

DIN EN 15634-5



ICS 07.100.30; 67.120.10

Entwurf

Einsprüche bis 2021-12-22
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 15634-5
(DIN SPEC 10701-4):2016-11

**Lebensmittel –
Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen
Verfahren –
Teil 5: Senf (*Sinapis alba*) sowie Soja (*Glycine max*) – Qualitativer Nachweis
einer spezifischen DNA-Sequenz in Brühwürsten mittels Real-time PCR;
Deutsche und Englische Fassung prEN 15634-5:2021**

Foodstuffs –

Detection of food allergens by molecular biological methods –

Part 5: Mustard (*Sinapis alba*) and soya (*Glycine max*) – Qualitative detection of a specific DNA sequence in cooked sausages by real-time PCR;

German and English version prEN 15634-5:2021

Produits alimentaires –

Détection des allergènes alimentaires par des méthodes d'analyse de biologie moléculaire –

Partie 5: Moutarde (*Sinapis alba*) et soja (*Glycine max*) – Détection qualitative d'une séquence d'ADN spécifique dans des saucisses cuites, par PCR en t;

Version allemande et anglaise prEN 15634-5:2021

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 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-5:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche 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 15634-5 (DIN SPEC 10701-4):2016-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) CEN/TS 15634-5 wurde in eine europäische Norm überführt;
- b) redaktionell überarbeitet.

<i>Titel de:</i>	Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren — Teil 5: Senf (<i>Sinapis alba</i>) sowie Soja (<i>Glycine max</i>) — Qualitativer Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz in Brühwürsten mittels Real-time PCR
<i>Titel en:</i>	Foodstuffs — Detection of food allergens by molecular biological methods — Part 5: Mustard (<i>Sinapis alba</i>) and soya (<i>Glycine max</i>) — Qualitative detection of a specific DNA sequence in cooked sausages by real-time PCR
<i>Titel fr:</i>	Produits alimentaires — Détection des allergènes alimentaires par des méthodes d'analyse de biologie moléculaire — Partie 5: Moutarde (<i>Sinapis alba</i>) et soja (<i>Glycine max</i>) — Détection qualitative d'une séquence d'ADN spécifique dans des saucisses cuites, par PCR en t

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	6
5.3 DNA-Aufreinigung mittels Festphasenextraktion.....	7
5.4 Real-time-PCR-Reagenzien	7
6 Geräte und Hilfsmittel.....	7
6.1 Allgemeines	7
6.2 DNA-Extraktion	8
6.3 PCR.....	8
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 und Normalisierung der DNA-Konzentration	10
7.4 Einstellungen für die Real-time-PCR	10
7.4.1 Reaktionsmix für die Real-time-PCR	10
7.4.2 Amplifikations-Reagenzienkontrolle	11
7.4.3 Negative Extraktionskontrolle	11
7.4.4 Positive Extraktionskontrolle	11
7.4.5 Temperatur-Zeit-Programm (Real-time-PCR).....	11
7.4.6 Kriterien für Annahme/Zurückweisung.....	12
7.4.7 Identifizierung.....	12
8 Validierung	12
8.1 Allgemeines	12
8.2 Validierung des Ringversuchs.....	12
8.2.1 Aufbau des Ringversuchs.....	12
8.2.2 Validierung der Ergebnisse des Ringversuchs.....	13
8.2.3 Qualitative Auswertung	13
9 Untersuchungsbericht	14
Literaturhinweise	15

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-5:2021) 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 15634-5:2016 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 7.4.6 „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 qualitativen Nachweis einer speziesspezifischen DNA von weißem Senf (*Sinapis alba*) und Soja (*Glycine max*) in Brühwurst mittels Singleplex-Real-time-PCR auf Basis der Gene MADS-D (Senf) und Lectin (Soja) fest.

Ein Senfgehalt von 10 mg/kg oder höher und ein Sojagehalt von 10 mg/kg oder höher können mit einer Wahrscheinlichkeit > 95 % nachgewiesen werden.

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*

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

4 Kurzbeschreibung

Aus der Probe wird die Gesamt-DNA von Brühwurst 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 74 Basenpaar (bp) lange Sequenz der DNA für das MADS-D-Protein von *Sinapis alba* (NCBI accession no. Y08626¹) bzw. eine 81 bp lange Sequenz aus dem Soja-Lectin-Gen nachgewiesen. Das Real-time-PCR-Verfahren umfasst einen Fluoreszenznachweis mit sequenzspezifischen Hydrolysesonden [1].

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.

¹ Die NCBI-GeneBank® ist ein Beispiel für ein kostenfreies, geeignetes Recherchemittel. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung durch CEN.

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), $c = 0,01 \text{ mol/l}$,
- Na_2EDTA (5.2.3), $c = 0,001 \text{ mol/l}$.

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

5.2.16 $0,2 \times$ TE-Pufferlösung, ein Volumenteil TE-Pufferlösung (5.2.15) wird mit vier Teilen Wasser gemischt

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 (2 ×) für die Real-time-PCR, enthält Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl₂ und Hotstart-Taq-Polymerase, doppelt konzentriert.

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

ANMERKUNG Im Ringversuch wurde der QuantiTect® Multiplex Mastermix² (2 ×) verwendet.

5.4.2 Oligonukleotide [1]:

Die Primer und Sonden für die Real-time-PCR sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 — Primer und Sonden für die Real-time-PCR

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids
Soya-Lectin-Gen	
Lectin-F	5′- TCC ACC CCC ATC CAC ATT T - 3′
Lectin-R	5′- ggC ATA gAA ggT gAA gTT gAA ggA - 3′
Sonde Lectin	5′- FAM - AAC Cgg TAG CgT TgC CAg CTT Cg - TAMRA-3′ ^a
Senf (Sinapis alba) MADS-D Protein	
MADS-D-F	5′- TGA AAA CTC TCT TCC CCT CTT AGG - 3′
MADS-D-R	5′- ACA AAT GCA CAC AAG ACA GAG ATA TAG A - 3′;
Sonde MADS-D	5′- FAM - TAC ATG ATG CTT ACC TCG C - TAMRA - 3′ ^a
^a FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin; gleichwertige Reporter- und/oder Quencherfarbstoffe dürfen verwendet werden, wenn gezeigt wird, dass sie 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.

² QuantiTect® Multiplex Mastermix, erhältlich bei QIAGEN GmbH, Hilden, ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

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^3 zu zentrifugieren.

6.2.5 Zentrifuge, geeignet 1,5-ml- und 2-ml-Reaktionsgefäße bei 16 000 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.

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 Aspekte sind in EN 15634-1 beschrieben.

7.2 Probenvorbereitung

Es sollte sichergestellt werden, dass dem Labor eine repräsentative Probe zur Untersuchung zur Verfügung gestellt wird.

Die Probe muss so transportiert und gelagert werden, dass Beschädigungen und/oder Veränderungen vermieden werden.

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.

³ $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$

Parallel zu den Untersuchungsproben sollte eine negative Extraktionskontrolle (7.4.3) in geeigneter Weise mitgeführt werden.

Die Analysen sollten 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 16 000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- 500 µl kaltes Isopropanol (5.2.7) werden 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 16 000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen.
- 500 µl Ethanol-Lösung (5.2.2) werden in das Reaktionsgefäß gegeben und es wird mehrmals gemischt.
- Es wird 5 min bei etwa 16 000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen.
- Die extrahierte DNA wird bei 50 °C getrocknet (alternativ in Vakuum).
- Der getrocknete DNA-Extrakt wird in 100 µl 0,2 × TE-Pufferlösung (5.2.16) gelöst.
- Der DNA-Extrakt wird aufgereinigt, z. B. mittels Festphasenextraktion. Bei im Handel erhältlichen Kits müssen die Angaben des jeweiligen Kit-Herstellers berücksichtigt werden. Im Ringversuch wurde der QIAQuick® PCR Purification Kit⁴ (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Der DNA-Extrakt kann kurzfristig bei 4 °C gelagert werden. Bei Lagerzeiten von mehr als einer Woche sollten die DNA-Extrakte bei –18 °C gelagert werden.

⁴ QIAQuick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.