Spezifische Fisch-Identifizierung mittels real-time PCR

Vergleich der Methoden Sequenzierung und Nachweis mit real-time PCR

›Autorin:
Julia Bornmann, M. Sc. , CONGEN Biotechnologie GmbH, Robert-Roessle-Str. 10, 13125 Berlin

Die Qualität der Lebensmittel wird vielen Verbrauchern und Verbraucherinnen immer wichtiger. Um die nötige Transparenz für den Kunden zu gewährleisten, entstanden immer schärfere Regularien im Lebensmittelbereich. Ein wichtiges Thema zur Erhöhung der Transparenz ist die Vermeidung von Produktverfälschungen (Food Fraud). Laut Europol waren Fischprodukte 2016 am dritthäufigsten von Verfälschungen betroffen. In diesem Jahr waren 20 % aller Fische im Einzelhandel und der Gastronomie falsch gekennzeichnet[1].

Dabei existieren verschiedene Beweggründe für Verfälschungen. Der wichtigste Grund ist die Vermarktung einer kostengünstigeren Fischart als eine höherwertige Art. Außerdem werden Fische aus der Aquakultur oder Zucht als Wildfische deklariert, um die Fische hochwertiger erscheinen zu lassen. Des Weiteren werden gefährdete Fischarten als nicht gefährdete deklariert, um auch diese besser verkaufen zu können.

Um die Transparenz zu erhöhen wurde 2014 die Verordnung (EU) Nr. 1379/2013 über die Gemeinsame Marktorganisation für Erzeugnisse der Fischerei und der Aquakultur veröffentlicht. In dieser Verordnung werden neue, ergänzende Regeln zur Kennzeichnung von Fischen dargestellt.

Für eine korrekte Kennzeichnung müssen mindestens folgende Hinweise angegeben werden: die Handelsbezeichnung der Art, der wissenschaftliche Name, die Produktionsmethode, das Fanggebiet, die Fanggerätekategorie.

Teilweise können unter einer Handelsbezeichnung verschiedene Fischarten vertrieben werden und nicht immer wird der wissenschaftliche Name von den Ländern im Fanggebiet angegeben. Daher ist es wichtig spezifische Systeme zur Identifizierung von Fischarten zur Verfügung zu haben.

Es existieren verschiedene Methoden zur Identifizierung der Fische. Wenn die Fische im ganzen verkauft oder nach Deutschland eingeführt werden ist eine visuelle Unterscheidung möglich. Wenn der Fisch allerdings nur noch als Filet oder schon verarbeitet als Lebensmittel vorliegt, zählt die Sequenzierung der DNA zu der am Häufigsten angewandten Methode. Dabei wird ein spezifischer Teil der Fisch-DNA repliziert und anhand von DNA-Sequenzen aus Datenbanken (NCBI oder BOL) ausgewertet.

In unserem Service Labor bieten wir Sequenzierungen von Fischen an. Dazu stehen uns zwei verschiedene Zielsequenzen in der Fisch-DNA zur Verfügung. In der DNA gibt es verschiedene Regionen, die in allen Fischen gleich sind, innerlich aber doch in jeder Art Unterschiede aufzeigen. Wenn man sich als Verdeutlichung diese Region der DNA als Leiter vorstellt, sind die oberen und unteren beiden Sprossen bei jedem Fisch identisch. Die Sprossen in der Mitte sind jedoch bei jeder Fischart unterschiedlich. Diese Regionen sind unsere Zielsequenzen. Wenn die erste Zielsequenz bei einer Fischart doch kein Ergebnis liefern sollte, haben wir die Möglichkeit die

Tabelle 1: Am häufigsten sequenzierten Fischarten

Alaska Seelachs	Großer Roter Drachenkopf	Rotbarbe
Amerikanischer Seeteufel	Haarschwanz	Rotbarsch
Atlantische Makrele	Hecht	Rotbrasse
Atlantische Sardine	Heilbutt	Rotlachs
Atlantischer Dreischwanzbarsch	Hering	Rotzunge
Atlantischer Hering	Heringskönig	Saiblinge
Atlantischer Lachs	Hornhecht	Sankt Petersfisch
Bachseibling	Japanische Meerbrasse	Sardelle
Barbe	Japanischer Aal	Scheibenbäuche
Bastardmarkrele	Kaiser-Schnapper	Schellfisch
Buckellachs	Kap-Seehecht	Schnapper
Buttermakrele	Kap-Seehecht (Tiefwasser)	Scholle
Coholachs	Karpfen	Schwarzer Heilbutt
Degenfisch	Ketalachs, Wildlachs	Schwarzer Seeteufel
Dorade	Kingklip	Schwertfisch
Dorsch	Kliesche	Seehecht
Dünnlippige Meeräsche	Köhler	Seeteufel
Echte Rotzunge	König-Sägebarsch	Seewolf
Echter Bonito	Kugelfische	Senegalenische Seezunge
Europäischer Papageifisch	Leng	Snapper
Europäischer Seehecht	Lumb	Stacheliger Kugelfisch
Europäischer Wolfsbarsch	Makrele	Steinbutt
Flunder	Maränen	Sterlet
Flussbarsch	Neuseeländischer Monkfisch	Stör
Forelle	Neuseeländischer Sankt Petersfisch	Streifenbarbe
Gebänderter Barrakuda	Offiziersfisch	Süßlippe
Gelbflossenthunfisch	Pangasius	Thunfisch
Gemeine Meerbrasse	Pazifische Kliesche	Tilapia
Gemeine Seezunge	Pazifische Scholle	Weißer Thunfisch
Gestreifter Seewolf	Pazifischer Dorsch	Wittling
Goldmakrele	Pazifischer Heilbutt	Wolgazander
Goldstrieme	Petersfisch	Zander
Grauer Drückerfisch	Regenbogenforelle	

zweite Zielsequenz zu untersuchen. Damit können wir ein breites Spektrum an Fischen zur Identifizierung abdecken.

In Tabelle 1 sind die am häufigsten sequenzierten Fischarten in unserem Service Labor dargestellt.

In Italien wurden zum Beispiel 2015 46,4 % der Schollenfilets durch Pangasius ersetzt[1]. Beide Arten konnten durch Sequenzierung nachgewiesen werden.

Allerdings ist die Sequenzierung nur in reinen Fischfilets gut durchführbar. Bei Mischproben, also Fisch in fertigen Lebensmittelprodukten ist der Nachweis sehr schwierig, da Sequenzen überlagert dargestellt werden und dann nur noch schwer auseinander zu halten sind. Dies macht die Identifizierung der Fischart in solchen Proben fast unmöglich.

Um dieses Problem zu umgehen haben wir spezifische Fisch Nachweise zur Bestätigung mittels realtime PCR entwickelt. Mit der real-time PCR wird nur der spezifische Teil der DNA repliziert und der Fisch oder auch verschiedene Fische können in der Probe nachgewiesen werden. Zudem sind die zur Identifizierung nötigen DNA-Abschnitte im Allgemeinen kleiner als die Zielsequenzen für die Sequenzierung. Daher können auch hoch prozessierte Lebensmitteln, wie zum Beispiel Konserven, untersucht werden.

Ein weiterer Vorteil der Bestätigung einer Fischart ist, dass die Analysen sehr schnell durchführbar sind. In unserem Service Labor kann die Fischart mittels real-time PCR Analyse innerhalb von 2-3 Tagen bestätigt werden. Für die Sequenzierung benötigten wir etwa die doppelte Zeit. Für beide Methoden muss die DNA in der Probe extrahiert und anschließend mittels PCR repliziert werden.

Bei der einfachen real-time Analyse wird die PCR im Anschluss nur noch ausgewertet (positiv oder negativ). Bei der Sequenzierung durchläuft die DNA einen weiteren Arbeitsschritt um die Sequenz zu ermitteln. Diese Sequenz wird danach durch einen Sequenzvergleich in Datenbanken ausgewertet.

Allerdings sind die nachweisbaren Fischarten in der real-time PCR begrenzt, da für jeden Fisch ein spezifisches System entwickelt werden muss. In folgender Tabelle sind unsere momentan verfügbaren Analysen und der Name der verwendeten PCR-Kits aufgelistet. Die Auswahl der Fischarten wurde anhand von Kundenwünschen festgelegt. Je nach Wunsch ist es auch möglich weitere Analysen zu entwickeln.

Die SureFood® FISH ID Kits sind Duplex-PCR Systeme. Zusätzlich zum spezifischen Fisch-Nachweis ist der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA (IAAC) ausgestattet.

Mithilfe der IAAC kann gleichzeitig kontrolliert werden, ob überhaupt tierische DNA in der Probe vorhanden ist und ob inhibierende Substanzen die PCR stören.

In der Routine können die Identifizierungen mit den SureFood® FISH ID Kits in molekularbiologischen Laboren einfach und schnell durchgeführt werden. In Verbindung mit dem SureFood® PREP Basic zur Extraktion der DNA dauert die Analyse etwa 4 Stunden. Dabei können mehrere Stichproben parallel getestet werden.

Alles in Allem ist die Verwendung der SureFood® FISH ID Kits eine gute Alternative für alle Unternehmen, die eine bestimmte Fischart geliefert bekommen und diese bestätigen müssen.

Alaska Seelachs	SureFood® FISH ID Gadus chalcogrammus IAAC
Atlantischer Lachs	SureFood® FISH ID Salmo salar IAAC
Buckellachs	SureFood® FISH ID Onchorhynchus gorbuscha IAAC
Dorsch/ Kabeljau	SureFood® FISH ID Gadus morhua IAAC
Echter Bonito	SureFood® FISH ID Katsuwonus pelamis IAAC
Europäischer Seehecht	SureFood® FISH ID Merluccius merluccius IAAC
Forelle	SureFood® FISH ID Salmo trutta IAAC
Heilbutt, schwarz (Reinhardtius hippoglossus)	SureFood® FISH ID 3plex Halibut IAAC
Heilbutt, weiß (Hippoglossus hippogossus)	SureFood® FISH ID 3plex Halibut IAAC
Königslachs	SureFood® FISH ID Oncorhynchus tshawytscha IAAC
Pazifischer Dorsch	SureFood® FISH ID Gadus macrocephalus IAAC
Regenbogenforelle	SureFood® FISH ID Oncorhynchus mykiss IAAC
Rotlachs	SureFood® FISH ID Oncorhynchus nerka IAAC
Schellfisch	SureFood® FISH ID Melanogrammus aeglefinus IAAC
Seelachs	SureFood® FISH ID Pollachius virens IAAC
Wittling	SureFood® FISH ID Merlangius merlangus IAAC

Literatur

[1] Reilly, Alan (2018). Overview of Food Fraud in the fisheries sector, FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1165 FIAM/C1165 (En)

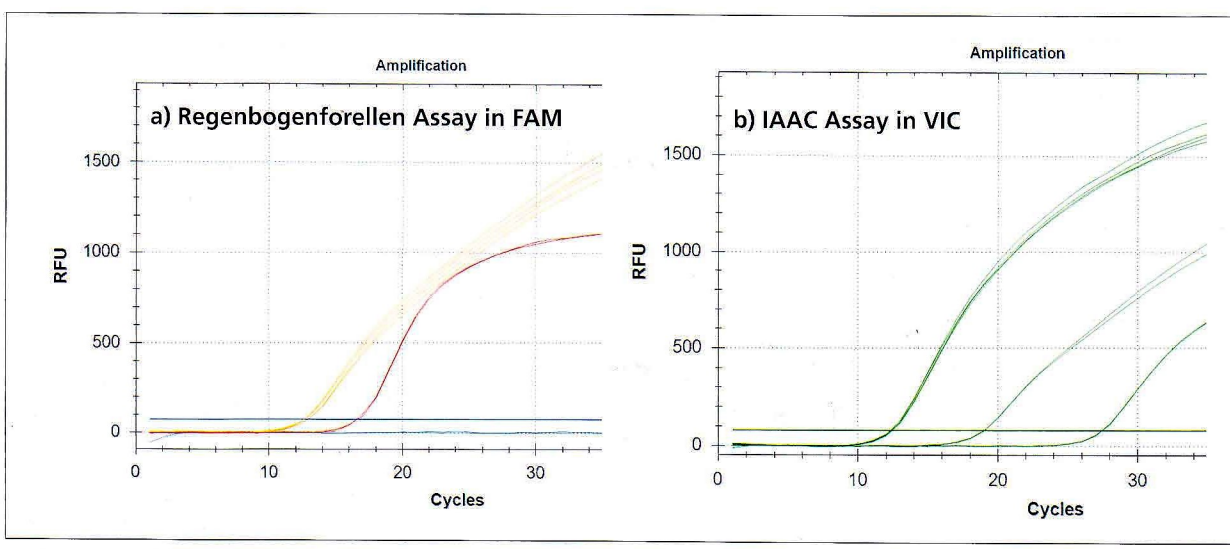

Abb. 1: Bio-Rad CFX96 real-time PCR mit SureFood® FISH ID Oncorhynchus mykiss IAAC Kit

a) Zeigt die Amplifikationskurven für Regenbogenforelle – positive Proben inklusive einer Negativ-Kontrolle (NTC) und einer Positiv-Kontrolle (PTC) im FAM Kanal.

b) Zeigt die interne Amplifikationskontrolle mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA (IAAC) im VIC Kanal.