

Authentifizierung ausgewählter Geflügelspezies mittels Pentaplex-Real-Time-PCR

Authentication of selected poultry species by means of pentaplex real-time PCR

S. ANDRÉE und F. SCHWÄGELE

Zusammenfassung

Zum Schutz der Verbraucher in Bezug auf falsch deklarierte Fleischwaren ist es notwendig, Methoden zur Hand zu haben, die eine eindeutige Identifizierung tierischer Bestandteile ermöglichen. Um eine eindeutige Identifizierung einiger der in Europa häufig genutzten Geflügelarten – Huhn, Pute, Fasan, Wachtel und Perlhuhn – mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu ermöglichen, wurden in vorausgegangenen Studien im Jahre 2007 sowohl bereits vorhandene Primersysteme auf ihre Spezifität getestet, als auch neue Primersysteme entwickelt. Als Grundlage für die tierartspezifischen Primer diente das mitochondriale *Cytochrome b-Gen*, das vielfach zur Tierartauthentifizierung eingesetzt wird. Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde ein Pentaplex-Real-Time PCR System entwickelt. Es wurden passend zu jedem Primersystem fluoreszenzmarkierte Sonden entwickelt. Basierend auf der TaqMan-Technik kamen die Fluorophore ROX, JOE, FAM, DY682 und ATTO633 sowie die Black Hole Quencher 1 und 2 zum Einsatz. Das so entwickelte Pentaplexsystem zur Bestimmung von DNA-Gehalten wurde bezüglich Spezifität, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit, Richtigkeit sowie Messunsicherheit erprobt. Auf Grund der zum Einsatz kommenden Real-Time-Multiplex-PCR-Technik ist es somit möglich, alle fünf Spezies in einer einzigen Analyse nachzuweisen.

Summary

To protect the consumer against incorrect labelled meat products it is necessary to have methods for a clear identification of animal components. Already in 2007 PCR primer systems were developed and reviewed, respectively, for the authentication of selected commonly used domestic poultry species. The mitochondrial *cytochrome b gene* was applied for interspecies comparison. Based on this work a pentaplex real-time PCR system was developed. Using the TaqMan technology fluorophores such as ROX, JOE, FAM, DY682 and ATTO633 as well as Black Hole Quencher 1 und 2 were used. The developed analytical system was tested for specificity, reproducibility, accuracy, sensitivity and uncertainty of measurement. Due to the multiplex-PCR character of the analytical method used, it is possible to detect all of the five poultry species in one run.

Schlüsselwörter	Authentifizierung – Geflügel – tierartspezifische Primer – TaqMan®-Sonden – <i>Cytochrome b-Gen</i> – Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion
Key Words	authentication – poultry – species-specific primer – TaqMan®-probes – <i>cytochrome b-gene</i> – multiplex polymerase chain reaction

Einleitung

Am 28. Januar 2002 trat die EU-Verordnung 178/2002 in Kraft. Artikel 18 dieser Verordnung regelt seit dem 01. Januar 2005 die Rückverfolgbarkeit von Lebensmitteln. Alle an der Produktions- und Wertschöpfungskette Beteiligten (wie Zulieferer, Landwirte, Importeure, Transporteure, Verarbeiter und Händler) stehen

seither in der Pflicht, jeden Produktionsschritt lückenlos zu dokumentieren. Eine Grundvoraussetzung der Rückverfolgbarkeit ist die Authentizität der Ware. Gerade beim Fleischeinkauf ist dies für den ungeschulten Verbraucher nicht immer leicht ersichtlich.

Preislich unterscheiden sich verschiedene Geflügelspezies in Abhängigkeit von der

Herkunft sowie der Marktsituation signifikant. Eine sprunghafte Änderung dieser Einflussfaktoren kann durchaus den Weg zu einer möglichen Verbrauchertäuschung öffnen.

Immer komplexer werdende Produktionsprozesse führen außerdem zu einem steigenden Risiko der Verschleppung von Ausgangsprodukten von einem Erzeugnis zu einem anderen.

Um diesen komplexen Problemen entgegentreten zu können, sind Methoden notwendig, welche die Authentizität der Waren qualitativ und quantitativ überprüfen können. Diese Methoden müssen in der Lage sein, in hochprozessierten und komplexen Produkten eine Vielzahl von Spezies nachzuweisen.

Die PCR als Technik kommt bereits seit geraumer Zeit zum Einsatz, um Spezies in verarbeiteten Fleischerzeugnissen nachzuweisen (MATSUNAGA *et al.* 1999; BINKE *et al.* 2005; STIRTZEL *et al.* 2006). Dabei ist der Nachweis einzelner Spezies aufwändig und teuer. Mit der Entwicklung der Real-Time-PCR und Multiplex-fähiger Geräte hat sich die Möglichkeit eröffnet, eine begrenzte Anzahl von Einzel-Spezies in einer Analyse parallel nachzuweisen (KÖPPEL *et al.* 2009). Begrenzende Faktoren sind hier die optischen Möglichkeiten der Instrumente, sowie die Verfügbarkeit adäquater Fluorophore und Quencher. In der vorliegenden Studie wird ein Pentaplex-Real-Time PCR System zum gleichzeitigen Nachweis von DNA der Spezies Huhn, Pute, Fasan, Wachtel und Perlhuhn in verarbeiteten Fleischerzeugnissen präsentiert.

Material und Methoden

Probenmaterial

Frisches bzw. tiefgekühltes Fleisch sowie Geflügelfleischerzeugnisse zur Überprüfung der Spezifität wurden in lokalen Märkten erworben. Die Brühwurstproben S1-S8 wurden im Rahmen des EU-Projektes MolSpec-ID (QLK1-CT-02373) hergestellt. Alle Proben wurden bei -20 °C gelagert.

DNA Extraktion

Die DNA Extraktion und Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Wizard®, Plus Minipreps DNA Purification Systems der Fa. Promega, Madison, USA. In aller Regel wurden 300 mg homogenisiertes Probenmaterial extrahiert. Die DNA wurde in 100 µL Elutionspuffer nach Herstellerangaben eluiert. Der Gehalt an Nucleinsäuren wurde nach WARBURG und CHRISTIAN (1942) spektralphotometrisch bestimmt (DU® 7400 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und auf 10 µg/mL eingestellt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit einer Heringssperma-DNA Lösung (Promega, Madison, USA) (10 µg/mL). Die Lagerung aller DNA-Lösungen erfolgte bei -20 °C.

Primer und Sonden

Für die Geflügelart Huhn wurden die Primer der Literatur (DOOLEY *et al.* 2004) entnommen. Die Primer für die Tierarten Pute, Perlhuhn, Fasan und Wachtel wurden im Rahmen einer früheren Studie etabliert (STIRTZEL *et al.* 2006). Sequenzvergleiche (CLUSTAL und BLASTN) wurden unter Verwendung des HUSAR-Programmpaketes (Heidelberg UNIX Sequence Analysis Package W2H 4.1) ausgeführt. Bei der Entwicklung der TaqMan®-Sonden kamen die Fluorophore JOE (gelb), ROX (orange), FAM (grün), ATTO633 (rot) und DY682 (crimson) zusammen mit Quenchern aus der Black Hole Quencher™ Familie zum Einsatz. Einzelheiten können den Tabellen 1 bis 5 entnommen werden. Alle Primer und Sonden wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

Real-Time-PCR

Der Mastermix je Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 5,5 µL PCR-Wasser, jeweils 0,5 µL des Primer- und Sondenmix, 1 µL einer 25 mM Magnesiumchloridlösung sowie 12,5 µL des QuantiTect Multiplex PCR NoRox Kit der Fa. Qiagen AG, Hilden, Deutschland. Dazu wurden jeweils 5 µL der auf 10 µg/mL eingestellten DNA-Lösungen gegeben. Die optimierten Konzentrationen des Primer- und Sondenmix können Tabelle 6 entnommen werden.

Tab. 1: Primer-Sequenzen (DOOLEY *et al.* 2004) sowie Sonden-Sequenz für das tierartspezifische PCR-System Huhn auf Basis des mitochondrialen Cytochrom b-Gens

Bezeichnung der Primer	Länge	Sequenz in 5'- 3' Richtung	T _M
Huhn forward	23	AGC AAT TCC CTA CAT TGG ACA CA	60,99 °C
Huhn reverse	25	GAT GAT AGT AAT ACC TGC GAT TGC A	61,30 °C
Huhn - JOE	29	JOE - CAG TCG ACA ACC CAA CCC TTA CCC GAT TC - BHQ1	69,50 °C

Produktsequenz für die Tierart Huhn (*Gallus gallus*):
Accession No.: L08376

1 AGCAATTCCC TACATTGGAC ACACCCTAGT AGAGTGAGCC TGAGGGGGAT
51 TTTCAGTCGA CAACCCAACC CTTACCCGAT TCTTCGCTTT ACACTTCCCTC
101 CTCCCCTTG CAATCGCAGG TATTACTATC ATC

Tab. 2: Primer-Sequenzen (STIRTZEL *et al.* 2006) sowie Sonden-Sequenz für das tierartspezifische PCR-System Pute auf Basis des mitochondrialen Cytochrom b-Gens

Bezeichnung der Primer	Länge	Sequenz in 5'- 3' Richtung	T _M
Pute forward	23	CAC TCT TGC ATT CTC TTC TGT GG	62,77 °C
Pute reverse	21	GGA GGT TAT GGA GGA GTC AAC	62,57 °C
Pute - ROX	27	ROX - CCT ACA CAT GCC GAA ACG TAC AAT ACG - BHQ2	65,00 °C

Produktsequenz für die Tierart Pute (*Meleagris gallopavo*):
Accession No.: L08381

1 CACTCTGCA TTCTCTCTG TGG CCTACAC ATGCCGAAAC GTACAATACG
51 GTTGACTCCT CCATAACCTC C

Tab. 3: Primer-Sequenzen (STIRTZEL *et al.* 2006) sowie Sonden-Sequenz für das tierartspezifische PCR-System Wachtel auf Basis des mitochondrialen Cytochrom b-Gens

Bezeichnung der Primer	Länge	Sequenz in 5'- 3' Richtung	T _M
Wachtel forward	22	TGT ACC CTA CAT CGG CCA AAC C	64,54 °C
Wachtel reverse	22	GTC AGA TGA GAT TCC TAA TGG G	60,81 °C
Wachtel - FAM	28	FAM - CCT ACC CTA ACC CGA TTC TTC GCC CTC C - BHQ1	71,00 °C

Produktsequenz für die Tierart Wachtel (*Coturnix coturnix*):
Accession No.: L08377

1 TGTACCTAC ATCGGCCAAA CCCTAGTAGA ATGAGCCTGA GGAGGCTTT
51 CAGTTGACAA TCCTACCTA ACCCGATTCT TCGCCCTCCA CTTCCTCCCTC
101 CCATTCTTAA TCGCAGGAAT CACTATCATC CACCTCACAT TCCTACACGA
151 ATCAGGCTCA AATAACCCAT TAGGAATCTC ATCTGAC

Tab. 4: Primer-Sequenzen (STIRTZEL et al. 2006) sowie Sonden-Sequenz für das tierartspezifische PCR-System Fasan auf Basis des mitochondrialen Cytochrome b-Gens

Bezeichnung der Primer	Länge	Sequenz in 5'-3' Richtung	T _M
Fasan forward	19	GAG ACA TGA AAC ACT GGA G	58,00 °C
Fasan reverse	19	CAG GTC CAT TCT ACC AAG G	60,16 °C
Fasan - ATTO633	28	ATTO633 - CGT CCT ACT CCT CAC ACT CAT AGC AAC C - BHQ2	68,00 °C

Produktsequenz für die Tierart Fasan (*Phasianus colchicus*):
Accession No.: AF028798

1 GAGACATGAA ACACGGAGT CGTCCTACTC CTCACACTCA TAGCAACCGC
51 CTTCTGTAGGA TATGTCCTTC CATGAGGACA AATATCATTT TGAGGAGCTA
101 CCGTCATCAC AAACCTATTTC TCAGCAATCC CCTACATTGG ACAAACCTTG
151 GTAGAATGGA CCTG

Tab. 5: Primer-Sequenzen (STIRTZEL et al. 2006) sowie Sonden-Sequenz für das tierartspezifische PCR-System Perlhuhn auf Basis des mitochondrialen Cytochrome b-Gens

Bezeichnung der Primer	Länge	Sequenz in 5'-3' Richtung	T _M
Perlhuhn forward	20	GCA TAC GCC ATC CTC CGC TC	66,55 °C
Perlhuhn reverse	19	GCT GCC CAC TCA GGT TAG A	62,32 °C
Perlhuhn - DY682	29	DY682 - TGG AGG CGT ACT AGC ACT AGC AGC CTC CG - BHQ2	72,30 °C

Produktsequenz für die Tierart Perlhuhn (*Numida meleagris*):
Accession No.: L08383

1 GCATACGCCA TCCTCCGCTC AATTCCAAAC AAACTTGGAG GCGTACTAGC
51 ACTAGCAGCC TCCGTACTTA TCCTCCTCCT AATCCCATTG CTCCACAAAT
101 CCAAACAAACG AACCATAACA TTCCGCCCAT TCTCCCAACT TCTATTCTGA
151 CTCCTAGTAG CCAACCTTCT CATTCTAACCG TGAGTGGGCA GC

Tab. 6: Optimierte Primer- und Sondenkonzentrationen

Primer	Konzentration ^{*)} (µM)	Sonde	Konzentration ^{*)} (µM)
Fasan f/r	0,2	Fasan-ATTO633	0,1
Huhn f/r	0,2	Huhn-JOE	0,08
Pute f/r	0,1	Pute-ROX	0,02
Wachtel f/r	0,2	Wachtel-FAM	0,1
Perlhuhn f/r	0,2	Perlhuhn-DY682	0,08

^{*)} alle Verdünnungen in 1xTE-Puffer

Die PCR wurde auf dem Real-Time Cycler Rotorgene 6000 der Fa. Qiagen AG, Hilden, Deutschland nach folgendem Protokoll durchgeführt: Initiale Denaturierung

95 °C/15 min; Denaturierung: 95 °C/15 s, Annealing 56 °C/20 s, Elongation 72 °C/20 s für 35 Zyklen.

Ergebnisse

Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR Systeme wurde DNA der folgenden Spezies isoliert und im hier präsentierten Pentaplex-PCR-System getestet: Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Pferd, Bison, Gans, Ente, Strauss, Hirsch, Känguru, Wildschwein, Zwiebel, Knoblauch, Pfeffer, Muskat, Kardamom, Zimt, Paprika sowie Herinssperma-DNA. In keinem Fall trat eine Querempfindlichkeit von mehr als 0,01 % auf.

Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Messunsicherheit

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Messunsicherheit der Real-Time-PCR wurden DNA Extrakte der fünf Zielspezies hergestellt und photometrisch auf 10 µg/mL eingestellt. Aus diesen Extrakten wurden, wie in Tabelle 7 beschrieben, Mischstandards hergestellt. Dabei wurde auf eine möglichst konstante DNA Endkonzentration geachtet. Alle Verdünnungen erfolgten unter Einsatz einer ebenfalls auf 10 µg/mL eingestellten Lösung aus Herinssperma-DNA.

Tab. 7: Mischstandards (ng DNA/5 µL)

Standard	Pute	Perlhuhn	Wachtel	Huhn	Fasan	Gesamt DNA
1	50	0,2	0 ^{*)}	0,05	0,8	51,05
2	0,8	0,05	0,8	50	0 ^{*)}	51,65
3	0,2	50	0,2	0 ^{*)}	0,05	50,45
4	12,5	12,5	3,15	12,5	3,15	43,8
5	3,15	3,15	12,5	3,15	12,5	34,45
6	0,05	0 ^{*)}	50	0,8	0,2	51,05
7	0 ^{*)}	0,8	0,05	0,2	50	51,05

alle Standards verdünnt mit: 10 ng/µL Herinssperma-DNA in Elutionspuffer

DNA-Endkonzentration: ca. 10 ng/µL

^{*)} negative Kontrolle

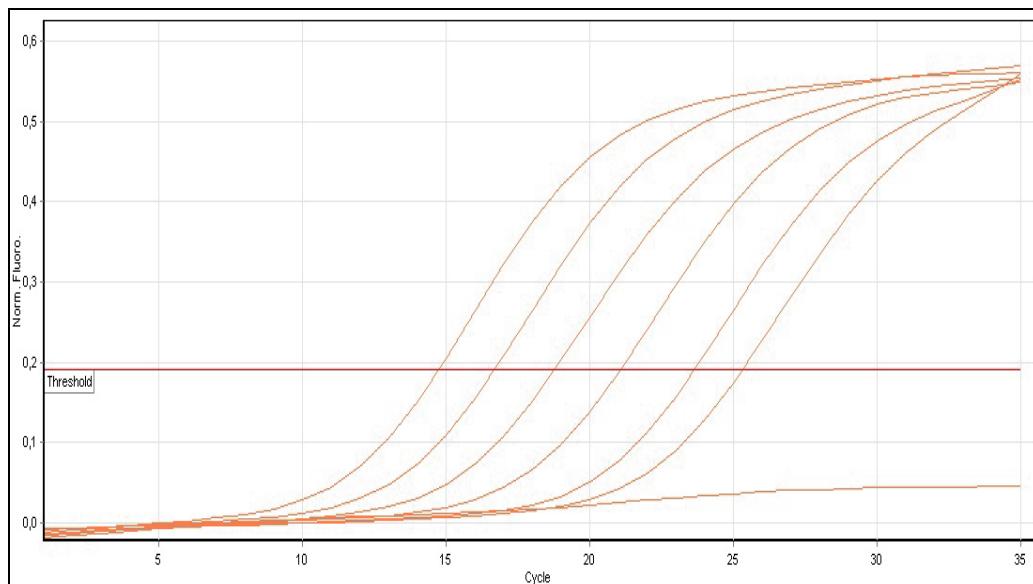


Abb. 1: Pentaplex-Real-Time-PCR; Kanal Orange, tierartspezifische PCR-System Pute auf Basis des mitochondrialen *Cytochrome b-Gens*; Nachweis von Putengewebe; Mischstandards 1-7

Diese DNA-Mischstandards wurden 12-fach ($n=12$) vermessen. Standardmäßig wurden für jede Analyse die Slope Correction und Dynamic Tube Normalisation eingesetzt sowie der Threshold konstant auf 0,05 (Normalisierte Fluoreszenz) eingestellt. Alle fünf Zielspezies zeigten bei 0,05 ng/5 μ L, entsprechend einem Gehalt von 0,1 %, ein positives Signal. Exemplarisch zeigt die Abbildung 1 den Lauf der 7 Mischstandards für das System Pute.

Lediglich das System Huhn zeigte hier eine Querempfindlichkeit im Bereich von <0,05 ng/5 μ L (<0,1%) bei 10 von 12 Analysen.

Die Ergebnisse der 12 Analysen wurden im Anschluss genutzt, um die Reaktions-Effizienz sowie das Bestimmtheitsmaß (R^2) für jede Zielspezies zu ermitteln (Abb. 2, ebenfalls exemplarisch für das System Pute).

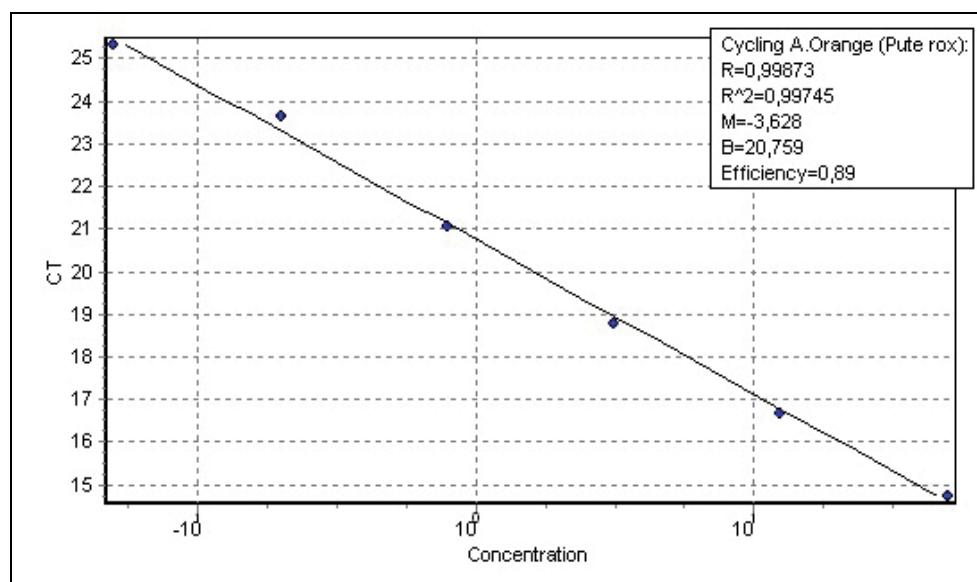


Abb. 2: Pentaplex-Real-Time-PCR; Kanal Orange, tierartspezifisches PCR-System Pute auf Basis des mitochondrialen Cytochrom b-Gens; Nachweis von Putengewebe; Mischstandards 1-7; Kalibrierung

Tab. 8: Methodenkenngrößen des Pentaplex-Real-Time-PCR-Systems

Kenngröße	Huhn	Pute	Perlhuhn	Wachtel	Fasan ***)
R^2	0,994	0,999	0,994	0,992	0,993
Reaktions-Effizienz	0,808	0,926	0,904	0,885	0,802
Reproduzierbarkeit*) ±%	8,33	6,70	7,99	8,44	7,87
Richtigkeit**) ±%	11,2	4,21	11,6	11,5	12,4
Messunsicherheit***) % (Einzelmessung)	14,0	7,91	14,0	14,2	14,7

n = 12, gemittelt über 7 Konzentrationsniveaus;

DNA-Standards

*) rel. Variationskoeffizient

**) mittlere absolute Abweichung vom Sollwert

***) geometrische Addition aus *) und **)

****) ohne Standard 6

Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurde der relative Variationskoeffizient der berechneten Konzentrationswerte herangezogen. Die Richtigkeit wurde als mittlere absolute Abweichung vom Sollwert be-

stimmt. Die Messunsicherheit ergab sich aus der geometrischen Addition der vorgenannten Werte. Die Methodenkenngrößen für die Bestimmung der DNA-Konzentration aller fünf Zielspezies innerhalb

des Pentaplex-Systems sind in Tabelle 8 angegeben. An dieser Stelle muss noch einmal betont werden, dass die Werte aus Tabelle 8 ausschließlich als Methodenkenngrößen für die Quantifizierung von DNA Gehalten der fünf Zielspezies zu verstehen sind.

Untersuchung von Marktproben (qualitativ)

Das oben beschriebene Real-Time-Pentaplex-PCR-System wurde für die Identifikation von Geflügelspezies in verschiedenen Fleischerzeugnissen eingesetzt. Dazu wurden Geflügelfleischprodukte aus dem Handel (Wachtelterrine mit Steinpilzen, Perlhuhnterrine mit Pfifferlingen, Fasanterrine mit Fenchelknollen, Puten-Gelbwurst und Geflügel-Wiener) auf die deklarierten Geflügelarten hin untersucht. Folgende Zutaten waren laut Herstellerangaben in den untersuchten Geflügelfleischerezeugnissen enthalten:

Wachtelterrine mit Steinpilzen

Schwein, Geflügelleber, Wachtelfleisch 20 %, rehydratisierte getrocknete Steinpilze 2,5 %, modifizierte Stärke, Salz, Milchproteine, Pfeffer, Aroma

Perlhuhnterrine mit Pfifferlingen

Schwein, Perlhuhnklefisch 20 %, Geflügelleber, rehydratisierte getrocknete Pfiffer-

linge 4 %, Eier, Salz, modifizierte Stärke, Milchproteine, Schalotten, Pfeffer, Muskat

Fasanterrine mit Fenchelknollen

Schweinefleisch und -fett, Fasanenfleisch 20 %, Geflügelleber, Ei, Kartoffelstärke, Portwein, Magermilchpulver, Zwiebel, Salz, Entenbrühe (Entenbein und -fleisch, Entenschmalz, Wasser, Salz, Aromen, Glukosesirup und Maltodextrin (Kornderivat), Hefeextrakt, Sonnenblumenöl, Milchzucker und Milcheiweiß), Fenchelknollenpulver 0,1 %, Pfeffer, Konservierungsmittel: Nitritpökelsalz

Puten-Gelbwurst

Putenfleisch und -fett 68 %, Trinkwasser, Rapsöl, jodiertes Speisesalz, Zuckerstoffe, Gewürze (enthaltene Sellerie), Stabilisator: Natriumcitrat, Gewürzextrakte, Gewürz- aromen

Geflügel-Wiener

Geflügelfleisch und -fett 78 % (Puten-, Hähnchenfleisch), Trinkwasser, jodiertes Nitritpökelsalz (jodiertes Speisesalz, Konservierungsstoff: Natriumnitrit), Maisstärke 1 %, Calciumcarbonat, Gewürze (u. a. Sellerie), Dextrose, Zucker, Maltodextrin, Antioxidationsmittel: Ascorbinsäure, pflanzliche Brühe, Aromen, essbare Hülle, Rauch. Kann Spuren von Senf und Pistazien enthalten.

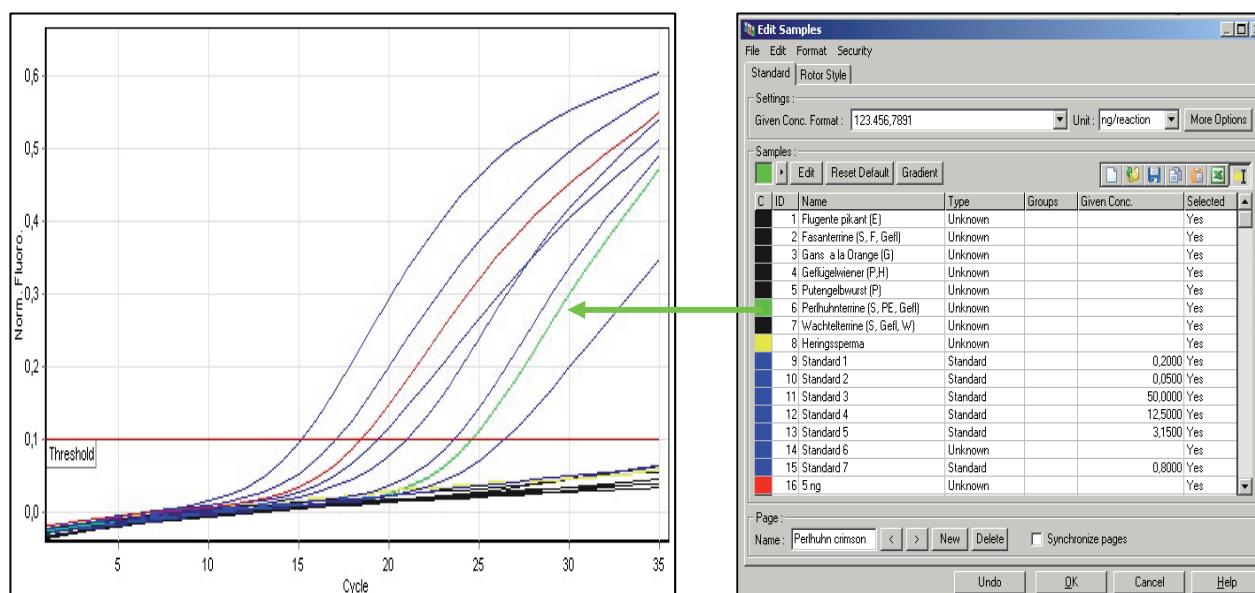


Abb. 3: Pentaplex-Real-Time-PCR; Kanal Crimson, tierartspezifisches PCR-System Perlhuhn auf Basis des mitochondrialen *Cytochrome b*-Gens ; Nachweis von Perlhuhngewebe; blau: Mischstandards 1-7; Kalibrierung; grün: Perlhuhnterrine; rot: Kontrollstandard 5 ng/ μ L; schwarz: Marktproben; gelb: Herinssperma-DNA (Negativkontrolle)

In Abbildung 3 ist exemplarisch für die Zielspezies Perlhuhn ein Lauf mit den entsprechenden Marktproben zu sehen. In diesem wie in allen anderen Fällen konnten die Herstellerangaben bestätigt werden.

Untersuchung von Proben mit bekannten Gehalten an Pute und Huhn (quantitativ)

Mitochondriale DNA ist auf Grund ihrer speziellen, stabilen Struktur sehr gut geeignet, um eine bestimmte Zielspezies in einem hoch prozessierten Fleischerzeugnis nachzuweisen. Da je nach Zelltyp 10^3 bis 10^5 Kopien der mitochondrialen DNA pro Zelle vorliegen können, ist dieser Nachweis auch außerordentlich empfindlich. Dieser Vorteil beim qualitativen Nachweis verwandelt sich in einen Nachteil beim Versuch, eine mitochondriale Zielsequenz zur Quantifizierung (im Sinne von

Gewichtsanteilen) einer Zielspezies zu verwenden, da eine Quantifizierung konstante, nicht gewebeabhängige DNA Gehalte voraussetzt. Trotzdem sollte das hier beschriebene Pentaplex System auf seine Eignung für eine mögliche quantitative Bestimmung hin überprüft werden.

Im Rahmen des EU-Projektes MolSpec-ID (QLK1-CT-02373) wurde eine Reihe von Fleischerzeugnissen definierter Zusammensetzung hergestellt. Diese enthalten unter anderem Puten- und Hühnerfleisch in Anteilen von 0-91,4 % w/w (vom Fleischanteil).

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Proben S1 bis S8. Jede Probe wurde 8-fach ($n=8$) untersucht. Hervorgehoben sind in der Tabelle Werte, bei denen die mittlere absolute Abweichung vom Sollwert mehr als 30 % beträgt. Dies

Tab. 9: Quantifizierung der Tierart Pute

Probe *)	Sollwert %	gemessener Wert %	Abweichung abs.
S1	2,00	2,00	0,00
S2	5,00	2,20	2,80
S3	91,4	64,2	27,2
S4	0,00	<0,01	
S5	0,10	0,07	0,03
S6	0,50	0,50	0,00
S7	1,0	1,08	-0,08
S8	8,0	6,61	1,39

n = 8, gemittelt über alle Messungen;
fett: mittlere absolute Abweichung vom Sollwert > 30 %
*) MolSpec-ID (QLK1-CT-02373)

Tab. 10: Quantifizierung der Tierart Huhn

Probe *)	Sollwert %	gemessener Wert %	Abweichung abs.
S1	5,00	11,32	-6,32
S2	91,4	63,1	28,27
S3	0,00	<0,01	
S4	0,10	0,24	-0,14
S5	0,50	0,59	-0,09
S6	1,00	1,86	-0,86
S7	2,00	3,95	-1,95
S8	12,00	15,51	-3,51

n = 8, gemittelt über alle Messungen
fett: mittlere absolute Abweichung vom Sollwert > 30 %
*) MolSpec-ID (QLK1-CT-02373)

ist lediglich bei zwei Proben der Fall, so dass man konstatieren kann, dass das hier vorgestellte Pentaplex-PCR-System mit allen Einschränkungen zumindest in der Lage ist, Putengewebe mit einiger Sicherheit auch quantitativ zu bestimmen.

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der analogen Bestimmung für die Zielspezies Huhn. Es fällt auf, dass hier in der überwiegenden Mehrheit der Proben die mittlere absolute Abweichung vom Sollwert höher als 30 % liegt. Somit kann der Gehalt an Huhngewebe bestenfalls abgeschätzt werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde ein Pentaplex Real Time-PCR System zum spezifischen Nachweis von Huhn-, Puten-, Wachtel-, Perlhuhn- und Fasan-DNA in Fleischerzeugnissen entwickelt. Der gleichzeitige Nachweis aller fünf Zielspezies gelingt mit einer Empfindlichkeit von 0,1 %. Die Reproduzierbarkeit liegt zwischen $\pm 6,70\%$ und $\pm 8,44\%$, die jeweilige Richtigkeit der Messung zwischen $\pm 4,21\%$ und $\pm 12,4\%$, die Messunsicherheit der Einzelmessung bewegt sich zwischen $\pm 7,91\%$ und $\pm 14,7\%$. Somit gelingt die Bestimmung der Zielspezies mit gutem Erfolg. Die Möglichkeit der Quantifizierung (im Sinne von Gewichtsanteilen) ist für die Spezies Huhn mit deutlichen Einschränkungen, für die Spezies Pute gut belegt. Quantifizierungsexperimente für die übrigen Zielspezies Fasan, Perlhuhn und Wachtel stehen aus und sollen zukünftig ergänzend durchgeführt werden.

Danksagung

Die Entwicklung der Primersysteme erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit gemäß § 26 der Prüfungsordnung des Fachbereichs Lebensmitteltechnologie der Hochschule Fulda:

„Authentifizierung von Geflügel mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion“, vorgelegt von Frau Sonja Stirzel. Die Autoren danken außerdem Frau Karin Fischer und Frau Edith Müller für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Literatur

- BINKE, R., SPIEGEL, K. und SCHWÄGELE, F. (2005): Vergleichende Untersuchungen von mitochondrialen und nucleären Gensequenzen zur Identifizierung von tierischen Bestandteilen in Fleischerzeugnissen mittels PCR. Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach 44, Nr. 169, S. 201-210
- DOOLEY, J. J., PAINE, K. E., GARRETT, S. D. und BROWN, H. M. (2004): Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. Meat Science, 68, S. 431-438
- KÖPPEL, R., ZIMMERLI, F. und BREITENMOSER (2009): Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. European Food Research and Technology, 230, S. 125-133
- MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J. und SHIMURA, Y. (1999): A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assays. Meat Science, 51, S. 143-148
- STIRZEL, S., ANDRÈE, S. und SCHWÄGELE, F. (2006): Authentifizierung von Geflügel mit tierartspezifischen Primersystemen. Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach 45, Nr. 174, S. 251-258
- VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit ABI. L 31 vom 1.2.2002, S. 1
- WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. (1942): Isolation and crystallisation of enolase. Biochem. 310, S. 384-421