

Fischrogen: Artidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS

C. Wind¹, E. Müller-Hohe¹, J. Fuchs², E. Becker¹, B. Bohl¹



Einleitung

Fischrogen wird weltweit als Lebensmittel in Verkehr gebracht. Bei „echtem“ Kaviar handelt es sich um den Rogen der weiblichen Störe. Dieser gilt als Delikatesse und ist im Hochpreissegment angesiedelt. Bei Rogen anderer Fischarten ist zusätzlich zur Bezeichnung Kaviar die entsprechende Fischart anzugeben. So finden sich beispielsweise Lachskaviar, Forellenkaviar oder Heringskaviar. Der Rogen des Seehasen wird als Deutscher Kaviar vermarktet. Diese im Vergleich zum „echten“ Kaviar preisgünstigeren Produkte sind häufig in deutschen Supermarktregalen anzutreffen.

Zum Schutz des Verbrauchers vor Täuschung wird am CVUA Freiburg die Sequenzierung als Routineanalytik zur Tierartbestimmung eingesetzt, um die Angabe der Fischart zu überprüfen. Als weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Fischarten hat sich die MALDI-TOF-Massenspektrometrie als zeitsparende und kostengünstige Analyseverfahren bewährt [1]. Sie kann auch zur Untersuchung von Fischrogen eingesetzt werden. Basis der Artidentifizierung bildet dabei die Detektion spezifischer Massenprofile von Proteinen. Die resultierenden charakteristischen Fingerprints werden mit vorhandenen Datenbankeinträgen abgeglichen. Bisher ist jedoch für die Matrix Fischrogen keine kommerzielle Datenbank verfügbar. Um diese Lücke zu schließen, entwickelt das CVUA Freiburg in Zusammenarbeit mit dem CVUA Karlsruhe derzeit eine erste Datenbank auf diesem Gebiet.

Material und Methoden

Proteinextraktion:

Für die Proteinextraktion wurde die für Fischarten beschriebene Methode [1] modifiziert: Ca. 5-10 mg Probe wurden in 500 µl Trifluoressigsäure (0,1%) mit einem Pistill zermahlen, im TissueLyser LT (Fa. Qiagen) aufgeschlossen, ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten zentrifugiert. Zur Reduktion störender Substanzen wie Salz wurde für Rogen die Methode um einen weiteren Aufreinigungsschritt mit Magnetic silica beads S-C18 (Fa. MoBiTec GmbH) ergänzt. 1 µl des Extraktes wurde auf das Target gegeben, trocknen gelassen und im Anschluss mit 1 µl Matrix (HCCA) überschichtet (Abb. 1).

Datenbankaufbau:

Zur Erzeugung von Referenzspektren für die Datenbank wurde Fischrogen verschiedener, mittels Sequenzierung bestätigter Arten verwendet (Cytochrom-b [2]). Dabei wurden häufig im Handel anzutreffende Vertreter berücksichtigt: *Acipenser spp.*, *Clupea harengus*, *Coregonus spp.*, *Cyclopterus lumpus*, *Gadus chalcogrammus*, *Oncorhynchus gorbusha*, *Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus mykiss*.

Nach Proteinextraktion wurden im MALDI microflex LT/SH System (Fa. Bruker) Referenzspektren erzeugt. Dazu wurden aus den vorbereiteten Proben Rohspektren im Massebereich 2-20 kDa aufgenommen. Es folgte eine Qualitätskontrolle bevor die Rohspektren durch die gerätespezifische Software in MSPs (Main Spectra Projections) umgewandelt wurden. Diese wurden als Referenz in der Datenbank hinterlegt. Für jede Referenz wurde ein Cross-Check gegen die weiteren in der Datenbank hinterlegten Referenzen durchgeführt.

Probenmessung:

Nach Proteinextraktion werden die Proben im MALDI microflex LT/SH System (Fa. Bruker) gemessen und von der gerätespezifischen Software mit den in der Datenbank hinterlegten Referenzen abgeglichen. Die Auswertung der Spektren erfolgt durch die Software anhand eines Score-Systems.

Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Identifizierung von Fischrogen mittels MALDI-TOF MS möglich ist. Das hier dargestellte Verfahren, bestehend aus Probenvorbereitung und der anschließenden massenspektrometrischen Messung, ermöglicht eine Bestimmung der Art innerhalb kurzer Zeit (~ 3,5 h).

Voraussetzung für die Identifizierung ist die Hinterlegung von Referenzspektren in einer Datenbank. Die Qualität der Analyse ist von der Anzahl und Güte der in der Datenbank verfügbaren Referenzen abhängig. Für Fischrogen umfasst die Datenbank derzeit 17 Referenzen von 8 verschiedenen Arten (Abb. 2). Die Erweiterung der Datenbank um weitere Referenzen wird fortgeführt.

Als Voraussetzung für den Routineeinsatz im Labor werden parallel Validierungsstudien zur Überprüfung des Systems durchgeführt, um die Sensitivität und Spezifität der in der Datenbank vorhandenen Arten zu ermitteln.

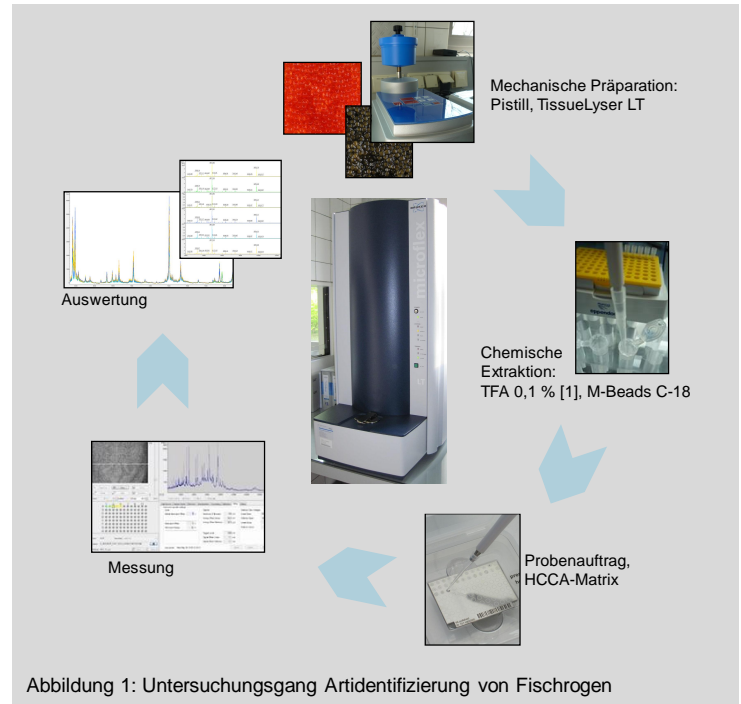


Abbildung 1: Untersuchungsablauf Artidentifizierung von Fischrogen

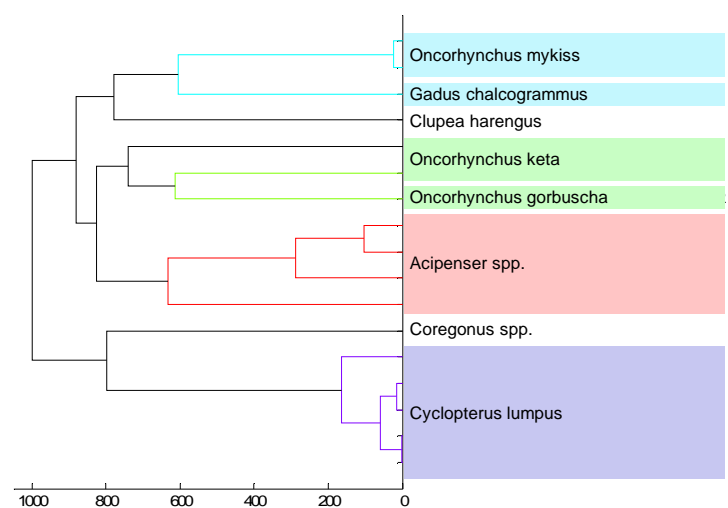


Abbildung 2: Dendrogramm der Fischrogen-Referenzen

Literatur:

- Fuchs, J., Krause, A., Skuballa, J., Eisenbeiss, F., Pietsch, K., Wind, C. (2017). Fischarten-Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS. Amtstierärztlicher Dienst, Sonderausgabe: 26.9.-29.9.2017, S. 149.
- Ämtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: BVL L 10.00-12:2012-07 Untersuchung von Lebensmitteln - Fischartbestimmung in rohen Fischen und Fischerzeugnissen durch Sequenzanalyse von Cytochrom-b-Sequenzen
- Sabrowski, A., Bachert, A., Müller-Hohe, E., Fuchs, J., Wind, C. (2019). Identifikation von Krebstieren mittels MALDI-TOF-MS. Poster 60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG vom 24. bis 27. 09. 2019 in Garmisch-Partenkirchen

Anschrift der Verfasser:

¹ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg, e-mail: poststelle@cvuafw.bwl.de
² Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, Weißenburger Str. 3, 76187 Karlsruhe, e-mail: poststelle@cvuaka.bwl.de

60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG vom 24. bis 27. 09. 2019 in Garmisch-Partenkirchen



Baden-Württemberg