

P 20 Identifizierung biotischer Verunreinigungen durch Hochdurchsatzsequenzierung

Identification of biotical impurities by next-generation sequencing

Brigitte Lukas, Corinna Schmiderer, Johannes Novak

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich
Johannes.Novak@vetmeduni.ac.at



DOI 10.5073/jka.2014.446.050

Zusammenfassung

Mit zunehmender Bedeutung der DNA-Sequenzierung wurden Methoden entwickelt, die einen erhöhten Durchsatz erlauben. Diese Methoden werden allgemein als „Sequenzierung zweiter Generation“ (engl. ‚second generation sequencing‘ oder ‚next-generation sequencing‘) oder „Hochdurchsatzsequenzierung“ bezeichnet (LIU et al., 2012).

Rohmaterialien von Arznei- und Gewürzpflanzen können niemals ganz frei von anderen Pflanzenarten oder mikrobieller Besiedelung sein. Daher wurden Grenzwerte erlaubter Verunreinigungen bzw. mikrobieller Belastung definiert, ohne aber die Arten (mit Ausnahme von gefährlichen Taxa wie z.B. *Salmonella*) zu identifizieren. Die neuen Technologien des Sequenzierens mit erhöhtem Durchsatz könnte man dazu nutzen, neben der Identifizierung der deklarierten Art auch eine Artbestimmung biotischer Verunreinigungen (Pflanzen, Pilze, Bakterien) im selben Analysengang durchzuführen, um eine bessere Risikoabschätzung gewährleisten zu können.

Als Beispiel wurde DNA von zwei Handelsproben von Salbei (*Salviae officinalis folium*) extrahiert und ribosomale DNA-Abschnitte (ITS1 und ITS2), die sowohl bei Pflanzen (LI et al., 2011) als auch bei Pilzen (SCHOCH et al., 2012) zur Artidentifizierung („DNA-Barcoding“) verwendet werden, mit PCR amplifiziert und zur Sequenzierung zweiter Generation (Technologie: Illumina MiSeq) vorbereitet. Bei Probe 1 wurden beim Sequenzieren insgesamt 396.479 Sequenzen, bei Probe 2 199.672 Sequenzen generiert.

Die Auswertung dieser Fülle an Sequenzen ergab, dass neben *Salvia officinalis* bei Probe 1 noch *Nigella sativa* und *Bupleurum baldense*, bei Probe 2 noch *Artemisia abrotanum* auftraten. Ausserdem wurden noch die folgenden Pilze identifiziert: *Aspergillus* sp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullans*, *Cladosporium* sp. und *Phoma* sp. in Probe 1; *Aspergillus* sp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium* spp., *Cladosporium* sp. und *Pleospora herbarum* in Probe 2.

Die Anzahl der Sequenzen pro Art könnte man auch quantitativ auswerten, da sie mit der Menge an DNA korreliert. Da aber die Anzahl der Kopien von ITS im Genom von Art zu Art sehr stark variieren kann, und andere Faktoren berücksichtigt werden müssen, ist eine quantitative Aussage nur bedingt zulässig. Durch weitere Entwicklungsarbeit könnte man aber in Zukunft auch quantifizierbarere Ergebnisse erzielen. Ein Lauf dieser hochtechnisierten Sequenzierung ist zwar sehr kostspielig, es gibt aber die Möglichkeit viele Proben parallel in einem Sequenzierlauf zu plazieren. Dadurch wäre es möglich, die Kosten auf ein Niveau anderer Routineuntersuchungen zu senken. Insgesamt könnte dies ein guter Ansatz für die Routinekontrolle sein, der es erstmals ermöglicht, die Artzusammensetzungen von Rohmaterialien in einem Analysengang zu bestimmen, sowie auch botanische und mikrobiologische Prüfungen zusammenzuführen.

Stichwörter: DNA-Barcoding, Sequenzierung zweiter Generation, Next Generation Sequencing, Hochdurchsatzsequenzierung, Pflanzen, Pilze, Bakterien, Qualitätskontrolle

Literatur

- LI, M., CAO, H., BUT, P.P.-H. und P.C. SHAW, 2011: Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *J Syst Evol* **49**: 271-283.
- LIU, L., LI, Y., LI, S., HU, N., HE, Y., PONG, R., LIN, D., LU, L. und M. LAW, 2012: Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* **2012**: 251364. doi: 10.1155/2012/251364.
- SCHOCH, C.L., SEIFERT, K.A., HUHNENDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J.L., LEVESQUE, C.A., CHEN, W., et al., 2012: Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 6241-6246.