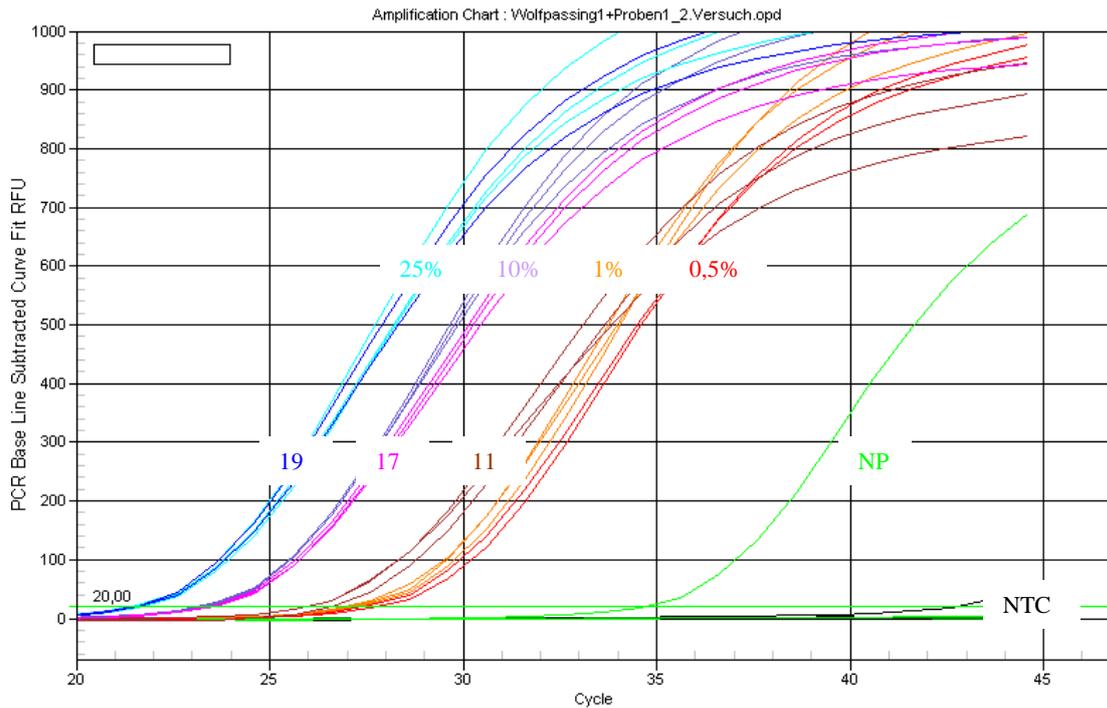


Abbildung 29: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 1 – Amplifikationskurven
[Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Die Schmelzkurvenanalyse in Abb. 30 zeigt deutlich, dass es sich bei den Amplikons, die in der Negativprobe und der NTC erhalten werden, um unspezifische Produkte und nicht um das für Kuh spezifische Amplikon handelt. Die Kurven der einzelnen Wolfpassing-Standards bzw. der Handelsproben sind dabei als grüne Peaks zu erkennen, während die der Negativkontrolle rot gefärbt und die der NTC schwarz gefärbt vorliegen. Dabei wird deutlich, dass sowohl die Negativkontrolle, als auch die NTC, keinen für Rind spezifischen Peak aufweisen.

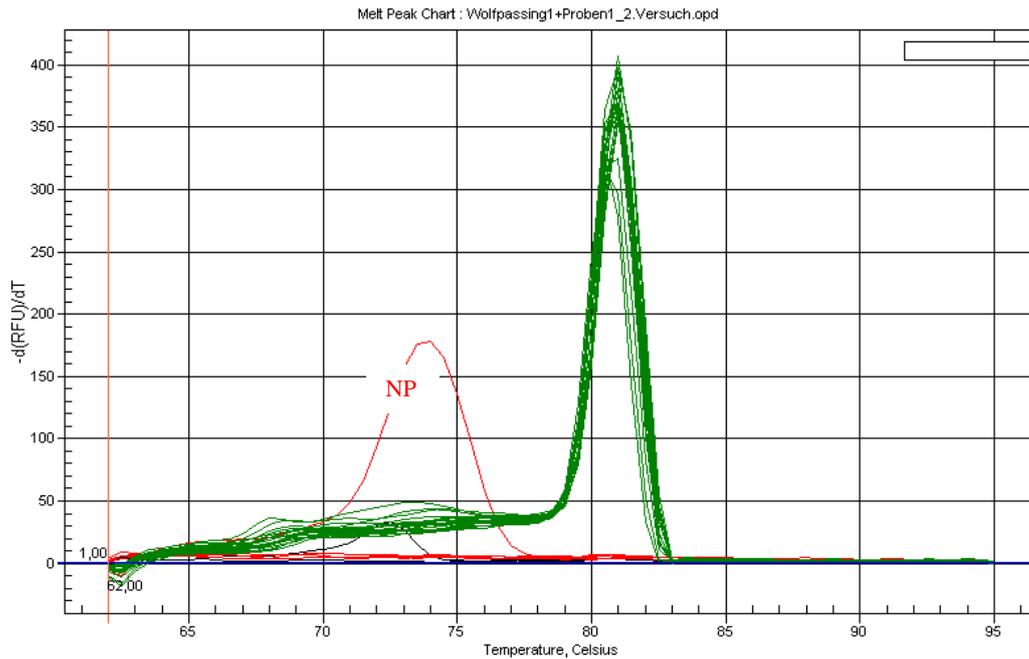


Abbildung 30: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 1 – Schmelzkurvenanalyse [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

In der zweiten Probengruppe wurden wiederum drei Versuche durchgeführt, wobei diese aus drei unterschiedlichen Isolierungen stammen. Tab. 46 zeigt dabei die C_t -Mittelwerte mit dem daraus errechneten durchschnittlichen Kuhmilchanteil in %. Dabei werden neben den 9 Handelsproben sechs Wolfpassing-Standards im Bereich von 5 bis 100% analysiert.

Während die Probennummern 8, 4, 14, 1, und 20 in den unterschiedlichen Versuchen relativ gut zusammenpassen, so variieren manche Proben sehr stark. So lässt sich bei Probe 16 ein deutlich höherer Kuhmilchanteil im zweiten und dritten Versuch nachweisen. Ebenso unterscheidet sich der 3. Versuch der Probe 6 um etwa 20% mehr Kuhmilchanteil. Dasselbe Phänomen tritt ebenso bei der Probennummer 5 auf. Die Probe 13 hingegen weist gar drei unterschiedliche Kuhmilchanteile auf. So variieren diese zwischen 96% und 144%.

Bei Betrachtung der einzelnen Standards können keine großen Ausreißer entdeckt werden.

Insbesondere stechen die Bestimmtheitsmaße hervor, da diese nur ca. bei 0,97 liegen. Dahingegen liegen die Effizienzen in einem akzeptablen Bereich, wobei eine Effizienz von 71,3% im 1. Versuch schon etwas niedrig liegt, was sich auch in einem slope von -4,277 äußert (siehe Tab. 46).

Tabelle 46: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 2 - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr	Versuch 1 (1.Isolierung)		Versuch 2 (2. Isolierung)		Versuch 3 (3. Isolierung)	
	C_t -Mittelwert \pm STABW	%-Mittelwert \pm STABW	C_t -Mittelwert \pm STABW	%-Mittelwert \pm STABW	C_t -Mittelwert \pm STABW	%-Mittelwert \pm STABW
8	20,04 \pm 0,15	51,55% \pm 4,19%	19,68 \pm 0,05	58,57% \pm 1,80%	19,76 \pm 0,11	54,89% \pm 3,69%
4	20,09 \pm 0,12	50,04% \pm 3,27%	19,99 \pm 0,11	47,97% \pm 3,44%	19,93 \pm 0,11	49,35% \pm 3,17%
16	19,58 \pm 0,13	66,14% \pm 4,60%	19,05 \pm 0,20	87,50% \pm 11%	19,15 \pm 0,06	79,91% \pm 2,92%
6	19,03 \pm 0,09	88,87% \pm 4,30%	19,11 \pm 0,12	84,18% \pm 6,52%	18,67 \pm 0,21	107,87% \pm 13,7%
14	20,50 \pm 0,14	40,18% \pm 2,99%	19,96 \pm 0,09	49,08% \pm 2,75%	20,11 \pm 0,06	44,19% \pm 1,74%
1	19,97 \pm 0,24	53,63% \pm 6,70%	19,79 \pm 0,13	54,74% \pm 4,34%	19,81 \pm 0,07	53,17% \pm 2,37%
5	19,16 \pm 0,11	82,55% \pm 4,68%	19,07 \pm 0,13	86,25% \pm 7,14%	18,74 \pm 0,09	102,63% \pm 5,98%
20	19,36 \pm 0,09	74,19% \pm 3,75%	19,14 \pm 0,09	82,25% \pm 4,90%	19,13 \pm 0,29	81,55% \pm 13,67%
13	18,86 \pm 0,01	96,61% \pm 0,63%	18,25 \pm 0,04	144,6% \pm 3,28%	18,43 \pm 0,19	125% \pm 14,52%
13	24,66 \pm 0,03					
14	22,71 \pm 0,20		22,64 \pm 0,01		22,62 \pm 0,09	
15	21,30 \pm 0,06		20,73 \pm 0,07		20,73 \pm 0,13	
16	20,28 \pm 0,05		20,11 \pm 0,11		20,21 \pm 0,07	
17	19,40 \pm 0,38		19,40 \pm 0,11		19,25 \pm 0,12	
18			18,71 \pm 0,05		18,65 \pm 0,13	
E	71,3%		88,2%		85%	
R ²	0,977		0,972		0,971	
s	-4,277		-3,640		-3,744	

Insbesondere sticht die Probe 13 aus Tab. 46 hervor, da sie einen Kuhmilchanteil von durchschnittlich 122,18% aufweisen soll. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Wolfpassingreihe mit den Handelsproben nicht kompatibel ist, da Werte über 100% nicht möglich sind.

Vergleicht man hingegen die absoluten C_T -Mittelwerte der einzelnen Handelsproben mit denen von Tab. 41, so unterscheiden sich diese nicht besonders stark. Somit liegt der Grund für die große Kuhmilchanteil-Differenz rein in der verwendeten Standardreihe (siehe Kap. 4.3.3.3.).

Tab. 47 gibt den durchschnittlichen Kuhmilchanteil in % aller Ansätze bzw. den Kuhmilchanteil in % laut IEF an. Dabei ist zu erkennen, dass die absoluten Werte besser zu passen scheinen als bei der Verwendung der Bryndza-Standardreihe. Auch hier lässt sich wieder mit Ausnahme der Proben 14, 1, und 20 eine steigende Tendenz erkennen.

Tabelle 47: C_T -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 2
[Wolfpassing, Cow-Bottero 1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr.	C_T -Mittelwert	Durchschnittlicher Kuhmilchanteil in %	Kuhmilchanteil in % laut IEF
8	19,82 ± 0,18	54,99% ± 4,03%	50%
4	20,01 ± 0,12	49,12% ± 2,99%	50%
16	19,26 ± 0,27	77,85% ± 11,21%	61%
6	18,93 ± 0,24	93,64% ± 13,43%	64%
14	20,19 ± 0,26	44,48% ± 4,45%	64%
1	19,86 ± 0,17	53,85% ± 4,22%	69%
5	18,99 ± 0,21	90,47% ± 10,62%	70%
20	19,20 ± 0,21	79,65% ± 9,09%	71%
13	18,51 ± 0,30	122,18% ± 22,45%	72%

Abb. 31 zeigt den grafischen Vergleich der Ergebnisse der zweiten Probengruppe. Dabei ist gut zu erkennen, dass der Kuhmilchanteil, der laut IEF gemessen wurde, in allen Fällen höher liegt als beim Real-Time PCR-Nachweis mit Verwendung der Bryndza-Käsereihe als Standardreihe. Auch in dieser Grafik scheinen die Wolfpassing-Ergebnisse besser zu den Werten der IEF zu passen. Dabei ist der einzige Ausreißer die Probe 13, denn sie hebt sich stark vom IEF-Wert ab und liefert zusätzlich einen Kuhmilchanteil von über 100%. Prinzipiell lässt sich eine Parallelität zwischen den Bryndza- und Wolfpassing-Werten erkennen, während der kontinuierlich steigende Trend des Kuhmilchanteils laut IEF in keiner der beiden Gruppen zu erkennen ist.

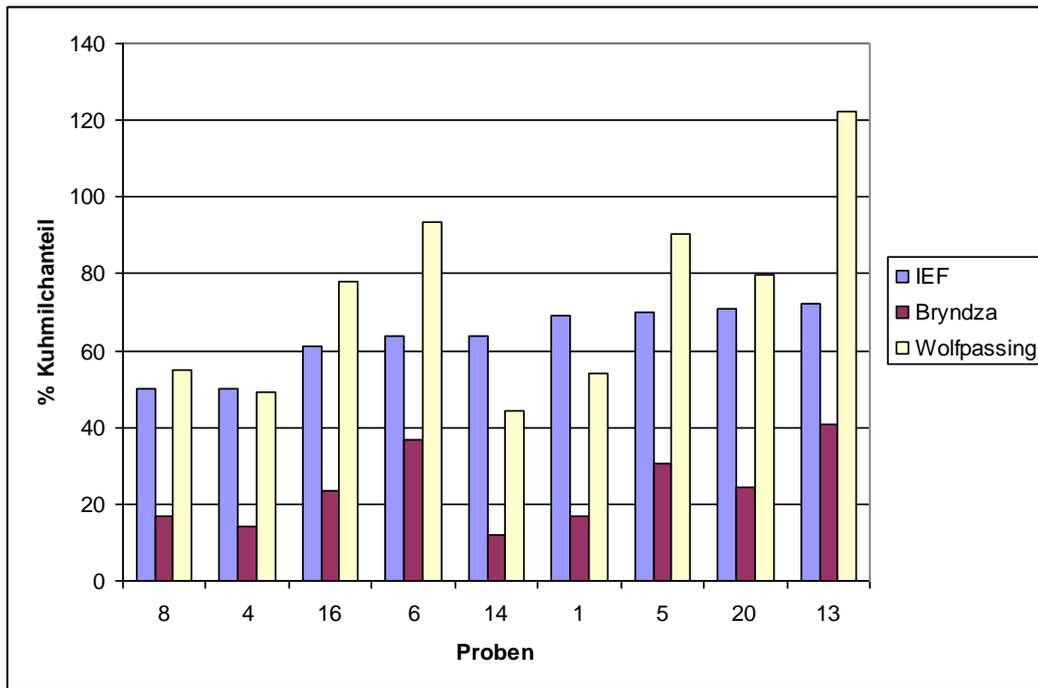


Abbildung 31: Vergleich der Kuhmilchanteil-Ergebnisse der Gruppe 2 [IEF, Bryndza, Wolfpassing]

In der dritten Probengruppe werden wiederum drei Versuche durchgeführt, wobei auch diese aus drei unterschiedlichen Isolierungen stammen. Tab. 48 zeigt dabei die C_t -Mittelwerte und die daraus errechneten durchschnittlichen Kuhmilchanteile in %. Dabei werden neben den 9 Handelsproben fünf Wolfpassing-Standards im Bereich von 10 bis 100% analysiert.

Dabei sticht insbesondere die Probe 2 im Versuch 1 hervor, die eine Standardabweichung von 30% aufweist. Ebenso weist die Probe 12 vom ersten Versuch eine hohe Abweichung von 16% auf. Auch hier variieren die Proben der 3. Gruppe sehr stark untereinander. Eigentlich liefern nur die Probennummern 12 und 3 relativ konstante Ergebnisse. Während die Probe 10 einen Kuhmilchanteil von 110 bis 145% aufweist, findet man in Probe 15 zwischen 110 und 120%. Probe 7 weist einen Kuhmilchanteil von 100 bis 120% auf, wohingegen die Probe 9 zwischen 80 und 110% Kuhmilch enthält. Insbesondere die Proben 21 und 2 weisen sehr hohe Kuhmilchanteil-Werte auf, wobei sich diese zwischen 130 und 180% bzw. zwischen 160% und 210% befinden.

Bezüglich der Standards können keine großen Ausreißer beobachtet werden, wobei ein leichtes kontinuierliches Absinken der C_t -Mittelwerte der einzelnen Standards von Versuch zu Versuch erkennbar ist. Die Bestimmtheitsmaße befinden sich alle im Bereich von 0,99, während auch die Effizienz der einzelnen Versuche im guten Bereich liegen. Dies äußert sich auch in einem guten Kurvenabstand von -3,694 bis -3,824 (siehe Tab. 48).

Tabelle 48: Real-Time PCR zur Bestimmung des Kuhmilchanteils in Handelsproben Gruppe 3 - Vergleich der C_t -Werte, der Effizienz, des Bestimmtheitsmaßes, und des slope zwischen den unterschiedlichen Ansätzen [Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr	Versuch 1 (1.Isolierung)		Versuch 2 (2. Isolierung)		Versuch 3 (3. Isolierung)	
	C_t -Mittelwert STABW	%-Mittelwert STABW	C_t -Mittelwert STABW	%-Mittelwert STABW	C_t -Mittelwert STABW	%-Mittelwert STABW
12	18,85 ± 0,20	133,09% ± 16,1%	18,67 ± 0,00	139,95% ± 0,20%	18,54 ± 0,12	132,38% ± 9,26%
3	18,72 ± 0,10	143,49% ± 8,25%	18,72 ± 0,07	135,70% ± 5,55%	18,34 ± 0,10	149,54% ± 8,63%
10	18,98 ± 0,00	122,76% ± 0,24%	18,62 ± 0,01	145,08% ± 0,58%	18,81 ± 0,03	112,23% ± 1,95%
15	19,00 ± 0,08	121,24% ± 5,56%	19,07 ± 0,07	109,17% ± 4,58%	18,84 ± 0,06	110,73% ± 3,68%
7	19,32 ± 0,07	99,86% ± 4,03%	18,94 ± 0,03	118,67% ± 1,95%	19,00 ± 0,04	100,07% ± 2,62%
9	19,70 ± 0,06	79,53% ± 2,69%	19,13 ± 0,05	105,36% ± 3,18%	19,14 ± 0,09	92,49% ± 4,89%
21	18,79 ± 0,08	138,16% ± 7,00%	18,28 ± 0,05	178,95% ± 5,16%	18,59 ± 0,05	128,39% ± 3,78%
2	18,08 ± 0,23	212,85% ± 30,0%	18,42 ± 0,09	163,92% ± 9,29%	17,94 ± 0,13	190,65% ± 14,42%
18	18,66 ± 0,08	124,17% ± 7,64%	18,46 ± 0,03	159,79% ± 2,65%	18,56 ± 0,13	130,55% ± 10,25%
14	23,11 ± 0,04		22,96 ± 0,10		22,93 ± 0,08	
15	21,55 ± 0,10		21,33 ± 0,06		21,14 ± 0,20	
16	20,48 ± 0,13		20,32 ± 0,05		20,11 ± 0,02	
17	19,93 ± 0,05		19,74 ± 0,07		19,64 ± 0,05	
18	19,20 ± 0,13		19,14		18,97 ± 0,20	
E	83,5%		86,5%		82,6%	
R ²	0,994		0,995		0,988	
s	-3,793		-3,694		-3,824	

Tab. 49 gibt Auskunft über den durchschnittlichen Kuhmilchanteil in % aller Ansätze bzw. den Kuhmilchanteil in %, der laut IEF vorhanden ist. Auch diese Tabelle gibt zu erkennen, dass die Proben 15 und 7 etwas niedriger liegen. Jedoch sticht auch die Probennummer 9 mit ihrem niedrigeren Wert hervor.

Während mit der Bryndza-Standardreihe die Probe 10 und die Probe 2 den höchsten Kuhmilchanteil aufweisen, wird dieses Ergebnis zwar in Probe 2 bestätigt, jedoch wird mit Hilfe der Wolfpassing-Reihe als Standardreihe kein erhöhter Anteil in Probe 10 nachgewiesen.

Des Weiteren fällt auf, dass acht der neun Proben über 100% Kuhmilchanteil aufweisen. Dies bestätigt ebenso, dass die Wolfpassingreihe mit den Handelsproben nicht kompatibel ist. Vergleicht man hingegen die C_t -Mittelwerte der Handelsproben mit denen von Tab. 43, so unterscheiden sich diese zwar stärker wie in der Probengruppe 1, jedoch nicht extrem. Somit liegt auch hier der Grund für die große Kuhmilchanteil-Differenz rein in der verwendeten Standardgerade (siehe Kap. 4.3.3.3.).

Tabelle 49: C_t -Mittelwerte und durchschnittlicher Kuhmilchanteil aller Ansätze in Gruppe 3

[Wolfpassing, Cow-Bottero1/2, Annealingtemperatur 62°C]

Nr.	C_t -Mittelwert	Durchschnittlicher Kuhmilchanteil in %	Kuhmilchanteil in % laut IEF
12	18,69 ± 0,17	135,14% ± 9,09%	73%
3	18,60 ± 0,20	142,91% ± 8,51%	75%
10	18,80 ± 0,15	126,69% ± 14,79%	76%
15	18,97 ± 0,12	113,71% ± 7,02%	77%
7	19,09 ± 0,18	106,20% ± 9,06%	80%
9	19,32 ± 0,30	92,46% ± 11,25%	82%
21	18,55 ± 0,22	148,50% ± 22,12%	84%
2	18,15 ± 0,26	189,14% ± 26,82%	91%
18	18,56 ± 0,11	146,51% ± 14,47%	91%

Abb. 32 zeigt den grafischen Vergleich der Ergebnisse der dritten Probengruppe. Dabei ist gut zu erkennen, dass der Kuhmilchanteil, der laut IEF gemessen wurde, in allen Fällen höher liegt als beim Real-Time PCR-Nachweis mit Verwendung der Bryndza-Käsereihe als Standardreihe. Im Gegensatz dazu liegen alle Wolfpassing-Werte weit über den anderen Werten. Des Weiteren liefern acht der neun Proben einen Kuhmilchanteil von über 100%. Prinzipiell lässt sich jedoch eine Parallelität zwischen den beiden Standardgeraden-Werten erkennen, während der kontinuierlich steigende Trend des Kuhmilchanteils laut IEF in keiner der beiden Gruppen zu beobachten ist.

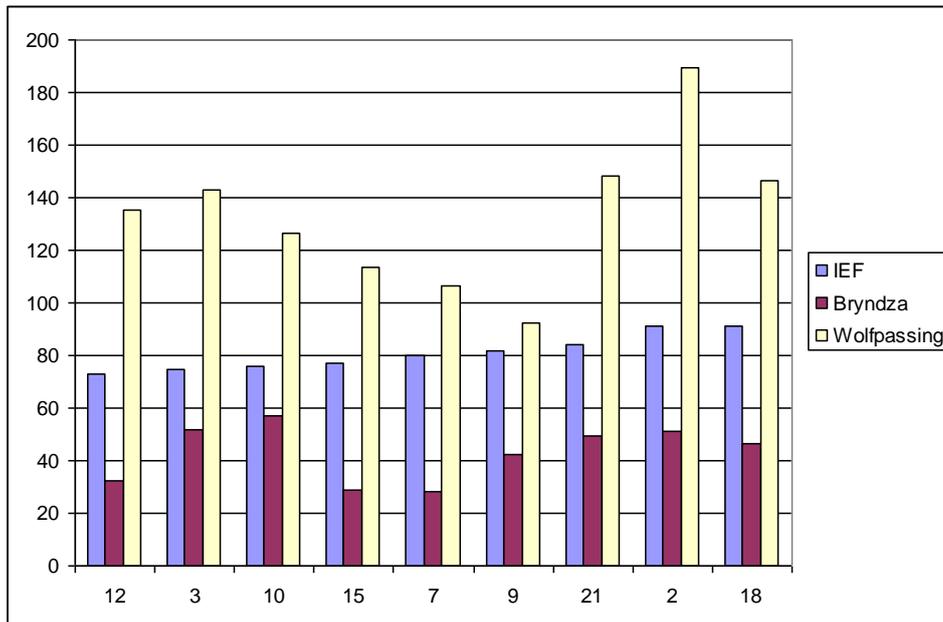


Abbildung 32: Vergleich der Kuhmilchanteil-Ergebnisse der Gruppe 3 [IEF, Bryndza, Wolfpassing]

Prinzipiell treten sowohl in der zweiten als auch in der dritten Proben­gruppe starke Abweichungen auf. Dies ist in der extremen Inhomogenität der Käseproben begründet. Trotz der größeren Einwaage von 2 g Käse konnte kein gutes bzw. vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Des Weiteren könnten sehr hohe Konzentrationen an PCR-Inhibitoren vorliegen, die den DNA-Nachweis stark beeinflussen können.

4.3.3.3. Vergleich der Standardgeraden

Abb. 33 zeigt den Vergleich der Standardgeraden, die mit der Proben­gruppe 1 analysiert wird. Dabei lässt sich erkennen, dass beide Bryndza-Reihen ident verlaufen, während die Wolfpassing-Reihen parallel liegen. Die Bryndza-Standardgerade verläuft dabei extrem steil, was sich in einer Geradensteigung von -5,59 äußert. Im Gegensatz dazu findet man in der Wolfpassing-Reihe eine Steigung von -3,71. Interessanterweise liegt die Bryndza-Gerade unterhalb der Wolfpassing-Gerade versetzt, wobei sie diese ab einer Konzentration von etwa 10% schneidet und die C_t -Werte dabei drastisch ansteigen. Würde man die 3,8% Probe exkludieren, da sie wie bereits in Kap. 4.2.3.1. die Geradengleichung bzw. -steigung verfälscht, würde sich die Geradensteigung auf einen Wert von -4,21 verringern. Wie bereits in Kap. 4.2.3.1. erwähnt, wird zusätzlich vermutet, dass die 23,04%

Standardprobe in Wirklichkeit etwas weniger Kuhmilchanteil aufweist, was die Gerade zusätzlich abflachen würde.

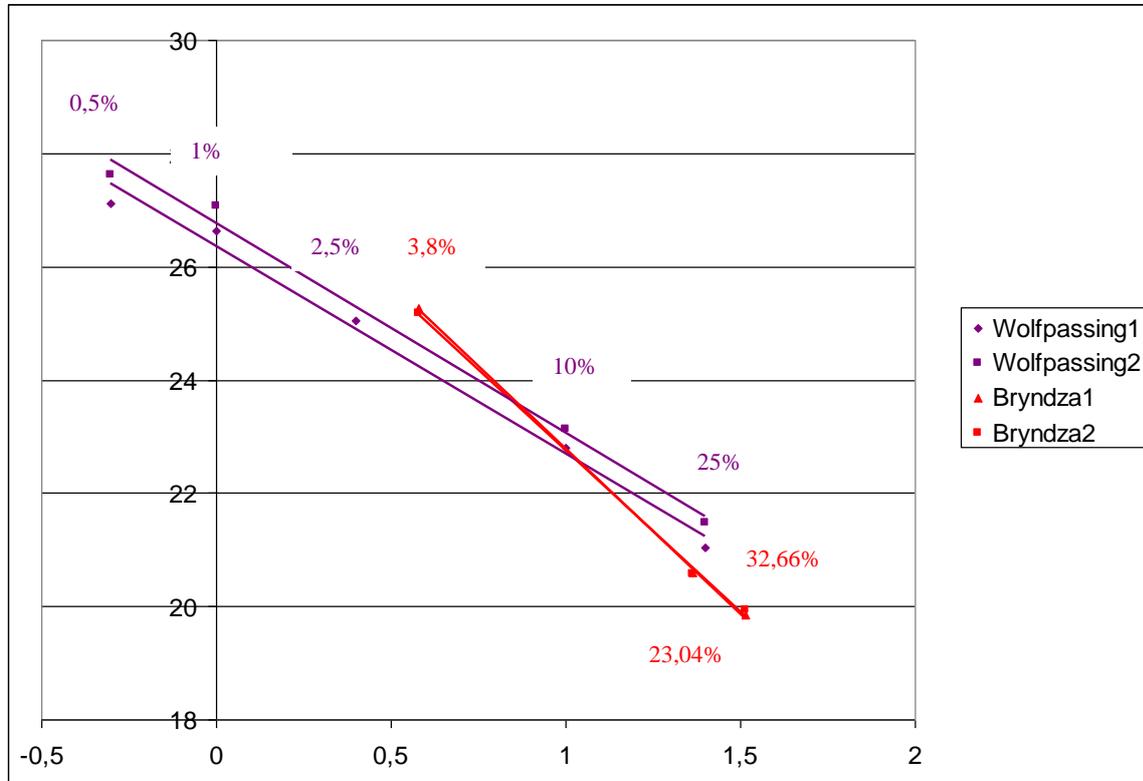


Abbildung 33: Vergleich der Winter(Z)-Bryndza- und Wolfpassing-Standardgeraden – Gruppe 1

Abb. 34 zeigt den Vergleich der Standardgeraden der Gruppe 2, wobei eine Verschiebung über dem gesamten Konzentrationsbereich zu beobachten ist. Somit waren mehr Zyklen in der Real-Time PCR nötig, um den Threshold Cycle zu erreichen. Bei gleicher Konzentration kommt es dabei zur Verschiebung um etwa 1 bis 1,5 C_t -Einheiten. Dabei ist zu erkennen, dass beispielsweise eine Probe mit einem C_t -Wert von 19 mit der Winter(Z)-Bryndza-Reihe zwischen einen Kuhmilchanteil von 30 und 40% aufweist, während dieselbe Probe mit der Wolfpassing-Reihe als Standardreihe einen Kuhmilchanteil von über 100% hat.

Des Weiteren zeigt Abb. 31, dass zwei von drei Wolfpassing-Standardreihen beinahe ident sind, während ebenso bei der Winter(Z)-Bryndza-Standardreihe zwei ähnlich verlaufen.

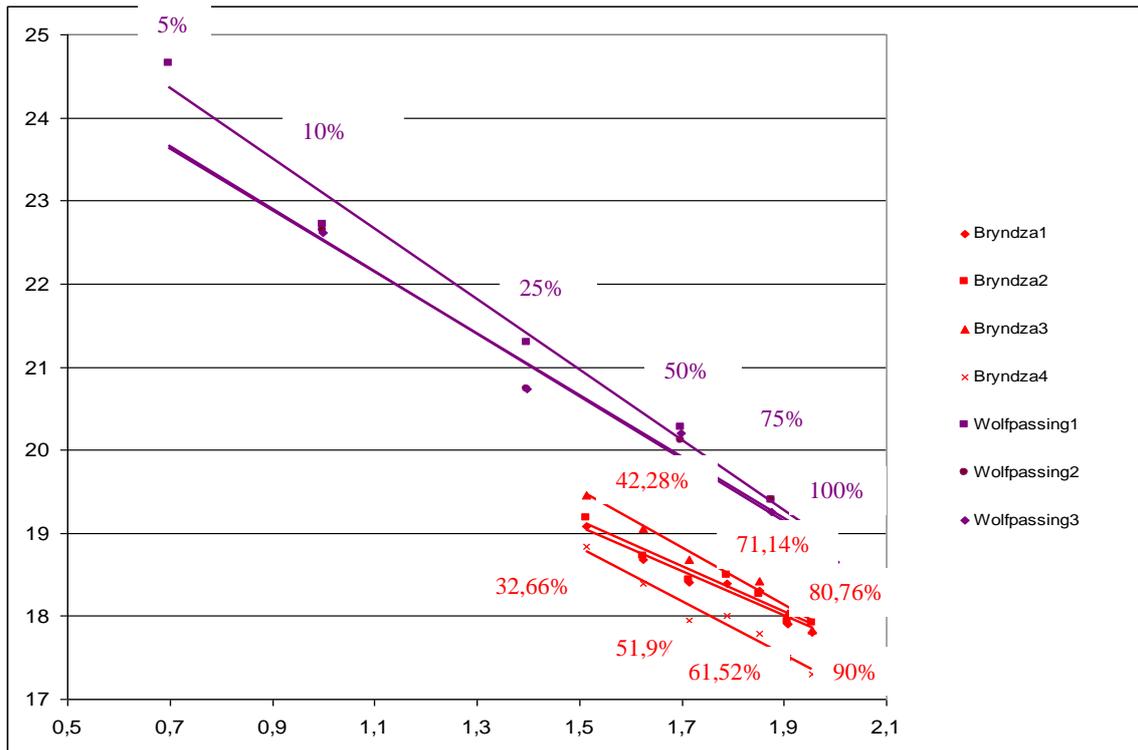


Abbildung 34: Vergleich der Winter(Z)-Bryndza- und Wolfpassing-Standardgeraden – Gruppe 2

Abb. 35 zeigt den Vergleich der Standardgeraden der Gruppe 3, wobei auch hier eine Verschiebung über dem gesamten Konzentrationsbereich zu beobachten ist. Dabei verlaufen die Standardgeraden parallel zueinander. Prinzipiell findet man sowohl in der Wolfpassing-Reihe als auch in der Bryndza-Reihe große Abweichungen voneinander, wobei diese insbesondere in der Bryndza-Reihe sehr hoch ausfallen.

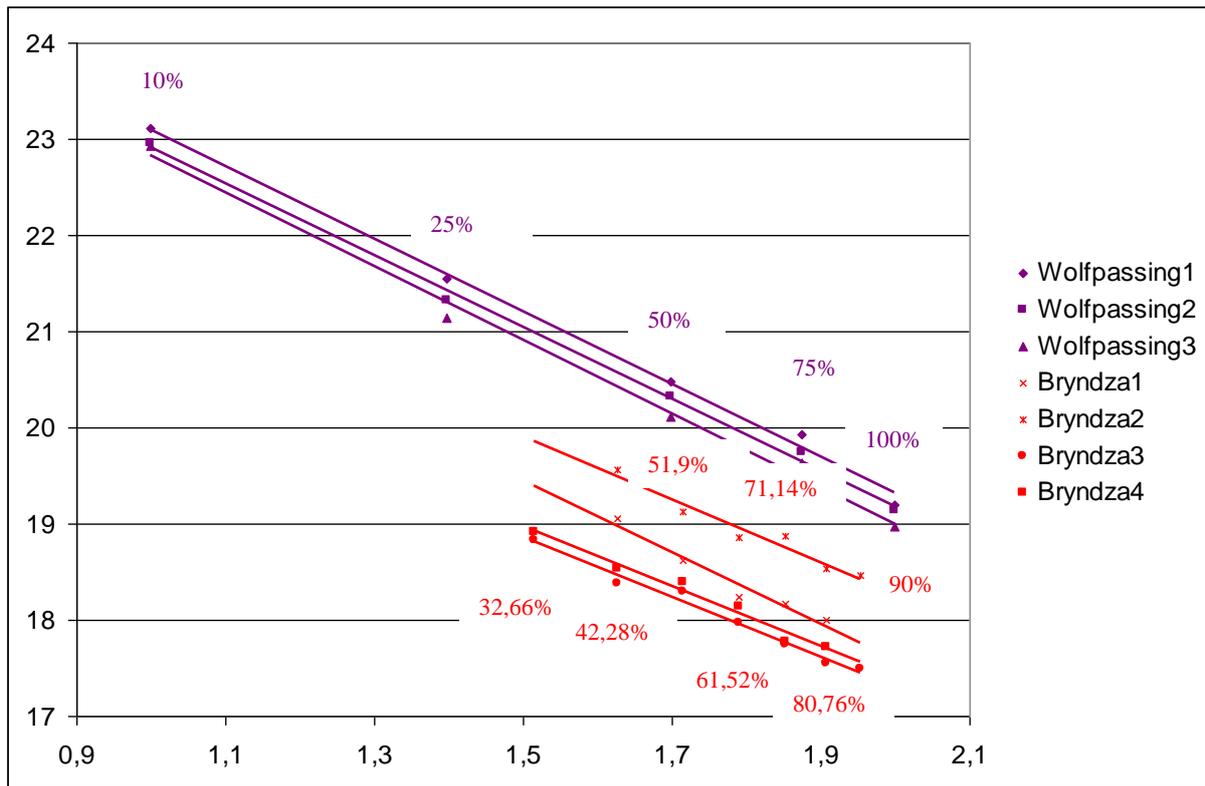


Abbildung 35: Vergleich der Winter(Z)-Bryndza- und Wolfpassing-Standardgeraden – Gruppe 3

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wolfpassing-Reihe im Vergleich zur Bryndza-Reihe in allen Versuchen nach oben verschoben vorliegt. Dies äußert sich auch in den völlig unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich des Kuhmilchanteils der einzelnen Proben beim Vergleich mit den einzelnen Standardgeraden in Kap. 4.3.3.2.

Die Problematik, dass die Wolfpassing-Standardreihe nach oben verschoben vorliegt, wurde bereits von *Weippl* aufgeworfen [WEIPPL, 2009].

Des Weiteren lässt sich auch anhand der letzten Grafiken erkennen, dass die Wolfpassing-Reihe stabilere Werte liefert, wohingegen die Bryndza-Reihe eine stärkere Abweichung der einzelnen Geraden aufweist.

5. Schlussbetrachtung

Beim Vergleich der beiden Isolierungskits Qiagen und Wizard wurde neben einem qualitativen DNA-Nachweis mittels photometrischer Absorptionsmessung auch ein quantitativer Nachweis mit Hilfe einer Real-Time PCR durchgeführt. Obwohl der A_{260}/A_{280} -Quotient, der Aufschluss über die DNA-Reinheit gibt, von der Qiagen-DNA im guten Bereich lag, konnten jedoch große Abweichungen der einzelnen Werte beobachtet werden. Im Gegensatz dazu lieferte die Wizard-DNA einen optimalen A_{260}/A_{280} -Quotienten, der jedoch nur eine geringe Variation aufzeigte. Sowohl der stabilere A_{260}/A_{280} -Quotient, als auch die größere absolute DNA-Ausbeute deuten darauf hin, dass die Wizard-Isolierungsmethode sowohl eine qualitativ hochwertigere DNA als auch eine höhere quantitative Ausbeute aus Käseproben liefert.

Nachdem die optimale Isolierungsmethode evaluiert wurde, sollte diese anschließend optimiert werden. Dies wurde anhand verschiedener Eluiervolumina durchgeführt. Schon die photometrische Absorptionsmessung gab zu erkennen, dass auch noch erhebliche Mengen an DNA im zweiten Eluat vorhanden waren und sich somit ein zweimaliges Eluieren positiv auf die DNA-Ausbeute auswirkte, während die DNA-Qualität weiterhin gut war. Ebenso konnte erkannt werden, dass eine zu große Eluiermenge die DNA-Qualität verschlechtert, da wahrscheinlich zu viele PCR-Inhibitoren mit dem großen Volumen herausgelöst wurden.

Diese beiden Ergebnisse konnten auch mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR bestätigt werden. Diese lieferte zusätzlich das Ergebnis, dass im zweiten Eluat zwar weniger DNA vorhanden war, weshalb eine Unterscheidung zwischen der 1:1000 und der 1:10000 Verdünnung nicht mehr möglich war. Durch den Vergleich der einzelnen Möglichkeiten erwies sich letztendlich das zweimalige Eluieren in 50 μ l AE-Puffer als optimal. Hierbei konnten zusätzlich die besten Parameter wie Bestimmtheitsmaß und Effizienz erreicht werden. Eine Steigerung der Einwaage von 200 mg auf 300 mg führte zwar in der photometrischen Absorptionsmessung zu einer erhöhten DNA-Quantität, jedoch konnte in dieser Messung nicht zwischen rinderspezifischer DNA und anderen Verbindungen, die bei derselben Wellenlänge Licht absorbieren, unterschieden werden. Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden, da im Gegenteil sogar eine geringere DNA-Konzentration nachgewiesen wurde.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde schlussendlich für alle Proben die Methode mit dem zweimaligen Eluieren in 50 μ l AE-Puffer angewandt, während bei den Standards zusätzlich der zweite Anteil nach der Chloroform-Zugabe verwendet wurde und somit ein Gesamteluiervolumen von 200 μ l erreicht wurde.

Bevor der Kuhmilchanteil der unbekanntenen Proben nachgewiesen werden konnte, mussten zuerst die Standardreihen evaluiert werden. Schon anhand der photometrischen Ergebnisse ließ sich vermuten, dass die Bryndza- und die Wolfpassing-Standardreihe nicht miteinander vergleichbar waren, da sie zu unterschiedliche DNA-Konzentrationen bzw. –Ausbeuten aufwiesen. Betrachtete man nun die einzelnen Standardkurven selbst, so war sofort zu erkennen, dass eine schöne Auftrennung bzw. Unterscheidung der Kurven in der Bryndza-Reihe nicht möglich war, da die einzelnen Werte einfach zu nahe beisammen lagen. So war eine Unterscheidung zwischen 47,09% und 56,71% nicht möglich. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die 3,8% Probe die Standardgerade stark nach oben verzerrte, weshalb diese exkludiert werden musste. Zusätzlich war zu erkennen, dass die 23,04%-Probe in allen Ansätzen oberhalb der Standardgerade lag, weshalb diese einen geringeren Kuhmilchanteil besaß, als durch die IEF bestimmt wurde. Beim Evaluieren der Wolfpassing-Standardreihe lag die 5% Probe ebenso immer oberhalb der Standardgeraden, weshalb auch hier ein geringerer Kuhmilchanteil vermutet wurde. Prinzipiell konnten in dieser Standardreihe stabilere Werte erreicht werden, was sich in einer geringeren Abweichung widerspiegelte.

Nach dem Evaluieren der Standardgeraden konnte der Kuhmilchanteil der unbekanntenen Proben bestimmt werden. Schon die stark variierende Absorptionsmessung gab Hinweise auf unterschiedliche DNA-Konzentrationen der einzelnen Handelsproben. Beim Vergleich der absoluten Absorptionsergebnisse mit denen der Standardgeraden ließ sich schnell erkennen, dass die Handelsproben im Bereich der Bryndza-Käsereihe lagen, während die Wolfpassing-Reihe deutlich geringere Absorptionen aufwies.

Aufgrund der stark inhomogenen Käsemasse musste die DNA-Isolierung modifiziert werden, weshalb anstatt von 200 mg nun das Zehnfache eingewogen wurde. Diese größere Einwaage ermöglichte bessere Werte, die reproduzierbarer waren, jedoch zum Teil noch immer starken Schwankungen unterlagen.

Bei der Analyse der ersten Proben, die einen Kuhmilchanteil von 0-7% aufweisen sollten, erwies sich die Wolfpassing-Reihe als besser. Der Grund dafür ist, dass die Bryndza-Reihe keine Proben mit derartig niedrigem Kuhmilchanteil besaß, weshalb keine exakten quantitativen Aussagen getroffen werden konnten. Zusätzlich kam es erneut durch den 3,8% Standard zu einer Verzerrung der Geraden, weshalb diese entfernt werden musste. Während die Werte der Probennummer 11 mit beiden Standardreihen gut übereinstimmten, so lieferten die Proben 17 und 19 doch sehr unterschiedliche Ergebnisse. So wurde insbesondere in der Probe 19 mit Hilfe der Wolfpassing-Reihe ein mehr als doppelt so hoher Kuhmilchanteil nachgewiesen. Verglichen mit den Ergebnissen der IEF, lagen alle Werte, egal ob mit Bryndza- oder Wolfpassing-Reihe evaluiert, oberhalb deren Kuhmilchanteil-Werte.

Bei Betrachtung der zweiten Probengruppe, die laut IEF einen Kuhmilchanteil von 50 bis 72% aufweisen sollten, mit der Bryndza-Reihe als Standardreihe konnte sofort festgestellt werden, dass die erhaltenen Werte alle unter den Ergebnissen der IEF lagen. Auch hier schienen die Wolfpassing-Werte besser zu passen, da sich diese zum Teil mit denen der IEF deckten. Der einzige Ausreißer war die Probe 13, deren Werte sich mit der Wolfpassing-Standardreihe stark von den Werten der IEF abhoben. Des Weiteren lieferte sie einen Kuhmilchanteil von über 100%, was unmöglich ist. Prinzipiell ließ sich jedoch eine gewisse Parallelität zwischen den Bryndza- und den Wolfpassing-Werten erkennen, während der Trend nicht mit dem der IEF-Werte übereinstimmte.

Bei der Interpretierung der bisher erhaltenen Ergebnisse lag der Verdacht nahe, dass die Wolfpassing-Reihe besser zu den Proben passte. Dies widersprach zwar den Ergebnissen der photometrischen Absorptionsmessung, konnte jedoch bei Betrachtung der Probe 13 als Ausreißer gut bestätigt werden. Die dritte Probengruppe, die laut IEF einen Kuhmilchanteil von 73 bis 91% aufweisen sollte, lieferte Ergebnisse mit sehr starken Abweichungen. Des Weiteren fiel auf, dass acht der neun Proben einen Kuhmilchanteil von über 100% aufwiesen. Dies widerlegte die Vermutung, dass die Wolfpassing-Standardreihe mit den Handelsproben kompatibel ist. Prinzipiell ließ sich auch in dieser Gruppe eine gewisse Parallelität zwischen den Werten der beiden Standardgeraden erkennen, während diese erneut nicht mit dem Trend der IEF-Werte übereinstimmten.

Auf Basis dieser überraschenden Ergebnisse wurden anschließend die beiden Standardreihen direkt miteinander verglichen. Dies zeigte, dass die Wolfpassing-Reihe im Vergleich zur Bryndza-Reihe in allen Versuchen nach oben verschoben war. Dies war letztendlich auch der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse des Kuhmilchanteils der einzelnen Proben.

Ein möglicher Grund für diese Verschiebung könnte eine allgemein geringere DNA-Menge schon im Ausgangsmaterial der Wolfpassing-Reihe sein. Dies würde dazu führen, dass keine zuverlässigen Aussagen bezüglich des Kuhmilchanteils unbekannter Proben getroffen werden können, da die Standardreihe mit den Handelsproben nicht kompatibel ist. Dies wird auch in der Absorptionsmessung der einzelnen Standards bestätigt. Unterschiedliche Lagerbedingungen, aber auch Herstellungsverfahren beeinflussen zusätzlich sowohl die DNA-Menge, als auch die –Qualität.

Verschiedene Faktoren können den DNA-Nachweis beeinträchtigen. Neben dem Vorliegen diverser inhibitorischer Substanzen in der Käsematrix selbst, spielt vor allem auch das Ausmaß der DNA-Zerstörung und die durchschnittliche Fragmentlänge eine entscheidende Rolle. Hierbei nimmt insbesondere der Verarbeitungsprozess der Probe einen wichtigen Stellenwert ein. Übermäßiges Erhitzen führt zu einer hohen Fragmentierung der hochmolekularen DNA, was zu einer Reduktion der Fragmentlänge führt [PEANO et al., 2004]. Die technologische Behandlung der Milch muss bekannt

sein, um eine verlässliche Quantifizierung zu ermöglichen. So üben insbesondere Be- und Verarbeitungsprozesse von Lebensmittel einen entscheidenden Einfluss auf das Real-Time Ergebnis aus [LÓPEZ-CALLEJA et al., 2007b].

Zusätzlich tritt das Problem der Wahl der DNA-Isoliermethode auf. So sollte immer mit der gleichen Methode gearbeitet werden. Da im Rahmen dieser Arbeit mit der Wolfpassing-Reihe aus bereits isolierten DNA-Lösungen, die mit der Qiagen-Methode isoliert wurden, gearbeitet wurde, konnte diese Standardreihe nicht mit den Proben bzw. der Bryndza-Reihe verglichen werden. Dies wurde erneut durch diese Ergebnisse bestätigt, da eine idente Isolierung eine entscheidende Voraussetzung für die Vergleichbarkeit und somit Quantifizierbarkeit darstellt. Somit stellt die unterschiedliche DNA-Isolierung in diesem Fall eine entscheidende Fehlerquelle dar.

6. Zusammenfassung

Aufgrund des immer häufigeren Auftretens von Verfälschungen und fehlerhaften Deklarationen bei Milch- und Milchprodukten übernimmt die Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln eine essentielle Rolle beim Schutz des Konsumenten vor Täuschung und Irreführung. Insbesondere werden sehr gerne hochwertige Komponenten von Milchprodukten durch minderwertige ersetzt, wobei Schaf- und Ziegenmilchprodukte häufig mit billigerer Kuhmilch verfälscht werden. Die Entwicklung DNA-basierter Methoden zur Aufdeckung dieser Verfälschungen nimmt dabei eine besonders wichtige Stellung ein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl mit einer spezies-spezifischen PCR zum qualitativen, als auch mit der Real-Time PCR zum quantitativen Kuhmilchnachweis gearbeitet. Die verwendeten Primer zielten dabei auf das mitochondriale 12S rRNA Gen von Rindern ab, wobei sie ein Amplikon von 256 bp lieferten. In der Real-Time PCR wurde dabei SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, wobei mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der amplifizierten Produkte überprüft wurde. Beim Evaluieren einer optimalen DNA-Isolierungsmethode wurden zwei Isolierungskits, nämlich Qiagen und Wizard, miteinander verglichen und diskutiert. Sowohl die photometrische Absorptionsmessung, als auch der quantitative Nachweis mittels Real-Time PCR zeigten, dass die Wizard-Methode eine höhere DNA-Ausbeute, aber auch –Qualität aus den Käseproben lieferte. Des Weiteren wurde anschließend diese Wizard-Methode optimiert, indem unterschiedliche DNA-Eluierolumina ausgetestet wurden. Dabei erwies sich ein zweimaliges Eluieren in je 50µl AE-Puffer als ideale Technik. Um den Kuhmilchanteil der unbekannteren Handelsproben nachweisen zu können, mussten zuerst zwei Standardreihen, die Bryndza- und die Wolfpassing-Reihe, evaluiert werden. Dabei zeigte sich, dass in beiden Reihen Ausreißer vorhanden waren, die letztendlich aus der Standardgerade eliminiert wurden. Prinzipiell zeigte sich die Wolfpassing-Reihe als stabilere Standardreihe, jedoch wiesen schon die Absorptionsmessungen der Wolfpassing-Reihe auf eine niedrige DNA-Konzentration im Vergleich zur Bryndza-Reihe, aber auch zu den Handelsproben, hin. Bei der Quantifizierung der unbekannteren Proben konnte beobachtet werden, dass die Wolfpassing-Reihe nicht kompatibel mit den Handelsproben war. Dies bestätigte sich auch im Vergleich der Standardgeraden, denn die Wolfpassing-Standardgerade lag im Vergleich zur Bryndza-Gerade nach oben versetzt, was bei gleichen C_t -Werten der Handelsproben einen weitaus höheren Kuhmilchanteil bedeuten würde. Somit waren die Ergebnisse des Kuhmilchanteils mit der Bryndza-Standardreihe als exakter einzustufen. Hierbei trat das Problem auf, dass für die ersten Proben, die laut IEF nur einen sehr geringen Kuhmilchanteil aufweisen sollten, keine optimalen Bryndza-Standards zur Verfügung standen. Der Kuhmilchanteil der restlichen Proben lag in allen Fällen unterhalb der Werte, die anhand der IEF nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse unterstreichen einerseits die Bedeutung von adäquaten Standards, die sich zu den Proben äquivalent verhalten, und andererseits die hohe Variabilität der Real-Time Ergebnisse beim Vergleich mit der IEF-Methode, da deren Werte nicht mit den Werten der Real-Time PCR übereinstimmen.

7. Literaturverzeichnis

ABDEHL-RAHMAN SM, AHMED MMM. Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. *Food Control* 2007, 18:1246-1249

ADAMS DS. In: *Lab Math: A Handbook of Measurements, Calculations, and Other Quantitative Skills for Use at the Bench* Chapter 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 127-45

ALONSO-LEBRERO E., FUENTES V., ZAPATERO L., PÉREZ-BUSTAMANTE S., PINEDA F., MARTINEZ-MOLERO M.I. Goat's milk allergies in children following specific oral tolerance induction to cow's milk. *Allergologia et Immunopathologia* 2008, 36(3):180-1

BESLER M. Determination of allergens in food. *Trends in analytical chemistry*. 2001

BIO-RAD LABORATORIES. *Real-time PCR Applications Guide*, 2006.

BORDIN G., RAPOSO F.C., DE LA CALLE B., RODRIGUEZ A.R. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 2001, 928:63-76

BOTTERO M. T., CIVERA T., NUCERA D., ROSATI S., SACCHI P., TURI R. M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 2003, 13:277-282

BOTTERO M.T., DALMASSO A. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 2010

BOTTERO MT, CIVERA T., ANASTASIO A., TURI RM, ROSATI S. Identification of Cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of food protection* 2002, 65(2):362-6

BOTTERO MT, CIVERA T., NUCERA D., ROSATI S., SACCHI P., TURI R.M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 2003, 13:277-288

BOTTERO MT, DALMASSO A., CAPPELLETTI M., SECCHI C., CIVERA T. Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay, *Journal of Biotechnology* 2007, 129:575-580

CAFFARELLI C., BALDI F., BENDANDI B., CALZONE L., MARANI M., PASQUINELLI P.
Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. Italian Journal of Pediatrics 2010, 36:5

CHAPELA M.J., SOTELO C.G., PÉREZ-MARTÍN R.I., PARDO M.A., PÉREZ-VILLAREAL B.,
GILARDI P., RIESE J. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for
species identification. Food Control 2007, 1211-1215

COLLOMB M., BÜTIKOFER U., SIEBER R., JEANGROS B., BOSSET O. Composition of fatty
acids in cow's milk fat produced in lowlands and highlands of Switzerland using high-resolution gas
chromatography. International Dairy Journal 2002, J 12, 649-659.

DE S., BRAHMA B., POLLEY S., MUKHERJEE A., BANERJEE D., GOHAINA M., SINGH K.P.,
SINGH R., DATTA T.K. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle
and buffalo milk and cheese. Food Control 2011, 22:690-696

DI BERNARDO G., DEL GAUDIO S., GALDERISI U., CALCINO A., CIPOLLARO M.
Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples. Biotechnology
Process 2007, 23(2):297-301

DURTSCHI J.D., STEVENSON J., HYMAS W., VÖLKERDING K.V. Evaluation of quantification
methods for real-time PCR minor groove binding hybridization probe assays. Analytical
Biochemistry 2007, 361:55-64

EBERMANN R., ELMADFA I. Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung, 1. Auflage, Springer
Verlag Wien, 2008, 306-315

ELMADFA I., FREISLING H., NOWAK V., HOFSTÄDTER D. et al. Österreichischer
Ernährungsbericht 2008. 1. Auflage, Wien, März 2009

ENNE G., ELEZ D., FONDRINI F., BONIZZI I., FELIGINI M., ALEANDRI R. High-performance
liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo
Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. Journal of Chromatography A
2005, 1094:169-174

GARFIN D.E. Kapitel 7: Gel Electrophoresis of Proteins in: Essential Cell Biology: a practical
approach by J. DAVEY and M. LORD, Oxford University Press, Oxford UK, Band 1, 2003

HOLZAPFEL B. und WICKERT L. Methoden und Anwendungsgebiete: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Biol. Unserer Zeit, Wiley-VCM Verlag, Weinheim, 2007

INVITROGEN Handbook: Real-Time PCR: from theory to practice, 2008

KÖPPEL R., DVORAK V., ZIMMERLI F., BREITENMOSER A., EUGSTER A., WAIBLINGER H. Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. Eur Food Res Technol 2010, 230:367-374

KOTOWICZ M., ADAMCZYK E., BANIA J. Application of a duplex-pcr detection of cow's milk in goat's milk, Ann Agric Environ Med 2007, 14:215-218

KROWAS D. Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch im EU-Hygienerecht. Schriftreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft 2008

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

LOCCI F., GHIGLIETTI R., FRANCOLINO S., IEZZI R., OLIVIERO V., GAROFALO A., MUCCHETTI G. Detection of cow milk in cooked buffalo Mozzarella used as Pizza topping. Food Chemistry 2008. 1337-1341

LOPPARELLI RM, CARDAZZO B., BALZAN S., GIACCONE V., NOVELLI E. Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, 55:3429-3434

LÓPEZ-CALLEJA DÍAZ I., ALONSO I.G., FAJARDO V., MARTÍN I., HERNÁNDEZ P., LACARRA T.G., MARTÍN DE SANTOS R. Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. Eur Food Res Technol 2007a, 225:345-349

LÓPEZ-CALLEJA I., GONZÁLEZ I., FAJARDO V., MARTÍN I., HERNÁNDEZ P.E., GARCÍA T., MARTÍN R. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cow's milk in ewes 'milk mixtures. International Dairy Journal 2007b, 729-736

LÓPEZ-CALLEJA I., GONZÁLEZ I., FAJARDO V., MARTÍN I., HERNÁNDEZ P.E., GARCÍA T., MARTÍN R. Quantitative detection of goat's milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control* 2007c, 1466-1473

LÓPEZ-CALLEJA I., ALONSO G., FAJARDO V., RODRÍGUEZ M.A., HERNÁNDEZ P.E., GARCÍA T., MARTÍN R. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese, *International Dairy Journal* 2005, 15:1122-1129

LÓPEZ-CALLEJA I.; GONZÁLEZ I., FAJARDO V., HERNÁNDEZ P.E., GARCÍA T., MARTÍN R. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goat's milk cheeses. *International Dairy Journal* 2007d, 17:87-93

MARTÍN T.M., CABALLER B.H.; LIZANA F.M., MENDIOLA R.G., MONTANO P.P, CANO M.S. Selective allergy to sheep's and goat's milk proteins. *Allergologia et Immunopathologia* 2004, 32(1):39-42

MATISSEK R., STEINER G., FISCHER M. DNA-Isolierungsmethoden; In: *Lebensmittelanalytik*, Springer Verlag 2010, 432-433

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

MAYER H.K., WEIPPL A., MAYR S. Authentication of ewes' cheese by using isoelectric focusing of γ -caseins and Real-time PCR 2008. *New Aspects in Quality and Biofunctionality of Foods*. P16

MOUILLESSEAU K.P., KLIMPEL K.R., DHAR A.K. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2003, 121-127

MÜLHARDT C. *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 1. Auflage, Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: G. Fischer, 2006

PAFUNDO S., GULLÍ M., MARMIROLI N. Multiplex real-time PCR using SYBR GreenER for detection of DNA allergens in food. *Anal Bioanal Chem* 2010, 396:1831-1839

PEANO C., SAMSON M.C., PALMIERI L., GULLI M., MARMIROLI N. Qualitative and quantitative Evaluation of the Genomic DNA Extracted from GMO and Non-GMO Foodstuff with Four Different Extraction Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52:6962-6968

PETER C., BRÜNEN-NIEWELER C., CAMMANN K., BÖRCHERS T. Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. *Eur Food Res Technol* 2004, 219:286-293

POMS R.E., KLEIN C.L., ANKLAM E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants: Part A* 2004, 21:1, 1-31

PROMEGA: Technical Bulletin: Wizard DNA Clean-Up System; Instructions for use of product A7280; 2010

QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Handbook. 2006

REA S., CHIKUNI K., BRANCIARI R., SANGAMAYYA R.S., RANUCCI D., AVELLINI P. Use of polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research* 2001, 68, 689-698

REALE S., CAMPANELLA A., MERIGIOLI A., PILLA F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of Dairy Research* 2008, 75:107-112

ROCHE H.M., NOONE E., NUGENT A., GIBNEY M.J. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutrition Research Review* 2001, 14, 173-187

RODRÍGUEZ M.A., GARCÍA T., GONZÁLEZ I., ASENSIO L., HERNÁNDEZ P.E., MARTÍN R. Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52:1478-1483

SONG H., XUE H., HAN Y. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control* 2011. 883-887

SØRENSEN B.M., KAZALA E.C., MURDOCH G.K., KEATING A.F., CRUZ-HERNANDEZ C., WEGNER J., KENNELLY J.J., OKINE E.K., WESELAKE R.J. Effect of CLA and Other C18 Unsaturated Fatty Acids on DGAT in Bovine Milk Fat Biosynthetic Systems. *Lipids* 2008, 43:903–912

SOYEURT H., GENGLER N. Genetic variability of fatty acids in bovine milk. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 2008, 12(2),203-210

STATISTIK AUSTRIA.

http://www.statistik.at/web_de/statistiken/land_und_forstwirtschaft/viehbestand_tierische_erzeugung/milch/index.html (geöffnet am 2.Mai.2011)

TOMOTAKE H., KATAGIRI M., FUJITA M., YAMATO M. Preparation of Fresh Cheese from Caprine Milk as a Model for the Reduction of Allergenicity. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2009, 55:296-300

TOMOTAKE H., OKUYAMA R., KATAGIRI M., FUJITA M., YAMATO M., OTA F. Comparison between Holstein Cow's Milk and Japanese-Saanen Goat's Milk in Fatty Acid Composition. *Lipid Digestibility and Protein Profile, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2006, 70(11):2771-2774

VAN HENGEL A.J. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem* 2007, 389:111-118

VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 28.Jänner 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit

WEAVER C.M. Role of dairy beverages in the diet. *Physiology and behavior* 2010, IN 47907-2059

WEIPPL A. Differenzierung und Quantifizierung der Tierspezies in Käse mittels PCR und Real-Time PCR. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur Wien, 2009

WILFINGER W., MACKEY M., CHANCZYNSKI P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 1997, 22:474-80

WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION KIT – LITERATURE

ZHANG J., HUANG H., CAI Z., HUANG L. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondria 12S rRNA gene sequence. *Food Control* 2007, 18:1331-1336

ZIMMERMANN A., LÜTHY J., PAULI U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. Z Lebensm Unters Forsch A 1998, 207:81-90

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nicole Kaar, BSc
Geburtsdatum	02.09.1986
Nationalität	Österreich

Ausbildung

02/2011 – 08/2011	Masterarbeit am Institut für Lebensmittelwissenschaften an der Universität für Bodenkultur Wien
12/2009 – 09/2011	Masterstudium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien - <i>Spezialisierung: Food Quality and Safety</i>
08/2010 - 12/2010	Auslandsaufenthalt am Karolinska Institut, Stockholm, Schweden
10/2006 - 12/2009	Bakkalaureatsstudium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
09/2001 - 06/2005	Bundesoberstufenrealgymnasium Honauerstraße; Linz - <i>naturwissenschaftlicher Zweig</i>
09/1993 - 07/2001	Private Mädchenvolks- und hauptschule der Franziskanerinnen; Linz

Berufserfahrung

01/2011 - dato	Universität Wien: Tutorin im „Lebensmittelchemischen Praktikum für Chemiker“
05/2010	Universität Wien: Tutorin in den „Lebensmittelchemischen Übungen für Ernährungswissenschaftler“
07/2010	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH <i>Abteilung für Pflanzliche Lebensmittel, Nahrungsergänzungsmittel und Novel-Food:</i>
10/2009	Universität Wien: Praktikum am Department für Ernährungswissenschaften
07-08/2009	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
06/2009	Nutrition Day AKH Wien: <i>Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung</i>
09/2008	Gourmet GmbH; St. Pölten: <i>Bereich Marketing</i>
07-08/2005	REWE Austria AG: <i>Verkauf</i>

Weitere Qualifikationen

Sprachen	Deutsch (Muttersprache) Englisch (verhandlungssicher) Spanisch (Grundkenntnisse)
EDV-Kenntnisse	Microsoft Office, SPSS, Photoshop