

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού
μοσχαρίσιου κρέατος σε μίγματα κρέατος**

Μωϋσίδου Ελισάβετ - Λίζα

ΛΑΡΙΣΑ, 2014

**Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού
μοσχαρίσιου κρέατος σε μίγματα κρέατος**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:
(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών
Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας.

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας
Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας.

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής
Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
1. Το κρέας	8
1.1 Γενικά... ..	8
1.2. Διατροφική αξία κρέατος.....	9
1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος.....	11
1.4. Παραγωγή και κατανάλωση κρέατος στον κόσμο και στην Ελλάδα.....	12
1.5. Προέλευση μοσχαρίσιου κρέατος.....	14
2. Επισήμανση και ιχνηλασιμότητα των τροφίμων	15
2.1. Επισήμανση των τροφίμων.....	15
2.2. Ιχνηλασιμότητα των τροφίμων	17
3. Αυθεντικότητα και Ταυτοποίηση των τροφίμων.....	24
4. Μοριακοί Δείκτες.....	29
4.1. Γενικά	29
4.2. Μιτοχονδριακό DNA.....	31
4.3. Περιοχή 12S rRNA.....	36
5. Σκοπός	38
6. Πειραματική πορεία-μέθοδοι.....	38
6.1. Δείγματα	38
6.2. Απομόνωση του DNA	39
6.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	40
6.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) .	44
6.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction - Real time PCR).....	50
6.6. Διαφορετικές μεθοδολογίες για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR)	57
6.7. Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτή.....	61
6.8. Μετρήσεις real-time PCR	63
7.Αποτελέσματα	66
7.1. Απομόνωση DNA.....	66
7.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	66
7.3 Έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης.....	67
7.4. Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα	69
7.5. Έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης σε μείγματα κρέατος.....	70
7.6. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων.....	71
8. Συζήτηση.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κρέας και τα προϊόντα με βάση το κρέας, έχουν υψηλή διατροφική αξία και βρίσκονται σε υψηλή θέση ανάμεσα στις προτιμήσεις των καταναλωτών. Λόγω της αυξημένης κατανάλωσης κρέατος, και κυρίως του βόειου κρέατος, τεράστιες ποσότητες ζωικών ειδών διακινούνται καθημερινά σε όλο τον κόσμο δημιουργώντας συνολικά μεγάλο τζίρο γύρω από αυτά τα προϊόντα. Τα οικονομικά αυτά οφέλη κατέστησαν σύνθηρες φαινόμενο στη βιομηχανία κρέατος τη νοθεία κρεάτων και την παραπλανητική σήμανση, οδηγώντας τους καταναλωτές να προβληματίζονται ολοένα και περισσότερο για τα προϊόντα που καταναλώνουν.

Η ανάγκη για ταυτοποίηση και ιχνηλασιμότητα του κρέατος αποκτά ακόμα μεγαλύτερη σημασία, αν αναλογιστούμε τις κρίσεις σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων (διατροφικά σκάνδαλα) και την αυξημένη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών, όσον αφορά τη σύνθεση των τροφίμων για λόγους ηθικούς, θρησκευτικούς, οικονομικούς, και διατροφικούς.

Ο προσδιορισμός της προέλευσης των τροφίμων και η εξακρίβωση των επισημάνσεων στις ετικέτες έχει γίνει πρωτεύουσας σημασίας, για να υποστηριχτεί το δίκαιο εμπόριο, η προστασία των δικαιωμάτων των καταναλωτών καθώς και για να διασφαλιστεί η τήρηση των κανονισμών και να επιβληθούν οι ανάλογες ποινές όταν χρειάζεται. Για την επίλυση του προβλήματος απαιτείται η εύρεση αξιόπιστων και ευαίσθητων μεθόδων αναγνώρισης της νοθείας.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με βάση το DNA, για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση βόειου κρέατος σε μείγματα μοσχάρι-χοιρινό σε διάφορες προσμίξεις, λόγω της σταθερότητάς του υπό υψηλές θερμοκρασίες, πιέσεις και χημικές επεξεργασίες που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία των τροφίμων.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο τμήμα 12S rRNA του μιτοχονδριακού DNA, που απομονώθηκε από μυϊκό ιστό. Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν ήταν η PCR και η real-time PCR, που χρησιμοποιούνται συχνά για τον εντοπισμό των ειδών προέλευσης στα τρόφιμα ως αποτέλεσμα της υψηλής εξειδίκευσης και ευαισθησίας. Αρχικά ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR τμήμα του γονιδίου 12S rRNA για το μοσχάρι με τους αντίστοιχους εκκινητές και έγινε έλεγχος για διασταυρούμενη ενίσχυση άλλων ζωικών ειδών (χοιρινό, γαλοπούλα και κοτόπουλο) από τους ίδιους εκκινητές. Στην συνέχεια έγινε έλεγχος με την μέθοδο της real-time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR green για να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση των εκκινητών, στην οποία θα είχαμε την καλύτερη απόδοση (Efficiency, E) της αντίδρασης καθώς και για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών μοσχάρι, γαλοπούλα, κοτόπουλο και χοιρινό. Τέλος, με την μέθοδο της real-time PCR και χρησιμοποιώντας ανιχνευτή Taqman δημιουργήθηκαν τέσσερις διαφορετικές καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων DNA.

Με την χρήση του γονιδίου 12S rRNA και την μέθοδο real-time PCR βελτιώνεται η ακρίβεια της μεθόδου και είναι εφικτή η δημιουργία καμπύλων αναφοράς για την ποσοτικοποίηση DNA σε άγνωστα δείγματα. Η μέθοδος κρίθηκε ικανή για την ανίχνευση ειδών κρέατος σε μείγματα κρέατος και τη διαφοροποίηση χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας σε προϊόντα κρέατος.

ABSTRACT

Meat and meat products have a high nutritional value and they occupy an important position among consumers preferences. Due to the increased consumption of meat, especially beef, huge quantities of meat products are moving daily around the world, receiving a high amount of money. Because of these economic benefits meat adulteration and misleading labeling have become commonplace in the meat industry increasing consumers concern about the products they consume.

The need for identification and traceability of meat acquires even greater importance given the crises on food safety (food scandals) and the increased consumer awareness regarding the composition of food they eat for moral, religious, economic, and nutritional reasons.

The traceability of food and the correct labeling have become of primary importance in order to support fair trade, protection of consumer rights and to ensure compliance with the regulations and to impose appropriate penalties where it is necessary. To solve this problem requires developing a reliable and sensitive method to identify adulteration.

In this study, DNA-based molecular techniques were applied, for the identification and quantitation of bovine meat in binary pork/beef muscle mixtures in various quantities, because of its stability at high temperatures, pressures and chemical treatments used in the processing of foodstuffs.

The analysis was performed in the 12S rRNA gene of the mitochondrial DNA, which was isolated from muscle tissue. The methods employed were PCR and real-time PCR, which are often used to identify origin of species in food due to high specificity and sensitivity. Initially a segment of the 12S rRNA gene of the calf was amplified with the PCR method and its species-specific primers and the primers were checked for cross-reactivity with sequences of other species (pork, turkey and chicken). Then, with the method of real-time PCR using SYBR green dye, we tried to determine the appropriate concentration of species-specific primers for optimum reaction efficiency and furthermore we checked for cross-reactivity between species using calf, turkey, chicken and pork. Finally, using the method of real time PCR with Taqman probe we created four different standard curves for the quantification of unknown DNA samples.

Using the 12S rRNA gene and the real-time PCR method we improve the accuracy of the method and the establishment of standard curves was possible for quantifying DNA in unknown samples. This method was able to differentiate meat species in binary mixtures and to distinguish meat product from other related species, so it is consider a useful tool for monitoring adulteration in meat products.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο για την συνεχή καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα στάδια της διατριβής μου, καθώς και τους διδάκτορες Γιαννούλη Θεμιστοκλή και Σαρρή Κωνσταντίνα, για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές τους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο.

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

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2014

Μωϋσίδου Ελισάβετ -Λίζα

1. Το κρέας

1.1. Γενικά

Ως «κρέας», σύμφωνα με τον «Κώδικα Τροφίμων και Ποτών», χαρακτηρίζονται τα τμήματα που λαμβάνονται από το σώμα των θηλαστικών ζώων και των πτηνών μετά τη σφαγή τους και τα οποία είναι κατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου. Τα είδη κρέατος διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, το λευκό και το ερυθρό κρέας. Το λευκό κρέας είναι το κρέας των πουλερικών (κοτόπουλο, γαλοπούλα) και των ψαριών, ενώ το κόκκινο κρέας είναι το κρέας από το αρνί, το μοσχάρι και το χοιρινό. Το μοσχαρίσιο κρέας, θεωρείται το κατεξοχήν κόκκινο κρέας κι αυτό οφείλεται στην περιεκτικότητά του σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, την μυοσφαιρίνη. Το οξυγόνο μεταφέρεται στους μύες μέσω των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος και η μυοσφαιρίνη είναι μία από τις πρωτεΐνες του κρέατος που το «συγκρατούν» στους μύες. Άρα η ποσότητα μυοσφαιρίνης στους μύες των ζώων καθορίζει και το χρώμα τους.

Ως «προϊόντα κρέατος» χαρακτηρίζονται τα τρόφιμα, τα οποία παρασκευάζονται από κρέας με την ευρεία έννοια του όρου, δηλαδή από το σύνολο των ζωικών ιστών που είναι κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση με την εφαρμογή της κατάλληλης τεχνολογίας. Τα προϊόντα κρέατος είναι πολυάριθμα και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

A. Προϊόντα με βάση το κρέας (ή προϊόντα αλλαντοποιίας):

A.1. Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας (η μεταποιητική διαδικασία εξυγίανσης επιτυγχάνεται με τη θερμική τους επεξεργασία).

A.1.a. Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας από τεμάχια κρέατος (π.χ. ζαμπόν, σπάλα, μπέικον, φιλέτο ή στήθος γαλοπούλας κλπ).

A.1.β. Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας από τεμαχισμένο (σύγκοπτο) κρέας (π.χ. λουκάνικα Φρανκφούρτης, πάριζα, παριζάκι, μορταδέλες κλπ).

A.2. Προϊόντα ζύμωσης & ωρίμανσης (ο αρχικός παράγοντας συντήρησης των προϊόντων αυτών είναι το μαγειρικό αλάτι, το οποίο συμβάλλει στη πτώση της τιμής του ενεργού νερού. Οι σημαντικότερες όμως επεξεργασίες είναι η ζύμωση που συνδέεται με την πτώση της τιμής του pH της μάζας τους και η ωρίμανση).

A.2.a. Προϊόντα ζύμωσης-ωρίμανσης από τεμάχια κρέατος (π.χ. χοιρομέρι/ζαμπόν ωρίμανσης, καπνιστό χοιρομέρι Μέλανα Δρυμού κλπ).

A.2.β. Προϊόντα ζύμωσης - ωρίμανσης από τεμαχισμένο κρέας (π.χ. αλλαντικά αέρος διατηρητά, σουτζούκια και επαλειφόμενα αλλαντικά ζύμωσης-ωρίμανσης κλπ).

A.3. Προϊόντα μερικής ζύμωσης/ημίξηρα (είναι προϊόντα από τεμαχισμένο κρέας και αποτελούν μια ενδιάμεση κατηγορία μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης-ωρίμανσης και των προϊόντων θερμικής επεξεργασίας π.χ. σαλάμι μπύρα).

A.4. Προϊόντα διπλής θερμικής επεξεργασίας (ένα μέρος ή και όλη η ποσότητα των πρώτων υλών, πριν από τον τεμαχισμό τους υποβάλλονται σε θέρμανση συνήθως στους 100°C π.χ. αλλαντικά ήπατος (πατέ), φουά-γκρα, πηκτές, αλλαντικά αίματος κλπ).

Β. Παρασκευάσματα κρέατος (είναι τα προϊόντα που περιγράφονται στο Παράρτημα Ι, σημείο 1.15 του Κανονισμού (ΕΚ) 853/2004):

Β.1. Παρασκευάσματα από τεμάχια κρέατος [προϊόντα που παράγονται από τεμάχια κρέατος σε αυτοτελή κατάσταση (σνίτσελ) ή τοποθετημένα με ειδικό για το είδος του προϊόντος τρόπο (γύρος, σουβλάκι) π.χ. γύρος, σουβλάκι, σνίτσελ, κοκορέτσι, γαρδούμπα, ρολά κρέατος κλπ].

Β.2. Παρασκευάσματα από σύγκοπτο κρέας (προσσκευασμένα παρασκευάσματα νωπού κιμά του παρ. II ΚΑΝ 1333/2008. Π.χ. μπιφτέκι, σουτζουκάκι, κεμπάπ, ντονέρ, σεφταλιά κλπ).

Β.3. Μορφοποιημένα παρασκευάσματα κρέατος (η μορφοποίηση σχετίζεται με το σχήμα του τελικού προϊόντος που μπορεί να προκύψει με πίεση σε τεμάχιο κρέατος σε καλούπι ή με την ένωση τεμαχίων με επιτρεπόμενες συνδετικές ύλες π.χ. μορφοποιημένο σνίτσελ, μορφοποιημένο στήθος κοτόπουλο, κοτομπουκιές κλπ).

Β.4. Μη θερμικά επεξεργασμένα νωπά προϊόντα (στην κατηγορία αυτή υπάγονται μόνο λουκάνικα που ενθικεύονται σε βρώσιμα φυσικά περιβλήματα και μπορούν να υποστούν κάπνιση μόνο για βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτήρων π.χ. παραδοσιακά χωριάτικα λουκάνικα).

Γ. Κονσέρβες κρέατος (διάφορα προϊόντα με βάση το κρέας ή παραλλαγές αυτών, τα οποία εγκλείονται αεροστεγώς σε μεταλλικούς, πλαστικούς ή γυάλινους περιέκτες και υποβάλλονται σε θερμική επεξεργασία με στόχο την αποστείρωσή τους π.χ. κορν μπιφ, κονσέρβες προϊόντων αλλαντοποιίας κλπ).

Δ. Παράγωγα κρέατος (π.χ. ζωμοί, κονσομέ, σούπες, σάλτσες, εκχύλισμα κρέατος, ζελατίνη κλπ). (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 91)

1.2. Διατροφική αξία κρέατος

Το κρέας και τα προϊόντα κρέατος μπορούν να είναι μέρος μιας ισορροπημένης διατροφής συμβάλλοντας στην διατήρηση της υγείας με πολύτιμα θρεπτικά συστατικά. Αποτελούν συμπυκνωμένη πηγή υψηλής ποιότητας πρωτεΐνης και η σύνθεσή τους από αμινοξέα αντισταθμίζει συνήθως τις ελλείψεις που μπορεί να έχει ο οργανισμός. Παρέχουν σίδηρο, μαγνήσιο, ψευδάργυρο και είναι πλούσια πηγή για μερικές από τις βιταμίνες της ομάδας Β. Ταυτόχρονα, όμως, αποτελεί και πηγή κορεσμένων («κακών») λιπαρών και χοληστερόλης. Οι μελέτες το έχουν κατά καιρούς συνδέσει με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, καθώς και με διάφορες μορφές καρκίνου, γεγονός που το κατατάσσει υψηλά στην πυραμίδα, γι' αυτό συνιστάται η «χαμηλή κατανάλωση» του. Τα σημαντικότερα από τα συστατικά του κρέατος είναι:

- **Πρωτεΐνες:** Οι πρωτεΐνες αποτελούν συστατικό κάθε ιστού και οργάνου και είναι απαραίτητες για τη σωστή και ομαλή λειτουργία του οργανισμού, καθώς και για την αύξηση και ανάπτυξή του. Η βιολογική αξία της πρωτεΐνης δεν εξαρτάται μόνο από την ποσότητά της, αλλά και από τα αμινοξέα που την απαρτίζουν. Η πρωτεΐνη του κρέατος περιέχει μία πλήρη και ισορροπημένη αλληλουχία αμινοξέων, γεγονός που την καθιστά «υψηλής ποιότητας».

- **Λιπαρά:** Το λίπος είναι ένα βασικό συστατικό που πρέπει να προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας. Προστατεύει τα οστά και τα όργανα, βοηθά στη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος και αποτελεί δομική ουσία των κυτταρικών μεμβρανών που περιβάλλουν, προφυλάσσουν και δίνουν σχήμα στα κύτταρά μας. Το λίπος του κρέατος αποτελεί μία συμπυκνωμένη πηγή ενέργειας, πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων καθώς και το όχημα με το οποίο μεταφέρονται ορισμένες λιποδιαλυτές βιταμίνες στο σώμα μας. Το κρέας περιέχει τόσο «καλά» μονοακόρεστα, όσο και «κακά» κορεσμένα λιπαρά.
- **Σίδηρος:** Παρόλο που υπάρχει σε αρκετά τρόφιμα, το κρέας αποτελεί την βασικότερη πηγή αιμικού (ζωικού) σιδήρου, ενός τύπου σιδήρου που απορροφάται και αφομοιώνεται από το σώμα σε μεγαλύτερο ποσοστό, σε σχέση με το σίδηρο που υπάρχει στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, όπως για παράδειγμα τα λαχανικά, τα όσπρια και τα δημητριακά. Η έλλειψη σιδήρου αποτελεί μία από τις πιο κοινές ανεπάρκειες στον ευρωπαϊκό χώρο και έχει δυσμενή συμπτώματα, όπως η κόπωση, η αδυναμία και η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Όσο πιο κόκκινο είναι το κρέας, τόσο περισσότερο σίδηρο περιέχει και η τακτική κατανάλωση κρέατος, που συχνά υπερβαίνει τη συχνότητα των συστάσεων, είναι ένας τρόπος για να αντιμετωπισθεί η ανεπάρκεια σιδήρου σε περιπτώσεις σιδηροπενικής αναιμίας.
- **Ψευδάργυρος:** Ο ψευδάργυρος είναι ένα στοιχείο απαραίτητο για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή, που ενισχύει την άμυνα του οργανισμού και βοηθά στην επούλωση των τραυμάτων. Ο ψευδάργυρος του κρέατος προσλαμβάνεται και χρησιμοποιείται αποτελεσματικά από τον οργανισμό.
- **Σελήνιο:** Το κρέας είναι μία σημαντική πηγή σεληνίου, ενός ανόργανου στοιχείου που εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και την επιδιόρθωση του DNA. Η περιεκτικότητα του κρέατος σε σελήνιο εξαρτάται άμεσα από την περιεκτικότητα του εδάφους σε σελήνιο, αφού αυτό καθορίζει τη σύσταση των καρπών από τους οποίους τρέφονται τα ζώα.
- **Βιταμίνη B₁₂:** Το κρέας περιέχει ένα ευρύ φάσμα βιταμινών του συμπλέγματος B, με πιο σημαντική τη B₁₂. Η βιταμίνη B₁₂ είναι απαραίτητη προκειμένου να δομηθεί σωστά το DNA και έχει πολλαπλές λειτουργίες στο σώμα, καθώς συμμετέχει στην παραγωγή αίματος και συμβάλλει στην καλή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η ανεπάρκεια της B₁₂ μπορεί να προκαλέσει νευρολογικές δυσλειτουργίες.

Πίνακας 1.1: Όλα τα διατροφικά στοιχεία του βόειου κρέατος σύμφωνα με την έκθεση του USDA 2014

	Αξία στα 100g		Αξία στα 100g		Αξία στα 100g
Νερό	61.04g	Βιταμίνες		Τρυπτοφάνη	0.31g
Ενέργεια	210Kcal	Ασκουρβικό οξύ	0	Θρεονίνη	1.214g
Πρωτεΐνη	27.59g	Θειαμίνη	0.089mg	Ισολευκίνη	1.173g
Ολικό λίπος	11.07g	Ριβοφλαβίνη	0.305mg	Λευκίνη	2.219g
Ιχνοστοιχεία		Νιασίνη	4.268mg	Λυσίνη	2.412g
Ca	14mg	Βιταμίνη B6	0.397mg	Μεθειονίνη	0.784g
Fe	3.01mg	Βιταμίνη B9	7μg	Κυστίνη	0.290g
Mg	23mg	Βιταμίνη B12	5.04μg	Φαινυλαλανίνη	1.050g
P	271mg	Βιταμίνη A	7μg	Τυροσίνη	0.951g
K	379mg	Βεταΐνη	19.5mg	Βαλίνη	1.247g
Na	85mg	Ρετινόλη	7μg	Αργινίνη	1.816g
Zn	9.48mg	Βιταμίνη E	0.13mh	Ιστιδίνη	0.894g
Cu	0.123mg	Κορεσμένο Λιπαρό οξύ	4.528g	Αλανίνη	1.574g
Mn	0.015	Ολικά μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	5.298g	Ασπαρτικό οξύ	2.474g
Se	30.7mg	Ολικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	1.034g	Γλουταμινικό οξύ	4.363g
		χοληστερόλη	95mg	Γλυκίνη	1.259g

<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>

1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος

Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού της γης καταναλώνει κρέας. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την κατανάλωση κρέατος και διαφέρουν στη σημαντικότητα τους από περιοχή σε περιοχή. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι οι εξής (Μπλούκας, 2007):

1. Οι θρησκευτικές, κοινωνικές και πολιτικές πεποιθήσεις.
2. Οι διατροφικές και διαιτητικές συνήθειες του καταναλωτικού κοινού.
3. Η τιμή πώλησης του κρέατος τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών κρέατος, όσο και σε σύγκριση με τις τιμές των υποκατάστατων ή συμπληρωματικών προϊόντων κρέατος.
4. Το βιοτικό επίπεδο και το εισόδημα των καταναλωτών.
5. Οι προτιμήσεις του καθενός.
6. Η εμφάνιση του κρέατος κατά την αγορά του, καθώς και η τυποποίηση και το είδος επεξεργασίας.
7. Οι αντιλήψεις του καταναλωτικού κοινού για τις επιδράσεις του κρέατος στην υγεία του ανθρώπου.
8. Οι αντιλήψεις του καταναλωτικού κοινού για το βαθμό ικανοποίησης των προσδοκιών του από το μαγειρεμένο κρέας.

9. Η μεταχείριση των ζώων μέχρι την σφαγή τους.
10. Ο τρόπος εκτροφής των ζώων σε συνάρτηση με τις επιδράσεις στο περιβάλλον.
11. Τα διατροφικά σκάνδαλα.
12. Τοπικά ήθη και έθιμα.

1.4. Παραγωγή και κατανάλωση κρέατος στον κόσμο και στην Ελλάδα

Ο τομέας του κρέατος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τομείς της παγκόσμιας παραγωγής και τα κυριότερα είδη κρέατος είναι το βόειο, το χοιρινό, τα πουλερικά και το αίγαιο/πρόβειο κρέας. Σύμφωνα με την έκθεση του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) μέχρι το 2050, ο όλο και αυξανόμενος παγκόσμιος πληθυσμός θα καταναλώνει περισσότερη ζωική πρωτεΐνη απ' ότι σήμερα, δημιουργώντας πίεση στους φυσικούς πόρους του πλανήτη. Η κατανάλωση κρέατος αναμένεται να αυξηθεί κατά 73% μέχρι το 2050, ενώ αντίστοιχα η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων θα αυξηθεί 58% (World Livestock 2011, Livestock in food security).

Η μέση κατά κεφαλήν κατανάλωση κρέατος ανέρχεται παγκοσμίως στα 42,5 κιλά το χρόνο. Σύμφωνα με τον FAO το 2006 ένας μέσος κάτοικος αναπτυσσόμενης χώρας κατανάλωσε 30,7 κιλά κρέας, ενώ το 2012 ήταν ήδη 32,7 κιλά. Στις βιομηχανικές χώρες αντίθετα, η κατανάλωση κρέατος μειώθηκε το ίδιο διάστημα από τα 81 στα 79 κιλά ανά άτομο.

Πίνακας 1.2: Παγκόσμια αγορά κρέατος (FAO World Food Outlook 2014)

	2012	2013	2014	Διαφορά: 2014 over 2013
	Εκατομμύρια τόνοι			%
Συνολική Παραγωγή	304.2	308.5	311.8	1.1
Βόειο κρέας	67.0	67.7	68.0	0.5
Κοτόπουλο	105.4	107.0	108.7	1.6
Χοιρινό	112.4	114.3	115.5	1.1
Διακίνηση	29.7	30.9	31.3	1.4
Βόειο κρέας	8.0	9.1	9.4	3.5
Κοτόπουλο	13.0	13.2	13.5	2.4
Χοιρινό	7.5	7.4	7.2	-2.1
Παροχή και Ζήτηση				
Κατανάλωση κατά άτομο (kg/year):				
Παγκοσμίως	42.9	42.9	42.9	-0.1
Αναπτυγμένες χώρες	76.2	75.9	76.1	0.3
Αναπτυσσόμενες χώρες	33.5	33.7	33.7	0.0

Η ορεινή διαμόρφωση του εδάφους, το ξηροθερμικό κλίμα και άλλες δομικές αδυναμίες, προσανατολίζουν την κτηνοτροφία στην Ελλάδα σε εκτατική μορφή. Μια εκτίμηση της παράγωγής φαίνεται στο Διάγραμμα 1.1. Η κτηνοτροφία στην Ελλάδα είναι περιορισμένη συγκριτικά με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Το κυριότερο πρόβλημα που δημιουργείται είναι ότι η εγχώρια παραγωγή κρέατος δεν επαρκεί για να ικανοποιήσει την ζήτηση της συνεχώς διευρυνόμενης αγοράς και ως εκ τούτου το έλλειμμα καλύπτεται με εισαγωγές κρέατος από την Ευρωπαϊκή Ένωση και από τρίτες χώρες. Μάλιστα το ποσοστό της εγχώριας παραγωγής κρέατος σε σχέση με την κατανάλωση συνεχώς μειώνεται, με αποτέλεσμα τη συνεχή αύξηση των εισαγωγών κρέατος και κρεατοσκευασμάτων.

Σύμφωνα με στοιχεία της Γενικής Διεύθυνσης Γεωργικής και Αγροτικής Ανάπτυξης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής το 2011 παρήχθησαν 7,9 εκατ. τόνοι βόειου και μοσχарίσιου κρέατος, 23 εκατ. τόνοι χοιρινού κρέατος, 985 χιλιάδες τόνοι αιγοπρόβειου κρέατος και 12 εκατ. τόνοι κρέας πουλερικών.



Διάγραμμα 1.1: Εκτίμηση ζωικής παραγωγής.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων. Γενική Διεύθυνση Ζωικής Παραγωγής. Αθήνα 2011.
Νομαρχιακές Αυτοδιοικήσεις Δ/νσεις Αγροτικής Ανάπτυξης, 2010-εκτίμηση

1.5. Προέλευση μοσχαρίσιου κρέατος

Όλες οι γνωστές φυλές βοοειδών εξελίχθηκαν από την ασιατική φυλή, εξαπλώθηκαν σε όλο τον κόσμο και προσαρμόστηκαν ανάλογα με τους φυσικούς παράγοντες κάθε τόπου. Αποτέλεσμα ήταν να δημιουργηθούν ποικίλες φυλές. Η σημερινή μορφή της «βελτιωμένης» αγελάδας διαμορφώθηκε με ανθρώπινη παρέμβαση, κυρίως στα δυτικά (Αγγλία, νησιά Μάγχης) και συγκεκριμένα με τη χρήση ζωοτεχνικών μεθόδων, όπως επιλογή, αιμομιξία, πλούσια διατροφή και διασταύρωση. Οι βελτιωμένες φυλές μεταφέρθηκαν και κατέκτησαν την Αμερική και από εκεί άρχισαν να επεκτείνονται σε όλο τον κόσμο.

Στην Ελλάδα υπάρχει ένα ελάχιστο ποσοστό καθαρών εγχώριων φυλών (~1%). Σε αυτές ανήκουν ο στεππικός τύπος, με χαρακτηριστικά πρωτογενούς βοός (*Bos taurus primigenius*), που εκτρέφεται κυρίως στη Μακεδονία και στη Θράκη και ο βραχυκερατικός τύπος, με χαρακτηριστικά βραχυκερατικού βοός (*Bos taurus brachyceros*), που είναι διαδεδομένος στην Κεντρική Ελλάδα, Ήπειρο και Πελοπόννησο. Τα ζώα των φυλών αυτών είναι γενικά μικρόσωμα και έχουν μικρή γαλακτοπαραγωγή και κρεοπαραγωγή. Εκτρέφονται κυρίως στις ορεινές και φτωχότερες περιοχές της χώρας (Χατζημηνάογλου, 2006).

Ο υπόλοιπος βόειος πληθυσμός αποτελείται εν μέρη από τις λεγόμενες βελτιωμένες αγελάδες, που προέρχονται κυρίως από διασταυρώσεις των εγχώριων αγελάδων με ταύρους ή μοσχάρια ή άλλες αγελάδες και εν μέρη γίνεται εισαγωγή ξένων φυλών όπως Holstein-Friesian, Schwyz, Aberdeen Angus Hereford κλπ.

2. Επισήμανση και ιχνηλασιμότητα των τροφίμων

2.1. Επισήμανση των τροφίμων

Προκειμένου να επιτευχθεί υψηλό επίπεδο προστασίας της υγείας των καταναλωτών και να εξασφαλισθεί το δικαίωμά τους για πληροφόρηση, θα πρέπει να διασφαλισθεί ότι οι καταναλωτές είναι κατάλληλα ενημερωμένοι όσον αφορά τα τρόφιμα που καταναλώνουν. Η ενημέρωση των καταναλωτών πραγματοποιείται με τη σωστή επισήμανση των προϊόντων. Ως «**επισήμανση**» ορίζεται οποιοσδήποτε μνείες, ενδείξεις, εμπορικά σήματα, εμπορικές ονομασίες, εικόνες ή σύμβολα που αναφέρονται σε ένα τρόφιμο και τοποθετούνται σε κάθε συσκευασία, έγγραφο, πινακίδα, ετικέτα, δακτύλιο ή περιλαίμιο που συνοδεύει ή αναφέρεται στο τρόφιμο αυτό.

Ο κανονισμός με αριθ. 1169/2011 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 25^{ης} Οκτωβρίου 2011, σχετικά με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές, αποτελεί τη βάση για την εξασφάλιση υψηλού επιπέδου προστασίας των καταναλωτών, όσον αφορά τις πληροφορίες για τα τρόφιμα, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορετικές αντιλήψεις των καταναλωτών και την ανάγκη τους για πληροφόρηση με παράλληλη διασφάλιση της εύρυθμης λειτουργίας της εσωτερικής αγοράς.

Σύμφωνα με το άρθρο 7 του κανονισμού με αριθ. 1169/2011 ορίζονται οι θεμιτές πρακτικές σχετικά με τις πληροφορίες ως εξής:

1. Οι πληροφορίες για τα τρόφιμα δεν πρέπει να είναι παραπλανητικές, ιδίως:
 - α) ως προς τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και ιδίως τη φύση, την ταυτότητα, τις ιδιότητες, τη σύνθεση, την ποσότητα, τη διατηρησιμότητα, τη χώρα καταγωγής ή τον τόπο προέλευσης, τη μέθοδο παρασκευής ή παραγωγής του.
 - β) με την απόδοση στο τρόφιμο αποτελεσμάτων ή ιδιοτήτων που δεν έχει.
 - γ) με τον υπαινιγμό ότι το τρόφιμο έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, ενώ στην πραγματικότητα όλα τα παρόμοια τρόφιμα έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά, ιδιαίτερα τονίζοντας την παρουσία ή απουσία ορισμένων συστατικών και/ή θρεπτικών ουσιών.
 - δ) με το να προτείνουν, μέσω της εμφάνισης, της περιγραφής ή των εικονογραφημένων παραστάσεων, την ύπαρξη συγκεκριμένου τροφίμου ή συστατικού, ενώ στην πραγματικότητα ένα φυσικώς ενεχόμενο συστατικό ή ένα συστατικό που χρησιμοποιείται συνήθως στο εν λόγω τρόφιμο έχει υποκατασταθεί από διαφορετικό συστατικό.
2. Οι πληροφορίες για τα τρόφιμα πρέπει να είναι ακριβείς, σαφείς και κατανοητές για τον καταναλωτή.
3. Με την επιφύλαξη των παρεκκλίσεων που προβλέπονται στην νομοθεσία της Ε.Ε. σχετικά με τα φυσικά μεταλλικά νερά και τα τρόφιμα ειδικής διατροφής, οι πληροφορίες για τα τρόφιμα δεν πρέπει να αποδίδουν σε οποιοδήποτε

τρόφιμο τις ιδιότητες πρόληψης, αγωγής ή θεραπείας οιασδήποτε ανθρώπινης ασθένειας, ούτε να αναφέρονται σε τέτοιες ιδιότητες.

Ο κύριος λόγος για τον οποίο απαιτείται η αναγραφή υποχρεωτικών πληροφοριών για τα τρόφιμα είναι να παρέχεται στους καταναλωτές η δυνατότητα να αναγνωρίζουν ένα τρόφιμο και να κάνουν κατάλληλη χρήση του, καθώς και να τους επιτραπεί να πραγματοποιούν τεκμηριωμένες επιλογές, οι οποίες να ανταποκρίνονται στις ατομικές διατροφικές τους ανάγκες. Ως εκ τούτου, οι ετικέτες των τροφίμων θα πρέπει να είναι σαφείς και κατανοητές, ώστε να βοηθούν τους καταναλωτές να είναι ενήμεροι και να εξασφαλίζουν γρηγορότερα την καλύτερη εξυπηρέτησή τους.

Σύμφωνα με το άρθρο 9 του κανονισμού με αριθ. 1169/2011 πάνω στα προϊόντα είναι υποχρεωτική η αναγραφή των ακόλουθων ενδείξεων:

- α) η ονομασία του τροφίμου
- β) ο κατάλογος των συστατικών
- γ) κάθε συστατικό ή τεχνολογικό βοήθημα το οποίο προκαλεί αλλεργίες ή δυσανεξίες και χρησιμοποιείται στην παραγωγή ή παρασκευή ενός τροφίμου και εξακολουθεί να υπάρχει στο τελικό προϊόν, ακόμη και σε τροποποιημένη μορφή
- δ) η ποσότητα ορισμένων συστατικών ή κατηγοριών συστατικών
- ε) η καθαρή ποσότητα του τροφίμου
- στ) η ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας και η τελική ημερομηνία ανάλωσης
- ζ) τυχόν ιδιαίτερες συνθήκες αποθήκευσης και/ή συνθήκες χρήσης
- η) το όνομα ή η εμπορική επωνυμία και η διεύθυνση του υπευθύνου επιχείρησης τροφίμων
- θ) η χώρα καταγωγής ή ο τόπος προέλευσης
- ι) οδηγίες χρήσης, εφόσον η παράλειψή τους θα δυσχέραινε τη σωστή χρήση του τροφίμου
- ια) για τα ποτά με περιεκτικότητα σε αιθυλική αλκοόλη μεγαλύτερη από 1,2% κατ' όγκο, η αναγραφή του αποκτηθέντος κατ' όγκο αλκοολικού τίτλου
- ιβ) διατροφική δήλωση

Σύμφωνα με τον κανονισμό με αριθ. 1169/2011 τα τρόφιμα που διατέθηκαν στην αγορά ή επισημάνθηκαν πριν από τις 13 Δεκεμβρίου 2014 και δεν συμμορφώνονται προς τις απαιτήσεις του παρόντος κανονισμού διατίθενται στην εμπορία μέχρις εξαντλήσεως των αποθεμάτων τους. Ο παρόν κανονισμός εφαρμόζεται από τη 13^η Δεκεμβρίου 2014, εξαιρουμένης της παραγράφου 1 του άρθρου 9 για τον κατάλογο των συστατικών η οποία θα εφαρμόζεται από τη 13^η Δεκεμβρίου 2016.

Η ακριβής επισήμανση είναι σημαντική για την υποστήριξη του θεμιτού εμπορίου. Επιπρόσθετες περιγραφικές πληροφορίες μπορούν να προστεθούν στην ετικέτα από τις επιχειρήσεις τροφίμων, ως συνέπεια του εμπορικού σήματος και για σκοπούς μάρκετινγκ του προϊόντος. Αν και οι εθνικοί και διεθνείς νόμοι κατοχυρώνουν τις υποχρεωτικές πληροφορίες επισήμανσης, δυστυχώς δεν επαρκούν για την πρόληψη της απάτης στα τρόφιμα.

Για να διατηρηθεί και να ενισχυθεί η εμπιστοσύνη του καταναλωτή στο βόειο κρέας και να αποφευχθεί η παραπλάνησή του, είναι ανάγκη να θεσπιστεί ένα αποτελεσματικότερο σύστημα επισημάνσης του βοείου κρέατος, το οποίο να είναι υποχρεωτικό σε όλα τα κράτη μέλη. Βάσει του υποχρεωτικού αυτού συστήματος, οι επιχειρηματίες και οι οργανώσεις εμπορίας του βοείου κρέατος, θα πρέπει να αναγράφουν στην ετικέτα πληροφορίες που αφορούν όλη τη διακίνηση του βοείου κρέατος από το στάδιο παραγωγής έως τη διάθεση του στους καταναλωτές, παρέχοντας τις πληροφορίες με την κατάλληλη και σαφή επισημάνση του προϊόντος.

Όσο αφορά το βόειο κρέας, ως «**επισημάνση**» ορίζεται η τοποθέτηση ετικέτας σε τεμάχιο ή τεμάχια κρέατος χωριστά ή στο υλικό συσκευασίας τους ή, σε περίπτωση μη προσυσκευασμένων προϊόντων, η παροχή των ενδεδειγμένων γραπτών και ευδιάκριτων πληροφοριών στον καταναλωτή στο σημείο πώλησης.

Σύμφωνα με το άρθρο 3 του κανονισμό (ΕΚ) με αριθ. 1760/2000 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 17^{ης} Ιουλίου 2000, για τη θέσπιση συστήματος αναγνώρισης και καταγραφής των βοοειδών και την επισημάνση του βοείου κρέατος και των προϊόντων με βάση το βόειο κρέας, το σύστημα αναγνώρισης και καταγραφής βοοειδών περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

- α) μέσα αναγνώρισης για την ατομική αναγνώριση κάθε ζώου
- β) ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων
- γ) διαβατήρια ζώων
- δ) τήρηση ατομικών μητρώων σε κάθε εκμετάλλευση

Το υποχρεωτικό σύστημα επισημάνσης εξασφαλίζει τη σύνδεση μεταξύ, αφενός της αναγνώρισης των σφαγίων, τεταρτημορίων ή τεμαχίων κρέατος και αφετέρου του μεμονωμένου ζώου ή της οικείας ομάδας ζώων, καθώς και τον έλεγχο των πληροφοριών που αναφέρονται στην ετικέτα.

Συμπληρωματικά σύμφωνα με το άρθρο 13 του κανονισμό (ΕΚ) με αριθ. 1760/2000 η ετικέτα πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες ενδείξεις:

- α) αριθμό ή κωδικό αναφοράς που δηλώνει τη σχέση μεταξύ του κρέατος και του ζώου ή των ζώων. Ο αριθμός αυτός μπορεί να είναι αριθμός αναγνώρισης του ζώου από το οποίο προέρχεται το βόειο κρέας ή αριθμός αναγνώρισης ομάδας ζώων
- β) τον αριθμό έγκρισης του σφαγείου στο οποίο εσφάγη το ζώο ή η ομάδα ζώων και το κράτος μέλος ή την τρίτη χώρα όπου ευρίσκεται το σφαγείο. Στην ένδειξη πρέπει να αναγράφεται: «Τόπος σφαγής»
- γ) τον αριθμό έγκρισης της μονάδας τεμαχισμού, στην οποία τεμαχίσθηκε το σφάγιο ή η ομάδα σφαγίων, και το κράτος μέλος ή την τρίτη χώρα όπου ευρίσκεται αυτή η μονάδα. Στην ένδειξη πρέπει να αναγράφεται: «Τόπος τεμαχισμού»

2.2. Ιχνηλασιμότητα των τροφίμων

Σύμφωνα με το «γενικό νόμο των τροφίμων» η «**ιχνηλασιμότητα**» (traceability) ορίζεται ως η δυνατότητα ανάχνευσης και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών και ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ουσιών που πρόκειται ή αναμένεται να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή σε ζωοτροφές σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τους.

Το άρθρο 18 του κανονισμού με αριθ. 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 28^{ης} Ιανουαρίου 2002 (για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής αρχής, για την ασφάλεια των τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων) περιγράφει το πλαίσιο των απαιτήσεων για την ανάπτυξη συστήματος ιχνηλασιμότητας. Συγκεκριμένα προβλέπει τα εξής:

1. Η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων, των ζωοτροφών, των ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων και οποιασδήποτε άλλης ουσίας που προορίζεται για ενσωμάτωση σε ένα τρόφιμο ή σε μια ζωοτροφή ή αναμένεται ότι θα ενσωματωθεί σε αυτά, διασφαλίζεται σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής.
2. Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών είναι σε θέση να αναγνωρίζουν κάθε πρόσωπο από το οποίο έχουν προμηθευτεί ένα τρόφιμο, μια ζωοτροφή, ένα ζώο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τροφίμων ή οποιαδήποτε άλλη ουσία που προορίζεται για ενσωμάτωση σε ένα τρόφιμο ή σε μια ζωοτροφή ή αναμένεται ότι θα ενσωματωθεί σε αυτά. Για το σκοπό αυτό οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων εγκαθιδρύουν συστήματα και διαδικασίες που καθιστούν τις πληροφορίες αυτές διαθέσιμες στις αρμόδιες αρχές, εάν αυτές το ζητήσουν.
3. Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών καθιερώνουν συστήματα και διαδικασίες για την αναγνώριση των άλλων επιχειρήσεων στις οποίες προμηθεύουν τα προϊόντα τους. Αυτές οι πληροφορίες είναι διαθέσιμες στις αρμόδιες αρχές, εάν αυτές το ζητήσουν.
4. Τα τρόφιμα ή οι ζωοτροφές που διατίθενται ή ενδέχεται να διατεθούν στην αγορά της Κοινότητας πρέπει να φέρουν κατάλληλη επισήμανση ή σήμα αναγνώρισης ώστε να διευκολύνεται η ιχνηλασιμότητα τους, μέσω κατάλληλων εγγράφων ή πληροφοριών, σύμφωνα με τις σχετικές απαιτήσεις των ειδικότερων διατάξεων.
5. Οι διατάξεις για την εφαρμογή των απαιτήσεων του παρόντος άρθρου όσον αφορά συγκεκριμένους τομείς να θεσπίζονται από ειδική μόνιμη επιτροπή την οποία αποτελούν εκπρόσωποι των κρατών μελών και στην οποία προεδρεύει εκπρόσωπος της Ευρωπαϊκής επιτροπής.

Οι κρίσεις σχετικά με την ασφάλεια των τροφών απέδειξαν, ότι ο προσδιορισμός της προέλευσης των τροφίμων έχει πρωτεύουσα σημασία για την προστασία των καταναλωτών. Πρόσφατα περιστατικά όπως:

- Η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (bovine spongiform encephalopathy –BSE), που ανήκει στην ομάδα των μεταδοτικών σπογγωδών εγκεφαλοπαθειών και είναι μια θανατηφόρος νευροεκφυλιστική νόσος των βοοειδών, που μεταδίδεται στον άνθρωπο από την πρόσληψη τροφίμων που περιέχουν μολυσμένο ιστό βοοειδών εμφανιζόμενη με διάφορες μορφές της ασθένειας Cruetzfeld Jacobs (Chiappini, 2005)
- Η υποκατάσταση σε προϊόντα βοείου κρέατος με κρέας αλόγου, που εντοπίστηκαν να πωλούνται σε διάφορες αλυσίδες σούπερ μάρκετ και φέρουν

κατάλοιπα αντιβιοτικών φαρμάκων (που χρησιμοποιούνται στα άλογα αγώνων π.χ. φαινυλβουταζόνη) τα καθιστά ιδιαίτερα τοξικά αν καταναλωθούν από τον άνθρωπο.

Τα περιστατικά αυτά και πολλά ακόμα είχαν σαν αποτέλεσμα να κλονιστεί η εμπιστοσύνη των καταναλωτών στην ποιότητα του κρέατος και των προϊόντων με βάση το κρέας και να προκληθεί αστάθεια στη αγορά κρέατος, λόγω μη ορθής διαφύλαξης της δημόσιας υγείας. Έγινε αναγκαίο λοιπόν να καθιερωθεί ένα ολοκληρωμένο σύστημα ιχνηλασιμότητας εντός των επιχειρήσεων τροφίμων, ώστε να μπορούν να πραγματοποιούνται αποσύρσεις ή ανακλήσεις (ακριβείς και με συγκεκριμένο στόχο) από την αγορά των μη ασφαλών τροφίμων. Επιπλέον μέσω αυτού να επιτρέπεται η στοχοθετημένη, αξιόπιστη και ακριβής ενημέρωση των καταναλωτών για τα προϊόντα που εγκυμονούν κινδύνους, καθώς και η παροχή κατάλληλων πληροφοριών στους υπευθύνους των επιχειρήσεων τροφίμων και τις ελεγκτικές αρχές, ώστε να γίνει σωστή αξιολόγηση του κινδύνου. Με αυτόν τον τρόπο θα αποφευχθούν οι πιθανότητες δημιουργίας άσκοπων γενικότερων δυσλειτουργιών στις περιπτώσεις εμφάνισης προβλημάτων που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων. Η ιχνηλασιμότητα δεν εγγυάται από μόνη της την ασφάλεια των προϊόντων.

Παρά την αυστηρή νομοθεσία που επέβαλε η Ευρωπαϊκή Ένωση για τα συστήματα επισήμανσης, έχει παρατηρηθεί ότι οι μέθοδοι ιχνηλασιμότητας που βασίζονται μόνο σε κωδικούς παρτίδας ή οποιαδήποτε άλλα έγγραφα και αρχεία καταγραφής, δεν μπορούν να είναι εντελώς αξιόπιστα, διότι υπάρχει πάντα η πιθανότητα να είναι ψεύτικα ή πλαστογραφημένα. Η ιχνηλασιμότητα πρέπει να αποτελεί εργαλείο διαχείρισης του κινδύνου και να χρησιμοποιείται σωστά, για να συμβάλλει στην ανάλυση προβλημάτων σχετικών με την ασφάλεια των τροφίμων.

Η ιχνηλασιμότητα αποσκοπεί στο δίκαιο εμπόριο μεταξύ των διαφόρων επιχειρήσεων και την αποφυγή γενικότερης διατάραξης του εμπορίου. Οι κατευθυντήριες γραμμές για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας με βάση το άρθρο 18 του κανονισμού με αριθ. 178/2002 απαιτούν από τους υπευθύνους των επιχειρήσεων τροφίμων τα εξής:

1. να είναι σε θέση να προσδιορίζουν από ποιον και σε ποιον έγινε η προμήθεια ενός προϊόντος.
2. να διαθέτουν συστήματα και διαδικασίες για την παροχή των σχετικών πληροφοριών στις αρμόδιες αρχές κατόπιν αίτησής τους.

Η πρώτη απαίτηση βασίζεται στην προσέγγιση «ένα βήμα πίσω»-«ένα βήμα μπροστά», σύμφωνα με την οποία οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων οφείλουν:

- να είναι σε θέση να προσδιορίσουν οποιοδήποτε «πρόσωπο» από το οποίο προμηθεύτηκαν τρόφιμα ή πρώτες ύλες. Το πρόσωπο αυτό μπορεί να είναι φυσικό (κυνηγοί ή συλλέκτες μανιταριών) ή νομικό.
- να διαθέτουν ένα σύστημα που να τους επιτρέπει να εξακριβώνουν ποιος (-οι) είναι ο (οι) άμεσος (-οι) πελάτης (-ες) των προϊόντων τους.

- να είναι σε θέση να συνδέουν προμηθευτές με προϊόντα (ποια προϊόντα προέρχονται από ποιους προμηθευτές).
- να είναι σε θέση να συνδέουν πελάτες με προϊόντα (ποιοι πελάτες προμηθεύτηκαν ποια προϊόντα). Ωστόσο, οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων δεν οφείλουν να προσδιορίζουν τους άμεσους πελάτες, όταν αυτοί είναι οι τελικοί καταναλωτές.

Στην πράξη ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα ταυτοποίησης, βασικός στόχος του οποίου είναι όλες οι επιχειρήσεις που εμπλέκονται στην αλυσίδα παραγωγής και διακίνησης ενός προϊόντος να εφαρμόσουν ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας, δημιουργώντας μια δυναμική ταυτότητα για κάθε προϊόν, σε κάθε στάδιο της εφοδιαστικής αλυσίδας, αποκαθιστώντας έτσι την πλήρη ιχνηλασιμότητα σε όλη την αλυσίδα (από το «χωράφι» στο «πιάτο»). Εάν ένας κρίκος της αλυσίδας δε λειτουργεί παύουμε να έχουμε ιχνηλασιμότητα. Η ταυτότητα έχει τη μορφή ενός κωδικού πάνω στο προϊόν, καθώς και ενός αρχείου με πληροφορίες για το ιστορικό του προϊόντος και των συστατικών του, τόσο στα προηγούμενα και επόμενα στάδια της αλυσίδας (διαδοχική ιχνηλασιμότητα), όσο και στο τρέχον στάδιο (εσωτερική ιχνηλασιμότητα).

Το σύστημα ιχνηλασιμότητας παρέχει δεδομένα για τους δύο βασικούς τύπους ιχνηλασιμότητας (Εικ.2.1):

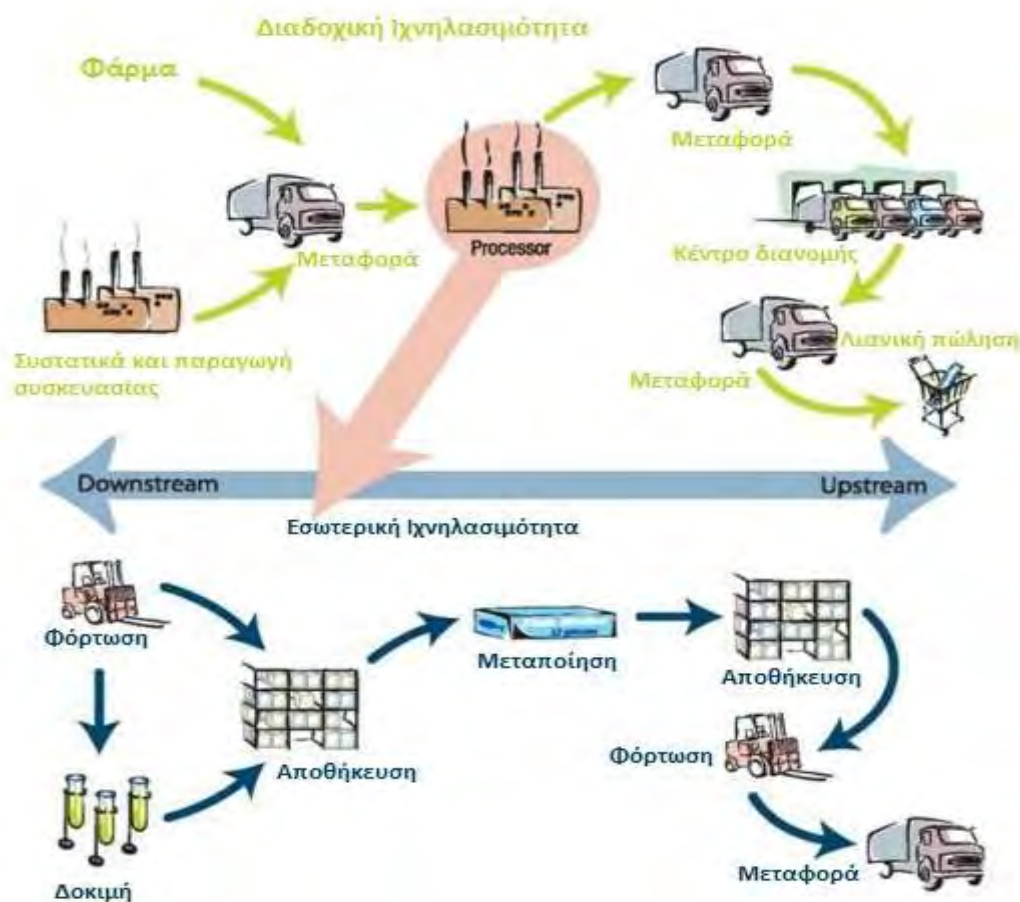
- **Προς τα εμπρός (Downstream) Ιχνηλασιμότητα:** ξεκινώντας από μια συγκεκριμένη παρτίδα πρώτης ύλης (lot number), μας δίδεται η δυνατότητα να εντοπίσουμε όλες τις παρτίδες των τελικών προϊόντων που παρήχθησαν από τη συγκεκριμένη παρτίδα πρώτης ύλης.
- **Προς τα πίσω (Upstream) Ιχνηλασιμότητα:** γνωρίζοντας μια συγκεκριμένη παρτίδα τελικού προϊόντος (lot number), μας δίδεται η δυνατότητα να εντοπίσουμε όλες τις παρτίδες των πρώτων υλών που απαρτίζουν το τελικό προϊόν.

Το σύστημα ιχνηλασιμότητας αποτελείται από τρία υποσυστήματα (Εικ.2.1):

1. **Σύστημα Διαδοχικής Ιχνηλασιμότητας -1:** καλύπτει την διακίνηση προϊόντων μεταξύ της επιχείρησης και των προμηθευτών της. Η διαδοχική ιχνηλασιμότητα -1 είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για τις επιχειρήσεις λιανικού εμπορίου, οι οποίες διαθέτουν μεγάλο αριθμό προμηθευτών και προμηθευόμενων ειδών ανά είδος, όσο και για τις επιχειρήσεις μεταποίησης, οι οποίες προμηθεύονται από άλλες εταιρίες τα απαιτούμενα υλικά συσκευασίας και τις πρώτες ύλες.
2. **Σύστημα Εσωτερικής Ιχνηλασιμότητας (Internal Traceability):** καλύπτει την διακίνηση και τον μετασχηματισμό των προϊόντων μέσα στην ίδια την επιχείρηση. Η εσωτερική ιχνηλασιμότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις επιχειρήσεις παραγωγής, επεξεργασίας και τυποποίησης, διότι υπάρχει μια σημαντική παραγωγική διαδικασία η οποία κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες

και σύμφωνα με προκαθορισμένες τεχνικές προδιαγραφές μετασχηματίζει τις πρώτες ύλες σε τελικά προϊόντα.

3. **Σύστημα Διαδοχικής Ιχνηλασιμότητας +1:** καλύπτει την διακίνηση προϊόντων μεταξύ της επιχείρησης και των πελατών της. Η διαδοχική ιχνηλασιμότητα +1 είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για τις επιχειρήσεις που προμηθεύουν με πρώτες ύλες και υλικά συσκευασίας τις βιομηχανίες τροφίμων, όσο και για τις ίδιες τις βιομηχανίες οι οποίες προμηθεύουν με τα τελικά προϊόντα τα σημεία λιανικής πώλησης (ISO 22005, 2007).



Εικόνα 2.1: Σύστημα ιχνηλασιμότητας.

<http://interestcaptured.hubpages.com/hub/Developing-a-Regulatory-Regime-for-Aquaculture-Products>

Τα στοιχεία που κρατούνται για λόγους ιχνηλασιμότητας καθορίζονται με βάση τα χαρακτηριστικά του κάθε συστήματος ιχνηλασιμότητας και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό προτεραιότητάς τους.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που διαβιβάζονται στις αρμόδιες αρχές σε όλες τις περιπτώσεις:

- Επωνυμία και διεύθυνση του προμηθευτή, είδος των προϊόντων που προμήθευσε.
- Επωνυμία και διεύθυνση του πελάτη, είδος των προϊόντων που παραδόθηκαν.

- Ημερομηνία συναλλαγής / παράδοσης (όταν μια επιχείρηση τροφίμων προμηθεύεται επανειλημμένα τον ίδιο τύπο προϊόντων).

Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται πρόσθετα στοιχεία, των οποίων η καταγραφή συνιστάται από τις αρχές:

- Όγκος ή ποσότητα.
- Αριθμός παρτίδας, εάν υπάρχει.
- Λεπτομερέστερη περιγραφή του προϊόντος (προϊόντα προσυσκευασμένα ή χύμα, ποικιλία φρούτων/λαχανικών, ακατέργαστα ή μεταποιημένα προϊόντα).

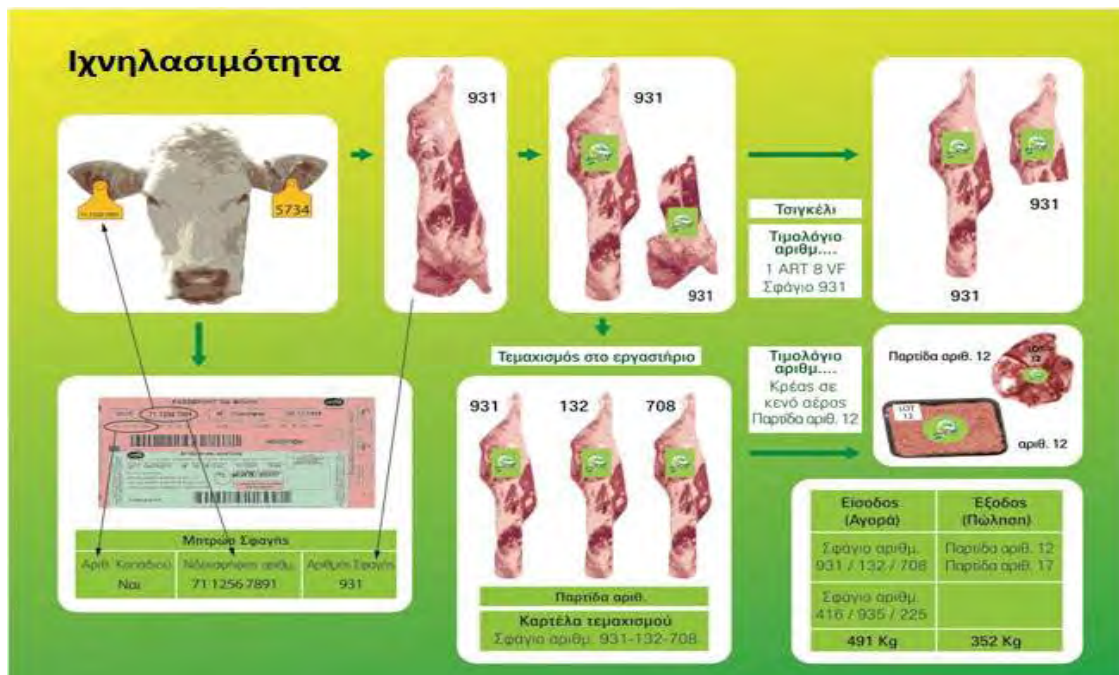
Οι κρίσεις με τα τρόφιμα στο παρελθόν απέδειξαν ότι η ιχνηλάτηση της εμπορικής ροής των προϊόντων (με τιμολόγια στο επίπεδο της εταιρείας) δεν ήταν επαρκής για την παρακολούθηση της φυσικής ροής τους. Συνεπώς, έχει ιδιαίτερη σημασία το σύστημα ιχνηλασιμότητας της κάθε επιχείρησης τροφίμων να σχεδιάζεται έτσι ώστε να παρακολουθείται η φυσική ροή των προϊόντων: η χρήση δελτίων παράδοσης ή η καταχώριση της διεύθυνσης των μονάδων παραγωγής κρίνεται ότι εξασφαλίζει αποτελεσματικότερα την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων. Καθυστερήσεις στη διαβίβαση των σημαντικών αυτών στοιχείων κρίνεται ότι παρεμποδίζουν την ταχεία αντίδραση σε περίπτωση κρίσης.

Το χρονικό διάστημα που θα πρέπει να φυλάσσονται τα εμπορικά έγγραφα για το αρχείο της ιχνηλασιμότητας ξεκινώντας από την ημερομηνία παρασκευής ή παράδοσης καθορίστηκε ως εξής:

- Για προϊόντα χωρίς συγκεκριμένη διάρκεια ζωής ισχύει χρονικό διάστημα 5 ετών.
- Για προϊόντα με διάρκεια ζωής άνω των 5 ετών, πρέπει να φυλάσσεται αρχείο για περίοδο ίση με τη διάρκεια ζωής συν 6 μήνες.
- Για ιδιαίτερα ευαλλοίωτα προϊόντα, με «ημερομηνία λήξης» μικρότερη των 3 μηνών ή χωρίς συγκεκριμένη ημερομηνία λήξης το αρχείο φυλάσσεται για περίοδο 6 μηνών μετά την ημερομηνία παραγωγής ή παράδοσης.

Η ζωική ιχνηλασιμότητα είναι πολύ περισσότερο από την αναγνώριση των ζώων. Η χρήση των εμπορικών σημάτων, το μαρκάρισμα και οι συσκευές ταυτοποίησης είναι μόνο μια συνιστώσα σε μια σειρά κινήσεων που πρέπει να συνδέονται μεταξύ τους, για να μπορέσει ένα ζώο ή μια ομάδα ζώων να εντοπιστούν σε μια αλυσίδα παραγωγής, για την αντιμετώπιση προβλημάτων όσον αφορά την υγεία των ζώων και την ασφάλεια των τροφίμων. Η ιχνηλασιμότητα διαθέτει πολυάριθμα πλεονεκτήματα για το σύνολο του κλάδου του βόειου κρέατος από την παραγωγή μέχρι την εμπορία. Κάθε τεταρτημόριο και κάθε κομμάτι κρέατος μπορεί να ταυτοποιηθεί σε κάθε βήμα επεξεργασίας του σφαγίου από τα στάδια παραγωγής, την αγορά και τη μετακίνηση των προς σφαγή ζώων, την αναισθητοποίηση, τη σφαγή και την περιποίηση του κρέατος στο σφαγείο, τη μεταφορά του νωπού κρέατος στο κρεοπωλείο, μέχρι τη συντήρησή του και τη διάθεσή του στην αγορά. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να παρακολουθήσουμε τη διαδρομή του ζώου από το λιβάδι μέχρι το ράφι. Για να καταστεί δυνατός ο εντοπισμός των μετακινήσεων των βοοειδών, θα πρέπει σε κάθε αντί των ζώων, να τοποθετείται αναγνωριστικό ενώτιο και να συνοδεύονται από διαβατήριο καθ' όλη τη

διάρκεια οποιασδήποτε μετακίνησης. Για τον ταχύ και ακριβή εντοπισμό της προέλευσης των ζώων για λόγους ελέγχου, κάθε κράτος μέλος θα πρέπει να δημιουργήσει εθνική ηλεκτρονική βάση δεδομένων, στην οποία θα καταγράφονται η ταυτότητα του ζώου, όλες οι εκμεταλλεύσεις που ευρίσκονται στην επικράτειά του και οι μετακινήσεις ζώων. Κατά την άφιξή του στο σφαγείο, το μοσχάρι, συνοδεύεται υποχρεωτικά από το προσωπικό του διαβατηρίου, που αναφέρει τον αριθμό ταυτοποίησής του. Σε αντιστοιχία με τον αριθμό αυτό, ένα συγκεκριμένο νούμερο σφαγής τοποθετείται με ειδικό μελάνι πάνω στο σφάγιο, όπως επίσης και στα επιμέρους τεμάχια του. Όταν πολλά ίδια κομμάτια που προέρχονται από διαφορετικά ζώα τυποποιούνται την ίδια μέρα, δημιουργείται ένας αριθμός παρτίδας που επιτρέπει την αντιστοιχία ανάμεσα στο τυποποιημένο κρέας και τα κομμάτια από τα οποία προήλθε. Αυτό το ίδιο νούμερο αναγράφεται στη συνέχεια πάνω στα παραστατικά που συνοδεύουν τα κομμάτια αυτά έως το σημείο τελικής πώλησης, έτσι ώστε να μπορεί να εξακριβωθεί η ακριβής προέλευση κάθε κομματιού κρέατος. Ένα σωστά σχεδιασμένο σύστημα ιχνηλασιμότητας επιτρέπει την παρακολούθηση του ζώου από την αρχή μέχρι το τέλος και δίνει στους προμηθευτές τη δυνατότητα υποστήριξης των ισχυρισμών τους για το είδος κρέατος, αφού γνωρίζουν όλα τα σχετικά με τα συστήματα παραγωγής που χρησιμοποιήθηκαν σε όλη την ζωή του ζώου. Τα συστήματα εντοπισμού μπορούν να βοηθήσουν τους προμηθευτές να υποστηρίξουν τους ισχυρισμούς τους ότι τα προϊόντα και οι πρακτικές τους είναι «βιολογικά», «ελεύθερης βοσκής» και / ή «χωρίς ορμόνες» και να επιτύχουν μια καλύτερη τιμή στην αγορά. Τέλος τέτοια συστήματα επιτρέπουν τη δημοσιοποίηση ατομικών πληροφοριών για το ζώο, όπως τη φυλή, την ημερομηνία γέννησης και την καταγωγή, για τα ζωικά προϊόντα, εφόσον απαιτείται.



Εικόνα 2.2: Διαδικασία ιχνηλασιμότητα βόειου κρέατος.

<http://www.bovillage.eu/el/nos-engagements-gk/tracabilite-des-viandes-gk.html>

3. Αυθεντικότητα και Ταυτοποίηση των τροφίμων

Η αυξημένη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών, όσον αφορά τη σύνθεση των τροφίμων, έχει ως αποτέλεσμα την ανάγκη εξακρίβωσης των επισημάνσεων στις ετικέτες. Η εσφαλμένη επισημάνση των τροφίμων αντιπροσωπεύει μια εμπορική απάτη με πρόθεση την απόκτηση μεγαλύτερης μερίδας των καταναλωτών. Είναι πολύ σημαντικό να καθοριστεί, ότι τα είδη υψηλής εμπορικής αξίας είναι αυτά που δηλώνουν στην ετικέτα και όχι αντικατεστημένα με φθηνά υποκατάστατα. Η υποκατάσταση κρεάτων υψηλής αξίας με αυτών με χαμηλό κόστος και η παραπλανητική σήμανση των προϊόντων με βάση το κρέας, καθιστά σημαντική την αναγνώριση και τον εντοπισμό των ειδών κρέατος και των μεταποιημένων προϊόντων τους στην τροφική αλυσίδα.

Ως «μη αυθεντικά» τρόφιμα ορίζονται τα τρόφιμα που δεν είναι «της φύσης ή της ουσίας ή της ποιότητας που αναγράφεται στη συσκευασία και που απαιτεί ο αγοραστής». Αυτό σημαίνει:

- Πλήρης ή μερική παράλειψη ή αφαίρεση πολύτιμων συστατικών.
- Ολική ή μερική αντικατάσταση συστατικών των τροφίμων με ένα διαφορετικό αδήλωτο συστατικό (συνήθως φθηνότερα).
- Απόκρυψη βλάβης ή κατώτερων τροφίμων.
- Νοθεία: προσθήκη αδήλωτων ουσιών ή υλικών έτσι ώστε να αυξηθεί ο όγκος ή το βάρος του προϊόντος ή να κάνει το προϊόν να έχει καλύτερη εμφάνιση από ότι αξίζει (Hargin, 1996).

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για την αυθεντικότητα του κρέατος έχει αυξηθεί. Πολλοί καταναλωτές ανησυχούν για το κρέας που τρώνε και η ακριβής επισημάνση είναι σημαντική για να ενημερώνει τους καταναλωτές για τις επιλογές τους. Τα πιθανά προβλήματα γνησιότητας έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις βασικούς τομείς, όπου η απάτη είναι πιθανότερο να συμβεί (είναι όμως δυνατόν να έχουμε ταυτόχρονα δύο ή περισσότερα από αυτά τα προβλήματα σε ένα προϊόν):

1. Προέλευση κρέατος (με υποκατηγορίες):

- Φύλο (χρήση φυλοεξαρτούμενων ορμονών για τον καθορισμό του φύλου και περιοχών DNA που διαφέρουν μεταξύ των δύο φύλων-XY με τη μέθοδο της PCR).
- Είδος τεμαχίου κρέατος (οπτικός διαχωρισμός για τα πρωτογενή τεμάχια - στήθος, μπούτι, κορμός και ανάλυση χημικών συστατικών για κομμάτια που προέρχονται από περεταίρω τεμαχισμό του αρχικού τεμαχίου - μπριζόλες).
- Φυλή (η αναγνώριση βασίζεται κυρίως στην PCR).
- Ζωοτροφή (τα διαφορετικά χημικά συστατικά που υπάρχουν στις τροφές μετά την κατανάλωσή τους εμφανίζονται ως διαφορετικά χημικά συστατικά ή προϊόντα μεταβολισμού στο αίμα και το λίπος των ζώων).
- Ηλικία σφαγείου (το κρέας από τα νεαρά ζώα είναι υψηλότερης αξίας).
- Άγρια ή εκτρεφόμενα (θηράματα και τα παράγωγα τους προϊόντα είναι συχνά στόχοι νοθείας λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας, της ιδιαίτερης

εκλεπτυσμένης γεύσης και υφής τους που τα καθιστούν είδη υψηλής εμπορικής αξίας - γίνεται γενετικός διαχωρισμός και ταυτοποίηση ειδών για αναγνώριση).

- Βιολογικά ή συμβατικά (η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων υπόκειται σε περιορισμούς στην παραγωγή βιολογικού κρέατος και μπορεί να γίνει ανίχνευση με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού σε τεμάχια ζώου. Άλλες στρατηγικές είναι η διερεύνηση των διαφορών σε ζωικό λίπος με αέρια χρωματογραφία μεταξύ βιολογικών και συμβατικών εκτρεφόμενων ζώων και η ανάλυση της ισοτοπικής σύνθεσης με φασματομέτρα μάζας).
- Γεωγραφική προέλευση [η περιεκτικότητα ιχνοστοιχείων και ισοτόπων στα ζώα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η πρόσληψη τροφής, το πόσιμο νερό, η ρύπανση και η σύνθεση του εδάφους, τα οποία εξαρτώνται με τη γεωγραφική προέλευση και ανιχνεύονται με επαγωγικά συζευγμένη φασματοσκοπία μάζας πλάσματος (ICP-MS)].

2. Υποκατάσταση κρέατος (με υποκατηγορίες):

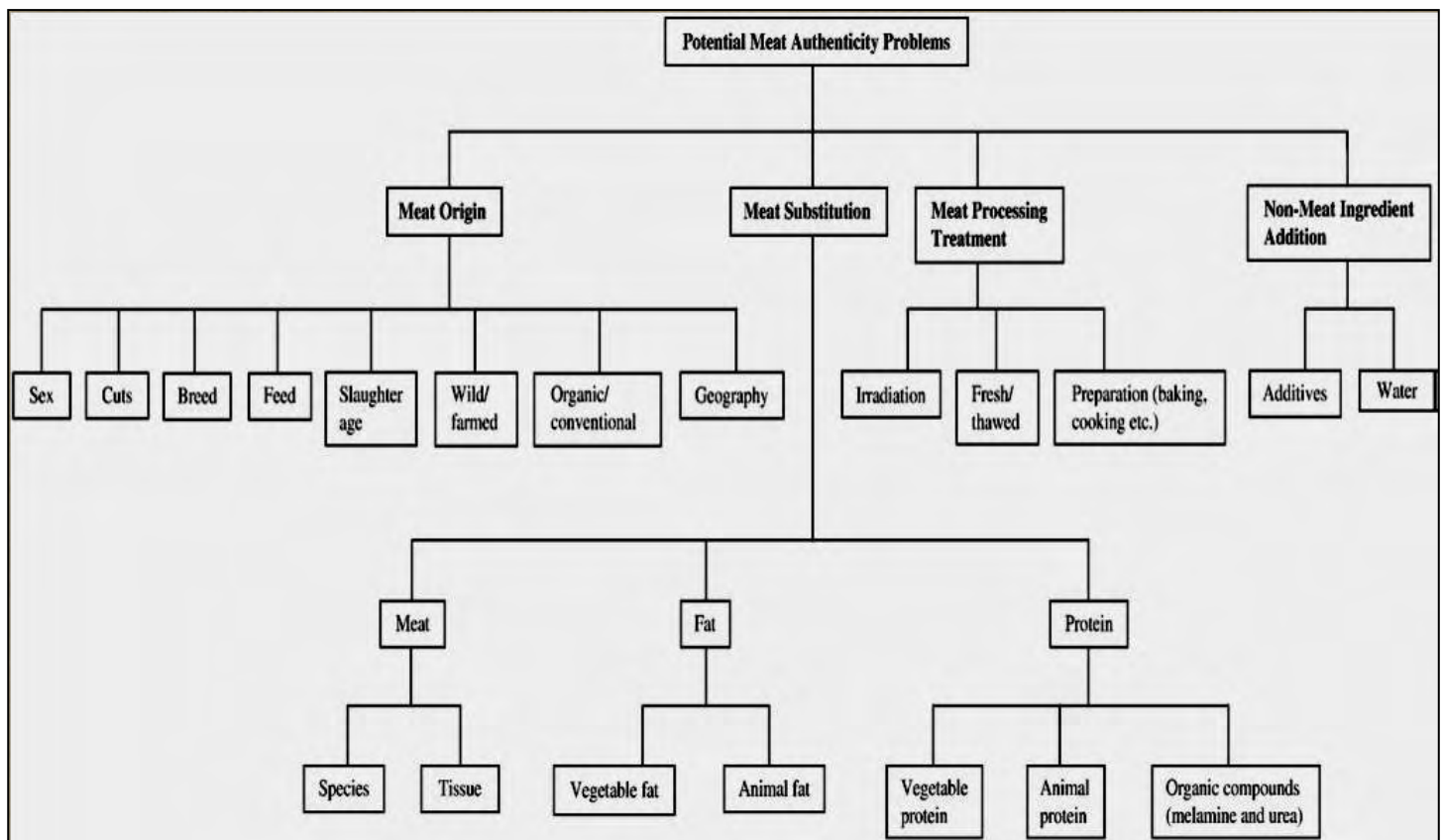
- Με κρέας (υποκατάσταση ενός είδους με ένα άλλο καθώς και αντικατάσταση του ιστού με κολλαγόνο και εντόσθια).
- Με λίπος (υποκατάσταση ζωικού λίπους με φυτικά καθώς και ζωικό λίπος από άλλο είδος κρέατος).
- Με πρωτεΐνη (υποκατάσταση ακριβής ζωικής πρωτεΐνης με φτηνή ζωική, όπως σόγια, καθώς και υποκατάσταση με μελαμίνη και ουρία).

3. Επεξεργασία κρέατος (με υποκατηγορίες):

- Με ακτινοβολία (χωρίς επισήμανση).
- Φρέσκα ή αποψυγμένα [διαφοροποίηση με τη μέθοδο της ενζυματικής β-υδροξύακυλο-συνένζυμοΑ-αφυδρογονάσης (enzymatic β- hydroxyacyl - CoA-dehydrogenase (HADH), η οποία είναι δυνατή μόνο εάν η θερμοκρασία κατάψυξης είναι -12 ° C ή χαμηλότερη].
- Προετοιμασία κρέατος (ο σχηματισμός προϊόντων της αντίδρασης Maillard, κάνει δυνατή τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών διαδικασιών προετοιμασίας κρέατος, όπως βραστά, τηγανητά ή ψητά καθώς και πάνω από ορισμένες θερμοκρασίες γίνεται δυνατή η διάκριση μεταξύ μακροπρόθεσμου μαγειρέματος σε χαμηλή θερμοκρασία από βραχυπρόθεσμο μαγειρέματος σε υψηλή θερμοκρασία).

4. Προσθήκη συστατικών όχι με βάση το κρέας (με υποκατηγορίες):

- Διάφορα πρόσθετα (μεγάλος αριθμός οργανικών ουσιών όπως χρωστικές, αρώματα ή συντηρητικά, καθώς και ένζυμα τα οποία λαμβάνουν μέρος στη θρόμβωση του αίματος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες δέσμευσης με βάση το αίμα).
- Νερό (κανονισμοί υπαγορεύουν το επιτρεπόμενο ποσοστό πρόσθετου νερού στο κρέας) (Ballin, 2010).



Εικόνα 3.1: Πιθανά προβλήματα ταυτοποίησης κρέατος.

N. B. Ballin / Meat Science 86 (2010) 577-587

Ο έλεγχος απάτης είναι αναγκαίος για την υποστήριξη του δίκαιου εμπορίου και την προστασία των δικαιωμάτων των καταναλωτών. Τα τελευταία χρόνια, η ταυτοποίηση ειδών του κρέατος και των προϊόντων τους κρέατος έχουν αποκτήσει αυξημένη προσοχή. Η νοθεία κρεάτων και η παραπλανητική σήμανση έχει γίνει σύνηθες φαινόμενο στη βιομηχανία κρέατος και οδήγησαν σε ανησυχίες σχετικά με διάφορους τομείς. Οι πληροφορίες που παρέχονται στους καταναλωτές είναι απαραίτητες διότι βάση αυτών επιλέγουν ορισμένα τρόφιμα σε σχέση με κάποια άλλα.

Η επιλογή ενός προϊόντος έναντι κάποιου άλλου μπορεί να αντανακλά:

1. Πτυχές του τρόπου ζωής: π.χ. χορτοφαγία και βιολογικά τρόφιμα.
2. Τη διατροφή και τη δίαιτα: π.χ. διατροφική αξία και θερμίδες.
3. Οικονομικούς λόγους.
4. Ανησυχίες για την υγεία: π.χ. δυνητικά αλλεργιογόνα τροφίμων και εισαγωγή τροφιμογενών επιβλαβών μικροοργανισμών. Οι τροφικές αλλεργίες θεωρούνται ένα αναδυόμενο πρόβλημα της δημόσιας υγείας, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες. Άτομα με κάποιες αλλεργίες πρέπει να γνωρίζουν ότι το προϊόν που αγοράζουν περιέχει ακριβώς ότι αναγράφεται στην ετικέτα και τίποτα άλλο. Πρόσφατα, ο Codex Alimentarius του FAO, ο Παγκόσμιος οργανισμός υγείας (Π.Ο.Υ.) και η Ευρωπαϊκή Επιτροπή πρότειναν έναν κατάλογο αλλεργιογόνων, που βασίζεται στη συχνότητα και τη σοβαρότητα των αλλεργιογόνων, των οποίων η ύπαρξη θα πρέπει να αναφέρεται σε προσυσκευασμένα τρόφιμα. Ο κατάλογος περιλαμβάνει 12 ομάδες συστατικών

που θεωρούνται δυνητικά αλλεργιογόνα και από τα οποία τονίζονται το γάλα, τα αυγά, τα ψάρια, τα φιστίκια, τα φουντούκια, η σόγια, τα καρύδια, ο ορός γάλακτος και άλλα δημητριακά που περιέχουν γλουτένη (όπως το σιτάρι, η σίκαλη και το κριθάρι και έχουν τη δυνατότητα να βλάψουν το βλεννογόνο του μικρού εντέρου των ασθενών με κοιλιακά προβλήματα) (Marfa et al., 2008).

5. Ειδική διατροφή για έγκυες γυναίκες.
6. Τη θρησκεία: π.χ. Ο ακριβής προσδιορισμός του είδους θεωρείται σημαντικός δεδομένου ότι ορισμένες θρησκευτικές ομάδες θα μπορούσαν να προσβληθούν από την κατανάλωση κρέατος «μη-kosher» ή «μη-halal». Απουσία του χοιρινού κρέατος στις διατροφικές συνήθειες ομάδων ατόμων λόγω θρησκευτικών πρακτικών, όπως οι Εβραίοι και οι Μουσουλμάνοι. Στην Ινδία η αγελάδες θεωρούνται ιερές και η σφαγή αγελάδων και η εξαγωγών βοείου κρέατος απαγορεύεται.

Το κατά πόσο είναι αυθεντικό ή όχι έναν προϊόν και κυρίως προϊόντα κρέατος είναι μια δύσκολη υπόθεση διότι πάντα θα υπάρχει ο ανθρώπινος παράγοντας που αποσκοπεί στο χρηματικό κέρδος. Τα προϊόντα κρέατος λόγω του μεγάλου αριθμού ειδών που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη, αλλά και εξαιτίας των ποικίλων επεξεργασιών που δέχονται μέχρι την τελική πώληση, όπως το μαγείρεμα, το κάπνισμα, το τηγάνισμα, το αλάτισμα ή η κονσερβοποίηση κάνουν ποιο δυσχερή την αναγνώριση του είδους που χρησιμοποιείται. Τα σοβαρά όμως προβλήματα της αναλυτικής ταυτοποίησης προκύπτουν κατά την αλλοίωση των βασικών διακριτικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Η ανάγκη για την ταυτοποίηση του κρέατος αποκτά ακόμα μεγαλύτερη σημασία, αν αναλογιστούμε τις ποσότητες των ζωικών ειδών που διακινούνται καθημερινά ανά τον κόσμο καθώς και το συνολικό τζίρο που δημιουργείται γύρω από αυτά τα προϊόντα.

Για να διασφαλιστεί η τήρηση των κανονισμών και να επιβληθούν οι ανάλογες ποινές όταν χρειάζεται, απαιτούνται σωστές μέθοδοι αναγνώρισης της νοθείας. Οι τεχνικές για τον έλεγχο της αυθεντικότητας έχουν βελτιωθεί αφάνταστα τα τελευταία χρόνια και πλέον έχουμε μια ευρεία ποικιλία από ταχείες και αξιόπιστες τεχνικές και μεθόδους ταυτοποίησης για να βασιστούμε, κάθε μια κατάλληλη και εξειδικευμένη να ασχοληθεί με ένα συγκεκριμένο πρόβλημα. Υπάρχουν πολυάριθμες συμβατικές μέθοδοι που βασίζονται σε ανατομικά, ιστολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά καθώς και άλλες μέθοδοι ανάλυσης, όπως χημικές, χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας, μικροσκοπία, φασματοσκοπία, ενζυμικές και ανοσολογικές δοκιμασίες που έχουν εφαρμοστεί για την ταυτοποίηση των ειδών και η καθεμιά τους δίνει τα δικά της όρια ανίχνευσης (Sakaridis, 2013). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών έχουν γίνει δημοφιλής μέθοδοι με βάση το DNA, ως αντικαταστάτες των συμβατικών μεθόδων. Η σταθερότητα του DNA υπό υψηλές θερμοκρασίες, πιέσεις και χημικές επεξεργασίες που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία εξασφαλίζει την ιδιαιτερότητα και την αξιοπιστία των μεθόδων που βασίζονται στο DNA. Κατά τα τελευταία χρόνια, αρκετές μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) έχουν προταθεί σαν χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό των ειδών προέλευσης στα τρόφιμα. Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μοριακή τεχνική, ως αποτέλεσμα της υψηλής εξειδίκευσης και ευαισθησίας, της αναπαραξιμότητας των αποτελεσμάτων, του

γρήγορου χρόνου επεξεργασίας, της απλότητας της μεθόδου και του χαμηλού κόστους. Η ακρίβειά της στην διαφοροποίηση προϊόντων με βάση το κρέας από άλλα συγγενικού είδους, μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με τη χρήση μιτοχονδριακού DNA, λόγω του υψηλού ποσοστού μετάλλαξης και του αριθμού των αντιγράφων σε κάθε κύτταρο σε σύγκριση με γονιδιωματικό DNA (Girish et al., 2005). Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την αξιοπιστία της ενίσχυσης PCR διαφόρων περιοχών του μιτοχονδριακού γονιδιώματος ως ένα εργαλείο για την ταυτοποίηση του κρέατος και των προϊόντων του. Αυτή η μελέτη παρέχει μια επισκόπηση των πιθανών αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του κρέατος και των προϊόντων του.

4. Μοριακοί Δείκτες

4.1. Γενικά

Η αδυναμία μορφολογικής ταυτοποίησης των διαφόρων ειδών κρέατος στα μεταποιημένα προϊόντα, τονίζει τη σημασία εύρεσης μεθόδων ανίχνευσης τους, για την αποφυγή της εκμετάλλευσης των καταναλωτών. Για την ανίχνευση των ειδών κρέατος σε μείγματα, αναπτύχθηκε μια ποικιλία αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούν μία από τις τρεις κατηγορίες μοριακών δεικτών: 1) Λιπίδια, 2) Βιοχημικούς δείκτες, στους οποίους ανήκουν οι πρωτεΐνες και τα ισοένζυμα (με κύρια χρησιμοποιούμενη υποκατηγορία τα αλλοένζυμα), που ανιχνεύουν μεταβολές στα προϊόντα έκφρασης και 3) Γενετικοί ή DNA δείκτες, οι οποίοι αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό DNA (μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό), που ανιχνεύουν μεταβολές στο DNA, όπως αλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (αντιγραφή, αναστροφή, διαγραφή και εισαγωγή) (Εικ.4.1).

Η ανάλυση λιπιδίων εφαρμόζεται στις περιπτώσεις όπου υπάρχει ανάγκη να καθοριστούν τα είδη από τα οποία προήλθαν τα ζωικά λίπη και περιλαμβάνει την υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιώντας στήλη αντίστροφης φάσης και ανιχνευτή UV (Ibrahim, 2008). Το όριο ανίχνευσης των ζωικών λιπών είναι υψηλό, οπότε πρέπει να υπάρχει μεγάλη υποκατάσταση για να μπορέσουμε να την ανιχνεύσουμε.

Αρκετές μέθοδοι βασίζονται στην ανάλυση πρωτεϊνών για την αναγνώριση των ειδών, σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης (Ozgen Arun & Ugur, 2000), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Aristoy & Toldra, 2004) και η ανοσολογική δοκιμή (Ayaz et al., 2006). Η ανοσολογική δοκιμή (μια βιοχημική δοκιμασία που μετρά την παρουσία ή τη συγκέντρωση ενός μακρομορίου σε ένα διάλυμα με τη χρήση ενός αντισώματος ή μιας ανοσοσφαιρίνης), είναι η πιο εύκολη στη χρήση και προσφέρει καλύτερη εξειδίκευση σε ένα ευρύ φάσμα ειδών. Ωστόσο λόγω της θερμικής μετουσίωσης των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος ή οποιασδήποτε άλλης θερμικής επεξεργασίας του κρέατος, καθώς και η παρουσία πρωτεϊνών εξαρτώμενων από τους ιστούς και η αδυναμία διακρίσεως μεταξύ κάποιων κρεάτων όπως κοτόπουλο / γαλοπούλα ή αρνί / αίγα (Zhang et al., 2007) καθιστούν δύσκολη έως ανέφικτη τη χρήση των πρωτεϊνικών δεικτών σε πολλές περιπτώσεις.

Σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες το DNA εμφανίζει υψηλή σταθερότητα, τόσο ενάντια σε περιβαλλοντικές επιρροές όσο και σε διάφορες θερμικές επεξεργασίες. Είναι παρόν στην πλειοψηφία των κυττάρων και εξάγεται επιτυχώς από κατεργασμένα, ωμά και κονσερβοποιημένα κρέατα επιτρέποντας την ανίχνευση μέσω της PCR ακόμα και σε άκρως μεταποιημένα προϊόντα. Ο γενετικός δείκτης είναι ένα γονίδιο ή μια αλληλουχία DNA σε μία γνωστή θέση πάνω στο χρωμόσωμα, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση ποικιλιών, ατόμων, ειδών, ομάδων ή πληθυσμών. Μοριακές μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση του DNA έχουν δείξει ένα πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης και παίζουν πλέον κεντρικό ρόλο στην ταυτοποίηση των ειδών κρέατος. Υπάρχουν δύο γενικοί τύποι δεικτών DNA: 1) Εκείνοι που βασίζονται στον υβριδισμό DNA-DNA, όπως ο πολυμορφισμός μεγέθους

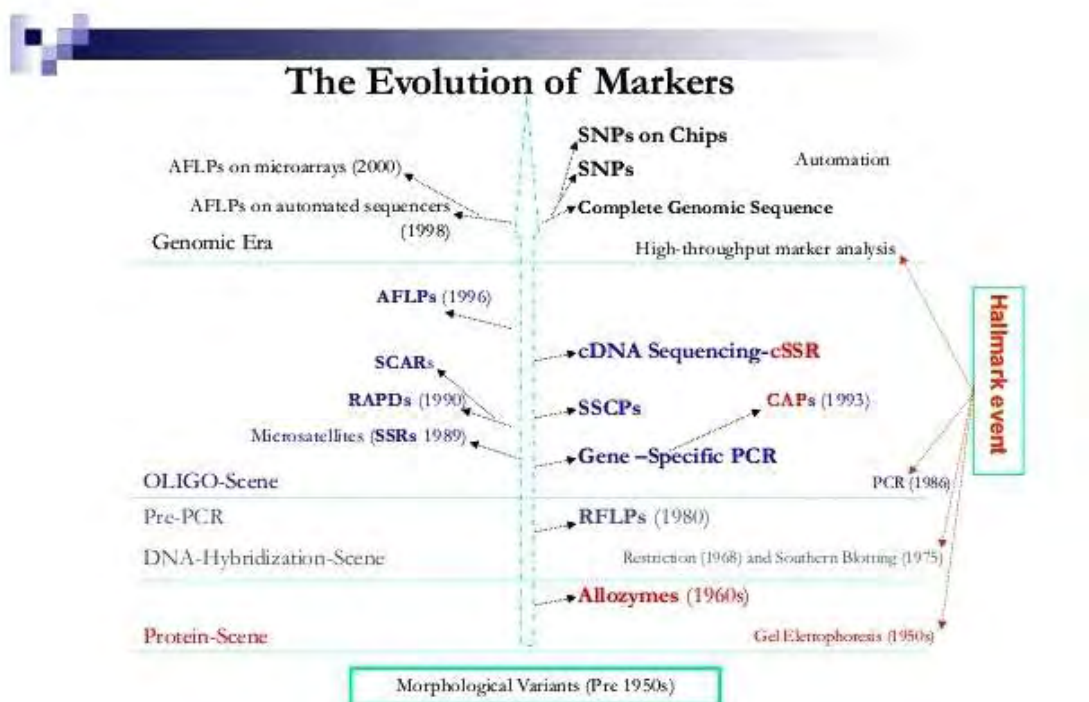
περιοριστικού θραύσματος ή RFLP (restriction fragment length polymorphisms). Πρόκειται για ένα μοριακό δείκτη ο οποίος βασίζεται στην παραγωγή διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα και 2) Εκείνοι που βασίζονται στην ενίσχυση αλληλουχιών DNA χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκει μια πληθώρα τεχνικών όπως (Chauhan et al., 2010):

- RAPD (random amplification of polymorphic DNA)
- AFLP (amplified fragment length polymorphism)
- SSR microsatellite polymorphism (simple sequence repeat)
- SNP (single nucleotide polymorphism)
- SSLP (simple sequence length polymorphism)
- SSCP (single-strand conformation polymorphism)
- EST (expressed sequence tag) κτλ

Μερικά από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός μοριακού δείκτη είναι:

1. Παρουσία πολυμορφισμού, δηλαδή η ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο.
2. Απλή κληρονομικότητα με συνεπικράτεια στην έκφραση των αλληλόμορφων. Έτσι εάν ένα άτομο φέρει δύο διαφορετικά αλληλόμορφα να μπορεί να απεικονίσει και τα δύο (διαχωρισμός ομοζυγώτων και ετεροζυγώτων ατόμων).
3. Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε όλο το γονιδίωμα.
4. Να μπορούν να αναπτυχθούν και να εφαρμοστούν εύκολα, γρήγορα και οικονομικά.
5. Να είναι ισχυροί και επαληθεύσιμοι μεταξύ διαφορετικών τύπων ιστών και σε δεδομένα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων.
6. Να έχουν φαινοτυπική σταθερότητα, δηλαδή να είναι ανεπηρέαστοι από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την εξελικτική μεταβολή των ειδών (White et al., 2007).

Οι μοριακοί δείκτες έχουν μια ευρεία ποικιλία εφαρμογών, όπως είναι η μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας, η γενετική ταυτοποίηση και η γονιδιακή χαρτογράφηση φυτών και ζώων, η σύγκριση μεταξύ άγριων πληθυσμών και αυτών που ανατρέφονται ελεγχόμενα κάτω από τεχνητές συνθήκες και η γενετική βελτίωση των φυτών. Μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της σχέσης μεταξύ μιας κληρονομικής ασθένειας και της γενετικής της αιτίας, για εγκληματολογικές μελέτες, τεστ πατρότητας καθώς και στην επιστήμη της ασφάλειας των τροφίμων.

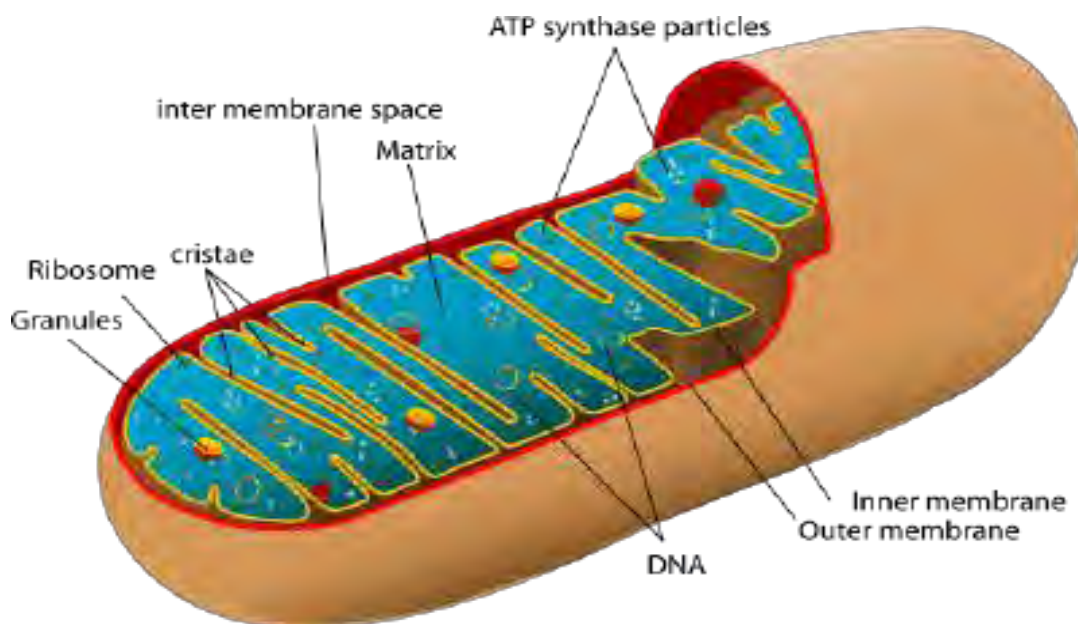


Εικόνα 4.1: Εξέλιξη των μοριακών δεικτών.

<http://www.slideshare.net/FOODCROPS/molecular-marker-and-its-application-to-genome-mapping-and-molecular-breeding-18457692>

4.2. Μιτοχονδριακό DNA

Κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο διαθέτει μιτοχόνδρια ο αριθμός των οποίων είναι ανάλογος με τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου αλλά και την τυχαία κατανομή των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Τα μυϊκά, νευρικά και ηπατικά κύτταρα μεταφέρουν συνήθως το μεγαλύτερο αριθμό μιτοχονδρίων λόγω της αυξημένης μεταβολικής τους δραστηριότητας (Hartwell et al., 2008). Κατά μέσο όρο έχουν βρεθεί περίπου 800-1000 μιτοχόνδρια ανά κύτταρο στα ζώα και η πλήρης αλληλουχία του βόειου μιτοχονδριακού γονιδιώματος αποτελείται από 16.338bp. Το βόειο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι σχεδόν ομόλογο με το ανθρώπινο και τα γονίδια οργανώνονται με σχεδόν πανομοιότυπο τρόπο (Anderson et al., 1982). Το μιτοχόνδριο διαχωρίζεται από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου με μια διπλή πορώδη μεμβράνη εξωτερικά. Υπάρχει ένας λεπτός διαμεμβρανικός χώρος, διάκενο μεταξύ των δύο μεμβρανών. Εντός του μιτοχονδρίου υπάρχει εσωτερική μεμβράνη με πολλές αναδιπλώσεις (Εικ.4.2). Ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη καλείται μήτρα (matrix) και περιέχει ριβοσώματα, ένζυμα και πολλά αντίγραφα μιτοχονδριακού DNA που εμφανίζονται σε κυκλικά ή γραμμικά χρωμοσώματα, των οποίων το μέγεθος και το περιεχόμενο σε γονίδια διαφέρει από είδος σε είδος.



Εικόνα 4.2: Δομή του μιτοχονδρίου.

<http://biology.about.com/od/cellanatomy/ss/mitochondria.htm>

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια υπό την έννοια ότι εξαρτώνται μόνο εν μέρει από το κύτταρο για να αναπαραχθούν και να αναπτυχθούν. Το μιτοχόνδριο αναφέρεται και ως το ενεργειακό κέντρο του κυττάρου μεταβολίζοντας τα βιολογικά μακρομόρια που λαμβάνει ο οργανισμός με την τροφή (υδατάνθρακες και λίπη) και συνθέτοντας χημική ενέργεια – μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για να πραγματοποιήσει τις διάφορες λειτουργίες του κυττάρου.

Γενικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν το μιτοχονδρικό από το πυρηνικό DNA καθιστώντας το κατάλληλο για μελέτες ταυτοποίησης ειδών είναι:

- Το πυρηνικό DNA (nDNA) είναι ένα μακρύ, γραμμικό, δίκλωνο μόριο τυλιγμένο γύρω από πρωτεΐνες ιστόνης στην υπερελικομένη δομή των χρωμοσωμάτων, με μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο και μια υδροξυλομάδα στο 3' άκρο και αντιπροσωπεύει το γενετικό υλικό που περιέχεται σε κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο εντός του πυρήνα. Από την άλλη πλευρά, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι συνήθως ένα κυκλικό μόριο, επί το πλείστον μη δεσμευμένο με πρωτεΐνες και αναφέρεται στο γενετικό υλικό που βρίσκεται εντός των μιτοχονδρίων (Hartwell et al., 2008). Το κυκλικό του σχήμα το καθιστά πιο σταθερό και λιγότερο επιρρεπές σε υποβάθμιση με το πέρασμα του χρόνου, σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA, και έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση του μιτοχονδριακού DNA σε επεξεργασμένα τρόφιμα που υποβάλλονται σε ακραίες συνθήκες (Mohamad et al., 2013).
- Ένα πλεονέκτημα του μιτοχονδριακού DNA για την ταυτοποίηση των ειδών προέρχεται από το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά μιτοχόνδρια ανά κύτταρο και υψηλός αριθμός αντιγράφων του mtDNA σε κάθε μιτοχόνδριο, καθιστώντας το μιτοχονδριακό DNA μία φυσική πηγή γενετικής ποικιλομορφίας (Hartwell et

al., 2008). Αντίθετα, η ανίχνευση του πυρηνικού DNA είναι περιορισμένη, ως αποτέλεσμα του γενικά χαμηλού αριθμού αντιγράφων DNA στον πυρήνα κάθε κυττάρου (συνήθως υπάρχει μόνο ένα αντίγραφο). Η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων του mtDNA σε ένα κύτταρο βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία του συστήματος της PCR και συμβάλει στην επιβίωση τουλάχιστον ενός αντιγράφου mtDNA, όταν ο ιστός υποβάλλεται σε ακραίες συνθήκες επεξεργασίας σε σύγκριση με το nDNA (Rodriguez et al., 2005). Έχει αναφερθεί ότι η ανάλυση mtDNA επιλεγμένων γονιδίων απαιτεί μόνο 10 μόρια για την επιτυχή ανίχνευση του, αλλά πολύ περισσότερα μόρια nDNA, υποδεικνύοντας τη μεγαλύτερη ευαισθησία του mtDNA σε σχέση με το nDNA σε δοκιμές PCR πραγματικού χρόνου και το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (Mohamad et al., 2013).

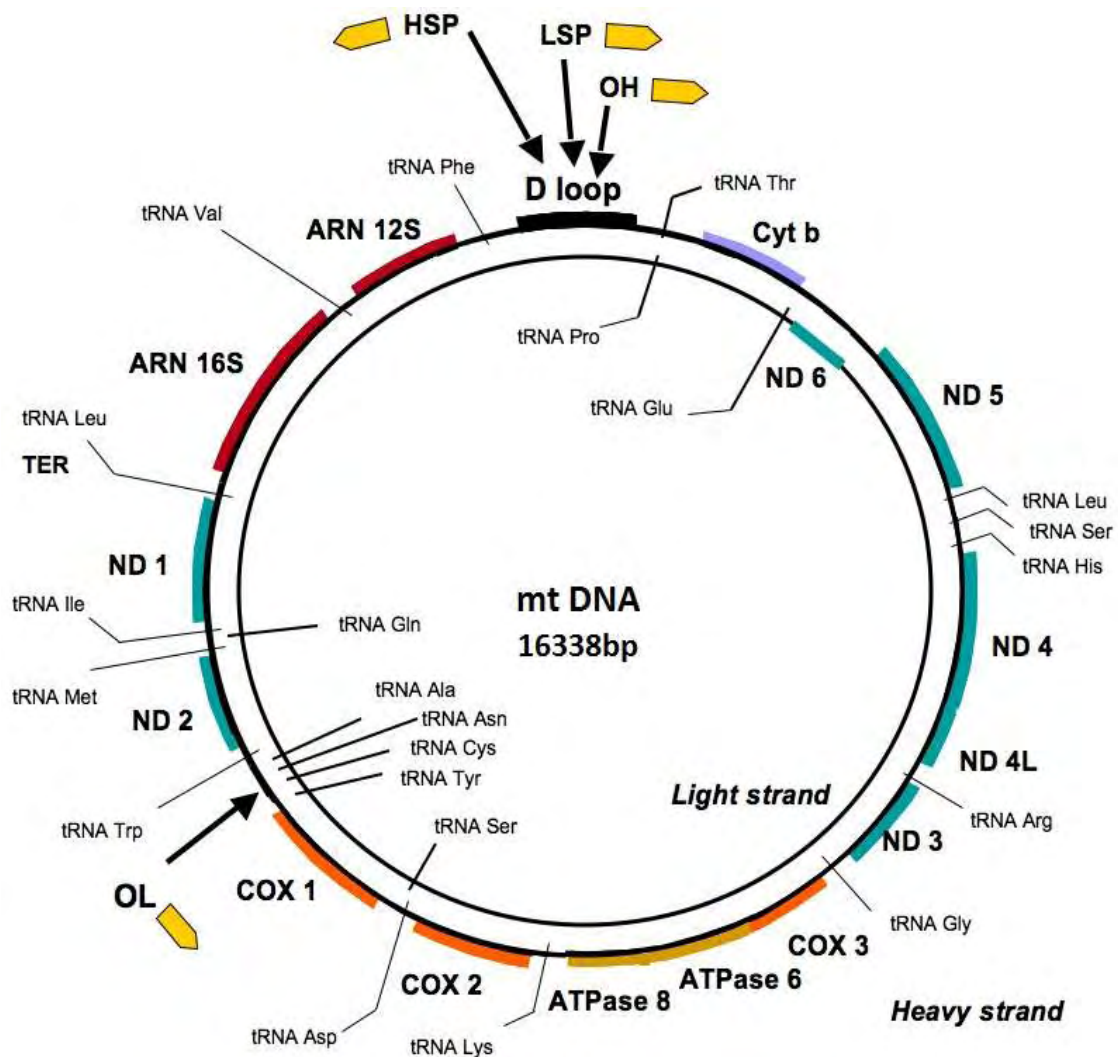
- Το πυρηνικό DNA των θηλαστικών αποτελείται από περίπου 20.000 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Περίπου το 98% του πυρηνικού γονιδιώματος των περισσότερων οργανισμών αποτελείται από μη-κωδικοποιούμενες και επαναλαμβανόμενες περιοχές DNA (οι οποίες έχουν άγνωστη λειτουργία και συχνά θεωρούνται «άχρηστο» DNA το ποσοστό του οποίου διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ειδών), περιοχές που περιλαμβάνουν ιντρόνια και αλληλουχίες διαχωρισμού μεταξύ των γονιδίων, καθιστώντας τα όλα παράγοντες που διακρίνουν το πυρηνικό από το μιτοχondριακό DNA (Hartwell et al., 2008). Μελέτες έχουν δείξει ότι στοιχεία του πυρηνικού DNA, όπως το δορυφορικό DNA (satellite DNA - Guoli et al., 1999), τα ιντρόνια (introns - Whittall et al., 2006), η εσωτερική διαχωριστική περιοχή μεταγραφής (internal transcribed spacer region - Wang et al., 2006) και τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία είναι χρήσιμα για την ταυτοποίηση των ειδών. Από την άλλη το μέγεθος του μιτοχondριακού DNA είναι πολύ μικρότερο από εκείνο του nDNA και ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των οργανισμών. Το μιτοχondριακό DNA περιέχει 37 γονίδια, τα οποία είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία των μιτοχondρίων. Σε αυτά περιλαμβάνονται 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην παραγωγή των ενζυμικών υπομονάδων για τη μεταφορά ηλεκτρονίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση, δύο γονίδια για τα ριβοσωματικά RNAs (rRNA) (12S και 16S rRNA) και 22 γονίδια για τα μεταφορικά RNAs (tRNA) (η λειτουργία των rRNAs και tRNAs για τη μετάφραση των πρωτεϊνών γίνεται στα ριβοσώματα). Τέλος στο μιτοχondριακό DNA υπάρχει μια περιοχή μη-κωδικοποίησης περίπου 1000bp που αναφέρεται ως εκτόπισμα βρόχου ή D-loop (Hartwell et al., 2008).
- Το πυρηνικό DNA κληρονομείται στους απογόνους μέσω του μεντελικού τρόπου κληρονομικότητας που αναφέρεται και στους δύο γονείς. Η διαδικασία περιλαμβάνει το γενετικό ανασυνδυασμό που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων συνδυασμών αλληλομόρφων ή τις διαφορετικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων από εκείνες του κάθε γονέα με αποτέλεσμα τα ιντρόνια του πυρήνα να εξελίσσονται πολύ αργά, να είναι υπερανাকাτεμένα και δύσκολα στην ταξινόμηση οδηγώντας στην ατελή επίλυση φυλογενετικών σχέσεων

μεταξύ των ειδών (Whittall et al., 2006). Αντίθετα το mtDNA κληρονομείται σχεδόν αποκλειστικά από τη μητέρα και σπάνια είναι αποτέλεσμα γενετικού ανασυνδυασμού (Hartwell et al., 2008). Η μητρική κληρονομικότητα του μιτοχονδριακού DNA επιτρέπει την καλύτερη σύγκριση ενός ατόμου προς ένα άλλο με μακρινή συγγένεια άτομο και είναι χρήσιμο για τη μελέτη εξελικτικών και φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Αν και η μονογονική κληρονομιά των μιτοχονδρίων είναι ο κανόνας μεταξύ των μεταζώων και των φυτών, έχει αναφερθεί ότι τα μιτοχόνδρια μπορούν περιστασιακά και κατ' εξαίρεση να κληρονομηθούν και από τον πατέρα σε ορισμένα είδη, όπως τα μύδια (Hoeh et al., 1991). Πατρικής προέλευσης μιτοχόνδρια έχουν αναφερθεί επίσης σε ορισμένους μικροοργανισμούς (yeast) καθώς και ορισμένα έντομα, όπως οι μύγες των φρούτων (fruit flies) (Kondo et al., 1992), ένα είδος μέλισσας (Meusel et al., 1993) και σε σπάνιες περιπτώσεις ανδρική μιτοχονδριακή κληρονομικότητα εμφανίζεται σε ορισμένα θηλαστικά, όπως πρόβατα (Zhao et al., 2004) και κλωνοποιημένα βοοειδή (Steinborn et al., 1998).

- Το μιτοχονδριακό DNA έχει υψηλότερο βαθμό εξέλιξης (περίπου 10 φορές) σε σχέση με το πυρηνικό DNA μεταξύ των ίδιων ομάδων ατόμων, που οφείλεται στον ασυνήθιστα υψηλό ρυθμό μετάλλαξης. Εμφανίζει περισσότερα λάθη κατά την αντιγραφή, εξαιτίας του μη αποτελεσματικού μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA και του πιο μεταλλαξιογόνου ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος (Brown et al., 1979 & Hartwell et al., 2008). Η συσσώρευση παραλλακτικότητας του mtDNA μεταξύ στενά συγγενικών ειδών, οι οποίοι μοιράζονται σε μεγάλο βαθμό παρόμοιο nDNA, εξηγεί την προτίμηση χρήσης του μιτοχονδριακού DNA για την παρακολούθηση της εξελικτικής πορείας ενός συγκεκριμένου είδους. Επιπλέον, διάφορες περιοχές του mtDNA εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς, παρέχοντας ευρεία επιλογή περιοχών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχος ανάλογα με το σκοπό της μελέτης (Mohamad et al., 2013). Άρα οι υψηλότερες γενετικές παραλλαγές που εμφανίζονται στο mtDNA μεταξύ των ειδών σε σύγκριση με nDNA βοηθά στην αύξηση της εξειδίκευσης της αντίδρασης της PCR με το σχεδιασμό ειδικών εκκινητών για τα διάφορα είδη.
- Οι μέθοδοι επεξεργασίας που εφαρμόζονται κατά την παρασκευή των προϊόντων με βάση το κρέας, επηρεάζουν την ακεραιότητα του DNA και προκαλούν τον κατακερματισμό του κάνοντας την ανίχνευση μεγάλων αλληλουχιών στόχων αδύνατη σε πολλές περιπτώσεις. Για να ξεπεράσουμε αυτό το πρόβλημα, συνιστάται η χρήση μικρότερων θραυσμάτων (100-200bp), καθιστώντας το mtDNA κυρίαρχο σε τέτοιες μελέτες, λόγω του υψηλού αριθμού μικρών αντιγράφων DNA σε κάθε κύτταρο, εξασφαλίζοντας επαρκή ποσότητα προϊόντος στην PCR, ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες ωμών ή επεξεργασμένων ιστών (Dooley et al., 2004).

Για την ταυτοποίηση των ειδών κρέατος η προέλευση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στόχου, είτε από πυρηνικό (nDNA) είτε από μιτοχονδριακό DNA

(mtDNA), πιστεύεται ότι επηρεάζει την εξειδίκευση και την ευαισθησία της αντίδρασης της PCR (Mohamad et al., 2013). Επιπλέον, η μεταβλητότητα των αλληλουχιών εντός του είδους καθώς και μεταξύ των ειδών και ο αριθμός των αντιγράφων του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού DNA, μπορεί να επηρεάσει την απόδοση της αντίδρασης της PCR στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αλληλουχιών στόχων. Η επιλογή του γονιδίου για την ανάλυση της PCR εξαρτάται από τη μεταβλητότητα των αλληλουχιών-στόχων στα διαφορετικά είδη. Για την εντός και μεταξύ των ειδών ταυτοποίηση με την PCR, χρησιμοποιείται τουλάχιστον ένα ειδικό ζεύγος εκκινητών που να αναγνωρίζει ειδικά μια μοναδική νουκλεοτιδική αλληλουχία σε κάθε είδος. Με βάση διάφορες μελέτες για τη διαφοροποίηση των ειδών κρέατος έχουν χρησιμοποιηθεί γονίδια τόσο από το πυρηνικό, όσο και από το μιτοχονδριακό DNA (Εικ.4.3) για να εντοπιστεί ένα συγκεκριμένο είδος ζώου και να αξιοποιηθεί η μεταξύ και η εντός του ίδιου είδους μεταβλητότητα στην αλληλουχία των γονιδίων. Από τα μιτοχονδριακά γονίδια το πιο κοινό για την ανίχνευση ειδών μέσω της PCR είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το κυτόχρωμα b. Το κυτόχρωμα b χρησιμοποιείται συχνά σε φυλογενετικές μελέτες και ως γονίδιο αναφοράς για την αναγνώριση ειδών μέσω της PCR. Περιέχει τόσο μεταβλητές όσο και συντηρημένες περιοχές που είναι επαρκείς για την αναγνώριση απόκλισης σε επίπεδο πληθυσμού και την εκτίμηση εξελικτικής σχέσης μεταξύ των ειδών (Dooley et al., 2004). Συχνή επιλογή για τη διάκριση ειδών κρέατος είναι επίσης και η περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού DNA, λόγω του υψηλού ποσοστού υποκατάστασης και της ταχείας εξέλιξης της λόγω μεταλλάξεων (Fajardo et al., 2008a). Σε γενικές γραμμές, μη-κωδικοποιούμενα τμήματα όπως η περιοχή D-loop παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα διακύμανσης σε σχέση με αλληλουχίες κωδικοποίησης, όπως το κυτόχρωμα b, πιθανώς λόγω των μειωμένων λειτουργιών. Χρήσιμα επίσης είναι τα γονίδια των υπομονάδων της αφυδρογονάσης NADH (ND5, ND2, ATPase6/ATPase8), εξαιτίας της μεταβλητότητας που εμφανίζουν μεταξύ των ειδών (Kesmen et al., 2009) καθώς και το γονίδιο 16S rRNA, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη καθολικών εκκινητών, δεδομένου ότι οι αλληλουχίες του είναι καλά διατηρημένες (αργά εξελισσόμενο γονίδιο) και κωδικοποιεί πρωτεΐνες που παίζουν ζωτικό ρόλο στη λειτουργία του κυττάρου, με αποτέλεσμα μικρότερο ρυθμό μετάλλαξης των γονιδίων (Chiappini et al., 2005), επίσης το γονίδιο 12S rRNA για τη δημιουργία ειδο-ειδικών εκκινητών για την αναγνώριση της μεταβλητότητας τόσο μεταξύ όσο εντός των ειδών (Fajardo et al., 2008b).



Εικόνα 4.3: Δομή του μιτοχονδριακού DNA.

<https://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/figures.htm>

4.3. Περιοχή 12S rRNA

Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μιτοχονδριακό γονίδιο 12S rRNA ως μοριακός δείκτης για την ποσοτικοποίηση των ειδών κρέατος εφαρμόζοντας τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου. Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε επειδή δείχνει κατάλληλο βαθμό μεταβλητότητας μεταξύ και εντός του ίδιου είδους και λόγω του υψηλού αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο (Rodriguez et al., 2005). Τα πολυάριθμα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA και κατά επέκταση της περιοχής 12S rRNA σε ένα κύτταρο, συμβάλουν στην επιβίωση τουλάχιστον ενός αντίτυπου, όταν ο ιστός υποβάλλεται σε ακραίες συνθήκες επεξεργασίας, όπως αποστείρωση, και αυξάνουν σημαντικά την ευαισθησία της PCR (Girish et al., 2004). Στη βάση δεδομένων GenBank υπήρχαν διαθέσιμες αλληλουχίες του γονιδίου 12S rRNA από διάφορα ζώα γλιτώνοντας έτσι χρόνο και χρήμα. Το γονίδιο 12S rRNA χρησιμοποιείται ευρέως στην μοριακή ταξινόμηση και στην εύρεση φυλογενετικών σχέσεων. Το γονίδιο έχει

χρησιμοποιηθεί στην πράξη για τη δημιουργία ειδικών εκκινητών εξειδικευμένων για μερικά είδη ελαφιών, υποδεικνύοντας την παρουσία μεταβλητότητας μεταξύ των ειδών επί της αλληλουχίας στόχου (Fajardo et al., 2008b). Εκτός αυτού, το 12S rRNA έχει χρησιμοποιεί σε συνδυασμό με μία σειρά ειδικών εκκινητών, για μια σειρά πτερωτών θηραμάτων εφαρμόζοντας την ανάλυση PCR και καταδεικνύοντας τόσο τη μεταξύ όσο και την εντός του είδους μεταβλητότητα που περιέχεται στην αλληλουχία στόχο (Rojas et al., 2010). Επίσης, έχουν σχεδιαστεί ειδικοί εκκινητές για το χοιρινό βασιζόμενοι στο γονίδιο αυτό, δίδοντας ένα πολύ ειδικό σύστημα αναγνώρισης στην PCR ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ζώων όσο και των φυτών που εμφανίζονται στις ζωοτροφές (Martin et al., 2009). Οι τιμές του ορίου ανίχνευσης του 12S rRNA που βασίζονται στο σύστημα της PCR και αναφέρθηκαν στις παραπάνω μελέτες κυμαίνονται από λιγότερο των 5 fg έως 10 pg DNA.

5. 5. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας γρήγορης, αξιόπιστης, με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση μεθόδου της real-time PCR, για την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση των ειδών κρέατος σε μείγματα κρεάτων. Ειδικά για τον προσδιορισμό βόειου κρέατος (*Bos taurus*) κυρίως σε μείγματα με χοιρινό (*Sus domesticus*) αλλά και σε μείγματα με χοιρινό, γαλοπούλα και κοτόπουλο σε διάφορες αναλογίες.

Ο μοριακός δείκτης που εξετάστηκε ήταν το μιτοχονδριακό γονίδιο 12S rRNA που έχει εφαρμοστεί και παλιότερα για την ταυτοποίηση ειδών κρέατος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Αρχικά σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές για κάθε είδος και έγινε έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με αλληλουχίες άλλων ειδών μέσω της PCR. Ύστερα διεξήχθησαν μια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας τη φθορίζουσα χρωστική SYBR green για να βρεθεί η επιθυμητή συγκέντρωση των εκκινητών (Fw & Rv), η οποία θα μας έδινε την καλύτερη απόδοση στην αντίδραση (πρέπει να κυμαίνεται από 95%-100%). Τέλος έγινε ξανά έλεγχος διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με εσωτερικό ανιχνευτή και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων μας. Όλες οι μέθοδοι ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν το είδος στόχο (μοσχάρι) όταν βρισκόταν σε μορφή αναμειγξών σε συγκεντρώσεις από 5% έως 95% με άλλα είδη (κοτόπουλο, γαλοπούλα, χοιρινό). Οι αναλύσεις δοκιμάστηκαν σε μείγματα με βάση το κρέας για να αξιολογηθεί η διαγνωστική ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου.

6. Πειραματική πορεία-μέθοδοι

6.1. Δείγματα

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυρίως δύο ζωικά είδη: μοσχάρι (*Bos taurus*) και χοιρινό (*Sus domesticus*). Ο μυϊκός ιστός συλλέχθηκε από ωμό κρέας το οποίο πάρθηκε από τοπικό κατάστημα ειδών διατροφής στη Λάρισα. Δημιουργήσαμε αναμειγξεις αυτών των δύο ειδών σε διάφορες αναλογίες, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1. Οι αναλογίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλυφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί, μέσα στα πλαίσια βέβαια που θα μπορούσαν να εξαχθούν χρήσιμα αποτελέσματα. Οπότε από κάθε είδος χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα ιστού (5-100mg). Μικρότερη ποσότητα κρίθηκε ότι δεν θα ήταν, στην παρούσα φάση, εύστοχο να χρησιμοποιηθεί. Παράλληλα για να σιγουρευτούμε ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε δεν πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες από άλλα είδη κάναμε επιπλέον αναμειγξεις με κοτόπουλο (*Gallus gallus*) και γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*). Η συντήρησή τους έγινε στους -20°C.

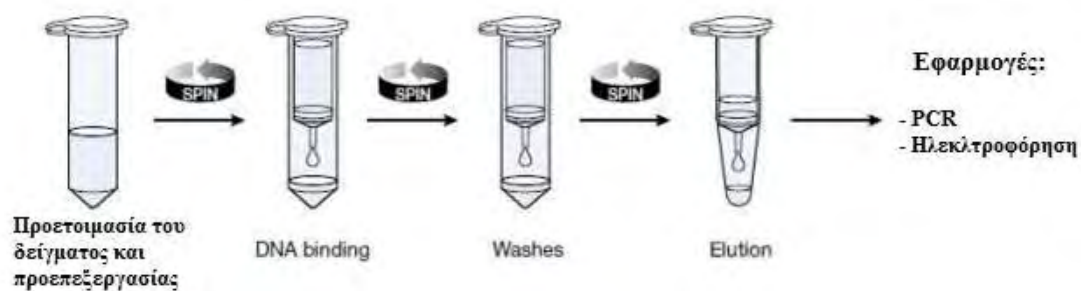
Πίνακας 6.1: Αναμείξεις των δύο ζωικών ειδών (μοσχάρι-χοιρινό) σε διάφορες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν

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

6.2. Απομόνωση του DNA

Η απόκτηση υψηλής ποιότητας άθικτου DNA, είναι συχνά το πρώτο και πιο κρίσιμο βήμα σε πολλές εφαρμογές θεμελιώδους μοριακής βιολογίας, όπως η PCR και η ηλεκτροφόρηση. Η απομόνωση άθικτου ολικού DNA από δείγματα ιστού κυμαίνεται σε δυσκολία ανάλογα με την φυσική και βιοχημική φύση του ιστού. Για την απομόνωση ολικού DNA από τον ιστό θηλαστικών (χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες ιστού που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen by life technologies), που επιτρέπει την ταχεία και αποτελεσματική απομόνωση του ολικού DNA και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Τεμαχίζουμε το δείγμα και τοποθετούμε τον ιστό σε φιαλίδια eppendorf των 1,5ml.
2. Προσθέτουμε 180μl PureLink Genomic Digestion Buffer και 20 μl πρωτεϊνάση K και αναδεύουμε, αφού εξασφαλίσουμε ότι ο ιστός έχει βυθιστεί πλήρως στο buffer mix.
3. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55 °C για περίπου 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση.
4. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για να αφαιρέσουμε τυχόν υλικά σωματίδια, και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο eppendorf των 2ml.
5. Προσθέτουμε 20μl RNase A, κάνουμε μια σύντομη ανάδευση στο vortex και τα αφήνουμε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει επώαση.
6. Προσθέτουμε 200μl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer και αναδεύουμε ξανά καλά στο vortex.
7. Προσθέτουμε 200μl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε έντονα για 5 δευτερόλεπτα.
8. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά eppendorf με στήλες που διαθέτει το kit (Εικ.6.1).
9. Προσθέτουμε 640μl διάλυμα λύσης των κυττάρων που έχει προετοιμαστεί με PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer και αιθανόλη.
10. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 1 λεπτό.



Εικόνα 6.1: Στάδια απομόνωσης ολικού DNA χρησιμοποιώντας PureLink Genomic DNA kit.

<http://www.lifetechnologies.com/gr/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/dna-extraction/genomic-dna-extraction/purelink-genomic-dna.html>

11. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής, τοποθετούμε την ανώτερη στήλη διήθησης σε καθαρό σωλήνα συλλογής, προσθέτουμε 500μl Wash Buffer 1 και φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό.
12. Μεταφέρουμε ξανά τη διηθητική στήλη σε νέο σωλήνα συλλογής, προσθέτουμε 500μl Wash Buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά.
13. Απορρίπτουμε ξανά το σωλήνα συλλογής, τοποθετούμε τη στήλη διήθησης σε νέο αποστειρωμένο erppendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 70μl Elution Buffer.
14. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και μετά φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές. Το erppendorf πλέον περιέχει καθαρό DNA (για να ανακτήσουμε περισσότερο DNA μπορούμε να εκτελέσουμε ένα 2^ο στάδιο με Elution Buffer).
15. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

6.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

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

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σε δύο φάσεις. Αρχικά μετά την απομόνωση του DNA από τους ιστούς των ζωικών οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν, για τον έλεγχο του μιτοχονδριακού DNA όπου μας πληροφορεί για την ακεραιότητα ή τον κατακερματισμό του και έπειτα μετά την ολοκλήρωση της PCR, για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης όπου μας δείχνει την ποσότητα του DNA, μας πληροφορεί για το μέγεθος του καθώς και την καθαρότητα του σε περίπτωση επιμόλυνσης.

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA που διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το ηλεκτρικό τους

φορτίο και τη στερεοδιάταξη τους, αφού κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας μάλιστα τις βιολογικές τους ιδιότητες. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA κινούνται μέσα σε ένα πορώδες πήκτωμα αгарόζης (από την κάθοδο προς την άνοδο) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (Ανασυνδιασμένο DNA, 2007). Τα μικρά μόρια κινούνται γενικά γρηγορότερα από τα μεγάλα αφού περνούν πιο εύκολα μέσα από τους πόρους. Επίσης όσο μεγαλύτερη είναι η τάση του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η μετακίνηση των μορίων, χωρίς όμως να υπερβεί κάποιο όριο γιατί υπάρχει κίνδυνος να λιώσει το πήκτωμα. Την κίνηση των μορίων επηρεάζει και η συγκέντρωση της αгарόζης, η στερεοδιάταξη των τμημάτων DNA καθώς και το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide - EtBr), μίας χρωστικής ένωσης που προσδένεται στο DNA και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η χρώση των τμημάτων του, ενώσω αυτό βρίσκεται στο πήκτωμα. Εκθέτοντας το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (ultraviolet – UV) τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμιά από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις του πηκτώματος λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς τους. Συνήθως χρησιμοποιούνται το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα loading buffers περιέχουν ως επί το πλείστον γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη, έτσι ώστε να καταβυθίζεται το DNA, καθώς και χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Τα κυριότερα loading buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αгарόζης είναι το TAE (Tris-Acetate-EDTA) και το TBE (Tris-Borate-EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

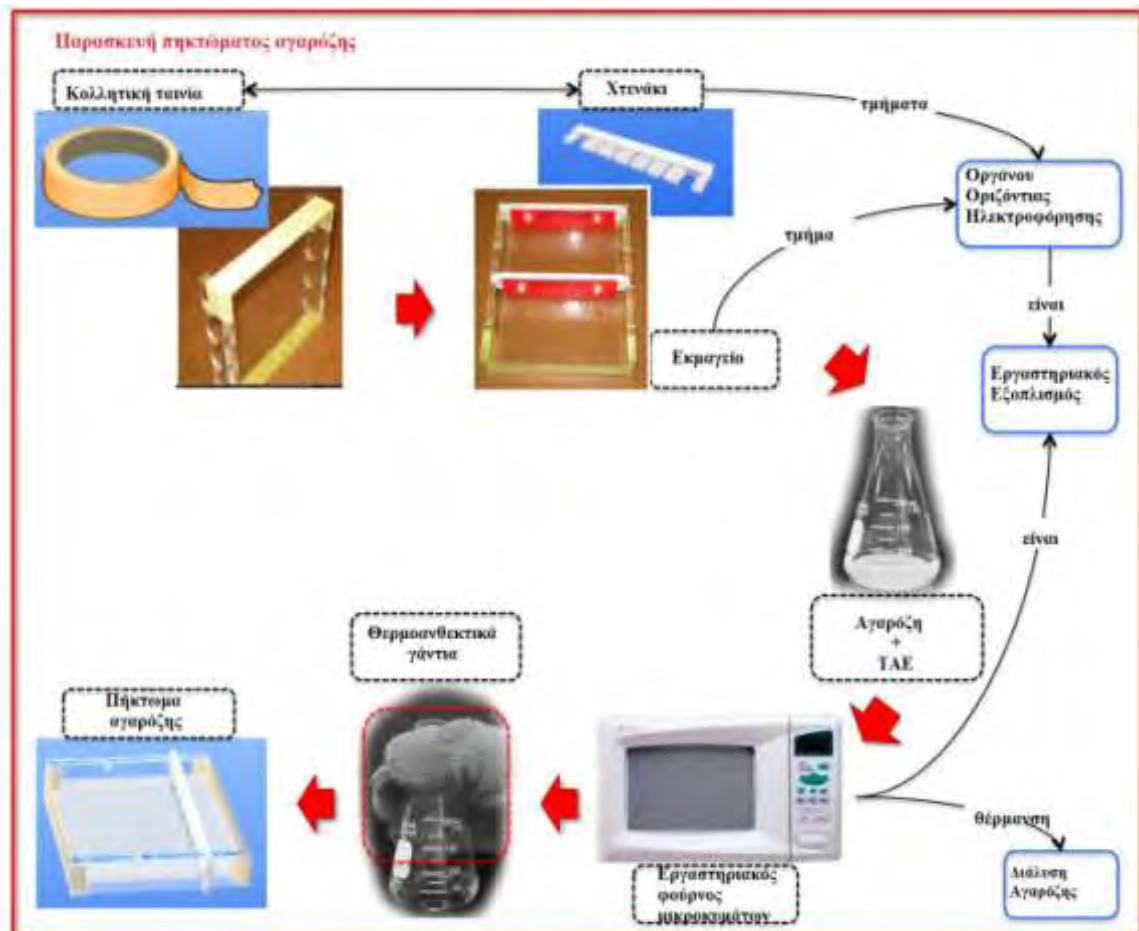
Bromophenol blue 0,1% w/v

TBE 1x

Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία του πηκτώματος διαλύουμε 0,6g αгарόζης σε 40ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3μl βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml. Η συγκέντρωση του πηκτώματος διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν.



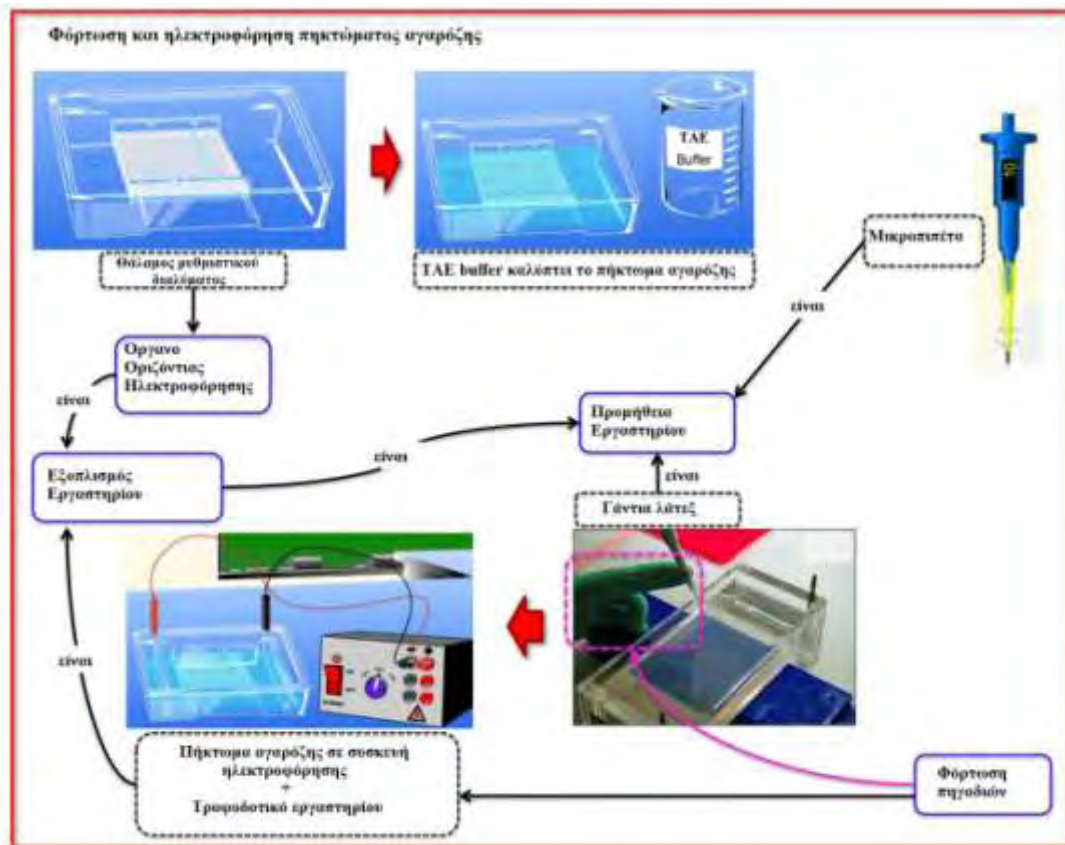
Εικόνα 6.2: Προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης

<http://www.biotea.ws/node/16>

Για την προετοιμασία του πηκτώματος αгарόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμάζουμε το εκμαγείο στο οποίο θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα αгарόζης και εισάγουμε τα χτενάκια για να σχηματιστούν οι θέσεις (πηγαδάκια) στις οποίες θα εισαχθούν τα δείγματα (Εικ.6.2).
2. Παρασκευάζουμε το πήκτωμα αгарόζης (σε μορφή λεπτής πλάκας). Ζυγίζουμε 0,6g αгарόζης και τα τοποθετούμε εντός κωνικής φιάλης των 100ml. Προσθέτουμε 40ml διάλυμα TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Βράζουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων και ανακινούμε ανά διαστήματα ώστε να διαλυθεί πλήρως η αгарόζη.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.

5. Προσθέτουμε 4μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) C=10mg/ml και ανακινούμε για ομογενοποίηση του διαλύματος.
6. Αδειάζουμε το διάλυμα στο εκμαγείο και με τη βοήθεια πλαστικού tip απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες που έχουν σχηματιστεί στα πηγαδάκια.
7. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρούμε το χτενάκι.



Εικόνα 6.3: Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης.

<http://www.biotea.ws/node/16>

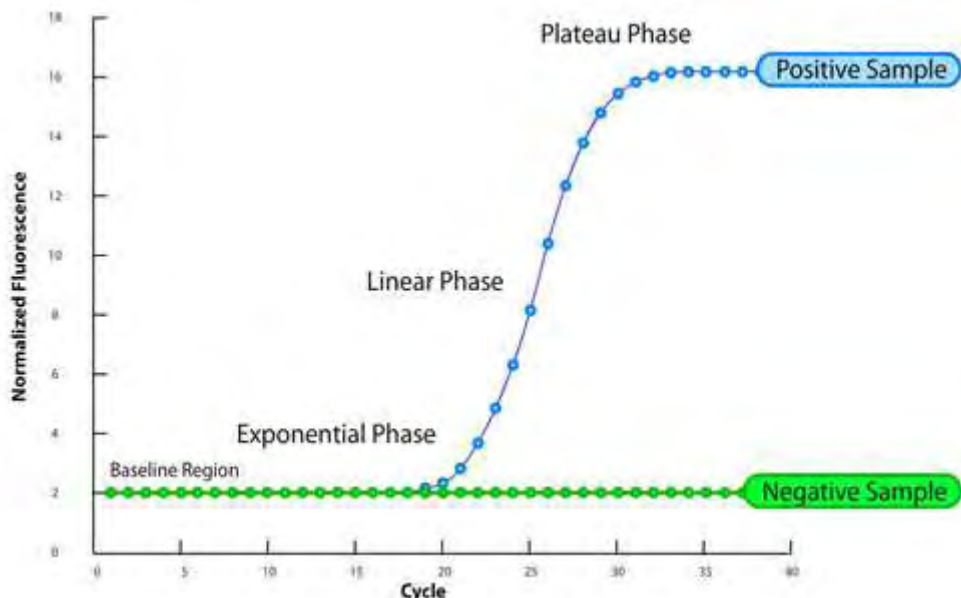
8. Τοποθετούμε το πήκτωμα μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x, ώστε η πηκτή να είναι πλήρως καλυμμένη (Εικ.6.3).
9. Προετοιμάζουμε τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση. Στην περίπτωση ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 3μl DNA ενώ στην περίπτωση ελέγχου της αντίδρασης της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA (PCR προϊόν) και στη συνέχεια γίνεται εισαγωγή των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής με μια πιπέτα.
10. Ρυθμίζουμε την τάση του τροφοδοτικού περίπου στα 80V. Μετά από περίπου 30 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Εικ.6.4).
11. Βγάζουμε φωτογραφία και κρατάμε αρχείο των αποτελεσμάτων.

αλυσίδας, εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε (Ανασυνδιασμένο DNA, 2007).

- ✓ Τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP και dTTP), τα οποία αποτελούν τα δομικά υλικά των νεοσυντιθέμενων μορίων DNA ενώ ταυτόχρονα προσφέρουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιμήκυνση.
- ✓ Το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο διατηρεί ένα σταθερό pH για τη βέλτιστη δράση της πολυμεράσης.
- ✓ Και τέλος τα ιόντα μαγνησίου, με μορφή θειϊκού μαγνησίου ή χλωριούχου μαγνησίου, τα οποία βοηθούν στην αποτελεσματική υβριδοποίηση των εκκινητών.

Η διαδικασία της PCR μπορεί να χωριστεί σε 3 φάσεις (Εικ.6.5):

- **Εκθετική φάση (exponential phase):** Είναι η φάση κατά την οποία έχουμε ακριβή διπλασιασμό της προεπιλεγμένης αλληλουχίας σε κάθε κύκλο (υποθέτοντας 100% αποτελεσματικότητα της αντίδρασης). Η αντίδραση είναι πολύ συγκεκριμένη και ακριβής.
- **Γραμμική φάση (linear phase):** Είναι η φάση κατά την οποία έχουμε υψηλή μεταβλητότητα από δείγμα σε δείγμα. Τα συστατικά της αντίδρασης αρχίζουν να καταναλώνονται και η αντίδραση επιβραδύνεται.
- **Φάση Plateau (or end - point):** Είναι το σημείο ανίχνευσης του προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης για τη μέθοδο της PCR. Η αντίδραση έχει σταματήσει εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων και τα προϊόντα της PCR όσο παραμένουν αρχίζουν να εκφυλίζονται (Applied Biosystems, 2003).



Εικόνα 6.5: Ανάλυση δεδομένων της PCR.

<https://www.abbottmolecular.com/technologies/real-time-pcr/maxratio-data-analysis.html>

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

Τα τρία στάδια του κάθε κύκλου της PCR είναι τα ακόλουθα (Εικ.6.6):

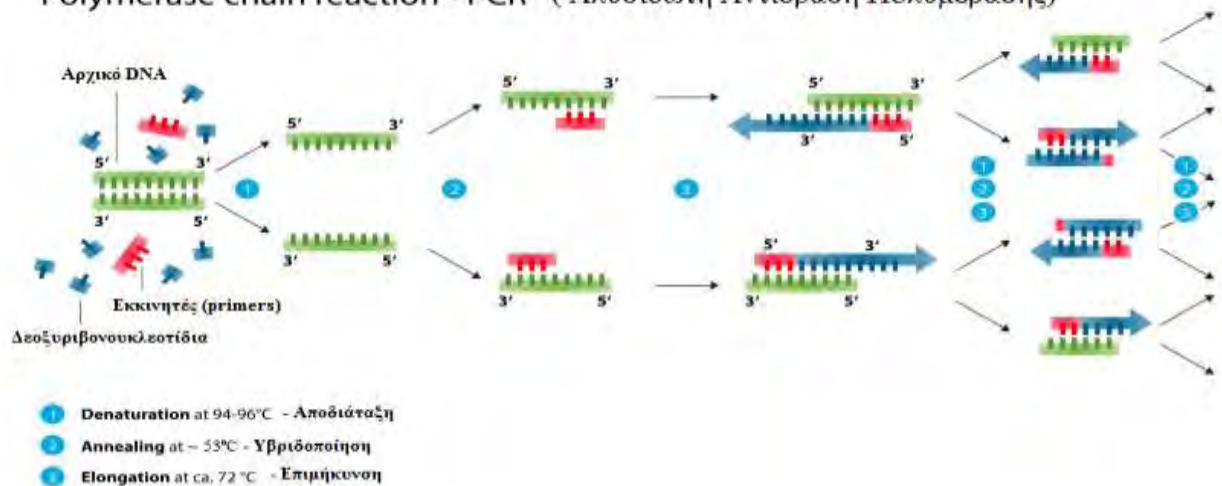
- **Αποδιάταξη (denaturation):** Στο στάδιο της αποδιάταξης γίνεται θέρμανση του μείγματος της αντίδρασης ώστε να διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων και να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA δίνοντας μονόκλινα μόρια ($94^{\circ} - 95^{\circ}\text{C}$).
- **Υβριδοποίηση (annealing):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι δύο εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις θέσεις πρόσδεσης (μία σε κάθε κλώνο) των αποδιατεταγμένων αλυσίδων του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των εκκινητών ($50^{\circ} - 65^{\circ}\text{C}$). Δείκτης των ιδιοτήτων αυτών είναι η θερμοκρασία υβριδισμού του 50% των μορίων του εκκινητή στο μόριο του DNA (θερμοκρασία τήξης T_m - melting temperature). Η θερμοκρασία T_m εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία του εκκινητή. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του εκκινητή και το ποσοστό του σε βάσεις γουανίνης - κυτοσίνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία T_m . Όμως όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία T_m , τόσο μεγαλύτερη είναι και η θερμοκρασία υβριδοποίησης της αντίδρασης της PCR που μπορεί να οδηγήσει σε πρόβλημα αν η T_m αυξηθεί υπερβολικά και η θερμοκρασία που απαιτείται για την υβριδοποίηση είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία που η πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση των νέων αλυσίδων του DNA. Είναι επίσης σημαντικό οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν παραπλήσιες T_m , ώστε στην ίδια θερμοκρασία να υβριδοποιούνται αποτελεσματικά και οι δύο. Ένας απλός τύπος για τον υπολογισμό της (T_m) είναι:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T) ^{\circ} \text{C}$$

Όπου A, T, G και C είναι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων αδεΐνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης στον εκκινητή. Με βάση την T_m των εκκινητών και με διάφορες δοκιμές προκύπτει η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού στην αντίδραση της PCR.

- **Επιμήκυνση (extension or elongation):** Πραγματοποιείται η σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση $5'-3'$, χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση. Στο τέλος του σταδίου αυτού έχουν διπλασιαστεί τα μόρια του DNA της υπό ενίσχυσης περιοχής και ολοκληρώνεται ένας κύκλος της αντίδρασης.

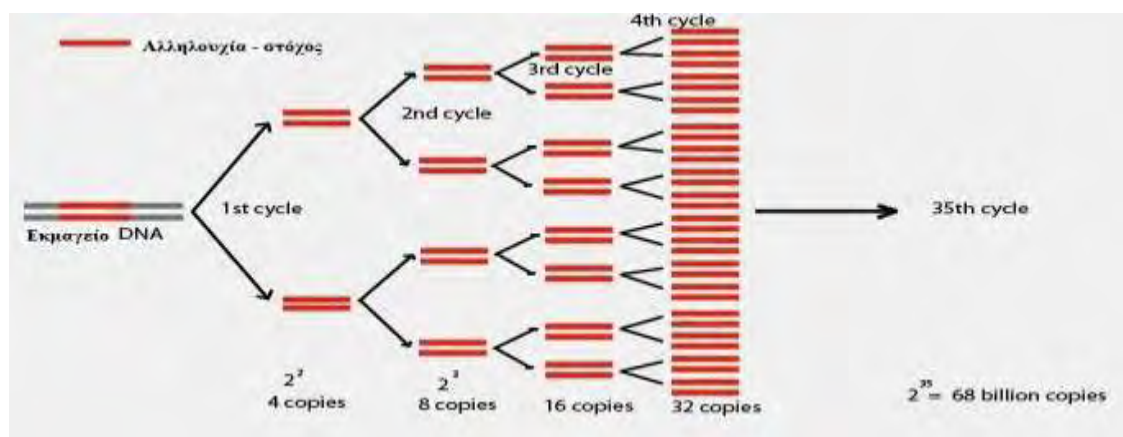
Polymerase chain reaction - PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)



Εικόνα 6.6: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

Υστερα το μείγμα της αντίδρασης ξαναθερμαίνεται. Οι αρχικοί και οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι διαχωρίζονται εκ νέου και αυτή τη φορά έχουμε 4 θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών, όπου η Taq πολυμεράση συνθέτει νέους συμπληρωματικούς κλώνους. Στο τυπικό πρόγραμμα της PCR περιλαμβάνονται ακόμα δύο στάδια. Ένα στάδιο αρχικής αποδιάταξης στους 95°C για 2-4 λεπτά, με σκοπό τον πλήρη διαχωρισμό των δύο κλώνων του DNA, και ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης στους 72°C για 3-10 λεπτά προκειμένου να γίνει πλήρης σύνθεση όλων των μορίων που έχουν συντεθεί από τη διαδικασία της PCR. Τα τρία στάδια (αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης) επαναλαμβάνονται για πολλούς κύκλους με αποτέλεσμα την εκθετική ενίσχυση των αλληλουχιών στόχων του DNA σε κάθε επερχόμενο κύκλο της αντίδρασης και σε ποσοστό ανάλογο με τους κύκλους που έχουμε ρυθμίσει να πραγματοποιηθούν (Εικ.6.7).



Εικόνα 6.7: Κύκλοι ενίσχυσης της PCR.

<http://www.paulvanouse.com/dwpcr.html>

Για τον πολλαπλασιασμό του 12S rRNA χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 12S rRNA Fw και 12S rRNA Rv. Η αλληλουχία τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA

Εκκινητές Bos	Αλληλουχία
12S rRNA Fw	5'- ATG-ACG-AAA-GTG-ACC-CTA-CAA-TAG-CC – 3'
12S rRNA Rv	5'- ATT-TTG-TTT-ATG-TAA-TTA-TCT-GT – 3'

Για την διαδικασία της PCR ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

1. Μεταφέρουμε 1μl εκμαγείου DNA, το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα 200-700ng, από το κάθε δείγμα DNA σε φιαλίδια erppendorf των 200μl. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιούμε δεν είναι πάντα ίδια, αλλά είναι ανάλογη με την ποιότητα & ποσότητα του ολικού DNA που παίρνουμε κατά την απομόνωση για το κάθε δείγμα (εάν το DNA είναι αχνό βάζω μεγαλύτερη ποσότητα). Στην περίπτωση που χρησιμοποιώ διαφορετικές ποσότητες DNA, με βάση τη μεγαλύτερη ποσότητα συμπληρώνω τα υπόλοιπα δείγματα με ddH₂O, ώστε όλα τα erppendorf στο τέλος να έχουν την ίδια ποσότητα σε μl. Επίσης σε ένα erppendorf των 200μl τοποθετούμε ddH₂O αντί DNA σαν αρνητικό μάρτυρα (negative control sample), ο οποίος θα μας δείξει εάν υπάρχει επιμόλυνση κατά ή πριν την αντίδραση.
2. Παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα για την αντίδραση (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση μείγματος για κάθε δείγμα 50μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε για το πείραμα μας (taq πολυμεράση, buffer και MgCl₂) ήταν της Kapabiosystems.

Πίνακας 6.3: Συστατικά αντίδρασης PCR

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

3. Μοιράζουμε σε κάθε eppendorf που περιέχει 1μl DNA από 49μl του master mix, κάνουμε ανακίνηση με το χέρι και μετά spin στη φυγόκεντρο. Βάζουμε την ίδια ποσότητα master mix και στο eppendorf που χρησιμοποιούμε σαν αρνητικό μάρτυρα.
4. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή (Εικ.6.8), ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου 12S rRNA είναι:

- **Αρχική αποδιάταξη:** 95° C για 4 min
 - **Αποδιάταξη:** 95° C για 40 sec
 - **Υβριδοποίηση:** 53° C για 45 sec
 - **Επιμήκυνση:** 72° C για 30 sec
 - **Τελική επιμήκυνση:** 72° C για 10 min
- } 35 κύκλοι



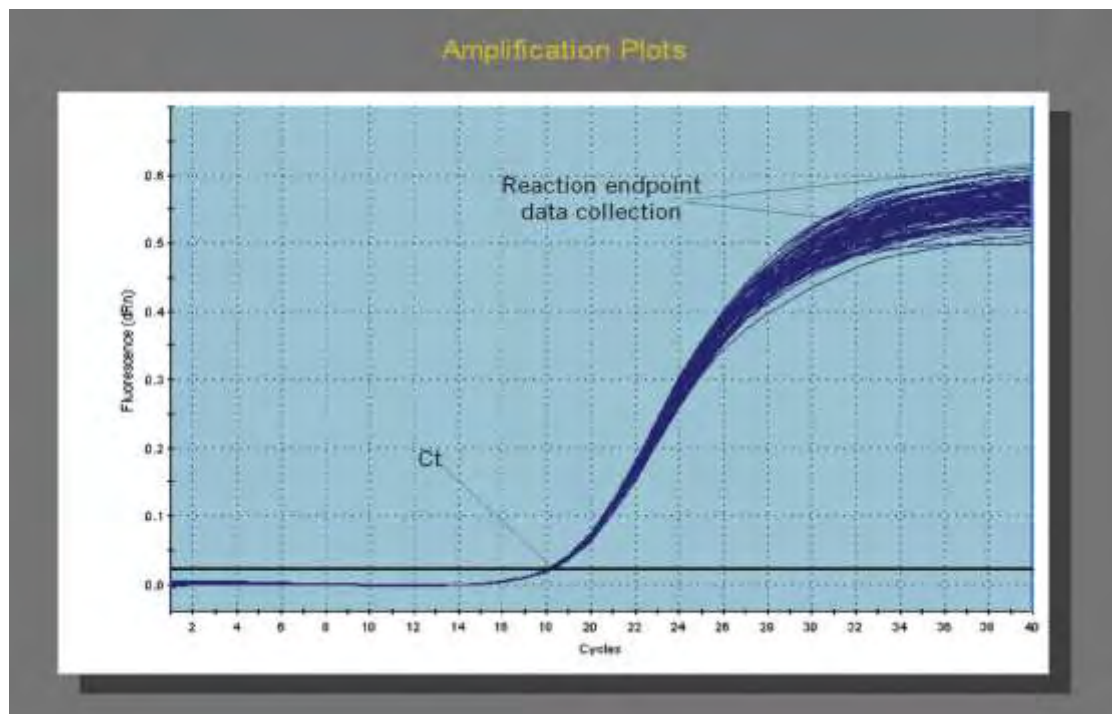
Εικόνα 6.8: Θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για την αντίδραση της PCR.

<http://www.thelabworldgroup.com/pcr-thermal-cyclers-eppendorf-eppendorf-mastercycler-ep-s>

5. Μετά το πέρας της PCR κάνουμε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης 2%, για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας (όπως αναφέραμε προηγουμένως στην παράγραφο 6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης). Παράλληλα ελέγχουμε τον αρνητικό μάρτυρα για πιθανή επιμόλυνση.

6.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction - Real time PCR)

Στη συμβατική PCR τα δεδομένα συλλέγονται αφού η αντίδραση ενίσχυσης έχει ολοκληρωθεί (endpoint determination), συνήθως μετά από 30-40 κύκλους και η τελική ποσότητα φθορισμού χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η ποσότητα του αρχικού DNA στόχου, χρησιμοποιώντας πήκτωμα αγαρόζης. Αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης είναι χρονοβόρα, αφού χρειάζεται επεξεργασία των δεδομένων και μετά το πέρας της αντίδρασης για να δούμε τα αποτελέσματα. Επιπλέον μπορεί να δώσει αντιφατικά αποτελέσματα μιας και η αποδοτικότητα της αντίδρασης της PCR μειώνεται κατά τη διάρκεια πολλαπλασιασμού, επειδή τα αντιδραστήρια καταναλώνονται και έτσι η αλληλουχία στόχος δεν διπλασιάζεται πλέον σε κάθε κύκλο. Επίσης η κινητική της αντίδρασης μειώνεται από τη συσσώρευση αναστολέων. Η επίδραση αυτή μπορεί να ποικίλει από δείγμα σε δείγμα, γεγονός που θα οδηγήσει σε διαφορές στις τελικές τιμές φθορισμού που δεν είναι συναφείς με τις αρχικές συγκεντρώσεις της αλληλουχίας στόχου (Applied Biosystems, 2003). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.9 ακόμα και όταν πανομοιότυπα δείγματα ενισχύονται, τα δεδομένα, που συλλέγονται στο τελικό σημείο της αντίδρασης (plateau phase) δεν είναι ομοιόμορφα. Η παραλλακτικότητα των τελικών δεδομένων, δείχνει ότι με την συμβατική PCR τα δεδομένα που παίρνουμε δεν έχουν ακρίβεια και δεν είναι αναπαράξιμα, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για ποιοτικές μελέτες που απλά μας νοιάζει αν μια αλληλουχία στόχος είναι παρούσα ή όχι.



Εικόνα 6.9: Καμπύλες ενίσχυσης δεδομένων της συμβατικής PCR.

http://qcbs.ca/wiki/media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_application_guide.pdf

Αντίθετα η PCR πραγματικού χρόνου είναι μια εξέλιξη της συμβατικής PCR, η οποία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία, μεγαλύτερη ακρίβεια επιτρέποντας την ανίχνευση μικρότερων διακυμάνσεων της αλληλουχίας στόχου έναντι της συμβατικής PCR και είναι μια πιο αναπαράξιμη μέθοδος, γιατί μετρά το φθορισμό σε κάθε κύκλο καθώς η ενίσχυση εξελίσσεται, καθιστώμενη έτσι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο της μοριακής βιολογίας. Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλληλουχίας στόχου να βασίζεται στο σήμα φθορισμού κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, προτού περιοριστούν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, συσσωρευτούν αναστολές ή απενεργοποιηθεί η πολυμεράση και έχουμε συνέπειες στην αποτελεσματικότητα της ενισχύσεως (Stratagene, 2007). Έτσι έχουμε άμεσα τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας στόχου σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, χωρίς να χρειαζόμαστε περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων. Στην PCR πραγματικού χρόνου συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχοι, μέσα σ' ένα μόριο DNA, cDNA ή RNA που ανιχνεύονται με τη βοήθεια εκκινητών, μπορούν να αντιγραφούν εκατομμύρια φορές και ταυτόχρονα να γίνει παρακολούθηση της προόδου ενισχύσεως της αντίδρασης χρησιμοποιώντας ένα μόριο σήμανσης, όπως μια χρωστική πρόσδεσης σε δίκλωνο μόριο DNA (SYBR green) ή έναν ανιχνευτή (probe), καθώς αυτό ενσωματώνεται στο προϊόν. Σε κάθε κύκλο ενίσχυσης, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας στόχου και γίνεται συλλογή των δεδομένων για κάθε δείγμα κατά τη διάρκεια του κάθε κύκλου της real-time PCR. Εάν η αλληλουχία στόχος είναι άφθονη στο αρχικό μας δείγμα, θα παρατηρηθεί αύξηση στην ένταση του φθορισμού σε χαμηλότερο κύκλο από ότι εάν η αλληλουχία στόχος είναι ελλειμματική, οπότε και θα ανιχνευθεί σε μεταγενέστερο κύκλο. Τέλος, δεδομένου ότι η αντίδραση της real-time PCR πραγματοποιείται σε ένα κλειστό σωλήνα καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, αποφεύγουμε τη δυνητική μόλυνση των δειγμάτων με τη μεταφορά τους σε πηκτώμα αгарόζης για περαιτέρω ανάλυση και κατ' επέκταση την εμφάνιση ψευδών θετικών αποτελεσμάτων.

Η γενική αρχή λειτουργίας της real-time PCR είναι ίδια με της συμβατικής PCR, οπότε το διάλυμα για την real time PCR περιέχει τα ίδια αντιδραστήρια με αυτό της συμβατικής με την προσθήκη μορίων σήμανσης ή ανιχνευτών (probe). Η διαδικασία χωρίζεται σε 3 φάσεις και κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε τρία στάδια (αποδιάταξη - υβριδοποίηση - επιμήκυνση). Στην αποδιάταξη η τήξη πρέπει να είναι επαρκής, ώστε να διαχωριστούν πλήρως οι δύο κλώνοι του εκμαγείου, διαφορετικά θα αναδιαταχθούν όταν η θερμοκρασία μειωθεί και δεν θα γίνει σύνδεση των εκκινητών. Η απαιτούμενη θερμοκρασία και διάρκεια τήξεως εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία του εκμαγείου, καθώς επίσης και από το μηχάνημα και τα δοχεία των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης πρέπει να είναι λίγους βαθμούς κάτω από την θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών, για να μπορέσουν να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις αλληλουχίες στόχους, αλλά όχι με οποιεσδήποτε άλλες αλληλουχίες. Αύξηση της συγκέντρωσης του Mg^{2+} ευνοεί τον υβριδισμό, όμως υπερβολικό Mg^{2+} μπορεί να προωθήσει το σχηματισμό διμερών μεταξύ των εκκινητών. Τέλος είναι καλό να χρησιμοποιηθεί σχετικά υψηλή θερμοκρασία επιμήκυνσης, για να λιώσουν όλες οι δευτερεύουσες δομές που μπορούν να σχηματιστούν στο εκμαγείο και

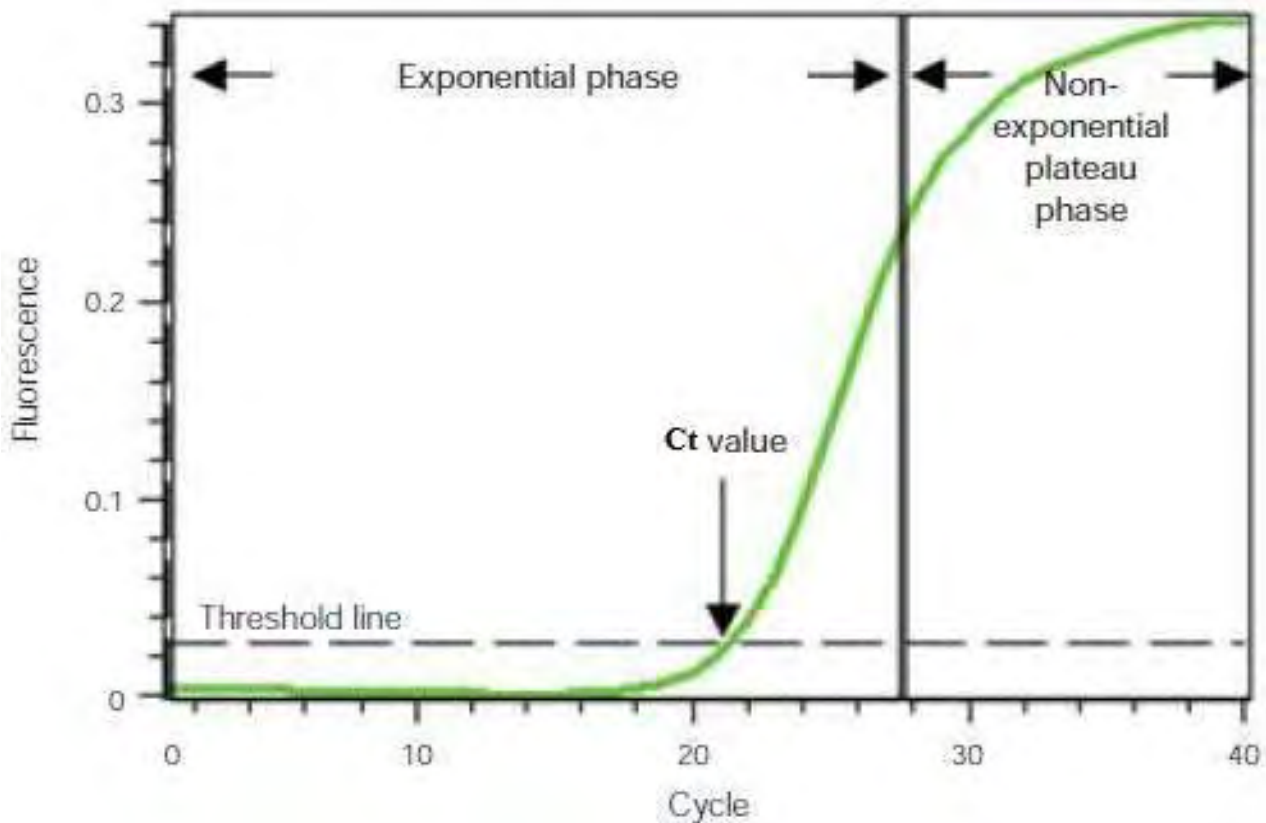
μπορούν να μπλοκάρουν την επέκταση της Taq πολυμεράσης (Kubista et al., 2006). Η real-time PCR έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές όπως στην ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, την ανίχνευση πρωτεϊνών και μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (single nucleotide polymorphism - SNP), την ανάλυση και διάκριση αλληλομόρφων, την επικύρωση δεδομένων των μικροσυστοιχιών, δοκιμές γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών (GMO), την παρακολούθηση του ιϊκού φορτίου και άλλες εφαρμογές ανίχνευσης παθογόνων (Stratagene, 2007).

Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης και διαλέγουμε την κατάλληλη ανάλογα με το σκοπό του πειράματος μας. Εάν θέλουμε να υπολογίσουμε με ακρίβεια την ποσότητα της αλληλουχίας στόχου στο δείγμα, χρησιμοποιούμε την πρότυπη καμπύλη (standard curve) για απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification), ενώ εάν δεν είναι απαραίτητος ο ακριβής προσδιορισμός, χρησιμοποιούμε τη σχετική ποσοτικοποίηση (relative or comparative quantification). Στην σχετική ποσοτικοποίηση έχουμε μέτρηση της συγκέντρωσης του γονιδίου του ενδιαφέροντος σε άγνωστα δείγματα σε σύγκριση με ένα βαθμονομητή ή με ένα δείγμα ελέγχου.

Η πιο άμεση και ακριβής προσέγγιση για την ανάλυση ποσοτικών δεδομένων, είναι να χρησιμοποιηθεί μία πρότυπη καμπύλη, η οποία παρασκευάζεται από μία σειρά αραιώσεων προτύπου δείγματος γνωστής συγκέντρωσης. Για την καμπύλη αναφοράς, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας γνωστής συγκέντρωσης, ο οποίος μπορεί να προέρχεται από γενωμικό DNA, ολικό RNA, cDNA, συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ή ανασυνδιασμένο πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή όταν σχεδιάζουμε τους εκκινητές, ώστε να λειτουργούν αποτελεσματικά τόσο με την αλληλουχία στόχο, όσο και με τον μάρτυρα που θα χρησιμοποιήσουμε. Δημιουργούμε την πρότυπη καμπύλη κάνοντας διαδοχικές αραιώσεις στο μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης και εφαρμόζοντας τις ίδιες συνθήκες στην real-time με τα υπό μελέτη δείγματα.

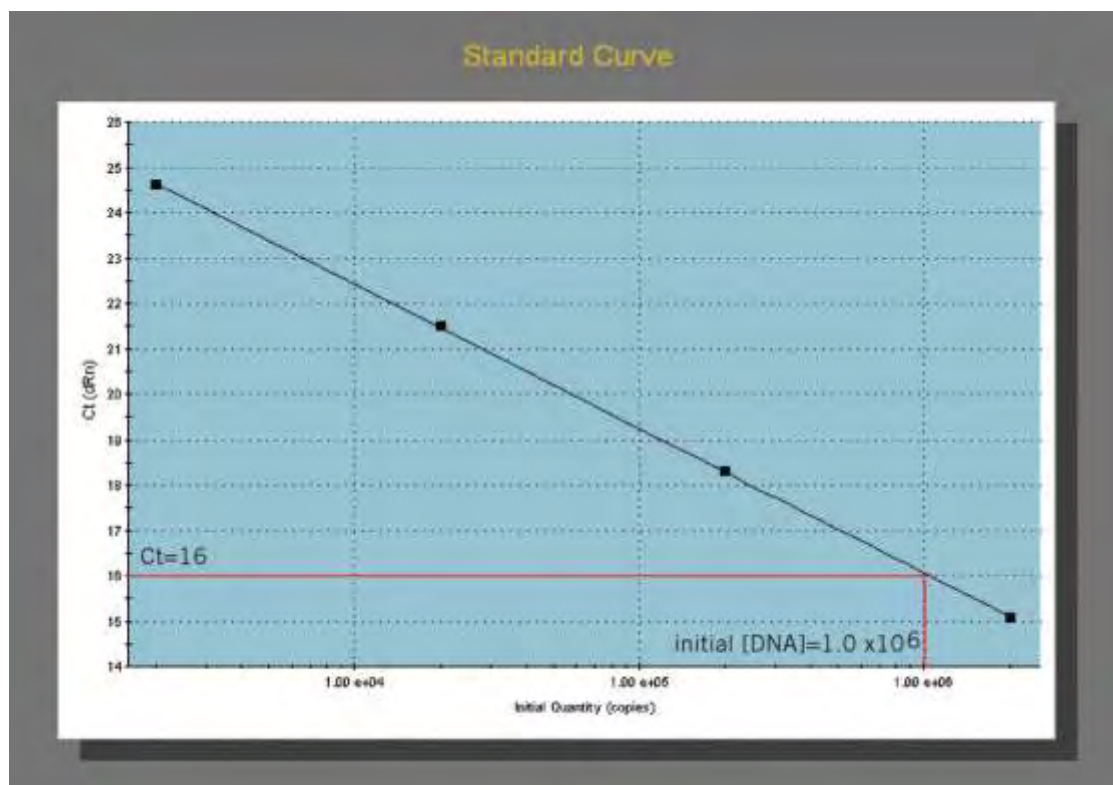
Στους αρχικούς κύκλους της real-time PCR, συνήθως μεταξύ 3-15, το προϊόν δεν είναι ανιχνεύσιμο λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα και έτσι δεν υπάρχει σημαντική αλλαγή στην ένταση φθορισμού, παρά μόνο ένα ελάχιστο σήμα που ανιχνεύεται και αναφέρεται ως baseline. Το χαμηλό αυτό σήμα ισοδυναμεί με τον ενδογενή φθορισμό (background fluorescent) των αντιδρώντων μορίων ή αλλιώς το «θόρυβο» της αντίδρασης. Το baseline θα πρέπει να οριστεί προσεκτικά, ώστε να συμπεριλάβει μεν αρκετούς κύκλους της αντίδρασης, για να αποκλείσουμε το «θόρυβο» της αντίδρασης που υπάρχει στους αρχικούς κύκλους της ενίσχυσης, αλλά ταυτόχρονα να μην συμπεριλάβουμε κύκλους στους οποίους έχει αρχίσει η ενίσχυση και υφίσταται το κανονικό σήμα φθορισμού (Life technologies, 2012). Η βασική αρχή που χρησιμοποιείται στην ανάλυση των δεδομένων της PCR πραγματικού χρόνου, βασίζεται στον αριθμό των κύκλων που είναι αναγκαίος να επιτευχθεί, για να φτάσει η αλληλουχία στόχος μία συγκεκριμένη συγκέντρωση στην αντίδραση, ώστε να αρχίσει να ανιχνεύεται το σήμα φθορισμού πάνω από το «θόρυβο» της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για να φτάσουν αυτήν την ανιχνεύσιμη ένταση φθορισμού, συσχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου, όπως και οι τιμές της έντασης φθορισμού συσχετίζονται με τη συγκέντρωση των προϊόντων της PCR και έτσι μπορεί να γίνει μια ακριβής εκτίμηση της αρχικής συγκέντρωσης της

αλληλουχίας στόχου. Το σημείο ανίχνευσης του σήματος φθορισμού πάνω από το «θόρυβο» της αντίδρασης ορίζεται ως threshold, και ο αριθμός των κύκλων που αντιστοιχεί σε αυτό το σημείο ονομάζεται threshold cycle ή Ct (Εικ.6.10). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αρχικού DNA στόχου στο δείγμα, τόσο πιο γρήγορα θα διασχίσει η καμπύλη το όριο threshold. Άρα και οι τιμές Ct συσχετίζονται με την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και έτσι χρησιμοποιούνται για να την υπολογίσουμε, εφόσον πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις, όπως ότι η κινητική της αντίδρασης είναι σταθερή κατά διάρκεια της αντίδρασης και παρόμοια μεταξύ όλων των δειγμάτων. Για αυτό το λόγο το threshold ορίζεται σ' ένα σημείο όπου όλα τα δείγματα που αναλύονται έχουν τον ίδιο ρυθμό αύξησης στην ένταση φθορισμού και παράλληλα βρίσκονται στην εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τις τιμές Ct των άγνωστων δειγμάτων με αυτές της πρότυπης καμπύλης, καθίσταται εφικτή η ποσοτικοποίηση του αρχικού αριθμού των αντιγράφων. Η καμπύλη αναφοράς θα πρέπει να αποτελείται από τουλάχιστον 4 σημεία και το φάσμα των συγκεντρώσεων της πρότυπης καμπύλης, θα πρέπει να καλύπτει όλο το φάσμα των συγκεντρώσεων που θα μετρηθούν στο πείραμα μας (Εικ.6.11). Δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για δείγματα των οποίων η αρχική ποσότητα υπερβαίνει το εύρος της καμπύλης.



Εικόνα 6.10: Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός διαγράμματος PCR.

<http://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/qpcr-real-time-pc>



Εικόνα 6.11: Καμπύλη αναφοράς.

http://qcbs.ca/wiki/media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_application_guide.pdf

Ιδανικά η καμπύλη αναφοράς πρέπει να είναι γραμμική σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Η γραμμικότητα της καμπύλης συμβολίζεται με το R^2 (Rsquared - RSQ) ή συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson correlation coefficient) και θα πρέπει να είναι πολύ κοντά στο 1 ($>0,985$). Το RSQ είναι η προσαρμογή όλων των δεδομένων προς την πρότυπη καμπύλη και επηρεάζεται από την ακρίβεια της σειράς των αραιώσεων που εφαρμόσαμε και τη συνολική ευαισθησία της δοκιμασίας. Ο συντελεστής συσχέτισης δείχνει πόσο καλά τα σημεία των δεδομένων στη γραφική μας παράσταση ταιριάζουν σε μια ευθεία γραμμή, ελέγχοντας τόσο τη συμφωνία μεταξύ των αντιγράφων μας, όσο και το γραμμικό εύρος της δοκιμής μας. Εάν όλα τα δεδομένα βρίσκονται σε μία ευθεία γραμμή το RSQ θα είναι 1,00, ενώ όσο τα δεδομένα απομακρύνονται από την ευθεία γραμμή το RSQ μειώνεται. Καθώς μειώνεται ο συντελεστής συσχέτισης, είναι όλο και πιο δύσκολο να καθοριστεί η ακριβής θέση της πρότυπης καμπύλης και έτσι μειώνεται και η ακρίβεια της ποσοτικοποίησης της αλληλουχίας στόχου. Εάν τα σημεία που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα πάνω στη γραφική παράσταση ξεφεύγουν από τη γραμμικότητα στο ένα άκρο της πρότυπης καμπύλης, διαπιστώνουμε ότι αυτές οι συγκεντρώσεις είναι εκτός της γραμμικής περιοχής ανίχνευσης που ορίστηκε από την αντίδραση και μπορεί να είναι απαραίτητη περαιτέρω βελτιστοποίηση της δοκιμασίας για να ποσοτικοποιηθούν με ακρίβεια οι συγκεντρώσεις αυτών των δειγμάτων. Τιμές $RSQ > 0.985$ είναι αποδεκτές για τις περισσότερες δοκιμασίες.

Μία γραμμική πρότυπη καμπύλη συνεπάγεται ότι η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης είναι σταθερή σε ποικίλες συγκεντρώσεις εκμαγείου. Η κλίση (slope) της γραμμής της βέλτιστης προσαρμογής, που σχεδιάζεται για να δείξει την πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης. Γραμμική καμπύλη αναφοράς με κλίση μεταξύ -3.6 και -3.1, ισοδυναμεί με αποτελεσματικότητα της αντίδρασης 90-110%, η οποία είναι τυπικά αποδεκτή. Δεδομένου ότι η αντίδραση της real-time PCR βασίζεται στην εκθετική ενίσχυση, εάν η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης της real-time PCR είναι 100% συνεπάγεται με τον τέλειο διπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Αυτή η υπόθεση επιτρέπει τον αξιόπιστο υπολογισμό της αρχικής ποσότητας της αλληλουχίας στόχου από το Ct και άρα πριν τρέξουμε τα δείγματα πρέπει να αξιολογείται και να ελέγχεται ότι η απόδοση της αντίδρασης βρίσκεται κοντά στο 100%. Η αποτελεσματικότητα (efficiency) της αντίδρασης επηρεάζεται από τον αριθμό των βάσεων της αλληλουχίας στόχου (είναι πιο εύκολα να ενισχύσουμε μια περιοχή 90bp και να οδηγηθούμε σε πλήρη σύνθεση αντιγράφων σε ένα δεδομένο κύκλο, από ότι να ενισχύσουμε μία αλληλουχία στόχο 1.000bp. Για το λόγο αυτό, στη real-time PCR το μήκος της αλληλουχίας στόχου είναι συνήθως 60-200bp), από την περιεκτικότητα της αλληλουχίας στόχου σε GC, τις δευτεροταγείς δομές (οι δευτεροταγείς δομές εμποδίζουν τη δράση της πολυμεράσης) και τέλος τις θέσεις δέσμευσης των εκκινητών που πρέπει να είναι μοναδικές στο γονιδίωμα. Αν η απόδοση είναι σημαντικά λιγότερη συνεπάγεται ότι στην αντίδραση γίνεται επιβράδυνση με κάποιο τρόπο: 1) από συσσώρευση αναστολέων, 2) από διάφορους παράγοντες στο μίγμα της αντίδρασης (όπως μη σωστές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων), 3) από μη καλή ποιότητα ενζύμων, 4) από υποβέλτιστη ομάδα εκκινητών, 5) από το μέγεθος, το περιεχόμενο σε GC και τις δευτερογενείς δομές της αλληλουχίας στόχου και 6) από τις συνθήκες της αντίδρασης. Από την άλλη εάν η αποτελεσματικότητα είναι σημαντικά πάνω από 100% συνήθως υποδεικνύει πειραματικό σφάλμα. Οι αποκλίσεις στην απόδοση μπορεί επίσης να οφείλονται σε κακή προετοιμασία των αραιώσεων, καθώς και σε ακραίες τιμές συγκεντρώσεων που είτε αναστέλλουν την real-time PCR (υψηλές τιμές στην πρότυπη καμπύλη), είτε υπερβαίνουν την ευαισθησία του προσδιορισμού μας (πολύ μικρές τιμές στην πρότυπη καμπύλη). Είναι σημαντικό όταν γίνεται η βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας των προτύπων δειγμάτων και των αλληλουχιών στόχων, να βρίσκονται σε τιμές περίπου 5% το ένα από το άλλο και όλα όσο πιο κοντά γίνεται στο 100%. Οι τιμές της κλίσης και του συντελεστή συσχέτισής μας βοηθούν να προσδιορίσουμε την ευαισθησία του πειράματος μας. Στην καμπύλη αναφοράς, η απόδοση και η γραμμικότητα εμφανίζονται αυτόματα από το λογισμικό του προγράμματος που χρησιμοποιούμε βάση της εξίσωσης (Stratagene, 2007):

$$X_n = X_0 (1 + E)^n$$

Όπου

X_n = το συνολικό ποσό ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου σε n κύκλους

X_0 = αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου

E = απόδοση της ενίσχυσης

n = αριθμός των κύκλων

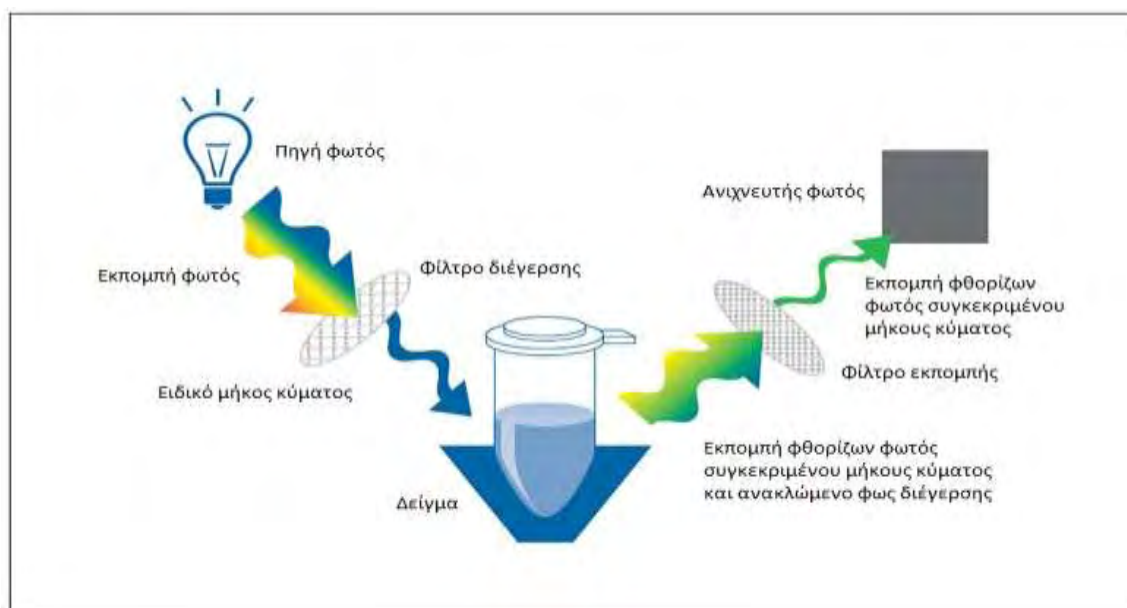
Για αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα η αντίδραση πρέπει να έχει αποτελεσματικότητα κοντά στο 100% και ισοδύναμη κλίση -3.32 στην πρότυπη καμπύλη. Στο σχεδιασμό της γραφικής παράστασης χρησιμοποιούμε το Ct έναντι του λογαρίθμου της αρχικής συγκέντρωσης της αλληλουχίας στόχου. Ο υπολογισμός της αποτελεσματικότητας μπορεί να γίνει απευθείας χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

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

Τρέχοντας την real-time PCR θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για επιμόλυνση του πειράματος. Πιθανές πηγές μόλυνσης είναι η μόλυνση των δειγμάτων μεταξύ τους και η μόλυνση από μη σωστή απολύμανση του εργαστηριακού εξοπλισμού. Η μόλυνση θεωρείται η κύρια πηγή ψευδών θετικών αποτελεσμάτων στην real-time PCR. Οι δύο βασικοί τύποι ελέγχων είναι με θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Στο θετικό μάρτυρα τα δείγματα θα πρέπει να δείχνουν πάντα την ενίσχυση. Αν αποτύχουν να δείξουν την αναμενόμενη ενίσχυση, υποδηλώνεται ότι έχουμε κάποιο πρόβλημα με την αντίδραση ή τα αντιδραστήρια. Από την άλλη ο αρνητικός μάρτυρας περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός του DNA (αντί αυτού χρησιμοποιείται ddH₂O ίσης ποσότητας με τα υπόλοιπα δείγματα), άρα δεν πρέπει να εμφανίσει καμιά ενίσχυση. Εάν υπάρχει αύξηση στο φθορισμό έχουμε επιμόλυνση των δειγμάτων, μη-ειδικό σχηματισμό προϊόντος της real-time PCR ή μη ειδική αποικοδόμηση ανιχνευτή (Stratagene, 2007).

Σημαντική ακόμα επίδραση στα αποτελέσματα της real-time PCR έχουν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των εκκινήτων και των ανιχνευτών, όπως είναι η θερμοκρασία αποθήκευσής τους, εάν έχουν υποστεί παρατεταμένη έκθεση στο φως, καθώς και το χρονικό διάστημα και η συγκέντρωση κατά την αποθήκευση.

Τελικό ρόλο παίζει το μηχάνημα που χρησιμοποιούμε για να τρέξουμε την αντίδραση της real-time PCR (Εικ.6.12). Σήμερα υπάρχει μια πληθώρα διαθέσιμων μηχανημάτων με εξαιρετικές αποδόσεις, ευαίσθητα όργανα και βελτιστοποιημένες δοκιμασίες που μπορούν να ανιχνεύσουν με πρωτοφανή ακρίβεια, διαφορά ακόμα και σε ένα μόνο μόριο μέσα σε ένα πολύπλοκο δείγμα, μέσω της αντίδρασης της real-time PCR. Οι κύριες διαφορές μεταξύ των οργάνων έχουν να κάνουν με τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής που δίνουν διαθέσιμα, την ταχύτητα και τον αριθμό των αντιδράσεων που μπορούν να τρέξουν παράλληλα και τα δοχεία πραγματοποίησης της αντίδρασης. Το λογισμικό ανάλυσης είναι σχεδόν το ίδιο σε όλα, τουλάχιστον όσον αφορά τις βασικές λειτουργίες, όπως το στήσιμο του πειράματος, ο προσδιορισμός των πρωτοκόλλων και η επεξεργασία των δεδομένων, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του baseline και τον υπολογισμό του Ct. Η τιμή των οργάνων είναι αυτή που ποικίλει σημαντικά και είναι ανάλογη με την απόδοση και τον αριθμό των χρωστικών που μπορούν να χειριστούν. Προσοχή πρέπει να δίνεται στη σωστή συντήρηση και ρύθμιση του μηχανήματος της real-time PCR ακολουθώντας πάντα τις οδηγίες του κατασκευαστή (life technologies, 2012).



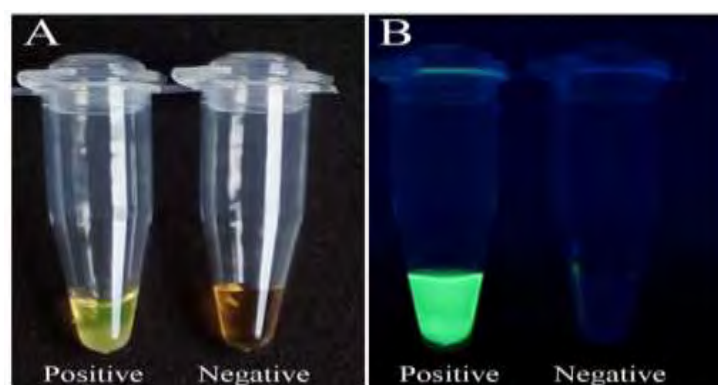
Εικόνα 6.12: Ανίχνευση φθορισμού σε ένα μηχάνημα real-time PCR.

<http://www.thermoscientificbio.com/applications/pcr-and-qpcr/introduction-to-qpcr/>

6.6. Διαφορετικές μεθοδολογίες για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real time PCR)

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου υπάρχουν δύο μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοστούν για τη σήμανση των προϊόντων: Η πρώτη μέθοδος βασίζεται σε μια μη ειδική χρωστική πρόσδεσης (π.χ. SYBR green I) που φθορίζει όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA. Στη δεύτερη μέθοδο γίνεται χρήση ενός ανιχνευτή ειδικής αλληλουχίας, ο οποίος υβριδοποιείται σε μία εσωτερική αλληλουχία του μορίου στόχου και αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο ιχνηθετημένο με μια φθορίζουσα χρωστική στο ένα άκρο και έναν αποσβέστη στο άλλο (π.χ., TaqMan® ανιχνευτές).

A) SYBR green



Εικόνα 6.13: Οπτική ανίχνευση ενισχυμένων προϊόντων χρησιμοποιώντας SYBR green.

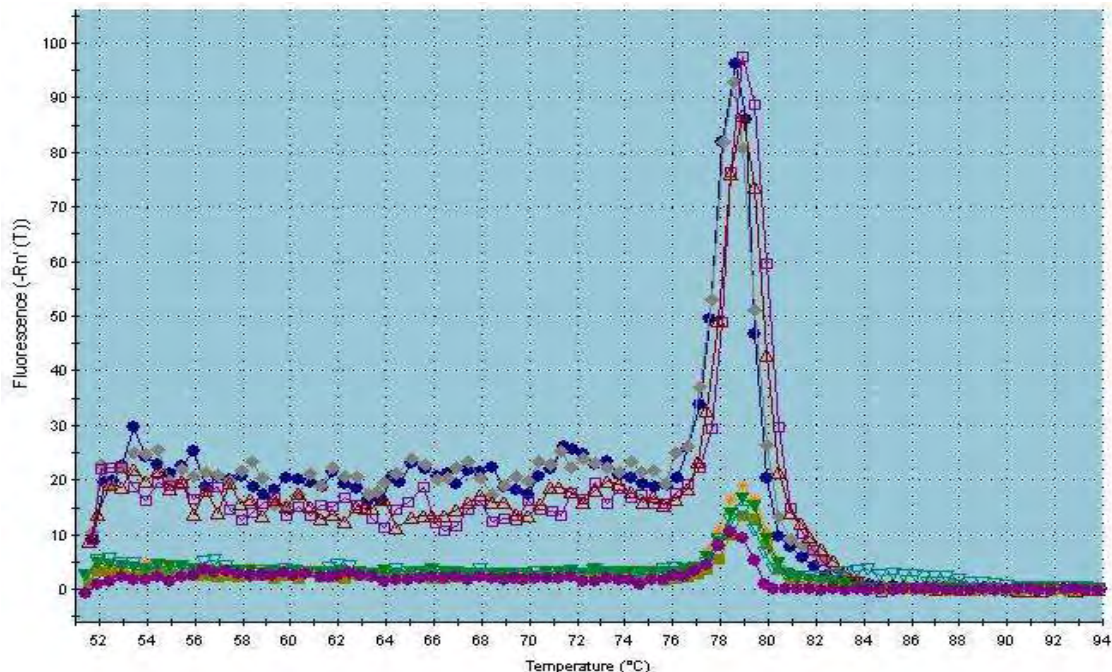
http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3525532_pone.0052486.g001&req=4

Η SYBR green είναι μία ασύμμετρη χρωστική κυανίνης, με δύο αρωματικά συστήματα που περιέχουν άζωτο, το ένα εκ των οποίων είναι θετικά φορτισμένο. Είναι η πρώτη χρωστική που χρησιμοποιήθηκε και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται, γιατί είναι σχετικά οικονομική και εύκολη στη χρήση της. Όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα εμφανίζει σχετικά χαμηλό φθορισμό, ενώ όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA ο φθορισμός της αυξάνει κατά 1000 φορές (Houghton et al, 2006). Δεσμευμένη απορροφά στο μπλε φως ($\lambda = 497 \text{ nm}$) και εκπέμπει στο πράσινο φως ($\lambda = 520 \text{ nm}$) (Εικ.6.13). Όσο περισσότερα μόρια δίκλωνου DNA υπάρχουν στο διάλυμα τόσες περισσότερες θέσεις πρόσδεσης, που οδηγούν σε μεγαλύτερο σήμα φθορισμού (Εικ.6.15).

Ο περιορισμός της SYBR green είναι ο μη-ειδικός τρόπος πρόσδεσης της, που προκαλεί αύξηση στο σήμα φθορισμού με την σύνδεσή της σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA και όχι απαραίτητα της αλληλουχίας στόχου. Ως εκ τούτου, η εξειδίκευση της αντίδρασης καθορίζεται αποκλειστικά από το σωστό σχεδιασμό των εκκινητών (ώστε να αποφευχθεί μη-ειδική σύνδεση π.χ. σχηματισμός διμερούς μεταξύ εκκινητών) και τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου. Διαφορετικά, είναι πιθανό ο φθορισμός που εκπέμπεται, να περιλαμβάνει μη επιθυμητά μόρια και να έχουμε μόλυνση του σήματος, με αποτέλεσμα να ξεπεράσει νωρίτερα το C_t δίνοντας μία λανθασμένη αναπαράσταση της πραγματικής συγκέντρωσης της αλληλουχίας στόχου. Ένα μη-ειδικό σήμα δεν μπορεί πάντοτε να προληφθεί, αλλά η παρουσία του μπορεί να ανιχνευτεί εύκολα και αξιόπιστα εκτελώντας συμπληρωματικές αναλύσεις επιβεβαίωσης. Αυτές συμπεριλαμβάνουν την καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curves or melting curves) για τα προϊόντα της real-time PCR, καθώς και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (gel electrophoresis), αυξάνοντας όμως περαιτέρω το κόστος και το χρόνο που απαιτείται για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της ακρίβειας των δεδομένων της real-time PCR. Η κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης βασίζεται στη θερμοκρασία στην οποία ένα μόριο DNA λιώνει (θερμοκρασία αποδιάταξης ή T_m) και εξαρτάται από το μήκος του, την αλληλουχία των βάσεων και το περιεχόμενο του σε G/C βάσεις. Συνήθως λιώνουν σε θερμοκρασίες μεταξύ $80-90^\circ\text{C}$ (Life Technologies, 2012). Μετά την αντίδραση ενισχύσεως ακολουθείται αύξηση της θερμοκρασίας, τα προϊόντα της real-time PCR τήκονται και η ένταση του φθορισμού μειώνεται.

Η real-time PCR μπορεί να ενισχύσει μη στόχους, που παράγονται από την υβριδοποίηση των εκκινητών σε φαινομενικώς τυχαίες τοποθεσίες στο δείγμα ή κάποιες φορές μεταξύ τους, τα επονομαζόμενα διμερή εκκινητών (primer-dimer), τα οποία σχηματίζονται όταν η ποσότητα της αλληλουχίας στόχου στο δείγμα μας είναι χαμηλή. Η λάθος υβριδοποίηση των εκκινητών παρεμβαίνει στο σχηματισμό επιθυμητών προϊόντων λόγω του ανταγωνισμού των δύο αντιδράσεων για τα αντιδραστήρια και οδηγούμαστε σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Λόγω της μη ειδικής φύσης της SYBR green πραγματοποιούνται συμπληρωματικές αναλύσεις για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της real-time PCR με καμπύλες αποδιάταξης μετά το πέρας της real-time. Όταν τα προϊόντα της real-time PCR αποτελούνται από μόρια ομοιογενούς μήκους και αλληλουχίας, λαμβάνουμε ένα ενιαίο θερμικό σήμα (μόνο μία κορυφή). Η παρουσία όμως περισσότερων του ενός προϊόντων στην real-time PCR,

αντανακλάται ως πολλαπλά θερμικά σήματα (πολλαπλές κορυφές στο διάγραμμα) (Εικ.6.14). Με τον τρόπο αυτό, ο φθορισμός μαζί με την καμπύλη αποδιάταξης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, με βάση την θερμοκρασία αποδιάταξης των τελικών προϊόντων.



Εικόνα 6.14: Καμπύλη αποδιάταξης με πολλαπλά θερμικά σήματα.

<http://www2.gvsu.edu/haringsh/realtime.jpg>

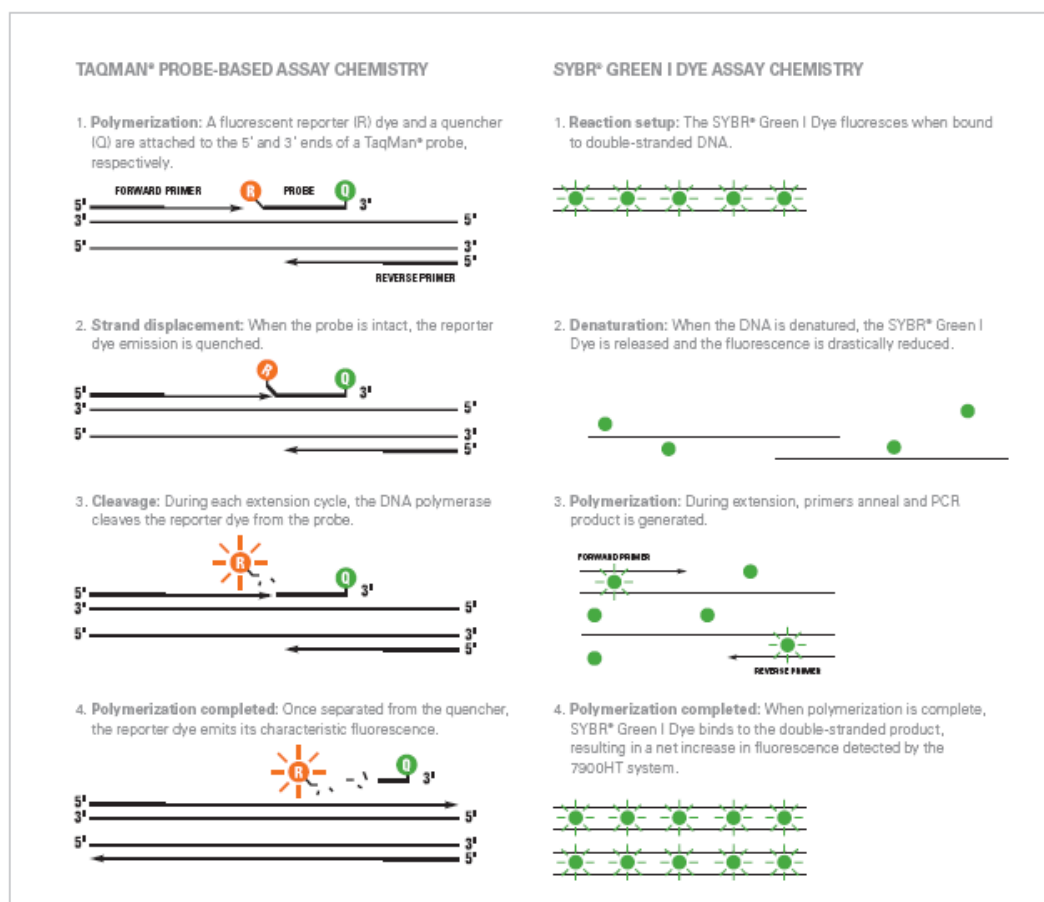
Η καμπύλη αποδιάταξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο όταν στην αντίδραση της real-time PCR χρησιμοποιούμε χρωστική πρόσδεσης όπως η SYBR green. Αντίθετα η χρήση ενός ανιχνευτή ειδικής αλληλουχίας αποτρέπει την υλοποίηση της καμπύλης αποδιάταξης, επειδή προκαλεί μη αντιστρεπτή αλλαγή στο μηχανισμό εκπομπής φθορισμού διασπώντας τον ανιχνευτή και ελευθερώνοντας τον στο διάλυμα.

B) Taqman probe

Η χρήση ενός εσωτερικού ανιχνευτή παρέχει υψηλότερο επίπεδο ειδικότητας στην ανίχνευση της αλληλουχίας στόχου που βελτιώνει την ακρίβεια, την αξιοπιστία και την αναπαραγωγικότητα της PCR πραγματικού χρόνου. Ένας καλός ανιχνευτής, θα πρέπει να έχει χαμηλό ενδογενή φθορισμό, υψηλό επίπεδο φθορισμού κατά την υβριδοποίηση με την αλληλουχία στόχο και ειδικότητα πρόσδεσης στην αλληλουχία στόχο (Life Technologies, 2012). Όταν απουσιάζει η αλληλουχία στόχος από την αντίδραση, ο ανιχνευτής φθορισμού δεν υβριδοποιείται απλά παραμένει ανενεργός και δεν φθορίζει. Όταν όμως υπάρχει η αλληλουχία στόχος, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται μαζί της και η φθορίζουσα χρωστική αναφοράς μπορεί πλέον να ανιχνευθεί. Το επίπεδο φθορισμού ανιχνεύεται άμεσα με την ποσότητα του ενισχυμένου στόχου σε κάθε κύκλο της real-time PCR.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα με τη χρήση του ανιχνευτή, είναι ότι πολλαπλοί ανιχνευτές μπορούν να σημανθούν με διαφορετικές χρωστικές και να συνδυαστούν, ώστε να επιτραπεί η ανίχνευση περισσότερων της μιας αλληλουχίας στόχου με μία μόνο αντίδραση (Kubista et al, 2006). Ο Taqman είναι ο πιο διαδεδομένος χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής για τις εφαρμογές της real-time PCR. Για τη διαδικασία της real-time PCR με Taqman χρειαζόμαστε τους εκκινητές της real-time PCR, ένα ολιγονουκλεοτίδιο (15-30 ζεύγη βάσεων) γνωστό ως ανιχνευτή (probe) ο οποίος σχεδιάζεται με μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς υψηλής ενέργειας (reporter dye, συνήθως FAM TM), που είναι συνδεδεμένη με το άκρο 5' του ανιχνευτή και μια χρωστική απόσβεσης χαμηλής ενέργειας (quencher, συνήθως TAMRA TM σε συνδυασμό με FAM TM), που προσαρτάται στο άκρο 3' του ανιχνευτή (Houghton et al, 2006). Εφ' όσον τα δύο μόρια (φθορίζουσα αναφοράς και αποσβέστης) διατηρούνται σε στενή εγγύτητα, ο φθορισμός από τη φθορίζουσα χρωστική αναφοράς καταστέλλεται από τον αποσβέστη και δεν ανιχνεύεται. Όταν όμως ο ανιχνευτής διασπαστεί από την 5' εξωνουκλεοτιδική δράση του ενζύμου DNA taq πολυμεράση η απόσταση μεταξύ της φθορίζουσας χρωστικής αναφοράς και του αποσβέστη αυξάνεται, η μεταφορά ενέργειας διακόπτεται και έχουμε εκπομπή φθορισμού από τη χρωστική αναφοράς. Οι ανιχνευτές TaqMan χρησιμοποιούν ένα μηχανισμό σβησίματος που ονομάζεται FRET (fluorescent resonance energy transfer - μεταφορά ενέργειας μέσω αντανάκλασης φθορισμού). Η ενέργεια που εκπέμπεται από τη χρωστική αναφοράς μπορεί να μειωθεί από την παρουσία μια άλλης χρωστικής (χαμηλής ενέργειας), της χρωστικής απόσβεσης, λόγω μεταφοράς ενέργειας από τη χρωστική υψηλής ενέργειας προς αυτήν της χαμηλής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σε μία αρκετά μεγάλη απόσταση, ανάλογα με τη φθορίζουσα χρωστική αναφοράς και την χρωστική απόσβεσης που χρησιμοποιείται (Εικ.6.15).

Ο ανιχνευτής υβριδοποιείται σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία, την αλληλουχία στόχο, η οποία βρίσκεται μεταξύ των δύο εκκινητών και κατ' επέκταση στο δρόμο της taq πολυμεράσης (η taq DNA πολυμεράση έχει 5'-3' δραστηριότητα εξωνουκλεάσης). Καθώς αυτή επεκτείνει τους εκκινητές θα συναντήσει στο 5' άκρο τη φθορίζουσα χρωστική αναφοράς και θα την απελευθερώσει, προκαλώντας το διαχωρισμό της από τον αποσβέστη, οπότε θα έχουμε και ανίχνευση φθορισμού (Houghton et al, 2006). Ο ανιχνευτής καλό είναι να σχεδιαστεί με ένα T_m 8-10°C υψηλότερο από αυτό των εκκινητών. Η υψηλότερη T_m για τον ανιχνευτή, εξασφαλίζει τον υβριδισμό του με την αλληλουχία στόχο πριν αρχίσει η επεκτατική δράση της πολυμεράσης και έτσι θα υπάρχει πάντοτε μία αύξηση σε σήμα φθορισμού για κάθε ενισχυμένο αντίγραφο που παράγεται.



Εικόνα 6.15: Μηχανισμός λειτουργίας της SYBR green και του ανιχνευτή Taqman.
Taqman probe: 1.Μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (R) και ένας αποσβέστης (Q) συνδέονται με το 5' και 3' άκρο του ανιχνευτή TaqMan αντίστοιχα. 2.Όταν ο ανιχνευτής είναι άθικτος η εκπομπή από τη χρωστική αναφοράς αποσβένεται. 3.Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου επέκτασης η DNA πολυμεράση διασπά τη χρωστική αναφοράς από τον ανιχνευτή. 4.Μόλις χωριστούν, η χρωστική αναφοράς εκπέμπει το χαρακτηριστικό φθορισμό της.

SYBR green: 1.Η SYBR green χρωστική φθορίζει όταν δεσμευτεί σε δίκλωνο DNA. 2.Όταν το DNA μετουσιωθεί η SYBR green απελευθερώνεται και ο φθορισμός μειώνεται δραστικά. 3.Κατά τη επέκταση οι εκκινητές υβριδοποιούνται και παράγονται προϊόντα PCR. 4.Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός η SYBR green προσδένεται στο δίκλωνο προϊόν και έχουμε αύξηση του φθορισμού που ανιχνεύεται από το μηχάνημα.

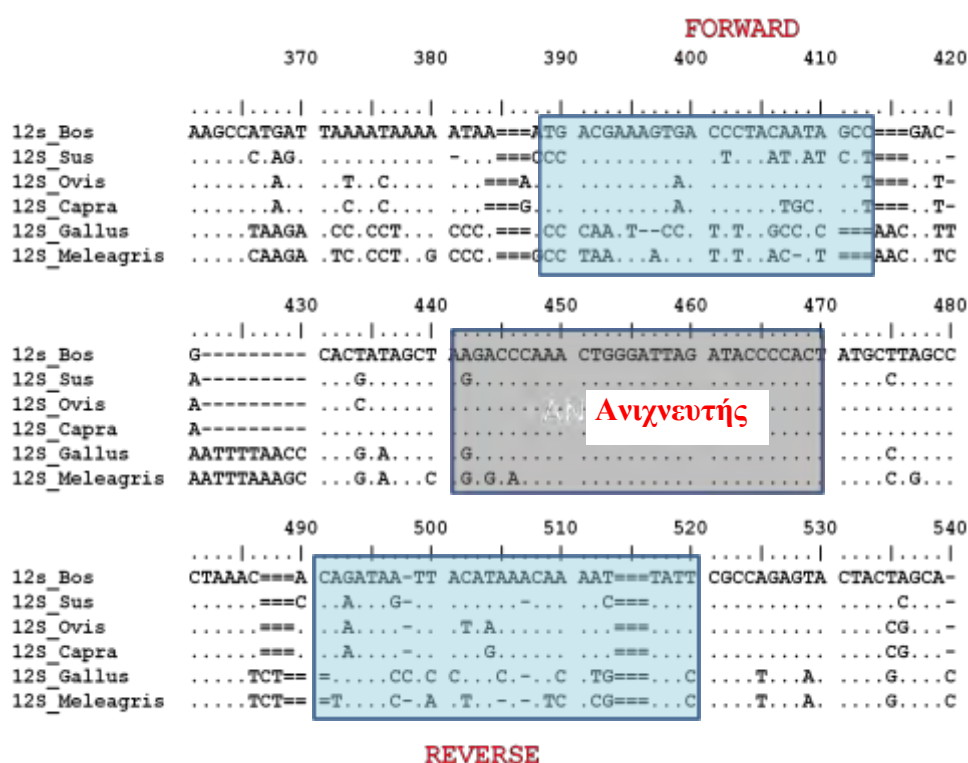
<http://technologyinscience.blogspot.gr/2013/05/taqman-assay-vs-sybr-green-assay.html#.VJBvuHvzg2d>

6.7. Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτή

Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών και του ανιχνευτή είναι από τις πιο σημαντικές παραμέτρους στην real-time PCR. Πήραμε την αλληλουχία βάσεων του γονιδίου 12S rRNA του μιτοχondριακού DNA για τα τέσσερα ζωικά είδη που μας ενδιαφέρουν (μοσχάρι, χοιρινό, γαλοπούλα και κοτόπουλο) από τις αλληλουχίες που διατίθενται στη Genbank βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information). Κάναμε ομοπαράθεση των αλληλουχιών των γονιδίων

12S rRNA του μιτοχondριακού DNA των τεσσάρων ειδών και βρήκαμε μια κοινή αλληλουχία μεταξύ και των τεσσάρων ειδών.

Η εύρεση κοινής αλληλουχίας έδειξε ότι θα ήταν δυνατόν να σχεδιαστεί ένας ενιαίος ανιχνευτής γύρω από τα τέσσερα είδη που θέλουμε να προσδιορίσουμε (Εικ.6.16). Η αλληλουχία στόχος πρέπει να συγκριθεί με το σύνολο του μιτοχondριακού γονιδιώματος, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι είναι μοναδική καθώς και χωρίς εσωτερικό πολυμορφισμό σε όλα τα είδη ζώων που μας ενδιαφέρουν. Έτσι δημιουργήσαμε για το πείραμά μας ένα κοινό ανιχνευτή που σχεδιάστηκε για να υβριδοποιείται σε όλα τα είδη και σημάνθηκε με τη φθορίζουσα χρωστική αναφοράς 6-carboxyfluorescein (FAM) στο 5' άκρο και με τον αποσβέστη 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) στο 3' άκρο. Περιοχές διακύμανσης στην αλληλουχία των τεσσάρων ειδών γύρω από την ομόλογη αλληλουχία στόχο, επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό των ζευγαριών (Fw & Rv) των ειδικών εκκινητών για κάθε ένα από τα συγκεκριμένα είδη, που έγινε με τη χρήση προγράμματος σχεδιασμού εκκινητών, που μας βοηθά να αποφύγουμε τα προβλήματα που μπορούν να δημιουργηθούν από το λάθος σχεδιασμό των εκκινητών. Οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι περίπου 15-30bp σε μήκος και το θεωρητικό Tm των δύο εκκινητών να είναι εντός 2-5°C του ενός από τον άλλο. Το ιδανικό ζευγάρι εκκινητών θα δώσει την χαμηλότερη τιμή «Ct», δεν θα σχηματίζει διμερή εκκινητών και στην καμπύλη αναδιάταξης θα δείχνει ένα ενιαίο προϊόν.



Εικόνα 6.16: Αλληλουχίες βάσεων στη περιοχή 12S rRNA των mtDNA των υπό εξέταση ειδών με εμφάνιση περιοχής κοινού ανιχνευτή και διαφορετικών εκκινητών.

6.8. Μετρήσεις real-time PCR

Για την διαδικασία της real-time PCR με SYBR green ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

1. Μεταφέρουμε 3μl DNA από την αρχική απομόνωση σε φιαλίδια eppendorf των 200μl και μετά παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα για την αντίδραση (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4 και 6.5. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση μείγματος για κάθε δείγμα 43,3μl. Κάνουμε δοκιμή χρησιμοποιώντας τη SYBR green για να δούμε ποια είναι η βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών μας. Η SYBR green είναι πάντα το τελευταίο συστατικό που προσθέτω στο κοινό διάλυμα γιατί είναι φωτοευαίσθητη.

Πίνακας 6.4: Συστατικά αντίδρασης real-time PCR με SYBR green και συγκέντρωση εκκινητών 200nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	3μl
Primer Fw	0.86μl
Primer Rv	0.86μl
ddH ₂ O	16.88μl
SYBR green	21.7μl
Σύνολο	43.3μl

Πίνακας 6.5: Συστατικά αντίδρασης real-time PCR με SYBR green και συγκέντρωση εκκινητών 300nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	3μl
Primer Fw	1.3μl
Primer Rv	1.3μl
ddH ₂ O	16μl
SYBR green	21.7μl
Σύνολο	43.3μl

2. Μοιράζουμε σε κάθε eppendorf που περιέχει DNA από 40.3μl του master mix και σε ένα eppendorf που δεν περιέχει DNA βάζουμε μόνο master mix, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν αρνητικός μάρτυρας (negative control sample), ο οποίος θα μας δείξει εάν υπάρχει επιμόλυνση κατά ή πριν την αντίδραση.

3. Από την ποσότητα που περιέχουν πλέον τα eppendorf (43.3μl) παίρνουμε 20 μl εις διπλούν και τα τοποθετούμε στα ειδικά tube της real-time PRC (τα δείγματα τρέχουν πάντα εις διπλούν για να γίνεται διασταύρωση των αποτελεσμάτων).
4. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στο μηχάνημα της real-time PCR (Εικ.6.17) και το προγραμματίζουμε να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου συμπεριλαμβάνοντας την καμπύλη αποδιάταξης μετά το πέρας της αντίδρασης.

- **Αρχική αποδιάταξη:** 95° C για 3 min
 - **Αποδιάταξη:** 95° C για 30 sec
 - **Υβριδοποίηση:** 61° C για 1 min
 - **Επιμήκυνση:** 72° C για 1 min
- } 30 κύκλοι
- 95° C για 1 min
 - 95° C για 30 sec
 - 95° C για 30 sec
- } dissociation curve

Για την διαδικασία της real-time PCR με ανιχνευτή taqman ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

1. Μεταφέρουμε 3μl DNA από την αρχική απομόνωση σε φιαλίδια eppendorf των 200μl και μετά παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα για την αντίδραση (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.6. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση μείγματος για κάθε δείγμα 43μl. Ο probe μπαίνει πάντα τελευταίος στο κοινό διάλυμα γιατί είναι φωτοευαίσθητος.

Πίνακας 6.6: Συστατικά αντίδρασης real-time PCR με Taqman probe και συγκέντρωση εκκινητών 300nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	3μl
Primer Fw	1.29μl
Primer Rv	1.29μl
ddH ₂ O	15.275μl
Taqman	21.5μl
probe	0.645μl
Σύνολο	43μl

2. Μοιράζουμε σε κάθε eppendorf που περιέχει DNA από 40μl του master mix και σε ένα eppendorf που δεν περιέχει DNA βάζουμε μόνο master mix, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν αρνητικός μάρτυρας (negative control sample), ο οποίος θα μας δείξει εάν υπάρχει επιμόλυνση κατά ή πριν την αντίδραση.

3. Από την ποσότητα που περιέχουν πλέον τα eppendorf (43μl) παίρνουμε 20 μl εις διπλούν και τα τοποθετούμε στα ειδικά tube της real-time PCR (τα δείγματα τρέχουν πάντα εις διπλούν για να γίνεται διασταύρωση των αποτελεσμάτων).
4. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στο μηχάνημα της real-time PCR (Εικ.6.17) και το προγραμματίζουμε να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου.

- **Αρχική αποδιάταξη:** 50°C για 2 min
 - **Αποδιάταξη:** 95°C για 10 min
 - **Υβριδοποίηση:** 95°C για 15 sec
 - **Επιμήκυνση:** 53°C για 1 min
- } 35 κύκλοι

Η ρύθμιση του μηχανήματος πριν τρέξουμε κάποια δοκιμασία γίνεται ως εξής:

1. Επιλέγουμε όλα τα πηγάδια που χρησιμοποιούνται μέσα στο μηχάνημα στο πρόγραμμα του υπολογιστή και τα ονομάζουμε ως "Άγνωστο".
2. Με όλα τα πηγάδια επιλεγμένα, ορίζουμε από το διπλανό πλαίσιο το φίλτρο SYBR green ή Taqman ανάλογα με τη δοκιμή που θέλουμε να τρέξουμε.
3. Εάν χρησιμοποιήσαμε κάποια χρωστική ουσία αναφοράς (reference dye) στο κύριο μείγμα μας, επιλέγουμε από το πλαίσιο δίπλα από το σετ φίλτρων την εν λόγω χρωστική ουσία και στη συνέχεια επιλέγουμε την βαφή.
4. Ορίζουμε στην επόμενη καρτέλα το θερμικό προφίλ για το πείραμα μας καθώς και τον αριθμό των κύκλων για κάθε στάδιο. Μπορούμε να προσθέσουμε μια καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve) να πραγματοποιηθεί αφού ολοκληρωθεί το πρωτόκολλο της δοκιμής στην περίπτωση που έχουμε χρησιμοποιήσει SYBR green.
5. Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα συλλέγουμε τα δεδομένα. Τα δεδομένα της καμπύλης τήξης, όταν υπάρχει, πρέπει να συνδεθούν με τη γραφική παράσταση της καμπύλης διαχωρισμού.



Εικόνα 6.17: Μηχάνημα της real-time PCR.

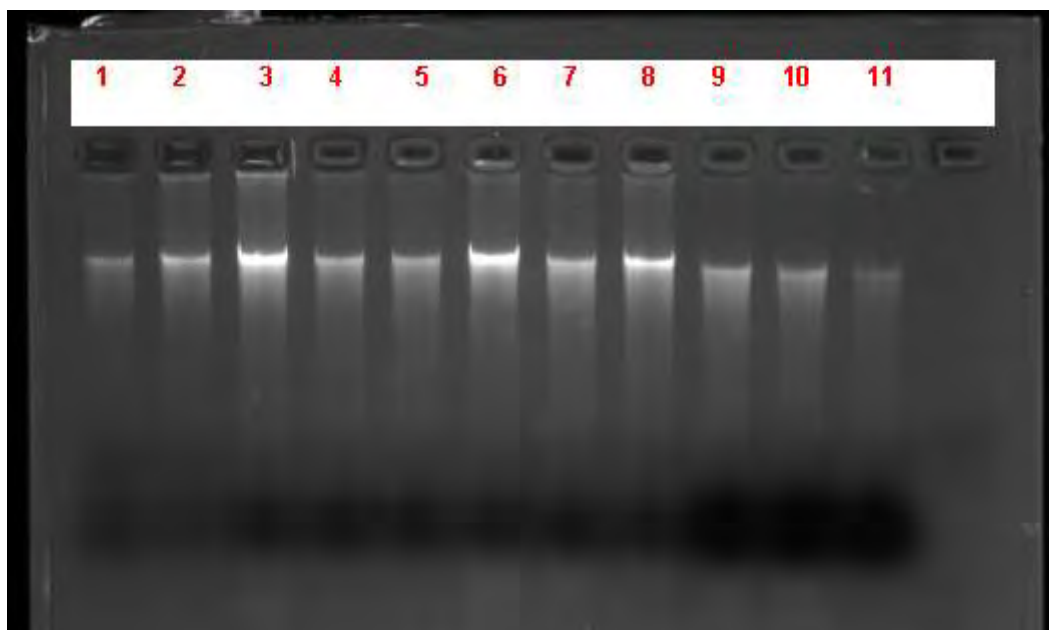
<http://afab-lab.com/product-category/biotechnology/pcrthermal-cycler-biotechnology/>

7.Αποτελέσματα

7.1. Απομόνωση DNA

Δείγματα ωμού κρέατος αγοράστηκαν από τοπικό λιανοπωλητή και επεξεργάστηκαν. Διμερή μείγματα συνδυασμού κρεάτων παρασκευάστηκαν με ομογενοποίηση άπαχου μυϊκού ιστού σε διάφορες αναλογίες. Οι ομογενοποιημένες αναλογίες φαίνονται στον Πίνακα 6.1.

Στην Εικόνα 7.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης μειγμάτων μοσχάρι με χοιρινό στις αναλογίες που φαίνονται στον Πίνακα 6.1. Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που βρέθηκε είναι ικανοποιητική για όλα τα δείγματα, οπότε προχωρήσαμε στη PCR.

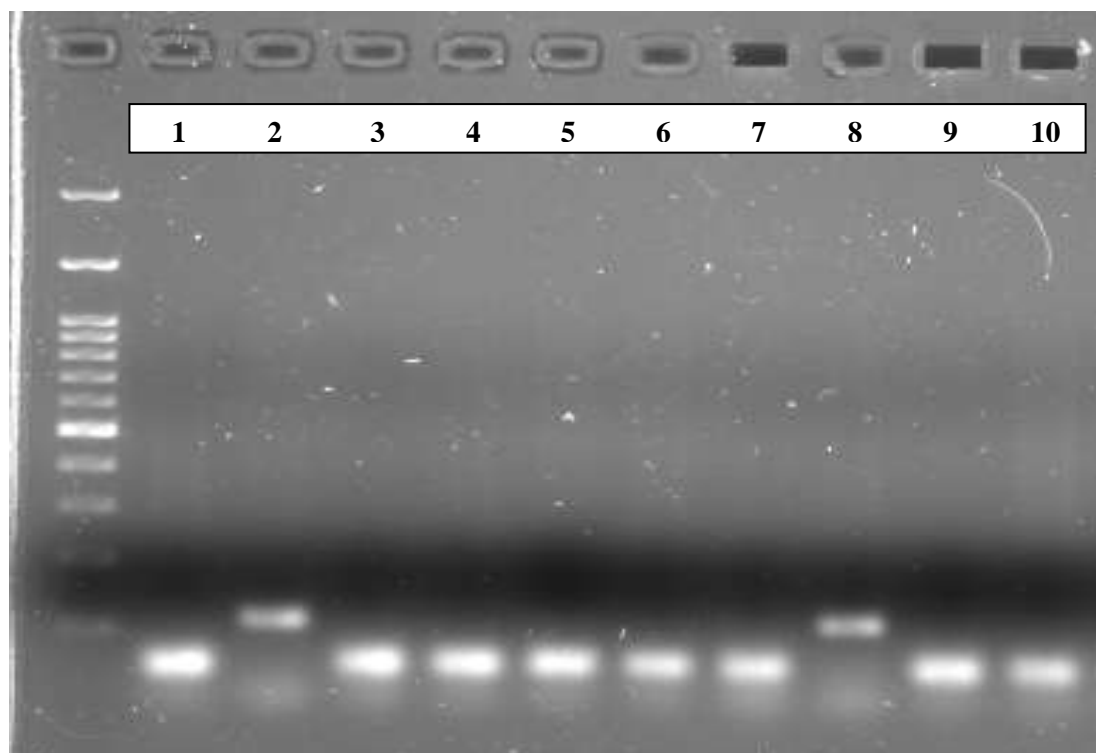


Εικόνα 7.1: Απεικόνιση απομόνωσης μείγματος DNA χοιρινού με μοσχάρι με τις αντίστοιχες αναλογίες του Πίνακα 6.1 σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

7.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Προκειμένου να ελέγξουμε την εξειδίκευση των εκκινητών που σχεδιάσαμε, χρησιμοποιούμε την αντίδραση PCR για να πολλαπλασιάσουμε την αλληλουχία στόχο του γονιδίου 12S rRNA του μιτοχονδρίου, που ανιχνεύει το κάθε ζευγάρι εκκινητών για κάθε δείγμα και κάναμε έλεγχο αν πολλαπλασιάζουν και αλληλουχίες άλλων ειδών.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% παράλληλα με μάρτυρα τμημάτων γνωστών μοριακών μεγεθών, για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 12S rRNA και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος PCR. Στην Εικόνα 7.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου 12S rRNA σε διαφορετικά είδη ζώων.



Εικόνα 7.2: Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Έχουμε με τη σειρά 1. Χοιρινό 2. Μοσχάρι 3. Κοτόπουλο 4. Γαλοπούλα 5. Πρόβατο 6. Κατσίκι 7. Άλογο 8. Χοιρινό-μοσχάρι 9. Κοτόπουλο-γαλοπούλα 10. Πρόβατο- κατσίκι.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το βοδινό ενίσχυσαν τα αναμενόμενα δείγματα. Πολλαπλασιασμός παρατηρείται μόνο στο δείγμα (2) που είχαμε καθαρό μοσχάρι και στο δείγμα (8) που ήταν μείγμα χοιρινό με μοσχάρι. Δεν υπήρχε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με αλληλουχία στόχο από τα άλλα είδη. Μπορούμε πλέον να προχωρήσουμε στο μηχανήμα της real-time PCR για να υλοποιήσουμε το σκοπό μας.

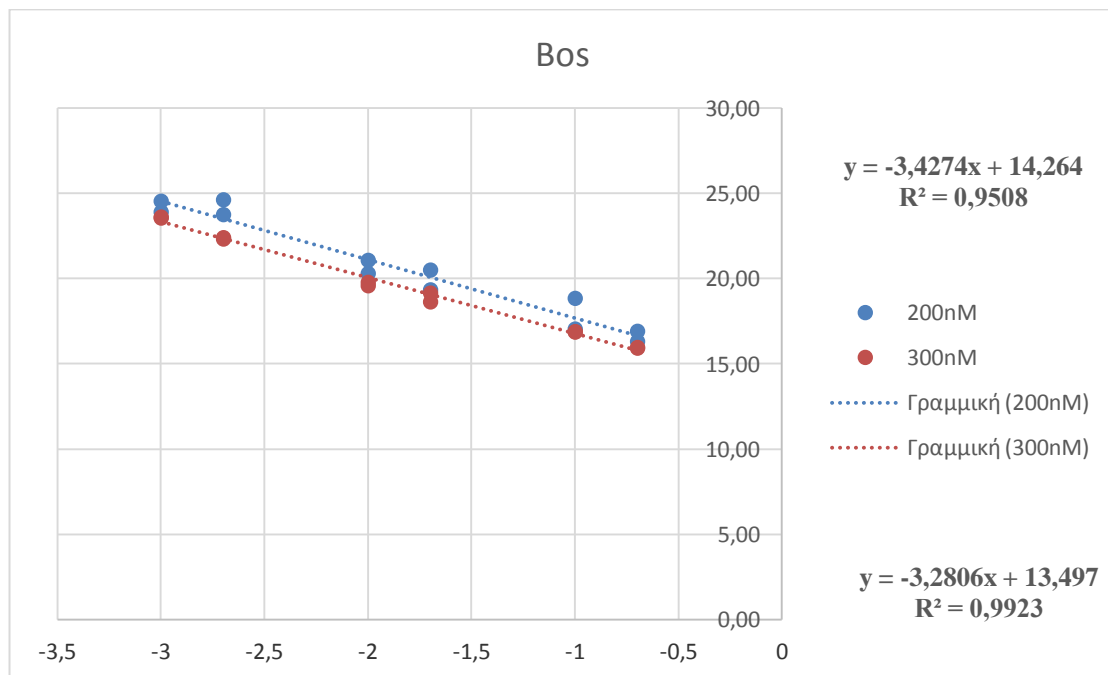
7.3. Έλεγχος απόδοσης της αντίδρασης

Μετά την επιτυχή ενίσχυση των ειδικών εκκινητών *bos* με τη συμβατική PCR μια δοκιμασία PCR πραγματικού χρόνου προτάθηκε για να ελεγχθεί ποια θα ήταν η επιθυμητή συγκέντρωση εκκινητών (Fw & Rv), η οποία θα μας έδινε και την καλύτερη απόδοση στην αντίδραση. Γι' αυτόν τον σκοπό δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστές αντιδράσεις, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις DNA βόειου κρέατος (Πίνακας 7.1) με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις στο ζεύγος εκκινητών. Στην πρώτη αντίδραση οι εκκινητές (Fw & Rv) είχαν συγκέντρωση 200nM και στην δεύτερη 300nM. Για την αντίδραση χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της real-time PCR σε συνδυασμό με τη χρωστική SYBR green. Το περιεχόμενο των δύο αντιδράσεων φαίνεται στους Πίνακες 6.4-6.5 και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) από τις διαδοχικές αραιώσεις βόειου κρέατος σε συγκεντρώσεις 200nM και 300nM

Dilution	log dilution	Bos 200nM (Ct)	Bos 300nM (Ct)
0,2	-0,69897	16,92	15,93
0,2	-0,69897	16,32	15,97
0,1	-1	17,05	16,90
0,1	-1	18,85	16,87
0,02	-1,69897	19,35	19,16
0,02	-1,69897	20,51	18,64
0,01	-2	20,31	19,59
0,01	-2	21,08	19,79
0,002	-2,69897	23,76	22,33
0,002	-2,69897	24,63	22,41
0,001	-3	23,91	23,56
0,001	-3	24,55	23,62

Από τον Πίνακα 7.1 χρησιμοποιώντας τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και το λογάριθμο των αραιώσεων κατασκευάζουμε τις καμπύλες του Διαγράμματος 7.1. για να βρούμε την κλίση της καμπύλης που δημιουργείται και να ελέγξουμε την γραμμικότητα της. Για να είναι γραμμική, ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) πρέπει να είναι κοντά στο 1.



Διάγραμμα 7.1: Καμπύλες αναφοράς της αντίδρασης με χρωστική SYBR green για συγκεντρώσεις εκκινητών 200nM και 300nM.

Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα της αντίδρασης με χρωστική SYBR green σύμφωνα με το Διάγραμμα 7.1 για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών

Species	primers (Fw & Rv)	R ²	Intercept	Slope		Efficiency
Bos	200nM	0,9508	14,264	-3,4274	0,29	0,9578
Bos	300nM	0,9923	13,497	-3,2806	0,30	1,0175

Από τον Πίνακα 7.2 παρατηρούμε ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι καλύτερη σε συγκέντρωση εκκινητών Fw/Rv = 300/300nM. Η αποτελεσματικότητα της real-time PCR ήταν πολύ κοντά στην ιδανική τιμή E=100%, που αντιστοιχεί σε μια κλίση κοντά στην ιδανική -3,32 και όλα τα στοιχεία που έχουν υψηλή συσχέτιση ($R^2 > 0,99$). Έτσι επιλέγουμε αυτήν την συγκέντρωση εκκινητών για να συνεχίσουμε την υπόλοιπη πειραματική πορεία.

7.4. Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Χρησιμοποιώντας την συγκέντρωση εκκινητών που μας έδωσε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (300 nM) έγινε έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών κρέατος βοδινό, χοιρινό, κοτόπουλο και γαλοπούλα. Συγκεκριμένα ο έλεγχος έγινε με τους εκκινητές για το μοσχάρι, που χρησιμοποιήθηκαν τόσο απέναντι στην ειδική αλληλουχία στόχου για το μοσχάρι όσο και των αλληλουχιών στόχων των υπόλοιπων τεσσάρων ειδών για να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση της δοκιμασίας.

Ο έλεγχος έγινε με την μέθοδο της real-time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR green. Παρασκευάστηκε η αντίδραση του Πίνακα 6.5 και για δείγμα χρησιμοποιήθηκε DNA από μοσχάρι, χοιρινό, κοτόπουλο και γαλοπούλα σε ποσότητα 3μl και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA για έλεγχο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) με εκκινητές από μοσχάρι (300 nM) σε DNA από μοσχάρι, χοιρινό, γαλοπούλα, κοτόπουλο

DNA	Bos primers (300nM), Ct
Μοσχάρι	14.02
	13.97
Χοιρινό	23.38
	23.54
Γαλοπούλα	No Ct
	No Ct
Κοτόπουλο	No Ct
	No Ct
Negative control	No Ct

Από το Πίνακα 7.3 παρατηρείται ότι οι εκκινητές για το μοσχάρι δεν ανιχνεύουν καθόλου DNA από γαλοπούλα και κοτόπουλο. Ανιχνεύουν όμως μετά από πολλούς κύκλους (Ct) DNA από χοιρινό κάτι που μας δίνει το δικαίωμα να συνεχίσουμε το πείραμα με τους συγκεκριμένους εκκινητές, χωρίς να έχουμε το πρόβλημα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας.

7.5. Έλεγχος της απόδοσής της αντίδρασης σε μείγματα κρέατος

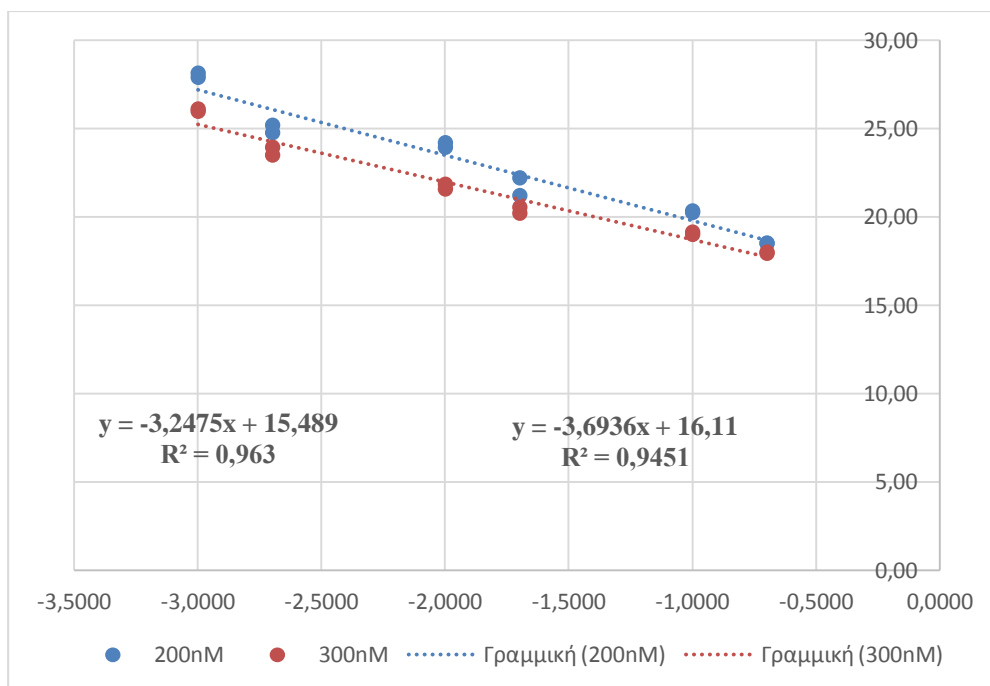
Το επόμενο βήμα ήταν να γίνει έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης με εκκινητές που είχαν συγκέντρωση 200nM και 300nM σε μείγματα κρέατος. Για να σιγουρευτούμε ότι οι εκκινητές ανιχνεύουν το DNA βόειου κρέατος και σε μικρές ποσότητες μέσα στα μείγματα, χρησιμοποιήθηκε DNA από μείγμα το οποίο περιείχε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

Δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστές αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές με συγκέντρωση 200nM (Πίνακας 6.4) και στην δεύτερη αντίδραση εκκινητές με συγκέντρωση 300nM (Πίνακας 6.5). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.4.

Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) από τις διαδοχικές αραιώσεις μείγματος κρέατος μοσχάρι με χοιρινό σε συγκεντρώσεις εκκινητών για το μοσχάρι 200nM και 300nM

Dilution	log dilution	Bos 200nM (Ct)	Bos 300nM (Ct)
0,2	-0,698970004	18.51	18.02
0,2	-0,698970004	18.53	17.95
0,1	-1	20.35	19.15
0,1	-1	20.26	19.02
0,02	-1,698970004	21.22	20.56
0,02	-1,698970004	22.22	20.22
0,01	-2	23.95	21.86
0,01	-2	24.21	21.59
0,002	-2,698970004	24.78	23.95
0,002	-2,698970004	25.2	23.51
0,001	-3	27.91	25.99
0,001	-3	28.15	26.12

Από τον Πίνακα 7.4 χρησιμοποιώντας τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και τις αραιώσεις φτιάχνουμε το Διάγραμμα 7.2 για να βρούμε την κλίση της καμπύλης που δημιουργείται και να ελέγξουμε την γραμμικότητα της. Για να είναι γραμμική, ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) πρέπει να είναι κοντά στο 1.



Διάγραμμα 7.2: Καμπύλες αναφοράς της αντίδρασης με χρωστική SYBR green σε μείγματος κρέατος μοσχάρι με χοιρινό για συγκεντρώσεις εκκινητών 200nM και 300nM.

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα της αντίδρασης με χρωστική SYBR green σύμφωνα με το Διάγραμμα 7.2 για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών

Species	primers (Fw & Rv)	R ²	Intercept	Slope		Efficiency
Bos	200nM	0.9451	16.110	-3.6936	0.27	0.8653
Bos	300nM	0.963	15.489	-3.2475	0.31	1.0320

Παρατηρούμε ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση εκκινητών αυξάνει η απόδοση της αντίδρασης $E=1.0320$. Αυτό σε συνδυασμό με τον πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης $R^2=0.9630$ μας επιτρέπουν να χρησιμοποιήσουμε τους εκκινητές με συγκέντρωση 300nM για το τελικό στάδιο του πειράματος μας δηλαδή για την ποσοτικοποίηση του DNA σε δείγματα, χρησιμοποιώντας πλέον την μέθοδο της real-time PCR με εσωτερικό ανιχνευτή (probe).

7.6. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων

Γνωρίζοντας από την προηγούμενη πειραματική πορεία ότι η καλύτερη απόδοση της αντίδρασης $E=1.0320$ προέρχεται από εκκινητές με συγκέντρωση 300nM, δημιουργήσαμε την αντίδραση του Πίνακα 6.6 με την μέθοδο της real-time PCR, ορίσαμε την τιμή Threshold=2000 και χρησιμοποιώντας τις αναλογίες του Πίνακα 7.6 πήραμε τα αποτελέσματα του Πίνακα 7.7.

Πίνακας 7.6: Αναμείξεις των δύο ζωικών ειδών (μοσχάρι-χοιρινό) σε διάφορες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν

Μείγματα	Μοσχάρι	Χοιρινό
1	100	-
2	95	5
3	90	10
4	50	50
5	10	90
6	5	95
7	-	100

Πίνακας 7.7: Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle), φθορισμού και ποσότητας DNA από τις διαδοχικές αραιώσεις μείγματος κρέατος μοσχάρι με χοιρινό και σε συγκέντρωση εκκινητών 300nM

Μείγματα	Μοσχάρι	ng DNA	Ct	R ₀
1	100	18.57	11.94	0.1263
	100	18.57	11.69	0.1508
2	95	17.64	12.59	0.0797
	95	17.64	12.47	0.0868
3	90	16.71	12.72	0.0727
	90	16.71	13.14	0.0540
4	50	9.28	15.51	0.0101
	50	9.28	14.79	0.0167
5	10	1.86	17.61	0.0023
	10	1.86	16.29	0.0058
6	5	0.93	18.86	0.0009
	5	0.93	17.29	0.0028
7	0	0	-	-
	0	0	-	-

Οι μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες μεθόδους για την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από την real-time PCR, προέρχονται από τη βασική φόρμουλα που περιγράφει την ενίσχυση της PCR στην εκθετική φάση της αντίδρασης και είναι η εξής:

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

Όπου

X_n = το συνολικό ποσό ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου σε n κύκλους

X₀ = αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου

E = απόδοση της ενίσχυση

n= αριθμός των κύκλων

Στην real-time PCR γίνεται δεκτό ότι η συσσώρευση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς είναι ανάλογη προς την συσσώρευση του προϊόντος ενίσχυσης της PCR και η εξίσωση μπορεί να γραφτεί:

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

και έτσι ο αρχικός φθορισμός να υπολογιστεί ως εξής:

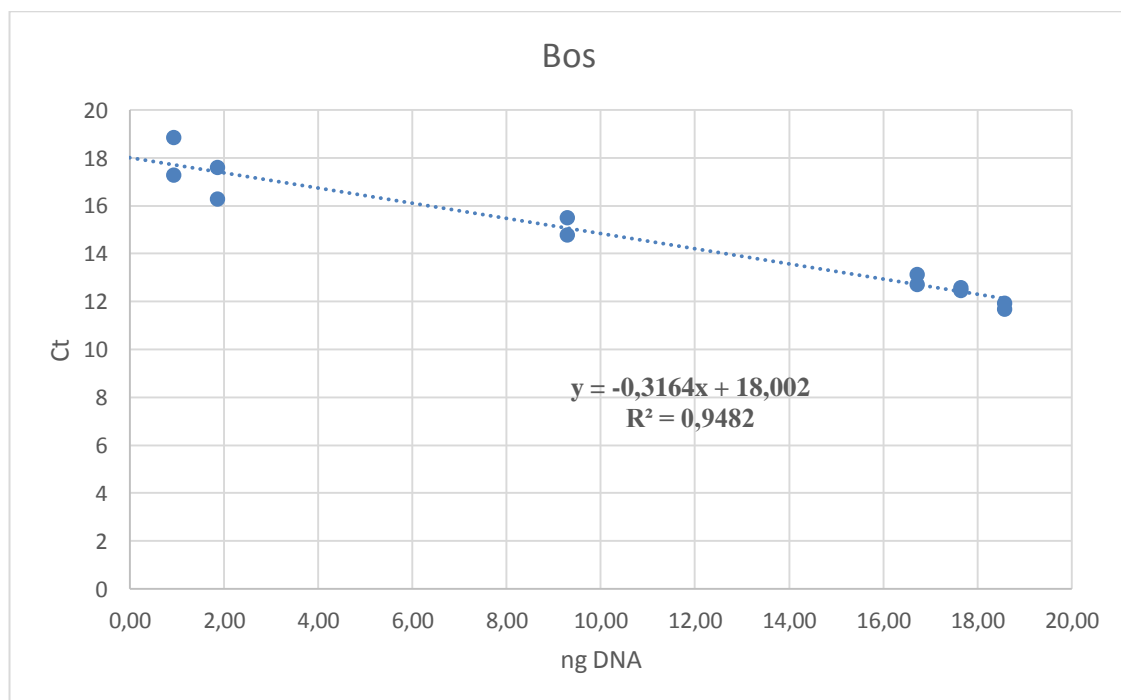
$$R_0 = R_n / (E+1)^n$$

R_n = η ένταση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς σε κύκλο n

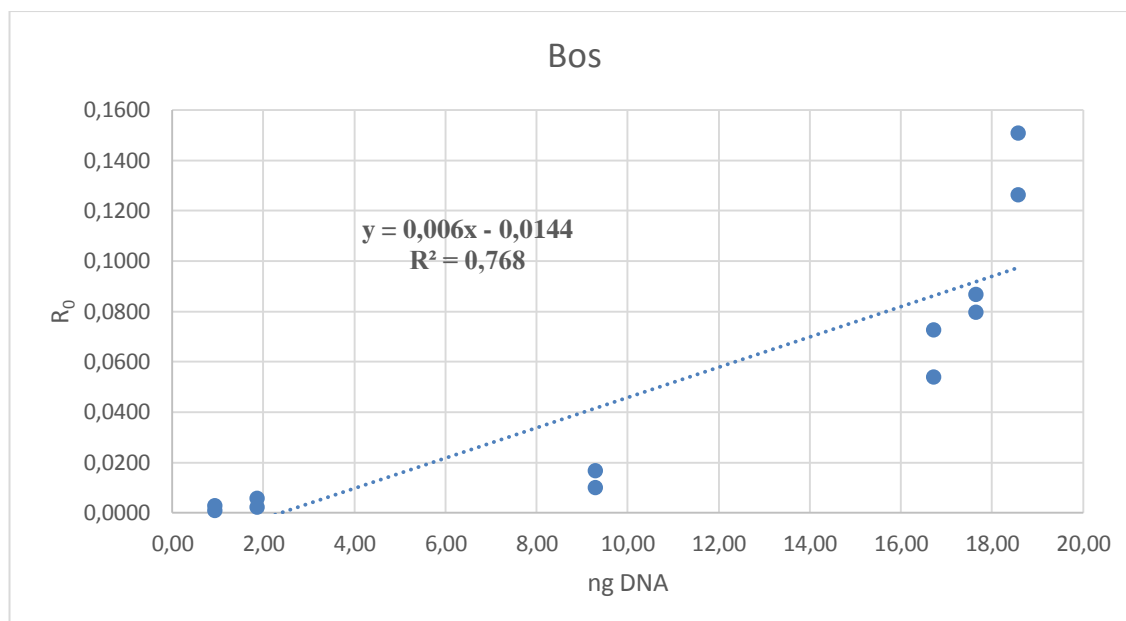
R₀ = το θεωρητικό σημείο έναρξης του φθορισμού το οποίο είναι ανάλογο προς την ποσότητα του αρχικού εκμαγείου.

Έτσι, η τιμή R₀ αντιπροσωπεύει την ποσότητα της αλληλουχίας στόχο που εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού. Η ποσότητα DNA του Πίνακα 7.7 προέρχεται από το γινόμενο της ποσότητας του DNA που υπάρχει στα δείγματα με τις αραιώσεις που δημιουργήσαμε.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 7.7 δημιουργήσαμε δύο καμπύλες αναφοράς. της ποσότητας DNA στο δείγμα σε σχέση με τις τιμές Ct (Διάγραμμα 7.3) και σε σχέση με τα επίπεδα φθορισμού R₀ (Διάγραμμα 7.4).



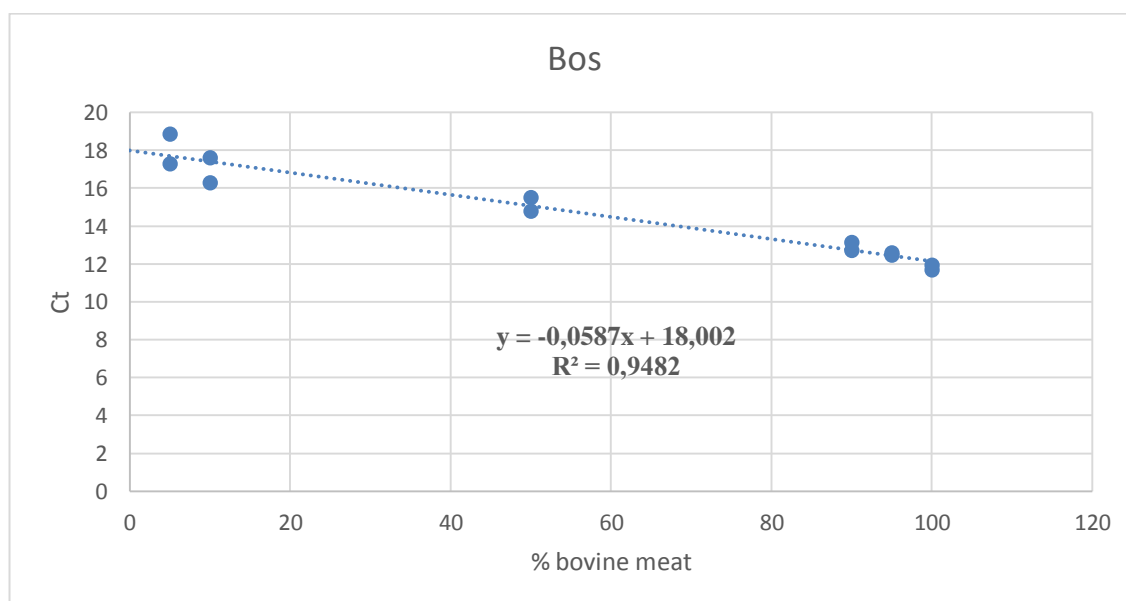
Διάγραμμα 7.3: Καμπύλη αναφοράς της ποσότητας DNA στο δείγμα σε σχέση με Ct.



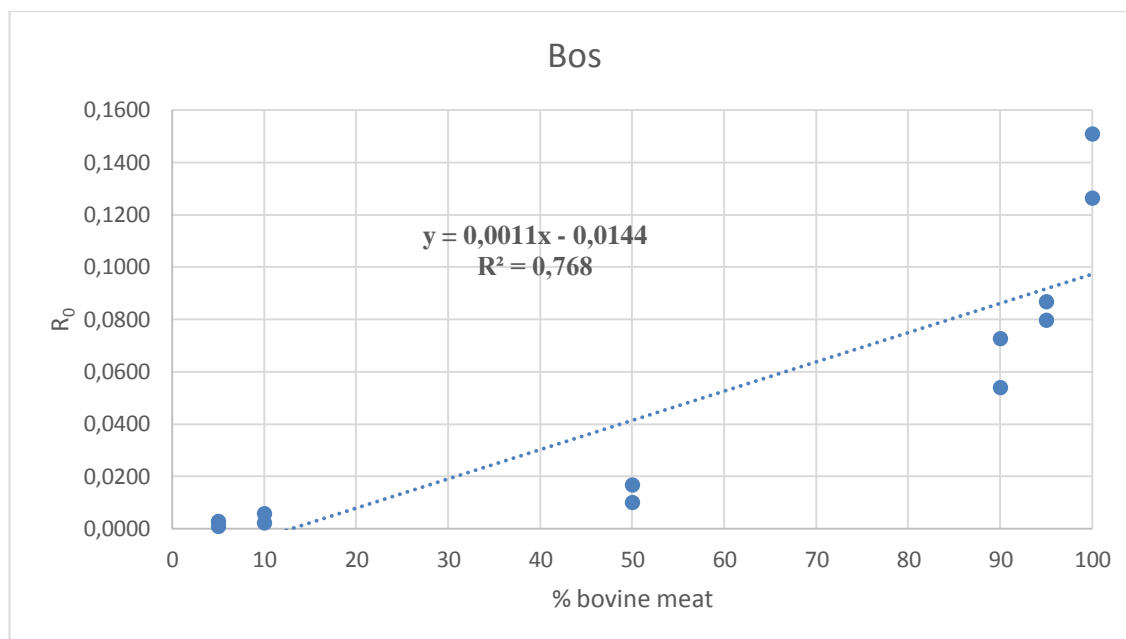
Διάγραμμα 7.4: Καμπύλη αναφοράς της ποσότητας DNA στο δείγμα σε σχέση με το επίπεδο φθορισμού.

Το Διάγραμμα 7.3 έχει στον άξονα y τους αριθμούς Ct και στον άξονα x την ποσότητα DNA. Το Διάγραμμα 7.4 έχει στον άξονα y το επίπεδο φθορισμού και στον άξονα x την ποσότητα DNA. Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 είναι μεγαλύτερος στην πρώτη καμπύλη αναφοράς (Ct, ng DNA). Έτσι λοιπόν συμπεραίνουμε ότι είναι προτιμότερο για ποσοτικούς προσδιορισμούς να χρησιμοποιηθεί η καμπύλη αναφοράς του Διαγράμματος 7.3 (Threshold cycle) η οποία είναι πιο γραμμική από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού και μας δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Επίσης από τον Πίνακα 7.6 δημιουργήσαμε ακόμα δυο καμπύλες αναφοράς που φαίνονται στα Διαγράμματα 7.5 και 7.6.



Διάγραμμα 7.5: Καμπύλη αναφοράς του ποσοστού DNA στο δείγμα σε σχέση με το Ct.



Διάγραμμα 7.6: Καμπύλη αναφοράς του ποσοστού DNA στο δείγμα σε σχέση με το επίπεδο φθορισμού.

Η πρώτη καμπύλη (Διάγραμμα 7.5) δημιουργήθηκε από τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και από το ποσοστό DNA στα δείγματα και η δεύτερη από τα επίπεδα φθορισμού και το ποσοστό DNA στα δείγματα. Η καμπύλη αναφοράς των τιμών Ct δίνει μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης $R^2=0.9482$ από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού $R^2=0.7680$. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι είναι προτιμότερο για ποσοτικούς προσδιορισμούς να χρησιμοποιηθεί η καμπύλη αναφοράς του Διαγράμματος 7.5 σε σχέση με τις τιμές Ct (Threshold cycle) η οποία είναι πιο γραμμική από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού και μας δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

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

8. Συζήτηση

Το ερυθρό κρέας αποτελεί σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι στις διατροφικές συνήθειες του σύγχρονου δυτικού κόσμου. Ακόμα και σε καιρό κρίσης, οι ποσότητες κρέατος που καταναλώνονται παραμένουν αρκετά υψηλές. Το οικονομικό κέρδος ωθεί πολλές φορές τις επιχειρήσεις που ασχολούνται με τη βιομηχανία κρέατος, στην αντικατάσταση κρέατος υψηλής εμπορικής αξίας με φθηνά υποκατάστατα και την παραπλανητική επισήμανση των ειδών.

Η εκτίμηση της γνησιότητας των τροφίμων είναι ένα πολύ σημαντικό θέμα, ώστε να αποφευχθεί ο αθέμιτος ανταγωνισμός μεταξύ των παραγωγών και να επιτραπεί στους καταναλωτές να έχουν ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τα προϊόντα που αγοράζουν. Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί βασική προτεραιότητα της πολιτικής του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου, τα οποία με τους κανονισμούς με αριθμό 1169/2011 και 178/2002 ορίζουν κανόνες για τη σήμανση και την ιχνηλασιμότητα του κρέατος και των προϊόντων με βάση το κρέας μέσα στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Σύμφωνα με τους κανόνες σήμανσης καθιερώνεται ότι τα προϊόντα κρέατος πρέπει να επισημαίνονται με ακρίβεια, όσον αφορά τα είδη που περιέχουν και ως εκ τούτου, οποιαδήποτε ασάφεια ως προς το πρακτικές επισήμανσης είναι μη αποδεκτή. Σύμφωνα με τους κανόνες ιχνηλασιμότητας δίνεται η δυνατότητα για ένα πλήρη έλεγχο "από το αγρόκτημα στο τραπέζι".

Δυστυχώς όμως η σήμανση και η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων, δεν αποτελούν από μόνα τους εγγύηση ότι θα αποφευχθούν οι απάτες και οι παράνομες πρακτικές που πραγματοποιούνται από ορισμένους παραγωγούς τροφίμων. Μια πρόσφατη έρευνα ανίχνευσε κρέας από αδήλωτα είδη στο 22,0% των προϊόντων που αναλύθηκαν με βάση το κρέας (Ayaz, 2006). Λόγω της αφθονίας και της κατώτερης τιμής τους, το κοτόπουλο και η γαλοπούλα είναι συνήθως τα φθηνά και αδήλωτα υποκατάστατα βοδινού και χοιρινού κρέατος σε πολλά από τα προϊόντα τους (Djurdjevic et al., 2005), καθώς και σε λουκάνικα και σε αλλαντικά (Ghonnati et al., 2009). Επιπλέον πρόσφατες διατροφικές κρίσεις (π.χ. ο αφρώδης πυρετός) έχουν αυξήσει δραματικά το δημόσιο ενδιαφέρον για τη σύνθεση των προϊόντων διατροφής.

Η αυξανόμενη ζήτηση για διαφάνεια στην βιομηχανία τροφίμων έχει γίνει μια κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη μεθόδων για την ανάλυση των συστατικών των τροφίμων. Απαιτείται η εύρεση μιας αξιόπιστης και ευαίσθητης αναλυτικής μεθόδου, που να διευκολύνει τις δοκιμασίες ελέγχου ρουτίνας των ειδών κρέατος στα διάφορα τρόφιμα και τις ζωοτροφές.

Για το σκοπό αυτό, πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την αναγνώριση των ειδών ζωικών ιστών στα προϊόντα κρέατος. Μεταξύ αυτών, μοριακές τεχνικές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου PCR (real-time PCR), που έχουν αποδειχθεί κατάλληλα εργαλεία για την πιστοποίηση της αυθεντικότητας. Ειδικά η τεχνική της real-time (PCR) με ειδικούς εκκινητές χρησιμοποιείται ευρέως, λόγω της δυνατότητάς της για απλή, γρήγορη, εξειδικευμένη και ευαίσθητη ανάλυση που επιτρέπει τον προσδιορισμό ακόμα και ειδών σε περίπλοκα μείγματα και πολύ επεξεργασμένα τρόφιμα (Marfa, 2008).

Στο παρελθόν έχει μελετηθεί η ποσοτικοποίηση του DNA με την μέθοδο της real-time PCR σε μείγματα διαφόρων ειδών κρέατος από πολλούς ερευνητές, όμως στις περισσότερες περιπτώσεις δεν χρησιμοποιήθηκε ως γενετικός δείκτης το γονίδιο 12S rRNA του mtDNA και κυρίως δεν είχαμε κοινό ανιχνευτή, η χρήση του οποίου μειώνει σημαντικά το κόστος του πειράματος. Στην πράξη το γονίδιο 12S rRNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ειδικών εκκινητών εξειδικευμένων για μερικά είδη ελαφιών, υποδεικνύοντας την παρουσία μεταβλητότητας μεταξύ των ειδών επί της αλληλουχίας στόχου και όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης 0.1-0.8%, ανάλογα με το είδος και την επεξεργασία των δειγμάτων (Fajardo et al., 2008b). Εκτός αυτού, το 12S rRNA έχει χρησιμοποιεί σε συνδυασμό με μία σειρά ειδικών εκκινητών, για μια σειρά πτερωτών θηραμάτων εφαρμόζοντας την ανάλυση PCR και καταδεικνύοντας τόσο τη μεταξύ όσο και την εντός του είδους μεταβλητότητα που περιέχεται στην αλληλουχία στόχο πετυχαίνοντας όριο ανίχνευσης χαμηλότερο από 5fg DNA (Rojas et al., 2010). Επίσης, έχουν σχεδιαστεί ειδικοί εκκινητές για το χοιρινό βασιζόμενοι στο γονίδιο αυτό, δίδοντας ένα πολύ ειδικό σύστημα αναγνώρισης στην PCR ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ζώων όσο και των φυτών που εμφανίζονται στις ζωοτροφές. Η ανάλυση των πειρατικών δειγμάτων κατέδειξε την καταλληλότητα της δοκιμασίας για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του χοίρου DNA σε μίγματα που περιέχουν μέχρι και 0,1% (Martin et al., 2009). Οι τιμές του ορίου ανίχνευσης του 12S rRNA που βασίζονται στο σύστημα της PCR και αναφέρθηκαν στις παραπάνω μελέτες κυμαίνονται από λιγότερο των 5 fg έως 10 pg DNA ενώ με εξειδικευμένους εκκινητές που σχεδιάστηκαν από άλλα κωδικοποιούμενα μιτοχονδριακά γονίδια (κυτόχρωμα b, 16S rRNA κτλ) ανιχνεύθηκαν έως και 0.1pg DNA (Kesmen et al., 2009).

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν οι δύο αυτές μοριακές τεχνικές με σκοπό την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ειδών ερυθρού κρέατος, που βρίσκονταν σε μορφή προσμείξεων (κυρίως μοσχάρι – χοιρινό). Η διαδικασία στηρίχθηκε στο γονίδιο 12S rRNA του μιτοχονδριακού DNA, γιατί τα μιτοχόνδρια υπάρχουν σε μεγάλο αριθμό σε κάθε κύτταρο και έτσι ακόμη και μικρή ποσότητα δείγματος είναι αρκετή για να δώσει ανιχνεύσιμη ενίσχυση. Ειδικά δεδομένης της ικανότητας της PCR να ενισχύει ακόμα και μικρές αλληλουχίες που προέρχονται από πολύ υποβαθμισμένο DNA. Στόχος ήταν να επιτευχθεί ο έλεγχος προσμείξεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με μοριακούς δείκτες.

Με τη μέθοδο της απομόνωσης πήραμε μια αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA από μικρή ποσότητα κρέατος. Κάναμε ομοπαράθεση των αλληλουχιών των γονιδίων 12S rRNA του μιτοχονδριακού DNA των τεσσάρων ειδών και βρήκαμε μια ομόλογη αλληλουχία ώστε να δημιουργήσουμε έναν ενιαίο ανιχνευτή. Περιοχές διακύμανσης στην αλληλουχία των τεσσάρων ειδών γύρω από την ομόλογη αλληλουχία στόχο επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό του ζεύγους (Fw & Rv) των ειδικών εκκινητών για κάθε ένα από τα συγκεκριμένα είδη.

Αρχικά με τη μέθοδο της PCR πολλαπλασιάσαμε την αλληλουχία στόχο για όλα τα δείγματα και κάναμε έλεγχο διασταυρούμενης αντιδραστικότητας των εκκινητών για το μοσχάρι με τα άλλα είδη.

Έπειτα χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της real-time PCR για την ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών στόχων στο δείγμα. Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου υπάρχουν δύο μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοστούν για τη σήμανση των προϊόντων. Η πρώτη μέθοδος βασίζεται σε μια μη ειδική χρωστική πρόσδεσης (π.χ. SYBR Green I) που φθορίζει όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στη χρήση ενός ανιχνευτή ειδικής αλληλουχίας, ο οποίος υβριδοποιείται σε μία εσωτερική αλληλουχία του μορίου στόχου μεταξύ των δύο εκκινητών και αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο ιχνηθετημένο με μια φθορίζουσα χρωστική στο ένα άκρο και έναν αποσβέστη στο άλλο (π.χ., TaqMan® ανιχνευτές).

Στην εργασία χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της real-time PCR με τη χρωστική SYBR green αφενός ώστε να γίνει έλεγχος της καταλληλότερης συγκέντρωσης των εκκινητών και αφετέρου για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς, η οποία θα μας έδινε καλύτερη απόδοση στην αντίδραση (Efficiency, E) και μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης. Καταλήξαμε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση εκκινητών, η οποία μας έδινε και την καλύτερη απόδοση ($E=1,0320$) ήταν 300nM. Επίσης με την μέθοδο αυτή έγινε έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ μοσχαριού, χοιρινού, γαλοπούλας και κοτόπουλου.

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

Με την εξειδίκευση και ευαισθησία που παρουσιάζει η μέθοδος της PCR πραγματικού χρόνου, φαίνεται ότι είναι εφικτή η δημιουργία καμπυλών αναφοράς για την ποσοτικοποίηση DNA σε δείγματα κρεάτων. Από τις τέσσερις καμπύλες αναφοράς που δημιουργήσαμε, φαίνεται καθαρά ότι οι πιο αξιόπιστες για ποσοτικές εκτιμήσεις καμπύλες είναι αυτές που προκύπτουν σε σχέση με τις τιμές Ct, γιατί είχαν καλύτερο συντελεστή συσχέτισης, με αποτέλεσμα να έχουμε πιο ακριβή αποτελέσματα. Μπορούμε λοιπόν να ανιχνεύσουμε άγνωστα δείγματα από μείγματα κρεάτων με μοσχάρι, σε σύγκριση των τιμών Ct (Threshold Cycle) των υπό μελέτη δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και με τον τρόπο αυτό να επιτύχουμε την ποσοτικοποίησή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderson S., de Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Eperon I. C., Sanger F., Young I. G., 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* 156, pp 683–717.

Applied Biosystem, 2003. Real-time PCR Vs Traditional PCR. Applied Biosystem, pp 1-15.

Aristoy, M. C., Toldra, F., 2004. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science* 67, pp 211-217.

Ayaz, Y., Ayaz, N. D., Erol, I., 2006. Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods* 17, pp 214-220.

Ballin, N. Z., 2010. Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 86, pp 577-587.

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

Chauhan, T., Rajiv, K., 2010. Molecular markers and their applications in fisheries and Aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, pp 281-291.

Chiappini, B., Brambilla, G., Agrimi, U., Vaccari, A., Aarts, A., Berben, G., et al., 2005. Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *Journal of AOAC International* 88, pp 1399–1403.

Djurdjevic, N., Sheu, S.-C., Hsieh, Y.-H. P., 2005. Quantitative detection of poultry in cooked meat products. *Journal of Food Science* 70.

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

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

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

Ghovvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z., Heravi Moussavi, A., Javadmanesh, A., 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 20, pp 696-699.

Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al., 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science* 66, pp 551–556.

Guoli, Z., Mingguang, Z., Zhijiang, Z., Hongsheng, O., & Qiang, L. (1999). Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Science*, 51, 233–236.

Hargin, K. D., 1996. Authenticity Issues in Meat and Meat Products. *Meat Science* 43, pp S277-S289

Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., Silver, L. M., Veres, R. C., 2008. *Genetics: From Genes to Genomes* (3rd Edition). New York, NY : McGraw-Hill, pp 82-86, 168-170, 173-183, 191-195, 207-220, 581-603.

Hoeh, W.R., Blakley K.H., Brown W.M., 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* Vol. 251, No.5000, pp 1488–1490.

Houghton, S. G. and Cockerill III, F. R., 2006. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery*, Vol. 139, No 1, pp 1-5.

Ibrahim, A. A., 2008. Improved DNA extraction method for porcine contaminants, detection in imported meat to the Saudi market. *Saudi Journal of Biological Sciences* 15, 225–229.

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

Kondo R., Matsuura E.T., Chigusa S.I., 1992. Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method. *Genetical Research* Vol.59, Issue 2, pp 81–84.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006.

The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, pp 95-125.

Life Technologies, 2012. Real - time PCR handbook. Life Technologies, pp 4-15, 24-26, 28.

Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Oliveira, M. B. P. P., 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, Vol. 227, Issue 3, pp 649-665

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

Meusel, M.S., Moritz, R.F., 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics*, Vol.24, Issue 6, pp 539–543.

Mohamad, N.A., El Sheikha, A. F., Mustafa, M., Mokhtar, N. F . K., 2013. Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International* 50, pp 330–338.

Ozgen Arun, O., Ugur, M., 2000. Animal species determination in sausages using an SDS-PAGE technique. *Archiv fur Lebensmittel Hygiene* 51, pp 49-53.

PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA, 2012. Invitrogen by life technologies, user guide, pp 16, 23-24.

Rodriguez, M. A., García, T., González, I., Hernández, P. E., Martín, R., 2005. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science* 70, pp 113-120.

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

Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., Tsaftaris, A., 2013. A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. *Meat Science* 94, pp 84-88.

Steinborn, R., Zakhartchenko, V., Jelyazkov, J. et al., 1998. Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. FEBS Letters, Vol.426, Issue 3, pp 352–356.

Stratagene, 2007. Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide. Stratagene, pp 4-7, 9-10, 21-22, 26-27, 29, 35-36.

Wang, S., Bao, Z., Zhang, L., Li, N., Zhan, A., Guo, W., et al., 2006. A new strategy for species identification of planktonic larvae: PCR–RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA detected by agarose gel electrophoresis or DHPLC. Journal of Plankton Research 28, pp 375–384.

White, T. L., Adams, W. T., Neale, D. B., 2007. Forest Genetics. CAB International, pp 53-76.

Whittall, J. B., Medina-Marino, A., Zimmer, E. A., Hodges, S. A., 2006. Generating single-copy nuclear gene data for a recent adaptive radiation. Molecular Phylogenetics and Evolution 39, pp 124–134.

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

Zhao, X., Li, N., Guo, W. et al., 2004. Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). Heredity 93, pp 399–403.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Watson, J. M, Myers, R. M., Candy, A. A., Witkowski, J. A., 2007. Ανασυνδιασμένο DNA: γονίδια και γονιδιώματα - μια συνοπτική παρουσίαση. Ακαδημαϊκές εκδόσεις, σελ. 126-139.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1760/2000 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 17^{ης} Ιουλίου 2000 «για τη θέσπιση συστήματος αναγνώρισης και καταγραφής των βοοειδών και την επισημάνση του βοείου κρέατος και των προϊόντων με βάση το βόειο κρέας, καθώς και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 820/97 του Συμβουλίου»

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 178/2002 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 28^{ης} Ιανουαρίου 2002 «για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων».

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 1169/2011 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 25^{ης} Οκτωβρίου 2011 «σχετικά με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές, την τροποποίηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 1924/2006 και (ΕΚ) αριθ. 1925/2006 και την κατάργηση της οδηγίας 87/250/ΕΟΚ της Επιτροπής, της οδηγίας 90/496/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της οδηγίας 1999/10/ΕΚ της Επιτροπής, της οδηγίας 2000/13/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, των οδηγιών της Επιτροπής 2002/67/ΕΚ και 2008/5/ΕΚ και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 608/2004 της Επιτροπής».

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 16^{ης} Δεκεμβρίου 2008 «που αφορά τα πρόσθετα τροφίμων».

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 853/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 29^{ης} Απριλίου 2004 «για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης»

Μπλούκας, Γ. Ι., (2007). Τεχνολογία Κρέατος. Εκδόσεις Σταμούλη, σελ. 20.

Χατζημηνάογλου, Ι., Λιαμάδης, Δ., Αυδή, Μ., 2006. Εισαγωγή στη ζωική παραγωγή. Εκδόσεις Γιαχούδη, σελ. 26-30,37-39.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ)

<http://technologyinscience.blogspot.gr/2013/05/taqman-assay-vs-sybr-green-assay.html#.VJBvuHvzg2d>

<http://www.iso.org/iso/home/standards/management-standards/iso22000.htm>

<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>

<http://www.gcsf.gr/media/trofima/91-iss1n.pdf>

<http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf>