



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ»

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. .... 92 .....
Ημερομηνία .... 16-9-10 .....

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΝΤΑΚΟΣ**

## Ανάπτυξη και Εφαρμογή Μοριακών Δεικτών για την Ταυτοποίηση Ειδών Γάλακτος



ΛΑΡΙΣΑ 2010



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8103/1

Ημερ. Εισ.: 14-04-2010

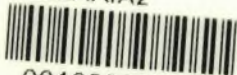
Δωρεά: \_\_\_\_\_

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

637.127

ΝΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087109

# Ανάπτυξη και Εφαρμογή Μοριακών Δεικτών για την Ταυτοποίηση Ειδών Γάλακτος

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ζήσης Μαμούρης (Επιβλέπων): Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αικατερίνη Μούτου: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αιμιλία Ζίφα: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας)  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία έγινε στα πλαίσια της διπλωματικής διατριβής, των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η όλη έρευνα διεξήχθη στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελεγκτικής Βιολογίας

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο της εργασίας το οποίο έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για μένα.

Επίσης, τον υποψήφιο Διδάκτορα κ. Κώστα Σταμάτη, χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του οποίου με την εις βάθος γνώση του ερευνητικού αντικειμένου, θα ήταν αδύνατο να φέρω εις πέρας την εργασία. Αλλά και την Λέκτορα κα Θεολογία Σαραφίδου για την ουσιαστική και καθοριστική της βοήθεια ιδίως στο τελικό στάδιο και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους υπόλοιπους συνεργάτες του εργαστηρίου ( Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη, Θέμη Γιαννούλη, κ.α.) αλλά και όλους τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές που εργάστηκαν την ίδια περίοδο στο εργαστήριο, για την αρμονική συνεργασία και το φιλικό κλίμα, ιδίως δε τον φίλο Παναγιώτη Σταμούλη – γεωπόνου, του οποίου η εργασία ήταν παρεμφερής και του οποίου η βοήθεια ήταν σημαντική.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια μοριακή τεχνική με στόχο το γρήγορο και αποτελεσματικό προσδιορισμό του είδους γάλακτος. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό DNA που απομονώθηκε από διάφορα δείγματα γάλακτος (αγελάδος, πρόβειο, γίδινο και μίγματα αυτών).

Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-RFLP. Αφού απομονώθηκε mtDNA, ενισχύθηκε με την μέθοδο PCR τμήμα του γονιδίου *cyt b*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινοί για τα διάφορα είδη (universal primers). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέψεις με δύο διαφορετικά ένζυμα περιορισμού (HaeIII και MboI) και ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των τμημάτων περιορισμού σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γάλακτος, πρόβειο, γίδινο και αγελάδος καθώς και μιγμάτων αυτών, τα οποία αφορούν κυρίως νωπό γάλα που επί το πλείστον ελήφθη κυρίως από κτηνοτροφικές μονάδες.

Εκτός των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης πρότυπα δείγματα για πρόβειο, αίγιο και αγελάδος και μίγματα αυτών (πρόβειο-αίγιο, αίγιο-αγελάδος, πρόβειο-αγελάδος) που έγιναν στο εργαστήριο.

Η επεξεργασία των προτύπων δειγμάτων και των μιγμάτων τους με τη μέθοδο και η σύγκριση αυτών με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από θεωρητική επεξεργασία με τα προγράμματα βιοπληροφορικής, μας έδωσε μια πολύ καλή ταύτιση για τα προκύπτοντα τμήματα περιορισμού για το κάθε είδος, Διαφοροποίηση είχαμε μόνο για το πρόβειο και τα τμήματα περιορισμού που προκύπτουν με την πέψη με το MboI. Το ίδιο είχαμε για το αγελαδινό.

Αυτές οι διαφορές οφείλονται πιθανώς σε πολυμορφισμό εντός του είδους (πρόβειο, αγελάδος) και είναι ιδιαίτερης σημασίας η ανίχνευσή του με τη μεθόδό μας.

Για τα πρότυπα και τα μίγματά τους αλλά και όλα τα δείγματα, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, έδωσε ευδιάκριτες ζωνώσεις που αντιστοιχούν στα τμήματα περιορισμού, ευκόλως συγκρίσιμες μεταξύ τους

Επίσης για τα πρότυπα και τα μίγματά τους αλλά και όλα τα δείγματα είναι σημαντικό ότι είχαμε πολύ καλή ταύτιση των αποτελεσμάτων ταυτοποίησης που προέκυψαν για τα δύο ένζυμα HaeIII και MboI, αποδεικνύοντας ότι η χρήση τους δίνει σωστά τμήματα περιορισμού ώστε να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ως μοριακοί δείκτες για την ταυτοποίηση των ειδών.

Από τα 50 προς εξέταση δείγματα δεν αξιολογήθηκαν 3 δείγματα κυρίως λόγω κακών απομονώσεων, ενώ για τα υπόλοιπα 47 είχαμε πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την ταυτοποίηση της αυθεντικότητας ή τυχόν αναμίξεων και νοθειών.

Από τα 33 δείγματα πρόβειο γάλακτος όπως δηλώθηκαν, τα 19 ταυτοποιήθηκαν ως πρόβεια, για τα 12 ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη και γίδινο γάλακτος, ενώ για τα υπόλοιπα 2 ταυτοποιήθηκε ανάμιξη και γίδινο και αγελαδινό. Από τα 6 δείγματα γίδινο, για τα δύο ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη και πρόβειο γάλακτος. Ενώ για τα μίγματα αιγοπρόβειο η μέθοδος έδειξε ότι ήταν όντως μίγματα, ενώ όλα τα αγελαδινά δεν είχαν καμία ανάμιξη με άλλο γάλα.

## ABSTRACT

In this study, we have developed an easy, quick and efficient molecular technique to identify the species origin of raw milk. The analysis was carried out in mitochondrial DNA isolated from milk

PCR- RFLP was the used technique. The method based on the amplification of a fragment of the mitochondrial cytb gene of a 369 bp by PCR. Then the products of PCR are digested by two restriction enzymes HaeIII και MboI and the separation of the restriction fragments achieved through polyacrylamide gel electrophoresis.

The samples were taken from the three different kinds, sheep, goat and cow milk and mainly were raw milk.

We used also prototypes from each kind of milk and their mixtures in order to compare the results of the method with these we took through the analysis with bioinformatics.

We concluded that the method gave us very good results and that is sufficient, to detect different kinds of milk and also good for checking adulteration in the whole production and market line of milk and dairy products. Both restriction enzymes can be used alternatively.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
Σημασία καταπολέμησης της νοθείας.....	11
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΔΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ... ..	12
PCR.....	14
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	18
RFLP.....	22
PCR-RFLP.....	28
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	31
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
ΥΛΙΚΑ – ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	32
Υλικά & εξοπλισμός για την απομόνωση DNA από γάλα.....	33
Υλικά & εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	33
Υλικά & εξοπλισμός για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εξαγόμενου DNA.....	34
Υλικά & εξοπλισμός για την εφαρμογή PCR.....	35
Υλικά & εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου RFLP.....	36
Υλικά & εξοπλισμός για τη Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή Πολυακρυλαμίδης.....	36
Υλικά & εξοπλισμός για τη χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης.....	37
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
Ανάπτυξη Μεθόδου.....	38
Απομόνωση Μιτοχονδριακού DNA από δείγματα γάλακτος.....	40
Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός εξαγόμενου DNA.....	42
Ενίσχυση επιθυμητών τμημάτων mtDNA με την μέθοδο PCR.....	44
Θεωρητικός υπολογισμός RFLP.....	46
Ανάλυση RFLP.....	49
Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης.....	49
Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με Νιτρικό Αργυρο.....	51
Αποτελέσματα.....	52
Συζήτηση.....	63
Βιβλιογραφία.....	66



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ταυτοποίηση των ειδών προέλευσης των ζωικών προϊόντων λαμβάνει ολοένα και μεγαλύτερη σημασία τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερα για το γάλα και τα προϊόντα του έχει μεγαλύτερη βαρύτητα καθώς αποτελούν προϊόντα ιδιαίτερης σημασίας για την καθημερινή διατροφή και γι' αυτό είναι μια σταθερά ανοδική αγορά υψηλής αξίας η οποία γίνεται συχνά στόχος κερδοσκοπίας κυρίως με εκτεταμένη νοθεία ιδιαίτερα σε προϊόντα υψηλής αξίας όπως η Φέτα.

Η νοθεία συνήθως γίνεται με αντικατάσταση των ειδών γάλακτος με υψηλότερη τιμή όπως το πρόβειο, με άλλα χαμηλότερης τιμής, είτε με γίδινο περισσότερο από το επιτρεπτό, είτε με αγελαδινό γάλα που είναι κατά πολύ φθηνότερο.

Σε σημαντικό παράγοντα επίσης για την ταυτοποίηση των ειδών έχει αναδειχθεί τελευταία η ύπαρξη διάφορων αλλεργιών οι οποίες οφείλονται στην παρουσία κάποιων πρωτεϊνών σε ορισμένα είδη γάλακτος, ιδίως δε στο αγελαδινό.

Ειδικότερα για την Ελλάδα και τα παραγόμενα από αιγοπρόβειο γάλα τυριά ΠΟΠ (φέτα) το θέμα έχει αποκτήσει διαστάσεις εθνικής σημασίας καθώς η Ελλάδα μετά από την προσφυγή της στα ευρωπαϊκά δικαστήρια έχει κερδίσει την κατοχύρωση της ονομασίας «φέτας» ως Π.Ο.Π. σε πανευρωπαϊκό επίπεδο.

Ωστόσο, τα ανταγωνιστικά κράτη (Δανία, Γερμανία, Γαλλία) προσπαθούν να τεκμηριώσουν την κατάργηση της αποκλειστικότητας χρήσης του ονόματος «φέτα» από την Ελλάδα βασιζόμενοι και σε παραδείγματα εκτεταμένης νοθείας που υφίσταται το προϊόν από παρασκευαστές στην Ελλάδα

## 1. Γάλα, Αιγοπρόβειο Γάλα και Τυροκομικά Προϊόντα από Αιγοπρόβειο Γάλα.

### 1.1 Γενικά

Το γάλα και το κρέας είναι τρόφιμα ζωτικής σημασίας, αναπτυξιακοί μοχλοί και διατροφικά όπλα στρατηγικής σημασίας για τις χώρες που τα παράγουν και τα εμπορεύονται. Η Ελλάδα είναι χώρα με μεγάλη παράδοση στην κτηνοτροφία, ειδικότερα σ' αυτή των μικρών μηρυκαστικών (αιγοπροβατοτροφία). Η παραγωγική αυτή κατεύθυνση στηρίχθηκε στους άφθονους φυσικούς πόρους και προσαρμόστηκε στις ιδιαίτερες κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες της πατρίδας μας.

Στην Ελλάδα, η ζωική παραγωγή αντιπροσωπεύει περίπου το 1/4 της ακαθάριστης αξίας της γεωργικής παραγωγής (23,6 % το 2005). Παρά την περιορισμένη συμμετοχή της στην ακαθάριστη αξία της γεωργικής παραγωγής κατέχει σημαντικό ρόλο στην εθνική μας οικονομία, γιατί παρέχει εισόδημα και εργασία σε χιλιάδες οικογένειες, συμβάλλοντας έτσι καθοριστικά στην περιφερειακή ανάπτυξη και στη διατήρηση του κοινωνικού ιστού του τόπου μας σε περιοχές με ιδιαίτερα προβλήματα (ορεινές-μειονεκτικές). Η συμμετοχή των επί μέρους κλάδων της κτηνοτροφίας στο σύνολο της ζωικής παραγωγής υπολογίζεται σε 58,7% για την αιγοπροβατοτροφία, 19,25% για τη βοοτροφία, 9,9% για την πτηνοτροφία, 7,8% για τη χοιροτροφία και 4,45% για τους λοιπούς τομείς (35).



Το αιγοπρόβειο κρέας και το γάλα είναι δύο βασικές κατηγορίες προϊόντων με μεγάλη οικονομική σημασία. Ειδικότερα για την Περιφέρεια Θεσσαλίας είναι οι στυλοβάτες του αγροτικού εισοδήματος των κατοίκων των ορεινών και μειονεκτικών περιοχών της (πρώην Επαρχία Ελασσόνας, ορεινά Νομών Τρικάλων , Καρδίτσας, Μαγνησίας) (36).

## 1.2 ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ

Ο κλάδος της κτηνοτροφίας που επικράτησε στην Ελλάδα είναι η αιγοπροβατοτροφία, λόγω των εδαφοκλιματικών συνθηκών που δεν ευνοούσαν την αγελαδοτροφία. Το 75% του εδάφους της καταλαμβάνουν ορεινές και ημιορεινές εκτάσεις με φυσική βλάστηση, για την εκμετάλλευση των οποίων η εκτροφή αιγοπροβάτων αποτελούσε και αποτελεί την καλύτερη λύση.

Το αιγοπρόβειο γάλα αντιπροσωπεύει το 60% περίπου της συνολικής γαλακτοπαραγωγής της και τουλάχιστον το 85% της παραγωγής της, σε τυριά, προέρχεται από το γάλα αυτό. Κατά συνέπεια, τα περισσότερα τυριά παρασκευάζονται από Αιγοπρόβειο γάλα.

Ο τομέας της αιγοπροβατοτροφίας για το σύνολο των χωρών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε) δεν έχει την ίδια σημασία όπως για τη χώρα μας. Στην Ε.Ε εκτρέφονται περίπου 100,5 εκατομμύρια πρόβατα και αίγες. Οι σημαντικότερες χώρες από πλευράς εκτρέφόμενου αριθμού προβάτων, είναι το Ηνωμένο Βασίλειο με 24,4



εκατομμύρια, η Ισπανία με 22,5 εκατομμύρια, η Ιταλία με 8,0 εκατομμύρια, η Γαλλία με 8,8 εκατομμύρια και η Ελλάδα με 8,5 εκατομμύρια με βάση στοιχεία του 2005..

Σε ότι αφορά τις αίγες, για το ίδιο έτος, η Ελλάδα εκτρέφει 5,1 εκατομμύρια ζώα περίπου και ακολουθούν η Ισπανία με 2,9 εκατομμύρια , η Γαλλία με 1,2 εκατομμύρια και η Ιταλία με 960 χιλιάδες ζώα περίπου (37).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στη χώρα μας εκτρέφεται περίπου το 45% του συνολικού αριθμού αιγών της Ε.Ε.

Στην Ε.Ε η εκτροφή προβάτων και αιγών γίνεται κύρια για το κρέας τους ενώ στη χώρα μας γίνεται για το γάλα τους, χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι το 95% των ζώων στην Ελλάδα αρμέγεται.

Το ζωικό κεφάλαιο σε επίπεδο Ε.Ε παρουσιάζει μείωση στο σύνολό του σε ποσοστό 11,3% περίπου το διάστημα 2000-2006, μείωση που αφορά τόσο τα πρόβατα, όσο και τις αίγες. Η μείωση αυτή είναι ιδιαίτερα αισθητή κατά τα δύο έτη 2005 και 2006, αν και τα υπάρχοντα μέχρι τώρα στοιχεία για τα έτη αυτά αποτελούν εκτιμήσεις ή προβλέψεις.

Στην Ελλάδα στην αιγοπροβατοτροφία γαλακτοπαραγωγής απασχολούνταν περίπου 200.000 οικογένειες που ζουν από την άσκηση αυτού του δύσκολου και επίπονου επαγγέλματος, ενώ η παραγωγή γάλακτος κυμαίνεται σε 1,1 εκ. τόνους και αντιπροσωπεύει το 25% της ευρωπαϊκής παραγωγής.

Χαρακτηριστικά ο αριθμός των εκμεταλλεύσεων είναι μεγάλος (συνολικά 125.000 χιλιάδες εκμεταλλεύσεις προβάτων και 160.000 εκμεταλλεύσεις αιγών), ενώ η πολυπληθέστερη κατηγορία και στους δυο τύπους ζώων είναι εκμεταλλεύσεις με 10 έως 50 κεφάλια (συνολικά 79.828 κεφάλια). Στα κατσίκια οι μικρές εκμεταλλεύσεις (1-9 ζώα) συνιστούν το 66% του συνολικού αριθμού εκμεταλλεύσεων.

Από γεωγραφική άποψη, η Περιφέρεια Θεσσαλίας συγκεντρώνει το 12,4% του πληθυσμού αιγών και το 16,7% του πληθυσμού προβάτων. Η τεχνολογική υποδομή των αιγοπροβατοτροφικών εκμεταλλεύσεων της χώρας (ζωικό κεφάλαιο, οργάνωση, διαχείριση, εγκαταστάσεις) είναι ανεπαρκής. Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικά βήματα στη ζώνη συλλογής του γάλακτος, η εξασφάλιση υγιεινών συνθηκών στη συλλογή και μεταφορά του γάλακτος είναι προβληματική με επιπτώσεις στη διαδικασία τυροκόμησης και στο τελικό κόστος του προϊόντος.

Το 75% του αιγοπρόβειου γάλακτος χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριών και μεγάλο μέρος του υπολοίπου για ιδιοκατανάλωση από τους παραγωγούς

### 1.3 ΤΥΡΟΚΟΜΙΚΑ

Η εγχώρια παραγωγή τυροκομικών προϊόντων υπολείπεται σταθερά της κατανάλωσης. Ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα στην παραγωγή τυροκομικών προϊόντων είναι η επάρκεια πρώτης ύλης. **Η εγχώρια τυροκομία αφορά κυρίως την παραγωγή προϊόντων από αιγοπρόβειο γάλα.**

Το γεγονός αυτό προκύπτει από την ιστορική παράδοση της χώρας αφενός, αλλά και από τους υφιστάμενους περιορισμούς στην εγχώρια κτηνοτροφία που προέκυψαν πιο πρόσφατα με την είσοδο της Ελλάδας στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Οι περιορισμοί που ισχύουν για το αγελαδινό γάλα και καθορίζονται από τα όρια ποσόστωσης που αποφασίζονται από την Ε.Ε. δεν ισχύουν για το αιγοπρόβειο γάλα. Παράλληλα το αιγοπρόβειο γάλα δεν δικαιούται ενισχύσεων. Έτσι οι κτηνοτρόφοι είναι ελεύθεροι να διαμορφώσουν την παραγωγή τους, αλλά και τις τιμές, ανάλογα με την πορεία της ζήτησης που είναι κυρίως η τυροκόμηση φέτας και σε πολύ μικρότερο βαθμό άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα.

#### *Σχετικά με την αγορά τυροκομικών προϊόντων από αιγοπρόβειο γάλα*

Η φαινομενική κατανάλωση τυριών από 230 χιλιάδες τόνους το 1993 διαμορφώθηκε σε 254 χιλιάδες τόνους το 1997 και σε 269 χιλιάδες τόνους το 1998. Εξαίρεση αποτελεί η διετία 1995-96, όπου η αγορά επηρεάστηκε αρνητικά από την άνοδο στις τιμές της φέτας, με αποτέλεσμα να συσσωρευτεί σημαντικό μέρος της παραγωγής αλλά και από τη μείωση των εισαγωγών.

Η συμμετοχή των εισαγόμενων τυριών στο σύνολο κατανάλωσης κυμαίνεται στο 24-26%. Σύμφωνα με εκτιμήσεις προβλέπεται ότι οι εισαγωγές τυριών θα παραμείνουν σ' αυτά τα επίπεδα. Είναι φανερό από τα μεγέθη ότι η σταδιακή αύξηση της κατανάλωσης οφείλεται κυρίως στα Ελληνικά τυριά.

Η ετήσια συνολική παραγωγή φέτας στην Ελλάδα εκτιμάται στους 120 χιλιάδες τόνους.

Στην Περιφέρεια Θεσσαλίας παράγονται συνολικά περίπου 22.000 τόνοι φέτας ετησίως. Το 20% της ποσότητας αυτής εξάγεται κύρια στις χώρες της Ε.Ε. , στην Αυστραλία και στην Αμερική.

Πρέπει λοιπόν να σημειωθεί ότι οι μέσες τιμές των εξαγωγών κατά την τελευταία πενταετία είναι μεγαλύτερες των αντίστοιχων μέσων τιμών των εισαγωγών, μιας και κατά την τελευταία πενταετία η μέση τιμή εισαγόμενων τυριών αυξήθηκε κατά 9,7%, ενώ η αντίστοιχη των εξαγομένων αυξήθηκε κατά 17,1%. Η ένδειξη αυτή συνηγορεί στο ότι τα

Ελληνικά τυριά που εξάγονται πετυχαίνουν καλύτερες τιμές από τα αντίστοιχα τυριά που εισάγονται στην Ελλάδα. Σύμφωνα δε με το EUROSTAT, οι τιμές των εξαγόμενων Ελληνικών τυριών είναι ανάμεσα στις υψηλότερες τιμές των τυριών της Ε.Ε.

Στην περίπτωση της Φέτας, οι εισαγωγές λευκών τυριών (Τύπου Φέτας) χρησιμοποιούνται κυρίως από τις επιχειρήσεις μαζικής εστίασης και κατασκευής πιτών, μιας και το πλεονέκτημα του προϊόντος αυτού είναι η σαφώς χαμηλότερη τιμή του, τόσο έναντι της Φέτας, όσο και έναντι άλλων Ελληνικών τυριών άλμης (Τελεμές, λευκά τυριά, κ.λπ.).

Η Ελληνική παραγωγή τυριών υπόκειται, τα τελευταία χρόνια σε δριμύ ανταγωνισμό από τα εισαγόμενα τυριά. Εκτός αυτού μόνιμο πρόβλημα για τα παραδοσιακά προϊόντα είναι η κυκλοφορία αντίστοιχων υποδεέστερων νοθευμένων προϊόντων.

**Γι αυτό είναι πρωταρχικής σημασίας η καταπολέμηση της νοθείας σ' όλα τα σημεία της αλυσίδας παραγωγής και εμπορίας, από την α' ύλη το γάλα μέχρι το τελικό προϊόν.**

## 2. Σημασία της καταπολέμησης της νοθείας

Όπως αναθέρθηκε παραπάνω για ένα μεγάλο αριθμό ελληνικών παραδοσιακών προϊόντων και προϊόντων ποιότητας, όπως π.χ. η Φέτα ή διάφορα άλλα προϊόντα τα οποία έχουν καταχωρηθεί ως ΠΟΠ, ΠΓΕ κ.α. είναι ιδιαίτερης σημασίας η ευόδωση της προσπάθειας για τον έλεγχο της ποιότητας και την αποτροπή της νόθευσης σ' όλη την αλυσίδα παραγωγής, «από το χωράφι ως το πιάτο του καταναλωτή».

Μετά τα πολλά διατροφικά σκάνδαλα των τελευταίων ετών, όλα τα εμπλεκόμενα μέρη (παραγωγοί, αγρότες, μεταποιητές, έμποροι και καταναλωτές) συμφωνούν ότι το πιο σημαντικό θέμα είναι η ΠΟΙΟΤΗΤΑ των διατιθέμενων τροφίμων.

Και με τον όρο «ΠΟΙΟΤΗΤΑ» εννοείται ότι:

- Το προϊόν είναι ασφαλές για την υγεία του καταναλωτή
- Έχει τα κατάλληλα οργανοληπτικά και διατροφολογικά χαρακτηριστικά που ικανοποιούν το μέσο καταναλωτή
- «Είναι και Περιέχει» ότι αναγράφεται στην επισήμανση της συσκευασίας
- Είναι «αυθεντικό»

Πλέον, είναι γεγονός η στροφή των καταναλωτών όλο και περισσότερο προς την υγιεινή διατροφή και μάλιστα σε προϊόντα υψηλής ποιότητας και διατροφικής αξίας, όσο γίνεται πιο φρέσκα και αγνά, με ελάχιστη μεταποίηση, παραδοσιακά και αυθεντικά.

Λόγω αυτού παρατηρείται τελευταία ένας αγώνας δρόμου από κράτη και επιχειρήσεις για την παραγωγή, ανάδειξη και προστασία παραδοσιακών προϊόντων (π.χ. Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης ΠΟΠ, Προϊόντων Γεωγραφικής Ενδειξης ΠΓΕ, βιολογικών) και για την τεκμηρίωση της αυθεντικότητας αυτών, καθώς θεωρούνται ιδιαίτερης σημασίας για τις εθνικές και τοπικές οικονομίες.

Γι' αυτό κρίνεται ιδιαίτερης σημασίας η ανάπτυξη των κατάλληλων μεθόδων ελέγχου της ποιότητας και της νοθείας σ' όλα τα κρίσιμα στάδια της παραγωγής και διάθεσης αυτών των προϊόντων και μάλιστα με αναλύσεις πέραν των παραδοσιακών μεθόδων που εφαρμόζονται.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνολογιών που αφορούν την ταυτοποίηση και τη διάκριση των ειδών στα προϊόντα με την παράλληλη ανίχνευση πιθανών προσμίξεων καθώς και την ιχνηλασιμότητα με την έννοια του ελέγχου της προέλευσης των προϊόντων, δηλαδή της φυλής των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν ή της γεωγραφικής τους προέλευσης.

Έτσι, οι μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών προέλευσης των ζωικών προϊόντων (κρέας – γάλα) αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη αξία τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερα για τα γαλακτοκομικά είναι ιδιαίτερης βαρύτητας, εξαιτίας της εκτεταμένης νοθείας που παρατηρήθηκε σε κάποια προϊόντα (π.χ. Φέτα) με αντικατάσταση των ακριβότερων ειδών γάλακτος (πρόβειο: ~1 euro/kg, αίγαιο: 0,6 euro/kg), είτε με περισσότερο αίγαιο, είτε με αγελαδινό γάλα που είναι κατά πολύ φθηνότερο (0,3 – 0,4 euro/kg).

Επίσης η ταυτοποίηση των ειδών προέλευσης στα διάφορα προϊόντα είναι ιδιαίτερα σημαντική και για τις περιπτώσεις διατροφικών αλλεργιών, σε συγκεκριμένης ζωικής προέλευσης προϊόντα π.χ. κρέας ή γάλα αγελάδος, χοιρινό κρέας κ.λπ. Σε ορισμένες περιπτώσεις τέτοιες αλλεργίες προκαλούνται ακόμη και με την παρουσία ιχνών του αλλεργιογόνου, γεγονός που δείχνει την ανάγκη ανάπτυξης μίας μεθόδου ταυτοποίησης ιδιαίτερα ευαίσθητης.



### 3. Μέθοδοι για την ταυτοποίηση ειδών – Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται έως τώρα βασίζονται κυρίως στην ανίχνευση πρωτεϊνών που περιέχονται μόνο στο ένα είδος γάλακτος, όπως ηλεκτροφορετικές (capillary, two dimensions) , χρωματογραφικές – HPLC (De Noni, Tirelli & Masoti, 1996, Molina, Martin-Alvarez & Ramos, 1999), και ανοσολογικές (ELISA).

Η μέθοδος της Ισοηλεκτρικής εστίασης είναι η Μέθοδος Αναφοράς της Ευρωπαϊκής κοινότητας για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος (EC Regulation, 2001).

Στην ανάλυση τροφίμων η μέθοδος ELISA ( Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) είναι η πιο διαδεδομένη ανοσοβιολογική μέθοδος, καθώς είναι εύκολη στη χρήση και δεν απαιτεί εξεζητημένο εξοπλισμό και έχει έτσι μειωμένο κόστος ( Giannaccini et al., 2004).

Εως τώρα έχουν αναφερθεί αρκετές ανοσολογικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών για το γάλα και το τυρί. Για παράδειγμα οι Hurley, Coleman, Ireland and Williams (2004) ανέπτυξαν μια ELISA για την ανίχνευση χαμηλών ποσοστών αγελαδινού γάλακτος σε γίδινο, πρόβειο ή βουβαλίσιο γάλα. Επίσης οι Rodriguez, Martin, Garcia, Hernandez and Sanz (1994) ανέφεραν μια sandwich ELISA για την ανίχνευση πάνω από 1% γιδίνου γάλακτος σε πρόβειο γάλα και τυρί, εκτός άλλων (Anguita et al., 1997; Garcia et al., 1990; Haza et al., 1997; Levieux & Vevien, 1994; Rodriguez, Martin, Garcia, Hernandez & Sanz, 1990).

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί προς την πλευρά τεχνικών προσέγγισης με βάση το DNA οι οποίες έχουν αποδειχθεί αξιόπιστες, ευαίσθητες και γρήγορες για πολλές περιπτώσεις αξιολόγησης της αυθεντικότητας ιδιαίτερα στα τρόφιμα.

Ανάμεσα σε άλλες βιομοριακές τεχνικές (Plath, Krause and Einspanier, 1997) η PCR (Polymerase Chain Reaction – Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) είναι αναμφίβολα εκείνη που έχει εφαρμοστεί και χρησιμοποιηθεί περισσότερο, ιδιαίτερα για την ανίχνευση της προέλευσης και την ταυτοποίηση των ειδών στα τρόφιμα (Dalmasso et al., 2004).

Όταν πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ ειδών στενά σχετιζόμενων, τότε τα τμήματα τα παραγόμενα από την PCR με τη χρήση primers γενικής χρήσης (universal) οι οποίοι σχεδιάστηκαν στο μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b (cyt.b), τότε ο χαρακτηρισμός γίνεται με ανάλυση περιορισμού PCR-RFLP (**Restriction Fragment Length Polymorphism**) (Kocher et al., 1989)

Ετσι έχει καταστεί δυνατή η διαφοροποίηση μεταξύ πρόβειου, γιδίνου και αγελαδινού , καθώς και μεταξύ αγελαδινού και βουβαλίσσιου DNA (Meyer, Hofelein, Luthy, & Candrian, 1995)

Το γάλα από υγιή ζώα αυτών των ειδών (πρόβατο, κασίκι, αγελάδα) έχει ένα μεγάλο αριθμό σωματικών κυττάρων , τα οποία περιέχουν γενομικό DNA κατάλληλο για ενίσχυση με τη μέθοδο PCR (Amills, Francino, Jansa, & Sanchez, 1997; Lipkin, Shalom, Khatib, Soller, & Friedmann, 1993).

- Το 2000 Jacek Bania, Maciej Ugorski, Antoni Polanowski και Eryk Adamczyk χρησιμοποίησαν μια διαδικασία PCR ενός βήματος για την ανίχνευση νοθείας του γιδίνου γάλακτος με αγελαδινό. Χρησιμοποίησαν εκκινητές (primers) με ειδίκευση στο αγελαδινό για την ενίσχυση ενός τμήματος 274 bp του cyt b του DNA. Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και με καλή εξειδίκευση και ευαισθησία.
- Το 2003 οι Bottero M.T., Civera T., Nucera D., Rosati S., Sacchi P., Turi R.M., ανέπτυξαν μια πολλαπλή (multiplex) PCR για να ταυτοποιήσουν αγελαδινό, γίδινο και πρόβειο γάλα σε μίγματα τυριών. (20)

➤ Το 2005 οι Ines M. Lopez-Calleja, Isabel Gonzalez , Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin (Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain) *International Dairy Journal* 17 (2007) 87–93 διερεύνησαν την εφαρμογή των μεθόδων PCR -polymerase chain reaction και ELISA (indirect enzyme-linked immunosorbent assay) για την ανίχνευση της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος σε τυριά από γίδινο και πρόβειο γάλα. Για την εφαρμογή της PCR χρησιμοποιήθηκε ένας specific primer με στόχο το τμήμα 223 από το μιτοχονδριακό γονίδιο 12 S rRNA

Η μέθοδος (PCR) εφαρμόστηκε σε έτοιμα πειραματικά μίγματα τυριών αλλά και σε βιομηχανικά παρασκευασμένα τυριά με γνωστά ποσοστά % αγελαδινού γάλακτος και έδειξε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση χαμηλών ποσοστών αγελαδινού γάλακτος έως 1%

Η ELISA εφαρμόστηκε με τη χρήση ενός μονόκλωνου αντισώματος (AH4) έναντι της αγελαδινής b-casein

Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι και οι δύο μέθοδοι αποτελούν πολύ καλά εργαλεία για την ανίχνευση νοθείας με αγελαδινό γάλα έως και 1% σε πρόβεια και γίδινα τυριά. (19)

➤ Οι ίδιοι ( Ines M. Lopez-Calleja, Isabel Gonzalez , Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin) το 2006 ανέπτυξαν μια άλλη μέθοδο η οποία βασίζεται στη Real time PCR, το προϊόν της οποίας μετρείται με τη χρήση ενός probe φθορισμού (σημασμένο 6-καρβοξυφθορίζον) Tagman, για την ποσοτική ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος σε μίγματα με πρόβειο γάλα.

➤ Οι Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin Το 2005 οι S.M. Abdel-Rahman, M.M.M Ahmed χρησιμοποίησαν τις τεχνικές PCR και PCR – RFLP's για την ανίχνευση Αγελαδινού, βουβαλίσσιου και πρόβειου γάλακτος με τρόπο γρήγορο και με εξειδίκευση και ευαισθησία Το DNA από μικρή ποσότητα γάλακτος (~100 µl) εξάγεται για να ενισχυθεί η περιοχή του γονιδίου όπου κωδικοποιείται SSR-species specific repeat και το τμήμα του μιτοχονδριακού DNA (cytochrome-b gene). Το μέγεθος ενίσχυσης για το πρώτο ήταν 603 bp και στο αγελαδινό και στο βουβαλίσσιο γάλα, ενώ στο πρόβειο ήταν 374 bp. Η τεχνική PCR – RFLP's χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό μεταξύ βουβαλίσσιου και αγελαδινού γάλακτος. Ανάλυση περιορισμού της αναλυσης PCR-RFLP του μιτοχονδριακού cyt-b τμήματος (359 bp) έδειξε διαφορά μεταξύ βουβαλίσσιου και αγελαδινού γάλακτος.

#### 4. PCR – Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

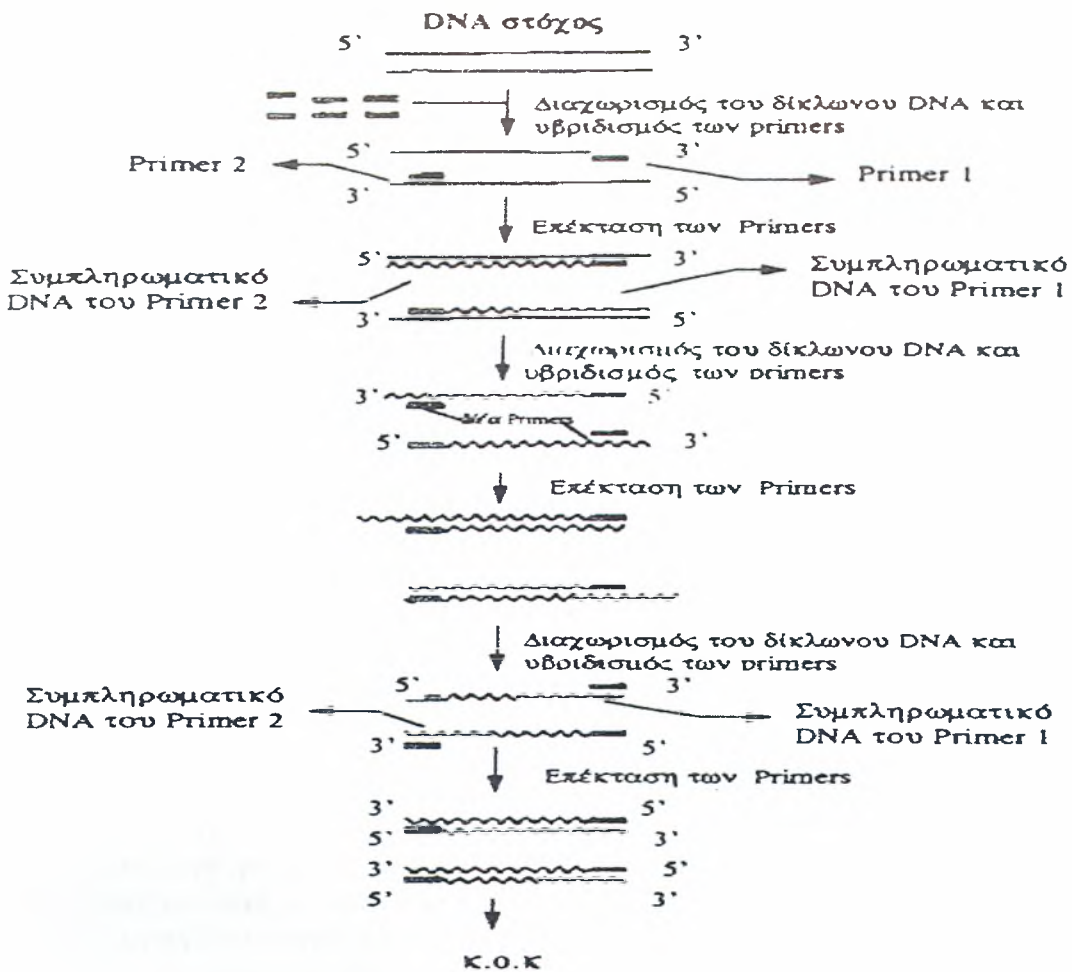
Η τεχνική PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki την εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών.

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, "in vitro". Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλύσεων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

στόχος, επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Εν συνεχεία συνδέονται «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητές ή και "primers" στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2ο στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού (primer) και η αλυσος επεκτείνεται (3ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσος ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR.





Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές "primers", τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο *Taq DNA* πολυμεράση, ιόντα  $Mg^{++}$  απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα  $pH \approx 8.2$  για τη δράση του ενζύμου.

Το ένζυμο *Taq DNA* είναι μια θερμοάντοχη DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus (Taq)* και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους  $+95^\circ C$ , θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου, επί 40 τουλάχιστον λεπτά.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον 4 και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2ο κύκλο. Στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων, αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του στόχου DNA, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA στόχου,  $2^n$  όπου  $n$  ο αριθμός των κύκλων.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια, μετουσίωσης, υβριδισμού και επέκτασης. Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία  $94-95^\circ C$  για 30 sec περίπου, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία  $50-65^\circ C$  επί 1 min και τέλος η επέκταση των εκκινητών στους  $72-74^\circ C$  επί 30sec έως 1 min ανάλογα του μεγέθους του προϊόντος της PCR και της ποιότητας της *Taq DNA* πολυμεράσης.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, **τους θερμοκυκλοποιητές**, οι οποίοι έχουν την ικανότητα

να ανεβοκατεβάζουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερομένων θερμοκρασιών, σε λιγότερο από 1 min για αυξομείωση θερμοκρασίας 40° C.

Το DNA στόχος είναι δυνατόν να προέρχεται από ποικιλία δειγμάτων και μάλιστα σε μη καθαρή μορφή. Συνήθως 100 ng ολικού DNA είναι αρκετά για να επιτευχθεί η γονιδιακή επέκταση του DNA στόχου. Προϋπόθεση για την επέκταση του DNA στόχου είναι η ακεραιότητά του.

Η αλληλουχία βάσεων του DNA στόχου είναι δυνατόν να είναι άγνωστη, θα πρέπει όμως η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA στόχου να είναι γνωστή ώστε να κατασκευασθούν τα *συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια* (primers).

Η επιλογή των εκκινητικών μορίων (primers) είναι μεγάλης σημασίας. Τα *εκκινητικά μόρια* θα επιλεγθούν πάνω σε μη μεταβλητές περιοχές του DNA στόχου, το οποίο θα μεγεθυνθεί μεταξύ των 2 εκκινητικών μορίων. Το προϊόν της αντίδρασης PCR θα είναι το μεγεθυμένο τμήμα DNA, το οποίο θα καθορίζεται από τα 2 εκκινητικά μόρια, τα οποία θα αποτελούν και τα άκρα του. Τα εκκινητικά μόρια, θα πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C, A/T να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3 ή 5 άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων. Τα εκκινητικά μόρια θα πρέπει επίσης να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιατάξεως η τήξεως (*T<sub>m</sub>*, *melting temperature*).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους οπότε το τμήμα του DNA στόχου μεγεθύνεται 2<sup>n</sup> (όπου n ο αριθμός των κύκλων). Για την επιτυχή μεγέθυνση ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο μεγέθυνσης. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στην μη ανίχνευση του DNA στόχου.

Το κύριο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης την πολυμεράσης είναι δίκλωνο DNA το οποίο περιβάλλεται από τα primers, των οποίων τα 5' άκρα είναι και τα άκρα του προϊόντος της PCR. Το μέγεθος του σε ζεύγη βάσεων (bp) είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητών στο DNA στόχο η οποία εξαρτάται κυρίως από την *θερμοκρασία υβριδισμού* (*T<sub>a</sub>*). Όσο πιο κοντά είναι η *T<sub>a</sub>* προς την *T<sub>m</sub>* τόσο πιο πολύ η ειδικότητα αυξάνει. Η ειδικότητα εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση ιόντων Mg<sup>++</sup>, τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητών και του DNA στόχου. Η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε βέλτιστες συνθήκες επιβεβαιώνεται σαν ένα ομοιογενές προϊόν **σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης**, το μέγεθος του οποίου ταυτίζεται με το μέγεθος του DNA στόχου. Το ομοιογενές προϊόν της PCR συνήθως προσδιορίζεται **με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας αποκαλύπτοντας το προϊόν της PCR.

**Εναλλακτικά επιβεβαίωση της ειδικότητας του προϊόντος της PCR μπορεί να γίνει και με ανάλυση με ένζυμα περιορισμού.** Το ή τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης υποβάλλονται ακολούθως σε ηλεκτροφόρηση για να διαπιστωθεί αν το άθροισμα των θραυσμάτων του προϊόντος της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος (δηλ.

τον ίδιο αριθμό βάσεων). Το κύριο χαρακτηριστικό της PCR είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου.

### ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

Οι κυριότεροι παράγοντες λοιπόν που επιδρούν θετικά και ενισχύουν την ειδικότητα της αντίδρασης PCR είναι:

- σωστή ( μετά από τιτλοποίηση ) συγκέντρωση  $Mg^{2+}$ , dNTPs, Taq, εκκινητών
- χαμηλός αριθμός κύκλων
- αυξημένη θερμοκρασία υβριδισμού
- εκτέλεση της όλης διαδικασίας προετοιμασίας της PCR σε χαμηλή θερμοκρασία ( 4°- 8°C ) και σε ειδικές συσκευές ( PCR WORKSTATION) και ενδεχομένως
- θερμική εκκίνηση (hot start)

### ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ PCR

**Θερμικοί κυκλοποιητές (Thermal cyclers).** Οι συσκευές αυτές έχουν αυτοματοποιήσει πλήρως την εκτέλεση της PCR. Στις συσκευές αυτές ένα ειδικό λογισμικό πρόγραμμα ελέγχει το σύστημα ψύξης/θέρμανσης, που είναι υπεύθυνο για τις αλλαγές της θερμοκρασίας, ανάλογα με το βήμα της αντίδρασης.

Εξελίξεις στους θερμικούς κυκλοποιητές περιλαμβάνουν:

- δυνατότητα εκτέλεσης της PCR εντός φρεατίων **μικροπλακών 96 ή και 384 θέσεων** με σκοπό την αυτοματοποίηση των σταδίων προετοιμασίας της PCR
- δυνατότητα **διαβάθμισης θερμοκρασίας υβριδισμού (gradient)** με σκοπό την ευκολότερη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών
- δυνατότητα εκτέλεσης PCR σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου για πειράματα **in situ PCR**
- δυνατότητα ταχύτερης αυξομείωσης θερμοκρασίας με **συστήματα Peltier** καθώς και με κυκλοφορητή αέρα (**air cycling systems**)
- εκτέλεση της αντίδρασης σε υάλινα τριχοειδή με σημαντική μείωση του χρόνου για την ολοκλήρωση της αντίδρασης (30 κύκλοι σε 30 min)
- δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε **πραγματικό χρόνο (real time PCR)** με τη βοήθεια κατάλληλων ιχνηθετημένων ολιγονουκλεοτιδίων με φθορίζουσες ουσίες και δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των αρχικών αντιγράφων του DNA στόχου.

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

**Ποιοτικός προσδιορισμός.** Περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel), η συγκέντρωση της οποίας εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται. Για τμήματα DNA μεγαλύτερα των 150bp (ζεύγη βάσεων) περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη 2 έως 6% (W/V) είναι επαρκής, αλλά για τμήματα μεταξύ 50-150bp, απαιτείται συνήθως ειδική αγαρόζη ( metaphor ).

Για τμήματα μικρότερα των 50bp σε μέγεθος, το πολυακρυλαμίδιο είναι το καλύτερο διαχωριστικό μέσο με συγκεντρώσεις από 8 - 20% (W/V). Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου είναι πολύ κατάλληλη για διαχωρισμούς μικρών τμημάτων DNA καθώς χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή ικανότητα διαχωρισμού ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται η χρωστική Silver Staining . Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό

των προϊόντων της αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται κυρίως το βρωμιούχο αιθίδιο, μια ουσία που έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό λόγω σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής (intercalation) με το δίκλωνο DNA όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (UV - γύρω στα 300 nm). Το όριο ανίχνευσης με την τεχνική αυτή είναι 10 ng DNA.

Άλλη φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται και χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή ευαισθησία είναι το SYBR GREEN (Molecular Probes).

Αν είναι απαραίτητο, οι ζώνες του DNA μπορούν να ανακτηθούν από το πήκτωμα, να καθαριστούν και να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς (όπως π.χ. για αλληλούχηση).

## 5. Σχετικά με τους Μοριακούς Δείκτες ( RFLP, SSCP, RAPD κ.α.) <sup>(41)</sup>

Εξαιτίας της μεγάλης προόδου που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια στην μοριακή βιολογία, μπορούμε σήμερα να χρησιμοποιήσουμε τεχνικές που μας διευκολύνουν πολύ στη προσπάθεια ταυτοποίησης ατόμων, ομάδων πληθυσμών και ειδών. Η επιλογή αυτή γίνεται με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, οι DNA και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Οι πρώτοι αναφέρονται και ως γενετικοί δείκτες και αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό (μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό) DNA.

Τα κριτήρια επιλογής μοριακών δεικτών είναι πολλά και σχετίζονται τόσο με αυτούς καθ' αυτούς του δείκτες όπως η **αφθονία, ο πολυμορφισμός, η εξειδίκευση για ορισμένο γενετικό τόπο, τα συγκυρίαρχα αλληλόμορφα**, όσο και με τη **διαδικασία παραγωγής** τους. Αναφορικά με τη διαδικασία παραγωγής τους, θα πρέπει να δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα, να έχει χαμηλές απαιτήσεις σε ανθρώπινο δυναμικό και τεχνική εξειδίκευση, να έχει μικρό κόστος εφαρμογής και ανάπτυξης, να απαιτεί μικρή ποσότητα DNA και να επιδέχεται αυτοματισμούς.

**Στους πρωτεϊνικούς δείκτες**, που εμφανίσθηκαν προτού εμφανισθούν οι DNA δείκτες, ανήκουν τα ισοένζυμα και τα αλλοένζυμα. Υπάρχουν μικρές διαφορές μεταξύ των ισοενζύμων και των αλλοενζύμων. Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου που καταλύουν την ίδια αντίδραση, αλλά διαφέρουν ελάχιστα στην αμινοξική τους σύσταση ή στην δομή τους, τόσο ώστε να μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση ή χρωματογραφία. Τα αλλοένζυμα αποτελούν διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα που βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο.



Η εφαρμογή πρωτεϊνικών δεικτών έχει τα εξής πλεονεκτήματα: δεν χρειάζεται εκκινητές ή σημαντές, είναι γρήγορη και εύκολη, με χαμηλό κόστος. Τα ζυμογράμματα που προκύπτουν από την εφαρμογή πρωτεϊνικών δεικτών, μπορούν να αφορούν σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα. Στην περίπτωση των πρωτεϊνικών δεικτών υπάρχει συγκυριαρχία αλληλομόρφων και τα αποτελέσματα τους είναι επαναλήψιμα.

Τα μειονεκτήματα της εφαρμογής πρωτεϊνικών δεικτών είναι ότι δεν βρίσκονται σε αφθονία, έχουν χαμηλό πολυμορφισμό, τα ζυμογράμματα μερικές φορές ερμηνεύονται δύσκολα εξαιτίας «ζωνών» που οφείλονται σε πολυπλοειδία ή σε γονίδια που έχουν διπλασιασθεί, οι πρωτεΐνες που έχουν όμοια ηλεκτροφορητική ικανότητα μπορεί να μην είναι ομόλογες, ενώ δεν είναι «ουδέτεροι» στην επιλεκτική πίεση. Τέλος, συχνά απαιτείται η θανάτωση του ζώου, γεγονός που δεν είναι πάντα εφικτό ή λίαν επιθυμητό.

**Η κατηγορία των DNA δεικτών** είναι πολυπληθής (Πίνακας 1) και αφορά γενετικούς πολυμορφικούς τόπους, μοναδιαίους στο γονιδίωμα, με περισσότερα του ενός αλληλόμορφα, οι οποίοι είναι δυνατόν να ανιχνευτούν με μοριακή ανάλυση. Οι δείκτες με τις περισσότερες εφαρμογές είναι τα **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphisms), τα **RAPD** (Randomly Amplified DNA Polymorphisms), τα **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphisms), οι **μινιδορυφόροι** (minisatellites) και οι **μικροδορυφόροι** (microsatellites) ή αλλιώς **SSR** (Simple Sequence Repeats), τα **SNP** (Single Nucleotide Polymorphisms), τα **SSCP** (Single Strand Conformation Polymorphisms) και η **DNA αλληλούχιση** (DNA ή PCR Sequencing).

Η διαδικασία παραγωγής των **RAPD** βασίζεται στην τυχαία ενίσχυση DNA με την χρήση PCR. Έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθούν πολλές θέσεις του γονιδιώματος ταυτόχρονα όσον αφορά την ύπαρξη πολυμορφικών αλληλουχιών. Τα πλεονεκτήματα των RAPD είναι ότι για την εφαρμογή τους απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση DNA, 5-50ng για κάθε αντίδραση, ενώ οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι τυχαίες. Η δοκιμή γίνεται εύκολα και γρήγορα, με χαμηλό κόστος. RAPD δείκτες υπάρχουν άφθονοι και τυχαία διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα. Σε κάθε αντίδραση παράγονται συνήθως πολλές ζώνες, ενώ υπάρχει η δυνατότητα αυτοματισμού. Τα μειονεκτήματα τους είναι ότι απαιτούν καθαρό DNA, μεγάλου μοριακού βάρους. Επίσης απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή μόλυνσεων και κανονικοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, ενώ οι ζώνες που αναπαράγονται δεν μπορούν να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα.

Τέλος παράγουν κυρίως αλληλόμορφα, έχουν μικρή επαναληψιμότητα, ενώ τμήματα ίδιου μεγέθους μπορεί να μην είναι ομόλογα.

Η διαδικασία παραγωγής των AFLP (Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων) ξεκινάει με την απομόνωση και πέψη του DNA καθώς και την πρόσδεση ολιγονουκλεοτιδίων προσαρμοστών στα τμήματα του DNA που προκύπτουν από την πέψη. Κατόπιν γίνεται, με PCR, επιλεκτική αναπαραγωγή τμημάτων DNA και διαχωρισμός του με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης. Η ανίχνευση των ζωνών που προκύπτουν γίνεται με αυτοραδιογραφία, χρώση με άργυρο ή φθορισμό. Οι εκκινητές δεν χρειάζεται να έχουν γνωστή αλληλουχία. AFLP βρίσκονται άφθονοι, διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα, αν και σε μερικές περιπτώσεις εντοπίζονται γύρω από τα κεντροσώματα. Μπορεί να γίνει αναπαραγωγή πολλών «ζωνών» σε κάθε αντίδραση. Τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα και υπάρχει η δυνατότητα αυτοματισμού. Απαιτούν όμως πολύ καθαρό DNA, μεγάλου μοριακού βάρους. Το DNA προφίλ δεν μπορεί να ερμηνευθεί σχετίζοντας αλληλόμορφο και γενετικούς τόπους. Είναι κυρίως αλληλόμορφα, ενώ παρόμοιου μεγέθους τμήματα, μπορεί να μην είναι ομόλογα.

Οι **μινδορουφόροι** παράγονται με απομόνωση, πέψη και διαχωρισμό των τμημάτων DNA, μεγέθους 4-20kb, με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, υβριδοποίηση κατά Southern με ραδιοσημασμένο μινδορουφορικό σημαντή και ανίχνευση πολυμορφισμού με αυτοραδιογραφία. Οι μινδορουφόροι έχουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, παράγουν πολλές ζώνες, ενώ τα αποτελέσματα της εφαρμογής τους είναι επαναλήψιμα. Απαιτούν όμως μεγάλες συγκεντρώσεις DNA, 5-10μg, μεγάλου μοριακού βάρους και έχουν μεγάλο κόστος εφαρμογής. Η διαδικασία παραγωγής τους είναι χρονοβόρα και απαιτεί επιδεξιότητα. Η διασπορά των μινδορουφόρων στο γονιδίωμα μπορεί να μην είναι τυχαία. Οι ζώνες που παράγουν δεν μπορεί να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα. Είναι κυρίως αλληλόμορφα, ενώ ζώνες ίδιου μεγέθους μπορεί να μην είναι ομόλογες. Επίσης είναι δύσκολο να συγκρίνει κανείς πολυμορφισμούς σε διαφορετικά πηκτώματα, ενώ δεν επιδέχονται αυτοματισμό.

Οι **μικροδορυφόροι** ή αλλιώς SSR, παράγονται μετά από απομόνωση και αναπαραγωγή τμημάτων DNA με PCR. Ο διαχωρισμός «ζωνών» γίνεται με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης ή αγαρόζης και η ανίχνευση του πολυμορφισμού με αυτοραδιογραφία, χρώση με άργυρο ή χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η εφαρμογή μικροδορυφόρων απαιτεί χαμηλή συγκέντρωση DNA, 10-100 ng/αντίδραση, με την οποία παράγονται «ζώνες» που μπορούν να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα. Μικροδορυφόροι βρίσκονται σε αφθονία και διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα. Είναι συγκυρίως αλληλόμορφα, δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα, και υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής αυτοματισμού στην

παραγωγή τους. Δυστυχώς αν δεν υπάρχουν γνωστοί εκκινητές, το κόστος τους είναι υψηλό. Επίσης ετερόζυγα άτομα μπορεί να θεωρηθούν ομόζυγα, όταν εμφανίζονται «μηδενικά» αλληλόμορφα, εξαιτίας μετάλλαξης σε θέση πρόσδεσης εκκινητή, ενώ «λάθος» ζώνες δυσχεραίνουν την βαθμολόγηση του πολυμορφισμού. Παρόμοιου μεγέθους τμήματα, μπορεί να μην είναι ομόλογα..

Πίνακας 1: Μοριακοί Δείκτες από Pushpendra et al. (2002)

AFLP	Amplified fragment length polymorphism	RAHM	Randomly amplified hybridizing microsatellites
AMP	Anchored microsatellite primed PCR	RAMPO	Randomly amplified microsatellite polymorphisms
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR	RAPD	Randomly amplified polymorphic
ASA	Allele-specific amplification	RBIP	Retrotransposon-based insertion polymorphism
ASSR	Anchored simple sequence repeat	REMAP	Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence	RFLP	Restriction fragments length polymorphism
DAF	DNA amplification fingerprint	SAMPL	Selective amplification of microsatellite polymorphic loci
DALP	Direct amplification of length polymorphism	SCAR	Sequence characterised amplified regions
DAMD-PCR	Direct amplification of microsatellite DNA by PCR	SNP	Single nucleotide polymorphism
DFLP	DNA fragment length polymorphism	SPAR	Single primer amplification reaction
dRAMP	Digested RAMP	S-SAP	Sequence-specific amplification polymorphism
IFLP	Intron fragment length polymorphism	SSCP	Single strand conformation polymorphism
IM-PCR	Inter-microsatellite PCR	SSLP	Single sequence length
IRAP	Inter-retrotransposon amplified polymorphism	SSR	Simple sequence repeat
ISA	Inter-SSR amplification	STAR	Sequence tagged amplified region
ISSR	Inter-simple sequence	STMS	Sequence-tagged microsatellite
MAAP	Multiple arbitrary amplicon profiling	STR	Short tandem repeat
MP-PCR	Microsatellite-primer PCR	STS	Sequence-tagged-site
OLA	Oligonucleotide ligation	VNTR	Variable number of tandem repeat



Στην **DNA αλληλούχιση** το PCR προϊόν αναλύεται σε ειδικές συσκευές με στόχο την πλήρη ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του τμήματος DNA που μας αφορά και με την χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής επιτυγχάνεται η ανεύρεση πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου. Εδώ υπάρχει και η πιθανότητα εντοπισμού και μη γνωστών πολυμορφισμών. Πρόκειται για μέθοδο που απαιτεί εξειδικευμένο και ακριβό εξοπλισμό, που πολλές φορές δυσχεραίνει τη γρήγορη και χαμηλού κόστους ανάλυση σε μεγάλο αριθμό δεικτών.

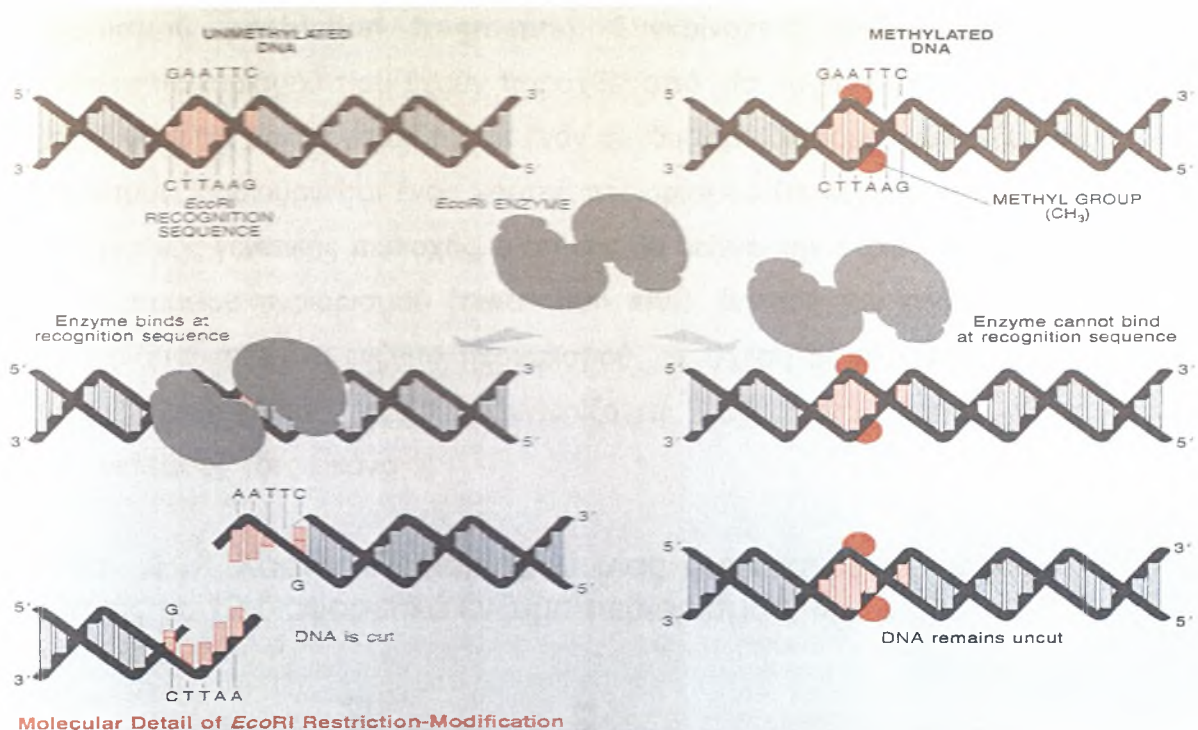
Η μέθοδος **SSCR** (Πολυμορφισμός Διαμόρφωσης Μονόκλωνης Αλυσίδας) περιλαμβάνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των δίκλωνων αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων καθιστώντας τες μονόκλωνες. Βασίζεται σε πολύ μικρές διαφορές της αλληλουχίας (ακόμη και διαφορά σε μία βάση), ιδιότητα η οποία τροποποιεί τη δευτεροταγή δομή και επηρεάζει την κινητικότητα των μορίων όταν διαπερνούν μέσα από πήκτωμα κάτω από την δράση ηλεκτρικής τάσης.

## **6. RFLP - ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR (Restriction fragments Length Polymorphism ) <sup>(40)</sup>**

### **Αρχή της Μεθόδου και Γενικά Χαρακτηριστικά**

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποικοδομώντας «ξένο» προς αυτά DNA (π.χ. DNA των φάγων), αναστέλλοντας έτσι την ικανότητα του να μολύνει το βακτηριακό κύτταρο.

Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων έως οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες, όπου υπάρχουν στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου, προστατεύονται χάρη στη μεθυλίωση μίας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης. Όταν οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού βρίσκονται σε «ξένο» ως προς το βακτήριο DNA, δεν είναι γενικώς μεθυλιωμένες και συνεπώς, αποκόπτονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Πολλές τέτοιες ενδονουκλεάσες έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη βακτηρίων, αναγνωρίζουν διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και είναι διαθέσιμες εμπορικά.



### Τα ένζυμα περιορισμού ταξινομούνται βιοχημικά σε τρεις κατηγορίες: Τύπου I, Τύπου II και Τύπου III.

Στις κατηγορίες τύπου I και III η δραστηριότητα περιορισμού και μεθυλίωσης διεκπεραιώνεται από ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο. Παρ' όλο που αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, τα ακριβή σημεία που τέμνουν το DNA βρίσκονται σε ποικίλες αποστάσεις από αυτά τα σημεία αναγνώρισης και μπορεί να είναι ακόμα και εκατοντάδες νουκλεοτίδια μακριά.

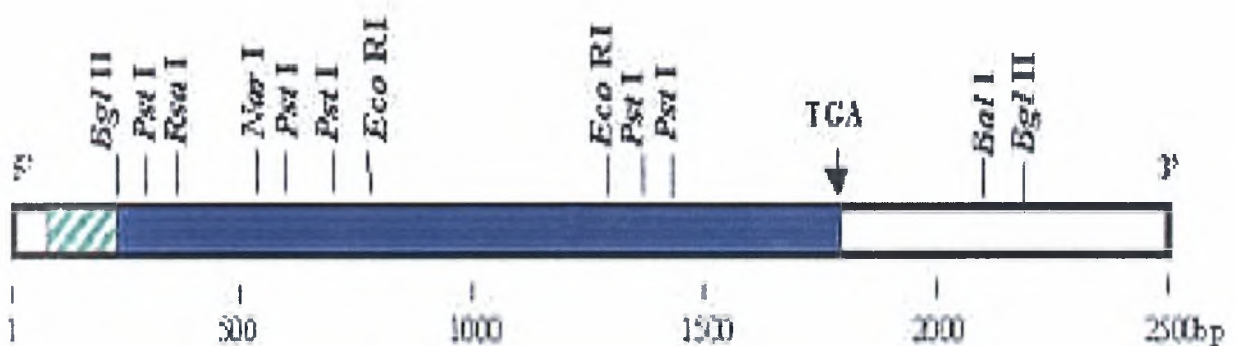
Τα τύπου II ένζυμα περιορισμού είναι ανεξάρτητα από δραστηριότητες μεθυλίωσης και διεκπεραιώνουν τις τομές τους σε πολύ συγκεκριμένα σημεία που βρίσκονται εντός, ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Επίσης, χρειάζεται ένα μόνο ένζυμο τύπου II για την τομή και των 2 κλώνων του DNA (όπως και τα τύπου III ένζυμα), σε αντίθεση με τα τύπου I ένζυμα, όπου χρειάζονται 2 μόρια για την τομή και των δύο κλώνων του DNA.

Η συντριπτική πλειοψηφία των γνωστών ενζύμων περιορισμού είναι τύπου II και είναι τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε στην συγκεκριμένη εργασία.

Μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού θα κόψει σε μία σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA που έχει απομονωθεί από ένα κύτταρο. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται **τμήματα**

**περιορισμού (restriction fragments).** Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μία συγκεκριμένη γενετική περιοχή μετά την επεξεργασία της με έναν συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, δημιουργείται ένας χάρτης περιορισμού (**restriction map**) της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής, ο οποίος θα δείχνει την ακριβή τοποθεσία καθενός σημείου περιορισμού (**restriction site**), δηλαδή του σημείου που αναγνωρίζεται από ένα ένζυμο περιορισμού, σε σχέση με τα γειτονικά του σημεία περιορισμού που αναγνωρίζονται αντίστοιχα από άλλες ενδονουκλεάσες. (δες εικόνα 1)

Εικόνα 1 : Χάρτης Περιορισμού μίας συγκεκριμένης γενετικής περιοχής με 12 διαφορετικά ένζυμα περιορισμού.



Επειδή κάθε ενδονουκλεάση περιορισμού αναγνωρίζει μία διαφορετική, μικρή αλληλουχία DNA, ένας χάρτης περιορισμού αντικατοπτρίζει τη διευθέτηση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στη γενετική περιοχή που μελετάμε. Αυτό σημαίνει ότι διαφορετικές περιοχές DNA μπορούν να συγκριθούν ως προς τους χάρτες περιορισμού τους που παράγονται με συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού.

Η διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ δύο, ή περισσότερων τμημάτων γενετικού υλικού, απόρροια των διαφορετικών τους νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ονομάζεται **πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού. (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP)** Έτσι αντί να εξετάζεται ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, η ανάλυση RFLP παρέχει το πλεονέκτημα του απ' ευθείας προσδιορισμού του γονότυπου ενός

οργανισμού, όπως φανερώνεται από το χάρτη περιορισμού. Αυτός ο πολυμορφισμός είναι συχνός και κάθε οργανισμός έχει έναν μοναδικό και συγκεκριμένο συνδυασμό τμημάτων περιορισμού που τον χαρακτηρίζουν. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός τμημάτων περιορισμού που παρατηρείται σε μία συγκεκριμένη περιοχή του γενώματος ενός οργανισμού ονομάζεται και απλότυπος (karlotype).

Η ανάλυση RFLP μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

- ❖ για τη μοριακή ταυτοποίηση μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Η ανάλυση RFLP για τις ανάγκες της μοριακής ταυτοποίησης βασίζεται στο ότι το σημείο περιορισμού που δημιουργείται από μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση σε ένα τμήμα DNA εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού. Ο πολυμορφισμός των τμημάτων περιορισμού δημιουργείται από τις διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία πιθανών σημείων αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, ή οροτύπων ενός μικροοργανισμού, κάτι το οποίο οδηγεί στη δημιουργία τμημάτων περιορισμού με διαφορετικό αριθμό βάσεων τα οποία μπορούν να διαχωρισθούν και να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Ένας σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της εφαρμογής RFLP είναι ότι η κοπή των τμημάτων DNA που θέλουμε να αναλύσουμε με τα ένζυμα περιορισμού πρέπει να είναι πλήρης έτσι, ώστε προϊόντα μερικής κοπής να μην παρεμβαίνουν στη σωστή ανάλυση των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί.
- ❖ Πολλές εφαρμογές της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) δεν μπορούν από μόνες τους να μας δώσουν περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τον ορότυπο, το στέλεχος, ή την υπο-ομάδα στην οποία ανήκει ο μικροοργανισμός που ανιχνεύθηκε. Η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP) είναι μία από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR για τον προσδιορισμό διαφορών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR, καθιστώντας δυνατή με αυτόν τον τρόπο τη μοριακή ταυτοποίηση πολλών μικροοργανισμών.

**Πίνακας 2.** Ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα βέλη δείχνουν τα σημεία τομής των ενζύμων, ενώ τα γράμματα στη νουκλεοτιδική αλληλουχία αναγνώρισης αυτών των ενζύμων φανερώνουν τα μονόκλινα τμήματα που παράγονται από τις τομές των ενζύμων

Ένζυμο Περιορισμού	Πηγή	Αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει
HaeIII	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'...GG▼CC...3' 3'...CC▲GG...5'
MboI	<i>Moraxella bovis</i>	5'...▼GATC...3' 3'...CTAG▲...5'



Μειονεκτήματα της μεθόδου ανάλυσης RFLP :

- ❖ Η παρουσία μίας μετάλλαξης, ή μίας διαφοράς στη νουκλεοτιδική αλληλουχία η οποία ξεχωρίζει αντίστοιχα διαφορετικά στελέχη και οροτύπους μικροοργανισμών δεν μπορεί να ανιχνευθεί εάν αυτή η μετάλλαξη ή η διαφορά αλληλουχίας δεν αναγνωρίζεται από την ενδονουκλεάση.
- ❖ Μία συσχέτιση μεταξύ του χάρτη περιορισμού με μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες περιοχές στο γενετικό υλικό δεν μπορεί επίσης να γίνει χωρίς να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γενωμάτων διαφορετικών μικροοργανισμών που πρόκειται να συγκριθούν με ανάλυση RFLP.
- ❖ Ένας άλλος περιορισμός είναι η πιθανότητα ενός ασθενή να έχει ταυτόχρονα μολυνθεί με περισσότερα από ένα στελέχη ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της RFLP ανάλυσης στη συγκεκριμένη περίπτωση θα ήταν εξαιρετικά πολύπλοκη ( μείγμα προϊόντων RFLP ανάλυσης ) αν και εφόσον οι εκκινητές οι οποίοι είχαν σχεδιασθεί αναγνωρίζουν την ίδια περιοχή του γενώματος.

Οι παράγοντες που αναφέρονται παρακάτω παίζουν σπουδαίο ρόλο στις πέψεις του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού (Ε.Π.).

- I. **Η ποσότητα του ενζύμου.** Θεωρητικά η μονάδα δραστηριότητας των Ε.Π. (U) αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που θα πέψει 1μg DNA σε όλες τις θέσεις αναγνώρισης σε 1h στους 37°C. Στην πράξη τα πράγματα είναι λίγο διαφορετικά. Όταν το DNA περιέχει πολλές θέσεις αναγνώρισης η ποσότητα ενζύμου που θα χρειαστεί είναι μεγαλύτερη. Για αυτό τον λόγο σε μια αντίδραση πέψης χρησιμοποιούμε 2-3 μονάδες Ε.Π. ανά 1μg DNA για τουλάχιστον 2h στους 37°C.
- II. **Η καθαρότητα του DNA.** Όσο πιο καθαρό είναι το δείγμα μας τόσο καλύτερα αναγνωρίζονται οι θέσεις δράσης από το ένζυμο και τόσο πιο ικανοποιητική και πλήρης είναι η πέψη. Ακόμη, η μεθυλίωση του DNA, η σύνδεση του με πρωτεΐνες και το υψηλό μοριακό του βάρος σε ένα πυκνό διάλυμα δυσχεραίνουν την απόδοση μιας αντίδρασης πέψης. Στις περιπτώσεις αυτές, γίνεται καθαρισμός του DNA και η αντίδραση πέψης επιτελείται σε μεγαλύτερο όγκο.

- III. **Το ρυθμιστικό διάλυμα πέψης.** Τα διαλύματα αυτά πρέπει να περιέχουν  $Mg^{++}$  και κατάλληλη ποσότητα άλατος ώστε να παρέχεται η βέλτιστη ιοντική ισχύς για την δράση της Ε.Π. Σε πολλές περιπτώσεις προστίθενται στο διάλυμα πέψης BSA, DTT και σπερμιδίνη για βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα.
- IV. **Η συσκευασία παράδοσης των Ε.Π.** Όλες οι Ε.Π. φυλάσσονται στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}C$ . Για την αποφυγή της καταστροφής των ενζύμων λόγω κατάψυξης, το ρυθμιστικό τους διάλυμα περιέχει 25-50% γλυκερόλη. Συγκέντρωση όμως γλυκερόλης πάνω από 5% επί του συνολικού όγκου όπου επιτελείται η αντίδραση μπορεί να αναστείλει την ενζυμική δράση. Επίσης η υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης μπορεί να δημιουργήσει τη λεγόμενη star activity αποτέλεσμα της οποίας είναι η ακανόνιστη πέψη του DNA από τις Ε.Π. Για την αποφυγή όλων των παραπάνω ανεπιθύμητων φαινομένων θα πρέπει ο συνολικός όγκος μίας αντίδρασης πέψης να είναι τουλάχιστον 10 φορές περισσότερος από τον όγκο του διαλύματος του ενζύμου που θα προστεθεί στην αντίδραση.
- V. **Η κατάσταση του ενζύμου.** Οι Ε.Π., όπως άλλωστε και όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην μοριακή βιολογία, είναι πολύ ευαίσθητες. Η έξοδος του ενζύμου από την κατάψυξη, η κακή χρήση με την χρησιμοποίηση ακάθαρτων ακρορυγχίων κλπ. έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου.

#### Southern blotting RFLP

Για τα τμήματα που προκύπτουν μετά την κοπή χρησιμοποιούνται τμήματα ανιχνευτών (probes) οι οποίοι προσκολλώνται ταυτόχρονα σε πολλές διαφορετικές θέσεις και υβριδοποιούνται με το τμήμα του γονιδίου που αναλύεται για την εύρεση πολυμορφισμών (minisatellites). Η μέθοδος δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα καθώς διαχωρίζονται πολύ εύκολα τα ετερόζυγα άτομα. Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί σχετικά μεγάλες ποσότητες γενωμικού DNA (5g) και η υβριδοποίηση των ανιχνευτών είναι αρκετά επίπονη εργαστηριακή διαδικασία. Παρ' ότι ανιχνεύεται ο πολυμορφισμός του εξεταζόμενου τμήματος του γονιδίου, δεν προσδιορίζεται η ακριβής θέση που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός, ενώ για να ανιχνευθεί πραγματικά ο πολυμορφισμός πρέπει να υπάρχει δημιουργία ή απώλεια θέσης κοπής του περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιείται σε σύγκριση με ήδη γνωστή θέση κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο.

## 7. PCR-RFLP <sup>40</sup>

Η ανάλυση RFLP είναι μία από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR. για τον προσδιορισμό διαφορών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR..

Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας και της μοριακής ταυτοποίησης διαφόρων οργανισμών (θηλαστικά, πτηνά, ψάρια και μικροοργανισμοί). Πρώτα ενισχύεται η επιθυμητή DNA αλληλουχία και στην συνέχεια ακολουθεί πέψη με ένζυμο περιορισμού.

Η ανάλυση RFLP για τις ανάγκες της μοριακής ταυτοποίησης βασίζεται στο ότι το σημείο περιορισμού που δημιουργείται από μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση σε ένα τμήμα DNA εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού.

Ο πολυμορφισμός των τμημάτων περιορισμού δημιουργείται από τις διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία πιθανών σημείων αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, ή οροτύπων ενός οργανισμού, κάτι το οποίο οδηγεί στη δημιουργία τμημάτων περιορισμού με διαφορετικό αριθμό βάσεων τα οποία μπορούν να διαχωριστούν και να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου μετά από κατάλληλη χρώση.

Ένας σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της εφαρμογής RFLP είναι ότι, η κοπή των τμημάτων DNA που θέλουμε να αναλύσουμε με τα ένζυμα περιορισμού πρέπει να είναι πλήρης έτσι, ώστε προϊόντα μερικής κοπής να μην παρεμβαίνουν στη σωστή ανάλυση των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί.

Πρόκειται για την τεχνική που εφαρμόστηκε στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλό κόστος, είναι γρήγορη και δίνει καλά αποτελέσματα σε μελέτες πολυμορφισμού.



## 8. Το Μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια <sup>(39)</sup>, είναι θεμελιώδη οργανίδια που συναντούνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια - μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) - μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κυτταρική αναπνοή, είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν DNA έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Αυτή η σχετική αυτοδυναμία κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς που ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά.

Τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συνδέονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μόρια rRNA και tRNA που χρησιμοποιούνται στα μιτοχόνδρια και λίγες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάφραση.

Έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία τουλάχιστον 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν από 3 έως 37 πρωτεΐνες. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων, αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και έχουν κατά κανόνα μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (συν 22 tRNA και 2 rRNA).

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών για τους εξής λόγους<sup>(38)</sup>:

- Η ποσότητα του ανά κύτταρο θεωρείται υπερεπαρκής αφού απαντάται περίπου σε 1000 αντίτυπα (1000 φορές περισσότερο από το πυρηνικό DNA). Κάτι τέτοιο αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης με την τεχνική PCR, του επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει.
- Εξαιτίας της μητρικής του προελεύσεως και την απουσία ανασυνδυασμού κληρονομείται απaráλλακτο από γενιά σε γενιά.
- Ο μεγάλος ρυθμός μεταλλαγής του (10 φορές υψηλότερος του πυρηνικού) έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και την δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων,

όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.

Τα γονίδια του mtDNA με την μεγαλύτερη προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα: Cyt b, 12S και 16S rRNA και το D-loop με το πρώτο να κατέχει την πρώτη θέση. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται αφενός στην μεγάλη εξελικτική συντήρηση τους και αφετέρου στις επιμέρους διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ των ειδών.

## **B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και εφαρμογή μιας εύχρηστης και αξιόπιστης μοριακής μεθόδου για την ταυτοποίηση του διαφορετικών ειδών προέλευσης του γάλακτος στην αλυσίδα παραγωγής και εμπορίας του.

Γι αυτό το σκοπό μελετήθηκε τμήμα του γονιδίου *cytb* του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η μοριακή τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η PCR-RFLP's (Restriction fragments Length Polymorphism ) ή **Ανάλυση Πολυμορφισμού μήκους με Ένζυμα Περιορισμού των προϊόντων της PCR** .

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *HaeIII* και το *MboI*, με σκοπό τον καλύτερο και αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των ειδών. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων έγινε σε πηκτική πολυακρυλαμίδης.

## Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στις παραγράφους που ακολουθούν αναφέρεται αναλυτικά ο εξοπλισμός (υλικά, συσκευές, αντιδραστήρια) ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον, αναφέρεται η πειραματική πορεία της κάθε μεθόδου που εφαρμόστηκε.

### ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

#### Εξοπλισμός για την Απομόνωση του DNA από Γάλα

##### Υλικά Εργαστηρίου

- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας [Gilson] των 1,10,20,100 & 1000 μl με τα αντίστοιχα ακρορύγχια (tips)
- Eppendorf των 0,5, 1 & 2 ml

##### Αντιδραστήρια-Διαλύτες

- SDS 5%
- (TNES-Urea Buffer)
- Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) (10μg/μl) [HT]
- Φαινόλη (Phenol) 90% [Applichem]
- Χλωροφόρμιο (Chloroform) [Merck]
- Ισοαμυλική Αλκοόλη (isoamyl alcohol) [Merck]
- NaOAc (Sodium Acetate Buffer Solusion) [Sigma], 3M.
- Αιθανόλη (EtOH) 100%
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 70%
- Αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O,
- Διπλά απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O)

Το SDS 5% παρασκευάζεται ως εξής: 5γρ διαλύονται σε 100 ml δισαπεστασταγμένο νερό

Το TNES – Urea Buffer παρασκευάζεται ως:

**TNES-Urea Buffer (200 ml):** 2 **Tris-HCl** (1M pH 7.5) + 5ml **NaCl** (5M) + 2 ml **EDTA-2Na** (0,5 M pH 7,5) + 10 ml **SDS** (10%) + 48.05 g **Urea** + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο 200 ml.

#### Συσκευές

- Κυκλικός αναδευτήρας [Bio RS-24]
- Κλίβανος [ProBLot Hybridization Oven]
- Κλίβανος επώασης , Memmert
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος [Eppendorf – 5810R]
- Καταψύκτης [Pitsos]
- Απαγωγός εστία εργασίας
- Ανακινητής Vortex

#### Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση DNA σε Πηκτή (gel) Αγαρόζης

##### Υλικά εργαστηρίου

- Πλάκα παρασκευής (πήξης) της πηκτής
- Κωνική φιάλη των 100 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml
- Πιπέττα ακριβείας των 10 μl

##### Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη [HT]
- TAE 1X
- Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr)
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer)

Τα διαλύματα TAE παρασκευάζονται ως εξής:

**TAE 50X** (500 ml): 121g **Tris Base** + 28.5ml **Acetic Acid** + 50ml **EDTA 0.5M** + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο 500ml.

Το TAE 1X παρασκευάζεται με αραιώση διαλύματος stock TAE 50X (20ml σε τελικό όγκο 1lt).

**Loading buffer 6X** (10ml): 1ml **Bromophenol blue** 1%w/v + 0.5 ml **TBE 20X** + 5 ml **Glycerol** + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο 10ml.

### Συσκευές

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (και τροφοδοτικό μηχανήμα) [Bio-Rad (Scie plus)]
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή παροχής υπεριώδους (U.V.) ακτινοβολίας [Ultra Lum] για την παρατήρηση της πηκτής

### Εξοπλισμός για τον Ποσοτικό προσδιορισμό του εξαγόμενου DNA

#### Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας των 2 & 100 μl με τα αντίστοιχα tips
- Φιαλίδια erpendorf 500μl
- Πλαστικές κυβέτες φωτομέτρησης οπτικής διαδρομής 10 mm [erpendorf]

#### Αντιδραστήρια

- ddH<sub>2</sub>O

### Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος [Eppendorf S414C]
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS [Eppendorf BioPhotometer]

### **Εξοπλισμός της PCR ( Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)**

#### Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέττες ακριβείας των 2,10,20 & 100 μl με τα αντίστοιχα tips.
- Φιαλίδια erppendorf των 200 μl.

#### Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O
- Ρυθμιστικό διάλυμα (1 OX PCR Buffer) [Bioline]
- Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>) 50mM [Bioline]
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM
- Εκκινητές (Primers)
- Ταq DNA πολυμεράση 5U/μl [Bioline]

### Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος ( erppendorf centrifuge 5415 C)
- Θερμικοί κυκλοποιητές [Eppendorf – Mastercycler epgradient S]



## Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου RFLP 'S

### Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέττες ακριβείας των 10 & 100  $\mu$ l
- Φιαλίδια erpendorf των 500  $\mu$ l.

### Αντιδραστήρια

- ddH<sub>2</sub>O
- Ρυθμιστικό διάλυμα πέψης (Buffer) ανάλογα για το κάθε ένζυμο
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: HaeIII (10U/ $\mu$ l), MboI (5U/ $\mu$ l), (εταιρείας New England Biolabs)

### Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Κλίβανος

## Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση των RFLP 'S σε Πηκτή

### Πολυακρυλαμίδης

### Υλικά Εργαστηρίου

- Ποτήρι ζέσεως των 200ml
- Μαγνήτικός αναδευτήρας
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 15 & 100ml
- Χωνί μετάγγισης
- Χαρτί διήθησης

### Αντιδραστήρια

- Urea (Ουρία) [Merck]
- ddH<sub>2</sub>O
- Acrylamide (ακρυλαμίδα) 99% [SIGMA]
- Bis-acrylamide [SIGMA]
- TBE 10x
- TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99% [SIGMA]
- APS 20% w/v

- Loading buffer
- Ακολουθίες DNA γνωστών μοριακών βαρών (Marker) των 25 & 100 bp [Bioline]

**Διάλυμα Πολυακρυλαμίδης 30%** (100ml): 29g **Acrylamide** + 1g **Bis-acrylamide** + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο τα 100ml.

**TBE 10X** (2lt): 216g **Tris Base** + 110g **Boric acid** + 16,6g **EDTA** + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο τα 2 lt.

### Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας (Yellow line)
- Συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης (και τροφοδοτικό) / [Scie Plus U2-DC (Hoefel)]

### Εξοπλισμός για την Εμφάνιση (Χρώση) των αποτελεσμάτων σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης

#### Υλικά Εργαστηρίου

- Μεταλλικό δοχείο χρώσης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 1000 ml
- Ποτήρι ζέσεως των 500 ml
- Μαγνήτης ανάδευσης

#### Αντιδραστήρια

- **ddH<sub>2</sub>O**
- EtOH 100%
- Acetic acid (Οξικό οξύ) 99% [Riedel-de Haen]
- Νιτρικός άργυρος (AgNO<sub>3</sub>) 99.9% [sds]
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) 99% [Riedel-de Haen]
- Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH<sub>4</sub>)

- Φορμαλδεΰδη (Formaldehyde) 37% [SIGMA]

### Συσκευές

- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης - Ανακινούμενη πλάκα
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή προβολής πηκτής πολυακρυλαμίδης

### **Λογισμικό**

Για την θεωρητική ανάπτυξη του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής: Rebsites-NCBI, BioEdit, Blast, Webcutter, Ncb cutter

### **Ανάπτυξη Μεθόδου**

Η μέθοδος που εξαρχής αποφασίσαμε να εξετάσουμε ήταν αυτή της PCR-RFLP με εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτική πολυακρυλαμίδης. Η πηκτική πολυακρυλαμίδης αν και πιο χρονοβόρα της αντίστοιχης με αгарόζη, επιλέχτηκε λόγω της μεγάλης διακριτικής ικανότητας που εμφανίζει, δηλαδή εξαιτίας της δυνατότητας να διαχωρίζει πολύ μικρά τμήματα DNA και τα αποτελέσματα της να παρουσιάζονται με ευδιάκριτο τρόπο.

Δοκιμάστηκαν διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης (εξαγωγής) mtDNA από γάλα, εκ των οποίων αναφέρεται μόνον η τελικώς επιλεγείσα. Μετά τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο του DNA πειραματιστήκαμε πάνω στο μιτοχονδριακό γονίδιο Cyt b

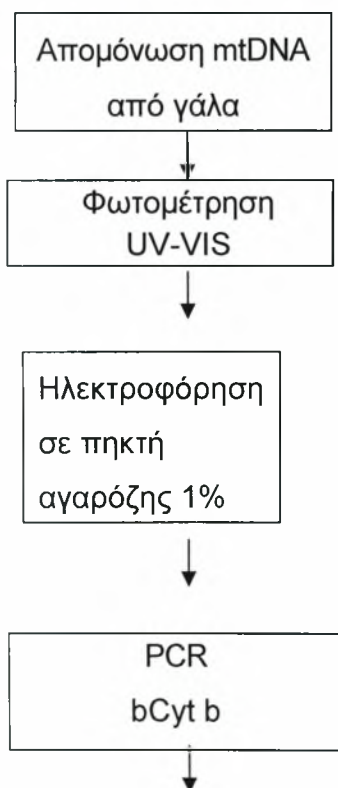
Τμήματα του επιλεγμένου γονιδίου τα πολλαπλασιάσαμε με την τεχνική PCR και στην συνέχεια τα πέψαμε («κόψαμε») με 2 διαφορετικά ένζυμα περιορισμού (HaeIII, Mbol).

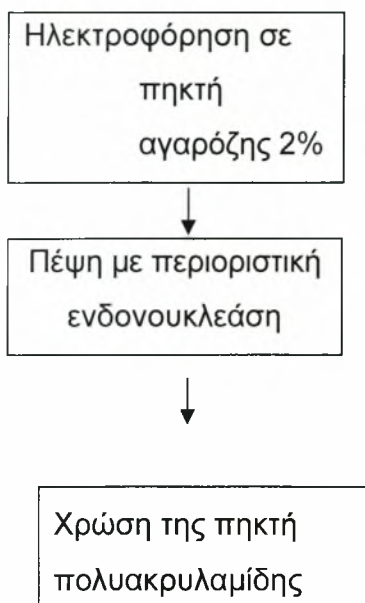
Πριν από κάθε πέψη, προβάλαμε σε θεωρητικό επίπεδο τα αποτελέσματα αυτής, με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Δηλαδή, πραγματοποιήσαμε ανάλυση αλληλουχιών DNA επιθυμητών τμημάτων για το κάθε είδος, με το πρόγραμμα BioEdit και τους αντίστοιχους primers και το πρόγραμμα Blast βρίσκουμε τις αλληλουχίες για το κάθε είδος και στην συνέχεια κάνουμε εικονικές πέψεις με τα προγράμματα Webcutter ή Nebcutter για τα δύο ένζυμα για να βρούμε τα τμήματα που κόβουν, ώστε να τα αντιστοιχίσουμε με τα ευρήματα της πειραματικής διαδικασίας. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται σε καταχωρημένες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στις βάσεις δεδομένων Rebsites-NCBI ή Genbank.

Χρησιμοποιήσαμε universal primers (και όχι species specific primers) διότι η επιδίωξή μας είναι η απλοποίηση της όλης διαδικασίας διαχωρισμού.

Παρακάτω παρουσιάζεται διαγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήσαμε:

### **Διάγραμμα 1: Απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήσαμε στην συγκεκριμένη μελέτη**





### **Απομόνωση Μιτογονδριακού DNA από Γάλα**

Για την εξαγωγή του mtDNA χρησιμοποιήθηκαν από το κάθε δείγμα και ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία:

1. Εισάγουμε το δείγμα γάλακτος (~2 ml) σε φυαλίδια erpendorf των 2ml.
2. Φυγοκεντρούμε στις 10000rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο (ορός + λίπος)
4. Προσθέτουμε: 50μl SDS 5% + 0,5 ml NaOAc (0,2 M) και 5 ml proteinase K (10mg/ml) -αναδεύουμε στο vortex.
5. Τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 55°C για 1h με ταυτόχρονη αργή ανάδευση (τα δείγματα περιστρέφονται αργά σε ειδικό αναδευτήρα).
6. Φυγοκεντρούμε στις 10000rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου
7. Λαμβάνουμε το υπερκείμενο και το μεταφέρουμε σε νέο erpendorf
8. Προσθέτουμε 1 ml φαινόλη. Αναδεύουμε στο vortex
9. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C.
10. Λαμβάνουμε το υπερκείμενο και το μεταφέρουμε σε νέο erpendorf
11. Προσθέτουμε 1 ml χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (24V:1V) και αναδεύουμε τα δείγματα στον κυκλικό αναδευτήρα (εκτός κλιβάνου) για 5 min. (ή και ελαφρώς με το χέρι)
12. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 5 min στους 4°C.
13. Λαμβάνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και το τοποθετούμε σε νέο



φιαλίδιο erpendorf των 2ml.

14. Προσθέτουμε 1 ml ισοπροπανόλη και αναδεύουμε είτε ελαφρώς με το χέρι, είτε στον κυκλικό αναδευτήρα για 10min
15. Τοποθετούμε στην κατάψυξη (-20 °C) για 20min
16. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 min στους 4°C.
17. απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml αιθανόλη 75% και φυγοκεντρούμε παρομοίως για 5 min.
18. απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml παγωμένη αιθανόλη 70% και φυγοκεντρούμε παρομοίως.
19. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας παράλληλα να μην χάσουμε το ίζημα που έχει σχηματιστεί.
20. Στεγνώνουμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37°C για 1h.
21. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O και είναι έτοιμα για PCR
22. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

Όσον αφορά τον ρόλο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο ισχύουν τα εξής:

Το SDS, το οποίο είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό, συμβάλλει στην διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες.

Ο ρόλος του χηλικού παράγοντα EDTA είναι η δέσμευση των ιόντων Ca<sup>++</sup> και Mg<sup>++</sup> τα οποία συμβάλουν στην δράση των νουκλεασών.

Η πρωτεΐνάση K πέπτει τις πρωτεΐνες. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στην μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμιση του DNA στην αιθανόλη οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στον συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη. (Ισοπροπυλική αλκοόλη)

### **Φωτομέτρηση**

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA υπολογίζεται μέσω της μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm και 280nm με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-Vis. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά την αραιώση 1μl δείγματος απομονωμένου DNA σε 49μl ddH<sub>2</sub>O.

Η τιμή της απορρόφησης στα 260nm (OD260) αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του DNA στο δείγμα. Η τιμή της απορρόφησης στα 280nm (OD280) μετράει την ποσότητα πρωτεϊνών (μη επιθυμητές) στο δείγμα. Ο λόγος OD260/OD280 αποτελεί δείκτη καθαρότητας του απομονωμένου DNA και πρέπει να έχει τιμές μεταξύ 1,80 -2,00. Στην περίπτωση που είναι αισθητά μικρότερος το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεΐνες ή φαινόλη και η μέτρηση του DNA δεν είναι ακριβής.

Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη διαδικασία έδινε ένδειξη της απορρόφησης και στα 230nm (OD230). Υψηλές τιμές OD230 αποδεικνύουν ότι στο δείγμα υπάρχουν οργανικά υπολείμματα ή άλατα. Ο λόγος OD260/OD230 πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5.

### **Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης**

Πρόκειται για την ευκολότερη μέθοδο διαχωρισμού και ελέγχου του DNA. Στηρίζεται στον καταμερισμό των νουκλεϊνικών οξέων, ανάλογα του μεγέθους τους, καθώς αυτά αρνητικά φορτισμένα, κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας της απομόνωσης αλλά και των προϊόντων που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της τεχνικής PCR. Στην πρώτη περίπτωση η εικόνα μας δίνει πληροφορίες για την ακεραιότητα ή τον κατακερματισμό του απομονωμένου DNA αλλά επίσης και για την ποσότητα η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται.

Όσον αφορά το PCR προϊόν, εκτός από την οπτικοποίηση της ποσότητας του, πληροφορούμαστε και για το μέγεθος του χρησιμοποιώντας marker αλλά και για την καθαρότητα του σε περίπτωση

που υπάρχει επιμόλυνση (μη επιθυμητά τμήματα DNA που ενισχύθηκαν κατά την PCR).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Εντός κωνικής φιάλης των 100ml ζυγίζουμε 0,6g αγαρόζης και προσθέτουμε 30ml διάλυμα TAE 1X. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε πηκτής αγαρόζης 2%.
2. Βράζουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων και ανακινούμε ανά διαστήματα, ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Αφήνουμε το περιεχόμενο να κρυώσει μέχρι την θερμοκρασία των 50°C και προσθέτουμε 3μl EtBr.
4. Προετοιμάζουμε το εκμαγείο στο οποίο θα σχηματιστή η πηκτή και τοποθετούμε το εξάρτημα («χτένα») που θα σχηματίσει τις θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το δείγμα («πηγάδια»)
5. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης, πριν αυτό στερεοποιηθεί, στο εκμαγείο και με την βοήθεια πλαστικού tip απομακρύνουμε τις φυσαλλίδες που πιθανώς έχουν δημιουργηθεί.
6. Περιμένουμε να πήξει η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρούμε τη χτένα και τοποθετούμε την πηκτή στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.
8. Γεμίζουμε την συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή.
9. Προετοιμάζουμε τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση:
  - Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 2μl DNA.
  - Στην περίπτωση ελέγχου της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA (PC προϊόν). Χρησιμοποιούμε DNA marker για την εύρεση του μεγέθους του προϊόντος.
10. Τοποθετούμε («φορτώνουμε») τα δείγματα με μικροπιπέττα σε κάθε ένα από τα πηγάδια.
11. Εφαρμόζουμε σταθερή τάση 5V/cm.

12. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε την πηκτική πάνω από τη συσκευή υπεριώδους φωτός και την φωτογραφίζουμε (τήρηση αρχείων).

Το διάλυμα πλήρωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης που εξυπηρετεί ως δείκτης παρακολούθησης του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, γλυκερόλη για την καθίζηση των δειγμάτων στα πηγάδια και EDTA για την δέσμευση των κατιόντων και την παύση οποιασδήποτε ενζυμικής δραστηριότητας.

Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων DNA. Έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα DNA που δέσμευσε BrEt. Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση ρυθμίζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα.

### **Ενίσχυση Τμημάτων mtDNA από το Γονίδιο Cyt b**

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου Cyt b ενισχύσαμε ένα τμήμα του, μεγέθους 369 bp, με την βοήθεια της τεχνικής PCR,.

Στην φάση αυτή, στοχεύοντας πάντα στην απλοποίηση της όλης μεθόδου ταυτοποίησης, χρησιμοποιήσαμε universal primers (Πίνακας 3) οι οποίοι μπορούν να δώσουν PCR προϊόν για πολλά διαφορετικά είδη.

Πίνακας 3 : Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA από το γονίδιο Cyt b.

Εκκινητές για το <b>Cyt b</b>	Αλληλουχία
L 14841	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'
H 15149	5'-CTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1. Τοποθετούμε, σε φιαλίδια eppendorf των 200μl, 1μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης). Αυτό αντιστοιχεί σε ποσότητα DNA 200 – 700ng /μl.
2. Ανάλογα του αριθμού των δειγμάτων παρασκευάζουμε ένα κοινό

διάλυμα (master mix) η σύσταση του οποίου περιέχει τις ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα:

**Master Mix:** 38,8μl **αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O** + 5μl **Buffer 10X** + **2μl MgCl<sub>2</sub>** (50mM) + 1μl **dNTPs** (10mM) + 1μl **Primer Fw** (50pmol/μl) + 1μl **Primer Rv** (50pmol/μl) + 0,2μl **Taq DNA polymerase** (5U/μl).

3. Μοιράζουμε, σε κάθε eppendorf που περιέχει δείγμα, από 49μl του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.
4. Κλείνουμε καλά το καπάκι του φιαλιδίου και πραγματοποιούμε μία σύντομη φυγοκέντρηση (spin).
5. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου:

Πίνακας 4 : Το πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου της κάθε PCR αντίδρασης.

Στάδιο Αντίδρασης	PCR στο Cyt b	
	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	<b>95</b>	<b>5min</b>
Αποδιάταξη	<b>95</b>	<b>40sec</b>
Συγκόλληση	<b>54</b>	<b>40sec</b>
Επιμήκυνση	<b>72</b>	<b>40sec</b>
Τελική επιμήκυνση	<b>72</b>	<b>10min</b>

6. Ελέγχουμε την επιτυχία της διαδικασίας κάνοντας ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2% (όπως έχουμε αναφέρει).
7. Παρατηρούμε την πηκτή πάνω από τη συσκευή υπεριώδους φωτός και την φωτογραφίζουμε (τήρηση αρχείων).



### Θεωρητικός Υπολογισμός RFLP

Πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με την βοήθεια εξειδικευμένων προγραμμάτων βιοπληροφορικής και αποτελεί έναν τρόπο ελέγχου της επιτυχίας ή όχι της πέψης των προϊόντων με συγκεκριμένο ένζυμο, πριν ακόμα αυτή πραγματοποιηθεί. Αναλυτικότερα:

1. Για τον κάθε οργανισμό-δείγμα, βρίσκουμε την αλληλουχία DNA του γονιδίου που θα εξετάσουμε (Πίνακας 4). Αυτές οι αλληλουχίες βρίσκονται καταχωρημένες σε βάσεις δεδομένων όπως η GenBank ή Rebsites του NCBI
2. Επεξεργαζόμαστε την αλληλουχία με τα προγράμματα BioEdit και Blast βάζοντας τους primers που χρησιμοποιήσαμε ώστε να πάρουμε το τμήμα DNA που θα αποτελέσει το προϊόν PCR.
2. Κατόπιν την κάθε αλληλουχία την επεξεργαζόμαστε με τα προγράμματα Webcutter ή Ncb cutter για τα ένζυμα που θέλουμε (HaeIII και MboI) . Αυτή η εφαρμογή μας δίνει μία οπτική απεικόνιση της πέψης του δοσμένου DNA με τα γνωστά ενζύμα περιορισμού καθώς και πληροφορίες για το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού.

Πρόκειται για μέθοδο με την οποία μπορούμε να μειώσουμε: αισθητά i) τον χρόνο αναζήτησης του κατάλληλου ενζύμου, αφού πλέον η έρευνα μας είναι πιο στοχευμένη αλλά και ii) τα έξοδα από την άσκοπη σπατάλη αντιδραστηρίων.

Στον Πίνακα 5 βλέπουμε τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των παραπάνω για τα είδη πρόβειο, αίγιο, αγελάδος

Πίνακας 5: Αλληλουχίες mtDNA που επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα πληροφορικής ώστε να βρούμε τα τμήματα περιορισμού που δίνει μια εικονική πέψη του *cytb* για κάθε είδος και για τα δύο ένζυμα (*HaeIII*, *Mbol*)

	Κωδ. αλληλουχίας	Σημεία πέψης		Τμήματα περιορισμού	
		<i>HaeIII</i>	<i>Mbol</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Mbol</i>
Πρόβειο ( <i>ovisaries</i> )					
1	FJ218132.1	77 236	247	77 133 159	122 247
2	FJ218124.1	77 236	247	77 133 159	122 247
3	FJ218119.1	77 236	247	77 133 159	122 247
4	FJ218113	77 236	247	77 133 159	122 247
5	<i>FJ218091</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
6	<i>FJ218086</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
7	<i>FJ218084</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
8	<i>FJ218080</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
9	<i>FJ218078</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
10	<i>FJ218055</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
11	<i>FJ218054</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
12	<i>FJ218053</i>	77 236	247	77 133 159	122 247
Αίγριο ( <i>caprus hircus</i> )					
1	AB004070	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
2	GQ141265	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
3	DQ089474	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
4	DQ514548	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
5	GQ141264	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
6	GQ141262	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
7	DQ089475	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
8	AF217255	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
9	GQ141259	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
10	DQ089476	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
11	EU130779	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213
12	GQ141260	77 304	34 247	62 77 230	34 122 213

Αγελάδος						
1	<i>EU177824</i>	77	-	77	292	-
2	<i>AY676866</i>	77	-	77	292	-
3	<i>AY676855</i>	77	-	77	292	-
4	<i>DQ124413</i>	77	-	77	292	-
5	<i>DQ124399</i>	77	-	77	292	-
6	<i>DQ124395</i>	77	-	77	292	-
7	<i>DQ124387</i>	77	-	77	292	-
8	<i>DQ124372</i>	77	-	77	292	-
9	<i>DQ124389</i>	77	-	77	292	-
10	<i>FJ971086</i>	77	-	77	292	-
11	<i>FJ971085</i>	77	-	77	292	-
12	<i>FJ971084</i>	77	-	77	292	-

## Ανάλυση RFLP'S

### Πέψη των προϊόντων της PCR (cytb) με Ένζυμα Περιορισμού

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήσαμε πέψη του cytb με 2 διαφορετικά ένζυμα περιορισμού HaeIII, MboI:

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Σε φιαλίδιο erpendorf των 500μl προσθέτουμε 2μl από το PCR προϊόν.
2. ανάλογα του αριθμού δειγμάτων, παρασκευάζουμε σε ένα φιαλίδιο erpendorf το διάλυμα πέψης, η σύσταση του οποίου περιέχει τις εξής ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα:

Διάλυμα **Πέψης**: 5μl **ddH<sub>2</sub>O** + 0,6μl από το αντίστοιχο **Buffer** του ενζύμου + 0,3μl ενζύμου (ποσότητα που αναφέρεται σε δραστικότητα 10U/μl)

3. Μοιράζουμε στο κάθε δείγμα 5,9μl από το διάλυμα πέψης. Ο τελικός όγκος της αντίδραση είναι 7,9μl.
4. Επωάζουμε σε κλίβανο στην άριστη θερμοκρασία για την δράση του ενζύμου (συνήθως στους 37°C) για τουλάχιστον 3h (με καλύτερο την overnight επώαση).

## Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης

Η αρχή της μεθόδου δεν διαφέρει από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης μόνο που εδώ μιλάμε για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Πλεονέκτημα έναντι της αγαρόζης είναι ότι η πηκτή πολυακρυλαμίδης αναλόγως της πυκνότητάς της έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα, τα αποτελέσματα του διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα και η πηκτή μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Αρχικά παρασκευάζουμε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%:

1. Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής της πηκτής.

2. Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 8g ουρία + 16ml μητρικού διαλύματος ακρυλαμίδης 30% + 5ml TBE 10X. Αναδεύουμε σε οριζόντιο αναδευτήρα μέχρι πλήρους διάλυσης των συστατικών.
3. Διηθούμε το διάλυμα με διηθητικό χαρτί εντός ογκομετρικού κυλίνδρου των 100ml.
4. Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O έως τα 50ml και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
5. Προσθέτουμε 50ml TEMED και 300ml APS 20% και γρήγορα, πριν πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα και πήξει, περιχύουμε το διάλυμα στην συσκευή παρασκευής της πηκτής.
6. Τοποθετούμε τη χτένα για την δημιουργία των πηγαδιών και περιμένουμε περίπου 45min ώστε η πηκτή να είναι έτοιμη προς ηλεκτροφόρηση.

Στην συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που έχουμε πέψει:

7. Τοποθετούμε στην συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης μία μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X (προέρχεται από αραιώση 1:10 του TBE 10X).
8. Τοποθετούμε την πηκτή πάνω στην συσκευή (αφού πρώτα της έχουμε αφαιρέσει τη χτένα) και προσθέτουμε TBE 1X.
9. Προετοιμάζουμε τα δείγματα αναμιγνύοντας 4μl loading buffer με όλη την ποσότητα του διαλύματος που βρίσκεται στο eppendorf.
10. Φορτώνουμε τα δείγματα στην πηκτή. Στην πρώτη θέση τοποθετούμε marker των 100bp, στην μεσαία marker των 25bp και στην τελευταία marker των 2μl από αντίστοιχο PCR προϊόν, χωρίς ένζυμο περιορισμού.
11. Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση με σταθερή τάση 200 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 2,5 ώρες.

### **Χρώση των Πηκτών Πολυακρυλαμίδης με Νιτρικό Άργυρο (Silver Staining)**



Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στην συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο.

Η χρώση πραγματοποιείται σε πλάκα ανάδευσης και απαιτούνται 3 διαλύματα:

**Διάλυμα 1** (400ml): 8ml EtOH + 0.5 ml Acetic acid + ddH<sub>2</sub>O έως τα 400ml

**Διάλυμα 2** (200ml): διάλυμα AgNO<sub>3</sub> 1g/lit

**Διάλυμα 3** (200ml): 3g NaOH + 0.01g NaBH + 1 ml Formaldehyde + ddH<sub>2</sub>O έως τα 200ml

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη και πραγματοποιείται υπό ανάδευση:

1. Εμβαπτίζουμε την πηκτή σε 200ml Διαλύματος 1 για 3min.
2. Απομακρύνουμε το διάλυμα με την αντλία κενού.
3. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 1 & 2.
4. Ξεπλένουμε μία φορά με ddH<sub>2</sub>O για 1min – απομακρύνουμε το νερό.
5. Προσθέτουμε το Διάλυμα 2 για 10-15 min.
6. Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O για 1min.
7. Απομακρύνουμε το νερό και προσθέτουμε το Διάλυμα 3 έως να εμφανιστούν ευκρινώς οι ζωνώσεις των RFLP.
8. Παρατηρούμε την πηκτή πάνω συσκευή προβολής και την φωτογραφίζουμε (τήρηση αρχείων).

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι:

Πίνακας 6 : Δείγματα γάλακτος προς εξέταση

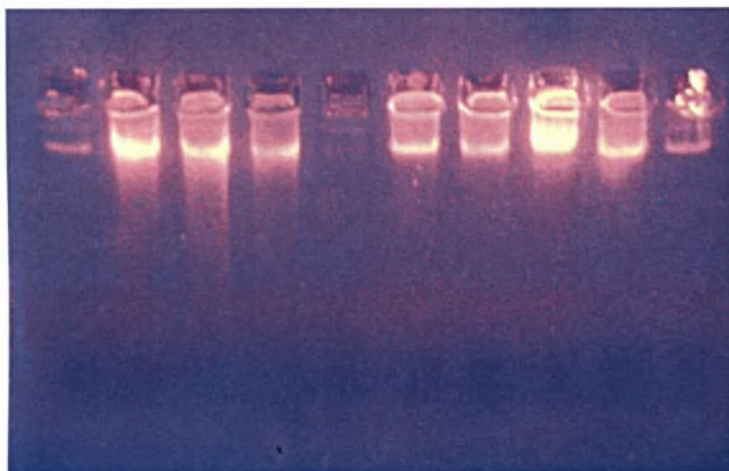
α/α	Ημερομηνία		Είδος Γάλακτος
1	25.11.2008	1	Πρόβειο νωπό γάλα
2	25.11.2008	2	Πρόβειο νωπό γάλα
3	25.11.2008	3	Πρόβειο νωπό γάλα
4	25.11.2008	4	Πρόβειο νωπό γάλα
5	25.11.2008	5	Πρόβειο νωπό γάλα
6	25.11.2008	6	Πρόβειο νωπό γάλα
7	25.11.2008	7	Πρόβειο νωπό γάλα
8	25.11.2008	8	Γίδινο νωπό γάλα
9	25.11.2008	9	Πρόβειο νωπό γάλα
10	25.11.2008	10	Πρόβειο νωπό γάλα
11	25.11.2008	11	Πρόβειο νωπό γάλα
12	01.12.2008	1	Πρόβειο νωπό γάλα
13	01.12.2008	2	Πρόβειο νωπό γάλα
14	01.12.2008	3	Πρόβειο νωπό γάλα
15	01.12.2008	4	Γίδινο νωπό γάλα
16	01.12.2008	5	Πρόβειο νωπό γάλα
17	01.12.2008	6	Πρόβειο νωπό γάλα
18	01.12.2008	7	Πρόβειο νωπό γάλα
19	01.12.2008	8	Πρόβειο νωπό γάλα
20	01.12.2008	9	Γίδινο παστεριωμένο (εμφιαλωμένο)
21	01.12.2008	10	Γίδινο Υψηλής παστερίωσης (εμφιαλωμένο)
22	01.12.2008	11	Αγελάδος Υψηλής Παστερίωσης (εμφιαλωμένο)
23	01.12.2008	12	Αγελάδος Παστεριωμένο
24	16.12.2008	1	Πρόβειο νωπό γάλα
25	16.12.2008	2	Πρόβειο νωπό γάλα
26	16.12.2008	3	Πρόβειο νωπό γάλα
27	16.12.2008	4	Πρόβειο νωπό γάλα
28	16.12.2008	5	Γίδινο νωπό γάλα
29	16.12.2008	6	Πρόβειο νωπό γάλα
30	16.12.2008	7	Πρόβειο νωπό γάλα
31	16.12.2008	8	Πρόβειο νωπό γάλα
32	16.12.2008	9	Πρόβειο νωπό γάλα
33	16.12.2008	10	Πρόβειο νωπό γάλα
34	16.12.2008	11	Γίδινο νωπό γάλα
35	18.12.2008	1	Γίδινο + ελάχιστο Πρόβειο νωπό γάλα
36	18.12.2008	2	Γίδινο νωπό γάλα
37	18.12.2008	3	Πρόβειο + ελάχιστο γίδινο νωπό γάλα
38	18.12.2008	4	Πρόβειο νωπό γάλα
39	18.12.2008	5	Πρόβειο νωπό γάλα
40	18.12.2008	6	Πρόβειο νωπό γάλα

41	18.12.2008	7	Πρόβειο νωπό γάλα
42	18.12.2008	8	Πρόβειο νωπό γάλα
43	18.12.2008	9	Πρόβειο νωπό γάλα
44	18.12.2008	10	Γίδινο + ελαχιστο Πρόβειο νωπό γάλα
45	18.12.2008	11	Πρόβειο νωπό γάλα
46	18.12.2008	12	Αγελάδος νωπό γάλα
47	18.12.2008	13	Αγελάδος νωπό γάλα
48	18.12.2008	14	Αγελάδος νωπό γάλα
49	18.12.2008	15	Αγελάδος νωπό γάλα
50	18.12.2008	16	Αγελάδος νωπό γάλα

Τα δείγματα είναι νωπού γάλακτος και ελήφθησαν κυρίως από κτηνοτροφικές μονάδες, εκτός από τα Νο 20,21,22 τα οποία προέρχονται από εμφιαλωμένο γάλα.

Εκτός των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης κάποια πρότυπα δείγματα για πρόβειο, αίγιο και αγελάδος και μίγματα αυτών (πρόβειο-αίγιο, αίγιο-αγελάδος, πρόβειο-αγελάδος) που έγιναν στο εργαστήριο.

Με την διαδικασία απομόνωσης DNA που αναφέρθηκε στα προηγούμενα και μετά από φωτομέτρηση απομονώθηκαν ποσότητες 20 ως 800 ng/l , αρκετές για να δώσουν καλά προϊόντα μετά από PCR. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έγινε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης όπως απεικονίζεται παρακάτω



Εικόνα 2 Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης (1%) του DNA που απομονώθηκε από κάποια δείγματα γάλακτος

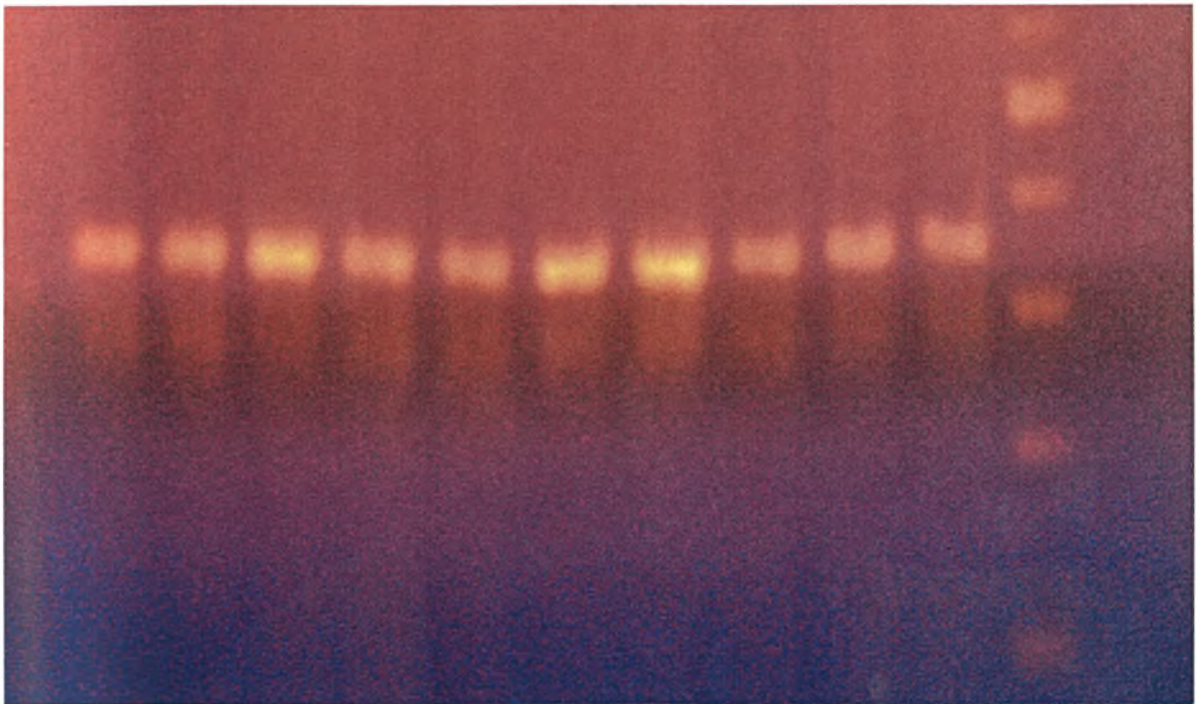
Στην εικόνα 2 η ένταση της φωτεινότητας αποτελεί κατά προσέγγιση

## ένδειξη της ποσότητας DNA

Κατόπιν με την τεχνική PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα 369 bp του γονιδίου Cytb.

Η επόμενη εικόνα 3 είναι ενδεικτική της εμφάνισης των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%

M100



**Εικόνα 3 : PCR προϊόντα του γονιδίου Cyt b μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.**

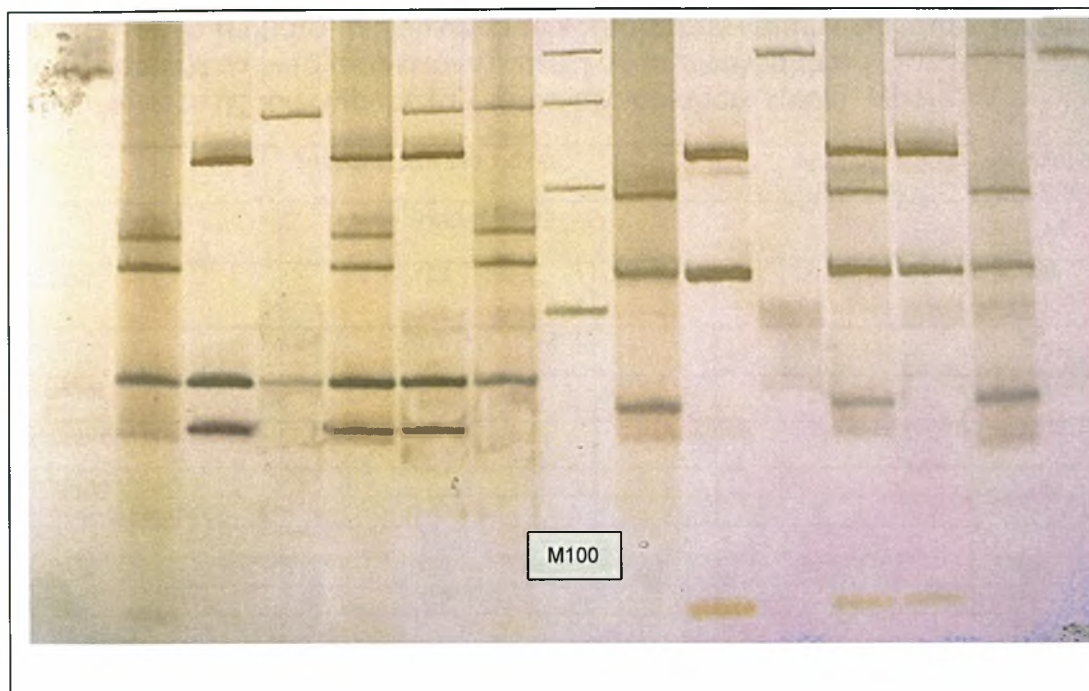
Ενδιαφέροντα ήταν τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των RFLP's και μετά την πέψη του Cytb με τα ένζυμα περιορισμού HaeIII και MboI.

Αρχικά αυτό έγινε για τα πρότυπα και τα μίγματά τους για να πιστοποιήσουμε τα αποτελέσματα της μεθόδου που αναπτύξαμε σε σύγκριση με εκείνα που προέκυψαν με την θεωρητική επεξεργασία με τα προγράμματα βιοπληροφορικής, ώστε να έχουμε κατόπιν τη δυνατότητα αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της μεθόδου για όλα τα δείγματα.

Στην εικόνα 4 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πέψης (των προτύπων και των μιγμάτων τους) σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15





**Εικόνα 4 :** Ενδεικτικά αποτελέσματα πέψης του *cytb* με τα ένζυμα *HaeIII* (θέσεις 2 -7) και *Mbol* ( θέσεις 9 – 14) μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. 2,9: Πρότυπο πρόβειου 3, 10: πρότυπο αίγειου, 4,11: πρότυπο αγελάδος, 5,12: μίγμα πρόβειου-αίγειου, 6,13: μίγμα αίγειου – αγελάδος, 7,14: μίγμα πρόβειου-αγελάδος , θέση 8 : M100 Ladder 100 bp

Στην εικόνα 4 διακρίνονται καθαρά τα πρότυπα (ζωνώσεις) που λαμβάνουμε για κάθε είδος και τα μίγματα αυτών. Τα τμήματα περιορισμού (τμήματα DNA) του κάθε είδους όπως προέκυψαν μετά την πέψη εμφανίζονται στον πίνακα 7, ενώ στον πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αναμενόμενα τμήματα που θα έπρεπε να προκύψουν μετά την θεωρητική εφαρμογή και την εικονική πέψη που πραγματοποιήσαμε με τη βοήθεια των προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

**Πίνακας 7:** Τα τμήματα περιορισμού των προτύπων και των μιγμάτων τους όπως προέκυψαν μετά από την πέψη του *cytb* με τα ένζυμα περιορισμού *HaeIII*, *Mbol*

Είδος	Τμήματα περιορισμού bp						Αριθμός τμημάτων	Αθροισμα τμημάτων	
	HaellI								
Πρόβειο		77	133	159			3	369	
Αίγειο	62	77			230		3	369	
Αγελάδος		77				292	2	369	
Πρόβειο-αίγειο	62	77	133	159	230				
Αίγειο-αγελάδος	62	77			230	292			
Πρόβειο - αγελάδος		77	133	159		292			
		Mbol							
Πρόβειο		60	122	187			3	369	
Αίγειο	34		122		213		3	369	
Αγελάδος						369	1	369	
Πρόβειο-αίγειο	34	60	122	187	213				
Αίγειο-αγελάδος	34		122		213	369			
Πρόβειο – αγελάδος		60	122	187		369			

Πίνακας 8: Τα τμήματα περιορισμού των προτύπων και των μιγμάτων τους όπως προέκυψαν μετά από εικονική πέψη με τα προγράμματα βιοπληροφορικής του cytb με τα ένζυμα περιορισμού HaeIII, MboI

Είδος	Τμήματα περιορισμού bp							Αριθμός Τμημάτων	Αθροισμα τμημάτων
	HaeIII								
Πρόβειο		77	133	159				3	369
Αίγειο	34		122		213			3	369
Αγελάδος		77				292		2	369
Πρόβειο-αίγειο									
Αίγειο-αγελάδος									
Πρόβειο - αγελάδος									
	MboI								
Πρόβειο			122			247		2	369
Αίγειο	34		122		213			3	369
Αγελάδος								-	369
Πρόβειο-αίγειο									
Αίγειο-αγελάδος									
Πρόβειο - αγελάδος									

Παρατηρούμε ότι υπάρχει ταύτιση για τα τμήματα προορισμού που δίνουν τα πρότυπα στο πείραμα με αυτά που εξάγονται με τα προγράμματα εκτός από αυτά που παίρνουμε για το πρόβειο με την πέψη με το MboI, καθώς με τη μέθοδό μας «κόβει» περαιτέρω το τμήμα των 247 βάσεων δίνοντας 2 τμήματα 60 και 187 βάσεων.

Το ίδιο βλέπουμε για το αγελάδος (θα το δούμε παρακάτω σε κάποια δείγματα) όταν με τη μέθοδό μας για κάποια από τα δείγματα «κόβει» δίνοντας 2 τμήματα 122 και 247.

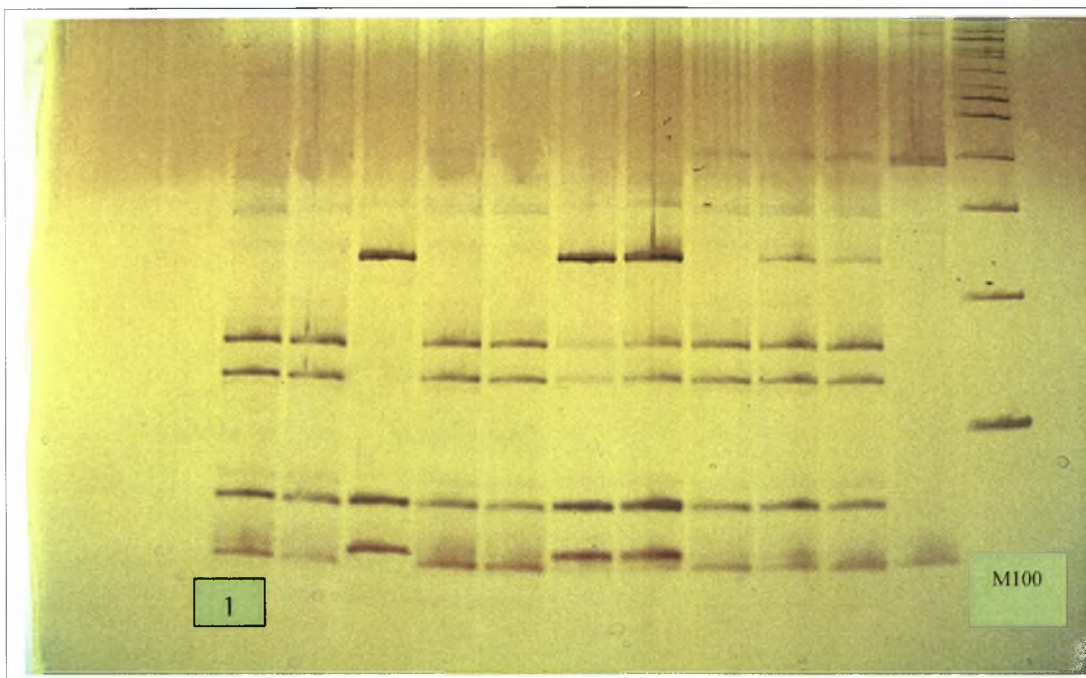
Αυτές οι διαφορές οφείλονται πιθανώς σε πολυμορφισμό του ίδιου είδους (πρόβειο, αγελάδος) και είναι ιδιαίτερης σημασίας η ανίχνευσή του με τη μέθοδό μας.

Η όλη διαδικασία της μεθόδου εφαρμόστηκε για όλα τα δείγματά μας, μέχρι και την τελική εφαρμογή των RFLP'S με την πέψη των δειγμάτων με τα δύο διαφορετικά ένζυμα HaeIII και MboI

Στις εικόνες 5,6 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πέψης με HaeIII σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για κάποια δείγματα, ενώ στις 7, 8 και 9, τα αντίστοιχα της πέψης με το MboI

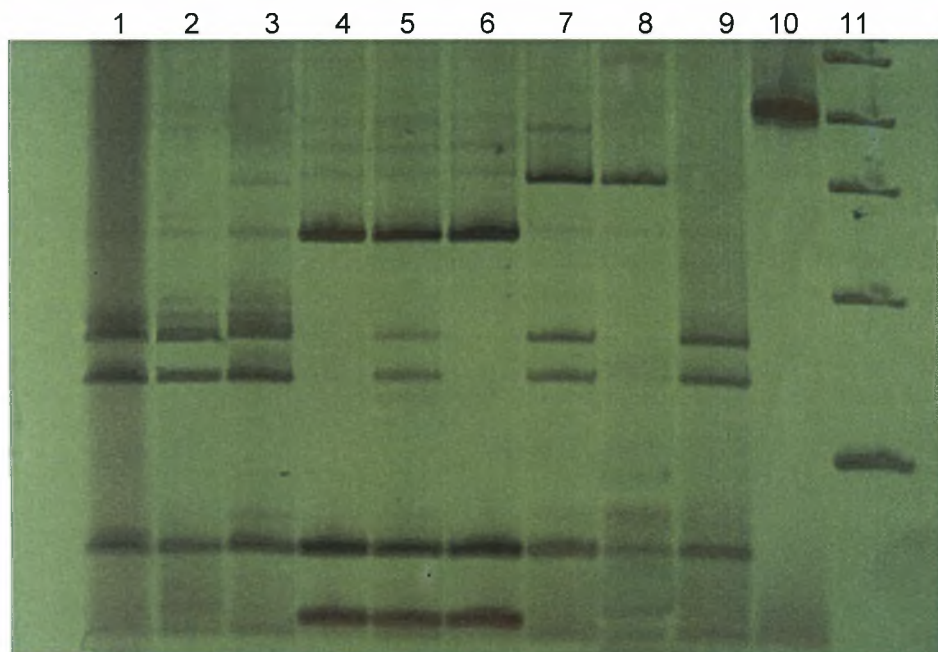
Όλα τα αποτελέσματα για τα δείγματα παρατίθενται στον πίνακα 9





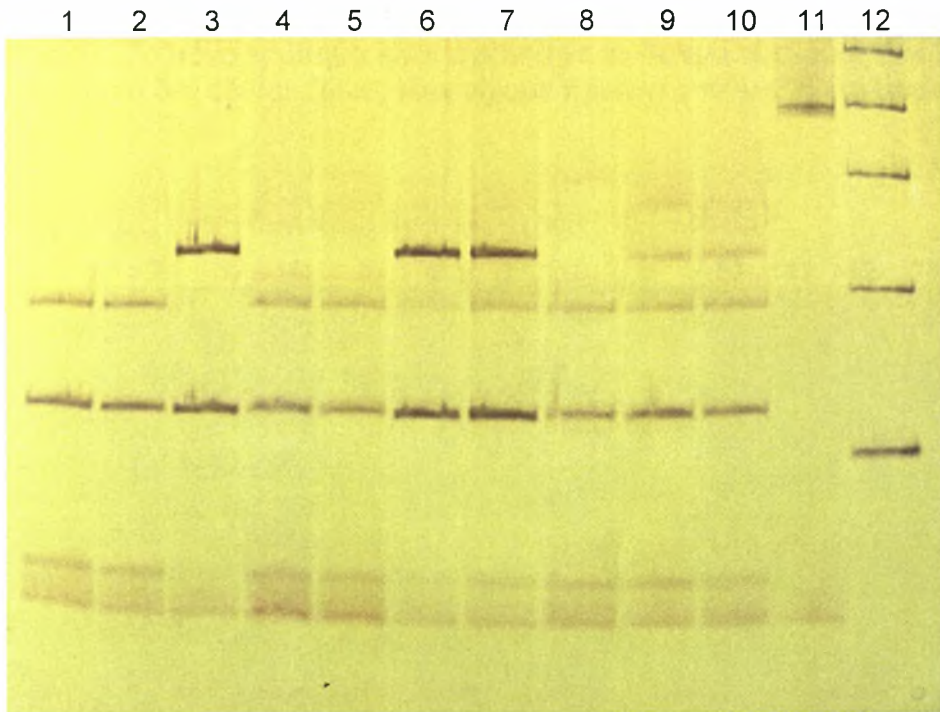
**Εικόνα 5:** Πέψη του *cytb* δειγμάτων γάλακτος με το ένζυμο *HaeII*, 1: πρόβειο(2), 2: πρόβειο (4), 3: αίγιο (20) , 4: πρόβειο (6) 5: πρόβειο (9) , 6: Γίδινο (+Πρβ) (36) , 7: Γίδινο(+Πρόβειο) (44) , 8: Πρόβειο (10) , 9: Πρόβειο (+γίδινο) (1) , 10:Πρόβειο (+γίδινο) (27) 11: PCR προϊόν, 12: M100 Ladder 100bp

Παρατηρούμε ότι έχουμε για τα δείγματά μας καθαρές ζωνώσεις οι οποίες συμπίπτουν με εκείνες που έχουν δώσει τα πρότυπα ενώ στα δείγματα των θέσεων 6, 7, 9 και 10 έχουμε και εμφάνιση ζωνών που αφορούν και άλλο είδος, παράδειγμα για το πώς η μέθοδος μπορεί να αναδείξει την ανάμιξη με διάφορα είδη ή τη νοθεία

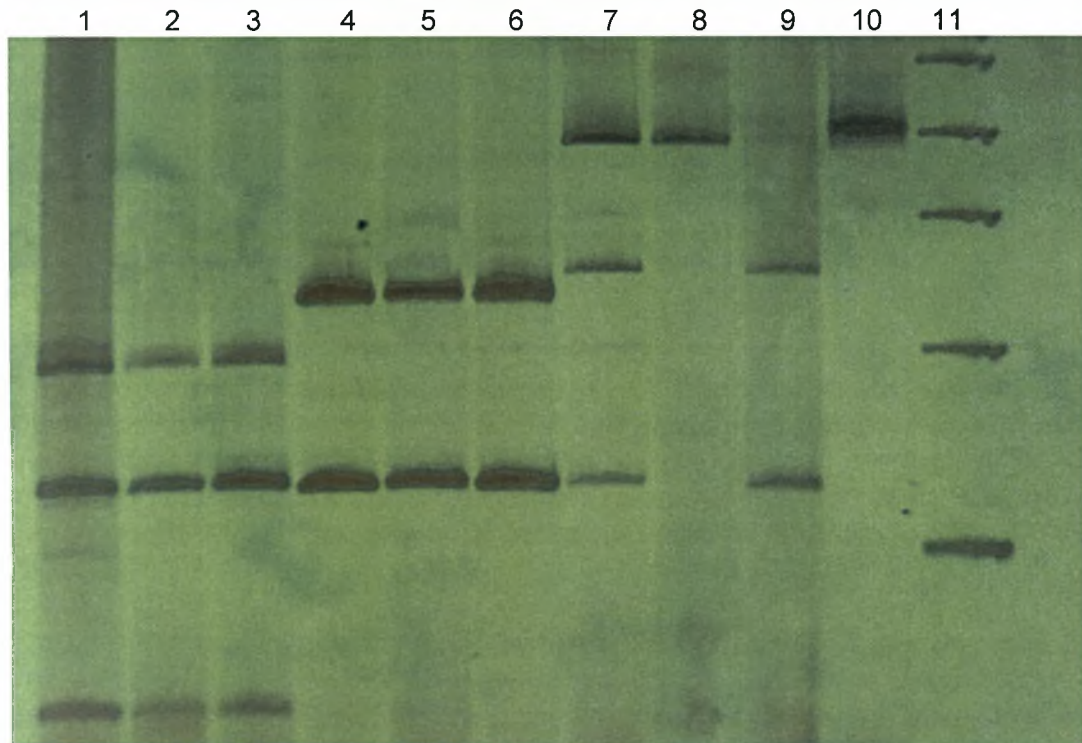


**Εικόνα 6:** Πέψη του *cytb* δειγμάτων γάλακτος με το ένζυμο *HaeIII*, 1: πρόβειο(11), 2: πρόβειο (24) 3: πρόβειο (25) , 4: αίγιο (15) 5: αίγιο (+πρόβειο) , 6: αίγιο (28) , 7: Προβειο + γίδινο (27) , 8: αγελάδος (22) , 9: Πρόβειο (29) , 10: PCR προϊόν, 11: M100 Ladder 100bp

Παρατηρούμε και εδώ ότι έχουμε για τα δείγματά μας καθαρές ζωνώσεις αντίστοιχες των προτύπων (δες πίνακα 9) ενώ στα δείγματα των θέσεων 5 και 7 έχουμε και εμφάνιση ζωνών που αφορούν και άλλο είδος



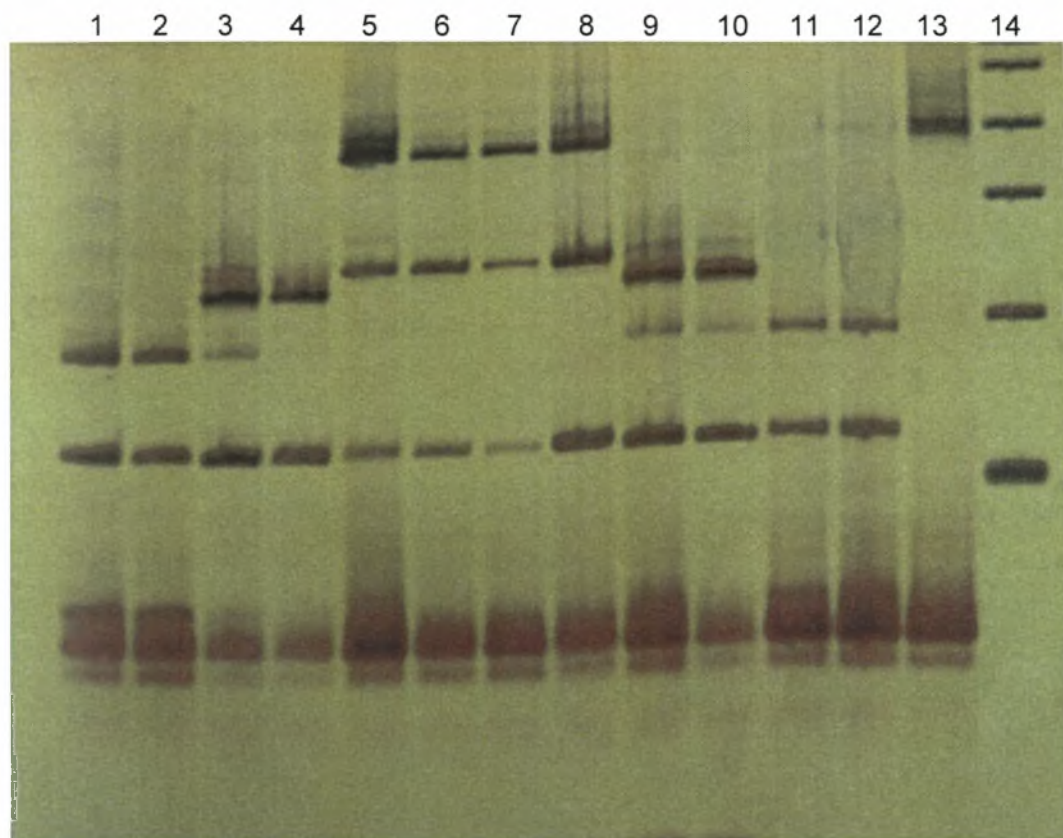
Εικόνα 7 : Πέψη του *cytb* δειγμάτων γάλακτος με το ένζυμο *MboI*, 1: πρόβειο(2), 2: πρόβειο (4), 3: αίγιο (20) , 4: πρόβειο (6) 5: πρόβειο (9) , 6: Γίδινο (+Πρβ) (36) , 7: Γίδινο(+Πρόβειο) (44) , 8: Πρόβειο (10) , 9: Πρόβειο (+γιδινό) (1) , 10:Πρόβειο (+γιδινό) (27) 11: PCR προϊόν, 12: M100 Ladder 100bp



Εικόνα 8: Πέψη του *cytb* δειγμάτων γάλακτος με το ένζυμο *MboI*, 1: πρόβειο(11), 2: πρόβειο (24) 3: πρόβειο (25) , 4: αίγιο (15) 5: αίγιο (+πρόβειο) , 6: αίγιο (28) , 7: Προβειο + γίδινο (27) , 8: αγελάδος (:) ακοπο (22) , 9: Πρόβειο (29) ,10: PCR προϊόν, 11: M100 Ladder 100bp



Και για τις παραπάνω απεικονίσεις της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πέψης του *cytb* με το ένζυμο *MboI*, παρατηρούμε ότι έχουμε για τα δείγματά μας καθαρές ζωνώσεις οι οποίες συμπίπτουν με εκείνες που έχουν δώσει τα πρότυπα (δες και πίνακα 9) ενώ έχουμε και απόλυτη σχεδόν συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα που προέκυψαν με την χρήση του ενζύμου *HaeIII*. Το μόνο ερώτημα είναι σχετικά με το δείγμα αγελάδος (εικ.8 Θ.8 δ22) το οποίο δεν έδωσε ζώνες (δεν είχαμε προϊόντα πέψης ή «ακοππο»)



**Εικόνα 9 ; Πέψη του *cytb* δειγμάτων γάλακτος με το ένζυμο *MboI*, 1: πρόβειο (33), 2: πρόβειο (39), 3:Μίγμα πρόβειου+ γίδινο, 4:Γίδινο 5. Αγελάδος 6: Αγελάδος, 7: Αγελάδος, 8: Αγελάδος, 9, 10: Μίγματα Γίδινο+Πρόβειο, 11, 12: Πρόβεια 13: PCR προϊόν, 14: M100 Ladder 100bp**

Στην παραπάνω απεικόνιση ισχύει η γενική διαπίστωση για ταύτιση των ζωνών με τα πρότυπα για το πρόβειο και το αίγιο και τα μίγματα αυτών, ενώ για τα δείγματα αγελάδος παρατηρούμε διαφοροποίηση σε σχέση με το πρότυπο (το οποίο δεν έδωσε τμήματα περιορισμού) αλλά και τη θεωρητική επεξεργασία, καθώς παρατηρούμε ότι κάποια από τα δείγματα «κόβουν» ενώ άλλα όχι.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 8 από τα 50 δείγματα που εξετάστηκαν με την υπό μελέτη μέθοδο δεν αξιολογήθηκαν τελικά 3 δείγματα για διάφορους λόγους και κυρίως λόγω κακών απομονώσεων ενώ για τα υπόλοιπα 47 είχαμε πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την ταυτοποίηση της αυθεντικότητας ή τυχόν αναμίξεων και νοθειών.

Για το μεγαλύτερο αριθμό από αυτά (εκτός από 6 που δεν έγινε χρήση του ενζύμου *MboI*) η μέθοδος έδειξε καλά αποτελέσματα καθώς είχαμε και

σχεδόν απόλυτη ταύτιση των αποτελεσμάτων της ταυτοποίησης μετά την πέψη με τα δύο διαφορετικά ένζυμα HaeIII και MboI.

Από τα 33 δείγματα πρόβειου γάλακτος όπως δηλώθηκαν, τα 19 ταυτοποιήθηκαν ως πρόβεια, τα 12 περιείχαν και γίδινο γάλα και τα 2 και γίδινο και αγελάδος. Από τα 6 δείγματα γίδινου τα δύο είχαν και ελάχιστο πρόβειο γάλα. Δύο μίγματα αιγοπρόβειου ήταν όντως μίγματα, ενώ όλα τα αγελαδινά δεν είχαν καμμία ανάμιξη.

**Πίνακας 9. Αποτελέσματα ταυτοποίησης ειδών γάλακτος (μετά την πέψη με τα 2 ένζυμα)**

Πρότυπα	Haelll			Mbol	
Πρόβειο	A	159 / 133 / 77	369	187 / 122 / 60	369
Αίγιο	B	230 / 77 / 62	369	213 / 122 / 34	369
Αγελάδος	Γ	292 / 77	369	292 / 77 ή 369	369
Δηλωθέν Είδος Γάλακτος			Τελικό είδος γάλακτος εκ της μεθόδου		Τελικό είδος γάλακτος εκ της μεθόδου

1	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο + Γίδιο	A + B	Πρόβειο + γίδιο
2	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
3	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο + Γίδιο	A + B	Πρόβειο + γίδιο
4	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
5	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο+γίδιο	A + B	Πρόβειο+γίδιο
6	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
7	Πρόβειο	-	Όχι καλές απομονώσεις	-	Όχι καλές Απομονώσεις
8	Γίδιο	-	Όχι καλές απομονώσεις	-	Όχι καλές Απομονώσεις
9	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
10	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
11	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο

12	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο+γίδιο	A + B	Πρόβειο+γίδιο
13	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο+γίδιο	A + B	Πρόβειο+γίδιο
14	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο+γίδιο	A + B	Πρόβειο+γίδιο
15	Γίδιο	B	Γίδιο	B	Γίδιο
16	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
17	Πρόβειο	A + B + Γ	Πρόβειο+γίδιο + αγελάδος	A + B + Γ	Πρόβειο + Γίδιο + αγελάδος
18	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
19	Πρόβειο	A + B + Γ	Πρόβειο+γίδιο+αγελάδος	A + B + Γ	Πρόβειο + Γίδιο + αγελάδος
20	Γίδιο	B	Γίδιο	B	Γίδιο
21	Γίδιο	B	Γίδιο	B	Γίδιο
22	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος
23	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος

24	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
25	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
26	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
27	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο + γίδιο	A + B	Πρόβειο + γίδιο
28	Γίδιο	B	Γίδιο	B	Γίδιο
29	Πρόβειο	A	Πρόβειο	-	Δεν έγινε
30	Πρόβειο	A	Πρόβειο	-	Δεν έγινε
31	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο + γίδιο	-	Δεν έγινε
32	Πρόβειο	A	Πρόβειο	-	Δεν έγινε
33	Πρόβειο	A	Πρόβειο	-	Δεν έγινε
34	Γίδιο	A + B	Πρόβειο + γίδιο	-	Δεν έγινε

35	Γίδιο + ελχ Πρόβειο	B + A	Γίδιο + Πρόβειο	B + A	Γίδιο + Πρόβειο
36	Γίδιο	B + A	Γίδιο + Πρόβειο	B + A	Γίδιο + Πρόβειο
37	Πρόβειο + Γίδιο	A + B	Πρόβειο + Γίδιο	A + B	Πρόβειο + Γίδιο
38	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο + Γίδιο	A + B	Πρόβειο + Γίδιο
39	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο

40	Πρόβειο	-	Δεν έγινε	-	Δεν έγινε
41	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
42	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
43	Πρόβειο	A + B	Πρόβειο + Γίδινο	A + B	Πρόβειο + Γίδινο
44	Γίδινο + ελαχ. Πρόβειο	B + A	Γίδινο + Προβειο	B + A	Γίδινο + Προβ
45	Πρόβειο	A	Πρόβειο	A	Πρόβειο
46	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος
47	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος
48	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος – δεν έκοψε
49	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος - δεν έκοψε
50	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος	Γ	Αγελάδος



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γάλα και τα προϊόντα του είναι τρόφιμα ζωτικής σημασίας, αναπτυξιακοί μοχλοί και διατροφικά όπλα στρατηγικής σημασίας για τις χώρες που τα παράγουν και τα εμπορεύονται

Επιπλέον είναι γεγονός η στροφή των καταναλωτών όλο και περισσότερο προς την υγιεινή διατροφή και μάλιστα σε προϊόντα υψηλής ποιότητας και διατροφικής αξίας, όσο γίνεται πιο φρέσκα και αγνά, με ελάχιστη μεταποίηση, παραδοσιακά και αυθεντικά.

Λόγω αυτού παρατηρείται τελευταία ένας αγώνας δρόμου από κράτη και επιχειρήσεις για την παραγωγή, ανάδειξη και προστασία παραδοσιακών προϊόντων (π.χ. Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης ΠΟΠ, Προϊόντων Γεωγραφικής Ενδειξης ΠΓΕ, βιολογικών) και για την τεκμηρίωση της αυθεντικότητας αυτών, καθώς θεωρούνται ιδιαίτερης σημασίας για τις εθνικές και τοπικές οικονομίες.

Ετσι και για την Ελλάδα και για ένα μεγάλο αριθμό ελληνικών παραδοσιακών προϊόντων και προϊόντων ποιότητας, όπως π.χ. η Φέτα ή διάφορα άλλα προϊόντα τα οποία έχουν καταχωρηθεί ως ΠΟΠ, ΠΓΕ κ.α. είναι ιδιαίτερης σημασίας η ευόδωση της προσπάθειας για τον έλεγχο της ποιότητας και την αποτροπή της νόθευσης σ' όλη την αλυσίδα παραγωγής, «από το χωράφι ως το πιάτο του καταναλωτή».

Γι' αυτό κρίνεται ιδιαίτερης σημασίας η ανάπτυξη των κατάλληλων μεθόδων ελέγχου της ποιότητας και της νοθείας σ' όλα τα κρίσιμα στάδια της παραγωγής και διάθεσης αυτών των προϊόντων και μάλιστα με αναλύσεις πέραν των παραδοσιακών μεθόδων που εφαρμόζονται.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνολογιών που αφορούν την ταυτοποίηση και τη διάκριση των ειδών στα προϊόντα με την παράλληλη ανίχνευση πιθανών προσμίξεων καθώς και την ιχνηλασιμότητα με την έννοια του ελέγχου της προέλευσης των προϊόντων, δηλαδή της φυλής των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν ή της γεωγραφικής τους προέλευσης.

Έτσι, οι μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών προέλευσης των ζωικών προϊόντων (κρέας – γάλα) αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη αξία τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερα για τα γαλακτοκομικά είναι ιδιαίτερης βαρύτητας, εξαιτίας της εκτεταμένης νοθείας που παρατηρήθηκε σε κάποια προϊόντα (π.χ. Φέτα) με αντικατάσταση των ακριβότερων ειδών γάλακτος όπως το πρόβειο με άλλα πολύ φθηνότερα.

Απαραίτητη είναι πλέον η ταυτοποίηση των ειδών στα διάφορα προϊόντα και λόγω των διάφορων διατροφικών αλλεργιών, σε συγκεκριμένης ζωικής προέλευσης προϊόντα π.χ. κρέας ή γάλα αγελάδος, χοιρινό κρέας κ.λπ. Σε ορισμένες περιπτώσεις τέτοιες αλλεργίες προκαλούνται ακόμη και με την παρουσία ιχνών του αλλεργιογόνου, γεγονός που κάνει πιο επιτακτική την ανάγκη για την ανάπτυξη μίας μεθόδου ταυτοποίησης ιδιαίτερα ευαίσθητης.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται έως τώρα βασίζονται κυρίως στην ανίχνευση πρωτεϊνών που περιέχονται μόνο στο ένα είδος γάλακτος, όπως ηλεκτροφορετικές (capillary, two dimensions), χρωματογραφικές – HPLC και ανοσολογικές (ELISA).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερη σημασία αποκτούν οι μοριακές μέθοδοι με βάση το DNA οι οποίες έχουν πολύ μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα για πολλές περιπτώσεις αξιολόγησης της αυθεντικότητας και είναι κατάλληλες ακόμη και σε περιπτώσεις υπερεπεξεργασμένων και θερμικά επεξεργασμένων προϊόντων.

Κρίνεται λοιπόν χρήσιμη η ανάπτυξη μιας μεθόδου αξιόπιστης, υψηλής ευκρίνειας, γρήγορης και οικονομικής που θα βασιστεί στη γενετική σύσταση των ελληνικών πληθυσμών ζώων αξιοποιώντας μοριακές τεχνικές.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για την ανάπτυξη και εφαρμογή μιας μοριακής μεθόδου για την ταυτοποίηση του διαφορετικών ειδών προέλευσης του γάλακτος. Η μέθοδος βασίζεται στην εύρεση και ανάπτυξη των κατάλληλων Μοριακών Δεικτών και η μοριακή τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η PCR-RFLP's (Restriction fragments Length Polymorphism) ή **Ανάλυση Πολυμορφισμού μήκους με Ένζυμα Περιορισμού των προϊόντων της PCR**. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή επαναληψιμότητα, είναι αξιόπιστη και σχετικά γρήγορη και οικονομική <sup>(16)</sup>

Τα βήματα εφαρμογής της μεθόδου είναι τα εξής:

- α) Απομόνωση mt DNA από το γάλα
- β) Ενίσχυση τμήματος 369bp του γονιδίου cytb με PCR και χρήση universal primers
- γ) Πέψη των προϊόντων της PCR με τα ένζυμα περιορισμού HaeIII και MboI
- δ) Εμφάνιση των τμημάτων περιορισμού με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης

Χρησιμοποιήθηκαν 50 δείγματα γάλακτος, πρόβειου, γίδινου και μιγμάτων αυτών, αλλά και αγελάδος τα οποία αφορούν κυρίως νωπό γάλα που επί το πλείστον ελήφθη κυρίως από κτηνοτροφικές μονάδες, εκτός από 3 εξ αυτών τα οποία ελήφθησαν από παστεριωμένα και εμφιαλωμένα δείγματα από την αγορά.

Εκτός των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης πρότυπα δείγματα για πρόβειο, αίγειο και αγελάδος και μίγματα αυτών (πρόβειο-αίγειο, αίγειο-αγελάδος, πρόβειο-αγελάδος) που έγιναν στο εργαστήριο.

Η επεξεργασία των προτύπων δειγμάτων και των μιγμάτων τους με τη μέθοδο και η σύγκριση αυτών με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από θεωρητική επεξεργασία με τα προγράμματα βιοπληροφορικής, μας έδωσε μια πολύ καλή ταύτιση για τα προκύπτοντα τμήματα περιορισμού για το κάθε είδος, Διαφοροποίηση είχαμε μόνο για το πρόβειο και τα τμήματα περιορισμού που προκύπτουν με την πέψη με το MboI.

Το ίδιο είχαμε για το αγελαδινό καθώς ενώ η θεωρητική επεξεργασία δεν έδωσε τμήματα περιορισμού για την πέψη με MboI, με τη μεθοδό υπήρξε διαφοροποίηση για κάποια από τα δείγματα καθώς έδωσαν τμήματα περιορισμού ( 122 και 247 bp)

Αυτές οι διαφορές οφείλονται πιθανώς σε πολυμορφισμό του ίδιου είδους (πρόβειο, αγελάδος) και είναι ιδιαίτερης σημασίας η ανίχνευσή του με τη μεθοδό μας.

Για τα πρότυπα και τα μίγματά τους αλλά και όλα τα δείγματα, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, έδωσε ευδιάκριτες ζωνώσεις που αντιστοιχούν στα τμήματα περιορισμού, ευκόλως συγκρίσιμες μεταξύ τους

Επίσης για τα πρότυπα και τα μίγματα τους αλλά και όλα τα δείγματα είναι σημαντικό ότι είχαμε πολύ καλή ταύτιση των αποτελεσμάτων ταυτοποίησης που προέκυψαν για τα δύο ένζυμα HaeIII και MboI, αποδεικνύοντας ότι η χρήση τους δίνει τα σωστά τα τμήματα περιορισμού ώστε να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για την ταυτοποίηση των ειδών.

Ετσι από τα 50 προς εξέταση δείγματα δεν αξιολογήθηκαν 3 δείγματα κυρίως λόγω κακών απομονώσεων, ενώ για τα υπόλοιπα 47 είχαμε πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την ταυτοποίηση της αυθεντικότητας ή τυχόν αναμιξεων και νοθειών.

Από τα 33 δείγματα πρόβειου γάλακτος όπως δηλώθηκαν, τα 19 ταυτοποιήθηκαν ως πρόβεια, τα 12 περιείχαν και γίδινο γάλα, ενώ τα 2 και γίδινο και αγελάδος. Από τα 6 δείγματα γίδινου τα δύο είχαν και ελάχιστο πρόβειο γάλα. Δύο μίγματα αιγοπρόβειου ήταν όντως μίγματα, ενώ όλα τα αγελαδινά δεν είχαν καμία ανάμιξη με άλλο γάλα.

Αρα η μέθοδος που αναπτύξαμε μπορεί να δώσει πολύ καλά αποτελέσματα για την ταυτοποίηση των ειδών προέλευσης του γάλακτος και την ανίχνευση της όποιας νοθείας ακόμη και μικροποσοτήτων καθώς δείχνει να έχει καλή ευαισθησία.

Εκείνο που θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί είναι κατά πόσο η μέθοδος θα μπορούσε με τη χρήση των κατάλληλων προτύπων να δώσει και ποσοτικά αποτελέσματα για την ανάμιξη του κάθε είδους.

Και σίγουρα απομένει να διερευνηθεί αν η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με το ίδιο ικανοποιητικά αποτελέσματα και για τα προϊόντα με βάση το γάλα (τυριά, γιαούρτι κ.α).

## **BIBΛIOΓPAΦIA**

- 1) Calleja I, Isabel Gonzalez , Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin Departamento de Nutricion, Bromatologia y Tecnologia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain International Dairy Journal 17 (2007) 87–93
- 2) Moatsou, G., & Anifantakis, E. (2003). Recent developments in antibodybased analytical methods for the differentiation of milk from different species. International Journal of Dairy Technology, 56, 133–138.
- 3) Anguita, G., Martin, R., Garcia, T., Morales, P., Haza, A. I., Gonzalez, I., et al. (1995). Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine b-casein. Journal of Dairy Research, 62, 655–659.
- 4) Kocher, T. D., Thomas, W. K., Mayer, A., Edwards, S. V., P. a. abo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 86, 6196–6200.
- 5) EC Regulation No. 1081/96 of the Commission June 14 (1996). Reference method for detection of cow's milk and cow's milk casein in cheese made from ewes, goats and buffalo milk or mixtures of ewes, goats and buffalo milk. Official Journal of the European Commission, L142, 15–25.
- 6) De Noni , Tirelli, Masotti (1996) Detection of cow's milk in non-bovine cheese by HPLC of whey protein: application to goat milk cheese. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 47, 7-17
- 7) Molina E, Martin-Alvarez P.J & Ramos M (1999). Analysis of cow' s, ewe's and goat's milk mixtures by capillary electrophoresis: Quantification by multivariate regression analysis. International Dairy Journal, 9, 99-105
- 8) Giovannacci I., Guizard C, Carlier M., Duval V., Martin J. L & Demeulemester C., (2004) Species identification of meat products by ELISA. International Journal of Food Science and Technology, 39, 863-867
- 9) Meyer H. K.,(2005). Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques., International Dairy Journal, 15, 595 – 604
- 10) Hurley, I. P., Ireland, H. E., Coleman, R. C., & Williams, J. H. (2004). Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. International Journal of Food Science and Technology, 39, 873–878.
- 11) Hurley, I.P., Coleman R.C., Ireland H.E., & Williams, J. H.H (2004) Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration in dairy products. International Journal of Food Science and Technology, 39, 873-878

- 12) Ronriguez E., Martin R., Garcia T., Hernandez P.E., & Sanz B., (1990). Detection of cow's milk in ewe's milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Dairy Research*, 57, 197-205
- 13) Ronriguez E., Martin R., Garcia T., Hernandez P.E., & Sanz B., (1994) Sandwich ELISA for detection of goat's milk in ewe's milk and cheese. *Food and Agricultural Immunology*, 6, 105-111
- 14) Branciarri, R., Nijman, I. J., Plas, M. E., Di Antonio, E., & Lenstra, J. A. (2000). Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *Journal of Food Protection*, 63, 408–411.
- 15) Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., & Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143–148.
- 16) Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J., & Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*, 78, 1542–1551.
- 17) Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., & Murby, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science*, 54, 369–376
- 18) Amills, M., Francino, O., Jansa, M., & Sanchez, A. (1997). Isolation of genomic DNA from milk samples by using chelex resin. *Journal of Dairy Research*, 64, 231 – 238
- 19) Lipkin, E., Shalom, Khatib, H., Soller, M., & Fredmann, A. (1993): Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 76, 2025-2032
- 20) Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Rodriguez, M. A., Hernandez, P. E., Garcia, T., et al. (2004). Rapid detection of cows milk in sheep's and goats' milk by a species-specific PCR technique. *Journal of Dairy Science*, 87, 2839–2845.
- 21) Ines M. Lopez-Calleja, Isabel Gonzalez , Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin (Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain): Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cow's milk in sheep's and goat's milk cheeses. *International Dairy Journal* 17 (2007) 87–93
- 22) Ines M. Lopez-Calleja, Isabel Gonzalez , Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin (Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain : Real-time Tagman PCR for quantitative detection of cow's milk in ewe's milk mixtures



- 23) Bottero M.T., Civera T., Nucera D., Rosati S., Sacchi P., Turi R.M et al. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's goat's and sheep's milk in dairy products / *International Dairy Journal* 13 (2003)
- 24) Bottero, M. T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R. M., & Rosati, S. (2002). Identification of cows' milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 362–366.
- 25) Branciari, R., Nijman, I. J., Plas, M. E., Di Antonio, E., & Lenstra, J. A. (2000). Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *Journal of Food Protection*, 63, 408–411
- 26) Dalmaso, 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.
- 27) EC Regulation No. 213/2001 of the Commission January 9. (2001). *Official Journal of the European Commission*, L037, 51–60.
- 28) Fox, P. F. (1987). *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Vol 1. London, UK: Elsevier Applied Science.
- 29) Haza, A. I., Morales, P., Martı́n, R., Garcı́a, T., Anguita, G., González, I., et al. (1997). Use of a monoclonal antibody and two enzyme-linked immunosorbent assay formats for detection and quantification of the substitution of caprine milk for ovine milk. *Journal of Food Protection*, 60, 973–977.
- 30) Herman, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*, 68, 420–436.
- 31) Maudet, C., & Taberlet, P. (2001). Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 229–235
- 32) Plath, A., Krause, I., & Einspanier, R. (1997). Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung. A, Food Research and Technology*, 205, 437–441.
- 33) Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., et al. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143–148.
- 34) Maudet, C., & Taberlet, P. (2001). Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 229–235.
- 35) Μελέτη για την Ανάπτυξη του κλάδου της Αιγοπροβατοτροφίας: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Σεπτέμβριος 2007
- 36) Διαγνωστική έκθεση για την Αιγοπροβατοτροφία – Τυροκομικά. Δίκτυο Πληροφόρησης και Υποστήριξης του πληθυσμού της Θεσσαλικής Υπαιθρου, Ελασσόνα, Περιφέρεια Θεσσαλίας. 2006



- 37) Εγχειρίδιο του Τμήματος Αιγοπροβατοτροφίας του Υπ.Α.Α.Τ. «Η Κατάσταση της Αιγοπροβατοτροφίας στην Ελλάδα και την Ε.Ε», Αθανάσιος Παπαθεοδώρου, Ντίνα Νικολάου, Αικατερίνη Τσολακίδη, Αθήνα 2006.
- 38) Scheffler I. (2001). Mitochondria make come back. *Advanced Drug Delivery Review* 49: 3-26
- 39) Pereira S. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology* 23: 745 – 752
- 40) Μαρκουλάτος Π. (2007), Σημειώσεις του μαθήματος Ποιοτικές και Ποσοτικές Μέθοδοι Ανάλυσης – Βιοδείκτες, του ΜΠΣ. Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας Π.Θ.
- 41) Spooner D., Van Treuren R, Devincible M. (2005). Molecular markers for Genebank Management. *PGRI technical bulletin* No 10
- 42) [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)
- 43) [www.neb.com/Rebsites/index.php](http://www.neb.com/Rebsites/index.php)
- 44) [www.neb.com/NEBCUTTER](http://www.neb.com/NEBCUTTER)
- 45) [www.webcutter2.com](http://www.webcutter2.com)

