

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Department für Lebensmittel und Ernährung

**Entwicklung und Optimierung eines Real-Time PCR Screening-Systems
zum Nachweis von Lactobacillen / Pediococcen basierend auf spezifischen
Identifizierungsprimern**

vom
Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II
angenommene

Semesterarbeit

Vorgelegt von: Martin Nagel
1. Prüfer: Univ.-Prof. Dr. E. Geiger
Betreuer: Dipl.-Ing. Andreas Brandl
Vorgelegt am: 17. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	III
1 Einleitung, Problemstellung	1
2 Grundlagen	2
2.1 Das Prinzip der PCR	2
2.2 Real-Time-PCR	3
3 Material und Methoden	5
3.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	5
3.2 Aufbau der PCR-Systeme	5
3.3 Versuchsdurchführung	6
4 Auswertung	8
4.1 Kreuzreaktionen der spezifischen Identifikationsprimer	8
4.1.1 br1; Nachweis von <i>Lactobacillus brevis</i>	8
4.1.2 cas1; Nachweis von <i>Lactobacillus casei</i>	8
4.1.3 col1; Nachweis von <i>Lactobacillus collinoides</i>	8
4.1.4 cor2m; Nachweis von <i>Lactobacillus coryniformis</i>	9
4.1.5 pabu1; Nachweis von <i>Lactobacillus parabuchneri</i>	9
4.1.6 ped; Nachweis von <i>Pediococcus damnosus</i>	10
4.1.7 ped1; Nachweis von <i>Pediococcus damnosus</i>	10
4.1.8 per; Nachweis von <i>Lactobacillus perolens</i>	11
4.1.9 pla3; Nachweis von <i>Lactobacillus plantarum</i>	11
4.2 Nachweisgrenzen der spezifischen Identifikationsprimer	13
4.2.1 br1; Nachweis von <i>Lactobacillus brevis</i>	13
4.2.2 cas1; Nachweis von <i>Lactobacillus casei</i>	14
4.2.3 cor2m; Nachweis von <i>Lactobacillus coryniformis</i>	15
4.2.4 lindm; Nachweis von <i>Lactobacillus lindneri</i>	16
4.2.5 pabu1; Nachweis von <i>Lactobacillus parabuchneri</i>	17
4.2.6 pla3; Nachweis von <i>Lactobacillus plantarum</i>	18
4.2.7 ped, ped1; Nachweis von <i>Pediococcus damnosus</i>	19
4.2.8 pm; Nachweis von <i>Pectinatus spp., Megasphaera cerevisiae</i>	20
4.3 Kombinationssysteme	21
5 Diskussion und Ausblick	22
6 Zusammenfassung	23
Literaturverzeichnis	24
A Liste der Mikroorganismen	25

Tabellenverzeichnis

1	Mit dem iCycler detektierbare Fluorophore angegeben mit Extinktions- und Emissionswellenlängen	5
2	Standardansatz zur Bestimmung der Kreuzreaktionen und Nachweisgrenzen der spezifischen Identifikationsprimer	7
3	PCR-Ansatz des Screening-Systems 630c	7
4	Kreuzreaktionen des br1-Primers	8
5	Kreuzreaktionen des cas1-Primers	9
6	Kreuzreaktionen des col1-Primers	9
7	Kreuzreaktionen des cor2m-Primers	10
8	Kreuzreaktionen des pab1-Primers	10
9	Kreuzreaktionen des ped-Primers	11
10	Kreuzreaktionen des ped1-Primers	11
11	Kreuzreaktionen des per-Primers	12
12	Kreuzreaktionen des pla3-Primers	12
13	Vergleich verschiedener Systeme kombinierter Primer	21
14	Liste der Mikroorganismen	25

Abbildungsverzeichnis

1	Das PCR-Prinzip. Quelle: Mülhard (1999) S.66.	3
2	Das Prinzip der TaqMan-Sonde. Quelle: Roche (2003) S.10.	4
3	Nachweisgrenze des br1 Primers	13
4	Nachweisgrenze des cas1 Primers	14
5	Nachweisgrenze des cor2m Primers	15
6	Nachweisgrenze des lindm Primers	16
7	Nachweisgrenze des pabu1 Primers	17
8	Nachweisgrenze des pla3 Primers	18
9	Nachweisgrenze der ped, ped1 Primer	19
10	Nachweisgrenze des pmtaq Primers	20

1 Einleitung, Problemstellung

An den Brauer werden heute große Anforderungen gestellt. Das Getränk Bier muss den hohen Qualitätsansprüchen der Verbrauchererwartung genügen. Eine Kontamination mit bierfremden Mikroorganismen auf dem Herstellungsweg kann von leichtem Bodensatz, zu Trübungen, über geschmackliche Veränderungen bis hin zur Ungenießbarkeit des Bieres führen. Es muss daher alles mögliche unternommen werden, um fremde Mikroorganismen frühzeitig nachzuweisen¹.

Der klassischen biologischen Betriebskontrolle gelingt ein solcher Nachweis mit Hilfe von Nährböden in einem Zeitraum von drei bis fünf Tagen. Eindeutige Identifizierungen mit Hilfe von Selektivmedien nehmen noch mehr Zeit in Anspruch. Die Polymerase-Ketten-Reaktion verkürzt diesen Zeitraum auf mehrere Stunden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Real-Time PCR Screening-System zum Nachweis von Lactobacillen und Pediococcen basierend auf spezifischen Identifizierungsprimern zu entwickeln und zu optimieren. Das System sollte nur eine kleine Gruppe von Bierschädlingen nachweisen, die den Großteil aller in Brauereien auftretender Kontaminationen verursachen. Damit sollten die Probleme bestehender allgemeiner Screening-Systeme - mögliche positive PCR-Ergebnisse durch den Nachweis von harmloser Begleitflora - umgangen werden. Die Tatsache, dass das Screening aus spezifischen Identifizierungsprimern aufgebaut ist, ermöglicht außerdem - bei Abkopplung der Primer vom Screening - eine genaue Identifikation eines Bierschädlings.

Zur Entwicklung und Optimierung des System wurden die Kreuzreaktionen und Nachweisgrenzen der spezifischen Identifizierungsprimer in verschiedenen Versuchsreihen bestimmt und gegebenenfalls die Primersequenzen überarbeitet. Die abschliessende Versuchsreihe kombinierte die Primer zu zwei experimentellen Screening-Systemen und prüfte ihre praktische Einsatzfähigkeit.

¹vgl. Kunze (1998), S. 19ff und S. 686

2 Grundlagen

2.1 Das Prinzip der PCR

Alle modernen Anwendungen der Polymerase-Ketten-Reaktion - kurz PCR - beruhen auf der 1983 von Kary Mullis erdachten in vitro Amplifikation von DNA. Der Name PCR leitet sich von der exponentiellen Vermehrungsrate der DNA bei dieser Technik ab².

Ausgehend von einer anfänglichen DNA-Probe, der Template-DNA, wird in ca. 25 - 40 Zyklen die Menge der vorliegenden DNA vervielfältigt. Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich dabei die Menge der Template-DNA bei jedem Zyklus. Jeder einzelne besteht aus einem Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt³. Die Zeit- und Temperaturführung der einzelnen Schritte ist abhängig von der jeweiligen Anwendung, orientiert sich aber an den beteiligten Enzymen und Reagenzien.

Die Denaturierung erfolgt bei ca. 94 °C in einem Zeitraum von etwa 15-30 Sekunden, abgesehen von einer initialen längeren Denaturierung. Die doppelsträngige DNA wird dabei in Einzelstränge geteilt.

Annealing und Elongation erfolgen bei ca. 55 °C bzw. 72 °C, werden aber bei modernen Anwendungen häufig auf einer Temperaturstufe bei ca. 60 °C zusammengefasst. Im Annealingschritt lagern sich Oligonucleotidprimer an die DNA-Einzelstränge an und werden im Elongationsschritt von einer DNA-Polymerase unter Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) verlängert. Diese Vorgänge wiederholen sich in jedem weiteren Zyklus. Die Primer, die dNTPs sowie verschiedene weitere Substanzen, z.B. Magnesiumchlorid als Coenzym für die Polymerase, stellt der Reaktionsansatz zur Verfügung. Für den optimalen pH sorgt ein geeigneter Puffer⁴. Eine schematische Darstellung des Reaktionsablaufs findet sich in Abbildung 1 auf der nächsten Seite.

Bei den Primern handelt es sich um kurze, einzelsträngige - zu einer definierten Sequenz der Ausgangs-DNA komplementäre - DNA-Moleküle. Die Gestaltung der Primer ist verantwortlich für den spezifischen Ablauf der PCR. Es lassen sich gezielt nur bestimmte DNA-Teilstücke amplifizieren⁵.

Das vermehrte DNA-Segment wird mit Hilfe verschiedener Verfahren entweder nach der PCR (Standard-PCR) oder während der Durchführung (Real-Time-PCR) gemessen.

²vgl. Müller (2001), S. 1

³vgl. Mülhard (1999) S.65ff; vgl. Newton und Graham (1994) S. 19ff

⁴vgl. Mülhard (1999) S.65ff

⁵vgl. Newton und Graham (1994) S. 20f

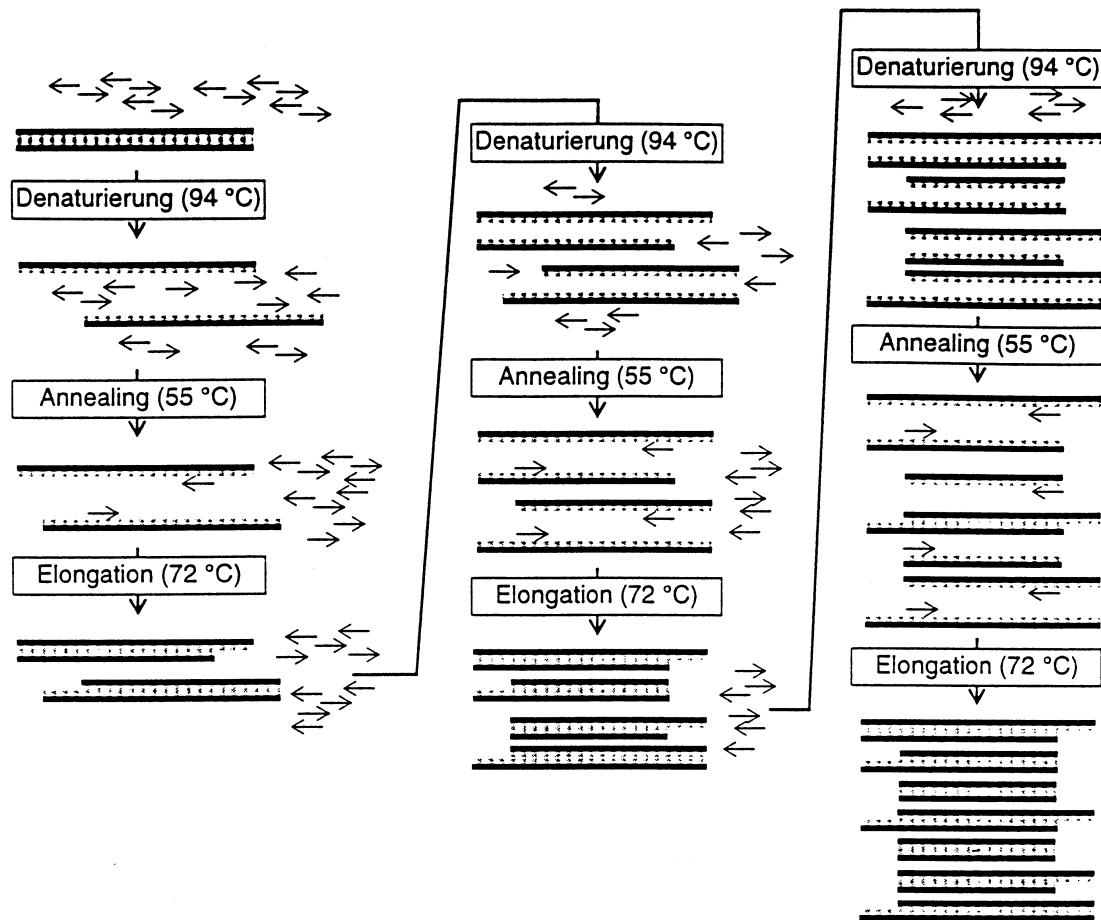


Abbildung 1: Das PCR-Prinzip: Denaturierung, Annealing und Elongation. Quelle: Mülhard (1999) S.66.

2.2 Real-Time-PCR

Bei der Real-Time-PCR wird der Amplifikationsstatus der Template-DNA direkt während der Durchführung der PCR gemessen. Die Detektion erfolgt i.d.R. mit fluoreszierenden Molekülen. Diese sind endständig an Oligonucleotide, ähnlich den Primern, gekoppelt. Die Sequenz ist komplementär zu einem Abschnitt der nachzuweisenden Template-DNA⁶.

Das TaqMan-System bedient sich eines Fluorophors (Reporter) und eines Quencher-Moleküls, die jeweils an die Enden des Oligonucleotids geknüpft sind (TaqMan-Sonde). Die räumliche Nähe des Quencher-Moleküls hindert das Fluorophor an der Emission von Licht. Trifft die Polymerase während des Elongationsschritt auf die angelagerte TaqMan-Sonde wird das Quencher-Molekül vom Fluorophor getrennt, der Reporter kann dann Licht emittieren, welches von spezifischen Detektoren gemessen wird.⁷ Das Prinzip wird in Abbildung 2 auf der nächsten Seite dargestellt.

⁶vgl. Müller (2001), S. 61

⁷vgl. Müller (2001), S. 63

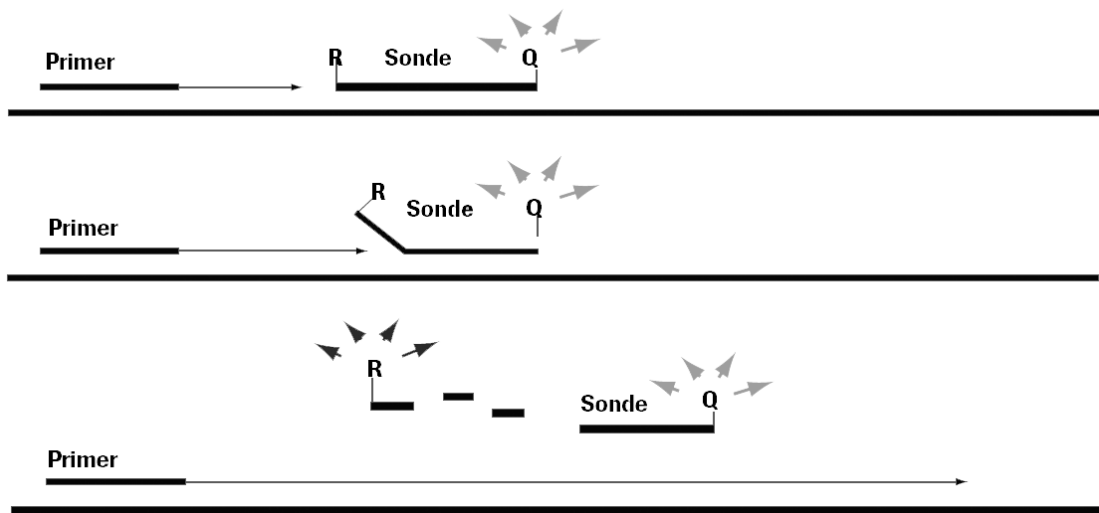


Abbildung 2: Das Prinzip der TaqMan-Sonde. R Reporter , Q Quencher. Quelle: Roche (2003) S.10.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die Versuche wurden mit einem iCycler iQTM Multi-Color Real Time von BIO-RAD Laboratories GmbH durchgeführt. Das Filterset ermöglichte die gleichzeitige Online-Beobachtung von vier verschiedenen Fluorophoren (vgl. Tabelle 1). Die Thresholdcycles positiver Befunde werden von der Software des Gerätes automatisch bestimmt.

Tabelle 1: Mit dem iCycler detektierbare Fluorophore angegeben mit Extinktions- und Emissionswellenlängen

Fluorophor	Extinktion (nm)	Emission (nm)
Cy5	649	670
FAM	488	518
HEX	466	556
6-ROX	575	602

Die Polymerase (Qiagen Hotstart) und der PCR-Puffer stammen von Qiagen, das verwendete $MgCl_2$ von Roche bzw. Qiagen, und die dNTP's von Amersham Pharmacia. Die Primer wurden von MWG Biotech AG synthetisiert, die TaqMan-Sonden von Metabion. Alle Sequenzen sind Teil eines laufenden Forschungsprojekts und werden daher nicht veröffentlicht. Von den Sonden stehen Varianten für die Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen zu Verfügung.

3.2 Aufbau der PCR-Systeme

Die Systeme der Identifizierungsprimer aus einem spezifischen Vorwärtsprimer und einem universellen Rückwärtsprimer. Die amplifizierte DNA wird mit Hilfe einer universellen Sonde detektiert. Rückwärtsprimer und Sonde sind in ihrer DNA-Sequenz so gestaltet, dass sie auf eine Vielzahl von Lactobacillen, Pediococcen und anderen Bakterien passen⁸.

Vorteilhaft bei diesem Aufbau ist die, selbst bei einer Kombination der Einzelsysteme, geringe Anzahl von Primern und Sonden im Reaktionsmix. Hohe Zahlen senken die Sensitivität des PCR-Systems und erhöhen die Gefahr von unspezifischen Reaktionen⁹.

⁸vgl. Panit (2003)

⁹vgl. Mülhard (1999), S. 68ff

3.3 Versuchsdurchführung

Für alle Versuche wurde als Template ein DNA-Isolat des entsprechenden Mikroorganismus mit einer Konzentration von 1 ng/ μ l verwendet¹⁰. Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde, ausgehend von dieser Konzentration, eine dekadische Verdünnungsreihe eingesetzt (vgl. 4.2.1 auf Seite 13). Das Temperaturprofil für alle Versuche setzte sich aus einer 12 minütigen Vordenaturierung bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen mit je 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 60 Sekunden zusammen. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte jeweils am Ende eines Zyklus.

Für die Bestimmung der Kreuzreaktionen der einzelnen spezifischen Identifikationsprimer wurde der PCR-Ansatz aus Tabelle 2 auf der nächsten Seite verwendet. Getestet wurde gegen eine Auswahl von Bierschädlingen (vgl. 4.1 auf Seite 8ff, und Anhang A auf Seite 25). Bei diesen Versuchen ist zu beachten, dass aufgrund der hohen verwendeten DNA-Konzentration nur bei Thresholdcycles kleiner als 35 auftretende Kreuzreaktionen praxisrelevant sind. Praxisproben mit Spurenkontaminationen weisen i.d.R. wesentlich geringere Konzentrationen auf.

Der gleiche PCR-Ansatz kam bei den Versuchen bezüglich der Nachweisgrenzen zum Einsatz. Vergleichend wurde dieselben Verdünnungsreihen mit dem 630c Screening-System (vgl. Tabelle 3 auf der nächsten Seite) getestet. Alle Versuche erfolgten in Doppelbestimmung. Die Berechnung der PCR-Effizienz (Efficiency) zur Bewertung der Primer erfolgte nach folgenden Formeln aus der Standardkurve.

$$\begin{aligned} \text{Exponential Amplification} &= 10^{(-1/\text{slope})} \\ \text{Efficiency} &= (\text{Exponential Amplification} - 1) * 100\% \end{aligned}$$

Eine Effizienz von 100 % lässt auf einen optimalen Ablauf der PCR schließen. Die Templatemenge verdoppelt sich bei diesem Wert mit jedem Zyklus. Eine zu hohe oder zu niedrige Effizienz schränkt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ein und lässt Rückschlüsse auf einen ungünstigen Reaktionsverlauf (z.B. spätes extrem starkes Einsetzen der Reaktion, vgl. Abb. 7 auf Seite 17) zu¹¹. Folglich ist eine hohe Effizienz (z.B. 150 %) nicht wünschenswert, sondern ein Wert nahe der 100 % Marke.

¹⁰Protokoll zur DNA-Isolierung Panit (2003) S. 14f

¹¹vgl. Stratagene (2003) und 2.1 auf Seite 2

Tabelle 2: Standardansatz zur Bestimmung der Kreuzreaktionen und Nachweisgrenzen der spezifischen Identifikationsprimer

PCR-Volumen	25,00 μ l
Template-Volumen	2,50 μ l
Puffer	1,00 x
Mg²⁺	3,00 mM
Getesteter Primer	500,00 nM
zugehöriger Rückwärtsprimer [taq_rp, pm_rp (pm), 767 (lind_m, pla3)]	500,00 nM
zugehörige Sonde [295, pm576 (pm), 707(lind_m, pla3)]	200,00 nM
dNTPs	200,00 μ m
Polymerase	2,00 U

Tabelle 3: PCR-Ansatz des Screening-Systems 630c

PCR-Volumen	25,00 μ l
Template-Volumen	2,50 μ l
Puffer	1,00 x
Mg²⁺	3,00 mM
Primer 1: 630c	500,00 nM
Primer 2: lindm	500,00 nM
Primer 3: pla	250,00 nM
Rückwärtsprimer: 767	500,00 nM
Sonde: 707	200,00 nM
dNTPs	200,00 μ m
Polymerase	2,00 U

4 Auswertung

4.1 Kreuzreaktionen der spezifischen Identifikationsprimer

Bei allen Versuchen in diesem Kapitel wurde eine doppelte Positivkontrolle mit einem DNA-Isolat des entsprechenden Mikroorganismus durchgeführt. Alle Primer zeigten die erwarteten Nachweisreaktionen.

4.1.1 br1; Nachweis von *Lactobacillus brevis*

Bei dem Test des mit br1 bezeichneten Primers zum Nachweis von *Lactobacillus brevis* traten keine Kreuzreaktionen auf (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Kreuzreaktionen des br1-Primers (bei aufgetretenen Kreuzreaktionen ist der Threshold-cycle in Klammern angegeben)

BS 3	BS 4	BS 6	BS 41	BS 42	BS 46	BS 109	BS 111
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 112	BS 189	BS 190	BS 195	BS 203	BS 218	BS 221	BS 224
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 225	BS 226	BS 230	BS 232	BS 233	BS 235	BS 239	BS 244
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 246	BS 248	BS 264	BS 268	BS 269	BS 271	BS 272	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	

4.1.2 cas1; Nachweis von *Lactobacillus casei*

Die Bestimmung der Kreuzreaktionen des mit cas1 bezeichneten Primers zum Nachweis von *Lactobacillus casei* zeigte nur den erwarteten Befund bei *Lactobacillus paracasei* (BS 225). Diese Mikroorganismen sind nahe verwandt und können mit dem cas1 Primer nicht unterschieden werden. Die Kreuzreaktion mit *Pectinatus frisingensis* (BS 42) ist vernachlässigbar (vgl. Tabelle 5 auf der nächsten Seite).

4.1.3 col1; Nachweis von *Lactobacillus collinoides*

Die Bestimmung der Kreuzreaktionen des mit col1 bezeichneten Primers zum Nachweis von *Lactobacillus collinoides* zeigte viele Kreuzreaktionen. Der Primer muss für den Praxiseinsatz überarbeitet werden (vgl. Tabelle 4.1.3).

Tabelle 5: Kreuzreaktionen des cas1-Primers (bei aufgetretenen Kreuzreaktionen ist der Treshold-cycle in Klammern angegeben)

BS 4	BS 6	BS 40	BS 41	BS 42	BS 46	BS 109	BS 111
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv (36,9)	negativ	negativ	negativ
BS 112	BS 189	BS 190	BS 195	BS 203	BS 218	BS 221	BS 224
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 225	BS 226	BS 230	BS 232	BS 233	BS 235	BS 239	BS 244
positiv (19,8)	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 246	BS 248	BS 264	BS 268	BS 269	BS 271	BS 272	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	

Tabelle 6: Kreuzreaktionen des col1-Primers (bei aufgetretenen Kreuzreaktionen ist der Treshold-cycle in Klammern angegeben)

BS 3	BS 4	BS 6	BS 40	BS 41	BS 42	BS 46	BS 109
positiv (34,3)	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 111	BS 189	BS 190	BS 195	BS 203	BS 218	BS 221	BS 224
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv (29,9)
BS 225	BS 230	BS 232	BS 233	BS 235	BS 239	BS 240	BS 244
positiv (26,7)	negativ	negativ	negativ	positiv (32,5)	positiv (30,2)	positiv (30,4)	positiv (29,7)
BS 246	BS 248	BS 264	BS 268	BS 269	BS 271	BS 272	
positiv (31,3)	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	

4.1.4 cor2m; Nachweis von *Lactobacillus coryniformis*

Bei dem Test des mit cor2m bezeichneten Primers zum Nachweis von *Lactobacillus coryniformis* traten keine Kreuzreaktionen auf (vgl. Tabelle 7 auf der nächsten Seite).

4.1.5 pabu1; Nachweis von *Lactobacillus parabuchneri*

Die Bestimmung der Kreuzreaktionen des mit pabu1 bezeichneten Primers zum Nachweis von *Lactobacillus parabuchneri* zeigte nur den erwarteten Befund bei *Lactobacillus buchneri* (BS 264). Diese Mikroorganismen sind nahe verwandt und können mit dem pabu1 Primer nicht unterschieden werden. Die Kreuzreaktion mit *Pediococcus parvulus* (BS 269) ist vernachlässigbar (vgl. Tabelle 8 auf der nächsten Seite).

Tabelle 7: Kreuzreaktionen des cor2m-Primers (bei aufgetretenen Kreuzreaktionen ist der Thresholdcycle in Klammern angegeben)

BS 3	BS 4	BS 6	BS 40	BS 41	BS 42	BS 46	BS 111
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 112	BS 189	BS 190	BS 195	BS 203	BS 218	BS 221	BS 224
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 225	BS 226	BS 230	BS 232	BS 233	BS 235	BS 239	BS 244
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 246	BS 248	BS 264	BS 268	BS 269	BS 271	BS 272	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	

Tabelle 8: Kreuzreaktionen des pabu1-Primers (bei aufgetretenen Kreuzreaktionen ist der Thresholdcycle in Klammern angegeben)

BS 3	BS 4	BS 40	BS 41	BS 42	BS 46	BS 109	BS 111
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 112	BS 189	BS 190	BS 195	BS 203	BS 218	BS 221	BS 224
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 225	BS 226	BS 230	BS 232	BS 233	BS 235	BS 239	BS 244
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 246	BS 248	BS 264	BS 268	BS 269	BS 271	BS 272	
negativ	negativ	positiv (22,9)	negativ	positiv (37,7)	negativ	negativ	

4.1.6 ped; Nachweis von *Pediococcus damnosus*

Die Bestimmung der Kreuzreaktionen des mit ped bezeichneten Primers zum Nachweis von *Pediococcus damnosus* zeigte nur eine Kreuzreaktion bei *Lactobacillus plantarum* (BS 111) und *Pediococcus inopinatus* (BS 195), diese Kreuzreaktionen sind nicht vernachlässigbar (vgl. Tabelle 9 auf der nächsten Seite). Eine Veränderung der Primersequenz wirkte zwar den Kreuzreaktionen entgegen (vgl. 4.1.7), allerdings wurde dadurch die Nachweisgrenze erheblich verschlechtert (vgl. 4.2.7 auf Seite 19).

4.1.7 ped1; Nachweis von *Pediococcus damnosus*

Die Bestimmung der Kreuzreaktionen des mit ped1 bezeichneten Primers zum Nachweis von *Pediococcus damnosus* zeigte nur einen Befund bei *Pediococcus inopinatus* (BS 195), diese Kreuzreaktion ist vernachlässigbar (vgl. Tabelle 10 auf der nächsten Seite).

Tabelle 9: Kreuzreaktionen des ped-Primers (bei aufgetretenen Kreuzreaktionen ist der Treshold-cycle in Klammern angegeben)

BS 3	BS 4	BS 6	BS 40	BS 42	BS 46	BS 109	BS 111
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv (32,8)
BS 112	BS 189	BS 190	BS 195	BS 203	BS 218	BS 221	BS 224
negativ	negativ	negativ	positiv (28,6)	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 225	BS 226	BS 230	BS 232	BS 233	BS 235	BS 239	BS 244
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 246	BS 248	BS 264	BS 268	BS 269	BS 271	BS 272	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	

Tabelle 10: Kreuzreaktionen des ped1-Primers (bei aufgetretenen Kreuzreaktionen ist der Tresholdcycle in Klammern angegeben)

BS 3	BS 4	BS 6	BS 40	BS 42	BS 46	BS 109	BS 111
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 112	BS 189	BS 190	BS 195	BS 203	BS 218	BS 221	BS 224
negativ	negativ	negativ	positiv (38,6)	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 225	BS 226	BS 230	BS 232	BS 233	BS 235	BS 239	BS 244
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
BS 246	BS 248	BS 264	BS 268	BS 269	BS 271	BS 272	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	

4.1.8 per; Nachweis von *Lactobacillus perolens*

Die Bestimmung der Kreuzreaktionen des mit per bezeichneten Primers zum Nachweis von *Lactobacillus perolens* zeigte nur einen Befund bei *Micrococcus kristinae* (BS 239), diese Kreuzreaktion ist vernachlässigbar (vgl. Tabelle 11 auf der nächsten Seite).

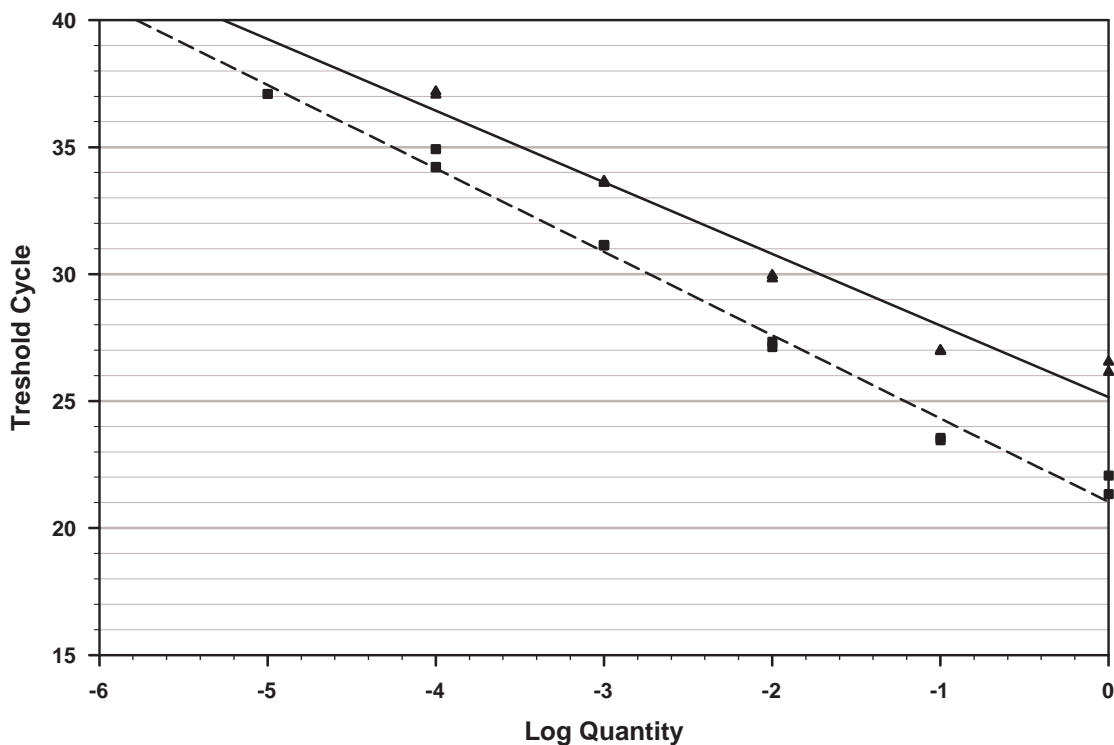
4.1.9 pla3; Nachweis von *Lactobacillus plantarum*

Die Bestimmung der Kreuzreaktionen des mit pla3 bezeichneten Primers zum Nachweis von *Lactobacillus plantarum* zeigte nur einen Befund bei *Lactobacillus curvatus* (BS 218), diese Kreuzreaktion ist vernachlässigbar (vgl. Tabelle 12 auf der nächsten Seite).

4.2 Nachweisgrenzen der spezifischen Identifikationsprimer

4.2.1 br1; Nachweis von *Lactobacillus brevis*

Zur Bestimmung dieser und der folgenden Nachweisgrenzen wurde ausgehend von der Ausgangskonzentration des jeweiligen DNA Isolats - 1 ng/ μ l - eine dekadische Verdünnungsreihen angelegt, d.h. bei einer Verdünnung von 10^{-1} betrug die Konzentration 0,1 ng/ μ l, bei 10^{-2} 0,01 ng/ μ l, fortgesetzt bis 10^{-7} . Die logarithmische Auftragung und lineare Regression wurden mit dem Programm Sigmaplot 8.0 durchgeführt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des br1 Primers wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 40 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.

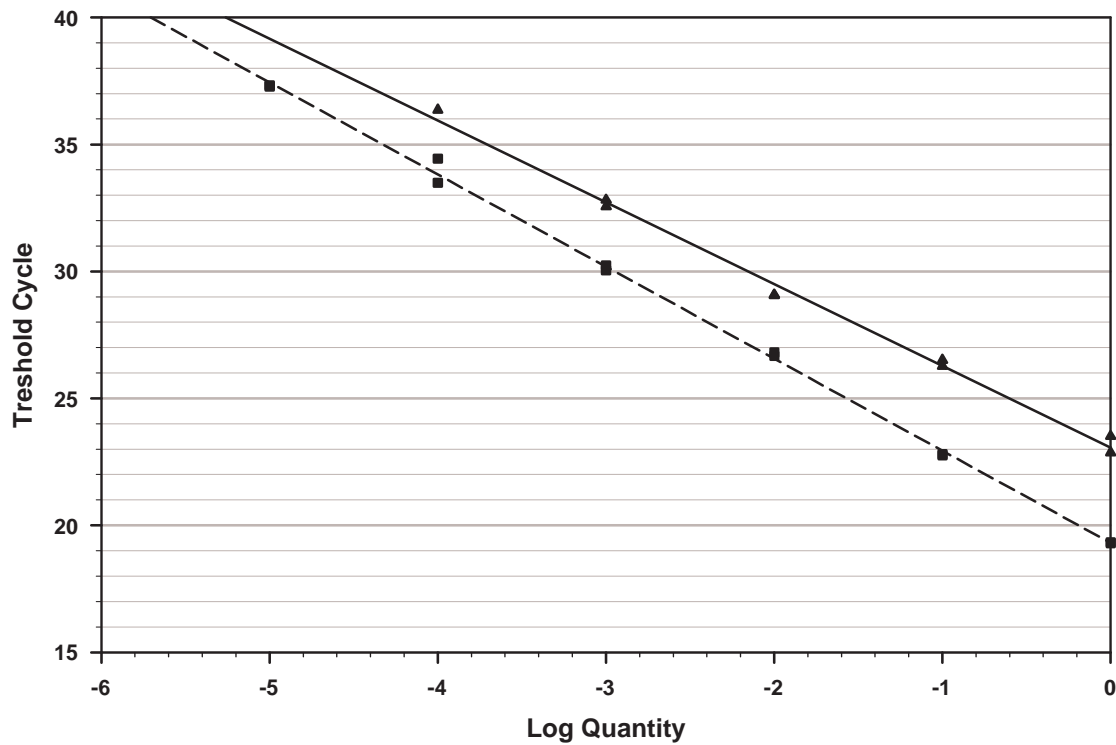


	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
br1	0,955	-2,820	2,263	126 %
630C	0,988	-3,823	1,826	183 %

Abbildung 3: Nachweisgrenze des br1 Primers. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((\blacktriangle) br1, (\blacksquare) 630c) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörigen linearen Regressionen (—br1, - - - 630c) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regressionen und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.2.2 cas1; Nachweis von *Lactobacillus casei*

Die Verdünnungsreihe wurde analog zu 4.2.1 auf der vorherigen Seite angelegt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des cas1 Primers wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 3 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.

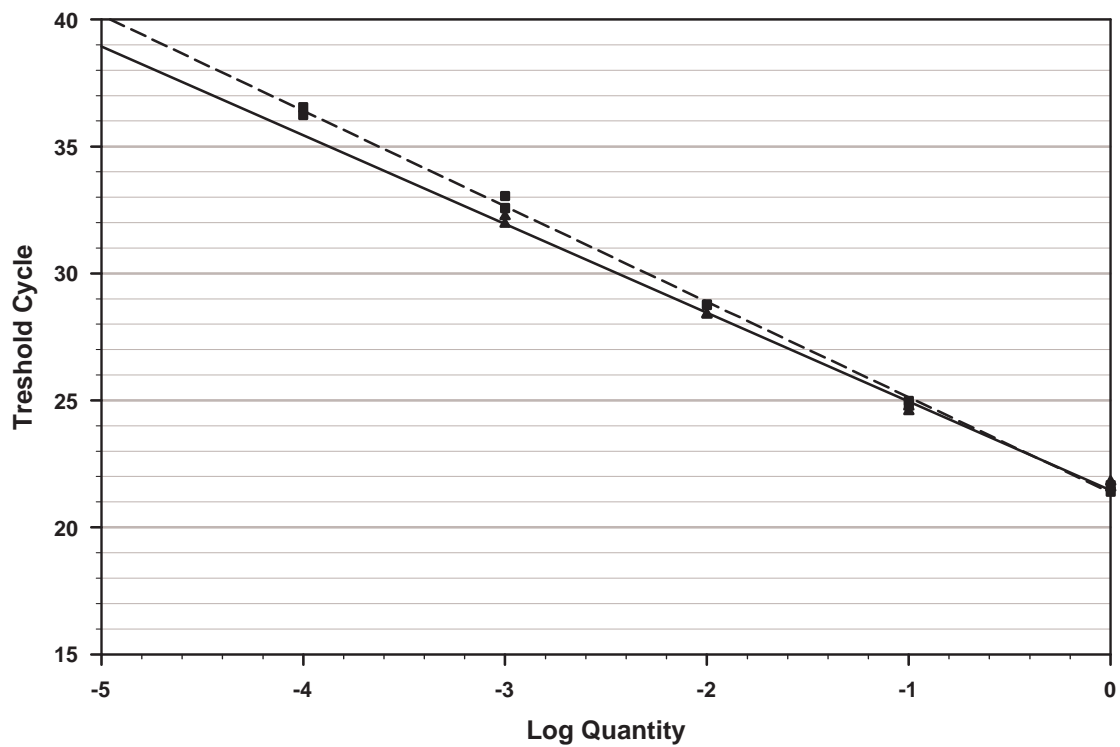


	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
cas1	0,995	-3,220	2,044	104 %
630C	0,999	-3,626	1,887	89 %

Abbildung 4: Nachweisgrenze des cas1 Primers. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((▲) cas1, (■) 630c) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörigen linearen Regressionen (—cas1, - - - 630c) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regressionen und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.2.3 cor2m; Nachweis von *Lactobacillus coryniformis*

Die Verdünnungsreihe wurde analog zu 4.2.1 auf Seite 13 angelegt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des cor2m Primers wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 109 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.

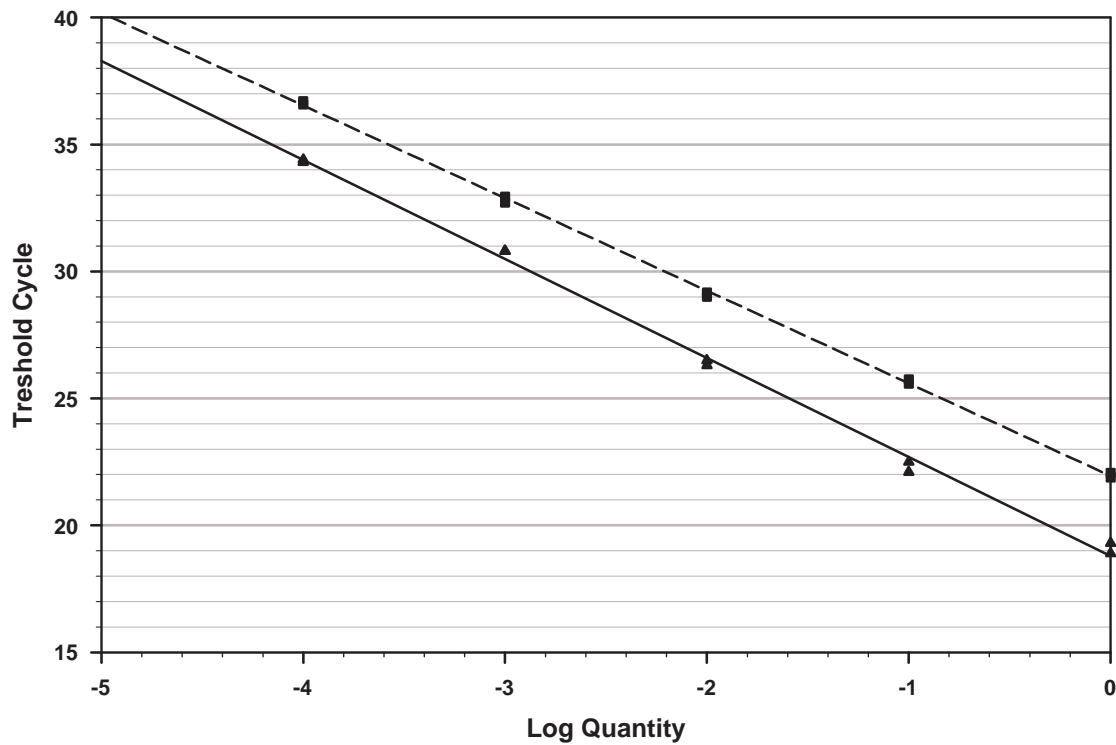


	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
cor2m	0,997	-3,495	1,933	93 %
630C	0,998	-3,760	1,845	85 %

Abbildung 5: Nachweisgrenze des cor2m Primers. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((▲) cor2m, (■) 630c) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörigen linearen Regressionen (—cor2m, - - - 630c) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regressionen und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.2.4 lindm; Nachweis von *Lactobacillus lindneri*

Die Verdünnungsreihe wurde analog zu 4.2.1 auf Seite 13 angelegt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des lindm Primers wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 4 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.



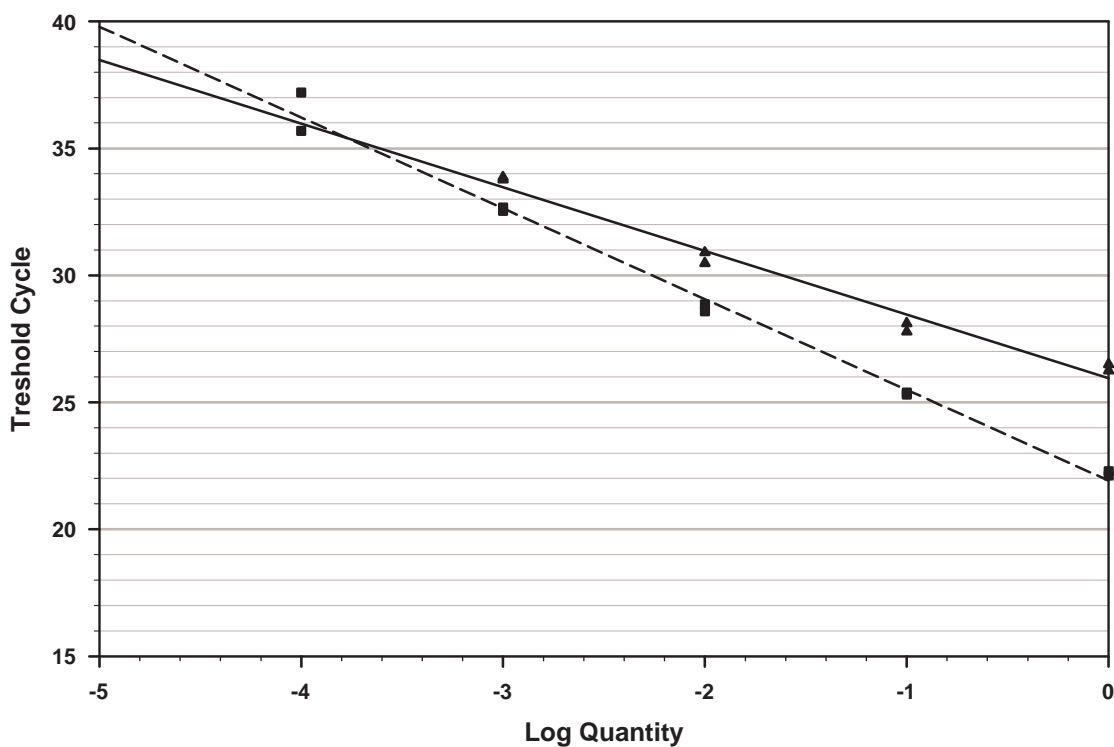
	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
lindm	0,997	-3,900	1,805	81 %
630C	0,999	-3,647	1,880	88 %

Abbildung 6: Nachweisgrenze des lindm Primers. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((▲) cor2m, (■) 630c) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörigen linearen Regressionen (—lindm, - - - 630c) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regressionen und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.2.5 pabu1; Nachweis von *Lactobacillus parabuchneri*

Die Verdünnungsreihe wurde analog zu 4.2.1 auf Seite 13 angelegt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des pabu Primers wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 6 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden bei Log Quantity -4 (vgl. Abbildung 7) lässt den Nachweis dieser Konzentration mit dem pabu Primer erwarten. Der ausbleibende Nachweis liegt möglicherweise in der Schwankungsbreite des Schnittpunkts begründet. Die Bestimmtheitsgrade der Regressionen lassen diese Annahme zu.

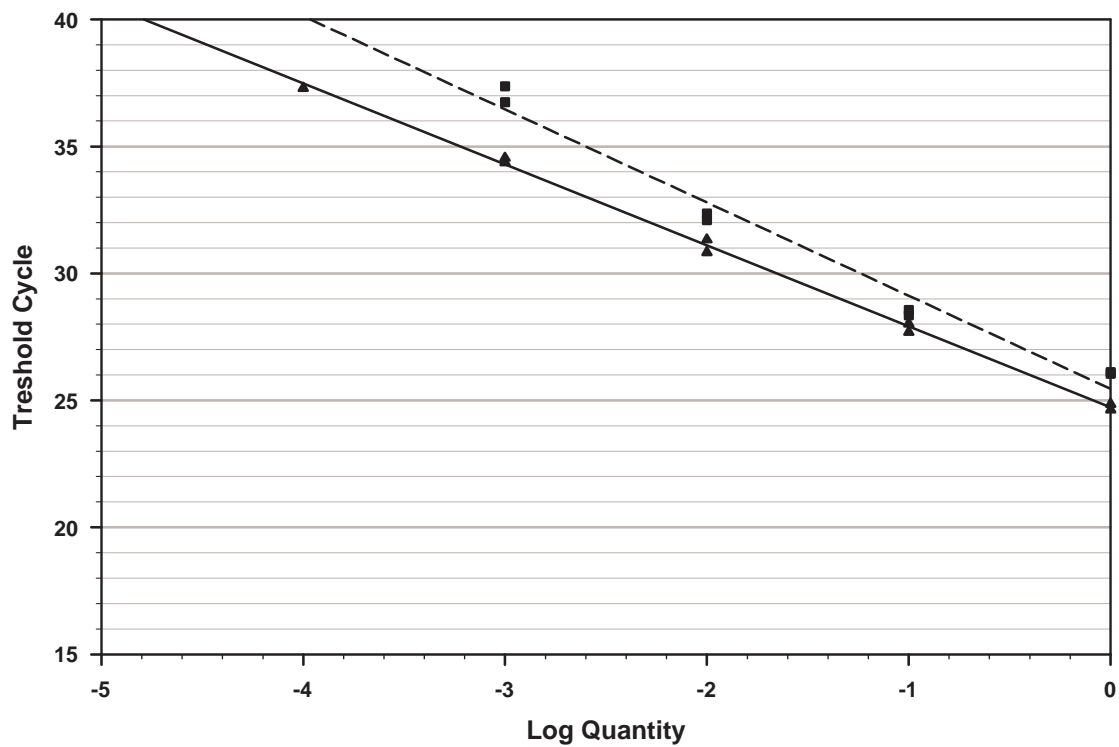


	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
pabu1	0,977	-2,507	2,505	151 %
630C	0,993	-3,575	1,904	90 %

Abbildung 7: Nachweisgrenze des pabu1 Primers. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((▲) pabu1, (■) 630c) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörigen linearen Regressionen (—pabu1, - - - 630c) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regressionen und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.2.6 pla3; Nachweis von *Lactobacillus plantarum*

Die Verdünnungsreihe wurde analog zu 4.2.1 auf Seite 13 angelegt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des pla3 Primers wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 111 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.

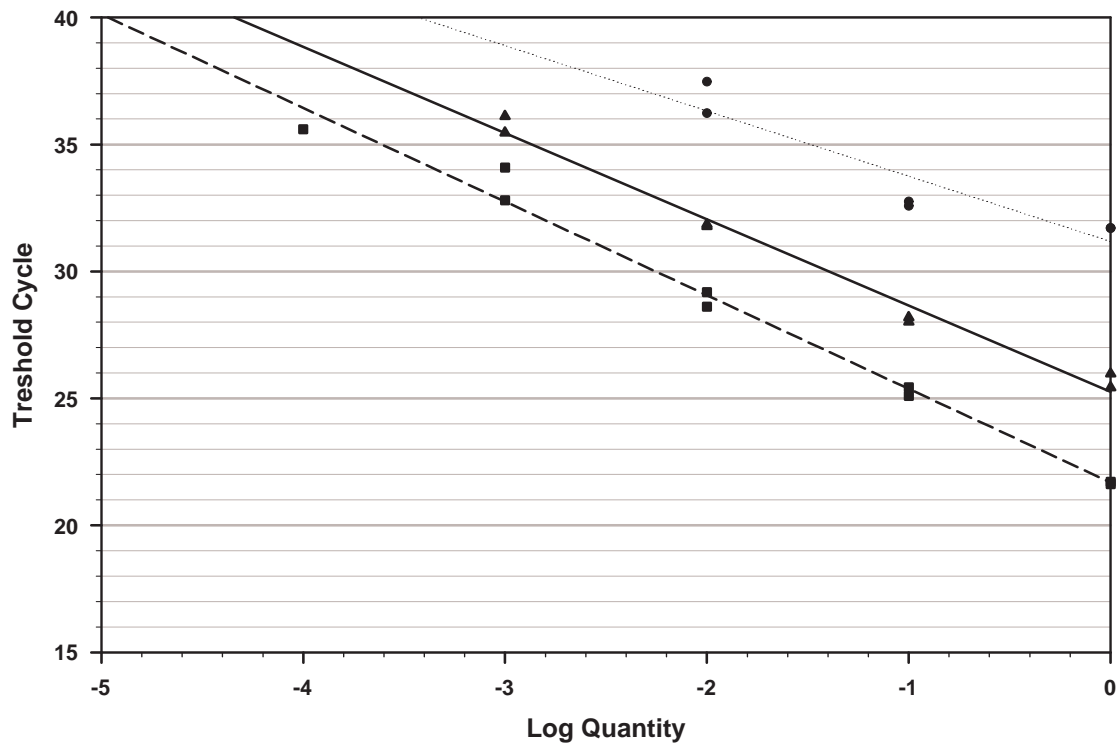


	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
pla3	0,977	-3,188	2,058	106 %
630C	0,976	-3,670	1,873	87 %

Abbildung 8: Nachweisgrenze des pla3 Primers. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((▲) pla3, (■) 630c) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörigen linearen Regressionen (—pla3, - - - 630c) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regressionen und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.2.7 ped, ped1; Nachweis von *Pediococcus damnosus*

Die Verdünnungsreihe wurde analog zu 4.2.1 auf Seite 13 angelegt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der ped, ped1 Primer wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 41 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.



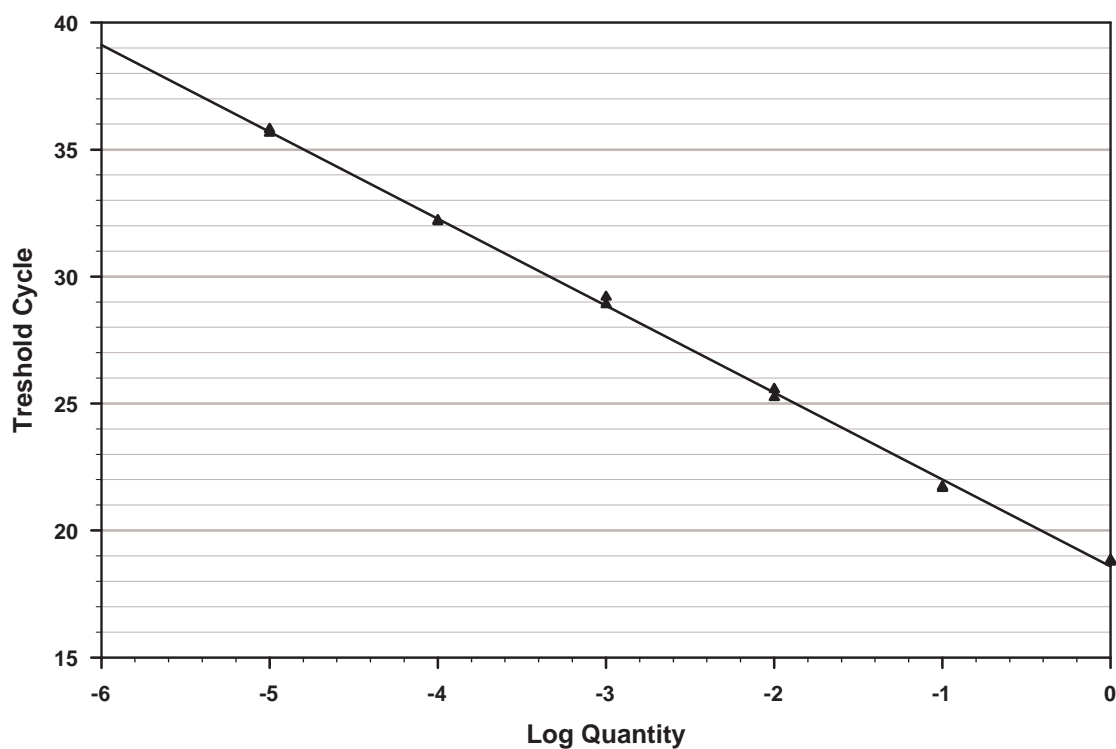
	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
ped	0,985	-3,397	1,970	97 %
ped1	0,862	-2,573	2,447	106 %
630C	0,987	-3,687	1,867	87 %

Abbildung 9: Nachweisgrenze der ped, ped1 Primer. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((▲) ped, (●) ped1, (■) 630c) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörigen linearen Regressionen (—ped, ... ped1, - - - 630c) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regressionen und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.2.8 pm; Nachweis von *Pectinatus spp.*, *Megasphaera cerevisiae*

Die Verdünnungsreihe wurde analog zu 4.2.1 auf Seite 13 angelegt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des pm Primers wurde das DNA Isolat mit der Bezeichnung BS 42 als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe verwendet.

Pectinatus frisingensis (BS 42) und *Megasphaera cerevisiae* (BS 46) werden vom 630C-Screening nicht erfasst, darum ist in Abbildung 10 nur die Nachweisgrenze des pm Primers dargestellt.



	R^2	Slope	Amplification	Efficiency
pm	0,999	-3,421	1,960	96 %

Abbildung 10: Nachweisgrenze des pmtaq Primers. Im Diagramm sind die Threshold Cycles ((▲) pm) den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet und die zugehörige lineare Regression (—pmtaq) dargestellt. Die angeschlossene Tabelle gibt Auskunft über die Eckdaten der Regression und die Kennzahlen der PCR (vgl. 3.3 auf Seite 6).

4.3 Kombinationssysteme

In den letzten Versuchsreihen wurden die Einzelprimer in zwei verschiedenen Screening-Systemen kombiniert. Der Vergleich der beiden mit dem 630C Screening ist in Tabelle 13 dargestellt.

Das blc2p4 System (Name abgeleitet von den Anfangsbuchstaben der Primer) besteht aus den Primern br1, lind_m, cas1, cor2m, ped, pla3, pabu sowie dem taq_rp Rückwärtsprimer (Konzentration 500nm), den pm Vorwärts- und Rückwärtsprimer (400nm), sowie den Sonden 707, 295 und pm576 (200nm). Das Fluoreszenzsignal wurde auf den Kanälen FAM (707, 295) und ROX (pm576) gemessen (vgl. Tabelle 1 auf Seite 5).

Bei der Durchführung der Versuche wurden weitere Kreuzreaktionen mit *Lactobacillus rhamnosus* und *Lactobacillus zeae* festgestellt. Sie wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit vom cas1 Primer detektiert. Die DNA-Sequenzen der beiden Mikroorganismen sind der von *Lactobacillus casei* sehr ähnlich, früher erfolgte ihre Einteilung als subspecies von *Lactobacillus casei*¹².

Das Screening und relevante Bierschädlinge System ist eine Kombination aus dem oben beschriebenen blc2p4 System und dem 630C Screening System (vgl. Tabelle 3 auf Seite 7) sowie einer internen Positivkontrolle. Dabei wurde 630C auf dem FAM Kanal (Primer: 630C, lind_m, pla, 767, Sonde 707), bc2p4 auf dem CY5 (Primer: br1, cas1, cor2m, ped, pla3, pabu, taq_rp, Sonde 295CY5) und dem ROX Kanal(pm, Sonde pm576) gemessen. Die interne positiv Kontrolle - gemessen auf HEX (Sonde Y58HEX) - besteht aus dem cat_fw, cat_rw Primerpaar und dem zugehörigen DNA-Isolat (*Candida tropicalis*). Ziel dieser Kombination ist es ein evtl. positives Signal des breiten 630C Screenings einer engen Gruppe relevanter Bierschädlinge zuzuordnen (bc2p4), die interne Positivkontrolle hätte den Praxiseinsatz vereinfacht. Allerdings zeigten die Versuche nur mangelhafte Ergebnisse (vgl. Tabelle 13 und 5 auf der nächsten Seite).

Tabelle 13: Vergleich verschiedener Systeme kombinierter Primer. Angegeben sind die Threshold Cycles ausgewählter Bierschädlinge, die von den Systemen erfasst werden.

	630c	blc2p4	Screening & relevante BS	
<i>Lactobacillus casei</i> (BS 3)	22,7	24,8	26,6	-
<i>Lactobacillus lindnerii</i> (BS 4)	22,4	23,5	31,6	-
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> (BS 6)	20,85	24,15	24,6	-
<i>Lactobacillus brevis</i> (BS 40)	21,95	27,8	25,6	30,4
<i>Pediococcus damnosus</i> (BS 41)	24,2	27,35	27,6	-
<i>Pectinatus frisingensis</i> (BS 42)	19,6	19,7	22,1	
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (BS 109)	23,05	22,4	26,3	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> (BS 111)	23,6	24,4	27,6	-

¹²vgl. Yansanyav *et al.* (2003) und Tilsala-Timisjärvi und Allatossava (1997)

5 Diskussion und Ausblick

Die Versuche bestätigen die Praxistauglichkeit der spezifischen Identifikationsprimer, sowohl einzeln zur Identifikation als auch kombiniert in einem Screening-System. Davon ist der mit col1 bezeichnete Primer aufgrund seiner zahlreichen Kreuzreaktionen als einziger auszunehmen (vgl. 4.1.3 auf Seite 8). Beim Nachweis von *Pediococcus damnosus* muss für das jeweilige Einsatzgebiet der richtige Primer gewählt werden. Im Screening-System kann der ped Primer ohne weiteres zum Einsatz kommen, es treten nur Kreuzreaktionen mit Mikroorganismen auf, die von Screening sowieso mit abgedeckt werden. Folglich muss jedoch als einzelner Identifikationsprimer ped1 genutzt werden, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Dabei kann aber aufgrund der schlechten Nachweisgrenze (vgl. 4.2.7 auf Seite 19) je nach Ausgangskonzentration eine Aufkonzentrierung der Template DNA, z.B. in Form einer Anreicherungskultur, erforderlich sein.

Die Kombination der br1, lind_m, cas1, cor2m, ped, pla3, pabu und pm Primer im blc2p4 Screening-System brachte gute Ergebnisse. Die Nachweisgrenzen sind nur unwesentlich schlechter als bei dem unspezifischeren 630C System (vgl. 4.3 auf der vorherigen Seite). Mit dieser Kombination der einzelnen Primer ist das Ziel ein Screening System, das sich nur auf den Nachweis einer eingeschränkten Gruppe von Bierschädlingen konzentriert (vgl. 1 auf Seite 1) im Wesentlichen erfüllt.

Die Kombination des blc2p4 mit dem 630C System und einer internen Positivkontrolle führte zu mangelhaften Ergebnissen (vgl. 4.3 auf der vorherigen Seite). Mit großer Wahrscheinlichkeit treten die 630C und blc2p4 Primer in Konkurrenz um die Template DNA, zusätzlich dazu beansprucht die interne Positivkontrolle einen Teil der Polymeraseaktivität für sich. Dadurch stehen für jede Sonde weniger DNA-Material pro Zyklus zur Verfügung und die Threshold Cycles verschieben sich in den hohen Bereich bis hin zum fehlenden Nachweis (vgl. Tabelle 13 auf der vorherigen Seite).

Ausgehend von den gewonnenen Ergebnissen erschließen sich verschiedene Möglichkeiten weiter vorzugehen. Der col1 Primer könnte weiter entwickelt und in das blc2p4 Screening-System integriert werden. Mit Hilfe von fertigen PCR-Mixen könnte ein PCR-Kit zum Einsatz in der biologischen Betriebsüberwachung entwickelt werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Real-Time PCR Screening-System zum Nachweis von *Lactobacillen* / *Pediococcen* basierend auf spezifischen Identifizierungsprimern entwickelt und optimiert. Es wurden Versuche zu den Kreuzreaktionen und Nachweisgrenzen der Primer durchgeführt.

Dadurch wurde die Praxistauglichkeit der spezifischen Identifikationsprimer, sowohl einzeln zur Identifikation als auch kombiniert in einem Screening-System basierend auf TaqMan-Sonden bestätigt. Davon ist der mit col1 bezeichnete Primer aufgrund seiner zahlreichen Kreuzreaktionen als einziger auszunehmen. Beim Nachweis von *Pediococcus damnosus* wird für das Screening-System der ped Primer aufgrund seiner niedrigeren Nachweisgrenze genutzt, für die Identifikation sollte der ped1 Primer herangezogen werden, er gewährleistet eine höhere Spezifität durch weniger ausgeprägte Kreuzreaktionen.

Das blc2p4 Screening-System basierend auf den spezifischen Identifizierungsprimern detektiert mit einer ausreichenden Nachweisgrenze spezifisch die gewünschten Mikroorganismen (*L. brevis*, *L. lindneri*, *L. coryniformis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. parabuchneri*, *P. damnosus*, *M. cerevisiae* und *P. spp*). Die Kombination des blc2p4 mit dem 630C System und einer internen Positivkontrolle führte zu mangelhaften Ergebnissen.

Literatur

- KUNZE, W. (1998). *Technologie Brauer und Mälzer*. Berlin: VLB, 8., völlig neu bearbeitete Auflage.
- MÜLHARD, C. (1999). *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Jena, Lübeck, Ulm: G. Fischer.
- MÜLLER, H.-J. (2001). *PCR - Polymerase-Ketten-Reaktion*. Heidelberg, Berlin: Spektrum; Akademischer Verlag.
- NEWTON, C. UND GRAHAM, A. (1994). *PCR*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum; Akademischer Verlag.
- PANIT, K. (2003). *Entwicklung und Optimierung verschiedener Primersysteme zum PCR-Nachweis von bierschädlichen Lactobacillus- und Pediococcus-Arten*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II der Technischen Universität München.
- ROCHE (2003). *PCR: Eine ausgezeichnete Methode*. Roche Facetten(Nr. 22). URL http://www.roche.com/pages/facetten/pcr_d.pdf.
- STRATAGENE (2003). *Application Note 10: Efficiency of PCR Reactions*. URL <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/mx4000-appnotes10.pdf>.
- TILSALA-TIMISJÄRVI, A. UND ALLATOSSAVA, T. (1997). *Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR*. International Journal of Food Microbiology(Nr. 35 S. 49-56).
- YANSANYAV, A.; SVEC, P.; SEDLACEK, I.; HOLLEROVA, I.; UND NEMEC, M. (2003). *Ri-potyping of lactobacilli isolated from spoiled beer*. FEMS Microbiology Letters(Nr. 229 S. 141-144).

A Liste der Mikroorganismen

Tabelle 14: Liste der Mikroorganismen

BS 3	<i>Lactobacillus casei</i>	BS 225	<i>Lactobacillus paracasei</i>
BS 4	<i>Lactobacillus lindneri</i>	BS 226	<i>Lactobacillus perolens</i>
BS 6	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	BS 230	<i>Leuconostoc lactis</i>
BS 40	<i>Lactobacillus brevis</i>	BS 232	<i>Weisella mesenteroides</i>
BS 41	<i>Pediococcus damnosus</i>	BS 233	<i>Escherichia coli</i>
BS 42	<i>Pectinatus frisingensis</i>	BS 235	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BS 46	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	BS 239	<i>Micrococcus kristinae</i>
BS 109	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	BS 240	<i>Lactobacillus perolens</i>
BS 111	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BS 244	<i>Pantoea dispersa</i>
BS 112	<i>Lactobacillus collinoides</i>	BS 246	<i>Obesumbacterium proteus</i>
BS 189	<i>Gluconobacter oxidans</i>	BS 248	<i>Sarcina maxima</i>
BS 190	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	BS 264	<i>Lactobacillus buchneri</i>
BS 195	<i>Pediococcus inopinatus</i>	BS 268	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
BS 203	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BS 269	<i>Pediococcus parvulus</i>
BS 218	<i>Lactobacillus curvatus</i>	BS 271	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>
BS 221	<i>Lactobacillus gasseri</i>	BS 272	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
BS 224	<i>Lactobacillus johnsonii</i>		