

Lebensmittel
DNA-Kometentest zum Nachweis von bestrahlten
Lebensmitteln
Screeningverfahren
Deutsche Fassung EN 13784:2001

DIN
EN 13784

ICS 67.050

Foodstuffs — DNA Comet Assay for the detection of irradiated foodstuffs —
Screening method;
German version EN 13784:2001

Produits alimentaires — Détection d'aliments ionisés en utilisant le test de
criblage de comète d'ADN —
Méthode par criblage;
Version allemande EN 13784:2001

Die Europäische Norm EN 13784:2001 hat den Status einer Deutschen Norm.

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN) unter intensiver deutscher Mitarbeit erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss „Bestrahlte Lebensmittel“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Für die im Abschnitt 2 zitierte Internationale Norm wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen (Identisch mit ISO 3696:1987)*.

Fortsetzung 16 Seiten EN

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)
im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Lebensmittel
DNA-Kometentest zum Nachweis von bestrahlten Lebensmitteln
Screeningverfahren

Foodstuffs —
DNA Comet Assay for the detection of
irradiated foodstuffs —
Screening method

Produits alimentaires —
Détection d'aliments ionisés en utilisant le test
de comète d'ADN —
Méthode par criblage

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 29. September 2001 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
1 Anwendungsbereich	3
2 Normative Verweisungen	3
3 Prinzip	3
4 Reagenzien	3
5 Geräte	6
6 Durchführung	6
7 Auswertung	9
8 Grenzen des Verfahrens	9
9 Validierung	10
10 Untersuchungsbericht	12
Anhang A (informativ) Bilder	13
Literaturhinweise	14

Vorwort

Diese Europäische Norm wurde vom CEN /TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“, dessen Sekretariat vom DIN geführt wird, erarbeitet.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2002, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2002 zurückgezogen werden.

Diese Europäische Norm wurde auf der Grundlage einer Verfahrensvorschrift erarbeitet, die aus einer von der Kommission der Europäischen Union (XII C.5) (BCR) unterstützten gemeinsamen Aktion entwickelt wurde. Fachleute und Laboratorien aus EU- und EFTA-Ländern trugen gemeinsam zur Entwicklung der Verfahrensvorschrift der gemeinsamen Aktion bei.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieser Europäischen Norm ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

Anhang A ist informativ.

Diese Norm enthält Literaturhinweise.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Screeningverfahren für Lebensmittel, die DNA enthalten, fest. Das Verfahren basiert auf der Mikro-Gelelektrophorese einzelner Zellen oder Zellkerne und dient dem Nachweis einer DNA-Fragmentierung nach einer Strahlenbehandlung [1] bis [8]. Dieser DNA-Kometentest ist kein Verfahren für den spezifischen Nachweis einer Bestrahlung. Es wird daher empfohlen, positive Ergebnisse durch Anwendung eines genormten Verfahrens, z.B. EN 1784, EN 1785, EN 1786, EN 1787, EN 1788, EN 13708 und prEN 13751, zu bestätigen.

An einigen Lebensmitteln, sowohl tierischer als auch pflanzlicher Herkunft, wurden Ringversuche erfolgreich durchgeführt, z. B. an verschiedenen Fleischarten [9] bis [11] sowie an Samen, getrockneten Früchten und Gewürzen [6], [12]. Weitere Untersuchungen [13] bis [32] haben die Anwendbarkeit des Verfahrens auf eine große Anzahl von Lebensmitteln erwiesen, aber auch die Grenzen des Verfahrens aufgezeigt (siehe Abschnitt 8).

2 Normative Verweisungen

Diese Europäische Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen nur zu dieser Europäischen Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696:1987)*.

3 Prinzip

Eine DNA-Fragmentierung kann durch verschiedene chemische oder physikalische Behandlungen einschließlich einer ionisierenden Bestrahlung verursacht werden. Durch eine ionisierende Bestrahlung DNA-haltiger Lebensmittel werden die großen DNA-Moleküle modifiziert, u. a. entstehen DNA-Fragmente durch den Bruch von Einzel- oder Doppelsträngen. Diese Fragmentierung kann durch Mikro-Gelelektrophorese an einzelnen Zellen oder Zellkernen untersucht werden. Diese werden auf Mikroskop-Objektträgern in Agarose eingebettet und unter Anwendung eines Detergens lysiert, bis die Zellmembranen durchlässig sind; dann wird bei einer bestimmten Spannung eine Elektrophorese durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden gestreckt oder wandern aus den Zellen heraus, so dass sich in Richtung der Anode ein Schweif bildet, der den geschädigten Zellen ein kometenähnliches Aussehen verleiht. Dieser Kometentest zur Ermittlung der Schädigung der DNA kann unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden. Es gibt ein alkalisches und ein neutrales Verfahren. Während unter alkalischen Bedingungen im Allgemeinen sowohl Einzel- als auch Doppelstrang-Brüche sowie alkali-empfindliche Stellen bestimmt werden, werden unter neutralen Bedingungen nur DNA-Doppelstrang-Brüche gemessen. Trotzdem beeinflussen auch unter neutralen Bedingungen [1] Einzelstrangbrüche durch Relaxation der im Zellkern als Superhelix angeordneten DNA das Kometen-Aussehen [7], [8]. Bestrahlte Zellen zeichnen sich durch eine stärkere Streckung der DNA vom Kern in Richtung zur Anode aus und haben folglich deutlich längere Kometenschweife (d. h. die Fragmentierung ist ausgeprägter) als nicht bestrahlte Zellen. Nicht bestrahlte Zellen erscheinen rund oder nur mit schwach ausgeprägtem Schweif (siehe Bild A.1).

In dieser Europäischen Norm wird eine einfache Agarose-Gelelektrophorese mit einlagiger Agaroseschicht unter Anwendung eines neutralen pH-Wertes, niedriger Spannung und kurzer Elektrophoresedauer beschrieben.

4 Reagenzien

4.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben, werden zur Untersuchung nur analysenreine Reagenzien verwendet sowie Wasser, das mindestens der Qualität 1 nach EN ISO 3696 entspricht.

4.2 Salzsäure, Stoffmengenkonzentration $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

4.3 Dimethylsulfoxid, DMSO¹⁾ (wahlweise).

4.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH = 7,4

8,0 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 2,94 g Dinatriumhydrogenphosphat Dodekahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$) und 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) werden in 900 ml Wasser gelöst, mit einigen Tropfen Salzsäure (4.2) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung sollte autoklaviert oder sterilfiltriert werden.

4.5 Agarose-Lösung zum Vorbeschichten der Objektträger, 0,5 % Agarose in destilliertem Wasser.

50 mg Agarose werden in 10 ml Wasser durch Kochen oder Erhitzen im Mikrowellengerät gelöst (flockenfreie, klare Lösung). Die Lösung, die für eine Vorbeschichtung der Objektträger vorgesehen ist, wird in einem Wasserbad bei 45 °C warmgehalten.

4.6 Gel-Lösung, 0,8 % Agarose in PBS

80 mg Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt werden in 10 ml PBS (4.4) durch Kochen oder Erhitzen im Mikrowellengerät gelöst. Diese Lösung, die zum Mischen mit der Zellsuspension und zum Gießen des Gels auf die Objektträger vorgesehen ist, wird in einem Wasserbad bei 45 °C warmgehalten.

4.7 EDTA-Stammlösung, $c(\text{EDTA}) = 0,5 \text{ mol/l}$

93,05 g Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat werden 300 ml destilliertem Wasser zugefügt, die Lösung wird gut gemischt und mit 40 %iger Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert.

4.8 TBE-Stammlösung

54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) und 27,5 g Borsäure werden in 20 ml EDTA-Stammlösung (4.7) gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt (TBE). Diese TBE-Stammlösung kann in Glasflaschen bei Raumtemperatur gelagert werden. Bei Ausfällung wird die Lösung verworfen.

4.9 Elektrophorese-Pufferlösung

Ein Volumenteil der TBE-Stammlösung (4.8) wird mit 9 Volumenteilen Wasser verdünnt. Bei Bedarf wird der pH-Wert auf 8,4 eingestellt.

4.10 Lyse-Pufferlösung

25 g Natriumdodecylsulfat (SDS) werden in Elektrophorese-Pufferlösung (4.9) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.

4.11 Färbelösungen

4.11.1 Acridinorange-Stammlösung²⁾

100 mg Acridinorange werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird im Dunkeln bei etwa 4 °C bis 6 °C aufbewahrt.

1) DMSO ist eine schädliche Substanz, bei deren Anwendung geeignete Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden sollten.

2) Acridinorange, Propidiumiodid und Ethidiumbromid sind schädliche Substanzen, bei deren Anwendung geeignete Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden sollten.