

Master-Abschlussarbeit

Thema: Entwicklung einer isothermalen DNA-Amplifikationsmethode für einen qualitativen Schnelltest zur Fischartendifferenzierung

Zusammenfassung:

Bei Fischen und Fischereiprodukten kommt es recht häufig, unbeabsichtigt oder auch gewollt (*Food Fraud*), zu fehlerhaften Kennzeichnungen. Da dies wirtschaftliche und ökologische Schäden mit sich führt sowie ein gesundheitliches Risikopotenzial darstellt, soll im Rahmen eines Forschungsprojektes (Fördernummer AiF 18667 N) eine DNA-Chip basierte Methode zur Fischartendifferenzierung entwickelt werden. Die vorliegende Arbeit trug mit der Entwicklung einer isothermalen Amplifikationsmethode dazu bei. Im Gegensatz zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wird bei dieser Methode DNA bei einer konstanten und niedrigen Temperatur innerhalb einer recht kurzen Zeit (30 bis 60 Minuten) vervielfältigt.

Es wurden zwei Amplifikationsmethoden getestet, die Helikase-abhängige Amplifikation (HDA) und die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA). Für die RPA, die sich als die bessere Methode erwies, wurden die geeigneten Reaktionsbedingungen und die Anforderungen an die eingesetzten DNA-Extrakte getestet. Insgesamt konnte bei 26 verschiedenen Fischarten ein Fragment des *cyt b*-Gens und bei 19 Fischarten ein Fragment des 16SrDNA-Gens amplifiziert werden. Bei den Garnelenproben konnte bei vier verschiedenen Arten ein Fragment des 16SrDNA-Gens mittels RPA vervielfältigt werden. Von den ausgewählten 13 Zielspezies konnten bei dem *cyt b*-Gen alle Fische erfasst werden, wobei für das 16SrDNA-Gen von Fischen vier der elf Zielarten nicht amplifiziert wurden. Eine Multiplex-RPA sowie das Verwenden von Biotin-markierten Primern waren im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich. Für die RPA eigneten sich die zwei Probenahmemethoden (Gewebeentnahme mittels Tupfer und Kanüle) gut.

Die RPA hat sich insgesamt als robuste Amplifikationsmethode erwiesen, die dieselbe Spezifität wie eine PCR aufwies. Es konnte aus verschiedenen Arten von Extrakten (Rohextrakte, Magnetbead-Extrakte) DNA amplifiziert werden. Die Verarbeitung der Proben spielte für die Gesamtanalytik eine Rolle, denn marinierte Proben waren schwieriger zu amplifizieren, als nicht verarbeitete Proben. Lediglich die Auswahl der Primer machte die Methode anspruchsvoller als eine PCR, da die verwendeten Primer eine Länge von 32 Nukleotiden besitzen mussten.

Die RPA-Produkte wurden am Ende der Arbeit am DNA-Microarray getestet. Als Produkt der vorliegenden Masterarbeit wurde schließlich eine SOP erstellt, die als Modul für die spätere Gesamtanalytik von der Gewebeentnahme bis zum Hybridisierungsergebnis mit dem DNA-Chip eingesetzt werden soll.

Verfasser/in: Kristina Kamenjas

Betreuer/in: Prof. Dr. Veronika Hellwig, Dr. Ralf Moll, Dr. Erik Eschbach (Universität Hamburg)

Datum der Abgabe: 13.07.2018