

Nachweis von Weizenverunreinigungen in Nichtweizenprodukten mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) = Detection of wheat contamination in non-wheat products by the polymerase chain reaction (PCR)

Autor(en): **Allmann, M. / Candrian, U. / Lüthy, J.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **83 (1992)**

Heft 1

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982249>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

M. Allmann, U. Candrian und J. Lüthy, Institut für Biochemie der Universität Bern, Bern

Nachweis von Weizenverunreinigungen in Nichtweizenprodukten mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Detection of Wheat Contamination in Non-Wheat Products by the Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zoeliakie

Unter der Zoeliakie bzw. der Sprue wird eine Malabsorptionskrankheit des Dünndarms verstanden, welche auf einer genetisch mitbedingten Unverträglichkeit des Darms gegenüber Prolaminen des Weizens, des Roggens, der Gerste und des Hafers beruht. Es kommt zu einer Schädigung der Dünndarmschleimhaut, Zottenatrophie, und daraus folgend zu verminderter Resorptionsfähigkeit des Darms. Dies wiederum führt zu extremen, lebensbedrohenden Abmagerungen.

Weil es nach neuesten Erkenntnissen keine echte Heilung gibt, müssen konsequent die toxischen Faktoren aus der Nahrung des Zoeliakiepatienten eliminiert werden, wobei die glutenfreie Diät lebenslang eingehalten werden muss (1). Die Verfahren zur Herstellung von Diätprodukten für Zoeliakiepatienten basieren auf dem generellen Austausch der üblichen Mehle durch alternative Rohstoffe wie Mais, Reis, Soja, Hirse und Buchweizen.

Schon seit langer Zeit ist ein grosser Unterschied in der Häufigkeit der Zoeliakie zwischen der nordamerikanischen und der westeuropäischen Bevölkerung festzustellen. In den USA gilt die Zoeliakie als Rarität (2), hingegen tritt sie in Europa bei jedem tausendsten Neugeborenen auf. Studien sprechen von 1 bis 3,7 Fällen auf tausend Einwohner in Schweden, einem auf fünfhundertfünfzig Bewohner Irlands, einem auf dreihundert Westiren (3) und 4,6 Fällen auf tausend, nicht auf Zoeliakieverdacht endoskopierte Patienten, in Italien (4).

Als die klassischen Symptome der Zoeliakie gelten Inanition, Diarrhoe und Steathorrhoe (Fettdurchfall). Der unregelmässig auftretende chronische Durchfall ist für 54% der Patienten typisch (5). Der Verdacht, dass Schwachformen von Zoeliakie und Diätfehler zu bösartigen Tumoren führen können, wurde 1990

statistisch bestätigt. Eine retrospektive Untersuchung des Kantonsspitals Winterthur (6) ermittelte für Zöliakiepatienten ein um 25- bis 250fach erhöhtes Risiko gegenüber der Normalbevölkerung bezüglich der Entwicklung eines Adenokarzinoms im Dünndarm.

Prolaminnachweis in «glutenfreien» Produkten

Um die Therapie von Zöliakiepatienten erfolgversprechend zu gestalten, müssen alle toxischen Faktoren, Gliadine des Weizens und des Hafers, Secaline des Roggens und Hordeine der Gerste, aus der Nahrung entfernt werden.

Die 1988 vom Codex Alimentarius Komitee für Ernährung und diätetische Lebensmittel vorgeschlagene Maximalmenge von 1 mg Prolamin pro 100 g Trockenmasse für «glutenfreie» Produkte kann weder von der Getreideproduktverarbeitenden Industrie, die 30 mg pro 100 g Trockenmasse fordert, eingehalten werden noch mit einer vom obenerwähnten Codex-Komitee vorgeschlagenen Nachweismethode für verarbeitete und teilweise hydrolysierte Getreideprodukte befriedigend nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 1,5 mg pro 100 g Trockengewicht (7).

Bestimmung von Weizenverunreinigungen mittels DNA-Analytik

Die Gliadine werden im Kern der Kornzellen mittels Desoxyribonukleinsäure (DNA) kodiert, transkribiert und in Proteine übersetzt. Statt die Gliadinproteine oder ihre Peptidfragmente direkt mit einem mono- oder polyklonalen enzymmarkierten Antikörper nachzuweisen, werden ihre entsprechenden, von einigen Weizen bekannten DNA-Sequenzen mittels DNA-Analytik identifiziert. Diese Analytik korreliert folglich nicht mit der zöliakiespezifischen Toxizität der Gliadinpeptidfragmente, sondern detektiert nur eine mögliche Weizenkontamination eines Nichtweizenproduktes. Daher eignen sich prinzipiell auch andere als die Gliadine für die DNA-Analytik.

Der Vorteil der DNA-Analytik gegenüber den immunochemischen Methoden liegt in der höheren Sensitivität und der Druck- und Hitzestabilität des Zielmoleküls, DNA, die auch Analysen erhitzter oder verarbeiteter Produkte erlaubt.

DNA-Analytik mit der Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine *in vitro* Klonierungsmöglichkeit von DNA-Sequenzen, falls Teile der DNA-Sequenz bekannt sind (8). Zwei Oligonukleotid-Primer hybridisieren je an die gegenüberliegenden Seiten einer interessie-

renden Sequenz der Ziel-DNA. In einem sich wiederholenden Zyklus bestehend aus: Denaturierung der Templat-DNA, *denaturation*, Primerhybridisierung, *primer annealing*, Synthese neuer DNA-Stränge in 5'-3'-Richtung mit den beiden Primern als *template primer, extension*, verdoppelt sich ungefähr die Anzahl DNA-Fragmente bzw. PCR-Produkte. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Zyklus entsteht eine exponentielle Akkumulation des gewünschten DNA-Fragments, weil das Syntheseprodukt des vorangehenden Zyklus als Templat für den folgenden dienen kann. Das DNA-Fragment wird durch die 5'-Enden der beiden Primer bestimmt.

Mit der Einführung der thermostabilen DNA-Polymerase vom *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), welche die Denaturierungstemperatur übersteht, wird die Polymerase Chain Reaction stark vereinfacht.

Probenvorbereitung, DNA-Extraktion

Über die Extraktion von DNA aus Getreidekörnern oder verarbeiteten Getreideprodukten ist wenig bekannt. Zur Gewinnung von Getreide-DNA für genetische Untersuchungen und rekombinanter DNA-Technologie werden nicht Körner, sondern die Keimblätter der Getreidepflanzen zur Extraktion verwendet, denn die Ausbeute ist höher und die DNA liegt in voller Länge und in undegradierter Form vor, Hoch-Molekular-Gewichts-DNA (HMG-DNA) (9).

Es wurde nun in einem ersten Schritt die Länge und Ausbeute der DNA, gewonnen aus Getreidekörnern, -mehlen und -produkten bestimmt. Es zeigte sich, dass die DNA, die aus Getreidekörnern extrahiert wurde, vergleichbar mit der aus Keimblättern ist. Sie lag in unfragmentierter, aber methylierter Form als HMG-DNA vor. Die Ausbeute pro eingesetztes Milligramm (mg) Kornprobe halbierte sich gegenüber der Extraktion aus Keimblättern von 52 auf 22 Nanogramm (ng). Die DNA extrahiert aus Mehlen ist schwach degradiert. Es liessen sich DNA-Fragmente zwischen 200–15 000 Basenpaaren (bp) finden. Die Ausbeute sank gegenüber der Extraktion aus Keimblättern auf 5 ng DNA pro mg Mehlprobe. Die aus Brot gewonnene DNA war sehr stark degradiert. Die mittlere Fragmentgrösse lag unterhalb 300 bp und die Ausbeute im Bereich der Extraktion aus Mehlen.

DNA-Analytik, Weizen-PCR

Die Zielsequenz, *gibberillin responsive gene* (10), wurde so gewählt, dass das PCR-System Weizen-DNA erfasst, die als zöliakietoxisch verdächtigten, verwandten Getreide Roggen, Gerste und Hafer erfassen kann, hingegen die untoxischen Getreide, Reis, Hirse und Mais sowie Additive in verarbeiteten Getreideprodukten, wie Hefe, nicht erfasst. Die PCR-Fragmentlänge wurde mit 159 bp so

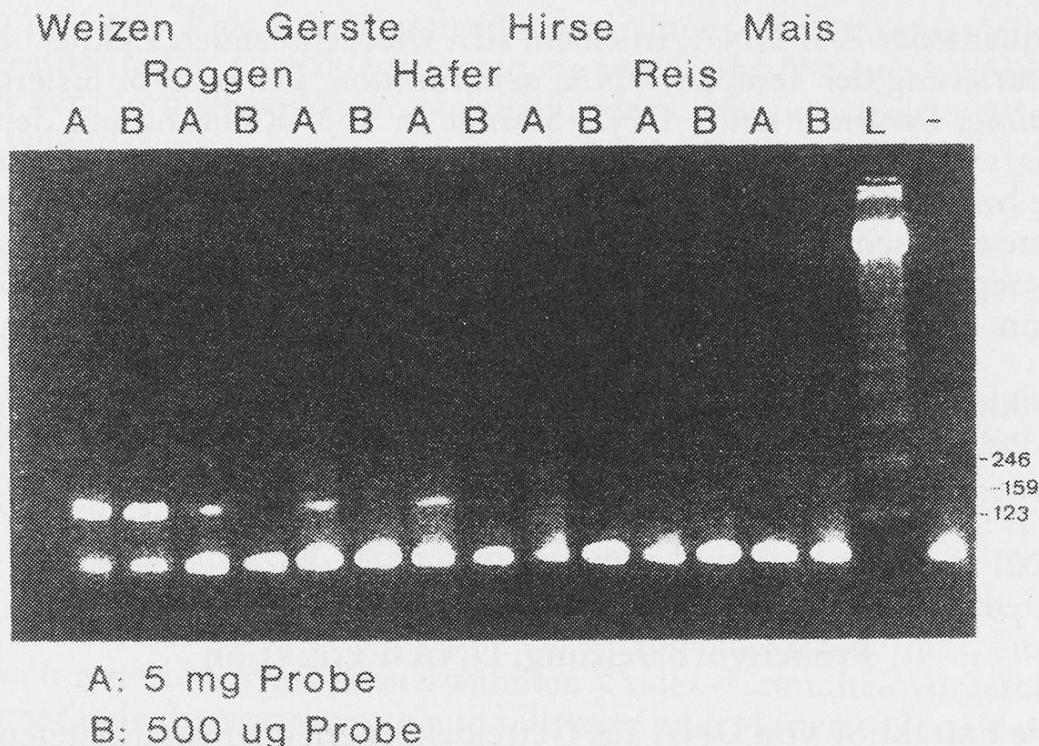


Abb. 1. PCR-Reaktionen mit DNA-Extrakten verschiedener Getreide: Aliquots der Reaktionslösung wurden elektrophoretisch auf einem 2%-Agarosegel aufgetrennt. Fragmentgrösse 159 Basenpaare (bp) entspricht den Amplifikationsprodukten. Fragmente kleiner als 123 bp sind Reaktionsartefakte. Linie L, 123-Bp-Molekulargewichtsstandard; Linie-, Negativkontrolle. Linien A zeigen PCR-Signale genomischer Ziel-DNA, 100 ng, die 5 mg Getreideprobe entsprechen, Linien B PCR-Signale genomischer Ziel-DNA, die 0.5 mg Probe entsprechen.

definiert, dass auch die Amplifikation mit degradiertem DNA aus verarbeiteten erhitzten Getreideprodukten, wie Brot, ein detektierbares PCR-Signal ermöglicht.

Das PCR-System erzeugte, wie in der *Abbildung 1* gezeigt, mit Weizen, Roggen, Gerste und Hafer positive Signale richtiger Fragmentgrösse. Hingegen mit Hirse, Reis und Mais waren keine Signale auf der Agarosegel-Matrix sichtbar. Das Signal der 5 mg Weizenprobe, ca. 100 ng genomische Weizen-DNA, *Abbildung 1*, «Weizen»-Linie A, war ungefähr hundertmal stärker als die entsprechenden Proben von Roggen, Gerste und Hafer, *Abbildung 1*, Linien A. Die Detektionsgrenze dieses PCR-Systems lag unter 10 pg genomischer Weizen-DNA, entsprechend 500 ng Weizenmehl. 500 mg Maisstärke, die künstlich mit 0,1% Weizenmehl verunreinigt war, *Abbildung 2*, Linie D, lieferte noch ein positives PCR-Signal richtiger Fragmentgrösse. Stark degradierte DNA aus 500 mg Halbweissbrot gab ungefähr ein gleich starkes Signal, *Abbildung 2*, Linie W, wie schwach degradierte DNA aus 500 mg Weizenmehl, *Abbildung 2*, Linie A. Als Proben von weizenfreien, für Zöliakieerkrankte empfohlenen Produkten untersucht wurden, konnte eine Mehlmischung bestehend aus Reis- und Maisstärke gefunden werden, *Abbildung 2*, Linie M, die mit Weizen oder den verwandten zöliakietoxischen Getreiden verunreinigt war. Dieser Befund konnte mit immunochemischen Methoden (11) bestätigt werden.

% Weizenmehl in Maizena

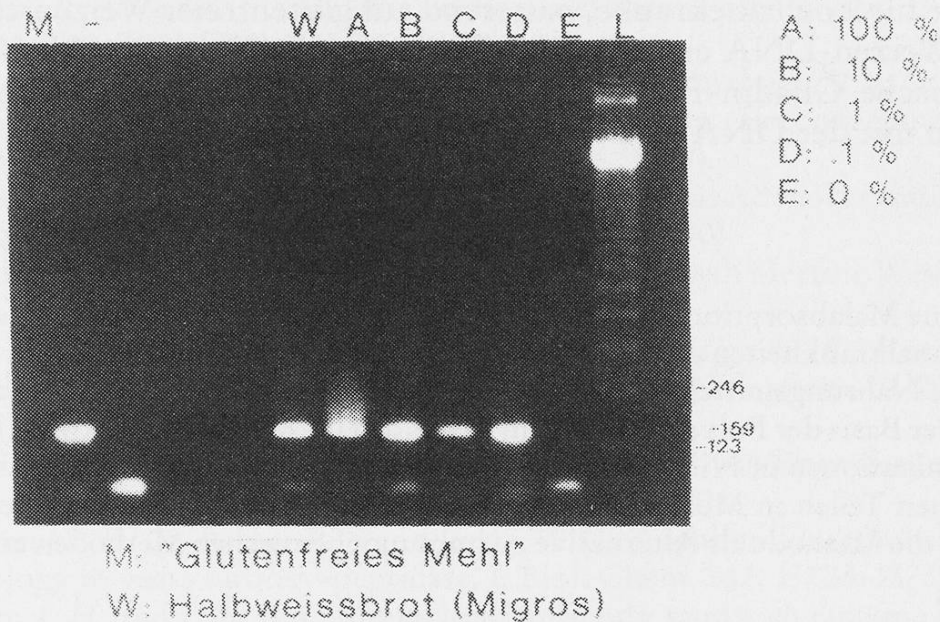


Abb. 2. PCR-Reaktionen mit DNA-Extrakten verschieden kontaminierter Maisstärke, Brot und einem für Zöliakiepatienten empfohlenen Mais- und Reisstärkemehl: Aliquots der Reaktionslösung wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Amplifikationsprodukte, 159 bp Linie L, 123-bp-Molekulargewichtsstandard; Linien-, Negativkontrollen. Linien A-E zeigen PCR-Signale 1 µg genomischer DNA gewonnen aus Maisstärke (Maizena), die mit Weizenmehl verschieden stark kontaminiert ist; Linie W zeigt das Amplifikationsprodukt von 1 µg DNA extrahiert aus Brot (Halbweissbrot) und Linie M von 1 µg DNA extrahiert aus glutenfreiem Mehl, basierend auf Reis- und Maisstärke.

Diskussion

Weizenverunreinigungen in Nicht-Weizenprodukten können mit der Polymerase Chain Reaction (PCR) nachgewiesen werden. Das hier vorliegende PCR-System kann nicht nur mit Weizen positive Signale erzeugen, sondern auch mit den verwandten zöliakietoxischen Getreiden Roggen, Gerste und Hafer. Durch Änderung der Reaktionsbedingungen, höhere Annealingtemperatur, kann das PCR-System aber so verändert werden, dass es nur noch Weizen und keine anderen Getreidearten erfasst. Diese Änderung vermindert dagegen die Sensitivität um ein bis zwei Größenordnungen. Die Fragmentierung der Getreide-DNA im Mahl- und Backprozess hat kaum einen Einfluss auf die Amplifizierbarkeit in der PCR-Reaktion, im Gegensatz zu immunochemischen Methoden (11), deren Zielmoleküle, Proteine, durch diese Verarbeitungsprozesse fragmentiert und denaturiert werden, was mit zunehmendem Verarbeitungsgrad der Produkte die zu Grunde liegende Antigen-Antikörper-Reaktion verunmöglicht. Zudem ist die Sensitivität der

DNA-Analytik mittels PCR-Reaktion gegenüber den immunochemischen Methoden um ungefähr zehn- bis hundertmal erhöht.

Diätprodukte für Zoeliakieerkrankte, basierend auf glutenfreier Weizenstärke, die ja immer noch Weizen-DNA enthält, oder Produkte mit Glutenzusätzen, welche die zoeliakietoxische Gliadin-Proteinfraktion enthalten, hingegen Weizen-DNA frei sind, können mit der DNA-Analytik nicht untersucht werden.

Zusammenfassung

Zoeliakie ist eine Malabsorptionskrankheit des Dünndarms, welche zu den meistverbreiteten Gastrointestinalkrankheiten gehört. Die Symptome der Zoeliakie entwickeln sich nach der Aufnahme von Nahrungsmitteln, die Weizen, Roggen, Gerste oder Hafer enthalten. Wir entwickelten auf der Basis der Polymerase Chain Reaction (PCR) ein DNA-Analytiksystem, das Weizenkontaminationen in Nichtweizenprodukten feststellen kann. Da diese Kontaminationen zu gleichen Teilen in Mehl wie in verarbeiteten Produkten, wie Brot, feststellbar waren, würde sich die Methode als Alternative zu immunochemischen Methoden empfehlen.

Résumé

La maladie coeliaque (MC), entéropathie au gluten, est une maladie gastrointestinale fréquente chez les enfants et adultes. Les symptômes de MC sont par exemple la diarrhée ou la régression des signes anatomiques. Ils se développent après l'ingestion de denrées alimentaires qui contiennent du blé. Nous avons analysé la DNA à l'aide de la Polymerase Chain Reaction (PCR) pour détecter les contaminations de blé dans les denrées recommandées pour un régime alimentaire sans gluten. Il est possible de détecter la DNA de blé dans la farine aussi bien que dans les produits transformés, l'analyse de DNA peut donc être considérée comme méthode alternative aux méthodes immunochimiques.

Summary

Celiac disease (CD), a gluten induced enteropathy, is one of the most common chronic gastrointestinal diseases of children and adults. The symptoms of CD, like diarrhoea or poor growth, develop after ingestion of food containing wheat, rye, oat or barley. We investigated the potential of DNA analysis by the Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect wheat contaminations in dietary non-wheat products. The target gene was the *gibberillin responsive gene* of wheat. The possibility to detect wheat DNA to the same extent in flour as well as in bakery products makes DNA analysis a possible alternative to immunochemical methods.

Literatur

1. *Hohlfeld, K. und Pietsch, H.P.*: Zu aktuellen Problemen der Zoeliakie und ihre Diätbehandlung. *Ernährungsforsch.* 5, 27 (1982).
2. *Stern, M.*: Neues zur Pathogenese, Diagnostik und zum Verlauf der Zoeliakie. *DZG Aktuell.* 1, 5-7 (1990).

3. Mylotte, M., Egan-Mitchell, B., McCarthy, C. F. and McNicoll, B.: Incidence of coeliac disease in the West of Ireland. *Brit. Med. J.* **1**, 703–705 (1973).
4. Rampal, P. et Cadot, C.: Maladie coeliaque et régime sans gluten. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **14**, T22–T25 (1990), 741–746 (1988).
5. Montgomery, A. M. P., Goka, A. K. J., Kumar, P. J., Farthing, M. J. G. and Clark, M. L.: Lowgluten diet in the treatment of adult coeliac disease: effect on jejunal morphology and serum antigluten antibodies. *Gut* **29**, 1964–1968 (1988).
6. Marsch, S. C. U., Heer, M., Sulser, H. und Hany, A.: Das Adenokarzinom des Dünndarms bei Zoeliakie. *Schweiz. med. Wschr.* **120**, 135–141 (1990).
7. Working group on prolamin analysis and toxicity. Fourth Meeting Wassenaar, 12–14 April 1989.
8. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Ehrlich, H. A.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
9. Rogers, S.O. and Bendich, A. J.: Extraction of DNA from Plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual*. A6, 1–10, Kluwer Academic Publishers (1988).
10. Baulcombe, D. C., Barker R. F. and Jarvis M. G.: A gibberillin responsive wheat gene has homology to yeast carboxy-peptidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 13728–13735 (1987).
11. Skeritt, J. H. and Hill, A.S.: Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food. Chem.* **38**, 1771–1778 (1990).

M. Allmann
 Universität Bern
 Institut für Biochemie
 Abteilung Lebensmittelchemie
 Freiestrasse 3
 CH-3012 Bern