

PCR in der Lebensmittelanalytik

Bedeutung und Anwendungsbeispiele



► PD Dr. Markus Fischer
Lehrstuhl für Organische
Chemie und Biochemie,
Technische Universität München



► Dr. Ilka Haase
Lehrstuhl für Organische
Chemie und Biochemie,
Technische Universität München

Weiterentwicklungen in den Mess- und Analyseverfahren haben sich auch auf die Lebensmitteluntersuchungsmethoden ausgewirkt und hier ihre Spuren hinterlassen. Analytische Methoden bilden die Grundlage zur Einhaltung von Spezifikationen, Qualitätsmaßstäben und rechtlicher Vorgaben im Bereich der Nahrungsmittel. Durch ständig verfeinerte Analysetechniken mit zum Teil extrem niedrigen Nachweisgrenzen konnte man in Konzentrationsbereiche vorstoßen, die vor einigen Jahren noch nicht denkbar waren.

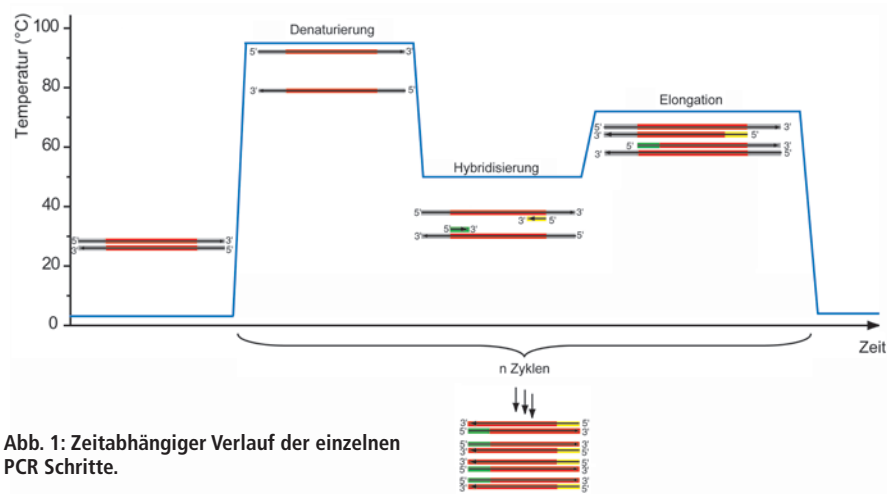


Abb. 1: Zeitabhängiger Verlauf der einzelnen PCR Schritte.

Gentechnische Veränderungen oder auch mikrobielle Kontaminationen lassen sich am einfachsten auf DNA-Ebene mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren nachweisen. Angewandt wird bevorzugt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von genmanipulierten Pflanzenteilen in Lebensmitteln, zum Nachweis von bakteriellen oder viralen Verunreinigungen in Lebensmitteln, zur Überprüfung der Tierart-Kennzeichnung und zur Herkunftsanalyse von tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln.

a) Die qualitative PCR

Bei jeder Zellteilung müssen die DNA-Doppelstränge zunächst in ihre

Einzelstränge getrennt und anschließend mit Hilfe der DNA-Polymerase kopiert (repliziert) werden. Abweichend vom in vivo System werden bei der PCR die Doppelstränge durch Hitze getrennt und eine temperaturstabile DNA-Polymerase verwendet.

Das Prinzip der qualitativen in vitro Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA (Desoxy-Ribonukleinsäure) wurde 1983 von Kary Mullis erfunden, beruht auf einer exponentiellen Vermehrungsrate der DNA und wird als Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“) oder kurz als PCR bezeichnet. Das Verfahren lässt sich wie folgt beschreiben (Abb. 1):

Es basiert zunächst auf der Denaturierung einer doppelsträngigen

DNA (Matrize) durch Energiezufuhr, d.h. Temperaturerhöhung auf ca. 95°C. Eine anschließende Temperaturniedrigung ermöglicht die Anlagerung (Hybridisierung oder Annealing) von im Überschuss vorhandenen spezifischen synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die 3'-Enden der zu kopierenden Bereiche der Matrizen-DNA. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primersequenzen ab und liegt normalerweise 2–3°C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65°C. Die Primer werden durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in Anwesenheit von freien Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP's) matrizenabhängig verlängert (Elongation). Die Elonga-



tions-Temperatur hängt von der verwendeten DNA-Polymerase ab, sie liegt zwischen 68 und 72 °C. Durch mehrfache Wiederholung der Denaturierung, der Anlagerung der Primer und der Verlängerung durch die DNA-Polymerase wird eine exponentielle Vermehrung (2^n) der Matrizen-DNA erreicht. Die PCR bietet in Kombination mit einer thermostabilen DNA-Polymerase (aus hyperthermophilen Mikroorganismen isoliert; z.B. Taq) den Vorteil, dass alle Komponenten (DNA, Matrize, Oligonukleotide, dNTPs, Puffer) in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt werden und die DNA vollautomatisch in einem DNA-Thermal-Cycler amplifiziert werden kann. Durch die exponentielle Amplifikation ist die Sensitivität der PCR sehr hoch – minimale Mengen an Matrizen-DNA sind bereits ausreichend für einen erfolgreichen Nachweis.

Nach der PCR wird das spezifisch amplifizierte DNA-Fragment entweder in einer Agarose- oder einer Polyacrylamid-Gelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Interkalationsfarbstoffes (z.B. Ethidiumbromid) oder unter Verwendung

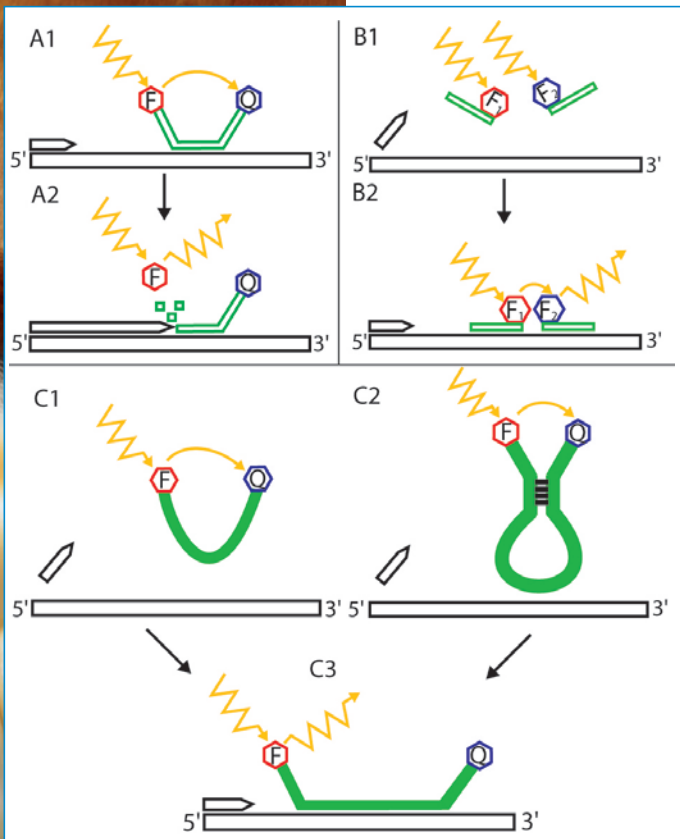
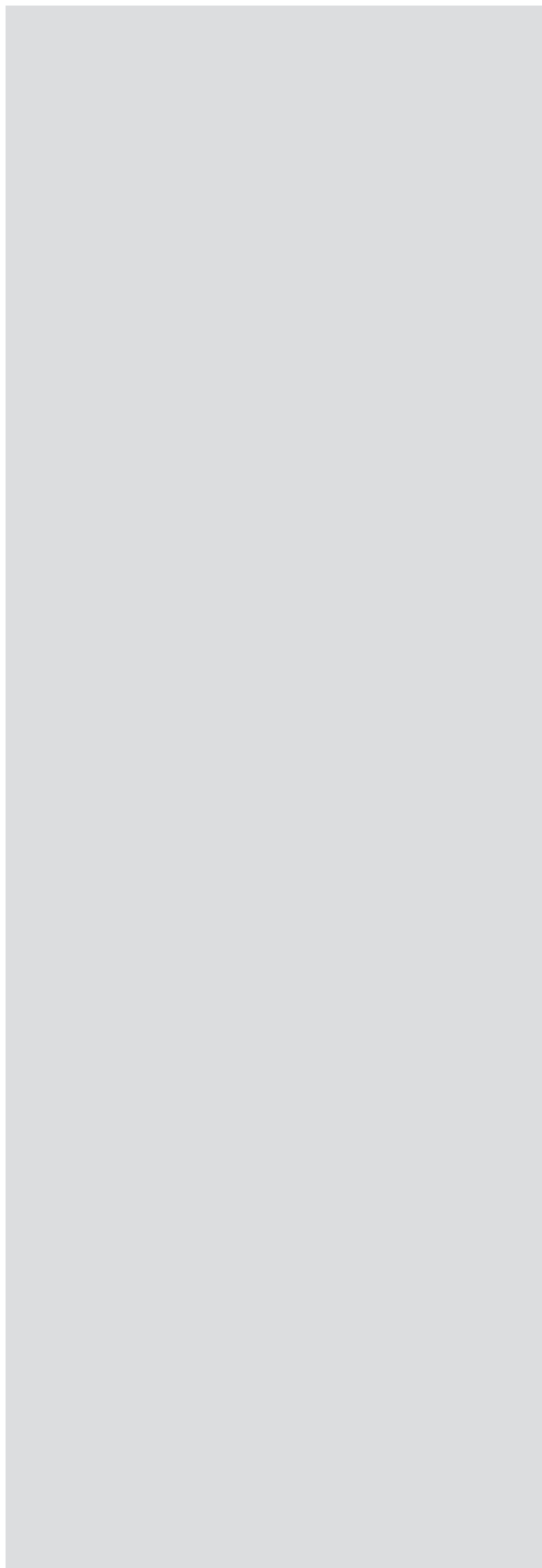


Abb. 2: RT-PCR. Detektion mit einer TaqMan-Sonde (A1, A2), FRET-Sonde (B1, B2), Quantiprobos (C1, C2) oder einer Molecular-Beacons-Sonde (C2, C3). B1, C1, C2, Denaturierung; B2, C3, Annealing; A2, Elongation; F, Fluorophor; Q, Quencher.



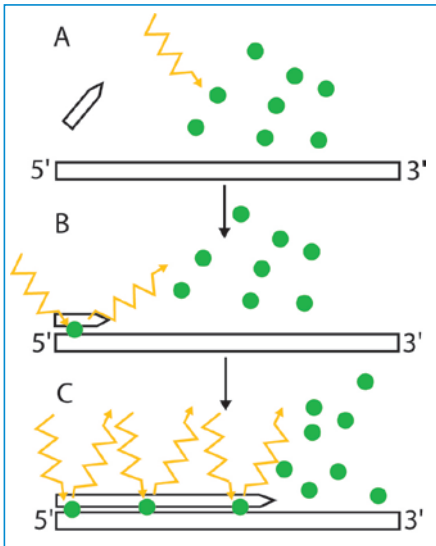


Abb. 3: RT-PCR mit SYBR -Green I. A, Denaturierung; B, Annealing; C, Elongation

von Silbernitrat angefärbt. Amplifikate können auch mit Hilfe des ELISA-Verfahrens detektiert werden. Hierbei wird die PCR mit Biotin markierten Primern durchgeführt. Nach erfolgter Fixierung der Amplifikate auf einer Mikrotiterplatte können diese mit Hilfe spezifisch bindender, markierter Moleküle (bei Biotin i.d.R. Streptavidin) photometrisch detektiert werden. PCR-ELISA Verfahren sind in der Literatur für den Nachweis von bakteriellen Kontaminationen in Lebensmitteln und zum Screening von gentechnisch veränderten Organismen, wie z.B. Bt176 Mais in Mehl und Stärke, beschrieben. Durch Standardisierungs-Methoden sind hier semiquantitative Aussagen möglich.

Die Spezifität und die Sensitivität der qualitativen PCR Methode beruhen auf selektiv bindenden Primer-Paaren, durch die sowohl der amplifizierte Genlokus als auch die Länge des Amplifikats definiert werden. Dieses Ergebnis kann mit verschiedenen Methoden, wie „Nested-PCR“, d.h. in diesem Fall dient das zunächst erhaltene DNA-Fragment als Matrize für eine weitere PCR mit anderen Primer-Kombinationen, Restriktionsverdau (siehe PCR-RFLP), DNA-Sequenzierung, oder auch durch Hybridisierung mit markierten Sonden, bestätigt werden.

b) Die quantitative PCR oder Real-Time-PCR

Die „Real-Time-PCR“ ist eine Weiterentwicklung des qualitativen PCR-Verfahrens. Hierbei wird während der Reaktion die Menge des gebildeten PCR-Produktes fluorimetrisch gemessen und anschließend die ursprünglich in die Reaktion eingesetzte Matrizen-DNA-Menge (Kopienzahl) berechnet. Als Detektionshilfsmittel werden je nach Fragestellung und Geräteausrüstung unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (Real-Time-Proben) eingesetzt. Das Prinzip der Detektion beruht auf der Anregung (Extinktion) der ein-

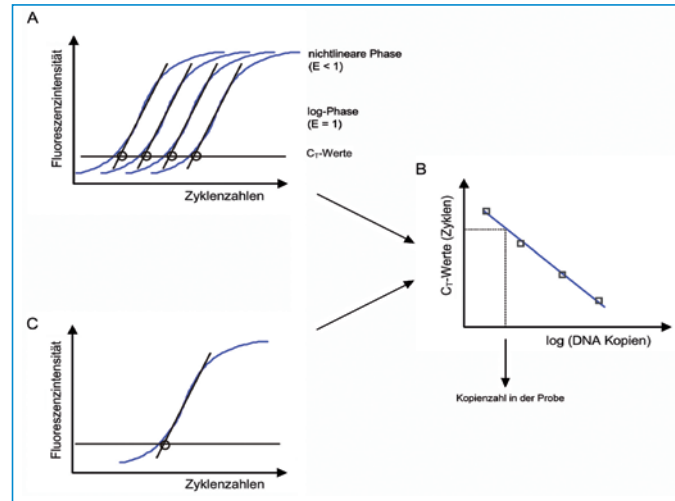


Abb. 4: Absolute Quantifizierung mit externen Standards. A, Amplifikationskurven von Standardfragmenten bekannter Kopienzahl; B, Standardkurve aus A resultierend; C, Amplifikationskurve einer Probe mit unbekannter Konzentration. Anhand des gemessenen C_T -Wertes kann Kopienzahl der unbekanntenen Probe aus der Standardkurve ermittelt werden (gestrichelte Linien in B).

gesetzten Fluorophore durch kurzwelligeres Licht, worauf höherwelligeres Licht abgestrahlt (Emission) und gemessen wird. Damit die im Überschuss vorhandenen Real-Time-Proben nicht permanent, sondern nur nach erfolgreich verlaufender Amplifikation Licht emittieren, wurden verschiedene Methoden zur Unterdrückung unspezifischer Signale entwickelt.

Das TaqMan-System basiert auf der Quencher-Methode, wobei ein zweites Molekül – ein Quencher-Molekül neben dem Fluoreszenzfarbstoff – an die Real-Time-Probe (TaqMan-Sonde) kovalent gebunden wird. Liegt das Oligonukleotid frei, d.h. nicht in ein PCR-Produkt eingebunden vor, findet bei Anregung des Fluorophors ein Energietransfer auf das Quencher-molekül statt. Die messbare Fluoreszenz wird erst im Laufe der PCR mit Hilfe des sog. „5'-Nuklease Assays“ generiert, indem der Fluorophor durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase aus der fluoreszenzmarkierten Real-Time-Probe freigesetzt wird, die spezifisch an die nachzuweisende DNA-Sequenz bindet (Abb. 2A). Anwendung findet das TaqMan-System beim Nachweis und der Quantifizierung von gentechnisch verändertem Mais oder Soja in Lebensmitteln und bei der Quantifizierung des Aflatoxin-bildenden Pilzes *Aspergillus flavus* in Mais, Pfeffer und Paprika.

Neben dem TaqMan-System werden noch andere auf der Quencher-Methode basierende Real-Time-Techniken, wie z.B. das Molecular-Beacons-System, das Quantiprobe-System, oder das FRET-System eingesetzt (Abb. 2B, 2C).

Eine Alternative zu fluoreszenz-markierten Sonden stellt die Real-Time-Quantifizierung von PCR-Produkten mit Hilfe des Doppelstrang-DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green dar (Abb. 3). In Abhängigkeit der Quantität amplifizierter DNA steigt hierbei die Fluoreszenzintensität an. Bhagwat entwickelte eine Methode zur simultanen PCR-gestützten Detektion der hu-

manpathogenen Bakterienstämme *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* ssp. in frischen Produkten. Bedeutung erlangte das SYBR-Green-Verfahren beim Nachweis von Gluten in Gluten-freier Nahrung.

Um zu reproduzierbaren quantitativen Werten zu kommen, ist eine Standardisierung sowohl der DNA-Extraktion als auch der PCR notwendig. Die Zahl der amplifizierten Moleküle hängt neben der Effizienz (E) der Reaktion auch von der Menge und der Qua-

lität der eingesetzten DNA (N_0) ab ($N = N_0 \times (E+1)^n$; N_0 , Anzahl der Moleküle vor der PCR; N, Anzahl der vervielfältigten Moleküle; n, Anzahl der Zyklen). Mögliche Schwierigkeiten beim Einsatz der PCR als analytisches Verfahren entstehen insbesondere bei der Isolierung eines geeigneten DNA-Präparates. Die DNA muss ausreichend rein sein, da eine Reihe von Lebensmittelinhaltsstoffen (z.B. Proteine, phenolische Verbindungen oder Salze) schon in sehr geringen Konzentrationen die PCR inhibieren und somit die Effizienz der PCR verringern können. Zusätzlich nimmt die Effizienz im Laufe der PCR ab. Verursacht wird dieses nicht-lineare Verhalten beispielsweise durch Reassoziierung der PCR-Produkte, Abnahme der Reagenzienkonzentration, Polymeraseinstabilität oder Produktinhibition (z.B. Akkumulierung von Pyrophosphaten). Eine Quantifizierung kann deshalb nur als log-Phasenanalyse, d.h. in der Phase mit konstanter Effizienz, erfolgen. Der Messpunkt wird als *threshold-cycle* (C_T -Wert) oder als *crossing point* (C_P -Wert) bezeichnet. Der C_T -Wert bezeichnet die Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird und befindet sich am Anfang der logarithmischen Phase.

Bei allen genannten Methoden kann eine absolute Quantifizierung der Fluoreszenzsignale und damit der vorhandenen DNA, letztlich anhand von Standard-DNA-Fragmenten mit bekannten Konzentrationen erfolgen (Abb. 4). Die dabei gemessene Fluoreszenz während der Amplifikation wird hierbei in Abhängigkeit der PCR-Zyklenzahl gestellt. Alternativ wird bei der relativen Quantifizierung die DNA-Menge mit einem internen Standard ins Verhältnis gesetzt.

c) Die Multiplex-PCR

Die meisten PCR-basierten Nachweisverfahren beruhen auf dem Nachweis von einem einzelnen Gen. So

sind beispielsweise Primer zum spezifischen Einzelnachweis von Maximizer Mais (Event 176 von Syngenta) und RoundupReady Soja in der Literatur beschrieben. Multiplex-PCR ist eine weiterentwickelte Methode bei der mehrere Gene bzw. mehrere gentechnisch veränderte Organismen simultan in einem Reaktionsansatz nachgewiesen werden können. Von mehreren Autoren konnte gezeigt werden, dass sich diese Methode hervorragend zur schnellen Detektion von GMOs eignet. Permingeat et al. entwickelten eine Multiplex-PCR-Methode zum parallelen Nachweis zweier Transgene (CryIA(b) und pat) in vier gentechnisch veränderten Maislinien (Event 176, MON810, BT11, T25) unter Verwendung von lediglich zwei Primer-Paaren. Von Matsuoka et al. konnte ein Multiplex-PCR-System zur Unterscheidung von fünf Maislinien mit Hilfe spezifischer Primer-Paare etabliert werden. Demeke et al. entwickelten ein Verfahren zum simultanen Nachweis dreier Rapslinien. Von Delano et al. wurde ein System zur zuverlässigen Detektion und Identifizierung von gentechnisch verändertem Mais, Soja und Raps entwickelt. Ebenso wird die Multiplex-PCR zum simultanen Nachweis verschiedener bakterieller Krankheitserreger in Lebensmitteln eingesetzt.

d) Die Reverse-Transkriptase-PCR

Bakterielle Infektionen, die durch Lebensmittel übertragen werden, stellen eine weltweit ernst

zunehmende Problematik dar. Wasserverschmutzung oder andere Kontaminationen können die Ursache für eine bakterielle Infektion von Obst und Gemüse darstellen. Eine schnelle und sichere Identifizierung pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln ist sowohl für die Qualität als auch für die Lebensmittelsicherheit wichtig.

Aufgrund der außerordentlichen Stabilität von DNA kann ein konventioneller PCR-gestützter Nachweis von Mikroorganismen nicht zwischen DNA aus toten bzw. lebenden Zellen unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen lebensfähigen und toten Zellen ist aber zur Beurteilung der Qualität des Lebensmittels in vielen Fällen unumgänglich. Meistens hilft hier eine Voranreicherung der Mikroorganismen, d.h. eine Vermehrung der Erreger in einem Voranreicherungsmedium. Eine weitere Möglichkeit bietet der Nachweis von RNA. Da diese sehr viel schneller abgebaut wird als DNA, ist sie nur in lebenden Zellen nachweisbar. RNA kann nicht direkt durch Einsatz der PCR amplifiziert werden, sie muss erst mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase in DNA umgeschrieben werden. Nach erfolgter reverser Transkription kann die erhaltene cDNA mit allen hier beschriebenen PCR-Verfahren qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Marois et al. entwickelten eine RT-PCR-Methode zum Nachweis von lebensfähigen *Mycoplasma synoviae* Zellen in Geflügel über reverse Transkription der

bakteriellen 16S rRNA. Andere Autoren konnten lebensfähige Salmonellen über reverse Transkription und anschließender PCR von mRNA nachweisen. Der Nachweis von Tomato spotted wilt virus (TSWV), eines der wichtigsten Pflanzenviren und dessen Vektor *Frankliniella occidentalis* gelang Mason et al. ebenfalls mit Hilfe der RT-PCR. Neben Pflanzenviren stellen auch humanpathogene Viren, z.B. Rotaviren (Verursacher der infantilen Diarrhoe), Hepatitis A Virus (HAV) oder Norwalk-like-Virus (NLV) eine von kontaminierten Lebensmitteln ausgehende Bedrohung dar, die mittels RT-PCR-Verfahren erkannt werden kann.

Literatur bei den Autoren erhältlich.

► KONTAKT

PD Dr. Markus Fischer
Dr. Ilka Haase
Technische Universität München, Garching
Tel.: 089/289-13336
Fax: 089/289-13363
markus.fischer@ch.tum.de
www.food-chemistry.com