

DIN EN 17882



ICS 07.080; 67.020; 67.120.10

Einsprüche bis 2022-09-08

Entwurf

**Lebensmittelauthentizität –
DNA-Barcoding von Fleisch und Fleischerzeugnissen von Säugetieren
und Vögeln anhand definierter mitochondrialer Cytochrom b und
Cytochrom c Oxidase-I-Gensegmente;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17882:2022**

Food authenticity –

DNA barcoding of meat and meat products derived from mammalia and poultry using
defined mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase I gene segments;
German and English version prEN 17882:2022

Authenticité des aliments –

Codage à barres de l'ADN des poissons et des produits de la pêche à l'aide de segments
définis du gène du cytochrome b mitochondrial et du cytochrome c oxydase I;
Version allemande et anglaise prEN 17882:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-07-08 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 41 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17882:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-08-02-02 AK „Molekularbiologische Speziesanalytik“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Lebensmittelauthentizität – DNA-Barcoding von Fleisch und Fleischerzeugnissen von Säugetieren und Vögeln anhand definierter mitochondrialer Cytochrom b und Cytochrom c Oxidase-I-Gensegmente

Food authenticity – DNA barcoding of meat and meat products derived from mammalia and poultry using defined mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase I gene segments

Authenticité des aliments – Codage à barres de l'ADN des poissons et des produits de la pêche à l'aide de segments définis du gène du cytochrome b mitochondrial et du cytochrome c oxydase I

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	7
5 Chemikalien und Hilfsmittel	7
5.1 Allgemeines	7
5.2 PCR-Reagenzien	8
6 Prüfeinrichtung	8
7 Durchführung	9
7.1 Probenvorbereitung	9
7.2 DNA-Extraktion	9
7.3 PCR	9
7.3.1 Allgemeines	9
7.3.2 PCR-Ansatz	9
7.3.3 Temperatur-Zeit-Programm	10
7.3.4 PCR-Kontrollen	10
8 Bewertung	11
8.1 Bewertung der PCR-Produkte	11
8.2 Bewertung der PCR-Ergebnisse	11
8.3 Sequenzierung der PCR-Produkte	11
8.4 Bewertung der Sequenzdaten	12
8.5 Abgleich der Sequenz mit öffentlichen Datenbanken	12
8.5.1 Allgemeines	12
8.5.2 Abgleich der <i>cytb</i> - und/oder <i>COI</i> -DNA Sequenzen mit GenBank	13
8.5.3 Sequenzvergleich von <i>COI</i> -DNA-Sequenzen mit BOLD	13
9 Interpretation von Ergebnissen der Datenbankabfrage	14
10 Validierungsstatus und Leistungskriterien	15
10.1 Ringversuch zur Identifizierung von Fleischspezies durch Analyse von <i>cytb</i> - und <i>COI</i> -Sequenzen	15
11 Prüfbericht	19
Literaturhinweise	20

Tabellen

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der <i>cytb</i> -Genregion [1]	8
Tabelle 2 — Oligonukleotide für die Amplifikation der <i>COI</i> -Genregion [2]	8
Tabelle 3 — Komponenten für die <i>cytb</i> -PCR und die <i>COI</i> -PCR	9
Tabelle 4 — Temperatur-Zeit-Programm für die <i>cytb</i> -PCR bzw. die <i>COI</i> -PCR	10
Tabelle 5 — Validierungsdaten des <i>cytb</i> -Ringversuchs	15
Tabelle 6 — Auswertung der Ergebnisse des <i>cytb</i> -Ringversuchs in Abhängigkeit von der Fleischspezies	16
Tabelle 7 — Validierungsdaten des <i>COI</i> -Ringversuchs	16
Tabelle 8 — Auswertung der Ergebnisse des <i>COI</i> -Ringversuchs in Abhängigkeit von der Fleischspezies	16

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17882:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Die betrügerische Fälschung von Fleisch in Lebensmitteln gefährdet sowohl die öffentliche Sicherheit als auch den Handel. Sie kann sich auf diejenigen Personen auswirken, die sich an ethnologische Ernährungsregeln halten, sowie auf die wirtschaftliche Entwicklung und die soziale Stabilität. In den letzten drei Jahrzehnten hat im Handel mit Lebensmitteln ein Globalisierungsprozess stattgefunden. Die Handelswege für Fleisch werden immer länger und komplexer, sodass für die Sicherstellung der Lebensmittelsicherheit zuverlässige Methoden zur Rückverfolgbarkeit benötigt werden. Die korrekte Kennzeichnung von Lebensmitteln ist die Voraussetzung für sichere Fleischerzeugnisse und fairen Handel.

Die Erarbeitung von einheitlichen und standardisierten Verfahrensvorschriften zur Authentifizierung von Fleischerzeugnissen ist notwendig, um verlässliche Methoden für den Nachweis von potentiellern Lebensmittelbetrug („Food Fraud“) zu schaffen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren für die Identifizierung von Fleisch und Fleischerzeugnissen von Säugetieren und Vögeln auf Gattungs- oder Speziesebene.

Die Identifizierung der Fleischspezies erfolgt durch PCR-Amplifikation entweder eines Segments des mitochondrialen Cytochrom-b-Gens (*cytb*) [1] oder des Cytochrom-c-Oxidase-I-Gens (*COI*) [2] oder von beiden, gefolgt von der Sequenzierung der PCR-Produkte und einem anschließenden Datenbankabgleich der Sequenzen [3] [4]. Die Vorgehensweise ermöglicht die Identifizierung einer großen Anzahl häufig konsumierter aber auch exotischer Fleischspezies in Lebensmitteln.

Die Entscheidung, ob das *cytb*- oder das *COI*-Gensegment oder beide Segmente für die Fleischidentifizierung herangezogen werden, hängt von der deklarierten Fleischspezies, der Anwendbarkeit des PCR-Verfahrens für die Fleischspezies und der Verfügbarkeit vergleichbarer Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken ab.

Dieses Verfahren wurde erfolgreich an rohem Fleisch validiert, Laborerfahrungen zeigen jedoch, dass es auch bei verarbeiteten Fleischerzeugnissen angewendet werden kann.

Für die Untersuchung stark verarbeiteter Lebensmittel mit stark degradierter DNA, bei denen die Fragmentlängen nicht für eine Amplifikation der Zielsequenzen ausreichen, ist dieses Dokument in der Regel nicht geeignet. Außerdem ist es nicht anwendbar auf zusammengesetzte Fleischprodukte, die mehr als einer Fleischspezies enthalten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 16577, *Molecular biomarker analysis — Terms and definitions*

ISO 20813, *Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) — General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16577 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

3.1

Alignment

Prozess oder Ergebnis eines Abgleichs der Nukleotidreste zweier oder mehrerer biologischer Sequenzen, um eine maximale Übereinstimmung zu erzielen

[QUELLE: BLAST Glossary]

3.2

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool [3]

auf Geschwindigkeit optimierter Algorithmus zum Sequenzvergleich, der zum Durchsuchen von Sequenzdatenbanken nach optimalen lokalen Alignments mit einer Eingabesequenz genutzt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Mit dem Algorithmus werden Alignments durch Maximierung eines Wertes für lokale Übereinstimmungen, dem „maximum signal pair (MSP) score“ oder „high scoring signal pair (HSP) score“, optimiert.

3.3

BOLD

Barcode of Life Data Systems [4]

EDV-Arbeitsplattform für die Erfassung, Speicherung, Analyse und Veröffentlichung von DNA-Barcode-Datensätzen

Anmerkung 1 zum Begriff: Durch die Zusammenführung von Daten zu Molekularbiologie, Morphologie und geographischer Verbreitung wird eine traditionelle bioinformatische Lücke überwunden. BOLD ist für jeden Wissenschaftler mit Interesse am DNA-Barcoding frei zugänglich. Durch die Bereitstellung spezialisierter Dienste fördert BOLD die Zusammenstellung von Datensätzen, die den üblichen Anforderungen für eine Barcode-Angabe in den weltweiten Datenbanken entsprechen. Aufgrund der webbasierten Bereitstellung und des flexiblen Datensicherheitsmodells ist diese Online-Plattform zudem gut geeignet, um Projekte groß angelegter wissenschaftlicher Netzwerke zu unterstützen.

[QUELLE: BOLDSYSTEMS About Us]

3.4

FASTA-Format

textbasiertes Format zur Darstellung von Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen, welches mit einer einzeiligen Beschreibung beginnt, der Zeilen mit Sequenzdaten folgen.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Beschreibungszeile („define“) wird am Anfang von den Sequenzdaten durch ein „Größer-als“-Zeichen („>“) abgegrenzt.

BEISPIEL Eine Beispielsequenz im FASTA-Format ist im Folgenden dargestellt:

> Probe_04_cytb

```
ATGGCCAGCCTCCGAAAACTCATCCCCTTCTAAAGATTGCTAATGATGCATTAGTAGACCTTCTGCCCCCTCTAACCTCTCAA-  
CATTATGAACTTCGGGTCTCTCCTAGGCCTCTGCTTAGCCGCCCAAATCTTAACAGGACTATTTCTAGCGATACATTATACCG-  
CAAACGTCGAGATAGCTTCTCATCCGTCGTACACATCTGCCGCGACGTAAATTACGGATGACTAATCCGCAACATACACGCCAA-  
CGGCGCTTCTTTCTTCTTCATCTGCCTCTACCTACACATTGCACGAGGCCTATATTACGGCTCCTACTTATTCATAGAGACCTGAAA-  
CATTGAGTTGTACTATTCCTTTTAGTAATAATGACCGCCTTCGTAGGCTACGTCCTCCCT
```

[QUELLE: BLAST Topics, modifiziert]

3.5

GenBank

umfangreiche öffentliche Datenbank, z. B. für genetische Sequenzen [5]

Anmerkung 1 zum Begriff: GenBank ist Teil der International Nucleotide Sequence Database Collaboration, welche die DNA DataBank of Japan (DDBJ), das European Nucleotide Archive (ENA) und die GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) umfasst. Diese drei Organisationen tauschen täglich Daten aus.

3.6

Identität

Ausmaß, in dem zwei (Nukleotid- oder Aminosäure-)Sequenzen die gleichen Reste an den gleichen Positionen in einem Alignment haben, oftmals als prozentualer Anteil angegeben

Anmerkung 1 zum Begriff: In der Datenbank BOLD wird statt der Benennung „identity“ (Identität) die Benennung „similarity“ (Ähnlichkeit) verwendet.

[QUELLE: BLAST Glossary]

3.7

NCBI

National Center for Biotechnology Information

Einrichtung, die molekularbiologische Datenbanken (z. B. GenBank) betreibt und die BLAST-Sammlung bereitstellt

3.8

Nukleotid-Sammlung

nr/nt

nicht-redundante Datenbank, die aus GenBank-Sequenzen besteht, bei denen identische Sequenzen zu einem Eintrag zusammengefasst wurden

3.9

Eingabesequenz

Sequenz (oder eine andere Art von Suchanfrage), mit der alle in einer Datenbank enthaltenen Einträge abzugleichen sind

[QUELLE: BLAST Glossary]

3.10

Abdeckung der Eingabesequenz

prozentualer Anteil der Eingabesequenz, welcher durch das Alignment mit der Datenbanksequenz abgedeckt wird

[QUELLE: BLAST Help]

4 Kurzbeschreibung

Mit einem geeigneten Verfahren wird DNA aus Fleisch und Fleischerzeugnisse von Säugetieren und Vögeln extrahiert. Segmente von etwa 359 Basenpaaren des *cytb*-Gens und/oder von etwa 540 Basenpaaren des *COI*-Gens werden durch PCR amplifiziert. Dann wird mit einer geeigneten DNA-Sequenzierungsmethode (z. B. Sanger-Sequenzierung) die Nukleotidsequenz des PCR-Produkts ermittelt. Die Sequenz wird durch den Vergleich mit Sequenzeinträgen in Datenbanken bewertet, was eine Zuordnung der Sequenz zu einer Fleischspezies oder -gattung anhand der Identitätsübereinstimmung mit den dort eingetragenen Sequenzen ermöglicht.

5 Chemikalien und Hilfsmittel

5.1 Allgemeines

Falls nicht anders festgelegt, werden für die Analyse ausschließlich Reagenzien mit einem für die Molekularbiologie anerkannten Reinheitsgrad sowie destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser vergleichbarer Qualität nach ISO 20813 verwendet. Hinsichtlich der Labororganisation siehe ISO 20813.

5.2 PCR-Reagenzien

5.2.1 Thermostabile DNA-Polymerase (für die Hot-Start-PCR)¹

5.2.2 PCR-Reaktionspuffer (mit MgCl₂ oder mit separater MgCl₂-Lösung)¹

5.2.3 Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)²

5.2.4 Oligonukleotide (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2)

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der *cytb*-Genregion [1]

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids
cytB-1	5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'
cytB-2	5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'

Tabelle 2 — Oligonukleotide für die Amplifikation der *COI*-Genregion [2]

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids
CO1e-H	5'-CCA GAG ATT AGA GGG AAT CAG TG-3'
CO1f-L	5'-CCT GCA GGA GGA GGA GAY CC-3'

5.2.5 Agarose

5.2.6 Geeigneter DNA-Längenstandard für die Beurteilung der Amplikonlänge

6 Prüfeinrichtung

Zusätzlich zur gewöhnlichen Laborausstattung werden folgende Geräte benötigt:

6.1 UV-Spektralphotometer oder Fluorometer zur Bestimmung der DNA-Konzentration

6.2 Thermocycler

6.3 Gelelektrophoresegerät

6.4 Geldokumentationssystem

6.5 DNA-Sequenzierungsautomat

1 Im Ringversuch wurde für die *cytb*-Amplifikation der Maxima® Hot Start PCR Master Mix (2 x) der Fermentas GmbH (gebrauchsfertige PCR-Puffer-Lösung mit thermostabiler DNA-Polymerase) und für die *COI*-Amplifikation die BIO-TAQ DNA-Polymerase von Bioline mit 10x-Reaktionspuffer und separater MgCl₂-Lösung verwendet. Neben der empfohlenen BIO-TAQ DNA-Polymerase wurden im Ringversuch auch andere Mastermixe und Polymerasen erfolgreich eingesetzt.

2 Desoxynukleosidtriphosphate können auch Teil eines kommerziellen PCR-Mastermixes sein.

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

Es sollte sichergestellt sein, dass die zur DNA-Extraktion verwendete Einwaage repräsentativ für die Laborprobe ist. Bei zusammengesetzten Proben (z. B. Fertigmahlzeiten) müssen einzelne Fleischstücke separiert und analysiert werden. Bei der Analyse von Proben, die aus mehreren Stücken bestehend, werden Einwaagen für jede vermeintliche Fleischspezies entnommen und separat analysiert. Um das Risiko der Amplifikation von anhaftendem Fremdmaterial zu minimieren, darf die Untersuchungsprobe nicht an der Oberfläche der Laborprobe entnommen werden. Für weitere Informationen bezüglich der Probenvorbereitung siehe ISO 20813.

7.2 DNA-Extraktion

Für die Extraktion von DNA aus der Untersuchungsprobe sollten die in ISO 21571 beschriebenen allgemeinen Anleitungen und Maßnahmen befolgt werden, siehe ISO 20813. Es wird empfohlen, eins der in ISO 21571:2005³, Anhang A, beschriebenen DNA-Extraktionsverfahren anzuwenden. Alternativ können handelsübliche Kits für die Extraktion und Reinigung der DNA verwendet werden.

7.3 PCR

7.3.1 Allgemeines

Die Primer, die für die Amplifikation des Abschnitts aus den konservierten Bereichen des mitochondrialen *cytb*-Gens von Wirbeltieren, einschließlich einer variablen Region, verwendet wurden, sind universelle Primer. [1].

Die Primer, die zur Amplifikation des Abschnitts des mitochondrialen *COI*-Gens verwendet wurden, wurden für die Amplifikation eines Segments der 5'-Region des *COI*-Gens von Fleisch entworfen [2].

7.3.2 PCR-Ansatz

Das Verfahren wurde für ein Gesamtvolumen von 25 µl je PCR validiert. Für die *cytb*-PCR und die *COI*-PCR sollten die in Tabelle 3 angegebenen Reagenzien verwendet werden.

Die Reagenzien werden bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und sollten vor der Verwendung kurz zentrifugiert werden. Es wird ein PCR-Reagenziengemisch hergestellt, das bis auf das DNA-Extrakt alle PCR-Komponenten in den angegebenen Konzentrationen enthält. Die Menge des PCR-Reagenziengemisches hängt vom Gesamtvolumen je PCR sowie von der Gesamtzahl der Reaktionen ab und enthält eine ausreichende Pipettierreserve.

Positive PCR-Ergebnisse werden bei der Verwendung einer DNA-Konzentration von ungefähr 1 ng/µl Reaktionslösung erwartet. Falls es notwendig ist, das PCR-Ergebnis zu verbessern, darf die eingesetzte DNA-Menge erhöht werden (z. B. um die Ausbeute des PCR-Produkts zu erhöhen) oder verringert werden (z. B. um eine PCR-Inhibition zu vermeiden).

Tabelle 3 — Komponenten für die *cytb*-PCR und die *COI*-PCR

Reagens (Stammlösung)	Endkonzentration in der Reaktionslösung
PCR-Puffer	1-fach
MgCl ₂ ^a	1,5 mmol/l
dNTP-Mix ^a	0,2 mmol/l je dNTP

³ EN ISO 21571:2005 wird derzeit durch EN ISO 21571:2005/A1:2013 geändert.

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Reagens (Stammlösung)	Endkonzentration in der Reaktionslösung
Vorwärts-Primer ^b	500 nmol/l
Rückwärts-Primer ^b	500 nmol/l
Hot-Start-DNA-Polymerase	0,5 Einheiten bis 1 Einheit
Wasser	auf Endvolumen auffüllen
Proben-DNA	etwa 1 ng/µl
^a Das Reagens wird nur verwendet, falls nicht bereits im PCR-Puffer enthalten.	
^b Siehe Tabelle 1 für die <i>cytb</i> -PCR und Tabelle 2 für die <i>COI</i> -PCR.	

Die PCR-Reagenzien werden gemischt, das Gemisch wird kurz zentrifugiert und in die einzelnen Reaktionsansätze aufgeteilt. Die zu untersuchenden DNA-Extrakte bzw. PCR-Kontrollen (siehe 7.3.3) werden in die verschiedenen Reaktionslösungen pipettiert. Die Reaktionsansätze werden in den Thermocycler überführt und das Temperatur-Zeit-Programm wird gestartet.

Für weiterführende Informationen zu PCR-Kontrollen siehe auch ISO 20813.

7.3.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle 4 dargestellte Temperatur-Zeit-Programm wurde in den Ringversuchen erfolgreich angewendet. Die Verwendung von abweichenden Reaktionsbedingungen und PCR-Cyclern kann eine gezielte Optimierung erfordern. Die Zeit bis zur ersten Denaturierung hängt dabei von der verwendeten Hot-Start-DNA-Polymerase ab.

Tabelle 4 — Temperatur-Zeit-Programm für die *cytb*-PCR bzw. die *COI*-PCR

Schritt	Parameter		Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Erste Denaturierung/Aktivierung der Hot-Start-DNA-Polymerase		95 °C	15 min	1
2	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	40 s	35
		Primeranlagerung	50 °C	80 s	
		Elongation	72 °C	80 s	
3	Abschließende Elongation		72 °C	3 min	1

Nach Abschluss der PCR werden die Proben bis zur weiteren Untersuchung im Kühlschrank gelagert.

7.3.4 PCR-Kontrollen

Zusätzlich zu den Reaktionsansätzen für die zu analysierende Proben-DNA müssen eine PCR-Reagenzienkontrolle sowie eine negative Extraktionskontrolle (siehe ISO 20813) durchgeführt werden.

Eine positive DNA-Zielkontrolle (siehe ISO 20813) kann hilfreich sein für den Nachweis, dass mit der PCR die Zielsequenz amplifiziert werden kann. Als Material für die Positivkontrolle kann genomische DNA, die von einer bekannten Fleischspezies extrahiert wurde, oder ein verfügbares Plasmid, das die Zielsequenz enthält, verwendet werden.

Falls beide Zielsequenzen einer Probe nicht amplifiziert werden können, kann es hilfreich sein, eine Inhibition der PCR mit Hilfe einer Inhibitionskontrollreaktion (siehe ISO 20813) auszuschließen. Dies kann entweder

durch Verdünnen der Proben-DNA oder durch Verwenden eines internen Nachweissystems zur Inhibitionskontrolle erfolgen.

Bezüglich weiterer PCR-Kontrollen siehe ISO 20813.

8 Bewertung

8.1 Bewertung der PCR-Produkte

Beispielsweise durch Agarose-Gelelektrophorese kann das PCR-Produkt bewertet und dessen Qualität und Quantität abgeschätzt werden.

Die Gelelektrophorese von DNA in Agarosegel ist ein molekularbiologisches Standardverfahren. Deshalb werden nur allgemeine Bedingungen vorgeschlagen, die von jedem Laboratorium angepasst werden müssen.

4 µl bis 10 µl jedes PCR-Produkts werden in beispielsweise einem Agarosegel von geeigneter Konzentration [z. B. 1 % bis 2 % (w/v)] aufgetrennt und mit einem Geldokumentationssystem ausgewertet. Zum Größenvergleich wird in einer Spur ein geeigneter DNA-Größenstandard mitgeführt. Bei der *cytb*-PCR sollte nach der Gelelektrophorese ein Produkt von etwa 359 bp und bei der *COI*-PCR ein Produkt von etwa 540 bp gut sichtbar sein.

Weder für die PCR-Reagenzienkontrolle noch für die negative Extraktionskontrolle sollten Amplikons sichtbar sein. Bei der positiven DNA-Zielkontrolle sollten PCR-Produkte von erwarteter Größe sichtbar sein.

8.2 Bewertung der PCR-Ergebnisse

Die *cytb*-PCR und/oder die *COI*-PCR kann/können ein positives oder ein negatives Ergebnis bezüglich der Amplifikation der Zielsequenz(en) liefern.

Abhängig vom Ergebnis der PCR ist im nächsten Schritt Folgendes zu beachten:

- Wenn die Probe ein positives Ergebnis für eine oder beide Zielsequenz(en) (*cytb* und/oder *COI*) ergibt, sollte als nächster Schritt die Sequenzierung eines oder beider PCR-Produkte(s) durchgeführt werden (siehe 8.3).
- Wenn die Probe ein negatives Ergebnis für beide Zielsequenzen ergibt, ist die Durchführung einer Inhibitionskontrolle notwendig (siehe EN ISO 24276 sowie 7.3.4). Wenn keine Inhibition festgestellt wird, kann es möglich sein, dass:
 - beide PCR-Systeme keine ausreichende Übereinstimmung mit der Zielsequenz der DNA, die aus der zu analysierenden Fleischspezies extrahiert wurde, aufweisen. In diesem Fall ist eine Speziesidentifizierung der Probe mit diesem Verfahren nicht möglich und es dürfen Untersuchungen mit anderen universellen Primerpaaren (d. h. 16S rRNA-Primer) durchgeführt werden; oder
 - die extrahierte DNA in degradiert Form oder in einer für die PCR nicht ausreichenden Menge vorliegt.

ANMERKUNG 1 Die Primerpaare der PCR-Systeme liefern für einige Fleischspezies keine Amplikons der Zielsequenzen. Beispiele sind im Barcoding Table of Animal Species [6] aufgeführt.

ANMERKUNG 2 Weitere universelle Primerpaare sind in der Literatur beschrieben, z. B. 16S-Gen für ribosomale RNA, 12S-Gen für ribosomale RNA [2].

8.3 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgt mit dem für das Prüflabor verfügbaren Verfahren.