



Einsatz der ligationsabhängigen PCR (LPA) als Screeningmethode zum Nachweis allergener Bestandteile in Lebensmitteln



Anja Demmel
Berlin, 8. Dezember 2010

Überblick

- Rechtlicher Hintergrund
- Nachweismethoden in der Allergen-Analytik
- Ligationsabhängige Sondenamplifizierung (LPA)
 - Sondenhybridisierung
 - Ligation
 - Amplifizierung der ligierten Sonden
 - Detektion
- Anwendungen der ligationsabhängigen PCR (LPA)
- Erweiterung der LPA
 - Sondendesign
 - Überprüfung der neuen Sonden
 - Zeitliche Verkürzung der Methode
 - Ausblick
- Zusammenfassung

Kennzeichnungspflichtige allergene Zutaten nach Anhang IIIa RL 2003/89/EG

- **Glutenhaltiges Getreide** (*Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut oder Hybridstämme daraus*) und daraus hergestellte Erzeugnisse
- **Krebstiere** und Krebserzeugnisse
- **Eier** und Eierzeugnisse
- **Fisch** und Fischerzeugnisse
- **Erdnüsse** und Erdnusserzeugnisse
- **Soja** und Sojaerzeugnisse
- **Milch** und Milcherzeugnisse
- **Schalenfrüchte** (*Mandel, Haselnuss, Walnuss, Cashewnuss, Pecannuss, Paranuss, Pistazie, Macadamia- und Queenslandnuss*)
- **Sellerie** und Sellerieerzeugnisse
- **Senf** und Senferzeugnisse
- **Sesamsamen** und Sesamsamenerzeugnisse
- **Schwefeldioxid und Sulfite** >10 mg/kg (SO₂)
- **Lupine**
- **Weichtiere**

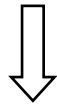


Nachweismethoden in der Allergen-Analytik

Anforderungen:

- Hohe Spezifität
- Hohe Sensitivität (Nachweisgrenze im niedrigen mg/kg-Bereich wünschenswert)
- Nachweis auch in prozessierten Lebensmitteln möglich
- Anwendbarkeit in vielen unterschiedlichen Lebensmittelmatrices
- Routinefähigkeit

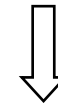
immunchemisch



ELISA

Nachweis allergener Proteine
oder Markerproteine für die
Spezies

molekularbiologisch



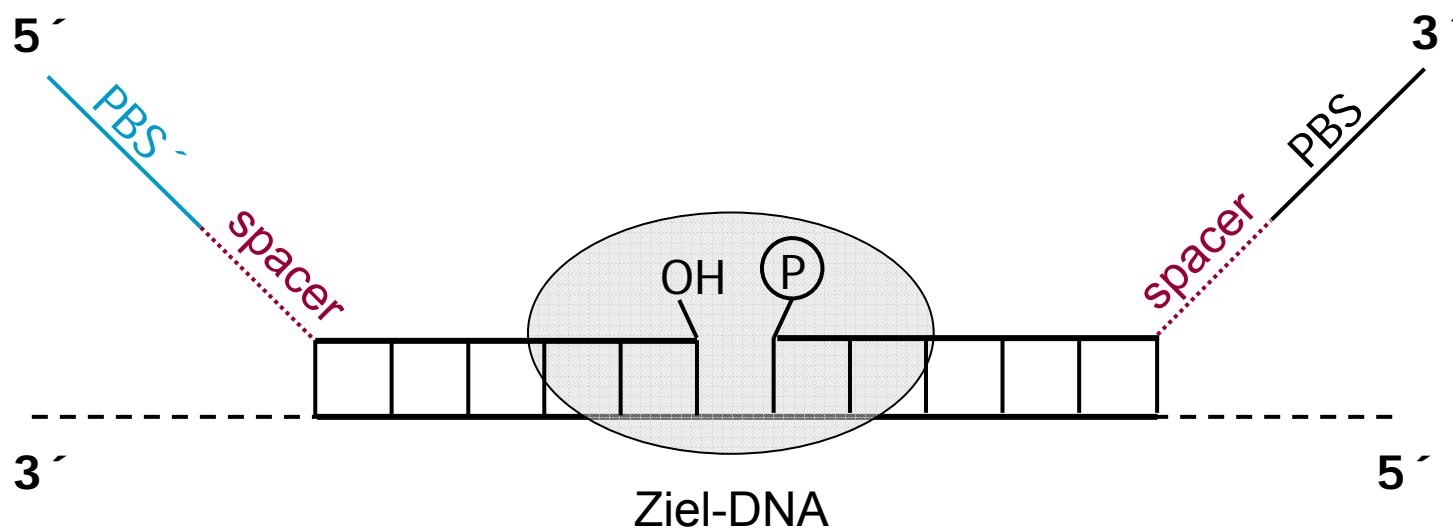
PCR

Nachweis
speziesspezifischer DNA-
Sequenzen

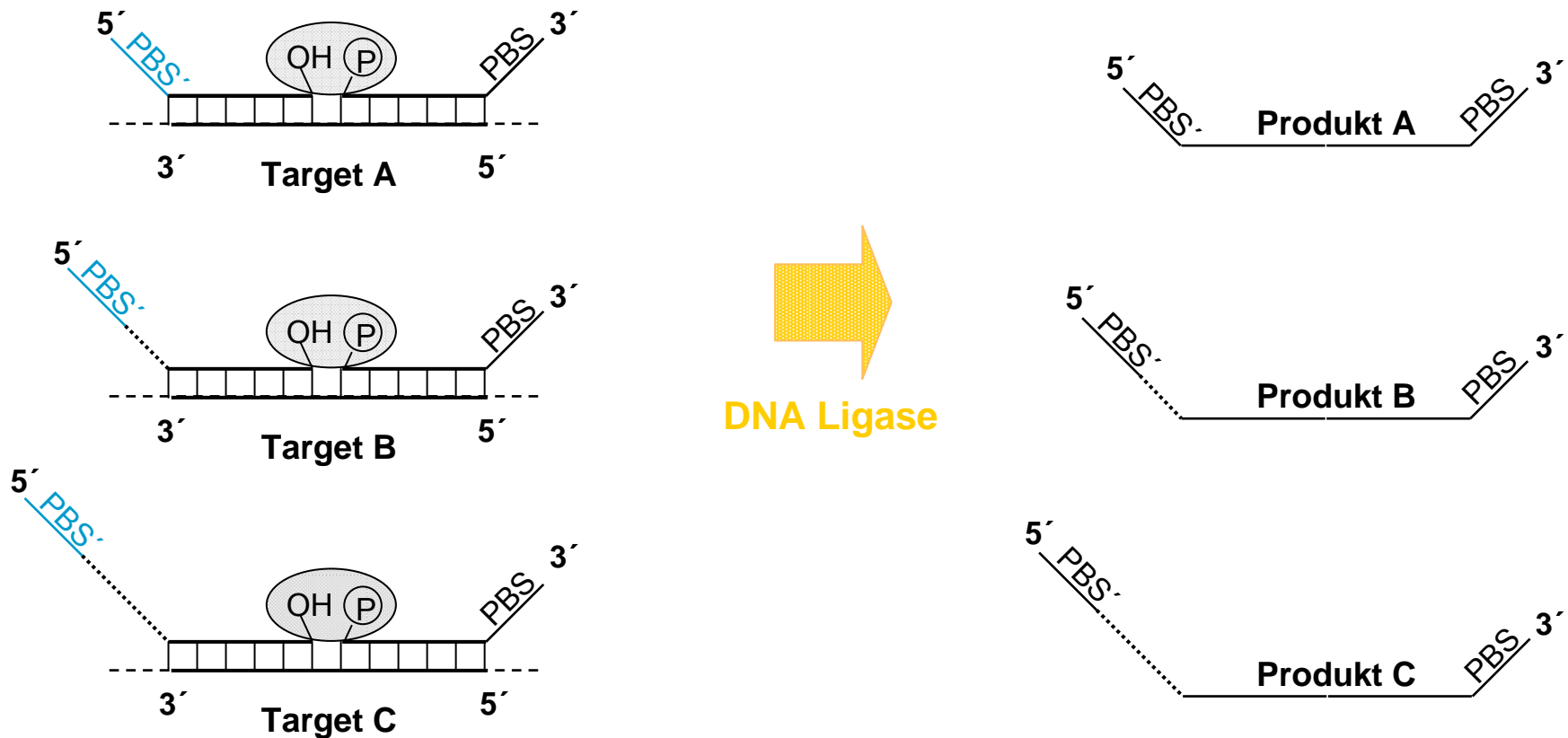
PCR: Ligationsabhängige Sondenamplifizierung (LPA)

- LPA: ligation-dependent probe amplification –
ligationsabhängige Sondenamplifizierung
- Paralleler Nachweis mehrerer Zielsequenzen (Multianalytmethode)
- ➔ Eignung als Screening-Methode für allergene Bestandteile

LPA: Sondenhybridisierung



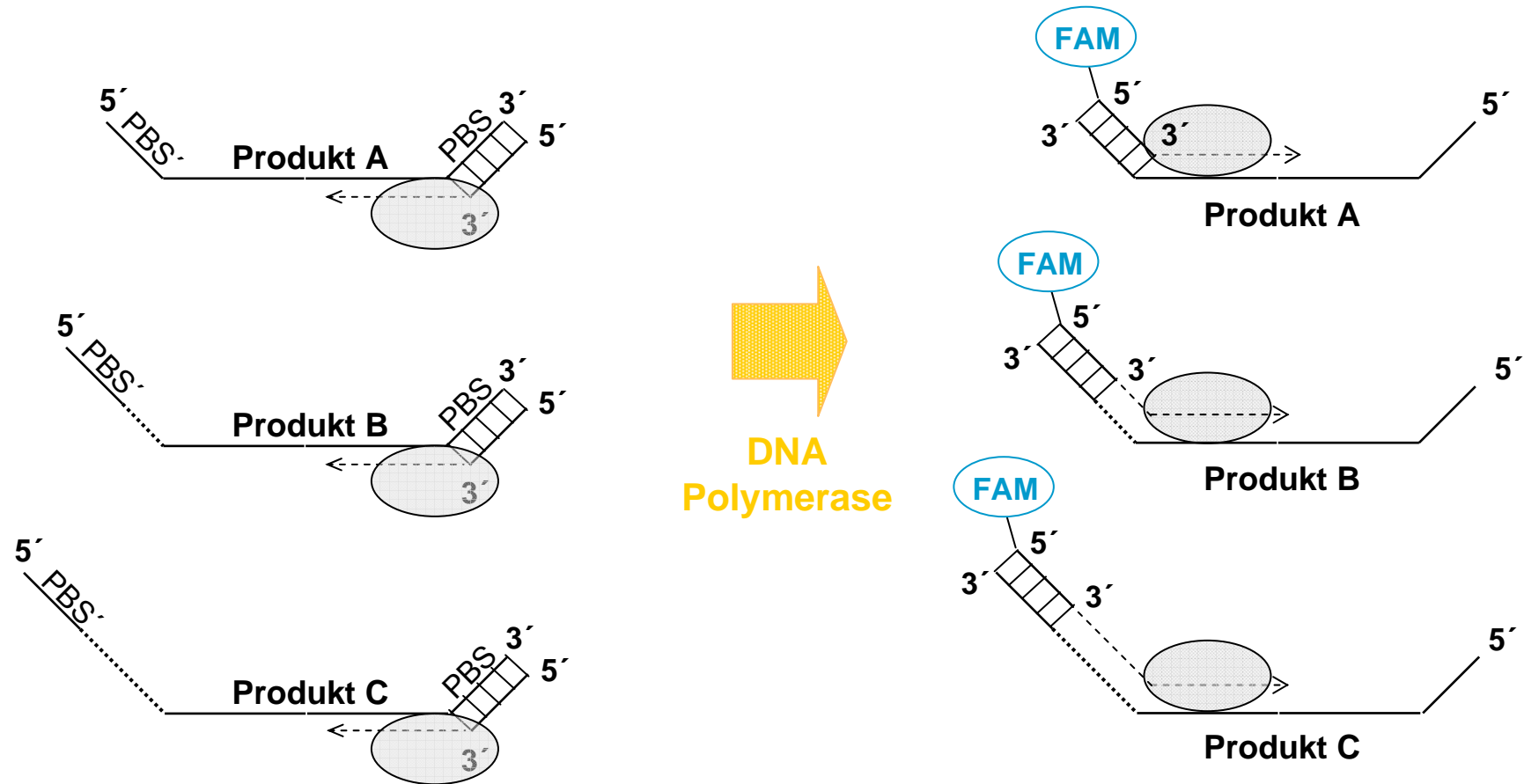
LPA: Ligation



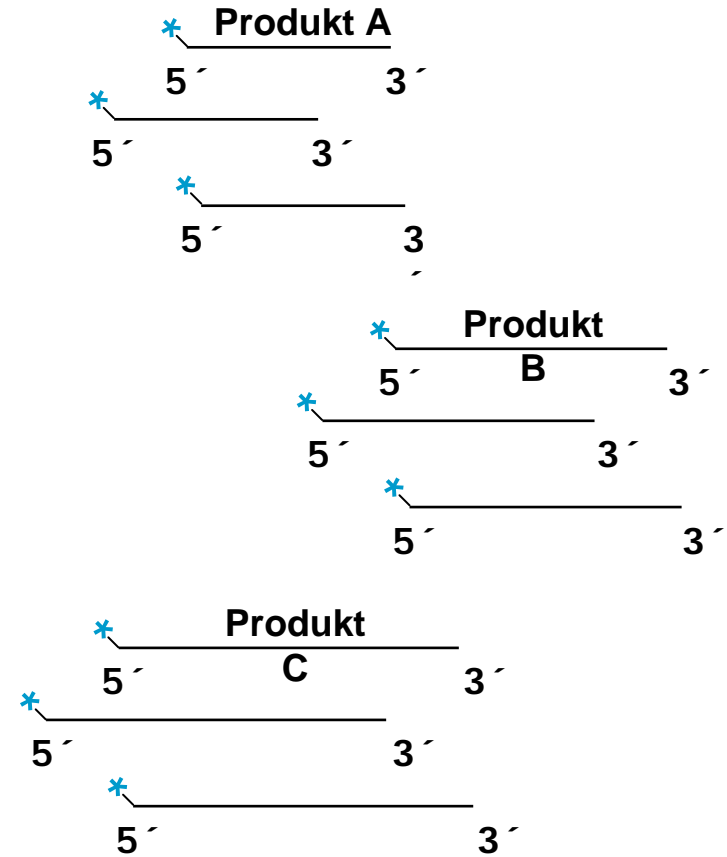
LPA: Amplifizierung



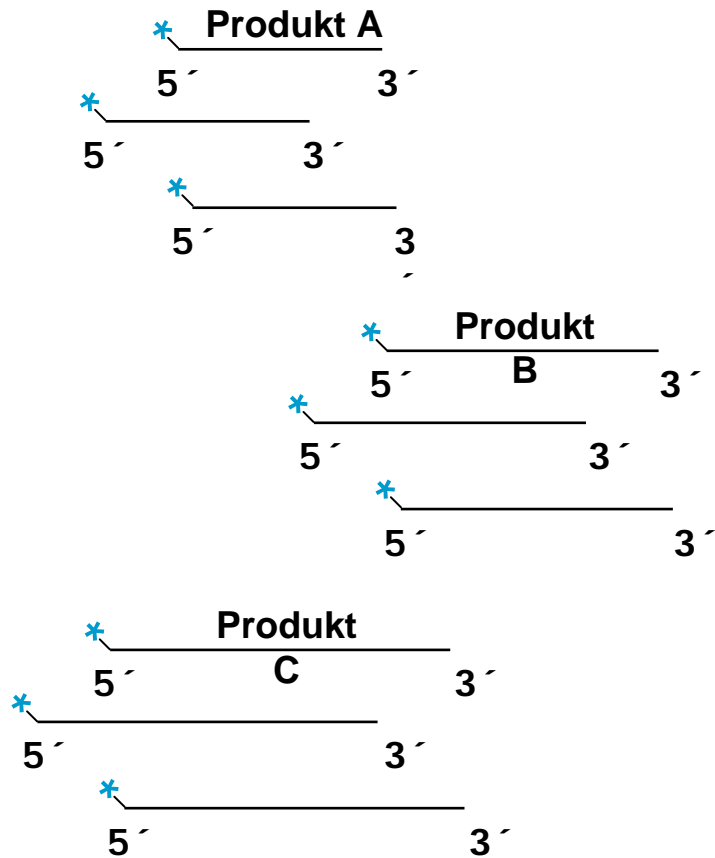
LPA: Amplifizierung



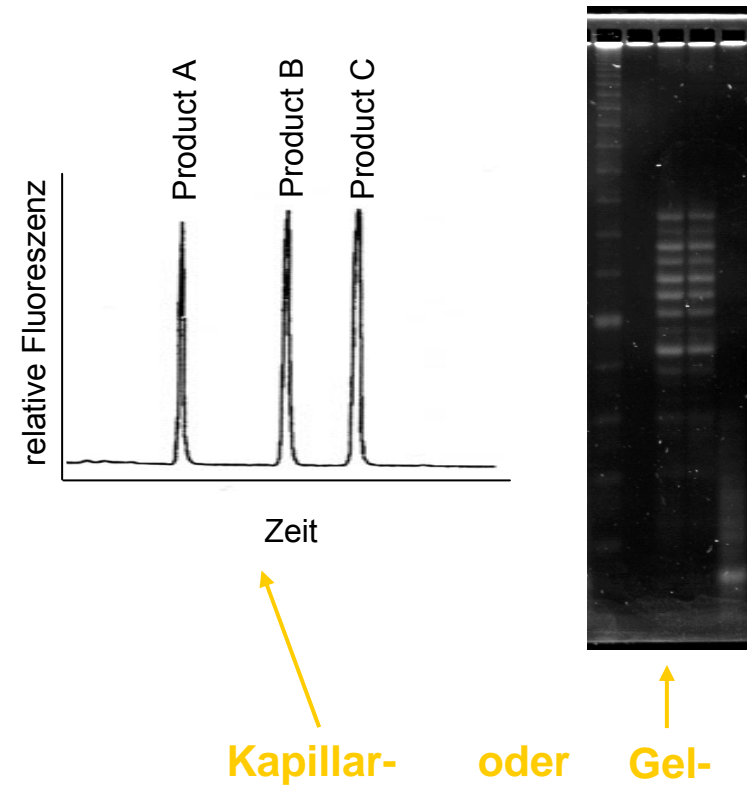
LPA: Detektion



LPA: Detektion



➔
Elektrophorese



Elektrophorese

Anwendungen der ligationsabhängigen PCR (LPA)

- Medizinische Diagnostik
 - Schouten et al. (2002)
 - Simultane Detektion von 40 bis 50 Targetsequenzen
 - Anwendung Gendeletion/ -duplikation, Trisomien, SNP-Detektion

- Nachweis gentechnisch veränderter Organismen in Lebensmitteln
 - Moreano et al. (2006)
Paralle Detektion von 4 Targets für Mais, MON810, Soja, RRS
 - Ehlert et al. (2008)
Screeningmethode 7 Targets (Mais, Soja, Raps, 35S, 35S-pat, MON810, RRS)

- Nachweis von Verfälschungen
 - Luber et al. (in Vorbereitung)
Nachweis von Aprikosen-DNA in Marzipan

- Anwendung zum Nachweis allergener Zutaten in Lebensmitteln
 - Ehlert et al. (2009)
Gleichzeitige Detektion 10 verschiedener **Allergene**

LPA Allergene - Auswahl der Zielorganismen

- Aus Anlage 3 LMKV: alle Organismen der Gruppe „Schalenfrüchte“ zusätzlich Erdnuss und Sesam
- Häufig in Backwaren, Schokolade, Pralinen verwendet

- Cashew
- Pistazie
- Haselnuss
- Macadamianuss
- Mandel
- Paranuss
- Pecannuss
- Walnuss
- Erdnuss
- Sesam



Design von LPA-Sonden

- Literaturrecherche
 - Auswahl potentiell spezifischer Sequenzabschnitte für jeden Analyten

- Sequenz-Vergleich: Alignments
 - Innerhalb der Spezies
 - Speziesübergreifend

- Auswahl der Hybridisierungssequenz

- Design der linken und der rechten Sondenhälfte
 - Beachtung verschiedener Parameter
 - Spezifität an der Ligationsstelle
 - Länge der ligierten Sonde
 - GC-Gehalt, Schmelztemperatur, Mindestlänge der Hybridisierungsstelle jeder Sondenhälfte
 - ...

LPA-Sonden allergene Nüsse, Erdnuss und Sesam

Table 1. Probes and primers.

Target/GenBank Accession No.	Left probe	Right probe	Ligation products (retention time) [nt]
Peanut/L77197	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCGAG GCAGCAGTGGAACTC-3'	P-5'-CAAGGAGACAGAAGATGCCAGAG CCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	88 (87.10 ± 0.13)
Cashew/AY081853	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTTATTA GATTAATTCAGTGGACTGC-3'	P-5'-CATGAAGTGAAGCAGTAGTAGAAGTCT AGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	92 (91.16 ± 0.17)
Pecan nut/DQ156215	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGACACAATC CCTACTACTTTCCTCCAGGGA-3'	P-5'-CTCAGGTCGAGACATGAGTCCG GGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	96 (94.67 ± 0.17)
Pistachio nut/Y07600	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCTGAA CACGGCGAGCACAAAG-3'	P-5'-AGGGACTGGTGGAGAAGATCAAAGAC AAgtgtgtgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	100 (99.37 ± 0.18)
Hazelnut/AF136945	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGATCACC AGCAAGTACCACCAAGG-3'	P-5'-GCAACGCTTCAATCAATGAGGAGGA GAtgtgtgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	104 (102.75 ± 0.12)
Sesame seeds/ AF240006	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAgtgtgttGA AGGGAGAGAAAGAGAGGAGGAGCAA-3'	P-5'-GAAGAACAGGGACGAGGGCCGGATg tgtgtgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	108 (108.11 ± 0.13)
Macadamia nut/ AF161883	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTTA ATCAACCGAGACAACAACGAGAGG-3'	P-5'-CTCCACATAGCCAAGTTCTTACAGACCA TtgtgtgtgtgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	112 (111.07 ± 0.14)
Almond/X65718	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAgtgtgtgtgt CCATTACAAGTCTCCACCACCACCAC-3'	P-5'-CTTCTCCTACTCCTCCAGTCTACTCACC ACCgtgtgtgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	116 (114.84 ± 0.12)
Walnut/AF066055	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAgtgtgtgtgtGG CACAATCCCTACTACTTTCCTCCAGAG-3'	P-5'-CATTAGGTCGAGACATGAGTCCGAGGA AGGgtgtgtgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	120 (119.80 ± 0.11)
Brazil nut/M17146	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAgtgtgtgtgtgt gtgGAGGAGGAGAACCAGGAGGAGTGC-3'	P-5'-GCGAGCAGATGCAGAGACAGCAGgtgtgt gtgtgtgtgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'	124 (124.84 ± 0.09)
Primer R – unlabeled	5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'		
Primer F – labeled	FAM-5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'		

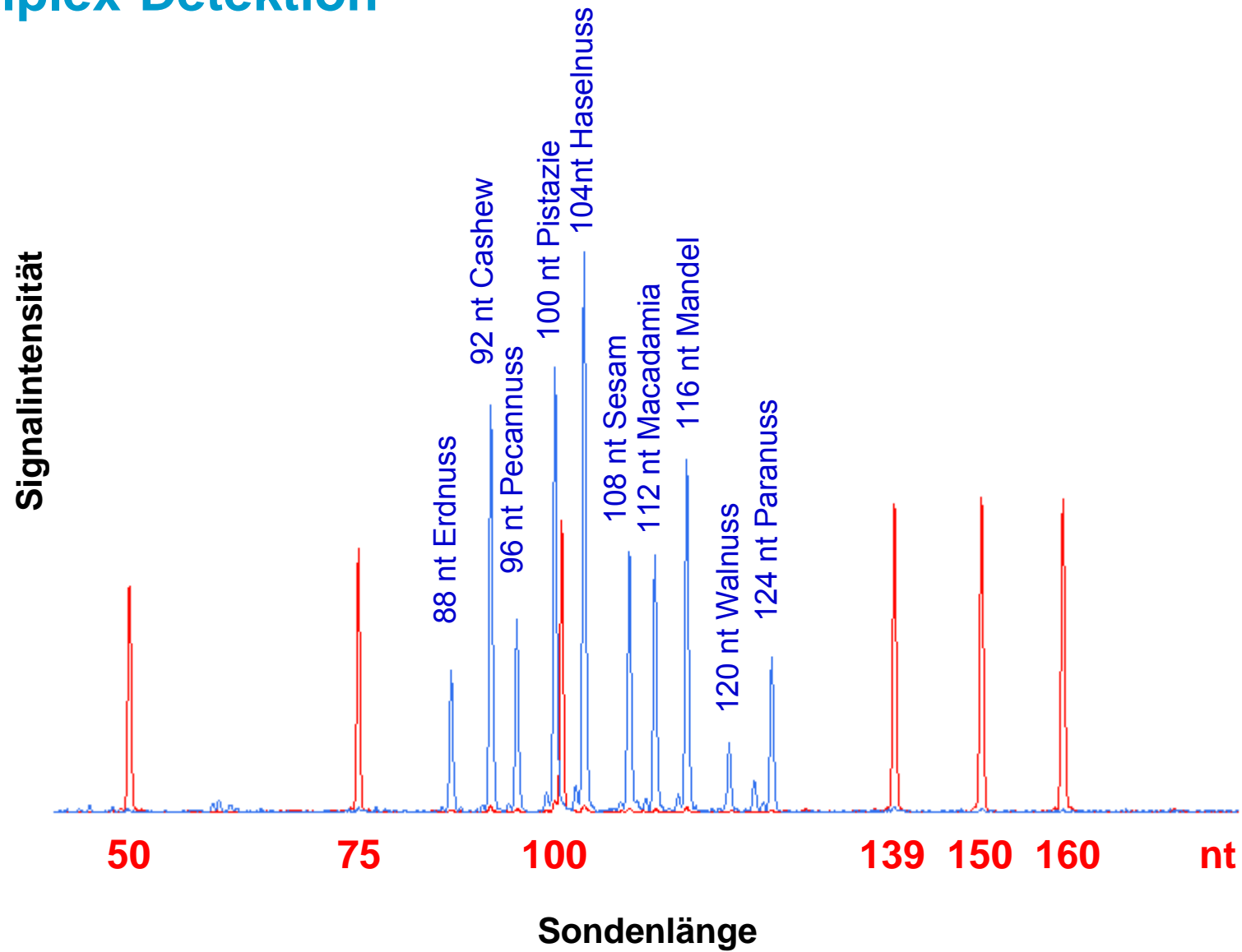
Capitals: plant DNA.

Bold capitals: primer binding site.

Lowercase fonts: spacer DNA.

Ehlert, Alexandra; Demmel, Anja; Hupfer, Christine; Busch, Ulrich and Engel, Karl-Heinz (2009):
Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification,
Food Additives & Contaminants: Part A, 26:4, 409 - 418

Multiplex-Detektion



Erweiterung der LPA - Sondendesign

- Sonden des Ausgangssystems
 - **Nüsse** (Cashew 92 bp, Pecannuss 96 bp, Pistazie 100 bp, Haselnuss 104 bp, Macadamianuss 112 bp, Mandel 116 bp, Walnuss 120 bp, Paranuss 124 bp), **Erdnuss** (86 bp) und **Sesam** (108 bp)
- Neu entwickelte Sonden und ihre Zuordnung zu Produktgruppen
 - Fleisch
 - **Soja** (92 bp), **Sellerie** (108 bp), **Senf** (116 bp), Pistazie, **Lupine** (124 bp), glutenhaltige Getreide (**Weizen** u.a. 132 bp, **Hafer** 140 bp, **Gerste** 148 bp)
 - Feinkost
 - **Krebstiere** (104 bp), **Fische** (96 bp), **Weichtiere** (112 bp)
 - Süßwaren
 - **Soja** (92 bp), glutenhaltige Getreide (**Weizen** u.a. 132 bp, **Hafer** 140 bp, **Gerste** 148 bp), **Lupine** (124 bp), Nüsse, Erdnuss, Sesam

Überprüfung der neuen Sonden

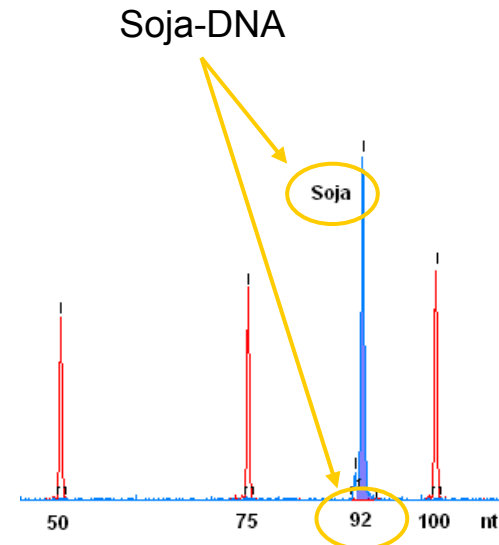
- **Test der Sonden mit Positivkontroll-DNA**

- **Fleischgruppe**

Peak bei spezifischer

Länge der jeweiligen Sonde

Beispiel: Soja



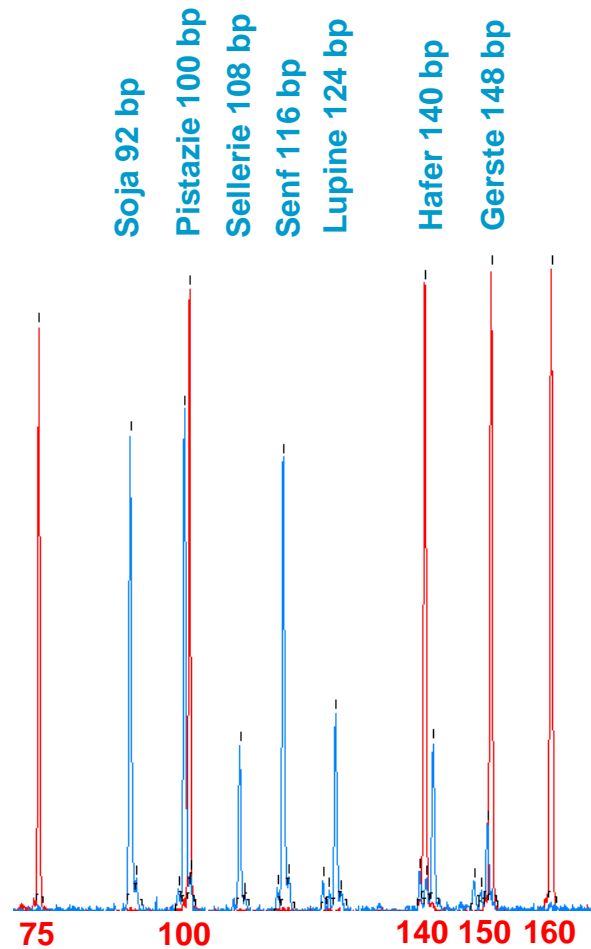
- **Feinkostgruppe**

DNAs mehrerer verschiedener Fische/Krebstiere/Weichtiere getestet:
nicht alle getesteten Spezies führten zu einem positiven Ergebnis

▶ Sonden-Optimierung

Überprüfung der neuen Sonden

- Fleischgruppe: Test gegen Mischung aller DNAs der jeweiligen Gruppe



Überprüfung der neuen Sonden

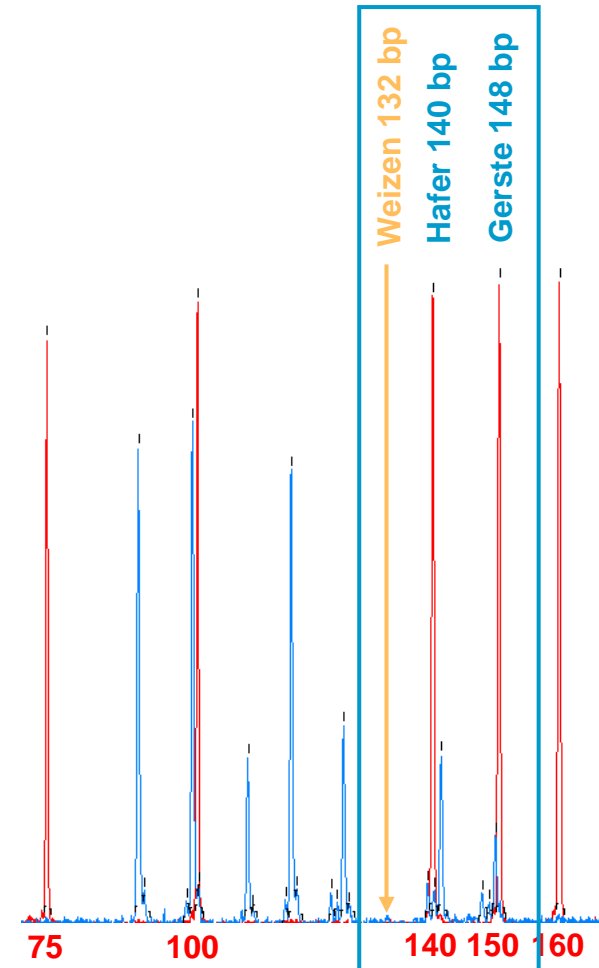
- Glutenhaltige Getreide: 3 Einzelsonden

- Hafer

- Gerste

- Weizen/Roggen/Dinkel/Kamut:
Beeinflussung durch Anwesenheit
von Gersten-DNA:
Peakhöhe stark
verringert

- ▶ Sonden-Optimierung



Zeitliche Verkürzung

- Ziel: „time to result“ 8h

- Ansatzpunkte
 1. Dauer der **Sondenhybridisierung** (derzeit 16 h)

 2. **Detektion**
Alternativen zur Kapillarelektrophorese:
Gelelektrophorese, Biochip...

Zeitliche Verkürzung – 1. Sondenhybridisierung

- Material

DNA-Mischung aus 8 Schalenfrüchten, Erdnuss und Sesam zu gleichen Teilen

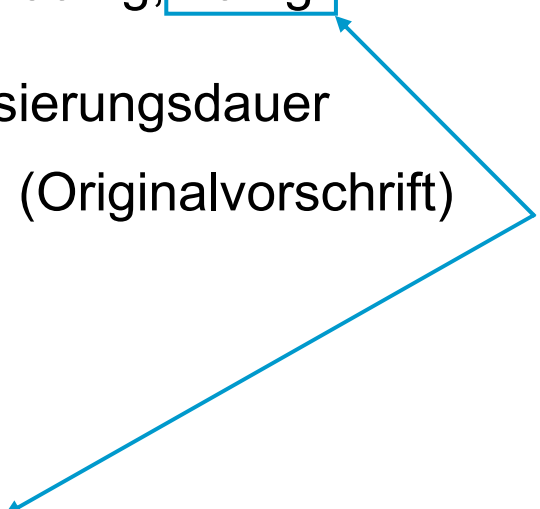
- Eingesetzte DNA-Menge

100 ng, 50 ng, 10 ng

- Hybridisierungsdauer

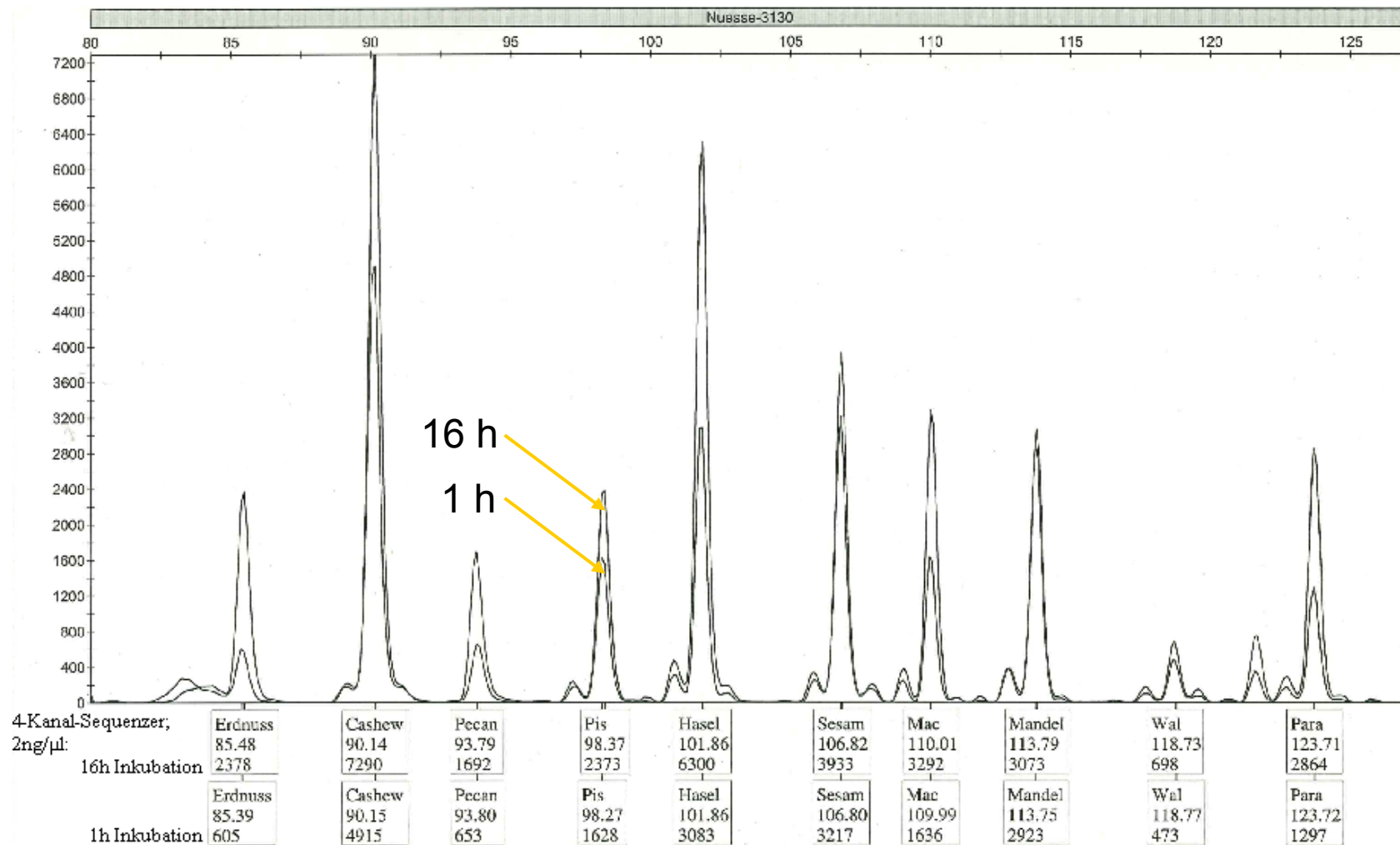
- 16 h (Originalvorschrift)
- 4 h
- 3 h
- 2 h
- 1 h
- 0,5 h

Senkung der Hybridisierungsdauer
von 16h auf bis zu 1h möglich
(eingesetzte DNA-Menge 10 ng)



Zeitliche Verkürzung – 1. Sondenhybridisierung

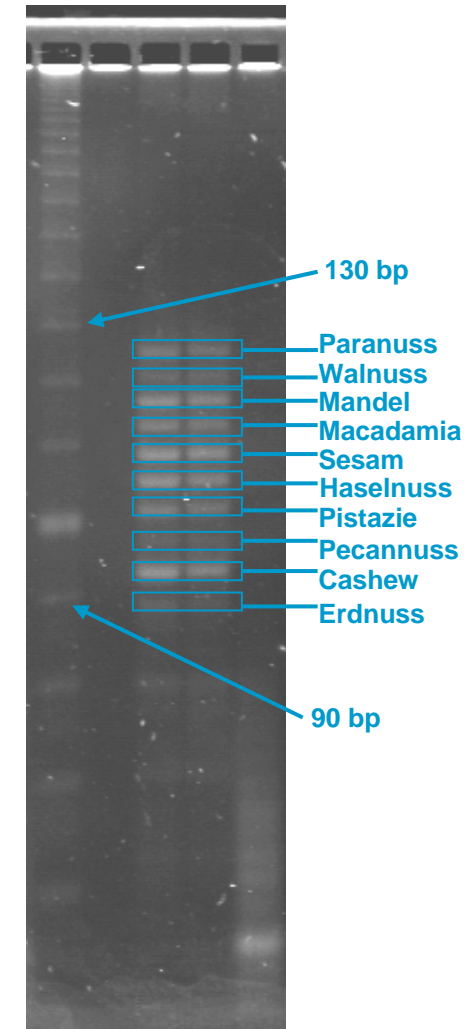
- Vergleich 16 h und 1 h Inkubation (10 ng DNA)
- ABI 3130 Genetic Analyzer



Zeitliche Verkürzung – 2. Geldetektion

	Kapillarelektrophorese (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)	Gelelektrophorese (Elchrom Spreadex EL300)
Ansätze pro Lauf	1	Bis zu 20
Dauer pro Lauf	40 min	240 min
Dauer (20 Ansätze)	800 min (knapp 13,5 h)	240 min (4 h)

Probe	DNA-Mischung (8 Schalenfrüchte, Erdnuss, Sesam)
Eingesetzte DNA-Menge	100 ng
Gel	Elchrom Spreadex EL300
Größenstandard	Invitrogen 10 bp Ladder
Färbung	GelRed



Ausblick

■ Spezifitätstests

- Test der Sonden auf Inklusivität

Beispiel: Test der Fischsonde mit DNA verschiedener Fische

- Untersuchung von DNA nicht kennzeichnungspflichtiger, naher Verwandter der zu detektierenden Organismen

■ Sensitivitätstests

- Untersuchung dotierter Lebensmittel

■ Zeitliche Verkürzung

- Überprüfung der verkürzten Sonden-Hybridisierungszeit anhand von dotierten Lebensmitteln

→ Einfluß auf Sensitivität?

- Vergleich Detektionsmethoden anhand dotierter Lebensmittel:

Kapillarelektrophorese, Gelelektrophorese, Biochip