

Vergleichende Untersuchung von mitochondrialen und nukleären Gensequenzen zur Identifizierung von tierischen Bestandteilen in Fleischerzeugnissen mittels PCR

Comparative examination of mitochondrial and nuclear gene sequences for the identification of animal tissues in meat products by means of PCR

R. BINKE, Katharina SPIEGEL und F. SCHWÄGELE

Zusammenfassung

Auf Grundlage ausgewählter mitochondrialer und nukleärer DNA-Abschnitte konnte, bezogen auf den Fleischanteil, gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze für PCR-Methoden auf Basis von mitochondrialen Gensequenzen mit $<0,01\%$ etwa 2-3 Zehnerpotenzen kleiner ist als bei Verwendung von kernkodierten single-copy Genen. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Anwendungsspektren für die Tierartenbestimmung auf DNA-Basis. Die DNA-Analyse auf Basis von mitochondrialen Sequenzen kann insbesondere dann erfolgreich eingesetzt werden, wenn tierische Bestandteile mit sehr geringer DNA-Dichte oder in hochprozessierten Produkten mit stark degradierter DNA nachgewiesen werden sollen. Dagegen ermöglicht die DNA-Analyse auf Basis von nukleären Sequenzen die Abschätzung von Fleischanteilen in Produkten. Des Weiteren kann das Risiko einer Detektion von technologisch unvermeidbaren Kontaminationen (falsch positives Ergebnis), bedingt durch die geringere Nachweisgrenze von ca. 1% , deutlich reduziert werden.

Summary

Based on suitable DNA sequences from mitochondrial and nuclear genes a limit of detection of less than 0.01% with respect to the meat content was determined using mitochondrial gene sequences. In contrast to the mitochondrial target sequences the use of nuclear gene fragments leads to a limit of detection which is between 100 to 1000 fold higher. This fact influences the method to be selected for DNA based animal species identification. DNA based methods applying mitochondrial sequences are convenient for the detection of animal tissue with only a low nucleic acid content or highly processed products with poor DNA quality. On the other hand methods based on nuclear DNA proved to be more successful in the case of semiquantitative determination of the meat content in processed products. Furthermore false positive PCR products caused by process dependant contaminations are normally not detected if nuclear gene sequences are used for PCR as the limit of detection is about 1% .

Schlüsselwörter Tierart – DNA-Analyse – PCR – Fleischerzeugnis

Key Words animal species – DNA analysis – PCR – meat product

Einleitung

Durch zahlreiche Lebensmittelskandale wurde der Ruf der Lebensmittelindustrie in den letzten Jahren zunehmend in ein schlechtes Licht gerückt. Insbesondere neuro-degenerative Krankheiten wie BSE (bei Rind) und Scrapie (bei Schaf) oder die durch verschiedene *Influenza A* Viren ver-

ursachte Geflügelpest (BAG, 2004) verunsicherten den Konsumenten und führten hinsichtlich des Verbraucherschutzes zu der Forderung nach einer umfassenden und verständlichen Deklaration von zusammengesetzten Lebensmitteln.

Verpackte Fleischerzeugnisse, die an den Endverbraucher abgegeben werden,

müssen nach den Bestimmungen der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV) ein Zutatenverzeichnis aufweisen. Seit dem 1.7.2003 ist darüber hinaus die Mengenkennzeichnung von Zutaten nach Maßgabe des §8 der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung entsprechend den QUID-Leitlinien (Quantitative Ingredient Declaration) durchzuführen. Der Gesetzgeber erhofft sich von der Kennzeichnungspflicht, dass der Verbraucher beim Kauf von Produkten objektiver informiert wird und somit eine von ihm bevorzugte Auswahl treffen kann.

Im Zuge dieser Entwicklung gewannen auch Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung tierischer Bestandteile in Fleischerzeugnissen zunehmend an Bedeutung. Das Einsatzgebiet dieser Methoden liegt derzeit überwiegend im Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung und dient hier zur Überprüfung der Einhaltung gesetzlicher Regelungen. In zunehmendem Maße werden aber auch Methoden zur Tierartbestimmung von der Industrie oder in deren Auftrag im Rahmen ihrer Qualitätssicherung angewandt.

Dieser Trend könnte sich verstärken, folgt man den Thesen von WINDHORST (2003) und URBAN (1998). Nach Meinung von WINDHORST lässt sich Fleisch in der Zukunft nur dann auf dem Markt absetzen, wenn die Käufer von der Qualität und Sicherheit des Produktes überzeugt sind und dessen Herkunft sich über die gesamte Produktionskette, d. h. von der landwirtschaftlichen Produktion bis zur Ladentheke, zurückverfolgen lässt. Dabei ist es ohne Bedeutung, ob alle Konsumenten diese Möglichkeit nutzen. Entscheidend wird sein, dass diese Informationsmöglichkeit vom Hersteller angeboten wird (WINDHORST, 2003).

Zur Bestätigung einer Tierart stehen derzeit eine Vielzahl von Verfahren zur Verfügung, wobei insbesondere Nachweismethoden auf Protein- und DNA-Basis zur Anwendung kommen (BERGER *et al.*, 1988; NEWGARD *et al.*, 2002; ROSSMANITH *et al.*, 1994; MANZ, 1979, WOLF *et al.*, 2001; CALVO *et al.*, 2002a; PALISCH *et al.*, 2003; FREZZA *et al.*, 2003).

Innerhalb der Angebotspalette protein-basierter Methoden ist derzeit der Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA), aufgrund seiner einfachen und anwenderfreundlichen Handhabung und seiner hohen Sensitivität und Robustheit die Methode der Wahl.

Neben der ELISA-Technik hat die Artenbestimmung auf Basis der DNA-Analyse, insbesondere in Verbindung mit der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) zunehmend an Bedeutung gewonnen. Für viele Tierarten sind Testsysteme unterschiedlicher Hersteller erhältlich. Diese Testsysteme basieren auf einer kontrollierten Vermehrung eines i. d. R. tierartspezifischen Genabschnittes, welcher während (Real-Time PCR) oder nach erfolgter Amplifikation und Gelelektrophorese mit geeigneten Farbstoffen identifiziert werden kann. Bei gleichzeitiger Amplifizierung eines geeigneten tierartunspezifischen Genabschnittes (interner Standard) kann darüber hinaus der relative Fleischanteil im Erzeugnis abgeschätzt werden. Derzeitige Systeme zur quantitativen Abschätzung tierischer Zutaten sind jedoch noch sehr kostenintensiv und nur bedingt bei komplexen tierischen Erzeugnissen einsetzbar (BINKE *et al.*, 2004a).

Ziel dieser Arbeit ist es aufzuzeigen, welchen Einfluss die Auswahl geeigneter Gensequenzen (nukleär oder mitochondrial) auf die Nachweisbarkeit von tierischem Gewebe in Fleischerzeugnissen hat. In einer tierischen Muskelzelle ist die DNA von der Menge her zu etwa 99,9 % im Kern, zu 0,1 % in den Mitochondrien lokalisiert (LEHNINGER *et al.*, 1994). Mitochondriale DNA-Moleküle (mtDNA) von Säugern sind mit etwa 16500 Basenpaaren, wie beim Menschen, im Vergleich zur Länge der im Kern lokalisierten DNA mit ca. 3 Milliarden Basenpaaren (einfacher Chromosomensatz) verhältnismäßig klein. Damit ist die Ausgangskopienzahl für ein auf dem Mitochondriengenom liegendes Gen der Theorie nach etwa zwei Zehnerpotenzen höher als für einen kernkodierten Gen-Abschnitt, wodurch die Nachweisgrenze deutlich verringert wird.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden Referenzbrühwürste, abgefüllt in 50 ml fassende Leichtmetallbehälter, mit definierten Anteilen verschiedener Tierarten, von unerhitzten Brühwurstproben über Kesselkonserven (20 min / 82 °C; $F_c < 0,9$), Vollkonserven (33 min / 116 °C/2,0 bar; $F_c = 3,4$) bis hin zu Tropenkonserven (60 min/116 °C/2,0 bar; $F_c = 12,3$) und überhitzten Produkten ($F_c = 32$) hergestellt.

Die Isolierung der DNA aus den Wurstproben erfolgte entsprechend eines optimierten und für Fleisch und Fleischerzeugnisse validierten Extraktionssystems (BINKE *et al.*, 2003). Die DNA-Gehalte der erhaltenen Extrakte wurden nach dem Verfahren von WARBURG und CHRISTIAN (1942) bestimmt, indem die Absorptionen der Lösungen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen wurden.

Auswahl geeigneter Primer und Sondensequenzen

Gensequenzen zur Erstellung schweine- und rinderspezifischer PCR-Systeme wurden über die Gendatenbank EMBL und Genbank ermittelt. Sequenzvergleiche wurden unter Verwendung des HUSAR-Programmpaketes (Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources) ausgeführt. Die Primerauswahl erfolgte mit Hilfe der frei zugänglichen Software „Oligo Analysis & Plotting Tool“ von der Firma Qiagen (Hilden). Die Primer-Bindungsstellen innerhalb der Sequenzen werden in den nachfolgenden Tabellen durch Linien markiert (Tab. 1 bis 4). Die ziegenspezifischen Primer- und Produktsequenzen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hankeln (Uni Mainz) bereitgestellt. Die pferdespezifische Sequenz, entwickelt von der Firma CIBUS Biotech GmbH, wurde dem Ringversuch der §35 Arbeitsgruppe „Biochemische und molekularbiologische Analytik“ entnommen.

Tab. 1: Sequenzen für das tierartspezifische PCR-System [NG-Zie] auf Basis des nukleären *Neuroglobin* Gens zur Bestimmung des Ziegengewebeanteils (Primer- und Produktsequenz wurde von Herrn Prof. Dr. T. Hankeln, Johannes Gutenberg Universität in Mainz bereitgestellt)

Bezeichnung der Primer	Länge	Sequenz in 5´- 3´Richtung
NG-Zie / Primer 1	20	AGG ATA ACA CTG TCC AAC AG
NG-Zie / Primer 2	20	TGC CTA CTA CAG GCG CTC AC
Produktsequenz für die Tierart Ziege (<i>Capra hircus</i>):		Produktlänge: 118 bp
Accession No.: Sequenz im Rahmen eines Posterbeitrages präsentiert (BINKE <i>et al.</i> , 2004b)		
1	<u>AGGATAACAC</u> <u>TGTCCAACAG</u>	GTGTGTYTAG GGCTTTGAGC CCCTCAGCAG
51	AAGGCAGCTT <u>CCTTCATGGC</u>	CTAACGTTAG TAGTCTGGCT ACCATAATGT
101	<u>GAGCGCCTGT</u> <u>AGTAGGCA</u>	

Tab. 2: Sequenzen für das tierartspezifische PCR-System [BC-Sch] auf Basis des nukleären *beta-Casein* Gens zur Identifizierung von Schweinegewebe

Bezeichnung der Primer bzw. Sonden	Länge	Sequenz in 5´- 3´Richtung
BC-Sch / Primer 1	21	GCC CAA TCA AGT CCA TAA CTG
BC-Sch / Primer 2	20	AAA GCA AGT GTG CCC TAA CC
Produktsequenz für die Tierart Schwein (<i>Sus scrofa</i>):		Produktlänge: 151 bp
Accession No.: E12614		
1	<u>GCCCAATCAA</u> <u>GTCCATAACT</u>	GTATCTATTC ATATAATTCA AAATTGGTGA
51	GCGATAGTCA TAAGGGAATG	TTGTATTTAT TGCACAATAG GTAAAGCATC
101	TTGCTGAGAA AACACAAAGG	AAGTATCAAA <u>TGGTTAGGGC</u> <u>ACACTTGCTT</u>
151	<u>T</u>	

Tab. 3: Sequenzen für das tierartspezifische PCR-System [BC-Rin] auf Basis des nukleären *beta-Casein* Gens zur Identifizierung von Rindergewebe

Bezeichnung der Primer bzw. Sonden	Länge	Sequenz in 5'-3'Richtung
BC-Rin / Primer 1	21	GAG TTG TGT CTC ACT CTT GTC
BC-Rin / Primer 2	21	AAC TGG AAA TAG TGG AGC CTG
Produktsequenz für die Tierart Rind (<i>Bos taurus</i>): Accession No.: X14711		Produktlänge: 64 bp
1		<u>GAGTTGTGTC TCACTCTTGT CAACCCCATG AATGACAGTC CACCAGGCTC</u>
51		<u>CACTATTTCC AGTT</u>

Tab. 4: Sequenzen für das tierartspezifische PCR-System [CY-Pfe] auf Basis des mitochondrialen *Cytochrom b* Gens zur Identifizierung von Pferdegewebe (§ 35 Methode L-XX.XX-XX (XXX 03) Arbeitstitel: Nachweis der Tierart Pferd mit pferdespezifischen Primern in der PCR und Bestätigung durch Restriktionsanalyse, im Druck)

Bezeichnung der Primer bzw. Sonden	Länge	Sequenz in 5'-3'Richtung
CY-Pfe / Primer 1	15	CAC AGC CCT GGT AGT
CY-Pfe / Primer 2	20	GCA AGA TCA GGA GGA GGA GT
Produktsequenz für die Tierart Pferd (<i>Equus caballus</i>): Accession No.: X79547		Produktlänge: 146 bp
1		<u>CACAGCCCTG GTAGTCGTAC ATTTACTATT TCTTCACGAA ACAGGATCTA</u>
51		<u>ATAACCCCTC AGGAATCCCA TCCGATATGG ACAAATCCC ATTCCACCCA</u>
101		<u>TATTATACAA TTAAAGACAT CCTAGGACTC CTCCTCCTGA TCTTGC</u>

PCR-Reaktionsansätze und Thermocyclerprogramme

Alle PCR-Reaktionen erfolgten mit einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer (PE 9600) mit 33 Zyklen. Für den PCR-Ansatz wurden 2 µl einer 1:30 verdünnten DNA-Lösung in den nachfolgend beschriebenen Mastermix eingesetzt: 2,5 µl 1x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden), 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM je dNTP (Qbiogene, Heidelberg), 0,8 µM Primer und 1 Unit HotStarTaqTM (Qiagen, Hilden) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die PCR-Programme für die einzelnen Systeme sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Für die parallele Bestimmung von Schwein, Ziege und Rind unter Verwendung der Primersysteme BC-Sch, NG-Zie und BC-Rind im Multiplex-Verfahren wurde der Reaktionsansatz wie folgt modifiziert. Für den PCR-Ansatz wurden ebenfalls 2 µl einer 1:30 verdünnten DNA-Lösung in den nachfolgend beschriebenen Mastermix eingesetzt: 2,5 µl 1x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden), 2,5 mM MgCl₂,

0,15 mM je dNTP (Qbiogene, Heidelberg), 0,4 µM Primer und 1,5 Unit HotStarTaqTM (Qiagen, Hilden) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Das PCR-Programm entsprach dem in Tabelle 5 angegebenen Thermocyclerprogramm.

Tab. 5: Thermocyclerprogramme für PCR-Systeme NG-Zie, BC-Sch, BC-Rin, CY-Pfe zur Identifizierung der Tierarten Ziege, Schwein, Rind und Pferd

PCR-Schritt	Temperatur / Zeit - Programm
Anfangsdenaturierung	95 °C; 15 min
Annealing	60 °C ± 1 °C; 30 s
Extension	72 °C; 30 s
Denaturierung	95 °C; 30 s
Abschluss-extension	72 °C; 3 min

Detektion der PCR-Produkte

Die Detektion der tierartspezifischen PCR-Produkte erfolgte nach elektrophoretischer Trennung der Amplifikate im Polyacrylamidgel durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Die erzeugten Banden wurden zur Bestimmung ihrer Molekulargewichtsgröße mit dem DNA-Marker pBR 322/Hae III verglichen.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung eines 10%igen Gels folgender Zusammensetzung: 20 ml 5fach TBE-Puffer [54 g TRIS; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) ad 1000 ml bidest. Wasser]; 33,3 ml Protogel[®]; 46 ml bidest. Wasser; 700 µl Ammoniumpersulfat (10 %) und 35 µl TEMED. Für die Elektrophorese wurden 5 µl PCR-Produkt bzw. 3 µl Marker mit 2 µl Loadingpuffer-Lösung [1,5 g Ficoll; 25 mg Xylencyanol; 25 mg Bromphenolblau ad 10 ml bidest. Wasser] vermischt und aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte erfolgte über einen Zeitraum von etwa 1,5 h bei 85 V und einer Stromstärkenbegrenzung von 200 mA. Zur Auswertung wurde das Gel 10 min in einer Ethidiumbromidlösung [600 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml); 60 ml 5fach TBE-Puffer und 240 ml bidest. Wasser], anschließend 10 min im bidest. Wasserbad getaucht und die Banden mit Hilfe eines UV-Flächenstrahlers bei 312 nm detektiert.

Ergebnisse und Diskussion

Nachweis von mitochondrialen Gensequenzen am Beispiel eines pferdespezifischen PCR-Systems in Fleischerzeugnissen, verursacht durch prozessabhängige Kontaminationen

Bedingt durch die hohe Sensitivität der DNA-Analyse auf Basis von mitochondrialen Gensequenzen, können selbst geringste Spuren an DNA mit Hilfe der PCR detektiert werden. Somit kann bei Nichtkenntnis der Nachweisgrenze im Falle eines positiven Ergebnisses, wenn z. B. ein spezifisches PCR-Produkt detektiert wurde, nicht automatisch auf einen Fleisch-

zusatz geschlossen werden, da es sich beispielsweise um eine technologisch unvermeidbare Kontamination handeln könnte.

Die Bestimmung des Kontaminationspotentials bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen wurde an den kritischen Kontrollpunkten (CCP's) Arbeitsfläche, Fleischwolf, Kutter und Füllmaschine beispielgebend für den gesamten Produktionsprozess untersucht. Hierfür wurden die Arbeitsgeräte mit Pferdefleisch kontaminiert und nach einer 20-minütigen Inkubationszeit mit heißem Wasser gereinigt. An jedem der vier gereinigten Geräte wurde anschließend Schweinefleisch verarbeitet, davon jeweils 2 Analyseproben entnommen und auf die Tierart Pferd mit Hilfe der PCR (Primersystem: CY-Pfe) untersucht. Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten PCR nach Kontamination und entsprechender Reinigung der als CCP's festgelegten Geräte. Die deutlichen Banden bei den CCP's Zerlegetisch und Fleischwolf (Abb. 1, Bahn 2 und 3) und die weniger stark ausgeprägten beim Kutter und der Füllmaschine (Abb. 1, Bahn 4 und 5) signalisieren, dass selbst bei augenscheinlich sauberen Geräten amplifizierbare DNA-Fragmente auf die neue Wurstcharge übertragen werden können. Die mitgeführten Negativkontrollproben (Abb. 1, Bahn 1 und 9) zeigen eindeutig, dass die Kontamination nicht bei der Probenaufarbeitung nachträglich eingeschleppt, sondern bei der Herstellung eingebracht wurde.

Erst bei intensiver Gerätereinigung unter Verwendung eines Reinigungsmittels mit einer Einwirkzeit von 20 min wurde in der anschließend analysierten Probe kein PCR-Produkt mehr identifiziert (Abb. 2). Für die Vorzerkleinerung der Fleischteile wurde hier eine kratzfeste Arbeitsplatte aus Glas verwendet. Eine weitere Zerkleinerung durch den Fleischwolf fand nicht statt. Die vorzerkleinerten Fleischteile wurden sofort im Kutter weiter zu Wurstbrät verarbeitet. Durch diese veränderte Prozessführung wurde das Kontaminationspotential deutlich gesenkt (Abb. 2, Bahn 2, 3 und 4). Eine solche Prozessführung kann ausschließlich zur

Herstellung von kleinsten Brätmengen, beispielsweise für die Herstellung von Negativkontrollproben, eingesetzt werden.

Sie ist jedoch für die Großproduktion nicht praktikabel.

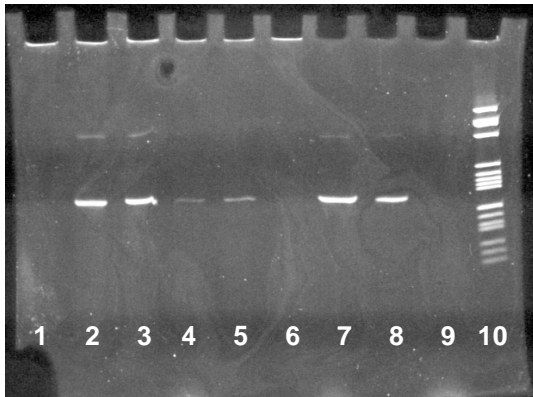


Abb. 1: Identifizierung von Pferd in prozessiertem Schweinefleisch nach Reinigung der Geräte mit Wasser. 1: Negativkontrolle; 2: Zerlegetisch; 3: Fleischwolf; 4: Kutter; 5: Füllmaschine; 6: Negativkontrolle; 7: Pferdefleisch 0,1 %; 8: Pferdefleisch 0,01 %; 9: Negativkontrolle, 10: Marker pBR 322

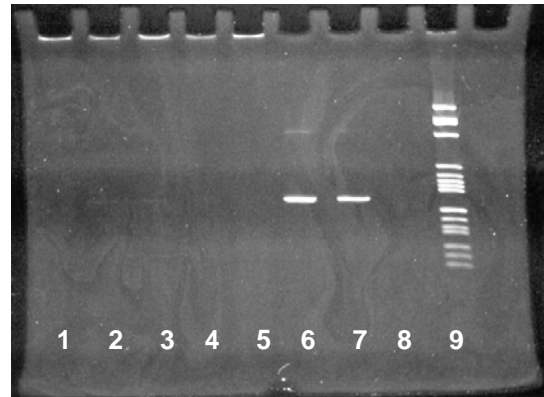


Abb. 2: Identifizierung von Pferd in prozessiertem Schweinefleisch nach Reinigung der Geräte mit einem Reinigungsmittel. 1: Negativkontrolle; 2: Arbeitsfläche (kratzfestes Glas); 3: Kutter (Probe unerhitzt); 4: Kutter (Probe anschließend erhitzt); 5: Negativkontrolle; 6: Pferdefleisch 0,1 %; 7: Pferdefleisch 0,01 %; 8: Negativkontrolle; 9 Marker pBR 322

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es nicht möglich ist, Fleischerzeugnisse entsprechend der guten Herstellungspraxis (GMP) kontaminationsfrei herzustellen, ohne die entsprechende Tierart ganz aus dem Produktionsprozess zu verbannen. Insbesondere gilt dies für den Nachweis auf Grundlage von mitochondrialen Zielsequenzen, da hier die Ausgangskopienzahl sehr hoch ist und somit eine extrem niedrige Nachweisgrenze von <0,01 % (Abb. 1) erreicht werden kann.

Identifizierung von Schweine- und Rindergewebe auf Basis des nukleären single-copy Gens beta-Casein

Spezifität. Die Spezifität der PCR-Systeme für Schwein und Rind wurde für verschiedene Tierarten und Rassen getestet (Abb. 3 bis 6). Hierfür wurden DNA-Abschnitte innerhalb der Promotorregion des beta-Casein Gens lokalisiert und auf Grundlage dessen die PCR-Systeme BC-Sch mit einer Produktlänge von 151 bp und BC-Rin mit 64 bp entwickelt.



Abb. 3: Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten verschiedener Tierarten nach PCR unter Einsatz des PCR-Systems BC-Sch. 1: Marker pBR 322; 2: Schwein; 3: Rind; 4: Pferd; 5: Schaf; 6: Ziege; 7: Pute; 8: Huhn; 9: Wildschwein; 10: Hirsch



Abb. 4: Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten verschiedener Tierarten nach PCR unter Einsatz des PCR-Systems BC-Rin. 1: Marker pBR 322; 2: Schwein; 3: Rind; 4: Pferd; 5: Schaf; 6: Ziege; 7: Pute; 8: Huhn; 9: Wildschwein; 10: Hirsch

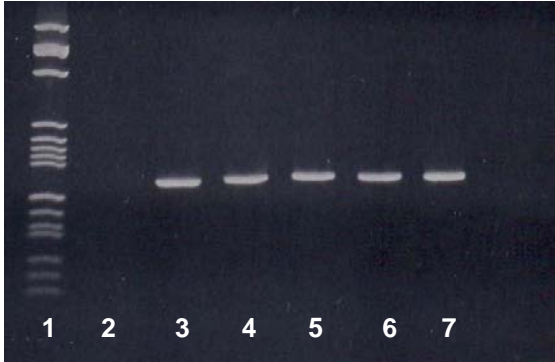


Abb. 5: Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten verschiedener Schweinerassen nach PCR unter Einsatz des PCR-Systems BC-Sch. 1: Marker pBR 322; 2: Negativkontrolle; 3: Pit-Rasse; 4: Deutsche Landrasse; 5: Kreuzung (Pit x Deutsche Landrasse); 6: Deutsches Edelschwein; 7: Mangalitza

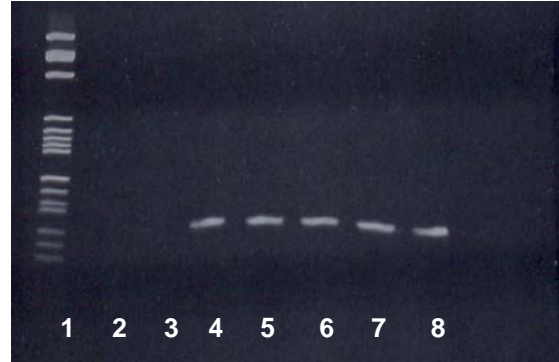


Abb. 6: Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten verschiedener Rinder- und rindernahen Rassen nach PCR unter Einsatz des PCR-Systems BC-Rin. 1: Marker pBR 322; 2: Negativkontrolle; 3: Büffel; 4: Fleckvieh; 5: Holsteiner Schwarzbunt; 6: Kreuzung (Holsteiner Schwarzbunt x Holstein Friesian); 7: Holsteiner Rotbunt; 8: Angler

Es konnte gezeigt werden, dass die PCR-Systeme für Schwein und Rind sowohl intraspezifisch den Nachweis verschiedener Rassen ermöglichen (Abb. 5 und 6), als auch die interspezifische Unterscheidung der Tierart Schwein bzw. Rind gegen andere Tierarten zulassen (Abb. 3 und 4). Eine Kreuzsimilarität wurde beim schweinespezifischen System gegen Wildschwein festgestellt (Abb. 3, Bahn 9).

Bestimmung der Nachweisgrenzen. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen für das schweinespezifische und das rindspezifische PCR-System auf Basis nukleärer *beta-Casein* Gensequenzen erfolgte anhand von Referenzbrühwürsten mit Schweinefleischanteilen von 0,5-91,4 % bzw. Rindfleischanteilen von 0,5-96,2 %, bezogen auf den Gesamtfleischanteil (Abb. 7 und 8).

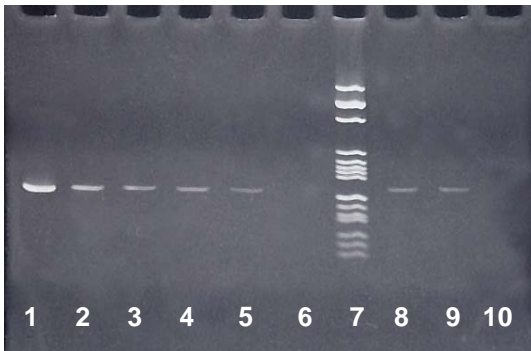


Abb. 7: Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten aus Brühwürsten zur Bestimmung der Nachweisgrenze unter Einsatz des PCR-Systems BC-Sch bei unterschiedlichen Erhitzungsstufen. 1: 91 %; 2: 5 %; 3: 2 %; 4: 1 %; 5: 0,5 %; 6: Negativkontrolle; Proben auf Bahn 1 bis 6: Erhitzungsgrad entsprechend einer Dreiviertelkonserve; 7: Marker pBR 322; 8: 1 % Vollkonserve; 9: 1 % Tropenkonserve; 10: 1 % überhitztes Produkt mit F_C -Wert von ca. 32

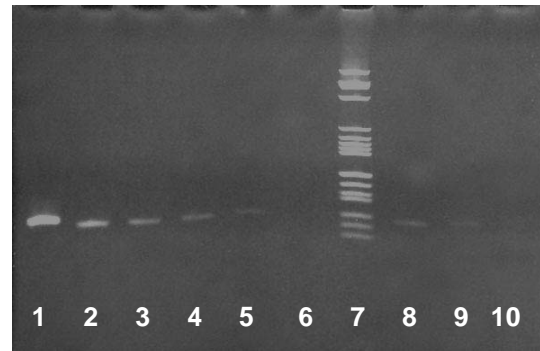


Abb. 8: Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten aus Brühwürsten zur Bestimmung der Nachweisgrenze unter Einsatz des PCR-Systems BC-Rin bei unterschiedlichen Erhitzungsstufen. 1: 96 %; 2: 5 %; 3: 2 %; 4: 1 %; 5: 0,5 %; 6: Negativkontrolle; Proben auf Bahn 1 bis 6: Erhitzungsgrad entsprechend einer Dreiviertelkonserve; 7: Marker pBR 322; 8: 1 % Vollkonserve; 9: 1 % Tropenkonserve; 10: 1 % überhitztes Produkt mit F_C -Wert von ca. 32

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen, dass ein spezifischer Nachweis mit nukleären Gensequenzen für die Tierarten Rind und Schwein mit einem Fleischanteil von 1 % für Produkte bis zu einer Erhitzungsstufe entsprechend einer Vollkonserve und teilweise auch darüber möglich ist.

Multiplex-PCR zur parallelen Identifizierung von Ziegen-, Schweine- und Rindergewebe

Bestimmung der Nachweisgrenzen. Für die Multiplex-PCR wurden die Primer für den schweine- (151 bp), den ziegen- (118 bp) und den rindspezifischen Nachweis

(64 bp) auf Basis nukleärer Gensequenzen zu einem gemeinsamen Mastermix vereinigt, so dass diese drei Tierarten parallel in einem Lauf bestimmt werden konnten. Die Nachweisgrenze wurde bestimmt, indem die Referenzproben in den jeweiligen Erhitzungsstufen so vermischt wurden, dass ein ca. 1%iger Fleischanteil für jede Tierart vorkam. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 9 dargestellt und zeigen, dass auch mit der Multiplex-PCR ein 1%iger Fleischanteil von Schwein, Ziege und/oder Rind bis zu einer Erhitzungsstufe entsprechend einer Vollkonserve nachweisbar ist.

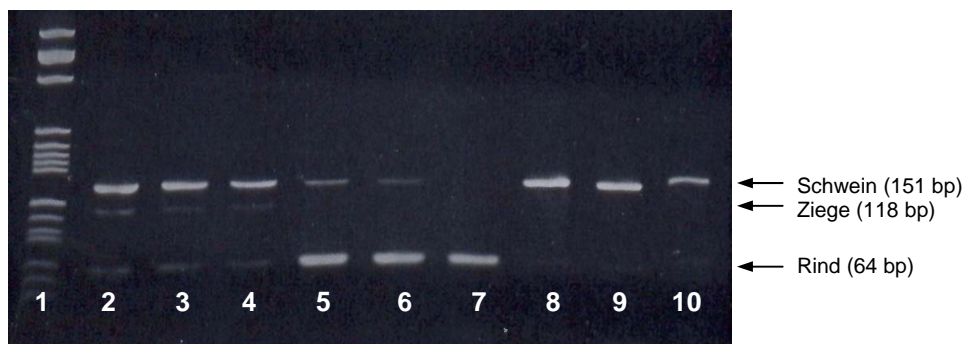


Abb. 9: Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten aus Mischungen von Referenzproben zur Bestimmung der Nachweisgrenzen unter Einsatz des PCR-Multiplexsystems BC-Sch, NG-Zie und BC-Rin bei unterschiedlichen Erhitzungsstufen. Angegebene Fleischanteile beziehen sich auf den Gesamtfleischanteil und wurden mit Fleisch der Tierarten Huhn, Pute, Ente, Pferd und Schaf auf 100 % ergänzt. 1: Marker pBR 322; 2: Kesselkonserve; 3: Vollkonserve; 4: Tropenkonserve; Proben auf Bahn 2 bis 4 mit folgender Zusammensetzung (27 % Schwein, 1 % Rind, 1 % Ziege); 5: Kesselkonserve; 6: Vollkonserve; 7: Tropenkonserve; Proben auf Bahn 5 bis 7 mit folgender Zusammensetzung: (2 % Schwein, 96 % Rind); 8: Kesselkonserve; 9: Vollkonserve; 10: Tropenkonserve; Proben auf Bahn 8 bis 10 mit folgender Zusammensetzung: (91 % Schwein, 0,1 % Rind)

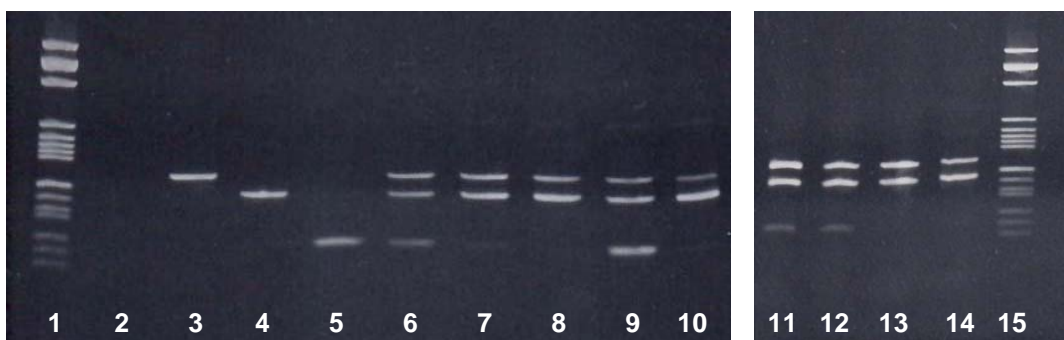


Abb. 10: Gelelektrophorese verschiedener DNA-Amplifikate nach PCR zum parallelen Nachweis der Tierarten Schwein, Ziege und Rind in kommerziell erworbenen Ziegenfleischerzeugnissen unter Einsatz der Primer BC-Sch, NG-Zie und BC-Rin im Multiplexverfahren. 1: Marker pBR 322; 2: Negativkontrolle; 3: Schwein; 4: Ziege; 5: Rind; 6: Schwein, Ziege, Rind; 7: Kochsalami; 8: Minisalami; 9: Landjäger; 10: Leberwurst; 11: Weißwurst; 12: Gelbwurst; 13: Wiener; 14: Leberkäse (grob); 15: Marker pBR 322

Anwendbarkeit auf kommerziell erworbene Ziegenfleischerzeugnisse. Um Aussagen über die Anwendbarkeit dieses Testsystems zur parallelen Identifikation der Tierarten Schwein, Ziege und Rind in handelsüblichen Produkten verschiedenster Prozessierungsart und Matrixbeschaffenheit treffen zu können, wurden käuflich erworbene Ziegenfleischerzeugnisse mit dem entwickelten Multiplex-System getestet (Abb. 10).

Die deutlichen Banden für DNA-Fragmente mit einer Länge von 151 bp weisen darauf hin, dass den Ziegenprodukten zusätzlich Schweinefleisch und/oder Schweinespeck zugesetzt wurde. Darüber hinaus wurde in einigen Produkten die Tierart Rind identifiziert (Abb. 10, Bahn 9, 11 und 12), was auf die Verwendung von Rindfleisch hindeutet.

Fazit

Vergleichend zu PCR-Systemen, die auf mitochondrialen Gensequenzen basieren, lässt sich feststellen, dass unvermeidbare gerätebedingte Kontaminationen bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen mit dem in dieser Arbeit entwickelten Multiplex-PCR System mit kernkodierten Gensequenzen nicht nachgewiesen werden.

Literatur

BERGER, R.G., MAGEAU, R.P., SCHWAB, B. & JOHNSTON, R.W. (1988): Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 406-409.

BINKE, R., EICHNER, R., ZÄH, M. & SCHWÄGELE, F. (2003): Entwicklung eines leistungsfähigen Extraktionssystems zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Fleisch und Fleischerzeugnissen für die PCR. *Arch. Lebensmittelhyg.* 3, 52-55.

BINKE, R., ALTMANN, FISCHER, K., MÜLLER, E. & SCHWÄGELE, F. (2004a): Semiquantitative Bestimmung von Ziegen-

gewebe in Fleischerzeugnissen mittels PCR: Bestimmung auf Basis der nukleären single-copy Gene beta-Casein und Myostatin. *Mitteilungsblatt BFEL, Standort Kulmbach* 43 (Nr. 164), 155-161.

BINKE, R., ALTMANN, K., HANKELN, T. & SCHWÄGELE, F. (2004b): Semiquantitative Bestimmung von Ziegengewebe in Fleischerzeugnissen mittels PCR. *Lebensmittelchemikertag in Bonn, 13.09.-15.09.2004.*

CALVO, J.H., OSTA, R. & ZARAGOZA, P. (2002): Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pate. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5265-5267.

FREZZA, D., FAVARO, M., VACCAI, G., HOLST, C., GIAMBRA, V., ANKLAM, E., BOVE, D., BATTAGLIA, P.A., AGRIMI, U., BRAMBILLA, G., AJMONE-MARSAN, P. & TARTAGLIA, M. (2003): A competitive Polymerase Chain Reaction-based approach for identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J. Food Protect.* 66 (1), 103-109.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. (1994): *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage.

MANZ, J. (1979): Serologische Untersuchungen an Extrakten aus Muskulatur von Rind, Schaf, Ziege und Reh. *Fleischwirtschaft* 59 (3), 408-410.

NEWGARD, J.R., ROUSE, G.C., MCVICKER, J.K. (2002): Novel Method for detecting bovine Immunoglobulin G in dried porcine plasma as an indicator of bovine plasma contamination. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3094-3097.

PALISCH, A., MERGEMEIER, S. & KUHN, M. (2003): Einsatz der Real-Time-PCR zur quantitativen Bestimmung des Rinder- und Schweineanteils in Lebensmitteln. *Fleischwirtschaft* 3, 153-156.

ROSSMANITH, W. & BAUER, F. (1994): Enzymimmunologischer Nachweis von Hühnerfleisch in erhitzten Fleischwaren. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 81, 253-258.

URBAN, T.N. (1998): Beyond industrialization: The prescription food system. *Choices* 4th Quarter, 43-44.

WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. (1942): Isolation and crystallisation of enolase. *Biochem.* 310, 384-421.

WINDHORST, H.W. (2003): Wie wird die Lebensmittelkette in der Fleischwirtschaft im Jahre 2025 organisiert sein? Vortrag auf dem FAL-Forum "Fleisch 2025" am 18. 3. 2003 in Braunschweig, Skript: http://www.ispa.uni-vechta.de/staff/windhorst/windhorst_pub.html.

WOLF, C. & LÜTHY, J. (2001): Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Sci.* 57, 161-168.