Schiller-Schule Bochum **Jahrgangsstufe Q1/I**

Schuljahr 2013/14

FACHARBEIT

im Leistungskurs Biologie

Thema:

Identifizierung von Fleischsorten in Lebensmitteln mit Hilfe molekularbiologischer Methoden am Beispiel eines Kalb-fleischdöners – hier Ermittlung von Pferdefleisch -

Verfasserin: Leonie Bosl

Kursleiter: Herr Schaller / Herr Sauerwald

Bearbeitungszeit: 01.10.2013 – 03.12.2012

Abgabetermin: 03.12.2013 – 12.00 Uhr

Inhaltsverzeichnis

Seite

Inhaltsverzeichnis **2**

1 Einleitung **3**

2 Methoden **4**

2.1 NCBI-Datenbank 4

2.2 Sequenzen-Alignement 4

2.3 Extraktion von DNA aus Tiergewebe 4

2.4 Reinigung isolierter DNA 6

2.5 PCR Polymerase Chain Reaction 7

2.6 Agarosegelektrophorese und Auftrennung 8

3 Ergebnisse und Diskussion **9**

4 Zusammenfassung **12**

5 Literaturverzeichnis **13**

5.1 Literatur- und Quellenverzeichnis 13

5.2 Bildnachweis 13

6 Anhang **14**

6.1 Materialien, Geräte und Chemikalien 14

6.2 PCR 15

6.3 Arosegelelektrophorsebilder / Ergebnisbilder 17

6.4 Acrosin Sequenz 28

6.5 Actin Sequenzen 31

6.6 Primersequenzen für Acrosin und Actin 34

7 Selbstständigkeitserklärung **35**

1 Einleitung

Durch verschiedene Vorfälle, die in den vergangenen Jahren bzw. Monaten publiziert worden sind, hat das Thema Fleisch in der Lebensmittelindustrie zu großen Schlagzeilen geführt.

- Pferdefleisch war in Gerichten, welche mit Rind gekennzeichnet wurden, vorzufinden;
- Industrieller Käse wurde auf verschiedene Fertigproduckte ohne entsprechende Angaben gefunden;
- Verarbeitung von Gammelfleisch und generelle unrichtige Beschriftung.

Wie kann man einem Vegetarier versichern, dass sich in seinem Essen kein genetisch verändertes Fleisch befindet? Zum einen läge ein Lebensmittelbetrug zum anderen eine Verletzung des Verbraucherschutzes vor.

Wie kann man den Glauben an eine gute instandgesetzte Lebensmittelindustrie wahren, wenn es zu solchen Vorkommnissen kommt?

Dies sind die Anstöße, die mich dazu veranlassten, mich mit diesem Thema anhand von biologisch-chemischen Untersuchungen auseinanderzusetzen.

Mit einer Schülergruppe und Herrn Dr. Schaller haben wir eine Woche lang geforscht, ob in einem Kalbsdöner nur Kalbsfleisch enthalten ist und nicht etwa Pferd oder Schwein, welches auch eine großer Skandal für die muslimische Religion sein würde.

Dabei war ich in der Gruppe für die Untersuchung auf eventuell enthaltenes Pferdefleisch zuständig. Grundsätzlich ist Pferdefleisch als Lebensmittel nicht schädlich, jedoch ist die unbeabsichtigte Aufnahme von Arzneimitteln mit welchen die Pferde behandelt worden sind, nicht ausgeschlossen. Das Auftreten gesundheitlicher Schäden ist zwar unwahrscheinlich, dennoch sollte die Kennzeichnung der Lebensmittel wahrheitsgemäß und vollständig sein. Nicht gekennzeichnete Lebensmittel können bei empfindlichen Menschen zu allergischen Reaktionen führen.

Meine Zielsetzung war daher, den so genannten Kalbsdöner mit biologisch-chemischen Methoden auf eventuell enthaltenes Pferdefleisch zu untersuchen.

2 Methoden

2.1 NCBI-Datenbank

„NCBI“ ist eine Datenbank, in der sämtliche DNA-Sequenzen, die jeweils publiziert wurden, verzeichnet sind (http;//www.ncbi.nlm.nih.gov/). Sucht man zu einem Protein die dazugehörige Gen-Sequenz, benutzt man dieses Programm.

Nachdem man die Spezies angegeben hat, erhält man einen Datenpfeil für das Gen. Auch systematische Einordnungen in den Stammbaum und die einzelnen Evolutionsstadien der gesuchten Spezies werden beispielsweise angegeben. Außerdem wird gezeigt, wer diese Sequenzen publiziert hat und zusätzliche Informationen werden gegeben.

2.2 Sequenzen-Alignement

Eine codierende DNA-Sequenz aus der NCBI-Datenbank kann als Fasta-Format abgespeichert und z.B. mit dem Programm „GlustalW“ (http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html) aligniert werden, Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Sequenzen von Actin und Acrosin mit Hilfe dieses Programmes verglichen. Hierzu müssen die jeweilig entsprechenden Parameter nicht verändert werden.

2.3 Extraktion von DNA aus Tiergewebe

2.3.1. Standardmethode

Die Extraktion dient zum Lösen der DNA aus einem Teil eines Organismus.

2g Fleisch werden abgewogen und mit 1ml Spülmittel und jeweils eine Spatelspitze Waschpulver und Kochsalz in einer Reibschale bis zur Homogenität zerrieben. 9 ml Wasser werden hinzugefügt und mit dem Homogenat bei 45°C inkubiert und anschließend filtriert. Das Filtrat wird mit eiskaltem Ethanol überschichtet. Nach fünfminütigen Warten erfolgt die Überführung der DNA-Fäden, die sich an den Phasengrenzen angelagert haben. Diese werden mithilfe einer Tropfpipette in ein anderes Eppendorf-Gefäß

gegeben. Die DNA wird für fünf Minuten bei 10.000g (Erdanziehungskraft = g) zentrifugiert, sodass sich 2 Phasen bilden. Der Überstand und das DNA-Sediment, wobei ersteres nicht relevant für die weitere Vorgehensweise ist. Das DNA-Sediment wird für fünf Minuten bei 35°C getrocknet.

2.3.2. NaOH-Methode

Die NaOH-Methode ist eine weitere Methode der DNA Extraktion, bei der man folgende Materialien benötigt: 0,2 Gramm DNA-Gewebe, welche man analysieren möchte, sowie 500 µl NaOH und 200 µl 0,5 M Tris-Puffer, Phenol, Chloroform und Ethanol.

Zuerst gibt man 0,2 Gramm Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß und zerreibt es darin mit einen Mikropistill. Man fügt 800 µl von 50mM NaOH dazu und zerreibt es ein weiteres Mal. Nun inkubiert man dieses Gemisch bei 95°C eine halbe Stunde lang. Der Zugabe von 200 µl 0,5 MTris-Puffer, mit einem ph-Wert von 8.0, folgt eine Zentrifugation von 2’ bei 14000rpm. Danach gibt man dem Gemisch im Verhältnis 1:1 Phenol und Chloroform hinzu und zentrifugiert nach kräftigem Schütteln dieses Gemisch abermals, pipettiert die oberste Phase ab, und fügt lediglich Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzu. Es wird wieder 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 direkt als PCR-Template einsetzt (1a) und die andere DNA-Probe erst mit 2fach Vol. Ethanol übergießt, 10 Minuten zentrifugiert und dann das Ethanol verwirft und das Sediment mit 100µl Wasser aufnimmt (1b) und anschließend als PCR-Template verwendet.

2.3.3. Hexan-NAOH-SDS-Methode

Bei dieser Methode benötigt man 0,2 Gramm DNA-Material sowie 500 µl SDS-NaOH-Lösung, 20 µl Proteinase K, Phenol und Chloroform. Zuerst gibt man die 0,2 Gramm Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß und zerreibt sie mit einem Mikropistill. Man gibt 500µl Hexan hinzu und benutzt das Pistill erneut. Dann gibt man 500 µl SDS-NaOH-Lösung (10% SDS, 0,2M NaOH) in das Eppendorf-Gefäß. Nun muss man das Gefäß kräftig schütteln, es folgt eine Zetrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 5’.

Es entstehen drei Phasen, von denen man die untere wässrige Phase abnimmt und 20 µl Proteinase K hinzugibt. Daraufhin wird das Gemisch 30’ bei 65°C inkubiert und ein weiteres Mal 5’ bei 5000 rpm 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.

Das erste Eppendorf-Gefäß gibt man direkt in den Thermocycler um die PCR durchzuführen (2a).Die andere DNA-Probe wird nach einer Zentrifugation von 12000rpm für 5’ mit Ethanol gefällt, bevor die in Wasser gelöste DNA PCR anfängt (2b).

2.3.4. Tail-Extraktion

Für diese Methode der DNA-Extraktion werden 0,2 Gramm DNA-Mateiral, 450µl Tail-Puffer, 800µl Isopropanol und 600µl Ethanol und 20µl Proteinase K, 200µl Kaliumacetat benötigt. Zu Beginn gibt man die 0,2 Gramm 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 30’ bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation gibt man 200µl 5M Kaliumacetat hinzu, schüttelt das Gefäß und zenrifugiert es 5’ bei 5000rpm und danach noch einmal 5’ bei 12000rpm. Den daraus entstehenden Überstand (ca. 500µl) gibt man in ein neues Eppendorf-Gefäß und gibt 800µl Isopropanol hinzu. Nach dieser Zugabe schüttelt man die Probe zuerst und gibt sie für 5’ bei 12000rpm in die Zentrifuge. Die Flüssigkeit wird verworfen, wobei eine dünne Sediment-Schicht übrig bleiben sollte. Auf diese Sediment-Schicht gibt man 600µl Ethanol und invertiert das Gemisch vorsichtig. Dann wird es bei 12000rpm 3’ lang zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen, das Sediment getrocknet und danach in Wasser aufgenommen.

2.4 Reinigung isolierter DNA

Durch eine Phenol-Chloroformextraktion erfolgt anschließend eine Reinigung der isolierten DNA um Proteine und andere störende Stoffe von der DNA zu entfernen, da diese bei der PCR (welche im Folgenden noch erklärt wird) Störfaktoren darstellen.

Das getrocknete DNA-Sediment(siehe Methode der Extraktion der DNA) wird in 650 µl Wasser gelöst. Je 500 µl Phenol und Chloroform werden dazu gegeben und nach kräftigem Schütteln wird die Zentrifugation für 1 min bei 10000g durchgeführt. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt; allerdings wird bei dem letzten Durchgang nur 500 µl Chloroform hinzugegeben.

Das daraus folgende Produkt der Zentrifugation wird mit dem 1,5fachen Volumens eiskalten Ethanol gefällt und für fünf Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Sediment wird für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 100µl Wasser aufgenommen, die Ethanol-Phase wird verworfen.

2.5 PCR Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase-Chain-Reaktion PCR dient der Amplifikation bestimmter Gensequenzen. Mithilfe dieser Methode können gering vorliegende DNA-Spuren vermehrt werden, die für eine weitere Untersuchung nicht ausreichend sind. Zur Vorbereitung stellt man ein FA-Reaktionsansatz aus einem Puffer (sorgt für das pH-Optimium der Enzyme), dNTP (den Nukleotiden), Primerforward and -reverse, H_2O, taq-Polymerase und einem DNA-Template zusammen. Nach der Fertigstellung des Reaktionsansatzes wird dies in einen Thermocycler platziert und durchläuft dort drei Phasen.

In der ersten Phase, der Denaturierung, wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aufgespalten werden. Nun dienen die Einzelstrang-Matrizen zur Synthese der neuen DNA.

Die darauf folgende zweite Phase, die Hybridisierung, stellt einen Vorgang dar, in dem künstliche Primer an die zu amplifizierenden DNA-Strangenden angelagert werden. Während dieser Anlagerung versucht man, dass zu den jeweiligen Primer gehörenden Maximum der spezifischen Bindung zu erreichen, welches in den meisten Fällen zwischen 50°C und 70°C liegt. Falls die Temperatur zu hoch eingestellt wird, kann keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Primer und Strang erfolgen. Ist die Temperatur zu niedrig, kann es vorkommen, dass die Primer sich unspezifisch anlagern, da die Basenpaarung nicht vollständig komplementär ist.

In der dritten und letzten Phase findet die Verlängerung des hydrisierten Primer statt, wobei die taq-Polymerase aus den dNTP‘s einen komplementären Strang bildet. Die Temperatur beträgt hierbei 72°C. Nachdem dieser Teil dieses Vorgangs beendet ist, kühlt sich der Thermocycler das Homogenat auf 8 °C runter. Damit findet die PCR ihren Abschluss (siehe Anhang, PCR, S. 15f).

2.6 Agarosegelektrophorese und Auftrennung

Die Visualisierung der geeigneten DNA soll durch Agarosegelelektrophrose veranschaulicht werden. Um eine Agarosegelelektrophorese laufen zu lassen benötigt man eine Phorese-Kammer, das Gel, einen „Kamm“ und eine Energiequelle. Das Gel wird in die Kammer eingelassen und der Kamm am negativen Pol befestigt, damit er die sogenannten Taschen im Gel bildet. Danach wird eine Pufferlösung aufgetragen.

Die vorher extrahierte DNA bzw. das PCR-Produkt wird auf einen Streifen Parafilm in 9 µl Tropfen mit 1 µl Farbstoff (Xylencyanolblau) gefärbt.

Nun wird der Kamm aus dem Gel entfernt, damit der nächste Arbeitsschritt erfolgen kann. Die Tropfen aus DNA und Farbstoff werden mit Pipetten in die schon vorbereiteten Geltaschen am Minusende der Gelkammer gegeben, wobei zwischen den DNA-Tropfen ein Marker in eine Tasche gegeben wird, welcher nachher bei der Auswertung die Größe der DNA-Fragmente anzeigt.

Nach Aktivierung des Stromkreises (120 mV) wird das Gemisch für eine Reaktionszeit stehen gelassen. Anschließend wird das Gel vorsichtig entfernt, bevor die negativ geladene DNA über die Gelkammer hinauswandert.

3 Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von einer vorherigen Arbeit (Johanna Ana-Liza Schaller, 2013) wurden auch bei der vorliegenden Arbeit die DNA´s des Aktingens und des Acrosingens als Basis herangezogen. Die DNA-Sequenz des codierenden Bereichs des Gens wurde innerhalb der NCBI-Gendatenbank über den Suchbereich „Acrosin“ bzw „Aktin“ und die jeweilige Tierspezies (z.B. equus) identifiziert.

Die codierenden Sequenzen (cds) wurden als Fasta-Format abgespeichert und mit den Programm „ClustalW“ aligniert (Methode 2.2).

Die Sequenz-Aligenments (s. Anhang 6.4 und 6.5) zeigen, dass es sich bei dem Aktin um ein konservatives Gen handelt, während das Acrosin teilweise starke Sequenzunterschiede aufwirft. Für sämtliche der hier betrachteten Aktin-DNA´s und Acrosin-DNA´s wurde das beschriebene Primerpaar für die Amplikation ausgewählt (siehe Anhang 6.6). Die Ampflifikation des Aktingens sollte hier als Positivkontrolle dienen und wurde mittels unspezifisierten Primer amplifiziert. Um spezifische PCR-Produkte für das Acrosingen zu erhalten, wurde Primer aus den divergenten DNA Bereichen abgleitet.

Um festzustellen, ob nun Pferdefleisch im Kalbsdöner vorhanden ist, habe ich eine gesamte DNA-Aufbereitung und Auswertung vorgenommen.

Als ersten habe ich die Extraktion von DNA aus Pferdefleischgewebe (vgl. Methode Extraktion von DNA aus Tiergewebe, s. Abschn. 2.3) durchgeführt. Grundsätzlich ergaben sich keine Probleme. Die einzige Herausforderung war es, die gefrorenen Proben so schnell wie möglich zu mörsern, bevor sie anfingen aufzutauen, da Fett, welches selbst bei kleinsten Mengen von Fleisch vorzufinden ist, sich im weichen Zustand schwer präparieren lässt.

Nach diesem Schritt folgte die Reinigung der DNA (s. Methode Reinigung isolierter DNA, s. Abschn. 2.4), die PCR (vgl. Methode PCR, s. Abschn. 2.5) und Agrosegelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.6).

Wenn man nun das Agarosegel betrachtet (s. Anhang, S. 18 ff.), wobei ich Döner DNA mit Pferdeprimern gekoppelt habe, erkennt man an der 13. Tasche/ Spalte, dass keine DNA vorhanden ist.

Vergleicht man dieses mit der 11. Tasche/Spalte, welche Döner DNA + Lamm spez. Primer enthält, stellt man ebenfalls fest, dass dort keine DNA vorzufinden ist. Dieses wäre ein zu erwartendes Ergebnis, wenn man davon ausgeht, dass im Kalbsdöner kein Pferdefleisch und/oder Lammfleisch vorhanden ist.

Bei einem weiteren Versuch vom 24.10.13 habe ich nochmals ein neues Agarosegel erstellt, wobei in der 5. Tasche Döner(-Kalbsfleisch-)DNA mir spez. Pferdeprimern, in der 6ten Tasche Pferde-DNA mit spezifischen Pferdeprimern und in der 7. Tasche Pferde-DNA mit einer Actinkontrolle ist (vgl. Anhang Datum 24.10.13, Seite 20). Es lässt sich feststellen, dass bei der 5. Tasche/Spalte DNA angezeigt wird, welches bedeuten würde, dass Pferdefleisch in dem von uns bearbeiteten Kalbfleisch-Döner vorhanden ist, welches eine unrichtige Angabe darstellen würde. Dies würde eine Verbrauchertäuschung bzw. ein Betrug vorliegen. Man könnte dieses damit widerlegen, wenn bei der 6. Tasche/Spalte keine Banden d.h. DNA zu sehen wäre. Allerdings kann man bei ganz genauer Betrachtung eine ganz schwache DNA Bande erkennen, welches das festgestellte Ergebnis bestätigen würde. Um für einen solchen Fall vorbereitet zu sein, hatte ich ebenfalls - wie schon erwähnt die Pferde-DNA - mit der Actinkontrolle in der 7. Tasche laufen lassen, welche bei dem vorliegenden Gel Banden bzw. DNA nachweist. Somit kann man einen Fehler beim Nachweis von Pferdefleisch im Döner ausschließen.

Hier muss ich allerdings auf die nicht idealen technischen Gegebenheiten wie die schon sehr alte UV-Lampe, eine Kamera ohne Stativ und das Fehlen eines professionellen Geldokumentationssystems hinweisen.

Bei einem letzten Versuch am 25.10.13 habe ich mit DNA gearbeitet, die durch die Tail-Extraktion extrahiert wurde. Es sollten nämlich unterschiedliche DNA-Präparierungsmethoden durchgeführt werden, um die dadurch erhaltene DNA zu vergleichen. Diese Methode sollte eine eindeutige Aussage darüber geben, ob nun ein Lebensmittelbetrug vorliegt oder nicht.

Bei dieser Agarosegelelektrophorese wurden mir die 17., 18. und 19. Tasche zugewiesen (vgl Anhang Datum 25.10.13 drittes Bild, S. 25).

Die 17. Tasche habe ich mit Kalbsfleischdöner-DNA mit spezifischen Pferde-Primern, die 18. Tasche mit Pferde-DNA mit spez. Pferdeprimer und die 19. Tasche mit Pferde-DNA mit der Actinkontrolle, befüllt.

Bei der Auswertung dieses Agarosegels kann man bei allen drei Taschen Spalten keine DNA nachweisen (s. Anhang Datum 25.10.13 drittes Bild, S. 25).

In der 17. Tasche wird eine Verwendung von Pferdefleisch im Kalbsdöner nicht angezeigt, welches grundsätzlich auch zu erwarten war.

Bei der 18. und 19. Spalte ist dennoch ein erstaunliches Ergebnis entstanden, da selbst bei der Actinkontrolle keine Anzeige vorliegt. Ein Fehler, der dies verursacht haben könnte, ist, dass man beim Pipettieren mit einer schon benutzten Kappe ausversehen in die Proben hinein gekommen ist und diese somit verunreinigt hat. Die DNA-Präparation nach der TAIL-Methode scheint dennoch nicht geeignet zu sein für die Präparation von genomischen Matrizen-DNA für die PCR.

Dieses Ergebnis haben wir auch mit den verschiedenen Methoden zur DNA-Aufarbeitung und Stoffzusammensetzung überprüft (s. Methoden, Seite 5 ff.), um herauszufinden welche Extraktion von DNA am besten funktioniert (vgl. Anhang PCR Fotos, Datum 25.10.13 PCR 1, Datum 25.10.13 PCR 2):

- Extraktion von DNA (filtriert) hat keine DNA angezeigt (s. Anhang Datum 23.10.13)
- Extraktion von DNA (zentrifugiert) nicht ausprobiert
- Actinkontrolle (s. Anhang Datum 22.10.13)
- NaOH-Methode 1a hat funktioniert
- NaOH-Methode 1b hat funktioniert
- Hexan-NaOH-SDS-Methode 2a hat NICHT funktioniert
- Hexan-NaOH-SDS-Methode 2b hat NICHT funktioniert
- Tail-Extraktion hat NICHT funktioniert

4 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man auf die Frage: „Ist in dem Kalbsdöner, mit dem ich gearbeitet habe, Pferdefleisch enthalten?“ keine sichere Antwort geben kann, da ich mit der einen Methode eine Bestätigung, mit der anderen Methode keine Bestätigung erhalten habe. Die Kontrollverfahren führten ebenfalls zu einem unklaren Ergebnis.

Aufgrund der sehr komplexen und schwierigen Testverfahren konnten mögliche auftretende Fehler bei der Ermittlung der jeweiligen DNA nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Da die fehlende Bestätigung allerdings auf der nicht geeigneten TAIL-Methode beruht, tendiere ich zur Ansicht, dass der Kalbfleisch-Döner wohl unzulässigerweise zumindest Spuren von Pferdefleisch enthielt.

Somit lässt sich am Ende dieser Facharbeit keine 100% sichere und eindeutige Aussage in Bezug auf meine Fragestellung aufstellen. Es wären weitere Untersuchungsreihen notwendig, um ein genaues und verifizierbares Ergebnis zu erhalten. Dies wäre ums wünschenswerter, da wir mittlerweile herausgearbeitet haben, welche Methoden sich als zielführender als andere erwiesen haben, um unsere Fragestellung zu beantworten.

Die DNA-Aufarbeitungen macht sich hier z.T. kommerzielle Verfahrensweise zur Isolation von DNA aus Blut zunutze. Als Fleischgewebe werden weiterhin Lebergewebe und bei Muskelfleisch eingesetzt. Die verbesserte Methode lässt sich auf die Benutzung einer professionellen Analyse zurückführen (Dank an Herrn PD Dr. M Piotrowski RUB).

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine Praktikumsvorschrift erarbeitet werden, die es erlaubt der Fragestellung auch zukünftig innerhalb der Q1-Biokurse nachzugehen.

An diesem Punkt möchte ich mich bei meinem Betreuungslehrer Herrn Dr. Florian Schaller bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, mich in diese Thematik einzuarbeiten und er mir bei der Erarbeitung zur Seite gestanden und mit seiner Motivation und nötigen Unterstützung zu dieser Facharbeit erheblich beigetragen hat.

5 Literaturverzeichnis

5.1 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ZEIT ONLINE GmbH Hamburg, Lydia Klöckner „Fleisch muss wieder Luxusgut werden“ eingestellt 18. Februar 2013 19:03 Uhr, entnommen am 26.11.2013 um17.36 http://www.zeit.de/wissen/umwelt/2013-02/Pferdefleisch-Kommentar-Verbraucherschutz
- Johanna Ana-Liza Schaller, April 2013, Witten und Stuttgart, Identifizierung von Fleischsorten in Lebensmitteln mit Hilfe molekularbiologischer Methoden am Beispiel eines Döners
- NCBI(National Center for Biotechnology Information) Datenbank online

  http:/www.ncbi.nlm.nih.gov

- ClustalW (Berechnungsprogramm für Alignente)

  http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html

- John Gatesy and Willie J. Swanson, MammalogistsAdaptive Evolution and Phylogenetic Utility of Acr (Acrosin),

  a Rapidly Evolving Mammalian Fertilization

  Journal of Mammalogy, Vol. 88, No. 1 (Feb., 2007), pp. 32- 42

- Willie J. Swanson and Victor D.Vacquier, 2002 ,The Rapid Evolution of Reproductive Proteins, Nature Reviews Genetics, Volume 3, Februar 2002, S. 137 ff.

5.2 Bildnachweis

Zu Abschnitt 2.5 PCR-Verfahren und Anhang 6.2 Schemata des PCR aus

MolecularHub, veröffentlicht am 03.01.2011 – zur freien Verfügung- Link

http://molecularhub.blogspot.de/2011/01/pcr.html

6 Anhang

6.1 Materialien, Geräte und Chemikalien

6.1.1 Zentrifuge

- Perfectspin 24 plus Fa. PEQLAB Biotechnik GmbH, D-Erlangen

6.1.2 Thermocycler

- peq STAR Universal Gradient, Fa. PEQLAB Biotechnik GmbH, D-Erlangen

6.1.3 Gleichspannungsquelle

- EV 265 Kisher Biotechnik GmbH u. Co. KG, D-Steinfurt

6.1.4 Agarosegelkammer

- MSCHOICETRIO Kisher Biotechnik GmbH u. Co.KG, D-Steinfurt

6.1.5 UV- Illuminator

- TFX-20 Vilbert Lourmat , F-Maine de la Vallee
- Geldokumentationssystem des Lehrstuhls für …. und Biotechnologie der RUB

6.1.6 taq-Polymerase

- peq Gold-Polymerasen mit 5 U/µl mit 10* Reaktionspuffer, PEQLAB Biotechnik GmbH, D-Erlangen

6.1.7 Primer

- Eurofins MWG Synthesis GmbH, D-Ebersbach

6.1.8 dNTP`s

- Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe

6.1.9 DNA – Größenstandards

- " 50 bp DNA –Leiter " Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe,
- "100 bp DNA-Leiter " Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe

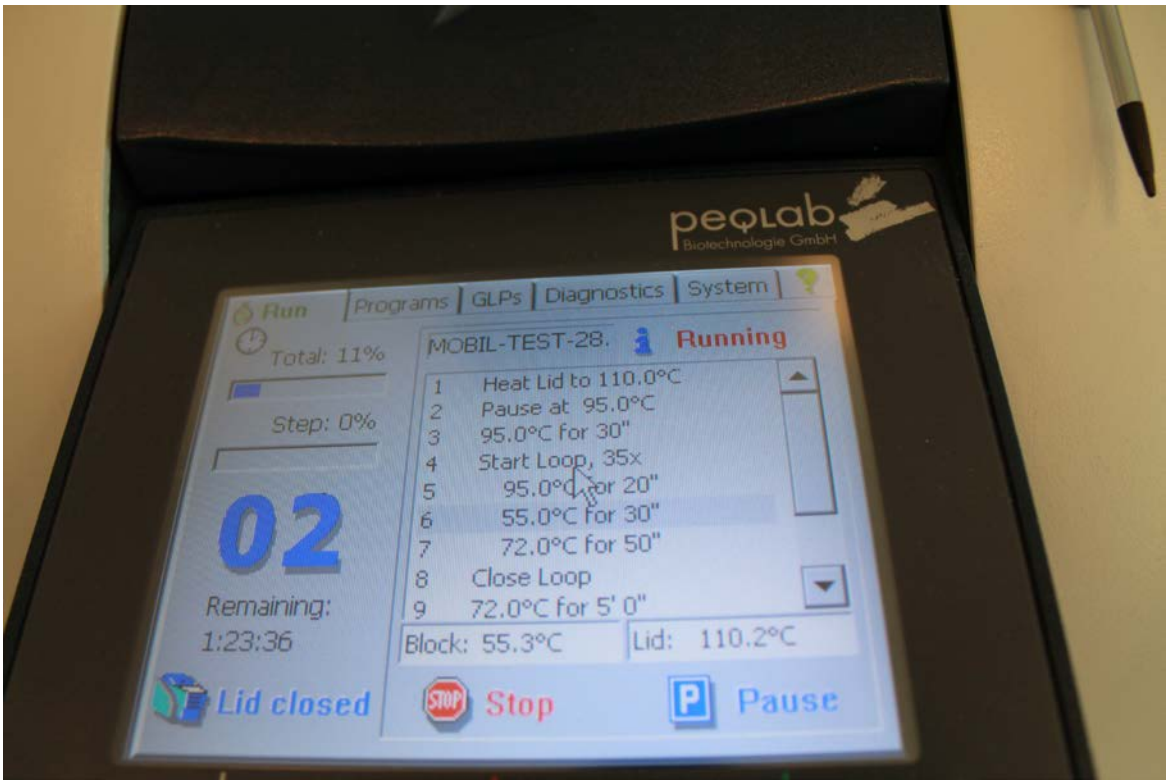
6.1.10 Agarose

- 50 * TAE Carl Roth GmbH & Co. KG ,D-Karlsruhe

6.1.11 Pferdefleisch

- Rossschlachterei Dortmund

6.2 PCR

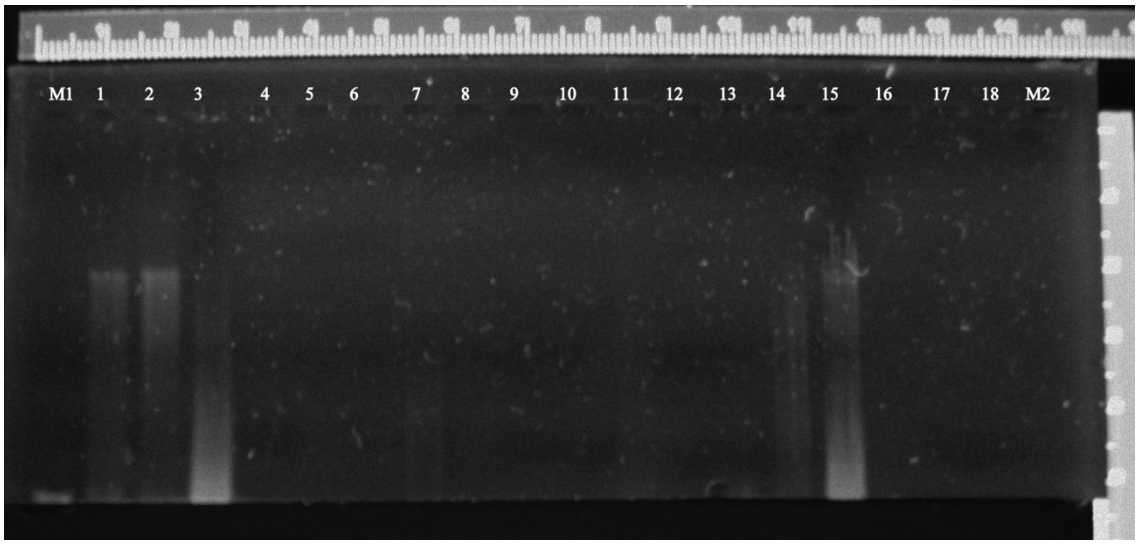


Display des Polymerase Chain Reaction Gerätes der Fa. Pequlab

Anzeige der verschiedenen Zyklen der Polymerase Chain Reaction

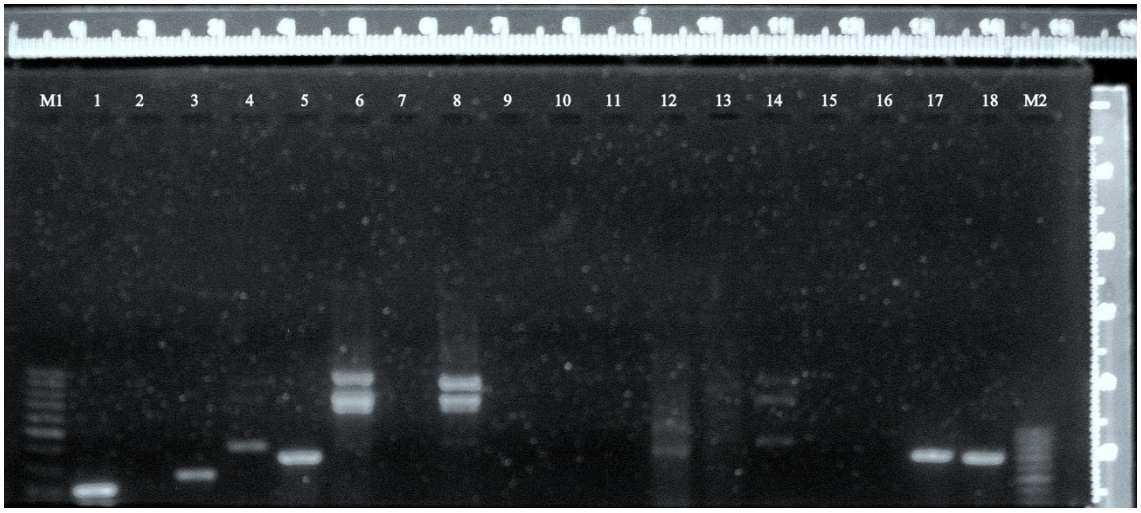
6.3 Arosegelelektrophorsebilder / Ergebnisbilder

Datum 21.10.2013



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)

Datum 22.10.13



1 Marker

2 Lamm Spez Primer – DNA vorhanden

3 Lamm Actin Primer – Actin nicht vorhanden (vermutung Actin Primer haben nicht funktioniert

4 Pferd Spez Primer – DNA vorhanden

5 Pferd spez Primer – Actin vorhanden

6 Huhn spez Primer – DNA vorhanden

7 Huhn Actin Primer – Actin vorhanden

8 Schwein Spez Primer – keine DNA zu sehen

9 Schwein Actin Primer – Actin vorhanden

10 Rind Spez Primer – keine DNA zu sehen

11 Rind Actin Primer – kein Actin zu sehen

12 Geflügelwurst RFLP primer/ Tierunspezifische Primer – keine DNA zu sehen

13 Geflügelwurst Actin primer – Actin vorhanden

14 Döner RFLP Primer – DNA vorhanden

15 Döner Actin Primer – Actin vorhanden

16 Pferdewurst RFLP Primer – keine DNA zu sehen

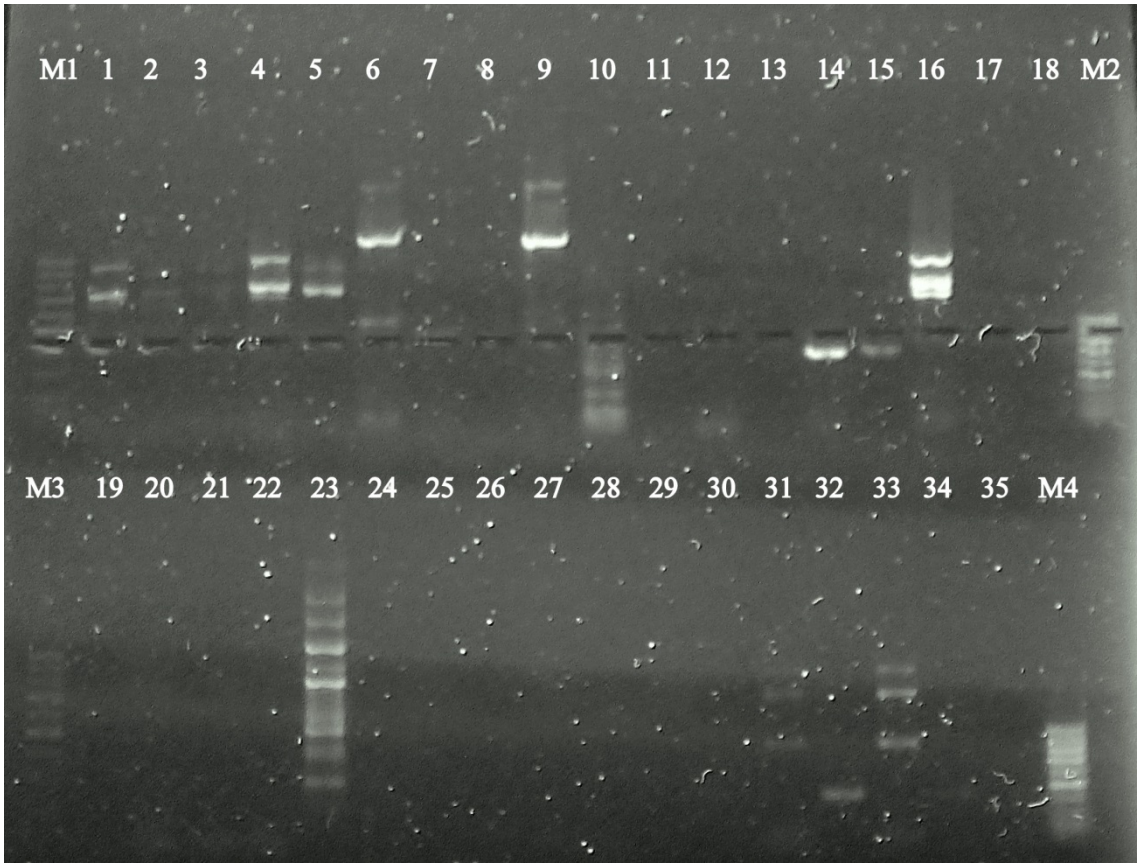
17 Pferdewurst Actin Primer – kein Actin vorhanden

18 Schaller Huhn spez, pol neu – Pol funktioniert

19 Schaller Huhn spez, pol alt - Pol funktioniert

20 Marker

Datum 23.10.13



M1 Marker
1 Schaller
2 Schaller
3 Schaller
4 Schaller
5 Schaller
6 Schaller
7 Schaller
8 Schaller
9 Schaller
10 Schaller
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 (Zentriert)
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)

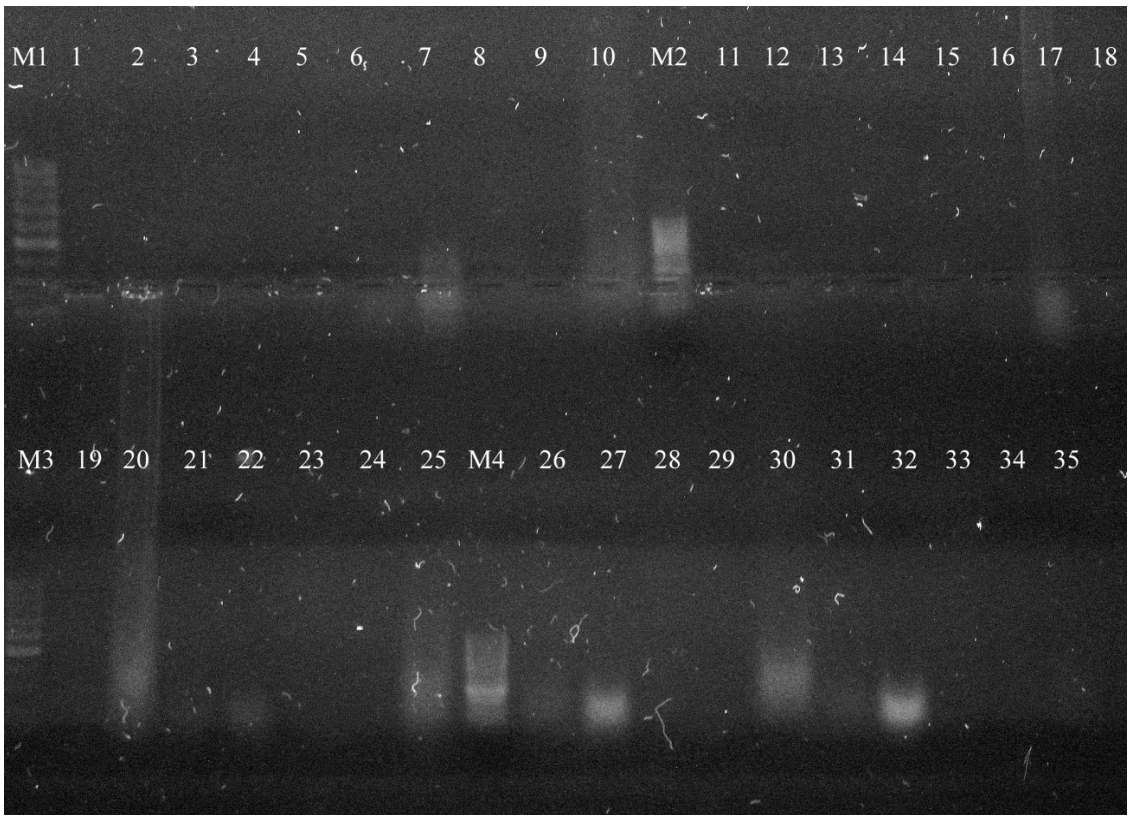
Datum 24.10.13

M1/M4: 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 Lammprimer
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 Lammprimer
19. Geflügelleberwurst mit Rindprimer
20. Geflügelleberwurst mit Schweineprimer

Datum 25.10.13 PCR1



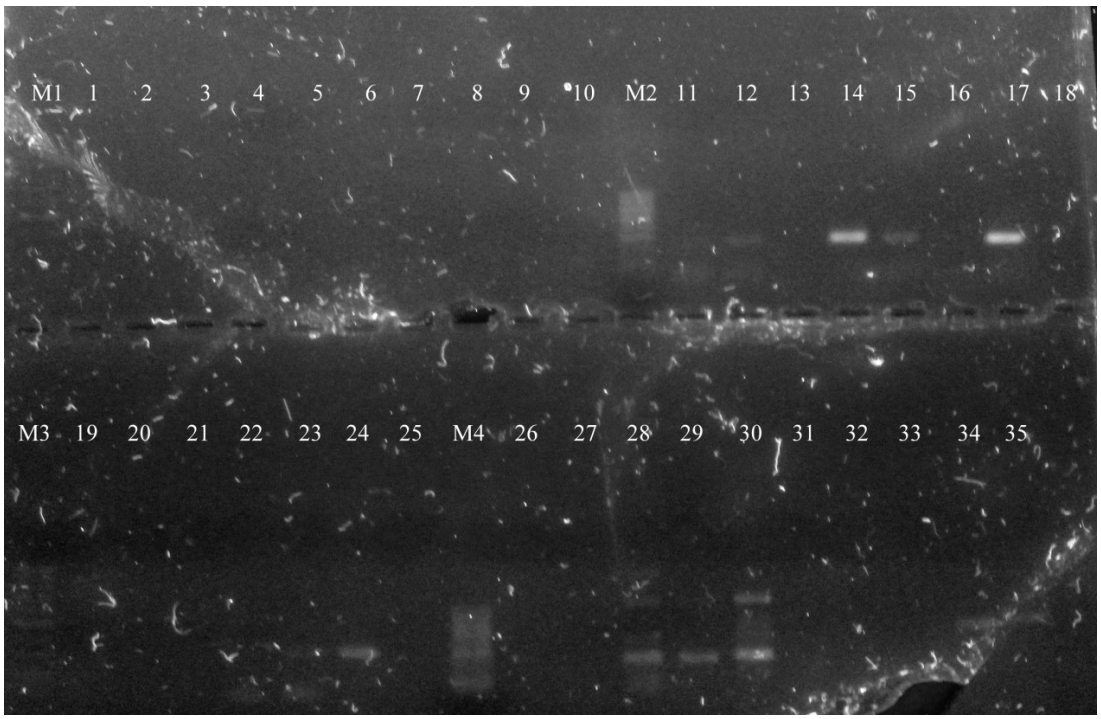
M1 Marker
1 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1a
2 Geflügelleberwurst (NaOH-Methode) 1b
3 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a
4 Geflügelleberwurst (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b
5 Geflügelleberwurst (TAIL extraktion)3
6 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1a
7 Pferdewurst (NaOH-Methode) 1b
8 Pferdewurst (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

Datum 25.10.13 PCR 2



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

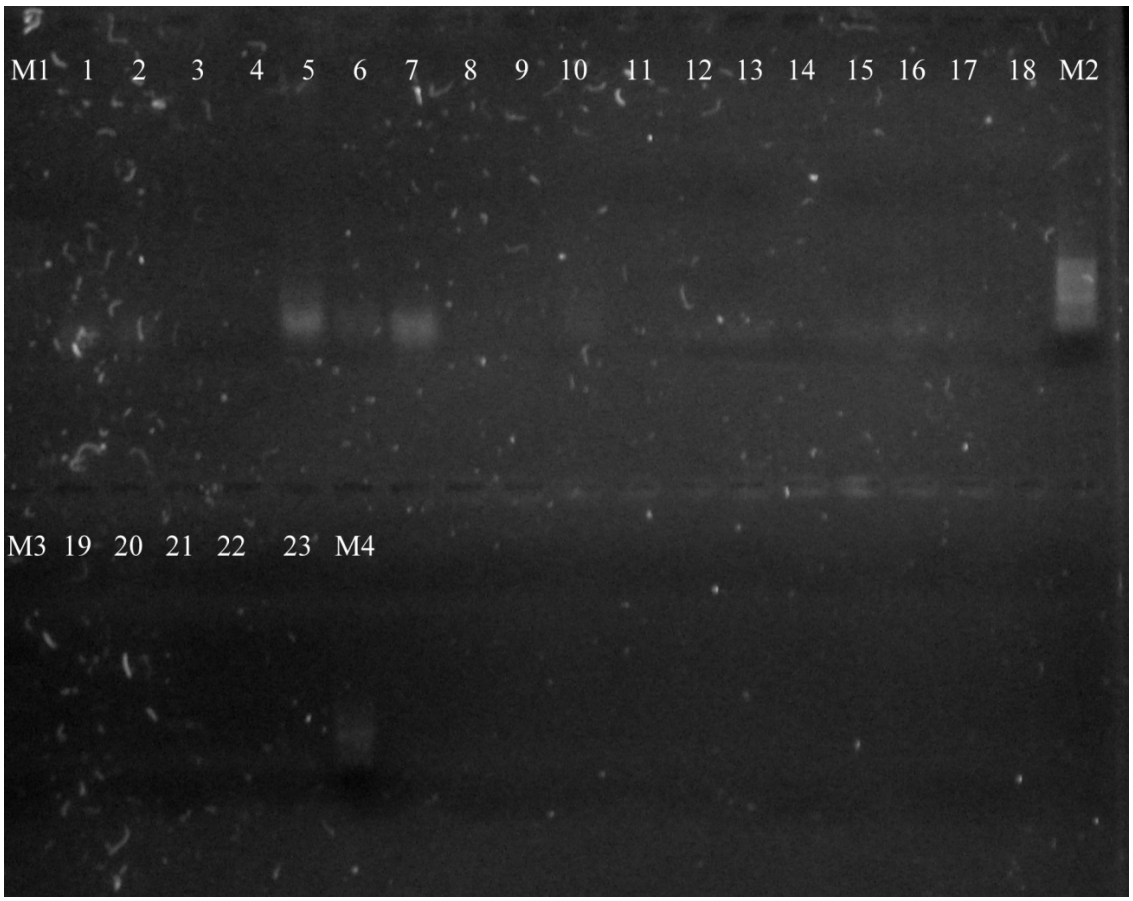
15 Rind (TAIL extraktion)3 + PCR

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

Datum 25.10.13 PCR 3



1Schwein (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 (Tail Extraktion) + Pferd spez Primer

19 Pferd (Tail Extraktion) + 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

6.4 Acrosin Sequenz

```
CLUSTAL W (1.83) Acrosion multiple sequence alignment


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


ovis            ----------------------------TTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
bos             ---------------------AGGACTTTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCATTCTGC-T
equus           ATATTCAGGCCGTGCTGGGGCAGGAGTCTGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
sus             GCTTCCAGGCCAGGCCGGCG-AGGAGCGCGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTC----T
gallus          CCGGGCGCGATGGGCTGCCGTGCGCCTCCGGGAGCGATGGTGCTG-CTGCTGCCCCTCGC
                                          ** ** **** ***   ****    *

ovis            GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCGCCAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCCTGC
bos             GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCACCAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCCTGT
equus           GGTCTTGGCAGT-GTCTGTGGTGGCCAATG-ATAACATCACGTGTG---ATGGTCCCTGT
sus             GGTCCTGGCAGT-GTCTGTGGCGGCCAGAG-ATAACGCCACGTGTG---ATGGCCCCTGC
gallus          GGTGCTGCTGGCCGTCTGC--CGGCCTGGGCACGGCTCCTCCGGCGCCTGCGACACCTGC
                ***  **   *   ****      **   * *   *  * *  * *     *   ****

ovis            GGGGTCCGGTTCA-GGCAGAAC-CGGCAGGGGGGCGTACGGATCATCGGTGGGCAAGA-C
bos             GGGACACGGTTCC-GGCAGAAC-CGTCAGGGGGGCATGCGGATCATCGGCGGGCAAGA-C
equus           GGGTTACGATTCA-GGCAGAAC-CTACAAGGGACCCTCCGCATCATCGGAGGGCAGGA-C
sus             GGCTTACGGTTCA-GGCAGAAA-TTAGAGTCAGGCATGCGTGTGGTTGGCGG-CATGAGT
gallus          GGGCTCCGGCCCATGGCTTATCACTACGGGGGAAC--GCGTGTCGTGGGCGG-CACGGAC
                **    **   *  ***  *              *   **  *  * ** ** ** *

ovis            GCCGCCCACGGGGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTCACGTACCACAACAAC
bos             GCTGCCCACGGGTCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTCACATACCACAACAAC
equus           GCGGCACTTGGAGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAAGTCTTCACTTACCACAACAAG
sus             GCAGAACCGGGCGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTTATGTACCACAACAAC
gallus          GCCCCGCAGGGGGCCTGGCCGTGGATTGTCAGCCTCCAAAGC---ACGTGGTATG-TGGG
                **    *  **  ******* ***** **********   *   *  *   *

ovis            CGGCGGTACCACGTGTGCGGGGGCTCCCTGCTGAACTCCCAGTGGCTGCTCACGGCCGCT
bos             CGGCGGTACCACGTGTGTGGGGGCTCCCTGCTGAACGCCCACTGGCTGCTCACTGCCGCT
equus           CGGAGGTATCATGCCTGCGGAGGCACATTGCTGAACTCCCACTGGCTGGTGACAGCTGCT
sus             CGGAGGTACCACACGTGCGGGGGCATCTTGCTGAACTCGCACTGGGTGCTCACTGCTGCT
gallus          CA-CGGGA-CACATCTGTGGAGGATCTCTCATCACCCCGCAGTGGGTCCTCACGGCAGCG
                *   ** * **    ** ** **     *  * * * * ** *** *  * ** ** **

ovis            CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTCGGAGCTAAGG
bos             CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTTGGAGCTAAGG
equus           CACTGCTTCAGGACCAAAAAAAAAGCGTATGACTGGAG-AC-TGATTTTTGGAGCAAGGG
sus             CACTGCTTCAAGAACAAAAAAAAAGTTACTGACTGGAG-AC-TGATTTTCGGAGCAAACG
gallus          CACTGCTTC--GACCATGCAACCCCCGACACGCCGTGGCACGTGGTGATCGGTGGCCACG
                *********  ** **   **           * *  *  * ** *  * ** *     *

ovis            AAGTTGAGTGGGGGACCAATAAGCCAGTGAAGCCGCCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
bos             AAGTTGAGTGGGGGAGCAATAAGCCAGTGAAGCCGCCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
equus           AAATTCAATATGGCAGCAATAAGCCAGTGAAGCCACCTCTGCAGGAGAGACGTGTTGAGA
sus             AAGTTGTGTGGGGAAGCAATAAGCCGGTGAAGCCACCCCTGCAGGAGAGATTTGTTGAGG
gallus          A--TC---TGAAACGCC--TGGGCCC-CGAAGCTGTCG-TGC----GCAACGTGATACGG
                *  *    *       *  *  ***   *****   *  ***    *  *  ** *  *
```

```
ovis            AAATCATCATTCATGAGAAATACTCCGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATGA
bos             AAATCATCATTCATGAGAAATACTCGGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATAA
equus           AAATCATCATTCATGAAAATTACTCCCCTCGTTCAGAGGCAAACGACATTGCTCTCTTGA
sus             AGATCATCATTCATGAAAAATACGTTTCAGGGTTAGAGATAAATGACATTGCTCTCATAA
gallus          A--TAATCCCCCACGAATACTATCACAGAAACAACATGGCCAATGACATCGCGCTGCTTG
                *  * ***   ** **  * **               *   ** ***** ** **  *

ovis            AGATCACCCCTCCTGTTACCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGATGCCTGCCTCA-GTTT
bos             AGATCACCCCTCCTGTTATCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGCTGCCTGCCTCA-GTTT
equus           AGATCACCCCTCCCGTTCCCTGTGGGCACTTCATTGGACCGGGCTGCCTGCCCCA-ATTT
sus             AGATCACCCCTCCTGTTCCATGCGGGCCCTTCATCGGACCAGGCTGCCTGCCCCA-GTTT
gallus          AGCTGGACCAACCTGTCCAGTGCAGCTACTACATCCAGCTCGCCTGCGTGCCCGATGCCT
                ** *   **  ** **    **  *   ** ***    *  *  *** **** *    *

ovis            AGG-GCAGGCCCACCCAGAGTTCCCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACA
bos             AGG-GCAGGCCCACCCAGAGTTCCCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACG
equus           AAG-GCAGGCCCACCTAGAGTTCCTCAGACCTGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTAAA
sus             AAG-GCTGGCCCGCCCAGAGCGCCCCAGACATGCTGGGTGACTGGCTGGGGCTACTTAAA
gallus          CGCTGCGAGTGT---CAGAGCTCA-CAGAC-TGCTATGTCAGTGGCTGGGGACACATGGG
                    **  *      ****  *  ***** ****  **   *********   * *

ovis            AGAGA-ATGCCCGCAGGA----------CATCCCCTATGCTGCAGGAGGCGCGCGTGGA
bos             TGAGA-ATGCCCGCAGGA----------CATCACCTGTGCTGCAGGAGGCGCATGTGGA
equus           AGAGA-ATGCCCGCAAGA----------CATCACCTATACTGCAGGAGGCGCCTGTGGA
sus             AGAGA-AAGGCCCCAGGA----------CGTCACCTACACTGCAGGAGGCACGTGTGGC
gallus          GCTGAGATCTCTACAGGAATATGTCGAACCATACCGTGTCCTGCAGGAGGCCAAGGTCCA
                   ** *   *  ** **           * *  * *   **********    **

ovis            CCTCATCGACCTCGGCTTGTGTAACTCGACCAGATGGTACAACGGGCGCATTCGT-TCAA
bos             CCTTATCGACCTCGACTTGTGTAACTCGACCAGATGGTACAATGGGCACATTCGT-TCAA
equus           GCTCATCGACCTCGACTTATGTAACTCGACCCAGTGGTACAATGGGCGCATTCGT-TCAA
sus             CCTCATCGACCTCGAATTATGTAACTCGACCCAGTGGTACAATGGGCGTGTCACG-TCAA
gallus          GCTCATTGACCTCAACATCTGCAACAGCAGCAACTGGTATGCTGGGGCTGTCCATATCCA
                 ** ** ******    * ** ***   * *   *****    ***    *     ** *

ovis            CCAACGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
bos             CCAATGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
equus           CCAATGTGTGTGCAGGGTATCCTCAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
sus             CTAATGTGTGCGCAGGGTATCCTAGAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCG
gallus          C-AACGTGTGTGCTGGTTACCCGCAGGGCGGCATCGACACCTGCCAGGGTGACAGCGGTG
                * ** ***** ** ** ** **    ***   ** ************** ******** *

ovis            GGCCTCTCATGTGCAAAGACAGCGCGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC
bos             GGCCTCTCATGTGCAAAGACAGCGTGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC
equus           GGCCTCTCATGTGCAGAGACAGCATGGAAAACGCCTATGTGG-TCGTGGGAGTCACGAGC
sus             GGCCTCTCATGTGCAGAGACAGAGCGGAAAACACCTTTGTGG-TCGTGGGCATCACAAGC
gallus          GTCCTCTCATGTGCAAAGATAAAACTGCTGACTACT-TCTGGCTCATTGGTGTGACCAGC
                * ************* *** *     *   **  ** * *** ** * **  * ** ***

ovis            TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGAGCTAAGCGCCCCGGAGTCTACACGTCTACCTGGTCCTAT
bos             TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGAGCTAAGCGCCCCGGAGTCTACACGTCTACCTGGTCCTAT
equus           TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGTGCTAAGCGCCCTGGAGTCTACACGGCTACCTGGCCCTAT
sus             TGGGGGGTAGGCTGCGCCCGAGCTAAGCGCCCTGGAGTCTACACGTCTACCTGGCCCTAT
gallus          TGGGGGAAAGGCTGTGGGAGAATACAGCAGCCTGGAGTCTATGCCTCCACTCAGTACTTT
                ******  ****** *   *     ***  ** ********  *  * **   *  ** *

ovis            CTGAACTGGATCGCCTCCA-AGATAGGCTCTACCGCCGTGCACATGATTCAGTTGCCCAC
bos             CTGAACTGGATTGCCTCCA-AGATAGGCTCTAACACGGTGCACATGATTCAGTTGCCCAC
equus           CTGAATTGGATTGCTTCCA-AGATCGGTTCTAACGCCTTGCACATGATTCAACTGGGCAC
sus             CTGAACTGGATTGCTTCCA-AGATTGGTTCTAATGCCTTGCAGATGGTTCAACTGGGCAC
gallus          CGCAACTGGATC-CTGGTACAGATGGGATT--GCTTCCAGCAGAAGCGCCTACTACA-AC
                *  ** *****  *    * **** ** *          *** * *   *   *    **

ovis            CGCCTCCCCCGCTTCTACTCCAGGGGCCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTCCAGCCTTCCGT
```

```
bos             CGCTCCCCCTGCTTCTACTCCAGCAGCCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTTCAGCCTTCCAT
equus           CCCTCCCCCTCCTACTACTCAAGCACTCCCGGCTAGACTCCCCTCTATTCAACCT---AT
sus             CCCTCCCCGTCCTTCTACTCCAGCACCCCCTGTCAGACCCCCCTCTGTTCAGACTCCTGT
gallus          GCCATATCCAGTCTATATCTCA--ACCTCCTACCAGA---GGCCAAAACCAACAT---AC
                  *    *       **    *      *     **      *      **   *

ovis            TCG--CCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCTCGACCACCTCCC-----TCTCAGCAAG
bos             TCG--CCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCTCAACCACCTCCC-----TCTCAGCAAG
equus           TCA--CCCTCTTTGGTCCTTCCAACGCCCTCCTCAACCACCTCCC-----CCT-------
sus             TCG--CCCACCTTGGTACTTCCAACGCCCTCCTGGAC--CCTCCCAGCAACCTGGGTC--
gallus          TCGAGCCCATTTAGACCATGCCCAT---TTCCACG-------------------------
                **   ***   * *    * ** *     ***

ovis            CTATTGCCGTGGCCCAA--CCCCTAGATCCCTCAAACCTCCGACCCTC---CATCCCATC
bos             CTATTGCCGTGGCCCAA--CCCTCACGTCCCTCAAGCCCCCGGTCCTC---AGTCCCACC
equus           ----------GGATCA---CCTGCA-----CCCAAACC-CCAACCCCC---AGCCCCACC
sus             CCGCCCCCGCCCCCCAGCTCCCCCCCCTGCCCCGCCCCCCCCGCCCCCCCCACCCCCACC
gallus          -------------CCAG---------------AAGCTCCTGGATTTC-----TTTAATC
                             **                 *  *      *        * *

ovis            TGCCACCCCCTCCCGACGACCACCCCCACCGCAGCCGTCCACTAGGCCTCCCCAGGCGCT
bos             TGCCCCCCGACCCCCACGACCACCCCCACCGCAGCCTTCCACTAGGCCTCCCCAGGCACT
equus           T-----------------CCACCCCCACACCAAACTTCCACCAAACCTCCTCAAGCACT
sus             GCCTCCACCACCCCCACCCCCACCCCCACAGCAAGTTTCCGCTAAACCTCCCCAAGCACT
gallus          TG--------------------CTCCAG---GAGCTCCTGC-AGGGTTTAAGAGGAAAG
                                     * ***          *  * *    *    * *

ovis            CTCCTTTGCCAAGCGACTGCAGCAGCTCATAGAGGTCTTGAAGGGA--AAGGCCTTTCTG
bos             CTCCTTTGCCAAGCGACTGCAGCAGCTCATAGAGGTCTTGAAGGGA--AAGACCTTTCTT
equus           TTCTTTTGCCAAGCGACTACAGCAACTCATAGAGGACTTGAAGGGG--AAGTCCTTTTCG
sus             TTCCTTTGCCAAGCGACTGCAGCAGCTCATAGAG---CTGAAGGGG--ACGGCATTCTCT
gallus          AAAGCTT---AATTAGCTGCA-TGACCCAGAGCAGGCTGCAATGCATTGCGACCCTTTTC
                     **   **    ** **    * ** **        ** *      * *  *

ovis            AACGAAAAG-AGCAGTTATGAAATGGAAACCACAGACCTTCCA-GGACGACACGCCTCCT
bos             AACGAGAAG-AGCAATTATGAAATGGAAACCACAGGCCTTCCA-GGACAACATGCCTCCT
equus           AATGCAAAG-CGCTATTATGAAATGGAGACCACAGACCTCCCA-GAAC------------
sus             AGTGGAAAGGAGCTATTATGAAACAGAGACCACAGACCTCCGAAGAACTGCCCGCCTCCT
gallus          TTTGGGG------TAATGCCCAATGGCAGCCCCAG---TACCA-AAGC---------CCT
                   *          *    **  *   ** ***   * * *    *

ovis            ---GATCTGAGCCCATTCTTGGC------GGACCCAGCGAAGCCCTCACTCCTGAGGGAA
bos             CCTGATCTGAACCCATTCTCAAC------GGACCCAGTGAAGCCCTCACTCCTGAGGGAA
equus           -------TGA--CCGCT-----------------------GCC-----TCCTGA-----
sus             ---GATTTGACCTCATTTTCACCTGATTTGGACCCATTGCACACCTCATCCCTGAGAAAA
gallus          ---GCTCTGT-CCCATCC----------------------ACCCTC-CTCTTGACTGCA
                       **    *                          *      * ***

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

ovis            --------
bos             AAAAAAAA
equus           --------
sus             --------
gallus          --------
```

6.5 Actin Sequenzen

```
ovis            ATGTGTGACGAAGACGAGACCACCGCCCTCGTGTGCGACAATGGCTCTGGCCTGGTGAAA
Bos             ATGTGTGACGAAGACGAGACCACCGCCCTCGTGTGCGACAATGGCTCTGGCCTGGTGAAA
Equus           ATGTGCGACGACGAGGAGACCACTGCCCTGGTATGTGACAACGGCTCTGGGCTGGTGAAG
Sus             ATGTGTGACGAAGACGAGACCACCGCCCTTGTGTGCGACAATGGCTCCGGCCTGGTGAAA
Gallus          ATGTGTGACGAGGACGAGACCACCGCGCTCGTGTGCGACAACGGCTCCGGCCTAGTGAAG
                ***** ***** ** ******** ** ** ** ** ***** ***** ** ** *****

ovis            GCCGGCTTCGCCGGCGACGACGCCCCTAGGGCCGTGTTCCCGTCCATCGTGGGCCGCCCT
Bos             GCCGGCTTCGCCGGCGACGACGCCCCTAGGGCCGTGTTCCCGTCCATCGTGGGCCGCCCT
Equus           GCCGGCTTCGCGGGCGATGATGCGCCCCGCGCTGTCTTCCCGTCCATCGTGGGCCGCCCA
Sus             GCCGGCTTCGCCGGTGACGACGCCCCTAGGGCTGTGTTCCCGTCCATCGTGGGCCGCCCT
Gallus          GCTGGCTTCGCCGGGGATGACGCCCCCAGGGCCGTGTTCCCTTCCATCGTGGGCCGGCCC
                ** ******** ** ** ** ** **  * ** ** ***** ************** **

ovis            CGTCACCAGGGCGTCATGGTGGGCATGGGGCAGAAAGATTCCTACGTGGGAGACGAGGCG
Bos             CGTCACCAGGGCGTCATGGTGGGCATGGGGCAGAAAGATTCCTACGTGGGCGACGAGGCG
Equus           CGCCACCA--------------------------------------------------
Sus             CGCCACCAGGGCGTCATGGTGGGTATGGGTCAGAAAGATTCCTACGTGGGCGACGAGGCT
Gallus          CGCCACCAAGGTGTCATGGTGGGTATGGGTCAGAAGGACTCCTACGTAGGAGATGAAGCT
                ** *****

ovis            CAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCTCAAGTACCCCATCGAGCACGGCATCATCACCAAC
Bos             CAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACTCTCAAGTACCCCATTGAGCACGGCATCATCACCAAC
Equus           ------------------------------------------------------------
Sus             CAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACCCTCAAGTACCCCATCGAGCACGGCATCATCACCAAC
Gallus          CAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACCCTGAAGTACCCCATTGAACACGGCATCATCACAAAC


ovis            TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTCCGCGTGGCCCCC
Bos             TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTCCGCGTGGCCCCC
Equus           -----------------GATCTGGCACCATACCTTTTACAATGAGCTCCGTGTGGCCCCT
Sus             TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTCCGGGTGGCCCCC
Gallus          TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCCCCT
                                  ************ ***** ***** ***** ** ********

ovis            GAGGAGCACCCCACCCTGCTCACCGAGGCGCCCCTCAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAG
Bos             GAGGAGCACCCCACCCTGCTCACCGAGGCCCCCCTCAACCCCAAGGCTAACCGCGAGAAG
Equus           GAGGAGCACCCCACTCTACTCACTGAGGCCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGAGAGAAG
Sus             GAGGAGCACCCCACCCTGCTCACCGAGGCCCCCCTCAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAG
Gallus          GAGGAGCACCCCACCCTGCTCACTGAGGCCCCCCTTAATCCCAAAGCTAACCGTGAAAAG
                ************** ** ***** ***** ***** ** ***** ** ***** ** ***

ovis            ATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACGTTCCGGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCA
Bos             ATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACGTTCCGGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCC
Equus           ATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAATGTCCCCGCCATGTATGTGGCCATCCAGGCA
Sus             ATGACTCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACGTGCCCGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCA
Gallus          ATGACCCAAATCATGTTTGAGACCTTTAACGTGCCCGCCATGTACGTGGCCATCCAAGCT
                ***** ** ***************** ** ** ** ******** *********** **

ovis            GTGCTGTCCCTTTACGCCTCCGGCCGTACCACCGGTATCGTGCTCGACTCCGGCGACGGC
Bos             GTGCTGTCCCTCTACGCCTCCGGCCGTACCACCGGTATTGTGCTCGACTCCGGCGACGGC
Equus           GTGCTGTCCCTGTATGCTTCTGGCCGTACCACAGGCATTGTTCTGGACTCTGGGGATGGT
Sus             GTGCTGTCCCTCTACGCCTCCGGCCGTACCACCGGCATCGTGCTCGACTCTGGCGACGGC
Gallus          GTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGCCGTACCACCGGTATTGTGCTGGACTCCGGCGATGGT
                *********** ** ** ** *********** ** ** ** ** ***** ** ** **




ovis            GTCACCCACAATGTGCCCATCTATGAGGGCTACGCGCTGCCGCACGCCATCATGCGTCTG
Bos             GTCACCCACAATGTGCCCATCTATGAGGGCTACGCGCTGCCACACGCCATCATGCGTCTG
Equus           GTAACTCACAATGTCCCCATCTATGAGGGCTATGCTTTGCCCCATGCCATCATGCGTCTG
Sus             GTCACCCACAACGTGCCCATCTATGAGGGCTACGCGCTGCCACACGCCATCATGCGCCTG
```

```
Gallus          GTGACACACAACGTCCCCATCTATGAAGGGTATGCCCTGCCCCATGCCATCATGCGCTTG
                ** ** ***** ** *********** ** ** **  **** ** ***********  **

ovis            GACCTGGCTGGCCGCGATCTCACCGACTACCTTATGAAGATCCTCACCGAGCGTGGCTAC
Bos             GACCTGGCTGGCCGCGATCTCACCGACTACCTGATGAAGATCCTCACCGAGCGTGGCTAC
Equus           GATCTAGCTGGTCGGGATCTCACTGACTACCTCATGAAGATCCTCACTGAGCGTGGCTAC
Sus             GACCTGGCCGGCCGCGATCTCACCGACTACCTGATGAAGATCCTCACCGAGCGTGGCTAC
Gallus          GATCTGGCTGGCCGCGACCTCACTGACTACCTGATGAAGATCCTGACTGAGCGTGGCTAT
                ** ** ** ** ** ** ***** ******** *********** ** ***********

ovis            TCCTTCGTGACCACAGCTGAGCGCGAGATCGTGCGCGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTAC
Bos             TCCTTCGTGACCACAGCCGAGCGCGAGATCGTGCGCGACATCAAAGAGAAGCTGTGCTAC
Equus           TCCTTTGTCACCACTGCTGAACGTGAAATTGTGCGCGACATTAAAGAGAAGCTGTGCTAT
Sus             TCCTTCGTGACCACAGCTGAGCGCGAGATCGTGCGCGACATCAAGGAGAAGCTATGCTAC
Gallus          TCCTTTGTCACCACAGCTGAACGTGAGATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTAT
                ***** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ******** *****

ovis            GTGGCCTTGGACTTTGAGAACGAAATGGCCACCGCCGCCTCCTCCTCCTCCCTGGAGAAG
Bos             GTGGCCTTGGACTTTGAGAACGAAATGGCCACCGCCGCCTCCTCCTCCTCCCTGGAGAAG
Equus           GTTGCCCTGGATTTTGAGAATGAGATGGCCACGGCTGCTTCTTCCTCCTCCCTGGAGAAG
Sus             GTGGCCCTGGACTTCGAGAACGAGATGGCCACCGCCGCCTCCTCCTCCTCCCTGGAGAAG
Gallus          GTGGCTCTGGACTTTGAGAACGAGATGGCCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCTTGGAGAAG
                ** **  **** ** ***** ** ******** ** ** ** ********* ********

ovis            AGCTACGAGCTGCCCGACGGTCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGCTGCCCG
Bos             AGCTACGAGTTGCCCGACGGTCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGCTGCCCG
Equus           AGTTATGAACTGCCTGATGGCCAAGTCATCACTATTGGCAACGAGCGCTTCCGCTGCCCT
Sus             AGCTACGAGCTGCCAGACGGCCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGCTGCCCG
Gallus          AGCTATGAGCTGCCTGATGGGCAGGTCATCACCATCGGCAATGAGCGTTTCCGCTGCCCA
                ** ** **  **** ** ** ** ******** ** ***** ***** ***********

ovis            GAGACGCTCTTCCAGCCCTCATTCATTGGCATGGAATCGGCGGGCATCCACGAGACCACC
Bos             GAGACGCTCTTCCAGCCCTCGTTCATCGGCATGGAATCGGCGGGAATCCATGAGACCACC
Equus           GAGACACTCTTCCAGCCCTCCTTCATTGGTATGGAATCTGCTGGCATCCATGAAACGACT
Sus             GAAACGCTCTTCCAGCCCTCCTTCATCGGCATGGAGTCGGCGGGCATCCATGAGACTACC
Gallus          GAAACCCTCTTCCAGCCTTCCTTCATTGGTATGGAGTCCGCTGGGATCCATGAGACAACT
                ** ** *********** ** ***** ** ***** ** ** ** ***** ** ** **

ovis            TACAACAGCATCATGAAGTGCGACATCGACATCCGGAAGGACCTGTACGCCAACAACGTC
Bos             TACAACAGCATCATGAAGTGCGACATCGACATCAGGAAGGACCTGTACGCCAACAACGTC
Equus           TATAATAGCATCATGAAGTGTGACATTGATATCCGCAAGGACCTGTATGCCAACAATGTC
Sus             TACAACAGCATCATGAAGTGCGACATCGATATCAGGAAGGACCTGTACGCCAACAATGTC
Gallus          TACAACAGCATCATGAAATGCGACATTGACATCAGGAAGGACCTGTATGCCAACAACGTC
                ** ** *********** ** ***** ** *** * *********** ******** ***

ovis            ATGTCTGGGGGCACCACCATGTACCCGGGCATCGCCGACCGCATGCAGAAGGAGATCACC
Bos             ATGTCTGGGGGCACCACCATGTACCCGGGCATCGCCGACCGCATGCAGAAGGAGATCACC
Equus           TTATCTGGAGGTACTACCATGTACCCTGGTATCGCTGATCGCATGCAGAAGGAAATCACT
Sus             ATGTCAGGGGGCACCACCATGTACCCGGGCATCGCTGACCGCATGCAGAAGGAGATCACC
Gallus          ATGTCTGGGGGTACCACCATGTACCCAGGTATTGCTGACCGCATGCAAAAGGAGATCACA
                 * ** ** ** ** *********** ** ** ** ** ******** ***** *****

ovis            GCCCTGGCCCCCAGCACCATGAAGATCAAGATCATCGCCCCACCTGAGCGCAAGTATTCC
Bos             GCCCTGGCCCCCAGCACCATGAAGATCAAGATCATCGCCCCACCTGAGCGCAAGTATTCC
Equus           GCCCTGGCTCCCAGCACCATGAAGATTAAGATTATTGCTCCCCCTGAGCGCAAGTACTCT
Sus             GCTCTGGCCCCCAGCACCATGAAGATCAAGATCATCGCCCCGCCGGAGCGCAAGTACTCC
Gallus          GCCCTGGCCCCCAGCACAATGAAGATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGCAAGTACTCT
                ** ***** ******** ******** ***** ** ** ** ** *********** **

ovis            GTGTGGATCGGCGGCTCCATCCTGGCTTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCACC
Bos             GTGTGGATCGGTGGCTCCATCCTGCGTTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCACC
Equus           GTCTGGATCGGGGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGC
Sus             GTGTGGATCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCACC
Gallus          GTCTGGATCGGTGGCTCCATCTTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCACA
                ** ******** ********* **   ** **************************
```

```
ovis            AAGCAGGAGTACGACGAGGCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG
Bos             AAGCAGGAGTACGACGAGGCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG
Equus           AAGCAGGAGTACGATGAGGCAGGCCCGTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAA
Sus             AAGCAGGAGTACGACGAGGCCGGCCCATCTATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAA
Gallus          AAGCAGGAGTATGATGAAGCCGGCCCATCCATTGTCCACCGTAAATGCTTCTAA
                *********** ** ** ** ***** ** ** ******** ***********
```

6.6 Primersequenzen für Acrosin und Actin

Tier u. Primerart	Primersequenzen	Länge der zu erwartenden PCR-Produkte
ovis-for	CCT CAA ACC TCC GAC CCT CCA (21 bp)	214 bp
ovis-rev	GCT CAG ATC AGG AGG CGT GTC (21 bp)	
bos-for	CTC AAG CCC CCG GTC CTC AG (20 bp)	214 bp
bos-rev	TCA GAT CAG GAG GAG GCA TGT T (22 bp)	
sus-for	CCC CCT CTG TTC AGA CTC CTG T (22 bp)	366 bp
sus-rev	TTC TCA GGG ATG AGG TGT GCA A (22 bp)	
equus-for	GAC TCC CCT CTA TTC AAC CTA TTC A (25 bp)	266 bp
equus-rev	GGA GGC AGC GGT CAG TTC TG (20 bp)	
gallus-for	GGG AAA GGC TGT GGG AGA ATA C (22 bp)	392 bp
gallus-rev	TGG GGC TGC CAT TGG GCA TTA (21 bp)	
mam-actin-for	GGC ATC ACA CTT TCT ACA ACG AGC T (25 bp)	ca. 410 bp
mam-actin rev	CGA CGT AGC ACA GCT TCT CCT TGA T (25 bp)	

7 Selbstständigkeitserklärung

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

Bochum, 15.12.13

(Leonie Bosl)