
Bestimmung von Aprikosenkernbestandteilen in Marzipan und Marzipanvorstufen mittels Realtime-(Sonden)-PCR

Wolfgang Weber[#] und Wolfgang Hauser

ifp Institut für Produktqualität GmbH, Teltowkanalstr. 2, D-12247 Berlin, Deutschland

Zusammenfassung

Es wird ein molekularbiologischer Realtime-PCR-Test mittels Hybridisierungssonden zum Nachweis und zur Bestimmung von Aprikosenkernen (*Prunus armeniaca*) in Marzipan und Marzipanvorstufen vorgestellt. Die Nachweisgrenze liegt unter 0,1%. Es wird der prozentuale Aprikosenkern-DNA-Anteil am Gesamtanteil extrahierter DNA detektiert. Die Zielsequenz (target) hierfür ist das Gen für das Lipid Transfer Protein I in Aprikosen mit 119 bp. Die Methode ist 100% spezifisch auf Aprikose und erlaubt eine semi-quantitative Aussage.

Summary

A molecular biological Realtime PCR test using hybridization probes for the detection and determination of apricot kernels (*Prunus armeniaca*) in marzipan and semi-finished marzipan products is presented. The detection limit is below 0.1%. The method detects the percentage of apricot kernel DNA in the total amount of extracted DNA. The target sequence for this is the gene for the lipid transfer protein I in apricots with 119 bp. The method is 100% apricot-specific and permits semi-quantitative statements.

Keywords: Aprikosenkerne, Marzipan, PCR, Realtime PCR, Hybridisierungssonden, Produktreinheit / Apricot kernels, marzipan, semi-finished marzipan products, Realtime PCR, hybridization probes, product purity

Ausgangssituation

Nach den Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuches für Ölsamen und daraus hergestellte Massen und Süßwaren¹⁾ besteht Marzipanrohmasse hauptsächlich aus süßen Mandeln. Bittermandeln werden in geringen Mengen für die Geschmacksgebung zugegeben. Der Zusatz von Aprikosenkernen und Bergmandeln ist nicht erlaubt. Für die Süßwarenindustrie ist die Produktreinheit und -identität von Marzipan von großer Bedeutung. In der Vergangenheit

[#] Dr. Wolfgang Weber, Tel.: 030-7668-60-0; Fax: 030-7668-60-50;
E-Mail: weber@produktqualitaet.com; Internet: www.produktqualitaet.com

wurde immer wieder versucht, Aprikosenkernbeimischungen mittels Tocopherolspektren zu identifizieren. Dies gelingt aber bei Beimischungen unter 10 % nicht bzw. ist die Aussage nicht eindeutig. Tocopherolspektren können nur zur Unterscheidung zwischen den Rohstoffen Mandel und Aprikose herangezogen werden. Immunologische Verfahren konnten auf Grund der hohen Verwandtschaft zwischen Mandel und Aprikose und der daraus resultierenden Kreuzreaktivität von gewonnenen Antisera bis heute nicht etabliert werden. Als Methode der Wahl steht heute die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Verfügung²⁻⁴.

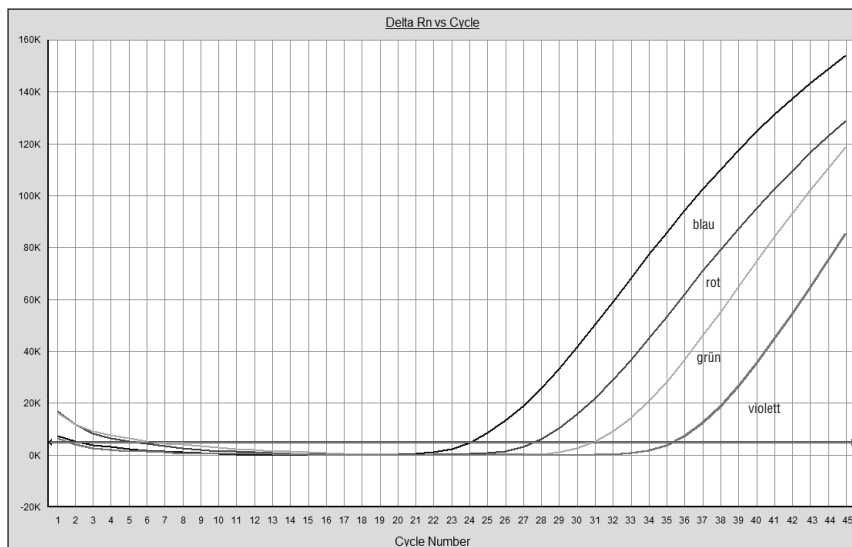


Abb. 1 Amplifikationsblots Aprikosenstandards 100 % (blau), 10 % (rot), 1 % (grün), 0,1 % (violett) Aprikosen-DNA

Extraktion der Proben

Die DNA wird aus den zu untersuchenden Marzipanproben mittels klassischer CTAB-Extraktion⁵ isoliert. Für eine repräsentative Probeneinwaage werden 2-mal eine 2 g Probe mit jeweils 10 ml Lysepuffer versetzt und mit Proteinase K die DNA freigesetzt. Nach Fällung der DNA und Aufreinigung wird der DNA-Gehalt der Probe auf einen einheitlichen DNA-Gehalt eingestellt (100 ng Gesamt-DNA pro PCR-Reaktion).

Kalibrierung

Als Kalibrator dient eine 1 : 10 Verdünnungsreihe einer Aprikosen-DNA. Der erste Kalibrator wird dabei auf 100 ng DNA pro PCR-Reaktion eingestellt (entspricht 100 % Aprikosen-DNA).

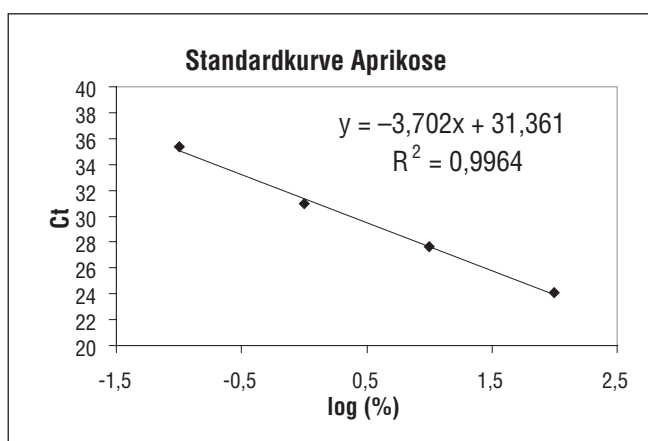


Abb. 2 Geradengleichung der Standards aus vier Einzelbestimmungen

PCR-Bedingungen

Die Durchführung der PCR erfolgt in Realtime mit Hybridisierungssonden unter folgenden Bedingungen:

Die Primer Apr-LF1 (5'-TTATCTGCGT-CAAGCTCACA-3') und Apr-LR1 (5'-GATCATTGAAATTTTGGTCTAGC-3') werden mit einer Konzentration von je 750 nM, die Sonde Apr-LS1 (5'-Fam-TGTTGACAATTAATGCGGAATATT-TAMRA-3') mit einer Konzentration von 220 nM im 25 µl PCR Ansatz eingesetzt. Als MasterMix wird der TaqMan® Universal PCR MasterMix von Applied Biosystems verwendet und die Amplifikation findet im Applied Biosystems 7500 Realtime Cycler mit folgendem Temperaturprofil statt:

Tab. 1 Spezifität PCRFast® Aprikosenkerne Realtime (+: Amplifikation; -: keine Amplifikation)

Spezies		Spezies		Spezies		Spezies	
Aprikosen							
Südafrika, bitter	+	China, bitter 1	+	Türkei, bitter 1	+	Iran, bitter	+
Türkei, süß 1	+	China, bitter 2	+	Türkei, bitter 2	+	Griechenland, bitter	+
Türkei, süß 2	+	China, bitter 3	+	Syrien, bitter	+	China, süß	+
Mandeln							
Italien, süß	-	Kalifornien, süß	-	Iran, bitter	-	Marokko, bitter	-
Afghanistan	-	Griechenland	-	Spanien, bitter	-	Syrien, bitter 1	-
Türkei, bitter	-	Kalifornien	-	Mandel, bitter	-	Syrien, bitter 2	-
Spanien 1	-	Spanien 2	-				
Andere							
Bergmandel	-	Kirsche	-	Cashew	-	Pflaume	-
Pekannuss	-	Erdnuss	-	Haselnuss	-	Walnuss	-
Buchweizen	-	Pistazie	-	Mais	-	Soja	-

Tab. 2 Ct-Werte und Quantifizierung verschiedener Proben

Probe	Ct-Wert	Quantifizierung
Probe 2 % A	30,17	ca. 2 %
Probe 2 % B	30,26	ca. 2 %
Probe 0,5 % A	32,63	ca. 0,5 %
Probe 0,5 % B	32,04	ca. 0,6 %
Mischung 5 % syrische, bittere Aprikose	28,7	ca. 5 %
Mischung 5 % chinesische, bittere Aprikose	28,07	ca. 7 %
Mischung 5 % türkische, süße Aprikose	28,47	ca. 6 %
10 ng syrische, bittere Aprikose	27,53	ca. 11 %
10 ng chinesische, bittere Aprikose	27,63	ca. 11 %
10 ng türkische, süße Aprikose	27,8	ca. 10 %
Probe 1 A	37,22	< 0,1 %
Probe 1 B	37,84	< 0,1 %
Probe 2 A	37,75	< 0,1 %
Probe 2 B	37,2	< 0,1 %
Probe 3 A	29,76	ca. 3 %
Probe 3 B	29,49	ca. 3 %
Probe 4 A	30,71	ca. 2 %
Probe 4 B	30,25	ca. 2 %

95 °C für 10 min, 45 Zyklen mit 95 °C für 15 sec und 60 °C für 1 min.

In den folgenden Abbildungen sind die Amplifikationsplots der Standards sowie die Standardkurve dargestellt.

Sensitivität

Die Methode erlaubt eine Bestimmung des Aprikosenanteils von weniger als 0,1 %.

Spezifität

Der Test ist 100 % spezifisch auf Aprikose. Die Spezies in Tabelle 1 wurden mit jeweils 100 ng DNA auf Kreuzreaktivität getestet.

Analyse von Referenzproben und Proben

Tabelle 2 fasst beispielhaft die Messergebnisse von Marzipanproben mit bekannten Aprikosenkerngehalten (2 % und

0,5 %), 5 % Mischungen von verschiedenen gemahlene Aprikosenkernen auf gemahlene Mandeln, 10 ng Gesamt-DNA von Aprikosenkernen und 4 unbekannten Marzipanproben zusammen.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Amplifikationsplots verschiedener Aprikosen-DNAs (süß und bitter) beispielhaft sowie die Amplifikationsplots der 5 %-Mischungen. Es konnte gezeigt werden, dass der gesuchte DNA-Abschnitt in allen Aprikosen, die als Referenz dienten, die gleiche Amplifikationseffizienz hat und somit für die Quantifizierung herangezogen werden kann (Abb. 3).

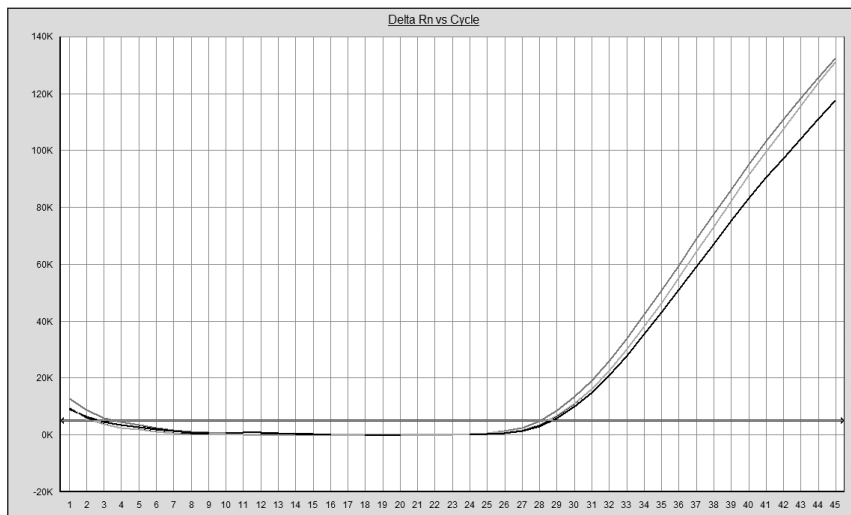


Abb. 3 Amplifikationsplots von 10 ng Aprikosen-DNAs Verschiedener Herkunft und Arten

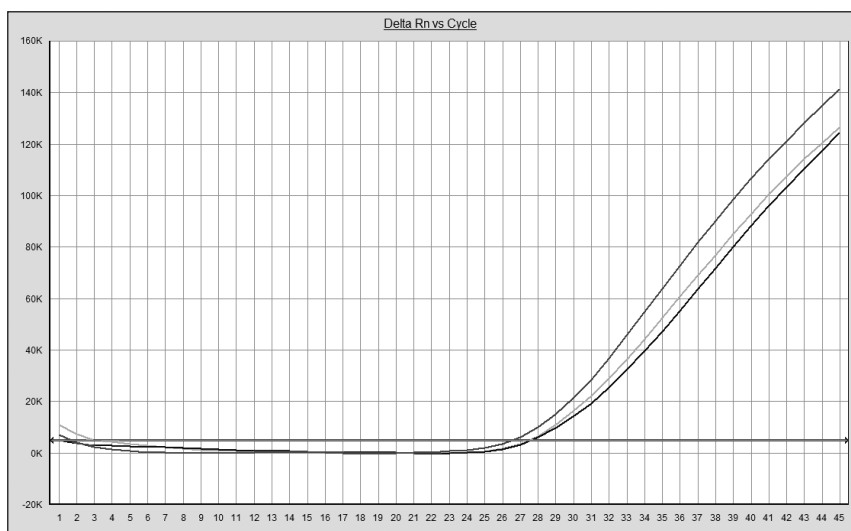


Abb. 4 Amplifikationsplots der 5 % Mischungen (Kurven von links: rot-grün-rot)

Genauigkeit der Methodik

Grundsätzlich sollten in der PCR die Proben im Doppelansatz aufgearbeitet werden. Eine größere Abweichung als 30 % zwischen einer Doppelbestimmung sollte nicht akzeptiert werden. Die Richtigkeit des Ergebnisses ist abhängig von der genauen Einstellung der Gesamt-DNA pro Reaktion. Dafür muss die DNA in aufgereinigter Form vorliegen bzw. keine inhibitorischen Begleitstoffe für die PCR-Reaktion enthalten.

Diskussion und Ergebnisse

Die hier vorgestellte Realtime PCR-Methode mit Hybridisierungssonden erlaubt die zuverlässige Detektion von Aprikosenbestandteilen in Marzipanen und Marzipanvorstufen bis unter 0,1 %. Die Methode wurde mit allen im Markt zur Verfügung stehenden bitteren und süßen Aprikosenkernen aller Herkunftsländer sowie mit allen im Markt zur Verfügung stehenden süßen und bitteren Mandeln validiert. Kreuzreaktionen konnten nicht festgestellt werden, die Methode ist somit als hochspezifisch einzustufen.

Die Erfahrung zeigt, dass die Qualität der DNA für die semi-quantitative Bestimmung von entscheidender Bedeutung ist. Schwankungen in der quantitativen Auswertung sind bedingt durch die Art der DNA-Extraktion und Qualität der isolierten DNA. Die vorgestellte Methode kann zur halbquantitativen Aussage herangezogen werden. Dies konnte mit eigens hergestellten Referenzmaterialien verifiziert werden.

Mit der Methode können zukünftig unbeabsichtigte Verunreinigungen und beabsichtigte Beimischungen von Aprikosenkernen eindeutig und sicher nachgewiesen werden. Das Verfahren eignet sich somit für die Qualitätskontrolle in der Herstellung als auch zur Überprüfung von Importwaren.

Das ifp Institut für Produktqualität verfügt über weitere molekularbiologische und immunologische Nachweisverfahren zur Überprüfung der Reinheit von Marzipanen und Ölsaatprodukten. Zum weiteren Nachweis-Portfolio gehört der PCR-Nachweis von Bergmandeln, Soja, Cashew und Lupine sowie der immunologische Nachweis von Kichererbsen, weiße Bohnen, Lupinen und Cashew mit spezifischen Antiseren, gewonnen aus Schafen und Kaninchen.

Literatur

- 1) Leitsätze des Deutschen Lebensmittelbuches, Verkehrsbezeichnung, Zusammensetzung und Qualität. **Bundesanzeiger Verlagsges. mbH, Köln** (2003).
- 2) *Haque, K. A., R. M. Pfeiffer, M. B. Beerman, J. P. Struewing, S. J. Chanock, and A. W. Bergen*: Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnology* **3**, 20 (2003).
- 3) *Bustin, S. A.*: Review: Absolut quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169–193 (2000).
- 4) *Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis*: Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2002).
- 5) ISO 21571: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Methods for nucleic acid extraction.