

Erarbeitung einer Praktikumsvorschrift zum Nachweis von Fleischsorten verschiedener Spezies im Döner mittels der Polymerase-Kettenreaktion

V. Bokemeyer, L. Bosl, F. Kothe-Marxmeier, N. Stein, L. Tara, L. Tollrian, K. Weitkämper und F. Schaller

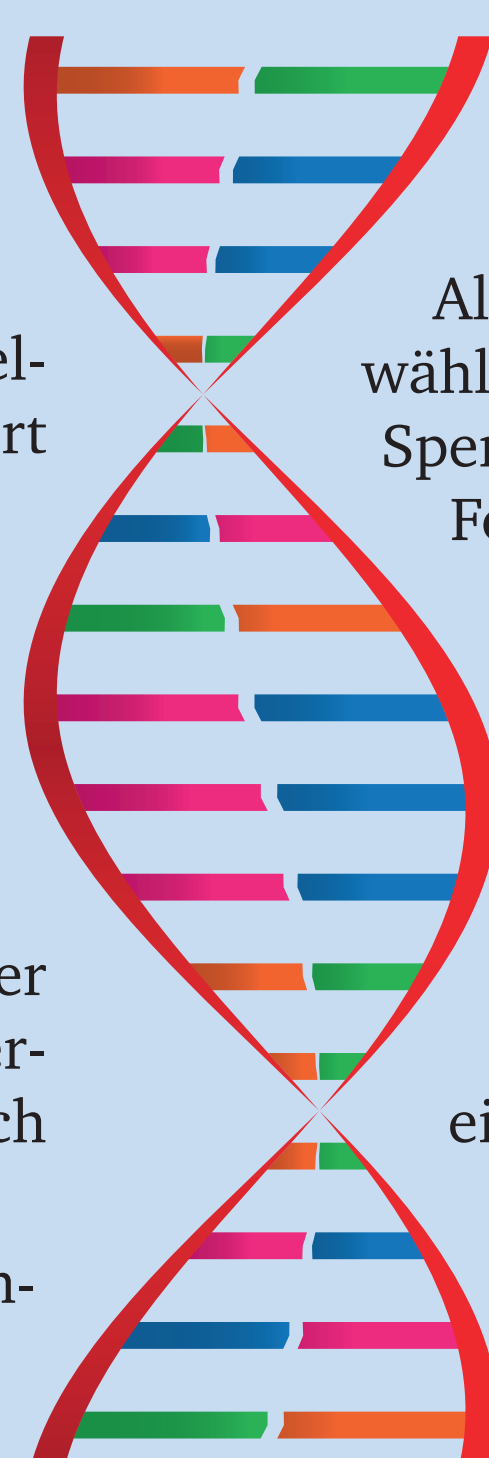
Einleitung

Die Kennzeichnung zu Inhaltsstoffen und Eigenschaften eines Lebensmittels wurde zum Schutz der Verbraucher eingeführt. Trotz dieser Kennzeichnungspflicht von Lebensmitteln werden die Verbraucher immer wieder getäuscht. Falsch deklarierte Lebensmittel und Gammelfleisch – beides scheinen in heutiger Zeit nicht selten vorkommende Phänomene zu sein. Wie der Pferdefleischskandal aus dem Jahre 2013 zeigt, werden für die Herstellung von fleischhaltigen Lebensmitteln z. B. andere Tierarten verwendet, als die, die deklariert sind, einfach um kostengünstiger produzieren zu können. Derzeit überwachen Lebensmittelkontrolleure die Qualität der Lebensmittel.

Ein spezifischer Nachweis über die in käuflichen Nahrungsmitteln der Lebensmittelindustrie enthaltenen Tierarten kann mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit sich anschließender Analyse der (für jede Tierart spezifischen) amplifizierten (vermehrten) DNA mittels Agarosegelelektrophorese erfolgen.

Aus aktuellem Anlass sollte hier der Nachweis von eventuell vorhandenem Pferdefleisch im Döner im Vordergrund stehen. In Dönerfleisch wurde ursprünglich nur Hammel- oder Lammfleisch verarbeitet, inzwischen sind – zumindest außerhalb der Türkei – in der „Rotfleischvariante“ auch Kalb- bzw. Rindfleisch üblich.

(Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz: Lebensmittelkennzeichnung, 2013; Bundesministerium der Justiz: Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln, 2013; Tagesspiegel online, 2013; Saiki et al., 1988)



Der Nachweis der Existenz von Fleisch bestimmter Spezies (Rind/Kalb, Lamm und Pferd) im Döner erfolgte hier über den Einsatz spezifischer PCR-Primerpaare, die nur in Verbindung mit der entsprechenden DNA ein PCR-Produkt ergeben.

Als zu amplifizierendes DNA-Fragment wurde ein Ausschnitt aus dem Akrosin-Gen gewählt. Das Genprodukt, das Akrosin-Protein, ist die Hauptproteinase im Akrosom reifer Spermien. Im Akrosom befindet sich das inaktive Präkursor-Protein Proakrosin. Die aktive Form des Enzyms bewirkt die Auflösung (Lyse) der *Zona pellucida*, der Schutzhülle der Eizelle. Dies ermöglicht dem Spermium das Eindringen in die Eizelle. Proakrosin ist im Verlauf der Spermatogenese erstmals bei den haploiden Spermatozyten nachweisbar. Das Akrosin-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 22 (Genlocus q13.3). Ein Mangel an Akrosin ist eine Ursache für die genetisch bedingte Unfruchtbarkeit bei Männern.

Die Amplifikation eines Akrosin-DNA-Fragments bietet sich hier an, da das Akrosin-Gen, wie viele andere an der sexuellen Fortpflanzung beteiligten Gene der Säugetiere, eine erhöhte Evolutionsrate, d.h. eine erhöhte Mutationsrate und damit eine hohe DNA-Divergenz im Artvergleich aufweist, und somit für das Ableiten artspezifischer Primer für die PCR geeignet ist.

(Swanson und Vacquier, 2002; Gatesy und Swanson, 2007; Schaller, 2013)

Methoden

1. Ermittlung der DNA-Sequenzen der Akrosin-Gene der einzelnen Tierart innerhalb der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ und Alignierung der Sequenzen zwecks Homologievergleich mit dem Internetprogramm „ClustalW“. (→ Ergebnisse Abb. 1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> <http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>)
2. Ableitung der entsprechenden Primerpaare aus hoch mutierten Sequenzbereichen. (→ Ergb. Abb. 1)
3. Extraktion und Reinigung genomischer DNA aus Tiergewebe und Dönerfleisch (hier: Rind, Lamm, Pferd, Döner 1, Döner 2, Döner 3). Hierzu wurden etliche Verfahren ausprobiert. Mit einem kommerziellen System („peqGOLD Blood DNA Mini Kit“ der Firma PEQLAB) wurde schließlich eine Methode gefunden, die reproduzierbar, zeiteffizient und gesundheitlich unbedenklich ist und somit für die Praktika geeignet erschien (→ Ergebnisse Abb. 2)
4. PCR-Amplifikation der Akrosin-DNA-Fragmente mit genomischer Matrizen-DNA von Lamm, Pferd, Rind und den dreierlei Döner. Hierbei wurde im Vorfeld nachgewiesen, dass die Primer bei der Hybridisierungstemperatur von 55°C keine Kreuzreaktivität zeigen. (→ Ergebnisse Abb. 3)
5. Analyse der PCR-Ansätze auf das Vorhandensein von amplifizierten DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese. (→ Ergebnisse Abb. 4)

Ergebnisse

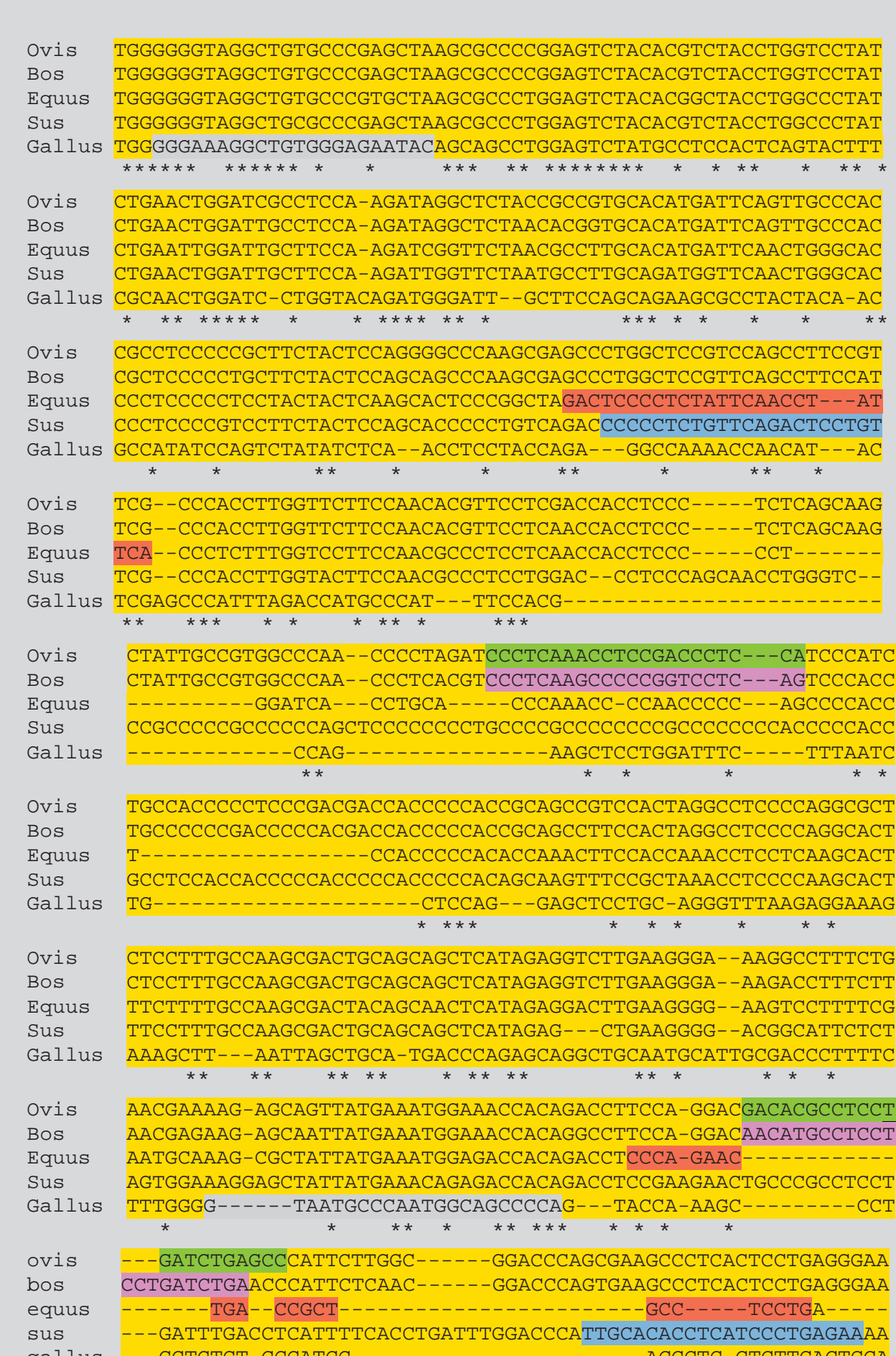


Abb. 1 Sequenzalignement des Akrosingens
 Ovis: Lamm, Bos: Rind, Equus: Pferd, Sus: Schwein, Gallus: Huhn. Farblich hervorgehoben die Primersequenzen (Fragmentgrößen: Rind und Lamm 214bp, Pferd 266bp, Schwein 366bp, Huhn 392bp). „*“ = Sequenzübereinstimmung, „-“ = vom Programm eingefügte Lücken (gaps).

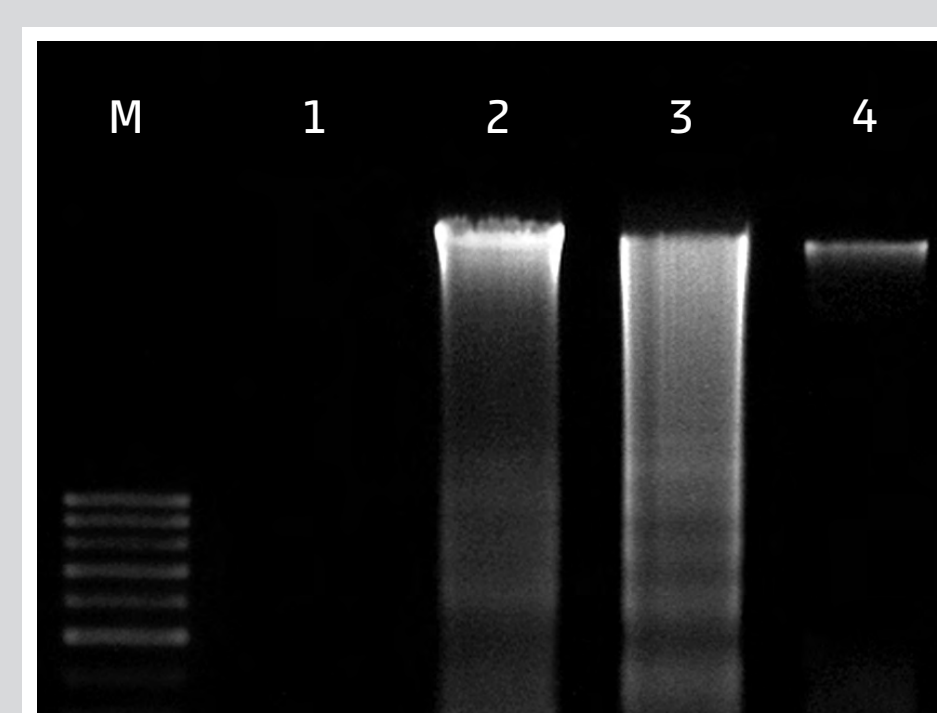


Abb. 2 Gelelektrophorese genomischer DNA
 Spur 2: Rind, Spur 3: Pferd, Spur 4: Lamm, M: Größenstandard; 1,8%iges Agarosegel in TAE-Puffer, angefärbt mit Ethidiumbromid.



Abb. 3 Screenshot des Thermocyclers
 Dargestellt ist das Zeit- und Temperaturprogramm der PCR-Methode zur Amplifizierung der Akrosin-Fragmente.

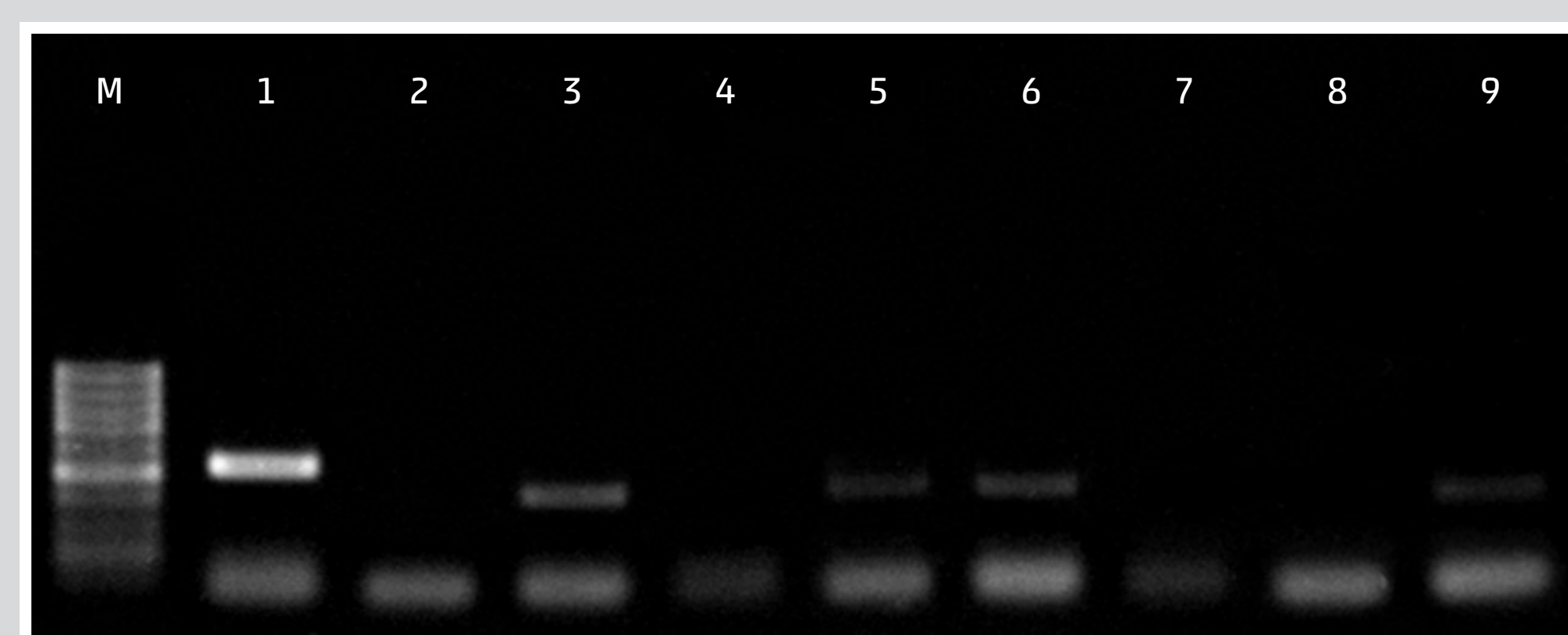


Abb. 4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit genomischer Döner-DNA als Matrize
 Spuren 1-3: Döner 1; Pferdeprimer (1), Lammprimer (2), Rinderprimer (3); Spuren 4-6: Döner 2; Pferdeprimer (4), Lammprimer (5), Rinderprimer (6); Spuren 7-9: Döner 3; Pferdeprimer (7), Lammprimer (8), Rinderprimer (9); 1,8%iges Agarosegel in TAE-Puffer, M: Größenstandard.

Zusammenfassung

Ausgehend von grundlegenden Experimenten zur Identifikation von Tierarten über die Amplifikation von spezifischen Akrosin-Fragmenten konnte, nach Aufbau eines Molekularbiologischen Labors (Schiller-Mobil), dank der großzügigen Unterstützung durch die Rütgers-Stiftung die Methode innerhalb der experimentellen Teile von 7 Facharbeiten an der Schiller-Schule in den Herbstferien 2013 so ausgearbeitet werden, dass eine praktikable Versuchsdurchführung zur Verfügung stand, die für die Erstellung einer Praktikumsvorschrift herangezogen werden konnte (Bokemeyer, Bosl, Kothe-Marxmeier, Stein, Tara, Tollrian, Weitkämper, 2013).

Erstmals konnten so sämtliche Schülerinnen und Schüler der Biologiekurse der Jahrgangsstufe Q1 in der Woche vom 27.01.2014 bis zum 31.01.2014 an der Schiller-Schule Molekularbiologie selber erleben. Eine alljährliche Wiederholung dieser Großpraktika ist genauso geplant, wie eine Erweiterung des Praktikums-Angebotes innerhalb des Schiller-Mobils (zunächst: „Enzymologie rund um den Alkohol“ für Schülerinnen und Schüler der Biologie- und Chemiekurse der Jahrgangsstufe der EF).

Durch die gewählten Versuchsbedingungen konnten von den SuS in verschiedenen Kalbsdöner-Proben unterschiedliche Tierart nachgewiesen werden (Döner 1: Rinder- und Pferdefleisch, Döner 2: Rinder- und Lammfleisch, Döner 3: lediglich Rinderfleisch, Abb.4) und somit im Experiment moderne molekularbiologische Methoden für die Beantwortung einer aktuellen Fragestellung bzw. für das Erkennen eines Betrug am Verbraucher eingesetzt werden.

Literatur

Bokemeyer, V. (2013) Religionen und Reinheit von Nahrungsmitteln – Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Schweinefleisch. Facharbeit, Schiller-Schule Bochum

Bosl, L. (2013) Identifizierung von Fleischarten in Lebensmitteln mit Hilfe molekularbiologischer Methoden am Beispiel eines Kalbfleischdöners – hier Ermittlung von Pferdefleisch. Facharbeit, Schiller-Schule Bochum

Gatesy, J., Swanson, W.J. (2007) Adaptive evolution and phylogenetic utility of ACR (akrosin), a rapidly evolving mammalian fertilization gene. *Journal of Mammalogy*, 88, 32-42

Kothe-Marxmeier, F. (2013) Identifizierung der Fleischsorten im Döner durch die Polymerase-Kettenreaktion mit Schwerpunkt auf der DNA des Rindes und Prüfung auf Eignung dieser Methode für den Unterricht. Facharbeit, Schiller-Schule Bochum

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491

Schaller, J. A.-L. (2013) Identifizierung von Fleischsorten in Lebensmitteln mit Hilfe molekularbiologischer Methoden am Beispiel des Döners. Facharbeit am Ruhr-Gymnasium Witten

Stein, N. (2013) Molekularbiologische Methoden zur Bestimmung von Fleisch verschiedener Tierarten am Beispiel von Lamm im Dönerfleisch. Facharbeit, Schiller-Schule Bochum

Swanson, W.J. and Vacquier, V.D. (2002) The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature reviews | Genetics*, 3, 137-144

Tagesspiegel online, 15.02.2013, 17:29 <http://www.tagesspiegel.de/politik/pferdefleisch-skandal-aldi-und-lidl-finden-pferdefleisch-in-ihren-fertiggerichten/7792486.html>, letzter Zugriff 14.5.2013

Tara, L. (2013) Ist im Döner drin was draufsteht? Nachweis von Fleischsorten auf molekularbiologischer Weise in einem beliebigen Lebensmittel. Facharbeit, Schiller-Schule Bochum

Tollrian, L. (2013) Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Fleisch verschiedener Tierarten in Lebensmitteln am Beispiel von Huhn im Döner. Facharbeit, Schiller-Schule Bochum

Weitkämper, K.P. (2013) Döner-PCR. Facharbeit, Schiller-Schule Bochum

