



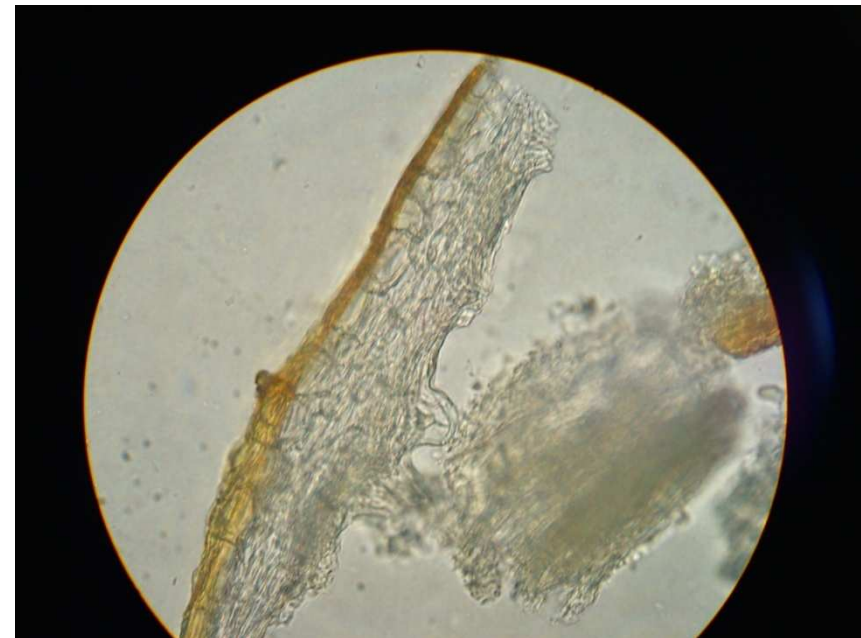
Molekularbiologische Methoden für die Lebensmittelanalytik am Beispiel der Gewürze

Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)



Warum überhaupt Gewürze?

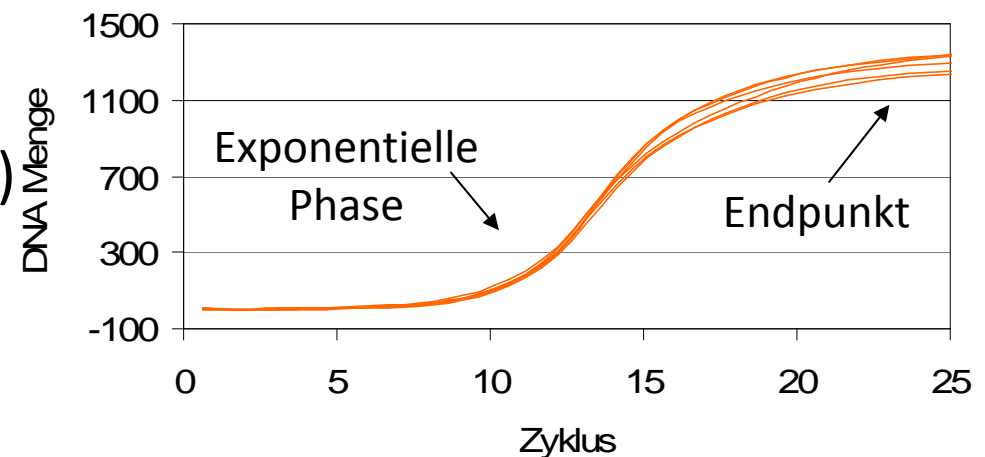
- Die Vielseitigkeit der Gewürz-Matrices lässt eine Anpassung der entwickelten Methoden an andere Fragestellungen in der Lebensmittelanalytik erwarten.
- Aktuelle Methode „der Wahl“ für die Differenzierung von Gewürzen: Mikroskopie →
- Molekularbiologische Methoden können von nicht speziell geschultem Personal angewendet werden.



Was sind das für Methoden?

- Nachweis von Organismen über ihre DNA.
 - Ähnliche Methoden werden z.B. in der Forensik genutzt.
 - Jeder Organismus enthält seine (spezifische) DNA.
 - Lebensmittel stammen (fast immer) aus Organismen.

- Etablierte Methode: PCR
(Polymerasekettenreaktion)
 - Spezifische DNA-Abschnitte werden kopiert und somit nachgewiesen

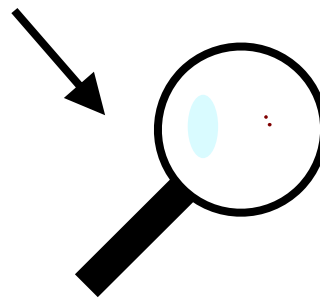


Mittels PCR können wenige ppm nachgewiesen werden:

500 g
Backmischung



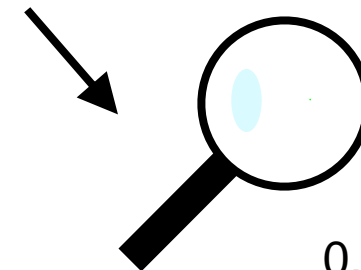
2 mg Senf



125 g
Rucola



0,1 mg
Kreuzkraut





Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)

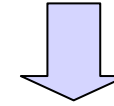
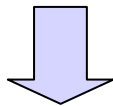
- Im Jahre 2000 von Notomi et al. zuerst beschrieben.
Kaum Methoden zu Lebensmittelzutaten (-kontaminanten).
- Isothermale Methode zur Amplifikation von DNA.
Reaktion ohne Thermocycler / außerhalb eines Labors.
- Größerer Substratumsatz im Vergleich zur PCR.
Detektion mit bloßem Auge / außerhalb eines Labors.



Entwicklung, Optimierung und Validierung:

DNA-Isolierung

- Einheitliche Methode zur Isolierung der DNA aus allen betrachteten Gewürzen



Endpunkt PCR

- als Gewürz-Nachweis



Endpunkt LAMP

- als Gewürz-Nachweis?

Real-time PCR

- zur quantitativen Bestimmung

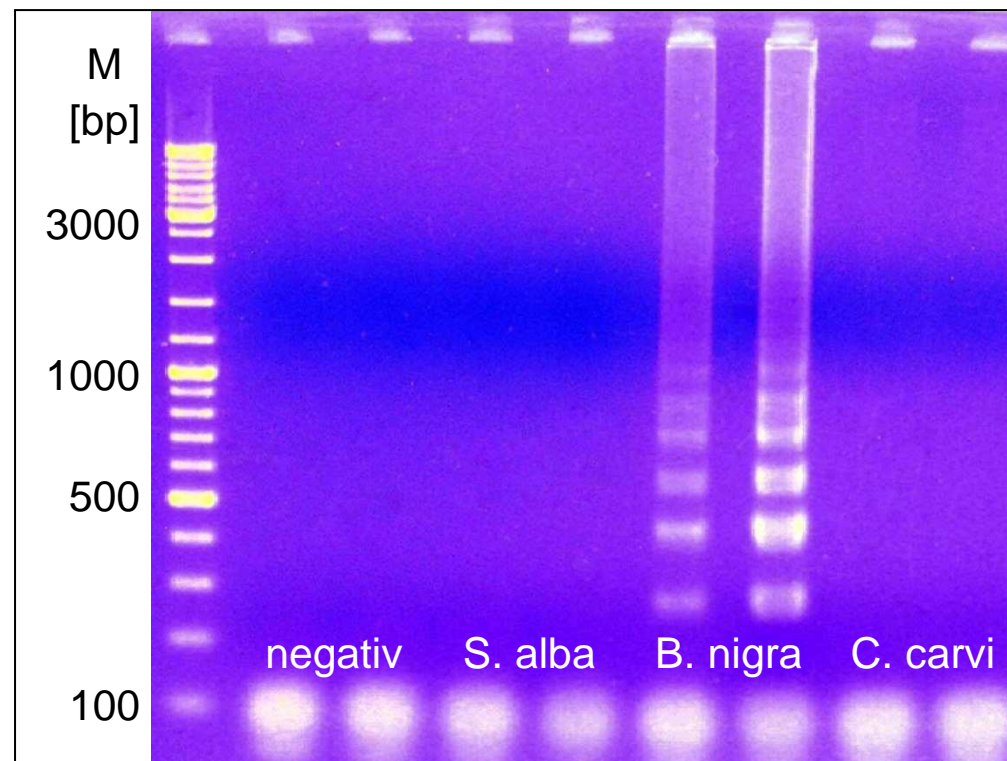


Real-time LAMP

- zur quantitativen Bestimmung?
- Charakterisierung der LAMP
- Ermittlung des Leistungspotentials

Ergebnis: LAMP als Gewürz-Nachweis

(Beispiel: Schwarzer Senf)

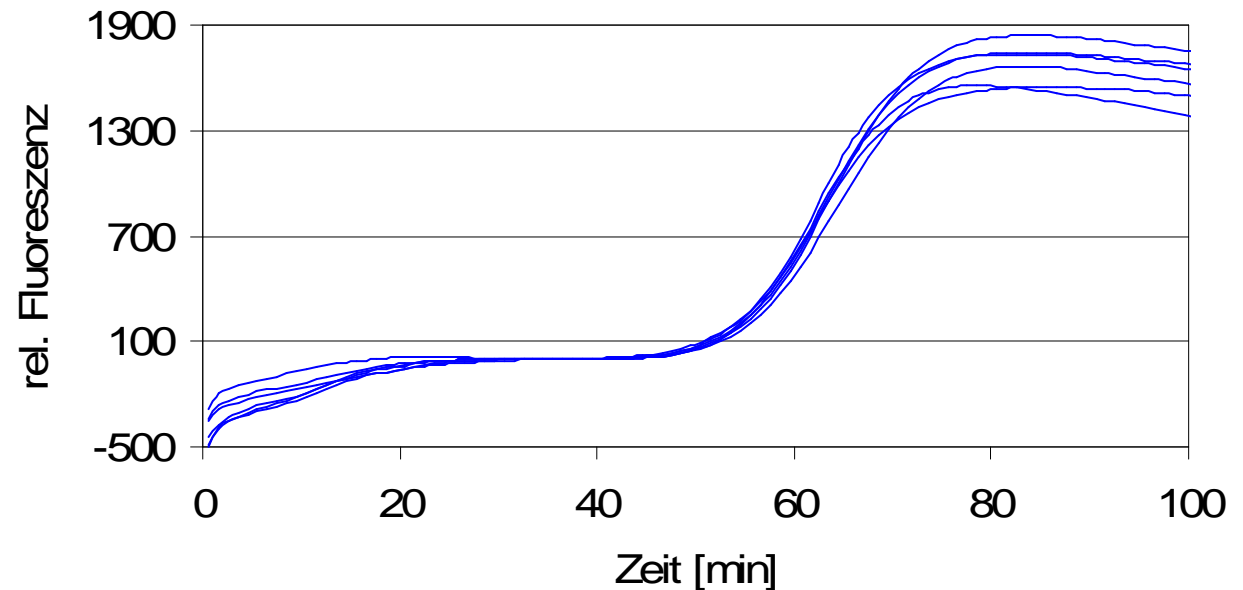


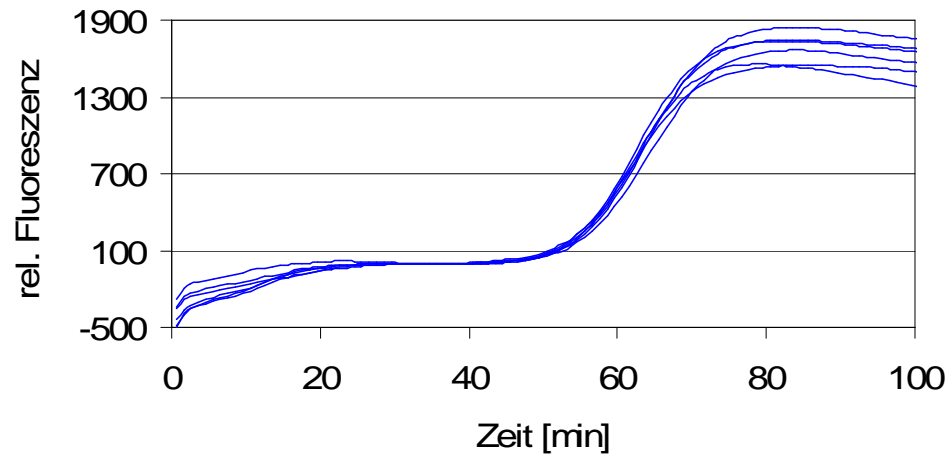
(Agarosegel, 2 %, Ethidiumbromidfärbung)

Quantitative Bestimmung mittels real-time-LAMP?

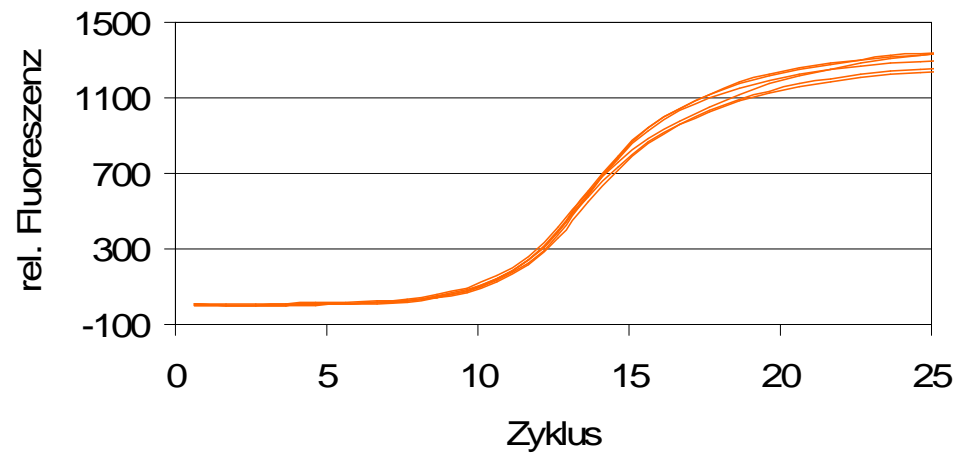
(Beispiel: Kümmel)

- Endpunkt LAMP:
 - Reaktionsansatz ergänzt um SYBR Green I.
 - Reaktionsbedingungen optimiert.
 - Fluoreszenz-Messung im real-time-Cycler.





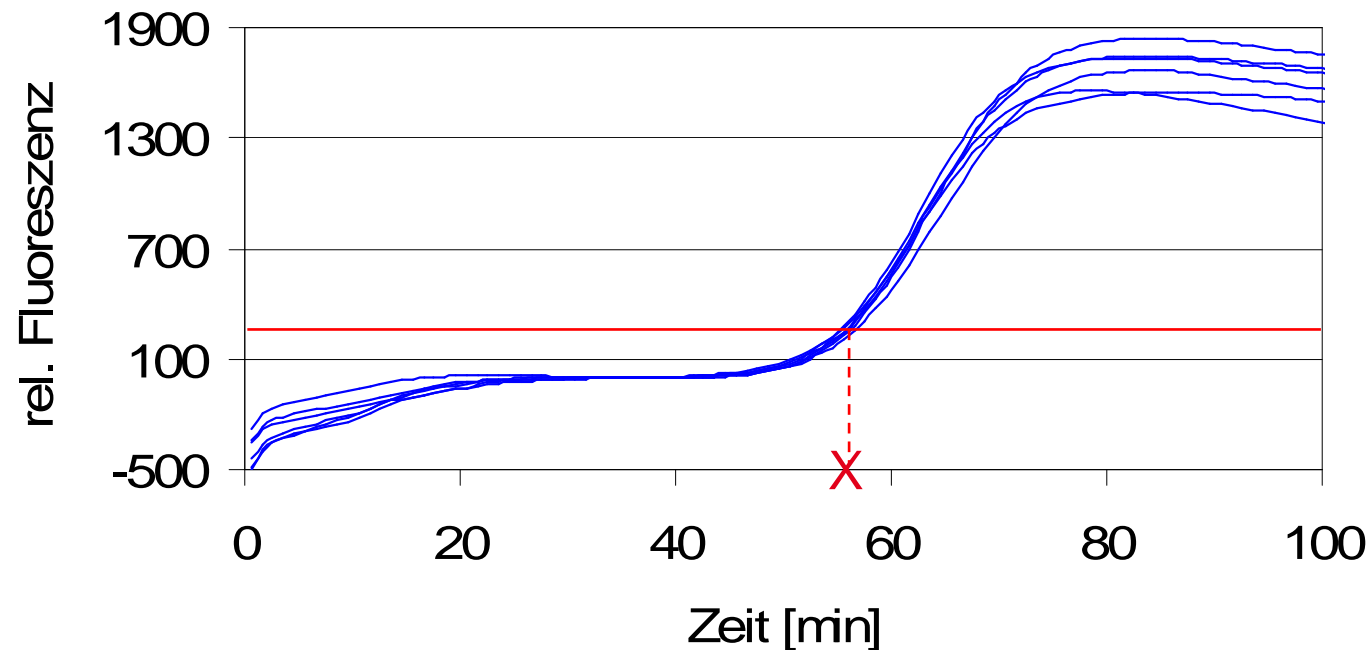
real-time LAMP



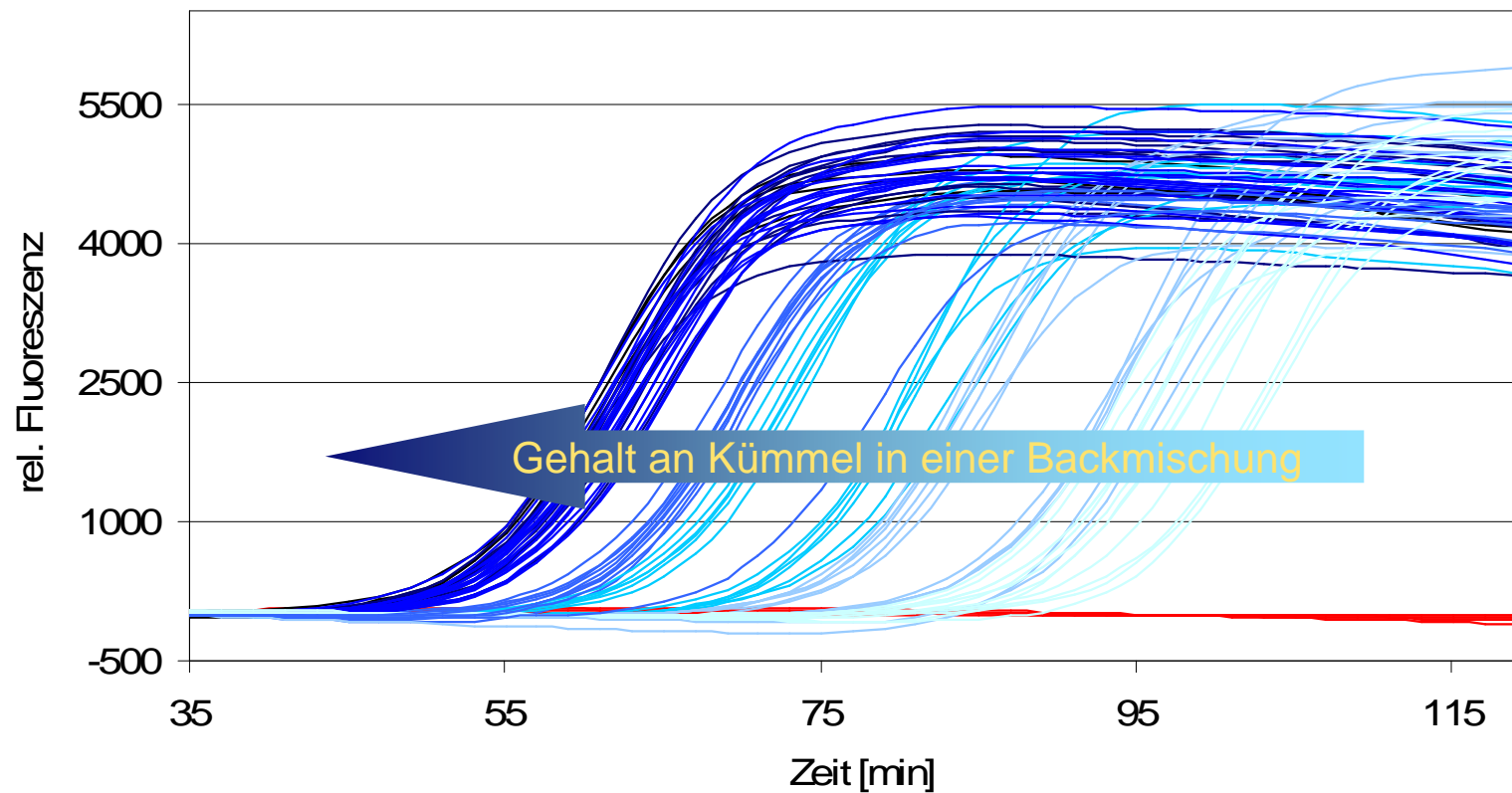
real-time PCR

Messgröße:

- PCR: C_t -Wert (Schwellenwert-Zyklus).
- LAMP: T_t -Wert (Schwellenwert-Zeit).



Korrelation zwischen T_t -Wert und DNA-Gehalt:



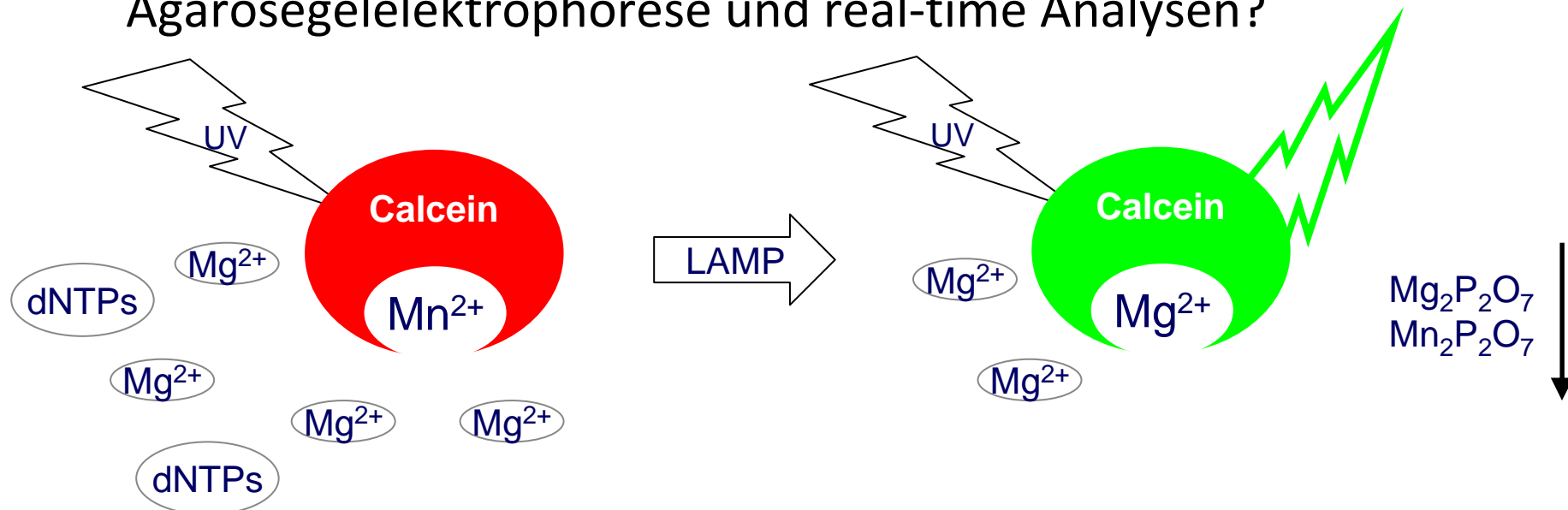


Die Vorteile der LAMP gegenüber der PCR?

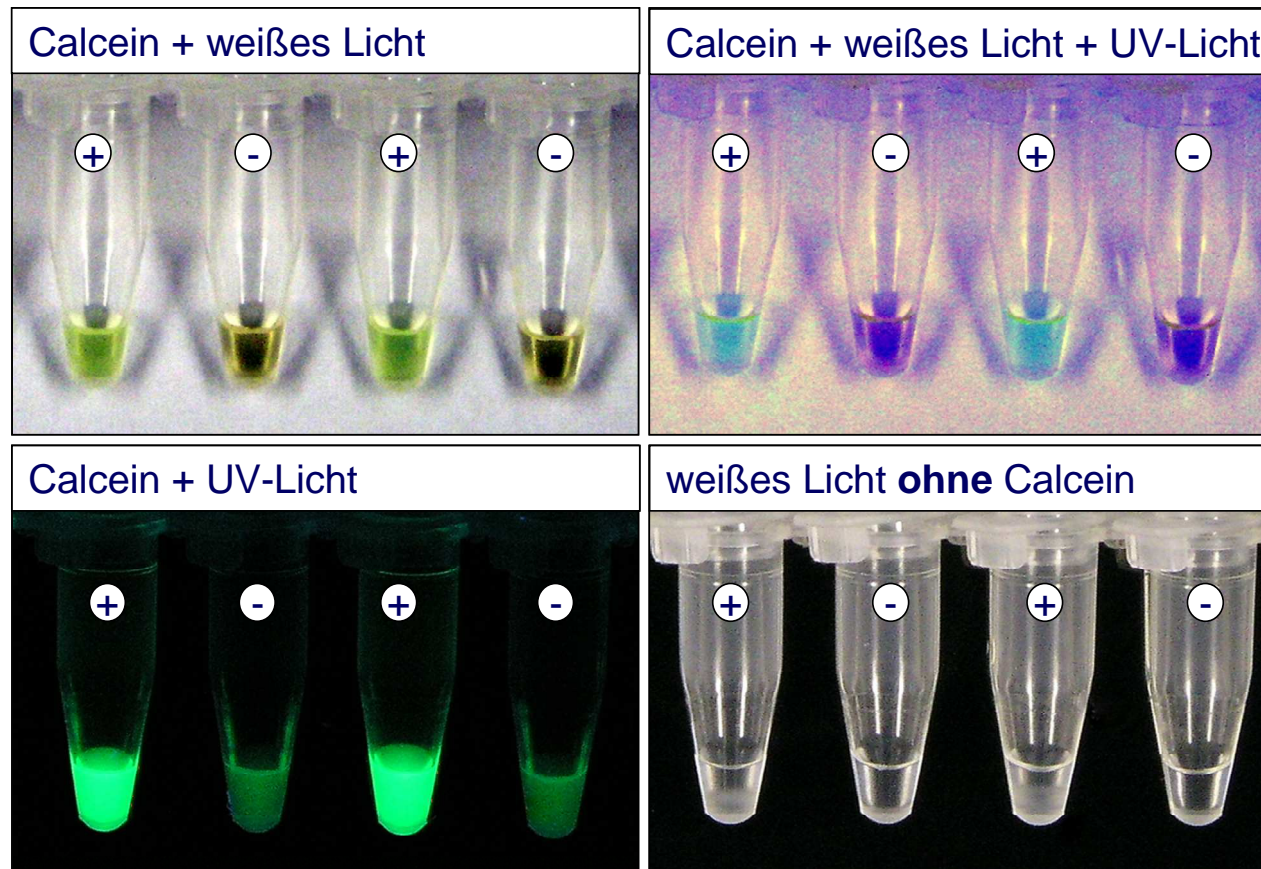
- Ein Nachweis der Gewürze ist mittels LAMP genauso wie mit der konventionellen PCR möglich.
- Mit Hilfe der real-time LAMP können Gewürzgehalte quantitativ erfasst werden.
- Die Leistungsgrenzen der LAMP liegen in ähnlichen Bereichen wie die der PCR.
- Wo sind die Vorteile der LAMP?

Vor-Ort-Analysen mittels LAMP?

- Die Amplifikation kann mit Hilfe einer „konstanten“ Wärmequelle (ohne Thermocycler) durchgeführt werden.
- Welche Möglichkeiten der Detektion bieten sich neben Agarosegelelektrophorese und real-time Analysen?



Detektion mit Calcein (Beispiel: weißer und schwarzer Senf)





Zusammenfassung - LAMP

- Die LAMP ermöglicht einen qualitativen Nachweis und eine quantitative Bestimmung von Gewürzen in Lebensmittelmatrices.
- Durch isothermale Reaktionsprotokolle und Detektionsverfahren mit dem bloßen Auge ermöglicht die LAMP eine Analytik „vor Ort“.
- **Fazit:** Die LAMP stellt für die Lebensmittelanalytik eine leistungsfähige Methode mit großem Potential in der Vor-Ort-Analytik als Alternative zur PCR dar.



Zusammenfassung - Überblick

- Methoden zur **DNA-Isolierung** aus **Gewürzen**. Anwendbarkeit der Methoden auf andere Lebensmittelmatrices (z.B. Kaffee) [1].
- MDA-basierte **Präamplifikation** zur Verbesserung des DNA/Inhibitor-Verhältnisses für „**schwierige**“ **Matrices** (z.B. Nelke, Piment) [1].
- **PCR-Nachweise** für **18 Gewürze**. Erweiterung der Methode z.B. für die Artendifferenzierung von Kaffee [1].
- **Real-time PCR** für die **quantitative Bestimmung** von allergenen Gewürzen (z.B. Senf und Sellerie). Erweiterung der Methode auf eine aktuelle Fragestellung (Kreuzkraut in Rucolasalat) [2].
- **LAMP-Methoden** als Alternative zur PCR [3].

[1] Focke et al. (2011) "DNA-based identification of spices: DNA isolation, whole genome amplification and polymerase chain reaction"

[2] Focke et al. (2011) "Determination of plant contaminants in food using real-time-PCR"

[3] Focke et al. (in prep.) "Development of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Methods as a Tool for Food Analysis"



Danke...

...für die Aufmerksamkeit!

...für die Unterstützung

- Prof. Dr. Markus Fischer
- Dr. Ilka Haase
- Philipp Brüning



... meinen Diplomanden

- Christian Schoefinius
- Johanna Schiller
- Dominique Tressat
- Sonja Schüssler
- Qi Chen
- Malte Oetting
- Annika Sötje
- Sandra Lorenz

für die tollen Arbeiten!



Danke...

... den Sponsoren:



KROHN
RECHTSANWÄLTE

