

Aus dem Institut für klinische Chemie
(Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Junker)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ENTWICKLUNG EINER MULTIPLEX-PCR
ZUM NACHWEIS AUSGEWÄHLTER EUROPÄISCHER
NUTZTIERE IN DER FORENSISCHEN GENETIK**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
VERA HANNA HESSLING

aus Bocholt

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Junker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Almut Nebel
Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2017
zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.06.2017

gez.:

Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Forensische Genetik	1
1.2 Desoxyribonukleinsäure	2
1.2.1 Aufbau der nukleären DNA	2
1.2.2 Short Tandem Repeats	4
1.3 Der Nachweis von DNA tierischen Ursprungs in der Forensischen Genetik	4
1.3.1 Praktische Relevanz der Speziesidentifikation	4
1.3.2 Methoden zur Speziesidentifizierung	5
1.3.2.1 Serologische und immunologische Methoden	6
1.3.2.2 Genetische Nachweismethoden	8
2 Zielsetzung	10
3 Material und Methoden	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Ausgewählte Tierarten.....	12
3.1.2 Probenmaterial	12
3.1.2.1 Kontrollproben	12
3.1.2.2 Lebensmittel.....	13
3.1.2.3 Tierfutter	14
3.1.2.4 Mageninhalt	14
3.1.2.5 Leder	15
3.1.2.6 Proben aus der forensischen Praxis.....	15
3.2 DNA-Extraktion	16
3.2.1 Semiautomatische DNA-Extraktion	16
3.2.2 Manuelle DNA-Extraktion	19
3.3 Überprüfung der DNA-Qualität und -Quantität	20
3.3.1 Agarosegelelektrophorese.....	20
3.3.2 Densitometrische Auswertung.....	22
3.4 Speziesspezifische STR-Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	23
3.4.1 Prinzip der Polymerasen-Kettenreaktion.....	23
3.4.2 Auswahl speziesspezifischer Primer.....	24
3.4.3 Singleplex –PCR.....	27

3.4.4 Multiplex-PCR.....	28
3.4.4.1 „Meatplex“	28
3.4.4.2 „Horse-Plex“	30
3.5. Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese.....	31
3.5.1 Prinzip der Kapillarelektrophorese	31
3.5.2 Durchführung.....	31
3.5.3 Auswertung.....	32
4 Ergebnisse	36
4.1 Auswahl der untersuchten Tierspezies	36
4.2 Einfluss der Extraktionsmethode.....	36
4.2.1 DNA-Quantität und -Qualität	36
4.2.2 Aufwand und Kosten	38
4.3 Speziesidentifizierung mittels PCR.....	39
4.3.1 Spezifität der Multiplex-PCR	39
4.3.2 Nachweisgrenzen der Multiplex-PCR	43
4.3.3 Optimierung der Multiplex-PCR	45
4.3.3.1 PCR-Bedingungen	45
4.3.3.2 Halbierung des PCR-Ansatzes	46
4.3.4 Überprüfung der DNA-Proben auf PCR-Inhibitoren.....	47
4.4 Einsatz der etablierten Methode	48
4.4.1 Speziesbestimmung aus Fleisch- und Wurstwaren.....	49
4.4.1.1 Verifizierung durch die pferdespezifische Analyse: die „Horse-Plex“-PCR	53
4.4.1.2 Bestimmung des Mischungsverhältnisses in Fleischwaren	55
4.4.2 Speziesbestimmung in Tierfutter	58
4.4.3 Tierische Speisereste im Mageninhalt	59
4.4.4 Forensische Anwendungsbeispiele	61
4.4.4.1 Organfund im Wald.....	61
4.4.4.2 Bolus eines Todesopfers durch Verschlucken	62

5 Diskussion	63
5.1 Stellenwert der ausgewählten Spezies	63
5.2 Einflussfaktoren auf die Speziesanalyse des Probenmaterials	64
5.2.1 Für Kontrollproben geeignetes Gewebe	64
5.2.2 Einfluss der Lebensmittelverarbeitung auf die Anwendung der Multiplex-PCR	65
5.2.3 Anwendung der Multiplex-PCR auf Tierfutterproben.....	65
5.2.4 Einfluss des Magenmyleus auf die Speziesidentifizierung	66
5.2.5 Lederprobenspezifizierung	67
5.2.6 Forensische Anwendung.....	68
5.3 Qualitative und quantitative Unterschiede des Probenmaterials	68
5.3.1 Methoden der Quantifizierung.....	68
5.3.2 Einfluss der Gewebeart und der Verarbeitung.....	70
5.3.3 Einfluss der Extraktionsmethode	71
5.4 Nachweis europäischer Nutztiere mittels Multiplex-PCR	71
5.4.1 PCR-Inhibitoren.....	71
5.4.2 Primerspezifität.....	72
5.4.3 Die Methodik im Vergleich	73
5.4.4 Anwendungsspektrum	74
6 Zusammenfassung.....	75
7 Ausblick.....	77
Literaturverzeichnis.....	79
Artikel- und Buchquellen	79
Internetquellen.....	83
Anhang	85
Anhang A: Abkürzungsverzeichnis.....	85
Anhang B: Abbildungsverzeichnis.....	87
Anhang C: Tabellenverzeichnis	93

Anhang D: Weitere Abbildungen und Tabellen.....	95
D.1 Extraktionsmethoden im Vergleich	95
D.2 Speziesnachweis mittels entwickelter Multiplex-PCR	96
D.3 Anwendungsbeispiele	102
D.3.1 Untersuchung von Fleischproben von Frischetheken	102
D.3.2 Untersuchung von Fleischproben aus Fertiggerichten	108
D.3.3 Mageninhaltsuntersuchungen.....	113
Anhang E: Geräteverzeichnis	125
Anhang F: Softwareverzeichnis	126
Angang G: Verbrauchsmaterialien	127
Danksagung.....	129
Lebenslauf.....	130

1 Einleitung

1.1 Forensische Genetik

Als Teilgebiet der Rechtsmedizin gewinnt die Forensische Genetik immer stärker an Bedeutung. Mit Hilfe sich ständig weiterentwickelnder Methoden zur Untersuchung von Erbinformationen können vielzählige forensische Fragestellungen aufgeklärt werden.

Grundlage für diese Entwicklung bildete die Beschreibung hochvariabler, nicht genspezifischer Loci im menschlichen Genom durch Wyman und White im Jahre 1980 (Wyman und White, 1980). Diese interindividuellen Unterschiede der Basenabfolgen derselben Genabschnitte führten in den folgenden Jahren zur Entdeckung des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) (Jeffreys, Wilson et al., 1985). Alec Jeffreys definierte darauf aufbauend im Jahre 1985 den Begriff des „genetischen Fingerabdrucks“ (Jeffreys, Brookfield et al., 1985).

Durch gelelektrophoretische Auswertung polymorpher Genloci konnte die Identifikation oder der Ausschluss von Täterschaften bei forensischen Fragestellungen erfolgen (Gill et al., 1985). Bereits im Jahre 1987 wurde die RFLP-Analyse zur Aufklärung einer Serie von Sexual- und Tötungsdelikten in Leicester erstmals erfolgreich angewendet (Der Spiegel, 1987).

Diese Entdeckung revolutionierte, gemeinsam mit der im darauffolgenden Jahr von Mullis entdeckten Methode zur Vervielfältigung minimaler DNA-Spuren in auswertbare Menge mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: PCR) (Mullis und Faloona, 1987), die Forensische Genetik (Jeffreys, Brookfield et al., 1985).

Seitdem beschäftigt sich diese mit der Identifizierung von Individuen, die beispielsweise durch mechanische Einwirkung, wie bei Bombenanschlägen oder Naturkatastrophen, durch Erdbeben oder Verkehrsunfälle morphologisch nicht mehr zugeordnet werden können. Auch die Identifikation fäulnisbedingt veränderter Leichen ist ein häufiges forensisches Problem, welches mittels Abgleich genetischer Profile aufgeklärt werden kann (Schwark, Heinrich und von Wurmb-Schwark, 2011). Biologische Proben vielfältiger Art, seien es Organfunde ungeklärter Herkunft, Hautschuppen, Haare, Blut- oder Schleimhautzellen am Tatort, können einem Individuum wie dem mutmaßlichen Täter zugeordnet werden und wichtige Hinweise auf den Tathergang bergen.

Ein weiterer Aspekt genetisch forensischer Untersuchungen sind Abstammungsanalysen, die häufig zur Bestätigung verschiedener Herkunftsszenarien durchgeführt werden.

Dabei werden in der Routine zum großen Teil Proben humanen Ursprungs untersucht. Dennoch rücken Untersuchungsmaterialien tierischer Genese vermehrt in den Fokus forensischer Fragestellungen, wodurch die Analyse tierischen Materials immer mehr an Bedeutung gewinnt. Dieser Aspekt steht im Vordergrund der vorliegenden Arbeit und wird im Verlauf näher betrachtet.

1.2 Desoxyribonukleinsäure

Die Desoxyribonukleinsäure, aus dem Englischen deoxyribonucleic acid (kurz: DNA), befindet sich im Zellkern einer jeden kernhaltigen Körperzelle. Jede Zelle enthält identische DNA-Kopien, wobei die Expression der Proteine sich nach der spezifischen Funktion und dem Bedarf der entsprechenden Zelle richtet.

1.2.1 Aufbau der nukleären DNA

Die DNA ist der Träger der Erbinformationen, die von einer Generation auf die nächste Folgegeneration übertragen wird. Im Zellkern von Säugetieren liegt die DNA in Form geschlechtsunabhängiger Autosomen und geschlechtsspezifischer Gonosomen vor.

Seitdem Richard Roberts und Philip Sharp in den 1970er Jahren den diskontinuierlichen Aufbau des Erbguts erkannt hatten - wofür sie 1993 den Nobelpreis für Medizin erlangten (Nobel Media AB, 2014) - wird zwischen den kodierenden DNA-Sequenzen, den Exons, und den nicht-kodierenden Bereichen, den Introns, unterschieden (Hoefler, 1993). Untersuchungen des Humangenomprojektes führten zur Erkenntnis, dass das menschliche Genom zu weniger als zwei Prozent aus kodierenden und wenig variierenden Exons besteht, die den Phänotyp determinieren (Venter et al., 2001). Der übrige Anteil des Genoms ist für die Merkmalsausprägung kaum von Relevanz.

Auf molekularer Ebene betrachtet, bildet die DNA eine rechtsgängig verdrillte Doppelhelix, die aus Nukleotiden zusammengesetzt ist (Watson und Crick, 1953). Jedes Nukleotid besteht dabei aus einem Zuckermolekül (Desoxyribose) und einer Phosphatgruppe, die durch eine Esterbindung miteinander verknüpft sind. Der dritte Bestandteil des Nukleotids ist eine Purin- oder eine Pyrimidinbase, die durch eine N-glykosidische Bindung (Stickstoffbrücke) an das erste Kohlenstoffatom der Desoxyribose bindet. Die Einheit aus Pentose und Base wird als Nukleosid bezeichnet. Phosphodiesterbindungen verbinden die Nukleotide untereinander,

indem die Hydroxygruppe des Zuckers an das Phosphat des nebenliegenden Nukleotids bindet.

Zwei kovalent stabilisierte Polynukleotidstränge verbinden sich durch nicht-kovalente Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren komplementären Nukleinbasen zu einer antiparallelen Doppelhelix. Das 5'-Phosphatende und 3'-Hydroxylende stehen also in entgegengesetzter Orientierung zueinander. Dabei verhalten sich die Basen Adenin (A) und Thymin (T) sowie Guanin (G) und Cytosin (C) komplementär zueinander und bilden je zwei oder drei Wasserstoffbrückenbindungen aus (Stachman und Read, 2005).

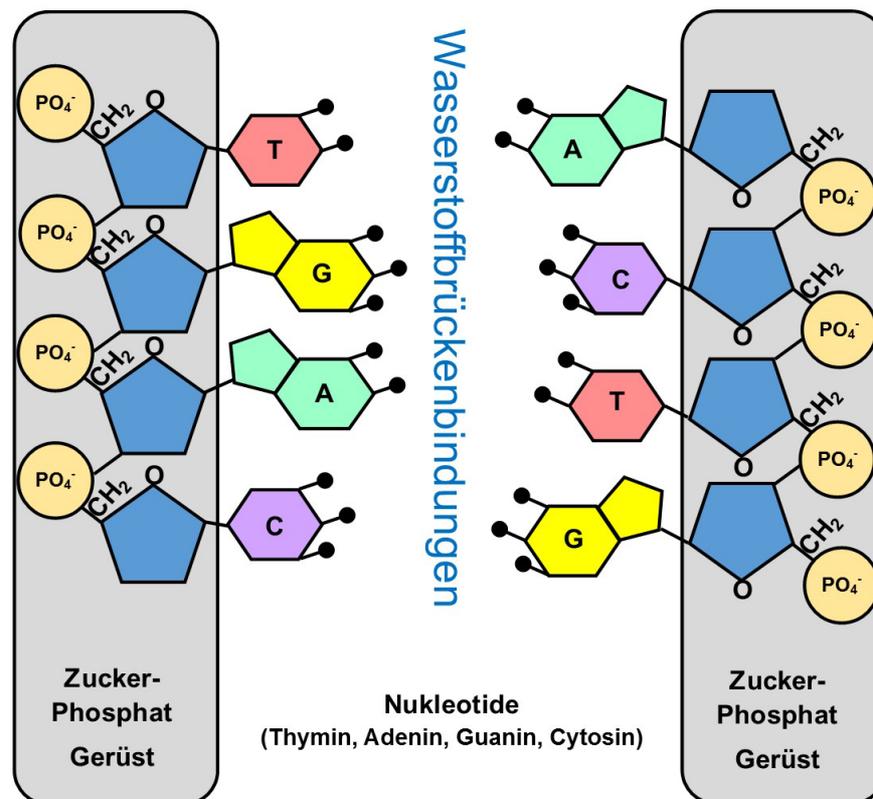


Abbildung 1: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der DNA.

Dabei bildet die kovalente Verkettung von Zuckermolekülen und Phosphatresten das Grundgerüst. Die am Zucker gebundenen Basen sind untereinander durch nicht-kovalente Bindungen verknüpft und bilden so einen Doppelstrang aus. (aus Modrow, 2014)

1.2.2 Short Tandem Repeats

Die Short Tandem Repeats (STRs), auch Mikrosatelliten genannt, sind aus 2-6 Basenpaaren bestehende, annähernd repetitive Sequenzen, die in den nicht-kodierenden Bereichen der DNA lokalisiert sind. Sie machen nur etwa zehn Prozent des menschlichen Genoms aus (Benson, 1999). Die sich wiederholende Basenabfolge führt zu einer spezifischen Sekundärstruktur der DNA, welche die Replikation, Reparatur und Rekombination stören können (Sinden und Wells, 1992). Dadurch weisen diese Loci eine besondere Anfälligkeit gegenüber Mutationen auf, was gemeinsam mit ihrer fehlenden phänotypischen Relevanz eine Erklärung für den Längenpolymorphismus und die leichte Variabilität der repetitiven Basensequenz sein kann. Die Anzahl der Motivwiederholungen variiert stark und kann hundertfach vorkommen. Im rechtsmedizinischen Alltag werden diese autosomal und auch gonosomal vererbten Längenpolymorphismen genutzt, indem sie zur Unterscheidung und Identifikation von Individuen eingesetzt werden (Kayser und de Knijff, 2011; Jeffreys, Brookfield et al., 1985). Dabei ist der Träger der entsprechenden Erbinformation homozygot, wenn zwei identische Kopien des Locus vorliegen. Heterozygote Träger besitzen hingegen zwei unterschiedliche Kopien auf je einem homologen Chromosom.

1.3 Der Nachweis von DNA tierischen Ursprungs in der Forensischen Genetik

Die Forensische Genetik beschäftigt sich mit der Analyse biologischer Proben. Dazu gehört nicht nur Material humanen Ursprungs, sondern auch tierischer Genese. Die Identifikation beinhaltenen Spezies kann zur Aufklärung von Straftaten, Versicherungsangelegenheiten oder in der Lebensmittelindustrie einen hohen Stellenwert einnehmen. Die gängigsten Analysemethoden sind in diesem Abschnitt beschrieben.

1.3.1 Praktische Relevanz der Speziesidentifikation

Sir Alec Jeffreys Entdeckung des genetischen Fingerabdrucks mittels der Untersuchung der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen bildet bis heute die Grundlage genetisch forensischer Untersuchungen (Jeffreys, Wilson et al., 1985; Prinz et al., 2007). Derartige Analysen humaner Proben wurden in der rechtsmedizinischen Praxis bis zur Etablierung der STR- und PCR-Methodik routinemäßig zum Zweck der Abstammungsbestimmung sowie der Identifizierung von Tätern oder Opfern verwendet. Dabei kann die Zugehörigkeit der Proben bekannt oder unklar sein.

Werden beispielsweise Proben am Tatort sichergestellt, so kann das Ergebnis der genetischen Untersuchung Auskunft über den möglichen Tathergang geben. Ist die menschliche Herkunft des Materials ausgeschlossen, kann die Identifikation beteiligter tierischer Spezies wichtige Informationen über Hintergründe und in Betracht zu ziehende Parteien bergen. Insbesondere bei Schuld- oder Versicherungsfragen bezüglich Unfällen im Straßenverkehr, bei Gewebefunden oder nicht identifizierbaren verbrannten Material können landwirtschaftliche Nutztiere beteiligt sein. (Müller et al., 1999)

Auch in der Lebensmittelindustrie kann die Kenntnis der Spezies des verarbeiteten Tieres von Interesse sein. Dies ist beispielsweise zur Klärung der Umstände einer Lebensmittelvergiftung oder der Übertragungsform einer Seuche unabdinglich. Insbesondere nach Aufkommen der durch Prionen hervorgerufenen Problematik der Bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) im Jahre 1986 in England, war die wahrheitsgetreue Deklaration von Lebensmitteln oder der Nachweis von Tiermehl und tierischen Fetten in Tierfutter weltweit von großem Interesse (Shinoda et al., 2011).

Von besonders aktueller Bedeutung ist die Aufdeckung vermehrt auftretender Täuschungen der Verbraucher bezüglich des Alters, der Art und der Herkunft des ihnen verkauften Fleisches (Topagrar online, 2014). So kamen beispielsweise im sogenannten „Pferdefleischskandal“, der sich 2013 auf seinem Höhepunkt befand, europäübergreifend falsche Deklarationen von Fleischprodukten an die Öffentlichkeit. Die Aspekte der Verbrauchertäuschung betreffen auch ethische sowie religiöse Glaubensproblematiken. So verbietet beispielsweise die muslimische Religion den Verzehr von Schweinefleisch und für viele Menschen in (Nord-) Europa stellt das Pferd eher ein Haus- als ein für den Verzehr gedachtes Nutztier dar. Nur durch engmaschige Überprüfung der Deklaration fleischhaltiger Produkte sowie mehr Transparenz der Lebensmittelindustrie kann das geminderte Vertrauen der Verbraucher wiedererlangt werden (Der Tagesspiegel, 2013).

1.3.2 Methoden zur Speziesidentifizierung

Es bestehen mehrere etablierte Methoden zur Identifizierung einer Spezies, die jeweils auf unterschiedliche Ansätze beruhen. Die Wichtigsten werden im Folgenden in Kürze beschrieben.

1.3.2.1 Serologische und immunologische Methoden

Die Katalase- sowie die Peroxidaseaktivitätsprüfung des Hämoglobins ermöglichen die Identifizierung einer Probe als Blut (sogenannter Peroxtesmo-Test). Dabei beruht die Katalaseaktivitätsprüfung auf Schaumbildung, die nach Zugabe einer Wasserstoffperoxidlösung durch Sauerstofffreisetzung entsteht. Ein Peroxidaseaktivitätstest ist positiv, wenn die im Hämoglobin enthaltene Peroxidase zugeführtes Wasserstoffperoxid und Benzidin oder Leukomalachit zu einem blauen Endprodukt umwandelt (Forster und Ropohl, 1989; Penning, 2006).

Als weiterführende Methode ermöglicht es beispielsweise der OBTI-Test, den humanen Ursprung des Blutes nachzuweisen oder auszuschließen (Penning, 2006). Das Reagenz des OBTI-Tests enthält rot markierte, durch Immunisierung von beispielsweise Mäusen gewonnene Antikörper gegen humanes Hämoglobin (hHb). Ist in der zugeführten Probe humanes Blut enthalten, so formen sich Immunkomplexe. An dem Teststreifen, auf den an vorgegebener Lokalisation das Proben-Reagenz-Gemisch aufgetragen wird, befindet sich eine Bande mit fixierten Antikörpern gegen hHb und eine weitere Bande fixierter Anti-Maus-Immunglobulin Cs (IgC). Ist humanes Blut im Probenmaterial enthalten, so binden die Immunkomplexe an die anti-hHb-Banden sowie an die anti-Mausantikörper-Banden und treten rötlich in Erscheinung. Ist im Probenmaterial kein menschliches Hämoglobin vorhanden, so binden nur die Anti-IgC-Mausantikörper an die zweite Bande, die somit die Positivkontrolle darstellt. Im letzten geschilderten Falle ist also, bei korrekter Durchführung des Tests, von Probenmaterial tierischer Herkunft auszugehen. (Bluestar Forensics, 2014)

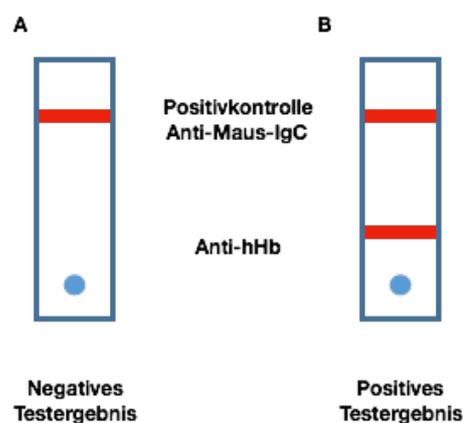


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Nachweises humanen Blutes mittels sogenannten OBTI-Test. A: Auf dem ersten Teststreifen treten Immunkomplexe mit anti-Maus-Antikörpern in Erscheinung, jedoch keine Präzipitate mit Antikörpern gegen hHb. Es liegt kein menschliches Blut vor. B: Auf dem Teststreifen treten beide Banden in Erscheinung. Es handelt sich dementsprechend um menschliches Blut. (Eigene Darstellung)

Die Fragestellung der Spezieszugehörigkeit von tierischen Proben wird häufig proteinbiochemisch behandelt. Zu den geeigneten Methoden gehören Immunassayverfahren wie Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), das sich vom Radioimmunassay (RIA) ableitet, oder die Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony. Beide Verfahren machen sich die Eigenschaft der Agglutination von Antigenen und Antikörpern zu Nutze. Dabei werden Antikörper verwendet, die zu den gesuchten Antigenen, in diesem Falle zu den speziesspezifischen Proteinen, komplementär sind.

Bei dem ELISA werden die Antikörper an einer Trägeroberfläche fixiert. Falls entsprechende Antigene, wie beispielsweise speziesspezifische Epitope, im Untersuchungsmaterial enthalten sind, binden diese und ermöglichen die Bindung des Detektionsantikörpers. Reporterenzyme, die an Detektionsantikörpern gebunden sind, katalysieren einen Farbumschlag bei Zugabe des passenden Substrates. Mit Hilfe photometrischer Messung erlaubt diese Methode, neben der qualitativen Bestimmung auch quantitative Aussagen. (Butler, 2000)

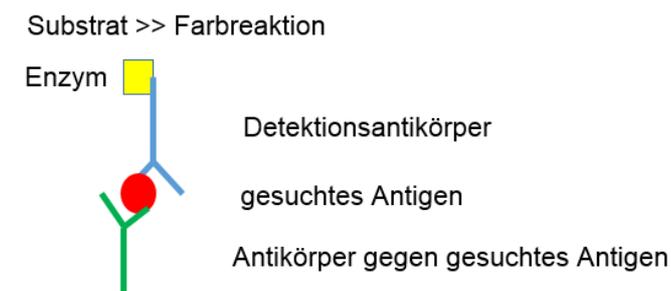


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines ELISAs.

Der Antikörper gegen das gesuchte Antigen ist an der Trägeroberfläche gebunden. Bei Vorhandensein des Antigens bindet dieses am Antikörper. Ein weiterer antigenspezifischer Detektionsantikörper wird hinzugegeben und bindet das Antigen. Das am Detektionsantikörper gebundene Enzym setzt das Substrat um. Das Produkt tritt farbig in Erscheinung. (Eigene Darstellung)

Die kaum noch angewendete Methode der Doppelimmundiffusionsmethode nach Ouchterlony beweist dagegen die Übereinstimmung von Antigen und Antikörpern. Diese werden in einem Agarosegel gegeneinander aufgetragen. Durch Diffusion nähern sich die Lösungen an und bilden an deren Schnittfläche Präzipitationslinien aus, die je nach Konfiguration als übereinstimmend, nicht-identisch oder teilweise identisch eingestuft werden können. Dieses Verfahren eignet sich nur für einfache Antigenlösungen, was häufig eine vorangehende Auftrennung der Proteine mittels Agarosegelelektrophorese erforderlich macht. (Pingoud und Urbanke, 1997)

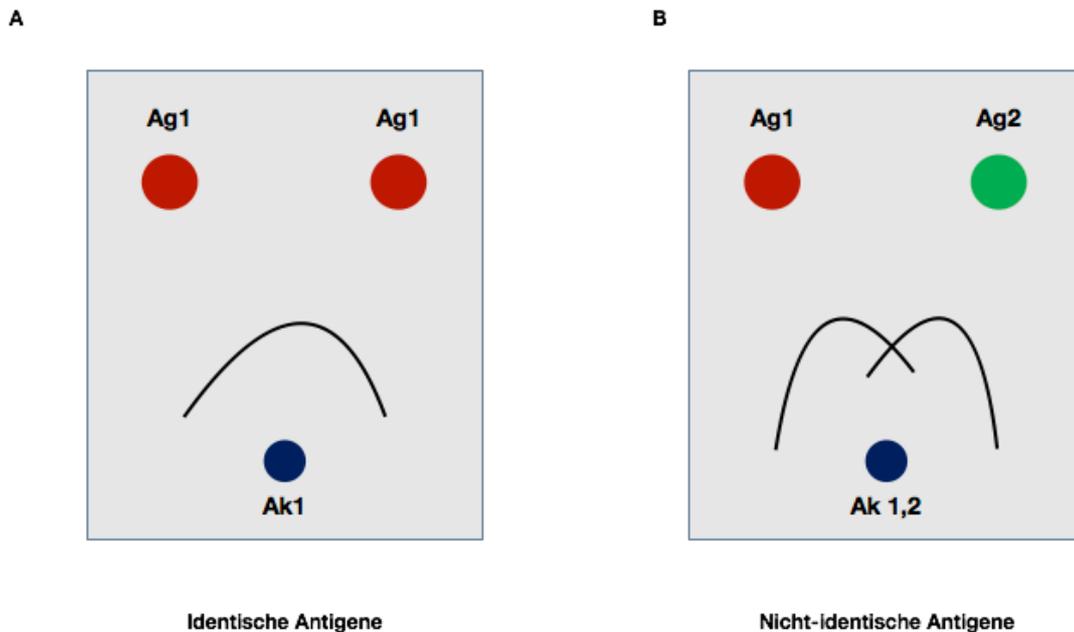


Abbildung 4: Darstellung einer Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony.

A: Die Präzipitationslinien der ersten Platte konfluieren. Die Epitope der Antigene stimmen also überein. B: Die Präzipitationslinien auf der zweiten Platte kreuzen sich. Die Epitope der Antigene sind also unterschiedlich. (Eigene Darstellung basierend auf Abbildung 6-5 aus Pingoud et al., 1997)

1.3.2.2 Genetische Nachweismethoden

Zu den genetischen Möglichkeiten der Identifizierung von Spezies zählen vor allem die Dot-Blot-Hybridisierung, die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Untersuchung (RFLP) und die Multiplex- sowie Realtime-PCR.

Der Mechanismus der **Dot-Blot-Hybridisierung** beruht auf der Eigenschaft sich komplementär paarenden Basen. Je ein Kontroll-DNA-Einzelstrang der zu testenden Spezies, das heißt einer ausgewählten ubiquitär in einer Spezies auftretender Sequenz, ist als Sonde auf dem Teststreifen fixiert. Dieser bindet bei Vorhandensein der entsprechenden Sequenz im Untersuchungsmaterial fest an den komplementären zuvor denaturierten Strang, was farblich dargestellt wird. Diese Methode wurde 1987 an denaturierten Fleischproben im Mageninhalt getestet (Baur et al., 1987).

Bei der **RFLP-Untersuchung** wird die DNA mittels Restriktionsendonukleasen verdaut. Aufgrund von Sequenzunterschieden variieren die Schnittstellen des Enzyms, wodurch DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Die somit verschieden tragen Restriktionsfragmente wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das angelegte Spannungsfeld des Agarosegels. Die Fragmente werden so ihrer Größe nach aufgetrennt und verbleiben nach Aufhebung der Spannung an dem entsprechenden Ort und bilden somit nach ihrer Färbung ein charakteristisches Bandenmuster aus. Dieses Muster erlaubt die Spezieszuordnung.

Beispielsweise eignet sich das mitochondriale Cytochrom-b-Gen aufgrund seiner konservativen Regionen mit Primerbindungsfunktion und seines variablen Abschnittes, welcher die Grundlage der RPFL- Analyse bildet, für diese Untersuchung. Positive Testergebnisse der Speziesidentifizierung von erhitzten Fleisch- und Mageninhaltspalten bestätigen den Nutzen dieser Methode (Zehner et al., 1998).

Die **Realtime-PCR** stellt eine weitere Spezifizierungsmethode da. Mit dieser kann mittels fluoreszenzmarkierter speziesspezifischer DNA-Sonden unter anderem die Zusammensetzung von Fleischgemischen bestimmt werden. Während der Vervielfältigung wird die Quantität und Qualität speziesspezifischer PCR-Produkte und damit in diesem Falle die Spezieszugehörigkeit detektiert. So eignet sich die 2001 entwickelte TaqMan™-Technologie zur Identifizierung von Rinderbestandteilen in Fleischproben (Laube et al., 2001).

Die **STR-Analyse** bietet ebenfalls einen Ansatzpunkt der Speziesspezififizierung. Mit Hilfe von Vervielfältigung ausgewählter DNA-Segmente mittels spezifischer Primer in einer Singleplex-PCR können die Proben auf je eine Spezies untersucht werden (Lahiff et al., 2001). Die Vereinigung mehrerer Singleplex-PCRs zu einer Multiplex-PCR vereinfacht und beschleunigt das Verfahren der Spezifizierung von Fleischproben und ist Gegenstand aktueller Forschung. Im Multiplex-Verfahren sind unterschiedliche Spezies simultan in einem Ansatz identifizierbar.

2 Zielsetzung

In der genetisch forensischen Routine steht die Analyse biologischen Untersuchungsmaterials im Vordergrund. Ist der humane Ursprung derartiger Proben ausgeschlossen, stellt sich die Frage der Spezieszuordnung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Speziesidentifizierung von fünf der wichtigsten Nutztiere Nordeuropas, durch eine simultane STR-Analyse mittels Multiplex-PCR.

Die momentan gängigen Methoden der Speziesidentifizierung mittels Sequenzierung, Dot-Blot-Technik, RFLP- oder Singleplex-PCR-Untersuchungen benötigen eine Vielzahl von Arbeitsschritten, die neben einer hohen Anzahl von möglichen Fehlerquellen, einen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand erfordern. Dabei ist für die Realtime-PCR ein zusätzliches Analysegerät nötig.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher eine schnell und einfach anwendbare, dabei zugleich kostengünstige Methode der Speziesspezifizierung zu etablieren. Von besonderer Bedeutung ist das Bestreben der simultanen Speziesdetektion mehrerer Tierfamilien in einem PCR-Ansatz durch Zusammenführung der jeweils artspezifischen Ansätze. Dabei werden mindestens zwei STR-Marker pro Spezies verwendet, die möglichst artspezifisch sein sollen. Falls dieses nicht möglich ist, soll die Kombination familienübergreifender Marker die Spezies ermitteln können.

Zu den hier ausgewählten Arten gehören **Rind, Pferd, Schwein, Schaf** und **Ziege**. Sie zählen zu den Vertretern der am häufigsten gehaltenen landwirtschaftlichen Nutztiere Nordeuropas. Dieser Untersuchungsansatz deckt daher einen großen Bereich, beispielsweise bei der Herkunftsfrage von Gewebefunden, ab.

Des Weiteren soll die praktische Anwendbarkeit dieser Methode überprüft werden. Sie soll unabhängig von Geschlecht, Lebensalter und Art des Gewebes Auskunft über die Artzugehörigkeit erlauben.

Häufig liegt die zu spezifizierende Probe in degradiertem Zustand vor. Gründe dafür liegen unter anderem in der Verarbeitungsweise oder fäulungsbedingten Veränderungen des Fleisches oder sonstigen tierischen Materials in der Lebensmittelindustrie oder im Zersetzungsgrad des Gewebes im Magenlumen eines Verstor-

benen. Die Auswirkungen jener Einflussfaktoren auf die Aussagekraft der Multiplex-PCR wurden anhand von Versuchen ermittelt, welche den Nutzen für die Lebensmittelindustrie verdeutlichen sollen. Die forensische Relevanz wird anhand Versuchsreihen von Mageninhaltsproben sowie tatsächlicher Fallbeispiele der forensischen Praxis untersucht. Insbesondere Fragestellungen um Versicherungsangelegenheiten von Verkehrsunfällen und um die Herkunft von Gewebsfunden sind Gegenstand genetischer Untersuchungen. Ergebnisse der Multiplex-PCR sollen bei der Antwortfindung helfen.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob aufgrund der koamplikativen Fähigkeit dieses Verfahrens, qualitative und quantitative Aussagen über die Zusammensetzung von Fleischgemischen getätigt werden können. Durch Möglichkeit der Detektion der Anzahl enthaltender Allele für den ausgewählten Genlocus soll erörtert werden, in wie weit das Assay Auskunft über die Anzahl der in der Probe enthaltenden Individuen geben kann. Die Einhaltung rechtlicher Vorgaben zur Deklaration von Lebensmitteln könnten somit überprüft werden.

Mit der Etablierung dieser speziesspezifischen Multiplex-PCR soll eine kostengünstige Methode entwickelt werden, die ohne zeitlichen und apparativen Mehraufwand in jedem genetisch forensischen Labor eingesetzt werden kann. Sie soll für jeden Untersucher schnell erfassbar und durchführbar sein und sich somit für Routineuntersuchungen eignen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Probenmaterialien ausgewählt, die verschiedenste Untersuchungsbereiche der forensischen Praxis abdecken. Anhand der ausgewählten Proben wurde die hier etablierte Multiplex-PCR auf ihre Anwendbarkeit überprüft.

3.1.1 Ausgewählte Tierarten

Mit der entwickelten Multiplex-PCR soll die Identifizierung der häufigsten landwirtschaftlichen Nutztiere möglich sein, wobei deren Haltung meist der Fleischproduktion dient. Laut statistischem Bundesamt stellen Schweine, Geflügel und Rinder in absteigender Reihenfolge den größten Masseanteil der Schlachtungen dar, wogegen Ziegen und Schafe in Deutschland nur geringfügig zur Schlachtmasse beitragen (Statistisches Bundesamt, 2013). Diese Faktoren bilden die Grundlage der Spezieswahl des vorliegenden Projektes. Gewebeproben von Rindern, Schweinen, Pferden, Schafen und Ziegen wurden in die Entwicklung der Multiplex-PCR integriert.

3.1.2 Probenmaterial

In dieser Arbeit wurde Probenmaterial unterschiedlichen Ursprungs wie Tierfutter, Mageninhalt oder Lebensmitteln untersucht. Vor Verwendung jeder Probe wurde eine Zustimmung zur Teilnahme an der Untersuchung eingeholt. Insbesondere die Inhaber der Dönerläden in Kiel, des Ziegenhofes Rheder in Boksee, der Lederhandlung Klaus Flach in Kiel sowie der Fleischerei Hasch zeigten nach der Aufklärung und Zustimmung großzügige Hilfsbereitschaft. Bei der Auswahl der Lebensmittel liegt ein besonderes Augenmerk auf der Art der Verarbeitung.

3.1.2.1 Kontrollproben

Als Positivkontrolle wurde je ein μl einer DNA-Lösung mit einer Konzentration von drei bis vier $\text{ng}/\mu\text{l}$ verwendet, die aus Leber- und Muskelgewebe der verschiedenen Tierarten extrahiert wurde. Diese für die kapillarelektrophoretische Auswertung optimale Konzentration,

wurde anhand der Erstellung von Verdünnungsreihen des DNA-Extraktes mit anschließender gelelektrophoretischen Auftragung und densitometrischen Quantifizierung ermittelt.

3.1.2.2 Lebensmittel

Die getesteten Produkte stammten von Frischfleischtheken oder aus Fertigprodukten, die gekühlt oder tiefgefroren aufbewahrt wurden. Analysiert wurden 18 DNA-Extraktionserzeugnisse von Fleischproben unterschiedlicher Frischfleischtheken, wovon fünf zuvor thermisch und zwölf stark mechanisch verarbeitet wurden sowie neun gewürzte Proben. Die zwölf untersuchten Fleischproben aus tiefgefrorenen und gekühlten Fertigprodukten lagen in bereits hitzebehandelter, gewürzter und häufig stark mechanisch bearbeiteter Form vor.

Zusätzlich wurden Dönerproben aus sechs unterschiedlichen Dönerläden Kiels, mit Zustimmung der Inhaber, getestet.

Tabelle 1: Übersicht über die getesteten Frischfleischarten.

Die Proben entstammen Frischfleischtheken einer Fleischerei und einer Supermarktkette Kiels mit Angabe der Verarbeitung und der Spezies.

Fleischart	Deklarierte Spezies	Verarbeitung	Anzahl der Proben
Leber	Rind	Roh	1
Leber	Schwein		1
Pferdefleisch (Muskel)	Pferd		1
Lammfleisch (Muskel)	Schaf		1
Ziegenrippchen (Muskel)	Ziege		1
Minutensteak	Schwein	mariniert	2
Hackfleisch, gemischt	Schwein, Rind	roh	3
Beefhack	Rind		1
Hackfleisch	Lamm, Rind		1
Hackfleisch	Lamm, Rind	roh, gewürzt	1
Mett	Schwein	geräuchert, gewürzt	1
Cevabcici	Rind	gebraten, gewürzt	1
Lotsensalami	Schwein	geräuchert, gewürzt	1
Leberwurst	Schwein	geräuchert, gewürzt	1
Leberwurst	Schwein, Rind	gekocht, gewürzt	1

Tabelle 2: Übersicht der getesteten gekühlten und gefrorenen Fertiggerichte.

Es handelt sich um Probenmaterial zweier Supermarktketten. Die Produkte wurden zuvor bereits verarbeitet und erhitzt. Einige dieser Proben können pflanzliches Material enthalten.

Fleischart	Deklarierte Spezies
Geflügelfrikadelle	Pute, Hähnchen
Leberkäse	Schwein
Kloß aus Suppentopf	Schwein
Kloß aus Nudeltopf	Schwein
Königsberger Klöpse	Schwein
Gänseleberpastete	Gans (Leber), Schwein (Muskel-, Fettgewebe)
Lasagne	Schwein
Ravioli	Schwein
Fleischsalat	Schwein
Tortelloni mit Fleischfüllung	Schwein
Schinken aus der Tortellonisauce	Schwein
Tortellini mit Schinkenfüllung	Schwein

3.1.2.3 Tierfutter

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Multiplex-PCR auf die Speziesidentifizierung in Tierfutter zu überprüfen, wurden je zwei Trocken- und Nassfutterproben für Hunde und Katzen untersucht:

1. Katzenfutter (nass)
2. Hundefutter (nass)
3. Katzen Knabberstick (trocken)
4. Katzenfutter (trocken)

3.1.2.4 Mageninhalt

Getestet wurden zehn Proben fester Nahrungsbestandteile, die dem Mageninhalt von Sektionsleichen entstammen. Diese Spuren konnten morphologisch nicht eindeutig als pflanzliches Material identifiziert werden und bargen dadurch die Möglichkeit der tierischen Herkunft.

Um den Einfluss des Magensaftes auf die Spezifizierbarkeit von Fleischproben genauer beurteilen zu können, bedarf es einer Versuchsreihe, in der die Verweildauer des Fleisches, wie auch die Größe des Gewebestückes und somit die angreifbare Oberfläche, definiert sind. Getestet wurde je 100 mg, 200 mg und 300 mg gemischtes Hackfleisch vom Schwein und

Rind sowie reines Rinderhackfleisch. Dieses lag bereits zerkleinert vor und kommt der Konsistenz des Speisebreies nahe. Zu Vergleichszwecken wurde die DNA der Proben zuerst ohne Einwirkung von Magensaft extrahiert. Um möglichst die physiologischen Bedingungen im Magen zu simulieren, wurden die weiteren Proben im Magensaft, welcher während Obduktionen entnommen wurde, bei 37 Grad im Thermoschüttler inkubiert. Nach einer Verweildauer von 45, 90 und 120 Minuten wurde die DNA, die als Template der Multiplex-PCR dient, extrahiert. Als Negativkontrolle diente das Extraktionserzeugnis aus dem reinen Magensaft. Der Magensaft wurde im Rahmen von Routineuntersuchungen während einer Obduktion am Institut für Rechtsmedizin entnommen. Es handelt sich hierbei um nicht mehr benötigte Reste, die ansonsten verworfen worden wären.

3.1.2.5 Leder

Lederwaren finden sich in der forensischen Praxis häufig als Spurenmaterial, besonders in Form von Kleidungsbestandteilen, am Tatort. Die Kenntnis der Genese des Spurenmaterials und die genaue Zuordnung zwei solcher Proben könnte bei der Aufklärung forensischer Fälle von Vorteil sein.

Beispielhaft wurden sechs Proben von chrom-, pflanzlich- und mischgegerbten gefärbten und ungefärbten Leder vom Rind und Lamm sowie Pferdehaar untersucht.

3.1.2.6 Proben aus der forensischen Praxis

Es wurden zwei verschiedene Gewebeproben aus der forensischen Praxis untersucht. Die erste Probe stammt aus einem Gewebefund im Wald. Dieser war morphologisch weder menschlicher oder tierischer Herkunft zuzuordnen, noch war das Organ identifizierbar. Der Verwesungsprozess hatte bereits begonnen, was einen charakteristischen Geruch bedingte, der ebenfalls die Zuordnung zu einer Spezies erschwerte. Nach Ausschluss der menschlichen Genese wurde eine Gewebeprobe aus der Tiefe des Gewebefundes entnommen und nach der Extraktion der Multiplex-PCR und kapillarelektrophoretischen Auswertung zugeführt.

Als zweites forensisches Anwendungsbeispiel wurde das DNA-Extrakt des Bolus eines mutmaßlichen Erstickungsopfers untersucht. Zur Verifizierung der Erstickung als Todesursache wurde die Leiche obduziert. Die Probenentnahme erfolgte währenddessen mit Frage nach dem Inhalt des aspirierten Bolus, der Auskunft über Umstände des Todes geben könnte.

3.2 DNA-Extraktion

Um die DNA untersuchen zu können, muss sie von weiteren Zellbestandteilen, wie beispielsweise Zellwandproteinen, getrennt werden. Die gesäuberte DNA erlaubt dann weitere Verarbeitungsschritte ohne inhibierende Einflüsse. Zwei DNA-Extraktionsmethoden wurden gegenübergestellt um die effizienteste zu ermitteln.

3.2.1 Semiautomatische DNA-Extraktion

Sämtliche, während dieser Arbeit untersuchte DNA wurden mit Hilfe des KingFisher® Flex-Extraktionsgerät semiautomatisch isoliert. Die Reagenzien, den PBS-Puffer (phosphate buffered saline Puffer) ausgenommen, sind Bestandteile des InviMag® Blood DNA KF96-Kits.

Während die Extraktion der DNA nach einem standardisierten Schema erfolgte, variierte die Vorbereitung der Proben geringfügig in Abhängigkeit von der erwarteten DNA-Qualität und Quantität.

Die Vorbereitung besteht aus der Zugabe von 200 µl Lysispuffer HLT und 20 µl kühler Proteinase K zu 100 mg abgewogener Gewebeprobe im 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Die Zugabe von 200 µl PBS-Puffer als Lösungsmittel ist dann nötig, wenn die Probe im festen Zustand vorliegt, wie es bei einigen Fleischprodukten wie Salami, bei Trockenfutter, bei Lederproben oder einigen Mageninhaltsproben der Fall war. Das Gemisch wird anschließend gevortext und 15 Minuten bei 60°C im Thermoschüttler inkubiert. Wird eine geringe DNA-Ausbeute der Extraktion wegen kleiner Mengen enthaltender DNA oder destruiertem Erbmaterial erwartet, wird die Inkubationszeit auf maximal 24 Stunden verlängert, um ein ausreichendes Ergebnis zu erzielen. Dieses Vorgehen ist beispielsweise bei chemisch verarbeiteten Lederproben oder Mageninhaltsproben, die zersetzenden Einflüssen des Magensaftes exponiert sind, erforderlich.

Nach der Inkubation wird das Gemisch fünf Minuten bei 4°C und 14 000 Umdrehungen pro Minute (upm) zentrifugiert. Der entstehende Überstand wird aus dem Reaktionsgefäß entnommen und den Vertiefungen der Arbeitsplatte zugeführt.

Eine Arbeitsplatte enthält 96 Vertiefungen, was der Zahl der möglichen simultanen Gewebsextraktionen entspricht. Hinzugefügt werden je 270 µl der Lösung, welche die magnetischen Partikel, die Magnetic Beads, enthält. Diese bestehen aus MAP-Solution und Binding Solution, die an die DNA binden. In das KingFisher® Flex-Gerät werden fünf Platten eingesetzt. Dazu gehören die Platte der vorbereiteten Proben inklusive der Magnetic Beads, drei

Platten mit Waschfunktion, die 800-900 µl unterschiedliche Waschpuffer enthalten, und eine Platte, deren Reaktionsvertiefungen mit je 100 µl Elutionspuffer befüllt sind.

Plastikkämme dienen als Träger der DNA durch die unterschiedlichen Arbeitsplatten, wobei die magnetischen Partikel als Bindeglied zwischen den Plastikkämmen und der DNA agieren. Folglich durchläuft die DNA verschiedene Waschvorgänge, bis sie schließlich im Elutionspuffer gelöst in der letzten Arbeitsplatte verbleibt (Manual zum InviMAG Blood Kit, Stratec molecular, 2013; geändert nach Thermo Scientific, 2010). Die DNA Probe wird nun in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gefüllt, gekühlt gelagert und dient als Ausgangslösung weiterer Analyseschritte. Das Pipettierschema der Arbeitsplatten ist im Folgenden tabellarisch aufgeführt und orientiert sich an dem von Stratec vorgeschlagenen Schema (Stratec molecular, 2012; Manual zum InviMag® Blood DNA Mini Kit, Stratec molecular, 2013).

Tabelle 3: Schematische Darstellung der befüllten Platten im KingFisher® Flex Extraktionsgerät.

Die Arbeitsplatte A beinhaltet unter anderem die zu extrahierende DNA und das magnetische Bindungselement. In der Arbeitsplatte B wird die DNA mittels dieser Bindeelemente mit den Plastikkämmen (Tipps), die dem Transfer zwischen den Arbeitsplatten dienen, verbunden. Die Platten C bis E übernehmen die Reinigungsfunktion. Nach dem Abschluss der Waschung liegt die DNA in Elutionspuffer gelöst in der Arbeitsplatte F vor. Die Mengenangaben sind pro Probe angegeben.

Arbeitsplatte	Reagenzien
A	Probenlysat, 200 µl Lysispuffer, 20 µl Proteinase K, 270 µl Magnetic Beads (240 µl Bindingbuffer und 30 µl MAP-Solution), optional 200 µl PBS-Puffer
B	Tipps
C	800 µl Waschpuffer HLT
D	900 µl Waschpuffer M
E	900 µl Waschpuffer II
F	100 µl Elutionspuffer

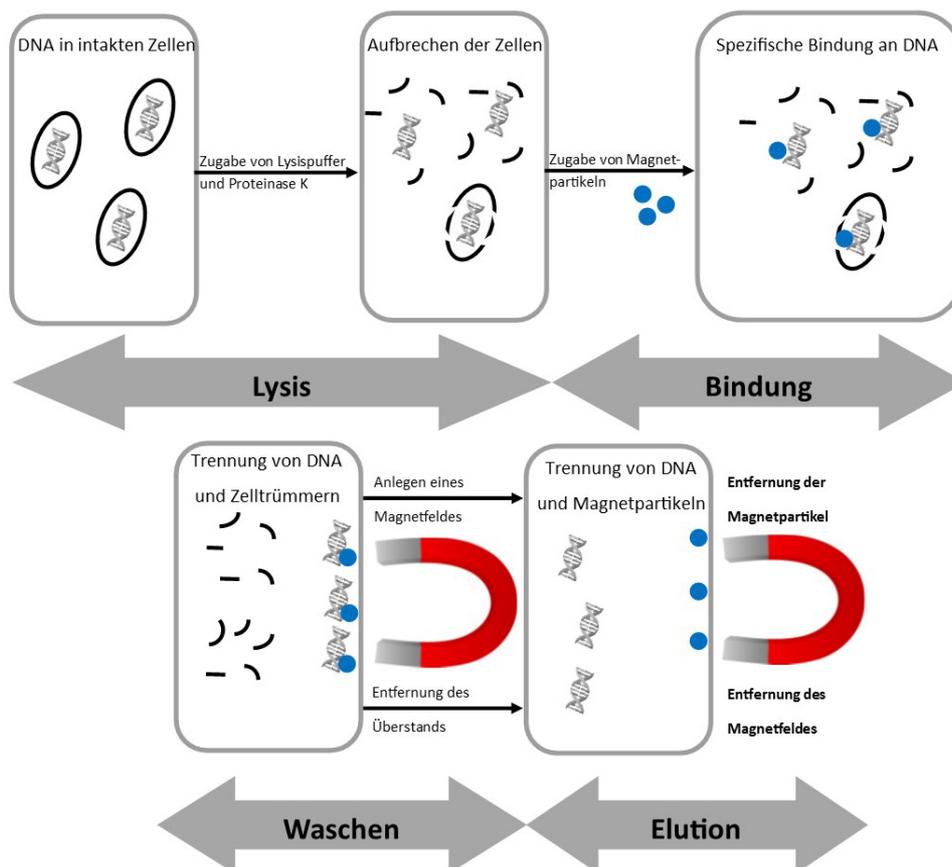


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der semiautomatischen Extraktionsmethode.

Im ersten Schritt wird die Zellmembran zerstört, sodass die Zellbestandteile sowie die DNA freigesetzt werden. Um die zu extrahierende DNA von den restlichen Zelltrümmern zu trennen, werden die magnetischen Partikel, hier blau dargestellt, hinzugefügt, die an der DNA binden. Durch Anlage eines Magnetfeldes bindet die DNA an die Plastikkämmen. Diese transportieren das Erbmateriale durch die Waschplatten. Durch Auflösung des Magnetfeldes kann die DNA mit einem geeigneten Puffer in Lösung gehen. (aus Modrow, 2014)

3.2.2 Manuelle DNA-Extraktion

Die DNA von Lebergewebsproben aus Rind und Schwein wurden mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Stratec) extrahiert. Dabei orientiert sich das Protokoll an den Herstellerempfehlungen (Manual zum Invisorb® Spin Tissue Mini Kit, Stratec molecular, 2013).

Von einer gekühlten zu untersuchenden Probe wurden 100 mg Gewebe mit einem Skalpell entnommen und zur Extraktion in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen. Nach der Zugabe von 400 µl Lysispuffer G und 40 µl Proteinase K wird das Gemisch gevortext und anschließend bei 52°C für zwei Stunden im Thermoschüttler inkubiert. Diese Umstände schaffen ein denaturierendes Milieu und führen so zur Lyse der Zelle. Um den Überstand von den Zelltrümmern zu trennen, werden die Proben fünf Minuten lang bei 4°C und 14 000 upm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird nun abpipettiert und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Die folgenden Schritte dienen dem Zweck der weiteren Säuberung der DNA von verbleibenden Zellbestandteilen und Verunreinigungen durch Bindung und anschließendes Waschen der gebundenen DNA. Dazu wird 200 µl Binding Puffer T hinzugefügt und zehn Sekunden gevortext. In ein 2 ml-Reaktionsgefäß, dem „Receiver Tube“, wird nun ein Filter enthaltendes Säulchen gesetzt, der „Spin Column“. Auf diesen Filter wird das überstehende Puffergemisch pipettiert und eine Minute lang inkubiert, nachdem es bei 12 000 upm zentrifugiert wurde. Das Filtrat enthält die DNA. Verunreinigende Bestandteile befinden sich im Überstand und werden verworfen.

Das Säulchen, welches die DNA enthält, wird wieder in ein „Receiver Tube“ eingesetzt, mit 500 µl Waschpuffer versetzt und abermals bei 12 000 upm für eine Minute zentrifugiert. Wieder wird das Filtrat verworfen und das Säulchen in ein Reaktionsgefäß eingesetzt. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt.

Anschließend erfolgt die Zentrifugation für zwei Minuten bei 13 000 upm. Der Filtereinsatz, welcher die DNA enthält, wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und mit 70 µl vorgewärmten Elutionspuffer befüllt. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten in Raumtemperatur und zweiminütigem Zentrifugieren bei 10 000 upm ist die DNA im Elutionspuffer gelöst. Der Filter kann nun verworfen werden. Das DNA-Elutionspuffergemisch sollte gekühlt oder tiefgekühlt aufbewahrt werden.

3.3 Überprüfung der DNA-Qualität und -Quantität

Zur weiteren Analyse der extrahierten DNA-Proben muss eine ausreichende Qualität und Quantität gewährleistet sein. Dies wird mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.3.1 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese wandern die DNA-Moleküle entsprechend ihrer Ladung durch das Spannungsfeld, welches im Gel angelegt ist. Dabei übernimmt dieses eine Siebfunktion, indem es Maschen ausbildet, dessen Größe von der Agarosekonzentration abhängt. Die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente wandern in Richtung Anode. Dabei sinkt die Geschwindigkeit der Überwindung des Widerstandes im Spannungsfeld mit der Größe des Fragmentes sowie dem steigenden Anteil von Agarose im Gel und steigt mit der Höhe der angelegten Spannung (Mülhardt, 2009). Nach Aufheben des Spannungsfeldes sind die ungleich großen Fragmente verschieden weit gelaufen, verbleiben also an unterschiedlichen Stellen im Gel. Fluoreszierendes Ethidiumbromid wird zum Gel hinzugefügt, welches mit der DNA interkaliert. Die so gefärbten DNA-Fragmente werden ab 20 kb (Kilobasen) in Form von Banden sichtbar. Somit lassen sich Aussagen über die Größe der Fragmente und damit über die Qualität treffen. Anhand der Stärke der Fluoreszenz lässt sich auf die Quantität schließen.

Bevor das Gel angesetzt und gegossen werden kann, wird die Gelkammer, bestehend aus einem Gelschlitten und Gelgusssperren, zusammengesetzt und mit Klebeband abgedichtet.

Zur Herstellung eines zwei Prozentigen Agarosegels werden zwei g Agarose in einem Erlenmyerkolben mit 100 ml 1 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) vermischt und bei 800 Watt in der Mikrowelle kurz aufgekocht, bis das Gemisch eine klare Farbe annimmt. Tabelle 4 veranschaulicht die Zusammensetzung des TBE- sowie des Ladepuffers. Nach kurzem Abkühlen wird unter einem Abzug fünf µl fluoreszierendes Ethidiumbromid zugegeben und vermengt. Das Gel wird nun möglichst luftblasenfrei in die Gelwanne gegossen. Die Kämme, dessen Aussparungen nach Entfernung des ausgehärteten Gels zur Befüllung mit den zu untersuchenden DNA-Proben dienen, werden in das noch flüssige Gel an die dafür vorgegebene Stelle gesteckt. Das Agarosegel benötigt eine Ruhezeit von mindestens 30 Minuten, bis porenbildende Polysaccharidstränge ausgebildet sind.

Nach der Aushärtung des Gels werden die Kämme entfernt und die Kammer mit 1 x TBE-Puffer befüllt. Die Taschen werden mit fünf µl der zu untersuchenden Proben gemeinsam mit fünf µl Bromphenolblau beinhaltenden Ladepuffer befüllt. Bromphenolblau ist mit bloßem

Auge sichtbar und markiert die laufenden DNA-Proben. Die Proben werden, abhängig von der Fragestellung, pur oder in Verdünnungen eingesetzt.

Weitere Taschen werden mit jeweils fünf μl der DNA-Größenstandards Hyperladder I und IV von Bioline™ befüllt, die DNA-Fragmente bekannter Größe und Menge besitzen. Daher eignen sie sich zur Abschätzung der Fragmentlängen und der Quantität des Untersuchungsmaterials.

Dem Verschluss der Gelkammer folgt die Anlegung des Spannungsfeldes mit 120 V und 135 mA für etwa 60 Minuten. Unter UV-Licht werden die fluoreszierenden DNA-Banden sichtbar. Sie können fotografisch mittels der Gel-DOC EQ (Bio-RAD™) festgehalten und anschließend beurteilt werden. Das Foto einer Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese ist beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt.

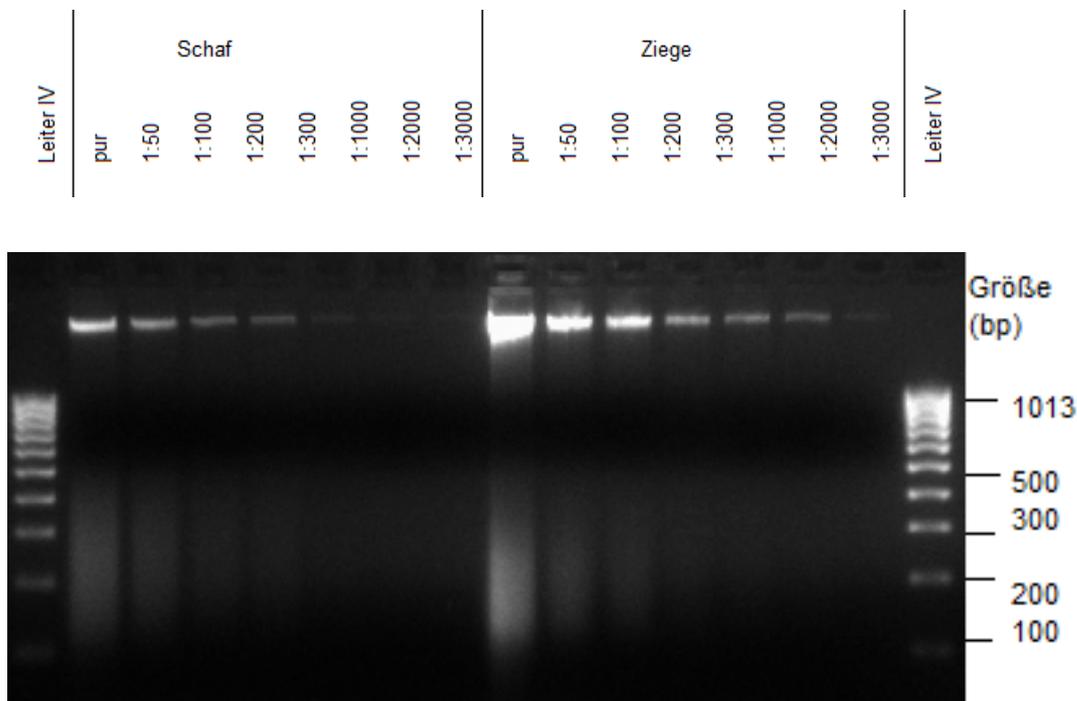


Abbildung 6: Beispiel eines Agarosegelelektrophoreseergebnisses anhand von Verdünnungsreihen je einer Schafs- und Ziegen-DNA-Probe. Foto eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels.

Die Abnahme der Fluoreszenz der Banden steht in Relation zur DNA-Konzentrationsabnahme. Große DNA-Fragmente sind im Bild als scharfe Banden oben im Gel, nahe der befüllten Taschen zu sehen. Sie sind hochmolekular sowie entsprechend groß und haben daher nur eine kleine Strecke im widerstandsreichen Gel zurückgelegt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der in der Agarosegelelektrophorese notwendigen Reagenzien.

TBE-Puffer ist das Lösungsmittel der Agarose im Gel. Das Gel selbst ist in TBE-Puffer gebettet. Der Ladebuffer wird mit der zu untersuchenden DNA-Probe 1:1 vermengt.

Reagenz	Zusammensetzung
---------	-----------------

TBE-Puffer	890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, 890 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8,3
Ladepuffer	25 mg Bromphenolblau, 25 mg Kyleine Cyanol, 2,5 g Ficoll 400 mit 10 ml Aqua bidest

3.3.2 Densitometrische Auswertung

Die quantitative Auswertung der Agarosegelelektrophorese kann mit Hilfe der MeMo Forensics Membralyzer© Software densitometrisch durchgeführt werden. Diese wurde in Kiel am Institut für Rechtsmedizin, ursprünglich für die Quantifizierung von Proteinen, entwickelt (Modrow et al., 2012). Die Methode beruht auf dem Prinzip der Farbdichteunterschiedsmessung der mittels GelDOC EQ dokumentierten Fotografie der DNA-Banden im Agarosegel. Die Intensität der Fluoreszenz der DNA-Banden steigt mit der in ihr vorhandenen DNA-Konzentration. Sie wird in Form von Graustufen auf dem Foto abgebildet und liegt im relativen Bereich von 0 bis 255.

Durch die Messung des Graustufenindex (GI) der verwendeten bekannten Menge des Größenstandards, wird der Umrechnungsfaktor $GI_{Bande\ i}$ zur DNA-Konzentration von der Software selbstständig ermittelt. Mittels seiner Hilfe lässt sich von dem gemessenen Graustufenindex der zu bestimmenden DNA-Banden auf die DNA-Konzentration in ng pro μl schließen:

$$c_{\text{spezifische Bande}} = \frac{GI_{\text{Bande}}}{\sum_{i=1}^n GI_{\text{Bande } i}} \times c_{\text{DNA Verdünnung}}$$

Der bekannte Größenstandard besitzt eine Gesamtmenge von 610 ng DNA und unterteilt sich in durch den Hersteller definierte Banden bekannter DNA-Menge und Basenpaarlänge.

Auf dem in der Software dargestellten Gel werden nun die Banden der Standardleiter Hyperladder IV in absteigender Reihenfolge, das bedeutet von hoher zur niedriger Basenpaaranzahl, markiert und der jeweilig vorgegebenen Fragmentlängen zugeordnet. Die Angabe des in diesem Fall verwendeten Standards Hyperladder IV, ist daher unerlässlich. Da die Banden eine definierte Menge an DNA besitzen, ist das Programm somit geeicht. Durch Markierung der zu quantifizierenden Banden kann mit Hilfe des automatisch errechneten Umrechnungsfaktors die DNA-Konzentration der jeweiligen Bande ermittelt werden. Da die angegebene DNA-Menge in fünf μl Probe enthalten ist, ergibt die Division mit fünf die herkömmliche Konzentrationsangabe in ng/ μl .

3.4 Speziesspezifische STR-Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) ist Grundlage für die hier vorgestellte Analysemethode. Einerseits ist es mit ihrer Hilfe möglich die zu amplifizierenden Sequenzen artspezifisch auszuwählen. So wird nur bei Vorhandensein des entsprechenden Allels, also bei Vorliegen der zu verifizierenden Art, ein PCR-Produkt amplifiziert. Dabei stehen Single- und Multiplexverfahren zur Verfügung, bei denen je eine oder mehrere DNA-Sequenzen simultan vervielfältigt werden. Andererseits wird die Menge des genetischen Materials vergrößert, was in einigen Fällen die Durchführung weiterer Untersuchungen erst erlaubt. Das grundlegende Prinzip der PCR ist einheitlich und wird hier in Kürze skizziert.

3.4.1 Prinzip der Polymerasen-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im Jahre 1987 von Kary Mullis entwickelt. Seither wurde diese Methode stetig weiterentwickelt und modifiziert, was eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten und Anwendungsbereichen birgt. Dabei sind die grundlegenden Komponenten eines PCR-Ansatzes der DNA-Ausgangsstrang (Template), spezifische Oligonukleotidprimer, eine hitzeresistente DNA-Polymerase mit Magnesiumionen als Kofaktor, die vier der Basen entsprechenden Desoxyribonukleosidphosphate (dNTPs) und ein geeigneter Puffer als Medium.

Die PCR unterteilt sich in drei Schritte. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge, die als Vorlage für die spätere Amplifikation dienen, denaturiert. Dieser Vorgang wird durch Sprengung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Erhitzen auf 94-98°C hervorgerufen. Im folgenden Schritt, der Primeranlagerung oder Annealing, binden nach Abkühlung auf unter 67°C die kurzen, einsträngigen Oligonukleotidprimer an den Anfang und an das Ende der zu vervielfältigenden DNA-Segmente. Sie agieren als Andockpunkt für die hitzestabile DNA-Polymerase. Dieses Enzym ermöglicht, unter Vorhandensein von zweiwertigen Magnesiumionen als Kofaktor, die Verlängerung der DNA bei 72°C, die auch als Elongation bezeichnet wird. Dabei werden die Desoxynukleotide komplementär zum Template-Strang verknüpft, bis der rückwärtsgerichtete Primer (reverse Primer) erreicht wird und die Polymerisierung abbricht. So entsteht ein zur ursprünglichen DNA identischer Doppelstrang. Ist die Elongation vollendet, beginnt ein erneuter Zyklus, wobei der neu synthetisierte Strang als Matrizenstrang verwendet wird. Die Kopienzahl steigt also im Idealfall annähernd exponentiell, bis eine Pla-

teuphase erreicht wird. Abbildung 6 veranschaulicht das soeben erläuterte Funktionsprinzip. (Mülhardt, 2009)

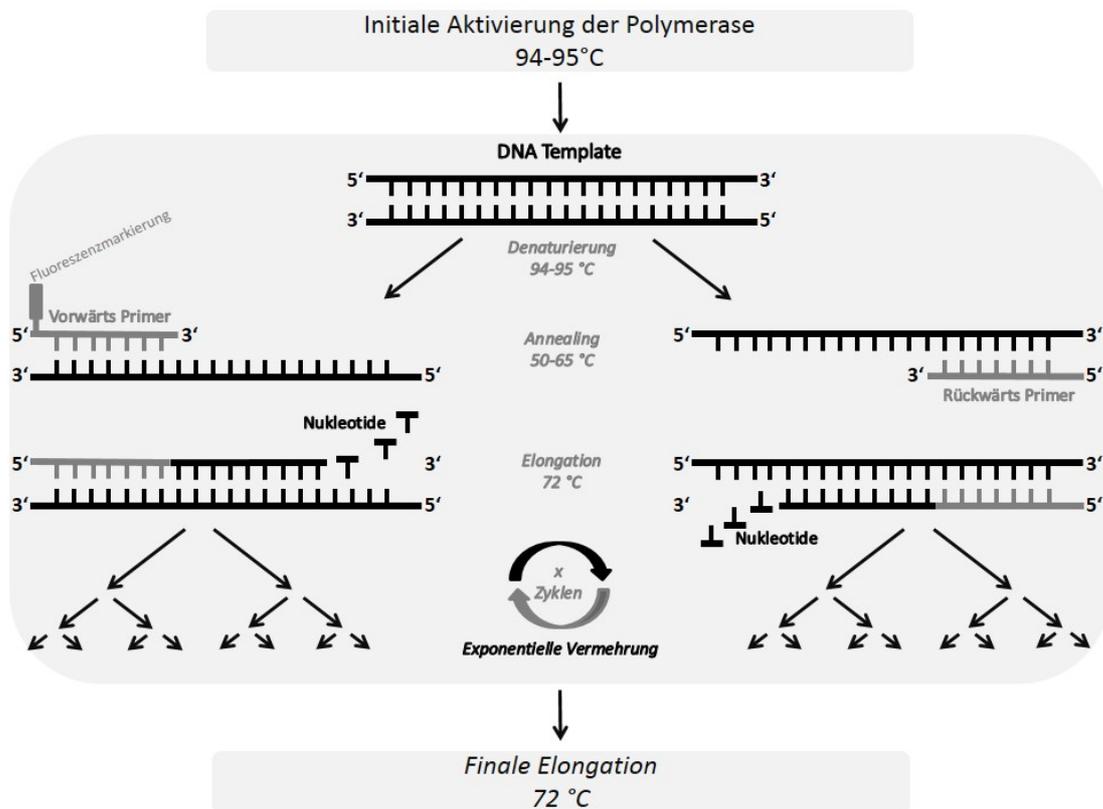


Abbildung 7: Darstellung des Prinzips der Polymerase-Kettenreaktion.

Dazu zählen die bereits beschriebenen Schritte der Denaturierung, Annealing (Andocken der Primer) und Elongation (Generierung eines neuen Strangs). Bei weiteren Zyklen bilden die neu entstandenen Einzelstränge wieder Templatestränge für die erneute Elongation, sodass die DNA-Menge sich beinahe exponentiell vervielfältigt. (aus Modrow, 2014)

Die gängige, auch in dieser Arbeit verwendete Modifikation der PCR, ist die hot-start-Technik. Dabei wird anstatt der bereits bei Raumtemperatur arbeitenden Taq-Polymerase ein verändertes Enzym verwendet, welches erst bei jener Temperatur seine Funktion ausübt, bei der die Primer bereits die Matrize binden. Dieses Verfahren vermindert die Anzahl unspezifischer PCR-Produkte, die insbesondere in den ersten Zyklen entstehen und ermöglicht eine erhöhte Arbeitstemperatur, was die Hybridisierung der Primer vermindert (Chou et al., 1992).

3.4.2 Auswahl speziesspezifischer Primer

Um die Auswahl geeigneter Primer zu treffen, muss auf eine Reihe von Kriterien geachtet werden. So steigt die Gewissheit der Übereinstimmung mit dem Probenergebnis, also die Diskriminierungsrate der Probenherkunft, mit der Anzahl getesteter Genorte. Die Auswahl von mindestens zwei Primerpaaren ist also wünschenswert und erfolgte zum einen aus der Literaturrecherche (Conyers et al., 2012; Vaiman et al., 1994; Sadeghi et al., 2009;

Nanekarani et al., 2011) und zum anderen durch eine institutseigen entwickelten STR-Analyzer©-Software. Sie ist in der Lage verwendbare speziesspezifische Wiederholungsmuster zu suchen, die Sequenzen aufzuarbeiten und nach Anzahl der Wiederholungen und Gesamtanzahl der Basenpaare ins Analysesystem einzupflegen. Entsprechend der so gefundenen polymorphen Sequenzen können dazu passende vorwärts- und rückwärtsgerichtete Primer von 20 bis 26 Basenpaaren (bp) Länge generiert werden (Broad Institute, 2014).

Alle verwendeten Primer müssen in der Lage sein bei einer einheitlichen Primerbindungstemperatur zu arbeiten, die vom Anteil der Guanin-Cytosin-Basenpaaren der Primer abhängig ist (Newton und Graham, 1994). Sie sind in der Literatur zu finden und liegen bei den ausgewählten Primern zwischen 55 und 60 °C.

Durch Übereinstimmung von Gensequenzen verschiedener Arten können Kreuzreaktionen entstehen, die zu einem falsch-positiven Ergebnis führen. Je spezifischer die ausgewählten Sequenzen sind, desto unwahrscheinlicher ist das Auftreten von Kreuzreaktionen. Um diese Wahrscheinlichkeit zu minimieren, können die Primer mittels eines Online Tools Nucleotide Blast der National Library of Medicine getestet werden (National Center for Biotechnology Information, 2009).

Ein weiteres Augenmerk sei auf die Primerinteraktionen gerichtet. Insbesondere bei simultaner Verwendung mehrerer Primerpaare in einem Multiplex-Ansatz kann es durch Kongruenz von PCR-Produkten verschiedener Primer zur Hybridisierung und somit zur Verfälschung der Ergebnisse führen. Diese Interaktionen sind empirisch durch Zusammenführen von Singleplex-Ansätzen ermittelbar, wie es im Abschnitt 3.4.4 beschrieben wird.

Die Primer wurden bei der Firma Biomers™ bestellt und gefriergetrocknet geliefert. Sie werden nach Anleitung des Herstellers mit TE-Puffer aufgefüllt, sodass die Konzentration 100 pmol/μl beträgt. Nach weiterer 1:10-Verdünnung mit TE-Puffer sind die Primer gebrauchsfertig und können bei -10°C aufbewahrt werden.

Da die amplifizierten Genbereiche im Anschluss kapillarelektrophoretisch ausgewertet werden, werden sie bei der Herstellung an ihrer 5'-Position mit den Fluoreszenzfarbstoffen JOE und ATTO565 markiert. Dabei wird, neben der Fragmentlänge, die Emission eines der Fluoreszenzfarbstoffe detektiert, was die Zuordnung von Fragmenten ähnlicher Länge zu den markierten speziesspezifischen Primern ermöglicht. Für die weiteren PCRs werden Aliquots eingesetzt. Eine detaillierte Beschreibung der ausgewählten Primer ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Übersicht der Eigenschaften der ausgewählten Primer.

Die Wiederholungsmotive sämtlicher Primer, mit Ausnahme von BOV-2, bestehen aus Dinukleotiden. BOV-2 besitzt komplexe Wiederholungsmuster. Grün unterlegte Primer sind mittels JOE fluoreszenzmarkiert, die rote Unterlegung veranschaulicht die ATTO565-Markierung der Primer. Die Nomenklatur der Primerpaare richtet sich nach der englischen Bezeichnung der Spezies und Nummerierung der Systeme (Rind: COW; Schwein: PIG; Pferd: HRS, Hornträger: BOV; Schaf: Sheep; Ziege: Goat).

Spezies/ Bezeichnung	Marker	Vorwärts- /Rückwärtsgerichtete Primersequenz	Annealingtempe- ratur (°C)	Fragment- länge (bp)
Rind/ COW-1	TGLA22 7 (D18S1)	CGAATT- CCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAACTCAAT- GAAAGCA	55-56	64-115
Rind/ COW-2	INRA023 (D3S10)	GAGTAGAGCTACAAGA- TAAACTTC TAACTACAGGGTGTTA- GATGAACTC	55	193-235
Schwein/ PIG-1	SW857	TGAGAGGTCAGTTACAGAA- GACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	55	140-160
Schwein/ PIG-2	SW1111	AGGTCC- TACTGTCCATCACAGG GAAGCAGAGTT- GGCTTACAGTG	55	166-187
Pferd/ HRS-1	HTG4	CTATCTCAGTCTT- GATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCT C	60	116-137
Pferd/ HRS-2	ASB2	CCAC- TAAGTGTCGTTTCAGAAGG CACAACCTGAGTTCTCTGA- TAGG	60	237-268
Schaf/ She	OARFCB 20	AAATGTGTTTAA- GATCCATACAGTG GGAAACCCCATATATAC- CTATAC	55	83-123
Schaf/ BOV-1	BMS332	GACAAAACCCTTTTAG- CACAGG AATT- GCATGGAAAGTTCTCAGC	57	127-157
Ziege/ BOV-2	BM121	TGGCATTGTGAAAA- GAAGTAAAA CTAGCACTATCTGGCAAGCA	65	165-185
Ziege/ GoaShe	ILSTS02 2	AGTCTGAAGGCCTGAGAACC CTTACAGTCCTTGGGGTTGC	60	186-202

3.4.3 Singleplex-PCR

Um die Eignung der einzelnen Primer zu kontrollieren, wurden die zugehörigen Primerpaare für die Spezies Rind, Schwein, Pferd, Schaf und Ziege vorab in je einem standardisierten hot-start-PCR-Ansatz getestet. Dazu wurde ein Mastermix für die jeweilige Anzahl an zu testenden Proben in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und gevortext. Die in Raumtemperatur inaktive Immolase™, die ihre Funktion erst nach zehnminütigem Erhitzen aufnimmt, wurde als Polymerase verwendet (Bioline, 2014).

In dieser Arbeit wurde der halbierte Reaktionsansatz der PCR verwendet. Daraus resultiert das in Tabelle 6 gelistete Pipettierschema.

Tabelle 6: Bestandteile des verwendeten Reaktionsansatzes der hot-start-PCR.

Dieser entspricht einem halben herkömmlichen Ansatz. Der Mastermix enthält jedes der gelisteten Komponenten, ausgenommen der DNA. Er wird für die Anzahl der auf einmal zu untersuchenden Proben gemeinsam angesetzt. Der dabei entstehende Pipettierverlust beträgt erwartungsgemäß ein zweifaches Probenvolumen und ist dem Ansatz zuzufügen.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen (µl)
Bidestilliertes Wasser		6,2
Immobuffer	10 x	1,2
Primer	10 pmol/µl	2
dNTP	Je 2,5 mM	1
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	50 mM	0,5
Dimethylsulfoxid (DMSO)	100 %	0,5
Immolase	5 U/µl	0,1
DNA-Template	3-4 ng/µl	1 µl
Gesamtvolumen		12,5 µl

Pro Reaktionsansatz werden in ein achter PCR-Reaktionsgefäßstreifen je 12,5 µl Mastermix sowie zwei µl DNA-Template gefüllt. Als Positivkontrolle dient DNA aus Lebergewebsproben vom Rind oder Schwein, sowie Muskelgewebsproben vom Pferd, Schaf oder Ziege, die jeweils zuvor quantifiziert wurden. Negativkontrollen beinhalteten keine DNA-Templates, sondern zwei µl Aqua bidest, um die Konzentration der Bestandteile weiterhin zu gewährleisten.

Bevor die befüllten Reaktionsgefäße in den GeneAmp®2700 PCR-Thermoblock überführt werden konnten, wurden verbleibende Luftblasen durch kurzes Zentrifugieren beseitigt. In Tabelle 7 sind die Temperaturprofile dargestellt.

Tabelle 7: Standardtemperaturprofil der PCR.

Nach der Vervielfältigung werden die Proben bei vier Grad gekühlt. Die dadurch stabilisierten PCR-Produkte können vor Weiterverarbeitung maximal zwölf Stunden bei entsprechender Temperatur im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (in Minuten)	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,5	17
Primerbindung	60	0,5	
Elongation	72	1	
Denaturierung	95	0,5	17
Primerbindung	55	0,5	
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	0,5	1
Kühlung	4	∞	-

3.4.4 Multiplex-PCR

Nachdem die Eignung der Primer für die Detektion einzelner Spezies durch entsprechende Primer im Singleplex-Verfahren überprüft wurde, werden die einzelnen Ansätze schrittweise zu einem Reaktionsansatz zusammengeführt. Probleme können bei der Auswahl der Primer im Sinne von nicht speziesspezifischen Hybridisierungseigenschaften auftreten, ebenso wie dimerisierende und hemmende Wechselwirkungen der Primer untereinander.

3.4.4.1 „Meatplex“

Als Erstes wurden die beiden, für die Art spezifischen Primer in einem gemeinsamen Ansatz getestet. Zu 12,5 µl Mastermix wurde je ein halber µl der für eine Art spezifischen Primerpaare hinzugegeben, sodass jeder Reaktionsansatz Marker beider zu untersuchender Genlokalisierungen im Verhältnis 1:1 beinhaltete. Die der Spezies zugehörigen Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Als Template diente je ein µl der aus Leber- oder Muskelgewebeproben extrahierten DNA-Lösung. Wie gewohnt enthielt die Negativkontrolle keine DNA. In jedem Multiplex-Ansatz liefert sie, neben möglichen Kontaminationen der Ansätze, ebenfalls Auskunft über

Primerinteraktionen.

Tabelle 8: Auflistung der in der entwickelten Multiplex-PCR verwendeten artspezifischen Primerpaare.

Nach alleiniger Testung der Primerpaare im Singleplexverfahren wurden im ersten Schritt der Multiplex-PCR-Testung die Primerpaare artgleicher Zugehörigkeit in einem Ansatz getestet. Anschließend wurden die Primerpaare gleicher Farbsysteme (JOE in grün oder ATTO565 in rot) in jeweiligen Ansätzen getestet, bevor alle Primerpaare simultan in einer Multiplex-PCR untersucht wurden. Die Primerpaare für Schweine können zur Testung von Haus- und Wildschweinen angewendet werden (Costa et al., 2012). In dieser Arbeit wurde die Überprüfung jedoch auf das Hausschwein beschränkt.

Spezies	1. Primerpaar	2. Primerpaar	Farblabel
Rind	TGLA227	INRA023	JOE
Schwein	SW857	SW1111	JOE
Pferd	HTG4	ASB2	JOE
Schaf	OARFCB20	BMS332	ATTO565
Ziege	BM121	ILSTS022	ATTO565

Da die Primer jeweils fluoreszenzmarkiert sind, können auch PCR-Produkte ähnlicher Größe differenziert werden. Primerpaare für Rind, Schwein und Pferd sind dem grünen, mittels JOE markierten System, zuzuordnen, während die Primerpaare für Schaf und Ziege durch ihre ATTO565-Markierung dem roten System angehören. Diese Zuordnung ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Die Farbsysteme wurden getestet, indem Primermixe der farbspezifischen Primerpaare in 1:10 Verdünnung in 5 µl-Reaktiongefäßen erstellt wurden. Unabhängig von der Zahl der enthaltenen Primerpaare in einem Primermix kamen pro PCR-Reaktionsansatz zwei µl der Primermixe zum Einsatz. Neben den üblicherweise verwendeten Negativkontrollen, wurden die im vorherigen Schritt getesteten DNA-Proben aus Leber- oder Muskelgewebe als Positivkontrollen verwendet. Des Weiteren waren Extraktionsergebnisse aus Hackfleischproben sowie Gewebeproben einzelner Individuen Untersuchungsgegenstand.

Im letzten Schritt wurden die beiden Farbsysteme zusammengeführt, das bedeutet alle Primerpaare wurden in einem gemeinsamen Reaktionsansatz in die PCR eingesetzt. Neben den bereits zuvor verwendeten Negativ- und Positivkontrollen wurden nun die Extraktionsergebnisse sämtlicher in 3.1.2 beschriebenen Probematerialien auf dieser Weise auf ihre Herkunft überprüft.

3.4.4.2 „Horse-Plex“

Im Rahmen von Doppelbestimmungen wurden Proben einer Raviolifüllung, neben der Testung mittels „Meatplex“-PCR, einer bereits etablierten Multiplex-PCR für Pferde, der „Horseplex“-PCR, zugeführt. Diese Analyse stellt bei nicht eindeutigen kapillarelektrophoretischen Ausschlägen der Pferdesysteme eine Möglichkeit der Überprüfung der Ergebnisse dar (siehe 4.4.1.1). Verwendet wurde das kommerziell erhältliche Finnzyme® Equine Panel 1.1, mit dem 17 polymorphe STR-Genorte untersucht werden.

Das Pipettierschema für den Mastermix ist in Tabelle 9, das Temperaturprofil der sich anschließenden PCR ist in Tabelle 10 beschrieben.

Tabelle 9: Pipettierschema des Finnzyme Equine Panel 1.1.

Gelistet sind die Zusammensetzung des Mastermixes und die speziesspezifischen Genorte der verwendeten Primerpaare. Die eingesetzten Mengen beinhalten den zu erwartenden Pipettierverlust von einem Viertel des Probevolumens.

Komponente	Inhalt	Eingesetztes Volumen (µl)
Equine Panel 1.1 Mastermix	Aqua bidest	5 µl
	dNTPs (der vier Basen)	
	PCR-Puffer	
	Phusion-Polymerase	
Equine Panel 1.1 Primermix	Primerpaare für die Genorte VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425	5 µl
Proben-DNA		1 µl

Tabelle 10: Temperaturprofil der „Horse-Plex“-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (in Minuten)	Zahl der Zyklen
Initialisierung	98	1	1
Denaturierung	98	0,25	30
Primerbindung	60	1,25	30
Elongation	72	0,5	30
Finale Elongation	72	5	1
Stabilisierung	4	∞	-

3.5. Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese

Um die amplifizierten DNA-Sequenzen auswerten und einer Spezies zuordnen zu können, wird die Kapillarelektrophorese verwendet. Die ersten praktischen Analyseversuche wurden in den 1930er Jahren von Tiselius unternommen und seither ständig weiterentwickelt (Kay, 1988; Tiselius, 1937).

3.5.1 Prinzip der Kapillarelektrophorese

Wie bei der Agarosegelelektrophorese basiert auch die Kapillarelektrophorese auf der Unterscheidung von Wanderungsgeschwindigkeiten durch ein elektrisches Spannungsfeld (Hjerten, 1967). Dabei beeinflusst der durch Polymere entstehende Widerstand im höheren Maße die Wanderung länger als kurzer Fragmente. Bei der Kapillarelektrophorese sind zwei Elektrophoresepufferbereiche voneinander getrennt und durch eine schmale, Polymer enthaltende Kapillare verbunden. Zwischen den Pufferkammern ist eine Spannung angelegt. Die negativen DNA-Fragmente laufen durch das Polymergel in Richtung positive Anode. Dabei wandern kurze Fragmente schneller als längere. Werden die am 5'-Ende gekoppelten Farbstoffe mittels Laser angeregt, so kann ein Sensor das unterschiedliche Emissionsspektrum detektieren und auf einen CCD-Chip aufzeichnen (Mansfield et al., 1998). Diese Methode erlaubt also nicht nur die Unterscheidung der Fragmentlängen, sondern auch die Zuordnung der Fragmente zu den beiden Farbsystemen rot und grün (siehe Tabelle 8). Diese Aspekte ermöglichen die genaue Zugehörigkeit zum speziesspezifischen Marker. Zur Ermittlung der genauen Fragmentlänge wird ein Größenstandard, mit vom Hersteller definierter Basenpaaranzahl, verwendet. In der GeneMapper ID v3.2-Software werden diese Ergebnisse erhoben und im Elektropherogramm graphisch veranschaulicht.

3.5.2 Durchführung

Verwendet wurden je 11,7 µl Formamid als Puffer und Laufmittel, die mit 0,3 µl Größenstandard LIZ500® und zwei µl des zu untersuchenden PCR-Amplifikats versetzt, in eine 96er Arbeitsplatte pipettiert und mittels Gummiaufsatz verschlossen wurden. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 1000 upm, konnte die Platte im ABI Prism© 3130 Genetic Analyzer-Gerät von Applied Biosystems™ platziert und der Vorgang begonnen werden (Applied Biosystems,

2007). Die Kapillare enthielt POP®-4-Polymer als aufspaltendes Medium und maß 36 cm Länge sowie einen Durchmesser von 50 µl. Die im Genetic Analyzer ABI 3130 verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 11 beschrieben.

Tabelle 11: Analyseparameter im Genetic Analyzer ABI 3130 während der Kapillarelektrophorese.

Parameter	Einstellungswert
Injektionszeit	16 – 22 Sekunden
Injektionsvolt	1 kV
Laufvolt	15 kV
Lauftemperatur	60 °C
Laufzeit	1200 – 3000 Sekunden

3.5.3 Auswertung

Die Auswertung der Kapillarelektrophorese mit Hilfe der GeneMapper ID v3.2-Software bedient sich einer zweidimensionalen Darstellung. Das eigens für die Multiplex-PCR erstellte Panel beinhaltet zwei getrennte Darstellungen für identische Fragmentlängenbereiche. In dieser Form wird zwischen Primern des grünen, JOE markierten und des roten, ATTO565 markierten Systems, unterschieden.

Die für jede Spezies charakteristische Fragmentlänge, gemessen in Basenpaaren (bp), ist auf der x-Achse skaliert und beschreibt somit die Allele der PCR-Produkte. Die in RFUs (relative fluorescent units) gemessene Emissionsintensität der Fluoreszenzmarkierung findet sich auf der y-Achse und ermöglicht relative quantitative Aussagen über das Probenmaterial. Die Skalierung der x-Achse geschieht anhand des Größenstandards, welcher DNA-Fragmente definierter Länge enthält. Die Bereiche auf der Achse, in denen die den Primern zuzuordnenden DNA-Fragmente erwartet werden, sind grau unterlegt. Die Bezeichnung der Marker findet sich über dem dazugehörigen Bereich. Befindet sich entsprechendes Material in der Probe, sodass ein Peak erscheint, wird dieser entsprechend der zugehörigen Spezies, wie in Tabelle 5 beschrieben, benannt. Ein Peak wird dann erst als positives Ergebnis gewertet, wenn er eine RFU von 50 erreicht. Liegt er unter diesem Wert, kann er als Artefakt oder Hintergrundrauschen gewertet werden.

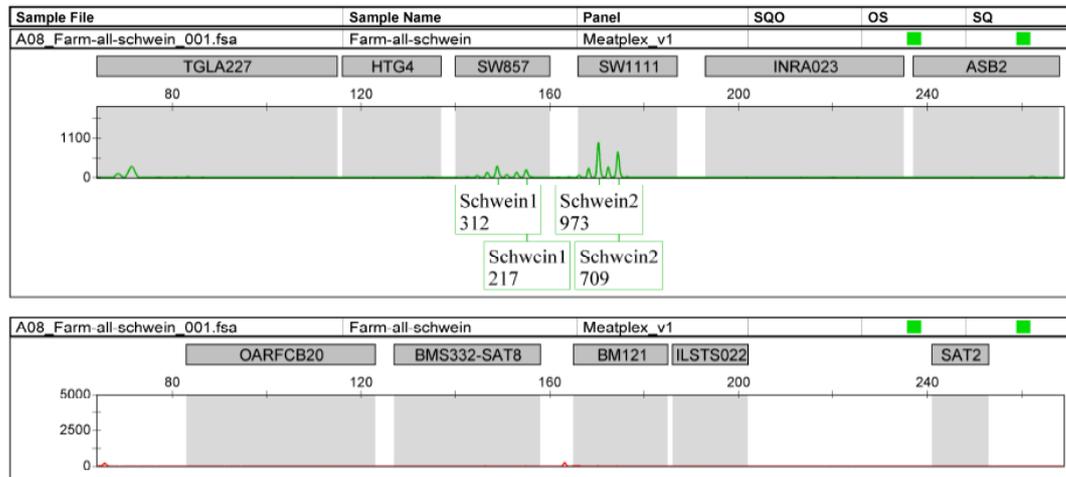


Abbildung 8: Beispiel für die elektropherographische Ansicht eines Testergebnisses des Nachweises schweinespezifischer STR-Merkmale. Die Kapillarelektrophorese erfolgte auf einem ABIPrism3130 unter Einsatz der GeneMapper Software.

Es wurde eine Schweinelebergewebsprobe verwendet. Unter der Bezeichnung der Spezies (hier in deutscher Sprache) ist die Fluoreszenzintensität in RFU angegeben. Da die Primer der beiden schweinespezifischen Genloci JOE-markiert sind, bleibt das rote System mit Ausnahme kleiner Artefakte peakfrei.

Als weiteres Kriterium hilft die Konfiguration der jeweiligen Peaks (Signale) bei der Entscheidung einen Ausschlag als positives Ergebnis zu werten oder ob es sich um Durchschläge, Artefakte oder Verunreinigungen handelt. Die Peaks der in dieser Arbeit ausgewählten Systeme sind triadenförmig aufgebaut. Dabei treten zwei oder mehrere sogenannte Vorpeaks auf. Der höchste erscheinende Ausschlag, welcher meistens der letzte ist, wird als wahr gewertet. Abbildung 9 gibt dafür ein Beispiel.

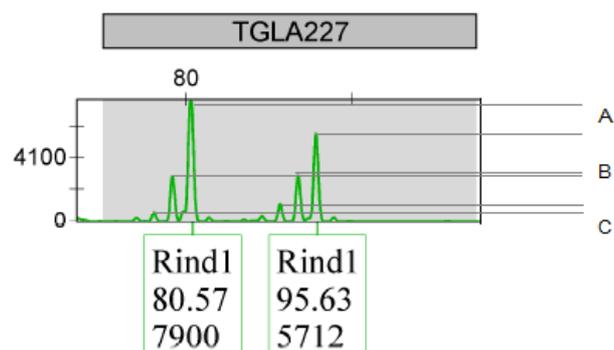


Abbildung 9: Peakkonfiguration einer Rinderprobe im Elektropherogramm eines ABIPrism3130.

A: Die beiden Peaks stellen jeweils die echten Peaks dar. B und C: Diese Ausschläge sind Vorpeaks und charakteristisch für den Dinukleotidprimer TGLA227 (entspricht COW-1 oder Rind-1).

Daraus wird deutlich, dass jeder Ausschlag im Elektropherogramm eine spezifische Morphologie aufweist. Die in Abbildung 10 sichtbare Darstellung zeigt die spezifische Konfigura-

tion eines jeden Peaks. Das Vergleichen der Ausschläge der zu untersuchenden Probe mit diesem Muster gibt eine Entscheidungshilfe, um echte Peaks von Durchschlägen und Artefakten abzugrenzen.

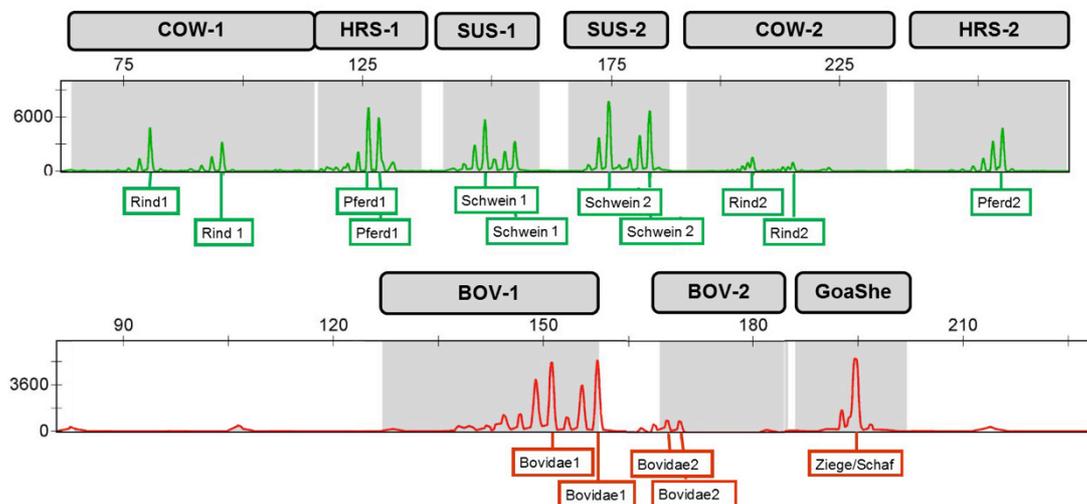


Abbildung 10: Musterhafte Darstellung der Peakkonfigurationen des Nachweises speziesspezifischer STR-Merkmale nach Kapillarelektrophorese auf einem ABI3130 sowie unter Einsatz der GeneMapper Software.

Meist treten sie in Form von Triaden in Erscheinung, wobei der höchste und meist letzte Peak der echte ist. Für diese Übersicht wurden mehrere Elektropherogramme zusammengeschnitten (verändert nach Modrow, 2014).

Anhand der Anzahl der Peaks für ein bestimmtes Merkmal lassen sich Homozygoten von Heterozygoten unterscheiden. Homozygoten besitzen auf den homologen Chromosomen je eine Kopie des identischen Gens, welches sie von mütterlicher und väterlicher Seite geerbt haben. Ihre Fragmentlängen sind identisch, weswegen die Peaks sich überlagern und wie ein alleiniger erscheinen. Heterozygote Merkmalsträger hingegen tragen auf den homologen Chromosomen nicht-identische Sequenzen unterschiedlicher Länge. Die Allele treten als zwei voneinander trennbare Peaks in Erscheinung. So ist beispielsweise die in Abbildung 10 dargestellte Pferde-DNA homozygoter Merkmalsträger für das Merkmal HRS-2, während die Rinder-DNA für die Marker beider Merkmale heterozygot ist, weswegen zwei Allele im selben System in Erscheinung treten.

Diese Kenntnis lässt sich ebenfalls auf die Untersuchung von Fleischgemischen übertragen. Erscheinen ein oder zwei Allele im Elektropherogramm, so ist die Herkunft der Probe von nur einem Individuum möglich. Sind mehr als drei Peaks für ein Merkmal sichtbar, setzt sich die Probe aus genetischen Material mehrerer Individuen zusammen. Abbildung 11 gibt hierfür ein Beispiel.

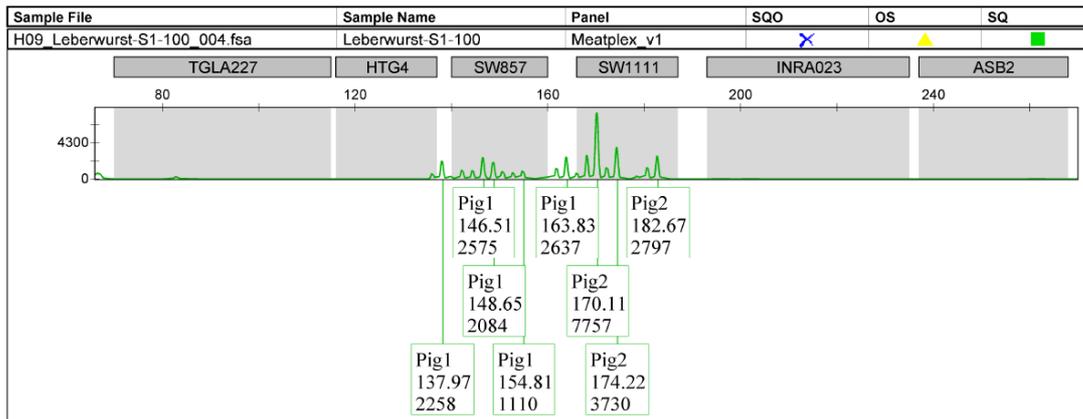


Abbildung 11: Elektropherographische Darstellung des Nachweises schweinespezifischer STR-Signale von mehr als einem Individuum nach Analyse durch einen ABIPrism3130 und multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation.

In einer Leberwurst sind mehr als zwei Fragmente pro getesteten Genlocus erkennbar. Jedes Allel ist mit einer Beschriftung Pig 1 oder Pig 2 gekennzeichnet. Diese Anzahl der Ausschläge liefert den Beweis, dass die Leberwurst Gewebe von mindestens zwei Individuen enthält.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der untersuchten Tierspezies

Jedes der für dieses Projekt ausgewählten Spezies ist mit der entwickelten Multiplex-PCR identifizierbar. Aufgrund der geschichtlichen Entwicklung der Domestikation lassen sich unter den hier untersuchten Arten Verwandtschaften feststellen. So lassen sich die Ordnungen der Paarhufer, zu denen das Pferd gezählt wird, von den Unpaarhufern, wie Schwein, Rind, Ziege und Schaf, unterscheiden. Des Weiteren gehören Rinder, Ziegen und Schafe zu den Hornträgern (lat.: Bovidae). Die Kenntnis über den Grad der Verwandtschaft ist unerlässlich für die Auswahl der Primer und die Interpretation der Ergebnisse.

Unter forensischen und lebensmittelkontrolltechnischen Aspekten kann es wichtig sein aus beispielsweise im Wald aufgefundenen Gewebsteilen oder aus Lebensmitteln die beteiligte Tierart zu ermitteln. Entsprechend wurden die in Deutschland am weitesten verbreiteten Nutztiere, Geflügel ausgenommen, ausgewählt. Um diese Arten sicher in einer Doppelbestimmung feststellen zu können, wurden pro Spezies mindestens zwei Primerpaare verwendet.

4.2 Einfluss der Extraktionsmethode

Die Grundlage jeglicher weiterführenden Untersuchung des Probenmaterials ist abhängig von der Ausbeute und der Qualität der DNA-Extraktion. Neben diesen Kriterien, die den weiteren Verlauf der Experimente mitbestimmen, müssen jedoch auch wirtschaftliche Aspekte, wie der zeitliche und finanzielle Aufwand berücksichtigt werden. Im Folgenden werden die manuelle Extraktionsmethode mittels Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Stratec™) der semiautomatischen Methode mit Hilfe des stratec InviMag KF96 Mini Kits für das KingFisher Flex-Gerät (Thermo Scientific®) gegenübergestellt.

4.2.1 DNA-Quantität und -Qualität

Zum Zwecke der Qualitäts- und Quantitätskontrolle wurden definierte Mengen von Gewebeproben sowohl manuell als auch semiautomatisch extrahiert und die erhaltenen Extrakte mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert und quantifiziert.

Verwendet wurden je 100, 50, 25 sowie 12,5 mg Lebergewebe vom Rind und Schwein, deren DNA anhand der in 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Vorgehensweise extrahiert wurden. Im

Anschluss wurden die Erzeugnisse in einem Agarosegel aufgetragen (siehe 3.3.1). Im Gel wandern hochmolekulare, große DNA-Fragmente langsamer, verbleiben also näher an den Geltaschen, dem Ausgangspunkt der Gelelektrophorese. Hochfragmentierte niedermolekulare DNA kann im Spannungsfeld das Gitternetz des Agarosegels schneller überwinden und legt daher eine längere Strecke zurück. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, enthielten die Extraktionsprodukte der manuell extrahierten Gewebeproben relativ betrachtet mehr hochmolekulare DNA, im Gegensatz zu den semiautomatisch extrahierten DNA-Proben, die weniger hochmolekulare aber mehr fragmentierte DNA beinhalteten.

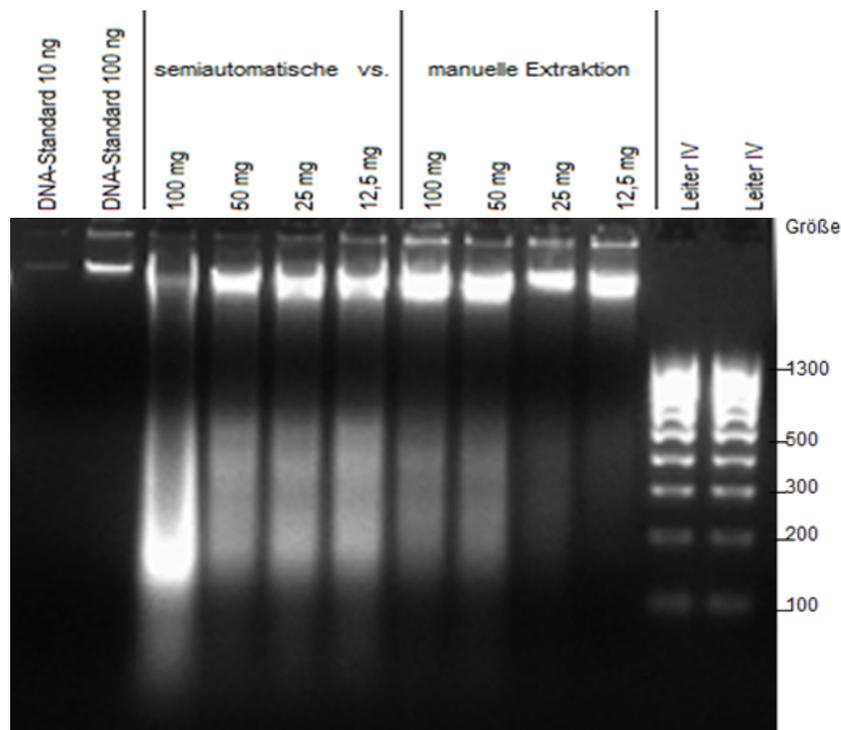


Abbildung 12: Überprüfung von DNA-Quantität und -Qualität von Erbmateriale aus Gewebeproben nach manueller und semiautomatischer Extraktion. Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung.

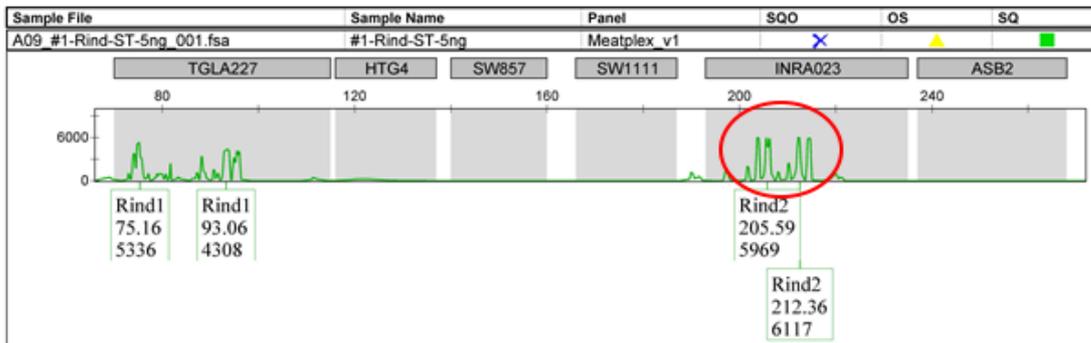
Dabei wurden unterschiedliche Gewebemengen eingesetzt. Fragmente der Leiter IV wurden bei der densitometrischen Auswertung als Größenstandard (gemessen in Anzahl der Basenpaaren) verwendet. Es ist sichtbar, dass die semiautomatische Extraktionsmethode im Vergleich zur manuellen Extraktion zu mehr Fragmentenebel, also fraktionierter DNA und weniger hochmolekularer DNA führt.

Die anschließende, auf densitometrischer Messung beruhende Quantifizierung mit Hilfe der MeMo Forensics Membralyzer© Software (siehe 3.3.2) ergab keine deutlichen Differenzen der in den Proben enthaltenden DNA-Gesamt mengen (siehe Tabelle 19 im Anhang).

Um die Auswirkung der Extraktionsmethode auf die kapillarelektrophoretische Auswertung abschätzen zu können, wurden je 5, 2,5, 1,25 und 0,625 ng des manuell und semiautomatisch gewonnenen DNA-Materials im ABI Prism© 3130 Genetic Analyzer-Gerät untersucht. Die Elektropherogramme beider Extraktionsmethoden sind ähnlich und gut auswertbar. Le-

diglich die Elektropherogramme der Extraktionen von 5 ng Gewebeproben unterscheiden sich, wobei die Proben der semiautomatischen Methode saubere Triaden erkennen lässt, während die Triaden der manuell extrahierten Proben mit Artefakten durchsetzt sind. Sie sind in Abbildung 13 gegenüber gestellt.

A:



B:

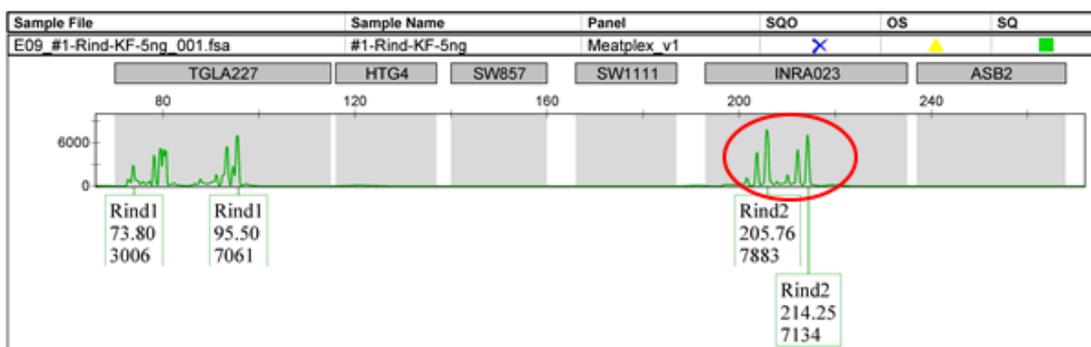


Abbildung 13: Qualität der PCR-Produkte nach manueller und semiautomatischer DNA-Extraktion. Elektropherogramm eines ABIPrim3130 des Extraktionsproduktes von je fünf ng Rinderlebergewebe nach Amplifikation mittels „Meatplex“-PCR.

A: DNA-Extraktion mittels manueller Methode; B: DNA-Isolierung mittels semiautomatischer Extraktion. Erkennbar ist, dass die Triadenbildung der semiautomatischen Extraktionsmethode mit Hilfe des King Fisher Flex- Gerätes im Bereich des Rindsystems (= COW-2) eindeutiger zur Geltung kommt, während die beiden entsprechenden Allele beim Spin-Tissue-Extraktionsprodukt mit Artefakten durchsetzt ist. Die roten Umkreisungen zeigen auffällige Unterschiede der triadenförmigen Konfiguration der Ausschläge zwischen manuell und semiautomatisch extrahierten DNA-Proben.

4.2.2 Aufwand und Kosten

Die semiautomatische Extraktionsmethode mit Hilfe des King Fisher Flex-Gerätes liefert im Vergleich zur manuellen Extraktion mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit erhebliche zeitliche Vorteile. Einerseits stellt die Inkubationszeit von 15 Minuten der semiautomatischen, im Vergleich zu zwei Stunden bei der manuellen Methode, einen Grund der Zeitersparnis dar. Zum anderen birgt die jeweils vom Personal eigenhändig durchzuführenden anschließenden Waschschriffe der manuellen Methode, durch Filtration und Zentrifugation der DNA einen

deutlich höheren Zeit- und Arbeitsaufwand. Im Gegensatz dazu benötigt die automatische Reinigung durch Transport der an die Plastikämme gebundenen DNA lediglich die Vorbereitung der jeweiligen Waschplatten vor Einsatz der Proben in das Gerät.

Neben den Kosten, die durch die Präsenz des Personals bei der manuellen Methode entstehen, ist der Verbrauch an Reaktionsgefäßen und Filtern hier besonders hoch. Nach jedem Reinigungsschritt werden die Reaktionsgefäße jeder einzelnen Probe, die den Überstand enthalten, verworfen. Im King Fisher Flex-Gerät werden mit vier Arbeitsplatten, die in 96 Kammern unterteilt sind, weniger Materialien benötigt.

Da sowohl in Hinsicht auf die aufzuwendende Arbeitskraft und die finanziellen Mittel, als auch auf die Qualität der kapillarelektrophoretischen Auswertung im Elektropherogramm die semiautomatische Extraktionsmethode mittels KingFisher Flex-Gerätes von Vorteil ist, werden alle in dieser Arbeit verwendeten Proben mit seiner Hilfe extrahiert.

4.3 Speziesidentifizierung mittels PCR

Die Identifizierung von Rind, Schwein, Pferd, Schaf und Ziege erfolgt durch die Amplifizierung ausgewählter Bereiche mittels Polymerase-Kettenreaktion. Dabei muss die Spezifität der Systeme gesichert, die Nachweisgrenzen ermittelt und Reaktionsbedingungen angepasst werden.

4.3.1 Spezifität der Multiplex-PCR

Zuerst wurden die, wie in 3.4.2 beschrieben ausgewählten Primerpaare mit DNA-Proben der ihnen zuzuordnenden Spezies einzeln getestet. Alle Versuchsergebnisse waren positiv für die DNA-Probe des erwarteten Tieres, mit Ausnahme des schafspezifischen Systems OARFCB20.

Im darauffolgenden Schritt wurden fünf unterschiedliche Multiplex-PCRs mit den fünf zu testenden Spezies und deren in Tabelle 8 gelisteten zwei Primerpaaren im gemeinsamen Ansatz untersucht. Mit Ausnahme des Primers OARFCB20, agierte jeder Primer erwartungsgemäß als Ausgangspunkt der Elongation. Dieser Versuchsablauf wird in Tabelle 12 veranschaulicht. Nach mehrfacher Reproduktion der Ergebnisse, wurde OARFCB20 aus der Primerauswahl gestrichen und war aus jeder weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

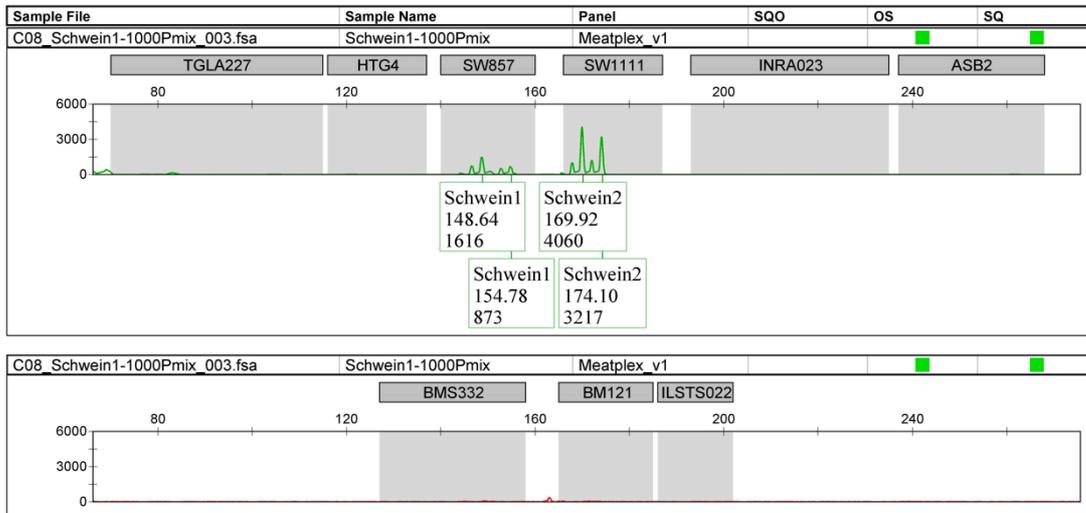
Tabelle 12: Ergebnisübersicht der gemeinsamen Testung beider Primerpaare einer Spezies in einem Multiplex-PCR-Ansatz.

Nur die spezifischen Signale für das Schaf im Bereich des Markers OARFCB20 (entspricht She), für eine Region des Schafgenoms, blieb aus. Alle weiteren Untersuchungen beider artspezifischen Primerpaare im gemeinsamen Ansatz ergaben entsprechende elektropherographische Signale und waren somit erfolgreich.

Genetisches Material	Primer	Amplifikation	
Rind	COW-1	Erfolgreich	
	COW-2		
Schwein	PIG-1		
	PIG-2		
Pferd	HRS-1		
	HRS-2		
Schaf	She		Ohne Erfolg
	BOV-1		Erfolgreich
Ziege	BOV-2		
	GoaShe		

Die gemeinsame Testung der Primer in ihren Farbsystemen (siehe Tabelle 8) in einem Multiplex-Ansatz sowie die Testung aller Primerpaare gemeinsam war erfolgreich. Unerwartete Besonderheiten ergaben sich bei den Primern des roten Farbsystems. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 13 beschrieben. Die Elektropherogramme der vervielfältigten DNA-Proben aus extrahierten Schweine- und Ziegengewebssproben sind beispielhaft in Abbildung 14 dargestellt. Die Elektropherogramme der weiteren getesteten Spezies können der Abbildung 28 des Anhangs entnommen werden.

A:



B:

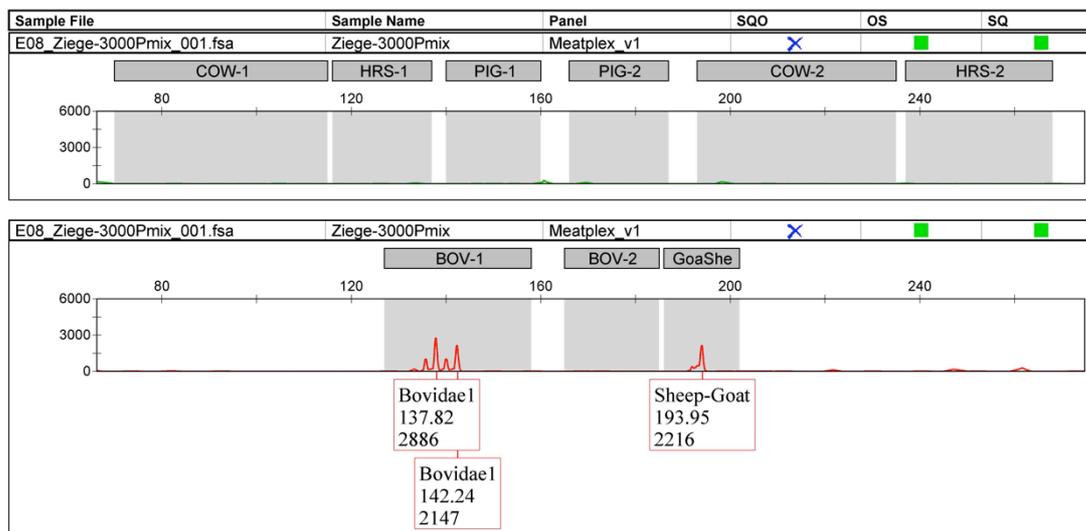


Abbildung 14: Elektropherographische Darstellung des DNA-Nachweises aus Schweine- und Ziegenproben, die mittels Multiplex-PCR vervielfältigt und auf einem ABIPrism3130 kapillarelektrophoretisch analysiert wurden.

A: Elektropherogramm der Schweine-DNA-Probe. Wie erwartet lassen sich Ausschläge der System PIG-1 und PIG-2 (Schwein-1 und Schwein-2) verzeichnen. B: Elektropherogramm einer vervielfältigten Ziegen-DNA-Probe. Es zeigen sich Ausschläge in den Fragmentlängenbereichen der Primer BMS332 (entspricht BOV-1) und ILSTS022 (entspricht GoaShe). Diese Kombination kann sowohl bei Testung von Ziegen-DNA, wie auch von Lamm-DNA vorkommen.

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der im Elektropherogramm ausschlagenden und somit speziesspezifischen Primersysteme mit vorheriger Amplifikation mittels entwickelter Multiplex-PCR.

Hierzu wurden Proben bekannter Herkunft getestet. Die Kombination der Primer ist für die entsprechende Spezies charakteristisch. Anhand dieser Tabelle lässt sich die in einer unbekannt Probe enthaltene Art ablesen. Die Benennung der Genorte erfolgte auf Grundlage dieser Versuchsergebnisse. So ergeben die Primersysteme BMS332 und BM121 ebenfalls bei Rinderproben Ausschläge und sind dementsprechend spezifisch für alle hier getesteten Hornträgern (Bovidae). Der Primer BM121 initiiert nur bei einigen Schafen die Amplifikation, was möglicherweise mit den unterschiedlichen Verwandtschaftsgraden der Unterformen mit Ziegen zusammenhängt. Entsprechendes gilt auch für den Primer BMS332, der die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen einiger Ziegenarten veranlassen kann. Meist reagiert nur einer der beiden hornträgerspezifischen Systeme auf Ziegen- und Schafs-DNA, was eine definitive Spezifizierung erschwert.

Primer	Rind	Schwein	Pferd	Schaf	Ziege	Bezeichnung
TGLA227	?	X	X	X	X	COW-1
INRA023	?	X	X	X	X	COW-2
SW857	X	?	X	X	X	PIG-1
SW1111	X	?	X	X	X	PIG-2
HTG4	X	X	?	X	X	HRS-1
ASB2	X	X	?	X	X	HRS-2
BMS332	X	X	X	(?)	(?)	BOV-1
BM121	?	X	X	(?)	(?)	BOV-2
ILST022	?	X	X	?	?	GoaShe

Die speziesspezifischen Markerfragmente besitzen jeweils eine charakteristische Fragmentlänge und Farbmarkierung, die, in Abhängigkeit von der Kombination, auf die Herkunft des Probenmaterials hinweisen. Die entsprechenden Untersuchungsergebnisse ergeben das in Abbildung 15 vereinfachte dargestellte Schema.

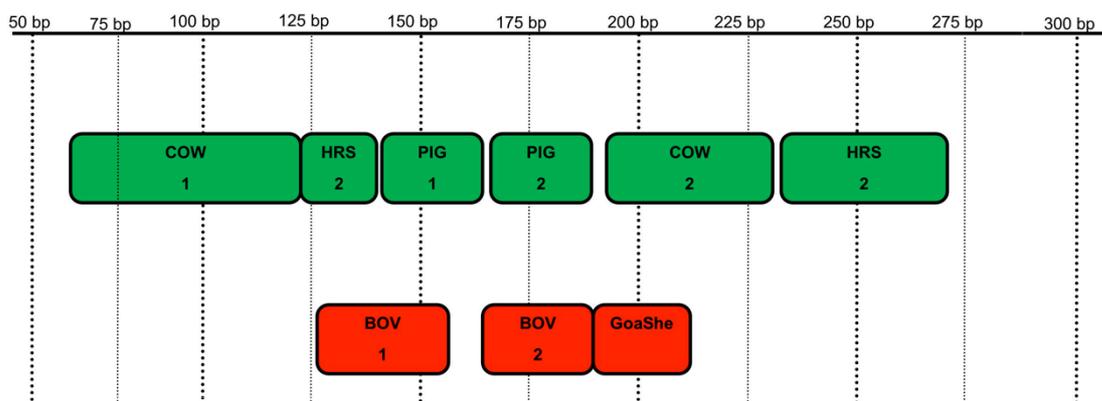


Abbildung 15: Veranschaulichung der speziesspezifischen DNA-Fragmente nach ihren Basenpaarlängen und Farbmarkierungen.

Nach der Kombination des Auftretens im Elektropherogramm lassen sich Fleischproben oder sogar Probengemische spezifizieren. (Eigene Darstellung)

4.3.2 Nachweisgrenzen der Multiplex-PCR

Um Aussagen darüber zu treffen, bis zu welchem DNA-Gehalt einer Spezies in der Testprobe das Erbgut als artspezifisch erkannt werden kann, muss die Nachweisgrenze ermittelt werden. Dazu wurden 100 mg Rinder-, Schweine-, Pferde-, Schafs- und Ziegenewebe extrahiert und mit TE-Puffer bis auf eine Konzentration von 3, 1,5, 0,75 und 0,375 ng/ μ l verdünnt. Als Grundlage dafür diente die Quantifizierung von Verdünnungsreihen von 1:50 bis 1:3000 mittels densitometrischer Ausmessung der Agarosegelelektrophoresen. Beispielhaft ist das Agarosegel in Abbildung 16 dargestellt, dessen Banden die Proben je einer Verdünnungsreihe von Rinder- und Schweine-DNA zeigen. Entsprechende Gelelektrophoresen mit den dazugehörigen densitometrischen Auswertungen sind der Abbildung 29 und Tabelle 20 des Anhangs zu entnehmen.

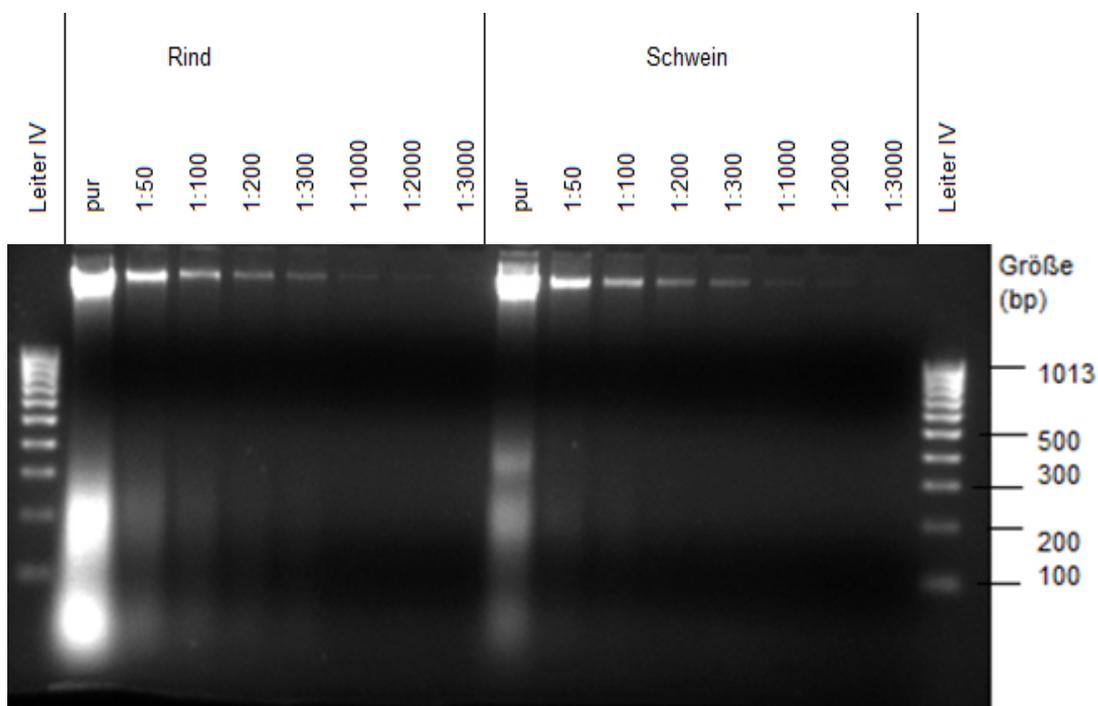


Abbildung 16: Quantifizierung der Gesamt-DNA aus Gewebe von Rind und Schwein über densitometrische Auswertung einer Verdünnungsreihe. Foto eines zweiprozentigen, ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels nach 45 Minuten Laufzeit.

Mit steigender Verdünnung der DNA-Lösung ist die Abnahme der Fluoreszenz der Banden zu erkennen.

Die definierten DNA-Mengen von 3 bis 0,375 ng wurden folglich als Template in die PCR eingesetzt. Anhand der durch das ABI Prism© 3130 Genetic Analyzer-Gerät erstellten Elektropherogramme, konnte die Nachweisgrenze ermittelt werden. Sie ist die kleinste einsetzbare Menge, bei der beide Allele heterozygoter Individuen als auswertbare Peaks in Erscheinung treten. Die so ermittelten Nachweisgrenzen der jeweiligen Markersysteme der Spezies sind in

Tabelle 14 dargestellt. Die Marker COW-1 und -2, HRS-2 sowie BOV-2 liefern bei einem DNA-Gehalt von 0,75 ng zuverlässige Ergebnisse, während alle anderen Markersysteme in der Lage sind einen DNA-Gehalt von 0,375 zu detektieren. Im Allgemeinen lassen sich bei einem DNA-Gehalt von 0,75 ng in jedem System spezifische und reproduzierbare Peaks detektieren, weswegen dieser Wert als Nachweisgrenze dieser Multiplex angenommen wird.

Tabelle 14: Nachweisgrenzen der Spezies in den unterschiedlichen STR-Systemen-

Die endgültige Nachweisgrenze liegt bei 0,75 ng, da jedes System diesen DNA-Gehalt einer Probe detektieren kann. Die genauen Ergebnisse dieser Versuchsreihe inklusive RFUs können der Tabelle 21 des Anhangs entnommen werden.

Art	Marker	Nachweisgrenze des Markers (ng)	Sichere Nachweisgrenze für die Spezies (ng)
Rind	COW-1	0,75	0,75
	COW-2	0,75	
	BOV-1	0,375	
	BOV-2	0,375	
Schwein	PIG-1	0,375	0,375
	PIG-2	0,375	
Pferd	HRS-1	0,375	0,75
	HRS-2	0,75	
Schaf	BOV-1	0,375	0,375
	GoaShe	0,375	
Ziege	BOV-2	0,75	0,75
	GoaShe	0,375	

Die zur Nachweisgrenzenbestimmung durchgeführte Quantifizierung der Verdünnungsreihen kann ebenfalls zur Suche der einzusetzenden Verdünnung genutzt werden, die zur Auswertung mittels Multiplex-PCR und Kapillarelektrophorese optimal ist. Wie bereits beschrieben, ist für eine sichere Bestimmung eine Konzentration von drei bis vier ng zu bevorzugen.

Auffällig ist die Abhängigkeit der Verdünnungen mit entsprechender Konzentration von der Art des Gewebes. Organewebe, in diesem Falle Lebergewebe von Rind und Schwein, erreichte den genannten DNA-Gehalt bei einer Verdünnung von 1:1000, während er beim Muskelgewebe, wie es beispielsweise bei der Ziege verwendet wurde, einer Verdünnung von 1:300 entsprach. (siehe Tabelle 20 der densitometrischen Ausmessung im Anhang). Für

Mischfleisch wie beispielsweise Hackfleisch, Würstchen und Leberwurst stellte sich eine Verdünnung von 1:100 als geeignet heraus. (Siehe Abbildung 30 im Anhang)

4.3.3 Optimierung der Multiplex-PCR

Allgemeine PCR-Protokolle dienen als Ausgangspunkt für das Protokoll der vorgestellten Multiplex-PCR. Um die PCR zu optimieren oder lukrativer zu machen, lassen sich an einigen Stellen jedoch die verändern.

4.3.3.1 PCR-Bedingungen

Die anfängliche Zyklenanzahl der PCR betrug 20 und wurde allmählich vermindert. Aus dieser Verminderung der Replikationsvorgänge sollte unter anderem eine möglichst hohe Anzahl von Amplifikaten des gewünschten Gensegments folgen, während die Anzahl fälschlicherweise vervielfachter Artefakte möglichst niedrig gehalten werden sollte. Nach schrittweiser Erniedrigung der Anzahl der Zyklen erwiesen sich 34 Amplifikationswiederholungen als geeignet.

Jedes der Primerpaare, die in der Multiplex-PCR zum Einsatz kommen, hat ein spezifisches und individuelles Temperaturoptimum, in dem es die Zielsequenz des Matrizenstranges spezifisch binden kann. Um die Bindetemperatur zu ermittelt bei der alle Primerpaare zielgenau mit dem Templatestrang hybridisieren, wurde ausgehend von der höchsten der optimalen Bindungstemperaturen, hier 65°C, die Temperatur Schritt für Schritt minimiert. Artefakte wurden mit sinkender Temperatur weniger, während die triadenförmigen Peaks deutlicher in Erscheinung traten. Zwischen 55°C und 65°C waren die Ausschläge am deutlichsten, während niedrigere Temperaturen die Qualität der Peaks minderten. Diese Bindungstemperaturspanne erwies sich also als optimal für die Multiplex-PCR, weswegen diese in zwei Phasen unterschiedlicher Primerbindungstemperaturen unterteilt wurde. Nach der initialen Denaturierung erfolgt also die erste, 17 Zyklen beinhaltende Phase mit einer Primerbindetemperatur von 60°C, während die zweite Phase gleicher Zyklenzahl mit einer Primerbindetemperatur von 55°C beginnt. Die optimierten Temperaturbedingungen für die etablierte PCR sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Optimale Reaktionsbedingungen für die entwickelte Multiplex-PCR.

Die Multiplex-PCR lässt sich in zwei Phasen unterteilen, die sich lediglich in ihren Primerbindungstemperaturen unterscheiden.

Phase	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (in Minuten)	Anzahl der Zyklen
	Initiale Denaturierung	95	10	1
Phase I	Denaturierung	95	0,5	17
	Primerbindung	60	0,5	
	Elongation	72	1	
Phase II	Denaturierung	95	0,5	17
	Primerbindung	55	0,5	
	Elongation	72	1	
	Finale Elongation	72	0,5	1
	Kühlung	4	∞	-

4.3.3.2 Halbierung des PCR-Ansatzes

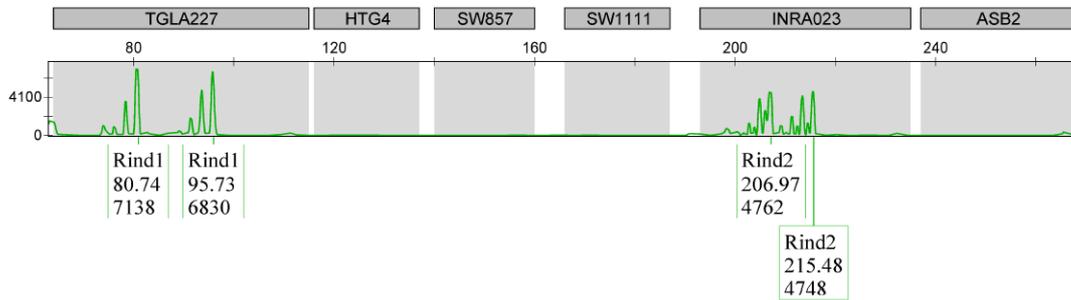
Mit dem Ziel, Ressourcen und damit Kosten zu sparen, wurde der PCR-Ansatz halbiert. Diese Reduzierung hatte keinen negativen Einfluss auf die Qualität der elektrophoretischen Auswertung, wie der Abbildung 17 zu entnehmen ist. In allen Reaktionsansätzen wurde folglich nur der halbe Reaktionsansatz verwendet. Das neue Pipettierschema ist in Tabelle 16 gezeigt.

Tabelle 16: Pipettierschema des halbierten PCR-Ansatzes.

(Vergleiche Tabelle 6) Es wird routinemäßig nur ein µl DNA-Template eingesetzt.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen (µl)
Bidestilliertes Wasser		6,2
Immobuffer	10 x	1,2
Primer	10 pmol/µl	2
dNTP	Je 2,5 mM	1
MgCl ₂	50 mM	0,5
Dimethylsulfoxid (DMSO)	100 %	0,5
Immolase	5 U/µl	0,1
DNA-Template	3-4 ng/µl	1 µl
Gesamtvolumen		12,5 µl

A:



B:



Abbildung 17: Nachweis multiplexgesteuert spezifischer Amplifikate bei reduziertem Reaktionsansatz im Elektropherogramm einer ABIPrism3130 analysierten DNA-Probe. Vergleich der Elektropherogramme zwischen vollen und halben PCR-Ansatz.

Beispielhaft wurden drei ng einer DNA-Probe vom Rind verwendet. Abbildung A zeigt das Elektropherogramm eines vollen, Abbildung B hingegen das Ergebnis eines halben PCR-Ansatzes. Die Höhe des Ausschlag ist vergleichbar, was eine negative Beeinflussung der Auswertung durch die Halbierung des Ansatzes ausschließt.

4.3.4 Überprüfung der DNA-Proben auf PCR-Inhibitoren

Ist im Elektropherogramm kein Ausschlag erkennbar, kann ursächlich das Nichtvorhandensein einer ausreichenden Menge intakter DNA im Probenmaterial oder die Hemmung der Extraktion oder der PCR vorliegen. Die Beinhaltung von DNA im Extraktionsprodukt lässt sich, sofern in ausreichender Menge vorliegend, im Agarosegel darstellen. Wird das Vorhandensein von DNA-Material damit bestätigt und ergibt die kapillarelektrophoretische Auswertung dennoch kein Ergebnis, so stammt das genetische Material entweder nicht von den, mittels „Meatplex“-PCR detektierbaren Spezies, oder die Amplifikation während der PCR wird durch gewisse Hemmstoffe verhindert. Um letzteres auszuschließen, kann eine sogenannte Inhibitor-PCR durchgeführt werden. Dabei wird als positive Amplifikationskontrolle die DNA eines Süßwasserpolypen Hydra, inklusive sein spezifisches Primerpaar, dem üblichen PCR-Ansatz mit der zu testenden DNA-Probe zugeführt. Die Amplifikation dieser Polypenspezifischen DNA ist unter verschiedensten Reaktionsbedingungen möglich und eignet sich daher für den Zweck, Hemmstoffe der PCR auszuschließen. Wird die DNA des Polypen vielfältig und in Form eines Peaks im Elektropherogramm sichtbar, so wird die PCR als sol-

ches nicht gehemmt. Anderenfalls ist eine Hemmung unter normalen Umständen und funktionierenden Analyseparametern nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurden Lederproben unterschiedlicher Verarbeitung (siehe 3.1.2.5) verwendet. Den Verdacht, in den Gerbstoffen seien Hemmstoffe der PCR vorhanden, galt es zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurden dem herkömmlichen PCR-Ansatz 0,5 µl Hydra-DNA und ein µl des dazugehörigen Primerpaares (je 10 pmol) beigelegt. Zeitgleich wurde das entsprechende Volumen Aqua Bidest weggelassen, um die PCR-Bedingungen konstant zu halten. In jeder Analyse der Lederproben war der Hydra-spezifische Peak immer gleicher Basenpaarlänge weit außerhalb des Fragmentlängenbereiches der Speziessysteme zu sehen. Damit war die Hemmung der PCR ausgeschlossen und es ist davon auszugehen, dass durch die Bearbeitung der Lederproben die DNA-Moleküle zu stark zerstört wurden, als dass sie amplifizierbar wären. Eines der Elektropherogramme wird in Abbildung 18 exemplarisch gezeigt, in der ein Panel für den Hydra-Marker als Hemmstoffkontrolle eingerichtet ist.

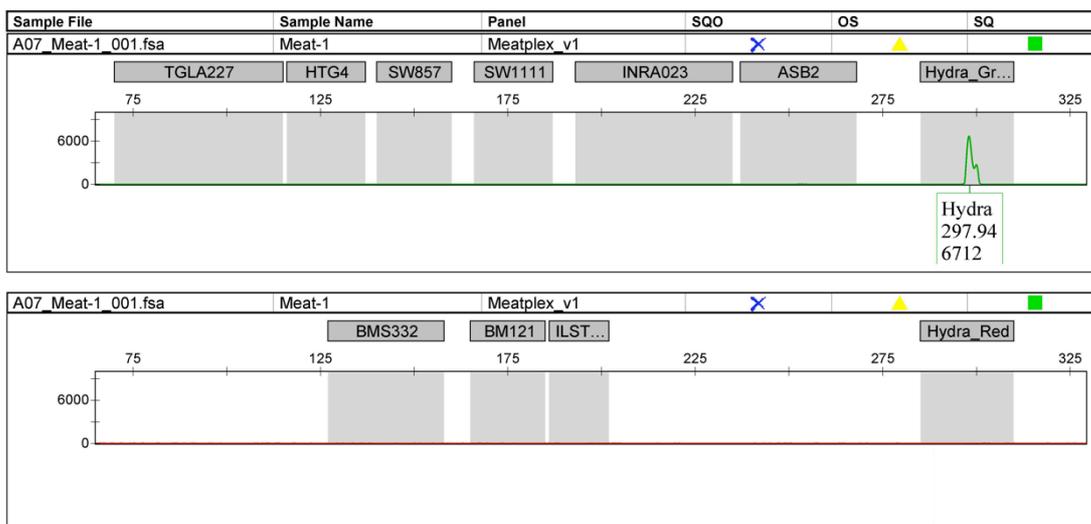


Abbildung 18: Überprüfung der Multiplex-PCR auf Inhibitoren durch Koamplifikation von Hydra-spezifischen DNA-Fragmenten. Elektropherographische Darstellung eines mittels ABIPrism3130 analysierten DNA-Extraktionserzeugnisses einer Rindslederprobe.

Als Beispiel ist hier das Elektropherogramm des vervielfältigten Extraktes einer chromgegerbten Rindslederprobe aufgeführt, in dem keine Ausschläge zu verzeichnen sind. Das Auftreten von Hydra-DNA-Peaks spricht gegen die Hemmung der PCR durch Gerbstoffe. Die Ursache des Fehlens der DNA ist also in anderen Schritten der Probenverarbeitung zu suchen.

4.4 Einsatz der etablierten Methode

Die Multiplex-PCR macht es möglich, die DNA von fünf der in Deutschland am häufigsten vertretenen Nutztierarten in nur einem PCR-Ansatz simultan zu amplifizieren und sie so zu

identifizieren. Die ausgewählten Tierarten begegnen uns in vielen Bereichen wie beispielsweise in der Lebensmittel- und Textilindustrie. Auch im rechtsmedizinischen Alltag sind sie ein wichtiger Bestandteil. In dieser Arbeit wurden Gewebeproben unterschiedlichster Art auf Anwendbarkeit der Methode geprüft.

f4.4.1 Speziesbestimmung aus Fleisch- und Wurstwaren

Getestet wurden 18 Fleischproben aus Fleischtheken der Fleischerei Hasch sowie einer Supermarktkette in Kiel und des Ziegenhofes Rheder in Boksee. Sämtliche Proben waren, wie in Tabelle 1 im Abschnitt 3.1.2.2 beschrieben, in unterschiedlichster Weise verarbeitet. Sie wurden nach Zustimmung der Inhaber auf die enthaltenden Spezies untersucht. Zuvor wurden, falls möglich, pflanzliches Material, Öl und sonstige Zusätze durch Waschen reduziert.

Beinahe jede der untersuchten Proben enthielten die deklarierten Spezies, was nicht nur die Richtigkeit der Ausweisungen bestätigt, sondern auch die Anwendbarkeit der entwickelten Multiplex-PCR. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 19 das Elektropherogramm einer Hackfleischprobe abgebildet. Weitere Beispiele sind der Abbildungen 31 bis 41 des Anhangs zu entnehmen (siehe Anhang D.3.1).



Abbildung 19: ABIPrism3130 basierter, kapillarelektrophoretischer Nachweis speziesspezifischer STR-Merkmale von Lamm und Rind aus einer Hackfleischprobe. Die verwendete DNA wurde zuvor mittels entwickelter Multiplex-PCR amplifiziert.

Aus der hohen Anzahl der Allele lässt sich schließen, dass das Fleisch von mehreren Individuen stammt.

Eine Ausnahme bildet die Benennung des in Cevapcici enthaltenen Fleisches. Während nach Angabe des Verkäufers ausschließlich Rindfleisch enthalten sein sollte, war laut Untersuchung und Doppelbestimmung durch die etablierte Multiplex-PCR ebenfalls Schweinefleisch enthalten, wie das folgende Elektropherogramm in Abbildung 20 zeigt.



Abbildung 20: ABI-Prism3130 basierter elektropherographischer Nachweis rinds- sowie schweinespezifischer DNA, die mittels Multiplex-PCR aus dem Extraktionsergebnis einer als Rindercevapceci deklarierten Ware amplifiziert wurde.

Nach Angaben des Verkäufers beinhaltet die Ware reines Rindfleisch. Nach kapillarelektrophoretischen Auswertung der Probe werden jedoch auch Ausschläge in den Schweinesystemen SW857 (PIG-1) und SW1111 (PIG-2) gefunden. Die Peaks sind durch rote Umrandung hervorgehoben.

Des Weiteren waren gekühlte und tiefgefrorene Fertigspeisen Gegenstand der Untersuchungen. Diese sind in Tabelle 2 (siehe 3.1.2.2) aufgelistet. Der Auswertung der Elektropherogramme zufolge entsprach das Fleisch jeweils der deklarierten Spezies; die Ergebnisse der Analyse sind demzufolge derselben Tabelle zu entnehmen. Eine Ausnahme bildete das Ergebnis der Untersuchung der Ravioli-Probe, welches nicht eindeutig zu beurteilen war. So zeigte sich, neben den zu erwartenden Ausschlägen in schweinespezifischen Markersystemen, Signale im Bereich des pferdespezifischen STR-Bereich HRS-1. Die weiterführende, zielführende Untersuchung ist im Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben.

Das Elektropherogramm der Analyse einer Gänseleberpastete ist in Abbildung 21 aufgezeigt. Hier bestätigt sich der vom Hersteller deklarierte Anteil Schweinegewebe. Alle weiteren Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abbildungen 42 bis 51 des Anhangs D.3.2 zu finden.

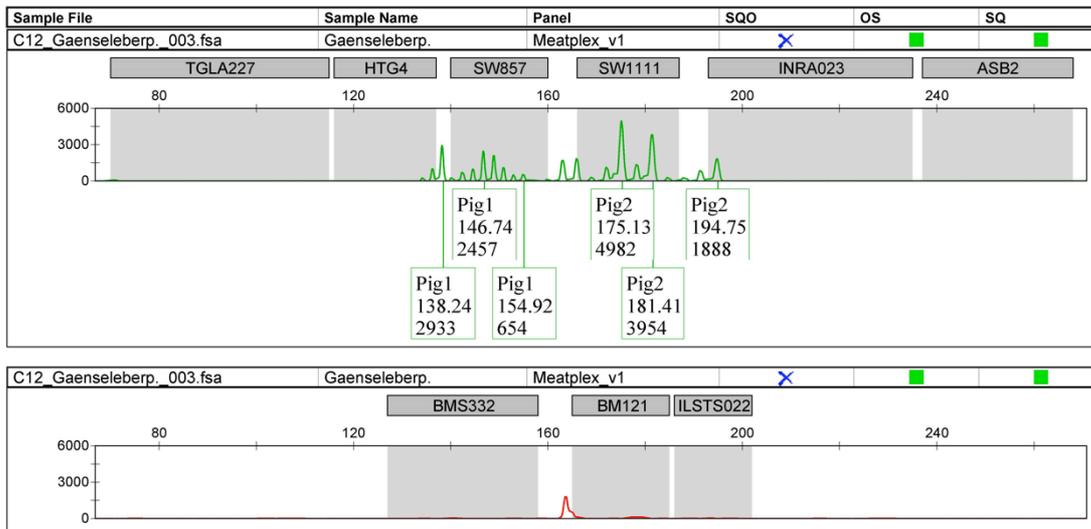


Abbildung 21: Speziesidentifizierung einer aus Gänseleberpastete stammender DNA-Probe mittels neu entwickelter Multiplex-PCR. Elektropherogramm der durch ABIPrism3130 analysierten Probe.

Wie vom Hersteller beschrieben, enthält dieses Lebensmittel neben Geflügelleber auch große Mengen Schweinefleisch. Dementsprechend erscheinen schweinespezifische Allele im Elektropherogramm.

Von den sechs getesteten Dönerproben (als Kalbsfleisch deklariert), die jeweils aus unterschiedlichen Dönerläden Kiels stammen, konnte mittels Multiplex-PCR nur in drei Fällen genetisches Material nachgewiesen werden. Dabei waren ausschließlich die hornträgerspezifischen Systeme BOV-1 und BOV-2 nachweisbar. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den untersuchten Proben tatsächlich um reines Rindfleisch handelt. Die zusätzliche Nachweisgrenzenbestimmung (siehe 4.3.2) bestätigt die hohe Empfindlichkeit der hornträgerspezifischen Systeme. Da jedoch Ausschläge anderer wegweisender Systeme wie GoaShe oder COW-1 und COW-2 ausblieben, kann diese Annahme, ebenso wie die Aussage der Verkäufer, nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Exemplarisch ist eines der drei Elektropherogrammen in Abbildung 22 gezeigt.

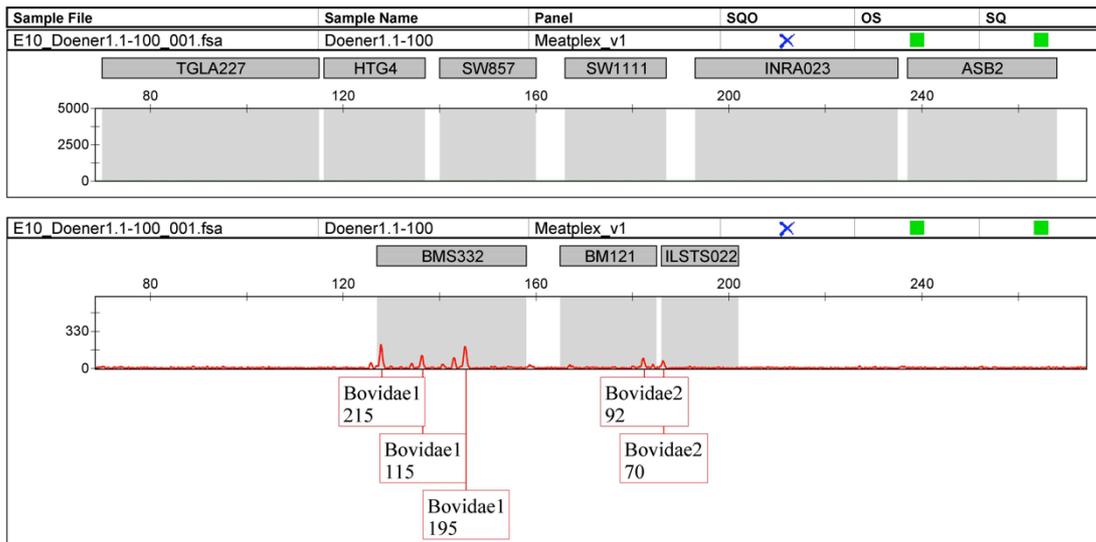


Abbildung 22: Elektropherogramm eines mittels „Meatplex“-PCR amplifizierten und ABIPrism3130 analysierten DNA-Extraktes aus einer als Kalbsdönerfleisch deklarierten Probe.

In den für Hornträger spezifischen Systemen BOV-1 und BOV-2 lassen sich spezifische Signale erkennen. Diese Kombination spricht für die Verwendung von Rindfleisch bei der Dönerherstellung. Diese Annahme kann jedoch nicht mit Sicherheit verifiziert werden, da in den dazu notwendigen STR-Markersystemen COW-1 und COW-2 keine Ausschläge zu verzeichnen sind. Die Anzahl der Peaks im Fragmentlängenbereich des BOV-1-Markers von über zwei, weist zudem auf eine Mischung aus mehreren Individuen hin.

4.4.1.1 Verifizierung durch die pferdespezifische Analyse: die „Horse-Plex“-PCR

Das Elektropherogramm der mittels selbst-etablierten Multiplex-PCR quantifizierten DNA-Probe aus Raviolifüllung war nicht eindeutig zu beurteilen. Wie im abgebildeten Elektropherogramm der Abbildung 23 erkennbar wird, waren eindeutige Ausschläge in Basenpaarbereiche der Systeme PIG-1 und PIG-2 nachweisbar. Ein weiterer, als Peak zu deutender Ausschlag, lag im Fragmentlängenbereich des Systems HRS-1. Dieser Genort ist ein pferdespezifischer STR-Marker.

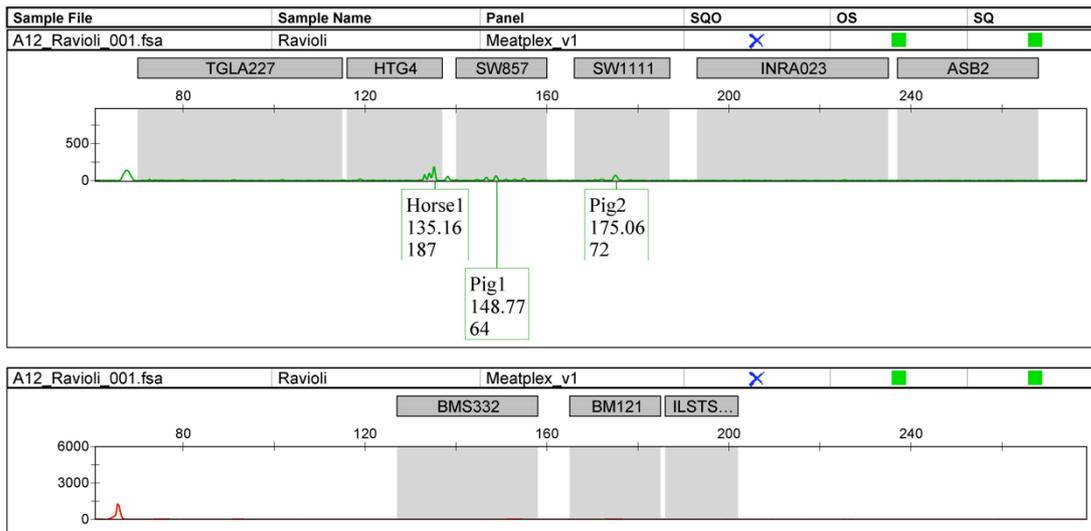


Abbildung 23: Nachweis von spezifischen STR-Merkmalen aus der Probe einer Raviolifüllung, die mittels Multiplex-PCR amplifiziert wurde. Elektropherogramm nach Analyse auf einem ABI3130.

Die PIG-1 und PIG-2-Marker bestätigen das Vorhandensein von Schweinefleisch. Ein pferdespezifischer Ausschlag des HRS-1 Markers spricht für Pferdefleisch als Bestandteil der Füllung und damit für eine falsche oder unvollständige Lebensmittelekklärung. Anhand eines alleinigen Ausschlags eines pferdespezifischen Markersystems lassen sich allerdings keine sicheren Aussagen über die Herkunft des Fleisches treffen. Durch eine erneute Überprüfung mittels einer kommerziell erhältlichen, pferdespezifischen Multiplex-PCR kann sich diesbezüglich Klarheit verschafft werden.

Das Ergebnis dieser Fleischuntersuchung ist ohne zusätzliche Analyse nicht eindeutig zu beurteilen. Gründe dafür liegen einerseits im alleinigen Vorkommen des Ausschlags ohne weitere bestätigende Peaks im selben oder zweiten pferdespezifischen Markersystem HRS-2. Andererseits liegt der Ausschlag im Bereich der hohen Basenpaaranzahl des Markers. Die Verkürzung eines schweinespezifischen DNA-Fragmentes, dessen Amplifikation durch die Bindung des für das PIG-1-System charakteristischen Primerpaares SW857 initiiert wurde, wäre also möglich.

Um die Zugehörigkeit des nachgewiesenen Peaks zu einem der Systeme HRS-1 oder PIG-1 zu ermitteln, bietet sich die Testung der DNA-Probe im Multiplex-PCR-Ansatz mit den pferdespezifischen Primerpaaren der HRS-1 und HRS-2-Marker an. Die kapillarelektrophoretische Auswertung dieses Versuches ergab keine Ausschläge. Somit sind die Primerpaare der Pferdesysteme als PCR-Initiatoren für den zuzuordnenden Peak ausgeschlossen.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die DNA-Probe der Raviolifüllung mittels Horse-Plex-PCR (siehe 3.4.4.2) untersucht. Keines der 17 pferdespezifischen Genloci, welche in dieser Multiplex-PCR getestet werden, wurde amplifiziert. Das Elektropherogramm auf Abbildung 24 veranschaulicht dieses Ergebnis. Damit ist die falsche Zuordnung des Fragments zum Pferdesystem bestätigt, während die Zugehörigkeit zum PIG-2-Markersystem angenommen werden kann.

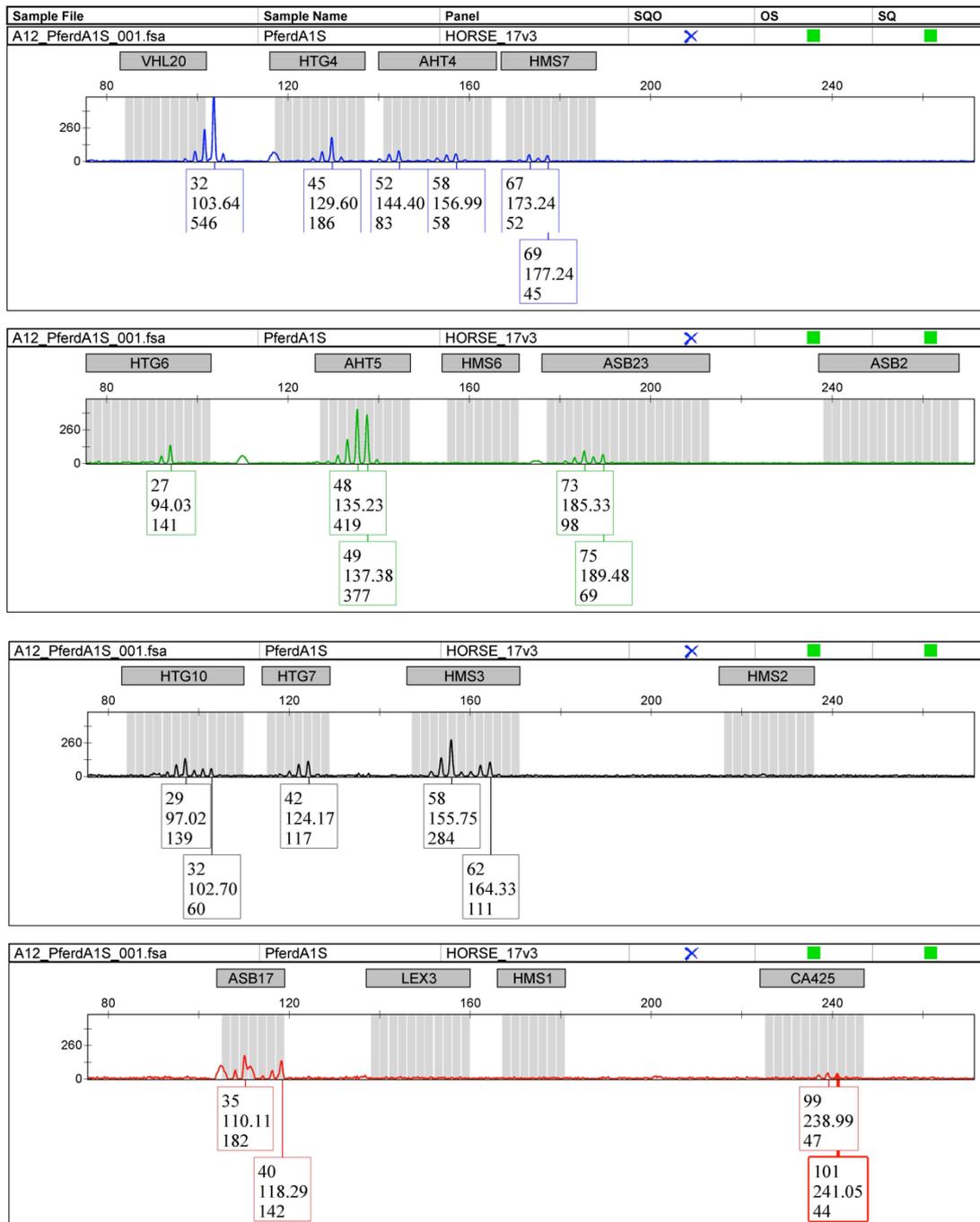


Abbildung 24: Nachweis pferdespezifischer STR-Merkmale aus Pferdefleisch als Positivkontrolle. Elektro-pherogramm nach Vervielfältigung der Merkmale durch die Multiplex-PCR und Kapillarelektrophorese auf einem ABIPrism3130.

Im Gegensatz zu den getesteten Ravioli lassen sich hier Peaks verzeichnen, die die Herkunft des Fleisches vom Pferd belegen. Diese Probe dient als Positivkontrolle der DNA-Probe, die aus der Extraktion der Ravioli-Probeprobe gewonnen wurde. Die triadenförmige Peakkonfiguration ist hinweisend auf die Dinukleotidwiederholungsmuster der Fragmente.

4.4.1.2 Bestimmung des Mischungsverhältnisses in Fleischwaren

Bereits während der kapillarelektrophoretischen Auswertung der Verdünnungsreihen zu Zwecken der Nachweisgrenzenbestimmung fielen Korrelationen zwischen den Ausschlaghö-

hen, gemessen in RFUs, und den DNA-Gehalten auf. Setzt man diese in Relation zueinander, lassen sich semiquantitative Aussagen über die Zusammensetzung von Fleischgemischen treffen. Mithilfe folgender Formel kann für jedes System der Umrechnungsfaktor ermittelt werden:

$$\text{Umrechnungsfaktor } U = \frac{\text{Peakamplitude (RFU)}}{\text{DNA Konzentration } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}$$

Die im Elektropherogramm messbare Amplitude des Ausschlages eines Markers (gemessen in RFUs) kann nun mit diesem Umrechnungsfaktor multipliziert werden. Das Ergebnis entspricht in etwa der enthaltenen DNA-Menge.

$$\text{Umrechnungsfaktor} \times \text{gemessene RFU} = \text{gemittelte DNA - Menge}$$

Reagieren mehrere Marker auf ein Fleischgemisch, so können die so errechneten DNA-Mengen in Relation gesetzt werden, wodurch das Mischungsverhältnis ermittelt werden kann.

Dementsprechend wurden einige der getesteten Proben auf ihre quantitative Zusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 17 veranschaulicht.

Tabelle 17: Übersicht der getesteten Fleischproben mit den zugehörigen Mischungsverhältnissen der Fleischprodukte.

Anhand von Umrechnungsfaktoren lassen sich annäherungsweise die Mischungsverhältnisse verschiedener Fleischsorten in einer Probe bestimmen. Alle dazu notwendigen Informationen sind in dieser Tabelle zu finden. Das Fettgedruckte verdeutlicht die getestete Spezies, die von der Deklaration der Probe abweicht.

Fleischart	Spezies (deklariert)	Spezies (Testergebnis)	Marker	Peakhöhe (RFU)	DNA Konzentration (ng/µl)	Mischungsverhältnis
Cevapcici (Rind & Schwein, gewürzt, roh)	Rind, Schwein	Rind, Schwein	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	106/1803/978/ 242/676	0,375/0,75	1:3
Cevapcici (Rind, gewürzt, roh)	Rind	Rind, Schwein	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	754/193/4372/ 5140/195/709	0,375/0,75	1:3
Würstchen (Schwein, roh)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	3569/5183	5	kein Gemisch
Hackfleisch (Schwein, gewürzt, roh)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	1217/4293	1,5	kein Gemisch
Leberwurst (Rind & Schwein, gewürzt, gekocht)	Rind, Schwein	Rind, Schwein	COW-1/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	362/632/633 / 5306/4864	0,375/4,0	1:10
Leberwurst (Schwein, geräuchert)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	2007/4230	4,0	kein Gemisch
Hackfleisch (Rind & Schwein, roh)	Rind, Schwein	Rind, Schwein	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	468/178/3494/ 2650/3550/2830	1,0/4,0	1:4
Hackfleisch (Rind & Schaf, roh)	Rind, Schaf	Rind, Schaf	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/GoaShe	1535/637/2630/3230/100	1.5/0,375	4:1
Hackfleisch (Rind & Schaf)	Rind, Schaf	Rind, Schaf	COW-1/COW-	203/295/2545/2975/1330	0,75/1,5	1:2

Fleischart	Spezies (deklariert)	Spezies (Testergebnis)	Marker	Peakhöhe (RFU)	DNA Konzentration (ng/µl)	Mischungsverhältnis
Schaf, gewürzt, roh)			2/BOV-1/ BOV-2/GoaShe			
Hackfleisch (Rind, roh)	Rind	Rind	COW-1/COW-2/BOV-1/ BOV-2	398/179/279 2/1694	0,75	kein Gemisch
Steak (Schwein, mariniert)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	586/1124	0,75	kein Gemisch
Salami (Schwein, geräuchert)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	2574/4230	4	kein Gemisch
Wildsalami (Wildschwein)	Wildschwein	Schwein	SUS-1/SUS-2	4061//2826/ 7887//2283	4	kein Gemisch

4.4.2 Speziesbestimmung in Tierfutter

Getestet wurden jeweils zwei Trockenfutterarten für Katzen und je eine Nassfuttersorte für Hunde und Katzen. Nur bei dem Nassfutter für Katzen konnte Schweinefleisch durch DNA-Fragmente im Basenpaarbereich der Marker PIG-1 und PIG-2 nachgewiesen werden, wie in Abbildung 25 erkennbar ist.

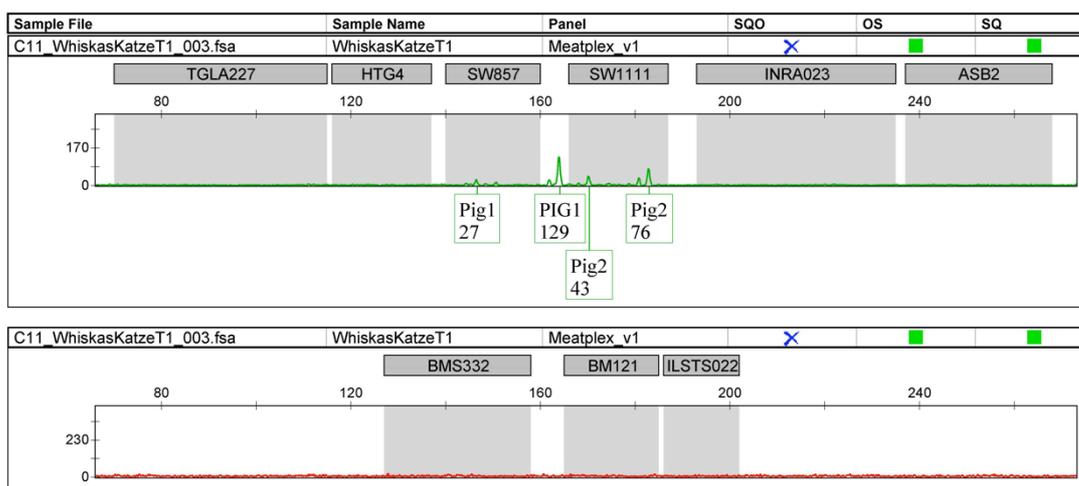


Abbildung 25: Nachweis von Schweinefleisch in einer Nassfutterprobe für Katzen. Elektropherogramm nach Amplifikation durch die etablierte Multiplex-PCR und kapillarelektrophoretischer Auftrennung durch einen ABI3130.

Das erwartete Schweinefleisch war hier, im Gegensatz zu anderen Tierfutterproben, eindeutig nachzuweisen.

4.4.3 Tierische Speisereste im Mageninhalt

Die Untersuchungen von zehn festen Mageninhaltproben waren durchgehend negativ. Um zu kontrollieren, ob die DNA durch Bestandteile der Magensäure oder sonstiger Vorgänge im Magenlumen derart verändert ist, dass eine Extraktion und Auswertung nicht möglich ist, wird eine Versuchsreihe simuliert, deren Ablauf in Abschnitt 3.1.2.4 beschrieben und dessen Ergebnisse hier in Kürze tabellarisch wiedergegeben sind:

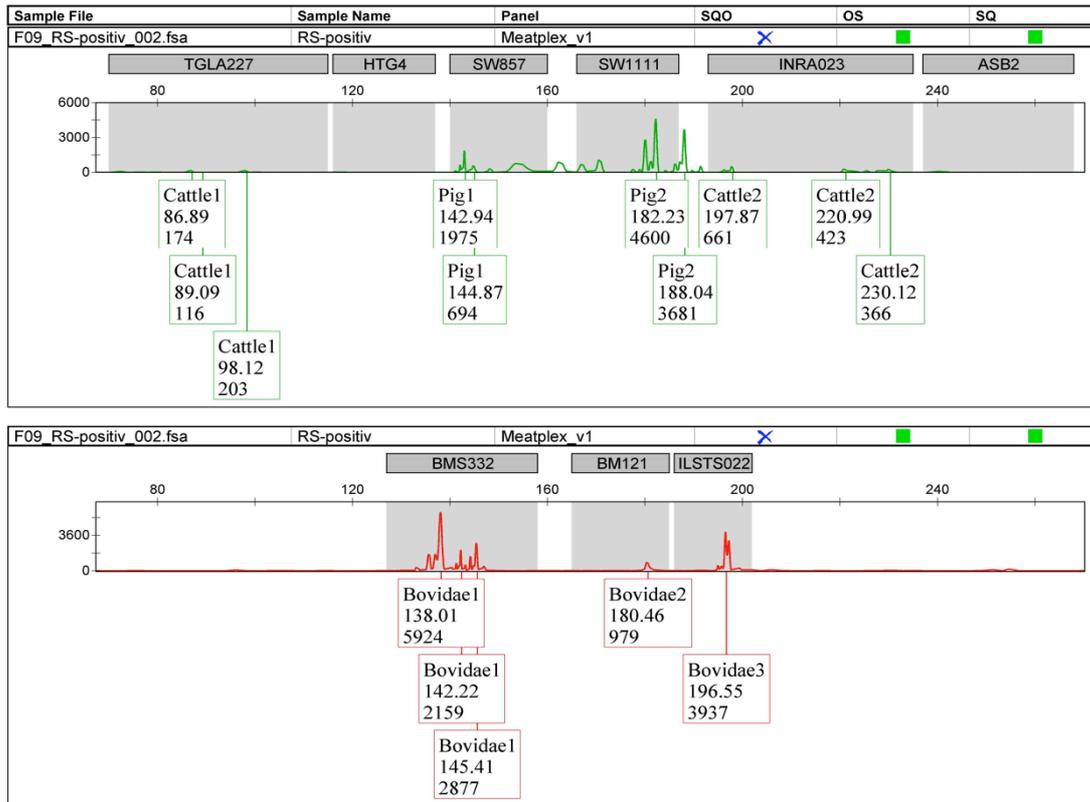
Tabelle 18: Einfluss des Magenmilieus auf die Untersuchungsergebnisse der Multiplex-PCR anhand des RFU-Verlaufes der ausschlagenden Systeme in Abhängigkeit zur Inkubationszeit im Magensaft.

Zur Beibehaltung der Anschaulichkeit sind nur die Ergebnisse der Versuchsreihe mit 100 mg gemischten Hackfleisch von Rind und Schwein gelistet. Die Positivkontrolle bildet eine Hackfleischprobe ohne Einfluss von Magensaft. Die weiteren Proben wurden jeweils bei 37°C unterschiedlich lange in Magensaft unter ständigem Schütteln inkubiert. Die im Elektropherogramm ablesbaren RFUs der höchsten Peaks der jeweiligen ausschlagenden Systeme sind dargestellt.

Eingesetzte Probenmenge (mg)	Inkubationszeit (Stunden)	COW-1 (RFU)	COW-2 (RFU)	BOV-1 (RFU)	BOV-3 (RFU)	PIG-1 (RFU)	PIG-2 (RFU)
Positivkontrolle	0	203	661	5924	3937	1975	4600
100	0,5	133	401	3200	3767	1290	2951
100	0,75	199	296	4364	2995	597	3538
100	1,5	-	440	1834	1761	664	3029
100	2	-	-	1023	724	158	692

Aus Tabelle 18 lassen sich die RFUs der ausschlagenden Systeme nach unterschiedlicher Inkubationszeit einer gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind unter magenähnlichen Bedingungen entnehmen. Es wird ersichtlich, dass eine absteigende Tendenz der RFUs mit steigender Verweildauer der Proben im simulierten Magenmilieu zu verzeichnen ist. So ist jede, nach Inkubation in Magensaft detektierte Amplitude geringer als die, der nicht mit Magensaft versetzten Positivkontrollen (siehe Abbildung 26 sowie Abbildungen 60 bis 65 des Anhangs D.3.3). Die Rindersysteme COW-1 und COW-2 reagieren dabei am empfindlichsten. Aus vorliegenden Ergebnissen wird deutlich, dass die Speziesspezifizierung von Mageninhaltproben bis zu einer Verweildauer von 45 Minuten ohne Probleme möglich ist. Tabelle 22 des Anhangs beschreibt die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Gewebeproben reinen Rinderhackfleisches (siehe Abbildung 52 bis 59 im Anhang D.3.3). Dabei decken sich die Ergebnisse beider Versuche des Systems COW-2, während der Marker COW-1 auch nach zweistündiger Inkubation unter Magenbedingungen noch möglich ist.

A:



B:

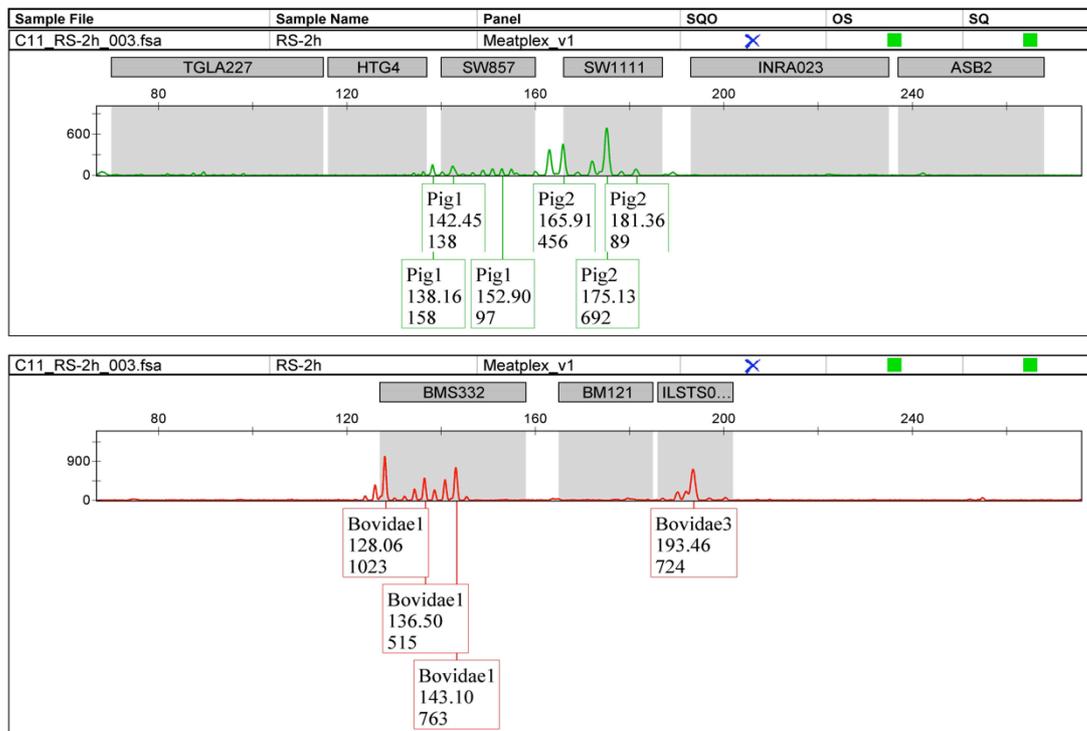


Abbildung 26: Nachweis spezifischer STR-Merkmale in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Probe in Magensaft. Elektropherogramme nach selektiver Vervielfältigung mittels „Meatplex“-PCR und anschließender kapillarelektrophoretischer Analyse durch einen ABIPrism3130.

A: Positivkontrolle: DNA aus Hackfleisch ohne Inkubation in Magensaft; B: Inkubationszeit 120 Minuten. Dabei wird der Verlust der Ausschläge der Rindersysteme COW-1 und COW-2 deutlich.

4.4.4 Forensische Anwendungsbeispiele

Wird in der forensischen Praxis genetisches Material nicht humanen Ursprungs untersucht, kann dieses möglicherweise mittels der entwickelten Multiplex-PCR spezifiziert werden. Je nach Fall kann die Kenntnis der Herkunft der DNA zu seiner Klärung beitragen. Dieser Abschnitt schildert die Ergebnisse zweier derartiger Beispiele:

4.4.4.1 Organfund im Wald

Bei einem Organfund im Wald unbekanntem Ursprungs (siehe 3.1.2.6) wurde mittels OB-TI-humanspezifischen Antikörpertest die humane Herkunft der Probe ausgeschlossen. Zur weiteren Spezifizierung wurde die selbst-etablierte Multiplex-PCR angewendet. Nach Extraktion von DNA aus dem Gewebefund, anschließender selektiver Amplifizierung mittels der beschriebenen PCR und kapillarelektrophoretischen Auswertung, wurde die Probe als Rindergewebe spezifiziert. Der Ausschlag jedes dem Rind zugehörigen Systems sichert dieses Ergebnis. Das zugehörige Elektropherogramm ist der Abbildung 27 zu entnehmen.

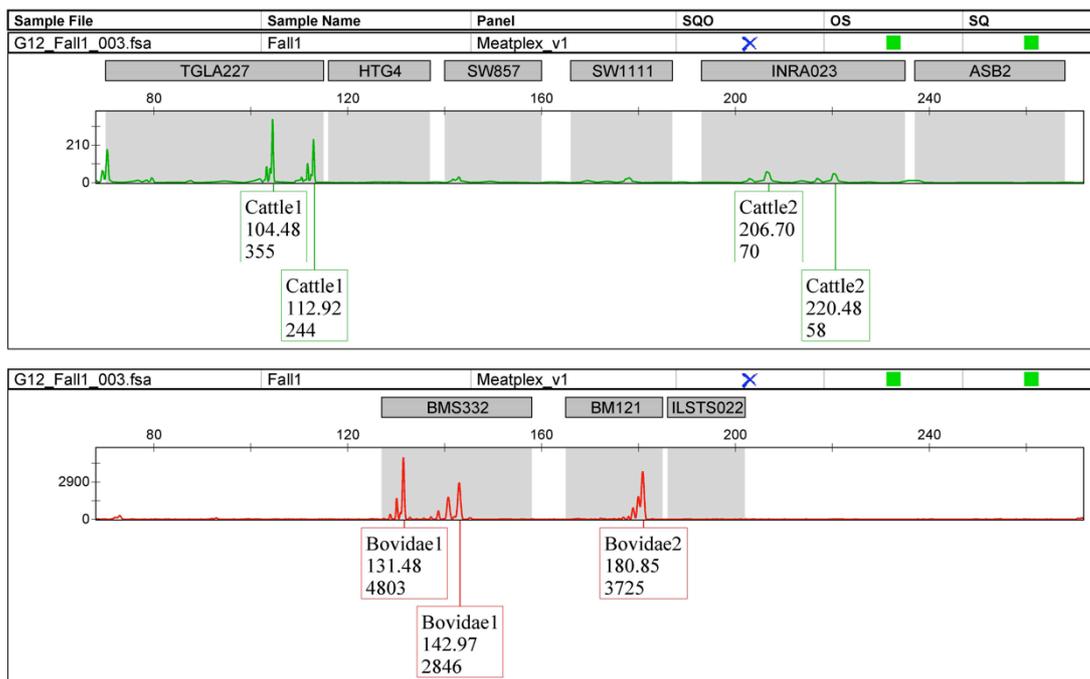


Abbildung 27: Nachweis von Rindergewebe aus einem unbekanntem Gewebefund im Wald. Elektropherogramm nach multiplexgesteuerter Amplifikation und Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130. Sichtbar sind jeweils die beiden Allele des heterozygoten Merkmalsträger für die Marker COW-1 (TGLA227) und COW-2 (INRA023), hier: Cattle1 und Cattle2, sowie BOV-1 (BMS332). Das identifizierte Rind ist homozygoter Träger des Merkmals BOV-2, weswegen nur ein Allel sichtbar ist.

4.4.4.2 Bolus eines Todesopfers durch Verschlucken

Ein weiterer Fall beschäftigte sich mit der Aufklärung der Todesumstände einer Person, die vermutlich an einem Erstickungs- oder Bolustod verstorben ist. Dazu kann die Kenntnis über den Inhalt des den Larynx oder die Luftröhre verschließenden Bolus von Vorteil sein.

Die Untersuchung dieses Objektes mittels Multiplex-PCR ergab kein positives Ergebnis, was die Wahrscheinlichkeit der Beinhaltung von fleischhaltiger Kost deutlich verringert.

5 Diskussion

Mit der entwickelten Multiplex-PCR ist es möglich, durch die simultane Untersuchung von neun STR-Systemen die Spezies Rind, Schwein, Pferd, Schaf und Ziege zu identifizieren. Die Zusammenführung der einzelnen Singleplex-Ansätze verringert den Arbeitsaufwand und die Dauer der Untersuchung. Die Optimierung der Multiplex-PCR, die Minimierung der Materialien und Reagenzien durch Gebrauch von nur einem anstatt neun Versuchsansätzen sowie die zusätzliche Halbierung des Ansatzes führen zu einem geringen Verbrauch von Reagenzien und Template-DNA. Diese Faktoren stellen einen gewaltigen Vorteil gegenüber herkömmlichen Nachweismethoden, wie beispielsweise ELISA dar. Da besonders bei Minimal Spuren nur geringe Mengen genetischen Materials vorhanden sind, ist die Anwendung des ELISAs limitiert, während die entwickelte Multiplex-PCR selbst in solchen Fällen noch zuverlässige Ergebnisse liefert.

5.1 Stellenwert der ausgewählten Spezies

In der deutschen Landwirtschaft ist beinahe die Hälfte des Produktionswertes tierischer Genese. Nach der Milchproduktion steht die Fleischerzeugung dabei an zweiter Stelle (German Meat GmbH, 2014). So steht die Schweineschlachtung mit über 5,5 Millionen Tonnen im Jahre 2012 an erster Stelle, gefolgt von Geflügel, Rindern, Schafen und Ziegen sowie Pferden (Statistisches Bundesamt, 2013). Pferde sind gesondert zu betrachten, da ihre Haltung häufig anderer, beispielsweise sportlicher Motivationen entspringt. Das erklärt die Relevanz dieser Tierarten im Alltag, sei es als vitale Präsenz in unserer Umgebung oder als Lebensmittel. Daher wurden im vorliegenden Projekt die Tierarten Rind, Schwein, Pferd, Schaf und Ziege ausgewählt.

Laut dem Fleischatlas 2013, einem Projekt der Heinrich Böll Stiftung, stehen bei rund 85 Prozent der Menschen in Deutschland fleischhaltige Nahrungsmittel fast täglich auf dem Speiseplan (Heinrich-Böll-Stiftung, 2014). Diese Daten verdeutlichen den Stellenwert, die eine simultane Identifikation mehrerer Spezies in einem Multiplex-PCR-Ansatz einnehmen kann, da somit die hauptfleischerzeugenden Arten Deutschlands zum großen Teil abgedeckt sind.

5.2 Einflussfaktoren auf die Speziesanalyse des Probenmaterials

Bei der Probenentnahme nahm die Messgenauigkeit einen hohen Stellenwert ein. Diese beeinflusst wesentlich die Menge der resultierenden DNA im Extrakt und somit die quantitativen Aussagen, die aus den Amplituden der elektrophoretischen Peaks geschlossen werden. Die verwendete Feinwaage rundet das Gewicht auf 0,1 mg. Ist eine größere Genauigkeit der quantitativen Bestimmung gefragt, empfiehlt es sich auf eine exaktere Waage zurück zu greifen.

Je nach erwarteter DNA-Ausbeute der Extraktion variiert die Probenvorbereitung der semiautomatischen Extraktionsmethode. Damit steigen sowohl die Erfolgchancen, als auch die Ausbeute der DNA-Isolierung. Liegt die Probe in fester und trockener Form vor, war die Zugabe von PBS-Puffer nötig. Waren durch DNA-beungünstigende und zerstörende Vorbehandlung der Proben kaum Extraktionsprodukte zu erwarten, wurde die Lyse über Nacht verlängert, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Hier empfiehlt sich für die forensische Routine die Erstellung einer tabellarischen Übersicht bezüglich der einzusetzenden Mengen und Bearbeitungszeiten in Abhängigkeit vom jeweiligen Ausgangsmaterial. Derartige, ähnliche Anweisungen existieren in den akkreditierten forensischen Laboren bereits für die Anwendung anderer Nachweismethoden humaner DNA.

Die Anwendbarkeit der Multiplex-PCR hängt wesentlich von der Qualität und der Quantität des extrahierten Erbmaterials ab. Diese Faktoren werden, sofern die Extraktion nicht durch Hemmstoffe verhindert wird, von den qualitativen Eigenschaften der im Gewebe vorliegenden DNA beeinflusst. Vielfältige Verarbeitungsschritte des Gewebes können die Qualität der DNA senken oder diese sogar zerstören. Einige werden in den folgenden Abschnitten besprochen.

5.2.1 Für Kontrollproben geeignetes Gewebe

Als Positivkontrolle eignet sich Gewebematerial, welches sich einfach beschaffen lässt und eine möglichst konstante sowie ausreichende DNA-Konzentration besitzt. Lebergewebe enthält aufgrund des Zellreichtums besonders viel DNA, ist jedoch nicht für jedes der ausgewählten Tiere im Handel ohne großen Aufwand beschaffbar. Trotz des größeren Anteils an Bindegewebe im Muskel ist der DNA-Gehalt in dieser Gewebsart ausreichend. Es ist überall im Handel erhältlich und daher besonders zur Extraktion der Kontroll-DNA geeignet.

5.2.2 Einfluss der Lebensmittelverarbeitung auf die Anwendung der Multiplex-PCR

Ein ausschlaggebendes Kriterium bei der Auswahl der Lebensmittelproben war die Vielfalt ihrer Verarbeitung. So wurden Proben unterschiedlichen Gewebes, wie Leber- und Muskelgewebe, diverser Zerkleinerungsgrade, wie in Brat- und Leberwurstproben, Fleischproben mit Beimengung von pflanzlichen Materialien, wie Gewürzen, beispielsweise Ravioli- oder Tortelliniproben sowie thermisch vorbehandelte Fleischprodukte, wie gebratenes Hackfleisch, untersucht. Aus allen der genannten Fleischprodukte konnten Ergebnisse erzielt werden. Die herkömmliche Verarbeitung von Fleischprodukten der Frischfleischtheke und von gekühlten Fertigprodukten verhindert also weder die DNA-Extraktion noch die PCR-Untersuchung.

Durch Analyse von Dönerproben wurde die Anwendbarkeit der Multiplex-PCR, auf durch stärkste thermische und mechanische Beanspruchung verändertes Gewebe, getestet. Jedes der genannten Einflussgrößen beeinflusst die Qualität der DNA wesentlich. Von den sechs Dönerproben konnte nur die Hälfte der DNA-Extrakte als Rinder-DNA identifiziert werden. Ein Grund für diese hohe Misserfolgsrate kann die große Anzahl verschiedener Verarbeitungsschritte darstellen. Dazu gehören mechanische Zerkleinerung, starke Druckeinwirkung durch Pressen des Fleisches, wiederholte Erhitzung und der Zusatz von Gewürzen vielfältiger Art.

Dementsprechend konnte aus allen Fleischproben, die nicht erhitzt wurden oder eine Mindestgröße unzerkleinerter Fragmente von etwa einem Millimeter Durchmesser hatten, positive Analyseergebnisse erzielt werden. Hingegen waren die Untersuchungsergebnisse stark getrockneter Proben wie Trockenfutter und Lederproben tierischer Genese negativ.

Die Testung derartiger Proben dient nicht nur der Überprüfung des Nutzens für die Lebensmittelindustrie, sondern repräsentiert auch den Einfluss vielfältiger Einwirkung physikalischer Größen auf das zu untersuchende Gewebe. Die Testung erhitzter Gewebeproben simuliert Untersuchungsmaterial denkbarer rechtsmedizinischer Fälle, wie beispielsweise verbrannter Gewebeproben.

5.2.3 Anwendung der Multiplex-PCR auf Tierfutterproben

Das Angebot von Tierfutter für Fleischfresser reicht über Nassfutter und Hundekuchen bis zu verschiedensten Trockenfutterarten. In der Trockenfutterherstellung ist das enthaltene tierische Material großem Druck, Zerkleinerungsprozessen und hohen Temperaturen ausgesetzt. Die meist homogene Mischung mit weiteren Bestandteilen, wie Getreideprodukten, Fetten und Quellstoffen sowie der Entzug von Wasser führen zu einer starken Beanspruchung des zellulären Materials.

Nur in einer der vier untersuchten Proben verlief die Speziesidentifizierung erfolgreich. So konnte in der Katzennassfutterprobe Schweine-DNA nachgewiesen werden, während in den anderen zwei Trockenfutter- sowie der Nassfutterprobe keine speziesspezifische DNA detektiert wurde. Die positiv getestete Probe enthielt optisch deutlich abgrenzbare Muskelstrukturen, die in einer Flüssigkeit hoher Viskosität eingebettet waren. Hingegen erschienen die Nass- als auch Trockenfutterproben, deren Analyseergebnisse negativ ausfielen, als homogenere Masse der unterschiedlichen Inhalte. Im Falle des Nassfutters waren vereinzelt pflanzliche Bestandteile zu identifizieren, während Anteile tierischer Genese nicht eindeutig abzugrenzen waren.

Vermutlich werden durch die Verarbeitung und Trocknung die Zellstrukturen, insbesondere Zell- und Kernmembranen, zerstört. Diese dienen unter anderem dem Schutz der DNA, die folglich durch die genannten Vorgänge aufgehoben ist. Das Erbgut geht zugrunde, weswegen keine intakte DNA mehr extrahiert werden kann, die als Template der entwickelten Multiplex-PCR agieren kann. Daher kann sie für derartige Proben (noch) keine zuverlässigen Ergebnisse liefern. Es empfehlen sich weitere Optimierungen und zusätzliche Untersuchungen.

Eine weitere mögliche Erklärung für den Misserfolg der Speziesspezifizierung der Tierfutterproben ist der Fleischanteil der untersuchten Proben. So wurde für die Extraktion unabhängig vom deklarierten Fleischanteil des Futters jeweils 100 mg Material verwendet. Damit liegt die verwendete Fleischmasse gegebenenfalls unter der Nachweisgrenze der entwickelten Multiplex-PCR. Eine erneute Testung dieser Proben unter Berücksichtigung des Fleischanteils des Tierfutters mit entsprechender Anpassung der in der Extraktion eingesetzten Probenmenge ist zu erwägen.

5.2.4 Einfluss des Magenmehls auf die Speziesidentifizierung

Zur Klärung unklarer Todesursachen oder Nahrungsmittelintoxikationen kann eine Analyse des Mageninhalts notwendig sein. Auch beim Erstickungs- oder Bolustod kann der Fremdkörper durch gastroösophagealen Reflux oder Aspiration von Magensaft zersetzt sein. Die Kenntnis der Zusammensetzung des Bolus birgt möglicherweise Informationen über den Hergang des Vorfalls, hilft bei der Rekonstruktion und kann somit einer Untersuchung bedürfen.

Gelangt der Bissen in den Magen, führen peristaltische Kontraktionen der Magenwand zur Zerkleinerung desselben und der zur Aggregation neigenden Fetttropfen. Hormonelle Reakti-

onen führen zur Sekretion von Magensaft, wovon täglich zwei bis drei Liter produziert werden.

Der Magensaft setzt sich hauptsächlich aus Intrinsic Factor zur Vitamin B12 Resorption, desinfizierender und andauernder Salzsäure, Vorstufen von proteolytischen Enzymen und pH-steigernden bicarbonathaltigen Schleim zusammen. Die Sekretion der Salzsäure wird sowohl hormonell, als auch durch Dehnung der Magenwand sowie durch chemische Nahrungsbestandteile gesteuert. Sie führt zur Denaturierung von Proteinen und aktiviert das eiweißverdauende Enzym Pepsin durch die Spaltung von Pepsinogen. Der pH-Wert sinkt mit steigender Menge an Salzsäure, dessen autolytische Wirkung auf das Magenepithel durch die bicarbonatreiche Schleimschicht verhindert wird. Die Nahrung verweilt, je nach Zusammensetzung, zwischen zwei und sieben Stunden im Magen. (Jensen-Jarolim et al., 2006; Klinke et al., 2010)

Mit der in 3.1.2.4 beschriebenen Versuchsreihe, in der die physiologischen Magenbedingungen simuliert werden, wird die Anwendbarkeit der entwickelten Multiplex-PCR auf bis zu zwei Stunden im Magen verweilenden Speisebrei bestätigt. Das Magenmilieu vermindert zwar die Ausschlagshöhen und senkt damit die Nachweisgrenze der Multiplex-PCR, verhindern jedoch nicht die Aussagekraft der qualitativen Ergebnisse. Diese Methode eignet sich also für Routineuntersuchungen von aus Mageninhalt gewonnenen DNA-Proben. Dabei ist sie abhängig vom Zerkleinerungsgrad der zu untersuchenden Probe, da für den Magensaft entsprechend unterschiedliche Angriffsflächen vorliegen.

5.2.5 Lederprobenspezifizierung

Die Untersuchung von gefärbten sowie ungefärbten chrom-, pflanzlich- und mischgegerbten Lederproben fiel negativ aus. Die Erklärung liegt vermutlich im Herstellungsprozess des Leders aus Tierhaut. Bei diesem Vorgang unterliegt sie vielzähligen Einflüssen chemischer, mechanischer und thermischer Natur. Sowohl die Gerbung als auch der Entzug von Wasser durch Trocknung kann modulierend oder destruktiv auf die zellulären Strukturen wirken, sodass die DNA-Extraktion und folglich die PCR-Untersuchung erfolglos bleiben.

Da es allerdings vereinzelte Veröffentlichungen gibt, in denen eine erfolgreiche DNA-Analyse aus derartigen Produkten beschrieben wird, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um sicher zu gehen, dass es sich bei den hier erzielten negativen Ergebnissen nicht um Einzelfälle handelt oder die eingesetzte DNA-Extraktionsmethode möglicherweise nicht ausreichend ist. So gelang es Ojeda et. al. eine Extraktionsmethode zu entwickeln, die

aus 25 mg Ledergewebsmaterial DNA in ausreichender Menge und Qualität für weitere PCR-analytische Methoden bereit stellt (Ojeda et al., 2012). Das Erhalten von quantitativ und qualitativ verwertbarer DNA durch Anpassung des Extraktionsprotokolls der semiautomatischen Methode oder durch Wechseln der Extraktionsmethode auf beispielsweise kommerziell erhältliche Pflanzenextraktionskits, könnte das Anwendungsspektrum der entwickelten Multiplex-PCR verbreitern.

5.2.6 Forensische Anwendung

Das Untersuchungsergebnis des Gewebefundes, welcher in 3.1.2.6 beschrieben wird, belegt eindeutig die Herkunft vom Rind und zeigt ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung dieser neuen Methode in der rechtsmedizinischen Routine.

Das negative Ergebnis der Bolusanalyse des mutmaßlichen Erstickungsopfers schließt die Beinhaltung fleischhaltiger Kost mit hoher Wahrscheinlichkeit aus, da die hauptfleischerzeugenden Arten Deutschlands mit Hilfe dieser Multiplex-PCR zum großen Teil abgedeckt sind. Eine zusätzliche Testung auf Geflügelfleisch würde die Wahrscheinlichkeit der Aussage erhöhen, ebenso wie die Analyse durch einen fusionierten PCR-Ansatz, welcher zusätzlich die wichtigsten Wildtiere zu detektieren vermag.

5.3 Qualitative und quantitative Unterschiede des Probenmaterials

Für die Untersuchung des Probenmaterials mittels Multiplex-PCR ist eine ausreichende Menge intakter DNA notwendig. Sowohl die Art des Gewebes und seine Verarbeitung, als auch die verwendete Extraktionsmethode sind von Interesse. Die Amplituden der systemspezifischen Ausschläge ermöglichen aus Genauigkeitsgründen der Quantifizierung zwar keine exakten Aussagen über die DNA-Konzentrationen, Auskünfte über Mischungsverhältnisse zusammengesetzter Fleischproben sind jedoch möglich (siehe 4.4.1.2). Insbesondere in der Lebensmittelindustrie ist die Kenntnis des Mischungsverhältnisses von besonderem Interesse.

5.3.1 Methoden der Quantifizierung

Die Überprüfung der Qualität sowie der Quantität der DNA geschieht in dieser Arbeit mittels Agarosegelelektrophorese. Die genannte Methode macht eine Visualisierung dieser Aspekte durch Fluoreszenzmarkierungen der DNA-Fragmente mittels Ethidiumbromid möglich (Mülhardt, 2009). Nachteilig sind der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand, der mit der Herstellung des Agarosegels und der sich anschließenden elektrophoretischen Laufzeit verbunden ist.

Darüber hinaus interkaliert Ethidiumbromid mit der DNA, was zur Zellmutationen und Entartungen führen kann. Die Einhaltung von Sicherheitsmaßnahmen bezüglich Umgang, Hautschutz und Entsorgung sind einzuhalten (Sicherheitsdatenblatt für Ethidiumbromid, Carl Roth®, 2013).

Eine schnellere und vergleichbar exakte Methode ist die auf Extinktion beruhende, spektralphotometrische Messung, beispielsweise mit einem sogenannten NanoDrop-Gerät. Ihr Prinzip beruht auf der Absorption monochromatischen Lichtes der Wellenlänge 260 nm (Nanometer) durch die DNA (Thermo Scientific, 2013). Dabei absorbiert jegliche Form von DNA das Licht unabhängig von der Fragmentlänge in gleicher Weise. Die Extinktion steht mit der DNA-Konzentration im linearen Zusammenhang. Die spektralphotometrische Messung führt also zur unspezifischen Quantifizierung jeglicher DNA-Moleküle. Qualitative Aussagen wie der Fragmentierungsgrad der DNA, sind im Gegensatz zur Quantifizierung mittels MeMo Forensics Membralyzer© Software, nicht möglich (Modrow, 2012).

Die fluorimetrische Messung, die mit Hilfe des Quantus™ Fluorometer erfolgen kann, stellt eine einfache, schnelle und spezifische Quantifizierungsmöglichkeit dar. Fluoreszenzfarbstoffe sind an DNA-Moleküle gekoppelt, die komplementär zu den zu quantifizierenden DNA-Sequenzen sind. Die Bindung der markierten Komplementärstränge ist proportional zur enthaltenen spezifischen DNA-Konzentration. Die nach Anregung durch monochromatisches Licht entstehende Emission ist dementsprechend proportional zur enthaltenen DNA-Menge.

Bei der Realtime- oder quantitativen PCR erfolgt die Quantifizierung durch Emissionsmessung fluoreszenzmarkierter DNA-Moleküle während der Amplifikation. Die Vervielfältigung und Emission verläuft in einem engen Bereich bei optimalen Bedingungen exponentiell zur Zyklenzahl und erlaubt Rückschlüsse auf die DNA-Konzentration der Probe (Jansohn und Rothämel, 2012). Vorteil dieser Methode ist die simultane Testung auf Hemmstoffe der PCR durch Abweichungen der Kurvenkonfiguration oder Ausbleiben des Graphen. Ist die DNA hochgradig fragmentiert, wird eine vollständige Amplifikation gewünschter Sequenzen verhindert, sodass keine saubere Amplifikationskurve der zu untersuchenden Probe entsteht. Die Realtime-PCR liefert dementsprechend Informationen über hochgradige Fragmentierung und den genauen DNA-Gehalt der Probe sowie über das Vorhandensein von PCR-Hemmstoffen. Die Vereinigung qualitäts- und quantitätsüberprüfender Schritte minimiert den Arbeitsaufwand, hingegen ist die Herstellung der benötigten fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden teuer.

Aufgrund der Verfügbarkeit sowie aus Kostengründen wurde in dieser Arbeit zu Zwecken der Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der DNA-Proben die Methode der gelelektrophoretischen Auftragung mit einer anschließenden densitometrischen Auswertung durchgeführt.

Sie bewährt sich durch zuverlässige Ergebnisse bezüglich der Beurteilung des untersuchten genetischen Materials. Ein Ersatz dieser Methode durch die durchaus zeitsparendere und simplere Quantifizierung sowie Qualitätskontrolle mittels fluorimetrischer Messung kann erwogen werden, um die „Meatplex“-PCR als wirtschaftlicheren Standard in die rechtsmedizinische Praxis zu integrieren.

5.3.2 Einfluss der Gewebeart und der Verarbeitung

Die densitometrische Quantifizierung der agarosegelelektrophoretisch aufgetragenen Verdünnungsreihen von speziesspezifischen DNA-Proben zeigt eine Korrelation zwischen DNA-Konzentration und Art des Gewebes, welches der Extraktion zu Grunde lag. Wie den Agarosegelen in Abbildung 16 und 29 sowie deren Quantifizierungen, die der Tabelle 20 des Anhangs zu entnehmen ist, erreichen Lebergewebsproben von Rind und Schwein die angestrebte DNA-Konzentration von zwei bis vier ng/µl jeweils bei einer Verdünnung von 1:1000. Die Extraktionserzeugnisse aus Muskelgewebe wie Steak oder Schinken, welches bei Pferd, Schaf und Ziege verwendet wurde, erreichte die besagte optimale Einsatzkonzentration für die PCR bei einer Verdünnung von 1:300. Wie das in Abbildung 30 dargestellte Gel und die dazugehörige densitometrische Quantifizierung einer Hackfleischprobe verdeutlicht, sollte Mischfleisch aus mehrerer Individuen oder Spezies, wie beispielsweise Leberwurst, Bratwurst und Tortellinifüllung in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt werden.

Dieser Unterschied des DNA-Gehaltes der Extraktionsprodukte verschiedener Gewebe hat möglicherweise seinen Ursprung im DNA-Gehalt des Probenmaterials selbst. Leber ist, wie die meisten inneren Organe, reich an DNA-enthaltenden Zellen, während der Gehalt in Muskelgewebe durch den hohen Anteil von Bindegewebe und extrazellulärem Material deutlich geringer ausfällt. Auch der Quotient von extranukleären und intranukleären Zellbestandteilen ist hoch, was den DNA-Gehalt eines bestimmten Gewebegewichtes mindert. Mischfleisch aus mehreren Individuen, insbesondere Hackfleisch, Leberwurst und Salami, sind reich an Fettgewebe, welches einen noch geringeren Zellanteil besitzt und deren Zellen einen großen Anteil an Zytoplasma aufweisen.

Die Einwirkung auf das Probenmaterial durch thermische und mechanische Einflüsse, wie auch die Vermengung mit weiteren, meist pflanzlichen Inhaltsstoffen, trägt bei stark verarbeiteten Nahrungsmitteln, wie Füllungen von Ravioli oder Dönerfleisch, zu geringen Mengen von intakter DNA bei. In diesen Proben führt die starke Verarbeitung zum Verlust ausrei-

chender Mengen intakter DNA und begrenzt demnach die erfolgreiche Nutzung der Multiplex-PCR.

5.3.3 Einfluss der Extraktionsmethode

Nicht nur das Probenmaterial selbst ist ausschlaggebend für die Qualität, sondern auch die Extraktionsmethode. So ist die DNA-Extraktion auch in jüngster Zeit noch immer Untersuchungsgegenstand zur Optimierung der DNA-Analyse in der forensischen Routine (Schwark, Heinrich, Preusse-Prange et al., 2011). Wie im Gel der Abbildung 12 deutlich wird, entsteht bei der manuellen, im Gegensatz zur semiautomatischen Extraktion, weniger fragmentierte DNA, die sich in Form von Fragmentnebel darstellt. Möglicherweise entstehen diese Fragmente durch Auf- und Abbewegungen der Tipps während der Waschvorgänge der semiautomatischen Methode. Die Annahme, hochmolekulare, unfraktionierte DNA sei in der kapillarelektrophoretischen Auswertung mit saubereren Peaks vergesellschaftet, stellte sich als unzutreffend heraus. Vielmehr zeigte die Gegenüberstellung der Elektropherogramme beider Extraktionsmethoden eine deutlichere Triadenbildung bei der semiautomatischen Methode, im Gegensatz zu den artefakt durchsetzten Ausschlägen der manuell extrahierten DNA. Eine Begründung dieses Phänomens könnte sich in der Bindung der DNA an Magnetpartikel während der semiautomatischen Extraktion finden. Sie ermöglicht vermutlich eine wirkungsvollere Trennung der DNA von unerwünschten Zellbestandteilen als die Filterung durch eine Silikamembran der manuellen Methode. In dem vorliegenden Projekt wird ausschließlich nukleäre DNA verwendet.

5.4 Nachweis europäischer Nutztiere mittels Multiplex-PCR

Es ist gelungen eine Multiplex-PCR aus unterschiedlichsten Singleplex-PCRs zu entwickeln, die unter definierten Reaktionsbedingungen simultan funktionsfähig ist. Exogene Faktoren, wie Inhibitoren oder komplexere Verwandtschaftsverhältnisse, können den reibungslosen Ablauf der PCR oder deren Auswertung beeinflussen:

5.4.1 PCR-Inhibitoren

In der Forensik kommen Proben unterschiedlicher Zustände vor. Faktoren wie Zersetzung oder Zusatzstoffe können die PCR beeinflussen oder ihren Ablauf hemmen. In dieser Arbeit wurden beispielsweise gewürzte, gesalzene und mit Pflanzenbestandteilen versetzte Lebens-

mittel untersucht. Die getesteten Fleischproben waren entweder mariniert oder mit Salz, Gewürzen und anderen Stoffen zu einer homogenen Masse verarbeitet, beispielsweise zu Leberwurst oder Tortellinifüllungen. Die in Pflanzen enthaltenen Polysaccharide, Polyphenole und sekundären Metabolite stehen dabei in Verdacht die PCR zu beeinflussen (Khanuja et al., 1999), ebenso wie Endonukleasen und Phosphate. Eine weitgehende Entfernung dieser potentiellen Inhibitoren durch Waschung mit Leitungswasser war bei den Proben möglich, die nur oberflächlich mit den potentiellen Hemmstoffen in Kontakt gekommen sind. Die Ergebnisse der Auswertung der tiefgefrorenen Fertiggerichte sowie die an der Frischfleischtheke erworbenen Fleischproben blieben unbeeinträchtigt. Möglicherweise verhindert nicht nur das einfache Waschen der Proben unter dem Wasserhahn, sondern auch die Separation der reinen DNA von potentiell hemmenden Einflüssen während der Extraktion die PCR-Inhibition. Die Multiplex-PCR ist also eine geeignete Methode zur Testung gemischter, Fleisch und Pflanzenmaterial beinhaltender Lebensmittel.

Ein positiver STR-Nachweis aus Lederproben blieb hingegen aus, weswegen die Vermutung der PCR-Hemmung durch Gerbstoffe wie Huminsäure nahe liegt. Die Inhibierung wurde anhand des Süßwasserpolyphen Hydra vulgaris überprüft (siehe 4.3.4). Erscheint kein Peak im erwarteten Fragmentlängenbereich, ist das Vorhandensein von PCR-Hemmstoffen bewiesen (von Wurmb-Schwark et al., 2009). Um die aufwändige Quantifizierung der PCR zu umgehen und Hemmstoffe ohne weitere Untersuchungen ausschließen zu können, wäre die standardmäßige Integration der Hydra-DNA einschließlich des zugehörigen Primerpaares sinnvoll. Probleme der Primerinteraktion oder Auswertung durch überlappende Basenpaarbereiche des Hydra-

Systems mit speziesspezifischen Markern traten bei der Testung der Lederproben nicht auf und sind daher auch in Zukunft nicht zu erwarten. Wie bereits beschrieben, sollten hier weitere Versuche zur Optimierung der DNA-Extraktion durchgeführt werden.

5.4.2 Primerspezifität

Aus der Kombination der Signale im Elektropherogramm lassen sich Proben spezifizieren. Ausschläge von zwei Markersystemen erlauben eine sichere Doppelbestimmung und sind daher für eine definitive Aussage ausreichend.

Die Primer der Systeme sind in der Lage, Familien zu detektieren. So weisen COW-1 und -2, BOV-1 und -2, sowie GoaShe die Familie der Hornträger nach (Bovidae). Dabei sind die beiden erst genannten Systeme spezifisch für Rinder- und Büffelarten. Das System GoaShe

erzielt positive Ausschläge für die Unterfamilie der Ziegenartigen (Caprinae), wozu die Arten Schaf und Ziege gezählt werden. Je nach Peakkombination mit BOV-1 und BOV-2 spricht der Peak im GoaShe-Marker für die genannten Spezies. Durch die Detektion der Schafe können Haus- und Wildschafe, wie das Mufflon, erfasst werden. Gämse, Haus- und Wildziegen sowie Steinböcke können dem Untersuchungsergebnis der Ziege zu Grunde liegen. Die Markersysteme HRS-1 und -2 zeigen die Familie der Equidae auf, zu denen die Gattungen der Pferde, Wildpferde, Esel und Zebras gehören. Die Multiplex-PCR erlaubt also die Unterscheidung der Familien sowie im Falle der Hornträgerfamilie die weitere Untergliederung in Unterfamilien und Gattungen. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass vielzählige miteinander verwandte Arten sowie Hybride mit Hilfe dieser Multiplex-PCR nachgewiesen werden können.

Die Verteilung des Vorkommens bestimmter Arten einer Gattung in Deutschland sowie die Herkunft des Probenmaterials begründet das endgültige Probenergebnis. Die aus deklarierten Rinderhackfleisch entnommenen Proben werden durch entsprechende Ergebnisse bestätigt, obwohl die Herkunft vom Büffel durchaus möglich wäre.

Ausnahmen, in denen weitere oder andere Primersysteme auf eine Probe reagieren, erschweren die Auswertung. Beispiele sind die Rinderhackfleisch- und Mischhackproben (siehe 4.4.3), bei denen das System GoaShe anstelle des erwarteten BOV-2 System ausschlug.

Diese Variationen und möglichen Kombinationen lassen sich mit der engen Verwandtschaft der paarhufigen Hornträger erklären. Insbesondere zwischen Schafen und Ziegen sind Kreuzungen möglich, was sich negativ auf die Spezifität der Primer auswirkt. Während die Unterscheidung von Spezies derselben Gattung dadurch erschwert und die Aussagekraft der Artzugehörigkeit vermindert wird, können durch die Reaktion von Markern einer Spezies auf verwandte Arten auch von der Norm abweichende Individuen anhand dieser Multiplex-PCR detektiert werden.

5.4.3 Die Methodik im Vergleich

Der Speziesnachweis durch eine Multiplex-PCR birgt im Vergleich zur herkömmlichen ELISA-Untersuchung einige Vorteile. Während bei der Untersuchung mittels ELISA etwa 100 g Untersuchungsmaterial benötigt wird (Martin et al., 1991), ermöglichen die niedrigen Nachweisgrenzen von 0,75 ng für Rind, Pferd und Ziege sowie 0,375 ng Template-DNA für Schwein und Schaf, positive Testergebnisse aus Minimal Spuren von weniger als 0,1 g des eingesetzten Gewebematerials. Auch andere Multiplex-PCRs, wie die von Matsuaga 1999

entwickelte Methode, welche sich mitochondriale Gene zu Nutzen macht, benötigt etwa die fünffache Menge an Gewebsmaterial (Matsunaga et al., 1999). Die in dieser Arbeit etablierte Multiplex-PCR birgt den Vorteil jeweils mindestens zwei Markersysteme pro Spezies zu besitzen und dadurch die Sicherheit der Aussage zu erhöhen.

Durch die Validierung der Multiplex-PCR ist im Gegensatz zum ELISA keine Positivkontrolle nötig, was zusätzlich Ressourcen spart. Auf aufwändige und teure Antikörperherstellung kann verzichtet werden. Nachteil der antikörperbasierten Speziesidentifizierung mittels ELISA ist die Selektivität, mit der diese Methode Proteine bindet. Antikörper sind hochspezifisch für ihre Epitope, somit ist das Untersuchungsergebnis durch Varianten des zu bindenden Proteins leicht zu verfälschen. Eine familienübergreifende Detektion, wie es bei der neu entwickelten Multiplex-PCR geschieht, ist mit dieser Methode nicht möglich.

Die Untersuchungsergebnisse der im Rahmen dieses Projektes beschriebenen Methode, geben Auskunft über die Herkunft des Probenmaterials von einem oder mehreren Individuen. Diese Aussage lässt sich der Allelzahl der entsprechenden Speziesmarker entnehmen und ist durch die Proteinuntersuchung mittels ELISA nicht zu treffen.

5.4.4 Anwendungsspektrum

Die Anwendbarkeit der Multiplex-PCR auf die Testung der Herkunft von Fleisch verschiedener Lebensmittel sowie Gewebefunde und durch Magensäure verändertes tierisches Material wurde in dieser Arbeit belegt.

Wurde bei der Untersuchung fleischhaltiger Lebensmittel mittels Multiplex-PCR eine nicht vom Hersteller ausgewiesene Spezies identifiziert, kann zur Prüfung der Vorsätzlichkeit die Anzahl der beinhalteten Individuen nützlich sein. Sind beispielsweise in Rinderhackfleisch ein oder zwei Allele eines HRS-Markers positiv, sodass das Fleisch vermutlich nur einem Individuum entstammt, so ist das zufällige Verarbeiten einer falschen Art möglich. Mit Anzahl der detektierbaren Allele steigt die Zahl der enthaltenden Individuen, während sich die Wahrscheinlichkeit der vorsätzlichen Beimengung nicht deklarerter Spezies erhöht. Kleine Amplituden unerwarteter Ausschläge können durch Verunreinigung von Verarbeitungsgeräten wie beispielsweise eines sogenannten Fleischwolfes, entstehen.

Neben der Identifizierung der Spezies spielt bei der Verbrauchertäuschung auch die Zahl der im Fleisch enthaltenen Individuen eine Rolle. Seit Dezember 2014 ist die Kennzeichnung von Fleisch aus nicht zusammenhängenden Gewebsteilen obligat (Bundesministerium für

Ernährung und Landwirtschaft, 2014). Der Nachweis von mehr als zwei Allelen eines untersuchten speziesspezifischen Merkmals beweist den Verstoß gegen diese Vorschrift.

Die Kontrolle der Deklaration von Lebensmitteln ist nicht nur der Täuschung wegen von Relevanz, es kann auch in gesundheitlicher Hinsicht von Bedeutung sein.

Ein Beispiel ist die Ig-E vermittelte allergische Reaktion auf ein Oligosaccharid, welches Blutgruppenbestandteil von Säugetieren roten Fleisches ist. Induziert durch den Biss einer Zecke, ist das Immunsystem auf dieses Antigen sensibilisiert, woraufhin dem Verzehr von Schweine-, Rind- oder Lammfleisch sowie Milchprodukten und anderen tierischen Produkten ein anaphylaktischer Schock folgen kann. Geflügel und Fisch hingegen, führen nicht zur besagten Reaktion. (Tripathi et al., 2014)

6 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit etablierte Multiplex-PCR ist eine effiziente Methode zur simultanen Identifikation der fünf wichtigsten landwirtschaftlich genutzten Säugetiere Nordeuropas. Zu ihnen gehören Rind, Schwein, Pferd, Ziege und Schaf, deren Vorkommen nicht nur in der Lebensmittelindustrie eine besondere Bedeutung zukommt, sondern auch in forensischen Bereichen, wie Gewebsspuren am Unfallort bei Versicherungsfragen, Organfunden makroskopisch unklarer Genese oder Mageninhaltsuntersuchungen bei Obduktionen. Die Anwendbarkeit der Methode auf die genannten Bereiche wurde in dieser Arbeit durch entsprechende Versuchsreihen verifiziert.

Die semiautomatische DNA-Extraktion mit Hilfe des KingFisher® Flex-Extraktionsgeräts und die anschließende zeitgleiche Amplifikation von neun spezifischen STR-Markern in einem einzigen Multiplex-PCR-Ansatz ermöglichen zeitnahe Aussagen über die Zusammensetzung der zu bestimmenden Gewebematerialien ohne hohen personellen und finanziellen Aufwand. Die verwendeten Primer besitzen spezifische Dinukleotidwiederholungsmuster, mit Ausnahme des aus komplexen Wiederholungsmustern bestehenden Primers des BOV-2-Systems, weshalb die Auswertung der Analyseergebnisse mit großer Sorgfalt und Routine erfolgen muss.

Durch die Amplifikation der neun Marker in einem halbierten PCR-Ansatz, werden Reagenzien und Arbeitsmaterialien eingespart, was der Multiplex-PCR zusätzliche Wirtschaftlichkeit verleiht.

Die interne Qualitätskontrolle der Methode erfolgt durch die Doppelbestimmung mit jeweils mindestens zwei spezifischen STR-Systemen. Rinder nehmen hierbei eine Sonderstellung ein, da neben den zwei spezifischen STR-Markern, auch die beiden Bovidae-spezifischen Systeme amplifiziert werden. Insgesamt zeigen hier also vier Systeme ein positives Testergebnis an. Aussagekräftige, triadenförmige Ausschläge mit einer minimalen Amplitude von 50 RFUs in den spezieszugehörigen Systemen im Elektropherogramm der kapillarelektrophoretischen Auswertung sichern das Ergebnis. Die Nachweisgrenze der sogenannten „Meatplex“-PCR für die Spezies Rind, Pferd und Ziege liegt bei einem DNA-Gehalt von etwa 0,75 ng, während Schweine und Schafe sogar bis zu einem Einsatz von 0,375 ng nachgewiesen werden können.

Spezifische Umrechnungsfaktoren erlauben annähernde Aussagen über die enthaltenen DNA-Mengen des jeweiligen Tieres. Ihre Relation zueinander gibt Auskunft über das Mischverhältnis der Spezies in einer Fleischprobe.

Die Allelzahl pro Markersystem gibt Auskunft darüber, ob ein Produkt einem oder mehreren Individuen entstammt.

Die vorgestellte Multiplex-PCR ist aufgrund ihrer schnellen und effizienten Durchführung sowie wegen sensitiver Ergebnisse für den Einsatz in der forensischen Praxis besonders gut geeignet. Die mit ihrer Hilfe erlangten Erkenntnisse über das untersuchte Spurenmaterial können auf Tathergänge hinweisen, die zur Aufklärung von Straftaten beitragen können.

7 Ausblick

Die Methode der Multiplex-PCR ermöglicht die Detektion der in Nordeuropa am häufigsten gehaltenen Nutztiere.

In dieser Arbeit wurde Probenmaterial von Rindern, Hausschweinen, Hauspferden, Hausschafen und Hausziegen, als die häufigsten lokalen Vertreter der jeweiligen Familien, herangezogen. Die Detektion weiterer Wildformen, wie beispielsweise Büffel, Wildschweine, Zebras sowie Hybride, die zum Beispiel durch Kreuzung von Schaf und Ziege entstehen, ist möglich. Eine Validierung der unterschiedlichen Spezies steht noch aus.

Die Haltung der getesteten Spezies entspringt unterschiedlichen Motivationen. Sie beinhalten sportliche und freizeitaktive Aspekte, wie es bei der Pferdehaltung der Fall ist, oder ernährungsorientierte Faktoren. Aus diesen Gründen kommt es im Lebensraum dieser Tiere und dem der Menschen zu Überschneidungen. Dort können sie zelluläre Spuren jeglicher Art hinterlassen, die rechtsmedizinisch oder auch lebensmitteltechnisch von Bedeutung sein können.

Um auch kleinste Mengen von Spurenmaterial auswerten zu können, ist eine Steigerung der Sensitivität der Methode anzustreben.

Die Integration anderer Single- oder Multiplex-PCRs birgt unter anderem eine größere Gefahr an Primerinteraktionen sowie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Inkompatibilität von Reaktionsbedingungen. Die Problematik der kapillarelektrophoretischen Auswertung von Systemen, deren Amplifikate im selben Fragmentlängenbereich angesiedelt sind, kann durch Fluoreszenzmarkierung unterschiedlicher Farbstoffe verhindert werden.

Die Multiplex-PCR, welche die zeitgleiche Detektion von Rindern, Schweinen, Pferden, Schafen und Ziegen ermöglicht, ist für die Untersuchung von Lebensmitteln geeignet. So kann beispielsweise die falsche Deklaration von Lebensmitteln aufgedeckt werden. In diesem Sinne wäre die Erweiterung der PCR um Geflügel, welches nach Rindfleisch an zweiter Stelle des meist verbrauchten Fleisches steht, sinnvoll. Auch eine weitere Unterscheidung bezüglich der Geflügelgattung, sei es Huhn, Pute oder Gans, wäre hilfreich. Zunehmend erlangen auch exotische, nicht heimische Arten einen Platz auf dem Speiseplan der Europäer. Dementsprechend sollte auch über die Integration von „Reptilienprimern“, die die Identifizierung von Alligatoren, Insekten oder Beuteltieren, wie beispielsweise Kängurus ermöglichen, nachgedacht werden.

Haustiere teilen sich ihr Zuhause mit ihren Besitzern, weswegen Hinterlassenschaften auf der Kleidung und in der Wohnung schwer zu vermeiden und daher bei der Spurensuche am Tatort von großer Bedeutung sind. Die Aufnahme von Markern für Haustiere, wie Hund, Katze oder Kaninchen in die Multiplex-PCR ist demzufolge aus forensischer Sicht von Interesse.

Besonders in Versicherungsangelegenheiten bei Verkehrsunfällen kommen neben den in der entwickelten Multiplex-PCR getesteten Spezies Wildtiere als Unfallursache in Betracht. Im rechtsmedizinischen Institut in Kiel wurde bereits eine Multiplex-PCR vier wichtiger Wildtierfamilien, den Hirschartigen (Rotwild, Damwild, Rehwild und Sikawild), Hasenartigen, Marderartigen und Schweinen, entwickelt. Die Zusammenlegung der sogenannten „Wildplex“-PCR mit der in dieser Arbeit beschriebenen „Meatplex“-PCR ist bereits geplant.

Literaturverzeichnis

Artikel- und Buchquellen

- Baur, C., Teifel-Greding, J. und Liebhardt, E. (1987): Spezifizierung hitzedenaturierter Fleischproben durch DNA-Analyse. Arch. Lebensmittelhyg., 38, 172-174
- Benson, G. (1999): Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Research, 27, 573-580
- Butler, J. E. (2000): Enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of immunoassay, 21, 165-209
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J. und Bloch, W. (1992): Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Res, 20, 1717-1723
- Conyers, C. M., Allnutt, T. R., Hird, H. J., Kaye, J. und Chisholm, J. (2012): Development of a microsatellite-based method for the differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) from domestic pig breeds (*Sus scrofa domestica*) in food. Journal of agricultural and food chemistry, 60, 3341-3347
- Costa, V., Perez-Gonzalez, J., Santos, P., et al. (2012): Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). BMC research notes, 5, 479
- Forster, B. und Ropohl, D. (1989): Rechtsmedizin. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Gill, P., Jeffreys, A. J. und Werrett, D. J. (1985): Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature, 318, 577-579
- Heinrich-Böll-Stiftung. (2014): Fleischatlas 2013- Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel. 8, Bund für Umwelt- und Naturschutz und Le Monde diplomatique, Berlin
- Hjerten, S. (1967): Free zone electrophoresis. Chromatographic reviews, 9, 122-219
- Hoefler, I. (1993): Nobelpreis für Medizin - das genetische Mosaik. Spektrum der Wissenschaft, 12, 19
- Jansohn, M und Rothämel, S. (2012): Gentechnische Methoden- Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F. und Semeonoff, R. (1985): Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature, 317, 818-819

- Jeffreys, A. J., Wilson, V. und Thein, S. L. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73
- Jensen-Jarolim, E, Schöll, I und Szalai, K. (2006): *Gastrointestinaltrakt- mukosale Pathophysiologie und Immunologie*. Springer Wien New York, Wien, Österreich
- Kay, L. E. (1988): Laboratory technology and biological knowledge: the Tiselius electrophoresis apparatus, 1930-1945. *History and philosophy of the life sciences*, 10, 51-72
- Kayser, M. und de Knijff, P. (2011): Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature reviews. Genetics*, 12, 179-192
- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P. und Kumar, S. (1999): Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producin large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*, 7, 1-7
- Klinke, R., Pape, H.-P., Kurtz, A. und Silbernagel, S. (2010): *Physiologie*. 6, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M. und Shilton, N. (2001): Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM). *Molecular and cellular probes*, 15, 27-35
- Laube, I., Butschke, A., Zagon, J., Spiegelberg, A., Schauzu, M., Mögl, K.-W., Kroh, L.-W. und Broll, H. (2001): Nachweisverfahren für Rindfleisch in Lebensmitteln unter Anwendung der TaqMan™-Technology. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 44, 326-330
- Mansfield, E. S., Robertson, J. M., Vainer, M., et al. (1998): Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) systems using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis*, 19, 101-107
- Martin, R., Wardale, R. J., Jones, S. J., Hernandez, P. E. und Patterson, R. L. (1991): Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat science*, 30, 23-31
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J. und Shinmura, Y. (1999): A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat science*, 51, 143-148
- Modrow, J. H. (2014): *Entwicklung molekularbiologischer Methoden und Aufbau einer Datenbank zur Identitäts-, Mischlings- und Abstammungsanalyse ausgewählter Tierarten*. Dissertation in Bereich Forensische Genetik, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Modrow, J. H., Preusse-Prange, A., Meyer, P., Harder, M., Schwark, T. und von Wurmb-Schwark, N. (2012): Highly reliable quantification of proteins such as members of the HSP70 superfamily based on the grey scale index via immune detection stained bands on a Western blot. *Forensic science international*, 222, 256-258

- Mülhardt, C. (2009): *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. 6, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Müller, S., Flekna, G., Müller, M. und Brem, G. (1999): Use of canine microsatellite polymorphisms in forensic examinations. *The Journal of heredity*, 90, 55-56
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335-350
- Nanekarani, S., Amirinia, C. und Amirmozafari, N. (2011): Genetic analysis of Karakus sheep breed using microsatellite markers. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 703-707
- Newton, C und Graham, A. (1994): *PCR*. 2, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Ojeda, G. N., Amavet, P. S., Rueda, E. C. und Siroski, P. A. (2012): DNA extraction from skins of wild (*Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) species using a novel protocol. *Genetics and molecular research : GMR*, 11, 672-678
- Penning, R. (2006): *Rechtsmedizin systematisch*. 2, UNI-MED Verlag AG, Bremen
- Pingoud, A und Urbanke, C. (1997): *Arbeitsmethoden der Biochemie*. De Gruyter Lehrbuch, Berlin
- Prinz, M., Carracedo, A., Mayr, W. R., et al. (2007): DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic science international. Genetics*, 1, 3-12
- Sadeghi, R., Mahmoudi, B., Babayev, M.S., Rameshknia, Y. und Daliri, M. (2009): Genetic Analysis in Tali Goats Based on 13 Microsatellite Markers. *Research Journal of Biological Science*, 4, 734-737
- Schwark, T., Heinrich, A., Preusse-Prange, A. und von Wurmb-Schwark, N. (2011): Reliable genetic identification of burnt human remains. *Forensic science international. Genetics*, 5, 393-399
- Schwark, T., Heinrich, A. und von Wurmb-Schwark, N. (2011): Genetic identification of highly putrefied bodies using DNA from soft tissues. *International journal of legal medicine*, 125, 891-894
- Shinoda, N., Hashimoto, Y., Takagi, M., Kojima, F., Onodera, T. und Sugiura, K. (2011): PCR-RFLP identification of prohibited animal derived DNA in animal feed. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 52, 24-27
- Sinden, R. R. und Wells, R. D. (1992): DNA structure, mutations, and human genetic disease. *Current opinion in biotechnology*, 3, 612-622
- Stachman, T. und Read, A. P. (2005): *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag ist ein Imprint der Elsevier GmbH, München

- Tiselius, A. (1937): A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*, 33, 524-531
- Tripathi, A., Commins, S. P., Heymann, P. W. und Platts-Mills, T. A. (2014): Delayed anaphylaxis to red meat masquerading as idiopathic anaphylaxis. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 2, 259-265
- Vaiman, D., Mercier, D., Moazami-Goudarzi, K., et al. (1994): A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 5, 288-297
- Venter, J. Craig, Adams, Mark D., Myers, Eugene W., et al. (2001): The Sequence of the Human Genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291, 1304-1351
- von Wurmb-Schwark, N., Preusse-Prange, A., Heinrich, A., Simeoni, E., Bosch, T. und Schwark, T. (2009): A new multiplex-PCR comprising autosomal and y-specific STRs and mitochondrial DNA to analyze highly degraded material. *Forensic science international. Genetics*, 3, 96-103
- Watson, J D und Crick, E A (1953): Molecular structure of nucleic acids: a structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171: 737-738.
- Wyman, A. R. und White, R. (1980): A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 6754-6758
- Zehner, R., Zimmermann, S. und Mebs, D. (1998): RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International journal of legal medicine*, 111, 323-327

Internetquellen

- Applied Biosystems (2007): Applied Biosystems® 3130/3130kl Genetic Analyzers- Getting Started Guide, URL:
https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041468.pdf. [Abrufdatum 03.08.2015]
- Bioline (2014): Immolase™ DNA-Polymerase,
http://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/872/immolase_dna_polymerase_manual.pdf. [Abrufdatum: 25.09.2014]
- Bluestar Forensics (2014): Hexagon OBTI, <http://www.bluestar-forensic.com/gb/hexagon.php>. [Abrufdatum: 26.08.2014]
- Broad Institute (2014): Broadinstitute.com, <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data> [Abgerufen am 25.09.2014]
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (November 2014): Kennzeichnung von Lebensmitteln- die neuen Regelungen,
http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Flyer-Poster/Flyer-LM-Kennzeichnung.pdf?__blob=publicationFile. [Abrufdatum 25.11.2014]
- Carl Roth® (2013): Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006,
https://www.carlroth.com/downloads/sdb/de/7/SDB_7870_DE_DE.pdf. [Abrufdatum 07.10.2015]
- Der Spiegel (1987): 41/1987 Gentechnik- Wilde Träume,
<http://www.spiegel.de/spiegel/print/d-13524230.html>. [Abrufdatum: 21.08.2014]
- Der Tagesspiegel (2013): Lebensmittelskandale- nach den Problemen nun die Lösung?,
<http://www.tagesspiegel.de/politik/lebensmittelskandale-vertrauen-der-verbraucher-zurueckgewinnen/7858720-2.html>. [Abrufdatum 28.11.2014]
- German Meat GmbH (2014): Die Entwicklung der Nutztierhaltung,
<http://www.fleischexperten.de/fleischerzeugung/entwicklung-der-nutztierhaltung/>. [Abrufdatum: 26.08.2014]
- Heinrich-Böll-Stiftung (2014): Fleischatlas 2013- Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel. URL:
http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/publikationen/landwirtschaft/140328_bund_landwirtschaft_fleischatlas_2013.pdf. [Abrufdatum: 23.07.2014]
- National Center for Biotechnology Information (2009): Blast®, http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. [Abrufdatum: 19.09.2014]

Nobel Media AB 2014 (2015): The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1993,
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1993/. [Abrufdatum:
01.06.2015]

Statistisches Bundesamt (2013): Statistisches Jahrbuch – Deutschland und Internationales,
https://www.destatis.de/DE/Publikationen/StatistischesJahrbuch/StatistischesJahrbuch2013.pdf?__blob=publicationFile. [Abrufdatum: 30.8.2013]

Stratec molecular (2012): Purification of Forensic DNA Samples with the KingFisher®
Magnetic Particle Processor and Characterization of the Purified DNA,
http://www.stratec.com/share/molecular/Application_Notes/invitek_agowa_thermo.pdf
[Abrufdatum: 26.11. 2014].

Stratec molecular (2013): Introduction for Invisorb® Spin Tissue Mini Kit,
<http://www.stratec.com/share/molecular/Manuals/Single/DNA/InvisorbSpinTissueMiniKit.pdf>
f. [Abrufdatum: 26.11.2014]

Stratec molecular (2013): User manual- InviMag® Blood DNA Mini Kit/KFmL,
<http://www.stratec.com/share/molecular/Manuals/InviMag/KFmL/InviMagBloodDNAMiniKitKFmL.pdf>. [Abrufdatum: 26.11.2014]

Thermo Scientific (2010): KingFisherFlex- User Manual,
<https://static.thermoscientific.com/images/D01475~.pdf>. [Abrufdatum: 26.11.2014]

Thermo Scientific (2013): Assessment of Nucleic Acid Purity,
<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. [Abrufdatum: 07.09.2015]

Anhang

Anhang A: Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
c	Konzentration
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled device
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
engl.	englisch
et al.	
g	et alteri
G	Gramm
GI	Guanin
hHb	Graustufenindex
IgC	humanes Hämoglobin
K	Immunglobulin C
Kb	Zusatzbezeichnung der Proteinase
lat.	Kilobasen
M	
mA	Mol
MAP	Milliampere
MgCl ₂	Magnetic Active Particle
ml	Magnesiumchlorid
mM	Milliliter
ng	Millimol

N-glycosidische Bindung	Nanogramm
OBTI	Glycosidische Bindung über eine Stickstoffgruppe
PBS	Eigenname eines Identifikationstestes humanen Blutes
PCR	phosphate-buffered saline
pH	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	potentia hypogenii
	Picomol
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RFU	relative fluorescent unit
RIA	Radioimmunassay
STR	Short Tandem Repeat
T	Thymin
Taq	aus Thermophilus aquadicus stammende DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
u	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius

Anhang B: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der DNA.	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Nachweises humanen Blutes mittels sogenannten OBTI-Test.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines ELISAs.....	7
Abbildung 4: Darstellung einer Doppelimundiffusion nach Ouchterlony.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der semiautomatischen Extraktionsmethode.....	18
Abbildung 6: Beispiel eines Agarosegelelektrophoreseergebnisses anhand von Verdünnungsreihen je einer Schafs- und Ziegen-DNA-Probe. Foto eines Ethidium- bromid-gefärbten Agarosegels.	21
Abbildung 7: Darstellung des Prinzips der Polymerase-Kettenreaktion.....	24
Abbildung 8: Beispiel für die elektropherographische Ansicht eines Testergebnisses des Nachweises schweinespezifischer STR-Merkmale. Die Kapillarelektrophorese erfolgte auf einem ABIPrism3130 unter Einsatz der GeneMapper Software.	33
Abbildung 9: Peakkonfiguration einer Rinderprobe im Elektropherogramm eines ABIPrism3130.....	33
Abbildung 10: Musterhafte Darstellung der Peakkonfigurationen des Nachweises speziesspezifischer STR-Merkmale nach Kapillarelektrophorese auf einem ABI3130 sowie unter Einsatz der GeneMapper Software.	34
Abbildung 11: Elektropherographische Darstellung des Nachweises schweine- spezifischer STR-Signale von mehr als einem Individuum nach Analyse durch einen ABIPrism3130 und multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation.....	35
Abbildung 12: Überprüfung von DNA-Quantität und –Qualität von Erbmaterial aus Gewebeproben nach manueller und semiautomatischer Extraktion. Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung.....	37
Abbildung 13: Qualität der PCR-Produkte nach manueller und semiautomatischer DNA-Extraktion. Elektropherogramm eines ABIPrim3130 des Extraktionsproduktes von je fünf ng Rinderlebergewebe nach Amplifikation mittels „Meatplex“-PCR.....	38
Abbildung 14: Elektropherographische Darstellung des DNA-Nachweises aus Schweine- und Ziegenproben, die mittels Multiplex-PCR vervielfältigt und auf einem ABIPrism3130 kapillarelektrophoretisch analysiert wurden.	41
Abbildung 15: Veranschaulichung der speziesspezifischen DNA-Fragmente nach ihren Basenpaarlängen und Farbmarkierungen.	42

Abbildung 16: Quantifizierung der Gesamt-DNA aus Gewebe von Rind und Schwein über densitometrische Auswertung einer Verdünnungsreihe. Foto eines zwei-prozentigen, ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels nach 45 Minuten Laufzeit.....	43
Abbildung 17: Nachweis multiplexgesteuert spezifischer Amplifikate bei reduziertem Reaktionsansatz im Elektropherogramm einer ABIPrism3130 analysierten DNA-Probe. Vergleich der Elektropherogramme zwischen vollen und halben PCR-Ansatz.....	47
Abbildung 18: Überprüfung der Multiplex-PCR auf Inhibitoren durch Koamplifikation von Hydra-spezifischen DNA-Fragmenten. Elektropherographische Darstellung eines mittels ABIPrism3130 analysierten DNA-Extraktionsergebnisses einer Rindslederprobe.....	48
Abbildung 19: ABIPrism3130 basierter, kapillarelektrophoretischer Nachweis speziesspezifischer STR-Merkmale von Lamm und Rind aus einer Hackfleischprobe. Die verwendete DNA wurde zuvor mittels entwickelter Multiplex-PCR amplifiziert.	50
Abbildung 20: ABI-Prism3130 basierter elektropherographischer Nachweis rinds- sowie schweinespezifischer DNA, die mittels Multiplex-PCR aus dem Extraktionserzeugnis einer als Rindercevapcici deklarierten Ware amplifiziert wurde.	51
Abbildung 21: Speziesidentifizierung einer aus Gänseleberpastete stammender DNA-Probe mittels neu entwickelter Multiplex-PCR. Elektropherogramm der durch ABIPrism3130 analysierten Probe.	52
Abbildung 22: Elektropherogramm eines mittels „Meatplex“-PCR amplifizierten und ABIPrism3130 analysierten DNA-Extraktes aus einer als Kalbsdönerfleisch deklarierten Probe.....	53
Abbildung 23: Nachweis von spezifischen STR-Merkmalen aus der Probe einer Raviolifüllung, die mittels Multiplex-PCR amplifiziert wurde. Elektropherogramm nach Analyse auf einem ABI3130.....	54
Abbildung 24: Nachweis pferdespezifischer STR-Merkmale aus Pferdefleisch als Positivkontrolle. Elektropherogramm nach Vervielfältigung der Merkmale durch die Multiplex-PCR und Kapillarelektrophorese auf einem ABIPrism3130.....	55
Abbildung 25: Nachweis von Schweinefleisch in einer Nassfutterprobe für Katzen. Elektropherogramm nach Amplifikation durch die etablierte Multiplex-PCR und kapillarelektrophoretischer Auftrennung durch einen ABI3130.....	58
Abbildung 26: Nachweis spezifischer STR-Merkmale in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Probe in Magensaft. Elektropherogramme nach selektiver	

Vervielfältigung mittels „Meatplex“-PCR und anschließender kapillarelektrophoretischen Analyse durch einen ABIPrism3130.....	60
Abbildung 27: Nachweis von Rindergewebe aus einem unbekanntem Gewebefund im Wald. Elektropherogramm nach multiplexgesteuerter Amplifikation und Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130.....	61
Abbildung 28: Elektropherogramme der kapillarelektrophoretischen Auswertung auf einem ABIPrism3130 nach Amplifikation der speziesspezifischen Marker mittels entwickelter Multiplex-PCR.....	98
Abbildung 29: Foto eines Argarosegelelektrophoreseergebnisses der Verdünnungsreihen von Schafs- und Ziegenmuskelproben nach semiautomatischer Extraktion mit Hilfe des KingFisher® Flex-Extraktionsgerät.....	98
Abbildung 30: Foto einer Gelelektrophorese der Verdünnungsreihe von DNA aus Mischfleisch, die mittels einem KingFisher® Flex-Extraktionsgerät gewonnen wurde. Ausgewählt wurde beispielhaft gemischtes Hackfleisch von Rind und Schwein.....	100
Abbildung 31: Elektropherogramm einer Leberprobe von einer Frischfleischtheke nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung durch einen ABIPrism 3130 und DNA-Vervielfältigung durch die Multiplex-PCR.....	102
Abbildung 32: Elektropherogramm einer Pferdefleischprobe von einem Marktstand, die nach Amlifikation durch die „Meatplex“-PCR durch einen ABIPrism3130 kapillarelektrophoretisch analysiert wurde.....	102
Abbildung 33: Elektropherogramm eines Ziegenrippchens eines Ziegenzüchters. Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130 nach selektiver Amplifikation mittels entwickelter Multiplex-PCR.....	103
Abbildung 34: Elektropherogramm eines Minutensteaks nach kapillarelektrophographische Auftrennung durch einen ABIPrism3130 und „Meatplex“-PCR-gesteuerter Amplifikation der DNA.....	103
Abbildung 35: Elektropherogramm einer mittels entwickelter Multiplex-PCR vervielfältigten DNA-Probe gemischten Hackfleisches. Die kapillarelektrophoretische Untersuchung erfolgte durch ein ABIPrism3130.....	104
Abbildung 36: Elektropherogramm einer Beefhackprobe nach Kapillarelektrophorese mit einem ABIPrism3130. Selektiv vervielfältigt wurden die DNA-Sequenzen durch die entwickelte „Meatplex“-PCR.....	105

Abbildung 37: Ergebnisse der elektropherographischen Analyse einer Mettprobe von einer Frischfleischtheke durch einen ABIPrism3130 nach selektiver DNA-Amplifikation durch die Multiplex-PCR.....	105
Abbildung 38: Elektropherographische Darstellung einer Schweinesalamiprobe nach Analyse durch einen ABIPrism3130 und multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation.....	106
Abbildung 39: Elektropherogramm einer Bratwurst nach Analyse durch einen ABIPrism3130 und selektiver Vervielfältigung der DNA-Sequenzen durch die entwickelte Multiple-PCR.....	106
Abbildung 40: Kapillarelektrophoretische Auswertung einer Leberwurstprobe durch einen ABIPrism3130 nach Amplifikation mittels Multiplex-PCR.....	107
Abbildung 41: Elektropherogramm als Ergebnisse der Analyse einer Leberwurstprobe vom Schwein nach Amplifikation mittels „Meatplex“-PCR und anschließender kapillarelektrophoretischen Auftrennung durch einen ABIPrism3130.....	107
Abbildung 42: Elektropherogramm der Testung einer Geflügelfrikadelle durch einen ABIPrism3130 nach Amplifikation mittels Multiplex-PCR.....	108
Abbildung 43: Elektropherogramm der Testung einer Geflügelfrikadelle mittels Multiplex-PCR und anschließender kapillarelektrophoretischen Auswertung durch einen ABIPrism3130.....	108
Abbildung 44: Elektropherogramm eines Kloßes aus einem Suppentopf aus der Dose durch kapillarelektrophorese Analyse mittels einem ABIPrism3130 nach multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation.....	109
Abbildung 45: Elektropherogramm eines Kofes aus einem Nudeltopf aus der Dose. Kapillarelektrophoretische Auswertung durch einen ABIPrism3130 nach Vervielfältigung gezielter DNA-Sequenzen mittels Multiplex-PCR.....	109
Abbildung 46: Elektropherogramm eines Fertigproduktes von Königsberger Klößen nach Amplifikation mittels „Meatplex“-PCR und anschließender Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130.....	110
Abbildung 47: Kapillarelektrophoretische Auswertung einer tiefgefrorenen Hackfleischprobe einer Fertiglasagne durch einen ABIPrism3130 nach DNA-Vervielfältigung mittels entwickelter Multiplex-PCR.....	110
Abbildung 48: Elektropherogramm der Untersuchung einer Wurstprobe aus einem Fleischsalat durch kapillarelektrophoretische Analyse durch einen ABIPrism3130 nach Amplifikation mittels Multiplex-PCR.....	111

Abbildung 49: Kapillarelektrophoretische Auswertung einer Schweinetortelliniprobe durch einen ABIPrism3130 nach DNA-Vervielfältigung mittels entwickelter Multiplex-PCR.	111
Abbildung 50: Elektropherogramm der mittels multiplexgesteuerten Amplifikation gewonnenen DNA aus einem Schinkenstück einer Tortellinsauce eines Fertigproduktes. Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130.....	112
Abbildung 51: Elektropherogramm einer mittels ABIPrism3130 analysierten DNA-Probe aus der Füllung eines Schinkentortellini. Zuvor erfolgte die Amplifikation entsprechender Sequenzen durch die entwickelte Multiplex-PCR.....	112
Abbildung 52: Negativkontrolle der Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt. Kapillarelektrophoretische Analyse von Magensaft durch einen ABIPrism3130 nach Durchlaufen der Multiplex-PCR.....	113
Abbildung 53: Elektropherogramm der Positivkontrolle des Versuches der Simulation von Mageninhalt anhand einer Rinderhackprobe. Nach multiplexgesteuerter Amplifikation wurde die Probe durch einen ABIPrism3130 kapillarelektrophoretisch analysiert.	113
Abbildung 54: Elektropherogramm der kapillarelektropherographischen Analyse durch einen ABIPrism3130 einer Rindergewebsprobe nach 30 minütiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt anhand einer Rinderhackprobe.	114
Abbildung 55: Elektropherogramm der Analyse mittels eines ABIPrism3130 einer multiplexgesteuert amplifizierten 100 mg Rinderhackprobe nach 45 minütiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.	115
Abbildung 56: Elektropherogramm der Analyse mittels eines ABIPrism3130 einer multiplexgesteuert amplifizierten 200 mg Rinderhackprobe nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Magensaft.	116
Abbildung 57: Kapillarelektrophoretisches Analyseergebnis eines ABIPrism3130 nach DNA-Amplifikation einer 300 mg Rinderhackprobe mittels Multiplex-PCR. Die Inkubationszeit im Magensaft vor DNA-Extraktion betrug 45 Minuten. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.	117
Abbildung 58: Elektropherographische Darstellung der Analyseergebnisse durch einen ABIPrism3130 einer 100 mg Rinderhackprobe, die vor DNA-Extraktion eineinhalb Stunden im Magensaft inkubiert wurde. Die Amplifikation erfolgte durch die „Meatplex“-PCR. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.....	117
Abbildung 59: Elektropherogramm einer 100 mg Rinderhackprobe durch einen ABIPrism3130 nach multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation. Die DNA-Extraktion	

erfolgte nach zweistündiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Magensaft.	118
Abbildung 60: Kapillarelektrophoretische Ergebnisse eines ABIPrism3130 einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind als Positivkontrolle der Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt. Die Amplifikation selektiver DNA-Sequenzen erfolgte mittels entwickelter Multiplex-PCR.	119
Abbildung 61: Ergebnis der Kapillarelektrophorese eines ABIPrism3130 der DNA einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit von 45 Minuten im Magensaft. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte durch die „Meatplex“-PCR. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.	120
Abbildung 62: Elektropherogramm nach Auswertung durch einen ABIPrism3130 der DNA einer 200 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit im Magensaft von 45 Minuten und multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.	121
Abbildung 63: Kapillarelektrophoretische Analyseergebnisse eines ABIPrism3130 der DNA von einer 300 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit von 45 Minuten im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.	122
Abbildung 64: Elektropherographische Darstellung des Extraktionserzeugnisses einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden im Magensaft. Die kapillarelektrophoretische Analyse erfolgte nach selektiver, multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation durch einen ABIPrism3130. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.	123
Abbildung 65: Elektropherogramm eines ABIPrism3130 nach multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind nach zweistündiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.	124

Anhang C: Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die getesteten Frischfleischarten.....	13
Tabelle 2: Übersicht der getesteten gekühlten und gefrorenen Fertiggerichte.....	13
Tabelle 3: Schematische Darstellung der befüllten Platten im KingFisher® Flex Extraktionsgerät.....	18
Tabelle 4: Zusammensetzung der in der Agarosegelelektrophorese notwendigen Reagenzien.....	21
Tabelle 5: Übersicht der Eigenschaften der ausgewählten Primer.....	26
Tabelle 6: Bestandteile des verwendeten Reaktionsansatzes der hot-start-PCR.....	27
Tabelle 7: Standardtemperaturprofil der PCR.....	28
Tabelle 8: Auflistung der in der entwickelten Multiplex-PCR verwendeten artspezifischen Primerpaare.....	29
Tabelle 9: Pipettierschema des Finnzyme Equine Panel 1.1.....	30
Tabelle 10: Temperaturprofil der „Horse-Plex“-PCR.....	30
Tabelle 11: Analyseparameter im Genetic Analyzer ABI 3130 während der Kapillarelektrophorese.....	32
Tabelle 12: Ergebnisübersicht der gemeinsamen Testung beider Primerpaare einer Spezies in einem Multiplex-PCR-Ansatz.....	40
Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der im Elektropherogramm ausschlagenden und somit speziesspezifischen Primersysteme mit vorheriger Amplifikation mittels entwickelter Multiplex-PCR.....	42
Tabelle 14: Nachweisgrenzen der Spezies in den unterschiedlichen STR-Systemen.....	44
Tabelle 15: Optimale Reaktionsbedingungen für die entwickelte Multiplex-PCR.....	46
Tabelle 16: Pipettierschema des halbierten PCR-Ansatzes.....	46
Tabelle 17: Übersicht der getesteten Fleischproben mit den zugehörigen Mischungsverhältnissen der Fleischprodukte.....	57
Tabelle 18: Einfluss des Magenmilieus auf die Untersuchungsergebnisse der Multiplex-PCR anhand des RFU-Verlaufes der ausschlagenden Systeme in Abhängigkeit zur Inkubationszeit im Magensaft.....	59
Tabelle 19: Ergebnisse der desitometrischen Quantifizierung der manuellen und semiautomatischen Extraktionserzeugnisse.....	95
Tabelle 20: Densitometrisches Quantifizierungsergebnisse der Agarosegelelektrophoresen der Verdünnungsreihen von Rinder- und Schweineleberproben sowie Schafs- und Ziegenmuskelproben zur Nachweisgrenzenbestimmung der Multiplex-PCR.....	99

Tabelle 21: Nachweisgrenzenbestimmung der entwickelten Multiplex-PCR durch Bestimmung der detektierbaren Konzentrationen der einzelnen Markersysteme.	993
Tabelle 22: Darstellung des Einflusses des simulierten Magenmilieus auf den DNA-Gehalt der Extraktionsprodukte der Rinderhackproben.	118
Tabelle 23: Geräteverzeichnis	125
Tabelle 24: Softwareverzeichnis	126
Tabelle 25: Verbrauchsmaterialien	127

Anhang D: Weitere Abbildungen und Tabellen

D.1 Extraktionsmethoden im Vergleich

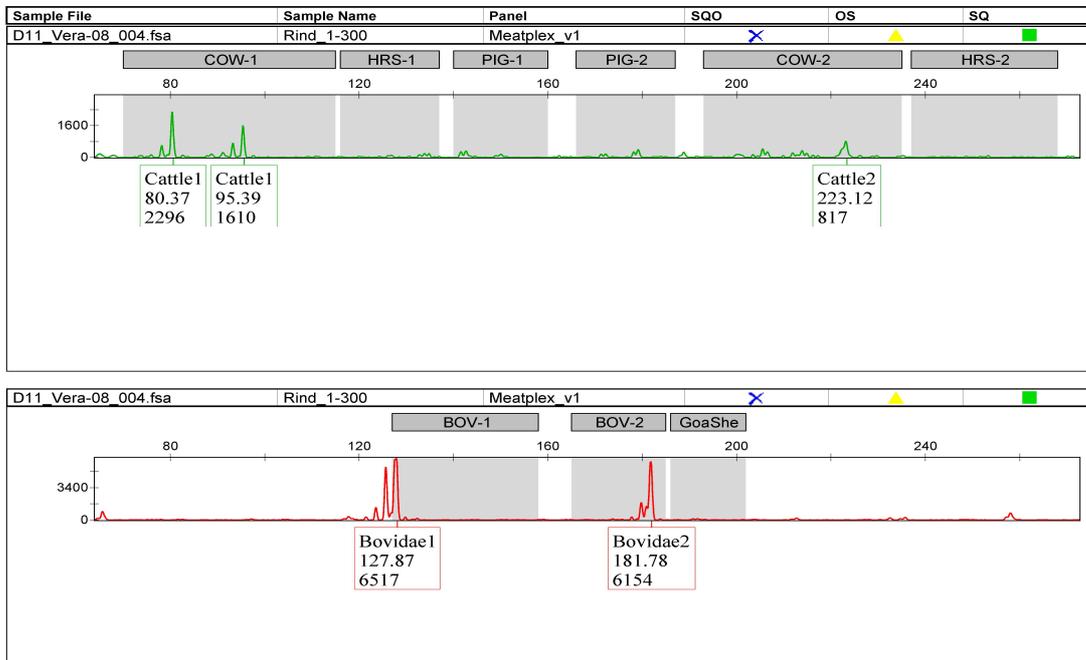
Tabelle 19: Ergebnisse der desitometrischen Quantifizierung der manuellen und semiautomatischen Extraktionserzeugnisse.

Dabei wird der Graustufenindex jeder detektierbaren Bande gemessen (relativer Wert von 0 bis 255) und daraus die enthaltene DNA-Menge errechnet. Die Summe der DNA-Mengen jeder der einzelnen Proben zugehörigen Banden ergeben die DNA-Menge, die pro Tasche im Gel eingesetzt wurde. Da fünf μl DNA pro Tasche hinzugegeben wurden, entspricht der Quotient aus diesem Wert mit fünf die DNA Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{l}$. Die Ausbeute der Extraktion ist ähnlich. Die semiautomatische Extraktion ermöglicht eine geringfügig höhere DNA-Menge im Extrakt.

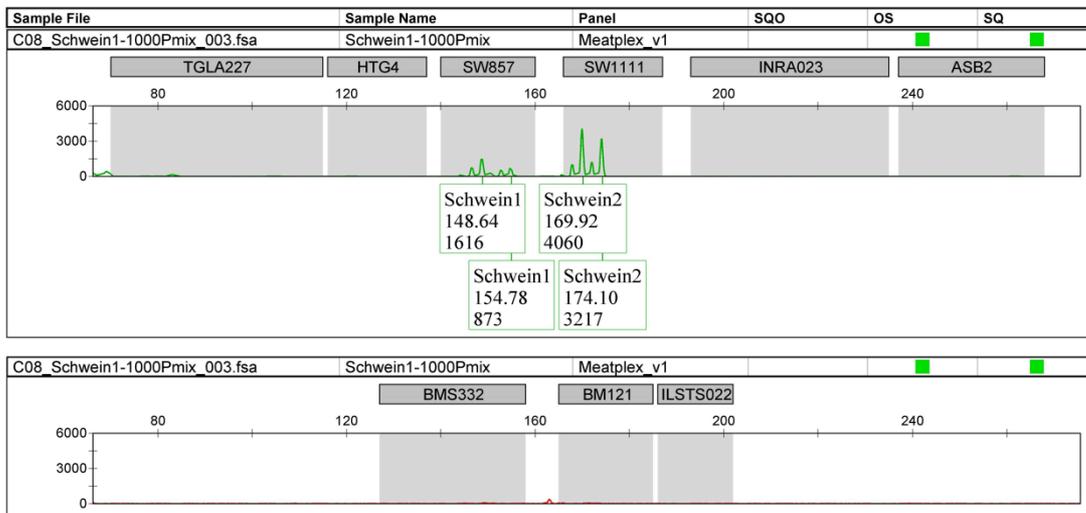
Extraktionsmethode	Gewebsgewicht (mg)	Graustufenindex (GI) der einzelnen Banden	DNA-Menge pro Bande (ng)	DNA-Menge in 5 μl (ng/5 μl)	DNA-Menge pro μl (ng/ μl)
Semiautomatisch mittels KingFisher Flex	100	107	39,14	137,43	27,48
		162	59,52		
		106	38,77		
	50	229	83,76	133,87	26,77
		137	50,11		
	25	247	90,34	138,99	27,79
		133	48,65		
	12,5	244	89,25	142,65	28,53
		146	53,4		
	Manuell mittels SpinTissue Kit	100	249	91,08	128,75
103			37,67		
50		250	91,44	126,92	15,384
		97	35,48		
25		188	68,76	88,51	17,7
		54	19,75		
12,5		249	91,08	91,08	18,21

D.2 Speziesnachweis mittels entwickelter Multiplex-PCR

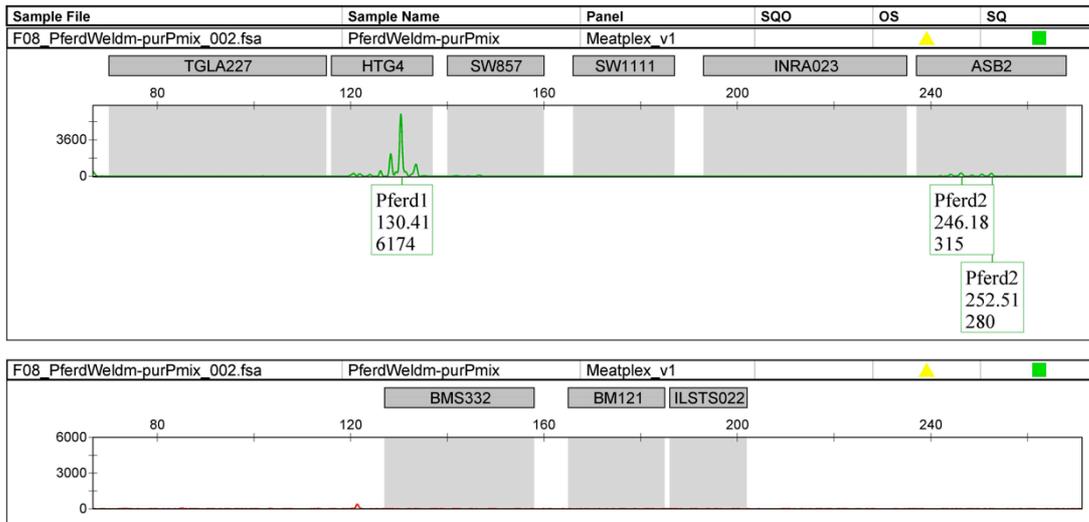
A:



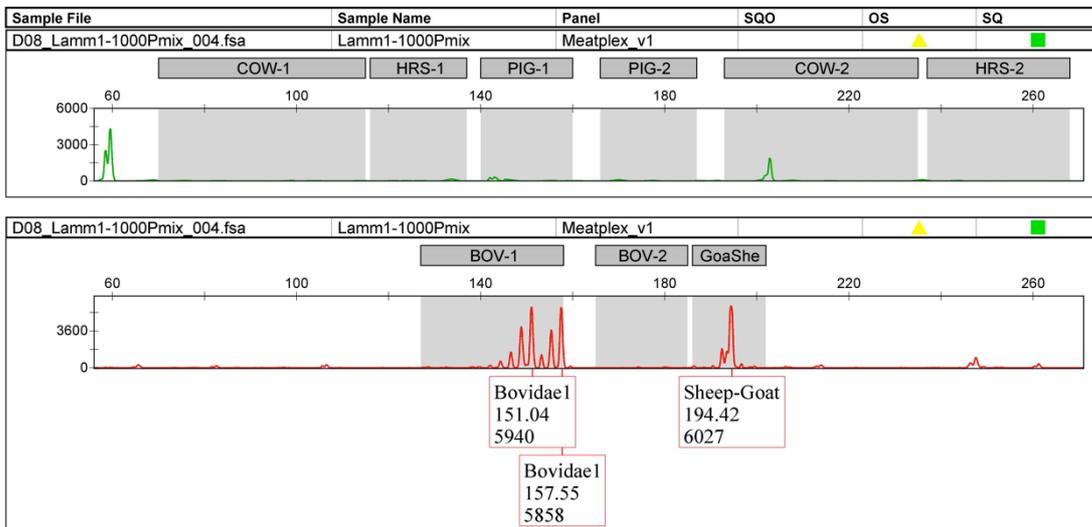
B:



C:



D:



E:

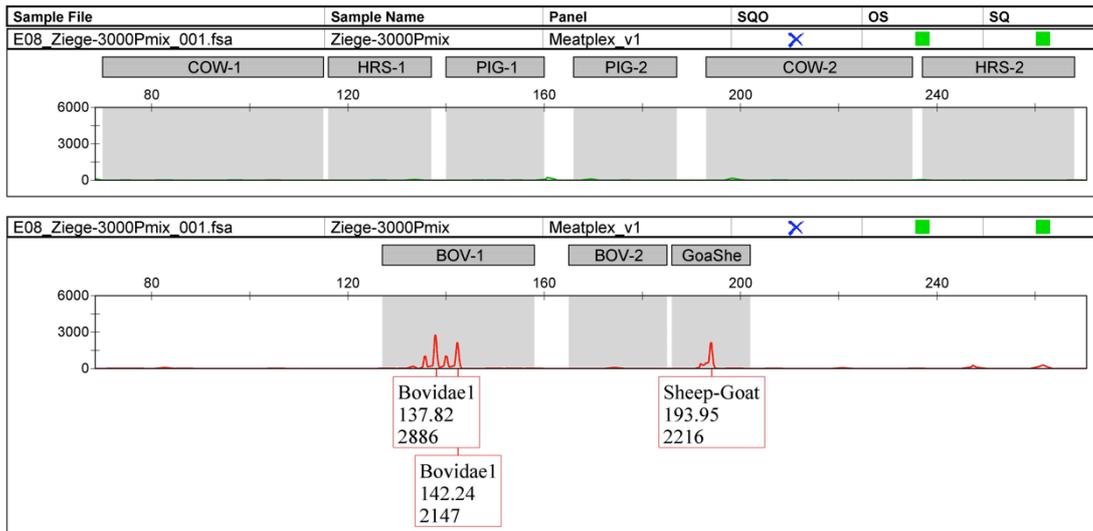


Abbildung 28: Elektropherogramme der kapillarelektrophoretischen Auswertung auf einem ABIPrism3130 nach Amplifikation der speziesspezifischen Marker mittels entwickelter Multiplex-PCR. Getestet wurde jede Spezies im eigenen „Meatplex“-Ansatz. A: Rind, B: Schwein, C: Pferd, D: Schaf, E: Ziege. Dabei fällt auf, dass die gleichen Systeme bei der Testung der DNA von Schafen und Ziegen reagieren.

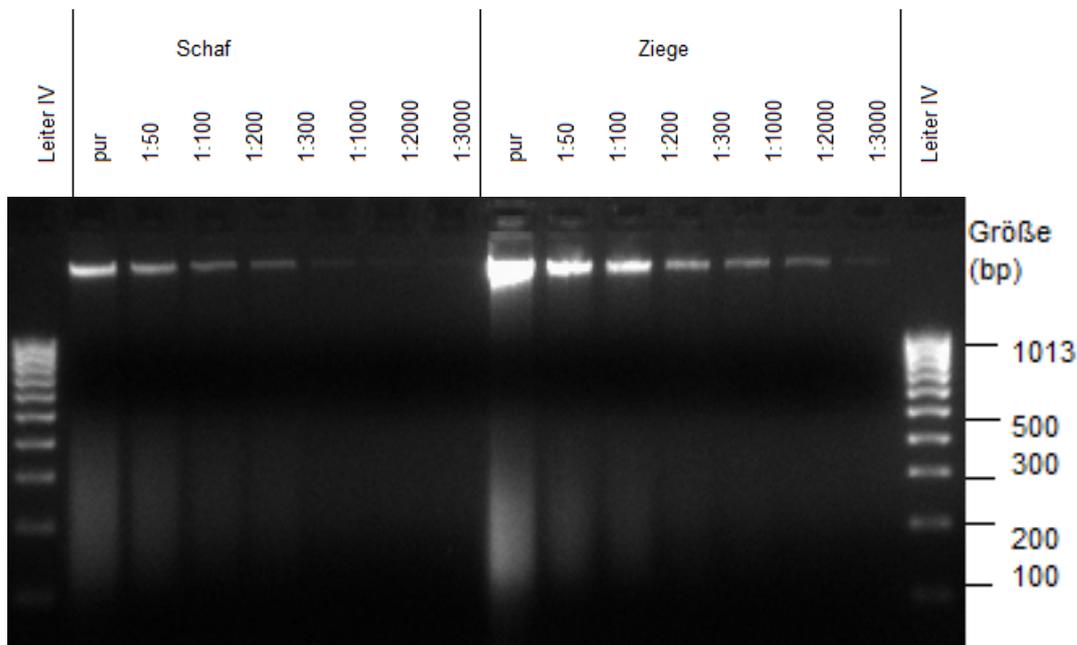


Abbildung 29: Foto eines Argarosegelelektrophoreseergebnisses der Verdünnungsreihen von Schafs- und Ziegenmuskelproben nach semiautomatischer Extraktion mit Hilfe des KingFisher® Flex-Extraktionsgerät.

Die Konzentrationsabnahme ist mit steigender Verdünnung in Form von Kontrastabnahme der Banden zu sehen und dient als Grundlage der Quantifizierung zum Zwecke der Nachweisgrenzenbestimmung der „Meatplex“-PCR.

Tabelle 20: Densitometrisches Quantifizierungsergebnisse der Agarosegelelektrophoresen der Verdünnungsreihen von Rinder- und Schweineleberproben sowie Schafs- und Ziegenmuskelproben zur Nachweisgrenzenbestimmung der Multiplex-PCR.

Die jeweiligen Verdünnungen mit gewünschter Konzentration von drei bis vier ng/µl sind rot unterlegt. Aufgrund dieser Werte werden in der vorgestellten Arbeit Organewebe in einer Verdünnung von 1:1000 und Muskelgewebe in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Obwohl für das verwendete Schafsmuskelgewebe die Quantifizierung eine optimale Verdünnung von 1:1000 ergab, wird zur Vereinfachung und eine Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Dies dient der Vereinheitlichung der eingesetzten Verdünnungen für Muskelgewebe um für die Untersuchung einen ausreichenden DNA-Gehalt zu gewährleisten.

Probenummer	GI	ng in 5 µl	ng pro µl
Rind pur	253	91,8	18,36
Rind 1:50	253	91,8	18,36
Rind 1:100	163	59,14	11,828
Rind 1:200	104	37,74	7,548
Rind 1:300	83	30,12	6,024
Rind 1:1000	58	21,04	4,208
Rind 1:2000	52	18,87	3,774
Rind 1:3000	54	19,59	3,918
Schwein pur	252	91,44	18,288
Schwein 1:50	252	91,44	18,288
Schwein 1:100	170	61,68	12,336
Schwein 1:200	104	37,74	7,548
Schwein 1:300	76	27,58	5,516
Schwein 1:1000	51	18,51	3,702
Schwein 1:2000	40	14,51	2,902
Schwein 1:3000	38	13,79	2,758
Lamm pur	115	103,23	20,646
Lamm 1:50	249	223,52	44,704
Lamm 1:100	180	161,58	32,316
Lamm 1:200	71	63,73	12,746
Lamm 1:300	61	54,76	10,952
Lamm 1:1000	21	18,85	3,77
Lamm 1:2000	12	10,77	2,154
Ziege 1:50	100	89,77	17,954
Ziege 1:100	60	53,86	10,772
Ziege 1:200	32	28,73	5,746
Ziege 1:300	17	15,26	3,052
Ziege 1:1000	8	7,18	1,436

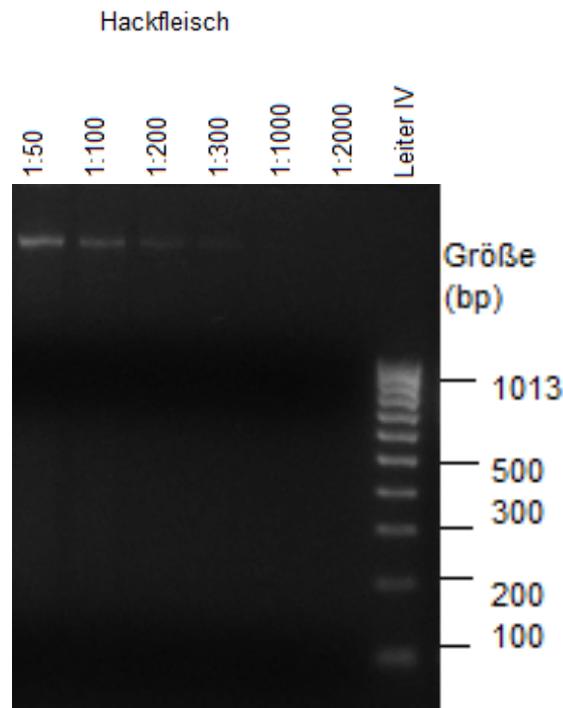


Abbildung 30: Foto einer Gelelektrophorese der Verdünnungsreihe von DNA aus Mischfleisch, die mittels einem KingFisher® Flex-Extraktionsgerät gewonnen wurde. Ausgewählt wurde beispielhaft gemischtes Hackfleisch von Rind und Schwein.

Die densitometrische Quantifizierung ergab bei einer Verdünnung von 1:100 die Konzentration von ungefähr fünf ng/µl. Da bei einer höheren Verdünnung der Graustufenindex annähernd gleich blieb, wurde dieses Verhältnis der Verdünnung von 1:200, die laut Messung einen Gehalt von 3,7 ng/µl aufwies, vorgezogen. Damit wurden der Einfluss von Messungenauigkeiten und durch Eichung nicht abgedecktem Hintergrundrauschen minimiert.

Tabelle 21: Nachweisgrenzenbestimmung der entwickelten Multiplex-PCR durch Bestimmung der detektierbaren Konzentrationen der einzelnen Markersysteme.

Die RFUs stehen mit der DNA-Menge im Verhältnis. Dabei ist die Konzentration des letzten zu detektierenden Peaks mit einer Amplitude von über 50 die Nachweisgrenze des einzelnen Systems. Die DNA-Menge, bei der alle Systeme einen Ausschlag verzeichnen, liegt bei 0,75 ng und ist daher als Nachweisgrenze der „Meatplex“-PCR anzusehen.

Spezies	DNA-Menge (ng/ul)	Speziesmarker 1	Allel 1 (RFU)	Allel 2 (RFU)	Speziesmarker 2	Allel 1 (RFU)	Allel 2 (RFU)
Schwein	3	Schwein-1 (SW857)	2086	1037	Schwein-2 (SW1111)	2653	2653
	1,5		1492	655		1866	1535
	0,75		542	281		638	655
	0,375		251	329		844	657
Schaf	3	BOV-1 (BMS332)	4125	3806	GoaShe (ILST002)	6143	
	1,5		3008	2786		4889	
	0,75		1589	1565		3181	
	0,375		1569	1577		30041	
Rind	6	Rind-1 (TGLA227)	3034	2207	Rind-2 (INRA023)	1026	702
	3		2178	1305		543	451
	1,5		1694	1132		308	225
	0,75		125	55		62	128
	0,375		-	-		-	-
	6	BOV-1 (BMS332)	6003		BOV-2 (BM121)	4096	
	3		6533			3713	
	1,5		6463			2812	
	0,75		2116			835	
	0,375		588			163	
Pferd	20	HRS-1 (HTG4)	5119	3764	HRS-2 (ASB2)	3768	
	4		2288	1584		355	
	2		1308	730		93	
	1		742	386		-	
Spezies	DNA-Menge (ng/ul)	Speziesmarker 1	Allel 1 (RFU)	Speziesmarker 2	Allel 1 (RFU)	Speziesmarker 3	Allel 1 (RFU)
Ziege	3	BOV-2 (BM121)	481	BOV-1 (BMS332)	293	GoaShe(ILST002)	633
	1,5		295		222		629
	0,75		255		159		519
	0,375		79		-		145

D.3 Anwendungsbeispiele

D.3.1 Untersuchung von Fleischproben von Frischetheken

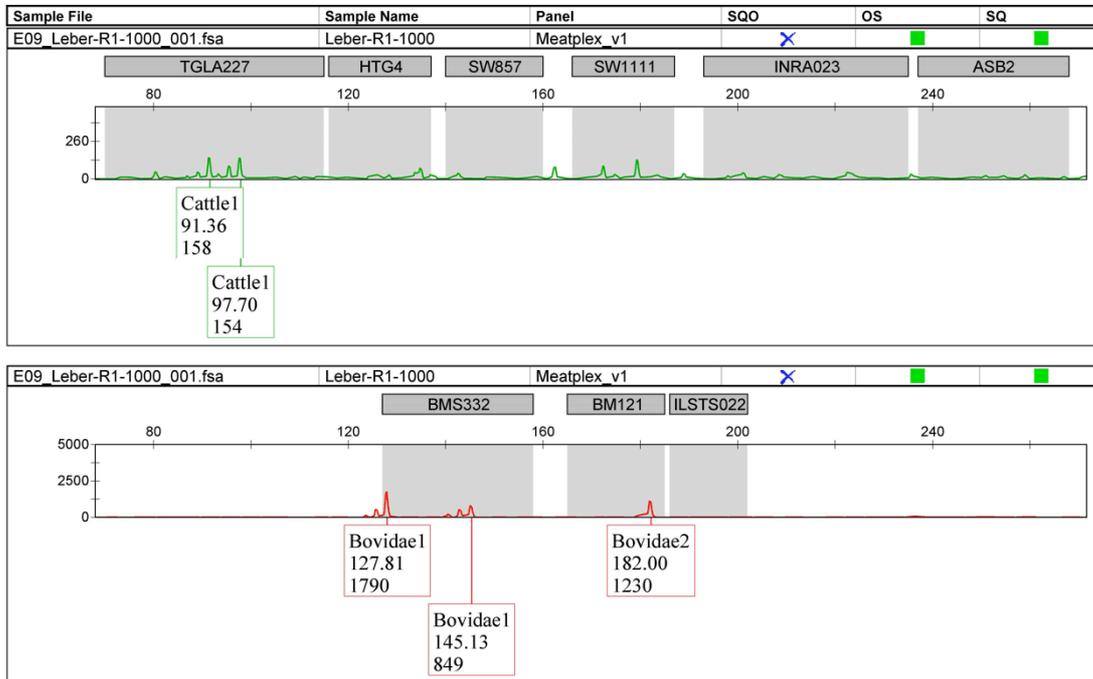


Abbildung 31: Elektropherogramm einer Leberprobe von einer Frischfleischtheke nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung durch einen ABIPrism 3130 und DNA-Vervielfältigung durch die Multiplex-PCR.

Die Systeme Cattle-1 (=COW-1), sowie BOV-1 und BOV-2 belegen die Herkunft der Probe von einem Rind.

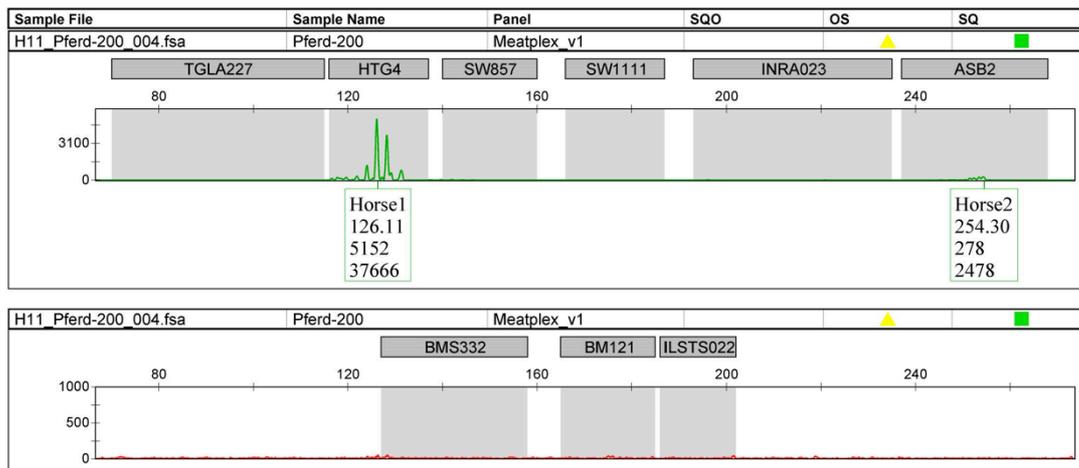


Abbildung 32: Elektropherogramm einer Pferdefleischprobe von einem Marktstand, die nach Amplifikation durch die „Meatplex“-PCR durch einen ABIPrism3130 kapillarelektrophoretisch analysiert wurde. Die Herkunft ist durch Peaks in den Markersystemen HRS-1 und HRS-2 bestätigt.

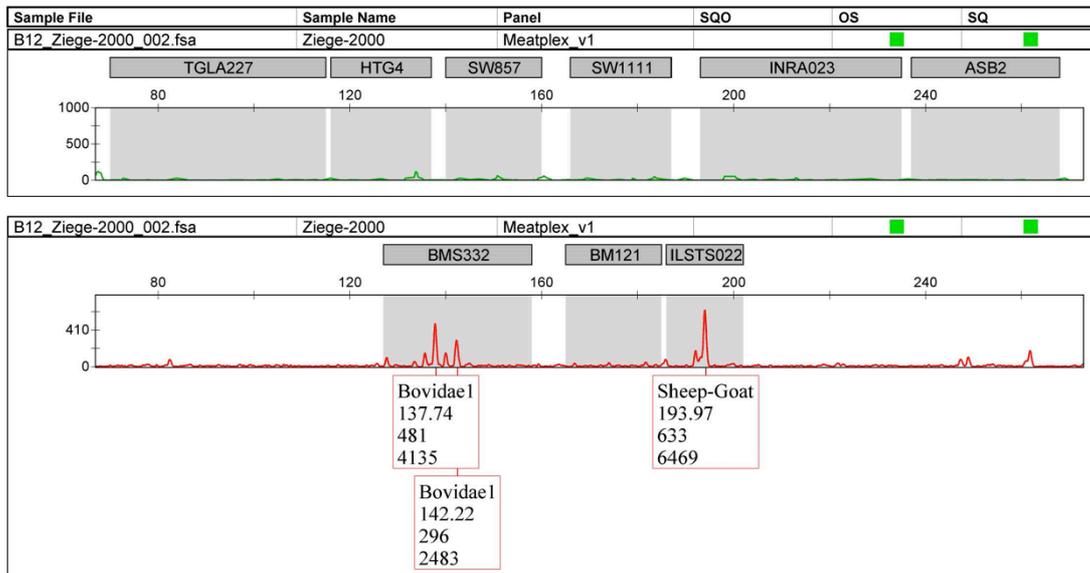


Abbildung 33: Elektropherogramm eines Ziegenrippchens eines Ziegenzüchters. Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130 nach selektiver Amplifikation mittels entwickelter Multiplex-PCR.

Die Ausschläge in den Systemen BOV-1 und GoasHe belegen die Genese von der Ziege. Durch die Kombination der ausschlagenden Systeme wäre auch die Herkunft vom Lamm denkbar.

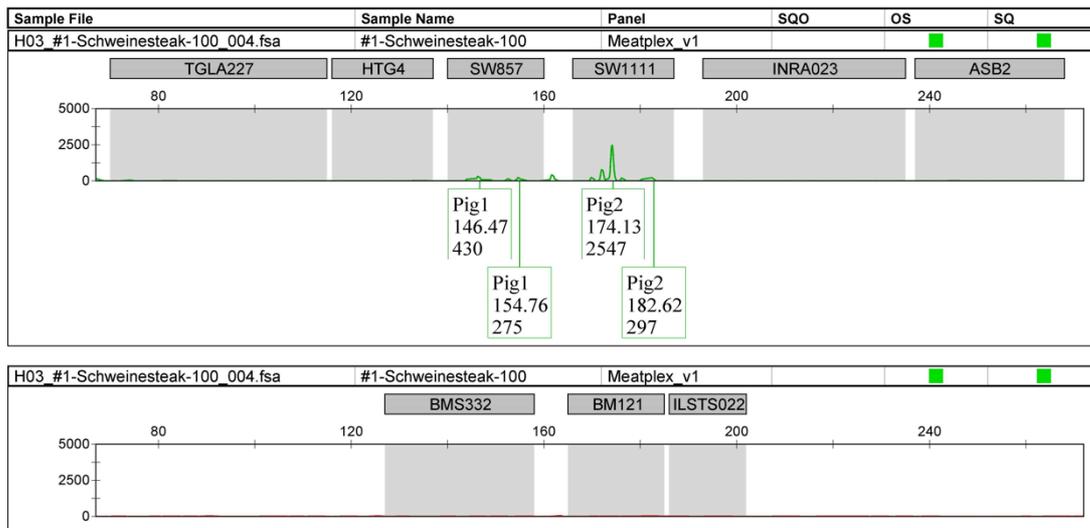


Abbildung 34: Elektropherogramm eines Minutensteaks nach kapillarelektropherographische Auftrennung durch einen ABIPrism3130 und „Meatplex“-PCR-gesteuerter Amplifikation der DNA.

Es beweist den Schweinegehalt der Probe und zeigt einen heterozygoten Merkmalsträger für die Systeme PIG-1 und -2.

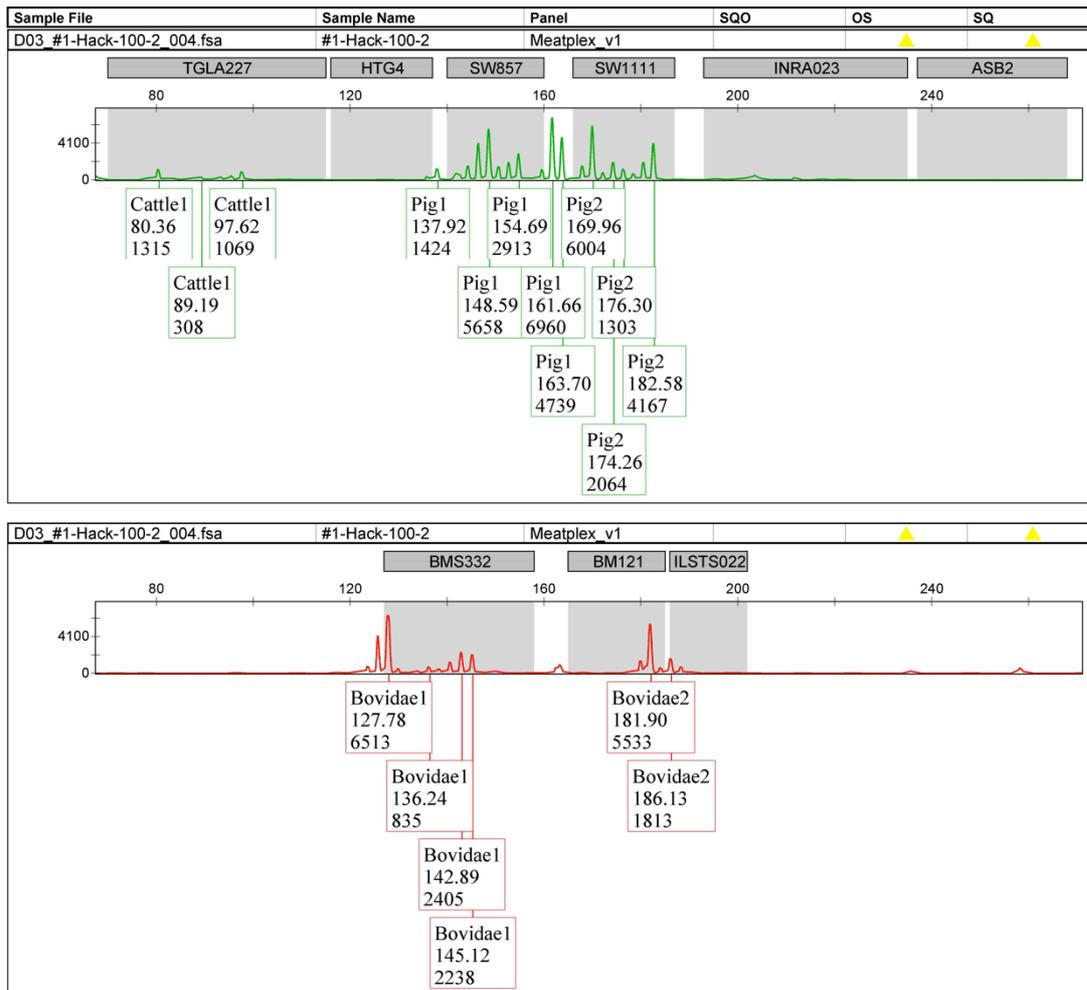


Abbildung 35: Elektropherogramm einer mittels entwickelter Multiplex-PCR vervielfältigten DNA-Probe gemischten Hackfleisches. Die kapillarelektrophoretische Untersuchung erfolgte durch ein ABIPrism3130.

Bei der getesteten Probe handelt es sich um Fleisch von Rindern und Schweinen, welches der Allelzahl zufolge mehreren Individuen entstammt.

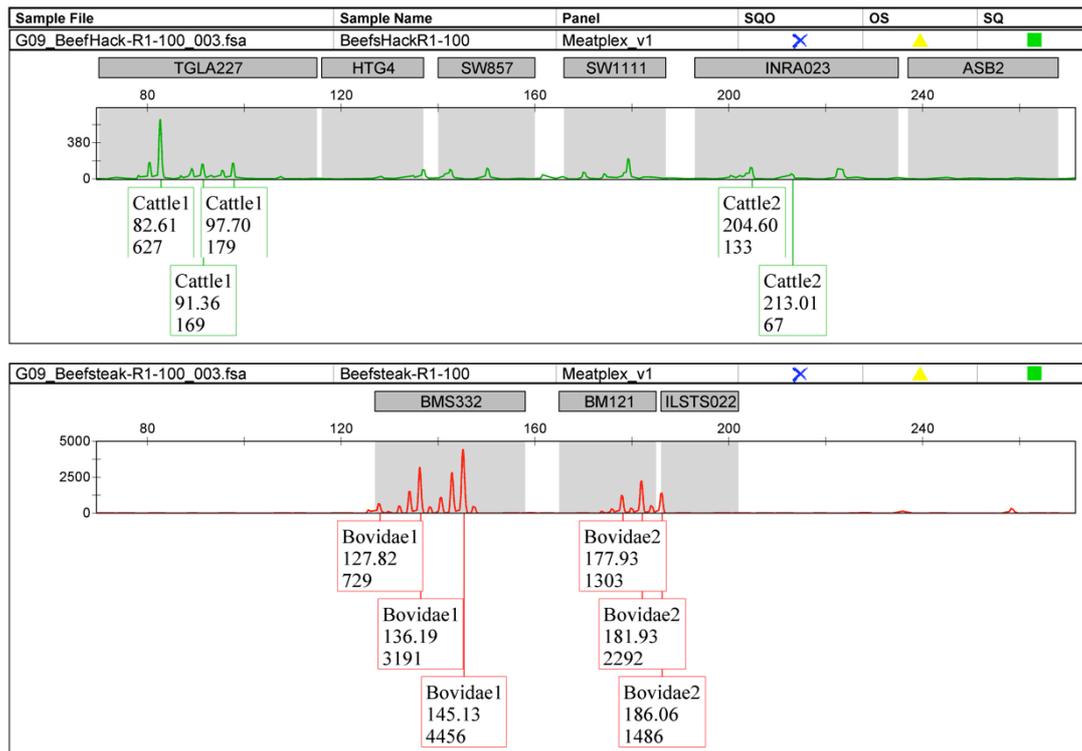


Abbildung 36: Elektropherogramm einer Beefhackprobe nach Kapillarelektrophorese mit einem ABIPrism3130. Selektiv vervielfältigt wurden die DNA-Sequenzen durch die entwickelte „Meatplex“-PCR.

Sie beinhaltet ausschließlich Rindfleisch mehrerer Individuen.

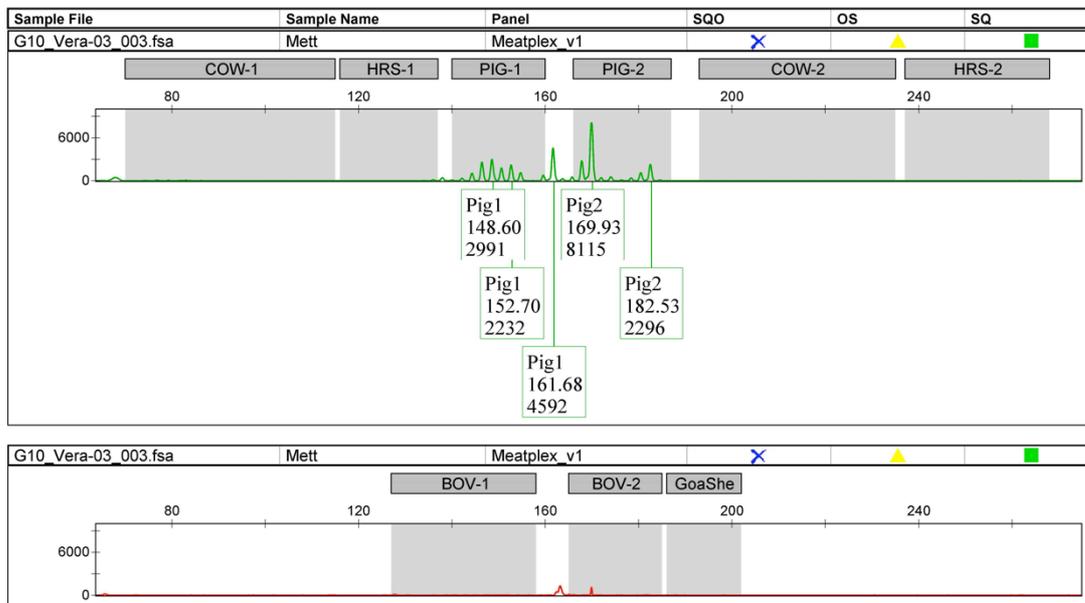


Abbildung 37: Ergebnisse der elektropherographischen Analyse einer Mettprobe von einer Frischfleischtheke durch einen ABIPrism3130 nach selektiver DNA-Amplifikation durch die Multiplex-PCR.

Die Ausschläge in den Systemen PIG-1 und PIG-2 belegen die Herkunft vom Schwein.

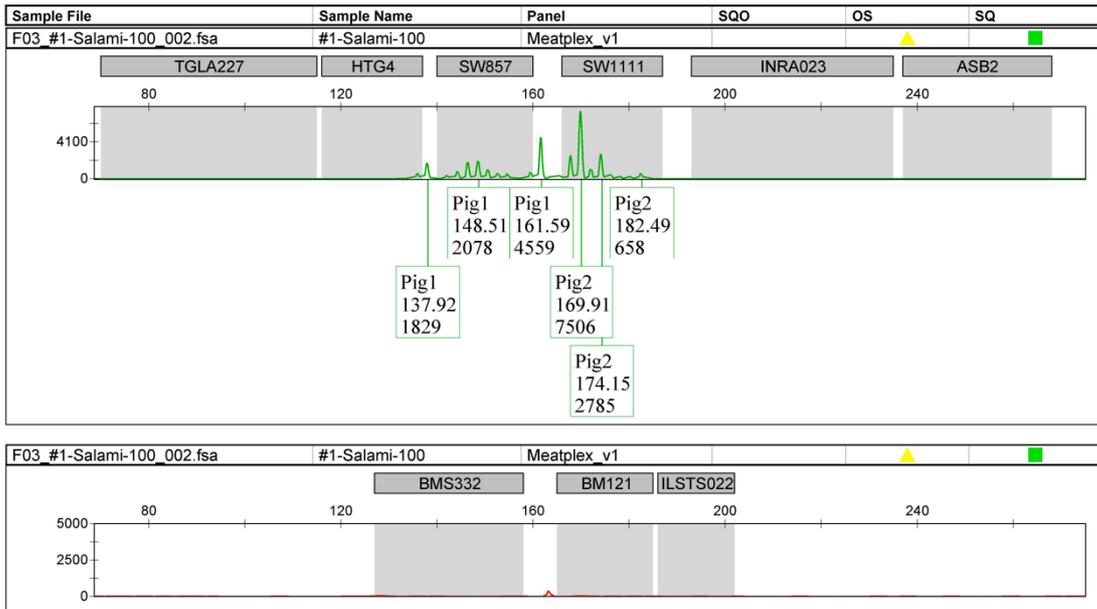


Abbildung 38: Elektropherographische Darstellung einer Schweinesalamiprobe nach Analyse durch einen ABIPrism3130 und multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation.

Die Ausschläge bestätigen die Deklaration des Herstellers. Erbmaterial mehrerer Individuen ist in der Salamiprobe identifizierbar.

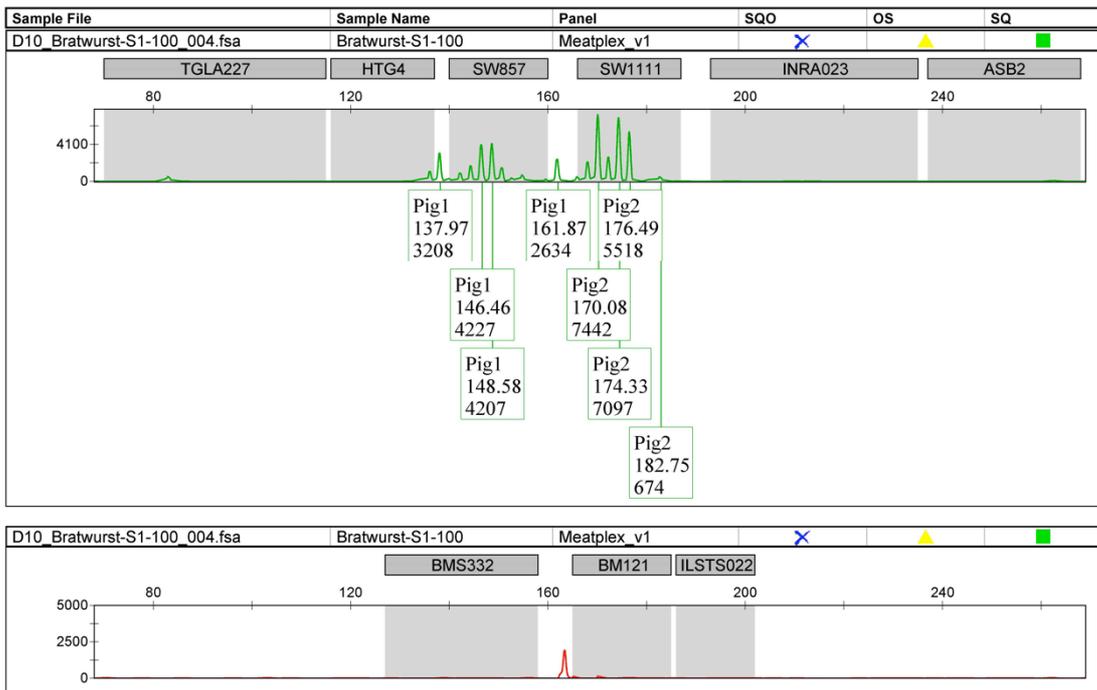


Abbildung 39: Elektropherogramm einer Bratwurst nach Analyse durch einen ABIPrism3130 und selektiver Vervielfältigung der DNA-Sequenzen durch die entwickelte Multiple-PCR.

Die Untersuchung durch die „Meatplex“-PCR bestätigt das Bestehen der Wurst aus Schweinefleisch. Es handelt sich um Fleisch, welches von unterschiedlichen Individuen abstammt, worauf die Allelzahl hinweist.



Abbildung 40: Kapillarelektrophoretische Auswertung einer Leberwurstprobe durch einen ABIPrism3130 nach Amplifikation mittels Multiplex-PCR.

Sie entstammt, wie die Beschreibung vermuten lässt, aus Rinder- und Schweinegewebe. Eine sichere Verifizierung ist wegen Ausbleiben der rinderspezifischen Signale in den STR-Systemen COW-1 und COW-2 nicht möglich.

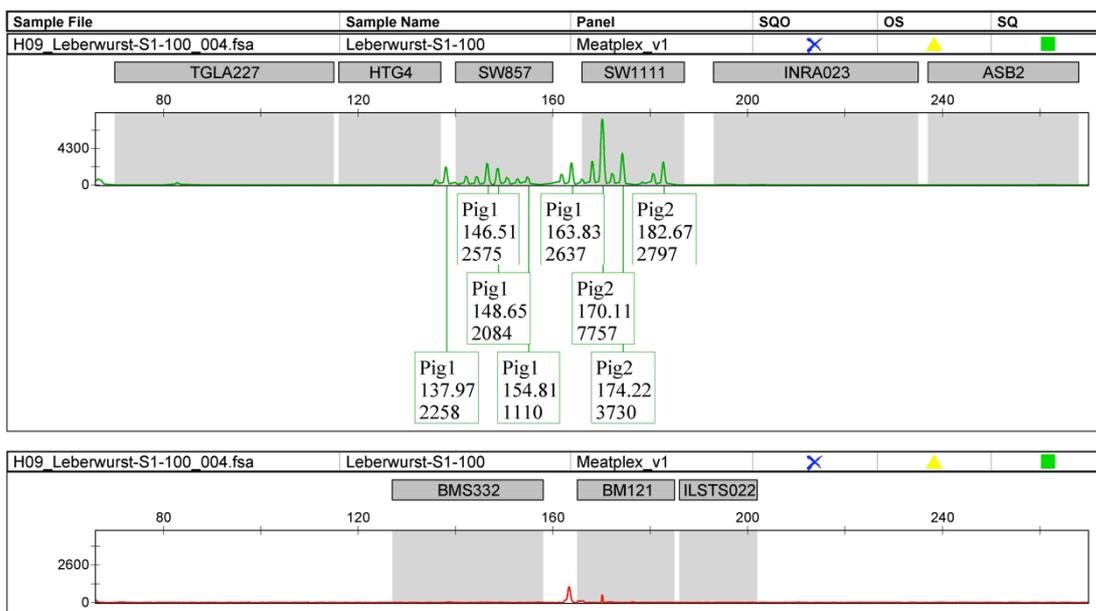


Abbildung 41: Elektropherogramm als Ergebnisse der Analyse einer Leberwurstprobe vom Schwein nach Amplifikation mittels „Meatplex“-PCR und anschließender kapillarelektrophoretischen Auftrennung durch einen ABIPrism3130.

Sie bestätigen die Deklaration und verdeutlicht durch die hohe Anzahl der Allele eines Systems die Herkunft von mehreren Individuen.

D.3.2 Untersuchung von Fleischproben aus Fertiggerichten

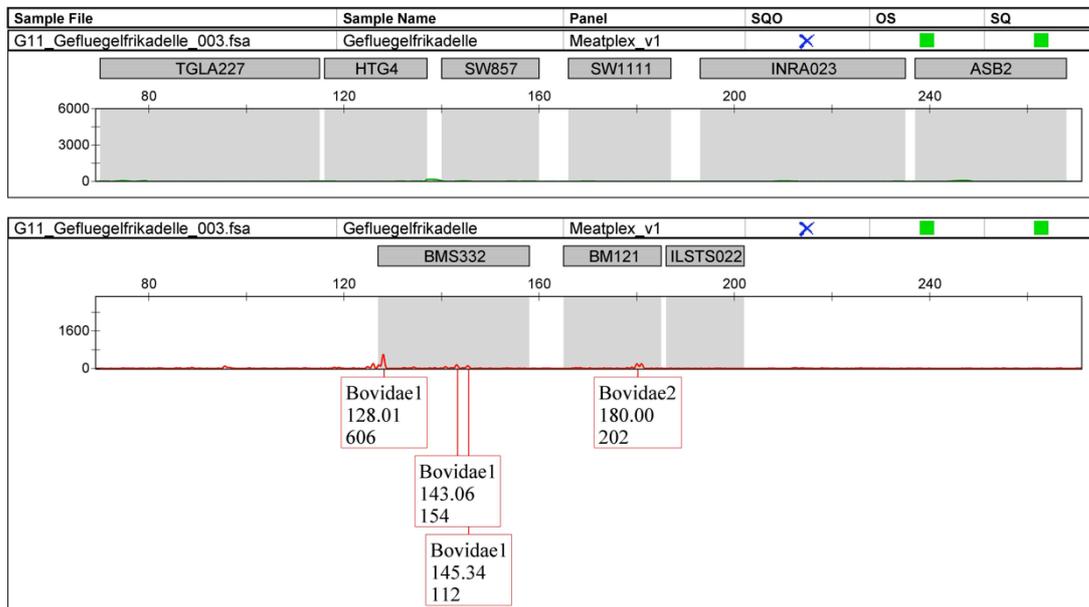


Abbildung 42: Elektropherogramm der Testung einer Geflügelfrikadelle durch einen ABIPrism3130 nach Amplifikation mittels Multiplex-PCR.

Die Systeme BOV-1 und BOV-2 schlagen aus, was auf den Gehalt von Rindergewebe hinweist. Da in keinen der weiteren Systeme ein Peak erscheint, kann jedoch der Inhalt tierischen Materials, der mittels entwickelten Multiplex-PCR nachzuweisenden Spezies, nicht mit Sicherheit bewiesen werden.

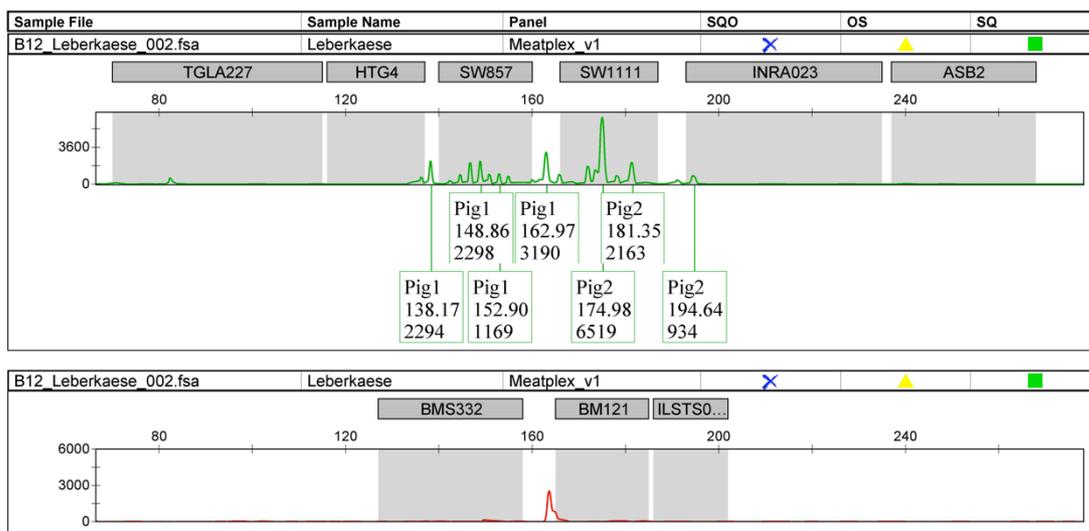


Abbildung 43: Elektropherogramm der Testung einer Geflügelfrikadelle mittels Multiplex-PCR und anschließender kapillarelektrophoretischen Auswertung durch einen ABIPrism3130.

Die Systeme PIG-1 und PIG-2 schlagen aus, wodurch das Beinhalt von Schweinefleisch, entsprechend der Deklaration auf der Rückseite der Produktverpackung, nachgewiesen ist.

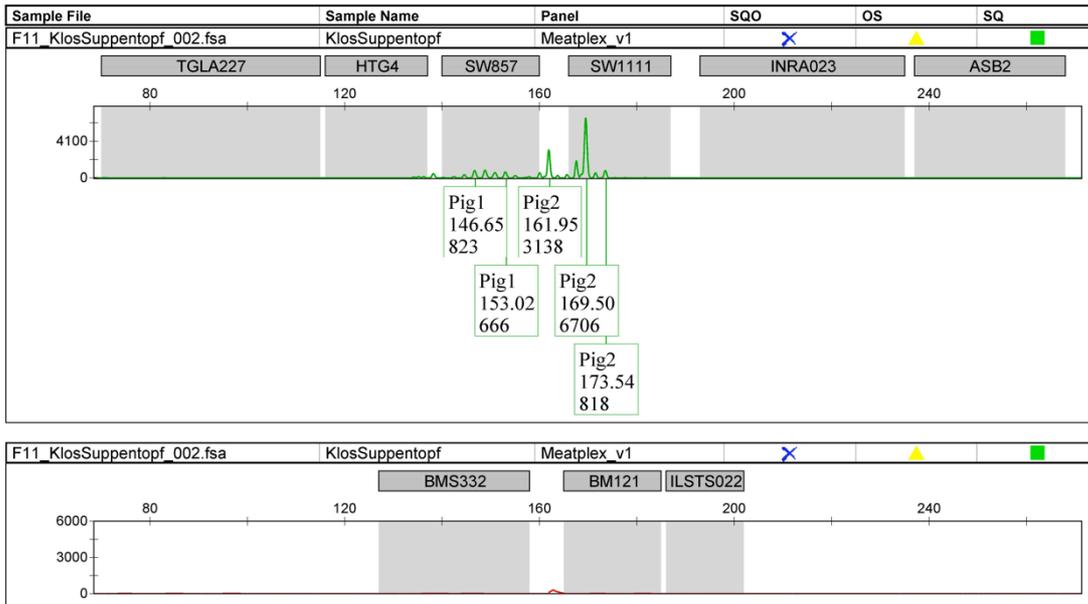


Abbildung 44: Elektropherogramm eines Kloßes aus einem Suppentopf aus der Dose durch kapillarelektrophoretische Analyse mittels einem ABIPrism3130 nach multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation. Wie deklariert besteht der Kloß aus Schweinefleisch, was die Ausschläge in den schweinespezifischen Systemen PIG-1 und PIG-2 bestätigen. Da mehr als zwei Allele in einem System vorhanden sind, muss es sich um eine Mischung mehrerer Individuen handeln.

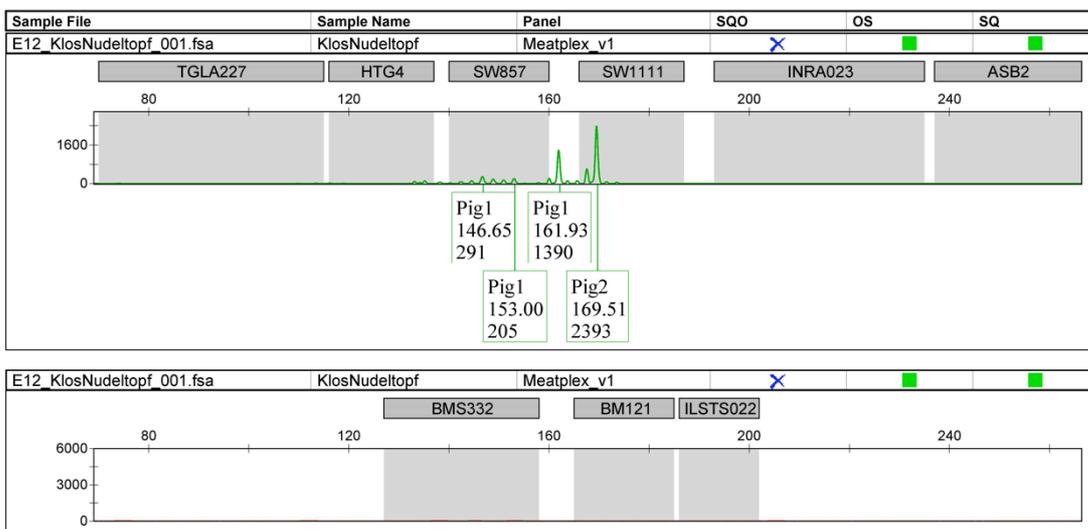


Abbildung 45: Elektropherogramm eines Koßes aus einem Nudeltopf aus der Dose. Kapillarelektrophoretische Auswertung durch einen ABIPrism3130 nach Vervielfältigung gezielter DNA-Sequenzen mittels Multiplex-PCR.

Wie durch die Deklaration auf der Rückseite der Dose anzunehmen war, konnte Schweinefleisch nachgewiesen werden.

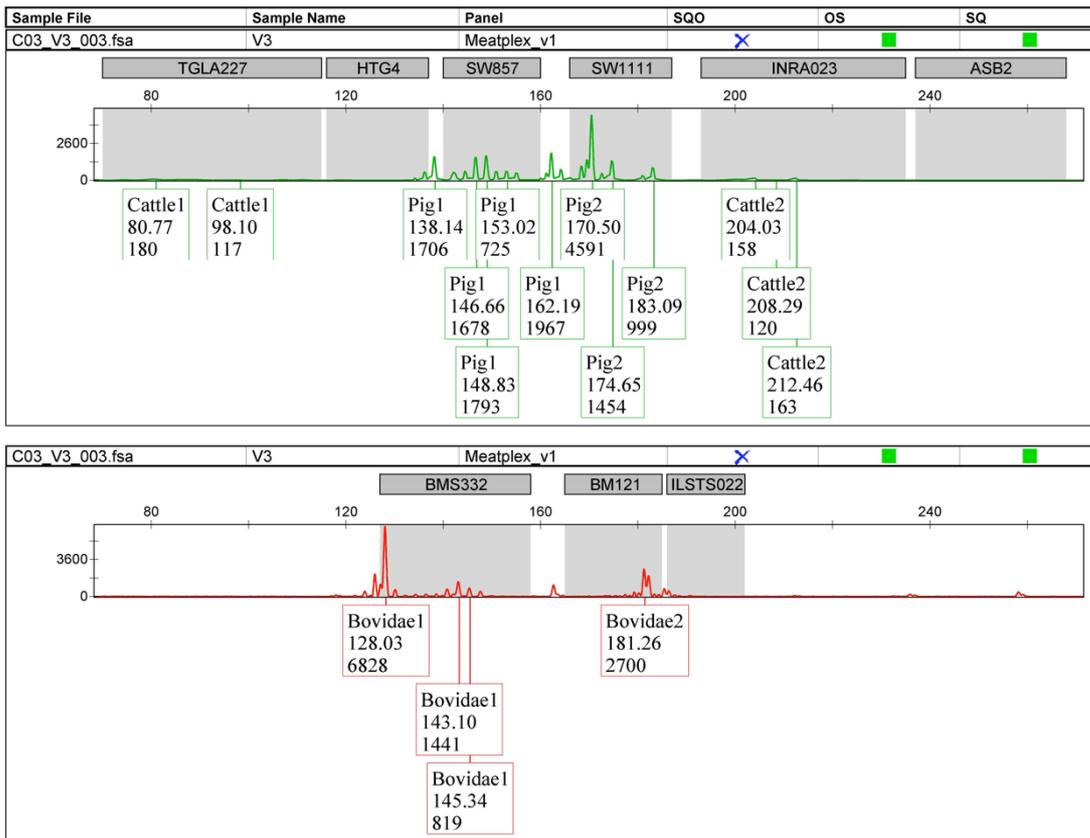


Abbildung 46: Elektropherogramm eines Fertigproduktes von Königsberger Klößen nach Amplifikation mittels „Meatplex“-PCR und anschließender Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130. Diese enthalten, gemäß der Herstellerbeschreibung, Fleisch von Schwein und Rind, welches der Testung zu Folge von mehreren Individuen stammt.

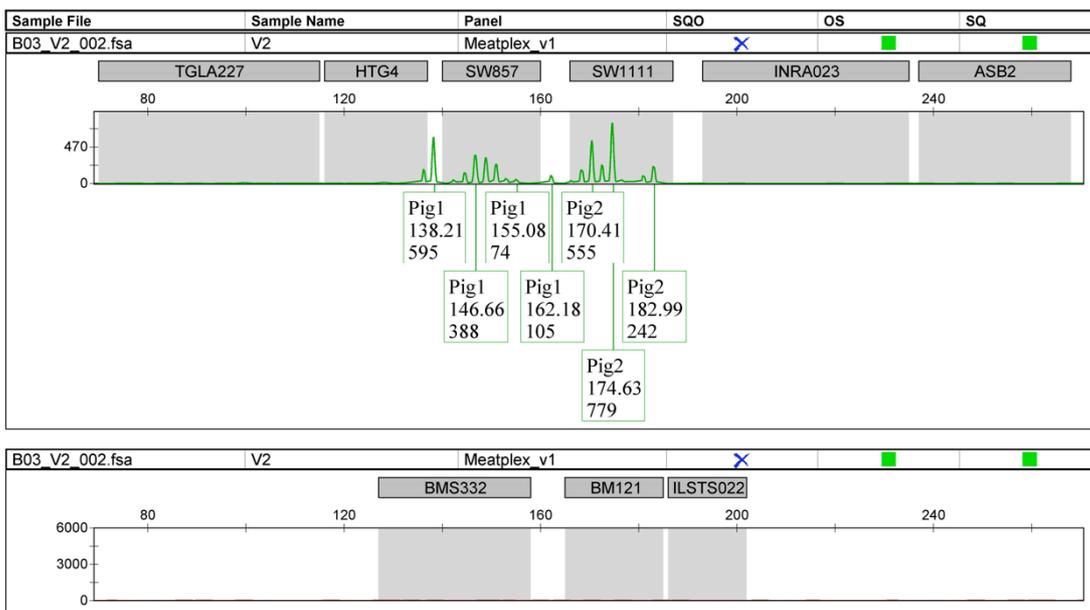


Abbildung 47: Kapillarelektrophoretische Auswertung einer tiefgefrorenen Hackfleischprobe einer Fertiglasagne durch einen ABIPrism3130 nach DNA-Vervielfältigung mittels entwickelter Multiplex-PCR. Die Testung bestätigt den Inhalt von Schweinefleisch in der Lasagne.

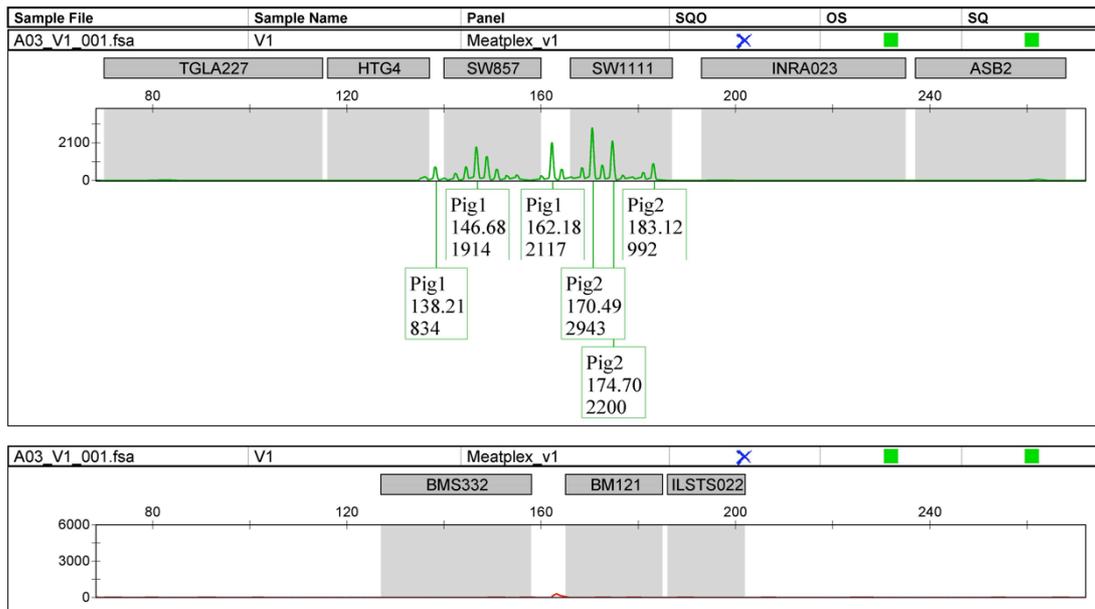


Abbildung 48: Elektropherogramm der Untersuchung einer Wurstprobe aus einem Fleischsalat durch kapillarelektrophoretische Analyse durch einen ABIPrism3130 nach Amplifikation mittels Multiplex-PCR.

Die Testung verifiziert die Herkunft vom Schwein. Es ist von einer Mischung mehrerer Tiere auszugehen.

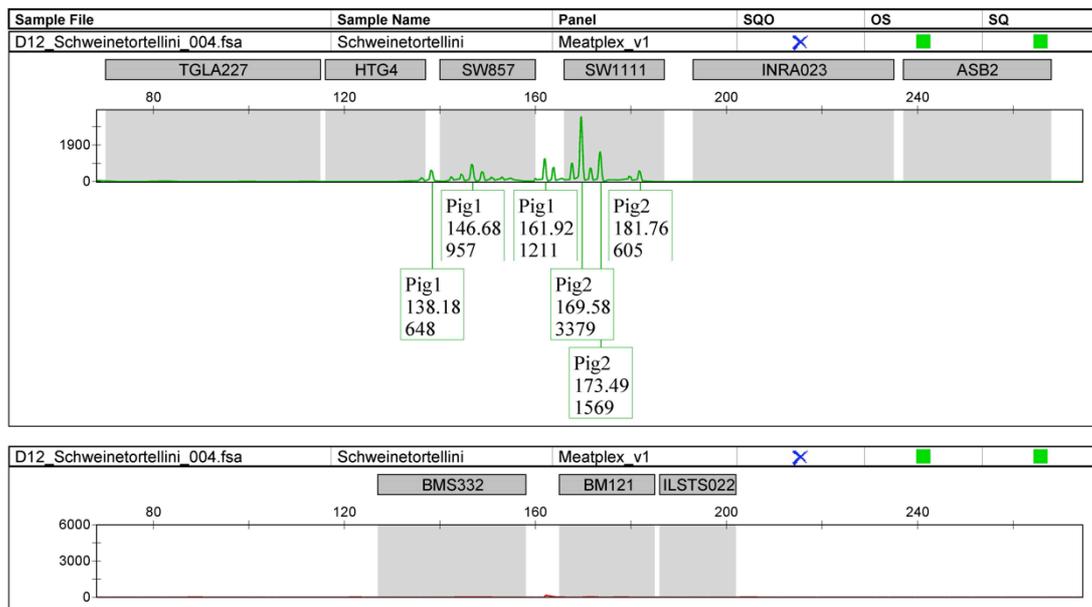


Abbildung 49: Kapillarelektrophoretische Auswertung einer Schweinetortelliniprobe durch einen ABIPrism3130 nach DNA-Vervielfältigung mittels entwickelter Multiplex-PCR.

Die Herkunft des Fleisches vom Schwein konnte durch die Testung bestätigt werden. Aus der Anzahl der Peaks eines Systems ist die Herkunft von mehreren Individuen anzunehmen.

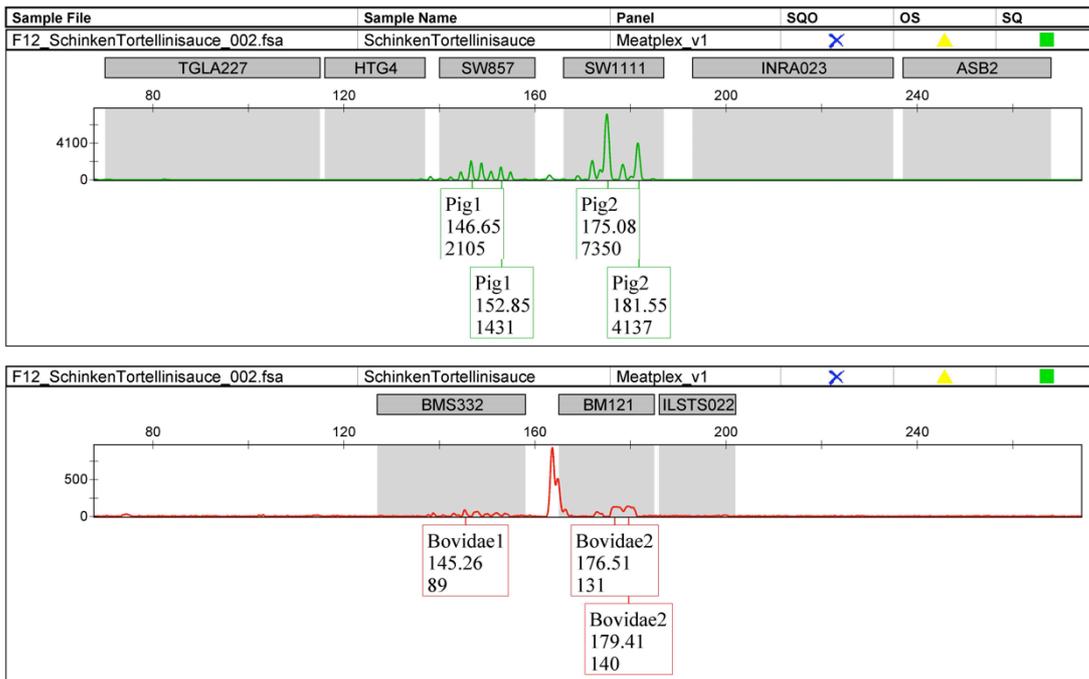


Abbildung 50: Elektropherogramm der mittels multiplexgesteuerten Ampifikation gewonnenen DNA aus einem Schinkenstück einer Tortellinisauce eines Fertigproduktes. Kapillarelektrophorese durch einen ABIPrism3130.

Nach Herstellerangaben ist Schweinefleisch enthalten, was die Ausschläge in den Systemen PIG-1 und PIG-2 belegen. Darüber hinaus sind Peaks in beiden hornträgerspezifischen Systemen zu detektieren. Da keine weiteren Ausschläge in den Systemen COW-1, COW-2 oder GoaShe erkennbar sind, kann das beinhalten weiterer Spezies in dieser Probe nicht bewiesen werden.

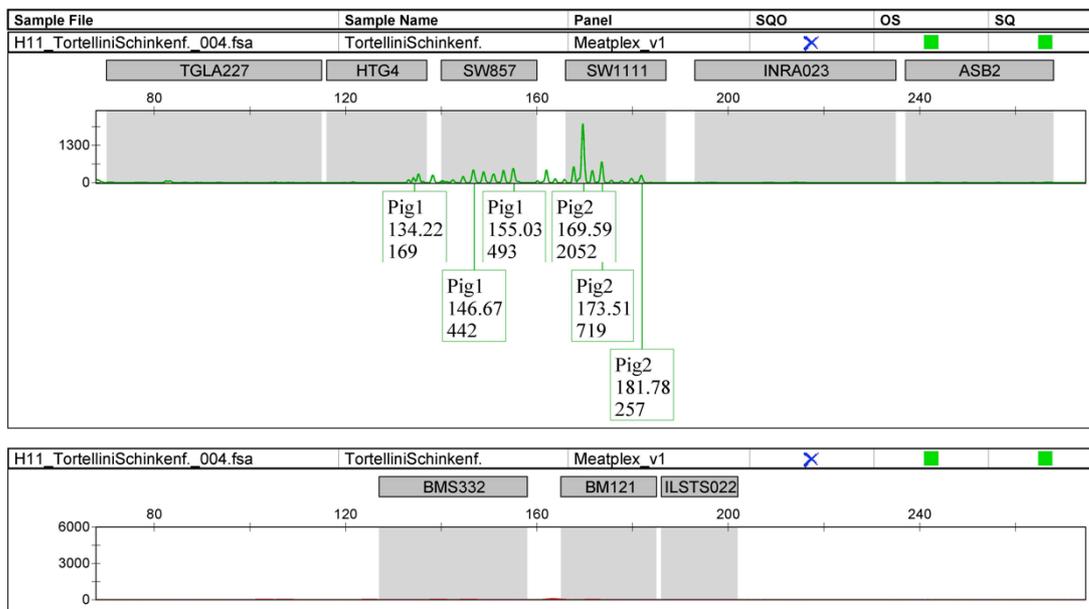


Abbildung 51: Elektropherogramm einer mittels ABIPrism3130 analysierten DNA-Probe aus der Füllung eines Schinkentortellini. Zuvor erfolgte die Amplifikation entsprechender Sequenzen durch die entwickelte Multiplex-PCR.

Diese enthält nach Angaben des Herstellers Schweineschinken. Die Herkunft vom Schwein wurde mittels „Meatplex“-PCR bestätigt.

D.3.3 Mageninhaltuntersuchungen

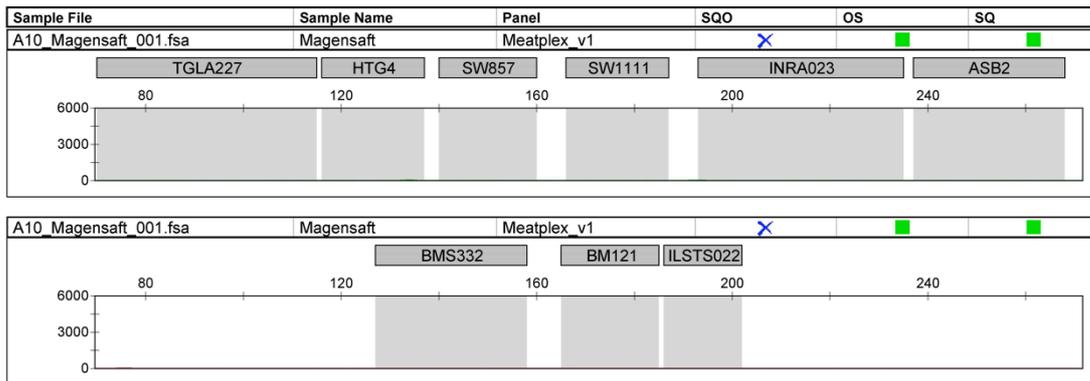


Abbildung 52: Negativkontrolle der Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt. Kapillarelektrophoretische Analyse von Magensaft durch einen ABIPrism3130 nach Durchlaufen der Multiplex-PCR. Hierzu wurde reiner Magensaft verwendet. Das Beinhalt von Fleischresten wurde hiermit ausgeschlossen.

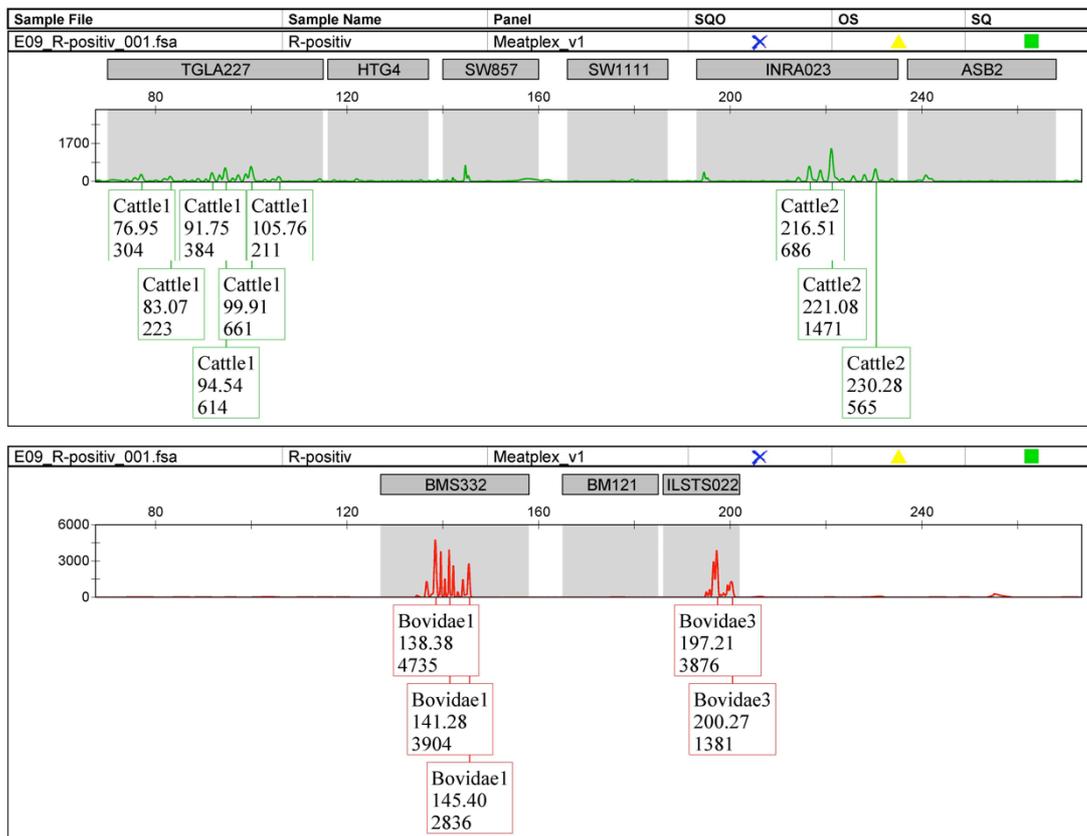


Abbildung 53: Elektropherogramm der Positivkontrolle des Versuches der Simulation von Mageninhalt anhand einer Rinderhackprobe. Nach multiplexgesteuerter Amplifikation wurde die Probe durch einen ABIPrism3130 kapillarelektrophoretisch analysiert.

Als Positivkontrolle wurde Rinderhack verwendet. Es wurden 100 mg Gewebe extrahiert. Anstatt eines Ausschlages im erwarteten BOV-2-System, konnte ein Peak im Fragmentlängenbereich des Primers ILSTS022 (entspricht GoeShe) gefunden werden. Da es aufgrund der weiteren reagierenden Systeme COW-1, COW-2 und BOV-2 als Rinderhack identifiziert wurde, wurde dieser Ausschlag als hornträgerspezifisch gewertet und folglich in BOV-3 umbenannt. Diese Positivkontrolle wurde als Vergleichspunkt für die folgenden, im Magensaft inkubierten Proben verwendet.

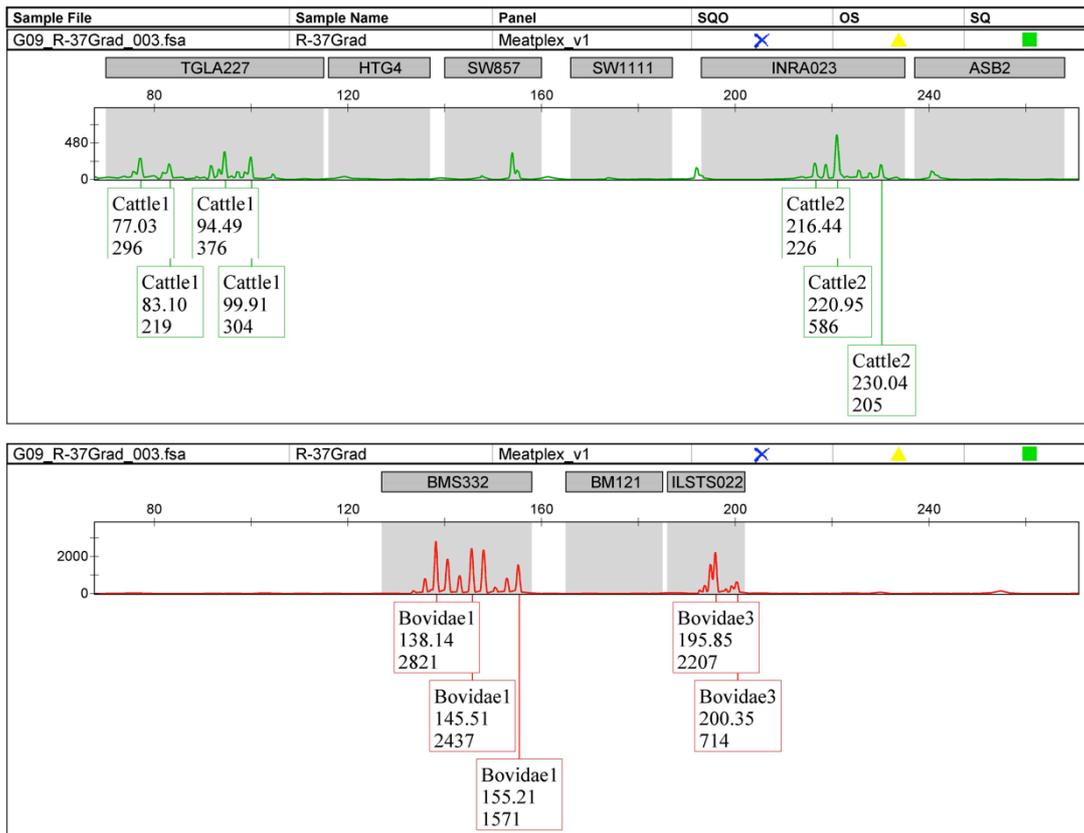


Abbildung 54: Elektropherogramm der kapillarelektropherographischen Analyse durch einen ABIPrism3130 einer Rindergewebsprobe nach 30-minütiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt anhand einer Rinderhackprobe.

Die Extraktion von 100 mg Gewebe erfolgte nach 30 min Inkubation bei 37°C in Magensaft im Thermoschüttler. Die Amplituden der Ausschläge, also ihre RFUs, sind bereits im Vergleich zur Probe ohne Inkubation im Magensaft, gesunken.



Abbildung 55: Elektropherogramm der Analyse mittels eines ABIPrism3130 einer multiplexgesteuert amplifizierten 100 mg Rinderhackprobe nach 45 minütiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.

Extrahiert wurden 100 mg Gewebe. Die RFUs der Peaks sind im Vergleich zur Positivkontrolle leicht verringert, das bedeutet die DNA-Menge ist erniedrigt. Im Vergleich zur Inkubation von 30 Minuten ist kaum einen Unterschied zu verzeichnen.

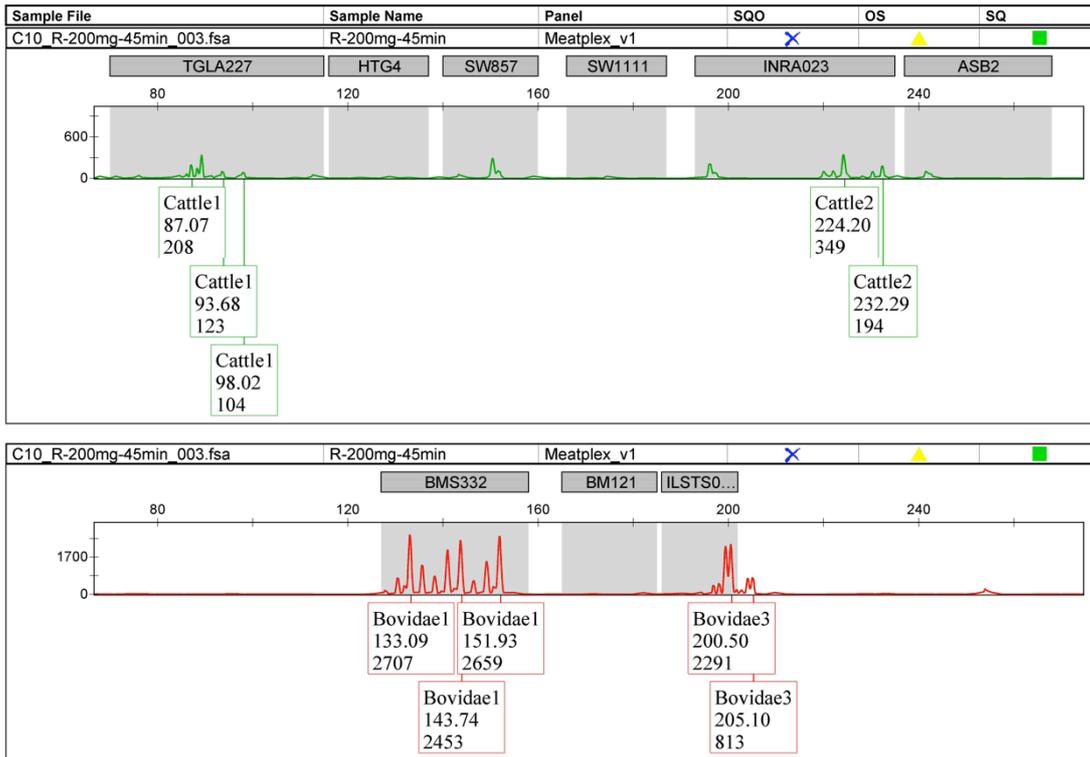


Abbildung 56: Elektropherogramm der Analyse mittels eines ABIPrism3130 einer multiplexgesteuert amplifizierten 200 mg Rinderhackprobe nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Magensaft.

Extrahiert wurden 200 mg Gewebe. Die Peaks sind eindeutig auswertbar.

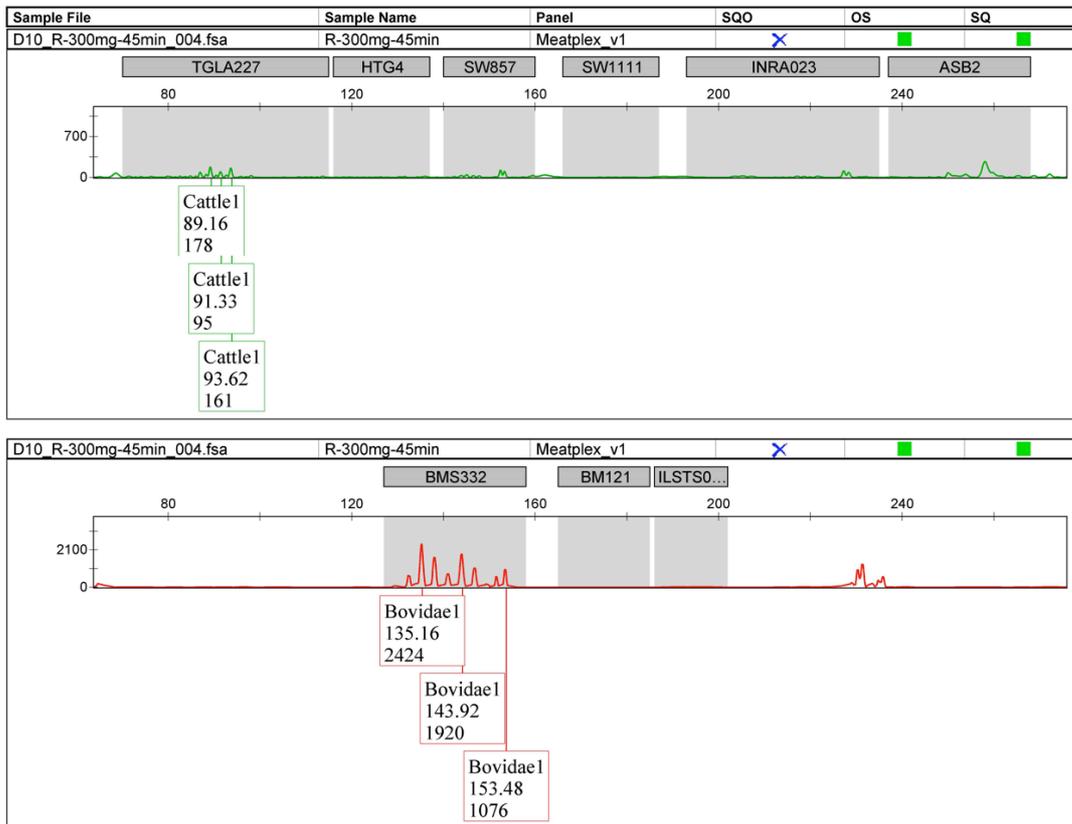


Abbildung 57: Kapillarelektrophoretisches Analyseergebnis eines ABIPrism3130 nach DNA-Amplifikation einer 300 mg Rinderhackprobe mittels Multiplex-PCR. Die Inkubationszeit im Magensaft vor DNA-Extraktion betrug 45 Minuten. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.
Es wurde 300 mg Gewebe extrahiert. Alle Peaks sind eindeutig auswertbar.

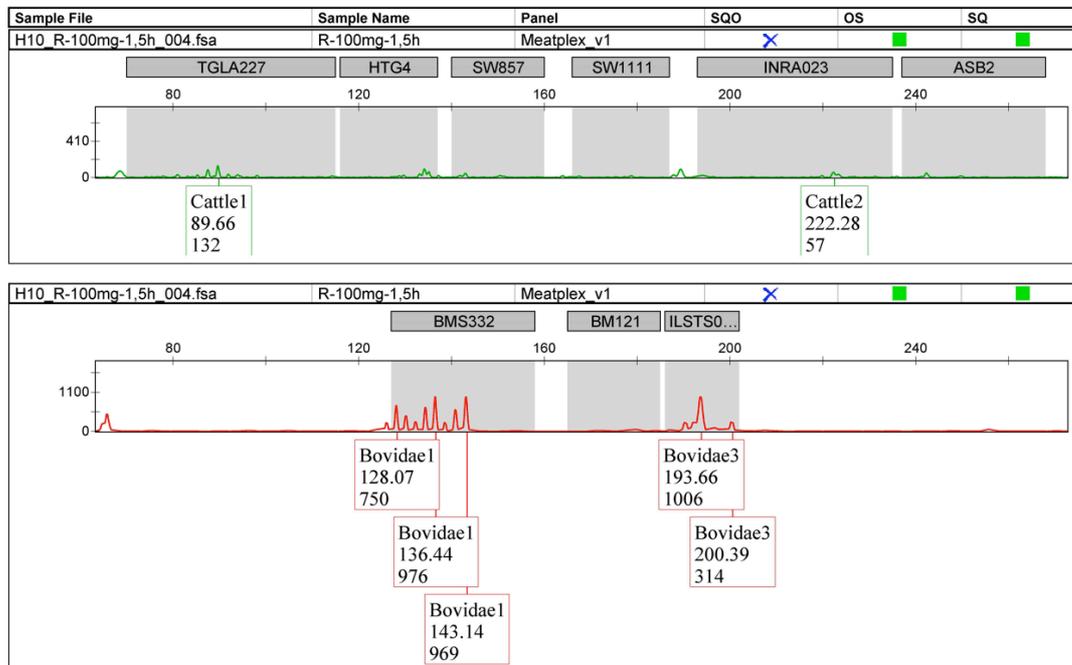


Abbildung 58: Elektropherographische Darstellung der Analyseergebnisse durch einen ABIPrism3130 einer 100 mg Rinderhackprobe, die vor DNA-Extraktion eineinhalb Stunden im Magensaft inkubiert wurde. Die Amplifikation erfolgte durch die „Meatplex“-PCR. Versuchsreihe der Mageninhalt.

Es wurden 100 mg Gewebe extrahiert. Die RFUs, welche proportional zur DNA-Menge sind, sind deutlich niedriger als die der Positivkontrolle sowie der Proben nach 30 und 45 minütiger Inkubationszeit.

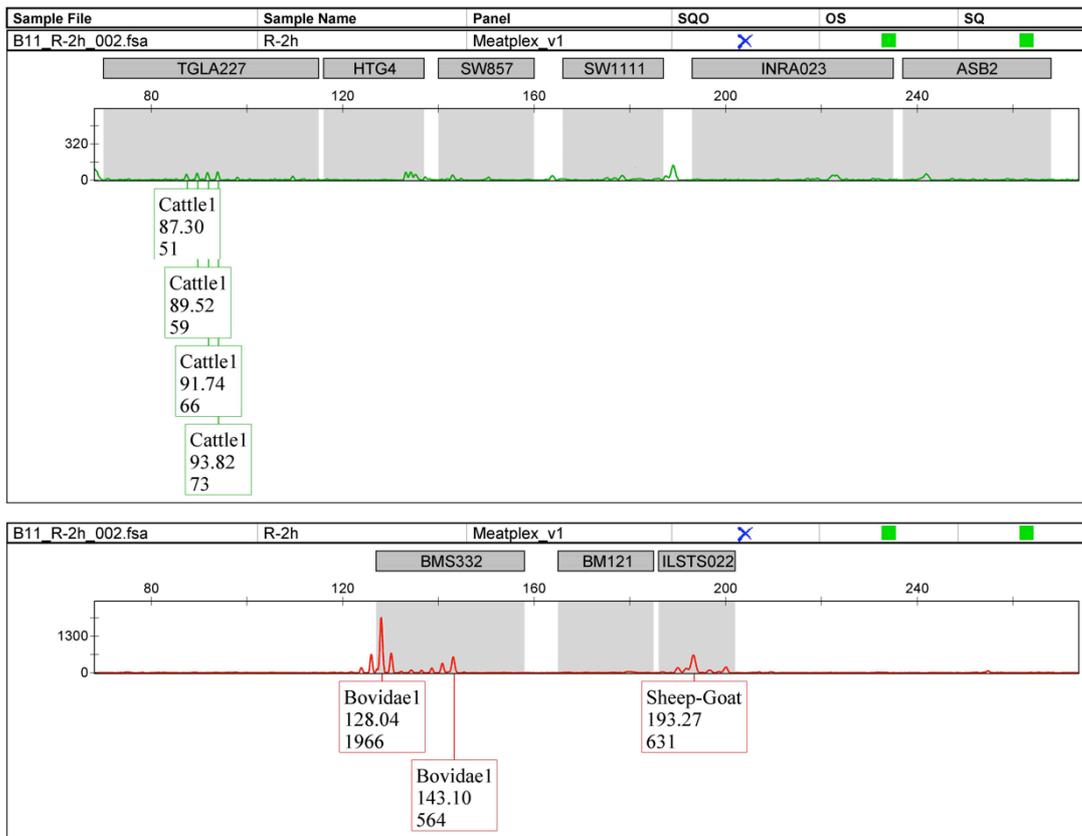


Abbildung 59: Elektropherogramm einer 100 mg Rinderhackprobe durch einen ABIPrism3130 nach multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation. Die DNA-Extraktion erfolgte nach zweistündiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Magensaft.

Es wird deutlich, dass die Ausschläge im System COW-2 versiegen, während die Peaks der Systeme COW-1 und BOV-3 weiter sinken.

Tabelle 22: Darstellung des Einflusses des simulierten Magenmilieus auf den DNA-Gehalt der Extraktionsprodukte der Rinderhackproben.

Diese werden unterschiedlich lange bei 37°C mit Magensaft versetzt im Thermoschüttler inkubiert. Je niedriger die RFUs, desto geringer der DNA-Gehalt der Probe. Aufgelistet sind die höchsten RFUs der jeweiligen Systeme. Dabei fällt auf, dass ab einer Inkubationszeit von zwei Stunden der Marker COW-2 nicht mehr arbeiten kann. Da der DNA-Gehalt unter die Nachweisgrenze sinkt. Dieser Wert deckt sich mit den Ergebnissen der Versuchsreihe mit Mischhackproben. Dabei funktioniert das System COW-1 ebenfalls bei einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden, welches bei der Versuchsdurchführung mit gemischtem Hackfleisch bereits bei einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden seine Funktion nicht mehr erfüllen konnte.

Eingesetzte Probenmenge (mg)	Inkubationszeit (h)	COW-1 (RFU)	COW-2 (RFU)	BOV-1 (RFU)	BOV-2 / 3 (RFU)
Positivkontrolle	0	614	1471	4735	3876
100	0,5	376	586	2821	2207
100	0,75	421	350	3284	2931

100	1,5	132	57	976	1006
100	2	66	-	1966	631



Abbildung 60: Kapillarelektrophoretische Ergebnisse eines ABIPrism3130 einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind als Positivkontrolle der Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt. Die Amplifikation selektiver DNA-Sequenzen erfolgte mittels entwickelter Multiplex-PCR. Dabei erscheint, wie in der Rinderhackprobe derselben Versuchsreihe, ein Ausschlag im Sequenzlängenbereich des Primers ILSTS022 anstatt im erwarteten BOV-2-System. Er wird hier als BOV-3 bezeichnet.

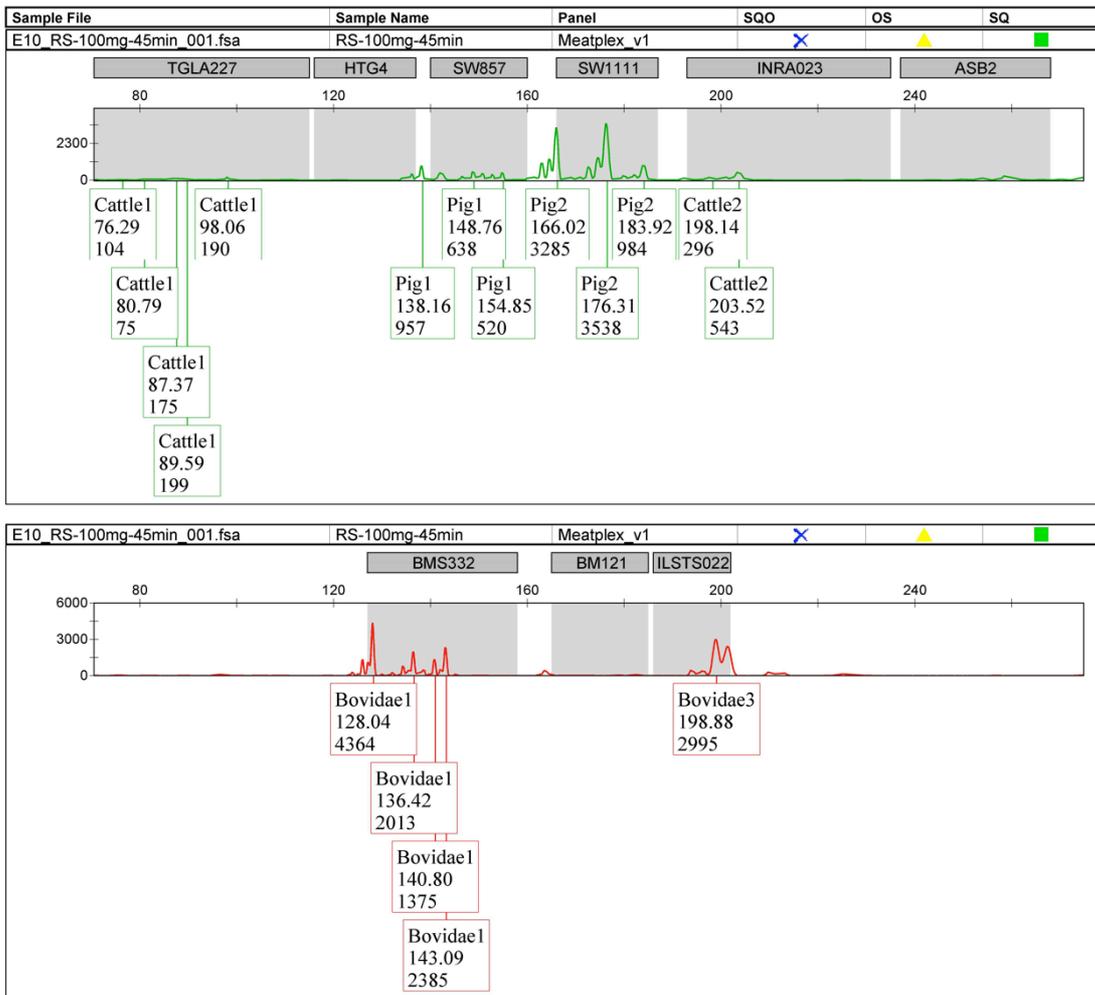


Abbildung 61: Ergebnis der Kapillarelektrophorese eines ABIPrism3130 der DNA einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit von 45 Minuten im Magensaft. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte durch die „Meatplex“-PCR. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.

Die RFUs der ausschlagenden Systeme ist geringer als die Positivkontrolle.



Abbildung 62: Elektropherogramm nach Auswertung durch einen ABIPrism3130 der DNA einer 200 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit im Magensaft von 45 Minuten und multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt. Die Peaks der Systeme COW-1, COW-2, BOV-1 und BOV-3 sind auswertbar.

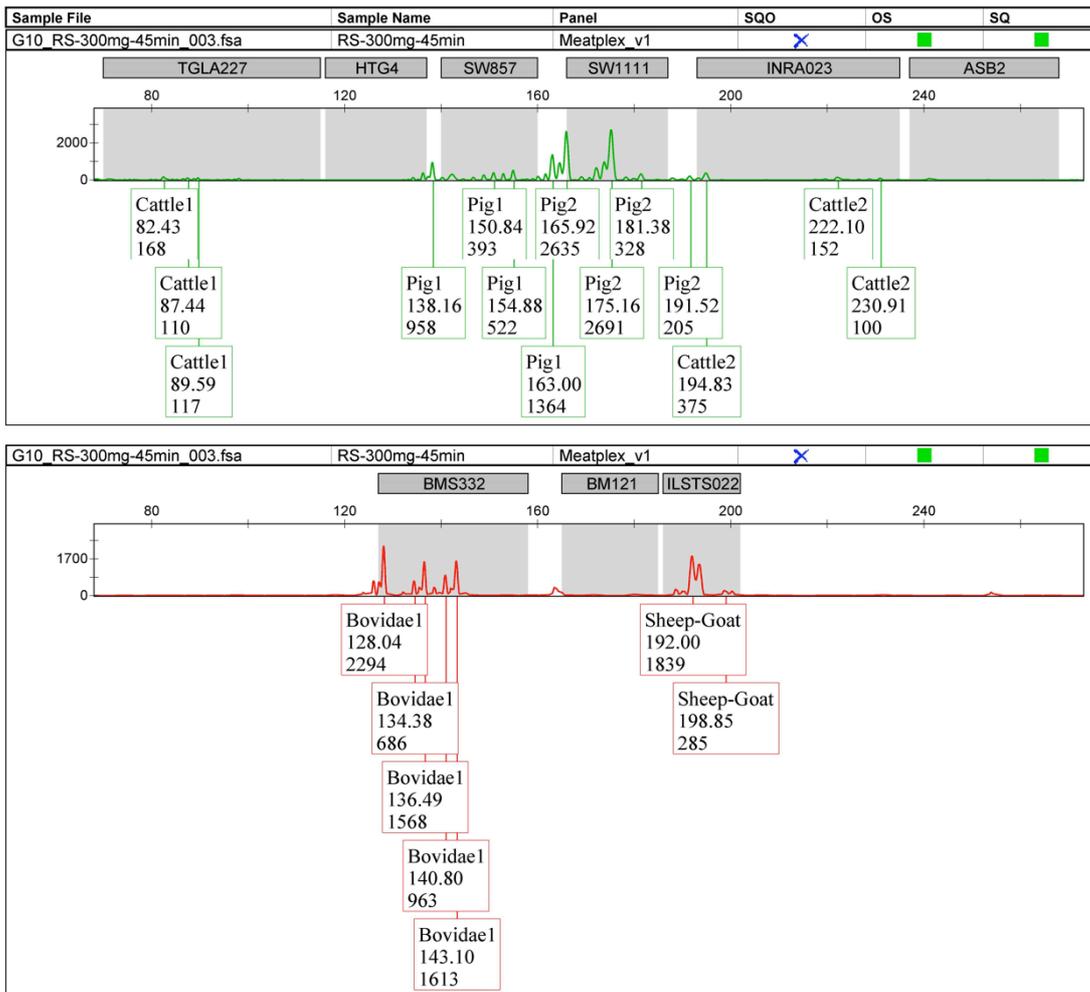


Abbildung 63: Kapillarelektrophoretische Analyseergebnisse eines ABIPrism3130 der DNA von einer 300 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit von 45 Minuten im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.
 Die Peaks der Systeme COW-1, COW-2, BOV-1 und BOV-3 sind auswertbar.

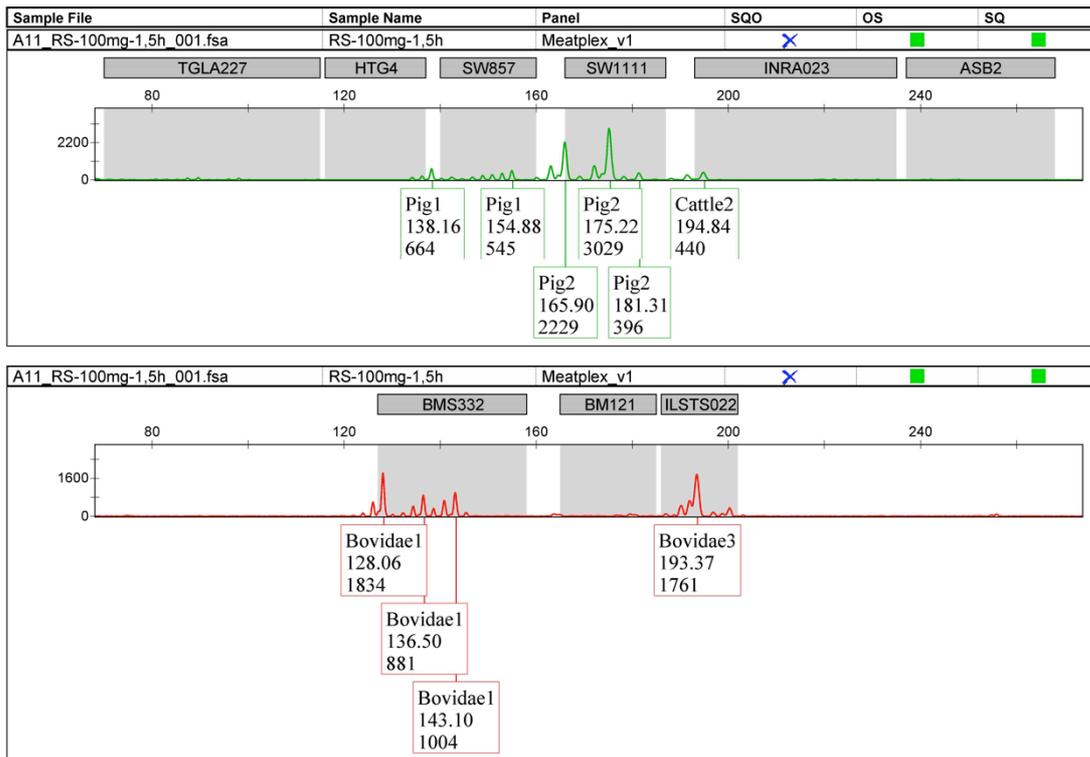


Abbildung 64: Elektropherographische Darstellung des Extraktionsergebnisses einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind mit einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden im Magensaft. Die kapillarelektrophoretische Analyse erfolgte nach selektiver, multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation durch einen ABIPrism3130. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.

Der Ausschlag im System COW-1 verschwindet. Somit ist die Grenzverweildauer von Fleisch im Magen gesetzt, um das Fleisch noch ohne Probleme mit der entwickelten „Meatplex“-PCR identifizieren zu können.

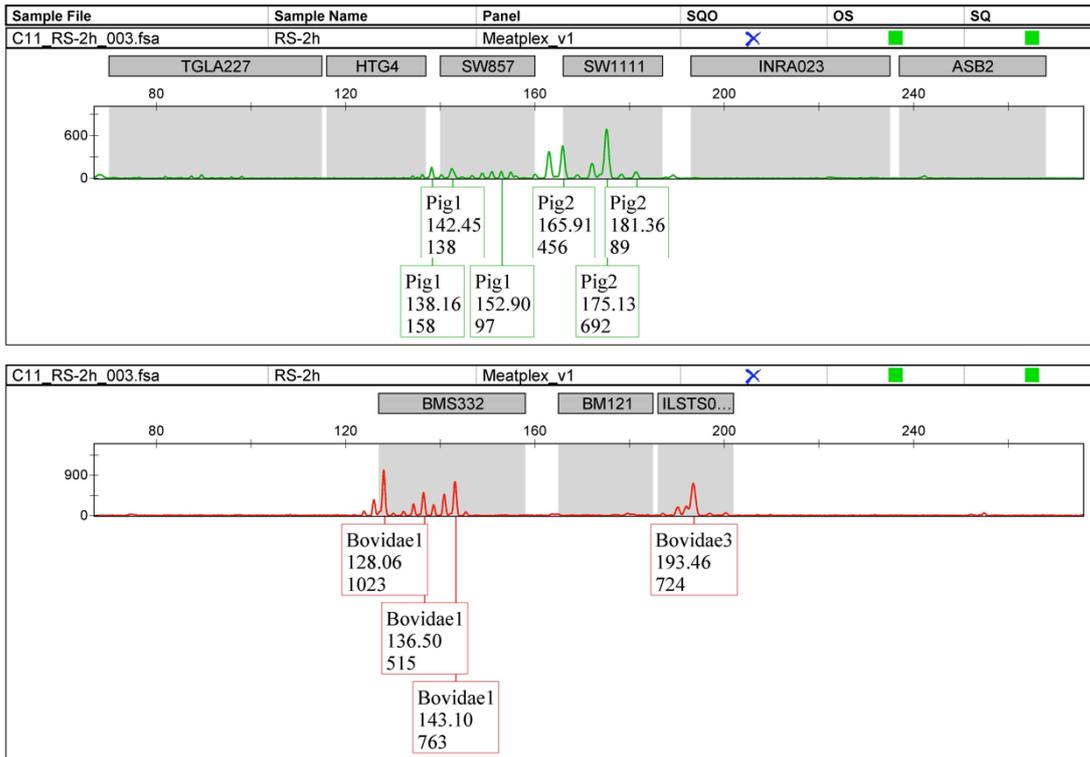


Abbildung 65: Elektropherogramm eines ABIPrism3130 nach multiplexgesteuerter DNA-Amplifikation einer 100 mg gemischten Hackfleischprobe vom Schwein und Rind nach zweistündiger Inkubation im Magensaft. Versuchsreihe der Simulation von Mageninhalt.

Neben sinkenden Amplituden der ausschlagenden Systeme und dem persistierenden Verlust des Peaks im COW-1-System, fällt der Verlust der Reaktion des Markers COW-2 auf.

Anhang E: Geräteverzeichnis**Tabelle 23: Geräteverzeichnis**

Gerät	Typ	Hersteller
DNA-Extraktionsgerät	KingFisher®Duo	Thermo Fischer Scientific GmbH
Erlenmeyerkolben 500 ml	Simax-Glas	Simax®, Bohemia Cristal GmbH
Feinwaage	Feinwaage SAC 62	Scaltec Instruments
	Waage KB 360 KM	Kern & Sohn GmbH
Gelelektrophoresekammer	Horizon™ 11..14	Gibco®, Life Technologies
Genetic Analyzer	ABI Prism™3130	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Kühlschränke		Liebherr Hausgeräte GmbH
		Robert Bosch GmbH
Messzylinder		Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Mikrowelle	Microwave 800	Sverin Elektrogeräte GmbH
Minizentrifuge	Sprout™	G.Kisker GbR, Produkte für Biotechnologie
Petrischalen 100 x 20 mm		Greiner Bio-One GmbH
Pinzette	0,1-2,5 µl	Carl Roth GmbH Co. KG
	0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 200-1000 µl "Reference"	Eppendorf AG
Reaktionsgefäßständer	Rotilabo® Reaktionsgefäßständer	Carl Roth GmbH Co. KG
	Rotilabo® 2 in 1 Reaktionsgefäßständer	
Skalpell	Feather Disposable Scalpel	Pfm medical AG
Sterilbank	DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M	G. Kisker GbR, Produkte für Biotechnologie
Stromversorgungsgerät	Electrophoresis Power Supply ST304	Gibco® BRL, Life Technologies
Thermoschüttler	Thermoschüttler 5436	Eppendorf AG
	Thermomixer comfort	
Tiefkühlschrank	Tiefkühlschrank I und II	Liebherr Hausgeräte GmbH
Ultraschallbad	Elmasonic one Elma®	Hans Schmidbauer GmbH & Co.

Gerät	Typ	Hersteller
		KG
UV-Kammer	Gel-Doc EQ	Bio-Rad Laboratories GmbH
Vortexer	Vortexer Genie 2™	Scientific Industries Inc.
	Mixomat	Erich Eydam KG
	REAX2000	Heidolph Instruments GmbH Co. KG
Zentrifugen	Centrifuge 5424	Eppendorf AG
	Centrifuge 5415C	
	Micro Centrifuge IR 220VAC	Carl Roth GmbH & Co. KG
	Heraeus Multifuge X1R Centrifuge	Thermo Fischer Scientific GmbH
	Laboratory Centrifuge LMC-3000	G. Kisker GbR, Produkte für Biotechnologie

Anhang F: Softwareverzeichnis

Tabelle 24: Softwareverzeichnis

Funktion	Softwaretyp	Hersteller
Auswertung der Kapillarelektrophorese	GeneMapper™ ID Software 3.2	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Genetic Analyser Software	3130 Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0	Applied Biosystems Deutschland GmbH
STR-Analyse	STR-Analyzer© v1.5.6	MeMo Forensics

Angang G: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 25: Verbrauchsmaterialien

Material	Typ / Inhalt	Hersteller
Agarose	Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH
Agarosegelelektrophoreseleitern	Hyperladder I und II	Bioline GmbH
Primer	TGLA227, HTG4, SW857, SW1111, INRA023, ASB2, BMS332, BM121, ILSTS022, Aktin 34F und R, VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425	Bioline GmbH
Aqua bidest	H2O-HPLC analyzed	J.T. Baker Mallinckrodt Baker B.V.
Borsäure	BORSÄURE $\geq 99,8\%$, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolsäure	Bromphenol Blue	Serva Electrophoresis GmbH
Desoxynukleotide	dNTP Mix	Bioline GmbH
DMSO	Dimethylsulfoxid	Qbiogene-Alleis Deutschland GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH Co. KG
Ethanol	vergällt $\geq 99,8\%$ mit ca. 1% MEX	Carl Roth GmbH Co. KG
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ficoll	Ficoll 400 TM	Simga-Aldrich Chemie GmbH
Formamid Mikrotiterplatte	Micro Amp® Optical 96 well Platte	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Größenstandard zur Auswertung der Kapillarelektrophorese	GeneScam TM LIZ500 TM Size Standard	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Gummiseptaplatte der Mikrotiterplatte (Fragmentalanalysegerät)	Plate Septa 96 well	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Handschuhe	Peha-Soft Powderfree	Paus Hartmann AG
Hygienereiniger	Dan Klorix Hygienereiniger	Colgate-Palmolive GmbH
Extraktionskit, manuelle	Invisorb® Spin Tissue Mini Kit	Stratec Biomedical

Material	Typ / Inhalt	Hersteller
Methode		
Extraktionskit, semiautomatische Methode	InviMag® Blood DNA KF96-Kit	Stratec Biomedical
Kreppklebeband	Color Code Tape	TimeMed Labeling Systems, Inc.
MgCl ₂	Magnesiumchlorid 50 mM	Bioline GmbH
OP-Kittel	Einmal-OP-Mantel	3 M Health Care GmbH
OP-Mundschutz	Surgical mask	Mölnlyck Health Care GmbH
Puffer für PCR	Phusion®HF Reaction	Thermo Fischer Scientific GmbH
	10x PCR Gold Buffer	Applied Biosystems Deutschland GmbH
	ImmoBuffer 10x	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Pipettenspitzen	2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co.
Reaktionsgefäße	Für PCR: PCR-Soft Tube, 8 Gefäßbestreifen mit 0,2 ml	Nerbe Plus
	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co.
	50 ml	Nerbe Plus GmbH
Polymer	3130 POP-4™ Performance Opimizes Polymer	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Polymerasen	AmliTaq Gold®-Polymerase	Applied Biosystems Deutschland GmbH
	Phusion®Hotstart-Polymerase	Thermo Fischer Scientific GmbH
	Immolase DNA-Polymerase (5u/µl)	Bioline GmbH
Tris-Hydrochlorid	Pufferan® ≥ 99% p.a. M 157,6 g/mol	Carl Roth GmbH Co. KG
Ultraschallbad-Zusatz	Ultrasosol® 7-neutral	Carl Roth GmbH Co. KG

Danksagung

Ich möchte mich aufrichtig bei Frau PD Dr. Nicole von Wurmb-Schwark für die Gelegenheit bedanken, meine Doktorarbeit in der DNA-Abteilung der Rechtsmedizin anzufertigen. Wesentliche Förderung erfuhr die Arbeit durch fachbezogene aber auch persönliche Gespräche. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Jürgen Kaatsch, dem ehemaligen Direktor des rechtsmedizinischen Instituts. Das Arbeiten in seinem unkomplizierten Umfeld hat die Entstehung der Dissertation erst möglich gemacht. Herrn Prof. Dr. Ralf Junker verdanke ich die Möglichkeit diese Arbeit in Kooperation mit der klinischen Chemie fertig zu stellen. Besondere Unterstützung erhielt ich von Herrn Dr. Jan-Hendrik Modrow durch seine professionelle und ideale Betreuung. Herzlichen Dank für seine anhaltende Geduld und ständige Hilfsbereitschaft, die mir während der gesamten Zeit meiner Arbeit an diesem Projekt zu Teil wurde. Danke auch an Elisabeth Richert, Dr. Andrea Preusse-Prange, Stefanie Petzel, Ingrid Wessel und Johannes Hasse für die stets hilfsbereite und liebenswerte Unterstützung während des praktischen Teils im Labor.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Vera Hanna Heßling
Geburt: 08. Mai 1990 in Bocholt

Ausbildungen

06/2009 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
09/2009 - 09/2011 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität Budapest (Ungarn)
04/2012 - 06/2016 Klinisches Studium der Humanmedizin an der CAU zu Kiel
05/2015 - 04/2016 Praktisches Jahr

- Inneren Medizin in der Helios Park Klinik, Leipzig
- Herz- und Gefäßchirurgie im Hospital de la Santa Creu i San Pau, Barcelona (Spanien)
- Chirurgie im Kantonsspital Appenzell-Ausserrhodon, Herisau (Schweiz)
- Pädiatrie in der Kinderklinik der CAU Kiel

Wissenschaftliche Tätigkeit

2013 - 2016 Promotion am rechtsmedizinischen Institut der CAU Kiel zum Thema „Entwicklung einer Multiplex-PCR zum Nachweis ausgewählter europäischer Nutztiere in der forensischen Praxis“

2013

- Poster: Schwark, T., Hessling, V., Modrow, J. H., von Wurmb-Schwark, N., Establishment of an STR multiplex PCR for identification of farm animal species in gastric contents and food. 25th Congress of the International Society for Forensic Genetics (ISFG), September 2-7, 2013, Melbourne, Australien

2013

- Poster: Modrow, J. H., Richert, E., Hessling, V., Hasse, J., Schwark, T., von Wurmb-Schwark, N., Etablierung einer STR-Multiplex zur Identifizierung von Nutztieren in Lebensmitteln und Mageninhalt. Norgenta, Dezember 5, 2013, Kiel

2016

- im Review: Modrow, J. H., Richert, E., Hessling, V., Hasse, J., Schwark, T., von Wurmb-Schwark, N. (2016): Identification of European wild and farm animals using multiplex STR-Assays, FSI Genetics

2013 - 2014 Wissenschaftliche Hilfskraft bei der kinder-kardiologischen Studie zur Therapie postoperativer Juktionalektooper Tachykardien