



# Evaluation and optimization of four real-time PCRs, using TaqMan-probes, for detection of and discrimination between barley, oat, rye and wheat



Kristofer Björklund

# Innehållsförteckning

ABSTRACT	3
INTRODUKTION	4
MATERIAL	6
Laboratorieutrustning och kemikalier	6
Frömaterial	7
Primers och prober	7
METOD	8
Provberedning	8
Isolering av DNA	8
Koncentrationsbestämning av DNA	9
PCR	9
Inledande funktionstest	11
Primeroptimering	11
Probeoptimering	11
Specificitet	11
Selektivitet	12
Detektionsgräns (LOD - Limit of Detection)	12
Amplifieringseffektivitet	12
RESULTAT	13
DNA-extraktion	13
Val av målgener samt design av TaqMan® primer och probesystem	13
Resultatbearbetning	13
Inledande funktionstest	14
Primeroptimering	15
Probeoptimering	15
Specificitet	15
Selektivitet	17
Detektionsgräns (LOD – Limit of Detection)	18
Amplifieringseffektivitet	19
DISKUSSION	20
ACKNOWLEDGEMENTS	22
REFERENSER	23

# ABSTRACT

Coeliac disease is a chronic inflammatory disease treated with a gluten-free diet, excluding barley, rye and wheat. Hence, there is a demand for methods able to detect gluten in foods in order to ensure correct labeling of products. According to the Codex Alimentarius Commission, 20ppm gluten is the maximum amount allowed in food labeled gluten-free.

PCR can detect DNA from cereals in food. Four real-time PCR-systems, using TaqMan®-probes for detection of barley, oat, rye and wheat were optimized and evaluated. Evaluations were carried out using seeds. Primers were targeted to genes coding for prolamines, seed storage proteins. PCR-systems targeted to barley, oat and wheat were shown to be specific for the cereals corresponding to each system. The system targeted to rye showed cross-reactions with durum wheat and spelt wheat. Detection limits were 50pg, corresponding to <10 haploid genome copies for each cereal. All systems were able to detect 250ppm amounts of DNA, most likely even smaller amounts are detectable. All systems showed an amplification efficiency of  $\geq 95\%$ .

Systems for detection of barley, oat and wheat are ready for further evaluation, using food products as samples. The rye system however, needs to be re-designed before further evaluation can take place.

## Keywords:

Gluten containing cereals, coeliac disease, cereal-specific analysis, Gluten-free food, polymerase chain reaction

# INTRODUKTION

Celiaki är en kronisk inflammatorisk sjukdom som orsakas av intolerans mot gluten, proteiner i vete och besläktade proteiner i korn och råg. Sjukdomen är i stor utsträckning ärftlig. Hos syskonpar där det ena syskonet är drabbat är risken att drabbas av celiaki 20-60% högre för det andra syskonet jämfört med risken hos normalbefolkningen. Hos monozygota tvillingar är konkordansen 75%, dvs. hög. Celiaki är knutet till vävnadstyperna HLA-DQ2 och, i en viss utsträckning, HLA-DQ8. Den kroniska inflammationen leder till atrofi i tunntarmen och ökad mängd lymfocyter i tunntarmens lamina propria (1). Uppskattningsvis drabbas 0,5% -1,26% av befolkningen i Västeuropa och Nordamerika. Norra Europa tenderar att ha något högre prevalens, 1%-1,5%. Antalet ej diagnostiserade fall tros vara stort, främst i den vuxna delen av befolkningen (2). I Sverige ökade antalet barn i åldersgruppen 0-2 år som fick diagnosen celiaki drastiskt från mitten av 1980-talet fram till mitten av 1990-talet, då det skedde en snabb nedgång i statistiken över antalet nyställda diagnoser. Ökningen samt nedgången tros kunna förklaras med ändringar i kostrekommendationer angående introduktion av gluten i kosten. I början av 80-talet introducerades stora mängder gluten hastigt vid avvänjning. I början av 90-talet ändrades rekommendationerna så att gluten introducerades i små mängder under fortsatt amning (3).

Debutålder liksom symtom vid celiaki varierar. Typiska symtom hos barn är malabsorption och diarré. Atypiska symtom kan vara relaterade till malabsorption, men kan även sakna tydlig koppling till malabsorption (4). CD4<sup>+</sup> T-celler i lamina propria har konstaterats initiera ett immunsvaret mot gliadinpeptider hos celiakipatienter. Gliadin är ett av de proteiner som ingår i glutenkomplexet. Immunsvaret orsakas av en 33 aminosyror lång peptid. Denna peptid bildas genom enzymatisk digererering av gliadin som sker i tunntarmen. Peptiden skiljer sig från andra peptider genom att proteaser i mag-tarmkanalen inte kan bryta ner den till mindre peptider. Detta innebär att peptiden når tarmslemhinnan i intakt form, medan andra peptider bryts ner till aminosyror, di- eller tripeptider. Därför kan denna peptid fungera som epitop för CD4<sup>+</sup> T-celler. I peptiden finns tre aminosyrasekvenser som är kända epitoper för CD4<sup>+</sup> T-celler hos celiakipatienter. Specifika regioner i peptiden deamideras av enzymet transglutaminas. Deamideringen innebär ökad affinitet till antigenpresenterande celler med HLA-DQ2 eller HLA-DQ8 (5). En ökad kunskap om vilka peptider i gluten som fungerar som epitoper för CD4<sup>+</sup> T-celler kan leda till att nya metoder etableras för analys av glutenfria livsmedel. Kunskapen skulle också kunna ligga till grund för nya behandlingsmodeller. Traditionellt har celiaki behandlats genom att vete, råg, korn och havre uteslutits ur kosten. På senare tid har flera studier visat att celiakipatienter kan inkludera havre i kosten (6, 7, 8). Dieten är livslång och kräver stor följsamhet. I nuläget är den glutenfria dieten det enda behandlingsalternativet.

De proteiner som utgör gluten i vete tillhör gruppen prolaminer. Prolaminer är lagringsproteiner i cerealier. Dessa lagringsproteiner har stor betydelse för de egenskaper som ett sädeslag har. I vete är det glutenproteiner som ger en deg dess elastiska egenskaper. Gluten kan delas in i gliadiner- och gluteniner. Gliadinerna är monomerer och gluteninerna är polymerer. Gliadinerna delas in efter sin elektroforetiska vandring baserat på aminosyrainnehåll i  $\alpha$ -,  $\gamma$ - och  $\omega$ -gliadiner. Gluteniner delas in i högmolekylära och lågmolekylära fraktioner (10). Prolaminer i korn, råg och havre är hordein, secalin respektive avenin (9).

Hur stort dagligt glutenintag som kan tolereras varierar mellan celiakipatienter. Studier har visat att 50 mg gluten per dygn orsakar mätbara skador på tunntarmen (11). Mot bakgrund av sammansättningen hos den diet som ordineras till celiakipatienter finns uppskattningar att livsmedel som är baserade på vetestärkelse inte orsakar kliniskt detekterbara sjukdomstecken om de innehåller  $\leq 100$  mg gluten/kg (12). Om havre inkluderas i dieten är det viktigt att halten kontaminationer från korn, råg och vete inte överskrider den mängd gluten som kan tolereras (6).

Codex Alimentarius är FN:s (Förenta Nationerna) och WHO:s (World Health Organisation) organ för livsmedelsfrågor. I Codex standard för glutenfria livsmedel, Codex stan 118-1981, definieras gluten som vissa proteiner som normalt finns i vete, råg, korn och havre. Codex standard för glutenfria livsmedel definierar glutenfri som att det totala kväveinnehållet från gluteninnehållande spannmål inte ska överskrida 0,05 g per 100 g av torrvikten för en produkt. Denna gräns är satt för vetestärkelse eller liknande ingredienser. Detta motsvarar ca 300-500 mg gluten/kg livsmedel. De här gränsvärdena är baserade på en okänslig och föråldrad mätmetod (10). Codex Alimentarius har föreslagit ändringar i standarden. Dessa innebär sänkning av glutenhalten till 20 mg/kg för livsmedel som får benämnas glutenfria och en sänkning till 100 mg gluten/kg för livsmedel som får märkas låg-gluten (13).

Metoder för glutenanalys måste ta hänsyn till flera problemområden: livsmedelsprover kan vara mycket heterogena; det finns flera olika peptider som är toxiska för glutenintoleranta; mycket låga halter av peptiderna/proteinerna måste kunna detekteras; metoder ska kunna användas på både upphettade och icke-upphettade livsmedel (14). Codex Alimentarius fastslår i sin standard för glutenfria livsmedel att en sandwich-ELISA baserad på en monoklonal antikropp, R5, ska användas för att kvantitativt bestämma om ett livsmedel uppfyller kraven för att benämnas glutenfritt (13). Den monoklonala antikroppen R5 är riktad mot en pentapeptid i secalin, QQFPF (glutamin-glutamin-prolin-fenylalanin-prolin). R5 har även en mindre reaktivitet med liknande peptidsekvenser i andra spannmål. Peptiden QQFPF förekommer frekvent i gliadiner, hordeiner och secaliner. Denna metod kan detektera gliadinmängder ner till 3,2 ppm i livsmedel. Metoden kan användas för kvantifiering i både upphettade och icke-upphettade livsmedel (14). På Livsmedelsverket är metoden ackrediterad av SWEDAC (Styrelsen för ackreditering och teknisk kontroll) och används rutinmässigt. Dock kan R5 inte särskilja sädeslagen korn, råg eller vete som från varandra.

PCR-metoder har utvecklats som ett komplement till de proteinbaserade ELISA-metoderna för glutenanalys. Både konventionella PCR-metoder, där end-point analyser som t.ex. gelelektrofores används för detektion, och realtids-PCR-metoder finns beskrivna (15, 16, 17). PCR kan användas för att göra screeningar med hög känslighet efter gluteninnehållande sädeslag i livsmedel eller för att verifiera resultaten av en immunologisk metod riktad mot proteiner. PCR gör det också möjligt att avgöra vilket av sädeslagen korn, råg eller vete som ligger bakom en kontamination med gluten.

Fyra realtids-PCR metoder baserade på smältpunktsanalys har tidigare utvecklats vid Livsmedelsverket. Metoderna kan detektera och skilja på havre, korn, råg och vete. Då det gäller detektion av glutenhaltiga sädeslag i livsmedel korrelerar resultaten väl med resultat från en proteinbaserad immunologisk mätningmetod. De fyra realtids-PCR metoderna använder smältpunktsanalys med SYBR-green för detektion (17). SYBR-green binder in till dubbelsträngat DNA och avger då fluorescens. I smältpunktsanalys mäts fluorescens som funktion av temperatur. Ökad temperatur ger minskad fluorescens. Fluorescensförändringen blir därför störst då templatsträngarnas smältpunkt nås, dvs. då de separerar (18).

I TaqMan®-system däremot sker detektion med hydrolyseringsprobe. Proben är en fluorescensinmärkt oligonukleotid som är riktad mot en specifik DNA-sekvens. Proben binder in till enkelsträngat DNA. Vid syntetisering av ny sträng bryts proben ner och fluorescens avges (18).

Mitt arbete har bestått i optimering och validering av fyra TaqMan®-system för detektion av havre, korn, råg och vete. Systemen optimerades med avseende på koncentrationer av primers samt prober. Systemen validerades med avseende på specificitet, selektivitet och amplifieringseffektivitet. Valideringen innefattade även en uppskattning av detektionsgränser för respektive system.

## MATERIAL

### Laboratorieutrustning och kemikalier

- ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System, PCR-maskin, Applied Biosystems
- DNeasy® Blood and Tissue Kit, Qiagen, Cat no 69506: ATL-buffer, AL-buffer, AW1-buffer, AW2-buffer, AE-buffer, Proteinase K, minikolonner står nedan = bort
- FastPrep® FP120 homogeniseringsapparat, BIO 101 Savant Inc.
- FastPrep®-rör, BIO 101 Savant Inc.
- NanoDrop™ ND-1000, spektrofotometer, Nanodrop Technologies Inc. behövs?
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, p/n: 4304437, Applied Biosystems
- Transparenta 96-hålsplattor , Micro Amp™ Optical 96 Well Reaction plate, p/n 4306737, Applied Biosystems behövs?
- Vatten renat på jonbytare,  $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$  resistivitet behövs+
- Fluka DNA Decontamination reagent, 43944, Fluka
- Primer Express® software v2.0, Applied Biosystems

## Frömaterial

De sädeslag, som utöver havre (*Avena sativa*), korn (*Hordeum vulgare*), råg (*Secale cereale*) och vete (*Triticum aestivum*), ingick i studien valdes ut mot bakgrund av att de ingår i födan. De är också närbesläktade med de fyra ovan nämnda arterna som PCR-systemen satts upp för. Sädeslagen hirs (*Panicum miliaceum*), kamutvete (*Triticum polonicum*), majs (*Zea mays*), ris (*Oryza sativa*) och rågvete (*Triticale*) hämtades ur Livsmedelsverkets förråd. Durumvete (*Triticum durum*), durra (*Sorghum bicolor 'nigrum'*), speltvete (*Triticum spelta*) och teff (*Eragrostis tef*) köptes från Impecta Fröhandel, Julita. Samtliga arter ingår i gräsfamiljen (*Poaceae*).

## Primers och prober

Primers och prober som användes, smältpunkter samt amplikonlängden i respektive system finns i tabell 1. Målgener för havre var avenin, för korn B1hordein, för råg  $\omega$ -secalin och för vete  $\omega$ -gliadin. Samtliga, utom HVH1663F, HVH1743R, syntetiserades av TIB MOLBIOL, Berlin. HVH1663F, HVH1743R syntetiserades av Thermo Fisher Scientific, Waltham. Amplikonlängden varierade mellan 72-93 baspar.

Tabell 1. Förteckning över de primers och prober som användes för de fyra PCR-systemen, amplikonlängder för respektive system samt smältpunkter för primers och prober. Reportern 6FAM (6-karboxyfluorescein) är kovalent bunden till proben och *quencher* TAMRA (6-karboxytetrametylrhodamin).

Sädeslag	Primer	Sekvens	Amplikonlängd (bp)	Smältpunkt $T_m$ (C)	
Havre	ASA1430F	5'- GAG TAA GAA CCA GGT GCA GAT GAT AG - 3'	81	57,4	
	ASA1510R	5'- ATC CAA TGC ATG TCA GCC AAT A - 3'		57,3	
Korn	HVH1665F	5'- TTT GTA CAT CCA CCC CTT TGC - 3'	72	58,3	
	HVH1736R	5'- TTG ACG GCA GAT TCT GAA GCT - 3'		58,2	
	HVH1663F	5'- TGT TTG TAC ATC CAC CCC TTT G - 3'		81	53,9
	HVH1743R	5'- CAG GAA CTT GAC GGC AGA TTC T - 3'		54,9	
Råg	SCS9061F	5'- CAG ACG CTC GCC CGA TT - 3'	93	59,6	
	SCS9153R	5'- ACG TTC TCG GAA AAG CCA ATT - 3'		59,0	
Vete	TAG1019F	5'- TTT GAG TAG GGA GGC GAC AAA T - 3'	73	58,5	
	TAG1091R	5'- TTG CGT CGT ACT TTG GGA ATT - 3'		58,2	

Sädeslag	Probe	Sekvens	Smältpunkt $T_m$ (C)
Havre	ASA1457-Taq	5'- 6FAM - AGG TCA CAA CTC ACA AGC CTC ACC ATT AAA GA -- TMR	66,4
Korn	HVH1687-Taq	5'- 6FAM - TGT CCA GCA AAA GAA CGC CAT TTC G -- TMR	67,7
Råg	SCS9109-Taq	5'- 6FAM - CGG CCA AGC AAC ACG CCT CTC TC -- TMR	70,0
Vete	TAG1046-Taq	5'- 6FAM - TTC CCG CGC ACA ACC AGT TTG AT-- TMR	67,9

# METOD

## Provberedning

Hela frön från samtliga sädesslag, undantaget hirs, maldes till mjöl i mortel. För att förhindra kontamination diskades morteln innan malning av nytt sädesslag. På grund av problem med kontamination förfinades diskningen senare med att morteln också torkades ur med Fluka dekontaminationsreagens (Fluka), speciellt avsedd för DNA. Mjölerna förvarades i plastkärl med lock i  $-20^{\circ}\text{C}$  tills isolering av DNA utfördes. Detta för att förhindra eventuella mögelangrepp.

## Isolering av DNA

DNA isolerades genom att kombinera en modifikation av protokollet i DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen) tillsammans med homogenisering i Fastprep®-rör (Savant Inc.). Fastprep®-rör innehåller en keramikkula samt korn av grafit, vilka underlättar den mekaniska sönderdelningen. Anledningen till kombinationen är att DNeasy® Blood and Tissue Kit är avsett att användas för att isolera DNA från animaliska celler. Växtceller har cellvägg och kräver därför mer bearbetning för att cellen ska lysas än vad som krävs för lysning av animaliska celler. Provmängd och buffertvolym har anpassats för att klara att isolera DNA från vitt skilda matriser. Modifieringen har gjorts genom empiriska tester på laboratoriet.

Av respektive sädesslag vägdes 100mg in och fördes över till FastPrep®-rör. Till FastPrep®-rören sattes 720 $\mu\text{L}$  av ATL-buffert (DNeasy® Blood and Tissue Kit). ATL-bufferten lyserar celler. Innehållet homogeniserades med FastPrep® FP120 homogeniseringsapparat (Savant Inc.), nivå 4 i 40s. För att förhindra kontamination mellan rören så centrifugerades rören kort för att allt innehåll skulle hamna i botten innan lock öppnades. Sedan tillsattes 80 $\mu\text{L}$ , 20mg/mL, Proteinase K (DNeasy® Blood and Tissue Kit) och rören inkuberades på skakbord i  $55^{\circ}\text{C}$  under 1,5h. Proteinase K hydrolyserar amidbindningarna i proteiner. Det innebär att proteiner bryts ner, s.k. proteolys. Till proverna sattes sedan 400 $\mu\text{L}$  AL-buffert (DNeasy® Blood and Tissue Kit) och proverna inkuberades i  $70^{\circ}\text{C}$  i 10min följt av centrifugering, 16000g i 5min. Supernatanten flyttades till eppendorfrör och 99,5% etanol sattes till rören, slutkoncentration av etanol blev 50-53%. Isoleringen av DNA fortsattes med minikolonner. Prov applicerades, 600 $\mu\text{L}$  åt gången, i minikolonn och centrifugerades 1min vid 6000g. När allt provmaterial applicerats och centrifugerats i minikolonn tillsattes 500 $\mu\text{L}$  tvättbuffert AW1 buffert (DNeasy® Blood and Tissue Kit) och kolonnerna centrifugerades 1min vid 6000g. 500 $\mu\text{L}$  tvättbuffert AW2 buffert (DNeasy® Blood and Tissue Kit) tillsattes sedan och kolonnerna centrifugerades 3min vid 16000g. DNA eluerades från minikolonnerna genom tillsats av 50 $\mu\text{L}$  AE-buffert (DNeasy® Blood and Tissue Kit), inkubering i rumstemperatur under 1min följt av centrifugering 1min vid 6000g. Elueringen upprepades en gång. Parallellt med isoleringen följde negativa kontroller vilka behandlades som prover. Material i negativa kontroller var 100 $\mu\text{L}$  vatten renat på jonbytare.

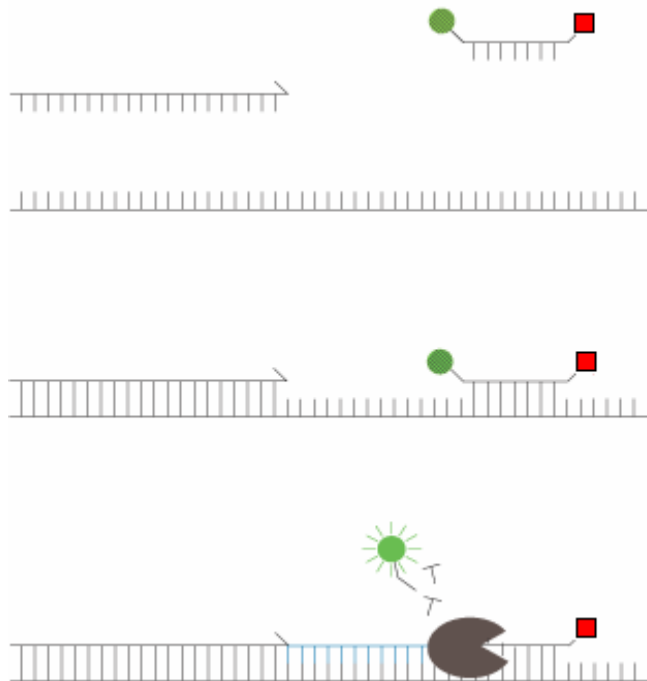


## Koncentrationsbestämning av DNA

Isolerat DNA koncentrationsbestämde med NanoDrop™-spektrofotometer (Savant Inc.). Av respektive DNA-isolat späddes 5µL med 5µL 0,4M natriumhydroxid. Detta gav enkelsträngat DNA, på vilket mätningarna utfördes. DNA-koncentrationen i proven mättes vid 260nm, parallellt med detta mättes också absorbansen vid 280nm. Renheten kontrollerades genom kvoten 260nm/280nm, vilken ska vara  $\approx 1,8$ . Lägre kvoter kan tyda på kontamination av protein. Isolerat DNA förvarades i frys, -20C.

## PCR

TaqMan® 5' nukleassystem användes för att detektera amplifierade PCR-produkter. TaqMan® 5' nukleassystem är baserat på TaqMan®-probe som är inmärkt med en reporter med hög energi kovalent bunden till probens 5'ände och en quencher med låg energi som är kovalent bunden till probens 3'ände. Mellan proben och quenchern sker energiutbyte, vilket dämpar fluorescensen från reportern. Reportern består här av fluoroforen 6FAM (6-karboxyfluorescein) som är kovalent bunden till proben och quenchern TAMRA (6-karboxytetrametylrhodamin). Om probens målsekvens finns med i provet som är föremål för PCR så binder proben in. Vid elongering med AmpliTaq Gold® DNA Polymerase kommer proben att klyvas av enzymet (Fig 1). Bindningen mellan 6FAM och TAMRA upphör och 6FAM ger ifrån sig fluorescens. Fluorescensen från 6FAM är proportionell mot mängden amplifierad PCR-produkt.



Figur 1. Principskiss över TaqMan® 5' nukleassystem. Primer och TaqMan®-probe binder in till mallen. AmpliTaq Gold DNA Polymerase digererar sedan proben. Reportern 6FAM (cirkel i figur) och quenchern TAMRA (kvadrat i figur) kommer då inte längre vara bundna till varandra. Det innebär att 6FAMs fluorescens inte längre absorberas av TAMRA. Fluorescensen från 6FAM blir proportionell mot mängden amplifierad PCR-produkt.

TaqMan®-PCR-mastermix för varje reaktion utgjordes av 5µL Forward primer i varierande koncentration, 5µL Reverse primer i varierande koncentration, 5µL TaqMan®-Probe samt 25µL 2 × TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Koncentrationer på reagenser i mastermix alternerades enligt vad som beskrivs i de individuella försöken. TaqMan® Universal Master Mix är avsett att användas i kombination med TaqMan®-prober och innehåller AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, AmpErase® UNG (uracil-N-glykosylas), dNTP (där dTTP är ersatt av dUTP), samt MgCl<sub>2</sub> och PCR-buffert. Koncentrationerna uppges inte av Applied Biosystems. AmpliTaq® Gold DNA Polymerase är ett termostabilt DNA-polymeras med 5'→3' polymerasaktivitet som har 5'→3' exonukleasaktivitet. Digerering av TaqMan®-prober under elongeringssteg medges av 5'→3' exonukleasaktivitet.

AmpErase® UNG syftar till att förhindra carry-over av PCR-produkter genom att ta bort eventuella uracil-baser som finns i enkel- eller dubbelsträngat DNA. Att ersätta dTTP med dUTP i mastermixen gör alltså att carry-over kontaminationer kan elimineras. Detta beror på att DNA normalt har dTTP, medan PCR-produkter här får dUTP, eftersom denna här har ersatt dTTP. På så sätt skiljs de från varandra och AmpErase® UNG bryter därför enbart ner kontaminationer av eventuella PCR-produkter som eventuellt finns kvar från föregående PCR-körningar, s.k. carry-over kontaminationer.

PCR kördes på ABI Prism® 7900HT. PCR utfördes i 96-hålsplatta. Samtliga prover kördes i duplikat utom i selektivitetstesterna och amplifieringseffektivitetstesterna där triplikat av prover kördes. I varje reaktionsbrunn sattes 40µL mastermix samt 10µL prov. Innan temperaturcykeln startades centrifugerades plattorna kort för att samtliga reagenser skulle hamna nere i brunnen och för att ta bort luftbubblor. Temperaturcykeln inleddes med 2min i 50°C följt av 10min i 95°C. Under de första två minuterna är AmpErase® UNG aktivt. Med ökad temperatur minskar aktiviteten hos AmpErase® UNG betydligt. Därför bryts inte nysyntetiserad PCR-produkt ner i nämnvärd utsträckning efter dessa två minuter. Under följande 10min aktiverades AmpliTaq® DNA-Polymerase. Detta är ett s.k. Hot Start® Taq-polymeras. Det innebär att polymeraset kräver lång tid i hög temperatur (här 10min i 95°C) för att aktiveras. Syftet med detta är att kunna förhindra ospecifik amplifiering och amplifiering innan temperaturcykler inletts. Detta är möjligt tack vare att polymerasets aktiveringstemperatur är betydligt högre än primrarnas smältpunkter.

Sedan kördes 45 cykler, vilka bestod av två steg, först 15s denaturering, 95°C, och sedan 1min annealing och elongering, 60°C. TaqMan®-prober kräver att PCR-cykeln enbart har två temperaturer för att de ska fungera ordentligt. Detta är inte optimalt för polymeraset (18). AmpliTaq DNA-Polymeras har temperaturoptimum vid 72°C. Temperaturen 60°C kan ses som en avvägning mellan enzymets temperaturoptimum och enzymets exonukleasaktivitet. Elongeringstiden är lång relativt mot amplikonlängden. Den långa tiden är vald med hänsyn till att digerering av proben, dvs. polymerasets 5'→3' nukleasaktivitet, är tidskrävande.

## Inledande funktionstest

Ett inledande funktionstest gjordes för att kontrollera att de primerpar och prober som hade designats i Primer Express enbart fungerade mot de sädeslag som de var avsedda för. Varje primer-probesystem testades både mot det sädeslag som det var avsett för, och mot de tre sädeslag som de övriga tre primer-probesystemen designats för. Primerkoncentrationer i PCR-mixen var 300nM och probekoncentrationerna 200nM. Till detta sattes 200ng DNA isolerat DNA från respektive sädeslag.

## Primeroptimering

För att för varje PCR-system bestämma vilka primerkoncentrationer som gav lägst  $C_t$  (Cycle threshold) samt högst  $\Delta R_n$  (fluorescens) spädde forward- och reverse-primers så att de i PCR-mixen fick koncentrationerna 50nM, 300nM och 900nM. Samtliga koncentrationer av forward- respektive reverseprimers kombinerades med varandra.  $C_t$ -värdet påverkas av mängden ursprungstemplat samt koncentrationer av primers och prober i mastermix. Primers kombinerades enligt Tabell 1. Probekoncentration var i primeroptimeringen 200nM.

## Probeoptimering

För att bestämma vilken probekoncentration som gav lägst  $C_t$  (Cycle threshold) spädde proben så att den i PCR-mixen fick koncentrationerna 50nM, 100nM, 150nM, 200nM samt 250nM. Till probeoptimeringen användes de koncentrationer av primerpar som gett lägst värden för  $C_t$  samt högst värde för  $\Delta R_n$ .

## Specificitet

Vid design av primers och prober kontrollerades teoretiskt att ingen korsreaktivitet med andra arter förekom för primers. Denna kontroll gjordes genom sökningar i databasen GenBank® med algoritmen BLASTn (NCBI Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). De fyra PCR-systemens specificitet testades för att empiriskt undersöka att ingen korsreaktivitet fanns med närbesläktade arter inom gräsfamiljen (*Poaceae*), dvs. för att kontrollera att resultaten från BLASTn-sökningen stämde överens med data som erhöles från PCR-körningar.

Primerpar och prober sattes dels till PCR-mix med DNA från det sädeslag som de var avsedda för, dels till PCR-mixar med DNA från övriga sädeslag. Mängden DNA från varje art var 200ng. För att undersöka om förekomst av något av de övriga sädeslagen kunde inhibera PCR-processen så testades även primerparen och proberna på PCR-mixar där det både förekom 20ng DNA från avsett sädeslag samt 180ng DNA från ett annat sädeslag, s.k. spikning av prover. 20ng DNA från det sädeslag som aktuellt primer- och

probesystem var avsett för mixades med 180ng DNA från soja, vilket tidigare genom empiriska tester har visats vara inhibitionsfritt. Detta prov inkluderades för att få ett mått på vilket  $C_t$ -värde ett prov med 20ng DNA bör ge i respektive system då det är inhibitionsfritt. Proverna åtföljdes av negativ extraktionskontroll samt av negativ reagenskontroll. Specificitetstesten var en utvidgning av det inledande funktionstestet. Spikade prover kunde indikera eventuella problem med inhibition.

## Selektivitet

Metodernas förmåga att selektivt identifiera det/de sädesslag som var avsett testades genom att jämföra ett prov där 30ng DNA från samtliga arter inkluderats och ett prov där 30ng DNA från varje art utom den art/de arter som PCR-systemet ifråga var riktat mot. För vetesystemet användes 50ng DNA av varje art. Färre arter testades i vetesystemet, vilket gjorde att mer behövdes av varje inkluderad art för att uppnå tillräcklig volym prov för PCR-körningen. Proven sattes i triplikat. Proverna åtföljdes av negativ extraktionskontroll i duplikat samt duplikat av negativ reagenskontroll.

## Detektionsgräns (LOD - Limit of Detection)

Minsta detekterbara mängd DNA bestämdes genom att analysera en spädningsserie med koncentrationer på DNA 2000; 200; 20 samt 2pg DNA. Lägsta detekterbara mängd bestämdes noggrannare genom att analysera spädningar kring LOD-värdet i en bakgrund av 200ng DNA från soja. Koncentrationer för den noggrannare bestämningen i sojabakgrund valdes med utgångspunkt i resultaten från omgången med spädningsserie 2000; 200; 20 samt 2pg DNA.

## Amplifieringseffektivitet

Standardkurva med  $C_t$ -värden som funktion av prov med DNA-mängderna 200; 40; 8; 1,6 samt 0,32ng togs fram för respektive system.  $C_t$ -värden plottades mot en logaritmisk skala för DNA-mängderna. Amplifieringseffektivitet beräknades ur lutningen hos standardkurvan enligt  $E = 10^{-1/\text{lutning}}$  där maximal effekt är 2, dvs. en fördubbling av antalet PCR-produkter för varje cykel. Proverna analyserades i triplikat.

# RESULTAT

## DNA-extraktion

DNA kunde utan problem extraheras ur samtliga fröer. DNA-koncentrationen i proven mättes vid 260nm. Renheten kontrollerades genom kvoten 260nm/280nm, vilken var  $\approx 1,8$ . Kvoter 260nm/280nm tydde således inte på kontaminationer av protein, eftersom kvoterna då skulle varit lägre.

## Val av målgener samt design av TaqMan® primer och probesystem

Primer- och probesystemen riktades mot gener som kodar för prolaminer, dvs. lagringsproteiner. Målgenen för havre var avenin, för korn B1hordein, för råg  $\omega$ -secalin och för vete  $\omega$ -gliadin. För dessa gener är hela den genomiska sekvensen känd, dvs. inte bara cDNA. De genomiska nukleotidsekvenserna erhöles ur databasen GenBank

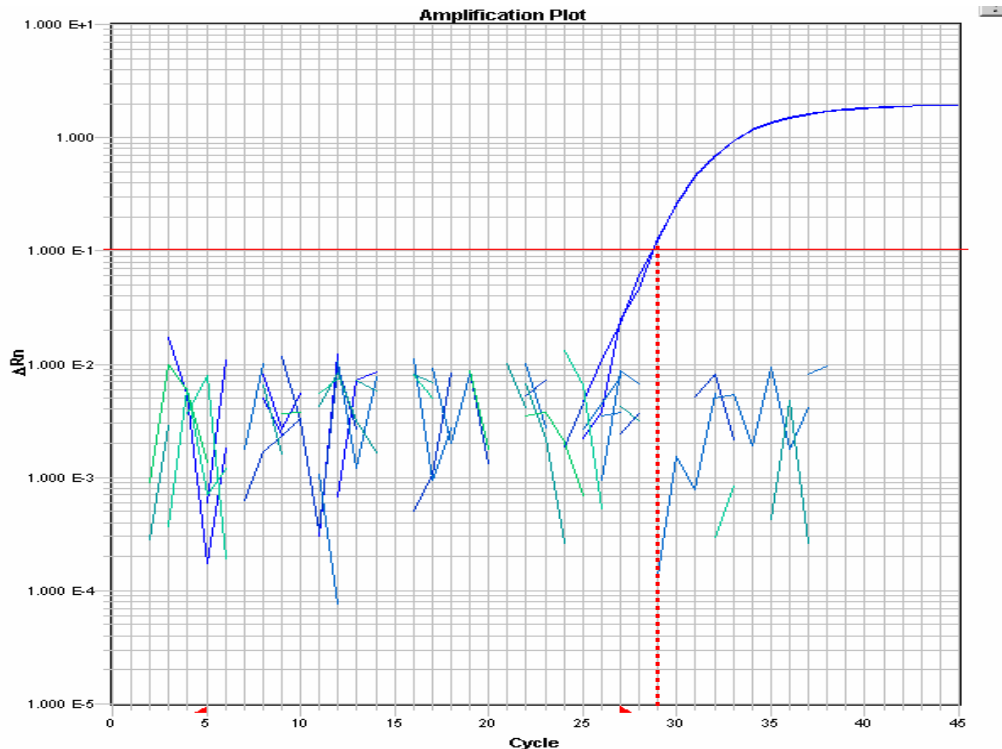
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Primer och probesystem designades utifrån erhållna gensekvenser med mjukvaran Primer Express (Applied Biosystems). Probernas smältpunkter ska vara högre än primrarnas, annars finns risk att proben inte hinner binda in innan elongeringen påbörjas (19). Primer Express indikerade inte någon överhängande risk att primers skulle binda in till varandra, s.k. primer-dimer, inte heller risk för hairpins, dvs. att en primer binder in till sig själv. Med BLASTn (NCBI Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) kontrollerades eventuell homologi med andra närbesläktade arter. Amplikonlängden hölls under 100bp eftersom detta möjliggör att även kunna använda metoden på livsmedel som upphettats och bearbetats mycket. För sekvenser på primerpar och prober, se Material.

Då primers HVH1665F och HVH1736R för korn inte fungerade bra med avseende på specificitet så syntetiserades i efterhand primerparet HVH1663F och HVH1743R. Proben, HVH1687-Taq, kunde behållas, då det är primerparen som är viktiga för specificitet (18).

## Resultatbearbetning

Mängden PCR-produkt detekteras med fluorescensförändring,  $\Delta R_n$ , som funktion av antalet temperaturcykler.  $\Delta R_n$ , fluorescensförändringen, beräknas ur skillnaden i fluorescens mellan en reaktion med samtliga beståndsdelar (dvs. det prov som man vill undersöka och där fluorescens alstras) och ett prov där ingen reaktion sker (dvs. ett nollprov där fluorescens inte alstras).  $\Delta R_n$  ökar med ökad mängd genererad PCR-produkt. Ökning av  $\Delta R_n$  sker för varje temperaturcykel, dvs. varje gång ny PCR-produkt har genererats. Ökningen av  $\Delta R_n$  sker exponentiellt i proportion till antalet tillgängliga templatsträngar, dvs. mängden genererad PCR-produkt. Efter ett tag avtar ökningen av  $\Delta R_n$  successivt, dvs. den upphör att vara exponentiell, och tillslut antar  $\Delta R_n$  ett konstant värde. Detta beror på att mängden av någon av de

reagenser som ingår i mastermixen begränsar hur många templatsträngar som kan amplifieras. Behovet av reagenser ökar efter varje temperaturcykel som gett ökad mängd amplikon.  $C_t$  (Cycle threshold) definieras som den första cykel där  $\Delta R_n$  når en angiven detektionsgräns (threshold), dvs. ett tröskelvärde. Detektionsgränsen sattes i varje reaktion så lågt som var möjligt inom den exponentiella ökningsfasen av  $\Delta R_n$ . Se Fig 2.



Figur 2. Fluorescensmätning av duplikat där bägge prov har amplifierats. Provernas mätvärden överensstämmer väl, vilket gör att de två kurvorna i figuren överlappar varandra eller ligger mycket nära varandra. På y-axeln är fluorescensförändringen,  $\Delta R_n$ , avsatt i logaritmisk skala och på x-axeln kan antal PCR-cykler avläsas. Den logaritmiska skalan innebär att exponentiell ökning sker där kurvorna är linjära. Threshold markeras med horisontell linje i bilden. Threshold sätts så lågt som möjligt i kurvans linjära fas, men inte förrän nivåerna är säkra. De brutna linjer som syns en bit under thresholdlinjen är bakgrundsfluorescens. Den vertikala streckade linjen som infogats i figuren visar var  $C_t$ -värdet ska avläsas.

## Inledande funktionstest

Primer- och probesystemet för havre (ASA1430F, ASA1510R; ASA1457-TaQ) samt primer- och probesystem för råg (SCS9061F, SCS9153R; SCS9109-TaQ) amplifierade enbart DNA från de sädeslag de var avsedda för. Primer- och probesystem för korn (HVH1665F, HVH1736R; HVH1687-TaQ) amplifierade både DNA isolerat från korn respektive från havre. Ett nytt primersystem för korn (HVH1663F, HVH1743R; HVH1687-TaQ) designades, medan probedesignten behölls från föregående system. Amplikonlängden ökades därmed från 72 baspar till 81 baspar. Applied Biosystems rekommenderar att primrars smältpunkter ska vara 58-60°C. HVH1663F och HVH1743R har smältpunkterna ( $T_m$ ) 53,9°C respektive 54,9°C. Dessa lägre

smältpunkter fungerade för kornsystemet. Systemet amplifierade enbart DNA från korn i test med DNA från havre, korn, råg samt vete. Primer och probesystem för vete (TAG1019F, TAG1091R; TAG1046-Taq) amplifierade DNA från vete men gav även en amplifiering med  $C_t$ -värde 37 i ett av duplikatproverna med havre-DNA i test med DNA från havre, korn, råg samt vete. Test med vete-DNA gav  $C_t$ -värdet 24. Det höga  $C_t$ -värdet, samt att det enbart erhöles i ett av duplikaten talar för att en kontamination orsakade det amplifierade havreprovet. Detta styrks också av att ingen amplifiering av havre-DNA skedde vid ett specificitetstest av primer och probesystemet för vete där havre-DNA ingick.

### Primeroptimering

Primeroptimering gjordes för att bestämma vilka koncentrationer av forward- respektive reverseprimer som i respektive system gav lägst  $C_t$ -värde samt högst  $\Delta R_n$ . Optimeringen gjordes genom att kombinera olika koncentrationer av forward- respektive reverseprimer med varandra. De koncentrationer av varje systems forward- respektive reverseprimer som gav lägst  $C_t$ -värde samt högst  $\Delta R_n$  var: ASA1430F 300nM, ASA1510R 300nM; HVH1663F 300nM, HVH1743R 900nM; SCS9061F 50nM, SCS9153R 300nM; TAG1019F 300nM, TAG1091R 900nM. Dessa tester gjordes med PCR-mixar med 200ng DNA från avsett sädesslag och 200nM av avsedd probe Koncentrationer är angivna i slutkoncentration av respektive primer i PCR-mix.

### Probeoptimering

Probeoptimering gjordes för att bestämma vilken koncentration av probe som för respektive system gav lägst  $C_t$ -värde. Optimeringen gjordes genom försök med olika probekoncentrationer. De koncentrationer av varje systems probe som i PCR-mix med 200ng DNA från avsett sädesslag och optimerade koncentrationer av varje systems forward- respektive reverseprimer gav lägst  $C_t$ -värde var: ASA1457-Taq 250nM; HVH1687-Taq 250nM; SCS9109-Taq 100nM; TAG1046-Taq 100nM. Koncentrationerna är angivna i slutkoncentration av respektive primer i PCR-mixen.

### Specificitet

I Tabell 3 redovisas resultat av specificitetstester där 200ng DNA från närbesläktade arter inom gräsfamiljen (*Poaceae*) testades mot de fyra primer- och probesystemen. Specificitetstestet syftade till att empiriskt undersöka förekomsten av korsreaktioner med närbesläktade arter.

Systemen för havre, korn och vete var specifika vid prövning mot de andra sädesslagen (Tabell 3). Vissa sädesslag gav initialt positiva reaktioner med höga  $C_t$ -värden. De höga  $C_t$ -värdena indikerade att små mängder DNA utgjorde amplifieringsbara ursprungstemplat. Små mängder ursprungstemplat tyder på kontamination av ursprungsmaterialet, varför nytt DNA isolerades från nytt frömaterial av dessa sädesslag. Vid ny DNA-isolering användes den

förbättrade provberedning som beskrivs under Metoder. Omkörningar med DNA från ny isolering gav negativa resultat. Därför kan resultaten från första omgången i dessa fall förklaras som kontamination. Rågsystemet var inte specifikt då det korsreagerade med durumvete och speltvete trots att nytt provmaterial beretts.  $C_t$ -värden var här också låga, vilket inte talar för kontamination. I rågsystemet var positiv reaktion för prov med DNA från rågvete väntad med tanke på homologin mellan rågvete och råg. I vetesystemet var positiv reaktion för prov med DNA från durumvete, speltvete, kamutvete och rågvete väntad med tanke på homologin mellan dessa sädeslag och vete.

Tabell 3. Resultat av specificitetstester. Prover som gav positiv reaktion, dvs. prover som amplifierades och därmed gav  $C_t$ -värden, markeras med +. Negativa prover, dvs. prover som inte amplifierades markeras med -.

Art	PCR-system			
	Havre	Korn	Råg	Vete
Havre	+	-	-	-
Korn	-	+	-	-
Råg	-	-	+	-
Vårvete	-	-	-	+
Höstvete	-	-	-	+
Durumvete	-	-	+	+
Speltvete	-	-	+	+
Kamutvete	-	-	-	+
Rågvete	-	-	+	+
Majs	-	-	-	-
Ris	-	-	-	-
Durra	-	-	-	-
Hirs	-	-	-	-
Teff	-	-	-	-
Soja	-	-	-	-
Neg.*	-	-	-	-
Blank**	-	-	-	-

\*Neg. är en extraktionskontroll på att kontamination inte skett under DNA-extraktionen.

\*\* Blank är ett blankprov där DNA-templat ersattes av vatten. Detta kontrollerar att kontamination av PCR-mix inte skett.

För att utesluta att ingen av de närbesläktade arterna kan inhibera PCR-systemen så utfördes inhibitionstest. Inhibitionstest utfördes genom spikning av prover där 20ng DNA från den art som respektive PCR-system var avsedd för blandades med 180ng DNA från en av de närbesläktade arterna. Ett sådant prov blandades till för varje närbesläktad art som skulle undersökas med avseende på inhibition. Detta gjordes för alla fyra system (Tab. 4).  $C_t$ -värden som avviker kraftigt från väntat  $C_t$ -värde tyder på inhibition. För att få en uppfattning om väntat  $C_t$ -värde för 20ng DNA i respektive system inkluderades i inhibitionstestet ett prov med 180ng soja-DNA och 20ng av den art som aktuellt PCR-system var avsett för. Det soja-DNA som användes har i tidigare tester på laboratoriet visats vara inhibitionsfritt.  $C_t$ -värdena inom respektive system var vid spikningstest inom följande intervall havre 32-34; korn 30-33; råg 26-29; vete 27-28. Ingen art visade signifikant inhibition vid jämförelse av  $C_t$ -värden med det inhibitionsfria provet som var spikat med soja-DNA. Möjligen syntes en viss förhöjning av  $C_t$ -värdet för teff-DNA i havresystemet liksom speltvete-DNA i kornsystemet (Tab 4).



Tabell 4. C<sub>t</sub>-värden i heltal efter inhibitionstest med spikade prov. Värdet anges som medelvärdet av duplikat. – markerar att arten inte testades eftersom den, med tanke på homologin, väntades ge positivt resultat i aktuellt PCR-system.

Art för inhibitions- undersökning	PCR-system + 20ng DNA (C <sub>t</sub> -värde)			
	Havre	Korn	Råg	Vete
Havre	-	30	29	28
Korn	32	-	29	28
Råg	32	30	-	28
Vårvete	32	31	28	-
Höstvete	33	31	28	-
Durumvete	32	30	28	-
Speltvete	32	33	26	-
Kamutvete	32	30	28	-
Rågvete	32	30	-	-
Majs	32	31	28	28
Ris	32	31	28	28
Durra	32	31	28	27
Hirs	32	30	28	28
Teff	34	30	29	27
Soja	32	31	28	28
Neg.*	-	-	-	-
Blank**	-	-	-	-

\*Neg. är en extraktionskontroll på att kontamination inte skett under DNA-extraktionen.

\*\* Blank är ett blankprov där DNA-templat ersattes av vatten. Detta kontrollerar att kontamination av PCR-mix inte skett.

## Selektivitet

Metodernas förmåga att selektivt identifiera det/de sädeslag som de var avsedda för testades genom att jämföra ett prov där 30ng DNA från samtliga arter inkluderades och ett prov där 30ng DNA från varje art utom den art/de arter som PCR-systemet ifråga var riktat mot, dvs. de arter som aktuellt system kan amplifiera uteslöts. För vetesystemet användes dock 50ng DNA av varje art. Färre arter testades i vetesystemet, vilket gjorde att mer behövdes av varje art för att få tillräcklig provvolym. De arter som uteslöts ur ena provet i selektivitetstest var: havre i havresystemet, korn i kornsystemet, råg och rågvete i rågsystemet respektive vårvete, höstvete, durumvete, speltvete, kamutvete och rågvete i vetesystemet. För havre, korn och vete var systemen selektiva, dvs. amplifieringen skedde endast i det av de två proverna där de för systemen avsedda sädeslagen fanns. Rågsystemet var endast selektivt då durumvete och speltvete, som gett upphov till korsreaktion i specificitetstestet, uteslutits ur det ena provet.

## Detektionsgräns (LOD – Limit of Detection)

Med en spädningsserie på 2000pg, 200pg, 20pg samt 2pg av DNA som respektive system är avsett för uppskattades detektionsgränsen. Utifrån de erhållna resultaten bestämdes detektionsgränsen i en bakgrund av 200ng soja DNA (Tabell 5). De detektionsgränser som fastställs ska betraktas som preliminära bestämningar av metodernas detektionsgränser.

Detektionsgränsen för havre uppskattas ligga mellan 20-50pg DNA. Detta motsvarar ca 2– 4 haploida genomkopior. 50pg med bakgrund av 200ng soja-DNA kan med största sannolikhet detekteras av metoden. Värt att notera är att mängder från 200pg ner till 50pg var detekterbara i 5/6 prover, medan 20pg DNA endast amplifierades i 2 av 6 prover.

Detektionsgränsen för korn uppskattas ligga mellan 20-50pg DNA. Detta motsvarar ca 4– 9 haploida genomkopior. I en bakgrund av 200ng soja-DNA har 50pg kunnat detekteras av samtliga sex prov. I en bakgrund av 200ng soja-DNA har 20pg kunnat detekteras i 4 av 9 prov. Det innebär att man inte med säkerhet kan detektera denna nivå. För korn så gjordes testet med 200ng soja-DNA som bakgrund med fler mätpunkter än motsvarande test för havre. Ett test mellan 2pg – 20pg korn-DNA med 200ng soja-DNA som bakgrund kan tyckas naturligt mot bakgrund av de resultat som det första testet gav. 2-20pg motsvarar dock ca 0,36 - 4 haploida genomkopior av korn-DNA. Området 2-20pg är för snävt och med tanke på de få körningar som gjordes kommer resultatet att bli slumpmässigt och därför osäkert för dessa låga nivåer.

För råg tillämpas samma resonemang som för korn. Test i bakgrund av 200ng soja-DNA visar på en detektionsgräns mellan 5-50pg råg-DNA. 50pg DNA amplifieras i samtliga tre prover, vilket motsvarar ca 6 haploida genomkopior. För vete ligger detektionsgränsen mellan 15-50 pg, vilket motsvarar ca 1 - 3 haploida genomkopior av vete. Med fler provomgångar skulle detektionsgränsen för vete kunna bestämmas mer noggrant. Detektionsgränsen är med nuvarande data osäker, eftersom samtliga prover amplifieras för 15pg och 50pg DNA i en bakgrund av 200ng soja-DNA, medan 20pg DNA i en bakgrund av 200ng soja-DNA enbart amplifieras i ett av proverna. Det beror på att för få tester har utförts och att det är små mängder genom som hanteras. Då får sluppen en stor inverkan.

I relativ mängd motsvarar 50pg DNA, vilket kan sägas vara den preliminära detektionsgränsen för samtliga system, 250ppm av den totala DNA-mängden. De viktdata för haploida genom som användes för att uppskatta antal haploida genomkopior som en viss vikt svarar mot erhöles för samtliga sädesslag hur databasen Plant DNA C-values Database 4.0 (<http://data.kew.org/cvalues/>).

Tabell 5. Tester av detektionsgränser för respektive system. De fyra första raderna för varje system syftar till den första analysen av detektionsgräns. Följande rader syftar till detektionsgränsbestämning i bakgrund av 200ng soja-DNA. Mängderna som togs med i bestämningen av detektionsgränsen bestämdes individuellt för varje system efter utfallet av den första detektionsgränsbestämningen.

DNA	Mängd (pg)	Antal positiva	Antal analyser
Havre	2000	6	6
Havre	200	5	6
Havre	20	2	6
Havre	2	0	6
Havre + 200ng soja	200	5	6
Havre + 200ng soja	150	5	6
Havre + 200ng soja	100	5	6
Havre + 200ng soja	50	5	6
Havre + 200ng soja	20	2	6

DNA	Mängd (pg)	Antal positiva	Antal analyser
Korn	2000	6	6
Korn	200	6	6
Korn	20	5	6
Korn	2	1	6
Korn + 200ng soja	200	6	6
Korn + 200ng soja	150	6	6
Korn + 200ng soja	100	6	6
Korn + 200ng soja	50	6	6
Korn + 200ng soja	20	4	9
Korn + 200ng soja	15	0	3
Korn + 200ng soja	10	1	3
Korn + 200ng soja	5	0	3
Korn + 200ng soja	2	0	3

DNA	Mängd (pg)	Antal positiva	Antal analyser
Råg	2000	3	3
Råg	200	3	3
Råg	20	3	3
Råg	2	0	3
Råg + 200ng soja	200	3	3
Råg + 200ng soja	150	3	3
Råg + 200ng soja	100	3	3
Råg + 200ng soja	50	3	3
Råg + 200ng soja	20	2	3
Råg + 200ng soja	15	2	3
Råg + 200ng soja	10	2	3
Råg + 200ng soja	5	2	3
Råg + 200ng soja	2	1	3

DNA	Mängd (pg)	Antal positiva	Antal analyser
Vete	2000	6	6
Vete	200	6	6
Vete	20	3	6
Vete	2	0	6
Vete + 200ng soja	200	3	3
Vete + 200ng soja	150	3	3
Vete + 200ng soja	100	3	3
Vete + 200ng soja	50	3	3
Vete + 200ng soja	20	1	3
Vete + 200ng soja	15	3	3
Vete + 200ng soja	10	1	3
Vete + 200ng soja	5	0	3
Vete + 200ng soja	2	2	3

## Amplifieringseffektivitet

Lutningen, förstagsderivatan, för en standardkurva med  $C_t$ -värden som funktion av prov med DNA-mängderna 200ng; 40ng; 8ng; 1,6ng samt 0,32ng avsatta på en logaritmisk skala gav enligt  $E = 10^{-1/lutning}$

amplifieringseffekterna;

Havre:  $E = 1,89$  med  $r^2 = 0,97$ ; Korn:  $E = 1,89$  med  $r^2 = 0,99$ ; Råg:  $E = 1,95$  med  $r^2 = 0,99$  (0,9985...); Vete:  $E = 1,93$  med  $r^2 = 0,99$ .

Maximal effekt är två, vilket motsvarar en fördubbling av antalet PCR-produkter efter en temperaturcykel. I procent uttryckt är effekterna: havre 94,5%; korn 94,5%; råg 97,5%; vete 96,5%.

## DISKUSSION

TaqMan®-system för sädeslagen havre, korn, råg och vete har optimerats samt validerats med avseende på primer- och probekoncentrationer. Systemen för havre, korn och vete visade sig inte korsreagera med närbesläktade arter inom gräsfamiljen (*Poaceae*). De tre systemen kunde också selektivt identifiera det sädeslag som de var avsedda att identifiera i en blandning med DNA från närbesläktade arter inom gräsfamiljen. För systemen riktade mot havre, korn och vete bestämdes detektionsgränserna preliminärt till 50pg. För en mer exakt bestämning krävs ett större statistiskt underlag. Mot bakgrund av projektets tidsramar har inte detta kunnat genomföras. Ett större statistiskt underlag, dvs. fler omgångar, skulle också behövas med tanke på hur stor inverkan slumpmässiga fördelningar har vid de låga koncentrationer och de få genomkopior som spädningarna innehåller.

Mängden 50pg DNA motsvarar <10 haploida genomkopior för samtliga tre sädeslag. Troligen kan även mindre mängder DNA detekteras med metoderna. Detta gäller främst för kornsystemet, där 50 pg motsvarar 9 haploida genomkopior. PCR ska teoretiskt kunna detektera en genomkopia. I en bakgrund av 200ng DNA motsvarar 50pg i relativ mängd 250ppm DNA. Genom att i PCR använda en större mängd DNA som bakgrund och behålla 50pg av det specifika DNA:t så skulle den relativa detektionsgränsen kunna sänkas. Dock ökar risken för PCR-inhibition med ökad mängd DNA. Detektionsgränserna kan inte jämföras med detektionsgränserna för proteinbaserade metoder, t.ex. den som Codex Alimentarius beskriver i sin standard. Olexová et al. visade att detektionsgränsen för en metod baserad på ett primerpar som detekterade korn, råg och vete var  $42 \pm 12$ pg. Det systemet kan dock inte påvisa vilket eller vilka av tre sädeslagen som ger upphov till ampliferingen (20).

Rågsystemet är inte specifikt trots att inga indikationer för homologi ges i BLAST-sökningar i databasen GenBank®. I specificitetstest korsreagerar rågsystemet med durumvete och speltvete. Flera utgångsmaterial av durumvete och speltvete provades.  $C_T$ -värden var låga, vilket inte talar för kontamination. Därför bör ett nytt system designas med mjukvaran Primer Express. Det nya systemet för detektion av råg bör gå igenom samma testförfarande som beskrivs i denna rapport. Vid nytt test av primers- och probesystem för råg skulle frömaterial kunna ersättas av växtmaterial, t.ex. blad, från framodlade fröer. Extraktion av DNA från framodlat växtmaterial kan eliminera problem med kontaminerat ursprungsmaterial. Sådana problem har funnits under arbetets gång och isolering av nytt DNA har krävts i dessa fall. Rena ursprungsmaterial är viktiga för att specificitetstesten ska bli adekvata. Kontamination kommer oftast från tidigare fröhantering. Nuvarande rågsystem hade en detektionsgräns på 50pg i bakgrund av 200ng soja-DNA. De prover med vilka rågsystemet inte korsreagerade visade inte på inhibition i spikningstest. Rågsystemet kunde också selektivt identifiera råg-DNA i en blandning av DNA från närbesläktade arter inom gräsfamiljen där de arter som korsreagerade hade uteslutits. Efter optimeringar av primers och prober hade systemen en amplifieringseffektivitet på minst 95%.

För att testa metodernas användbarhet bör havre, korn och vetesystemen testas mot livsmedel. Därför bör test mot livsmedel ses som en slutlig validering och utvärdering av metoden. Inhibitionsproblem kan ofta uppstå i livsmedelsprover. Inhibition kan bero förekomst av fetter, polysackarider och proteiner i DNA-isolaten (21). Bearbetning, t.ex. upphettning, av livsmedel kan också inverka på användbarheten av PCR som detektionsmetod eftersom detta kan degradera DNA (22). Med tanke på att relativt korta amplikon valdes borde inte upphettning eller annan bearbetning inverka nämnvärt på metodens användbarhet. Inhibitionsproblem har funnits i tidigare system som har utvecklats på andra laboratorer där PCR har använts för att detektera glutenhaltiga sädesslag i livsmedel.

För en kvantitativ-kompetitiv PCR (QC-PCR) syntes inhibitionsproblem för ett mjölprov samt i en barnmatsprodukt. Där upptäcktes det tack vare att det i det kompetitiva systemet syntes att varken mål-DNA eller standard DNA hade amplifierats (23). I en studie av 35 barnmatsprodukter uteblev amplifikation i 7 av produkterna. Den uteblivna amplifikationen förklarades med inhiberande innehåll i produkterna eller att DNA hade brutits ner till följd av produktionsprocessen (24). Den tidigare inhibitionsproblematiken talar för att det kan finnas behov av att kontrollera negativa resultat för att undvika att dessa är falskt negativa. Om det i rapporten validerade systemet tas i bruk skulle negativa resultat kunna kontrolleras genom spikning av de prover som genererat negativa resultat. Extraktion av DNA från främateriäl har fungerat bra med befintliga extraktionsmetoder. Eventuella extraktionsproblem för DNA från livsmedel skulle dock kunna bidra till inhibitionsproblem i systemen.

Som nämnts så har resultat från den på Livsmedelsverket tidigare utvecklade PCR-metoden med smältpunktsanalys för detektion jämförts med resultat från en immunologisk metod. Den immunologiska metoden detekterade  $\omega$ -gliadin (17). En liknande jämförelse mellan realtids-PCR baserad på TaqMan®-system och den av Codex Alimentarius föreslagna sandwich ELISA:n är givetvis intressant att göra för att undersöka hur väl metoderna korrelerar med varandra. Speciellt intressant skulle detta kunna vara för att undersöka förekomsten av glutenkontaminationer i havreprodukter, eftersom dessa numera inkluderas i den glutenfria kosten. PCR-system riktade mot korn, råg och vete skulle kunna visa vilket sädesslag som ligger bakom en eventuell kontamination. PCR kan dock inte användas för att kvantifiera mängden gluten i ett livsmedel då PCR är riktat mot DNA och inte proteiner. En kvantifiering av DNA-mängden från gluteninnehållande sädesslag i livsmedel är svår att åstadkomma, då olika livsmedel är bearbetade i olika utsträckning. Detta påverkar karaktären på ursprungstemplet på olika sätt (17). PCR kan alltså fungera som en detektionsmetod för att påvisa att DNA från gluteninnehållande sädesslag förekommer i livsmedel. Eftersom PCR är riktat mot DNA så kan det inte användas för att avgöra om t.ex. vetestärkelse som renats från gluten är toxiska för celiakipatienter. PCR kan användas för att undersöka vilket spannmål som kontaminerar ett livsmedel.

Då amplifiering och detektion i realtids-PCR sker i ett slutet system så minskas risken betydligt för att PCR-produkter skulle förorena laboriemiljön jämfört med riskerna vid konventionell PCR med end-pointanalys (25). Samtidig amplifiering och detektion minskar också den laborativa insatsen. Eftersom realtids-PCR bygger på amplifiering av korta fragment, amplikon, så passar metoden bra även för livsmedel som bearbetats (26). CEN (European Committee for Standardization) skriver i sin standard för analysmetoder för genmodifierade livsmedel (ISO/FDIS 21569:2005(E) ) att amplikon för ett livsmedel som i bearbetats bör vara mellan 60-150 baspar. Amplikon för de fyra systemen som beskrivs här är  $\leq 93$  baspar.

Detektion med SYBR-green och smältpunktsanalys är inte sekvensspecifik. Det har vållat problem i användandet av den tidigare uppsatta metoden. Prover med blandat innehåll, t.ex. livsmedel, kan på grund av det heterogena DNA-innehållet förskjuta smältpunkten något. Därför har systemet passat bäst för rena prover. Systemet blir svårt att standardisera och ofta har en konfirmation av resultaten med t.ex. gelelektrofores krävts. Ett TaqMan®-system kan eliminera dessa problem. Eftersom oligonukleotiden är riktad mot en specifik sekvens så är detektionen i TaqMan®-systemet mer tillförlitlig och precis än vad detektionen är med SYBR-green och smältpunktsanalys. Fyra realtids-PCR-metoder baserade på TaqMan®-system kan öka specificiteten och säkra produktidentifieringen för havre, vete råg och korn i jämförelse med ett system där smältpunktsanalys används för detektion.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Stort tack till mina handledare Martin Sandberg och Lisa Lundberg för att ni tagit emot mig samt för råd, idéer, stöttning, back-up och allt annat ni hjälpt mig med under arbetet. För all experthjälp med artiklar och skrivande vill jag ge ett stort tack till Ingrid Malmheden-Yman. Ett speciellt tack till Birgitta Kruse och Monica Ferm för all hjälp ni gett mig på labbet - speciellt i mina vilsna ögonblick då jag irrat runt och letat efter pipettspetsar eller annat labmaterial! Hela K2-gänget för alla samtal och fikapausar – de har varit intressanta, roliga och goda. Jag har känt mig mycket välkommen hos er! Givetvis vill jag också ta tillfället i akt och tacka för alla ägg som jag fick till påskhelgen.

## REFERENSER

- (1) Sollid LM. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Immunology* 2002; 2:647-655
- (2) Dubé C, Rostom A, Richmond SY, Cranney A, Saloojee N, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, Macneil J, Mack D, Patel D, Moher D. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations; A systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128: 57-67
- (3) Ivarsson A. The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach – som lessons to be learnt. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2005; 19:425-427
- (4) Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120:636-651
- (5) Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 27; 2275-2279
- (6) Garsed K, Scott BB. Can oats be taken in a gluten-free diet? A systematic review. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2007; 42: 2:171-178
- (7) Guttormsen V, Løvik A, Bye A, Bratlie J, Mørkrid L, Lundin KEA. No induction of anti-avenin IgA by oats in adult, diet-treated coeliac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2008; 43:161-165
- (8) Hallert C, Olsson M, Störsrud S, Lenner RA, Kilander A, Stenhammar L. Havre kan ingå i den glutenfria kosten. *Läkartidningen* 1999; 96:3339-334
- (9) Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, Troncone R, Ward R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary and Pharmacology Therapeutics* 2006; 23:559-575
- (10) Shewry RP, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 2002; 53:947-958
- (11) Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F,

- Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007; 85:160-166
- (12) Collin P, Thorell L, Kaukinen K, Mäki M. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary and Pharmacology Therapeutics* 2004; 19:1277-1283
- (13) Codex Alimentarius Commission. Draft revised Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Report of the 29th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary uses (ALINORM 08/31/26) 2007 Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Bad Neuenahr-Ahrweiler
- (14) Valdés I, Garcia E, Llorente M, Méndez E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003; 5:465-474
- (15) Allmann M, Candrian U, Höfelein C, Lüthy J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*. 1993; 196:248-251
- (16) Köppel E., Stadler M., Lüthy J., Hübner P. Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*. 1998; 206:399-403
- (17) Sandberg M, Lundberg L, Ferm M, Malmheden-Yman I. Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research and Technology*. 2003; 217:344-349
- (18) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27: 95-125
- (19) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection och specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991; 88:7276-7280



- (20) Olexová L, Dovičovičova, Švec M, Siekel P, Kuchta T. Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control* 2006; 17:234-237
- (21) Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63:3741-3751
- (22) Moreano F, Busch U, Engel K-H. Distortion och genetically modified organism quantification in processed foods: Influence of particle size compositions and heat-induced DNA degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53:9971-9979
- (23) Dahinden I, v Büren M, Lüthy J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 2001; 212:228-233
- (24) Dahinden I, Stadler M, Lüthy J. Evaluation of a Real-Time PCR to detect coeliac-toxic components and comparison to the ELISA method analysing 35 baby food samples. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 2000; 91:723-732
- (25) Saunders N. An introduction to real-time PCR. In: Edwards K, Logan J, Saunders N. *Real Time PCR - an essential guide*. Norfolk: Horizon Bioscience, 2004: 1-13
- (26) Mafra I, Ferreira IMPLVO, Beatriz M, Oliveira PP Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology* 2007; First published online