

# **BIOforum**

**FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG**

**S O N D E R D R U C K**

© GIT VERLAG GMBH

Röblerstr. 90

D-64293 Darmstadt

BIOforum

22 (1999) 411-413

DR. MEINHARD BEHRENS

DR. MONIKA UNTHAN

**Molekulargenetische Methoden  
zur Tierartbestimmung in Lebens-  
mitteln**

**GIT VERLAG**

# Molekulargenetische Methoden zur Tierartbestimmung in Lebensmitteln



Meinhard Behrens



Monika Unthan

**Molekulargenetische Methoden zur Tierartbestimmung werden zur Zeit fest in das Untersuchungsspektrum der Lebensmittelanalytik eingebunden. Die Erbsubstanz DNA als Zielmolekül der Analyse ist weitgehend stabil gegenüber Verarbeitungsprozeduren und bietet der Analytik damit ungeahnte Möglichkeiten. Die wesentliche Grundlage bei diesen Analyseverfahren ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Diese DNA-Vervielfältigungstechnik ermöglicht im Gegensatz zu konventionellen proteinchemischen Methoden auch dann noch eine eindeutige Tierartbestimmung, wenn es sich um stark erhitzte oder anderweitig hochgradig verarbeitete Proben handelt. Dargestellt werden zwei PCR-Verfahren, die sich im Rahmen der Lebensmittelanalytik durchgesetzt haben und zur Zeit hauptsächlich angewendet werden.**

## KEYWORDS

PCR, Tierartidentifizierung, DNA-Analytik, tierart-spezifische PCR-Primer, verarbeitete, erhitzte Lebensmittel

## Einleitung

Molekulargenetische Nachweismethoden zur Tierartidentifizierung anhand der Erbsubstanz DNA gewinnen in der Lebensmittelanalytik zunehmend an Bedeutung. Das Zielmolekül DNA ist im Gegensatz zu Proteinen praktisch in jedem für die Verarbeitung bedeutsamen tierischen Bestandteil vorhanden und in ihrem Informationsgehalt absolut identisch. Darüber hinaus ist die Erbsubstanz DNA gegenüber den meisten Verarbeitungsschritten bei der Herstellung eines Lebensmittels stabiler als Proteine. Die langkettigen DNA-Moleküle werden zwar durch Erhitzen und andere Prozessierungsschritte in kürzere Bruchstücke gespalten, jedoch wird das für die Analyse entscheidende Kriterium – die Abfolge der Nukleotide der DNA – nicht verändert [1].

Obgleich sich molekulargenetische Nachweisverfahren in vielen Fachdisziplinen schon seit 20 Jahren fest etabliert haben, erlangten sie in der Lebensmittelanalytik erst in den letzten 5 Jahren eine ernstzunehmende Bedeutung. Während die ersten Ansätze auf DNA-Hybridisierungsverfahren mit tierart-spezifischen DNA-Sonden basierten, führte die enorme Zunahme an DNA-Sequenzinformationen und die Verbreitung der Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) als vielfältig einsetzbares Diagnostikinstrument dazu, daß sich Identifizierungstechniken auf PCR-Basis auch in der Lebensmittel- und Futtermittelanalytik zunehmend durchsetzten [2-6]. In diesen Einsatzbereichen nehmen PCR-Verfahren heute gegenüber anderen DNA-Verfahren eine herausragende Position ein.

Bei den PCR-Verfahren zur Tierartbestimmung haben sich zwei Verfahren durchgesetzt, und zwar:

- PCR mit universellen Primern und anschließender RFLP-Analyse und
- PCR mit tierart-spezifischen Primern

## PCR mit universellen Primern – PCR-RFLP

Bei der PCR mit universellen Primern (auch Consensusprimer genannt) und anschließender RFLP-Analyse werden

Primer-Paare verwendet, deren Bindungsstellen zur DNA vieler verschiedener (aber nicht aller!) Tierarten ein hohes Maß an Übereinstimmung aufweisen. Dabei werden bei der PCR DNA-Bereiche synthetisiert, die – unabhängig von der vorliegenden Tierart-DNA – gleich lang sind, aber tierart-spezifische Sequenzunterschiede aufweisen. Diese Unterschiede in den PCR-Produkten werden für die eigentliche Identifizierung der vorliegenden Tierart(en) genutzt. Im Anschluß an die Vervielfältigungsreaktion werden die PCR-Produkte enzymatisch mit Restriktionsendonukleasen gespalten, wodurch aufgrund der Sequenzunterschiede verschieden lange DNA-Fragmente entstehen. Nach elektrophoretischer Trennung im Agarose- oder Polyacrylamidgel werden die PCR-Fragmentmuster durch Vergleich mit gespaltenen PCR-Produkten definierter Referenztierarten ausgewertet (Abb. 1). Die Analyse der tierart-spezifischen DNA-Fragmentmuster wird auch als RFLP-Analyse (RFLP = restriction fragment length polymorphism) bezeichnet. Zur Identifizierung von Tierarten mittels RFLP sollten – je nach Genbereich – PCR-Produkte von mindestens 300 bis 500 Basenpaaren Länge synthetisiert werden, d.h. die beiden Primerbindungsstellen müssen einen entsprechenden Abstand auf der DNA haben. Kürzere PCR-Produkte weisen in der Regel zu wenige unterschiedliche Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen auf, so daß sich insbesondere eng verwandte Tierarten nicht eindeutig differenzieren bzw. bestimmen lassen.

RFLP-Analysen erfordern generell enzymatische Spaltungen mit mehreren verschiedenen Restriktionsendonukleasen, um sichere Zuordnungen der DNA-Fragmente zu einzelnen Tierarten zuzulassen. Beispielsweise können einzelne DNA-Positionen aufgrund individueller Mutationen oder durch rassen-spezifische Sequenzunterschiede auch innerhalb einer Tierart variieren. Hierdurch können zusätzliche Erkennungssequenzen für einzelne Restriktionsenzyme entstehen oder wegfallen, wodurch das Fragmentmuster des betroffenen Enzyms von der entsprechenden Referenz abweicht. Nach eigenen Erfahrungen bei

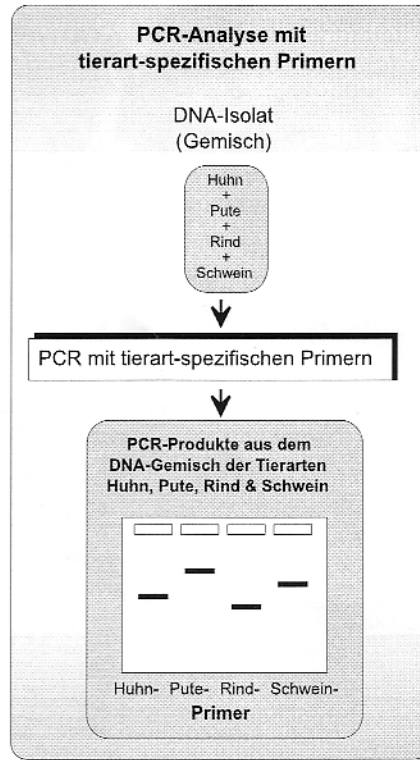
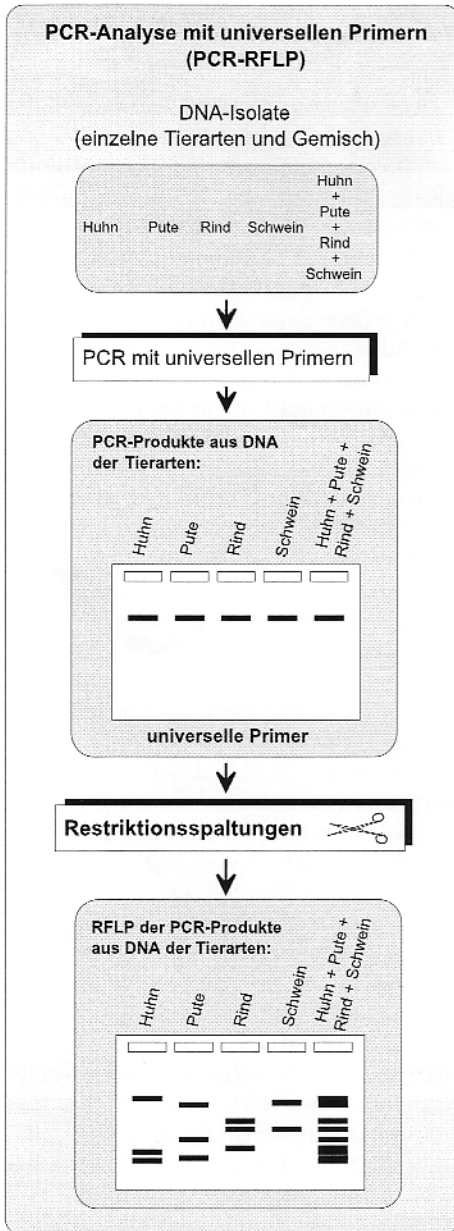


Abb. 1: Vergleichende Darstellung der Tierart-identifizierung mittels PCR-RFLP und der PCR-Analyse mit tierart-spezifischen Primern. Für die Tierartidentifizierung mittels PCR-RFLP erfolgt die Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes mit einem universellen Primerpaar. Die entstehenden PCR-Produkte sind – unabhängig von der Tierart – gleich lang. Die artspezifischen Sequenzunterschiede sind die Ursache für unterschiedliche Restriktionsfragmente bei anschließender enzymatischer DNA-Spaltung und elektrophoretischer Trennung. Komplexe Proben, die sich aus mehreren Tierarten zusammensetzen, ergeben häufig ein schwer zuzuordnendes RFLP-Muster. Durch Verwendung von tierart-spezifischen Primerpaaren wird nur DNA der entsprechenden Art vervielfältigt. Das Erscheinen der artspezifischen PCR-Produkte bei der Elektrophorese zeigt das Vorhandensein der jeweiligen Art in der Lebensmittelprobe – ohne vorherige Restriktionsspaltung – direkt an.

der Analyse verschiedener Rehrassen können diese intraspezifischen Variationen innerhalb des für Artbestimmungen häufig benutzten mitochondrialen Markergens Cytochrom b bis zu 3 % betragen, so daß sich sehr unterschiedliche RFLPs innerhalb einer Art ergeben können. Diese Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Rassen können – zumindest in bestimmten DNA-Regionen – sogar größer sein als zwischen verschiedenen Arten!

Für die RFLP-Analyse ist es nicht unbedingt erforderlich, die DNA-Sequenzen der PCR-Produkte für die jeweiligen Tierarten zu kennen. Die Analysen können auch anhand von empirischen Untersuchungen mit Referenzfleisch erstellt werden. Das Vorliegen von entsprechenden Sequenzdaten erleichtert jedoch die Suche nach geeigneten Restriktionsenzymen enorm, da deren Auswahl gezielt erfolgen kann.

Vorteilhaft bei der PCR-RFLP Analyse ist, daß sich verschiedene Tierarten mit nur einem Primer-Paar amplifizieren bzw. identifizieren lassen. In der Praxis wird man jedoch über kurz oder lang mit Fragestellungen konfrontiert, die sich mit einem Universalprimerpaar nicht lösen lassen und so müssen für einzelne Arten bzw. taxonomische Einheiten weitere Universalprimer entwickelt werden.

Zur Analyse von einzelnen Fleischstücken einer Sorte ist die PCR-RFLP zur Tierartbestimmung in der Regel gut einsetzbar und liefert bei Einsatz mehrerer verschiedener Restriktionsenzyme verlässliche Ergebnisse. Komplexe Lebensmittel, in denen mehrere Tierarten verarbeitet wurden (Wurstwaren, Pasteten etc.), sind jedoch mit diesem Verfahren meistens nicht exakt zu analysieren. Da

universelle Primer in Abhängigkeit von der Tierart unterschiedlich gut binden, werden in Mischungen DNA-Moleküle bestimmter Arten unter Umständen nur schwach amplifiziert und somit bei der RFLP-Analyse nicht nachgewiesen [7, 8]. Selbst bei vergleichbarer Amplifikationseffizienz jeder vorliegenden Tier-DNA gestaltet sich eine RFLP-Analyse häufig schwierig, da sich einzelne Fragmente oder Fragmentgruppen aufgrund von Überlappungen bei der elektrophoretischen Auftrennung nicht immer eindeutig einer bestimmten Tierart zuordnen lassen (Abb. 1).

Bei hocherhitzten Produkten stößt die Technik ebenfalls an ihre Grenzen. Verarbeitungsschritte, wie z. B. Hitze-Konservierung, können zu einer unspezifischen Spaltung der DNA in kürzere Bruchstücke führen. Bedingt durch die thermische Degradation der Nukleinsäuren stehen häufig nur noch wenig hinreichend große DNA-Bruchstücke zur Verfügung, die als Bindungsstellen für die beiden PCR-Primer dienen können (Abb. 2). Damit überhaupt PCR-Produkte gebildet werden können, dürfen die Primer-Bindungsstellen bei derartigen Proben somit nicht zu weit voneinander entfernt liegen (möglichst  $\leq 200$  Basenpaare). Ein Umstand, der erfolgreiche RFLP-Analysen in der Laborpraxis häufig erschwert, wenn nicht gar unmöglich macht.

### PCR mit tierart-spezifischen Primern

Die tierart-spezifische PCR-Analyse beruht auf der Verwendung von Primern, die perfekt und ausschließlich mit der DNA einer einzigen Tierart reagieren, gegen die sie gerichtet sind. Das bedeutet, daß das Auftreten tierart-spezifischer PCR-Produkte das Vorhandensein der entsprechenden Tierart-DNA in der untersuchten Probe direkt anzeigt. Die Visualisierung der synthetisierten PCR-Produkte erfolgt auch hierbei meistens im Agarose- oder Polyacrylamidgel nach entsprechender Anfärbung und UV-Beleuchtung (Abb. 1).

Bei dem PCR-Verfahren mit artspezifischen Primern erübrigen sich kosten- und zeitintensive Restriktionsspaltungen der amplifizierten DNA, jedoch können diese zur zusätzlichen Absicherung des korrekten PCR-Amplifikates durchgeführt werden. Nach eigenen Erfahrungen ist bei einer gut eingestellten PCR-Reaktion mit artspezifischen PCR-Primern, bei der nur ein PCR-Produkt mit richtiger Größe auftritt, keine Verifizierung mittels Restriktionsspaltung nötig.

Um geeignete tierart-spezifische Primerpaare auszuwählen, sind umfangreiche Sequenzanalysen verschiedener

Tierarten notwendig. Entsprechende Sequenzdaten sind teilweise aus Datenbanken via Internet verfügbar. Erfahrungsgemäß müssen jedoch als Ergänzung häufig noch eigene Sequenzanalysen durchgeführt werden, um alle lebensmittelrelevanten Arten und Rassen zu erfassen. Liegen genügend Sequenzinformationen vor, beginnt die Suche nach geeigneten PCR-Primern. Entscheidend dabei ist eine ausgeprägte Homologie zur DNA der zu vervielfältigenden Tierart und eine genügend große Divergenz zur DNA mit der sie nicht reagieren sollen. Für die Konstruktion bzw. Auswahl geeigneter Primer stehen mittlerweile mehr oder weniger umfangreiche DNA-Analyseprogramme zur Verfügung. Generell gilt, je mehr DNA-Sequenzen beim Software-unterstützten Primerdesign Berücksichtigung finden, desto verlässlicher ist die Primerauswahl. Das heißt, es verringert sich damit die Wahrscheinlichkeit, daß unspezifische Kreuzreaktionen bei der PCR-Amplifikation auftreten.

Den theoretischen Überlegungen folgen die experimentellen Überprüfungen der konstruierten PCR-Primer. Hierzu müssen nicht nur die optimalen PCR-Bedingungen für die jeweils nachzuweisende Tierart-DNA etabliert werden, sondern es müssen auch mögliche Kreuzreaktionen oder PCR-Artefakte mit praxisrelevanten Proben ausgeschlossen werden. Außerdem sind neue tierart-spezifische Primer auch auf Rassenunabhängigkeit zu prüfen.

Die Entwicklung von PCR-Systemen mit tierart-spezifischen Primern erfordert recht umfangreiche theoretische Überlegungen und praktische Vorexperimente. Sind artspezifische Primer aber erst einmal etabliert, so können Proben analysiert werden, an denen alle anderen Techniken scheitern.

Aufgrund der Spezifität der Primer für „ihre“ Tierart, ist es vollkommen gleichgültig, welche und wieviel „andersartige“ DNA in der Probe enthalten ist. Selbst geringe Zumischungen können in komplexen Mischproben identifiziert werden.

Da eine RFLP darüber hinaus nicht erforderlich ist, reichen auch kurze PCR-Produkte ( $\leq 200$  Basenpaare) für den Nachweis aus, die sogar mit DNA aus hocherhitzten Produkten synthetisiert werden können.

## Fazit

Die beiden skizzierten PCR-Verfahren zur Tierbestimmung haben – in Abhängigkeit von der analytischen Fragestellung – beide ihre Vorzüge und Defizite.

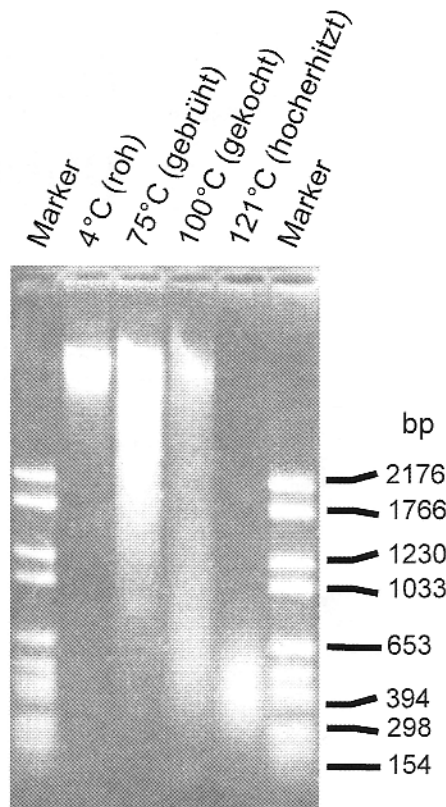


Abb. 2: Einfluß der Temperatur auf die Qualität der Gesamt-DNA

DNA-Isolate aus: Schweinefleisch, roh, 24 Std. 4 °C; Schweinefleisch, 30 Min. 75 °C; Schweinefleisch 30 Min. 100 °C; Schweinefleisch 20 Min. 121 °C

Der Einsatz universeller Primer erfordert im Anschluß an die PCR eine kosten- und zeitintensive RFLP-Analyse, um die Amplifikate einer bestimmten Tierart zuzuordnen zu können. Dafür können Tierarten, für die nicht genügend Sequenzinformationen vorliegen, mit der PCR-RFLP bisweilen empirisch identifiziert werden, sofern die universellen Primer in einem hohen Maß mit der Tierart-DNA übereinstimmen und entsprechendes Referenzfleisch vorhanden ist.

Das PCR-Verfahren mit tierart-spezifischen Primern erfordert zunächst umfangreiche Sequenzanalysen und Vorexperimente, so daß sich die Etablierung eines spezifischen Primer-Paars nur für häufig nachzuweisende Tierarten lohnt. Dafür kann es bei komplexen Proben, die sich aus Komponenten vieler Tierarten zusammensetzen, seine Vorteile ins Feld bringen. Außerdem ermöglichen spezifische PCR-Primer mit dichter beieinander liegenden Bindungsstellen auch die Analyse hochgradig erhitzter Proben wie Vollkonserven, so daß mit tierart-spezifischen Primern ein weitaus größeres Probenspektrum als mit universellen Primern überprüft werden kann.

Aus diesem Grund hat sich unser Labor vor einiger Zeit entschlossen, entsprechende tierart-spezifische Primer zu

entwickeln. Inzwischen werden Nachweissysteme für die lebensmittelrelevanten Tierarten Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Pferd, Esel, Huhn und Pute in der Laborroutine verwendet.

Darüber hinaus haben tierart-spezifische PCR-Primer auch Eingang in Diagnostik-Kits (Animal-Kits, alcum GmbH) gefunden, die im Rahmen der Qualitätssicherung in Handelsunternehmen, in der verarbeitenden Industrie aber auch in Laboratorien sowie in Untersuchungsbehörden erfolgreich eingesetzt werden. Ihre Anwenderfreundlichkeit ermöglicht sogar „Newcomern“ moderne Lebensmittelanalysen mit dem Diagnostikinstrument PCR durchzuführen.

## Literatur

- [1] JEMMI, T., H. SCHLOSSER: *Fleischwirtschaft* 73, 600–602 (1993)
- [2] BAUR, C., J. TEIFEL-GREDING, E. LIEBHARDT: *Arch. Lebensmittelhyg.* 38, 172–174 (1987)
- [3] MEYER, G., M. MÜLLER, L. KRUSE, H. RÜGGEBERG, G. KETSCHAU, A. HILDEBRANDT: *Fleischwirtschaft* 74, 1237–1238 (1994)
- [4] SAIKI, R. K., S. SCHARF, F. FALOONA, K. B. MULLIS, G. T. HORN, H. A. ERLICH, N. ARNHEIM: *Science* 230, 1350–1354 (1985)
- [5] MEYER, R., C. HÖFELEIN, J. LÜTHY, U. CANDRIAN: *Journal of AOAC International* 78, 1542–1551 (1995)
- [6] BEHRENS, M., M. UNTHAN, Y. BRINKMANN, R. BUCHHOLZ, N. LATUS: *Fleischwirtschaft* 79, 97–100 (1999)
- [7] BENEKE, B., M. HAGEN: *Fleischwirtschaft* 78, 1016–1019 (1998)
- [8] SCHWÄGELE, F.: *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung* 37, 179–184 (1998)

## Die Autoren

### Dr. Meinhard Behrens

Biologiestudium an den Universitäten Bielefeld und Düsseldorf, Promotion 1990. Forschungstätigkeit am Biozentrum in Basel. Seit 1993 bei der alcum GmbH, Rietberg zuständig für Forschung und Entwicklung molekulargenetischer Nachweisverfahren für die Lebensmittelanalytik und Leitung der Mikrobiologie.

### Dr. Monika Unthan

Studium der Biologie an der Universität Bielefeld, Promotion 1995. Seit 1997 für die alcum GmbH, Rietberg tätig. Schwerpunkte: Entwicklung molekulargenetischer Verfahren für die Lebensmittelanalytik und Marketing.

alcum GmbH  
Platzstraße 33  
D-33397 Rietberg