

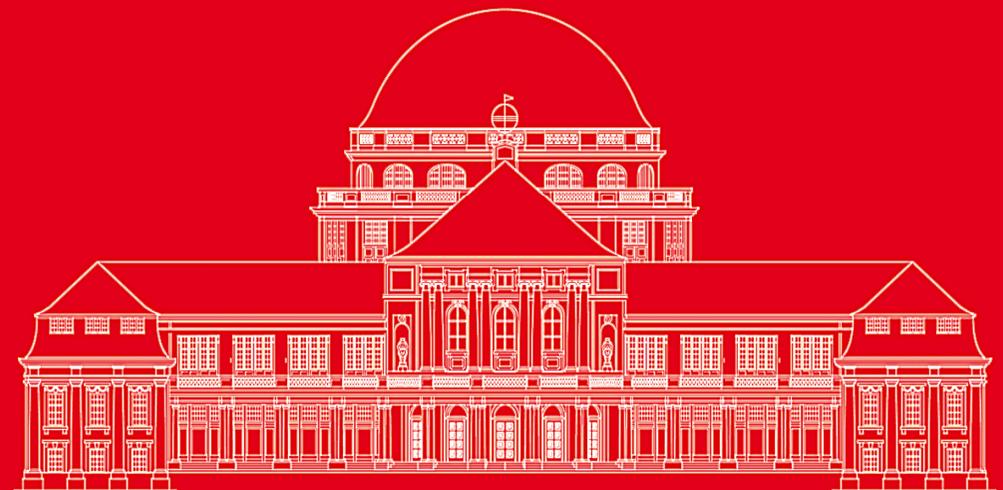


FEI-JAHRESTAGUNG 2012 - HAMBURG

Molekularbiologische Methoden zur
Authentizitätsbestimmung und Qualitätskontrolle
von Lebensmitteln

IST DRIN, WAS DRAUFSTEHT?

5. September 2012



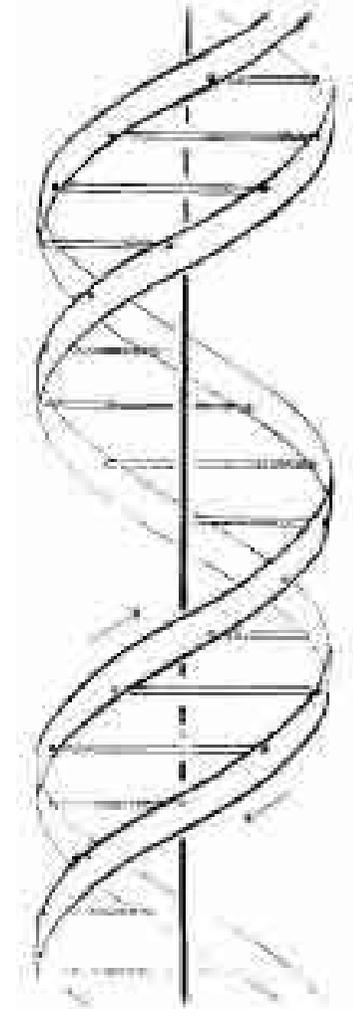
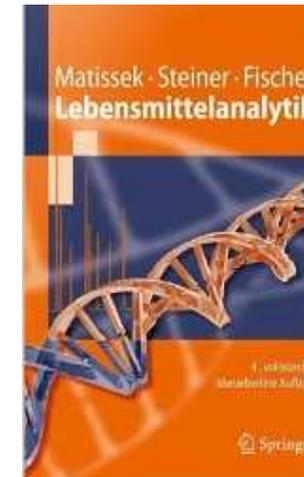
DNA-basierte Methoden

- **Wozu wollen wir diese Methoden einsetzen?**
 - Authentizitäts- und Qualitätskontrolle von Lebensmitteln
- **Was können wir nachweisen?**
 - DNA, bedingt RNA
 - Sequenzen, Mutationen, Sequenzunterschiede
- **Wie machen wir das?**
 - Sequenzieren || amplifizieren (kopieren) || separieren || physikalischer Nachweis
- **Voraussetzungen**
 - DNA muss enthalten sein
 - DNA muss isolierbar sein
 - DNA muss sich nach der Isolierung in ausreichender Qualität vorliegen

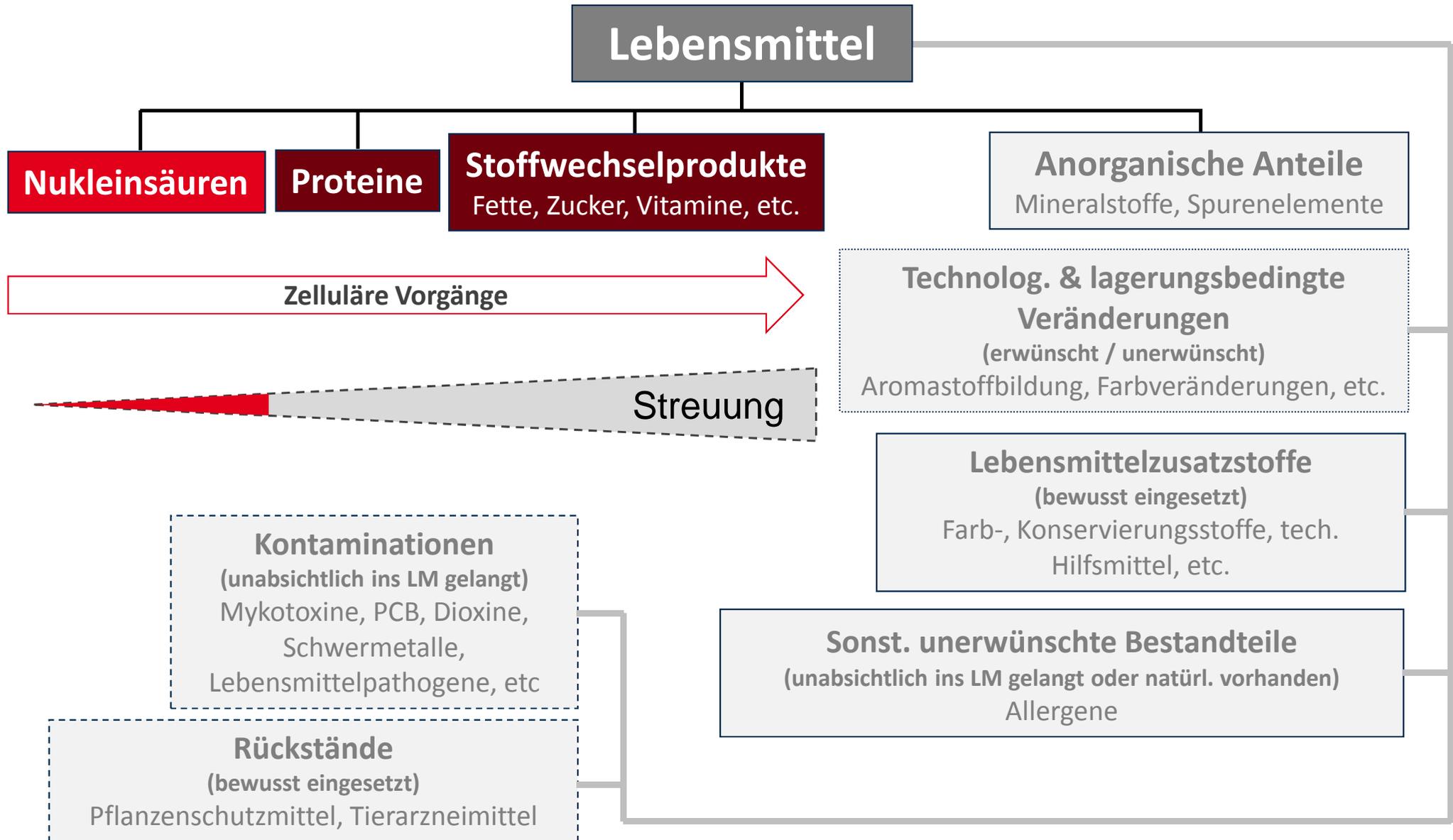
Ein kleines Glossar...

DNA (= DNS, Desoxyribonukleinsäure) ist eine polymere Verbindungen, die **aus Nukleotiden aufgebaut (Basen)** ist

- **DNA-Sequenzen sind speziesspezifisch:** Aus verschiedenen Geweben der gleichen Art isolierte DNA-Proben haben immer die gleiche Zusammensetzung
- **DNA nicht vom Alter, Ernährungszustand oder Veränderungen der Umgebung abhängig:** Innerhalb einer bestimmten Spezies ist die Basenzusammensetzung konstant
- **Kopienzahl chromosomaler DNA ist konstant:** Geeignet zur Quantifizierung
- **Plastiden DNA kommt in mehreren Kopien vor:** Gewisse Vorteile für analytische Zwecke



1953: James Watson und Francis Crick



DNA-basierte Methoden – eine kleine Auswahl

1. **Musteranalyse** \Rightarrow Barcoding/Ultra-Barcoding
2. **Nachweis von bekannten Unterschieden in Sequenzen** \Rightarrow dHPLC, HRM
3. **Amplifikation: Alternative zur PCR** \Rightarrow Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)
4. **Kombinierte Methoden** \Rightarrow LAMP und Lateral-Flow Dipstick (LFD)
5. **Hazards & Critical Control Points** \Rightarrow Ist tatsächlich drin, was draufsteht??



Wer hat die ganze Arbeit gemacht?



Dr. Ilka
Haase



Dr. Felix
Focke



Jan-Hinnerck
Jarck



Franziska
Vaagt



Luise
Herrmann

Diplomandinnen und Diplomanden:

Christian Schoefinius, Johanna Schiller, Dominique Tressat, Sonja Schüssler, Qi Chen, Malte Oetting, Annika Sötje, Sandra Lorenz, Oliver Keunecke, Yvonne Peglow, Julia Fritzsich, Tim Hünninger, Maïke Blauhut

Danke!

1. Auffinden von Sequenzunterschieden zur Unterscheidung von Arten und Unterarten

Musteranalyse: Barcoding & Ultra-Barcoding

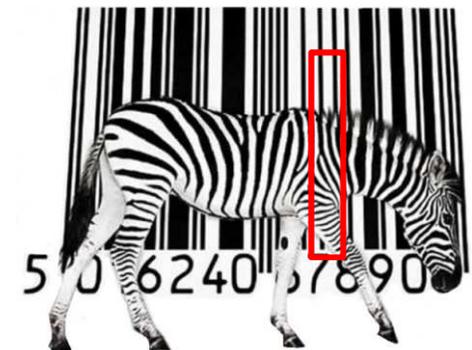
- Taxonomische Methode zur **Artenbestimmung** anhand von DNA-Sequenzen (Markergen oder größere Bereiche)
- **Wie?**
 1. Gen- und Genomsequenzierungen
 2. **Basenpaar-Abfolge** wird analog wie der **Strichcode** auf Lebensmittel-Verpackungen als Kennzeichen für eine bestimmte Art bzw. Unterart verwendet



Quelle:
<http://africatech.wordpress.com/2011/05/23/barcode-scanner-for-zebras/>

1a. Barcoding – Tool zur Unterscheidung von Arten

- Während der Evolution entwickeln sich die Sequenzen mit annähernd konstanter Rate auseinander
 - **Je ähnlicher die Basenabfolge, d.h. je geringer die Anzahl der Unterschiede zwischen den Sequenzen, umso verwandter die Proben**
 - **Je geringer die Anzahl der unterschiedlichen Basen, desto größer müssen die Bereiche werden, die in eine Analyse einbezogen werden**
 - **Bei Tieren:** Abschnitt aus der mitochondrialen DNA (Markergen *cox1*)
 - **Bei Pflanzen:** Abschnitt des Plastidgenoms (Markergen *matK*)



1b. Steigerung der Auflösung (Verwandtschaftsnähe) - Ultra-Barcoding

Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA

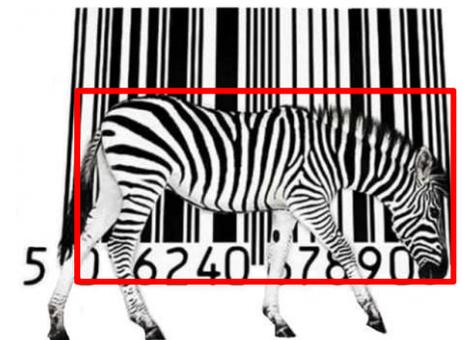
(Kane et al., American Journal of Botany 99(2): 320–329 (2012))

▪ **Barcoding nicht nur auf ein Gen beschränkt**

- Gesamtes Plastiden-Genom oder chromosomaler rDNA-Bereich wird herangezogen
 - Höhere Auflösung, als mit kürzerem Stück (je länger, desto besser)
 - Man braucht allerdings entsprechende Sequenzieretechnologie

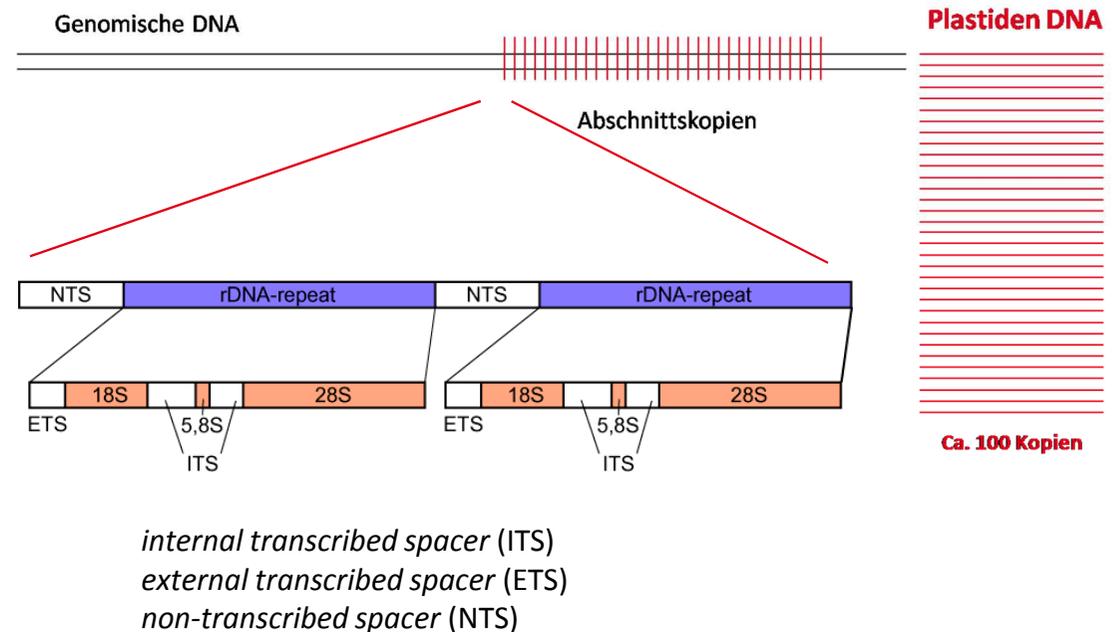
▪ **Wie sequenzieren?**

- Chloroplasten abtrennen und Plastiden-DNA isolieren (theoretisch gut ...)
- **Genomische DNA zusammen mit Plastiden sequenzieren, allerdings ohne vorherige Trennung**
 - *Low coverage, whole genome sequencing*



1b. Ultra-Barcoding - *Low coverage, whole genome sequencing*

- Gesamt-DNA isolieren, verdünnen, sequenzieren
 - Höchste Abdeckung bei den in höchster Konzentration vorliegenden DNA-Bereichen
 - ✓ **Plastiden-DNA:** ca. 100 x höhere Kopienzahl als chromosomale DNA
 - ✓ **rDNA-Bereiche:** zwar chromosomal kodiert, aber repetitive Abschnitte
- In beiden Fällen erhält man ein hochaufgelöstes Bild
- **Unterscheidung von Arten und auch Unterarten möglich**



Projekt: Evaluierung chemisch-analytischer und molekularbiologischer Methoden zur Differenzierung von hochwertigem Arriba Edelkakao und Konsumkakao (AiF 16796 N)

2a. Nachweis von Sequenzunterschieden - No. 1

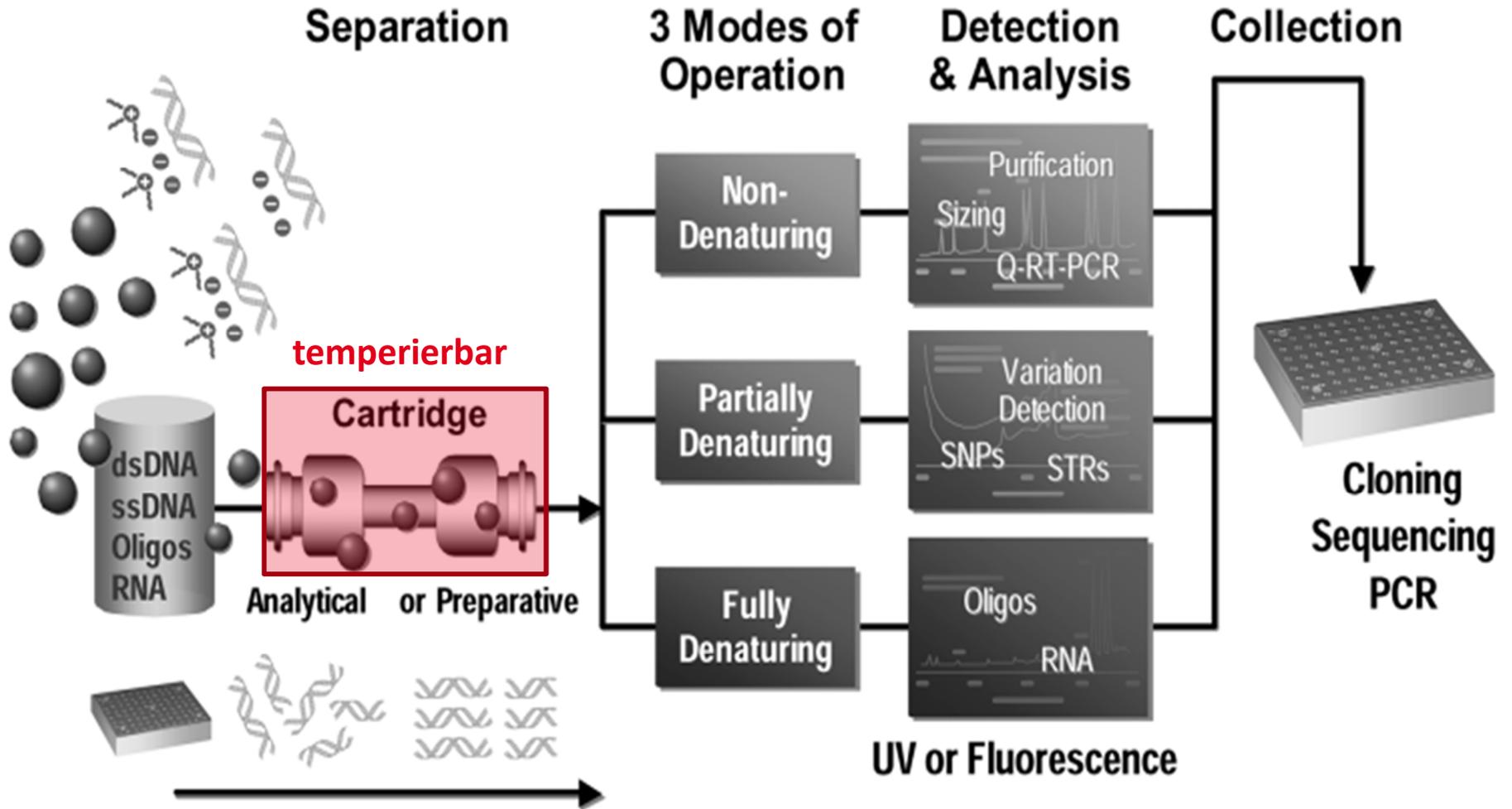
Denaturierende – HPLC (dHPLC)

- Trennung von DNA-Amplifikaten mittels Ionenpaar-Chromatographie
 - Hydrophobe stationäre Phase (RP-Säule)
 - Triethylammoniumacetat als **Ionenpaarreagenz** interagiert zwischen DNA-Molekül und Säule
 - Acetonitril/Wasser als mobile Phase
- Trennung in einem Bereich von 40-80°C
 - Partielle Denaturierung



WAVE[®] System, Transgenomics Inc.

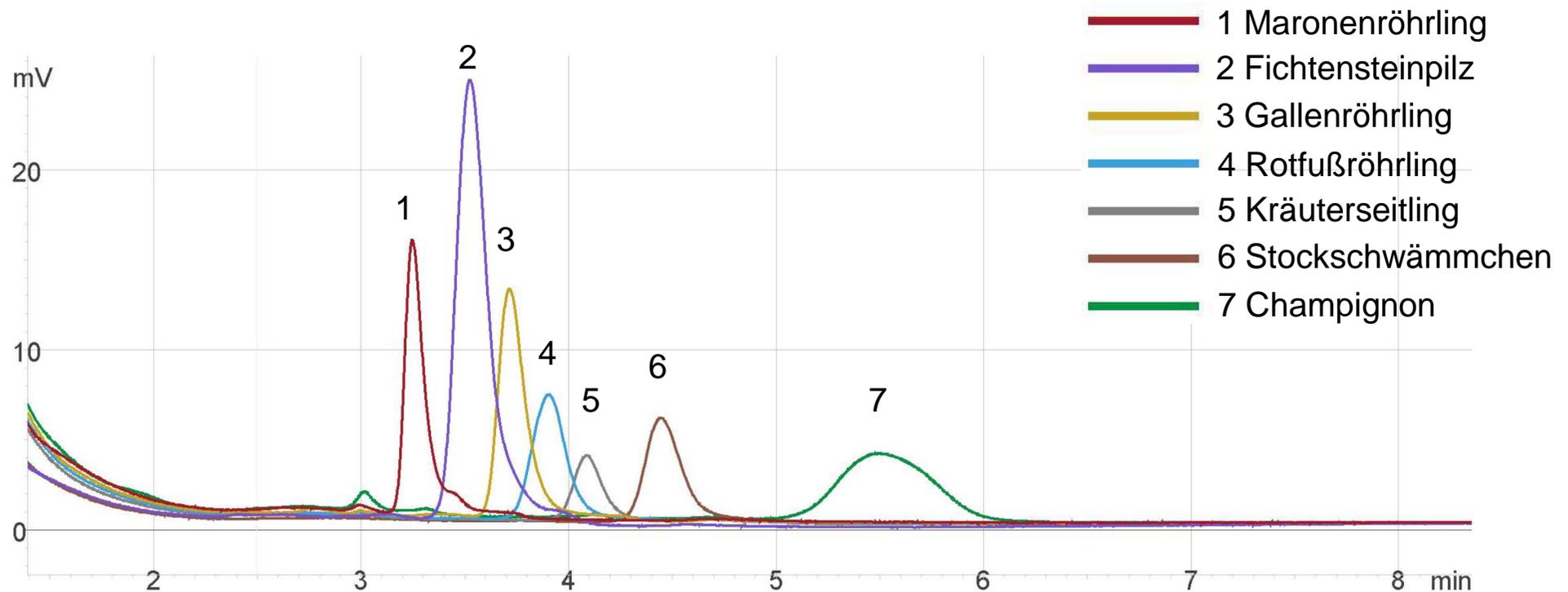
2a. dHPLC



Quelle : Frueh and Noyer-Weidner, 2003

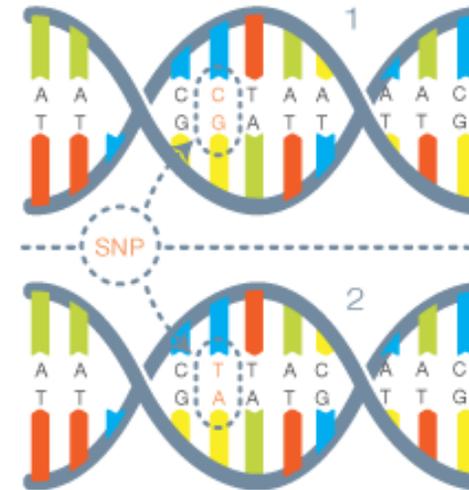
2a. dHPLC in der Lebensmittelanalytik - Sizing

Mischung aus 7 Pilzen: → wesentlich höhere Trennleistung als im Agarose-Gel



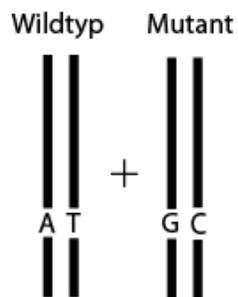
2a. dHPLC in der medizinischen Diagnostik – SNPs (single nucleotide polymorphism)

- Beispiel:** Detektion von Punktmutationen und Polymorphismen in Markergenen für Krebserkrankungen
 - z.B. Detektion von Mutationen in p53 Gen (Gross et al. 2001); Mutationen in den Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 (Wanger et al. 1999)

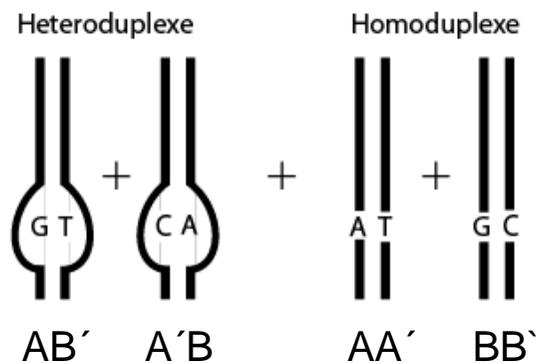


Bildquelle:
www.siriusgenomics.com

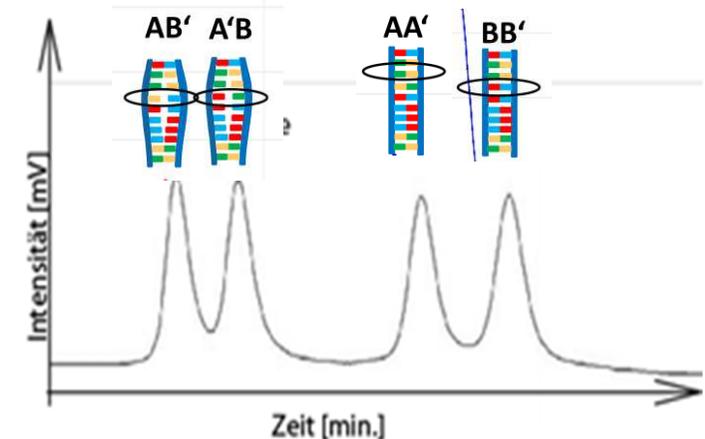
1. PCR



2. erhitzen
abkühlen

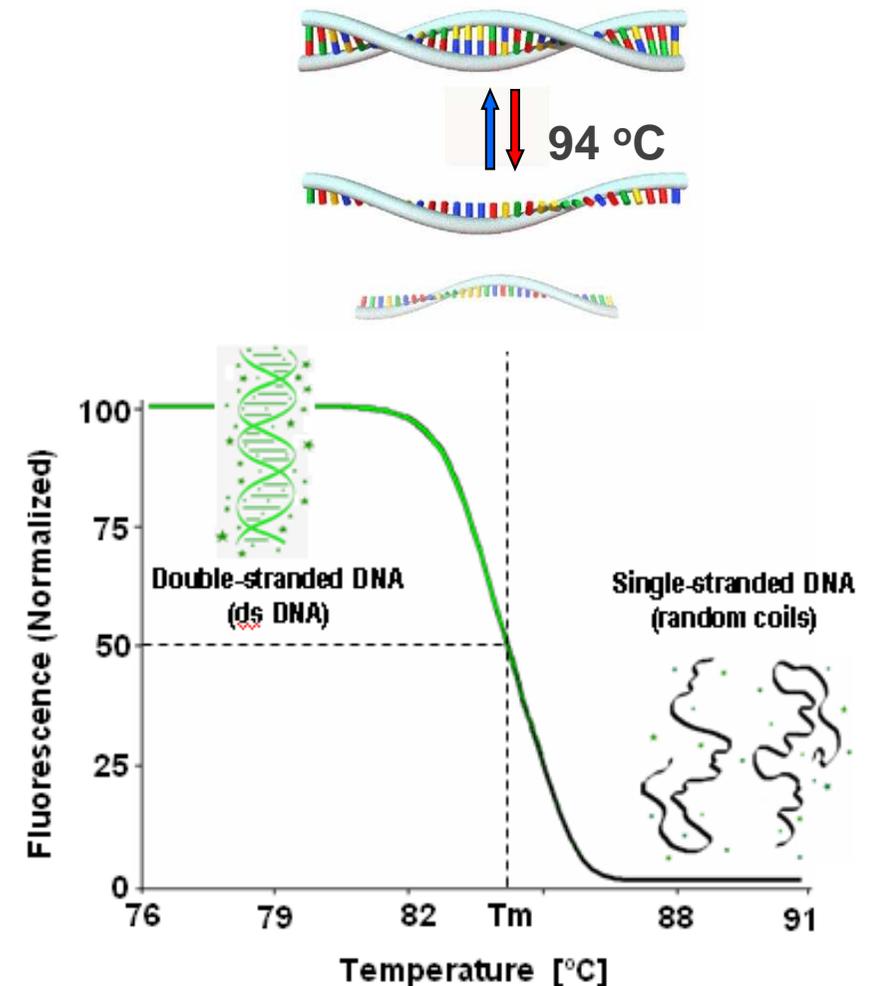
3. DHPLC

2b. Nachweis von Sequenzunterschieden – No. 2

High Resolution Melting Analysis (HRM)

- DNA-Amplifikate werden anhand ihres Schmelzverhaltens charakterisiert
- Unterschiede werden durch optische und thermische Präzision ($\pm 0,01$ °C) detektiert
- Mutations-Screening, DNA Fingerprinting, SNP's, Methylierungsstudien und Artenidentifizierung können untersucht werden



3. Amplifikation: PCR oder LAMP

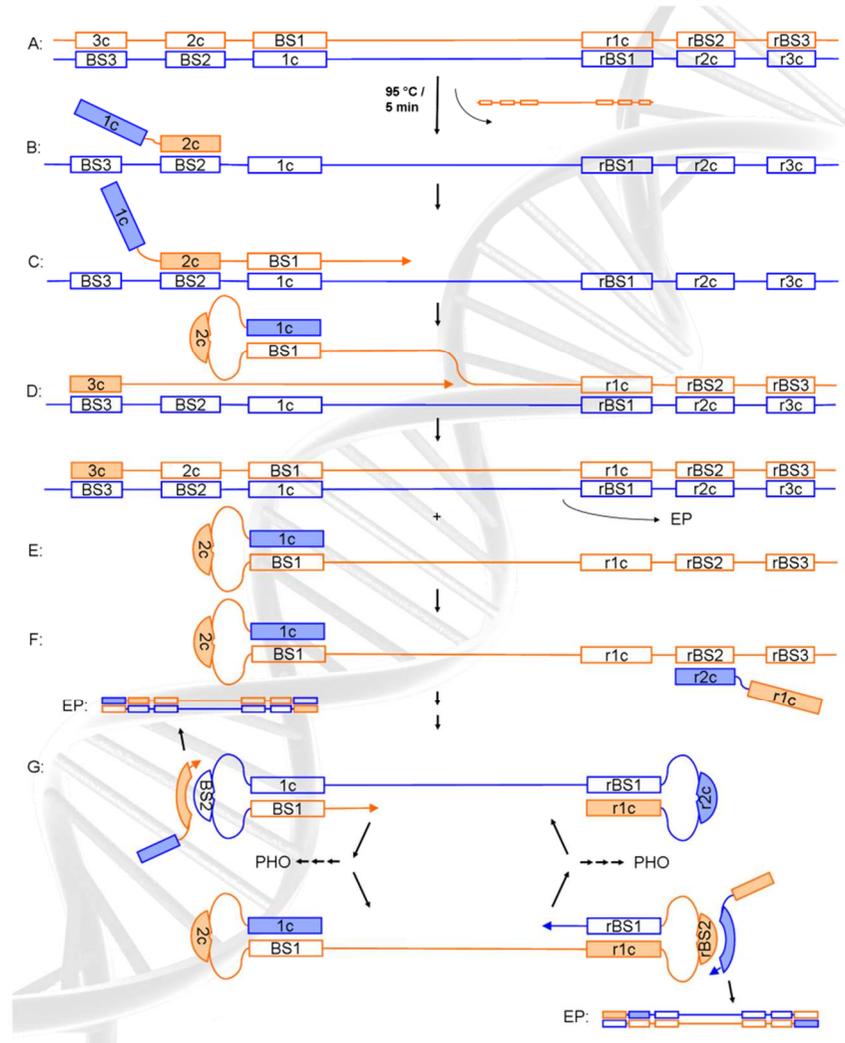
Polymerase chain reaction (PCR)

- 1983 – Kary Banks Mullis, Nobelpreis 1993
- Zyklischer, temperaturabhängiger Reaktionsverlauf
- Thermocycler erforderlich
- Detektion über Agarosegel
- Quantifizierung möglich (real time PCR)
- Bedingte Eignung für *on site* Analytik

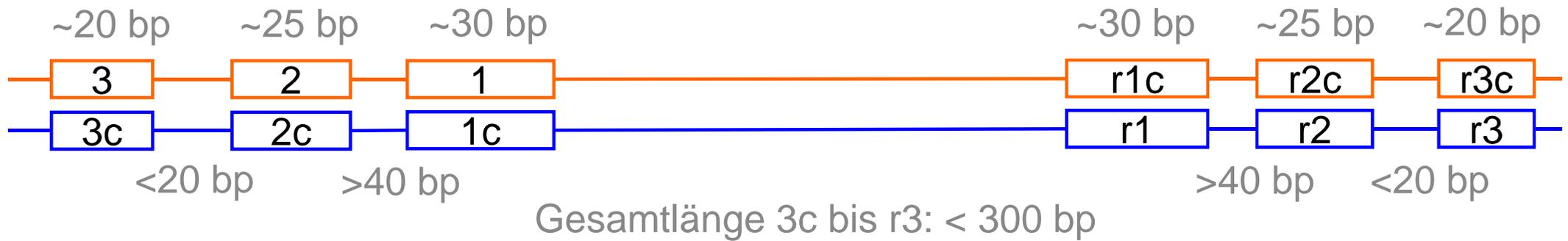
Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

- 2000 - Notomi et al.
- Isothermaler Reaktionsverlauf durch Polymerasen mit Strangverdrängungsaktivität
- Reaktion ohne Thermocycler möglich
- Sehr großer Substratumsatz - Detektion mit bloßem Auge möglich
- **Gute Eignung für *on site* Analytik**

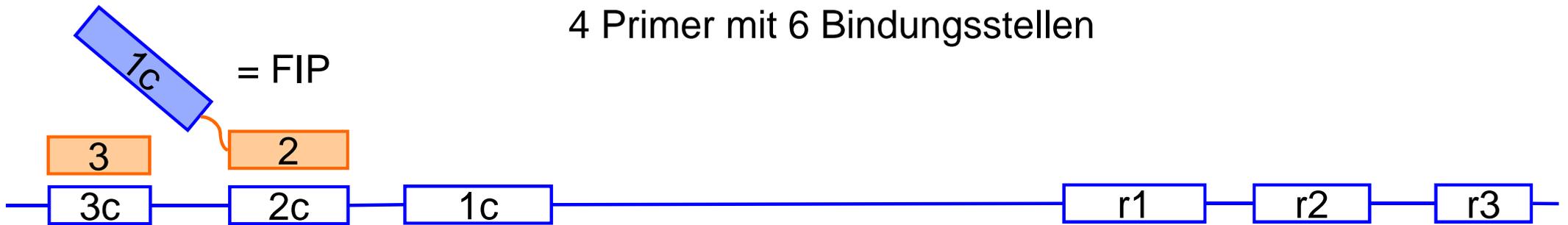
3. LAMP - Komplet

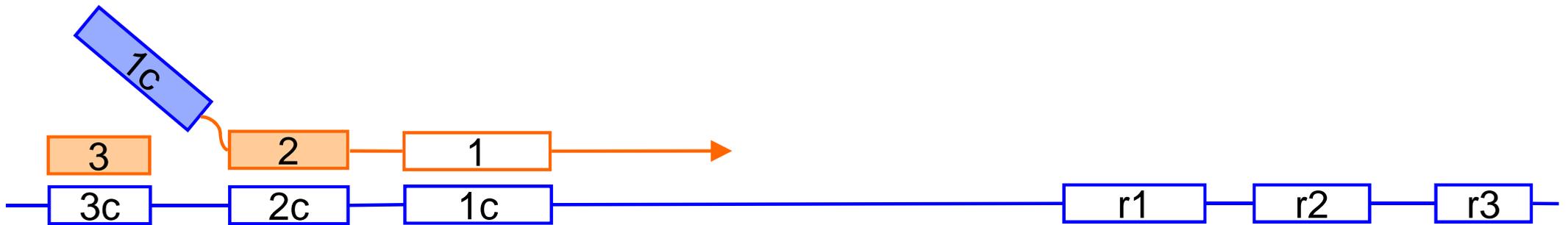


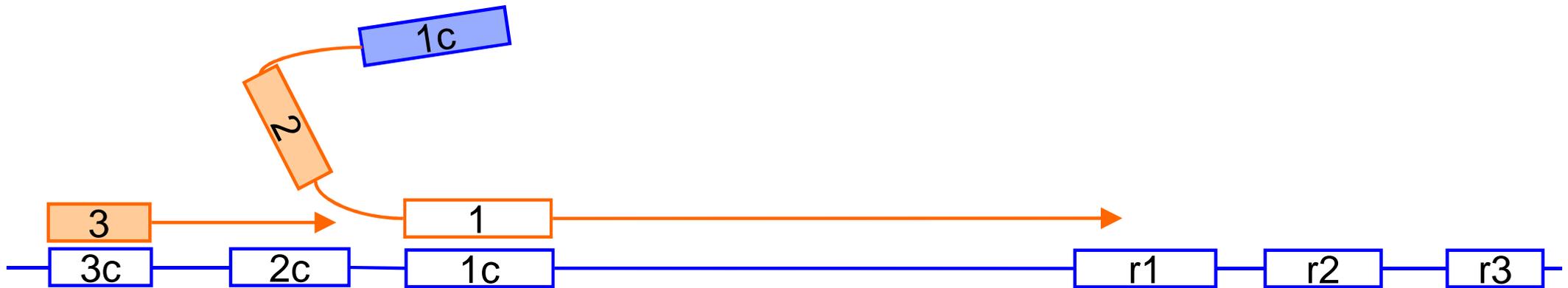
3. LAMP - Primerdesign

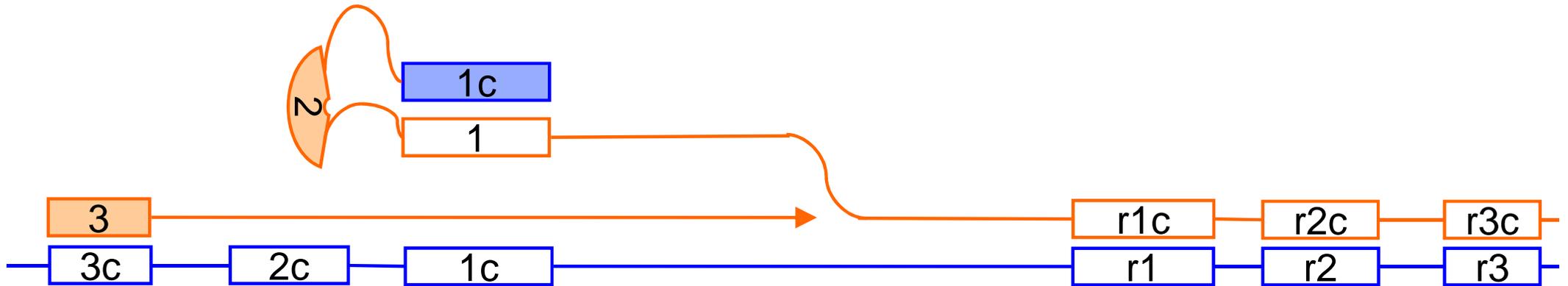


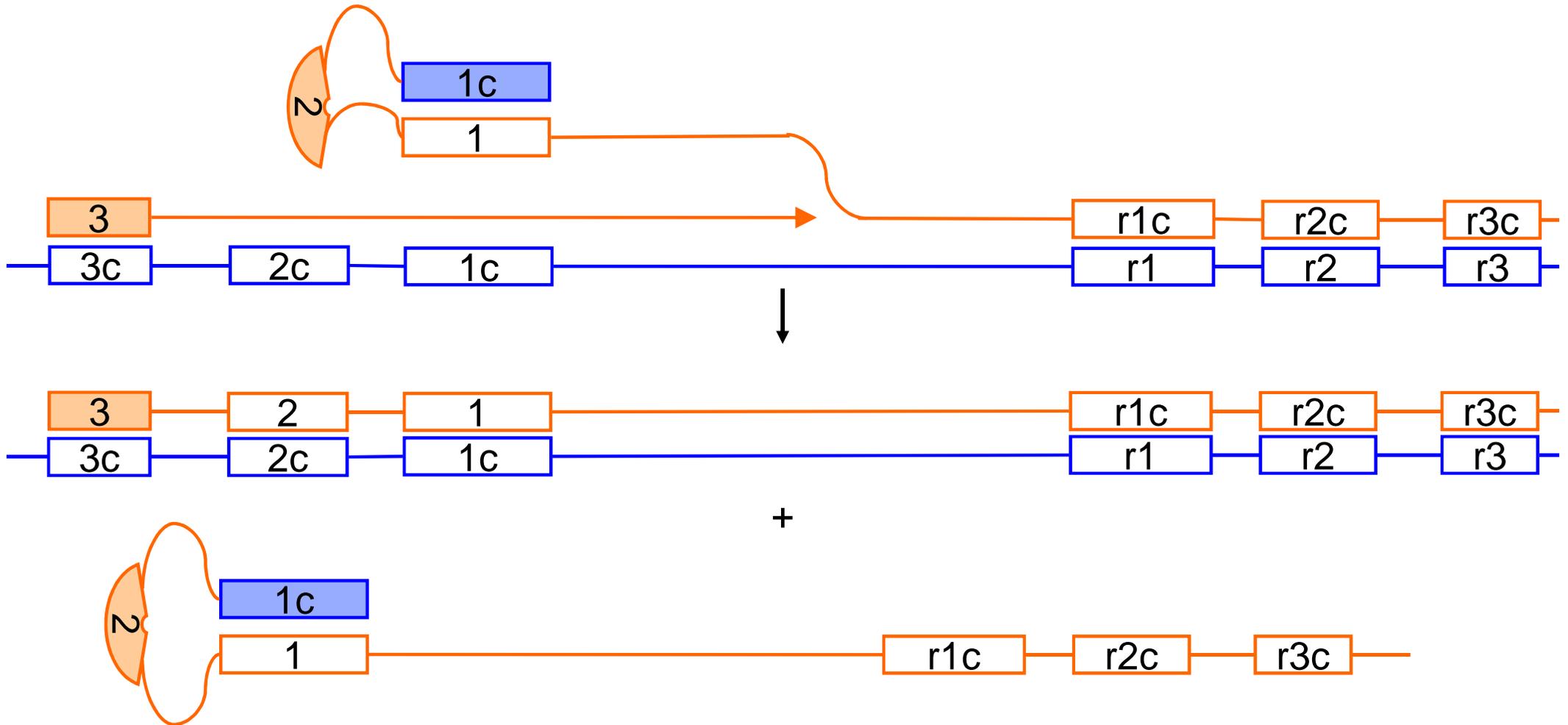
4 Primer mit 6 Bindungsstellen

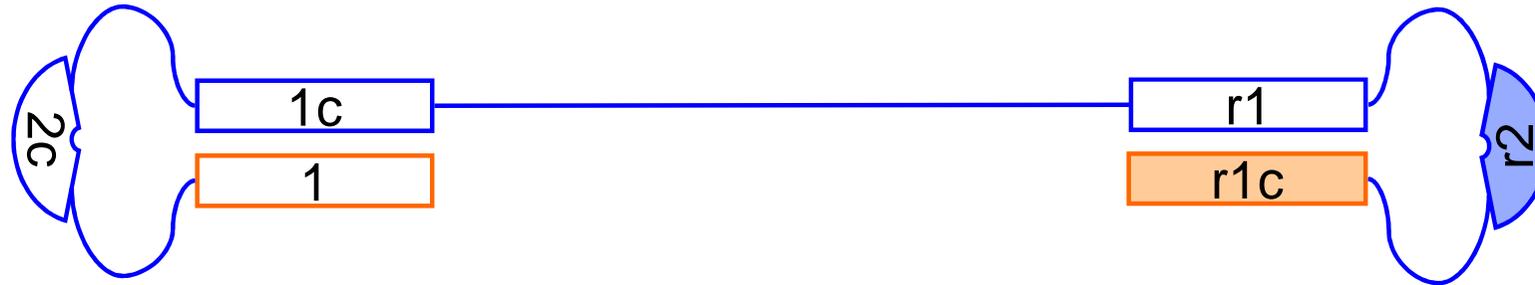




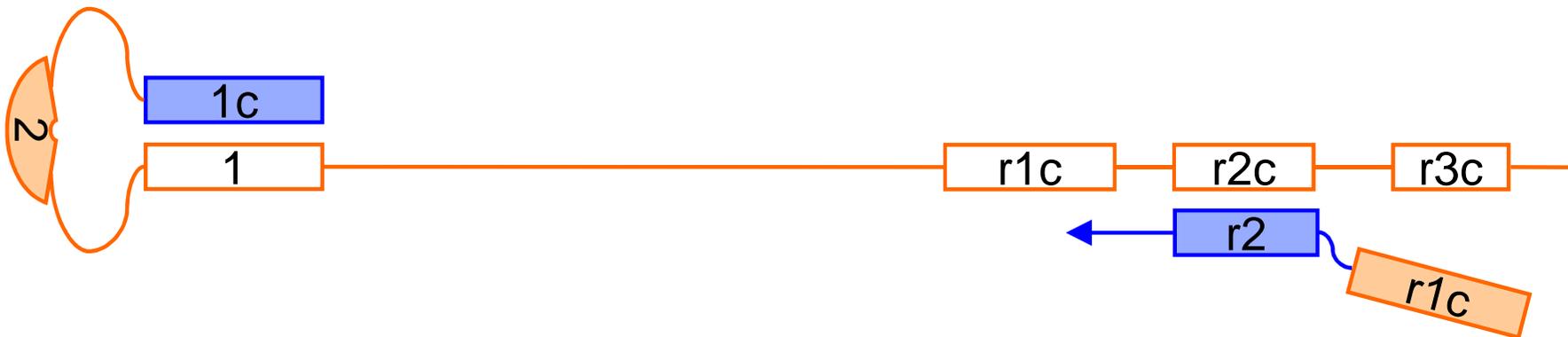


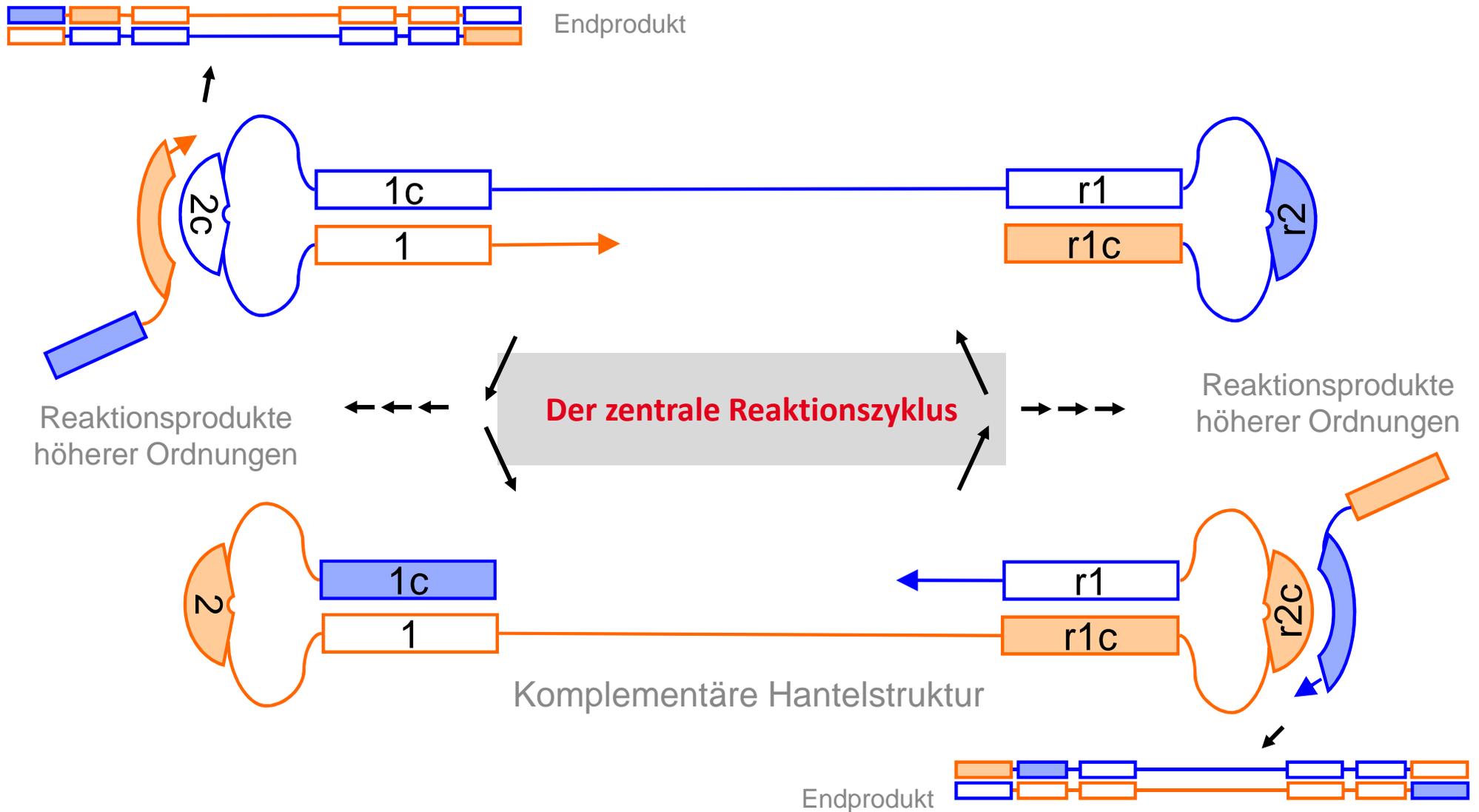






LAMP: Entstehung zentraler Strukturen



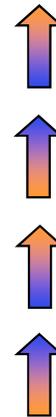


3. LAMP: Beispiel Gewürzanalytik

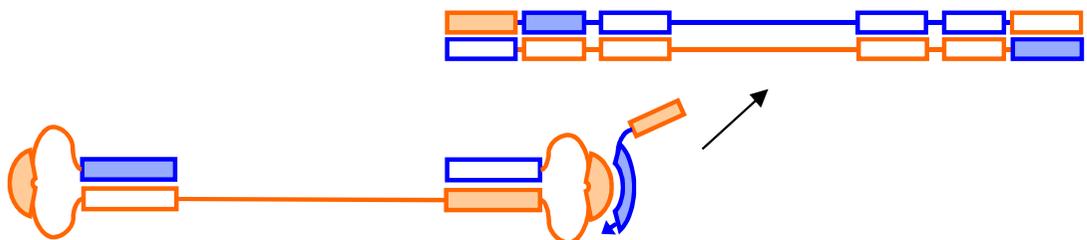
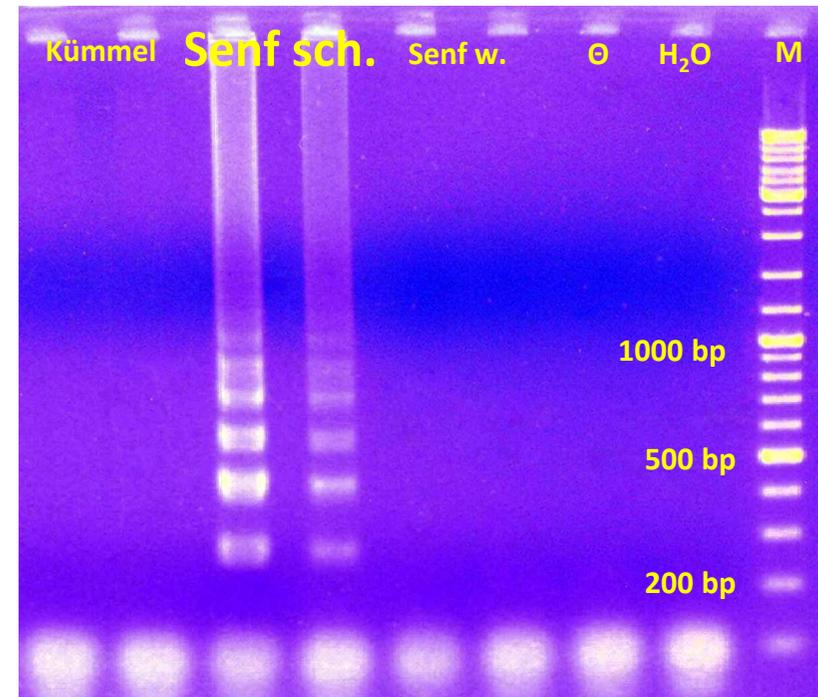
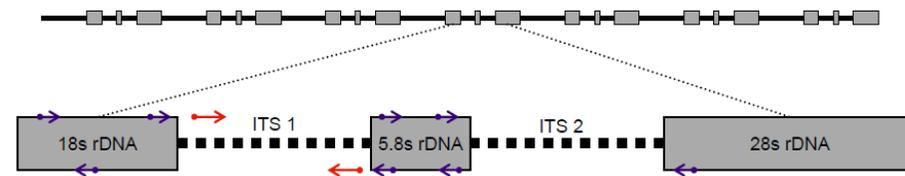
- **Spezifische Primer für schwarzen Senf**

- Amplifikationszeit: 80 min
- Reaktionstemperatur: 65 °C

Diverse Reaktionsprodukte höherer Ordnungen

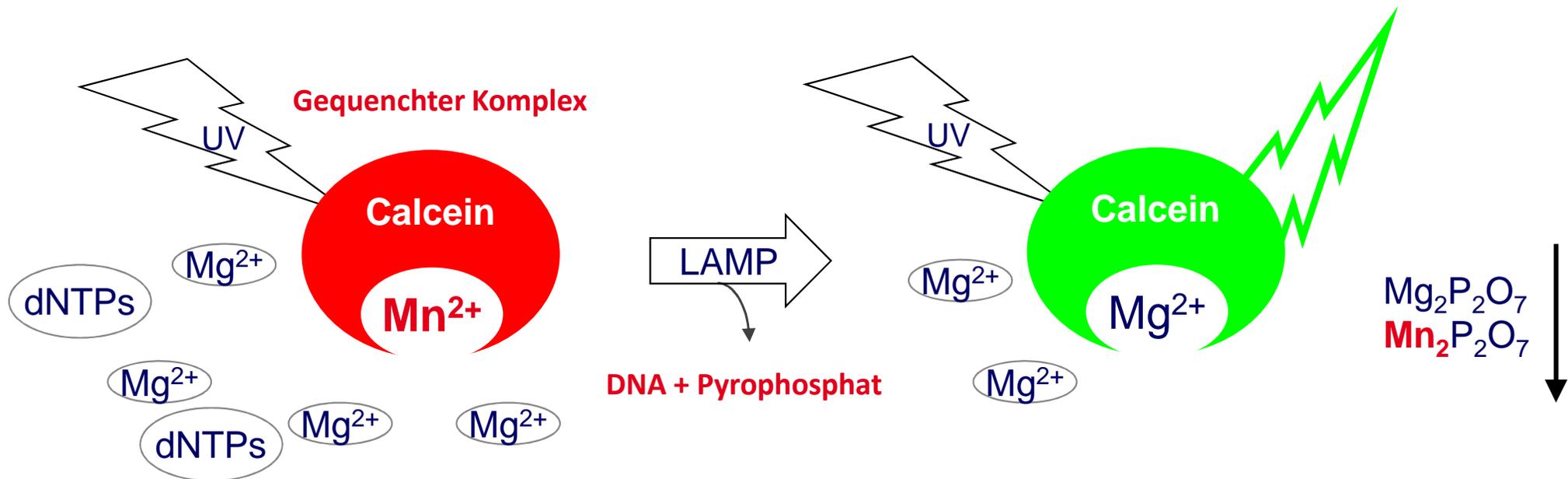
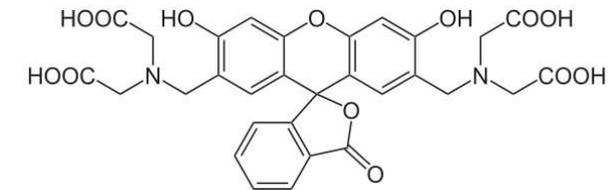


Aufbau der rDNA: Wiederholungen von rRNA-Genen und Spacern

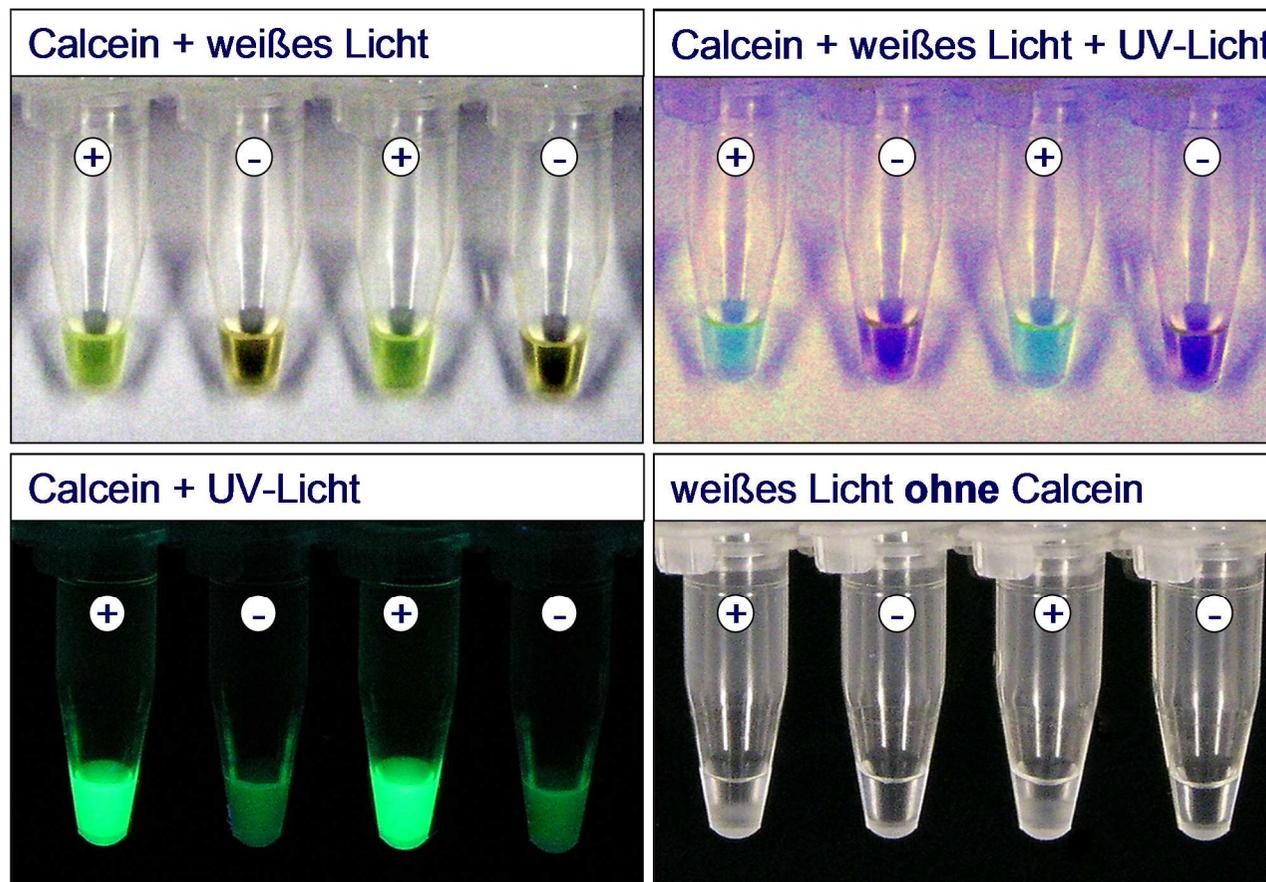


3. LAMP – Einfache visuelle Detektion

- Umfangreiche Möglichkeiten der visuellen Detektion
 - Trübung, Interkalationsfarbstoffe oder Pyrophosphat-Detektion



3. LAMP – Detektion mit / ohne Calcein

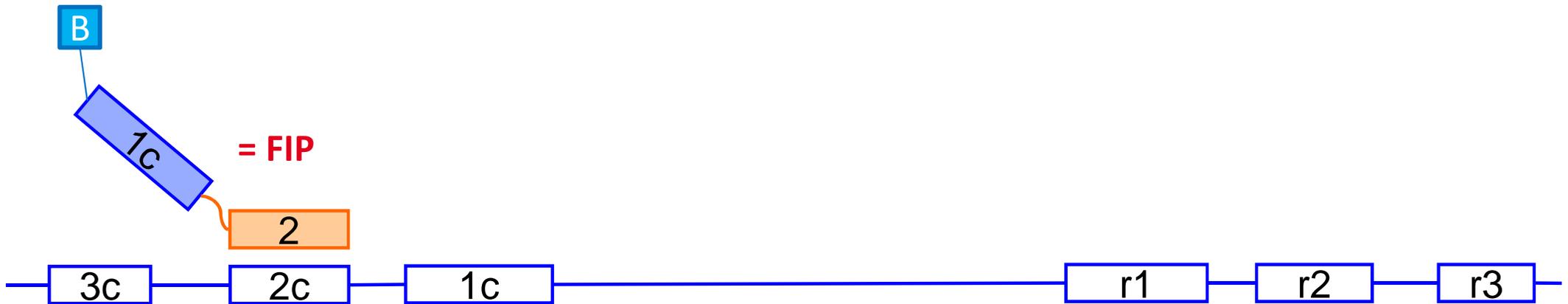


4. Gekoppelte Methoden – LAMP gekoppelt an Dipstick

- Entwicklung einer einfachen Schnellmethode zur DNA-Analytik „vor-Ort“
 - LAMP auf **Lateral-Flow Dipstick (LFD)**
 - **Hohe Produktbildung** stellt sich hier als wichtiger Vorteil heraus
- **Nachweisgrenze: 0,5 %**
- **Messzeit: unter 2 Stunden**

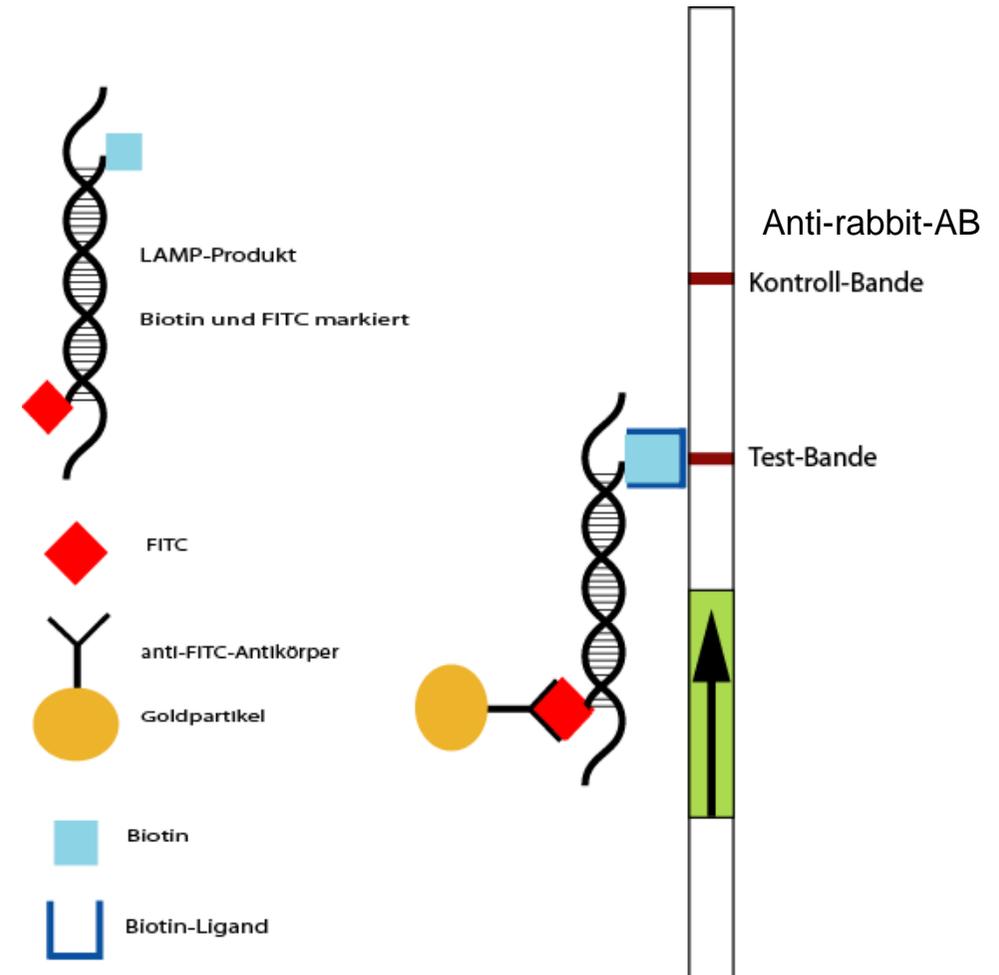


LAMP für Dipstick



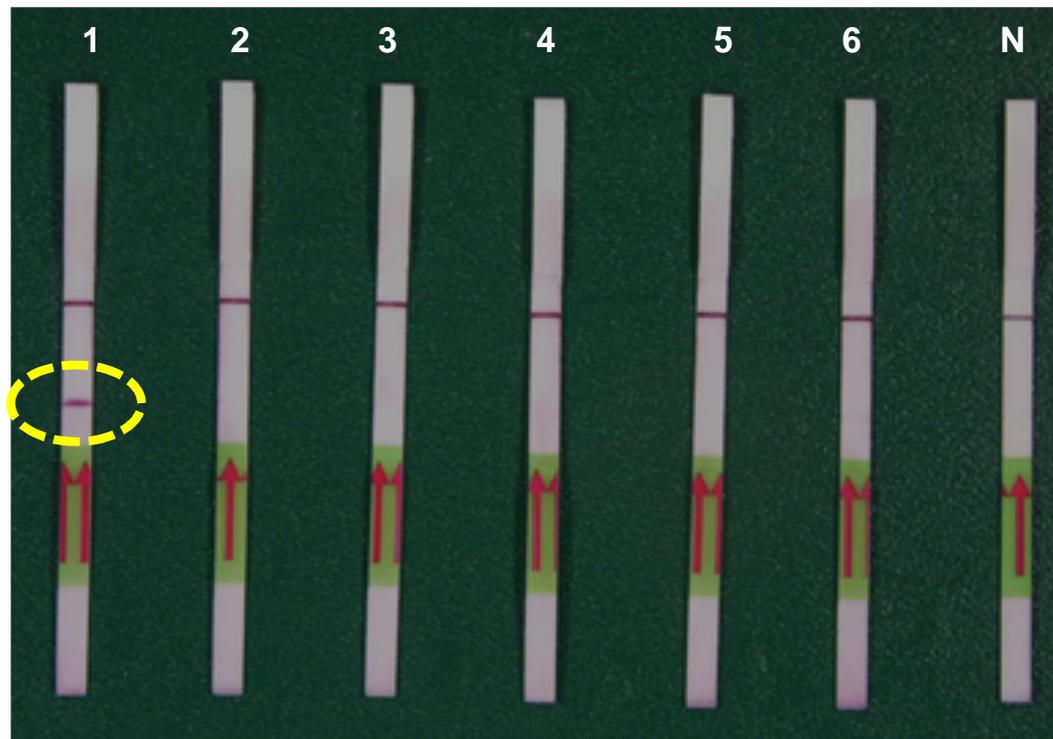
4. Gekoppelte Methoden – Lateral-Flow Dipstick

- **Biotin- markierten FIP-Primer** zur LAMP-Reaktion einsetzen
- Produkte mit **FITC- markierter Sonde** hybridisieren
- markierte LAMP-Produkte binden an Gold-markierten-Antikörper
- **Test-Bande** wird durch Kapillarkräfte überströmt und LAMP-Produkte werden gebunden
- **Messzeit:** LAMP 90 min, Hybridisierung 10 min, Inkubation 10 min

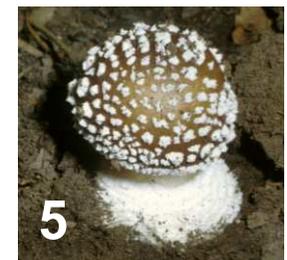


4. Gekoppelte Methoden – Nachweis des *Grünen Knollenblätterpilzes*

- Kreuztest mit anderen Pilzen



- 1: *Amanita phalloides*
- 2: *Amanita rubescens*
- 3: *Amanita citrina*
- 4: *Amanita muscaria*
- 5: *Amanita pantherina*
- 6: *Agaricus bisporus*
- N: Wasserwert



5. HCCP: Hazards & Critical Control Points – Ist tatsächlich drin, was draufsteht??

1. Probenbeschaffung

- Wie und woher eindeutig klassifizierte (möglichst genau beschrieben) Proben beschaffen? Herkunftsnachweis? Regionale Abgrenzung?
- Qualität des Probenmaterials? Sortenreinheit?
- Ist mein „Probenbeschaffer“ zuverlässig? Wichtig, insbesondere wenn Proben aus dem Ausland beschafft werden sollen. (**Am besten, man fährt selber hin...**)

2. Sequenzen

- Was ist meine Referenz? Was ist beispielsweise Edelkakao?
- Sequenzen in Datenbanken häufig nicht genau beschrieben: Stimmen die Sequenzen? Datenbanken enthalten oft Fehler, da jeder „seine“ Sequenzen hinterlegen kann (**Am besten, man sequenziert selber...**)

5. HCCP: Hazards & Critical Control Points – Ist tatsächlich drin, was draufsteht??

1. Probenbeschaffung

- Wie und woher eindeutig klassifizierte (möglichst genau beschrieben) Proben beschaffen? Herkunftsnachweis? Regionale Abgrenzung?
- Qualität des Probenmaterials? Sortenreinheit?
- Ist mein „Probenbeschaffer“ zuverlässig? Wichtig, insbesondere wenn Proben aus dem Ausland beschafft werden sollen. (**Am besten, man fährt selber hin...**)

2. Sequenzen

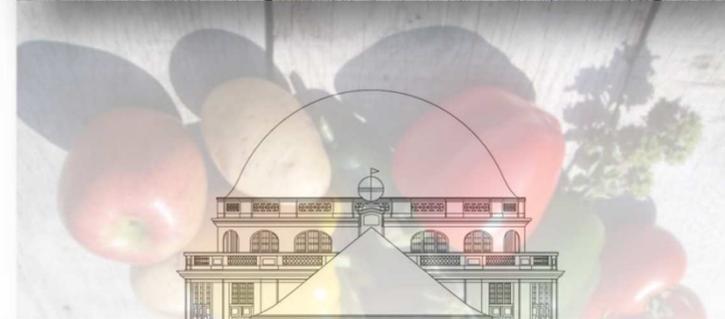
- Was ist meine Referenz? Was ist beispielsweise Edelkakao?
- Sequenzen in Datenbanken häufig nicht genau beschrieben: Stimmen die Sequenzen? Datenbanken enthalten oft Fehler, da jeder „seine“ Sequenzen hinterlegen kann (**Am besten, man sequenziert selber...**)



FORSCHUNGSKREIS
DER ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.



ALLIANZ
INDUSTRIE
FORSCHUNG



DANKE!

