

Qualitativer Nachweis von Ziege in Fleischerzeugnissen auf Basis des nukleären single-copy Gens *beta-casein*

Qualitative determination of goat in meat products by means of the nuclear single-copy gene *beta-casein*

Katrin ALTMANN, R. BINKE und F. SCHWÄGELE

Zusammenfassung

Ein artspezifisches Primersystem BC290501 für die Identifikation von Ziege in Fleischprodukten wurde entwickelt. Beide Primer binden in der 5'-flankierenden Region des single-copy Gens *beta-casein*. Von 12 verarbeitungsrelevanten Tierarten ergab ausschließlich Ziegen DNA mittels PCR ein Amplifikationsprodukt. Weiterhin wurde gezeigt, dass unter Anwendung des Primer-Paares das Vorhandensein von Ziegenfleisch in hochoerhitzten Fleischerzeugnissen bis hin zu einer Nachweisgrenze von 1 % zuverlässig detektiert werden konnte. Derzeit wird getestet, ob das System BC290501 quantitative Analysen von Ziegenfleisch in Lebensmitteln mittels Real-Time-PCR zulässt.

Summary

A species-specific primer system BC290501 has been developed for the identification of goat in meat products. Both primers bind in the 5'-flanking region of the single-copy gene *beta-casein*. Twelve species were examined, but only goat DNA leads to amplification of a specific product by means of PCR. Furthermore the primer pair was shown to determine at least 1 % goat meat in meat products treated with high temperatures. At the moment it is investigated, if the BC290501 primer system allows a quantitative analysis of goats meat in food by means of real-time-PCR.

Schlüsselwörter Ziege – qualitativer Nachweis – *beta-casein* – Tierartidentifizierung

Key Words goat - qualitative determination – *beta-casein* – species identification

Einleitung

Die Lebensmittelbranche verzeichnete in den letzten Jahren wiederholt Skandale unterschiedlicher Tragweite. Neurodegenerative Krankheiten wie Scrapie (bei Schaf) oder BSE (bei Rind) führten hinsichtlich des Verbraucherschutzes zu der Forderung nach einer umfassenden und verständlichen Deklaration von zusammengesetzten Lebensmitteln. Seit dem 1. Juli 2003 ist die „mengenmäßige Angabe der Zutaten“ (QUID) auch für tierische Bestandteile in Fleischerzeugnissen rechtlich geregelt. Im Zuge dieser Entwicklung gewinnen Methoden zur Tierart-

bestimmung in Lebensmitteln zunehmend an Bedeutung.

Neben den herkömmlichen Nachweismethoden, basierend auf Proteinanalyse mittels chromatographischer, elektrophoretischer und immunologischer Assays (PATTERSON *et al.*, 1990), wurden in den letzten Jahren verstärkt Testsysteme entwickelt, die auf DNA-Sequenzebene die Unterscheidung verschiedener Tierarten in Produkten möglich machen (SCHWÄGELE, 2001). DNA-analytische Methoden bieten hierbei entscheidende Vorteile. Das DNA-Molekül ist auch in stark prozessierten und erhitzten Lebensmitteln relativ verlässlich

nachweisbar (JANSSEN *et al.*, 1998); der stabile Analyt wird zwar ab einer bestimmten Temperatur fragmentiert (BINKE *et al.*, in Druck), die Basenfolge bleibt aber erhalten. Somit geht die analytische Spezifität (JEMMI *et al.*, 1993) nicht verloren. Weiterhin können bereits niedrigste Mengen spezifischer DNA zuverlässlich detektiert werden (BENEKE *et al.*, 1998). Darüberhinaus liegt die DNA ubiquitär in den Zellen eines Individuums vor, kann also in jedem Gewebe in vollem Umfang nachgewiesen werden.

PCR-Methoden zur Tierartendifferenzierung eigneten sich bisher jedoch ausschließlich für eine qualitative Kontrolle verwendeter Tierarten in Fleischerzeugnissen (PALISCH *et al.*, 2003). Die Wahl mitochondrialer Zielgene, die zwar in großer, aber auch in variabler Anzahl in der Zelle vorliegen, schließt die Quantifizierung aus. Für die Durchführung quantitativer Analysen werden Gene benötigt, die in konstanter Kopienzahl vorliegen. Im Idealfall stammt die Zielsequenz aus Genen, die auf der Kern-DNA exakt einmal (single-copy) vorkommen (PALISCH, 2003). Tierartspezifische Primersysteme auf Basis von single-copy Genen ermöglichen, zusammen mit der neuen Technologie der Real-Time-PCR, eine schnelle quantitative und sensitive Analyse von PCR-Produkten (SILVA *et al.*, 1998). Während für in Fleischprodukten häufig vorkommende Tierarten wie Rind (LAUBE *et al.*, 2001) und Schwein (PALISCH, 2002) auf Grund vorhandener großer Datenfülle schnell geeignete Sequenzen zur Spezifizierung ermittelt werden konnten, ergeben sich bei der Ziege (*Capra hircus*) als Randgruppe aufgrund fehlender Sequenzinformationen Schwierigkeiten.

Ein weiteres Problem entsteht aus dem hohen genetischen Verwandtschaftsgrad von Ziege und Schaf (HUNT *et al.*, 1997). Abgesehen von einzelnen punktuellen Unterschieden in der Basensequenz ergaben sich auf Basis von publizierten Sequenzen bisher keine brauchbaren Daten zur Unterscheidung beider Tierarten.

In diesem Beitrag wird nun erstmals mit dem 5'-flankierenden Bereich des single-copy Gens (ROSEN *et al.*, 1999) *beta-casein* eine veröffentlichte Sequenz vorgestellt, welche für spezifische Identifizierung von Ziege in Fleischprodukten geeignet ist und potentiell quantitative Analysen von Ziegenfleisch in Lebensmitteln mittels Real-Time-PCR zulässt.

Material und Methoden

Probenzusammenstellung und Extraktion. Um die Spezifität des PCR-Primer-Systems BC290501, basierend auf der *beta-casein* Zielsequenz, zu überprüfen, wurden Fleischproben folgender Tierarten verwendet: Ziege (vertreten durch die Rassen „Toggenburger Ziege“, „Weiße deutsche Edelziege“, „Bunte deutsche Edelziege“, und „Burenziege“); Schwein, Rind, Pferd, Schaf, Huhn, Pute, Ente; Strauß, Känguru, Wildschwein und Hirsch. Brühwürste (Tab. 1) mit unterschiedlichen Ziegenfleischgehalten und Erhitzungsgraden, von unerhitzten Brühwurstproben über Kesselkonserven (20 min/82 °C; Fc < 0,9), Vollkonserven (33 min/116 °C; Fc = 3,4) bis hin zu Tropenkonserven (60 min/116 °C; Fc = 12,3) machten es möglich, die Nachweisgrenze in prozessierten und erhitzten Produkten festzustellen. Die Isolierung der DNA aus Fleisch und Fleischerzeugnissen erfolgte gemäß dem Protokoll von BINKE *et al.*, (2003).

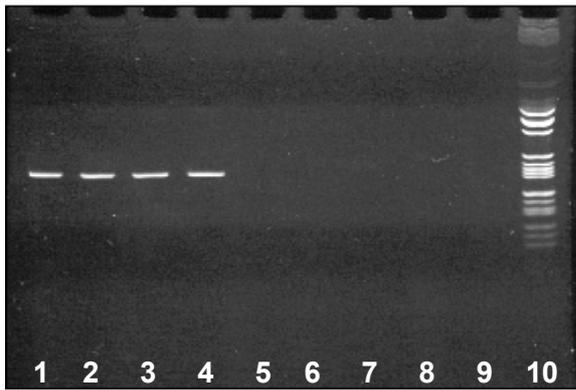


Abb. 2: Gelelektrophorese verschiedener DNA-Amplifikate nach PCR unter Einsatz des BC290501 Primersystems. 1. Burenziege; 2. Bunte deutsche Edelziege; 3. Weiße deutsche Edelziege; 4. Toggenburger Ziege; 5. Schaf; 6. Rind; 7. Pferd; 8. Schwein; 9. Negativkontrolle; 10. Standard (51-587 bp)

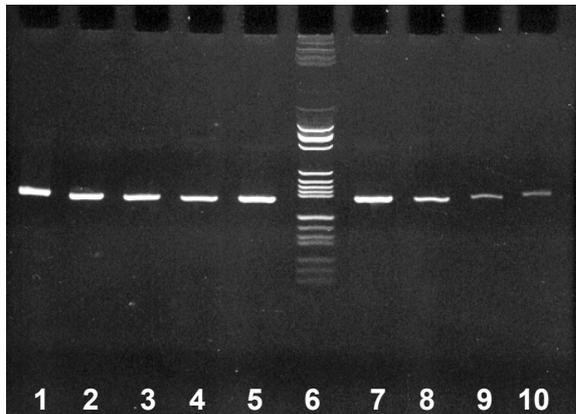


Abb. 3: Gelelektrophorese verschiedener DNA-Amplifikate nach PCR unter Einsatz des BC290501 Primersystems. 1. B1 unerhitzt; 2. B2 unerhitzt; 3. B3 unerhitzt; 4. B4 unerhitzt; 5. B5 unerhitzt; 6. Standard (51-587 bp); 7. B5 unerhitzt; 8. B5 Kesselkonserve ($F_c < 0,9$); 9. B5 Vollkonserve ($F_c = 3,4$); 10. B5 Tropenkonserve ($F_c = 12,3$)

Ergebnisse und Diskussion

Aus Abbildung 2 ist zu erkennen, dass das entwickelte PCR-Primer-System BC290501 spezifisch für alle getesteten Ziegenrassen ist (Bahn 1-4). Die amplifizierten Fragmente zeigen eine eindeutige starke Bande mit 161 bp. Nebenprodukte wurden nicht beobachtet. Die Länge des Amplikons stimmt mit der bekannten Länge der *beta-casein* Zielsequenz exakt überein. Das Ergebnis bestätigt, dass im gewünschten Genabschnitt der Ziegen-DNA die Vervielfältigung durch das

Primer-System BC290501 stattfindet. Bei Schaf, Rind, Pferd und Schwein (Abb. 2, Bahn 5-8) wird ebenso wie bei den anderen getesteten Tierarten (Daten nicht gezeigt) keine DNA-Vermehrung nach Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar. Auch in der Negativkontrolle (Spur 9) ist kein Amplikon zu sehen.

In allen unerhitzten Brühwurstprodukten (Abb. 3, Spur 1-5) mit einem Ziegenfleischgehalt von 50 %-1 % erfolgt ein eindeutiger Nachweis der Tierart Ziege. Von den Brühwürsten B1-B4 (Daten nicht gezeigt) und B5 (Abb. 3, Spur 7-10) wurden jeweils Proben aller Erhitzungsstufen der PCR mit dem Primerpaar BC290501 unterzogen und mittels Gelelektrophorese untersucht. Selbst in der Wurst B5 mit einem Ziegenfleischanteil von lediglich 1 % können in allen Proben eindeutige Banden der gesuchten Länge gefunden werden. Die Ausprägung dieser Banden lässt jedoch mit zunehmender Erhitzung bis hin zur Tropenkonserve (Spur 10) immer mehr nach. Ursache hierfür ist die zunehmende Fragmentierung der DNA bei steigenden Temperaturen. Dabei wird unter anderem auch der Bereich der *beta-casein* Zielsequenz gespalten, an den die Primer binden. Somit sinkt die amplifizierbare Ausgangs-DNA-Menge in höher erhitzten Produkten und die Banden werden schwächer.

Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das neu entwickelte PCR-Primer System BC290501 in Bezug auf Spezifität, Sensibilität und Anwendbarkeit für Fleischerzeugnisse gute Ergebnisse erzielt. Die Tierart Ziege ist eindeutig detektierbar und kann bis zu einer Nachweisgrenze von 1 % in prozessierten und erhitzten Produkten nachgewiesen werden. In weitergehenden Studien wird nun versucht, das System BC290501 mittels einer geeigneten Sonde oder unter Anwendung von SYBR-Green auf die Real-Time-PCR zu übertragen, um mit dieser Methode auch quantitative Aussagen hinsichtlich ziegenfleischhaltiger Lebensmittel treffen zu können.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. Behrens von der Firma CIBUS Biotech GmbH und Herrn Butschke

vom BfR für die Bereitstellung von Ziegenreferenz DNA.

Literatur

- Beneke, B., und Hagen, M. (1998). Eignung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion). *Fleischwirtsch.* 78 (9), 1998
- Binke, R., Altmann, K. und Schwägele, F. (in Druck). Influencing factors for the quantification of animal species in meat by means of PCR. *Innovations in Food Technology*
- Binke, R., Eichner, R., Zäh, M. und Schwägele, F. (2003): Entwicklung eines leistungsfähigen Extraktionssystems zur Isolierung von Nucleinsäuren aus Fleisch und Fleisch-erzeugnissen für die PCR, *Mitteilungsblatt BAFF 42, Nr. 159*, 21-26.
- Hunt, D.J., Parkes, H.C. und Lumley, I.D. (1997). Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chemistry*, Vol.60, No.3, pp. 437-442
- Janssen, F.W., Hagele, G.H., Buntjer, J.B., and Lenstra, J.A. (1998). Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *Journal of Industrial Microbiology*, 21, 115-120.
- Jemmi, T., and Schlosser, H. (1993). Tierartbestimmung aus mariniertem und erhitztem mariniertem Fleisch mittels isoelektrischer Fokussierung. *Fleischwirtsch.* 73, 600-602.
- Laube, I., Butschke, A., Zagon, J., Spiegelberg, A., Schauzu, M., Bögl, K.W., Kroh, L.W. und Broll, H. (2001). Nachweisverfahren für Rindfleisch in Lebensmitteln unter Anwendung der TaqMan-Technologie. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 44, 326-330
- Palisch, A., Mergemeier, S. und Kuhn M. (2003). Einsatz der Real-Time-PCR zur quantitativen Bestimmung des Rinder- und Schweineanteils in Lebensmitteln. *Fleischwirtsch.* 3/2003, 153-156
- Palisch, A. (2002). Etablierung einer Real-Time-PCR-Methode zur quantitativen Bestimmung des Rinder- und Schweineanteils in Lebensmitteln. Diplomarbeit TFH Berlin
- Patterson, R.L.S. and Jones, S.J. (1990). Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. *Analyst*, 115, 501-506
- Rosen, J.M., Wyszomierski, S.L. and Hadsell, D. (1999). Regulation of milk protein gene expression. *Annu. Rev. Nutr.* 19 :407-36
- Schwägele, F. (2001). Analytik bei Fleisch: Bewertung immunologischer und gentechnischer Methoden. *Fleischwirtsch.* 82 (2), 78-81.
- Silva, D. de, Reiser, A., Herrmann, M., Tabiti, K. and Wittwer, C. (1998). Rapid genotyping and quantification on the LightCycler with Hybridization Probes. *Roche Molecular Biochemicals Biochemica* 2/1998

