

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
der Technischen Universität München

**Quantitativer Nachweis von Deoxynivalenol und Trichothecene-bildenden
Fusarium spp.
mit Biosensor und PCR in Getreide**

Helge Schnerr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel
2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rolf Geisen, Universität Karlsruhe (TH)

Die Dissertation wurde am 25. März 2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 09. Juli 2002 angenommen.

Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Registrierte Handelsmarken.....	XII
1. Zielsetzung.....	2
2. Einleitung.....	5
2.1. Allgemeine Einleitung.....	5
2.1.1. Mykotoxine.....	5
2.1.2. Kontamination des Getreides.....	8
2.1.3. Fusarium Toxine.....	10
2.1.4. Die Gruppe der Trichothecen Mykotoxine.....	13
2.1.5. Charakterisierung von Deoxynivalenol.....	16
2.1.5.1. Eigenschaften.....	16
2.1.5.2. Biochemische Wirkung und Toxikokinetik.....	18
2.1.5.3. Toxizität.....	19
2.2. Nachweis von <i>Fusarium</i> -Arten.....	22
2.2.1. Herkömmliche Analysemethoden.....	22
2.2.2. Desoxyribonukleinsäure.....	24
2.2.2.1. Wechselwirkung von niedermolekularen Substanzen mit DNA.....	25
2.2.3. Die Polymerase Kettenreaktion.....	26
2.2.4. Elektrophoretische Methoden.....	29
2.2.5. Quantifizierung von DNA.....	30
2.2.5.1. Absorbionsmessung.....	30
2.2.5.2. Quantitative PCR.....	30
2.2.5.3. Quantitative PCR für Mycotoxin-bildende <i>Fusarium</i> -Arten.....	31
2.2.5.4. Kinetischer Verlauf einer PCR-Reaktion.....	32
2.2.5.5. Real-Time-PCR unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligo- nukleotiden.....	33
2.2.5.6. Real-Time-PCR unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen.....	34
2.2.6. LightCycler-System.....	35
2.3. Nachweis von Deoxynivalenol.....	37
2.3.1. Allgemeines.....	37
2.3.2. Extraktion und Reinigung.....	38
2.3.3. Trennung und Detektion.....	39
2.3.3.1. Physikalisch-Chemische Nachweisverfahren.....	39
2.3.3.1.1. Gaschromatographie.....	39
2.3.3.1.2. Hochdruckflüssigkeitshromatographie.....	40
2.3.3.2. Alternative Verfahren.....	42
2.3.3.2.1. Dünnschichtchromatographie.....	42
2.3.3.2.2. Immunologische Nachweisverfahren.....	44
2.3.3.2.3. Biosensoren.....	46
2.3.3.2.4. Theorie des heterogenen Immunoassays.....	47
2.3.4. BIAcore-System.....	50
2.3.4.1. Einführende Beschreibung des Phänomens der SPR.....	50
2.3.4.2. Grundlagen des BIAcore Systems.....	53

3. Material und Methoden	57
3.1. Chemikalien	57
3.2. Material und Geräte	59
3.3. Puffer, Medien und Lösungen	61
3.4. Methoden	63
3.4.1. Allgemeine Methoden	63
3.4.1.1. Sterilisation	63
3.4.1.2. Agarosegelelektrophorese	63
3.4.1.3. Elution mittels "freeze squeeze"-Methode	64
3.4.2. Methoden LightCycler	64
3.4.2.1. Präparation der pilzlichen DNA aus Reinkulturen und aus Getreide	64
3.4.2.1.1. Extraktion von Gesamt-DNA aus <i>Fusarium</i> spp.	64
3.4.2.1.2. DNA-Extraktion aus Getreideproben	65
3.4.2.2. Quantifizierung der Standard-DNA	66
3.4.2.3. Tox5-Primer	67
3.4.2.4. ToxHS Primer	68
3.4.2.5. PCR-Puffer	69
3.4.2.6. PCR Protokoll	70
3.4.2.7. Auswertung der Messergebnisse	71
3.4.2.7.1. Methodik der Quantifizierung	71
3.4.2.7.2. Methodik der Identifizierung	73
3.4.3. Methoden BIAcore	74
3.4.3.1. Antikörper	74
3.4.3.1.1. Antikörper gegen Deoxynivalenol	74
3.4.3.1.2. Anti-rabbit-Antikörper	74
3.4.3.2. Herstellung eines Deoxynivalenol-Biotin Konjugats	74
3.4.3.3. Reinigung von Syntheseprodukten mittels HPLC	75
3.4.3.4. Kopplung des Deoxynivalenolderivats an Biotin	76
3.4.3.5. Extraktion von DON aus Getreide	77
3.4.3.6. Allgemeiner Messablauf im BIAcore	78
3.4.3.7. Messauswertung	79
3.4.3. Statistische Validierung	80
4. Ergebnisse	85
4.1. LightCycler	85
4.1.1. Anpassung der PCR-Reaktion an den LightCycler	85
4.1.2. Quantifizierung eines DNA-Standards für den Einsatz im LightCycler	87
4.1.3. Reproduzierbarkeit der LightCycler PCR	90
4.1.4. Identifizierung der PCR-Produkte	91
4.1.5. Analyse von Feldproben	92
4.2. BIAcore X	97
4.2.1. Eichkurve einer Verdünnungsreihe des Anti-DON-Antikörpers	97
4.2.2. Eichkurve der Antikörperbindung einer Verdünnungsreihe von DON	98
4.2.3. Untersuchung des Einflusses der Extraktionsdauer und der Inkubationszeit auf das SPR-Signal	99
4.2.4. Verwendung eines <i>Sandwich</i> -Assays zur Bestimmung von DON	100
4.2.5. Optimierung des Regenerierungsschrittes der Sensoroberfläche	101
4.2.6. Optimierung der Probenextraktion für den Einsatz im BIAcore	106
4.2.7. Sensorstabilität	108
4.2.8. Untersuchung von natürlich kontaminierten Weizenproben	108

5. Diskussion	112
5.1. LightCycler	112
5.1.1. Die Optimierung der quantitativen PCR	112
5.1.2. Analyse von natürlich und künstlich kontaminierten Getreideproben	114
5.1.3. Empfehlung für die Durchführung einer kontaminationsfreien PCR.....	116
5.2. BIAcore X.....	117
5.2.1. Biosensor für den Deoxynivalenol-Nachweis	117
5.2.2. Probenvorbereitung	118
5.2.3. Systemoptimierung	119
5.2.4. Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche.....	120
5.2.5. Anwendung des Biosensors.....	122
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	125
7. Summary.....	130
Literatur.....	XIII
Danksagung.....	XXXVIII

Abbildungen

Abbildung 1: Zusammenwirken von primärem und sekundärem Stoffwechsel bei der Biosynthese von Mykotoxinen	5
Abbildung 2: Wichtige Vertreter der <i>Fusarium</i> Toxine	12
Abbildung 3: Grundstruktur der Trichothecene	13
Abbildung 4: Biosynthese des Trichodiens	14
Abbildung 5: Biosynthese der Trichothecene in <i>Fusarium</i> Spezies.....	15
Abbildung 6: Metabolismus von DON im Verdauungssystem	18
Abbildung 7: Möglichkeiten zum Nachweis eines Pilzbefalls in Getreide	22
Abbildung 8: Komplementäre Basenpaarung in DNA.....	24
Abbildung 9: Struktur von Farbstoffen mit einer hohen Affinität zu <i>dsDNA</i>	26
Abbildung 10: Kettenverlängerung bei der PCR durch eine DNA-Polymerase	27
Abbildung 11: Theoretische Aspekte der PCR Amplifikation.....	33
Abbildung 12: Temperatur-Zeit-Profil für eine herkömmliche PCR bzw. für eine Rapid-Cycle-PCR	36
Abbildung 13: Zweistufige Nachsäulenderivatisierung von DON.....	41
Abbildung 14: Immunologische Nachweisverfahren	45
Abbildung 15: Typische Kalibrierkurve für einen Immunoassay	49
Abbildung 16: Kretschmann-Anordnung	51
Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines SPR-Systems.....	54
Abbildung 18: Schema des Trichodien-Zyklase-Gens (<i>tri5</i>) und Lage der verwendeten Tox5-Primer.....	67
Abbildung 19: Prinzip der Konzentrationsbestimmung mit der LightCycler Software	72
Abbildung 20: Identifizierung eines PCR-Produktes über seine spezifische Schmelztemperatur	73
Abbildung 21: Synthese von DON zu 3-HG-DON	75
Abbildung 22: Kopplung von 3-HG-DON mit Biotinhydrazid.....	77
Abbildung 23: Schematischer Verlauf der gesamten BIAcore-Messung.....	79
Abbildung 24: Agarosegelelektrophorese nach einer Tox5-PCR im LightCycler.....	85
Abbildung 25: Agarosegelelektrophorese nach einer ToxHS-PCR im LightCycler.....	87
Abbildung 26: Eichgeraden einer Verdünnungsreihe von Kalbsthymus DNA.....	88
Abbildung 27: Quantifizierung einer DNA-Verdünnungsreihe	89
Abbildung 28: Reproduzierbarkeit der LightCycler-Methode	90
Abbildung 29: Schmelzkurve im Anschluss an die PCR Reaktion.....	91
Abbildung 30: Zusammenhang der DNA-Konzentration und dem DON-Gehalt in natürlich infizierten Weizenproben	93
Abbildung 31: Korrelation zwischen der ermittelten DNA und der DON-Konzentration.....	94
Abbildung 32: Korrelation zwischen der ermittelten DNA und der DON-Konzentration im Bereich bis 1,5 ppm	95
Abbildung 33: Intervallabschätzung der DON-Belastung bis 1,5 ppm.....	96
Abbildung 34: Eichkurve einer Antikörperverdünnungsreihe	97
Abbildung 35: Eichkurve einer Verdünnungsreihe von Deoxynivalenol	98
Abbildung 36: Inkubationszeiten des Antikörpers mit der Probe	99
Abbildung 37: SPR-Signale nach primärer bzw. sekundärer Antikörperanbindung für verschiedene Extraktionszeiten.	100
Abbildung 38: Eichkurve einer Verdünnungsreihe von DON mit der <i>Sandwich</i> -Methode...	101
Abbildung 39: Zunahme des SPR-Signals der Basislinien	102

Abbildung 40: Ausschnitt eines Sensogramms, bei dem mit 1 % SDS-Lösung regeneriert wurde	103
Abbildung 41: Sensogramm für die primäre und die sekundäre Antikörperbindung mit anschließender Regeneration mit 0,5 % SDS bzw. 10 mM HCl.....	104
Abbildung 42: Messablauf für das <i>Sandwich</i> -Assay	105
Abbildung 43: Vergleich der Biosensor Werte mit GC/MS Daten	109
Abbildung 44: Vergleich der Biosensor Werte mit HPLC Daten	110

Tabellen

Tabelle 1: Geplante Grenzwerte für Mykotoxine.....	8
Tabelle 2: Faktoren, welche die Biosynthese von Mykotoxinen beeinflussen.....	9
Tabelle 3: Mykotoxine, welche von <i>Fusarium</i> Spezies in Getreide gebildet werden.....	11
Tabelle 4: Eigenschaften des Deoxynivalenols.....	17
Tabelle 5: Deoxynivalenol: NOAELs and LOAELs.....	21
Tabelle 6: Detektion von Trichothecene bildenden Fusarien.....	23
Tabelle 7: GC-Methoden zur Bestimmung von Deoxynivalenol.....	40
Tabelle 8: HPLC-Methoden zur Bestimmung von Deoxynivalenol.....	42
Tabelle 9: Alternative Verfahren zur Bestimmung von Deoxynivalenol.....	43
Tabelle 10: Pipettierschema für der Erstellung einer Eichkurve aus Kalbsthymus-DNA mittels Fluoreszenzmessung.....	67
Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide.....	68
Tabelle 12: Zusammensetzung der Reaktionsmischung für die PCR.....	70
Tabelle 13: Das PCR-Protokoll für die Durchführung der LightCycler PCR.....	70
Tabelle 14: Liste der Organismen, die in der Tox5-PCR (<i>tri5</i> -Gen) getestet wurden.....	86
Tabelle 15: Mikrobiologische Daten und die Konzentration an <i>Fusarium</i> DNA in kontaminierten Weizenproben.....	92
Tabelle 16: Sechsfachbestimmung von drei verschiedenen Standardkonzentrationen unmittelbar hintereinander mit dem BIAcore gemessen.....	105
Tabelle 17: Sechsfachbestimmung von drei verschiedenen Standardkonzentrationen an zwei verschiedenen Tagen mit dem BIAcore gemessen.....	106
Tabelle 18: Wiederfindungsraten von DON bei künstlich kontaminierten Getreideproben..	107

Abkürzungen der Mykotoxine

AcDON	Monoacetyldeoxynivalenol (3- bzw. 15-AcDON)
AcNIV	Monoacetylnivalenol (15-AcNIV)
BEA	Beauvericin
DAcDON	Diacetyldeoxynivalenol (3,15- AcDON)
DAcNIV	Diacetylnivalenol (4,15-AcNIV)
DAS	Diacetoxyscirpenol
DON	Deoxynivalenol
DOM-1	De-Epoxy-Deoxynivalenol
FB ₁	Fumonisin B ₁
FUP	Fusaproliferin
FUS	Fusarenone X (4-AcNIV)
FUSA	Fusaric Acid
HT-2	HT-2-Toxin
MAS	Monoacetoxyscirpenol
MON	Moniliformin
NEO	Neosolaniol
NIV	Nivalenol
OTA	Ochratoxin A
T-2	T-2-Toxin
ZEA	Zearalenon
ZOL	Zearalenol (α und β Isomer)

Allgemeine Abkürzungen

$[\alpha]_D^{20}$	Drehwinkel (20 °C und 589 nm)
A	Adenin
a_w	Wasseraktivität
AG	Antigen
AK	Anikörper

AOAC International	Association of Official Analytical Chemists International
atm	Atmosphäre (1 atm=1,013·10 ⁵ Pa)
ATP	Adenosintriphosphat
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin
BIA	Biomolekulare Interaktions Analyse
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BTMSAA	N, O-cBis-(trimethylsilyl)acetamid
b.w.	Körpergewicht (<i>body weight</i>)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
CCD	<i>charge coupled device</i>
¹⁴ C-DON	Deoxynivalenol radioaktiv markiert
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CoA	CoenzymA
CRM	<i>certified reference material</i>
CV	Standardabweichung (<i>coefficient of variance</i>)
deion.	deionisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
ε	Extinktionskoeffizient
ECD	Elektroneneinfangdetektion
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzym-linked-immunosensor-assay</i>
ELOSA	<i>enzyme-linked oligosorbent assay</i>
EPS	extrazelluläres Polysaccharid
<i>et al.</i>	et alii (<i>lat.</i> und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EU	Europäische Union

ExAg	Extrazelluläres Antigen
FHB	<i>Fusarium</i> head blight
FHO	United Nations Food and Agricultural Organization
FID	Flammen-Ionisation Detektion
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer
g	Gramm (für Massenangaben)
g	Erdbeschleunigung (für die Zentrifugengeschwindigkeit)
G	Guanin
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometerdetektion
h	Stunde(n)
HACCP	<i>hazard analysis and critical control points</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonsäure
HFBA	Heptafluorbutyrylsäureanhydrid
HFBI	Heptafluorbutyrylimidazol
3-HG-DON	3-Hemiglutaryl-DON
¹ H-NMR	Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie (Kernisotop ¹ H)
HPLC	<i>high-pressure-liquid-chromatography</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSA	humanes Serumalbumin
IARC	International Agency for Research and Cancer
IBT	Institute of Biotechnology, TU Lyngby, Denmark
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements
ITEM	Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italien
JECFA	Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives
λ	Wellenlänge
l	Liter
LC	<i>liquid chromatography</i>
LD ₅₀	Lethale Dosis 50
LED	<i>light-emitting diode</i>
LOAEL	<i>lowest observed adverse effect level</i>
LOD	Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i>)

M	Mol
m	Meter
MES	2-(4-Morpholinyl) ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometer
MSA	<i>mycelia-soluble antigens</i>
MS.MS	Tandemmassenspektrometer
MVOC	<i>microbial volatile organic compounds</i>
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NOAEL	<i>no observed adverse effect level</i>
NOEL	<i>no observed effect level</i>
OD	optische Dichte
Pa	Pascal
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFPA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
pH	potentia hydrogenii (<i>lat.</i> Stärke des Wasserstoffs)
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PP _i	Pyrophosphat
PPase	Pyrophosphatase
ppb	<i>parts per billion</i> (µg/kg)
ppm	<i>parts per million</i> (mg/kg)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SA	Streptavidin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFE	<i>supercritical fluid extraction</i>
SPR	Oberflächen Plasmon Resonanz
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TDI	<i>total daily intake</i>
TE	Tris-EDTA
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TMCS	Trimethylchlorosilan
TMP	Testmittelpunkt
TMS	Trimethylsilylderivaten
TMSI	Trimethylsilylimidazol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTDI	temporärer TDI
U	Unit(s)
UDG	Uracil DNA Glykosylase
UDP	Glucuronyldiphosphat-Uridine
UV	Ultraviolett (λ ~400-200 nm)
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	World Health Organization
w/v	Gewicht pro Volumen

Präfixe für die Einheiten

k	Kilo
c	Centi
m	Milli
μ	Mikro
n	Nano
p	Pico

Registrierte Handelsmarken

AmpliTaq[®]

Hoffmann-La Roche

BIACORE[®]

Biacore AB

BCR[®]

European Commission - Joint Research Centre IRMM

DONtest[™]

VICAM

Light Cycler[™]

Idaho Technologies, Inc.

MycoSep[™]

Romer Labs, Inc

Pico Green[®]

Molecular Probes, Inc.

Plasmoon[®]

BioTuL Inc.

SPREETA[™]

Texas Instruments, Inc.

SYBR[®] Green

Molecular Probes, Inc.

TaqStart[™]

CLONTECH Laboratories, Inc.

Zielsetzung

1. Zielsetzung

Viele Schimmelpilze sind ubiquitär verbreitet und finden sich vor allem in den oberen Bodenschichten. Hier nehmen sie auf Grund ihrer saprophytischen Lebensweise mit der Zersetzung von toter organischer Materie eine Schlüsselstellung im Stoffkreislauf ein. Schimmelpilze bilden Sporen und sind so in der Lage sich andere Lebensräume zu erschließen. Der Übergang von der saprophytischen zur parasitären Lebensweise ist dabei fließend. Die Vertreter der Gattung *Fusarium* sind gefürchtete Parasiten auf Kulturpflanzen, vor allem auf Getreide. Die Gefahr der Kontamination mit Pilzsporen, die unter ungünstigen Bedingungen auskeimen können, besteht zu jeder Zeit der Rohstoffherzeugung bzw. -verarbeitung. In den gemäßigten Klimazonen Mitteleuropas findet man auf Getreidekörnern am häufigsten die *Fusarium*-Arten *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. cerealis*, *F. equiseti* und *F. tricinctum*. Die Gefahr besteht dabei einerseits in direkten Schäden am Feldertrag und dessen Qualität und andererseits in der Kontamination der Ernte mit meist hochgiftigen Substanzen, den Mykotoxinen. Zu den häufigsten von Fusarien gebildeten Mykotoxinen gehört die Gruppe der Trichothecene, der Fumonisine, der Cyclopeptide und das Zearalenon. Zur Gruppe der Trichothecene zählt auch Deoxynivalenol, das wohl bedeutendste Mykotoxin im Getreideanbau hinsichtlich Häufigkeit und Konzentration.

Der Nachweis von Deoxynivalenol in Lebens- und Futtermitteln erfolgt zur Zeit weitestgehend über physikalisch-chemische Methoden, wie der HPLC oder GC/MS, aber auch immunologische Nachweisverfahren, wie ELISA, gewinnen immer stärker an Bedeutung. Der Nachteil der physikalisch-chemischen Methoden liegt dabei in einem sehr hohen apparativen, personellen und zeitlichen Aufwand. Somit sind diese Methoden nur bedingt für eine Routineanalyse geeignet. Der Nachteil der immunologischen Methoden ist sicherlich die Datenzuverlässigkeit und ein immer noch hoher zeitlicher Aufwand für die Durchführung.

In Hinblick auf die anstehende Mykotoxin-Höchstmengen-Verordnung und somit den Verbraucherschutz sowie für die Sicherung der Qualität von Lebensmitteln benötigen getreideverarbeitende Industriezweige und die Landwirtschaft schnelle und zuverlässige Analysen in der Wareneingangs- bzw. Qualitätskontrolle für Getreide.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Schnellmethoden zur Analyse von Getreideproben hinsichtlich der Kontamination mit Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. und den Deoxynivalenolgehalten. Im Vordergrund stand hierbei die praktische Anwendbarkeit dieser Nachweisverfahren, die anhand der Analyse von kontaminiertem Probenmaterial gezeigt werden sollte. Die hier eingesetzten und entwickelten Methoden basieren auf einem quantitativen PCR Verfahren zum Nachweis der *Fusarium* spp. mit Hilfe des LightCycler Systems sowie auf einem immunochemischen, optischen BIASensor zur Quantifizierung von Deoxynivalenol.

Einleitung

2. Einleitung

2.1. Allgemeine Einleitung

2.1.1. Mykotoxine

Als Mykotoxine bezeichnet man die sekundären Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen hauptsächlich der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Stachybotrys* und *Myrothecium*, die bereits in geringen Dosen toxisch auf den tierischen bzw. menschlichen Organismus wirken, aber auch für höhere Pflanzen teilweise giftig sind. Sekundärmetabolismus tritt in einem Stadium des Lebenszyklus der Pilze auf. Nach einer Phase des schnellen Wachstums der Zellen, wenn ein wesentlicher Nährstoff beginnt die starke Verbreitung der Zelle einzuschränken, verursachen die akkumulierenden Produkte des Primärmetabolismus die Synthese neuer Enzyme für die Synthese organischer Säuren, von Antibiotika und Mykotoxinen. Anders als die Substanzen des Primärstoffwechsels, sind die Substanzen des Sekundärstoffwechsels nicht essentiell für den Organismus.

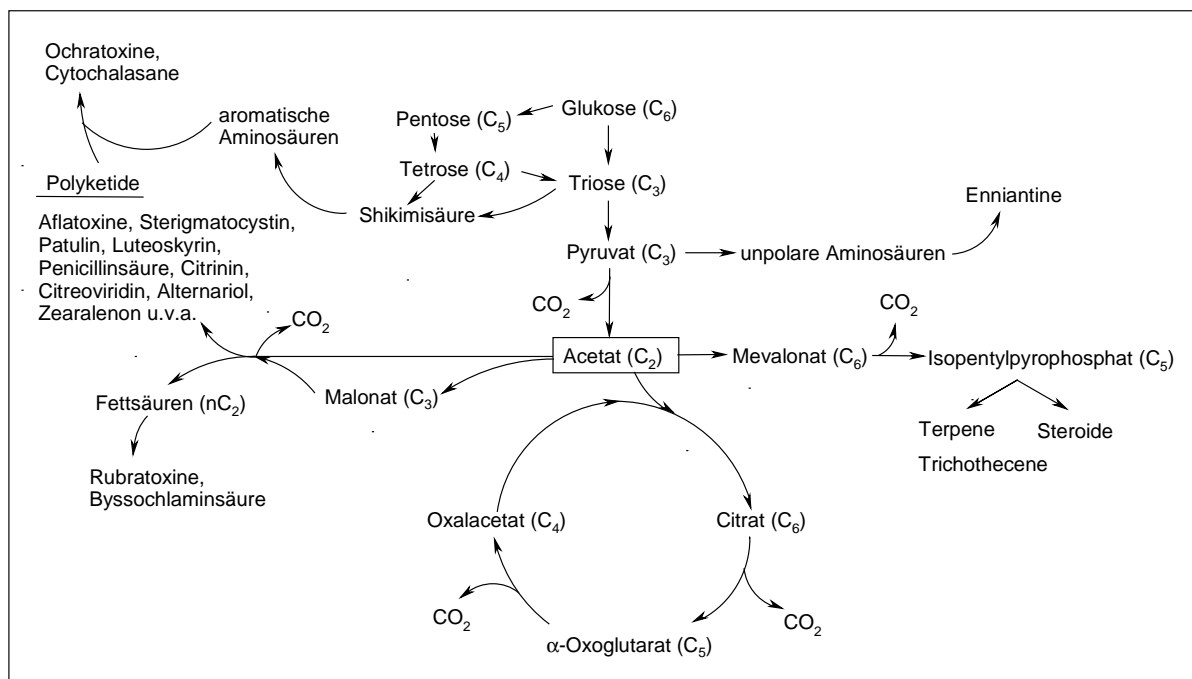


Abbildung 1: Zusammenwirken von primärem und sekundärem Stoffwechsel bei der Biosynthese von Mykotoxinen (ergänzt und erweitert nach Turner 1975).

Es kann nur spekuliert werden, ob diese Verbindungen vor allem im Hinblick auf ihre Toxizität dem Organismus einen Selektionsvorteil verschaffen können (Smith und Moss, 1985).

Primärer und sekundärer Stoffwechsel sind dadurch miteinander verknüpft, dass einzelne Zwischenprodukte aus dem primären Metabolismus die Ausgangssubstanzen für den sekundären Metabolismus darstellen. Abbildung 1 gibt eine vereinfachte Zusammenfassung dieses biochemischen Systems, wobei als sekundäre Stoffwechselprodukte nur Mykotoxine berücksichtigt sind.

Bei den Mykotoxinen handelt es sich um niedermolekulare, sehr stabile Substanzen die nicht als Antigen wirken und auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekülstruktur verschiedenste Wirkungen im Organismus hervorrufen. Sehr bedenklich ist die subakute, chronische Toxizität einiger Mykotoxine, die sich schon bei sehr geringen Konzentrationen bemerkbar macht. Die Wirkungen reichen von teratogen, mutagen bis cancerogen. Die am häufigsten betroffenen Organe sind die Leber (hepatotoxisch), die Nieren (nephrotoxisch), die Nerven (neurotoxisch), der Uterus (uterotrop), die Haut (dermatotoxisch) und das Immunsystem (immunosuppressiv). Man unterscheidet drei Wege, über die Mykotoxine in die Nahrungskette des Menschen gelangen können.

- Primärkontamination

- Die Lebensmittelrohstoffe sind von Toxinbildnern befallen.

- Sekundärkontamination

- Das fertige Lebensmittel wird von Toxinbildnern kontaminiert.

- *carry over*

- Nutztiere, die toxinhaltige Futtermittel konsumieren, können einzelne Mykotoxine auf Grund ihrer Stabilität in Organen oder in tierischen Produkten anreichern.

Ein Befall von Getreide mit Schimmelpilzen hat also stets eine Qualitätsminderung zur Folge, wovon alle getreideverarbeitenden Industriezweige sowie die Futtermittelindustrie betroffen sind. Die Infektion von Braugetreide mit Schimmelpilzen ist in zweifacher Hinsicht als kritisch einzustufen. Zum einen besteht für die Brauereien neben einer deutlichen Verminderung der Malzqualität die Gefahr von rohstoffausgelöstem Gushing, welches zu erheblichen finanziellen Schäden und zu einem möglichen Imageverlusten führen kann. Als Gushing-Faktoren wurden pilzliche Metabolite der Gattungen *Fusarium*, *Nigrospora* und *Trichoderma* identifiziert (Haikara, 1999). Es soll sich dabei um kleine Proteine handeln, die sogenannten Hydrophobine.

Die spontane Selbst-Aggregation der Hydrophobin-Monomere an Grenzschichten, die durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgelöst wird (Wösten *et al.*, 1994), beschreibt ein wichtiges Charakteristikum der Hydrophobine. Sie besitzen die Fähigkeit, zu amphipatischen Schichten an einer hydrophoben/hydrophilen Grenzschicht zu aggregieren. Diese Eigenschaft stabilisiert auch Gasblasen in Flüssigkeiten (Wessels, 1996), z. B. CO₂ in Getränken. Die Grenzflächenerscheinung der Reduzierung der Oberflächenspannung führt auch zur Bildung von Blasen, da die Verkleinerung der Grenzfläche mit einem Energiegewinn verbunden ist. Eine Blase, die größer als der kritische Blasendurchmesser ist und sich in einer übersättigten Lösung befindet, wächst durch Stofftransport weiter an, und dies kann zur spontanen Entbindung des CO₂ bei der Druckentlastung des Gebindes führen (Fischer, 2001).

Zum anderen kann es durch Bildung und Anreicherung der gesundheitsschädlichen Stoffwechselprodukte in toxikologischer Hinsicht zu Problemen kommen. Dies kann aufgrund des Produkthaftungsgesetzes (ProdHaftG, 1989) Konsequenzen ungeahnten Ausmaßes nach sich ziehen. Nach dem ProdHaftG können Lebensmittelhersteller für die Folgen, die unmittelbar oder mittelbar aus dem Verzehr ihrer Produkte entstehen, verantwortlich gemacht werden. Eine einwandfreie hygienische Qualität der verwendeten Rohstoffe muss deshalb oberste Priorität haben. Aufgrund der Änderung der EU-Richtlinie über die Haftung für fehlerhafte Produkte (1999/34/EG vom 10.05.1999), die in deutsches Recht umgesetzt werden muss, hat der Bundestag am 06.07.2000 einstimmig beschlossen, dass ab 01.12.2000 alle Regelungen im Produkthaftungsgesetz auch für landwirtschaftliche Produkte der Urproduktion gelten. Bisher waren diese davon ausgenommen. Die Ergebnisse zahlreicher toxikologischer Studien sowie der Druck von Verbraucherverbänden führen in jüngster Zeit verstärkt zu Überlegungen, für die gefährlichsten Substanzen unter den Mykotoxinen Grenzwerte einzuführen um ihre Verbreitung zu reglementieren (Jukes, 1999). Derartige Reglementierungen sind auf EU-Ebene bereits in der Diskussion oder konkret in Vorbereitung (Scientific Committee on Food, 1998). Für die klassischen *Fusarium*-Mykotoxine existieren entsprechende Grenzwerte derzeit jedoch weder in Deutschland noch auf EU-Ebene. In Ländern wie USA oder Kanada wurden allerdings bereits Grenzwerte für DON in Getreide und Getreideprodukten eingeführt (2 mg/kg in Brot- und Futtergetreide, 1 mg/kg in Getreide zur Herstellung von Säuglingsnahrung). Sollten entsprechende Regelungen für *Fusarium*-Toxine auf EU-Ebene eingeführt werden, so wird Deutschland gezwungen sein, diese in kurzer Zeit in nationale Verordnungen umzusetzen. Nach dem derzeitig vorliegenden Entwurf (Tabelle 1) einer Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengen-Verordnung (MHmV, 1999) sollen Grenzwerte für verschiedene Mykotoxine und Lebensmittel aufgenommen werden (Ernährungsdienst, 2001).

Tabelle 1: Geplante Grenzwerte für Mykotoxine

Mykotoxin	Lebensmittel	Geplanter Grenzwert
DON	Speisegetreide, Getreideerzeugnisse	500 µg/kg
	Teigwaren, Brot- und Backwaren (>33% Getreideanteil)	350 µg/kg
	Diätetische Lebensmittel	100 µg/kg
ZEA	Speisegetreide, Getreideerzeugnisse, Teigwaren, Brot- und Backwaren	50 µg/kg
	Diätetische Lebensmittel	20 µg/kg
FB ₁ und B ₂	Mais und Maiserzeugnisse	500 µg/kg
Fumonisine	Cornflakes, diätetische Lebensmittel	100 µg/kg
OTA	Säuglingsanfangsnahrung	0,01 µg/kg
	Kleinkindnahrung	0,03 µg/kg

2.1.2. Kontamination des Getreides

Während ihres Wachstums gehört die Getreidepflanze zu einem komplizierten Ökosystem, das durch zahlreiche biotische und abiotische Faktoren beeinflusst wird. Der mikrobiologische Befall des Getreides, zu dem auch die pilzliche Mikroflora gehört, ist von signifikantem Einfluss auf die weitere Verwendung dieses Rohstoffs. Die wichtigsten pilzlichen Kontaminationen werden durch Vertreter der Gattungen *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum* und *Microdochium* hervorgerufen (Lacey, 1989). Die Vertreter dieser Gattungen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine sehr hohe Wasseraktivität ($a_w > 0,85$) benötigen. Sie werden deshalb in der Gruppe der Feldpilze zusammengefasst (Chelkowski, 1991). Die Sporen werden mittels Wind, Wasserspritzern oder über den Kontakt mit bereits infizierten Pflanzenteilen übertragen. Äußerst kritisch für eine Infektion ist dabei die Zeit der Blüte (Suty *et al.* 1996), wobei ein feuchtwarmes Klima die Infektion begünstigt. Deshalb hat eine mögliche Toxinkontamination durch diese Feldpilze häufig schon vor der Ernte stattgefunden. Die Sporen dieser Organismen bleiben aber über weite Zeiträume lebensfähig und können so bei entsprechend unsachgemäßer Lagerung, Transport und Verarbeitung wieder auskeimen und zur Mykotoxinbildung führen (Bennett und Richard, 1996).

Da die Mykotoxine von lebenden Pilzen produziert werden, können Faktoren, die das Wachstum von Schimmelpilzen beeinflussen, auch auf die Biosyntheserate der Mykotoxine einwirken. Diese werden folglich nicht jenseits der Minimal- und Maximalwerte der entsprechenden Parameter, wie Temperatur, a_w -Wert, pH-Wert oder chemische bzw. biologische Faktoren gebildet (siehe hierzu Tabelle 2).

Einen entscheidenden Einfluss auf die mikrobielle Flora hat die Ernte des Getreides. Der a_w -Wert wird abgesenkt und es kommt zu einer starken Vermischung der Getreidekörner, von Feldstaub und Getreideresten in der Erntemaschine (Magan und Lacey, 1988, Noots *et al.*, 1998). Die Kornreife, Wetterbedingungen während der Ernte und die landwirtschaftliche Erntemethode sind ausschlaggebend für den mikrobiellen Eintrag in die Lagersilos. Durch sofortige Trocknung des Erntegutes auf einen a_w -Wert unter 0,7 wird das Wachstum der meisten Pilze stark eingeschränkt (JECFA, 2001).

Der epidemische Verlauf eines Fusarien-Befalls tritt nur sporadisch auf (Parry, 1995), kann dann aber in bestimmten Jahren gravierende Ausmaße annehmen, da die erhältlichen fungiziden Präparate, wie Tebuconazol und Metconazol, noch keine wirklich wirksamen Mittel darstellen, weil die Anwendung auf einen engen Zeitraum während der Blüte beschränkt ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Fungizide nur gegen pathogene Stämme, aber nicht gegen nichttoxische Stämme wirksam sind (Edwards *et al.*, 2001).

Tabelle 2: Faktoren, welche die Biosynthese von Mykotoxinen beeinflussen (erweitert nach Reiß, 1986)

Physikalische Faktoren	Chemische Faktoren	Biologische Faktoren
Wetterbedingungen	Kohlendioxid	Größe des Inokulums
Feuchtigkeit	Sauerstoff	Belastung der Pflanze
Substratfeuchtigkeit	Substratzusammensetzung	Wirbellose Tiere als Über-
Schnelligkeit des	Chemische Behandlung des	träger
Trocknens	Substrates	Genetische Unterschiede der
Wiederanfeuchten	Fungizide	Pflanzen
relative Luftfeuchtigkeit	Düngung	Pilzinfektion
Temperatur		Genetische Unterschiede der
Mechanische Beschädigung		Pilzstämme
Wendende Bodenbearbeitung		Wechselbeziehungen der
Zeit		Mikroorganismen
		Mais als Vorfrucht

Die Folge sind erhebliche Ertragsverluste mit ihren ökonomischen Konsequenzen, sowie das Gefährdungspotential durch die verschiedenen Toxine im Erntegut.

Schätzungen der FHO zufolge sind 25 % aller weltweit produzierten Lebensmittel mit Mykotoxinen kontaminiert (Mannon und Johnson, 1985). Für Deutschland liegen leider keine statistischen Daten zum Ausmaß der damit verbundenen Verluste vor. Ihre beeindruckende Höhe kann jedoch anhand von Zahlen aus den USA verdeutlicht werden. Allein in diesem Land beläuft sich der geschätzte volkswirtschaftliche Schaden, der durch den Befall von Getreide mit *F. graminearum* und anderen Arten der Gattung verursacht wurde, auf eine Summe von drei Milliarden US-Dollar zwischen 1990 und 1999 (Windels, 2000).

2.1.3. Fusarium Toxine

Zur Gruppe der *Fusarium* Toxine zählt man diejenigen Mykotoxine, die vor allem von *Fusarium* spp. gebildet werden: die Trichothecene, die Fumonisine, Moniliformin und Zearalenon, die Butenolide, sowie die zur Stoffklasse der zyklischen Oligopeptide zählenden Enniatine, Beauvericine und Fusaroproliferine (Abbildung 2, S. 12).

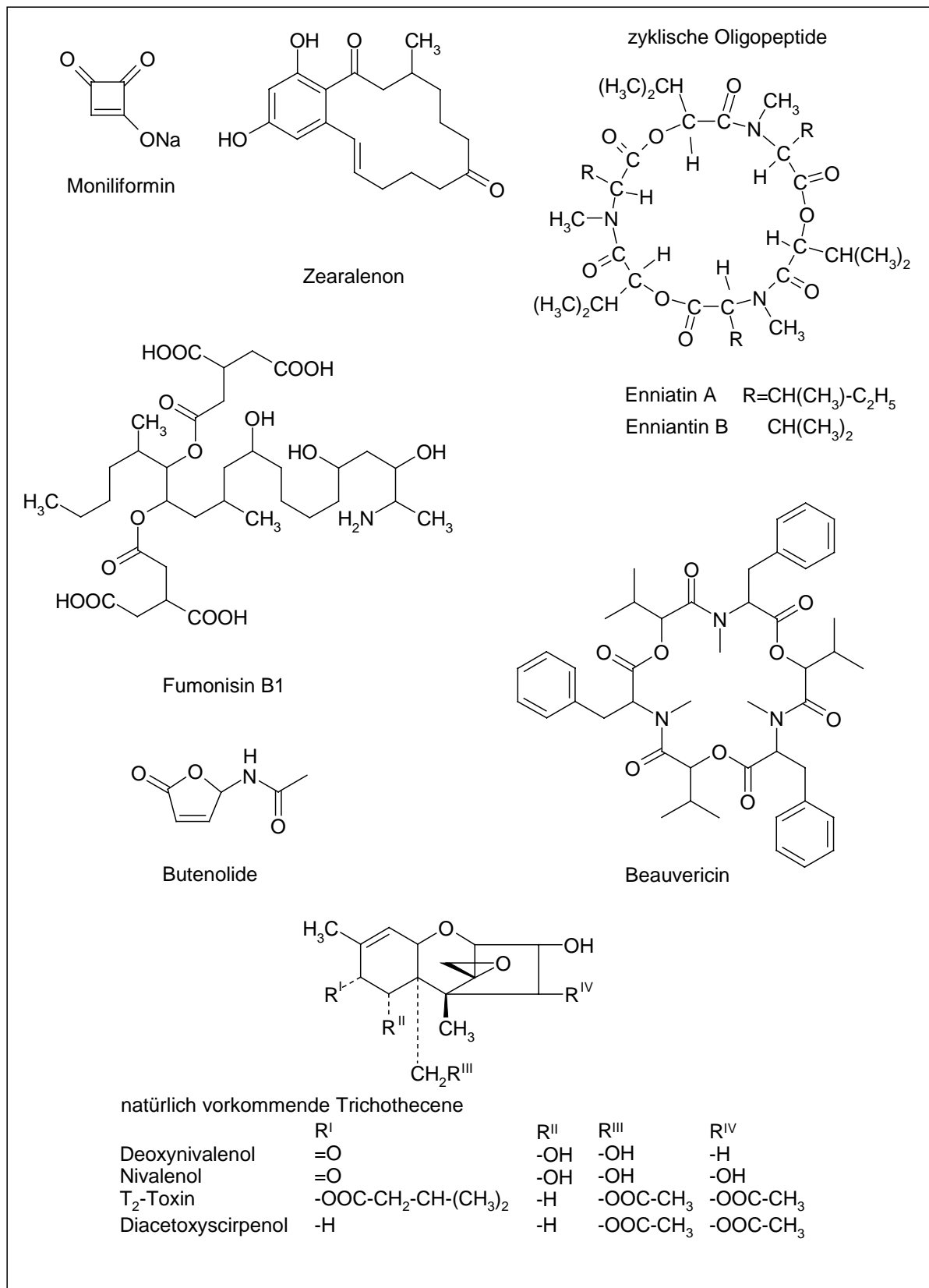
Tabelle 3 zeigt die Trichothecene-bildenden *Fusarium* spp. mit ihren wichtigsten Toxinen. Die Tabelle wurde dabei um *Fusarium* spp. ergänzt, die in der Tox5-PCR (Niessen *et al.*, 1998) ein positives Signal ergaben. Daraus lässt sich schließen, dass diese Arten ein *tri-5* Gen besitzen (Kapitel 3.4.2.3.) und somit zu den potentiellen Trichothecen-Bildnern gezählt werden müssen, auch wenn diese Arten in der Literatur noch nicht mit dieser Eigenschaft beschrieben wurden.

In der Stoffgruppe der Trichothecene sind mittlerweile über 150 verschiedene Substanzen bekannt. Zu den relevanten, in Getreide vorkommenden Trichothecenen gehören Deoxynivalenol, Nivalenol, Diacetoxyscirpenol sowie das T-2 Toxin. Fumonisine als toxische Stoffwechselprodukte vom *F. moniliforme* wurden erstmals 1988 isoliert (Gelderblom *et al.*). Bis heute sind sechs verschiedene Fumonisine bekannt, von denen Fumonisin B1 wahrscheinlich die höchste Toxizität besitzt und unter Verdacht der Kanzerogenität steht. Auch Moniliformin ist ein toxisches Stoffwechselprodukt von *F. moniliforme*, aber auch andere Fusarien wie *F. culmorum* und vor allem *F. avenaceum* sind in der Lage dieses Mykotoxin zu synthetisieren. Bei den Butenoliden handelt es sich um ungesättigte Lactone, die sich von der Butensäure ableiten. Beim Zearalenon handelt es sich um ein als karzinogen verdächtigtes makrozyklisches Lacton, mit östrogenartigen Eigenschaften. Bei den Enniatinen handelt es sich um aus *Fusarium*-Stämmen isolierte ionophore Antibiotika, die zyklische Depsipeptide darstellen. Depsipeptide sind Verbindungen aus α -Hydroxy- und α -Aminocarbonsäuren, die sowohl durch ester- als auch amidartige Bindungen miteinander verknüpft sind.

Tabelle 3: Mykotoxine, welche von *Fusarium* Spezies in Getreide gebildet werden (Marasas *et al.*, 1984; Niessen und Vogel, 1998; Botalico, 1998)

Sektion	<i>Fusarium</i> Spezies	Mykotoxine
Discolor	<i>F. crookwellense</i>	NIV, ZEA, ZOL
	<i>F. culmorum</i>	DON, ZEA, AcDON, T-2, NIV
	<i>F. flocciferum</i>	---
	<i>F. graminearum</i>	DON, ZEA, NIV, FUS, AcDON, Butenolide
	<i>F. heterosporum</i>	ZEA, ZOL
	<i>F. lunulosporum</i>	---
	<i>F. reticulatum</i>	---
	<i>F. robustum</i>	---
	<i>F. sambucinum</i>	DAS, T-2, NEOS, EB, Butenolide
	<i>F. sulphureum</i>	---
	<i>F. trichotehecioides</i>	---
	<i>F. tumidum</i>	NEOS
	<i>F. venenatum</i>	DAS, Enniantine B
Sporotrichiella	<i>F. sporotrichioides</i>	T-2, HT-2, NEOS, Butenolide
	<i>F. chlamydosporum</i>	MON
	<i>F. poae</i>	T-2, DAS, HT-2, NEOS
Roseum	<i>F. avenaceum</i>	MON
Arthrosporiella	<i>F. camptoceras</i>	NEOS
	<i>F. semitectum</i>	ZEA, DAS, MAS, Butenolide
Gibbosum	<i>F. equiseti</i>	Butenolide, DAS, ZEA
	<i>F. acuminatum (spp. armeniacum)</i>	Enniantine, T-2, HT-2
Liseola	<i>F. moniliforme</i>	FB ₁ , MON, BEA
	<i>F. proliferatum</i>	FB ₁ , MON
	<i>F. subglutinans</i>	FUSA, MON, BEA

(--- nicht untersucht)

Abbildung 2: Wichtige Vertreter der *Fusarium* Toxine

2.1.4. Die Gruppe der Trichothecen Mykotoxine

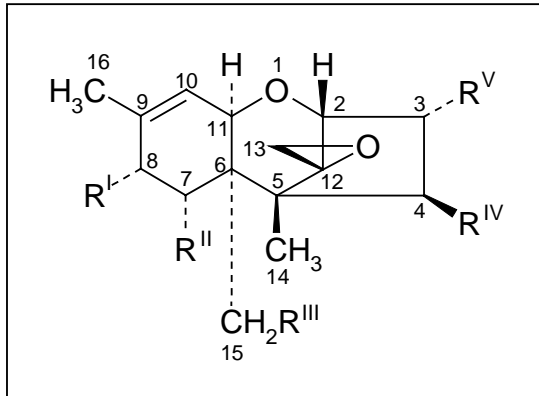


Abbildung 3: Grundstruktur der Trichothecene

Die Trichothecene sind eine Gruppe von Sesquiterpenen, deren molekulares Grundgerüst das tetrazyklische 12,13-Epoxy-trichothec-9-en-Ringsystem ist (Abbildung 3). Die betreffenden Substanzen werden in erster Linie von *Fusarium* Arten gebildet, aber auch von Vertretern der Gattungen *Cephalosporium*, *Cryptoela*, *Cylindrocarpon*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Trichothecium* und *Verticimonosporium* (Smith *et al.*, 1994). Dabei handelt es sich um biologisch sehr aktive Substanzen. Alle untersuchten Vertreter der Trichothecene hemmen die DNA- und Protein-Biosynthese in vielen eukaryontischen Zellen und lösen die Struktur von Polysomen auf (Ueno, 1977).

Ueno (1985) klassifizierte die Trichothecene in vier Gruppen. Typ A ist in C-8 Position substituiert, Typ B hat in C-8 Position eine Carbonyl-Gruppe, für Typ C ist eine zweite Epoxy-Funktion zwischen C-7,8 oder C-9,10 charakteristisch und Typ D bilden alle Trichothecene mit einem makrozyklischen Ring zwischen C-4 und C-5.

Tamm und Tori (1984) klassifizierten die Trichothecene ebenfalls in vier Klassen; Trichothecene ohne Substitution in C-8 Position, Trichothecene mit einer Hydroxy- oder Ester-Gruppierung in der C-8 Position, Trichothecene mit einer Ketogruppe in der C-8 Position und makrozyklischen Trichothecene.

Wie auch bei den Steroiden, etwa dem Cholesterin, lässt sich die Biosynthese der Trichothecene auf Mevalonsäure zurückführen (Abbildung 4). Der erste Schritt bei der Biosynthese ist die Bildung von Isopentenylpyrophosphat aus Acetyl-CoA.

Dieses synthetisiert der Organismus entweder aus Pyruvat, das in der Glykolyse und anderen primären Stoffwechselwegen entsteht. Dabei wird das Pyruvat durch eine Oxidationsreaktion unter Verwendung von Coenzym A und NAD^+ in Acetyl-CoA umgewandelt.

Der Organismus kann aber Acetyl-CoA auch direkt aus dem Fettsäureabbau gewinnen. Zwei Moleküle Acetyl-CoA kondensieren unter Bildung von Acetoacetyl-CoA. Diese Reaktion ist eine Umkehr des Thiolyseschrittes bei der Fettsäureoxidation und wird von der 3-Ketothiolase katalysiert. Acetoacetyl-CoA reagiert dann mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA und Wasser, wobei 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA entsteht. Eine Reduktase katalysiert die irreversible Umwandlung zu Mevalonat.

Das Mevalonat wird durch drei ATP-abhängige Reaktionen in 3-Isopentenylpyrophosphat umgewandelt. Im letzten Schritt findet dabei die Decarboxylierung statt, durch welche das C_5 -Isopren-Zwischenprodukt entsteht. Zwei dieser isomeren C_5 -Einheiten kondensieren zu einer C_{10} -Untereinheit. Dabei wird ein aus Dimethylallylpyrophosphat gebildetes Allylcarbeniumion über eine nukleophile konjugate Addition an Isopentenylpyrophosphat gebunden, dadurch entsteht Geranylpyrophosphat. Dieser Schritt wiederholt sich und es entsteht eine C_{15} -Einheit, das Farnesylpyrophosphat (Stryer, 1996).

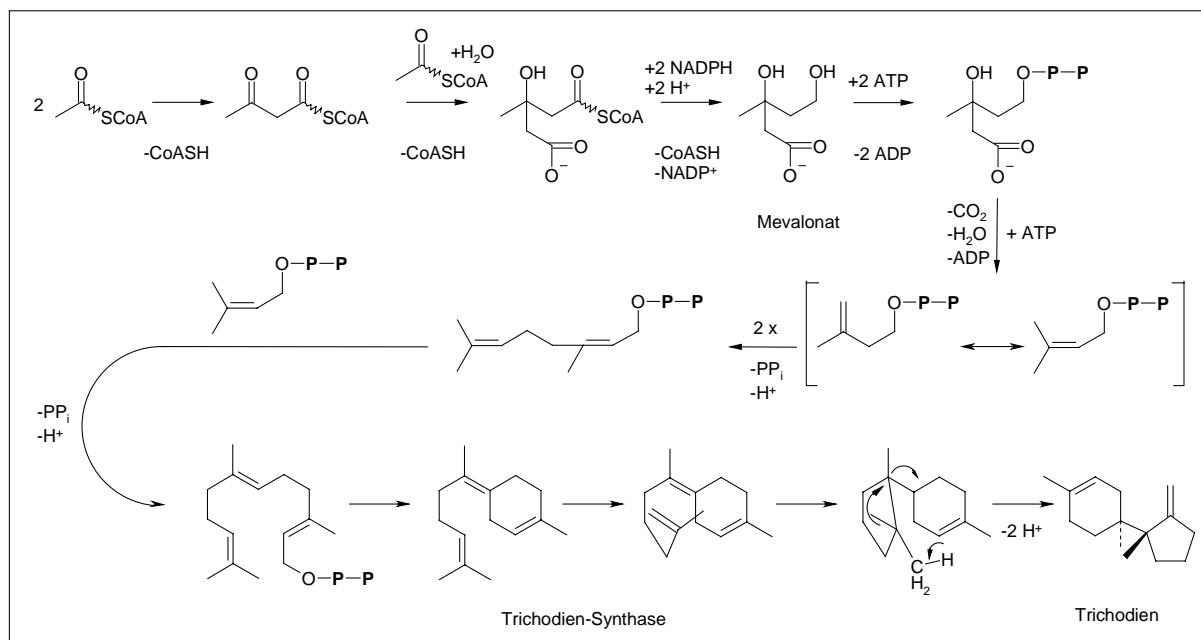


Abbildung 4: Biosynthese des Trichodiens

Durch die intramolekulare Ringschlussreaktion, die durch das Enzym Trichodien-Synthase katalysiert wird, entsteht aus dem Farnesylpyrophosphat Trichodien, die Vorstufe aller Trichothecene (Desjardins *et al.*, 1993).

Der nachfolgende Biosyntheseweg (Abbildung 5) zu den komplexeren Trichothecenen verläuft über eine Anzahl von Oxygenierungen, Isomerisierungen, Veresterungen und Ringschlüssen (Desjardins *et al.*, 1993).

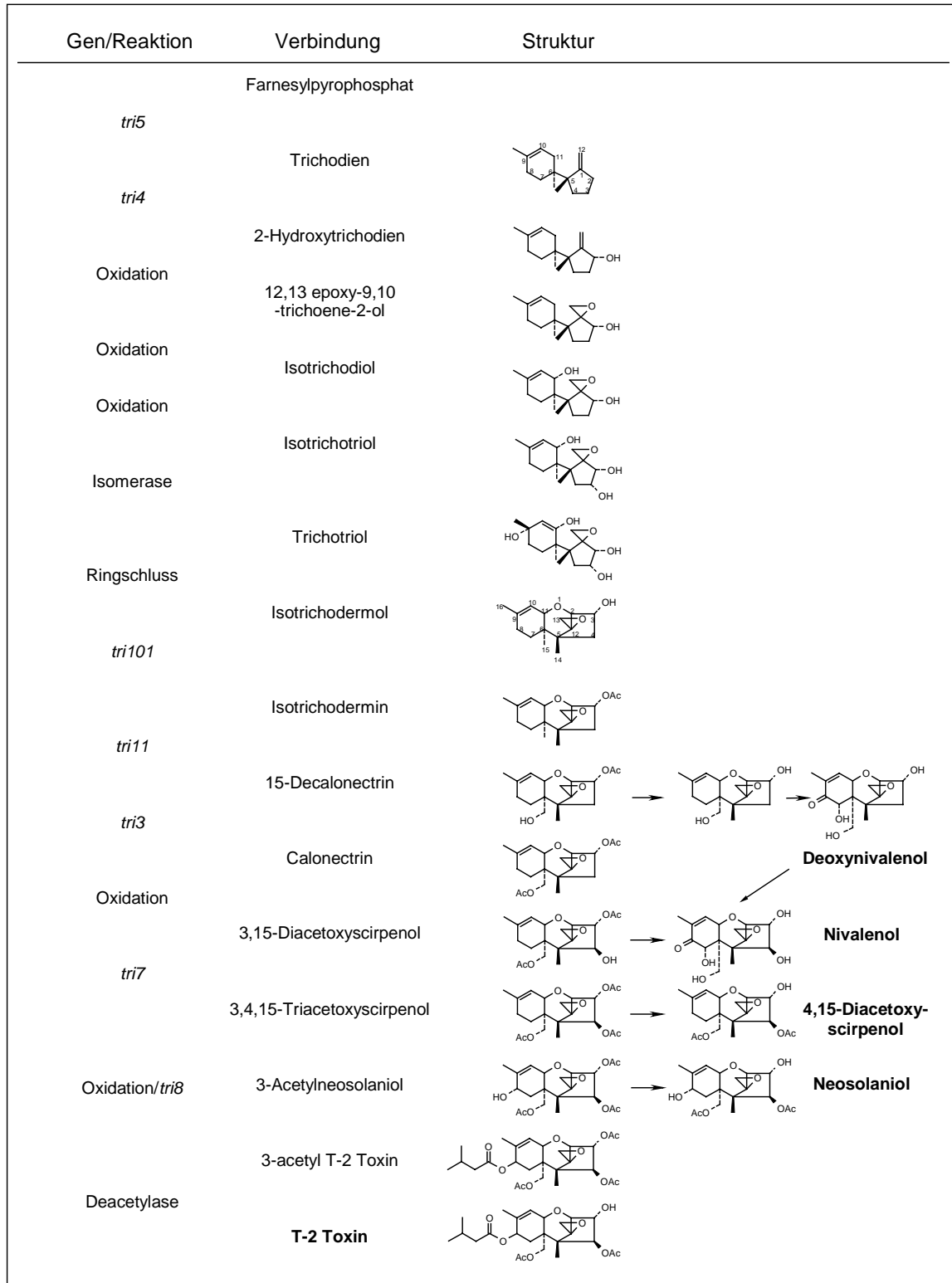


Abbildung 5: Biosynthese der Trichothecene in *Fusarium* Spezies

Von den vierzehn mutmaßlichen Reaktionsschritten zum T-2 Toxin konnten bisher sechs Gene im Trichothecen-Cluster zugewiesen werden. Die Modifikation der Trichodienstruktur beginnt mit der Oxidation von Trichodien zu 2-Hydroxytrichodien, katalysiert von einer Cytochrom P450-Monooxygenase, die auf dem *tri4*-Gen kodiert ist (Hohn *et al.*, 1995). Die Gene für die Hydroxylierung in C-11 und C-3 Position des Trichodiens sowie für die folgende Isomerisierung und die anschließende Ringschlussreaktion des 2,3,11-Trichotriol zu Isotrichodermol sind unbekannt. Die Acetylierung von Isotrichodermol zum Isotrichodermin wird von einem *tri101* kodierten Enzym katalysiert (McCormick *et al.*, 1999). Die Hydroxylierung in C-15 Position zum 15-Decalonecetrin wird vom *tri11*-Gen kodiert (Alexander *et al.*, 1998), das dann durch eine vom *tri3*-Gen kodierte Acetylase zum Calonecetrin umgesetzt wird (McCormick *et al.*, 1996). Das Gen, das für die Oxidation von Calonecetrin in C-4 Position verantwortlich ist und 3,15-Diacetoxyscirpenol synthetisiert, ist ebenfalls unbekannt, während die Acetylierung des Sauerstoffes in C-4 Position vom *tri7*-Gen kodiert wird (Brown *et al.*, 2001). Die Konvertierung von 3,4,15-Triacetoxyscirpenol zum 3-Acetyl T-2 Toxin bezieht eine Oxidation an der C-8 Position mit ein, die von einer Veresterung der Hydroxylgruppe mit Isopentansäure gefolgt wird. Das Enzym des *tri8*-Gens wird in diesen Syntheseschritt in einer unbekannt Weise mit einbezogen (Brown *et al.*, 2001). Schließlich muss in C-3 Position noch deacetyliert werden um das T-2 Toxin zu erhalten, wobei das Gen ebenfalls unbekannt ist. Außerdem gibt es vier zusätzliche Gene, die sich auch in dem Trichothecen-Cluster befinden; *tri6* verschlüsselt einen Transkriptions-Aktivator, *tri12* kodiert für eine Membranpumpe (Alexander *et al.*, 1999), und *tri9* und *tri10* verschlüsseln Proteine mit kaum erforschten Rollen in der Trichothecen-Biosynthese.

2.1.5. Charakterisierung von Deoxynivalenol

2.1.5.1. Eigenschaften

Deoxynivalenol (DON, Vomitoxin, Dehydronivalenol, 4-Deoxynivalenol, RD-Toxin) wurde von Yoshizawa und Morooka (1973) und Vesonder *et al.* (1973) als 3 α , 7 α , 15-trihydroxy-12,13-epoxytrichotec-9-en-8-on beschrieben. Eine Aufstellung wichtiger physikalisch-chemischer Eigenschaften ist in Tabelle 4 vorgenommen.

Tabelle 4: Eigenschaften des Deoxynivalenols

Name	Deoxynivalenol
Summenformel	$C_{15}H_{20}O_6$ ¹
Molgewicht	296,32 g ¹
Schmelzpunkt	151-153 °C ¹
UV _{max}	219 nm ²
Molarer Extinktionskoeffizient (in Methanol bei 219 nm)	5.930 ⁴
$[\alpha]_D^{20}$	+6,35 ¹
Spektroskopie	IR, UV, MS, H-NMR ³
Löslichkeit	Sehr gut in Ethanol, Methanol, Ethylacetat, Acetonitril, Wasser und Chloroform ²

¹Yoshizawa und Morooka (1973); ² Cole und Cox (1981); ³ Tamm und Tori (1984);

⁴ Benett und Shotwell (1990)

Die Getreidekrankheit, die im deutschsprachigen Raum als Weißährigkeit bezeichnet wird und in englischsprachigen Ländern als *Scab* oder auch *Fusarium Head Blight* (FHB) bekannt ist, resultiert vor allem aus dem Befall mit *F. culmorum* (Perkowski *et al.*, 1996) und *F. graminearum* (Wiersma *et al.*, 1996; Schaafsma *et al.*, 1993).

Diese beiden pflanzenpathogenen Arten sind auch die wichtigsten Bildner des weltweit vorkommenden Deoxynivalenol (Marasas *et al.*, 1984; Thrane, 1989).

Die Ausdehnung von FHB ist eng mit übermäßiger Feuchtigkeit zur Zeit der Blüte verknüpft. Die Menge des Niederschlags nach der Infektion ist der kritische Faktor für die Ausbreitung der Infektion. *F. graminearum* wächst optimal bei einer Temperatur von 24-26 °C und einem a_w-Wert über 0,9. *F. culmorum* wächst optimal bei 21 °C und einem a_w-Wert über 0,87 (Pitt und Hocking, 1997). Die geographische Verbreitung der beiden Arten scheint im Zusammenhang mit dem Temperaturoptimum zu stehen, da *F. graminearum* bevorzugt in wärmeren Klimaten auftritt.

Deoxynivalenol ist weltweit die häufigste Toxinkontamination in Getreide. Wie Untersuchungen der JECFA (2001) zeigten, fand sich DON in Weizen (11.444 Proben, positiv 57%), Mais (5.349 Proben, positiv 41%), Hafer (834 Proben, positiv 68%), Gerste (1.662 Proben, positiv 59%), Roggen (295 Proben, positiv 49%) und Reis (154 Proben, positiv 27%).

DON wurde auch in Buchweizen, Röstmais, Hirse und in einigen verarbeiteten Nahrungsmitteln wie Weizenmehl, Brot, Frühstücksmüsli, Nudeln, Baby- und Kindernahrungen gefunden. Die Konzentrationen in den Proben lagen zwischen 4-9.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Gerste, 3-3.700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Mais, 4-760 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Hafer, 6-5.100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Reis, 13-240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Roggen und 1-5.700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Weizen (JECFA, 2001).

Außerdem wurde DON in Gerstenprodukten wie Malz (Prickett et al, 2000) und Bier (Scott et al., 1993; Molto et al., 2000) nachgewiesen.

2.1.5.2. Biochemische Wirkung und Toxikokinetik

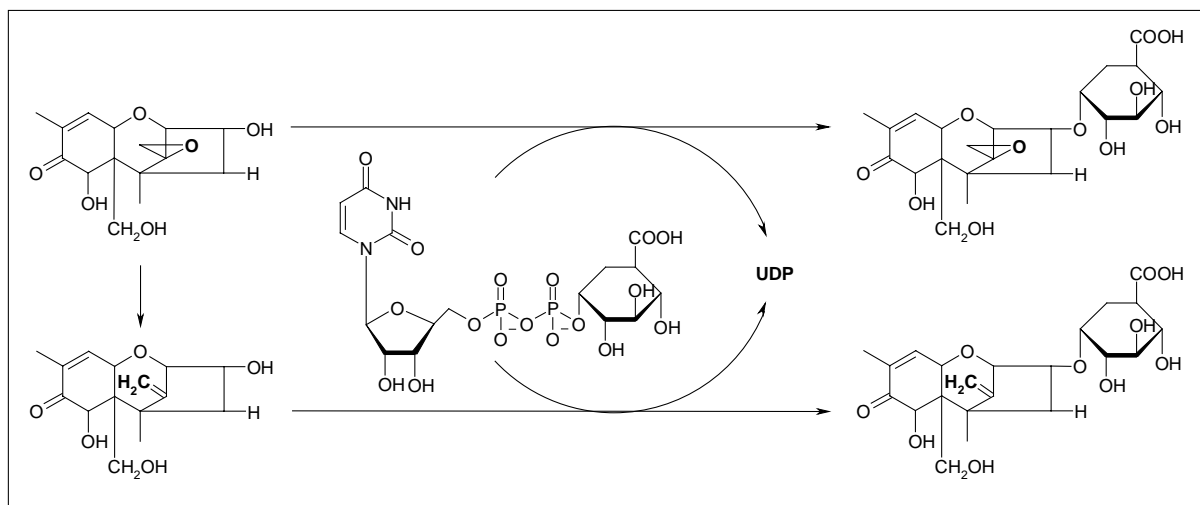


Abbildung 6: Metabolismus von DON im Verdauungssystem

DON hemmt die Synthese der DNA und RNA und die Proteinbiosynthese auf der ribosomalen Ebene. Das Toxin hat außerdem einen hämolytischen Effekt auf Erythrozyten. Während bei einer akuten Dosis das Erbrechen von Schweinen beobachtet wurde, verursachen niedrigere Konzentrationen im Futter Verweigerung der Nahrungsaufnahme und verringertes Wachstum. Beide Effekte wurden auch mit anderen Trichothecenen beobachtet. Sie stehen im Zusammenhang mit der Wirksamkeit auf die serotonergische Aktivität im Zentralnervensystem bzw. die Wirkung an den Serotoninrezeptoren (Rotter et al., 1996; Eriksen und Alexander, 1998). Sechshundneunzig Stunden nach Gabe einer einzelnen Dosis von ^{14}C -DON (10 mg/kg Körpergewicht) an Ratten wurde 64 % der Radioaktivität im Faeces und 25 % im Urin wiedergefunden. Das übrige Toxin wurde von der Leber und anderen Geweben zurückgehalten (Lake et al., 1987).

Durch Deoxygenierung des Epoxydrings unter Bildung eines Methylenrestes wird DON nach oraler Aufnahme im Magen-Darm-Trakt zu De-Epoxy-Deoxynivalenol metabolisiert (Abbildung 6), (Yoshizawa *et al.*, 1983). Sowohl DON als auch DOM-1 können an ihrer Hydroxylgruppe in C-3 Position mit Glucuronyldiphosphat-Uridine unter Wirkung des Enzyms UDP-Glucuronyltransferase zu Deoxynivalenol-Glucuronid bzw. Deepoxydeoxynivalenol-Glucuronid metabolisiert werden (Prelusky *et al.*, 1985). Der D-Glucuronsäure-Rest wird in der Leber durch UDP-Glucuronosyltransferasen auf solche Stoffe übertragen, die als D-Glucuronsäure-Konjugate (D-Glucuronide) zur Entgiftung des Körpers ausgeschieden werden müssen, wie dies für Giftstoffe der Fall ist (Römpp, 1998).

Bisher wurde die Glucuronsäure-Konjugation an DON nur in der Kuh (Côté *et al.*, 1986) und im Schaf (Prelusky *et al.*, 1985) gezeigt. Für das strukturell verwandte T-2 Toxin konnte dieser metabolische Stoffwechselweg auch im Schwein (Corley *et al.*, 1985, 1986) und im Hund (Sintov *et al.*, 1987) nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass es sich nicht um einen besonderen Metabolismus in Wiederkäuern handelt.

2.1.5.3. Toxizität

DON ist eines der weniger akut toxischen Trichothecene. Die akute- bzw. subakute Toxizität von DON ist gekennzeichnet durch Erbrechen, Futterverweigerung, Gewichtsverlust und Diarrhöe. Nach akuter Intoxikation wurden Nekrosen in den verschiedenen Geweben, wie Gastrointestinaltrakt, Knochenmark und lymphoidem Gewebe beobachtet. Bei oraler Gabe war die minimale emetische Dosis in Schweinen 0,05 - 0,2 mg/kg b.w.

In subchronischen Studien wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, d. h. verringerte Futteraufnahme, verringerter Gewichtszuwachs und Änderungen in den Blutwerten einschließlich der Serumimmunoglobuline. Das IARC stuft 1993 DON in der Kategorie 3 ein, d. h. nicht klassifizierbar hinsichtlich seiner Karzinogenizität im Menschen. In einer chronischen Fütterungsstudie mit Mäusen B6C3F1 wurde ein NOAEL von 1 mg/kg DON im Futter ermittelt, dies entspricht 0,1 mg/kg b.w./Tag (Iverson *et al.*, 1995). Oberhalb dieser Konzentration wurden erhöhte relative Leber- und Testikelgewichte sowie verringerte relative Milzgewichte beobachtet. Auf Grund dieser Studien sollte die Einstufung durch die IARC nochmals überdacht werden.

Deoxynivalenol war im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* nicht mutagen (IARC, 1993). Orale Experimente mit Mäusen, Ratten und Kaninchen zeigten keine teratogenen Wirkungen. Embryotoxische Effekte wurden in Mäusen und Kaninchen beobachtet. Eine Erhöhung der

postnatalen Sterblichkeit wurde ab einem NOEL von 0,38 mg/kg Körpergewicht pro Tag beobachtet (Khera *et al.*, 1984).

Die Resultate von zwei Studien in Mäusen mit einem NOEL von 0,25 mg/kg Körpergewicht pro Tag deuten auf eine Erhöhung der Anfälligkeit für ansteckende Krankheiten (Deijns *et al.*, 1994). Immunantworten in Form von Antikörperbildung wurden auch durch Deoxynivalenol ausgelöst, der NOEL war 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag in Mäusen (JECFA, 2001). Durch die epidemiologische Studie einer Lebensmittelvergiftung in Indien 1989 kennt man die Symptome einer DON-Vergiftung beim Menschen (Bhat *et al.*, 1989). Die Symptome umfassen Unterleibsschmerzen und Völlegefühl, Übelkeit, Kopfschmerzen, Rachenentzündung, Erbrechen, Diarrhöe und blutigen Stuhl. Der ermittelte NOAEL von 0,44 mg/kg b.w. muss aber kritisch betrachtet werden, da es unmöglich ist, das Vorhandensein anderer Giftstoffe in dem betreffenden Weizen auszuschließen. In Tabelle 5 sind die NOAELs verschiedener Studien zusammengefasst, die zwischen 0,04-0,375 mg/kg b.w./Tag schwanken.

Um einen TDI zu berechnen wurde der NOAEL (0,1 mg/kg b.w./Tag) der chronischen Fütterungsstudie mit Mäusen zur Sicherheit mit einem Ungewissheitsfaktor von 100 zu Grunde gelegt. Damit berechnet sich ein temporärer TDI von 1 µg/kg b.w. Dieser tTDI Wert schützt auch vor den subchronischen und reproduktiven Effekten, die in der Tabelle aufgeführt sind.

Die Aufnahme von DON über Getreide und Bier wurde in den nordischen Ländern (Eriksen und Alexander, 1998) und über Getreide in den Niederlanden (Pieters *et al.*, 1999) geschätzt; es wurde ein Wert in der Größenordnung des tTDI ermittelt.

Für den Verbraucher geht die größte Gefahr für die Gesundheit von Rohstoffen aus, die verschimmelt waren und dadurch Mykotoxin-haltig wurden, durch die Verarbeitung aber derart verändert wurden, dass der Schimmelbefall und damit eine mögliche Toxin-Kontamination äußerlich nicht mehr feststellbar ist (Reiß, 1981).

Es werden daher Methoden gefordert, die außer der Belastung mit den eigentlichen Toxinen auch die Belastung mit den Produzenten dieser Substanzen erlauben.

Tabelle 5: Deoxynivalenol: NOAELs and LOAELs

Versuchstier	Studie	Effekt	Parameter	Dosis	Literatur
Maus	akut	Exitus	LD50 oral	49-78	Forsell <i>et al.</i> , 1987
Hühnchen	akut	Exitus	LD50 oral	140	Huff <i>et al.</i> , 1981
Schwein	akut	Erbrechen	---	0.05-0.2	Eriksen & Alexander, 1998
Schwein	subakut	Reduzierung Futteraufnahme	---	0.03-0.07 (1-2 mg/kg Futter)	Eriksen & Alexander, 1998
Maus	subakut	Reduzierung Futteraufnahme	---	0.6-1.2 (4-8 mg/kg Futter)	Rotter <i>et al.</i> , 1996
Ratte	subakut	Reduzierung Futteraufnahme	---	0.75-1.0 (15-20 mg/kg Futter)	Rotter <i>et al.</i> , 1996
Maus	5 Wochen	Abnahme $\alpha 1/\alpha 2$ Globulin	NOAEL	0.25	Eriksen & Alexander, 1998
Ratte	9 Wochen	Reduzierung Futteraufnahme; Wachstum	LOAEL	0.25	Arnold <i>et al.</i> , 1986
Ratte	90 Tage	Reduzierung Wachstum	LOAEL	1.0	Morrissey <i>et al.</i> , 1985
Maus	2 Jahre	Reduzierung Wachstum	NOAEL	0.11	Iverson <i>et al.</i> , 1995
Maus	Immunotoxizität	Erhöhung Infektionsempfangnis	NOAEL	0.25	Tryphonas <i>et al.</i> , 1986
Maus	Immunotoxizität	Erhöhung Infektionsempfangnis	LOAEL	0,22	Deijns <i>et al.</i> , 1994
Maus	Teratogenizität	Fötale Skelett-missbildung	NOAEL	0.5	Khera <i>et al.</i> , 1982
Maus	Fortpflanzung	Exitus Embryo	NOAEL	0.375	Khera <i>et al.</i> , 1984
Ratte	Fortpflanzung	Maternale und Embryotoxizität	NOAEL	= 1.0	Khera <i>et al.</i> , 1984
Ratte	Fortpflanzung	Reduzierung Fruchtbarkeit	LOAEL	≤ 2.0	Morrissey & Vesonder, 1985
Kaninchen	Teratogenizität	Reduzierung Embryogewicht	NOAEL	0.6	Khera <i>et al.</i> , 1986
Schwein	Fortpflanzung	Reduzierung Wachstum (maternale Toxizität)	LOAEL	0.03-0.07 (1-2 mg/kg Futter)	Eriksen & Alexander, 1998
Schwein	28 Tage	Reduzierung Futteraufnahme Abnahme Thyroidgewicht und α -Globulin, Erhöhung T4, Serumalbumin und A/G Verhältnis	LOAEL	0.03 (0,75 mg/kg Futter)	Rotter <i>et al.</i> , 1994
Schwein	42 Tage	Reduzierung Futteraufnahme; Wachstum Magenfurchung	LOAEL	≤ 0.15 (= 4 mg/kg Futter)	Rotter <i>et al.</i> , 1995
Schwein	90 Tage	Reduzierung Futteraufnahme; Wachstum	NOAEL	0.04 (1 mg/kg Futter)	Bergsjø <i>et al.</i> , 1992
Schwein	95 Tage	Reduzierung Futteraufnahme; Wachstum Erhöhung Lebergewicht Abnahme Serumalbumin	NOAEL	0.06 (1.7 mg/kg Futter)	Bergsjø <i>et al.</i> , 1993

*) Dosis in mg/kg b.w./Tag.

2.2. Nachweis von *Fusarium*-Arten

2.2.1. Herkömmliche Analysemethoden

Die vorhandenen Methoden, mit denen die Belastung von Getreide mit Pilzen festgestellt werden kann, sind in Abbildung 7 dargestellt.

Die visuelle Beurteilung beruht auf der Handbonitierung einer Stichprobe, wobei die Differenzierung zwischen Körnern mit *Fusarium*-Befall (relevante rote Körner) und solchen mit anders begründeter Rotfärbung (irrelevante rote Körner, Hefen und andere Pilze mit roten Pigmenten) (Niessen *et al.*, 1991) relativ ungenau ist.

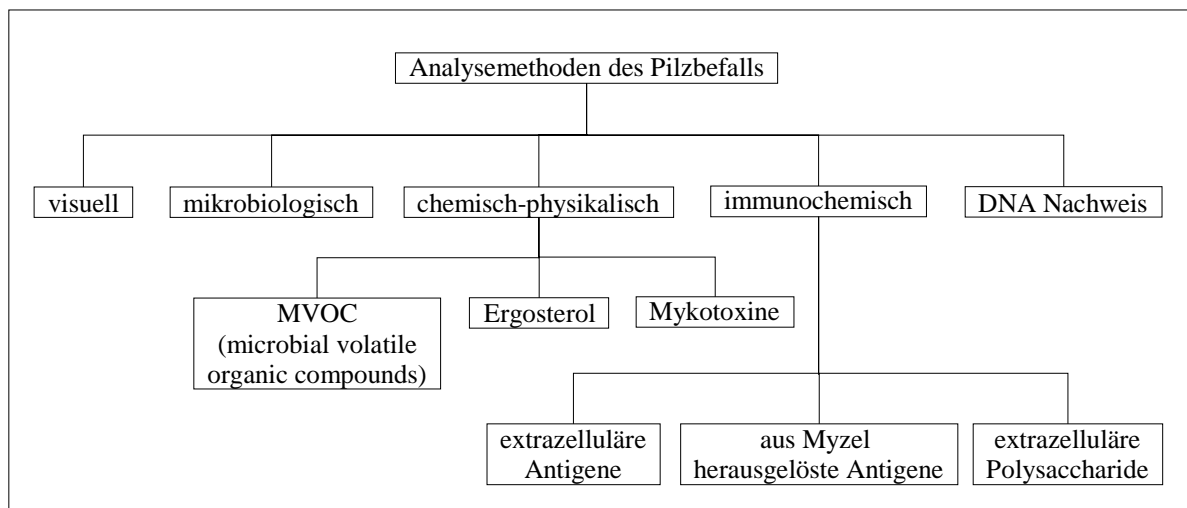


Abbildung 7: Möglichkeiten zum Nachweis eines Pilzbefalls in Getreide

Der größte Nachteil der mikrobiologischen Methoden unter Verwendung komplexer oder synthetischer mikrobiologischer Nährböden ist die Analysenzeit von mindestens einer Woche, bei *Fusarium* 14 Tage. Außerdem wird dabei nur lebendes Myzel erfasst. Die Analyse von Ergosterol (Zill *et al.*, 1988; Gessner und Schmitt, 1996; Bakan *et al.*, 2001), einem spezifisch Bestandteil der pilzlichen Cytoplasmamembranen, ist relativ aufwändig und sehr unspezifisch, da neben relevanten Schimmelpilzen auch Hefen und andere Pilzarten erfasst werden. Eine weitere Methode zum Nachweis eines Schimmelpilzbefalls beruht auf der Bestimmung von primären Stoffwechselprodukten der Schimmelpilze, den sogenannten MVOC-Verbindungen (Review von Schnürer *et al.*, 1999). Der Nachweis der Mykotoxine wird in Kapitel 2.3. genauer abgehandelt.

Für die immunochemische Detektion von Pilzmyzelien werden häufig Substanzen wie Proteine oder extrazelluläre Polysaccharide als Antigene verwendet (Suzhen et al, 2000), die der Pilz in das Medium ausscheidet. Immunochemische Detektionsverfahren sind in der Regel schnell, sensitiv und lassen sich sehr rationell und in großen Zahlen in Mikrotiterplatten durchführen. Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch einerseits, dass durch Produktionsparameter wie hohe Temperaturen bei der Mälzung oder anderen lebensmitteltechnologischen Prozessen die Antigene verändert werden können und so nicht mehr nachweisbar sind. Andererseits ist die Bildung der Antigene stark von äußeren Bedingungen wie Temperatur und Feuchtigkeit abhängig. Eine Auswahl von Methoden für den spezifischen Nachweis einzelner Trichothecene bildender Arten und ihrer Stoffwechselprodukte ist in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Detektion von Trichothecene bildenden Fusarien

chemisch-physikalische Methoden			
Organismus	Analyt	Methode	Zitat
<i>F. gramineum</i>	MVOC	GC-MS und electronic nose	Olsson <i>et al.</i> (2002)
<i>F. moniliforme</i>	MVOC	14 Sensoren	Keshri und Magan (2000)
<i>F. proliferatum</i>			
<i>F. sambucinum</i>	flüchtige Sesqui-terpene	GC-MS	Jelen <i>et al.</i> (1995)
immunochemische Methoden			
Organismus	Antigen/Analyt	Antikörper	Zitat
artspezifische Nachweise			
<i>F. avenaceum</i>	MSA	monoklonal	Banks <i>et al.</i> (1996)
<i>F. graminearum</i>	ExAg	polyklonal	Gan <i>et al.</i> (1997)
	MSA	polyklonal	
	ExAg	polyclonal	Abramson <i>et al.</i> (1998)
<i>F. oxysporum</i>	EPS	polyklonal	Notermans <i>et al.</i> (1985)
	EPS	polyklonal	Notermans <i>et al.</i> (1987)
	EPS	polyklonal	Notermans <i>et al.</i> (1986)
<i>F. poae</i>	ExAg	polyklonal	Gan <i>et al.</i> (1997)
	MSA	polyklonal	
<i>F. sporotrichoides</i>	ExAg	polyklonal	Abramson <i>et al.</i> (1998)
	MSA	polyklonal	
	ExAg	polyclonal	
<i>Microdochium nivale</i>	MSA	monoklonal	Banks <i>et al.</i> (1996)
Nachweis von Organismengruppen			
<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>F. poae</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Microdochium circinelloides</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	Antigengemisch	polyklonal	Yong <i>et al.</i> (1995)
Schimmelpilze	Antigengemisch	monoklonal	Dewey <i>et al.</i> (1993)
Latex Agglutinations Methode			
Organismus	Analyt	Antikörper	Zitat
<i>F. moniliforme</i>	EPS		Kamphuis <i>et al.</i> (1989)
<i>Fusarium</i> spp.	EPS		Schwabe <i>et al.</i> (1993, 1994)

Untersuchungsmethoden, die auf der Basis des Nachweises bestimmter Strukturen innerhalb der DNA der Zielorganismen aufgebaut sind, erfüllen hohe Anforderungen bezüglich Empfindlichkeit, Spezifität und non-viabler Erfassung von bereits abgetötetem Myzel.

2.2.2. Desoxyribonukleinsäure

Desoxyribonukleinsäure ist ein Polymer aus Nukleotiden. Grundbausteine der Nukleotide sind phosphorylierte Zucker (für die DNA: Desoxyribose) und die Purin- bzw. Pyrimidinbasen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin, die über eine N-glykosidische Bindung an das Zuckergerüst gebunden sind. Die Verknüpfung zum Polymer erfolgt durch Verbrückung der Zuckerreste über die Phosphatgruppen. Charakteristisch für die DNA eines bestimmten Organismus ist die Abfolge (Sequenz) der 4 Basen, da in ihr die genetische Information gespeichert ist. Die komplementären Basen einer DNA sind über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft (Abbildung 8) und bilden so einen Doppelstrang.

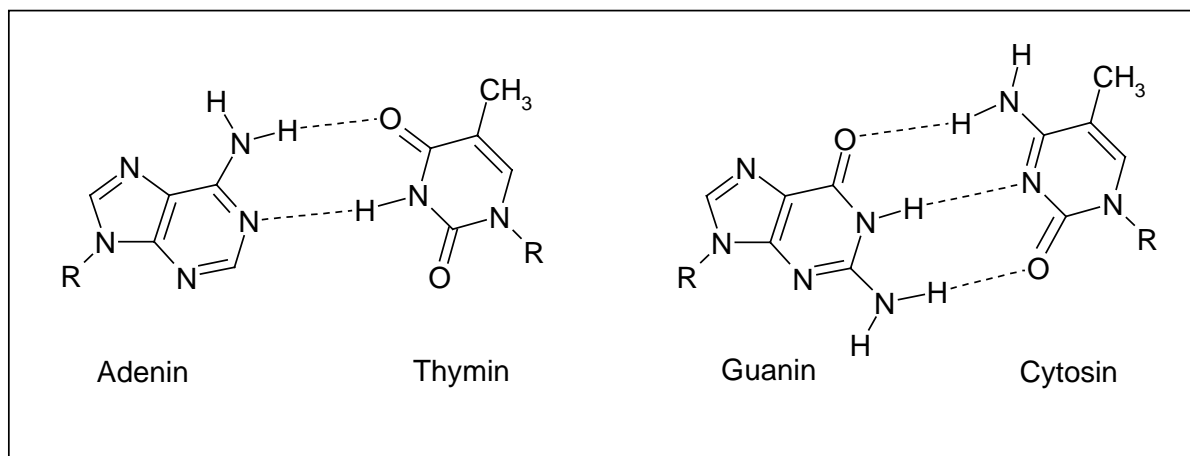


Abbildung 8: Komplementäre Basenpaarung in DNA: Guanin (G) und Cytosin (C) bilden jeweils drei, Adenin (A) und Thymin (T) jeweils zwei Wasserstoffbrücken aus (R – Desoxyribose)

Eine Eigenschaft der unter physiologischen Bedingungen vorliegenden DNA ist das Auftreten von zwei verschiedenen Arten von Furchen. Sie werden als große Furche (engl. *major groove*) und als kleine Furche (engl. *minor groove*) bezeichnet. Sie entstehen dadurch, dass sich die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht diametral gegenüber stehen.

2.2.2.1. Wechselwirkung von niedermolekularen Substanzen mit DNA

Neben Enzymen und verschiedenen Proteinen, die in der Transkription und Replikation der DNA eine große Rolle spielen, haben niedermolekulare Substanzen die Möglichkeit, mit der Nukleinsäure Komplexe zu bilden. Dabei können die sog. große bzw. kleine Furche der DNA-Doppelhelix als Bindungsstellen dienen oder kleinere Moleküle schieben sich zwischen die Basenpaare der Helix (*Interkalation*) und interagieren mit den heteroaromatischen Ringen der Pyrimidin bzw. Purinbasen.

Häufig bestehen solche Einlagerungsverbindungen aus planaren Ringstrukturen, wie das in Abbildung 9 gezeigte Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid). Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Die Bindung an DNA bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenz, so dass die Färbung der Nukleinsäuren auch in Gegenwart des freien Farbstoffs im Gel gut zu sehen ist. Aus toxikologischer Sicht sind diese Moleküle von Bedeutung, da sie zu Fehlern beim Ablesen der genetischen Information sowie bei der Vervielfältigung der DNA führen können: Zerstörung der Zelle und Tumorbildung wurden häufig beobachtet (Andres *et al.*, 1998).

Aus diesem Grund wurden weitere Farbstoffe entwickelt, z. B. die Familie der asymmetrischen Cyanine (Abbildung 9). Diese Farbstoffe bestehen aus drei Untereinheiten, einem heterozyklischen Ringsystem, einer olefinischen Brücke und einem zweiten heterozyklischen Ringsystem, welches entweder ein substituiertes Pyridin- oder Chinolin-System ist (US-Patent 5,436,134). Dazu zählt SYBR Green I als ein Farbstoff, der nicht mehr in die DNA interkaliert, sondern sich in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA anlagert. Er ist sensitiver und weniger mutagen als Ethidiumbromid. Der Farbstoff wird optimal durch Licht der Wellenlänge 492 nm angeregt, besitzt aber auch sekundäre Absorptionsmaxima bei 284 und 382 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 519 nm (Molecular Probes, 2001).

Auch Thiazol Orange gehört zu den asymmetrischen Cyaninen. Das Absorptionsspektrum des Monomers hat ein Maximum bei 500 nm und bei ca. 300 nm und Spektrum des Dimers bei 471 nm und bei ca. 300 nm. Das Emissionsmaximum wurde für das Monomer zu 535 nm und für das Dimer zu 550 nm bestimmt (Nygren *et al.*, 1998).

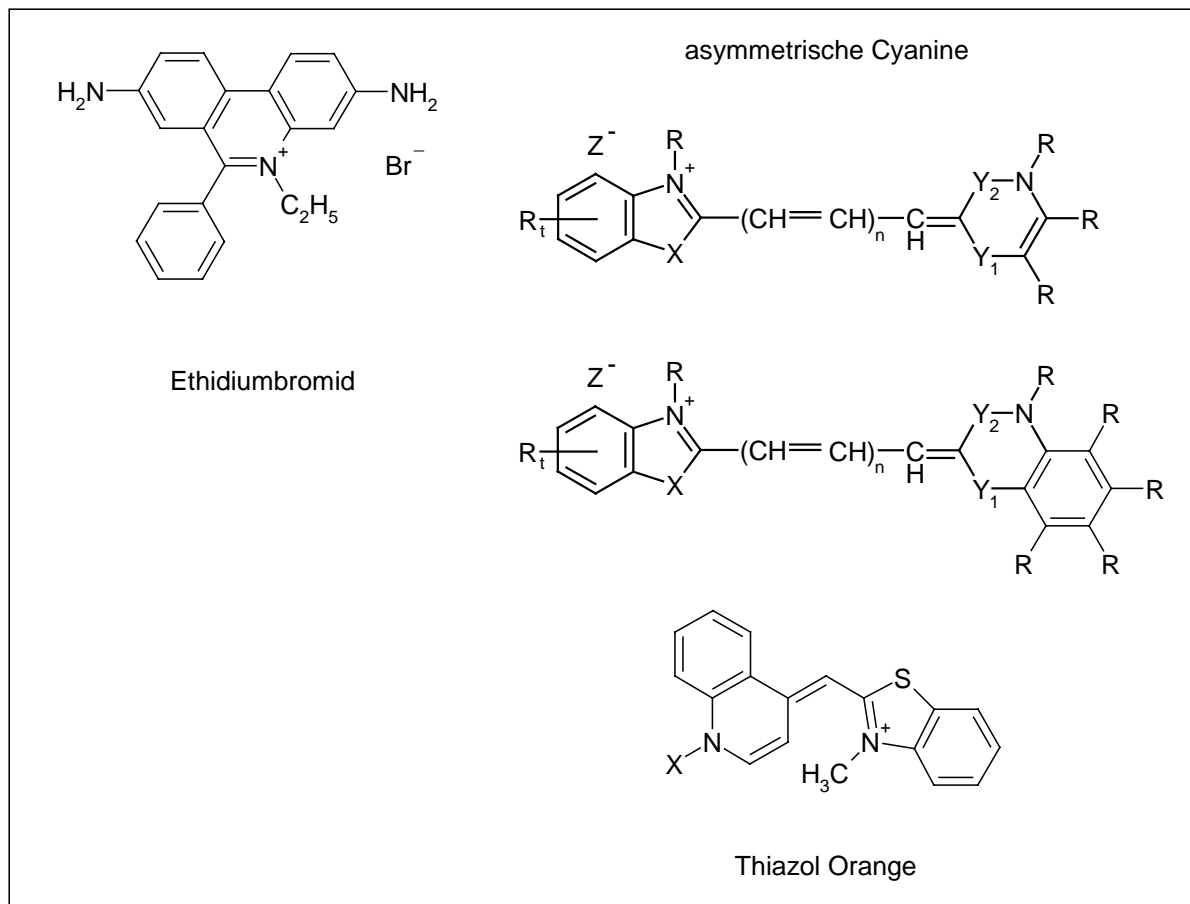


Abbildung 9: Struktur von Farbstoffen mit einer hohen Affinität zu *ds*DNA

2.2.3. Die Polymerase Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*), einer Methode zur Amplifikation von Nukleinsäure, handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren. Nicht der Organismus selbst, sondern ein spezifischer Teil seines Erbmaterials wird nachgewiesen. Seit der Entwicklung der PCR im Jahre 1985 durch Mullis (US-Patent 4,683,202) hat die Methode zur Vervielfältigung (Amplifikation) beliebiger DNA-Sequenzen die Molekularbiologie revolutioniert (Saiki *et al.*, 1985).

Dabei nutzt die Methode die Eigenschaft von DNA-Polymerasen einzelsträngige Nukleinsäure zu duplizieren. Voraussetzung hierfür ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, welches dann entsprechend verlängert werden kann (Abbildung 10).

In der PCR-Reaktion schafft man sich künstlich diesen kurzen Abschnitt durch den Einsatz von Oligonukleotiden (DNA-Fragmente von ca. 20 bp), den sog. Primern. Diese binden an den zu amplifizierenden Einzelstrang (engl. *annealing*) und können von der Polymerase verlängert werden (engl. *extension*).

Denaturiert man anschließend die neu-synthetisierte DNA durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge, können nach Abkühlen neue Primermoleküle binden und der Prozess wiederholt sich. Gibt man in den PCR-Ansatz jeweils zwei solcher Primer (einen, der am *sense*-Strang und einen anderen, der am *anti-sense*-Strang bindet), so erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts. Die PCR führt zu einer exponentiellen Amplifikation, da auch die neugebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen.

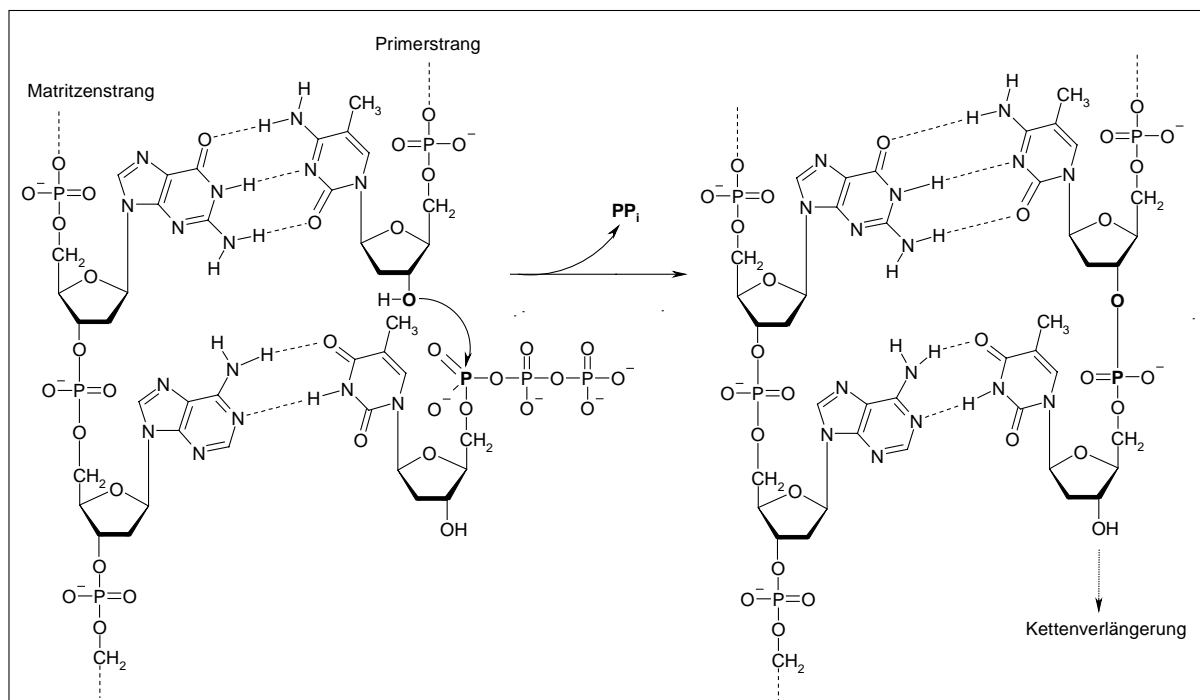


Abbildung 10: Kettenverlängerung bei der PCR durch eine DNA-Polymerase

Durch die Verwendung der temperaturstabilen *Taq*-Polymerase ist es möglich, die Reaktion ohne Unterbrechung über eine bestimmte Anzahl von Zyklen laufen zu lassen.

Das Temperaturoptimum der häufig verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) liegt bei 72 °C, bei der das Enzym mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Nukleotide/s den neuen Strang synthetisieren kann (Newton *et al.*, 1997).

Der typische PCR-Verlauf setzt sich aus einem dreistufigen Temperaturprofil zusammen:

- Denaturierung (95 °C)
- Annealing (Temperatur ist primerabhängig)
- Extension (72 °C, Aktivitätsoptimum der *Taq*-Polymerase)

Dieses Temperaturprofil wird in der Regel 30 bis 40 Mal wiederholt. Eine hohe Anzahl von Zyklen hat zur Folge, dass sich neben der millionenfachen Vermehrung an PCR-Produkt die Reaktionskinetik verändert. Die exponentielle Zunahme klingt in einer Plateauphase ab, bedingt durch z. B. Hitzeinaktivierung der Polymerase. Mit hoher Konzentration an PCR-Produkten vermindert auch deren Hybridisierung untereinander die Effektivität der Vervielfältigung, da diese Reaktion mit der Anlagerung der Primer konkurriert (Newton *et al.*, 1997). Um die Spezifität und Sensitivität der PCR zu erhöhen, verwendet man im allgemein die *hotstart* PCR (D'Aquila *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 1992; Faloona *et al.*, 1990). Jedoch ist ein manueller *hotstart* der PCR ungünstig, zeitintensiv und es besteht die Gefahr der Kontamination der Proben. In geschlossenen Reaktionsgefäßen läßt sich die *hotstart* PCR entweder durch eine mit einem monoklonalen Antikörper geschützte *Taq*-Polymerase (Kellogg *et al.*, 1994) realisieren oder durch die Verwendung einer chemisch modifizierten Polymerase, wie AmpliTaq Gold (PE Biosystems). Der TaqStart-Antikörper blockiert die Polymeraseaktivität während des Ansetzens der PCR-Reaktionen bei Raumtemperatur. Die Hemmung der DNA-Polymerase wird bei Temperaturen über 70 °C vollständig aufgehoben. Während des ersten Denaturierungsschrittes trennt sich der Enzym-Antikörperkomplex und der TaqStart-Antikörper wird inaktiviert. Gleichzeitig wird die Aktivität der DNA-Polymerase wieder hergestellt.

In der chemisch modifizierten Polymerase wird das Enzym reversibel inaktiviert, indem Dicarbonsäureanhydride an das Protein gebunden wird (Birch *et al.*, 1997). Die Aktivität wird dann durch Temperaturerhöhung auf 95 °C langsam wieder freigesetzt.

Durch Annealing und Extension in einem gemeinsamen Reaktionsschritt bei ca. 72 °C kann die PCR auf zwei Temperaturstufen reduzieren werden. Die neuesten Entwicklungen gehen sogar auf eine isotherme Reaktionsführung (eine Temperaturstufe), wobei Denaturierung und Annealing durch elektromagnetische Wellen induziert werden (Patent WO 00/47732).

Weiter Entwicklungen für die isotherme Reaktionsführung sind die SDA (*strand displacement amplification*); (Walker *et al.*, 1992; Walter und Strunk, 1994), sowie die NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*); (Compton, 1991).

2.2.4. Elektrophoretische Methoden

Der Begriff *Elektrophorese* beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Nukleinsäuren wandern als negativ geladene Moleküle zur positiven Elektrode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit entscheidend beeinflusst wird durch:

- die angelegte *Potentialdifferenz*
- die Art der *Matrix*, durch die sich die Nukleinsäure bewegt. Häufig kommt ein Gel aus Agarose oder Polyacrylamid zum Einsatz (Martin, 1996).
- die *Größe* und *Form* (doppel- oder einzelsträngig, spiralisiert oder linearisiert) der Nukleinsäure.

Kleinere Moleküle bewegen sich schneller als größere. Dabei ist das Verhältnis von Masse m zur Ladung z von zentraler Bedeutung, das für Nukleinsäuren annähernd konstant ist, d. h. das Moleküle gleicher Länge auch die gleiche Wegstrecke pro Zeiteinheit zurücklegen, unabhängig von der Sequenz. Bei der Agarose-Gelelektrophorese bestehen die Gele aus einer festen Matrix, deren Porengröße durch die Konzentration der Agarose variieren werden kann. Die entsprechende Konzentration wählt man je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren, in der Regel zwischen 1 - 4 % Agarose. Die Auftrennung der Proben wird bei einer Feldstärke um 5 V/cm durchgeführt. Nach Abschluss der elektrophoretischen Trennung, die von Dichte und Länge der Gelstrecke abhängig ist (1-3 h), wird das Gel entnommen und für die Anfärbung der DNA etwa 30 min in eine Lösung eingelegt, die einen fluoreszierenden Farbstoff enthält. Im Anschluss an die Färbung kann das Gel entnommen und unter UV-Licht untersucht werden. Mit Hilfe von CCD-Kameras oder Polaroidgeräten können die Gele dokumentiert werden. Agarosegele sind leicht herzustellen und ungiftig. Desweiteren gibt es derivatisierte Agarose, wie *low-melting* Agarose, die der leichteren Isolierbarkeit von Nukleinsäurebanden aus Gelen dient (Lottspeich *et al.*, 1998) oder *sieving* Agarose, die zur Auftrennung besonders kleiner Fragmente eingesetzt wird und Trennbereiche ähnlich einem Polyacrylamidgel (Auflösung von 2-3 bp) erreicht (Martin, 1996).

Ein wesentlicher Nachteil der konventionellen Gelelektrophorese ist allerdings der hohe Zeitaufwand von einigen Stunden. Erheblich verkürzte Analysezeiten erreicht man mit der Kapillarelektrophorese. Neuere Entwicklungen der Kapillarelektrophorese auf Basis planarer Mikrochips konnten die Trenndauer sogar auf wenige Sekunden verkürzen und die Trennung in Kapillarenarrays mit bis zu 96 Trennkanälen parallelisieren (Simpson *et al.*, 1998 und Manz, 1997).

2.2.5. Quantifizierung von DNA

2.2.5.1. Absorbtionsmessung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte mit Hilfe von Absorbtionsmessungen bei 260 nm. Verantwortlich für die Absorption sind die aromatischen Ringsysteme der Basen. Man nutzt den Zusammenhang, dass eine Lösung, die 50 µg/ml DNA enthält, eine optische Dichte von $OD = 1$ besitzt (Lottspeich *et al.*, 1997).

2.2.5.2. Quantitative PCR

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels PCR ist zu einem essentiellen Bestandteil vieler analytischer und diagnostischer Fragestellungen geworden. Dies gilt in besonderem Maße für die Diagnose und Therapiekontrolle von Infektionskrankheiten wie die durch das HI-Virus verursachte Immunschwächekrankheit AIDS. Aber auch im lebensmitteltechnologischen Bereich wird die quantitative Bestimmung von Biomasse zur Qualitätsbeurteilung von Rohstoffen und der daraus gewonnenen Produkte immer relevanter.

Die quantitative PCR kann in vier Kategorien unterteilt werden (Cross, 1995):

- *Limiting dilution*
- Bestimmung der Ausbeute an PCR-Produkt gegen eine externe Eichkurve
- Bestimmung über einen internen endogenen Standard
- kompetitive PCR

Bei der Methode der *limiting dilution* wird ein Referenzstandard bekannter Konzentration und die zu quantifizierende Probe in mehreren Stufen verdünnt, amplifiziert und die Konzentration bestimmt, bei der gerade noch ein Amplifikat nachweisbar ist. Die Anzahl der Verdünnungen lässt auf die Ausgangskonzentration der Probe schließen. Die Methode erlaubt jedoch nur semiquantitative Aussagen.

Bei der Bestimmung gegen eine externe Eichkurve wird das Signal der zu bestimmenden Probe aufgetragen und die Konzentration abgelesen. Beide Methoden sind jedoch nicht in der Lage interne Störungen der Amplifikationseffizienz einer individuellen Probe zu erkennen.

Bei der internen Standardisierung werden interne endogene Sequenzen des Genoms verwendet. Dabei setzt man zwei Primerpaare ein, eines amplifiziert die endogene Sequenz, das andere die nachzuweisende DNA. Die Kenntnis der Konzentration an internen Standard erlaubt über das Verhältnis beider Signale nach der Amplifikation eine Aussage über die Menge der unbekanntes Template-DNA. Im Gegensatz zur externen Standardisierung ermöglicht dieses Verfahren die Erfassung von inhibitorisch wirksamen Substanzen, sofern diese auf beide PCR's denselben Einfluss haben und nicht sequenzspezifisch wirken (Lottspeich *et al.*, 1998). Als kompetitive PCR bezeichnet man die Konkurrenzreaktion der Primer um die Zielsequenz und einen coamplifizierten Standard (Mimic-Fragment). Dafür wird die zu bestimmende Probe aliquotiert und mit einer Konzentrationsreihe der internen Kalibrierungskontrolle versetzt. Nach der Amplifikation werden die Signale von Probe und Standard in den jeweiligen Mischungen gegen die Ausgangskonzentration der Mimic-Fragmente aufgetragen. Am Schnittpunkt (*point of equivalence*) lässt sich die Ausgangskonzentration der Probe ablesen (Lottspeich *et al.*, 1998). Um mit dieser Methode ein einziges quantitatives Ergebnis zu erhalten, sind eine Reihe paralleler PCR-Reaktionen erforderlich. Die Methode ist daher zeit- und materialaufwändig, der Umfang an quantifizierbaren Proben je PCR-Lauf relativ gering.

Für die Quantifizierung der PCR Produkte wurden verschiedene Verfahren publiziert:

- Densitometrische Messung in gefärbten Agarosegelen (Lyttelton *et al.*, 1994)
- Southern-blots mit anschließender Hybridisierung mit spezifischen Sonden (Velleman, 1995; Nicholson *et al.*, 1996; Maggiolini *et al.*, 1999)
- Kapillare Elektrophorese mit Laser-Fluoreszenz-Detektion (Butler *et al.*, 1994)
- HPLC-UV (Katz, 1993).

2.2.5.3. Quantitative PCR für Mykotoxin-bildende *Fusarium*-Arten

Eine Übersicht der vorhandenen PCR-Assays zum Nachweis Mykotoxin-bildender *Fusarium*-Arten findet sich bei Chelkowski *et al.* (1999).

Für Fusarien wurden auch verschiedene quantitative PCR-Systeme beschrieben. So für Arten, wie *F. culmorum*, *F. poae* und *F. graminearum*, die als Verursacher der Weißfährigkeit von Weizen bekannt sind. Nicholson *et al.* (1997, 1998) und Doohan *et al.* (1999) verwendeten eine kompetitive PCR mit anschließender densitometrischer Auswertung mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen. Fumonisine-produzierende Fusarien wurden unter Verwendung von DIG markierten PCR Produkten in einem *Enzyme-linked oligosorbent assay* quantifiziert (Grimm und Geisen, 1998). Mit einer Festphasen-PCR und der Quantifizierung des immobilisierten PCR Produktes gelang der quantitative Nachweis von *Fusarium graminearum* DNA (Niessen *et al.*, 1998).

Bei diesen Methoden handelt es sich ausnahmslos um Endpunktmessungen bei der Bestimmung der Ausgangskonzentration an DNA. Endpunktmessungen haben den Nachteil, dass kleinste Änderungen in der Effizienz der Gesamtreaktion, etwa durch eine leichte Inhibition individueller Proben, zu einer drastischen Änderung der Produktmenge führen können. Die Quantifizierung wird zusätzlich dadurch erschwert, dass sich die Effizienz während der PCR verändert.

2.2.5.4. Kinetischer Verlauf einer PCR-Reaktion

Den Konzentrationsverlauf in einer PCR-Reaktion zeigt Abbildung 11. In der ersten Phase der Amplifikation ist die Templatemenge noch sehr begrenzt. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template-DNA, Primer und Polymerase treffen, ist gering. In der zweiten Phase folgt die PCR nur über einen relativ kleinen dynamischen Bereich dem zugrunde gelegten mathematischen Modell, nach dem mit jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der DNA erfolgt. Eine gute Quantifizierung zweier Proben ist nur möglich, wenn zum Zeitpunkt der Messung beide Proben dieser gleichen exponentiellen Kinetik folgen. Gegen Ende der PCR steigt die Menge an Produkten (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnukleotide) derart, dass es zur Produkt-hemmung kommt. Die Produktfragmente hybridisieren immer häufiger nicht mit den Primern, sondern mit anderen Produktfragmenten.

Außerdem verbrauchen sich die Primer und Nukleotide und die Stabilität der Polymerase nimmt mit zunehmender Zyklenzahl durch die thermische Belastung ab.

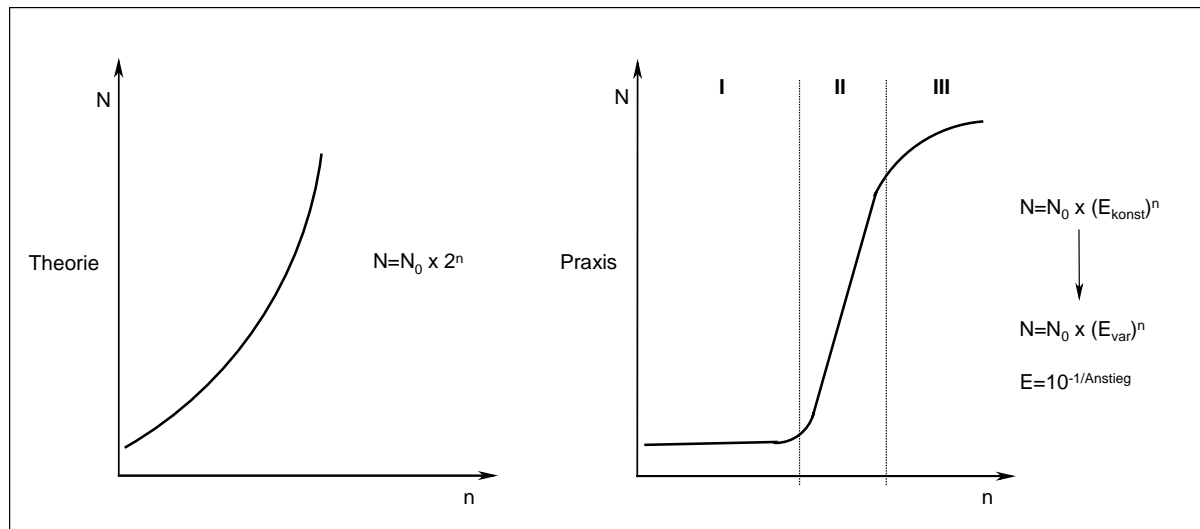


Abbildung 11: Theoretische Aspekte der PCR Amplifikation.

N	Anzahl der Targetmoleküle
N₀	Ausgangskonzentration an Targetmolekülen
n	Anzahl der Zyklen
E	Effizienz der Amplifikation

2.2.5.5. Real-Time-PCR unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

Die genaue Ermittlung der exponentiellen Kinetik gelingt z. B. durch die Kombination von Amplifikation und Detektion. Moderne Real-Time-Detektionssysteme verbinden Reaktionsmodul und Detektionsmodul in einem Gerät (Wittwer *et al.*, 1997). Dieses homogene System erlaubt die simultane Messung der Fluoreszenzzunahme und ermöglicht somit die Bestimmung des PCR-Produkts während der Amplifikationsreaktion.

Verschiedene Systeme erlauben die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte zur Mutationsanalyse oder zur Identifizierung spezifischer PCR-Produkte (Ririe *et al.*, 1997).

Für die Fluoreszenzdetektion gibt es verschiedene Applikationen. Man unterscheidet die Gruppe der Affinitätsfarbstoffe und die Gruppe der fluoreszenzmarkierten DNA-Hybridisierungssonden. Die meisten dieser Fluoreszenzsonden basieren auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer. Das FRET-Prinzip beruht auf der Anregung eines fluoreszierenden Donormoleküls durch kurzwelliges Licht. Das Molekül kann seine Emissionsenergie auf ein zweites Akzeptormolekül übertragen, das darauf mit der Emission längerwelliges Lichtes reagiert.

Der Energietransfer von einem auf das andere Molekül erfolgt über einen Elektronenfluss. Dabei kann ein sog. Quencher-molekül die Fluoreszenzsignale des Reporter-moleküls absorbieren, so lange beide Moleküle in der Hybridisierungs-sonde direkt benachbart zueinander liegen. Ein Beispiel hierfür ist das TaqMan Prinzip (US-Patent 5,487,972), bei dem fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs-sonden am komplementären Zielstrang zwischen den Primerbindungsstellen binden. Bei der Neustrangsynthese wird die Hybridisierungs-sonde durch die 5'→3' Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten und aus dem Zielstrang freigesetzt. Reporter- und Quencher-moleküle liegen jetzt räumlich getrennt vor, die gemessene Zunahme der Reporterfluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus korreliert direkt mit der PCR-Produktzunahme. Weitere Beispiele sind MolecularBeacons (WO 99/31276), Scorpion Primers (Whitcombe *et al.*, 1999), LightSpeed Probes (WO 99/21881) und die Q-PNA PCR (Fiandaca *et al.*, 2001). Diese Applikationen beruhen grundlegend darauf, dass die Reporterfluoreszenz aufgrund der Delokalisation von Quencher- und Reporter-molekül sichtbar wird. Die FRET-Systeme können auch dazu verwendet werden, dass man die unmittelbare Nachbarschaft zweier fluoreszenzmarkierter Hybridisierungs-sonden ausnutzt. Dabei wird durch die Emissionenenergie des Donormoleküls ein Akzeptormolekül angeregt, welches dann ein messbares Fluoreszenzsignal aussendet (Wittwer *et al.*, 1997).

2.2.5.6. Real-Time-PCR unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen

Eine andere Möglichkeit die Zunahme an PCR-Produkt zu messen, ist die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I. Dieser Fluorophor hat die Eigenschaft, sich unspezifisch in die kleine Furche von *dsDNA* anzulagern. Diese Anlagerung hat eine starke Erhöhung der Fluoreszenz zur Folge. Im Gegensatz dazu fluoresziert der ungebundene Farbstoff nur sehr schwach. Je mehr Template mit fortschreitender PCR-Reaktion entsteht, umso mehr Farbstoff kann binden, d. h. die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Zunahme an *dsDNA*. Der Nachteil dieses Formats ist die fehlende Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates, denn auch Primer-Dimere, die sich während der Reaktion bilden können, interagieren mit dem Farbstoff und verursachen so ein erhöhtes Fluoreszenzsignal.

Die Verwendung von SYBR Green I erlaubt eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR-Reaktion.

Dabei wird die Temperatur langsam erhöht und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Am Schmelzpunkt trennt sich die *dsDNA* in Einzelstränge. Das hat zur Folge, dass sich der Farbstoff ablöst und das Fluoreszenzsignal verlischt.

Der Schmelzpunkt eines DNA-Fragments ist abhängig von seiner Sequenz, dem GC-Gehalt und seiner Größe. Damit wird eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren möglich, da kleine Fragmente wie die Primer-Dimere einen niedrigeren Schmelzpunkt als die eigentliche Template-DNA aufweisen.

Zusätzlich ist aufgrund seiner spezifischen Schmelztemperatur eine Identifizierung des PCR-Produkts möglich. Damit kann die zeitaufwändige Analyse des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese mit einem Größenstandard eingespart werden.

Eine Verbesserung der Spezifität lässt sich durch die Verwendung von Light-up Probes (Svanvik *et al.*, 2000) erzielen. Es handelt sich dabei um ein spezifisches Sondensystem, das nicht auf der FRET-Technologie basiert. Die Sonden bestehen aus PNA Oligonukleotiden, die mit Thiazol Orange markiert sind. Dieser Farbstoff zeigt nur dann eine Fluoreszenz, wenn er an DNA gebunden vorliegt. Auf diese Weise verbindet diese Applikation die sehr guten Hybridisierungseigenschaften von PNA mit der Fluoreszenzzunahme der asymmetrischen Cyanine bei der Bindung an DNA.

2.2.6. LightCycler-System

Die Real-Time-PCR ist eine Methode zur Analyse von PCR-Produkten während der Amplifikation. Die mittels Fluoreszenzmessung mögliche kontinuierliche Bestimmung der Amplifikatmenge erlaubt eine sehr viel einfachere Bestimmung der Templatmenge als die herkömmlichen Endpunktmessungen zur Quantifizierung der DNA. Die Daten fallen schon während der PCR an; die Ergebnisse liegen spätestens am Ende der Reaktion ohne weitere Pipettierschritte vor, ohne ein Kontaminationsrisiko durch Amplifikationsprodukte und ohne eine Gelelektrophorese.

Der LightCycler ist ein Real-Time-PCR-Instrument auf dem Prinzip der Rapid-Cycle-PCR, in Kombination mit einem Fluorimeter (Wittwer *et al.*, 1997). Die Rapid-Cycle-PCR, die von Wittwer *et al.* Anfang der 90iger Jahre entwickelt wurde, erlaubt es 30 PCR-Zyklen in weniger als 20 Minuten durchzuführen (Abbildung 12). Zur schnellen und genauen Kontrolle der Temperatur werden Kapillaren aus Borosilicatglas als Reaktionsgefäße verwendet. Der Boroxidanteil im Glas verringert dessen Ausdehnungskoeffizient und damit dessen Empfindlichkeit gegen rasches Erhitzen und Abkühlen (Holleman und Wiberg, 1985).

Die Kapillarform hat ein sehr gutes Verhältnis von Volumen zu Oberfläche, wodurch schnelle Temperatursprünge in der Reaktionslösung möglich werden. Darüber hinaus ist der Einsatz eines Luftstroms als Temperatur-Transfer-Medium eine wesentliche Voraussetzung für die schnelle Reaktionsführung, da Luft eine sehr hohe Wärmekapazität besitzt. Mit dieser Reaktionsanordnung werden Heiz- bzw. Kühlraten bis zu 20 °C pro Sekunde möglich.

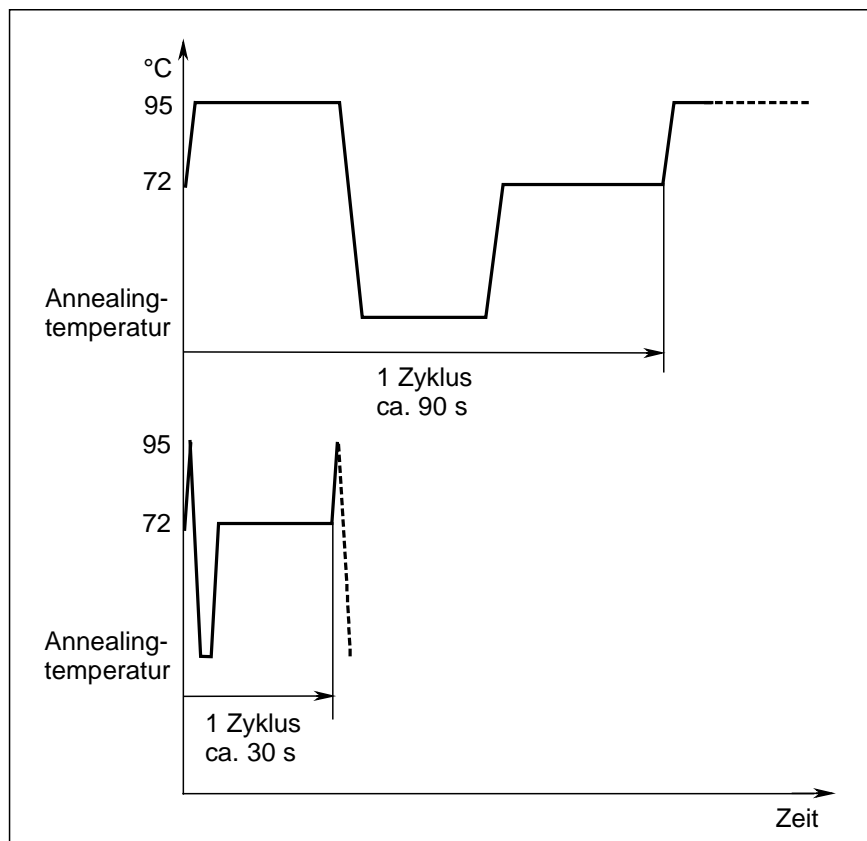


Abbildung 12: Temperatur-Zeit-Profil für eine herkömmliche PCR bzw. für eine Rapid-Cycle-PCR

In einem LightCycler PCR-Lauf können bis zu 32 Kapillaren eingesetzt werden. Die Kapillaren werden in einem Probenkarussell platziert. Das Probenkarussell rotiert in der Reaktionskammer und führt dabei die Kapillaren an der Messoptik vorbei. Durch die optischen Eigenschaften von Borosilicatglas sind die Kapillaren als Küvetten für die Fluoreszenzmessung ideal geeignet. Der Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung im Verlauf eines Zyklus kann durch die Software programmiert werden, typischerweise wird einmal nach jedem PCR-Zyklus zur Überwachung der Zunahme an PCR-Produkt gemessen.

Während einer Messung wird durch eine LED blaues Licht eingestrahlt (470 nm). Dieser Lichtstrahl wird auf die Kapillare fokussiert und dadurch der Fluorophor angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch die Optik in die Messapparatur zurückgeleitet.

Dort wird es durch ein System von Spiegeln und Filtern in die einzelnen Wellenlängenbereiche aufgetrennt und in dem entsprechenden Detektionskanal (Kanal 1 (530 nm), Kanal 2 (640 nm) Kanal 3 (710 nm)) mit Hilfe von Photohybriden gemessen. Die Messzeit für jede Kapillare beträgt ca. 20 Millisekunden, d. h. für 32 Proben fünf Sekunden (Roche LightCycler Operators Manual, 1999).

Mit dem LightCycler ist es möglich, eine gesamte PCR-Reaktion einschließlich der Probenvorbereitung und der Identifizierung des spezifischen PCR-Produktes mit Hilfe einer Schmelzkurve in weniger als einer Stunde durchzuführen. Dies entspricht einer Zeitersparnis von mindestens 3 h gegenüber einer herkömmlichen PCR.

2.3. Nachweis von Deoxynivalenol

2.3.1. Allgemeines

Die Wahl der Methode für die Analyse von Mykotoxinen hängt von der vorhandenen Instrumentenausstattung, von der geforderten Nachweisgrenze, vom Probenmaterial und von den Eigenschaften der jeweiligen Substanz ab. Die einzelnen analytischen Verfahren unterscheiden sich im Extraktionsverfahren, in der Aufreinigung des Extrakts und der eigentlichen analytischen Methode. Die AOAC International hat einige Methoden zur Bestimmung von Mykotoxinen validiert (AOAC International, 1995). Dazu zählt die Bestimmung von Aflatoxinen, Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, Sterigmatocystin, Patulin und Fumonisin.

Einige TLC-Methoden für Trichothecene sind in den amtlichen Analyseverfahren der BR Deutschland enthalten, obgleich GC und HPLC in zunehmendem Maße populär werden, weil sie im Allgemeinen sensitiver, selektiver und reproduzierbar sind (Krska *et al.*, 2001). Es wurde auch eine Vielzahl von immunochemischen Methoden, insbesondere ELISA, für die Bestimmung von Trichothecen entwickelt (Reviews von Morgan, 1989, Candlish, 1991, Park und Chui, 1996).

Aufgrund mehrerer Studien hat sich gezeigt, dass die Reinigung mit den Festphasen von Mycosep mit anschließender Gaschromatographie und der Detektion mit ECD bzw. MS die beste Technik für die Quantifizierung von Deoxynivalenol in Getreide und komplexen Nahrungsmitteln darstellt. Die HPLC, besonders in Kombination mit der Nachsäulenderivatisierung, stellt eine interessante Alternative dar. Für technisch einfacher ausgerüstete Labors ist besonders TLC eine wenig aufwändige Methode für den Nachweis von DON.

Mehr und mehr gewinnen aber auch die immunochemischen Methoden an Bedeutung. Besonders ELISA-Verfahren sind für ein schnelles und dennoch zuverlässiges *Screening* geeignet.

Die Grundlage aller quantitativen Analysemethoden ist ein bezüglich seiner Reinheit und seiner Konzentration definierter Standard. Die Hauptaufgabe eines aktuellen Standard-, Mess- und Prüfungsprojektes (SMT) der Europäischen Kommission (1998) war es, die Reinheit von Standards für die Trichothecenanalyse zu überprüfen und eine Prozedur für die Überprüfung der Reinheit dieser Standards zu entwickeln. Resultierend aus dem erwähnten SMT-Projekt wird vorgeschlagen, als molaren Extinktionskoeffizient für alle B-Typ-Trichothecene in Acetonitril $\epsilon = 6400$ zu verwenden.

2.3.2. Extraktion und Reinigung

DON ist verhältnismäßig polar und wird normalerweise mit Mischungen von Wasser-Acetonitril oder Wasser-Methanol extrahiert. Für die Verwendung in Immunoassays ist eine Aufreinigung normalerweise nicht notwendig, die Rohextrakte werden direkt in diese Analyseverfahren eingesetzt. Anders ist es bei den physiko-chemischen Methoden, die in der Regel eine umfangreiche Reinigungsprozedur erfordern. Die üblichen Verfahren sind die Flüssig-Flüssig- und die Festphasen-Extraktion, Säulenchromatographie und die Verwendung von Immunoaffinitätssäulen. Die Säulenchromatographie kann an einer Vielzahl von stationären Phasen durchgeführt werden (Silikagel, Aluminiumoxyd, Aktivkohle und C8 oder C18 RP). Das am häufigsten eingesetzte Säulenmaterial für DON ist eine Mischung aus Aktivkohle, Aluminiumoxid und Silika.

Eine Reinigungsmethode für die schnelle und effektive Aufreinigung von Extraktionslösungen stellen die MycoSep Festphasensäulen von ROMER Labs, Inc. dar, da bei ihrer Handhabung die zeitaufwändige Elution entfällt. Die Anwendung von Immunoaffinitätssäulen für die Reinigung vor der instrumenteller Analyse war für einige Mykotoxine sehr erfolgreich, aber jede Säule ist nur für ein Toxin spezifisch. Zu erwähnen ist auch die Extraktion mit superkritischen Flüssigkeiten, die aber wegen hoher Investitions- und Unterhaltungskosten nicht das Mittel der Wahl sein kann.

2.3.3. Trennung und Detektion

In der letzten Sitzung der Arbeitsgruppe "Mycotoxins" der Arbeitsgruppe 5 des Europäischen Normierungsausschusses (CEN) (CEN, 2001) musste festgestellt werden, dass es keine aktuelle Methode für die Quantifizierung von DON und anderen Trichothecenen gibt, die für eine Normierung geeignet wäre. Dennoch seien im Folgenden die zur Zeit gängigen Verfahren näher beschrieben.

2.3.3.1. Physikalisch-Chemische Nachweisverfahren

2.3.3.1.1. Gaschromatographie

Als Gaschromatographie bezeichnet man die Trennung von Stoffgemischen, die gasförmig vorliegen oder sich unzersetzt verdampfen lassen. Das Prinzip beruht darauf, dass ein inertes Trägergas durch eine thermostatisierte Säule strömt und die zu analysierenden Substanzen im Gasstrom detektiert werden. Die Detektion erfolgt mittels Elektroneneinfangdetektion, Flammen-Ionisations Detektion, Massenspektrometer oder über ein Tandemmassenspektrometer.

Vor der Chromatographie muss die Flüchtigkeit der Trichothecene durch Derivatisierung der freien Hydroxyl-Gruppen erhöht werden. Vor allem hat sich die Veresterung zu Trimethylsilylderivaten bewährt. Für die Derivatisierung der Hydroxylgruppen stehen eine Vielzahl von Reagenzien zur Verfügung. Die häufigsten sind N,O-cBis-(trimethylsilyl)acetamid, Trimethylchlorosilan, Trimethylsilylimidazol. Die Probleme von Doppelpeaks durch unvollständige Derivatisierung können mittels Derivatisierungsmischungen wie Tri-Sil TBT und Sylon BTZ vermieden werden, die TMSI (40±5 %), BTMSAA (35±5 %) und TMCS (25±5 %) enthalten (Krska, 2001). Es hat sich auch die Derivatisierung mit halogenierten Säureanhydriden wie Heptafluorbutyrylsäureanhydrid, Heptafluorbutyrylimidazol oder Pentafluorpropionsäureanhydrid bewährt.

Gaschromatographische Verfahren stellen speziell in Verbindung mit massenspektrometrischer Detektion die derzeit zuverlässigsten und empfindlichsten Nachweismethoden für Trichothecene dar. Eine Auswahl für die Analyse von Deoxynivalenol findet sich in Tabelle 7.

Sie sind jedoch aufgrund des hohen Aufwandes an teuren Geräten, die zudem hochqualifiziertes Bedienungspersonal erfordern, nur begrenzt für den breiten Einsatz geeignet. Außerdem ist der mögliche Probendurchsatz wegen der notwendigen intensiven Probenaufbereitung gering.

Tabelle 7: GC-Methoden zur Bestimmung von Deoxynivalenol

Matrix	Extraktion	Reinigung	Derivatisierungsreagenz	Analyse	LOD (ng/g)	Recovery (%)	Zitat
Getreide	Chloroform - Ethanol	Silicagel	HFB	GC-ECD	100	-	Ware <i>et al.</i> (1986)
Milch	Ethylacetat	C ₁₈	TMS	GC-ECD	1	-	Swanson <i>et al.</i> (1986)
Futtermittel	-	-	PFPA	GC-ECD	20 (Getreide, Soja) 50 (Silage)	57-65	Rood <i>et al.</i> (1988)
Urin, Galle	-	-	HFBI	GC-ECD/MS	20 (Urin), 40 (Galle)	-	Prelusky <i>et al.</i> (1986)
Weizen	-	-	HFBA	GC-ECD	30	92	Ware <i>et al.</i> (1986)
Weizen	SFE	SFE	-	GC-ECD	1600	53	Josephs <i>et al.</i> (1998)
Weizen, Gerste, Malz	CH ₃ CN-H ₂ O	C ₁₈ -Aluminiumoxid	TMS	GC-ECD	50	94-100	Tacke <i>et al.</i> (1996)
Weizen, Gerste	CH ₃ CN-H ₂ O	C ₁₈ -Aluminiumoxid	TMS, TCMS	GC-MS	-	87-97	Mirocha (1998)
Weizen	CH ₃ CN-H ₂ O	Mycosep™	Tri-Sil-TBT	GC-ECD	23-41	76-107	Krska <i>et al.</i> (1997)
Getreide	CH ₃ CN-H ₂ O	Florisil	-	GC-MS	5-10	81-84	Tanaka <i>et al.</i> (2000)
Weizen	CH ₃ CN-H ₂ O	Mycosep™	-	GC-FID	25	96-103	Van Egmond (2000)

2.3.3.1.2. Hochdruckflüssigkeitshromatographie

Im Gegensatz zur GC werden bei der Flüssigkeitschromatographie gelöste Substanzen aufgetrennt. Die Trennung erfolgt meist an Chromatographiesäulen (C18 RP) und die Detektion mittels UV-Detektor. Die Trichothecene vom Typ B haben aufgrund der Konjugation der Ketogruppe in C-8 Position mit der Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 Position eine relative gute Absorption bei $\lambda = 219$ nm. Als mobile Phase werden Methanol-Wasser-Gemische oder Acetonitril verwendet (UV bei 190 nm).

Die analytische Leistungsfähigkeit der Gaschromatographie kann mit HPLC-Methoden durch Vor- oder Nachsäulenderivatisierung erreicht werden (Maycock *et al.*, 1985).

Es wurden verschiedene Vorsäulenderivatisierungen beschrieben, die UV oder Fluoreszenzchromophore einführen und damit die Nachweisbarkeit verbessern sollen. Bisher hat sich jedoch keine dieser Methoden durchgesetzt (Lepschy, 2000). Die Nachsäulenderivatisierung basiert auf einer fluorimetrischen Bestimmung von DON, die von Sano *et al.* (1987) ausgearbeitet wurde.

Sie beruht auf der alkalischen Spaltung von Deoxynivalenol mit Natronlauge bei 115 °C zu Formaldehyd. Das Formaldehyd wird in einer zweiten Stufe mit einem Acetoacetat und Ammoniumacetat in ein fluoreszierendes Dihydropyridin umgewandelt (Abbildung 13). Aus dieser Reaktionsfolge resultiert eine hervorragende Selektivität.

Die Nachweisgrenze ist wegen des hohen Rauschpegels allerdings nicht besser als bei der UV-Detektion (Lepschy, 2000).

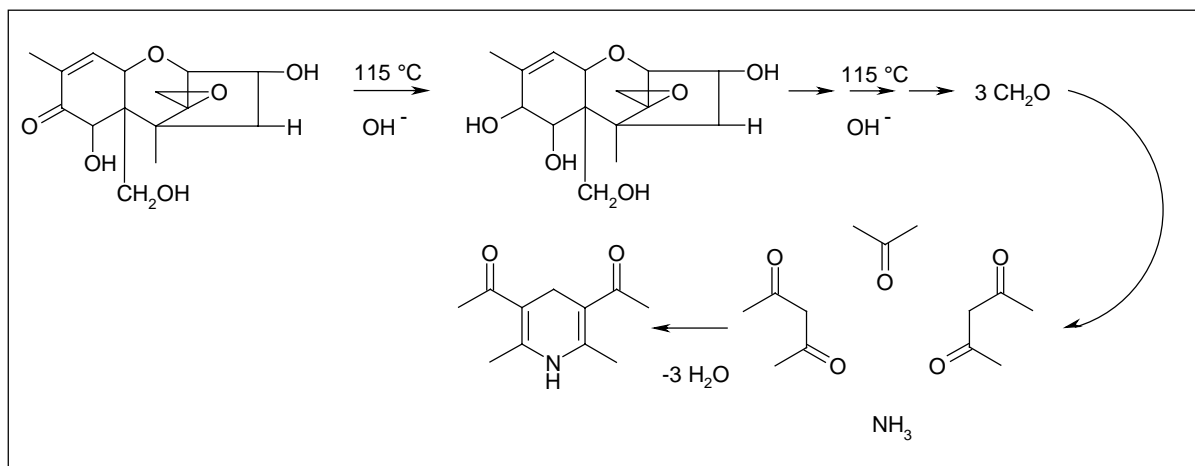


Abbildung 13: Zweistufige Nachsäulenderivatisierung von DON

Angehts des hohen Aufwandes für gaschromatographische Analysen stellt insbesondere die HPLC-Methode mit Nachsäulenderivatisierung eine Alternative für zuverlässige und genaue Messwerte für DON auch in den unteren Konzentrationsbereichen dar. Eine Auswahl an Methoden für die Analyse von Deoxynivalenol mit HPLC findet sich in Tabelle 8.

2.3.3.2. Alternative Verfahren

Wie schon erwähnt sind die bisher behandelten Nachweisverfahren sehr geräte- und zeitaufwändig, außerdem bedarf es hochqualifizierten Personals für die Durchführung solcher Analysen, wodurch die Analysekosten nochmals intensiviert werden.

Deshalb wurde immer wieder versucht, kostengünstige, schnelle und einfach zu handhabende Methoden zu entwickeln. Diese Methoden finden vor allem ihren Einsatz für Übersichtsanalysen (engl. *screening*). Eine Zusammenstellung solcher Methoden zeigt Tabelle 9 (S. 43).

Tabelle 8: HPLC-Methoden zur Bestimmung von Deoxynivalenol

Matrix	Extraktion	Reinigung	Analyse	LOD (ng/g)	Recovery (%)	Zitat
Futter	CH ₃ CN-H ₂ O	Celite-charcoal-alumina	HPLC-UV	100-500	60-86	A. Veldman (1992)
Weizenmehl Weizenkleie	CH ₃ CN-H ₂ O	Mycosep	HPLC-UV	500	87-97	M.W. Trucksess <i>et al.</i> (1998)
Mais, Reis	MeOH-H ₂ O-NaCl	Flüssig-Flüssig-Extraktion	HPLC-UV	5	-	Visconti und Bottalico (1983)
Mais, Reis	MeOH-H ₂ O	Keine	HPLC-ED	25	-	Sylvia <i>et al.</i> (1986)
Getreide	CH ₃ CN-H ₂ O	Celite-charcoal-alumina	HPLC-UV	50	-	Lauren und Greenhalgh (1987)
Getreide, Futter	CH ₃ CN-H ₂ O	Celite-charcoal-alumina Immunoaffinitätssäule	HPLC-UV	50-100	-	M. Reutter (1999)
Getreide	PEG-salt water	Immunoaffinitätssäule	HPLC-UV	100	-	DONtest HPLC
Weizen	CH ₃ CN-H ₂ O	Mycosep	HPLC-DAD	500	79	R. Schuhmacher <i>et al.</i> (1996)
Weizen	H ₂ O-PEG	DONtest	HPLC-UV	100	81-100	L.M. Cahill <i>et al.</i> (1999)

2.3.3.2.1. Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis von Trichothecenen erfolgt wegen des geringen apparativen Aufwandes häufig mittels dünnschichtchromatographischer Methoden. Als stationäre Phase dienen meist Kieselgelplatten und als mobile Phase Laufmittel verschiedener Zusammensetzungen, z. B. Mischungen Wasser-Methanol oder Wasser-Acetonitril. Die Auftrennung der einzelnen Substanzen erfolgt hierbei nach ihrer Polarität durch spezifische hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften und daraus resultierenden stärkeren oder schwächeren Wechselwirkung mit der Kieselgelmatrix.

In jedem Laufmittel ergibt sich für jede Substanz eine spezifische Laufhöhe R_f :

$$R_f = \text{Laufhöhe der Substanz} / \text{Laufhöhe der Fließmittelfront}$$

Für die Entwicklung der DC-Platten sind viele Verfahren in der Literatur beschrieben.

Das wohl bedeutendste Verfahren ist die Chelatbildung mit Trichothecenen, die an C-7 eine Hydroxy- und an C-8 Position eine Carbonylfunktion besitzen (Typ B). Dabei wird Aluminiumchlorid in 60 %igem Ethanol als Färbereagens mit anschließender Erhitzung auf 130 °C und Detektion unter UV-Licht ($\lambda=366\text{nm}$) verwendet. Die Typ B-Trichothecene fluoreszieren hellblau (Kamimura *et al.*, 1979).

Mit der Dünnschichtchromatographie ist es möglich, mehrere Proben simultan zu untersuchen. Dabei kann die Bestimmung qualitativ oder unter Verwendung eines Toxinstandards semiquantitativ durchgeführt werden. Die Sensitivität dieser Methode ist sehr gering, lässt sich jedoch durch instrumentelle Auswertung mittels Densitometer steigern.

Tabelle 9: Alternative Verfahren zur Bestimmung von Deoxynivalenol

Matrix	Extraktion	Reinigung	Analyse	LOD (ng/g)	Recovery (%)	Zitat
Weizen, Gerste, Mais, Hafer, Kleie	CH ₃ CN-H ₂ O	Mycosep	fluorimetrische Messung nach Derivatisierung	100	-	B.R. Malone <i>et al.</i> (1998)
Getreide	PEG-Salz	Immunoaffinitätssäule	fluorimetrische Messung	150	-	DONtest TAG test kit (2000)
Lebensmittel Futtermittel	-	-	TLC(AlCl ₃)	300	-	T. Romer (1986)
Weizen, Mais, Lebensmittel, Futtermittel	CH ₃ CN-H ₂ O	Aktivkohle, Aluminiumoxid, Celite	TLC	20-300	72-99	C. Fernandez <i>et al.</i> (1994)
Bier	keine	dekarbonisiert	ELISA	5 ng/ml	-	Niessen <i>et al.</i> (1993)
Weizen, Gerste	deion. H ₂ O	keine	ELISA	500	-	T. Romer (1999)
Getreide	H ₂ O	keine	ELISA	20-500	-	M. Abouzied (2000) Veratox test (1998)
Weizen	CH ₃ CN-H ₂ O	keine	ELISA (IgY)	160	104-120	L. Schneider <i>et al.</i> (2000)
Weizen	MeOH-H ₂ O	Ethylacetat	ELISA	4.5 ng/ml	71-79	E. Usleber <i>et al.</i> (1992)
Mais, Weizen	CH ₃ CN-H ₂ O	keine	ELISA	10	-	Xu <i>et al.</i> (1988)
Gerste, Malz	CH ₃ CN-H ₂ O	Mycosep	Biosensor (SPR)	0,5	-	van der Gaag <i>et al.</i> (2001)

2.3.3.2.2. Immunologische Nachweisverfahren

Der qualitative und quantitative Nachweis eines Analyten kann über einen sogenannten *Affinitätsassay* erfolgen (Price et al., 1997). Dieser nutzt die spezifische Wechselwirkung, beispielsweise zwischen einem Antigen und einem Antikörper, einem Liganden und seinem Rezeptor oder zwischen zwei komplementären DNA-Strängen. Antigen bzw. Ligand sind häufig komplexere Biomoleküle, können aber auch niedermolekular sein.

Der Vorteil von Affinitätsassays liegt darin, dass eine aufwändige Aufreinigung und Anreicherung des Analyten entfallen kann, wie sie bei Nachweisverfahren mit chemischen Umsetzungen des Analyten bzw. in der instrumentellen Analytik in der Regel notwendig wären. Diese Selektion zwischen Analyt und Verunreinigung übernimmt gewissermaßen der spezifische Bindungspartner.

Dank ihrer hohen Spezifität in der Erkennung von Antigenen, vor allem auch von solchen, die sich nur geringfügig unterscheiden, haben Antikörper eine steigende Bedeutung in der Bioanalytik gewonnen (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Der grundsätzliche Vorteil immunologischer Nachweisverfahren (Abbildung 14) liegt in der Einfachheit der Anwendung bei hoher Sensitivität und der Möglichkeit einer Automatisierung, wodurch ein hoher Probendurchsatz erzielt werden kann. Zur Problematik des immunologischen Mykotoxinnachweises finden sich sehr viele Arbeiten in der Literatur (Chu et al., 1986).

Mykotoxine sind aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes nur in kompetitiven Testverfahren nachweisbar. Dabei unterscheidet man direkt kompetitive und indirekt kompetitive Testverfahren. Beim direkt kompetitiven Verfahren ist eine begrenzte Zahl spezifischer Antikörper an eine Oberfläche gebunden und dient als Festkörperphase. Freies und markiertes Antigen konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen.

Beim indirekten kompetitiven ELISA wird ein Antigen-Protein-Konjugat an das Trägermaterial gebunden. Die Probe wird gemeinsam mit einer begrenzten Menge spezifischer Antikörper inkubiert. Das in der Probe vorhandene freie Antigen konkurriert mit dem immobilisierten Antigen um die Antikörperbindungsstellen. Abhängig von der Konzentration des freien Antigens werden somit mehr oder weniger Antikörper an das immobilisierte Antigen-Protein-Konjugat gebunden. Die gemessene Konzentration an Antikörper-Antigen Bindung ist bei beiden Verfahren umgekehrt proportional zur Konzentration an freiem Antigen in der Probe.

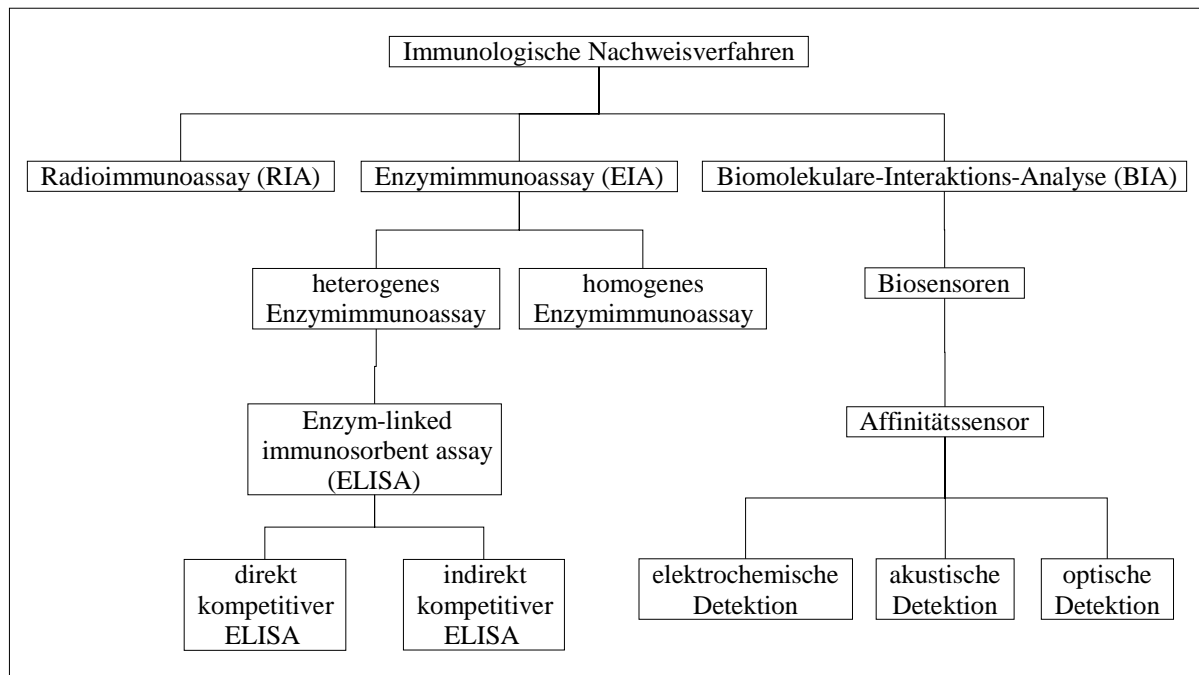


Abbildung 14: Immunologische Nachweisverfahren

Für die Detektion sind verschiedene Methoden möglich. Die radioimmunologischen Verfahren bedienen sich der Erfassung der Strahlungsenergie von radioaktiv markierten Toxinen. Zur Markierung verwendet man die β -Strahler ^3H und ^{14}C .

Durch die Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren auf der Grundlage von enzymmarkierten Antikörpern und Antigenen sind die radioimmunologischen Verfahren aufgrund der sicherheitstechnischen Problematik bei der Handhabung und Entsorgung der radioaktiven Isotope weitgehend verdrängt worden. Die enzymimmunologischen Verfahren können entweder homogen, d. h. ohne Trennung zwischen gebundener und ungebundener Fraktion erfolgen oder heterogen. Das heterogene Verfahren erfordert eine Trennung von gebundenem und ungebundenem Enzymkonjugat. Die Trennung lässt sich durch die Verwendung eines Trägermaterials, an welches der Antikörper oder das Antigen gebunden wird, durchführen. Dieses Verfahren ist auch als ELISA bekannt (Engvall und Perlmann, 1971). Die Detektion erfolgt über die Messung eines Substratumsatzes.

Um eine Immunantwort bei Säugetieren zu erzeugen, müssen Substanzen mit relativ geringer Molmasse (Haptene) an Trägersubstanzen (*carrier*) gekoppelt werden, damit sie vom Immunsystem als Antigen erkannt werden. Als Trägersubstanzen können Proteine, Polypeptide oder Polysaccharide dienen.

Für DON konnte durch Immunisierung von Mäusen mit Deoxynivalenol-3-Hemiglutarat, gekoppelt an bovines Serumalbumin, eine spezifische Immunantwort erzielt werden (Casale et al, 1988). Die gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden zum Nachweis von DON in einem direkten (DON-HRP-Konjugat als markiertes Antigen) und in einem indirekten (DON-Ovalbumin-Konjugat als Festphase) ELISA eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag in beiden Testanordnungen bei 200 ppb.

2.3.3.2.3. Biosensoren

Seit einigen Jahren ist ein deutlicher Trend zu Nachweissystemen, basierend auf Biosensoren, zu verzeichnen.

Biosensoren setzen sich aus zwei Komponenten zusammen, aus einer biologisch sensitiven Schicht und einem Signalwandler, dem sog. *Transducer*. Erstere dient der spezifischen Erkennung eines Analyten. Der *Transducer* erfasst die biomolekulare Erkennungsreaktion, so dass ein reagenzloses Messsystem mit hoher Spezifität für den Analyten entsteht.

Das vom *Transducer* übertragene Signal ist eigentlich ein sekundäres Signal, welches aufgrund der Reaktion zwischen der Biokomponente und dem zu bestimmenden Analyten entsteht und nicht durch ein direktes Signal des Analyten selbst.

Mit der Verwendung des biologischen Elements macht man sich die einzigartige Spezifität biologischer Moleküle für bestimmte Analyten zunutze. Eine solche indirekte Messmethode bedeutet, dass strukturell ähnliche, gelöste Verbindungen über ihre biospezifische Reaktion mit einem immobilisierten Biomolekül, wie z. B. einem Enzym, einem Antikörper oder einem Oligonukleotid, identifiziert werden können. Die Spezifität des Biosensors wird also durch die biologische Komponente vorgegeben, während die Sensitivität vor allem durch den verwendeten *Transducer* beeinflusst wird.

Grundsätzlich kann man Biosensoren in zwei Gruppen unterteilen (Scheller *et al.*, 1989):

- *Enzym- oder Metabolismussensoren*

Diese metabolisieren den Analyten, wobei die Zunahme eines Reaktionsproduktes quantifiziert werden kann.

- *Affinitätssensoren*

Dagegen nutzen diese eine Form der biomolekularen Erkennung, wie Antikörper-Antigen, Nukleinsäure-komplementäre Nukleinsäure oder Rezeptor-Ligand als hochspezifische Affinitätspartner.

Besonderes Merkmal der Biosensoren ist ihre Regenerierbarkeit und die daraus resultierende Wiederverwendbarkeit. Bei einer irreversiblen Immobilisierung des einen Biomoleküls auf der Trägeroberfläche kann die Wechselwirkung mit dem Analyten (zweites Biomolekül) *in situ* reversibel aufgehoben werden.

Damit die biologische Wechselwirkung messbar wird ist es notwendig, physiko-chemische Parameter zu finden, die mit der biologischen Wechselwirkung korrelieren. Alle diese Reaktionen sind bei Affinitätssensoren sowohl durch eine Zunahme der molekularen Masse als auch durch eine Vergrößerung des Volumens gekennzeichnet. Von besonderer Bedeutung sind deshalb in der Affinitätssensorik akustische, elektrochemische und optische Messprinzipien.

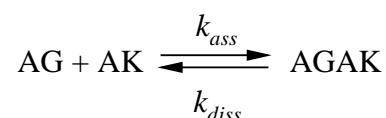
Die akustischen Detektionsverfahren nutzen die Frequenzänderungen eines piezoelektrischen Schwingquarzes, der Masseänderung hochempfindlich nachweist.

Die elektrochemischen Verfahren verwenden eine Erkennungsreaktion auf einer Elektrodenoberfläche, wie z. B. bei der Voltametrie oder Amperometrie.

Zu den optischen Methoden zählen z. B. die Interferenz an dünnen Schichten (*Reflektometrische Interferenzspektroskopie, RIfS*), aber auch die optische Detektion, die den Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonanz, SPR*) ausnutzt (Abschnitt 2.3.4.1.). Die SPR wurde für die Analyse der verschiedensten Mykotoxine verwendet, z. B. für Deoxynivalenol und Zearalenon (van der Gaag *et al.*, 1998), Aflatoxin B₁ (Daly *et al.*, 2000) und Fumonisin B₁ (Mullett *et al.*, 1998).

2.3.3.2.4. Theorie des heterogenen Immunoassays

Die nachfolgenden Betrachtungen werden speziell für die Immunanalytik erläutert, lassen sich aber auch auf andere biochemische Systeme, wie z. B. Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen übertragen. Eine AG-AK-Affinitätsreaktion ist als Gleichgewichtsreaktion zu betrachten.



Die Gleichgewichtskonstante K_{aff} , die hierbei ein Maß für die Affinität darstellt, ist mit der Assoziationsratenkonstante (k_{ass}) und der Dissoziationsratenkonstante (k_{diss}) bzw. den Gleich-

gewichtskonzentrationen des Komplexes c_{AGAK} und der ungebundenen Komponenten $c_{AG, frei}$ bzw. $c_{AK, frei}$ über das Massenwirkungsgesetz wie folgt verknüpft:

$$K_{aff} = \frac{k_{ass}}{k_{diss}} = \frac{c_{AGAK}}{c_{AG, frei} \cdot c_{AK, frei}} = \frac{c_{AGAK}}{(c_{AG,0} - c_{AGAK}) \cdot (c_{AK,0} - c_{AGAK})}$$

Für kleine Liganden <400 g/mol (z. B. Pestizide) werden aufgrund ihrer geringen Wechselwirkungsfläche nur Affinitätskonstanten bis in die Größenordnung von bis zu 10^{10} L/mol beschrieben (Winklmaier *et al.*, 1997).

Zur quantitativen Bestimmung eines Analyten mittels eines Immunoassays werden *Kalibrierkurven* der Beziehung von Signal zur Analytkonzentration unter gleichen Bedingungen herangezogen. In semilogarithmischer Auftragung erhält man dabei sigmoidale Kurven.

Die Datenanpassung erfolgt durch eine nichtlineare Regression über eine semiempirische logistische Modellgleichung:

$$Y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D$$

Die Gleichung setzt eine sigmoidale Kurvenform voraus und gleicht dadurch kleine Messfehler sehr zuverlässig aus.

In Abbildung 15 sieht man den typischen sigmoidalen Verlauf einer Kalibrierkurve, die sich aus der Datenanpassung nach dem 4-Parametermodell ergibt. Die Parameter A und D grenzen die Kurve als obere und untere Asymptote ab (maximales und minimales Messsignal). Der Parameter C gibt den *Testmittelpunkt* der Kalibrierkurve an und B ist die Steigung am TMP.

Der Testmittelpunkt eines Assays gibt die Analytkonzentration an, bei der 50 % des Maximalsignals erreicht wird. Unter dem *Arbeitsbereich* eines Assays versteht man die Analytkonzentrationen im Bereich 10-90 % des Sensorsignals.

Die *untere Nachweisgrenze* (engl. *limit of detection*) gibt die niedrigste Analytkonzentration an, mit der ein statistisch signifikanter Signalwert erzielt werden kann. Da die statistisch korrekte Berechnung sehr komplex ist (Rodbard *et al.*, 1978), bestimmt man als Nachweisgrenze den Wert, der sich auf der Kalibrierkurve aus der dreifachen Standardabweichung vom Mittelwert des Nullsignals (kein Analyt) ergibt. In dieser Arbeit wird die 10-90 %-Definition für den Arbeitsbereich und die dreifache Standardabweichung für den LOD verwendet.

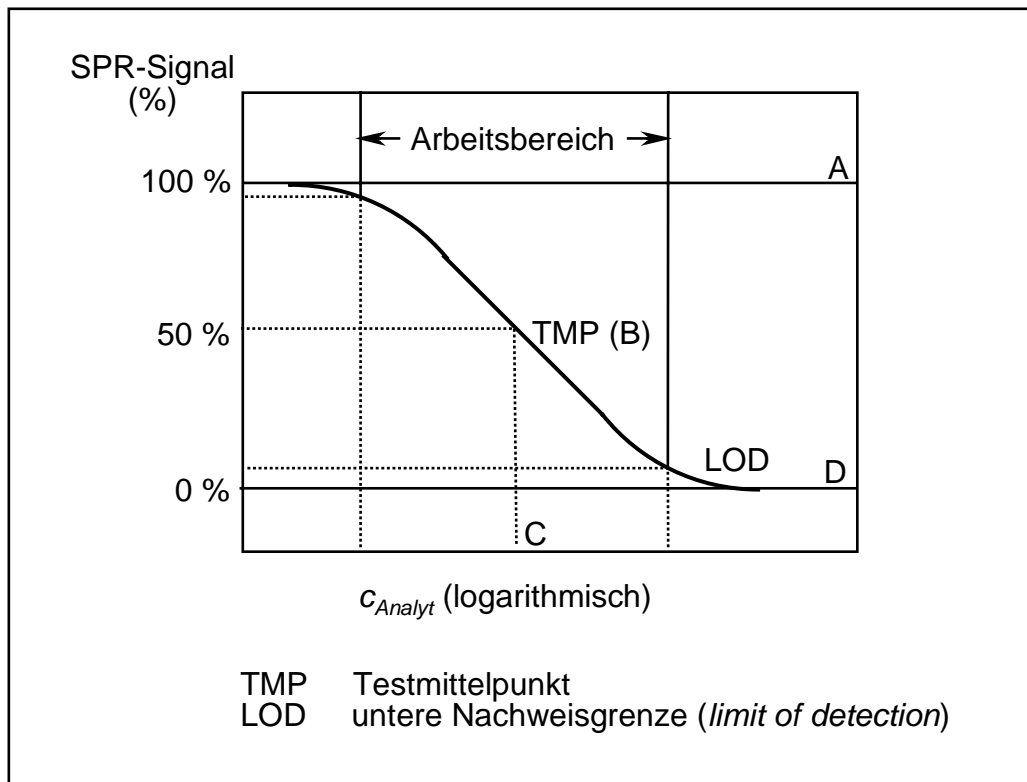


Abbildung 15: Typische Kalibrierkurve für einen Immunoassay

Aus den vier Parametern der sigmoidalen Funktion kann über die Umkehrfunktion der Arbeitsbereich (Signal 10-90 %) berechnet werden:

$$X = \left(\frac{Y - A}{D - Y} \right)^{\frac{1}{B}} \cdot C$$

Über die Gleichgewichtsbedingungen am Testmittelpunkt:

$$c_{AGAK} = c_{AK}$$

lässt sich die Affinitätskonstante ermitteln (Weil *et al.*, 1993):

$$K_{aff} = \frac{1}{c_{AG}}$$

Polyklonale Antikörper weisen als Mischung verschiedener Antikörper-Klone ein verbreitetes Spektrum an Affinitätskonstanten auf. Bei der Bestimmung werden deshalb mittlere Affinitäten angegeben.

Günstige AK-Konzentrationen liegen bei immunanalytischen Verfahren im Allgemeinen bei $1/K_{\text{aff}}$. Kleinere Konzentrationen verschieben den Testmittelpunkt nur noch geringfügig (Hock, 1995). In jedem Fall wird durch eine Verringerung der Konzentration an markiertem Antikörper die Dynamik des Tests entsprechend verkleinert.

2.3.4. BIAcore-System

2.3.4.1. Einführende Beschreibung des Phänomens der SPR

In Metallen können Leitungselektronen zu einer kollektiven longitudinalen Schwingung angeregt werden. Das Quant einer solchen Plasmaschwingung wird als Plasmon bezeichnet. Man unterscheidet Volumenplasmone und die niederenergetischeren Oberflächenplasmone. Aufgrund der Stetigkeitsbedingung von Feldern an Grenzflächen fällt das elektrische Feld eines Oberflächenplasmons im Medium nicht sofort auf Null ab, sondern erst exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche. Die Reichweite dieses sogenannten evaneszenten Feldes liegt in der Größenordnung der Wellenlänge.

Ein Dielektrikum innerhalb dieser Reichweite führt zu einer Rückkopplung mit dem Evaneszenzfeld der Plasmaschwingung und somit zu einer Änderung der Anregungsbedingung (Resonanzfrequenz) für das Plasmon. Oberflächenplasmone können unter Lichtabstrahlung oder Umwandlung in Wärmeenergie deaktiviert werden (Hellwege, 1988).

Bei der Anregung über reflektierte Photonen am Prisma ist der elektrische Feldvektor der ankommenden Welle entscheidend. Dessen evaneszentes Feld kann mit elektrischen Feldern innerhalb seiner Eindringtiefe wechselwirken und somit ein Plasmon anregen. Der charakteristische Intensitätsverlust, den der reflektierte Lichtstrahl hierbei erfährt, wird schließlich detektiert.

Alle gängigen SPR-Varianten basieren auf der sog. Kretschmann-Anordnung (Kretschmann und Raether, 1968; Kretschmann, 1971), bei welcher sich ein sensitiver, etwa 50 nm dicker Metallfilm direkt auf der Prismenoberfläche befindet (Abbildung 16). Ein solcher Transducer, bestehend aus einer goldbeschichteten Glas- oder Kunststoffoberfläche, und kann in einfacher Form mit dem Analyt kontaktiert bzw. mit einer Flusszelle kombiniert werden.

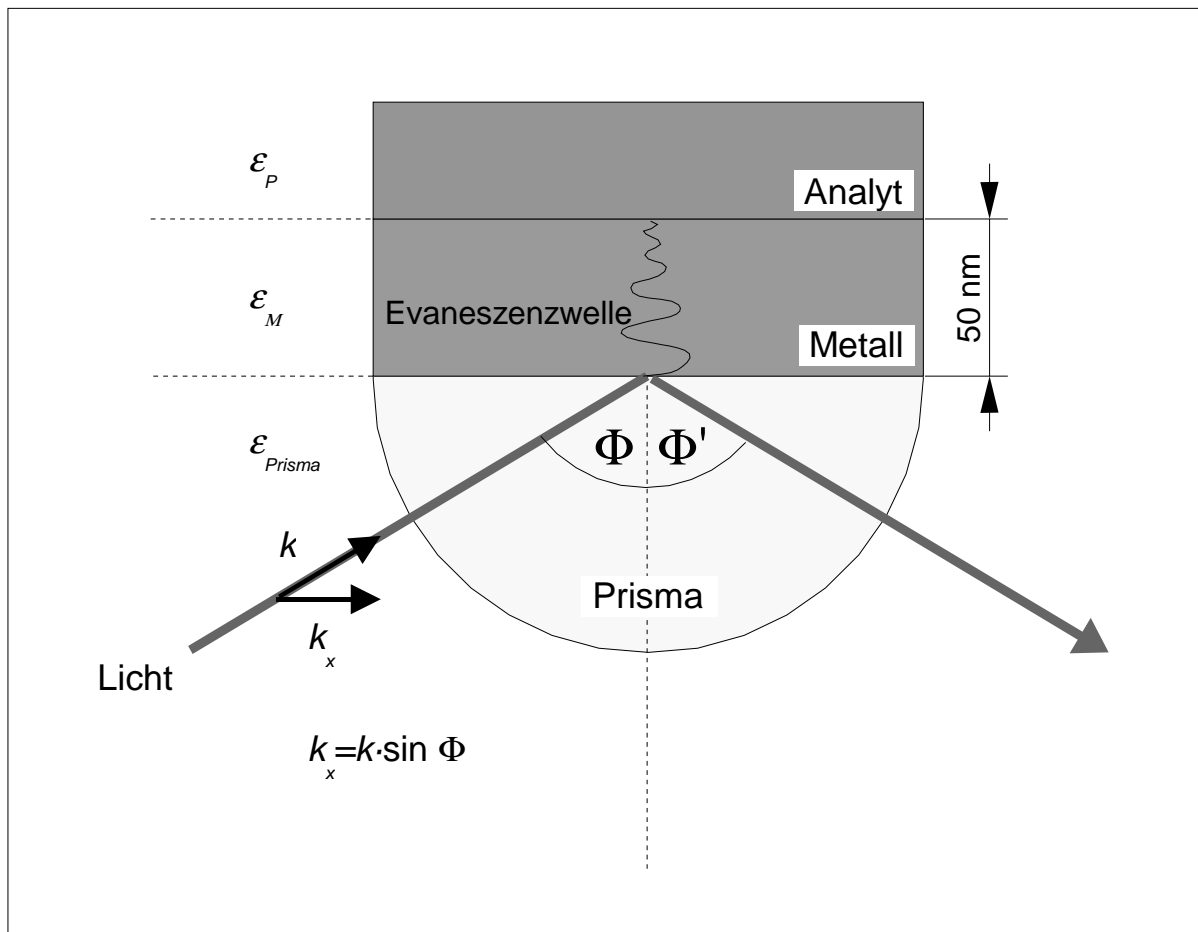


Abbildung 16: Kretschmann-Anordnung

Die Notwendigkeit eines Prismas lässt sich aus den Dispersionsrelationen für Licht und Oberflächenplasmonen erklären, also aus der Abhängigkeit des Impulses von der Energie. Die Dispersionsrelation für Licht im Vakuum ist über die Winkelgeschwindigkeit definiert durch:

$$\omega = 2\pi \cdot \nu = k \cdot c$$

mit c als Lichtgeschwindigkeit im Vakuum.

Für die Anregung eines Oberflächenplasmons ist lediglich die Impulskomponente parallel zur Oberfläche (x-Richtung) entscheidend:

$$k_x = k \cdot \sin \Phi = \frac{\omega}{c} \cdot \sin \Phi$$

Eine elektromagnetische Welle wird in der Optik auch über den komplexen Brechungsindex n bzw. die Dielektrizitätskonstante ϵ beschrieben.

Für nicht-ferromagnetische Stoffe lässt sich in sehr guter Näherung vereinfachen:

$$\epsilon = n$$

Für die komplexe Dielektrizitätskonstante und somit auch für den komplexen Brechungsindex gilt, dass der Realteil die Dispersion beschreibt. Für ein Oberflächenplasmon ergibt sich eine Dispersionsrelation, die von der (wellenlängenabhängigen) Dielektrizitätskonstante des Puffers beeinflusst wird:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_M \cdot \epsilon_P}{\epsilon_M \cdot \epsilon_P}}$$

mit ϵ_M als Dielektrizitätskonstante des Metallfilms und ϵ_P als Dielektrizitätskonstante des Puffers. Da sich die Dispersionsrelationen für Licht und Plasmon nicht schneiden, kann aufgrund des Energie- und Impulserhaltungssatzes keine Anregung stattfinden. Im Prisma hat Licht im Vergleich zum Vakuum höhere Impulseigenschaften:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sin \Phi \cdot \sqrt{\epsilon_{Prisma}} = \frac{\omega}{c} \cdot \sin \Phi \cdot n_{Prisma}$$

An der Phasengrenze Metall/Prisma ändern sich die Impulseigenschaften von Licht und Plasmon annähernd gleich stark mit dem Brechungsindex des Prismas, weshalb hier kein Plasmon angeregt werden kann. Die außenliegende Metalloberfläche weist hingegen die unveränderte Dispersionsrelation für ein Oberflächenplasmon auf. Die erhöhten Impulseigenschaften des prismengeführten Lichts werden auch in dessen Evaneszenzfeld weitergeführt. Dieses kann somit in die Fluktuationen des elektrostatischen Feldes der Plasmaschwingung auf gegenüberliegenden Metalloberfläche einkoppeln und damit ein Plasmon anregen. Zur Anregung des Oberflächenplasmons wird dem eingestrahlenen Energiespektrum eine charakteristische (Resonanz-)Energie entzogen.

Durch Dielektrika an der Oberfläche verschiebt sich diese Energie aufgrund der Wechselwirkung mit dem Evaneszenzfeld des Oberflächenplasmons. SPR gehört demnach zur

Gruppe der ATR-Methoden (*Attenuated Total Reflection*), welche den Intensitätsverlust totalreflektierten Lichts durch eine Wechselwirkung seines Evaneszentfeldes detektieren.

2.3.4.2. Grundlagen des BIAcore Systems

1983 wurde von Liedberg *et al.* (1983) das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) erstmalig verwendet, um eine sensorisch aktive Oberfläche zu erzeugen. Der SPR-Aufbau gestattete damals die Analyse von Gasen, die mit der Oberfläche wechselwirkten. Heutzutage sind einige Geräte, die dieses Prinzip nutzen, kommerziell erhältlich: Biacore AB (Uppsala, Schweden) vertreibt als Marktführer und erster Anbieter seit 1990 das BIAcore Gerät (Löfås *et al.*, 1990), das zur Untersuchung und Charakterisierung von Affinitätsreaktionen weitverbreitete Anwendung fand (Malmquist, 1993). Das Gerät „Plasmoon“ der Firma BioTul Bio Instruments GmbH (München, Deutschland), verwendet wie das BIAcore mit Hydrogel beschichtete Goldchips, die über acht separate Reaktionsküvetten angesteuert werden können. Der SPREETA Sensor der Firma Texas Instruments (Dallas, USA) vereint die Sensoroberfläche mit allen optischen und elektronischen Bauteilen in einer kompakten, leichten und kostengünstigen Apparatur.

Grundprinzip aller SPR-Sensoren ist das Phänomen der optischen Schwingungsanregung von Elektronen in einem dünnen Metallfilm (siehe Kapitel 2.3.4.1.). Die durch Wechselwirkung mit Photonen entstandenen Schwingungen, sog. *Polaritone* oder *Plasmone* breiten sich über einige Mikrometer wellenförmig in der Metallschicht aus (Lawrence *et al.*, 1992). Die Schwingungen sind verbunden mit einem evaneszenten Feld, das über die Phasengrenze in die Umgebung hineinreicht. Wechselwirkungen von Molekülen mit dem evaneszenten Feld können hochsensitiv detektiert werden. Der SPR-Effekt tritt bei Verwendung von ca. 50 nm dünnen Metallschichten auf (z. B. Ag, Au, Al, Pt), wobei häufig Goldschichten durch ihre Edelmetall- und guten Kopplungseigenschaften zum Einsatz kommen. Über ein Prisma, das von der Rückseite des Chips gegen ein Glassubstrat drückt, wird monochromatisches Licht einer LED eingestrahlt und das Winkelspektrum des reflektierten Lichts über eine CCD-Zeile ausgelesen (Abbildung 17). Da Licht einer bestimmten Wellenlänge und eines bestimmten Einstrahlwinkels zur Anregung des SPR-Effektes absorbiert wird, erscheint in der Reflexion ein Intensitätsminimum. Kommt es nun auf der Goldoberfläche zu geringen Änderungen der Massebeladung, z. B. durch Anlagerung von Proteinen oder Nukleinsäuren, so wechselwirken diese Moleküle mit dem elektromagnetischen evaneszierenden Feld.

Ergebnis dieser Wechselwirkung ist eine detektierbare Veränderung des Intensitätsminimums im Reflexionswinkelspektrum, die mit der Massezunahme korreliert.

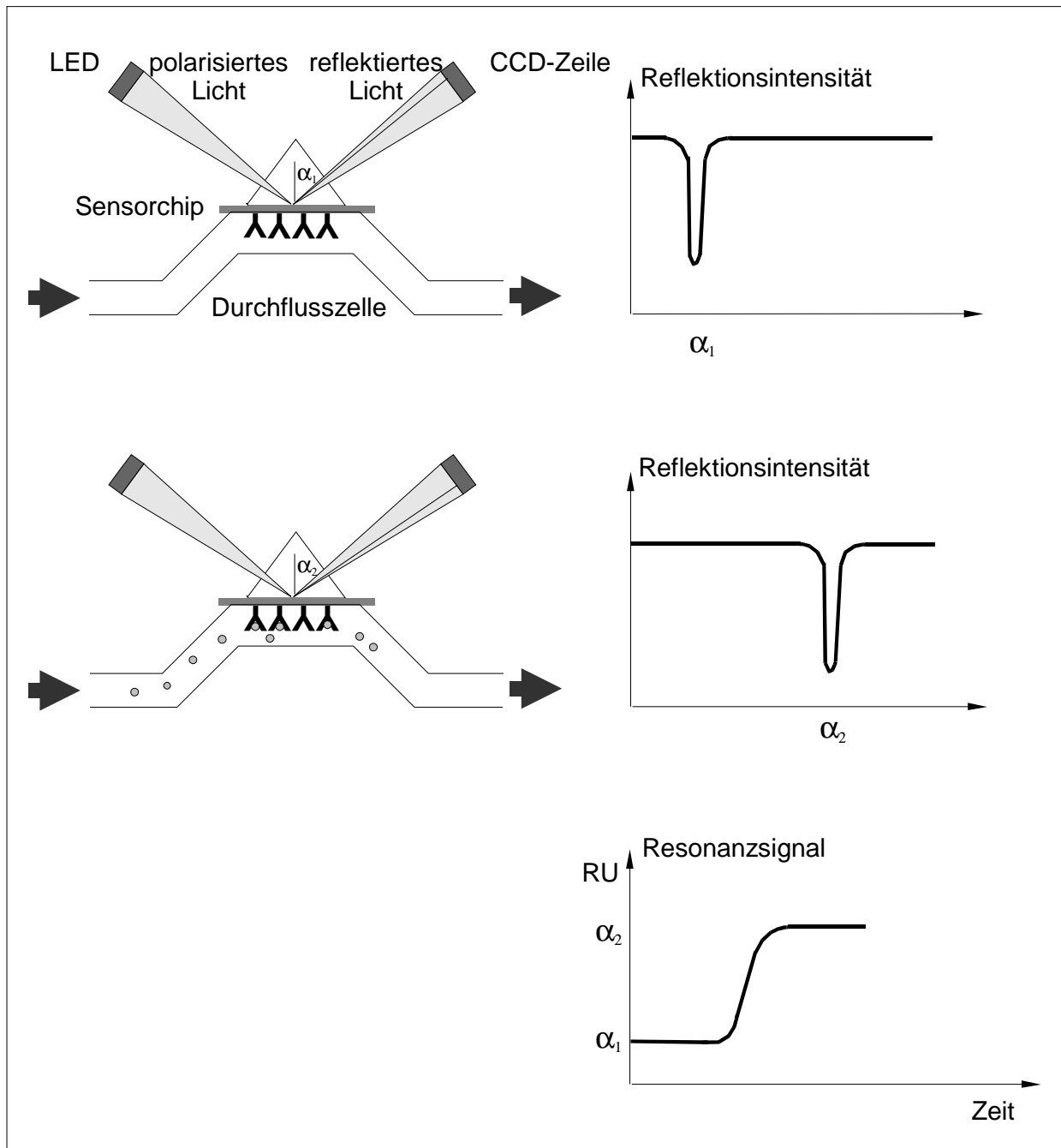


Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines SPR-Systems. Eine Massenänderung an der Oberfläche verändert das aufgezeichnete Reflexionsspektrum. Die Veränderung, gemessen in RU, ist proportional zur Veränderung der Massenbeladung

Das BIAcore gibt das Sensorsignal in sog. *Resonance Units* RU an, wobei willkürlich festgesetzt wurde, dass 1000 RU einer Anlagerung von 1 ng/mm^2 Protein entspricht (Stenberg *et al.*, 1991 und Fagerstam *et al.*, 1992). 1000 Resonance Units entsprechen ebenfalls einer Ablenkung des Reflexionswinkels von $0,1^\circ$. Dargestellt werden die Daten in einem Diagramm mit Ordinate [RU] und Abszisse [Zeit].

Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

Hersteller, Bezugsquelle	Chemikalien, Biochemikalien und Kits
Amersham Pharmacia	2'Deoxyuridin 5'-Triphosphat 100 Base-Pair Ladder
Biacore AB	BIAMaintenance KIT for BIACORE EDC-coupling HBS-EP buffer BIA certified NHS-coupling solution Surfactant P 20 BIA Certified
BioWhittaker Molecular Applications	NuSieve [®] GTG [®] agarose
Boehringer Mannheim GmbH	Tth Pyrophosphatase Tween [®] 20
Clontech Laboratories, Inc.	TaqStart [™] Antikörper
DAKO A/S	Kaninchenimmunoglobuline
Fluka Chemie GmbH	Butylboronsäure Glutarsäureanhydrid Natriumlauryl-sulfat (SDS), Pyridin Tetraethylammoniumchlorid UNG-Glycosylase
FMC Bioproducts	SeaKem [®] LE agarose
GeneCraft Germany	dNTP's
Genomed	JETsorb Gel Extraction Kit / 300
Gerbu Biotechnik GmbH	Glycin MES
ICN Biomedicals, Inc.	Tris Ultra Pure
Linde AG	Stickstoff (flüssig, gasförmig)
Mallinckrodt Baker Deutschland	Ethanol Methanol Chloroform Isoamylalkohol
MBI Fermentas	UNG-Glycosylase
Molecular Probes	PicoGreen SYBRGreen,
PE Applied Biosystems	AmpliTaq Gold
Promega	Tth DNA Polymerase
Roche Diagnostics GmbH	High-pure PCR Template Preparation Kit LightCycler Kits for PCR (DNA Master SYBR Green I) LightCycler FastStart (DNA Master SYBR Green I)

Hersteller, Bezugsquelle	Chemikalien, Biochemikalien und Kits
Roche Diagnostics GmbH	LightCycler Color Compensation Set Proteinase K Rnase A
Carl Roth GmbH & Co.	Roti-Phenol
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Biotinhydrazid Borsäure Bromphenolblau Deoxynivalenol Dimethylsulfoxid EDC EDTA HEPES MOPS Polyvinylpyrrolidon pUC 18 DNA Msp I DIGEST
Supelco	Glaswolle, silanisiert
Wako Chemicals Industries Ltd.	Deoxynivalenol
VWR International (Merck eurolab GmbH)	Acetonitril, Albumin Fraktion V (von bovinen Serum) Aluminiumchlorid Ethidiumbromid LiChrosolv (Wasser für die Molekularbiologie) Seesand

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma VWR International in p.A. Qualität bezogen.

3.2. Material und Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bad/Umwälzthermostat	MA 6 B	Lauda
BIA-Instrumentierung	BIAcore X BIAevaluation 3.1 BIAcore Control 3.1 Sensor Chip CM5 Sensor Chip SA	Biacore AB
Dampfsterilisator	VARIOKLAV Typ 500 E, EV-Z, EV-RL/Stand	H+P Labortechnik GmbH
Drehschieber-Vakuumpumpe	RZ-2	Vakuubrand GmbH & Co.
Dünnschichtchromatographie	DC-Alufolien RP-18 F _{254s} DURAN® Ringcaps® Einmal-Mikro Pipetten mit Ringmarke MinUVIS, Duo-Strahler für Dünnschicht- und Säulenchromatographie	VWR International Hirschmann Laborgeräte Germany Desega
Fluoreszenz-Multifunktionsreader	SpectraFluor Mikrotiterplatten F 16 Black Polysorb	Tecan Deutschland GmbH Nalge Nunc International
Gelelektrophorese	Mini-Gel-Elektrophoresekammer MWG Power Supply PPS 200-1D	MWG Biotech
Geldokumentation	Video-Gel-Dokumentationssystem Software EASY-Store	Herolab
Hochdrucksterilisator	Sanoklav LaM-201 2540 ELV	Adolf Wolf SANOclav Tuttnauer Systec
HPLC	Kapitel 3.4.3.3., S. 75	Gykotek
Membran-Vakuumpumpe	ME4	Vacuubrand
PCR-Cycler	LightCycler Instrument LightCycler Capillaries LightCycler Centrifuge Adapters LightCycler Sample Carousel LightCycler Software 3.5.3	Roche Diagnostics GmbH
PC	HP, Vectra Vli Serie 8 PIII/450 Modell 6400 ATA	Hewlett Packard
pH-Meter	Mikroprozessor-pH-Meter 761 calimatic	Knick
Pipetten	Multipette® plus mit Combi-tips® plus 0,2 ml, 5 ml und 50 ml Pipettensatz mit Standartips	Eppendorf AG

Gerät	Modell	Hersteller
Probenmühle	Laborscheibenmühle DLFU	Bühler GmbH
Probenreinigung	MycoSep™ Säulen	Romer™ Labs, Inc.
Reaktionsgefäße	Polypropylen-Mehrzweckgefäße mit Schraubverschluss (120 ml), Probenröhrchen (50 ml) Safe-Lock Tubes (0,5 ml; 1,5 ml und 2,0 ml) Sorenson™, SafeSeal Microcentrifuge Tubes Oak-Ridge-Röhrchen	Sarstedt Eppendorf AG BioScience, Inc. Nalgen
Reinstwassersystem	RS 90-4/UF	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Rotationsverdampfer	VV 2000 WB 2000 Vakuumpumpe Laboport Vacuumkontroller	Heidolph KNF Neuberger
Spektrophotometer	UV-Visible-Spectrometer Biochrom 4060	Pharmacia Biotech Norden AB
Sterilschrank	SLP 500	Memmert GmbH & Co. KG
Sterilfiltration	Ecoject® 20 ml Sterilfilter Minisart® 0,2 µm	Dispomed Witt oHG Sartorius AG
Tischrundschtüttler	Ceromat R	B. Braun Diessel Biotech GmbH
Überkopfschtüttler	REAX 2	Heidolph
Ultraschallgeräte	Ultraschallprozessor (Frequenz von 24.000kHz) Sonorex Super RK 103 H	Dr. Hielscher GmbH Bandelin electronic
Vakuumentrifuge	MAXI dry plus / Iyo	Heto Lab Equipment A/S
Vibrationsschtüttler	Vortex Genie2 G560-E	Scientific Industries, Inc.
Waagen	BP 210 S SBA 52	Sartorius AG Scaltec
Wasser Ionenaustauscher	SG 2000	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Wasserbad-Thermostat	MD-19 A	Julabo
Wasserenthärtung	C 16-100	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Wasserfiltrations- und Entsalzungsanlage	euRO-25	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Zentrifugen	Sigma 1K15 Sigma 112 Z E2 K	Sigma Hermle Labortechnik GmbH

3.3. Puffer, Medien und Lösungen

Der pH-Wert der Puffer wurde, wenn nicht anders angegeben, vor dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C, 1 atm) mit NaOH oder HCl eingestellt.

Probenpuffer:

Saccharose	25 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
EDTA, pH 8,0	100 mM

Elektrophoresepuffer:

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
pH 8,0	

TAE-Puffer:

Tris	40 mM
EDTA	2 mM
pH 8,0 (mit Eisessig eingestellt)	

Phosphatpuffer:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	30 mM
pH 7,2	

TE-Puffer:

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH-Wert 8,0	

Lyse-Puffer für Myzel:

Tris	50 mM
EDTA	50 mM
3 % SDS (w/v)	
1 % DTT (w/v)	
pH 7,2; sterilfiltriert	

Lyse-Puffer für Getreideproben:

Tris	10 mM
EDTA	20 mM
Guanidin-HCl	500 mM
NaCl	250 mM
1 % Triton X-100	
6 % PVP (vor Verwendung zugeben)	

Extraktionspuffer:

10 % Methanol (v/v)
6 % PVP (vor Verwendung zugeben)

HEPES-Puffer:

HEPES 10 mM
150 mM NaCl
3 mM EDTA
0,005 % Surfactant P20
pH 7,4; sterilfiltriert

Malzextrakt-Boullion:

2 % Malzextrakt
0,2 % Sojapepton

3.4. Methoden

3.4.1. Allgemeine Methoden

3.4.1.1. Sterilisation

Medien und Pufferlösungen sowie alle für molekularbiologischen Arbeiten benötigten Materialien und Geräte wurden 20 min bei 121 °C, 1 atm Druck autoklaviert oder 4 h bei 160 °C sterilisiert, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Lösungen, die nicht hitzebeständige Substanzen enthielten, wurden sterilfiltriert.

3.4.1.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Trennung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten.

Als Längenstandards wurden verschiedene Basenpaarleitern verwendet. Für Kontrollgele wurden 5 mm dicke, horizontale Gele mit 1,5 % Agarose in TBE- oder TAE-Puffer gegossen. Zur DNA-Präparation wurden 4 %ige Low-melting Agarosegele verwendet. Zum Gießen der Gele wurde Agarose in dem entsprechenden Volumen Puffer vorgequollen und dann durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, auf etwa 50 °C abgekühlt und in die Gelapparatur gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in die Elektrophoresekammer eingesetzt, mit Puffer überschichtet und die mit 0,1 Vol. Probenpuffer versetzten DNA-Proben in die Geltaschen eingetragen.

Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm Gellänge. Nach dem Lauf wurden die Gele in einem EtBr-Bad (Konzentration: 1µg/ml) für 10-15 min gefärbt. Dabei interkaliert das EtBr in die Doppelhelix der DNA und ermöglicht durch seine Fluoreszenz im UV-Licht die Detektion der DNA-Fragmente im Gel.

Die Auswertung erfolgte auf dem Transilluminator bei 302 nm. Mit dem Bilddokumentationssystem wurde das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

Bei allen präparativen Agarosegelelektrophoresen wurde für das Gel sowie als Elektrophoresepuffer TAE-Puffer verwendet. Die Elution von DNA aus dem Gel erfolgte mit der „freeze-squeeze“-Methode.

3.4.1.3. Elution mittels "freeze squeeze"-Methode

Die Methode zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde von Tautz und Renz (1982) entwickelt und ist eine Abwandlung der Methode von Thuring (1975).

Nach der elektrophoretischen Trennung der DNA wurden die gewünschten Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und 15 min in 0,3 M Natriumacetat-Lösung (pH 7,0), der 1 mM EDTA zugesetzt war, äquilibriert. Danach wurden die Gelstücke in kleine Eppendorf-Tubes (0,5 ml), die mit silanisierter Glaswolle gestopft waren und am Boden mit einer Öffnung versehen waren, mit möglichst wenig Flüssigkeit überführt. Die Deckel der Eppendorf-Tubes wurden mit Parafilm fixiert und 5 min in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Tubes wurden dann in 1,5 ml Eppendorf-Tubes (ohne Deckel) gesteckt und sofort 10 min bei 14.000 x g und RT zentrifugiert. Die eluierte Flüssigkeit wurde in ein frisches Eppendorfgefäß (1,5 ml) pipettiert und die Zentrifugation wiederholt. Der gepoolten Lösung wurden 1/100 Vol. 1 M MgCl₂-Lösung mit 10 % Essigsäure und 2,5 Vol. 96 %igen Ethanol zugesetzt. Es wurde 15 min bei -80 °C inkubiert und anschließend wieder 10 min bei 14000 x g und RT zentrifugiert. Die so erhaltenen Pellets wurden mit 70 %igem Ethanol und mit 96 %igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 60 °C getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in wenig Wasser aufgenommen und für weitere Arbeiten verwendet.

3.4.2. Methoden LightCycler

3.4.2.1. Präparation der pilzlichen DNA aus Reinkulturen und aus Getreide

3.4.2.1.1. Extraktion von Gesamt-DNA aus *Fusarium* spp.

Ein 200 ml Erlenmeyerkolben, der 100 ml Malzextrakt-Boullion enthielt, wurde mit dem jeweiligen Pilz beimpft und für 4-7 Tage bei RT auf dem Rundschtüttler inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde das Myzel mit einer steriler Nutsche über einem sterilen Rundfilter abfiltriert und mit deion. H₂O nachgespült. Danach wurde das Myzel vom Filter in ein steriles 50 ml Sarstedtröhrchen überführt, das Myzel bei -20°C vorgefroren und im Vakuum für 24 h getrocknet.

Die Gewinnung von DNA aus pilzlichen Reinkulturen erfolgte in einem zweistufigen Verfahren. In einem sterilem Mörser wurde das Myzel mit sterilem Seesand gut verrieben, so

dass die Hyphen zerstört wurden. Das Ergebnis wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Gemenge wurde in 50 ml Oak-Ridge-Röhrchen überführt, 12 ml Lyse-Puffer zugeben und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 65 °C im Wasserbad wurden 10 ml Phenol (RT) zugeben und 30 min langsam überkopf geschüttelt. Anschließend wurde für 10 min. bei 15.000 x g und RT zentrifugiert. Dabei bildete sich eine scharfe Phasengrenze. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Oak-Ridge-Röhrchen überführt und mit 10 ml Phenol /CIA (1:1, RT) gemischt und ebenfalls wie oben beschrieben geschüttelt und wieder zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder in ein neues Oak- Ridge-Röhrchen überführt, mit 10 ml CIA (24:1, RT) geschüttelt und wie oben zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde in ein 15 ml Sarstedt-Röhrchen geben und das Volumen bestimmt. Es wurde 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 7,5) zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde 1 Vol. eiskalter absoluter Ethanol zugeben und wieder vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde für 30 min bei -20 °C inkubiert, danach für 30 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und mit 1 ml 70 %igem, eiskalten Ethanol gewaschen und im Vakuum für 20 min getrocknet. Das Pelett wurde in 3 ml sterilem deion. H₂O gelöst.

Zur Entfernung von möglichen Enzymen wurde pro 1 ml DNA-Lösung 10 µl Rnase A (10mg/ml) zugesetzt und für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden pro 1 ml DNA-Lösung 10 µl Proteinase K (20mg/ml) zugegeben und für zwei Stunden bei 55 °C im Wasserbad inkubiert.

Für die Fällung wurde 1 Vol. CIA (24:1, RT) zur DNA-Lösung zugegeben und unter leichtem Überkopfschütteln für 15 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei RT und 5000 x g wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 15 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert und die Extraktion wiederholt.

Im Anschluss erfolgte wieder eine Ethanol-fällung mit Natriumacetat und Ethanol wie bereits beschrieben. Die DNA wurde in 2 ml sterilem deion. H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.4.2.1.2. DNA-Extraktion aus Getreideproben

Von den Getreideproben wurden jeweils ca. 100 g in einer Probenmühle fein gemahlen.

In 100 ml Plastikröhrchen mit Schraubdeckel wurden 20 g gemahlene Getreide eingewogen. Dazu wurden 25 ml Lysepuffer-Konzentrat und 55 ml deion. H₂O zugesetzt, anschließend wurden zunächst durch leichtes Schütteln oder Rühren die Probe homogenisiert.

Die Proben wurden für 1 min mit einer Ultraschallsonde mit einer 14 mm Sonotrode (flache Spitze) behandelt. Im Anschluss an die Ultraschallbehandlung ruhten die Proben 15 min um den Schaum von der Flüssigkeit zu trennen.

Für die weitere DNA-Extraktion wurde der High-pure PCR Template Preparation Kit nach Herstellerangaben verwendet.

Aus dem klaren Überstand jeder Probe wurde ein Aliquot von 800 µl entnommen und in einem sterilen Eppendorfgefäß mit 400 µl absolutem Ethanol von -20 °C durch langsames Kippen vermischt. Die Mischung wurde in einer Tischzentrifuge in zwei Arbeitsgängen mit je 600 µl durch ein Extraktionssäulchen zentrifugiert (14.000 x g; 2 min; RT).

Anschließend wurden die Säulen durch Zentrifugation einmal mit 500 µl Inhibitor Removal Puffer und danach zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Säulen wurden nach diesem Arbeitsschritt durch nochmaliges kurzes Zentrifugieren getrocknet.

Die Elution der DNA erfolgte in zwei Schritten mit je 100 µl Elutionspuffer 72 °C in ein steriles Eppendorf Gefäß. Die Proben wurden vor dem Abzentrifugieren 1 min mit dem Elutionspuffer in der Säule inkubiert. Die DNA konnte nun direkt in die PCR eingesetzt werden.

3.4.2.2. Quantifizierung der Standard-DNA

Die Quantifizierung der DNA von *Fusarium graminearum* DSM 4527 wurde nach einer Vorschrift der Firma Molecular Probes (2001) durchgeführt.

Für die Eichkurve wurde eine Stammlösung von 1 mg/ml Kalbsthymus DNA hergestellt. Dafür wurde die DNA-Menge abgewogen und in TE-Puffer gelöst. Von der Stammlösungen wurden eine 1:1.000 und eine 1:10.000 Verdünnung in TE-Puffer hergestellt.

Die Stammlösung von PicoGreen wurde unmittelbar vor der Durchführung des Versuches 1:200 in TE-Puffer verdünnt. Für die Standardkurve wurden die beiden Verdünnungen der Stammlösung nach dem Schema in Tabelle 10 in Mikrotiterplatten gemischt.

Von den unbekanntem DNA-Konzentrationen wurden ebenfalls 100 µl DNA-Lösung mit 100 µl PicoGreen gemischt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Spektra Fluor der Firma TECAN. Die Mikrotiterplatten wurden für 5 min gerüttelt und im Anschluss die Fluoreszenz bei den Standard-Fluorescein-Wellenlängen (Extinktion 485 nm und Emission 520 nm) vermessen. Die erhaltenen Messwerte der Fluoreszenz wurden gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen. Anhand dieser Eichkurve war die Bestimmung der unbekanntem Konzentrationen möglich.

Tabelle 10: Pipettierschema für der Erstellung einer Eichkurve aus Kalbsthymus-DNA mittels Fluoreszenzmessung

DNA-Lösung (µl)	TE-Puffer (µl)	PicoGreen (µl)	Konzentration 1:1.000 (µg/ml)	Konzentration 1:10.000 (µg/ml)
100	0	100	0,5	0,05
80	20	100	0,4	0,04
60	40	100	0,3	0,03
40	60	100	0,2	0,02
20	80	100	0,1	0,01
0	100	100	0	0

3.4.2.3. Tox5-Primer

Die Gruppe der Trichothecene zeichnet sich durch das gemeinsame molekulare Grundgerüst des tetrazyklischen 12,13-Epoxy-trichothec-9-en-Ringsystems aus (siehe Kapitel 2.1.4.).

Aus der Tatsache heraus, dass es bei der Vielzahl von natürlich vorkommenden Trichothecenen für die Qualitätskontrolle primär nicht von Interesse ist, um welches Toxin es sich handelt, sondern ob Trichothecene in einem Lebensmittel vorhanden sind bzw. ob eine pilzliche Kontamination vorhanden ist, von der die Gefahr der Toxinbildung ausgeht, entwickelten Niessen und Vogel (1998) ein Primerpaar, welches Produzenten der Trichothecene gruppenspezifisch nachweist.

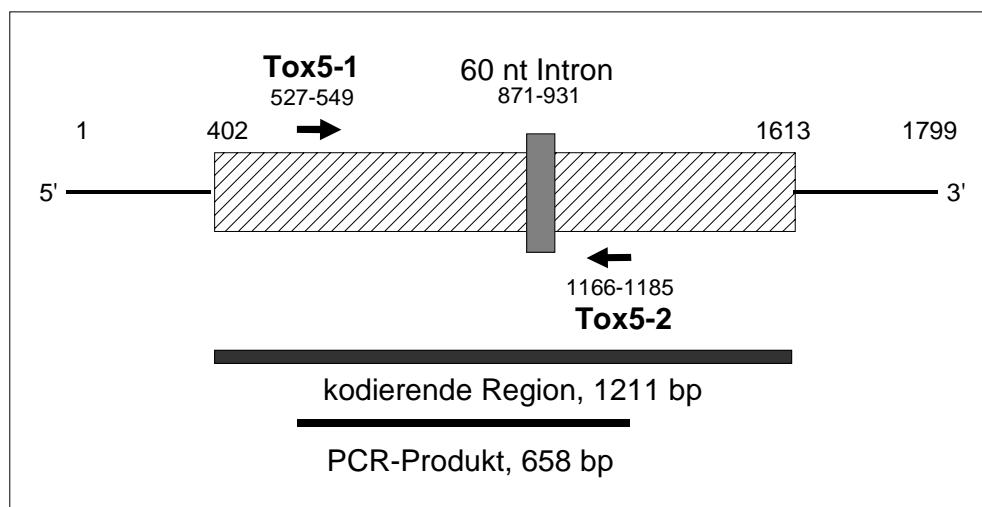


Abbildung 18: Schema des Trichodien-Zyklase-Gens (*tri5*) und Lage der verwendeten Tox5-Primer

Die Primer Tox5-1 und Tox5-2 (Tabelle 11) basieren auf dem Gen *tri5*, das für das Enzym Trichodien-Synthase kodiert (Abbildung 18).

An der Schnittstelle von Primär- und Sekundärstoffwechsel katalysiert das Enzym die Faltung und den Ringschluss von *trans, trans*-Farnesylpyrophosphat zu Trichodien, der ersten Stufe in der Biosynthese aller Trichothecene (Abbildung 4, S. 14). Die Forschungsarbeiten von Cane *et al.* (1990) deuten darauf hin, dass es sich bei der Trichodien-Synthase um eine typische Zyklase in der Biosynthese zyklischer Terpenoide handelt. Aus diesem Grunde ist zu erwarten, dass das genannte Gen *tri5* in allen *Fusarium*-Arten vorkommt, die ein Toxin aus der Gruppe der Trichothecene produzieren können.

Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz
Tox5-1	5'-GCT GCT CAT CAC TTT GCT CAG-3'
Tox5-2	5'-CTG ATC TGG TCA CGC TCA TC-3'
Tox5HS-1	5'-GAG CAG TAC AAC TTT GGA GG-3'
Tox5HS-2	5'-ACC ATC CAG TTC TCC ATC TG-3'

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Das mit der Methode erfasste Spektrum entspricht voll der in der Literatur als Produzenten von Trichothecenen genannten Gruppe von Arten (siehe Tabelle 3). Niessen und Vogel (1998) fanden zusätzlich noch einige Arten, die wegen des positiven Signals in der Tox5 PCR theoretisch in der Lage sein sollten, Trichothecene zu bilden. In der Literatur wurden diese Arten jedoch noch nicht auf diese Eigenschaft hin untersucht.

3.4.2.4. ToxHS Primer

Die Größe des PCR-Fragments bestimmt die Zeitdauer der Extension. Durch die Maßgabe eine Schnellmethode zu entwickeln und durch den Umstand, dass bei hohen Ausgangskonzentrationen an Template-DNA mit den Tox5-Primern die Plateauphase der PCR sehr schnell erreicht wurde, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus der Sequenz des *tri5*-Gens ein weiteres Primerpaar abgeleitet.

Der Sequenzvergleich der DNA Fragmente aus der gruppenspezifischen Tox5-PCR zeigte ein hohes Maß an Homologie über sehr weite Bereiche. Die Primer wurden aus zwei verschiedenen Regionen der Tox5-Fragmente abgeleitet, die in ihrer Sequenz hochgradig konservativ sind. Mit dem Primerpaar ToxHS-1 und ToxHS-2 (Tabelle 11) wird ein 120 bp großes DNA-Fragment in der PCR erhalten.

3.4.2.5. PCR-Puffer

Der PCR-Puffer für den Nachweis der DNA von Trichothecene-bildenden *Fusarium*-Arten wurde in Hinblick auf die Sensitivität optimiert.

Die Konzentrationen der Komponenten des Reaktionspuffers wurden optimiert. Es wurden verschiedene Polymerasen getestet, vor allem mit Schwerpunkt der *hot start*-Fähigkeit ohne lange Aktivierungszeiten. Außerdem wurde im Reaktionsansatz Uracil DNA Glykosylase und Pyrophosphatase getestet. Die Verwendung von Uracil DNA Glykosylase verhindert unspezifische PCR-Produkte. Solange das Enzym aktiv ist, werden alle unspezifischen Fragmente abgebaut. UDG hat keinen Effekt auf natürliche DNA, weil das Enzym nicht mit dTTP reagiert. Während der Hitzedenaturierung im Aktivierungsschritt der PCR wird das Enzym inaktiviert. Bis zu diesem Zeitpunkt können DNA-Kontaminationen aus der Laborluft und unspezifische Amplifikationen während der PCR Vorbereitung effektiv unterdrückt werden, weil die unspezifisch gebildeten Produkte Uracil anstelle des Thymins enthalten und somit durch UDG abgebaut werden (Longo *et al.*, 1990).

Mit der Verwendung von Pyrophosphatase kann man das Reaktionsgleichgewicht zugunsten des Produktes verschieben, indem eines der Reaktionsprodukte das Pyrophosphat entfernt. Das Pyrophosphat entsteht beim Einbau der Triphosphatnukleotide durch die Polymerase in den neusynthetisierten DNA-Strang (Abbildung 10).

Die endgültige Zusammensetzung der Reaktionsmischung, die für die Quantifizierung der Biomasse in Getreideproben verwendet wurde, ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Reaktionsmischung für die PCR

Menge	Komponente	Zusammensetzung	
2 µl	10x Reaktionspuffer (pH 8,2)	30 mM MgCl ₂	
		1 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	
		50 mM Tris-HCl	
		0,5 mM EDTA	
		2,5 mg/ml BSA	
		10 % SYBR Green I (1:1000 stock in deion. H ₂ O)	
1,5 µl	rTaq-Polymerase/ TaqStart antibody	1:1	
1 µl	dNTP Mix	100 mM	dATP dCTP dGTP
		200 mM	dUTP
1 µl	Uracil DNA Glykosylase		
1 µl	Primer 1	100 pmol/µl	
1 µl	Primer 2	100 pmol/µl	
2 µl	Template DNA		
11,5 µl	H ₂ O		

3.4.2.6. PCR Protokoll

Der Verlauf der verwendeten PCR-Reaktion ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Üblicherweise wurde PCR mit 40 Zyklen durchgeführt. Die Zyklenzahl kann jedoch durch die Detektion in Echtzeit je nach Bedarf noch während der laufenden Reaktion variiert werden, d. h. bei der Bestimmung sehr hoher Konzentrationen an pilzlicher DNA eine geringere Anzahl bzw. bei der Bestimmung sehr niedriger Konzentrationen eine höhere Anzahl (± 10 Zyklen).

Tabelle 13: Das PCR-Protokoll für die Durchführung der LightCycler PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung		
	95 °C	2 min
40 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	1 s
Annealing	63 °C (Tox5) 60 °C (ToxHS)	5 s
Extension	72 °C	30 s (Tox5) 20 s (ToxHS)
Fluoreszenzmessung	83 °C	2 s
Schmelzkurve		
	72 °C \Rightarrow 95 °C	5 min (0,1 °C/s)

3.4.2.7. Auswertung der Messergebnisse

Für die Auswertung der Messergebnisse wurde die LightCycler Software, Version 3.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet.

Die Auswertung setzte sich aus zwei Schritten zusammen: Einerseits der Quantifizierung der Messergebnisse und andererseits der Identifizierung des erhaltenen PCR-Fragments anhand der Analyse der Schmelzkurve. Für die Quantifizierung wurde eine Standardkurve aufgenommen, an deren Verlauf die unbekannt Konzentrationen der Proben ermittelt wurden.

3.4.2.7.1. Methodik der Quantifizierung

Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional.

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung ist anhand einer externen Standardkurve in Abbildung 19 schematisch dargestellt. Je höher die Ausgangskonzentration an Template-DNA ist, desto früher erreicht der PCR-Verlauf die Phase der exponentiellen Kinetik. Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten C_T -Wert (*threshold cycle*). Der C_T -Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird. Dieser Fluoreszenzwert liegt im linearen Bereich der Reaktion. Im Auswertungsprogramm stehen zwei verschiedene Optionen für die Quantifizierung zur Verfügung: die *fit points* Methode und die Methode des *second derivative maximum*.

Die *fit points* Methode arbeitet mit einer *crossing line*, die manuell so verschoben werden kann, dass die linearen Bereiche der Amplifikation erfasst werden. Aus den Schnittpunkten der Kurvenverläufe der PCR mit der *crossing line* wird die Zyklenzahl bis zum Erreichen des Schnittpunktes ermittelt und in einem neuen Diagramm über den Logarithmus der Konzentration dargestellt. Die Methode des *second derivative maximum* ermittelt die Schnittpunkte automatisch über einen Algorithmus zur Identifizierung der linearen Phase des PCR-Verlaufs. Dafür wird der Punkt ermittelt, an welchem die Konzentrationsänderungen an PCR-Produkten am stärksten zunimmt (zu Beginn der exponentiellen Phase). Dieses automatische Verfahren sichert eine hohe Reproduzierbarkeit von einem PCR-Lauf zum nächsten. Für die Quantifizierung muss eine Standardreihe mit bekannten DNA-Mengen bei der PCR mitgeführt werden.

Die Erstellung einer Standardkurve der erhaltenen C_T -Werte ermöglicht die Analyse der unbekannt Probe durch die Kenntnis der Konzentrationen der Standardlösungen.

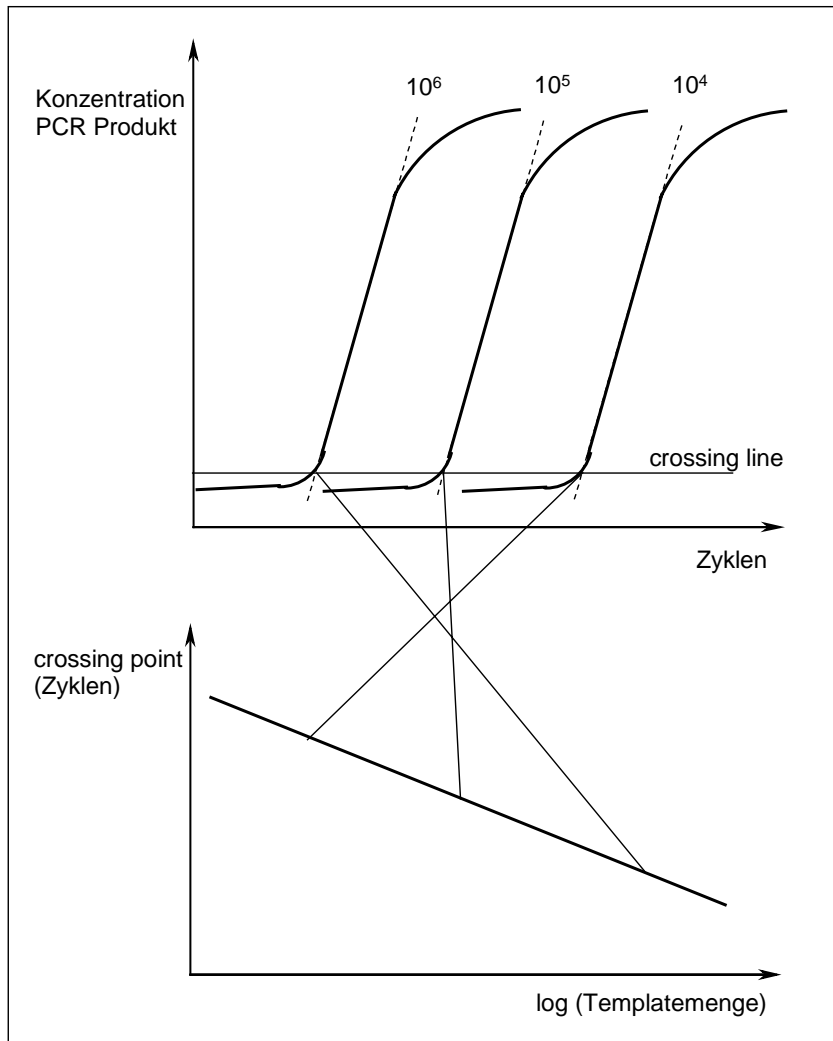


Abbildung 19: Prinzip der Konzentrationsbestimmung mit der LightCycler Software

3.4.2.7.2. Methodik der Identifizierung

Die Identifizierung des PCR-Produktes erfolgte durch die Ermittlung der spezifischen Schmelztemperatur anhand einer Schmelzkurvenanalyse. Das Prinzip ist in Abbildung 20 dargestellt. Während die Temperatur in der Reaktionskammer langsam erhöht wird, wird die Fluoreszenz der Proben kontinuierlich aufgezeichnet. Wenn die spezifische Schmelztemperatur des PCR-Produktes erreicht wird, löst sich die *dsDNA* in die beiden Einzelstränge auf. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I löst sich dabei ab und das Fluoreszenzsignal verlischt.

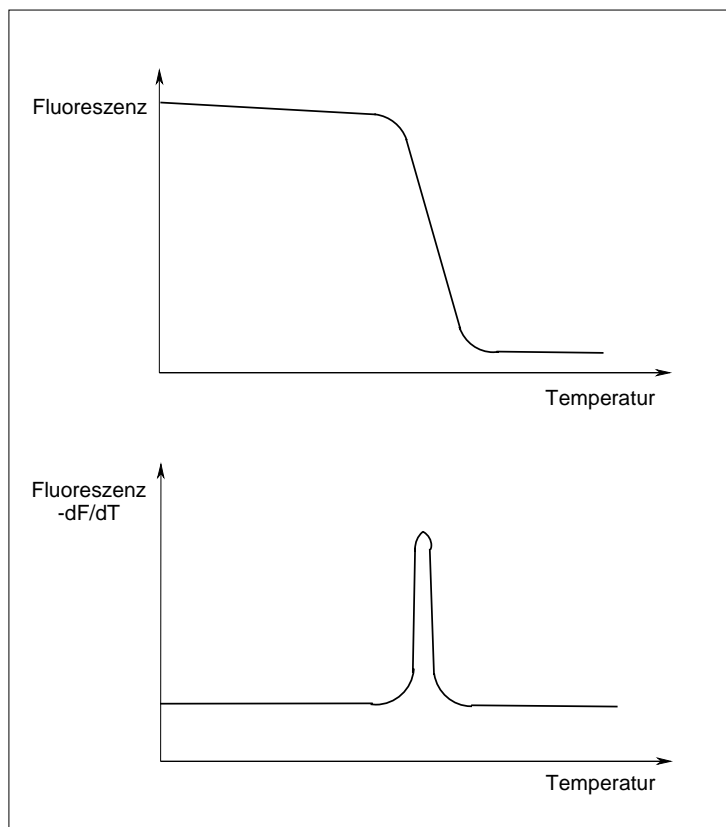


Abbildung 20: Identifizierung eines PCR-Produktes über seine spezifische Schmelztemperatur

Der obere Teil der Abbildung zeigt den typischen Verlauf der Fluoreszenzintensität einer Schmelzkurve. Das Auswertungsprogramm bildet die erste negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur. So erhält man einen scharfen Peak, der über eine Gaußsche Regressionsanalyse eine spezifische Temperatur ergibt. Über diese spezifische Temperatur kann das PCR-Produkt eines bestimmten Primerpaares immer wieder identifiziert werden.

3.4.3. Methoden BIAcore

3.4.3.1. Antikörper

3.4.3.1.1. Antikörper gegen Deoxynivalenol

Für die Deoxynivalenol Analyse wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der von Niessen *et al.* (1993) entwickelt wurde. Der Antikörper wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit Deoxynivalenol-Hemiglutaryl, gekoppelt an HSA, gewonnen. Der Antikörper zeigte Kreuzreaktionen mit DON, 15-AcDON und 3-AcDON mit einem Niveau von 100 %, 260 % bzw. 216 %. Kreuzreaktionen mit zwanzig anderen strukturverwandten Trichothecenen waren <1 % (Niessen, 1993).

3.4.3.1.2. Anti-rabbit-Antikörper

Zur Durchführung eines *Sandwich*-Assays wurde gegen Kaninchen IgG gerichtetes Antiserum von der Ziege (DAKO Diagnostics GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet.

3.4.3.2. Herstellung eines Deoxynivalenol-Biotin Konjugats

Die Präparation des 3-*O*-hemiglutaryl-DON wurde in Abwandlung einer von Casale *et al.* (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden die Hydroxylgruppen in den Positionen C-7- und C-15 mit einem zyklischen Borsäureester geschützt und anschließend die C-3 Position mit Glutaranhydrid verestert (Abbildung 21). In der ersten Stufe der Synthese wurden 20 mg (0,067 mmol) DON in 200 µl trockenem Pyridin gelöst (5 ml Spitzkolben mit Schliff).

Nach Lösung des Toxins wurden 68 mg (0,67 mmol) 1-butyl-Borsäure zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es entsteht das 7,15-*O*-(butylboronyl)-DON.

Unter Rühren wurden 800 µl einer 1,7 M Lösung von Glutaranhydrid in Pyridin zugegeben. Die Reaktion wurde für 90 Minuten unter Rühren im Wasserbad bei 100°C weitergeführt. Dabei entsteht das 3-*O*-hemiglutaryl-7,15-*O*-(butylboronyl)-DON.

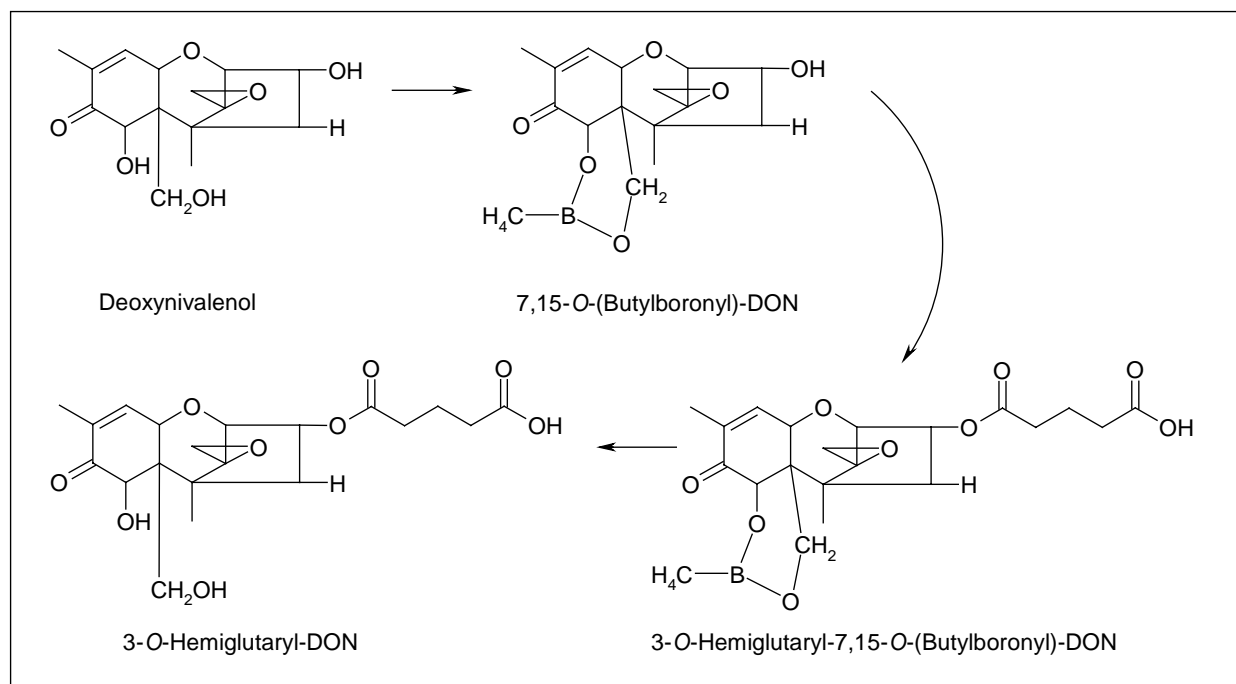


Abbildung 21: Synthese von DON zu 3-HG-DON

Während der letzten 10 min der Reaktion wurde das Pyridin durch einen N_2 -Strom aus der Reaktionsmischung verdrängt. Um das Pyridin vollständig aus der Reaktionsmischung zu entfernen (Geruchsprobe), wurde die Begasung für weitere 10 min fortgesetzt. Der Rückstand wurde lyophilisiert, in 500 μ l Methanol gelöst und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von destilliertem Wasser wurde ein Verhältnis Methanol:Wasser von 55:45 eingestellt. Dabei entsteht das 3-O-hemiglutaryl-DON. Das Endprodukt der Synthese wurde mittels HPLC gereinigt.

3.4.3.3. Reinigung von Syntheseprodukten mittels HPLC

Für die Reinigung der Syntheseprodukte wurde eine HPLC-Anlage mit folgenden Komponenten verwendet:

Probengeber:	GINA 50; Gynkotec
Entgasung:	Degasser; Gynkotec
Pumpe:	High Precision Pump Model 480; Gynkotec
Trennsäule:	LiChroCART [®] 250-10, HPLC-Cartidge, VWR International
Detektion:	UV-Detektor UVD 160S/320S; Gynkotec
Auswertung:	Chromleon Client Version 3.14

Als Laufmittel diente Methanol:Wasser in verschiedenen Volumenverhältnissen. Das Laufmittel wurde sterilfiltriert und für 15 min im Ultraschallbad entgast. Es wurde eine Flussrate von 1,0 ml/min eingestellt. Der entstehende Gegendruck hatte eine Größe von 60-70 bar. Die Detektion der verschiedenen Fraktionen erfolgte im UV-Bereich bei 210 nm.

Die Trennung des HG-DON erfolgte mit 35 %igem Methanol (pH 7,2 mit 30 mM Phosphatpuffer). Es wurden 100 µl Fraktionen aufgetragen. Die Retentionszeiten betragen für nicht umgesetztes DON 10 min und für HG-DON 12 min.

Die Fraktionen wurden gesammelt und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Danach wurden die Proben direkt weiterverwendet.

Eine Zuordnung der Retentionszeiten war über eine externe Kontrolle mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie möglich. Hierfür wurden die Proben und ein DON-Standard automatisch oder manuell auf die DC-Platten aufgetragen. Es wurden DC-Kammern verwendet, die zur besseren Sättigung des Kammervolumens mit dem Laufmittel eine Auskleidung der Wände mit Filterpapier erhielten. Die Entwicklung der Platten wurde jeweils gestoppt, wenn die Laufmittelfront 2 cm unterhalb des oberen Plattenrandes angelangt war. Die Platten wurden nach dem Lauf mit Heißluft getrocknet und dann entsprechend weiterbehandelt. Als Laufmittel diente die Mischung aus der HPLC. Als Färbereagenz wurde AlCl_3 , 60 % in Ethanol als Sprühreagenz verwendet. Nach dem Besprühen der Platten wurden diese für 5 min bei 130 °C getrocknet und anschließend unter UV-Licht (366 nm) inspiziert. Die B-Trichothecene fluoreszieren hellblau und so konnte DON über den Standard zugeordnet werden, die zweite Bande entsprach dem Produkt HG-DON.

3.4.3.4. Kopplung des Deoxynivalenolderivats an Biotin

Für die Kopplung von 3-HG-DON an Biotin (Abbildung 22) wurde Biotinhydrazid in Gegenwart des wasserlöslichen Carbodiimids EDC verwendet (Pierce Tech Tips, 2002). 10 mg von 3-HG-DON wurden in 500 µl eines 0,1 M MES-Puffers (pH 5,5) gelöst und mit 50 µl einer 50 mM Biotinhydrazid-Stammlösung gemischt. EDC wurde kurz vor der Reaktion in 0,1 M MES-Puffer (pH 5,5) in einer Konzentration von 100 mg/ml gelöst. Von dieser Lösung wurden 15 µl zur Reaktionsmischung zugegeben und das Ganze über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reinigung des biotinylierten Produktes erfolgte mittels HPLC.

Als Laufmittel wurde 25 % Methanol in deion. H₂O (pH 7,2 mit 30 mM Phosphatpuffer) verwendet. Es wurden 100 µl Fraktionen aufgetragen. Die Retentionszeiten betragen für nicht umgesetztes HG-DON 8 min und für HG-DON-Biotin 12 min. Mit den Fraktionen wurde wie oben beschrieben weiterverfahren.

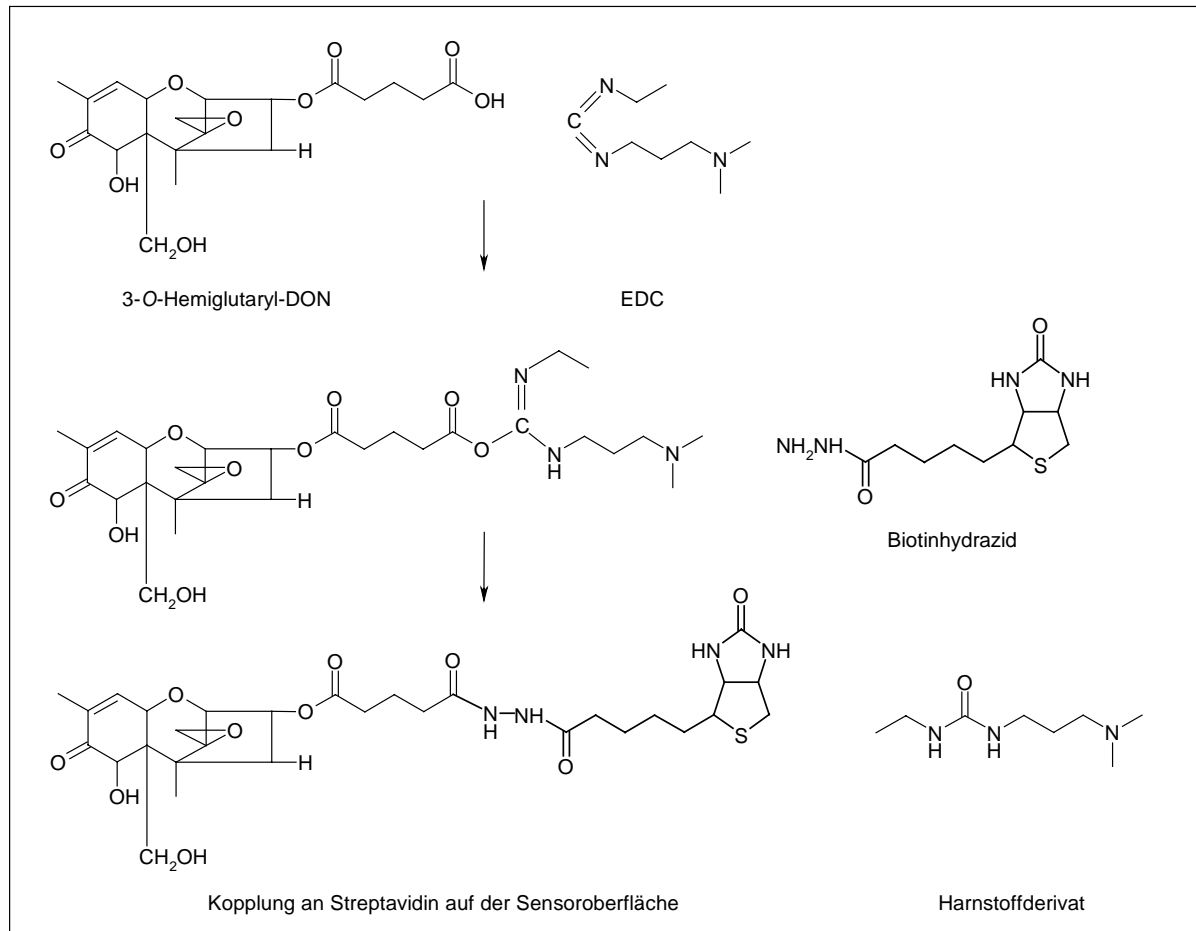


Abbildung 22: Kopplung von 3-HG-DON mit Biotinhydrazid zu einem Antigen-Konjugat

3.4.3.5. Extraktion von DON aus Getreide

Zur Extraktion wurden 2 g gemahlene Getreideprobe mit 6 ml Methanol:Wasser (1:9; 6 % Polyvinylpyrrolidone) versetzt und für 30 min auf einem Überkopfschüttler extrahiert. Zur Klärung des Überstandes wurde dieser für 2 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden direkt in die Analyse eingesetzt.

3.4.3.6. Allgemeiner Messablauf im BIAcore

Es wurden SA-Sensorchips, die auf der Goldoberfläche eine mit Streptavidin vorbeschichtete carboxymethylierte Dextranmatrix (*Hydrogel*) besitzen, verwendet. Das über Thiolgruppen an das Gold gekoppelte Hydrogel besteht aus linearen, hydrophilen Dextranmolekülen, die eine Schichtdicke von ca. 100 nm ausmachen.

Die Software *BIAcore-Control* ermöglichte eine gezielte Steuerung der Temperatur der Fließzelle und der Fließrate. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 25 °C und mit HEPES-Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min durchgeführt.

Nach dem Einbau des Sensorchips wurde das Fließsystem für 3 min bei hoher Fließrate mit entgastem Puffer gespült (Working tool: *Prime*). Danach wurden 10 µl Deoxynivalenol-Biotin-Konjugates für 10 min mit einer entsprechenden Fließgeschwindigkeit von 1µl/min über die Sensoroberfläche gegeben, wobei ein mit Streptavidin vorbeschichteter Sensorchip benutzt wurde, um das Antigen zu immobilisieren.

Der anschließende Messzyklus erfolgte nach folgendem Schema:

- Spülen der Oberfläche für 2 min zum Erhalt einer Grundlinie.
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems zur Entfernung unspezifisch gebundenen biotinylierten Antigens für 10 min.
- Injektion der Proben- bzw. Standardlösung zur Bindung (Injektionsvolumen von 5 µl).
- Spülen der Oberfläche mit Elutionspuffer für 30 s um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.
- Injektion von 10 µl Anti-rabbit-Antikörper (0,1 mg /ml).
- Regenerierung der Sensoroberfläche durch Spülung mit 4 µl 6 M Guanidinhydrochlorid in 10 mM Glycin pH 2,6).
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit Elutionspuffer für 1 min um den Sensorchip für eine erneute Probenaufnahme bereitzustellen.

3.4.3.7. Messauswertung

Die Bestimmung von unbekannt Konzentrationen erfolgte über eine Standardkurve. Die Messanordnung wurde mit zwölf Standardwerten einer Verdünnungsreihe zwischen 50 ng/μl und 0,02 ng/μl geeicht. Die Bestimmung des Deoxynivalenols erfolgte über eine indirekt kompetitive Messung (siehe Kapitel 2.3.3.2.2.).

Das Gerät benötigt für eine Injektion von 5 μl ein Auftragsvolumen von 25 μl, außerdem wurde bei der Probeninjektion mit der sog. *double-bubble* Technik gearbeitet, um eine Rückvermischung mit dem Elutionspuffer und daraus folgende Konzentrationsschwankungen maßgeblich zu verhindern. Dafür wurden 30 μl der primären Antikörperlösung (0,25 mg/ml) mit 10 μl der Standard/Probe-Lösung gemischt und für eine Minute inkubiert. Von dieser Mischung wurden anschließend 5 μl im BIAcore vermessen. Zur Signalverstärkung wurde der Anti-rabbit-Antikörper anschließend injiziert. Die Messung wurde für jede Konzentration als Dreifachbestimmung durchgeführt.

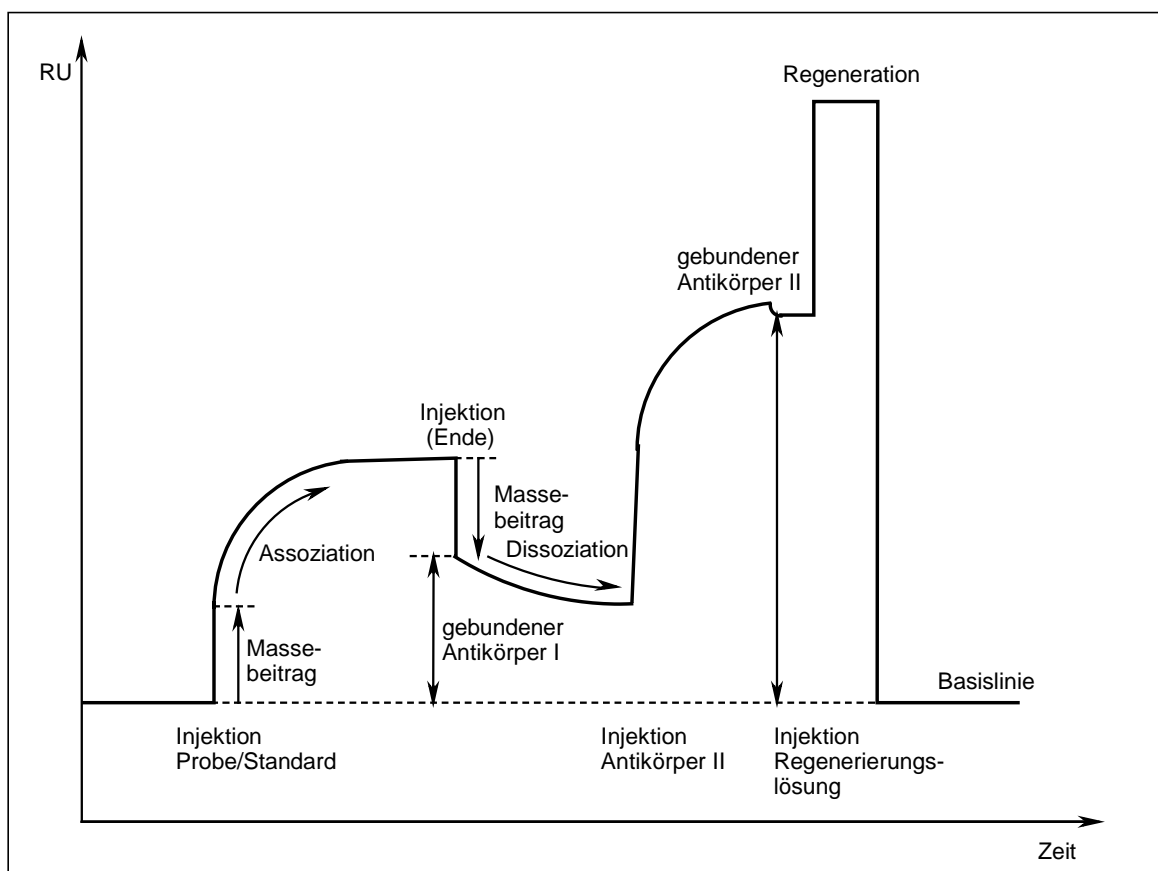


Abbildung 23: Schematischer Verlauf einer gesamten Messung, einschließlich der Regeneration, wie er als online Reaktionsverfolgung vom Biacore-System aufgezeichnet wird

Anhand eines beispielhaften Messablaufs soll die Konzentrationsmessung verdeutlicht werden. Abbildung 23 zeigt schematisch die Bindung des primären Antikörpers an das immobilisierte Antigen auf der Sensoroberfläche mit anschließender *Sandwich*-Reaktion eines sekundären Antikörpers.

Ausgewertet wurde das Response-Signal zwischen Basislinie und Niveaulinie nach der Anlagerung des sekundären Antikörpers, wobei über die gesamte Zeit derselbe Laufpuffer verwendet wurde. Der Brechungsindex der Pufferlösung nahm einen großen Einfluss auf das Sensorsignal, so dass für eine Charakterisierung der Massezunahme eine vergleichbare Pufferzusammensetzung essentiell war. Von der Signifikanz von Signalen (Messempfindlichkeit) wurde ausgegangen, wenn das erhaltene Signal dreimal größer als das Grundrauschen war, das bedeutete eine Signalthöhe von $RU > 10$.

3.4.3. Statistische Validierung

Die Auswertungen der Daten erfolgten unter Verwendung von SigmaPlot[®]4.0 für Windows (SPSS Inc. Chicago, IL 60611 USA).

Einige für die Versuchsauswertung wichtige statistische Formeln werden im folgenden angegeben (Precht, 1987;1983; Weiss, 1999).

Der Mittelwert eines Messwertes ergibt sich aus dem Quotienten der Summe der Messwerte und ihrer Anzahl:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Die Standardabweichung ist die positive Quadratwurzel aus der Varianz s^2 :

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Damit lässt sich der Standardfehler des Mittelwertes bestimmen:

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Der Variationskoeffizient gibt an, wie groß die Standardabweichung in Prozent vom Mittelwert ist:

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Nach dem Gaußschen Prinzip der kleinsten Quadrate lässt sich die empirische Regressionsgerade bestimmen:

$$y = a + bx$$

Der Parameter a ist dabei der Schnittpunkt mit der y -Achse:

$$a = \frac{\sum y_i - b \cdot \sum x_i}{n} = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Der Parameter b ist der Regressionskoeffizient:

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{1}{n} \sum x_i \sum y_i}{\sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2}$$

Der Regressionskoeffizient gibt die Steigung der Geraden an, der Korrelationskoeffizient r dagegen gibt an, wie gut die Stichprobenpunkte im Streudiagramm auf einer Geraden liegen:

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{1}{n} \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2 \right) \left(\sum y_i^2 - \frac{1}{n} (\sum y_i)^2 \right)}}$$

Die statistische Signifikanz von r wurde über einen t -Test mit der Nullhypothese $H_0: \rho = 0$ (ρ Korrelationsparameter zwischen zufälligen Variablen) abgesichert.

Wenn die Grundgesamtheit zweidimensional normal verteilt ist mit $\rho = 0$, so ist die Testgröße:

$$t_0 = r \cdot \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

studentverteilt mit $n-2$ Freiheitsgraden. Es wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,1\%$ geprüft. Die 99,9 %-Fraktile der t -Verteilung wurden aus Precht (1993) entnommen. Ist t_0 größer als die 99,9 %-Fraktile, konnte auf dem gewählten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,001$ eine positive Korrelation gesichert werden.

Die Summe der totalen Abweichungsquadrate lässt sich in eine durch die Regression erklärte Variation und eine Restvariation teilen:

$$SQ_y = SQ_{Regression} + SQ_{Rest}$$

Das Bestimmtheitsmaß B ist definiert als der Quotient aus erklärter Variation und Gesamtvariation und ist gleich dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten:

$$B = \frac{SQ_{Regression}}{SQ_y} = r^2$$

Das Bestimmtheitsmaß ist also auch eine Größe, die den linearen Zusammenhang wieder spiegelt. Es gibt an, zu wieviel Prozent man die Variation SQ_y der Zielgröße durch die lineare Regressionsfunktion erklären kann.

Mit dem Schätzwert für die Streuung der Fehlervariablen:

$$s_R^2 = \frac{SQ_{Rest}}{n-2}$$

ergibt sich der geschätzte Standardfehler:

$$s_b = \frac{1}{\sqrt{SQ_x}} \cdot s_R$$

Für den Regressionskoeffizienten kann man somit folgende $(1-\alpha)$ -Vertrauensintervalle konstruieren:

$$\left\{ b - t_{n-2;1-\alpha/2} \cdot s_b \leq \beta \leq b + t_{n-2;1-\alpha/2} \cdot s_b \right\}_{1-\alpha}$$

Das Konfidenzintervall (Vertrauenswahrscheinlichkeit $P = 95\%$) wurde basierend auf den Datensätzen aller vermessenen Proben bestimmt. Unter einem Vertrauens- oder Konfidenzintervall versteht man einen Zahlenbereich, in dem der unbekannte Parameter mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit liegt. Mit einem geschätzten Standardfehler:

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

und bei normalverteilter Grundgesamtheit lässt sich das Vertrauensintervall für die Standardabweichung wie folgt schätzen:

$$\hat{y}_p \pm t_{n-2;1-\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{n(x_p - \bar{x})^2}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \right)}$$

Unter dem Prognose- oder Vorhersageintervall für den Mittelwert versteht man einen Zahlenbereich, in dem der Mittelwert einer zukünftigen Messreihe mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit liegt. Im Gegensatz zum Vertrauensintervall muss hier nicht nur die Streuung der bereits beobachteten, sondern auch die Streuung der zukünftigen Messreihe berücksichtigt werden.

Das Vorhersageintervall für den erwarteten Wert \hat{y}_p in Abhängigkeit von dem gegebenen Wert x_p wurde wie folgt geschätzt:

$$\hat{y}_p \pm t_{n-2;1-\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n} + \frac{n(x_p - \bar{x})^2}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \right)}.$$

Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. LightCycler

4.1.1. Anpassung der PCR-Reaktion an den LightCycler

Ausgangsexperimente, die mit dem Primerpaar Tox5-1/Tox5-2 unter den von Niessen und Vogel (1998) beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurden, ergaben keine Amplifikation der Template-DNA mit dem LightCycler. Folglich war eine Optimierung des PCR Programms und der Pufferzusammensetzung für die Reaktion notwendig.

Dafür wurde der pH-Wert von 7,9 bis 8,6 in 0,1er Schritten variiert, sowie unterschiedliche Salze in verschiedenen Konzentrationen und weitere Zusätze getestet. Letztendlich führten die Versuche zu dem Reaktionspuffer, der unter Abschnitt 3.4.2.5. beschrieben ist. Mit dem optimierten PCR Protokoll und dem optimierten Reaktionspuffer konnte schließlich die Amplifikation eines Fragments mit ca. 650 bp erreicht werden, welches mit der theoretischen Länge von 658 bp für das Tox5-Fragment korrespondierte.

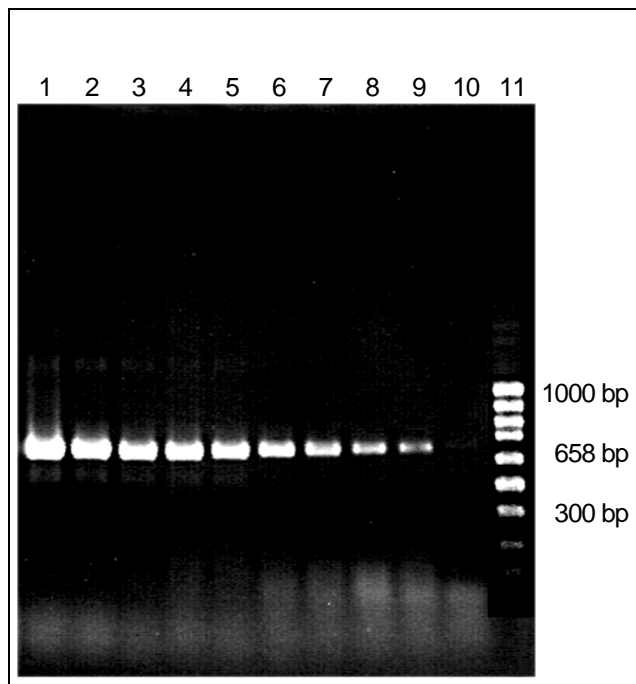


Abbildung 24: Agarosegelelektrophorese von *Fusarium graminearum* DSM 4527 DNA im Anschluss an die Tox5-PCR im LightCycler unter optimierten Bedingungen

Bahn 1: Positivkontrolle; **Bahn 2:** 6 ng; **Bahn 3:** 3 ng; **Bahn 4:** 1.5 ng; **Bahn 5:** 0.75 ng; **Bahn 6:** 0.4 ng; **Bahn 7:** 0.2 ng; **Bahn 8:** 0.1 ng; **Bahn 9:** 0.05 ng; **Bahn 10:** Negativkontrolle (destilliertes H₂O); **Bahn 11:** Größenstandard.

Die theoretische Länge wurde von der Gensequenz des *tri5*-Gens von *Gibberella zeae* (= *F. graminearum*) abgeleitet (Proctor *et al.*, 1996). Abbildung 24 zeigt ein Agarosegel, auf welches der Inhalt der LightCycler-Kapillaren im Anschluss an eine Tox5-PCR im LightCycler aufgetragen wurde. Als Template diente eine Verdünnungsreihe von DNA aus *F. graminearum* DSM 4527.

Die Fluoreszenzintensität der DNA-Bande verringerte sich mit Abnahme der Template-Konzentration in der PCR-Reaktion. Ein schwaches Signal war noch bei 50 pg DNA sichtbar. Bei höheren Template-Konzentrationen wurden schwache Banden bei 1200 bp und bei 500 bp detektiert, die beide nicht sichtbar waren, wenn sich die Konzentration der DNA unter 0,75 ng pro Reaktion verringerte.

Tabelle 14: Liste der Organismen, die in der Tox5-PCR (*tri5*-Gen) getestet wurden

Spezies	Stamm	Quelle	Tox5 PCR	ToxHS PCR
<i>F. acuminatum ssp. armeniacum</i>	CBS 485.94	unbekannt, Australien	+	+
<i>F. camptoceras</i>	CBS 193.65	<i>Theobroma cacao</i> , Costa Rica	-	+
<i>F. cerealis</i>	CBS 589.93	<i>Iris hollandica</i> , Niederlande	+	+
<i>F. crookwellense</i>	CBS 623.85	Kartoffel, Niederlande	+	+
<i>F. culmorum</i>	CBS 62191	<i>Triticum aestivum</i> , Deutschland	+	+
<i>F. equiseti</i>	CBS 406.86	Boden, Deutschland	+	+
<i>F. flocciferum</i>	CBS 831.85	<i>Triticum aestivum</i> , Deutschland	-	+
<i>F. graminearum</i>	DSM 4527	<i>Zea mays</i> , Deutschland	+	+
<i>F. heterosporum</i>	DSM 62231	<i>Claviceps purpurea</i> on <i>Secale cereale</i> , Deutschland	(+)	+
<i>F. lunulosporum</i>	CBS 636.76	<i>Citrus paradisi</i> , Südafrika	+	+
<i>F. poae</i>	DSM 62376	<i>Avena sativa</i> , Deutschland	+	+
<i>F. reticulatum</i>	DSM 62395	<i>Pterocarya fraxinifolia</i> , Iran	+	+
<i>F. robustum</i>	CBS 637.76	<i>Araucaria angustifolia</i> , Argentinien	+	+
<i>F. sambucinum var. sambucinum</i>	CBS 185.29	<i>Ulmus sp.</i> , Deutschland	(+)	-
<i>F. scirpi</i>	CBS 448.84	Boden, Australien	-	+
<i>F. sporotrichioides</i>	CBS 412.86	<i>Juncus sp.</i> , Dänemark	+	+
<i>F. sulphureum</i>	DSM 62433	<i>Beta vulgaris</i> , Deutschland	+	+
<i>F. trichothecioides</i>	CBS 136.73	<i>Solanum tuberosum</i> , Südafrika	+	+
<i>F. tumidum</i>	CBS 486.76	<i>Lupinus spec.</i> , Neuseeland	+	+
<i>F. venenatum</i>	CBS 458.93	Winterweizen, Österreich	+	+
<i>F. kyushuense</i>	BBA 70812	<i>Triticum aestivum</i> , Japan		+
<i>F. musarum</i>	ITEM 1293	Früchte, Costa Rica		+
<i>F. langsethiae</i>	IBT 9956	Gerstenkörner, Norwegen		+

Die Gruppenspezifität des verwendeten Primerpaares blieb für die meisten Spezies bei Amplifikation im LightCycler so erhalten, wie sie von Niessen und Vogel (1998) beschrieben

wurde (Tabelle 14). Kein Signal wurde in der LightCycler PCR mit gereinigter DNA von *F. camptoceras*, *F. flocciferum* und *F. scirpi* erhalten. Die Amplifikation von DNA von *F. heterosporum* und von *F. sambucinum* ergab nur ein schwaches Fluoreszenzsignal der spezifischen Bande im Agarosegel. Mit dem Primerpaar Tox5HS wurde kein Signal mit *F. sambucinum* erhalten. Zusätzlich wurden mit *F. kyushuensis*, *F. musarum* und einem Isolat einer in Beschreibung befindlichen neuen *Fusarium*-Art weitere Arten getestet, welche in der Arbeit von Niessen und Vogel (1998) fehlten. *F. acuminatum ssp. armeniacum*, *F. camptoceras*, *F. crookwellense*, *F. flocciferum*, *F. heterosporum*, *F. musarum*, *F. scirpi* sowie die neu zu beschreibende Art zeigten neben der spezifischen Bande eine zweite Bande, eines Fragments, das ca. um 30 bp länger ist (Abbildung 25).

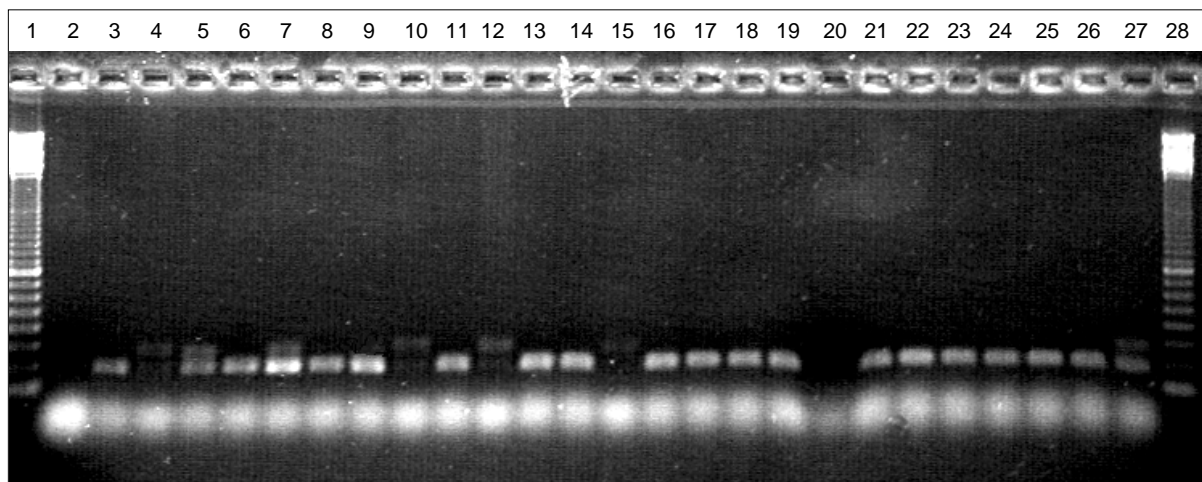


Abbildung 25: Agarosegelelektrophorese in Anschluss an die ToxHS-PCR im LightCycler

Bahn: 1, 28 Größenstandard 2 Negativkontrolle 3 Positivkontrolle *F. graminearum*
 4 *F. acuminatum ssp. armeniacum* 5 *F. camptoceras* 6 *F. cerealis* 7 *F. crookwellense* 8 *F. culmorum*
 9 *F. equiseti* 10 *F. flocciferum* 11 *F. graminearum* 12 *F. heterosporum* 13 *F. kyushuense*
 14 *F. lunulosporum* 15 *F. musarum* 16/17 *F. poae* 18 *F. reticulatum* 19 *F. robustum*
 20 *F. sambucinum var. sambucinum* 21 *F. scirpi* 22 *F. sporotrichioides* 23 *F. sulphureum* 24 *F. trichothecioides* 25 *F. tumidum* 26 *F. venenatum* 27 *F. poae "powdery"*

4.1.2. Quantifizierung eines DNA-Standards für den Einsatz im LightCycler

Die Quantifizierung des verwendeten DNA-Standards erfolgte mit Kalbsthymus DNA und dem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen (Kapitel 3.4.2.2.). Der Gehalt der Stammlösung von DNA aus *F. graminearum* DSM 4527 wurde an einer Eichgeraden von Kalbsthymus DNA bestimmt (Abbildung 26).

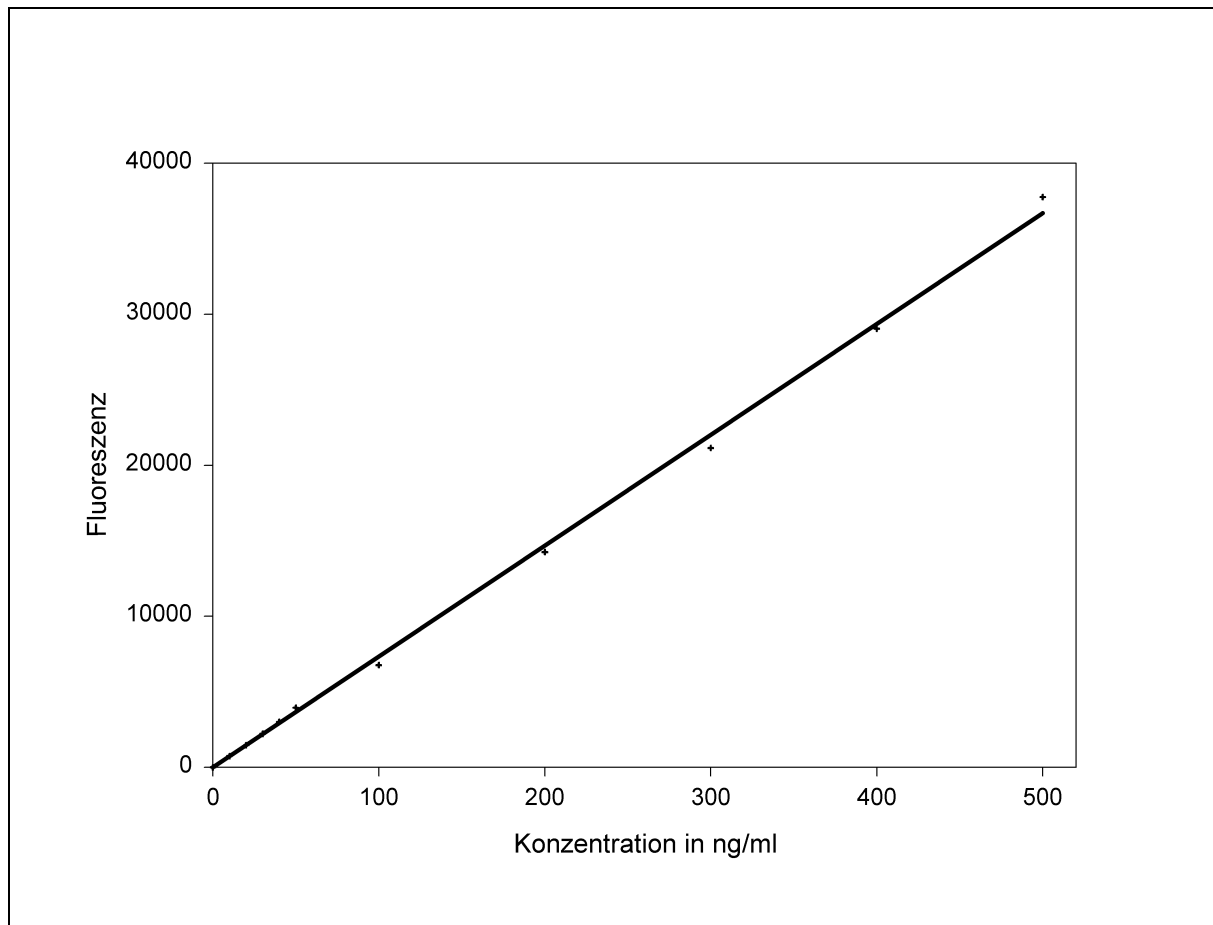


Abbildung 26: Eichgeraden einer Verdünnungsreihe von Kalbsthymus DNA, ermittelt über die Fluoreszenzmessung von PicoGreen im TECAN

Die lineare Regression ergab einen Regressionskoeffizienten $b = 0,9992$ und eine lineare Gleichung:

$$y = 73,4 \cdot x$$

mit der die Bestimmung der unbekannt Konzentrationen möglich war. Es wurde ein Wert von $2,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ermittelt. Die Konzentration der DNA-Stammlösung wurde für die Quantifizierung im LightCycler auf $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ eingestellt.

Die online Messung der Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus ist für eine Verdünnungsreihe von DNA aus *F. graminearum* DSM 4527 in Abbildung 27 oben dargestellt. Die Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der PCR-Zyklen ergab den typischen sigmoidalen Verlauf einer PCR-Kinetik. Je höher die Konzentration der Template-DNA in der Probe war, um so weniger PCR-Zyklen waren notwendig, damit die Kinetik den exponentiellen Reaktionsverlauf erreichte.

In Abbildung 27 unten sind die Zyklenzahlen, die zum Erreichen der exponentiellen Phase benötigt werden (Schnittpunkt mit der *crossing line*), gegen den Logarithmus der jeweiligen Template-Konzentration dargestellt. Die Kalibrierung resultiert aus einer linearen Regression, für die ein Korrelationskoeffizient $r = 1,0$ berechnet wurde.

Die externen Standards, die routinemäßig für die DNA-Quantifizierung in Probenmaterial verwendet wurden, waren 20 ng/Reaktion, 2 ng/Reaktion und 0,2 ng/Reaktion.

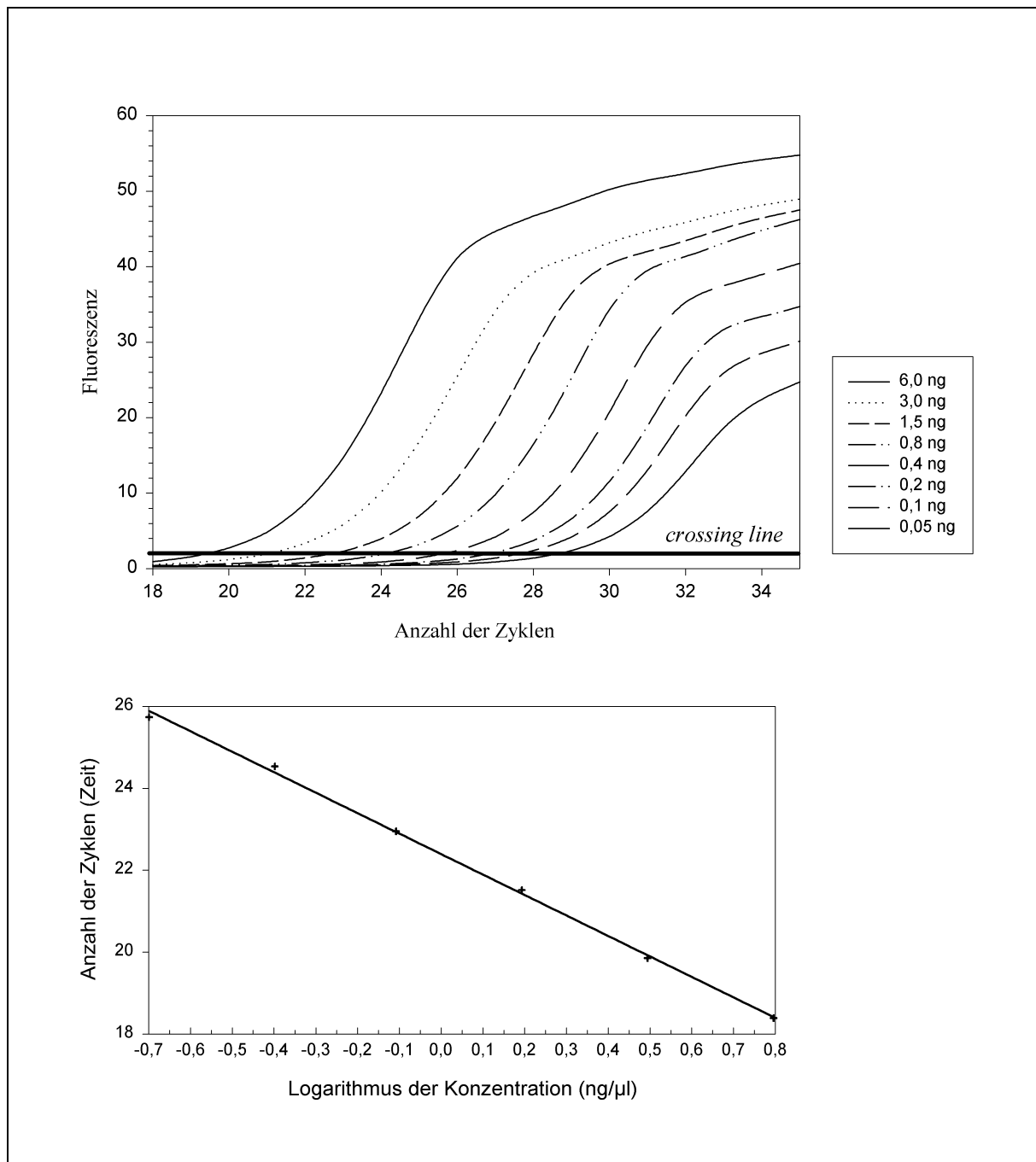


Abbildung 27: Quantifizierung einer Verdünnungsreihe von *Fusarium graminearum* DSM 4527 DNA
oben: Kinetischer Verlauf der PCR Reaktion
unten: Resultierende Standardkurve

4.1.3. Reproduzierbarkeit der LightCycler PCR

Die Amplifikation von DNA aus *Fusarium graminearum* DSM 4527 wurde mit 20, 2 und 0,2 ng Template-DNA/Reaktion in je 6 parallelen Experimenten durchgeführt (Abbildung 28).

In der exponentiellen Phase der PCR Kinetik, die für die Quantifizierung verwendet wurde, wurde der Variationskoeffizient bestimmt; 1,83 %, 1,76 % und 1,48 % bei 0,2; 2 bzw. 20 ng/Reaktion. Die Schnittpunkte für den Verlauf der Fluoreszenz mit der *crossing line* wurden wie folgt ermittelt: für 20 ng bei 15,7 Zyklen ($\pm 0,2$); für 2 ng bei 20,5 Zyklen ($\pm 0,4$); und für 0,2 ng bei 24,9 Zyklen ($\pm 0,5$). Dies entspricht einem Standardfehler von 0,096, von 0,148 bzw. von 0,187. Die Reproduzierbarkeit der Amplifikation war auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,001$ statistisch signifikant.

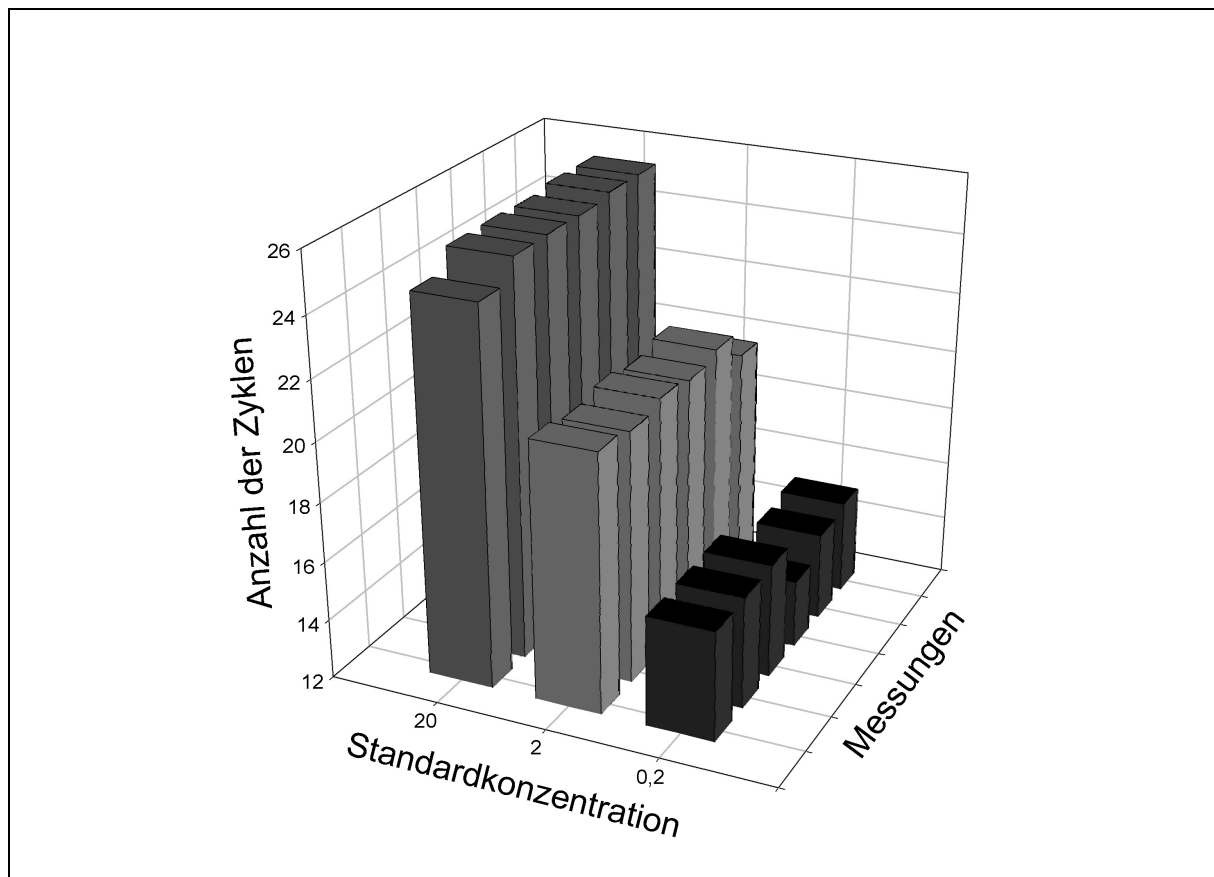


Abbildung 28: Reproduzierbarkeit der LightCycler-Methode

4.1.4. Identifizierung der PCR-Produkte

Die Identifizierung des spezifischen PCR-Produktes erfolgte anhand einer Schmelzkurve, die im Anschluss an die Amplifikationsreaktion aufgezeichnet wurde. Die Gaußsche Regression der Schmelzkurven, die aus den verschiedenen externen Standards resultierte, ist in Abbildung 29 gezeigt. Die spezifische Schmelztemperatur T_m des PCR-Fragments wurde zu $85,0 (\pm 0,1)^\circ\text{C}$ bestimmt. Ein zweites Maximum lag im Temperaturbereich zwischen 75°C und 78°C . Dieses Maximum resultierte aus dem Aufschmelzen von Produkten, die unspezifisch amplifiziert wurden. Dabei handelte es sich vor allem um Primerdimere, die typischerweise dann entstehen, wenn die Template-Konzentration in der PCR-Reaktion sehr gering ist.

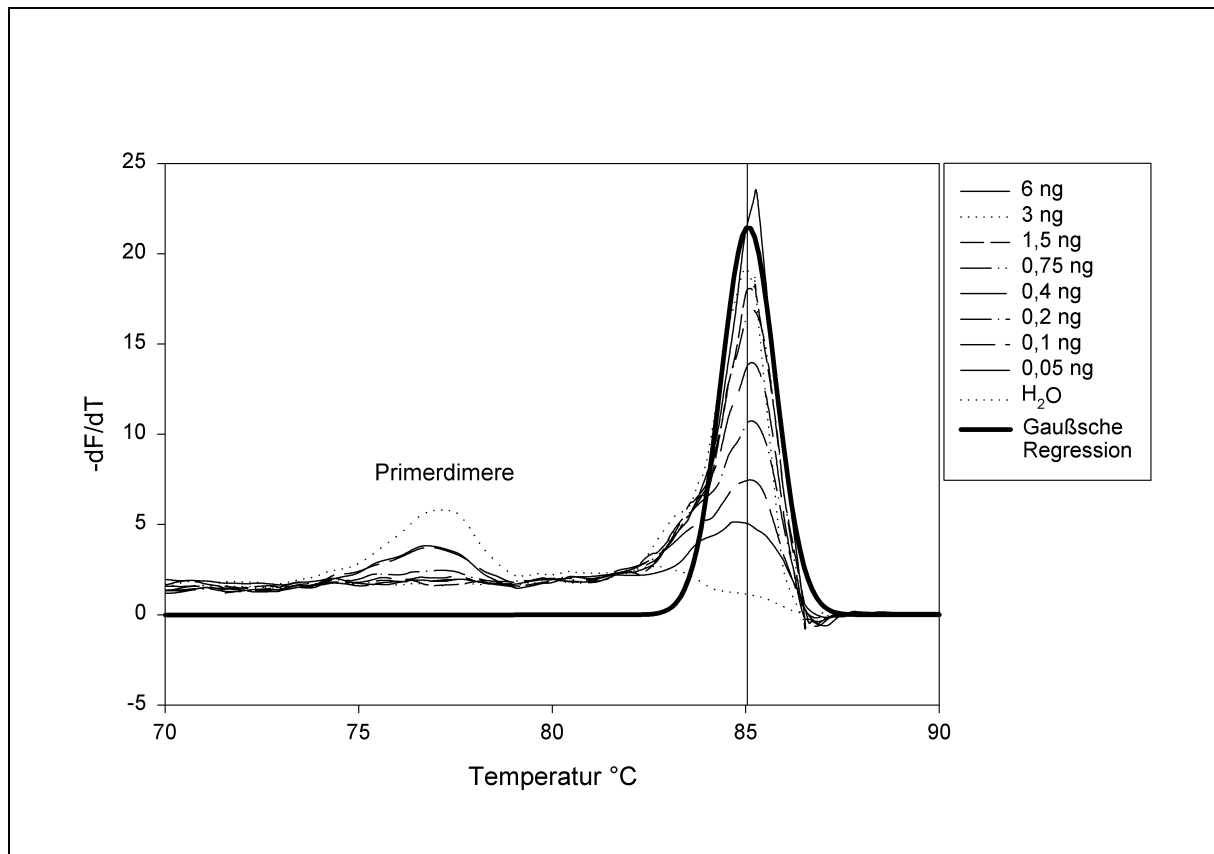


Abbildung 29: Schmelzkurve im Anschluss an die PCR Reaktion. Die Schmelztemperatur des spezifischen PCR-Produktes wurde mit Hilfe einer Gaußschen Regression bestimmt.

4.1.5. Analyse von Feldproben

Die entwickelte Methode wurde in ersten Versuchen zur Analyse von 30 Weizenproben eingesetzt, die mit Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. natürlich kontaminiert waren. Eine mikrobiologische Untersuchung der oberflächendesinfizierten Körner, die auf PDA-Medium durchgeführt wurde, ergab einen Infektionsgrad der Proben zwischen 0 % und 78 %. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau A. Suty, Bayer AG, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 15: Mikrobiologische Daten und die Konzentration an *Fusarium* DNA in kontaminierten Weizenproben

<i>F. graminearum</i>	infizierte Körner (in %)			Σ	<i>Fusarium</i> Belastung µg DNA/kg
	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>			
0				0	0
2				2	103
8				8	206
10				10	217
10				10	229
10				10	194
2	10			12	251
14				14	423
14				14	263
14	4			18	240
10		8		18	274
16		2		18	206
8	10			18	366
20				20	354
16	2	2		20	423
10		12		22	297
24				24	434
22		4		26	480
28				28	629
32		2		34	697
38				38	377
42				42	1040
40		4		44	377
52				52	709
52				52	971
66				66	823
62		6		68	800
74				74	891
74	2			76	1051
68		10		78	709

Alle Proben zeigten ein Signal in der LightCycler Analyse. Der LightCycler erlaubte die Quantifizierung der Kontamination mit Trichothecene bildenden Fusarien in diesen Proben. Die bestimmten DNA-Konzentrationen lagen zwischen 103 und 1051 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 gegenübergestellt.

In einem weiteren Versuch konnte eine Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt in natürlich kontaminierten Proben ($n = 65$) und dem darin enthaltenen Deoxynivalenol gefunden werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient wurde zu $r = 0,8267$ bestimmt.

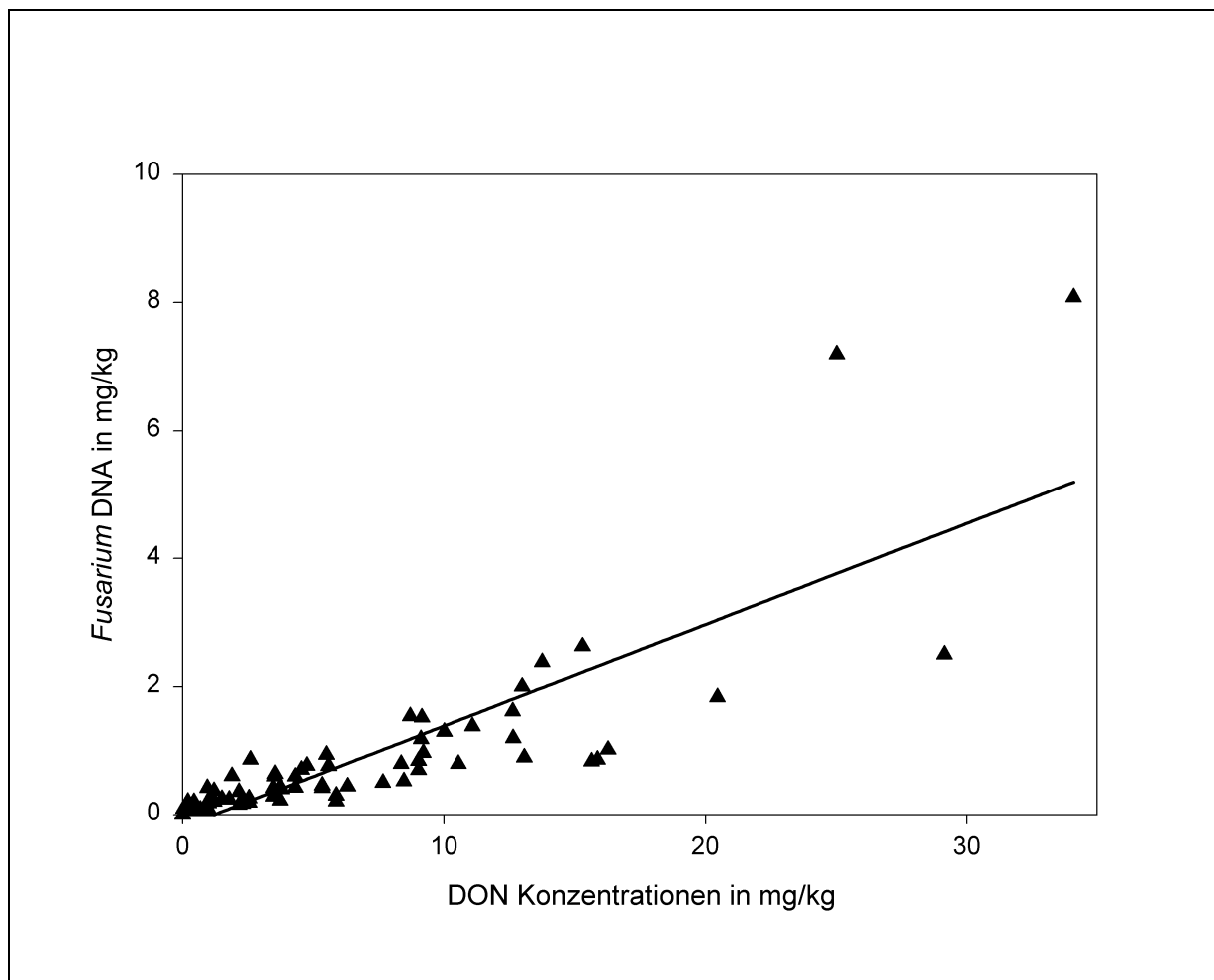


Abbildung 30: Zusammenhang der DNA-Konzentration und dem Deoxynivalenolgehalt in 65 natürlich infizierten Weizenproben

In weiteren Versuchen wurde eine größere Anzahl Proben ($n = 300$) untersucht, um das erhaltene Ergebnis zu bestätigen und um eine größere Datenmenge für eine statistische Auswertung zu erhalten.

In Abbildung 31 ist der Zusammenhang zwischen der Konzentration an *Fusarium*-DNA, die aus der LightCycler PCR ermittelt wurde, gegen die jeweilige DON Konzentration in allen analysierten Proben dargestellt.

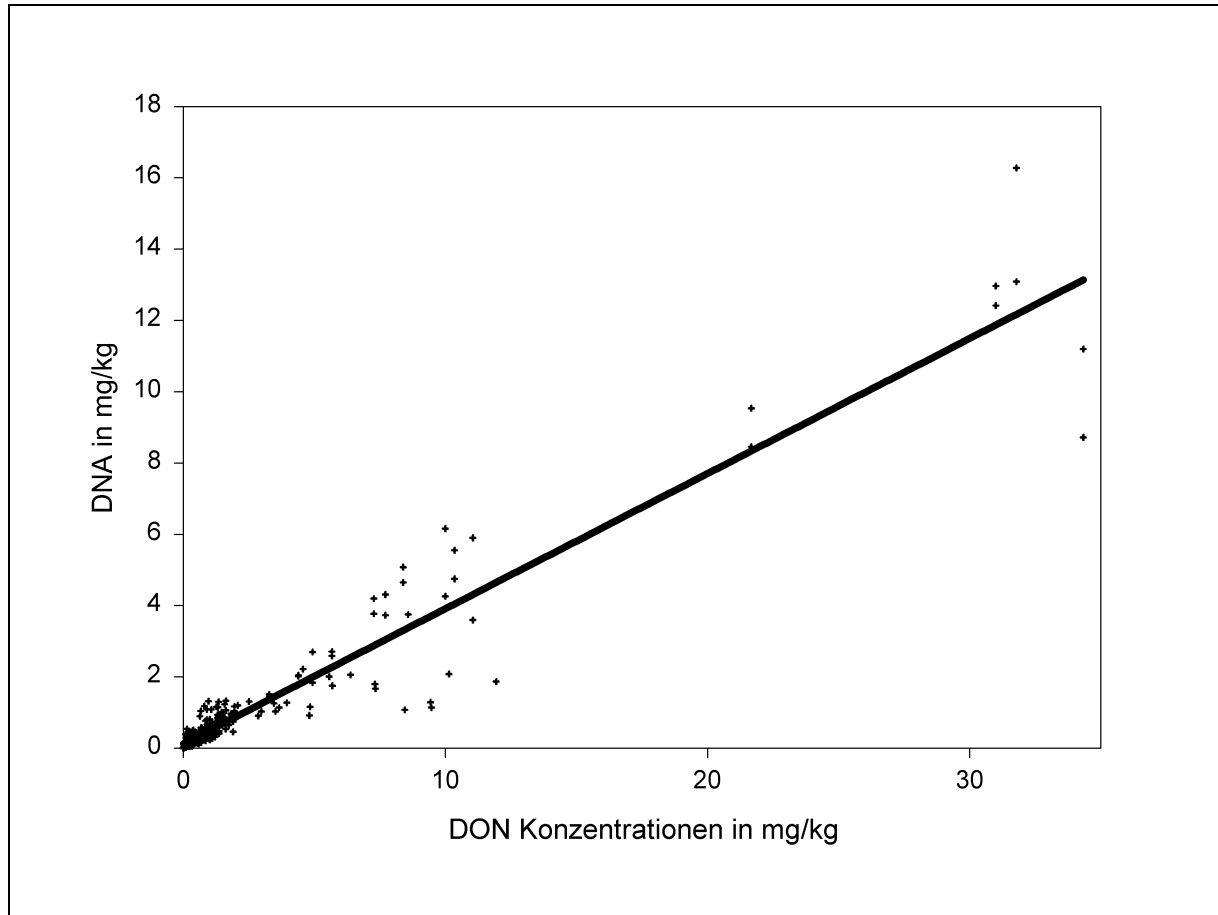


Abbildung 31: Korrelation zwischen der ermittelten DNA von Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. mit der Konzentration an Deoxynivalenol in der entsprechenden Getreideprobe

Über den gesamten Konzentrationsbereich bestand auch hier eine lineare Korrelation zwischen nachgewiesener DNA-Menge von Trichothecen-Bildnern und der Belastung der Proben mit dem Toxin Deoxynivalenol. Der Korrelationskoeffizient zwischen DNA-Gehalt und DON-Konzentration wurde über die Gesamtheit aller analysierten Proben zu $r = 0,9557$ errechnet.

Eine entsprechende Berechnung, die nur auf Proben basierte, die Konzentrationen an DON in dem für die Praxis relevanten Bereich (Tabelle 1, S. 8) zwischen nicht nachweisbar und 1,5 mg/kg (ppm) ($n = 234$) enthielten, ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,7476$. Abbildung 32 zeigt die Korrelation für alle Proben mit Konzentrationen $\leq 1,5$ ppm Deoxynivalenol.

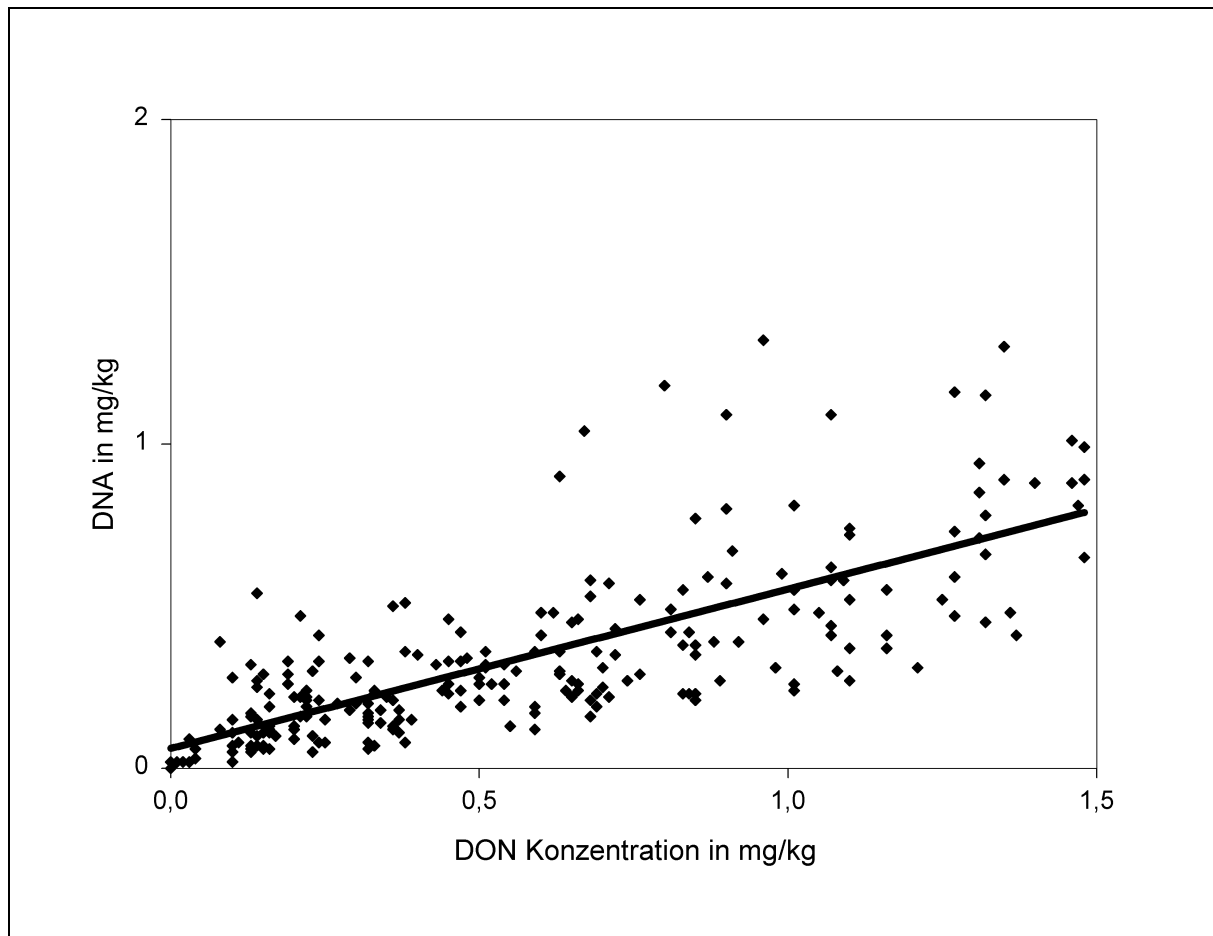


Abbildung 32: Korrelation zwischen der ermittelten DNA-Menge von Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. mit der Konzentration an Deoxynivalenol in der entsprechenden Getreideprobe im Bereich bis 1,5 ppm.

Der t -Test der Student-Verteilung für $n = 232$ Freiheitsgrade wurde zur Absicherung des Korrelationskoeffizienten verwendet. Mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,1\%$ wurde überprüft, ob dieser Zusammenhang erheblich größer als Null ist. Mit $t_{232;0,999} \approx 3,1$ und $t_0 = 17,1$ resultiert $t_0 > t_{232;0,999}$. Auf der ausgewählten Stufe der Stichhaltigkeit von $\alpha = 0,001\%$ wurde eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von *Fusarium*-DNA und der jeweiligen Konzentration an Deoxynivalenol in einer Probe bestätigt. Für die Probenmenge bis 1,5 ppm DON wurde ein Vorhersageintervall mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 95\%$ abgeschätzt (Abbildung 33). Nur 12 Proben hatten Werte, die außerhalb des errechneten Vorhersageintervalls lagen.

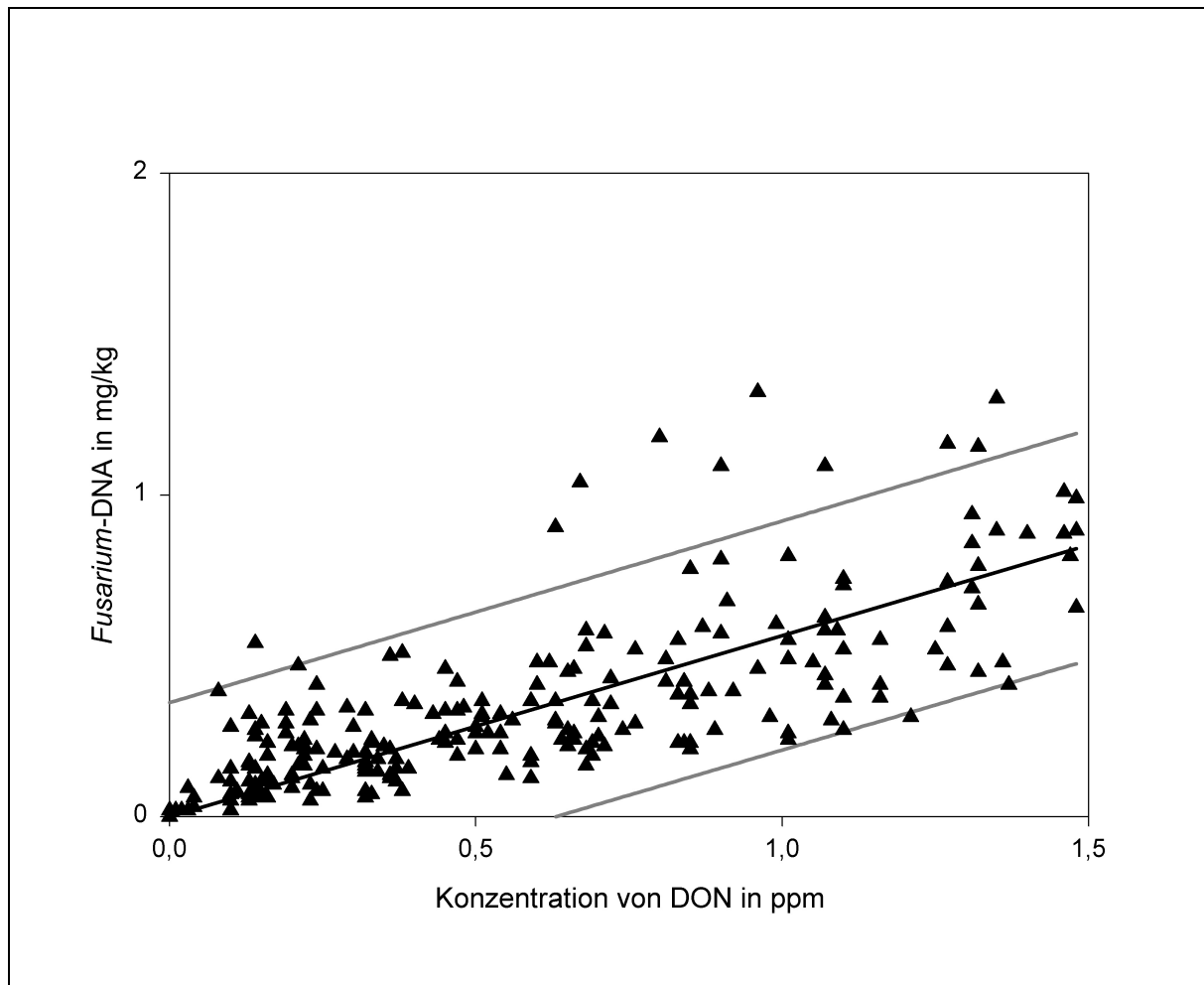


Abbildung 33: Intervallabschätzung für die Proben mit einer Belastung an Deoxynivalenol bis 1,5 ppm. Das Signifikanzniveau betrug $P = 95\%$.

Damit ergibt sich für diesen Stichprobenumfang die Möglichkeit der Abschätzung der Konzentration an DON in der Probe aus dem gemessenen DNA-Gehalt. Bei einer DNA-Konzentration von 0,5 mg/kg errechnet sich beispielsweise eine DON Kontamination von $0,74 \pm 0,57$ mg/kg, d. h. eine Probe mit dieser Konzentration von *Fusarium*-DNA enthält mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit eine Konzentration an DON zwischen 0,17 und 1,31 mg/kg.

4.2. BIAcore X

4.2.1. Eichkurve einer Verdünnungsreihe des Anti-DON-Antikörpers

Für den Nachweis von Deoxynivalenol wurde ein indirekt kompetitiver Assay entwickelt. Dafür wurde ein biotinyliertes DON-Derivat auf einer Streptavidin beschichteten Sensoroberfläche immobilisiert. Die Messungen wurden mit dem BIAcore System durchgeführt. Dazu war es notwendig eine geeignete Antikörperkonzentration zu bestimmen, die für die Messungen verwendet werden konnte.

Eine Verdünnungsreihe des gereinigten Antikörpers im Konzentrationsbereich zwischen 88 μg und 4 ng/Probe ergab eine sigmoidale Kurve (Abbildung 34), wenn das SPR-Signal gegen die Konzentration des Antikörpers aufgetragen wurde. Der lineare Bereich reichte von 6,0 bis 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, äquivalent zu 30,0 bzw. 4,0 μg in einem Injektionsvolumen von 5 μl . Zu den folgenden Messungen wurden deshalb 16 μg Antikörper pro Messansatz eingesetzt, um schon bei geringen Konzentrationen an Deoxynivalenol eine möglichst starke Signaländerung zu erhalten.

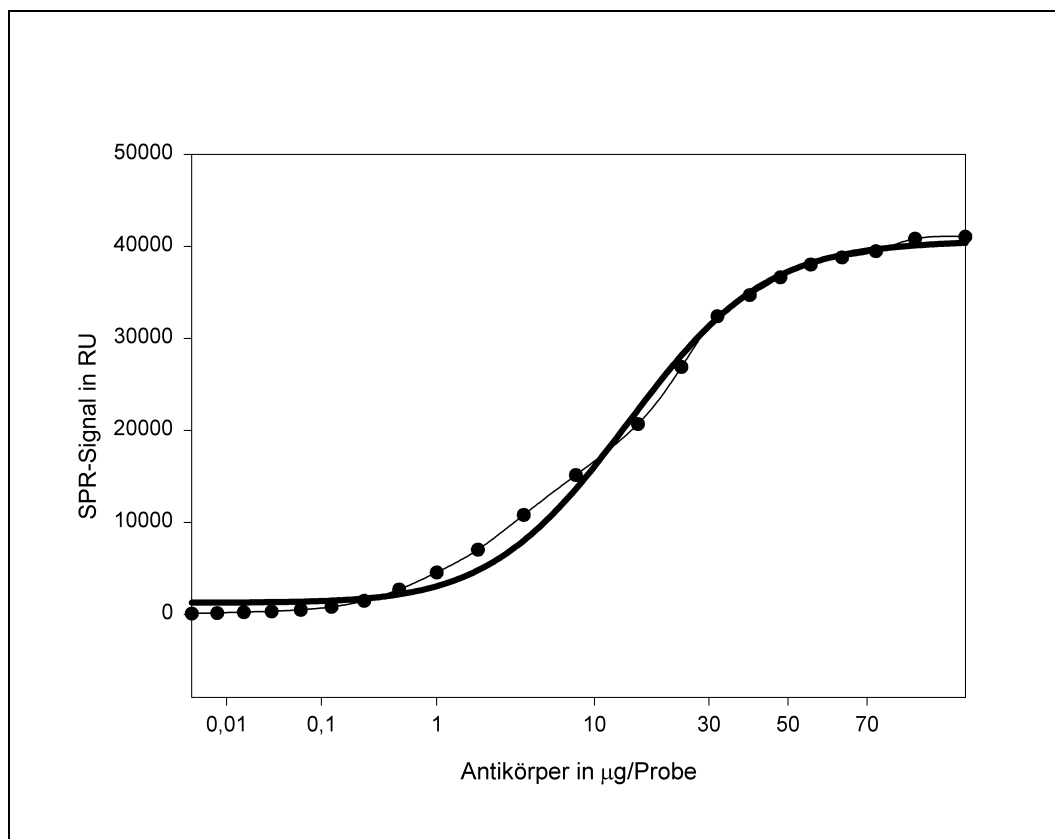


Abbildung 34: Eichkurve einer Antikörperverdünnungsreihe

4.2.2. Eichkurve der Antikörperbindung einer Verdünnungsreihe von DON

Eine Verdünnungsreihe von Deoxynivalenol-Standard in Konzentrationen zwischen 50,0 bis 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde für die Kalibrierung des Systems verwendet. Jede Probe wurde mit der gleichen Konzentration des Antikörpers (16 μg) bei Raumtemperatur inkubiert, um das Antigen zu binden. Von dieser Mischung wurden 5 μl in die BIAcore-Einheit injiziert. Jede Standardkonzentration wurde in dreifacher Ausführung analysiert. Die Bindung des Antikörpers an die Sensoroberfläche war umgekehrt proportional zur Menge des freien Toxins in der Probenlösung. Abbildung 35 zeigt das Verhältnis zwischen der Signalstärke und der Konzentration des freien Deoxynivalenols.

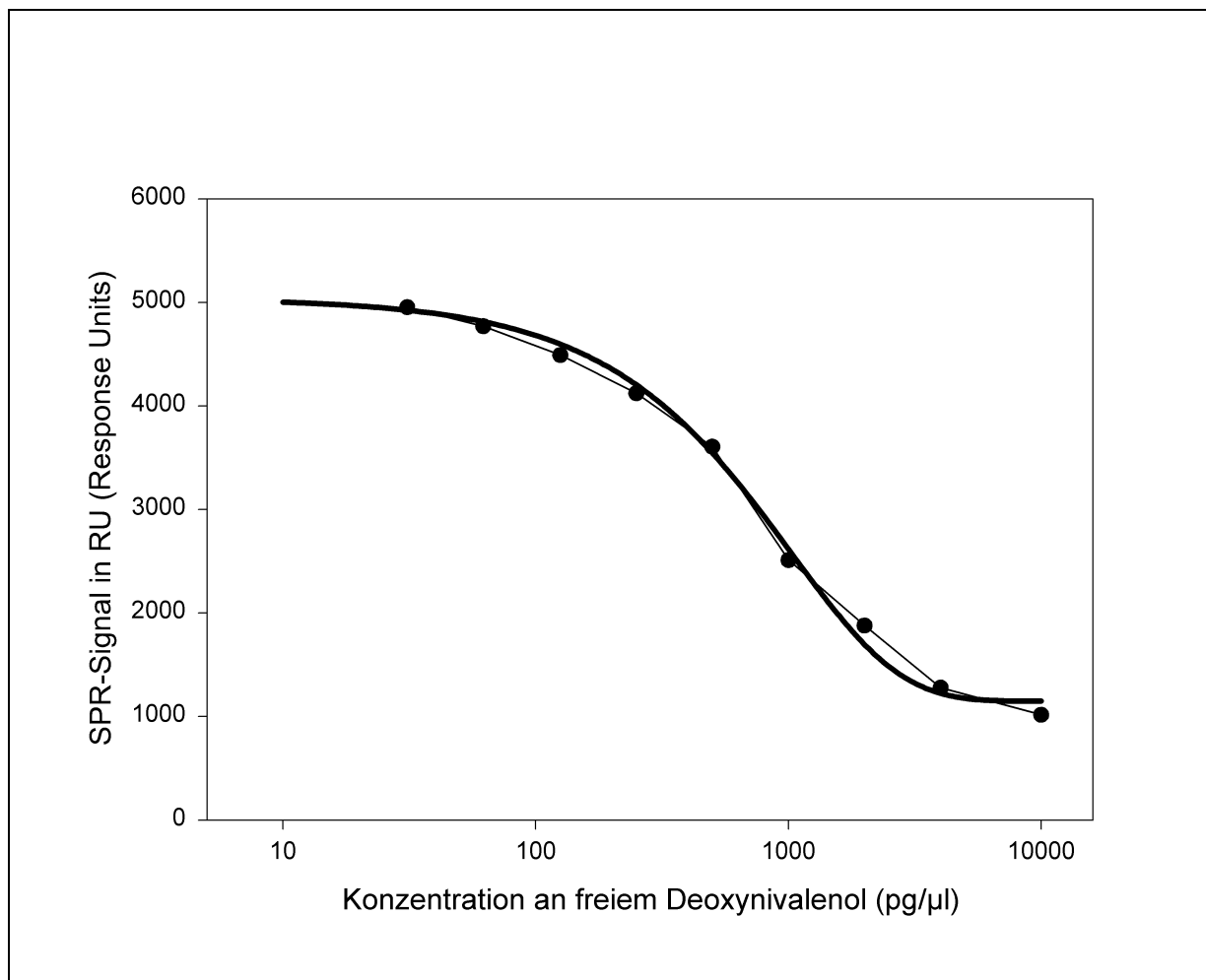


Abbildung 35: Eichkurve einer Verdünnungsreihe von Deoxynivalenol

Der Assay hat einen Arbeitsbereich zwischen 0,13 und 10,0 ng Deoxynivalenol, äquivalent zu 390 ppb und 30 ppm DON in natürlich kontaminiertem Probenmaterial.

Das Bestimmtheitsmaß B (r^2) wurde für diesen Bereich zu 0,992 bestimmt. Die kleinste nachgewiesene Konzentration lag bei 2,5 pg/ μ l, das entspricht einer Probenkontamination von ~7,5 ppb DON.

4.2.3. Untersuchung des Einflusses der Extraktionsdauer und der Inkubationszeit auf das SPR-Signal

Das Responssignal wurde hinsichtlich der Inkubationszeit des Antikörpers mit der Probenlösung nach 0,5; 5 und 15 Minuten sowie nach 5 Tagen bestimmt (Abbildung 36). Es wurde kein bedeutender Unterschied zwischen den jeweiligen Messungen gefunden. Die Inkubationszeit des Antikörpers in der Probe ist also ohne Einfluss auf die Intensität und die Qualität des Messsignals.

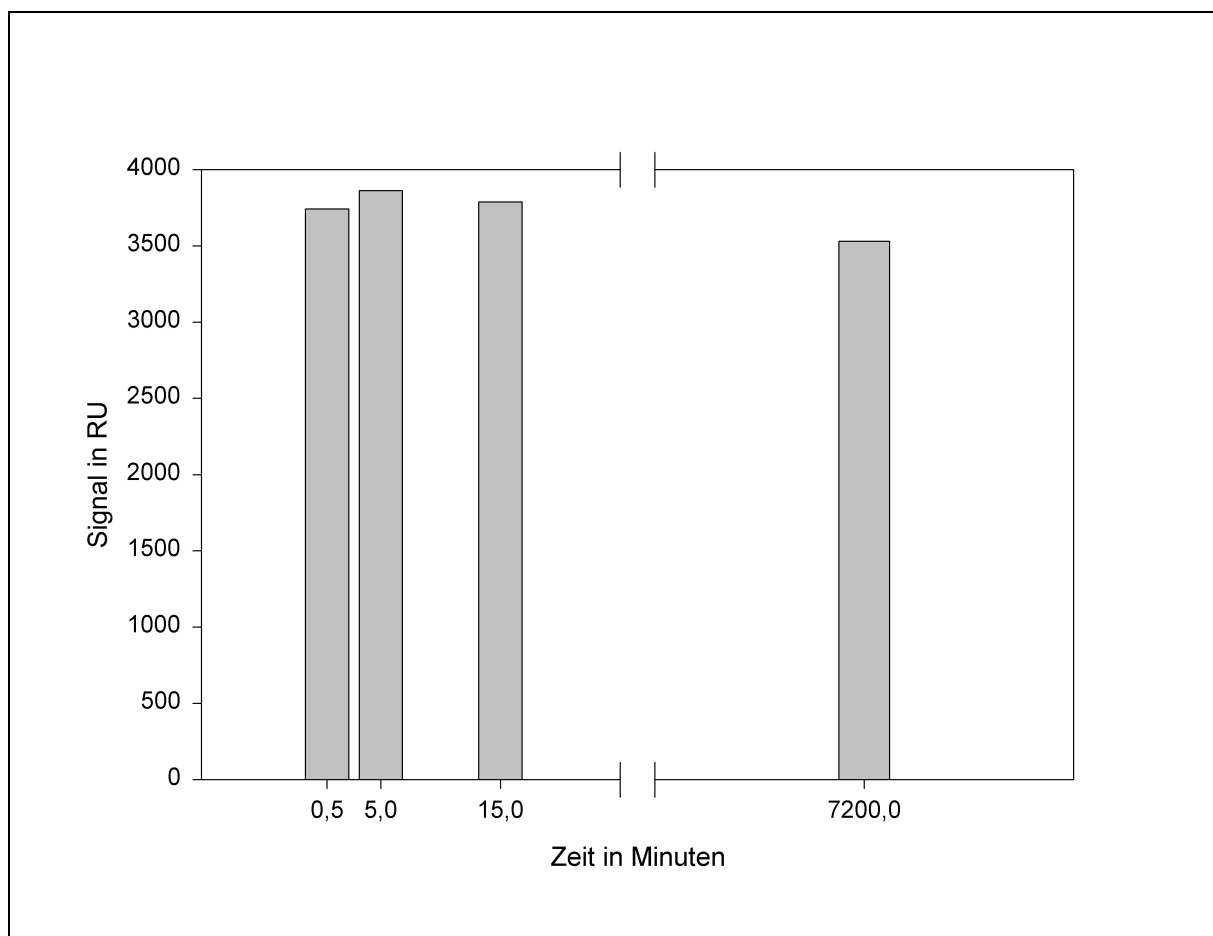


Abbildung 36: Inkubationszeiten des Antikörpers mit der Probe

Für die Validierung der Extraktionsmethode für Deoxynivalenol aus Getreide wurden 10 unabhängige Isolierungen von derselben Getreideprobe durchgeführt. Der Variationskoeffizient für das ermittelte Responssignal lag bei 2,34 %.

Es konnte gezeigt werden, dass mit der angewandten Methode bei einer Extraktionsdauer von 5 min dieselbe Menge an Deoxynivalenol aus dem Getreide isoliert wurde wie bei einer Extraktionsdauer von 30 min (Abbildung 37).

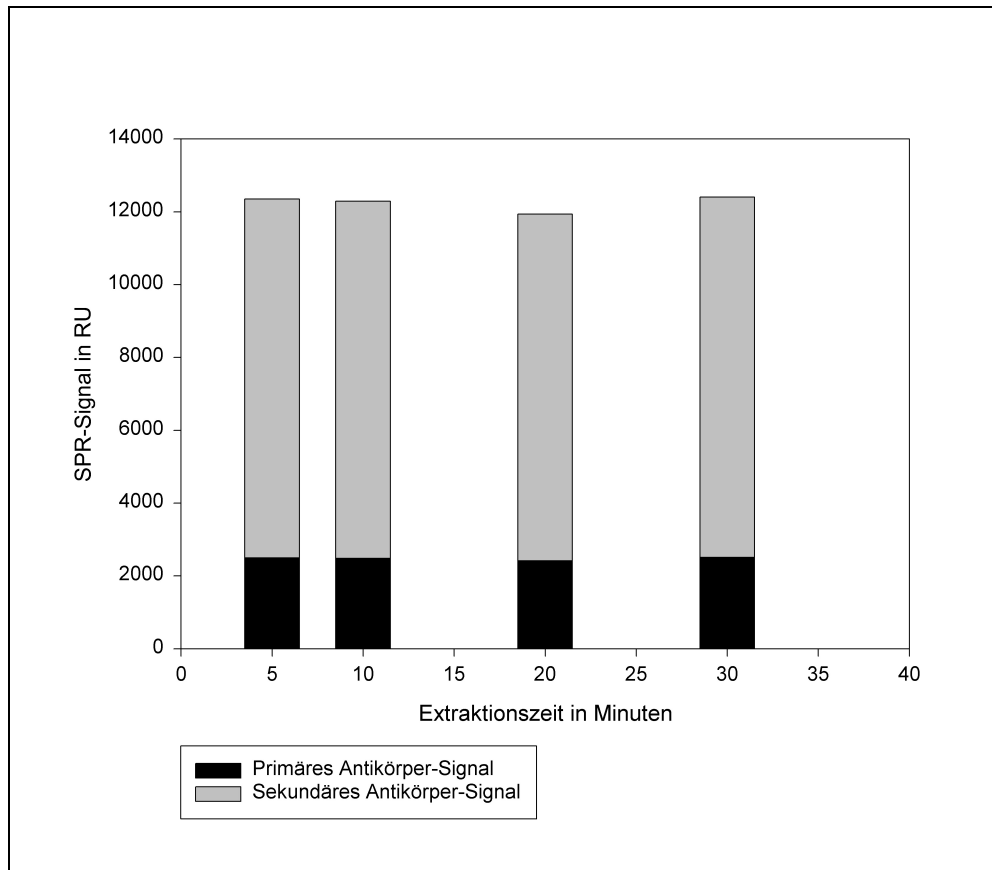


Abbildung 37: SPR-Signale nach primärer bzw. sekundärer Antikörperanbindung für verschiedene Extraktionszeiten.

4.2.4. Verwendung eines *Sandwich*-Assays zur Bestimmung von DON

Durch die Verwendung der Anti-Kaninchenimmunoglobuline konnte die Signalstärke deutlich erhöht werden. Dabei wurde nach der primären Antikörperbindung des Anti-DON-Antikörpers, der aus Kaninchen gewonnen wurde (Niessen *et al.*, 1993) der zweite Antikörper injiziert, der wiederum an den primären Antikörper binden konnte.

Die Signalverstärkung lag mit diesem *Sandwich*-Assay beim 4 bis 5fachen des Grundsignals (Abbildung 37). Die mit dieser Modifikation erreichte Signalverstärkung führte zu einer deutlichen Verschiebung des dynamischen Bereiches der Eichkurve (Abbildung 38), aber auch der TMP verschiebt sich zu höheren Konzentrationen an Deoxynivalenol, von 720 pg/ μ l beim primären AK-Signal zu 9400 pg/ μ l.

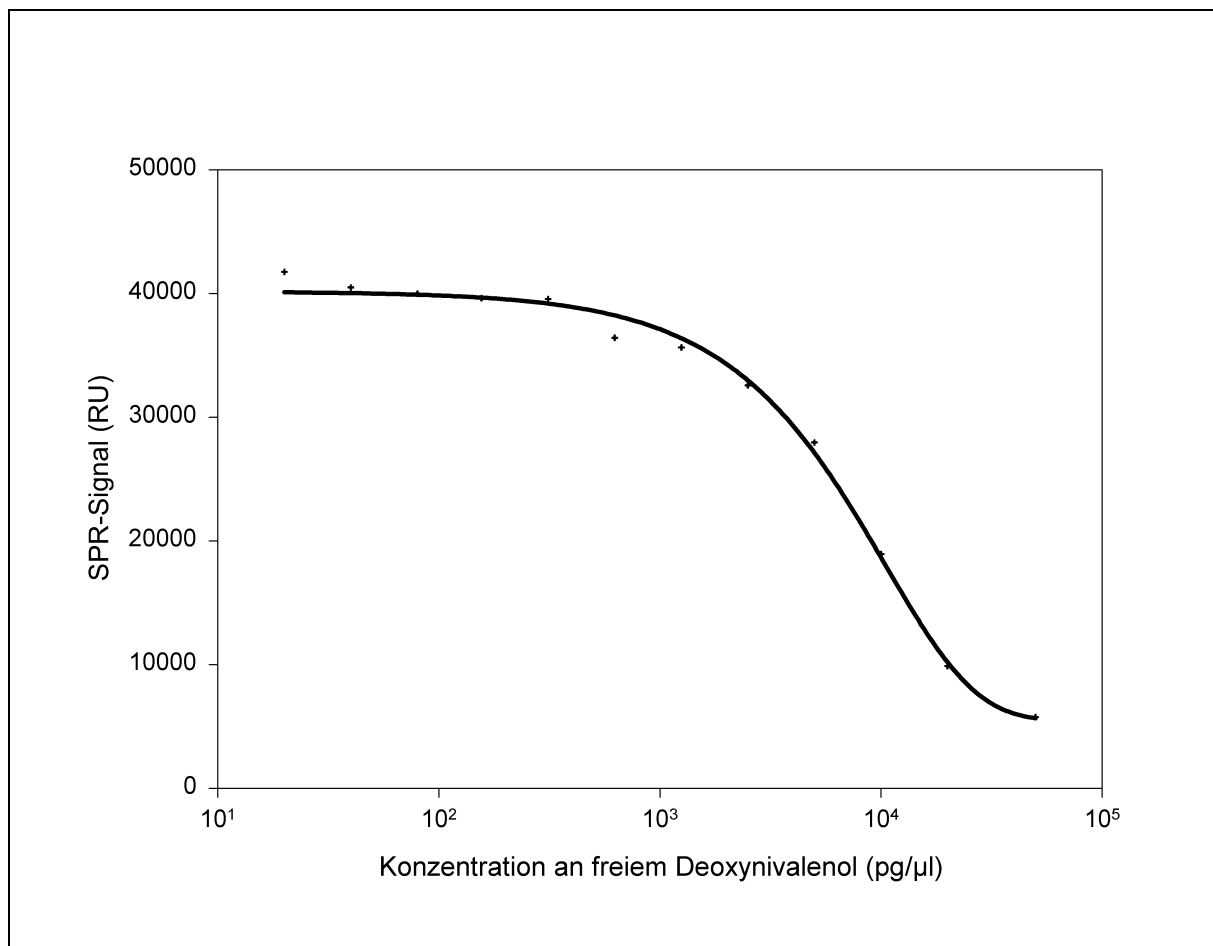


Abbildung 38: Eichkurve einer Verdünnungsreihe von Deoxynivalenol mit der *Sandwich*-Methode

4.2.5. Optimierung des Regenerierungsschrittes der Sensoroberfläche

Zu Beginn der Arbeiten wurde die Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche durch Einsatz von 50 mM NaOH bzw. 10 mM HCl gut und effektiv erzielt. Nach längerem Einsatz wurde jedoch eine Signalabschwächung über die Zeit festgestellt. Die Basislinie zeigte einen leichten Anstieg über die Zeit, was auf eine unvollständige Regeneration hinweist (Abbildung 39).

Deshalb wurde die Optimierung des Schrittes der Regeneration der Sensorfläche hinsichtlich vollständiger Ablösung des gebundenen Antikörpers und hinsichtlich einer Schonung der immobilisierten Liganden durchgeführt.

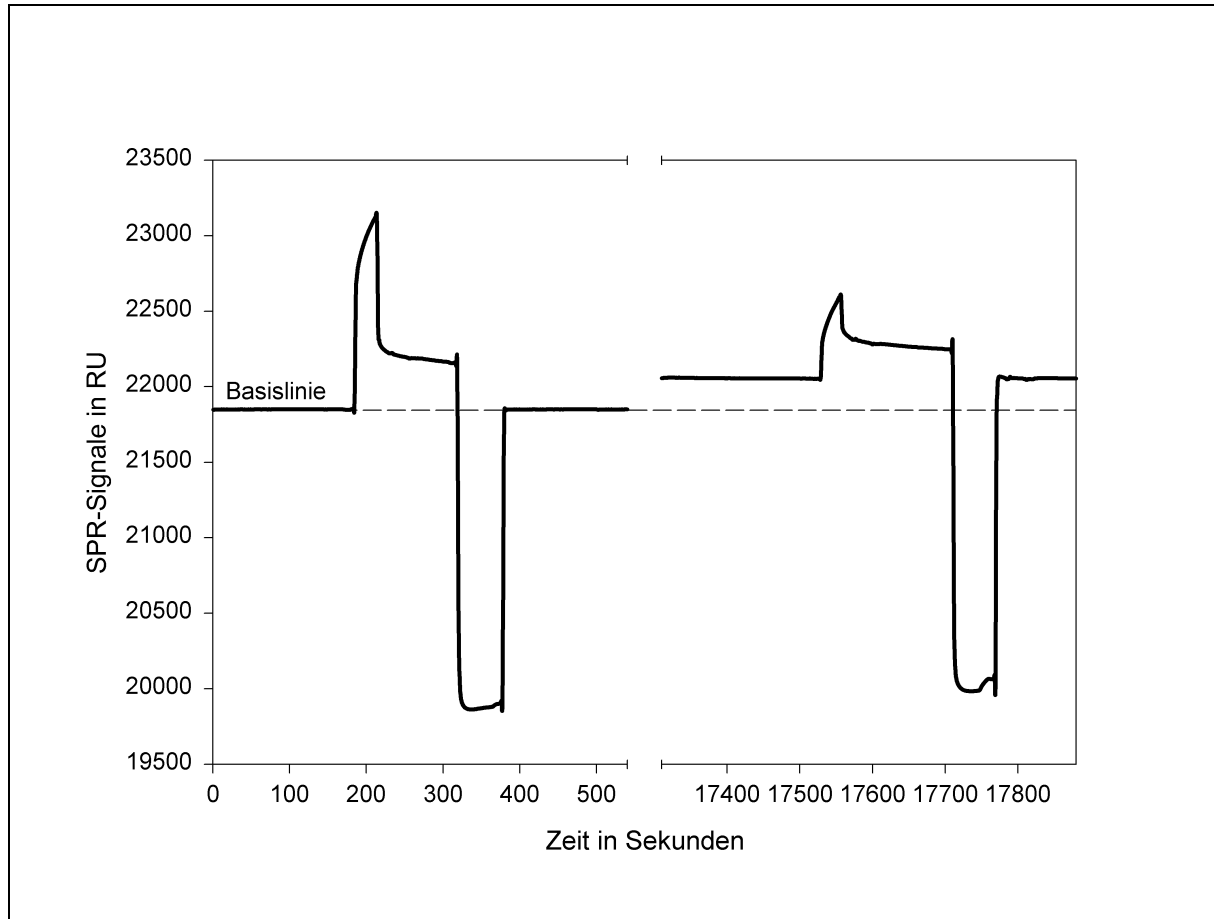


Abbildung 39: Zunahme des SPR-Signals der Basislinien über eine Messdauer von ca. 5 Stunden

Für den Einfach-Assay wurden sehr gute Regenerationsergebnisse mit 1 % SDS-Lösung erzielt. Die Basislinie verlief über die gesamte Messdauer stabil, wobei die Regeneration immer vollständig war. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Tensid, das sehr stark an der Oberfläche anhaftet. Deshalb musste die Fließgeschwindigkeit auf 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ heraufgesetzt werden, damit die SDS-Moleküle vollständig aus der Fließzelle entfernt wurden. Dieser Effekt zeigt sich im Sensogramm sehr deutlich durch die langsame Stabilisierung der Basislinie (Abbildung 40).

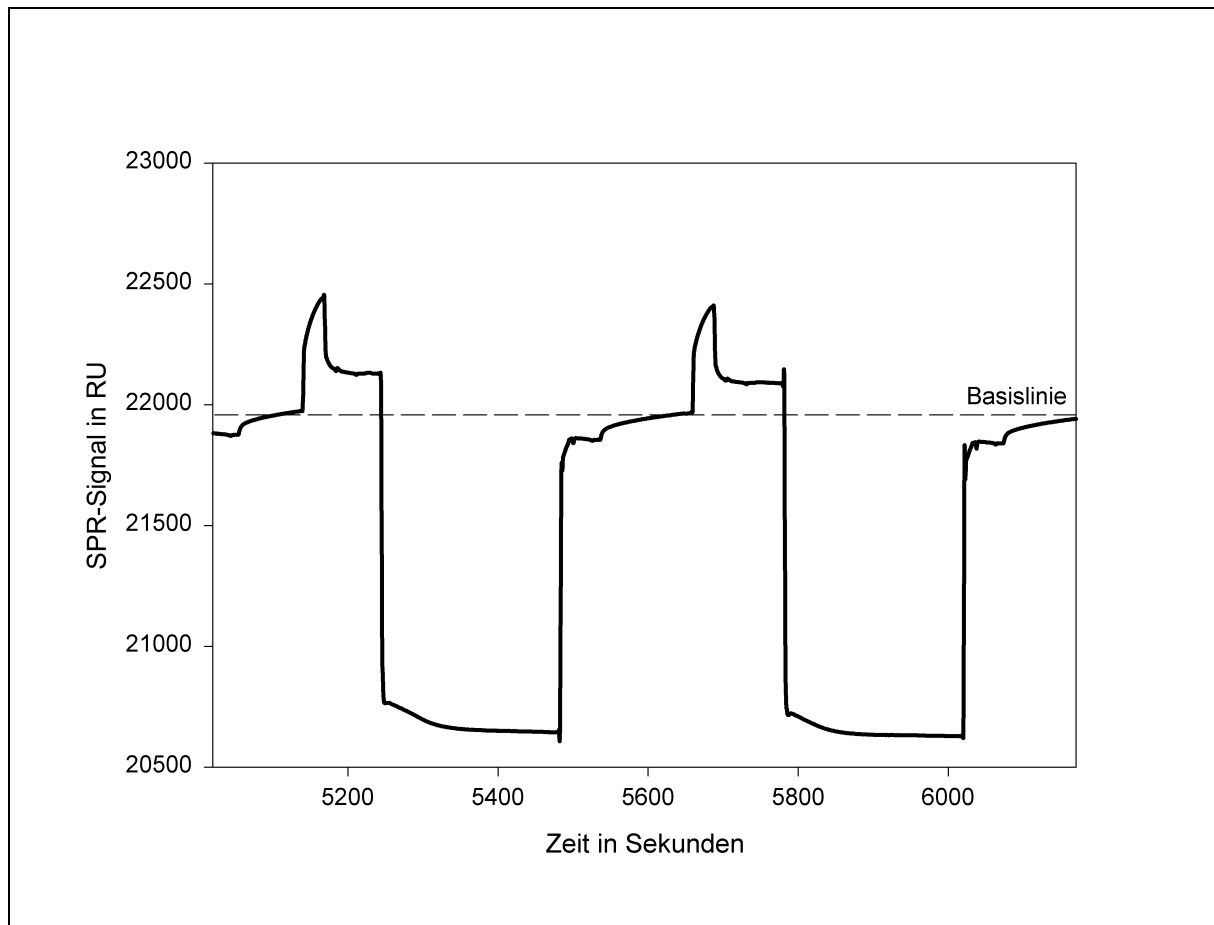


Abbildung 40: Ausschnitt eines Sensogramms, bei dem mit 1 % SDS-Lösung regeneriert wurde. Die Basislinie driftet langsam in ein stabiles Grundniveau.

Für den *Sandwich*-Assay lag die Regeneration bei Verwendung der SDS-Lösung trotz sehr langer Regenerationsdauer nur noch bei ~55 % (Abbildung 41). Erst ein Impuls von 10 μ l HCl-Lösung (10 mM) erreichte eine vollständige Regeneration der Sensoroberfläche.

Daraufhin wurde nach weiteren Regenerationslösungen gesucht; organische Lösungsmittel wie Acetonitril, Formamid oder Ameisensäure zeigten keinerlei regenerierende Effekte.

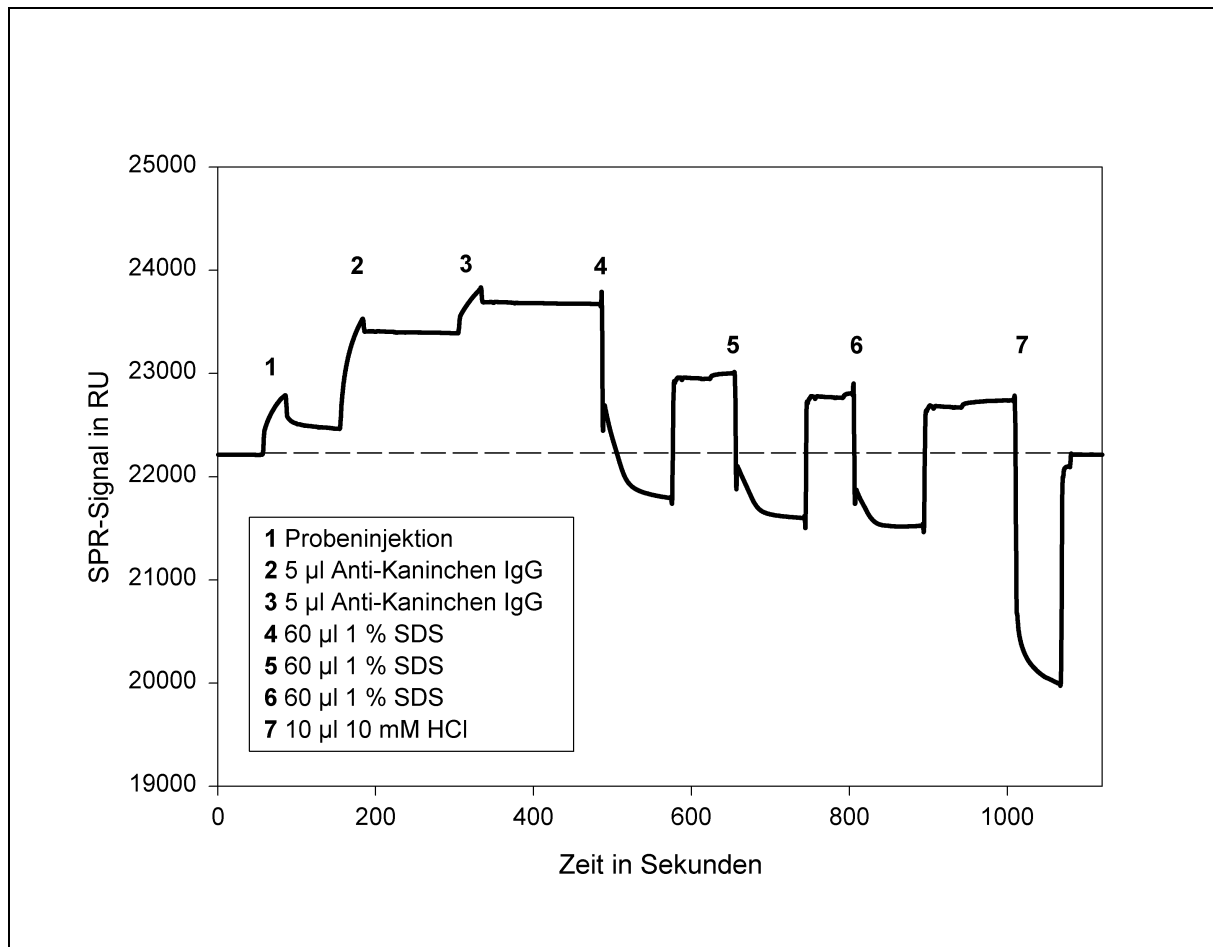


Abbildung 41: Sensogramm für die primäre und die sekundäre Antikörperbindung mit anschließender Regeneration mit 0,5 % SDS bzw. 10 mM HCl

Mit einer 6 M Guanidinchlorid-Lösung in 10 mM Glycin (pH 2,6) konnte eine vollständige Regeneration erreicht werden. Von dieser Lösung war ein Impuls von 2-4 µl notwendig um die Oberfläche wieder vollständig zu regenerieren. Damit wurde ein sehr schneller und effektiver Regenerationsschritt etabliert. Die Regenerationsdauer lag bei einem Fluss von 10 µl/min bei ca. 30 s. Die weiteren Versuche wurden mit dieser Regeneration durchgeführt. Damit ergab sich eine effektive Messdauer von ~4 min pro Probe, wobei nach Abschluss eines Messzyklus die Basislinie wieder sicher erreicht wurde (Abbildung 42).

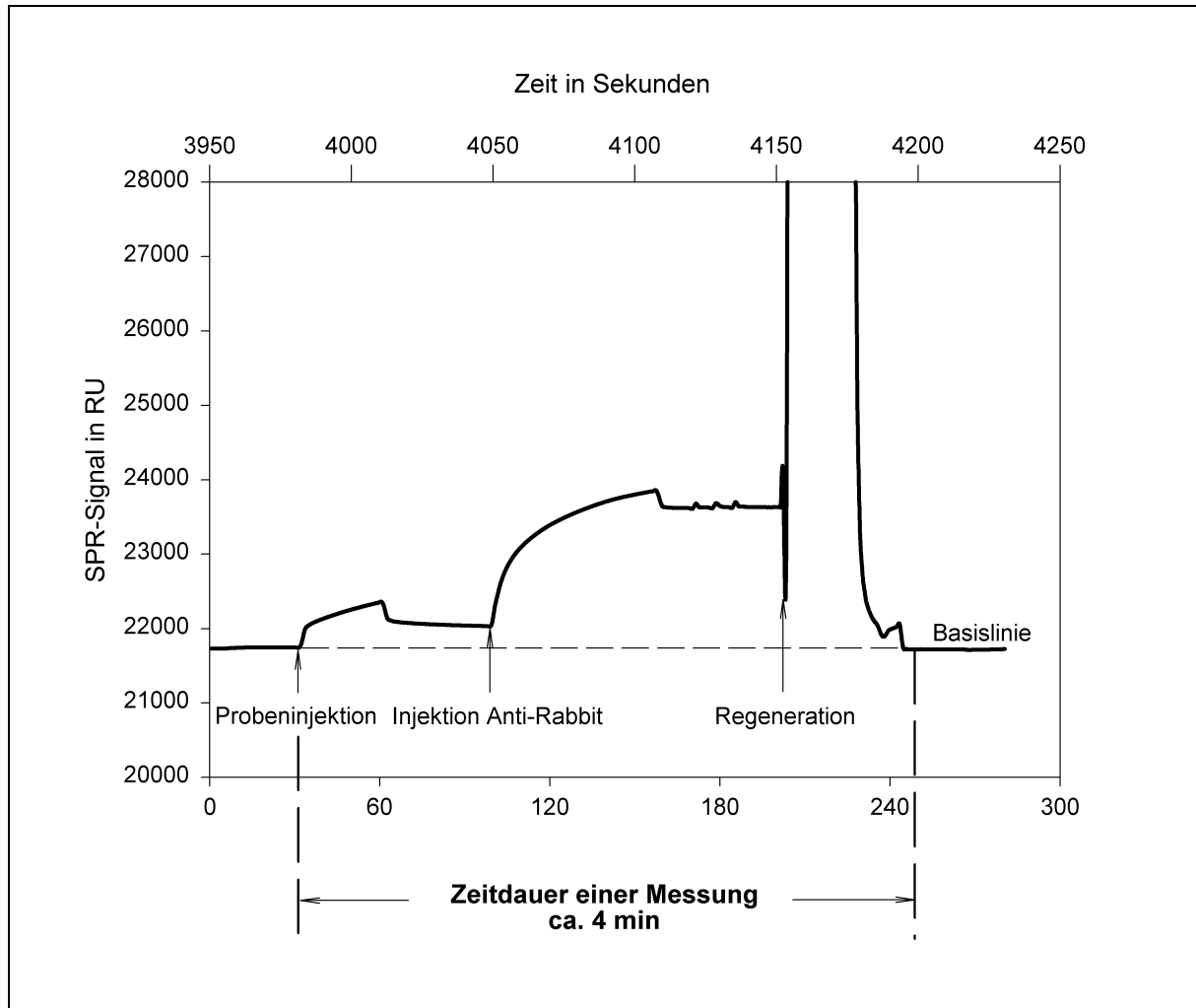


Abbildung 42: Messablauf für das *Sandwich*-Assay. Die effektive Messdauer lag bei ~4 min pro Probe.

In einem weiteren Versuch wurde die Reproduzierbarkeit der Messung überprüft.

In Tabelle 16 sind die Messergebnisse für drei unterschiedliche Standardkonzentrationen in deion. H₂O angegeben. Dabei wurden die Mehrfachbestimmungen unmittelbar nacheinander durchgeführt.

Tabelle 16: Sechsfachbestimmung von drei verschiedenen Standardkonzentrationen unmittelbar hintereinander mit dem BIAcore Deoxynivalenol Assay gemessen.

DON Konzentration (ng/μl)	Mittelwert ± s (RU)	VK (%)
5,0	1994,3 ± 42,7	2,1
2,5	2536,2 ± 23,6	0,9
0,6	3167,0 ± 33,9	1,1

Tabelle 17 zeigt einen ähnlich angelegten Versuch, wobei aber drei Messungen jeweils unmittelbar hintereinander durchgeführt wurden, weitere drei jedoch am darauf folgenden Tag.

Tabelle 17: Sechsfachbestimmung von drei verschiedenen Standardkonzentrationen an zwei verschiedenen Tagen mit dem BIAcore Deoxynivalenol Assay gemessen. Die Standardabweichungen wurden angegeben.

DON Konzentration (ng/μl)	Mittelwert ± s (RU)	VK (%)
5,0	1940,0 ± 76,8	4,0
2,5	2532,5 ± 5,3	0,2
0,6	3204,3 ± 52,7	1,6

Bei höheren Toxinkonzentrationen war die Standardabweichung am größten. D. h. je weniger freier Antikörper in der Probe enthalten ist und somit an das immobilisierte Antigen binden kann, um so ungenauer wird die Messung.

4.2.6. Optimierung der Probenextraktion für den Einsatz im BIAcore

Ein weiteres Ziel war die Optimierung der Probenvorbereitung in Hinblick auf Zeiteffizienz, Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsrate und Einfachheit der Isolierungsmethode.

Die Proben wurden 30 min extrahiert, obwohl gezeigt werden konnte, dass auch kürzere Extraktionszeiten gleiche Effizienz in der Isolierung von DON aufwiesen (Kapitel 4.2.3.). Dem Puffer wurden 6 % Polyvinylpyrrolidon zugesetzt um Störsubstanzen zu entfernen. Mit phenolischen Verbindungen bildet PVP unlösliche Komplexe, wodurch es sich hervorragend für die Filtration eignet. Es wird deshalb auch bei der Klärung von Bier, Wein und Fruchtsaft eingesetzt um unerwünschte Anthocyanogene, Catechine und Flavone zu entfernen.

Zusätzlich wurden für die Reinigung MycoSep Säulen von ROMER Labs Inc. eingesetzt. Dabei handelt es sich um Festphasensäulen für die schnelle und effektive Aufreinigung von Extraktionslösungen in der Mykotoxin-Analytik.

Diese Säulen werden für die unterschiedlichsten Mykotoxine angeboten, so auch für Deoxynivalenol. Nach Überführen des filtrierte Extrakts in ein Kultur-Röhrchen wird der Extrakt mittels Durchdrücken der MycoSep Säule durch die Lösung von Matrixbestandteilen befreit. Der gereinigte Extrakt befindet sich nach diesem Schritt im oberen Teil der MycoSep Säule und kann direkt in die Messung eingesetzt werden.

Tabelle 18 zeigt die Wiederfindungsraten von Deoxynivalenol in Getreideproben.

Entsprechende Konzentrationen des Toxins wurden in Methanol gelöst und den Getreideproben 30 min vor der Extraktion zudosiert. Die Proben wurden gegen Toxinstandards vermessen.

Tabelle 18: Wiederfindungsraten von Deoxynivalenol bei künstlich kontaminierten Getreideproben

Nr.	Behandlung	Konzentration (µg/kg)	Signal (RU)		Wiederfindungsrate (%)	
			primär	sekundär	primär	sekundär
1	Standard	0	10493	40347		
1	MykoSep		11483	39197		
1	6% PVP		9268	34679		
2	Standard	50	10243	38421		
2	MykoSep		10868	36622	106	95
2	6% PVP		8830	33064	86	86
3	Standard	100	10452	35372		
3	MykoSep		9040	35998	86	102
3	6% PVP		8018	30077	77	85
4	Standard	500	8121	31279		
4	MykoSep		9538	31066	117	99
4	6% PVP		7288	27732	90	89
5	Standard	1000	6380	25933		
5	MykoSep		9559	32332	---	---
5	6% PVP		6494	23821	102	92

Bei den Proben, die mit Extraktionspuffer, der 6 % PVP enthielt, behandelt wurden, lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate bei 83,5 % bzw. 86,5 % für das primäre Antikörpersignal bzw. das sekundäre Antikörpersignal. Bei den Proben, bei denen der Rohextrakt zusätzlich über MykoSep Säulen gereinigt wurde, lag die Wiederfindungsrate für das primäre Antikörpersignal bei 104 % und für das sekundäre bei 98,3 %.

Während der Messungen zeigte sich, dass in den natürlich kontaminierten Proben Substanzen mitisoliert wurden, welche die sekundäre Antikörperbindung inhibieren, auch wenn die Rohextrakte über MykoSep Säulen gereinigt wurden. Der inhibierende Effekt trat verstärkt auf, wenn der zweite Antikörper unmittelbar nach dem ersten injiziert wurde.

Wurde das System, einschließlich *Sample-Loop*, vor der sekundären Antikörperbindung durch einen Waschschrift gereinigt, konnte dieser Effekt verringert, aber nicht ausgeschaltet werden. Es blieb ein Signalverlust von 10 % über alle Konzentrationsmessungen.

Die Ergebnisse der primären Antikörperanbindung, die noch ohne Signalverlust verläuft zeigen, dass Inhibitoren für diesen Effekt verantwortlich sind. Der Effekt wurde aber nur bei natürlich kontaminierten Proben beobachtet. Bei den Getreideproben, die nicht kontaminiert waren und das Toxin künstlich zugesetzt wurde, traten diese Effekte nicht auf. Das weist auf inhibierende Faktoren hin, die aus dem Pilzbefall stammen könnten.

4.2.7. Sensorstabilität

Über die Messdauer wurde ein Verlust in der Signalintensität festgestellt. Der Verlust der Bindekapazität der Oberfläche lag bei ~0,5 % pro Regenerationszyklus. Der Verlust der Signalstärke konnte durch eine Nachimmobilisierung des Liganden nicht wieder ausgeglichen werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass nicht nur biotinylierter Ligand abgelöst wird, sondern dass auch die Bindekapazität des Streptavidins zerstört wird. Somit hat der Regenerationsschritt essentiellen Einfluss auf die Lebensdauer der Sensoroberfläche.

4.2.8. Untersuchung von natürlich kontaminierten Weizenproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 65 Getreideproben mit dem Sensorsystem untersucht. Für 15 Proben lagen die mit GC/MS bestimmten Daten für die DON-Konzentrationen in den Getreideproben vor bzw. für weiter 50 die mit HPLC bestimmten DON-Konzentrationen.

Die mit dem Biosensor bestimmten Deoxynivalenol-Konzentrationen wurden jeweils gegen die mit der jeweiligen Methode bestimmten Konzentrationen, GC/MS (Abbildung 43) bzw. HPLC (Abbildung 44), aufgetragen.

Für beide Methodenvergleiche wurde eine Intervallschätzung durchgeführt. Die Vertrauenswahrscheinlichkeit wurde auf $P = 95$ % festgelegt. Die Konvidenzintervalle und die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

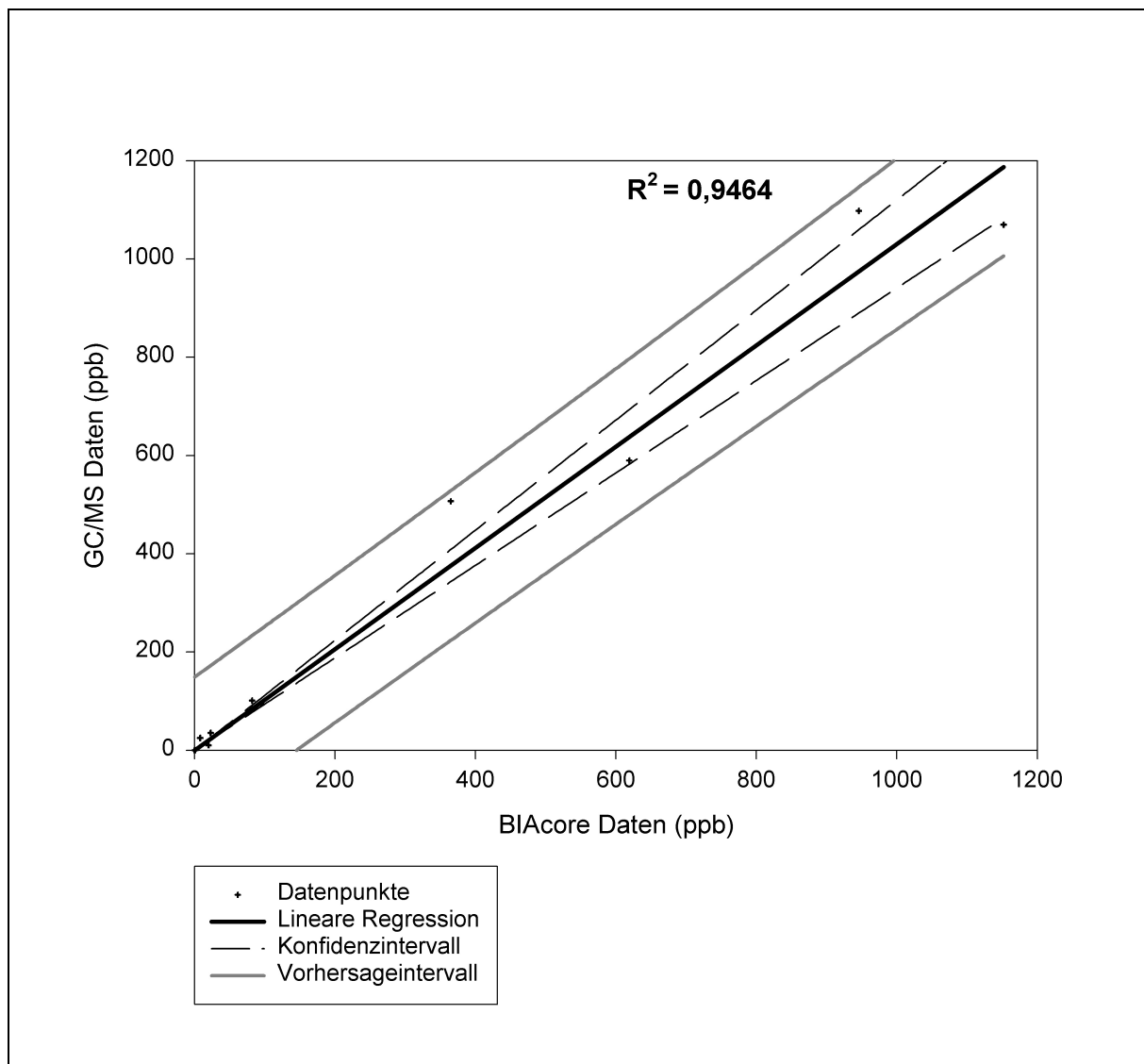


Abbildung 43: Vergleich der Biosensor Werte mit GC/MS Daten

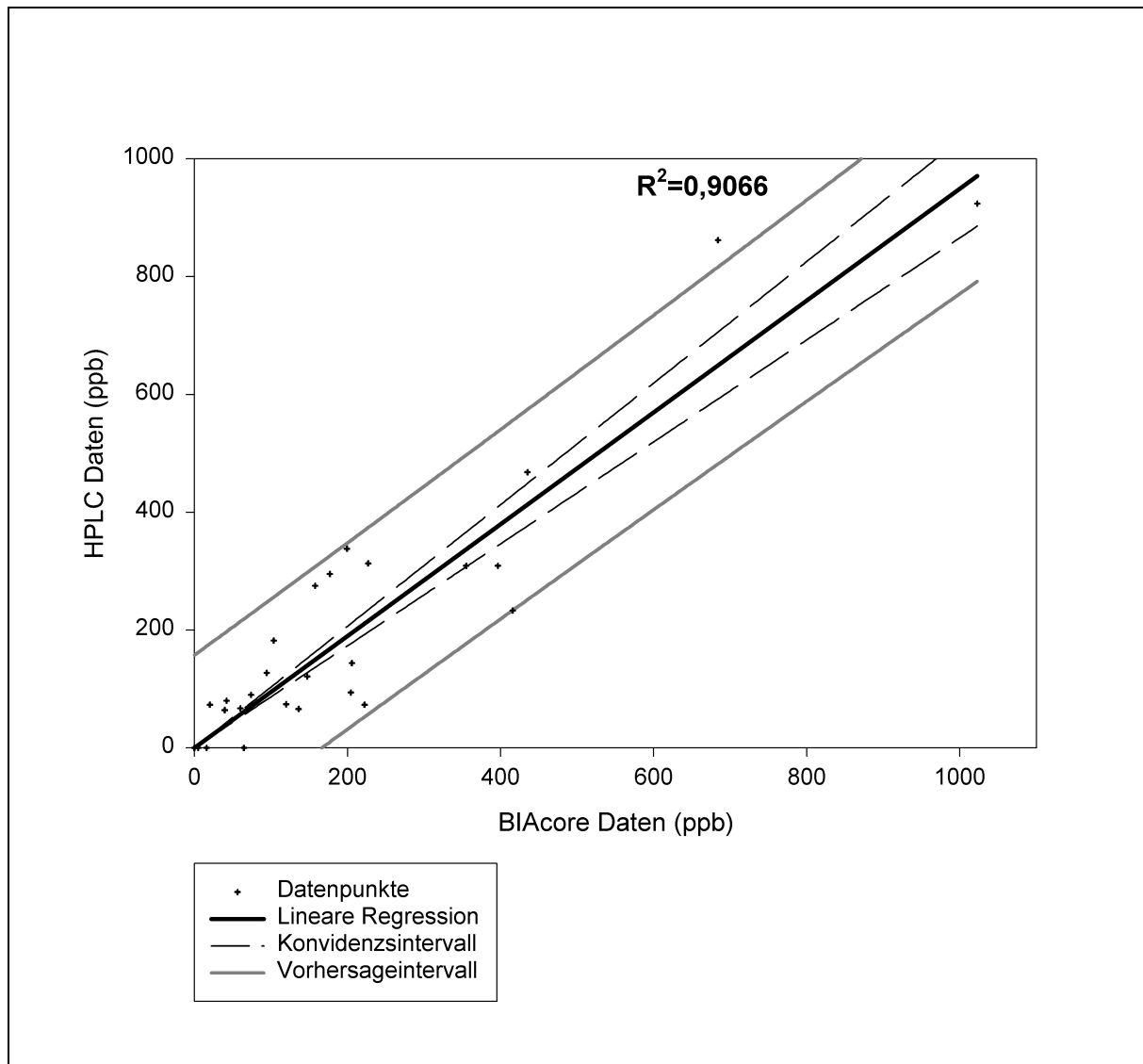


Abbildung 44: Vergleich der Biosensor Werte mit HPLC Daten

Diskussion

5. Diskussion

5.1. LightCycler

5.1.1. Die Optimierung der quantitativen PCR

Das LightCycler System bildet die Basis für sehr schnelle quantitative PCR-Assays. Die Gruppenspezifität der Tox5-Primer (Niessen und Vogel, 1998), die in der PCR verwendet wurden, blieb in der LightCycler PCR weitest gehend erhalten. Vor allem die beiden wichtigsten Repräsentanten in der Gruppe der Trichothecenbildner, *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum*, die als Trichothecenproduzenten in den gemäßigten Klimazonen auf der ganzen Erde eine wichtige Rolle spielen, wurden erfasst. Die Methoden, die bis jetzt für die Quantifizierung der PCR Produkte vorhanden sind, basieren auf Endpunktmessungen. Eine korrekte Quantifizierung ist nur dann möglich, wenn die Konzentrationsbestimmung im linearen Bereich des Kinetikverlaufs der PCR erfolgt. Die LightCycler Technologie erlaubt durch die fluoreszenzoptische Überwachung der PCR, die Erkennung der exponentiellen Phase und ermöglicht so die genaue Berechnung der Template-Konzentration aus der Menge des gebildeten PCR-Produktes durch die Referenz eines externen Standards. Ein Nachteil der Methode, die SYBR Green I als Fluoreszenzmarker verwendet, ist die unspezifische Bindung von SYBR Green I an *dsDNA*, weil damit auch unspezifische Artefakte detektiert werden.

Zur Identifizierung des PCR Produktes wurde eine Schmelzpunktanalyse im Anschluss an die PCR durchgeführt. Weil die unspezifischen Fragmente niedrigere Schmelztemperaturen aufweisen, ist die Unterscheidung zwischen dem PCR-Produkt und den unspezifischen Amplikons möglich. Die Methode wurde in einer Weise optimiert, dass die unspezifischen Fragmente nur bei niedrigen Konzentrationen an Template-DNA auftreten.

Die LightCycler Messung ist über einen breiten Konzentrationsbereich sehr gut reproduzierbar. Für die Methode wurde ein mittlerer Variationskoeffizient von 2 % über den gesamten Konzentrationsbereich bestimmt. Die höchste Variation trat bei den niedrigeren Konzentrationen auf.

Die Empfindlichkeit der LightCycler Technik wurde maßgeblich durch einen *hotstart* verbessert. Dabei wurde dem Taqstart-Antikörper (CLONTECH-laboratories GmbH) in der Methode der Vorzug gegeben, weil diese Variante nach einem Startschritt von 2 min bei 95 °C die volle Aktivität freisetzte.

Dagegen musste die modifizierte Polymerase für 20 min vor der PCR bei einem Hitzeschritt aktiviert werden. Die hohe Aktivierungsdauer ist jedoch in dem hier angestrebten schnellen analytischen Konzept unpassend. Außerdem wurden in den vorliegenden Untersuchungen nach 20 min nur 70 % der ursprünglichen Aktivität freigesetzt.

Eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit wurde erzielt, indem man Pyrophosphatase (Baykov *et al.*, 1988) als Zusatz im Reaktionspuffer verwendete. Dieses Enzym entfernt anorganisches Pyrophosphat, das während der Synthese der DNA-Stränge von den Nucleotidtriphosphaten abgespalten wird. Durch die Entfernung dieses Reaktionsproduktes wird die Kinetik der Reaktion in die Richtung der Produktsynthese verschoben. Durch die Verwendung eines Units des Enzyms PPase pro Reaktionsansatz konnte die Ausbeute an PCR-Produkt um 10 % erhöht werden. Wegen des ungünstigen Kosten-Leistungsverhältnisses konnte die PPase in der Routineanalyse jedoch nicht verwendet werden.

Der Zusatz von Uracil-DNA-Glycosylase unterdrückt die Bildung unspezifische Fragmente in der PCR. UDG hat die Eigenschaft Nucleotidstränge abzubauen, die Uracil als Base enthalten. Deshalb hat das Enzym keinen Effekt auf native DNA, weil es nicht mit dTTP reagiert und durch Denaturierung während des ersten Hitzeschrittes vor der eigentlichen PCR inaktiviert wird (Longo *et al.*, 1990).

Die Nachweisgrenze der entwickelten Methode lag für die Tox5-Primer bei 0,05 ng Template-DNA in natürlich kontaminierten Proben und entsprach 910 haploiden Genomen.

Diese Berechnungen basierten auf der Annahme, dass die Größe eines haploiden Genoms von *Gibberella fujicuroi* (*F. proliferatum*) auf 50 Mbp geschätzt wurde (Xu *et al.*, 1995). Dies entspricht einem theoretischen Genom-Gewicht von $5,5 \times 10^{-8}$ µg.

Um falsch positive Signale zu unterdrücken, wurde die Fluoreszenzintensität bei erhöhter Temperatur (3 °C unter der spezifischen Schmelztemperatur des PCR-Fragments) bestimmt. Die Fluoreszenzmessung bei erhöhter Temperatur stellt eine genauere Quantifizierung des gewünschten PCR-Produktes sicher. So wurde die Nachweisgrenze der Methode von 5×10^{-5} auf 4×10^{-7} µg gereinigter Standard-DNA in der Probe erhöht. Im Probenmaterial war die minimale nachweisbare Quantität der Template DNA 16 µg/kg, dies entspricht 290 haploiden Genomen.

5.1.2. Analyse von natürlich und künstlich kontaminierten Getreideproben

Die Untersuchung von natürlich kontaminierten Weizenproben zeigte einen Zusammenhang zwischen quantitativer PCR und mikrobiologisch ermittelten Werten der *Fusarium*-Belastung. Dabei handelte es sich aber ausschliesslich um frische Feldproben, so dass abgestorbenes Pilzmyzel eher nicht zu erwarten war.

Die Abweichung zwischen den Parametern kann durch die Tatsache erklärt werden, dass die PCR die gesamte *Fusarium* Biomasse in der Probe bestimmt. Demgegenüber bestimmt die mikrobiologische Technik nur die Zahl der infizierten Körner, nicht den Grad der Infektion. Außerdem wird mit mikrobiologischen Methoden nur lebendes Myzel nachgewiesen.

Der Vorteil der LightCycler Methode gegenüber herkömmlichen quantitativen PCR Verfahren ist die enorme Zeiteinsparung, weil die Analyse der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese oder *Southern-Blots* entfällt.

Für die getreideverarbeitende Industrie stellt die neu entwickelte Methode eine Möglichkeit zur schnellen Messung von Pilzkontaminationen in Getreide auch in großen Probenzahlen dar. Die Detektion und Quantifizierung von Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. ermöglicht die Abschätzung der dazugehörigen Trichothecene-Kontamination, insbesondere von Deoxynivalenol.

Der DON-Gehalt in Getreidekörnern ist in hohem Grade von der Intensität der FHB abhängig (Visconti *et al.*, 1986, Wang und Miller, 1988, Miedaner *et al.*, 2000, Homdork *et al.*, 2000a). *Fusarium* spp. können die Giftstoffe im Getreide nicht nur auf dem Feld, sondern auch nach der Ernte unter ungünstigen Lagerbedingungen bilden (Müller *et al.*, 1998). Während der Lagerung zeigten Birzele *et al.* (2000) eine Zunahme der DON-Konzentration in den Proben, die unter natürlichen Anbaubedingungen kultiviert wurden. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Resultaten von Homdork *et al.* (2000b), entsprechend denen der DON-Gehalt der stark befallenen Kornproben unverändert unter allen möglichen Speicherbedingungen blieb, aber sich in schwächer infizierten Proben während der Lagerung erhöhte.

Jedoch wurde in beiden Studien keine Korrelation zwischen dem Mykotoxingehalt und der Pilzkontamination in den Proben gefunden. Dies kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass die Schätzung der Fusariumbelastung über eine herkömmliche PCR-Endpunktmessung mit visueller Auswertung von Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen erfolgte (Birzele *et al.*, 2000). Diese Methode spiegelt aber nicht die genaue Biomasseänderung über die

Lagerdauer wieder. Andererseits verwendeten Homdork *et al.* (2000b) eine mikrobiologische Methode, um die Zahl von infizierten Körnern während der Lagerung zu kontrollieren und verglichen diese mit den DON-Konzentrationen. Hier kann jedoch bereits vom methodischen Ansatz her nicht mit einer Zunahme der Anzahl der infizierten Körner gerechnet werden.

Demgegenüber bestimmt die LightCycler PCR die genaue Veränderung der spezifischen DNA-Menge als Äquivalent für die vorhandene Pilzbiomasse in den Proben über die Zeit und erfasst neben den lebenden auch die abgestorbenen Myzelien, welche ebenfalls zur Erhöhung des DON-Gehaltes zu einem früheren Zeitpunkt beigetragen haben können.

Die hier erhaltenen Daten zeigen, dass eine positive, lineare Wechselbeziehung zwischen der Menge an DNA der Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. und der Konzentration des von ihnen produzierten Deoxynivalenol in den analysierten Kornproben bestand.

Die Mengen an *Fusarium*-DNA, die durch die quantitative PCR in 300 Weizenproben ermittelt wurde, lagen zwischen nicht nachweisbar und 16.3 mg/kg. Die DON-Konzentrationen lagen zwischen nicht nachweisbar und 34.3 mg/kg, wie durch GC/MS-Messungen (BASF AG, Limburgerhof, Deutschland) analysiert wurde.

Es wurden sehr gute Korrelationen zwischen *Fusarium*-DNA und DON-Konzentration für im Feld beimpftes (n = 300) und natürlich kontaminiertes (n = 65) Probenmaterial demonstriert. Die hier gezeigten Korrelationen erlauben eine Aussage über das Verhältnis von *Fusarium*-Kontamination und Belastung des Probenmaterials mit dem *Fusarium*-Mykotoxin Deoxynivalenol. Nach Angaben von Edwards *et al.* (2001) könnte das gefundene Verhältnis in natürlich kontaminierten Proben schwächer sein, weil verschiedene *Fusarium* spp. bzw. verschiedene Stämme einer *Fusarium*-Art unterschiedliche Fähigkeiten für die Bildung von Trichothecenen aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass die Korrelationskoeffizienten für künstlich bzw. natürlich kontaminiertes Probenmaterial von vergleichbarer Größenordnung sind, aber die Anstiege der positiven Korrelationen in den Streudiagrammen (Abbildung 30, S. 93; Abbildung 31, S. 94; Abbildung 32, S. 95) unterschiedlich sind. Dieser Umstand ist für die Praxis von großer Bedeutung, denn er zeigt, dass es nicht möglich ist von der DNA-Menge direkt auf die Belastung mit Trichothecenen zu schließen. Dafür ist die Mykotoxinbildung zu stark von einer Vielzahl individueller Einflussfaktoren abhängig (Tabelle 2, S. 9). Für das schnelle *Screening* hoher Probenzahlen ist die Methode jedoch sehr gut geeignet. Die spezifische Diagnose und Quantifizierung der für die Qualität relevanten *Fusarium*pilze war mit 45 Minuten, verglichen mit mikrobiologischen Methoden (10-14 Tage) und mit chemischer Analyse der Mykotoxine (mind. 2 h), in kurzer Zeit möglich. Außerdem bestimmt die entwickelte Methode das

Potenzial einer augenblicklichen, sowie die Gefahr einer Trichothecen-Kontamination zu einem späteren Zeitpunkt, weil der Organismus auch später, etwa bei der Mälzung, seine Toxine bilden kann. Unbelastete Chargen können schnell und sicher identifiziert werden. Nur belastete Proben müssen zur genaueren Bestimmung der Toxinbelastung durch chemisch-physikalische Nachweisverfahren weiter untersucht werden. Aus den Ergebnissen der beiden Untersuchungen lassen sich dann Schritte für das Qualitätsmanagement, zur weiteren Verwendung des Getreides, ableiten.

Insbesondere muß auch betont werden, dass durch schnelle, relativ einfach handhabare und günstige Analyseverfahren die Probendichte unbegrenzt erhöht werden kann. Für die Praxis bedeutet dies, dass nicht nur Verdachtsproben zur Analyse gelangen, sondern das routinemäßig alle Chargen untersucht werden können. Für inhomogene Proben wie dem Getreide besteht die Möglichkeit, mehrere Analysen von verschiedenen Chargenpunkten durch-zuführen. Ein solches Konzept führt zu höherer Produktsicherheit, was letztendlich dem Verbraucher zu Gute kommt.

5.1.3. Empfehlung für die Durchführung einer kontaminationsfreien PCR

Die Technik der PCR dient zur Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen, theoretisch sogar eines einzelnen Moleküls. Deshalb besteht eine hohe Gefahr der Kontamination der Proben mit Fremd-DNA. Nur wenige DNA-Moleküle können leicht zu falsch positiven Ergebnissen führen. Im Fall der Quantifizierung können die Konzentrationen der Template-DNA falsch bestimmt werden, deshalb ist es unablässig einige Regeln zu beachten.

- für die PCR-Ansätze Reinstwasser verwenden
- immer eine Negativkontrolle mitführen
- Pipettensatz ausschließlich für die PCR
- räumliche Trennung von Probenisolierung und PCR-Vorbereitung, am besten eine PCR Werkbank mit laminar geführten Luftströmungen und entsprechenden Filtersystemen für Reinraumklasse 100 für die effektive Unterdrückung des Risikos der Probenkontamination
- UV-Licht 15 min vor und nach dem Ansatz der PCR-Reaktion für eine effiziente Dekontamination
- UV-Licht Behandlung der Pipettenspitzen für 30 min
- UV-Licht Behandlung des Puffers (bevor SYBR Green I zugemischt wird) für 30 min

Um die Kontamination des Pipettenkonus und damit eine Verschleppung von Probenmaterial von einem Reaktionsgefäß zum anderen zu verhindern, bieten verschiedene Hersteller sog. Filtertips an. Dabei handelt es sich um Pipettenspitzen mit eingesetzten Tiefenfilter verschiedener Materialbeschaffenheit für den Einsatz auf herkömmlichen Luftpolsterpipetten. In Untersuchungen (Fritz *et al.*, 1993) wurde jedoch gezeigt, dass nur durch die Verwendung von Pipetten, die nach dem Direktverdränger-Prinzip (*positive displacement*) arbeiten, auch die Aerosolbildung, eine häufige Ursache für Kontamination der PCR-Ansätze, vollständig eliminiert wird. Die Pipetten nach dem Direktverdränger-Prinzip erwiesen sich selbst gegenüber Gasmolekülen wie Formaldehyd als dicht und erfüllen damit die höchsten Anforderungen, die durch die PCR-Technik gestellt werden können.

Diese Empfehlungen können selbstverständlich nur als solche verstanden werden, da je nach finanziellen und räumlichen Gegebenheiten jeder für sich entscheiden muss, wie weit er diese Vorschläge realisieren kann.

5.2. BIAcore X

5.2.1. Biosensor für den Deoxynivalenol-Nachweis

Während der letzten Jahre sind viele Bemühungen unternommen worden, um Biosensoren zu entwickeln und zu untersuchen. Biosensoren verbinden Sensitivität mit hoher Spezifität und haben das Potential zu preiswerten Detektionen sowie zu Messentechnologien für eine genaue und hochspezifische quantitative Bestimmung bei niedrigen Analytkonzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich ein optischer Biosensor eignet, um die Wechselwirkungen zwischen dem Antigen DON und einem Anti-DON-Antikörper nachweisen zu können. Die neu zu entwickelnde Methode sollte bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität mit den aktuell angewandten Methoden, wie HPLC oder GC/MS (Kapitel 2.3.3.1.), vergleichbar sein. Sie sollten dabei sowohl schnell als auch kostengünstig sein. Arbeitsaufwändige und komplizierte Arbeitsschritte sollten soweit wie möglich vermieden werden.

Die Analyse von DON in Getreide stellt einen wichtigen Schritt in der Qualitätskontrolle für Rohstoffe oder Futtermittel dar. Die Analyse gestaltet sich aber häufig sehr schwierig, weil das Probenmaterial eine sehr komplexe Matrix darstellt. Für die meisten herkömmlichen Methoden ist eine umfangreiche Aufreinigung und Derivatisierung des Analyten notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine einfache und schnelle Probenvorbereitung mit der Echtzeitmessung im BIAcore-System kombiniert.

Für die getreideverarbeitende Industrie stellt die neu entwickelte Methode ein Verfahren zur Verfügung, das sich durch hohe Geschwindigkeit der Probenvorbereitung und -messung auszeichnet. Damit ist ein schnelles *Screening* auf DON für eine große Anzahl von Proben möglich. Bisher sind nur wenige Immunoassays, die auf einem SPR-Biosensor basieren, für Mykotoxine (van der Gaag *et al.*, 1998, Mullett *et al.*, 1998, Daly *et al.*, 2000) beschrieben.

Die Vorteile sind hauptsächlich, dass ein Biosensor als schnelles Online-System ohne zusätzliche Konjugationen benutzt werden kann, d. h., die Oberflächen-Plasmon-Resonanz dient zur direkten markierungsfreien Detektion affiner Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen an einer Oberfläche, wobei der Analyt mittels Fließinjektionssystem zugeführt wird. Außerdem ist die Sensoroberfläche bis zu 100 Mal regenerierbar. Weil Mykotoxine niedermolekulare Verbindungen darstellen, ist die Massenänderung, die durch die Anbindung an die Sensoroberfläche verursacht wird zu klein, um eine bedeutende Signaländerung zu ergeben. Infolgedessen wurde eine indirekte Methode verwendet.

5.2.2. Probenvorbereitung

Neben genauen Kenntnissen über Sensitivität und Spezifität immunologischer Verfahren ist für deren praktische Anwendung die Entwicklung geeigneter Probenextraktions- und Aufarbeitsverfahren unerlässlich. Auf Grund der meist höheren Empfindlichkeit dieser Verfahren im Vergleich zu den chemisch-physikalischen Methoden ist in der Regel keine Aufkonzentrierung des Probenmaterials notwendig. Da jedoch eine unspezifische Beeinflussung der Antigen-Antikörper-Reaktion nicht auszuschließen ist, kann durch eine geeignete Aufarbeitung des Probenmaterials die Sicherheit der ermittelten Resultate deutlich gesteigert werden.

Feldproben enthalten nach der Ernte eine große Anzahl von Substanzen, wie z.B. Polyphenole oder anorganische Stäube, die den Immunoassay inhibieren können (Matrixeffekte). Da die Störsubstanzen bei der Extraktion aus dem gemahlene Getreide herausgelöst werden, wurde versucht diese Substanzen aus dem Extrakt weitestgehend zu entfernen. Durch den Zusatz von 6 % PVP zum Extraktionsmittel wurde ein deutliche Verbesserung des Messsignals erreicht. Eine weitere Verbesserung ließ sich durch die zusätzliche Aufreinigung des Rohextraktes über die MycoSep-Röhrchen erreichen.

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate von DON aus Getreide erlaubte eine quantitative Aussage über die Probenaufbereitung, sowie zum Vergleich verschiedener Methoden.

Es zeigte sich, dass bei der einfachen Extraktion die Wiederfindungsrate nur bei 60 % lag. Durch den Zusatz von 6 % PVP, konnte die Wiederfindung auf 87 % erhöht werden und konnte bei zusätzlicher Aufreinigung über die MycoSep-Säulen auf 98 % gesteigert werden. Deshalb sollte, wenn die Toxinkonzentration im Probenmaterial in der Nähe der Nachweisgrenze der Standardkurve liegt, die Probe einem Reinigungsschritt mit MycoSep Säulchen unterzogen werden.

5.2.3. Systemoptimierung

Für zeitaufgelöste Verfahren spielen kinetische Aspekte und somit die Diffusion eine wichtige Rolle. Das Messsignal, z. B. die Anbindung der Antikörper an die Sensoroberfläche, hängt vom Transport der Stoffe durch die Diffusionsschicht ab. Deshalb wurde das System mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ betrieben, da sich hier ein Optimum von kurzer Messzeit und hohem Messsignal ergab.

Die Hauptfrage bei der Optimierung ist immer: Wie lässt sich ein Assay optimieren, um den Testmittelpunkt in einen bestimmten Bereich zu bringen?

Stemmler (1999) entwickelte ein mathematisches Modell für die Vorhersage eines theoretischen Messsignals. Dabei hängt die *heterogene Affinität*, die Gleichgewichtskonstante zwischen immobilisierten Antigenen und freiem Antikörper, von verschiedenen Parametern ab, wie z. B. der Zugänglichkeit des immobilisierten Antigens oder der Affinitätsänderung durch Anbindung an einen hochmolekularen Träger. Die Simulation zeigte, dass eine kleinere *coating*-Konzentration weitgehend denselben Effekt wie eine entsprechend kleinere Affinität zum Antikörper hat. Das Verhältnis von immobilisiertem Antigen zu eingesetztem Antikörper (*coating excess*) ist eine wichtige Kenngröße für den Assay. Steht weniger immobilisiertes Antigen wie Antikörper (bei gleichen Affinitäten) zur Verfügung, so kann auch weniger Antikörper an die Oberfläche binden, d. h. die verbleibenden Antikörper sorgen für ein Nullsignal. Damit verschlechtern sich die Dynamik und der Testmittelpunkt des Assays.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer maximalen Belegung der Streptavidinoberfläche gearbeitet. Es erwies sich, dass eine Sättigung des Streptavidins mit einem Injektionsschritt von 10 min mit 10 μl HG-DON-Biotin erreicht werden konnte. Da die *coating*-Konzentration mit dem derzeitigen DON-HG-Biotin Liganden nicht visualisiert werden kann, wäre es für eine Optimierung der immobilisierten Ligandenmenge notwendig,

das DON-HG bzw. das DON-HG-Biotin an ein Protein wie BSA zu koppeln, damit man in Folge der größeren Massenänderung die Immobilisierung auf der Sensoroberfläche quantifizieren könnte.

Die Affinitätskonstante des verwendeten Antikörpers bestimmt die analytische Leistungsfähigkeit des Assays. Da eine Verbesserung der Antikörperaffinität den TMP proportional verschiebt, wäre es für zukünftige Arbeiten von Vorteil, bei der Entwicklung eines neuen Antikörpers auf diesen Parameter im Besonderen zu achten. Die absolute Dynamik verringert sich durch die Verbesserung der Antikörperaffinität auf grund der notwendigen Verringerung der AK-Konzentration sowie der *coating*-Konzentration. Dadurch stellen sich entsprechend höhere Anforderungen an die Detektion.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass bei weiterer Verringerung der Konzentration des primären Antikörpers der dynamische Bereich kleiner wird. Diese Beobachtungen gehen konform mit Ergebnissen von Hock (1993). Er zeigte, dass bei Abnahme der Antikörperkonzentration der dynamische Bereich bei nur geringer Verschiebung des TMP kleiner wird.

Mit dem verwendeten System und einer Antikörperkonzentration von 16 µg pro Probenansatz wurde ein Immunoassay erhalten, dessen Arbeitsbereich zwischen 0,13 und 10,0 ng Deoxynivalenol lag. Dieser Bereich ist äquivalent zu 390 ppb bzw. 30 ppm DON in natürlich kontaminiertem Probenmaterial. Damit wird der Bereich abgedeckt, in dem sich der diskutierte Grenzwert für DON (Tabelle 1, S. 8) befindet. Entsprechend zu beanstandende Proben wären dann sicher zu identifizieren.

5.2.4. Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche

Eine breitere Akzeptanz der Biosensortechnologie in der Praxis wird besonders dadurch beeinträchtigt, dass die biologische Komponente, die auf der Transducer-Oberfläche immobilisiert wird, nur eine begrenzte Stabilität aufweist.

Die Verbesserung der Stabilität und der Retention der biochemischen Aktivität unter *in vitro*-Bedingungen ist die primäre Voraussetzung für einen breiten Erfolg von Biosensoren in der medizinischen Diagnose, der industriellen Prozesssteuerung oder der Qualitätskontrolle.

In dieser Arbeit gelang die Regenerierung der Sensoroberfläche durch Einsatz von 50 mM NaOH bzw. 10 mM HCl gut und effektiv. Es wurde jedoch eine Signalabschwächung über die Zeit festgestellt und die Basislinie zeigte einen leichten Anstieg über die Zeit, was auf eine unvollständige Regeneration hinweist. Kulmeier (2001) beobachtete einen Einfluss der

Natronlauge auf die Hybridisierungseffektivität seiner Oligonukleotidsonden. Die Ursache der Reduktion könnte in einem Abspülen der biotinylierten Sonden von der Oberfläche begründet liegen.

Bier (1997) beschreibt den gleichen Effekt bedingt durch die Regenerierungsschritte. Er beobachtete, dass in einer nachgeschalteten zweiten, nur mit Streptavidin beschichteten Oberfläche das Signal im Verlauf der Regenerierungsschritte zunahm. Diesen Effekt begründet er mit einer Auswaschung der biotinylierten Sonden, die jedoch auf der zweiten Fließzelle wieder banden. Er beschreibt jedoch auch, dass die Nachlieferung biotinylierter Sonden das Hybridisierungssignal nur auf lediglich 80 % ansteigen ließ, so dass das Ausspülen nur eine Ursache der Signalabnahme sein kann. Eine weitere Ursache für die abnehmende Bindungseffektivität könnte daher die baseninduzierte Hydrolyse der Amidbindung des Streptavidins an die Dextranmatrix sein. Challis *et al.* (1970) beschreiben den Prozess als langsam, aber irreversibel, so dass durch häufige Regenerierungsschritte die Menge an oberflächengebundenem Streptavidin reduziert wird. Deshalb besteht der Bedarf an alternativen Oberflächen und Liganden, um die Systeme noch besser zu stabilisieren.

Daly *et al.* (2000) war es nicht möglich, die Oberfläche vollständig zu regenerieren, ohne die Bindefähigkeit des immobilisierten Konjugates zu verringern.

Sie verwendeten eine Regenerationslösung, bestehend aus 1 M Ethanolamin mit 20% Acetonitril (v/v), pH 12,0. Diese Lösung kombinierte hohe Ionenstärke und extremen pH-Wert sowie chaotrope Eigenschaften.

Die Lösung wurde von Quinn *et al.* (1999) zur Oberflächenregeneration von hochaffinen Molekülen verwendet. Dabei lag die Regeneration nur bei ~90 %, aber pro Regenerationszyklus lag der Verlust der Bindekapazität der Oberfläche bei ~4 %. Die Regeneration der Oberfläche war auch bei Daly *et al.* (2000) nur unvollständig, so dass bei jedem Regenerationsschritt ca. 15 % des gebundenen Antikörpers an der Oberfläche verblieben (Daly *et al.*, 2000). Diese Menge unregenerierten Antikörpers beeinflusst durch Interferenzen von einem Messzyklus zum nächsten mit Sicherheit die korrekte Messung an freiem Antikörper in den kompetitiven Tests und die Nachweisgrenze solcher Systeme. Ein Grund dafür sind die sterischen Hinderungen an der Oberfläche. Bei hohen Toxin-konzentrationen, wenn die Konzentration an freiem Antikörper in der Lösung eher gering ist und somit auch das Messsignal entsprechend gering ausfällt, werden diese Einflüsse besonders deutlich.

In den eigenen Arbeiten zeigten organische Lösungsmittel wie Acetonitril, Formamid oder Ameisensäure keinerlei regenerierende Effekte.

Für den Einfach-Assay wurden sehr gute Regenerationsergebnisse mit 1 % SDS-Lösung erzielt. Die Basislinie verlief über die gesamte Messdauer stabil und die Regeneration war immer vollständig.

Für den *Sandwich*-Assay lag die Regeneration bei Verwendung der SDS-Lösung nur noch bei ~85 %. Daraufhin wurden weitere Regenerationslösungen gesucht, vor allem auch im Hinblick auf die Regenerationsdauer. Einerseits wegen der Zeitersparnis für die Messdauer, aber andererseits auch aus dem Gesichtspunkt heraus, dass je länger die Oberfläche mit der Regenerationslösung im Kontakt ist, um so stärker auch die Einflüsse der Chemikalien auf die Beschichtung sind und dies letztlich im direkten Zusammenhang mit der Lebensdauer einer Sensorbeschichtung steht.

5.2.5. Anwendung des Biosensors

Die Vorteile immunologischer Nachweisverfahren wie Schnelligkeit, einfache Durchführbarkeit, Automatisierbarkeit und die daraus resultierende Kosteneffektivität lassen die hier entwickelte Methode besonders als *Screening*-Verfahren zur Bewältigung großer Probenumfänge geeignet erscheinen. Ein Nachteil dieser Verfahren ist, dass Beeinflussungen des Testsystems durch kreuzreagierende Substanzen oder das Auftreten unspezifischer Effekte durch die Probenmatrix nicht auszuschließen sind.

Deshalb wäre es ein großer Vorteil, die Versuchsbedingungen auch für die Ermittlung der Standardkonzentration konstant zu halten. Vorstellbar wäre eine Eichung des Systems mit einem Referenzmaterial wie dem BCR-379 CRM des IRMM (2002). Dies bedeutet, dass das Referenzmaterial in der Probenvorbereitung und -vermessung genauso behandelt wird wie das eigentliche Probenmaterial und somit die Beeinflussungen des Testsystems minimiert wird. Außerdem bietet sich der Vorteil, dass man die Konzentration des Referenzmaterials so wählt, dass sie einem bestimmten Grenzwert entspricht, und somit ein *Screening* noch schneller und sicherer wird, da man das System nicht mit einer Eichkurve kalibriert, sondern nur eine Aussage trifft, ob der Grenzwert überschritten wird oder nicht.

Trotzdem ist eine Absicherung immunologischer Befunde durch Referenzverfahren zumindest für gerichtliche und amtliche Zwecke unerlässlich. Immunologische und chemisch-physikalische Nachweisverfahren könnten sich somit in idealer Weise ergänzen, sei es als unabhängige Methoden zur gegenseitigen Absicherung von Ergebnissen oder als kombinierte Verfahren. So verbindet z. B. die Kopplung von chemisch-physikalischen Nachweisverfahren und Biosensoren die hohe Selektivität des chemisch-physikalischen mit der Sensitivität des

immunologischen Verfahrens und bietet die Möglichkeit, auch noch sehr geringe Stoffkonzentrationen mit großer Spezifität nachzuweisen (Krone *et al.*, 1997; Jungar *et al.*, 2000).

Zusammenfassung
und
Ausblick

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits untersucht, ob sich ein optischer Biosensor eignet um Deoxynivalenol in Getreideproben nachzuweisen. Andererseits wurde eine quantitative PCR entwickelt, mit der es möglich war das Spektrum der Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. auf Getreide quantitativ nachzuweisen.

Die quantitative PCR basiert auf der LightCycler-Technologie, die schnelle *in vitro* Amplifizierung von DNA mit gleichzeitiger Detektion in Echtzeit über Fluoreszenzmessung kombiniert. Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR Green I, die Quantifizierung wurde anhand einer externen Standardkurve mit genomischer DNA von *F. graminearum* DSM 4527 durchgeführt. Das entwickelte PCR-Verfahren erlaubt die Quantifizierung der Menge an Templatemolekülen, die in einer Probe vorhanden sind sowie die Identifizierung des PCR-Produkts über seine Schmelztemperatur.

Das Verfahren beruht auf dem Primerpaar Tox5, das spezifisch mit Teilen der Sequenz des *tri5*-Gens hybridisiert. Dieses Gen kodiert für ein Enzym, das die Synthese zu Trichodien katalysiert, der ersten Stufe in der Biosynthese aller Trichothecene. Die Größe des PCR-Fragments bestimmt die Zeitdauer der Extension. In Hinblick auf die Entwicklung einer Schnellmethode und durch den Umstand, dass bei hohen Ausgangskonzentrationen an Template-DNA mit den Tox5-Primern die Plateauphase der PCR sehr schnell erreicht wird, wurde ein neues Primerpaar abgeleitet. Die ToxHS-Primer, gleichfalls spezifisch zum *tri5*-Gen, erlauben die Synthese eines 120 bp Fragments. Mit einem optimierten Reaktionspuffer und der Fluoreszenzdetektion bei erhöhter Temperatur wurde die Nachweisgrenze für das System auf $4 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ gereinigter Standard-DNA bestimmt. Im Probenmaterial (Weizen) war die minimale nachweisbare Quantität der Template-DNA $16 \mu\text{g/kg}$, was 290 haploiden Genomen entspricht.

Die neue Methode analysiert das Potential für die Toxinproduktion in Getreideproben. Daneben wird nicht nur lebendes, sondern auch abgestorbenes Myzel erfasst. Das heißt für die Praxis, dass eine mögliche Toxinkontamination detektierbar bleibt, auch wenn der Organismus bereits abgestorben ist. Mit dem hier entwickelten Verfahren ist die Analyse von 30 Getreideproben einschließlich Probenvorbereitung, PCR-Reaktion und Datenauswertung gegen einen externen Standard innerhalb von einer Stunde möglich.

Daher eröffnet das LightCycler-System neue Möglichkeiten, einer sehr frühzeitigen Qualitätskontrolle der Rohstoffe in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie sowie als Instrument für die Realisierung der HACCP-Konzepte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Korrelation zwischen DNA-Gehalt als Parameter für die Biomasse von Thrichothecene bildenden *Fusarium* spp. und deren Leittoxin Deoxynivalenol in Getreide gefunden. Die statistische Auswertung einer hinreichend großen Datenmenge ($n = 300$) erlaubte die Abschätzung der Konzentration an DON in der Probe über die Bestimmung der DNA-Konzentration.

Für eine noch bessere Absicherung der Messergebnisse wäre die Entwicklung eines internen Standards von Vorteil. Obwohl die verschiedenen PCR Parameter gut kontrolliert und optimiert werden können, verbleiben methodische Variabilitäten, die nur mit Hilfe eines internen Standards zu korrigieren sind. Ein interner Standard dient als zusätzliche Kontrolle sowohl als Indikator für PCR-hemmende Kontaminationen als auch als interner Referenzpunkt zur Quantifizierung. Dabei darf jedoch nicht ausser acht gelassen werden, dass die Detektionsformate für parallele Fluoreszenzmessungen (z. B. FRET-Sonden) sehr kostenintensiv sind und für eine Routineanalytik weniger geeignet erscheinen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf dem Nachweis von Deoxynivalenol in Getreideproben mittels eines Biosensors. Hierfür wurde DON so modifiziert, dass in der C-3 Position ein Linkerarm eingeführt wurde, über dessen Carbonylfunktion die Kopplung an Biotin möglich war. Das biotinylierte Antigen wurde auf einer mit Streptavidin beschichteten Sensoroberfläche immobilisiert. Für die Bestimmung des Toxins wurde ein indirekt kompetitiver Immunoassay verwendet. Die Messungen wurden im Biacore X-Gerät über Fließinjektionsanalyse durchgeführt. Das System wurde über eine DON-Verdünnungsreihe kalibriert. Der Assay hat einen Arbeitsbereich zwischen 0,13 und 10,0 ng Deoxynivalenol, äquivalent zu 390 ppb und 30 ppm DON in natürlich kontaminiertem Probenmaterial. Die kleinste nachgewiesene Konzentration lag bei 2,5 pg/ μ l, das entspricht einer Probenkontamination von ~7,5 ppb DON. Die Regeneration des Systems wurde mit einem Impuls von 6 M Guanidinchlorid in 10 mM Glycin (pH 2,6) erreicht. Zur Verstärkung der Messsignale wurde ein sekundärer Antikörper verwendet.

Es wurde gezeigt, dass eine Extraktionszeit von 10 min durchaus ausreichend ist, um DON quantitativ aus Getreideproben zu gewinnen. Bei der Aufreinigung des Rohextraktes über MycoSep-Säulen wurde eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 98,3 % für das sekundäre Antikörpersignal und von 104 % für das primäre Antikörpersignal gefunden. Mit

dem hier entwickelten Biosensor beträgt die Dauer für die Bestimmung eines Messwertes ca. 4 min. Das bedeutet, dass die Messzeit für eine Probe einschließlich Probenextraktion und Aufreinigung auf 15 min minimiert werden kann. Diese Zeitdauer wird nach derzeitigen Kenntnisstand von keinem anderen Nachweisystem erreicht.

Damit verbindet der Biosensor die Spezifität der Immunoassays mit einer schnellen konjugationsfreien Detektion des Messsignals mittels der SPR im Biacore-System.

Durch Fortschritte in der Messtechnik und der Anwendungsentwicklung ist mit der RIFS-Technik heute schon die direkte Messung von Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 200 Da möglich (Piehler *et al.*, 1996). Mit verbesserter Messtechnik wird es zukünftig möglich sein, direkte Nachweisverfahren für Lebensmittelkontaminationen wie Toxine zu entwickeln. Der Vorteil solcher direkter Verfahren wäre die Einsparung an spezifischem Antikörper, da dieser nur noch als immobilisierter Ligand verwendet würde.

Lebensmittel können in verschiedenen Prozessen und aus verschiedenen Gründen kontaminiert werden. Im Allgemeinen wirkt sich eine Kontamination negativ auf die Qualität von Lebensmitteln aus und kann ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen.

Als Kontaminant gilt jeder Stoff, der dem Lebensmittel nicht absichtlich hinzugefügt wird, jedoch als Rückstand der Gewinnung, Fertigung, Verarbeitung, Zubereitung, Behandlung, Aufmachung, Verpackung, Beförderung oder Lagerung des betreffenden Lebensmittels oder infolge einer Verunreinigung durch die Umwelt im Lebensmittel vorhanden ist (VERORDNUNG (EWG) Nr. 315/93).

Wenn es Hinweise darauf gibt, dass der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln gesundheitsgefährdend ist, muss eine Risikobewertung durchgeführt werden. Je nachdem, wie das Ergebnis dieser Bewertung ausfällt, müssen Höchstwerte oder andere Maßnahmen zur Regelung der Kontamination in Lebensmitteln festgelegt werden.

Die Gefahr einer Mykotoxinbelastung unserer Nahrung wird tendenziell eher größer. Verantwortlich dafür sind Faktoren wie eine zunehmende Zentralisierung von Produktion und Verarbeitung und dem damit verbundenen Trend der Kostensenkung, steigende Importe aus Überseeländern mit oft langen Transportzeiten sowie der Vermeidung von Fungiziden vor allem in der Saatgutbehandlung.

Nach heutigem Wissenstand besteht bei der Anwesenheit von Schimmelpilzen in einem Lebensmittel grundsätzlich immer die Gefahr, dass Mykotoxine gebildet werden. Die effektiven Gesundheitsrisiken aufgrund der Mykotoxine sind noch schwer abschätzbar. Sie

dürfen einerseits nicht überschätzt werden; sie sind aber sicher auch nicht zu verharmlosen, besonders in Hinblick auf ihr allergenes Potential.

Für die Praxis heißt das, dass offensichtlich verschimmelte Lebens- und Futtermittel grundsätzlich als toxisch zu betrachten sind, solange nicht der Gegenbeweis erbracht wurde.

Deshalb werden für die systematische Kontrolle und Überwachung von Lebens- und Futtermitteln schnelle und zuverlässige Analyseverfahren benötigt. Ein zusätzliches Problem bei Getreide stellt auch ein genügend aussagekräftiges Probenahmeverfahren dar, da der Befall inhomogen sein kann. Die eingetragene Toxinmenge kann dennoch ein Problem im erzeugten Produkt darstellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahren stellen die Grundlage für ein schnelles *Screening* hoher Probenzahlen von Getreide in der Futter- und Lebensmittelindustrie dar; einerseits zum Nachweis der Belastung von Getreide mit Trichothecene bildenden *Fusarium* spp. und andererseits zur Bestimmung des "Leittrichothecens" Deoxynivalenol.

Dennoch sind zukünftig weitere Forschungsbemühungen notwendig, besonders auf dem Gebiet der Probenaufbereitung und Probenahme zur möglichst verlustfreien Gewinnung eines hochreinen Analyten und zu einer statistisch verlässlichen Aussage.

Summary

7. Summary

This study shows that *Fusarium* spp. DNA from reference strains and field isolates can be rapidly identified and quantified by rapid cycle PCR in the LightCycler™ using SYBR® Green I as fluorescence dye and an external standard. The new method analyses the potential for the toxin production in pure fungal cultures and in cereal samples.

The LightCycler™ technology combines rapid *in vitro* amplification of DNA with real time detection and quantification of the amount of target molecules present in a sample. The system enables a 35 cycle PCR with 32 samples to be completed in 45 min including quantification and identification of the product. Based on PCR primers specific to the *tri5* gene, a quantitative group specific assay for trichothecene producing *Fusarium* spp. was established. In the assay, SYBR® Green I was used as fluorescent dye enabling real time detection of PCR products. Characterisation of the amplicons was achieved by melting point analysis (85 ± 0.1 °C). Non-specific products like primer dimers could readily be distinguished from the product by their lower melting point. Composition of the amplification buffer was optimised and various hot start methods were tested in order to achieve highest sensitivity of the assay. Uracil DNA glycosylase was added to prevent amplification of non-specific products due to DNA carry-over. The spectrum of species detected was widely in accordance with the results found in conventional PCR using the Tox5 primer pair. Reproducibility of the assay developed was determined to be 98 % in the range between 0.05 ng and 6 ng of purified DNA from *Fusarium graminearum* DSM 4527 when six parallel experiments were run. The assay developed was used to analyse the DNA from trichothecene-producing *Fusarium* spp. in wheat. Three hundred wheat samples were field inoculated with *Fusarium culmorum* and analysed for deoxynivalenol by GC/MS (data kindly provided by BASF AG, Limburgerhof, Germany). Results were compared to LightCycler™ data. DNA concentrations ranged from not detectable to 16,3 mg/kg whereas DON concentrations varied between not detectable and 34,3 mg/kg. Data analysis revealed a coefficient of correlation $r = 0,9557$ between DON concentrations and DNA-amounts over all samples. Using only samples with DON concentration $\leq 1,5$ mg/kg a coefficient of $r = 0,7476$ was calculated. All correlations found were highly significant. An interval of confidence for $P = 95\%$ was calculated based on samples with DON concentration $\leq 1,5$ mg/kg. Data analysis allowed estimation of DON contamination from quantitative PCR data in the wheat samples. Results presented in this study clearly demonstrate that specific diagnosis and quantification of quality relevant

Fusarium spp. are possible in only a small portion of time and expenditure of labour compared to microbiological methods and to chemical analysis of mycotoxins.

The developed method is well suited for routine analysis of large sample numbers in quality control and a definition of hazard analysis critical control point (HACCP) concepts. It may improve quality management of the cereal industry such as malteries as well as breweries, food and feed producers.

Furthermore, a BIAcore-based indirect inhibitive immunoassay was developed for a rapid quantification of concentrations of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. A surface plasmon resonance sensor chip coated with biotinylated DON was used to measure free antibody added to a sample. A DON-biotin conjugate was synthesised and immobilized to a streptavidin coated sensor surface. For analysis, ground wheat was extracted with 10 % methanol in water with 6 % polyvinylpyrrolidone, filtered and cleaned up with MycoSep™ columns. Ten microlitre extract were mixed with 30 µl of diluted polyclonal antibody and pre-incubated prior to injection into a BIAcore® X device.

The sensor surface was regenerated with a rinse of 3 µl of 6 M guanidinechloride in 10 mM glycine (pH 2.9). The assay was applied to the analysis of wheat samples with different levels of contamination by DON aimed at providing statistical data analysis. Data analysis showed a positive, linear correlation between concentration of DON measured with the new biosensor and GC/MS or HPLC, respectively. A coefficient of correlation of $r = 0,9728$ (GC/MS data) and $r = 0,9522$ (HPLC data) was found.

The system enables analysis of a sample to be completed in 30 min including sample preparation and quantification.

Literatur

Abouzied M., 2000, Proc X Int IUPAC Symp Mycotoxins and Phytotoxins 21–25 May 2000, Sao Paulo, Brazil.

Abramson D., Gan Z., Clear R.M., Gilbert J., Marquardt R.R., 1998, Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *Int. J. Food Microbiol.*, **45**: 217-224.

Alexander N. J., Hohn T. M., and McCormick S. P. 1998. The *TRI11* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 221–225.

Alexander N. J., McCormick S. P., and Hohn T. M. 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: Gene isolation and expression in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **261**: 977–984.

Andres J.L., Turkel G.J., Wang J.A., Twu N.F., Yuan R.Q., Lamszus K., Goldberg I.D., Rosen E.M., 1998, Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNAdamaging agents, *Oncogene*, **16**: 2229-2241.

AOAC International. 1995. *Official methods of analysis of AOAC International*, ed. P. Cunniff. Sixteenth Edition Vol II Chapter 49, p. 1-49. Arlington, Virginia, United States.

D'Aquila R. T., Bechtel L. J., Videler J. A., Eron J. J. Gorczyca P., Kaplan J. C., 1991, Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 3749.

Bakan B., Pinson L., Cahagnier B., Melcion D., Semon E., Richard-Molard D., 2001, Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Add. Contamin.*, **18**: 998-1003.

Banks J.N., Rizvi R.H., Barker I., Turner J.A., Rahman S., Northway B.J., 1996, Specific monoclonal antibodies to *Fusarium* species and *Microdochium nivale*. *Food Agric. Immunol.*, **8**: 249-268.

Bennett G.A., Richard J.L., 1996, Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Technol.*, **50**: 235-238.

Bennett G.A., Shotwell O.L., 1990, Criteria for determining of *Fusarium* mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**: 270-275

Bergsjø B., Matre T., Nafstad I., 1992, Effects of diets with graded levels of deoxynivalenol on performance in growing pigs. *J. Vet. Med.*, **A39**: 752-758.

Bergsjø B., Langseth W., Nafstad I., Høgset Jansen J., Larsen H.J.S., 1993, The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Vet. Res. Commun.*, **17**: 283-294.

Bhat R.V., Beedu S.R., Ramakrishna Y., Munshi K.L., 1989, Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet* **7**: 35-37.

Bier F.F., 1997, Biomolekulare Erkennung und Signaltransduktion in Affinitätssensoren, *Habilitation*, Universität Potsdam.

Bier F.F., Fürste J.P., 1997, Nucleic acid based sensors, in: *Frontiers in Biosensorics I, Fundamental Aspects*, Eds.: Scheller F.W., Schubert F., Fedrowitz J., Birkhäuser Verlag Basel, Schweiz.

Birzele B., Prange A., Krämer J., 2000, Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Add. Contamin.*, **17**: 1027-1035.

Bottalico A., 1998, *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.*, **80**: 85-103.

Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E., 2001, A Genetic and Biochemical Approach to Study Trichothecene Diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Gen. Biol.*, **32**: 121-133.

Butler J. M., McCord B. R., Jung J. M., Wilson M. R., Budowle B., Allen R. O., 1994, Quantitation of polymerase chain reaction products by capillary electrophoresis using laser fluorescence. *J. Chromatogr.*, **658**: 271-280.

Cane D.E., 1990, Enzymatic formation of sesquiterpenes. *Chem. Rev.*, **90**: 1089-1103.

Candlish A.A.G., 1991, In: Smith J.E., Henderson R.S. (eds) *Mycotoxins and Animal Foods: The Determination of Mycotoxins in Animal Feeds by Biological Methods*. CRC Press, Boca Raton, 223-246.

Casale W.L., Pestka J.J., Hart L.P., 1988, Enzym-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogues. *J. Agr. Food Chem.*, **36**: 663-668.

Cahill L.M., Kruger S.C., McAlice B.T., Ramsey C.S., Prioli R., Kohn B., 1999, Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **859**: 23-28.

Challis B.C., Challis J.A., 1970, in *The Chemistry of Amides*, Ed. Zabicky J., Interscience, New York, 731-857.

Chelkowski J., 1991. (ed.) *Cereal grain: Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*, Elsevier, Amsterdam, 53-66.

Chelkowski J., Bateman G.L., Mirocha C.J., 1999, Identification of toxigenic *Fusarium* species using PCR assays. *J. Phytopathol.* (Berlin) **147**: 307-311.

Chou Q., Russell M., Birch D., Raymond J., Bloch W., 1992, Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.*, **20**:1717-1723.

Chu F.S., 1986, Immunoassays for mycotoxins. In Cole R.J. *Modern methods and analysis and structural elucidation of mycotoxins*. 207-239, Academic Press, Orlando.

Cole R.J., Cox R.H., 1981, Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York.

Compton J., 1991, Nucleic acid sequence-based amplification, *Nature*, **350**: 91-92.

Corley R.A., Swanson S.P., Buck W.B., 1985, Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine bile and urine. *J. Agric. Food Chem.*, **33**: 1085-1089.

Corley R.A., Swanson S.P., Gullo G.J., Johnson L., Beasley V.R., Buck W.B., 1986, Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in intralveolarly dosed swine. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 868-875.

Côté L.M., Dahlem A.M., Yoshizawa T., Swanson S.P., Buck W.B., 1986, Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **69**: 2416-2423.

Cross N.C., 1995. Quantitative PCR techniques and applications. *Brit. J. Haematol.*, **89**: 693-697.

Daly S.J., Keating G.J., Dillon P.P., Manning B.M., O'Kennedy R., Lee H.A., Morgan M.R., 2000, Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B₁. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 5097-5104.

Deijns A.J., Egmond H.P. van, Speijers G.A.J., Loveren H. van, 1994. Immunotoxiciteit van natuurlijke toxinen. Een literatuur overzicht. RIVM-rapport 388802007, 16-17. Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P., 1993, Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.*, **57**: 595-604.

Dewey F.M., Banham A.H., Priestley R.A., Martin B., Hawes C., Phillips S.I., Wareing P.W., 1993, Monoclonal antibodies for the detection of spoilage fungi. *Inter. Biodeterior. Biodegrad.*, **32**: 127-136.

DONtest TAG, VICAM, Watertown, MA, USA.

Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P., Nicholson P., 1999, *Fusarium* ear blight of wheat: The use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control. *Plant Pathol.* (Oxford) **48**: 209-217.

Edwards S.G., Pirgozliev S.R., Hare M.C., Jenkinson P., 2001, Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1575-1580.

Egmond van H., 2000, CEN Doc Nr CEN/TC275/WG5 N239.

Engvall E., Perlmann P., 1971, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.*, **8**: 871-874.

Eriksen G.S., Alexander J. (eds.), 1998. *Fusarium* toxins in cereals – a risk assessment. Nordic Council of Ministers; TemaNord 1998: 502, 7-27 and 45-58; Copenhagen.

Ernährungsdienst, 2001, Getreide wird zum Lebensmittel. *Agrarzeitung Ernährungsdienst*, **75**: 2.

EU-Weissbuch der Lebensmittelsicherheit (2000)

http://europa.eu.int/comm/food/fs/intro/index_de.html

Fagerstam L.G., Frostell-Karlssoon A., Karlsson R., Persson B., Ronnberg I., 1992, Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding-site and concentration analysis, *J. Chromatogr.*, **597**: 397-410.

Faloon F., Weiss S., Ferre F., Mullis K., 1990, Direct detection of HIV sequences in blood: highgain polymerase chain reaction. 6th Int'l. Conf. AIDS, San Francisco, CA; Abstract number 1019.

Fernandez C., Stack M.E., Musser S.M., 1994, Determination of deoxynivalenol in 1991 U.S. winter and spring wheat by high-performance thin-layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **77**: 628-630.

Fiandaca M.J., Hyldig-Nielsen J, Gidda, B.D., Coull J.M., 2001, Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis. *Genome Res.*, **11**: 609-613.

Findlay J. B., Atwood S. M., Bergmeyer L., Chemelli J., Christy K., Cummins T., Donish W., Ekeze T., Flavo J., Patterson D., Puskas J., Quenin J., Shah J., Sharkey D., Sutherland J. W. H., Sutton R., Warren H., Wellman J., 1993, Automated closed-vessel system for in vitro diagnostics based on polymerase chain reaction. *Clin. Chem.*, **39**: 1927-1933.

Fischer S., 2001, Blasenbildung von in Flüssigkeiten gelösten Gasen. *Dissertation*, Technische Universität München, Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde.

Forsell J.H., Jensen R., Tai J.H., Witt M., Lin W.S., Pestka J.J., 1987, Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F₁ mouse. *Food Chem. Toxicol.*, **25**: 155-162.

Fritz B., Färber W.U., Wille B., 1993, Kontaminationsvermeidung bei Mikroliterpipetten durch Verwendung spezieller Pipettenspitzen. *Krh.-Hyg.+Inf.verh.* **15**

Gaag van der B., Stigter E., Duijn van G., Bleeker H., Hofstra H., Wahlström L., 1998, Application development on BIACORE for the detection of mycotoxins in food and feed. <http://www.biacore.com/keyareas/pdf/Mycotoxin2.pdf>.

Gaag van der B., Stigter E., Spath S., Veen van S., Schans M., 2001, Development of a biosensor allowing reliable and fast detection of mycotoxins, Proceedings of 28th EBC Congress, Budapest 2001 (CD-ROM)

Gan Z., Marquardt R.R., Clear R.M., 1997, The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzym-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Int. J. Food Microbiol.*, **38**: 191-200.

Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Theil P.G., Horak R.M., Vleggark R., Kriek N.P.J., 1988, Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 1806-1811.

Gessner M.O., Schmitt A.L., 1996, Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 415-419.

Grimm C., Geisen R., 1998. A PCR-ELISA for the detection of potential fumonisin producing *Fusarium* species. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**: 456-462.

Haikara A., Sarlin T., Nakari-Setälä T., Penttilä M., 1999, Method for determining a Gushing faktor for a beverage. PCT Patent WO 99/54725.

Hellwege K.H., 1988, Einführung in die Festkörperphysik, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 442-452.

Hock B., Immunochemical assay of environmental pollutants using pesticides as an example. in: Hock B., Nießner R., Immunochemical detection of pesticides and their metabolites in the water cycle. DFG Research Report, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 3-24.

Hohn T. M., Desjardins A. E., McCormick S. P., 1995, The *tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, **248**: 95-102.

Homdork S., Fehrmann H., Beck R., 2000, Effects of field application of tebuconazole on yield, yield components and the mycotoxin content of *Fusarium*-infected wheat grain. *J. Phytopathol.*, **148**: 1-6.

Homdork S., Fehrmann H., Beck R., 2000, Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat grain. *J. Phytopathol.*, **148**: 7-15.

Huff W.E., Doerr J.A., Hamilton P.B., Vesonder R.F., 1981, Acute toxicity of vomitoxin (deoxynivalenol) in broiler chickens. *Poultry Sci.*, **60**: 1412-1414.

IARC, 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Vol. 56: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 397-333; Lyon.

IRMM, 2002, <http://www.irmm.jrc.be/mrm.html>

Iverson F, Armstrong C, Nea E, Truelove J, Fernie S, Scott PM, Stapley R, Hayward S, Gunner S, 1995, Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **15**: 283-306.

JECFA, 2001, <http://www.fao.org/es/ESN/Jecfa/Jecfa.htm>

Jelen H.H., Mirocha C.J., Wasowicz E., Kaminski E., 1995, Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sabucinum* strains with different abilities to synthesized trichothecenes. *App. Environ. Microbiol.*, **61**: 3815-3820.

Josephs R.D., Krska R., Grasserbauer M., Broekaert J.A.C., 1998, Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A*, **795**: 297–304.

Jukes D., 1999, EU Food Law News. Department of Food Science and Technology, University of Reading, UK.

Jungar C., Strandh M., Ohlson S., Mandenius C.F., 2000, Analysis of carbohydrates using liquid chromatography-surface plasmon resonance immunosensing systems. *Anal. Biochem.* **281**: 151–158.

Kamimura H., Nishijima M., Saito K., Yasuda K., Ibe A., Nagayama T., Ushiyama H., Naoi Y., 1979, The decomposition of trichothecene mycotoxins during food processing. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **20**: 352-357.

Kamphuis H.J., Notermans S., Veeneman G.H., van Boom J.H., Rombouts F.M., 1989, A rapid and reliable method for the detection of moulds in foods: Using the Latex Agglutinations Assay. *J. Food Protect.*, **52**: 244-247.

Katz E. D., 1996, Quantitation and purification of polymerase chain reaction products by high-performance liquid chromatography. *Mol. Biotech.* **6**: 79-86.

Kellogg D. E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P. D., Chenchik A., 1994, TaqStart Antibody: hot start PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *BioTechn.*, **16**: 1134-1137.

Keshri G., Magan N., 2000, Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *J. App. Microbiol.*, **89**: 825-833.

Khera K.S., Whalen C., Angers G., Vesonder R.F., Kuiper-Goodman T., 1982. Embryo-toxicity of 4-deoxynivalenol (Vomitoxin) in mice. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **29**: 487-491.

Khera K.S., Arnold D.L., Whalen C., Angers G., Scott P.M., 1984. Vomitoxin (4-deoxynivalenol): effects on reproduction of mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **74**: 345-356.

Khera K.S., Whalen C., Angers G., 1986. A teratology study on Vomitoxin (4-deoxynivalenol) in rabbits. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 421-424.

Kretzschmann E., Raether H., 1968, Radiative decay of non-radiative surface plasmons by light, *Z. Naturforsch.*, **23**: 2135.

Kretzschmann E., 1971, Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen, *Z. Phys.* **241**: 313-324.

Krone J.R., Nelson R.W., Dogruel D., Williams P., Granzow R., 1997, BIA/MS interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **244**:124-132.

Krska R., Baumgartner S., Josephs R., 2001, The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371**: 285-299.

Lacey J., 1989, Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **18**: 11-25.

Lake B.G., Phillips J.C., Walters D.G., Bayley D.L., Cook M.W., Thomas L.V., Gilbert J, Startin J.R., Baldwin N.C.P., Bycroft B.W., Dewick, P.M., 1987, Studies on the metabolism of deoxynivalenol in the rat. *Food Chem. Toxicol.*, **25**: 589-592.

Lauren D.R., Greenhalgh R., 1987, Simultaneous analyses of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**: 479-483.

Lawrence C.R., Martin A.S., Sambles J.R., 1992, Surface plasmon polariton studies of highly absorbing Langmuir-Blodgett films, *Thin Solid Films.*, **208**: 269.

Lepschy J., 2000, Die häufigsten Fusarientoxine in Getreide – Analytik, Toxikologie, Grenzwerte in: Risiken durch Ährenparasiten *Fusarium graminearum* - Ergebnisse eines LPB-Forschungsverbundes, Schriftreihe der Bayrischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, **4**: 27-32.

Liedberg B., Nylander C., Lundström I., 1983, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sens. Actuators*, **4**: 299-304.

Löfås S., Johnsson B., 1990, A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **21**: 1526.

Logrieco A., 1997, Toxigenic fungi: List of fungal cultures and their secondary metabolites. The toxigenic fungi unit Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.) Bari, Italy

Longo M. C., Berninger M. S., Hartley, J. L., 1990, Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, **93**: 125-128.

Lottspeich F., Zorbas H., 1998, Bioanalytik, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.

Lyttelton M. P. A., Hart S., Ganeshaguru K., Hoffbrand A. V., Mehta, A. B., 1994, Quantification of multidrug resistant MDR1 transcript in acute myeloid leukaemia by non-isotopic quantitative cDNA polymerase chain reaction. *Brit. J. Haematol.*, **84**: 540-546.

Magan, M., Lacey J., 1988, Ecological determinants of mould growth in stored grain. *Int. J. Food Microbiol.*, **7**: 245-256.

Maggiolini M., Donze O., Picard D., 1999. A non-radioactive method for inexpensive quantitative RT-PCR. *Biol. Chem.*, **380**: 695-697.

Malmqvist M., 1993, Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics, *Curr. Opin. Immunol.*, **5**: 282-286.

Malone B.R., Humphrey C.W., Romer T.R., Richard J.L., 1998, One-step solid-phase extraction cleanup and fluorometric analysis of deoxynivalenol in grains. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **81**: 448-452.

Mannon J., Johnson E., 1985, Fungi on the farm. *New Sci.*, **105**: 12-16.

Manz A., 1997, Ultimate speed and sample volumes in electrophoresis, *Biochem. Soc. Trans.*, **25**: 278-281.

Marasas W.F.O., Nelson P.E., Toussoun T.A., 1984, Toxigenic *Fusarium* species: Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.

Martin R., 1996, Elektrophorese von Nukleinsäuren, Reihe Labor im Fokus, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.

McCormick S. P., Alexander N. J., Trapp S. E., Hohn T. M., 1999, Disruption of *TRI101*, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 5252–5256.

McCormick S. P., Hohn T. M., Desjardins A. E., 1996, Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-*O*-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 353–359.

Miedaner T., Reinbrecht C., Schilling A.G., 2000, Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *J. Plant Dis. Protect.*, **107**: 124-134.

Mirocha C.J., Kolaczowski E., Xie W., Yu H., Jelen H.H., 1998, Analysis of deoxynivalenol and its derivatives (batch and single kernel) using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 1414–1418.

Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande, 2001, Product Information: SYBR[®] Green I

Molecular Probes Europe BV, 2001, PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Reagent and Kits: *Produktinformation*: 1-4.

Molto G., Samar M.M., Resnik S., Martinez E.J., Pacin A., 2000, Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment. *Food Add. Contamin.*, **17**: 809-13.

Morgan M.R.A., 1989, Mycotoxin immunoassays: with special reference to ELISAs. *Tetrahedron*, **45**: 2237–2249.

Morrissey R.E., Norred W.P., Vesonder R.F., 1985, Subchronic toxicity of Vomitoxin in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.*, **23**: 995-999.

Morrissey R.E., Vesonder R.F., 1985, Effect of deoxynivalenol (Vomitoxin) on fertility, pregnancy, and postnatal development of Sprague-Dawley rats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1062-1066.

Mullett W., Lai E.P., Yeung, J.M., 1998, Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Biochem.*, **258**: 161-167.

Müller H. M., Reimann J., Schumacher U., Schwadorf, K., 1998, Natural occurrence of *Fusarium* toxins in oats harvested during five years in an area of southwest Germany. *Food Add. Contamin.*, **15**: 801-806.

Mykotoxin-Höchstmengen-Verordnung [BGBl. I S. 1248] vom 02.06.1999

Newton C.R., Graham A., 1997, PCR, Reihe Labor im Focus, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.

Nicholson P., Doohan F, Rezanoor H.N., Simpson D., Smith P.H., Turner A., Weston G., 1997, Detection and quantification of individual fungal species in *Fusarium* disease complexes of cereals by polymerase chain reaction (PCR). *Cer. Res. Comm.* **25**: 477-482.

Nicholson P., Simpson Weston G.,D., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., Joyce D., 1998, Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, **53**: 17-37

Niessen L., Donhauser S., Weideneder A., Geiger E., Vogel, H., 1991, Möglichkeiten einer verbesserten visuellen Beurteilung des mikrobiologischen Status von Malzen. *Brauwelt*, **131**: 1556-1562.

Niessen L., 1993, Entwicklung und Anwendung immunochemischer Verfahren zum Nachweis wichtiger *Fusarium*-Toxine bei der Bierbereitung sowie mykologische Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) von Bieren. *Dissertation*, Technische Universität München, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwirtschaft, 118-120.

Niessen L., Böhm-Schraml M., Vogel H., Donhauser S., 1993, Deoxynivalenol in commercial beer-screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Research* **9**: 99-109.

Niessen L., Klusmann J., Vogel, R. F., 1998, Quantitative estimation of *Fusarium graminearum* DNA using a solid phase PCR assay (DIAPOPS). *J. Food Mycol.* **1**: 73-84.

Niessen L., Vogel R. F., 1998. Group Specific PCR-Detection of Potential Trichothecen-Producing *Fusarium*-Species in Pure Cultures and Cereal Samples. *System. Appl. Microbiol.*, **21**: 618-631.

Noots I., Delcour J.A., Michiels, C.W., 1998, From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Crit. Rev. Microbiol.*, **25**: 121-153.

Notermans S., Heuvelman C.J., 1985, Immunological detection of moulds in food by using the enzym-linked immunosorbent assay (ELISA); preparation of antigens. *Int. J. Food Microbiol.*, **2**: 247-258.

Notermans S., Soentoro P.S.S., 1986, Immunological relationship of extra-cellular polysaccharide antigens produced by different mould species. *Antonie van Leeuwenhoek*, **52**: 393-401.

Notermans S., Wieten G., Engel H.W.B., Rombouts F.M., Hoogerhout P., van Boom J.H., 1987, Purification and properties of extracellular polysaccharide (EPS) antigens produced by different mould species. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**: 157-166.

Nygren J., Svanvik N., Kubista M., 1998, The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers*, **46**: 39-51.

Olsson J., Börjesson T., Lundstedt T., Schnürer J., 2002, Detection and quantification of ochratoxin A and deoxinivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.*, **72**: 203-214.

Park J.J., Chu F.S., 1996, Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **79**: 465-471.

Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L., 1995, *Fusarium* ear blight (scab) in cereals-a review. *Plant. Pathol.*, **44**: 207-238.

Patentschrift US 4,683,202, Process for amplifying nucleic acid sequences. (1992).

Patentschrift U. S. 5,338,671, TaqStart™ Antibody.

Patentschrift US 5,436,134, Cyclic-substituted unsymmetrical cyanine dyes. (1993).

Patentschrift US 5, 487, 972, Nucleic acid detection by the 5'-3' exonuclease activity of polymerases acting on adjacently hybridised oligonucleotides. (1993).

Patentschrift WO 00/47732, Method for fractionating double-stranded nucleic acids in solutions in order to obtain single-stranded nucleic acids. (1999).

Patentschrift WO 99/31276, Homogenous detection of a target through nucleic acid ligand-ligand beacon interaction. (1997).

Patentschrift WO99/21881, Methods, kits and compositions pertaining to linear beacons. (1999).

Perkowski J., Kiecana I, Schumacher U., Muller H.M., Chelkowski J., Colinski P., 1996, Head blight and biosynthesis of fusarium toxins in barley kernels field inoculated with *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **102**: 491-496.

Pettersson H, 1998, Intercomparison of thricothecene analysis and feasibility to produce certified calibrants and reference materials, EUR-Report no. 18214 EN, Brussels, BE, ISBN-92-828-3224-4.

Piehler J., Brecht A., Gauglitz G., 1996, Affinity detection of low molecular weight analytes. *Anal. Chem.*, **68**: 139-143.

Piehler J., 1997, Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern. *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Piehler J., Brecht A., Giersch T., Hock B., Gauglitz G., 1997, Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Methods*, **201**: 189-206.

Pierce Tech Tips, 2002, Use EDC to selectively biotinylate carboxyl groups with biotin hydrazides. <http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=Page&ID=9F38B509-1300-4523-AB49-5DB879D3DECA>

Pieters M.N., Fiolet D.C.M., Baars A.J., 1999. Deoxynivalenol. Derivation of concentration limits in wheat and wheat containing products. RIVM report 388802018, Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, The Netherlands.

Pitt J.I., Hocking A.D., 1997, Fungi and food spoilage. Second edition, Blackie Academic & Professional.

Precht M., 1987, Bio-Statistik, 4., erweiterte Auflage, R. Oldenbourg Verlag München Wien.

Precht, M., Kraft, R., 1993, Bio-Statistik 2, 5., völlig überarbeitete Auflage, R. Oldenbourg Verlag München Wien.

Prelusky D.B., Veira D. M., Trenholm H.L., 1985, Plasma pharmacokinetics of the mycotoxin deoxynivalenol following oral and intravenous administration to sheep. *J. Environ. Sci. Health. B*, **20**: 603-634.

Preslusky D.B., Veira D.M., Trenholm H.L., Hartin K.E., 1986, Excretion profiles of a mycotoxin deoxynivalenol, following oral and intravenous administration to sheep. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **6**: 356-363.

Prickett A.J., MacDonald S., Wildey K.B., 2000, HGCA Project report No 230. Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, Great Britain, 28 p.

Price C.P. Newman D.J. (Hrsg.), Principles and practice of immunoassay, Stockton Press, 2nd Edition, New York (1997).

Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P., 1995, Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **8**: 593-601.

Produkthaftungsgesetz – ProdHaftG Gesetz über die Haftung für fehlerhafte Produkte vom 15.12.1989 (BGBl. I S. 2198).

Quinn J., Patel P., Fitzpatrick B., Manning B., Dillon P., Daly S., O'Kennedy R., Alcocer M., Lee H., Morgan M., Lang K., 1999, The use of regenerable, affinity ligand-based surfaces for immunosensor applications. *Biosen. Bioelec.*, **14**: 587-595.

Reutter M., 1999, Zearalenon und Deoxynivalenol in Getreide und Futtermitteln Schleswig-Holsteins: Untersuchungen aus dem Erntejahr 1998. *Proc 21st Mycotoxin Workshop*, 7–9 June 1999, Jena, Germany

Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T., 1997, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **245**: 154-160.

Roche Molecular Biochemicals, 1999, LightCycler Operator's Manual, Version 3.0, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.

Rodbard D., 1978, Statistical estimation of the minimal detectable (“sensitivity”) for radioligand assays. *Anal. Biochem.*, **90**: 1-12.

Romer Labs, 1999, AccuTox DON Quantitative Method, Ver. **99**:1–4.

Romer T.R., 1986, Use of small charcoal alumina cleanup columns in determination of trichothecene, mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**: 699-703.

Römpp Chemie Lexikon, 1995, 9., korrigierte und verbesserte Auflage des Römpp Chemie Lexikons auf CD-ROM, Version 1.0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Rood H.R., Buck W.B., Swanson S.W., 1988, Gas-Chromatographic screening method for T-2 Toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, and related trichothecenes in feeds, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 493-498.

Rotter B.A., Thompson B.K., Lessard M., Trenholm H.L., Tryphonas H., 1994, Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **23**: 117-124.

Rotter B.A., Thompson B.K., Lessard M., 1995, Effects of deoxynivalenol-contaminated diet on performance and blood parameters in growing swine. *Can. J. Anim. Sci.*, **75**: 297-302.

Rotter B.A., Prelusky D.B., Pestka J.J., 1996. Toxicology of deoxynivalenol (Vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**: 1-34.

Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, **239**: 1350-1354.

Sano A., Matsutani S., Suzuki M., Takitani S., 1987, High performance liquid chromatographic method for determining trichothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.*, **410**: 427-436.

Schaafsma A.W., Miller J.D., Savard M.E., Ewing R.J., 1993, Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid and species of *Fusarium*. *Can. J. Plant Pathol.*, **15**: 185-192.

Scheller F.W., Schubert F., 1989, Biosensoren, Birkhäuser-Verlag, Basel, Schweiz.

Schneider L., Pichler H., Krska R., 2000, An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **367**: 98-100.

Schnürer J., Olsson J., Börjesson T., 1999, Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Gen. Biol.*, **27**: 209-217.

Schuhmacher R., Apfalter S., Krska R., Grasserbauer M., 1996, Qualitätssicherung bei der Einführung eines Analysenverfahrens zur Bestimmung des Mykotoxins Deoxynivalenol in Getreide. Proc Österr. Lebensmittelchemikertage 1996.

Schwabe M., Rath F., Golomb A., Engels R., Krämer J., 1993, Immunologischer Schnellnachweis von *Fusarium* in Getreide. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **11**: 408-412.

Schwabe M., Fenz R., Engels R., Krämer J., Rath F., 1994, Nachweis von *Fusarium* auf Braugerste mit dem EPS-Latex-Agglutinations-Test. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **5**: 160-164.

Scientific Committee on Food (SCF) (1998). Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A (expressed on 17 september 1998). *SFC Outcome of discussions*, **14**: 1-8, Brüssel, Directorate General 24

Scott P.M., Kanhere S.R., Weber D., 1993, Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Add. Contamin.*, **10**: 381-389.

Sharkey D., Scalice E., Christy K., Atwood S. M., Daiss J. L., 1994, Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *BioTechnol.*, **12**: 506-509.

Sigg H.P., Mauli R., Flury E., Hauser D., 1965, Die Konstitution von Diacetoxyscirpenol. *Helv. Chim. Acta.*, **48**: 962-988.

Simpson P.C., Roach D., Wooley A.T., Thorsen T., Johnston R., Sensabaugh G.F., Mathies R.A., 1998, High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 2256-2261.

Sintov A., Bialer M., Yagen B., 1987, Pharmacogenetics of T-2 tetraol, a urinary metabolite of a trichothecene mycotoxin, T-2 toxin, in dogs. *Xenobiotica*, **17**: 941-950.

Smith J.E., Moss M.O., 1985, *Mycotoxins – formation, analysis and significance*. John Wiley & Sons, New York, 31-33.

Smith J.E., Lewis C.W., Anderson J.G., Solomons G.L., 1994, *Mycotoxins in human health*. Report EUR 16048 EN. European Commission, Directorate-General XII. Brussels.

Stemmler I., 1999, Miniaturisierte Affinitätsanalytik-Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion. *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Stenberg E., Persson B., Roos H., Urbaniczky C., 1991, Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Coll. Interf. Sci.*, **143**: 513-526.

Stryer L., 1996, Biochemie (4. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.

Suty A., Mauler-Machnik A., Courbon R., 1996, New findings on the epidemiology of fusarium ear blight on wheat and its control with tebuconazole. In: Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases, Volume 2, 511-516.

Suzhen L., Marquardt R.R., Abramson D., 2000, Immunochemical detection of molds: a review. *J. Food. Protect.*, **63**: 281-291.

Svanvik N., Westmann G., Wang D., Kubista M., 2000, Light-Up Probes: Thiazole orange-conjugate peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution. *Anal. Biochem.*, **281**: 26-35.

Swanson S.P., Dahlem A.M., Rood H.D., Cote L.M., Yoshizawa T., 1986, Gas Chromatographic analyses of milk for deoxynivalenol and its metabolite DOM-1, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**: 41-43.

Sweeney M.J., Dobson A.D.W., 1998, Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *Int. J. Food Microbiol.*, **43**: 141-158.

Sylvia V.L., Phillips T.D., Clemint B.A., Green J.L., Kubena L.F., Heidelbaugh N.D., 1986, Determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection *J. Chromatogr.*, **362**: 79-85.

Tacke B.K., Casper H.H., 1996, Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **79**: 472–475.

Tamm Ch., Tori M., 1984, in V. Betina (Editor), *Mycotoxins-Production, Isolation, Separation and Purification*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 131.

Tanaka T., Yoneda A., Inoue S., Sugiura Y., Ueno Y., 2000, Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **882**: 23–28.

Tautz D., Renz M., 1982, An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.*, **132**: 14-19.

Texas Instruments, <http://www.ti.com/sc/docs/products/msp/control/spreeta/>

Thrane U., 1989, *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. In: Chelkowski Y., ed., *Fusarium* mycotoxins taxonomy and pathogenicity, Amsterdam, Elsevier, 199-225.

Thuring R.W.J., 1975, A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal. Biochem.*, **66**: 213-220.

Trucksess M.W., Page S.W., Wood G.E., Cho T.H., 1998, Determination of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran by solid-phase extraction/liquid chromatography: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **81**: 880–886.

Tryphonas H., Iverson F., Ying So E.A., McGuire P.F., O'Grady L., Clayson D.B., Scott P.M., 1986, Effects of deoxynivalenol (Vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice. *Toxicol. Lett.*, **30**: 137-150.

Turner W.B., 1975, Biosynthetic origins of mycotoxins. *Int. J. Environ. Stud.*, **8**: 159-164.

Ueno Y., 1977, Mode of action of trichothecenes. *Ann. Nutr. Aliment.*, **31**: 88-900.

-
- Ueno Y., 1985, The toxicology of mycotoxins. *CRC Crit. Revs. Toxicol.*, **14**: 99-132.
- Usleber E., Renz V., Märtlbauer E., Terplan G., 1992, Studies on the application of enzyme immunoassays for the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone. *J. Vet. Med. B*, **39**: 617–627.
- Velleman S. G., 1995, Quantifying immunoblots with a digital scanner. *BioTechniques*, **18**: 1056-1058.
- Veldman A., Borggreve G.G., Mulers E.J., Van de Lagemaat D., 1992, Occurrence of the mycotoxins ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in feed components. *Food Add. Contam.*, **9**: 647–655.
- Veratox test, Neogene Corporation, 1998, USA/Canada.
- VERORDNUNG (EWG) Nr. 315/93 DES RATES vom 8. Februar 1993 zur Festlegung von gemeinschaftlichen Verfahren zur Kontrolle von Kontaminanten in Lebensmitteln
- Vesonder R.F., Ciegler A., Jensen A.H., 1973, Isolation of a emetic principle from *Fusarium* infected corn. *Appl. Microbiol.*, **16**: 1008-1010.
- Visconti A., Bottalico A., 1983, Detection of *Fusarium* trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, fusarenone and 3-acetyldeoxynivalenol) by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **17**: 97-100.
- Visconti, A., Chelkowski, J., Bottalico, A., 1986, Deoxynivalenol and 3- acetyldeoxynivalenol – mycotoxins associated with wheat head fusariosis in Poland. *Mycotoxin Research*, **2**: 59-64.
- Walker G. T., Little M. C., Nadeau J. G., Shank D. D., 1992, Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**: 392–396.

Walter N. G., Strunk G., 1994, Strand displacement amplification as an *in vitro* model for rolling-circle replication: deletion formation and evolution during serial transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 7937–7941.

Wang Y.Z., Miller J.D., 1988, Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to Fusarium head blight resistance. *J. Plant Pathol.*, **122**: 118-125.

Ware G.M., Francis O.J., Carman A.S., Kuan S.S., 1986, Gas Chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat with electron capture detection: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**: 899-901.

Weil L., Nießner R., Schneider R., Ruppert T., Weller M., 1995, Validation of immunoassay for determination of triazine herbicides. in: Hock B., Nießner R., Immunochemical detection of pesticides and their metabolites in the water cycle. DFG Research Report, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 43-62.

Weiss N., 1999, Elementary Statistics, 4th edition, Addison-Wesley Boston.

Wessels J.G.H., 1996, Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends Plant Science*, **1**: 9-15.

Whitecombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T., Little S., 1999, Detection of PCR products using selfprobing amplicons and fluorescence, *Nat. Biotech.*, **17**: 804-807.

Wiersma J.V., Peters E.L., Hanson M.A., Bouvette R.J., Busch R.H., 1996, Fusarium head blight in hard red spring wheat: cultivar responses to natural epidemics. *Agron. J.* **88**: 223-230.

Windels C.E., 2000, Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the northern great plains. *Phytopathology* **90**: 17-21.

Winklmaier M., Weller M.G., Mangle J., Schlosshauer B., Niessner R., 1997, Development of a high sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **358**: 614-622.

Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.T., 1997, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, **22**: 130-138.

Wittwer C.T., Ririe K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J., 1997, The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques*, **22**: 176-181.

Wösten H.A.B., Schuren F.H.J., Wessels J.G.H., 1994, Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.*, **13**: 5848-5854.

Xu Y.C., Zang G.S., Chu F.S., 1988, Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn and wheat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 945-949.

Xu J.R., Yan K., Dickman M.B., Leslie J.F., 1995, Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**: 74-84.

Yong R.K., Cousin M.A., 1995, Non-specific enzym-linked immunosorbent assay for moulds in foods. *J. Food Sci.*, **60**: 1363-1375.

Yoshizawa T., Morooka N., 1973, Deoxynivalenol and its monoacetate: New mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agric. Biol. Chem.*, **37**: 2933-2934.

Yoshizawa T., Takeda H., Ohi T., 1983, Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.*, **47**: 2133-2135.

Zill G., Engelhardt G., Wallnofer P.R., 1988, Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **187**: 246-249.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1999 bis Februar 2002 am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München in Weihenstephan angefertigt.

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rudi F. Vogel für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die fruchtbaren Diskussionen.

Ganz besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch Herrn Dr. Ludwig Niessen, der mich an das Thema herangeführt hat und durch dessen Engagement und dem von ihm gestellten Forschungsantrag diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht wurde. Außerdem bedanke ich mich für den regen Austausch an fachlichen Informationen, seine Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Frau Dr. Annette Matthies, BASF AG Agrarzentrum Limburgerhof, danke ich für die Überlassung von Probenmaterial und entsprechenden Daten.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF), über die das Forschungsvorhaben aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft gefördert wurde.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls. Durch das hervorragende Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft haben sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Frau Silke, die immer Verständnis für meine Arbeit aufgebracht und mir auch in schwierigen Situationen fest zur Seite stand.