

DIE ROLLE DER PCR IN DER AUTHENTIZITÄTSPRÜFUNG

Margit Cichna-Markl

**Institut für Analytische Chemie, Universität Wien, Währinger Straße 38, 1090
Wien**

Schlüsselwörter: Authentizität, Polymerasekettenreaktion (PCR), Tierarten-
differenzierung, Fleisch, Olivenöl

EINLEITUNG

Gemäß dem Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz ist es verboten, verfälschte oder wertgeminderte Lebensmittel in den Verkehr zu bringen. Die Konsumenten dürfen nicht durch falsche Angaben über die Art, Zusammensetzung, Ursprung, Herkunft und/oder Herstellungs- oder Gewinnungsart des Lebensmittels in die Irre geführt werden.

In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche Analysemethoden entwickelt, welche die Identifizierung von Tierspezies in Lebensmitteln ermöglichen. Schwieriger ist es jedoch, den geographischen Ursprung von Lebensmitteln festzustellen oder die Authentizität von Bio-Lebensmitteln zu verifizieren. Im Folgenden werden verschiedene auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) basierende Analysemethoden besprochen, die zur Identifizierung von Tierspezies in Lebensmitteln und/oder zur Authentizitätsprüfung von Olivenöl angewandt werden.

1. TIERARTENDIFFERENZIERUNG

Die Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln dient zur Prüfung, ob teurere Fleischsorten durch billigere ersetzt wurden. Weiters ist die Kenntnis über die enthaltene Tierart in einem Lebensmittel für Personen von Interesse, die gegen

bestimmte Fleischsorten allergisch sind oder aus religiösen Gründen bestimmte Fleischsorten meiden wollen.

Bei Lebensmitteln, die einen großen Anteil an zellulären Bestandteilen enthalten, spielen bei der Identifizierung der Tierart vor allem proteinchemische (z.B. Immunoassays) und DNA-analytische Methoden eine große Rolle. Diese Methoden beruhen auf Sequenzunterschieden von Proteinen und der DNA in verschiedenen Tierspezies.

DNA-analytische Methoden haben - verglichen mit proteinchemischen Methoden - einige Vorteile [1-3]. Im Unterschied zu Proteinen ist die DNA relativ stabil und kann daher auch in stark verarbeiteten Lebensmitteln nachgewiesen werden. Während die DNA in allen Zellen und Geweben eines Individuums ident ist, hängt das Proteinexpressionsmuster u.a. vom Gewebetyp und der Entwicklungsstufe des Individuums ab. Außerdem ist der Informationsgewinn aus der Analyse der DNA-Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes und des Auftretens von nichtcodierenden Regionen höher.

Bei den meisten DNA-analytischen Methoden zur Speziesidentifizierung in Lebensmitteln wird die DNA zuerst aus dem Lebensmittel extrahiert, ein oder mehrere DNA-Abschnitte mittels der PCR amplifiziert und die PCR-Produkte im Anschluss analysiert.

1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ausgehend von zwei spezifischen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, die komplementär zu einem bestimmten Sequenzabschnitt sind, wird mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase der DNA-Abschnitt zwischen den Primern *in vitro* vervielfältigt (amplifiziert).

Auswahl des genetischen Materials

Es kann entweder genomische oder mitochondriale DNA amplifiziert werden. Niedrigere Nachweisgrenzen erzielt man, wenn mitochondriale DNA verwendet wird, da die meisten tierischen Zelltypen viele Kopien von mitochondrialer DNA, jedoch nur eine Kopie von genomischer DNA enthalten. Da die Zahl der Kopien an

mitochondrialer DNA in verschiedenen Geweben unterschiedlich ist, kann in diesem Fall jedoch keine quantitative Bestimmung durchgeführt werden [3].

Auswahl der Primer

Es können entweder universelle oder spezies-spezifische Primer verwendet werden. Universelle Primer werden so entworfen, dass sie an konservierten Regionen der DNA anlagern und einen Abschnitt amplifizieren, in dem sich die Spezies, für die man sich interessiert, unterscheiden. Die gebildeten PCR-Produkte sind in der Regel gleich lang, unterscheiden sich aber in der Basenzusammensetzung. Universelle Primer werden verwendet, wenn die spezies-spezifischen Unterschiede in der Sequenz der PCR-Produkte danach mittels Restriction fragment length polymorphism (RFLP, siehe 1.2.) untersucht werden sollen. Spezies-spezifische Primer werden so entworfen, dass sie nur an die DNA einer bestimmten Spezies anlagern [3].

Detektion

Wenn spezies-spezifische Primer verwendet werden, kann mittels Gelelektrophorese oder in der real-time PCR mit fluoreszenzmarkierten Sonden geprüft werden, ob das bestimmte PCR-Produkt gebildet wurde oder nicht. Da bei der real-time PCR die Überprüfung in einem geschlossenen Gefäß stattfindet, wird die Kontaminationsgefahr und damit das Auftreten von falsch positiven Ergebnissen reduziert. Die Quantifizierung erfolgt in der Regel relativ, d.h. die Zielsequenz wird relativ zu einer zweiten Sequenz bestimmt [4].

Multiplex PCR:

In der letzten Zeit kann ein Trend zur Entwicklung von Multiplex-PCR Methoden beobachtet werden [5]. Mit diesen Methoden kann man durch Kombination von mehreren Primern in einem Reaktionsansatz mehrere Tierarten identifizieren. Der Vorteil ist, dass Zeit und Kosten gespart werden können und die Kontaminationsgefahr sinkt.

1.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Die Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-Analyse spielt eine große Rolle in der Tierartendifferenzierung [3, 6]. Bei dieser Methode werden die PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen (Endonukleasen) an definierten Sequenzstellen gespalten, wobei infolge der artspezifischen Sequenzunterschiede verschiedene Fragmente entstehen. Diese werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit den Restriktionsmustern von Referenzproben (DNA aus lebensmittelrelevanten Tierarten) verglichen. Die Methode ist einfach und kostengünstig, hat jedoch auch Nachteile. Der Hauptnachteil ist, dass es Sequenzunterschiede innerhalb einer Spezies geben kann und in diesem Fall für Individuen der gleichen Spezies unterschiedliche Restriktionsmuster erhalten werden. Um Sequenzunterschiede durch Punktmutationen innerhalb der Spezies aufzudecken, müssen zahlreiche Individuen der gleichen Spezies untersucht werden. Außerdem müssen PCR-Produkte, die mit einer RFLP-Analyse unterschieden werden sollen, relativ groß sein, damit ausreichend viele Sequenzunterschiede vorliegen. Das kann bei stark verarbeiteten Lebensmitteln ein Problem sein. Weiters ist die Methode nicht zur Tierartenidentifizierung in Mischungen geeignet, da man in diesem Fall komplizierte Restriktionsmuster erhält, die nicht leicht zu interpretieren sind.

1.3. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Bei der Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-Analyse werden kurze (~10 bp lange), zufällig ausgewählte Primer eingesetzt, sodass während der PCR eine Reihe von Produkten gebildet wird. Diese Produkte werden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und das Bandenmuster mit dem von Referenzproben verglichen. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie im Unterschied zu anderen Methoden auch zum Nachweis von Spezies angewendet werden kann, deren DNA Sequenz nicht bekannt ist [7].

2. PRÜFUNG DER AUTHENTIZITÄT VON OLIVENÖL

Die Eigenschaften eines Olivenöls hängen sowohl von den klimatischen Bedingungen einer Region als auch von der Olivensorte ab. Aus diesem Grund sind manche Olivenöle durch die EU Bezeichnungen „Geschützte Ursprungsbezeichnung“ (Protected Designation of Origin, PDO) oder „Geschützte geographische Angabe“ (Protected geographical indication, PGI) rechtlich geschützt.

Es gibt einige Studien, die sich mit der Analyse von chemischen Parametern zur Authentizitätsprüfung von Olivenöl beschäftigt haben, wie z.B. der Bestimmung des Fettsäuremusters, um eine Verfälschung des Olivenöls durch Sesamöl aufzudecken. Da die chemische Zusammensetzung eines Olivenöls von der Jahreszeit abhängen kann, sind chemische Parameter nicht ausreichend, um die Authentizität eines Olivenöls zu bestätigen. DNA basierende Marker sind hingegen unabhängig von der Jahreszeit und den Umweltbedingungen und daher geeignet, die Olivensorte zu identifizieren [1].

Es ist jedoch eine Herausforderung, aus Olivenöl DNA in ausreichender Menge und Qualität zu extrahieren. PCR Inhibitoren im DNA-Extrakt, wie z.B. phenolische Verbindungen und Polysaccharide, können die Amplifikationseffizienz der PCR-Methode herabsetzen [8].

In der Authentizitätsprüfung von Olivenöl spielen vor allem die RAPD-Analyse, die RFLP-Analyse und die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)-Analyse eine Rolle [9].

2.1. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)-Analyse beginnt mit dem Verdau der gesamten genomischen DNA mit zwei Restriktionsenzymen, die sich in der Häufigkeit des Schneidens unterscheiden und die den DNA-Doppelstrang mit überstehenden Enden schneiden. Danach werden Adaptermoleküle an diese Enden angebracht (= Ligation) und die PCR Amplifikation mit Primern, die an die Adaptermoleküle anlagern, durchgeführt. Danach laufen zwei PCR-Reaktionen ab, in denen ein Teil der erhaltenen Fragmente amplifiziert wird. Die in etwa 100 Fragmente

werden mittels Gelelektrophorese getrennt und z.B. mittels Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht.

Der Vorteil der Methode ist, dass sie unabhängig von der Komplexität der Ziel-DNA durchgeführt werden kann. Wie bei der RAPD-Analyse muss auch bei der AFLP-Analyse die DNA-Sequenz nicht bekannt sein. Der Nachteil der Methode ist, dass sie ziemlich arbeitsintensiv ist.

LITERATUR

- [1] Mafra I., Ferreira I.M.P.L.V.O., Oliveira M.B.P.P. Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 649-665.
- [2] Martinez I., Aursand M., Erikson U., Singstad T.E., Veliyulin E., Van der Zwaag C. Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, 14, 489-498.
- [3] Ballin N.Z., Vogensen F.K., Karlsson A.H. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science* **2009**, 83, 165-174.
- [4] Laube I., Zagon J., Broll H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2007**, 42, 336-341.
- [5] Köppel R., Zimmerli F., Breitenmoser A. Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, 230, 125-133.
- [6] Fajardo V., Gonzalez I., Lopez-Calleja I., Martin I., Hernandez P.E., Garcia T., Martin R. PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1144-1150.
- [7] Rastogi G., Dharme M.S., Walujkar S., Kumar A., Patole M.S., Shouche Y.S. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Sci.* **2007**, 76, 666-674.

- [8] Gimenez M.J., Piston F., Martin A., Atienza S.G. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food Chem.* **2010**, 118, 482-487.
- [9] Pafundo S., Agrimonti C., Marmiroli N. Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 6995-7002.