

Tierartbestimmung und Sojanachweis in erhitzten Fleischprodukten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) = Species differentiation and detection of soya in heated meat products by polymerase chain reaction (PCR)

Autor(en): **Meyer, R. / Candrian, U. / Lüthy, J.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 1

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982127>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

R. Meyer, U. Candrian und J. Lüthy, Institut für Biochemie der Universität Bern, Bern

Tierartbestimmung und Sojanachweis in erhitzten Fleischprodukten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Species Differentiation and Detection of Soya in Heated Meat Products by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Einleitung

Die Bedeutung der Tierartbestimmung liegt bei der Überprüfbarkeit der Deklaration von Fleisch- und Fischprodukten (1–3). Der Konsument soll vor Täuschungen geschützt werden, nicht nur wenn Billigfleisch exotischer Tierarten (z. B. afrikanischer Springbock *Antidorcas marsupialis*) als einheimisches Wild in den Handel kommt (4), sondern auch, wenn er aus religiösen oder anderen Gründen das Fleisch bestimmter Tierarten ablehnt. Zudem besteht auch für eine kleine Gruppe der Bevölkerung ein gewisses gesundheitliches Risiko, wenn Produkte undeckliertes Fleisch oder pflanzliche Proteine enthalten, die bei sensiblen Personen Allergien auslösen könnten (5). Ausserdem besteht die Gefahr, dass exotische Parasiten eingeschleppt werden (z. B. *Trichinella spiralis*). Pflanzliche Proteine aus Weizen, Mais und Soja können zur Stabilisierung und Verbesserung des Wasserbindungsvermögens von Wurstwaren bis zu 3,5% (6) oder als Ersatzstoff eingesetzt werden. Eine weitere Bedeutung liegt in der wissenschaftlichen Taxonomie der Spezies nach phäno- und genotypischen Merkmalen, um nahe verwandte Arten innerhalb der Huftiere und Wiederkäuer zu differenzieren, was eine Kontrolle zum Schutz bedrohter Tierarten erlaubt (7). Taxonomische Differenzierung nahe verwandter Tierarten, die Analyse des Nachweises hoch erhitzter Fleischmischungen oder stark verarbeiteter Fleischprodukte und Fleischersatzstoffe lassen sich aber mit den aktuellen Analysemethoden (Elektrophorese, Serologie, Histologie) nicht befriedigend durchführen.

Methoden der Tierartenbestimmung

Aus der Vielzahl der Methoden (8, 9) haben sich für den Nachweis der Tierarten vor allem elektrophoretische (isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel, PAGIF) und immunologische (Ouchterlony Double Immunodiffusion; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) Methoden durchgesetzt.

Isoelektrische Fokussierung basiert auf dem Vergleich von Proteinbandenmustern der Fleischprobe mit Referenzmaterial. Die Proteinzusammensetzung variiert von Zelle zu Zelle, ist abhängig von Alter, Rasse und Herkunft der Tiere und wird weiter beeinflusst vom Frischezustand und der Verarbeitung des Fleisches. Die Löslichkeit der sarkoplasmatischen Proteine nimmt mit zunehmender Erhitzung ab, somit auch die Differenzierung nahe verwandter Tierarten. Die Methode ist anwendbar zur Erfassung von zwei Tierarten in Fleischmischungen sowie technologisch nicht zu stark verändertem Fleisch (z. B. Sterilisation). Die nachzuweisende Tierart muss zudem in genügend grosser Konzentration vorhanden sein (10–13). Bei hoch erhitzten Proben ist die Interpretation der Pherogramme oftmals schwierig und von zweifelhafter Reproduzierbarkeit.

Serologische Methoden zeichnen sich durch hohe Spezifität und Empfindlichkeit aus. Proteine verändern sich aber durch Hitzeeinwirkung in ihrer Konformation, was meist zu einem Verlust der Antigen determinanten führt und die Antigen-Antikörper-Reaktion unmöglich macht. Es wird jedoch versucht, mit Spezies spezifischen, polyklonalen Antikörpern, welche gegen hitzeresistente Antigene gerichtet sind, hocheerhitzte Fleischproben zu untersuchen (Cortecs Diagnostics: Cooked Meat Identification Kit) (14–19).

Die Identifizierung von Tierarten kann auch auf der Ebene der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgen (20–22). Das Verfahren beruht auf der Isolation von DNA aus Fleischproben, gefolgt von der Bestimmung der durchschnittlichen Grösse der DNA-Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese. Die DNA wird anschliessend auf einen Nylonfilter übertragen, fixiert und mit ^{32}P markierter, genomischer DNA verschiedener Spezies hybridisiert. Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme erlaubt zwar eine quantitative Bestimmung standardisierter Fleischmischungen von Schwein und Rind, auch von erhitzten Proben, aber bei nahe verwandten Spezies sind Kreuzreaktionen nicht zu vermeiden (23, 24). Zudem ist der zeitliche und materielle Aufwand für DNA-Hybridisierung sehr hoch, auch wenn mit nicht radioaktiven Detektionssystemen gearbeitet wird.

Vorteile der PCR

Durch den Vergleich homologer Gene ist es möglich, speziesspezifische Primer für die Polymerase Chain Reaction (PCR) zu wählen (25). Die entsprechenden Sequenzen müssen jedoch bekannt sein. Unterschiede von einzelnen Basenpaaren in gut konservierten Regionen innerhalb der DNA-Sequenzen erlauben es deshalb, eine Tierart genetisch exakt zu definieren. Kreuzreaktionen können somit ausge-

geschlossen werden, da die zwei kurzen Oligonucleotide, im Vergleich zu genomischen DNA-Sonden, hochspezifisch sind und die PCR entsprechend optimiert werden kann.

DNA ist stabil, langlebig (26) und verändert sich durch enzymatische (Reifung des Fleisches) und thermisch-mechanische Einflüsse, wie sie in der fleischtechnologischen Verarbeitung auftreten, nur in ihrer Fragmentgrösse (23), nicht aber in ihrer Basensequenz. Die durchschnittliche Fragmentgrösse der DNA, isoliert aus hochoverhitzten Fleischproben (121 °C, 20 min), beträgt ca. 400 bp. DNA ist in allen Zellen und Geweben eines Organismus gleich. Mit der PCR-Technik ist es möglich, komplexe Gemische von DNA (mikrobieller, pflanzlicher und tierischer Herkunft) so zu analysieren, dass nur das gesuchte Genfragment amplifiziert wird. Die Methode ist zudem schnell und kostengünstig.

Konzept für die PCR-Entwicklung

Für einige Tierarten sind bereits bestimmte Gensequenzen bekannt und publiziert. Mit Hilfe dieser Informationen liessen sich nun Primer für die artspezifische PCR selektionieren.

Die Sequenzdaten für das Wachstumshormon Gen (gh-Gen) von Schwein (*Sus scrofa*), Rind (*Bos taurus*), Schaf (*Ovis ovis*) und Ziege (*Capra hircus*) (28–31) sowie des Lektin Gens (le1) für Soja (*Glycine max*) (32) wurden verglichen und verschiedene, artspezifische Oligonucleotide synthetisiert. Jedes PCR-System musste optimiert und auf seine tatsächliche Spezifität hin überprüft werden. Um nun wirklich einen speziesspezifischen Assay zu haben, musste die Frage der genotypischen Spezifität durch Analyse von Fleisch verschiedener Rassen und Herkunft beantwortet werden. So wurde für den Nachweis der Art «Schwein» das Fleisch von Wild-, Edel- und Hamshire Plattenscheck-Schwein untersucht. Alsdann konnte mit der Anwendung auf Fleischmischungen, erhitzten Fleischproben, Konserven und Fertigprodukten begonnen werden. Dazu war es jedoch nötig, entsprechende Protokolle für die DNA-Extraktion auszuarbeiten.

Evaluation einer geeigneten DNA-Extraktionsmethode

Die Isolation der DNA stellt den wichtigsten Schritt der Analyse dar. Dabei ist es von Bedeutung, ob man hochmolekulare DNA aus Frischfleisch oder stark degradierte DNA aus erhitzten Fleischprodukten extrahieren will. Die PCR stellt an die Reinheit der DNA höhere Anforderungen als die Hybridisierung, da es sich um eine empfindliche enzymatische Reaktion handelt, die leicht gehemmt werden kann. So hemmt beispielsweise Hämoglobin die PCR in einer Konzentration von bereits 25 µM (1,6 µg/ml) vollständig (33).

Bei der meist gebräuchlichen Methode zur DNA-Isolation werden die Zellen mit Proteinase, in Anwesenheit anionischer Detergentien, lysiert und verdaut, gefolgt von Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (34) (Phenol und/oder Chloroform) oder hohen Salzkonzentrationen (35) mit anschliessender Präzipitation der DNA mit Ethanol. Für die DNA-Extraktion aus Thunfisch wurde ein modifiziertes Protokoll angewendet (36). Aus gesundheitlichen und umweltschützerischen Gründen sollte aber ein Verfahren ohne chlorierte Kohlenwasserstoffe bevorzugt werden. Neuerdings sind auch kommerziell erhältliche DNA-Isolations Kits, basierend auf DNA-bindenden Matrices, erhältlich.

Resultate, Diskussion

DNA liess sich aus frischem, getrocknetem, gekochtem und sterilisiertem Fleisch sowie Haut, Schwarte und Würsten extrahieren. In hoch gereinigten Produkten, wie Gelatine, war es nicht mehr möglich, DNA zu finden (Tabelle 1). Die Konzentration der DNA wurde spektrometrisch bei 260 nm bestimmt und die Qualität (Fragmentgrösse) mittels Agarosegelelektrophorese beurteilt. Für den spezifischen Nachweis von Schweinefleisch konnten zwei PCR-Systeme gefunden werden, wobei sich das Primerpaar, welches ein 352-bp-Fragment amplifiziert (Abb. 1), besser für erhitztes Fleisch eignet, als das, welches ein 740-bp-Fragment amplifiziert. Das PCR-Produkt aller drei Schweinerassen (*Sus scrofa*) liess sich mit dem Restriktionsenzym EcoR1 verdauen (Abb. 2). Die durchschnittliche Grösse der DNA korreliert mit dem Abstand der Amplifikationsprimer. Über längere Zeit hoch erhitztes, frisches Schweinefleisch (121 °C, 30 min) liess sich mit diesem

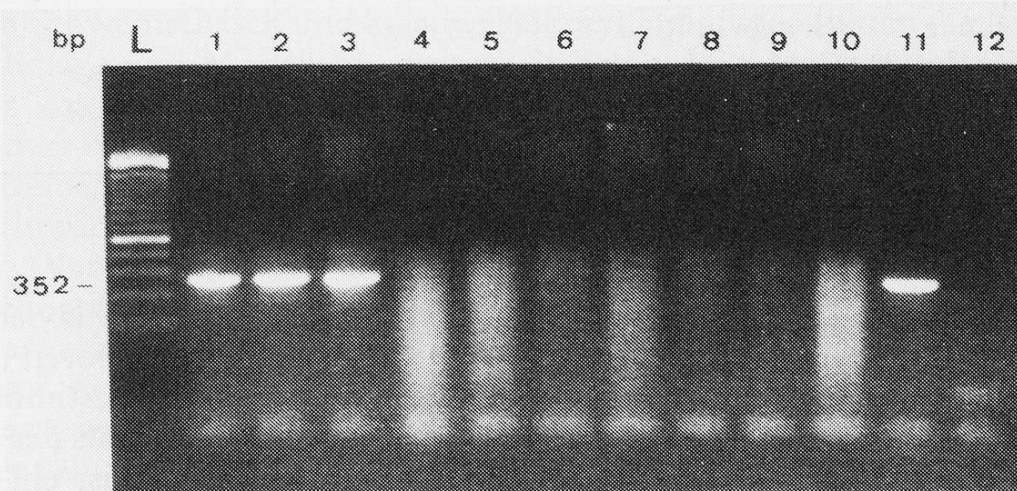


Abb. 1. Analyse von Schweine spezifischen (*Sus scrofa*) Amplifikationsprodukten mittels Agarosegelelektrophorese.

1 = Wildschwein; 2 = Edelschwein; 3 = Hamshire-Schwein; 4 = Huhn; 5 = Truthahn; 6 = Reh; 7 = Hirsch; 8 = Hase; 9 = Pferd; 10 = Ziege; 11 = Schwein (Kontrolle); 12 = Wasser (Negativkontrolle ohne DNA); L = 100 bp Leiter

Tabelle 1. Analyse von Fleischproben mittels *pgh*-PCR (*porcine growth hormone gene*, spezifisch für Schwein)

DNA extrahiert aus:	<i>pgh</i> -PCR
Edelschwein (<i>Sus scrofa</i>)	+
Hamshire-Schwein (<i>Sus scrofa</i>)	+
Wildschwein (<i>Sus scrofa</i>)	+
Schaf (<i>Ovis ovis</i>)	-
Ziege (<i>Capra hircus</i>)	-
Rind (<i>Bos taurus</i> forma domestica)	-
Hirsch (<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>)	-
Reh (<i>Capreolus capreolus capreolus</i>)	-
Pferd (<i>Equus caballus</i>)	-
Hase (<i>Lepus</i>)	-
Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	-
Truthahn (<i>Meleagris gallopava</i>)	-
Soja (<i>Glycine max</i>)	-
Mais (<i>Zea mais</i>)	-
Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	-
Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	-
Bakterien (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	-
Salami	+
Cervelas	+
Schweinswürstchen	+
Pfefferterrine	+
Fleischbouillon (Instant)	+
Erbsensuppe mit Schinken (Pulver)	+
Erbsensuppe mit Speck (Pulver)	+
Fleischmischung 2% Schwein in Rind (121 °C, 10 min)	+
Schweinefleisch (121 °C, 30 min)	+
Schweinefleisch (121 °C, 45 min)	-
Gelatine (serologisch Schwein)	-

System noch nachweisen. Schweinefleisch, das noch länger autoklaviert wurde (121 °C, 45 min) oder vor der Erhitzung mehrere Monate tiefgefroren (-20 °C), bisweilen mit Essig mariniert wurde, ist im Moment nicht mehr bestimmbar. Die durchschnittliche Grösse der isolierten DNA war kleiner (Abb. 2) als der Abstand der Primer. Für den Nachweis solch stark degradierter DNA muss ein weiteres spezifisches Primerpaar gefunden werden, das ein PCR-Fragment in der Grössenordnung von 100 bp amplifizieren kann. Es wurden weitere Primer für den Nachweis von Rind, Schaf, Ziege und Soja getestet. Das System für den Sojanachweis erwies sich als spezifisch für Extrakte aus Sojaprotein. Ein weiteres System erfasst neben Schaf und Ziege auch Reh und Gemse; Schaf kann aber von Ziege mittels Restriktionsverdauung unterschieden werden.

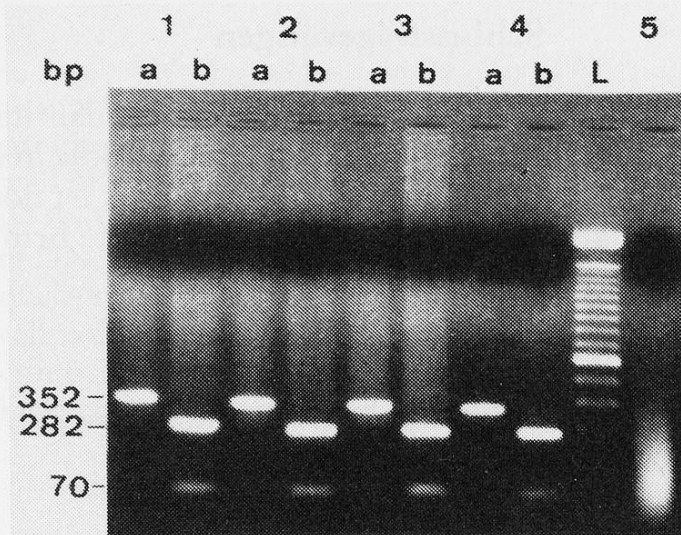


Abb. 2. Restriktionsanalyse von 352 bp PCR-Produkten mit *EcoRI* mittels Agarosegelelektrophorese.
 a = unverdaut, b = verdaut mit *EcoRI*
 1 = Wildschwein; 2 = Edelschwein; 3 = Hamshire-Schwein; 4 = Schwein (Kontrolle); L = 100 bp Leiter; 5 = DNA isoliert aus Schweinefleisch (erhitzt auf 121 °C, 30 min)

Weiterentwicklung

Das Ziel der Arbeit ist es, für alle relevanten Tierarten ein spezifisches Nachweissystem auf molekularer Grundlage mittels PCR auszuarbeiten. Die Bestimmung von Schweinefleisch und Soja in erhitzten Fleischprodukten dient als Erfahrungsgrundlage und Modell für weitere Systeme. Von grossem Interesse ist der Nachweis von exotischen Tierarten wie Springbock, Känguruh und Antilopen. Insbesondere sollen hoch erhitzte Fleischprodukte mit dieser Methode analysiert werden können. Ein direkter Vergleich der PCR-Methode mit ELISA (Cortecs-Kit), Ouchterlony, DNA-Hybridisierung und PAGIF soll die Grenzen und Möglichkeiten (Vorteile) der PCR aufzeigen. Die Nukleotid-Sequenzen der Gene für das mitochondrial codierte Cytochrom b und die 12S rRNA sind für viele Vertebraten, darunter Säuger, Vögel und Fische, bekannt. Für die Unterscheidung von Schaf und Ziege wurde das Hämoglobingen vorgeschlagen (24). Zur Differenzierung nahe verwandter Tierarten kann ein gemeinsames PCR-Fragment sequenziert (direct sequencing) (40) und Einzelbasenunterschiede für die weitere Analyse (PCR, Restriktionsanalyse) verwendet werden (36–38). Für die Unterscheidung von Rassen und Stämmen könnten Methoden wie das DNA-Fingerprinting (41) weitere Informationen liefern. Das Problem der Quantifizierung der Resultate kann mittels internem Standard gelöst werden. Eine Vereinfachung des DNA-Extraktionsprotokolls und der Detektion der PCR-Produkte wird die routinemässige Anwendung erleichtern.

Schlussfolgerungen

Mit der PCR steht eine schnelle, spezifische und halbquantitative Methode für den Nachweis und die Differenzierung von Tierarten und Soja in Fleischprodukten zur Verfügung. Das diagnostische Potential dieser Technik ist noch sehr gross und wird auch in der Fleischanalytik entscheidende Fortschritte bringen.

Dank

Wir danken dem Migros-Genossenschafts-Bund für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation und für die gute Zusammenarbeit.

Zusammenfassung

Strategien zur Anwendung der Polymerase Chain Reaction (PCR) in der Fleischanalytik für den spezifischen, halbquantitativen Nachweis von Schwein (*Sus scrofa*) in hitzebehandelten Fleischprodukten sowie des Nachweises von Soja (*Glycine max*) werden vorgeschlagen. Das Verfahren beruht auf der Isolation von DNA aus Fleischproben und Sojaprodukten, gefolgt von der Bestimmung der durchschnittlichen Grösse der DNA-Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese mit anschliessender PCR-Analyse. Aufgrund bekannter DNA-Sequenzdaten für die Wachstumshormongene von Schwein, Rind (*Bos taurus*), Schaf (*Ovis ovis*) und Ziege (*Capra hircus*) sowie des Lektin-Gens (*le1*) für Soja konnten Unterschiede in den Basensequenzen evaluiert werden, die sich eignen, um Spezies spezifische Primer für die PCR zu definieren. Die Methode eignet sich für den spezifischen Nachweis degradierter Schweine-DNA, isoliert aus hochoverhitzten Fleischmischungen (Schwein/Rind).

Résumé

Des stratégies pour l'application de la technique dite de «Polymerase Chain Reaction (PCR)» dans l'analyse des viandes sont proposées et, en particulier, pour la détection spécifique et semiquantitative de viande de porc (*Sus scrofa*) dans un mélange thermisé de viandes ainsi que pour l'identification du soja (*Glycine max.*). La méthode est fondée sur l'isolation d'ADN provenant de différentes viandes et de produits à base de soja, suivie d'une détermination de la grandeur des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et d'une analyse PCR. A partir de séquences d'ADN connues pour les gènes des hormones de croissance chez le porc, le veau (*Bos taurus*), le mouton (*Ovis ovis*) et la chèvre (*Capra hircus*), ainsi que pour le gène de la lectine (*le1*) du soja, on a pu évaluer des différences dans les séquences de bases qui se prêtent à la détermination de «primers» spécifiques aux espèces; «primers» qui sont utilisés dans l'analyse PCR.

La méthode se prête à la détection spécifique d'ADN porcine dégradée, dans des mélanges thermisés de viandes (porc/veau).

Summary

Strategies for the application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to meet analytical questions for the specific and semiquantitative detection of pork (*Sus scrofa*) in heat-treated meat products, as well as the detection of soya (*Glycine max*) are proposed. The procedure involves isolation of DNA from meat samples and soya products followed by a determination of the average size of DNA fragments by agarose gel electrophoresis and PCR analysis. Based on the published nucleotide sequences of the porcine, bovine, ovine and caprine growth hormone gene as well as the lectin gene for soya, sequence differences were used to evaluate pairs of species specific primers for PCR. This method was used for the specific determination of degraded pork-DNA isolated from autoclaved meat mixtures (pork/beef).

Literatur

1. Hofmann, K. und Blüchel E.: Tierartbestimmung von hochehitztem Fleisch und Fleischkonserven durch isoelektrische Fokussierung und empfindlicher Silberfärbung. Fleischwirtsch. 72, 85–89 (1992).
2. Bauer, F.: Elektrophoretische Tierartenidentifizierung bei rohem und erhitztem Fleisch. Ernährung/Nutrition 14, 357–361 (1990).
3. Rehbein, H.: Electrophoretic techniques for species identification of fishery products – Review article. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 191, 1–10 (1990).
4. Jemmi, T. und Schlosser, H.: Tierartbestimmung bei erhitztem Fleisch von Haus- und Wildwiederkäuern mittels isoelektrischer Fokussierung. Fleischwirtsch. 71, 1191–1195 (1991).
5. Hayden, A.R.: Use of antisera to heat-stable antigens of adrenals for species identification in thoroughly cooked beef sausages. J. Food Sci. 46, 1810–1813 (1981).
6. Gnanasambandam, R. and Zayas, J.F.: Functionality of wheat germ protein in comminuted meat products as compared with corn germ and soy proteins. J. Food Sci. 57, 829–833 (1992).
7. McCormick, R.J., Collins, D.A., Field, R.A. and Moore, T.D.: Identification of meat from game and domestic species. J. Food Sci. 57, 516–520 (1992).
8. Hitchcock, C.H.S. and Crimes, A.A.: Methodology for meat species identification: a review. Meat Sci. 15, 215–224 (1985).
9. Patterson, R.L.S. and Jones, S.J.: Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. Analyst 115, 501–506 (1990).
10. Hofmann, K.: Grundlegende Probleme bei der Identifizierung der Tierart von Muskelfleisch mit Hilfe elektrophoretischer Methoden. Fleischwirtsch. 66, 91–98 (1986).
11. Hofmann, K. und Blüchel, K.: Bestimmung der Tierart von rohem Muskelfleisch anhand der Myoglobinemuster im pH-Gradienten-Gel. Fleischwirtsch. 66, 916–921 (1986).
12. Bauer, F. und Hofmann, K.: Elektrophoretische Tierartenidentifizierung bei erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen. Fleischwirtsch. 69, 419–422 (1989).
13. Rehbein, H., Kress, G. und Kündiger, R.: Bestimmung der Fischart in Dauerkonserven durch isoelektrische Fokussierung. Fleischwirtsch. 70, 706–709 (1990).
14. Kang'ethe, E.K. and Gathuma, J.M.: Species identification of autoclaved meat samples using antisera to thermostable muscle antigens in an enzyme immunoassay. Meat Sci. 19, 265–270 (1987).

15. *Bandman, E. and Zdanis, D.*: An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. *Meat Sci.* **22**, 1–19 (1988).
16. *Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B. and Johnston, R.W.*: Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 406–409 (1988).
17. *Marín, M.L., Casas, C., Cambero, M.I. and Sanz, B.*: Study of the effect of heat (treatments) on meat protein denaturation as determined by ELISA. *Food Chem.* **43**, 147–150 (1992).
18. *Sherikar, A.T., Khot, J.B., Jayarao, B.M. and Pillai, S.R.*: Use of species-specific antisera to adrenal heat-stable antigens for the identification of raw and cooked meats by agar gel diffusion and counter immunoelectrophoretic techniques. *J. Sci. Food Agric.* **44**, 63–73 (1988).
19. *Cutrufelli, M.E., Mageau, R.P. and Schwab, B.*: Development of a deer rapid identification field test (DRIFT) by modified agar-gel immunodiffusion. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **75**, 74–76 (1992).
20. *Baur, C., Teifel-Greding, J. und Liebhardt, E.*: Spezifizierung hitzedenaturierter Fleischproben durch DNA-Analyse. *Arch. Lebensmittelhyg.* **38**, 172–174 (1987).
21. *Wintero, A.K., Thomsen, P.D. and Davies, W.*: A comparison of DNA hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Sci.* **27**, 75–85 (1990).
22. *Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T. and Kato S.*: Species Identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Sci.* **27**, 119–128 (1990).
23. *Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D.*: Species differentiation of heated meat products by DNA Hybridisation. *Meat Sci.* **30**, 221–234 (1991).
24. *Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D.*: Differentiation of closely related species by DNA-Hybridization. *Meat Sci.* **30**, 359–366 (1991).
25. *Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.*: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
26. *Pääbo, S., Higuchi, R.G. and Wilson, A.C.*: Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. *J. Biol. Chem.* **264**, 9709–9712 (1989).
27. *Carr, S.M. and Marshall, H.D.*: Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 48–52 (1991).
28. *Vize, P.D. and Wells, J.R.E.*: Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene. *Gene* **55**, 339–344 (1987).
29. *Gordon, D.F., Quick, D.P., Erwin, C.R., Donelson, J.E. and Maurer, R.A.*: Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **33**, 81–95 (1983).
30. *Orian, J.M., O'Mahoney, J.V. and Brandon, M.R.*: Cloning and sequencing of the ovine growth hormone gene. *Nucleic Acid Res.* **16**, 9046 (1988).
31. *Kioka, N., Manabe, E., Abe, M., Hashi, H., Yato, M., Okuno, M., Yamano, Y., Sakai, H., Komano, T., Utsumi, K. and Iritani, A.*: Cloning and sequencing of goat growth hormone gene. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1583–1587 (1989).
32. *Vodkin, L.O., Rhodes, P.R. and Goldberg, R.B.*: cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell* **34**, 1023–1031 (1983).

33. *Ruano, G., Pagliaro, E.M., Schwartz, T.R., Lamy, K., Messina, D., Gaensslen, R.E. and Lee, H.C.:* Heat-soaked PCR: An efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis. *BioTechniques* **13**, 266–274 (1992).
34. *Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.:* Molecular cloning; A laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA 1989.
35. *Ross, J.A., Nelson, G.B. and Holden, K.L.:* DNA isolation from small tissue samples using salt and spermine. *Nucleic Acid Res.* **19**, 6053 (1991).
36. *McVeigh, Bartlett, S.E. and Davidson, W.S.:* Polymerase chain reaction/direct sequence analysis of the cytochrome b gene in *Salmo salar*. *Aquaculture* **95**, 225–233 (1991).
37. *Bartlett, S.E. and Davidson, W.S.:* Identification of *Thunnus* tuna species by the Polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 309–317 (1991).
38. *Bartlett, S.E. and Davidson, W.S.:* FINS (Forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *BioTechniques* **12**, 408–411 (1992).
39. *Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. and Wilson, A.C.:* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6196–6200 (1989).
40. *Kocher, T.D.:* PCR, Direct sequencing and the comparative approach. *PCR Methods Applic.* **1**, 217–221 (1992).
41. *Kirby, L.T.:* DNA Fingerprinting – An Introduction. Stockton Press, New York 1990.

R. Meyer
 U. Candrian
 Universität Bern
 Institut für Biochemie
 Abteilung Lebensmittelchemie
 Freiestrasse 3
 CH-3012 Bern

PD Dr. J. Lüthy
 Bundesamt für Gesundheitswesen
 Abteilung Lebensmittelwissenschaft
 Postfach
 CH-3000 Bern 14