

Schiller-Schule Bochum

Jahrgangsstufe

Q1.2

Schuljahr 2013/14

Facharbeit

im Leistungskurs Biologie

Thema: Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von
Fleisch verschiedener Tierarten in Lebensmitteln am Beispiel
von Huhn im Döner

Verfasserin: Lea Tollrian

Kursleiter/in: Frau Wirbals/Herr Schaller

Bearbeitungszeit: 21.10. – 20.12.

Abgabetermin: 20.12.13

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
2 Material	4
3 Methoden	4
3.1 Arbeiten mit Gendatenbank und DNA Analyse Software	4
3.2 Primer Identifizierung und Bestellung	5
3.3 Extraktion von DNA aus Tiergewebe (Standardmethode)	5
3.4 NaOH-Methode	6
3.5 Hexan-NAOH-SDS-Methode	6
3.6 Tail-Extraktion	7
3.7 Reinigung isolierter DNA	7
3.8 Agarosegelelektrophorese	8
3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction)	9
4 Ergebnisse und Diskussion	10
5 Fazit	15
6 Literatur	16
7 Anhang	17

1 Einleitung

Deutschland hat ein strenges und umfangreiches Lebensmittelgesetz (Wikipedia). Hierzu zählt auch die Lebensmittelkennzeichnungsordnung (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2010). Die Lebensmittelindustrie hat vermehrt durch Betrugsversuche und Missachtung der Lebensmittelgesetze, die Aufmerksamkeit auf sich gerichtet. So gab es in den letzten Jahren Fälle von falschen Deklarationen, z.B. industriellem, synthetischem Käse auf Fertigpizza, ohne entsprechender Angabe; den Pferdefleischskandal, bei dem billigeres Pferdefleisch, als Rindfleisch deklariert, in Fertiggerichten entdeckt worden war; bis hin zu verbrecherischen Betrugsfällen, wie z.B. verdorbenem Fleisch („Gammelfleisch“), welches nicht aus dem Handel genommen wurde, sondern stark gewürzt, zum Beispiel in der größten Dönerfleischproduktion, entdeckt wurde (Tagesspiegel 2013). Der Verbraucher wird getäuscht um den Gewinn der Hersteller zu maximieren. Mittlerweile gibt es aber verschiedene Kontrollmethoden um solchen Täuschungen auf die Spur zu kommen. Die verarbeiteten Tierarten lassen sich durch immer bessere Tests, bei denen die in den Zellen enthaltene Erbinformation (DNA) zur Identifikation dient, bestimmen. Wegen des als Rindfleisch deklarierten Pferdefleisches, das in mehreren europäischen Ländern gefunden wurde, wollte die EU-Kommission DNA-Tests für verarbeitetes Rindfleisch einführen (Zeit 2013). In Deutschland werden solche Methoden von Veterinärämtern bereits regelmäßig angewandt. Im Veterinäruntersuchungsamt Münsterland-Emscher-Lippe werden etwa 600 Fleischproben im Jahr auf die Tierarten untersucht (Hartl 2013).

Molekulare Analysemethoden der DNA bieten sich als Methode zur Identifikation an, da die DNA-Analyse eine Standardmethode darstellt. Sie wurden in den letzten Jahren immer mehr verfeinert (Lenstra et al. 2001). Diese Methoden werden sehr vielfältig eingesetzt. Mit ihrer Hilfe können z.B. auch Straftäter anhand ihrer DNA-Spuren überführt werden oder Vaterschaftstests und forensische Analysen durchgeführt werden.

Die Bestimmung der DNA ist auch beim Artenschutz sehr wichtig, da dieses Verfahren die Identifikation von illegal gejagten, vom Aussterben bedrohten Arten ermöglicht (Alacs et al. 2009, Dudley et al. 2013).

Damit kann zum Beispiel Betrug beim Walfang aufgedeckt werden bei dem japanische Walfänger bedrohte Arten aus „wissenschaftlichen Zwecken“ jagen und dann auf den Markt bringen (Baker & Palumbi 1994, Baker et al. 2007).

Mich hat in diesem Kontext interessiert ob ein Verfahren zur Bestimmung der Tierart aus Fleischproben auch an der Schule durchgeführt werden kann. Ich habe hierbei den Nachweis von Hühnerfleisch für meinen Versuch gewählt. Mitschüler arbeiteten an ähnlichen Themen mit anderen Fleischsorten.

Dönerfleisch, das aus verschiedenen kleinen Fleischstücken besteht, wurde im Supermarkt gekauft und anschließend auf die enthaltenen Tierarten untersucht. Dazu habe ich das Fleisch homogenisiert und mit Enzymen und Chemikalien versetzt, die die Zellen aufschließen, und so die darin enthaltene Erbinformation, die DNA, freigeben. Die DNA wurde extrahiert und die dabei gewonnene Erbinformation anschließend mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt. Die PCR vervielfältigt DNA-Abschnitte und erlaubt es, auch aus geringen Konzentrationen genügend DNA für den Nachweis zu gewinnen. Somit kann auch mit geringsten DNA-Mengen ein Test durchgeführt werden.

Um gezielt DNA-Fragmente amplifizieren zu können, sind sogenannte Primer nötig. Primer sind Oligonukleotide, die als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme z.B. die DNA-Polymerase dienen, die DNA Stücke herauszuschneiden.

Um die Primer für die relevanten Bereiche der zwei hier betrachteten Gene zu bestimmen, wurden die DNA-Sequenzen der codierenden Bereiche des Gens innerhalb der Datenbank (NCBI) über die Suchbegriffe „Acrosin“ bzw „Actin“ und die Tierspezies (*Gallus gallus*) identifiziert.

Das Ziel dieser Arbeit ist es die molekularbiologischen Methoden zum Nachweis bestimmter Tierarten in Lebensmitteln, am Beispiel von Hühnerfleisch im Döner, zu veranschaulichen und zu analysieren, ob sie praktikabel und geeignet wären, im Schulunterricht eingesetzt zu werden.

2 Material (s. Anhang)

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Gendatenbank und DNA Analyse Software

Das „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) ist eine Datenbank, in der sämtliche DNA-Sequenzen, die publiziert wurden, verzeichnet sind (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Wird zu einem Protein die bestimmte Gensequenz gesucht, wird meist dieses Programm benutzt. Auch Informationen und Publikationen wissenschaftlicher Arbeiten werden mit angezeigt und können über die Datenbank

„PubMed“ gesucht werden. Eine Taxonomie-Suchfunktion erlaubt nach Genen oder Proteinen bestimmter Tierart zu suchen. Nachdem Spezies und Proteinnamen angegeben worden sind, erhält man eine Datei (Datenfile) mit den Daten für das Gen. Auch systematische Einordnungen in den Stammbaum werden angegeben.

Man geht auf die Nucleotid-Suche (Nucleotide), gibt dort das Protein und den Namen des Tieres auf lateinisch ein (z.B. „actin gallus gallus“) und durchsucht die Datenbank. Werden die Ergebnisse angezeigt wählt man „Reference sequence information“ (RefSeq) um die Referenzproteinsequenzen zu suchen. Dann wählt man die für das Protein codierenden Abschnitte (CDS) aus und speichert die angegebene Sequenz im „FASTA-Format“ (FASTA) ab.

Um ein Sequenz-Alignment zu erstellen können die DNA-Sequenzen von verschiedenen Tierarten mit Hilfe des Programms „ClustalW“ verglichen werden. Die voreingestellten Parameter des Programms müssen dafür nicht verändert werden. In das Fenster mit dem Namen „Input sequences“ kopiert man die zu vergleichenden Abschnitte. Dabei ist darauf zu achten, dass jeder neue Genabschnitt mit > beginnt. Nach Fertigstellung wählt man Run ClustalW (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>).

3.2 Primer Identifizierung und Bestellung

Die Identifizierung der Primer läuft anhand der durch ClustalW erzeugten Alignements der FASTA-Sequenzen. Die Primer wurden daraufhin bestellt (Eurofins MWG Synthesis GmbH).

Für sämtliche der hier betrachteten Actin-DNA's wurde ein Primerpaar für die Amplifikation ausgewählt (s. Anhang 7.8) für die spezifische Amplifikation der Acrosin DNA der einzelnen Spezies wurden verschiedene Primerpaare ausgewählt (s. Anhang 7.9).

3.3 Extraktion von DNA aus Tiergewebe (Standardmethode)

Die DNA bzw. deren Basenabfolge ist genetisch spezifisch und einzigartig. Somit lässt sich anhand bestimmter Bereiche (Marker) der DNA eine Tierart von der anderen unterscheiden und bestimmen. Zunächst muss dazu die DNA extrahiert werden.

Die Extraktion dient zur Gewinnung der DNA aus den Zellen des Organismus'. Nachfolgend werden verschiedenen Extraktionsmethoden, die im Verlauf des experimentellen Teils der Facharbeit eingesetzt wurden, beschrieben.

Für die Analyse werden 2g Fleisch abgewogen und in einer Reibschale homogenisiert, mit 1ml Spülmittel und mit jeweils einer Spatelspitze Waschpulver und Kochsalz in einer Reibschale zerrieben. Anschließend werden 9ml Wasser hinzugefügt und das Gemisch erneut homogenisiert. Nach einer Inkubation (15Min) bei 45°C wird das Homogenat durch einen Papierfilter filtriert und das Filtrat mit eiskaltem Ethanol überschichtet. Nach 5minütigem Warten erfolgt die Überführung der DNA-Fäden, die sich an der Phasengrenze angelagert haben, mit einer Tropfpipette in ein Eppendorf-Gefäß.

Die DNA wird für 5Min bei 10000g (Erdanziehungskraft) abzentrifugiert, sodass sich zwei Phasen, der Überstand und das DNA-Sediment bilden. Der Überstand wird verworfen, das DNA-Sediment wird für 5Min bei 35°C getrocknet.

3.4 NaOH-Methode

Die NaOH-Methode ist eine weitere Methode der DNA-Extraktion, bei der man folgende Materialien benötigt: 0,2g Probenmaterial, sowie 500µl NaOH (50mM) und 200µl 0,5M Tris-Puffer, Phenol, Chloroform und Ethanol.

Zuerst gibt man 0,2g Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß und zerreibt es darin mittels eines Mikropistills. Man fügt 800µl von 50mM NaOH dazu und zerreibt es ein weiteres Mal. Nun inkubiert man dieses Gemisch bei 95°C eine halbe Stunde. Der Zugabe von 200µl 0,5M Tris-Puffer, mit einem pH-Wert von 8,0, folgt eine Zentrifugation von 2 Min bei 14000rpm (Umdrehungen pro Minute). Danach gibt man dem Gemisch im Verhältnis 1:1 Phenol und Chloroform hinzu, zentrifugiert dieses Gemisch nach kräftigem schütteln abermals, pipettiert die oberste Phase ab, und fügt nochmals Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzu. Wiederum wird kräftig geschüttelt und zentrifugiert. Die obere Phase wird weiter verwendet und die untere Phase, das Chloroform, wird verworfen. Nun teilt man das Gemisch in zwei gleich große Mengen, von denen man einen Überstand als Template für die PCR (s.3.9) einsetzt und die andere DNA-Probe zuvor noch mit dem 2-fachem Volumen Ethanol übergießt, 10Min zentrifugiert und dann das Ethanol verwirft und das Sediment mit 100µl Wasser aufnimmt.

3.5 Hexan-NAOH-SDS-Methode

Bei dieser Methode benötigt man 0,2g Probenmaterial sowie 500µl SDS-NaOH-Lösung (10% SDS, 0,2M NaOH), 20µl Proteinase K (20mg/ml), Phenol und Chloroform. Zuerst gibt man die Fleischprobe in ein Eppendorf-Gefäß und zerreibt sie mit einem Mikropistill. Man gibt 500µl Hexan hinzu und benutzt das Pistill erneut. Dann gibt man

500µl SDS-NaOH-Lösung in das Eppendorf-Gefäß. Nun muss man das Gefäß kräftig schütteln, es folgt eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 5Min. Es entstehen 3 Phasen, von denen man die untere wässrige Phase abnimmt und 20µl Proteinase K hinzugibt. Daraufhin wird das Gemisch 30Min bei 65°C inkubiert und ein weiteres Mal 5Min bei 5000rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und man führt eine einmalige Phenol-Chloroform-Extraktion durch. Nach Zugabe von Chloroform im Verhältnis 1:1 zu der oberen, weiter zu verwendenden Phase, wird das Homogenat gleichmäßig in zwei Gefäße aufgeteilt. Die untere Phase wird verworfen. Die eine DNA-Probe wird als Template für die PCR eingesetzt um diese durchzuführen zu können und die andere DNA-Probe wird nach einer Zentrifugation von 12000rpm für 5Min mit Ethanol gefällt und anschließend in Wasser aufgenommen und so als Template für die PCR (s.3.9) eingesetzt.

3.6 Tail-Extraktion

Für diese Methode der DNA-Extraktion werden 0,2g Probenmaterial, 450µl Tail-Puffer, 800µl Isopropanol, 600µl Ethanol, 20µl Proteinase K (20mg/ml) und 200µl Kaliumacetat (5M) eingesetzt. Zu Beginn gibt man 0,2g Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß und zerreibt es mit einem Pistill. Sobald ein Homogenat entstanden ist, folgt die Zugabe von 450µl Tail-Puffer und 20µl Proteinase K. Nach diesem Vorgang wird das Gemisch mindestens 30Min bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation gibt man 200µl 5M Kaliumacetat hinzu, schüttelt das Gefäß und zentrifugiert es 5Min mit 5000rpm und danach noch einmal 5Min mit 12000rpm. Den daraus entstehenden Überstand (ca. 500µl) gibt man zusammen mit 800µl Isopropanol in ein neues Eppendorf-Gefäß, nach dieser Zugabe schüttelt man die Probe zuerst und gibt sie für 5Min bei 12000rpm in die Zentrifuge. Der Überstand wird weggekippt, auf das Sediment pipettiert man 600µl Ethanol und invertiert das Gemisch vorsichtig. Dann wird es bei 12000rpm 3Min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, das Sediment getrocknet und danach in Wasser aufgenommen.

3.7 Reinigung isolierter DNA

Durch Phenol-Chloroformextraktion erfolgt eine Reinigung der isolierten DNA, um Proteine und andere störende Stoffe von der DNA zu entfernen, da diese bei der PCR Störfaktoren darstellen. Das getrocknete DNA-Sediment (s. 3.3, 3.4) wird mit 650µl destilliertem Wasser gelöst. Eine identische Menge von Phenol und Chloroform (je

500µl) wird zu der DNA-Lösung hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln wird für 1Min bei 10000g zentrifugiert.

Die Phenol-Chloroform-Behandlung wird zweimal wiederholt, allerdings werden bei dem letzten Durchgang nur 500µl Chloroform mit der DNA versetzt.

Der Überstand der Chloroformextraktion wird mit dem 1,5-fachen Volumen eiskalten Ethanols gefällt und 5Min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Sediment wird für 20Min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100µl Wasser aufgenommen, während die Ethanol-Phase verworfen wird.

3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, mit der sich Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) nach ihrer Größe auftrennen lassen. Agarosepolymere werden zu einem Gel vernetzt das wie ein Sieb wirkt. Durch ein elektrisches Feld werden die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix gezogen. Die Geschwindigkeit der Bewegung ist von der Größe der Moleküle abhängig, was zu einer unterschiedlichen Laufweite und zu einer Auftrennung mit der Zeit führt.

Jeweils 9µl der DNA-Proben werden auf einen Streifen Parafilm gesetzt. Diesen 9µl werden mit jeweils 1µl Farbstoff (Xylencyanolblau) gefärbt.

Nach diesem Schritt werden die Tropfen aus DNA und Farbstoff mit Pipetten in die vorbereiteten Geltaschen am Minus-Ende der Gelkammer, die das Agarosegel enthält, pipettiert. Gel und Gelkammern liegen in einer Pufferlösung (1xTAE Puffer mit Ethidiumbromid) durch die ein konstanter elektrischer Strom (120Volt) vom Minus-Pol zum Plus-Pol läuft. Da die DNA negativ geladen ist wird sie am Minus-Pol in eine Gelkammer gegeben und läuft dann Richtung Plus-Pol. Mithilfe sogenannter Marker (s. 10.2.4) lässt sich die Größe des DNA-Fragments anhand der Anzahl der Basenpaare erkennen. Nach Aktivierung des Stromkreises beginnt die Elektrophorese. Das Gel wird anschließend vorsichtig entfernt und unter UV-Licht analysiert. Der Stromkreis muss unterbrochen werden bevor die negative geladene DNA über die Gelkammer hinausgewandert ist. Dieser Vorgang dauert in diesem Fall 30Min. Die Agarose-Gelelektrophorese wird sowohl eingesetzt um die DNA zu untersuchen, als auch um die PCR-Produkte zu analysieren.

3.9 PCR

Die Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) dient der Amplifikation kleiner Gen-Abschnitte. Mithilfe dieser Methode können auch gering vorliegende DNA-Spuren vermehrt werden, die für eine weitere Untersuchung sonst nicht ausreichend wären. Zur Vorbereitung stellt man ein PCR-Ansatz aus einem Puffer (sorgt für das pH-Optimum der taq-Pol), dNTP's (Nukleotide), forward und reverse Primer, H₂O, Taq-Polymerase und einem DNA-Template zusammen. Nach der Fertigstellung wird der PCR-Ansatz in 0,2ml Eppendorfgefäße in einem Thermocycler platziert und durchläuft dort drei Phasen (s. Abb.1)

In der ersten Phase, der Denaturierung, wird das Homogenat auf 95°C erhitzt um die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aufzuspalten. Nun dienen die Einzelstrang-Matrizen zur Synthese der neuen DNA.

Die darauf folgende Hybridisierung, die zweite Phase, stellt einen Vorgang dar, in dem künstliche Primer an die zu amplifizierenden DNA-Strangenden angelagert werde. Während dieser Anlagerung versucht man das zu den jeweiligen Primern gehörende Temperaturoptimum zu erreichen, welches meist 5-10°C unter dem Schmelzpunkt der Primer, etwa zwischen 50°C und 70°C liegt. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, kann zwischen Strang und Primer keine Wasserstoffbrückenbindung erfolgen bzw. es zu keiner Vervielfältigung kommt, ist die Temperatur zu niedrig kann es vorkommen dass die Primer sich unspezifisch anlagern, die Basenpaarung also nicht komplett komplementär ist und so die falschen DNA-Abschnitte amplifiziert werden..

In der 3. und letzten Phase findet die Verlängerung des DNA-Abschnittes statt, wobei die Taq-Polymerase aus den dNTP's einen komplementären Strang bildet. Die Temperatur beträgt hierbei 72°C. Die drei Schritte (Denaturierung, Hybridisierung und Elongation) werden mehrfach (30-40mal) wiederholt. Nachdem dieser Teil des Vorgangs beendet ist, kühlt der Thermocycler das Homogenat auf 8°C herunter und dadurch wird die PCR gestoppt.

Tab. 1: Temperaturprogramm der verwendeten PCR

95°C 30sek

95°C 20sek

55°C 30sek

72°C 50sek

=> Vorgang wird 35x wiederholt

72°C 5 min

8°C ∞

Polymerasekettenreaktion - PCR

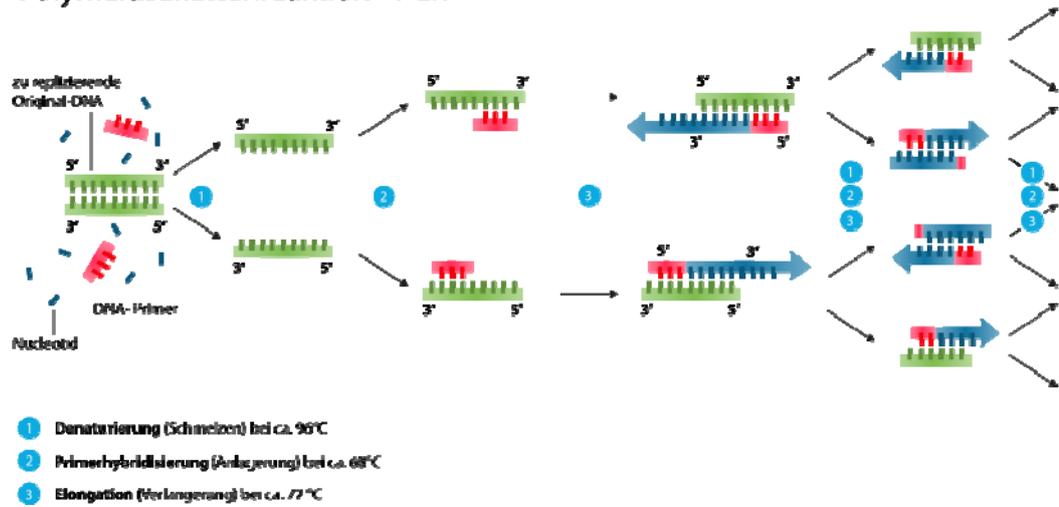


Abb. 1: Schema einer PCR-Reaktion (Abb. aus Wikipedia).

4. Ergebnisse und Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die molekularbiologischen Methoden zum Nachweis bestimmter Tierarten in Lebensmitteln, am Beispiel von Hühnerfleisch im Döner, anzuwenden und zu analysieren, ob sie praktikabel und geeignet wären, im Schulunterricht eingesetzt zu werden. Dazu musste ich in mehreren Schritten vorgehen.

Bekannt war, dass das Acrosin (Gatesy and Swanson 2007) zur Fleischidentifikation genutzt werden können (Schaller, 2013). Das Actin-Gen ist ein sehr konserviertes Gen d.h. es hat sich im Laufe der Vertebratenevolution nur langsam durch Mutationen verändert und liegt somit in den verschiedenen untersuchten Tierarten sehr ähnlich vor. Es codiert ein sogenanntes Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es ist Bestandteil des Zytoskeletts und eines der fünf häufigsten Proteine in Eukaryoten. Actinproteine lagern sich zusammen und dienen der Stabilisierung der äußeren Zellform. Actin ist außerdem eine zentrale Komponente für die Muskelkontraktion (Alberts et al. 2011). Innerhalb dieser Arbeit diente es als Kontrollgen, welches die Position angab, die sich im Verlauf der Versuche nicht änderte.

Acrosin trägt zur Fruchtbarkeit bei, ist im Akrosom reifer Spermien vorzufinden und für das Aufbrechen der Eizelle zuständig. Es ist schneller evolviert, liegt in den

verschiedenen Tierarten mit unterschiedlicheren Sequenzen vor und ist somit spezifisch für die Tierarten (Gatesy und Swanson 2007).

Eine grundsätzliche Bedingung zur Herstellung spezifischer Primer ist, dass bekannt sein muss, welche DNA-Sequenzen für bestimmte Tierarten spezifisch sind. Diese Informationen sind z.B. aus Datenbanken abrufbar. In unserem Fall verwendeten wir die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zum Identifizieren der DNA-Sequenzen. In dieser Datenbank sind sämtlich publizierte DNA-Sequenzen enthalten, die veröffentlicht wurden. Sucht man zu einem bestimmten Protein die Gen-Sequenz, so kann man dieses Programm dafür verwenden. Man kann sogar die phylogenetischen Evolutionsstadien einer Spezies in diesem Programm über den wissenschaftlichen Fachterminus abrufen (s. 3.1).

Die codierenden Sequenzen (CDS) wurden in dem in der Bioinformatik gebräuchlichen „FASTA – Format“ abgespeichert und mit dem Programm Clustal W aligniert (s. Anhang und 3.1).

Die im Actin-Gen gewählte Sequenz ist nur bedingt bei Schwein, Huhn, Pferd, Lamm und Rind unterschiedlich. Die Unterschiede bestehen aber nur in wenigen Basenpaaren (s. Anhang 7.8)

Die im Acrosin-Gen gewählten Sequenzen sind spezifisch für die jeweilige Tierart (s. Anhang 7.9). Aus diesen Sequenzen wurden Primer abgeleitet und in der PCR zur Vervielfältigung der DNA-Abschnitte eingesetzt (s.3.9). Diese Genabschnitte lassen sich nachfolgend in der Gelelektrophorese auftrennen und anfärben (s.3.6). An den dann sichtbaren Banden lässt sich die Basenpaarlänge in Relation zu einem Marker ablesen (s. Anhang 7.1-7.7).

Zur Optimierung der Extraktion der DNA aus den Hühnerfleischproben testete ich vier verschiedene Extraktionswege aus (s. 3.3-3.6 Methoden). Dabei fanden wir heraus, dass neben unserer „Standardmethode“ die NaOH-Methode 1a (s. Abb. 7.5, Spur 32) am ertragreichsten war und direkt darauf die NaOH-Methode 1b (s. Abb 7.5, Spur 31) folgte. Bei den restlichen DNA-Extraktionsmethoden konnte die genomische DNA im Agarosegel nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 7.4/7.7). Bei 7.6 ist auf den Spuren 34 und 35 ein DNA-Fragment erkennbar, was leider nicht deutlich erkennbar ist, da das Gel an dieser Stelle gebrochen ist. Ob die Hexan-NaOH-SDS-Methode funktioniert hat ist in diesem Gel nicht zu bestätigen (Spur 33). Dieselbe Methode wiederholte ich auf einem anderen Gel (Anhang 7.7) allerdings ohne eine PCR, da diese aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war. In Spur 10, der Hexan-NaOH-SDS-Methode 2b, ist eine schwache DNA-Bande erkennbar, allerdings ist auch diese nicht deutlich. Die TAIL-Extraktion war in fast keinem meiner Versuche erfolgreich (s. Abb 7.5 Spur 35).

Prinzipiell funktioniert die Methode bei anderen Fleischsorten, da meine Mitschüler bei Pferd und Lamm jeweils Banden hatten (Anhang, Abb. 7.5, Spuren 25 und 30). Allerdings schmierten die Banden etwas. Dies könnte auf eine Verunreinigung durch Proteine hinweisen oder eine partielle Degradation der DNA.

Bei der NaOH-Methode war vor der PCR die DNA klarer zu erkennen, was eventl. auf eine zu hoch oder niedrig temperierte PCR hindeuten könnte. In DNA Nachweis (Abb. 7.5) ist in Spur 34 (Hexan-NaOH-SDS 2b) keine Bande zu erkennen, aber später nach der PCR (Abb. 7.6) ist eine Bande sichtbar. Dies zeigt dass DNA vorhanden, aber wohl zu niedrig konzentriert war und durch die PCR vervielfältigt wurde. Falls keine DNA vorhanden gewesen wäre, hätte sich auch nach der PCR keine Bande gezeigt.

Somit konnte ich nachweisen, dass DNA in meinen Proben 2mal identifiziert werden konnte und dass die huhn-spezifischen Primer das Hühnerfleisch „erkennen“. Die Kernfrage war aber, ob ich auch im Döner mit den spezifischen Huhnprimern DNA von Hühnern nachweisen kann.

An Abb. 7.1, Spur 3 ist zu sehen dass DNA vorhanden ist. Bei diesem Versuch überprüfte ich nur die Wirksamkeit der Primer, die hierdurch bewiesen wurden. Der Verlauf der Banden, mit einem hohen Anteil kleiner Fragmente, deutet allerdings an, dass die DNA teilweise degradiert war. Das Gel war allerdings auch etwas zu lange am Stromkreis angeschlossen, sodass die DNA über das Gel hinausgewandert ist.

Auf Abb. 7.2 Spuren 5/6 ist DNA vorhanden. Hier wurden die spez. Primer und die Actinprimer getestet, Spur 17/18 zeigt an, dass kein Unterschied zwischen der neuen und alten Polymerase besteht, beide also verwendbar sind.

An Abb. 7.3 wurde die mit einem spezifischer Primer amplifizierte DNA im Dönertemplate nachgewiesen und eine Actinkontrolle durchgeführt (Spur 14-16).

In Abb. 7.4 hat der Nachweis der DNA funktioniert d.h. DNA ist vorhanden und die Primer funktionieren (Spur 14) aber es ist kein Huhn im Döner nachweisbar (Spur 15). Da durch die Kontrolle der spezifische Primer in Huhn die Möglichkeit der Primerdenaturierung ausgefallen ist, muss man davon ausgehen, dass entweder in der vorherigen Extraktion etwas schief gelaufen ist oder in dem untersuchten Fleischstück kein Döner vorhanden ist.

An Abb. 7.5 Spuren 31,32 (NaOH-Methode) ist erkennbar, dass DNA vorhanden ist, auf den Spuren 33/34 müsste auch was sein, da in 7.6 auf den Spuren klare Banden zu erkennen sind.

Auf Abb. 7.6 NaOH-Methode Spur 31/32 ist nichts zu sehen. Das ist seltsam, da bei 7.5 dort DNA vorhanden war. Dafür ist aber bei Spuren 34/35 DNA vorhanden.

An Abb. 7.7 6/7 konnte die DNA nochmals bei NaOH nachgewiesen. Auf Spur 6/7 hinterließ die Tail-Extraktion deutlicher Schatten. An diesem Punkt ist erkennbar, dass auch die Tail-Methode eine geringe DNA-Menge lieferte.

In einem Gel (s. Abb. 7.3) ist in Spur 15, in der Dönerfleisch-DNA mit dem huhn-spezifischen Primer auf einem PCR-Ansatz, eine Bande zu sehen. Damit ist deutlich zu erkennen, dass Huhn im Döner enthalten ist. Meine Versuchsergebnisse waren aber nicht bei allen Proben einheitlich. Wie an Abb. 7.4 Spur 15 und 7.7 Spur 20-23 ersichtlich ist, in diesem Fall keine Hühner-DNA in dem Döner nachzuweisen. Allerdings ist das Gel (Abb. 7.7) nicht optimal erkennbar; auch die Ergebnisse von Mitschülern sind bei diesem Gel nur unklar zu erkennen. Zu vermuten ist, dass in dem Fleischstück, welches ich untersuchte, kein Huhn enthalten war. Im Döner ist Huhn nur erlaubt, wenn es gekennzeichnet ist. In den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2010) ist erwähnt, dass Hühner- oder Putenfleisch verwendet werden darf. Dort ist unter Ausgangsmaterial aufgeführt: „.... grob entsehntes Geflügelfleisch (1.132) (Huhn, Pute) bei Hähnchen-/Puten-Döner Kebab,...“ (Absatz 2.511.7). Herr Malla von der Lebensmittelüberwachung des Veterinär-amtes Bochum stellte im telefonischen Gespräch klar, dass das Produkt sortenrein oder aber gekennzeichnet sein muss. (Malla, persönliche Mitteilung). Somit hätte kein Hühnerfleisch im untersuchten Döner enthalten sein dürfen. Eventuell war das Schneidewerkzeug mit Hühnerfleisch kontaminiert, doch so geringe Fleischmengen, von ein paar Zellen, wie sie am Schneidewerkzeug vorhanden sein könnten, sollten in der PCR bei 35 Zyklen nicht so amplifiziert werden, dass Huhn im Lebensmittel nachzuweisen ist. Eine plausible Theorie wäre allerdings, dass es sich bei dem verwendeten Dönerfleisch um Betrug handelt und in den Döner billigeres Hühnerfleisch eingearbeitet wurde. Zum Nachweis eines Betrugs wäre noch mehr Zeit notwendig gewesen, um noch mehr Analysen durchzuführen und die Ergebnisse zu bestätigen.

Trotzdem heißt das nicht, dass in der negativen Probe kein Hühnerfleisch enthalten war. Das Dönerfleisch bestand aus kleinen Fleischstückchen und war nicht homogen

vermischt. Dadurch kann Huhn zwar enthalten gewesen sein, es wurde aber möglicherweise in der homogenisierten Probe verpasst. Um dies zu verhindern müsste man noch vor dem Extrahieren der DNA einen größeren Teil Dönerfleischs homogenisieren und davon 0,2g nehmen um die DNA zu extrahieren, statt erst 0,2g abzuwiegen und diese dann zu homogenisieren.

Der Test der Aktivität der Polymerase (s. Anhang Mat. 2, Spur 17,18) zeigte, dass kein Unterschied zwischen der alten und neuen Polymerase bestand, die Polymerase demzufolge gute Qualität hatte und verwendet werden konnte. An der Polymerase können die unterschiedlichen Ergebnisse also nicht gelegen haben.

Ich konnte mit meiner Untersuchung den Nachweis erbringen, dass Hühnerfleisch in dem hier verwendeten Dönerfleisch enthalten war. Dies zeigt, dass die angewandten Methoden geeignet sind die Analyse von Fleisch durchzuführen.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode lässt sich zwar Hühnerfleisch über die spezifische DNA-Amplifikation im Döner nachweisen, nicht jedoch wie hoch der Anteil des Hühnerfleischs ist. Für quantitative Analysen müsste eine „quantitative PCR“ (qPCR) oder auch „real time PCR“ (rtPCR) verwendet werden, bei der ein Fluoreszenzfarbstoff die DNA markiert (Jonker et al., 2006). Mit dieser Methode würde sich nachweisen lassen ob es sich bei der nachgewiesenen Hühner-DNA nur um „Kontaminationen“ handelte, oder ob ein Betrugsfall vorliegt, bei dem billigeres Hühnerfleisch, ohne Kennzeichnung, verwendet wurde. Diese teurere Methode ist aber für den Nachweis im Rahmen eines Schulversuchs nicht erforderlich und aufgrund mangelnder Ausstattung auch nicht möglich.

Die Qualität des verwendeten Fleisches lässt sich durch unsere Methode ebenfalls nicht bestimmen. Der Nachweis einer schlechten Qualität (Gammelfleisch) erfolgt meist indirekt, über im verdorbenen Fleisch vorhandene Bakterien (Pseudomonaden).

Schwieriger wird die Extraktion aus Lebensmitteln mit vielen verschiedenen Zutaten (z.B. Lasagne) oder bereits erhitztem Fleisch aus Fertigprodukten, wodurch eine Gefahr besteht, dass die DNA bereits denaturiert ist, oder nur noch zu geringe Mengen vorhanden sind. Doch sogar bei geringsten Mengen ist es noch möglich ein sinnvolles Ergebnis zu erhalten. Es wird intensiv an der Verbesserung der Methoden der Fleischidentifikation gearbeitet. Das Fraunhofer-Institut hat eine Methode entwickelt, mit der geringe Anteile (ab 0,5%) von 50 verschiedenen Tierarten in Lebensmitteln analysiert werden können (Fraunhofer 2013).

Für das Analysieren der DNA in der Schule ist die von uns verwendete Methode durchaus geeignet, wenn man nur die einfache Methode der DNA-Extraktion wählt, eine PCR durchführt und das Ergebnis an einem Gel veranschaulicht. (Schallers 2013) Allerdings dauert auch diese einfache Methode mehrere Stunden und übersteigt damit den Umfang normaler Biologiestunden. Man müsste dafür Unterricht ausfallen lassen. Dies wäre ein Problem, welches jede Schule individuell behandeln müsste. Eventuell könnte man hierfür einen Projekttag einführen. Zusätzlich muss der Kostenfaktor bedacht werden: Wer finanziert das Projekt und könnte man Geld sparen indem man z.B. zwei Schüler an einem DNA-Template arbeiten lässt. Die Finanzierung könnte über Sponsoren, Fördervereinsmittel, oder einen Antrag an die Schulkonferenz gedeckt werden.

Eine hilfreiche Methode war es einen Mastermix für die PCR zu erstellen. Würde man das Verfahren an der Schule durchführen, wäre es sehr sinnvoll die Herstellung des Mastermixes genau zu überwachen, da dies ein sehr wichtiger Schritt ist. Da nicht jeder Schüler auf Anhieb den Instruktionen folgen können wird, könnten erfahrene Schüler als Tutoren fungieren.

Der Zeitaufwand war sehr hoch. Die Zeit die meine Mitschüler und ich an dem Projekt verbrachten betrug bis zu 9 Stunden am Tag, über einen Zeitraum von 5 Tagen. Zwischen den Versuche gab es längere Wartezeiten, die man, wenn man dieses Projekt wiederholen möchte, was durchaus zu empfehlen ist, da es sehr interessant war, bereits mit weiteren Versuchen zur Extraktion füllen könnte. So könnte man noch mehr Versuchsvarianten durchführen.

5. Fazit

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Methoden grundsätzlich alle funktioniert haben, wenn auch nicht immer bei den Hühnertemplates, sondern in einigen Fällen nur bei anderem Fleisch.

Würde man dieses Projekt oder ein ähnliches nochmal durchführen wollen erfordert dies eine optimierte Zeitplanung, um lange Wartezeiten zu vermeiden. An der Schule könnte dieses Projekt durchaus an einem Tag durchgeführt werden, allerdings müssten einige notwendigen Vorkehrungen getroffen werden (s. Diskussion).

Zum eigentlichen Ziel dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass im Döner Huhn enthalten war. Dies ist aus der einen positiven Probe erkennbar. Trotzdem sind meine Ergebnisse nicht eindeutig, da in der zweiten Probe kein Hühnerfleisch nachgewiesen werden konnte. Dies bedeutet wie oben diskutiert aber nicht, dass in der zweiten Probe

kein Hühnerfleisch enthalten war. Da die Verwertung von Hühnerfleisch in Kalbsdöner illegal, ist zu vermuten, dass die Hersteller Hühnerfleisch im Kalbsdöner einsetzten, da dies für die Hersteller billiger ist.

6. Literatur

Alacs, E.A., A. Georges, N.N. FitzSimmons and J. Robertson. 2010. DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 6:180-194.

Albers B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter. 2011. *Molekularbiologie der Zelle* (5. Aufl.). Wiley-Verlag.

Baker, C. S., and S. R. Palumbi. 1994. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science* 265:1538-1539.

Baker, C.S., J.G. Cook, S. Lavery, M.L. Dalebout, Y.-U. Ma, N. Funahashi, C. Carraher and R.L. Brownell. 2007. Estimating the number of whales entering trade using DNA profiling and capture-recapture analysis of market products. *Molecular Ecology* 16:2617-2626.

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2010. Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse Stand 4.2.2010:
http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/Leitsaetze_Fleisch.html

Dudley, N., S. Stolton and W. Elliott. 2013. Editorial: Wildlife crime poses unique challenges to protected areas. *PARKS*, 19:7-12.

Faz.net. <http://www.faz.net/aktuell/wirtschaft/fleisch-skandal-jeder-zweite-doener-wird-beanstandet-1353227.html>

Fraunhofer, 2013.

http://www.ime.fraunhofer.de/de/presse_medien1/Tierartendifferenzierung.html

Gatesy, J. and Swanson, W.J. 2007. Adaptive evolution and phylogenetic utility of ACR

(acrosin), a rapidly evolving mammalian fertilization gen. Journal of Mammalogy. 88:32-42.

Hartl, J. 2013. <http://www.dw.de/dna-test-f%C3%BCr-fleisch/a-16598720>

Hopwood A. J., K. S. Fairbrother, A. K. Lockley, R. G. Bardsley. 1999. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. Meat Science, 53: 227–231.

Jonker, K.M., J.J.H.C. Tilburg, G.H. Hägele and E. de Boer. 2006. Species identification in meat products using real-time PCR. Food Additives and Contaminants. 25:527-533.

Lenstra J. A., J. B. Buntjer and F. W. Janssen. 2001. On the origin of meat - DNA techniques for species identification in meat products. Veterinary Sciences Tomorrow. 2:1-15

Schaller, F. 2013. Identifizierung von Lebensmittelskandalen. Ist Pferdefleisch im Döner?

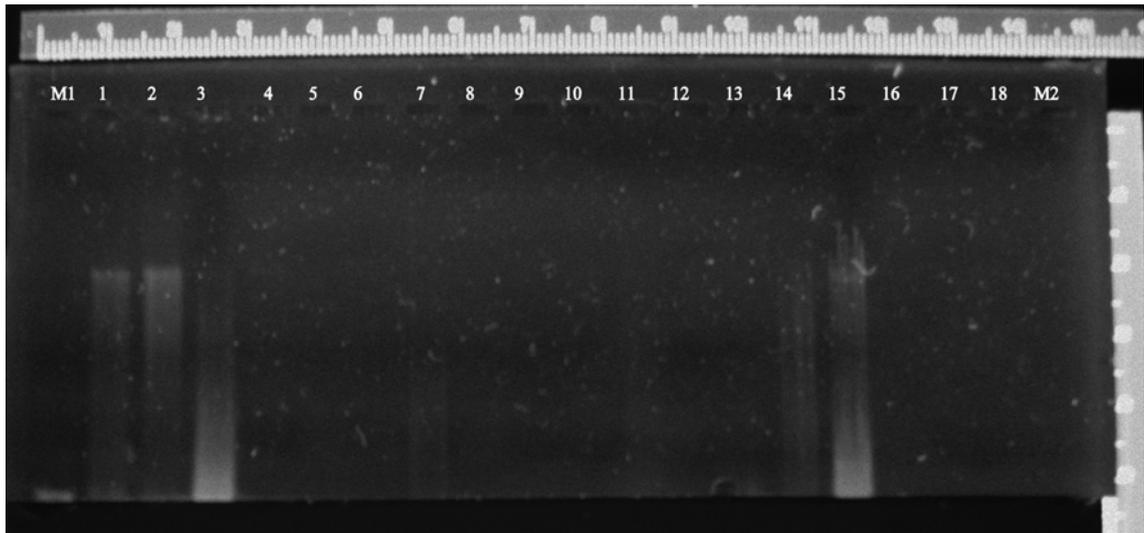
Tagesspiegel. <http://www.tagesspiegel.de/berlin/polizei-justiz/gammelfleisch-prozess-doener-produzent-soll-40-000-euro-strafe-zahlen/1234280.html>

Wikipedia. <http://de.wikipedia.org/wiki/Lebensmittelrecht>

Zeit, 2013. <http://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2013-02/pferdefleisch-eu-gentests>

7. Anhang

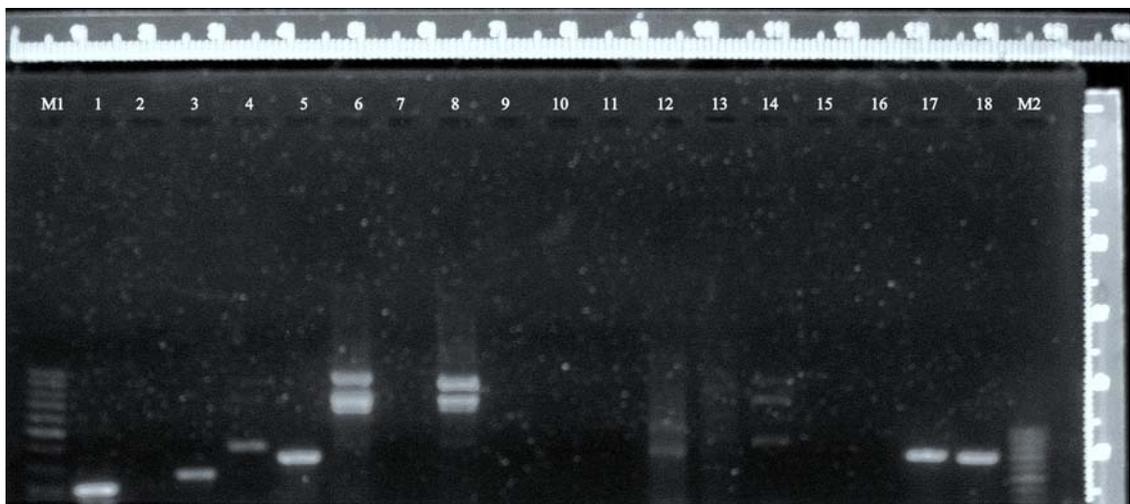
7.1: Auftrennung genomischer DNA (Bild der Gelelektrophorese vom 21.10)



0,6%iges Agarosegel angefärbt mit Ethidiumbromid

M1 Marker, 1 Schwein, 2 Lamm, 3 Huhn, 4 Pferd, 5 Geflügelleberwurst, 6 Rind, 7 Geflügelwurst, 8 Pferdefleischwurst, 9 Döner, 10 Pferdewurst, 11 Rind (GK), 12 Schwein (GK), 13 Huhn (GK), 14 Lamm (GK), 15 Huhn (GK)

7.2: Auftrennung genomischer DNA (Bild der Gelelektrophorese vom 22.10)

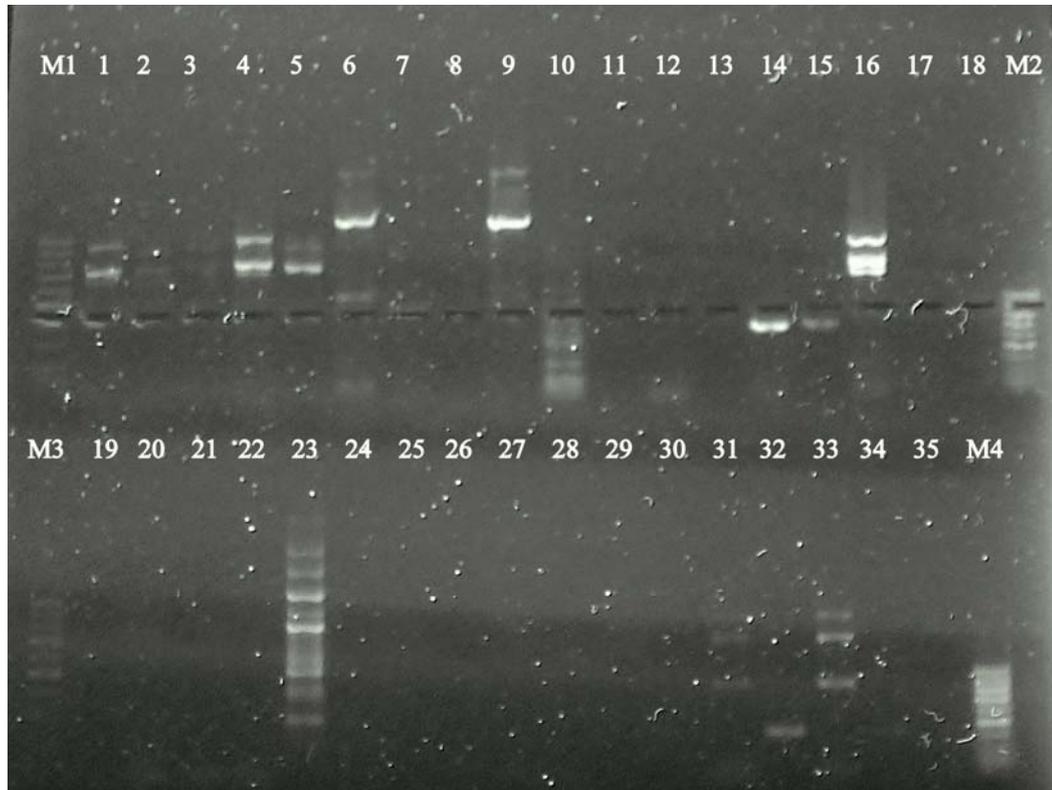


1,8%iges Agarosegel angefärbt mit Ethidiumbromid

M1 Marker, 1 Lamm Spez Primer – DNA vorhanden, 2 Lamm Actin Primer – Actin nicht vorhanden (vermutung Actin Primer haben nicht funktioniert, 3 Pferd Spez Primer – DNA vorhanden, 4 Pferd Actin Primer – Actin vorhanden, 5 Huhn spez Primer – DNA vorhanden, 6 Huhn Actin Primer – Actin vorhanden, 7 Schwein Spez Primer – keine DNA zu sehen, 8 Schwein Actin Primer – Actin vorhanden, 9 Rind Spez Primer – keine DNA zu sehen, 10 Rind Actin Primer – kein Actin zu sehen, 11 Geflügelwurst RFLP primer/ Tierunspezifische Primer – keine DNA zu sehen, 12 Geflügelwurst Actin primer – Actin vorhanden, 13 Döner RFLP Primer

– DNA vorhanden, 14 Döner Actin Primer – Actin vorhanden, 15 Pferdewurst RFLP Primer – keine DNA zu sehen, 16 Pferdewurst Actin Primer – kein Actin vorhanden, 17 Schaller Huhn spez, pol neu – Pol funktioniert, 18 Schaller Huhn spez, pol alt - Pol funktioniert, M2 Marker

7.3: Auftrennung genomischer DNA (Bild der Gelelektrophorese vom 23.10.)



Agarosegel angefärbt mit Ethidiumbromid

M1 Marker, 1 Geflügelwurst, 2 Geflügelwurst, 3 Geflügelwurst, 4 Geflügelwurst, 5 Geflügelwurst, 6 Pferdewurst, 7 Pferdewurst, 8 Pferdewurst, 9 Pferdewurst, 10 Pferdewurst, 11 Döner DNA + Lamm Primer spez (Filtriert), 12 Lamm + Actin Primer (Filtriert), 13 Döner + Pferd spez (Filtriert), 14 Huhn + Huhn spez Primer (Filtriert), 15 Döner + Huhn spez Primer (Filtriert), 16 Huhn + Actin (Filtriert), 17 Schwein + Schwein spez. Primer (Filtriert), 18 Schwein + Schwein spez. Primer (Zentrifugiert), 19 Schwein + Schwein spez Primer (Filtriert), 20 Schwein + Actin Primer (Filtriert), 21 Schwein + Actin Primer (Zentrifugiert), 22 Schwein + Actin Primer (Filtriert), 23 Rind + Rind spez Primer (Filtriert), 24 Rind + Rind spez Primer (Filtriert), 25 Rind + Rind spez Primer (Filtriert), 26 Rind + Rind spez Primer (Filtriert), 27 Rind + Rind spez Primer (Filtriert), 28 Geflügelleberwurst + RFLP Primer (Filtriert), 29 Geflügelleberwurst + Actin Primer (Filtriert), 30 Döner + Rind spez Primer (Filtriert), 31 Döner + Actin (Filtriert), 32 Döner + Rind spez. Primer (Zentriert), 33 Döner + Actin (Zentriert), 34 Döner + Rind spez. Primer (Filtriert), 35 Döner + Actin (Filtriert)

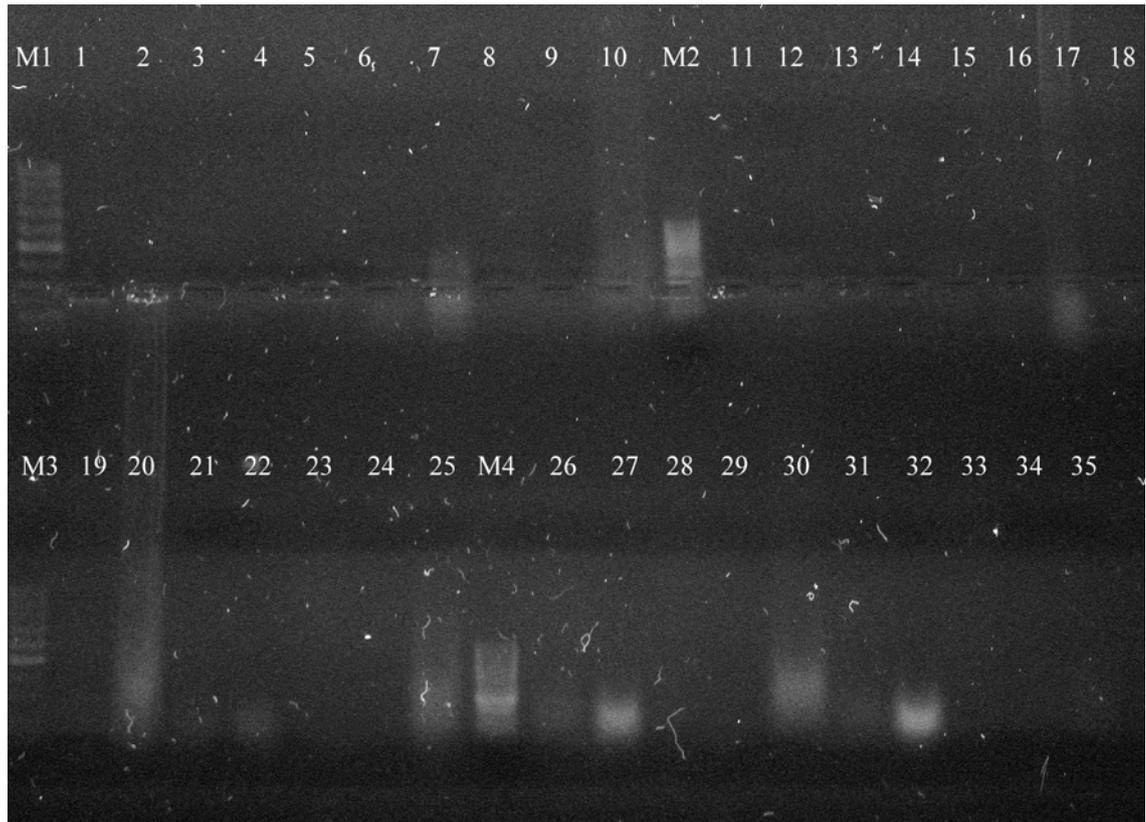
7.4: Auftrennung genomischer DNA (Bild der Gelelektrophorese vom 24.10.)



Agarosegel angefärbt mit Ethidiumbromid

M1: Marker; 1 Rind zentrifugiert, spezifischer Primer; 2 Rind filtriert, spezifischer Primer; 3 Rind filtriert, spezifischer Primer; 4 Döner mit Rindprimer; 5 Döner mit Pferdeprimer; 6 Pferd mit spezifischem Primer; 7 Pferd mit Actinkontrolle, 8 Schwein filtriert, spezifischer Primer; 9 Schwein filtriert, spezifischer Primer; 10 Döner mit Schweineprimer; 11 Döner mit Lammpriemer; 12 Lamm, spezifischer Primer; 13 Lamm, Actinkontrolle; 14 Huhn, spezifischer Primer ; 15 Döner mit Huhnprimer; 16 Geflügelleberwurst mit Huhnprimer; 17 Geflügelleberwurst, Actinkontrolle; 18 Geflügelleberwurst mit Lammpriemer; M2 Marker; M3 Marker; 19 Geflügelleberwurst mit Rindprimer; 20 Geflügelleberwurst mit Schweineprimer; M4 Marker

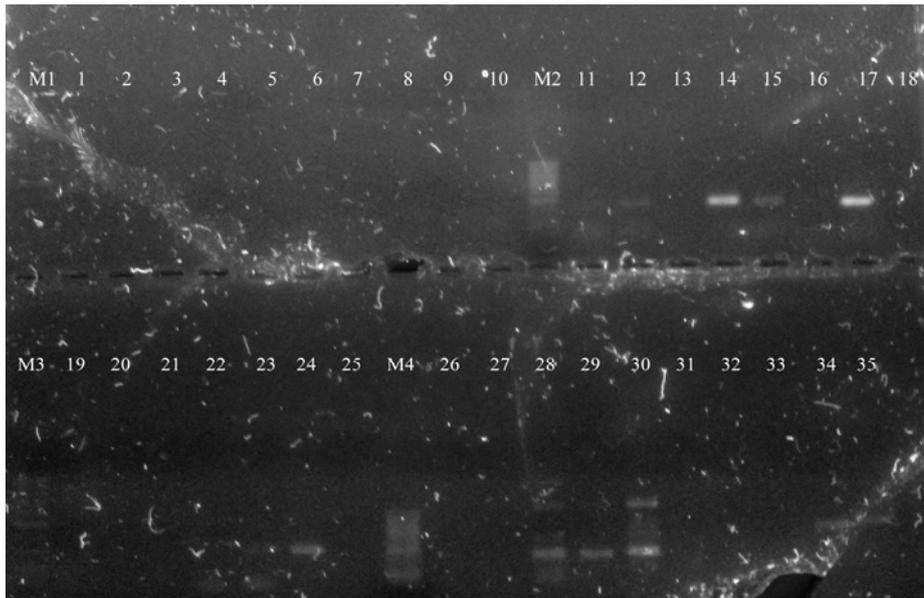
7.5: Auftrennung genomischer DNA (Bild der Gelelektrophorese vom 25.10; 1)



Agarosegel angefärbt mit Ethidiumbromid

M1 Marker; 1 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1a; 2 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1b; 3 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; 4 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 5 Geflügelleberwurst (TAIL extraktion)³; 6 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1a; 7 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1b; 8 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; 9 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 10 Pferdewurst (TAIL extraktion)³; M2 Marker; 11 Rind (NaOH-Methode) 1a; 12 Rind (NaOH-Methode) 1b; 13 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; 14 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 15 Rind (TAIL extraktion)³; 16 Döner (NaOH-Methode) 1a; 17 Döner (NaOH-Methode) 1b; 18 Döner (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; M3 Marker; 19 Döner (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 20 Döner (TAIL extraktion)³; 21 Pferd (NaOH-Methode) 1a; 22 Pferd (NaOH-Methode) 1b; 23 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; 24 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 25 Pferd (TAIL extraktion)³; M4 Marker; 26 Lamm (NaOH-Methode) 1a; 27 Lamm (NaOH-Methode) 1b; 28 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; 29 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 30 Lamm (TAIL extraktion)³; 31 Huhn (NaOH-Methode) 1b; 32 Huhn (NaOH-Methode) 1a; 33 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; 34 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 35 Huhn (TAIL extraktion)³

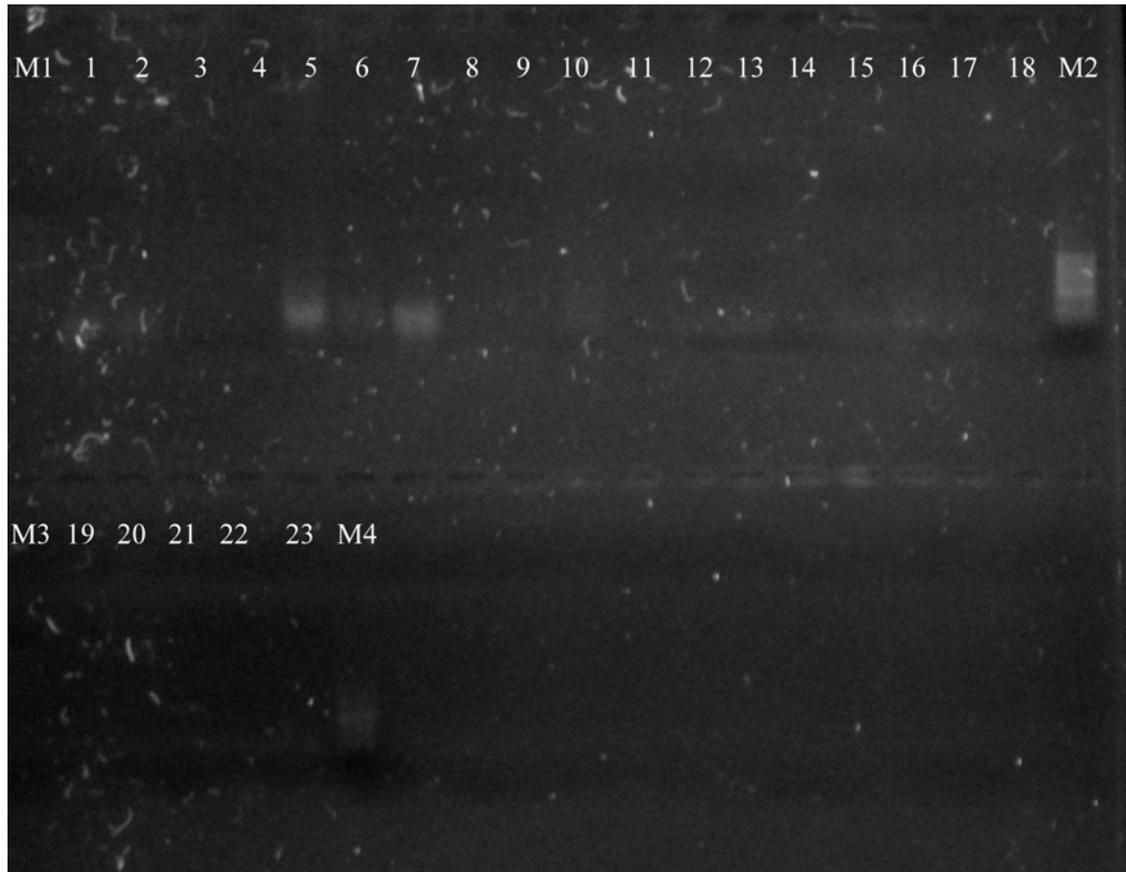
7.6: Auftrennung genomischer DNA (Bild der Gelelektrophorese vom 25.10.: 2)



Agarosegel angefärbt mit Ethidiumbromid

M1 Marker; 1 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1a + PCR; 2 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1b + PCR; 3 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; 4 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR; 5 Geflügelleberwurst (TAIL extraktion)³ + PCR; 6 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1a + PCR; 7 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1b + PCR; 8 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; 9 Pferdewurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR; 10 Pferdewurst (TAIL extraktion)³ + PCR; M2 Marker; 11 Rind (NaOH-Methode) 1a + PCR; 12 Rind (NaOH-Methode) 1b + PCR; 13 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; 14 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR; 15 Rind (TAIL extraktion)³ + PCR; 16 Döner (NaOH-Methode) 1a + PCR; 17 Döner (NaOH-Methode) 1b + PCR; 18 Döner (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; M3 Marker; 19 Döner (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR; 20 Döner (TAIL extraktion)³ + PCR; 21 Pferd (NaOH-Methode) 1a + PCR; 22 Pferd (NaOH-Methode) 1b + PCR; 23 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; 24 Pferd (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR; 25 Pferd (TAIL extraktion)³ + PCR; M4 Marker; 26 Lamm (NaOH-Methode) 1a + PCR; 27 Lamm (NaOH-Methode) 1b + PCR; 28 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; 29 Lamm (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR; 30 Lamm (TAIL extraktion)³ + PCR; 31 Huhn (NaOH-Methode) 1a + PCR; 32 Huhn (NaOH-Methode) 1b + PCR; 33 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; 34 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR

7.7: Auftrennung genomischer DNA (Bild der Gelelektrophorese vom 25.10.; 3)



Agarosegel angefärbt mit Ethidiumbromid

M1 Marker; 1 Schwein (NaOH-Methode) 1a; 2 Schwein (NaOH-Methode) 1b; 3 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a; 4 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b; 5 Schwein (TAIL extraktion)3; 6 Huhn (NaOH-Methode) 1a ; 7 Huhn (NaOH-Methode) 1b ; 8 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a ; 9 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b ; 10 Huhn (TAIL extraktion)3; 11 Huhn (TAIL extraktion)3 +PCR; 12 Schwein (NaOH-Methode) 1a + PCR; 13 Schwein (NaOH-Methode) 1b + PCR; 14 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + PCR; 15 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + PCR; 16 Schwein (TAIL extraktion)3 + PCR; 17 Döner + Pferd spez Primer; 18 Pferd+ Pferd spez Primer; 19 Pferd + Actin; 20 Döner zentrifugiert +Huhn spez. Primer ; 21 Döner Filtriert + Proteinase K+ Huhn spez. Primer; 22 Döner Filtriert + Huhn spez. Primer; 23 Döner 3 (Tail- Methode) + Huhn spez. Primer

7.8: Sequenz-Alignements der FASTA-Formate unterschiedlicher Tierarten des codierenden Genabschnittes für das Protein Actin.

NCBI Sequenzen:

gi|45382926_69-1196 - Huhn

gi|126352603|ref|NM_001081838. - Pferd

gi|57619328_87-1214 - Schaf

gi|75832053_93-1220 - Rind

gi|545892687_123-1250 - Schwein

Alignement

gallus ATGGATGATGATATTGCTGCGCTCGTTGTTGACAATGGCTCCGGTATGTGCAAGGCCGGT
 equus ATGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTGGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGC
 ovis ATGGATGATGATATTGCTGCGCTCGTGGTTGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGC
 bos ATGGATGATGATATTGCTGCGCTCGTGGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGC
 sus ATGGAAGAAGAGATCGCCGCGCTGGTCATCGACAATGGCTCCGGCATGTGCAAAGCTGGC
 ***** **

gallus TTCGCGGGGACGATGCCCCCGTGTGTTCATCTATCGTGGGTCGCCCCAGACAT
 equus TTCGCGGGGACGACGCTCCCCGCGCGTCTTCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCGGCAC
 ovis TTCGCGGGGACGATGCTCCCCGGGCGTCTTCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCGGCAC
 bos TTCGCGGGGACGATGCTCCCCGGGCGTCTTCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCGGCAC
 sus TTTGCTGGGGATGACGCCCCCGGGCGTCTTCCCTCCATCGTGGGGCGTCCCCGACAC
 **

gallus CAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCCCAGAGC
 equus CAGGGCGTGATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACTCATACTGGGGCGACGAGGCCAGAGC
 ovis CAGGGCGTGATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACTCCTACGTTGGGGATGAGGCTCAGAGC
 bos CAGGGCGTAATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACTCGTACGTTGGGGATGAGGCTCAGAGC
 sus CAGGGTGTGATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACAGCTACGTTGGGGCGACGAGGCTCAGAGC
 ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****

gallus AAAAGAGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATTTGAACACGGTATTTGTCACCAACTGGGAT
 equus AAGAGGGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATCGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGAC
 ovis AAGAGAGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATTTGAGCACGGCATTTGTCACCAACTGGGAC
 bos AAGAGAGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATTTGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGAC
 sus AAGCGGGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATCGAACACGGCATCGTCACCAACTGGGAC
 ** * ** ***** ***** ** ***** ** ***** *****

gallus GATATGGAGAAGATCTGGCACCACACTTCTACAATGAGCTGAGAGTAGCCCTGAGGAG
 equus GACATGGAGAAGATCTGGCACCACACTTCTACAACGAGCTGCGCGTGGCCCCGAGGAG
 ovis GACATGGAGAAGATCTGGCACCACACTTCTACAACGAGCTGCGTGTGGCCCCGAGGAG
 bos GACATGGAGAAGATCTGGCACCACACTTCTACAACGAGCTGCGTGTGGCCCCGAGGAG
 sus GACATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTCTACAACGAGCTGCGCGTGGCCCCGAGGAG
 ** ***** ***** ***** ***** * ** ***** *****

gallus CACCCTGTGCTGCTCACAGAGGCTCCCTGAACCCCAAAGCCAACAGAGAGAAGATGACA
 equus CACCCCGTGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACCGCGAGAAGATGACC
 ovis CACCCCGTGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACCGTGAGAAGATGACC
 bos CACCCCGTGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACCGTGAGAAGATGACC
 sus CACCCCGTGTGCTGCTCACGGAGGCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACCGTGAGAAGATGACT
 ***** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** *****

gallus CAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCGCCATGTATGTAGCCATCCAGGCTGTGCTG
 equus CAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCGTGTGCTG
 ovis CAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCTGTGCTG
 bos CAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCTGTGCTG
 sus CAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCGCCGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCGTGTGCTG
 ***** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****

gallus TCCCTGTATGCCTCTGGTTCGTAACACTGGTATTGTGATGGACTCTGGTGTGTTTACC
 equus TCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTACC
 ovis TCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTACC
 bos TCCCTGTATGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTACC
 sus TCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATTTGTCATGGACTCTGGGGATGGGGTACC
 ***** ***** ** ***** ** ** ** ***** ***** ***** *****

gallus CACACTGTGCCATCTATGAAGGCTACGCCCTCCCCATGCCATCCTCCGTCTGGATCTG
 equus CACACTGTGCCATCTACGAGGGGTACGCCCTCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTG
 ovis CACACGGTGCCATCTACGAGGGGTACGCCCTCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTG
 bos CACACGGTGCCATCTATGAGGGGTACGCCCTCCCCATGCCATCCTGCGTCTGGACCTG
 sus CACACGGTGCCATCTACGAGGGGTACGCCCTGCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTG
 ***** ***** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** *****

gallus GCTGGCCGTGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTGACAGAGAGGCTACAGCTTC
 equus GCTGGCCGGGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTCACGGAGCGTGGCTACAGCTTC
 ovis GCTGGCCGGGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTCACGGAGCGTGGCTACAGCTTC
 bos GCTGGCCGGGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTCACGGAGCGTGGCTACAGCTTC
 sus GCTGGCCGGGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTCACGGAGCGGGCTACAGCTTC

gallus ACCACCACAGCCGAGAGAGAAATTGTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCCCA
 equus ACCACCACGGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTATGTCCCC
 ovis ACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGCC
 bos ACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGCC
 sus ACCACCACGGCCGAGCGGGAGATCGTGCGGGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGCC

gallus CTGGATTTGAGCAGGAGATGGCCACAGCTGCCTCTAGCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTAT
 equus CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGCCTCCAGCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTAC
 ovis CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGCCTCCAGCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTAC
 bos CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGCCTCCAGCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTAC
 sus CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGCCTCTTCCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC

gallus GAACTCCCTGATGGTCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGAGGTTCCAGGTGCCCGAGGCC
 equus GAGCTGCCCCGACGGCCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGGTTCCGCTGCCCGAGGCC
 ovis GAGCTGCCGGACGGGCAGGTCATCACCATCGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCCCTGAGGCT
 bos GAGCTTCCCTGACGGGCAGGTCATCACCATCGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCCCTGAGGCT
 sus GAGCTGCCCCGACGGCCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGGTGTCCAGAGGCC
 ** ** ** **

gallus CTCTTCCAGCCATCTTTCTTGGGTATGGAGTCTGTGGTATCCATGAAACTACCTTCAAC
 equus CTCTTCCAGCCCTCCTTTCCTGGGCATGGAATCCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTCAAC
 ovis CTCTTCCAGCCTTTCCTTTCCTGGGCATGGAATCCTGCGGCATTCACGAAACTACCTTCAAT
 bos CTCTTCCAGCCTTTCCTTTCCTGGGCATGGAATCCTGCGGCATTCACGAAACTACCTTCAAT
 sus CTCTTCCAGCCCTCCTTTCCTGGGCATGGAGTCTGTGGCATCCACGAGACCACCTTCAAC

gallus TCCATCATGAAGTGTGATGTGGATATCCGTAAGGATCTGTATGCCAACACAGTGCTGTCT
 equus TCCATCATGAAGTGTGACGTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCCG
 ovis TCCATCATGAAGTGTGACGTCGACATCCGCAAAGACCTCTACGCCAACACGGTGCTGTCC
 bos TCCATCATGAAGTGTGACGTCGACATCCGCAAAGACCTCTACGCCAACACGGTGCTGTCC
 sus TCGATCATGAAGTGGGACATCAGGAAGGACCTCTACGCCAACACGGTGCTGTCT
 ** *****

gallus GGTGGTACCACAATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTG
 equus GGTGGGACCACCATGTACCCAGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTG
 ovis GGCAGGACCACCATGTACCCGGCATCGCAGACAGGATGCAGAAAGAGATCACTGCCCTG
 bos GGCAGGACCACCATGTACCCGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAAGAGATCACTGCCCTG
 sus GGCAGGACCACCATGTACCCGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTG
 ** ** *****

gallus GCACCTAGCACAATGAAAATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGCAAGTACTCTGTCTGG
 equus GCTCCCAGCACGATGAAGATCAAGATCATTGCGCCCCCTGAGCGCAAGTACTCCGTATGG
 ovis GCACCCAGCACGATGAAGATCAAGATCATCGC GCCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGG
 bos GCACCCAGCACAATGAAGATCAAGATCATCGC GCCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGG
 sus GCGCCCAGCACCATGAAGATCAAGATCATCGC CCTCCGAGCGCAAGTACTCGGTGTGG
 ** ** *****

gallus ATTGGAGGCTCTATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAG
 equus ATCGGCGGCTCCATTCTGGCCTCATTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAG
 ovis ATTGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAG
 bos ATTGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAG

```

sus      ATCGGGGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAG
        ** ** ***** ** *****
gallus   GAGTACGATGAATCCGGACCCTCCATTGTCCACCGCAAATGCTTCTAA
equus    GAGTACGACGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG
ovis     GAGTACGACGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG
bos      GAGTACGATGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG
sus      GAGTACGACGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG
        ***** ** ** * * ***** *****

```

```

GGCACCACACTTCTACAATGAGCT -forw gallus
GGCACCACACCTTCTACAACGAGCT -forw equus
GGCACCACACCTTCTACAACGAGCT -forw ovis
GGCACCACACCTTCTACAACGAGCT -forw bos
GGCATCACACCTTCTACAACGAGCT -forw sus

```

```

CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTGAT -rev primer
-> rückwärts und komplementär -> ATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCG

```

7.9: Sequenz-Alignements der FASTA-Formate unterschiedlicher Tierarten des codierenden Genabschnittes für das Protein Acrosin.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

ovis      -----
bos       -----
equus     ATGTGTCATACTCTGGGAGGTGAGATGCTGCCTCCTGACAACCAGAGGAAATACGTCATG
sus       -----GAGGTCA-----CTGG
gallus    -----AG

ovis      -----TTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
bos       -----AGGACTTTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCATTCTGC-T
equus     ATATTCAGGCCGTGCTGGGGCAGGAGTCTGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
sus       GCTTCCAGGCCAGGCCGGCG-AGGAGCGCGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTT---T
gallus    CCGGGCGCGATGGGCTGCCGTGCGCCTCCGGGAGCGATGGTGTG-CTGTGCCCTCGC
                ** * * * * * * * * * *

ovis      GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTTCGCCAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCTGC
bos       GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTTCACCAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCTGT
equus     GGTCTTGGCAGT-GTCTGTGGTGGCCAATG-ATAACATCACGTGTG---ATGGTCCCTGT
sus       GGTCTTGGCAGT-GTCTGTGGCGGCCAGAG-ATAACGCCACGTGTG---ATGGCCCTGC
gallus    GGTGCTGCTGGCCGTCTGC--CGGCTGGGCACGGCTCCTCCGGCGCCTGCCACCTGC
                *** ** * * * * * * * * * *

ovis      GGGGTCCGGTTCA-GGCAGAAC-CGGCAGGGGGCGTACGGATCATCGGTGGGCAAGA-C
bos       GGGACACGGTTCC-GGCAGAAC-CGTCAGGGGGGCATGCGGATCATCGGCGGGCAAGA-C
equus     GGGTTACGATTC-A-GGCAGAAC-CTACAAGGGACCCTCCGCATCATCGGAGGGCAGGA-C
sus       GGCTTACGGTTCA-GGCAGAAA-TTAGAGTCAGGCATGCGTGTGGTTGGCGG-CATGAGT
gallus    GGGCTCCGGCCCATGGCTTATCACTACGGGGGAAC--GCGTGTGCTGGGCGG-CACGGAC
                ** ** * * * * * * * * * *

ovis      GCCGCCACGGGCTGGCCCTGGATGGTTCAGCTCCAGATCTTCACGTACCACAACAAC
bos       GCTGCCACGGTCTGGCCCTGGATGGTTCAGCTCCAGATCTTCACATACCACAACAAC

```

```

equus      GCGGCACTTGGAGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCTCCAAGTCTTCACTTACCACAACAAG
sus        GCAGAACCGGGCGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCTCCAAGATCTTTATGTACCACAACAAC
gallus     GCCCCGACAGGGGGCCTGGCCCTGGATTGTGTCAGCTCCAAGC---ACGTGGTATG-TGGG
          **      *  **  *****  *****  *****  *  *  *  *

ovis       CGGCGGTACCACGTGTGCGGGGGCTCCCTGCTGAACTCCCAGTGGCTGCTCACGGCCGCT
bos        CGGCGGTACCACGTGTGTGGGGGCTCCCTGCTGAACTCCCAGTGGCTGCTCACTGCCGCT
equus      CGGAGGTATCATGCCTGCGGAGGCACATTGCTGAACTCCCAGTGGCTGGTGACAGCTGCT
sus        CGGAGGTACCACACGTGCGGGGGCATCTTGTGAACTCGCACTGGGTGCTCACTGCTGCT
gallus     CA-CGGGA-CACATCTGTGGAGGATCTCTCATACCCCGCAGTGGGTCTCACGGCAGCG
          *  ** * **  ** * * *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ovis       CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTCGGAGCTAAGG
bos        CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTCGGAGCTAAGG
equus      CACTGCTTCAGGACCAAAAAAAAAAGCGTATGACTGGAG-AC-TGATTTTTGGAGCAAGGG
sus        CACTGCTTCAAGAACAAAAAAAAAGTTACTGACTGGAG-AC-TGATTTTTGGAGCAAAACG
gallus     CACTGCTTC--GACCATGCAACCCCGACACGCGCTGGCAGTGGTGATCGGTGGCCACG
          *****  ** **  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ovis       AAGTTGAGTGGGGGACCAATAAGCCAGTGAAGCCGCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
bos        AAGTTGAGTGGGGGAGCAATAAGCCAGTGAAGCCGCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
equus      AAATTC AATATGGCAGCAATAAGCCAGTGAAGCCACCTCTGCAGGAGAGACGTGTTGAGA
sus        AAGTTGTGTGGGAAGCAATAAGCCGGTGAAGCCACCCCTGCAGGAGAGATTTGTTGAGG
gallus     A--TC---TGAAACGCC--TGGGCC--CGAAGCTGTCG-TGC---GCAACGTGATACGG
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ovis       AAATCATCATTCATGAGAAATACTCCGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATGA
bos        AAATCATCATTCATGAGAAATACTCCGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATAA
equus      AAATCATCATTCATGAAAATACTCCCTCGTTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCTTGA
sus        AGATCATCATTCATGAAAATACTGTTTCAGGGTTAGAGATAAATGACATTGCTCTCATAA
gallus     A--TAATCCCCACGAATACTATCACAGAAACAACATGGCCAATGACATCGCGCTGCTTG
          *  *  ***  ** **  * **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ovis       AGATCACCCCTCCTGTTACCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGATGCCTGCCTCA-GTTT
bos        AGATCACCCCTCCTGTTATCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGCTGCCTGCCTCA-GTTT
equus      AGATCACCCCTCCCGTTCCCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGCTGCCTGCCTCA-ATTT
sus        AGATCACCCCTCCTGTTCCATGCGGGCCCTTCATCGGACCAGGCTGCCTGCCTCA-GTTT
gallus     AGCTGGACCAACCTGTCCAGTGCAGCTACTACATCCAGCTGCCTGCCTGCGGTGCTGCTG
          ** *  **  ** **  ** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ovis       AGG-GCAGGCCACCCAGAGTTCCTCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACA
bos        AGG-GCAGGCCACCCAGAGTTCCTCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACG
equus      AAG-GCAGGCCACCTAGAGTTCCTCAGACCTGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTAAA
sus        AAG-GCTGGCCCGCCAGAGCGCCACGACATGCTGGGTGACTGGCTGGGGCTACTTAAA
gallus     CGCTGCGAGTGT---CAGAGCTCA-CAGAC-TGCTATGTCACTGGCTGGGGACATGGG
          ** *  ****  *  *****  *****  *  *  *****  *  *

ovis       AGAGA-ATGCCCGCAGGA-----CATCCCTATGCTGCAGGAGGCGCGCTGGA
bos        TGAGA-ATGCCCGCAGGA-----CATCACCTGTGCTGCAGGAGGCGCATGTGGA
equus      AGAGA-ATGCCCGCAAGA-----CATCACCTATACTGCAGGAGGCGCCTGTGGA
sus        AGAGA-AAGGCCCGCAGGA-----CGTCACCTACACTGCAGGAGGCACGTGTGGC
gallus     GCTGAGATCTCTACAGGAATATGTGCAACCATAACCGTGTCTGCAGGAGGCCAAGTCCA
          ** *  *  ** **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ovis       CCTCATCGACCTCGGCTTGTGTAACCTCGACCAGATGGTACAACGGGCGCATTTCGT-TCAA
bos        CCTTATCGACCTCGACTTGTGTAACCTCGACCAGATGGTACAATGGGCACATTTCGT-TCAA
equus      GCTCATCGACCTCGACTTATGTAACCTCGACCCAGTGGTACAATGGGCGCATTTCGT-TCAA
sus        CCTCATCGACCTCGAATTATGTAACCTCGACCCAGTGGTACAATGGGCGTGCAG-TCAA
gallus     GCTCATTGACCTCAACATCTGCAACAGCAGCAACTGGTATGCTGGGGCTGTCCATATCCA
          ** **  *****  *  ** **  *  *  *****  **  *  ** *

ovis       CCAACGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG
bos        CCAATGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG
equus      CCAATGTGTGTGCAGGGTATCCTCAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG
sus        CTAATGTGTGCGCAGGGTATCCTAGAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG
gallus     C-AACGTGTGTGCTGGTTACCCGAGGGCGGCATCGACACCTGCCAGGGTGACAGCGGCG
          *  *  *****  ** ** **  *  *  *****  *****  *****  *

```


** *

* * **

```

ovis      AAA--A-GACGCAATAAATGGATATAAATACAAATATAAATATATATGCACTAA-----
bos      AAA--AAGATGAAATAAATGGATATAAATACAAATATAAATATATATACACTAAAAAAAA
equus    -----
sus      AAA--AGGATGAAATAAATGACTATAAATACAAATATAAATATATATACATAAAG-----
gallus   CACCCAGGTTTACTCAGTTGG-----ACAAATA-AAGCTTATTTTCACAGCTA-----

```

```

ovis      -----
bos      AAAAAAAAA
equus    -----
sus      -----
gallus   -----

```

Primersequenzen:

ovis: CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA GACACGCCTCCTGATCTGAGCC 214 bp
 ovis-for: CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA
 ovis-rev: GGCTCAGATCAGGAGGCGTGTC
bos: CCCTCAAGCCCCCGTCTCAG AACATGCCTCCTGATCTGA 214 bp
 bos-for: CCCTCAAGCCCCCGTCTCAG
 bos-rev: TCAGATCAGGAGGAGGCATGTT

sus: CCCCTCTGTTTCAGACTCCTGT TTGCACACCTCATCCCTGAGAA 366 bp
 sus-for: CCCCTCTGTTTCAGACTCCTGT
 sus-rev: TTCTCAGGGATGAGGTGTGCAA

equus: GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA CCCAGAACTGACCGCTGCCTCCTG 266 bp
 equus-for: GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA
 equus-rev: CAGGAGGCAGCGGTCTGTTCTGGG

gallus: GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC G-----TAATGCCCAATGGCAGCCCCA 392 bp
 gallus-for: GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC
 gallus-rev: TGGGGCTGCCATTGGGCATTAC

 actin-for: GGCATCACACTTTCTACAACGAGCT
 actin-rev: CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTGAT

 ca 410 bp

7.10 Material**10.1 Geräte****10.1.1 Zentrifuge**

„Perfectspin24plus“ – PEQLAB Biotech GmbH D-Erlangen

10.1.2 Thermocycler

„peqSTAR 96 Universal Gradient“ PEQLAB Biotech GmbH D-Erlangen

10.1.3 Gleichspannungsquelle

„EV265“ – Kisher Biotech GmbH u CoKG D-Steinfurt

10.1.4 UV-Illuminator

„TFX-20 M“ – Vilber Lourmat F- Maine la Vallée

10.1.5 Agarosegelkammer

„MSCHOICETRIO“ - Kisher Biotech GmbH u CoKG D-Steinfurt

10.2 Chemikalien

10.2.1 taqPol

„peqGOLD-Polymerase, 5U/µl mit 10x Reaktionspuffer Y“

10.2.2 dNTS's – Carl Roth GmbH u CoKG, D-Karlsruhe

10.2.3 Primer – Eurofins MWG Synthesis GmbH D- Ebersbach

10.2.4 DNA Größenstandards

„50 bp DNA-Leiter“ – Carl Roth GmbH u CoKG, D-Karlsruhe

„100bp DNA-Leiter“ – Carl Roth GmbH u CoKG, D-Karlsruhe

10.2.5 Agarose

50xTAE – Carl Roth GmbH u CoKG, D-Karlsruhe

10.3 Biologisches Material:

Hühnerfleisch (hell rosa)

Dönerfleisch (Kalbsdöner, in kleinen Fleischstücken ca. 3x1cm)

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt habe und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift