



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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

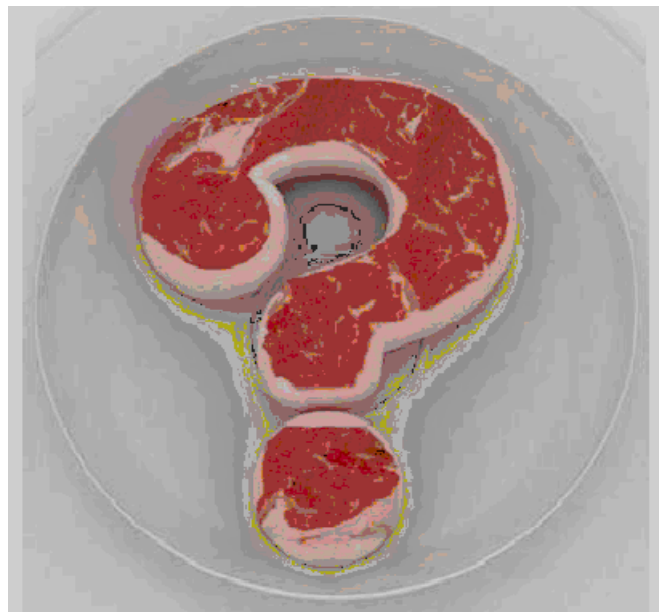
### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

---

**Έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης με  
μοριακούς δείκτες**

---

**Γαλάρα Ιωάννα**



---

ΛΑΡΙΣΑ, 2012

---

**Έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης  
με μοριακούς δείκτες**

---

---

**Development of molecular markers for the  
identification of admixtures in food of animal origin**

---

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

---

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:  
(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

### ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

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

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:

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

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:

Λέκτορας Μοριακής Βιολογίας Ζωικών  
Οργανισμών

---

© Γαλάρα Ιωάννα

© Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>Ευχαριστίες</b> .....	9
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	10
<b>1.1 Το κρέας</b> .....	10
1.1.1 Γενικά.....	10
1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος.....	11
1.1.3 Κατανάλωση κρέατος .....	11
1.1.4 Παραγωγή και κατανάλωση κρέατος στην Ελλάδα .....	14
<b>1.2 Επισήμανση και ιχνηλασιμότητα κρέατος</b> .....	16
1.2.1 Γενικά.....	16
1.2.2 Επισήμανση των τροφίμων.....	18
1.2.3 Ιχνηλασιμότητα των τροφίμων .....	18
<b>1.3 Αυθεντικότητα και Ταυτοποίηση Κρέατος</b> .....	22
<b>1.4 Μοριακοί δείκτες</b> .....	27
1.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)...	31
1.4.2 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) .....	37
1.4.3 Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους με ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP).....	38
1.4.4 Μιτοχονδριακό DNA/ 16S rRNA.....	40
<b>1.5 Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος</b> .....	43
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	47
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	48
<b>3.1. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ</b> .....	48
3.1.1. Εξοπλισμός για την απομόνωση του DNA από ιστό κρέατος.....	48
3.1.2. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή (gel) αγαρόζης.....	49
3.1.3. Εξοπλισμός για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων (PCR) .....	50
3.1.4. Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου SSCP.....	50
3.1.5. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση των SSCP σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	51

3.1.6. Εξοπλισμός για την εμφάνιση (χρώση) των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	51
3.1.7. Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου RFLP .....	52
3.1.8. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση των RFLP σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	53
3.1.9. Εξοπλισμός για την εμφάνιση (χρώση) των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	53
<b>3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>54</b>
3.2.1. Δείγματα .....	54
3.2.2. Απομόνωση DNA .....	55
3.2.3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA .....	57
3.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	60
3.2.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) .....	63
3.2.5.1. Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιάταξη των προϊόντων PCR.....	63
3.2.5.2. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	64
3.2.5.3. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining).....	66
3.2.6. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους με ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP).....	68
3.2.6.1. Θεωρητικός υπολογισμός RFLP .....	68
3.2.6.2. Ανάλυση RFLP.....	68
3.2.6.3. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	69
3.2.6.4. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining).....	71
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>72</b>
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>77</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>79</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές για τον προσδιορισμό της προέλευσης καθώς και της ταυτοποίησης ειδών κρέατος που είναι υπό την μορφή αναμειξέων. Με τις τεχνικές αυτές θέλουμε να επιτύχουμε των έλεγχο προσμίξεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Τα είδη κρέατος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το μοσχάρι και το χοιρινό, σε διάφορες αναμειξείες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό DNA που απομονώθηκε από μυϊκό ιστό των κρεάτων αυτών. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν η PCR-SSCP και η PCR-RFLP. Αρχικά ενισχύθηκε με την μέθοδο PCR τμήμα του γονιδίου 16s rRNA μεγέθους 243bp για το μοσχάρι και 247bp για το χοιρινό. Οι ολιγονουκλεϊνικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινοί για τα παραγωγικά ζώα (universal primers). Έπειτα ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για απεικόνιση των αποτελεσμάτων. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού και ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των τμημάτων περιορισμού σε πηκτική πολυακρυλαμίδης.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι, η ανάλυση του τμήματος του γονιδίου του 16s rRNA αποκάλυψε 2 πρότυπα, όσα ήταν και τα είδη, οπότε επιβεβαίωσε ότι η τεχνική PCR-SSCP εφαρμόζεται και σε αναμειξείες κρεάτων με επιτυχία. Όσο αναφορά την PCR-RFLP, προέκυψε ότι το ένζυμο *XbaI* που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατάλληλο για την ταυτοποίηση και των δύο ειδών κρέατος σε όλες τις αναμειξείες που δημιουργήσαμε. Τέλος η μέθοδος αυτή κρίθηκε ικανή προς ανίχνευση μιγμάτων κρέατος, οπότε την καθιστά χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας σε προϊόντα κρέατος.

## ABSTRACT

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

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

In this study, molecular techniques were employed to determine the species origin of the meat contained in foods and furthermore to identify meat species in intermixing samples. With these techniques we want to achieve the detection of impurity in meat products.

The species that we used in our research were intermixes of calf (*Bos Taurus*) and pig (*Sus scrofa*). The analysis was carried out in mitochondrial DNA isolated from muscle tissue of these meat species. PCR-SSCP and PCR-RFLP were the techniques that we used. Firstly amplified by the PCR method a region of 16s rRNA gene, size 243bp for the calf and 247bp for the pig. The primers that we used were universal primers. Then denaturation of the PCR products took place and their electrophoresis in polyacrylamide gel. Furthermore PCR products digested by a suitable restriction enzyme and the separation of the restriction fragments achieved through polyacrylamide gel electrophoresis.

From the results we conclude that the analysis of the 16s rRNA fragment revealed 2 patterns, so were our species. This confirmed that PCR-SSCP technique can be applied to meat mixtures. As for PCR-RFLP technique, we conclude that the enzyme *XbaI* is appropriate for the identification of the two meat species in meat mixtures. Finally this method was considered sufficient to detect mixtures of meat, which could make it a valuable tool for checking the adulteration in meat products.



## Ευχαριστίες

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο για την συνεχή καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα στάδια της διατριβής μου, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια 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 2012  
Γαλάρα Ιωάννα

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Το κρέας

---

### 1.1.1 Γενικά

Ως **κρέας (meat)**, με την ευρεία έννοια του όρου, ορίζεται το σύνολο των ζωικών ιστών που είναι κατάλληλοι για ανθρώπινη κατανάλωση. Ακριβέστερα, ωστόσο, ως κρέας ορίζεται η σάρκα των θερμόαιμων ζώων και πτηνών που αποτελείται κυρίως από μυϊκό ιστό και η οποία μετά τη σφαγή του ζώου/ πτηνού έχει υποστεί μεταθανάτιες βιοχημικές μεταβολές που την καθιστούν τρυφερή και εύγευστη.

Το κρέας και τα προϊόντα του προτιμώνται από τους καταναλωτές έναντι άλλων τροφίμων για την αισθητική τους έλξη, τη γευστικότητα και τη θρεπτική τους αξία. Επίσης, το κρέας είναι από τα λίγα τρόφιμα που μπορούν να ικανοποιήσουν τόσο γρήγορα και αποτελεσματικά το αίσθημα της πείνας και τις γευστικές απαιτήσεις του ανθρώπου, αποτελεί εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, περιέχει σίδηρο και ψευδάργυρο, που είναι εύκολα αφομοιώσιμα από τον ανθρώπινο οργανισμό, και βιταμίνες του συμπλέγματος Β, ενώ είναι μία από τις λίγες αξιόλογες πηγές της βιταμίνης Β12. Τέλος περιέχει ουσίες όπως το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ και άλλες με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου.

Το κρέας αποτέλεσε μέρος της διαίτας του ανθρώπου από τους προϊστορικούς ακόμη χρόνους. Αυτό προκύπτει από αρχαιολογικά ευρήματα στη Φλώρινα των ΗΠΑ, τα οποία χρονολογούνται πριν από 12.200 χρόνια. Αρχικά ο άνθρωπος κάλυπτε τις ανάγκες του σε κρέας με το κυνήγι των άγριων ζώων και πτηνών. Με την πάροδο του χρόνου εξημέρωσε άγρια ζώα και πτηνά και με την εκτροφή τους εξασφάλισε τις ανάγκες του σε κρέας. Τα εκτρεφόμενα είδη των θερμόαιμων ζώων, τα οποία αποτελούν και την κύρια πηγή κρέατος για τις αναπτυγμένες χώρες είναι τα βοοειδή (cattle), οι χοίροι (pigs), τα πρόβατα (sheep) και οι αίγες (goats), ενώ τα εκτρεφόμενα πουλερικά είναι οι όρνιθες (chicken), οι γαλοπούλες (turkey), οι πάπιες (duck) και οι χήνες (geese). Το βοδινό/μοσχάρισιο, το χοιρινό και το αιοπρόβειο κρέας χαρακτηρίζονται ως **ερυθρά κρέατα**, ενώ το κρέας των πουλερικών ως **λευκό κρέας**. Ωστόσο, σε διάφορες χώρες του κόσμου πηγή κρέατος αποτελούν και άλλα είδη εκτρεφόμενων ή μη ζώων, ανάλογα με τις τοπικές συνήθειες.

### **1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος**

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

- 1) Η τιμή πώλησης του κρέατος και το εισόδημα του καταναλωτή.
- 2) Η εμφάνιση του κρέατος κατά την αγορά του.
- 3) Η αποτυπωμένη αντίληψη στον καταναλωτή για το βαθμό ικανοποίησης των προσδοκιών του από το μαγειρεμένο κρέας.
- 4) Οι αντιλήψεις του καταναλωτικού κοινού για τις επιδράσεις του κρέατος στην υγεία του ανθρώπου.
- 5) Η μεταχείριση των ζώων μέχρι τη σφαγή τους.
- 6) Ο τρόπος εκτροφής των ζώων και οι επιδράσεις του στο περιβάλλον.

### **1.1.3 Κατανάλωση κρέατος**

Τη δεκαετία του 1970 θεωρούσαν ότι το κρέας πληρούσε όλες τις προσδοκίες του καταναλωτή. Το κρέας και τα προϊόντα κρέατος θεωρούνταν απαραίτητα στοιχεία για την καθημερινή υγιεινή διατροφή του ανθρώπου.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, έχει διαπιστωθεί ότι οι προτιμήσεις των ευρωπαϊών καταναλωτών κρέατος παρουσιάζουν σε σημαντικό βαθμό διαφοροποίηση σε σύγκριση με το παρελθόν, που κατ' αρχήν αποδίδεται στις οικονομικές και στις κοινωνικές αλλαγές που έχουν συμβεί, καθώς και στα ιδιαίτερα δημογραφικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών (Tserveni και Goussi, 1997; Tserveni και Gousi, 2002).

Σύμφωνα με στοιχεία FAO (2000), ο αριθμός των βοοειδών παγκοσμίως ανερχόταν στα 1.346.430 χιλιάδες κεφάλια εκ των οποίων τα 146.342 χιλιάδες κεφάλια εκτρέφονταν στην Ευρώπη (περίπου 11% του παγκόσμιου ζωικού κεφαλαίου βοοειδών). Στην ΕΕ-25, το 2005, εκτρέφονταν 88,7 εκατομμύρια βοοειδή. Ο τομέας του κρέατος αποτελεί παγκοσμίως έναν από τους σημαντικότερους τομείς της γεωργικής παραγωγής. Η παγκόσμια παραγωγή του βόειου-μοσχαρίσιου κρέατος ανέρχεται σε 59 εκατομμύρια τόνους (ΥΠΑΑΤ, 2011). Από τις κυριότερες εξαγωγικές χώρες, την πρώτη θέση σε παραγωγή βόειου-μοσχαρίσιου κρέατος καταλαμβάνουν οι ΗΠΑ με ποσοστό ανώτερο του 19% της παγκόσμιας παραγωγής. Ακολουθούν η

Βραζιλία (13,1), η Κίνα (11,0%), η Αργεντινή (4,6%), η Αυστραλία (3,4%), η Ρωσία (3,2%), το Μεξικό (2,6%), ο Καναδάς (2,5%), και τέλος η Νέα Ζηλανδία (1,2%).

Η Ε.Ε-25 αποτελεί σημαντικό παραγωγό βόειο-μοσχαρίσιου κρέατος σε παγκόσμια κλίμακα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 14% της παγκόσμιας παραγωγής, με παραγωγή η οποία αγγίζει τα 8,1 εκατομμύρια τόνους βάρους ισοδύναμου σφαγίου (Eurostat 2005).

Το βόειο κρέας κατέχει την πρώτη θέση ανάμεσα στα διάφορα είδη κρέατος που παράγονται στην Ε.Ε-25 (στοιχεία μέχρι το 2004) και αποτελεί το δεύτερο παραγωγό τομέα, αντιπροσωπεύοντας το 10% της συνολικής αξίας της γεωργικής παραγωγής της Ε.Ε-25.

Οι κυριότερες χώρες παραγωγής βόειου κρέατος της ΕΕ-25 ήταν οι ακόλουθες: Γαλλία με ποσοστό 19,77%, Γερμανία με 15,8%, Ιταλία με 14,4%, Ηνωμένο Βασίλειο με 9,06%, Ισπανία με 8,93% και Ιρλανδία με 7,04%.

Η παραγωγή βόειου κρέατος ακολουθεί κανονικά ένα κυκλικό πρότυπο, με την αύξηση της παραγωγής να οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές οι οποίες ακολουθούνται από μείωση της προσφοράς και ανάκαμψη των τιμών, ο δε πλήρης οικονομικός κύκλος ολοκληρώνεται στη διάρκεια δύο ή τριών ετών. Η παραγωγή μμοσχαρίσιου κρέατος είναι σε μμεγάλο βαθμό υποπροϊόν του γαλακτοκομικού τομέα και ακολουθεί ένα λιγότερο κυκλικό πρότυπο.

Το σημαντικότερο στοιχείο του τομέα του βόειου κρέατος στα πρόσφατα χρόνια ήταν ο αντίκτυπος των ασθενειών των ζώων στην κατανάλωση. Ειδικότερα η Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών (ΣΕΒ) διατάραξε το κανονικό κυκλικό πρότυπο δεδομένου ότι παρατηρήθηκε δραματική μείωση στην κατανάλωση που οδήγησε σε βραχυπρόθεσμη υπερπροσφορά και κατά συνέπεια σε σημαντικά μειωμένες τιμές. Μετά από την πρωτοφανή πτώση κατά 7,4% που σημειώθηκε το 1996, η οποία προκλήθηκε κατά κύριο λόγο από αυτή την κρίση, η κατανάλωση βόειου κρέατος σημείωσε σχετική ανάκαμψη το 1997 (2,7%) και το 1998 (2,8%).

Η παραγωγή χοίρειου κρέατος κυριαρχείται από συστήματα διαχείρισης των εκμεταλλεύσεων που βασίζονται στο σταβλισμό των χοίρων και στη διατροφή με έτοιμες ζωοτροφές οι οποίες περιλαμβάνουν όλα τα θρεπτικά και λοιπά απαιτούμενα συστατικά. Δεδομένου ότι τα εν λόγω συστήματα δεν βασίζονται στο έδαφος και ότι η διατροφή των ζώων αποτελεί τη μεγαλύτερη δαπάνη για τους παραγωγούς, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) παρείχε στους παραγωγούς περιορισμένα μέτρα στήριξης της αγοράς. Ως εκ τούτου, η παραγωγή χοίρειου κρέατος ήταν για πολλά χρόνια

προσανατολισμένη στην αγορά. Τα προβλήματα που αντιμετωπίζει συνδέονται συνεπώς λιγότερο με την κοινή γεωργική πολιτική (ΚΓΠ) και περισσότερο με την ποιότητα του κρέατος, τις σωστές συνθήκες διαβίωσης των ζώων και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της εκτροφής χοίρων.

Η ΕΕ παράγει 17,8 εκατ. τόνους χοίρειου κρέατος ετησίως (21) και είναι ο δεύτερος μεγαλύτερος παραγωγός στον κόσμο μετά την Κίνα. Η υψηλότερη παραγωγή κατά το δεύτερο ήμισυ της δεκαετίας του 1990 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών. Από τότε, η παραγωγή μειώθηκε και σταθεροποιήθηκε, με ευνοϊκότερη ανταπόκριση των τιμών. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής χοίρειου κρέατος το 2002 ήταν: Γερμανία (23,1 % της παραγωγής), Ισπανία (17,5 %), Γαλλία (13,2 %), Κάτω Χώρες (7,7 %) και Δανία (9,9 %).

Η ετήσια κατά κεφαλή κατανάλωση στην ΕΕ ανέρχεται κατά μέσο όρο σε 43kg. Ο αριθμός αυτός ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των κρατών μελών.

Η αγορά χοίρειου κρέατος, όπως συμβαίνει με ολόκληρο τον τομέα της κτηνοτροφίας στην ΕΕ, αντιμετώπισε έκτακτα περιστατικά τα οποία είχαν βραχυπρόθεσμες συνέπειες και αναμένεται να εξακολουθήσουν να επηρεάζουν τη μεσοπρόθεσμη εξέλιξη του τομέα. Η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (ΣΕΒ), που προκάλεσε μετατόπιση της ζήτησης σε άλλους τύπους κρέατος (κυρίως πουλερικά), ευνόησε επίσης τον τομέα του χοίρειου κρέατος και συνέβαλε σε καλύτερες τιμές κατά την περίοδο 2000-2002.

Η εμφάνιση του αφθώδους πυρετού στο Ηνωμένο Βασίλειο και στη συνέχεια στην Ιρλανδία, τη Γαλλία και τις Κάτω Χώρες το 2001 διατάραξε επίσης τον τομέα του χοίρειου κρέατος. Λόγω της εμφάνισης της ασθένειας αυτής, οι περιορισμοί μεταφοράς ζωικού κεφαλαίου, σε συνδυασμό με αρκετές απαγορεύσεις εξαγωγής από τρίτες χώρες, δημιούργησαν σοβαρές διαταραχές στη σφαγή και τις πωλήσεις. Ο σημαντικός ρόλος των εξαγωγών καθιστά τον τομέα του χοίρειου κρέατος ιδιαίτερα ευάλωτο σε τέτοιου είδους προβλήματα που συνδέονται με τις ασθένειες. Στη δεκαετία του 1990 εμφανίστηκαν κρούσματα κλασικής πανώλης των χοίρων (για παράδειγμα στη Γερμανία, τις Κάτω Χώρες και την Ισπανία) (ΥπΑΑΤ, 2007).

### 1.1.4 Παραγωγή και κατανάλωση κρέατος στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, τα χαρακτηριστικά της κατανάλωσης του κρέατος έχουν επίσης παρακολουθήσει τις εξελίξεις στην οικονομία και την κοινωνία, όπως για παράδειγμα τη βελτίωση του επιπέδου ζωής των Ελλήνων, την είσοδο των γυναικών στην αγορά εργασίας, κ.ά. (Yannakopoulos *et al.*, 1994). Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, οι τάσεις που εμφανίζονται στους Έλληνες καταναλωτές είναι από τη μία πλευρά η αύξηση στην κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, γάλατος, τυριών και ψαριών και από την άλλη, η μείωση της ζάχαρης και των αυγών. Πιο συγκεκριμένα, το 1998/99 η κατά κεφαλή κατανάλωση κρέατος και λαχανικών ήταν 86.1 και 246.8 κιλά αντίστοιχα, ενώ μια δεκαετία πριν (1984/85) οι αντίστοιχοι αριθμοί ήταν 72.0 και 194.0 κιλά.

Στην Ελλάδα εκτρέφονται περίπου 633.656 (ΕΣΥΕ 2008) βοοειδή και παράγονται περίπου 750.000 τόνοι αγελαδινού γάλακτος και 59.000 τόνοι βόειου - μοσχαρίσιου κρέατος.

Στην Ελλάδα εκτρέφονται εγχώριες φυλές (Κοινή Βραχυκερατική, Τήνου, Κατερίνης, Συκιάς), γαλακτοπαραγωγικές φυλές, κυρίως της φυλής Ασπρόμαυρη (Holstein .Friesian), κρεοπαραγωγικές φυλές κυρίως Λιμουζέν και Μπλοντ ντ' Ακιτέν (Blonded. Aquitaine) και μικτής απόδοσης (Φαιά των Άλπεων και Σίμενταλ).

Οι βοοτροφικές επιχειρήσεις, με βάση την παραγωγική τους κατεύθυνση διακρίνονται σε:

- Μονάδες εκτροφής αγελάδων γαλακτοπαραγωγής
- Μονάδες εκτροφής αγελάδων κρεοπαραγωγής
- Μονάδες πάχυνσης μοσχαριών

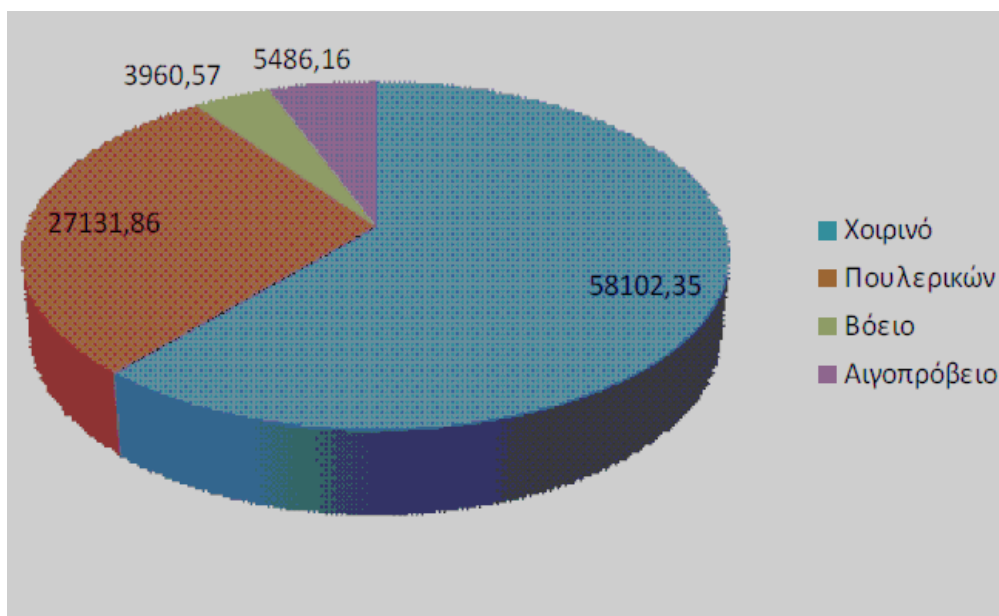
Η κρεοπαραγωγός βοοτροφία στην Ελλάδα χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό μονάδων, σχετικά μικρής δυναμικότητας, διεσπαρμένων σε όλη τη χώρα. Το ποσοστό συμμετοχής των συστηματικών μονάδων στο σύνολο της παραγωγής ωστόσο κυμαίνεται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα.

Οι βοοτροφικές επιχειρήσεις κρεοπαραγωγής ασχολούνται συνήθως με την πάχυνση (σε μικρό βαθμό με την αναπαραγωγή) ζώων που εισάγονται σε μικρή ηλικία και εν συνεχεία με την σφαγή αυτών. Επειδή η παραγωγή μοσχαριών δεν επαρκεί για την κάλυψη των αναγκών της χώρας γίνονται αθρόες εισαγωγές μοσχαριών, είτε από ευρωπαϊκές, είτε από τρίτες χώρες. Οι Έλληνες αγελαδοτρόφοι είναι ως επί το πλείστον νέοι επιχειρηματίες, που δεν βασίζονται τη βιωσιμότητά τους

στις άμεσες επιδοτήσεις της Ε.Ε, έχουν προχωρήσει σε πολύ σημαντικές επενδύσεις συγκριτικά με άλλους κλάδους της οικονομίας και έχουν στόχο τη δημιουργία κτηνοτροφικής παράδοσης για τα διάδοχα μέλη της οικογένειας.

Η χοιροτροφία στην Ελλάδα θεωρείται από τους περισσότερους δυναμικούς κλάδους της κτηνοτροφίας και της αγροτικής της οικονομίας. Καλύπτει το 25% της εγχώριας παραγωγής κρέατος με το περίπου 35%. Η παραγωγή χοιρείου κρέατος που το 2009 ανήλθε σε 115.000 τόνους προέρχεται από παραγωγικό υλικό 100.000 χοιρομητέρων εκ των οποίων το 80% εντατικής εκτροφής. Ο τομέας παρέχει απασχόληση σε χιλιάδες οικογένειες. Η διαρκώς αυξανόμενη κατανάλωση χοιρινού κρέατος σε συνδυασμό με τις υψηλές απαιτήσεις των καταναλωτών διαμορφώνουν νέες συνθήκες ανταγωνισμού. Η εφαρμογή σύγχρονων μορφών οργάνωσης της παραγωγής, με ταυτόχρονη τήρηση κανόνων που αφορούν τη δημόσια υγεία. Την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων, αναμένεται να οδηγήσει σε ανάπτυξη του κλάδου και ανάδειξη της ποιότητας των προϊόντων χοιροτροφίας.

Το μεγαλύτερο μέρος της εγχώριας παραγωγής χοιρινού κρέατος συγκεντρώνεται στις περιφέρειες της Κεντρικής Μακεδονίας, της Ηπείρου, της Στερεάς Ελλάδας (συμπεριλαμβανομένης της Εύβοιας - εκτός της Αττικής), της Θεσσαλίας, της Δυτικής Ελλάδας, και της Αν. Μακεδονίας/Θράκης (ΥΠΑΑΤ, 2011).



Γράφημα 1.1.4: παραγωγή κρέατος σε τόνους το 2009 (ΥΠΑΑΤ, 2011).

---

## 1.2 Επισήμανση και ιχνηλασιμότητα κρέατος

---

### 1.2.1 Γενικά

Στην Ελλάδα, η πρώτη προσπάθεια οργάνωσης μηχανισμού ελέγχου στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, επιχειρήθηκε με το **N. 248/1914 "Περί οργανώσεως της Ζωοτεχνικής και Κτηνιατρικής Υπηρεσίας"**, όπου, στην παρ. 1 του άρθρου 20 ορίζεται: *"Δια Β.Δ. εκδιδόμενων προτάσει του επί της Γεωργίας Υπουργού, καθορισθήσονται άπασαι αι λεπτομέρειαι αι αφορώσαι: .....7) τα του ελέγχου των τροφίμων ζωικής προελεύσεως. ...."*

Από τότε εκδόθηκαν πλήθος νομοθετημάτων σχετικά με τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και βέβαια για το κύριο ζωικής προέλευσης τρόφιμο, το κρέας.

Το 1981, με την είσοδο της χώρας στην ΕΟΚ, προέκυψε και η υποχρέωσή της να συμμορφωθεί προς τις κοινοτικές ρυθμίσεις και να εναρμονίσει την υπάρχουσα νομοθεσία προς αυτήν της Κοινότητας (Τσώνης, 1999).

Η νομοθεσία λοιπόν που διέπει την παραγωγή και την εμπορία ,του νωπού κρέατος περιλαμβάνει όλες τις διατάξεις που αναφέρονται στα βοοειδή, τα αιγοπρόβατα και τα χοιρινά, ζώα από τα οποία κατά κύριο λόγο προέρχεται το κρέας, ξεκινά από το στάβλο και ακολουθεί από εκεί και πέρα όλα τα στάδια παραγωγής, από 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.

Η βελτίωση της ποιότητας των σφαγίων και του κρέατος και η εξασφάλιση των υψηλότερων δυνατών προτύπων υγιεινής πρέπει να συνοδεύονται από πληροφορίες προς τους καταναλωτές έτσι ώστε οι τελευταίοι να είναι σε θέση να γνωρίζουν με ακρίβεια τι είδους κρέας αγοράζουν.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι καταναλωτές επιθυμούν να γνωρίζουν περισσότερα σε σχέση με την προέλευση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό μπορεί να προσθέσει αξία στο προϊόν και να δώσει τη δυνατότητα στον παραγωγό να επιτύχει καλύτερη τιμή από την αγορά. Η ενημερωτική επισήμανση και οι εγγυήσεις ότι η προέλευση του κρέατος είναι δυνατόν να ανιχνευθεί μέσω της αλυσίδας διατροφής μέχρι την εκμετάλλευση έχουν συνεπώς ουσιαστική σημασία. Ο προσδιορισμός της



ταυτότητας των ζώων συνδέεται με την ιχνηλασιμότητα και αποτελεί επίσης βασικό στοιχείο της στρατηγικής της Ε.Ε για τον έλεγχο των νόσων των ζώων.

Για τους λόγους αυτούς, η Ε.Ε εισήγαγε σειρά μέτρων για τη βελτίωση της επισήμανσης του κρέατος, την εγγύηση της ποιότητας και την ιχνηλασιμότητα. Οι ενέργειες αυτές έγιναν με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με τον τύπο του κρέατος. Η νομοθεσία της Ε.Ε είναι περισσότερο εκτεταμένη για το βόειο κρέας.

Η Ε.Ε παρέχει περαιτέρω δυνατότητα στους παραγωγούς να προσθέσουν αξία στα προϊόντα τους με βάση το κρέας, μέσω σημάτων ποιότητας που καθίστανται διαθέσιμα στο πλαίσιο του συστήματος για την ανάπτυξη και προστασία των τροφίμων.

Η αυθεντικότητα των τροφίμων, η οποία είναι κομμάτι της ιχνηλασιμότητας των τροφίμων, αποτελείται από την ταυτοποίηση των συστατικών των τροφίμων η οποία επιβεβαιώνει την συμμόρφωση με την επισήμανση των τροφίμων έτσι ώστε να αποφευχθεί η οικονομική απάτη έναντι των καταναλωτών (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2011).

Φαίνεται ξεκάθαρα η σχέση και η αλληλεπίδραση των μεθόδων της επισήμανσης, της ιχνηλασιμότητας, της αυθεντικότητας και της ταυτοποίησης των τροφίμων μεταξύ τους, για αυτό το λόγο θα αναφερθούμε εκτενέστερα σε αυτούς τους όρους για να μπορέσουμε να καταλάβουμε πως συμβάλουν στον έλεγχο κατά της νοθείας των τροφίμων.



Εικόνα 1.2.1: Απεικόνιση της σχέσης της ιχνηλασιμότητας και προϊόντων κρέατος (<http://www.baxtek.com/software/scoringag/index.php>).

### **1.2.2 Επισήμανση των τροφίμων**

Ο ορισμός της **επισήμανσης** των τροφίμων σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Οδ.2000/13/ΕΚ) είναι οι μνείες, οι ενδείξεις, εμπορικά ή βιομηχανικά σήματα, εικόνες ή σύμβολα που αναφέρονται σε ένα τρόφιμο και φέρονται σε κάθε συσκευασία, πινακίδα, ετικέτα, που συνοδεύουν ή αναφέρονται στο τρόφιμο.

Η επισήμανση δεν πρέπει να είναι τέτοιας φύσεως ώστε:

-- να οδηγεί σε πλάνη τον αγοραστή ιδίως :

**i)** ως προς τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και ιδίως τη φύση, την ταυτότητα, τις ιδιότητες, την σύνθεση, την ποσότητα, τη διατηρησιμότητα, την καταγωγή ή προέλευση, τον τρόπο παρασκευής ή λήψεως,

**ii)** με την απόδοση από τρόφιμο αποτελεσμάτων ή ιδιοτήτων που δεν έχει,

**iii)** με τον υπαινιγμό ότι το τρόφιμο έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά , ενώ στην πραγματικότητα όλα τα παρόμοια τρόφιμα έχουν αυτά τα ίδια χαρακτηριστικά.

-- να αποδίδει σε ένα τρόφιμο ιδιότητες πρόληψης, αγωγής και θεραπείας οποιασδήποτε ανθρώπινης ασθένειας (πλην των φυσικών μεταλλικών νερών και των τροφίμων που προορίζονται για ειδική διατροφή για τα οποία υπάρχουν ιδιαίτερες κοινοτικές διατάξεις) (Κουτσουμανής, 2008).

### **1.2.3 Ιχνηλασιμότητα των τροφίμων**

Η ιχνηλασιμότητα, δηλαδή η δυνατότητα να γνωρίζουμε ποια είναι η προέλευση και η προέλευση κάθε υλικού που χρησιμοποιούμε, σε ποιο προϊόν χρησιμοποιήθηκε και πού έχει διατεθεί το συγκεκριμένο υλικό, υπήρξε, ανέκαθεν, μία από τις βασικές προϋποθέσεις των Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας.

Έτσι, η ιχνηλασιμότητα, αναδείχτηκε ως απαραίτητος όρος ασφαλείας για την εφοδιαστική αλυσίδα (κανάλια) των προϊόντων, και ειδικά των νωπών, και μάλιστα, με την αφορμή κάποιων γενικότερων διατροφικών κρίσεων, όπως αυτές της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας και των διοξινών του 1999.

Σύμφωνα με την πρόσφατη παγκόσμια συμφωνία στην [CODEX ALIMENTARIUS](#) (2004) η **Ιχνηλασιμότητα** ορίζεται επίσημα ως “Η ικανότητα παρακολούθησης της διακίνησης ενός τροφίμου κατά τις φάσεις της παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής” (“The ability to follow the movement of a food through specified stage(s) of production, processing and distribution”) (CAC, 2004).

Στην πράξη ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα ταυτοποίησης, βασικός στόχος του οποίου είναι η δημιουργία μιας δυναμικής ταυτότητας για κάθε προϊόν, σε κάθε στάδιο της εφοδιαστικής αλυσίδας (**από το “χωράφι” στο “ράφι”**) (Shackell, 2008; Fajardo *et al*, 2010). Η ταυτότητα αυτή 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:

- **Προς τα εμπρός (Downstream) Ιχνηλασιμότητα:** ξεκινώντας από μία συγκεκριμένη παρτίδα πρώτης ύλης (Lot), να φτάσουμε στον εντοπισμό όλων των παρτίδων τελικών προϊόντων που παρήχθησαν.

- **Προς τα πίσω (Upstream) Ιχνηλασιμότητα:** γνωρίζοντας την παρτίδα του τελικού προϊόντος (Lot), να ανιχνεύσουμε τις Α' ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή της.

Ένα Σύστημα Ιχνηλασιμότητας αποτελείται από τρία υποσυστήματα:

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 Α' 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 Α' 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 Α' 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).

Η αρχή της ιχνηλασιμότητας των τροφίμων είναι πλέον γεγονός από την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου του 2005. Η ανάγκη, για την υποχρεωτική εφαρμογή συστημάτων ιχνηλασιμότητας στον τομέα των τροφίμων, προέκυψε από την στιγμή που έγινε σαφές, ότι οι υπάρχουσες δομές και τα συστήματα ελέγχου δεν επαρκούν για να εξασφαλίσουν την ασφάλεια των προϊόντων. Το 2002 λοιπόν, δημοσιεύθηκε ο κανονισμός (ΕΚ) 178 / 2002, για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την ασφάλεια των τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφάλειας των τροφίμων. Μεταξύ των άλλων που προβλέπει, δίνει τον ορισμό και τις γενικές κατευθύνσεις για την υποχρεωτική εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας σε όλα τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Regulation (EC) 178, 2002; Schwagele 2005).

Ο κανονισμός άρχισε να εφαρμόζεται στις αρχές του 2002, ενώ για ορισμένα άρθρα του η ισχύς μετατέθηκε για την 01-01-2005. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται και το άρθρο 18 που αφορά στην ιχνηλασιμότητα, την ικανότητα ιχνηλάτησης και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών και ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ουσιών που πρόκειται ή αναμένεται να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή ζωοτροφές, σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τους.

#### **Κοινοτική νομοθεσία.**

##### Κανονισμός 178 / 2002 (Καθορισμός Απαιτήσεων για Ασφάλεια και Ιχνηλασιμότητα Τροφίμων και Ζωοτροφών).

- Εγκαθίδρυση συστημάτων ή διαδικασιών ιχνηλασιμότητας, σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής (διαθέσιμη στις αρμόδιες αρχές) για το  $\pm 1$ .

[Τι προμηθεύτηκα και από ποιον (-1) — τι πούλησα και σε ποιον (+1)].

Θεσμοθέτηση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA).

Η Κοινοτική νομοθεσία για το βόειο κρέας αναφέρει: .

##### Ο Κανονισμός 1760 / 2000 (Θέσπιση Συστήματος Αναγνώρισης και Καταγραφής Βοοειδών και Επισήμανση του Βόειου Κρέατος και των Προϊόντων του).

Το σύστημα αναγνώρισης περιλαμβάνει:

- Ενώτια για ατομική αναγνώριση ζώων.
- Ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων.
- Διαβατήρια ζώων.
- Τήρηση ατομικών μητρών σε κάθε εκμετάλλευση.

Το σύστημα επισήμανσης (σε μορφή ετικέτας) περιλαμβάνει:

- Αριθμό αναγνώρισης ζώου.
- Αριθμός έγκρισης σφαγείου και τόπος – χώρα σφαγής.
- Αριθμός έγκρισης μονάδας τεμαχισμού και τόπος – χώρα τεμαχισμού.

Ισχύει σε βοοειδή με ημερομηνία σφαγής από 01 – 09 – 2000.

Ο **κανονισμός 178 / 2002** της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τονίζει ότι από 01 – 01 – 2005, όλες οι επιχειρήσεις τροφίμων, οι οποίες εμπλέκονται στην αλυσίδα των τροφίμων (πρωτογενής παραγωγή, επεξεργασία, μεταφορά, διάθεση), πρέπει να εφαρμόζουν συστήματα ιχνηλασιμότητας.

Οφείλουν:

- να έχουν επαρκείς μηχανισμούς και διαδικασίες, για την ταυτοποίηση, από ποιόν προέρχεται (άμεσος προμηθευτής) και σε ποιόν καταλήγει ένα προϊόν (άμεσος πελάτης),
- να διαθέτουν ενεργά συστήματα και διαδικασίες, που θα επιτρέπουν σχετικές πληροφορίες να δίνονται, στις αρμόδιες αρχές και φορείς, όταν ζητούνται.

Η ιχνηλασιμότητα αποσκοπεί, στην πρόληψη των εξής φαινομένων:

- των δόλιων πρακτικών ή πρακτικών εξαπάτησης,
- της νόθευσης των τροφίμων και
- οποιωνδήποτε άλλων πρακτικών, που ενδέχεται να παραπλανήσουν τον καταναλωτή

και έχει ως στόχο την:

- η ασφάλεια των τροφίμων,
- η δυνατότητα απομάκρυνσης επικίνδυνου τροφίμου, από την αγορά,
- οι υγιείς κανόνες εμπορίου, η διαφάνεια και
- η αξιοπιστία της πληροφορίας, που διαχέεται, στον καταναλωτή.

(Οδηγία 2000/13/EK)

---

### 1.3 Αυθεντικότητα και Ταυτοποίηση Κρέατος

---

Τα θέματα της αυθεντικότητας των τροφίμων μέσα από την οπτική της γνησιότητας, της προέλευσης και των ακατάλληλων χαρακτηριστικών βρίσκονται στη πρώτη γραμμή του ενδιαφέροντος πιθανότατα από τη στιγμή που τα τρόφιμα ξεκίνησαν να πωλούνται (Arvanitoyannis *et al.*, 2005).

Η ταυτοποίηση των ζωικών ειδών στο κρέας έχει γίνει πολύ σημαντικός παράγοντας στην εκτίμηση της σύστασης των τροφίμων και στην παροχή ορθών πληροφοριών προς τους καταναλωτές. Οι καταναλωτές απαιτούν σωστή και ακριβή πληροφόρηση έτσι ώστε να κάνουν ενημερωμένες επιλογές στα προϊόντα που επιλέγουν να αγοράσουν (Woolfe και Primrose 2004; Stamoulis *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2012).

Στις μέρες μας, η αυθεντικότητα των τροφίμων και των κρεάτων συγκεκριμένα, έχει γίνει ζήτημα κρίσιμης σπουδαιότητας εξαιτίας του υψηλού αριθμού περιπτώσεων νόθευσης. Παρά την αυστηρή νομοθεσία που επέβαλε η Ευρωπαϊκή Ένωση το 2005 για τα συστήματα επισήμανσης έτσι ώστε να εγγυηθεί την ιχνηλασιμότητα του κρέατος, 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 σε αυτά υπάρχει πάντα η πιθανότητα να είναι ψεύτικα ή πλαστογραφημένα (Rojas *et al.*, 2009).

Η ταυτοποίηση των ειδών είναι το βασικό στοιχείο για την επαλήθευση της αυθεντικότητας των τροφίμων και την αντιμετώπιση των παραπλανητικών πρακτικών. Η προϋπόθεση αυτή ισχύει ειδικότερα για 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 καθώς και των μεγάλων αποκλίσεων στα θέματα της διατροφικής αξίας και της κοστολόγησης.

Τα σοβαρά όμως προβλήματα της αναλυτικής ταυτοποίησης προκύπτουν κατά την αλλοίωση των βασικών διακριτικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, όπως το μαγείρεμα, το κάπνισμα, το τηγάνισμα, το αλάτισμα ή η κονσερβοποίηση, διότι η αναγνώριση του είδους του κρέατος που χρησιμοποιείται

γίνεται πιο δυσχερής (Haunshi *et al.*, 2009). Ο ακριβής προσδιορισμός της αυθεντικότητας των επεξεργασμένων προϊόντων γίνεται πλέον υποχρεωτικός όχι μόνο για τις νομοθετικά απαιτούμενες επισημάνσεις στις ετικέτες τους αλλά και την αξιολόγηση της διατροφικής αξίας (προσθήκη συστατικών που δεν επιτρέπεται από το νόμο, αναγραφή συστατικών που δεν περιέχονται κλπ.), καθώς και την αποφυγή των κινδύνων που αφορά στην παρουσία οργανισμών με κατάλοιπα τοξινών.

Επίσης ανάμεσα στο καταναλωτικό κοινό που επιλέγει το κρέας που θα καταναλώσει βάση ορισμένων κριτηρίων (όπως την τιμή, το επίπεδο ζωής, τις διατροφικές ανάγκες κ.α.), υπάρχουν και ορισμένες ομάδες καταναλωτών που έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και είναι πιο ευαίσθητες όσο αναφορά την αυθεντικότητα του κρέατος. Τέτοιες ομάδες αποτελούν οι χορτοφάγοι (vegetarians) που απαιτούν παντελή έλλειψη κρέατος στις τροφές τους, καταναλωτές που επιλέγουν μόνο βιολογικό, άνθρωποι που εξαιτίας της θρησκείας τους απαγορεύεται να καταναλώσουν χοιρινό κρέας (π.χ. μουσουλμάνοι-“halal”) καθώς και περιπτώσεις με προβλήματα υγείας (π.χ. αλλεργίες) (Fajardo *et al.*, 2007; Haunshi *et al.*, 2009; Stamoulis *et al.*, 2010; Sentandreu και Sentandreu, 2011; Nakyinsige *et al.*, 2012).

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. Το οικονομικό όφελος των επιχειρήσεων που νοθεύουν τα προϊόντα τους που περιέχουν κρέας με άλλα είδη κρέατος χαμηλότερης αξίας είναι πολύ μεγάλο και πλέον πολύ σύνηθες (Woolfe και Primrose 2004; Fajardo *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012).

Τα τελευταία χρόνια το είδος κρέατος που υφίσταται την μεγαλύτερη νοθεία είναι κρέατα που προέρχονται από κυνήγι, γνωστά ως “**game meat**”, ορισμός αυτός πρόκειται για πτηνά και ζώα που αποτελούν θηράματα (Santos *et al.*, 2012). Το κρέας αυτών των ζώων θεωρείται πολύ υψηλής διατροφικής αξίας (χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης και απουσία στεροειδών) και ιδιαίτερης εκλεπτυσμένης γεύσης και υφής, για αυτό και το κόστος του είναι πολύ υψηλό. Οπότε η νόθευσή του με κρέας χαμηλότερης αξίας (π.χ. χοιρινό) αποφέρει πολύ μεγάλα κέρδη στις επιχειρήσεις (Fajardo *et al.*, 2008; Neve *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2009; Stamoulis *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012).

Η εξακρίβωση της αυθεντικότητας των ζωικών ειδών είναι μια ιδιαίτερα κρίσιμη διαδικασία εξαιτίας του υψηλού αριθμού των περιπτώσεων νοθείας.

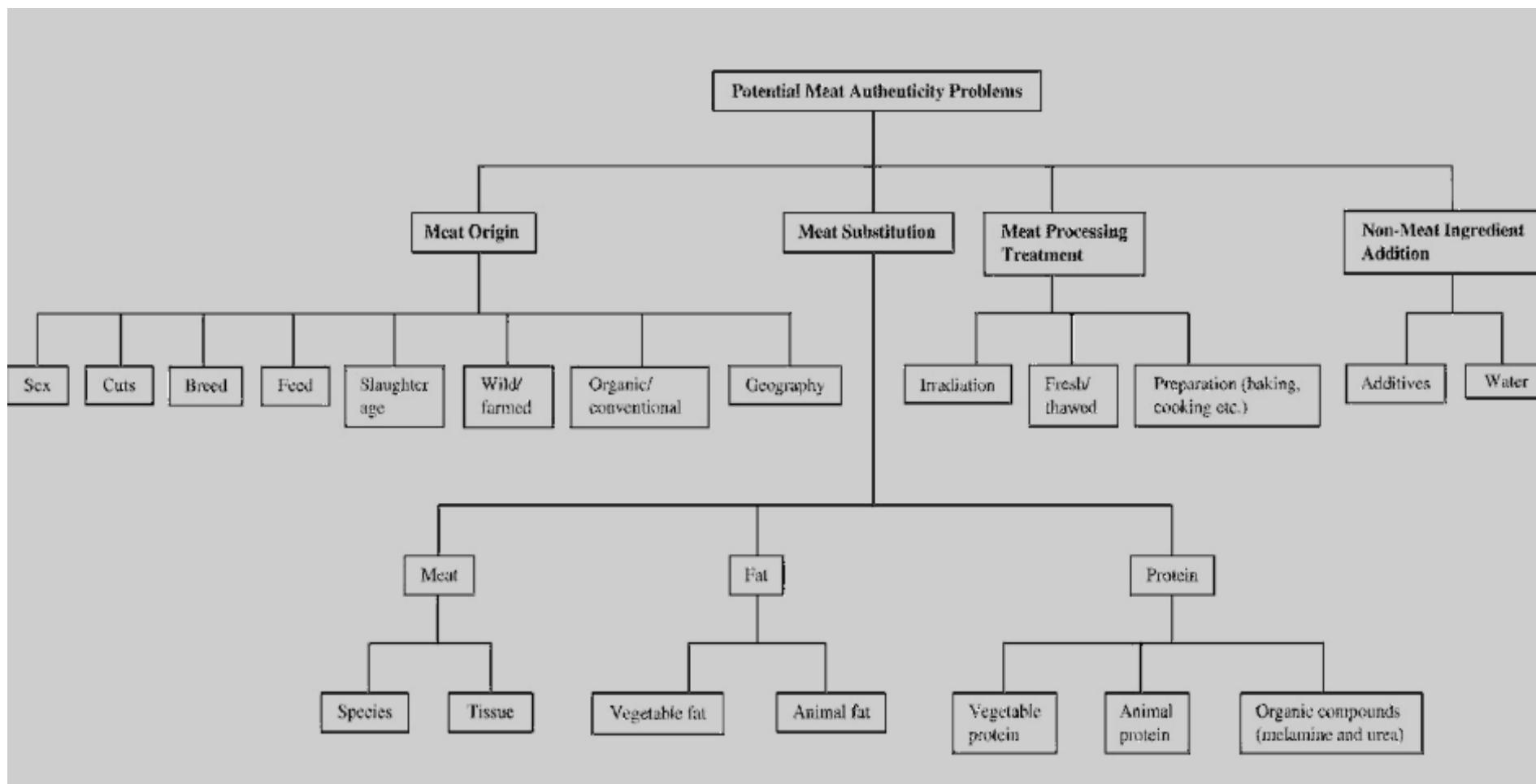
**Γενικά ως Νοθεία** (adulteration) ορίζεται η προσθήκη στα τρόφιμα ουσιών των οποίων απαγορεύεται η χρήση, καθώς και η κανονική (μεγαλύτερη ή μικρότερη) περιεκτικότητά τους σε ουσίες που επιτρέπονται. Οι νοθείες είναι δύο ειδών: α) επικίνδυνες για την υγεία και β) ακίνδυνες οι οποίες ζημιώνουν οικονομικά τον αγοραστή. Μη νοθευμένο θεωρείται ένα τρόφιμο εφόσον αναγράφεται στη συσκευασία η σύσταση και ταυτίζεται με τη σύνθεσή του (Hargin, 1996). Οι καταναλωτές πρέπει να προστατεύονται από τις νοθείες των τροφίμων. Πρέπει να γίνεται αυστηρός έλεγχος για την τήρηση των προδιαγραφών του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών.

Στην περίπτωση της νοθείας σε κρέας και προϊόντα κρέατος, τα είδη της νοθείας μπορούν να είναι πολλά.

Ο **Hargin** (1996) διαχωρίζει τα υφιστάμενα θέματα αυθεντικότητας τα οποία σχετίζονται με τα προϊόντα κρέατος σε τέσσερις γενικές κατηγορίες :

1. Προέλευση (φύλλο, φυλή, ζωοτροφή, ηλικία σφαγής, γεωγραφική προέλευση, άγρια και εκτρεφόμενα κρέατα, βιολογικά και συμβατικά κρέατα),
2. Σύσταση (είδος κρέατος, λίπος, πρωτεΐνη, άλλες ουσίες με στόχο την παραπλάνηση του καταναλωτή, καθορισμός των συστατικών των ειδών σημαντικός ακόμα και για θρησκευτικούς λόγους),
3. Επεξεργασία (κατεψυγμένα τα οποία πωλούνται ως φρέσκα, ακτινοβολημένα τα οποία πωλούνται ως μη ακτινοβολημένα),
4. Ποικίλα πρόσθετα (όπως τεχνητές χρωστικές χρησιμοποιούνται ως φυσικές, συντηρητικά, γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί, πρόσθετα γεύσης, συντηρητικά κλπ.) (Hargin, 1996; Ballin, 2010).





Σχεδιάγραμμα 1.3.1: Πιθανά προβλήματα νοθείας του κρέατος (Ballin 2010).

Η εξάπλωση της νοθείας σε κρέας σήμερα είναι δύσκολο να προσδιοριστεί επακριβώς. Όμως υπάρχουν πάρα πολλά παραδείγματα στην βιβλιογραφία για κρέατα και προϊόντα κρέατων που έχουν λάθος επισήμανση. Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.3.1: Παραδείγματα από αποτελέσματα ελέγχου νοθείας σε προϊόντα κρέατος (Ballin 2010).

Προϊόν που ελέγχθηκε	Χώρα που έγινε ο έλεγχος	Πρόβλημα αυθεντικότητας	Ποσοστό λάθος επισήμανσης (αριθμός δειγμάτων)	Βιβλιογραφία
Χάμπουρκερ	Βραζιλία	Μη δηλωμένη πρωτεΐνη σόγιας	30.8% (39)	Macedo-Silva et al (2001)
Χάμπουρκερ	Μεξικό	Μη δηλωμένα ζωικά είδη	39% (23)	Flores-Munguia et al (2000)
Λουκάνικα	Μεξικό	Μη δηλωμένα ζωικά είδη	29% (17)	Flores-Munguia et al. (2000)
Προϊόντα κρέατος	ΗΠΑ	Μη δηλωμένα ζωικά είδη	15.9% νωπά 22.9% μαγειρεμένα (902)	Hsieh, Woodward, and Ho (1995)
Προϊόντα κρέατος	Τουρκία	Μη δηλωμένα ζωικά είδη	22% (100)	Ayaz et al (2006)
Προϊόντα κρέατος	Ελβετία	Παλιό κρέας ως φρέσκο	15% (43)	Anon (2001)
Προϊόντα κρέατος	Αγγλία	Παλιό κρέας ως φρέσκο	8% (534)	Anon (1996)

Εν τέλει, το κατά πόσο είναι αυθεντικό ή όχι έναν προϊόν και κυρίως κρέας είναι μια δύσκολη υπόθεση διότι πάντα θα υπάρχει ο ανθρώπινος παράγοντας που αποσκοπεί στο χρηματικό κέρδος. Για αυτό και τώρα είναι απαραίτητο όσο ποτέ η ανάπτυξη ικανοποιητικών τεχνικών για τον έλεγχο της αυθεντικότητας με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια και εφαρμογή, που θα στοχεύουν στη διάκριση ενός είδους από άλλο.

---

## 1.4 Μοριακοί δείκτες

---

Η ανησυχητική κατάσταση που επικρατεί στον χώρο των τροφίμων, έχει οδηγήσει στη θέσπιση μιας σειράς ελέγχων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για να πιστοποιήσουν τη γνησιότητα και να αποκαλύψουν τη νοθεία και την παραπλάνηση των τελικών αποδεκτών, με την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου ανά περίπτωση, η οποία εξαρτάται από τη φύση του προϊόντος. Λαμβάνεται συνεπώς υπόψη, αν το προϊόν αποτελείται από ολόκληρα τμήματα, αν εξετάζεται ωμό ή έχει υποστεί θερμική επεξεργασία και τέλος, εξετάζεται η απαίτηση να καθοριστεί, εάν ένα προϊόν περιέχει τα συστατικά που αναφέρονται στην ετικέτα.

Για αυτό σήμερα εφαρμόζονται μοριακές τεχνικές ανάλυσης (**μοριακοί δείκτες**), οι οποίες είναι σύγχρονες τεχνικές που βασίζονται στην πρωτεϊνική ανάλυση και στην ανάλυση του DNA. Είναι προηγμένες τεχνικές σε σχέση με τις οργανοληπτικές, μορφολογικές και ιστολογικές τεχνικές που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα στον τομέα των τροφίμων και οι οποίες αποδείχτηκαν ανεπαρκείς

Η χρήση των μοριακών δεικτών είναι ευρέως διαδεδομένη σε διάφορους κλάδους της σύγχρονης επιστήμης και οι μέθοδοι ανάλυσης των γενετικών δεδομένων βελτιώνονται ταχύτατα.

Με την ανάπτυξη των μεθόδων μοριακής ανάλυσης προέκυψαν δείκτες για την ανάλυση της παραλλακτικότητας στο επίπεδο DNA. Έτσι έγινε δυνατός ο εντοπισμός διαφορών τόσο μεταξύ ολόκληρων τμημάτων DNA, όσο και μεταξύ αλληλουχιών νουκλεοτιδίων σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών δεικτών, οι DNA και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Οι πρώτοι αναφέρονται και ως γενετικοί δείκτες και αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό (μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό) DNA.

Οι μοριακοί δείκτες παρουσιάζουν όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός γενετικού δείκτη: εντοπίζουν ποιοτικές διαφορές, δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, εντοπίζουν διαφορές τόσο στις αλληλουχίες γονιδίων όσο και στις περιοχές του γενώματος και απεικονίζουν την ποικιλότητα που υπάρχει στο ίδιο το γενετικό υλικό και όχι στα προϊόντα έκφρασης.

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

- 1) Παρουσία πολυμορφισμού,
- 2) Απλή κληρονομικότητα,
- 3) Υψηλό συντελεστής κληρονομικότητας.
- 4) Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα έκφρασης των γονιδίων.
- 5) Διασπορά σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- 6) Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας.
- 7) Η μεθοδολογία της αναγνώρισης να είναι χαμηλού κόστους.

Οι μοριακοί δείκτες καθορίζονται από δύο συνιστώσες: την περιοχή του DNA που πρόκειται να «καλύψουν», καθώς και το επίπεδο πολυμορφισμού και το ποσοστό της ετεροζυγωτίας που εμφανίζεται σε αυτή, και την τεχνική που χρησιμοποιείται για την εύρεση της διαφοροποίησης.

Η επιλογή του μοριακού δείκτη που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και κατ' επέκταση για την ταυτοποίηση κάποιου είδους εξαρτάται κυρίως από το κόστος εφαρμογής της μεθόδου (μιας και αρκετές μεθοδολογίες απαιτούν υψηλό κόστος για να εφαρμοστούν) και από τη δυνατότητα που έχει κάθε μέθοδος να διαχωρίζει προϊόντα τα οποία υπέστησαν ένα είδος κατεργασίας π.χ με υψηλή θερμοκρασία.

Μπορούμε να διαχωρίσουμε τους μοριακούς δείκτες (DNA δείκτες) σε δύο κατηγορίες:

- Δείκτες που δεν βασίζονται στην PCR (RFLPs)
- Δείκτες που βασίζονται στην PCR (RAPDs, SSRs, SNPs, SSCP)

Υπάρχουν και δείκτες που ανήκουν και στις δύο παραπάνω κατηγορίες (PCR- RFLP, AFLPs).

Οι συχνότεροι τύποι μοριακών που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν από τους επιστήμονες είναι οι ακόλουθοι:

### **Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού θραύσματος (RFLP).**

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *RFLPs* (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (Botstein *et al.*, 1980). Πρόκειται για μοριακό δείκτη, ο οποίος βασίζεται στην παραγωγή διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (Williams *et al.*, 1990) (θα γίνει λεπτομερής αναφορά στην επόμενη παράγραφο).

### **Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP).**

Τα SSCP είναι τμήματα DNA (200-800 bp) που ενισχύονται μέσω της τεχνικής της PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών μεγέθους 20-25 bp. Για τον εντοπισμό της παραλλακτικότητας στις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται πηκτές ηλεκτροφόρησης μονόκλωνου DNA (όπως και για την RFLP, θα γίνει λεπτομερής αναφορά στη συνέχεια).

### **Τυχαίος πολλαπλασιασμός πολυμορφικού DNA (RAPD).**

Ο όρος *RAPD* προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων *Random Amplified Polymorphic DNA*, που μπορεί να μεταφραστεί ως *Τυχαία Πολλαπλασιασμένο Πολυμορφικό DNA*. Στην τεχνική RAPD-PCR χρησιμοποιείται, εκτός από το ρυθμιστικό διάλυμα, τα νουκλεοτίδια, την Taq πολυμεράση και την μικρή ποσότητα DNA, ένας εκκινητής μήκους 10 νουκλεοτιδίων τυχαίας αλληλουχίας με μια αναλογία βάσεων GC τουλάχιστον 50 %. Το παραπάνω μίγμα τοποθετείται στον θερμοκυκλοποιητή και υπόκειται σε έναν αριθμό κύκλων μετουσίωσης, υβριδισμού και επέκτασης των αφετηριών. Για να μπορέσει να γίνει η επικόλληση του εκκινητή σε πολλά σημεία του γενωμικού DNA θα πρέπει η θερμοκρασία να είναι μικρότερη από αυτή της κλασικής PCR, θα πρέπει δηλαδή να είναι γύρω στους 36- 37°C. Στη συνέχεια ακολουθεί ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια η βαφή τους με βρωμιούχο εθίδιο.

Οι RAPD πολυμορφισμοί που προκύπτουν, θεωρητικά οφείλονται σε διάφορα αίτια όπως: **1)** προσθήκη ενός μεγάλου τμήματος DNA μεταξύ των δύο άκρων, που καθιστά το αρχικό τμήμα πολύ μεγάλο για να αντιγραφεί οπότε χάνεται, **2)** έλλειψη ενός τμήματος DNA σε ένα από τα δύο άκρα και **3)** νουκλεοτιδική αντικατάσταση που μπορεί να επηρεάσει τη σύνδεση των αφετηριών στη δεδομένη πλευρά λόγω αλλαγών στην ομολογία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε παρουσία ή απουσία ενός πολυμορφισμού.

Η τεχνική RAPD πλεονεκτεί στο ότι με τη χρήση κάθε τυχαίου εκκινητή προκύπτουν πολυάριθμες γονιδιακές θέσεις, απαιτούνται πολύ μικρές ποσότητες DNA, και έχει σχετικά μικρό κόστος. Μειονέκτημα της τεχνικής είναι η μεγάλη της ευαισθησία που απαιτεί πολύ προσεκτικούς χειρισμούς ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία και η επαναληπτικότητα. Οι δείκτες RAPD έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα πεδία έρευνας όπως σε μελέτες γενετικής παραλλακτικότητας, στην κατασκευή γενετικών χαρτών, στην πιστοποίηση κλώνων, σε φυλογενετικές μελέτες

και σε μελέτες εξέλιξης των ειδών όπως επίσης και σε μελέτες για τον εντοπισμό γονιδίων δεικτών.

### **Πολυμορφισμός Μήκους Πολλαπλασιασμένων Τμημάτων (AFLP).**

Ο όρος *AFLP* προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων *Amplified Fragment Length Polymorphism*, που μεταφράζεται ως Πολυμορφισμός Μήκους Πολλαπλασιασμένων Τμημάτων. Βασίζεται στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει από τον περιορισμό του γενωμικού DNA με κάποιο περιοριστικό ένζυμο και στον διαχωρισμό των τμημάτων σε πηκτή ακρυλαμιδίου και χρώση ασημιού ή ραδιενέργειας (Vos *et al.*, 1995). Η τεχνική αυτή προσφέρει τα πλεονεκτήματα των RAPD, και επιπλέον, είναι πιο αξιόπιστη και προκύπτουν περισσότεροι δείκτες σε σχέση με τα RAPD. Παράλληλα όμως παρουσιάζουν και τα μειονεκτήματα των RAPD, εμφανίζουν σχέση κυριαρχίας στην κληρονομικότητα. Επιπλέον, η μέθοδος είναι πιο δαπανηρή και πιο επικίνδυνη όταν χρησιμοποιείται ραδιενέργεια.

### **Μικροδορυφόροι (microsatellites), SSR (Simple Sequence Repeats).**

Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, διάσπαρτες στο γονιδίωμα και διαφορετικές μεταξύ των ατόμων. Οι δείκτες αυτοί, αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA οι οποίες έχουν μήκος συνήθως 2-5 βάσεων και ο πολυμορφισμός προκύπτει από διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων. Πλεονεκτήματα των δεικτών αυτών είναι η απλότητα στην εφαρμογή, η συγκυριαρχία στην κληρονομία και η παρουσία μεγάλου πολυμορφισμού. Μειονέκτημα τους είναι η εκτεταμένη έρευνα που απαιτείται για την εφαρμογή τους σε ένα νέο είδος (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

### **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.**

Πρόκειται για σύστημα μοριακών δεικτών βασισμένο στη υπάρχουσα ποικιλότητα των πρωτεϊνών που επιτελούν ταυτόσημη λειτουργία αλλά διαφέρουν ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα, λόγω διαφορών που παρουσιάζουν στην αμινοξική αλληλουχία (Αλαχιώτης, 2005).

Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνταν στις φυλογενετικές μελέτες και όχι μόνο, επειδή ήταν πιο οικονομικές και γρήγορες απ' ό,τι η αλληλούχηση του DNA. Με το πέρασμα όμως του χρόνου, τόσο το κόστος όσο και ο χρόνος που χρειάζεται για την

αλληλούχηση του γενετικού υλικού, μειώθηκαν. Έτσι, η αλληλούχηση άρχισε να κερδίζει έδαφος στις φυλογενετικές μελέτες, αφού επρόκειτο για μια λεπτομερή και αναλυτική μέθοδο που μπορούσε να εκτιμήσει τις γενετικές αποστάσεις γονιδιακών τμημάτων ή γονιδίων των υπό μελέτη οργανισμών.

Πίνακας 1.4.1: Σύγκριση ευρέως χρησιμοποιούμενων μοριακών δεικτών (Αραβανόπουλος, 2003).

Δείκτης	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
Βασίζεται σε	υβριδισμό	PCR	PCR	PCR
Βαθμός παραλλακτικότητας	υψηλός	υψηλός	υψηλός	πολύ υψηλός
Κληρονόμηση	συγκυρίαρχη	κυρίαρχη	κυρίαρχη /συγκυρίαρχη	συγκυρίαρχη
Κόστος	υψηλό	χαμηλό	υψηλό	υψηλό
Επαναληψιμότητα	υψηλή	χαμηλή	υψηλή	υψηλή
Ανάλυση δεδομένων	εύκολη	εύκολη	δύσκολη	πολύ εύκολη

Στη συνέχεια θα αναλύσουμε τους μοριακούς δείκτες και τις αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην δικιά μας πειραματική μελέτη!

---

### 1.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)

---

Την τελευταία εικοσαετία έχουν αναπτυχθεί μοριακοί δείκτες που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης** (polymerase chain reaction, **PCR**, amplification) είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1985 από τον Mullis και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 1987 με την χρήση θερμοοανθεντικών DNA πολυμερασών. Ο Kary Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993 για αυτήν του την ανακάλυψη διότι κατέστησε δυνατή την παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός μορίου DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακόμα και αν υπάρχει στη διάθεσή μας ένα μόνο αρχικό μόριο DNA. Σήμερα η PCR θεωρείται μια από τις πιο επαναστατικές επιστημονικές ανακαλύψεις του 20<sup>ου</sup> αιώνα και αποτελεί πλέον την κοινή βάση μιας πληθώρας άλλων μοριακών τεχνικών (μερικές αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο της μελέτης μας). Πρόκειται για μια αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται *in vitro* τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου (πυρηνικό ή μιτοχονδριακό).

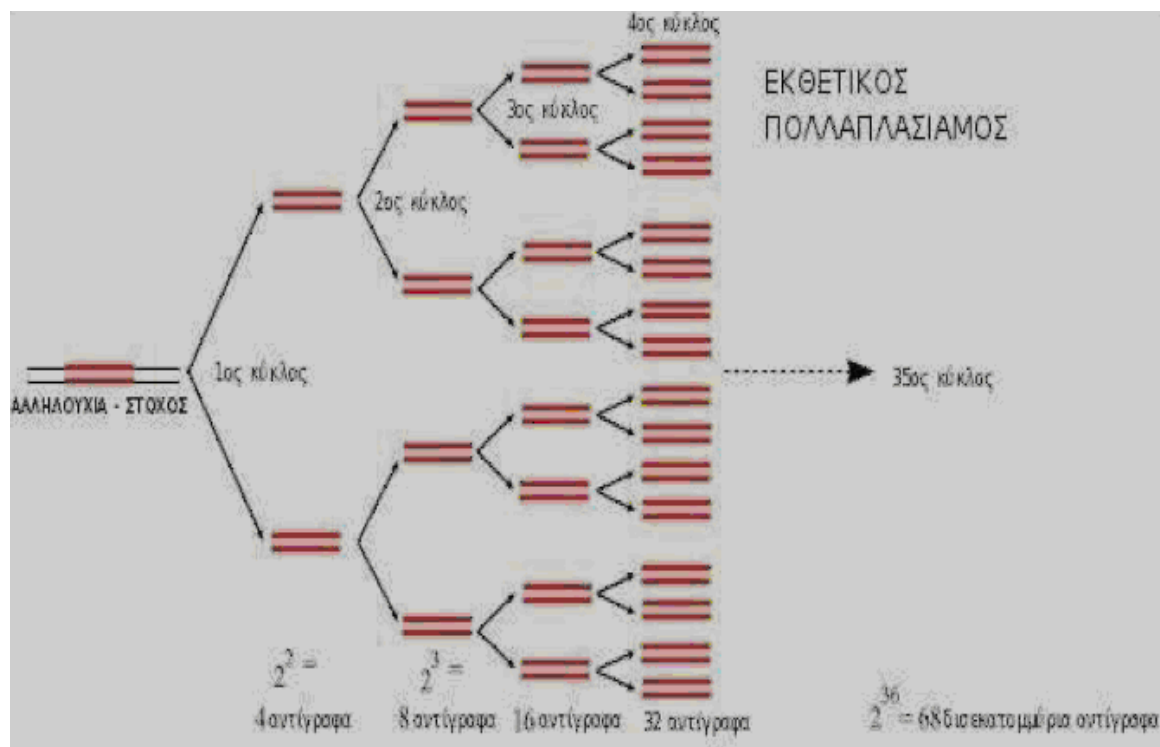
Η κινητική επανασύνδεση αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA, ιδιαίτερα στην αρχή, όπου η διάρκεια επανασύνδεσης εξαρτάται από την συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμπληρωματικών αλυσίδων αποτελεί τη βάση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Με τη μέθοδο αυτή συντίθεται μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια ενζυματική αντίδραση *in vitro*. Η PCR είναι μια εργαστηριακή ελεγχόμενη, εκτός οργανισμού, αντίδραση ενζυμικού πολλαπλασιασμού επιλεγμένων αλληλουχιών του DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες μητρικού DNA (Berg *et al.*, 2002).

Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο **εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια (primers)**. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητού είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δυο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές) για *in vitro* σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Αυτό το κομμάτι θα επιλεγεί και θα πολλαπλασιαστεί πολλές φορές με τη συνεργασία άλλων μορίων. Συγκεκριμένα μια **Taq DNA πολυμεράση**, η οποία βάσει ενός πρότυπου δίκλωνου DNA και παρουσία κατάλληλου **ρυθμιστικού διαλύματος** και ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, των τεσσάρων τριφωσφορικών



δεοξυνουκλεοτιδίων (**dNTPs** : dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων Μαγνησίου (**Mg<sup>++</sup>**) συνθέτει εκατομμύρια νέα πιστά αντίγραφα μόρια DNA, ως προς εκείνο το τμήμα της ακολουθίας του αρχικού εκμαγείου, το οποίο περικλείεται ανάμεσα στους DNA εκκινητές (Berg *et al.*, 2002).

Οι εκκινητές, όπως αναφέρθηκε, καθορίζουν τα όρια της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί. Το ρυθμιστικό διάλυμα ορίζει το ιοντικό περιβάλλον (κυρίως το pH) της αντίδρασης στο βέλτιστο για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα μαγνησίου μετέχουν στη διαδικασία υβριδισμού των εκκινητών. Τα dNTPs συνιστούν τα δομικά υλικά των μορίων DNA που θα συντεθούν, ενώ επίσης προσφέρουν και την ενέργεια για την επιμήκυνση. Η όλη αντίδραση σχηματισμού των νέων μορίων καταλύεται από το ένζυμο πολυμεράση. Η Taq πολυμεράση προέρχεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, έτσι ώστε να μην μειώνεται η δράση της κατά τους διάφορους εξαιτίας της θέρμανσης, είναι θερμοσταθερή διατηρώντας την δραστηρότητά της σε θερμοκρασία 95°C για τουλάχιστον 40 λεπτά (Mullis *et al.*, 1987).



Εικόνα 1.4.1.1: Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου

(<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

Οι παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) είναι:

- Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη μονόκλωνη αλυσίδα να γίνεται γρήγορα και κατά την εξέλιξη της αντίδρασης η σύνδεση αυτή να είναι γρηγορότερη από την επανασύνδεση εκμαγείου- εκμαγείου.
- Η εκλογή κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης βοηθά την ειδικότητα της αντίδρασης.
- Η ειδικότητα και απόδοση της μεθόδου αυξήθηκε με τη χρήση της Taq πολυμεράσης, αφού χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες στα στάδια σύνδεσης και επιμήκυνσης.

Προκειμένου ωστόσο να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αυτή, το μίγμα αντιδραστηρίων μαζί με την ποσότητα του ολικού DNA, μεταφέρεται σε θερμοκυκλοποιητές. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κύκλους (συνήθως 30-35). Ο κάθε κύκλος έχει ως αποτέλεσμα εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Έτσι ο DNA-στόχος, από αρχική ποσότητα δείγματος μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδισμού, ενισχύεται σε σημείο που να γίνει ευρέως ανιχνεύσιμος (Williams *et al.*, 1990).

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιείται σε 3 στάδια και είναι τα εξής :

- 1) **Στάδιο αποδιάταξης** (denaturation): στο οποίο το όλο μίγμα θερμαίνεται στους 94°C για ορισμένο χρονικό διάστημα (συνήθως ένα με δύο λεπτά) προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA (διάσπαση των δεσμών υδρογόνου).
- 2) **Στάδιο υβριδισμού των εκκινητών** (annealing): στο οποίο γίνεται η σύνδεση των εκκινητών σε καθένα από τους δύο κλώνους του DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR (συνήθως μεταξύ 50 και 62°C) καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των εκκινητών. Δείκτης των ιδιοτήτων αυτών είναι η θερμοκρασία υβριδισμού του 50% των μορίων του εκκινητή στο μόριο DNA (θερμοκρασία  $T_m$ ). Η θερμοκρασία  $T_m$  εξαρτάται κυρίως από το ποσοστό σε βάσεις γουανίνης-κυτοσίνης (GC content), αλλά και από το μήκος του εκκινητή. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης και το μήκος του εκκινητή τόσο μεγαλύτερη είναι κατά κανόνα και η  $T_m$ . Αντίστοιχα, όσο μεγαλύτερη είναι η  $T_m$  τόσο μεγαλύτερη μπορεί να είναι και η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR. Ένας προσεγγιστικός τύπος υπολογισμού της θερμοκρασίας  $T_m$  είναι ο:

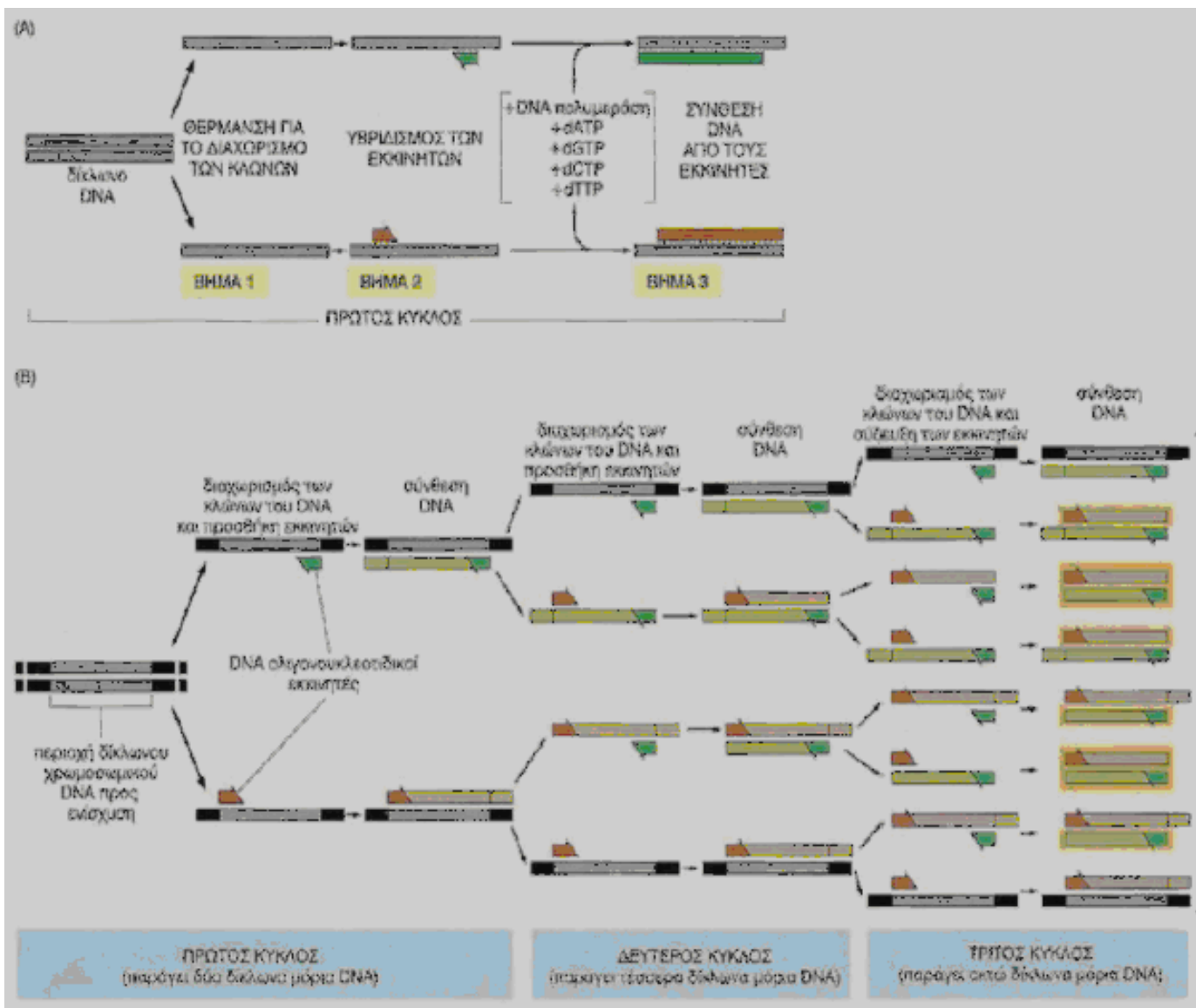
$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

όπου A, T, G, C είναι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης, κυτοσίνης στον εκκινητή. Με βάση την  $T_m$  των εκκινητών και μετά από πειραματισμό συνήθως προκύπτει η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού στην αντίδραση PCR.

3) **Στάδιο επιμήκυνσης** (extension): (συνήθως 70 - 72°C) στο οποίο εκδηλώνεται η ενζυμική δράση της πολυμεράσης και πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων. Στο τέλος του σταδίου αυτού έχουν διπλασιαστεί τα μόρια DNA της περιοχής υπό ενίσχυση και ολοκληρώνεται ένας κύκλος της αντίδρασης PCR.

Η διάρκεια του κύκλου δεν υπερβαίνει συνήθως τα δύο λεπτά. Έτσι, σ' ένα τυπικό πρόγραμμα PCR που περιλαμβάνει 35 κύκλους είναι δυνατό σε μικρό χρονικό διάστημα (λιγότερο από δύο ώρες) να πάρουμε μεγάλο αριθμό μορίων (ενίσχυση της τάξεως των  $2^3$  μορίων). Σημειώνεται, τέλος, ότι στο τυπικό πρόγραμμα της PCR περιλαμβάνονται επίσης: α) ένα στάδιο αρχικής αποδιάταξης (94°C συνήθως για δύο με τρία λεπτά), ώστε να γίνει πλήρης αποχωρισμός των αλυσίδων του ολικού DNA και β) ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης (72°C συνήθως για τρία με πέντε λεπτά) προκειμένου να γίνει πλήρης σύνθεση όλων των μορίων που έχουν συντεθεί από τη διαδικασία (Mullis και Fallona, 1987; Rolfs *et al.*, 1992).

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος που πολλαπλασιάστηκε.



Εικόνα 1.4.1.2: (Α) τα στάδια της PCR και (β) σχηματική απεικόνιση των κύκλων της PCR (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>)

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά (**molecular markers**). Σε ορισμένες περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στο διαχωρισμό των μορίων DNA (π.χ αλληλούχιση) προτιμάται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Dieffenbach *et al.*, 2003). Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή του **Βρωμιούχου αιθιδίου** (Ethidium bromide) το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR,

εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του διπλόκλωνου DNA (Hunt, 2006). Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτική αγαρόζη πριν την ηλεκτροφόρηση ή να εμβαπτιστεί η πηκτική σε διάλυμα του μετά την ηλεκτροφόρηση.

Τα κυριότερα **πλεονεκτήματα** της τεχνικής PCR είναι η ταχύτητα ανάλυσης και το γεγονός ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολύ μικρές ποσότητες αρχικού δείγματος ιστού από το οποίο θα απομονωθεί το DNA, ενώ τα προϊόντα της μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μεγάλο εύρος αναλύσεων του γενετικού υλικού. Ωστόσο, συχνά είναι απαραίτητο να προϋπάρχει κάποια γνώση για την υπό εξέταση αλληλουχία. Ακόμη το μέγεθος της αλληλουχίας δεν μπορεί να υπερβαίνει μερικές χιλιάδες βάσεων. Υφίσταται, τέλος, και ο κίνδυνος επιμόλυνσης του υπό ενίσχυση DNA.

---

#### **1.4.2 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)**

---

Η ανάλυση πολυμορφισμών τριτοταγούς δομής μονόκλωνων αλυσίδων DNA (Single-Strand Conformation Polymorphism / SSCP) αποτελεί μια από τις κυριότερες μεθόδους ανίχνευσης των προϊόντων της PCR που παρουσιάζουν μονοσημειακές μεταλλάξεις σε σχέση με το προϊόν του φυσικού τύπου (Orti *et al.*, 1997). Το DNA του υπό μελέτη δείγματος εξετάζεται παράλληλα με το φυσιολογικό ή παράλληλα με άλλα υπό μελέτη δείγματα, οπότε συγκρίνονται οι διαφορές που τυχόν παρουσιάζουν.

Η SSCP αποτελεί σήμερα μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους ανίχνευσης αγνώστων μεταλλάξεων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι η διαμόρφωση του μονόκλωνου DNA που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι χαρακτηριστική για κάθε αλληλουχία DNA. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων του DNA εξαρτάται από τη διαμόρφωση τους, η οποία σχετίζεται με το μέγεθος και τη σύστασή τους σε βάσεις. Επομένως δύο μονόκλιωνα μόρια DNA που διαφέρουν έστω και ως προς μία βάση αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση και μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (Orita *et al.*, 1989).

Έτσι η περιοχή του DNA που πρέπει να ελεγχθεί για την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης ή πολυμορφισμού ενισχύεται με την μέθοδο της PCR. Το προϊόν της PCR αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες και φορτώνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκεκριμένης συγκέντρωσης και χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες. Τα μονόκλωνα τμήματα του DNA κινούνται ανάλογα με το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους. Όταν το τμήμα του DNA που ελέγχεται δεν φέρει κάποια μετάλλαξη τότε η κινητικότητα όλων των μορίων είναι ίδια και συνήθως μετά τη χρώση της πηκτής εμφανίζονται δύο ζώνες που αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA.

Οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, που καθορίζουν τη διαμόρφωση του μορίου, αλλάζουν ανάλογα με τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ. Επομένως ο διαχωρισμός με τη μέθοδο SSCP διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Ωστόσο με τη χρήση γνωστών προτύπων μπορούν ορισμένες στερεότυπες ηλεκτροφορικές μορφές να συσχετισθούν με συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητά της να ανιχνεύει ακόμα και ελάχιστες διαφορές στην αλληλουχία του DNA ταυτόχρονα σε πολλά PCR προϊόντα. Μπορεί έτσι να ελαττώσει στο ελάχιστο την ανάγκη προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (Sequencing). Πρόκειται επομένως για μέθοδο σχετικά απλή, γρήγορη και οικονομική, που μπορεί να εκτελεστεί σε οποιοδήποτε σύγχρονο εργαστήριο μοριακής βιολογίας, παρουσιάζει δε αρκετά μεγάλη ευαισθησία (Mitterski *et al.*, 2000).

Η μέθοδος αυτή επιλέχτηκε για την ανίχνευση πιθανών μεταβολών του γενετικού υλικού (μεταλλάξεων και πολυμορφισμών) του μιτοχονδριακού DNA, συγκεκριμένα του γονιδίου 16S rRNA, το οποίο μελετάμε στην παρούσα εργασία, σε βόειο και χοιρινό κρέας.

---

### **1.4.3 Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους με ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)**

---

Ο όρος RFLP προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων Restriction Fragment Length Polymorphism, που μεταφράζεται ως Πολυμορφισμός Μήκους Θραύσματος εκ Περιορισμού. Η χρήση ενζύμων περιορισμού επιτρέπει την κατάτμηση του DNA.

Τα θραύσματα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς μεταξύ των οποίων και η ανάλυση γενετικών διαφορών. Δύο ομόλογα τμήματα DNA (με την ίδια αλληλουχία βάσεων) έχουν τις ίδιες θέσεις τομής ποιοτικά και ποσοτικά και επομένως τα θραύσματα που προκύπτουν μετά από την κατεργασία τους με το ίδιο ένζυμο, έχουν το ίδιο μέγεθος (Μαρκουλάτος, 2009).

Η ύπαρξη μετάλλαξης στο ένα από τα δύο τμήματα DNA μπορεί να προκαλέσει την απάλειψη μίας θέσης τομής ή τη δημιουργία μίας νέας θέσης έτσι ώστε τα θραύσματα που προκύπτουν να έχουν διαφορετικό μέγεθος.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι βακτηριακά ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών σε συγκεκριμένες θέσεις αλληλουχιών στόχων που αναγνωρίζουν, μήκους 4 με 6 bp τις περισσότερες φορές (η αντίδραση αυτή αναφέρεται συνήθως και ως «πέψη»). Τα RFLPs είναι ζώνες που αντιστοιχούν σε τμήματα DNA συνήθως με μέγεθος 2-10 kb. Τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ανιχνεύονται με υβριδισμό στυπώματος κατά Southern με τη χρήση επισημασμένου ιχνηλάτη DNA. Η επισήμανση του ιχνηλάτη μπορεί να πραγματοποιηθεί με ένα ραδιενεργό ισότοπο ή εναλλακτικά με μη ραδιενεργές χρώσεις.

Υπάρχουν βάσεις δεδομένων που περιλαμβάνουν χιλιάδες απομονωμένες και χαρακτηρισμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού (Roberts *et al.*, 2007). Σημειακές μεταλλάξεις είναι δυνατό να προκαλέσουν τη δημιουργία ή απώλεια θέσεων κοπής, οδηγώντας στη δημιουργία προτύπων ικανών να διακρίνουν πληθυσμούς ή ταξινομικές ομάδες (Baxevanis *et al.*, 2005).

Η ανάλυση RFLP είναι μία από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR για τον προσδιορισμό διαφορών στην νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας και της μοριακής ταυτοποίησης διαφόρων οργανισμών (θηλαστικά, πτηνά, ψάρια και μικροοργανισμοί).

Αυτόν ακριβώς το συνδυασμό PCR - RFLP χρησιμοποιήσαμε και εμείς στην παρούσα μελέτη. Επιλέχθηκε για τον χαρακτηρισμό του είδους του **βόειου** (*Bos taurus*) και του **χοιρινού** (*Sus scrofa*) κρέατος, διότι πρόκειται για μια εύκολη, γρήγορη, αλλά και σχετικά οικονομική μέθοδο στην περίπτωση ταυτοποίησης μεγάλου αριθμού δειγμάτων, ιδιαίτερα εφόσον βρεθούν και ειδο-ειδικά (species-specific) πρότυπα κοπής. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε στην μιτοχονδριακή περιοχή,

16S, με σκοπό την περιγραφή της σύστασης σε είδος κρέατος των αναμειξών κρέατος που μελετήθηκαν.

Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, αρχικά γίνεται πολλαπλασιασμός κάποιου τμήματος του γενωμικού DNA με τη χρήση συγκεκριμένων εκκινητών. Στη συνέχεια, το τμήμα αυτό κόβεται με τη χρήση ενζύμων περιορισμού, έχουμε επίδραση συγκεκριμένου αριθμού ενζυμικών μονάδων από την ενδονουκλεάση σε ορισμένη ποσότητα της ενισχυμένης με PCR περιοχής DNA. Ως ενζυμική μονάδα ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη «πέψη» ποσότητας DNA 1 μg στις βέλτιστες συνθήκες για το ένζυμο σε αντίδραση τελικού όγκου 20 μL σε μια ώρα (Maniatis *et al.*, 1982). Τα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή σε πηκτή ακρυλαμιδίου, που στη συνέχεια βάφεται με βρωμιούχο εθίδιο. Η αντίδραση γίνεται σε ιοντικό περιβάλλον με κατάλληλο pH και σε βέλτιστη για τη δραστηριότητα του ενζύμου θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί έναντι της κλασικής μεθόδου επειδή χρειάζεται μικρότερη ποσότητα DNA, είναι ευκολότερη, πιο οικονομική και πιο ακίνδυνη γιατί δεν χρησιμοποιείται ραδιενέργεια. Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι είναι απαραίτητη η γνώση της αλληλουχίας βάσεων σε κάποιο τμήμα για το σχεδιασμό των εκκινητών.

---

#### 1.4.4 Μιτοχονδριακό DNA/ 16S rRNA

---

Στην παρούσα μελέτη οι τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιήσαμε PCR, SSCP και RFLP εφαρμόστηκαν στην μιτοχονδριακή περιοχή 16S των κυττάρων του βόειου και του χοιρινού κρέατος. Για αυτό και θα προσπαθήσουμε να δικαιολογήσουμε την επιλογή μας.

Τα μιτοχόνδρια είναι θεμελιώδη οργανίδια που συναντιούνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπών τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια –μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)- μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Διαμαντίδης, 1994).



Το mtDNA είναι ένα μικρό πλασμίδιο μικρότερο από 20kb στα περισσότερα θηλαστικά που υπάρχει μόνο στα μιτοχόνδρια. Είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό μέσα στα είδη και εξελίσσεται πολύ γρήγορα σε σχέση με το πυρηνικό DNA και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες γενετικής ποικιλότητας και φυλογενετικής δομής σ' ένα είδος. (Bruford *et al.*, 2003).

Έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία τουλάχιστον 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν από 3 έως 37 πρωτεΐνες. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων, αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και έχουν κατά κανόνα μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μαζί με 22 tRNA και 2 rRNA (Stryer, 1997).

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών για τους εξής λόγους:

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

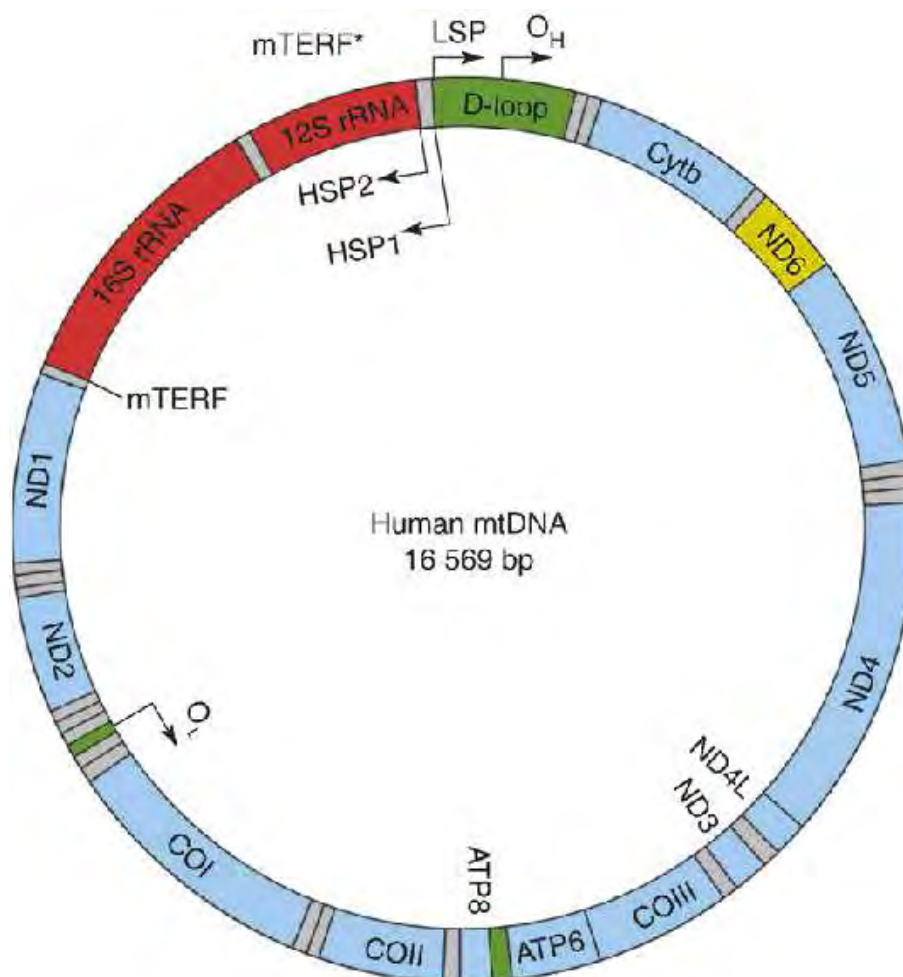
Τα γονίδια του mtDNA με την μεγαλύτερη προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα : 16S και 12S rRNA, Cyt b και το D-Loop. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται στο γεγονός ότι ο ρυθμός και ο τρόπος εξέλιξης τους είναι καλά κατανοητός και θεωρείται ότι είναι σχετικά σταθερός και όμοιος μεταξύ μεγαλόσωμων χερσαίων ειδών (Bruford *et al.*, 2003).

Το 16S rRNA αποτελεί συστατικό των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων. Πολλαπλές ακολουθίες 16S rRNA μπορούν να υπάρχουν σε ένα μοναδικό βακτήριο. Το 16S rRNA είναι κατάλληλο για χαρακτηρισμό διαφόρων ειδών διότι: έχει συντηρημένες αλληλουχίες ανάμεσα στα είδη που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό γενικών εκκινητών για PCR, έχει μεταβλητές αλληλουχίες που

παρέχουν τον πολυμορφισμό για χαρακτηρισμό σε επίπεδο είδους ή στελέχους (Μαρκουλάτος, 2009).

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο εργαλείο σε μελέτες ταυτοποίησης ειδών για τους παρακάτω λόγους:

- Ο μεγάλος ρυθμός μεταλλαγής έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και την δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.
- Σε κάθε κύτταρο μπορεί να υπάρχει μεγάλος αριθμός μιτοχονδρίων που φτάνει μέχρι και τα 1000 αντίτυπα. Έτσι με την τεχνική της PCR αυξάνεται η πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης. (Scheffler *et al.*, 2001).



Εικόνα 1.4.4.1: Μιτοχονδριακό γονιδίωμα (mtDNA). Φαίνονται τα γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος καθώς και η θέση τους στο γονιδίωμα (Asin-Cayuela και Gustafsson, 2007).

---

## 1.5 Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος

---

Στην περίπτωση του κρέατος τα σοβαρά προβλήματα της αναλυτικής ταυτοποίησης προκύπτουν κατά την αλλοίωση των βασικών διακριτικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, όπως το μαγείρεμα, το κάπνισμα, το τηγάνισμα, το αλάτισμα ή η κονσερβοποίηση (Haunshi *et al.*, 2009). Για το σκοπό αυτό, οι ερευνητές προσπαθούν να τυποποιήσουν τις μεθόδους, για να υπολογίσουν το ποσοστό κάθε είδους κρέατος που έχει χρησιμοποιηθεί στα υπό εξέταση προϊόντα κρεάτων.

Μέθοδοι όπως η οργανοληπτική εξέταση και οι ανατομικές διαφορές, οι ιστολογικές διαφορές της τρίχας των ζώων, οι φυσικές ιδιότητες του λιπώδους ιστού και τα επίπεδα γλυκογόνου στον μυϊκό ιστό χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν για την αναγνώριση της προέλευσης των κρεάτων (Matsunaga *et al.*, 1999; Iihak και Arslan, 2007; Karabasanavara *et al.*, 2011).

Με την χρήση των αναλυτικών μοριακών τεχνικών που αναπτύχθηκαν τα προβλήματα αυτά ξεπεράστηκαν. Όπως αναφέραμε αυτές οι τεχνικές βασίζονται στην πρωτεϊνική ανάλυση και στην ανάλυση DNA.

Οι πρωτεΐνες καταστρέφονται κατά την θέρμανση και την πίεση στην διάρκεια της επεξεργασίας οπότε είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε επεξεργασμένα τρόφιμα (Haunshi *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2009).

Στην πρωτεϊνική ανάλυση ανήκουν ηλεκτροφορητικές (Renon *et al.*, 2003; Karabasanavara *et al.*, 2011), χρωματογραφικές (Ashoor *et al.*, 1988; Karabasanavara *et al.*, 2011) και ανοσοβιολογικές (Elisa) (Hajmeer *et al.*, 2003; Asensio *et al.*, 2008; Karabasanavara *et al.*, 2011) μέθοδοι. Όμως οι μέθοδοι αυτοί συχνά αντιμετωπίζουν προβλήματα διότι δεν μπορούν να διαχωρίσουν συγγενικά είδη σε επεξεργασμένα τρόφιμα και είναι αρκετά δαπανηροί σε χρόνο και σε χρήμα. (Stamoulis *et al.*, 2010).

Η ανάλυση DNA που βασίζεται στην PCR είναι μια αξιόπιστη μέθοδος και χρησιμοποιείται πολλές φορές ως εναλλακτική λύση σε σχέση με τις μεθόδους που έχουν ως βάση την ανάλυση της πρωτεϊνικής δομής. Η ανάλυση των νουκλεϊνικών οξέων (μιτοχονδριακό ή γενωματικό DNA) που χρησιμοποιείται παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με τις βασισμένες σε πρωτεϊνική ανάλυση τεχνικές, κυρίως επειδή οι δοκιμές με χρήση DNA δεν είναι εξαρτώμενες από την πηγή του ιστού, την

ηλικία του ατόμου ή την όποια ευαισθησία και ταλαιπωρία των δειγμάτων. Αν και το DNA αλλοιώνεται, όπως και οι πρωτεΐνες, σε συνθήκες αποστείρωσης, τα τμήματα DNA που λαμβάνονται διατηρούν σε ικανοποιητικά επίπεδα τις διαφορές στην ακολουθία τους ώστε να επιτρέπουν το διαχωρισμό τους ακόμη και από τα πολύ σχετικά είδη.

Οι τεχνικές του DNA θεωρούνται ως καταλληλότερες στην εξακρίβωση του είδους του κρέατος διότι : **1)** το DNA είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο, επιτρέποντας την ανάλυση επεξεργασμένων και θερμικά κατεργασμένων τροφίμων, **2)** το περιεχόμενο της πληροφορίας του DNA είναι καλύτερο από αυτό των πρωτεϊνών λόγω του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα και **3)** το DNA είναι παρόν σε όλους τους τύπους ιστών λόγω της καθολικής παρουσίας του σε κάθε τύπου κύτταρο (Fajardo *et al.*, 2007).

Πολλές βιομοριακές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί στο παρελθόν, ειδικά μοριακές προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση ειδών κρέατος που περιέχουν την υβριδοποίηση του DNA (Ebbehoj και Thomsen, 1991a; Ebbehoj και Thomsen, 1991b; Hunt *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 1999; Ghovvati *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010; Karabasanavara *et al.*, 2011). Οι περισσότερες από τις PCR μεθόδους για τον προσδιορισμό των ειδών στα προϊόντα κρέατος είναι βασισμένες στην ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής μιτοχονδριακού DNA, που ακολουθείται από την αλληλουχία, ή την ανάλυση του πολυμορφισμού κατά μήκος των τεμαχίων περιορισμού (PCR-RFLP) του ενισχυμένου τμήματος (Rehbein *et al.*, 2002; Woolfe και Primrose, 2004; Girish *et al.*, 2007; Ghovvati *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010; Karabasanavara *et al.*, 2011; Haider *et al.*, 2012; Nakyinsige *et al.*, 2012). Εναλλακτικά ως προς τις παραπάνω μεθόδους, η ανάλυση PCR-SSCP έχει χρησιμοποιηθεί για να παραγάγει αποτυπώματα στην πηκτή, ανιχνεύοντας την άγνωστη μεταβλητότητα της ακολουθίας στο ενισχυμένο τμήμα (Rehbein *et al.*, 1997; Rehbein *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2007; Ghovvati *et al.*, 2009; Aranceta-Garza *et al.*, 2011). Η PCR ενίσχυση σε περιοχές DNA από την τυχαία ενισχυμένη πολυμορφική ανάλυση DNA (RAPD) έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη στη μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού ως δείκτη της γεωγραφικής προέλευσης. Αν και η δυνατότητα αναπαραγωγής της PCR αντίδρασης αντιπροσωπεύει ένα πολύ σημαντικό σημείο της μεθόδου RAPD, η καταλληλότητα αυτής της μεθόδου στον προσδιορισμό των προϊόντων κρέατος έχει ακόμα μέλλον (Calvo *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2003; Ballin *et al.*, 2009; Ghovvati *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010).

Στη συνέχεια θα παραθέσουμε αποτελέσματα μελετών στις οποίες εφαρμόστηκαν οι τεχνικές PCR-SSCP και PCR-RFLP, τις οποίες χρησιμοποιήσαμε και εμείς στη μελέτη μας, συγκεκριμένα σε ζωικά είδη.

→ Για την **PCR-RFLP**

Το **1998** οι **Matsunaga et al.** θέλησαν να εξακριβώσουν τη νοθεία σε κρέας ελαφιού από ορισμένα άλλα είδη κρέατος (μοσχάρι, γουρούνι, κοτόπουλο, πρόβατο, κατσίκι, άλογο, λαγό). Τα ένζυμα που χρησιμοποίησαν ήταν τα EcoRI, BumHI και ScaI τα οποία έκοβαν σε ένα τμήμα του Cyt b. Το EcoRI έδωσε ζώνες στα 67 και 127 bp για το είδος ελαφιού (*red deer*) και 194 bp για το είδος ελαφιού (*sika deer*). Τα BumHI και ScaI έκοψαν στα 194 bp για το είδος red deer ενώ για το sika deer έδωσαν διαφορετικές ζώνες. Οπότε τα δύο είδη μπορούν να διαφοροποιηθούν και με τα τρία αυτά ένζυμα.

Το **2002** οι **Verkaar et al.** προσπάθησαν να διαχωρίσουν διάφορα είδη βοοειδών μεταξύ τους, τα ένζυμα που χρησιμοποίησαν ήταν τα AvaIII, BamHI, EcoRI, HindIII, HinfI, StuI, TaqI και XbaI. Τα γονίδια που μελέτησαν ήταν το Cyt b και τη κυτοχρωμική οξειδάση II. Τα αποτελέσματα έδωσαν ικανοποιητική ταυτοποίηση για όλα τα είδη βοοειδών, εκτός από τα είδη taurine cattle (*Bos taurus*) και zebu (*Bos indicus*).

Το **2005** οι **Girish et al.** ταυτοποίησαν τέσσερα είδη κρέατος (βουβάλι, μοσχάρι, κατσίκι και αρνί) χρησιμοποιώντας τμήμα 456 bp του 12S rRNA και τα ένζυμα AluI, HhaI, ApoI και BspTI. Η τεχνική έδωσε καλά αποτελέσματα τόσο σε νωπά όσο και σε επεξεργασμένα προϊόντα αλλά δεν θεωρήθηκε κατάλληλη για μείγματα κρεάτων.

Το **2009** οι **Stamoulis et al.** 2009 χρησιμοποίησαν την PCR-RFLP για τον διαχωρισμό δέκα πτηνών: κότα, γαλοπούλα, πάπια, χήνα, φασιανός, πέρδικα, μεκκάτσα, στρουθοκάμηλος, ορτύκι και τσίχλα. Ειδικότερα με PCR ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου 12s rRNA και ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Acil* το οποίο και διαχώρισε επιτυχώς τα δέκα πτηνά. Η μέθοδος κρίθηκε ικανή τόσο για την ταυτοποίηση του επεξεργασμένου κρέατος όσο και για την ταυτοποίηση μιγμάτων κρέατος.

Το **2010** οι **Chen et al.** ταυτοποίησαν πέντε είδη κρέατος (μοσχάρι, βόδι Ιμαλαΐων, βουβάλι, κατσίκι και γουρούνι) όπου χρησιμοποίησαν τα ένζυμα Alu I και Bfa I σε τμήμα του μιτοχονδριακού 12S rRNA γονιδίου. Το κατσίκι και το γουρούνι ταυτοποιήθηκαν με το Alu I, ενώ τα υπόλοιπα είδη ταυτοποιήθηκαν με πέψη του Bfa I. Η τεχνική τους έδωσε υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση DNA μοσχαριού σε

μείγματα μοσχαριού βουβαλιού Ιμαλαΐων. Στα αποτελέσματα αναφέρεται ότι παρατηρήθηκαν πολλές περιπτώσεις νοθείας προϊόντων βουβαλιού Ιμαλαΐων με μοσχάρι.

Το **2012** οι **Haider et al.** πραγματοποίησαν πέψη με επτά ένζυμα (Hind II, Ava II, Rsa I, Taq I, Hpa II, Tru II, Xba I) σε τμήμα 710 bp του μιτοχondριακού COI γονιδίου για να δουν το διαχωρισμό σε 8 είδη ζώων μέσω του κρέατος τους ( πρόβατο, καμήλα, βουβάλι, αγελάδα, γαλοπούλα, κοτόπουλο, γουρούνι και γάιδαρο). Το Xba I λειτούργησε μόνο στο πρόβατο, το Tru II ήταν το μοναδικό που λειτούργησε σε όλα τα είδη, το Taq I δημιούργησε ένα μοναδικό προφίλ μόνο για την καμήλα, το Hind II διαχώρισε μόνο στο πρόβατο, το βουβάλι και τον γάιδαρο, το Ava II διαχώρισε μόνο στο πρόβατο, το βουβάλι και την καμήλα, το Rsa I διαχώρισε μόνο στο κοτόπουλο, το Hpa II μόνο στο γάιδαρο. Το Hpa II παρήγαγε το μεγαλύτερο επίπεδο παραλλαγής που ήταν αρκετό για την διάκριση όλων των δειγμάτων.

Για την **PCR-SSCP**

→ Οι μελέτες που χρησιμοποιούν την μέθοδο αυτή και υπάρχουν άφθονες στη βιβλιογραφία, αφορούν ως επί το πλείστον μελέτες σε ψάρια και θαλασσινά.

Οι **Gupta et al.** το **2007** μελέτησαν διάφορα είδη αιγοπροβάτων για να διαπιστώσουν αν υπάρχει διαφορά στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Ήθελαν να παρατηρήσουν αν υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα στα γονίδια των αυξητικών ορμονών μεταξύ των ειδών. Βρέθηκαν επτά απλότυποι (A, B, C, D, E, F, και G) για το exon-4 τμήμα του γονιδίου της αυξητικής ορμόνης και πέντε απλότυποι (A, B, C, D, και E) για το exon-5 για τη φυλή Black Bengal. Μετά συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων μίας άλλης φυλής αιγοπροβάτων (Churra da Terra Quente). Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν υψηλή γενετική μεταβλητότητα για τη φυλή Black Bengal.

---

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

---

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εξέταση της καταλληλότητας μεθόδων που χρησιμοποιούνταν ήδη για την μοριακό διαχωρισμό και την ταυτοποίηση ζωικών ειδών, αν θα μπορούσαν να είναι εξίσου αποτελεσματικές και στην γενετική ταυτοποίηση και τον μοριακό διαχωρισμό ορισμένων κοινών ερυθρών ειδών κρέατος (μοσχάρι και χοιρινό) τα οποία είναι σε μορφή αναμειξέων.

Οι μοριακοί δείκτες που εξετάστηκαν ήταν το γονίδιο 16srRNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι PCR-SSCP και PCR- RFLP. Για αυτόν το λόγο διεξήχθησαν μία σειρά πειραμάτων με στόχο την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού, ενός γονιδίου και μίας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, με τον οποία θα επιτυγχανάμε τον καλύτερο διαχωρισμό και την ταυτοποίηση μεταξύ ειδών κρέατος τα οποία βρίσκονται σε μορφή αναμειξέων. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε και για τις δύο μεθόδους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

---

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

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

---

#### 3.1. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

---

##### 3.1.1. Εξοπλισμός για την απομόνωση του DNA από ιστό κρέατος

Υλικά Εργαστηρίου

- Αυτόματες πιπέττες ακριβείας (Gilson) των 20 μl & 1000μl με τα αντίστοιχα ακρορύγχια (tips)
- Φιαλίδια erpendorf των 1,5 & 2 ml
- Στατώ

Αντιδραστήρια-Διαλύτες

- TNES-Urea Buffer
  - Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) (10μg/μl)
  - Φαινόλη (Phenol) 90%
  - Χλωροφόρμιο (Chloroform)
  - Ισοαμυλική Αλκοόλη (isoamyl alcohol )
  - Διάλυμα οξικού νατρίου 3M (Sodium Acetate Buffer Solution)
  - Απόλυτη αιθανόλη (EtOH) 100%
  - Αιθανόλη συγκέντρωσης 70%
  - Αποστειρωμένο, διπλά απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O)
- **TNES-Urea Buffer** (200 ml) : 2 ml **Tris -HCl** (0,01M) (1M pH 7.5) + 5 ml **NaCl** (0,125M) (5 M) + 2 ml **EDTA-2Na** (0,005M)(0.5 M pH 7.5) + 10 ml **SDS** (0,5%)(10%) + 48.05 g **Urea** (4M) + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο 200 ml.



## Συσκευές

- Κυκλικός αναδευτήρας
- Κλίβανος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος [Eppendorf – 5810R]
- Καταψύκτης
- Απαγωγός εστία εργασίας
- Αναδευτήρας Vortex

### 3.1.2. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή (gel) αγαρόζης

#### Υλικά Εργαστηρίου

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

#### Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη
  - TAE 1X
  - Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr) (10mg/ml)
  - Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer)
- **TAE 50X** (500ml): 121g **Tris Base** (1.98M) + 28.5ml **Acetic Acid** (0.95M) + 50ml **EDTA** (0,05M)0.5M + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο 500ml. Το TAE 1X παρασκευάζεται με αραιώση διαλύματος πυκνού TAE 50X (20 ml σε τελικό όγκο 1lt).
- **Loading buffer 6X** (10ml): 1ml **Bromophenol blue** 1% w/v (0,015M) + 0.5ml **TBE 20X** + 5ml **Glycerol** + **ddH<sub>2</sub>O** έως τελικό όγκο 10ml.

## Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής του πηκτώματος
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό μηχάνημα
- Συσκευή παροχής υπεριώδους (U.V.) ακτινοβολίας

### **3.1.3. Εξοπλισμός για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων (PCR)**

#### Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέττες ακριβείας των 2 μl, 10 μl, 20 μl και 100 μl με τα αντίστοιχα tips.
- Φιαλίδια erpendorfs των 200 μl
- Στατώ

#### Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O
- Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR Buffer)
- Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>) 50mM
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM το καθένα
- Εκκινητές (Primers)
- Taq DNA πολυμεράση 5U/μl

#### Συσκευές

- Θερμικοί κυκλοποιητές (Eppendorf – Mastercycler epgradient S)
- Φυγόκεντρος

### **3.1.4. Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου SSCP**

#### Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας των 10 και 100ml
- Tubes
- Πάγος

#### Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα SSCP buffer (φορμαμίδιο μπλέ της βρωμοφαινόλης {BPB}, κυανούν του ξυλαινίου {XC} και υδροξείδιο του νατρίου {NaOH})
- PCR προϊόν των δειγμάτων μας

#### Συσκευές

- Φυγόκεντρος
- Θερμοκυκλοποιητής (cyclogene)

### **3.1.5. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση των SSCP σε πηκτή πολυακρυλαμίδης**

#### Υλικά Εργαστηρίου

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

#### Αντιδραστήρια

- Διπλά αποσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O
  - Ακρυλαμίδη (acrylamide) 99%
  - Δις- ακρυλαμίδη (bis-acrylamide)
  - TBE 10X
  - TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99%
  - APS 20% w/v
  - Loading buffer
- **TBE 10X ( 2lt) :** 216gr Tris Base (0,89M) + 110gr Boric Acid (0.89M) + 16,6 gr EDTA + ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο τα 2lt.

#### Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμίδης
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας (Yellow line)
- Συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό

### **3.1.6. Εξοπλισμός για την εμφάνιση (χρώση) των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης**

#### Υλικά Εργαστηρίου

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

#### Αντιδραστήρια

- Διπλά αποσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O
- EtOH 100 %
- Οξικό οξύ (acetic acid) 99%
- Νιτρικός άργυρος (AgNO<sub>3</sub>)
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)
- Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH<sub>4</sub>)
- Φορμαλδεΰδη (formaldehyde) 37%

#### Συσκευές

- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης – ανακινούμενη πλάκα
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή προβολής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

#### **3.1.7. Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου RFLP**

##### Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας των 10 και 100 ml
- Φιαλίδια erpendorf των 500 ml
- Στατώ

#### Αντιδραστήρια

- Διπλά αποσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O
- Ρυθμιστικό διάλυμα πέψης (buffer) ανάλογα για το κάθε ένζυμο
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες : *Xba*I.

#### Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Κλίβανος

### **3.1.8. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση των RFLP σε πηκτική**

#### **πολυακρυλαμίδης**

Υλικά Εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- Ουρία (Urea)
  - Διπλά αποσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O
  - Ακρυλαμίδα (acrylamide) 99%
  - Δις- ακρυλαμίδα (bis-acrylamide)
  - TBE 10X
  - TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99%
  - APS 20% w/v
  - Loading buffer
- **TBE 10X ( 2lt) :** 216gr Tris Base (0,89M) + 110gr Boric Acid (0.89M) + 16,6 gr EDTA + ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο τα 2lt.

Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμίδης
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας (Yellow line)
- Συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό

### **3.1.9. Εξοπλισμός για την εμφάνιση (χρώση) των αποτελεσμάτων σε πηκτική**

#### **πολυακρυλαμίδης**

Υλικά Εργαστηρίου

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

- Μαγνήτης ανάδευσης

#### Αντιδραστήρια

- Διπλά αποσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O
- EtOH 100 %
- Οξικό οξύ (acetic acid) 99%
- Νιτρικός άργυρος (AgNO<sub>3</sub>)
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)
- Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH<sub>4</sub>)
- Φορμαλδεΰδη (formaldehyde) 37%

#### Συσκευές

- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης – ανακινούμενη πλάκα
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή προβολής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

---

## 3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 3.2.1. Δείγματα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ζωικά είδη: **μοσχάρι** (*Bos Taurus*) και **χοίρος** (*Sus domesticus*).

Δημιουργήσαμε αναμειξείς αυτών των δύο ειδών. Τα μείγματα αυτά που περιείχαν τα δύο είδη ήταν σε διάφορες αναλογίες. Οι αναλογίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλυφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί, μέσα στα πλαίσια βέβαια που θα μπορούσαν να εξαχθούν χρήσιμα αποτελέσματα. Οπότε από κάθε είδος χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα ιστού (5-100mg). Μικρότερη ποσότητα κρίθηκε ότι δεν θα ήταν, στην παρούσα φάση, εύστοχο να χρησιμοποιηθεί. Η συντήρησή τους έγινε στους -20<sup>0</sup>C. Στον πίνακα 3.2.1 παρουσιάζονται τα μείγματα που δημιουργήθηκαν στις διάφορες αναλογίες.

Πίνακας 3.2.1 : Αναμείξεις των δύο ζωικών ειδών (μοσχάρι-χοιρινό) σε διάφορες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν.

Μείγματα	Μοσχάρι	Χοιρινό	Χοιρινό	Μοσχάρι
(1)	95mg	5mg	95mg	5mg
(2)	90mg	10mg	90mg	10mg
(3)	80mg	20mg	80mg	20mg
(4)	70mg	30mg	70mg	30mg
(5)	60mg	40mg	60mg	40mg
(6)	50mg	50mg	50mg	50mg

### 3.2.2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής :

Πίνακας 3.2.2.: Σύσταση TNES-Urea Buffer.

TNes Urea	For 200ml final Conc.	final Conc
Tris	2 ml of 1M pH 7.5	10 mM
NaCl	5 ml of 5 M	125 mM
EDTA-2Na	2 ml of 0.5 M pH 7.5	10 mM
SDS	10 ml of 10%	0.5%
Urea	48.05 g	4 M

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνται οι ποσότητες ιστού που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf των 2 ml και προσθέτουμε 700 µl TNes Urea και 15 µl πρωτεΐνωση K (10 mg/ml).
2. Επιάζουμε τα δείγματα υπό ανάδευση στους 55°C για μια ώρα.
3. Προσθέτουμε 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.

4. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 min στους 4°C
5. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf και προσθέτουμε 1 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε έντονα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 5 min στους 4°C.
7. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf.
8. Προσθέτουμε 1 ml παγωμένη ισοπροπανόλη. Αναδεύουμε ήπια.
9. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για 30 min.
10. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 20 min στους 4°C
11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσπαθώντας να διατηρήσουμε ανέπαφο το ίζημα.
12. Προσθέτουμε 1 ml παγωμένη αλκοόλη 70%, αναδεύουμε ήπια.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 5 min στους 4°C.
14. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
15. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37° C, ώστε να ξηρανθεί το ίζημα.
16. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100 µl ddH<sub>2</sub>O και τοποθετούμε τα δείγματα είτε στο ψυγείο (4°C) είτε στην κατάψυξη (-20°C).

Η διάσπαση των κυττάρων, από τα οποία θα απομονωθεί το DNA, γίνεται με το NaCl, το οποίο ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, προκαλεί διόγκωση των κυττάρων και συνεπώς τη λύση τους. Η λύση των κυττάρων πρέπει να γίνεται σε κατάλληλο pH το οποίο ρυθμίζεται από το Tris – HCl (ρυθμιστικό διάλυμα). Το EDTA εμποδίζει τη δράση των νουκλεασών δεσμεύοντας με το χηλικό παράγοντα το Ca<sup>++</sup> ή το Mg<sup>+</sup>. Το EDTA μπορεί να δεσμεύσει 4 μονοσθενή ή 2 δισθενή κατιόντα. Το SDS είναι ιοντικό απορρυπαντικό που διασπά τη μεμβράνη του πυρήνα και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνάση K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, προστατεύοντας το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης pH 7 που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατινή φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη



70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 70%.

### **3.2.3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA**

Η συνολική ποσότητα του DNA στο εκάστοτε δείγμα ελέγχεται είτε με φωτομέτρηση του δείγματος είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v.

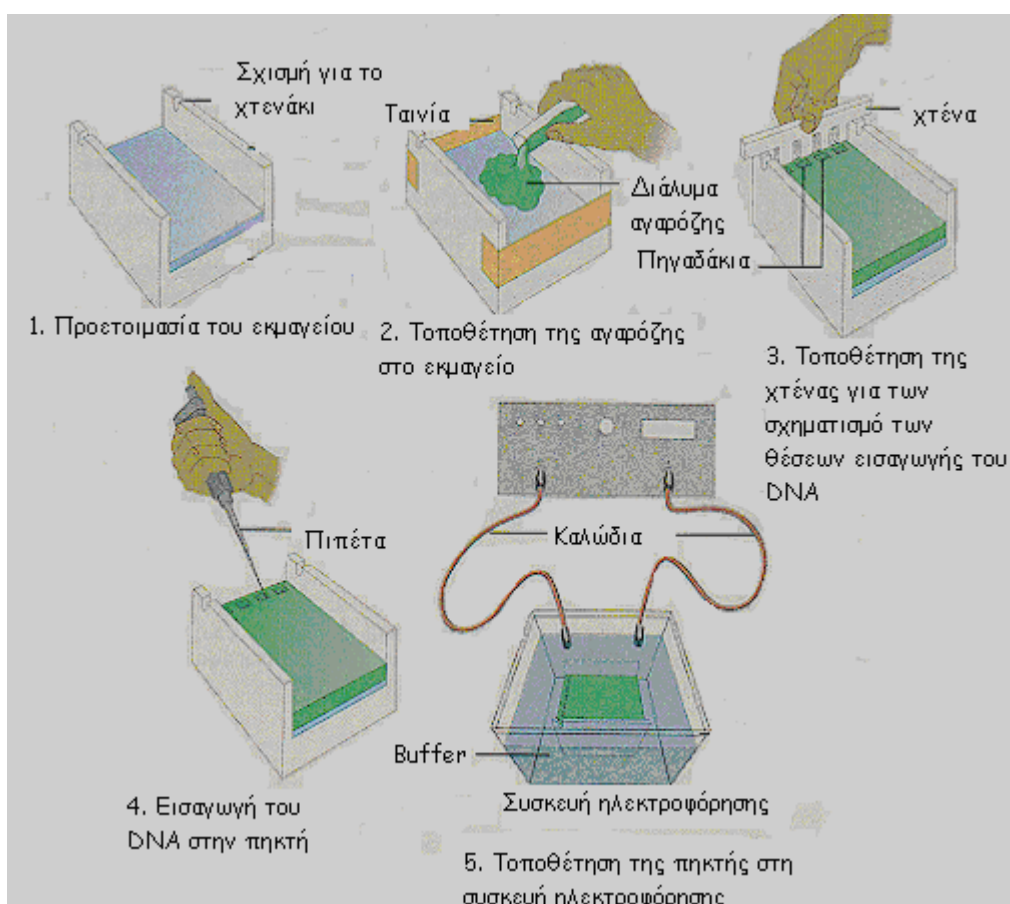
#### ***Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης***

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

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

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

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της μεγαλύτερης 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 buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αγαρόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.



Εικόνα 3.2.3. : Προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH<sub>2</sub>O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0,1% w/v

TBE 1X

Glycerol 8,7%

ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml

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

Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

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

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

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

### 3.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπως αναλύσαμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιείται ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινητών (primers), οι οποίοι είναι συνθετικά μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15 – 30 βάσεων, με αλληλουχία συμπληρωματική το καθένα για μία από τις αλυσίδες του DNA, και οριοθετούν την αλληλουχία που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Παρουσία του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών, περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού.

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

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

**Αποδιάταξη:** το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο, μέσω της θέρμανσής του σε υψηλή θερμοκρασία (94°-95°C).

**Υβριδοποίηση εκκινητών:** οι δύο εκκινητές υβριδοποιούνται με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών (50°-65°C).

**Επέκταση των εκκινητών (πολυμερισμός):** σύνθεση DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 16S RNA BM Rv και 16S RNA BM Fw. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2.4.1.

Πίνακας 3.2.4.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA, όπου Y= C ή T

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

Για την διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.4.2. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Έπειτα τοποθετούμε σε φιαλίδια erppendorf 1μl εκμαγείου DNA το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα 200-700ng.

Πίνακας 3.2.4.2: Συστατικά αντίδρασης PCR

<b>Συστατικά αντίδρασης PCR</b>	<b>Ποσότητες συστατικών αντίδρασης PCR</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
<b>DNA εκμαγείο</b>	~ 200 ng	
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα 10X</b>	5 μl	1X
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</b>	2 μl	2mM
<b>dNTPs (40mM)</b>	1 μl	0,8mM
<b>Εκκινητής Forward (50pmol/ml)</b>	1 μl	1pmol/ml
<b>Εκκινητής Reverse (50pmol/ml)</b>	1 μl	1pmol/ml
<b>Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)</b>	0,2 μl	1unit
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	έως τα 50 μl	

. Στην συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε eppendorf που περιέχει το DNA, από 49μl του master mix. Επίσης, σε ένα eppendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή (Εικ 3.2.4.1.) ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου.



Εικόνα 3.2.4.1.: Θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για την αντίδραση PCR.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* είναι:

**Αρχική αποδιάταξη :** 95° C για 4 min

**Αποδιάταξη:** 95° C για 40 sec

**Υβριδοποίηση:** 53° C για 50 sec

**Επιμήκυνση:** 72° C για 50 sec

**Τελική επιμήκυνση:** 72° C για 10 min

} 35 κύκλοι

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

Μετά τον διαχωρισμό των τμημάτων του DNA, το προϊόν της PCR μπορεί να ανιχνευθεί από το αναμενόμενο μέγεθός του, το οποίο προσδιορίζεται από την σύγκριση με τα τμήματα γνωστού μήκους του μάρτυρα (Dieffenbach *et al*, 2003). Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών με τη μέθοδο SSCP.

### **3.2.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)**

Η ανάλυση SSCP, όπως αναφέραμε και στις μοριακές τεχνικές, βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στη πηκτή και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα οφείλεται στη διαφορετική δομή που λαμβάνουν μονόκλωνα μόρια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μόνο μία βάση (Orita *et al.*, 1989). Έτσι, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν ενισχυθεί με PCR, από διαφορετικά άτομα και που παρουσιάζουν νουκλεοτιδικές διαφορές, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση και επομένως θα είναι δυνατή η διάκρισή τους.

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

#### **3.2.5.1. Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιάταξη των προϊόντων PCR**

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα:

##### Αποδιατακτικό διάλυμα

Formamide 95%

Bromophenol blue 0,05%

Xylene Cyanol 0,05%

NaOH 10 mM

Σε 5-7 μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος και τα δείγματα αποδιάσσονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλωνα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλωνη κατάσταση. Τέλος με μικροπιπέττα τα τοποθετούμε στα πηγαδάκια του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

### **3.2.5.2. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης**

Στην ανάλυση SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών οι οποίες με την σειρά τους διασυνδέονται παρουσία της N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης, ενός μορίου διασυνδέτη και έτσι σχηματίζεται ένα πορώδες πήκτωμα. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης παίζει σημαντικό ρόλο στην SSCP και αυτό γιατί υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να μειώσουν το επίπεδο της διακριτικής ικανότητας, επομένως είναι πολύ σημαντικό η ηλεκτροφόρηση να πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία. Ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας είναι το pH. Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ακρυλαμίδης μειώνει το pH και το αποτέλεσμα είναι η αυξημένη ευαισθησία της SSCP (Kukita *et al*, 1997). Επίσης το μήκος των τμημάτων επηρεάζει την ανάλυση SSCP και για βέλτιστα αποτελέσματα το μέγεθος των τμημάτων DNA θα πρέπει να εμπίπτει εντός του εύρους 150 με 300 bp. Ωστόσο, η παρουσία γλυκερόλης στο πήκτωμα μπορεί να επιτρέψει ανάλυση και μεγαλύτερου μεγέθους τμήματα DNA σε αποδεκτή ευαισθησία. Τέλος, σημαντική επίδραση στην διακριτική ικανότητα έχει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος που επιλέγεται με βάση το μέγεθος του DNA και καθορίζεται από την συγκέντρωση του πηκτώματος (Sunnucks *et al*, 2000).

Για την παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

→ Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (100ml)

Ακρυλαμίδη 37,5g

Bis-acrylamide 1g

ddH<sub>2</sub>O έως τα 100ml

→ TBE 10x (2lt)

Tris Base 0,5 M

Boric acid 0,04 M

EDTA 0,02 M

ddH<sub>2</sub>O έως τα 2lt

→ Glycerol 50% v/v



→ APS 20% w/v

Ammonium Persulfate 2gr

ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml

→ TEMED (Tetramethylethylenediamine)

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 10%.

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 10% αναγράφονται στον Πίνακα 3.2.5.2.

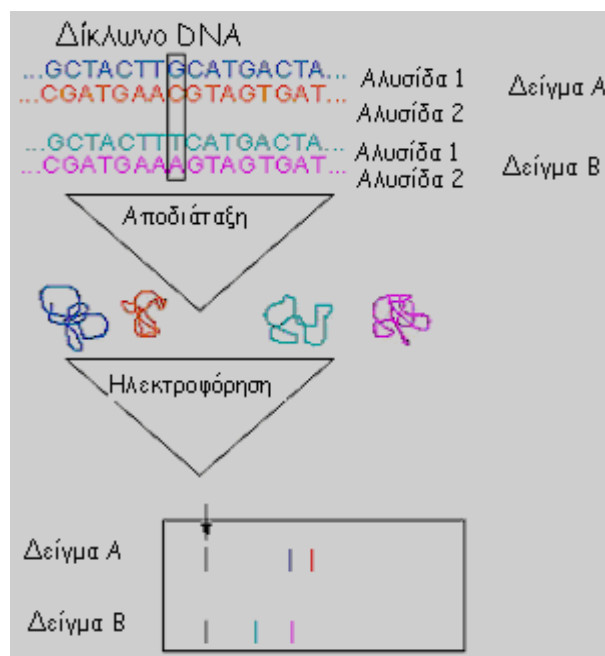
Πίνακας 3.2.5.2.: Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%

Σύσταση	Ποσότητα	Τελικές συγκεντρώσεις
<b>Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%</b>	16 ml	10%
<b>Glycerol 50%</b>	6,25 ml	5%
<b>TBE 10x</b>	5 ml	0,8%
<b>TEMED</b>	62,5 μl	
<b>APS 20%</b>	310 μl	0,1%
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως τα 62,5 ml	
<b>Συνολικός όγκος</b>	62,5 ml	

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

- Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής του πηκτώματος.
- Σε ποτήρι ζέσεως αναδεύουμε τα παραπάνω υλικά με μαγνητάκι εκτός από τα TEMED, APS.
- Φιλτράρουμε με διηθητικό χαρτί και σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο ρίχνουμε προσεκτικά (ροή σταγόνας) το διάλυμα.
- Συμπληρώνουμε μέχρι τα 62,5 ml με νερό και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.

- Προσθέτουμε τα TEMED και APS. Τα διαλύματα αυτά πολυμερίζουν την ακρυλαμίδα. Μετά την προσθήκη γίνεται μια σύντομη ανάδευση του μίγματος, ρίχνουμε γρήγορα το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούμε τα χτενάκια για να δημιουργήσουμε τα πηγαδάκια
- Περιμένουμε να πήξει το διάλυμα, αφαιρούμε τα χτενάκια και καθαρίζουμε τα πηγαδάκια.
- Προσθέτουμε 0.5X TBE στην συσκευή.
- Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια και αρχίζει η ηλεκτροφόρηση στα 240V σε RT overnight.



Εικόνα 3.2.5.2.: Ανίχνευση μεταλλαγής μιας βάσης με τη μέθοδο SSCP

### **3.2.5.3. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining)**

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook *et al.*, 2000).

Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 2%

Acetic Acid 0,125%

ddH<sub>2</sub>O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO<sub>3</sub> 1gr/lt

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 0,015 M

NaBH<sub>4</sub> 50 μM

Formaldehyde 0,2%

ddH<sub>2</sub>O έως τα 200ml

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

Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα νιτρικού αργύρου και οι πηκτές επωάζονται για 15 min υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1 min η κάθε μία υπό ανάδευση.

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

### **3.2.6. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους με ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)**

#### **3.2.6.1. Θεωρητικός υπολογισμός RFLP**

Βάσει των αλληλουχιών των 2 ειδών για το τμήμα που μελετάμε, τις οποίες βρήκαμε στη βάση δεδομένων **GenBank** (sequence database), ελέγχθηκαν οι αλληλουχίες των 2 ειδών με όλα τα διαθέσιμα ένζυμα με το πρόγραμμα BioEdit και καταλήξαμε σε 1 ένζυμο το οποίο διαχωρίζει τα είδη μας. Το ένζυμο αυτό το χρησιμοποιήσαμε στα PCR προϊόντα των αναμειξέων που δημιουργήσαμε με σκοπό να ταυτοποιήσουμε και τα 2 είδη σε όλες τις αναμειξείς.

#### **3.2.6.2. Ανάλυση RFLP**

Με τη μέθοδο RFLP γίνεται χρήση κατάλληλων ενδονουκλεασών περιορισμού οι οποίες ως «μοριακά ψαλίδια» έχουν την ικανότητα να κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη ενδονουκλεάση. Οι αλληλουχίες τις οποίες στοχεύουν οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι βραχείες (γενικά έχουν μήκος 4-8 ζεύγη νουκλεοτιδίων). Πιο συγκεκριμένα, τα RFLPs βασίζονται στο γεγονός ότι προκύπτουν πολυμορφισμοί του DNA μετά από αλλαγές κατά μήκος της αλληλουχίας των βάσεων του. Αυτό έχει ως συνέπεια να υπάρχουν παραλλαγές στο μήκος του κλάσματος που προκύπτει μετά από πέψη του DNA με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Επομένως, τα RFLPs προκύπτουν από αλλαγές στο DNA που αφορούν συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε πέψη των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν με το ένζυμο περιορισμού *XbaI*. Καταλήξαμε σε αυτό το ένζυμο έπειτα από έρευνα και δοκιμές και με άλλο ένζυμο περιορισμού.

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

- Σε φιαλίδιο erppendorf των 500μl προσθέτουμε 2μl από το PCR προϊόν
- Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που έχουμε, παρασκευάζουμε σε ένα φιαλίδιο erppendorf το διάλυμα πέψης, η σύσταση του οποίου περιέχει τις εξής ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα :

- Διάλυμα πέψης : 6,6μl ddH<sub>2</sub>O + 1μl από το αντίστοιχο buffer του ενζύμου + 0,4μl ενζύμου (ποσότητα που αναφέρεται σε δραστηκότητα 10U/μl)
- Μοιράζουμε στο κάθε δείγμα 8μl από το διάλυμα πέψης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10μl.
- Επιάζουμε στον κλίβανο στην άριστη θερμοκρασία για την δράση του ενζύμου (συνήθως είναι στους 37°C) για 3h τουλάχιστον.

### **3.2.6.3. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης**

Στην ανάλυση RFLP κάνουμε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, όπου είναι μία κάθετη ηλεκτροφόρηση. Η αρχή της μεθόδου αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα καθώς είναι η ίδια μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε και στην ανάλυση SSCP, με ελάχιστες διαφορές.

Για την παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

→ Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% (100ml)

Ακρυλαμίδη 37,5g

Bis-acrylamide 1g

ddH<sub>2</sub>O έως τα 100ml

→ TBE 10x (2lt)

Tris Base 0,5 M

Boric acid 0,04 M

EDTA 0,02 M

ddH<sub>2</sub>O έως τα 2lt

→ APS 20% w/v

Ammonium Persulfate 2gr

ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml

→ TEMED (Tetramethylethylenediamine)

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 8% αναγράφονται στον Πίνακα 3.2.6.3.

Πίνακας 3.2.6.3.: Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

Σύσταση	Ποσότητα	Τελικές συγκεντρώσεις
<b>Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%</b>	16,6 ml	10%
<b>Ουρία</b>	8gr	
<b>TBE 10x</b>	6,5 ml	0,8%
<b>TEMED</b>	62,5 μl	
<b>APS 20%</b>	325 μl	0,1%
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως τα 62,5 ml	
<b>Συνολικός όγκος</b>	62,5 ml	

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

- Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής του πηκτώματος.
- Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 8gr ουρία και 16,6 ml διαλύματος ακρυλαμίδης 30% + 6,5ml TBE 10%. Αναδεύουμε μέχρι πλήρους διάλυσης των συστατικών.
- Φιλτράρουμε με διηθητικό χαρτί και σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο ρίχνουμε προσεκτικά (ροή σταγόνας) το διάλυμα.
- Συμπληρώνουμε μέχρι τα 62,5 ml με νερό και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
- Προσθέτουμε τα 62,5μl TEMED και 325μl APS. Μετά την προσθήκη γίνεται μια σύντομη ανάδευση του μίγματος, ρίχνουμε γρήγορα το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούμε τα χτενάκια για να δημιουργήσουμε τα πηγαδάκια
- Περιμένουμε να πήξει το διάλυμα, αφαιρούμε τα χτενάκια και καθαρίζουμε τα πηγαδάκια.
- Προσθέτουμε 1X TBE στην συσκευή.

- Προετοιμάζουμε τα δείγματα αναμειγνύοντας 4μl loading buffer με όλη την ποσότητα του διαλύματος που βρίσκεται στο eppendorf.
- Φορτώνουμε τα δείγματα στην πηκτή. Στην πρώτη θέση τοποθετούμε marker των 100bp.
- Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση για 2,5h με σταθερή τάση 200 volts.

#### **3.2.6.4. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining)**

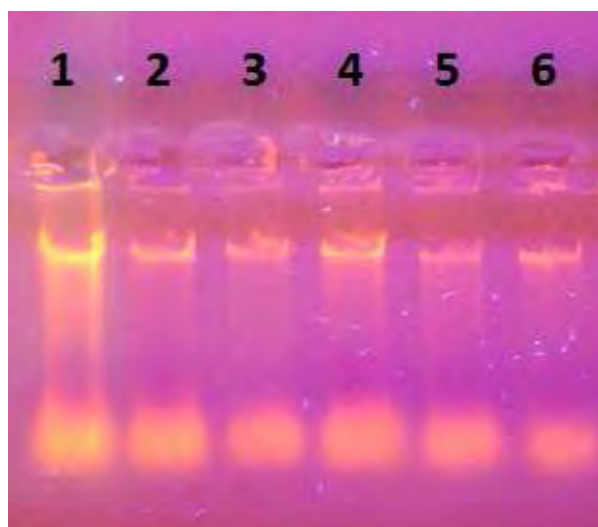
Η χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης γίνεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που αναφέραμε αναλυτικά προηγουμένως στη μέθοδο SSCP, όπου εδώ αντίστοιχα θα πάρουμε ζωνώσεις RFLP.

---

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

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



Εικόνα 4.1.: Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2%: 1) M/X 95:5, 2) M/X 90:10, 3) M/X 80:20, 4) M/X 70:30, 5) M/X 60:40, 6) M/X 50:50.

Όπου: **M/X 95:5** → μοσχάρι 95mg και χοιρινό 5mg

**M/X 90:10** → μοσχάρι 90mg και χοιρινό 10mg

**M/X 80:20** → μοσχάρι 80mg και χοιρινό 20mg

**M/X 70:30** → μοσχάρι 70mg και χοιρινό 30mg

**M/X 60:40** → μοσχάρι 60mg και χοιρινό 40mg

**M/X 50:50** → μοσχάρι 50mg και χοιρινό 50mg

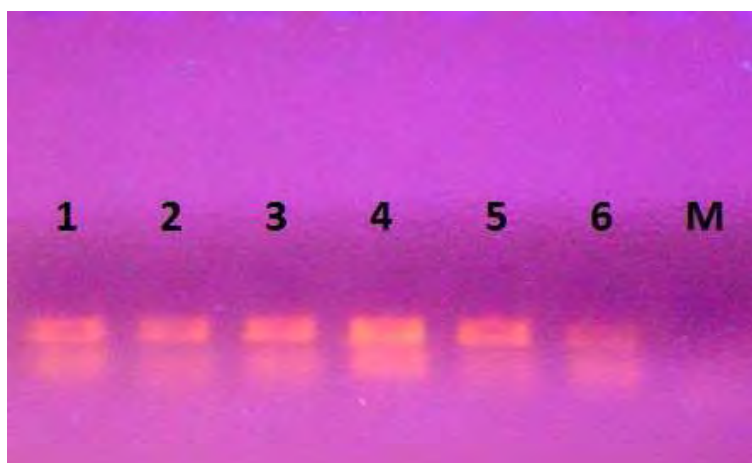
(Οι συντομογραφίες αυτές θα χρησιμοποιηθούν σε όλες τις εικόνες που παρουσιάζονται στη συνέχεια.)



Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν. Εκτός από τις αναμειξείς όπου ήταν κυρίαρχο το είδος του μοσχαριού κάναμε και αναμειξείς όπου το χοιρινό ήταν κυρίαρχο όσο αναφορά την ποσότητά του, με τις ίδιες αναλογίες. Σε όλες τις αναμειξείς έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2%.

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

Στην συνέχεια, με PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 16s RNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αгарόζης 2% για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος PCR. Η Εικόνα 4.2. είναι ενδεικτική της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αгарόζης 2%.



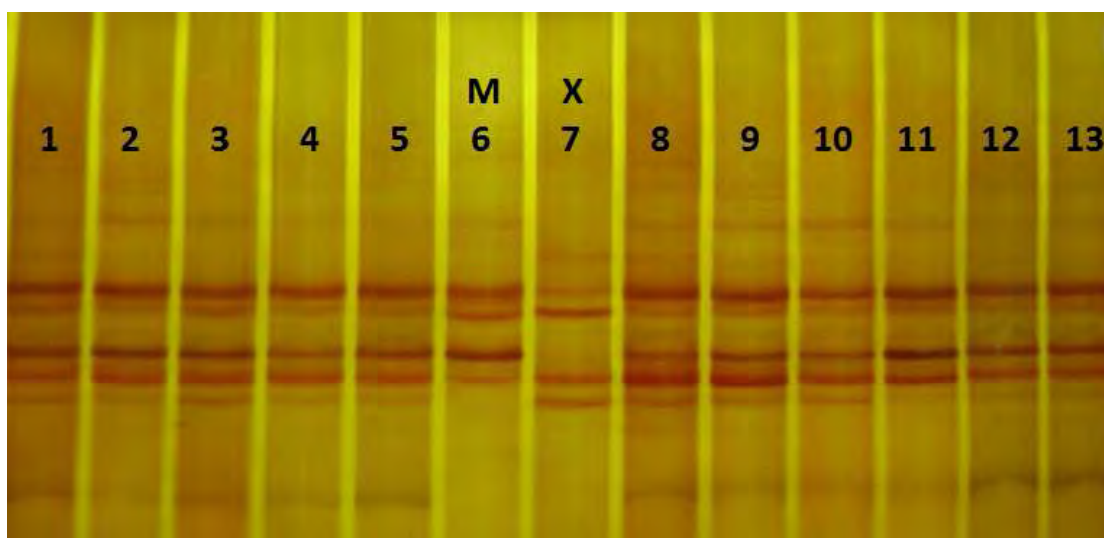
Εικόνα 4.2.: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αгарόζης 2%: 1) M/X 95:5, 2) M/X 90:10, 3) M/X 80:20, 4) M/X 70:30, 5) M/X 60:40, 6) M/X 50:50.

Τα προϊόντα pcr βρέθηκε ότι έχουν μέγεθος: 243bp για το μοσχάρι, *Bos taurus*, και 247bp για το χοιρινό, *Sus scrofa*.

Εκτός από την ανάλυση των αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR-SSCP για τον έλεγχο ικανού διαχωρισμού των ειδών με αυτή τη μέθοδο, που αποτελεί πιο οικονομική και άμεση επιλογή από την αλληλούχηση των προϊόντων PCR.

Η SSCP πραγματοποιήθηκε για όλες τις αναμείξεις που προαναφέραμε, χρησιμοποιώντας τα PCR προϊόντα που βρέθηκαν προηγουμένως.

Στην επόμενη εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης SSCP (ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης) ενδεικτικά για τα μείγματα μοσχάρι/χοιρινό, χοιρινό/μοσχάρι στις αναλογίες που έχουμε αναφέρει.



Εικόνα 4.3.: Ανάλυση SSCP των δειγμάτων που περιείχαν μοσχάρι/χοιρινό σε ορισμένες: 1) M/X 95:5, 2) M/X 90:10, 3) M/X 80:20, 4) M/X 60:40, 5) M/X 50:50, 6) M, 7) X, 8) X/M 95:5, 9) X/M 90:10, 10) X/M 80:20, 11) X/M 70:30, 12) X/M 60:40, 13) X/M 50:50.

Όπου **M** και **X** είναι τα πρότυπα : M- μοσχάρι και X- χοιρινό

Το αποτέλεσμα ήταν ο ικανός διαχωρισμός των ειδών, με την ανάλυση PCR-SSCP. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ειδών αλλά όχι η ταυτοποίησή τους.

Στη δική μας μελέτη αρχικά μας ενδιαφέρει με τη μέθοδο SSCP να διαπιστώσουμε αν γίνεται ο διαχωρισμός των ειδών ακόμη και σε αναμείξεις στις διάφορες ποσότητες που καθορίσαμε. Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα οι ζωνώσεις μαρτυρούν ότι διαχωρίζονται τα δύο είδη. Επίσης ταυτίζονται και τα δύο είδη με τα πρότυπά τους οπότε είμαστε σίγουροι για τα είδη που χρησιμοποιήσαμε. Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η ένταση των ζωνώσεων διαφέρει από ποσότητα σε ποσότητα. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα ενός είδους κρέατος σε κάθε

ανάμειξη, τόσο πιο έντονη είναι η ζώνη του. Όταν προχωράμε σε μικρότερες ποσότητες, οι ζωνώσεις γίνονται πιο αγνές.

Εκτός από την τεχνική SSCP, εφαρμόσαμε και την τεχνική RFLP για όλα τα δείγματα, τις αναμειξείς μοσχαριού/χοιρινού στις ίδιες αναλογίες, ακριβώς όπως στην προηγούμενη τεχνική.

Η ανάλυση RFLP είναι μία από τις μεθόδους που μπορούν, όπως είπαμε, να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR για τον προσδιορισμό διαφορών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας και ειδικότερα στην μοριακή ταυτοποίηση διαφόρων οργανισμών, στην περίπτωσή μας στα δύο ζωικά είδη.

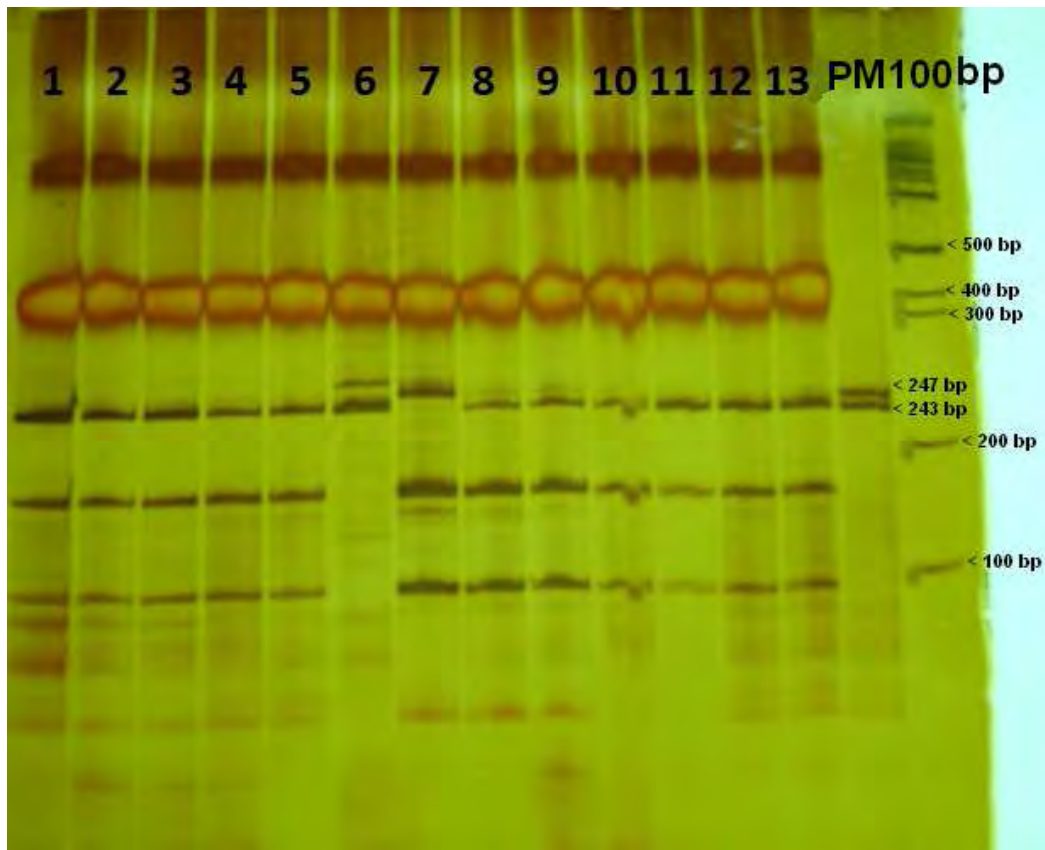
Επιλέξαμε μετά από έρευνα (με το πρόγραμμα BioEdit) να χρησιμοποιήσουμε το ένζυμο *XbaI* το οποίο διαχωρίζει τα είδη μας. Το ένζυμο αυτό το χρησιμοποιήσαμε στα PCR προϊόντα των αναμειξέων που δημιουργήσαμε με σκοπό να ταυτοποιήσουμε και τα δύο είδη σε όλες τις αναμειξείς.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί, η ταυτοποίηση των ειδών μας ήταν επιτυχής για το μοσχάρι και για το χοιρινό.

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το *XbaI* δεν πέπτει το προϊόν PCR του μοσχαριού, *Bos taurus*. Ενώ, όμως το προϊόν της PCR του χοιρινού, *Sus scrofa*, πέπτει σε μία θέση, δημιουργώντας 2 τμήματα μεγέθους **143bp** και **104bp**.

Στην εικόνα μπορούμε να παρατηρήσουμε τη θέση όπου πέπτει το είδος *Sus scrofa* και τα πρότυπα (ζωνώσεις) που πήραμε για το κάθε είδος κρέατος.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να διευκρινίσουμε ότι στα RFLP είναι δύσκολο να προσδιοριστεί επακριβώς το μέγεθος του κάθε τμήματος περιορισμού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο με τη διαδικασία της αλληλούχησης των τμημάτων αυτών. Στα RFLP μας ενδιαφέρει πρωταρχικός να παίρνουμε από την πέψη διαφορετικά αποτυπώματα για το κάθε είδος και στη συνέχεια το μέγεθος υπολογίζεται κατά προσέγγιση με βάση το μάρτυρα που έχουμε χρησιμοποιήσει.



Εικόνα 4.4.: Ανάλυση RFLP μειγμάτων μοσχάρι/χοιρινό σε διάφορες ποσότητες: 1) M/X 95:5, 2) M/X 90:10, 3) M/X 80:20, 4) M/X 60:40, 5) M/X 50:50, M, X, 6) X/M 95:5, 7) X/M 90:10, 8) X/M 80:20, 9) X/M 70:30, 10) X/M 60:40, 11) X/M 50:50, P : PCR προϊόν, M100 : Ladder 100bp.

Όπου: **M** και **X** είναι τα πρότυπα : M- μοσχάρι και X- χοιρινό

**M/X 95:5** → μοσχάρι 95mg και χοιρινό 5mg

**M/X 90:10** → μοσχάρι 90mg και χοιρινό 10mg

**M/X 80:20** → μοσχάρι 80mg και χοιρινό 20mg

**M/X 60:40** → μοσχάρι 60mg και χοιρινό 40mg

**M/X 50:50** → μοσχάρι 50mg και χοιρινό 50mg

**X/M 95:5** → χοιρινό 95mg και μοσχάρι 5mg

**X/M 90:10** → χοιρινό 90mg και μοσχάρι 10mg

**X/M 80:20** → χοιρινό 80mg και μοσχάρι 20mg

**X/M 70:30** → χοιρινό 70mg και μοσχάρι 30mg

**X/M 60:40** → χοιρινό 60mg και μοσχάρι 40mg

**X/M 50:50** → χοιρινό 50mg και μοσχάρι 50mg

---

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

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

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με σκοπό τον διαχωρισμό και την μοριακή ταυτοποίηση ειδών ερυθρού κρέατος αλλά υπό μορφή αναμειξεων των ειδών. Η διαδικασία στηρίχτηκε στον πολυμορφισμό που εμφανίζουν ορισμένοι γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Στόχος ήταν να επιτευχθεί ο έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με μοριακούς δείκτες.

Στο παρελθόν έχει μελετηθεί η ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ ζωικών οργανισμών από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι ανέπτυξαν ποικίλες μοριακές τεχνικές όπως τα RAPD, AFLP, DNA sequencing, Multiplex PCR και RFLP. Όμως στις περισσότερες εξ αυτών δεν χρησιμοποιήθηκε ως γενετικός δέκτης το γονίδιο 16s rRNA καθώς και ελάχιστες από αυτές τις μελέτες συνδύασαν τις τεχνικές PCR-SSCP και PCR-RFLP για είδη κρεάτων σε μορφή αναμειξεων.

Αρχικά χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR-SSCP, αναλύσαμε ένα τμήμα του γονιδίου 16s rRNA του μιτοχονδριακού DNA. Το μήκος του τμήματος του γονιδίου

που αναλύσαμε ήταν μεγέθους 243bp για το μοσχάρι (*Bos Taurus*) και 247bp για το χοιρινό (*Sus scrofa*). Έπειτα εφαρμόστηκε η τεχνική PCR-RFLP στο ίδιο τμήμα του γονιδίου 16s rRNA, χρησιμοποιώντας το ένζυμο περιορισμού *XbaI*.

Και οι δύο τεχνικές που χρησιμοποιήσαμε χαρακτηρίζονται από υψηλή επαναληψιμότητα, είναι αξιόπιστες, σχετικά γρήγορες και οικονομικές. Τα στάδια που λαμβάνουν μέρος είναι τέσσερα και στις δύο τεχνικές και είναι ίδια εκτός από το τρίτο στάδιο. Αυτά είναι τα εξής : **1)** απομόνωση του mtDNA από ιστό κρέατος, **2)** ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών τόπων, **3)** αποδιάταξη των τμημάτων DNA για την SSCP και πέψη με ένζυμο περιορισμού για την RFLP και τέλος **4)** ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Με τη μέθοδο της απομόνωσης λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA από μικρή ποσότητα ιστού κρέατος. Αρκετά τμήματα του μιτοχondριακού DNA είναι συντηρημένα, δίνοντας τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε παγκόσμιους εκκινητές, για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου 16s rRNA. Η χρήση των εκκινητών αυτών, απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων, μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, ήταν ικανοποιητική, δίνοντας ευδιάκριτες ζωνώσεις και στις δύο τεχνικές.

Με την τεχνική SSCP αποκαλύφθηκαν 2 πρότυπα, όσα και τα είδη που χρησιμοποιήσαμε, σε όλες τη σειρά των αναμειξεων ενώ με την τεχνική RFLP, χρησιμοποιώντας το ένζυμο περιορισμού *XbaI*, επιτύχαμε το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των δύο ειδών κρέατος (μοσχαρίσιου και χοιρινού) σε όλες τις αναμειξεις.

Με τις μεθόδους και τα αποτελέσματα που αναφέραμε φαίνεται ότι είναι εφικτός ο έλεγχος προσμίξεων κρεάτων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ο δείκτης που χρησιμοποιήσαμε, είναι ικανός να εντοπίσει διαφορετικά είδη κρέατος μέσα σε ένα τρόφιμο. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να καταστήσει τον μοριακό αυτό δείκτη πολύτιμο εργαλείο στον έλεγχο της αυθεντικότητας και την καταπολέμηση της νοθείας τροφίμων ζωικής προέλευσης κατά την πορεία την εμπορίας τους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αλαχιώτης, Σ., Ν. (2005) *Εισαγωγή στη γενετική*. Αθήνα: Ελληνικά Γράμματα
- Aravanopoulos, F., A. (2003) Molecular Identification of Micropropagation Plants. Edited by: Economou, A., S. *Asta Horticulturae* 616, 24-47.
- Aranceta-Garza, F., Perez-Enriquez, R., Cruz, P. (2011) PCR-SSCP method for genetic differentiation of canned abalone and commercial gastropods in the Mexican retail market. *Food Control*, 22, 1015-1020.
- Arvanitoyannis, I. S. (2005) Techniques for detecting fish and seafood authenticity. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 237–263
- Asensio, L., Isabel, Gonzalez, I., Garcia, T., Martin, R. (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19, 1–8.
- Ashoor, S. H., Monte, W. C., Stiles, P. G. (1988) Liquid chromatographic identification of meats. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 397–403.
- Asin-Cayuela J. and Gustafsson C.M., (2007) Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells, *Trends in Biochemical Sciences* Vol.32 No.3
- Ballin, N., Vogensen, F. K., Karlsson, A. H. (2009) Review Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83, 165–174.
- Ballin, N. Z. (2010) Review: Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86, 577–587.
- Baxevanis A.D., Triantaphyllidis G.V., Kappas I., Triantafyllidis A., Triantaphyllidis C.D., Abatzopoulos T.J. (2005) Evolutionary assessment of *Artemia tibetiana* (Crustacea, Anostraca) based on morphometry and 16S rRNA RFLP analysis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43: 189-198.
- Berg J., Tymoczko J. and Stryer L., (2002) “Biochemistry, 5th edition”. W.H. Freeman and Company, New York. Section 27.2 and 27.2.4. Διαθέσιμο on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A3769>.
- Botstein D., White R., Skolnick M., Davis R. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32 (3):314-319
- Bruford M., Bradley D., Luikart G., (2003) DNA Markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature* 2003. Vol.4 900-910
- CAC (Codex Alimentarius Commission) Discussion paper on traceability/product tracing in the context of food import and export inspection and certification systems, Codex Committee on food import and export inspection and certification systems, Alinorm 04/27/33A, Appendix IV
- Calvo, J. H., Zaragoza, P., & Osta, R. (2001) A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *Journal of American Society of Animal Science*, 79, 2108–2112
- Chen, S., Liu, Y., Yao, Y., (2010). Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene, *J. Genet. Genomics* 37, 763-769
- Ebbehoj, K. F., Thomsen, P. D. (1991a) Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Science*, 30, 221–234.
- Ebbehoj, K. F., Thomsen, P. D. (1991b) Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Science*, 30, 359–366.
- ΕΣΥΕ: Μηνιαίο Στατιστικό Δελτίο (2008), Τόμος 54-52, No 12-10
- Eurostat: Farm structure in Greece (2005),

[http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics\\_explained/index.php/Farm\\_structure\\_in\\_Greece](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Farm_structure_in_Greece))

- Dieffenbach, W., C., and Dveksler S., G., (1995) *PCR Primer. A Laboratory manual*. Cold Spring Laboratory Press.
- Διαμαντίδης, Γ. (1994) Εισαγωγή στην Βιοχημεία. Εκδόσεις University Studio Press. Θεσσαλονίκη.
- EE: Regulation (EC) No 178/2002, **32002R0178**, **Eur-lex**, Access to European Union law, (<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32002R0178:EN:NOT>)
- EE: Οδηγία 2000/13/EK ([Ευρωπαϊκό κείμενο Οδηγία 2000/13/EK](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2000L0013:20090807:EL:PDF)), Επίσημη Τροφίμων, (<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2000L0013:20090807:EL:PDF>)
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., Martín, R. (2007) Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, Vol. 76, Issue 2, 234–240.
- Fajardo, V., Gonzalez, I., Martin, I., Rojas, M., Hernandez, P.E., Garcia, T., Martin R., (2008) Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes, *Meat Science* 78, 314–322
- Fajardo, V., Gonzalez, I., Rojas, M., Garcia, T., Martin, R. (2010) A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 408-421
- FAO (2005) World fisheries technical report. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Fernandez, S., Costa, A., Katsuyama, A., Madeira, A., Gruber, A. (2003) A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of *Eimeria* spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. *Parasitology research*, 89 (6), 437–445.
- 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, 696–699.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Santhosh, F. H., Bhilegaonkar, K. N., Agarwal, R. K., Kondaiah, N., Nagappa, K. (2007) Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species. *Vet. Res. Commun.*, 31, 447–455.
- Gupta, N., Ahlawat, S.P.S., Kumar, D., Gupta, S.C., Pandey, A., Malik, G., (2007). Single nucleotide polymorphism in growth hormone gene exon-4 and exon-5 using PCR-SSCP in Black Bengal goats – A prolific meat breed of India, *Meat Science* 76, 658–665
- Haider, N., Nabulsi, I., Al-Safadi, B. (2012) Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Science*, 90, 490–493.
- Hajmeer, M., Cliver, D. O., Provost, R. (2003) Spinal cord tissue detection in comminuted beef: comparison of two immunological methods. *Meat Science*, 65, pp. 757-763.
- Haunshi, S., Basumatary, R., Girish, P.S., Doley, S., Bardoloi, R.K., Kumar, A., (2009) Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin, *Meat Science* 83, 454–459  
<http://www.baxtek.com/software/scoringag/index.php>  
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>  
<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>



- Hunt, M. (2006). Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina (<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>)
- Ilhak, O. I., Arslan, A. (2007) Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 31, 159–163.
- ISO: Διεθνές Πρότυπο ISO 22005: Ιχθυλασιμότητα στην εφοδιαστική αλυσίδα τροφίμων και ζωοτροφών – Γενικές αρχές και βασικές προδιαγραφές για το σχεδιασμό και την υλοποίηση Συστημάτων Ιχθυλασιμότητας. 1η Έκδοση: 15-07-2007. <http://www.iso.org/>
- Karabasanavara, N. S., Singha, S. P., Umapathi, V., Kumarc, D., Patil, G., Shebannavare, S. N. (2011) A highly specific PCR assay for identification of raw and heat treated mutton (*Ovis aries*). *Small Ruminant Research*, 100, 153–158
- Κουτσουμανής, Κ. (2008) Σημειώσεις : Ποιοτικός Έλεγχος και Διασφάλιση της Ποιότητας των Τροφίμων. Εκδόσεις: ΑΠΘ
- Kukita, Y., Tahira, T., Sommer, S., Hayashi, K. (1997) SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Human Mutations* 10: 400, 1997 400-7.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 545 p.
- Μαρκουλάτος Π. (2009) Σημειώσεις του μαθήματος Ποιοτικές και Ποσοτικές Μέθοδοι Ανάλυσης- Βιοδείκτες, του ΜΠΣ.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y. (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143–148.
- Miterski B, Krüger R, Wintermeyer P, Eppelen JT. (2000) PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations in large scale screening projects. *Comb Chem High Throughput Screen*, 3: 211-218.
- Mullis, K., Fallona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350.
- Nakyinsige, K., Che, Man, Y. B., Sazili, A. Q. (2012) Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 91, 207–214.
- Neve, F., Civera, T., Mucci, N. and Bottero, M., T. (2008) Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Science*, 80(2), 216–224.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T., (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 2766-2770
- Orti G, Hare MP, Avise JC. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol Ecol* 1997, 6: 575-580.
- Peres, B., Barlet, N., Loiseau, G., Montet, D. (2007) Review of the current methods of analytical traceability allowing determination of the origin of foodstuffs. *Food Control*, 18, 228–235.
- Rehbein, H., Kress, G., Schmidt, T. (1997) Application of PCR SSCP to species identification of fishery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 35–41.
- Rehbein, H., Stelo, C.G., Perez-Martin, R.I., Chapela-Garrido, M.J., Hold, G.L., Russel, V.J., Pryde, S.E., Santos A.T., Rosa, C., Quinteiro, J. and Rey-Martinez, M., (2002) Differentiation of raw or processed eel by PCR-Based techniques: restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) and single strand conformation polymorphism analysis (SSCP). *European Food Research and Technology*, 214, 171–177
- Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. (2007) REBASE-enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Research*, 35: 269-270.

- Renon, P., Bernardi, C., Scocca, S., Cantoni, C., Gridavilla, G. (2003) IEF (Isoelectric focussing) and gas chromatography to identify wild ruminant species. *Indus. Aliment*, 42, 496–500.
- Rodriguez-Ramirez, R., Gonzalez-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B. (2011) Review: Authentication and traceability of foods from animal origin by polymerase chain reaction-based capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 685, 120–126.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Hernández, P., E., Martín, R., García, T., Martín, R. (2009) Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris spp.*), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Control*, Vol. 20, Issue 10, October 2009, 896–902.
- Rojas, M., González, I., García, T., Hernández, P., E., Martín, R. (2012) Authentication of meat and commercial meat products from common pigeon (*Columba livia*) woodpigeon (*Columba palumbus*) and stock pigeon (*Columba oenas*) using a TaqMan® real-time PCR assay. *Food Control*, Vol. 23, Issue 2, February 2012, pp. 369–376.
- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., Weber-Rolfs, I. (1992) *PCR: Clinical diagnostics and research*. Springer Laboratory.
- Sambrook, J. (2001) *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Santos, C.G., Melo, V.S., Amaral, J.S., Estevinho, L., Oliveira, M.B., Mafra, I., (2012) Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin, *Meat Science* 90, 836–841
- Scheffler I. (2001). Mitochondria make come back. *Advanced Drug Delivery Review* 49:3-26
- Schwagele, F. (2005) Traceability from a European perspective. *Meat Science*, 71, 164–173.
- Sentandreu, A., M., Sentandreu, E. (2011) Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Science*, Vol. 89, 3, November 2011, 280–285.
- Shackell, G. H. (2008) Traceability in the meat industry e the farm to plate continuum. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(12), 2134-2142
- Stamoulis, P., Stamatis, C., Sarafidou, T., Mamuris, Z., (2010) Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain, *Food Control* 21, 1061–1065
- Stryer Lubert, (1997), BIOXHMEIA (916-917), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Sunnucks, P., Wilson, A., C., C., Beheregaray, L., B., Zenger, K., French, J. and Taylor, A., C. (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9: 1699–1710
- Tserveni-Gousi, A., S., Sossidou, E., N., Yannakopoulos, A., L. and Batzios, C., A. (1997), Consumer's behaviour in the Greek poultry market. *Archiv für Geflügelkunde (European Poultry Science)*, 61: (5), 205-208.
- Tserveni-Gousi, A., S., Yannakopoulos, A., L., Sossidou, E., N. and Batzios, C., A. (2002) Models to predict the consumer decision-making process towards chicken meat in the Greek market. *Arch. Geflügelk*, 67 (2), 87-91
- ΤΣΩΝΗΣ Α.Γ. (1999), Εθνική και κοινοτική νομοθεσία που διέπει την παραγωγή, τη διακίνηση και τη συντήρηση του νωπού κρέατος Υγιεινή παραγωγής και συντήρησης του νωπού κρέατος, Συνέδριο
- Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K., Lenstra J.A., (2002) Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA, *Meat Science* 60: 365–369

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Homes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, :23 (21): 4407-14.
- Williams, J., Kubelic, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No 22, 6531.
- Woolfe, M., Primrose, S. (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, Vol. 22. No. 5.
- Yannakopoulos, A., Batzios, Ch., Tserveni-Goussi, A. (1994) A pilot study on consumer's attitude towards egg requests. In proceedings: 9<sup>th</sup> European Poultry Conference, Glasgow, UK, Vol.1, pp. 397-398.
- ΥπΑΑΤ: Γραφείο Γεν. Γραμματέα ΥπΑΑΤ, Ανάπτυξη του τομέα βοοτροφίας, κρεοπαραγωγικής και γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, (2007)
- ΥπΑΑΤ: Ελληνική Κτηνοτροφία, Ζωική Παραγωγή (2011). Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Γενική Διεύθυνση Ζωικής Παραγωγής
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., (1994). Genome fingerprinting by single sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics* 20: 176-178