

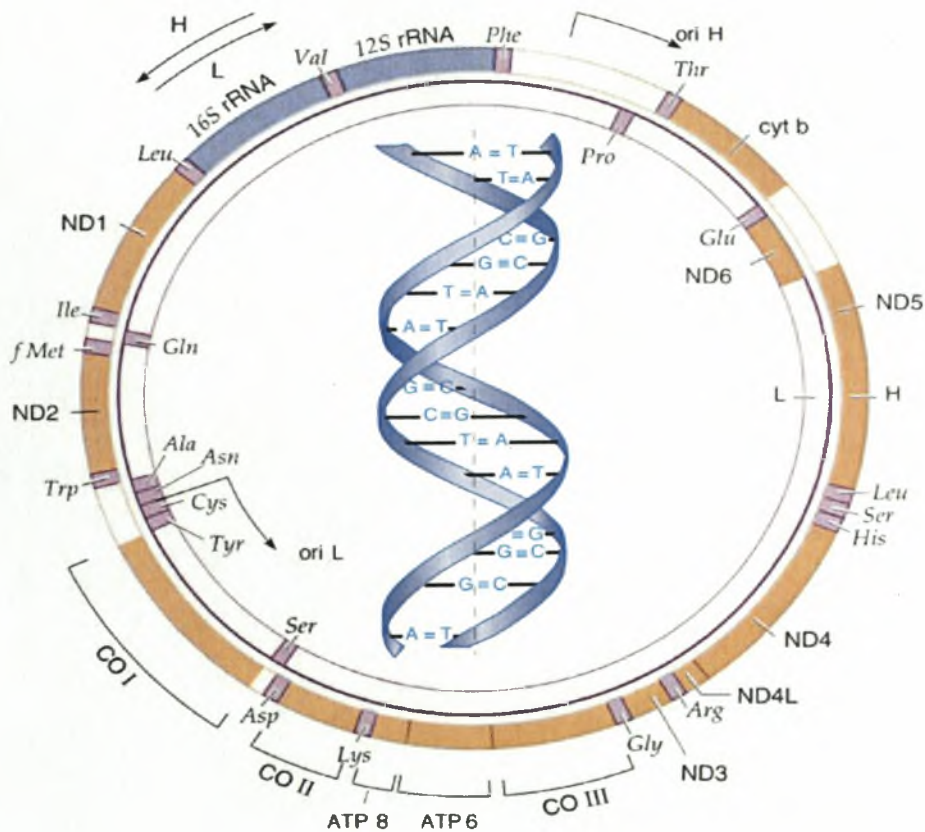
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ταυτοποίηση ειδών σε τυποποιημένα κρέατα με ανάλυση
γενετικών δεικτών

Βασίλης Δ. Γκοτσόπουλος



ΛΑΡΙΣΑ, 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8096/1

Ημερ. Εισ.: 10-03-2010

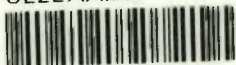
Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

664.9

ΓΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087131

Ταυτοποίηση ειδών σε τυποποιημένα κρέατα με ανάλυση γενετικών δεικτών.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ:	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρόλογος

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε, εάν υπάρχει νόθευση σε 50 διαφορετικά προϊόντα του εμπορίου με τυποποιημένα κρέατα. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16s RNA του μιτοχονδριακού DNA.

Η πτυχιακή διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο είναι το γενικό μέρος στο οποίο περιγράφεται η αναγκαιότητα της αναγνώρισης των προϊόντων του κρέατος με σκοπό να αποφευχθεί η νόθευση και η εξαπάτηση των καταναλωτών. Επίσης στο γενικό μέρος δίδονται οι αρχές της μεθόδου της λειτουργίας της PCR και αναλύεται πιο διεξοδικά η μέθοδος SSCP (πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης). Στη συνέχεια γίνεται μια αναφορά στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για μελέτη με μοριακούς δείκτες. Τέλος δίδονται οι ιδιότητες του μιτοχονδριακού DNA.

Στο δεύτερο και ειδικό μέρος περιγράφονται τα υλικά και ο εξοπλισμός του εργαστηρίου, οι μέθοδοι και οι πειραματικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών καθώς και η συζήτηση των συμπερασμάτων που προέκυψαν.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κύριο Ζήση Μαμούρη Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή, καθώς και για την καθοδήγηση, επίβλεψη και βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο Διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη για τη μετάδοση πολύτιμων επιστημονικών γνώσεων, τις πολύ χρήσιμες συζητήσεις που είχαμε και το ασταμάτητο ενδιαφέρον που έδειξε σε όλα τα στάδια της διατριβής μου. Σημαντική βοήθεια επίσης στην ολοκλήρωση της διατριβής, με την υπόδειξη χρήσιμων βιβλιογραφικών αναφορών, έδειξε και η Λέκτορας Θεολογία Σαραφίδου την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Αικατερίνη Μούτου και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Αιμιλία Ζίφα. Τους ανωτέρω ευχαριστώ για τις υποδείξεις στο κείμενο της διατριβής μου.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στην υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας, όπως και τα μέλη του Εργαστηρίου για τη βοήθεια και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράσταση καθώς και τον αδερφό μου για τη κατανόηση και τη συμπαράστασή του όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) για να εξετάσουμε τα είδη των ζώων που χρησιμοποιούνται στα τυποποιημένα προϊόντα του κρέατος. Σκοπός της εργασίας είναι η επαλήθευση των συστατικών που αναγράφονται στην ετικέτα, ώστε να γνωρίζει ο καταναλωτής εάν στα συγκεκριμένα προϊόντα υπάρχει νόθευση ή όχι. Συνολικά εξετάστηκαν 50 διαφορετικά προϊόντα με τυποποιημένα κρέατα (δείγματα). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16s RNA του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) που απομονώθηκε από το κάθε ένα δείγμα ξεχωριστά.

Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Αρχικά με εκκινητές κοινούς για όλα τα δείγματα (universal primers), ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR τμήμα του γονιδίου 16s RNA μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κατσίκι (*Capra hircus*), 247bp όσον αφορά τη γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*) και 239bp όσον αφορά το γουρούνι (*Sus scrofa*). Ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτικής για απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Η ανάλυση του τμήματος του γονιδίου 16s RNA αποκάλυψε 8 πρότυπα, τα οποία εμφανίζονται στα τυποποιημένα προϊόντα του κρέατος. Από την ανάλυση αυτών των προτύπων (αποτελεσμάτων) συμπεραίνουμε ότι τα 20 από τα 50 προϊόντα παρουσιάζουν κάποιο είδος νόθευσης, είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός. Τέλος τρία δείγματα χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης (η καλύτερη μέθοδος θα ήταν η αλληλουχησή τους) διότι δεν ταίριαζαν με κανένα από τα πρότυπα των γνωστών ειδών που βρέθηκαν και συνεπώς δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για αυτά.

ABSTRACT

In this paper the Single Strand Conformational polymorphism (SSCP) was used to examine the kinds of animals that used in the standard meat products. The purpose of the study is to check the ingredients on the label, so that the consumers know whether the products are adulterated or not. Total examined 50 different standard meat products (samples). The analysis was applied in a fragment of the 16s RNA gene of mitochondrial DNA isolated from each sample separately.

The technique that employed was the PCR-SSCP. Originally strengthened by the method of PCR part of the 16s RNA gene, size 234bp for the sheep (*Ovis aries*), 234bp for the calf (*Bos taurus*), 235bp for the goat (*Capra hircus*), 247bp for the turkey (*Meleagris gallopavo*) and 239bp for the pig (*Sus scrofa*). The primers that used were common to all samples (universal primers). Then we had the denaturation of the products of PCR, the electrophoresis of them in polyacrylamide gel and the staining of the gel in order to display the results.

The analysis of 16s RNA fragment showed 8 patterns, which appear in the standard meat products. From the analysis of the patterns (results), we conclude that 20 out of 50 products have some kind of adulteration, or by adding a different species to the product or by using a single species even though the label referred to several. Finally three samples require further analysis (we suggest the method of sequencing) because they did not fit with any of the patterns of the known species that found, and we cannot draw reliable conclusions about them.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A! ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.....	8
2. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	9
2.1. Γενικά.....	9
2.2. Αρχή της μεθόδου.....	11
2.3. Χαρακτηριστικά της τεχνικής PCR.....	18
2.4. Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR.....	19
3. Μέθοδοι (Γενικά).....	20
3.1. Αλλοένζυμα.....	20
3.2. Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).....	20
3.3. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Random Fragment Length Polymorphism).....	22
3.4. Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	22
3.5. Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSR) και απλές σε σειρά επαναλήψεις (Sort Tandem Repeats, STR).....	25
3.6. Κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως δείκτες (STS, EST, SSCP, SNP, ASOH, DASH).....	26
3.7. Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα μεθόδων.....	27
4. SSCP (Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης DNA).....	28
4.1. Εισαγωγή.....	28
4.2. Αρχή της μεθόδου SSCP.....	28
4.3. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου SSCP.....	29
4.4. Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα μεθόδου SSCP.....	31
5. Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	31

B! ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.....	35
2. Υλικά και εξοπλισμός.....	36
2.1. Εξοπλισμός για Απομόνωση DNA από ιστό κρέατος.....	36
2.2. Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης.....	37
2.3. Εξοπλισμός για το πολλαπλασιασμό των γονιδίων (PCR).....	37
2.4. Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	38
2.5. Εξοπλισμός για την Χρώση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	39
3. Μέθοδοι και πειραματική πορεία.....	39
3.1. Δείγματα – Βιολογικό υλικό.....	39
3.2. Απομόνωση DNA.....	41
3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης.....	43
3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	44
3.5. Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	46
3.5.1. Αποδιάταξη PCR προϊόντων.....	47
3.5.2. Παρασκευή και ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης.....	47
3.5.3. Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.....	49
4. Αποτελέσματα.....	50
5. Συζήτηση.....	55
6. Βιβλιογραφία.....	64
7. Παράρτημα.....	81

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Η αναγνώριση της προέλευσης του κρέατος, αντιπροσωπεύει ένα τεράστιο τομέα του σύγχρονου ελέγχου της ποιότητας των τροφίμων σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση, η οποία έχει θεσπίσει μια σειρά από αυστηρές διαδικασίες όσον αφορά τον τρόπο με το οποίο περιγράφονται τα συστατικά των τροφίμων στις ετικέτες. Έτσι σταδιακά αναπτύσσονται μια σειρά από συγκεκριμένες, ευαίσθητες και εύκολα αναλυτικές μέθοδοι, οι οποίες βοηθούν στην αναγνώριση των ειδών που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα του κρέατος, με σκοπό την επαλήθευση των συστατικών που αναγράφονται στην ετικέτα.

Η προέλευση και η αναγνώριση των ειδών στα επεξεργασμένα προϊόντα του κρέατος είναι απαραίτητη για πολλούς λόγους. Πρωτίστως πρέπει να αναγνωρίζεται η νόθευση του κρέατος, με υποκατάστατα του (πχ. σόγια) ή άλλα είδη κρέατος, ώστε να προστατεύεται ο καταναλωτής από προϊόντα κρέατος με μικρότερη θρεπτική αξία από την πραγματική. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η κατανάλωση κρέατος ενός είδους λιγότερου επιθυμητού για λόγους οικονομικούς, θρησκευτικούς και υγείας (Meyer, Höfelein, Lüthy, & Candrian, 1995). Επίσης, ο έλεγχος αυτός προάγει τον δίκαιο ανταγωνισμό στη βιομηχανία του κρέατος, διότι υπάρχουν είδη τα οποία πετυχαίνουν καλύτερες τιμές πώλησης στα μάρκετ σε σύγκρισή με άλλα. Συνεπώς η νόθευση με παρόμοια, ή άλλα είδη κατώτερης ποιότητας, πιο φθηνά από τα αναγραφόμενα στην ετικέτα, είναι συχνό φαινόμενο. Επιπρόσθετα οι καταναλωτές, στις μέρες μας, ανησυχούν περισσότερο για την προέλευση του κρέατος λόγω της παγκοσμιοποίησης. Είδη από όλες τις περιοχές του κόσμου βρίσκουν καθημερινά τρόπο να φτάνουν στο τραπέζι μας. Έτσι υπάρχει μεγάλη αναστάτωση για την διάδοση ασθενειών όπως είναι η σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες των βοοειδών (ΣΕΒ) κοινώς γνωστή ως ασθένεια των τρελών αγελάδων, η ασθένεια Creutzfeldt-Jakob (CJD) η οποία είναι μια εκφυλιστική νευρολογική διαταραχή του εγκεφάλου, ανίατη και θανατηφόρα, ή ο αφθώδης πυρετός των ζώων Foot-and-Mouth Disease (FMD). Η παγκοσμιοποίηση, δηλαδή το γεγονός ότι η αγορά προϊόντων κρέατος δεν περιορίζεται μόνο στα προϊόντα που παράγονται εντός των συνόρων μιας χώρας, ήταν ο κύριος λόγος μετάδοσης της (ΣΕΒ).

Συνεπώς η αναγκαιότητα της προέλευσης και της αναγνώρισης των ειδών του κρέατος κρίνεται απαραίτητη, περισσότερο από ποτέ, στις μέρες μας.

2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.

2.1 Γενικά.

Η γενετική παραλλακτικότητα είναι ένα τεράστιο θέμα που απασχόλησε και απασχολεί τους επιστήμονες. Η περισσότερη έρευνα που γίνεται σε αυτόν τον τομέα επικεντρώνεται στην εξέταση των εκάστοτε οργανισμών σε μοριακό επίπεδο (DNA), ώστε να γίνει λεπτομερέστερη ανάλυση και σαφώς πιο ακριβής εξαγωγή συμπερασμάτων. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε τέτοιου είδους μελέτες. Συγκεκριμένα, υπάρχει μεγάλο εύρος μεθόδων και προσεγγίσεων για τον καθορισμό και την αποκρυπτογράφηση των αλληλουχιών του DNA. Ο βαθμός επιτυχίας της κάθε μεθόδου βασίζεται στο επίπεδο της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων και σε αυτό ακριβώς βασίζεται η αξιοπιστία της από τον ερευνητή που τη χρησιμοποιεί.

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται βασίζονται στην εύρεση και αναγνώριση **πολυμορφικών τόπων**. Οι πολυμορφικοί τόποι είναι περιοχές ή σημεία στη γενετική δομή που μπορεί να διαφέρουν μεταξύ ατόμων, πληθυσμών, φυλών ή ειδών. Αυτή η παραλλακτικότητα οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις και τροποποιήσεις του DNA. Για την αναγνώριση τέτοιων τόπων χρησιμοποιούνται κυρίως μέθοδοι που περιλαμβάνουν τη χρήση μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες, όπως όλοι οι γενετικοί δείκτες, στην ουσία αποτελούν μέρος της διακριτικής ικανότητας, σε επίπεδο DNA, του γενετικού υλικού δυο ή περισσότερων ατόμων του ίδιου πληθυσμού. Άλλοι γενετικοί δείκτες είναι οι φαινοτυπικοί ή βιοχημικοί. Οι πρώτοι αναφέρονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και μπορούν να εκτιμηθούν οπτικά, αλλά όμως επηρεάζονται από το περιβάλλον. Οι βιοχημικοί δείκτες βασίζονται στους πολυμορφισμούς των ισοενζύμων (Χατζόπουλος 2001).

Οι μοριακοί δείκτες που είναι γενετικά χαρτογραφημένοι είναι χρήσιμοι για τη μελέτη της κληρονομικότητας γενετικών χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών και ως σύγχρονα εργαλεία χρησιμοποιούνται και στο χρωμοσωμικό βάδισμα για απομόνωση γονιδίων. Οι γενετικοί χάρτες είναι μια συλλογή στατιστικών εκτιμήσεων πολλών δεδομένων από την κατανομή των δεικτών σε πολλούς γονιδιακούς τόπους. Οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο και δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον μια και αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA, χωρίς αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν. Επιπλέον, δεν εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του

οργανισμού και δύνανται να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις (Χατζόπουλος 2001).

Αν θεωρηθεί ότι κάθε ένας μοριακός δείκτης αντιπροσωπεύει ένα σημείο από το γενετικό υπόβαθρο κάθε ατόμου, τότε η εκτίμηση όλων των αποτελεσμάτων που προέρχονται από την ανάλυση 2 σημείων, 3 σημείων ή n σημείων διαμορφώνει μια σύνδεση των σημείων. Αλληλόμορφα των μοριακών δεικτών του ίδιου χρωμοσώματος τείνουν να κληρονομούνται μαζί επιτρέποντας την ομαδοποίησή τους σε ομάδες σύνδεσης. Η σειρά των μοριακών δεικτών πάνω στο χρωμόσωμα και η γενετική απόστασή τους, που βασίζεται στο ποσοστό ανασυνδυασμού μεταξύ τους, εξαρτάται από το μέγεθος και τον τύπο του πληθυσμού που χρησιμοποιείται καθώς και από το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού. Η προσθήκη νέων δεικτών μπορεί να αλλάξει κάποιο προϋπάρχοντα γενετικό χάρτη. Οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται επίσης για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης διαφόρων ποικιλιών ή οικοτύπων (Χατζόπουλος 2001).

Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα:

- (1) Παρουσία πολυμορφισμού.
- (2) Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλομόρφους.
- (3) Υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.
- (4) Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- (5) Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου των οργανισμών.
- (6) Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των οργανισμών και συγκεκριμένα όταν αυτοί αναπτυχθούν τόσο, ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA.

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται εξελίσσονται συνεχώς και η χρήση της μιας ή της άλλης εξαρτάται από το ποσοστό επιθυμίας σάρωσης των χρωμοσωμάτων με τους μοριακούς δείκτες, από το χρόνο, από το κόστος, αλλά επίσης και από το βαθμό ετεροζυγωτίας. Παρακάτω

αναφέρονται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες μέχρι σήμερα που δίνουν ένα καλό βαθμό επαναληψιμότητας.

Οι περισσότερες από τις μεθοδολογίες που αναφέρονται παρακάτω βασίζονται εν μέρει στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ώστε να επιτυγχάνεται και να ενισχύεται ο πολυμορφισμός. Για αυτό το λόγο πριν αναλυθεί η κάθε μέθοδος χωριστά, είναι απαραίτητο να εξηγηθεί τι ακριβώς είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

2.2 Αρχή της μεθόδου.

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεση θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA, ιδιαίτερα δε στην αρχή, που ο χρόνος επανασύνδεσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμβαλλομένων συμπληρωματικών αλυσίδων. Με την μέθοδο PCR επιτυγχάνεται ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός *in vitro* τμήματος DNA που ονομάζεται και DNA στόχος, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος εντός ολίγων ωρών. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε κύκλους, όπου ο κάθε κύκλος αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Με τον τρόπο αυτό από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδισμού (Southern and Northern blotting), ο DNA στόχος ενισχύεται με την PCR σε σημείο που γίνεται ευρέως ανιχνεύσιμος (Williams *et al.*, 1991).

Συνεπώς η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση (δημιουργία πολλών αντιγράφων) ενός τμήματος DNA. Η PCR επιτρέπει σε μια μικρή ποσότητα DNA να αντιγραφεί πολλές φορές ώστε να είναι αρκετή και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση. Η τεχνική αυτή είναι πολύ διαδεδομένη στις βιολογικές επιστήμες και χρησιμοποιείται σε πολλές και διαφορετικές περιπτώσεις όπως: ανίχνευση κληρονομήσιμων ασθενειών, διάγνωση μολυσματικών ασθενειών, κλωνοποίηση γονιδίων, test πατρότητας κ.α. (Sambrook & Russell 2001, McPherson & Moller 2000, Higuchi *et al.* 1992, Higuchi *et al.* 1993, Wong 2005)

Η PCR ανακαλύφθηκε το Δεκέμβριο του 1983 από τον Δρ. Kary Mullis (Mullis 1983). Για αυτό το επίτευγμα βραβεύθηκε το 1993, μόλις 7 χρόνια αφού δημοσίευσε τις ιδέες του, με το βραβείο Nobel Χημείας. Αυτό το οποίο σκέφτηκε να κάνει ο Mullis ήταν να δημιουργήσει μια τεχνική με την οποία το DNA θα μπορούσε να πολλαπλασιάζεται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων διπλασιασμού, στους οποίους

κύριο ρόλο θα είχε ένα ένζυμο και συγκεκριμένα η DNA πολυμεράση (Sambrook & Russell 2001, McPherson & Moller 2000, Higuchi et al. 1992, Higuchi et al. 1993, Wong 2005).

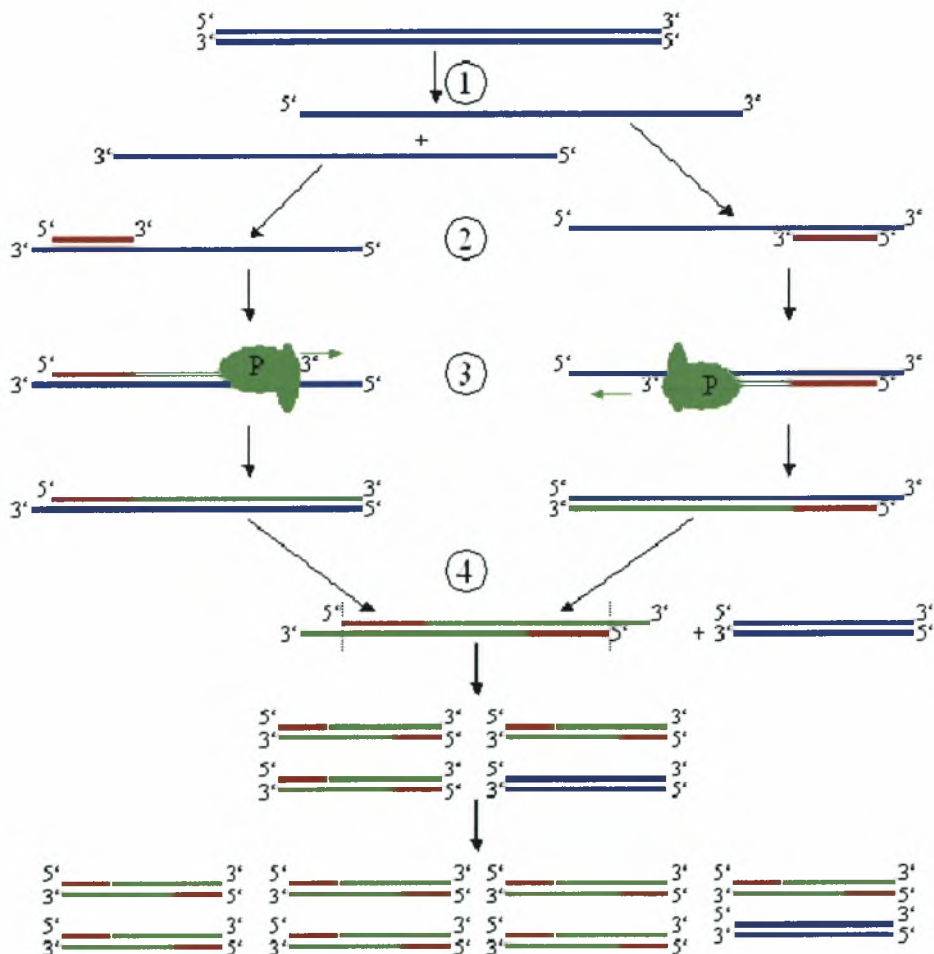
Η αρχή της λειτουργίας της μεθόδου (Mullis *et al.*, 1987) στηρίζεται στη χρήση:

- Ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA Polymerase) που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο, *Thermus aquaticus* (Taq), και είναι θερμοσταθερή, διατηρώντας τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες 95° C για 40 τουλάχιστον λεπτά.
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15-30 βάσεων) τα οποία ονομάζονται εκκινητικά μόρια ή primers. Οι εκκινητές υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA.
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂.
- Κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος απαραίτητου για τη δράση της Taq πολυμεράσης.
- Μικρή ποσότητα DNA, που παίζει το ρόλο μορίου μήτρας.

Η DNA πολυμεράση βρίσκεται στη φύση σε ζωντανούς οργανισμούς και η λειτουργία της είναι ο διπλασιασμός του DNA στη φάση του διαχωρισμού των κυττάρων κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης. Στο εργαστήριο, με την τεχνική PCR το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγραφεί από βραχέα ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές (primers), τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές παρασκευάζονται με χημική σύνθεση και για αυτό η τεχνική PCR χρησιμοποιείται μόνο για την κλωνοποίηση κλασμάτων DNA με γνωστή αλληλουχία των δυο άκρων τους. Υπό την καθοδήγηση των εκκινητών η DNA πολυμεράση παράγει πολλά αντίγραφα της επιλεγμένης αλληλουχίας. Η τεχνική PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη: μπορεί να ανιχνεύσει, έστω και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, επαυξάνοντάς το τόσο πολύ, ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (Alberts *et al.* *et al.* 1998).

Γενικά κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA στόχου, κατά την οποία το δίκλωνο

DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Ακολουθεί θερμική επαναδιάταξη του DNA, κατά την οποία τα δύο συνθετικά νουκλεοτίδια (primers), συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου, δηλαδή τις απλές αλυσίδες DNA (2^ο στάδιο). Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση DNA (πολυμερισμός), με το διπλασιασμό του DNA-στόχου, παρουσία της θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, οπότε οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητικών μορίων και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση DNA γίνεται πάντα προς την κατεύθυνση 5'→3'. Το σύνολο των τριών φάσεων α) μετουσίωσης-αποδιάταξης (denaturation), β) υβριδισμού-πρόσδεσής των εκκινητών επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου (annealing) και γ) επέκτασης-πολυμερισμού των προσδεδμένων εκκινητών (extension), αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης PCR (Εικόνα 1).

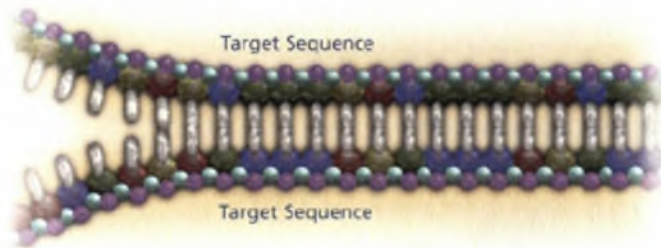


Εικόνα 1. Τα στάδια της PCR: (1) Αποδιάταξη, (2) Συγκόλληση, (3) Επέκταση, P = πολυμεράση, (4) Τέλος πρώτου κύκλου

(<http://www.ja.wikipedia.org>).

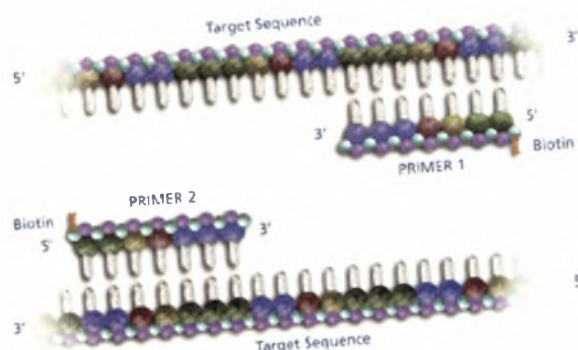
Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της PCR αποτελείται από είκοσι μέχρι τριάντα κύκλους και κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία στάδια που το καθένα αναλυτικά είναι:

(1) Το δίκλωνο μόριο του DNA πρέπει να θερμανθεί στους 94-96°C έτσι ώστε να χωριστεί σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες. Η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δυο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **αποδιάταξη** και ο χρόνος που συνήθως διαρκεί είναι 1-2 λεπτά.



ΣΤΑΔΙΟ 1°: Αποδιάταξη, διαχωρισμός της δίκλωνης αλυσίδας DNA.
1minute 94°C. (<http://www.ja.wikipedia.org>).

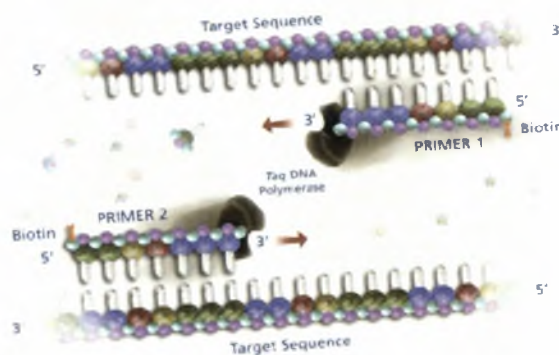
(2) Αφού γίνει ο διαχωρισμός των δυο αλυσίδων του DNA, η θερμοκρασία χαμηλώνει ώστε οι εκκινητές να μπορούν να προσκολληθούν σε κάθε μια από τις μονές αλυσίδες. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **συγκόλληση**. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από τους εκκινητές και είναι συνήθως 5°C χαμηλότερα από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m). Συνήθως η θερμοκρασία αυτή κυμαίνεται από 45 μέχρι 60°C και έχει μεγάλη σημασία γιατί αν δεν είναι η ιδανική για τον εκάστοτε εκκινητή που χρησιμοποιείται, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μη συγκόλληση του εκκινητή στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA ή την συγκόλλησή του σε τυχαία θέση. Η διάρκεια του σταδίου της συγκόλλησης κυμαίνεται από 1 έως 2 λεπτά.



ΣΤΑΔΙΟ 2°: Υβριδισμός συγκόλληση των εκκινητών σε κάθε μια από τις μονές αλυσίδες DNA. 45 seconds 54°C.
(<http://www.ja.wikipedia.org>).

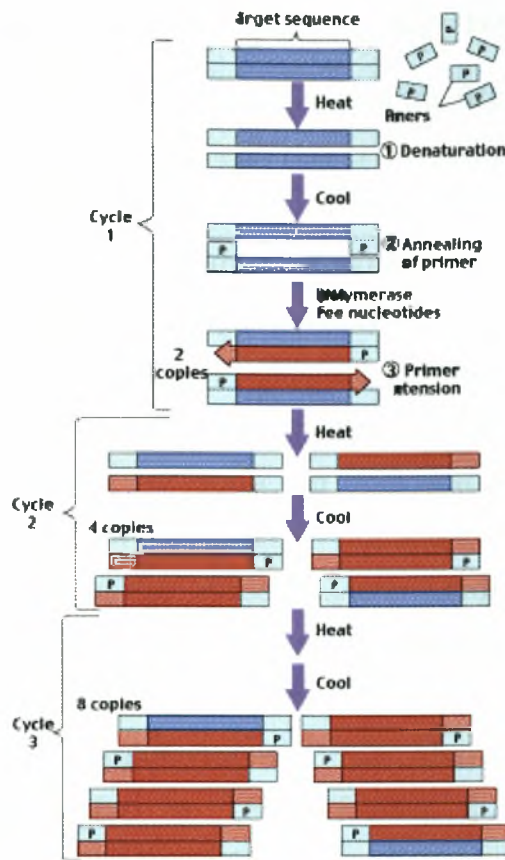
(3) Τέλος, η DNA-πολυμεράση πρέπει να συμπληρώσει τις αντίστοιχες αλληλουχίες στη κάθε αλυσίδα που συγκολλήθηκαν οι εκκινητές. Ξεκινάει από τον εκκινητή και συνεχίζει κατά μήκος της αλυσίδας. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **επέκταση** και η θερμοκρασία εξαρτάται από τη DNA-πολυμεράση.

Ο χρόνος που διαρκεί το τελευταίο στάδιο της PCR εξαρτάται τόσο από την DNA-πολυμεράση όσο και από το μήκος του τμήματος του DNA που πρέπει να ενισχυθεί. Κάτι που ισχύει και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στο τελευταίο στάδιο της συγκόλλησης είναι ότι το ένζυμο DNA-πολυμεράση προσθέτει στη θυγατρική αλυσίδα DNA περίπου 150 νουκλεοτίδια το δευτερόλεπτο.

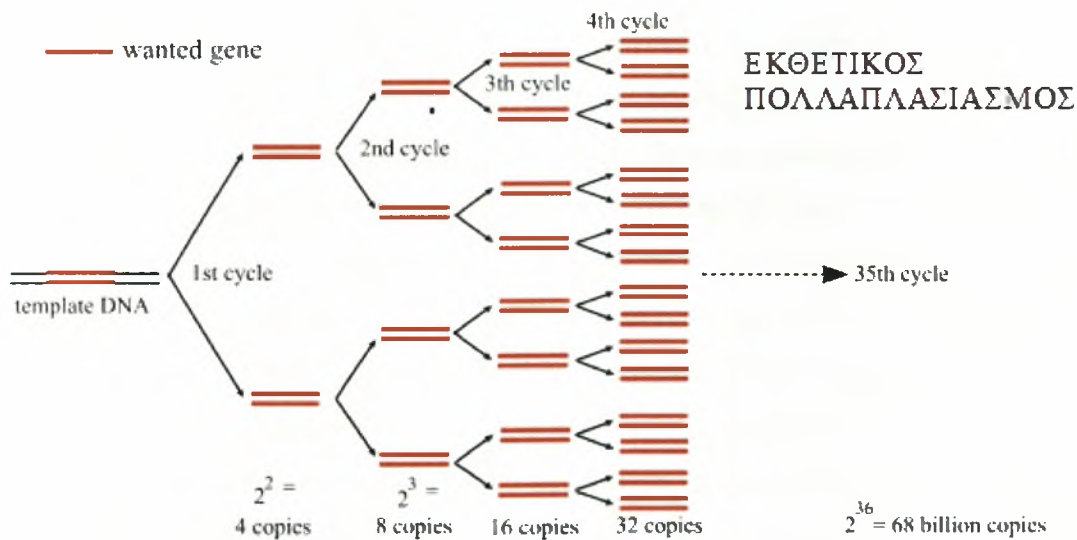


ΣΤΑΔΙΟ 3°: Συγκόλληση των εκκινητών και δημιουργία δυο δίκλωνων μορίων DNA. 2minutes 72°C. DNTP's.
(<http://www.ja.wikipedia.org>).

Στο τέλος της διαδικασίας, από μια δίκλωνη γονική έλικα DNA δημιουργούνται δύο θυγατρικές δίκλωνες έλικες DNA, στον αμέσως επόμενο κύκλο οι δίκλωνες έλικες DNA γίνονται 4 (δυο του αρχικού υποστρώματος και δυο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα-καλούπια για την σύνθεση νέων κλώνων DNA-στόχου στον επόμενο κύκλο (Εικόνα 2). Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται για 25-40 κύκλους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA-στόχου εκατομμύρια φορές μέσα σε λίγες ώρες. Μάλιστα, αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{25} (33.554.432) αντιγράφων, ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{40} (1.099.511.627.776) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA-στόχου (Εικόνα 3).



Εικόνα 2: Οι τρεις πρώτοι κύκλοι της PCR.



Εικόνα 3: Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου.

2.3 Χαρακτηριστικά της τεχνικής της PCR.

Η επιτυχία της PCR εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού T_a , η οποία εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων με τον DNA-στόχο. Όσο πλησιέστερη είναι η T_a προς την T_m που είναι η θερμοκρασία τήξεως (melting temperature) τόσο μεγαλύτερη είναι η ειδικότητα της αντίδρασης. Η ειδικότητα εξαρτάται επίσης από την συγκέντρωση ιόντων Mg^{++} , τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων και του DNA-στόχου. Η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης πιστοποιείται με την παρουσία ομοιογενούς προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου EtBr (1mg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών βάσεων της διπλής έλικας και διευκολύνει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR σε περιβάλλον υπεριώδους φωτισμού.

Η ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR γίνεται με υβριδισμό με γνωστό ανιχνευτή (probe) σημασμένο με ^{32}P , ή βιοτίνη, ή φλουορεσκίνη, ή αλκαλική φωσφάτη, ή υπεροξειδάση ή κάποια άλλη εύκολα ανιχνεύσιμη ουσία. Εναλλακτικά, η ταυτότητα του προϊόντος της γονιδιακής επέκτασης, μπορεί να εξακριβωθεί με ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων διάσπασης από κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.

Το κύριο χαρακτηριστικό της PCR είναι η πολύ μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου. Με ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή (probe), είναι δυνατή η ανίχνευση έως 1 pg DNA. Η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί στο 1 fg με την τεχνική της εντοπισμένης PCR (nested PCR). Στην τεχνική αυτή 1-2 μl του προϊόντος της PCR υποβάλλονται σε δεύτερη PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό (inner primers) των αρχικών (outer primers), με αποτέλεσμα όταν η πρώτη PCR γίνει για 25 κύκλους και το προϊόν της υποβληθεί σε επανεντοπισμένη PCR για 25 ακόμη κύκλους, να παράγονται 1.1×10^{15} αντίγραφα του DNA-στόχου. Θεωρητικά η επανεντοπισμένη PCR έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο προϊόντος HIV (Human Immunodeficiency Virus) σε 1×10^6 κύτταρα (Innis *et al.*, 1990).

Η τεχνική της PCR είναι πολύ ευαίσθητη στις μολύνσεις και έτσι είναι πιθανόν να οδηγήσει σε θετικά τα οποία όμως δεν είναι πραγματικά. Η επιμόλυνση είναι δυνατόν να προκληθεί και από αιωρούμενο (aerosol) DNA ή πλασμίδιο στο χώρο εργασίας. Προς αποφυγή των επιμολύνσεων, η προετοιμασία των χώρων εκτέλεσης της τεχνικής πρέπει να είναι σχολαστική. Για τον περιορισμό των πιθανοτήτων

επιμολύνσεων συνιστάται: α) χρήση διαφορετικών χώρων επεξεργασίας των δειγμάτων και διεξαγωγής των αντιδράσεων, κυρίως σε περιπτώσεις διαδοχικών PCR, β) χρησιμοποίηση διαφορετικών συσκευών καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood) για την απομόνωση του DNA και την προετοιμασία των αντιδραστηρίων και γ) αποστείρωση αντιδραστηρίων και σωληναρίων, προσεκτικός καθαρισμός πιπιετών με αιθανόλη και έκθεση του χώρου ή των χώρων εργασίας σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μετά το τέλος της εργασίας για 12 τουλάχιστον ώρες. Οι διαγνωστικές εφαρμογές της PCR, και των επανεντοπισμένων παραλλαγών της πρέπει να εκτελούνται με ιδιαίτερη προσοχή. Σε κάθε αντίδραση PCR, πρέπει να περιλαμβάνονται πολλοί μάρτυρες και να μην αξιολογείται κάποιο δείγμα σαν θετικό αν δεν επαναληφθεί και επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα δυο τουλάχιστον φορές ιδανικά με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών.

Η επιλογή του προς επέκταση στόχου καθώς και ο σχεδιασμός των κατάλληλων οδηγών και ανιχνευτών έχει μεγάλη σημασία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικίλων ιών όπως ο HIV και γονιδιακών περιοχών εντόμων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως για παράδειγμα διάφορων εύθραυστων αυτοσωμικών περιοχών ή των ψευδοαυτοσωματικών περιοχών του Y χρωμοσώματος. Επί θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, όπως συνηθίζεται για την επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών, τότε η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι δυνατό να υπερβεί το 97%.

2.4 Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR.

Η τεχνική της PCR είναι γρήγορη και απλή μέθοδος, σχετικά φθηνή, δεν απαιτεί τη χρήση ραδιενέργειας ούτε πληροφορία για την ακολουθία του DNA και μπορεί να εκτελεστεί χρησιμοποιώντας ελάχιστες ποσότητες ιστού χωρίς τη θανάτωση του δείγματος. Επιπλέον μπορεί να εφαρμοστεί σε DNA το οποίο προέρχεται από απολιθώματα καθιστώντας έτσι τον προσδιορισμό γενετικών δομών από πληθυσμούς του παρελθόντος.

Η PCR εντάσσεται μαζί με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και τη διαγονιδιακή τεχνολογία, στις βιοτεχνολογικές μεθόδους συνθετικής προσέγγισης του φαινομένου της ζωής. Η σύγχρονη συνθετική μεθοδολογία στηρίζεται στην κατανόηση και αξιοποίηση των γνώσεων της αναλυτικής μεθοδολογίας, από την οποία προέρχεται και της οποίας αποτελεί λογική συνέχεια και ολοκλήρωση. Την

τεράστια σημασία της PCR υποδηλώνει το ευρύ φάσμα εφαρμογών (Βιοτεχνολογία, Βιοϊατρική, Βιολογικός έλεγχος περιβάλλοντος κ.α.), καθώς και οι απεριόριστες δυνατότητες εξελικτικών προσαρμογών της μεθόδου. Η ταχύτατη διεθνοποίηση του όρου PCR σε σχεδόν ισότιμο των όρων DNA και RNA είναι επίσης ενδεικτικής σημασίας της μεθόδου.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ.

3.1. Αλλοένζυμα.

Ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1970 και πρόκειται για την παλαιότερη μορφή μοριακών δεικτών. Πρόκειται για πρωτεΐνες που παράγονται από το DNA και μπορεί να ποικίλουν εξαιτίας του πολυμορφισμού που παρουσιάζεται στο θεμελιώδες DNA. Η μέθοδος αυτή έχει δυο βασικές δυσκολίες: (α) τη χρήση ενζύμων, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν μόνο από την κινητικότητά τους στο τελικό χημικό προϊόν, και (β) την εύρεση αρκετά πολυμορφικών αλλοενζύμων, ώστε να παρέχουν την απαιτούμενη ανάλυση. Τα αλλοένζυμα δεν βασίζονται στη χρήση PCR.

3.2. Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).

Η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με τη χρήση τυχαίων εκκινητών, συνήθως δεκαμερών, σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη θερμοανθεκτική πολυμεράση Taq και ένα μόνο εκκινητή ανά αντίδραση. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA (ή τα αντιγραφόμενα τμήματα) δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιώματος που υβριδίζει ο εκκινητής με κατάλληλο προσανατολισμό σε μια απόσταση 300 έως 3000 βάσεις. Εν συντομία, τα μονόκλωνα μόρια του γονιδιωματικού DNA, μετά από αποδιάταξη, υβριδίζουν κατά προτίμηση με τον εκκινητή λόγω της αυξημένης συγκέντρωσής τους στο διάλυμα. Ακολούθως η θερμοανθεκτική πολυμεράση, πολυμερίζει με κατεύθυνση 5' → 3' όταν υπάρχει εκκινητής με ελεύθερο 3'-OH και μήτρα (μονόκλωνο DNA) (Allen & Bodowle 1994)

Ένας εκκινητής έχει μια καθορισμένη αλληλουχία αλλά η αλληλουχία αυτή είναι τυχαία. Έτσι, υπάρχει δυνητικά ένας απεριόριστος αριθμός εκκινητών RAPD με συγκεκριμένες αλληλουχίες. Το μικρό μέγεθος του εκκινητή (~10 bp) του δίνει τη δυνατότητα να υβριδίζει σε εκατοντάδες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα, όμως μόνο

εκείνοι που υβριδίζουν σε δυο θέσεις στις αντίθετες αλυσίδες του DNA μέσα σε 300-3000 βάσεις έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή και εμφάνιση ζωνών μετά από PCR (Wicker 1974). Ο κύκλος υβριδισμού, αποδιάταξης και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση της συγκέντρωσης του μέρους αυτού του γονιδιώματος.

Τα προϊόντα ενίσχυσης πολυμερισμού διαχωρίζονται σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με χρώση συνήθως βρωμιούχου αιθιδίου.

Ο πολυμορφισμός μεταξύ ατόμων, εκδηλώνεται με τις διαφορές του προτύπου των ζωνών και μπορεί να οφείλεται σε:

- (1) αλλαγές βάσεων της θέσης υβριδισμού καθιστώντας τη μη αναγνωρίσιμη από τον εκκινητή,
- (2) απάλειψη της θέσης υβριδισμού,
- (3) προσθήκες ή ελλείψεις τμημάτων DNA που διαφοροποιούν το μέγεθος της αλληλουχίας που ενισχύεται με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορετικές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση.

Είναι δεδομένο ότι η μεθοδολογία απομόνωσης του DNA και οι συνθήκες κατά την αντίδραση της PCR παραμένουν σταθερές. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα διαχωρίζονται από την παρουσία ή απουσία ενός προϊόντος (μιας ζώνης) ενός συγκεκριμένου μεγέθους με αποτέλεσμα να μπορούν να καταμετρηθούν πολλαπλές γενετικές θέσεις σε μια μόνο αντίδραση με την προϋπόθεση ότι τα προϊόντα του πολυμερισμού διαχωρίζονται σχετικά εύκολα, ως προς το μέγεθος, στην ηλεκτροφόρηση (Wicker 1974, Allen & Budowle 1994).

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι τέτοιες ώστε να μπορούν να εμφανιστούν μέχρι και 20 ζώνες. Η ικανότητα αυτή των RAPD να παράγουν πολλαπλές ζώνες χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή έχει ως αποτέλεσμα την άμεση και ταχεία εξέταση και εκτίμηση πολλαπλών γενετικών τόπων με τη χρήση μόνο μερικών εκκινητών σε ανεξάρτητες αντιδράσεις PCR. Επιπρόσθετα, η μεθοδολογία RAPD είναι πολύ αποτελεσματική όχι μόνο ως προς τη σάρωση πληθυσμών και στην εύρεση ποικιλομορφίας της αλληλουχίας, αλλά επίσης και όταν αυτή χρησιμοποιείται για την εύρεση μοριακών δεικτών σε εξειδικευμένες περιοχές του γονιδιώματος χωρίς την ανάγκη λεπτομερούς χάρτη (Beebee & Rowe 2004). Η μεθοδολογία είναι απλή, δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό, το κόστος δεν είναι ιδιαίτερα υψηλό και δεν είναι χρονοβόρα. Το τρωτό της σημείο είναι η μερική επαναληψιμότητα λόγω: α) της διαφορετικής μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται κατά την απομόνωση του DNA, β)

των διαφορετικών θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR, και γ) λόγω των διαφορετικών συσκευών που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR.

Λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν τα RAPD ως μέθοδος μοριακής ανάλυσης, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε μελέτες γενετικής πληθυσμών αλλά και διαχωρισμού μεταξύ ειδών.

3.3. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).

Η μεθοδολογία του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP) βασίζεται σε δυο τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μοριακή βιολογία, στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού και στη μεταφορά του DNA σε φίλτρα τα οποία υβριδίζουν σε ένα σημασμένο τμήμα DNA κατά Southern (Wickner 1974, Χατζόπουλος 2001).

Πολυμορφισμός σημαίνει η ύπαρξη πολλών διαφορετικών μορφών στις οποίες μια περιοχή του DNA μπορεί να έχει διαφορετικά μήκη σε διαφορετικά ομόλογα ή άτομα. Όταν ένας συγκεκριμένος κλωνοποιημένος έλεγχος DNA χρησιμοποιείται για να αναλύσει ένα σημάδι του ανθρώπινου (ή άλλου) DNA, ένας περιορισμένος αριθμός τεμαχίων περιορισμού συγκεκριμένου και χαρακτηριστικού μήκους θα προσδιοριστεί. Επειδή οι μεταλλαγές βάσεων μπορούν είτε να δημιουργήσουν πρόσθετες περιοχές περιορισμού είτε να καταστρέψουν τις προϋπάρχουσες περιοχές, οι προετοιμασίες DNA από τα διαφορετικά άτομα εκθέτουν συχνά τα διαφορετικά πρότυπα της διανομής μεγέθους των τεμαχίων περιορισμού που υβριδίζονται με έναν ιδιαίτερο έλεγχο. Αυτές οι διαφορές καλούνται πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP`s).

3.4. Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP).

Η τεχνολογία πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων AFLP παρέχει ένα νέο και αποτελεσματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό γενετικής ποικιλομορφίας και βιοποικιλομορφίας. Η μεθοδολογία AFLP βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά τη 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 πηχτή πολυακρυλαμίδης.

Η μεθοδολογία AFLP επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιορισμένων τμημάτων DNA σε μια μόνο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Συνοπτικά, το γονιδιωματικό DNA υφίσταται ταυτόχρονη διπλή πέψη με δυο ένζυμα περιορισμού εκ των οποίων το ένα αναγνωρίζει θέσεις 4 βάσεων (π.χ. MseI) και το άλλο θέσεις αναγνώρισης 6 βάσεων (π.χ. EcoRI). Τα άκρα των περιορισμένων τμημάτων συνδέονται με ειδικά σχεδιασμένους προσαρμοστές έτσι ώστε να είναι συμβατοί και να συνδέονται στις θέσεις αναγνώρισης των συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού. Καθώς οι θέσεις αναγνώρισης 4 βάσεων από τα περιοριστικά ένζυμα είναι πιο συχνές από αυτές των 6 βάσεων, η πλειονότητα των τμημάτων που θα παραχθούν θα προέρχεται μόνο μετά από την πέψη του ενζύμου που αναγνωρίζει 4 βάσεις. Μόνο ένας περιορισμένος αλλά ικανοποιητικός αριθμός τμημάτων θα έχουν στα άκρα τους και τις δυο διαφορετικές θέσεις. Αν και η ενίσχυση της μήτρας του DNA με εκκινητές ομόλογους με τους προσαρμοστές και αντίδραση PCR θα δημιουργήσει ένα διακριτό πρότυπο για μικρά γονιδιώματα (π.χ βακτήρια), για μεγαλύτερα γονιδιώματα το πρότυπο των ζωνών είναι αρκετά πολύπλοκο (ο αριθμός των ζωνών που θα παραχθούν θα είναι ιδιαίτερα μεγάλος) που δεν επιτρέπει το διαχωρισμό τους σε μια πηχτή πολυακρυλαμίδης (Ansorge et al. 1997, Χατζόπουλος 2001, Beebee & Rowe 2004).

Για το λόγο αυτό, μια επιπρόσθετη επιλογή ενίσχυσης μιας υποομάδας τμημάτων DNA επιτρέπει την ελάττωση της πολυπλοκότητας του προτύπου των ζωνών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών PCR που έχουν μια αλληλουχία ομόλογη με τον προσαρμοστή και επιπλέον «επιλεκτικά νουκλεοτίδια» που προστίθενται στο 3' άκρο των εκκινητών. Τα «επιλεκτικά νουκλεοτίδια» στο 3' άκρο επιτρέπουν στους εκκινητές να «εκκινήσουν» το πολυμερισμό μόνο στα τμήματα του DNA που υπάρχει τέλεια ομολογία. Οι ζώνες που ενισχύονται μπορούν να παρατηρηθούν με ραδιενεργά νουκλεοτίδια κατά τον πολυμερισμό (dATP- $\alpha^{32}\text{P}$) ή με ειδικά χρωμοφόρα φθορισμού στις βάσεις ή στους εκκινητές και ανάλυση με ακτίνες laser (Wicker 1974, Χατζόπουλος 2001). Ο αριθμός των «επιλεκτικών νουκλεοτιδίων» που χρησιμοποιούνται στο 3' άκρο των εκκινητών στην ουσία μπορεί να ελέγχει και να περιορίσει τον αριθμό των τμημάτων του DNA που ενισχύονται έτσι ώστε να παρέχεται ένα πρότυπο ζωνών που να δύναται να αναλυθεί.

Ο πολυμορφισμός των μοριακών δεικτών με τη μέθοδο AFLP εντοπίζεται από την παρουσία ή απουσία κάποιας ζώνης που οφείλεται: (α) στις διαφορές των θέσεων αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού (όπως στις περιπτώσεις RFLP), (β) στις αλλαγές των βάσεων μέσω μεταλλάξεων κοντά στις θέσεις αναγνώρισης (υβριδισμού εκκινητών) και διάκρισης λόγω των «επιλεκτικών νουκλεοτιδίων» και (γ) στις ενθέσεις ή ελλείψεις μέσα στα τμήματα που ενισχύονται. Γενικά οι μοριακοί δείκτες που παράγονται με AFLP είναι πολύ περισσότεροι από αυτούς που δημιουργούνται σε μια αντίδραση RAPD-PCR (Sunpuks 2000). Σε γενικές γραμμές το επίπεδο πολυμορφισμού που ανιχνεύεται με τη μέθοδο AFLP είναι χαμηλότερο από άλλες τεχνικές χαρτογράφησης όπως RFLP και μικροδορυφορικό DNA. Όμως, η ικανότητα ανάλυσης ταυτόχρονα μεγάλου αριθμού πολυμορφικών τόπων, «η αποδοτική πολλαπλή αναλογία», δηλαδή ο αριθμός των πολυμορφικών τόπων που αναλύονται ανά πείραμα με ένα μόνο συνδυασμό εκκινητών σε μια ηλεκτροφόρηση, επιβεβαιώνει την υψηλή και διαφωτιστική αξία της τεχνικής όταν συγκρίνεται με άλλες μεθόδους χαρτογράφησης. Οι μοριακοί δείκτες AFLP είναι κυρίαρχοι. Παρόλα αυτά η διάκριση των ετεροζυγωτών ατόμων όπως και στη περίπτωση RAPD είναι δυνατή με τη σύγκριση της έντασης της ζώνης (Χατζόπουλος 2001, Beebe & Rowe 2004).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι επαναλήψιμα, όμως ολόκληρη η διαδικασία είναι σχετικά δύσκολη, τουλάχιστον στην αρχή και γενικά το κόστος υψηλό. Μια άλλη πρακτική εφαρμογή της μεθόδου AFLP, όπως και στις προηγούμενες μεθοδολογίες είναι η γενετική χαρτογράφηση. Το πρότυπο ζωνών που προκύπτει με τη μέθοδο AFLP είναι παραπλήσιο με αυτό που προκύπτει με τη μεθοδολογία RAPD. Η διαφορά έγκειται στον αριθμό των πολυμορφικών ζωνών που ανιχνεύονται ανά άτομο λόγω της μεθοδολογίας και της πολύ καλής διακριτικής ικανότητας της πηκτής της πολυακρυλαμίδης (Allen & Budowle 1994, Ansoerge et al. 1997).

Τα ενισχυμένα προϊόντα όλων των παραπάνω μεθοδολογιών, διαβάζονται όπως ήδη είπαμε ως ζώνες διαφορετικού μεγέθους, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (Εικόνα 4). Πρόκειται για ζώνες που προέκυψαν μετά από επεξεργασία με τη μέθοδο AFLP αλλά και οι υπόλοιπες μεθοδολογίες παρουσιάζουν παρόμοια μοτίβα.



Εικόνα 4. Εμφάνιση ενισχυμένων τμημάτων με τη μέθοδο AFLP, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

(<http://images.google.gr/images?q=AFLP&hl=el&btnG>).

3.5. Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats SSR) και απλές σε σειρά επαναλήψεις (Short Tandem Repeats, STR).

Όλες αυτές οι μεθοδολογίες αναφέρονται σε μικρές συνεχείς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών 2, 3, ή 4 νουκλεοτιδίων. Τέτοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα και συχνά έχουν αρκετά ευδιάκριτη αλληλομορφία ανά τόπο και επίσης υψηλή συχνότητα ετεροζυγωτίας στους διάφορους πληθυσμούς. Έτσι, μοριακοί δείκτες που προέρχονται από αυτές τις μεθοδολογίες είναι αρκετά χρήσιμοι. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των άκρων τους. Εμφανίζονται σαν ζώνες ηλεκτροφόρησης με διαφορετικό μέγεθος που οφείλεται στις διαφορές των επαναλαμβανόμενων απλών αλληλουχιών και χαρακτηρίζονται από συγκυριαρχία. Το πλεονέκτημα αυτό επιτρέπει την εύκολη διάκριση των ετεροζύγωντων ατόμων. Η ταυτοποίηση κατάλληλων γενετικών τόπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες με τις μεθοδολογίες αυτές, απαιτεί εξειδικευμένες διαδικασίες κλωνοποίησης συγκεκριμένων τμημάτων DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας εκατέρωθεν των άκρων ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές. Αυτό είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα γιατί: (α) έχει αυξημένο κόστος, (β) απαιτεί σχετικά σημαντικό χρόνο και (γ) απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό (Wicker 1974, Ansorge et al. 1997, Χατζόπουλος 2001, Beebe & Rowe 2004).

3.6. Κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως δείκτες (STS, EST, SSCP, SNP, ASOH, DASH).

Άλλα συστήματα μοριακών δεικτών που βασίζονται σε κλωνοποιημένους γενετικούς τόπους είναι οι **θέσεις επισήμανσης αλληλουχίας (STS)**. Είναι ένας γενικός όρος για γενετικούς τόπους που ταυτοποιούνται βάσει της αλληλουχίας τους και ο πολυμορφισμός ανιχνεύεται με PCR. Μια άλλη προσέγγιση είναι η **επισήμανση εκφραζόμενων αλληλουχιών (EST)**. Οι δεύτεροι είναι ένα υποσύνολο των πρώτων και προέρχονται από κλώνους cDNA. Οι μοριακοί αυτοί δείκτες χρησιμοποιούνται στο πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη φυσική του χαρτογράφηση. Η αντίδραση PCR εκτελείται με δυο μοναδικούς εκκινητές συμπληρωματικούς εκατέρωθεν των κλωνοποιημένων άκρων. Ανάλογη προσέγγιση γίνεται και στη χαρτογράφηση γενετικών τόπων αντίστοιχων στα cDNA των οποίων έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία των άκρων (5' και 3') (Wicker 1974, Sunnucks 2000, Χατζόπουλος 2001).

Οι μοριακοί δείκτες που προκύπτουν είναι συγκυρίαρχοι. Αύξηση πολυμορφισμού επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων περιορισμού. Το πρόβλημα της χρήσης κάποιου ενζύμου περιορισμού στην αναζήτηση πολυμορφισμού οφείλεται στη δειγματοληψία ενός μικρού μέρους της δυνητικά ποικιλόμορφης αλληλουχίας, επειδή η πέψη βασίζεται μόνο στη παρουσία ή απουσία μιας τετρα- έως οκτα-νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που αναγνωρίζεται από το συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού. Μια εναλλακτική προσέγγιση του εντοπισμού ποικιλομορφίας της αλληλουχίας των ενισχυμένων τμημάτων DNA, πέρα από την αλληλούχιση, είναι ο **πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP)**. 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 (Wicker 1974, Alen & Budowle 1994, Sunnucks 2000).

Ο **πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP)** μπορεί να ταυτοποιηθεί με την αλληλούχιση γονιδίου από διαφορετικά άτομα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης. Όμως η αλληλούχιση γονιδίου από διαφορετικά άτομα είναι μια πολύ δαπανηρή διαδικασία. Σύγχρονες τεχνικές, όπως ο **υβριδισμός**

ολιγονουκλεοτιδίου εξειδικευμένου αλληλομόρφου (ASOH) είναι περιορισμένες λόγω της αναποτελεσματικότητας των συνθηκών διάκρισης. Όμως η τεχνική ASOH σε συνδυασμό με άλλες μεθοδολογίες μπορεί να διακρίνει σχετικά εύκολα πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου παρόλο που είναι χρονοβόρα και δαπανηρή. Μια άλλη τεχνική που μπορεί να διακρίνει και να καταγράψει SNP είναι η μέθοδος του δυναμικού υβριδισμού εξειδικευμένου αλληλομόρφου (DASH). Κατά τη μεθοδολογία αυτή η αλληλουχία στόχος ενισχύεται με PCR και η μια από τις δυο αλυσίδες ακινητοποιείται πάνω σε στρεπταβιδίνη. Ένα ολιγονουκλεοτίδιο χρησιμοποιείται σαν ανιχνευτής ειδικός για τον ένα αλληλόμορφο και υβριδίζει σε χαμηλή θερμοκρασία. Η δίκλωνη περιοχή του DNA αντιδρά με ένα παρεμβαλλόμενο δείκτη χρώματος ειδικού για δίκλωνη αλυσίδα. Μετά από διέγερση ο δείκτης εκπέμπει φθορισμό ανάλογο της δίκλωνης έλικας (ανιχνευτής-στόχος) του DNA. Η απότομη ελάττωση του φθορισμού λόγω της αύξησης θερμοκρασίας (μετουσίωση της δίκλωνης περιοχής ανιχνευτή-στόχου) μπορεί να εκτιμάται συνεχώς έτσι ώστε ακόμη και όταν υπάρχει μη τέλεια συμπληρωματικότητα σε μια βάση να εκτιμηθεί ανάμεσα σε ανιχνευτή και στόχο (Beridze 1986, Χατζόπουλος 2001, Beebeee & Rowe 2004).

3.7. Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα μεθόδων.

Όλες οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε PCR απαιτούν μικρή ποσότητα DNA. Από όλες τις μεθοδολογίες η RAPD είναι η πιο απλή, διότι δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, το κόστος είναι χαμηλό, έχει μια καλή «αποδοτική πολλαπλή αναλογία», δεν απαιτεί πολύ χρόνο και εργασία, αλλά έχει όμως μερική επαναληψιμότητα. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού εκκινήτων. Οι άλλες μεθοδολογίες (RFLP, AFLP, κ.α) είναι χρονοβόρες, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και πολύ εργασία αλλά έχουν υψηλή επαναληψιμότητα. Κάθε μεθοδολογία, έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η αξιολόγηση της πιθανής χρησιμότητας της κάθε μιας (Beridze 1986, Χατζόπουλος 2001, Beebeee & Rowe 2004).

4. SSCP (ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA).

4.1 Εισαγωγή.

Η SSCP ανάλυση περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Orita και τους συνεργάτες του (1989). Η γενική ιδέα ήταν η αποδιάταξη μικρών προϊόντων PCR και η ηλεκτροφορήσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Καθώς τα PCR προϊόντα μετακινούνται διαμέσου της πηκτής επανακτούν την δευτεροταγή δομή τους που εξαρτάται από την αλληλουχία (όπως και οι δευτεροταγείς δομές του DNA). Η κινητικότητα των μονόκλωνων προϊόντων PCR εξαρτάται από την δευτεροταγή δομή τους. Επομένως, τα προϊόντα PCR που περιέχουν διαφορές στην αλληλουχία ή ακόμα και απαλοιφές ή προσθήκες θα έχουν διαφορετική κινητικότητα

4.2. Αρχή της μεθόδου.

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). Η μέθοδος 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 παραχθεί με PCR, με υπόστρωμα γενωμικό DNA από διαφορετικά άτομα και που φέρουν μεταλλαγές σε διαφορετικές θέσεις, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση και άρα θα είναι δυνατή η διάκρισή τους. Στην SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους διασυνδέονται παρουσία του N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης, ενός μορίου διασυνδέτη και έτσι σχηματίζεται μία πορώδης 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 νανογραμμαρίων.

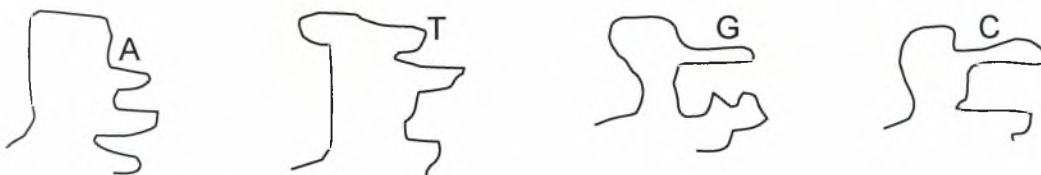
Καθώς η διαμόρφωση ενός μονόκλωνου τμήματος DNA εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους του πηκτώματος και της ηλεκτροφόρησης, αυτές πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την εφαρμογή της SSCP. Έτσι, η θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση είναι κρίσιμη καθώς υψηλές θερμοκρασίες λόγω αποδιατακτικών 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, παρατηρώντας 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 εκκινήτων κατά την PCR.

4.3. 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.

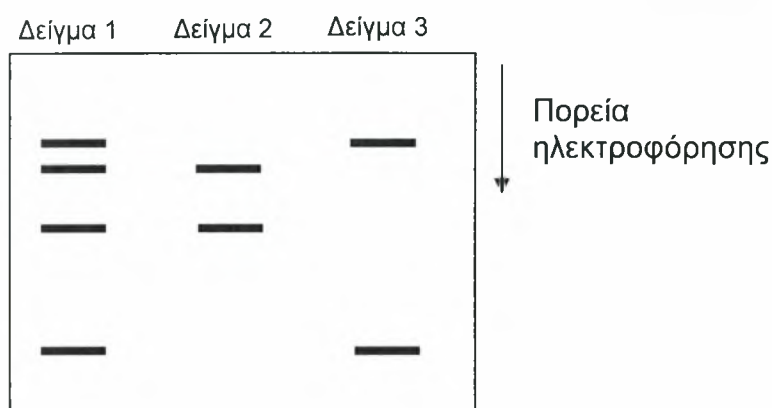


Μετά την αποδιάταξή τους και κατά την ηλεκτροφόρηση, τα τέσσερα, μονόκλινα πλέον, μόρια αποκτούν διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση, έστω αυτήν που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, με αποτέλεσμα να έχουν και διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα.

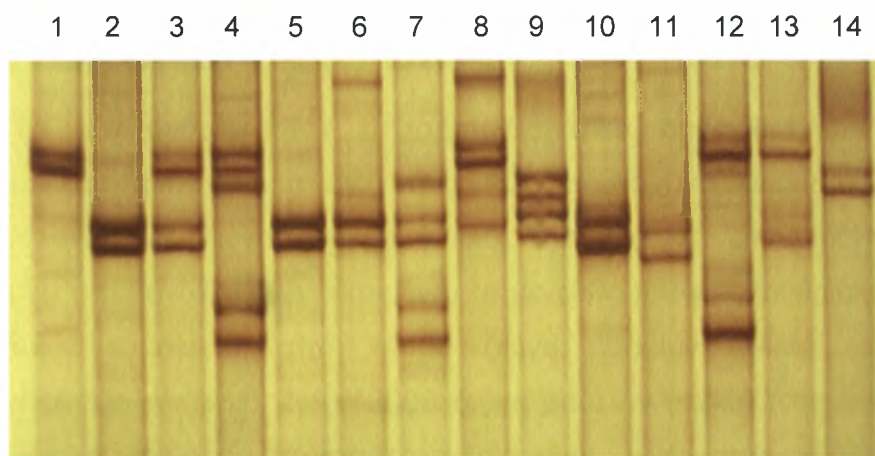


Έτσι, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την χρώση του πηκτώματος, στο συγκεκριμένο δείγμα (Δείγμα A) θα προκύψουν τέσσερις διακριτές ζώνες. Επίσης, αν στο πηκτωμα αυτό

συμπεριληφθούν και δείγματα, ομόζυγα για το αλληλόμορφο 1 και 2 αντίστοιχα (Δείγμα 2 και 3), τελικά θα έχουμε μία εικόνα ως εξής:



Ωστόσο, το αποτέλεσμα δεν είναι πάντα τόσο ευδιάκριτο καθώς κατά την ηλεκτροφόρηση κάποια μόρια επανασηματίζουν δίκλωνη αλυσίδα με αποτέλεσμα να εμφανίζονται επιπλέον ζώνες ενώ συνήθως αναλύονται ταυτόχρονα πολλαπλά 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 (Εικ. 5), 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.



Εικ. 5: Αποτέλεσμα ανάλυσης SSCP στα πλαίσια πληθυσμιακής μελέτης σε 14 δείγματα (προϊόντα PCR). Το πρότυπο των δειγμάτων 2, 5, 6 και 10 είναι ταυτόσημο και επειδή περιέχει δύο ζώνες συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για ομόζυγα άτομα. Επίσης το #3 (ετερόζυγο) ταυτίζεται με το #13 και το #4 με το #12. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι οι δύο ζώνες του δείγματος #1 (ομόζυγο) περιέχονται στα #3, 4, 7, 8, 12 και 13 και άρα στα δείγματα αυτά οι συγκεκριμένες ζώνες αντιστοιχούν στις δύο αλυσίδες του ενός αλληλομόρφου.

4.4. Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα μεθόδου.

Το κύριο πλεονέκτημα της ανάλυσης SSCP είναι ότι πολλά ξεχωριστά προϊόντα PCR μπορούν να ελεγχθούν για διαφοροποιήσεις ταυτόχρονα. Η ανάλυση SSCP εφαρμόζεται για να μειωθεί ο αριθμός των αλληλουχήσεων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό νέων αλληλόμορφων σε γενετικούς τόπους (e.g. Sweetman et al. 1992) ή για την καλύτερη εκτίμηση των αλληλομορφικών συχνοτήτων σε πληθυσμούς (e.g. Aguadé et al. 1994). Υπάρχουν επίσης και άλλες εφαρμογές της ανάλυσης SSCP. Πρώτον, η ανάλυση SSCP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των PCR προϊόντων γονιδίων που πρόκειται να αλληλουχηθούν για φυλογενετικές αναλύσεις. Ο έλεγχος αυτός προσδιορίζει εάν το γονίδιο περιέχει αρκετούς πολυμορφισμούς, που εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί αυτοί, ποιο είναι το επίπεδο της ενδοειδικής ποικιλότητας και αν υπάρχει πολυμορφισμός μεταξύ γονιδίων πολλαπλών αντιγράφων στα άτομα. Επιπλέον, η μέθοδος SSCP είναι κατάλληλη για την άντληση πληροφοριών σχετικά με τα επίπεδα των πολυμορφισμών σε πυρηνικούς γενετικούς τόπους.

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 περισσοτέρων σημειακών μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερα μικρό, περίπου 200bp.

5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων τα οποία έχουν το δικό τους DNA, το μιτοχονδριακό (mt) DNA. Το mtDNA είναι απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Συγκεκριμένα, το μέγεθος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ζώων κυμαίνεται από 14000 ζεύγη βάσεων (14kb) (στον νηματώδη, *Caenorhabditis elegans*), έως 42000 ζεύγη βάσεων (42kb) (στο χτένι, *Placopecten megallanicus*), ενώ στα περισσότερα ζώα είναι γύρω στις 16-20 kb. Στο έντομο *Drosophila yakuba* έχει βρεθεί η πλήρης αλληλουχία των 16,019 ζευγών βάσεων του μιτοχονδριακού DNA (Wolstenholme, 1992) όπως και σε εκατοντάδες άλλους οργανισμούς.

Η απομόνωση του mtDNA των 16-20 kb από τα δισεκατομμύρια άλλα νουκλεοτίδια του γονιδιώματος είναι σχετικά εύκολη λόγω φυσικού διαχωρισμού του. Το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται και μεταβιβάζεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω της μητέρας. Παρουσιάζει ταχύτερο αριθμό αλλαγών σε σχέση με το πυρηνικό DNA στην αλληλουχία των βάσεων του. Έτσι, μπορούν να εντοπιστούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και στις περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι στο ίδιο στο επίπεδο του πυρηνικού DNA (Awise *et al.*, 1987).

Το ζωικό mtDNA παρουσιάζει μια σαφή συντηρητικότητα ως προς τα γονίδια που περιέχει. Πράγματι, το mtDNA των σπονδυλωτών, εχινόδερμων και εντόμων περιλαμβάνει 13 γονίδια που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNA (12s και 16s rRNA) και 22 γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA). Επίσης υπάρχει μια περιοχή που δεν κωδικοποιεί, αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για αντιγραφή του mtDNA και την μεταγραφή του σε RNA, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος D (D-loop). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 6). Αυτά είναι: οι 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI, COII, COIII) και δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATάση 6, 8). Για τη λειτουργία των βιοχημικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων χρειάζονται περισσότερα ένζυμα, από το μεγαλύτερο μέρος των οποίων ελέγχεται από το πυρηνικό DNA, συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και εισάγεται στα μιτοχόνδρια. Προφανώς το εξαρτώμενο από τον πυρήνα μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αποτέλεσμα της προοδευτικής μεταφοράς του γενετικού ελέγχου στον πυρήνα από ένα προηγούμενο πιο σύνθετο και μεγαλύτερο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Wolstenholme, 1992).

Η απουσία ενδονίων, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενου DNA και μεγάλων ακολουθιών, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων του, καθιστούν το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση. Εξάλλου, οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, μικρές προσθήκες ή ελλείμματα ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων, ενώ λιγότερες αφορούν σε μεγάλες αλλαγές (μέχρι αρκετές εκατοντάδες νουκλεοτίδια) στο μήκος του μορίου. Οι περισσότερες διαφορές μήκους περιορίζονται στην περιοχή ελέγχου του μορίου (Roehrdanz & Degrugillier, 1998).

Στα σπονδυλωτά, οι αλυσίδες mtDNA, γνωστές ως L (light- ελαφριά), και H (heavy-βαριά), παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο G+T. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα γονίδια στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H. Έτσι από τα 37 γονίδια στο mtDNA των σπονδυλωτών μόνο ο τύπος tRNA και το γονίδιο ND6 κωδικοποιούνται από την αλυσίδα L (Avisé *et al.*, 1987).

Όμως, ενώ στα σπονδυλωτά λιγότερο από το 10% του ολικού αριθμού των βάσεων που κωδικοποιούν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα βρίσκονται στην αλυσίδα L, στη *Drosophila* (Meyer, 1993), το 50% περίπου βρίσκεται σε αυτή.

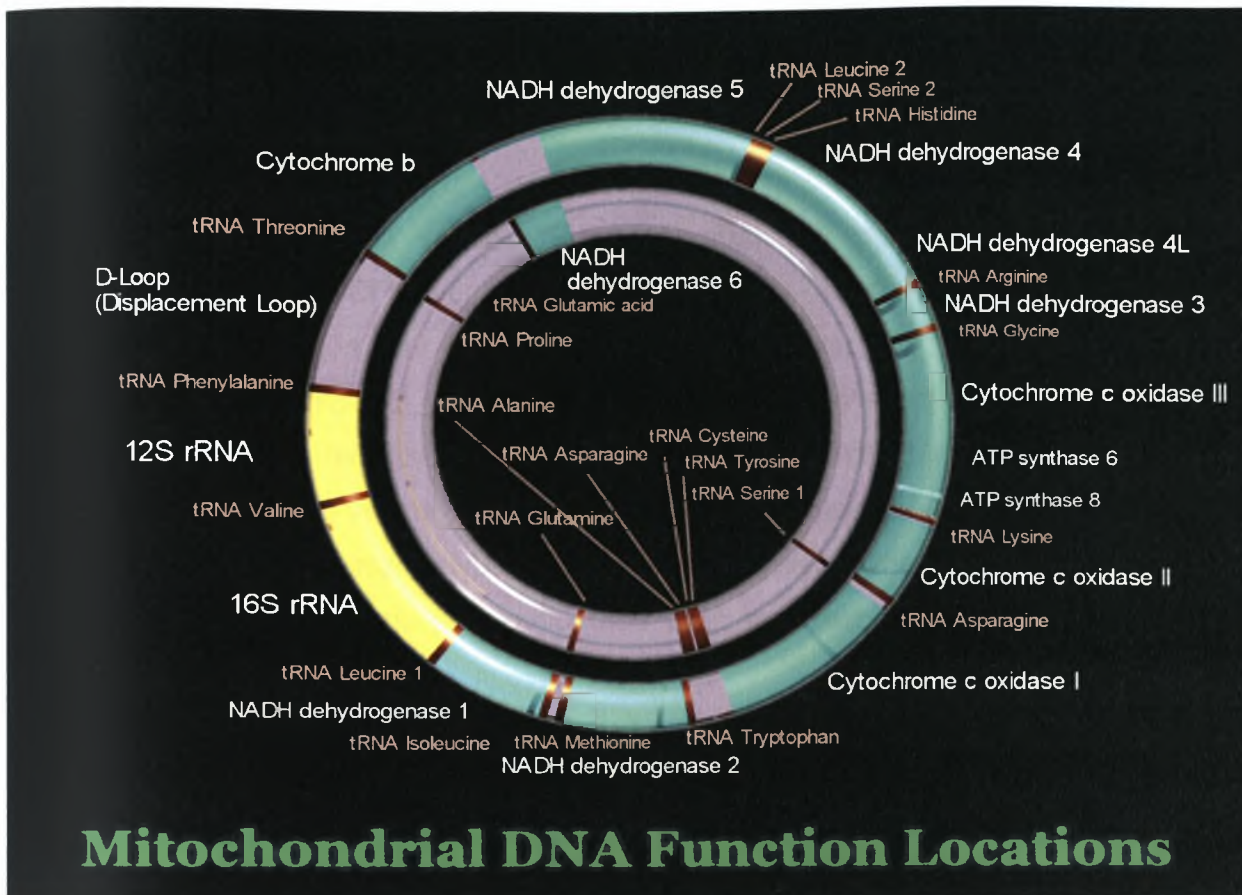
Η διάταξη των γονιδίων στο ζωικό mtDNA, είναι εξαιρετικά σταθερή, τουλάχιστον μέσα σε μια ταξινομική τάξη ή φύλλο. Ωστόσο, μπορεί να υπάρξει ποικιλότητα στη σειρά των γονιδίων του mtDNA, ακόμα και μέσα στο ίδιο φύλο (Wilson *et al.*, 1985).

Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα και τα ώριμα ωκύτταρα, περιέχουν εκατοντάδες ή χιλιάδες μόρια mtDNA. Έτσι, μια καινούρια μετάλλαξη θα δημιουργήσει μια κατάσταση ετεροπλασμίας, κατά την οποία δύο ή περισσότεροι γενότυποι θα συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο. Στην πράξη κάθε μιτοχόνδριο περιέχει μόνο έναν τύπο mtDNA (ομοπλασμία). Περιπτώσεις ετεροπλασμίας έχουν διαπιστωθεί σε διάφορες ομάδες οργανισμών, αλλά είναι σχετικά σπάνιες και έτσι έχουν μικρή σημασία σε μελέτες του ζωικού mtDNA (Avisé *et al.*, 1987).

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος και λιγότερος αυστηρός από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Ο μιτοχονδριακός κώδικας διαφέρει από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα στα εξής σημεία:

- Το UGA κωδικοποιεί για τρυπτοφάνη και δεν αποτελεί σημείο τερματισμού.
- Το CUA κωδικοποιεί για θρεονίνη αντί για λευκίνη.
- Το AUA κωδικοποιεί για μεθειονίνη αντί για ισολευκίνη.

Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι τα μεταλλαγμένα κωδικόνια αντιπροσωπεύουν εξελικτικά ατυχήματα, τα οποία όμως διατηρήθηκαν διότι συνθέτουν ελάχιστες πρωτεΐνες και είναι συνεπώς αβλαβή για τον οργανισμό. Η αντιγραφή του mtDNA βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του πυρήνα, αφού τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα, εισάγονται στο μιτοχόνδριο από το κυτταρόπλασμα. Στα ζωικά κύτταρα η κληρονομική μεταβίβαση του mtDNA γίνεται μητρικά καθώς το ωάριο προσφέρει πάντα όλο το κυτταρόπλασμα για το σχηματισμό του ζυγωτού (Griffiths *et al.*, 2002).



Εικόνα 6: Η διάταξη των γονιδίων στο μιτοχονδριακό DNA.

(<http://images.google.gr/images?svnum=10&hl=el&lr=&q=MITOCHONDRIAL+DNA+>)

Ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες ομάδες οργανισμών. Στα θηλαστικά εξελίσσεται 5 με 10 φορές ταχύτερα από το πυρηνικό DNA (Jorde, Bamshad, & Rogers 1998), ίσως επειδή η DNA πολυμεράση, που αντιγράφει το mtDNA, στερείται της ικανότητας εντοπισμού και διόρθωσής λαθών, ικανότητα που διαθέτουν οι πολυμεράσες που αντιγράφουν το πυρηνικό γονιδίωμα (Brown, 1993). Για παράδειγμα, ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA εκτιμάται ότι είναι 2% νουκλεοτιδική απόκλιση ανά ένα εκατομμύριο χρόνια. Ο ρυθμός αυτός αφορά σε ανώτερα ταξινομικά τάξα, ενώ στα έντομα εκτιμάται ότι είναι μικρότερος καθώς επηρεάζεται από διάφορα γνωρίσματα, όπως ο μεταβολικός αριθμός, ο χρόνος γενιάς και το μέγεθος (Avisé *et al.*, 1992). Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που συμβαίνει στο μόριο του μιτοχονδριακού DNA αφορούν απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Οι μεταπτώσεις υπερिσχύουν των μεταστροφών σε συγκρίσεις στενά συγγενικών ειδών, αλλά η αναλογία μεταπτώσεων/μεταστροφών ελαττώνεται καθώς αυξάνει η εξελικτική απόσταση μεταξύ των ειδών. Πιο σπάνια συμβαίνουν προσθήκες ή ελλείμματα και συνήθως περιορίζονται στην περιοχή του βρόγχου D σε ασπόνδυλα και κατώτερα σπονδυλωτά (Moritz *et al.*, 1987).

B.! ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA (16S RNA) για να εξετάσουμε τα είδη των ζώων που χρησιμοποιούνται στα τυποποιημένα προϊόντα του κρέατος. Σκοπός της εργασίας είναι η επαλήθευση των συστατικών που αναγράφονται στην ετικέτα, ώστε να γνωρίζει ο καταναλωτής εάν στα συγκεκριμένα προϊόντα υπάρχει νόθευση ή όχι. Συνολικά εξετάστηκαν 50 διαφορετικά προϊόντα με τυποποιημένα κρέατα (δείγματα). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16S RNA του μιτοχονδριακού DNA που απομονώθηκε από το κάθε ένα δείγμα ξεχωριστά.

Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Αρχικά με εκκινητές κοινούς για όλα τα δείγματα (universal primers), ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR τμήμα του γονιδίου 16s RNA μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κατσίκι (*Capra hircus*), 247bp όσον αφορά τη γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*) και 239 βάσεων όσον αφορά το γουρούνι (*Sus scrofa*) bp. Ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφορήσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για εμφάνιση των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση έδειξε νόθευση σε 20 από τα 50 δείγματα, είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός.

Παρακάτω περιγράφονται τα υλικά και ο εξοπλισμός του εργαστηρίου, οι μέθοδοι και οι πειραματικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών καθώς και η συζήτηση των συμπερασμάτων που προέκυψαν.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.

Στις παραγράφους που ακολουθούν αναφέρεται αναλυτικά ο εξοπλισμός (υλικά, συσκευές, αντιδραστήρια) ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

2.1 Εξοπλισμός για την απομόνωση DNA από ιστό κρέατος.

ΥΛΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

- ✓ Αυτόματες πιπέττες ακριβείας [Gilson] των 20 & 1000μl με τα αντίστοιχα ακρορύγια (tips)
- ✓ Φιαλίδια erpendorf των 1,5 & 2 ml
- ✓ Σατώ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΤΕΣ

- ✓ TNES - Urea Buffer
- ✓ Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) (10mg/μl) [HT]
- ✓ Φαινόλη (Phenol) 90% [Applichen]
- ✓ Χλωροφόρμιο (Chloroform) [Merck]
- ✓ Ισοαμυλική αλκοόλη (Isoamyl alcohol) [Merck]
- ✓ NaOAc (Sodium Acetate Buffer Solution) [Sigma], 3M
- ✓ Απόλυτη αιθανόλη (EtOH) 100%
- ✓ Αιθανόλη καθαρότητας 70%
- ✓ Αποστειρωμένο, διπλά αποσταγμένο νερό (ddH₂O)
- ❖ **TNES – Urea Buffer** (200 ml): 2 ml **Tris – HCl** (1M pH 7,5) + 5ml **NaCl** (5M) + 2ml **EDTA – 2Na** (0,5 M pH 7,5) + 10 ml **SDS** (10%) + 48,05 gr **Urea** + **ddH₂O** έως τελικό όγκο 200ml.

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

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

2.2 Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

ΥΛΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

- ✓ Κωνική φιάλη των 100ml
- ✓ Ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml
- ✓ Πιπέττα ακριβείας των 10 μl.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ✓ Αγαρόζη [HT]
- ✓ TAE 1X
- ✓ Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr)
- ✓ Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer)
- ❖ **TAE 50X** (500ml): 121 **Tris Base** + 28,5 ml **Acetic Acid** + 50 ml **EDTA** 0,5M + **ddH₂O** έως τελικό όγκο 500ml.
Το TAE 1X παρασκευάζεται με αραιώση διαλύματος stock TAE 50X (20 ml σε τελικό όγκο 1lt).
- ❖ **Loading Buffer 6X** (10 ml): 1ml **Bromophenol blue** 1%w/v +0,5 ml **TBE 20X** + 5ml **Glycerol** + **ddH₂O** έως τελικό όγκο 10ml.

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ✓ Συσκευή παρασκευής του gel
- ✓ Φούρνος μικροκυμάτων
- ✓ Συσκευή παροχής υπεριώδους (U.V) ακτινοβολίας [Ultra Lum]
- ✓ Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό μηχάνημα [Bio-Rad (Scie plus)]

2.3 Εξοπλισμός για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων PCR.

ΥΛΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

- ✓ Πιπέττες ακριβείας των 2,10, 20 & 100 μl με τα αντίστοιχα ακρορύγια (tips)
- ✓ Φιαλίδια erpendorf των 200 μl.
- ✓ Σατώ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ✓ Αποστειρωμένο, διπλά αποσταγμένο νερό (ddH₂O)
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR Buffer) [Bioline]
- ✓ Τριφωσφωρικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM
- ✓ Εκκινητές (Primers)
- ✓ Taq DNA πολυμεράση 5U/μl [Bioline]

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ✓ Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- ✓ Θερμικοί κυκλοποιητές [Eppendorf – Mastercycler epgradient S]

2.4 Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση των SSCP σε πηκτή πολυακρυαμίδης.

ΥΛΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

- ✓ Ποτήρι ζέσεως των 200ml
- ✓ Μαγνήτης ανάδευσης
- ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι των 15 και 100ml
- ✓ Χωνί μετάγγισης
- ✓ Χαρτί διήθησης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ✓ Urea (Ουρία) [Merck]
- ✓ Αποστειρωμένο, διπλά αποσταγμένο νερό (ddH₂O)
- ✓ Acrylamide (ακρυλαμίδη) 99% [SIGMA]
- ✓ Bis – Acrylamide [SIGMA]
- ✓ TBE 10X
- ✓ Temed (Tetramethylethylenediamine) 99% [SIGMA]
- ✓ APS 20% w/v
- ✓ Loading Buffer
- ❖ **Μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30%:** 29 gr **Acrylamide** + 1 gr **Bis – Acrylamide** διαλύονται σε 60 ml ddH₂O και στη συνέχεια διηθούνται και συμπληρώνονται με ddH₂O έως τα 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4° C
- ❖ **TBE 10X** (2lt): 216gr Tris Base + 110gr Boric Acid + 16,6gr EDTA + ddH₂O έως τελικό όγκο τα 2lt.

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ✓ Συσσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- ✓ Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας (Yellow line)
- ✓ Συσσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης (και τροφοδοτικό)/[Scie Plus U2 – DC (Hofer)]

2.5 Εξοπλισμός για την εμφάνιση (χρώση) των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυάμιδης.

ΥΛΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

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

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ✓ Αποστειρωμένο, διπλά αποσταγμένο νερό (ddH₂O)
- ✓ EtOH 100%
- ✓ Acetic acid (Οξικό οξύ) 99% [Riedel – de Haen]
- ✓ Νιτρικός άργυρος (AgNO₃) 99.99% [sds]
- ✓ Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) 99% [Riedel – de Haen]
- ✓ Βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄)
- ✓ Φορμαλδεΐδη (Formaldehyde) 37% [SIGMA]

Επίσης για την θεωρητική ανάπτυξη του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής : BioEdit, REBsites και η ηλεκτρονική βάση δεδομένων GeneBank.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ.

Παρακάτω αναφέρεται η πειραματική πορεία της κάθε μεθόδου που εφαρμόστηκε για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

3.1. Δείγματα – Βιολογικό Υλικό.

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 50 δείγματα ιστού από 50 διαφορετικά προϊόντα τυποποιημένου κρέατος, τα οποία κυκλοφορούν στα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Βόλου. Τα προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση SSCP-PCR αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ
1	ΝΙΚΑΣ Χωριάτικα Λουκάνικα Παραδοσιακά: (Κρέας Χοιρινό 85%, πρωτεΐνη σόγιας)
2	IFANTIS Franka Λουκάνικα: (Κρέας 68%, Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, πρωτεΐνες γάλακτος)
3	SPAR Λουκάνικα Κοκτέιλ: (Κρέας Χοιρινό 60%)
4	MONTORSI Παραδοσιακό Ιταλικό Προσούτο: (Κρέας Χοιρινό μπουτί)
5	IFANTIS Σαλάμι Αέρος: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος)
6	IFANTIS Πάριζα Βραστό: (Κρέας 82%, Χοιρινό, Πρόβειο, πρωτεΐνες γάλακτος , αυγού)
7	LUNCHEON Σαλάμι Σκορδάτο: (Κρέας 74%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη σόγιας, γάλακτος)
8	DIA Σαλάμι μπύρας: (Κρέας 75%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη σόγιας, γάλακτος)
9	DIA Λουκάνικα κοκτέιλ: (Κρέας άνω 60%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη γάλακτος)
10	Σαλάμι Αέρος τύπου ΛΕΥΚΑΔΟΣ: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος)
11	SALCHIHAS Λουκάνικα: (Κρέας Κοτόπουλο, Γαλοπούλα, Χοιρινό)
12	Λουκάνικα ΦΡΑΝΚΦΟΥΡΤΗΣ (Κρέας Κοτόπουλο, Γαλοπούλα, Χοιρινό μηχανικά διαχωρισμένο 59%, Χοιρινό λίπος 5%, Χοιρόδερμα 6%)
13	CAREFOYR Λουκάνικα Κοκτέιλ (Κρέας Χοιρινό 48%, Γαλοπούλα 18%)
14	IFANTIS Τεμάχια Χοιρινής Ωμοπλάτης (Κρέας Χοιρινό 80%, πρωτεΐνες αυγού, γάλακτος)
15	IFANTIS Σαλάμι Αέρος: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος)
16	ΠΑΝΤΕΡΗ Αλλαντικά Τυρολουκάνικα (Κρέας Χοιρινό, Λίπος Χοιρινό, Τυρί γκούντα)
17	IFANTIS Λουκάνικα Χωριάτικα (Κρέας 90% Χοιρινό, Βοδινό, Χοιρινό λίπος)
18	CAREFOYR Παριζάκι (Κρέας Χοιρινό 91%)
19	CAREFOYR Μορταδελάκι (Κρέας Χοιρινό 70%, Χοιρινό λαρδί)
20	365 Ζαμπόν Καπνιστό (Κρέας 75%, πρωτεΐνη σόγιας)
21	B.I.K.H. BACON Ωμοπλάτη (Χοιρινό 70%, πρωτεΐνες γάλακτος, φυτικά και ζωικά έλαια)
22	OSCAR Mayer (Χοιρινό πανσέτα 96%)
23	365 Μορταδέλα Φέτες (Χοιρινό 80%, πρωτεΐνη σόγιας, λαρδί)
24	365 Φέτες Ωμοπλάτη (75% Χοιρινό, Πρωτεΐνη σόγιας)
25	Sofficette CITTERIO BRESAOLA (Κρέας Χοιρινό)
26	HOMBCIRG Σαλάμι SAXONIAN LIVERSAUSAGE (Χοιρινό λίπος 44%, Χοιρινό Συκώτι)
27	365 Σαλάμι Αέρος Μίνι (Κρέας Χοιρινό, Λαρδί)
28	Σαλάμι Αέρος ΝΤΕΛΗΜΑΡΗ (Νωπό Χοιρινό 80%, Χοιρινό Λίπος)
29	365 Φέτες Μπέικον (Κρέας Χοιρινό 85%)
30	365 Σαλάμι Αέρος (Κρέας Χοιρινό - Βοδινό, Λίπος Χοιρινό)
31	Megroni PROCIUOTO CRUDO (Χοιρινό μπουτί)
32	365 ΠΑΡΙΖΑ ΦΕΤΕΣ (65% Χοιρινό, Χοιρινό λίπος)
33	IFANTIS Ζαμπόν μπουτί Light (Κρέας χοιρινό 88%, πρωτεΐνες γάλακτος, αυγού)
34	Λουκάνικο Χωριάτικο Παραδοσιακό Τρικόλων Γαλαξίας (Κρέας χοιρινό, χοιρινό λίπος)
35	Σαλάμι αέρος τύπου Λευκάδος LAKI (Κρέας Χοιρινό βοδινό, Χοιρινό)
36	Σαλάμι αέρος τύπου Λευκάδος Γαλαξίας (Κρέας Χοιρινό, Λίπος Χοιρινό)
37	Σαλάμι Πικάντικο LAKI (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό)
38	Σαλάμι Αέρος MINI LAKI (Κρέας Βοδινό, Χοιρινό)
39	Μορταδέλα Βραστή Γαλαξίας (Κρέας 72% χοιρινό, Πρόβειο, Χοιρινό Λίπος)
40	Λουκάνια BIENNA Γαλαξίας (Κρέας 68% Κρέας χοιρινό, πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος)
41	Λουκάνικα Φράγκα Γαλαξίας (Κρέας 68% Κρέας χοιρινό, πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος)
42	Χοιρινό Ωμοπλάτης Γαλαξίας (Χοιρινό 70%, πρωτεΐνη γάλακτος)
43	Γαλαξίας ΠΙΚ-ΝΙΚ Βραστό (Κρέας Χοιρινό 70%, πρωτεΐνη γάλακτος, σόγιας)
44	ΠΑΡΙΖΑ Γαλαξίας (Κρέας 68% Χοιρινό, Πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος, σόγιας)
45	IFANTIS Ζαμπόν μπουτί Light 2% (Κρέας χοιρινό 88%, πρωτεΐνες γάλακτος, αυγού)
46	Έδεσμα Natarelle Λουκάνικα Φρανκφούρτης (Κρέας Χοιρινό 70%)
47	Έδεσμα Μπέικον Καπνιστό (Χοιρινή Πανσέτα 90%, πρωτεΐνες γάλακτος)
48	Ζαμπόν Light Έδεσμα (Χοιρινό Μπουτί 90%, πρωτεΐνες γάλακτος)
49	Έδεσμα Natarelle Πάριζα (Κρέας Χοιρινό 70%)
50	Λουκάνικα Φρανκφούρτης M.r Grand Μασούτης (Κρέας Χοιρινό-Βοδινό 65%, Χοιρινό Λαρδί, πρωτεΐνη σόγιας)

Πίνακας 1. Τυποποιημένα προϊόντα του κρέατος τα οποία αναλύθηκαν.

3.2 Απομόνωση DNA.

Για την μελέτη της νόθευσης των προϊόντων του κρέατος με άλλα είδη απομονώσαμε mtDNA από τους ιστούς των προϊόντων (δειγμάτων), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνουν οι Asahida et al. (1996) το οποίο τροποποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 50-100mg ιστού και ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία.

1. Τεμαχίζουμε και τοποθετούμε τον ιστό σε φιαλίδια erpendorf των 2ml.
3. Προσθέτουμε 700ml TNES – Urea Buffer και 10μl proteinase K (10mg/ml) και αναδεύουμε έντονα στο vortex.
3. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον κυκλικό αναδευτήρα, ώστε τα δείγματα να περιστρέφονται και μεταφέρονται στον κλίβανο όπου παραμένουν για 1h στους 55°C.
3. Αφού τα βγάλουμε από τον κλίβανο προσθέτουμε 350ml φαινόλη και 350ml χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη (24V:1V) και αναδεύουμε τα δείγματα στο κυκλικό αναδευτήρα για 10min.
3. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C.
3. Λαμβάνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και το τοποθετούμε σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2ml.
3. Επαναλαμβάνουμε ακόμα μια φορά την διαδικασία που αναφέρεται στα βήματα 4, 5 και 6.
3. Προσθέτουμε 700ml χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη (24V:1V), αναδεύουμε στον κυκλικό αναδευτήρα για 10min και στην συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C.
3. Λαμβάνουμε το υπερκείμενο με πολύ προσοχή και το μεταφέρουμε σε φιαλίδιο erpendorf του 1,5ml.
3. Προσθέτουμε 50μl NaOAc και 1ml παγωμένη απόλυτη αιθανόλη. Ανακινούμε ελαφρά και τα δείγματα και τα τοποθετούμε στην κατάψυξη στους -20°C για 20min.
3. Στην περίπτωση όπου μετά την κατάψυξη εμφανίζονται πελέτες DNA, καλό είναι να τις λάβουμε και να τις τοποθετήσουμε σε νέο φιαλίδιο. Αν κάτι τέτοιο δεν συμβεί, φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C, απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml παγωμένη αιθανόλη 70% και φυγοκεντρούμε παρομοίως.
3. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας ταυτόχρονα το ίζημα το οποίο έχει σχηματιστεί να μην μετακινηθεί και το χάσουμε.

3. Στεγνώνουμε τα δείγματα με επώαση στους 37°C για περίπου 1h και προσέχουμε να μην υπάρχουν μικροσταγονίδια στα τοιχώματα του erpendorf.
3. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl αποστειρωμένο ddH₂O.
3. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20 °C για μελλοντική.

Κατά την διάρκεια της απομόνωσης χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα αντιδραστήρια των οποίων ο ρόλος είναι ο εξής:

Το NaCl (που περιέχεται στο TNES – Urea Buffer) ρυθμίζει την οσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε κατάλληλο pH 7.5 το οποίο ρυθμίζεται από το Tris – HCl. 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, συμβάλλει στη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η proteinase K (πρωτεϊνάση K) προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό των λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουλεϊκών οξέων. Το διάλυμα της 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 ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA στην αιθανόλη οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στο συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη.

3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης.

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA , στοχεύοντας πάντα στην απλοποίηση της όλης μεθόδου ταυτοποίησης, χρησιμοποιήσαμε universal primers. Οι primers αυτοί είναι σχεδιασμένοι από πολλά είδη πτηνών, θηλαστικών και ψαριών σε περιοχές που είναι συντηρημένες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μπορούν να δώσουν PCR προϊόν για πολλά διαφορετικά είδη. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

Εκκινητής	Αλληλουχία
B-M.16sRNA.Fw	5'-AYA AGA CGA GAA GAC CC-3'
B-M.16sRNA.Rv	5'-GAT TGC GCT GTT ATC CC-3'

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA. Όπου Y = C or T

Ενισχύσαμε ένα τμήμα του, μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κατσίκι (*Capra hircus*), 247bp όσον αφορά τη γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*) και 239 βάσεων όσον αφορά το γουρούνι (*Sus scrofa*).

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Εκμαγείο DNA	1μl
dNTPs (10 mM each)	1μl
MgCl ₂ (50mM)	2μl
Buffer 10X	5μl
Εκκινητής Fw 50pmol/μl	1μl
Εκκινητής Rv 50pmol/μl	1μl
Taq DNA Polymerase 5U/μl	0,2μl
ddH ₂ O	38,8
Συνολικός όγκος	50μl

Πίνακας 3. Σύσταση διαλυμάτων αντιδράσεων.

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf των 200μl, 1μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης)
2. Ανάλογα του αριθμού των δειγμάτων παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα (master mix) η σύσταση του οποίου περιέχει τις ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα που περιγράφονται στον παραπάνω πίνακα. Το μόνο αντιδραστήριο που θα λείπει από το master mix θα είναι το εκμαγείο DNA το οποίο έχει τοποθετηθεί ήδη στα φιαλίδια erpendorf από το πρώτο βήμα.
3. Μοιράζουμε, σε κάθε erpendorf που περιέχει δείγμα, από 49μl του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.
4. Κλείνουμε καλά το καπάκι του φιαλιδίου και πραγματοποιείται μια σύντομη φυγοκέντρηση (spin).
5. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου.

Στάδιο Αντίδρασης	Θερμοκρασία °C	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95 ⁰ C	4 min
Αποδιάταξη	95 ⁰ C	40 sec
Συγκόλληση Εκκινητών	53 ⁰ C	50 sec
Επιμήκυνση	72 ⁰ C	50 sec
Τελική Επιμήκυνση	72 ⁰ C	10 min

Πίνακας 4. Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA.

6. Ελέγχουμε την επιτυχία της διαδικασίας κάνοντας ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2%.
7. Παρατηρούμε την πηκτή πάνω από την συσκευή υπεριώδους φωτός.

3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Πρόκειται για την ευκολότερη μέθοδο διαχωρισμού και ελέγχου του DNA. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους, καθώς αυτά αρνητικά φορτισμένα κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

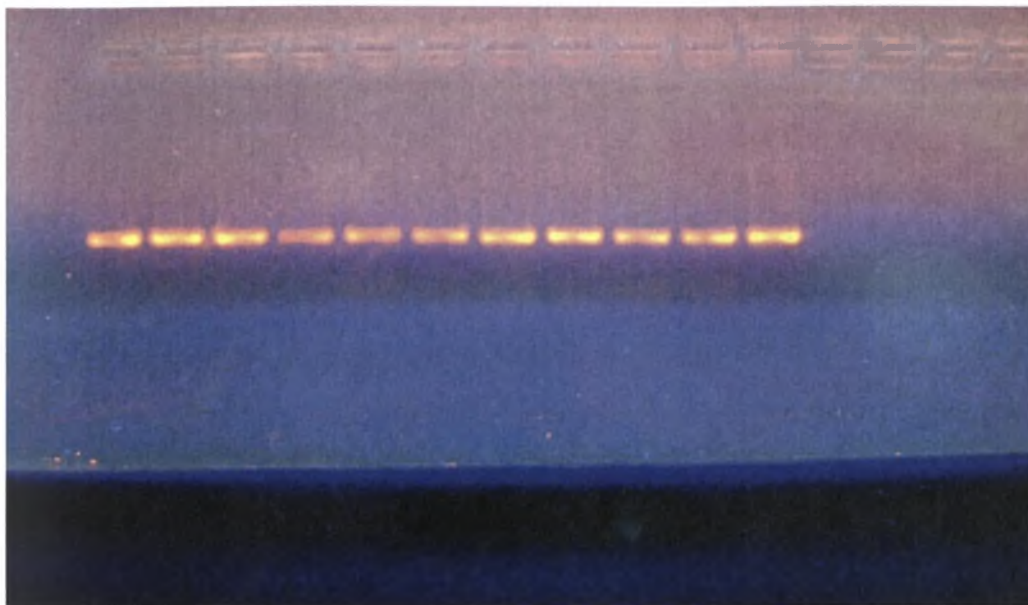
Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας της απομόνωσης όσο και των προϊόντων που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της τεχνικής PCR. Στην πρώτη περίπτωση η εικόνα μας δίνει πληροφορίες για την ακεραιότητα ή τον κατακερματισμό του απομονωμένου DNA, αλλά επίσης και για την ποσότητα η οποία είναι ανάλογη της έντασης. Όσον αφορά το προϊόν της PCR, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων (μη επιθυμητά τμήματα DNA μπορεί να ενισχύθηκαν κατά την διαδικασία της PCR). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

TAE 50X (500ml)

Tris Base 121gr
Acetic Acid 28,5ml
EDTA 0,5M 50ml
ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6X (10ml)

Bromophenol blue 1% w/v 1ml
TBE 20x 0,5ml
Glycerol 5ml
ddH₂O έως τα 1



Εικόνα 7. Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2% προϊόντων PCR.

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Εντός κωνικής φιάλης των 100ml ζυγίζουμε 0,6gr αγαρόζης και προσθέτουμε 30ml διάλυμα TAE 1X. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε πηκτή αγαρόζης με τελική συγκέντρωση 2%. Το διάλυμα TAE 1X παρασκευάζεται αραιώνοντας το διάλυμα stock 50X (20ml σε τελικό όγκο 1lt).
2. Βάζουμε 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 (βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/ml).
4. Προετοιμάζουμε το εκμαγείο στο οποίο θα σχηματιστεί 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 (ειδικό καλούπι) όπου και πολυμερίζεται και με την βοήθεια πλαστικού tip απομακρύνουμε τις φυσαλίδες που πιθανώς έχουν δημιουργηθεί.
6. Περιμένουμε να πήξει η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρούμε τη χτένα και τοποθετούμε την πηκτή στη 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 που ελέγχουμε την απομόνωση αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 2μl DNA.
- Στην περίπτωση που ελέγχουμε τα προϊόντα της PCR τότε αναμειγνύουμε 5ml DNA (προϊόν PCR) με 3μl loading buffer.

10. Τοποθετούμε «φορτώνουμε» τα δείγματα με μικροπιπέτα σε κάθε ένα από τα πηγάδια.

11. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts.

12. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε την πηκτή πάνω σε ειδική συσκευή με λάμπα υπεριώδους φωτός.

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 δεσμεύεται BrEt. Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση ρυθμίζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα.

3.5. Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

Η ανάλυση SSCP όπως έχει ήδη περιγραφεί βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητας τους στο πήκτωμα η οποία μπορεί να προκαλείται από μετάλλαξη ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και την χρώση της πηκτής για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

3.5.1. Αποδιάταξη PCR προϊόντων.

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε denaturation buffer, η σύσταση του οποίου είναι η εξής:

Denaturation buffer

- 95% Formamide
- 0,05% Bromophenol blue
- 0,05 Xylene Cyanol
- 10 Mm NaOH

Σε 5-7μl PCR προϊόντος (ανάλογα με την συγκέντρωση του) προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 2 min στους 95°C, 2 min στους 97°C και 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλινα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλινη κατάσταση

3.5.2. Παρασκευή και ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

1) Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

- Ακρυλαμίδα 75gr
- Bis – acrylamide 2gr
- ddH₂O έως τα 200ml

2) TBE 10x (2lt)

- Tris Base 216gr
- Boric Acid 110gr
- EDTA 16,6gr
- ddH₂O έως τα 2lt

3) Glycerol 50% v/v

4) APS 20% w/v

5) TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν για την δημιουργία μιας πηκτής.

	10%
Acrylamide	6,1875gr
Bis – Acrylamide	0,165gr
Glycerol 50%	6,25 ml
TBE 10X	5ml
TEMED	62,5μl
APS 20%	300μl
H ₂ O	Έως τα 62,5ml
Συνολικός όγκος	62.5ml

Πίνακας 5. Ποσότητες συστατικών που χρειάζονται για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής της πηκτής.
2. Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 6,1875gr Acrylamide + 0,165gr Bis – Acrylamide + 6,25ml Glycerol 50% + 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 ddH₂O έως τα 62,5ml και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη .
5. Προσθέτουμε 62,5μl TEMED και 300μl APS 20% και γρήγορα, πριν πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα και πήξει, περιχύουμε το διάλυμα στη συσκευή παρασκευής της πηκτής.
6. Τοποθετούμε την χτένα για την δημιουργία των πηγαδιών και περιμένουμε περίπου 45min ώστε η πηκτή να είναι έτοιμη για ηλεκτροφόρηση.

Η αρχή της μεθόδου δε 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 πυκνότητας έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα, τα αποτελέσματα του διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα και η πηκτή μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, ηλεκτροφορούνται τα αποδιατεταγμένα δείγματα με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (προέρχεται από αραιώση 1:20 του TBE 10X). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts στους 4⁰C για 12 με 16 ώρες.

3.5.3. Χρώση πηκτής 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 συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο. Για την χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα:

- 1) Διάλυμα 1 (400ml)
 - EtOH 8ml
 - Acetic Acid 0,5 ml
 - ddH₂O έως τα 400ml
- 2) Διάλυμα 2 (200ml)
 - Διάλυμα AgNO₃ 1gr/lt
- 3) Διάλυμα 3 (200ml)
 - NaOH 3gr
 - NaBH₄ 0,01gr
 - Formaldeyde 1ml
 - ddH₂O έως τα 200ml

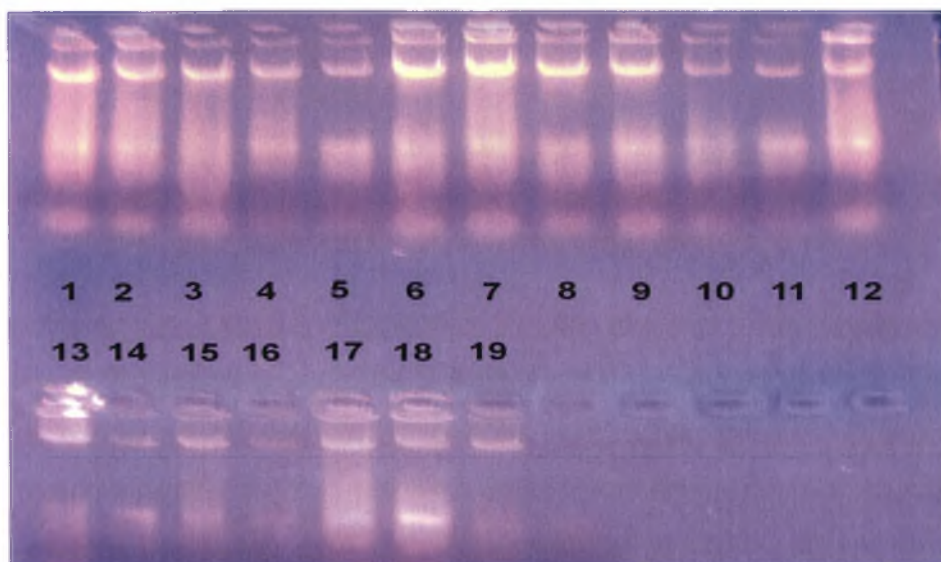
Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Εμβαπτιζουμε την πηκτή σε 200ml Διαλύματος 1 για 3min.
2. Απομακρύνουμε το διάλυμα με την αντλία κενού
3. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 1 & 2.
4. Ξεπλένουμε μια φορά με ddH₂O για 1min και απομακρύνουμε το νερό.
5. Προσθέτουμε το Διάλυμα 2 για 15 min.
6. Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε 2 φορές ddH₂O για 1 min.
7. Απομακρύνουμε το νερό και προσθέτουμε το Διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση των ορατών ζωνών στις πηκτές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν όλα προϊόντα κατεργασμένα και τυποποιημένα και προέρχονται από τα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Βόλου. Ο πίνακας 1, που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρουσιάζει αναλυτικά και τα 50 προϊόντα που αναλύθηκαν καθώς επίσης και το είδος από το οποίο προέρχονται.

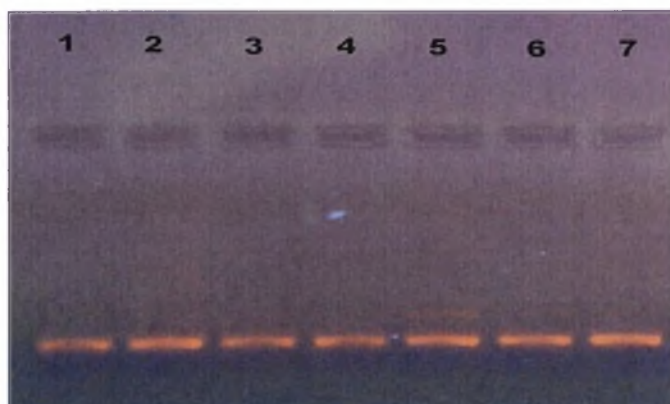
Με την διαδικασία της απομόνωσης του DNA, η διαδικασία της απομόνωσης έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, το υλικό που λάβαμε, ήταν αρκετά καθαρό (απαλλαγμένο από πρωτεΐνες) και ικανό να δώσει ικανοποιητικά PCR προϊόντα. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έγινε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.



Εικόνα 8. Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% του DNA που απομονώθηκε από δείγματα κρέατος. Η αρίθμηση αντιστοιχεί στην αρίθμηση των δειγμάτων του πίνακα 1.

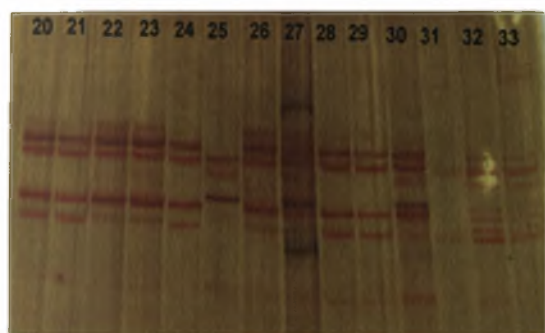
Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης για 19 από τα 50 δείγματα που χρειάστηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης. Οι ζώνες που βρίσκονται στο κάτω μέρος της εικόνας, εκπροσωπούν το μιτοχονδριακό DNA που προέκυψε μετά την απομόνωση. Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος της κάθε ζώνης αποτελούν κατά προσέγγιση ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ένταση των ζωνών και για τα 50 δείγματα που απομονώθηκαν, ήταν έντονες με αποτέλεσμα να θεωρείται αποτελεσματικό το πρωτόκολλο που προτείνουν οι Asahida et al. (1996) για απομονώσεις τέτοιων δειγμάτων (τυποποιημένων κρεάτων).

Στην συνέχεια με την τεχνική της PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 16s RNA και για τα 50 δείγματα. Το τμήμα που πολλαπλασιάστηκε ήταν μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κατσίκι (*Capra hircus*), 247bp όσον αφορά τη γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*) και 239 βάσεων όσον αφορά το γουρούνι (*Sus scrofa*). Η επόμενη εικόνα είναι ενδεικτική της εμφάνισης των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2%.



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% προϊόντων PCR γνωστών ειδών. 1) Χοιρινό, 2) Πρόβειο, 3) Μοσχαρίσιο, 4) Κατσίκι, 5) Κοτόπουλο, 6) Γαλοπούλα, 7) Κουνέλι.

Η εφαρμογή της μεθόδου PCR-SSCP στα 50 δείγματα τυποποιημένων κρεάτων αποκάλυψε 8 διαφορετικά πρότυπα. Κάθε πρότυπο αντιστοιχεί σε διαφορετικό συνδυασμό ειδών. Αυτό προκύπτει ύστερα από σύγκριση των ζωνώσεων των προτύπων που προέκυψαν από την απομόνωση των δειγμάτων μας (τυποποιημένα κρέατα), με τις ζωνώσεις από τις απομονώσεις γνωστών δειγμάτων (ειδών). Παρακάτω φαίνονται ενδεικτικά οι ηλεκτροφορήσεις κάποιων δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης καθώς επίσης και οι ηλεκτροφορήσεις των γνωστών δειγμάτων (ειδών)



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων κρεάτων (δείγματα).



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων κρεάτων (δείγματα).



Εικόνα 12. Ηλεκτροφορήση γνωστών δειγμάτων (ειδών).

Στις εικόνες 10 & 11 διακρίνονται κάποια πρότυπα που προέκυψαν από τις απομονώσεις των δειγμάτων (τυποποιημένα κρέατα). Η αρίθμηση που υπάρχει επάνω στη φωτογραφία αντιπροσωπεύει τα δείγματα που αναλύθηκαν. Στην εικόνα 12 διακρίνονται τα πρότυπα που προέκυψαν από τις απομονώσεις των γνωστών δειγμάτων (ειδών). Η αρίθμηση που υπάρχει επάνω στην φωτογραφία αντιπροσωπεύει τα γνωστά είδη τα οποία έχουν αναλυθεί. Συνολικά, όσον αφορά την ανάλυση των γνωστών ειδών, έχουν ελεγχθεί 5 διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους ώστε να μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι τα πρότυπα που προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση των γνωστών αυτών ειδών είναι ακριβής και δεν υπάρχει πολυμορφισμός. Τα γνωστά είδη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τον έλεγχο των τυποποιημένων προϊόντων είναι τα εξής: (1) πρόβατο (*Ovis aries*), (2) μοσχάρι (*Bos taurus*), (3) κατσίκι (*Capra hircus*), (4) γουρούνι (*Sus scrofa*), (5) κοτόπουλο (*Gallus gallus*), (6) γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo.*), (7) κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα πρότυπα που αποκαλύφθηκαν είναι 8. Από αυτά, τα 5 επαναλαμβάνονταν σε 47 από τα 50 δείγματα (τυποποιημένα κρέατα), ενώ τρία από αυτά δεν κατόρθωσαν να αναγνωριστούν και να ταυτοποιηθούν. Τα πέντε πρότυπα που προέκυψαν και αναγνωρίστηκαν ήταν : 1) Χοιρινό, 2) Βοδινό, 3) Χοιρινό – Βοδινό, 4) Χοιρινό – Γαλοπούλα, 5) Χοιρινό – Βοδινό – Γαλοπούλα. Τα υπόλοιπα 3 πρότυπα που προέκυψαν, σε 3 από τα 50 δείγματα (τυποποιημένα κρέατα), δεν μπόρεσαν να αναγνωριστούν ή να κατηγοριοποιηθούν σε κάποιο από τα 5 γνωστά πρότυπα. Συνεπώς κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω ανάλυση αυτών των προϊόντων ώστε να είμαστε να θέση να γνωρίζουμε τα συστατικά από τα οποία αποτελούνται. Η καλύτερη μέθοδος θα ήταν η αλληλούχηση αυτών των προϊόντων γιατί μόνο έτσι θα μπορέσουμε να αναγνωρίσουμε με σιγουριά τα είδη από τα οποία προέκυψαν αυτά τα προϊόντα.

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	
1	NIKAS Χωριάτικα Λουκάνικα Παραδοσιακά: (Κρέας Χοιρινό 85%, πρωτεΐνη σόγιας)	[Χοιρινό-γαλοπούλα]
2	IFANTIS Francka Λουκάνικα: (Κρέας 68%, Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, πρωτεΐνες γάλακτος)	[Χοιρινό]
3	SPAR Λουκάνικα Κοκτέιλ: (Κρέας Χοιρινό 60%)	[Χοιρινό-γαλοπούλα]
4	MONTORSI Παραδοσιακό Ιταλικό Προσούτο: (Κρέας Χοιρινό μπουτί)	[Χοιρινό]
5	IFANTIS Σαλάμι Αέρος: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος)	[Χοιρινό-Βοδινό]
6	IFANTIS Πάριζα Βραστό: (Κρέας 82%, Χοιρινό, Πρόβειο, πρωτεΐνες γάλακτος, αυγού)	[Χοιρινό-γαλοπούλα]
7	LUNCHEON Σαλάμι Σκορδάτο: (Κρέας 74%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη σόγιας, γάλακτος)	[Χοιρινό]
8	DIA Σαλάμι μπύρας: (Κρέας 75%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη σόγιας, γάλακτος)	[Χοιρινό]
9	DIA Λουκάνικα κοκτέιλ: (Κρέας ανω 60%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη γάλακτος)	[Χοιρινό-Βοδινό-Γαλοπούλα]
10	Σαλάμι Αέρος τύπου ΛΕΥΚΑΔΟΣ: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος)	[Χοιρινό-Βοδινό]
11	SALCHIHAS Λουκάνικα: (Κρέας Κοτόπουλο, Γαλοπούλα, Χοιρινό)	[?]
12	Λουκάνικα ΦΡΑΝΚΦΟΥΡΤΗΣ (Κρέας Κοτόπουλο, Γαλοπούλα, Χοιρινό μηχανικά διαχωρισμένο 59%, Χοιρινό λίπος 5%, Χοιρόδερμα 6%)	[Χοιρινό-γαλοπούλα]
13	CAREFOYR Λουκάνικα Κοκτέιλ (Κρέας Χοιρινό 48%, Γαλοπούλα 18%)	[Χοιρινό-γαλοπούλα]
14	IFANTIS Τεμάχια Χοιρινής Ωμοπλάτης (Κρέας Χοιρινό 80%, πρωτεΐνες αυγού, γάλακτος)	[Χοιρινό]
15	IFANTIS Σαλάμι Αέρος: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος)	[Χοιρινό-Βοδινό]
16	ΠΑΝΤΕΡΗ Αλλαντικά Τυρολουκάνικα (Κρέας Χοιρινό, Λίπος Χοιρινό, Τυρί γκούντα)	[Χοιρινό-Βοδινό]
17	IFANTIS Λουκάνικα Χωριάτικα (Κρέας 90% Χοιρινό, Βοδινό, Χοιρινό λίπος)	[Χοιρινό]
18	CAREFOUR Παριζάκι (Κρέας Χοιρινό 91%)	[?]
19	CAREFOUR Μορταδελάκι (Κρέας Χοιρινό 70%, Χοιρινό λαρδί)	[?]
20	365 Ζαμπόν Καπνιστό (Κρέας 75%, πρωτεΐνη σόγιας)	[Χοιρινό]
21	B.I.K.H. BACON Ωμοπλάτη (Χοιρινό 70%, πρωτεΐνες γάλακτος, φυτικά και ζωικά έλαια)	[Χοιρινό]
22	OSCAR Mayer (Χοιρινό πανσέτα 96%)	[Χοιρινό]
23	365 Μορταδέλα Φέτες (Χοιρινό 80%, πρωτεΐνη σόγιας, λαρδί)	[Χοιρινό]
24	365 Φέτες Ωμοπλάτη (75% Χοιρινό, Πρωτεΐνη σόγιας)	[Χοιρινό]
25	Sofficette CITTERIO BRESAOLA (Κρέας Χοιρινό)	[Βοδινό]
26	HOMBCIRG Σαλάμι SAXONIAN LIVERSAUSAGE (Χοιρινό λίπος 44%, Χοιρινό Συκώτι)	[Χοιρινό]
27	365 Σαλάμι Αέρος Μίνι (Κρέας Χοιρινό, Λαρδί)	[Χοιρινό-Βοδινό]
28	Σαλάμι Αέρος ΝΤΕΛΗΜΑΡΗ (Νωπό Χοιρινό 80%, Χοιρινό Λίπος)	[Χοιρινό]
29	365 Φέτες Μπέικον (Κρέας Χοιρινό 85%)	[Χοιρινό]
30	365 Σαλάμι Αέρος (Κρέας Χοιρινό - Βοδινό, Λίπος Χοιρινό)	[Χοιρινό-Βοδινό-Γαλοπούλα]
31	Megroni PROCIUTO CRUDO (Χοιρινό μπουτί)	[Χοιρινό]
32	365 ΠΑΡΙΖΑ ΦΕΤΕΣ (65% Χοιρινό, Χοιρινό λίπος)	[Χοιρινό]
33	IFANTIS Ζαμπόν μπουτί Light (Κρέας χοιρινό 88%, πρωτεΐνες γάλακτος, αυγού)	[Χοιρινό]
34	Λουκάνικο Χωριάτικο Παραδοσιακό Τρικόλων Γαλαξίας (Κρέας χοιρινό, χοιρινό λίπος)	[Χοιρινό]
35	Σαλάμι αέρος τύπου Λευκάδος LAKI (Κρέας Χοιρινό βοδινό, Χοιρινό)	[Χοιρινό-Βοδινό]
36	Σαλάμι αέρος τύπου Λευκάδος Γαλαξίας (Κρέας Χοιρινό, Λίπος Χοιρινό)	[Χοιρινό]
37	Σαλάμι Πικάντικο LAKI (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό)	[Χοιρινό-Βοδινό]
38	Σαλάμι Αέρος MINI LAKI (Κρέας Βοδινό, Χοιρινό)	[Χοιρινό-Βοδινό]
39	Μορταδέλα Βραστή Γαλαξίας (Κρέας 72% χοιρινό, Πρόβειο, Χοιρινό Λίπος)	[Χοιρινό-Βοδινό]
40	Λουκάνια BIENNA Γαλαξίας (Κρέας 68% Κρέας χοιρινό, πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος)	[Χοιρινό-Βοδινό]
41	Λουκάνικα Φράγκα Γαλαξίας (Κρέας 68% Κρέας χοιρινό, πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος)	[Χοιρινό-Βοδινό]
42	Χοιρινό Ωμοπλάτης Γαλαξίας (Χοιρινό 70%, πρωτεΐνη γάλακτος)	[Χοιρινό]
43	Γαλαξίας ΠΙΚ-ΝΙΚ Βραστό (Κρέας Χοιρινό 70%, πρωτεΐνη γάλακτος, σόγιας)	[Χοιρινό]
44	ΠΑΡΙΖΑ Γαλαξίας (Κρέας 68% Χοιρινό, Πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος, σόγιας)	[Χοιρινό]
45	IFANTIS Ζαμπόν μπουτί Light 2% (Κρέας χοιρινό 88%, πρωτεΐνες γάλακτος, αυγού)	[Χοιρινό]
46	Έδεσμα Naturelle Λουκάνικα Φρανκφούρτης (Κρέας Χοιρινό 70%)	[Χοιρινό]
47	Έδεσμα Μπέικον Καπνιστό (Χοιρινή Πανσέτα 90%, πρωτεΐνες γάλακτος)	[Χοιρινό]
48	Ζαμπόν Light Έδεσμα (Χοιρινό Μπουτί 90%, πρωτεΐνες γάλακτος)	[Χοιρινό]
49	Έδεσμα Naturelle Πάριζα (Κρέας Χοιρινό 70%)	[Χοιρινό]
50	Λουκάνικα Φρανκφούρτης M.r Grand Μασούτης (Κρέας Χοιρινό-Βοδινό 65%, Χοιρινό Λαρδί, πρωτεΐνη σόγιας)	[Χοιρινό-γαλοπούλα]

Πίνακας 6. Προϊόντα τυποποιημένων κρεάτων που αναλύθηκαν καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από την ανάλυσή τους.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι 20 από τα 50 δείγματα που ελέγχθηκαν παρουσιάζουν ένα είδος νόθευσης είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός. Ο παραπάνω πίνακας παρουσιάζει τα προϊόντα που αναλύθηκαν, τη σύστασή τους, η οποία αναγράφεται επάνω στην ετικέτα των προϊόντων καθώς επίσης και τα αποτελέσματα ύστερα από την ανάλυσή τους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται μέσα στην αγκύλη και είναι υπογραμμισμένα ενώ τα αναγραφόμενα συστατικά της ετικέτας παρουσιάζονται μέσα στις παρενθέσεις. Τα προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί νόθευση όπως προκύπτει από τον πίνακα 2 είναι τα εξής:

α/α	Αρ. Δείγματος	ΔΕΙΓΜΑΤΑ
1	1	NIKAS Χωριάτικα Λουκάνικα Παραδοσιακά: (Κρέας Χοιρινό 85%, πρωτεΐνη σόγιας) [Χοιρινό, +γαλοπούλα]
2	2	IFANTIS Franka Λουκάνικα: (Κρέας 68%, Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, πρωτεΐνες γάλακτος) [Χοιρινό, -Βοδινό, -Πρόβειο]
3	3	SPAR Λουκάνικα Κοκτέιλ: (Κρέας Χοιρινό 60%) [Χοιρινό, +γαλοπούλα]
4	5	IFANTIS Σαλάμι Αέρος: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος) [Χοιρινό, Βοδινό, -Πρόβειο]
5	6	IFANTIS Πάριζα Βραστό: (Κρέας 82%, Χοιρινό, Πρόβειο, πρωτεΐνες γάλακτος, αυγού) [Χοιρινό, - Πρόβειο, +γαλοπούλα]
6	7	LUNCHEON Σαλάμι Σκορδάτο: (Κρέας 74%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη σόγιας, γάλακτος) [Χοιρινό, -Πρόβειο]
7	8	DIA Σαλάμι μπίρας: (Κρέας 75%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη σόγιας, γάλακτος) [Χοιρινό, -Βοδινό]
8	9	DIA Λουκάνικα κοκτέιλ: (Κρέας ανω 60%, Χοιρινό, Βοδινό, πρωτεΐνη γάλακτος) [Χοιρινό, Βοδινό, -Γαλοπούλα]
9	10	Σαλάμι Αέρος τύπου ΛΕΥΚΑΔΟΣ: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος) [Χοιρινό, Βοδινό, -Πρόβειο]
10	12	Λουκάνικα ΦΡΑΝΚΦΟΥΡΤΗΣ (Κρέας Κοτόπουλο, Γαλοπούλα, Χοιρινό μηχανικά διαχωρισμένο 59%, Χοιρινό λίπος 5%, Χοιρόδερμα 6%) [Χοιρινό, γαλοπούλα, -Κοτόπουλο]
11	15	IFANTIS Σαλάμι Αέρος: (Κρέας Χοιρινό, Βοδινό, Πρόβειο, Χοιρινό λίπος) [Χοιρινό, Βοδινό, -Πρόβειο]
12	16	ΠΑΝΤΕΡΗ Αλλαντικά Τυρολουκάνικα (Κρέας Χοιρινό, Λίπος Χοιρινό, Τυρί γκούντα) [Χοιρινό, +Βοδινό]
13	17	IFANTIS Λουκάνικα Χωριάτικα (Κρέας 90% Χοιρινό, Βοδινό, Χοιρινό λίπος) [Χοιρινό, -Βοδινό]
14	25	Sofficette CITTERIO BRESAOLA (Κρέας Χοιρινό) [+Βοδινό, -Χοιρινό]
15	27	365 Σαλάμι Αέρος Μίνι (Κρέας Χοιρινό, Λαρδί) [Χοιρινό, -Βοδινό]
16	30	365 Σαλάμι Αέρος (Κρέας Χοιρινό - Βοδινό, Λίπος Χοιρινό) [Χοιρινό, Βοδινό, -Γαλοπούλα]
17	39	Μορταδέλα Βραστή Γαλαξίας (Κρέας 72% χοιρινό, Πρόβειο, Χοιρινό Λίπος) [Χοιρινό, +Βοδινό, -Πρόβειο]
18	40	Λουκάνικα BIENNA Γαλαξίας (Κρέας 68% Κρέας χοιρινό, πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος) [Χοιρινό, -Πρόβειο, +Βοδινό]
19	41	Λουκάνικα Φράγκα Γαλαξίας (Κρέας 68% Κρέας χοιρινό, πρόβειο, πρωτεΐνη γάλακτος) [Χοιρινό, -Πρόβειο, +Βοδινό]
20	50	Λουκάνικα Φρανκφούρτης M.r Grand Μασούτης (Κρέας Χοιρινό-Βοδινό 65%, Χοιρινό Λαρδί, πρωτεΐνη σόγιας) [Χοιρινό, -Βοδινό, +Γαλοπούλα]

Πίνακας 7. Προϊόντα τυποποιημένων κρεάτων που έχουν υποστεί νόθευση.

Τα προϊόντα τα οποία χρήζουν περαιτέρω ανάλυση όπως προκύπτει από τον πίνακα 2 είναι τα εξής:

α/α	Αρ. Δείγματος	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	
1	11	SALCHIHAS Λουκάνικα: (Κρέας Κοτόπουλο, Γαλοπούλα, Χοιρινό)	[?]
2	18	CAREFOYR Παριζάκι (Κρέας Χοιρινό 91%)	[?]
3	19	CAREFOYR Μορταδελάκι (Κρέας Χοιρινό 70%, Χοιρινό λαρδί)	[?]

Πίνακας 8. Προϊόντα τυποποιημένων κρεάτων των οποίων η σύσταση δεν μπόρεσε να αποκαλυφθεί.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Η γνησιότητα των τροφίμων αποτελεί ένα θέμα μείζονος ενδιαφέροντος, για το κοινωνικό σύνολο, καθώς η εσφαλμένη επισήμανση των ειδών των ζώων, που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις. Από την μία πλευρά η εσφαλμένη επισήμανση των τροφίμων αποτελεί εμπορική απάτη όσον αφορά των καταναλωτή, ιδίως όταν πρόκειται για αντικατάσταση ενός είδους από άλλο χαμηλότερης εμπορικής αξίας, ενώ από την άλλη μπορεί να έχει επιπτώσεις για την υγεία, ιδίως στην περίπτωση των καταναλωτών που έχουν ευαισθησία σε αδήλωτα αλλεργιογόνα. Επιπλέον, η εσφαλμένη επισήμανση, οδηγεί και σε εξαπάτηση ανθρώπων οι οποίοι έχουν θρησκευτικούς ή διαιτητικούς περιορισμούς. Επιπρόσθετα οι καταστάσεις κρίσης στα τρόφιμα (π.χ ΣΕΒ, γρίπη των πτηνών, η ασθένεια του αφθώδους πυρετού, ΓΤΟ, κ.λ.π.), έχουν ευαισθητοποιήσει το κοινό όσον αφορά τη σύνθεση των προϊόντων διατροφής. Συνεπώς, επειδή οι ετικέτες δεν παρέχουν επαρκείς εγγυήσεις σχετικά με το πραγματικό περιεχόμενο ενός προϊόντος, είναι αναγκαία η αναγνώριση και η επικύρωση των συστατικών των μεταποιημένων προϊόντων του κρέατος.

Οι πρωτεΐνες του κρέατος και τα μόρια DNA, έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να δημιουργηθούν βιολογικοί δείκτες που είναι χαρακτηριστικοί των ειδών.

Διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση των πρωτεϊνών έχουν περιγραφεί όπως για παράδειγμα τεχνικές που βασίζονται στην ηλεκτροφόρηση, την χρωματογραφία, την φασματομετρία ή την ανοσολογία (Niederer & Bollhalder, 2001; Skarpeid, Kvaal, & Hildrum, 1998). Ωστόσο, η παρουσία και τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών είναι ιστοεξαρτώμενα και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα κατά την διάρκεια της επεξεργασίας του κρέατος να μεταβληθεί η δομή και η σταθερότητα των πρωτεϊνών. Συνεπώς η “ταυτότητα” του μαγειρεμένου κρέατος είναι ιδιαίτερα δύσκολη να

αποκαλυφθεί κατά την διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας, διότι μπορεί να καταστραφούν οι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες του είδους (*Calvo et al., 2001; Gouli, Mingguang, Zhijiang, Hongsheng, & Qiang, 1999*).

Εναλλακτικά, η ανάλυση του DNA αποτελεί μια ελκυστική στρατηγική για την ταυτοποίηση των ειδών του κρέατος. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, το DNA είναι σταθερό κατά την επεξεργασία και δεν εξαρτάται από τον ιστό από τον οποίο προέρχεται (*Martinez & Yman, 1998; Wolf, Rentsch, & Hubner, 1999*). Για τους λόγους αυτούς, οι αναλύσεις που βασίζονται στις τεχνικές των νουκλεϊκών οξέων προτιμούνται για τον προσδιορισμό των ειδών των μεταποιημένων τροφίμων. Αρχικά χρησιμοποιούνταν τεχνικές όπως ο υβριδισμός του DNA, ο οποίος αντικαταστάθηκε βασικά από τεχνικές που βασίζονται στην ενίσχυση γενετικών δεικτών με βάση την PCR. Η πρώτη τεχνική βασίζεται στον προσδιορισμό ενός συγκεκριμένου γενετικού τύπου με την χρήση ειδικών εκκινητών για την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, και η δεύτερη με την αυθαίρετη επιλογή εκκινητών η οποία οδηγεί σε πολλούς γενετικούς τύπους και στην ενίσχυση μη-στοχευόμενων περιοχών του DNA.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μια τεχνική ανάλυσης του DNA και συγκεκριμένα την τεχνική PCR-SSCP. Με αυτή την τεχνική αναλύσαμε ένα τμήμα του γονιδίου 16sRNA του μιτοχονδριακού DNA. Οι *Arslan et al* υποστηρίζουν ότι για την μελέτη κατεργασμένων ειδών κρέατος, το τμήμα που ενισχύεται θα πρέπει να έχει μικρό μέγεθος (της τάξης των 200bp). Το μήκος του τμήματος του γονιδίου που αναλύσαμε ήταν μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κασίκι (*Capra hircus*), 247bp όσον αφορά τη γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*) και 239 βάσεων όσον αφορά το γουρούνι (*Sus scrofa*). Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή επαναληψιμότητα, είναι αξιόπιστη, σχετικά γρήγορη και οικονομική. Αποτελείται από τέσσερα στάδια: i) Απομόνωση του mtDNA από τον ιστό κρέατος, ii) την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών τύπων, iii) την αποδιάταξη των τμημάτων DNA, iv) την ηλεκτροφορήσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Από μια πολύ μικρή ποσότητα ιστού, με την μέθοδο της απομόνωσης, λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών δίνοντας μας έτσι τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου “universal primers” οι οποίοι ανταποκρίθηκαν σε όλα τα είδη. Η χρήση των “universal primers” απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR. Ελαχιστοποιεί τον χρόνο σχεδίασης

των εκκινητών και το κόστος απόκτησης τους, σε σύγκριση με την χρήση εκκινητών εξειδικευμένων στο κάθε είδος.

Όπως προανέφερα, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκαλύφθηκαν 8 πρότυπα. Τα 5 από αυτά επαναλαμβάνονταν σε 47 από τα 50 συνολικά δείγματα που ελέγχθηκαν. Τα υπόλοιπα 3 πρότυπα που βρέθηκαν και που αντιστοιχούν σε 3 προϊόντα του εμπορίου, δεν ταίριαζαν με κανένα από τα γνωστά πρότυπα με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για αυτά. Αυτά τα δείγματα χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης και προτείνουμε την μέθοδο της αλληλούχησης ώστε να είμαστε απόλυτα σίγουροι για το είδος του ζώου που χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή αυτών των προϊόντων. Συνολικά η τεχνική της PCR-SSCP που εφαρμόστηκε, μπόρεσε και ταυτοποίησε το είδος των ζώων, από τα οποία προέρχονται τα προϊόντα που αναλύθηκαν, σε ποσοστό 94%. Το υπόλοιπο 6% που δεν ταυτοποιήθηκε, δεν οφείλεται στο γεγονός ότι δεν καταφέραμε να πάρουμε αποτελέσματα από την τεχνική PCR-SSCP που εφαρμόσαμε, αλλά στο γεγονός ότι δεν βρέθηκε γνωστό πρότυπο από την ανάλυση που κάναμε για αυτά τα προϊόντα. Συνεπώς από όλα τα δείγματα τις έρευνας, κατορθώσαμε να απομονώσουμε DNA και να το πολλαπλασιάσουμε. Το DNA είναι ένα αρκετά θερμοάντοχο μόριο, γεγονός, που του δίνει προβάδισμα στις μελέτες επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος έναντι των πρωτεϊνών. Η επεξεργασία αναφαίρετε σε τόσο σε βιομηχανικές πρακτικές, όσο και σε οικιακές όπως το απλό μαγείρεμα (βρασμός, τηγάνισμα, ψήσιμο). Η θερμική μετουσίωση του DNA εξαρτάται από τον χρόνο θέρμανσης και την θερμοκρασία. (*Patris et al., 2000*).

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε πως, λόγω του υψηλού ποσοστού ταυτοποίησης που επιτεύχθηκε με αυτή την μέθοδο, ο δείκτης αυτός, έχει υψηλή ευαισθησία στα επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος και είναι ικανός να εντοπίσει διαφορετικά είδη κρέατος μέσα στα τρόφιμα. Επιπλέον η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη και απλή. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να καταστήσει αυτό το μοριακό δείκτη πολύτιμο εργαλείο σε ελέγχους ρουτίνας, για την διαπίστωση της προέλευσης του κρέατος στις επιχειρήσεις εστίασης (εστιατόρια, ξενοδοχεία) αλλά και για την αυθεντικότητα τυποποιημένων προϊόντων του κρέατος που πωλούνται σε καταστήματα ειδών διατροφής.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- Aguadé, M.W., Meyers, A.D., Long, and Langley, C.H.. (1994).** Reduced DNA sequence polymorphism in the *su(s)* and *su(w^a)* regions of the *Drosophila melanogaster* as revealed by SSCP and stratified DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 4658-4662.
- A. Di Pinto, V.T. Forte, M.C. Conversano, G.M. Tantillo (2005).** Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food control*, 16: 391 – 394.
- Ali Arslan, O. Irfan Ilhak, Mehmet Calicioglu (2006).** Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat science* 72: 326 – 330.
- Alberts et al., B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (1998).** *Essential Cell Biology. An introduction to the Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Allen, R. C. & Budowle, B. (1994).** *Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids: Selected Techniques.* W. de Gruyter, Berlin
- Ananás Pascoal, Marta Prado, Julia Castro, Alberto Cepeda, Jorge Barros-Velazquez (2004).** Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. *Eur. Food Res. Technol* 218:306-312.
- Ansorge, W., Voss, H. & Zimmerman, J. (1997).** DNA Sequencing Strategies: Automated and Advanced Approaches, EMBO Practical Course. Wiley, New York.
- Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T., Meylan, A.B & Bermingham, E. (1992).** Mitochondrial DNA evolution at turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines. *Molecular Biology and Evolution* 9:457-473
- Avise, J.C., (1994).** Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, pp. 511
- Avise JC (2000).** Phylogeography. The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA, pp.447
- Beebe, T. C. & Rowe G. (2004).** *An introduction to Molecular Ecology.* Oxford University Press, UK 246 pp.
- Beridze, T. G. (1986)** Satellite DNA. Springer-Verlag, New York 149 pp.
- Brodmann, P.D., & Moor, D. (2003).** Sensitive and semi – quantitative TaqMan real – time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*)

- and the detection of the family Mammalia in food and feet. *Meat Science*, 65, 599-607.
- Buntjer, J. B., & Lenstra, J. A. (1998).** Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 121-127.
- Calvo, J. H., Zaragoza, P., & Osta, R. (2001).** Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pate. *Poultry Science*, 80, 522–524.
- Gasparich, G.E., Silva, J.G., Han, H.Y., McPheron, B.A., Steck, G.J. & Sheppard, W.S. (1997).** Population genetic structure of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) and implications for worldwide colonisation patterns. *Annals of the Entomological Society of America* 90, 790–797.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., R.C.& Gelbart, W.M. (2002).** An Introduction to Genetic Analysis, 7th Edition, W.H. Freeman and Company, New York, pp. 626-627.
- Jorde, L. B., Bamshad, M., & Rogers, A.R.(1998).** Using Mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. *BioEssays*,20,126-136.
- Jorge H. Calvo, Clementina Rodellar, Pilar Zaragoza, And Rosario Osta. (2002).** Beef-and Bovine-Derived Material Identification in Processed and Unprocessed Food and Feed by PCR Amplification. *Agricultural and Food Chemistry* 50: 2562 – 5264.
- Heimpel, G.E., Antolin, M.F., Franqui, R.A. & Strand, M.R. (1997).** Reproductive isolation and genetic variation between two 'Strains' of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 9, 149–156.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992)** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413–417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993)** Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030.
- Koh, M. C., Lim, C. H., Chua, S. B., Chew, S. T., & Phang, S. T. W. (1998).** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science*, 48(3/4), 275-258.
- Lee, C. J., & Chang, G. J. (1994).** Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD – PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Science International*. 67, 103 – 107.

- Lockley AK, Bardsley RG (2000).** *Trends Food Sci Technol* 11:67–77
- Loxdale, H.D. & Lushai, G. (1998).** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88, 577-600.
- 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.
- Martinez, I., & Yman, M. I. (1998).** Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International*, 31, 459–466.
- McPherson, M.J. & Moller, S.G. (2000).** *PCR the basics from background to bench.* BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Meyer A. (1993).** Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2 (Eds P.W. Mochachka, & T.P. Mommsen), pp. 1-38. Elsevier, Amsterdam.
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J. (1994).** Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*, 78, 1542-1551.
- Moritz, C., (1994).** Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 363–373.
- Mullis, K. (1983)** General nature of genetic code for proteins. *Nature* **192**, 1227-1232.
- Mullis, K.B., Falloona, F.A (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155: 335-350.
- Niederer, M., & Bollhalder, R. (2001).** Identification of species specific central nervous tissue by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)—a possible method for supervision of meat products and cosmetics. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 92, 133–144.
- O. İrfan İlhak, Ali Arslan (2007).** Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. *Vet. Anim. Sci* 31:159 –163.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, (1989) T.** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770.
- Partis L., Croan B., Guo Z., Clark R., Coldham T., Murby J. (2000).** Evaluation of DNA fingerprinting method for determining the species origin of meat. *Meat science* 54: 369-376.

- Peter Brodmann (2002).** Part II. Species identification. Development and validation of species identification. Extracted from PhD.
- Powers, T.O., Jensen, S.G., Kindler, S.D., Stryker, C.J. & Sandall, L.J. (1989).** Mitochondrial divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Annals of the Entomological Society of America* 82, 298–302.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001)** *Molecular cloning (A lab manual)*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Scarpeid, H. J., Kvaal, K., & Hildrum, K. I. (1998).** Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectrofocusing protein profiles. *Electrophoresis*, 19, 3103–3109
- Sunnucks, P. (2000)** Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Evolution* 5, 199- 203.
- Sweetman, W. A., Rash, R., Sykes, B., Beighton, P., Hecht, J. T., Zabel, B., Thomas, J. T., Boot-Handford, R., Grant, M. E., and Wallis, G. A. (1992).** SSCP and segregation analysis of the human type X collagen gene (COL10A1) in heritable forms of chondrodysplasia. *American Journal of Human Genetics* 51:841-849.
- Wickner, R. B. (1974).** *DNA Replication Methods in Molecular Biology*. Volume 7. Dekker, New York.
- Wilson, A.C., Can, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M., (1985).** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal Linnaeus Society*. 26, 375-400.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hubner, P. (1999).** PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1350–1355.
- Wolstenholme, D.R. (1992).** Animal mitochondrial DNA: structure and evolution *International Review of Cytology* 141:173-216.
- Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005).** Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75-85.
- Zhang, G., Zheng, M., Zhou, Z., Ouyang, H., & Lu, Q. (1999).** Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat science*, 51, 223 – 236.
- Χατζόπουλος, Π. (2001).** *Βιοτεχνολογία Φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

7.1 Παρασκευή πηκτής Αγαρόζης (50 ml)

- Σε κωνική φιάλη τοποθετούνται 50 ml διαλύματος TAE και 1 gr αγαρόζης
- Το μίγμα τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα όπου αναδεύεται με προσθήκη θέρμανσης, μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- Αφού αφηθεί το διάλυμα για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη 1 μl βρωμιούχου αιθιδίου.
- Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται στη συσκευή δημιουργίας της πηκτής.
- Το διάλυμα αφήνεται στη συσκευή μέχρι να στερεοποιηθεί (περίπου 30 min).

7.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

Για τη παρασκευή 75 ml διαλύματος πολυακρυλαμίδης 8% ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Σε 20 ml H₂O διπλής απόσταξης (dd) γίνεται προσθήκη:
 - ✓ 31,5 gr ουρίας
 - ✓ 3,75 ml διάλυμα TBE 20X
 - ✓ 5,78 gr Ακρυλαμίδης
 - ✓ 0,2 gr Bis-Acrylamide
- Με τη βοήθεια θέρμανσης το παραπάνω μίγμα αναδεύεται ώσπου να ομοιογενοποιηθεί και να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τα 75 ml με H₂O dd.

*** Αμέσως πριν από τη χρήση, προσθέτουμε στο διάλυμα:

- (1) 37,5 μl TEMED
- (2) 200 μl Ammonium Persulfate (APS) 20%

Τα παραπάνω διαλύματα επιτρέπουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Οπότε μετά την προσθήκη τους γίνεται μια σύντομη ανάδευση του μίγματος και ακολουθεί γρήγορη τοποθέτηση του διαλύματος στη συσκευή δημιουργίας της πηκτής.

Ο χρόνος σε αυτό το στάδιο είναι πολύ κρίσιμος. Αν υπάρξει καθυστέρηση στη τοποθέτηση του διαλύματος υπάρχει κίνδυνος η πηκτική να στερεοποιηθεί εκτός συσκευής και να χρειαστεί το διάλυμα να παρασκευαστεί εκ νέου.

7.3 Διάλυμα TBE 20X

Το διάλυμα TBE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη προετοιμασία πηκτής και ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης.

Σε φιάλη του ενός λίτρου γίνεται προσθήκη:

121 gr Tris – Base (Merck/1.08382.0500)

61,7 gr Boric Acid (Βορικό οξύ)

80 ml EDTA 0,5 M pH 8

Προσθέτουμε ύδωρ μέχρι να συμπληρωθεί το 1 λίτρο

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου

7.4 Διάλυμα TAE 50X

Το TAE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη προετοιμασία πηκτής και ηλεκτροφόρησης αгарόζης.

Σε φιάλη του ενός λίτρου γίνεται προσθήκη:

242 gr Tris - Base (Merck/1.08382.0500)

57 gr Acetic Acid (Sigma/E - 7889)

100 ml EDTA

7.5 Διάλυμα EDTA 0.5 M (pH: 8)

- Σε 800 ml ύδατος γίνεται προσθήκη 186,1 gr EDTA και το διάλυμα τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα.
- Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης γίνεται ταυτόχρονη προσθήκη NaOH και μετράται συνεχώς το pH του διαλύματος μέχρι να φτάσει τη τιμή 8. Η ποσότητα του NaOH ποικίλει αλλά συνήθως ξεπερνάει τα 20 gr.
- Το EDTA δεν διαλύεται αν το pH δεν φτάσει τη τιμή 8.
- Εάν απαιτείται, μετά τη διάλυση το pH μπορεί να ρυθμιστεί σε άλλη τιμή.
- Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.