



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. 16
Ημερομηνία 16-2-10

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Ι. ΛΙΑΚΟΥ**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**



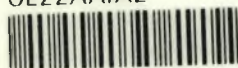
ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8102/1
Ημερ. Εισ.: 22-04-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
636.085 57
ΛΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087093

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

Συμβουλευτική Επιτροπή :

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

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

Αμιλία Ζίφα : Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας),
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ζήση Μαμούρη, που υπήρξε εμπνευστής του θέματος της εργασίας και μου εμπιστεύτηκε την εκπόνηση της συγκεκριμένης ενδιαφέρουσας έρευνας. Στην προσπάθειά μου να ολοκληρώσω την εργασία αυτή συνέβαλλαν άτομα με τα οποία συνεργάστηκα και θα ήθελα να ευχαριστήσω, κυρίως τον υποψήφιο Διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη που μου έδωσε τις απαραίτητες κατευθύνσεις και ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει με τις γνώσεις και την εμπειρία του σε όλα τα πειραματικά ζητήματα. Επίσης την Λέκτορα Θεολογία Σαραφίδου, όλα τα μέλη του εργαστηρίου με τους οποίους περευρεθήκαμε την ίδια χρονική περίοδο στο εργαστήριο, όπως και τους συναδέλφους μου κυρίως τον Βασίλη Γκοτοσόπουλο και τον Θεμιστοκλή Γιαννούλη τους οποίους ευχαριστώ για την προθυμία και την άπογη συνεργασία μας, χάρη στο ομαδικό πνεύμα και το φιλικό περιβάλλον που επικρατούσε. Ευχαριστώ την Επ. Καθηγήτρια Αικατερίνη Μούτου και την Επ.Καθηγήτρια Αιμιλία Ζίφα, που με τιμούν συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για την συνεχή συμπαράσταση και πολύπλευρη υποστήριξη κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κύριος στόχος της συγκεκριμένης εργασίας, ήταν η ανάπτυξη μιας μοριακής τεχνικής ώστε να μπορέσουμε αποτελεσματικά και σε σύντομο σχετικά χρονικό διάστημα να προσδιορίσουμε αλλά και να ταυτοποιήσουμε την προέλευση του κρέατος που περιέχεται στις ζωοτροφές. Απομονώθηκε μιτοχονδριακό γενετικό υλικό από τα διάφορα κρέατα (πρόβειο, χοιρινό, βοδινό, κατσικίσιο, κουνέλι, κότα, γαλοπούλα, πάπια, κνήγι) αλλά και συνδυασμός αυτών.

Εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR-SSCP, όπου ενισχυθήκανε τμήματα του γονιδίου 16S rRNA και πρότυπα ταυτοποιημένα είδη κρεάτων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινούς για τα παραγωγικά ζώα (universal primers) ώστε να απλοποιηθεί η διαδικασία και να έχουμε χαμηλό κόστος. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και διαχωρισμός των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Τα αποτελέσματα δείξαν ότι το 16S rRNA θεωρήθηκε κατάλληλος μοριακός δείκτης για τον διαχωρισμό κρεάτων ζωοτροφών για γάτες και σκύλους. Μετά την σύγκριση τους με ειδικά πρότυπα για το κάθε είδος, μπορέσαμε να προσδιορίσουμε και να ταυτοποιήσουμε την προέλευση των κρεάτων αλλά και να διαπιστώσουμε εάν αντιστοιχούν ή όχι σε ότι αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος. Εν κατακλείδι, η μέθοδος επιτυχώς ανίχνευσε και ταυτοποίησε κρέατα που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές, ώστε γρήγορα και εύκολα να μπορεί να γίνεται έλεγχος για νοθείες στις βιομηχανίες κρεάτων και παραγωγής ζωοτροφών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ.....	8
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	9
RAPD.....	12
AFLP.....	12
Μικροδορυφόροι (SSR).....	12
DNA αλληλούχηση.....	13
RFLP.....	13
SSCP.....	13
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	17
Τα ριβοσωματικά RNA ως εξελικτικά χρονόμετρα.....	19
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	20
Παράγοντες που επιδρούν στην αντίδραση PCR.....	23
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	27
Εξοπλισμός για την απομόνωση του από ιστό κρέατος ζωοτροφών.....	27
Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	28
Εξοπλισμός για την φωτομέτρηση.....	28
Εξοπλισμός για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων με PCR.....	29
Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου SSCP.....	29
Εξοπλισμός για την χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό	

άργυρο	30
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
Δείγματα.....	31
Μέθοδος.....	31
Απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA από ιστό κρέατων ζωοτροφών.....	33
Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός απομονωμένου DNA.....	34
Ενίσχυση τμημάτων μιτοχονδριακού (mt)DNA από το γονίδιο 16S rRNA με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	37
Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	38
Σύγκριση δειγμάτων με τα πρότυπα.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

Σαν ζωοτροφές ορίζουμε τα προϊόντα φυτικής ή ζωικής προέλευσης σε φυσική κατάσταση, νωπά ή διατηρημένα, και τα παράγωγα της βιομηχανικής τους μεταποίησης καθώς και τις οργανικές ή ανόργανες ουσίες, απλές ή σε μίγμα, που περιέχουν ή όχι πρόσθετες ύλες και προορίζονται για τη διατροφή των ζώων από το στόμα.

Στην συγκεκριμένη εργασία ασχοληθήκαμε συγκεκριμένα με την ανάλυση και την ταυτοποίηση σκυλοτροφών και γατοτροφών που περιέχουνε διάφορα είδη κρεάτων και συνδυασμούς αυτών. Οι σκύλοι και οι γάτες ανήκουν στα σαρκοφάγα, Ωστόσο, ένα σαρκοφάγο ζώο δεν τρώει αποκλειστικά κρέας. Το θήραμα δεν τους προσέφερε μόνο λίπος και πρωτεΐνες , αλλά βιταμίνες , ιχνοστοιχεία, φυτικές ίνες (περιεχόμενο πεπτικού σωλήνα), όπως και δύσπεπτα τμήματα (νύχια, δέρμα, κόκαλα) που χρησιμεύουν για κορεσμό του στομάχου. Όλα αυτά συντελούν στην καλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος και φυσικά είναι απόλυτα ισορροπημένη φυσική διατροφή για τα σαρκοφάγα ζώα. Κύρια πηγή πρωτεϊνών για τα κατοικίδια ζώα (σκύλους – γάτες) είναι το κρέας (κοτόπουλο, γαλοπούλα, αρνί, ψάρι, μοσχάρι).

Σύμφωνα με την υπουργική απόφαση 228652/2002, στην ετικέτα των ζωοτροφών για οικιακά ζώα επιτρέπεται επιπλέον να επισημαίνεται, με ειδική δήλωση, η παρουσία ή η χαμηλή περιεκτικότητα μιας ή περισσότερων πρώτων υλών ζωοτροφών που έχουν ουσιαστική σημασία για τα χαρακτηριστικά αυτής της ζωοτροφής. Τα βασικά συστατικά μιας ζωοτροφής για οικιακά ζώα είναι, κρέατα και παράγωγα ζώων, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, αβγά και παράγωγα αβγών, έλαια και λίπη, ψάρια και παράγωγα ψαριών, σιτηρά, λαχανικά, παράγωγα φυτικής προελεύσεως, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα διάφορα σπέρματα. Συγκεκριμένα, όταν αναγράφονται ως πρώτη ύλη, κρέατα και παράγωγα ζώων εννοούμε όλα τα σαρκώδη τμήματα χερσαίων θερμόαιμων ζώων, νωπά ή διατηρημένα με κατάλληλη επεξεργασία και όλα τα προϊόντα και υποπροϊόντα της μεταποίησης του σώματος ή μερών του σώματος των χερσαίων θερμόαιμων ζώων. ^[36]

[37] Στον κτηνιατρικό τομέα, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα επιδιώκει πρώτα απ' όλα την προστασία της υγείας των ζώων και επομένως της υγείας των ανθρώπων, αλλά και την καλή λειτουργία της εσωτερικής αγοράς. Από την 1η Ιανουαρίου 1992, οι ζωοτεχνικοί έλεγχοι στα ενδοκοινοτικά σύνορα καταργήθηκαν και μεταφέρθηκαν στον τόπο αποστολής, ενώ συγχρόνως ενισχύθηκε η παρακολούθηση των ζωνοδόσων και των ζωνοσογόνων παραγόντων επιδιώκοντας την πρόληψη μολύνσεων και δηλητηριάσεων από τρόφιμα. Συγχρόνως, η Κοινότητα πέρασε από ένα καθεστώς βασιζόμενο στον συστηματικό προληπτικό εμβολιασμό κατά του αφθώδους πυρετού, που μπορούσε να αποτελέσει εμπόδιο στην ελεύθερη κυκλοφορία των ζώων και των ζωικών προϊόντων, σε μια πολιτική μη εμβολιασμού και σφαγής σε περίπτωση εμφάνισης της ασθένειας.

Σήμερα, οι ζωοτροφές πρέπει να έχουν ακριβώς το ίδιο υψηλό επίπεδο ασφάλειας που έχουν οι τροφές που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Αυτό βέβαια δεν προβλέπεται μόνο για λόγους ζωοφιλίας, αλλά για την προστασία της Δημόσιας Υγείας, αφού χοιρινά, κοτόπουλα, αγελάδες και αιγοπρόβατα, καθώς και τα παράγωγα προϊόντα τους (ζαμπόν, λουκάνικο, αβγά, γαλακτοκομικά), αποτελούν βασικά διατροφικά προϊόντα του ανθρώπου. Ζώα που διατρέφονται με ασφαλείς ζωοτροφές, θα δώσουν ασφαλή τρόφιμα. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο, αφορά και τις τροφές για τα μικρά ζώα.. Αν λοιπόν κυκλοφορήσει μία παρτίδα μιας πρώτης ύλης με κάποιο πρόβλημα, τότε είναι πολύ πιθανό ότι ένα μέρος της θα καταλήξει σε σκυλοτροφές, ενώ ένα άλλο μέρος θα καταλήξει στα καταστήματα τροφίμων. Οι έλεγχοι στρέφονται και προς τις δύο κατευθύνσεις με την ίδια αυστηρότητα.

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ [25]

Η χρήση Μοριακών Δεικτών αποτελεί την πιο σύγχρονη και αποτελεσματική τεχνική για την μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας, τη γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών και τη Βελτίωση. Οι μοριακοί δείκτες είναι μικρές περιοχές του γονιδιώματος που χρησιμοποιούνται ως δείκτες γενετικής ποικιλομορφίας.

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από την μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους σε προγράμματα ταυτοποίησης και πιστοποίησης γενετικού υλικού. Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν κάποια γνωρίσματα, όπως η παρουσία πολυμορφισμού ή ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τύπο, να παρουσιάζουν υψηλό συντελεστή

κληρονομικότητας και η μεθοδολογία να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο εξεταζόμενο δείγμα, να είναι εύκολη, και να εφαρμόζεται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του.^[34] Είναι δύσκολο να καθιερωθεί ένα γενικευμένο και ομοιόμορφο πλάνο που να αφορά εφαρμόσιμους και κατάλληλους μοριακούς δείκτες για ανίχνευση και ταυτοποίηση των ειδών. Μια σειρά από δεδομένα πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή του καταλληλότερου δείκτη. Οι ιδανικές και επιθυμητές ιδιότητες ενός μοριακού συστήματος συνοψίζονται στα ακόλουθα ^[2] να αποτελεί διακριτό χαρακτήρα, ευρέως καταναμημένο ώστε να μπορούν να γίνουν συγκρίσεις ομολογίας σε μεγάλο φάσμα οργανισμών,

β) να μπορεί να απομονωθεί και να εξεταστεί εύκολα,

γ) να έχει απλή γενετική δομή χωρίς πολύπλοκα στοιχεία όπως επαναλαμβανόμενο DNA, μεταθετά στοιχεία,

δ) να έχει άμεσο τρόπο γενετικής μετάδοσης, χωρίς ανασυνδυασμό ή άλλες γενετικές αναδιατάξεις,

ε) να εξελίσσεται με γρήγορο ρυθμό ώστε να εμφανίζονται νέες καταστάσεις χαρακτήρων ακόμα και κατά τη διάρκεια ζωής ενός είδους, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες μικροεξέλιξης.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες δείκτες που αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό DNA και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Στους πρωτεϊνικούς δείκτες ανήκουν τα ισοένζυμα και τα αλλοένζυμα. Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου που καταλύουν την ίδια αντίδραση ενώ τα αλλοένζυμα αποτελούν διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου. Στους δείκτες ανήκουν οι αλληλουχίες μιτοχονδριακού (mt) DNA, οι αλληλουχίες χλωροπλαστικού (cp) DNA, το μικροδορυφορικό DNA καθώς και οι αλληλουχίες πυρηνικού DNA. Οι δείκτες είναι πολυπληθείς, (Πίνακας 1) εκείνοι με τις περισσότερες εφαρμογές είναι τα RFLP (πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA), τα RAPD (τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA), τα AFLP (Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων), οι μικροδορυφόροι (microsatellites) ή SSR (απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες), τα SSCP (πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης) και η DNA αλληλούχιση.

A. Biochemical markers

- Allozymes

B. Molecular markers

i) Non-PCR² based techniques

- **RFLP** Restriction Fragment Length Polymorphisms ,
- **VNTR** Minisatellites or Variable Number of Tandem Repeats ,

ii) PCR-based techniques

- **DNA sequencing**
- **ITS, Multi-copy DNA**, Internal Transcribed Spacer regions of nuclear ribos.genes ,
- **Single-copy DNA**, including both introns and exons
- **STS** Sequence-Tagged Sites
- SSR Microsatellites**, Simple Sequence Repeat,
- STR** Short Tandem Repeat,
- STMS** Sequence Tagged Microsatellite
- **SSLP** Simple Sequence Length Polymorphism
- **ASLP** Amplified Sequence Length Polymorphism
- **SCAR**, Sequence Characterized Amplified Region
- CAPS**, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
- **SSCP**, Single-Strand Conformation Polymorphism
- **DGGE**, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- **TGGE**, Thermal Gradient Gel Electrophoresis
- **HDA** Heteroduplex Analysis
- **DHPLC**, Denaturing High Performance Liquid Chromatography
- **MAAP**, Multiple Arbitrary Amplicon Profiling
- **RAPD**, Random Amplified Polymorphic DNA
- **DAF**, DNA Amplification Fingerprinting
- **AP-PCR**, Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
- **ISSR**, Inter-Simple Sequence Repeat
- **SPAR**, Single Primer Amplification Reaction
- **DAMD** Directed Amplification of Minisatellite DNA
- **AFLP**, Amplified Fragment Length Polymorphism
- **SAMPL**, Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Loci

RAPDs ^[5]

Είναι μια τεχνική που στηρίζεται στην PCR για την ανίχνευση γενετικής ποικιλομορφίας και όχι στη χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών, όπως γίνεται στη χρήση των δεικτών RFLRs. Πρόκειται για μια απλή και γρήγορη μέθοδο με χαμηλό κόστος στην οποία χρησιμοποιούνται τυχαίοι εκκινητές, που μπορούν να συντεθούν εύκολα και να παράγουν μεγάλο αριθμό ζωνών. Μειονεκτεί όμως στο γεγονός ότι απαιτεί DNA μεγάλου μοριακού βάρους, ανιχνεύει μόνο τους κυρίαρχους δείκτες, η ανίχνευση του πολυμορφισμού είναι ακόμη περιορισμένη και η δυνατότητα επανάληψης των αποτελεσμάτων είναι μικρή και ανακόλουθη.

AFLP ^[34]

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά την πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού από ένα πολυσύνθετο σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος. Έτσι οι πολυμορφισμοί ταυτοποιούνται με μεγάλη αποτελεσματικότητα λόγω των διαφορών που προκύπτουν στο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Οι εκκινητές δεν είναι αναγκαίο να έχουνε γνωστή αλληλουχία. Τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι επαναλήψιμα, όμως ολόκληρη η διαδικασία είναι σχετικά δύσκολη και το κόστος υψηλό. Απαιτείται πολύ καθαρό DNA, μεγάλου μοριακού βάρους. Μία άλλη πρακτική εφαρμογή της μεθόδου είναι και η γενετική χαρτογράφηση.

Μικροδορυφόροι (SSR)

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία αναφέρεται σε μικρές συνεχείς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών 2, 3 ή 4 νουκλεοτίδια. Οι αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα, ο οποίος εντοπίζεται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των άκρων τους. Εμφανίζονται σαν ζώνες ηλεκτροφόρησης με διαφορετικό μέγεθος και χαρακτηρίζονται από συγκυριαρχία. Έτσι γίνεται εύκολη η διάκριση των ετεροζυγωτών ατόμων. Το γεγονός ότι απαιτούνται εξειδικευμένες διαδικασίες κλωνοποίησης συγκεκριμένων τμημάτων DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας εκατέρωθεν των άκρων ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές, αποτελεί μειονέκτημα, διότι έχει αυξημένο κόστος και απαιτεί αρκετό χρόνο και εξειδικευμένο προσωπικό.

DNA αλληλούχιση

Τεχνική κατά την οποία αναλύεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του τμήματος DNA που μας αφορά και με την χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου. Μειονέκτημα αποτελεί ο ακριβός εξοπλισμός.

RFLP

Η μεθοδολογία του RFLP που έχει πολύ καλή επαναληψιμότητα, βασίζεται στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το πολύπλοκο γονιδίωμα των οργανισμών σε διακριτά τμήματα συγκεκριμένου μεγέθους ελαττώνοντας την πολυπλοκότητα. Πολυμορφισμός παρατηρείται σε ένα πρότυπο περιορισμένων τμημάτων DNA όταν συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού. Επίσης πολυμορφισμός μπορεί να συμβεί και από τη δημιουργία ή εξάλειψη μιας νέας θέσης αναγνώρισης από ένθεση ή απαλοιφή περιοχών DNA. Το πρότυπο των πολυμορφικών ζωνών εμφανίζεται είτε μετά από υβριδισμό με τον ανιχνευτή ραδιενεργά σημασμένο ή χημικά τροποποιημένο, είτε πλέον με απλή ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλμίδης. Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση περιοχών του γονιδιώματος αλλά και στην εκτίμηση της ποικιλομορφίας σε τράπεζες γενετικού υλικού. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλό κόστος, είναι γρήγορη και αποτελεσματική. Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι απαιτούνται μεγάλες ποσότητες DNA υψηλής καθαρότητας.

SSCP ^[38]

Η ταυτοποίηση των σημειακών μεταλλαγών στο επίπεδο του DNA είναι απαραίτητη σε πολλούς διαφορετικούς κλάδους της βιολογίας, όπως στην πληθυσμιακή γενετική, τη διαγνωστική, τη γενετική του ανθρώπου κ.λπ. Η μεθοδολογία για την ανίχνευση των μεταλλαγών δέχτηκε τεράστια ώθηση στα τέλη της δεκαετίας του '80 με την ανακάλυψη της PCR. Έτσι, δεν απαιτείται πλέον η επανακλωνοποίηση γονιδίων ώστε να απομονωθούν και να μελετηθούν για τυχόν μεταλλαγές αλλά μοναδική προϋπόθεση είναι να είναι γνωστή η αλληλουχία τμήματος του γονιδίου ώστε να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές και να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός *in vitro*. Πλέον, είναι διαθέσιμες πολλές εναλλακτικές μέθοδοι για την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών οι οποίες

εφαρμόζονται ανάλογα με τον τύπο της μεταλλαγής και το απαιτούμενο διακριτικό όριο. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την επιλογή της μεθόδου είναι το αν η μεταλλαγή είναι γνωστή και σε συγκεκριμένη θέση του γονιδίου ή άγνωστη οπότε θα πρέπει να διερευνηθεί η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδίου ή έστω της κωδικής περιοχής του ώστε να γίνει η ταυτοποίησή της. Αντίθετα, στις περιπτώσεις όπου ένα γονίδιο έχει συσχετιστεί με κάποιο παθολογικό φαινότυπο αλλά δεν είναι γνωστή η υπεύθυνη μεταλλαγή, σε ένα καινούριο γονίδιο που εξετάζεται ως πιθανό υποψήφιο για ένα νόσημα, σε πληθυσμιακές μελέτες όπου διερευνάται η ποικιλομορφία ενός πληθυσμού είναι απαραίτητη η σάρωση όλου του γονιδίου ή του εξεταζόμενου τμήματος DNA για την ταυτοποίηση όλων των πιθανών μεταλλαγών.

Μία μέθοδος για την σάρωση τμημάτων DNA, με μεγάλη διακριτική ικανότητα και ταυτόχρονα ιδιαίτερα απλή, γρήγορη και οικονομική είναι η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP). Στηρίζεται στην διαφορετική δομή και συνεπώς διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα, που λαμβάνουν μονόκλωνα μόρια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μόνο μία βάση. Έτσι, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν ενισχυθεί με PCR, από διαφορετικά άτομα τα οποία φέρουν μεταλλαγές σε διαφορετικές θέσεις, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση. Η μεθοδολογία αυτή εκμεταλλεύεται την τάση του μονόκλωνου DNA να σχηματίζει ενδομοριακά ζεύγη βάσεων και προκύπτει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση που εξαρτάται από την αλληλουχία. Αλλαγές της αλληλουχίας των βάσεων του DNA μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη διαμόρφωση των μονόκλωνων μορίων DNA, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αλλαγές στη μετακίνηση των μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση και έτσι να εντοπιστεί ο πολυμορφισμός. Στην SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η πολυακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές, το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών που με τη σειρά τους διασυνδέονται παρουσία του N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδα, ενός μορίου διασυνδέτη, σχηματίζοντας μία πορώδη πηκτή. Τα δείγματα-προϊόντα PCR πριν την ηλεκτροφόρησή τους υφίστανται αποδιάταξη με θέρμανση ώστε να σχηματιστούν οι μονόκλωνες αλυσίδες, ενώ στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται απουσία αποδιατακτικού μέσου ώστε να επιτρέπονται μερικώς οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, η κινητικότητα του μορίου δεν εξαρτάται μόνο από το μέγεθός του αλλά και από την τριτοταγή δομή του που με τη σειρά της καθορίζεται από την αλληλουχία του κλώνου. Μετά το πέρας της

ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με διάλυμα νιτρικού αργύρου που έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα ανιχνεύοντας ποσότητες της τάξεως των λίγων νανογραμμάρων.

Καθώς η διαμόρφωση ενός μονόκλωνου τμήματος DNA εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους του πηκτώματος και της ηλεκτροφόρησης, αυτές πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την εφαρμογή της SSCP. Έτσι, η θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση είναι κρίσιμη καθώς υψηλές θερμοκρασίες λόγω αποδιατακτικών επιδράσεων, μπορούν να μειώσουν το επίπεδο της τριτοταγούς δομής με αποτέλεσμα τη μείωση της διακριτικής ικανότητας. Επίσης, επίδραση στη διακριτική ικανότητα έχει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος που επιλέγεται κυρίως βάση του μεγέθους του DNA και καθορίζεται τόσο από την συγκέντρωσή του πηκτώματος όσο και από την αναλογία της N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης. Όσον αφορά το μέγεθος του DNA υπό ανάλυση, αυτό επηρεάζει αντιστρόφως ανάλογα την διακριτική ικανότητα: παρατηρείται δηλαδή σταδιακή μείωσή της όσο αυξάνει το μήκος του προϊόντος. Γενικά, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τμήματα λίγων εκατοντάδων ζευγών βάσεων, συνθήκη που ρυθμίζεται εύκολα με βάση τον σχεδιασμό των εκκινητών κατά την PCR.

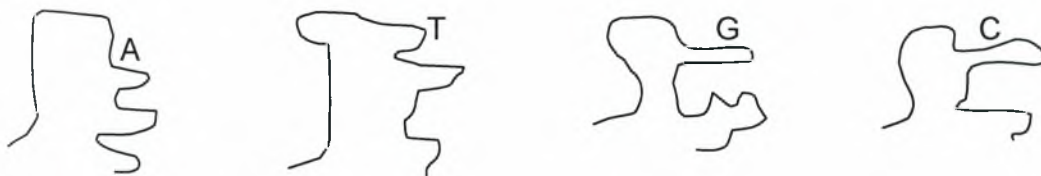
Υπάρχουν όμως και δύο μειονεκτήματα στη μέθοδο SSCP. Πρώτον, οι διαφορές στην κινητικότητα δε σχετίζονται με τον αριθμό των διαφορών στην αλληλουχία. Επομένως, η μόνη πληροφορία που μπορεί να αντληθεί είναι κατά πόσο τα ενισχυμένα τμήματα είναι πανομοιότητα ή διαφορετικά. Δεύτερον το βέλτιστο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων για την ανίχνευση των περισσότερων σημειακών μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερα μικρό, περίπου 200bp.

Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου SSCP

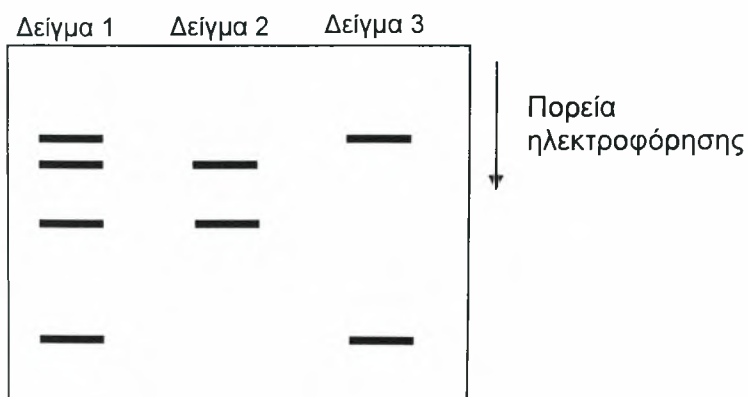
Έστω ότι σε μία θέση ενός τμήματος DNA διπλοειδούς οργανισμού υπάρχει η ετεροζυγωτία A/G. Συνεπώς στο ένα αλληλόμορφο το δίκλωνο DNA θα έχει σύσταση A/T και στο άλλο αλληλόμορφο G/C.



Μετά την αποδιάταξή τους και κατά την ηλεκτροφόρηση, τα τέσσερα, μονόκλιωνα πλέον, μόρια αποκτούν διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση, έστω αυτήν που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, με αποτέλεσμα να έχουν και διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα.



Έτσι, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την χρώση του πηκτώματος, στο συγκεκριμένο δείγμα (Δείγμα A) θα προκύψουν τέσσερις διακριτές ζώνες. Επίσης, αν στο πηκτώμα αυτό συμπεριληφθούν και δείγματα, ομόζυγα για το αλληλόμορφο 1 και 2 αντίστοιχα (Δείγμα 2 και 3), τελικά θα έχουμε μία εικόνα ως εξής:

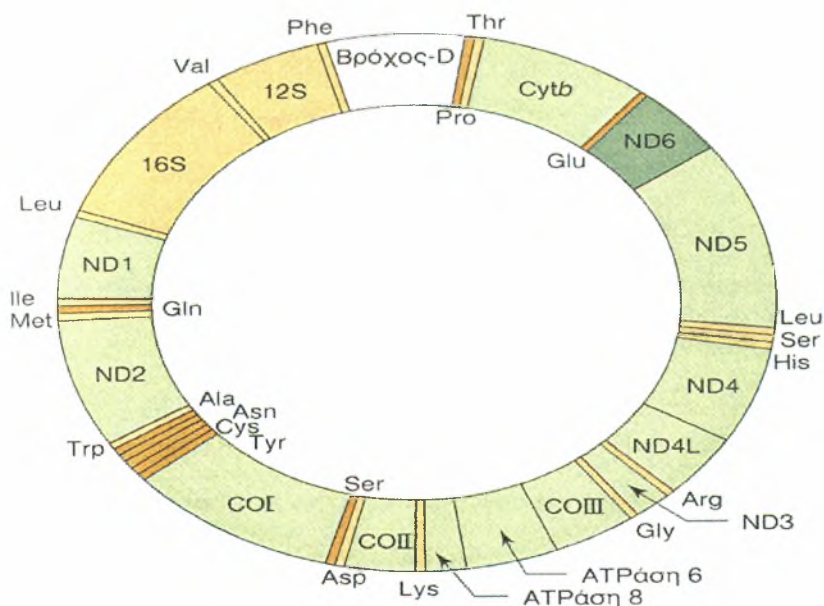


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου SSCP.

Ωστόσο, το αποτέλεσμα δεν είναι πάντα τόσο ευδιάκριτο καθώς κατά την ηλεκτροφόρηση κάποια μόρια επανασχηματίζουν δίκλωνη αλυσίδα με αποτέλεσμα να εμφανίζονται επιπλέον ζώνες. Επίσης, συνήθως αναλύονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα που είναι πιθανόν να φέρουν πολυμορφισμούς σε διαφορετικές θέσεις ή και σε περισσότερες του ενός, με συνέπεια τα τελικά πρότυπα των ζωνών και η σύγκρισή τους να είναι αρκετά πολύπλοκη. Παρόλα αυτά και εφόσον έχει πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση της PCR ώστε να μην προκύπτουν παραπροϊόντα τα οποία τελικά θα δώσουν επιπλέον ζώνες κατά τη χρώση και με προσεκτική ανάλυση των αποτελεσμάτων η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και με μεγάλη γενικά διακριτική ικανότητα. Επιπλέον, είναι δυνατή η ομαδοποίηση των δειγμάτων που εμφανίζουν ταυτόσημο πρότυπο έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση σε ένα μόνο από αυτά, μειώνοντας έτσι σημαντικά το κόστος του πειράματος.

ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA ^[18]

Ένας από τους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιείται κατεξοχήν στις μελέτες είναι το μιτοχονδριακό DNA (mt DNA) το οποίο στους περισσότερους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο με μέγεθος 14-17 kb αν και σε ορισμένους οργανισμούς έχει παρατηρηθεί ότι το μέγεθός του μπορεί να φτάσει μέχρι και 40 kb. Παρά την ποικιλία που παρατηρείται στο μέγεθός του, μικρή είναι η ποικιλία ως προς τα γονίδια που αυτό περιέχει, αφού στις περισσότερες μελέτες φαίνεται ότι μεγαλύτερα μεγέθη οφείλονται κυρίως σε διαφοροποίηση του μήκους μη κωδικών περιοχών^[29]. Το τυπικό μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών υποστηρίζεται ότι αποτελείται από μια μη κωδικοποιούσα ρυθμιστική περιοχή, 13 γονίδια που κωδικοποιούν, δύο ριβοσωμικά RNA (rRNA) και 22 μεταφορικά RNA (tRNA) καταναμημένα στο κυκλικό μόριο DNA. Από τα 37 γονίδια του mtDNA, τα 24 κωδικοποιούν για τη μεταφραστική μηχανή του ίδιου του mtDNA (22 tRNA, 2 rRNAs). Τα 2 rRNAs που κωδικοποιούνται είναι τα μοναδικά που υπάρχουν στο μιτοχονδριακό ριβόσωμα (12S rRNA-μικρή υπομονάδα, 16S rRNA-μεγάλη υπομονάδα).



Εικόνα 2: χάρτης του μιτοχondριακού γονιδιώματος του ανθρώπου, αποτελούμενου από 16.569 ζεύγη βάσεων, του οποίου η αλληλουχία προσδιορίστηκε το 1981.

Το γονιδίωμα κωδικοποιεί τα rRNA 16S και 12S και τα 22 tRNA. Οι προσδιορισμοί των αμινοξέων για το tRNA σημειώνονται εξωτερικά του κύκλου για τα γονίδια που μεταγράφονται αριστερόστροφα και εσωτερικά του κύκλου για τα γονίδια που μεταγράφονται δεξιόστροφα. Ομοίως τα 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υποδεικνύονται με σκούρο πράσινο (μεταγράφονται αριστερόστροφα) και ανοικτό πράσινο (μεταγράφονται δεξιόστροφα). Τα γονίδια κωδικοποιούν: Cytb, κυτόχρωμα b' ND1-6, συστατικά του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του NADH· COI-III, υπομονάδες του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος· ATPάση 6 και 8, πολυπεπτίδια του συμπλόκου της μιτοχondριακής ATPάσης. Οι δύο υποκινητές εντοπίζονται στον βρόχο -D περιοχή η οποία εμπλέκεται και στην αντιγραφή του DNA.

Τα γονίδια που κωδικοποιούνται είναι: Cytb, κυτόχρωμα b' ND1-6, συστατικά του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του NADH· COI-III, υπομονάδες του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος· ATPάση 6 και 8, πολυπεπτίδια του συμπλόκου της μιτοχondριακής ATPάσης. Οι δύο υποκινητές εντοπίζονται στον βρόχο -D περιοχή η οποία εμπλέκεται και στην αντιγραφή του DNA.

Το μιτοχondριακό DNA εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα τόσο από εξελικτική όσο και από τεχνική άποψη^[11], τα οποία μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Υπάρχει πολύ υψηλός αριθμός αντιγράφων του mtDNA στα κύτταρα
- Το mt DNA είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένο σε σχέση με το πυρηνικό
- Ο μητρικός τρόπος κληρονομικότητας του mtDNA και το ότι είναι απλοειδές το απαλλάσσει από τυχόν ανασυνδυασμούς που συμβαίνουν στο πυρηνικό DNA και έτσι οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι καθαρά αποτέλεσμα μεταλλάξεων.
- Είναι απλοειδές, οπότε δεν απαιτείται κλωνοποίηση πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας

ε) Ο γρήγορος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA το καθιστά πολύτιμο εργαλείο για εξελικτικές και φυλογενετικές μελέτες. Βέβαια ο ρυθμός εξέλιξης δεν είναι σταθερός για όλες τις ομάδες οργανισμών.

Τα ριβοσωματικά RNA ως εξελικτικά χρονόμετρα ^[32]

Τα ριβοσωματικά RNA έχουν σταθερή λειτουργικότητα, είναι οικουμενικώς κατανεμημένα και έχουν μια μετρίως διατηρημένη αλληλουχία σε ένα ευρύ φάσμα φυλογενετικών αποστάσεων. Σε μεγάλα μόρια όπως το ριβοσωματικό RNA, η ομοιότητα μεταξύ δύο αλληλουχιών αποτελεί πάντοτε ένδειξη *κάποιας* φυλογενετικής σχέσης. Εκείνο που συνιστά ένδειξη για τη σχετική εξελικτική απόσταση είναι ο *βαθμός* της ομοιότητας των αλληλουχιών των ριβοσωματικών RNA μεταξύ δύο οργανισμών. Από συγκριτικές αναλύσεις μπορούν να κατασκευαστούν οι μοριακές γενεαλογίες οι οποίες οδηγούν στα φυλογενετικά δέντρα που δείχνουν τις πιθανότερες εξελικτικές θέσεις των οργανισμών, όταν τοποθετούνται ο ένας σε σχέση με τον άλλο.

Υπάρχουν τρία μόρια ριβοσωματικού RNA, τα οποία στους προκαρυώτες έχουν μέγεθος 5S, 16S και 23S. Τα μεγάλα βακτηριακά rRNA, τα 16S και 23S (με περίπου 1500 και 2900 νουκλεοτίδια, αντιστοίχως), περιέχουν αρκετές περιοχές με συντηρημένες αλληλουχίες σε υψηλό βαθμό, χρήσιμες για την επίτευξη σωστών στοιχίσεων, αλλά χαρακτηρίζονται και από σημαντική μεταβλητότητα σε άλλες περιοχές του μορίου, ώστε να χρησιμεύουν ως εξαιρετικά φυλογενετικά χρονόμετρα. Η βάση δεδομένων των αλληλουχιών rRNA (Ribosomal Database Project – RDP) είναι προσβάσιμη μέσω Διαδικτύου. Οι νεοπροσδιοριζόμενες αλληλουχίες συγκρίνονται με τις υπάρχουσες στο RDP και με αλληλουχίες από άλλες βάσεις, όπως η GenBank (ΗΠΑ) ή αυτή του EMBL (Γερμανία).

Για την ανάλυση του ριβοσωματικού RNA χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν το ριβοσωματικό RNA 16S. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η αλληλουχία του προϊόντος της PCR. Μόλις ολοκληρωθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας, τα δεδομένα είναι έτοιμα για επεξεργασία με τη βοήθεια κατάλληλων λογισμικών (υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί αλγόριθμοι ανάλυσης αλληλουχιών και δημιουργίας φυλογενετικών δέντρων διαθέσιμοι για τη συγκριτική εξέταση του ριβοσωματικού RNA). Ωστόσο, ανεξαρτήτως από το ποιο πρόγραμμα χρησιμοποιείται, οι αλληλουχίες πριν από την επεξεργασία πρέπει να «στοιχηθούν».

Οι στοιχισμένες αλληλουχίες εισάγονται κατόπιν στο κατάλληλο λογισμικό και γίνονται οι συγκριτικές αναλύσεις.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ^[32]

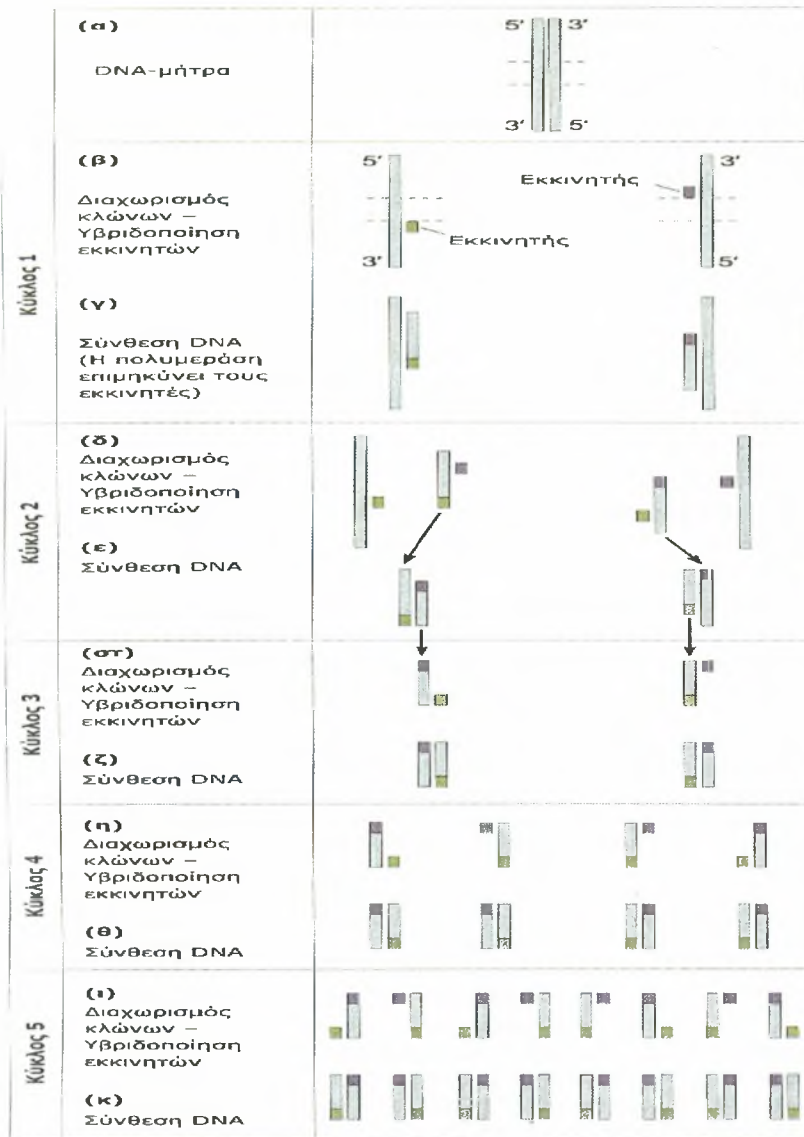
Η τεχνική PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis (Νόμπελ Χημείας το 1993), Fallona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοτεχνολογία με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών ^[16]. Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου, το σχετικά χαμηλό κόστος, η ταχύτητα και η ευκολία. Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση και ο πολλαπλασιασμός 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 αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος.

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της PCR είναι η αδυναμία να πολλαπλασιαστούν μεγάλα τμήματα DNA καθώς και τα συχνά λάθη που κάνει η Taq πολυμεράση, τα οποία δεν επιδιορθώνονται γιατί το ένζυμο δεν έχει δράση 3’-5’ εξωνουκλεάσης. Παρά την ευρεία χρήση της όμως, για να κατασκευαστούν ειδικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές οι οποίοι να επιτρέπουν τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων DNA αλληλουχιών, απαιτείται η εκ των προτέρων γνώση της αλληλουχίας. Ωστόσο, μέσω διαφόρων προσεγγίσεων έχει σταδιακά μειωθεί αυτή η ανάγκη, καθώς άγνωστες μέχρι τώρα αλληλουχίες μπορούν να κλωνοποιηθούν με τη χρήση εκφυλισμένων εκκινητών αρκεί να είναι μέλη μιας οικογένειας γονιδίων, κάποια από τα οποία έχουν ήδη χαρακτηριστεί και αλληλουχηθεί. Επιπλέον θα πρέπει να αναφερθεί ότι το ποσό του προϊόντος της PCR που προκύπτει από μια αντίδραση είναι πολύ περιορισμένο σε σχέση με αυτό που προκύπτει από άλλες τεχνικές κλωνοποίησης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το αρχικό DNA μπορεί να μην είναι διαθέσιμο εξ αιτίας θραύσης ή αποτυχίας του

να αποδεσμευθεί από άλλα μακρομόρια ή στην ποσότητα του ενζύμου που μπορεί να είναι περιορισμένη, με αποτέλεσμα σταδιακά η δράση του να μειώνεται ^[8]. Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται 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-υβριδισμός**). Με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού (primer) και η αλυσίδα επεκτείνεται (**3ο στάδιο-επιμήκυνση**). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί προς αυτούς των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου, ολοκληρώνοντας τον 1^ο κύκλο της αντίδρασης PCR. Οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA στόχου, 2ⁿ όπου n ο αριθμός των κύκλων. Οι νέοι κλώνοι περιβάλλονται από τους primers, των οποίων τα 5' άκρα είναι και τα άκρα του προϊόντος της PCR. Το μέγεθός τους σε ζεύγη βάσεων (bp) είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου.

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 ≈ 8.2 για τη δράση του ενζύμου.



Εικόνα 3: Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR. [28]

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 λεπτό για αύξομείωση θερμοκρασίας 40° C. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση μη ειδικών προϊόντων του γονιδιακού πολλαπλασιασμού, ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στην μη ανίχνευση του DNA στόχου.

Παράγοντες που επιδρούν στην αντίδραση PCR ^[32]

Δείγμα DNA

Στην αντίδραση PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA που προέρχεται από πολύ διαφορετικούς τύπους δειγμάτων, όπως ζωικοί και φυτικοί ιστοί, κυτταρικές καλλιέργειες, βακτήρια, εγκληματολογικό και αρχαιολογικό υλικό. Το ανθρώπινο DNA απομονώνεται κυρίως από εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος, ούρα, κυτταρικά επιχρίσματα, τρίχες, σπέρμα εγκεφαλονωτιαίο υγρό, υλικά βιοψίας, αμνιακό υγρό κ.α. Κάθε επιτυχημένη αντίδραση PCR ξεκινά με την προετοιμασία του νουκλεϊκού οξέως (DNA, RNA, mRNA), που περιέχει την αλληλουχία-στόχο που θέλουμε να ενισχύσουμε. Στα περισσότερα εργαστηριακά πειράματα είναι επαρκές λιγότερο από ένα μικρογραμμάριο ολικού γενωμικού DNA. Η μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα της PCR απαιτούν διαδικασίες απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων οι οποίες πρέπει να:

- αποφεύγουν την μόλυνση με ξένο DNA/RNA
- απομονώνουν ανέπαφο το DNA ή RNA

DNA πολυμεράση

Το βακτήριο *Thermus aquaticus*, ένα θερμοφίλο βακτήριο, απομονώθηκε και πρωτοπεριγράφηκε στις αρχές του 1980. Σήμερα η DNA πολυμεράση του (Taq πολυμεράση) είναι το πιο δημοφιλές ένζυμο για χρήση στην PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική δράση της Taq πολυμεράσης είναι οι 72°C, αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους 94°C. Η Taq πολυμεράση προστίθεται μόνο μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή για 40-45 κύκλους, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση των θερμικών κυκλοποιητών (thermal cyclers).

Η χρήση της Taq DNA πολυμεράσης εκτός από τη δυνατότητα αυτοματοποίησης βελτίωσε επίσης την εξειδίκευση και ευαισθησία της αντίδρασης PCR. Εάν οι εκκινητές υβριδοποιηθούν λανθασμένα τότε μπορεί να ενισχυθεί με την PCR και μία ανεπιθύμητη περιοχή DNA. Αντίθετα στις υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται με την Taq DNA πολυμεράση τα φαινόμενα αυτά

ελαχιστοποιούνται. Μερικές φορές η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει αλλά και να διορθώσει ένα λάθος νουκλεοτίδιο στην αυξανόμενη αλυσίδα του DNA. Η συχνότητα λάθους της Taq DNA πολυμεράσης είναι περίπου 1 στα 10^9 νουκλεοτίδια in vivo και 1 στα 2×10^4 νουκλεοτίδια in vitro.

Το ένζυμο Taq Polymerase είναι διαθέσιμο από πολλές εμπορικές εταιρείες. Άλλα ένζυμα που χρησιμοποιούνται γι' αυτό το σκοπό είναι η Tth DNA πολυμεράση, η Pfu DNA πολυμεράση, η AmpliTaq, AmpliTaq gold, Vent, Platinum, κ.α.

Σχεδιασμός και επιλογή του Εκκινητή (Primer Selection)

Ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. 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. Υπάρχουν ειδικά λογισμικά προγράμματα που βοηθούν αρκετά στην επιλογή. Είναι φανερό ότι οι εκκινητές είναι αυτοί που θα οδηγήσουν στην επιτυχία ή αποτυχία της αντίδρασης.

- Επιλέγονται εκκινητές που αποτελούνται από βάσεις που έχουν περιεκτικότητα σε βάσεις γουανίνης (G) κυτοσίνης (C) παρόμοια του τμήματος που θα αυξηθεί.
- Αποφεύγονται εκκινητές που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.
- Αποφεύγονται αλληλουχίες με σημαντική δευτεροταγή δομή.
- Έλεγχος των εκκινητών ως προς τη μεταξύ τους συμπληρωματικότητα.
- Αποφυγή ζευγών εκκινητών που έχουν αλληλεπικάλυψη στο 3' άκρο, η οποία μπορεί να προκαλέσει το φαινόμενο εμφάνισης “**διμερών εκκινητών**” (**primer dimer**). Οι περισσότεροι εκκινητές είναι συνήθως μήκους 18-22 βάσεων και μπορούν να συντεθούν με αυτόματα μηχανήματα (DNA synthesizers).

Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+}

Η Taq DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ιόντα Mg^{2+} ως μεταλλικό συμπάροντα. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Σε κάθε πρωτόκολλο πρέπει να γίνεται βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Mg^{2+} .

Γενικά, περίσσεια Mg^{2+} θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ έλλειψη Mg^{2+} θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος.

Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)

Τα ολιγονουκλεοτίδια, dNTPs (δηλ. dATP, dCTP, dGTP και dTTP) αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην αντίδραση PCR. Η παρασκευή τους γίνεται σε αυτόματες συσκευές, τους DNA συνθέτες. Τα dNTPs δεσμεύουν τα ιόντα Mg^{2+} και συνεπώς το ποσό των dNTPs προσδιορίζει και το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου Mg^{2+} . Έτσι αν η συγκέντρωση των dNTPs αλλάξει σημαντικά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και μια αλλαγή στη συγκέντρωση του ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου Mg^{2+} δηλ. η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Mg^{2+} θα πρέπει να γίνεται παράλληλα με την συγκέντρωση των dNTPs.

Αριθμός κύκλων

Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων σε μία PCR πρέπει να προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την επιθυμητή παραγωγή προϊόντος αλλά και την αποφυγή σχηματισμού μη ειδικού προϊόντος. Συνήθως ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 30-40, αλλά αυτό μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την εφαρμογή. Μετά από κάποιους κύκλους, η εκθετική ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του DNA-στόχου σταδιακά σταματά και μετά διέρχεται σε μια στατική φάση. Αυτή η 2η φάση λέγεται πλατώ αύξησης.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο τον αποτελεσματικό μοριακό έλεγχο της σύστασης των κρεάτων που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές του εμπορίου. Στόχος μας ήταν η εφαρμογή μιας μεθόδου αξιόπιστης και κατάλληλης για την ταυτοποίηση των ζωοτροφών, ώστε να επαληθευτεί εάν το περιεχόμενο πραγματικά αντιστοιχεί σε ότι αναγράφεται στην συσκευασία τους.

Η ανίχνευση έγινε με την εφαρμογή της τεχνικής PCR-SSCP, και οι μοριακοί δείκτες που εξετάσαμε ήταν αρχικά γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, 12S rRNA, 16S rRNA και Cyt b. Τελικά εστιάσαμε στο 16S rRNA για το οποίο τα αποτελέσματα ήταν πιο ικανοποιητικά. Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, όπου έγινε και η ταυτοποίηση των ειδών με πρότυπα δείγματα ιστών ζώων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Εξοπλισμός για την απομόνωση του από ιστό κρέατος ζωοτροφών

Υλικά εργαστηρίου

- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας των 10,20,100 και 1000μl με τα αντίστοιχα ακρορύγχια (tips).
- Φιαλίδια erpendorf
- Στατώ

Αντιδραστήρια

- TNES-Urea Buffer
- Πρωτεϊνάση K (Proteinase K)
- Φαινόλη (Phenol)
- Χλωροφόρμιο (Chloroform)
- Ισοαμυλική Αλκοόλη (Isoamyl alcohol)
- NaOAc (Sodium Acetate Buffer Solution)
- Απόλυτη αιθανόλη (EtOH) 100%
- Αιθανόλη (EtOH) 70%
- Διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Συσκευές

- Κυκλικός αναδευτήρας
- Κλίβανος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Καταψύκτης
- Απαγωγός εστία εργασίας

Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζη

Υλικά εργαστηρίου

- Κωνική φιάλη των 100ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml
- Πιπέτα ακριβείας των 10μl

Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη
- TAE 1X
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer)

Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής της πηκτής
- Ζυγαριά ακριβείας
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και συσκευή τροφοδοσίας

Εξοπλισμός για την φωτομέτρηση

Υλικά εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας των 2 και 100 ml με τα αντίστοιχα tips
- Φιαλίδια erpendorf
- Στατώ
- Πλαστικές κυβέττες φωτομέτρησης

Αντιδραστήρια

- ddH₂O

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS

Εξοπλισμός για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων με PCR

Υλικά εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας των 2, 10, 20 και 100 ml με τα αντίστοιχα tips
- Φιαλίδια erpendorf
- Στατώ

Αντιδραστήρια

- Απεσταγμένο ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Bioline, Kapa)
- Χλωριούχο Μαγνήσιο MgCl₂ (Bioline, Kapa)
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM
- Εκκινητές (primers)
- Taq Polymerase 5U/μl (Bioline, Kapa)

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Θερμικοί κυκλοποιητές

Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου SSCP

Υλικά εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας 10 και 100 ml με τα αντίστοιχα tips
- Φιαλίδια erpendorf
- Στατώ
- Ποτήρι ζέσεως των 200ml
- Μαγνήτης ανάδευσης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ογκομετρική φιάλη
- Χωνί μετάγγισης
- Διηθητικό χαρτί

Αντιδραστήρια

- Απεσταγμένο ddH₂O

- SSCP buffer
- Acrylamide
- Bis-Acrylamide
- Glycerol 50%
- TBE 10X
- TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99%
- APS 20% w/v

Συσκευές

- Ζυγαριά ακριβείας
- Μαγνητική συσκευή ανάδευσης
- Συσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό

Εξοπλισμός για την χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Υλικά εργαστηρίου

- Πιπέτα ακριβείας 1 ml με τα αντίστοιχα tips
- Μεταλλικά δοχεία χρώσης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 1000 ml
- Ποτήρι ζέσεως των 500 ml
- Μαγνήτης ανάδευσης
- Ζελατίνη διάφανη

Αντιδραστήρια

- Απεσταγμένο ddH₂O
- EtOH 100 %
- Acetic Acid (οξικό οξύ)
- AgNO₃ (νιτρικός άργυρος)
- Υδροξείδιο του Νατρίου, NaOH (sodium Hydroxide)
- Βοροϋδρίδιο του νατρίου, NaBH₄
- Φορμαλδεΰδη, Formaldehyde(HCHO)

Συσκευές

- Ζυγαριά ακριβείας
- Μαγνητική συσκευή ανάδευσης
- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης με ανακινούμενη πλάκα
- Συσκευή παρατήρησης των πηκτών πολυακρυλαμίδης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγματα

Για την συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 62 δείγματα ζωοτροφών σε στερεή μορφή από κονσέρβες εμπορίου των τοπικών καταστημάτων και σε αποξηραμένη μορφή. Χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα ιστού κάθε δείγματος και η συντήρησή τους έγινε στους -20°C . Τα δείγματα προήλθαν από ζωοτροφές οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Σκοπός της ανάλυσής τους ήταν ο εντοπισμός πιθανών προσμίξεων των κρεάτων των ζωοτροφών με άλλα που δεν αναγράφονταν στην συσκευασία των προϊόντων.

Μέθοδος

Η μέθοδος που εξετάσαμε ήταν η PCR-SSCP και η εμφάνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, ώστε να εξασφαλίσουμε τον ευδιάκριτο διαχωρισμό πολύ μικρών τμημάτων DNA.

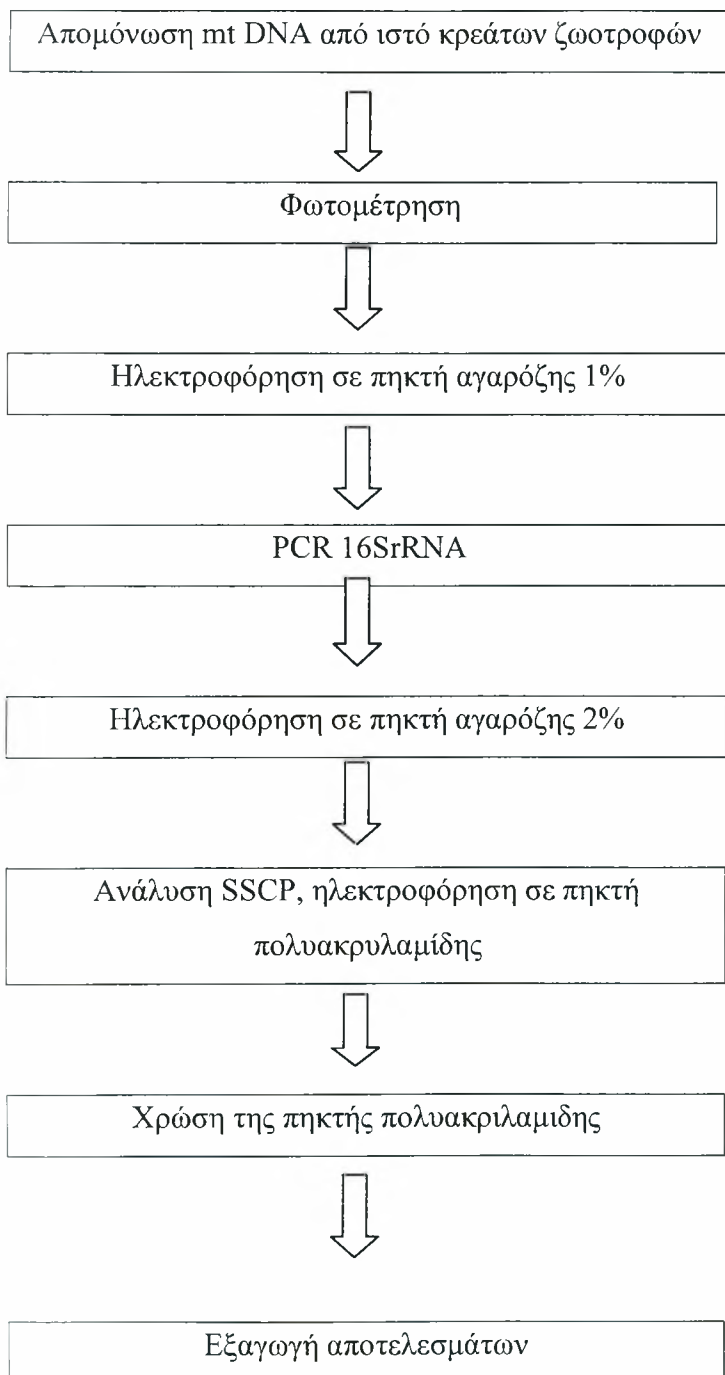
Αρχικά δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης μιτοχονδριακού DNA από ιστό. Ένα πρωτόκολλο που βασίζεται στην Πρωτεΐνάση K, μια μέθοδο με τη χρήση kit και η επιλογή, δηλαδή η μέθοδος απομόνωσης DNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο TNES- Urea Buffer^[1]. Πειραματιστήκαμε αρχικά πάνω σε 3 μιτοχονδριακά γονίδια, τα :Cyt b, 12S rRNA και 16S rRNA τμήματα των οποίων πολλαπλασιάσαμε με την τεχνική της PCR. Μετά από αρκετές επαναλήψεις διαπιστώσαμε ότι καλύτερα αποτελέσματα λαμβάναμε κατά την χρήση του γονιδίου 16S rRNA το οποίο και τελικά χρησιμοποιήσαμε για όλα τα δείγματα μας.

Πειραματιστήκαμε με πάρα πολλές εφαρμογές PCR, αλλάζοντας κάθε φορά τις ποσότητες των χρησιμοποιηθέντων ουσιών και τις ποσότητες του DNA, κάνοντας διάφορους συνδυασμούς.

Χρησιμοποιήσαμε universal primers: 16S RNA BM Rv και 16SRNA BM Fw (και όχι species specific primers) διότι η επιδίωξή μας είναι η απλοποίηση της διαδικασίας διαχωρισμού.

Παρουσιάζεται και διαγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήσαμε:

Διάγραμμα 1 Απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήσαμε στην μελέτη μας



Απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA από ιστό κρεάτων ζωοτροφών

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνται 100 mg ιστού σε σωληνάκια erpendorf και ακολουθούνται οι παρακάτω διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf και προσθέτουμε 700μl TNES-Urea Buffer.
2. Προσθέτουμε 5 μl Proteinase-K (10mg/ml).
3. Επιάζουμε τα δείγματα για 1h σε κλίβανο θερμοκρασίας 50°C και τοποθετημένα σε συσκευή συνεχούς ανάδευσης.
4. Προσθέτουμε 350μl φαινόλη και 350μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).
5. Αναδεύουμε για 10min στον αναδευτήρα τα δείγματα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 10 min στους 4°C.
7. Μεταφέρουμε προσεκτικά την πάνω υδατική φάση (υπερκείμενο) σε νέο σωληνάκι erpendorf.
8. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία απόσπασης (στάδια 4-7).
9. Προσθέτουμε 700μl διαλύματος Chloroform:Isoamyl Alcohol (24:1).
10. Αναδεύουμε για 10min στον αναδευτήρα τα δείγματα.
11. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 10 min στους 4°C.
12. Μεταφέρουμε προσεκτικά την πάνω υδατική φάση σε νέο σωληνάκι erpendorf
13. Προσθέτουμε 50μl 3M NaOAc pH 5.3.
14. Προσθέτουμε 1000μl παγωμένη EtOH 100% και τοποθετούμε τα δείγματα στην κατάψυξη για 20 min.
15. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 10 min στους 4°C.
16. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο προσέχοντας ώστε να μην μετακινηθεί το ίζημα.
17. Προσθέτουμε 1000μl παγωμένη EtOH 70%.
18. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 10 min στους 4°C.
19. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο προσέχοντας ώστε να μην μετακινηθεί το ίζημα.
20. Στεγνώνουμε τα δείγματα με επώαση στους 37°C για περίπου 1h.
21. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl ddH₂O.
22. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή στους - 20°C για μελλοντική χρήση.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται επιτελούν το κάθε ένα και τον ρόλο του. Το NaCl που περιέχεται στο TNES-Urea Buffer, ρυθμίζει την οσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Ο ρόλος του χηλικού παράγοντα EDTA είναι η δέσμευση των ιόντων Ca^{++} και Mg^{++} τα οποία συμβάλλουν στη δράση των νουκλεασών. Το SDS το οποίο είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό, συμβάλει στη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. 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 στο υπερκείμενο. 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 υδατινή φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA στην αιθανόλη οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στον συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη.

Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός απομονωμένου DNA

Φωτομέτρηση

Πρόκειται για μια διαδικασία μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου UV-Vis. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl δείγματος απομονωμένου DNA σε 49μl ddH₂O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA στο δείγμα και ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την τιμή της απορρόφησης στα 280nm αποτελεί δείκτη καθαρότητας του απομονωμένου DNA που αναμένεται να έχει τιμές μεταξύ 1,80-2,00. Σε περίπτωση η τιμή είναι μικρότερη, τότε το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεΐνες ή φαινόλες και η μέτρηση δεν λαμβάνεται ως ακριβής.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Πρόκειται για διαδικασία ποιοτικού προσδιορισμού και διαχωρισμού τμημάτων DNA, συνήθως μεγαλύτερα των 150bp (ζεύγη βάσεων). Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη 2,5 έως 4% (W/V) είναι επαρκής, αλλά για τμήματα μεταξύ 50-150bp, απαιτείται συνήθως ειδική αγαρόζη (metaphor). Έτσι μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για την ποιότητα αλλά και για την ποσότητα του DNA η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται. Παράλληλα πληροφορούμαστε – χρησιμοποιώντας control – και την καθαρότητα του σε περίπτωση που υπάρχει επιμόλυνση (ανεπιθύμητα τμήματα που ενισχυθήκανε).

Βασίζεται στο γεγονός ότι μόρια νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο τους, το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες (τα μικρά τμήματα γενικά κινούνται γρηγορότερα) μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατό να διαχωριστούν. Όντας αρνητικά φορτισμένα και υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής προς τον θετικό πόλο.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε είναι η εξής :

1. Ζυγίζουμε TAE 1X 30ml (προσφέρει καλύτερη ανάλυση ρυθμίζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα) σε κωνική και προσθέτουμε 0,6 gr αγαρόζης. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε πηκτή αγαρόζης 2%.

2. Βράζουμε 3 φορές στο μικροκυμάτων και ανακινούμε καλά μέχρι να διαυγάσει το διάλυμα.

3. Αφήνουμε να κρυώσει το διάλυμα και προσεκτικά, προσθέτουμε 3ml βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο φθορίζει στο υπεριώδες φως και έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσε BrEt.

4. Προετοιμάζουμε το εκμαγείο στο οποίο θα σχηματιστεί η πηκτή και τοποθετούμε τα «χτενάκια» που θα σχηματίσει τις θέσεις όπου θα εισαχθεί το δείγμα και αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής.

5. Αφού πήξει η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου αφαιρούμε τα «χτενάκια» και τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, την οποία και γεμίζουμε με ρυθμιστικό TAE 1X ώστε να καλυφθεί η πηκτή.

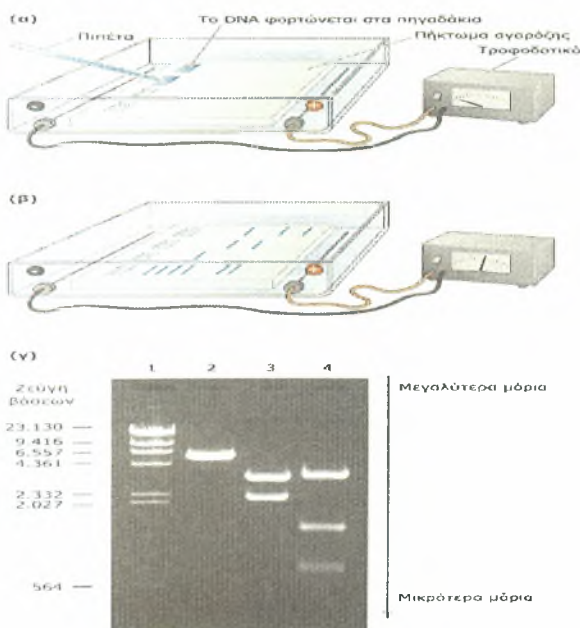
6. Προετοιμάζουμε τα δείγματα για την ηλεκτροφόρηση:

- Για έλεγχο της απομόνωσης DNA προσθέτουμε 3μl loading buffer και 3μl DNA.

- Για έλεγχο της PCR προσθέτουμε 3ml loading buffer και 5ml PCR προϊόν.
- Το διάλυμα πλήρωσης 10 ml (loading buffer), περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης 1ml, που αποτελεί δείκτη παρακολούθησης της ηλεκτροφόρησης, γλυκερόλη 5ml, για την καθίζηση των δειγμάτων στα πηγάδια και EDTA 0,5 ml, για την δέσμευση των κατιόντων και την παύση οποιασδήποτε ενζυμικής δραστηριότητας και διπλά απεσταγμένο νερό έως τελικό όγκο 10ml.

7. Τοποθετούμε τα δείγματά μας στις αντίστοιχες θέσεις με μικροπιπέττα και εφαρμόζουμε σταθερή τάση.

8. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, εκθέτουμε το πήκτωμα σε συσκευή υπεριώδους φωτός όπου τα τμήματα του εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια γνωστού μεγέθους



Εικόνα 4: Συσκευή ηλεκτροφόρησης και τυχαία απεικόνιση αποτελεσμάτων σε πήκτωμα.

Ενίσχυση τμημάτων μιτοχονδριακού (mt)DNA από το γονίδιο 16S rRNA με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA, ενισχύσαμε τμήματά του, μεγέθους 234bp για το πρόβειο κρέας (*Ovis aries*), 249bp για την γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*), 251bp για το κοτόπουλο (*Gallus gallus*), 243bp για το κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*), 234bp για το βοδινό (*Bos taurus*), 235bp για το κατσικίσιο (*Capra hircus*), και 239bp, για την πάπια (anas) 251bp για το χοιρινό κρέας (*Sus scrofa*) με τη βοήθεια της τεχνικής PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε είναι universal primers (Πίνακας 2) οι οποίοι μπορούν να δώσουν PCR προϊόντα για πολλά και διαφορετικά είδη. Αυτές οι αλληλουχίες βρίσκονται καταχωρημένες σε βάσεις δεδομένων όπως η Genebank ^{[35],[39]}.

Πίνακας 2: Αλληλουχία εκκινητών για το 16S rRNA

Εκκινητές για το 16S rRNA	Αλληλουχία
BM.16sRNA.Fw	5'- AYA AGA CGA GAA GAC CC-3' (Y = C or T)
BM.16sRNA.Rv	5'- GAT TGC GCT GTT ATC CC-3'

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η ακόλουθη :

1 Τοποθετούμε σε φιαλίδια eppendorf συνήθως 1μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης). Η ποσότητα DNA κυμάνθηκε από 0.5-4 μl ανάλογα με το δείγμα μας και μετά από αρκετούς συνδυασμούς, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη αποδοτικότητα αποτελεσμάτων.

2. Παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα (master mix) ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, η σύσταση του οποίου περιέχει τις ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων:

50μl/eppendorf

ddH ₂ O	39,μl
Buffer 10X Bioline	5μl
MgCl ₂ (50mM) Bioline	2,μl
dNTP (10mM) each	1μl
primer BM FW	1μl
primer BM RV	1μl

Taq polymerase 5U/□l Bioline	0,2 μl
DNA purified	1μl

3. Μοιράζουμε ισόποσα σε κάθε φιαλίδιο που περιέχει δείγμα από 49μl του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.

4. Πραγματοποιούμε μια σύντομη φυγοκέντρηση (spin) των δειγμάτων μας.

5. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή για PCR τον οποίον έχουμε προγραμματίσει ως εξής:

Πίνακας 3 : Το πρόγραμμα θερμοκρασίας/ χρόνου της κάθε PCR αντίδρασης

Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95° C	4 min	
Αποδιάταξη	95° C	40 sec	Κύκλοι 35
Συγκόλληση primer	53° C	50 sec	
Επέκταση	72° C	50 sec	
Τελική επέκταση	72° C	10 min	

6. Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2% (όπως προαναφέρθηκε) για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας.

7. Παρατηρούμε την πηκτή στη συσκευή υπεριώδους φωτός και εξάγουμε αποτελέσματα.

Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

1. Προετοιμασία δειγμάτων και αποδιάταξη PCR προϊόντων

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA, ώστε να μετατραπούν τα δίκλινα τμήματα του DNA σε μονόκλινα, χρησιμοποιήθηκε denaturation (SSCP) buffer, η σύσταση του οποίου είναι:

95% Formamide

0,05% Bromophenol blue

0.05% Xylene Cyanol

10mM NAOH

Σε 5-8 μl PCR (ανάλογα με την συγκέντρωση των δειγμάτων) προστίθενται 10 μl SSCP buffer. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 95°C για 2 min , στους 97°C για 2 min και στους 99°C για 7 min. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλωνη κατάσταση.

2. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 10% (για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων για το δεύτερο εξόνιο του UAA)

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου διαφέρει από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης στο ότι εδώ μιλάμε για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Πλεονεκτεί στο ότι η πηκτή πολυακρυλαμίδης έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα και τα αποτελέσματα διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα. Επίσης, τα δείγματά μας στα πηκτώματα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

2 gel=100 ml

Πίνακας 4 : Συστατικά και ποσότητες παρασκευής 2 πηκτωμάτων ακρυλαμίδης

Acrylamide	10 gr
Bis-Acrylamide	0,25 gr
Glycerol 50%	10 ml
TBE 10X	7,5 ml
dd H₂O	up to 50 ml
TEMED	100 ml
APS	600 ml

- Προετοιμάζουμε τη συσκευή παρασκευής της πηκτής.

- Σε ποτηράκι ζέσεως αναδεύουμε καλά με μαγνητάκι τα υλικά εκτός από TEMED, APS.
- Φιλτράρουμε με διηθητικό χαρτί και σε έναν ογκομετρητή το περιεχόμενο του ποτηριού (ροή σταγόνας), τέλος συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 ml με ddH₂O και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
- Προσθέτουμε και τα υπόλοιπα ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης (TEMED, καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS και APS που ξεκινάει τον πολυμερισμό).
- Περιχύνουμε γρήγορα το διάλυμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούνται τα χτενάκια δημιουργίας πηγαδιών.
- Σταθεροποιείται η πηκτή, αφαιρούμε τα χτενάκια και καθαρίζουμε με βελόνα τα πηγάδια.
- Προσθέτουμε buffer TBE 0.5X στη συσκευή.
- Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγάδια και αρχίζει η ηλεκτροφόρηση στα 240V, σε θερμοκρασία δωματίου, ολονύκτια.

3. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΰδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο. Για τη χρώση *2 gel* χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (800ml)

EtOH 20ml

Acetic Acid (οξικό οξύ) 1ml

ddH₂O 780 ml

Διάλυμα 2 (400ml)

Διάλυμα AgNO₃ (νιτρικός άργυρος) 1gr/lit

Διάλυμα 3 (400ml)

ddH₂O 400ml

NaOH (sodium Hydroxide) 6gr

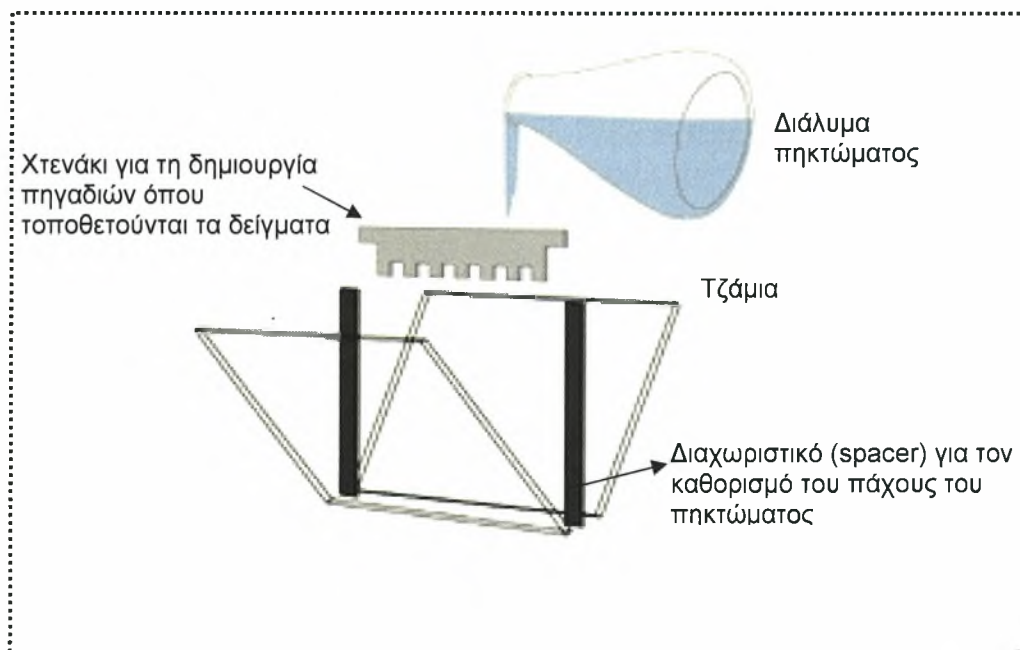
NaBH₄ 0,025 gr

Formaldehyde(HCHO) 2ml

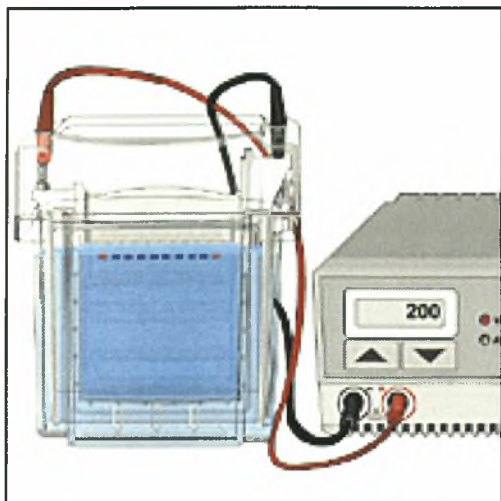
Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται έκαστες σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί 1 πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό (από 200ml) για 1min.

Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και οι πηκτές αναδεύονται για 15min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, (από 200ml) διάρκειας 1min η κάθε μια.

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.



Εικόνα 5: Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.



Εικόνα 6: Συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Σύγκριση δειγμάτων με τα πρότυπα

Μετά την εξαγωγή των αποτελεσμάτων μας εφαρμόσαμε την τεχνική της PCR σε πρότυπα κρεάτων, όπως πάπια, γαλοπούλα, κότα, πρόβατο, κατσίκι, γουρούνι, βοδινό, κουνέλι, που είχαν απομονωθεί επιτυχώς και διατηρούνταν ως πρότυπο αρχείο για να πραγματοποιούνται οι συγκρίσεις. Ακολούθησε η μέθοδος του SSCP όπου συγκρίναμε τις πηκτές πολυακριλαμίδης των προτύπων, με εκείνες των δειγμάτων μας σε διαφορετικά πηκτώματα και εν συνεχεία σε ίδια.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε δείγματα κρέατων από ζωοτροφές του εμπορίου που προμηθευτήκαμε από διάφορα πολυκαταστήματα και είμαι τα ακόλουθα :

Πίνακας 5: Τα 62 δείγματα κρέατων ζωοτροφών που αναλύθηκαν

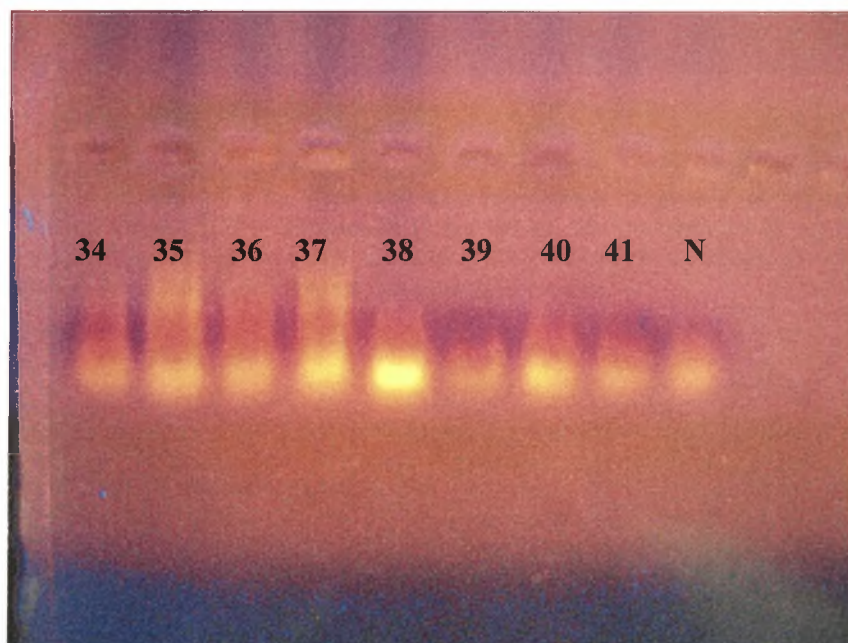
α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ
1	Sheba (μοσχάρι) , κρέας και παράγωγα κρέατος (μοσχάρι min 4%), μεταλλικά άλατα, σάκχαρα
2	Miglior gatto (κοτόπουλο, κουνέλι) , κρέας και υποπροϊόντα αυτού (κοτόπουλο 5%, κουνέλι 5%), άλατα και σάκχαρα
3	Friskies(κοτόπουλο με λαχανικά) , κρέας και ζωικά παράγωγα (κοτόπουλο 4%), λαχανικά, αυγό, ανόργανα άλατα, θειικός χαλκός
4	Miglior gatto (salmone) , κρέας και υποπροϊόντα αυτού, ψάρι και υποπροϊόντα αυτού, (σολομός 5%), άλατα και σάκχαρα
5	Sheba (στήθος κοτόπουλου) , κρέας κοτόπουλου (min 45% εκ των οποίων στήθος κοτόπουλου min 26%), άμυλο ταπιόκας
6	Miglior gatto (βοδινό/καρδιά) , κρέας και υποπροϊόντα αυτού (βοδινό 5%, καρδιά 5%), άλατα και σάκχαρα
7	Gourmet gold (βοδινό και κοτόπουλο) , κρέας και ζωικά παράγωγα (βοδινό 4%, κοτόπουλο 4%), εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, ψάρια
8	Gourmet gold (απαλή μους με μοσχάρι) , κρέας και ζωικά παράγωγα (4% μοσχάρι). Ανόργανα άλατα, παράγωγα φυτικής προέλευσης
9	Gourmet Perle (φιλετάκια από κουνέλι) , κρέας και ζωικά παράγωγα, (4% κουνέλι), εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, ψάρι, ανόργανα άλατα, σάκχ.
10	Gourmet Perle (γλώσσα και γαρίδες) , κρέας και ζωικά παράγωγα, εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, ψάρι, (γλώσσα 4%), μαλακόστρακα (γαρίδες 4%) ανόργανα άλατα
11	Whiskas με κοτόπουλο σε ζελέ , κρέας και ζωικά παράγωγα (κοτόπουλο min 4%), ολόκληρα κομμάτια από κρέας min 14%, μεταλλικά άλατα
12	Sheba essence, μοσχάρι σε σάλτσα , κρέας και ζωικά παράγωγα (μοσχάρι min 4%),δημητριακά, έλαια και λίπη, μεταλλικά άλατα
13	Gourmet delizie με κυνήγι και λαχανικά , κρέας και ζωικά παράγωγα (κυνήγι min 4%), λαχανικά (4% ντομάτα, 4%κολοκυθάκια)
14	Whiskas πατέ γαλοπούλας και κοτόπουλο , κρέας και ζωικά παράγωγα (γαλοπούλα min 4%,κοτόπουλο 4%),δημητριακά, εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, μεταλλικά άλατα
15	Gourmet delizie με αρνάκι , κρέας και ζωικά παράγωγα min 4%, ανόργανα άλατα
16	Gourmet gold με κουνέλι και κυνήγι , κρέας και ζωικά παράγωγα (κουνέλι min 4%, κυνήγι min 4%), ανόργανα άλατα

17	Gourmet (πατέ με κουνέλι) , κρέας και ζωικά παράγωγα (4% κουνέλι), δημητριακά, ανόργανα άλατα, σάκχαρα, χρωστικές
18	Romeo, μοσχάρι, γαλοπούλα και λαχανικά , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4%μοσχάρι, min 4% γαλοπούλα), λαχανικά, ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
19	Romeo, πουλερικά και βοδινό , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4% πουλερικά, min 4% βοδινό), λαχανικά, ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
20	Shah με πουλερικά και κυνήγι , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4% πουλερικά, min 4% κυνήγι), ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
21	Shah με αρνάκι και γαλοπούλα , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4% αρνί, min 4% γαλοπούλα), ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
22	Shah με βοδινό και συκώτι , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4% βοδινό, min 4%συκώτι), ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
23	Shah με γαλοπούλα ραγού και σως , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4% γαλοπούλα), ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
24	Shah με μοσχάρι και κοτόπουλο , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4% μοσχάρι και min 4% κοτόπουλο), ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
25	Shah με κουνέλι και πάπια , κρέας και ζωικά παράγωγα (min 4% κουνέλι και min 4% πάπια), ανόργανες ουσίες, έλαια, λίπη, ζάχαρη
26	Friskies (κοτόπουλο με λαχανικά) , κρέας και ζωικά παράγωγα (εκ των οποίων κοτόπουλο 4%), λαχανικά, αυγό και παράγωγα αυτού, ανόργανα άλατα, θειικός χαλκός
27	Miglior gatto (salmone) , σολομός και υποπροϊόντα αυτού, ψάρι και υποπροϊόντα αυτού, (σολομός 5%), άλατα και σάκχαρα
28	Sheba (στήθος κοτόπουλου) , κρέας κοτόπουλου (min 45% εκ των οποίων στήθος κοτόπουλου min 26%), άμυλο ταπήκας
29	Miglior gatto (βοδινό/καρδιά) , κρέας και υποπροϊόντα αυτού (βοδινό 5%, καρδιά 5%), άλατα και σάκχαρα
30	Gourmet gold (βοδινό και κοτόπουλο) , κρέας και ζωικά παράγωγα (βοδινό 4%, κοτόπουλο 4%), εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, ψάρια και παράγωγα ψαριού
31	Gourmet gold (απαλή μους με μοσχάρι) , κρέας και ζωικά παράγωγα εκ των οποίων 4% μοσχάρι. Ανόργανα άλατα, παράγωγα φυτικής προέλευσης
32	Gourmet Perle (φιλετάκια από κουνέλι) , κρέας και ζωικά παράγωγα, (εκ των οποίων 4% κουνέλι) ,εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, ψάρι και παράγωγα ψαριού, ανόργανα άλατα,σάκχαρα
33	Gourmet Perle (γλώσσα και γαρίδες) , κρέας και ζωικά παράγωγα, εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, ψάρι και παράγωγα ψαριού, (γλώσσα 4%), μαλακόστρακα (γαρίδες 4%) ανόργανα άλατα
34	Whiskas, στον ατμό κοτόπουλο σε ζελέ , κρέας και ζωικά παράγωγα (κοτόπουλο min 4%), εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, μεταλλικά άλατα
35	Whiskas στον ατμό, μοσχάρι σε ζελέ , κρέας και ζωικά παράγωγα (μοσχάρι min 4%), ντομάτα, εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, μεταλλικά άλατα
36	Kitekat με κοτόπουλο, συκώτι και αρακά σε σάλτσα , κρέας και ζωικά παράγωγα (κοτόπουλο min 4%, συκώτι min4%), αρακάς, δημητριακά

37	Kitekat με μοσχάρι, βοδινό και καρότα σε σάλτσα , κρέας και ζωικά παράγωγα (μοσχάρι min 4%, βοδινό min 4%), καρότα, δημητριακά, εκχυλίσματα φυτικών πρωτεϊνών, μεταλλικά άλατα
38	Carrefour πατέ με βοδινό και καρότα , κρέας και ζωικά υποπροϊόντα, (βοδινό min 4%, καρότα min 4%), μεταλλικά στοιχεία, σάκχαρα
39	Carrefour μπουκιές με μοσχάρι , κρέας και ζωικά υποπροϊόντα, (μοσχάρι min 5%), δημητριακά, ψάρι, μεταλλικά στοιχεία, σάκχαρα, ανόργανα άλατα
40	Carrefour πατέ με κοτόπουλο , κρέας και ζωικά υποπροϊόντα, (κοτόπουλο min 4%), δημητριακά, ψάρι, μεταλλικά στοιχεία, σάκχαρα, ανόργανα άλατα
41	Carrefour μπουκιές με βοδινό (σκυλοτροφή) , κρέας και ζωικά υποπροϊόντα, (βοδινό min 4%), δημητριακά, ψάρι, μεταλλικά στοιχεία, σάκχαρα, ανόργανα άλατα
42	Carrefour μπουκιές με κοτόπουλο και γαλοπούλα (σκυλοτροφή) , κρέας και ζωικά υποπροϊόντα, (κοτόπουλο min 4%, γαλοπούλα min 4%), δημητριακά, ψάρι, μεταλλικά στοιχεία, σάκχαρα, ανόργανα άλατα
43	Orlando classic με πουλερικά , κρέας και παράγωγα ζώων (πουλερικά 4%), ψάρια
44	Orlando classic με αρνί , κρέας και παράγωγα ζώων (αρνί 4%), ψάρια
45	Orlando classic με κυνήγι , κρέας και παράγωγα ζώων (κυνήγι 4%), ψάρια
46	Optidog pate με βοδινό και κυνήγι , κρέας και παράγωγα ζώων (κυνήγι 4%, βοδινό 4%), ψάρια
47	Optidog pate με κρέας πουλερικών και συκώτι , κρέας και παράγωγα ζώων (πουλερικά 4%, συκώτι 4%), ψάρια
48	Optidog pate με μοσχάρι και γαλοπούλα , κρέας και παράγωγα ζώων (μοσχάρι 4%, γαλοπούλα 4%), ψάρια
49	Bellosan με πουλερικά (κόκκινη κροκέτα) , κρέας και παράγωγα ζώων (πουλερικά 4%)
50	Bellosan με βοδινό (καφέ κροκέτα) , κρέας και παράγωγα ζώων (βοδινό 4%)
51	Orlando chunks με αρνί , κρέας και παράγωγα ζώων (αρνί 4%)
52	Optidog high premium με πουλερικά και μοσχάρι , κρέας και παράγωγα ζώων (πουλερικά 4%, μοσχάρι 4%), ιχθυάλευρα
53	Gheda magnimi SRL κροκέτες με κρέας
54	Monocroc με κρέατα
55	Gerodog premium croquettes chunks με βοδινό , κρέας και παράγωγα ζώων (βοδινό 4%)
56	Opticat, ραγκού με κυνήγι , κρέας και παράγωγα ζώων (4% κυνήγι), ψάρι και παράγωγα, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα
57	Opticat, πατέ με κρέας πουλερικών , κρέας και παράγωγα ζώων (4% κρέας πουλερικών), ψάρι και παράγωγα, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα
58	Optidog πατέ με κρέας βοδινού , κρέας και παράγωγα ζώων (4% βοδινό), ψάρι και παράγωγα, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα

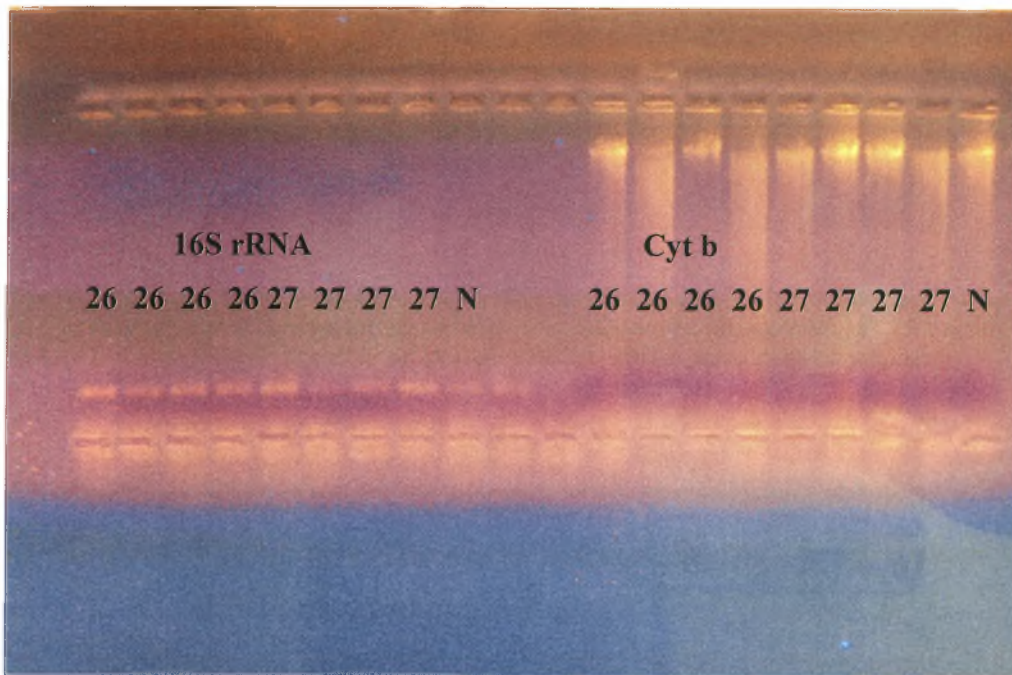
59	Optidog ραγκού με μοσχάρι, γαλοπούλα και λαχανικά , κρέας και παράγωγα ζώων (4% μοσχάρι, 4% γαλοπούλα), ψάρι και παράγωγα, λαχανικά, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα
60	Coshida, κομματάκια σε σάλτσα με βοδινό και καρδιά , κρέας και παράγωγα ζώων (4% βοδινό, 4% καρδιά από χοίρο), ψάρι και παράγωγα, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα
61	Coshida, κομματάκια σε σάλτσα με πουλερικά , κρέας και παράγωγα ζώων (4% πουλερικά), ψάρι και παράγωγα, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα
62	Coshida, κομματάκια σε σάλτσα με κουνέλι και γαλοπούλα , κρέας και παράγωγα ζώων (4% κουνέλι, 4% γαλοπούλα), ψάρι και παράγωγα, ανόργανα συστατικά, σάκχαρα

Απομονώσαμε γενετικό υλικό με την προαναφερθείσα διαδικασία, και έγινε ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων με την τεχνική της φωτομέτρησης και της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Με την φωτομέτρηση διαπιστώσαμε ότι πήραμε μεγάλες ποσότητες DNA που κυμάνθηκαν από 1000 έως 2000 ng/ml. Το DNA ήταν αρκετά καθαρό, δηλαδή απαλλαγμένο από πρωτεΐνες, ώστε να λάβουμε ικανοποιητικά προϊόντα PCR. Με την ηλεκτροφόρηση διαπιστώσαμε ότι δεν υπήρξε επιμόλυνση των δειγμάτων μας και συνεχίσαμε την πειραματική μας πορεία. Στην Εικόνα 8 παρατηρούμε το μιτοχονδριακό DNA που προέκυψε μετά την απομόνωση. Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA. Το control δείχνει ότι δεν υπήρξε κάποια επιμόλυνση.



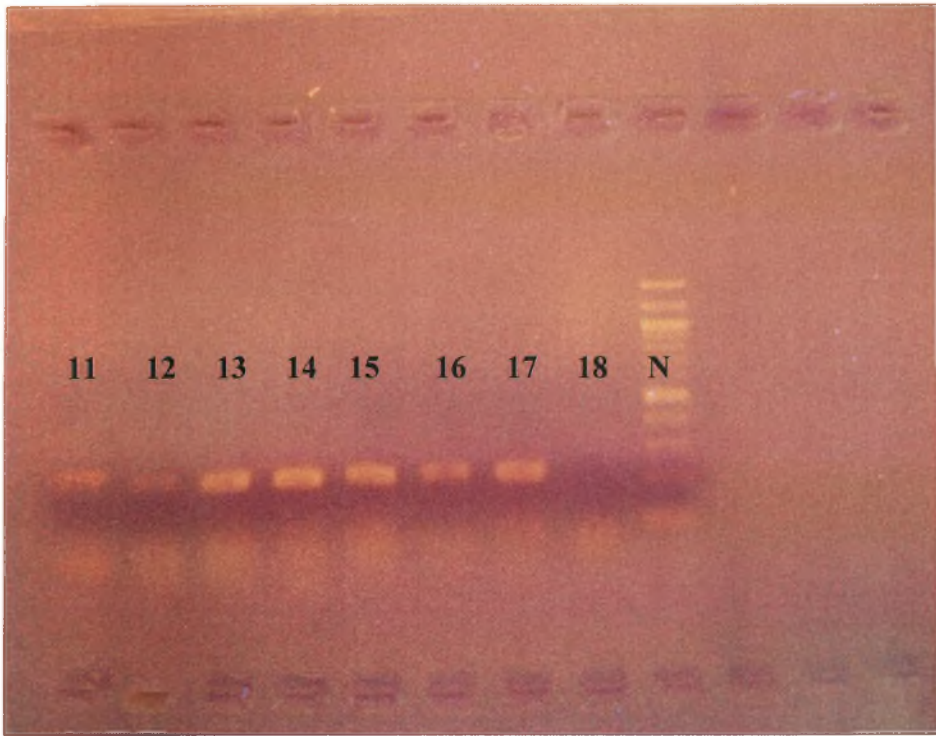
Εικόνα 7: Ενδεικτική απεικόνιση της απομόνωσης δειγμάτων μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% : 34 : κοτόπουλο, 35 : μοσχάρι, 36 : κοτόπουλο και συκώτι, 37 : βοδινό, 38 : βοδινό, 39 : μοσχάρι, 40 : κοτόπουλο, 41 : βοδινό, N : control, αρνητικός μάρτυρας.

Στη συνέχεια πολλαπλασιάσαμε τμήματα του γονιδίου 16S rRNA, 12S rRNA και Cyt b. Από τα 2 τελευταία γονίδια δεν πήραμε ικανοποιητικά αποτελέσματα ζωνώσεων, γι' αυτό και εστίασαμε στο 16S rRNA. Ακόμη παρατηρήσαμε ότι η ιδανική ποσότητα DNA ήταν 1μl. Έτσι ενισχύσαμε όλα τα δείγματά μας επιτυχώς. Τα μόνα δείγματα που δεν καταφέραμε να ενισχύσουμε, ήταν το 4, 9, 10, 20, 22, 27, 32, 33 και 50 για λόγους που θα αναφέρουμε παρακάτω. Η επόμενη εικόνα είναι ενδεικτική της εμφάνισης των προϊόντων DNA σε πηκτή αγαρόζης 2 %.



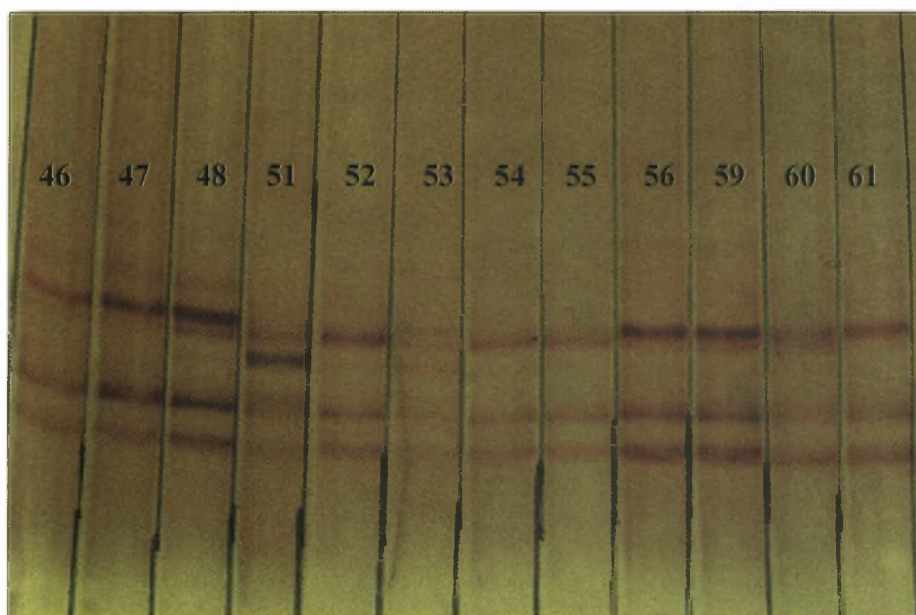
Εικόνα 8: Ενδεικτική συγκριτική απεικόνιση των PCR προϊόντων των γονιδίων 16S rRNA, και Cyt b σε τιμές DNA από 0,5-4 ng μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% : 26 : κοτόπουλο (0,5 ng DNA), 26 : κοτόπουλο (1 ng DNA), 26 : κοτόπουλο (2 ng DNA), 26 : κοτόπουλο (4 ng DNA), 29 : βοδινό (0,5 ng DNA), 29 : βοδινό (1 ng DNA), 29 : βοδινό (2 ng DNA), 29 : βοδινό (4 ng DNA), N : control, αρνητικός μάρτυρας.

Συγκεκριμένα παρακάτω στην Εικόνα 9 εμφανίζονται ενδεικτικά προϊόντα PCR του γονιδίου 16S rRNA σε πηκτή αγαρόζης 2%.



Εικόνα 9: Ενδεικτική απεικόνιση, PCR προϊόντων μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. : 11 : κοτόπουλο, 12 : μοσχάρι, 13 : κνήγι, 14 : γαλοπούλα και κοτόπουλο , 15 : αρνάκι, 16 : κουνέλι, 17 : κουνέλι, 18 : μοσχάρι και γαλοπούλα, N : control, αρνητικός μάρτυρας.

Στη συνέχεια ακολούθησε η τεχνική SSCP σε όλα τα δείγματα κρεάτων και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, όπως φαίνεται και παρακάτω. Αρκετά δείγματα εμφανίσανε κάποιες κοινές ζώνες, δηλαδή περιείχανε και κάποια κοινά αλληλόμορφα. Βέβαια ο ακριβής προσδιορισμός του αριθμού των αλληλομόρφων δεν είναι δυνατός μέσω αυτής της μεθόδου. Απλά αποτελεί ένδειξη της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων. Εάν επιθυμούσαμε μπορούσαμε με την τεχνική της αλληλούχισης του DNA να ερευνούσαμε την ποικιλομορφία. Παρατηρήσαμε σε όλα σχεδόν τα δείγματα ότι ο αριθμός των αλληλομόρφων φαίνεται να κυμαίνεται σε 3-4.

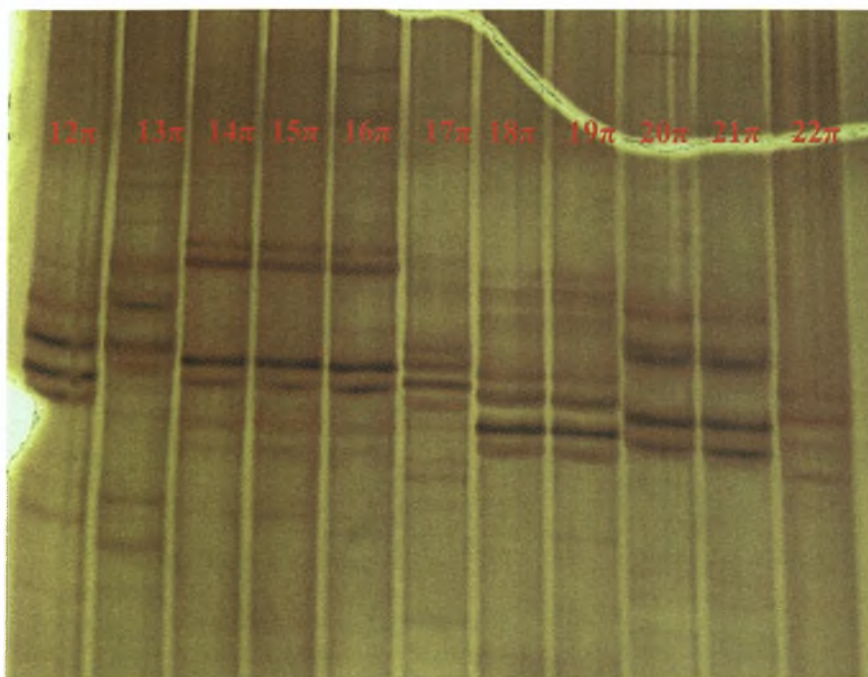


Εικόνα 10: Ενδεικτικά αποτελέσματα που προκύπτουν από SSCP ανάλυση ορισμένων δειγμάτων μας : 46: βοδινό με κνήγι, 47: κρέας πουλερικών, 48: μοσχάρι και γαλοπούλα, 51: αρνί, 52: πουλερικά και μοσχάρι, 53: κρέας, 54: κρέας, 55: βοδινό, 56: κνήγι, 59: μοσχάρι και γαλοπούλα, 60: βοδινό, 61: πουλερικά.

Ακολούθησε αντίστοιχα, η τεχνική SSCP στα πρότυπα κρεάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τον έλεγχο των τυποποιημένων προϊόντων και είναι τα εξής: πρόβειο κρέας (*Ovis aries*), γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*), κοτόπουλο (*Gallus gallus*), κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*), βοδινό (*Bos taurus*), κατσικίσιο (*Capra hircus*), πάπια (anas), χοιρινό κρέας (*Sus scrofa*) και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης που θα μας βοηθήσει να κάνουμε την σύγκριση ζωνώσεων.

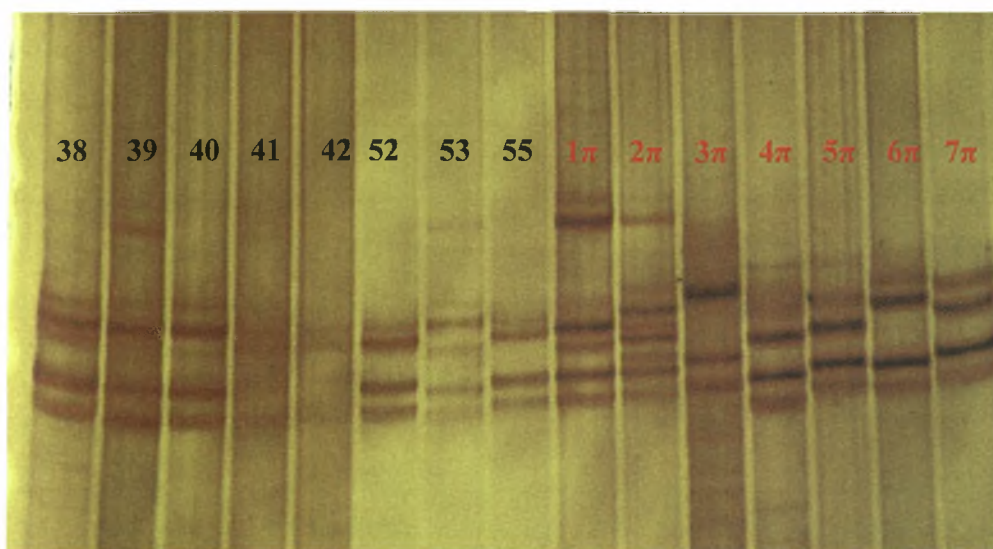


Εικόνα 11: Αποτελέσματα που προκύπτουν από SSCP ανάλυση ορισμένων ταυτοποιημένων κρεάτων (πρωτύπων) 1: πρόβατο θηλυκό, 2: πρόβατο Άρτας, 3: κατσίκι Βόλου, 4: κατσίκι Άρτας 5: κατσίκι, 6: γουρούνι, 7: γουρούνι, 8: γουρούνι, 9: μοσχάρι Άρτας 10: μοσχάρι, 11: μοσχάρι.

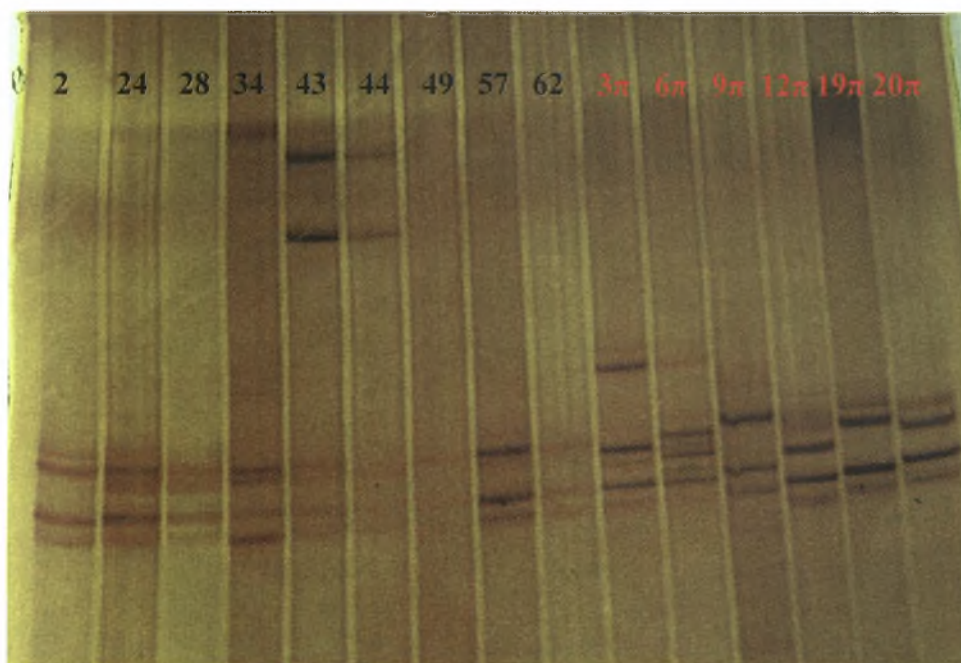


Εικόνα 12: Αποτελέσματα που προκύπτουν από SSCP ανάλυση ορισμένων ταυτοποιημένων κρεάτων (πρωτύπων) 12: πάπια νωπή, 13: χήνα νωπή, 14: γαλοπούλα λέσχης, 15: φιλέτο γαλοπούλας τηγανητό, 16: φιλέτο γαλοπούλας νωπό, 17: κότα χωριάτικη νωπή, 18: κότσυφας νωπός, 19: κότσυφας νωπός, 20: κουνέλι θηλυκό, 21: κουνέλι θηλυκό, 22: πρόβατο Βόλου.

Στη συνέχεια σε ίδιες πηκτές προσθέσαμε δείγματα και πρότυπα που παρουσίαζαν παρόμοιες ζώνες ώστε η σύγκριση να είναι πιο αποτελεσματική. Τα πρότυπα δεν αποτελούνται από τον ίδιο αριθμό αλληλομόρφων, ώστε να γίνονται οι συγκρίσεις τους με τα δείγμα (Εικόνα 13,14). Παρακάτω στον Πίνακα 6 μπορούμε να παρατηρήσουμε τα προϊόντα μας και τα διάφορα πρότυπα κρεάτων που εμπεριέχονται. Ελάχιστα είναι εκείνα που το περιεχόμενό τους πράγματι αντιστοιχεί σε αυτό που αναγράφεται στην ετικέτα.



Εικόνα 13: Ενδεικτικά αποτελέσματα που προκύπτουν από SSCP ανάλυση ορισμένων δειγμάτων μας 38: βοδινό, 39: μοσχάρι, 40: κοτόπουλο, 41: βοδινό, 42: κοτόπουλο-γαλοπούλα, 52: πουλερικά μοσχάρι, 53: κρέας 55: βοδινό ,1π: πρότυπο γαλοπούλας, 2π: πρότυπο κότας, 3π: πρότυπο κουνελιού, 4π: πρότυπο προβάτου, 5π: πρότυπο κατσικιού, 6π: πρότυπο χοιρινού, 7π: πρότυπο μοσχαριού.



Εικόνα 14: Ενδεικτικά αποτελέσματα που προκύπτουν από SSCP ανάλυση ορισμένων δειγμάτων μας 2: κοτόπουλο-κουνέλι, 24: μοσχάρι-κοτόπουλο , 28: κοτόπουλο, 34: κοτόπουλο, 43: πουλερικά, 44: αρνί, 49: πουλερικά, 57: πουλερικά , 62: κουνέλι-γαλοπούλα, 3π: πρότυπο γαλοπούλας, 6π: πρότυπο κότας, 9π: πρότυπο κουνελιού, 12π: πρότυπο προβάτου, 19π: πρότυπο χοιρινό, 20π: πρότυπο μοσχαρίσιο.

Πίνακας 6: Πραγματικό περιεχόμενο των δειγμάτων ζωοτροφής μετά από την σύγκριση τους με PCR-SSCP με τα πρότυπα κρεάτων. Με έντονη γραφή παρουσιάζονται τα κρέατα που δεν έχουνε νοθευτεί και δεν περιέχουνε προσμίξεις άλλων ειδών

a/a	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Αποτελέσματα σύγκρισης
1	Sheba (μοσχάρακι)	κότα και χοιρινό
2	Miglior gatto (κοτόπουλο, κουνέλι)	χοιρινό
3	Friskies(κοτόπουλο με λαχανικά)	ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ
4	Miglior gatto (salmone)	-
5	Sheba (στήθος κοτόπουλου)	χοιρινό και κότα
6	Miglior gatto (βοδινό/καρδιά)	χοιρινό και βοδινό
7	Gourmet gold (βοδινό και κοτόπουλο)	χοιρινό και βοδινό
8	Gourmet gold (απαλή μους με μοσχάρι)	χοιρινό και βοδινό
9	Gourmet Perle (φιλετάκια από κουνέλι)	-
10	Gourmet Perle (γλώσσα και γαρίδες)	-
11	Whiskas με κοτόπουλο	ΚΟΤΑ
12	Sheba essence, μοσχάρακι	ΜΟΣΧΑΡΙ
13	Gourmet delizie με κυνήγι	κότα και χοιρινό
14	Whiskas πατέ γαλοπούλας και κοτόπουλο	κότα και χοιρινό
15	Gourmet delizie με αρνάκι	χοιρινό
16	Gourmet gold με κουνέλι και κυνήγι	κουνέλι, γαλοπούλα και κότα
17	Gourmet (πατέ με κουνέλι)	χοιρινό και βοδινό
18	Romeo, μοσχάρι, γαλοπούλα	χοιρινό και βοδινό
19	Romeo, πουλερικά και βοδινό	χοιρινό και κότα
20	Shah με πουλερικά και κυνήγι	-
21	Shah με αρνάκι και γαλοπούλα	χοιρινό

22	Shah με βοδινό και συκώτι	ΒΟΔΙΝΟ
23	Shah με γαλοπούλα ραγού	χοιρινό
24	Shah με μοσχάρι και κοτόπουλο	χοιρινό
25	Shah με κουνέλι και πάπια	χοιρινό και κότα
26	Friskies (κοτόπουλο με λαχανικά)	ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ
27	Miglior gatto (salmone)	-
28	Sheba (στήθος κοτόπουλου)	χοιρινό και κότα
29	Miglior gatto (βοδινό/καρδιά)	χοιρινό και βοδινό
30	Gourmet gold (βοδινό και κοτόπουλο)	χοιρινό και βοδινό
31	Gourmet gold (απαλή μους με μοσχάρι)	χοιρινό και βοδινό
32	Gourmet Perle (φιλετάκια από κουνέλι)	-
33	Gourmet Perle (γλώσσα και γαρίδες)	-
34	Whiskas, στον ατμό κοτόπουλο	ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ
35	Whiskas στον ατμό, μοσχάρι	χοιρινό
36	Kitekat με κοτόπουλο	χοιρινό
37	Kitekat με μοσχάρι, βοδινό	χοιρινό και βοδινό
38	Carrefour πατέ με βοδινό	χοιρινό και βοδινό
39	Carrefour μπουκιές με μοσχάρι	χοιρινό
40	Carrefour πατέ με κοτόπουλο	χοιρινό
41	Carrefour μπουκιές με βοδινό	ΒΟΔΙΝΟ
42	Carrefour μπουκιές με κοτόπουλο και γαλοπούλα	βοδινό
43	Orlando classic με πουλερικά	κότα και χοιρινό
44	Orlando classic με αρνί,	ΑΡΝΙ
45	Orlando classic με κυνήγι	χοιρινό και κότα
46	Optidog pate με βοδινό και κυνήγι	ΧΟΙΡΙΝΟ ΚΑΙ ΒΟΔΙΝΟ

47	Optidog pate με κρέας πουλερικών και συκώτι	χοιρινό και βοδινό
48	Optidog pate με μοσχάρι και γαλοπούλα	χοιρινό και βοδινό
49	Bellosan με πουλερικά (κόκκινη κροκέτα)	ΚΟΤΑ
50	Bellosan με βοδινό (καφέ κροκέτα)	ΒΟΔΙΝΟ
51	Orlando chunks με αρνί	ΑΡΝΙ
52	Optidog high premium με πουλερικά και μοσχάρι	βοδινό
53	Gheda magnimi SRL κροκέτες με κρέας	ΧΟΙΡΙΝΟ ΚΑΙ ΠΡΟΒΕΙΟ
54	Monocroc με κρέατα	ΒΟΔΙΝΟ
55	Gerodog premium croquettes chunks με βοδινό	ΒΟΔΙΝΟ
56	Opticat, ραγκού με κυνήγι	βοδινό
57	Opticat, πατέ με κρέας πουλερικών	χοιρινό και κότα
58	Optidog πατέ με κρέας βοδινού	χοιρινό και κότα
59	Optidog ραγκού με μοσχάρι, γαλοπούλα	βοδινό
60	Coshida, κομματάκια σε σάλτσα με βοδινό	ΒΟΔΙΝΟ
61	Coshida, κομματάκια σε σάλτσα με πουλερικά	χοιρινό και βοδινό
62	Coshida, κομματάκια σε σάλτσα με κουνέλι και γαλοπούλα	χοιρινό

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με την μοριακή ανίχνευση 62 ζωοτροφών οικιακών ζώων που κυκλοφορούνε στο εμπόριο κονσερβοποιημένες. Ο στόχος ήταν η ανίχνευση του DNA τους αλλά και η ταυτοποίησή του κρέατος που περιλαμβάνουμε με ότι αναγράφεται στη συσκευασία. Η διαδικασία στηρίχτηκε στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και στον πολυμορφισμό μονόκλωνης διαμόρφωσης. Ο δείκτης που είναι πιο κατάλληλος είναι τμήμα του γονιδίου 16S rRNA παρά του 12S rRNA και του Cyt b, επειδή έδωσε αποτελέσματα σε μεγάλο εύρος δειγμάτων. Τα άλλα δύο τμήματα DNA δεν δώσανε αποτελέσματα ταυτοποίησης σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων κατά την ανίχνευση προϊόντων PCR μετά την ηλεκτροφόρηση.

Παίρνοντας μια μικρή ποσότητα ιστού με την μέθοδο της απομόνωσης λάβαμε μεγάλη ποσότητα μιτοχονδριακού DNA. Το mtDNA είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών, γι 'αυτό οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινοί για τα παραγωγικά ζώα (universal primers). Με αυτόν τον τρόπο απλοποιείται η διαδικασία, μειώνοντας έτσι τον χρόνο δημιουργίας εκκινητών εξειδικευμένων για κάθε είδος και έχουμε συνεπώς και χαμηλό κόστος.

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση ειδών σε ζωοτροφές έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποίησανε διάφορους μοριακούς δείκτες όπως τα RFLP^{[4],[12]}, real time PCR^[14], RAPD^[22], Species Specific PCR^[13], DNA sequencing^[6]. Συγκριτικά με άλλες τεχνικές ανίχνευσης DNA η PCR-SSCP παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα: 1) είναι δυνατή η ανάλυση μικρών τμημάτων DNA ανάλογα με την θέση των εκκινητών στο μιτοχόνδριο 2) τα μικρά τμήματα είναι κατάλληλα για SSCP διότι μπορούν να χωριστούν με ηλεκτροφόρηση πήκτωμάτων, 3) η τεχνική είναι πολύ ευαίσθητη στην ανίχνευση των αλλαγών των βάσεων, αλλά η ποικιλία της αναγνώρισης των ειδών υποτίθεται ότι είναι λιγότερο προβληματική από ότι με τις άλλες μεθόδους, 4) είναι γρήγορη και εύκολη τεχνική συγκριτικά με τις υπόλοιπες. Μειονεκτεί στο γεγονός ότι πρέπει να «τρέχουνε» στο ίδιο πήκτωμα τα δείγματα με τα πρότυπα και στο ότι μας δίνει σχετικά λίγες πληροφορίες συγκριτικά με την νουκλεοτιδική ακολουθία του αντίστοιχου σκέλους DNA^[10].

Άλλες αναλυτικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ζωοτροφών. Αυτές οι μέθοδοι βασίστηκαν κυρίως στην ανάλυση των πρωτεϊνών. Υπάρχουν όμως κάποιοι περιορισμοί που τις καθιστούν δύσκολες, κυρίως όταν

χρειάζεται να ανιχνευτούν ίχνη κρέατος, καθώς και η μετουσίωση και αποδιάταξη των πρωτεϊνών, εξαιτίας της διαδικασίας της μεταποίησης^[19]. Γι' αυτό εφαρμόζεται η PCR η οποία επιτρέπει την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς να χρειαστεί να καταφύγουμε σε κλωνοποίηση.

Η PCR αποτελεί μία μέθοδο υψηλής εξειδίκευσης και δεν επηρεάζεται από τις θερμοκρασίες της επεξεργασίας των προϊόντων κρέατος. Εξαιτίας του υψηλού αριθμού αντιγράφων του μικρού, κυκλικού μιτοχονδριακού DNA, οι πιθανότητες επιβίωσης των κυττάρων κάτω από διαφορετικές συνθήκες είναι αυξημένες και την καθιστούν ιδανική για την ταυτοποίηση κατεργασμένων ειδών κρέατων χρησιμοποιώντας μιτοχονδριακό DNA^[17]. Τελευταία οι τεχνικές της PCR έχουν βελτιωθεί πολύ και κυρίως όσον αφορά την ανίχνευση ζώων φάρμας, πτηνών, μηρυκαστικών και οικιακών ζώων.

Η απομόνωση του DNA, επετεύχθη για όλα τα είδη κρέατων που περιέχονταν στις ζωοτροφές, με την μέθοδο TNES-Urea buffer, μία μέθοδο σύντομη και εύκολη. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση ειδών κρέατων σε ζωοτροφές έγινε με την τεχνική PCR-SSCP όπου πολλά ξεχωριστά προϊόντα PCR μπορούν να ελεγχθούν για διαφοροποιήσεις ταυτόχρονα^[26].

Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το ότι σε 18 από τα δείγματά μας, το είδος κρέατος που αναγραφόταν στη συσκευασία της ζωοτροφής, δεν είχε απολύτως καμία σχέση με το τι ανιχνεύσαμε. Ζωοτροφές που αναγράφανε κυρίως μοσχάρι, κοτόπουλο και γαλοπούλα αντικατασταθήκανε πλήρως στην πραγματικότητα με άλλα κρέατα, κυρίως χοιρινό. Σε 16 δείγματα πιστοποιήθηκε πράγματι ότι το περιεχόμενο αντιστοιχεί σε ότι αναγράφεται στην ετικέτα της συσκευασίας, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα επιβεβαιώσαμε μεν το είδος του κρέατος που περιέχει, ωστόσο ανιχνεύσαμε και ταυτοποιήσαμε και κάποιες άλλες προσμίξεις κυρίως χοιρινού κρέατος. Τέλος, σε 7 δείγματα παρατηρήθηκε ότι οι ζωνώσεις που εμφανίστηκαν δεν ομοιάζαν με καμία από εκείνες των γνωστών κρέατων που χρησιμοποιήσαμε ως πρότυπα, συνεπώς πρόκειται για άγνωστο είδος κρέατος, που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση με αλληλούχιση και ταυτοποίηση του DNA.

Παρατηρήθηκε νοθεία στις περισσότερες ζωοτροφές, ανεξαρτήτου εταιρίας παραγωγής, κυρίως με την προσθήκη χοιρινού κρέατος. Πιθανώς ένας λόγος νοθείας είναι κυρίως ο οικονομικός ανταγωνισμός μεταξύ των εταιριών, διότι το χοιρινό κρέας είναι από τα πιο φθηνά, υπάρχει και διατίθεται σε μεγάλες ποσότητες και έτσι

εξασφαλίζεται μεγαλύτερο κέρδος. Προσφέρει υψηλό βαθμό κορεσμού και υψηλά ποσά ενέργειας.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη αναπτύξαμε μια αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων ειδών κρεάτων στις ζωοτροφές. Συνεπώς ο έλεγχος της σύστασης των ζωοτροφών καθίσταται εύκολος, γρήγορος και αποτελεσματικός.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. (1996). Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.*, 62(5): 727-730.
2. Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.a. & Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography : the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18:489-522.
3. Bardakci F, Skibinski D O F (1994). Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification *Heredity* 73, 117-123.
4. Bellagamba F., Moretti V., Comincini S., Valfre F., (2001). Identification of Species in Animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3775-3781.
5. Benter T., Papadopoulos S., Pape M. and Poliwoda H., (1995). Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human. *Anal Biochem.* 230(1) : 92-100.
6. Desjardins P., Morais R., (1999). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J.Mol.Biol* 212 :599-634.
7. 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.
8. Erlich H.A., Gelfand D. & Sninsky J.(1991). Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252:1643-1651.

9. Gizzi G., von Holst C., Baeten V., Berben G., van Raamsdonk L.,(2004) Determination of Processed Animal Proteins, Including Meat and Bone Meal, in Animal Feed. *J. AOAC Int.*, 87, 1334-1341.
10. Hartmut R., Kress G. and Schmidt T. (1997) Application of PCR-SSCP to Species Identification of Fishery Products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
11. Hurst Gregory, Jiggins Francis M (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*.
12. Krcmar P., Rencova E., Identification of Species- Specific DNA in Feedstuffs. (2003) *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7655-7658.
13. Lahiff, S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J.,Smith T., Maher M., Shilton N.(2000). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15:27-35.
14. Martin I., Garcia T., Fajardo V., Lopez-Calleja I., Rojas M., Pavon M.A., Hernandez P.E. Gonzalez I., Martin R., (2007). Technical note: Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *American Society of Animal Science*.
15. Martin I., Garcia T., Fajardo V., Lopez-Calleja I., Rojas M., Pavon M.A., Hernandez P.E. Gonzalez I., Martin R., (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs *Meat Science* 82 252–259 *J. Agric. Food Chem.* 2001.
16. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.(1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263-273.

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* 54:3690-376.
18. Pereira S.(2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and molecular Biology* 23:745-752..
19. Prado M., Berben G., Fumire O., Gert van Duijn, Mensinga-Kruize J., Reaney S., Boix A., and Christoph von Holst. (2007). Detection of Ruminant Meat and Bone Meals in Animal Feed by Real-Time Polymerase Chain Reaction: Result of an Interlaboratory Study. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (18), 7495-7501.
20. Richard H., Graeme R. (1995). *The world poultry industry*. IFC.
21. Rehbein H., Kress G., Schmidt T.,(1997). Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of the science of food and agriculture*, 74,35-41.
22. Saez R., Y. Sanz, F. (2004). Toldra PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science* 66 659–665.
23. Sawyer J., Wood C., Shanahan D., Gout S., McDowell D., (2003). Real time PCR for quantative meat species testing. *Science direct, Food Control* 14 579-583.
24. Scheffler I. (2001). Mitochondria make come back. *Advanced Drug Delivery Review* 49:3-26.
25. Spooner D., R. van Treuren and M. C. de Vicente (2005). *Molecular Markers for Genebank Management*. IPGRI technical bulletin No 10.
26. Sweetman, W.A., Rash, R., Sykes, B., Beighton, P., Hecht, J.T. Zabel, B., Thomas, J., T., Boot-Handford, R., Grant, M.E., Wallis, G.A.(1992). SSCP and segregation analysis of the human type X collagen in heritable forms of chondrodysplasia. *American Journal of human Genetics* 51:841-849.

27. Wang R-F, Myers M.J., Campbell W., Cao W., Paine D., Cerniglia C.E. (1999). A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuff. *Molecular and Cellular Probes*.
28. Watson J., Caudi A., Myers R., Witkowski J., τρίτη αγγλική έκδοση- πρώτη ελληνική έκδοση, ανασυνδυασμένο DNA , Ακαδημαϊκές εκδόσεις.
29. Wolstenholme, D.R., J.L. Macfarlane, C.T. Beagley, M.C. Thomson, and C.M.-R. Fauron.(1992). The maize mitochondrial *nad1* gene/*mat-r* gene complex. Proc. HFSP workshop on RNA editing - Plant mitochondria, Bedin.
30. Wolf C., Rentsch J., Hubner P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA. A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* 47:1350-1355.
31. Woolfe M. Primrose S. (2006). Food forensics using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* Vol 22.
32. Μαρκουλάτος Π. (2007), Σημειώσεις του μαθήματος Ποιοτικές και Ποσοτικές Μέθοδοι Ανάλυσης- Βιοδείκτες, του ΜΠΣ. Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
33. Μεταξόπουλος Ιωάννης (1994). Τεχνολογία κρέατος και κρεατοσκευασμάτων. Γ.Π.Α.
34. Χατζόπουλος Π.,(2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
36. <http://www.seviz.gr>
37. www.minagric.gr
38. www.bjo.davidson.edu/.../method.html

