

DETEKTION VON POTENTIELL ALLERGENEM SELLERIE (*APIUM GRAVEOLENS*) MITTELS REAL-TIME PCR

Magdalena Fuchs^{a,b}, Margit Cichna-Markl^b, Rupert Hohegger^a

^a Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Kompetenzzentrum Biochemie,
Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien

^b Institut für Analytische Chemie, Universität Wien, Währinger Straße 38, 1090 Wien

Schlüsselwörter: Sellerie, Allergene, real-time PCR, Lebensmittel

EINLEITUNG

Lebensmittelallergien können gesundheitliche Probleme verursachen, die von lokalen Reaktionen der Haut, des Mund- und Rachenraums, des Gastrointestinaltrakts sowie des Atmungssystems bis hin zum lebensgefährlichen anaphylaktischen Schock reichen können [1]. Lebensmittelallergiker können sich nur durch strikte Vermeidung der Lebensmittel, auf die sie allergisch reagieren, schützen. Um betroffenen Personen die Information über enthaltene Allergene in Lebensmitteln besser zugänglich zu machen, müssen in der EU nach der Direktive 2007/68/EC 14 Lebensmittelallergene gekennzeichnet werden. Zu diesen kennzeichnungspflichtigen Allergenen zählen auch Sellerie (*Apium graveolens*) und daraus hergestellte Produkte [2].

Sellerie wird als Knollensellerie (*Apium graveolens* var. *Rapaceus*), Stangensellerie (*Apium graveolens* var. *Dulce*) und Schnitt- bzw. Würzsellerie (*Apium graveolens* var. *Secalinum*) roh oder gekocht sowie als Zutat in Suppen, Saucen, Fertiggerichten, Würsten und Gewürzen konsumiert. Circa 30 bis 40% aller Lebensmittelallergiker in Frankreich und in der Schweiz sind von einer Sellerieallergie betroffen. Die Sellerieallergie ist stark assoziiert mit einer Birken- und Beifußpollen-Sensibilisierung, weshalb häufig vom „Birken-Beifuß-Sellerie-Syndrom“ berichtet wird. Auch Karotten und Gewürze zeigen klinische Kreuzreaktivitäten („Sellerie-Karotten-Beifuß-Gewürz-Syndrom“). 91% der Personen, die in oralen Provokationsstudien (doppelblind, placebo kontrolliert) auf Sellerie positiv getestet wurden, sind auf Birkenpollen und 64% auf

Beifußpollen sensibilisiert. Außerdem können Sellerieallergiker auf Karotten und andere birkenverwandte Lebensmittel wie Äpfel, Haselnuss und Kartoffel sensibilisiert sein.

Das Hauptallergen des Selleries, Api g 1, ein 17 kDa Protein, ist homolog zu Bet v 1, dem Hauptallergen der Birke. Weitere bisher identifizierte Sellerieallergene sind Api g 4 (ein 15 kDa Profilin), Api g 5 (ein 58 kDa Protein) sowie kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinanten (CCD, 32-70 kDa). Alle genannten Sellerieallergene sind thermostabil, weshalb auch prozessierte und erhitzte Lebensmittel noch allergische Reaktionen hervorrufen können. Die Schwellenwerte für Reaktionen im Mund- und Rachenraum liegen zwischen 0.7 und 2.7 g, schwerwiegendere systemische Reaktionen treten bei Dosen von 7.5-31 g auf. Ähnliche Schwellenwerte wurden auch für gekochten Sellerie ermittelt. Selleriegewürz rief bereits bei Dosen von 0.16-5.85 g systemische Reaktionen hervor [1].

Zur Überprüfung der richtigen Kennzeichnung sind der Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zum Nachweis eines (allergen) Proteins sowie die PCR oder real-time PCR zur Detektion der DNA einer allergenen Spezies geeignet. Zum Nachweis von potentiell allergenem Sellerie wurden bisher eine PCR Methode [3] sowie zwei real-time PCR Methoden, in denen jeweils ein Abschnitt des Sellerie-spezifischen Mannitol-Dehydrogenase-Gens amplifiziert wurde, veröffentlicht [4, 5]. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung, Optimierung und Validierung einer real-time PCR Methode zum Nachweis von Sellerie in verschiedenen Lebensmitteln wie Suppen, Fertiggerichten, Würsten und Gewürzen.

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB), Natriumchlorid, Salzsäure, Proteinase K, Chloroform, Iso-Amylalkohol, Ethanol und 2-Propanol wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) wurde bei J. T. Baker (Deventer, Niederlande) bestellt. Phenol/Chloroform/Iso-Amylalkohol (25:24:1, v/v/v) wurde von Sigma Life

Sciences (Buchs, Schweiz) verwendet. RNase und α -Amylase wurden von Roche (Mannheim, Deutschland), der SureFood[®]PREP Allergen Kit von Congen (Berlin, Deutschland) bezogen. Der TaqMan[®] Universal PCR Master Mix wurde bei Applied Biosystems (hergestellt von Roche, Branchburg, New Jersey, USA) bestellt. Hauseigenes bidestilliertes Wasser wurde für die DNA Extraktion und die PCR Reaktionen verwendet. Knollen- und Stangensellerie, Schweinefleisch, Tafelsalz und Lebensmittelproben wurden in lokalen Supermärkten gekauft. Schnittselleriesamen wurden von Samen Maier (Taiskirchen, Österreich), getrockneter Knollensellerie sowie getrocknete Gewürze von Kotányi (Wolkersdorf, Österreich) zur Verfügung gestellt.

DNA Extraktion

Die Lebensmittel wurden mit einem Mixer zerkleinert und ca. 3 g (bei der Aufarbeitung nach der CTAB Methode) bzw. 100 mg (bei der Aufarbeitung mit dem SureFood[®]PREP Allergen Kit) eingewogen. Die Aufarbeitung mittels der CTAB Methode erfolgte gemäß der Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) internen Prüfvorschrift, die Aufarbeitung mit dem SureFood[®]PREP Allergen Kit wurde nach der dem Kit beiliegenden Anleitung durchgeführt. Die DNA Extrakte wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Bestimmung der Ausbeute und Reinheit der DNA

Die Extinktion der DNA Extrakte wurde mit dem Photometer (Nano Photometer, Implen, München, Deutschland) bei 260 und 280 nm gemessen. Die DNA Konzentration wurde mit der Formel $c [ng/\mu L] = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ berechnet. Die DNA Reinheit wurde durch das Verhältnis A_{260}/A_{280} ermittelt.

PCR Analyse

Primer- und Sondendesign

Zur Detektion von Sellerie wurden 4 Primerpaare mit dazugehörigen TaqMan Sonden (FAM/TAMRA markiert), codierend für das Sellerie-Mannitoltransportergen (MaT3) (NCBI Accession No. EU262657) bzw. die NADPH-abhängige Sellerie-Mannose-6-

phosphatreduktase (M6PR) (NCBI Accession No. U83687), mit Hilfe der Primerdesign Software Primer Express 3.0 von Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA) sowie der Beacon Designer 6.0 Software von Premier Biosoft International (Palo Alto, Kalifornien, USA) entworfen und bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt.

Optimierung der Primer- und Sondenkonzentrationen und der Annealingtemperatur

Die Optimierungsversuche wurden mithilfe einer Primermatrix (100, 200 und 300 nM der jeweiligen Forward und Reverse Primer) bei einer konstanten Sondenkonzentration von 150 nM als auch einer Sondenmatrix (50, 100, 150 und 200 nM der jeweiligen Sonde) bei konstanten, bereits optimierten Primerkonzentrationen unter Verwendung des folgenden PCR Programms durchgeführt: 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C, 45 Zyklen mit 15 s bei 95 °C und 60 s bei 55 °C.

Die optimale Annealingtemperatur wurde bei optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen mit folgendem PCR Programm ermittelt: 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C, 45 Zyklen mit 15 s bei 95 °C und 60 s bei 52-62 °C. Die Optimierung der Annealingtemperatur erfolgte mit dem BioRad iCycler Thermocycler, ausgestattet mit dem IQ5 multicolor real time PCR Detektionssystem (Wien, Österreich), in 96 Well Platten in einem Reaktionsvolumen von 25 µL.

Optimierte PCR Bedingungen

Die PCR Reaktionen wurden mit einem Rotor-Gene RG-3000 von Corbett Life Sciences (Hilden, Deutschland), ausgestattet mit einem 72 Well Rotor, und einem Totalvolumen von 25 µL durchgeführt. Alle Reaktionen wurden im Doppelansatz analysiert. Bei jeder Analyse wurden zwei Positiv- und zwei Negativkontrollen mitgeführt.

Jeder Ansatz enthielt 12,5 µL TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, 200 nM M6PR Forward Primer 1, 300 nM M6PR Reverse Primer 1, 50 nM M6PR Sonde 1, 5 µL DNA Extrakt und H₂O_{dd}. Folgendes PCR Programm wurde ausgewählt: 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C, 45 Zyklen mit 15 s bei 95 °C und 60 s bei 60 °C. Das amplifizierte PCR Produkt weist eine Größe von 77 bp auf.

ERGEBNISSE

Optimierung der PCR Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen, die die niedrigsten Ct-Werte lieferten, wurden als optimale Reaktionsbedingungen gewählt. Die optimalen Konzentrationen und Annealingtemperaturen sind der **Tabelle 1** zu entnehmen.

Tabelle 1: Optimale Primer- und Sondenkonzentrationen und Annealingtemperaturen.

Primer/Sonde	c (Forward) [nM]	c (Reverse) [nM]	c (Sonde) [nM]	Annealingtemp. [°C]
MaT3_1	200	300	50	60
MaT3_2	300	300	50	56
M6PR_1	200	300	50	60
M6PR_2	200	200	50	60

Spezifität der Primer und Sonden

Zur Bestimmung der Spezifität der Primer und Sonden wurden über 60 unterschiedliche Lebensmittel, wie andere *Apiaceae*, Gewürze, Gemüse und verschiedene Fleischsorten, auf Kreuzreaktivitäten überprüft. Einzig das Primerpaar 1 und die Sonde 1 für M6PR erwiesen sich als spezifisch für Knollen-, Stangen- und Schnittsellerie. Die anderen drei Primerpaare und die dazugehörigen Sonden zeigten Kreuzreaktivität mit den *Apiaceae* Anis, Dille, Kümmel, Kreuzkümmel, Liebstöckel oder Petersilie sowie mit Bockshornklee, Bohnenkraut, Estragon, Ingwer, Kardamom, Kurkuma, Majoran, Oregano oder Salbei.

Validierung der Methode

Die Validierung der Methode erfolgte durch Ermittlung der Nachweisgrenze und der Effizienz in seriell verdünnten DNA Extrakten (1:1 bis 1:1000000, entspricht einer DNA-Konzentration von 20 µg/mL bis 20 pg/mL) sowie in DNA Extrakten, die aus Modellwürsten gewonnen wurden. Die Modellwürste wurden am Institut für Lebensmitteluntersuchung, Abteilung tierische Lebensmittel (AGES), mit getrocknetem Knollensellerie hergestellt und enthielten 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,005, 0,001, 0,0005 bzw. 0,0001% Knollensellerie oder waren selleriefrei. Die DNA wurde sowohl mittels der

CTAB Methode als auch mit dem SureFood®PREP Allergen Kit aus den Modellwürsten isoliert.

Die Nachweisgrenze in seriell verdünnten DNA Extrakten aus Knollen-, Stangen- und Schnittsellerie lag für jede der Selleriearten bei 2 pg/μL (entspricht einer Verdünnung von 1:10000). Die Effizienz der PCR Methode betrug für Knollensellerie 93.9%, für Stangensellerie 92.9% und für Schnittsellerie 92.0%.

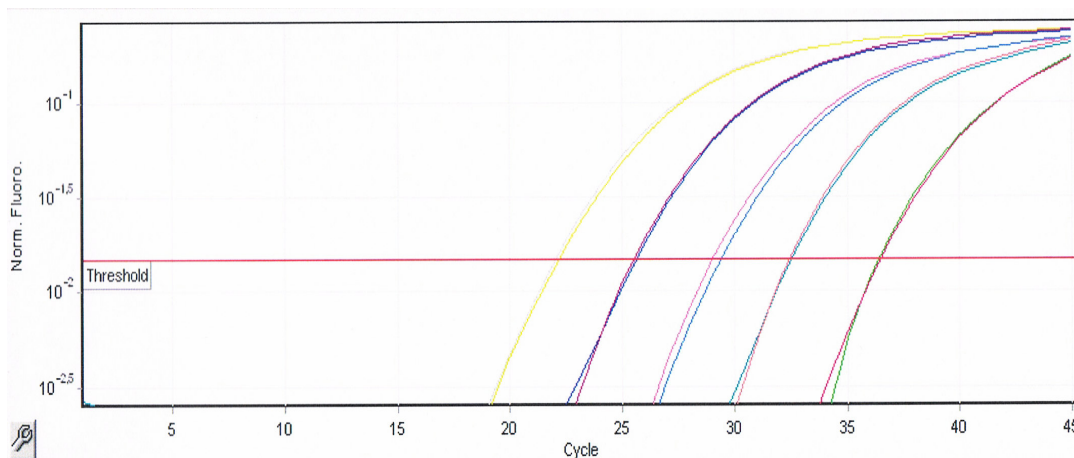


Abbildung 1: Amplifikationskurven für seriell verdünnte Knollensellerie DNA Extrakte.

Die Nachweisgrenze in DNA Extrakten aus Modellwürsten lag bei 0.001% (10 mg/kg) nach Aufarbeitung mit dem SureFood®PREP Allergen Kit und bei 0.005% (50 mg/kg) nach DNA Extraktion mit der CTAB Methode. Die Effizienz betrug 101.6% (SureFood®PREP Allergen Kit) und 106.6% (CTAB Methode).

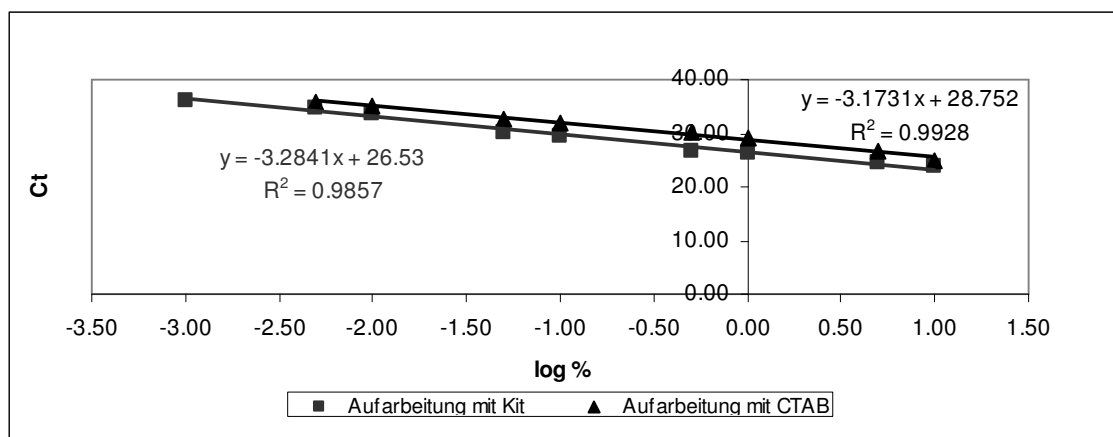


Abbildung 2: Vergleich der Standardgeraden von DNA Extrakten aus Modellwürsten nach DNA Isolierung mit der CTAB Methode bzw. mit dem SureFood®PREP Allergen Kit.

Nachweis von Sellerie in im Handel erhältlichen Produkten

Zur Bestimmung von Sellerie in Lebensmitteln wurden verschiedene Saucen, Suppen, Fertiggerichte, Gewürze und Würstel in lokalen Supermärkten gekauft. Einige führten Sellerie als Zutat in der Zutatenliste an (+), einige waren mit dem Hinweis, dass das Produkt Spuren von Sellerie enthalten kann (+/-), gekennzeichnet und einige enthielten keine Information über Sellerie als Zutat (-). Die DNA wurde mittels der CTAB Methode isoliert und im Doppelansatz mittels real-time PCR analysiert.

Tabelle 2: Ergebnisse der real-time PCR Analyse von im Handel erhältlichen Lebensmitteln.

Probe	Deklaration	PCR-Ergebnis
Pasta alla Bolognese	+	+
Kartoffelcreme Suppe mit Kräutern der Provence	+	+
Teigmuscheln in Frühlingszwiebel Sauce mit Gartengemüse	+	+
Gewürzzubereitung Barbecue	+	+
Gewürzzubereitung Kräuterbutter	+	+
Frühlingssuppe	+	+
Truthahngriller	+	-
ASIA Gebratene Nudeln Curry	+	+/-
Sugo 5 Kräuter	+/-	-
Sugo Gemüse	+/-	-
Mediterrane Gemüsepfanne	+/-	-
Magic ASIA Gebratene Nudeln	+/-	-
Gulaschsaft 1 (Würfel)	+/-	-
Knoblauchcremesuppe	+/-	-
Steinpilzsuppe	+/-	-
Gemüsecremesuppe mit Gartenkräutern	-	+
Klare Suppe und Allwürzmittel (keine allergenen Stoffe)	-	-
Tomaten Cremesuppe/Soße	-	-
Feine Kalbsbratwürstel	-	-
Dunkle Delikatess Soße	-	-
Landbratwürstel	-	-
Brokkolicremesuppe mit Croutons	-	-
Gulaschsaft 2 (Würfel)	-	-
Gewürzzubereitung Pasta asciutta	-	-
Steak Gewürzsalz	-	-

In dem Produkt „Truthahngriller“, das Sellerie als Zutat anführte, konnte Sellerie nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise war Sellerie nur in Spuren enthalten, so dass die Konzentration unter der Nachweisgrenze der PCR Methode lag. In einem weiteren Produkt (ASIA Gebratene Nudeln Curry), das Sellerie als Zutat auflistete, konnte Sellerie nur in einem von zwei Ansätzen nachgewiesen werden. Eventuell lag auch hier

die enthaltene Selleriekonzentration nahe der Nachweisgrenze der PCR Methode und konnte daher nicht eindeutig nachgewiesen werden. In keinem der Produkte, die Spuren von Sellerie enthalten konnten, wurde Sellerie nachgewiesen. In einem Produkt, das keine Information über Sellerie in der Zutatenliste anführte, konnte Sellerie nachgewiesen werden. Auch eine Wiederholung der Analyse (erneuter Kauf des Produkts im Handel, DNA Extraktion mittels der CTAB Methode, PCR Analyse im Doppelansatz) lieferte dasselbe Ergebnis. Eine Inhibitionskontrolle wurde mit allen negativ getesteten Proben durchgeführt und zeigte, dass die negativen PCR Ergebnisse nicht durch Inhibition der PCR Reaktion verursacht wurden.

LITERATUR

- [1] European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *The EFSA Journal*. **2004**, 32, 113-119.
- [2] Commission of the European Union. Commission Directive 2007/68/EC. *Official Journal of the European Union*. **2007**, L310/11-L310/14.
- [3] Dovičovičová L., Olexová L., Pangallo D., Siekel P., Kuchta T. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of celery (*Apium graveolens*) in food. *European Food Research and Technology*. **2004**, 218, 493-495.
- [4] Hupfer C., Waiblinger H-U., Busch U. Development and validation of a real-time PCR detection method for celery in food. *European Food Research and Technology*. **2007**, 225, 329-335.
- [5] Mustorp S., Engdahl-Axelsson C., Svensson U., Holck A. Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. *European Food Research and Technology*. **2008**, 226, 771-778.