

# Die Methode des Terminalen-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP) in der Lebens- und Futtermittelanalytik

Entwicklung eines universellen Verfahrens zur Tierartendifferenzierung



Fraunhofer Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie

Björn Seidel, Gisela Böhle, Rainer Peters und Werner Kördel

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg, E-mail: seidel@ime.fraunhofer.de

## Zusammenfassung

Die Bestimmung von Tierarten in verarbeiteten Lebensmitteln aus Gründen der Qualitätssicherung und im Hinblick auf BSE hat nach wie vor große Aktualität. Die zur Zeit durchgeführten Verfahren beruhen entweder auf immunologischen Untersuchungen wie z.B. ELISA-Tests, durch Detektion tierartenspezifischer Proteine oder durch Vervielfältigung und Nachweis entsprechender tierartenspezifischer Gene mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sowie durch die Kopplung beider Verfahren. Nachteilig an diesen Verfahren ist jedoch, dass z.B. beim ELISA-Test die Gefahr der Kreuzreaktionen durch die verwendeten Antikörper besteht und damit die Generierung falsch-positiver Ergebnisse möglich ist. Weiterhin sind in stark verarbeiteten Lebens- und Futtermitteln die tierartenspezifischen Proteine teilweise völlig degradiert und werden dadurch einem Nachweis entzogen. Die bisherigen PCR-Methoden sind wiederum langwierig und umständlich, da für jede Tierart jeweils getrennte Reaktionen durchgeführt werden müssen, um die einzelnen enthaltenen Tierarten nachzuweisen. Kommerziell erhältliche Kits basieren auf diesen tierartenspezifischen Primern. Weitere Nachweise mittels „Fingerprinting“-Technologien wie z.B. der Analyse durch Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) sind zwar schnell und universell auf eine Vielzahl von Tierarten anwendbar, versagen jedoch meist bei der Anwesenheit von mehr als zwei Tierarten in einer Probe, da ein unübersichtliches Bandenmuster entsteht.

Am Fraunhofer-IME wurde aufgrund dieser Nachteile eine Methode entwickelt, die, basierend auf der RFLP, den Speziesnachweis in allen bisher untersuchten Lebens- und Futtermitteln sicher erlaubt. Mittlerweile können mehr als 50 Spezies nachgewiesen werden.

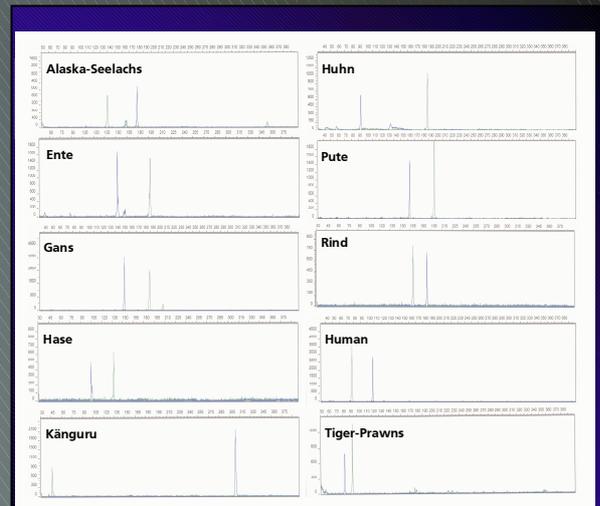
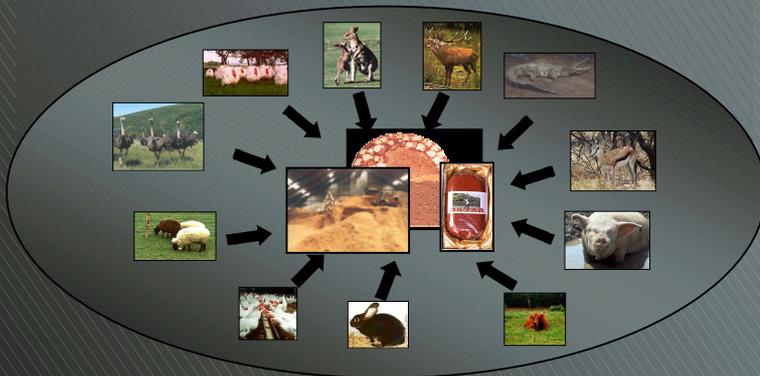


Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung der tierartspezifischen Bandenmuster



Die T-RFLP-Methode stellt eine molekulare Fingerprinting-Technik dar, die ursprünglich zur vergleichenden Analyse von Bakteriengemeinschaften im Boden entwickelt wurde und durch die Verwendung fluoreszenz-markierter Oligonukleotide, die Nachteile der herkömmlichen RFLP umgeht, da nur spezifische, markierte Genabschnitte detektiert werden. Der Einsatz der T-RFLP unter der Verwendung von neuentwickelten Universalprimern zur Speziesdifferenzierung, erlaubt die gleichzeitige Analyse von mehr als zehn Tierarten in einer Probe mittels einer einzigen PCR-Reaktion und der anschließenden Restriktionsanalyse durch spezifische Enzyme. Durch diese Methode können z.B. in Fleischerzeugnissen gleichzeitig die in Deutschland hauptsächlich verwendeten Tierarten (Rind, Schwein, Huhn, Pute, Hammel) bis zu einer Menge von 0,1-1% - auch in erhitzten Erzeugnissen - sicher nachgewiesen werden. Die Präsenz weiterer Tierarten wird ebenfalls angezeigt. Weiterhin ist die Analyse und Unterscheidung von Geflügel wie Huhn, Pute, Gans, Ente, Strauß und Taube leicht möglich sowie die Prüfung auf das Vorkommen „exotischer“ Fleischsorten wie Känguru- oder Krokodilfleisch. Das Verfahren wurde ebenfalls in stark prozessierten Produkten wie Tiermehl und Knochenmehl erfolgreich angewendet.

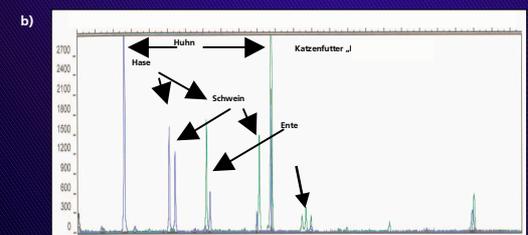
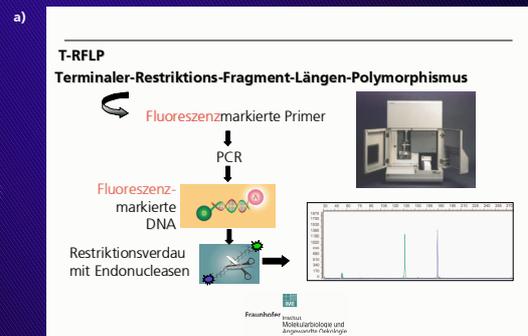


Abbildung 2:  
a) Schematische Darstellung des Verfahrens  
b) Untersuchte Futtermittelprobe und die nachgewiesenen Tierarten

Literatur:  
Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 1997 Nov;63(11):4516-22.