

Betreuer/-in	Jiawen Zhang
Arbeitstitel	Entwicklung und Etablierung einer Multiplex-PCR zur spezifischen Detektion hitzeresistenter Schimmelpilzsporen in Fruchtsäften
Art der Arbeit und Studiengang	<input checked="" type="checkbox"/> Bachelor-/ Diplomarbeit <input type="checkbox"/> Masterarbeit Geeignet für alle aus den Studiengängen: Bioprozesstechnik Biotechnologie Lebensmitteltechnologie Brauwesen und Getränketechnologie
Nullhypothese und Beschreibung des Status Quo	<p>Hitzeresistente Schimmelpilzsporen stellen ein bekanntes Problem in der Fruchtsaftindustrie dar. Während vegetative Zellen durch thermische Verfahren inaktiviert werden, überstehen die Ascosporen Pasteurisationsprozesse und können im Endprodukt auskeimen, was zu Verderb und Qualitätsmängeln führt. Der derzeitige Nachweis erfolgt überwiegend über kulturabhängige Methoden mit langen Analysezeiten.</p> <p>Ziel dieser Bachelorarbeit ist die Entwicklung einer spezifischen Multiplex-PCR zur schnellen Detektion hitzeresistenter, fruchtsaftschädlicher Schimmelpilzsporen. Dabei sollen in einem einzigen PCR-Ansatz ausschließlich jene Schimmelpilzstämme nachgewiesen werden, die das jeweilige artspezifische Zielgen tragen. Der Fokus liegt dabei auf einer hohen analytischen Spezifität bei gleichzeitiger Reduktion des zeitlichen Analyseaufwands.</p> <p>Im Rahmen dieser Arbeit werden acht bis zwölf hitzeresistente Schimmelpilzarten, die für die Fruchtsaftindustrie von Relevanz sind, untersucht. Die Auswahl und Einteilung der Organismen erfolgt anhand ihrer Auftretenshäufigkeit in Fruchtsäften, wobei eine Klassifizierung in drei bis vier Häufigkeitsgruppen (z. B. häufig, moderat häufig, selten) vorgenommen wird.</p> <p>Für jede dieser Gruppen werden geeignete molekulargenetische Zielregionen definiert. Als Marker kommen insbesondere die ITS-Region sowie das Calmodulin-Gen (CaM) und das β-Tubulin-Gen (benA) zum Einsatz, da diese Gene einerseits konserviert sind, andererseits jedoch ausreichend Sequenzvariabilität für eine spezifische Differenzierung aufweisen.</p> <p>Auf Grundlage dieser Zielgene werden gruppenspezifische Primerpaare und (TaqMan-)Sonden entwickelt, die eine eindeutige Zuordnung der amplifizierten DNA zu den jeweiligen Schimmelpilzgruppen erlauben. Das Primer- und Sondendesign erfolgt unter Berücksichtigung von Sequenzspezifität, Amplifikationseffizienz sowie der Kompatibilität innerhalb eines Multiplex-PCR-Systems, um einen parallelen Nachweis der Zielorganismen in einem einzigen PCR-Ansatz zu ermöglichen.</p> <p>Zur Überprüfung der Spezifität werden Referenz-DNA-Proben der Zielorganismen sowie DNA nicht relevanter Schimmelpilze, Hefen und</p>

	<p>Bakterien eingesetzt. Zusätzlich werden Negativkontrollen ohne Template-DNA in jede PCR-Serie integriert.</p>
<p>Methodenaufstellung</p>	<p>Die hitzeresistenten Schimmelpilzsporen werden aus vorhandenen Isolaten gewonnen. Die Methode der Sporen DNA-Extraktion wird unter Verwendung einiger kommerzielle DNA-Reinigungskits durchgeführt. Die DNA-Konzentration und -Reinheit werden mittels NanoDrop bestimmt. Die Sequenzen des Zielgens werden aus öffentlichen Sequenzdatenbanken bzw. Literaturrecherche bezogen. Auf Basis der Alignments werden geeignete Zielregionen für das Primer- und Sondendesign identifiziert. Das Primer- und Sondendesign erfolgt mithilfe einer Primer-Design-Software. Dabei werden Ampliconlängen, Schmelztemperaturen, GC-Gehalt sowie das Potenzial zur Primer-Dimer-Bildung berücksichtigt. Die (Taqman-)Sonden werden mit unterschiedlichen Fluorophoren und Quenchern ausgestattet, um eine gleichzeitige Detektion mehrerer Zielsequenzen im Multiplex-PCR-Ansatz zu ermöglichen. Die PCR-Reaktionen werden als Real-Time-PCR in einem geeigneten Thermocycler durchgeführt (LightCycler® 480).</p>
<p>Zeitraum</p>	<p>10-12 Wochen</p>

