

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης
(γαλοπούλα και κοτόπουλο) με μοριακούς δείκτες



ΚΟΛΟΒΟΣ ΜΑΤΘΑΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2012

Έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης (γαλοπούλα και κοτόπουλο) με μοριακούς δείκτες

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:	Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1. ΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ.....	7
2. ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	10
3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	15
4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	18
5. 16S rRNA.....	21
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	22
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	22
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ.....	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής διατριβής, των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα. Επίσης τον Διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη ο οποίος συνεχώς με καθοδηγούσε και μου προσέφερε πολύτιμες γνώσεις σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης του πειράματος. Την Λέκτορα Θεολογία Σαραφίδου και τον υποψήφιο διδάκτορα Θέμη Γιαννούλη για τη βοήθεια που μου παρείχαν. Ευχαριστώ επίσης την Αν. Καθηγήτρια Αικατερίνη Μούτου που με τιμά συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους με τους οποίους παρευρεθήκαμε την ίδια χρονική περίοδο στο εργαστήριο και είχαν την προθυμία να συνεργαστούμε σε φιλικό κλίμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο μοριακές τεχνικές, ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) και ο πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό DNA το οποίο απομονώθηκε από μυϊκό ιστό ωμού κρέατος γαλοπούλας και κοτόπουλου. Σκοπός της εργασίας είναι η χρησιμοποίηση των δύο μοριακών τεχνικών ώστε να παρατηρήσουμε τη νοθεία με την ανάμειξη των δύο πουλερικών σε διάφορα ποσοστά.

Αρχικά έγινε ενίσχυση με τη μέθοδο PCR τμήμα του γονιδίου 16S rRNA. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινοί για όλα τα δείγματα. Στη συνέχεια όσον αφορά για τη μέθοδο SSCP ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Από την άλλη με τη μέθοδο RFLP πραγματοποιήθηκαν πέψεις με δύο διαφορετικά ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφόρηση των τμημάτων περιορισμού σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Από την ανάλυση του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA για τη μέθοδο SSCP διαπιστώσαμε ότι από τις αναμείξεις των δύο ειδών πουλερικών σε διάφορα ποσοστά μπορούμε να παρατηρήσουμε τα πρότυπα και των δύο ειδών. Για τη μέθοδο RFLP διαπιστώνουμε ότι και για τα δύο ένζυμα περιορισμού (AvaII και DdeI) πήραμε τα πρότυπα των πέψεων σε όλες τις αναμείξεις και για τα δύο είδη πουλερικών. Άρα και οι δύο μέθοδοι κρίθηκαν ικανές για την ανίχνευση των δύο ειδών με την ανάμειξή τους σε διάφορα ποσοστά.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ

Τα πουλερικά είναι μια κατηγορία που ανήκει στα οικόσιτα πτηνά και συντηρούνται από τον άνθρωπο με σκοπό την εκτροφή τους για το κρέας, τα αυγά ή τα φτερά τους. Αυτά συνήθως είναι μέλη των οικογενειών των Ορνιθόμορφων (όρνιθα, γαλοπούλα) και των Χηνόμορφων (πάπιες και χήνες), ωστόσο πολλές φορές με τον όρο πουλερικά αναφερόμαστε και σε θηράματα όπως είναι ο φασιανός και το ορτύκι.

Τα τελευταία χρόνια και ειδικά στις αρχές του 21^{ου} αιώνα έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση της κατανάλωσης κρέατος πουλερικών, αφού είναι η δεύτερη πιο διαδεδομένη τροφή για τον άνθρωπο μετά την κατανάλωση βοδινού κρέατος. Έτσι το μοσχαρίσιο και βοδινό κρέας αυξήθηκαν περίπου 5% στα πρώτα 5 χρόνια του 21^{ου} αιώνα ενώ το χοιρινό κρέας και τα πουλερικά αυξήθηκαν περίπου 10%. Αυτή η αύξηση οφείλεται σε διάφορους παράγοντες με βασικότερους την πτώση των τιμών τους, αφού πριν την εντατική εκτροφή τους ήταν είδος πολυτελείας, και την υψηλή διατροφική τους αξία. Τα πουλερικά περιέχουν λιγότερα κορεσμένα λιπαρά και περισσότερες πρωτεΐνες σε σχέση με άλλα είδη κρεάτων.

Σύμφωνα με την έκθεση του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), μέχρι το 2050 ο όλο και διευρυνόμενος παγκόσμιος πληθυσμός θα καταναλώνει περισσότερη ζωική πρωτεΐνη απ' ότι σήμερα, δημιουργώντας πίεση στους φυσικούς πόρους του πλανήτη. Παρατηρείται ότι, η αύξηση πληθυσμού και εισοδήματος τροφοδοτεί μια διαρκή τάση προς μεγαλύτερη κατανάλωση ζωικής πρωτεΐνης στις

αναπτυσσόμενες χώρες και η κατανάλωση κρέατος αναμένεται να αυξηθεί σχεδόν 73% μέχρι το 2050 ενώ αντίστοιχα η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων θα αυξηθεί 58% (*World Livestock 2011, Livestock in food security*).

Από το 1967, η παγκόσμια παραγωγή κρέατος πουλερικών αυξήθηκε κατά 700%. Στην ίδια κατεύθυνση κινήθηκαν και άλλα προϊόντα: τα αυγά κατέγραψαν αύξηση 350%, το χοιρινό κρέας 290%, το αιγοπρόβειο 200%, το βόειο και το κρέας βουβάλου 180% και το γάλα 180%. Τα ζωικά προϊόντα παρέχουν σήμερα το 12,9% των θερμίδων που καταναλώνονται σε παγκόσμιο επίπεδο - 20,3% στις ανεπτυγμένες χώρες. Η συμβολή τους στην κατανάλωση πρωτεΐνης υπολογίζεται σε 27,9% παγκοσμίως και 47,8% στις ανεπτυγμένες χώρες. Ωστόσο, αυτοί οι αριθμοί δεν κατανέμονται ομοιόμορφα από περιοχή σε περιοχή. Σε πολλά μέρη, δεν είχαμε αύξηση παραγωγής και οι πιο φτωχές και ευάλωτες κοινότητες δεν σημείωσαν αύξηση στην κατανάλωση ζωικής πρωτεΐνης. Η παραγωγή επεκτάθηκε γρήγορα στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία και στη Λατινική Αμερική, εξαιρετικά αργά στην υποσαχάρια Αφρική (*World Livestock 2011, Livestock in food security*).

Στον αναπτυσσόμενο κόσμο, ζώα και ζωικά προϊόντα μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στην οικονομική και διατροφική ασφάλεια των νοικοκυριών. Η έκθεση του FAO (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας) σημειώνει ότι ακόμη και μικρές ποσότητες τροφίμων ζωικής προέλευσης μπορεί να βελτιώσουν τη διατροφική κατάσταση των νοικοκυριών με χαμηλό εισόδημα. Το κρέας, το γάλα και τα αυγά παρέχουν πρωτεΐνες με ένα ευρύ φάσμα αμινοξέων, καθώς και θρεπτικών στοιχείων όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, η βιταμίνη Α, η βιταμίνη Β12 και το ασβέστιο, στοιχεία στα οποία έχουν έλλειψη πολλοί πληθυσμοί υποσιτιζόμενων ανθρώπων (*World Livestock 2011, Livestock in food security*).

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα κυριότερα είδη πουλερικών είναι: η όρνιθα (*Gallus gallus domesticus*), η γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*), η στρουθοκάμηλος (*Struthio camelus*), η χήνα (*Anser anser*), η πάπια (*Anas sp.*), η πέρδικα (*Alectoris sp.*), το ορτύκι (*Coturnix coturnix*), η τσίχλα (*Turdus philomelos*), η μπεκάτσα (*Scolopax rusticola*) και ο φασιανός (*Phasianus colchicus*) (*Poultry diseases, sixth edition, 2008*).

Κοτόπουλο (Όρνιθα)

Η όρνιθα ή κοινώς κότα αποτελεί το βασικότερο είδος των εξημερωμένων και κατοικίδιων πουλερικών. Ανήκει στην οικογένεια των ορνιθοειδών και στην τάξη των αλεκτοροειδών και είναι ένα από τα πιο κοινά και διαδεδομένα οικόσιτα ζώα, αφού υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 24 δισεκατομμύρια εκπρόσωποι του είδους. Με άλλα λόγια υπάρχουν περισσότερες κότες στον κόσμο από οποιοδήποτε άλλο πουλί ή και από τους ανθρώπους. Ο άνθρωπος εκτρέφει τις κότες για την διατροφή του δηλαδή για το κρέας και τα αυγά τους. (*Firefly Encyclopedia of Birds, 2003*).

Γαλοπούλα

Η γαλοπούλα κατατάσσεται στην ταξινομική σειρά των Ορνιθόμορφων και ανήκει στο γένος των Μελεαγρίδων. Το *Meleagris gallopavo* γνωστό ως άγρια γαλοπούλα, κατάγεται από τα δάση της Βόρειας Αμερικής (*Porter, WF, 1994*).

2. ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Ο τομέας του κρέατος αποτελεί έναν από τους βασικότερους τομείς γεωργικής παραγωγής στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Το κρέας αποτελεί εδώ και πολλά χρόνια σημαντικό μέρος του ευρωπαϊκού τρόπου διατροφής, προσφέροντας μια υψηλής ποιότητας πηγή πρωτεϊνών για την κάλυψη των αναγκών των ευρωπαίων καταναλωτών. Από το λίπος που περιέχει το κρέας παράγεται επίσης ενέργεια. Άλλα συστατικά όπως οι βιταμίνες Α και Β, ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος και ο φώσφορος συμβάλλουν στην καλή υγεία. Το «ερυθρό κρέας» (κρέας βοοειδών και αιγοπροβάτων) και το «λευκό κρέας» (χοιρινό και κρέας πουλερικών) προσφέρουν μια μεγάλη ποικιλία ωφέλιμων χαρακτηριστικών και μια επιλογή γεύσεων και υφής. Τέλος το κρέας παρέχει αρκετές μαγειρικές δυνατότητες και έχει καταστεί βασικό στοιχείο της ευρωπαϊκής κουζίνας και κουλτούρας.

Τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη ξέσπασαν επανειλημμένα κρούσματα διατροφικών κρίσεων (π.χ. σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών και η γρίπη των πτηνών), οι μη ορθές πρακτικές που εσκεμμένα εφαρμόζονται από ορισμένους παραγωγούς τροφίμων, οι τροφικές αλλεργίες- δηλητηριάσεις και τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το καταναλωτικό κοινό να ανησυχήσει και κατ' επέκταση να ενδιαφερθεί για τη σύσταση και την ποιότητα των τροφίμων. Είναι γνωστό ότι οι ετικέτες των προϊόντων δε δίνουν σαφείς επεξηγήσεις για την πραγματική τους σύσταση. Έτσι, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει αναπτύξει σημαντικά συστήματα ποιότητας για τα κρέατα και τα προϊόντα με βάση το κρέας που έχουν ως στόχο τη βελτίωση της ποιότητας τους καθώς επίσης της σήμανσης και της εμπορίας τους. Αυτά τα συστήματα ποιότητας βοηθούν στο να αποφευχθεί η εξαπάτηση και να προστατευτεί ο καταναλωτής από

παράνομα υποκατάστατα αλλά χρησιμοποιούνται και για οικονομικούς λόγους (έλεγχος αθέμιτου ανταγωνισμού μεταξύ των βιομηχανιών).

Με τον όρο ιχνηλασιμότητα εννοούμε την ικανότητα παρακολούθησης και ανίχνευσης της προέλευσης ενός προϊόντος κατά τη διάρκεια παραγωγής και διακίνησής του. Η ιχνηλασιμότητα συνδέει τα υλικά παραγωγής με την προέλευσή τους, τις διαδικασίες επεξεργασίας, τη διανομή και τη διάθεση στον τελικό πελάτη. Θα πρέπει να πούμε ότι η ιχνηλασιμότητα από μόνη της δεν αποτελεί εγγύηση για την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά είναι ένα βασικό εργαλείο για τη διαχείριση της επικινδυνότητας που συμβάλλει στην αντιμετώπιση προβλημάτων σχετικών με την ασφάλεια των τροφίμων. Στόχοι της ιχνηλασιμότητας, οι οποίοι σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων, είναι η γρήγορη και εύκολη διάγνωση ενός προβλήματος, η ταυτοποίηση των ένοχων παρτίδων και ο εντοπισμός τους στη διατροφική αλυσίδα, η στοχοθετημένη και ακριβής ενημέρωση των καταναλωτών για τα προϊόντα που εγκυμονούν κινδύνους, η συλλογή στοιχείων σχετικά με επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία ώστε να αξιολογηθεί η επικινδυνότητα από τις επιχειρήσεις τροφίμων και τις αρμόδιες αρχές και τέλος η οριοθέτηση της ευθύνης των εμπλεκομένων επιχειρήσεων. Η ιχνηλασιμότητα σχετίζεται και με στόχους εκτός της ασφάλειας τροφίμων, όπως στην εξασφάλιση δίκαιου εμπορίου μεταξύ των διαφόρων επιχειρήσεων και στην αξιοπιστία των πληροφοριών που διατίθενται στους καταναλωτές (*Raspor Peter, 2005*).

Σύμφωνα με τον Καν.178/2002, άρθρο 18, θεσπίζεται για πρώτη φορά ρητά η υποχρέωση των υπεύθυνων επιχειρήσεων τροφίμων να διατηρούν συστήματα και διαδικασίες για την ιχνηλασιμότητα. Ο κανονισμός απαιτεί την ιχνηλασιμότητα να λειτουργεί υποχρεωτικά σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής των τροφίμων σε συνδυασμό πάντα με τη απόσυρση από την αγορά μη ασφαλών τροφίμων και ζωοτροφών. Η Ε.Ε έχει δώσει οδηγίες σύμφωνα με τις οποίες οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων είναι υποχρεωμένοι να

προσδιορίζουν από ποιον και σε ποιον έγινε η προμήθεια ενός προϊόντος και να διαθέτουν συστήματα για την παροχή των σχετικών πληροφοριών στις αρμόδιες αρχές (*Νομοθεσία της ΕΕ, 2002*).

Ειδικότερα η μελέτη του κρέατος για την αυθεντικότητά του αποτελεί σημαντικού ενδιαφέροντος για τις ελεγκτικές αρχές τροφίμων. Είναι γνωστό ότι πολλά προϊόντα στο τομέα του κρέατος έχουν υψηλή οικονομική αξία, καθώς επίσης ότι λαμβάνουν χώρα πολλές τεχνικές επεξεργασίες από το σφαγείο έως την κατανάλωσή τους. Κατά τον τεμαχισμό τους ο ιστός διατηρεί πολλά από τα ανατομικά χαρακτηριστικά τα οποία δείχνουν την προέλευση του ζώου. Ωστόσο, όταν υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία αλλάζει η φυσιολογία και η χημική του σύσταση, με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολο να αναγνωρισθεί το είδος. Αυτό συνεπάγεται δυσκολία στην ταυτοποίησή του που έχει ως επακόλουθο να εμφανίζονται φαινόμενα νοθείας στη βιομηχανία κρέατος αλλά και στη βιομηχανία εστίασης.

Στο παρελθόν, για την αναγνώριση της προέλευσης των κρεάτων χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι μέθοδοι όπως για παράδειγμα οι ιστολογικές διαφορές της τρίχας των ζώων, η οργανοληπτική εξέταση και οι ανατομικές διαφορές. Σήμερα δίνουν τη θέση τους σε διάφορες μοριακές τεχνικές ανάλυσης όπως οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι (ELISA) και οι τεχνικές υβριδισμού του DNA και η PCR. Αυτές οι μέθοδοι έχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και κάποιες απαιτούν την ύπαρξη εξειδικευμένου εξοπλισμού.

Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος- Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Γενικά ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών που ασχολούνται με το μοριακό διαχωρισμό ειδών ζώων είναι αρκετά μεγάλος. Οι περισσότερες αναφέρονται σε προστατευμένα είδη ζώων των οποίων απαγορεύεται η εμπορία. Κατά κύριο λόγο εστιάζουν σε λίγα και συγκεκριμένα είδη που ανήκουν στις τρεις βασικές ομάδες των σπονδυλωτών. Για τα θηλαστικά παρατηρούνται μελέτες που ασχολούνται περισσότερο με την ταυτοποίηση ειδών όπως η αγελάδα, ο χοίρος, το πρόβατο και η κατσίκα και λιγότερο με άλλα είδη όπως ο ρινόκερος ή η τίγρης. Στα πτηνά οι μελέτες αφορούν κυρίως δύο είδη τη γαλοπούλα και το κοτόπουλο και λίγες αναφέρονται σε άλλα όπως η χήνα και η πάπια. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών στις οποίες εφαρμόστηκε η τεχνική PCR-RFLP:

- ❑ Το 1994 οι Chicuni et al. πραγματοποίησαν πέψη με ένζυμα περιορισμού τόσο σε τμήμα του Cyt b για το διαχωρισμό προβάτου, κατσίκας και βοδιού και πέντε πτηνών. Η τεχνική εφαρμόστηκε με επιτυχία στο διαχωρισμό των ειδών.
- ❑ Το 1995 οι Meyer et al πραγματοποίησαν πέψη με τέσσερα ένζυμα (AluI, RsaI, TaqI, HinfI) σε τμήμα 356bp του Cyt b και διαχώρισαν 7 είδη ζώων μέσω του κρέατος τους (αγελάδα, βούβαλος, πρόβατο, κατσίκι, άλογο, κοτόπουλο και γαλοπούλα).
- ❑ Το 1999 οι Horwood et al ταυτοποίησαν κρέας από κοτόπουλο και γαλοπούλα, πέπτοντας τμήμα του πυρηνικού γονιδίου actin, με HaeIII και RsaI. Ωστόσο, δεν μπόρεσαν να διαχωρίσουν κρέας από πάπια, φασιανό, βόδι και αρνί.
- ❑ Το 2001 οι Hold et al ταυτοποίησαν 36 είδη ψαριών χρησιμοποιώντας το Cyt b και έξι ένζυμα περιορισμού. Επίσης απέδειξαν ότι η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη και για επεξεργασμένα προϊόντα καθώς επίσης και για ορισμένα μίγματα ψαριών.
- ❑ Το 2005 οι Girish et al ταυτοποίησαν 4 είδη κρέατος (βούβαλος, μοσχάρι, κατσίκι και αρνί) χρησιμοποιώντας τμήμα 456bp του 12S rRNA και τα ένζυμα AluI, HhaI, ApoI, BspTI. Η τεχνική έδωσε

καλά αποτελέσματα τόσο σε νωπά όσο και σε επεξεργασμένα προϊόντα, αλλά δεν κρίθηκε κατάλληλη για μίγματα κρεάτων.

- ❑ Επίσης μια από τις μελέτες που αναφέρεται στην ταυτοποίηση πουλερικών προέρχεται από τους Girish et al 2007 και πρόκειται για το διαχωρισμό έξη κοινών ειδών (όρνιθα, φραγκόκοτα, γαλοπούλα, πάπια, ορτύκι). Χρησιμοποιήθηκε τμήμα του 12S rRNA και τα ένζυμα HinfI, Mph 1103I, MvaI, Eco47I. Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε με επιτυχία και σε επεξεργασμένα δείγματα στους 120°C για 30 min.
- ❑ Το 2009 οι Chandrika Murugaiah et al διαχώρισαν 7 είδη κρέατος (χοιρινό, βοδινό, βούβαλος, ορτύκι, κοτόπουλο, κατσίκι, κουνέλι). Χρησιμοποιήθηκε τμήμα 359bp του Cyt b σε 6 από τα 7 είδη και τα ένζυμα AluI, BsaII, RsaI, MseI, και BstUI. Η τεχνική εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ταυτοποίηση των ειδών.

3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται συνεχής αλματώδης ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και γι' αυτό το λόγο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε διάφορες σύγχρονες και αποτελεσματικές τεχνικές για τη μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας, την πιστοποίηση γενετικού υλικού, τη γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών, ατόμων, ομάδων πληθυσμών, ειδών και την μοριακή βελτίωση. Η επιλογή αυτή γίνεται με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών.

Οι μοριακοί δείκτες είναι για τους επιστήμονες εργαλείο που βελτιώνει την εμφάνιση παραλλακτικότητας σε επίπεδο γενετικού υλικού που διαφορετικά δεν θα φαινόταν. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών δεικτών, οι DNA και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Οι πρώτοι αναφέρονται και με την ονομασία γενετικοί δείκτες και αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό δηλαδή το μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό DNA.

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

- Παρουσία πολυμορφισμού δηλαδή η ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο.
- Απλή κληρονομικότητα που στην καλύτερη περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχα αλληλόμορφα.
- Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Στους πρωτεϊνικούς δείκτες ανήκουν τα αλλοένζυμα και τα ισοένζυμα. Το κυριότερο πλεονέκτημα των πρωτεϊνικών δεικτών είναι η απλότητα. Επειδή η ανάλυση τους δεν απαιτεί την απομόνωση DNA ή τη διαθεσιμότητα γνωστών αλληλουχιών, εκκινητών και ιχνηλατών, είναι

γρήγορη και εύχρηστη. Οι απλές αναλυτικές διαδικασίες επιτρέπουν να εφαρμοστούν με σχετικά χαμηλότερο κόστος ανάλογα με το αντιδραστήριο χρώσης του ενζύμου που χρησιμοποιείται. Επιπλέον στην περίπτωση των πρωτεϊνικών δεικτών υπάρχει συγκυριαρχία αλληλομόρφων και τα αποτελέσματά τους είναι επαναλήψιμα. Τα κυριότερα μειονεκτήματα τους είναι ο σχετικά μικρός αριθμός τους και το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους.

Μπορεί οι πρωτεϊνικοί δείκτες να είναι σημαντικοί στη Μοριακή Βιολογία, ωστόσο παρατηρούμε ότι το DNA έχει περισσότερα πλεονεκτήματα: α) είναι γενικά πιο πολυμορφικό, β) πολλαπλασιάζεται μέσω της PCR και έτσι τα δείγματα που βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, γ) είναι πιο σταθερό, οπότε πιο εύκολο στη συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι τα RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), τα AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), τα RAPD (Randomly Amplified DNA Polymorphisms), οι μινιδορυφόροι (minisatellites) και οι μικροδορυφόροι (microsatellites) ή αλλιώς SSR (Simple Sequence Repeats), τα SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), τα πρότυπα SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms). Στους περισσότερους μοριακούς δείκτες-τεχνικές αρχικά γίνεται ενίσχυση ενός τμήματος DNA με PCR το οποίο χρησιμοποιείται σε μελέτες διαχωρισμού ειδών. Σε επόμενο κεφάλαιο περιγράφεται αναλυτικά το μιτοχονδριακό DNA.

RFLP (Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού)

Οι μοριακοί δείκτες RFLP είναι μέτρια πολυμορφικοί. Εκτός από την υψηλή τους αφθονία και την τυχαία κατανομή τους στο γονιδίωμα, έχουν τα πλεονεκτήματα της συγκυριαρχίας των αλληλόμορφων και της υψηλής επαναληψιμότητάς τους. Το σημαντικότερο μειονέκτημά τους είναι ο χαμηλός βαθμός πολυμορφισμού. Γενικά αν η έρευνα διεξάγεται σε είδη που δεν έχουν μελετηθεί αρκετά ώστε να υπάρχουν διαθέσιμοι κατάλληλοι δείκτες, απαιτούνται σημαντικές επενδύσεις για την ανάπτυξή τους.

Τα RFLPs μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση της γενετικής απόστασης και σε φυλογενετικές μελέτες μεταξύ ατόμων ενός πληθυσμού και μεταξύ συγγενικών ειδών. Αποτελούν μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες γονιδιακής χαρτογράφησης λόγω της αφθονίας τους στο γονιδίωμα, λόγω της διαθεσιμότητας των διαφόρων περιοριστικών ενζύμων και της τυχαίας κατανομής τους σε όλο το γονιδίωμα.

4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

Τα μιτοχόνδρια υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, με εξαίρεση τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια. Περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και σε αυτά γίνεται μετατροπή της ενέργειας σε μορφή που μπορεί να χρησιμεύσει για τις διάφορες λειτουργίες του κυττάρου. Το σχήμα των μιτοχονδρίων ποικίλλει δηλαδή έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα, όπως ποικίλλει και ο αριθμός τους στους διάφορους τύπους κυττάρων. Γενικά τα κύτταρα που έχουν υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, έχουν και μεγαλύτερο αριθμό μιτοχονδρίων όπως τα μυϊκά κύτταρα. Αντίθετα κύτταρα με μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις έχουν μικρότερο αριθμό μιτοχονδρίων. Όπως οι χλωροπλάστες, έτσι και τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από την εξωτερική και την εσωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία και έχει κυλινδρικό σχήμα. Αντίθετα η εσωτερική μεμβράνη παρουσιάζει αναδιπλώσεις προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου ενώ σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς πτυχώσεις. Στις αναδιπλώσεις αυτές εντοπίζονται διάφορα ένζυμα τα οποία ευθύνονται για τη φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα. Όπως στους χλωροπλάστες, έτσι και στα μιτοχόνδρια ο χώρος μέσα από την εσωτερική μεμβράνη καλύπτεται από μια παχύρρευστη μάζα δηλαδή την μήτρα του μιτοχονδρίου. Στη μήτρα του μιτοχονδρίου υπάρχουν DNA, ένζυμα και ριβοσώματα. Τα οργανίδια αυτά διαθέτουν εκείνο τον εξοπλισμό που τους παρέχει μια σχετική γενετική αυτοδυναμία ενώ χάρη σ' αυτό το μηχανισμό μπορούν να παράγουν ορισμένες πρωτεΐνες και να διπλασιάζονται ανεξάρτητα από το διπλασιασμό του κυττάρου. Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για τον μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη, συνθέτοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της

διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κυτταρική αναπνοή, είναι αερόβια και επιτυγχάνεται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση (*Alberts et. al., 2000*).

Τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μόρια rRNA και tRNA που χρησιμοποιούνται στα μιτοχόνδρια και λίγες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μετάφραση. Είναι γνωστή η αλληλουχία τουλάχιστον 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν μέχρι 37 πρωτεΐνες. Το mtDNA είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο που έχει μήκος 16-18 kb σε όλα τα ζώα. Περιλαμβάνει τους γονίδια 12S και 16S, οι οποίοι κωδικοποιούν τη μικρή και τη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος που λαμβάνει μέρος στο μεταφραστικό σύστημα του μιτοχονδρίου, καθώς επίσης και από 22 tRNA και 13 αγγελιοφόρα RNA τα οποία μεταφράζονται σε πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στο σύστημα της αναπνοής. Το μέγεθος του γονιδιώματος του mtDNA των πολυκύτταρων οργανισμών έχει συνήθως ένα εύρος μεταξύ 15700-20000 ζεύγη βάσεων (*Stryer, 1997*).

Είναι γνωστό ότι τα χαρακτηριστικά του mtDNA των πτηνών είναι όμοια με των υπόλοιπων σπονδυλωτών. Ωστόσο παρουσιάζει ορισμένες σημαντικές διαφορές σε σχέση με αυτό των υπόλοιπων σπονδυλωτών όπως για παράδειγμα η σειρά των γονιδίων (ND6 και ND5) είναι διαφορετική σε σύγκριση με αυτή των θηλαστικών και των αμφιβίων.

Το mtDNA είναι κατάλληλο σε μελέτες για το διαχωρισμό των ειδών για τους παρακάτω λόγους:

- Η ποσότητά του ανά κύτταρο θεωρείται υπερεπαρκής αφού απαντάται περίπου σε 1000 αντίγραφα (1000 φορές

περισσότερο από το πυρηνικό DNA). Αυτό αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης με την τεχνική PCR, του επιθυμητού τμήματος.

- Εξαιτίας της μητρικής προελεύσεως και την απουσία ανασυνδυασμού κληρονομείται απaráλλακτο από γενιά σε γενιά.
- Ο μεγάλος αριθμός μεταλλαγής του (10 φορές υψηλότερος του πυρηνικού) έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και τη δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.

Τα γονίδια που χρησιμοποιούνται περισσότερο για αυτό τον σκοπό είναι τα: Cyt b, 12S και 16S rRNA και η περιοχή ελέγχου D-loop. Η επιλογή τους εξαρτάται από τη μεγάλη εξελικτική συντήρησή τους και από τις διαφορές που εμφανίζονται ανάμεσα στα είδη (*Bruford et al., 2003*). Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο 16S rRNA που ενισχύθηκε με τη διαδικασία της PCR.

5. 16S rRNA

Το 16S rRNA είναι μόριο RNA μήκους 1500 νουκλεοτιδίων και εμπεριέχεται στη μικρή υπομονάδα των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων των βακτηρίων και των αρχαίων. Έχει ποικίλες λειτουργίες:

- Έχει δομικό ρόλο και δρα ως πλαίσιο στήριξης ορίζοντας τις λειτουργίες των ριβοσωμικών πρωτεϊνών.
- Αλληλεπιδρά με το 23S που βοηθά στο δέσιμο των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων (50S+30S).
- Σταθεροποιεί σωστά τα κωδικόνια-αντικωδικόνια μέσω δεσμών υδρογόνου.

Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές μελέτες. Παγκόσμιοι εκκινητές χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν το 16S rRNA γονίδιο που προσφέρει τη φυλογενετική πληροφορία (*Weisburg et al. 1991*). Κατά καιρούς έχουν αναπτυχθεί μελέτες που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο γονίδιο:

- ❑ Το 2010 ο Ramadan et al. ταυτοποίησε 4 είδη (ποταμίσιο βούβαλο, βόδι, πρόβατο, κατσίκι) μέσω ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του 16S rRNA.
- ❑ Το 2011 ο Baharum et al. χρησιμοποίησε το 16S rRNA και το Cyt b κυρίως σε ψάρια, στο πλαίσιο της μελέτης της γενετικής ποικιλότητας, και της ταυτοποίησης ειδών και της ενίσχυσης της παραγωγικότητας του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Είναι γεγονός ότι, οι μεγάλες διατροφικές κρίσεις (διοξίνες, τρελές αγελάδες κ.α) τα τελευταία χρόνια αποτέλεσαν αιτία ώστε να αυξηθεί ακόμη περισσότερο η ευαισθησία των καταναλωτών στο θέμα της ασφάλειας. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη γρήγορων και αξιόπιστων μεθόδων προκειμένου να γνωρίζει ο καταναλωτής εάν υπάρχει νοθεία από την ανάμιξη των ειδών (κοτόπουλο και γαλοπούλα) σε διάφορα ποσοστά. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) που απομονώθηκε από το κάθε είδος ξεχωριστά.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρακάτω αναφέρεται αναλυτικά ο εξοπλισμός (υλικά, συσκευές, αντιδραστήρια) που χρησιμοποιήθηκε για την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της συγκεκριμένης εργασίας καθώς επίσης και η πορεία της μεθόδου που εφαρμόστηκε. Η πειραματική πορεία που ακολουθήσαμε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η εξής:

1. Συλλογή δειγμάτων
2. Απομόνωση DNA
3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%
4. PCR
5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%
6. SSCP (Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της)
7. RFLP

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Εξοπλισμός για την Απομόνωση του DNA από ιστό κοτόπουλου και γαλοπούλας

Υλικά εργαστηρίου

- Αυτόματες πιπέτες ακρίβειας των 20 και 1000μl με τα αντίστοιχα tips.
- Φιαλίδια erpendorf των 1,5 και 2 ml
- Στατώ

Αντιδραστήρια-Διαλύτες

- TNES-Urea Buffer
- Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) (10μg/μl)
- Φαινόλη (Phenol) 90%
- Χλωροφόρμιο (Chloroform)
- Οξικό Νάτριο (CH_3COONa 0,2M)
- Απόλυτη Αιθανόλη (EtOH) 100%
- Αιθανόλη καθαρότητας 70%
- Αποστειρωμένο, διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

TNES-Urea Buffer (200ml): 2ml **Tris- HCl** (1M pH 7.5) + 5 ml **NaCl** (5M) + 2ml **EDTA-2Na** (0.5M pH 7.5) + 10ml **SDS** (10%) + 48.05g **Urea** + **ddH₂O** έως τελικό όγκο 200ml.

Συσκευές

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

Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση DNA σε Πηκτή (gel) Αγαρόζης

Υλικά εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

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

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

Συσκευές

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

Εξοπλισμός για τον Πολλαπλασιασμό των γονιδίων PCR

Υλικά εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR Buffer) (GeneON)
- Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl₂) 100mM (GeneON)

- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM
- Εκκινητές (Primers)
- Maximo Taq DNA πολυμεράση 5U/μl (GeneON)

Συσκευές

- Μη ψυχομένη φυγόκεντρος
- Θερμικοί κυκλοποιητές

Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου SSCP

Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέττες ακριβείας των 10 και 100 μl
- Φιαλίδια tuber 0,5 μl
- Στατώ

Αντιδραστήρια

- Προϊόν της PCR
- Loading buffer SSCP (Φορμαμίδιο μπλε της βρωμοφαινόλης κυανούν του ξυλαινίου και NaOH)

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Θερμοκυκλοποιητής

Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση του SSCP σε πηκτή Πολυακρυλαμίδης

Υλικά εργαστηρίου

- Ποτήρι ζέσεως
- Μαγνήτης ανάδευσης
- Ογκομετρικό κύλινδρος
- Κωνική φιάλη
- Χωνί μετάγγισης
- Χαρτί διήθησης

Αντιδραστήρια

- Acrylamide 38,5%
- Bis-acrylamide
- Glycerol 50%
- TBE 10X
- ddH₂O
- TEMED
- APS 20%

TBE 10X (2lt): 216g **Tris Base** + 110g **Boric acid** + 16,6g **EDTA** + **ddH₂O** έως τελικό όγκο τα 2lt.

Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό

Εξοπλισμός για την εμφάνιση (Χρώση) των αποτελεσμάτων σε πηκτή Πολυακρυλαμίδης

Υλικά εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- ddH₂O
- Αιθανόλη (EtOH 100%)
- Οξικό οξύ 99%
- Νιτρικός άργυρος (AgNO₃) 99,9%
- Υδροξειδίο του Νατρίου (NaOH) 99%
- Βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄)
- Φορμαλδεΰδη

Συσκευές

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

Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου RFLP

Υλικά εργαστηρίου

- Πιπέτες ακρίβειας των 10 και 100 μl
- Φιαλίδια errendorf των 500 μl
- Στατώ

Αντιδραστήρια

- ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα πέψης (Buffer) ανάλογα για το κάθε ένζυμο
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: *AvaII* (10U/μl) και *DdeI* (10U/μl)

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Κλίβανος

Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση των RFLP σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης

Υλικά Εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- Urea (Ουρία)
- ddH₂O
- Acrylamide (ακρυλαμίδη) 30%
- TBE 10X
- TEMED 99%
- APS 20%
- Loading Buffer
- Ακολουθίες DNA γνωστών μοριακών βαρών (Ladder)

Διάλυμα Πολυακρυλαμίδης 30% (100ml): 29g Acrylamide + 1g Bis-acrylamide + ddH₂O έως τελικό όγκο τα 100ml.

Συσκευές

- Συσκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή κάθετου ηλεκτροφόρησης

Εξοπλισμός για την εμφάνιση (Χρώση) των αποτελεσμάτων σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης

Υλικά εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- ddH₂O
- Αιθανόλη (EtOH 100%)
- Οξικό οξύ 99%
- Νιτρικός άργυρος (AgNO₃) 99,9%
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) 99%
- Βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄)
- Φορμαλδεΰδη

Συσκευές

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

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

1. Συλλογή δειγμάτων

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μυϊκός ιστός που συλλέχθηκε από ωμό κρέας πουλερικών, το οποίο κυκλοφορεί στα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής της Λάρισας. Συγκεκριμένα τα ωμά δείγματα προήλθαν από δύο είδη πουλερικών όπως κοτόπουλο και γαλοπούλα. Η συντήρησή τους έγινε στους -20°C . Σκοπός της ανάλυσής τους ήταν η ανίχνευση των δύο ειδών με την ανάμειξή τους σε διάφορα ποσοστά.

2. Απομόνωση του DNA

Για τη μελέτη του DNA έχει μεγάλη σημασία η σωστή απομόνωσή του από τα κύτταρα των οργανισμών. Για να είναι αποτελεσματική η μέθοδος απομόνωσης, θα πρέπει να δίνει αρκετή ποσότητα DNA. Με άλλα λόγια να είναι αποδοτική ποσοτικά και ποιοτικά δίνοντας DNA σε καλή κατάσταση, δηλαδή μη διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. Η επιλογή της σωστής μεθόδου εξαρτάται από το είδος και την ποσότητα των κυττάρων, αλλά και από το είδος του DNA που πρέπει να απομονωθεί (πυρηνικό, μιτοχονδριακό, πλασμιδιακό).

Διαδικασία

Για την εξαγωγή του mtDNA φτιάξαμε 12 δείγματα στα οποία έγινε ανάμειξη σε διάφορα ποσοστά γαλοπούλας και κοτόπουλου. Στα πρώτα 6 δείγματα πήραμε μεγαλύτερη ποσότητα γαλοπούλας και

λιγότερο κοτόπουλο, ενώ στα επόμενα 6 δείγματα συνέβη το αντίθετο. Έτσι στην ουσία πήραμε από κάθε δείγμα ποσότητα 1gr. Αυτό φαίνεται αναλυτικά στους πίνακες 1 και 2:

Πίνακας 1: Ποσότητες γαλοπούλας και κοτόπουλου

ΔΕΙΓΜΑ	ΓΑΛΟΠΟΥΛΑ	ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ
1	95	5
2	90	10
3	80	20
4	70	30
5	60	40
6	50	50

Πίνακας 2: Ποσότητες γαλοπούλας και κοτόπουλου

ΔΕΙΓΜΑ	ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ	ΓΑΛΟΠΟΥΛΑ
1	95	5
2	90	10
3	80	20
4	70	30
5	60	40
6	50	50

Ακολουθήσαμε την παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1. Τεμαχίζουμε αρκετά τους ιστούς, τους ζυγίζουμε σύμφωνα με τα παραπάνω ποσοστά και τους τοποθετούμε σε φιαλίδια errendorf του 1,5ml.
2. Προσθέτουμε 700μl TNES-Urea Buffer και 15μl Proteinase K χωρίς να κάνουμε φυγοκέντρηση, διότι έχει διαλυθεί το μίγμα.

3. Τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37°C για ολονύκτια (overnight) επώαση. Συγχρόνως τα δείγματα περιστρέφονται αφού πρώτα τα έχουμε τοποθετήσει στον κυκλικό αναδευτήρα.
4. Προσθέτουμε 350μl φαινόλη και 350μl χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε τα φιαλίδια με το χέρι και κάνουμε φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000 στροφές στους 4°C.
5. Λαμβάνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και το μεταφέρουμε σε νέο φιαλίδιο errendorf του 1,5ml.
6. Προσθέτουμε 700μl χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε τα φιαλίδια με το χέρι και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε για 5min στις 13.000 στροφές στους 4°C.
7. Λαμβάνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και το μεταφέρουμε σε νέο φιαλίδιο errendorf του 1,5ml.
8. Προσθέτουμε 50μl οξικό νάτριο και 1000μl παγωμένη απόλυτη αιθανόλη (100%) και τοποθετούμε τα δείγματα στην κατάψυξη στους -20°C περίπου για 30min.
9. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 20min στις 13.000 στροφές στους 4°C, απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1000μl παγωμένη αιθανόλη 70%, αναδεύουμε με το χέρι και φυγοκεντρούμε για 5min στις 13.000 στροφές στους 4°C.
10. Χύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας παράλληλα να μη χάσουμε το ίζημα που έχει σχηματιστεί.
11. Στεγνώνουμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα.
12. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl αποστειρωμένο ddH₂O.

Όσον αφορά τα αντιδραστήρια, το NaCl ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του κυττάρου και είναι εκείνο που διασπά τα κύτταρα από τα οποία θα απομονωθεί το DNA. Η διαδικασία της λύσης των κυττάρων πρέπει να γίνεται σε κατάλληλο pH 7.5 το οποίο ρυθμίζεται από το Tris-HCl (ρυθμιστικό διάλυμα). Ο ρόλος του EDTA είναι να δεσμεύει τα ιόντα Ca⁺⁺ και Mg⁺⁺ τα οποία παίζουν ρόλο στη δράση των νουκλεασών. Το SDS είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό το οποίο συμβάλλει στη

διάσπαση της μεμβράνης του πυρήνα και στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνωση K συμβάλλει στην πέψη των πρωτεϊνών. Η φαινόλη αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα. Το διάλυμα φαινόλης πρέπει να έχει $pH > 7$ ώστε η κατανομή του DNA να γίνεται στην επάνω υδάτινη φάση. Το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για να γίνει πιο εύκολος ο διαχωρισμός των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του χλωροφορμίου. Η παγωμένη αιθανόλη 100% αφυδατώνει και κατακρημνίζει το DNA με τη βοήθεια του οξικού νατρίου.

3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία και αποτελεί την ευκολότερη μέθοδο διαχωρισμού και ελέγχου τμημάτων του DNA, ανάλογα με το μέγεθός τους. Επίσης υπολογίζεται το μέγεθος των τμημάτων που έχουν διαχωριστεί.

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA μετακινούνται μέσα στην πηκτή εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου. Τα μικρά μόρια περνούν εύκολα και γρήγορα μέσα από τους πόρους της πηκτής. Τα μεγαλύτερα μόρια κινούνται πιο αργά, γι' αυτό πρέπει να αλλάξουν διαμόρφωση για να περάσουν μέσα από τους πόρους. Η βασική χρωστική στις πηκτές αгарόζης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο στην πηκτή αναγκάζει τα μόρια να κινηθούν πιο αργά προς το θετικό πόλο και έχει τη μοναδική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες. Εισάγοντας το DNA σε μια πηκτή που περιέχει αιθίδιο και εκθέτοντάς το στο υπεριώδες γίνονται ορατές οι διακριτές μπάντες του DNA καθώς αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του

DNA. Για να καθιζάνει το DNA καθώς φορτώνεται στην πηκτή και για να είναι εύκολα ορατό στο υπεριώδες προστίθεται το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) που συνήθως χρησιμοποιούνται το μπλε της βρωμοφαινόλης και το κυανό του ξυλενίου. Τα κυριότερα buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αγαρόζης είναι το TAE και το TBE . Το TAE συμβάλλει στην καλύτερη ανάλυση ρυθμίζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα.

Στη παρούσα εργασία η τεχνική εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας της απομόνωσης όσο και για τα προϊόντα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της τεχνικής PCR. Στην πρώτη περίπτωση η εικόνα μας πληροφορεί για την ακεραιότητα ή τον κατακερματισμό του απομονωμένου DNA, ενώ στην δεύτερη περίπτωση η εικόνα εκτός του ότι μας δείχνει την ποσότητα του DNA, μας πληροφορεί για το μέγεθός του χρησιμοποιώντας marker αλλά και για την καθαρότητά του σε περίπτωση επιμόλυνσης.

Ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία:

1. Προετοιμάζουμε το εκμαγείο που θα στερεοποιηθεί η πηκτή εισάγοντας το χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις (πηγάδια) στις οποίες θα εισαχθούν τα δείγματα.
2. Προετοιμάζουμε την πηκτή. Εντός κωνικής φιάλης των 100ml για την πρώτη περίπτωση ζυγίζουμε 0,3gr αγαρόζης και προσθέτουμε 40ml διάλυμα TAE 1X για την παρασκευή διαλύματος 1%, ενώ στην δεύτερη περίπτωση ζυγίζουμε 0,6gr αγαρόζης και προσθέτουμε 40ml διάλυμα TAE 1X για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Βράζουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων και ανακινούμε ανά διαστήματα, ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει και προσθέτουμε 4μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) C=10mg/ml.

5. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης στο εκμαγείο και με τη βοήθεια πλαστικού tip απομακρύνουμε τις φυσαλίδες που πιθανώς έχουν σχηματιστεί στα πηγαδάκια.
6. Περιμένουμε να στερεοποιηθεί η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Στη συνέχεια αφαιρούμε το χτενάκι και τοποθετούμε την πηκτή μαζί με την μήτρα στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X, ώστε η πηκτή να είναι καλυμμένη πλήρως.
8. Προετοιμάζουμε τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση και συγκεκριμένα στην περίπτωση ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 3μl DNA. Στην περίπτωση ελέγχου της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA (προϊόν PCR) προσθέτοντας και το αρνητικό.
9. Εισάγουμε τα δείγματα με μικροπιπέτα σε κάθε ένα από τα πηγάδια και εφαρμόζουμε σταθερή τάση 5V/cm.
10. Μετά από περίπου 20-30min παρατηρούμε τις ζώνες του DNA στην πηκτή πάνω από τη συσκευή υπεριώδους φωτός (UV) και την φωτογραφίζουμε.

4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια *in vitro*, απλή και ταχεία μέθοδος της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και για την ενίσχυση ενός ή πολλών αντιγράφων ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση κατά αρκετές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες με εκατομμύρια αντίγραφα του συγκεκριμένου τμήματος DNA. Είναι μια τεχνική που εφευρέθηκε από τον Δρ. Kary Mullis το Δεκέμβριο του 1983 και βραβεύτηκε γι' αυτό το επίτευγμα με το Nobel Χημείας το 1993.

Η PCR είναι μια τεχνική τριών βημάτων (αποδιάταξη του DNA, πρόσδεση των εκκινητών, σύνθεση νέου DNA) τα οποία

επαναλαμβάνονται πολλές φορές (30 ή 40 κύκλους) και επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία. Η αλληλουχία DNA που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί επιλέγεται από τους εκκινητές (primers), οι οποίοι είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του κομματιού DNA κι ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε μια συσκευή (θερμικός κυκλοποιητής) η οποία θερμαίνει και ψύχει τα σωληνάρια errendorf με το μίγμα της αντίδρασης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Αναλυτικότερα τα τρία βήματα έχουν ως εξής:

1. Αποδιάταξη στους 92°C-95°C:

Κατά την διάρκεια της αποδιάταξης το δίκλωνο DNA θερμαίνεται στους 95°C και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του σε μονόκλωνο και όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις να σταματούν. Έτσι το DNA αποδιατάσσεται. Στη θερμοκρασία αυτή η DNA πολυμεράση θα υφίσταται μετουσίωση. Αυτό αποφεύγεται με τη χρήση ενός είδους πολυμεράσης που είναι θερμοανθεκτική. Η πολυμεράση αυτή προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* που επιβιώνει σε υψηλές θερμοκρασίες.

2. Θερμική επαναδιάταξη στους 50°C-60°C:

Οι ιοντικοί δεσμοί διασπώνται ανάμεσα στους εκκινητές και στις μονόκλωνες αλυσίδες και σχηματίζονται παροδικά. Στην ουσία η θερμοκρασία μειώνεται στους 53°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών).

3. Επιμήκυνση στους 72⁰C:

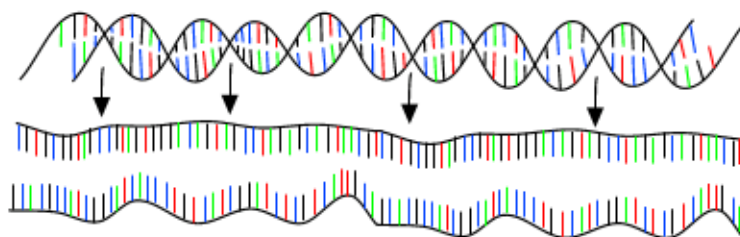
Αυτή είναι η κατάλληλη θερμοκρασία προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η δράση της DNA πολυμεράσης. Έτσι με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με φορά 5' προς 3' ενώ πραγματοποιείται και στις δύο αλυσίδες. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται τα 3 στάδια στα οποία οι θερμοκρασίες είναι διαφορετικές από αυτές που εφαρμόσαμε στην παρούσα εργασία.

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 κύκλοι 3 σταδίων:

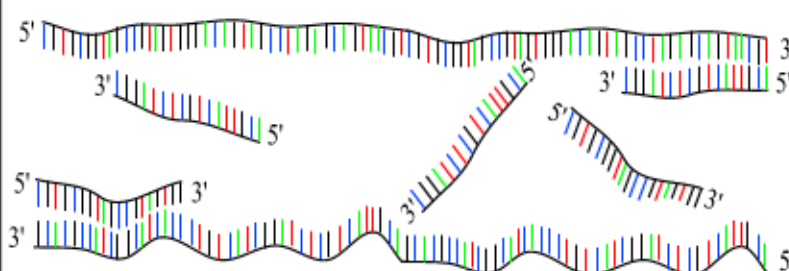
Στάδιο 1: Αποδιάταξη

1 minut 94 °C



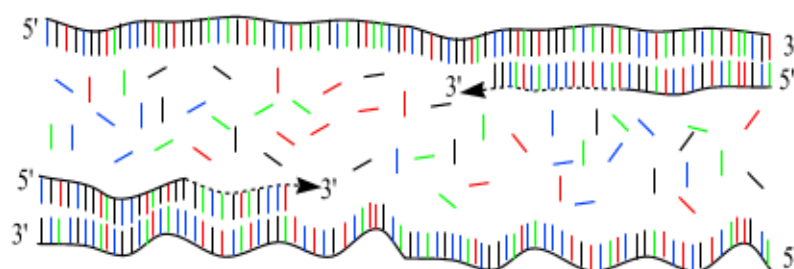
Στάδιο 2: Θερμική
Επαναδιάταξη

45 seconds 54 °C



Στάδιο 3: Επιμήκυνση

2 minutes 72 °C



(Andy Vierstraete 1999)

Εικόνα 1: Τα στάδια που εφαρμόζονται σε κάθε κύκλο της PCR (Vierstraete 1999)

Γενικά η μέθοδος της PCR στηρίζεται στη χρήση των παρακάτω:

- Μικρή ποσότητα DNA-στόχου που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.
- Ειδικό διάλυμα (buffer) για την πολυμεράση.
- Διάλυμα $MgCl_2$ κατάλληλης συγκέντρωσης.
- Ζεύγος εκκινητών για την έναρξη της αντιγραφής.
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).
- Θερμοσταθερή Taq πολυμεράση.

Τα σημαντικότερα αντιδραστήρια της PCR είναι οι εκκινητές, το DNA και η πολυμεράση. Το DNA αποτελείται από το στόχο DNA, τις αλληλουχίες δηλαδή που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης θα πρέπει να μην είναι κατεστραμμένο στην περιοχή του στόχου DNA, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και να είναι υψηλής καθαρότητας χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά, EDTA ή άλλα χημικά.

Οι εκκινητές αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της αντίδρασης, γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητοι προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας.

Όπως αναφέραμε και παραπάνω ένα από τα βασικά συστατικά της PCR είναι και η πολυμεράση. Στην ουσία είναι το ένζυμο με το οποίο πραγματοποιείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου DNA μετά από κάθε αποδιάταξη και υβριδισμό των εκκινητών. Η πιο ιδανική θερμοκρασία για τη δράση της Taq είναι 55-75°C και ο χρόνος ημιζωής της είναι 50 κύκλοι στους 95°C. Για να δράσει σωστά η πολυμεράση απαιτείται ειδικό διάλυμα buffer και κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂.

Για να πολλαπλασιάσουμε το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιήσαμε παγκόσμιους εκκινητές. Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι από πολλά είδη πτηνών, θηλαστικών και ψαριών. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA

Εκκινητής	Αλληλουχία
16S rRNA.Fw	5'-CCCGCCTGTTTACCAAAAACAT-3'
16S rRNA.Rv	5'-TCCATAGGGTCTTCTCGTC-3'

Μετά την απομόνωση DNA ακολουθήσαμε για τα δείγματα μας την εξής πειραματική διαδικασία:

- Μετά από αρκετές δοκιμές διαφόρων ποσοτήτων εκμαγείου DNA και επαναλήψεις της PCR που ήταν ανεπιτυχή, καταλήξαμε στην τοποθέτηση σε φιαλίδια errendorf 1μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης).
- Ανάλογα του αριθμού των δειγμάτων παρασκευάζουμε διαλύματα (master mix).

Παρακάτω φαίνονται αναλυτικά οι ποσότητες των διαλυμάτων (Master Mix) για γαλοπούλα και κοτόπουλο ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Επιπλέον προσθέτουμε και άλλα δύο φιαλίδια errendorf τα οποία δεν περιέχουν εκμαγείο DNA, αλλά είναι τα αρνητικά απαραίτητα για την διαδικασία της PCR.

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

- Μοιράζουμε σε κάθε errendorf που περιέχει 1μl δείγμα την ποσότητα του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.
- Κάνουμε μια σύντομη φυγοκέντρηση (spin).
- Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή και τον προγραμματίζουμε να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα:

Αρχική αποδιάταξη: 95⁰C για 4min

Αποδιάταξη: 95⁰C για 40sec

Θερμική Επαναδιάταξη: 53⁰C για 50sec

Επιμήκυνση: 72⁰C για 40sec

Τελική επιμήκυνση: 72⁰C για 10min

- Στη συνέχεια ελέγχουμε την επιτυχία της διαδικασίας κάνοντας ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2% όπως περιγράψαμε παραπάνω.
- Τέλος παρατηρούμε την πηκτή πάνω από τη συσκευή υπεριώδους φωτός και την φωτογραφίζουμε.

5. Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης ενός κλώνου (SSCP)

Τα **SSCPs** (Πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης) είναι τμήματα DNA που ενισχύονται μέσω της τεχνικής PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών μεγέθους 20 – 25 bp. Για τον εντοπισμό της παραλλακτικότητας στις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται πηκτές ηλεκτροφόρησης για μονόκλωνο DNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο ότι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του μονόκλωνου DNA εξαρτάται από τη δευτεροταγή δομή του μορίου, που αλλάζει σημαντικά με τις μεταλλάξεις. Είναι από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο DNA και την ανάλυση της ποικιλότητάς του. Στην ανάλυση με τα SSCP αρχικά το προϊόν αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Πιο αναλυτικά για τη διαδικασία θα αναφερθούμε παρακάτω. Έτσι αν υπάρχουν μεταλλάξεις, αλλάζει η κινητικότητα των ενισχυόμενων κομματιών DNA. Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η συγκυριαρχία των αλληλόμορφων, οι μικρές ποσότητες DNA που

απαιτούνται καθώς επίσης η ταχύτητα και το γεγονός ότι δε χρειάζεται ιδιαίτερος εξοπλισμός. Ωστόσο χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή τόσο κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων όσο και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τα δείγματα του DNA προκειμένου να διαχωριστούν φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές που πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών. Η αλυσίδα διασυνδέεται παρουσία συνήθως του N,N – methylenebisacrylamide με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας πορώδους πηκτής. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για τη μέθοδο SSCP είναι η εξής:

- ✓ Επιλέγουμε τζάμια, spacers (2mm) και “χτενάκι” 20 θέσεων (2mm). Τοποθετούμε τα τζάμια στη συσκευή και δοκιμάζουμε το χτενάκι πάνω στα τζάμια.
- ✓ Φτιάχνουμε διάλυμα 62,5ml 12% για 1gel το οποίο αποτελείται από:
 - 7,5gr acrylamide 38,5%
 - 0,1875gr bis-acrylamide
 - 5ml TBE 10X
 - Περίπου 6,5ml glycerol 50%
- ✓ Βάζουμε το διάλυμα στη συσκευή ανάδευσης με μαγνήτη και ρίχνουμε λίγο απιονισμένο νερό για να ανακατευτούν τα δύο πρώτα αντιδραστήρια και στη συνέχεια προσθέτουμε τα δύο τελευταία αντιδραστήρια.
- ✓ Τοποθετούμε γυάλινο χωνί και διηθητικό χαρτί σε ογκομετρικό σωλήνα και κάνουμε διήθηση του διαλύματος. Στη συνέχεια προσθέτουμε και απιονισμένο νερό μέχρι τα 65ml.

- ✓ Ρίχνουμε το διάλυμα στην κωνική φιάλη και προσθέτουμε 62,5μl TEMED και 325μl APS 20%. Ανακινούμε το διάλυμα στην κωνική φιάλη και ρίχνουμε το διάλυμα στο ζεύγος των τζαμιών.
- ✓ Ενώ περιμένουμε μέχρι να στερεοποιηθεί η πηκτή, ξεπαγώνουμε τα δείγματα (PCR προϊόν) κάνοντας spin.
- ✓ Μεταφέρουμε 7μl προϊόν της PCR και 10μl SSCP buffer (φορμαμίδιο μπλε της βρωμοφαινόλης κυανούν του ξυλαινίου και NaOH) σε 12 φιαλίδια των 0,5μl.
- ✓ Εφόσον έχει στερεοποιηθεί η πηκτή βγάζουμε τα τζάμια από τη συσκευή και καθαρίζουμε τα πηγαδάκια. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα τζάμια στη συσκευή SSCP και τη γεμίζουμε με TBE 0,5X.
- ✓ Πραγματοποιούμε spin των φιαλιδίων που είπαμε παραπάνω και ακολούθως αποδιάταξη.

Η αποδιάταξη του DNA είναι μια μέθοδος που επιτρέπει να παραμείνουν τα δείγματα του DNA σε μονόκλωνη κατάσταση για λίγη ώρα. Η αποδιάταξη είναι απαραίτητη για τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν με τη μέθοδο SSCP.

- ✓ Τοποθετούμε τα φιαλίδια στον αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή όπου επέρχεται η αποδιάταξή τους αφότου μείνουν σε υψηλές θερμοκρασίες (95⁰C για 2min, 97⁰C για 10min και 99⁰C για 7min).
- ✓ Σταματάμε οπωσδήποτε τη συσκευή 1,5min πριν τελειώσει το 3^ο στάδιο και τοποθετούμε τα φιαλίδια σε πάγο για να διατηρηθεί η μονόκλωνη κατάσταση του DNA.
- ✓ Τέλος εισάγουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια και ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση (18-22 ώρες).

Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Προκειμένου να γίνει ορατό το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιούμε χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου που περιλαμβάνει 3 διαλύματα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ✓ Ανοίγουμε τη συσκευή SSCP, παίρνουμε τα τζάμια και τα ανοίγουμε με μια τσιμπίδα.
- ✓ Κόβουμε την άκρη του gel και το τοποθετούμε σε κοντό δοχείο.
- ✓ Φτιάχνουμε το 1^ο διάλυμα σε ογκομετρικό σωλήνα 1lt. Αυτό αποτελείται από: 10ml αιθανόλη 100%, 0,5ml οξικό οξύ και προσθήκη H₂O μέχρι τον όγκο των 400ml.
- ✓ Ρίχνουμε 200ml στο δοχείο που περιέχει τη ζελατίνα με το gel και βάζουμε το δοχείο στην ειδική συσκευή (ανακινούμενη πλάκα) για 3min περίπου στις 150 στροφές.
- ✓ Αδειάζουμε το διάλυμα με προσοχή και κάνουμε επανάληψη της διαδικασίας για τα άλλα 200ml διαλύματος.
- ✓ Αδειάζουμε ξανά το διάλυμα και ξεπλένουμε το gel με ddH₂O για 1min.
- ✓ Προσθέτουμε το 2^ο διάλυμα στο δοχείο που αποτελείται από 200ml AgNO₃ 1gr/lt για περίπου 10-15min.
- ✓ Παράλληλα ετοιμάζουμε το 3^ο διάλυμα που αποτελείται από: 3gr NaOH, 0,1gr NaBH₄, 1ml φορμαλδεΰδη και προσθήκη H₂O μέχρι τον όγκο των 200ml. Το τοποθετούμε στην κίτρινη συσκευή για να αναδεύεται.
- ✓ Αφού περάσει ο χρόνος αδειάζουμε το δοχείο που περιέχει το διάλυμα και ξεπλένουμε το gel δύο φορές με ddH₂O.
- ✓ Προσθέτουμε το διάλυμα που έχουμε φτιάξει (το gel μαυρίζει) και το αφήνουμε περίπου 5-10min.

- ✓ Στη συνέχεια αδειάζουμε το διάλυμα που περιέχει το δοχείο και προσθέτουμε ddH₂O για 1min ώστε να καθαρίσει το gel. Αφαιρούμε το νερό και βγάζουμε το gel από το δοχείο.

Στην τεχνική της χρώσης νιτρικού αργύρου, ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με τη φορμαλδεϋδη παρουσία βάσης. Το DNA φαίνεται καφέ σε κίτρινο φόντο. Οι πηκτές μπορούν να διατηρηθούν για αρκετό καιρό. Έτσι μετά τη χρώση της πηκτής είναι δυνατή η παρατήρηση των προτύπων.

6. Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)

Πρόκειται για πολυμορφισμούς οι οποίοι δημιουργούνται από τις τυχαίες νουκλεοτιδικές αλλαγές που μπορεί να συμβούν σε μια περιοχή DNA, με αποτέλεσμα την καταστροφή της θέσης αναγνώρισης μιας συγκεκριμένης ενδονουκλεάσης περιορισμού. Με άλλα λόγια οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που κόβουν τα μόρια του DNA σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές θέσεις, αναλόγως το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Οι περιοχές αναγνώρισης του ενζύμου έχουν μέγεθος 4 – 6 ζεύγη βάσεων. Γενικά όσο πιο μικρή είναι η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, τόσο περισσότερα είναι τα κομμάτια DNA που προκύπτουν μετά από την πέψη. Τα τμήματα DNA μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης με τα μικρά μόρια του DNA να κινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Τα ένζυμα περιορισμού απομονώνονται από βακτήρια και αποτελούν μέρος της κυτταρικής άμυνας των βακτηρίων εναντίον των ιών, εφόσον καταστρέφουν το γενετικό υλικό του ιού μόλις αυτός προσβάλλει το βακτήριο.

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών που προκύπτουν μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπάρχουν δύο εναλλακτικές μέθοδοι. Σκοπός και των δύο μεθόδων είναι να ξεχωρίσει το συγκεκριμένο τμήμα στο οποίο υπάρχει αλλαγή στη θέση αναγνώρισης

του ενζύμου μεταξύ του συνόλου των τμημάτων που προκύπτουν μετά από μια τέτοια πέψη. Η πρώτη μέθοδος δηλαδή η ανάλυση κατά Southern των τμημάτων χρησιμοποιεί ως ανιχνευτή μια αλληλουχία που περιλαμβάνει τη συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού, επιτρέποντας το διαχωρισμό των ατόμων στα οποία υπάρχει η θέση αναγνώρισης του ενζύμου από εκείνα στα οποία λόγω κάποιας μετάλλαξης δεν υπάρχει πια. Όμως τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια νέα μέθοδος για την ανίχνευση RFLP δεικτών, η οποία βασίζεται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Σε αυτή την περίπτωση σχεδιάζονται εκκινήτες για τις αλληλουχίες που περιβάλλουν τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου και το προϊόν της PCR πέπτεται με τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού. Πιο αναλυτικά για τη μέθοδο συνήθως αρχικά γίνεται εξαγωγή DNA από ένα άτομο και ακολουθεί καθαρισμός του DNA. Το καθαρό DNA μπορεί να ενισχυθεί με τη μέθοδο της PCR. Στη συνέχεια το DNA κόβεται σε περιοριστικά κομμάτια από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, οι οποίες θα το κόψουν μόνο όπου υπάρχουν οι συγκεκριμένες αλληλουχίες αναγνώρισης των ενζύμων. Στη συνέχεια τα περιοριστικά θραύσματα διαχωρίζονται ανάλογα με το μήκος τους, σε μια ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης. Η απόσταση μεταξύ των θέσεων κοπής ποικίλει μεταξύ των ατόμων και έτσι το μήκος και ο αριθμός των κομματιών DNA θα διαφέρει. Άρα τα κύρια στάδια μιας ανάλυσης RFLP είναι τα παρακάτω:

- Επιλογή της ακολουθίας DNA που θα αναλυθεί.
- Εξαγωγή DNA.
- Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.
- Χρώση της πηκτής.
- Ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε πέψη του γονιδίου 16S rRNA με δύο διαφορετικά ένζυμα περιορισμού. Στη βάση δεδομένων GenBank sequence database βρήκαμε τις αλληλουχίες των δύο ειδών για το τμήμα που μελετάμε, στη συνέχεια έγινε έλεγχος των αλληλουχιών των δύο ειδών με όλα τα διαθέσιμα ένζυμα με το πρόγραμμα BioEdit και καταλήξαμε σε δύο ένζυμα τα οποία διαχωρίζουν τα είδη μας. Όπως θα δούμε αναλυτικά παρακάτω τα ένζυμα αυτά τα χρησιμοποιήσαμε στα PCR προϊόντα των αναμείξεων που δημιουργήσαμε με σκοπό να ταυτοποιήσουμε και τα δύο είδη σε όλες τις αναμείξεις. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας ενώ οι πλάγιες γραμμές δείχνουν τα σημεία τομής των ενζύμων.

Πίνακας 4. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού. Οι πλάγιες γραμμές δείχνουν τα σημεία τομής των ενζύμων. Το γράμμα W στην αλληλουχία αναγνώρισης δείχνει ότι στη θέση αυτή μπορεί να βρίσκεται A ή T.

Ένζυμο Περιορισμού	Αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει
AvaII	5' G/GWCC 3' CCWG/G
DdeI	5' C/TNAG 3' GANT/C

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

- Έχουμε συνολικά τα δείγματα (μαζί με τα δύο πρότυπα). Χρησιμοποιήσαμε φιαλίδια erpendorf των 0,5ml και προσθέσαμε σε όλα 2μl από το PCR προϊόν. Μοιράσαμε τα ένζυμα περιορισμού AvaII και DdeI στα δείγματα.
- Ανάλογα του αριθμού δειγμάτων, παρασκευάζουμε σε δύο φιαλίδια erpendorf τα διαλύματα πέψης .

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συνολικές ποσότητες των δύο διαλυμάτων πέψης που μοιράζονται στα φιαλίδια erpendorf

(προσθέσαμε και άλλα δύο που είναι τα αρνητικά). Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 10μl.

DdeI		
Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Συγκεντρώσεις
Buffer (10X)	1μl	1X
Ένζυμο (10units/μl)	0,3μl	3U
DNA	2μl	200ng
ddH ₂ O	6,7μl	

Οι ίδιες ποσότητες ισχύουν και για το ένζυμο περιορισμού AnaII.

- Αφού φτιάξουμε τα δύο διαλύματα πέψης κάνουμε vortex και spin.
- Επωάζουμε σε κλίβανο στους 37⁰C όλο το βράδυ για τη δράση του ενζύμου.

Στη συνέχεια τα δείγματα DNA προκειμένου να διαχωριστούν εισάγονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και στην ουσία μιλάμε για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτή που ακολουθήσαμε για την μέθοδο SSCP και σε γενικές γραμμές περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά παρασκευάζουμε πηκτή πολυακρυλαμίδης:

- Προετοιμάζουμε τη συσκευή παρασκευής της πηκτής 12% (2 gel).
- Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 16gr ουρία + 33ml μητρικού διαλύματος ακρυλαμίδης 30% + 13ml TBE 10X. Αναδεύουμε σε οριζόντιο αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν πλήρως τα συστατικά.
- Διηθούμε το διάλυμα με διηθητικό χαρτί εντός ογκομετρικού κυλίνδρου.

- Συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι τα 125ml και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
- Προσθέτουμε 125μl TEMED και 650μl APS 20%, ανακινούμε και γρήγορα προτού πήξει, περιχύνουμε το διάλυμα στην συσκευή παρασκευής της πηκτής.
- Τοποθετούμε τα χτενάκια για τη δημιουργία των πηγαδιών και περιμένουμε ώστε οι πηκτές να είναι έτοιμες προς ηλεκτροφόρηση.

Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που έχουμε πέψει:

- Τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης μια μικρή ποσότητα TBE 1X (προκύπτει από την αραίωση 1:10 του TBE 10X).
- Τοποθετούμε τις πηκτές στη συσκευή, αφού πρώτα έχουμε αφαιρέσει τα χτενάκια και προσθέτουμε TBE 1X.
- Προετοιμάζουμε τα δείγματα αναμιγνύοντας 4μl loading buffer με όλη την ποσότητα του διαλύματος που βρίσκεται στα eppendorf.
- Εισάγουμε τα δείγματα στις πηκτές και στο τελευταίο πηγαδάκι τοποθετούμε το ladder (100bp).
- Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση με σταθερή τάση 220 volts για περίπου 2 -2,5 ώρες.

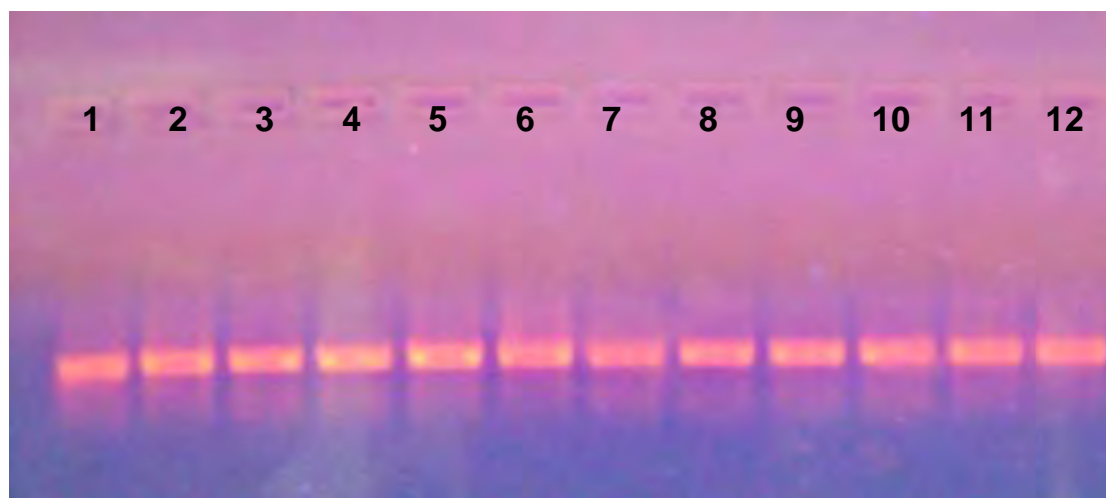
Η διαδικασία της χρώσης που πραγματοποιείται, είναι ακριβώς ίδια με αυτή της SSCP.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα είδη που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη ήταν προϊόντα ωμά και προέρχονται από τα τοπικά καταστήματα της Λάρισας. Οι πίνακες 1 και 2, που αναφέραμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, παρουσιάζουν αναλυτικά τα είδη και την ανάμειξή τους σε διάφορα ποσοστά.

Με τη διαδικασία της απομόνωσης του DNA, το υλικό που λάβαμε, ήταν αρκετά καθαρό δηλαδή απαλλαγμένο από πρωτεΐνες και άρα ικανό να δώσει ικανοποιητικά προϊόντα PCR. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έγινε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

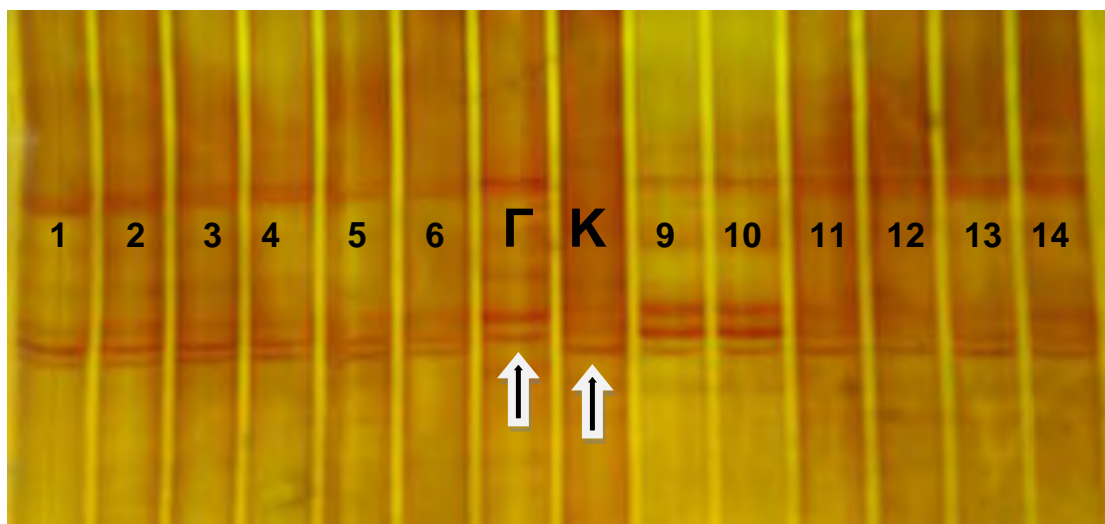
Στη συνέχεια ακολούθησε η τεχνική της PCR με την οποία πολλαπλασιάσαμε ένα τμήμα του γονιδίου 16S rRNA ίδιο και για τα δύο είδη. Η εικόνα 3 δείχνει τα προϊόντα της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%



Εικόνα 3: προϊόντα PCR του γονιδίου 16S rRNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, οι αριθμοί 1 έως 12 είναι τα δείγματα.

Η εφαρμογή της μεθόδου SSCP έδειξε ότι μπορούμε να δούμε τα πρότυπα γαλοπούλας και κοτόπουλου σε όλα τα ποσοστά των

αναμίξεων. Στην εικόνα 4 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

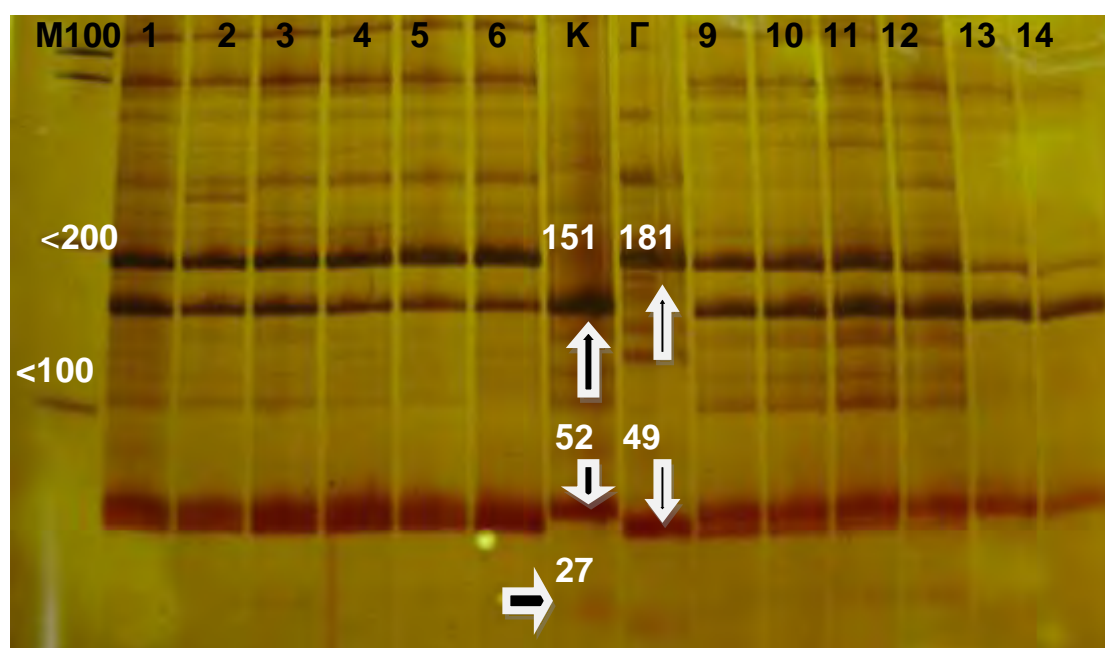


Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Στην εικόνα 4 παρατηρούμε ευδιάκριτες τις ζωνώσεις που δείχνουν τα δύο πρότυπα Γ (Γαλοπούλα) και Κ (Κοτόπουλο). Επιπλέον, τα δείγματα 1 έως 14 που αντιστοιχούν σε ποσοστά των προσμίξεων. Στο δείγμα 1 η ζώνωση της γαλοπούλας είναι πιο έντονη, καθώς έχει το μεγαλύτερο ποσοστό 95% ενώ η ζώνωση του κοτόπουλου σχεδόν δε φαίνεται, επειδή έχει ποσοστό 5%. Ωστόσο, όσο προχωράμε στα επόμενα δείγματα μέχρι το δείγμα 6 παρατηρούμε το χρώμα των ζωνώσεων της γαλοπούλας να είναι σταδιακά λιγότερο έντονο και το χρώμα των ζωνώσεων του κοτόπουλου να γίνεται σταδιακά πιο έντονο, έως ότου στο δείγμα 6 το χρώμα των ζωνώσεων να είναι το ίδιο στη γαλοπούλα και στο κοτόπουλο, δηλαδή να έχουν το ίδιο ποσοστό. Αντίθετα από τα δείγματα 9 έως 14 παρατηρούμε ότι στο δείγμα 9 οι ζωνώσεις του κοτόπουλου και της γαλοπούλας είναι έντονες που σημαίνει ότι έχουν το ίδιο ποσοστό (50% + 50%), αλλά όσο προχωράμε στα επόμενα δείγματα βλέπουμε ότι αυξάνεται η ένταση του χρώματος του κοτόπουλου, δηλαδή αυξάνεται το ποσοστό του και μειώνεται η

ένταση του χρώματος της γαλοπούλας, δηλαδή μειώνεται το ποσοστό της.

Η εφαρμογή της μεθόδου RFLP στα δείγματα, μας έδωσε τα πρότυπα των πέψεων και για τα δύο είδη σε όλες τις αναμίξεις. Μετά την πέψη του 16S rRNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *AvaII* και *DdeI* ακολούθησε η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες. Η παρούσα εφαρμογή αποδείχτηκε πολύ επιτυχής, αφού μας έδειξε τις προσμίξεις των δύο ειδών στα διάφορα ποσοστά.



Εικόνα 5: Τα αποτελέσματα πέψης του 16S rRNA των δύο ειδών πουλερικών με το ένζυμο *AvaII*, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. M100: Ladder 100bp. Οι λευκοί αριθμοί δείχνουν τα τμήματα περιορισμού των δύο ειδών. Τα δείγματα από 1 έως 14 μας δείχνουν τις αναμίξεις των δύο ειδών σε διάφορα ποσοστά.

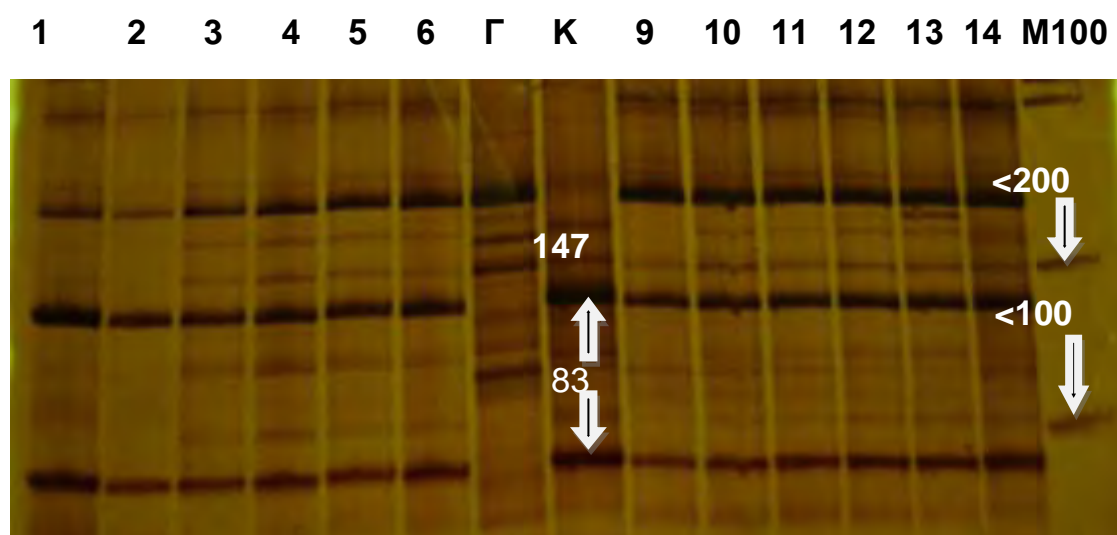
Στην εικόνα 5 φαίνονται με τα βέλη τα πρότυπα (οι ζωνώσεις) που πήραμε για το κάθε είδος πουλερικού σύμφωνα με το ένζυμο *AvaII*. Τα

τμήματα περιορισμού του κάθε είδους όπως προέκυψαν μετά την πέψη εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Είδος	Τμήματα Περιορισμού(bp)	Αριθμός Τμημάτων	Άθροισμα Τμημάτων
Γαλοπούλα	181 49	2	230
Κοτόπουλο	151 52 27	3	230

Πίνακας 5: Τα τμήματα περιορισμού των δύο ειδών πουλερικών όπως προέκυψαν μετά από πέψη του 16S rRNA με το ένζυμο *AvaII*.

Μετά την πέψη του 16S rRNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση *DdeI* ακολούθησε η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης όπως φαίνεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Τα αποτελέσματα πέψης του 16S rRNA των δύο ειδών πουλερικών με το ένζυμο *DdeI*, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. M100: Ladder 100bp. Οι λευκοί αριθμοί δείχνουν τα τμήματα περιορισμού των δύο ειδών. Οι αριθμοί από 1 έως 14 μας δείχνουν τις αναμίξεις των δύο ειδών σε διάφορα ποσοστά.

Στην εικόνα 6 διακρίνονται με τα βέλη τα πρότυπα (οι ζωνώσεις) που πήραμε για το κάθε είδος πουλερικού σύμφωνα με το ένζυμο *DdeI*. Παρατηρούμε ότι για τη γαλοπούλα δεν έδωσε τμήματα περιορισμού μετά την πέψη με το συγκεκριμένο ένζυμο. Τα τμήματα περιορισμού του κάθε είδους όπως προέκυψαν μετά την πέψη εμφανίζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Τα τμήματα περιορισμού των δύο ειδών πουλερικών όπως προέκυψαν μετά από πέψη του 16S rRNA με το ένζυμο

Είδος	Τμήματα Περιορισμού(bp)	Αριθμός Τμημάτων	Άθροισμα Τμημάτων
Γαλοπούλα		0	230
Κοτόπουλο	147 83	2	230

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα πουλερικά ως τρόφιμο έχουν ιδιαίτερη σημασία στη σύγχρονη διατροφή του ανθρώπου. Μάλιστα η εμπορική αξία ορισμένων προϊόντων όπως του κρέατος από γαλοπούλα είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Γι' αυτό πολλές φορές παρατηρείται το φαινόμενο νοθείας των τροφίμων, όπου το κρέας υψηλής αξίας αντικαθίσταται με ένα άλλο χαμηλότερης. Εξαιτίας αυτού του φαινομένου, όλοι οι ειδικοί συμφωνούν ότι το πιο σημαντικό θέμα είναι η ποιότητα των τροφίμων. Με τον όρο ποιότητα εννοείται το προϊόν εκείνο που είναι ασφαλές για τον καταναλωτή, είναι αυθεντικό, έχει τα κατάλληλα οργανοληπτικά και διατροφολογικά χαρακτηριστικά που ικανοποιούν το μέσο καταναλωτή και περιέχει ότι αναγράφεται στην επισήμανση της συσκευασίας.

Γι' αυτό είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν κατάλληλοι μέθοδοι, οι οποίοι θα ελέγχουν την ποιότητα και τη νοθεία σε όλα τα στάδια της παραγωγής και διάθεσης αυτών των προϊόντων. Επίσης είναι σημαντική η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνολογιών που σκοπεύουν στην ταυτοποίηση και στο διαχωρισμό των ειδών στα προϊόντα με την παράλληλη ανίχνευση πιθανών προσμίξεων.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για την ανάπτυξη και εφαρμογή δύο μοριακών μεθόδων προκειμένου να γίνει η ανίχνευση των ειδών κοτόπουλου και γαλοπούλας ύστερα από την ανάμειξή τους σε διάφορα ποσοστά. Τα είδη που χρησιμοποιήσαμε είναι από ωμό κρέας και κυκλοφορεί στην ελληνική αγορά. Η διαδικασία στηρίχθηκε στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και στον πολυμορφισμό που εμφανίζουν ορισμένοι γενετικοί του τόποι.

Η ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των ζωικών οργανισμών και κατά συνέπεια ο διαχωρισμός τους έγινε αντικείμενο μελέτης στο παρελθόν από αρκετούς ερευνητές, οι οποίοι ανέπτυξαν ποικίλες μοριακές τεχνικές βασισμένες στους γενετικούς δείκτες όπως τα AFLP (*Sasazaki et al. 2004*), RAPD (*Martinez 1998*), Multiplex PCR

(Matsunaga 1999), Species Specific PCR (Santos et al. 2012). Ελάχιστες από αυτές τις μελέτες ασχολήθηκαν με πουλερικά, τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο της δικιάς μας μελέτης. Οι περισσότερες ασχολούνται με το διαχωρισμό κρέατος από θηλαστικά και λίγες με το διαχωρισμό του κοτόπουλου από τη γαλοπούλα. Επιπλέον στις περισσότερες περιπτώσεις, έχει χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης το γονίδιο Cyt b.

Χρησιμοποιήσαμε δύο τεχνικές ανάλυσης του DNA και ειδικότερα την τεχνική PCR-SSCP και την PCR-RFLP. Με αυτές τις δύο τεχνικές αναλύσαμε ένα τμήμα του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχονδριακού DNA. Οι συγκεκριμένες τεχνικές χαρακτηρίζονται από υψηλή επαναληψιμότητα, είναι αξιόπιστες, γρήγορες και οικονομικές. Πρόκειται για δύο μεθόδους που αποτελούνται από τέσσερα στάδια τα οποία είναι ίδια: 1) Απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA από ιστό γαλοπούλας και κοτόπουλου, 2) Ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών τόπων, 3) Στην περίπτωση της τεχνικής SSCP, αποδιάταξη των τμημάτων DNA και στην περίπτωση της RFLP, πέψη με ένζυμα περιορισμού και 4) Ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Αρχικά από μικρές ποσότητες ιστών γαλοπούλας και κοτόπουλου λάβαμε διάφορες ποσότητες ενιαίου mtDNA που αντιστοιχούν σε διάφορα ποσοστά, όπως αναφέραμε αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών και γι' αυτό το λόγο μας δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου (16S rRNA) «universal primers» στους οποίους ανταποκρίθηκαν και τα δύο είδη. Η χρήση των «universal primers» διευκολύνει πολύ την εφαρμογή της PCR. Ελαχιστοποιεί το χρόνο σχεδίασης των εκκινητών και το κόστος απόκτησής τους σε αντίθεση με τη χρήση εκκινητών εξειδικευμένων στο κάθε είδος.

Με την εφαρμογή της μεθόδου SSCP, μπορέσαμε να δούμε τα πρότυπα της γαλοπούλας και του κοτόπουλου κατά την ανάμειξή τους σε διάφορα ποσοστά, όπως φαίνονται στους πίνακες που αναφέραμε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Πιο συγκεκριμένα διαπιστώσαμε με την ανάμειξη των δύο ειδών τη νόθευση που μπορεί να εμφανιστεί σε διάφορα καταστήματα σε ότι αφορά τα κρέατα και όχι μόνο. Έτσι πολλές φορές οι ετικέτες που αναγράφονται στα κρέατα δεν είναι πραγματικές.

Κάτι παρόμοιο παρατηρείται και στη μέθοδο RFLP. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι πήραμε τα πρότυπα των πέψων και για τα δύο είδη κατά την επίτευξη όλων των αναμίξεων σε διάφορα ποσοστά, χρησιμοποιώντας δύο ένζυμα περιορισμού και συγκεκριμένα το *AvaII* και το *DdeI*. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, έδωσε ευδιάκριτες ζωνώσεις που αντιστοιχούν στα τμήματα περιορισμού, οι οποίες μπορούν να συγκριθούν εύκολα μεταξύ τους. Επίσης φαίνεται ότι με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι εφικτός και ο εντοπισμός προσμίξεων όπως συνέβη στην περίπτωση της γαλοπούλας και του κοτόπουλου καθώς λάβαμε και τα δύο πρότυπα.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε τις τεχνικές SSCP και RFLP και καταφέραμε να αναπτύξουμε δύο αξιόπιστες μεθόδους για τον εντοπισμό των δύο προτύπων μετά την ανάμειξή τους και το αποτέλεσμα ήταν επιτυχές. Ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA ενισχύθηκε με την τεχνική PCR και στη συνέχεια η πρώτη μέθοδος μας έδειξε το αποτέλεσμα που θέλαμε, δηλαδή από την πρόσμιξη των δύο πουλερικών εμφανίστηκαν τα πρότυπα των ειδών σε ποσοστό 5% μέχρι βαθμιαία να φτάσει σε ποσοστό 95%, ενώ στη δεύτερη μέθοδο το τμήμα του mtDNA «κόπηκε» με τα ένζυμα περιορισμού *AvaII* και *DdeI*. Το αποτέλεσμα ήταν η εμφάνιση και η σύγκριση των δύο προτύπων. Γενικά μπορούμε να πούμε ότι και οι δύο μοριακοί δείκτες, και πολύ περισσότερο ο

δεύτερος, αποτελούν πολύτιμα εργαλεία σε ελέγχους ρουτίνας για να διαπιστώσουμε την προέλευση των πουλερικών και όλων των κρεάτων στις διάφορες επιχειρήσεις εστίασης όπως τα εστιατόρια και την αυθεντικότητα των τυποποιημένων προϊόντων κρέατος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία:

1. Stryer Lubert, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ (916-917), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
2. Benjamin Lewin, GENES VIII, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε Αλεξανδρούπολη
3. Bruford M., Bradley D., Luikart G., (2003). DNA Markers reveal the reveal the complexity of livestock domestication. *Nature* 2003. Vol.4 900-910
4. Spooner D., Van Treuren R., Devincible M. (2005). Molecular Markers for Genebank Management. PGRI technical bulletin No 10.
5. Pereira S. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and molecular Biology* 23: 745-752
6. Van Rijswijk Wendy, Frewer Lynn J., Menozzi Davide and Faioli Giusi 2007. Consumer perceptions of traceability: A cross-national comparison of the associated benefits. July 2008 (pages 452-464)
7. Raspor Peter, (2005). Bio-markers: traceability in food safety issues. *Acta biochimica Polonica Vol. 52 No. 3/2005, 659-664*
8. Spiegel ONLINE, Darminfekt, UKE-Direktor zweifelt an Hilfe durch Ehec-Schnelltest, 31 Μαΐου 2011
9. Matt Seaver, Συστήματα Ποιότητας ISO 9000:2000 με εφαρμογή στην πράξη, εκδόσεις Έλλην 2011.
10. Nicholas H. Barton, Derek E.G. Briggs, Jonathan A. Eisen, David B. Goldstein, Nipam H. Patel (2007)- Evolution
11. Brown WM, George M Jr., Wilson AC (1979). "Rapid evolution of mitochondrial DNA". *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1967-1971.
12. Brown WM (1980). "Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis". *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3605-3609

13. Porter, WF (1994). "Family Meleagrididae (Turkeys)". In del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. eds. *Handbook of the Birds of the World, Vol. 2. New World Vultures to Guinea fowl*. Barcelona: Lynx Edicions, pp. 364–375.)
14. (Firefly Encyclopedia of Birds, Ed. Perrins, Christopher. Perrins, Christopher. Buffalo, NY: Firefly Books, Ltd., 2003)
15. (World Livestock 2011, Livestock in food security)
16. Γενετική, μοριακή και φυλογενετική μελέτη του μιτοχονδριακού DNA του *Silurus glanis* (Siluriformes, Siluridae), Βήττας Σπυρίδων, 2010
17. Santos CG, Melo VS, Amaral JS, Estevinho L, Oliveira MB, Mafra_, Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin 2012
18. Sasazaki S, Itoh K, Arimitsu S, Imada T, Takasuga A, Nagaishi H, Takano S, Mannen H, Tsuji S, Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle 2004
19. Haunshi S, Basumatary R, Girish PS, Doley S, Bardoloi RK, Kumar A, Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin 2009.
20. CHIKUNI K., TABATA T., KOSUGIYAMA M., MONMA M., SAITO M., 1994a –
Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Science*. 37, 337-345
21. CHIKUNI K., TABATA T., SAITO M., MONMA M., 1994b –
Sequencing of
mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. *Animal Science and Technology (Jpn)*. 65, 571-579
22. Girish et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene, 2005
23. Girish et al. Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism of Mitochondrial 12S rRNA Gene: A Simple Method for Identification of Poultry Meat Species, 2007
24. Hopwood et al. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures, 1999

25. Trends in Biotechnology Vol. 23 No. 7 Ιούλιος 2005
26. Chandrika Murugaiah et al. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA, 2009
27. Coenye T, Vandamme P (November 2003). "Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes". *FEMS Microbiol. Lett.* **228**
28. MEYER R., HÖFELEIN C., LÜTHY J., CANDRIAN U., 1995 – Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification food. Journal Association of Official Analytical Chemists. 78, 1542-1551
29. The Polymerase Chain Reaction (PCR), Sumanas 2004
30. Iciar Martinez- Species identification in meat products by RAPD analysis, 1998
31. T. Matsunaga- A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay, 1999
32. Syarul Nataqain Baharum- Application of 16s rDNA and cytochrome b ribosomal markers in studies of lineage and fish populations structure of aquatic species, 2011
33. Hassan A. I. Ramadan- Sequence of specific mitochondrial 16S rRNA gene fragment from Egyptian buffalo is used as a pattern for discrimination between river buffaloes, cattle, sheep and goats- 2010
34. Steven Stenhouse- Poultry diseases, sixth edition, 2008

Πηγές από Internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>

http://www.conferences.gr/fileadmin/_temp_/proceedings_cretacert/Kardassi_Presentation_Cretacert.pdf,

http://europa.eu/legislation_summaries/environment/nature_and_biodiversity/l21170_el.htm)

http://biotech.aua.gr/EPEAEK/site_Biotech/gewp_biot/Evolution/course_material/Exel_mtDNA.htm

Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S (January 2007). ["Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies"](#)

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (January 1991). ["16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study"](#)

greengenes.lbl.gov - Aligned 16S rDNA data and tools

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (January 1991). ["16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study"](#)