

**FACHARBEIT**  
**im Leistungskurs Biologie**

**Religionen und Reinheit von  
Nahrungsmitteln -  
Molekularbiologische Methoden zum  
Nachweis von Schweinefleisch**

Verfasserin: Victoria Bokemeyer

Jahrgangsstufe: Q1.1

Betreuende Lehrkraft: Frau Wirbals

Abgabetermin: 20.12.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	3
<b>2. Material</b>	4
2.1 Geräte	4
2.2 Chemikalien und Enzyme	4
2.3 Biologisches Material	5
<b>3. Methoden</b>	5
3.1 Arbeiten mit Gendatenbanken und DNA-Analyse Software	5
3.2 Primer Identifizierung und Bestellung	5
3.3 DNA-Extraktion	6
3.3.1 Standardmethode der Extraktion von DNA aus Tiergewebe	6
3.3.2 Reinigung isolierter genomischer DNA	6
3.3.3 NaOH-Methode	7
3.3.4 Hexan-NaOH-SDS-Methode	7
3.3.5 TAIL-Extraktions-Methode	8
3.4 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	8
3.5 Agarosegelelektrophorese	9
<b>4. Diskussion und Ergebnis</b>	10
<b>5. Zusammenfassung</b>	14
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	15
<b>7. Anhang</b>	16

# 1 Einleitung

Das Essen von Schweinefleisch wird von einigen Religionen verboten. Woher jedoch wissen Juden und Muslime, dass sie nicht in ihrem Glauben betrogen werden? Wird den religiösen Bräuchen genug Respekt entgegen gebracht? Woher wissen wir, was für ein Fleisch wir essen? Liegt eine ausreichende Kontrolle vor? Besondere öffentliche Aufmerksamkeit erlangte dies Thema Anfang 2013 im Rahmen des sogenannten „Dönerfleisch-Skandals“. Bei Lebensmittelprüfungen war zunächst Pferde- und später auch Schweinefleisch im Döner, der üblicherweise aus Rindfleisch bestehen sollte, nachgewiesen worden. In der Folge, kam es zu großen Rückrufaktionen von Lebensmitteln, insbesondere von Fertigprodukten. Hiervon betroffen waren fast alle großen Lebensmittelketten (LÜDEMANN, 2013; FUNK, 2013).

Eine Speziesidentifizierung mittels DNA-Analytik wurde in den 80iger Jahren etabliert (KOCHER, 1989) und ersetzte die bis dahin übliche Artenbestimmung durch proteinbiochemische Tests. Die DNA-Analytik hat gegenüber der Proteindiagnostik den Vorteil einer höheren Sensitivität und Spezifität. Sie muss daher als Goldstandard zur Artenbestimmung nicht nur von Tieren, sondern auch von Pflanzen und Mikroorganismen gelten.

Im Rahmen einer Facharbeit wollten fünf Schüler des Biologie Leistungskurses der Schiller-Schule Bochum selbstständig überprüfen, welche Fleischsorten in einem zu testenden Döner nachweisbar seien. Die Untersuchungen basieren auf den Ergebnissen einer voraus gegangenen Facharbeit am Ruhr-Gymnasium Witten (SCHALLER, 2013). Hierbei waren Primer entwickelt worden, die es ermöglichen sollten, mittels PCR den Nachweis verschiedener Spezies in zu untersuchenden Lebensmitteln zu führen. Spezies spezifische Primer für Acrosin waren für Huhn, Pferd, Lamm, Rind und Schwein entwickelt worden. Acrosin wurde gewählt, da Sequenzalignements (Abb. 1) für dieses Gen starke Sequenzunterschiede für die verschiedenen Spezies zeigten, was die Voraussetzung für die Festlegung der spezifischen Primer (Abb. 2) war. Im Gegensatz hierzu zeigten die Sequenzalignements, dass es sich beim Actin um ein konserviertes Gen handelt. Actin eignet sich daher als Kontrollgen, da immer nur das gleiche Primerpaar benötigt wird, um für alle zu untersuchenden Arten eine PCR durchführen zu können. Die entsprechenden Primer waren ebenfalls in der Vorarbeit (SCHALLER, 2013) bereits entwickelt worden (Abb. 2).

In der Facharbeit sollte überprüft werden, welche Spezies tatsächlich im zu untersuchenden Fleisch (hier Kalbsdöner) enthalten sind. Laut Gesetzgeber ist neben Kalb im Kalbsdöner lediglich Lammfleisch erlaubt. Jeder Schüler untersuchte das Vorhandensein nur einer Spezies (Huhn, Pferd, Lamm, Rind oder Schwein). Meine eigenen Untersuchungen konzentrierten sich auf den Nachweis von Schweinefleisch. Als ein Ergebnis sollte im Zusammenhang der Facharbeiten eine Praktikumsvorschrift für ein 1-tägiges Praktikum für unsere Q1-Biologiekurse erarbeitet werden. Zur Durchführung der Experimente war eine einwöchige Versuchsreihe mit Betreuung durch Herrn Dr. Florian Schaller, Biologielehrer an der Schiller-Schule, geplant.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Zentrifuge: Perfectspin24plus	PEQLAB Biotech GmbH, Erlangen
Thermocycler: peqSTAR 96 Universal Gradient	PEQLAB Biotech GmbH, Erlangen
Gleichspannungsquelle: EV265	Kister Biotech GmbH + CoKG,
Steinfurt	
UV-Illuminator: TFX-20 M	Vilber Lourmat, Maine la Vallée
Agarosegelkammer: MSCHOICETRIO	Kister Biotech GmbH + CoKG,
Steinfurt	

### 2.2 Chemikalien und Enzyme

taqPolymerase: peqGOLD-Polymerase, 5U/µl	
dNTS's	Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
Primer	Eurofins MWG Synthesis, Ebersbach
DNA Größenstandards:	
50bp DNA-Leiter	Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
100bp DNA-Leiter	Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
50xTAE	Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe

### 2.3 Biologisches Material:

Muskelfleisch von Huhn, Pferd,

Lamm, Rind und Schwein

Döner

Supermärkte des Raumes Bochum sowie

die „Rossschlachtere“ in Dortmund

„Döner-Buden“ des Raumes Bochum-  
Witten-Dortmund

## 3 Methoden

### 3.1 Arbeiten mit Gendatenbanken und DNA-Analyse Software

Das „National Center for Biotechnology“ (NCBI) stellt eine Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), in der sämtliche jemals publizierte DNA-Sequenzen verzeichnet sind zur Verfügung. Zur Suche der Gensequenzen, von in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteinen, wurde auf dieses Programm zurückgegriffen. Nach Eingabe von Spezies und Proteinnamen erhält man einen Datensatz für das gesuchte Gen. Auch Informationen zu relevanten Publikationen und die systematische Einordnungen des Gens in den Stammbaum werden beispielsweise angegeben. Diese Arbeiten erfolgten im Rahmen der vorliegenden Facharbeit einer Schülerin (Schaller, 2013) und wurden von mir im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit verifiziert.

### 3.2 Primer Identifizierung und Bestellung

Sequenz-Alignments für die Spezies Schwein, Pferd, Lamm, Rind und Huhn wurden mit Hilfe des Programms „ClustalW“ (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) erstellt. Anhand dieser Alignments konnten die Sequenzen der Primer für Actin und Acrosin festgelegt werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Primer für Actin eine möglichst Spezies übergreifende Anlagerung sicherstellen. Bezüglich der Primer für Acrosin wurden jedoch jeweils Spezies spezifische Primer ausgewählt. Die Herstellung der Primer erfolgt durch die Firma MWG-Operon. Auch diese Arbeiten erfolgten bereits im Rahmen der vorliegenden Facharbeit einer Schülerin (Schaller, 2013) und wurden von mir im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit verifiziert.

### 3.3 DNA-Extraktion

#### 3.3.1 Standardmethode der Extraktion von DNA aus Tiergewebe

Die Extraktion dient der Isolation der DNA aus einem Teil eines Gewebes. Hierzu wurden 2g Fleisch abgewogen und mit 1ml Spülmittel und jeweils einer Spatelspitze Waschpulver und Kochsalz in der Reibschale bis zur Homogenität zerrieben. Nach Zugabe von 9ml Wasser wurde erneut homogenisiert, danach 15 Minuten bei 45°C inkubiert und dann filtriert. Im Rahmen des Versuchs die DNA-Isolation aus Schweinefleisch zu optimieren wurde im weiteren Verlauf das Homogenat nicht nur filtriert sondern alternativ auch zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit eiskaltem Ethanol überschichtet. Nach 5 Minuten erfolgte die Überführung der DNA-Fäden, die sich an der Phasengrenze angelagert hatten, mithilfe einer Tropfpipette in ein sauberes Eppendorf-Gefäß.

Die DNA wurde für 5 Minuten bei 10000g (Erdbeschleunigung=g) abzentrifugiert, sodass sich zwei Phasen bilden: der Überstand und das DNA-Sediment. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das DNA-Sediment für 5 Minuten bei 35°C getrocknet.

#### 3.3.2 Reinigung isolierter genomischer DNA

Die Proteine und andere störende Stoffe müssen von der isolierten DNA abgetrennt werden, da diese bei der PCR Störfaktoren darstellen; ein Vorgang der Reinigung. Zu diesem Vorgang der Reinigung wurde das getrocknete DNA-Sediment in 650µl destilliertem Wasser gelöst. Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgt anschließend eine Reinigung der DNA. Hierzu wurden 500µl von Phenol und 500µl Chloroform dem DNA-Sediment hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln wurde eine Zentrifugation für 1 Minute bei 10 000g durchgeführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, allerdings wurde beim letzten Durchgang nur 500µl Chloroform (d.h. kein Phenol) mit der DNA versetzt.

Das daraus folgende Produkt der Zentrifugation wurde mit eiskaltem Ethanol (anderthalbfaches Volumen) gefällt und 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Sediment, die fertig isolierte und gereinigte DNA, wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 100µl Wasser aufgenommen, während die Ethanol-Phase verworfen wurde.

### 3.3.3 NaOH-Methode

Die NaOH-Methode ist eine weitere Methode der DNA-Extraktion, bei der man folgende Materialien benötigt: 0,2g Gewebematerial sowie NaOH und 0,5-M Tris-Puffer, Phenol, Chloroform und Ethanol.

Zuerst wurden 0,2g Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und darin mit einem Mikropistill zerrieben. Es wurden 800µl von 50mM NaOH hinzugefügt und ein weiteres Mal zerrieben. Nun wurde dieses Gemisch bei 95°C eine halbe Stunde inkubiert. Der Zugabe von 200µl 0,5-M Tris-Puffer, pH 8,0, folgte eine Zentrifugation von 2 Minuten bei 14000rpm. Danach wurde dem Gemisch im Verhältnis 1:1 Phenol und Chloroform hinzugegeben und geschüttelt, dieses Gemisch wurde abermals zentrifugiert, die oberste Phase wurde überführt und Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase weiter verwendet und die untere Phase, das Chloroform, verworfen. Für die anschließende PCR wurde der Überstand in zwei gleich große Mengen geteilt, zum einen ohne weitere Verarbeitung zum anderen nach zusätzlicher Aufreinigung durch Zugabe von Ethanol, Zentrifugation für 10 Minuten und Aufnahme des Sediment mit 100µl Wasser.

### 3.3.4 Hexan-NaOH-SDS-Methode

Bei dieser Methode benötigt man 0,2g Gewebe sowie 500µl SDS-NaOH-Lösung, 20µl Proteinase K, Phenol und Chloroform. Zuerst wurden 0,2g Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und zerrieben mit einem Mikropistill. 500µl Hexan wurden dazugegeben und das Pistill erneut benutzt. Dann wurden 500µl SDS-NaOH-Lösung (10% SDS, 0,2M NaOH) in das Eppendorf-Gefäß hinzugefügt. Nun wurde das Gefäß kräftig geschüttelt, es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten. Es entstanden 3 Phasen, von denen die untere wässrige Phase abgenommen wurde und 20µl Proteinase K hinzugegeben worden sind. Daraufhin wurde das Gemisch 30 Minuten bei 65°C inkubiert und ein weiteres Mal 5 Minuten bei 5000rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und eine einmalige Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach Zugabe von Chloroform im Verhältnis 1:1 zu der oberen, weiter zu verwendenden Phase, wurde das Homogenat gleichmäßig aufgeteilt in zwei Gefäße. Die untere Phase wurde verworfen. Die eine Hälfte wurde für die sich anschließende PCR verwendet. Die andere Hälfte der DNA-Probe wurde mit Ethanol gefällt und für 5 Minuten bei 12000rpm zentrifugiert, bevor die in H<sub>2</sub>O gelöste DNA für die PCR eingesetzt wurde.

### 3.3.5 TAIL-Extraktion

Für diese Methode der DNA-Extraktion werden 0,2g Gewebe, 450µl Tail-Puffer, 800µl Isopropanol, 600µl Ethanol, 20µl Proteinase K und 200µl Kaliumacetat benötigt. Zu Beginn wurden 0,2g Fleisch in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit einem Pistill zerrieben. Sobald ein Homogenat entstanden ist, folgte die Zugabe von 450µl Tail-Puffer und 20µl Proteinase K. Nach diesem Vorgang wurde das Gemisch mindestens 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200µl 5-M Kaliumacetat hinzugegeben, das Gefäß geschüttelt und 5 Minuten mit 5000rpm und danach noch einmal 5 Minuten mit 12000rpm zentrifugiert. Der daraus entstehenden Überstand (ca. 500µl) wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 800µl Isopropanol zugegeben. Anschließend wurde die Probe zuerst geschüttelt und dann für 5 Minuten bei 12000rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abgekippt, wodurch eine dünne Sediment-Schicht entstand. Auf diese Sediment-Schicht wurden 600µl Ethanol gegeben und das Gemisch vorsichtig invertiert. Dann wurde es bei 12000rpm 3 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen, das Pellet getrocknet und danach in Wasser aufgenommen.

### 3.4 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation bestimmter Gen-Sequenzen. Mithilfe dieser Methode können auch gering vorliegende DNA Spuren vermehrt werden, die ansonsten nicht ausreichend dedektierbar für weitere Untersuchung wären.

Zur Vorbereitung stellt man einen sog. PCR-Ansatz bestehend aus einem Puffer (sorgt für das pH-Optimum der Enzyme), dNTP's (Nukleotide), forward und reverse Primer, Taq-Polymerase und einem DNA-Template zusammen. Nach der Fertigstellung wird dies in einem Thermocycler platziert und durchläuft dort mehrmals hintereinander 3 Phasen.

In der ersten Phase, der Denaturierung, wird das Homogenat auf 95°C erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA gespalten werden. Nun können die einzelstängigen DNA-Sequenzen als Matrizen zur Synthese der neuen DNA dienen.

Die darauf folgende zweite Phase, die Hybridisierung, stellt einen Vorgang dar, in dem künstliche Primer an die zu amplifizierenden DNA angelagert werden. Während dieser Anlagerung versucht man das zu den jeweiligen Primer gehörende Temperaturoptimum zu erreichen, welches in den meisten Fällen zwischen 50°C und 70°C liegt.

In der dritten und letzten Phase, die Polymerisation, findet ausgehend von den angelagerten Primern die Synthese des DNA-Abschnittes statt, wobei die Taq-Polymerase aus den dNTP's einen komplementären Strang bildet. Die Temperatur beträgt hierbei 72°C. Zur Darstellung dieser drei Phasen, die einen abgeschlossenen Zyklus der PCR darstellen, wird auf Abb. 3 verwiesen. Jeder PCR-Ansatz durchlief 30-40 dieser Zyklen, anschließend kühlt der Thermocycler das Homogenat auf 8°C runter. Da die in jedem Zyklus neu synthetisierten DNA-Stränge im nächsten Zyklus wiederum als Template dienen, kommt es im Verlauf der PCR zu einem exponentiellen Wachstum der produzierten DNA. Diese starke Amplifikation erklärt die hohe Sensitivität der PCR.

### **3.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Visualisierung, der Nachweis der extrahierten DNA und auch die Untersuchung der PCR Produkte, erfolgte durch die Agarosegelelektrophorese.

Hierbei wird die DNA in eine Tasche des Gels gegeben, das aus 0,6%-1,8% Agarose gelöst in 1xTAE besteht. Das Agarosegel liegt in einer Pufferlösung durch die ein elektischer Strom von „+“ nach „-“ läuft. Die vorher extrahierte und gereinigte DNA wird auf einem Streifen Parafilm in 9µl Tropfen mit 1µl Indikator (Xylencyanolblau) gefärbt. Nach diesem Schritt werden die Tropfen aus DNA und Farbstoff mit Pipetten in die Geltaschen am „+“ Ende der Gelkammer gegeben.

Nach der Aktivierung des Stromkreises wandert die negativ geladene DNA zum Minuspol. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Größe der DNA-Fragmente ab, so dass diese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Anfärbung der DNA erfolgte über Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert und diese bei Anregung durch UV-Licht orange einfärbt.

## 4 Diskussion und Ergebnis

Da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu überprüfen, ob Schweinefleisch in Döner nachweisbar ist, wird im Ergebnisteil vornehmlich auf die diesbezüglich relevanten Resultate eingegangen. Die Ergebnisse zu den anderen Spezies werden von den Mitschülern in separaten Facharbeiten beschrieben. Zu Beginn der Experimente musste die DNA, sowohl aus der Fleischprobe des Döners als auch aus 5 definierten Fleischsorten (Huhn, Rind, Lamm, Pferd und Schwein) extrahiert werden. Die DNA-Extraktion erfolgte zunächst nach der unter 3.3.1 beschriebenen Methode. Wie in Abbildung 4 gezeigt, konnte tatsächlich Schweinefleisch DNA in der selbst extrahierten Probe (Abb. 4, Nummer 1) nachgewiesen werden. Dies gelang nicht in der positiv Probe (Abb. 4, Nummer 12) und auch nicht im Döner (Abb. 4, Nummer 9). Da auch andere Proben mit negativen Ergebnissen in der Agarosegelelektrophorese bei späteren PCRs jedoch einen sicheren DNA Nachweis ermöglichten, verdeutlicht dies die geringe Sensitivität der Gelelektrophorese zum Nachweis von DNA. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die aufgetragene DNA-Menge für die Schweinefleisch Positivprobe und den Döner lediglich unter der Nachweisgrenze dieser Methode lag. Ein Problem in diesem Zusammenhang stellt die eher unzureichende Qualität unseres Geldokumentationssystems dar, welches aus einem altersschwachen UV-Illuminator kombiniert mit einem Fotoapparat ohne Stativ besteht.

Da ein Ziel der Projektwoche war die im Döner enthaltenen Fleischsorten mittels PCR nachzuweisen, wurden zunächst im Sinne einer Positivkontrolle die Primer an einem passenden Homogenat, nämlich Schweinefleisch, getestet. Als Hinweis auf die erfolgreiche Extraktion der DNA und das prinzipielle Funktionieren des untersuchten PCR Ansatzes ergab diese PCR mit Actinprimern und Schweinefleisch ein deutliches Signal (Abb. 5, Nr. 8). Hierbei auffällig sind jedoch die multiplen Banden des Actinansatzes, so dass es offensichtlich auch zu unspezifischen Bindungen der Actinprimer an das Template kam. Auf weitere Optimierung der PCR zur Steigerung der Spezifität der Actinprimer musste leider auf Grund von Zeitmangel in der einwöchigen Projektwoche verzichtet werden. Potentielle Möglichkeiten zur Optimierung einer PCR werden weiter unten beschrieben. Im Gegensatz zu Actin konnte in dem Ansatz aus den für das Schwein spezifischen Acrosinprimern mit Schweinefleisch keine PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 5, Nr. 7). Es sollte daher versucht werden, mit Veränderungen der Aufbereitung der

Schweinefleischhomogenate die Template-Qualität und -Konzentration zu verbessern. Hierzu wurden die Homogenate entweder mittels Filtration oder alternativ mit Zentrifugation (siehe 3.3.1) aufgearbeitet. Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnte hierdurch jedoch keine Verbesserung des spezifischen Nachweises von Schweine-DNA erreicht werden (Nr. 17-19). Diese Aussage muss jedoch vor dem Hintergrund der negativen PCR-Positivkontrolle für Actin in diesem Versuchsansatz (Nr. 20-22) als nicht bewiesen angesehen werden, da bei negativer Positivkontrolle auch ein fehlerhafter PCR Ansatz vorgelegen haben könnte. Um zu eindeutigeren Ergebnis zu kommen, wurde auch mit unterschiedlich hohen DNA-Konzentrationen im PCR Ansatz gearbeitet. Jedoch führte sowohl das Ergebnis der PCR mit einer höheren DNA-Konzentration von 2µl Template bei einem 25µl-Ansatz (Abb. 7, Nr. 8), als auch das Ergebnis mit der üblichen Menge von 1µl DNA-Template (Abb. 7, Nr. 9) zu keinen sichtbaren Banden.

In der Folge wurde getestet, welche Fleischsorten im Döner nachweisbar sind. Wie Abb. 7 zeigt, ergab die Untersuchung des Kalbsdöners auf Schweinefleisch mit den spezifischen Acrosinprimern keine sichtbaren Banden (Abb. 7, Nr.10), ein Hinweis auf die Reinheit des Dönerfleisches. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind jedoch nicht so eindeutig, wie die Ergebnisse bezüglich Rind- und Lammfleisch im Döner (Abb. 7). So war bei negativem Nachweis von Lamm im Dönerfleisch (Abb. 7, Nr. 11) die Positivproben in extrahierter Lamm-DNA sowohl für Acrosin als auch Actin tatsächlich positiv (Abb. 7, Nr. 12,13). Rindfleisch ließ sich spezifisch im Döner nachweisen (Abb. 7, Nr. 4). Auch zeigte die PCR mit Rind spezifischen Acrosinprimer in der Probe des untersuchten Döners ein vergleichbares Bandenmuster mit der Positivkontrolle an extrahierter Rind-DNA (Abb 7, Nr. 1-4). Die Ergebnisse für Lamm und Rind haben daher eine hohe Validität. Im Vergleich sind die Ergebnisse zum Schweinefleisch nicht so eindeutig: Bei fehlendem Nachweis einer Bande in der Positivkontrolle für den spezifischen Schweine-DNA Nachweis (Abb. 7, Nr. 10) ist keine definitive Aussage zum Gehalt von Schweinefleisch im Kalbsdöner erlaubt, da methodische Fehlerquellen nicht gänzlich ausgeschlossen sind. Andererseits ergaben die Untersuchungen aber auch keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Schweinefleisch im getesteten Döner.

Weitere Versuche zur Verbesserung des spezifischen Schweine-DNA Nachweises wurden unternommen. Insbesondere um die DNA-Extraktion aus Schweinegewebe zu verbessern, wurden drei weitere DNA-Extraktionsverfahren angewandt (Abb. 8, Nr. 1-5), nämlich die NaOH-Methode, Hexan-NaOH-SDS-Methode und TAIL-Extraktion.

Lediglich bei der DNA-Isolierung durch die TAIL-Extraktion wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese DNA sichtbar (Abb. 8, Nr. 5). Diese Ergebnisse zeigen die TAIL-Methode als das beste Verfahren der DNA-Extraktion aus Schweinefleisch. Nach der anschließenden PCR mit den für Schweinefleisch spezifischen Acrosinprimern war das Ergebnis jedoch für alle Extraktionsmethoden, also auch für die TAIL-Extraktion, negativ (Abb. 8, Nr.16). Basierend auf der TAIL-Extraktion wären weitere Schritte zur Optimierung der PCR mit Schwein spezifischen Acrosinprimern notwendig gewesen, um die angewandte Methodik weiter zu etablieren. Hierzu hätten z. B. Versuchsreihen u.a. mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen, Primer- und DNA-Konzentrationen, Zykluszahlen oder  $MgCl_2$ -Konzentrationen durchgeführt werden müssen (BUSCH, 2010; BALITZKI-KORTE, 2004). Eine besondere Relevanz hat hierbei die Annealing-Temperatur: Falls die Temperatur zu hoch eingestellt wird, kann zwischen Strang und Primer keine Wasserstoffbrückenbindung erfolgen, ist die Temperatur zu niedrig, kann es vorkommen, dass die Primer sich unspezifisch anlagern, die Basenpaarbindung also nicht komplett komplementär ist. Hieraus wird ersichtlich, dass in Abhängigkeit von der Annealing Temperatur sowohl falsch positive wie auch falsch negative Ergebnisse resultieren können. Die optimale Annealing-Temperatur variiert von Primer zu Primer und ist u.a. von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Primer und Template, d.h. von Länge und G-C-Gehalt, abhängig (BUSCH, 2010). Aufgrund des gesetzten Zeitrahmens waren solche Studien nicht möglich. Sollten jedoch auch entsprechende Versuchsreihen zur Optimierung der PCR nicht zur Etablierung einer Schwein spezifischen PCR führen, wäre auch nicht auszuschließen, dass PCR-Inhibitoren den Versuchsansatz verunreinigt haben. PCR-Inhibitoren sind alle Faktoren, die nach einer unzureichenden DNA-Aufbereitung die Amplifikation bei einer PCR hemmen können. Bei dem vorliegen ausreichender DNA-Templates sind PCR-Inhibitoren die häufigste Ursache für eine unzureichende Amplifikation (ALACEDDINI, 2012).

Wie in Abb. 7 wiedergegeben, ist durch die Gel-Analyse der PCR-Produkte die Existenz von Pferdefleisch (Nr. 5) im getesteten Döner nicht ausgeschlossen. Auch wenn die Positivkontrolle (Pferde spezifische Acrosinprimer mit Pferdefleisch Homogenat) zu keinem Ergebnis führte, bleiben hierdurch geringe Zweifel an der Reinheit des Kalbsdöners. Ein Betrug am Verbraucher ist allerdings weder in Bezug auf Pferdefleisch noch bezüglich Schweinefleisch zu beweisen. Der Glaube vieler Menschen untersagt das Konsumieren von Schweinefleisch und besitzt dadurch eine

hohe Priorität bei der Reinheit von Lebensmitteln. Beruhigend hierbei ist, dass auch die Versuchsreihen der Mitschüler nur Rindfleisch mit Gewissheit im Kalbsdöner nachweisen konnten.

Zusammenfassend konnte in der einwöchigen Projektwoche durch die beteiligten Schüler erfolgreich die Methodik der DNA-Extraktion, der PCR und der Agarosegelelektrophorese angewandt werden. Trotz einiger methodischer Einschränkungen konnte tatsächlich Rindfleisch im Döner nachgewiesen werden. Verunreinigungen des Döners ließen sich nicht beweisen, so dass die Ergebnisse auch als Hinweis auf die Reinheit des untersuchten Döners gewertet werden können.

## 5 Zusammenfassung

Anfang des Jahres 2013 ging zunächst die Meldung vom Nachweis von Pferdefleisch in einigen Lebensmitteln, insbesondere Fertigprodukten, durch die Presse (LÜDEMANN, 2013; FUNK, 2013). Später wurde dann auch Schweinefleisch in getesteten Dönern gefunden (LÜDEMANN, 2013; FUNK, 2013). Zum Schutz der Konsumenten wurde von der Bundesverbraucherschutzministerin Ilse Aigner ein „Nationaler Aktionsplan“ mit verschärften Lebensmittelkontrollen gestartet.

Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen einer Projektwoche die molekularbiologischen Methoden zum Nachweis verschiedener Spezies (Huhn, Pferd, Lamm, Rind und Schwein) in Lebensmitteln im Schülerlabor etabliert und am Beispiel eines Döners getestet werden. Die eigenen Arbeiten konzentrierten sich hierbei auf den Nachweis von Schweinefleisch. Mit Hilfe der Standardmethode gelang die Extraktion von DNA aus Schweinefleisch. Da die anschließende PCR mit Schwein spezifischen Primern jedoch negativ blieb, wurde die DNA Extraktion (Filtration vs. Standard) und der PCR Ansatz (DNA Template Menge) variiert. Auch wurden 3 weitere alternative DNA Extraktionsmethoden angewandt. Letztendlich konnte mit der „TAIL-Methode“ die größte Menge DNA aus Schweinefleisch extrahiert werden. Die durchgeführten PCRs zum Test auf Schweinefleisch im Döner, hierzu wurden Schwein spezifische Primern für das Acrosingen verwendet, blieben negativ. Kritisch ist jedoch zu diskutieren, dass diese Ergebnisse nicht eindeutig sind, da auch die mitlaufenden Positivproben mit homogenisierten Schweinefleisch als Template negativ blieben. Die weiteren Versuche während der Projektwoche konnten, wie zu erwarten, Rind aber nicht Lamm im Kalbsdöner nachweisen. Die Befunde bezüglich Pferdefleisch ließen zwar den Verdacht einer Verunreinigung aufkommen, beweisend waren sie jedoch nicht.

Zusammenfassend konnten die Methoden der DNA-Extraktion, PCR und Agarosegelelektrophorese im Schülerlabor erfolgreich angewandt und weiter optimiert werden. Im Kalbsdöner ließ sich neben Rind keine weitere Spezies sicher nachweisen, so dass die Ergebnisse dazu beitragen können, wieder Vertrauen in die Reinheit der verkauften Lebensmittel zu gewinnen.

## 6 Literaturverzeichnis

ALACEDDINI, R (2012)

Forensic implications of PCR inhibition—A review.

*Forensic Science International: Genetics* **6**: 297–305

BALITZKI-KORTE, B (2004)

Speziesidentifizierung mittels vergleichender Sequenzanalyse des mitochondrialen 12S-rRNA-Gens.

Dissertation, Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

BUSCH, U (2010)

Optimierung und Validierung.

Springer Verlag; Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: 35-49

FUNK, V (2013)

Schweinfleisch in Döner gefunden.

Frankfurter Rundschau 18.2.13: <http://www.fr-online.de/lebensmittel/fleischskandal-schweinefleisch-in-doener-gefunden,21868140,21868096.html>

KOCHER, TD; THOMAS, WK; MEYER, A; EDWARDS, SV; PÄÄBO, S; VILLABLANCE, FX; WILSON, AC (1989)

Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers.

Proc Natl Acad Sci **86**:6196-6200

LÜDEMANN, von D (2013)

Alles Wichtige zum Pferdefleisch-Betrug.

Zeit online 11.4.13: <http://www.zeit.de/wissen/umwelt/2013-02/faq-pferdefleisch>

SCHALLER, JA-L (2013)

Identifizierung von Fleischsorten in Lebensmitteln mit Hilfe von molekularbiologischer Methoden am Beispiel des Döners.

Facharbeit Biologie Leistungskurs, Ruhr-Gymnasium Witten

## 7 Anhang

**Abb. 1:** Sequenzalignments des Acrosingens für verschiedene Spezies

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

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

ovis -----TTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
bos -----AGGACTTTGGCAGAGATGCTGCCAACTGCCATTCTGC-T
equus ATATTTCAGGCCGTGCTGGGGCAGGAGTCTGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTCTGC-T
sus GCTTCCAGGCCAGGCCGGCG-AGGAGCGCGGTAGAGATGCTGCCAACTGCCGTTTC----T
gallus CCGGGCGCGATGGGCTGCCGTGCGCCTCCGGGAGCGATGGTGTGCTG-CTGCTGCCCTCGC
          ** * * * * * * * * * *

ovis GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCCGACAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCCTGC
bos GGTCTTGGCAGT-ATCTGTGGTCCAGAG-ATAACACCACGTGTG---ATGGCCCCTGT
equus GGTCTTGGCAGT-GTCTGTGGTGGCCAATG-ATAACATCACGTGTG---ATGGTCCCTGT
sus GGTCTTGGCAGT-GTCTGTGGCGCCAGAG-ATAACGCCACGTGTG---ATGGCCCCTGC
gallus GGTGCTGCTGGCCGTCTGC--CGGCCTGGGCACGGCTCCTCCGGCGCCTGCGACACCTGC
          *** ** * * * * * * * * * *

ovis GGGGTCCGGTTCA-GGCAGAAC-CGGCAGGGGGCGTACGGATCATCGGTGGGCAAGA-C
bos GGGACACGGTTC-GGCAGAAC-CGTCAGGGGGCGATCGGATCATCGGCGGGCAAGA-C
equus GGGTTACGATTCA-GGCAGAAC-CTACAAGGGACCCTCCGCATCATCGGAGGGCAGGA-C
sus GGCTTACGGTTCA-GGCAGAAA-TTAGAGTCAGGCATGCGTGTGGTTGGCGG-CATGAGT
gallus GGGCTCCGGCCATGGCTTACTACTACGGGGGAAC--GCGTGTGCTGGGCGG-CACGGAC
          ** ** * * * * * * * * * *

ovis GCCGCCACGGGGCCTGGCCCTGGATGGTCCAGCTCCAGATCTTACAGTACCACAACAAC
bos GCTGCCACGGGTCTGGCCCTGGATGGTCCAGCTCCAGATCTTACATACCACAACAAC
equus GCGGCACTTGGAGCCTGGCCCTGGATGGTCCAGCTCCAGTCTTCACTTACCACAACAAG
sus GCAGAACCGGGCGCCTGGCCCTGGATGGTCCAGCTCCAGATCTTATGTACCACAACAAC
gallus GCCCCGACGGGGCCTGGCCCTGGATTGTCCAGCTCCAAAGC---ACGTGGTATG-TGGG
          ** * * * * * * * * * *

ovis CGGCGGTACCACGTGTGCGGGGCTCCCTGCTGAACTCCCAGTGGCTGCTCACGGCCGCT
bos CGGCGGTACCACGTGTGCGGGGCTCCCTGCTGAACTCCCAGTGGCTGCTCACTGCCGCT
equus CGGAGGTATCATGCCTGCGGAGGCACATTGCTGAACTCCCAGTGGCTGGTGACAGCTGCT
sus CGGAGGTACCACACGTGCGGGGCGATCTTGTGAACTCGCACTGGGTGCTCACTGCTGCT
gallus CA-CGGGA-CACATCTGTGGAGGATCTCTCATACCCCGCAGTGGGTCTCACGGCAGCG
          * ** * * * * * * * * * *

ovis CACTGCTTACAGATCAAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTCGGAGCTAAGG
bos CACTGCTTACAGATCAAAAAAAAAAGTGACCGACTGGAG-GC-TGATCTTTGGAGCTAAGG
equus CACTGCTTACAGACAAAAAAAAAAGCGTATGACTGGAG-AC-TGATTTTGGAGCAAGGG
sus CACTGCTTCAAGAACAAAAAAAAAAGTTACTGACTGGAG-AC-TGATTTTTCGGAGCAACG
gallus CACTGCTTC--GACCATGCAACCCCGACACGCGTGGCACGTGGTGATCGGTGGCCACG
          ***** ** ** * * * * * * * * * *

ovis AAGTTGAGTGGGGACCAATAAGCCAGTGAAGCCGCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
bos AAGTTGAGTGGGGAGCAATAAGCCAGTGAAGCCGCTCTGCAGGAGAGATATGTTGAGA
equus AAATTCAATATGGCAGCAATAAGCCAGTGAAGCCACCTCTGCAGGAGAGACGTGTTGAGA
sus AAGTTGTGTGGGAAGCAATAAGCCGGTGAAGCCACCCCTGCAGGAGAGATTTGTTGAGG
gallus A--TC---TGAAACGCC--TGGGCC--CGAAGCTGTG-TGC----GCAACGTGATACGG
          * * * * * * * * * *

```

ovis AAATCATCATTCATGAGAAATACTCCGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATGA  
 bos AAATCATCATTCATGAGAAATACTCGGCGAGCTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCATAA  
 equus AAATCATCATTCATGAAAAATACTCCCCTCGTTCAGAGGCCAACGACATTGCTCTCTTGA  
 sus AGATCATCATTCATGAAAAATACGTTTCAGGGTTAGAGATAAATGACATTGCCCTCATAA  
 gallus A--TAATCCCCCAGGAATACTATCACAGAAACAACATGGCCAATGACATCGCGCTGCTTG  
 \* \* \*\*\* \*\* \*\* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

ovis AGATCACCCCTCCTGTTACCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGATGCCTGCCTCA-GTTT  
 bos AGATCACCCCTCCTGTTATCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGCTGCCTGCCTCA-GTTT  
 equus AGATCACCCCTCCCCTGTTCCCTGTGGGCACTTCATTGGACCAGGCTGCCTGCCCA-ATTT  
 sus AGATCACCCCTCCTGTTCCATGCGGGCCCTTCATCGGACCAGGCTGCCTGCCCA-GTTT  
 gallus AGCTGGACCAACCTGTCCAGTGCAGCTACTACATCCAGCTCGCTGCCTGCCTGCCTGCCT  
 \*\* \* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

ovis AGG-GCAGGCCACCCAGAGTTCCCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACA  
 bos AGG-GCAGGCCACCCAGAGTTCCCCAGACATGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTACG  
 equus AAG-GCAGGCCACCTAGAGTTCCCTCAGACCTGCTGGGTGGCTGGCTGGGGATTCTTAAA  
 sus AAG-GCTGGCCCGCCAGAGTCCAGACATGCTGGGTGACTGGCTGGGGCTACTTAAA  
 gallus CGCTGCGAGTGT--CAGAGCTCA-CAGAC-TGCTATGTCAGTGGCTGGGGACACATGGG  
 \*\* \* \* \*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*

ovis AGAGA-ATGCCCGCAGGA-----CATCCCCTATGCTGCAGGAGGCGCGCTGGA  
 bos TGAGA-ATGCCCGCAGGA-----CATCACCTGTGCTGCAGGAGGCGCATGTGGA  
 equus AGAGA-ATGCCCGCAAGA-----CATCACCTATGCTGCAGGAGGCGCGCTGGA  
 sus AGAGA-AAGGCCCGCAGGA-----CGTCACCTACACTGCAGGAGGCGCGTGTGGC  
 gallus GCTGAGATCTCTACAGGAATATGTCGAACCATAACCGTGTCTGCTGCAGGAGGCCAAGTCCA  
 \*\* \* \* \* \*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

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

ovis CCAACGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG  
 bos CCAATGTGTGCGCAGGGTACCCTGAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG  
 equus CCAATGTGTGCGCAGGGTATCCTCAAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG  
 sus CTAATGTGTGCGCAGGGTATCCTAGAGGCAAGATTGACACCTGCCAGGGGACAGCGGCG  
 gallus C-AACGTGTGTGCTGTTACCCGAGGGCGGCATCGACACCTGCCAGGGTGACAGCGGTG  
 \*

ovis GGCTCTCATGTGCAAAGACAGCGCGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC  
 bos GGCTCTCATGTGCAAAGACAGCGTGGAAAACAGCTATGTGG-TCGTGGGAATCACAAGC  
 equus GGCTCTCATGTGCAAGACAGCATGGAAAACGCTATGTGG-TCGTGGGAGTACAGAGC  
 sus GGCTCTCATGTGCAAGACAGAGCGGAAAACACCTTTGTGG-TCGTGGGCATCACAAGC  
 gallus GTCTCTCATGTGCAAAGATAAACTGCTGACTACT-TCTGGCTATTGGTGTGACCAGC  
 \*

ovis TGGGGGTAGGCTGTGCCGAGCTAAGCGCCCGGAGTCTACAGTCTACCTGGTCTTAT  
 bos TGGGGGTAGGCTGTGCCGAGCTAAGCGCCCGGAGTCTACAGTCTACCTGGTCTTAT  
 equus TGGGGGTAGGCTGTGCCGAGCTAAGCGCCCGGAGTCTACAGTCTACCTGGTCTTAT  
 sus TGGGGGTAGGCTGTGCCGAGCTAAGCGCCCGGAGTCTACAGTCTACCTGGTCTTAT  
 gallus TGGGGAAAGGCTGTGGGAGAATACAGCAGCTGGAGTCTATGCTCCACTCAGTACTTT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

ovis CTGAACTGGATCGCTCCA-AGATAGGCTCTACCGCCGTGCACATGATTGAGTTGCCAC  
 bos CTGAACTGGATTGCCTCCA-AGATAGGCTCTAACCGGTGCACATGATTGAGTTGCCAC  
 equus CTGAATTGGATTGCTTCCA-AGATCGGTTCTAACGCCTTGCACATGATTCAACTGGGCAC  
 sus CTGAACTGGATTGCTTCCA-AGATTGGTTCTAATGCCTTGCAGATGGTTCAACTGGGCAC  
 gallus CGCAACTGGATC-CTGGTACAGATGGGATT--GCTTCCAGCAGAGCGCCTACTACA-AC  
 \* \*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

ovis CGCTCCCCGCTTCTACTCCAGGGGCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTCAGCCTTCCGT  
 bos CGCTCCCCGCTTCTACTCCAGCAGCCCAAGCGAGCCCTGGCTCCGTCAGCCTTCCAT  
 equus CCCTCCCCCTCTACTACTCAAGCACTCCCGGCTAGCTCCCTCTATTCAACT--AT  
 sus CCCTCCCCGCTTCTACTCCAGCAGCCCTGTGAGACCCCCCTGTTGAGCTCCTGT

```

gallus      GCCATATCCAGTCTATATCTCA--ACCTCCTACCAGA---GGCCAAAACCAACAT---AC
            *   *           **   *           *           **   *           **   *

ovis        TCG--CCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCCTCGACCACCTCCC----TCTCAGCAAG
bos         TCG--CCCACCTTGGTTCTTCCAACACGTTCCCTCAACCACCTCCC----TCTCAGCAAG
equus       TCA--CCCTCTTTGGTCTTCCAACGCCCCTCCTCAACCACCTCCC----CCT-----
sus         TCG--CCCACCTTGGTACTTCCAACGCCCCTCCTGGAC--CCTCCCAGCAACCTGGGTC--
gallus      TCGAGCCCATTTAGACCATGCCCAT---TTCCACG-----
            **   ***   *   *   *   **   *           ***

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

ovis        TGCCACCCCTCCCAGCACCACCCACCAGCCGCTCCACTAGGCCTCCCAGGCGCT
bos         TGCCCCCGACCCACGACCACCCACCAGCCCTTCCACTAGGCCTCCCAGGCACT
equus       T-----CCACCCACACCAAACCTTCCACCAAACCTCCTCAAGCACT
sus         GCCTCCACCACCCACCACCCACCACCCACAGCAAGTTTCCGCTAAACCTCCCCAAGCACT
gallus      TG-----CTCCAG---GAGCTCCTGC--AGGGTTTAAGAGGAAAG
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

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

ovis        AACGAAAAG-AGCAGTTATGAAATGGAAACCACAGACCTTCCA-GGACGACACGCTCCT
bos         AACGAGAAG-AGCAATTATGAAATGGAAACCACAGGCCTTCCA-GGACAAATGCTCCT
equus       AATGCAAAG-CGCTATTATGAAATGGAGACCACAGACCTCCCA-GAAC-----
sus         AGTGAAAGGAGCTATTATGAAACAGAGACCACAGACCTCCGAAGAAGTGCCCGCTCCT
gallus      TTTGGGG-----TAATGCCCAATGGCAGCCCCAG---TACCA-AAGC-----CCT
            *           *           **   *           * * * * *   * * *   *

ovis        ---GATCTGAGCCATTCTTGGC-----GGACCCAGCGAAGCCCTCACTCCTGAGGGAA
bos         CCTGATCTGACCCATTCTCAAC-----GGACCCAGTGAAGCCCTCACTCCTGAGGGAA
equus       ---TGA---CCGCT-----GCC-----TCCTGA-----
sus         ---GATTTGACCTCATTTCACCTGATTGGACCCAATTGCACACCTCATCCCTGAGAAA
gallus      ---GCTCTGT-CCCATCC-----ACCTC-CTCTTGACTGCA
            * *           * * * * *

ovis        AAA--A-GACGCAATAAATGGATATAAATACAAATATAAATATATATGACTAA-----
bos         AAA--AAGATGAAATAAATGGATATAAATACAAATATAAATATATATACACTAAAAAAA
equus       -----
sus         AAA--AGGATGAAATAAATGACTATAAATACAAATATAAATATATATACATAAAG-----
gallus      CACCCAGGTTTACTCAGTTGG-----ACAAATA-AAGCTTATTTTACAGCTA-----
    
```

**Legende:**

- \* = Sequenzübereinstimmung
- = "gaps", d.h. kalkulatorisch eingefügte Lücke

Hervorhebungen = Abgeleitete Primerpaare

**Abb. 2:** Primersequenzen für Acrosin und ActinZu erwartende PCR-  
Fragmentgrößen:**Acrosin:**

**ovis:** CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA GACACGCCTCCTGATCTGAGCC 214 bp

ovis-for: CCCTCAAACCTCCGACCCTCCA

ovis-rev: GGCTCAGATCAGGAGGCGTGTC

**bos:** CCCTCAAGCCCCCGGTCCTCAG AACATGCCTCCTCCTGATCTGA 214 bp

bos-for: CCCTCAAGCCCCCGGTCCTCAG

bos-rev: TCAGATCAGGAGGAGGCATGTT

**sus:** CCCCTCTGTTTCAGACTCCTGT TTGCACACCTCATCCCTGAGAA 366 bp

sus-for: CCCCTCTGTTTCAGACTCCTGT

sus-rev: TTCTCAGGGATGAGGTGTGCAA

**equus:** GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA CCCAGAACTGACCGCTGCCTCCTG 266 bp

equus-for: GACTCCCCTCTATTCAACCTATTCA

equus-rev: CAGGAGGCAGCGGTCAGTTCTGGG

**gallus:** GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC G-----TAATGCCCAATGGCAGCCCCA 392 bp

gallus-for: GGGAAAGGCTGTGGGAGAATAC

gallus-rev: TGGGGCTGCCATTGGGCATTAC

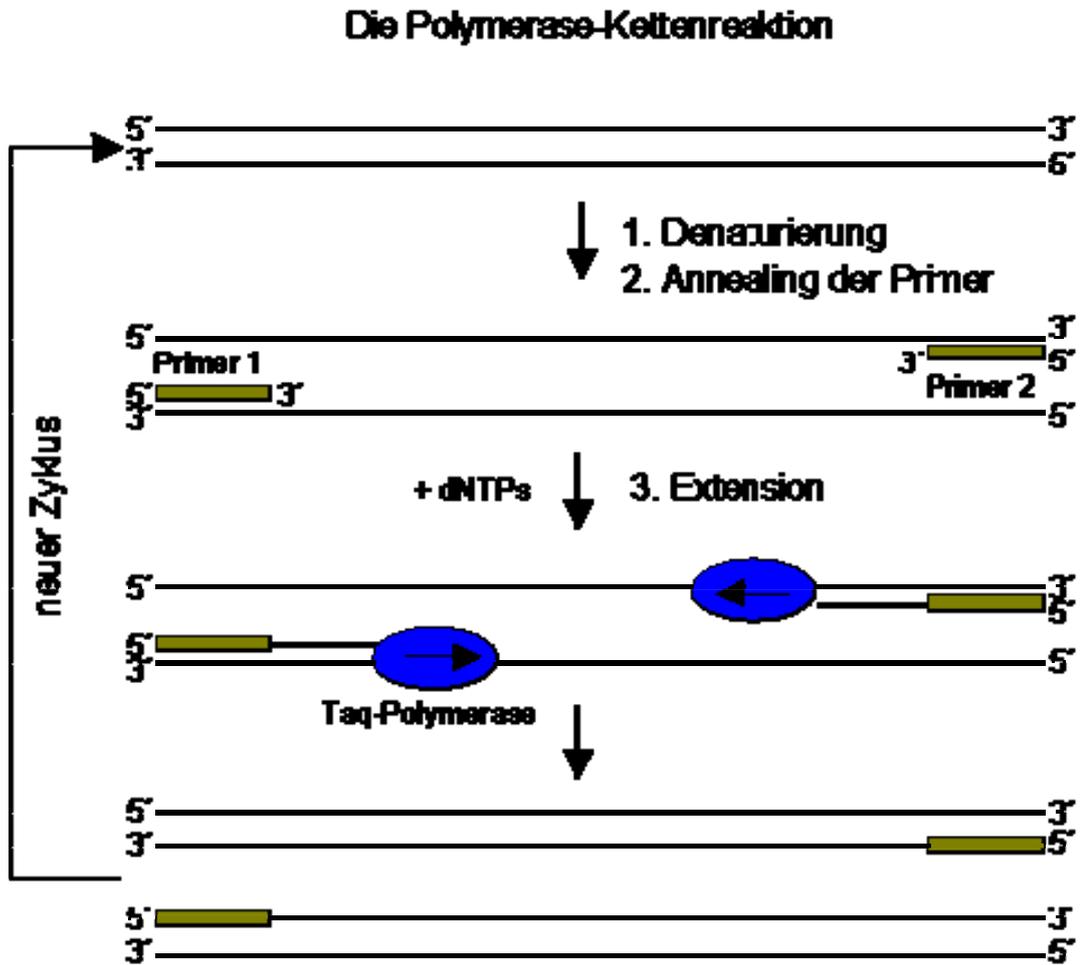
**Actin:**

actin-for: GGCATCACACTTTCTACAACGAGCT

actin rev: CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTGAT

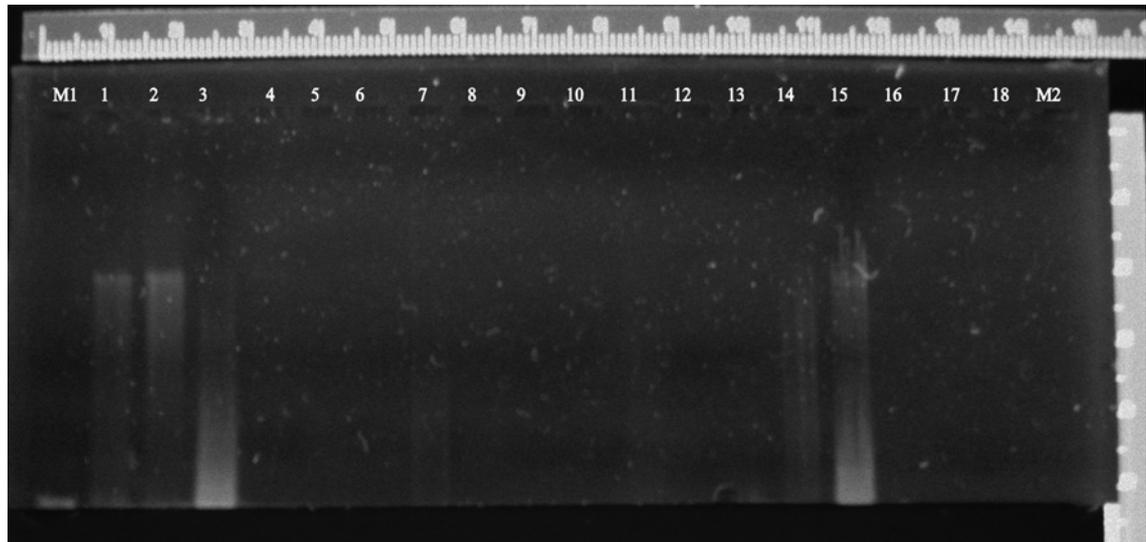
ca 410 bp

**Abb. 3:** Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (nach Labor Dr. Gärtner & Kollegen)



**Nach dem ersten Zyklus liegen zwei vollständige, identische DNA-Stränge vor, entsprechend einer Verdopplung der DNA-Menge**

**Abb. 4:** Nachweis der DNA-Extraktion. Die extrahierte DNA, der jeweiligen Fleischproben, wurde über ein 0,6 prozentiges Agarosegel aufgetrennt und nach der Elektrophorese mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.



M1/M2 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)

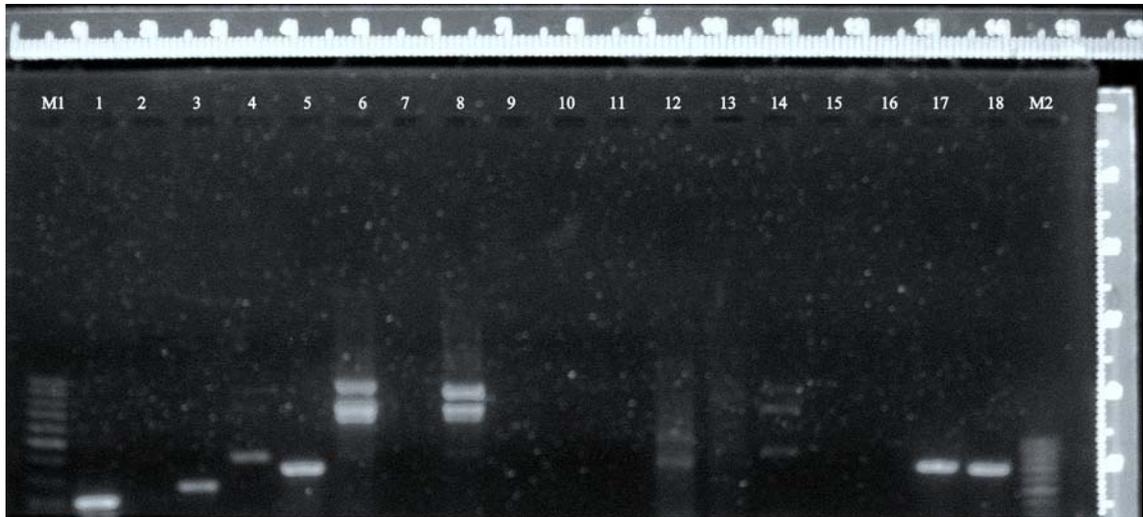
13 Huhn (GK)

14 Lamm (GK)

15 Huhn (GK)

GK: Genomische DNA im Vorfeld der Arbeit durch Schüler der Q1-Grundkurse präpariert wurde

**Abb. 5:** Gel-Analyse der PCR von Fleischproben mit Actinprimern und Spezies spezifischen Acrosinprimern. Produkte der PCR wurden über ein 1,8 prozentiges Agarosegel aufgetrennt und nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht.

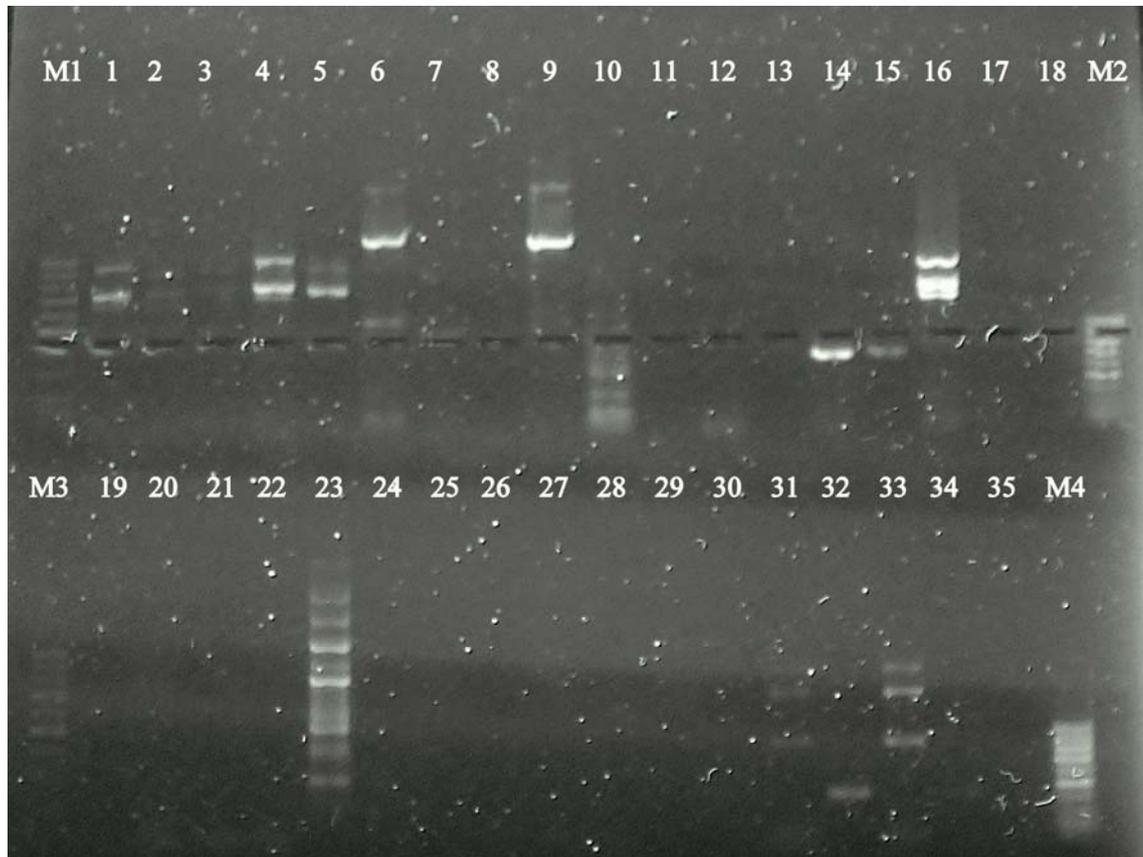


M1/M2 Marker

- 1 Lamm + Lamm spezifischer Primer
- 2 Lamm + Actin (Actinprimer haben nicht funktioniert)
- 3 Pferd + Pferd spezifischer Primer
- 4 Pferd + Pferd spezifischer Primer
- 5 Huhn + Huhn spezifischer Primer
- 6 Huhn + Actin
- 7 Schwein + Schwein spezifischer Primer
- 8 Schwein + Actin

- 9 Rind + Rind spezifischer Primer
- 10 Rind + Actin
- 11 Geflügelwurst RFLP Primer
- 12 Geflügelwurst + Actin
- 13 Döner + RFLP Primer
- 14 Döner + Actin
- 15 Pferdewurst RFLP Primer
- 16 Pferdewurst + Actin
- 17 Schaller
- 18 Schaller

**Abb. 6:** Gel-Analyse der Fleischproben nach der PCR. PCR von Fleischproben mit Actinprimern und Spezies spezifischen Acrosinprimern. Produkte der PCR wurden über ein 1,8 prozentiges Agarosegel aufgetrennt und nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht.



M1/M2/M3/M4 Marker

1-10 Schaller

11 Döner + Lamm spezifischer Primer

12 Lamm + Actin Primer

13 Döner + Pferd spezifischer Primer

14 Huhn + Huhn spezifischer Primer

15 Döner + Huhn spezifischer Primer

16 Huhn + Actin

17 Schwein + Schwein spezifischer Primer

18 Schwein + Schwein spezifischer Primer

19 Schwein + Schwein spezifischer Primer

20 Schwein + Actin Primer

21 Schwein + Actin Primer

22 Schwein + Actin

23 Rind + Rind spezifischer Primer

24 Rind + Rind spezifischer Primer

25 Rind + Rind spezifischer Primer

26 Rind + Rind spezifischer Primer

27 Rind + Rind spezifischer Primer

28 Geflügelleberwurst + RFLP Primer

29 Geflügelleberwurst + Actin

30 Döner + Rind spezifischer Primer

31 Döner + Actin

32 Döner + Rind spezifischer Primer

33 Döner + Actin

34 Döner + Rind spezifischer Primer

35 Döner + Actin

**Abb. 7:** Gel-Analyse unterschiedlicher Fleischproben mit Acrosinprimern. Produkte der PCR wurden über ein 1,8 prozentiges Agarosegel aufgetrennt und nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht.

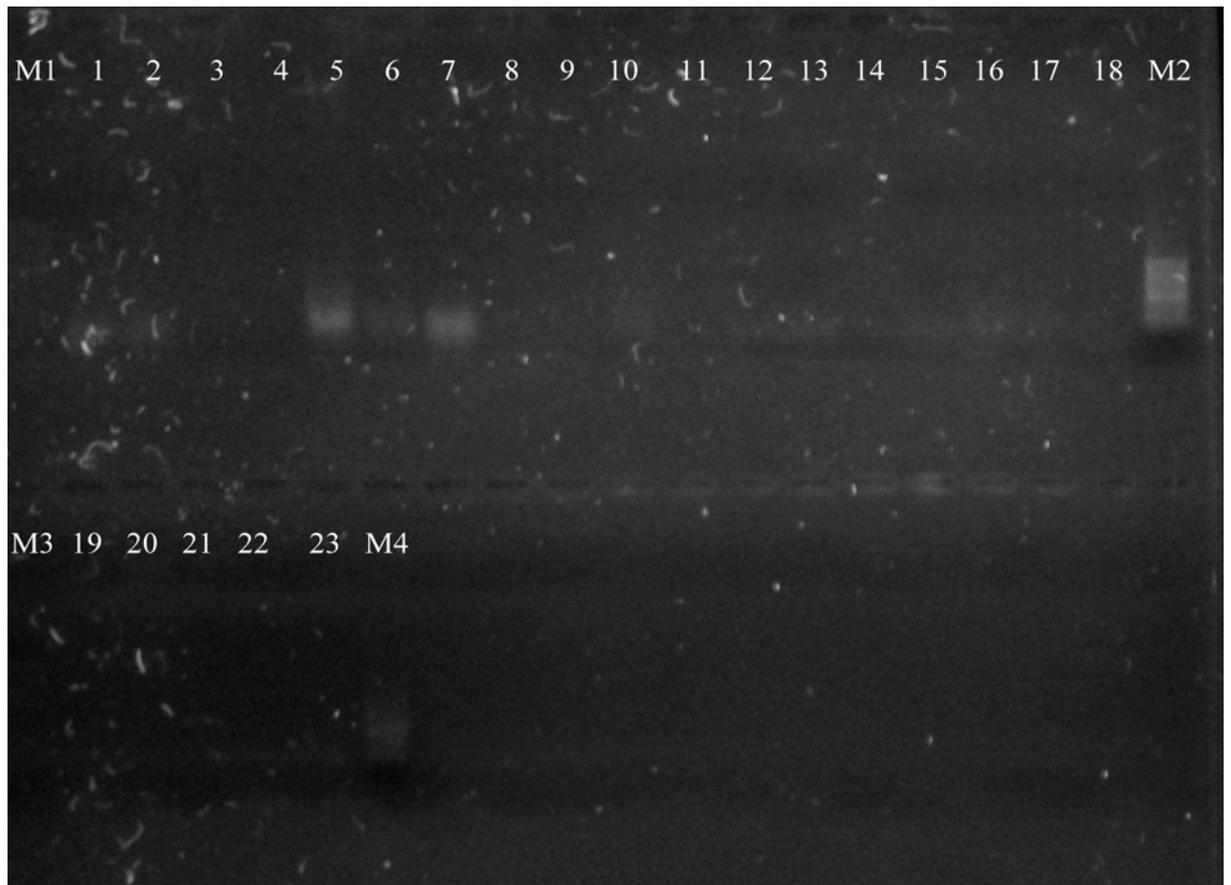


M1/M2/M3 Marker

- 1 Rind (zentrifugiert) + Rind spezifischer Primer
- 2 Rind (filtriert) + Rind spezifischer Primer
- 3 Rind (filtriert) + Rind spezifischer Primer
- 4 Döner + Rind spezifischer Primer
- 5 Döner + Pferd spezifischer Primer
- 6 Pferd + Pferd spezifischer Primer
- 7 Pferd + Actinkontrolle
- 8 Schwein (filtriert) + Schwein spezifischer Primer (höhere DNA-Konzentration)
- 9 Schwein (filtriert) + Schwein spezifischer Primer (Standard DNA-Konzentration)
- 10 Döner + Schwein spezifischer Primer

- 11 Döner + Lamm spezifischer Primer
- 12 Lamm + Lamm spezifischer Primer
- 13 Lamm + Actinkontrolle
- 14 Huhn + Huhn spezifischer Primer
- 15 Döner + Huhn spezifischer Primer
- 16 Geflügelleberwurst + Geflügelleberwurst spezifischer Primer
- 17 Geflügelleberwurst + Actinkontrolle
- 18 Geflügelleberwurst + Lamm spezifischer Primer
- 19 Geflügelleberwurst + Rind spezifischer Primer
- 20 Geflügelleberwurst + Schwein spezifischer Primer

**Abb. 8:** Nachweis verschiedener DNA-Extraktionen und PCR. Die Produkte der PCR und die, zuvor durch weitere Methoden, extrahierte DNA wurden über ein 0,6 prozentiges Agarosegel aufgetrennt und nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht.



M1/M2/M3/M4 Marker

- 1 Schwein (NaOH-Methode) 1a
- 2 Schwein (NaOH-Methode) 1b
- 3 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a
- 4 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b
- 5 Schwein (TAIL Extraktion)3
- 6 Huhn (NaOH-Methode) 1a
- 7 Huhn (NaOH-Methode) 1b
- 8 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a
- 9 Huhn (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b
- 10 Huhn (TAIL Extraktion)3
- 11 Huhn (TAIL Extraktion)3 +PCR
- 12 Schwein (NaOH-Methode) 1a + Schwein spezifischer Primer

13 Schwein (NaOH-Methode) 1b + Schwein spezifischer Primer

14 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2a + Schwein spezifischer Primer

15 Schwein (Hexan-NaOH-SDS-Methode) 2b + Schwein spezifischer Primer

16 Schwein (TAIL Extraktion)3 + Schwein spezifischer Primer

17 Döner + Pferd spezifischer Primer

18 Pferd+ Pferd spezifischer Primer

19 Pferd + Actin

20 Döner (zentrifugiert) + Huhn spezifischer Primer

21 Döner filtriert + Proteinase K + Huhn spezifischer Primer

22 Döner filtriert + Huhn spezifischer Primer

23 Döner 3 (TAIL- Methode) + Huhn spezifischer Primer

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

**Bochum, 19.12.2013**

Ort, Datum

---

Unterschrift