

Alternative quantitative Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln mittels Real-Time-PCR

Albert Eugster

Amt für Verbraucherschutz des Kantons Aargau, CH-5000 Aarau,
Schweiz

Zusammenfassung

Viele pflanzliche Lebensmittel mit allergenem Potenzial werden heutzutage mittels Real-Time-PCR, teilweise auch mithilfe von Multiplex-Verfahren, analytisch erfasst [1]. Die Gehaltsangabe in Massenanteilen gestaltet sich schwierig, besonders bei zusammengesetzten Lebensmitteln. Diese neue Methode ermöglicht Gehaltsangaben direkt in Massenanteilen. Die Grundlage dazu bildet die multiple Standardaddition mit einer veränderten Methodik, die es erlaubt, Analytkonzentrationen im Bereich von 0,01 bis 10 w/w% zu quantifizieren.

Summary

Nowadays many foods of plant origin with allergenic potential are analysed in foodstuffs by real-time PCR often in a multiplex manner [1]. These results are difficult to express in weight/weight units especially when composed food is analysed. This new method is able to determine contents of allergens in mass per cent based on a modified method of multiple standard addition with a simple mathematical analysis. It allows the quantitative analysis of an analyt in the range of 0.01 to 10 %.

Einleitung

Bei allergenen Zutaten (Lebensmittel und Zusatzstoffen) in Lebensmitteln gilt gemäß schweizerischer Gesetzgebung eine Deklarationsschwelle von 1 Gramm allergene Zutat pro Kilogramm oder Liter Lebensmittel. Dieser Wert gilt sowohl für Zutaten als auch für Verunreinigungen aus Kreuzkontaminationen. In der EU wird die Einführung derartiger Schwellenwerte schon seit längerer Zeit von verschiedenen Seiten gefordert [2–4].

Der Vollzug dieser zurzeit nur in der Schweiz angewandten Rechtsvorschrift stellt die quantitative Allergen-Analytik in ein anderes Licht im Vergleich zur GVO-Analytik. Im europäischen Raum ist die Quantifizierung von GVOs (gentechnisch veränderten Organismen) dergestalt geregelt, dass der Gehalt eines GVO-Events nach erfolgter Analyse mithilfe eines pflanzenartspezifischen Referenzgens berechnet wird in Relation zum entsprechenden Pflanzenanteil [5–7]. In einem zusammengesetzten Lebensmittel wird also der Gehalt an beispielsweise Bt176-Mais als Anteil des gesamten Maisgehaltes berechnet, unabhängig davon, ob in der Probe noch andere Getreidearten wie Weizen oder Reis vorhanden sind.

Die Angabe des Gehaltes einer allergenen Zutat erfolgt als Anteil des gesamten Lebensmittels, z. B. in Milligramm Sellerie pro Kilogramm Lebensmittel.

Prinzipiell bieten sich verschiedene Methoden an, um einen Analyten (im Folgenden ein allergenes Lebensmittel) mit einer hinreichend genauen Sicherheit zu quantifizieren. Ein möglicher Weg führt über das Beiziehen eines Referenz-

gens, das in konstanter Kopienzahl sowohl in der allergenen Pflanze als auch in der übrigen Lebensmittelmatrix vorhanden ist, z. B. auf der 18S rRNA [8,9]. Für viele Pflanzenarten sind aber keine brauchbaren Referenzgene bekannt. Eine solche Methode scheitert aber auch beim Vorliegen von Pflanzenmischungen wie Mischmehlen (Mehrkorn-Brotten) oder bei der Anwesenheit von viel anorganischem Material, wie z. B. bei einem Meersalz, bestehend aus 94 % Salz und 6 % Kräutern.

Eine weitere Methode zur Lösung des vorliegenden Problems bietet die klassische Aufstockmethode, die sog. „Multiple Standardadditionsmethode“. Mit dieser in vielen Bereichen der chemischen Analytik verwendeten Methode können quantitative Befunde abgesichert werden durch Zugabe von definierten Mengen an Analyt zur Probe und nochmaliger Durchführung der Analysen.

In Anbetracht der erwähnten schweizerischen Gesetzeslage wäre es wünschenswert, allergene Analyten bis zu einem Gehalt von 0,01 % (= 1/10 des schweizerischen Deklarationswertes) bestimmen zu können. Bei einer oftmals verwendeten Einwaage von 100 mg einer trockenen Probe bei Real-Time-PCR-basierten Methoden berechnet sich eine Aufstockung von 0,01 % Analyt zu 0,01 mg. Damit liegt man viel zu tief, um eine vernünftige Einwaage durchführen zu können, was bedeutet, dass die klassische Aufstockmethode in diesem Fall nicht angewendet werden kann. Ein weiteres Hindernis bei der Anwendung der klassischen Aufstockmethode bildet der Umstand, dass gemäß anerkannter Lehrmeinung eine Aufstockung im Bereich einer 3- bis 5-fachen Analytkonzentration erfolgen sollte. Diese Forderung ist sinnlos, da von einer im Screening auf einen Analyt positiv getesteten Probe keine Angabe über die Analytkonzentration gemacht werden kann.

Diese Arbeit beschreibt einen alternativen Weg der Quantifizierung eines Analyten in einem Lebensmittel mithilfe der Real-Time-PCR. Die Anforderung an diese Methode ist die Bestimmung eines Analyten im Bereich eines Gehaltes von 0,01 bis 10 %, was einem dynamischen Bereich von 1000 entspricht.

Prinzip

Wird eine Probe, die ursprünglich keinen Analyten ($c_A = 0$) enthält, mittels 4 individuellen Standardadditionen in dekadischen Abständen von 0,01 bis 10 % Analyt versetzt, ergibt sich aus den Ct-Messwerten versus der logarithmierten Aufstockkonzentration eine Gerade (s. Abb. 1). Dabei

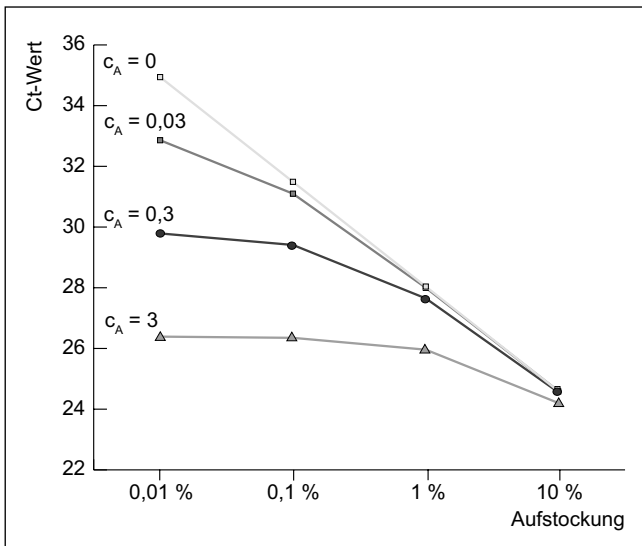


Abb. 1 Darstellung von berechneten Kurven. Es zeigt sich deutlich, dass die Kurvenform stark von der Analytkonzentration (c_A) abhängt.

erfolgen die Aufstockungen mithilfe von Lösungen im Verlaufe der DNA-Isolierung.

Enthält die Probe eine Analytkonzentration von beispielsweise 0,03 % ($c_A = 0,03$ %), so sind die Standardadditionen immer noch dominant und die Kalibrationskurve weist nur bei der Standardadditionskonzentration von 0,01 % eine leichte Krümmung auf. Am anderen Ende des Kalibrierbereiches befinden wir uns, wenn die zu untersuchende Probe 10 % Analyt enthält. In diesem Fall liegen die Kalibrierpunkte auf einer sehr flachen, nur schwach gekrümmten Kurve, siehe beispielhaft $c_A = 3$ % in Abbildung 1.

Da der mathematische Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration c_A und der Kurvenform gegeben ist, kann aus der Form der sich ergebenden Kurve, resultierend aus den Messungen der vier Aufstockungen, die Analytkonzentration c_A der Probe berechnet werden.

Dabei wird die Analytkonzentration c_A in der Berechnung so lange variiert, bis die experimentelle und die berechnete Kurve möglichst gut übereinstimmen, d. h. die Summe der

Fehlerquadrate zwischen der experimentellen und der berechneten Kurve minimal ist. Bildlich gesprochen, wird aus einer Kurvenschar von berechneten Kurven diejenige herausgesucht, die der experimentell ermittelten Kurve am ähnlichsten ist (s. Abb. 2).

Mathematisches Modell

Annahme: Bei einer Real-Time-PCR weisen Proben mit verschiedenen Analytkonzentrationen c_A bei ihrem individuellen Ct-Wert dieselbe Amplikonmenge auf. Dieser Sachverhalt lässt sich folgendermassen darstellen:

$$c_A \times A \times \left(\frac{\text{Eff}}{100} + 1 \right)^{\text{Ct}} = \varphi \quad (1)$$

mit

c_A : Anfangskonzentration des Analyten in %

Eff: Effizienz der PCR-Reaktion in %

A: Konstante, mit $7,37 \times 10^{-9}$ so gewählt, dass sich bei einer PCR mit 100 % Analytgehalt und einer PCR-Effizienz von 90 % ein Ct-Wert von 22 ergibt

Ct: Ct-Wert; Schnittpunkt einer Amplifikationskurve mit dem Threshold, Einheit: Zyklenzahl

Gleichung (1) wird umgeformt zu:

$$\left(\frac{\text{Eff}}{100} + 1 \right)^{\text{Ct}} = \frac{B}{c_A} \quad (2)$$

wobei B der reziproke Wert von A bedeutet.

Gleichung (2) wird aufgelöst nach Ct:

$$\text{Ct} = \frac{\log B - \log c_A}{\log \left(\frac{\text{Eff}}{100} + 1 \right)} \quad (3)$$

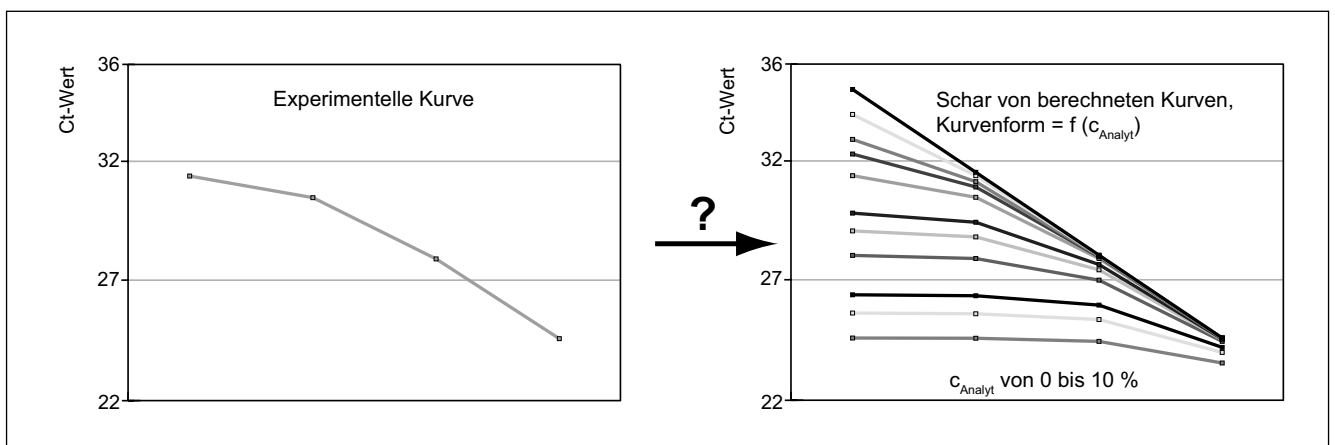


Abb. 2 Gesucht ist diejenige berechnete Kurve, die mit der experimentellen deckungsgleich ist.

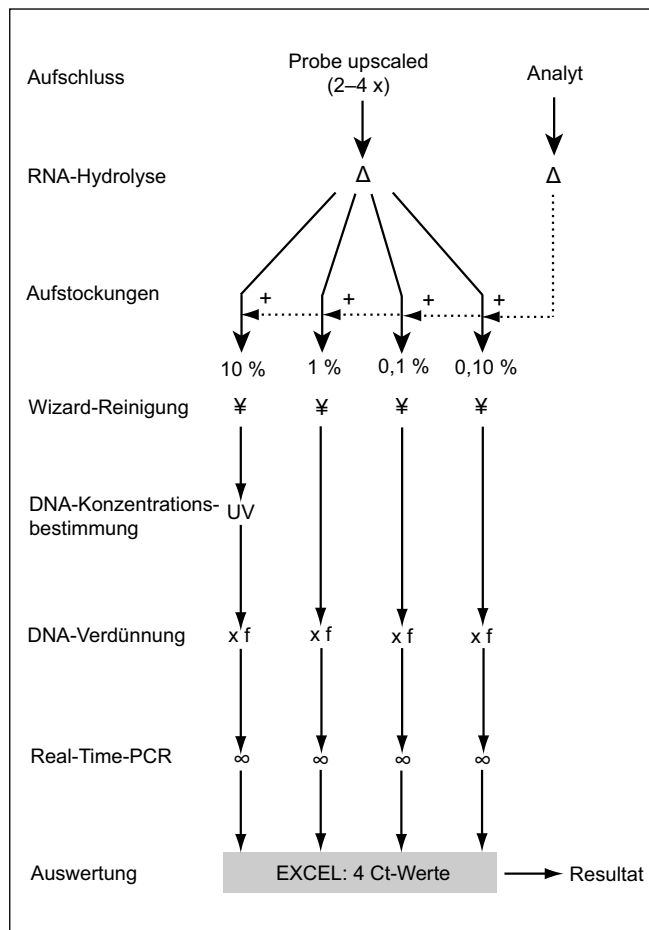


Abb. 3 Schematischer Ablauf einer Analyse

Werden Standardadditionen durchgeführt, so addiert sich zur Analytkonzentration c_A noch die zugegebene Konzentration des Analyten c_{st} . Damit lautet der berechnete Zusammenhang zwischen Ct-Wert und c_A :

$$Ct = \frac{\log B - \log(c_A + c_{st})}{\log\left(\frac{Eff}{100} + 1\right)} \quad (4)$$

Ausführung

a) DNA-Isolierung und Aufstockungen

Die Grundlage für die DNA-Isolierung und -Reinigung bildet die Methode „Wizard“ aus dem schweizerischen Lebensmittelbuch [10]. Der Zellaufschluss wird in der Wärme mithilfe von Proteinase K und Guanidinium durchgeführt, die DNA-Reinigung basiert auf einem DNA-bindenden Harz (Wizard®, Promega, Madison, WI, USA). Für den Aufschluss werden je z. B. 150 mg trockenes Probenmaterial und 150 mg Analyt (z. B. Sojamehl) eingewogen. Das weitere Vorgehen ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Eine Zusammenfassung der Vorgehensweise ist in Abbildung 4 zusammengefasst. Die Aufstockung von 10 % wird erreicht, indem 400 µl Roh-DNA-Extrakt der Probe mit 40 µl des unverdünnten Roh-DNA-Extraktes des Analyten

- Probe und Analyt (100 %): Aufschluss + RNA-Hydrolyse
- Aufstockungen vor Wizard-Reinigung:
 - 10 %: 400 µl Probenextrakt + 40 µl Analytextract x 1
 - 1 %: 400 µl Probenextrakt + 40 µl Analytextract x 10
 - 0,1 %: 400 µl Probenextrakt + 40 µl Analytextract x 100
 - 0,01 %: 400 µl Probenextrakt + 40 µl Analytextract x 1000
- 4 Wizard-Reinigungen parallel
- DNA-Konzentrationsmessung nur bei Aufstockung 10 %
- DNA-Verdünnung von allen 4 Aufstockungen identisch!
- Real-Time-PCR von allen 4 Aufstockungen

Abb. 4 Zusammenfassende Darstellung des Analysenablaufs

versetzt werden. Bei der Aufstockung von 1 % werden 40 µl des 10 x verdünnten Roh-DNA-Extraktes des Analyten zu 400 µl Roh-DNA-Extrakt der Probe addiert.

b) Messungen

Mittels analyt-spezifischer Real-Time-PCR wird von einer Probe, mit 4 individuellen Aufstockungen, jeweils der Ct-Wert bestimmt. Um die Messgenauigkeit zu erhöhen, sollten die Messungen als Triplicates ausgeführt werden.

c) Auswertung

Die Darstellung der vier ermittelten Ct-Werte vs. die logarithmierte Aufstockungskonzentration ergibt die experimentelle Kurve. Nun muss durch Variation der Analytkonzentration c_A die berechnete Kurvenform gemäß Formel (4) der experimentellen Kurve angeglichen werden.

Vorgehen

- 1) In einem ersten Schritt werden die experimentelle und die berechnete Kurve einander angepasst, in dem die Ct-Werte der 10 %-Aufstockung angeglichen werden: $Ct(10\% \text{-Aufstockung})_{exp} - Ct(10\% \text{-Aufstockung})_{berechnet} = \Delta Ct$ (s. Abb. 5).
- 2) Von den Ct-Werten der 4 individuellen Aufstockungen wird ΔCt subtrahiert.

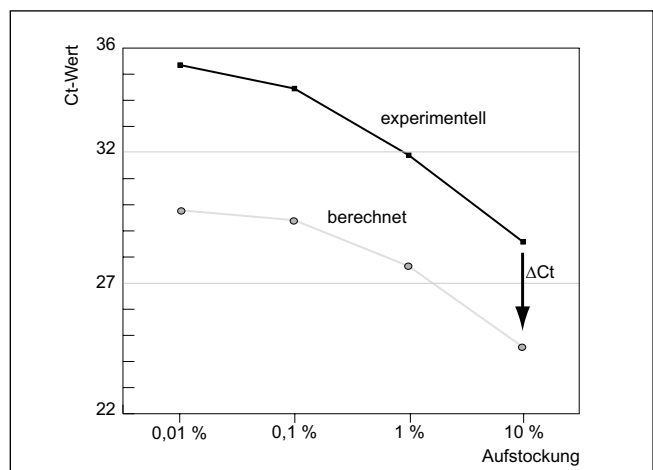


Abb. 5 Der experimentelle Ct-Wert der 10 %-Aufstockung wird durch den berechneten Wert ersetzt.

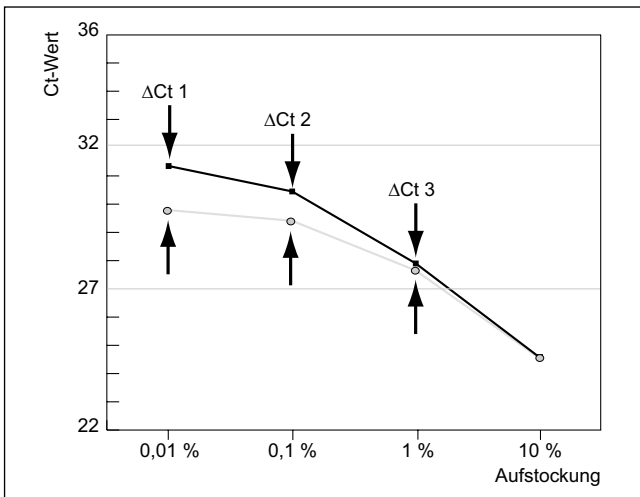


Abb. 6 Die Abweichung zwischen experimenteller und berechneter Kurve ist durch die Summe der Quadrate der dargestellten Fehler gegeben.

- 3) Bildung der Summe S der 3 Fehlerquadrate zwischen den experimentellen und den berechneten Ct-Werten (s. Abb. 6).

$$S = [Ct(0,01\% \text{ Aufst.})_{\text{exp.}} - Ct(0,01\% \text{ Aufst.})_{\text{berechnet}}]^2 + [Ct(0,1\% \text{ Aufst.})_{\text{exp.}} - Ct(0,1\% \text{ Aufst.})_{\text{berechnet}}]^2 + [Ct(1\% \text{ Aufst.})_{\text{exp.}} - Ct(1\% \text{ Aufst.})_{\text{berechnet}}]^2$$
- 4) Wiederholung der Berechnung von S ab Schritt 1 mit einer anderen Analytkonzentration c_A .
- 5) Wiederholen der ersten 4 Schritte, bis die Fehlerquadratsumme S minimal ist. Die dabei eingesetzte Analytkonzentration c_A entspricht der realen Analytkonzentration c_A der Probe.

Beispiel

Tabelle 1 zeigt an einem Beispiel, wie aus den experimentell ermittelten Ct-Werten die Analytkonzentration c_A einer

Probe ermittelt wurde. Die Berechnung der zu erwartenden Ct-Werte erfolgte mittels Gleichung (4); für log B (B = reziproker Wert von A) wurde der Wert 8,1326 eingesetzt. Die in Gleichung (4) verwendete PCR-Effizienz ist 95 %, was einem realen Wert bei einer ungehemmt verlaufenden PCR-Reaktion entspricht.

Validierung

a) Ringversuch

2008 wurde durch die ERFA Molekularbiologie Schweiz ein kleiner Ringversuch „Soja in unbekanntem Mehl“ durchgeführt. Es galt, den Sojaanteil in 3 Mehlproben mittels Real-Time-PCR zu bestimmen. Ein Sojamehl wurde zu Weizenmehl, Reismehl und einer Mischung Weizen-/Reismehl 6:1 dotiert. Den Ringversuchsteilnehmern wurde das Dotierungsmehl Soja bei der Analyse zur Verfügung gestellt.

Die wahren Werte der Sojadotierungen müssen mit einem Faktor von $\pm 50\%$ versehen werden, da die trockenen gemischten Soja/Mehl-Mischungen geringe Inhomogenitäten aufwiesen. In Tabelle 2 sind die Resultate ersichtlich, welche mithilfe dieser Methode generiert wurden.

b) Probe mit hohem Analytgehalt

Um diese beschriebene Methode auch an einer Probe mit einem hohen Analytgehalt zu prüfen, wurde folgende Mischung direkt eingewogen: 250 mg Reismehl + 16,4 mg Sojamehl $\hat{=}$ 5,18 \pm 0,3 w/w% (Bereich aus geschätztem Wägefehler). Der mit dieser Methode ermittelte Gehalt betrug 5,27 w/w%.

Das hervorragende Ergebnis der Analyse der Probe mit hohem Analytgehalt wurde unter anderem deshalb erreicht, weil das Dotierungsmaterial bei der Analyse der Probe vorlag und verwendet werden konnte.

Tab. 1 Schrittweise Ermittlung der Analytkonzentration c_A aus den experimentellen Ct-Werten der verschiedenen Aufstockungen (bei $c_A = 0,147\%$ ist die Fehlerquadratsumme S minimal)

	Aufstockung [%]				Fehlerquadratsumme S
	0,01	0,1	1 ^{a)}	10 ^{a)}	
	Ct-Wert	Ct-Wert	Ct-Wert	Ct-Wert	
exp. Ct-Werte	39,06	38,23	35,77	32,88	
$c_A = 5\%$ ber. Ct-Werte	25,627	25,600	25,360	24,079	
exp. Ct-Werte korr. ^{b)}	30,259	29,429	26,969	24,079	38,6955
$c_A = 0,5\%$ ber. Ct-Werte	29,048	28,805	27,443	24,655	
exp. Ct-Werte korr. ^{b)}	30,835	30,005	27,545	24,655	4,6410
$c_A = 0,147\%$ ber. Ct-Werte	30,812	30,134	27,848	24,711	
exp. Ct-Werte korr. ^{b)}	30,891	30,061	27,601	24,711	0,0725
$c_A = 0,1\%$ ber. Ct-Werte	31,345	30,450	27,911	24,719	
exp. Ct-Werte korr. ^{b)}	30,899	30,069	27,609	24,719	0,4366

a: Da bei der Aufstockung eine „Verdünnung“ der Proben-DNA stattfindet, wird in der Gleichung (4) für c_{st} der Wert von 0,99 statt 1 %, resp. 9,091 anstelle von 10 % eingesetzt.
 b: Diese Reihen zeigen die um ΔCt korrigierten experimentellen Ct-Werte, sodass bei der Aufstockung von 10 % die experimentellen und berechneten Ct-Werte identisch sind.

Tab. 2 Resultate der Analysen der 3 Ringversuchsproben A bis C

Probe	Sojagehalt wahrer Wert (w/w%)	Matrix	Sojagehalt analysiert ^{a)} [w/w%]		
			1. Aufarbeitung	2. Aufarbeitung	Mittelwert
A	0,15 ± 0,075	Weizen	0,147	0,096	0,122
B	0,08 ± 0,04	Reis	0,075	0,0479	0,062
C	0,15 ± 0,075	Weizen/Reis	0,209	0,104	0,157

a: mithilfe der beschriebenen Methode analysiert

Damit wurde gezeigt, dass im Bereich zwischen 0,08 und 5,2 w/w% Sojaanteil in einem Mehl mit unbekannter Zusammensetzung mit dieser beschriebenen Methode recht präzise Analytkonzentrationen ermittelt werden können.

Ausblick

Wie eingangs erwähnt, müssen in der Schweiz allergene Zutaten oder Verunreinigungen allergener Lebensmittel gekennzeichnet sein, falls ihr Anteil 1 g pro kg oder l Lebensmittel übersteigt. Im EU-Raum wird eine Einführung von Schwellenwerten für maximal tolerierbare Spuren allergener Lebensmittel diskutiert, deren Einführung die Sicherheit für Allergiker stark erhöhen würde.

Bis dato wurden Anteile von allergenen Lebensmitteln oft in DNA-% angegeben. Diese Gehaltsangabe beschreibt den prozentualen DNA-Anteil im Verhältnis zur Gesamtmenge an DNA in der Probe. Solche Gehaltsangaben können nützlich sein beim Vergleich von gleichartigen Proben, es kann aber nicht auf einfache Weise ein Zusammenhang zwischen DNA-% und Massenanteilen (z. B. w/w%) hergestellt werden, wie es mit dieser Methode möglich ist. Beim Auftreten von Kreuzkontaminationen können dem Lebensmittelhersteller/-verarbeiter nur Angaben in Massenanteilen dienlich sein.

Die hier beschriebene Methode eignet sich wegen des relativ großen experimentellen Aufwandes nicht zum Screening von allergenen Lebensmitteln, sie ist aber sehr hilfreich bei der Quantifizierung von Allergenen in Proben, die mit einem positiven Befund aus einem Screening hervorgegangen sind. Das Problem der unterschiedlichen Extraktionseffizienz in Abhängigkeit der Beschaffenheit eines Analyten

(Korngröße, Verarbeitungsgrad etc.) kann diese Methode jedoch nicht lösen. Prinzipiell ist diese beschriebene Methode auch für die Analyse von anderen Analytklassen, z. B. im GVO-Bereich, einsetzbar.

Literatur

- [1] Köppel R et al: Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *Eur Food Res Technol* **230**, 367–374 (2010).
- [2] Bessere Allergen Kennzeichnung von Lebensmitteln für Verbraucher: Schwellenwerte können derzeit noch nicht zuverlässig festgelegt werden. Stellungnahme 2/2010 des BfR vom 29. Juli 2009.
- [3] Busch U: Praktische Umsetzung der Kennzeichnung von Allergenen. *Food & Recht*, 2008, Heft 2.
- [4] Waiblinger H-U: Ungeregelte Kreuzkontaminationen erschweren die Überwachung. *Food & Recht*, 2008, Heft 2.
- [5] Scholdberg TA et al: Evaluating Precision and Accuracy When Quantifying Different Endogenous Control reference Genes in Maize Using Real-Time PCR. *J Agric Food Chem* **57**, 2903–2911 (2009).
- [6] Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 52B Molekularbiologische Methoden, Untersuchungsmethode 2.1.7: Quantitativer Nachweis von Roundup Ready™ Soja-DNA sowie des 35S-Promoters aus dem Blumenkohlmosaikvirus ("Real-Time PCR"). Bern, Bundesamt für Gesundheit 2000.
- [7] Paterno A: Finding the Joker among the Maize Endogenous Reference Genes for Genetically Modified Organism (GMO) Detection. *J Agric Food Chem* **57**, 11086–11091 (2009).
- [8] Brezna B, Hudecova L, Kuchta T: Detection of Peanuts in Food Products by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Arch Lebensmittelhyg* **56**, 112–113 (2005).
- [9] Lopez-Andrea M et al: Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **339**, 73–82 (2005).
- [10] Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 52B Molekularbiologische Methoden, Untersuchungsmethode 1.1: Isolation und Reinigung von Desoxyribonucleinsäuren aus Lebensmitteln mittels Wizard. Bern, Bundesamt für Gesundheit 2004.

Die kompletten Beiträge aus „Angewandte Wissenschaft Originalarbeiten exklusiv für Sie vorgestellt“ finden Sie auf www.dlr-online.de → DLR Plus
Passwort: Rote Grütze