

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού χοιρινού κρέατος σε μίγματα κρέατος

Μπαλαγιάννης Χρήστος

Λάρισα, 2014

Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού χοιρινού κρέατος σε μίγματα κρέατος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:	Λέκτορας Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
1. Το κρέας	7
1.1 Προϊόντα κρέατος	7
1.2 Κατανάλωση Κρέατος και προϊόντων του	7
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος.....	8
1.4 Προέλευση χοιρινού κρέατος	8
1.5 Θρεπτική αξία κρέατος	9
2. Επισήμανση και Ιχνηλασιμότητα τροφίμων	10
2.1 Γενικά	10
2.2 Επισήμανση των τροφίμων	10
2.3 Ιχνηλασιμότητα τροφίμων	11
3. Ταυτοποίηση κρέατος	12
4. Μιτοχονδριακό DNA	13
4.1 Γενικά	13
4.2 Γονίδια που χρησιμοποιούμε για την ταυτοποίηση των ειδών.....	15
4.3 Η επίδραση της φύσης του γονιδίου-στόχου στην Real Time PCR με βάση την ταυτοποίηση του DNA	17
5. Σκοπός της εργασίας	19
6. Πειραματική πορεία-μέθοδοι	20
6.1 Δείγματα	20
6.2 Ανίχνευση του DNA	20
6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	21
6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR.....	23
6.5 Real Time PCR.....	25
6.5.1 Διαφορετικές μεθοδολογίες για την Real Time PCR (Taqman Probes, SYBR Green)	29
7. Αποτελέσματα	33
8. Συζήτηση	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νοθεία του κρέατος αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τους καταναλωτές από οικονομική, θρησκευτική και διατροφική άποψη. Η σωστή επισήμανση και ιχνηλασιμότητα του κρέατος είναι σημαντική για τη σωστή εμπορία των προϊόντων καθώς και για την σωστά ενημερωμένη επιλογή του καταναλωτή.

Κάθε χρόνο καταναλώνονται τεράστιες ποσότητες ερυθρού κρέατος, οπότε η νοθεία αυτού και των προϊόντων του με φθηνότερα ή κατώτερα είδη κρέατος δημιουργεί μεγάλο πρόβλημα και στην βιομηχανία κρέατος. Για αυτό τον λόγο χρειάζονται αποτελεσματικές τεχνικές για την ταυτοποίηση των ειδών κρέατος τόσο για τους καταναλωτές, όσο και για τους υπεύθυνους της εμπορίας του κρέατος

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τμημάτων DNA χοιρινού κρέατος που είναι υπό την μορφή αναμειξέων. Με την τεχνική αυτή θέλουμε να επιτύχουμε των έλεγχο προσμίξεων χοιρινού σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Προκειμένου να ελέγξουμε την αποδοση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν αναμειξεις από μοσχάρι και χοιρινό. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό DNA που απομονώθηκε από μυϊκό ιστό των κρεάτων αυτών. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν η PCR και η real time PCR. Αρχικά ενισχύθηκε με την μέθοδο PCR τμήμα του γονιδίου 12s rRNA για το χοιρινό και έγινε έλεγχος ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν ενισχύουν αλληλουχίες διάφορων ειδών ζωικών ιστών. Οι ολιγονουκλεινικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινοί για τα παραγωγικά ζώα (universal primers). Στην συνέχεια έγινε έλεγχος για την κατάλληλη συγκέντρωση των εκκινητών η οποία θα μας έδινε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, E) και για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών χοιρινού, μοσχარიού, κοτόπουλου και γαλοπούλας με την μέθοδο της real time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Τέλος, με την μέθοδο της real time PCR χρησιμοποιώντας ανιχνευτές δημιουργήθηκαν τέσσερις διαφορετικές καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων DNA.

Η μέθοδος αυτή κρίθηκε αποτελεσματική για την ανίχνευση χοιρινού σε μίγματα κρέατος, οπότε την καθιστά χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας σε προϊόντα κρέατος.

ABSTRACT

The adulteration of meat is of high interest for the consumers due to economical, religious and public health reasons. Proper labeling and traceability of meat products is important to help “fair-trade”, and to enable consumers to make informed choices.

Every year, large quantities of red meat are consumed so adulteration of meat and meat products with their inferior/cheaper counterparts is an enormous problem in the meat industry. Thus, efficient techniques to identify the meat species origin are required which interest traders and consumers as well.

In this study molecular techniques were applied for the identification and quantification of DNA sequences of pork meat present in meat mixtures. With these techniques we want to achieve the detection of impurity in meat products.

The kinds of meat, that we use, were beef and pork, in various mixtures. The analysis was conducted in mitochondrial DNA which was isolated from muscle tissue of these meats. The applied techniques were PCR and real time PCR. Initially, a section of pork 12S rRNA was amplified by PCR method and was checked that the specific primers do not amplify sequences of different types of animal tissues. The primers that we used were universal primers. Then we checked for the appropriate concentration of primers which would give us better efficiency and for cross-reactivity between species of pork, beef, chicken and turkey with the method of real time PCR using SYBR Green dye. Finally, with the method of real time PCR using taqman probes four different standard curves were created for quantification of unknown DNA samples.

The method developed exhibited high efficiency and specificity in detecting pork in mixtures of meat, which could make it a valuable tool for checking the adulteration in meat products.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου την εκτέλεση αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη καθώς και τη Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ευχαριστώ επίσης την κ. Μούτου Αικατερίνη για τις υποδείξεις, τις διορθώσεις και την καθοδήγηση όσον αφορά το περιεχόμενο αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο για την συνεχή καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα στάδια της διατριβής μου, Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξή τους καθώς και τους φίλους μου για τη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Λάρισα, Ιούλιος 2014
Μπαλαγιάννης Χρήστος

Εισαγωγή

1. Το κρέας

Ως κρέας, με την ευρεία έννοια του όρου, ορίζεται το σύνολο των ζωικών ιστών που είναι κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Ακριβέστερα, ως κρέας ορίζεται η σάρκα των θερμόαιμων ζώων και πτηνών που αποτελείται κυρίως από μυϊκό ιστό και η οποία μετά την σφαγή του ζώου/πτηνού έχει υποστεί μεταθανάτιες βιοχημικές μεταβολές που την καθιστούν τρυφερή και εύγεστη (Μπλούκας Ι., 2007). Το κρέας και τα προϊόντα του προτιμώνται από τους καταναλωτές έναντι άλλων τροφίμων για την αισθητική τους έλξη, την γευστικότητα και την θρεπτική τους αξία. Επίσης, το κρέας είναι από τα λίγα τρόφιμα που μπορούν να ικανοποιήσουν τόσο γρήγορα και αποτελεσματικά το αίσθημα της πείνας και τις γευστικές απαιτήσεις του ανθρώπου. Τα εκτρεφόμενα είδη θερμόαιμων ζώων τα οποία αποτελούν και την κύρια πηγή κρέατος για τις αναπτυσσόμενες χώρες είναι τα βοοειδή, οι χοίροι, τα πρόβατα και οι αίγες, ενώ τα εκτρεφόμενα πουλικά είναι οι όρνιθες, οι γαλοπούλες, οι πάπιες και οι χήνες. Το βοδινό, το μοσχαρίσιο, το χοιρινό και το αιγοπρόβειο κρέας χαρακτηρίζονται ως ερυθρά κρέατα ενώ των πουλικών ως λευκό.

1.1 Προϊόντα κρέατος

Ως προϊόντα κρέατος χαρακτηρίζονται τα τρόφιμα, τα οποία παρασκευάζονται από κρέας με την ευρεία έννοια του όρου, δηλαδή από το σύνολο των ζωικών ιστών που είναι κατάλληλη για ανθρώπινη κατανάλωση με την εφαρμογή της κατάλληλης τεχνολογίας. Τα προϊόντα κρέατος είναι πολυάριθμα. Στην χώρα μας παράγονται περισσότερα από 300 διαφορετικά προϊόντα κρέατος και στην Γερμανία περισσότερα από 1100 είδη αλλαντικών. Τα προϊόντα κρέατος διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: α) σε επεξεργασμένα προϊόντα όπως τα ωμά λουκάνικα, κονσέρβες κρέατος κ.α. β) σε αναδομημένα νωπά προϊόντα (γύρος μπιφτέκια) και γ) σε εδώδιμα υποπροϊόντα κρέατος (εκχυλίσματα κρέατος, ζωμοί).

1.2 Κατανάλωση Κρέατος και προϊόντων του

Η κατανάλωση βοδινού κρέατος έχει μειωθεί στις χώρες της Ε.Ε. μετά τα 1992 και ιδίως στην Γερμανία, την Ιρλανδία και την Μ. Βρετανία. Ειδικότερα στην Μ. Βρετανία η κατανάλωση βοδινού κρέατος μειώθηκε από 175 g/ ημέρα το 1990 σε 145 g/ ημέρα. Η κατανάλωση του χοιρινού κρέατος παρουσιάζει τάση μείωσης αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το βοδινό κρέας. Αντίθετα η κατανάλωση των πουλικών παρουσιάζει αυξητική τάση. Στην χώρα μας την περίοδο 1990 – 2000, σημειώθηκε μείωση της κατανάλωσης βοδινού κρέατος κατά 15.5% , ακολουθώντας την διεθνή τάση. Η κατανάλωση του χοιρινού κρέατος σημείωσε σημαντική αύξηση κατά 61.5%, λόγω της αξιοποίησης του στην παραγωγή αλλαντικών και άλλων προϊόντων κρέατος. Τέλος σημειώθηκε αύξηση της κατανάλωσης κρέατος πουλικών κατά 23.8% και θεαματική αύξηση άλλων κρεάτων κατά 151,98% (Μπλούκας Ι., 2007)

Η κατανάλωση προϊόντων κρέατος στην Ελλάδα ήταν το 1995 περίπου 6 kg/άτομο/έτος και στις χώρες της Ε.Ε. 23 kg/άτομο/έτος. Η συνολική κατανάλωση προϊόντων κρέατος στην Ελλάδα ανερχόταν σε 60.000 τόνους. Αυτή κατά το μεγαλύτερο μέρος καλυπτόταν από την εγχώρια παραγωγή που ανερχόταν στους 50.000 έως 55.000 τόνους. Οι εισαγωγές προϊόντων κρέατος ξεπερνούσαν τους 10.000 τόνους το 1992. Δέκα χρόνια αργότερα, το 2005, η κατανάλωση προϊόντων κρέατος στην Ελλάδα ήταν περίπου 8.3 kg/άτομο/έτος στις χώρες της Ε.Ε. 19 kg/άτομο/έτος και στην Γερμανία 35 kg/άτομο/έτος. Την μεγαλύτερη κατανάλωση μεταξύ των προϊόντων κρέατος έχουν τα παστεριωμένα αλλαντικά (40%) και ακολουθούν τα προϊόντα γαλοπούλας (20%) , ζαμπόν (17%) και προϊόντα ωρίμανσης (13%).

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος

Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού της γης καταναλώνει κρέας. Ωστόσο η προτίμηση του καταναλωτή για το κρέας και η ποσότητα που καταναλώνει επηρεάζεται σημαντικά από ορισμένους παράγοντες, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι οι εξής:

1. Οι θρησκευτικές πεποιθήσεις
2. Η τιμή πώλησης του κρέατος και το εισόδημα του καταναλωτή
3. Η εμφάνιση του κρέατος κατά την αγορά του
4. Οι αντιλήψεις του καταναλωτικού κοινού για τις επιδράσεις του κρέατος στην υγεία του ανθρώπου
5. Η μεταχείριση των ζώων μέχρι την σφαγή τους
6. Ο τρόπος εκτροφής των ζώων
7. Διατροφικά σκάνδαλα

1.4 Προέλευση χοιρινού κρέατος

Όλες οι γνωστές φυλές χοίρων εξελίχτηκαν από τον ευρωπαϊκό και τον ασιατικό αγριόχοιρο, οι οποίοι αποτελούν υποείδη του άγριου είδους *Sus scrofa* Linnaeus, 1758. Η εξημέρωση του χοίρου έλαβε χώρα σε διαφορετικούς χρόνους σε διαφορετικές περιοχές (Ρογδάκης, 2000). Αρχικά υπήρχαν δύο μεγάλες ομάδες χοίρων αν την υφήλιο. Ο χοίρος την Βορειοανατολικής Ευρώπης και των Άλπεων, και ο άγριος χοίρος της Ινδοκίνας. Από την πρώτη ομάδα προήλθε ο Κέλτικος ή Αγγλικός χοίρος και από την δεύτερη ο Ασιατικός χοίρος (*S.vitatus*). Η διασταύρωση του κέλτικου με τον Ασιατικό έδωσε των σημερινό Ευρωπαϊκό χοίρο. Η διασταύρωση αυτή οδήγησε στην δημιουργία ενός ζώου το οποίο συνδύαζε το μεγάλο μέγεθος τοκετοομάδας του Ασιατικού με τους αυξημένους ρυθμούς αύξησης και τα μεγάλα σωματικά βάρη του Κέλτικου. Επίσης, από τον χοίρο των Άλπεων (*S. scrofa ferus*) προήλθε ο *S. mediterraneus*, που, όπως δηλώνει το όνομα του, ζούσε περιμετρικά σε όλη την μεσογειακή λεκάνη μέρος της οποίας είναι και η Ελλάδα (RDG Sierra de Acarena, 2002).

1.5 Θρεπτική αξία κρέατος

Το άπαχο κρέας αποτελεί ένα βασικό τρόφιμο στην διαίτα του ανθρώπου. Όταν το άπαχο κρέας καταναλώνεται σε λογικές ποσότητες ως μέρος ενός γεύματος μαζί με επαρκείς ποσότητες φυτικών προϊόντων, παρέχει πολύτιμα θρεπτικά στοιχεία για τον οργανισμό με βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Τα θρεπτικά στοιχεία αποτελούν οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι υδατάνθρακες, τα άλατα και οι βιταμίνες, τα οποία απορροφούμενα από τον ανθρώπινο οργανισμό παρέχουν σε αυτόν ενέργεια, προάγουν την ανάπτυξη και την συντήρηση των ιστών του και ρυθμίζουν βασικές λειτουργίες. Παρακάτω παρουσιάζονται πίνακες με διατροφικά στοιχεία χοιρινού και βοδινού κρέατος.

Πίνακας 1 Μέση περιεκτικότητα χοιρινού, βοδινού κρέατος σε πρωτεΐνες, λίπος και αποδιδόμενη ενέργεια (McCance & Widdowson, 1997)

Τρόφιμο	Πρωτεΐνη (%)	Λίπος (%)	Ενέργεια KJ/100g
Άπαχο νωπό κρέας			
Χοιρινό	21	7	615
Βοδινό	20	5	517

Πίνακας 2 Περιεκτικότητα του κρέατος σε βιταμίνες (Seuss, 1990)

Είδος τροφίμου	Βιταμίνες ανά 100g τροφίμου					
	B ₁ (μg)	B ₂ (μg)	B ₆ (μg)	B ₁₂ (μg)	A (μg)	C (μg)
Κρέας άπαχο μαγειρεμένο						
Χοιρινό	700	360	420	0.8	10	1
Βοδινό	100	260	380	2.7	20	1

Πίνακας 3 Σύνθεση των πρωτεϊνών του χοιρινού, βοδινού κρέατος σε αμινοξέα (Varnam & Sutherland, 1995)

Αμινοξέα (g/100g)	Είδος κρέατος	
	Χοιρινό	Βοδινό
Αργινίνη	12,2	13,7
Κυστίνη	2,6	2,6
Ιστιδίνη	8,9	7,5
Ισολευκίνη	9,2	10,4
Λευκίνη	14,5	16,3
Λυσίνη	19,7	18,5
Μεθειονίνη	5,6	5,5
Φαινυλαλανίνη	7,9	9,1
Θρεονίνη	8,9	9,4
Τρυπτοφάνη	2,3	2,6
Τυροσίνη	7,6	7,8
Βαλίνη	9,9	10,7

Πίνακας 4 Περιεκτικότητα του κρέατος σε άλατα σε mg/100g (Seuss, 1990)

Είδος τροφίμου	Μακροστοιχεία		Μικροστοιχεία	
	K	Mg	Fe	Zn
Κρέας μαγειρεμένο				
Χοιρινό	400	30	1.3	2.5
Βοδινό	300	20	3.2	4

2. Επισήμανση και Ιχνηλασιμότητα τροφίμων

2.1 Γενικά

Η στρατηγική παρακολούθησης της τροφικής αλυσίδας για την εξασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων εξετάζεται σε παγκόσμιο πλαίσιο, το οποίο εξελίσσεται συνεχώς όσον αφορά τους κανονισμούς και της απαιτήσεις. Ειδικότερα, ο έλεγχος των τροφίμων έχει αλλάξει σε μία πιο ολοκληρωμένη και προληπτική προσέγγιση. Αυτό απαιτείται από την παγκοσμιοποίηση του εμπορίου των τροφίμων. Στο πλαίσιο αυτό, οι βασικές κινητήριες δυνάμεις της ιχνηλασιμότητας τροφίμων είναι η ασφάλεια των τροφίμων, η διαχείριση του κινδύνου και ο έλεγχος της ταυτότητας του τροφίμου για την αποφυγή δόλιας επισήμανσης και για την πιστοποίηση της καταγωγής των προϊόντων στην αγορά. Κατανοούμε λοιπόν ότι ένα μέρος της ιχνηλασιμότητας είναι η επισήμανση των τροφίμων.

Η ιχνηλασιμότητα έχει αναδειχθεί ως ένα σύνθημα των καταναλωτών για την εμπιστοσύνη τους όσον αφορά την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων κατά μήκος της αλυσίδας εφοδιασμού από την παραγωγή, την μεταποίηση, και την λιανική πώληση, από το σημείο προέλευσης στο σημείο πώλησης.

Φαίνεται ξεκάθαρα η σχέση και η αλληλεπίδραση των μεθόδων της επισήμανσης και της ιχνηλασιμότητας και της ταυτοποίησης των τροφίμων για τον λόγο αυτό θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω σε αυτούς τους όρους για να κατανοήσουμε την σημασία τους στον έλεγχο κατά της νοθείας των τροφίμων.

2.2 Επισήμανση των τροφίμων

Η επισήμανση των τροφίμων ελέγχεται από την γενική οδηγία 2000/13/EK η οποία είναι μια κωδικοποιημένη απόδοση της οδηγίας 79/112/EK. Βασική αρχή των κανόνων της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την επισήμανση των τροφίμων είναι ότι πρέπει να δίνονται στους καταναλωτές όλες οι σημαντικές πληροφορίες για την σύνθεση του προϊόντος των παρασκευαστή, τις μεθόδους αποθήκευσης και παρασκευής. Οι παραγωγοί και οι παρασκευαστές είναι ελεύθεροι να δώσουν παραπάνω πληροφορίες αρκεί αυτές να μην είναι παραπλανητικές για τους καταναλωτές και να μην περιέχουν ισχυρισμούς σχετικά με προληπτικές, θεραπευτικές ή ιαματικές ιδιότητες των τροφίμων.

Οι πληροφορίες για ένα συσκευασμένο τρόφιμο αναγράφονται πάνω στη συσκευασία τροφίμου ή σε ετικέτα επικολλημένη σε αυτή. Στην περίπτωση

ασυσκευάστων τροφίμων, οι πληροφορίες αυτές μπορούν να αναγράφονται σε πινακίδα τοποθετημένη κοντά στα τρόφιμα.

Η σήμανση των συσκευασιών όλων των νωπών κρεάτων πρέπει να περιλαμβάνει σήμα αναγνώρισης, το οποίο φέρει τον αριθμό κτηνιατρικής έγκρισης της εγκατάστασης όπου πραγματοποιείται η σφαγή ή/και τεμαχισμός. Το σήμα αναγνώρισης δίδεται εντός ωσειδούς κύκλου ή, αν η πώληση του τροφίμου επιτρέπεται μόνο στην Κύπρο, εντός τριγώνου.

2.3 Ιχνηλασιμότητα τροφίμων

Μετά από τα επανειλημμένα κρούσματα διατροφικών κρίσεων που ξέσπασαν τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη έγινε σαφές ότι οι υπάρχουσες δομές και τα συστήματα ελέγχου δεν επαρκούσαν για να εξασφαλίσουν την ασφάλεια των προϊόντων. Στη Λευκή Βίβλο για την ασφάλεια των τροφίμων (12-01-2000) αναφέρεται μεταξύ άλλων ότι «Μια επιτυχημένη πολιτική τροφίμων απαιτεί την ιχνηλασιμότητα των τροφίμων και ζωοτροφών και των συστατικών τους. Για να διευκολυνθεί η ιχνηλασιμότητα πρέπει να εισαχθούν οι κατάλληλες διαδικασίες.».

Δύο χρόνια μετά τη Λευκή Βίβλο δημοσιεύθηκε ο Κανονισμός (ΕΚ) 178/2002 αυτός που είναι γνωστός απλά ως «Γενικός Νόμος Τροφίμων». Μεταξύ των άλλων που προβλέπει, δίνει τον ορισμό και τις γενικές κατευθύνσεις για την υποχρεωτική εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας σε όλα τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Ο Κανονισμός άρχισε να εφαρμόζεται στις αρχές του 2002, ενώ για ορισμένα άρθρα του η ισχύς μετατέθηκε για την 1.1.2005. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται και το άρθρο 18 που αφορά την ιχνηλασιμότητα. Ο κανονισμός δίνει και τον ορισμό της ιχνηλασιμότητας τροφίμων και ζωοτροφών Σύμφωνα λοιπόν με αυτόν, ιχνηλασιμότητα είναι η ικανότητα ιχνηλάτησης και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών και ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ουσιών που πρόκειται ή αναμένεται να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή ζωοτροφές, σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τους.

Τα κυριότερα σημεία των κατευθυντήριων γραμμών της ΕΕ για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας με βάση το άρθρο 18 του κανονισμού 178/2002 είναι:

- Οι επιχειρήσεις τροφίμων είναι υποχρεωμένες να γνωρίζουν από πού προμηθεύονται και σε ποιους προμηθεύουν τα προϊόντα τους. Ισχύει η αρχή -1 / +1 ή one back /one forward, με άλλα λόγια επιβάλλεται η τήρηση στοιχείων για τον άμεσο προμηθευτή και τον άμεσο πελάτη.
- Η υποχρεωτική ιχνηλασιμότητα καλύπτει και τα συστατικά τροφίμων, τα πρόσθετα και τις αρωματικές ύλες.
- Η υποχρέωση καλύπτει όλες τις επιχειρήσεις που ασχολούνται με: πρωτογενή παραγωγή, μεταποίηση, βιομηχανική παραγωγή ή επεξεργασία, αποθήκευση, μεταφορά, διανομή και διάθεση τροφίμων.
- Δεν είναι υποχρεωτική η «εσωτερική ιχνηλασιμότητα». Ωστόσο οι επιχειρήσεις ενθαρρύνονται για την εφαρμογή της.
- Στο είδος των πληροφοριών που πρέπει να συλλέγονται και να φυλάσσονται περιλαμβάνονται υποχρεωτικά: Η επωνυμία και η διεύθυνση του προμηθευτή (ή πελάτη), η φύση των προϊόντων που διακινήθηκαν καθώς και η ημερομηνία της διακίνησης. Συστήνεται ωστόσο να διατηρούνται επιπλέον και οι πληροφορίες που αφορούν την ποσότητα των

προϊόντων και τους αριθμούς παρτίδας των προϊόντων, καθώς επίσης και επιπλέον στοιχεία που θα καθορίζει η κάθε επιχείρηση ανάλογα με το είδος της δραστηριότητας και το διαχειριστικό της σύστημα.

- Το χρονικό διάστημα που θα πρέπει να φυλάσσονται οι πληροφορίες καθορίστηκε στα 5 χρόνια, με εξαίρεση τα προϊόντα που έχουν χρόνο ζωής μεγαλύτερο των 5 ετών (διατήρηση για χρονικό διάστημα ίσο με τον χρόνο ζωής και 6 μήνες επιπλέον) ή τα προϊόντα που φθάνουν στον τελικό καταναλωτή με ημερομηνία λήξης μικρότερη των τριών μηνών ή χωρίς συγκεκριμένη ημερομηνία (διατήρηση για χρονικό διάστημα έως και έξι μήνες μετά την ημερομηνία παραγωγής ή παράδοσης).

3. Ταυτοποίηση κρέατος

Το πιο πρόσφατο διατροφικό σκάνδαλο που ξέσπασε στην Ευρώπη είναι αυτό της νοθείας προϊόντων κρέατος με άγνωστης ποιότητας, προέλευσης και αγνώστου είδος κρεάτων. Γι' αυτό τον λόγο πρέπει να εφαρμοστούν μέθοδοι ταυτοποίησης των κρεάτων διαφόρων ειδών ζωικής προέλευσης τροφίμων καθώς η νοθεία μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην δημόσια υγεία. Σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες είδη διατροφής που κυκλοφορούσαν στην αγορά ως προϊόντα βόειου κρέατος βρέθηκαν να περιέχουν αδήλωτη ποσότητα κρέατος αλόγου σε μεγάλες ποσότητες που σε κάποια μεμονωμένα περιστατικά η πρόσμειξη άγγιζε το 100% (Findus Beef Lasagne, 2013). Ομοίως παρατηρήθηκαν αρκετά περιστατικά προσμίξεων με διάφορα είδη κρέατος όπως και με το χοιρινό, τα οποία ήταν αδήλωτα.

Οι οπαδοί του Ισλάμ και του Ιουδαϊσμού έχουν θρησκευτικές ανησυχίες σχετικά με την κατανάλωση χοιρινού κρέατος και οποιαδήποτε απόκρυψη της περιεκτικότητας χοιρινού κρέατος στην διατροφή τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της κατανάλωσης προϊόντων κρέατος, καθώς και παραβίαση των θρησκευτικών τους συναισθημάτων. Για την αποφυγή αυτών των θεμάτων νοθείας η διατροφή των μουσουλμάνων περιέχει μόνο είδη Halal. Στα αραβικά Halal (προφέρεται χαλάλ) σημαίνει το επιτρεπόμενο, το σύννομο, το κατάλληλο και τα τρόφιμα πρέπει να έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Δεν προέρχονται ή αποτελούνται από οποιοδήποτε μέρος ή είδος από ζώα που απαγορεύεται η κατανάλωση τους από τους μουσουλμάνους σύμφωνα με τον Ισλαμικό νόμο, ή τα ζώα δεν έχουν σφαγεί σύμφωνα με τον Ισλαμικό νόμο.
- Δεν περιέχουν καμία ουσία που θεωρείται ακάθαρτη σύμφωνα με τον Ισλαμικό νόμο
- Έχουν παραχθεί με την χρήση εξοπλισμού ή εργαλείων που είναι απαλλαγμένα από προσμίξεις απαγορευμένων ουσιών, όπως ορίζονται από τον Ισλαμικό νόμο
- Στο στάδιο προετοιμασίας, επεξεργασίας και αποθήκευσης, τα τρόφιμα δεν έρχονται σε επαφή ή αποθηκεύονται κοντά σε οποιοδήποτε είδη τροφίμων που δεν πληρούν τις απαιτήσεις των παραπάνω παραγράφων.

Αυτά τα θέματα νοθείας του κρέατος δείχνουν την ανάγκη της ορθής επισήμανσης των ειδών διατροφής. Τροφική αλλεργία που οφείλεται στην κατανάλωση χοιρινού κρέατος, αν και σπάνια, είναι ένας σημαντικός παράγοντας

που επιτάσσει την ταυτοποίηση του χοιρινού κρέατος (Ayuso et al., 1999; Bohler et al., 2001; Mamikoglu 2005). Μια εξέταση ρουτίνας δεν είναι πάντα σε θέση να ανιχνεύσει προσμείξεις κρέατος ιδιαίτερα όταν το δείγμα είναι επεξεργασμένο ή μαγειρεμένο σε υψηλές θερμοκρασίες. Κατά τον τεμαχισμό τους ο ιστός διατηρεί πολλά από τα ανατομικά χαρακτηριστικά τα οποία δείχνουν την προέλευση του ζώου. Ωστόσο, όταν υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία αλλάζει η φυσιολογία και η χημική του σύσταση, με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολο να αναγνωρισθεί το είδος. Στο παρελθόν, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι με βάση την πρωτεΐνη και την ανάλυση DNA. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε πρωτεΐνες περιλαμβάνουν ηλεκτροφόρηση (Zerifi et al, 1992), χρωματογραφία (Amstron et al, 1992) και ανοσολογικές τεχνικές (Hsieh et al 1998 : Kangethe et al, 1986; Patterson et al, 1990). Ωστόσο αυτές οι μέθοδοι είναι συχνά ακατάλληλες για σύνθετα προϊόντα τροφίμων δεδομένου ότι δεν μπορούν να διαφοροποιήσουν συγγενικά είδη σε επεξεργασμένα υλικά και είναι χρονοβόρες και δαπανηρές (Calvo et al, 2001; Koh et al, 1998; Saez et al, 2004).

Οι περιορισμοί αυτών των τεχνικών έχουν οδηγήσει στην εφαρμογή μοριακών τεχνικών με βάση το DNA, λόγω της ευαισθησίας και της επαναληψιμότητας των μεθόδων αυτών σε σύγκριση με αυτές που βασίζονται σε πρωτεΐνες. Επιπλέον, το DNA είναι ένα ιδιαίτερα σταθερό μόριο που μπορεί να ανιχνευθεί σε επεξεργασμένα προϊόντα ακόμα και όταν αυτά έχουν υποστεί υψηλή θερμική επεξεργασία. Επίσης οι προσδιορισμοί που βασίζονται σε πρωτεΐνες δεν μπορούν να διακρίνουν στενά συγγενικά είδη λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Σήμερα χρησιμοποιούνται διάφορες μοριακές τεχνικές ανάλυσης όπως οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι (ELISA) και οι τεχνικές υβριδισμού του DNA, PCR και η Real-Time PCR.

4. Μιτοχονδριακό DNA

4.1 Γενικά

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι κυκλικό, δίκλωνο, υπερελικωμένο, και δεν περιλαμβάνει ιστόνες. Το μέγεθος του είναι σχετικά σταθερό στα ανώτερα σπονδυλωτά, ποικίλει όμως στα κατώτερα ζώα και στα φυτά. Ένα κύτταρο περιέχει δεκάδες ως εκατοντάδες ή και χιλιάδες μιτοχόνδρια σε καθένα από τα οποία περιλαμβάνονται πολλαπλά γονιδιώματα.

Το mtDNA παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με το γενετικό υλικό που βρίσκεται στον πυρήνα:

1. Ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης του είναι ιδιαίτερα υψηλός σε σχέση με αυτόν του πυρηνικού DNA, γεγονός που οφείλεται στην αδυναμία του συστήματος επιδιόρθωση λαθών κατά την αντιγραφή (Clayton, 1984)
2. Τα μόρια του μιτοχονδριακού DNA δεν ανασυνδυάζονται, αν και ορισμένες μελέτες αναφέρουν φαινόμενα ανασυνδυασμού σε είδη όπως το μύδι και τον άνθρωπο (Hagelberg et al., 1999)
3. Κληρονομείται στα περισσότερα είδη αποκλειστικά από τη μητέρα. Εξαιρεση αποτελούν το μύδι *Mytilus* (Zourow et al., 1992) και το ποντίκι (Gyllensten et al. 1991)

4. Διαφορετικές περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος εξελίσσονται με διαφορετικό ρυθμό (Saccone et al., 1991).

Το κυκλικό σχήμα του μιτοχονδριακού DNA συμβάλλει στην μεγαλύτερη σταθερότητα στο χρόνο, δεδομένου ότι είναι λιγότερο ευαίσθητο στην αποικοδόμηση σε σύγκρισή με το πυρηνικό DNA (Gefridese et al., 2011). Αυτό οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση του mtDNA σε ιδιαίτερα επεξεργασμένα τρόφιμα, που υπόκεινται στις ακραίες συνθήκες της επεξεργασίας τροφίμων. Επιπλέον, μερικά αντίγραφα των γονιδιωμάτων mtDNA, περίπου 2-10 αντίγραφα, οργανώνονται σε νουκλεοειδή (Bogenhagen, 2009) με αποτέλεσμα την ύπαρξη πολύ υψηλού αριθμού αντιγράφων του mtDNA σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Σε αντίθεση, μόνο ένα αντίγραφο του nDNA υπάρχει στον πυρήνα του κάθε κυττάρου. Αυτό εξασφαλίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση του mtDNA σε σύγκριση με τις δοκιμές με nDNA (Gefridew & Welch, 2011). Στα θηλαστικά το nDNA αποτελείται από περίπου 20.000 γονίδια (Moran, 2011). Η παρουσία των ιντρονίων, το επαναλαμβανόμενο DNA καθώς και οι διαχωριστικές αλληλουχίες μεταξύ των γονιδίων στο nDNA είναι παράγοντες που διακρίνουν το nDNA από το mtDNA (Magoulas, 2005).

Το μέγεθος του μιτοχονδριακού DNA είναι πολύ μικρότερο από εκείνο του nDNA και ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των οργανισμών (Hartwell et al., 2008). Το τυπικό μέγεθος του mtDNA των ανώτερων θηλαστικών έχει αναφερθεί ότι είναι περίπου 16.000 ζεύγη βάσεων (bp) (Magoulas, 2005). Οι περιοχές κωδικοποίησης του mtDNA περιλαμβάνουν 13 πρωτεϊνικά γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή υπομονάδων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, δύο ριβοσωμικά RNA (12S και 16S rRNA) και 22 γονίδια μεταφορικών RNA (tRNA). Μία μη-κωδικοποιημένη περιοχή ελέγχου των περίπου 1000bp μπορεί επίσης να βρεθεί σε μία mtDNA αλληλουχία η οποία ονομάζεται ως εκτόπισμα βρόγχου (D-Loop) στα σπονδυλωτά και περιέχει την αρχή της αντιγραφής του mtDNA (Magoulas, 2005).

Το nDNA κληροδοτείται στους απογόνους κατά τον Μεντελικό τρόπο. Η διαδικασία περιλαμβάνει γενετικό ανασυνδιασμό που συμβαίνει στο nDNA όπου παράγονται οι νέοι συνδυασμοί αλληλόμορφων ή διαφορετικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων από εκείνες του μητρικού nDNA (Hartwell et al., 2008). Από την άλλη πλευρά, το mtDNA είναι σχεδόν αποκλειστικά κληρονομήσιμο από την μητέρα και συνήθως δεν συμβαίνει γενετικός ανασυνδιασμός σε αυτό (Magoulas, 2005). Λόγω της μητρικής κληρονομικότητας του η ανάλυση του mtDNA επιτρέπει την καλύτερη σύγκριση του ατόμου με άλλα πιο μακρινής συγγένειας άτομα (Gefridew et al., 2011).

Επιπλέον, το μιτοχονδριακό DNA είναι γνωστό ότι έχει υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης, περίπου 10 φορές συχνότερο από ότι το nDNA των ίδιων σπονδυλωτών (Brown, George, & Wilson, 1979). Η ποικιλομορφία mtDNA μεταξύ οργανισμών με μεγάλη συγγένεια που μοιράζονται σε μεγάλο βαθμό παρόμοια nDNA εξηγεί την προτίμηση της χρήσης του mtDNA στην εξελικτική παρακολούθηση ενός συγκεκριμένου είδους. Επιπλέον, οι διάφορες περιοχές του mtDNA εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς παρέχοντας ένα φάσμα περιοχών για να επιλεγεί ως στόχος, ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης (Kvist, 2000).



Εικόνα 6 Ο χάρτης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του ανθρώπου.

4.2 Γονίδια που χρησιμοποιούμε για την ταυτοποίηση των ειδών

Το γονίδιο που θα επιλέξουμε για μία ανάλυση PCR εξαρτάται από την μεταβλητότητα της αλληλουχίας του σε διαφορετικά είδη. Για την ταυτοποίηση των ειδών με την PCR χρησιμοποιούμε τουλάχιστον έναν συγκεκριμένο εκκινητή που να αναγνωρίζει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία που είναι μοναδική σε ένα είδος.

Το πιο κοινό γονίδιο-στόχος που χρησιμοποιείται στην PCR είναι το κυτόχρωμα b. Αυτό είναι ένα γονίδιο που χρησιμοποιείται συχνά σε φυλογενετικές μελέτες και ως γονίδιο αναφοράς στην PCR. Η δομή του μας επιτρέπει τον προσδιορισμό απόκλισης σε επίπεδο πληθυσμού και την αποσαφήνιση της βαθύτερης εξελικτικής σχέσης μεταξύ ειδών (Kvist, 2000). Οι Zhang et al (2007) ανέπτυξαν μια ποσοτική Real-Time PCR χρησιμοποιώντας σύστημα ανιχνευτή TaqMan με βάση το κυτοχρώμα b για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του DNA των βοοειδών στα κρέατα, γάλατα και τυριά. Η μεταξύ των ειδών μεταβλητότητα της αλληλουχίας του κυτοχρώματος b έχει αξιοποιηθεί για το σχεδιασμό ειδικών εκκινητών βοοειδών που είναι άκρως επιλεκτικοί έναντι προβάτων, χοίρων, αιγών, γαλοπούλας, κοτόπουλου, και βουβάλιων (Nurhidayatul A. et al., 2013) Το γονίδιο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει συγκεκριμένα πέντε είδη ζώων συμπεριλαμβανομένων των χοίρων, βοοειδών, πρόβατου, κοτόπουλου και γαλοπούλας σε μείγματα κρέατος (Dooley et al., 2004). Το όριο ανίχνευσης που αναφέρθηκε από τους Zhang et al. (2004) είναι 35pg DNA βοοειδών. Σε αναμίξεις DNA μπορεί να ανιχνευτεί 0.1% βοοειδών, προβάτων γαλοπούλας (περίπου 50pg DNA) σύμφωνα με τους Dooley et al. (2004). Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (1pg) έχει επιτευχθεί στην ανίχνευση κρέατος λαγού χρησιμοποιώντας το γονίδιο κυτόχρωμα b κατασκευάζοντας ειδικούς ανιχνευτές και εκκινητές για ένα μεγάλο

φάσμα διαφορετικών ειδών που δεν είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους (Santos et al., 2012).

Ένα άλλο μιτοχονδριακό γονίδιο που έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ειδών είναι το 12S rRNA. Το γονίδιο έχει χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν εκκινητές εξειδικευμένοι για μερικά είδη ελαφιών (Fejardo et al., 2008). Επίσης, έχουν σχεδιαστεί ειδικοί εκκινητές για χοίρους με βάση το γονίδιο αυτό δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα με την μέθοδο της PCR ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, συμπεριλαμβανομένων δύο ζώων και φυτών που υπάρχουν σε ζωοτροφές των χοίρων (Martin et al., 2009). Οι τιμές του ορίου ανίχνευσης του 12S rRNA με βάση το σύστημα PCR που αναφέρθηκαν στις τρεις μελέτες είναι μεταβλητές, κυμαινόμενες από λιγότερο από 5 fg έως 10 pg DNA.

Η περιοχή D-loop του mtDNA επιλέγεται συχνά για την διάκριση μεταξύ ειδών κρέατος λόγω του υψηλού ποσοστού υποκατάστασης και λόγω του ότι είναι η πιο ταχέως εξελισσόμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Fejardo et al., 2008). Οι μεταλλάξεις εντός ενός πληθυσμού ζώων και μεταξύ των ατόμων είναι πολύ συχνές στην περιοχή αυτή (Fajardo et al., 2008). Ο ποσοτικός προσδιορισμός του βοείου κρέατος σε μείγματα χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές και στόχευση της περιοχής D-loop έχει αναφερθεί από τον Sawyer et al. (2003). Οι εκκινητές είναι σε θέση να ανιχνεύουν ειδικά το DNA των βοοειδών σε προσμίξεις βοείου κρέατος με αρνί σε ποσοστό 0.1%.

Τα γονίδια των υπομονάδων της αφυδρογονάσης NADH είναι επίσης χρήσιμα για τον εντοπισμό ενός συγκεκριμένου είδους χρησιμοποιώντας Real-Time PCR. Το γονίδιο της NADH αφυδρογονάση υπομονάδα 5 (ND5) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό ειδικών εκκινητών για χοίρους για σύστημα PCR (Farihah Liyana et al., 2009; Kesmen et al., 2009). Η NADH δεϋδρογονάση υπομονάδα 2 (ND2) με βάση τον ειδικό εκκινητή για γαϊδούρι δείχνει αρκετή μεταβλητότητα εντός του ίδιου είδους για να διακρίνει γαϊδαρο από κρέας αλόγου (Kesmen et al., 2009) καθώς η διαφοροποίηση των ειδών μεταξύ αλόγου και γαϊδάρου είναι αρκετά δύσκολη. Από την άλλη πλευρά ειδικοί εκκινητές αλόγου που προέρχονται από γονιδιακή αλληλουχία ATPase6/ATPase8 είναι σε θέση να διαχωρίσουν άλογο από γαϊδαρο, όμως, σε υψηλή τιμή Ct άνω των 30 κύκλων μπορεί να ανιχνευθεί DNA χοίρου (Kesmen et al., 2009). Το όριο ανιχνεύσεως του συστήματος PCR που αναπτύχθηκε με βάση τα γονίδια ND2, ND5 και ATPase6/ATPase8 είναι πολύ χαμηλό 0,1 pg DNA σε διάλυμα νερού το οποίο δίνει ένα εξαιρετικά ευαίσθητο σύστημα ανίχνευσης ειδών

Τα γονίδια 16S rRNA χρησιμοποιούνται συνήθως ως καθολικοί εκκινητές με τις αλληλουχίες τους καλά διατηρημένες (Dalmasso et al., 2004) και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην ζωτική λειτουργία του κυττάρου, με αποτέλεσμα μικρότερο αριθμό μετάλλαξης των γονιδίων. Η διατηρημένη περιοχή στην 16S rRNA αλληλουχία είναι πιθανόν να διατηρείται σε στενά συγγενικά είδη αλλά και μεταξύ μακρινών συγγενών ειδών (αγελάδα και κοτόπουλο) ώστε να παρέχουν το καθολικό εκκινητή που θα ενισχύσει τόσο είδη θηλαστικών όσο και πτηνών (Sawyer et al., 2003). Το 16S rRNA με βάση τον καθολικό εκκινητή για θηλαστικά και πουλερικά χρησιμοποιήθηκε επίσης από τους Kesmen et al. (2009) για τον έλεγχο της ενισχύσεως. Ενώ, ειδικοί εκκινητές για μηρυκαστικά για το γονίδιο 16S rRNA αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ειδών

μηρυκαστικών συμπεριλαμβανομένων των προβάτων, των βοοειδών και των αιγών σε ένα πολύ περίπλοκο μείγμα DNA στο κρέας και στα οστεάλευρα (MBM) (Chiappini et al., 2005). Έχει επιλεγεί ως αλληλουχία-στόχος εφόσον το επίπεδο μεταβλητότητας εντός του είδους είναι πολύ χαμηλότερο από την μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών (Chiappini et al., 2005).

4.3 Η επίδραση της φύσης του γονιδίου-στόχου στην Real Time PCR με βάση την ταυτοποίηση του DNA

Παρά την ειδικότητα και ευαισθησία που προσφέρονται από τον ανιχνευτή και τους εκκινητές στην Real Time PCR, ο καθορισμός ενός συγκεκριμένου είδους, μπορεί δυνητικά να διακυβεύεται από άλλους παράγοντες, όπως η πηγή του γονιδίου. Το γονίδιο επιλογής είτε από mtDNA ή nDNA μπορεί να επηρεάσει σχετικά την ευαισθησία και την ειδικότητα της ανάλυσης PCR (López-Andreo et al., 2005; Martín et al., 2009).

Η ειδικότητα της γονιδιακής αλληλουχίας αποτελεί πλεονέκτημα για την ενίσχυση PCR και παρέχεται από τις υψηλότερες γενετικές παραλλαγές που συμβαίνουν στο mtDNA μεταξύ των ειδών σε σύγκριση με το nDNA, επιτρέποντας τον σχεδιασμό ειδικών εκκινητών PCR για διάφορα είδη (Kortbaoui et al, 2009). Για παράδειγμα, η αλληλουχία του γονιδίου του κυτοχρώματος b είναι εξαιρετικά μεταβλητή μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Mohd Hazim et al., 2012; Santos et al., 2012; Zhang et al., 2007), ενώ η μεταβλητότητα εντός του είδους στο 12S rRNA αξιοποιείται για την επίλυση των διαφορών μεταξύ των φυλών ενός συγκεκριμένου είδους (Fajardo et al., 2008b; Rojas et al., 2010). Η ND5 γονιδιακή αλληλουχία δείχνει επίσης επαρκή, μεταξύ των ειδών, μεταβλητότητα για την διαφοροποίηση των χοίρων, ενώ η μεταβλητότητα εντός του είδους της γονιδιακής αλληλουχίας ND2 και ATPase6/ATPase8 είναι σε θέση να διαφοροποιήσει κρέας αλόγου και γαϊδάρου.

Εκτός αυτού, ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου του mtDNA συμβάλλει επίσης στην υψηλότερη ευαισθησία των κωδικοποιημένων μιτοχονδριακών γονιδίων ως γενετικών δεικτών (Kortbaoui et al., 2009). Έχει αναφερθεί ότι για την ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA του επιλεγμένου γονιδίου απαιτούνται μόνο 10 μόρια mtDNA για την επιτυχή εντοπισμό, αλλά απαιτούνταν πολύ περισσότερο nDNA αντίγραφα, υποδεικνύοντας έτσι την μεγαλύτερη ευαισθησία του mtDNA έναντι του nDNA στην Real-Time PCR (Andréasson et al, 2002). Περαιτέρω, η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων του mtDNA μορίων σε ένα κύτταρο βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία του συστήματος PCR όταν τα κύτταρα βιώνουν ακραία κατάσταση επεξεργασίας (Rojas et al., 2010). Το όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται με mtDNA με βάση το σύστημα της PCR είναι γενικά πολύ χαμηλό, λιγότερο από 5fg όταν το DNA στόχος είναι γονίδιο 12S rRNA όπως καταδεικνύεται από τους Royas et al. (2010) και 40 fg όταν χρησιμοποιούμε για DNA το κυτόχρωμα b σύμφωνα με τους López-Andreo et al, (2006). Επιπλέον, οι ειδικοί εκκινητές PCR για διάφορα είδη που προέρχονται από μιτοχονδριακά γονίδια μπορούν να ανιχνεύσουν τόσο χαμηλό ποσό όπως 0.1pg του DNA (Kesmen et al., 2009). Οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί από πυρηνικά γονίδια θα έχουν ευρεία εξειδίκευση και μικρότερη ευαισθησία στη σύνδεση με την αλληλουχία στόχο (Lenstra, 2010). Η χρήση των μιτοχονδριακών γονιδίων για να δημιουργηθούν γενικοί εκκινητές μπορεί να

εξαλείφει το πρόβλημα της ευαισθησίας που προκαλείται από τη χρήση των πυρηνικών γονιδίων. Το σύστημα ανίχνευσης που βασίζεται στο mtDNA προσφέρει απόλυτη εξειδίκευση έναντι ενός συγκεκριμένου είδους και περιορίζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα είδη-μη στόχους.

Πίνακας 5 Συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διάφορων μιτοχονδριακών γονιδίων-στόχων για την PCR

Γονίδιο Στόχος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Αναφορές
Κυτόχρωμα b	Συνήθως χρησιμοποιούνται σε φυλογενετικές μελέτες. Υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών.	Αδύνατο να διαχωρίσει στενά συγγενικά είδη	Kvist (2000) Dooley et al. (2004) Zhang et al. (2007) Santos et al. (2012)
12S rRNA	Επαρκής μεταβλητότητα εντός και μεταξύ των ειδών.		Fajardo et al. (2008b) Martín et al. (2009) Rojas et al. (2010)
Περιοχή D-loop	Υψηλό ποσοστό υποκατάστασης. Η πιο ταχέως εξελισσόμενη περιοχή του mtDNA		Sawyer et al. (2003) Fajardo et al. (2008a)
ND5	Υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών		Farihah Liyana et al. (2009) Kesmen et al. (2009)
ND2	Επαρκής μεταξύ και εντός των ειδών μεταβλητότητα		Kesmen et al. (2009)
ATPase6/ATPase8	Επαρκής μεταβλητότητας μεταξύ των ειδών.	Χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών	
16S rRNA	Περιέχει καλά συντηρημένες περιοχές. Πολύ χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών. Συχνά χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη γενικών εκκινητών για είδη θηλαστικών, πτηνών και μηρυκαστικών.		Sawyer et al. (2003) Dalmaso et al. (2004) Chiappini et al. (2005) Kesmen et al. (2009)

5. Σκοπός της εργασίας

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με την μέθοδο της Real Time PCR για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό χοιρινού κρέατος σε αναμείξεις.

Οι μοριακοί δείκτες που εξετάστηκαν ήταν το γονίδιο 12S rRNA του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η PCR και η Real Time PCR. Για τον λόγο αυτό διεξήχθησαν μια σειρά πειραμάτων με στόχο την δημιουργία πρότυπων καμπύλων αναφοράς με την χρωστική SYBR Green και με Taqman ανιχνευτές. Σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές και ανιχνευτές για κάθε δοκιμή και προσδιορίστηκε η απόδοση της αντίδρασης. Όλες οι μέθοδοι ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν το είδος στόχο (χοιρινό) όταν εμπλουτίζονταν από 1% έως 99% από άλλα είδη (μοσχάρι). Οι αναλύσεις δοκιμάστηκαν σε μείγματα με βάση το κρέας για να αξιολογηθεί η διαγνωστική ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου.

6. Πειραματική Πορεία-Μέθοδοι

6.1 Δείγματα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυρίως δύο ζωικά είδη: χοιρινό (*Sus domesticus*) και μοσχάρι (*Bos taurus*). Δημιουργήσαμε αναμείξεις αυτών των δύο ειδών. Τα μείγματα περιείχαν τα δύο είδη σε διάφορες αναλογίες. Οι αναλογίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλυφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί, μέσα στα πλαίσια βέβαια που θα μπορούσαν να εξαχθούν χρήσιμα αποτελέσματα. Οπότε από κάθε είδος χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα ιστού (5-100mg). Μικρότερη ποσότητα κρίθηκε ότι δεν θα ήταν, στην παρούσα φάση, εύστοχο να χρησιμοποιηθεί. Για να σιγουρευτούμε ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε δεν πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες από άλλα είδη (κοτόπουλο, γαλοπούλα) κάναμε αναμείξεις και με αυτά τα 2 είδη. Η συντήρησή τους έγινε στους -20°C . Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα μείγματα που δημιουργήθηκαν στις διάφορες αναλογίες.

Πίνακας 6 Αναμείξεις των δύο ζωικών ειδών (χοιρινό – μοσχάρι) σε διάφορες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν

Μείγματα	Μοσχάρι	Χοιρινό	Μείγματα	Χοιρινό	Μοσχάρι
1	100mg	0mg	7	60mg	40mg
2	95mg	5mg	8	80mg	20mg
3	90mg	10mg	9	90mg	10mg
4	80mg	20mg	10	95mg	5mg
5	60mg	40mg	11	100mg	0mg
6	50mg	50mg			

6.2 Απομόνωση του DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από τον ιστό (χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες ιστού που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα), ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Τεμαχίζουμε το δείγμα και τοποθετούμε τον ιστό σε φιαλίδια erpendorf των 1,5ml.
2. Προσθέτουμε 180μl Genomic Digestion buffer και 20 μl πρωτεΐνάση K και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55°C για περίπου 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση.

4. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2ml.
5. Προσθέτουμε 20μl RNase A και αναδεύουμε στο vortex.
6. Προσθέτουμε 200μl Genomic lysis binding buffer και αναδεύουμε ξανά στο vortex.
7. Προσθέτουμε 200μl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε έντονα.
8. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά erpendorf με στήλες.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 1 λεπτό.
10. Προσθέτουμε 500μl Wash buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 9.
11. Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέα βάση, προσθέτουμε 500μl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 3 λεπτά.
13. Τοποθετούμε τη στήλη σε erpendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 100μl Elution buffer.
14. Τέλος φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 13000 στροφές.
15. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Πρόκειται για μια διαδικασία ποιοτικού προσδιορισμού και διαχωρισμού τμημάτων DNA που μας δίνει την δυνατότητα να πάρουμε πληροφορίες για το μέγεθος των γραμμικών μορίων, την ποιότητα αλλά και την ποσότητα του DNA.

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά μετά την απομόνωση του DNA από τους ιστούς των ζωικών οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν, για τον έλεγχο του μιτοχονδριακού DNA και έπειτα, μετά την ολοκλήρωση της PCR, για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης.

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωση που φθορίζει υπό υπεριώδες φως. Η παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή αναγκάζει τα μόρια να κινηθούν πιο αργά προς το θετικό πόλο. Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η μετακίνηση των μορίων. Η τάση όμως δε γίνεται να είναι πολύ υψηλή γιατί αναπτύσσονται μεγάλες θερμοκρασίες και προκαλείται το λιώσιμο της πηκτής. Φορτώνοντας το DNA σε μία πηκτή που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο και εκθέτοντάς το στο υπεριώδες γίνονται ορατές οι διακριτές ζώνες του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της

μεγαλύτερης πυκνότητας τους. Συνήθως χρησιμοποιούνται το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα loading buffers περιέχουν ως επί το πλείστον γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη έτσι ώστε να καταβυθίζεται το DNA καθώς και χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Τα κυριότερα buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αγαρόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X

Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1l). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6g αγαρόζης σε 30ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3ml βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν.

Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 0,6g αγαρόζης και 30ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά το βράσιμο πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.
5. Προστίθενται 3ml βρωμιούχου αιθιδίου C=10mg/ml.
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
7. Εισάγεται το χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι.
9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.

10. Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 2μl DNA, στην περίπτωση ελέγχου της αντίδρασης της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA (PCR προϊόν) και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.

Η τάση ρυθμίζεται έτσι ώστε να είναι 80V. Μετά από περίπου 40 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτική αφού τοποθετηθεί στη συσκευή UV.

6.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA. Από το 1985 η PCR έχει καταστεί μια απαραίτητη τεχνική που χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στα επιστημονικά εργαστήρια. Οι εφαρμογές αυτές χρησιμοποιούνται για την διάγνωση μιας νόσου, τον έλεγχο πατρότητας, την εγκληματολογική έρευνα, τον έλεγχο τροφίμων και στις περιβαλλοντολογικές επιστήμες.

Παρά την επανάσταση της επιστημονικής έρευνας, η αρχή της βασικής μεθόδου της PCR είναι αρκετά απλή και περιλαμβάνει μια αντίδραση τριών σταδίων, της θερμικής μετουσίωσης, την υβριδοποίηση των εκκινητών και την επέκταση των εκκινητών. Μια τυπική αντίδραση ενισχύσεως αποτελείται από το DNA στόχο, μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, δυο εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτιδίου (dNTPs), ρυθμιστικό διάλυμα και το μαγνήσιο.

Η αποδιάταξη, αναδιάταξη και επέκταση επαναλαμβάνεται για πολλούς κύκλους με αποτέλεσμα την εκθετική ενίσχυση του DNA στόχου. Η ενίσχυση του DNA τυπικά επιβεβαιώνεται χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA.
- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
- **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Applied Biosystems, 2003).

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

Τα τρία στάδια του κάθε κύκλου της PCR είναι τα ακόλουθα:

- **Αποδιάταξη:** το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο, μέσω της θέρμανσής του σε υψηλή θερμοκρασία (94°-95°C).
- **Υβριδοποίηση εκκινητών:** οι δύο εκκινητές υβριδοποιούνται με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών (50°-65°C).
- **Επέκταση των εκκινητών (πολυμερισμός):** σύνθεση DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 12S rRNA χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 12S rRNA Rv και 12S rRNA Fw. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA

Εκκινητής	Αλληλουχία
12S rRNA Fw	5'-CCC ACG AAA GTG ACT CTA ATA ATC CT-3'
12S rRNA Rv	5'-GTT TTG TTA TGT AAC TAT TTG G-3'

Για την διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Έπειτα τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf 1μl εκμαγείου DNA το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα 200-700ng.

Πίνακας 8 Συστατικά αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Συγκεντρώσεις σε 50μl αντίδρασης
DNA	1μl	200ng
ddH ₂ O	39,8μl	
Buffer 10X	5μl	1X
MgCl ₂ (100mM)	1μl	2mM
dNTPs (40mM)	1μl	0,8mM
Primer Fw (50pmol/μl)	1μl	1pmol/μl
Primer Rv (50pmol/μl)	1μl	1pmol/μl
Taq DNA (5U/μl)	0,2μl	1U

Στην συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε erpendorf που περιέχει το DNA, από 49μl του master mix. Επίσης, σε ένα erpendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε

master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου.

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 4min

Αποδιάταξη: 95°C για 40sec

Θερμική Επαναδιάταξη: 53°C για 50sec

Επιμήκυνση: 72°C για 40sec

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10min

Μετά το πέρας της PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας, όπως αναφέραμε προηγουμένως στην παράγραφο για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

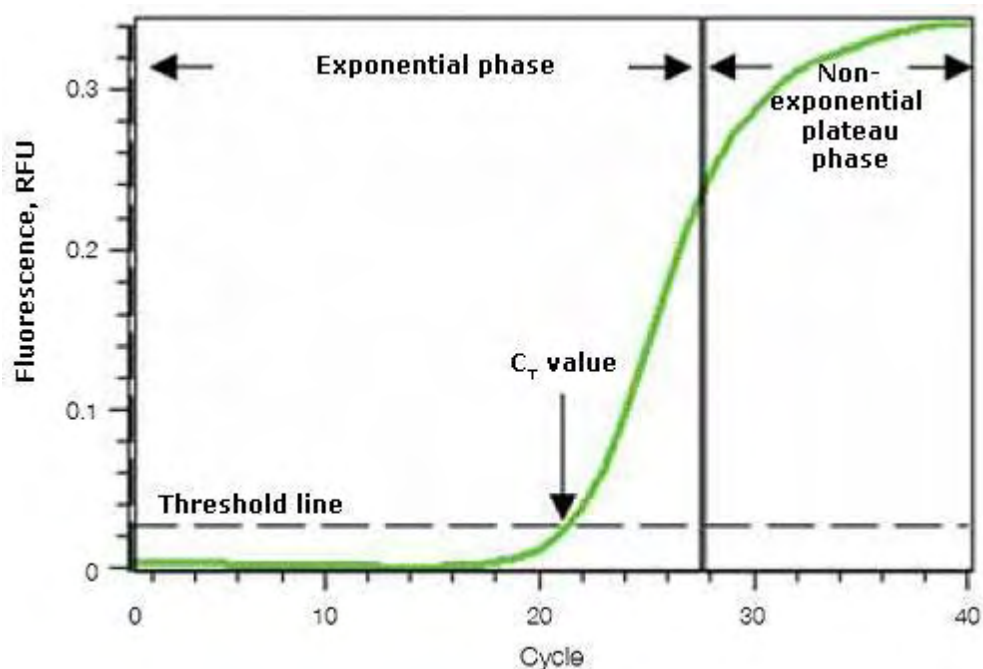
6.5 Real Time PCR

Η Real-time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Συχνά αναφέρεται και ως quantitative (ποσοτική) Real-time PCR (q-PCR). Η αρχή λειτουργίας της είναι παρόμοια με αυτή της συμβατικής PCR, με τη διαφορά ότι η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετριέται σε κάθε κύκλο, ενώ στη συμβατική PCR η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας-στόχου λαμβάνει χώρα μετά την ολοκλήρωση του τελευταίου κύκλου.

Το διάλυμα για την Real-Time PCR περιέχει τα ίδια αντιδραστήρια με αυτό της συμβατικής μεθόδου και επιπλέον κάποιες χρωστικές για την ανίχνευση του γονιδίου-στόχου (Houghton et al, 2006). Έτσι, η μέτρηση της ποσότητας DNA που παράγεται μετά από κάθε κύκλο γίνεται μέσω σήμανσης των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια ή ανιχνευτές (probes) που έχουν ενσωματωθεί στο τελικό προϊόν. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των παραγόμενων αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Παρόλο που η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα σε μικρότερο χρόνο απ' ό,τι η PCR και δίδει την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Houghton et al, 2006).

Στην Real time PCR η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule), στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Stratagene, 2006).

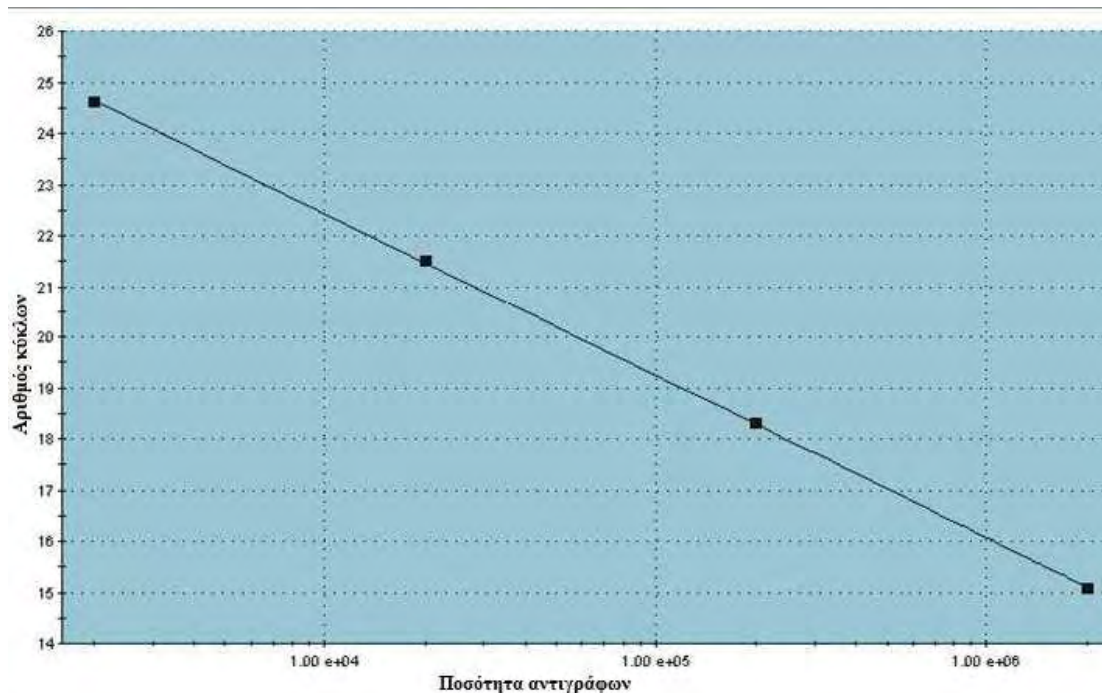
Σε ένα διάγραμμα QPCR, η γραμμή Threshold διέρχεται από το σημείο όπου το φθορίζον σήμα των προϊόντων ξεχωρίζει έντονα από το φόντο, ενώ ο κύκλος που αντιστοιχεί σ αυτό το σημείο λέγεται Threshold cycle (Ct, Εικ. 1). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct που αντιστοιχεί στο δείγμα αυτό (Wong et al, 2005).



Εικόνα 1 Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός διαγράμματος q-PCR (Threshold line, Ct value) (<http://www.bio-rad.com>).

Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογιστεί με ακρίβεια η ποσότητα του γονιδίου-στόχου στο δείγμα ή όταν δεν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί με ακρίβεια η αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα χρησιμοποιούμε αντίστοιχα δύο διαφορετικές μεθόδους, την απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) ή την σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification).

Η μέθοδος της απόλυτης ποσοτικοποίησης παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση των δειγμάτων της real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Βασίζεται στην δημιουργία και στην χρήση μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Standard curve) με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Απαιτούνται τουλάχιστον 5 σημεία (γνωστές συγκεντρώσεις) που να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλεγεί μια γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρα, που μπορεί να προέρχεται από DNA, γενωμικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδιασμένο (recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Stratagene, 2006). Αυτή τη συγκέντρωση-μάρτυρα θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real Time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα (Εικ. 2).



Εικόνα 2 Παράδειγμα καμπύλης αναφοράς (standard curve) που σχηματίζεται από τέσσερα σημεία, δηλαδή από τέσσερις αραιώσεις του αρχικού μάρτυρα (Stratagene, 2007).

Μετά το τέλος της αντίδρασης, η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μία ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του γνωστής συγκέντρωσης γονιδίου συναρτήσει των τιμών Ct. Στην συνέχεια γίνεται σύγκριση των τιμών Ct των υπό μελέτη δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση τους.

Ο συντελεστής συσχέτισης (**Correlation coefficient, R²**) αποτελεί ένα μέτρο του πόσο καλά ταιριάζουν κάθε φορά τα δεδομένα στην καμπύλη αναφοράς. Επί της ουσίας, η τιμή του R² εκφράζει την γραμμικότητα της καμπύλης και στην ιδανική περίπτωση είναι R²=1, ενώ στην πραγματικότητα η μέγιστη τιμή του είναι 0,999.

Η απόδοση της αντίδρασης (**Efficiency, E**) της Real-time PCR πρέπει να είναι όσο πιο κοντά γίνεται στο 100%, για την εξασφάλιση αξιόπιστων και αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται, όταν η τιμή της κλίσης (slope) της πρότυπης καμπύλης είναι -3,32, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Efficiency} = 10(-1/\text{slope}) - 1$$

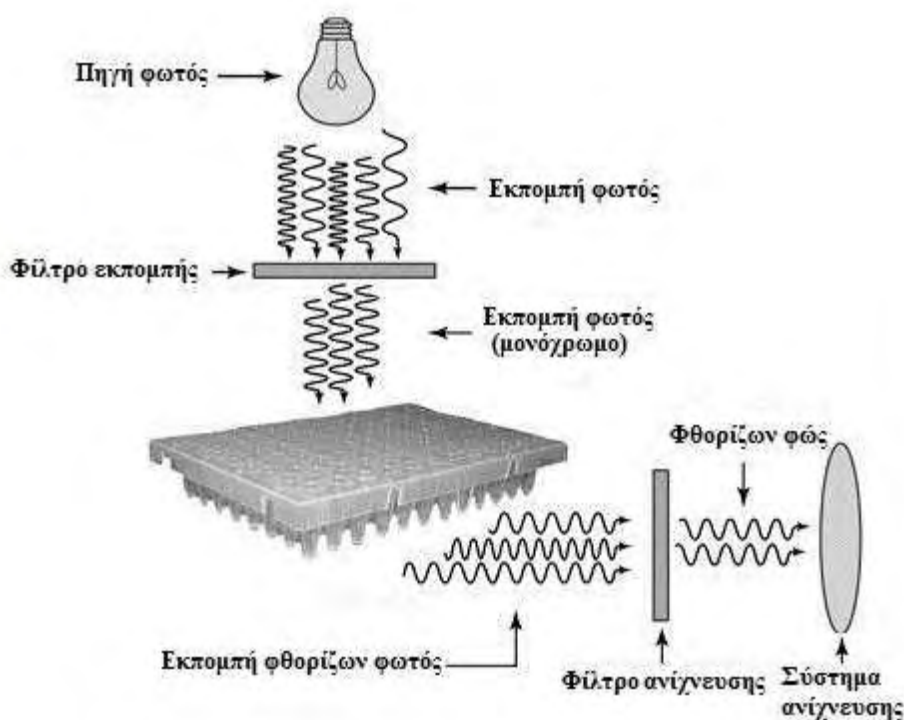
Η ιδανική τιμή E=100% δείχνει ότι το γονίδιο-στόχος διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης. Κάποιοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την αποτελεσματικότητα (E<90%) είναι η χρήση μη κατάλληλων συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων, η ποιότητα του ενζύμου, καθώς και η ίδια η δυναμική της αντίδρασης. Τιμές E μεταξύ 90-110% που αντιστοιχούν σε τιμές κλίσης από -3,58 έως -3,10 υποδεικνύουν μια καλή αντίδραση ([www.invitrogen.com/Basic principles of real-time PCR](http://www.invitrogen.com/Basic%20principles%20of%20real-time%20PCR)).

Μία ακόμη δυνατότητα που παρέχει η τεχνολογία της Real Time PCR είναι η κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης (**Melting curve ή Dissociation curve**) με την οποία μπορεί να γίνει αξιολόγηση των προϊόντων της αντίδρασης, να δούμε δηλαδή αν τα προϊόντα είναι επιθυμητά ή όχι. Η κατασκευή της καμπύλης αυτής βασίζεται

στην θερμοκρασία αποδιάταξης (**melting temperature, T_m**) των προϊόντων της αντίδρασης. (Houghton et al, 2006). Η T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία κάθε τμήμα του DNA αποδιάτασσεται και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος του DNA. Τα προϊόντα της αντίδρασης πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ εκκινητών ή τμήματα προέρχονται από τοποθέτηση των εκκινητών σε παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (Hund, 2006). Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, τότε στην καμπύλη θα εμφανιστεί μία μόνο κορυφή, ενώ αν στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους, τότε θα παρατηρηθούν στην καμπύλη και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης.

Η μεθοδολογία της αντίδρασης Real-time PCR περιλαμβάνει και αρνητικά δείγματα (χωρίς DNA) μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα. Τα αρνητικά δείγματα περιέχουν όλα τα υλικά του διαλύματος αντίδρασης, εκτός του DNA (συνήθως χρησιμοποιείται νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA) και χρησιμοποιούνται για την εξέταση της περίπτωσης επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης με DNA άλλου οργανισμού.

Όλες οι συσκευές της Real time PCR συνδυάζουν την τεχνολογία της συμβατικής PCR για την παραγωγή/ πολλαπλασιασμό προϊόντων με την συστήματα για παραγωγή, ανίχνευση και ανάλυση του φθορίζων σήματος που παράγεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Εικ. 3). Υπάρχουν πολλές εταιρίες που διαθέτουν συσκευές Real Time PCR και το κόστος της κάθε μιας διαφέρει ανάλογα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Fraga et al, 2008).



Εικόνα 3 Διάγραμμα με τον βασικό τρόπο λειτουργίας γενικά όλων των συσκευών Real Time PCR (Fraga, 2008).

Η μεγαλύτερη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στις διάφορες συσκευές είναι το λογισμικό που διαθέτει η κάθε συσκευή για την ανάλυση των δεδομένων και το

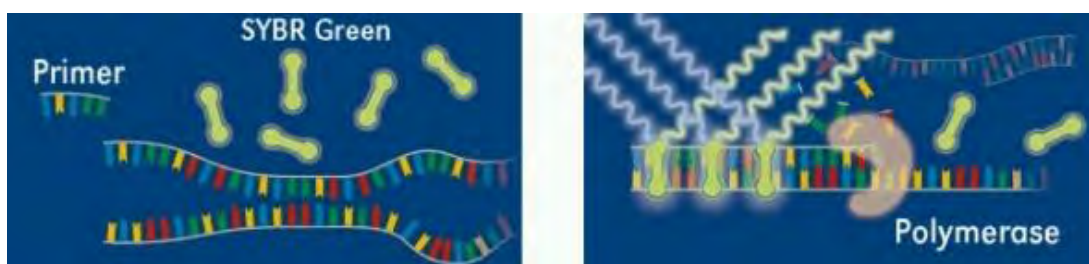
σύστημα ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης χρωστικής φθορισμού (Stratagene, 2007). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας εργασίας που θα αναφερθεί στην ενότητα του πειραματικού μέρους και το οποίο θα περιγραφεί στη συνέχεια είναι το μοντέλο MX pro 2005 P της εταιρείας Stratagene.

6.5.1 Διαφορετικές μεθοδολογίες για την Real Time PCR (Taqman Probes, SYBR Green)

Η ποσοτική PCR χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της ποσότητας της αλληλουχίας DNA μέσα στο δείγμα. Η ποσότητα του προϊόντος που ανιχνεύεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης σχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου μέσα στο δείγμα. Στην ποσοτική PCR υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να εφαρμοστούν για την σήμανση των προϊόντων της Real time PCR (Stratagene, 2007). Η μια μέθοδος βασίζεται στην χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA (DNA binding dyes) π.χ. SYBR Green I, και η άλλη στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών (probes). Οι μεθοδολογίες αυτές περιγράφονται παρακάτω.

A) SYBR Green

Είναι η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη χρωστική για την μέθοδο της real time PCR, και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως σε ερευνητικές εφαρμογές. Είναι μία χρωστική κυανίνης που δεσμεύεται ειδικά στην ελάσσονα αύλακα της διπλής έλικας του DNA και σαν αποτέλεσμα, παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA (Εικ. 4). Μόλις δεσμευτεί, η χρωστική εκπέμπει ένα σήμα φθορισμού πάνω από χίλιες φορές μεγαλύτερο από εκείνο που εκπέμπεται από την αδέσμευτη χρωστική (Wilhelm et al, 2003). Τα πλεονεκτήματα της SYBR green περιλαμβάνουν τη σχετική ευκολία με την οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε υπάρχουσες δοκιμασίες PCR, έχει σχετικά χαμηλό κόστος και την ευκολία σχεδιασμού της διαδικασίας. Οι προσδιορισμοί με SYBR Green δεν απαιτούν την πρόσθετη πολυπλοκότητα και το κόστος του σχεδιασμού και της κατασκευής των ανιχνευτών που επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές. Ένα μειονέκτημα, όμως, είναι η μη ειδική φύση της SYBR Green, η οποία επιτρέπει κάθε μη-ειδική ενίσχυση κατά την διάρκεια αντίδρασης PCR με αποτέλεσμα να αυξάνεται τεχνητά το σήμα φθορισμού και εσφαλμένα αυξάνονται η τιμές του δείγματος (Wilhelm et al, 2003; Bustin et al, 2002). Λόγω αυτής της μη ειδικής φύσης, οι ερευνητές συχνά υποχρεώνονταν να πραγματοποιήσουν συμπληρωματικές αναλύσεις επιβεβαίωσης, συμπεριλαμβανομένων των καμπυλών αποδιάταξης και την ηλεκτροφόρηση πηκτής, για να καθορίζουν την ποιότητα και την ακρίβεια των δεδομένων σε πραγματικό χρόνο, αυξάνοντας περαιτέρω το κόστος και τον χρόνο που απαιτείται για την εκτέλεση των μετρήσεων σε πραγματικό χρόνο (Wilhelm et al, 2003; Bustin et al, 2002). Ως εκ τούτου, ακόμη και αν η SYBR Green δοκιμασίες απαιτούν λιγότερο κόστος δημιουργίας στην αρχή της μεθόδου, απαιτείται πιο εκτεταμένη ανάλυση αργότερα.



Εικόνα 4 Τρόπος λειτουργίας της μεθόδου Real Time PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Για την διαδικασία της Real Time PCR με την χρωστική SYBR Green το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 και τον πίνακα 10. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.

Πίνακας 9 Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 200 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21.7 μl
Primer Fw (200nM)	0.86 μl
Primer Rv (200nM)	0.86 μl
ddH ₂ O	16.88 μl
DNA	3 μl

Πίνακας 10 Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 300 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21.7 μl
Primer Fw (300nM)	1.3 μl
Primer Rv (300nM)	1.3 μl
ddH ₂ O	16 μl
DNA	3 μl

Στην συνέχεια προσθέτουμε 3 μl DNA στα erpendorf και μοιράζουμε σε κάθε erpendorf που περιέχει το DNA, από 40μl του master mix. Επίσης, σε ένα erpendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Αμέσως μετά χωρίζουμε την ποσότητα του κάθε erpendorf στην μέση δηλαδή 20 μl και την τοποθετούμε στα ειδικά erpendorf για την Real Time PCR και τα τοποθετούμε στην συσκευή η οποία προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου για 35 κύκλους.

95°C για 3min

95°C για 30sec

61°C για 1 min

72°C για 1 min

95°C για 1 min

55°C για 30sec

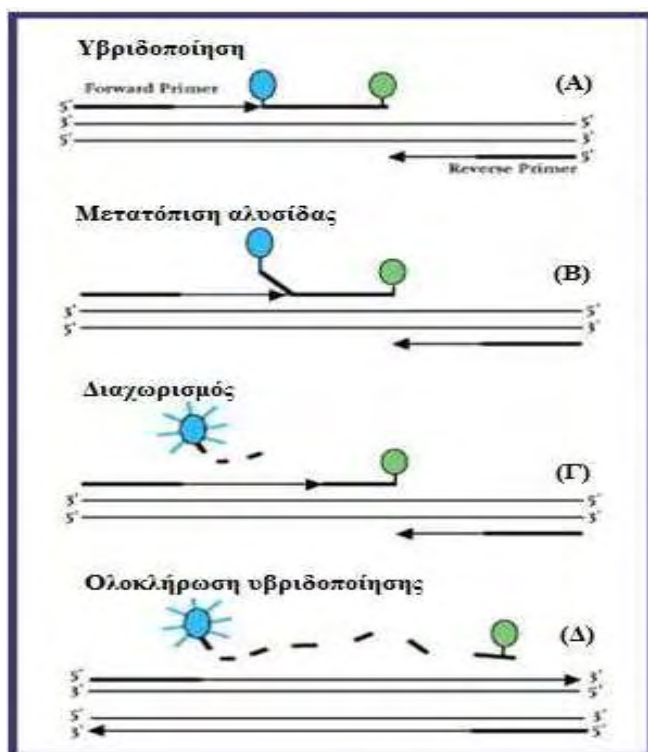
95°C για 30sec

B) Taqman Probe

Οι ανιχνευτές Taqman αποτελούν μια από τις πρώτες μορφές ανίχνευσης που βασίζονται σε ανιχνευτή και είναι διαθέσιμες για την real time PCR. Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιούν την εγγενή δραστικότητα της εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης (δηλαδή, την ικανότητα να υδρολύει το DNA) (Uhl, et al. 2002; Wilhelm et al, 2003; Uhl et al, 2004). Οι ανιχνευτές Taqman είναι μικρά ολιγονουκλεοτίδια (20-30 ζεύγη βάσεων) και περιέχουν μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς οι οποία επισυνάπτεται στο 5' άκρο και μία χρωστική απόσβεσης που επισυνάπτεται στο 3' άκρο (Uhl et al. 2002; Wilhelm et al, 2003; Uhl et al, 2004). Προσδένονται στο DNA στόχο μεταξύ των εκκινητών της PCR κατά την διάρκεια του σταδίου της υβριδοποίησης και διασπώνται από την δραστικότητα της εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης κατά την διάρκεια επέκτασης του εκκινητή, διαχωρίζοντας τις δύο χρωστικές στον ανιχνευτή Taqman (Εικ. 5). Ενώ ο ανιχνευτής είναι άθικτος, η χρωστική αναφοράς δεν θα εκπέμψει σήμα φθορισμού διότι «αποσβέστηκε» με την παρουσία της χρωστικής απόσβεσης. Μόλις ο ανιχνευτής διασπάται, η χρωστική αναφοράς είναι απαλλαγμένη από την χρωστική απόσβεσης και εκπέμπει ένα σήμα (Uhl et al. 2002; Wilhelm et al, 2003; Uhl et al, 2004). Οι Taqman προσδιορισμοί είναι πιο ειδικοί από τους SYBR Green προσδιορισμούς, σχετικά πιο ακριβοί και δεν επιτρέπουν άμεσα ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (Wilhelm et al, 2003).

Πλεονεκτήματα των ανιχνευτών Taqman περιλαμβάνουν την αύξηση σε εξειδίκευση και λιγότερες απαιτήσεις για βελτιστοποίηση. Η ενισχυμένη ειδικότητα των προσδιορισμών Taqman σε σύγκριση με τους προσδιορισμούς που χρησιμοποιούν χρωστικές παρεμβολής όπως η SYBR Green, οφείλεται σε τρία εξαιρετικά συγκεκριμένα γεγονότα που πρέπει να συμβούν πριν δημιουργηθεί ένα σήμα φθορισμού. Οι δύο εκκινητές (forward, reverse) πρέπει να δεσμευθούν και να επεκταθούν, αλλά επίσης και ο ανιχνευτής πρέπει να δεσμευθεί στην μήτρα μεταξύ των δύο εκκινητών. Εάν δεν εμφανιστούν αυτά τα τρία γεγονότα, δεν υπάρχει σήμα φθορισμού (Wilhelm et al, 2003; Uhl et al, 2004). Αυτές οι απαιτήσεις βελτιώνουν

δραματικά την ειδικότητα της ανάλυσης και να μειώνουν τον χρόνο που απαιτείται για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση δοκιμασίας. Ένα μειονέκτημα σε σύγκριση με αναλύσεις που χρησιμοποιούν χρωστικές παρεμβολής, είναι μερικές φορές δύσκολο το έργο του σχεδιασμού των συνδυασμών εκκινητή-ανιχνευτή για μία αλληλουχία που μας ενδιαφέρει.



Εικόνα 5 Τρόπος λειτουργίας ενός γραμμικού ανιχνευτή: (Α) Υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία DNA, (Β) Υβριδοποίηση του ανιχνευτή, (Γ) Διαχωρισμός της φθορίζουσας χρωστικής από το μόριο αποσβέστη και (Δ) Εκπομπή του φθορίζων σήματος (Gloffke, 2003).

Για την διαδικασία της Real Time PCR με ανιχνευτές Taqman το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.

Πίνακας 11 Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με Taqman Probe και συγκέντρωση εκκινητών 200 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
2X Taqman Probe	21.5 µl
Primer Fw (200 nM)	0.86 µl
Primer Rv (200 nM)	0.86 µl
Probe	0.645 µl
DNA	3 µl
ddH ₂ O	16.135 µl

Στην συνέχεια προσθέτουμε 3 μl DNA στα erpendorf και μοιράζουμε σε κάθε erpendorf που περιέχει το DNA, από 40μl του master mix. Επίσης, σε ένα erpendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Αμέσως μετά χωρίζουμε την ποσότητα του κάθε erpendorf στην μέση δηλαδή 20 μl και την τοποθετούμε στα ειδικά erpendorf για την Real Time PCR και τα τοποθετούμε στην συσκευή η οποία προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου για 30 κύκλους.

95°C για 5 min

95°C για 30 sec

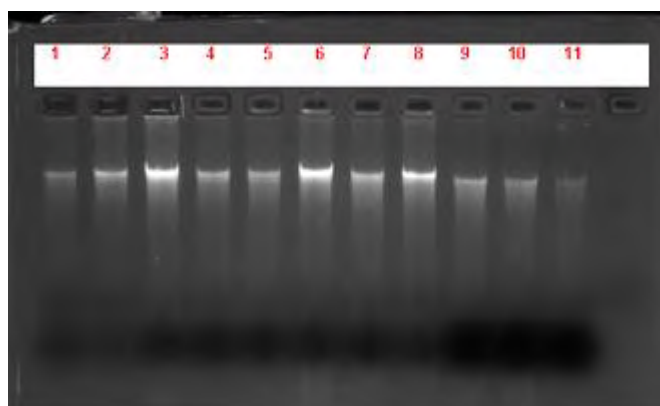
60°C για 1 min

72°C για 1 min

7. Αποτελέσματα

A) Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με την διαδικασία που έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης.



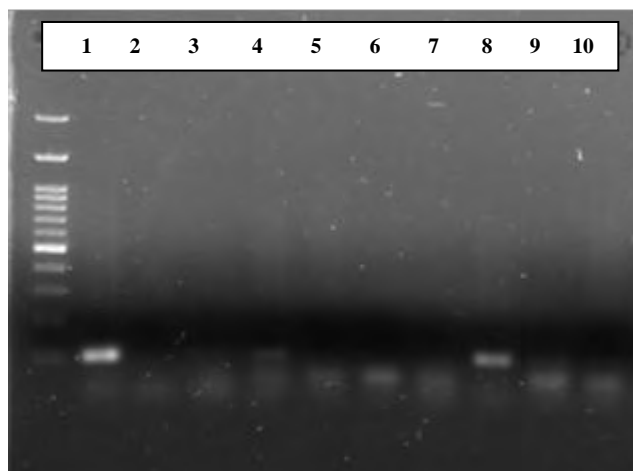
Εικόνα 7 Απομόνωση DNA μείγματος χοιρινού ιστού με μοσχάρι με τις αναλογίες του Πίνακα 6 σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που βρέθηκε είναι ικανοποιητική και για όλα τα δείγματα, οπότε προχωρήσαμε στη PCR.

B) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στην συνέχεια με PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 12s RNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα και κάναμε έλεγχο αν το τμήμα αυτό πολλαπλασιάζει αλληλουχίες άλλων ειδών. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% παράλληλα με μάρτυρα τμημάτων

γνωστών μοριακών μεγεθών, για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 12S rRNA και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος PCR. Η Εικόνα 7 είναι ενδεικτική της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Εικόνα 8 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης. 1. Χοιρινό 2. Μοσχάρι 3. Κοτόπουλο 4. Γαλοπούλα 5. Πρόβατο 6. Κατσίκι 7. Άλογο 8. Χοιρινό-μοσχάρι 9. Κοτόπουλο-γαλοπούλα 10. Πρόβατο-κατσίκι

Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR παρατηρούμε ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες DNA του χοιρινού (1) και μείγματος χοιρινού με μοσχάρι (8) και καμία άλλη αλληλουχία από τα άλλα είδη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία καμπύλης αναφοράς με την μέθοδο της Real Time PCR και την χρήση ανιχνευτών Taqman. Για να φτάσουμε στον σκοπό μας χρειάστηκε να περάσουμε από τα παρακάτω στάδια.

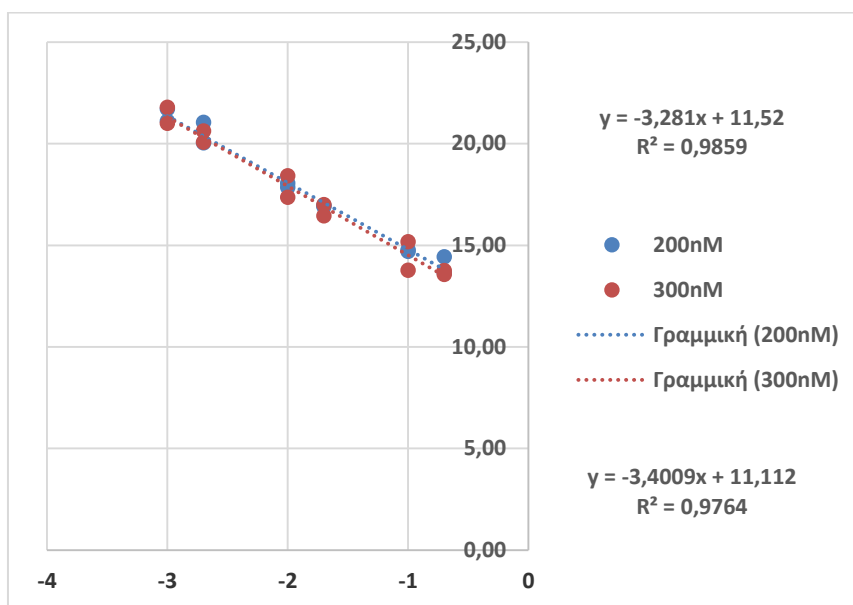
Γ) Έλεγχος συγκέντρωσης εκκινητών (Fw, Rv)

Πρώτα έπρεπε να ελεγχθεί ποια θα ήταν η επιθυμητή συγκέντρωση εκκινητών (Fw, Rv) και η οποία θα μας έδινε και την καλύτερη απόδοση αντίδρασης. Γι' αυτόν τον λόγο δημιουργήθηκαν δυο αντιδράσεις ξεχωριστά οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε διαδοχικές αραιώσεις από DNA χοιρινού κρέατος που φαίνονται στο Πίνακα 12. Στην πρώτη οι εκκινητές (Fw, Rv) είχαν συγκέντρωση 200 nM και στην δεύτερη 300 nM. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τις δύο αντιδράσεις χωριστά με την μέθοδο της Real Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green και πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα.

Πίνακας 12 Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) από τις διαδοχικές αραιώσεις χοιρινού κρέατος σε συγκεντρώσεις 200 nM και 300 nM

Dilution	log dilution	Sus 200nM (Ct)	Sus 300nM (Ct)
0,2	-0,698970004	13,63	13,55
0,2	-0,698970004	14,42	13,74
0,1	-1	14,69	13,76
0,1	-1	14,76	15,16
0,02	-1,698970004	16,89	16,44
0,02	-1,698970004	16,94	16,98
0,01	-2	17,83	17,35
0,01	-2	18,04	18,41
0,002	-2,698970004	20,03	20,06
0,002	-2,698970004	21,03	20,61
0,001	-3	21,10	20,98
0,001	-3	21,70	21,78

Από τον Πίνακα 12 χρησιμοποιώντας τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και τις αραιώσεις φτιάχνουμε το παρακάτω διάγραμμα για να βρούμε την κλίση της καμπύλης που δημιουργείται και για να ελέγξουμε αν η καμπύλη μας είναι γραμμική. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) πρέπει να είναι κοντά στο 1 για να είναι γραμμική η καμπύλη μας.



Διάγραμμα 1 Καμπύλες αναφοράς για συγκέντρωση εκκινήτων 200 nM και 300 nM

		R^2	intercept	slope		efficiency
ΧΟΙΡΙΝΟ	200nM	0,9859	11,52	-3,281	0,30	1,0174
ΧΟΙΡΙΝΟ	300nM	0,9764	11,112	-3,4009	0,29	0,9681

Από τον πίνακα παρατηρούμε ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι μεγαλύτερη σε συγκέντρωση 200 nM. Γι αυτό τον λόγο σύμφωνα με αυτήν την συγκέντρωση θα συνεχίσουμε την υπόλοιπη πειραματική πορεία.

Δ) Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Χρησιμοποιώντας την συγκέντρωση εκκινητών η οποία μας έδωσε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (200 nM) έγινε έλεγχος για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών χοιρινού, βοδινού, κοτόπουλου και γαλοπούλας. Συγκεκριμένα ο έλεγχος έγινε με εκκινητές χοιρινού που χρησιμοποιήθηκαν στα υπόλοιπα τρία είδη για να ελέγξουμε αν πολλαπλασιάζουν την αλληλουχίες των ειδών αυτών. Ο έλεγχος έγινε με την μέθοδο της Real Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Παρασκευάστηκε η αντίδραση του Πίνακα 9 και για δείγμα χρησιμοποιήθηκε DNA από χοιρινό, μοσχάρι, κοτόπουλο και γαλοπούλα σε ποσότητα 3μl. Τα αποτελέσματα ήταν τα παρακάτω:

Πίνακας 13 Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) με εκκινητές χοιρινού (200 nM) σε DNA από μοσχάρι, κοτόπουλο, γαλοπούλα.

DNA	Εκκινητές χοιρινού (200 nM), Ct
Χοιρινό	16,92
	16,52
Μοσχάρι	26,56
	26,06
Κοτόπουλο	No Ct
	No Ct
Γαλοπούλα	No Ct
	No Ct

Από το πίνακα 13 παρατηρείται ότι οι εκκινητές του χοιρινού δεν ανιχνεύουν καθόλου DNA κοτόπουλο και γαλοπούλα. Ανιχνεύουν μετά από πολλούς κύκλους (Ct) DNA από μοσχάρι κάτι που μας δίνει το δικαίωμα να συνεχίσουμε το πείραμα με τους συγκεκριμένους εκκινητές χωρίς να έχουμε το πρόβλημα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας.

Ε) Έλεγχος της συγκέντρωσης εκκινητών σε μείγματα κρέατος

Το επόμενο βήμα ήταν γίνει έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης με εκκινητές που είχαν συγκέντρωση 200 nM, 300 nM σε μείγματα κρέατος. Για να σιγουρευτούμε ότι οι εκκινητές ανιχνεύουν το DNA χοιρινού κρέατος και σε μικρές ποσότητες μέσα σε μείγματα χρησιμοποιήθηκε DNA από μείγμα το οποίο περιείχε 95 mg μοσχάρι και 5 mg χοιρινό. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η Real Time PCR με χρωστική SYBR Green.

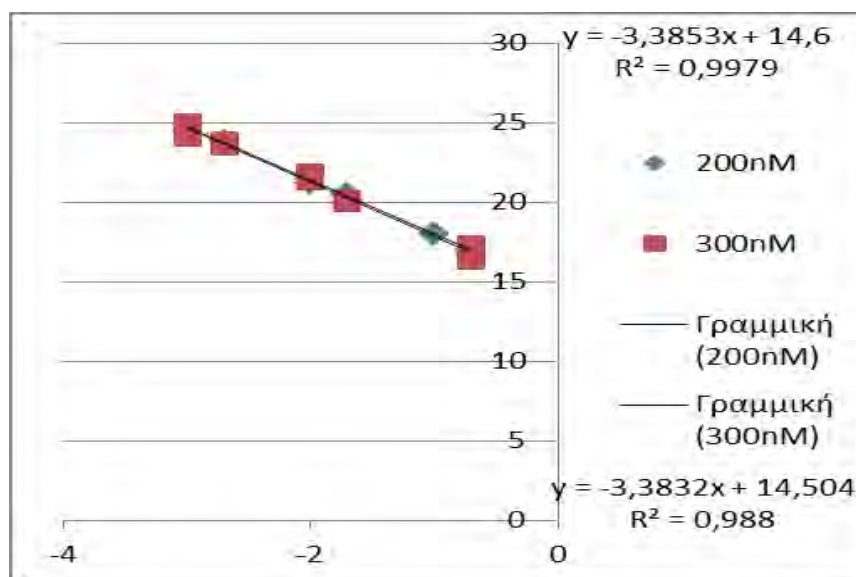
Δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστές αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές με συγκέντρωση 200 nM (Πίνακας 9) και στην δεύτερη

αντίδραση εκκινητές με συγκέντρωση 300 nM (Πίνακας 10) και πήραμε τα αποτελέσματα του πίνακα 13.

Πίνακας 13 Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) από τις διαδοχικές αραιώσεις μείγματος χοιρινού κρέατος σε συγκεντρώσεις 200 nM και 300nM

Dilution	log dilution	Sus 200nM (Ct)	Sus 300nM (Ct)
0,2	-0,698970004	17,02	17,23
0,2	-0,698970004	16,79	16,46
0,1	-1	18,04	
0,1	-1	17,96	
0,02	-1,698970004	20,52	20,07
0,02	-1,698970004	20,39	20,06
0,01	-2	21,41	21,71
0,01	-2	21,22	21,4
0,002	-2,698970004	23,82	23,77
0,002	-2,698970004	23,86	23,59
0,001	-3	24,83	24,91
0,001	-3	24,47	24,16

Από τον Πίνακα 13 χρησιμοποιώντας τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και τις αραιώσεις φτιάχνουμε το παρακάτω διάγραμμα για να βρούμε την κλίση της καμπύλης που δημιουργείτε και να δούμε αν οι καμπύλη μας είναι γραμμική. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) πρέπει να είναι κοντά στο 1 για να είναι γραμμική η καμπύλη μας.



Διάγραμμα 2 Καμπύλες αναφοράς για συγκέντρωση εκκινητών 200 nM και 300 nM

		R ²	intercept	slope		efficiency
ΧΟΙΡΙΝΟ	200nM	0,9979	14,6	-3,3853	0,30	0,9742
ΧΟΙΡΙΝΟ	300nM	0,988	14,504	-3,3832	0,30	0,9751

Η απόδοση της αντίδρασης $E = 0.9742$ σε συνδυασμό με τον πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9979$ μας επιτρέπουν να χρησιμοποιήσουμε τους εκκινητές με συγκέντρωση 200 nM για το τελικό στάδιο του πειράματος μας δηλαδή για την ποσοτικοποίηση του DNA σε δείγματα.

Δ) Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA

Γνωρίζοντας από την προηγούμενη πειραματική πορεία ότι η καλύτερη απόδοση της αντίδρασης $E = 1,0174$ προέρχεται από εκκινητές με συγκέντρωση 200 nM δημιουργήσαμε την αντίδραση του Πίνακα 11 και με την μέθοδο της Real Time PCR ορίζοντας την τιμή Threshold=2000 πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 14 Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle), φθορισμού και ποσότητας DNA από τις διαδοχικές αραιώσεις μείγματος χοιρινού κρέατος

Αραιώσεις	Ct	Φθορισμός, R ₀	ng DNA
0	No Ct	-	0,00
0	No Ct	-	0,00
0.05	22,73	3,6663	0,93
0.05	22,73	3,6663	0,93
0.1	22,67	3,6859	1,86
0.1	21,89	3,9557	1,86
0.2	21,58	4,0711	3,71
0.2	21,47	4,1133	3,71
0.4	21,10	4,2601	7,43
0.4	20,64	4,4538	7,43
0.5	20,64	4,4538	9,28
0.5	20,63	4,4582	9,28
0.6	20,14	4,6797	11,14
0.6	19,40	5,0468	11,14
0.8	19,33	5,0838	14,85
0.8	18,65	5,4647	14,85
0.9	18,52	5,5423	16,71
0.9	18,21	5,7343	16,71
0.95	18,03	5,8504	17,64
0.95	17,82	5,9903	17,64
1	17,76	6,0312	18,57
1	16,71	6,8202	18,57

Οι μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες μεθόδους για την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από την Real Time PCR που

προέρχονται από τη βασική φόρμουλα που περιγράφει την ενίσχυση PCR στην εκθετική φάση της αντίδρασης είναι η εξής:

$$X_n = X_0 * (E+1)^n \quad (1)$$

όπου το X_n είναι ποσότητα του προϊόντος της PCR σε n κύκλους, X_0 είναι η αρχική ποσότητα του εκμαγείου και E είναι η απόδοση της αντίδρασης η οποία μπορεί να έχει τιμή μεταξύ 0 και 1. Στην Real Time PCR που χρησιμοποιείται φθορισμός γίνεται δεκτό ότι η συσσώρευση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς είναι ανάλογη προς την συσσώρευση του προϊόντος ενίσχυσης της PCR και η εξίσωση (1) μπορεί να γραφεί

$$R_n = R_0 * (E+1)^n \quad (2)$$

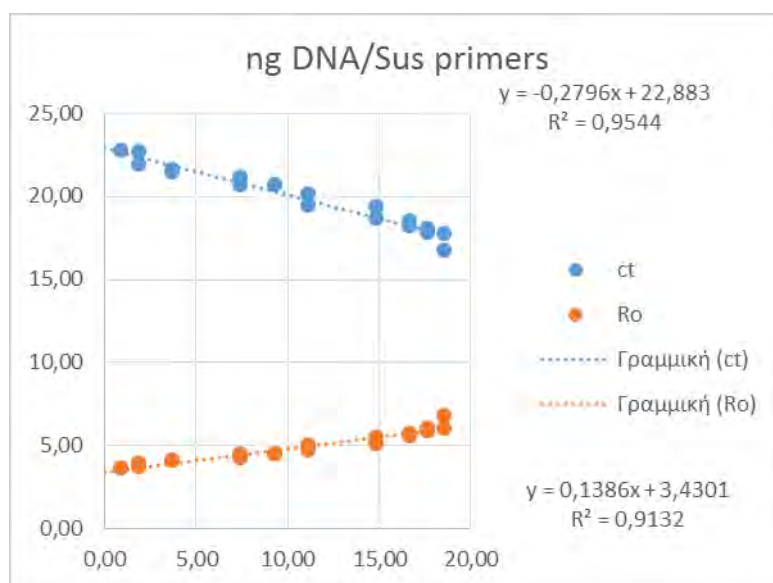
και ο αρχικός φθορισμός υπολογίζεται ως εξής

$$R_0 = R_n / (E+1)^n \quad (3)$$

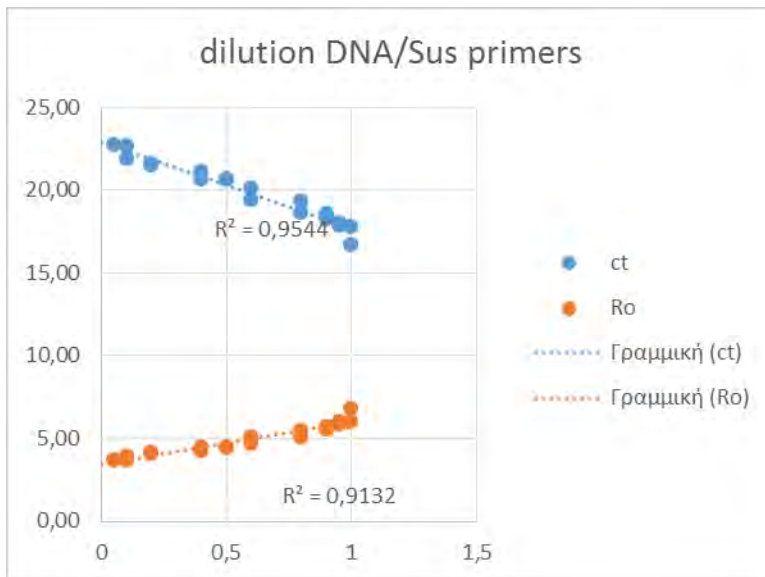
η παράμετρος R_n είναι η ένταση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς σε κύκλο n , και η παράμετρος R_0 είναι το θεωρητικό σημείο έναρξης του φθορισμού το οποίο είναι ανάλογο προς την ποσότητα του αρχικού εκμαγείου. Έτσι, η τιμή R_0 αντιπροσωπεύει την ποσότητα στόχου που εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού.

Η ποσότητα (ng) DNA του Πίνακα 14 προέρχονται από το γινόμενο της ποσότητας του DNA που υπάρχει στα δείγματα με τις αραιώσεις που δημιουργήσαμε.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 14 δημιουργήσαμε δύο διαγράμματα:



Διάγραμμα 3 Καμπύλες αναφοράς της ποσότητας DNA στο δείγμα



Διάγραμμα 4 Καμπύλες αναφοράς του ποσοστού DNA στο δείγμα

Το διάγραμμα 3 έχει στον άξονα y τους αριθμούς Ct και στον άξονα x την ποσότητα DNA. Δημιουργήσαμε 2 καμπύλες αναφοράς. Η πρώτη δημιουργήθηκε από τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και την ποσότητα σε ng του DNA στα δείγματα (πίνακας 14) και η δεύτερη δημιουργήθηκε από τα επίπεδα φθορισμού R_0 και από την ποσότητα DNA στα δείγματα (πίνακας 14). Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 είναι μεγαλύτερος στην πρώτη καμπύλη αναφοράς (Ct, ng DNA). Έτσι λοιπόν συμπεραίνουμε ότι τα δεδομένα μας ταιριάζουν καλύτερα στην καμπύλη αναφοράς των τιμών Ct (Threshold cycle) η οποία είναι πιο γραμμική από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού και μας δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Το διάγραμμα 4 έχει στο άξονα y τους αριθμούς Ct και στο άξονα x το ποσοστό DNA στο δείγμα. Δημιουργήσαμε δύο καμπύλες αναφοράς. Η πρώτη δημιουργήθηκε από τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και από το ποσοστό DNA στα δείγματα και η δεύτερη από τα επίπεδα φθορισμού και το ποσοστό DNA στα δείγματα. Η καμπύλη αναφοράς των τιμών Ct δίνει μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9544$ από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού $R^2 = 0,9132$. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα δεδομένα μας ταιριάζουν καλύτερα στην καμπύλη αναφοράς των τιμών Ct (Threshold cycle) η οποία είναι πιο γραμμική από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού και μας δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Το γενικό συμπέρασμα των αποτελεσμάτων είναι ότι η ποσοτικοποίηση του DNA με βάση τις τιμές Ct (Threshold cycle) μας δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση με μονάδες φθορισμού. Επίσης η χρήση των αποτελεσμάτων ως ποσοστό DNA σε δείγματα μας δίνει πιο εύχρηστα και κατανοητά αποτελέσματα σε σχέση με την ποσότητα DNA στο δείγμα.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ερυθρό κρέας αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στις διατροφικές συνήθειες του σύγχρονου δυτικού κόσμου. Εξαιτίας της βελτίωσης του επιπέδου ζωής, της οικονομικής και κοινωνικής ευμάρειας η κατανάλωση κρέατος τα τελευταία χρόνια είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα. Για αυτό το λόγο η εμπορία κρέατος απέκτησε τεράστια δυναμική. Όμως η μεγάλη ζήτηση και κατανάλωση κρέατος οδήγησε και σε μη σωστές πρακτικές εμπορίας με σκοπό να αποφέρει κέρδος στις βιομηχανίες κρέατος. Σε αυτό το σημείο κρίθηκε απαραίτητη η θέσπιση ενός νομοθετικού πλαισίου έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σωστή εμπορία και διακίνηση τους κρέατος, καθώς και η προστασία του καταναλωτή. Οι πολλές περιπτώσεις νοθείας σε κρέας έκαναν αυτήν την ανάγκη ακόμα πιο επιτακτική. Έγινε προσπάθεια με τη χρήση της επισήμανσης και της ιχνηλασιμότητας του κρέατος να ελεγχθεί η αυθεντικότητά τους χωρίς όμως να μπορέσει να εξαλείψει τα φαινόμενα νοθείας. Η επιτηδευμένη εσφαλμένη επισήμανση, οι διάφορες διατροφικές κρίσεις (π.χ. γρίπη των χοίρων, αφθώδης πυρετός, κλπ) και η αυξημένη ανησυχία των καταναλωτών οδήγησε στην ανάγκη εξεύρεσης πιο ασφαλών και δραστικών μεθόδων. Οπότε κρίνεται απαραίτητο, η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου τον έλεγχο νοθείας και ταυτοποίησης προϊόντων κρέατος.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με σκοπό την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση ειδών ερυθρού κρέατος που βρισκόταν σε μορφή αναμειξωμένων. Η διαδικασία στηρίχτηκε στο μιτοχονδριακό γονίδιο 12SrRNA. Στόχος ήταν να επιτευχθεί ο έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με μοριακούς δείκτες.

Στο παρελθόν έχει μελετηθεί η ποσοτικοποίηση DNA με την μέθοδο της Real Time PCR σε μείγματα διαφόρων ειδών κρέατος από πολλούς ερευνητές. Όμως στις περισσότερες από αυτές δεν χρησιμοποιήθηκε ο γενετικός δείκτης το γονίδιο 12S rRNA.

Με τη μέθοδο της απομόνωσης λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA από μικρή ποσότητα ιστού κρέατος. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών δίνοντας έτσι την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου universal primers. Η χρήση των universal primers απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR και της Real Time PCR.

Αρχικά με την μέθοδο της PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 12S RNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα και κάναμε έλεγχο εάν οι εκκινητές του χοιρινού πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες άλλων ειδών.

Έπειτα χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της Real Time PCR για την ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών DNA στο δείγμα. Στην ποσοτική Real Time PCR υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να εφαρμοστούν για την σήμανση των προϊόντων της Real Time PCR. Η μια μέθοδος βασίζεται στην χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA SYBR Green, και η άλλη στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών (probes).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε την χρωστική SYBR Green πραγματοποιήθηκε για να γίνει έλεγχος της συγκέντρωσης των εκκινητών για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς η οποία θα μας έδινε καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, E) και μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης. Επίσης με την μέθοδο αυτή έγινε έλεγχος για

την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ χοιρινού, μοσχαρίσιου, κοτόπουλου και γαλοπούλας.

Χρησιμοποιώντας την απόδοση της αντίδρασης που πήραμε από την καμπύλη αναφοράς με SYBR Green προχωρήσαμε στην δημιουργία καμπύλων αναφοράς για την ποσοτικοποίηση του DNA των δειγμάτων μας. Με την μέθοδο της Real Time PCR και την χρήση ανιχνευτών taqman δημιουργήσαμε μία αντίδραση η οποία μας έδωσε τιμές Ct (Threshold Cycle). Χρησιμοποιώντας τις τιμές Ct την τιμή της απόδοσης της αντίδρασης που αναφέραμε παραπάνω, το ποσοστό DNA σε γνωστά δείγματα, τα ng DNA σε γνωστά δείγματα και τον φθορισμό που παράγουν τα αρχικά επίπεδα DNA στο δείγμα δημιουργήσαμε τέσσερις διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Η πρώτη δημιουργήθηκε από τις τιμές Ct και τα ng DNA στο δείγμα, η δεύτερη από τα αρχικά επίπεδα φθορισμού και τα ng DNA στο δείγμα, η τρίτη από τις τιμές Ct και από το ποσοστό DNA στο δείγμα και η τέταρτη καμπύλη αναφοράς από τα αρχικά επίπεδα φθορισμού και το ποσοστό στο δείγμα.

Με τις μεθόδους που αναφέραμε φαίνεται πως είναι εφικτή η δημιουργία καμπύλων αναφοράς για την ποσοτικοποίηση DNA σε δείγματα. Από τις τέσσερις καμπύλες αναφοράς που δημιουργήσαμε φαίνεται καθαρά ότι η καμπύλες που κατασκευάστηκαν από τις τιμές Ct είχαν καλύτερο συντελεστή συσχέτισης με αποτέλεσμα να έχουμε πιο έγκυρα αποτελέσματα. Τέλος γίνεται σύγκριση των τιμών Ct (Threshold Cycle) των υπό μελέτη δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andréasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *BioTechniques*, 33, 402–411.

Applied Biosystems, (2003). “Real-Time PCR vs Traditional PCR”. Applied Biosystems. Σελ 1-15.

Ayuso, R., Lehrer, S. B., Tanaka, L., Ibanez, M. D., Pascual, C., Burks, A. W., et al. (1999). Ig-E antibody response to vertebrate meat proteins including tropomyosin. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 83, 399–405.

Bogenhagen, D. F. (2009). Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal Cells. In J. A. Stuart (Ed.), *Mitochondrial DNA: Methods and protocols* (pp. 3–14). (2nd ed.). New York: Humana Press.

Bohler, E., Schafer, T., Ruhdorfer, S., Weigl, L., Wessner, D., Heinrich, J., et al. (2001). Epidemiology of food allergy in adults. *Allergo Journal*, 10, 318–319.

Brown, W. M., George, M., Jr., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 1967–1971.

Cesare C., Marco Di Domenico, Federica M. (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 23, 400-404.

Chiappini, B., Brambilla, G., Agrimi, U., Vaccari, A., Aarts, A., Berben, G., et al. (2005).

Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *Journal of AOAC International*, 88, 1399–1403.

Clayton, D.A. (1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann Rev Biochem*, 53, 573-94.

Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 81–87.

Dooley J., Paine K., Garrett S., Brown H. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431–438.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008a). Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Science*, 78, 314–322.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008b). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science*, 79, 289–298.

Fariyah Liyana, K., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Sazili, A. Q., Aida, A. A., & Raha, A. R. (2009). Porcine specific real-time polymerase chain reaction (PCR) for Halal verification. Proceeding paper presented at the 3rd IMT-GT International Symposium on Halal Science and Management, 21–22 December 2009, pp. 24–28, KLIA Sepang, Selangor, Malaysia

Food Standards Agency, UK (2002), "Traceability in the Food Chain. A preliminary study":

<http://www.foodstandards.gov.uk/multimedia/pdfs/traceabilityinthefoodchain.pdf>

Fraga D., Meulia T. and Fenster S., (2008). "Real Time PCR". John Wiley & Sons, Inc. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Unit 10.3., 1-34.

Gefrides, L., & Welch, K. (2011). Forensic biology: Serology and DNA. In A. Mozayani, & C. Noziglia (Eds.), *The forensic laboratory handbook procedures and practice* (pp. 16–49). (2nd ed.). London: Humana Press.

Gloffke W., 2003. "Quantitative PCR Update". *The Scientist*. Vol 17, No 8, 41

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice *Nature*, 352(6332):255-7

Hagelberg, E., Goldman, N., Lio, P., Whelan, Schiefenhovel, W., Clegg, J.B., Bowden, D.k (1999). Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Malanesia. *Proceedings in Biological Sciences*, 266(1418):485-492

Houghton S. and Cockerill F., 2006. "RealTime PCR: Overview and applications". *Surgery*, Vol 139, No 1, 1-5.

Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*, 82, 444–449.

Kortbaoui, R., Locas, A., Imbeau, M., Payment, P., & Villemur, R. (2009). Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-

tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. *Water Research*, 43, 2001–2010.

Kvist, L. (2000). *Phylogeny and phylogeography of European Parids* (pp. 51). Oulu, Finland: University of Oulu.

Lenstra, J. A. (2010). Detection of adulterations: Identification of animal species. In L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), *Safety Analysis of Foods of Animal Origin* (pp. 601–617). Boca Raton, FL: CRC Press

López-Andreo M., Aldeguer M., Guillén I., Gabaldón J., Puyet A. (2012). Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA. *Food Chemistry*, 134, 518–523.

López-Andreo M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3978–7973.

López-Andreo M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I., & Puyet, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339, 73–82.

Magoulas, A. (2005). Mitochondrial DNA. In S. X. Cadrin, K. D. Friedland, & J. R. Waldman (Eds.), *Stock identification methods: Applications in fishery science* (pp. 311–330). Burlington, MA: Elsevier Academic Press.

Mamikoglu, B. (2005). Beef, Pork, and Milk Allergy (Cross reactivity with each other and pet allergies). *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 133, 534–537.

Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252–259.

Mohd Hazim, M. Y., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Abdul, O., & Nur Fadhilah, K. M. (2012). Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial Cytochrome B gene by molecular beacon probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Analytical Methods*, 5, 422–429.

Moran, C. (2011). Molecular genetics. In M. F. Rothschild, & A. Ruvinsky (Eds.), *The genetics of the pig* (pp. 73–100). Cambridge, MA: CAB International.

Nurhidayatul Asma Mohamad, Aly Farag El Sheikha, Shuhaimi Mustafa, Nur Fadhilah Khairil Mokhtar (2013). Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*, 50, 330–338,

Rodríguez M., Garcia T., Gonzalez I., Hernandez P, Martín R. (2005). TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113–120

Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., et al. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Contaminants and Additives*, 27, 749–763.

Rual Development Group Sierra de Avarena y Picos de Aoche S.A., *The Iberian Pig Rearing, Products and Gastronomy*, Acarena 2002

Saccone, C., Pesole, G., Sbisà, E. (1991). The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-Function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33:83-91

Santos, C. G., Melo, V. S., Amaral, J. S., Estevinho, L., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2012). Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. *Meat Science*, 90, 836–841.

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579–583.

Seuss, J (1990) The nutritional value of meat and meat products. A critical look at their constituents as compared with other foods. *Fleischwirtschaft* 70(12), 1444-1447

Stratagene, 2007. "Mx Pro QPCR Software". Stratagene, La Jolla, CA. pp 4-5, 231-236, 241-243.

Stratagene, 2006. "Introduction to Quantitative PCR". Stratagene, La Jolla, CA. pp. 3-8, 9-11, 23-26.

The Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries of Japan: "Guidelines for introduction of food traceability systems", http://www.maff.go.jp/trace/guide_en.pdf

Traces of pork DNA found in Halal prison meat. (2013). <<http://www.bbc.co.uk/news/uk-21302925>> Retrieved 2.02.13

United States Department of Agriculture: "Traceability in the U.S. Food Supply: Economic Theory and Industry Studies", <http://www.ers.usda.gov/publications/aer830/aer830.pdf>

Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. (1995). *Meat and meat products*. Chapman & Hall, London, pp 10-24.

Zhang, C. L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18, 1149–1158.

Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, A.O., Pogson, G.H. (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*, 389(6394):412-4

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κανονισμός (ΕΚ) 178/2002 «για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφάλειας των τροφίμων». Επίσημη Εφημ. Ευρωπ. Κοινот. αριθ. L 31, 01/02/2002 σ. 1-24.

Κουτσουμανής, Κ. (2008) Σημειώσεις : Ποιοτικός Έλεγχος και Διασφάλιση της Ποιότητας των Τροφίμων. Εκδόσεις : ΑΠΘ

Μπλούκας Ι. (2007), Τεχνολογία Κρέατος, εκδ. οργ. Σταμούλη, Αθήνα.

Οδηγός Εφαρμογής των άρθρων 11, 12, 16, 17, 18, 19 & 20 του κανονισμού (ΕΚ) 178/2002 σχετικά με τη γενική νομοθεσία για τα τρόφιμα. Συμπεράσματα της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων. http://europa.eu.int/comm/food/food/foodlaw/guidance/guidance_rev_7_el.pdf

Συστήματα διαχείρισης της ποιότητας - Θεμελιώδεις αρχές και λεξιλόγιο (2000). Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 9000.