

DIN EN 15634-4

ICS 07.100.30; 67.190

Entwurf

Einsprüche bis 2021-12-22
 Vorgesehen als Ersatz für
 DIN CEN/TS 15634-4
 (DIN SPEC 10701-3):2016-08

**Lebensmittel –
 Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen
 Verfahren –**

**Teil 4: Erdnuss (*Arachis hypogaea*) – Qualitativer Nachweis einer
 spezifischen DNA-Sequenz in Schokolade mittels Real-time PCR;
 Deutsche und Englische Fassung prEN 15634-4:2021**

Foodstuffs –

Detection of food allergens by molecular biological methods –

Part 4: Peanut (*Arachis hypogaea*) – Qualitative detection of a specific DNA sequence in
 chocolate by real-time PCR;

German and English version prEN 15634-4:2021

Produits alimentaires –

Détection des allergènes alimentaires par des méthodes de biologie moléculaire –

Partie 4: Arachide (*Arachis hypogaea*) – Détection qualitative d'une séquence d'ADN
 spécifique dans du chocolat, par PCR en temps réel;

Version allemande et anglaise prEN 15634-4:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-10-22 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
 Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
 besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
 Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
 sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im
 Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
 Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
 Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-4:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-05 AA „Lebensmittelallergene“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 15634-4 (DIN SPEC 10701-3):2016-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) CEN/TS 15634-4 wurde in eine europäische Norm überführt;
- b) redaktionell überarbeitet.

<i>Titel de:</i>	Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren — Teil 4: Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>) — Qualitativer Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz in Schokolade mittels Real-time PCR
<i>Titel en:</i>	Foodstuffs — Detection of food allergens by molecular biological methods — Part 4: Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>) — Qualitative detection of a specific DNA sequence in chocolate by real-time PCR
<i>Titel fr:</i>	Produits alimentaires — Détection des allergènes alimentaires par des méthodes de biologie moléculaire — Partie 4: Arachide (<i>Arachis hypogaea</i>) — Détection qualitative d'une séquence d'ADN spécifique dans du chocolat, par PCR en temps réel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	5
5.1 Allgemeines	5
5.2 Extraktionsreagenzien	5
5.3 DNA-Aufreinigung mittels Festphasenextraktion	6
5.4 Real-time-PCR-Reagenzien	7
6 Geräte und Hilfsmittel	7
6.1 Allgemeines	7
6.2 DNA-Extraktion	7
6.3 PCR	7
7 Durchführung	8
7.1 Allgemeines	8
7.2 Probenvorbereitung	8
7.3 Herstellung der Extrakte	8
7.3.1 DNA-Extraktion mit CTAB und DNA-Aufreinigung	8
7.3.2 Quantifizierung der DNA-Konzentration und Reinheits-/Qualitätskontrolle	9
7.4 Einstellungen für die Real-time-PCR	9
7.4.1 Reaktionsmix für die Real-time-PCR	9
7.4.2 Positivkontrolle der DNA-Targets	10
7.4.3 Negativkontrolle der DNA-Targets	10
7.4.4 PCR-Inhibitionskontrolle	11
7.4.5 Amplifikations-Reagenzienkontrolle	11
7.4.6 Negative Extraktionskontrolle	11
7.4.7 Positive Extraktionskontrolle	11
7.4.8 Temperatur-Zeit-Programm (Real-time-PCR)	11
7.4.9 Kriterien für Annahme/Zurückweisung	11
7.4.10 Identifizierung	12
8 Validierung	12
8.1 Allgemeines	12
8.2 Spezifität	12
8.3 Validierung des Ringversuchs	13
8.3.1 Aufbau des Ringversuchs	13
8.3.2 Validierung der Ergebnisse des Ringversuchs	13
9 Untersuchungsbericht	14
Literaturhinweise	15

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-4:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 15634-4:2016 ersetzen.

Im Vergleich zur vorherigen Ausgabe wurden folgende technische Änderungen vorgenommen:

- a) das Dokument wurde von einer Technischen Spezifikation in eine Europäische Norm umgewandelt;
- b) normative Verweisungen und der Abschnitt „Begriffe“ wurden hinzugefügt;
- c) die PCR-Kontrollen werden nicht mehr in Abschnitt 3 „Reagenzien“, sondern in Abschnitt 7 „Durchführung“ behandelt;
- d) ein neuer Unterabschnitt 7.4.9 „Kriterien für Annahme/Zurückweisung“ wurde hinzugefügt;
- e) die Abschnitte wurden in Übereinstimmung mit EN 15634-2:2019 neu gegliedert.

Einleitung

Bei der Verwendung dieses Dokuments gilt Folgendes:

- ‚muss/müssen‘ zeigt eine Anforderung an;
- ‚sollte/sollten‘ zeigt eine Empfehlung an;
- ‚darf/dürfen‘ zeigt eine Zulässigkeit an;
- ‚kann/können‘ zeigt eine Möglichkeit und/oder ein Vermögen an.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zum Nachweis von Erdnuss (*Arachis hypogaea*) in Schokolade fest.

Die Real-time-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis von Erdnuss beruht auf einer 86 bp (Basenpaar) großen Sequenz des Ara-h-2-Gens der Erdnuss.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 15634-1:2019, *Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren — Teil 1: Allgemeine Betrachtungen; Deutsche Fassung EN 15634-1:2019*

EN 15842, *Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen — Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 15842 und EN 15634-1.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Aus der Probe wird die Gesamt-DNA von Schokolade mittels eines Cetyltrimethylammoniumbromid-(CTAB-)Verfahrens extrahiert. Potentiell vorhandene PCR-Inhibitoren werden aus der mittels Aufreinigung mit Festphasensäulen extrahierten DNA entfernt und der DNA-Gehalt wird geschätzt. Mittels Real-time-PCR wird eine erdnusspezifische DNA-Sequenz nachgewiesen. Das Real-time-PCR-Verfahren umfasst einen Fluoreszenznachweis mit einer sequenzspezifischen Hydrolysesonde [1], [2].

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

Soweit nicht anders festgelegt, sollten die folgenden allgemeinen Bedingungen für die Analyse eingehalten werden: Es werden nur analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien verwendet. Jegliches Wasser muss frei von DNA und Nukleasen sein, z. B. bidestilliert oder von vergleichbarer Qualität (molekularbiologische Qualität). Soweit nicht anders festgelegt, müssen Lösungen durch Lösen der entsprechenden Reagenzien in Wasser und Autoklavieren hergestellt werden.

5.2 Extraktionsreagenzien

5.2.1 Chloroform.

5.2.2 Ethanol, Volumenanteil $\varphi = 70\%$.

5.2.3 Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Na_2EDTA).

5.2.4 Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB).

5.2.5 Salzsäure, Massenanteil $w = 37\%$.

5.2.6 Isoamylalkohol.

5.2.7 Isopropanol.

5.2.8 Proteinase K.

5.2.9 Natriumchlorid.

5.2.10 Natriumhydroxidlösung.

5.2.11 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS).

5.2.12 Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch, 24 Volumenteile Chloroform (5.2.1) werden mit einem Volumenteil Isoamylalkohol (5.2.6) gemischt.

Ähnliche handelsübliche Gemische dürfen verwendet werden.

5.2.13 CTAB-Extraktionspufferlösung, enthält:

- CTAB (5.2.4), Massenkonzentration $\rho = 20\text{ g/l}$,
- Natriumchlorid (5.2.9), Stoffmengenkonzentration $c = 1,4\text{ mol/l}$,
- TRIS (5.2.11), Stoffmengenkonzentration $c = 0,1\text{ mol/l}$,
- Na_2EDTA (5.2.3), Stoffmengenkonzentration $c = 0,02\text{ mol/l}$.

Der pH-Wert wird durch Zugabe von Salzsäure (5.2.5) auf 8,0 eingestellt.

5.2.14 Proteinase-K-Lösung, $\rho = 20\text{ mg/ml}$.

Die frisch hergestellte Proteinase-K-Lösung sollte in Form von Aliquoten bei -20 °C aufbewahrt werden.

5.2.15 TE-Pufferlösung, enthält:

- TRIS (5.2.11), $c = 0,001\text{ mol/l}$,
- Na_2EDTA (5.2.3), $c = 0,0001\text{ mol/l}$.

Der pH-Wert wird durch Zugabe von Salzsäure (5.2.5) oder Natriumhydroxidlösung (5.2.10) auf 8,0 eingestellt.

5.3 DNA-Aufreinigung mittels Festphasenextraktion

Für die DNA-Aufreinigung dürfen verschiedene Verfahren verwendet werden.

Im Handel sind verschiedene Formate erhältlich, u. a. Spin-Filter-Säulen bzw. -Platten. Im Handel erhältliche Kits dürfen, falls geeignet, verwendet werden. Dabei sind die Angaben des Herstellers zu befolgen (siehe auch 8.3.1).

5.4 Real-time-PCR-Reagenzien

5.4.1 PCR-Mastermix, enthält Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl_2 und Hotstart-Taq-Polymerase.

Als PCR-Mastermix dürfen gebrauchsfertige Reagenziengemische oder Einzelkomponenten verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

5.4.2 Oligonukleotide, jeweils 10 μmol .

5.4.2.1 Erdnuss (AR-58 F), gCA gCA gTg ggA ACT CCA Agg AgA CA.

5.4.2.2 Erdnuss (AR-143 R), gCA TgA gAT gTT gCT CgC Ag.

5.4.2.3 Erdnussonde (AR-103 T), FAM – CgA gAg ggC gAA CCT gAg gCC – TAMRA– oder BHQ1¹.

Gleichwertige Reporterfarbstoffe und/oder Quencherfarbstoffe dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

6 Geräte und Hilfsmittel

6.1 Allgemeines

Neben der üblichen Laborausstattung müssen folgende Hilfsmittel verwendet werden.

Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR-Analytik und der daraus resultierenden Gefahr von DNA-Kontaminationen ist die Verwendung von aerosol-geschützten Filterspitzen beim DNA-Extraktionsverfahren obligatorisch. Die Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden und frei von DNA sein.

6.2 DNA-Extraktion

6.2.1 Geeignete Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml, DNA-frei.

6.2.2 50-ml-Zentrifugenröhrchen, steril.

6.2.3 Thermostat bzw. Wasserbad, vorzugsweise mit Schüttelfunktion.

6.2.4 Zentrifuge, geeignet 50-ml-Reaktionsgefäße bei 8 000 g^2 zu zentrifugieren.

6.2.5 Zentrifuge, geeignet 1,5-ml- und 2-ml-Reaktionsgefäße bei 14 500 g zu zentrifugieren.

6.2.6 Ausrüstung und/oder Material zur Probenzerkleinerung, z. B. Mixer oder Mühle.

6.2.7 UV-Spektrometer oder andere Detektionsinstrumente, geeignet für die DNA-Mengenabschätzung.

6.3 PCR

6.3.1 Geeignete PCR-Gefäße.

¹ FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin, BHQ1: Black Hole Quencher 1

² $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$

6.3.2 Mikrozentrifuge für PCR-Gefäße.

6.3.3 Real-time-PCR-Gerät, geeignet zur Anregung und Emissionsmessung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden.

7 Durchführung

7.1 Allgemeines

Allgemeine Zusammenhänge sind in EN 15634-1 beschrieben.

7.2 Probenvorbereitung

Es sollte sichergestellt werden, dass die nach dem Vermahlen oder Homogenisieren entnommene Untersuchungsprobe für die Laborprobe repräsentativ ist.

7.3 Herstellung der Extrakte

7.3.1 DNA-Extraktion mit CTAB und DNA-Aufreinigung

Es ist zulässig, anstelle des nachfolgend beschriebenen DNA-Extraktionsverfahrens auch ein geeignetes kommerziell erhältliches Kit zu verwenden, wenn sichergestellt wird, dass vergleichbare oder bessere Ergebnisse erzielt werden.

Parallel zu den Untersuchungsproben sollten die unter 7.4.3, 7.4.6 und 7.4.7 aufgeführten Kontrollen in geeignetem Umfang durchgeführt werden.

Die Analysen sollten **doppelt** nach folgendem Protokoll durchgeführt werden:

- 2 g der homogenisierten Probe werden in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (Röhrchen A) eingewogen.
- 10 ml CTAB-Extraktionspufferlösung (5.2.13) werden zugegeben.
- 30 µl Proteinase-K-Lösung (5.2.14) werden zugegeben und es wird gemischt.
- Es wird 90 min bei 65 °C inkubiert und geschüttelt.
- Es wird 5 min bei 6 000 g bis 8 000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (5.2.12) werden in ein 2-ml-Reaktionsgefäß (Röhrchen B) vorgelegt.
- 700 µl Überstand aus Röhrchen A werden zu Röhrchen B hinzugefügt und 30 s gründlich gemischt.
- Es wird 15 min bei etwa 14 500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- 500 µl kaltes Isopropanol (5.2.7) wird in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Röhrchen C) vorgelegt.
- 500 µl Überstand (wässrige Phase) werden von Röhrchen B zu Röhrchen C hinzugefügt und vorsichtig gemischt.
- Es wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es wird 15 min bei etwa 14 500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen.