FACHARBEIT

im Leistungskurs Biologie

Thema: "Ist im Döner drin, was drauf steht?"

Nachweis von Fleischsorten auf molekularbiologische Weise in einem beliebten Lebensmittel

Verfasser/in: Leonie Tara Kursleiter: Frau Wirbals

Bearbeitungszeit: 04.11.2013 – 02.12.2013

Abgabetermin: Montag, 02.12.2013, 12.00 Uhr

<u>Inhaltsverzeichnis</u>

1.	Einleitung	. 3
2.	Methoden	. 4
	2.1 Arbeiten mit Gendatenbank und DNA-Analyse-Software	4
	2.2 Primer Identifizierung und Bestellung	4
	2.3 Extraktion von DNA aus Tiergewebe	4
	2.4 Reinigung isolierter DNA	5
	2.5 Alternative DNA Aufarbeitung	5
	2.6 PCR	7
	2.7 Agarosegelelektrophorese	8
	2.8 Durchführung der Versuche	8
3.	Ergebnisse und Diskussion	10
4.	Zusammenfassung	15
5.	Literaturverzeichnis	16
6.	Anhang	17
7.	Eigenständigkeitserklärung	35

1. Einleitung

Ziel meiner Facharbeit ist es Fleisch aus Lebensmitteln bzw. genauer eines Döners auf dessen Zusammensetzung hin zu untersuchen und den entsprechenden Versuchsverlauf so zu protokollieren, dass er auch von Schülern im Großpraktikum durchgeführt werden kann. Um die Zusammensetzung des verwendeten Fleisches zu untersuchen, identifiziere ich artspezifische Gensequenzen mit Hilfe der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) und amplifiziere sie mittels der Polymerase-Kettenreaktion. Die Facharbeit und das allgemeine Verfahren basiert auf den Ergebnissen einer an der Uni-Hohenheim angefertigten Facharbeit (SCHALLER 2013).

Ich wurde motiviert dieses Thema zu behandeln, als ich einen Artikel über einen Pferdefleischskandal gelesen habe (SPIEGEL ONLINE 2013 a, Anhang G). In einer Tiefkühllasagne, die eigentlich nur aus Rindfleisch bestehen sollte, wurde Pferdefleisch gefunden. Ich habe mich gewundert, ob wohl auch in anderen Fleischprodukten teilweise Fleischsorten verwendet werden, die von den jeweiligen Herstellern oder Verkäufern nicht angegeben werden. Von der Auswahl an Fleischprodukten interessierte mich besonders der Döner, der aus islamisch-religiösen Gründen ohne Schweinefleisch hergestellt werden muss. Auch in aktuellen Artikeln wird auf Lebensmittelskandale hingewiesen (SPIEGEL ONLINE 2013b, Anhang H).

Zusammen mit einer Gruppe von Schülern und einem Lehrer überlegte ich, wie man den Inhalt des Dönerfleisches am besten untersuchen könnte. Wir kamen zu dem Entschluss, dass dies mit der Methode PCR am besten funktioniert. Mithilfe der PCR kann ein bestimmtes Gen verglichen werden, dass in allen Tieren vorkommt, jedoch nicht in allen Tieren identisch ist. So kann durch einen Vergleich dieser Gene festgestellt werden, welche Fleischsorten sich in einem Döner befinden.

Für den Versuch traf ich mich eine Woche jeden Tag mit einer Schülergruppe und einem Lehrer in dem Chemielabor meiner Schule, der Schiller-Schule Bochum.

Für die praktische Durchführung des Versuchs verwendete ich nicht nur Dönerfleisch, sondern auch Hühner-, Schweine-, Rind- und Lammfleisch sowie zwei verschiedene Arten von Wurst: Geflügel- und Pferdewurst als Vergleich.

Ich erwarte, dass ich am Ende meines Experimentes beweisen kann, ob der Döner tatsächlich aus Rindfleisch besteht. So könnte ich auch nachweisen, ob ein Betrug vorliegt oder nicht. Ich identifiziere dazu ein Gen, das in den untersuchten Fleischsorten von Schwein, Huhn, Pferd, Rind und Lamm unterschiedlich ist und unterscheide so verschiedene Tiere mithilfe von genspezifischen Primern. Außerdem erwarte ich, dass der Versuchsablauf nach dem Experiment an die schulische Ausstattung so angepasst werden kann, dass dieser Versuch auch mit Schulklassen durchgeführt werden kann.

2. Methoden

2.1 Arbeiten mit Gendatenbank und DNA-Analyse-Software

"NCBI-Datensystem"

"NCBI" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ist eine Datenbank, in der sämtliche DNA-Sequenzen, die jemals publiziert wurden, verzeichnet sind. Benutzt wird dieses Programm zum Beispiel, um zu einem Protein die dazugehörige Gensequenz zu finden. Spezies und Proteinname müssen angegeben werden, um den entsprechenden Datenfile zum Gen zu bekommen. Außerdem können auch Nukleotide, Genom-Sequenzen oder systematische Einordnungen in einen Stammbaum angegeben werden.

NCBI kann auch Autoren und Publikationen zu gesuchten Genen angeben sowie die Lage des Gens innerhalb des Genoms, den Bereich der mRNA und die Aminosäurensequenzen aufrufen. Diese Sequenzen werden abschließend als FASTA-Format abgespeichert, welches zur Darstellung und Speicherung der Primärstruktur von Nukleinsäuren und Proteinen dient.

Sequenz-Alignment

Um ein Sequenz-Alignment zu erstellen, können die mRNA-Sequenzen (hier von Aktin und Akrosin) mit Hilfe des Programms "ClustalW" (http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html) miteinander verglichen werden. Die entsprechenden Parameter können unverändert übernommen werden.

2.2 Primer Identifizierung und Bestellung

Die Primer-Identifizierung erfolgt anhand der durch "ClustalW" erzeugten Alignments der FASTA-Sequenzen (s. 2.1). Die so identifizierten Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG bestellt. Die Sequenzen dieser Akrosin- und Aktin-Primer befinden sich im Anhang C.

2.3 Extraktion von DNA aus Tiergewebe

Die Extraktion der DNA dient dazu, die DNA aus einem Teil eines Organismus zu separieren.

Um die DNA einer eukariotischen Zelle zu extrahieren, werden jeweils 2 Gramm einer

Fleischsorte abgewogen und jeweils mit 1ml Spülmittel, einer Spatelspitze Waschpulver und einer Spatelspitze Kochsalz in einer Mörserschale homogenisiert. Dann wird dem Homogenat 9ml Wasser zugefügt. Diese Mischung wird wiederum homogenisiert und in ein Reagenzglas gefüllt. Danach wird das Homogenat für 15 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend filtriert. Die Probe wird nun im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem EtOH überschichtet und es sollten, nach fünfminütigem Warten, verschiedene Phasen im Gefäß zu erkennen sein. Die DNA-Fäden, die sich an der Phasengrenze bilden, werden mit einer Tropfpipette entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Anschließend wird die DNA für 5 Minuten bei 10.000 rpm (rounds per minute) abzentrifugiert, so dass sich wieder zwei verschiedene Phasen bilden: der Überstand und das DNA Sediment. Für die weitere Vorgehensweise ist der Überstand nicht mehr relevant, weshalb dieser verworfen wird. Das DNA-Sediment wird jedoch für 5 Minuten bei 35 °C getrocknet.

2.4 Reinigung isolierter DNA

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgt anschließend eine Reinigung der DNA, um mögliche Störungsfaktoren bei der späteren PCR, wie zum Beispiel Proteine, zu entfernen. Nachdem das DNA-Sediment (s. 2.3) getrocknet ist, wird es mit 650 µl destilliertem Wasser aufgenommen und resuspendiert. Je 500 µl Phenol und Chloroform werden nun zu der DNA-Lösung hinzugefügt. Das Eppendorf-Gefäß wird kräftig geschüttelt und anschließend bei 10.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert, die obere Phase abgenommen, die untere verworfen.

Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Beim letzten Durchgang wird der Überstand abgenommen und mit 500µl Chloroform versetzt. Dann wird das Gefäß wieder geschüttelt und zentrifugiert.

Nach der letzten Zentrifugation wird die obere Phase abgenommen und mit der 1,5-fachen Menge des Volumens an EtOH gefällt und für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Es bilden sich wieder zwei Phasen, von denen die EtOH-Phase verworfen und das Sediment für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet wird. Anschließend wird das Sediment in 100 µl Wasser aufgenommen.

2.5 Alternative DNA Aufarbeitung

2.5.1 NaOH-Methode

Zu Beginn wird eine Menge von 0,2 Gramm Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt und

in diesem mit einem Mikropistill zerrieben. Es werden 800 µl von 50mM NaOH hinzugefügt, um anschließend das Fleisch mit dem zugefügten NaOH nochmals vorsichtig zu zerreiben. Danach erfolgt eine Inkubation dieses Gemisches für eine halbe Stunde bei 95°C. Dem Eppendorf-Gefäß werden 200 µl 0,5 Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 8.0 hinzugegeben, und anschließend wird es für zwei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Es folgt eine Phenol-Chloroformextraktion (s. 2.4), bei welcher im Verhältnis 1:1 Phenol und Chloroform hinzugefügt wird. Nach einer erneuten Zentrifugation wird die obere der beiden Phasen, die sich gebildet haben sollten, abgenommen. Dieser wird nun wieder im Verhältnis 1:1 Chloroform hinzugefügt.

Anschließend teilt man den Inhalt des Eppendorf-Gefäßes in zwei gleich große Mengen, die in zwei neue Eppendorf-Gefäße gefüllt werden. Die DNA des einen wird so als Template für die PCR eingesetzt. Die DNA des anderen Gefäßes wird zuvor mit zwei Volumen EtOH gefällt und für zehn Minuten bei Maximal-Geschwindigkeit zentrifugiert. Dann wird das Sediment getrocknet und in Wasser aufgenommen.

2.5.2 Hexan-NaOH-SDS - Methode

Bei dieser Methode gibt man zuerst 0,2 Gramm Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß, zerreibt dieses mit einem Mikropistill, fügt 500 µl Hexan hinzu und zerreibt alles ein weiteres mal. Die Hexanphase wird verworfen. Zum Rückstand gibt man 500 µl SDS-NaOH-Lösung (10% SDS, 0,2M NaOH) hinzu und schüttelt das Gefäß kräftig. Das Homogenat wird für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sollten 3 Phasen zu erkennen sein, von denen die untere Phase abgenommen wird und dieser 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt wird. Danach wird alles für 30 Minuten bei 65°C inkubiert und nochmals 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (s. 2.4). Es werden als erstes Phenol und Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Dann wird alles wieder zentrifugiert und die wässrige obere Phase im Eppendorf-Gefäß wird wieder abgenommen. Diesmal wird nur Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Das Eppendorf-Gefäß wird wiederholt zentrifugiert und die wässrige Phase wird erneut abgenommen. Nun trennt man die Probe in zwei gleich große Teile auf: Die DNA des einen wird direkt als Template für die PCR eingesetzt. Die andere DNA-Probe wird mit EtOH gefällt, bevor auch sie nach Aufnahme in Wasser als DNA-Template für die PCR benutzt wird.

2.5.3 "Tail"-Extraktion

Zu Beginn wird auch in dieser Methode 0,2 Gramm Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit einem Mikropistill zerrieben. Sobald ein Homogenat entstanden ist, folgt die Zugabe von 450 µl eines Tail-Puffers und 20µl Proteinase K (20 mg/ml). Nach dieser Zugabe wird das Gemisch für mindestens 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend werden 200 µl Kaliumacetat hinzugefügt und alles wird kräftig geschüttelt. Dann wird das Eppendorf-Gefäß für fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der daraus entstandene Überstand (ca. 500 µl) wird in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 800 µl Isopropanol überschüttet. Nach dieser Zugabe wird die Probe zuerst geschüttelt und dann zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sollten sich zwei Phasen bilden: Ein dünnes Sediment und eine flüssige Phase. Die flüssige Phase wird verworfen. Auf das zurückgebliebene Sediment werden 600 µl Ethanol gegeben und das Gefäß wird vorsichtig invertiert. Dann wird es für drei Minuten wiederum bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird danach erneut verworfen, das Sediment getrocknet und später in Wasser aufgenommen.

2.6 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Englisch: Polymerase-Chain-Reaction [PCR]) dient der exponentiellen Amplifikation von DNA. DNA Spuren, die nicht ausreichend für eine weitere Untersuchung sind, können mithilfe dieser Methode vermehrt werden.

Zur Vorbereitung stellt man ein einen PCR-Ansatz aus einem Puffer (sorgt für das pH-Optimum der Enzyme), dNTP's (Nukleotide), forward und reverse Primer, H₂O, Taq-Polymerase und einem DNA-Template zusammen. Nach der Fertigstellung des PCR-Ansatzes wird dieser in einem 0,2 ml Eppendorfgefäß in einen Thermocycler platziert, in dem er eine Folge zyklischer Temperaturänderungen bestimmter Dauer in Form drei verschiedener Phasen durchläuft.

In der ersten Phase, der so genannten Denaturierung, wird das Homogenat auf 95°C erhitzt, um die Wasserstoffbrücken, welche die zwei Stränge der DNA Doppelhelix zusammenhalten, aufzuspalten. Die durch diesen Vorgang entstandenen Einzelstrang-Matritzen dienen nun zur Synthese der neuen DNA.

Die darauf folgende Hybridisierung, die zweite Phase, ist ein Vorgang, in dem künstliche Primer an die zu amplifizierenden DNA-Strangenden angelagert werden. Während dieser Anlagerung wird die Temperatur gesenkt. Es wird versucht, dass zu dem jeweiligen Primer gehörende Temperaturoptimum zu erreichen, welches meist zwischen 50°C und 60°C liegt. Dieses Temperaturoptimum ermöglicht wieder eine Bindung

komplementärer DNA Stränge. Das Einhalten dieses Temperaturoptimums ist sehr wichtig, denn falls die Temperatur zu hoch einstellt werden würde, könnte keine Bindung der Primer erfolgen und wenn die Temperatur zu niedrig ist, kann es zu einer unspezifischen Bindung der Primer kommen. Dies würde bedeuten, dass die Basenpaarung nicht komplett komplementär ist.

In der dritten und letzten Phase, der Elongation, findet die Verlängerung des DNA-Abschnittes statt. Die Primer werden verlängert und die komplementären Stränge werden von der Taq-Polymerase, aus den dNTP's, synthetisiert. Die Temperatur beträgt hierbei 72°C. Anschließend werden die DNA Moleküle wieder getrennt und der Zyklus wird von neuem wiederholt (s. Anhang E).

Wenn die PCR schließlich endet, wird das Homogenat auf 8°C gekühlt und kann anschließend dem Thermocycler entnommen werden.

2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese hilft die DNA Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Als erstes wird ein 2% Agarosegel angefertigt, wozu 150ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) abgemessen werden und zusammen mit 3g Agarose in einer Mikrowelle erhitzt wird, bis die Agarose geschmolzen ist. Nachdem die Flüssigkeit auf 55°C abgekühlt ist, wird diese in den abgedichteten Gelschlitten mit 2 Kämmen gegossen. Nach Erstarrung der Agarose werden die Kämme entfernt, so dass 40 Geltaschen entstehen und das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gegeben werden kann. Der vorher extrahierten und gereinigten DNA werden 9 µl entnommen und auf einen Parafilmstück gesetzt. Zu den 9µl der DNA wird jeweils 1µl Farbstoff (Xylencyanolblau) hinzugefügt. Beides wird vermengt durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Dann wird die DNA in die Geltasche des negativen Endes des Gels pipettiert.

Anschließend erfolgt die Elektrophorese bei 125 Volt über einen Zeitraum von 45 Minuten, bei der die DNA durch das Gel vom negativen zum positiven Pol wandert. Abschließend wird das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt, um die DNA unter UV-Licht sehen zu können (s. Anhang F).

2.8 Durchführung der Versuche

Vorbild für die Durchführung dieser Facharbeit waren die Untersuchungen von SCHALLER (2013), die Experimente zur Darstellung von DNA mit Hilfe des Aktin- und des Akrosinproteins machte. SCHALLERs Arbeit hatte nicht nur das Ziel unterschiedliche Fleischproben zu identifizieren, sondern sie sollte auch als Experimentier-Vorlage

für andere Biologie-Kurse dienen.

In der vorliegenden Facharbeit wurde daher SCHALLERs Vorgehensweise nachvollzogen und um eigene Experimente ergänzt. Diese dienten dazu weitere Lebensmittelproben zu untersuchen und die Nachvollziehbarkeit der Arbeiten für Biologie-Grundkurse auszuprobieren und darzustellen.

Die Experimente wurden mit Hilfe von Aktin- und Akrosingenen durchgeführt. Das Aktingen wurde in diesen Versuchen als Kontrollgen ausgewählt, da es in allen hier untersuchten Tierarten konserviert d. h. wenig mutiert vorliegt. Das Akrosingen hingegen, das an der sexuellen Vermehrung beteiligt ist, liegt nicht konserviert vor und weist abweichende Sequenzen auf (Gatesy, J. & W. J. Swanson 2007). Es ist daher sehr gut geeignet bei genetischen Untersuchungen unterschiedliche Tierarten anzuzeigen.

Die DNA-Sequenzen der codierenden Bereiche der Gene wurden über die NCBI Datenbank mit Hilfe der Suchbegriffe "Akrosin" bzw. "Aktin" und der jeweiligen Tierspezies (z.B. equus für Pferd) identifiziert.

Die codierende Sequenz ("cds") wurde als Fasta-Format abgespeichert und mit dem Programm "Clustal W" aligniert. Die Sequenzen-Alignments (s. Anhang B und H) zeigen eindeutig, dass es sich bei dem Aktin um ein konserviertes Gen handelt, während das Akrosin teilweise starke Sequenzunterschiede aufweist. Für sämtliche der hier betrachteten Aktin-DNA's wurde lediglich ein Primerpaar für die spezifische Amplifikation der Akrosin-DNA's ausgewählt, die spezifisch für die einzelnen Spezies sind (s. Anhang C und Facharbeit SCHALLER 2013, S.19).

Wie auch in der Facharbeit von SCHALLER (2013) musste für den ersten Teil des Experiments die DNA aus den 8 Fleischproben (Dönerfleisch, Schweinefleisch, Rind, Hühnerfleisch, Lamm sowie anfangs auch noch Geflügelwurst, Pferdewurst und Pferdefleischwurst) extrahiert werden. Dabei wurden verschiedene Methoden der Extraktion angewandt (s. 2.3 – 2.5). Anschließend wurde eine PCR angesetzt, damit die Fleischproben untersucht werden können. Nachdem die Isolierung der DNA als Präzipitat fertig gestellt war, wurde diese getrocknet und mit steril filtriertem Wasser übergossen und gelöst. Bevor die PCR gestartet wurde, wurde als Erstes eine Gelelektrophorese der extrahierten DNA's gestartet. Hierdurch kann man sehen, ob die DNA-Extraktion bei allen Fleischsorten gleichermaßen funktioniert hat. Um die Ergebnisse auswerten zu können, wurde eine Fotografie der Banden unter UV-Licht angefertigt (s. 3).

Dann wurde die DNA mit der PCR Reaktionslösung gemischt, die vorher vorbereitet werden musste. Um die Genauigkeit der Versuchsergebnisse zu erhöhen, wurde ein

Mastermix der Inhaltsstoffe angefertigt. Der Aktinprimer wurde eingesetzt um zu kontrollieren, ob die DNA-Extraktion gelungen ist und zu sehen, ob die PCR funktioniert hat. Denn es sind bei korrekter Behandlung der Proben bei allen Fleischsorten Banden bzw. Verlaufsspuren zu erwarten. Mit Hilfe der außerdem verwendeten tierartspezifischen Akrosinprimer lässt sich zeigen, von welcher Tierart das Fleisch stammt, das in Döner oder Wurst enthalten ist.

Die DNA Proben wurden zusammen mit dem Reaktionsgemisch in ein Gefäß gefüllt und in den Thermocycler gesetzt. Nachdem die PCR fertig war, wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt und wieder eine Fotografie der Banden unter UV-Licht gemacht um die Ergebnisse auswerten zu können.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Elektrophorese werden in den drei Abbildungen 1 bis 3 dargestellt. Der in allen Abbildungen aufgeführte Größenmarker zeigt die Laufweite der durch die Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente.

Abb. 1 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese nach der DNA-Extraktion. Wie man auf dem Bild sieht, erkennt man beim Schwein, Lamm, Huhn, der Geflügelwurst und dem Rind eine helle Spur. Dies bedeutet, dass die DNA dieser Fleischsorten erfolgreich extrahiert worden ist. Dies ist allerdings nicht bei allen Fleischsorten aufgetreten, obwohl dies zu erwarten war. Der Grund hierfür kann mehrere Ursachen haben. Es könnte zum Beispiel an einer Verunreinigung der Proben, an einer ungenauen Abfolge der Versuchsschritte oder an der falschen Ausführung der Extraktionsmethode gelegen haben.

Obwohl nicht alle Fleischsorten sichtbare Elektrophorese-Spuren aufweisen, wurde die PCR dennoch mit allen Fleischsorten durchgeführt, in der Hoffnung auf eventuelle Ergebnisse.

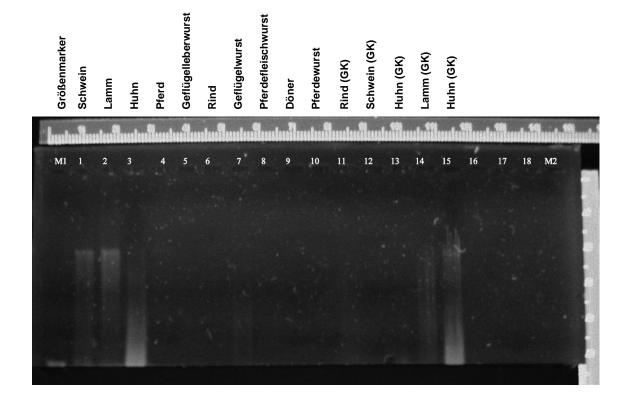


Abb. 1: Gelelektrophorese nach DNA-Extraktion (genomische DNA)

M1 Größenmarker; 1 Schwein; 2 Lamm; 3 Huhn; 4 Pferd; 5 Geflügelleberwurst; 6 Rind; 7 Geflügelwurst; 8 Pferdefleischwurst; 9 Döner; 10 Pferdewurst; 11 Rind (Testprobe Grundkurs); 12 Schwein (Testprobe Grundkurs); 13 Huhn (Testprobe Grundkurs); 14 Lamm (Testprobe Grundkurs); 15 Huhn (Testprobe Grundkurs); 0,6%iges Agarosegel in TAE. Ethidiumbromid gefärbt

Das zweite Bild zeigt das Ergebnis der PCR der verschiedenen DNA's sowohl mit den Primern des Aktingens als auch mit den spezifischen Primern des Akrosingens. Durch die Durchführung der PCR mit Aktinprimer wird ersichtlich, welche DNA-Matrizen im Versuch gut funktioniert haben und welche nicht brauchbar sind. Deutliche Banden sind fast bei jeder Fleischsorte bei der Durchführung mit Aktinprimer zu sehen. Nur beim Lamm, Rind und bei der Pferdewurst ist keine Bande zu sehen. Trotzdem weist der Durchlauf mit dem Akrosingen als spezifischem Primer beim Lamm eine Bande auf. Wahrscheinlich ist beim Vorbereiten der Aktinkontrolle beim Lamm etwas falsch zusammengesetzt worden. Auch ein paar der anderen Fleischsorten weisen in der Durchführung mit den spezifischen Primern Banden auf. Dazu gehören Pferd, Huhn und Döner.

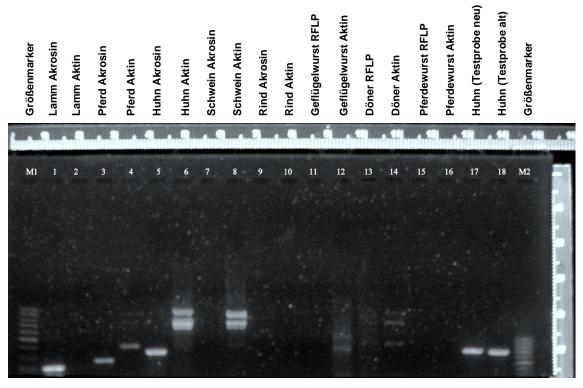


Abb. 2: Gelelektrophorese nach PCR mit Einsatz von Akrosin- (tierspezifische Primer) und Aktin-Primern

M1 Größenmarker, 1 Lamm Akrosin, 2 Lamm Aktin, 3 Pferd Akrosin, 4 Pferd Aktin, 5 Huhn Akrosin, 6 Huhn Aktin, 7 Schwein Akrosin, 8 Schwein Aktin, 9 Rind Akrosin, 10 Rind Aktin, 11 Geflügelwurst RFLP / tierunspezifisch, 12 Geflügelwurst Aktin, 13 Döner RFLP, 14 Döner Aktin, 15 Pferdewurst RFLP, 16 Pferdewurst Aktin, 17 Huhn (Testprobe Schaller neu), 18 Huhn (Testprobe Schaller alt), M2 Größenmarker;

1,8%iges Agarosegel in TAE, Ethidiumbromid gefärbt (Anmerkung zu 11, 13 und 15: das RFLP-Verfahren wird in einer anderen Facharbeit erläutert)

Durch die Ergebnisse der ersten PCR stellt sich heraus, welche DNA erfolgreich extrahiert worden ist, welche Primer funktioniert haben und welche Banden die jeweiligen Fleischsorten aufweisen. Um herauszufinden, welche der oben getesteten Fleischsorten letztendlich im Döner enthalten sind, muss noch eine weitere PCR durchgeführt werden, in welcher der Döner mit den jeweiligen spezifischen Primer des Acrosingens der unterschiedlichen Fleischsorten getestet wird. So kann aus der nächsten PCR geschlossen werden, welche Fleischsorten womöglich im hier getesteten Dönerfleisch enthalten sind.

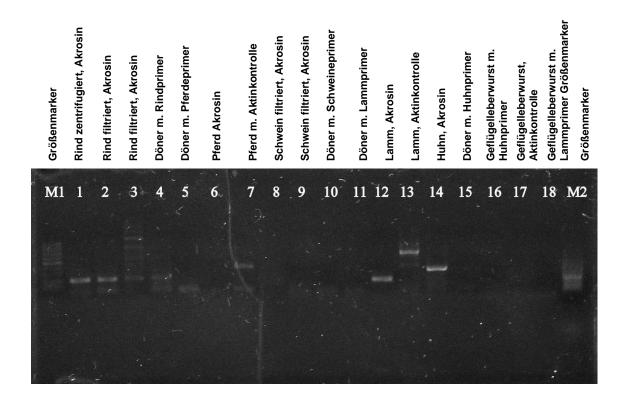


Abb. 3: Gelelektrophorese nach PCR. Untersucht wurde insbesondere Döner mit den verschiedenen tierspezifischen Primern

M1/M2: Größenmarker, 1 Rind zentrifugiert, Akrosin, 2 Rind filtriert, Akrosin, 3 Rind filtriert, Akrosin, 4 .Döner mit Rindprimer, 5 Döner mit Pferdeprimer, 6 Pferd Akrosin, 7 Pferd mit Aktinkontrolle, 8 Schwein filtriert, Akrosin, 9 Schwein filtriert, Akrosin, 10 Döner mit Schweineprimer, 11.Döner mit Lammprimer, 12.Lamm, Akrosin, 13.Lamm, Aktinkontrolle, 14.Huhn, Akrosin, 15 Döner mit Huhnprimer, 16 Geflügelleberwurst mit Huhnprimer, 17 Geflügelleberwurst, Aktinkontrolle, 18 Geflügelleberwurst mit Lammprimer:

1,8%iges Agarosegel in TAE, Ethidiumbromid gefärbt

In Abbildung 3 erkennt man nun verschieden gute Ergebnisse, mit denen nachgewiesen werden kann, welche Fleischsorten sich im Dönerfleisch befinden. In den ersten drei Spuren, die mit der DNA des Rindes gefüllt sind, liegen eindeutige Ergebnisse vor: Die Banden sind deutlich zu erkennen. In der vierten befindet sich die DNA des Döners und den spezifischen Akrosinprimer des Rindes. Zu erkennen sind zwei Banden, die genauso aussehen wie die Banden in Spur 1 und 2. Das Ergebnis beweist also, dass sich im Döner Rindfleisch befindet. In den nächsten drei Spuren wurde die Döner-DNA auf Pferdefleisch getestet. In Spur 5, in der sich die Döner-DNA mit den spezifischen Primern des Pferdes befindet, sind ebenfalls deutliche Banden zu erkennen, was bedeuten würde, dass sich auch Pferdefleisch im Döner befindet. Doch weist die Spur daneben, in der sich die Pferde-DNA mit dessen spezifischen Primern befindet, keine

Banden auf. Also kann kein sicherer Nachweis von Pferdefleisch im Döner erbracht werden. Da die Kontrolle mit dem Aktinprimer (Spur 7) positiv ist, könnte es sein, dass Probe 5 und 6 vertauscht wurden.

In Spuren 8-11 sind keine Banden zu erkennen. In Spur 8 befindet sich die Probe der Döner-DNA zusammen mit den spezifischen Primern des Schweines. Auch hier ist das Ergebnis, dass sich kein Schweinefleisch im Döner befindet. Doch konnte dies nicht klar nachgewiesen werden, da Spur 9 und 10, die mit der DNA des Schweines und dessen spezifischen Primern gefüllt waren, auch keine Banden aufweisen, jedoch eigentlich Banden hätten aufweisen müssen. In Spur 11, die wieder mit der DNA des Döners aber diesmal zusammen mit den spezifischen Primern des Lamms gefüllt ist, befinden sich keine Banden. Dies liefert einen eindeutigen Beweis, dass sich kein Lammfleisch im Döner befindet, da Spuren 12 und 13, die mit der DNA des Lamms und dessen spezifischen Primern gefüllt waren, Banden aufweisen. Spuren 14 und 15 liefern den Beweis, dass sich auch kein Hühnerfleisch im Döner befindet: Da Spur 14, Huhn DNA mit dessen spezifischen Primern, eine deutlich erkennbare Bande aufweist aber Spur 15, Döner-DNA mit Huhn spezifischen Primern, keine Bande aufweist.

So konnte insgesamt ein eindeutiger Beweis gefunden werden, dass sich im untersuchten Döner Rindfleisch befand, aber kein Hühnerfleisch und kein Lammfleisch. Der Test mit den spezifischen Primern des Schweins verlief sowohl beim Döner als auch bei den tatsächlichen Schweinefleischproben negativ. In diesem Teil kann also das Ergebnis nicht bewertet werden.

Auch beim Test auf Pferdefleisch gab es ein unerwartetes Ergebnis, weil der Döner mit den spezifischen Primern des Pferdes Banden aufwies, das getestete Pferdefleisch selbst aber nicht. Pferdefleisch kann jedoch als Bestandteil des getesteten Döners ausgeschlossen werden, da sich in den Elektrophoresen mit durch anderen Methoden aufbereiteten Fleischproben keine Hinweise auf Pferdefleisch ergaben (s. Anhang I).

Der erfreuliche Teil des Ergebnisses ist, dass nur Rindfleisch eindeutig als Bestandteil des getesteten Döners nachgewiesen werden konnte, denn es sollte ja ein Kalbsfleisch-Döner sein. Der weniger erfreuliche Teil ist jedoch, das Schweinefleisch als Bestandteil auf Grundlage dieser Versuche nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnte.

Da die Primer auch bei den Schweinefleischproben nicht reagiert haben, liegt der Fehler möglicherweise in der Qualität oder falschen Behandlung der Primer. Hier wäre zur Vervollständigung des Ergebnisses ein erneuter Test erforderlich, der aber nur noch Schweinefleisch und Döner vergleichen muss.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine sehr sorgfältige Aufbereitung der Proben und eine saubere Versuchsdurchführung erforderlich sind, um eindeutige Ergebnisse zu erzielen. Sollen diese Versuche in einem Biologie-Grundkurs angeboten werden, so ist eine intensive Betreuung erforderlich.

Die verschiedenen, alternativ ausprobierten Aufbereitungsmethoden der DNA können nicht abschließend bewertet werden. Ich habe den Eindruck, dass die Tail-Extraktionsmethode als letzte Methode zu den besten Ergebnissen geführt hat. Ich möchte aber nicht ausschließen, dass dies auf eine routiniertere Durchführung der DNA-Extraktion am Ende der Laborwoche zurückzuführen ist.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen einer fünftägigen Laborwoche untersuchten einige Schüler der Leistungskurse Biologie im schuleigenen Labor die Zusammensetzung von Fleischsorten in Dönerfleisch. Hierzu bedienten sich die Schüler verschiedener molekularbiologischer Methoden, unter anderem der PCR und der anschließenden Gelelektrophorese. Die Schüler haben sich die aufwendige Versuchsdurchführung aufgeteilt und konnten so zusammen eine große Zahl von Detailergebnissen erzielen. Hierbei hatte jeder Schüler einen eigenen experimentellen Teil durchzuführen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit unseren Experimenten gezeigt werden konnte, dass im Döner das drin ist, was draufsteht, nämlich Rindfleisch.

Durch die Woche im Labor konnten die Schüler kennenlernen, wie die moderne Molekularbiologie zur Lösung alltäglicher Fragestellungen eingesetzt werden kann und wie es ist, einen Beruf in einem Labor anzutreten.

Die Woche war sehr interessant und hat viel Spaß gemacht. Eine Laborwoche für Schüler zu machen, halte ich für eine sehr gute Idee, da die Schüler so einen besseren Einblick in ein mögliches Berufsfeld erhalten. Wichtige persönliche Erkenntnis am Ende der Woche war, dass eine gewisse Routine und bestimmte Vorkenntnisse bei solchen Versuchsdurchführungen unglaublich hilfreich sein können. Am Ende der Woche war es deutlich einfacher die bereits bekannten Versuchsdurchführungen zu bearbeiten. Außerdem war es für mich eine neue Erfahrung, dass häufig genau dieselbe Versuchsdurchführung sehr oft wiederholt werden muss, um letztendlich ein eindeutiges Ergebnis zu erlangen.

Die Ergebnisse am Ende der Woche waren sehr zufriedenstellend und ich bin sehr dankbar für die Woche und besonders unserem Lehrer Herrn Schaller, der uns unterstützt und die Woche im Labor ermöglicht hat.

5. Literaturverzeichnis

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

Gatesy, J.; Swanson, W. J. (2007): Adaptive evolution and phylogenetic utility of ACR (acrosin), a rapidly evolving mammalian fertilization gen. *Journal of Mammalogy* **88**: 32–42.

NCBI – National Center for Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, letzter Zugriff am 06.11.2013

Page, R. D. M. (1996): Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.

Saiki, R. K. et al. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491

Schaller, F. (2013): Praktikumsvorschrift. Unveröffentlichtes Manuskript

Schaller, J. A.-L. (2013): Identifizierung von Fleischsorten in Lebensmitteln mit Hilfe molekularbiologischer Methoden am Beispiel des Döners. – Facharbeit im Biologischen Leistungskurs am Ruhr-Gymnasium Witten im Schuljahr 2013/13

Spiegel online (2013 a): Artikel zum aktuellen Pferdefleischskandal: Aldi und LIDL finden Fleisch in ihren Fertiggerichten, online gestellt am 15.02.2013, 17:29, http://www.tagesspiegel.de/politik/pferdefleisch-skandal-aldi-und-lidl-finden-pferdefleisch-in-ihren-fertiggerichten/7792486.html

Spiegel online (2013 b): Warnung des EU-Parlaments: Lebensmittelbetrug in Europa weitet sich aus, online gestellt am 15.11.2013, http://www.spiegel.de/wirtschaft/service/eu-parlament-warnt-lebensmittelbetrug-in-europa-weitet-sich-aus-a-932438.html,

Wikipedia: Polymerase-Kettenreaktion: http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polymerase-Kettenreaktion;

Auf dieser Webseite gibt es eine kurze Anleitung für Clustal und Treeview: http://akira.ruc.dk/~olesk/sekvens/Treedraw.htm

6. Anhang

Anhang A

Materialliste:

Geräte:

Zentrifuge: "Perfectspin 24 plus" → PEQLAB Biotechnologie GmbH,

Thermocycler: "peqSTAR 96 Universal Gradient"→D-Erlangen

Gleichspannungsquelle "EV 265" → Kisker Biotech GmbH & CoKG

Agarosegelkammer: "MSCHOICETRIO" → D-Steinfurt

UV-Illuminator: "TFX-2011" → Vilber Lourmat, F - Maine la Vallée

Chemikalien:

DNTP's \rightarrow Carl Roth GmbH & CoKG, D-

Karlsruhe

DNA-Größenstandards:

"50 Basenpaare, DNA-Leiter" → Carl Roth GmbH & CoKG,

"100 Basenpaare DNA-Leiter" → D-Karlsruhe

Agarose 50 x TAE \rightarrow Carl Roth GmbH & CoKG,

D-Karlsruhe

Primer → Eurofins MWG Synthesis-GmbH,

D-Ebersbach

Taq-Polymerase = peq GOLD-Polymerase →

5u/µl; mit 10x Reaktionspuffer y

PEQLAB Biotechnologie GmbH,

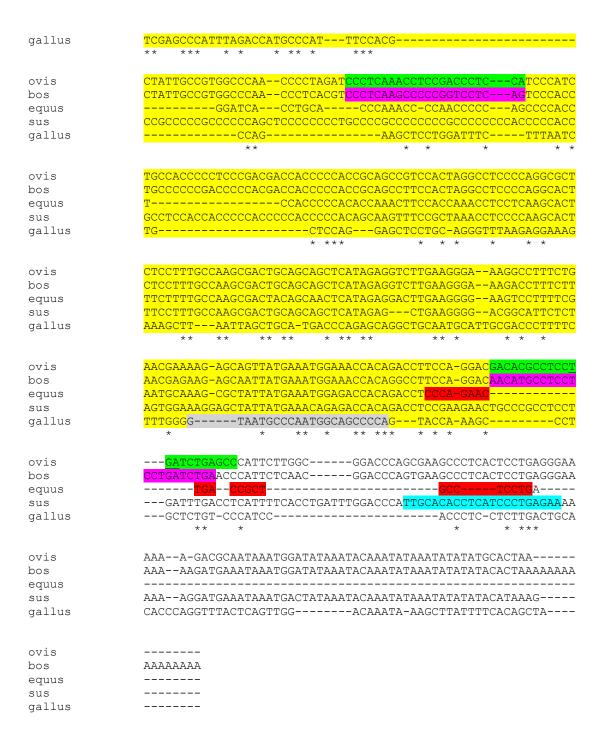
D-Erlangen

Anhang B

Sequenzalignment des Akrosingens für die verschiedenen Spezies $\tt CLUSTAL~W~(1.83)~multiple~sequence~alignment$

ovis bos	
equus	ATGTGTCATACTCTGGGAGGTGAGATGCTGCCTCCTGACAACCAGAGGAAATACGTCATG
sus gallus	GAGGTCACTGG
ovis	TTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
bos	AGGACTTTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCATTCTGC-T
equus sus	ATATTCAGGCCGTGCTGGGGCAGGAGTCTGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-TGCTTCCAGGCCAGG
gallus	CCGGGCGCGATGGGCTGCCGTGCGCCTCCGGGAGCGATGGTGCTG-CTGCTGCCCCTCGC
garras	** ** *** *** *
ovis	GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCGCCAGAG-ATAACACCACGTGTGATGGCCCCTGC
bos	GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCACCAGAG-ATAACACCACGTGTGATGGCCCCTGT
equus	GGTCTTGGCAGT-GTCTGTGGTGGCCAATG-ATAACATCACGTGTGATGGTCCCTGT
sus	GGTCCTGGCAGT-GTCTGTGGCGGCCAGAG-ATAACGCCACGTGTGATGGCCCCTGC
gallus	GGTGCTGCCGGCCTTGCCGGCCTGGGCACGGCTCCTCCGGCGCCTGCGACACCTGC
	*** **
ovis	GGGGTCCGGTTCA-GGCAGAAC-CGGCAGGGGGGGCGTACGGATCATCGGTGGGCAAGA-C
bos	GGGACACGGTTCC-GGCAGAAC-CGTCAGGGGGGCATGCGGATCATCGGCGGGCAAGA-C
equus	GGGTTACGATTCA-GGCAGAAC-CTACAAGGGACCCTCCGCATCATCGGAGGGCAGGA-C
sus	GGCTTACGGTTCA-GGCAGAAA-TTAGAGTCAGGCATGCGTGTGGTTGGCGG-CATGAGT
gallus	GGGCTCCGGCCCATGGCTTATCACTACGGGGGAACGCGTGTCGTGGGCGG-CACGGAC ** ** * * * * * * * * * * * * * * * *
ovis	GCCGCCCACGGGGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTCACGTACCACAACAAC
bos	GCTGCCCACGGGTCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTCACATACCACAACAAC
equus	GCGGCACTTGGAGCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAAGTCTTCACTTACCACAACAAG
sus	GCAGAACCGGGCCCTGGCCCTGGATGGTCAGCCTCCAGATCTTTATGTACCACAACAAC
gallus	GCCCCGCAGGGGGCCTGGCCGTGGATTGTCAGCCTCCAAAGCACGTGGTATG-TGGG ** * * * ****** ***** ***** * * * *
ovis	CGGCGGTACCACGTGTGCGGGGGCTCCCTGCTGAACTCCCAGTGGCTGCTCACGGCCGCT
bos	CGGCGGTACCACGTGTGGGGGGCTCCCTGCTGAACGCCCACTGGCTGCTCACTGCCGCT
equus	CGGAGGTATCATGCCTGCGGAGGCACATTGCTGAACTCCCACTGGCTGG
sus	CGGAGGTACCACACGTGCGGGGGCATCTTGCTGAACTCGCACTGGGTGCTCACTGCTGCT
gallus	CA-CGGGA-CACATCTGTGGAGGATCTCTCATCACCCCGCAGTGGGTCCTCACGGCAGCG * ** * * * * * * * * * * * * * * * *
	* ** * * * ** ** * * * * * * * * * * * *
ovis	CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTCGGAGCTAAGG
bos	CACTGCTTCAGGATCAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTTGGAGCTAAGG
equus	CACTGCTTCAGGACCAAAAAAAAGCGTATGACTGGAG-AC-TGATTTTTGGAGCAAGGG
sus	CACTGCTTCAAGAACAAAAAAAAGTTACTGACTGGAG-AC-TGATTTTCGGAGCAAACG
gallus	CACTGCTTCGACCATGCAACCCCCGACACGCCGTGGCACGTGGTGATCGGTGGCCACG
	****** ** ** ** * * * * * * * * * * * *
ovis	AAGTTGAGTGGGGGACCAATAAGCCAGTGAAGCCGCCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
bos	${\tt AAGTTGAGTGGGGGAGCAATAAGCCAGTGAAGCCGCCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA}$
equus	AAATTCAATATGGCAGCAATAAGCCAGTGAAGCCACCTCTGCAGGAGAGACGTGTTGAGA
sus	AAGTTGTGTGGGGAAGCAATAAGCCGGTGAAGCCACCCCTGCAGGAGAGATTTGTTGAGG
gallus	ATCTGAAACGCCTGGGCCC-CGAAGCTGTCG-TGCGCAACGTGATACGG
	* * * * * * *** * * * * * * * * * * * *
ovis	AAATCATCATTCATGAGAAATACTCCGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATGA
bos	${\tt AAATCATCATGAGAAATACTCGGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATAA}$
equus	AAATCATCATGAAAATTACTCCCCTCGTTCAGAGGCAAACGACATTGCTCTTTGA
sus	AGATCATCATGAAAAATACGTTTCAGGGTTAGAGATAAATGACATTGCTCTCATAA
gallus	ATAATCCCCCACGAATACTATCACAGAAACAACATGGCCAATGACATCGCGCTGCTTG * * *** ** * * * * * * * * * * * * * *
	* * *** ** * * * * * * * * * * * * * * *

ovis bos equus sus gallus	AGATCACCCCTCCTGTTACCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGATGCCTGCC
ovis bos equus sus gallus	AGG-GCAGGCCCACCCAGAGTTCCCCAGACATGCTGGGTGGCTGGC
ovis bos equus sus gallus	AGAGA-ATGCCCGCAGGACATCCCCTATGCTGCAGGAGGCGCGCGTGGA TGAGA-ATGCCCGCAGGACATCACCTGTGCTGCAGGAGGCGCATGTGGA AGAGA-ATGCCCGCAAGACATCACCTATACTGCAGGAGGCGCCTGTGGA AGAGA-AAGGCCCCAGGACGTCACCTACACTGCAGGAGGCCACGTGTGGC GCTGAGATCTCTACAGGAATATGTCGAACCATACCGTGTCCTGCAGGAGGCCAAGGTCCA ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ovis bos equus sus gallus	CCTCATCGACCTCGGCTTGTGTAACTCGACCAGATGGTACAACGGGCGCATTCGT-TCAA CCTTATCGACCTCGACTTGTGTAACTCGACCAGATGGTACAATGGGCACATTCGT-TCAA GCTCATCGACCTCGACTTATGTAACTCGACCAGTGGTACAATGGGCGCATTCGT-TCAA CCTCATCGACCTCGAATTATGTAACTCGACCAGTGGTACAATGGGCGTGTCACG-TCAA GCTCATTGACCTCAACATCTGCAACAGCAGCAACTGGTATGCTGGGGCTGTCCATATCCA ** ** ******
ovis bos equus sus gallus	CCAACGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCGCGCCAATGTGTGCCAGGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCGCGCCAATGTGTGCAGGGGTATCCTCAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCGCGCAATGTGTGCCACGGGGTATCCTAGAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGGACAGCGGCGCCAACGTGTGTGCTGCTAGCCCAGGGGCGCGCATCGACACCTGCCAGGGTGACAGCGGTGCACACCTGCCAGGGTGACAGCGGTGCACACCTGCCAGGGTGACACCTGCCAGGGTGACACCGGCGCGCGC
ovis bos equus sus gallus	GGCCTCTCATGTGCAAAGACAGCGGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC GGCCTCTCATGTGCAAAGACAGCGTGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC GGCCTCTCATGTGCAGAGACAGCATGGAAAACGCCTATGTGG-TCGTGGGAGTCACAAGC GGCCTCTCATGTGCAGAGACAGAGCGGAAAACACCTTTGTGG-TCGTGGGCATCACAAGC GTCCTCTCATGTGCAAAGATAAAACTGCTGACTACT-TCTGGCTCATTGGTGTGACCAGC * *********** *** * * * * * * * * * *
ovis bos equus sus gallus	TGGGGGTAGGCTGTGCCCGAGCTAAGCGCCCCGGAGTCTACACGTCTACCTGGTCCTAT TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGAGCTAAGCGCCCCGGAGTCTACACGTCTACCTGGTCCTAT TGGGGGGTAGGCTGTGCCCGTGCTAAGCGCCCTGGAGTCTACACGGCTACCTGGCCCTAT TGGGGGGTAGGCTGCGCCCGAGCTAAGCGCCCTGGAGTCTACACGTCTACCTGGCCCTAT TGGGGGGAAAGGCTGTGGGAGAATACAGCCCTGGAGTCTATGCCTCCACTCAGTACTTT ******
ovis bos equus sus gallus	CTGAACTGGATCGCCTCCA-AGATAGGCTCTACCGCCGTGCACATGATTCAGTTGCCCAC CTGAACTGGATTGCCTCCA-AGATAGGCTCTAACACGGTGCACATGATTCAGTTGCCCAC CTGAATTGGATTGCTTCCA-AGATCGGTTCTAACGCCTTGCACATGATTCAACTGGGCAC CTGAACTGGATTGCTTCCA-AGATTGGTTCTAATGCCTTGCAGATGGTTCAACTGGGCAC CGCAACTGGATC-CTGGTACAGATGGGATTGCTTCCAGCAGAAGCGCCTACTACA-AC * ** ***** * * * **** * * * * * * * *
ovis bos equus sus gallus	CGCCTCCCCGCTTCTACTCCAGGGGCCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTCCAGCCTTCCGT CGCTCCCCCTGCTTCTACTCCAGCAGCCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTTCAGCCTTCCAT CCCTCCCCCTCCTACTACTCAAGCACTCCCGGCTAGACTCCCTCTTATTCAACCTAT CCCTCCCCGTCCTTCTACTCCAGCACCCCCTGTCAGACCCCCTCTGTTCAGACTCCTGT GCCATATCCAGTCTATATCTCAACCTCCTACCAGAGGCCAAAACCAACATAC * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ovis bos equus sus	TCGCCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCTCGACCACCTCCCTCTCAGCAAG TCGCCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCTCAACCACCTCCCTCTCAGCAAG TCACCCTCTTTGGTCCTTCCAACGCCCTCCTCAACCACCTCCCCCT TCGCCCACCTTGGTACTTCCAACGCCCTCCTGGACCCTCCCAGCAACCTGGGTC



Legende: Alignment erstellt mit ClustalW

- ≜ "gap", Lücken, die vom Programm eingefügt werden farbige Markierung ≜ abgeleitete Primer

Anhang C

Primersequenzen:

ovis:	CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA	GACACGCCTCCTGATCTGAGCC	2	214	bp
ovis-for:	CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA				-
ovis-rev:	GGCTCAGATCAGGAGGCGTGTC				
bos:	CCCTCAAGCCCCCGGTCCTCAG	${ t A}$ ACA ${ t T}$ GCCTCCT ${ t CCT}$ GATCTGA	2	214	рd
bos-for:	CCCTCAAGCCCCCGGTCCTCAG				
bos-rev:	TCAGATCAGGAGGAGGCATGTT				
ou or		TTGCACACCTCATCCCTGAGAA	-	066	hn
sus:	CCCCCTCTGTTCAGACTCCTGT	TTGCACACCTCATCCCTGAGAA		366	qa
sus-for:	CCCCCTCTGTTCAGACTCCTGT				
545 101.	0000010101101101101101101101				
sus-rev:	TTCTCAGGGATGAGGTGTGCAA				
equus:	GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA	CCCAGAACTGACCGCTGCCTCCTG	2	266	bp
equus-for:	GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA				
equus-rev:	CAGGAGGCAGCGGTCAGTTCTGGG				
equus iev.	CAUGAUGCAGCOGTCAGTTCTGGG				
gallus:	GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC	GTAATGCCCAATGGCAGCCCCA	3	392	gd
5					-
gallus-for:	GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC				
gallus-rev:	TGGGGCTGCCATTGGGCATTAC				
actin-for: G	GCATCACACTTTCTACAACGAGCT				
actin-rev: CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTGAT ca 410 bp					

Legende:

farbige Markierung ≙ abgeleitete Primer bp ≙ Basenpaare; zu erwartende PCR-Fragmentgröße

actin-for \(\text{\tin\text{\texi}\text{\texi}\text{\text{\text{\text{\text{\text{\text{\text{\text{\text{\texi}\text{\text{\t actin-rev \(\perp\) Actinreverse-Primer

Anhang D

gallus equus

ovis

bos

sus

Sequenzalignment des Aktingens

```
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
gallus
             ATGGATGATGATATTGCTGCGCTCGTTGTTGACAATGGCTCCGGTATGTGCAAGGCCGGT
equus
            ATGGATGATATCGCCGCGCTCGTGGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGC
            ATGGATGATATTGCTGCGCTCGTGGTTGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGC
ovis
bos
            ATGGATGATATTGCTGCGCTCGTGGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGC
            ATGGAAGAGAGATCGCCGCGCTGGTCATCGACAATGGCTCCGGCATGTGCAAAGCTGGC
sus
             **** ** ** ** ** ** **
                                     * **** ****** ***** **
            TTCGCCGGGGACGATGCCCCCGTGCTGTTTCCCATCTATCGTGGGTCGCCCCAGACAT
gallus
equus
            TTCGCGGGCGACGACGCTCCCCGCGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCCGGCAC
ovis
            TTCGCGGGCGACGATGCTCCCCGGGCCGTCTTCCCGTCCATCGTGGGGCGCCCCCGGCAC
bos
            TTTGCTGGGGATGACGCCCCCGGGCCGTGTTCCCGTCCATCGTCGGGCGTCCCCGACAC
            gallus
           CAGGGTGTGATGGTTTGGTATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCCCAGAGC
            CAGGGCGTGATGGTGGGCCAGAAGGACTCATACGTGGGCGACGAGGCCCAGAGC
equus
ovis
            CAGGGCGTGATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACTCCTACGTGGGGGATGAGGCTCAGAGC
bos
            CAGGGCGTAATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACTCGTACGTGGGGGATGAGGCTCAGAGC
            CAGGGTGTCATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACAGCTACGTGGGCGACGAGGCTCAGAGC
SUS
                                             **** ** ** ** ** **
            **** ** ** **** ** ****** ***
gallus
            AAAAGAGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATTGAACACGGTATTGTCACCAACTGGGAT
equus
            AAGAGGGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATCGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGAC
            AAGAGAGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATTGAGCACGGCATTGTCACCAACTGGGAC
ovis
bos
           AAGAGAGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATTGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGAC
            AAGCGGGGCATCCTGACCCTCAAGTACCCCATCGAACACGGCATCGTCACCAACTGGGAC
SUS
gallus
           GATATGGAGAAGATCT<mark>GGCACCACACTTTCTACAATGAGCT</mark>GAGAGTAGCCCCTGAGGAG
                            GCACCACACCTTCTACAACGAGCTGCCGTGGCCCCCGAGGAG
eauus
            GACATGGAGAAGATCT
                            <mark>GGCACCACACCTTCTACAACGAGCT</mark>GCGTGTGGCCCCCGAGGAG
ovis
            GACATGGAGAAGATCT
            GACATGGAGAAGATCT<mark>GGCACCACACCTTCTACAACGAGCT</mark>CCGTGTGGCCCCTGAGGAG
bos
            GACATGGAGAAGATCT
                                                 GCGCGTGGCCCCCGAGGAG
sus
             ** ******* **** **** ***** ****
            gallus
            CACCCGTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGACC
equus
            CACCCGTGCTGACCGAGGCCCCCTTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATGACC
ovis
bos
            CACCCGTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATGACC
            CACCCGTGCTGCTCACGGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATGACT
sus
```

CAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCGGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCCGTGCTG

CAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCTGTGCTG
CAGATCATGTTCGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCTGTGCTG

CAGATCATGTTCGAGACCTTCAACACGCCGGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCCGTGCTG

gallus equus ovis bos sus	TCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATTGTGATGGACTCTGGTGATGGTGTTACC TCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACC TCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACC TCCCTGTATGCCTCTGGCCGCACCACCGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGTCACC TCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATTGTCATGGACTCTGGGGATGGGTCACC ******** ******* ** ****** ** ** ** ****
gallus equus ovis bos sus	CACACTGTGCCCATCTATGAAGGCTACGCCCTCCCCCATGCCATCCTCCGTCTGGATCTG CACACTGTGCCCATCTACGAGGGGTACGCCCTCCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTG CACACGGTGCCCATCTACGAGGGGTACGCCCTCCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTG CACACGGTGCCCATCTATGAGGGGTACGCCCTTCCCCATGCCATCCTGCGTCTGGACCTG CACACGGTGCCCATCTACGAGGGGTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTG ***** ********* ** ** ******** ********
gallus equus ovis bos sus	GCTGGCCGTGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTGACAGAGAGAG
gallus equus ovis bos sus	ACCACCACAGCCGAGAGAGAAATTGTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCAACCACCACGGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTG
gallus equus ovis bos sus	CTGGATTTCGAGCAGGAGATGGCCACAGCTGCCTCTAGCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTAT CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTAC CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCCTCCTGGAGAAGAGCTAC CTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCCGCGTCCTCCTCCTCCTGGAGAAGAGCTAC ***** *******************************
gallus equus ovis bos sus	GAACTCCCTGATGGTCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGAGGTTCAGGTGCCCCGAGGCC GAGCTGCCCGACGCCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGGTTCCGCTGCCCCGAGGCC GAGCTGCCGGACGGCAGTCATCACCATCGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCCCTGAGGCT GAGCTTCCTGACGGCAGGTCATCACCATCGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCCCTGAGGCT GAGCTGCCCGACGGCCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGGTGTCCAGAGGCG ** ** ** ** ** ** ** **************
gallus equus ovis bos sus	CTCTTCCAGCCATCTTTCTTGGGTATGGAGTCCTGTGGTATCCATGAAACTACCTTCAAC CTCTTCCAGCCCTCCTTCCTGGGCATGGAATCCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTCAAC CTCTTCCAGCCTTCCTTCCTGGGCATGGAATCCTGCGGCATTCACGAAACTACCTTCAAT CTCTTCCAGCCTTCCTTCCTGGGCATGGAATCCTGCGGCATTCACGAAACTACCTTCAAT CTCTTCCAGCCCTCCTTCTTGGGCATGGAGTCCTGCGGCATCCACGAGACCACCTTCAAC ***************************
gallus equus ovis bos sus	TCCATCATGAAGTGTGATGTGGATATCCGTAAGGATCTGTATGCCAACACAGTGCTGTCT TCCATCATGAAGTGTGACGTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCG TCCATCATGAAGTGTGACGTCGACATCCGCAAAGACCTCTACGCCAACACGGTGCTGTCC TCCATCATGAAGTGTGACGTCGACATCCGCAAGGACCTCTACGCCAACACGGTGCTGTCC TCGATCATGAAGTGCGACGTGGACATCAGGAAGGACCTCTACGCCAACACGGTGCTGTCT ** ********** ** ** ** ** ** ** ** ** *
gallus equus ovis bos sus	GGTGGTACCACAATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTG GGTGGGACCACCATGTACCCAGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTG GGCGGGACCACCATGTACCCTGGCATCGCAGACAGGATGCAGAAAGAGATCACTGCCCTG GGCGGGACCACCATGTACCCCGGCATCGCGGACAGGATGCAGAAAGAGATCACTGCCCTG GGCGGGACCACCATGTACCCCGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACGGCCCTG ** ** ***** ****** ****** ***********

gallus equus ovis bos sus	GCACCTAGCACAATGAAAATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGCAAGTACTCTGTCTG
gallus equus ovis bos sus	ATTGGAGGCTCTATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCA
gallus equus ovis bos sus	GAGTACGATGAATCCGGACCCTCCATTGTCCACCGCAAATGCTTCTAA GAGTACGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG GAGTACGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG GAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG GAGTACGACGAGTCGGGCCCGTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG ******** ** ** ** ** ** *************

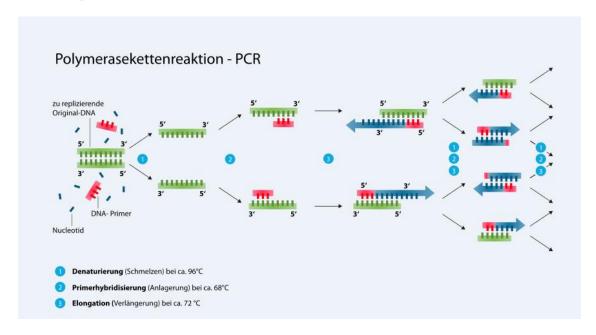


CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTGAT -rev primer

-> rückwärts und komplementär -> ATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCG

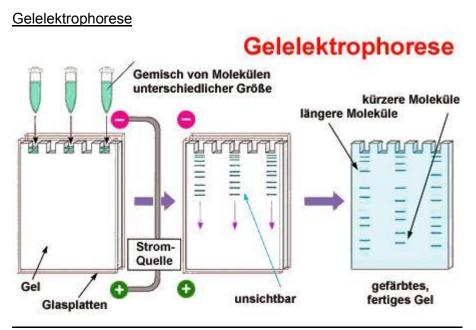
Legende: Alignment erstellt mit ClustalW

Anhang E



Quelle: Wikipedia: Polymerase-Kettenreaktion: http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polymerase-Kettenreaktion; http://de.wiki/Polym

Anhang F



Quelle:

Schaller, F. (2013): Praktikumsvorschrift. Unveröffentlichtes Manuskript

Anhang G

Spiegel online (2013 a): http://www.tagesspiegel.de/politik/pferdefleisch-skandal-aldi-und-lidl-finden-pferdefleisch-in-ihren-fertiggerichten/7792486.html online gestellt am 15.02.2013,17:29)

Artikel zum aktuellen Pferdefleischskandal:

Aldi und Lidl finden Pferdefleisch in ihren Fertiggerichten

Auch bei Aldi und Lidl werden jetzt Produkte aus den Regalen genommen, in denen falsch deklariertes Pferdefleisch enthalten ist. Die EU-Staaten einigten sich zwischenzeitlich darauf, mit Gentests nach Pferdefleisch zu fahnden.

Zwei Discount-Ketten in Deutschland nehmen Fertiggerichte aus ihren Regalen, nachdem eigene Analysen Pferdefleisch nachgewiesen haben. Die EU-Staaten wollen Gentests machen, um falsch deklariertes Pferdefleisch aufzuspüren. Die Kosten trägt teilweise die EU.

Der Lebensmittel-Discounter Aldi Süd nimmt zwei Fertiggerichte aus den Regalen, nachdem eigene Analysen Pferdefleisch nachgewiesen haben. Das teilte eine Sprecherin des Unternehmens am Freitag auf Anfrage der Nachrichtenagentur dpa mit.

Bei den betroffenen Produkten handele es sich um "Ravioli, 800 g Dose (Sorte Bolognese)" und um "Gulasch, 450 g Dose (Sorte Rind)", der allerdings nur in Nordrhein-Westfalen verkauft wurde.

Der Verkaufsstopp erfolge vorsorglich auf Bitten der Lieferanten. Nach aktueller Sachlage bestehe kein gesundheitliches Risiko für die Verbraucher. Kunden könnten die betroffenen Produkte in den Filialen von Aldi Süd gegen Erstattung des Kaufpreises zurückgegeben.

Auch beim Discounter Lidl gibt es einen ersten Verdacht auf ein mit Pferdefleisch angereichertes Produkt. Lidl Deutschland habe "Tortelloni Rindfleisch" des Herstellers "Gusto GmbH" der Hilcona AG aus dem Verkauf genommen, teilte Lidl am Freitag mit. Lidl habe zuvor eine Meldung der österreichischen Behörden erhalten, in der es hieß, in Tortelloni sei ein "nicht deklarierter Anteil an Pferdefleisch" gefunden worden. Bislang lägen qualitative Analysen von zwei Proben vor, in der zweiten Probe sei aber kein Erbgut von Pferden nachweisbar gewesen, hatte die Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) in Österreich weiter erklärt.

Hilcona mit Sitz in Liechtenstein erklärte ebenfalls, einer Untersuchung zufolge enthielten "Combino Tortelloni Carne", wie sie bei Lidl angeboten würden, Pferdefleisch. Hilcona selbst verarbeite kein Frischfleisch, vielmehr beziehe das Unternehmen Fleisch für seine Lebensmittel von Lieferanten. "In allen unseren Produkten ist gemäß Spezifikation kein Pferdefleisch vorgesehen", hieß es weiter. Hilcona vermutet die Quelle nun in einer "fehlerhaft deklarierten und gelieferten Rohware des Lieferanten".

Hilcona bewirbt Lebensmittel im Internet mit einer "Besseresser-Garantie", die für die "herausragende Qualität aller unserer Produkte" stehe. Pferdefleisch hatte sich trotz anderslautender Etikettierung in Deutschland unter anderem in Produkten des Handelsriesen Kaiser's Tengelmann und bei der Metro -Tochter Real gefunden.

Bei der Fahndung nach falsch deklariertem Pferdefleisch wollen die EU-Staaten nun Gentests machen. Darauf einigten sich am Freitag Vertreter der Staaten in Brüssel. Die EU-Kommission übernimmt einen Anteil der Kosten an den Untersuchungen, die bis spätestens Ende März abgeschlossen sein sollen.

In diesem Zeitraum sollen die nationalen Behörden 2250 Gentests an Rindfleischprodukten durchführen. Auf jedes Land entfallen dabei zwischen 10 und 150 Proben. Getestet werden nach Angaben der EU-Kommission vor allem Fleischprodukte im Einzelhandel.

Außerdem wollen die Staaten bei Pferdefleisch nach Rückständen des entzündungshemmenden Medikaments Phenylbutazon fahnden. Es ist für den Einsatz bei Tieren, die später auf dem Teller landen sollen, nicht zugelassen. Für je 50 Tonnen Pferdefleisch ist eine Probe auf die Arznei vorgesehen - bei einem Gewicht von etwa einer halben Tonne pro Tier, würde demnach ein Prozent der Pferde getestet. Für beide Untersuchungen übernimmt die EU-Kommission drei Viertel der Kosten. Bis Mitte April sollen die Hauptstädte ihre Testergebnisse in Brüssel einreichen. Dann könnten die Staaten auch eine weitere Runde an Untersuchungen beschließen.

Eine rechtlich bindende Verpflichtung zur Durchführung der Tests sind die einzelnen Länder jedoch nicht eingegangen. Diplomaten gehen aber davon aus, dass die Hauptstädte angesichts des öffentlichen Drucks mitziehen werden. Eine bindende Entscheidung hätten die Staaten nicht so kurzfristig treffen können, erklärte ein Diplomat: "Das ist einfach das schnellste Verfahren." Zudem bekämen die Staaten nur dann Geld aus europäischen Töpfen, wenn sie sich an die gemeinsamen Standards halten.

EU-Verbraucherkommissar Tonio Borg freute sich über die Zustimmung für seine Vorschläge. "Die Verbraucher erwarten, dass die EU, nationale Behörden und alle an der Lebensmittelkette Beteiligten ihnen alle nötige Beruhigung verschaffen für das, was sie auf ihren Tellern haben." Seine Behörde hatte die Pläne bei einem Treffen von mehreren betroffenen Ländern am Mittwoch ins Spiel gebracht. Auch beim nächsten Treffen der EU-Agrarminister am 25. Februar soll das Thema auf der Tagesordnung stehen. (dpa, Reuters)

(Aus dem Verlag "Der Tagesspiegel",von: http://www.tagesspiegel.de/politik/pferdefleisch-skandal-aldi-und-lidl-finden-pferdefleisch-in-ihren-fertiggerichten/7792486.html online gestellt am 15.02.2013,17:29)

Anhang H

Spiegel online (2013b): http://www.spiegel.de/wirtschaft/service/eu-parlament-warnt-lebensmittelbetrug-in-europa-weitet-sich-aus-a-932438.html

Warnung des EU-Parlaments: Lebensmittelbetrug in Europa weitet sich aus Von Nicolai Kwasniewski

Brüssel schlägt Alarm: In der Lebensmittelbranche wird offenbar zunehmend getäuscht und betrogen. Die Entdeckungsrisiken seien gering und die Strafen zu niedrig, schreibt der Umweltausschuss im EU-Parlament in einem Berichtsentwurf. Auch Calamari stehen unter Ekelverdacht.



Wok-Gericht: Sind das wirklich Tintenfischringe?

Hamburg - Es klingt ziemlich fies: Wer Calamari kauft, bekommt möglicherweise etwas ganz anderes. Bei den <u>vermeintlichen Tintenfischringen</u> könnte es sich um in Scheiben geschnittene Enddärme von Schweinen handeln. Europäische Supermärkte hätten Calamari auf eine Liste der am stärksten betrugsgefährdeten Produkte gesetzt, berichtet die EU-Parlamentsabgeordnete Esther de Lange von der konservativen Fraktion EVP. "Der Einzelhandel hat ein Auge auf Calamari", sagt de Lange SPIEGEL ONLINE, "sie sind Nummer neun auf der Liste." Vielleicht ist der Ekelverdacht auch nur ein Gerücht. Aber das Beispiel zeigt, wie sehr auch Einzelhandelsunternehmen davon überzeugt sind, dass sie immer wieder hintergangen werden.

Als Berichterstatterin im Ausschuss für Umweltfragen, öffentliche Gesundheit und Lebensmittelsicherheit im Europaparlament warnt Esther de Lange, dass der Betrug mit Lebensmitteln in der Europäischen Union schnell wachse und dringend gehandelt werden müsse. De Lange hat einen Bericht "über die Nahrungsmittelkrise, Betrug in der entsprechende Kontrolle" verfasst. Nahrungskette und die So Lebensmitteleinzelhandel eine Liste von Produkten führt, die besonders häufig überprüft werden, führt auch der Ausschussbericht die Top Ten jener Lebensmittel auf, die "am meisten der Gefahr des Lebensmittelbetrugs ausgesetzt sind". Das seien: Olivenöl, Fisch, Bio-Lebensmittel, Milch, Getreide, Honig und Ahornsirup, Kaffee und Tee, Gewürze, Wein sowie bestimmte Obstsäfte.

Ein Grund für die Zunahme der Betrugsfälle ist dem Bericht zufolge die aktuelle Wirtschaftskrise: Die Kontrollstellen litten unter Sparmaßnahmen, und "der Druck seitens des Einzelhandels und anderer Parteien, Lebensmittel noch billiger herzustellen", wachse. Die Supermarktlobby bestätigt die kritischen Thesen des Berichts zumindest teilweise. In Deutschland sei der Preisdruck nicht so hoch, teilte der deutsche Handelsverband auf Anfrage mit, allerdings könne es durchaus sein, "dass es in Europa Länder gibt, in denen die Kaufkraft durch die Krise enorm gesunken ist, was nicht nur den Handel vor Probleme stellt". Von gefälschten Calamari habe zwar weder der deutsche noch der europäische Handelsverband gehört, gefälschte Produkte seien aber ein zunehmendes Problem, heißt es beim Handelsverband.

In dem Papier führt der Umweltausschuss die jüngsten Betrugsfälle auf: Gewöhnliches Mehl wurde als Bio-Mehl verkauft, Eier aus Käfighaltung als Bio-Eier, Straßenstreusalz als Speisesalz; die Behörden fanden Methanol in Schnaps und <u>Pferdefleisch</u> in Rindfleischprodukten.

Es gibt demnach eindeutig wiederkehrende Muster:

- Wichtige Inhaltsstoffe werden durch billigere Alternativen ausgetauscht.
- Die Tierarten auf Fleischprodukten werden fehlerhaft gekennzeichnet.
- Das Gewicht wird falsch angegeben.
- Konventionelle Lebensmittel werden als "Bio" verkauft.
- Zuchtfisch wird als Wildfang gekennzeichnet.
- Lebensmittel werden wieder in den Verkehr gebracht, nachdem deren Haltbarkeitsdatum überschritten wurde.

Beim Lesen des Berichts wird klar, wie erschreckend groß die Lücken in der EU-Lebensmittelüberwachung sind: Weil sich Händler und Zwischenhändler in der Lebensmittelkette nicht registrieren müssen, kennt niemand die genaue Zahl der Unternehmen, die in der Lebensmittelbranche agieren. Weil die Regeln zwar in Brüssel gemacht, aber in den Mitgliedstaaten kontrolliert werden, ist laut Bericht ein "EU-weiter, grenzüberschreitender Überblick" nicht vorhanden.

"Die Betrugsfälle sind zwar nicht gesundheitsschädlich", sagt de Lange, "aber sie beschädigen das Verbrauchervertrauen in die Nahrungskette." Das größte Problem dabei: Die Gesetzgebung in Europa "ist derart zerstückelt, dass Lebensmittelbetrug viel zu einfach ist".

Die grenzüberschreitende Polizeibehörde <u>Europol</u> registriert einen steten Anstieg in der Zahl der <u>Betrugsfälle mit Lebensmitteln</u> und eine zunehmende Beteiligung von kriminellen Organisationen. Allerdings gebe es bei den Mitgliedstaaten offenbar große Vorbehalte, mit Europol zusammenzuarbeiten, im Pferdefleischskandal zum Beispiel habe die Kooperation eher schlecht funktioniert, sagt de Lange. "Die irischen Behörden sind den Spuren in ihrem Land nachgegangen - aber hinter der Grenze sind sie blind oder auch einfach nur hilflos."

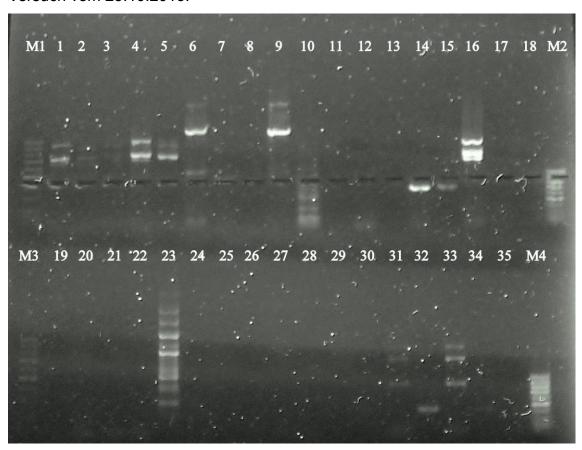
In der Lebensmittelkette gibt es strukturelle Schwächen, während gleichzeitig hohe Gewinne locken und die Chancen, erwischt zu werden, verschwindend gering sind. Der Ausschuss fordert deshalb, alle Akteure, also auch beispielsweise Eigentümer von Kühloder Lagerhäusern, als Lebensmittelunternehmer zu registrieren und zu kontrollieren. Für die gesamte Kette sollen elektronische Zertifizierungssysteme eingeführt werden. Besonders wichtig aber seien schärfere Strafen - mindestens doppelt so hoch, wie der Gewinn durch den Betrug war oder gewesen wäre. Im Wiederholungsfall soll dem Lebensmittelunternehmen die Registrierung entzogen werden. "Die Betrugsfälle", schließt der Bericht, hätten bereits negative Auswirkungen: "Ein Drittel der Verbraucher vertraut den Angaben auf Lebensmitteletiketten nicht mehr." Mit Blick auf die Frage, woraus vermeintliche Calamari möglicherweise wirklich bestehen könnten, ist das vielleicht auch angebracht.

Anhang I

Gelelektrophorese und PCR

Weitere Bilder, die in der Facharbeit nicht näher erläutert wurden:

Versuch vom 23.10.2013:



- M1 Marker
- 1 Schaller.Geflügelwurst
- 2 Schaller
- 3 Schaller
- 4 Schaller
- 5 Schaller
- 6 Schaller- Pferdewurst
- 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)

Versuch vom 24.10.2013



- M1/M4: Marker

 1. Rind zentrifugiert, spezifischer Primer

 2. Rind filtriert, spezifischer Primer

 3. Rind filtriert, spezifischer Primer

 4. Döner mit Rindprimer

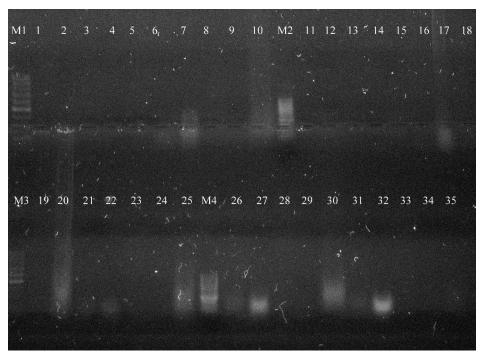
 5. Döner mit Pferdeprimer

- 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 Lammprimer12. Lamm, spezifischer Primer
- 13. Lamm, Actinkontrolle

- 14. Huhn, spezifischer Primer15. Döner mit Huhnprimer16. Geflügelleberwurst mit Huhnprimer

- 17. Geflügelleberwurst, Actinkontrolle
 18. Geflügelleberwurst mit Lammprimer
 19. Geflügelleberwurst mit Rindprimer
 20. Geflügelleberwurst mit Schweineprimer

Versuch vom 25.10.2013



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

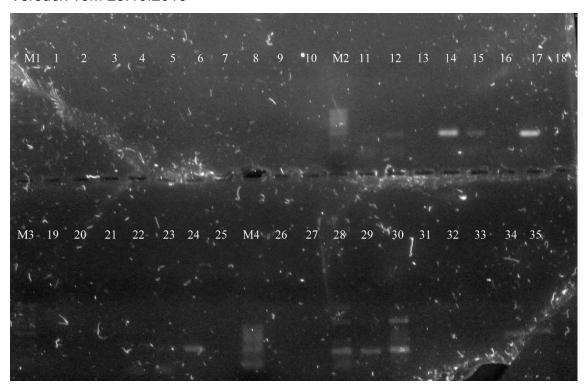
- 11 Rind (NaOH-Methode) 1a
- 12 Rind (NaOH-Methode) 1b 13 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a
- 14 Rind (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b
- 15 Rind (TAIL extraktion)3 16 Döner (NaOH-Methode) 1a 17 Döner (NaOH-Methode) 1b
- 18 Döner(Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a
- M3 Marker
- 19 Döner (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b
- 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

Versuch vom 25.10.2013



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

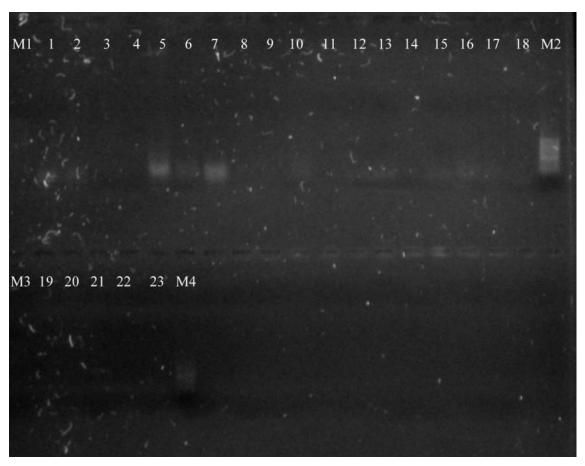
M2 Marker

- 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

Versuch vom 25.10.2013



- 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+ 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	Eigens	ständ	iakei	itserkl	ärung
•		Junia	9.0		ai ai ig

Ich erkläre, dass ich die Facharbeit	ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im
Literaturverzeichnis angeführten Qu	uellen und Hilfsmittel benutzt habe.
Ort Dotum	Lintercebrift
Ort, Datum	Unterschrift