



## **Endbericht**

**Forschungsprojekt Nr. 1245**

# **Entwicklung von Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis und zur Unterscheidung von Tier- und Fischmehl in Futtermitteln durch Nachweis von DNA mit PCR**

**Dr. Peter Remler**

**Dr. Ursula Mülleder**

Institut für Lebensmittelchemie und -technologie

**Dr. Werner Ruppitsch**

Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft

**Mag. Edith Rassi**

Lebensmitteluntersuchungsanstalt Kärnten

**Forschungsprojekt des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft,  
Umwelt und Wasserwirtschaft**

## Zusammenfassung

Laut Entscheidung 2000/766/EG des EU-Rates vom 4. Dezember 2000 über Schutzmaßnahmen bezüglich übertragbaren spongiformen Enzephalopathien ist die Verfütterung von verarbeiteten tierischen Proteinen EU-weit verboten. Das Verbot gilt nicht für die Verfütterung von Fischmehl an Nichtwiederkäuer.

Die Entscheidung wurde durch das Bundesgesetz, BGBl.I Nr. 143/2000, und BGBl.II Nr. 6/2001 umgesetzt und gilt seit 01.01.2001. Das erweitert das bereits seit 1990 bestehende Verbot der Verfütterung von Eiweißfuttermitteln tierischer Herkunft an Wiederkäuer.

Bisher erfolgt der Nachweis von Tiermehlen in Futtermitteln durch eine mikroskopische Analyse. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei 0,1%. Der Probendurchsatz dieser Methode ist bei den derzeit anfallenden Probenmengen aber viel zu niedrig.

Im Rahmen dieses Projektes wurden spezifische Nachweissysteme für den Nachweis und die Unterscheidung von Tier- und Fischmehlen mit Hilfe der PCR entwickelt. Der Nachweis beruht auf der Tatsache, dass nahe verwandte Arten weniger Unterschiede in der DNA Sequenz aufweisen als entfernter verwandte Arten.

Als Zielsequenzen für die PCR wurden Bereiche der DNA gewählt, die für das 18S rRNA Gen kodieren und innerhalb der relevanten Tiere kaum Unterschiede aufweisen, aber zu Sequenzen aus Fischen und Pflanzen ausreichende Unterschiede zeigen und so eine Unterscheidung erlauben. Das gleiche gilt für die Zielsequenzen zum Nachweis von Fischmehl.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der PCR ein Nachweis von Tier- und Fischmehl in Futtermitteln möglich ist. Die untere Nachweisgrenze liegt bei Tiermehl zwischen 0,05% und 0,01% Tiermehl im Futtermittel, bei Fischmehl unter 0,01% Fischmehl im Futtermittel.

Damit ist die Methode sensitiver als der mikroskopische Nachweis, der eine Nachweisgrenze von 0,1% hat.

Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit, viele Proben parallel zu verarbeiten. Der limitierende Faktor liegt in der Probenvorbereitung (mahlen der Proben), alle weiteren Schritte erlauben ein Verarbeiten von 48 oder 96 Proben. Es kann dann im Mikrotiterplattenformat gearbeitet werden.

Für den Nachweis in der Routineanalytik ist besonders die real-time PCR anzuraten. Die real-time PCR ist die robustere Methode und sie ist durch die Verwendung einer spezifischen Sonde sicherer. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Verringerung des Kontaminationsrisikos, da die Reaktionsgefäße nach der Reaktion nicht mehr geöffnet werden müssen.

Die real-time PCR liefert semi-quantitative Ergebnisse und lässt sich in eine quantitative Methode umwandeln, wenn Standardreferenzmaterialien zur Verfügung stehen.

Die Methoden sind so weit entwickelt, dass sie von Untersuchungslaboratorien übernommen und nach Validierung zur Untersuchung von Futtermitteln eingesetzt werden können.

Da es europaweite Bestrebungen gibt, neue amtliche Methoden zum Nachweis von Tiermehl in Futtermitteln zu etablieren, wird vorgeschlagen, mit Unterstützung des Ministeriums, an das JRC in Ispra heranzutreten, um einen Laborvergleichstest und eine Validierung im europäischen Rahmen anzustreben.

## Summary

Since the decision 2000/766/EG from December 4<sup>th</sup> of 2000 it is prohibited in the EU to feed animal proteins. Only fish meal is allowed for feeding of non-ruminants. This is a protective action against transmissible spongiforme encephalopathies.

In Austria it is forbidden to feed animal proteins to ruminants since 1990. The decision 2000/766/EG became part of the Austrian law on January 1<sup>st</sup> 2001.

The competent authorities need therefore a sensitive and reliable method to control this decision.

Meat and bone meal is detected in feedstuff by microscopic determination of small bone fragments. The lower limit of detection of this method is 0.1%. The method is time and manpower consuming and not useful for high throughput.

The aim of this project was the development of a PCR based method for detection of meat and bone meal and fish meal in animal feedstuff. The detection is based on the fact that close related species show less difference in their DNA sequence than not so close related species.

DNA sequence coding for the 18S rRNA gene is used for differentiation between animals, fishes and plants.

With the methods, which we have developed in this project, it is possible to identify addition of meat and bone meal and/or fish meal in animal feed.

The lower limit of detection lies between 0,05% and 0,01% for meat and bone meal and below 0,01% for fish meal.

Therefore the method is more sensitive than the determination by microscopy.

These PCR methods can be adopted for high throughput and a great number of samples can be analysed in a short time.

Especially real-time PCR should be used for routine analysis. There is less risk of cross contamination and the result will be semi quantitative. Quantitative determination is also possible if standard reference materials are available.

The methods are ready for use from competent authorities. After validation of the methods in the laboratories they can be used for analysis of feedstuff.

This means more safety and protection from not allowed additives in feed for farmers and consumers.

High throughput control will also enhance confidence of the consumers in agricultural products.

# Inhaltsverzeichnis

Einleitung		1
Material und Methode		2
Material		2
Methoden		4
DNA-Isolierung, Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	4	
Sequenzvergleich, Auswahl der Zielsequenzen	9	
Primer- und Sonden-Design		9
Polymerase-Kettenreaktion		10
Agarosegelelektrophorese	14	
Real-time PCR		14
Herstellung von Referenzplasmiden	27	
Validierung		28
Ergebnisse		
DNA-Isolierung		
Referenz DNA aus Tieren, Fischen und Pflanzen	34	
DNA aus Tiermehlen		37
DNA aus Fischmehlen		37
DNA aus Futtermittel		38
Zielsequenzen		
18S-rRNA Gen, chromosomal	40	
Mitochondriale Sequenzen, 16S rRNA und D-Loop	47	
Nachweissysteme		
Kontrollsystem		52
Tier- und Fischmehle		54
Klonierung von Referenzplasmiden	62	
Validierung	63	
Laborvergleichstest	80	
Probenherstellung	80	
Überprüfung der Homogenität	81	
PCR mit dem Primerpaar Tier-F und Tier-R1	85	
PCR mit den Primern 18S-FischF und 18S-FischR1/R2/R3	86	
Durchführung des Laborvergleichstests	88	
Teilnehmer am Laborvergleichstests	88	
Ergebnisse des Laborvergleichstests	89	
Diskussion der Ergebnisse	92	
DNA-Isolierung		92
Zielsequenzen		92
Kontroll-PCR	93	
Tiermehlnachweis	93	
Fischmehlnachweis	94	
Laborvergleichstest	94	
Zusammenfassung und Ausblick	95	
Anhang 1: Laborvergleichstest Arbeitsvorschrift		97
Anhang 2: Literatur		109

# **Abschlussbericht über das Forschungsprojekt Nr.1245: „Entwicklung von Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis und zur Unterscheidung von Tier- und Fischmehlen in Futtermitteln durch Nachweis von DNA mit PCR“**

## **Einleitung**

Seit 1990 besteht in Österreich das Verbot der Verfütterung von Eiweißfuttermitteln tierischer Herkunft an Wiederkäuer. Es war auch vorher in der österreichischen Landwirtschaft nicht üblich.

Laut Entscheidung 2000/766/EG des EU-Rates vom 4. Dezember 2000 über Schutzmaßnahmen bezüglich übertragbaren spongiformen Enzephalopathien ist die Verfütterung von verarbeiteten tierischen Proteinen (Fleisch- und Knochenmehl, Fleischmehl, Knochenmehl, Blutmehl, getrocknetes Plasma u.a. Blutprodukte, hydrolysierte Proteine, Hufmehl, Hornmehl, Mehl aus Geflügelabfällen, Federmehl, Trockengrieben, Fischmehl, Dicalciumphosphat, Gelatine) EU-weit verboten. Das Verbot gilt nicht für die Verfütterung von Fischmehl an Nichtwiederkäuer; Gelatine von Nichtwiederkäuern zur Umkleidung von Additiven gemäß Richtlinie 70/524/EWG; Dicalciumphosphaten und hydrolysierten Proteinen, die nach dem Verfahren des Art. 17 der Richtlinie 89/662/EWG hergestellt werden; Milch und Milchprodukte an Nutztiere. Die Entscheidung wurde durch das Bundesgesetz, BGBl.I Nr. 143/2000, und BGBl.II Nr. 6/2001 umgesetzt und gilt seit 01.01.2001.

Erforderlich ist daher ein schnelles, zuverlässiges und sensitives Testsystem mit einer Nachweisgrenze für Tier und Fischmehl von 0,1% oder besser.

Bisher erfolgt der Nachweis von Tiermehlen in Futtermitteln durch eine mikroskopische Analyse. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei 0,1%. Der Probendurchsatz dieser Methode ist bei den derzeit anfallenden Probenmengen aber viel zu niedrig, so dass Bedarf nach rationelleren Methoden besteht.

Als eine neue, sehr sensitive Methode bietet sich der Nachweis spezifischer DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an. Insbesondere die Verwendung der real-

time PCR verspricht eine effiziente und leistungsfähige Methode des Nachweises und der Unterscheidung von Tier- und Fischmehlen in Futtermitteln.

Die in diesem Projekt entwickelten Methoden sollen diesen raschen und rationellen Nachweis ermöglichen. Den kontrollierenden Behörden wird damit ein leistungsfähiges kostengünstiges Instrument zur Überwachung in die Hand geben.

Für die Landwirte bedeutet das mehr Sicherheit und Schutz vor verbotenen Beimengungen bei der Verwendung von Futtermitteln.

Außerdem dienen solche Untersuchungen, die mit den neuen Methoden auch in großer Anzahl durchgeführt werden können, der Vertrauensbildung der Konsumenten in die österreichische Landwirtschaft.

## **Material und Methoden**

### ***Material***

Als Untersuchungsmaterial wurden Tier- und Fischmehle und verschiedene Futtermittel verwendet.

Es wurde einerseits DNA direkt aus verschiedenen Tier-, Vogel-, Fisch- und Pflanzenarten isoliert. Diese DNA dient als Referenzmaterial um die Spezifität der einzelnen Assays zu bestimmen.

In Tabelle 1 sind alle Organismen angeführt, aus denen DNA isoliert wurde. Bei den Tieren und Vögeln sind die wichtigsten landwirtschaftlichen Nutztiere vertreten. Bei den Fischen wurde versucht ein möglichst breites Spektrum zu erfassen, da die Diversität bei den Fischen viel größer ist. Bei den Pflanzen wurden Vertreter der wichtigsten Futterpflanzen verwendet.

Andererseits wurde DNA aus Tier- und Fischmehlen isoliert, die vom BFL zur Verfügung gestellt wurden. Anschließend wurde DNA aus verschiedensten Futtermitteln und aus selbst hergestellten Mischungen von Mischfutter mit Zumischungen von Tier- und Fischmehlen isoliert. Dabei stellte sich heraus, dass in einem der Mischfutter, welches vor einigen Jahren auf GVOs untersucht wurde, Tiermehl enthalten ist. Daher wurde ein neues Mischfutter zur Herstellung der Mischungen besorgt, welches keinen Tier- oder Fischanteil enthielt.



**Tab. 1:** Tier-, Fisch- und Pflanzenarten, aus denen DNA isoliert wurde.

<b>Säugetiere und Vögel</b>	<b>Fische</b>	<b>Pflanzen</b>
Rind	Thunfisch	Raps
Schwein	Hering	Sojabohnen
Schaf	Makrele	Sonnenblume
Huhn	Kabeljau	Gerste
Truthahn	Heilbutt	Hafer
Ente	Lachs	Mais
Gans	Viktoriabarsch	Weizen
Strauss	Rotbarbe	
	Scholle	
	Sardine	
	Wolfsbarsch	
	Goldbrasse	

**Tab. 2:** Tier- und Fischmehle

<b>Bezeichnung</b>		<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
Tiermehl			Steirische
Fleischknochenmehl	FK 4496		Tierkörperverwertung
Blutmehl	FK 4585		BFL
Tiermehl	FK 4584	fettreich	BFL
Tiermehl	FK 4678	55%	BFL
Fleischmehl	FK 4496	Rohprotein	BFL
			BFL
Fischmehl			
Fischmehl	FK 5278		BFL
Fischmehl	FK 5425		BFL
Fischmehl	FK 5707		BFL
Fischmehl	FK 5704		BFL
Fischmehl	FK 5324	verunreinigt	BFL
50% Fischknochen + Muskel	FK 5084		BFL
<< 0,5 % Knochen, Fischknochen, Muskeln	FK 5006		BFL

**Tab. 3:** Futtermittel

<b>Bezeichnung</b>		<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
Mischfutter	T661/8	Kuhkorn 3	Fa. Tagger
Mischfutter	319145		Fa. Garant
Ferkelaufzuchtfutter	FK 5956		BFL
Putenmastfutter	FK 5957		BFL
Geflügelanfangsmastfutter	FK 5952		BFL
Geflügelmastfutter	FK 5933		BFL
Fasanaufzucht	FK 5931		BFL
Putenaufzucht	FK 5932		BFL

## **Methoden**

Es wurden mehrere Methoden der DNA-Isolierung auf ihre Eignung bei der Extraktion von DNA aus Tier-, Knochen- und Fischmehlen und aus Futtermitteln untersucht. Die Probleme sind einerseits die starke Degradation der DNA in korrekt thermisch-behandelten Tiermehlen, andererseits Pflanzeninhaltsstoffe, welche als Inhibitoren der PCR bekannt sind. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Polyphenole und Polysaccharide, die unter Umständen mit der DNA mit isoliert werden und die nachfolgenden enzymatischen Reaktionen, wie z.B. die PCR, hemmen können.

Als Nachweismethode für DNA von Säugetieren, Vögeln und Fischen in Futtermitteln wird die PCR und die Real-time PCR verwendet.

Die Validierung der Nachweismethoden soll nach allgemeinen Normen der Validierung biochemischer und molekularbiologischer Analysemethoden erfolgen.

## **DNA-Isolierung, Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

Es wurden folgende Methoden auf ihre Eignung zur Isolierung von DNA aus Futtermitteln untersucht:

SDS Aufschluß mit Reinigung über Affinitäts-Harz (Wizard Methode)

Cetyl-trimethyl-ammonium Bromid (CTAB) Aufschluß

Kit der Firma Congen

Die Methoden wurden untersucht auf Ausbeute und Reinheit der DNA, Arbeitsaufwand und Reproduzierbarkeit. Die einzelnen Methoden sind im folgenden kurz beschrieben, die genauen Arbeitsvorschriften befinden sich im Anhang.

### ***Aufschluß mit SDS-Puffer und Guanidin HCl***

SDS ist ein starkes anionisches Detergens, welches in Konzentrationen von 0,5% – 2% in Aufschlusspuffern verwendet wird. Nachteile seiner Anwendung sind die Bildung eines Niederschlags bei niedrigen Temperaturen, geringe Löslichkeit in 70%igen Ethanol und Lösungen mit hohem Salzgehalt.

Die geringe Löslichkeit in Ethanol kann zu einer Anreicherung von SDS in der gefällten DNA führen und eine Hemmung von Enzymreaktionen hervorrufen.

Guanidin HCl dient der Inaktivierung von Nukleasen. Bei hohem Proteingehalt der Probe kann dem Aufschlußpuffer Proteinase K zugegeben werden, welche 80% - 90% der Proteine enzymatisch abbaut.

Proteinase K ist ein sehr stabiles Enzym, welches in Gegenwart von niedrigen Konzentrationen anionischer Detergentien, hoher Salzkonzentrationen und EDTA aktiv ist. Es zeigt eine hohe pH-Toleranz, pH 6 – 10, und sein Temperaturoptimum liegt bei 50 – 67°C. Proteinase K benötigt keine Kofaktoren und kann native und denaturierte Proteine abbauen.

Bei kleinen Proteinkonzentrationen wird die Aktivität sehr niedrig. Der Rest an Proteinen kann durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (Phenol, Chloroform/Isoamylalkohol) entfernt werden. Bei der Verwendung von Phenol ist darauf zu achten, dass der pH-Wert nicht unter 8,0 sinkt. Bei pH-Werten unter 8,0 geht die DNA verstärkt in die Interphase und organische Phase.

### ***Wizard DNA Clean up Resin, Promega***

Der klare DNA Rohextrakt aus der vorhergehenden Methode wird mit mindestens dem doppelten Volumen Bindepuffer, der das Wizard DNA Cleanup Resin enthält gemischt und die DNA bindet auf Grund des hohen Gehalts an chaotropem Salz an

das Harz. Nach einem Waschschrift mit 80%igem Isopropanol wird die DNA mit Wasser, 10 mM Tris, pH 8,0 oder 1xTE, pH 8,0 eluiert.

### ***Aufschluß mit CTAB-Puffer***

CTAB kann mit Nukleinsäuren, Proteinen und Polysacchariden Komplexe bilden. Bei hoher NaCl-Konzentration, über 1,0 M oder höher, bilden Nukleinsäuren keine unlöslichen Komplexe mit CTAB, hingegen bilden Proteine und Polysaccharide solche aus. Diese Komplexe sind wasserunlöslich und können durch Zentrifugieren oder durch Extrahieren mit Chloroform/Isoamylalkohol entfernt werden.

Die DNA kann anschließend gleich mit Ethanol oder Isopropanol gefällt werden oder zuerst durch Fällen als CTAB/DNA-Komplex weiter gereinigt werden. Die Bildung des CTAB/DNA-Komplexes erfolgt durch Senkung der NaCl-Konzentration unter 0,7 M bei einer CTAB Konzentration von mindestens 0,5%. Der Komplex wird anschließend in 1,2 M NaCl Lösung aufgenommen und die DNA durch Alkoholfällung isoliert und mit 70%igem Ethanol überschüssiges CTAB entfernt.

Zwei Parameter sind bei der Anwendung von CTAB besonders zu beachten. Erstens muß die NaCl-Konzentration im Puffer hoch genug sein. Bei Proben mit hohem Wassergehalt ist darauf zu achten, dass die Salzkonzentration nicht unter 1,0 M sinkt. Sonst ist die NaCl-Konzentration im Aufschlußpuffer zu erhöhen, bis auf das doppelte bei wässrigen Proben.

Zweitens sollen alle Lösungen und Extrakte, die CTAB enthalten, Raumtemperatur besitzen, da CTAB und CTAB/DNA-Komplexe unter 15°C ausfallen. Es kann bei zu niedriger Temperatur bei der Abtrennung der Proteine und der Polysaccharide zu einem Ausfällen der DNA kommen. Das kann bis zu einem Totalverlust der DNA führen.

Erfolgt die Fällung mit Alkohol bei zu niedriger Temperatur wird CTAB mitgefällt und im anschließenden Waschschrift mit 70%igen Ethanol nicht vollständig entfernt. Keinesfalls darf mit auf -20°C gekühltem Ethanol gearbeitet werden. CTAB-Fällungen sind bei Raumtemperatur durchzuführen.

Nicht entferntes CTAB in der DNA Präparation kann in nachfolgenden enzymatischen Reaktionen zu Hemmung führen.

Laut Literatur sind auch nicht alle kommerziell erhältlichen CTAB-Präparationen zur DNA Isolierung geeignet.

### ***Abschätzen der DNA Konzentration mit Ethidium Bromid***

Ethidium Bromid ist ein intercalierender Fluoreszenzfarbstoff, der zum Färben der DNA in Agarosegelen verwendet wird. In einem Gel können Banden die 5 – 10 ng DNA enthalten mit EtBr noch sichtbar gemacht werden. Bei Verwendung eines Größenstandards bekannter Konzentration lassen sich durch Vergleich der Intensität der Fluoreszenz der DNA Gehalt einzelner Banden abschätzen.

Wird zum Beispiel 500 ng HindIII geschnittene Lambda-DNA verwendet, kann man den DNA Gehalt jeder einzelnen Bande berechnen und zum Abschätzen der Konzentration der DNA in den zu bestimmenden Proben verwenden.

**Tab. 4:** DNA-Gehalt der einzelnen Banden von 0,5 µg λ-HindIII Standard

<b>Bande [kbp]</b>	<b>DNA-Gehalt [ng]</b>
23,13	478
9,42	194
6,56	135
4,36*	90
2,32	48
2,03	42
0,56	12
0,12	2,5

\* die 4,36 kbp Bande ist zur Quantifizierung meist nicht geeignet, da sie die *cos*-site enthält und ein Teil der DNA an das 23,13 kbp Fragment gebunden ist. Sie erscheint daher oft schwächer als es dem Größenverhältnis entspricht.

Die isolierte DNA, vor allem wenn sie aus verarbeiteten Lebensmitteln stammt, soll man nur kurz ins Gel hineinlaufen lassen, da sonst keine diskrete Bande mehr sichtbar ist. Es ist vorteilhaft, den Standard bereits vorher aufzutrennen, damit die einzelnen Banden sichtbar sind.

RNA wird von EtBr ebenfalls gefärbt, lässt sich aber von höher molekularer DNA in Agarosegelen leicht abtrennen oder wird bei der Isolierung der DNA enzymatisch mit RNase A abgebaut.

Die noch einfachere Methode zum Abschätzen der DNA Konzentration ist der sogenannte **Tüpfeltest**. Die EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) wird 1/10000 verdünnt und von einer DNA mit bekannter Konzentration werden Standardverdünnungen hergestellt. Der lineare Bereich der Methode ist zwischen 5 und 100 µg/ml, daher werde Standards mit den Konzentratione 5, 10, 25, 50 und 100 µg/ml verwendet.

Auf einen UV-Leuchtschirm wird eine durchsichtige Haushaltsfolie gelegt und mit einer Pipette werden jetzt Tropfen der verdünnten EtBr-Lösung von je 10µl aufgebracht, und zwar für jeden Standard, für einen Leerwert und für jede Probe. Die Tropfen für die Proben und Standards werden dann mit je 1µl der entsprechenden DNA-Lösung gemischt. Die Tropfen werden mit UV bestrahlt und durch Vergleich der Intensitäten der Fluoreszenz wird die DNA Konzentration abgeschätzt.

Ist bei der DNA-Isolierung mit hohem RNA-Anteil zu rechnen, z.B bei der Isolierung aus Samen oder frischen Pflanzenteilen, muß vor dem Tüpfeltest ein RNase-Verdau durchgeführt werden, da sonst die RNA mitbestimmt wird.

Beide Methoden sind einfach durchführbar und erlauben ein rasches Abschätzen von DNA Konzentrationen über 5µg/ml.

### ***Photometrische Bestimmung der DNA Konzentration***

Bei der photometrischen Bestimmung wird die DNA Lösung im Photometer bei 260 und 280 nm vermessen und das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Das Verhältnis soll > 1,7 sein, sonst ist mit einer Verunreinigung mit Proteinen und/oder Polyphenolen zu rechnen. Eine Absorption von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Ist RNA in der DNA-Lösung enthalten oder das Verhältnis 260/280 <1,7 ist die berechnete DNA-Konzentration bestenfalls semi-quantitativ.

Bei Verunreinigung durch Proteine kann die Konzentration der DNA durch Messen der Absorption bei 280 nm oder bei 234 nm nach folgenden Formeln korrigiert werden:

$$N(\mu\text{g ml}^{-1}) = 70 \cdot A_{260} - 40 \cdot A_{280}$$

$$N(\mu\text{g ml}^{-1}) = 52,6 \cdot A_{260} - 5,24 \cdot A_{234}$$

Beide Formeln ergeben in den meisten Fällen ähnliche Werte, die um 10 bis 20 % unter den unkorrigierten Werten liegen.

## **Sequenzvergleich, Auswahl der Zielsequenzen**

Die erforderlichen Eigenschaften der Zielsequenzen sind durch die Ziele des Projektes vorgegeben. Sie müssen hohe Homologie innerhalb der im Tiermehl verwendeten Arten und eindeutige Unterschiede zu pflanzlichen Bestandteilen in Futtermitteln zeigen und sollen eine Differenzierung gegen Fischmehl erlauben.

Das selbe gilt für geeignete Sequenzen zum Nachweis von Fischmehlen, nur dass hier eine Unterscheidung gegen Säugetiere und Vögel gegeben sein sollte.

Um eine ausreichende Sensitivität der Methoden zu gewährleisten, sollen die Sequenzen in möglichst hoher Kopienzahl in den Zellen vorliegen.

Es bieten sich daher der Gencluster, der für die rRNAs kodiert, kurze repetitive Elemente, die in hoher Kopienzahl im Chromosom vorliegen, oder mitochondriale Sequenzen an.

Mit Hilfe des Homologie-Suchprogrammes BLAST wurde in der Sequenzdatenbank Genbank nach solchen Bereichen gesucht. Als erfolgversprechend erwiesen sich dabei Gene die für rRNAs kodieren, sowohl chromosomale als auch mitochondriale. Für diese Gene konnten in der Datenbank Einträge für viele verschiedene Arten gefunden werden. Teilweise wurden diese Bereiche für relevante Arten auch selbst sequenziert.

Mit den ausgewählten Sequenzen wurde mit den Programmen Pileup und Pretty des GCG Programmpaketes ein „multiple sequence alignment“ durchgeführt und die Bereiche für das Designen von PCR-Primern und Sonden eingegrenzt.

## **Primer- und Sonden-Design**

Zur Bestimmung der Sequenz der Primer und der Sonden wurde das Programm PrimerExpress 1.5 von PE-Biosystems verwendet. Besondere Aufmerksamkeit wurde darauf gelegt, den Abstand des Forward-Primers zur Sonde möglichst gering (einige Nukleotide) zu halten, um eine hohe Effizienz der Reaktion zu erreichen.

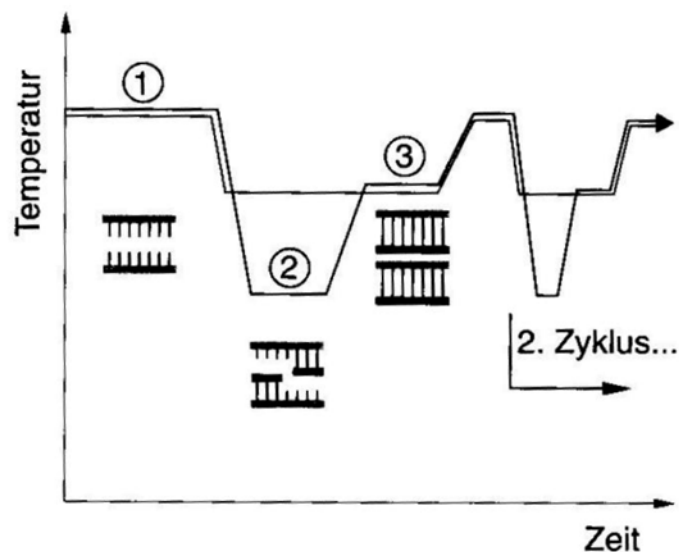
Dieser Punkt konnte auf Grund von unerwünschten Homologien nicht immer erfüllt werden.

Als Reporterfarbstoff für die Sonden wurde FAM gewählt.

Beim Designen von allen Primern und TaqMan-Sonden wurden die im Kapitel 2.2.6.2 diskutierten Grundsätze für die Real-time PCR beachtet.

## Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion hat sich zu dem wichtigsten Werkzeug der Molekularbiologie und Gentechnik entwickelt. Die von K. Mullis 1985 entwickelte Technik der enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten hat die Welt der Molekularbiologie revolutioniert und eine Reihe von präparativen und diagnostischen Anwendungen hervorgebracht.



Dreistufige PCR: ① Denaturierung  
② Primer-Annealing  
③ Primer-Extension

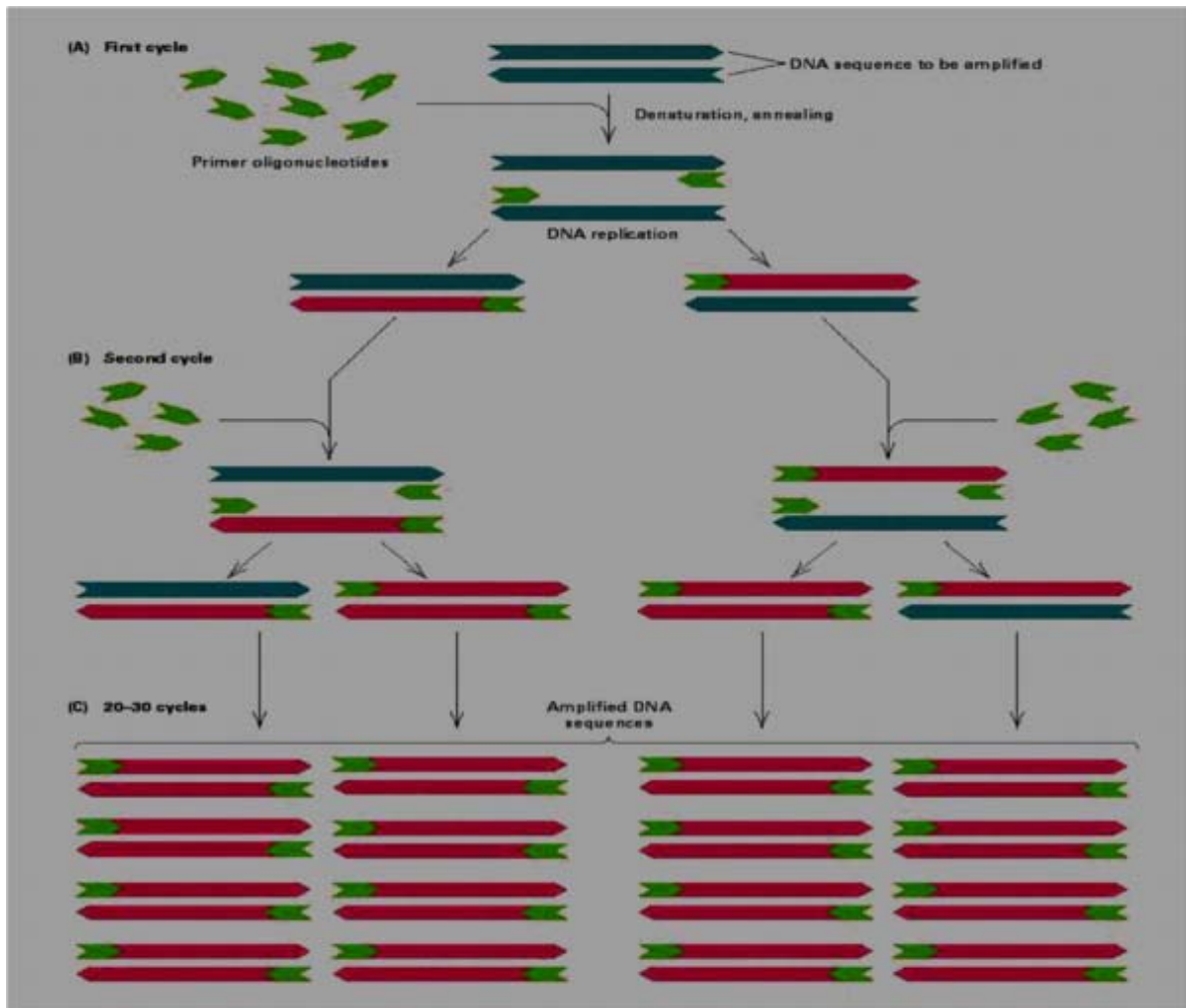
Zweistufige PCR: ① Denaturierung  
② + ③ Primer-Annealing und -Extension

Abb. 1: Temperaturprofile



Bei der PCR wird mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase und eines Paares kurzer Oligonukleotide (Primer), welche komplementär zu den 3'-Enden der Zielsequenz sind, die Ziel-DNA in einem zyklischen Prozess amplifiziert. Zuerst wird die DNA durch Erhöhen der Temperatur denaturiert, anschließend auf eine Temperatur, die ungefähr 5°C unter der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer liegt, abgekühlt. An die einzelsträngige DNA lagern sich jetzt die Primer an (annealing), darauf wird die Temperatur auf 72°C, nahe dem Temperaturoptimum der meisten erhältlichen thermostabilen Polymerasen, erhöht. Bei dieser Temperatur kommt es zu einer optimalen Verlängerung der DNA, aber nicht zu einer Trennung des sich bildenden Doppelstranges. Nach diesem Extensionsschritt folgt der nächste dreistufige Zyklus mit Denaturierung, Annealing und Extension.

Annealing und Extension können auch bei der gleichen Temperatur erfolgen, man spricht dann von einer zweistufigen PCR.



**Abb.2:** Polymerase-Kettenreaktion

Es kommt dadurch zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel DNA. Das kann mit der folgenden Formel dargestellt werden:

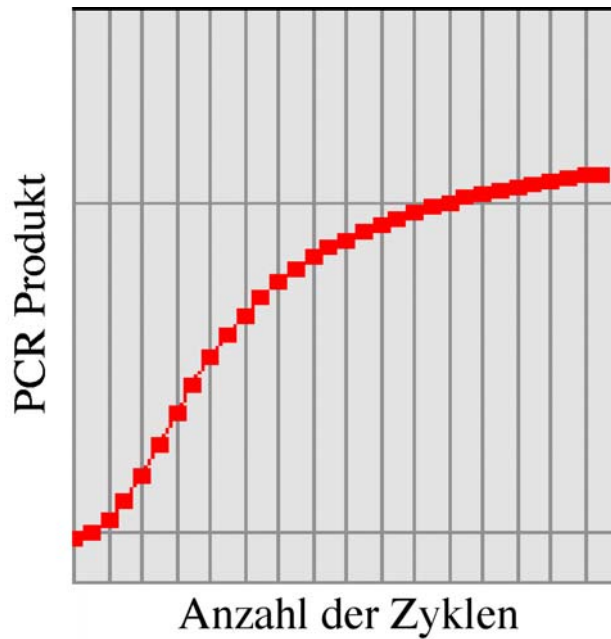
$$N_n = m^n \cdot N_0$$

Wobei für m gilt:

$$1 \leq m \leq 2$$

$N_0, N_n$  Anzahl der Kopien zu Beginn bzw. nach n-Zyklen

m Effizienz der Reaktion



**Abb. 3:** Verlauf einer PCR.

Um die Anzahl der Pipettierschritte zu minimieren soll bei mehreren Reaktionen, die sich nur in einem Bestandteil, z.B. Template-DNA, unterscheiden, ein Mastermix hergestellt werden. Im Mastermix wird ein Vielfaches der in Tabelle 5 angeführten Bestandteile gemischt, sodass ausreichend Reaktionsgemisch für x Reaktionen + 5 – 10 % vorhanden ist. Der Überschuss ist notwendig, um eventuelle Ungenauigkeiten der Pipetten auszugleichen.

**Tab. 5:** Zusammensetzung einer Standard PCR

Bestandteil	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	Volumen pro Ansatz [µl]
Wasser			16,4 - X
10xTaqMan PufferA	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	2,0
dATP	10 mM	200 µM	0,5
dCTP	10 mM	200 µM	0,5
dGTP	10 mM	200 µM	0,5
dTTP	10 mM	200 µM	0,5
Forward Primer	5 µM	200 nM	1,0

Reverse Primer	5 µM	200 nM	1,0
AmpliTaq Gold	5U/µl	0,02U/µl	0,1
Template			X
Gesamtvolumen			25,0

## Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung und Größenbestimmung der PCR Produkte eingesetzt. Da nur PCR Produkte in der Größe zwischen 75 und 250 bp erwartet werden, werden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2% verwendet.

Außerdem wurde die Qualität der isolierten DNA mit Agarosegelen mit einem Agarosegehalt zwischen 0,8 und 2 % untersucht.

Zum Sichtbarmachen der DNA wurde den Gelen Ethidium Bromid bzw. GelStar zugesetzt. GelStar zeichnet sich durch höhere Empfindlichkeit aus und läßt sich mit UV und Blaulicht anregen. Die Sensitivität ist bei Anregung durch UV höher.

## Real-time PCR

Um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen, war man bemüht, einen sogenannten homogenen Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelang erstmals 1991 mit dem von HOLLAND et al. beschriebenen 5'-Nuklease PCR Assay unter Ausnützung der 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase zur Detektion der sequenz-spezifischen Amplifikation.

Die *Taq*-Polymerase besitzt nicht nur eine 3'-Polymeraseaktivität, die es ihr erlaubt den komplementären Strang zu synthetisieren, sondern auch eine 5'-Exonukleaseaktivität. Diese ermöglicht es den komplementären Strang zu lösen und vom 5'-Ende her abzubauen. Diese Aktivität wird in vivo zur Reparatur der DNA verwendet.

Allerdings erforderte diese Technik ein aufwendiges Post-PCR-Processing. So wurden <sup>32</sup>P-markierte Sonden verwendet und die gebildeten Sondenfragmente von

intakten Sonden mittels Dünnschichtchromatographie im Anschluß an die Reaktion unterschieden.

Erst mit den von Lee et al. 1993 bei Applied Biosystems entwickelten fluorogenen Sonden wurde es möglich, den Abbau der Sonde ohne aufwendige Post-PCR-Schritte zu detektieren.

Neben der unten vorgestellten TaqMan-Sonde finden auch der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen, Molecular Beacons und Lightcycler-Hybridization Probes in der „Real Time“ PCR Anwendung. Alle diese Systeme, mit Ausnahme von SybrGreen, beruhen auf dem Konzept des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET).

SybrGreen, ein Fluoreszenzfarbstoff, der zum Nachweis von doppelsträngiger DNA dient und auch zum Färben von Agarosegelen verwendet wird, kann dem PCR-Reaktionsgemisch zugesetzt werden und zeigt dann die Zunahme doppelsträngiger DNA an. Der Nachweis ist nicht spezifisch, da alle gebildeten PCR-Produkte, auch Neben- und Fehlprodukte, detektiert werden.

Ähnlich wie SybrGreen läßt sich auch GelStar einsetzen, wie wir in einigen Versuchen zeigen konnten.

Die PCR ist daher so zu optimieren, dass keine Nebenprodukte in größerer Menge entstehen. Diese Nebenprodukte können zu einem falsch positiven Resultat führen.

Um das zu vermeiden kann man mit Hilfe einer Schmelzkurve die Schmelztemperatur des Amplikons bestimmen. Diese wird mit der positiven Kontrolle verglichen und erlaubt eine etwas spezifischere Aussage.

Die Methode ist für Routineanalysen von vielen gleichen Proben geeignet, wie sie z.B. in der klinischen Diagnostik vorkommen. In der Lebensmittelanalytik mit ihren vielen verschiedenartigen Matrices und der oft schlechten DNA-Qualität ist aber mit Bildung von Nebenprodukten zu rechnen, wie die Erfahrungen in der qualitativen PCR Analyse zeigen.

Molecular Beacons sind Sonden mit selbstkomplementären Enden, die einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und eine Quencher enthalten. Diese Sonden sind in der Abwesenheit der komplementären Ziel-DNA gefaltet und die Fluoreszenz ist ausgelöscht. Gebunden an die komplementäre Sequenz oder bei höherer Temperatur sind sie aufgefalted und geben ein Fluoreszenzsignal.

Die Bindung an die komplementäre Sequenz ist stabiler als die Bildung der Sekundärstruktur innerhalb des Oligonukleotids. Daher binden sie bevorzugt an die Zielsequenz und mit ihrer Zunahme wird das Signal größer.

Das Lightcycler-Hybridisation Probe System besteht aus zwei Oligonukleotiden. Das eine, der Donor, ist am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt. Das zweite Oligonukleotid, der Akzeptor, ist am 5'-Ende gelabelt.

Beide Oligonukleotide hybridisieren nebeneinander mit der Zielsequenz, und nur in diesem Fall wird die Resonanzenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen und das Signal des Akzeptors wird gemessen.

Die beiden letzten Methoden sind, wie der 5'-Exonukleaseassay, sequenzspezifisch.

### ***Prinzip des 5'-Exonukleaseassays***

Beim 5'-Exonukleaseassay wird während der PCR ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Zunahme des PCR-Produktes ist und direkt während der Reaktion im PCR-Reaktionsgefäß gemessen wird.

Wir verwenden den 5'-Exonukleaseassays (TaqMan-Technik) und das ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Dabei wird die PCR online über die Zunahme des Fluoreszenzsignals einer spezifischen Sonde verfolgt. Das erlaubt eine Messung der Reaktion in der logarithmischen Phase der PCR wodurch die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit erhöht wird.

Die Sonde (TaqMan-Sonde, Probe) ist ein Oligonukleotid mit einer Sequenz komplementär zum amplifizierten Fragment. Dadurch erhält man eine Spezifität, die einer PCR mit anschließendem Southernblot und Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde entspricht.

Die Sonde ist an ihren Enden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter und einem Quencher, konjugiert. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Standardmäßig wird FAM (6-carboxyfluorescein) als Reporter eingesetzt. Es stehen zusätzlich mehrere andere Farbstoffe, die sich im Emissionsspektrum ausreichend unterscheiden, zur Verfügung.

Den verschiedenen Reporterfarbstoffen (Multiplex-Anwendung des TaqMan<sup>a</sup> PCR Systems sind also möglich) steht jeweils der Quencher-Farbstoff TAMRA (N,N,N',N'-

tetramethyl-6-carboxyrhodamin) gegenüber. TAMRA wird über ein Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden.

Reporterfarbstoff:  
 6-FAM X: H, Y: H=  
 T: X= T, C: Y= H=  
 HE: X=, Y= 1 C 1

Base 1

Base 2

Quencherfarbstoff: AMRA

Base n

Linkerarmmodifiziertes Nukleotid (LAN)

3'-Phosphat

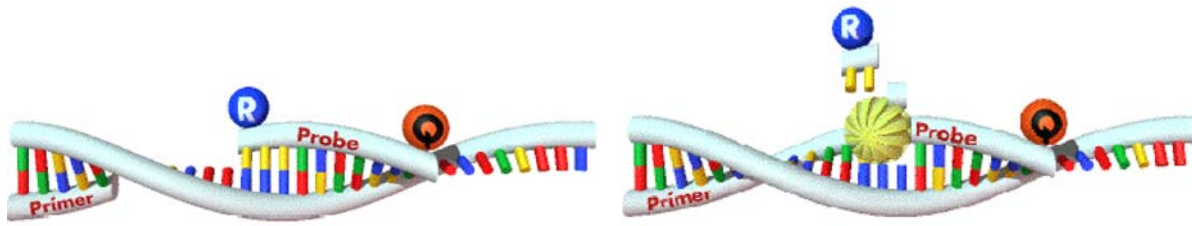
**Abb. 4:** Taqman-Sonde

Schließlich wird die Sonde noch chemisch phosphoryliert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden. Die Sonde würde sonst wie ein PCR Primer wirken und zur Bildung von Nebenprodukten führen und dadurch die Effizienz der Reaktion beeinflussen.

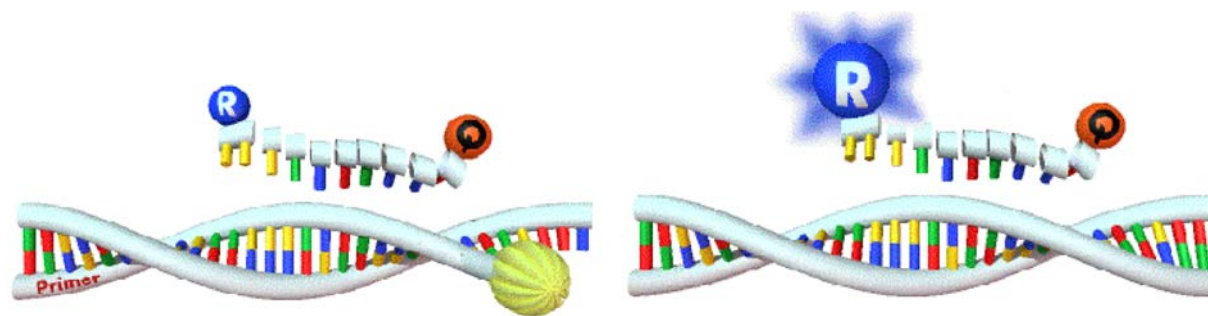
Ist das Oligonukleotid intakt, wird bei einer Anregung des Reporters durch den Laser die Fluoreszenzenergie auf den Quencher übertragen und dieser emittiert ein Lichtsignal (Fluorescence Resonance Energie Transfer, FRET). Man erhält nur ein Fluoreszenzsignal des Quenchers, und keines des Reporters.

Wird nun das Oligonukleotid durch die 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase abgelöst und gespalten, werden Reporter und Quencher räumlich getrennt und man erhält ein Lichtsignal vom Reporter. Gleichzeitig nimmt das Signal des Quenchers ab, da er durch die Wellenlänge des Lasers nur schwach angeregt wird.

Wenn sich die Emissionsspektren von Reporter und Quencher ausreichend unterscheiden, kann man aus dem Gesamtspektrum die Zunahme des Reportersignals berechnen.



1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer (Abbildung zeigt die Anlagerung des Forward Primers) 2. Primer Extension und Sondenhydrolyse



3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt 4. In Abhängigkeit von der Zahl der freigesetzten Reporter-Moleküle wächst das Reporter-Signal

**Abb.5:** Einfluß der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan-PCR.

### Sonden-Design

Um eine möglichst optimale TaqMan Sonde auszuwählen, müssen zunächst drei entscheidende Faktoren berücksichtigt werden: die Platzierung des Quenchers, das Quenching und die Hybridisierung.

Nur durch die räumliche Nähe von Reporter- und Quencher-Fluorophor kommt es zur Übertragung der Fluoreszenzenergie. Die Effizienz der Energieübertragung ist dabei umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Abstands der beiden Farbstoffe.

Deshalb ging man in ersten Arbeiten zur TaqMan PCR davon aus, dass es ratsam wäre, den Quencher möglichst nahe bei dem mit dem Reporter markierten 5'-Ende des Oligonukleotids zu platzieren, um eine ausreichende Energieübertragung zu erzielen. Nachfolgende Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß der Quencher direkt an das 3'-Ende der Sonde geknüpft werden kann.

Dieser Sondaufbau besitzt einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu einem intern platzierten Quencher: Sitzt der Quencher intern, so wird eine Sondenhydrolyse



nur dann nachweisbar, wenn die Hydrolyse auch tatsächlich zwischen den beiden Farbstoffen erfolgt .

Da der erste Schnitt endonukleolytisch erfolgt (meist nach den Basen 1-3 der Sonde), kann jedoch nicht vorhergesagt werden an welcher Position innerhalb der Sonde. Daher stellte die interne Quencher-Plazierung tatsächlich ein großes Problem bei der Reaktionsoptimierung dar. Bei einem am 3'-Ende plazierten Quencher ist hingegen stets gewährleistet, dass der erste, endonukleolytische Schnitt auch wirklich detektiert wird. Dieser Sondenbau stellt daher sicher, daß die Bildung des PCR-Produkts in vollem Umfang nachgewiesen werden kann.

Um zu verhindern, dass sich die Sonde wie ein zusätzlicher Primer in der PCR verhält, muß die freie OH-Gruppe am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe verestert werden. Dadurch kann es zu keiner Extension der Sonde durch die Taq-DNA Polymerase kommen, da diese ein freies OH am 3'-Ende benötigt um das nächste Nukletid einzufügen.

**Die bisherigen Punkte sind die theoretischen Grundlagen für das Sondendesign, wie sie von den Forschern, die die TaqMan-Sonden entwickelt haben, erarbeitet wurden. Die nachfolgenden Punkte sind bei der Entwicklung eigener Sonden vom Anwender zu berücksichtigen und experimentell zu optimieren.**

Den größten Einfluss, ob der Quenching-Effekt noch ausreichend ist oder nicht, hat der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren. Je weiter Reporter und Quencher voneinander entfernt sind, desto stärker gewinnt die  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentration an Einfluss auf das Quenching.

Durch Bindung von  $Mg^{2+}$  gewinnt die Sonde an Flexibilität und kann sich falten. Dadurch gelangen 5'- und 3'-Ende der Sonde wieder relativ näher zueinander und ein Quenching wird möglich. Typische  $MgCl_2$  -Konzentrationen liegen bei der TaqMan PCR daher zwischen 3,5 und 6 mM.

Die Sondenflexibilität wird außerdem von Sekundärstrukturen oder Selbstkomplementarität (Hairpins, etc.) der Sonde beeinflusst. Gerade diese schwer zu kontrollierenden Einflüsse können die Auswahl einer optimalen Sonde erschweren. Die  $MgCl_2$  Konzentration ist experimentell zu optimieren.

Schließlich ist noch die Reinheit der Sonde von entscheidender Bedeutung. Sonden, die mit dem Reporter-Fluorophor markiert sind, denen aber der Quencher fehlt, erhöhen die Hintergrundfluoreszenz des Reporters so stark, daß eine Veränderung der Reporterintensität kaum meßbar ist.

Die nötige aufwendige Reinigung zwischen den einzelnen Syntheseschritten erklärt auch den höheren Preis einer Taqmansonde im Vergleich zu einfach markierten Oligonukleotiden.

Damit es zu einer Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA Polymerase kommen kann, muß die Sonde zuvor stabil an die Zielsequenz hybridisiert haben.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist, daß das Sonden-Template-Hybrid im Gegensatz zum Primer-Template-Hybrid nicht zur Extension kommt und daher auch nicht von der Taq DNA-Polymerase stabilisiert wird. Um diese höhere Stabilität der Primer-Template Anbindung zu kompensieren, sollte die nach der Nearest Neighbour Methode bestimmte Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Sonde um ca. 5-10°C über der der PCR-Primer liegen.

Die Bestimmung der Schmelztemperatur von Primern und Sonden sollte nach der Nearest-Neighbour-Methode erfolgen, da diese Formel zur Zeit die wohl genaueste Schätzung der tatsächlichen Schmelztemperatur ermöglicht.

Um eine ausreichende Spezifität zu erzielen, sollte die Länge der Sonden ca. 20-30 Nukleotide betragen, wobei die optimale Länge zwischen 24 und 30 Nukleotiden liegt. Die obere Grenze für die Sondenlänge scheint bei 35 Nukleotiden zu liegen, da längere Sonden aufgrund von Sekundärstrukturausbildungen bei der Hybridisierung Probleme verursachen.

Neue Entwicklungen der Firma Applied Biosystems erlauben es, durch Verwendung von sogenannten *turbo* TaqMan-Probes und MGB-Probes (minor groove binder) die Sondensequenz kürzer zu halten.

Bei den *turbo* TaqMan-Probes ist Thymin durch 5-propyne-2'-deoxyuridin ersetzt. Der Einbau von 5-propyne-2'-deoxyuridin in Oligonukleotide stabilisiert die Bildung der Doppelhelix. Der Ersatz von Thymin durch 5-propyne-2'-deoxyuridin erhöht die  $T_m$  von TaqMan-Sonden um durchschnittlich 1°C pro Substitution.

Dadurch ist es möglich in A/T reichen Sequenzabschnitten, die auf Grund der geringeren Bindungskräfte der A/T-Paarung sehr lange Sonden erfordern, diese zu verkürzen. Die Verwendung dieser Sonden wird bei einer Länge von über 30 Basenpaaren für herkömmliche Sonden empfohlen. Für die Sonde wird der DNA-Strang gewählt, der mehr T enthält.

MGB-Probes unterscheiden sich von herkömmlichen Taqman-Sonden in zwei Punkten, erstens haben sie am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher. Dadurch ist das Instrument imstande, die Fluoreszenz des Reporters genauer zu messen. Zweitens befindet sich am 3'-Ende der Sonde ein „minor groove binder“, der die Sonde im kleinen Hohlraum der DNA-Doppelhelix verankert und die Bindung der Sonde dadurch verstärkt. Es kommt zu einer Erhöhung der  $T_m$  der Sonde und es sind ebenfalls kürzere Sonden möglich.

Das kann wichtig sein, wenn auf Grund der Sequenz nur ein kurzer Bereich für das Designen von Sonde und Primer verwendbar ist. Sei es, dass es sich um unspezifische Sequenzbereiche handelt, keine Primer mit ausreichend hoher  $T_m$  gefunden werden oder die Gefahr der Bildung von Primerdimeren oder anderen Fehlprodukten besteht.

Beim Designen der Sonde ist zu beachten, dass sich am 5'-Ende kein G befindet. Guanosin hat einen Quencheffekt, wenn der Reporterfarbstoff direkt gebunden ist. Der G/C Gehalt der Sonde kann zwischen 20% und 80% liegen, das Optimum ist bei 40 – 60%. Es soll der Strang mit dem größeren Gehalt an C verwendet werden. Es sollen auch nicht mehr als 3 Wiederholungen der selben Base hintereinander vorkommen.

Das LAN-TAMRA (Linkerarmnukleodit), welches als Quencher dient, wird entweder an Stelle eines 3'-terminalen T oder als Sequenzzusatz angefügt.

### ***TaqMan PCR-Assay***

Für die Auswahl der Primer gelten die allgemeinen Regeln unter Berücksichtigung, dass die  $T_m$  der Primer zwischen 58°C und 60°C liegen soll.

Die Länge der Primer soll zwischen 18 und 30 Basen betragen, um ausreichende Spezifität zu erhalten. Der G/C Gehalt soll zwischen 20 und 80% liegen, Poly-T-Bereiche sind zu vermeiden. Es besteht die Gefahr von unspezifischer Bindung.

Palindromische Sequenzen und Komplementarität an den 3'-Enden soll nicht vorhanden sein, dadurch besteht die Gefahr der Primerdimer-Bildung.

Für die Reinheit der Primer gelten ebenfalls die gleichen Anforderungen, wie für eine normale PCR. Es wurden nach Standardprotokoll hergestellte Oligonukleotide als Primer verwendet, ohne zusätzliche HPLC-Reinigung. Die Qualität von Oligonukleotiden ist heute bei allen renommierten Herstellern so hoch, dass eine HPLC-Reinigung oder ein anderer Reinigungsschritt nur mehr bei sehr langen Oligonukleotiden notwendig ist.

Die Länge des Amplikons soll zwischen 70 und 150 Basen betragen. Bei längeren Amplikons nimmt die Effizienz der Reaktion ab. Das 5'-Ende der Sonde soll möglichst Nahe am 3'-Ende des Forward-Primers liegen, eine Mindestabstand gibt es nicht, sie dürfen aber nicht miteinander überlappen. Dadurch wird sichergestellt, dass möglichst schon das erste an der Extension des Primers beteiligte Enzymmolekül auf die hybridisierte Sonde trifft und sie hydrolisieren kann.

Ab einer Entfernung von 50 – 60 Basen ist mit einer starken Abnahme der Effizienz unter Standardbedingungen zu rechnen. Der Abstand der Sonde zum Reverse-Primer ist nicht so wichtig, hier darf es auch zu einer leichten Überlappung kommen. Wichtiger ist die Gesamtlänge des Amplikons.

Es soll auch keine Komplementarität zwischen Primern und Sonde geben.

Die PCR wird im allgemeinen als zwei Stufen Reaktion durchgeführt, mit einem gemeinsamen Annealing- und Extensionsschritt bei 58 – 62 °C. Die Taq Polymerase besitzt bei dieser Temperatur eine ausreichende Aktivität. Durch die niedrige Extensionstemperatur wird die Bindung der Sonde an die Template-DNA stabilisiert und es kommt zu einer besseren Hydrolyse.

### **Quantifizierung**

Bei der PCR werden einige Kopien der Zielsequenz um eine Faktor  $10^8 - 10^{10}$  vermehrt, um eine Detektion zu ermöglichen. Sie ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100%igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Theoretisch kommt es bei jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der vorhandenen Kopien.

Die Effizienz einer PCR liegt meist zwischen 50 und 100 %, sie ist umso höher je kürzer das PCR-Produkt ist.

Kann man die Anzahl der Kopien nach n-Zyklen und die Effizienz der Reaktion bestimmen, sollte es möglich sein mit der im Abschnitt 2.2. angegebenen Formel, die Anzahl der Startkopien zu berechnen.

Es gibt zwei Einschränkungen, erstens muss man sich nach n-Zyklen noch im linearen Verlauf der Reaktion befinden und zweitens bei kleiner Startkopienzahl berücksichtigen, dass es sich um einen stochastischen Prozess handelt.

Statistische Berechnungen haben gezeigt, dass der Fehler auf Grund des stochastischen Verlaufs bei kleinen Kopienzahlen bei 30 – 50 % liegt. Dabei sind alle anderen Fehler durch Handhabung und die Reaktion selbst nicht berücksichtigt.

Die Effizienz erreicht nie 100%, wird aber immer größer je kürzer die Amplifikate sind.

Die Effizienz der Reaktion ist auch bei identen Proben (gemeinsamer Mastermix, anschließend aliquotiert) nicht über den gesamten Reaktionsverlauf gleich, was zu unterschiedlichen Produktmengen in der Plateauphase führt. Wird z.B. bereits in den ersten Zyklen ein Nebenprodukt gebildet, wird es anschließend mitamplifiziert. Dadurch kann die Menge des eigentlichen Amplifikats signifikant verringert werden.

Hybridisierung an eine nicht 100% komplementäre Sequenz bedeutet eine Herabsetzung der  $T_m$  oder eine Herabsetzung der theoretischen Startkopienzahl. Dadurch sind Nebenreaktionen mit einem sehr großen stochastischen Fehler behaftet.

Zu diesen Problemen der PCR selbst kommt noch hinzu, daß die Quantifizierung der Template-DNA meist mit einem großen Fehler behaftet ist. Reinheit und Menge sind oft nicht ausreichend um eine genaue photometrische Messung durchzuführen.

Aus diesem Grund wird eine endogene Amplifikationskontrolle als aktive Referenz verwendet und damit die experimentellen Ergebnisse normalisiert. Ein weiteres Beispiel für eine aktive Referenz ist eine exogene Amplifikationskontrolle, d.h. eine vorcharakterisierte RNA oder DNA, die dem Probenmaterial in einer definierten Konzentration zugesetzt wird.

Hierbei handelt es sich zumeist um ein *in vitro* Konstrukt. Eine solche Amplifikationskontrolle kann zum einen dazu verwendet werden, als interne

Positivkontrolle (IPC) PCR-Inhibitoren zu erfassen. Zum anderen kann über eine solche Kontrolle - wenn bereits vor der Nukleinsäureextraktion zugesetzt - auch die Effizienz der Nukleinsäureaufarbeitung erfaßt werden.

Schließlich kann mit Hilfe dieser Kontrolle im Falle einer RT-PCR der Schritt der reversen Transkription kontrolliert werden.

Unabhängig davon ist bei der TaqMan PCR der Farbstoff ROX (6-carboxy-X-rhodamine) stets als passive Referenz enthalten. Auf dieses Referenzsignal wird die Emission des Reporters normalisiert und es gleicht somit Pipettierfehler aus.

Da bei der real-time PCR der gesamte Reaktionsverlauf verfolgt wird, ist hier eine Quantifizierung in der logarithmischen Phase der Reaktion möglich. Die Quantifizierung kann dann auch über eine Standardkurve erfolgen. Die Qualität einer quantitativen PCR ist abhängig von den gewählten Standards und der Reinheit der eingesetzten DNA. Wenn der Standard genau charakterisiert ist, kann man auch eine absolute Quantifizierung durchführen.

Bei einer relativen Quantifizierung wird die unbekannte Menge der Zielsequenz auf eine zweite Sequenz bezogen. Die Erstellung von Standardkurven für eine relative Quantifizierung ist einfacher, da man die Absolutmenge der dafür verwendeten DNA nicht kennen muß. Es ist nur eine exakte Angabe der Verdünnungsstufen notwendig, aber nicht die genaue Kopienzahl, da diese sich bei der Berechnung herauskürzt.

### ***Optimierung des Reaktionsansatzes***

Alle Systeme wurden so ausgewählt, das sie mit demselben Temperaturprofil verwendet werden können. Als Polymerase wurde in allen Experimenten die AmpliTaq Gold von PE-Biosystems verwendet. Es handelt sich dabei um eine modifizierte Taq-Polymerase, die erst durch 5 – 10 minütiges Inkubieren bei 95°C aktiviert wird. Sie erlaubt daher das Ansetzen der Reaktionen bei Raumtemperatur und die Durchführung eines Hotstarts der PCR.

Von Hotstart spricht man, wenn die Polymerasereaktion erst nach Erreichen einer Temperatur über der Annealing-Temperatur beginnt. Da bei niedrigeren Temperaturen leichter Fehlbindung der Primer erfolgen kann, die normale Taq-Polymerase aber schon Enzymaktivität zeigt, werden diese durch Verlängerung stabilisiert. Das erhöht die Gefahr der Bildung von Nebenprodukten.

Bei einer klassischen Hotstart-PCR wird eine essentielle Komponente des PCR-Ansatzes erst nach Erreichen einer Temperatur mindestens 10 Grad über der Annealing-Temperatur zugegeben. Meistens ist das die Taq-Polymerase.

Eine zweite Möglichkeit ist es das Reaktionsgemisch in zwei Mastermixe aufzuteilen. Mastermix 1 enthält alle Bestandteile bis auf Template-DNA und Primer, Mastermix 2 nur Primer und Template-DNA. Mastermix 1 wird in die PCR-Röhrchen pipettiert, ein Wachskügelchen dazugegeben und so hoch erhitzt, dass das Wachs schmilzt. Anschließend wird abgekühlt und das Wachs bildet eine Sperrschicht über dem Mastermix 1.

Dann wird der Mastermix 2 dazugegeben und die Reaktion gestartet. Beim 1. Denaturierungsschritt schmilzt die Wachsschicht und Mastermix 1 und 2 vermischen sich und die PCR beginnt.

Durch Verwendung von Amplitaq Gold Polymerase oder einer anderen Hotstart-Polymerase kann man diese aufwendige Prozedur vermeiden. Zuerst erfolgt die Aktivierung der Polymerase durch 10 Minuten Inkubation bei 95°C, daran schließt eine 2 Stufen PCR mit 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 1 Minute Annealing und Extension bei 59°C an.

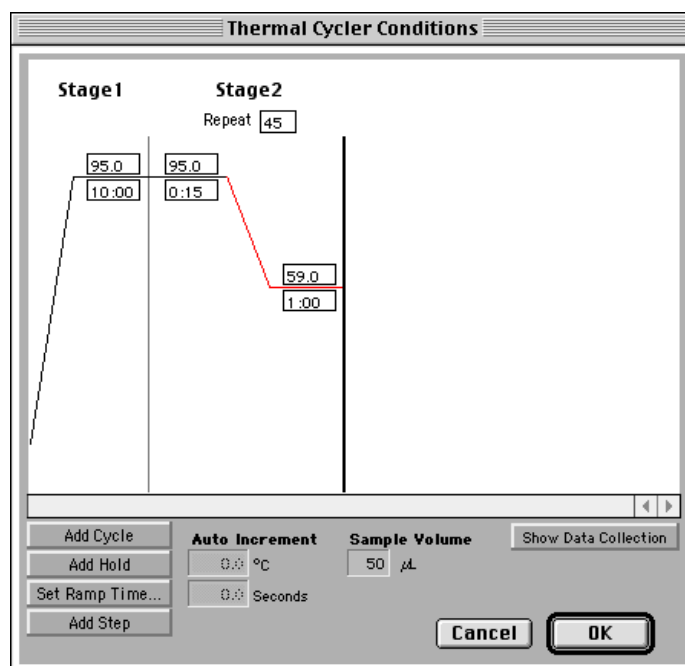
In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches dargestellt. Von den Bestandteilen müssen auf jeden Fall die Primerkonzentrationen optimiert werden.

**Tab. 6:** Standard real-time Reaktionsgemisch

Bestandteil	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	Volumen pro Ansatz [µl]
Wasser			ad 50
10xTaqMan PufferA	10x	1x	5,0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5,5 mM	11,0
dATP	10 mM	300 µM	1.5
dCTP	10 mM	300 µM	1.5
dGTP	10 mM	300 µM	1.5
dUTP	20 mM	300 µM	1.5
Forward Primer	5 µM	50 – 900 nM	0,5 – 9,0

Reverse Primer	5 µM	50 – 900 nM	0,5 – 9,0
Sonde	5 µM	100 nM	1,0
AmpliTaq Gold	5U/µl	0,025U/µl	0,25
AmpEraseUng	1U/µl	0,01U/µl	0,5
BSA	100mg/ml	1,6 µg/µl	0,8
Template			X
Gesamtvolumen			50,0

Die Optimierung erfolgt mit Hilfe einer Primermatrix. Dabei werden Reaktionsansätze mit verschiedenen Primerverhältnissen verwendet und nach Auswertung der Reaktionen die optimale Primerkonzentration bestimmt. In den meisten Fällen liegt sie bei jeweils 300nM. Eine Primermatrix ist für jede neue Charge von Primern durchzuführen, da sie auch von der Primer-Qualität abhängt.



**Abb. 6:** Temperaturprofile der TaqMan PCR

**Tab. 7:** Primermatrix: Forward Primer/Reverse Primer [nM]

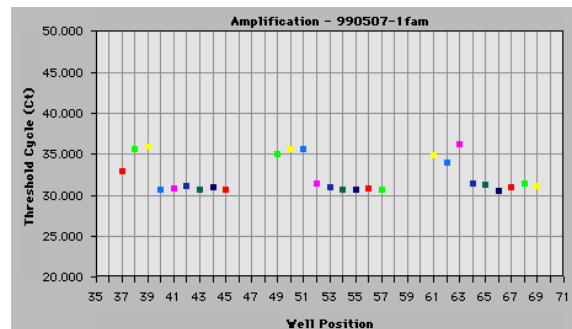
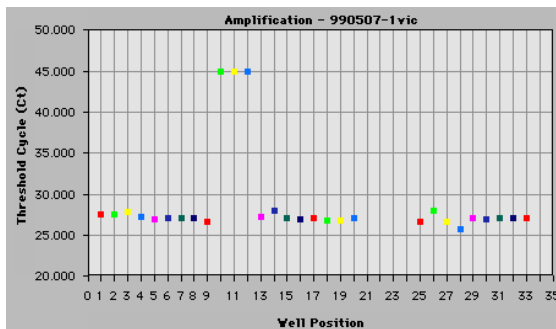
50/50	50/300	50/900
300/50	300/300	300/900



900/50

900/300

900/900



**Ab\*b.7:** Beispiele für die Ergebnisse einer Primer Matrix.

Auch die  $MgCl_2$  Konzentration und die Konzentration der Sonde sind zu optimieren.

## Herstellung von Referenzplasmiden

## Validierung

Die Durchführung zuverlässiger Analyseverfahren setzt eine entsprechende Entwicklung und letztendlich eine Validierung der verwendeten Methode voraus. Im Pharmabereich werden derartige Validierungsverfahren durch entsprechende Behörden-Vorgaben verbindlich vorgeschrieben (z.B.: "Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation" vom U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration und "ICH harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: Methodology" ausgearbeitet von der International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). Die Europäische Union hat die Texte für diese Prozeduren in ihren Schriftstücken (EMA- European Agency for the Evaluation Unit) als ICH Topic Q2B direkt übernommen.

Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden sollen unter Zuhilfenahme der beiden erwähnten Richtlinien validiert werden.

Auf Grund der hohen Empfindlichkeit erfordert der Einsatz von PCR-Techniken einige zusätzliche Qualitätssicherungs-Maßnahmen. Durch die Aufteilung der Probenaufarbeitung und –lagerung, der Reagenzienherstellung sowie der Probenanalyse auf drei getrennte Arbeitsbereiche mit eigenen Arbeitsgeräten und durch das Arbeiten unter der PCR- Arbeitshaube und das Verwenden von Einwegmaterialien (Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern) wurde die Verschleppung von positivematerial und damit das Risiko von "falsch positiven" Proben minimiert.

Folgende Kriterien erfüllen laut den Empfehlungen der ICH (International Conference on Harmonisation) die Mindestanforderungen an eine Methodvalidierung:

die **Richtigkeit** (mit Hilfe von Referenzstandards wurde die Wiederfindung überprüft)

die **Präzision** (durch Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Streuung der Werte)

die **Spezifität** (die Fähigkeit des Systems zur Unterscheidung der Wunschsubstanz von anderen Begleitsubstanzen)

die **Nachweisgrenze**

die **Quantifizierungsgrenze**

der **Messbereich**

die **Linearität** (durch Verdünnungsreihen von gespikten Proben) und

die **Robustheit** des Systems.

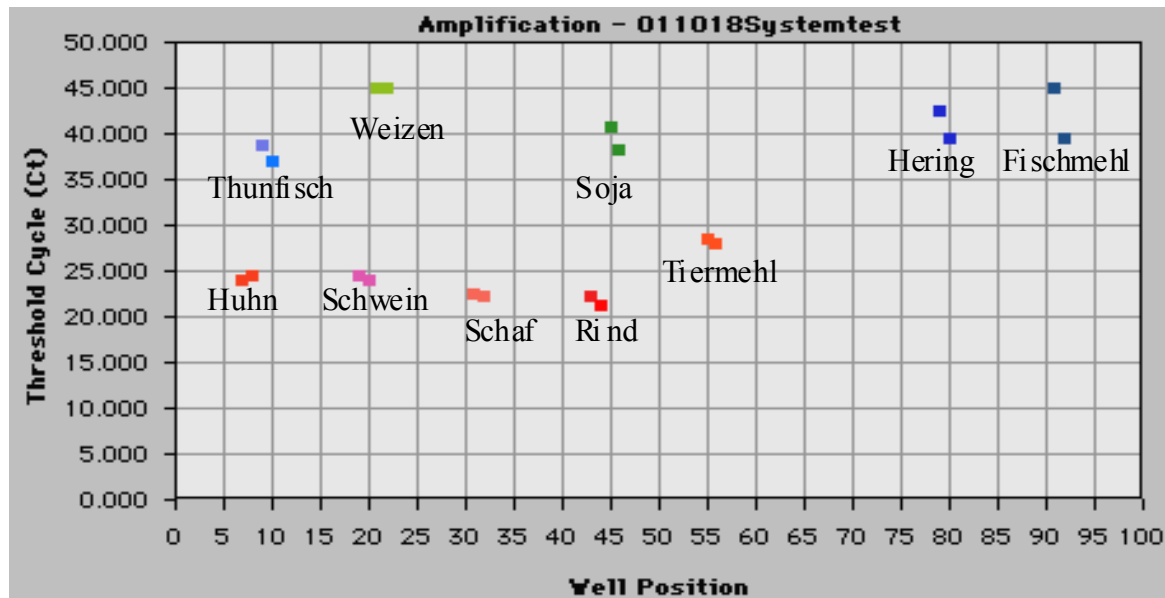
Außerdem wurde die DNA-Extraktion (verwendete Extraktionsmethode und Inkubationszeit) in den Gesamtprozess der Validierung mit eingeschlossen.

Im folgenden soll als Beispiel auf die einzelnen Punkte in Zusammenhang mit der Validierung der Methode zum Nachweis von Tiermehl mittels Real-time PCR näher eingegangen werden. Beginnend mit der **DNA-Extraktion** wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden (CTAB und Wizard) verglichen. Untersucht wurde einerseits die Ausbeute, andererseits die Reinheit der erhaltenen DNA (Verhältnis Abs.<sub>260</sub>/Abs.<sub>280</sub>, Real-time PCR Reaktionen der unterschiedlich extrahierten DNAs mit demselben Primersystem). Die mittels CTAB isolierten DNAs führten zwar zu niedrigeren Ct-Werten, allerdings war die Ausbeute bei der Extraktion selbst geringer. DNA aus reinem Tiermehl konnte mit dieser Methode überhaupt nicht (oder mit extrem geringer Ausbeute) extrahiert werden. Kombinationen der CTAB- mit der Wizard-Methode und mit einer Ethanol-fällung führten zwar zu bedeutend höheren Ausbeuten bei Tiermehl und Tiermehlmischungen, doch die isolierten DNAs zeigten höhere Ct-Werte als bei einer reinen CTAB-Isolierung. Letztendlich wurde für die DNA-Extraktion die Wizard-Methode eingesetzt, da mit dieser auch Tiermehl-DNA in ausreichender Menge erhalten wurde. Der Einfluss der Inkubationszeit auf die DNA-Ausbeute wurde untersucht.

Die folgenden Parameter dienen zur Validierung der Real-time Methode:

Die **Präzision** wurde durch den Vergleich der Streuung der Ct-Werte von Intra- und Inter-Assays ermittelt. Die Messungen erfolgten mit einem Primer-Sonden-System (18S-uni), mit dem tierische und pflanzliche DNA erfasst wird und mit einem tierspezifischen System (18S-animal1). Dabei wurden für den Intra-Assay pro Platte jeweils 6 gleiche Proben aufgetragen, für den Inter-Assay wurden die gleichen Messungen im Parallelansatz auf drei verschiedenen Platten durchgeführt. Die dabei eingesetzten DNAs waren von Rind, Schwein, Kabeljau und Sardine. Bei den Messungen wurde ein Konzentrationsbereich von 0.1 pg bis 100 ng/mL untersucht. In allen Fällen zeigte sich sowohl beim Intra- als auch beim Inter-Assay eine sehr hohe Präzision der Methode. Nur die Ct-Werte von sehr kleinen Konzentrationen (0.1 pg/mL) zeigten eine große Streuung. Die Präzision der Methode wurde anschließend für das Referenz-Tiermehl und für Mischungen dieses Mehls mit dem Referenzmischfutter bestimmt.

Zur Bestimmung der **Spezifität** des Systems 18S-ani wurden verschiedene tierische und pflanzliche DNAs auf einer Platte aufgetragen und ihre Ct-Werte verglichen. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich konnte DNA von Säugetieren klar von pflanzlicher DNA und von Fisch-DNA unterschieden werden (großer Unterschied der Ct-Werte).

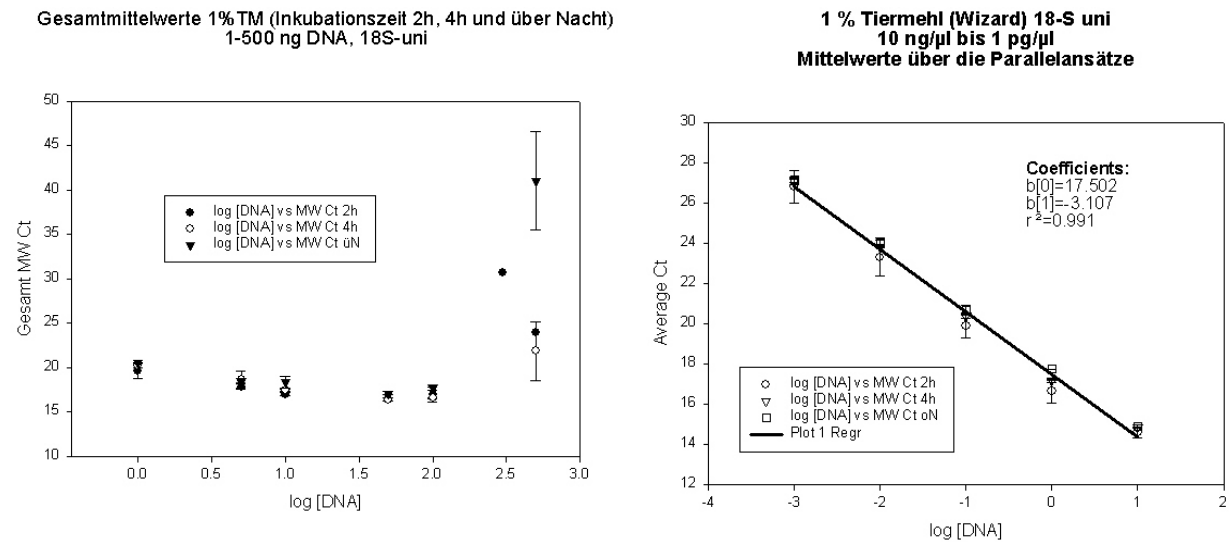


**Abb. 8:** Spezifität des Primer-Sondensystems 18S-ani

Die **Nachweisgrenze** ist sehr stark von der eingesetzten DNA abhängig und somit auch von der Zusammensetzung des Tiermehl, gleiches gilt auch für die **Linearität**. Vor allem im niederkonzentrierten Bereich (ab 1 pg/mL) kommt es manchmal zu einer starken Streuung der Ergebnisse, außerdem sind dabei die Ct-Werte schon im Bereich der NTC-Werte (no template control). Ab einem Einsatz von 10 ng/mL DNA wurde teilweise schon eine Inhibition der PCR-Reaktion beobachtet (dieser Konzentrationsbereich ist wieder stark abhängig von der eingesetzten DNA, Abb.2).

Genauere Studien, auch zur Ermittlung der **Quantifizierungsgrenze** und des **Messbereiches** müssen noch durchgeführt werden. Generell kann aber schon jetzt gesagt werden, dass diese Parameter stark DNA-abhängig sind und für die jeweiligen Tiermehle und Tiermehlmischungen gesondert ermittelt werden müssen. Weiters wird noch ein Referenzstandard benötigt, mit dem die **Richtigkeit** der Messungen bestimmt werden kann. Bis jetzt wurden nur Messungen mit dem System 18S-animal1 durchgeführt, bei denen zu einer Tiermehlmischung genau definierte Konzentrationen von Rind bzw. reinem Tiermehl zugegeben wurden. Die mit Hilfe der

Standardgeraden von Rind bzw. Tiermehl erhaltenen Quantifizierungen des zugemischten Anteils lieferten zufriedenstellende Ergebnisse.



**Abb. 9:** Ermittlung des linearen Bereiches mit dem Primersystem 18S-uni, eingesetzte DNA: 1% Tiermehl in Mischfutter.

Eine Quantifizierung der Zumischung von tierischer DNA mit dem 18S-uni System ist nicht möglich, da Pflanzen-DNA um bis zu 7-Zehnerpotenzen niedrigere Ct-Werte ergibt und demnach eine kleine Änderung des tierischen Anteils nicht messbar ist. Ziel des Projektes ist es, die Quantifizierung von unbekanntem Tiermehl-Mischfutter-Mischungen über genau definierte Referenzstandards durchzuführen. Mit diesen Referenzstandards wird auch noch die Richtigkeit der Messungen überprüft werden.

Die **Robustheit** des Systems ist durch die verwendete Methode bei Verwendung eines Standard-Mastermixes schon größtenteils gegeben, auch die Temperaturprogramme bleiben gleich. Die Auswirkung der Variation der Konzentrationen der verschiedenen Komponenten (MgCl<sub>2</sub>, Primer, Sonde, Polymerase, Rox) im Mastermix wurde zwar bei der Methodenentwicklung untersucht, bei der validierten Methode wird allerdings ein fertiger Mastermix eingesetzt werden. Es ist auch bei unterschiedlichen Chargen nicht anzunehmen, dass es zu einer Variation des pH-Wertes oder der Salzkonzentration kommt. Ebenso wird immer mit den gleichen Primern und Sonden gearbeitet. Nur eine völlig andere Zusammensetzung des Tiermehls im Mischfutter (z.B. erhöhter Anteil an Geflügel, Rind oder Schwein) kann zu einem erhöhten Fehler beim Ergebnis führen.

# Ergebnisse

## ***DNA-Isolierung***

Es wurde aus verschiedenen Tier-, Fisch- und Pflanzenarten DNA isoliert, um Referenz-DNAs für die Überprüfung der Spezifität der Analysesysteme zu haben. Diese Isolierungen erfolgten in den meisten Fällen mit der SDS-Wizard Methode.

Bei der Isolierung von DNA aus Tier- und Fischmehlen und Futtermittel wurden hauptsächlich zwei Isolierungsmethode, nämlich SDS-Wizard und CTAB verglichen. Ergebnisse siehe weiter unten.

Die Konzentration der isolierten DNAs wurde photometrisch bestimmt und Stammlösungen von  $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  hergestellt. Diese wurden aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## **Arbeitsvorschriften**

### ***SDS – Wizard Methode***

200 mg Probe in einem Eppendorfgefäß einwiegen

- + 860  $\mu\text{l}$  TNE-Puffer
- + 100  $\mu\text{l}$  Guanidinhydrochlorid [5 M]
- + 40  $\mu\text{l}$  Proteinase K [ $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ]

Proben vortexen und mind. 4h im Thermomixer bei  $56^\circ\text{C}$ , 1000 – 1300 rpm inkubieren

Fetteiche Proben (Fisch, Tier- oder Fischmehle, Mischfutter) mit Chloroform ausschütteln: Proben + 400  $\mu\text{l}$  Chloroform, 30 sec. vortexen

10 min bei 13 000 rpm zentrifugieren und 500  $\mu\text{l}$  des Überstandes bzw. der wässrigen Phase (oben) in ein frisches Epi geben

+ 5  $\mu\text{l}$  RnaseA (10 mg/ml), mischen und 5 min bei  $56^\circ\text{C}$  inkubieren

+ 1 ml Wizard-Resin (vorher gut schütteln!!!) und durch kippen der Epis mischen

Gemisch auf Säulchen auftragen und mit Vakuum die Flüssigkeit absaugen

Mit 2 ml Isopropanol [80%] waschen und anschließend 30 sec Vakuum anlegen (nicht länger)

Filtersäulchen in ein Epi geben und 2 min bei 13 000 rpm zentrifugieren

Säulchen in ein neues Epi geben, 50 µl 70 – 72 °C warmen 1x TE auf das Säulchen geben, 1 min stehen lassen und 1 min bei 13 000 rpm zentrifugieren

### **CTAB-Methode**

200 mg der Probe in einem Eppendorfgesäß einwiegen, 1 ml CTAB-Extraktionspuffer zugeben und mischen

Probe bei 65 °C im Thermomixer inkubieren und gelegentlich vortexen (oder bei 1300 rpm durchwegs schütteln)

10 min bei 13 000 rpm zentrifugieren und Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen

400 µl Chloroform zugeben und 30 sec am Vortex schütteln

10 min bei 13 000 rpm zentrifugieren und wässrige Phase (ca. 350 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführen

700 µl 0,5 %ige CTAB-Lösung (= 2x Volumen) zugeben und 60 min bei RT inkubieren

5 min bei 13 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen und das Pellet in 350 µl 1,2 molarer NaCl Lösung suspendieren

350 µl Chloroform zugeben, 30 sec vortexen und 10 min bei 13 000 rpm zentrifugieren

wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen (300 µl) und 0,6 Volumsanteile Isopropanol (= 180 µl) zugeben

10 min bei 13 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet in 500 µl 70 %igem Ethanol waschen

10 min bei 13 000 rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig absaugen, Pellet trocknen lassen und DNA in 100 µl H<sub>2</sub>O bidest lösen

Extraktionspuffer: 2% CTAB  
0,1 M Tris (pH 8.0)  
1,4 M NaCl  
0,02 M EDTA (pH 8.0)

### **Congen**

Es wurde entsprechend des Firmenprotokolls vorgegangen.

## Referenz DNA aus Tieren, Fischen und Pflanzen

Bei der Isolierung der Referenz-DNA wurde bei den Fischen ein starker Abbau bei verschiedenen nicht frischen Fischen beobachtet. Bei Vergleich der Ergebnisse der real-time PCR wurden starke Unterschiede bei verschiedenen Fischen beobachtet, die sich nicht aus Sequenzunterschiede erklären ließen.

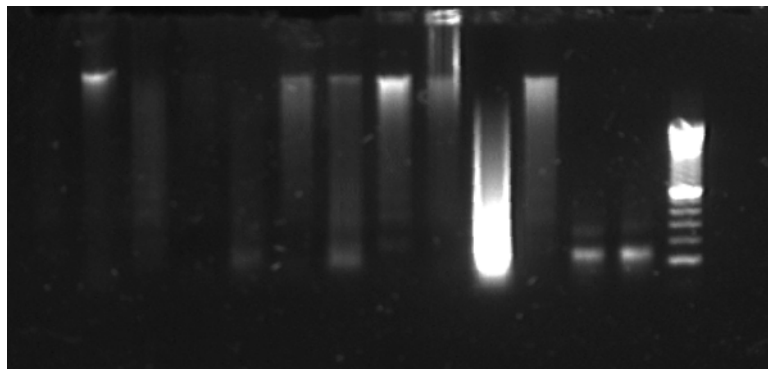
Die DNAs wurden daher auf einem Agarosegel aufgetragen und auf ihre Qualität untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die DNAs teilweise stark degradiert waren. Das erklärte auch die unterschiedlichen real-time PCR Ergebnisse.

Es wurden daher frische Fische gekauft und daraus sofort DNA isoliert. Diese zeigte bei der Überprüfung im Agarosegel viel geringere Degradation.

Ein Teil der Fische wurde über Nacht auf Eis gelagert, ein anderer Teil bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Am nächsten Tag wurde aus beiden erneut DNA isoliert. Bei der Lagerung auf Eis zeigte sich Degradation der DNA, bei eine Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  nicht.

Bei Tieren und Pflanzen gab es dieses Problem nicht.

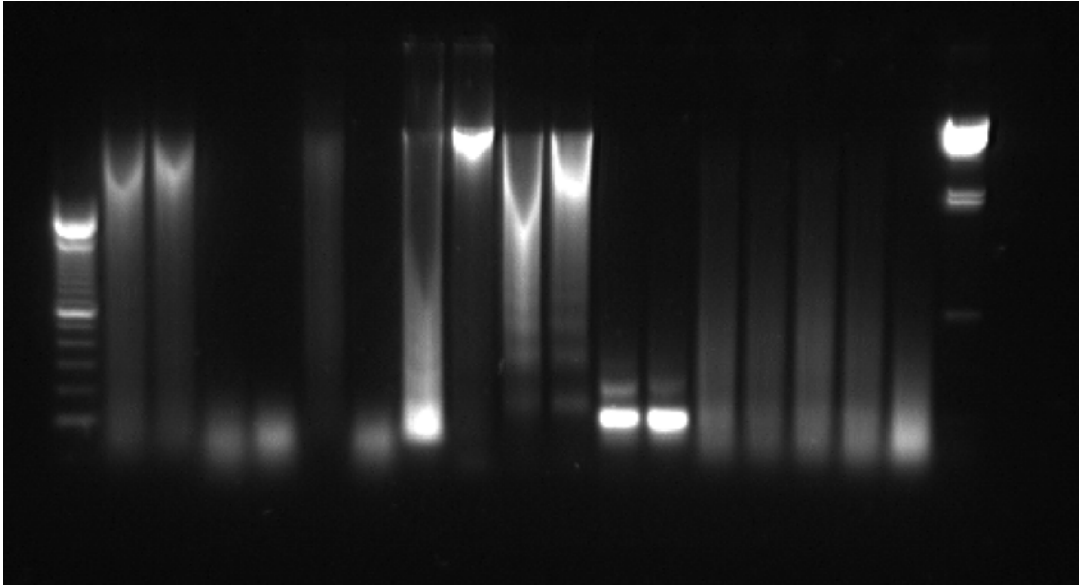
Liste der Organismen siehe Tabelle 1.



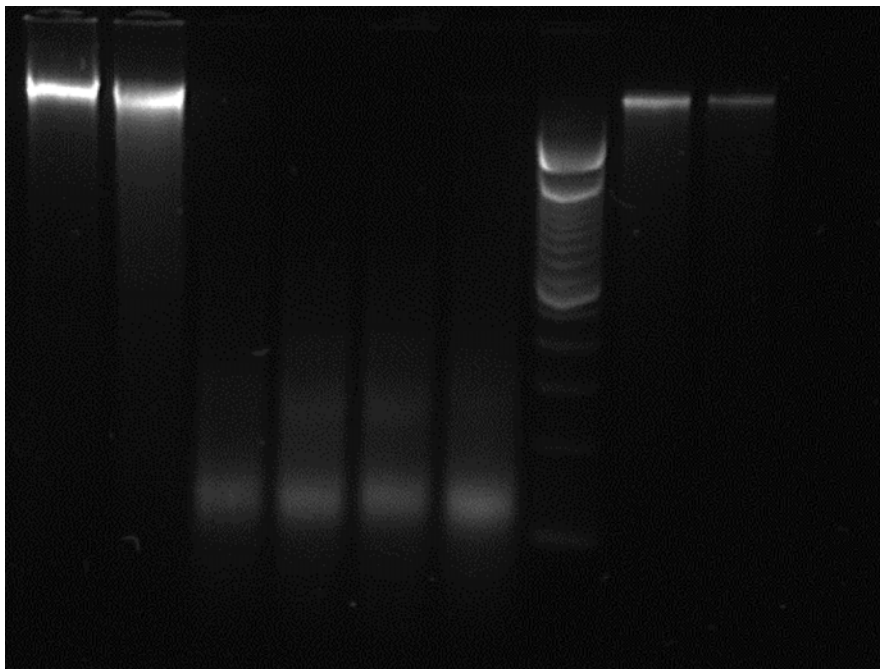
**Abb. 10:** Agarosegel von verschiedenen Referenz DNAs.

Spur 1: 100 ng Weizen; Spur 2: 150 ng Soja; Spur 3: 100 ng Roggen; Spur 4: 70 ng Sonnenblume; Spur 5: 50 ng Raps; Spur 6: 100 ng Hafer; Spur 7: 50 ng Mais; Spur 8: 100 ng Schwein; Spur 9: 100 ng Schaf; Spur 10: 500 ng Huhn; Spur 11: 100 ng Rind; Spur 12: 100 ng Hering; Spur 13: 100 ng Kabeljau; Spur 14: 500 ng 100 bp Leiter

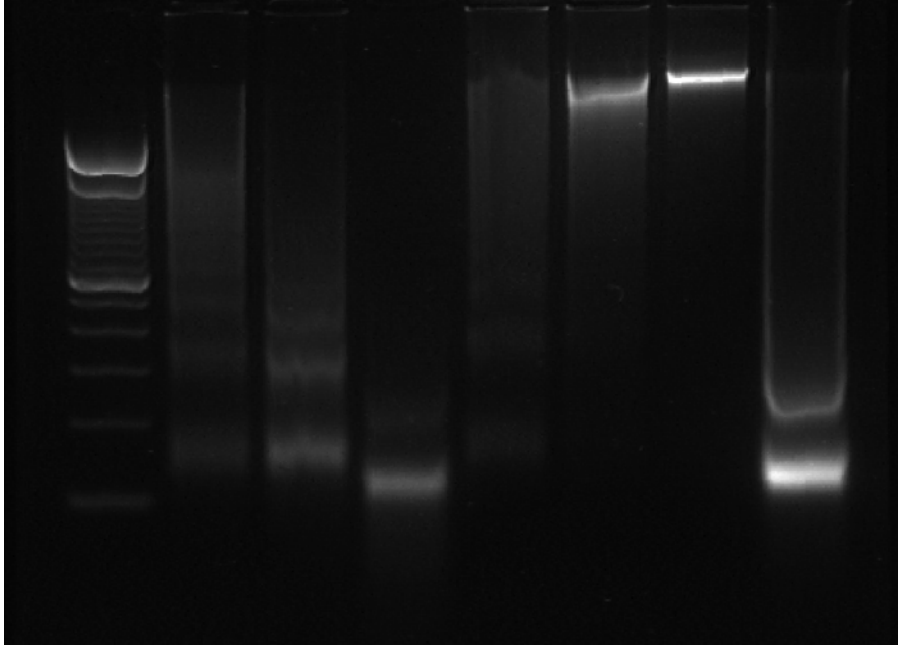




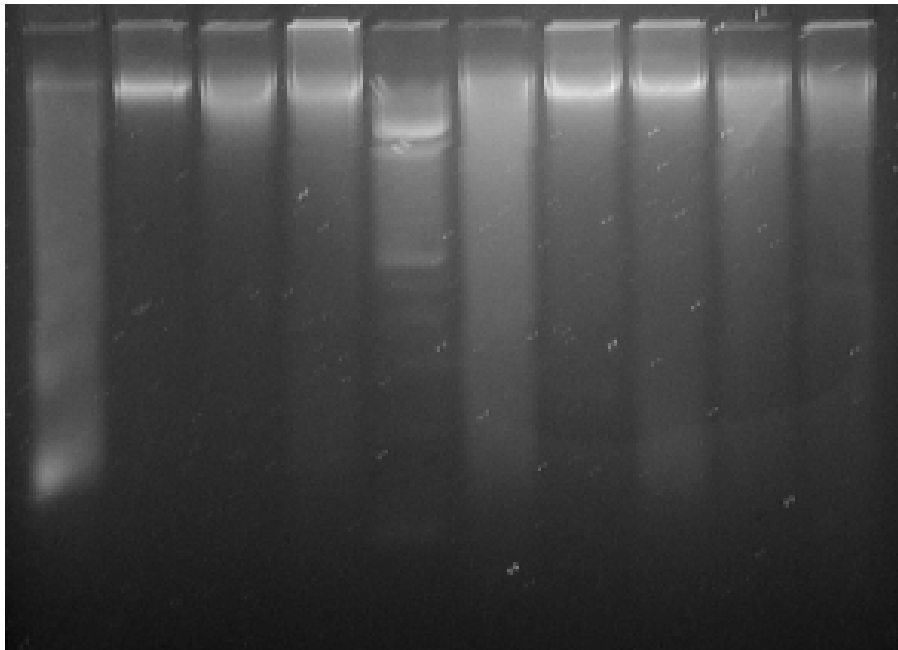
**Abb.11:** Agarosegel von je 500ng DNA verschiedener Organismen, Futtermittel, Tier- und Fischmehlen. Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: MF M1; Spur 3: MF M2; Spur 4: 4496; Spur 5: 4585; Spur 6: 4595; Spur 7: 4678; Spur 8: Mais; Spur 9: Soja; Spur 10: Rind; Spur 11: Schwein; Spur 12: Hering; Spur 13: Kabeljau; Spur 14: Fischmehl 1A; Spur 15: Fischmehl 2A; Spur 16: Fischmehl ; Spur 17: Fischmehl 4A; Spur 18: Fischmehl 5A; Spur 19: Lambda Hind III Standard.



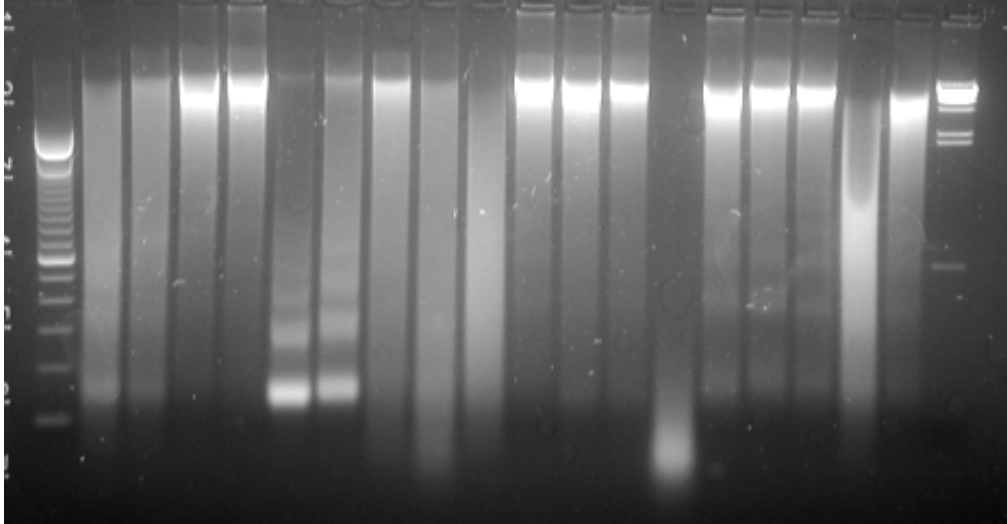
**Abb. 12:** Agarosegel von Fisch DNA. Spur 1: 500 ng Thunfisch; Spur 2: 500 ng Scholle; Spur 3: 500 ng Kabeljau ; Spur 4: 500 ng Hering; Spur 5: 500 ng Hering-Std; Spur 6: 500 ng Kabeljau-Std; Spur 7: 100 bp Leiter, 0,5 µg



**Abb. 13:** Agarosegel von Fisch DNA. Spur 1: 100 bp Leiter, 0,5  $\mu\text{g}$  ; Spur 2: 500 ng Heilbutt; Spur 3: 500 ng Makrele; Spur 4: 500 ng Hering; Spur 5: 500 ng Kabeljau; Spur 6: 500 ng Scholle; Spur 7: 500 ng Thunfisch; Spur 8: 500 ng Lachs



**Abb. 14:** Agarosegel von DNA aus frischen Fischen, sofort isoliert. Es wurden jeweils 500 ng DNA aufgetragen. Spur 1: Heilbutt; Spur 2: Viktoriabarsch; Spur 3: Thuna; Spur 4: Sardine; Spur 5: 100 bp Leiter, 0,5  $\mu\text{g}$ ; Spur 6: Wolfsbarsch; Spur 7: Goldbrasse ; Spur 8: Rotbarbe ; Spur 9: Scholle; Spur 10: Makrele



**Abb. 15:** Agarosegel von DNA aus frischen Fischen nach Lagerung über Nacht bei 4°C auf Eis bzw. bei -70°C. 500ng DNA je Spur. Spur 1: 100 bp Leiter, 0,5 µg ; Spur 2: Scholle, 4°C; Spur 3: Scholle, -70°C; Spur 4: Thuna, 4°C; Spur 5: Thuna, -70°C; Spur 6: Heilbutt, 4°C; Spur 7: Heilbutt, -70°C ; Spur 8: Makrele, 4°C ; Spur 9: Makrele, -70°C ; Spur 10: Goldbrasse, 4°C ; Spur 11 : Goldbrasse, -70°C ; Spur 12 : Rotbarbe, 4°C ; Spur 13 : Rotbarbe, -70°C ; Spur 14 : Sardine, 4°C ; Spur 15 : Sardine, -70°C ; Spur 16 : Viktoriabarsch, 4°C; Spur 17: Viktoriabarsch, -70°C; Spur 18: Wolfsbarsch, 4°C; Spur 19: Wolfsbarsch, -70°C; Spur 20: λ-Hind III, 0,5 µg

### **DNA aus Tiermehlen**

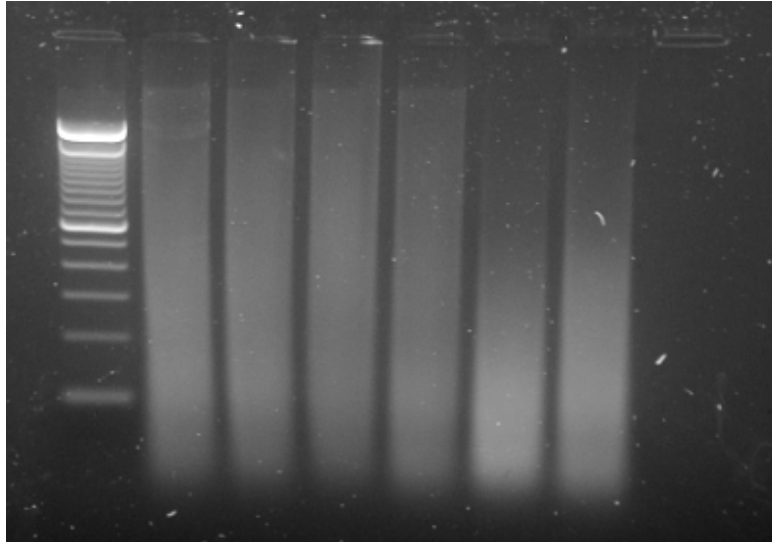
Da Tiermehle hoher thermischer Belastung ausgesetzt werden, ist aus ihnen nur stark degradierte DNA zu isolieren. Aus Abbildung 11 ist zu ersehen, dass die durchschnittliche Länge der DNA unter 100 bp liegt.

Daraus lässt sich auch erklären, dass aus Tiermehlen mit der CTAB-Methode nur sehr geringe DNA Mengen isoliert wurden. Bei einer Abwandlung der Methode, bei der die CTAB-Fällung vermieden und die DNA entweder gleich mit Alkohol gefällt oder nach dem Aufschluß über Wizard gereinigt wurde, konnten gleiche DNA Mengen wie bei der SDS-Wizard Methode isoliert werden. Daraus kann man schließen, dass sehr kleine DNA Fragmente bei der CTAB Fällung nur unvollständig gefällt werden.

### **DNA aus Fischmehlen**

Fischmehle werden keiner so starken thermischen Belastung ausgesetzt, wie Tiermehle. Die DNA zeigt daher auch wesentlich geringere Degradation wie DNA aus Tiermehlen.

Sie ließ sich sowohl mit der CTAB- als auch der SDS-Wizard Methode gut und mit sehr großer Ausbeute isolieren.



**Abb. 16:** Agarosegel von DNA aus Fischmehlen, je 500ng pro Spur. Spur 1: 100 bp Leiter, 0,25 µg; Spur 2: FM 1A ; Spur 3: FM 2A ; Spur 4: FM 3A ; Spur 5 : FM 4A ; Spur 6 : FM 5A ; Spur 7 : FM 1

### **DNA aus Futtermittel**

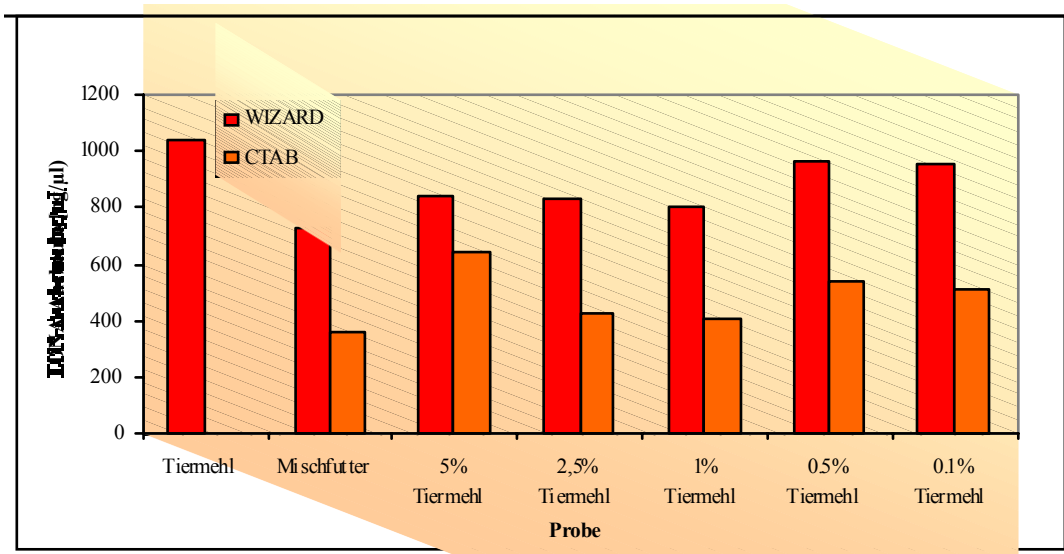
Hier wurde eine intensiver Vergleich der Methoden durchgeführt. Der Kit der Firma Congen wurde mitgetestet. Er ist geeignet zur Isolierung von DNA aus Futtermittel, da er aber keinen Vorteil gegenüber den anderen beiden Methoden zeigte wurde er nicht weiter verwendet.

Es wurde für die SDS-Wizard und die CTAB Methode der Einfluß der Inkubationszeit im Aufschlußpuffer untersucht.

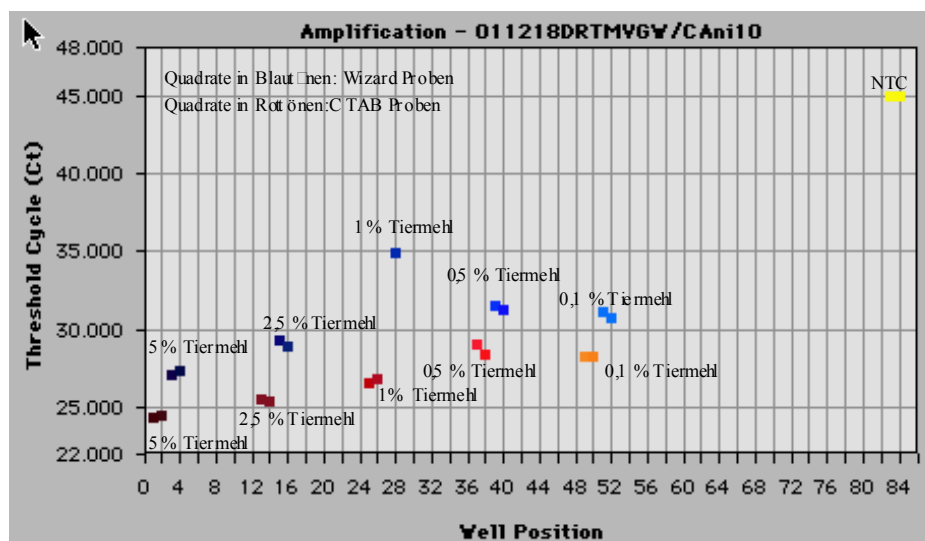
Bei der SDS-Wizard Methode zeigte eine Inkubationszeit von 2 h deutlich geringer Ausbeute. Bei einer Inkubationszeit von 4 – 16 h zeigte sich keine signifikante Änderung der DNA Ausbeute.

Die Inkubationszeit läßt sich also von 4 – 16 h variieren und so leicht an den Arbeitsablauf im Labor anpassen. Die DNA kann entweder innerhalb eines Arbeitstages isoliert werden, oder die Proben werden über Nacht inkubiert und die DNA am nächsten Morgen isoliert.

Bei der CTAB Methode läßt sich ein ähnlicher Verlauf feststellen, wobei hier auch bei 2 h und 4 h kein signifikanter Unterschied feststellbar ist.



**Abb. 17:** Unterschiede in der Gesamt-DNA-Ausbeute (SDS-WIZARD®- und CTAB-Methode). Die Extraktionszeit für beide Methoden betrug 6 Stunden, anschließend wurde die DNA-Ausbeute photometrisch bestimmt.



**Abb. 18:** Real-time PCR zum Nachweis von tierischer DNA in Mischfutter mit verschiedenen Zumischungen von Tiemmehl. Aus den unterschiedlichen Proben wurde mit CTAB- und WIZARD®-Methode nach 6 Stunden Extraktionszeit DNA isoliert und Real-time PCR mit dem 18Sanimal-System durchgeführt. Die Quadrate in den Blautönen zeigen die Ct-Werte der mit der WIZARD®-Methode isolierten Proben, jene in den Rottönen zeigen die Ct-Werte der mit CTAB behandelten Proben.

Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt, dass mit der SDS-Wizard etwas höhere Ausbeuten erreicht werden, bei der Ctab Methode aber höher molekulare DNA isoliert wird. Das zeigt sich in niedrigeren Ct-Werten in der real-time PCR bei gleicher

eingesetzter DNA Menge. Insbesondere der Anteil an tierischer DNA aus Tiermehlen scheint bei Mischfutter mit Zumischung von Tiermehl höher.

Auf Grund der Ergebnisse und des einfacheren Protokolls wurde für weiter Isolierungen von DNA aus Futtermittel die Wizard Methode gewählt.

### **Zielsequenzen**

Als Zielsequenzen entschieden wir uns für die Gene die für ribosomale RNA, sowohl chromosomal, als auch mitochondrial, codieren. Im Bereich des chromosomalen Genclusters wählten wir das Gen für die 18S rRNA aus, da hier Sequenzen für viele Organismen in der Datenbank vorhanden waren. Aus dem Mitochondrialen Genom wählten wir das 16S rRNA Gen aus, das zur Sequenz der Mitochondrien DNA aus Pflanzen geringe Homologie zeigt.

Der chromosomale Gencluster für die rRNA Gene liegt in allen Organismen in hoher Kopienzahl vor und ist daher für ein sensitives Nachweissystem gut geeignet. Die Anzahl der Kopien des mitochondrialen Genoms ist in den eukariontischen Zellen ebenfalls sehr hoch.

### **18S-rRNA Gen, chromosomal**

Die Sequenz des humanen 18S rRNA Gens (AC M10098) wurde als Suchsequenz verwendet, um die Bereiche mit hoher und geringer Homologie zu anderen Organismen herauszufinden.

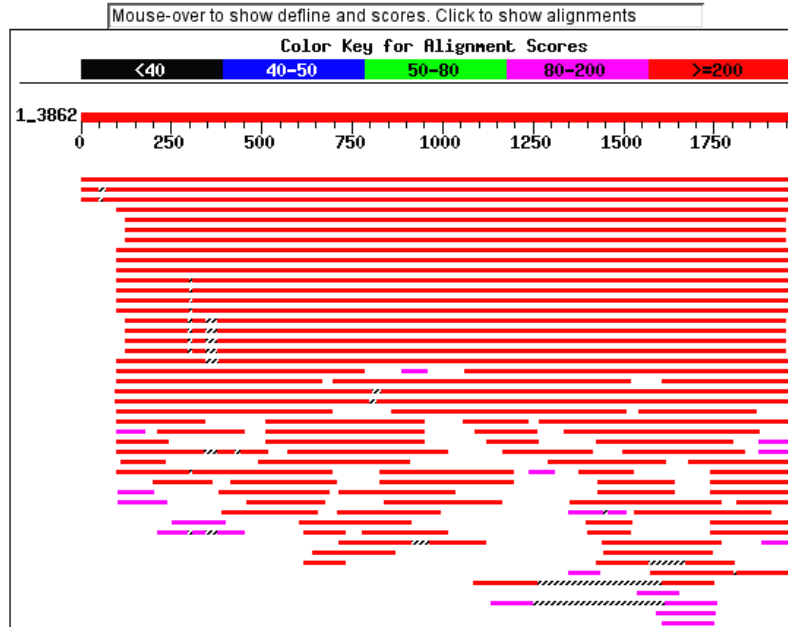
Zuerst wurde mit Hilfe des Programmes BLAST in Sequenzdatenbank Genbank gegen Säugetiersequenzen gesucht. Das Suchergebnis zeigt hohe Homologie über den ganzen Bereich mit allen in der Datenbank vorhandenen Sequenzen.

Im nächsten Schritt wurden rRNA Sequenzen von Fischen mit der humanen Sequenz verglichen, um festzustellen, ob eine Unterscheidung zwischen Fischen und Säugetieren und Vögeln möglich ist. In Abbildung 20 und 21 ist das Ergebnis dargestellt. Es zeigte sich, dass ein kleiner Bereich vorhanden ist, in dem geringe Homologie zwischen Mensch und Fischen besteht.

Abschließend wurde die humane Sequenz mit Sequenzen aus Pflanzen verglichen. Es zeigte sich, dass der Bereich, in dem sich die Fische von den Säugetieren unterscheiden ebenfalls unterschiede zu den Pflanzen aufwies. Es gab aber auch

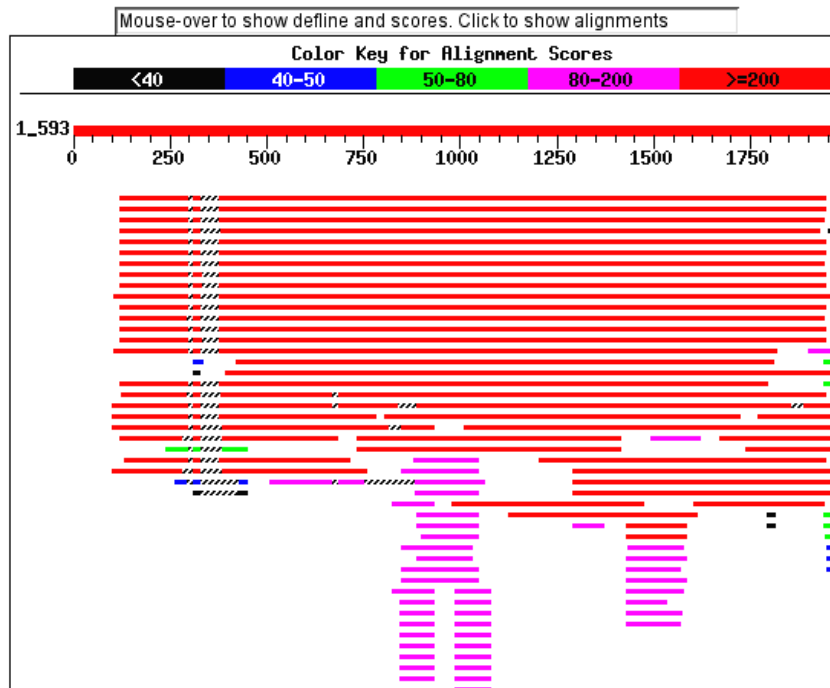
Bereiche, in denen Tiere, Fische und Pflanzen hohe Homologie in der Sequenz ihrer 18S rRNA aufwiesen.

#### Distribution of 130 Blast Hits on the Query Sequence



**Abb. 19:** BLAST-Suche mit der humanen 18S-rRna Sequenz gegen Säugetiersequenzen in der Datenbank (Genbank). Die Sequenzen zeigen über den gesamten Bereich hohe Homologie.

#### Distribution of 157 Blast Hits on the Query Sequence



**Abb. 20:** BLAST-Suche mit der humanen 18S-rRna Sequenz gegen Fischsequenzen in der Datenbank (Genbank). Die Sequenzen zeigen im Bereich zwischen den Basen 300 – 400 geringe, im übrigen Bereich hohe Homologie.

### Distribution of 90 Blast Hits on the Query Sequence

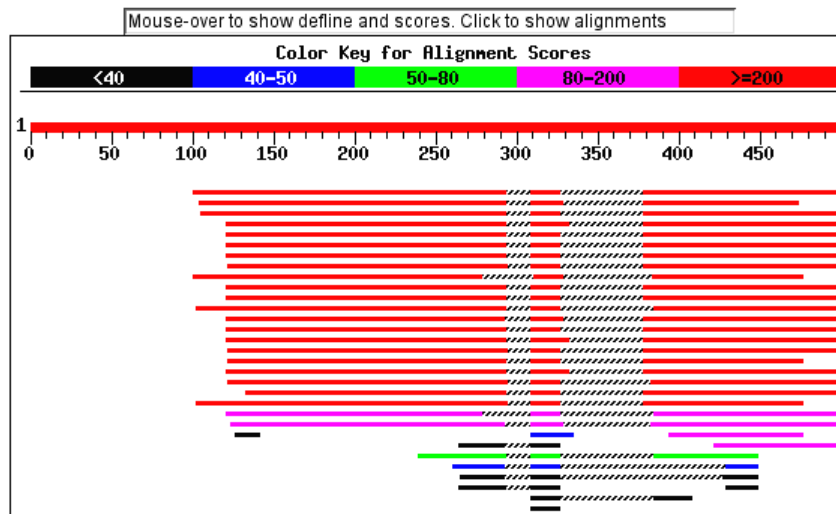


Abb. 21: BLAST-Suche mit der humanen 18S-rRna Sequenz gegen Fischsequenzen in der Datenbank (Genbank). Hier ist der Bereich mit geringer Homologie vergrößert dargestellt.

### Distribution of 890 Blast Hits on the Query Sequence

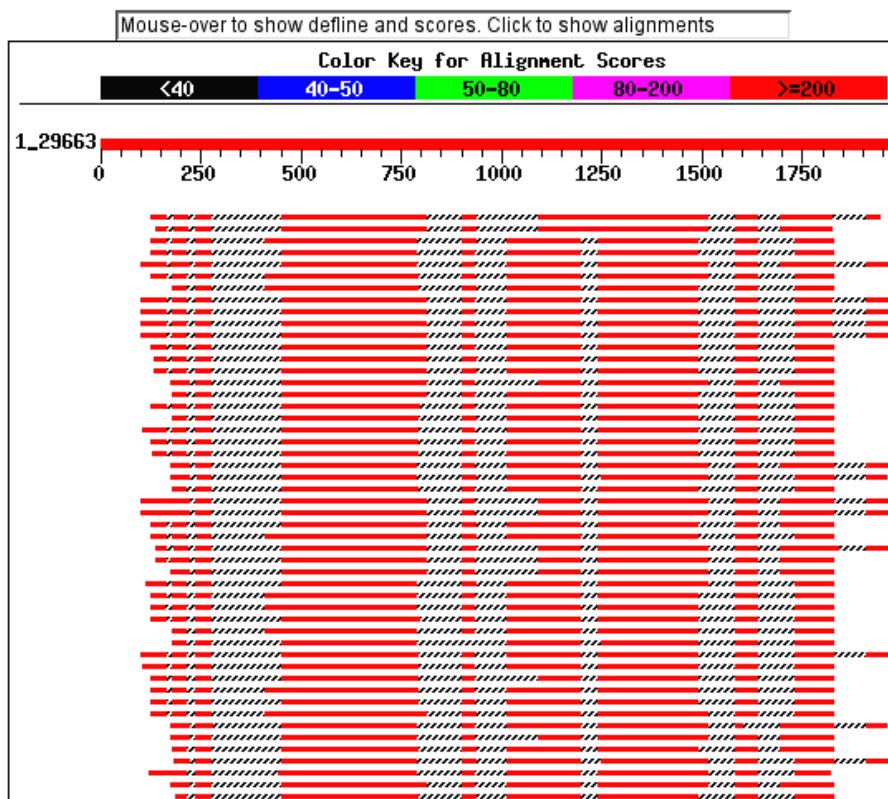


Abb. 22: BLAST-Suche mit der humanen 18S-rRna Sequenz gegen Pflanzensequenzen in der Datenbank (Genbank). Die Sequenzen zeigen nur Abschnittsweise hohe Homologie, dazwischen immer wieder Bereiche mit geringer Homologie..



Diese Ergebnisse erlaubten uns die Bereiche einzugrenzen, die wir für das Entwickeln unserer spezifischen Systeme und für ein Kontrollsystem verwenden können.

Die Sequenzen von relevanten Tieren, Vögeln, Fischen und Pflanzen wurden soweit vorhanden aus der Datenbank geholt, bzw. wurden die Bereiche selbst sequenziert.

Mit diesen Sequenzen wurde mit Hilfe der Programme Pileup und Pretty des GCG Programmpakets ein „multiple sequence alignment“ durchgeführt und Sequenzen für Primer und Sonden bestimmt.



**Abb. 23:** Multiple Sequence Alignment von 18S-rRNA Sequenzen von Tieren, Pflanzen und Fischen im Bereich hoher Homologien. Die Bereiche der Primer- und Sondensequenzen der universellen Systeme sind gelb unterlegt.





## Mitochondriale Sequenzen, 16S rRNA und D-Loop

Mitochondriale DNA wird häufig als Zielsequenz bei der Tierartendifferenzierung verwendet. Die meisten publizierten Methoden verwenden Bereiche des *cytB* Gens und weisen die Tierarten über eine PCR-RFLP nach. Der Vorteil der mitochondrialen Sequenzen ist die geringe Homologie zu pflanzlichen Sequenzen.

Ein Sequenzvergleich der *cytB*-Sequenzen zeigte, dass die Homologie zwischen den interessierenden Tierarten nicht ausreichend war, um eine real-time PCR zu entwickeln.

Es sind auch viele *cytB*-Sequenzen aus Fischen in der Datenbank, aber bei den Fischen war die Homologie noch geringer.

Wir haben daher einen Sequenzvergleich der vollständigen mitochondrialen Genome, die in der Datenbank vorhanden waren, durchgeführt. Nach der Analyse dieses Sequenzvergleiches haben wir für den Nachweis von Tier- und Fischmehlen das 16S-rRNA Gen ausgewählt, da es größere homologe Bereiche aufweist. Es wurde ein System mit universellen Primern für Tiere, Vögel und Fische entwickelt. Damit lassen sich Tier- und Fischmehle mit einem einzigen System erfassen. Das ist vor allem bei Futtermittel für Wiederkäuer wichtig, da hier beides verboten ist.

Mit einem zweiten Primerpaar und der gleichen Sonde lassen sich Fischmehle neben Tiermehl nachweisen. Die Spezifität ist nicht vollständig, da Wassevögel Kreuzreaktivität zeigen. Eine Unterscheidung gegenüber Hühnervögel ist aber gegeben.

Es wurde weiters versucht im Bereich der D-Loop Sequenzen der Mitochondrien ein System zum spezifischen Nachweis tierischer DNA zu entwickeln. In früheren Arbeiten wurde in diesem Bereich bereits ein spezifisches System für Rinder entwickelt. Ausgehend von diesem System unter Verwendung der gleichen Sonde wurde versucht ein tierisches System zu finden.

Es war möglich ein Primerpaar zu designen, das den Erwartungen entsprach. Zusätzlich wurde noch ein spezifisches Primerpaar für Schweine getestet.

Die Entwicklung eines Fischsystems im Bereich der D-Loops wurde nicht überlegt, da in der Datenbank nicht so viele Fischsequenzen vorhanden waren.

	51				100
Oa 16SMit.msf{AF010406}	+++++++c++	+a++++t+++	++t+++++++	+++++++	++ta+++++
Bt 16SMit.msf{J01394}	+++++++c++	+a++++t+++	++t+++++++	+++++++	++ta+++++
Ee 16SMit.msf{X79547}	+++++++c++	+a++++t+++	++t+++++++	+++++++	++ta+++c++
Ss 16SMit.msf{AJ002189}	+++++++c++	+a++++t+++	++t+++++++	+++++++	++tg+++t++
Duck16SMit.msf{DUKTGRG}	++++t+++t++	+c++++c+++	++c+++++++	+++++++	++c+c+++++
St 16SMit.msf{Y12025}	++++t+++t++	+c++++c+++	++c+++++++	+++++++	++c+c+++++
Gg 16SMit.msf{X52392}	+++g+++t++	+c++++c+++	++c+++++++	+++++++	++c+c+++++
16SMit.msf{meleagris16}	++++t+++t+a	+c++++c+++	++c+++++++	+++++++	++c+c+++++
Consensus	TGATCAA-GG	A-CAAG-TAC	CC <b>I</b> AGGGATA	ACAGCGCAAT	CC-CTTCAAG
			UniMit-R1		CAG
	101				150
16SMit.msf{AF010406}	++t+++++++	+++++.t+++	+++++++	+++++++	+++++++c
16SMit.msf{J01394}	++t+++++++	+++++.t+++	+++++++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{X79547}	++t+++++++	+++++t+++	+++++++	+++++++	++++a+++++
16SMit.msf{AJ002189}	++tt+c++++	+++++.t+++	+++++++	+++++++	+++++++c
16SMit.msf{DUKTGRG}	++c++c++++	++++g+gg.+	+++++++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{Y12025}	++++c++++	+++++g+.	+++++++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{X52392}	++c+++++++	+++++g+.	+++++++	+++++++	+++++++a
16SMit.msf{meleagris16}	++c+++++++	+++++g+.	+++++++	+++++++	+++++++a
Consensus	AG-CCATATC	GACAAG-AGG	GTTTACGACC	TCGATGTTGG	ATCAGGACAT
			CC CAAATGCTGG	AGCTACAACC	TAGT <b>I</b> CT
				Mit-T	
	CAGAGCCCATATC	GACGAGG			A
	FischMit-F				
	151				200
16SMit.msf{AF010406}	++cg+++++	+++++++	c++a+++++	+++++++	+++++.+++
16SMit.msf{J01394}	+++g+++++	+++++++	c++a+++++	+++++++	+++++.+++
16SMit.msf{X79547}	+++++++	+++++++	+++++++	+++++++	+++++.+++
16SMit.msf{AJ002189}	++a+++++	++g+++++	++a+++++	+++++++	+++++.+++
16SMit.msf{DUKTGRG}	+++++++	++g+++++	+++++++	+++++++	+++++t+++
16SMit.msf{Y12025}	+++++++	++g+++++	+++++++	+++++++	+++++c+++
16SMit.msf{X52392}	+++++++	+++++++	+++++++	+++++++	+++++c+++
16SMit.msf{meleagris16}	+++~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Consensus	CCTAATGGTG	CAACCGCTAT	TAAGGGTTCG	TTTGTTC AAC	GATTAA-AGT
	TACCAC	GTTGGCGATA	GTTTC		
		UniMit-F1			
	GGATTACCTC	GTCGGCGA			
	FischMit-R				
	201				250
16SMit.msf{AF010406}	+++++++	+++++++	+++++++t++	+++++++	+++++++g
16SMit.msf{J01394}	+++++++	+++++++	+++++++t++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{X79547}	+t+++++++	+++++++	+++++++t++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{AJ002189}	+++++++	+++++++	+++++++c++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{DUKTGRG}	+++++++	+++++++	+++++++c++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{Y12025}	+++++++	+++++++	+++++++a++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{X52392}	+++++++	+++++++	+++++++c++	+++++++	+++++++
16SMit.msf{meleagris16}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Consensus	CCTACGTGAT	CTGAGTTCAG	ACCGGAG-AA	TCCAGGTCGG	TTTCTATCTA

**Abb. 26:** Multiple Sequence Alignment von mitochondrialen 16S-rRNA Sequenzen von Tieren im Bereich hoher Homologien. Universelle Primer und Sonde zum Nachweis von Tieren und Fischen sind eingezeichnet. + steht für Basen, die mit dem Consensus übereinstimmen.

## **Nachweissysteme**

Es wurden im Bereich der weiter oben angeführten Zielsequenzen Systeme mit unterschiedlicher Spezifität entwickelt. Die meisten dieser Systeme sind sowohl für eine normale PCR als auch eine real-time PCR geeignet. Es wurde besonders auf eine geringe Amplikonlänge geachtet, um auch mit stark degradierter Tiermehl-DNA noch Produkte zu erhalten. Nur für das Kontrollsystem 2 wurde ein größeres Amplikon gewählt, da alle anderen Bestandteile der Futtermittel bei der Isolation höhermolekulare DNA liefern.

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Nachweissysteme die zum Nachweis und die Unterscheidung von Tier- und Fischmehlen entwickelt wurden.

In Tabelle 8 sind alle Primer die bei der Entwicklung bzw. für die Systeme verwendet wurden mit ihrer Sequenz angeführt.

Eine nähere Beschreibung der Systeme und der Ergebnisse findet sich weiter unten.

**Tab. 7:** Übersicht über die getesteten Nachweissysteme

System	Forward Primer	Reverse Primer	TaqMan Sonde
Kontroll-1	18S_Uni-F	18S_Uni-R	18S_Uni-T
Kontroll-2	18S_Uni-F2	18S_Uni-R2	-
UniMit	UNIMit-F1	UNIMit-R1	Mit-T
D-Loop	D-loop-F3	D-loop-R3	D-loop-T
18S-Animal1	18S_animal-F1	18S_animal-R1	18S_anim-T
18S-Animal2	18S_animal-F3	18S_animal-R3	18S_animal-MGB
18S-Tier	18S-Tier-F	18S-Tier-R1	
ITS1-Fisch	ITS1_Fisch-F	ITS1_Fisch-R	ITS1_Fisch
18S-Fisch	18S_Fisch-F	18S_Fisch-R1 18S_Fisch-R2	18S_Fisch-MGB
FischMit	FischMit-F	FischMit-R	Mit-T

**Tab. 8:** Liste der Primer und Sonden

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
MitSeq-F1	CCTGGATTACTCCGGTCTGAACT	Sequenzierprimer
MitSeq-R1	AAATAAGACGAGAAGACCCTATGGA	Sequenzierprimer
UNIMit-F1	CTT TGA TAG CGG TTG CAC CAT	
UNIMiT-F2	ACT TTA ATC GTT GAA CAA ACG AAC C	
Mit-T	TCITGATCCAACATCGAGGTCGTAAACCC	
UNIMiT-R1	CCC IAG GGA TAA CAG CGC AAT C	
FischMIT-F	CAGAGCCCATATCGACGAGG	
FischMIT-R	AGCGGCTGCACCATTAGGA	
D-loop-F1	GGGTCGCTATCCAATGAATTTTAC	Rinder spezifisch
D-loop-R1	TTATTTAAGAGGAAAGAATGGACCG	Rinder spezifisch
D-loop-F2	GGGTCGCTATCCAATGAATTTGAC	Rinder spezifisch
D-loop-R2	TTATTTAAGAGGAAAGAATGGAGCG	Rinder spezifisch
D-loop-F3	GATCCCTCTTCTCGCTCCG	
D-loop-R3	TTAGCCATTAGTCCATCGAGATGTCT	
D-loop_Ss-F	TGGGGGTTTCTATTGATGAACTTTA	Schwein spezifisch
D-loop_Ss-R	GAAAGAGTGGACGGTTTTAGATGAGA	Schwein spezifisch
D-loop-T	CATCTGGTTCTTTCTTCAGGGCCATCTCAT	
18SRNA-F1	CTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGC	Sequenzierprimer
18SRNA-R1	ATG GTA GGC ACG GCG ACT AC	Sequenzierprimer
18SRNA-R2	TCCGGAATCGAACCCCTGA	Sequenzierprimer
ITS1-F1	GTG AAC CTG CGG AAG GAT CAT	Sequenzierprimer
ITS1-R1	CGA GTG ATC CAC CGC TAA GAG T	Sequenzierprimer
ITS1-F2	CCGGCGCGGAGGTTTA	Sequenzierprimer



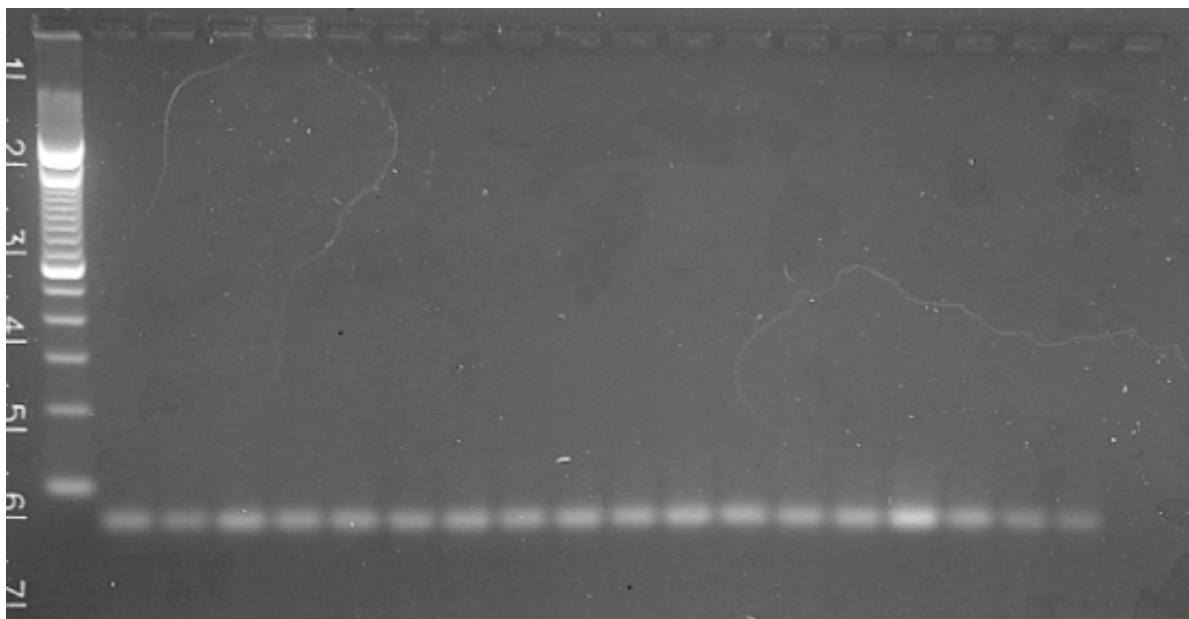
**Tab. 8:** Liste der Primer und Sonden (Fortsetzung)

ITS1-R2	TAAACCTCCGCGCCGG	Sequenzierprimer
ITS1-F3	CGGCCTGAGGCTACCCC	Sequenzierprimer
ITS1-R3	TCTTCATCGACGCACGAGC	Sequenzierprimer
ITS1-F4	GGTCCTCGGATCGGCC	Sequenzierprimer
ITS1-R5	GCCGGTGGCTGGCA	Sequenzierprimer
ITS1-R	GGGCACATCCCAGGCA	Sequenzierprimer
ITS1-R4	CGTAGCCCCGGGAGGA	Sequenzierprimer
18S_Uni-F	GTAATTTGCGCGCCTGCT	
18S_Uni-R	GTTCGATTCCGGAGAGGGA	
18S_Uni-T	CCTTCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTC	
18S_uni-R2	TGCCCTATCAACTTTTCGATGG	
18S_uni-F2	CACCAGACTTGCCCTCCAAT	
18S_animal-F1	ATTCTAGAGCTAATACATGCCGACG	
18S_animal-R1	AGTCACCAAAGCCGCCG	
18S_anim-T	CGTGCATTTATCAGACAAAACCAACCCG	
18S-animal F3	GGCGTGCGATCGGC	
18S-animal R3	TGCATTTATCAGATCAAACCAACC	
18S_animal-MGB	CACCAAAGCCGCCG	
18S-Tier-F	GGTCGCTCGCTCCTCTCC	
18S-Tier-R	GGTTTTGATCTGATAAATGCACGC	
18S-Tier-R1	GGTCAGCGCCCGTCG	
ITS1_Fisch-F	GCGGGTCGGGTAGGGTA	
ITS1_Fisch-R	GGGGAAGCGGGCTAGGA	

<b>Tab. 8:</b> Liste der Primer und Sonden (Fortsetzung)		
ITS1_Fisch	TCACGCCTCCCGCCTCTCCCT	
18S_Fisch-F	CTCATTAATCAGTTATGGTTCCTTTGA	
18S_Fisch-R1	GCATCCCCGGAGGTCA	
18S_Fisch-R2	CGT GAA GGG GGC CAG TCA	
18S_Fisch-MGB	AACTGTGGCAATTC	

## Kontrollsystem

Um die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA zu überprüfen und mögliche Inhibition der PCR auszuschließen wurde im hoch konservierten Bereich der 18S rRNA ein Amplifikationskontrollsystem entwickelt. Mit diesem System lassen sich alle Eukarionten, also alle Tiere, Vögel, Fische und Pflanzen erfassen.



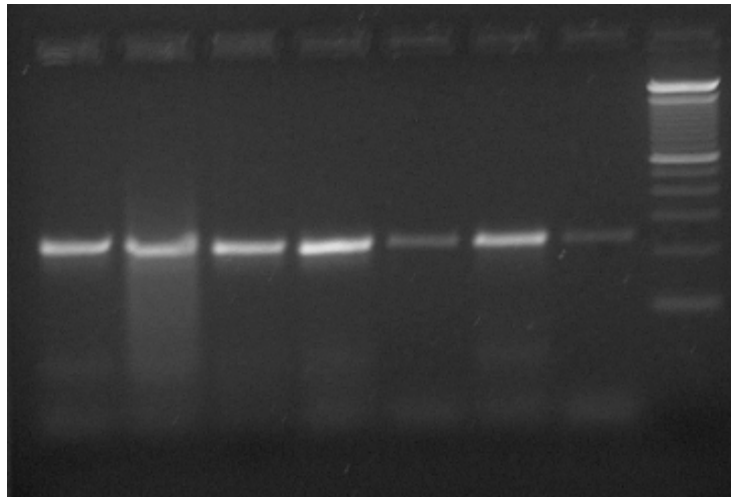
**Abb. 27:** Agarosegel von PCR Produkten mit den Primern 18S-Uni-F/R, 30 Zyklen. Spur 2 – 19 verschiedene Mischfutter, Tier- und Fischmehle, Spur 20 negative Kontrolle.

Es wird mit dem Primersystem 18S-UniF2/R2 ein Amplikon von 260 bp gebildet. Innerhalb dieses Systems liegt ein real-time PCR System, 18S-UniF/R mit der Sonde 18S-UniT, welches ein Fragment von 70 bp liefert und daher sehr effizient ist. Die Primer des real-time PCR Systems können natürlich auch in einer normalen PCR eingesetzt werden. Es ist bei der Optimierung aber darauf zu achten, dass es nicht

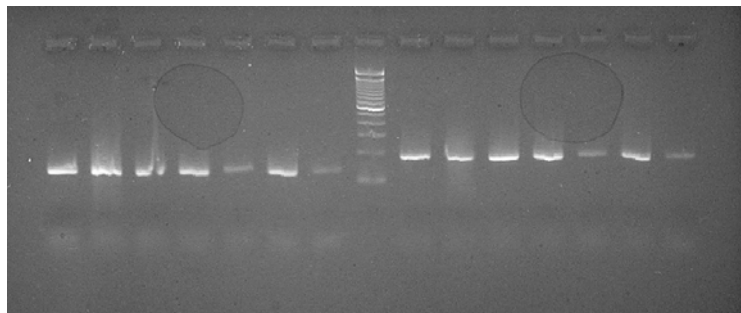
zu eine Bildung von Primerdimeren kommt, da diese sich in der Gelelektrophorese unter Umständen nicht vom eigentlichen Produkt unterscheiden lassen.

Die Primer der beiden Systeme lassen sich miteinander kombinieren und liefern dann Fragmente in der Größe von 137 bp (18S-UniF/R2) bzw. 193 bp (18S-UniF2/R).

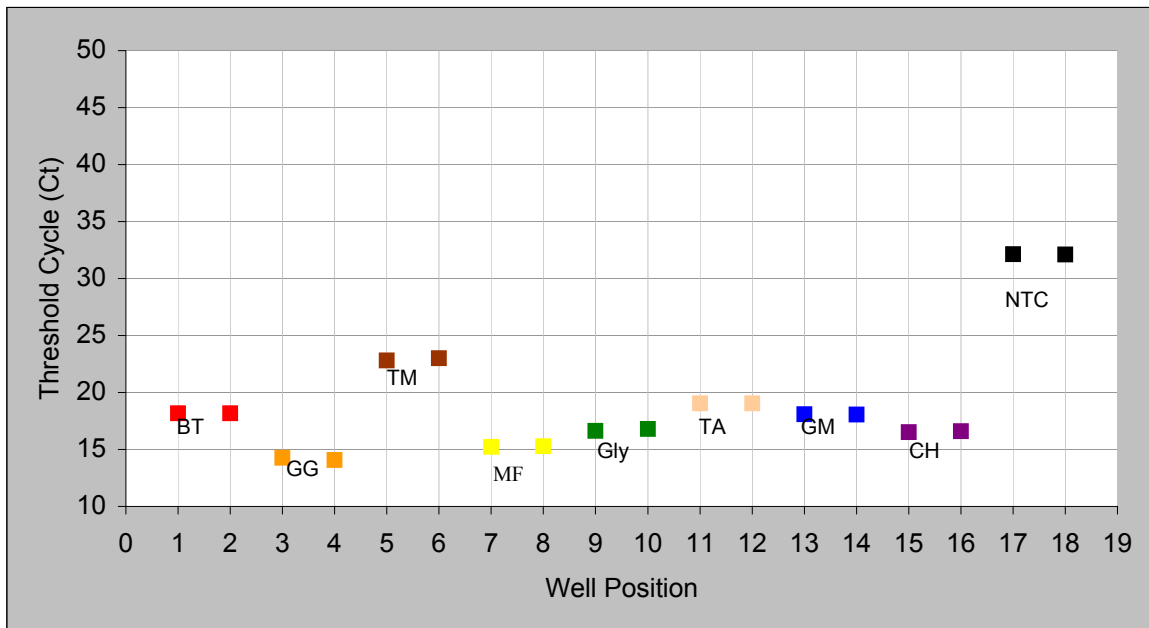
PCR Bedingungen: 5 min. 95°C, 30 Zyklen: 30 sek. 95°C, 30 sek. 60°C, 30 sek. 72°C, 7 min. 72°C, 4°C unendlich



**Abb. 28:** Agarosegel von PCR Produkten mit den Primern 18S-Uni-F2/R2, 35 Zyklen, 10 ng Template DNA. Spur 1 : Rind; Spur 2 : Huhn; Spur 3 : Mais ; Spur 4 : Soja ; Spur 5 : Hering ; Spur 6 : Kabeljau ; Spur 7 : Leerkontrolle ; Spur 8 : 250 ng 100 bp Leiter



**Abb. 29:** Agarosegel von PCR Produkten mit den Primern 18S-Uni-F/R2 und 18S-Uni-F2/R, 35 Zyklen. Spur 1 bis 7: PCR mit dem Primerpaar 18S Uni F und R2; Spur 1: Rind; Spur 2: Huhn; Spur 3: Mais; Spur 4: Soja; Spur 5: Hering; Spur 6: Kabeljau; Spur 7: Leerkontrolle Spur 8: 250 ng 100 bp Leiter. Spur 9 bis 15: PCR mit dem Primerpaar 18S Uni F2 und R; Spur 1: Rind; Spur 2: Huhn; Spur 3: Mais; Spur 4: Soja; Spur 5: Hering; Spur 6: Kabeljau; Spur 7: Leerkontrolle.



**Abb. 30:** Universeller Nachweis tierischer und pflanzlicher DNA mittels Real-time PCR  
 Bei einer  $MgCl_2$ -Konzentration von 5,5 mM wurden unter Verwendung des in Tabelle 1 angegebenen Real-time Systems 18S\_Uni ([Primer] = 300 nM, [Sonde] = 100 nM) folgende DNA's amplifiziert: BT = Rind, GG = Huhn, TM = Tiermehl, MF = Mischfutter, TA = Weizen, Gly = Soya, GM = Kabeljau, CH = Hering, NTC = Leerwert. Pro Ansatz (25  $\mu$ L) wurden 25 ng DNA und 0,625 Units der AmpliTaq Gold® Polymerase eingesetzt.

## Tier- und Fischmehle

Zur gemeinsamen Erfassung von DNA aus Tier- und Fischmehlen eignet sich das mitochondriale System UniMit F1/R1 mit der Sonde Mit-T. Dieses System amplifiziert einen hoch konservierten Bereich der 16S-rRNA.

DNA aus Tieren, Vögeln und Fischen wird mit gleicher Effizienz amplifiziert. DNA aus Pflanzen wird nur mit sehr geringer Effizienz amplifiziert.

Das System eignet sich zur Überprüfung von Wiederkäuerfutter, in dem weder Tier- noch Fischmehle enthalten sein dürfen.

## Tiermehl

Zum spezifischen Nachweis von Tiermehl wurden drei Systeme getestet. Das eine im Bereich des D-Loops in der mitochondrialen DNA, die beiden anderen im variablen Bereich der 18S-rRNA.

Im D-Loop waren bereits spezifische Primer und eine Sonde für den Nachweis von Rind vorhanden (D-loop-F1/R1; D-loop-F2/R2; D-loop-T). Es wurden neue Primer gesucht, die auch eine Amplifikation anderer Tiere erlauben. Da die Effizienz in der real-time PCR nicht sehr gut war, wurden die Produkte auch auf ein Gel aufgetragen, wobei keine Produkte mit falscher Länge beobachtet werden konnten.

Tabelle 9 zeigt die Spezifität der verschiedenen D-loop Systeme und Tabelle 11 die Ergebnisse mit unterschiedlichen Tier- und Fischmehlen.

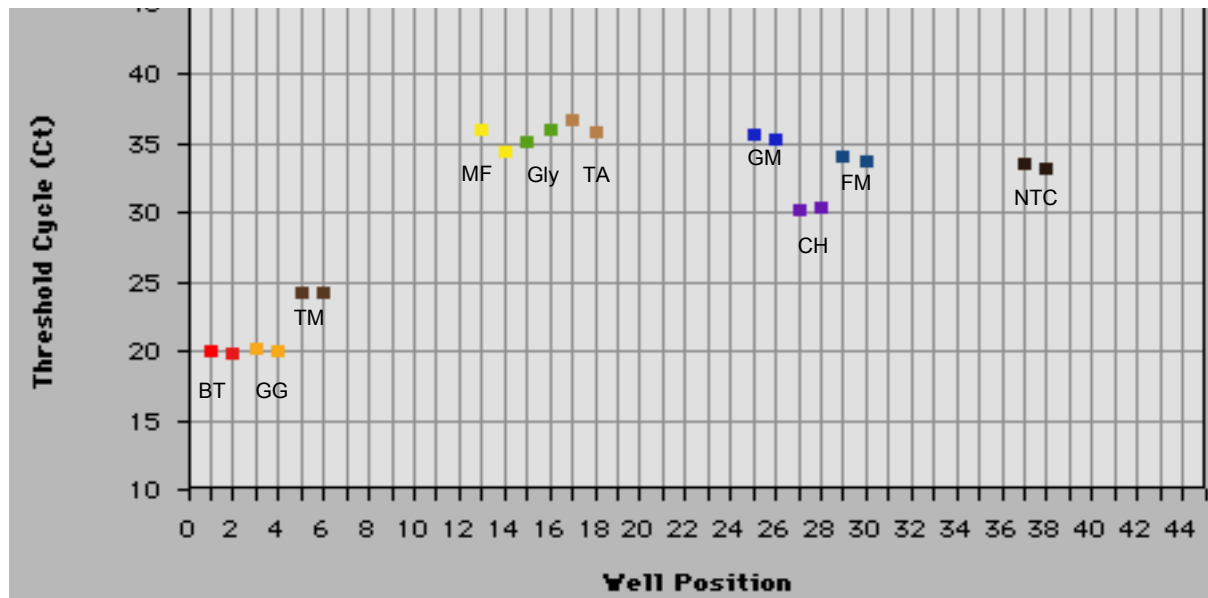
**Tab. 9:** Direkter Vergleich der Spezifität der drei D-loop Systeme

Template	Ct-Wert F1R1	Ct-Wert F2R2	Ct-Wert F3R3
Rind	<b>15.43</b>	<b>16.21</b>	<b>16.18</b>
Schwein	<b>27.72</b>	<b>28.72</b>	<b>16.97</b>
Huhn	<b>32.44</b>	<b>33.51</b>	<b>30.91</b>
Schaf	<b>31.70</b>	<b>32.51</b>	<b>18.79</b>
Hering	<b>29.68</b>	<b>28.29</b>	<b>29.10</b>
Kabeljau	<b>28.10</b>	<b>29.77</b>	<b>27.62</b>
Weizen	<b>40.75</b>	<b>37.13</b>	<b>34.98</b>
Tiermehl TM	<b>24.30</b>	<b>27.15</b>	<b>27.78</b>

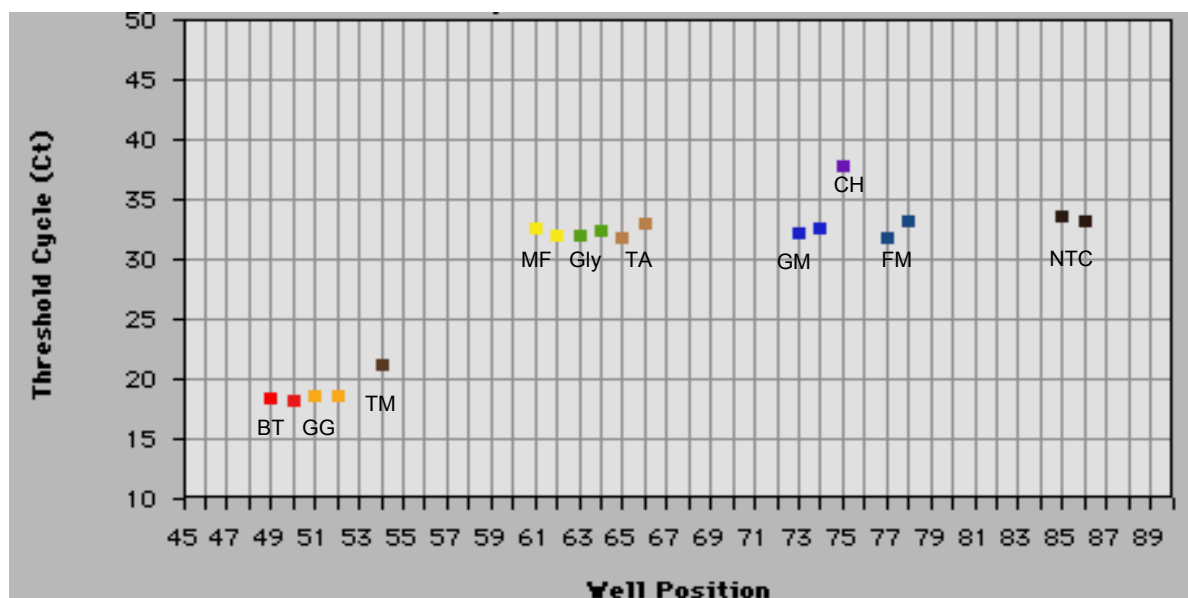
**Tab. 10:** Ct-Werte der unterschiedlichen Tier- und Fischmehle mit dem D-loop-System F3/R3

Template	Numme	Bezeichnung	Ct-Wert
F1A	FK 5278	Fischmehl	45.00
F2A	FK 5425	Fischmehl	45.00
F3A	FK 5707	Fischmehl	45.00
F4A	FK 5704	Fischmehl	45.00
F5A	FK 5324	Verunreinigtes Fischmehl	19.10
I	FK 4584	Tiermehl fettreich	25.71
II	FK 4585	Blutmehl	22.41
III	FK 4678	Tiermehl 55 % Rohpr.	25.10
IV	FK 5017	Mischfutter, < 5% Knochen, Fischknochen	31.17
V		Fleischmehl	20.60
VI		Mischfutter, 0.5% Knochen, Muskeln	32.68
VII	FK 4673	Fleischknochenmehl	20.27
VIII	FK 5006	<< 0.5% Knochen, Fischknochen, Muskeln	29.34
IX	FK 5084	50% Fischknochen + Muskeln	29.67

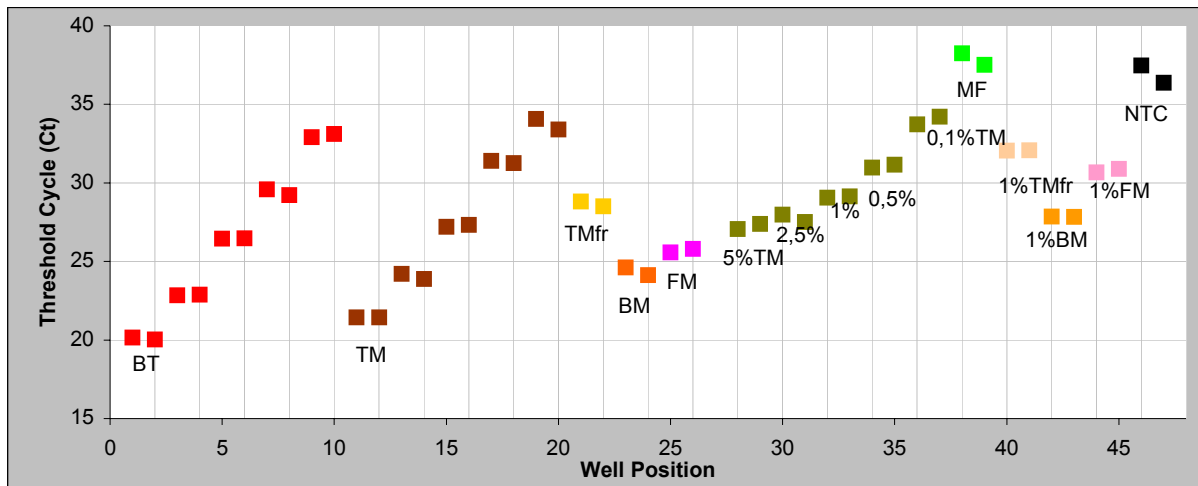
Im Bereich der 18S-rRNA wurden zwei real-time PCR Systeme entwickelt, die sich vor allem in der Effizienz in der real-time PCR unterscheiden, und ein drittes PCR System, welches auch im Ringversuch getestet wurde.



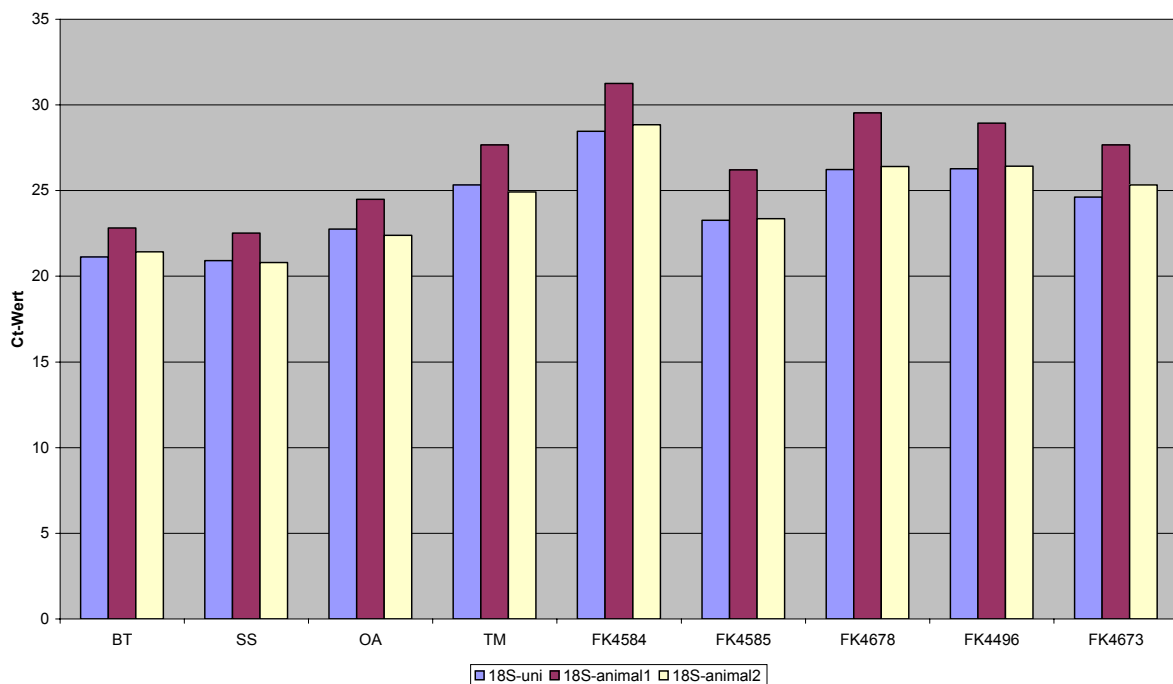
**Abb.31:** Spezifischer Nachweis von Säugetier- und Vogel-DNA bei Verwendung des real - time Assays 18S\_animal1. BT = Rind, GG = Huhn, TM = Tiermehl, MF = Mischfutter, TA = Weizen, Gly = Soya, GM = Kabeljau, CH = Hering, FM = Fischmehl, NTC = Leerwert.



**Abb. 32:** Spezifischer Nachweis von Säugetier- und Vogel-DNA bei Verwendung des real- time Assays 18S\_animal2. BT = Rind, GG = Huhn, TM = Tiermehl, MF = Mischfutter, TA = Weizen, Gly = Soya, GM = Kabeljau, CH = Hering, FM = Fischmehl, NTC = Leerwert.



**Abb. 33:** Standardkurven mit verschiedenen DNA Verdünnungsreihen mit dem real-time Assay 18S-animal1. BT = 25 ng – 2,5pg Rind, TM = 250 ng – 25 pg Tiermehl, TMfr = 25 ng Tiermehl fettreich, BM = 25 ng Blutmehl, FM = 25 ng Fleischmehl, x% = % Anteil des jeweiligen Tiermehls in 25 ng Mischfutter, MF = 25 ng Mischfutter, NTC = Leerwert.



**Abb. 34:** Vergleich der Effizienz der beiden tierspezifischen real time PCR Systeme mit dem 18S-uni System für verschieden Tierarten (BT = Rind, SS = Schwein, OA = Schaf) und mehreren Tiermehlen. Das 18S-animal1 System zeigt gleiche Effizienz wie das 18S-uni System, das 18S-animal2 System hingegen eine geringere Effizienz.

Die beiden Systeme 18S-animal1 und 18S-animal2 zeigen gleiche Spezifität für Säugetiere und Huhn und erlauben die Diskriminierung von Pflanzen und Fischen (Abb. 31 und 32). Die Effizienz des Systems 18S-animal1 ist schlechter, wie des Systems 18S-animal2.

Abbildung 34 zeigt einen Vergleich der beiden tierspezifischen Systeme mit dem univesellen System. Daraus ist ersichtlich, dass die Effizienz des 18S-animal2 Systems gleich der des 18S-uni Systems ist.

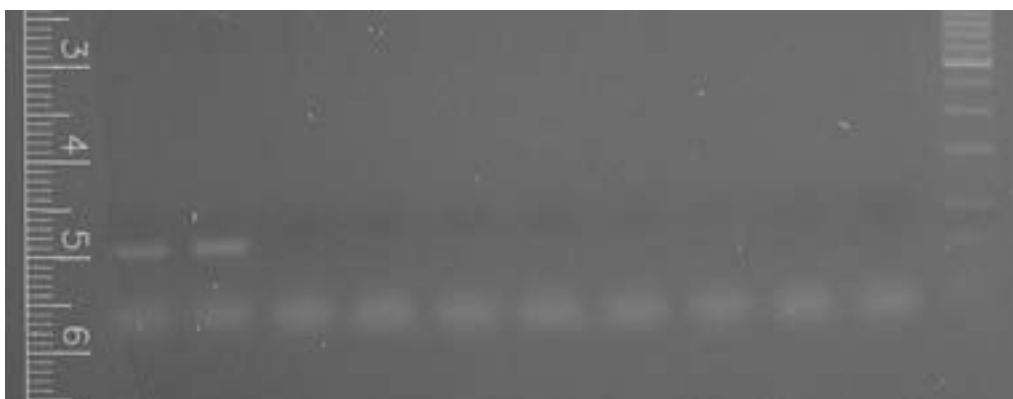
Da die beiden real-time PCR-Systeme in der normalen PCR mit verschiedenen Tieren unterschiedliche Fragmentlängen ergeben, wurden neue Primer gesucht, die eine tierspezifische PCR mit gleicher Fragmentlänge erlaubt.

Es wurde das Primerpaar 18S-TierF/18S-TierR1 ausgewählt. Dieses Primerpaar zeigt eine hohe Spezifität und gute Effizienz.

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen die Spezifität dieses Systems.



**Abb. 35:** Agarosegel von PCR Produkten mit den Primern 18S-TierF/R1, 1 ng Template DNA, 35 Zyklen. Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: Rind; Spur 3: Schaf; Spur 4: Schwein; Spur 5: Huhn; Spur 6: Kabeljau; Spur 7: Hering; Spur 8: Raps; Spur 9: Mais; Spur 10: Weizen; Spur 11: Luzerne; Spur 12: Sonnenblume; Spur 13: Soja; Spur 14: Erbse; Spur 15: Tiermehl, weißer Sack; Spur 16: Tiermehl, weißer Sack; Spur 17: Tiermehl, brauner Sack; Spur 18: Tiermehl, brauner Sack; Spur 19: leer; Spur 20: Leerkontrolle.



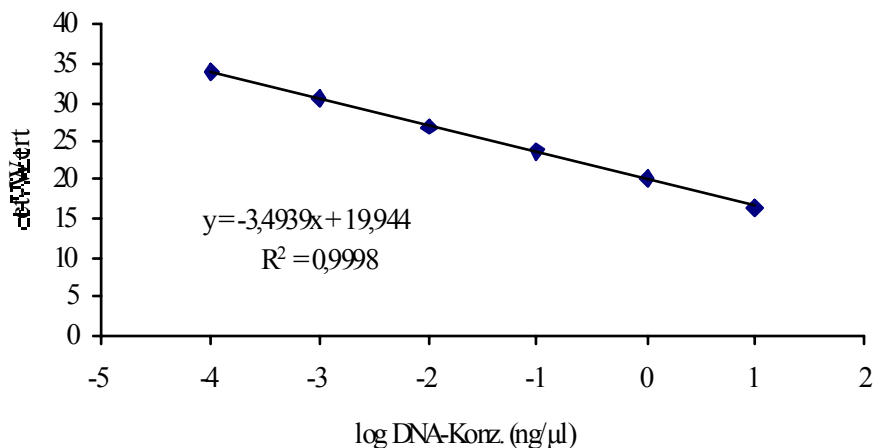
**Abb. 36:** Agarosegel von PCR Produkten mit den Primern 18S-TierF/R1, 1 ng DNA, 35 Zyklen. Spur 1: Rind; Spur 2: Schwein; Spur 3: Sonnenblume; Spur 4: Weizen; Spur 5: Gerste; Spur 6: Soja; Spur 7: Raps; Spur 8: Soja; Spur 9: Mais; Spur 10: Leerkontrolle; Spur 11: 100 bp Leiter.



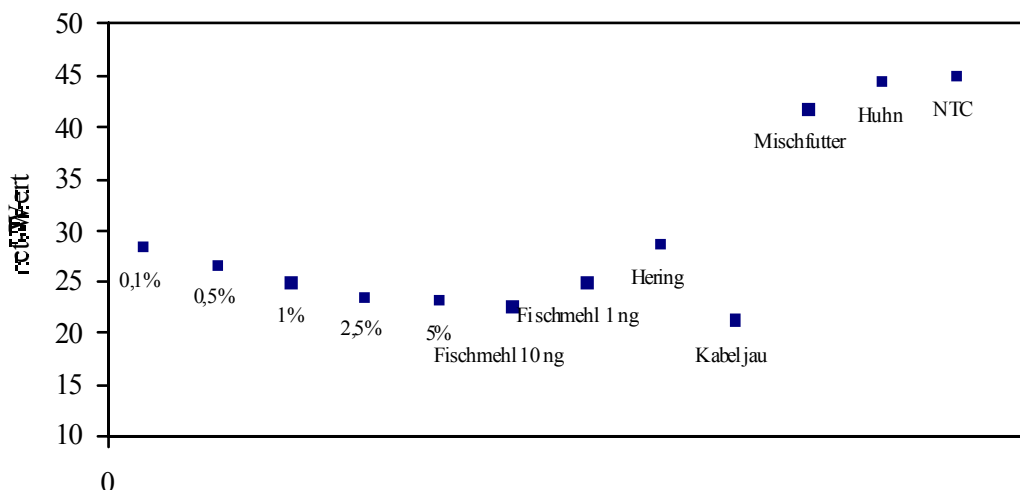
## Fischmehl

Für den Nachweis von Fischmehlen wurden ebenfalls zwei Systeme entwickelt, eines mit fischspezifischen Primern und der UniMit-T Sonde in der 16S-rRNA der Mitochondrien und das zweite wieder im Bereich der 18S-rRNA.

Das 18S-System zeigt höhere Spezifität wie das mitochondriale System, welches Kreuzreaktivität mit Wasservögeln zeigt.

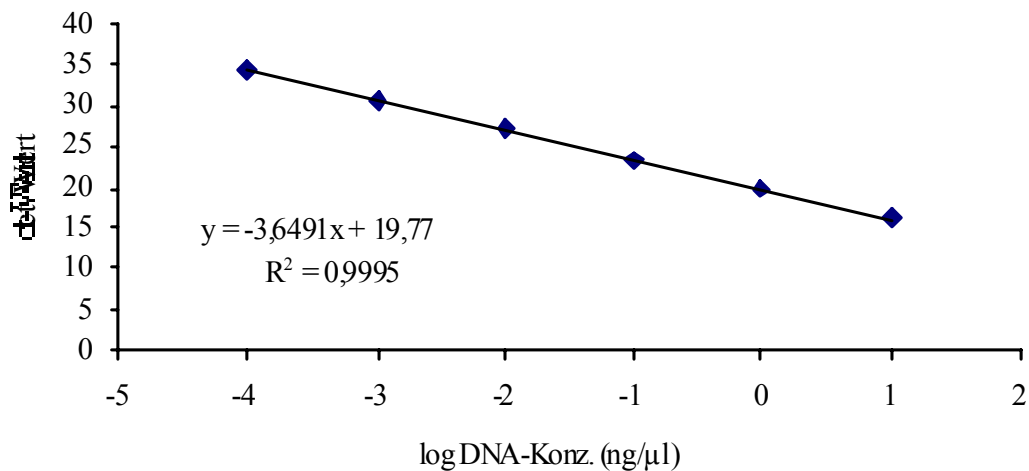


**Abb. 37:** Standardkurve von Kabeljau-DNA, erstellt mittels Real-time PCR im mitochondrialen System. Das System zeigt einen linearen Bereich von 0,1 pg bis 10 ng eingesetzter DNA.

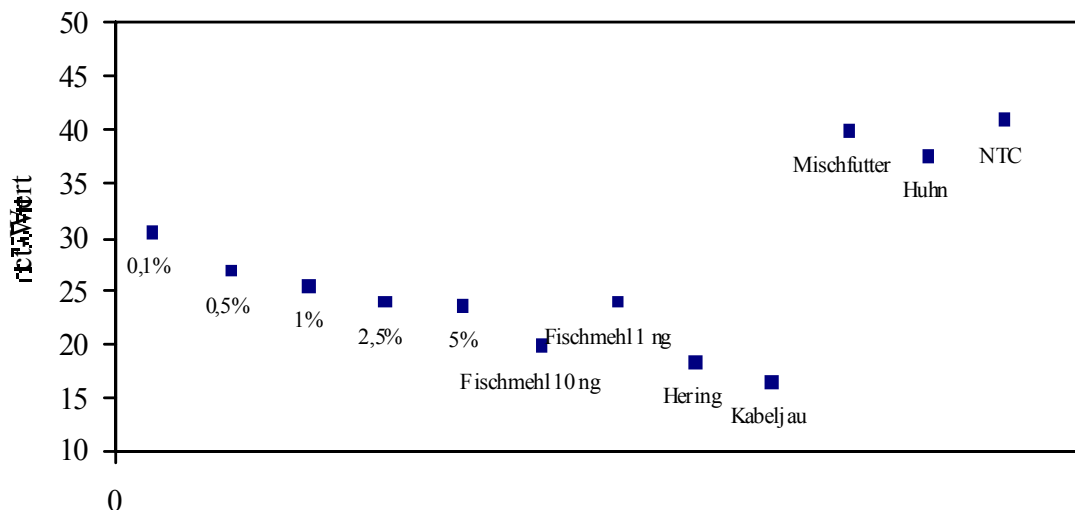


**Abb. 38:** Ct-Werte verschiedener Proben mit dem fischspezifischen mitochondrialen System: 0,1 bis 5 % Fischmehl im Mischfutter mit 10 ng/µl DNA-Ausgangskonzentration, Fischmehl mit 10 und 1 ng/µl, Hering, Kabeljau, Mischfutter und Huhn mit 10 ng/µl DNA-Konzentration und No Template Control (NTC)

Um alle Fische zu erfassen wurde beim 18S-Fischsystem zuerst mit zwei Reverse Primern gearbeitet. Dadurch werden alle Referenz-Fisch DNAs gleich erfasst. Ein Fischmehl zeigt jedoch mit dem 18S-Fischsystem höhere Ct-Werte wie das FischMit-System.



**Abb. 39:** Standardkurve von Kabeljau-DNA, erstellt mittels Real-time PCR im 18S rRNA System. Das System zeigt einen linearen Bereich von 0,1 pg bis 10 ng eingesetzter DNA.



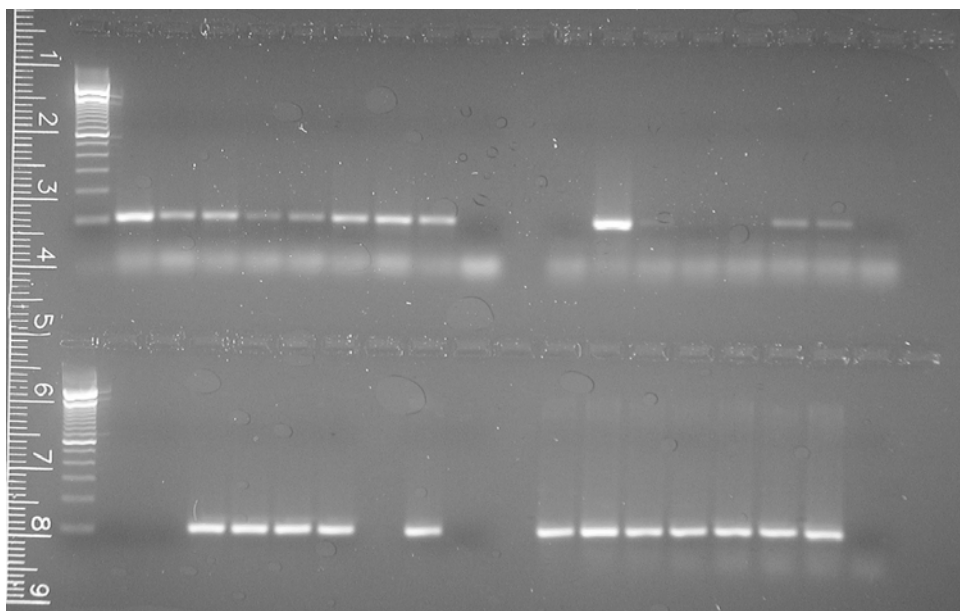
**Abb. 40:** Ct-Werte verschiedener Proben mit dem fischspezifischen 18S rRNA System: 0,1 bis 5 % Fischmehl im Mischfutter mit 10 ng/μl DNA-Ausgangskonzentration, Fischmehl mit 10 und 1 ng/μl, Hering, Kabeljau, Mischfutter und Huhn mit 10 ng/μl DNA-Konzentration und No Template Control (NTC)

Es wurde ein Hauptbestandteil dieses Fischmehls mit dem 18S-Fischsystem nicht vollständig erfasst. Daher wurde der Bereich der 18S rRNA dieser Fischmehl DNA mittels PCR amplifiziert und in einen Vektor kloniert. Mehrere der erhaltenen Klone wurden sequenziert und lieferten alle die gleiche Sequenz.

Diese Sequenz unterschied sich von allen in der Datenbank befindlichen Fischsequenzen. Die größte Homologie zeigte sich zur Heringssequenz.

Es wurde daher ein dritter Reverse Primer, 18S-FischR3, entworfen, mit dem jetzt auch diese Fischmehlbestandteile erfasst werden können.

Mit dem neuen Primer 18S-FischR3 wurden alle vorhandenen Fischmehle untersucht. Es wurde ein Vergleich zwischen den Primerkombinationen 18S-FischF/R3, 18S-FischF/R1+2 und 18S-FischF/R1+2+3 angestellt.



**Abb. 41:** Agarosegel von PCR Produkten mit verschiedenen Primerkombinationen des 18S-Fisch Systems, 1ng DNA, 35 Zyklen.

Reihe 1: Primerpaar 18S-Fisch-F/R1: Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: Kabeljau; Spur 3: Hering; Spur 4: Fischmehl FK 5278; Spur 5: Fischmehl FK 5425; Spur 6: Fischmehl FK 5707; Spur 7: Fischmehl FK 5707; Spur 8: Fischmehl FK5704; Spur 9: Fischmehl; Spur 10: Leerkontrolle; Primerpaar 18S-Fisch-F/R2: Spur 12: Kabeljau; Spur 13: Hering; Spur 14: Fischmehl FK 5278; Spur 15: Fischmehl FK 5425; Spur 16: Fischmehl FK 5707; Spur 17: Fischmehl FK5704; Spur 18: Fischmehl; Spur 19: Leerkontrolle.

Reihe 2: Primerpaar 18S-Fisch-F/R3: Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: Kabeljau; Spur 3: Hering; Spur 4: Fischmehl FK 5278; Spur 5: Fischmehl FK 5425; Spur 6: Fischmehl FK 5707; Spur 7: Fischmehl FK5704; Spur 8: leer; Spur 9: Fischmehl; Spur 10: Leerkontrolle; Primerpaar 18S-Fisch-F/R1+R2+R3: Spur 12: Kabeljau; Spur 13: Hering; Spur 14: Fischmehl FK 5278; Spur 15: Fischmehl FK 5425; Spur 16: Fischmehl FK 5707; Spur 17: Fischmehl FK5704; Spur 18: Fischmehl; Spur 19: Leerkontrolle.

Abbildung 41 zeigt ein Agarosegel mit Produkten von PCRs mit den verschiedenen Primerkombinationen. Nur die Kombination 18S-FischF/R1+2+3 liefert mit allen Fischen und Tiermehlen eine Bande.

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der real-time PCR mit DNAs aus verschiedenen Fischmehlen, Fischen, Tieren und Mischfutter. Der neue Reverse Primer bringt bei den Fischmehlen eine Verbesserung um 5 – 10 Ct-Werte. Hering zeigt eine schwache Reaktion und Kabeljau, Tiere und Mischfutter sind negativ.

**Tab. 11:** Ct-Werte des real-time Fischassays mit verschiedenen Primerkombinationen.

DNA	ng/µl	18S-FischF/R3	18S-FischF/R1+2	18S-FischF/R1+2+3
Fischmehl1	1	19,41	27,26	19,68
Fischmehl2	1	19,11	29,73	19,52
Fischmehl5	1	33,01	25,46	24,90
Fm1	1	19,65	24,96	19,99
Hering	10	30,4	15,92	16,83
Kabeljau	10	34,7	14,44	14,18
Mischfutter	10	36,89	41,09	34,86
Huhn	10	34,89	32,07	34,38
Rind	10	45	39,3	34,36
NTC		40,82	45	35,96

### **Klonierung von Referenzplasmiden**

Es wurden die Zielsequenzen der einzelnen Systeme in den Vektor pCRII-TOPO kloniert, um Referenzstandard DNAs zu bekommen.

Diese Plasmide können zur Erstellung von Standardkurven und zur Überprüfung von neuen Chargen von Primern und Sonden verwendet werden

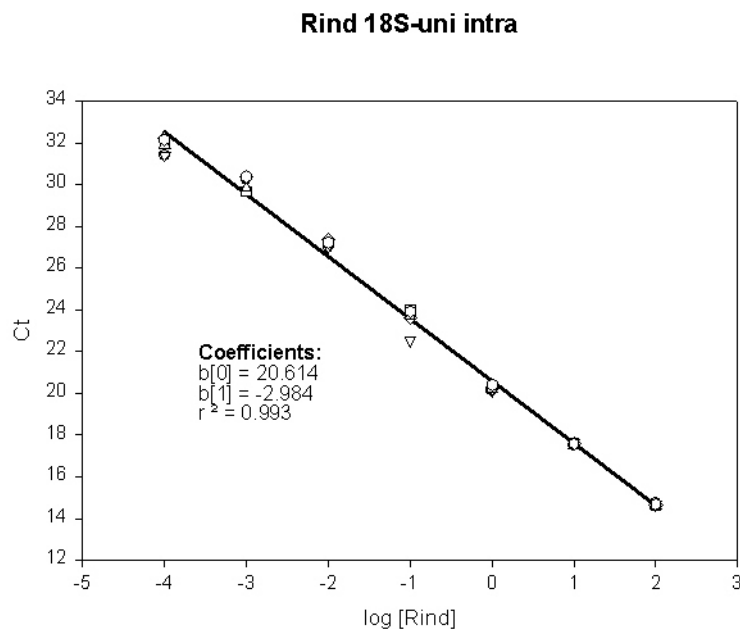
**Tab. 12:** Tabelle klonierter Fragmente.

Bezeichnung	Species	Fragmentlänge	Nachweissystem mittels Real-Time PCR		
			<i>F-Primer</i>	<i>R-Primer</i>	<i>Sonde</i>
Bt-Mit	Bt	360 bp	uniMit-F1	uniMit-R1	Mit-T
Bt-18S-RNA	Bt	350 bp	18S-animal-F1	18S-animal-R1	18S-ani-T1
Bt-D-loop	Bt	150 bp	D-loop-F3	D-loop-R3	D-loop-T
Ss-D-loop	Ss	150 bp	D-loop-F3	D-loop-R3	D-loop-T
FM2-18S-RNA	Fischmehl 2	350 bp	18S-Fisch-F	18S-Fisch-R1/R2	18S-Fisch-MGB
Bt-18SUni	Bt	262 bp	18SUniF	18SUniR	18SUniT

## Validierung

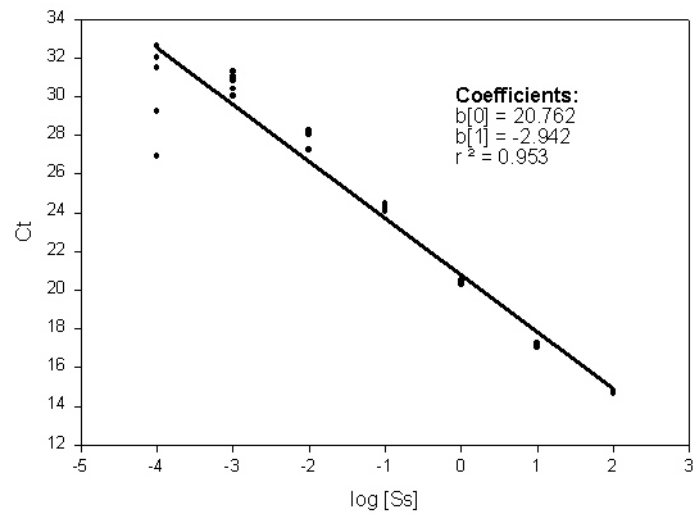
### Inter- und Intra-Assays für das 18-S-uni System mit Rind, Schwein, Kabeljau und Sardine

Um die Reproduzierbarkeit des 18-S-uni Systems innerhalb einer Platte und zwischen verschiedenen Platten zu überprüfen wurde auf der einen Seite für den Intra-Assay die gleiche Probe jeweils 6 mal aufgetragen, wobei für jede eingesetzte DNA eine Verdünnungsreihe von 100 ng/μl bis 0.1 pg/μl gemessen wurde (siehe Abb. 42 - 45), andererseits wurden für einen Inter-Assay die gleichen Messungen auf drei verschiedenen Platten durchgeführt (allerdings nur Parallelproben) (siehe Abb. 46 - 49).



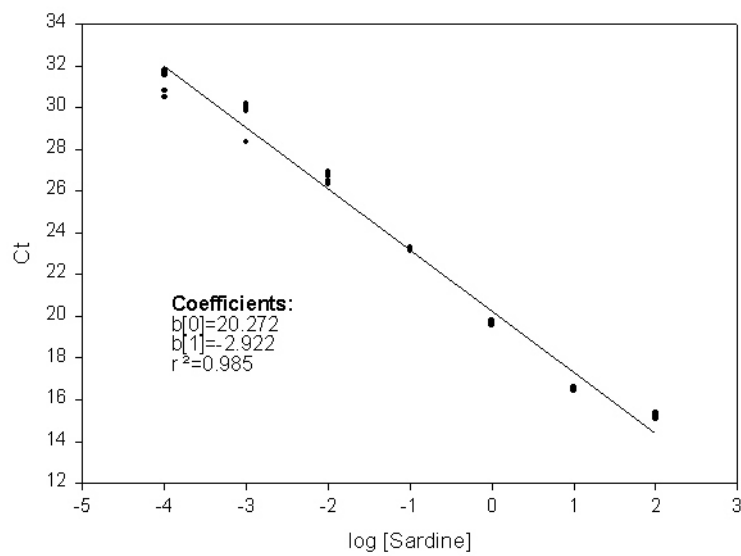
**Abb. 42:** Ergebnisse des Intra-Assays mit Rinder-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni

### Schwein 18-S uni intra



**Abb. 43:** Ergebnisse des Intra-Assays mit Schweine-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni

### Sardine 18S-uni intra



**Abb. 44:** Ergebnisse des Intra-Assays mit Sardinen-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni

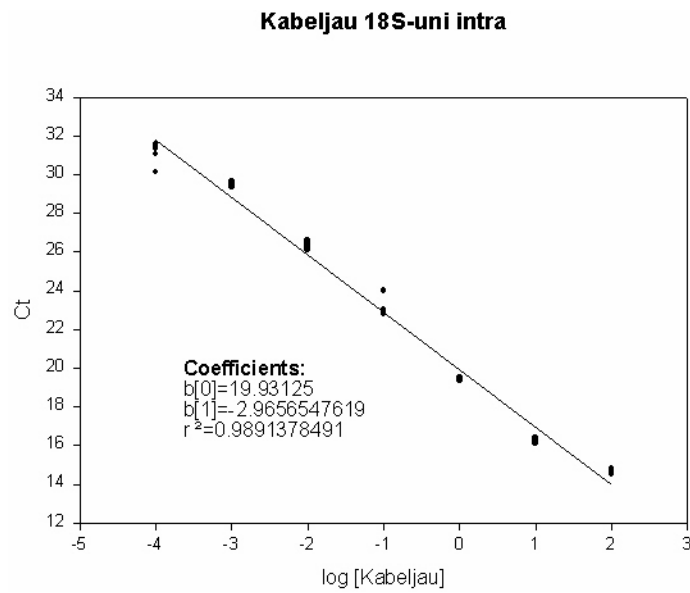


Abb. 45: Ergebnisse des Intra-Assays mit Kabeljau-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni

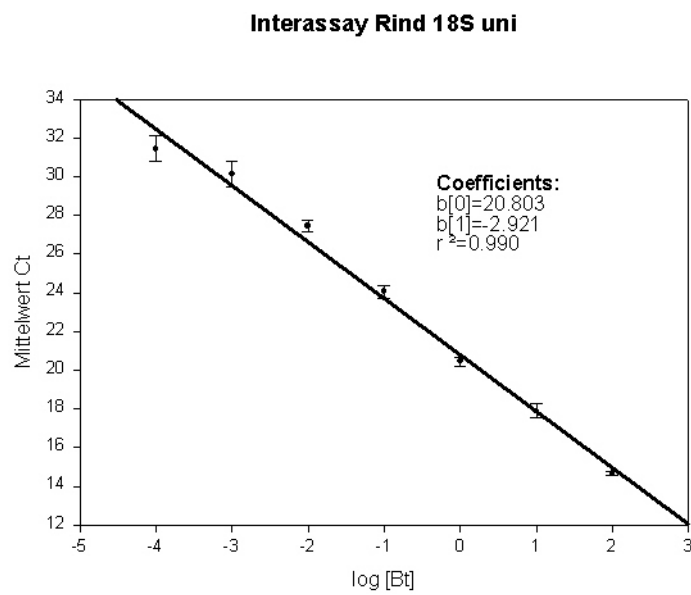
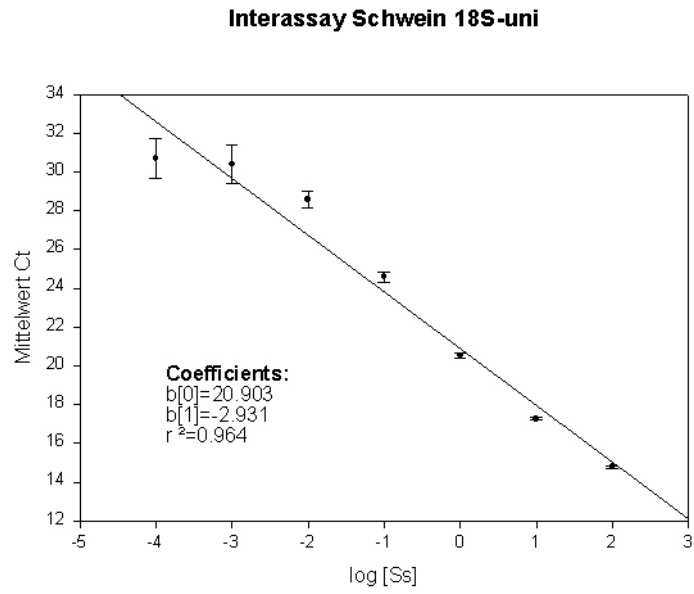
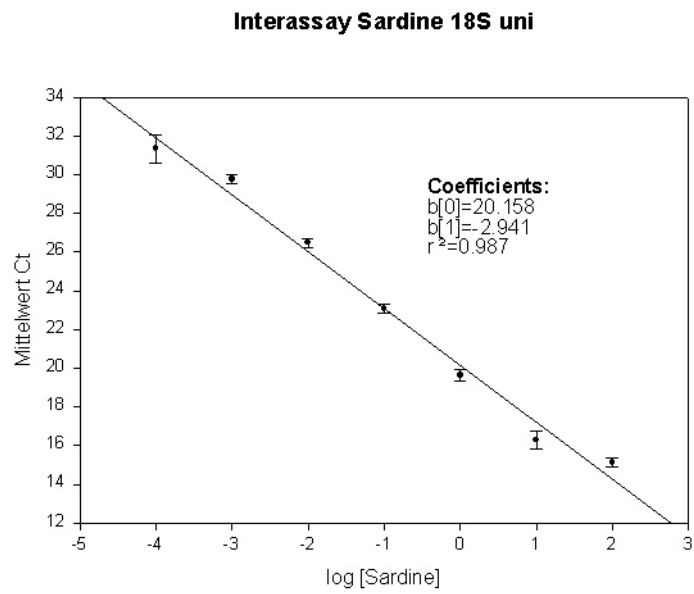


Abb. 46: Ergebnisse des Interassays mit Rinder-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni

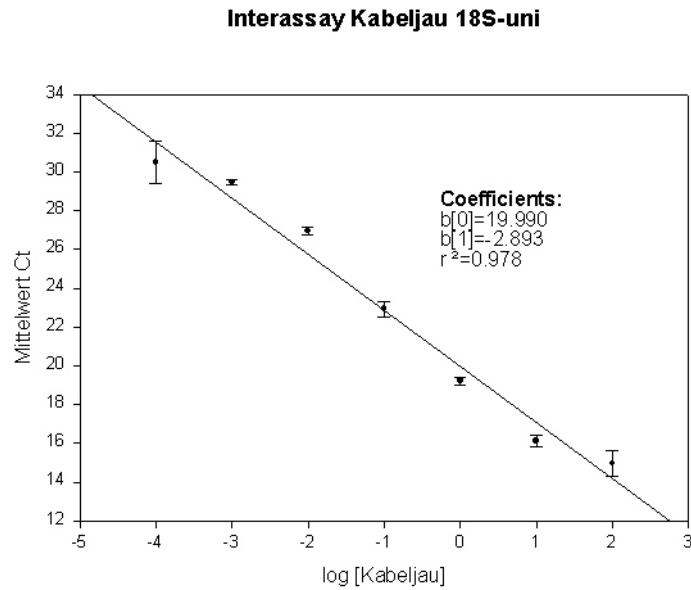


**Abb. 47:** Ergebnisse des Interassays mit Schweine-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni



**Abb. 48:** Ergebnisse des Interassays mit Sardinen-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni





**Abb. 49:** Ergebnisse des Interassays mit Kabeljau-DNA (100 ng bis 0.1 pg) mit 18-S-uni

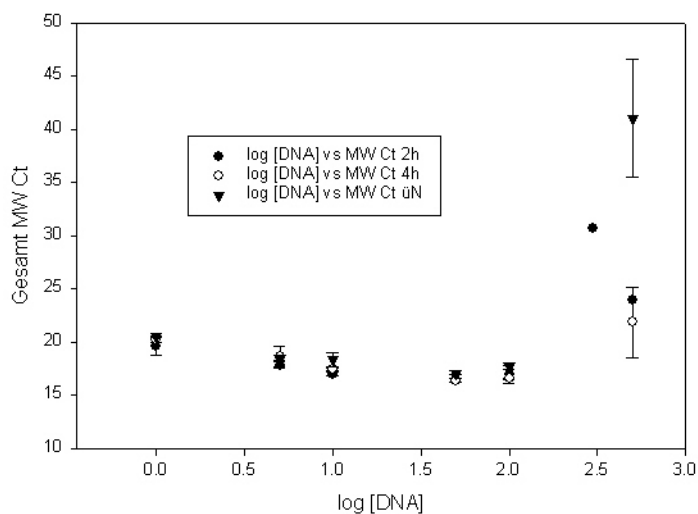
Die Auswertung ergibt in allen drei Fällen (Rind, Sardine, Kabeljau) einen akzeptablen Regressionskoeffizienten von ca. 0.99, nur bei der Schweine-DNA in hoher Verdünnung zeigt sich eine starke Streuung in den Ct-Werten und deshalb erhält man unter Einbeziehung dieser Werte in die lineare Regressionsgerade nur einen Regressionskoeffizienten von 0.95.

Wie aus den Abb. 46 - 49 ersichtlich, sind auch die Ergebnisse von verschiedenen Platten sehr gut miteinander vergleichbar, man erhält wieder mit Ausnahme der Schweine-DNA im niedrigen Konzentrationsbereich sehr gute Korrelationskoeffizienten.

### Untersuchungen zur Inhibition der PCR

Um festzustellen, in welchem Konzentrationsbereich die DNA eingesetzt werden kann, ohne dass Inhibition auftritt, wurden die Systeme 18-S-uni und 18-S-animal2 mit verschiedenen konzentrierten Templates untersucht.

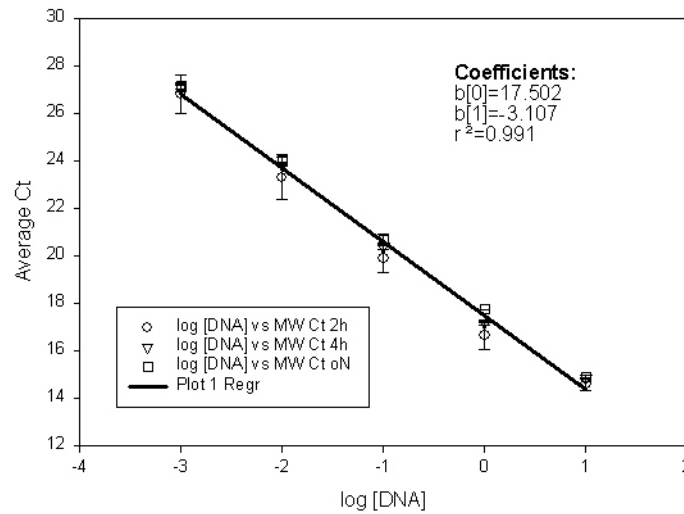
Gesamtmittelwerte 1% TM (Inkubationszeit 2h, 4h und über Nacht)  
1-500 ng DNA, 18S-uni



**Abb. 50:** Gemittelte Ct-Werte der Real-Time PCR (18S-uni) von 1% Tiermehl-Mischungen (Wizard, Inkubation: 2h, 4h, über Nacht) im Konzentrationsbereich von 500 ng bis 1 ng.

Mit dem 18-S-uni System wurden mit verschiedenen Tiermehl-DNA-Isolaten (Extraktion mit Wizard, Variation der Inkubationszeit von 2 h, 4 h und über Nacht) Ct-Werte ohne Inhibition unter 30 erzielt, die klar von den NTCs unterschieden werden konnten (Abb. 50). Die Inkubationszeit zeigt kaum einen Einfluss auf den Ct-Wert. Vor allem im Bereich > 100 ng eingesetzte DNA bewirkt eine starke Inhibition, eine Menge von 50 ng zeigt nur noch eine leichte Inhibition. In einem nachfolgenden Versuch wurden DNA-Mengen zwischen 10 ng und 1 pg eingesetzt, wobei eine sehr hohe Linearität der Messergebnisse erreicht wurde (Abb. 51).

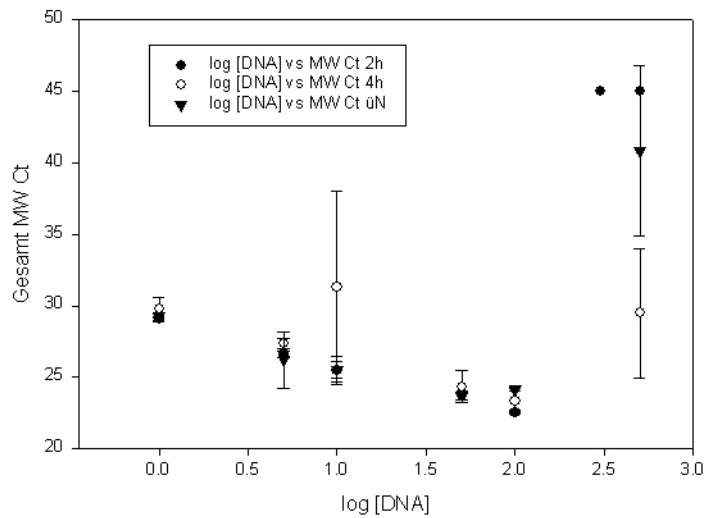
**1 % Tiermehl (Wizard) 18-S uni  
10 ng/µl bis 1 pg/µl  
Mittelwerte über die Parallelansätze**



**Abb. 51:** Gemittelte Ct-Werte der Real-Time PCR (18S-uni) von 1%Tiermehl-Mischungen (Wizard, Inkubation: 2h, 4h, über Nacht) im Konzentrationsbereich von 10 ng bis 1 pg.

Auch mit dem 18-S-animal2 System wurden dieselben 1%-Tiermehlmischungen im Konzentrationsbereich von 500 ng bis 1 ng/mL mittels Real-time PCR analysiert. Hier wurden allerdings bei niedrigen Konzentrationen sehr hohe Ct-Werte erzielt, die teilweise im Bereich der NTC-Werte liegen. Zum Unterschied zum 18-S-uni System ist hier die Inhibition bei 100 ng sehr schwach (Abb. 52), zwischen den einzelnen Inkubationszeiten sieht man auch hier kaum einen Unterschied im Ct-Wert.

Gesamtnittelwerte 1%TM mit Wizard isoliert (Inkubation 2,4h,üN)  
1-500 ng DNA, 18S-ani

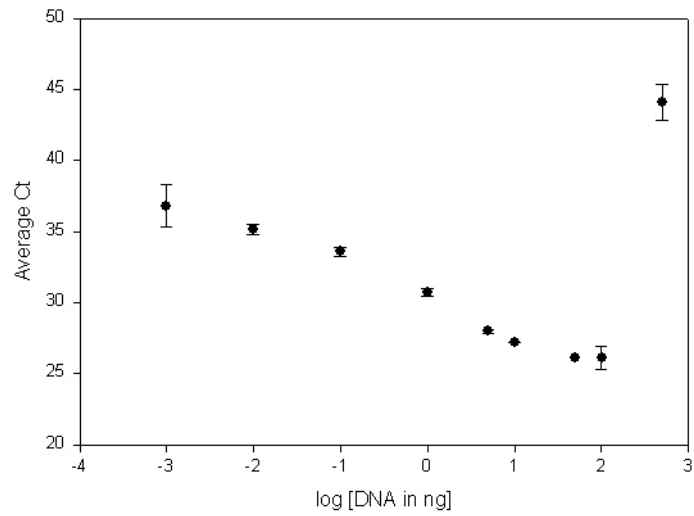


**Abb. 52:** Gemittelte Ct-Werte der Real-Time PCR (18-S-animal2) von 1% Tiermehl-Mischungen (Wizard, Inkubation: 2h, 4h, über Nacht) im Konzentrationsbereich von 500 ng bis 1 ng.

Das 18-S-animal2 System wurde im Anschluss mit verschiedenen Tiermehlen und Mischfuttern untersucht.

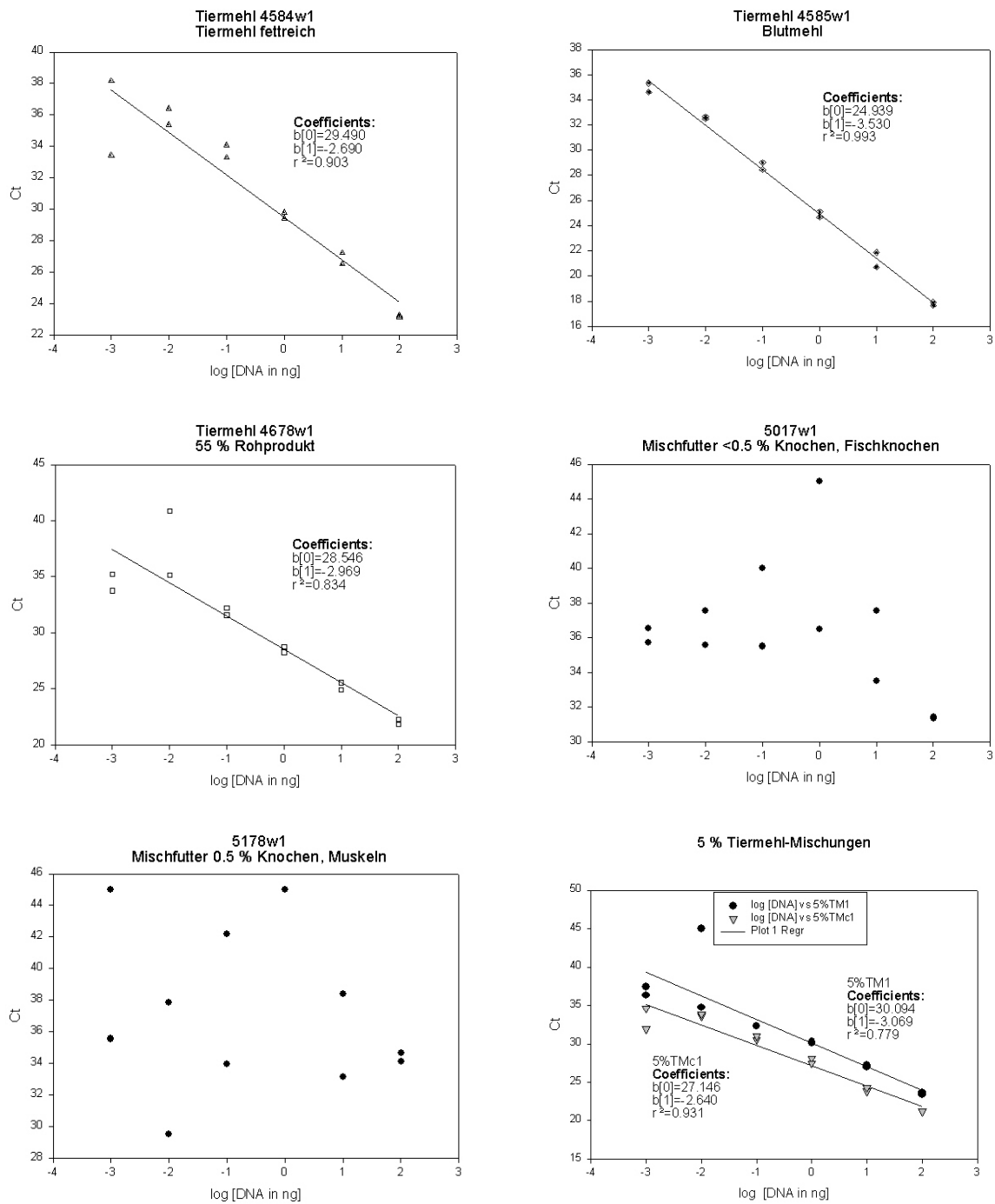
Auch mit reinem Fleischmehl (4496) kommt man mit den Ct-Werten der hohen Verdünnungen in den Bereich der NTCs. Wie aus Abbildung 53 ersichtlich ist beim Tiermehl bei einer DNA-Menge von 50 ng bereits Inhibition zu sehen, der Einsatz von 500 ng führt zur vollständigen Inhibition der Reaktion. Weiters sieht man, dass im hochverdünnten Bereich (1pg –100 pg) die Steigung der Ausgleichsgerade eindeutig niedriger ist ( $k = -2,734$ ,  $r^2 = 0,976$ ) als im Bereich von 1mg-10 mg ( $k = -3,247$ ,  $r^2 = 0,995$ ).

### Fleischmehl (4496) 18-S-ani



**Abb. 53:** Gemittelte Ct-Werte der Real-Time PCR (18-S-animal2) von Fleischmehl Nr. 4496 (Wizard) im Konzentrationsbereich von 500 ng bis 1 pg.

In einem weiteren Ansatz wurden die restlichen Tiermehle in den gleichen Verdünnungen, allerdings nur bis zu einer Konzentration von 100 ng/mL mit dem 18-S-animal2 System analysiert.



**Abb. 54:** Ct-Werte von verschiedenen Tiermehlen, Mischfuttern und einer 5%-Tiermehlmischung mit 18-S-animal2, falls möglich, wurde eine lineare Regressionsgerade eingezeichnet.

Wie zu erwarten war, ist das 18-S-animal2 System für Reaktionen mit Mischfutter nicht geeignet, mit den 5%-Tiermehlmischungen wurden zwar recht hohe Ct-Werte gemessen, ansonsten sieht man aber eine gute Korrelation der Werte. Die besten

Ergebnisse und niedrigsten Ct-Werte wurden mit dem Blutmehl erzielt, bei dem die Werte auch bei sehr hohen Verdünnungen noch sehr gut korrelieren. Bei den beiden anderen Tiermehlen (4584 und 4678) sind die Ct-Werte bis zu einer DNA Menge von 1-0.1 ng noch recht gut reproduzierbar, dann allerdings ist die Streuung sehr hoch. Außer beim Mischfutter Nr. 5178, bei dem keine Aussage möglich ist, sieht man in allen Fällen keine Inhibition bei einer eingesetzten DNA-Menge von 100 ng.

### **Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden und anschließender Inhibitionsversuch**

Mit drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden (CTAB kombiniert mit Wizard, CTAB kombiniert mit Ethanol und CTAB) wurde DNA aus Mischfutter, aus einer 2.5% Tiermehlmischung in Mischfutter und aus Tiermehl extrahiert. Die Konzentration der daraus erhaltenen Stammlösungen ist der folgenden Abbildung zu entnehmen.

	<b>CTAB/Wizard</b>	<b>CTAB/EtOH</b>	<b>CTAB</b>
<b>Mischfutter (M)</b>	612.708	673.67	55.36
<b>M + 2.5% TM</b>	800.202	514.8	348.564
<b>Tiermehl (TM)</b>	670.284	876.31	15.73

**Abb. 55:** Konzentrationen der Stammlösungen in ng/μl

Die verschiedenen Stammlösungen wurden verdünnt und in einem Konzentrationsbereich von 100 ng/μl bis 0.001 ng/μl in Real-Time-PCR Reaktionen eingesetzt. Die Versuche wurden jeweils mit dem Primersystem 18S-animal2 und 18S-uni durchgeführt. Einerseits sollte dabei die Qualität der mit verschiedenen Methoden extrahierten DNA überprüft werden, andererseits sollte festgestellt werden, ab welcher Konzentration die eingesetzte DNA zu einer Inhibition der PCR-Reaktion führt (Abb.56).

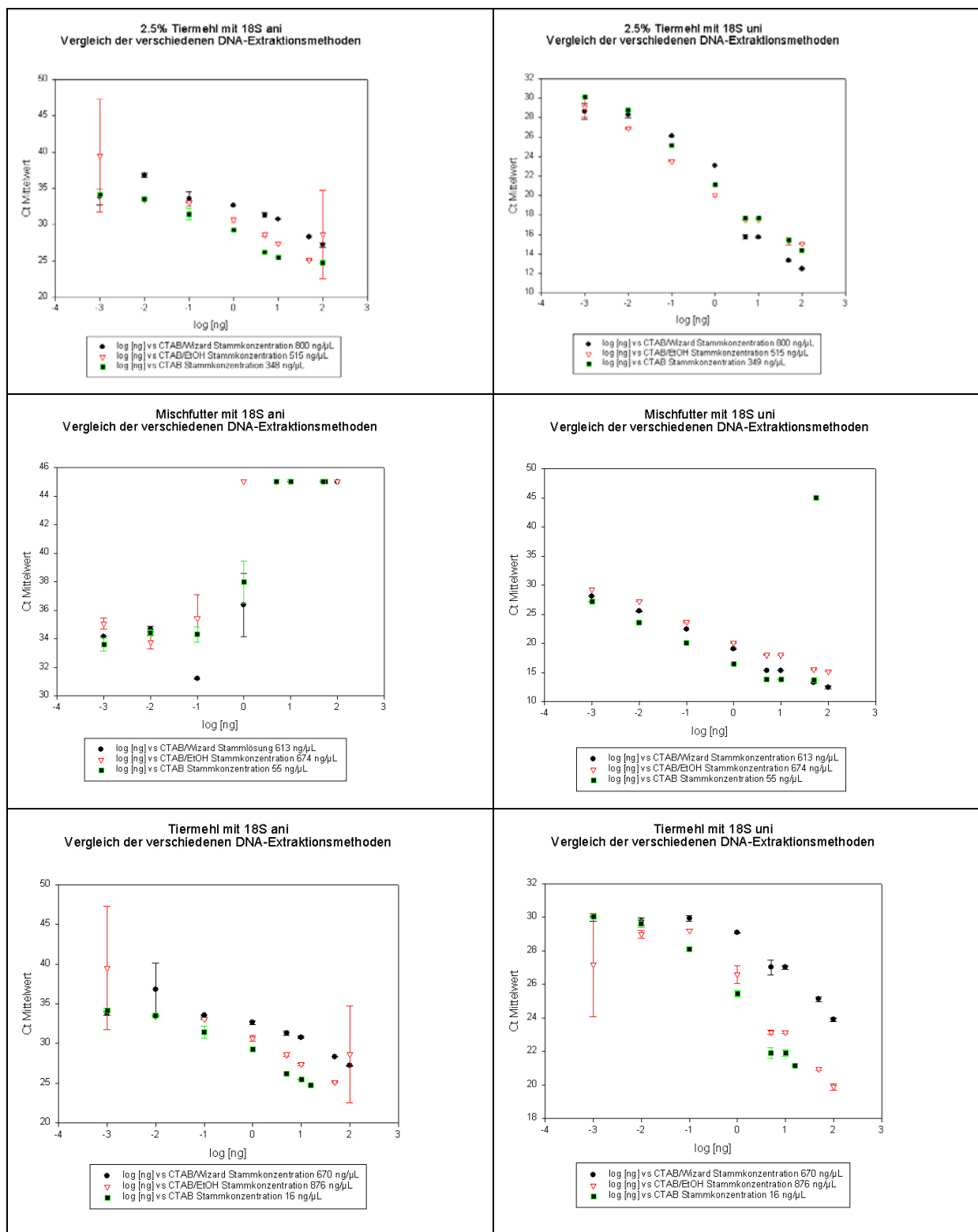
In Tabelle 13 ist jeweils die Extraktionsmethode aufgelistet, die bei der eingesetzten DNA zu den niedrigsten Ct-Werten geführt hat, falls eine eindeutige Aussage möglich war.

Beim Vergleich der Ergebnisse ist allerdings zu beachten, dass die DNA-Extraktion selbst zu einer stark unterschiedlichen Ausbeute geführt hat. Bei Tiermehl und Mischfutter wurden zwar die niedrigsten Ct-Werte mit CTAB-Präparationen erzielt, allerdings war die Ausbeute dieser Methode gerade mit diesen beiden Materialien extrem gering.

**Tab. 13:** Auflistung der DNA-Extraktionsmethode, die für die jeweils angeführte DNA zu den besten Ergebnissen führte (niedrigste Ct-Werte).

DNA	Primersystem	DNA-Extraktionsmethode, die zu den niedrigsten Ct-Werten führte
<b>2.5% TM</b>	18S-animal2	CTAB
<b>2.5% TM</b>	18S-uni	keine Aussage möglich
<b>Mischfutter</b>	18S-animal2	keine Aussage möglich
<b>Mischfutter</b>	18S-uni	CTAB
<b>Tiermehl</b>	18S-animal2	CTAB
<b>Tiermehl</b>	18S-uni	CTAB





**Abb. 56:** Ergebnisse der Real-Time-PCR von DNA aus verschiedenen Extraktionsmethoden mit den Primersystemen 18S-animal2 und 18S-uni.

## Validierung des Systems 18S-Fisch

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte, die für die Validierung des Systems 18S-Fisch notwendig sind, aufgeführt. Alle Ansätze für die Real-time PCR wurden im großen Maßstab (Mastermix für einen Parallelansatz jeweils 50 µl) durchgeführt.

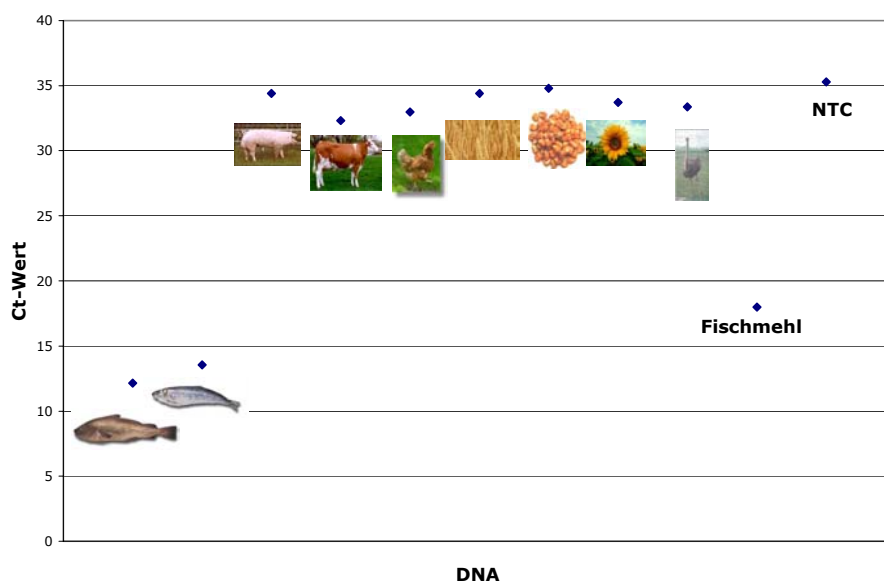
**Tab. 14:** Das Primer-Sondensystem 18S-Fisch.

Interne Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
338	18S Fisch-MGB	FAM-AACTGTGGCAATTC
335	18S Fisch-F	CTC ATT AAA TCA GTT ATG GTT CCT TTG A
336	18S Fisch-R1	GCA TCC CCG GAG GTC A
337	18S Fisch-R2	CGT GAA GGG GGC CAG TCA
350	18S Fisch-R3	CGA GAG GGG CCG AGT CA

In diesem System werden 3 Reverse-Primer verwendet, wobei R2 und R3 für Heringartige Fische geeignet sind. R3 wurde aus einem Fischmehl isoliert, das mit den Primern R1 und R2 keine Reaktion gezeigt hat.

### Spezifität

Die Spezifität des Systems wurde durch den Einsatz verschiedener DNAs (Säugetiere, Pflanzen, Fische, Fischmehle, Tiermehle) in die Real-time PCR untersucht (Tabelle 15, Abb. 57).



**Abb. 57:** Spezifität des Systems 18S-Fisch an Hand einiger ausgewählter Beispiele.

Tabelle 15 Spezifität des Systems 18S-Fisch.

<b>DNA</b>	<b>ng DNA</b>	<b>Ct 1</b>	<b>Ct 2</b>	<b>Mittelwert</b>
<b>Hering</b>	10	12,17	12,13	12,15
<b>1A</b>	10	13,62	13,47	13,55
<b>1B</b>	1	17,93	17,85	17,89
<b>2A</b>	1	17,94	17,72	17,83
<b>2B</b>	1	17,26	17,83	17,55
<b>3A</b>	1	17,56	17,30	17,43
<b>3B</b>	1	17,69	17,89	17,79
<b>4A</b>	1	17,72	17,80	17,76
<b>4B</b>	1	18,06	18,04	18,05
<b>5A</b>	1	17,19	17,45	17,32
<b>5B</b>	1	23,44	24,23	23,34
<b>Fm1</b>	1	23,7	24,11	23,91
<b>Tm 4496</b>	10	30,42	30,6	30,51
<b>Tm 4585</b>	10	33,31	29,6	31,46
<b>Schwein</b>	10	34,33	34,47	34,40
<b>Pute</b>	10	32,46	32,89	32,68
<b>Huhn</b>	10	32,70	33,26	32,98
<b>Gans</b>	10	25,99	33,47	29,73
<b>Rind</b>	10	32,22	32,43	32,33
<b>Hafer</b>	10	35,42	45	40,21
<b>Mischfutter</b>	10	31,63	32,41	32,02
<b>NTC</b>		34,33	32,6	33,47
<b>Kabeljau</b>	10	13,81	13,63	13,72
<b>Hering</b>	10	15,35	15,25	15,30
<b>Sardine</b>	10	16,33	15,98	16,16
<b>Fm1</b>	10	15,17	15,59	15,38
<b>Gerste</b>	10	35,14	34,41	34,78
<b>Weizen</b>	10	33,58	35,24	34,41
<b>Hafer</b>	10	33,16	35,31	34,24
<b>Mischfutter</b>	10	33,46	32,67	33,07
<b>Mais</b>	10	35,03	34,58	34,81
<b>Soja</b>	10	29,01	25,84	27,43
<b>Raps</b>	10	31,46	31,80	31,63
<b>Sonnenblume</b>	10	33,94	33,52	33,73
<b>Gans</b>	10	35,42	37,15	36,29
<b>Strauss1</b>	10	33,34	33,4	33,37
<b>Strauss2</b>	10	33,29	34,09	33,69
<b>NTC</b>		37,05	33,52	35,29

Abbildung 57 und Tabelle 15 zeigen sehr schön, dass das 18S-Fisch System sehr spezifisch ist und es auch zu keinen Kreuzreaktionen mit Vögeln kommt.

Fische und Fischmehle werden mit gleicher Spezifität und Effizienz erfaßt.

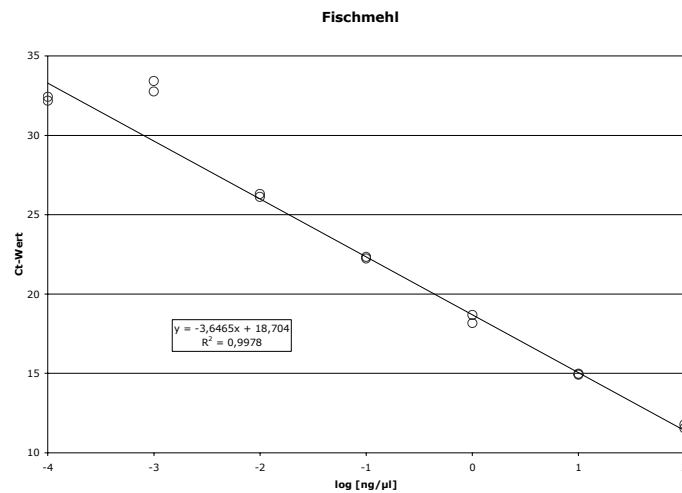
## Linearität und Messbereich

Die Linearität und der Messbereich wurden mit folgenden DNAs untersucht:

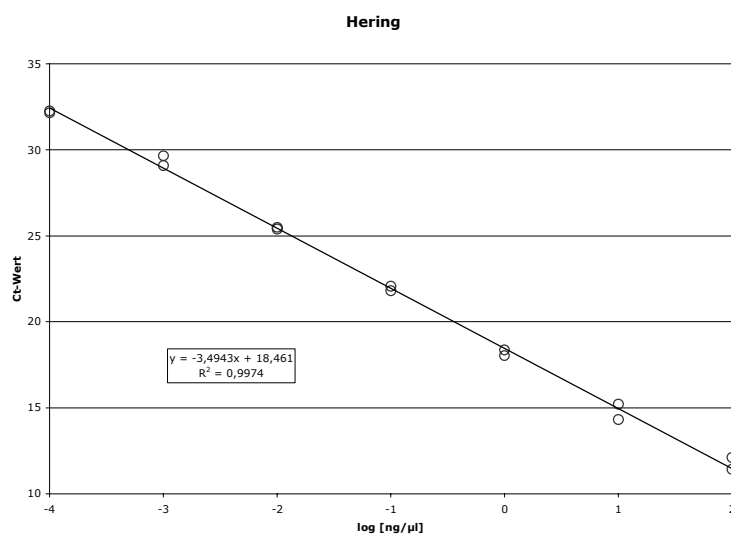
Kabeljau; 18S-Kabeljau Plasmid DNA

Fischmehl (FM1); Plasmid-Fischmehl

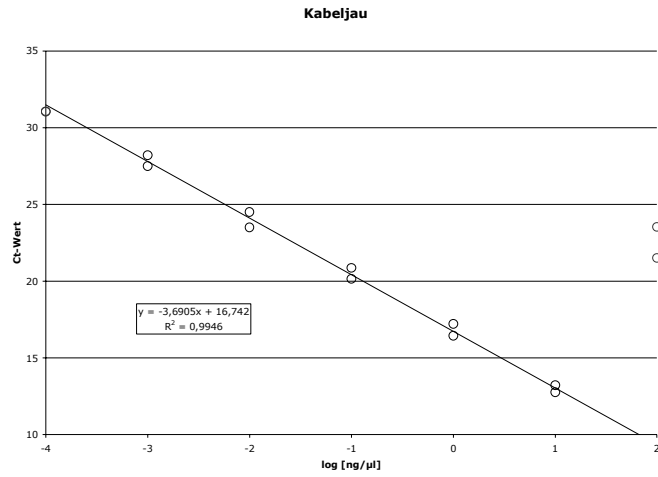
Hering



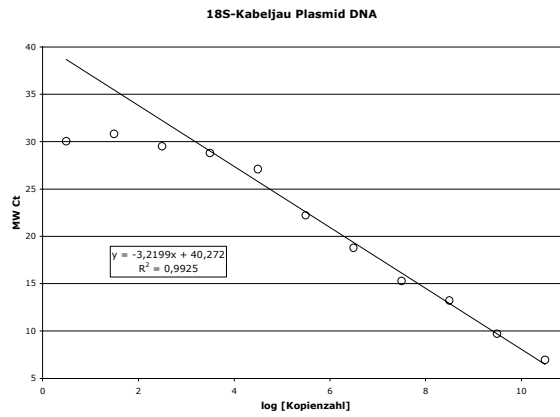
**Abb. 58:** Bestimmung des linearen Bereichs und des Messbereichs des 18S-Fisch Systems mit Fischmehl-DNA.



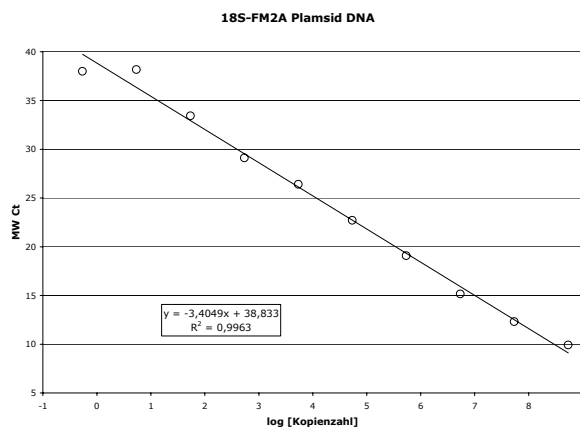
**Abb. 59:** Bestimmung des linearen Bereichs und des Messbereichs des 18S-Fisch Systems mit Hering-DNA.



**Abb. 60:** Bestimmung des linearen Bereichs und des Messbereichs des 18S-Fisch Systems mit Kabeljau-DNA.



**Abb. 61:** Bestimmung des linearen Bereichs und des Messbereichs des 18S-Fisch Systems mit 18S-Kabeljau-Plasmid-DNA.



**Abb. 62:** Bestimmung des linearen Bereichs und des Messbereichs des 18S-Fisch Systems mit 18S-Fischmehl-Plasmid-DNA.

## **Laborvergleichstest**

Nach der Validierung der neuen Methoden in Haus wurden zwei Laborvergleichsteste vorbereitet, einer zum Nachweis von Tiermehl, der zweite zum Nachweis von Fischmehl.

Da es in Österreich zu wenige Laboratorien gibt, die real-time PCR Geräte haben und im Stande sind diese Untersuchungen durchzuführen, haben wir uns entschlossen, die Laborvergleichsteste als klassische PCR und Analyse der Produkte mit Agarosegelen durchzuführen.

Die Primerpaare, die getestet wurden, sind für Tiermehl 18S-TierF/18S-TierR1 und für Fischmehl 18S-FischF/18S-FischR1+18S-FischR2+18S-FischR3.

## **Probenherstellung**

Da die Proben mit bekannten Gehalt an Tiermehl, die vom BFL zur Verfügung gestellt wurden, eine unbekannte Komponente enthielten, die an Hand der einzelnen Bestandteile nicht zu identifizieren war, haben wir eigene Mischungen mit verschiedenen Anteilen an Tier- bzw. Fischmehl in Mischfutter hergestellt.

Als Basis für die Mischungen wurde das Mischfutter 319145, Kuhkorn3 der Firma Garant verwendet. Das Futter wurde im Büchi-Mixer fein zermahlen. Vom gemahlene Futter wurden Proben gezogen und DNA isoliert.

Die DNA wurde mit den real-time PCR Assays 18S-animal2 und 18S-Fisch auf die Anwesenheit von Tier- und Fisch-DNA untersucht. Es wurde keine Reaktion beobachtet. Das Mischfutter enthält also kein Tier- oder Fischmehl, wie auch schon frühere Versuche gezeigt haben.

Für den Laborvergleichstest wurden Proben mit verschieden Gehalt (0.01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%) an Tier- bzw. Fischmehl hergestellt. Dazu wurden 100 g gemahlene Mischfutter mit der entsprechenden Menge Tier- bzw. Fischmehl versetzt und zuerst im Büchi-Mixer homogenisiert, dann in einen Plastikbeutel gefüllt und im Stomacher nochmals durchgemischt. Um die Gefahr der Verschleppung von Tier- bzw. Fischmehl gering zu halten, wurde mit dem geringsten Gehalt an Tier- bzw. Fischmehl begonnen. Erst nach sorgfältiger Reinigung der Geräte und des Arbeitsplatzes wurde mit der Probe mit dem nächst höheren Gehalt begonnen.

## Überprüfung der Homogenität

Zur Überprüfung der Homogenität der Ringversuchsproben wurde in jeweils acht Parallelansätzen aus je 200 ng Probe DNA isoliert. Tabelle 16 und 17 zeigen die Ergebnisse.

**Tab16:** DNA-Isolierung aus den Proben mit Tiermehlanteil

<i>Name der Probe</i>	<i>Konzentration [ng/μl]</i>	<i>A [260]</i>	<i>A [280]</i>	<i>Ratio</i>	<i>A[260]*F</i>
MF+0,01% TM A	1152	1,1519	0,665	1,73	57,6
MF+0,01% TM B	1135	1,1349	0,6576	1,73	56,7
MF+0,01% TM C	1111	1,1114	0,6485	1,71	55,6
MF+0,01% TM D	360	0,3592	0,2138	1,68	18,0
MF+0,01% TM E	896	0,8962	0,52	1,72	44,8
MF+0,01% TM F	758	0,7577	0,4346	1,74	37,9
MF+0,01% TM G	684	0,684	0,397	1,72	34,2
MF+0,01% TM H	801	0,8011	0,4626	1,73	40,1
MF+0,05% TM A	1340	1,3393	0,8327	1,61	67,0
MF+0,05% TM B	993	0,9926	0,6201	1,60	49,6
MF+0,05% TM C	1309	1,3093	0,8302	1,58	65,5
MF+0,05% TM D	1137	1,1373	0,6954	1,64	56,9
MF+0,05% TM E	1044	1,0441	0,6381	1,64	52,2
MF+0,05% TM F	1029	1,0289	0,6472	1,59	51,4
MF+0,05% TM G	973	0,9726	0,588	1,65	48,6
MF+0,05% TM H	707	0,7073	0,4309	1,64	35,4
MF+0,1% TM A	1256	1,2557	0,7305	1,72	62,8
MF+0,1% TM B	847	0,8465	0,4991	1,70	42,3
MF+0,1% TM C	771	0,7711	0,4512	1,71	38,6
MF+0,1% TM D	775	0,7752	0,4594	1,69	38,8
MF+0,1% TM E	770	0,7702	0,4516	1,71	38,5
MF+0,1% TM F	812	0,8124	0,4684	1,73	40,6
MF+0,1% TM G	814	0,814	0,4744	1,72	40,7
MF+0,1% TM H	844	0,8442	0,4998	1,69	42,2
MF+0,5% TM A	1338	1,3387	0,7554	1,77	66,9
MF+0,5% TM B	1150	1,1505	0,6499	1,77	57,5
MF+0,5% TM C	1104	1,1039	0,6369	1,73	55,2
MF+0,5% TM D	1020	1,0195	0,5825	1,75	51,0
MF+0,5% TM E	801	0,8007	0,4593	1,74	40,0
MF+0,5% TM F	726	0,7267	0,4147	1,75	36,3
MF+0,5% TM G	716	0,716	0,418	1,71	35,8
MF+0,5% TM H	752	0,752	0,4363	1,72	37,6
MF+1% TM A	1165	1,1653	0,6752	1,73	58,3
MF+1% TM B	946	0,9465	0,5508	1,72	47,3
MF+1% TM C	991	0,9907	0,5747	1,72	49,5
MF+1% TM D	950	0,9503	0,5465	1,74	47,5
MF+1% TM E	820	0,8204	0,4805	1,71	41,0
MF+1% TM F	885	0,885	0,5146	1,72	44,3
MF+1% TM G	880	0,88	0,5122	1,72	44,0

MF+1% TM H	888	0,8877	0,5227	1,70	44,4
MF+5% TM A	969	0,9694	0,5571	1,74	48,5
MF+5% TM B	872	0,8716	0,5045	1,73	43,6
MF+5% TM C	774	0,7742	0,4457	1,74	38,7
MF+5% TM D	847	0,8474	0,499	1,70	42,4
MF+5% TM E	948	0,9479	0,558	1,70	47,4
MF+5% TM F	1080	1,0801	0,6222	1,74	54,0
MF+5% TM G	1111	1,1115	0,6475	1,72	55,6
MF+5% TM H	1113	1,1129	0,6396	1,74	55,6
Reagenzienkontrolle	--	0,0222	0,0137	1,61	1,11

**Tab17: DNA-Isolierung aus den Proben mit Fischmehlanteil**

<i>Name der Probe</i>	<i>Konzentration [ng/µl]</i>	<i>A [260]</i>	<i>A [280]</i>	<i>Ratio</i>	<i>A[260]*F</i>
MF+0,01% FM A	1113	1,1128	0,6837	1,63	55,6
MF+0,01% FM B	854	0,8545	0,4943	1,73	42,7
MF+0,01% FM C	1031	1,0316	0,598	1,73	51,6
MF+0,01% FM D	757	0,7573	0,4325	1,75	37,9
MF+0,01% FM E	1296	1,2961	0,7401	1,75	64,8
MF+0,01% FM F	998	0,9987	0,5731	1,74	49,9
MF+0,01% FM G	840	0,8406	0,4744	1,77	42,0
MF+0,01% FM H	705	0,7056	0,4043	1,75	35,3
MF+0,05% FM A	574	0,874	0,5084	1,72	43,7
MF+0,05% FM B	777	0,777	0,4488	1,73	38,9
MF+0,05% FM C	664	0,6646	0,3911	1,70	33,2
MF+0,05% FM D	801	0,8016	0,4647	1,72	40,1
MF+0,05% FM E	806	0,8062	0,4674	1,72	40,3
MF+0,05% FM F	719	0,7197	0,4181	1,72	36,0
MF+0,05% FM G	824	0,8244	0,4815	1,71	41,2
MF+0,1% FM H	803	0,8035	0,474	1,70	40,2
MF+0,1% FM A	1025	1,0254	0,6001	1,71	51,3
MF+0,1% FM B	838	0,8379	0,4925	1,70	41,9
MF+0,1% FM C	792	0,7925	0,4678	1,69	39,6
MF+0,1% FM D	738	0,7388	0,4318	1,71	36,9
MF+0,1% FM E	758	0,7585	0,4377	1,73	37,9
MF+0,1% FM F	663	0,6631	0,3823	1,73	33,2
MF+0,1% FM G	852	0,8519	0,4995	1,71	42,6
MF+0,1% FM H	639	0,6396	0,3682	1,74	32,0
MF+0,5% FM A	872	0,8724	0,5025	1,74	43,6
MF+0,5% FM B	773	0,7731	0,4376	1,77	38,7
MF+0,5% FM C	758	0,7581	0,4359	1,74	37,9
MF+0,5% FM D	713	0,7132	0,4117	1,73	35,7
MF+0,5% FM E	701	0,7012	0,4084	1,72	35,1
MF+0,5% FM F	669	0,6695	0,3935	1,70	33,5
MF+0,5% FM G	736	0,7359	0,4337	1,70	36,8
MF+0,5% FM H	645	0,6455	0,373	1,73	32,3
Reagenzienkontrolle	--	0,0349	0,0256	1,3640	1,7470



Die isolierte DNA wurde dann mittels real-time PCR auf ihren Anteil an DNA von Tieren bzw. Fischen untersucht. Es wurden die Systeme 18S-animal2 und 18S-Fisch verwendet. Tabelle 18 und 19 zeigen die Ergebnisse der real-time PCRs. Es wurde die DNA aus acht unabhängigen Isolierungen eingesetzt.

**Tab18:** Ergebnisse der real-time PCR mit DNA aus den Proben mit Tiermehlzumischung. Es sind die Ct-Werte angegeben.

<b>Bezeichnung</b>	<b>0.01%</b>	<b>0.05%</b>	<b>0.10%</b>	<b>0.50%</b>	<b>1%</b>
A	36.57	35.59	32.02	31.02	29.6
B	37.66	35.13	32.04	30.77	29.41
C	37.06	36.03	32.75	30.54	29.21
D	37.06	35.58	34.34	30.8	30.63
E	35.51	34.49	30.86	30.64	29.47
F	35.92	34.05	34.47	30.48	29.38
G	35.62	34.29	32.82	30.03	28.96
H	36.75	34.42	32.63	31.43	28.97
<b>MW</b>	<b>36.52</b>	<b>34.95</b>	<b>32.74</b>	<b>30.71</b>	<b>29.45</b>
<b>Stdabw</b>	<b>0.72</b>	<b>0.68</b>	<b>1.12</b>	<b>0.38</b>	<b>0.49</b>

**Tab18:** Ergebnisse der real-time PCR mit DNA aus den Proben mit Fischmehlzumischung. Es sind die Ct-Werte angegeben.

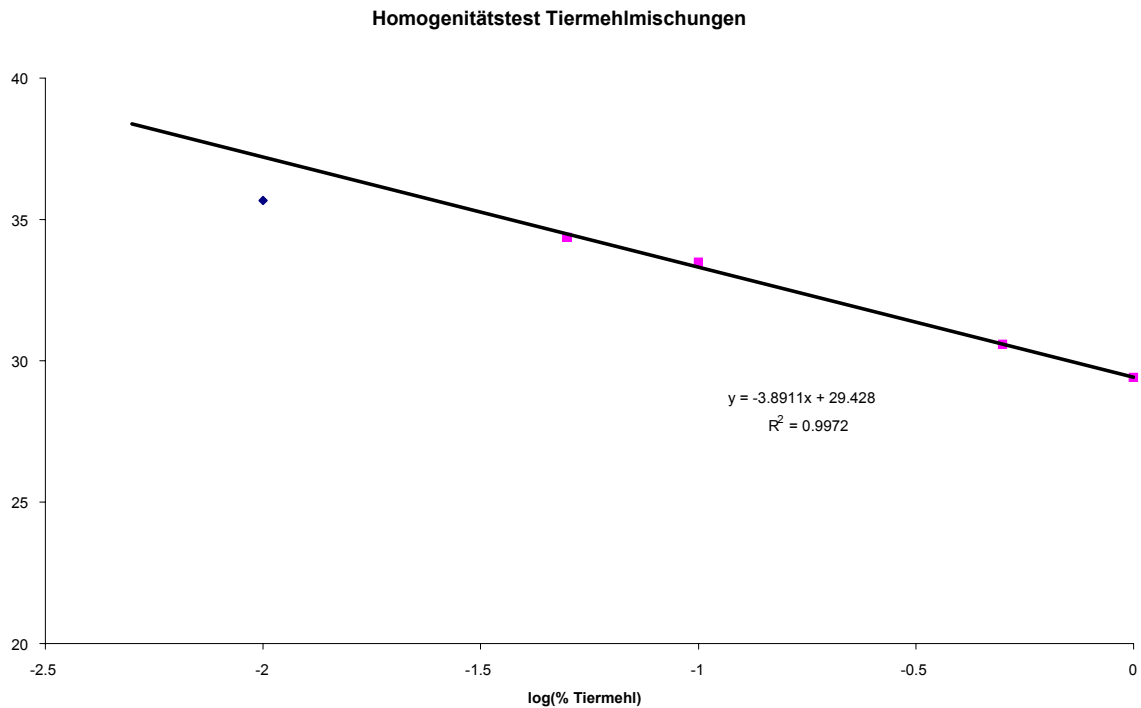
<b>Bezeichnung</b>	<b>0.01%</b>	<b>0.05%</b>	<b>0.10%</b>	<b>0.50%</b>	<b>1%</b>
A	29.09	25.17	27.69	22.01	22.06
B	27.9	24.49	23.72	22.48	20.6
C	25.42	26.07	24.41	21.69	21.24
D	27.62	25.21	23.27	23.42	21.57
E	27.72	24.36	24.98	23.21	20.53
F	27.88	25.13	25.18	21.75	20.5
G	28.81	26.92	23.19	22.08	21.81
H	28.37	25.19	23.03	21.18	22.1
<b>MW</b>	<b>27.85</b>	<b>25.32</b>	<b>24.43</b>	<b>22.23</b>	<b>21.30</b>
<b>Stdabw</b>	<b>1.04</b>	<b>0.78</b>	<b>1.45</b>	<b>0.72</b>	<b>0.64</b>

Die Abbildungen 63 und 64 zeigen die graphische Darstellung der real-time PCR Ergebnisse. Die Tiermehlmischungen zeigen einen linearen Verlauf von 1% bis 0,05%, nur die Mischung mit 0,01% weicht etwas davon ab.

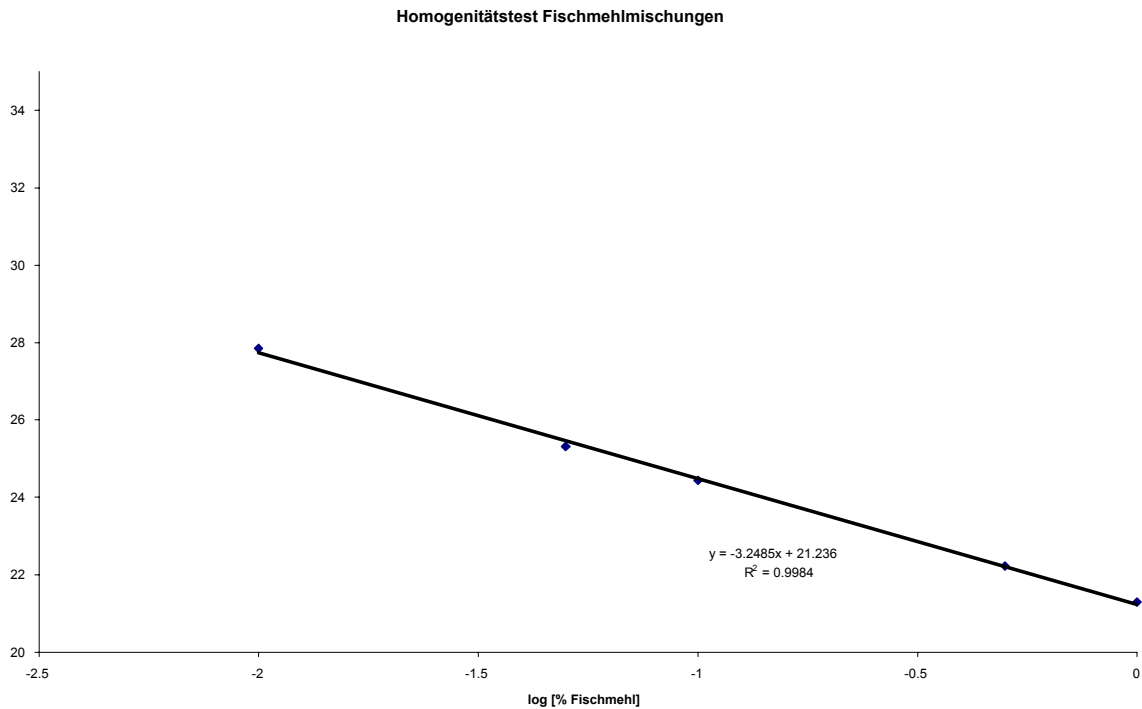
Bei den Fischmehlmischungen liegen alle Proben von 1% bis 0,01% im linearen Bereich.

Der Korrelationskoeffizient ist bei beiden Mischungen zufriedenstellend. Er liegt bei 0,997 bzw. 0,998.

Wie aus den Daten zu erkennen ist liegen die Werte für 0,01% Tiermehl an der Nachweisgrenze. Der Ct-Wert von 28 für 0,01% Fischmehl zeigt, dass in der DNA aus Fischmehl viel mehr amplifizierbare Kopien vorliegen und daher Fischmehl auch in noch geringeren Anteilen nachweisbar ist.



**Abb. 63:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der real-time PCR der Tiermehlmischungen mit dem System 18S-animal2. Es ist der Logarithmus % Tiermehl gegen die Ct-Werte aufgetragen.



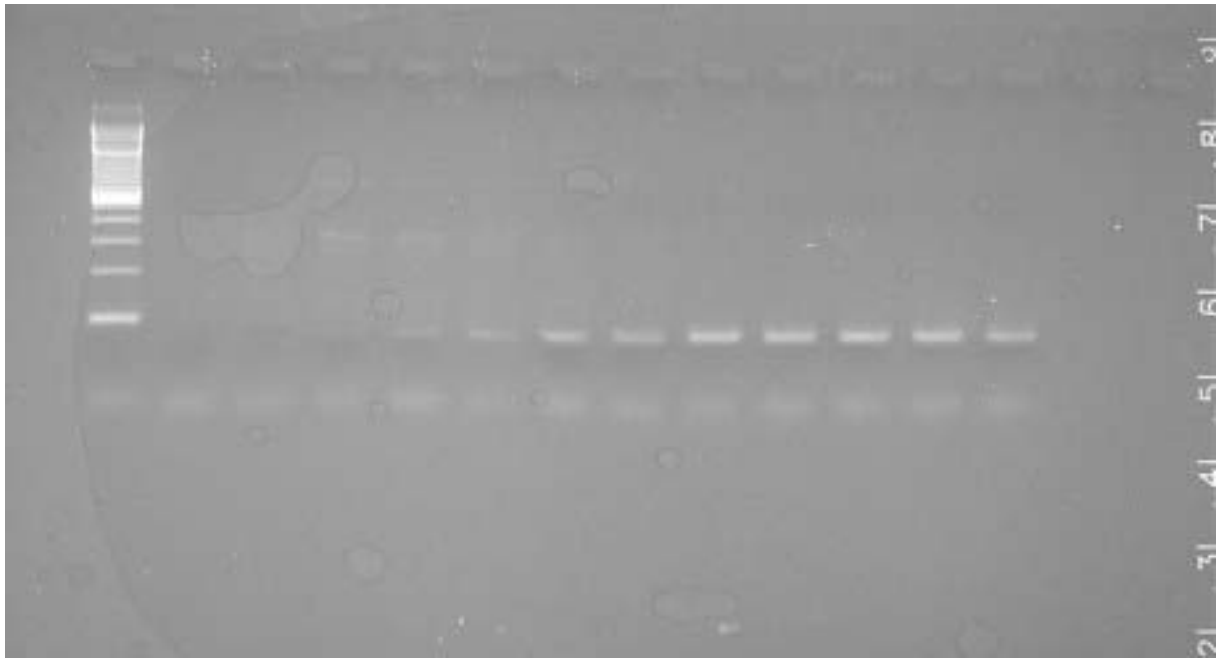
**Abb. 64:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der real-time PCR der Fischmehlmischungen mit dem System 18S-Fisch. Es ist der Logarithmus % Fischmehl gegen die Ct-Werte aufgetragen.

### PCR mit dem Primerpaar Tier-F und Tier-R1

Mit der DNA, die aus den Tiermehlmischungen isoliert wurde, wurde eine PCR mit dem Primerpaar Tier-F und Tier-R1 durchgeführt. Es wurden 10ng DNA als Template eingesetzt und 35 Zyklen gemacht.

Die PCR Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Abbildung 65 zeigt die Ergebnisse. Die Bande mit der Probe mit 0,01 % Tiermehl zeigt eine sehr schwache Bande, die am Gel besser sichtbar war, wie in der Abbildung.

Für den Ringversuch wurde die Zyklenzahl daher auf 40 erhöht.



**Abb. 65:** Agarosegel von PCR Produkten mit den Primern 18S-TierF/R1,35 Zyklen. Es ist die in die PCR eingesetzte DNA Menge angegeben. Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: Leerkontrolle; Spur 3: Mischfutter, 10 ng DNA; Spur 4: Mischfutter mit 0,01% Tiermehl, 10 ng DNA; Spur 5: Mischfutter mit 0,05% Tiermehl, 10 ng DNA; Spur 6: Mischfutter mit 0,1% Tiermehl, 10 ng DNA; Spur 7: Mischfutter mit 0,5% Tiermehl, 10 ng DNA; Spur 8: Mischfutter mit 1% Tiermehl, 10 ng DNA; Spur 9: Mischfutter mit 5% Tiermehl, 10 ng DNA; Spur 10: Tiermehl FK 4678/A, 0,1 ng DNA; Spur 11: Tiermehl FK 4678/B, 0,1 ng DNA ; Spur 12: Tiermehl FK 4678/C, 0,1 ng DNA ; Spur 13: Tiermehl FK 4678/D, 0,1 ng DNA.

### PCR mit den Primern 18S-FischF und 18S-FischR1/R2/R3

Zum Nachweis von Fischmehl wurden die gleichen Primer wie für den real-time PCR Fischnachweis verwendet.

Abbildung 66 zeigt die Ergebnisse der PCR aufgetrennt in einem Agarosegel. Es wurden wieder 10 ng DNA eingesetzt und 35 Zyklen durchgeführt. Auch die Probe mit 0,01 % Fischmehlanteil zeigt eine deutliche Bande.

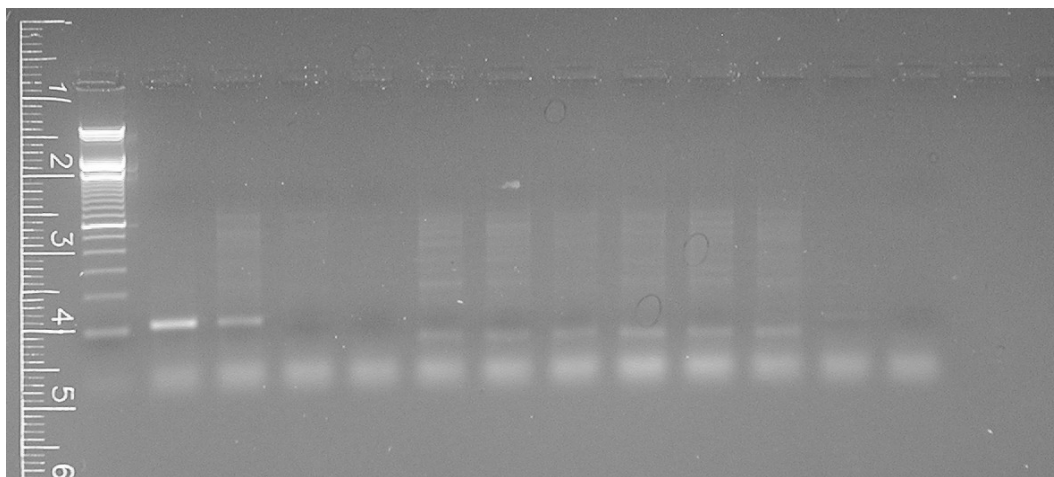
Abbildung 67 zeigt, dass auch noch 0,1 ng DNA eine 0,1%igen Fischmehlmischung bei 35 Zyklen eine starke Bande zeigen.



**Abb. 66:** Agarosegel von PCR Produkten mit dem 18S-Fisch System. Primer 18S-FischF/R1+R2+R3, 35 Zyklen.

Reihe 1: Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: Leerkontrolle; Spur 3: Mischfutter; Spur 4,5: Mischfutter mit 0,01% Fischmehl, 10 ng DNA; Spur 6,7: Mischfutter mit 0,05%Fischmehl, 10 ng DNA; Spur 8,9: Mischfutter mit 0,1%Fischmehl, 10 ng DNA; Spur 10,11: Mischfutter mit 0,5%Fischmehl, 10 ng DNA; Spur 12,13: Mischfutter mit 1%Fischmehl, 10 ng DNA; Spur 14,15: Mischfutter mit 2,5%Fischmehl, 10 ng DNA

Reihe 2: Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2,3: Mischfutter mit 5%Fischmehl, 10 ng DNA; Spur 4-7: Fischmehl, 0,1 ng DNA.



**Abb. 67:** Agarosegel von PCR Produkten mit dem 18S-Fisch System. Primer 18S-FischF/R1+R2+R3, 35 Zyklen.

Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: Mischfutter mit 0,1%Fischmehl, 1 ng DNA; Spur 3: Mischfutter mit 0,1%Fischmehl, 0,1 ng DNA; Spur 4: Mischfutter mit 0,1%Fischmehl, 0,01 ng DNA; Spur 5: Mischfutter mit 0,1%Fischmehl, 0,001 ng DNA; Spur 6-11: Mischfutter, 10 ng DNA; Spur 12: Tiermehl, 10 ng DNA; Spur 13: Leerkontrolle.

## **Durchführung des Laborvergleichstests**

Nach diesen vorbereitenden Arbeiten wurde eine Arbeitsvorschrift (siehe Anhang 1) für die Laborvergleichstests erstellt. In diesen Laborvergleichstests sollten die Nachweise als gesamtes auf ihre Eignung in der Routineanalytik hin untersucht werden.

Es war nicht vorgesehen, die einzelnen Schritte zu validieren, da der Zeitraum von einem Monat für die Teilnehmer zu kurz gewesen wäre.

Die DNA Isolierung hatte nach der SDS-Wizard Methode zu erfolgen, die DNA Konzentration war zu bestimmen und je 10ng DNA in der Reaktion einzusetzen.

Den teilnehmenden Laboren wurden von unserer Seite die Komponenten des Wizard Kits und die Primer zur Verfügung gestellt. Die übrigen Reagenzien wurden von den Teilnehmern selbst bereitgestellt.

Jeder Teilnehmer erhielt eine reine Mischfutterprobe, die sowohl für den Tiermehl- als auch den Fischmehlnachweis als negative Kontrolle diente. Eine 5%ige Tiermehlzumischung als positive Kontrolle für den Tiermehlnachweis und eine 5%ige Fischmehlzumischung als positive Kontrolle für den Fischmehlnachweis.

Weiters wurden je 6 codierte Proben verschickt, die einen Anteil an Tier- bzw. Fischmehl von 0,01% bis 1% enthielten. Die Proben enthielten entweder Tier- oder Fischmehl und waren als solche gekennzeichnet.

Die Aufgabe der Teilnehmer war qualitativ nachzuweisen, ob die Proben Tier- bzw. Fischmehl enthalten.

## **Teilnehmer am Laborvergleichstests**

Da in Österreich nur wenige Labore Erfahrung in der PCR Analytik im Futter- oder Lebensmittelbereich, war es nicht leicht Teilnehmer mit ausreichender Erfahrung zu finden.

Es gelang uns schließlich doch 6 Labore zu finden, die sich bereit erklärten an dem Laborvergleichstest teilzunehmen und auch ausreichende Erfahrung haben. Ein Labor konnte auf Grund anderer Arbeiten letztendlich nicht teilnehmen.

In Tabelle 19 sind die Labore und unsere Ansprechpartner angeführt. Es sind 5 Labore aus dem staatlichen Bereich und ein privates Labor.

**Tab. 19:** Liste der am Laborvergleichstest teilnehmenden Labore<sup>1</sup>

Labor	Ansprechpartner
Lebensmitteluntersuchungsanstalt Kärnten	Mag. Edith Rassi
BFL	Dr. Werner Ruppitsch
Umweltbundesamt	Dr. Andreas Heissenberger
BALU Graz	Dr. Johannes Lückl
Ökolab	Mag. Andreas Firzinger

<sup>1</sup> ARC Seibersdorf konnte aus Zeitgründen nicht teilnehmen.

## Ergebnisse des Laborvergleichstests

Labor C konnte, wie oben ausgeführt, auf Grund der knappen Zeit keine Ergebnisse liefern.

In der Tabelle 20 ist die Probencodierung für die verschiedenen Labore angegeben. Zusätzlich erhielt jedes Labor noch eine Mischfutterprobe als negative Kontrolle und eine 5%ige Tier- bzw. Fischmehlmischung als positive Kontrolle.

**Tab. 20:** Probencodierung

	Labor-Code						
	A	B	C	D	F	G	I
<b>Tiermehl:</b>							
Mischfutter	3 T	2 T	5 T	4 T	1 T	2 T	2 T
0.01 % Tiermehl	6 T	4 T	1 T	5 T	3 T	1 T	1 T
0.05 % Tiermehl	1 T	5 T	6 T	6 T	6 T	4 T	6 T
0.1 % Tiermehl	5 T	6 T	4 T	2 T	5 T	5 T	5 T
0.5 % Tiermehl	4 T	1 T	2 T	3 T	4 T	6 T	4 T
1 % Tiermehl	2 T	3 T	3 T	1 T	2 T	3 T	3 T
<b>Fischmehl:</b>							
Mischfutter	3 F	2 F	5 F	4 F	1 F	2 F	3 F
0.01 % Fischmehl	1 F	4 F	3 F	2 F	4 F	4 F	5 F
0.05 % Fischmehl	6 F	5 F	1 F	6 F	6 F	6 F	6 F
0.1 % Fischmehl	5 F	6 F	6 F	5 F	5 F	5 F	4 F
0.5 % Fischmehl	4 F	3 F	2 F	1 F	2 F	1 F	2 F
1 % Fischmehl	2 F	1 F	4 F	3 F	3 F	3 F	1 F

Negativkontrolle: Mischfutter  
 Positivkontrolle Tiermehl: 5 % Tiermehl in Mischfutter  
 Positivkontrolle Fischmehl: 5 % Fischmehl in Mischfutter

Tabelle 21 enthält die Ergebnisse der DNA Isolierung. Die DNA Konzentration wurde vom Labor F aus dem Agarosegel abgeschätzt (10 µl Probe wurden aufgetragen), von allen anderen wurde die DNA photometrisch vermessen.

Die DNA Ausbeute war innerhalb der einzelnen Labore sehr homogen. Zwischen den Laboren, die photometrisch vermessen haben, hat nur Labor D eine geringere Konzentration erhalten. Labor F hat die DNA Konzentration sicher zu niedrig bestimmt, da das Agarosegel überladen war und daher eine gute Konzentrationsabschätzung nicht möglich war.

**Tab. 21:** Ergebnisse des Laborvergleichstests: DNA Ausbeute

	Labor-Code						
	A	B	C*	D	F	G	I
<b>Tiermehl:</b>							
1T	1120	1240	5 T	300	150	1330	1170
2T	1130	1010	1 T	263	150	910	906
3T	1070	1080	6 T	259	150	1240	923
4T	970	1170	4 T	260	150	1060	850
5T	1040	1090	2 T	237	150	940	709
6T	950	1230	3 T	270	150	1150	970
<b>Fischmehl:</b>							
1F	1180	1260	5 F	264	150	1130	1115
2F	1140	1320	3 F	244	150	940	1095
3F	970	1230	1 F	266	150	940	905
4F	870	1170	6 F	252	150	1180	895
5F	1030	1150	2 F	266	150	1080	935
6F	810	1140	4 F	224	150	840	700

\* Labor C hat die Teilnahme nach Erhalt der Proben absagen müssen.

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse der PCR Reaktionen. Nicht dargestellt sind die Ergebnisse der Kontrollreaktionen mit dem Primerpaar 18S-uniF/18S-uniR. Die Reaktion war in allen Laboratorien für alle Proben positiv.

Beim Nachweis von Tiermehl hat es Probleme mit den Primern gegeben. Sie waren wahrscheinlich mit tierischer DNA verunreinigt, da auch die Kontrolle ohne DNA und reines Mischfutter in einigen Labors ein Produkt lieferte.

Es ist daher keine eindeutige Aussage möglich, jedenfalls ist der Tiermehlnachweis im Bereich unter 0,1 % nahe an der Nachweisgrenze und nur von einem erfahrenen Labor durchführbar.



**Tab. 22:** Ergebnisse des Laborvergleichstests: PCR

	Labor-Code						
	A	B	C*	D	F	G	I
<b>Tiermehl:</b>							
Mischfutter	-	-	5 T	+	-	k.A.	√
0.01 % Tiermehl	?	-	1 T	+	√	k.A.	√
0.05 % Tiermehl	-	-	6 T	++	+	k.A.	√
0.1 % Tiermehl	?	√	4 T	+	√	k.A.	√+
0.5 % Tiermehl	+?	+	2 T	++	++	k.A.	+
1 % Tiermehl	+?	+	3 T	+	√	k.A.	++
<b>Fischmehl:</b>							
Mischfutter	-	-	5 F	-	-	-	-
0.01 % Fischmehl	-	-	3 F	√	+	-	√
0.05 % Fischmehl	√	√+	1 F	+	√	√	√
0.1 % Fischmehl	√	-	6 F	+	+	√	√+
0.5 % Fischmehl	+	√	2 F	+	+	+	+
1 % Fischmehl	+	++	4 F	++	++	+	++

- keine Bande
- √ schwache Bande
- + starke Bande
- ++ sehr starke Bande
- k.A. keine Angaben

\* Labor C hat die Teilnahme nach erhalt der Proben absagen müssen.

Besser sind die Ergebnisse des Fischmehlnachweises. Hier konnten alle 6 Teilnehmer 0,05 % Tiermehl nachweisen, 0,01 % immerhin noch 50 % der Teilnehmer. 0,1 % wurde nur von einem Teilnehmer nicht nachgewiesen, der aber 0,05 % richtig detektiert hat.

Mit dem Fischsystem lassen sich also sicher 0,05 % nachweisen, bei einer Erhöhung der Zyklenzahl von 35 auf 40 auch 0,01 %.

Diese Ergebnisse spiegeln die Tatsache wieder, dass aus Fischmehl mehr und nicht so stark abgebaute DNA isoliert werden kann. Beim Tiermehlnachweis ist der entscheidende Schritt die DNA Isolierung. Es ist notwendig möglichst viel DNA in sehr hoher Reinheit frei von Inhibitoren zu isolieren. Dann kann man 10 – 100 ng DNA einsetzen, ohne Inhibition der PCR zu erhalten und so die Nachweisgrenze auf 0,01 % senken.

**Tab. 23:** Vergleichende Ergebnisse mit DNA isoliert aus Tier- und Fischmehlen und Mischfutterproben (teilweise mit Tier- und/oder Fischmehlanteilen)

Nummer	Bezeichnung	Bemerkung	18S- Uni	18S- animal2	18S- Fisch
FK 5425	Fischmehl		+	-	+
FK 5707	Fischmehl		+	-	+
FK 5704	Fischmehl		+	-	+
FK 5324	Fischmehl	Verunreinigt mit tierischem Material	+	+	+
FK 4584	Tiermehl fettreich		+	+	-
FK 4585	Blutmehl		+	+	-
FK 4678	Tiermehl	55 % Rohpr.	+	+	-
FK4496	Fleischmehl		+	+	-
FK 4673	Fleischknochenmehl		+	+	
T661/8	Mischfutter		+	-	-
319145	Mischfutter	Kuhkorn 3	+	-	-
FK 5017	Mischfutter	< 5% Knochen, Fischknochen	+	+	+
FK5178	Mischfutter	0.5% Knochen, Muskeln	+	+	-
FK 5006	Mischfutter	<< 0.5% Knochen, Fischknochen, Muskeln	+	+	+
FK 5084	Mischfutter	50% Fischknochen + Muskeln	+	+	+
FK 5956	Ferkelaufzuchtfutter		+	-	-
FK 5957	Putenmastfutter		+	-	-
FK 5952	Geflügelanfangsmastfutter		+	-	-
FK 5933	Geflügelmastfutter		+	-	-
FK 5931	Fasanaufzuchtfutter	5% Fischmehl (64%ig)	+	-	+
FK 5932	Putenaufzuchtfutter	5% Fischmehl (64%ig)	+	-	+

## ***Diskussion der Ergebnisse***

### **DNA-Isolierung**

Zwei Isolierungsmethoden wurden intensiv untersucht, erstens Aufschluss der Matrix mit SDS und Isolierung der DNA mit Wizard Resin und zweitens Aufschluss mit CTAB, Fällung des DNA-CTAB-Komplexes zur Abtrennung von Polyphenolen und Polysacchariden und abschließender Alkoholfällung der DNA.

Beide Methoden liefern bei Isolierung von DNA aus pflanzlichem und tierischem Gewebe genügend DNA von ausreichender Reinheit. Bei der ersten Methode ist die Ausbeute um einen Faktor 1,5 – 2 höher. Auch aus Fischmehlen werden mit beiden Methoden sehr gute Ergebnisse erreicht. Fischmehle weisen einen sehr hohen DNA-Gehalt auf.

Bei der Isolierung von DNA aus reinen Tiermehlen hat sich gezeigt, dass mit der SDS-Wizard Methode ausreichend DNA isoliert werden kann. Bei der Verwendung der CTAB Methode konnte jedoch kaum DNA isoliert werden. Wie weitere Untersuchungen gezeigt haben, geht die DNA beim CTAB-Fällungsschritt verloren.

Die Ursache liegt in der starken Fragmentierung, welche die DNA durch die starke thermische und mechanische Belastung bei der Herstellung von Tiermehlen erleidet. Wenn man aus Tiermehlen isolierte DNA auf einem Agarosegel auftrennt, sieht man, dass die höchste DNA Konzentration bei einer Größe von 50 – 150 bp liegt. Diese kleinen Fragmente werden bei der CTAB-Fällung nicht gefällt und gehen dadurch verloren.

Im Gegensatz zu Tiermehlen ist bei Fischmehlen die thermische Belastung bei der Produktion nicht so groß, daher ist hier auch eine deutlich größere Bandbreite in der Fragmentgröße zu sehen.

Als Standardmethode zum Nachweis von Tier- und Fischmehl in Futtermitteln wurde daher die SDS-Wizard Methode eingesetzt.

### **Zielsequenzen**

Um einen empfindlichen Nachweis entwickeln zu können wurden DNA Sequenzen ausgewählt, die in hoher Kopienzahl in der Zelle vorkommen. Das waren Bereiche des 16S-rRNA Gens der Mitochondrien und des chromosomalen 18S-rRNA Gens.

Das 18S-rRNA Gen hat sich als die geeignetere Zielsequenz herausgestellt. Es ist hier möglich Nachweissysteme mit unterschiedlicher Spezifität zu entwickeln. Teile der Sequenz sind in allen Eukarionten homolog, andere Bereiche sind zwischen Säugetieren homolog und erlauben eine Unterscheidung gegenüber Pflanzen und Fischen.

Am schwierigsten war es Bereiche zum Nachweis von Fischen zu finden. Die verschiedenen Fischarten, die zur Produktion von Fischmehlen verwendet werden, sind genetisch weiter von einander entfernt als die Tierarten, die in Tiermehlen verwendet werden. Es war daher notwendig drei reverse Primer im Fischassay einzusetzen.

### **Kontroll-PCR**

Um eine Kontrolle für die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA zu haben, wurde ein Primerpaar bestimmt, welches mit allen Eukarionten ein PCR Produkt ergibt. Es wurden 2 Primerpaare designt, wobei das innere als real-time PCR Primerpaar verwendet wird. Für normale PCR ist es möglich, die forward und reverse Primer beliebig zu kombinieren. Alle Primer sind universell einsetzbar, die verschiedenen Kombinationen ergeben PCR Produkte unterschiedlicher Länge.

### **Tiermehlnachweis**

Von den getesteten Systemen zum Nachweis tierischer DNA haben sich zwei als sehr gut geeignet herausgestellt, ein real-time PCR System, 18S-animal2, und ein normales PCR System, 18S-TierF/R1.

Das real-time PCR System zeigt hohe Spezifität und hohe Sensitivität. Es gibt keine Kreuzreaktionen mit DNA aus Pflanzen und Fischen. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,01% Tiermehlanteil in Mischfutter, wenn 10 ng DNA in der Reaktion eingesetzt werden.

Im Laborvergleichstest wurde das 2. System eingesetzt, da es in Österreich zu wenig Labore gibt, die real-time PCR Analysen durchführen können und bereit sind oder die Möglichkeit haben, an einem Laborvergleichstest teilzunehmen.

Das 18S-TierF/R1 erlaubt ebenfalls einen Nachweis von 0,01% Tiermehl bei einer eingesetzten DNA Menge von 10 ng und 40 Zyklen. Es müssen aber die PCR Bedingungen sehr sorgfältig optimiert werden, um diese Sensitivität zu erreichen.

### **Fischmehlnachweis**

Das Problem beim Nachweis von Fischmehl lag in der größeren genetischen Diversität bei den Fischen. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von drei reversen Primern gelöst werden. Werden alle drei Primer in der PCR eingesetzt, ist es möglich DNA aus allen Fischmehlen mit gleicher Effizienz zu amplifizieren.

Auf Grund der besseren Qualität der DNA aus Fischmehlen ist der Nachweis von Fischmehl um eine Faktor 100 empfindlicher.

Das 18S-Fischsystem erlaubt einen Nachweis von Fischmehl ab einer Konzentration von 0,001% Fischmehl in Mischfutter. Das System kann sowohl in der real-time PCR, als auch in der normalen PCR eingesetzt werden.

### **Laborvergleichstest**

Wie schon weiter oben ausgeführt, wurden im Laborvergleichstest der Nachweis von Tier- und Fischmehl nur mit klassischer PCR getestet.

Eine normale PCR erfordert im Gegensatz zur real-time PCR viel mehr Optimierungsarbeit. Es müssen die MgCl<sub>2</sub> Konzentration und das Temperaturprofile auf die verwendete Polymerase und den Thermocycler abgestimmt werden. Das war bei diesem Laborvergleichstest auf Grund der kurzen zur Verfügung stehenden Zeit den teilnehmenden Laboratorien nicht möglich. Es wurden daher unabhängig von der verwendeten Polymerase und des Thermocyclers von allen die gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Dieser Umstand ist bei der Beurteilung der Ergebnisse zu beachten.

Die DNA Isolierung hat bei allen Teilnehmern gute Ergebnisse gebracht. Die Ergebnisse waren vor allem innerhalb der Proben der einzelnen Labore, aber auch zwischen den verschiedenen Laboren sehr homogen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt besser photometrisch, bei der Konzentrationsabschätzung durch Agarosegelelektrophorese ist darauf zu achten, das Gel nicht zu überladen. In diesem Fall kommt es zu einer Unterbestimmung der DNA Konzentration und einer möglichen Inhibition der PCR durch zu hohe DNA Konzentration.

Die Kontroll PCR mit dem 18S-System hat in allen Fällen funktioniert. Sie ist eine Methode, die allen Fällen anwendbar ist.

Beim Tiermehlnachweis sind teilweise Probleme aufgetreten. Da es beim aliquotieren der Primer in unserem Labor zu einer teilweisen Kontamination der Primer gekommen ist, waren in einigen Laboren auch die Negativkontrollen positiv.

Die Ergebnisse zeigen aber, dass ohne Optimierung der PCR Bedingungen in den einzelnen Laboren, ein Nachweis von 0,1% Tiermehl in Mischfutter möglich ist. Labore mit großer Erfahrung in der PCR Analytik erreichten auch die 0,01 %. Dieses Ergebnis zeigt, dass wir uns hier im Bereich der unteren Nachweisgrenze bewegen und eine sorgfältige Validierung der Methode im eigenen Labor notwendig ist.

Beim Fischmehlnachweis konnten alle Labore 0,05% Fischmehl in Mischfutter nachweisen. Auch hier zeigte sich, dass die Erfahrung der einzelnen Labore mit PCR Analytik, die Nachweisgrenze nach unten schiebt. Diese Labore konnten auch 0,01% Fischmehl in Mischfutter nachweisen.

Da beim Fischmehlnachweis nur 35 Zyklen verwendet wurden, ist aus dem Ergebnis abzulesen, dass ein Nachweis von noch geringeren Mengen möglich ist.

### ***Zusammenfassung und Ausblick***

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der PCR ein Nachweis von Tier- und Fischmehl in Futtermitteln möglich ist. Die untere Nachweisgrenze liegt bei Tiermehl zwischen 0,05% und 0,01% Tiermehl im Futtermittel, bei Fischmehl unter 0,01% Fischmehl im Futtermittel.

Damit ist die Methode sensitiver als der mikroskopische Nachweis, der eine Nachweisgrenze von 0,1% hat.

Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit, viele Proben parallel zu verarbeiten. Der limitierende Faktor liegt in der Probenvorbereitung (mahlen der Proben), alle weiteren Schritte erlauben ein Verarbeiten von 48 oder 96 Proben. Es kann dann im Mikrotiterplattenformat gearbeitet werden.

Für den Nachweis in der Routineanalytik ist besonders die real-time PCR anzuraten. Die real-time PCR ist die robustere Methode und sie ist durch die Verwendung einer spezifischen Sonde sicherer.

Es werden keine falsch positiven Resultate geliefert, wenn bei der PCR Nebenprodukte entstehen. Sie entspricht einer klassischen PCR mit Auftrennung der Produkte in einem Agarosegel, anschließendem Southernplot und Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Verringerung des Kontaminationsrisikos, da die Reaktionsgefäße nach der Reaktion nicht mehr geöffnet werden müssen.

Die real-time PCR liefert semi-quantitative Ergebnisse und lässt sich in eine quantitative Methode umwandeln, wenn Standardreferenzmaterialien zur Verfügung stehen.

Die Methoden sind so weit entwickelt, dass sie von Untersuchungslaboratorien übernommen und nach Validierung zur Untersuchung von Futtermitteln eingesetzt werden können.

Da es europaweite Bestrebungen gibt, neue amtliche Methoden zum Nachweis von Tiermehl in Futtermitteln zu etablieren, wird vorgeschlagen, mit Unterstützung des Ministeriums, an das JRC in Ispra heranzutreten, um einen Laborvergleichstest und eine Validierung im europäischen Rahmen anzustreben.

## **Anhang 1: Laborvergleichstest Arbeitsvorschrift**

# **Ringversuch**

zum Nachweis von Tier- und Fischmehl in Futtermitteln durch

Nachweis von

DNA mit PCR



# 1. EINLEITUNG

Laut Entscheidung 2000/766/EG des EU-Rates vom 4. Dezember 2000 über Schutzmaßnahmen bezüglich übertragbarer spongioformen Enzephalopathien ist die Verfütterung von verarbeiteten tierischen Proteinen EU-weit verboten. Das Verbot gilt nicht für die Verfütterung von Fischmehl an Nichtwiederkäuer.

Die Entscheidung wurde durch das Bundesgesetz, BGBl.I Nr. 143/2000, und BGBl.II Nr. 6/2001 umgesetzt und gilt seit 01.01.2001. Das erweitert das bereits seit 1990 bestehende Verbot der Verfütterung von Eiweißfuttermitteln tierischer Herkunft an Wiederkäuer.

Zur Überwachung ist ein schnelles, zuverlässiges und sensitives Testsystem mit einer Nachweisgrenze für Tier- und Fischmehl von 0.1 % notwendig.

Im Ringversuch soll der Nachweis von Tiermehl bzw. Fischmehl in Futtermittel durch den Nachweis der DNA mit PCR geführt werden.

Hierzu wird

- DNA aus Futtermitteln isoliert und
- in einer anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einem geeigneten Primerpaar eine für Tier- bzw. Fischmehl spezifische Sequenz amplifiziert. Als Zielsequenz für die PCR wurden Bereiche der DNA gewählt, die innerhalb der relevanten Tiere kaum Unterschiede aufweisen, aber zu Sequenzen aus Fischen und Pflanzen ausreichende Unterschiede zeigen und so eine Unterscheidung erlauben. Das gleiche gilt für die Zielsequenz zum Nachweis von Fischmehl.
- Die PCR-Produkte werden anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und mittels Längenstandards auf die zu erwartenden Produktgrößen überprüft.

Als Zielsequenz für die Detektion von Tier- und Fischmehl wurde der variable Bereich der 18S-rRNA gewählt. Um im Fischmehl die unterschiedlichen Fischarten zu erfassen, besteht der Reverse-Primer 18S-Fisch-R1/R2/R3 aus einer Mischung aus 3 verschiedenen Primern, wobei der erste ausgehend von der Kabeljau-DNA-Sequenz, der zweite ausgehend von der Hering-DNA-Sequenz und der dritte ausgehend von der Fischmehl-DNA-Sequenz designt wurde.

Um die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA zu überprüfen und eine mögliche Inhibition der PCR auszuschließen, wurde im hoch konservierten Bereich der 18S rRNA ein Amplifikationskontrollsystem entwickelt. Mit diesem System (18S-Uni-F/18S-Uni-R) lassen sich alle Eukaryonten, also alle Tiere, Vögel, Fische und Pflanzen erfassen. Mit diesem System wird parallel zu den spezifischen Tiermehl- bzw. Fischmehlansätzen eine PCR durchgeführt.

## 2. Dokumentation der Ergebnisse

Es wird darum gebeten, die Dokumentationen der zwei Bestimmungen (Nachweis von Tiermehl und Nachweis von Fischmehl in Futtermittel) zusammen mit dem Ergebnisformular **bis 15. Oktober 2002**

an

Technische Universität Graz  
Institut für Lebensmittelchemie und –technologie  
Dr. Ursula Mülleider  
Petersgasse 12/II  
A-8010 Graz

Fax: 03 16-873-6971

Email: [ursula.muellerder@tugraz.at](mailto:ursula.muellerder@tugraz.at)

zu schicken. Bei beiden Nachweisen wird um die Zusendung der Fotos der gefärbten Gele gebeten.

Die PCR-Proben sind wenn möglich wie folgt auf das Gel aufzutragen:

Tasche 1:	Längenstandard	Tasche 8:	Probe 4
Tasche 2:	Positivkontrolle	Tasche 9:	Probe 5
Tasche 3:	Negativkontrolle	Tasche 10:	Probe 6
Tasche 4:	Leertasche	Tasche 11:	Leertasche
Tasche 5:	Probe 1	Tasche 12:	Wasserkontrolle
Tasche 6:	Probe 2	Tasche 13:	Längenstandard
Tasche 7:	Probe 3		

### 3. Zur Verfügung gestellte Materialien

- Komponenten aus dem Wizard Kit™
- Primerpaar 18S-Tier-F und 18S-Tier-R1 (100 µmol/l), 10 µl
- Primerpaar 18S-Fisch-F und 18S-Fisch-R1/R2/R3 (100 µmol/l), 10 µl
- Primerpaar 18S-Uni-F und 18S-Uni-R (100 µmol/l), 10 µl
- Jeweils 6 codierte Proben und eine Positivprobe für Fischmehl (**1-6 F** und **+ F**) und für Tiermehl (**1-6 T** und **+ T**)
- 1 Negativprobe (-), die für beide Systeme eingesetzt wird

### 4. Chemikalien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Chemikalien zu verwenden, mit denen weitgehend steril gearbeitet werden muss. Das verwendete Wasser muss bidestilliert oder von vergleichbarer Qualität und autoklaviert sein. Soweit nicht anders angegeben, ist unter „Lösung“ eine wässrige Lösung zu verstehen.

#### 4.1. DNA Extraktion mit Hilfe des Wizard Kits™ (Promega)

TNE-Puffer:	10 mmol/l	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	pH = 8.0
	150 mmol/l	Natriumchlorid	
	2 mmol/l	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	pH = 8.0
	1 %	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	

Guanidinhydrochlorid	5 mol/l
Proteinase K	20 mg/ml
RNAse A	10 mg/ml
Chloroform	
Isopropanol	

TE-Puffer	10 mmol/l	Tris	
	1 mmol/l	EDTA	pH = 8.0

#### 4.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

**Hinweis: Die für die PCR erforderlichen Reaktionslösungen werden i.a. aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.**

Desoxynukleosid-triphosphat (dNTP)-Lösung, enthaltend dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils c = 2.5 mmol/l.

PCR-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> (10fach)

MgCl<sub>2</sub>-Lösung (c = 25 mmol/l)

AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 5 U/ml

**Hinweis:** Alle Primer wurden in einer Konzentration von 100 µmol/l mitgeliefert. Um eventuell am Deckel haftende Primerlösung zu entfernen, müssen die Eppendorf Gefäße vor dem Verdünnungsschritt noch kurz zentrifugiert werden. Danach wird die Primerlösung mit 190 µl H<sub>2</sub>O verdünnt (1:20 = 5 µmol/l).

Primer 18S-Tier F, c = 5 µmol/l:  
5'-GGT CGC TCG CTC CTC TCC-3'

Primer 18S-Tier-R1, c = 5 µmol/l:  
5'-GGT CAG CGC CCG TCG-3'

**Hinweis:** Das Primerpaar 18S-Tier-F/18S-Tier-R1 ist spezifisch für Tiermehl-DNA. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 72 bp.

Primer 18S-Fisch-F, c = 5 µmol/l:  
5'-CTC ATT AAA TCA GTT ATG GTT CCT TTG A-3'

Primer 18S-Fisch-R1/2/3, c = 5 µmol/l für jeden Reverse-Primer  
Mischung aus:

- 18S-Fisch-R1  
5'-GCA TCC CCG GAG GTC A-3'
- 18S-Fisch-R2  
5'- CGT GAA GGG GGC CAG TCA-3'
- 18S-Fisch-R3  
5'- CGA GAG GGG CCG AGT CA-3'

**Hinweis:** Das Primerpaar 18S-Fisch-F/18S-Fisch-R1/R2/R3 ist spezifisch für Fischmehl-DNA. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 107 bp.

Primer: 18S-Uni-F, c = 5 µmol/l  
5'-GTA ATT TGC GCG CCT GCT-3'

Primer: 18S-Uni-R, c = 5 µmol/l  
5'-GTT CGA TTC CGG AGA GGG A-3'

**Hinweis:** Das Primerpaar 18S-Uni-F/18S-Uni-R dient zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA und erfasst alle Eukaryonten. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 70 bp.

### 4.3. DNA-Gelelektrophorese

Agarose, für die DNA-Elektrophorese geeignet

100 bp DNA-Längenstandard (oder ähnliche Fragmentgröße)

Elektrophoresepuffer:

TAE-Puffer: 40 mmol/l Tris-Acetat  
1 mmol/l EDTA

**Hinweis: Der TAE-Puffer wird als konzentrierte Stammlösung (z.B. 50fach) angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Bei Präzipitatbildung wird der Puffer verworfen.**

Proben-Auftragslösung:

40 % Saccharose  
1 mmol/l EDTA, pH 7.2  
0.05 % Bromphenolblau  
0.05 % Xylencyanol

alternativ Ethidiumbromidlösung, SybrGreen oder Gelstar

## **5. Geräte und Hilfsmittel**

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden und frei von DNA sein.

### **Hinweis:**

**Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR-Analytik und der daraus resultierenden Gefahr von DNA-Kontamination ist die Verwendung von aerosol-geschützten Filterspitzen obligatorisch.**

Über die laborübliche Ausstattung hinaus ist die folgende Ausrüstung notwendig:

### **5.1. DNA Extraktion**

Geeignete Reaktionsgefäße

Zentrifuge für Mikroliterreaktionsgefäße

Thermomixer

Vakuumabsaugvorrichtung (falls diese Vorrichtung nicht zur Verfügung steht, kann die Extraktion auch mit 3 ml Spritzen durchgeführt werden – siehe Seite 3 der mitgeschickten Arbeitsvorschrift von Promega)

UV-Photometer

### **5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

geeignete PCR-Gefäße

Thermocycler

### **5.3. DNA-Gelelektrophorese**

Apparatur für eine horizontale Gelelektrophorese, bestehend aus Gelelektrophoresekammer mit Zubehör und Netzgerät

UV-Lampe

Dokumentationsmöglichkeit, z.B. Digitalkamera

## 6. Durchführung

### 6.1. DNA-Extraktion mit Hilfe des Wizard Kits™ (Promega)

Von jeder Probe werden zwei parallele Extraktionen durchgeführt.

- 200 mg Probe in ein Eppendorf Gefäß einwiegen
- + 860 µl TNE-Puffer
- + 100 µl Guanidinhydrochlorid (5 mol/l)
- + 40 µl Proteinase K (20 mg/ml)
- Proben vortexen und mind. 5 h, oder über Nacht, im Thermomixer bei 56 °C, 1000 rpm inkubieren
- + 400 µl Chloroform, 30 sec vortexen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- 500 µl des Überstandes bzw. der wässrigen Phase (oben) in ein frisches Eppendorf Gefäß geben
- + 5 µl RNase (10 mg/ml), mischen und 5 min bei 56 °C inkubieren
- + 1ml Wizard Resin (vorher gut schütteln!) und durch Kippen der Eppendorf Gefäße mischen

**Hinweis:** Falls keine geeignete Vakuumabsaugvorrichtung zur Verfügung steht, kann die DNA-Extraktion auch mit 3 ml Spritzen durchgeführt werden. Die Arbeitsvorschrift von Promega für die weitere Vorgehensweise liegt bei (Seite 3).

- Gemisch auf Säulchen auftragen und mit Vakuum die Flüssigkeit absaugen
- Mit 2 ml Isopropanol waschen
- 30 sec Vakuum anlegen (nicht länger!)
- Filtersäulchen in ein Eppendorf Gefäß geben und 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säulchen in ein neues Eppendorf Gefäß geben, 50 µl 70-72 °C warmen 1 x TE-Puffer auf das Säulchen geben, 1 min stehen lassen und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- DNA-Lösung bei -20 °C aufbewahren

- Optional: Messung der Konzentration und Überprüfung der Reinheit der extrahierten DNA:

Die Konzentration eines DNA-Aliquots wird im UV-Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Konzentration in  $\mu\text{g/ml} = 50 \times \text{Optische Dichte} \times \text{Verdünnungsfaktor}$  des gemessenen Aliquots). Zur Überprüfung der Reinheit wird die Probe zusätzlich bei 280 nm gemessen. Der Quotient des Wertes der Optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm sollte bei ungefähr 1.8 liegen.

**Anmerkung: Die DNA-Konzentration kann auch gelelektrophoretisch oder mit einem anderen geeigneten Verfahren gemessen werden.**

## 6.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

**Hinweise: Die Methodenbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz von 25  $\mu\text{l}$ . Die Reagenzien werden während der Vorbereitung des PCR-Ansatzes im Eisbad aufbewahrt.**

PCR-Reaktionsgemisch: Folgende Lösungen sind **pro Ansatz** (25  $\mu\text{l}$ ) als Mastermix für den **Nachweis von Tiermehl** zu mischen:

H <sub>2</sub> O	14.4 $\mu\text{l}$
10 x PCR Puffer	2.5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	2.0 $\mu\text{l}$
dNTPs (jeweils 2.5 mmol/l)	2.0 $\mu\text{l}$
18S-Tier-F (5 $\mu\text{mol/l}$ )	1.5 $\mu\text{l}$
18S-Tier-R1 (5 $\mu\text{mol/l}$ )	1.5 $\mu\text{l}$
AmpliTag Gold (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.1 $\mu\text{l}$
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>24.0 <math>\mu\text{l}</math></b>

Folgende Lösungen sind **pro Ansatz** (25  $\mu\text{l}$ ) als Mastermix für den **Nachweis von Fischmehl** zu mischen:

H <sub>2</sub> O	14.4 $\mu\text{l}$
10 x PCR Puffer	2.5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	2.0 $\mu\text{l}$
dNTPs (jeweils 2.5 mmol/l)	2.0 $\mu\text{l}$
18S-Fisch-F (5 $\mu\text{mol/l}$ )	1.5 $\mu\text{l}$
18S-Fisch-R1/R2/R3 (5 $\mu\text{mol/l}$ )	1.5 $\mu\text{l}$
AmpliTag Gold (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.1 $\mu\text{l}$
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>24.0 <math>\mu\text{l}</math></b>



Folgende Lösungen sind **pro Ansatz** (25 µl) als Mastermix für die **universelle Amplifikationskontrolle** zu mischen:

H <sub>2</sub> O	14.4 µl
10 x PCR Puffer	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	2.0 µl
dNTPs (jeweils 2.5 mmol/l)	2.0 µl
18S-Uni-F (5 µmol/l)	1.5 µl
18S-Uni-R (5 µmol/l)	1.5 µl
AmpliTaq Gold (5 U/µl)	0.1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>24.0 µl</b>

- Herstellung des Mastermixes für **n+1** Reaktionen
- Den jeweiligen Mastermix mischen, kurz zentrifugieren und in die einzelnen Ansätze aufteilen. (24 µl Mastermix + 1 µl Template)
- In den Kontrollansatz (PCR ohne DNA-Template) 1 µl Wasser anstelle des verdünnten DNA-Extraktes pipettieren.
- Die DNA-Extrakte werden basierend auf der DNA-Konzentrationsbestimmung auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt.
- Von diesen Verdünnungen wird jeweils 1 µl in die PCR eingesetzt.
- Die Reaktionsansätze in den Thermocycler überführen und das Temperatur-Zeit-Programm starten.

Für die vorliegende PCR hat sich unter Einsatz des Thermocyclers „Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700“ der Firma PE Applied Biosystems das folgende Programm bewährt. Die Denaturierungszeit berücksichtigt die Verwendung der AmpliTaq Gold DNA Polymerase.

**Hinweis:** Bei Verwendung eines anderen Thermocyclers und/oder einer anderen Polymerase sind die PCR-Parameter möglicherweise zu optimieren.

#### Primersystem 18S-Tier-F/18S-Tier-R1

Denaturierung der DNA	5	min	bei	95 °C
<b>40maliger Durchlauf des folgenden Zyklus.....</b>	<b>30</b>	<b>sec</b>	<b>bei</b>	<b>95 °C</b>
.....	30	sec	bei	60 °C
.....	30	sec	bei	72 °C
abschließende Elongation	7	min	bei	72 °C
Halten	∞		bei	4 °C

### Primersystem 18S-Fisch-F/18S-Fisch-R1/R2/R3

Denaturierung der DNA	5	min	bei	95 °C
35maliger Durchlauf des folgenden Zyklus.....	30	sec	bei	95 °C
.....	30	sec	bei	60 °C
.....	30	sec	bei	72 °C
abschließende Elongation	7	min	bei	72 °C
Halten	∞		bei	4 °C

### Primersystem 18S-Uni-F/18S-Uni-R

Denaturierung der DNA	5	min	bei	95 °C
30maliger Durchlauf des folgenden Zyklus.....	30	sec	bei	95 °C
.....	30	sec	bei	60 °C
.....	30	sec	bei	72 °C
abschließende Elongation	7	min	bei	72 °C
Halten	∞		bei	4 °C

### 6.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt in einem 2%igem Agarosegel. Zu den 25 µl Reaktionsgemisch werden 5 µl Proben-Auftragslösung pipettiert. Von dieser Mischung werden 12 µl auf das Gel aufgetragen (Auftragungsschema siehe Punkt 2). Die Färbung der Banden kann alternativ zu Ethidiumbromid mit Gelstar oder SybrGreen durchgeführt werden. Das Ergebnis soll dokumentiert werden.

## 7. Auswertung

Die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA gilt als nachgewiesen und eine mögliche Inhibition der PCR kann ausgeschlossen werden, wenn mit dem Primerpaar 18S-Uni-F/18S-Uni-R ein PCR-Produkt mit einer Größe von **70 bp** erzielt wird.

Das Vorhandensein von **Tiermehl** im Futtermittel gilt als nachgewiesen, wenn mit dem Primerpaar 18S-Tier-F/18S-Tier-R1 ein PCR-Produkt einer Größe von **72 bp** erzielt wird. Zusätzlich darf weder im PCR-Kontrollansatz ohne DNA-Zusatz noch in dem Kontrollansatz mit der Negativprobe ein für Tiermehl spezifisches PCR-Produkt entstehen.

Das Vorhandensein von **Fischmehl** im Futtermittel gilt als nachgewiesen, wenn mit dem Primerpaar 18S-Fisch-F/18S-Fisch-R1/R2/R3 ein PCR-Produkt einer Größe von **107 bp** erzielt wird. Zusätzlich darf weder im PCR-Kontrollansatz ohne DNA-Zusatz noch in dem Kontrollansatz mit der Negativprobe ein für Fischmehl spezifisches PCR-Produkt entstehen.

## Anhang 2: Literatur

- Entscheidung des Rates 2000/766/EG; BGBl I Nr. 143/2000; BGBl II Nr. 6/2001. Verbot der Verfütterung von Tiermehl
- Burgener, M., and P. Hubner. (1998) Mitochondrial DNA Enrichment for Species Identification and Evolutionary Analysis. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 207: 261-263.
- Buntjer, J. B., J. A. Lenstra, and N. Haagsma. (1995) Rapid species identification in meat by using satellite DNA probes. *Z Lebensm Unters Forsch* 201: 577-82.
- Buntjer, J. B., I. A. Hoff, and J. A. Lenstra. (1997) Artiodactyl interspersed DNA repeats in cetacean genomes. *J Mol Evol* 45: 66-9.
- Buntjer, J. B., I. J. Nijman, C. Zijlstra, and J. A. Lenstra. (1998) A satellite DNA element specific for roe deer (*Capreolus capreolus*). *Chromosoma* 107: 1-5.
- Cespedes, A., T. Garcia, E. Carrera, I. Gonzalez, B. Sanz, P. E. Hernandez, and R. Martin. (1998) Identification of Flatfish Species Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification and Restriction Analysis of the Cytochrome B Gene. *J.FOOD SCI.* 63: 206-209.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15
- Heindel, U., M. Scheider, and K. Rubach. (1998) Fish Species Identification by DNA Fingerprinting PCR RFLP Analysis. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 94: 20-23.
- Lenstra, J. A. (1992) Bovine sequences in rodent DNA. *Nucleic Acids Res* 20: 2892.
- Lin J.-J., Kuo J., A new reagent for simple Isolation of Plant Genomic DNA (1998) *Focus*, 20: 46-48
- Liu, J. S., and C. L. Schardl. (1994) A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Mol Biol* 26: 775-8.
- Meyer, R., U. Candrian, and J. Luthy. (1994) Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J.AOAC.INT.* 77: 617-622.
- Meyer, R., C. Hofelein, J. Luthy, and U. Candrian. (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J.AOAC.INT.* 78: 1542-1551.
- Momcilovic D., Rasooly A. (2000) Detection and Analysis of animal materials in food and feed. *J. Food Prot.*, 63: 1602-1609
- Plath, A., I. Krause, and R. Einspanier. (1997) Species Identification in Daily Products by 3 Different DNA Based Techniques. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 205: 437-441.
- Rehbein, H., I. M. Mackie, S. Pryde, C. Gonzalesotelo, R. Perezmartin, J. Quinteiro, and M. Reymendez. (1998) Comparison of Different Methods to Produce Single Strand DNA for Identification of Canned Tuna by Single Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Electrophoresis* 19: 1381-1384.
- Straub, J. A., C. Hertel, and W. P. Hammes. 1999. The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. *EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY* 210: 62-67.
- Tartaglia M., Saule E., Pestalozza S., Morelli L., Antonucci G., Battaglia P.A. (1998) Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Ruminant Feeds: A Molecular Approach to Test for the Presence of Bovine-Derived Materials. *J. Food Prot.*, 61, 513-518
- Von Holst C., Tartaglia M., Macri A., Lipp M., Anklam E. (1998) Method Description for the Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Animal Feedingstuff of Plant Origin – Basis for a Validation Study. Joint Research Centre, European Commission EUR 18096 EN
- Wang R.F., Myers M.J., Campell W., Cao W.W., Paine D., Cerniglia C.E. (2000) A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. *Mol.Cell Probes*, 14: 1-5