

Identifizierung nahe verwandter Tierarten mittels Ultradünnschicht isoelektrischer Fokussierung

BAUER, F.

Institut für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und Lebensmittelkunde
Veterinärmedizinische Universität Wien, Austria

Einleitung:

In der Lebensmittelüberwachung tritt immer wieder das Problem der Tierartenbestimmung auf, insbesondere bei Fleisch in Stücken und tiefgefrorenen Produkten. Serologische Methoden haben sich zwar zur Unterscheidung von verwandtschaftlich weit entfernten Tierarten gut bewährt, versagen aber bei nahe verwandten. (MANZ 1979, HAYDEN 1979)

Es liegt nun der Gedanke nahe, elektrophoretische Methoden zur Speziesidentifizierung einzusetzen. Sowohl über die Verwendung der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) (EBERMANN 1972, SPELL 1974) als auch der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgelen (PAGE) (PAGIEF) und Agarose (KAISER 1980) liegen bereits einige Arbeiten vor (weitere Literaturangaben sind bei KAISER 1980 enthalten). Am leistungsfähigsten erwies sich dabei die Methode der isoelektrischen Fokussierung (IEF). Das Problem dieser Methoden liegt allerdings darin, daß sie unter anderem sehr zeitraubend sind. Eine mögliche Alternative stellt somit die Ultradünnschicht isoelektrische Fokussierung (UDIEF) dar. Die Möglichkeit des Einsatzes der UDIEF wurde zwar angedeutet aber nicht durchgeführt (KAISER 1980).

In der vorliegenden Arbeit wird nun die Anwendung der UDIEF auf die Tierartenidentifizierung beschrieben, wobei das Hauptaugenmerk auf den Nachweis von Büffelfleisch und dessen Unterscheidung von anderen Wiederkäuern gelegt wurde.

Experimentelles:

Fleischextrakte. (KAISER 1980) 5 g zerkleinertes Fleisch werden mit 5 ml dest. Wasser homogenisiert (Ultra-Turrax), 15 min stehengelassen und bei ca. 4000 g zentrifugiert. Der Überstand kann entweder direkt verwendet oder noch mittels Dialyse oder Gelfiltration entsalzt werden, weil bei der IEF höhere Salzgehalte verzerrte Banden insbesondere im sauren Bereich liefern können (Separation News 8, 1979).

Gelbereitung. Die ultradünnen Gele wurden mittels der Klapptechnik nach RADOLA (1980) hergestellt. Dabei wird auf eine ca. 5 mm dicke Glasplatte (a) eine silanisierte Polyesterfolie (b) aufgerollt (Gelfix Haftfolie von SERVA) oder eine silanisierte 1 mm dicke Glasplatte aufgelegt (silanisiert mit Silane A 174 von PHARMACIA). Als Abstandhalter werden auf beide Längsseiten zwei Schichten eines handelsüblichen Selbstklebestreifens (c) aufgebracht (Dicke ca. 130 µm). Die ebenfalls ca. 5 mm dicke Deckplatte (d) kann entweder mit einem Siliconentschäumer behandelt werden oder es wird eine unbehandelte Polyesterfolie (e) aufgerollt. Das Polymerisationsgemisch (f) wird nun aufgetragen und die Deckplatte aufgeklappt (Abb.1).

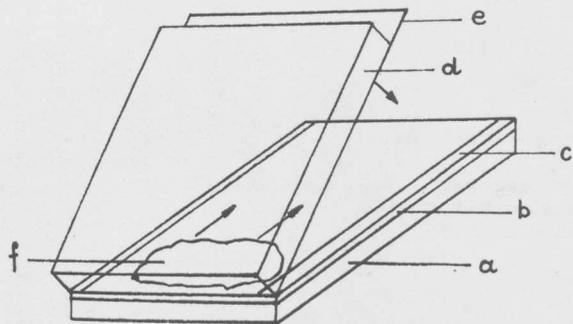


Abb.1: Legende siehe Text

Gelzusammensetzung. (T=5%, C=2,7%) 1,7 ml Acryl/Bis (29,2% Acrylamid und 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid), 0,5 ml Ampholyte (Servalyt T 4/9 oder Bio-lyte 4/9), 0,25 ml TEMED (2% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 7,3 ml dest. Wasser oder 6,7%iges Glycerin werden gemischt und ca. 30 sec entgast. Danach erfolgt die Zugabe von 0,3 ml einer 1,5%igen Ammoniumpersulfatlösung. Die Lösungen Acryl/Bis und TEMED sind ca. 2 Wochen bei 4°C haltbar, die Persulfatlösung wird täglich frisch vorbereitet. Mit diesem Polymerisationsgemisch (10 ml) können mit der Klapptechnik 3 Gele 120 x 80 mm hergestellt werden.

Elektrodenlösungen. (RADOLA 1980)

Anode: 0,83 g Asparaginsäure und 0,92 g Glutaminsäure auf 250 ml dest. Wasser.

Kathode: 30 ml Ethylendiamin, 1,09 g Arginin (freie Base) und 0,91 g Lysin (freie Base) auf 250 ml dest. Wasser.

Die UDIEF wurde in einer UGI-Universalkammer von DESAGA in Verbindung mit einem Hochspannungselektrophoreseetzgerät von CAMAG durchgeführt. Der Kühlblock (a) wird mit Paraffinöl behandelt, um einen besseren Wärmeübergang zu gewährleisten. Als Kühlflüssigkeit ist Leitungswasser (ca. 8°C) ausreichend. Die Elektrodenstreifen werden in die entsprechende Elektrodenflüssigkeit getaucht (d) und an den Rändern der Platte auf das Gel (c) gelegt. Auf diese Streifen werden Platinbreitbandelektroden aufgelegt (e), die durch Auflage einer ca. 5 mm dicken Glasplatte (f) stabilisiert werden (Abb.2).

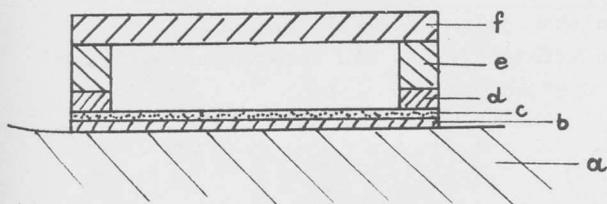


Abb.2: Legende siehe Text
b=Glasplatte

Die Proben werden punktförmig direkt auf das Gel aufgetragen (1 µl) und zwar auf der anodischen Seite.

Elektrophoresebedingungen (Trennstrecke 7 cm). Vorfokussierung 15 min bei 500 V

Trennung 60 min bei 1000 V (1000 Vh)

Die Trennstrecke kann ohne Informationsverlust bis 5 cm verkürzt werden, wobei die Fokussierungszeit weiter herabgesetzt wird.

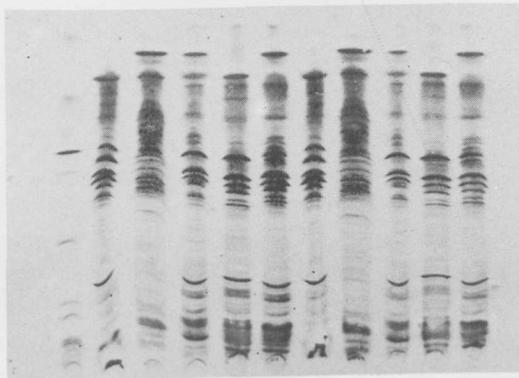
Anfärbung. Die Gele werden 10 min in 10%iger Trichloressigsäure fixiert, danach 1 min in die Entfärbelösung (Methanol:Eisessig:Wasser = 25:10:65) gelegt. Die Anfärbung erfolgt 10 min mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,1%ige Lösung in Entfärbelösung), schließlich wird ca. 30 min entfärbt. Die Gele haften während allen Visualisierungsschritten an der Glasplatte oder Polyesterfolie und können ohne Veränderung an der Luft getrocknet werden.

Ergebnisse und Diskussion:

Durch die UDIEF der wässrigen Fleischextrakte konnte Büffelfleisch eindeutig von anderen Wiederkäuern und Pferd unterschieden werden (Abb.3).

Abb.3: von links Testmischung/Rind/Pferd/
Büffel/Hirsch/Reh/Rind/...

Anode unten



Natürlich ist es auch möglich mittels Dünnschicht isoelektrischer Fokussierung (DIEF, 1-2 mm Gele) diese Tierarten zu unterscheiden, jedoch bringt die UDIEF wegen ihres geringen Zeit- und Kostenaufwandes (60 - 90 min UDIEF, bis zu 48 h DIEF), sowie der einfachen Dokumentation durch Trocknung große Vorteile. Es besteht auch die Möglichkeit fertige ultradünne Gele im Handel zu erwerben (Servalyt Precotes von SERVA). Außerdem wird noch die Auflösung verbessert und es lassen sich Nebenkomponenten in unmittelbarer Nähe von Hauptkomponenten besser nachweisen (RADOLA 1980). Es ist jedoch bei der Untersuchung unbekannter Proben empfehlenswert diese zwischen zwei Proben bekannter Tierarten laufen zu lassen, um einen eindeutigen Nachweis zu erbringen. Die von LUNDSTROM (1979) beschriebene Methode des Vergleiches mittels eines Photoarchivs ist nicht zu empfehlen, weil erstens Trägerampholyte verschiedener Firmen verschiedene Bandenmuster ergeben (ALLEN 1980) und weil zweitens bei kritischen Paaren wie z.B. Reh/Büffel ein indirekter Vergleich sehr problematisch wenn nicht gar unmöglich ist.

Durch serologische Methoden ist eine Unterscheidung nahe verwandter Tierarten nicht möglich. Es lassen sich nur Verwandtschaftsgruppen bestimmen bzw. es kann eine bestimmte Tierart ausgeschlossen werden (MANZ 1979). Außerdem ist es praktisch unmöglich exotische Tierarten (z.B. Büffel, Springbock) serologisch zu bestimmen, weil die entsprechenden Seren nicht vorhanden sind und die Herstellung sehr lange Zeit in Anspruch nehmen würde. Mittels PAGE lassen sich zwar die meisten Tierarten unterscheiden, jedoch ist die Auswertung insbesondere bei nahe verwandten Tieren schwieriger als bei der IEF.

Es zeigt sich hiemit, daß die IEF zur Tierartendifferenzierung die Methode der Wahl ist, wobei aus oben genannten Gründen die UDIEF der DIEF vorzuziehen ist.

Literatur

- ALLEN, R.C., *Electrophoresis* 1, 23(1980)
 EBERMANN, R., BARNA, J., *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 148, 341(1972)
 HAYDEN, A.R., *J.Food Sci.* 44, 494(1979)
 KAISER, K.P., MATHEIS, G., KMITA-DÜRRMANN, C., BELITZ, H.D.,
Z.Lebensm.Unters.Forsch. 170, 334(1980)
 LUNDSTROM, R.C., *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 62, 624(1979)
 MANZ, J., *Fleischwirtschaft* 59, 408(1979)
 RADOLA, B., *Electrophoresis* 1, 43(1980)
 SPELL, E., *Fleischwirtschaft* 54, 533(1974)