

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΡΓΥΡΑΚΟΥΛΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών δεικτών για τον έλεγχο
ποιότητας και την ταυτοποίηση ελληνικών τυριών
Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης



ΛΑΡΙΣΑ 2012

Ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών δεικτών για τον έλεγχο
ποιότητας και την ταυτοποίηση ελληνικών τυριών
Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:	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

Πρόλογος

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση ενός μοριακού δείκτη, ικανού να διακρίνει τα είδη ζώων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τυριών Π.Ο.Π, ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για έλεγχο πιθανής νοθείας σε όλα τα ελληνικά τυριά Π.Ο.Π. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16s rRNA του μιτοχονδριακού DNA.

Η πτυχιακή διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο είναι το γενικό μέρος στο οποίο περιγράφεται η σημασία ύπαρξης των ελληνικών τυριών Π.Ο.Π, η αναγκαιότητα της αναγνώρισης των ειδών τους με σκοπό να αποφευχθεί η νόθευση και η εξαπάτηση των καταναλωτών. Επίσης στο γενικό μέρος γίνεται μια αναφορά στα χαρακτηριστικά των ελληνικών τυριών Π.Ο.Π που μελετήθηκαν. Στη συνέχεια γίνεται μια σύντομη ιστορική αναδρομή των μεθόδων ταυτοποίησης και περιγράφεται η χρήση των μοριακών δεικτών. Επιπλέον γίνεται αναφορά στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και περιγράφονται οι λόγοι για τους οποίους χρησιμοποιήθηκε το 16s rRNA ως δείκτης για την ταυτοποίηση των ελληνικών τυριών Π.Ο.Π.

Στο δεύτερο και ειδικό μέρος περιγράφονται τα υλικά και ο εξοπλισμός του εργαστηρίου, οι πειραματικές διεργασίες που πραγματοποιήθηκαν, τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών καθώς και η συζήτηση των συμπερασμάτων που προέκυψαν.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την τιμή που μου έκανε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τον υποψήφιο Διδάκτορα, Θεμιστοκλή Γιαννούλη, για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έδειξε σ' όλα τα στάδια της διατριβής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Αικατερίνη Μούτου και τη Λέκτορα Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών κα. Θεολογία Σαραφίδου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθεια του σ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος και την άψογη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) για να εξετάσουμε τα είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται στα τυποποιημένα Π.Ο.Π ελληνικά τυριά. Σκοπός της είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου μοριακού ελέγχου ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε έλεγχο τυχόν νοθείας στα κρίσιμα στάδια της παραγωγής των συγκεκριμένων προϊόντων. Συνολικά εξετάστηκαν 18 διαφορετικά προϊόντα (δείγματα). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του γονιδίου 16s rRNA του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) που απομονώθηκε από το κάθε ένα δείγμα ξεχωριστά.

Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Αρχικά, με εκκινητές κοινούς για όλα τα δείγματα (universal primers), ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR τμήμα του γονιδίου 16s rRNA μεγέθους 234bp, όσον αφορά τα είδη του προβάτου και της αγελάδας και 235bp για το είδος της κατσίκας. Ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Η ανάλυση του τμήματος του γονιδίου 16s rRNA αποκάλυψε 4 πρότυπα, τα οποία εμφανίζονται στα τυποποιημένα προϊόντα. Από την ανάλυση αυτών των προτύπων (αποτελεσμάτων) συμπεραίνουμε ότι ένα από τα προϊόντα παρουσιάζουν κάποιο είδος νόθευσης, είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Γενικό μέρος-Εισαγωγή.....
1.1	Τυριά Π.Ο.Π και ΠΓΕ.....
1.1.1	Προδιαγραφές ελληνικών τυριών Π.Ο.Π.....
1.1.2	Τα 20 ελληνικά τυριά Π.Ο.Π.....
1.2	Μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών – βιβλιογραφική ανασκόπηση.....
1.3	Μοριακοί δείκτες.....
1.4	Μιτοχονδριακό DNA.....
1.5	16 sRNA.....
1.6	Σκοπός μελέτης.....
2.	Ειδικό μέρος-υλικά και μέθοδοι.....
2.1	Απομόνωση DNA.....
2.2	Ποσοτικοποίηση του DNA με φωτομέτρηση.....
2.3	Ποιοτικός έλεγχος του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτικήαγαρόζη
2.4	PCR.....
2.5	SSCP.....
3.	Αποτελέσματα.....
4.	Συζήτηση.....
5.	Βιβλιογραφία.....

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΤΥΡΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΜΕΝΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ-ΠΟΠ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΜΕΝΗΣ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΔΕΙΞΗΣ-ΠΓΕ

Στην Ευρώπη υπάρχει μια πληθώρα τυριών που παράγονται με ξεχωριστή μέθοδο και διαθέτουν ιδιαίτερη γεύση, υφή και άρωμα τα οποία παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην παράδοση κάθε τόπου. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, παρόλη την ελεύθερη κυκλοφορία προϊόντων, υπηρεσιών και προσώπων, έχοντας αποδεχτεί τη διαφορετικότητα κάθε κράτους μέλους όσον αφορά τα έθιμα, τις παραδόσεις και τη διατροφή θέσπισε τον κανονισμό 2081/92, για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων, ο οποίος αντικαταστάθηκε από τον κανονισμό 510/2006.

Σύμφωνα με τον κανονισμό αυτό, ως **«Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης - ΠΟΠ»** νοείται το όνομα μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται στην περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που προέρχεται από αυτή την περιοχή, το συγκεκριμένο τόπο ή τη χώρα, και του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο γεωγραφικό περιβάλλον, που περιλαμβάνει τους φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και του οποίου η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία λαμβάνουν χώρα στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή. Ως **«Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη - ΠΓΕ»** νοείται το όνομα μιας περιοχής ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται στην περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που κατάγεται από αυτήν την περιοχή, το συγκεκριμένο τόπο ή τη χώρα, και του οποίου η συγκεκριμένη ποιότητα, η φήμη ή άλλο χαρακτηριστικό μπορούν να αποδοθούν στη γεωγραφική αυτή καταγωγή και του οποίου η παραγωγή ή/και η μεταποίηση ή/και η επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή. (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων – Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας)

Όσον αφορά τα τυριά, οι φυλές των ζώων, ο τρόπος διαχείρισης και εκτροφής τους, οι εδαφο- κλιματικές συνθήκες της περιοχής μαζί με τη μέθοδο παρασκευής και ωρίμανσης των τυριών αποτελούν τους παράγοντες εκείνους οι οποίοι κάνουν ένα τυρί να ξεχωρίσει και να αποτελέσει τμήμα της παράδοσης μιας περιοχής.

Η προστασία των ονομασιών προέλευσης και των γεωγραφικών ενδείξεων μπορεί να αποτελέσει μοχλό ανάπτυξης των μειονεκτικών και απομακρυσμένων περιοχών, αυξάνοντας την αναγνωρισιμότητα των προϊόντων και κατά συνέπεια τα εισοδήματα των παραγωγών. Ταυτόχρονα, οι προστατευόμενες ονομασίες κατοχυρώνουν και τους καταναλωτές, σχετικά με την προέλευση των προϊόντων που αγοράζουν.



Εικόνα 1: Ειδική σήμανση προϊόντων Π.Ο.Π και Π.Γ.Ε

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΥΡΙΩΝ Π.Ο.Π ή Π.Γ.Ε. ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν καταχωριστεί, μέχρι στιγμής, 720 ονομασίες ως ΠΟΠ ή ΠΓΕ, ενώ εκκρεμούν άλλες 320 αιτήσεις, οι περισσότερες εκ των οποίων προέρχονται από τα δέκα νέα κράτη-μέλη. Από τις 720 προστατευόμενες ονομασίες οι 153 αφορούν τυριά, εκ των οποίων μόνο οι 12 έχουν καταχωρηθεί ως ΠΓΕ. Η Γαλλία έχει κατοχυρώσει 43 ονομασίες τυριών, η Ιταλία 31, η Ισπανία 19, η Πορτογαλία 12 και το Ηνωμένο Βασίλειο 11. Η Ελλάδα έχει κατοχυρώσει 84 ονομασίες ως ΠΟΠ και ΠΓΕ, εκ των οποίων οι 20 αφορούν τυριά. (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων – Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας)

1.1.1 ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΤΥΡΙΩΝ Π.Ο.Π

Οι 20 Προστατευόμενες Ονομασίες Προέλευσης των ελληνικών τυριών έχουν ορισμένες κοινές προδιαγραφές. Παρασκευάζονται με παραδοσιακή τεχνολογία από γάλα το οποίο προέρχεται από φυλές αιγών, προβάτων ή/και αγελάδων οι οποίες εκτρέφονται σε οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή, έχουν προσαρμοστεί πλήρως στο περιβάλλον και η διατροφή τους βασίζεται στη χλωρίδα της περιοχής. Οι φυλές αυτές είναι πλήρως προσαρμοσμένες στις τοπικές συνθήκες και αξιοποιούν άριστα τους ελληνικούς βοσκότοπους, με την εκπληκτική ποικιλία ενδημικής βλάστησης.

Οι ντόπιες φυλές ζώων χαρακτηρίζονται για τη χαμηλή γαλακτοπαραγωγή τους αλλά και για το ιδιαίτερα πλούσιας χημικής σύστασης και εξαιρετικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων γάλα τους.

Η παρασκευή και ωρίμανση των τυριών πραγματοποιούνται σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής. Κατά την παρασκευή τους απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών. Οι ονομασίες στις οποίες έχει δοθεί προστασία υπάγονται σε σύστημα ελέγχου, ώστε να κατοχυρώνονται, τόσο οι παραγωγοί από απομιμήσεις, όσο και οι καταναλωτές από παραπλανητικές ενδείξεις στα τρόφιμα. Οι έλεγχοι αφορούν στην ορθή τήρηση των προδιαγραφών και την ορθή χρήση της επισήμανσης. Απαγορεύεται η παραγωγή, εισαγωγή, εξαγωγή, διακίνηση και εμπορία τυριού με κάποια από τις Προστατευόμενες Ονομασίες Προέλευσης, εφόσον δεν πληρούνται όλες οι προδιαγραφές παραγωγής του. (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων – Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας)

1.1.2 ΤΑ 20 ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΤΥΡΙΑ Π.Ο.Π

1.ΑΝΕΒΑΤΟ

Περιγραφή:

Μαλακό λευκό τυρί, κοκκώδους υφής με υπόξινη ευχάριστη γεύση και άρωμα που παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγματα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 60% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 45% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Νομός Γρεβενών και επαρχία Βοΐου
Νομού Κοζάνης



2. ΓΑΛΟΤΥΡΙ

Περιγραφή:

Μαλακό λευκό επιτραπέζιο τυρί, αλοιφώδους υφής, χωρίς επιδερμίδα και οπές, με υπόξινη, ευχάριστη, δροσερή γεύση και άρωμα, που παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή από μίγματα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 75% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40% κατά βάρος

Γεωγραφική περιοχή:

A. Ήπειρος (νομοί Ιωαννίνων,
Θεσπρωτίας, Άρτας, Πρέβεζας).
B. Θεσσαλία (νομοί Λάρισας, Τρικάλων,
Καρδίτσας, Μαγνησίας).



3. ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΑΓΡΑΦΩΝ

Περιγραφή:

Σκληρό επιτραπέζιο τυρί, κυλινδρικού σχήματος, που παράγεται παραδοσιακά αποκλειστικά από γάλα πρόβειο, ή μίγματα αυτού με γίδινο, το οποίο δεν υπερβαίνει το 30% κατά βάρος. Είναι ένα σκληρό τυρί με ευχάριστη υπόγλυκη γεύση και πλούσιο άρωμα, άριστης ποιότητας. Έχει μέγιστη υγρασία 38% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40%.

Γεωγραφική περιοχή:

Περιοχή Αγράφων νομού Καρδίτσας.



4. ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΚΡΗΤΗΣ

Περιγραφή:

Σκληρό επιτραπέζιο τυρί κυλινδρικού σχήματος, με συμπαγή ελαστική μάζα στην οποία υπάρχουν οπές και το οποίο παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο, το οποίο δεν υπερβαίνει το 20% κατά βάρος. Έχει μέγιστη υγρασία 38%, ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40% και μέγιστη περιεκτικότητα σε αλάτι 2%. Είναι εκλεκτό επιτραπέζιο τυρί με ευχάριστη υπόγλυκη γεύση και πλούσιο άρωμα.

Γεωγραφική περιοχή:

Νομοί Χανίων, Ρεθύμνης,
Ηρακλείου και Λασιθίου



5. ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΝΑΞΟΥ

Περιγραφή:

Σκληρό επιτραπέζιο τυρί, κυλινδρικού σχήματος, που παράγεται παραδοσιακά αποκλειστικά από γάλα αγελαδινό, ή μίγματα αυτού με πρόβειο και γίδινο σε αναλογία των τελευταίων όχι μεγαλύτερη του 20% κ.β. Έχει μέγιστη υγρασία 38% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα 40% κατά βάρος. Έχει ευχάριστη γεύση και ελαφρύ άρωμα.

Γεωγραφική περιοχή:

Νήσος Νάξος του νομού Κυκλάδων



6. ΚΑΛΑΘΑΚΙ ΛΗΜΝΟΥ

Περιγραφή:

Μαλακό λευκό τυρί, με σχήμα κυλινδρικό με χαρακτηριστική ανάγλυφη υφή, που ωριμάζει και διατηρείται σε άλμη και το οποίο παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο σε αναλογία που δεν υπερβαίνει το 30%. Έχει ευχάριστη ελαφρά όξινη και πλούσιο άρωμα. Έχει μέγιστη υγρασία 56% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Νήσος Λήμνος του νομού Λέσβου.



7. ΚΑΣΕΡΙ

Περιγραφή:

Ημισκληρο τυρί που παράγεται από γάλα πρόβειο ή μείγμα πρόβειου και γίδινου, το οποίο δεν μπορεί να υπερβαίνει το 20% κατά βάρος. Έχει χρώμα λευκοκίτρινο, είναι συνήθως καλυμμένο είτε με παραφίνη είτε με άλλες επιτρεπόμενες ουσίες και έχει ευχάριστη γεύση και πλούσιο άρωμα. Έχει μέγιστη υγρασία 45% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40%.

Γεωγραφική περιοχή:

- Α. **Μακεδονία** (νομοί Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής, Κιλκίς, Ημαθίας, Πιερίας, Πέλλας, Φλώρινας, Κοζάνης, Καστοριάς, Γρεβενών, Σερρών, Δράμας, Καβάλας).
- Β. **Θεσσαλία** (νομοί Λάρισας, Τρικάλων, Καρδίτσας, Μαγνησίας)
- Γ. ο νομός **Ξάνθης**.
- Δ. ο νομός **Λέσβου**.



8. ΚΑΤΙΚΙ ΔΟΜΟΚΟΥ

Περιγραφή:

Τυρί μαλακό, λευκού χρώματος, αλοιφώδους υφής, με υπόξινη, δροσερή γεύση και ευχάριστο άρωμα, χωρίς επιδερμίδα, που παράγεται παραδοσιακά από γάλα γίδινο ή μίγμα του με πρόβειο εντός της οριοθετημένης περιοχής. Έχει μέγιστη υγρασία 75% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή: Περιοχή Δομοκού του νομού Φθιώτιδας, στο οροπέδιο Όθρυς



9. ΚΕΦΑΛΟΓΡΑΒΙΕΡΑ

Περιγραφή:

Σκληρό επιτραπέζιο τυρί, ελαφρώς αλμυρό με διάσπαρτες τρύπες στη μάζα του, που παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο (το τελευταίο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% κατά βάρος). Οι ιδιότητές του κυμαίνονται μεταξύ της γραβιέρας και του κεφαλοτυριού. Έχει μέγιστη υγρασία 40% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα 40% επί ξηρού.

Γεωγραφική περιοχή:

Δυτική Μακεδονία, Ήπειρος,
Νομός Αιτωλοακαρνανίας και
Νομός Ευρυτανίας.



10. ΚΟΠΑΝΙΣΤΗ

Περιγραφή:

Μαλακό αλμυρό τυρί, με αλοιφώδη υφή και πικάντικη γεύση, χωρίς επιδερμίδα, χρώματος από υποκίτρινο έως υπόφαιο, που παράγεται παραδοσιακά από γάλα αγελαδινό, πρόβειο ή γίδινο ή από μίγματα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 56% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Νομός Κυκλάδων.



11. ΛΑΔΟΤΥΡΙ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ

Περιγραφή:

Σκληρό επιτραπέζιο τυρί, χρώματος λευκό έως λευκοκίτρινο, με σκληρή και ξηρή επιδερμίδα, σχήματος κυλινδρικού, με αλμυρή γεύση και ευχάριστο άρωμα, που παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή μίγματά του με γίδινο, σε αναλογία που δεν υπερβαίνει το 30%. Έχει μέγιστη υγρασία 38% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Νήσος Λέσβος.



12. ΜΑΝΟΥΡΙ

Περιγραφή:

Τυρί τυρογάλακτος που παράγεται παραδοσιακά από τυρόγαλα πρόβειου ή γίδινου γάλακτος ή μιγμάτων τους στο οποίο προστίθεται πρόβειο ή γίδινο γάλα ή κρέμα τους. Το τυρί είναι εύφημα γνωστό για τα εξαιρετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Είναι εκλεκτό επιτραπέζιο τυρί τυρογάλακτος που παράγεται τουλάχιστον από τον προηγούμενο αιώνα με παραδοσιακή τεχνολογία σε εγκαταστάσεις της οριοθετημένης περιοχής. Είναι μαλακό τυρί με συμπαγή δομή, χρώματος λευκού, χωρίς επιδερμίδα, με ευχάριστη γλυκιά γεύση και χαρακτηριστικό άρωμα. Έχει μέγιστη υγρασία 60% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 70% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:**A. Κεντρική και Δυτική Μακεδονία**

(νομοί Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής, Κιλκίς, Ημαθίας, Πιερίας, Πέλλας, Φλώρινας, Κοζάνης, Καστοριάς, Γρεβενών).

B. Θεσσαλία (νομοί Λάρισας,

Τρικάλων, Καρδίτσας, Μαγνησίας).



13. ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ

Περιγραφή:

Ημίσκληρο ως σκληρό, καπνιστό επιτραπέζιο αχυρόχρουν τυρί, με ελαφρά αλμυρή και πικάντικη γεύση, με επιδερμίδα λεπτή, ξηρή, κίτρινη έως καστανόχρους, που παράγεται παραδοσιακά από γάλα αγελαδινό ή μίγματα αυτού με πρόβειο και γίδινο σε αναλογία όχι μεγαλύτερη από 20%. Έχει μέγιστη υγρασία 38% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Περιοχή επαρχίας Μετσόβου
του νομού Ιωαννίνων



14. ΜΠΑΤΖΟΣ

Περιγραφή:

Ημίσκληρο έως σκληρό τυρί χωρίς επιδερμίδα, χρώματος λευκό έως λευκοκίτρινο, που ωριμάζει και διατηρείται σε άλμη, με ευχάριστη υπόξινη ελαφρά πικάντικη και πολύ αλμυρή γεύση και το οποίο παράγεται παραδοσιακά αποκλειστικά από γάλα πρόβειο, γίδινο ή μίγματα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 45% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 25% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Α. Δυτική και Κεντρική Μακεδονία

(νομοί Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής, Κιλκίς, Ημαθίας, Πιερίας, Πέλλας, Φλώρινας, Κοζάνης, Καστοριάς, Γρεβενών).

Β. Θεσσαλία (νομοί Λάρισας,

Τρικάλων, Καρδίτσας, Μαγνησίας).



15. ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ

Περιγραφή:

Μαλακό τυρί τυρογάλακτος με ξινή ως υπόγλυκη γεύση και κοκκώδη ως αλοιφώδη υφή, χωρίς επιδερμίδα και σπές που παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 55% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 45% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Νήσος Κρήτης (διοικητικά όρια των νομών Χανίων, Ρεθύμνης, Ηρακλείου και Λασιθίου).



16. ΠΗΧΤΟΓΑΛΟ ΧΑΝΙΩΝ

Περιγραφή:

Μαλακό επιτραπέζιο τυρί αλοιφώδους υφής, χωρίς επιδερμίδα και οπές, χρώματος λευκού έως υπόλευκου με υπόξινη, ευχάριστη, δροσερή γεύση και άρωμα, που παράγεται παραδοσιακά από γάλα γίδινο ή πρόβειο ή μίγμα τους. Έχει μέγιστη υγρασία 65% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 50% κατά βάρος

Γεωγραφική περιοχή:

Διοικητικά όρια νομού

Χανίων Ν. Κρήτης



17. ΣΑΝ ΜΙΧΑΛΗ

Περιγραφή:

Σκληρό επιτραπέζιο λευκό έως λευκοκίτρινο τυρί, με συμπαγή μάζα, σκληρή και ξερή επιδερμίδα, χαρακτηριστικό άρωμα και αλμυρή και πικάντικη γεύση, παρασκευασμένο αποκλειστικά από γάλα αγελάδας. Έχει μέγιστη υγρασία 40% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 36% κατά βάρος

Γεωγραφική περιοχή:

Νήσος Σύρος του Νομού Κυκλάδων.



18. ΣΦΕΛΑ

Περιγραφή:

Ημίσκληρο τυρί άλμης που ωριμάζει και διατηρείται εντός αυτής, με πολλές μικρές οπές στη μάζα του, χρώματος λευκοκίτρινου, χωρίς επιδερμίδα, σχήματος περίπου παραλληλεπίπεδων λωρίδων. Παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο, γίδινο ή μίγματα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 45% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Νότια Πελοπόννησος και
συγκεκριμένα οι νομοί Μεσσηνίας
και Λακωνίας.



19. ΦΕΤΑ

Ειδικές προδιαγραφές για τη φέτα είχαν συμπεριληφθεί στο άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών το 1988. Η φέτα, ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης κατοχυρώθηκε, σε εθνικό επίπεδο το 1994, ενώ το 1996, στο πλαίσιο του ΚΑΝ. (ΕΟΚ) 2081 /92, με τον ΚΑΝ. (ΕΟΚ) 1107/96 κατοχυρώθηκε σε Κοινοτικό επίπεδο. Κατόπιν προσφυγής άλλων κρατών - μελών, με τον ΚΑΝ. (ΕΚ) 1070/99, η φέτα διαγράφηκε από το Κοινοτικό μητρώο ΠΟΠ και ΠΓΕ

Στη συνέχεια και με εντολή του Δικαστηρίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, προκειμένου να αξιολογήσει την κατάσταση, πραγματοποίησε αναλυτική έρευνα στα κράτη - μέλη σχετικά με την παραγωγή, την κατανάλωση και τη γνώση των καταναλωτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ονομασία φέτα. Με βάση τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης έρευνας και τη σύμφωνη γνώμη της επιστημονικής επιτροπής, η οποία συμβουλεύει την Ευρωπαϊκή Επιτροπή στο έργο της, η φέτα, με τον ΚΑΝ. (ΕΚ) 1829/2002, επανακαταχωρίστηκε στο Κοινοτικό μητρώο ΠΟΠ και

ΠΓΕ ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης. Ακολούθησαν νέες προσφυγές κατά της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Τελικά, στις 25 Οκτωβρίου 2005, το Δικαστήριο των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων εξέδωσε απόφαση με την οποία δικαιώνει την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την επανακαταχώρηση της φέτας στο Κοινοτικό μητρώο. Σύμφωνα με την εθνική και κοινοτική νομοθεσία που ισχύει, η ονομασία φέτα είναι ΠΟΠ και χρησιμοποιείται αποκλειστικά για το τυρί που παράγεται με παραδοσιακό τρόπο στην Ελλάδα, στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή που αποτελείται από την ηπειρωτική χώρα και το νομό Λέσβου, από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με αίγαιο (σε ποσοστό έως 30%) της ίδιας περιοχής. Το γάλα αυτό προέρχεται από φυλές προβάτων και αιγών, προσαρμοσμένων στην περιοχή παραγωγής της φέτας, η διατροφή των οποίων βασίζεται στη χλωρίδα των βοσκοτόπων της περιοχής.

Η διαδικασία μεταποίησης ακολουθεί την παραδοσιακή τεχνολογία και πραγματοποιείται εντός της ζώνης παραγωγής. Η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά της φέτας οφείλονται αποκλειστικά ή κυρίως στο γεωγραφικό περιβάλλον που περιλαμβάνει τους φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες της οριοθετημένης ζώνης παραγωγής της φέτας.

Περιγραφή:

Επιτραπέζιο λευκό τυρί που διατηρείται εντός άλμης και παράγεται παραδοσιακά και αποκλειστικά από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο. Το τελευταίο δεν υπερβαίνει το 30% κατά βάρος. Μέγιστη υγρασία 56% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43% κατά βάρος.

Γεωγραφική περιοχή:

Μακεδονία, Θράκη, Ήπειρος,
Θεσσαλία, Στερεά Ελλάδα,
Πελοπόννησος και νομός Λέσβου.



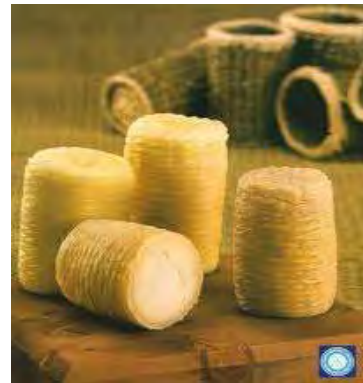
20. ΦΟΡΜΑΕΛΛΑ ΑΡΑΧΩΒΑΣ ΠΑΡΝΑΣΣΟΥ

Περιγραφή:

Ημισκληρο υποκίτρινο τυρί, με ευχάριστη γεύση και άρωμα που παράγεται παραδοσιακά και αποκλειστικά από γάλα γίδινο, πρόβειο ή μείγμα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 50% κατά βάρος, και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40% κατά βάρος

Γεωγραφική περιοχή:

Αράχωβα Παρνασσού του Ν. Βοιωτίας



(Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων – Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας)

1.2 Μέθοδοι για την ταυτοποίηση γαλακτοκομικών προϊόντων

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται έως τώρα για την ταυτοποίηση των γαλακτοκομικών προϊόντων βασίζονται κυρίως στην ανίχνευση πρωτεϊνών που περιέχονται μόνο στο ένα είδος γάλακτος, και περιλαμβάνουν ηλεκτροφορετικές (Τριχοειδούς, δύο διαστάσεων Garcia-Risco et al., 2000), χρωματογραφικές – με HPLC (De Noni, Tirelli & Masoti et al., 1996, Molina, Martin-Alvarez & Ramos et al., 1999), και ανοσολογικές μεθόδους όπως η Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA (Borkova, Snaselova, 2005)

Η μέθοδος της ισοηλεκτρικής εστίασης είναι η μέθοδος αναφοράς της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος (EC Regulation, 2001).

Στην ανάλυση τροφίμων η μέθοδος ELISA είναι η πιο διαδεδομένη ανοσολογική μέθοδος, καθώς είναι εύκολη στη χρήση, δεν απαιτεί εξεζητημένο εξοπλισμό και έχει μειωμένο κόστος (Giovannacci et al., 2004). Έως τώρα έχουν αναφερθεί αρκετές ανοσολογικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών στο γάλα και το τυρί. Για παράδειγμα οι Hurley et al., 2004 ανέπτυξαν μια μέθοδο ELISA για την ανίχνευση χαμηλών ποσοστών αγελαδινού γάλακτος σε γίδινο, πρόβειο ή βουβαλίσιο γάλα. Επίσης οι Rodriguez, et al., (1994) ανέπτυξαν μια μέθοδο ELISA για την ανίχνευση γίδινου γάλακτος σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% σε πρόβειο γάλα και τυρί.

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε τεχνικές προσέγγισης με βάση το DNA οι οποίες έχουν αποδειχθεί αξιόπιστες, ευαίσθητες και γρήγορες για πολλές περιπτώσεις αξιολόγησης της αυθεντικότητας, ιδιαίτερα στα τυποποιημένα προϊόντα όπως ζωοτροφές και γαλακτοκομικά προϊόντα .

Ανάμεσα σε άλλες βιομοριακές τεχνικές (Plath et al., 1997) η PCR (Polymerase Chain Reaction - Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) είναι αναμφίβολα εκείνη που έχει εφαρμοστεί και χρησιμοποιηθεί περισσότερο, ιδιαίτερα για την ανίχνευση της προέλευσης και την ταυτοποίηση των ειδών στα τρόφιμα (Dalmasso et al., 2004).

Όταν πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ στενά συγγενών ειδών, συνήθως ο χαρακτηρισμός των τμημάτων που παράγονται από την PCR με τη χρήση εκκινητών γενικής χρήσης (universal) σχεδιασμένων στο μιτοχονδριακό γονίδιο κυτόχρωμα b (cyt.b), γίνεται με ανάλυση περιορισμού PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Kocher et al., 1989)

Έτσι έχει καταστεί δυνατή η διαφοροποίηση μεταξύ πρόβειου, γίδινου και αγελαδινού , καθώς και μεταξύ αγελαδινού και βουβαλίσιου DNA (Meyer et al., 1995)

Το γάλα αυτών των ειδών (πρόβατο, κατσίκι, αγελάδα) περιέχει ένα μεγάλο αριθμό σωματικών κυττάρων , τα οποία περιέχουν γενωμικό DNA κατάλληλο για ενίσχυση με τη μέθοδο PCR (Amills et al., 1997, Lipkin et al., 1993). Ειδικότερα,

- Οι Bania et al., (2000), χρησιμοποίησαν μια διαδικασία RT-PCR ενός βήματος (μετατροπή RNA σε cDNA και αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο) για την ανίχνευση νοθείας του γίδινου γάλακτος με αγελαδινό. Χρησιμοποίησαν εκκινητές που αναγνωρίζουν τμήμα 274 bp του cytb του αγελαδινού μιτοχονδριακού DNA. Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και με ευαισθησία.

- Οι Bottero et al., (2003) ανέπτυξαν μια πολλαπλή (multiplex) PCR για να ταυτοποιήσουν αγελαδινό, γίδινο και πρόβειο γάλα σε μίγματα τυριών.

- Οι Lopez-Calleja et al., (2007) διερεύνησαν με την τεχνική της PCR, την ανίχνευση της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος σε τυριά από γίδινο και πρόβειο γάλα. Για την εφαρμογή της PCR χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές με στόχο τμήμα μήκους 223 bp του μιτοχονδριακού γονιδίου 12 S rRNA. Η μέθοδος PCR εφαρμόστηκε σε έτοιμα πειραματικά μίγματα τυριών αλλά και σε βιομηχανικά παρασκευασμένα τυριά με γνωστά ποσοστά αγελαδινού γάλακτος και έδειξε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση χαμηλών ποσοστών αγελαδινού γάλακτος έως 1%. Συμπληρωματικά εφαρμόστηκε ELISA με τη χρήση ενός μονόκλωνου αντισώματος (AH4) έναντι της αγελαδινής β-καζεΐνης. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι και οι δύο μέθοδοι

αποτελούν πολύ καλά εργαλεία για την ανίχνευση νοθείας με αγελαδινό γάλα έως και 1% σε πρόβεια και γίδινα τυριά.

➤ Οι ίδιοι ερευνητές (Lopez-Calleja et al., (2006) ανέπτυξαν μια άλλη μέθοδο η οποία βασίζεται στη real time PCR, το προϊόν της οποίας μετρείται με τη χρήση ενός ανιχνευτή φθορισμού για την ποσοτική ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος σε μίγματα με πρόβειο γάλα.

➤ Οι Kotowicz, et al., (2007) ανέπτυξαν μια μέθοδο duplex-PCR (χρήση δύο ζευγών εκκινητών που αναγνωρίζουν αλληλουχίες της μιτοχονδριακής περιοχής D-loop) για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε γίδινο γάλα. Η PCR έδειξε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό μικρότερο του 1%.

➤ Οι Sachinandan et al., (2011) ανέπτυξαν μια μέθοδο PCR (simplex and duplex PCR) για την ταυτοποίηση βουβαλίσσιου και αγελαδινού γάλακτος σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ενισχύθηκε η περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού DNA. Η PCR έδειξε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση νοθείας σε ποσοστό 0,1% σε αγελαδινό ή βουβαλίσσιο γάλα ή τυρί.

1.3 Μοριακοί Δείκτες

Η χρήση μοριακών δεικτών αποτελεί την πιο σύγχρονη και αποτελεσματική τεχνική για την μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας, τη γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών φυτών και διαφόρων φυλών ζώων. Οι μοριακοί δείκτες είναι μικρές περιοχές του γονιδιώματος που χρησιμοποιούνται ως δείκτες γενετικής ποικιλομορφίας.

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από την μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους σε προγράμματα ταυτοποίησης και πιστοποίησης γενετικού υλικού. Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν ορισμένα γνωρίσματα, όπως η παρουσία πολυμορφισμού ή ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο, να είναι υψηλά συντηρημένοι και η μεθοδολογία να μην κοστίζει πολύ, να μην προκαλεί τροποποιήσεις στο εξεταζόμενο δείγμα, που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τα

αποτελέσματα της ανάλυσης, να είναι εύκολη, και να εφαρμόζεται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του. Είναι δύσκολο να καθιερωθεί ένα γενικευμένο και ομοιόμορφο πλάνο που να αφορά εφαρμόσιμους και κατάλληλους μοριακούς δείκτες για ανίχνευση και ταυτοποίηση των ειδών. Μια σειρά από δεδομένα πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή του καταλληλότερου δείκτη. Οι ιδανικές και επιθυμητές ιδιότητες ενός μοριακού δείκτη συνοψίζονται στα ακόλουθα:

α) να αποτελεί διακριτό χαρακτήρα, ευρέως κατανεμημένο στο γονιδίωμα ώστε να μπορούν να γίνουν συγκρίσεις ομολογίας σε μεγάλο φάσμα οργανισμών,

β) να μπορεί να απομονωθεί και να εξεταστεί εύκολα,

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

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

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

Υπάρχουν δύο κατηγορίες δεικτών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι δείκτες DNA που αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό DNA. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεϊνικοί δείκτες στους οποίους ανήκουν τα ισοένζυμα και τα αλλοένζυμα. Τα αλλοένζυμα αποτελούν διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα ενώ τα ισοένζυμα είναι ένζυμα που καταλύουν την ίδια αντίδραση αλλά προέρχονται από διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους. Ως δείκτες μπορούν να θεωρηθούν οι αλληλουχίες μιτοχονδριακού (mt) DNA, οι αλληλουχίες χλωροπλαστικού (cp) DNA, το μικροδορυφορικό DNA καθώς και οι αλληλουχίες πυρηνικού DNA. Οι δείκτες με τις περισσότερες εφαρμογές είναι τα RFLP (πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA), τα RAPD (τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA), τα AFLP (πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων) και οι μικροδορυφόροι (microsatellites) ή SSR (απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες). (Spooner, 2005)

1.4 Το μιτοχονδριακό DNA

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 διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια –μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)- μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κυτταρική αναπνοή, είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση.

(Alberts *et. al.*, 2000)

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα κυκλικό μόριο μικρότερο από 20kb στα περισσότερα θηλαστικά (εικόνα 1). 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).

Τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, μόρια rRNA και tRNA που χρησιμοποιούνται στα μιτοχόνδρια.

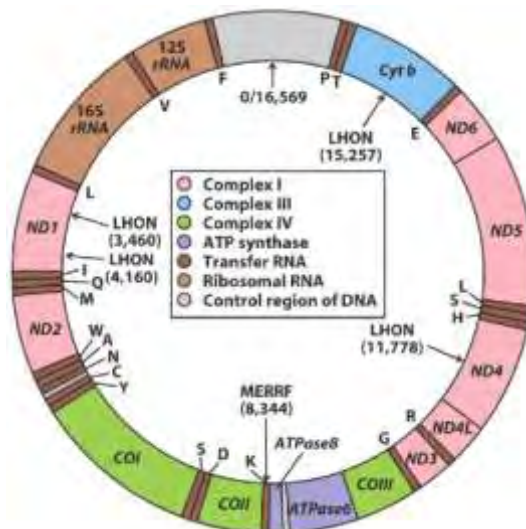
Έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία τουλάχιστον 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν από 3 έως 37 πρωτεΐνες. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων, αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και έχουν κατά κανόνα μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μαζί με 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.
- Εξαιτίας της μητρικής του προελεύσεως και την απουσία ανασυνδυασμού κληρονομείται απaráλλακτο από γενιά σε γενιά.

- Ο μεγάλος ρυθμός 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 μέσα στο ίδιο είδος. (Avisé, 1987)

Τα γονίδια του mtDNA που χρησιμοποιούνται συνήθως σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα: 16S και 12S rRNA, Cyt b και η περιοχή D-Loop. Η επιλογή αυτών των περιοχών στηρίζεται στο γεγονός ότι ο ρυθμός και ο τρόπος εξέλιξής τους είναι καλά κατανοητός και θεωρείται ότι είναι σχετικά σταθερός και όμοιος μεταξύ μεγάλωσμων χερσαίων ειδών (Bruford *et al.*, 2003). Γενικά το mtDNA των σπονδυλωτών, εχινόδερμων και εντόμων περιλαμβάνει 13 γονίδια που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNA (12s και 16s rRNA) και 22 γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA). Επίσης, υπάρχει μια περιοχή που δεν κωδικοποιεί, αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για αντιγραφή του mtDNA και την μεταγραφή του σε RNA, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος D (D-loop). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 2). Αυτά είναι: οι 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI, COII, COIII) και δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 6, 8).



Εικόνα 2: Η διάταξη των γονιδίων στο μιτοχονδριακό DNA.

(<http://genesinfo.blogspot.com/2010/06/mitochondrial-dna.html>)

1.5 Γονίδιο 16S rRNA

Το 16S rRNA αποτελεί συστατικό της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος μαζί με 21 πρωτεΐνες (συμβολίζονται S1 έως S21). Το 16S rRNA έχει πολλαπλές λειτουργίες:

- Έχει δομικό ρόλο, δρώντας ως πλαίσιο στήριξης και ορίζοντας τις λειτουργίες των ριβοσωμικών πρωτεϊνών
- Αλληλεπιδρά με το 23S, βοηθώντας στην ένωση των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων (50S+30S) (Lewin, 2004)
- Σταθεροποιεί σωστά τα κωδικόνια-αντικωδικόνια μέσω δεσμών υδρογόνου (Stryer, 1997)

Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές μελέτες αφού παραμένει συντηρημένο μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων και αρχαίων. Το γονίδιο 16S rRNA μεταλλάσσεται αργά σε σχέση με το υπόλοιπο μιτοχονδριακό DNA διά μέσου των εκατομμυρίων ετών της εξελικτικής πορείας.

1.6 Σκοπός μελέτης

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε ελληνικά τυριά Π.Ο.Π. με στόχο την ανίχνευση των ειδών γάλακτος που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή τους. Σκοπός της εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου μοριακού ελέγχου ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε έλεγχο τυχόν νοθείας στα κρίσιμα στάδια της παραγωγής των συγκεκριμένων προϊόντων. Για την ανάπτυξη μιας τέτοιας μεθόδου επιλέχθηκε ως δείκτης το γονίδιο 16S rRNA. Λόγοι επιλογής του συγκεκριμένου δείκτη αποτέλεσαν κάποια πλεονεκτήματά του που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα. Πιθανά θετικά πειραματικά αποτελέσματα θα μπορούσαν να καταστήσουν το μοριακό δείκτη πολύτιμο εργαλείο σε ελέγχους ταυτοποίησης τυποποιημένων ελληνικών τυριών Π.Ο.Π.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η εξής:

1. Συλλογή δειγμάτων
2. Απομόνωση DNA
 - 2.1 Έλεγχος ποιότητας και ποσότητας DNA με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης
3. PCR
 - 3.1 Έλεγχος των προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης
4. Ανάλυση SSCP

Συλλογή δειγμάτων

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 18 δείγματα-διαφορετικά προϊόντα τυποποιημένων τυριών Π.Ο.Π (Πίνακας 1), τα οποία κυκλοφορούν στα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Λάρισας .

Πίνακας 1: Κατάλογος ελληνικών τυριών Π.Ο.Π

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΑΝΑΓΡΑΦΟΜΕΝΗ ΣΥΣΤΑΣΗ
1	Γραβιέρα Νάξου	αγελαδινό/ αγελαδινό + πρόβειο + κατσικίσιο
2	Κεφαλογραβιέρα Δωδώνη	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο
3	Γραβιέρα Κρήτης	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο
4	Φορμαέλα Αράχωβας	κατσικίσιο/ πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο
5	Μετσοβόνε	αγελαδινό/ αγελαδινό + πρόβειο + κατσικίσιο
6	Κασέρι Σοχού	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο
7	Μανούρι	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο
8	Καλαθάκι Λήμνου	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο
9	Λαδοτύρι Μυτιλήνης	πρόβειο/ κατσικίσιο
10	Τυρί Σαν Μιχάλη	αγελαδινό
11	Τυρί φέτα	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο
12	Γαλοτύρι	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο
13	Κατίκι Δομοκού	κατσικίσιο / πρόβειο + κατσικίσιο
14	Ξινομυζήθρα Κρήτης	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο
15	Μπάτζος	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο
16	Ανεβατό	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο
17	Σφέλα	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο
18	Κοπανιστή Κυκλάδων	αγελαδινό/ πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Αντιδραστήρια

- SSC 1X₂ (0,15M NaCl, 0,015 M, Na₃Citrate 2H₂O, pH 7)
- Οξικό Νάτριο (CH₃COONa)
- SDS 5% (sodium dodecyl sulfate) θειικό δωδεκακυλικό

νάτριο

- Πρωτεΐνάση K (10mg/ml)
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- Ισοαμλική αλκοόλη
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- Διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Συσκευές

- Κυκλικός αναδευτήρας (Vortex)
- Επωαστήρας σταθερής θερμοκρασίας
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Καταψύκτης
- Απαγωγός εστία εργασίας

Στάδια απομόνωσης DNA

1. Τοποθέτηση 100 mg δείγματος σε eppendorf των 2ml
2. Προσθήκη 1 ml SSC 1X
3. Ανάδευση του διαλύματος (vortex)
4. Φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
6. Προσθήκη 1 ml SSC 1X (επαναδιάλυση του ιζήματος) και επανάληψη των βημάτων 3,4 και 5.

Διάλυση του ιζήματος σε 0,5 ml CH₃COONa 0,2 M

7. Προσθήκη 50 μ l SDS 5%
8. Προσθήκη 10 μ l πρωτεϊνάσης K
9. Επώαση στους 55 °C για 1 ώρα.
10. Προσθήκη 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)
11. Ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση 10 min στις 13000 rpm στους 4 °C
12. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα eppendorfs
13. Προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)
14. Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 rpm
15. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα eppendorfs.
16. Προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης
17. Επώαση στους -20 °C για 15 min
- Φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm στους 4 °C
18. Απομάκρυνση υπερκειμένου
19. Προσθήκη 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%
20. Φυγοκέντρηση 15 min στις 13000 rpm στους 4 °C
21. Απομάκρυνση υπερκειμένου
22. Ξήρανση του ιζήματος στους 37 °C.
23. Προσθήκη 100 μ l ddH₂O και επαναδιάλυση του DNA
24. Αποθήκευση του DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται επιτελούν το κάθε ένα και τον ρόλο του. Το SDS το οποίο είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό, συμβάλει στη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεϊνάση K πέπτει τις πρωτεΐνες. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στο υπερκείμενο κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στην μετουσίωση των

πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατίνη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA στην αιθανόλη οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στον συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη.

2.2 Ποσοτικοποίηση του DNA με φωτομέτρηση

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

2.3 Ποιοτικός έλεγχος του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

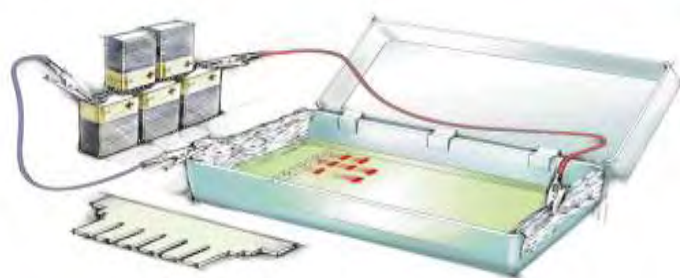
Η ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται για τον ποιοτικό προσδιορισμό και τον διαχωρισμό τμημάτων DNA, τα οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερα των 100bp. Η συγκέντρωση της πηκτής σε αгарόζη κυμαίνεται από 0,8 έως 2,5%. Για μικρότερα τμήματα (50-150bp), απαιτείται συνήθως ειδική αгарόζη (metaphor). Με την ηλεκτροφόρηση, εκτός από τον ποιοτικό έλεγχο επιτυγχάνεται και αδρός προσδιορισμός της ποσότητας του DNA, η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται.

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο τους, το μέγεθος και τη δομή κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες (τα μικρά τμήματα κινούνται γρηγορότερα) μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατό να διαχωριστούν. Τα μόρια αυτά καθώς είναι αρνητικά φορτισμένα κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής προς τον θετικό πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. (Εικόνα 3)

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.

Η βασική χρωστική στις πηκτές αγαρόζης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως. Η παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή καθυστερεί τη μετακίνηση των μορίων προς το θετικό πόλο. Μετά την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA σε μία πηκτή που περιέχει αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και εκθέτοντας την πηκτή σε υπεριώδες φως, γίνονται ορατές οι διακριτές ζώνες του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του. Για να αποκτήσει βάρος το δείγμα καθώς τοποθετείται στις θέσεις της πηκτής προστίθεται το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης χρησιμοποιούνται συνήθως ως χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Επίσης το διάλυμα φόρτωσης περιέχει συνήθως γλυκερόλη, σουκρόζη ή φυκόλη (για αύξηση βάρους) και EDTA για την δέσμευση των κατιόντων και την αναστολή ενζυμικής δραστηριότητας.

Τα κυριότερα διαλύματα ηλεκτροφόρησης 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. (en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis)



Εικόνα 3: Συσκευή ηλεκτροφόρησης και ενδεικτική απεικόνιση αποτελεσμάτων σε πήκτωμα.

(<http://greatmindsofscience.tumblr.com/post/26431122865/medicalschoo-gel-electrophoresis>)

Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη
- TAE 1X (40mM Tris, 20mM acetic acid, and 1mM EDTA)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) 10mg/ml
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) (1ml μπλε της βρωμοφαινόλης 1% w/v, TBE 20x 0,5ml, γλυκερόλη 100% 5ml, ddH₂O έως τα 10ml)

Διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1% για την απομόνωση του DNA. Για έλεγχο της PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2%

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή
 2. Προσθήκη 30 ml TAE 1X και 0,3 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη 250 ml
 3. Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων και συχνή ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης (διαυγές διάλυμα)
 4. Συνεχής ανάδευση μέχρι να κρυώσει
 5. Προσθήκη 4 μ L βρωμιούχου αιθιδίου
 6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο
- Εισαγωγή της χτένας 24 θέσεων (απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες που δημιουργούνται)
7. Μετά τη στερεοποίηση της πηκτής (~15min) αφαιρείται το χτενάκι
 8. Τοποθέτηση της πηκτής σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x
 9. Ανάμειξη 3 μ l loading buffer με 3 μ l διαλύματος DNA από τα 100 μ l (προϊόν της απομόνωσης) και εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.
 10. Ρύθμιση της τάσης στα 70V. Μετά από περίπου 20 min είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή UV.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, εκθέτουμε το πήκτωμα σε συσκευή υπεριώδους φωτός όπου τα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια γνωστού μεγέθους.

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Το 1984, ο Kary Mullis σκέφθηκε μια ευφυέστατη μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA που ονομάστηκε *αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης* (polymerase chain reaction, PCR). Αν μία αλληλουχία-στόχος περιβάλλεται από γνωστές αλληλουχίες, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου με PCR. Η PCR εκτός από την αλληλουχία-στόχο χρειάζεται τα ακόλουθα αντιδραστήρια: (1) ένα ζεύγος εκκινητών που μπορούν να υβριδοποιηθούν με τις παράπλευρες αλληλουχίες του στόχου, (2) τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTP) και (3) μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Ένας κύκλος PCR χωρίζεται σε τρία επιμέρους στάδια

1.Αποδιάταξη των αλυσίδων. Οι δύο αλυσίδες του DNA-στόχου αποδιατάσσονται με θέρμανση στους 95°C.

2.Υβριδοποίηση των εκκινητών. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (50-54 °C) οι εκκινητές υβριδοποιούνται με το DNA-στόχο. Ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'-άκρο της μιας αλυσίδας του στόχου και ο άλλος στο 3'-άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας. Προσθέτοντας εκκινητές σε περίσσεια αποφεύγουμε την επαναϋβριδοποίηση των κλώνων του αρχικού DNA. Οι εκκινητές συνήθως έχουν μήκος από 17 έως 30 νουκλεοτίδια

3.Σύνθεση του DNA. Στους 72°C, που είναι η ιδανική θερμοκρασία δράσης της *Taq DNA πολυμεράσης* πραγματοποιείται ο πολυμερισμός του DNA. Το θερμοανθεκτικό αυτό ένζυμο προέρχεται από το *Thermus aquaticus*, ένα θερμόφιλο βακτήριο που ζει στις θερμές πηγές. Η πολυμεράση επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές προς το μέρος του στόχου διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA ακολουθεί την πορεία από το 5' προς το 3'-άκρο. Η

σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και στις δύο αλυσίδες αλλά προεκτείνεται και πέρα από την αλληλουχία-στόχο στους αρχικούς κύκλους.

Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν έναν κύκλο ενίσχυσης PCR και μπορούν να επαναληφθούν συνεχώς με απλή αλλαγή της θερμοκρασίας του μείγματος. Εφόσον η πολυμεράση είναι θερμοανθεκτική, η PCR μπορεί να γίνει χωρίς την προσθήκη αντιδραστηρίων μετά τον πρώτο κύκλο. Η αποδιάταξη των αλυσίδων αποτελεί την αρχή του επόμενου κύκλου που παράγει τέσσερις κλώνους και κατόπιν ακολουθεί ο τρίτος κύκλος. Στο τέλος του τρίτου κύκλου δημιουργούνται δύο αλυσίδες σωστού μεγέθους που αντιστοιχούν στην αλληλουχία-στόχο και περιλαμβάνουν στα άκρα τους εκκινητές. Οι επόμενοι κύκλοι θα ενισχύσουν την αλληλουχία-στόχο εκθετικά. Οι μεγάλες αλυσίδες αυξάνονται με αριθμητική πρόοδο και αποτελούν πηγή για τη σύνθεση των μικρών αλυσίδων. Ιδανικά, μετά από n κύκλους, η αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί κατά 2^n φορές. Η ενίσχυση μετά από 20 κύκλους είναι ένα εκατομμύριο φορές και μετά από 30 κύκλους ένα δισεκατομμύριο φορές και ολοκληρώνεται σε λιγότερες από 3 ώρες.

Αρκετά στοιχεία αυτής της εντυπωσιακής μεθοδολογίας ενίσχυσης του DNA αξίζει να αναλυθούν λίγο περισσότερο. *Πρώτον*, δεν χρειάζεται να είναι γνωστή η αλληλουχία του στόχου. Χρειάζεται μόνο να είναι γνωστές οι αλληλουχίες που τον περιβάλλουν. *Δεύτερον*, ο στόχος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος. Στόχοι μεγαλύτεροι από 10 kb έχουν ενισχυθεί με PCR. *Τρίτον*, οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση του στόχου δεν είναι απαραίτητο να είναι πλήρως συμπληρωματικοί με την αλληλουχία στόχο. Με τη χρήση εκκινητών, οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση κάποιο γνωστό γονίδιο, μπορούμε να αναζητήσουμε γονίδια που εμφανίζουν υψηλή ομολογία. Η λογική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση οικογενειών γονιδίων με PCR. *Τέταρτον*, η PCR έχει υψηλή εξειδίκευση, λόγω της αυστηρότητας των συνθηκών υβριδοποίησης σε υψηλή θερμοκρασία. Η αυστηρότητα αυτή καθορίζει τα επιτρεπτά όρια συμπληρωματικότητας μεταξύ εκκινητή και στόχου και ρυθμίζεται από τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση άλατος. Σε υψηλή θερμοκρασία το μόνο DNA που θα ενισχυθεί είναι εκείνο που βρίσκεται μεταξύ των εκκινητών. Ένα γονίδιο, που αποτελεί το ένα εκατομμυριοστό του συνολικού DNA στους ανώτερους οργανισμούς, αποτελεί εφικτό στόχο για τη

μέθοδο PCR. **Πέμπτον**, η PCR είναι ιδιαίτερα εκλεκτική. Ένα μοναδικό μόριο DNA μπορεί να ενισχυθεί και να καταστεί ανιχνεύσιμο. (Stryer, 2001)

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA , στοχεύοντας πάντα στην απλοποίηση της όλης μεθόδου ταυτοποίησης, ώστε να προκύπτουν προϊόντα από όλα τα είδη που περιέχονται σε ένα δείγμα χωρίς να χρειάζεται να γνωρίζουμε ποια είδη είναι αυτά, χρησιμοποιήσαμε παγκόσμιους εκκινητές. Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι βάσει αλληλουχιών από πολλά είδη πτηνών, θηλαστικών και ψαριών σε περιοχές που είναι υψηλά συντηρημένες. (Σαρρή, 2011).

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μπορούν να ενισχύσουν το DNA πολλών διαφορετικών ειδών. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16s RNA

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

Όπου **Y = C ή T**

Έτσι ενισχύθηκε ένα τμήμα του 16sRNA, μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp το μοσχάρι (*Bos taurus*) και 235bp το κατσίκι (*Capra hircus*).

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε συσκευή erppendorf. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50μl.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη :

1. Τοποθετούμε σε φιαλίδια erppendorf εκμαγείο DNA (προϊόν της απομόνωσης από τα δείγματα του τυριού). Η ποσότητα DNA κυμάνθηκε από 100-200 ng ανάλογα με το δείγμα μας και μετά από αρκετούς συνδυασμούς, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση.

2. Παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα (master mix- Πίνακας 3) ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.

Πίνακας 3 : σύσταση master mix

ddH ₂ O	37,0μl
Buffer 5X Bioline	10,0μl
primer BM FW (50pmol/μl)	1,0μl
primer BM RV (50pmol/μl)	1,0μl
Taq polymerase 5U/μl Bioline	0,2 μl

3. Μοιράζουμε ισόποσα σε κάθε φιαλίδιο του βήματος 1 από 49μl του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.

4. Πραγματοποιούμε μια σύντομη φυγοκέντρηση των δειγμάτων μας.

5. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή (Πίνακας 4)

Πίνακας 4 : Το πρόγραμμα θερμοκρασίας/ χρόνου της PCR

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

6. Ο έλεγχος της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αгарόζης 2%

2.5 Ανάλυση Πολυμορφισμού Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism) SSCP

Η ταυτοποίηση των σημειακών μεταλλαγών στο επίπεδο του DNA είναι απαραίτητη σε πολλούς διαφορετικούς κλάδους της βιολογίας, όπως στην πληθυσμιακή γενετική, τη διαγνωστική, τη γενετική του ανθρώπου κ.λπ. Η μεθοδολογία για την ανίχνευση των μεταλλαγών δέχτηκε τεράστια ώθηση στα τέλη της δεκαετίας του '80 με την ανακάλυψη της PCR. Έτσι, δεν απαιτείται πλέον η επανακλωνοποίηση γονιδίων ώστε να απομονωθούν και να μελετηθούν για τυχόν μεταλλαγές. Μοναδική προϋπόθεση για την PCR είναι να είναι γνωστή η αλληλουχία τμήματος του γονιδίου ώστε να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές και να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός *in vitro*. Πλέον, είναι διαθέσιμες πολλές εναλλακτικές μέθοδοι για την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών οι οποίες εφαρμόζονται ανάλογα με τον τύπο της μεταλλαγής και την απαιτούμενη διακριτική ικανότητα. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την επιλογή της μεθόδου είναι το αν η μεταλλαγή είναι γνωστή και σε συγκεκριμένη θέση του γονιδίου ή άγνωστη οπότε θα πρέπει να διερευνηθεί η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδίου ή έστω της κωδικής περιοχής του ώστε να γίνει η ταυτοποίησή της. Αντίθετα, στις περιπτώσεις όπου ένα γονίδιο έχει συσχετιστεί με κάποιο παθολογικό φαινότυπο αλλά δεν είναι γνωστή η υπεύθυνη μεταλλαγή, σε ένα καινούριο γονίδιο που εξετάζεται ως πιθανό υποψήφιο για ένα νόσημα, σε πληθυσμιακές μελέτες όπου διερευνάται η ποικιλομορφία ενός πληθυσμού είναι απαραίτητη η σάρωση όλου του γονιδίου ή του εξεταζόμενου τμήματος DNA για την ταυτοποίηση όλων των πιθανών μεταλλαγών.

Μία μέθοδος για την σάρωση τμημάτων DNA, με μεγάλη διακριτική ικανότητα και ταυτόχρονα ιδιαίτερα απλή, γρήγορη και οικονομική είναι η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP). Στηρίζεται στην διαφορετική δομή και συνεπώς διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα, που λαμβάνουν μονόκλωνα μόρια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μόνο μία βάση. Έτσι, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν ενισχυθεί με PCR, από διαφορετικά άτομα τα οποία φέρουν μεταλλαγές σε διαφορετικές θέσεις, θα

έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση. Η μεθοδολογία αυτή εκμεταλλεύεται την τάση του μονόκλωνου DNA να σχηματίζει ενδομοριακά ζεύγη βάσεων με αποτέλεσμα να προκύπτει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση που εξαρτάται από την αλληλουχία. Αλλαγές της αλληλουχίας των βάσεων του DNA μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη διαμόρφωση των μονόκλωνων μορίων DNA, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αλλαγές στη μετακίνηση των μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση και έτσι να εντοπιστεί ο πολυμορφισμός. Στην SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η πολυακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές, το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών που με τη σειρά τους διασυνδέονται παρουσία της N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης, ενός μορίου διασυνδέτη, σχηματίζοντας μία πορώδη πηκτή. Τα δείγματα-προϊόντα PCR πριν την ηλεκτροφόρησή τους υφίστανται αποδιάταξη με θέρμανση ώστε να σχηματιστούν οι μονόκλωνες αλυσίδες, ενώ στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται απουσία αποδιατακτικού μέσου ώστε να επιτρέπονται μερικώς οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, η κινητικότητα του μορίου δεν εξαρτάται μόνο από το μέγεθός του αλλά και από την τριτοταγή δομή του που με τη σειρά της καθορίζεται από την αλληλουχία του κλώνου. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με διάλυμα νιτρικού αργύρου που έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα ανιχνεύοντας ποσότητες της τάξεως των λίγων νανογραμμαρίων.

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

όσο αυξάνει το μήκος του προϊόντος. Γενικά, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τμήματα λίγων εκατοντάδων ζευγών βάσεων, συνθήκη που ρυθμίζεται εύκολα με βάση τον σχεδιασμό των εκκινητών κατά την PCR.

Υπάρχουν όμως και δύο μειονεκτήματα στη μέθοδο SSCP. Πρώτον, οι διαφορές στην κινητικότητα δε σχετίζονται με τον αριθμό των διαφορών στην αλληλουχία. Επομένως, η μόνη πληροφορία που μπορεί να αντληθεί είναι κατά πόσο τα ενισχυμένα τμήματα είναι πανομοιότητα ή διαφορετικά. Δεύτερον το βέλτιστο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων για την ανίχνευση των περισσοτέρων σημειακών μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερα μικρό, περίπου 300-400 bp. (Η μέθοδος της ανάλυσης πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA – SSCP, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας)

Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

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

Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου SSCP

Αντιδραστήρια

- απεσταγμένο ddH₂O
- αποδιατακτικό διάλυμα: (95% φορμαμίδιο, 10mM NaOH, 0,01% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,01% κυανό του ξυλενίου)
- ακρυλαμίδη
- δις-ακρυλαμίδη
- γλυκερόλη 50%
- TBE 10X 2lt:(Tris Base 121gr, Βορικό οξύ 61,7gr, EDTA 80ml, 0.5M, pH=8, ddH₂O έως τα 2lt)
- TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99%
- (APS) Ammonium Persulfate 20% w/v

Αποδιάταξη του DNA

Με την αποδιάταξη, τα μόρια του DNA γίνονται μονόκλωνα. Η αποδιάταξη είναι απαραίτητη για τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν με τη μέθοδο SSCP. Η διαδικασία περιλαμβάνει προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος στο προϊόν της PCR (6μl από τα 50μl).

Στη συνέχεια τα δείγματα αποδιατάσσονται στους 97°C για 10 min και τοποθετούνται απευθείας στον πάγο για να διατηρηθούν σε μονόκλωνη κατάσταση τους.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου διαφέρει από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης καθώς πρόκειται για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Το πλεονέκτημα είναι ότι η πηκτή πολυακρυλαμίδης έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα με αποτελέσματα να ανιχνεύονται μικρότερες ποσότητες DNA και να διαχωρίζονται τμήματα που διαφέρουν κατά λίγες βάσεις τα οποία δεν διαχωρίζονται στην αγαρόζη. Επίσης, τα δείγματά στα πηκτώματα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5 : Ποσότητες για την παρασκευή ενός πηκτώματος ακρυλαμίδης

ακρυλαμίδη	6,187 gr
δισ-ακρυλαμίδη	0,165 gr
γλυκερόλη 50%	6,25 ml
TBE 10X	5,0 ml
dd H ₂ O	συμπλήρωμα έως 62,5ml
TEMED	62,5 μl
APS 20%	325 μl

- Προετοιμάζουμε τη συσκευή παρασκευής της πηκτής.
- Σε ποτηράκι ζέσεως αναμιγνύουμε καλά με μαγνητάκι τα υλικά εκτός από το TEMED και το APS
- Φιλτράρουμε με διηθητικό χαρτί και σε έναν ογκομετρικό σωλήνα το διάλυμα (ροή σταγόνας), συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 ml με ddH₂O και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη
- Προσθέτουμε το TEMED και το APS ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης (το TEMED καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS και το APS ξεκινάει τον πολυμερισμό)
- Το διάλυμα περιχύνεται γρήγορα στο καλούπι και τοποθετούνται τα χτενάκια δημιουργίας πηγαδιών
- Σταθεροποιείται η πηκτή, αφαιρούνται τα χτενάκια και τα πηγάδια καθαρίζονται με βελόνα
- Προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X στη συσκευή
- Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγάδια και αρχίζει η ηλεκτροφόρηση στα 220V, σε θερμοκρασία δωματίου για 16 έως 22 ώρες.

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

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

- **Διάλυμα 1 (400ml)**
100% EtOH 20ml
οξικό οξύ 1ml
ddH₂O 400 ml

- **Διάλυμα 2 (200ml)**
Διάλυμα AgNO₃ (νιτρικός άργυρος) 1gr/lt

- **Διάλυμα 3 (200ml)**
ddH₂O 200ml
NaOH (υδροξείδιο του νατρίου) 6gr
NaBH₄ (Βοροϋδρίδιο του Νατρίου) 0,025 gr
HCHO (Φορμαλδεϋδη) 2ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε 200ml του διαλύματος 1 και επωάζεται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί μία πλύση με απεσταγμένο νερό (200ml) για 1min.

Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και το πήκτωμα επωάζεται υπό ανάδευση για 15min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό, (από 200ml) διάρκειας 1min η κάθε μια.

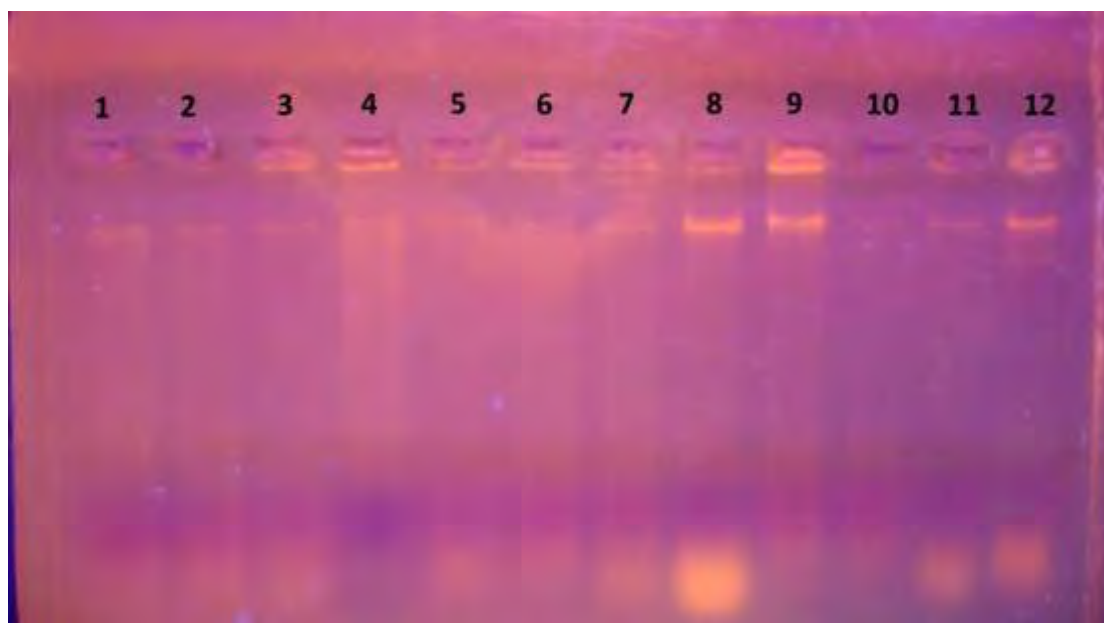
Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται επώαση υπό ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών.

Μετά τη χρώση της πηκτής είναι δυνατή η παρατήρηση των προτύπων. Στα ετερόζυγα άτομα παρατηρούνται τέσσερις καλά διαχωρισμένες ζώνες ενώ στα ομόζυγα άτομα δύο. Η κάθε ζώνη αντιστοιχεί στη μία αλυσίδα του μορίου του DNA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν όλα τυριά Π.Ο.Π. κατεργασμένα και τυποποιημένα. Τα περισσότερα προήλθαν από τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Λάρισας ενώ λίγα μόνο προϊόντα προήλθαν από άλλους νομούς (Αττικής και Θεσσαλονίκης). Ο Πίνακας 1, (κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι) παρουσιάζει αναλυτικά τα 18 προϊόντα που αναλύθηκαν καθώς επίσης και το αναγραφόμενο είδος από το οποίο προέρχονται.

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα ήταν επιτυχής καθώς έδωσε υλικό αρκετά καθαρό (απαλλαγμένο από πρωτεΐνες) όπως προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση και ικανό να δώσει ικανοποιητικά προϊόντα PCR. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έγινε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης (Εικόνα 4). Στην παρακάτω εικόνα τα αριθμημένα δείγματα αντιστοιχούν στα δείγματα του πίνακα 1.



Εικόνα 4 : Ενδεικτική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν από τα τυριά Π.Ο.Π (χρησιμοποιήσαμε 3μl από τα 100μl)

Μετά την απομόνωση του DNA των δειγμάτων, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% και φωτομέτρηση , ακολούθησε PCR με σκοπό τον

πολλαπλασιασμό του DNA. Για τον έλεγχο του αποτελέσματος της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας παρουσιάζονται στην εικόνα 5. Οι αριθμοί στην εικόνα αντιστοιχούν στα δείγματα που αναγράφονται στον Πίνακα 1. Οι δύο ζώνες που φαίνονται στην εικόνα συμβολίζονται με βέλη. Η πάνω ζώνη περιέχει το προϊόν της PCR για το κάθε μας δείγμα ενώ στην κάτω έχουμε τους εκκινητές μας (primers).

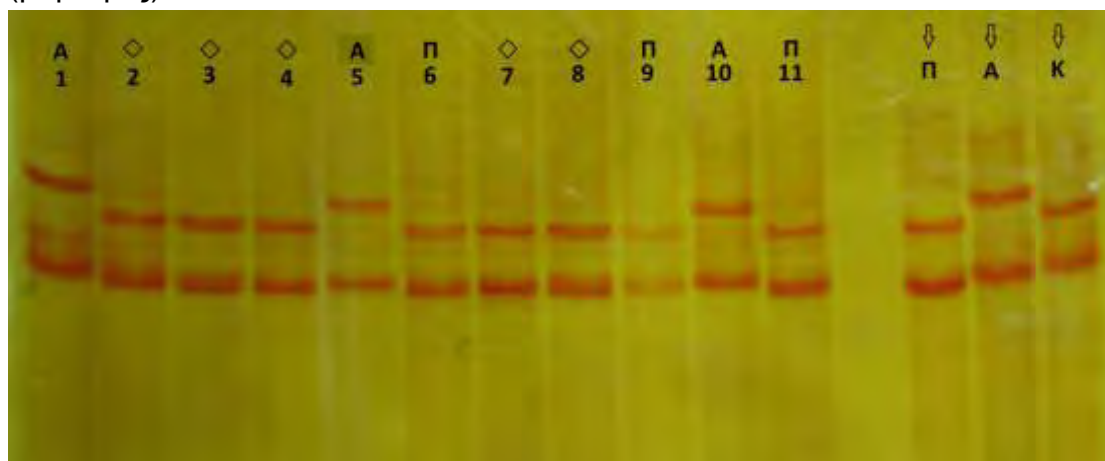


Εικόνα 5 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% προϊόντων PCR (από τα 50μl χρησιμοποιήσαμε 5μl)

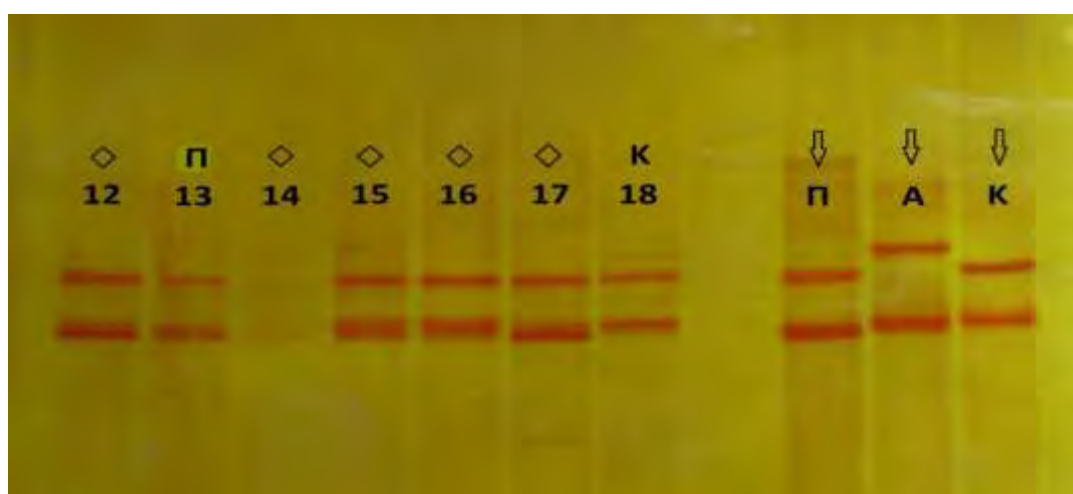
Η εφαρμογή της μεθόδου SSCP στα προϊόντα της PCR όλων των δειγμάτων αποκάλυψε τέσσερα διαφορετικά πρότυπα. Αυτό προκύπτει από σύγκριση των προτύπων των δειγμάτων (τυποποιημένα τυριά), με τα πρότυπα γνωστών δειγμάτων (μάρτυρες). Τα γνωστά είδη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τον έλεγχο των τυποποιημένων προϊόντων είναι τα εξής: (1) πρόβατο (*Ovis aries*), (2) μοσχάρι (*Bos taurus*), (3) κατσίκι (*Capra hircus*) τα οποία στις εικόνες 6α και 6β αναγράφονται αντίστοιχα ως Π,Α,Κ και συμβολίζονται με ένα βέλος. Από τα παραπάνω γνωστά είδη, το μοσχάρι (*Bos taurus*) που αναγράφεται στις εικόνες 6α και 6β ως Α, ανιχνεύθηκε και στα δείγματα 1,5 και 10 τα οποία συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα Α. Επίσης το γνωστό δείγμα πρόβατο (*Ovis aries*) που αναγράφεται στις εικόνες 6α και 6β ως Π ανιχνεύθηκε και στα δείγματα 6,9,11 και 13 τα οποία συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα Π. Ομοίως το γνωστό δείγμα κατσίκι (*Capra hircus*) που αναγράφεται στις εικόνες 6α και 6β ως Κ ανιχνεύθηκε και στο δείγμα 18 το οποίο και συμβολίζεται με το ίδιο γράμμα Κ. Τέλος, το τέταρτο πρότυπο που προέκυψε από την μοριακή ανάλυση, αντιστοιχεί στον συνδυασμό (πρόβειο-

κατσικίσιο) και ανιχνεύθηκε στα δείγματα 1,2,3,4,7,8,12,14,15,16 και 17 τα οποία στις εικόνες 6α και 6β συμβολίζονται με ένα ρόμβο.

Στην εικόνα 6α φαίνονται τα πρότυπα των δειγμάτων 1 έως 11 καθώς επίσης και αυτά των γνωστών δειγμάτων (μάρτυρες) και στην εικόνα 6β φαίνονται τα πρότυπα των δειγμάτων 12 έως 18 καθώς επίσης και τα γνωστά δείγματα (μάρτυρες).



Εικόνα 6α: Αποτέλεσμα ανάλυσης SSCP των τυποποιημένων τυριών Π.Ο.Π



Εικόνα 6β: Αποτέλεσμα ανάλυσης SSCP των τυποποιημένων τυριών Π.Ο.Π

Τα Κ, Α, Π αντιστοιχούν στα πρότυπα μας, όπου Κ= κατσίκι, Α= αγελαδινό και Π= πρόβειο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα πρότυπα που ταυτοποιήθηκαν είναι 4.

1. αγελαδινό
2. πρόβειο
3. κατσικίσιο
4. πρόβειο – κατσικίσιο

Συγκεντρωτικά στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα προϊόντα που αναλύθηκαν, η σύσταση τους, με βάση την ετικέτα των προϊόντων καθώς επίσης και τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσής τους.

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα της σύστασης των τυριών Π.Ο.Π. με ανάλυση PCR – SSCP

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΑΝΑΓΡΑΦΟΜΕΝΗ ΣΥΣΤΑΣΗ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
1	Γραβιέρα Νάξου	αγελαδινό/ αγελαδινό + πρόβειο + κατσικίσιο	αγελαδινό
2	Κεφαλογραβιέρα Δωδώνης	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
3	Γραβιέρα Κρήτης	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
4	Φορμαέλα Αράχωβας	κατσικίσιο/ πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
5	Μετσοβόνη	αγελαδινό/ αγελαδινό + πρόβειο + κατσικίσιο	αγελαδινό
6	Κασέρι Σοχού	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο
7	Μανούρι	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
8	Καλαθάκι Λήμνου	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
9	Λαδοτύρι Μυτηλίνης	πρόβειο/ κατσικίσιο	πρόβειο
10	Τυρί Σαν Μιχάλη	αγελαδινό	αγελαδινό
11	Τυρί Φέτα	πρόβειο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο
12	Γαλοτύρι	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
13	Κατίκι Δομοκού	κατσικίσιο / πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο
14	Ξινομυζήθρα Κρήτης	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
15	Μπάτζος	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
16	Ανεβατό	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
17	Σφέλα	πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο	πρόβειο + κατσικίσιο
18	Κοπανιστή Κυκλάδων	αγελαδινό/ πρόβειο/ κατσικίσιο/ πρόβειο + κατσικίσιο	κατσικίσιο

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι 1 από τα 18 δείγματα που ελέγχθηκαν παρουσιάζουν ένα είδος νόθευσης με την χρήση ενός μόνο είδους γάλακτος (πρόβειο) ενώ με βάση την ετικέτα θα έπρεπε να ανιχνευθούν δύο είδη γάλακτος(κατσικίσιο και πρόβειο), ή μόνο το άλλο είδος (κατσικίσιο) το οποίο και δεν ανιχνεύθηκε καθόλου.

Το προϊόν στο οποίο ανιχνεύθηκε κάποιο είδος νόθευσης όπως προκύπτει από τον πίνακα 6 είναι το εξής:

- δείγμα Νο 13 :Κατίκι Δομοκού

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν αναπόσπαστο μέρος του διαιτολογίου του ανθρώπου, επειδή περιέχουν και παρέχουν ευρύ φάσμα θρεπτικών συστατικών. Ειδικότερα, τα προϊόντα αυτά συμβάλλουν στην κάλυψη των αναγκών του ανθρώπου σε θερμιδογόνα και μη θερμιδογόνα θρεπτικά συστατικά. (Αναρτημένες Ανακοινώσεις Γ' μέρος «Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος»)

Στην Ευρώπη υπάρχει μια πληθώρα τυριών που παράγονται με ξεχωριστή μέθοδο και ιδιαίτερη γεύση, υφή και άρωμα τα οποία παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην παράδοση κάθε τόπου. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, παρόλη την ελεύθερη κυκλοφορία προϊόντων, υπηρεσιών και προσώπων, έχοντας αποδεχτεί τη διαφορετικότητα κάθε κράτους μέλους όσον αφορά τα έθιμα, τις παραδόσεις και τη διατροφή θέσπισε τον κανονισμό 2081 /92, για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων, ο οποίος αντικαταστάθηκε από τον κανονισμό 510/2006. (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων – Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας)

Το σκεπτικό ήταν να παραχθούν και να προστατευτούν παραδοσιακά ποιοτικά προϊόντα, που αποτελούν πολιτισμικό διατροφικό κεφάλαιο της Ευρώπης. Παραγωγοί, ακόμη και απομακρυσμένων περιοχών, να πετύχουν καλύτερες τιμές στην αγορά και ν' αποφευχθούν παραπλανήσεις και νοθεία

προς όφελος των καταναλωτών.(«Ροκ συνθήκες για Π.Ο.Π προϊόντα» Ελευθεροτυπία 30 Ιουλίου 2011)

Το σύνολο σχεδόν των ελληνικών τυριών, που έχουν καταχωρηθεί ως προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.), με κυρίαρχο το τυρί «Φέτα», παρασκευάζονται από πρόβειο ή και γίδινο γάλα.

Η διαφοροποίηση της παραγωγής, όταν υπάρχουν οι προϋποθέσεις σε προϊόντα προαιρετικώς πιστοποιημένα, ως Π.Ο.Π.-Π.Γ.Ε., βιολογικά, ορεινών περιοχών, παραδοσιακά κ.λ.π., αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για τη χώρα μας, αφού η κύρια παραγωγή, ιδίως στην προβατοτροφία και στην αιγοτροφία, αποτελεί εξαγωγίμο προϊόν με θετική επίδραση στην οικονομία της χώρας.

Τα προϊόντα αυτά, με πρωτεύοντα τα προϊόντα Π.Ο.Π. και τα βιολογικά προϊόντα, ανταποκρίνονται στην αυξημένη ζήτηση των καταναλωτών σε προϊόντα ποιότητας.

Σήμερα, αν και συνήθως ακριβότερα σε τιμή, τα ΠΟΠ και τα προϊόντα Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ενδειξης (ΠΓΕ) έχουν κερδίσει την εκτίμηση του καταναλωτικού κοινού λόγω υψηλής ποιότητας.

Συνεπώς, λόγω της ολοένα αυξανόμενης ζήτησης από το καταναλωτικό κοινό σε τέτοιου είδους προϊόντα και της ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας που αυτά απέκτησαν, κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων για τον έλεγχο της ποιότητας των συστατικών τους και την ανίχνευση τυχόν νοθείας αυτών σε όλα τα στάδια παραγωγής τους.

Το γεγονός ότι η προτίμηση των καταναλωτών για τα συγκεκριμένα προϊόντα έχει αυξηθεί αισθητά δημιούργησε ένα αρνητικό φαινόμενο, αυτό της εσφαλμένης επισήμανσης των προϊόντων με απώτερο στόχο την κερδοσκοπία. Η λανθασμένη επισήμανση λοιπόν, μπορεί πρωτίστως να θεωρηθεί εμπορική εξαπάτηση ως προς τους καταναλωτές γενικά, αλλά επίσης και στην περίπτωση καταναλωτών με θρησκευτικούς ή διαιτητικούς περιορισμούς. Ακόμα πιο σημαντικές είναι οι επιπτώσεις της λανθασμένης επισήμανσης για την υγεία των ανθρώπων καθώς μεγάλη μερίδα των καταναλωτών παρουσιάζει ευαισθησία σε αδήλωτα αλλεργιογόνα.

Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις στις οποίες χώρες με ισχυρή οικονομική πολιτική έχουν χρησιμοποιήσει αγροτικά προϊόντα με παραπλανητικές

ετικέτες, με αποτέλεσμα τη δυσφήμιση των αντίστοιχων ελληνικών προϊόντων. Επειδή λοιπόν η ετικέτα του εκάστοτε προϊόντος δεν αποτελεί εγγύηση για το περιεχόμενο του, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για την ταυτοποίηση των συστατικών των Π.Ο.Π προϊόντων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) για να εξετάσουμε τα ελληνικά τυριά Π.Ο.Π και να ανιχνεύσουμε τα είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή αυτών. Συνολικά εξετάστηκαν 18 διαφορετικά προϊόντα από τυποποιημένα τυριά (δείγματα). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16s rRNA του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Αρχικά με εκκινητές κοινούς για όλα τα δείγματα (universal primers), ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR τμήμα του γονιδίου 16s rRNA. Ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για εμφάνιση των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση έδειξε νόθευση σε 1 από τα 18 δείγματα, με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός. Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος κρίνεται αναγκαίο να επαναληφθεί η διαδικασία απομόνωσης DNA από το ίδιο δείγμα ή από δείγματα ίδιου προϊόντος με διαφορετική ημερομηνία παραγωγής.

Συμπερασματικά, και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω πειραματικών διαδικασιών, μπορούμε να πούμε πως, ο δείκτης αυτός, έχει υψηλή ευαισθησία στα επεξεργασμένα προϊόντα ελληνικών τυριών Π.Ο.Π. και είναι ικανός να εντοπίσει διαφορετικά είδη γάλακτος μέσα στο τυρί. Δηλαδή, παρέχονται πλέον ενδείξεις σε δύο κατευθύνσεις: i) το 16S rRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης διαχωρισμού μεταξύ διαφόρων ειδών και ii) μπορεί να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA ακόμη και από προϊόντα που έχουν υποστεί κατεργασία. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη και απλή. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να καταστήσει αυτό το μοριακό δείκτη πολύτιμο εργαλείο σε ελέγχους ρουτίνας, για την διαπίστωση των συστατικών των ελληνικών τυριών Π.Ο.Π. σε οργανισμούς, σύλλογο καταναλωτών κ.λ.π. αλλά και για την αυθεντικότητα τυποποιημένων προϊόντων ελληνικών τυριών Π.Ο.Π. που πωλούνται σε καταστήματα ειδών διατροφής.

Άρα, η μέθοδος που αναπτύξαμε μπορεί να δώσει πολύ καλά αποτελέσματα για τη ταυτοποίηση των ειδών γάλακτος που περιέχονται στα Π.Ο.Π τυριά και την ανίχνευση της όποιας νοθείας καθώς δείχνει να έχει καλή ευαισθησία.

Εκείνο που θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί είναι κατά πόσο η μέθοδος θα μπορούσε με τη χρήση των κατάλληλων προτύπων να δώσει και ποσοτικά αποτελέσματα για την ανάμιξη του κάθε είδους.

Επίσης θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει έλεγχος των δειγμάτων χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό δείκτη, είτε μιτοχονδριακό, είτε πυρηνικό, για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της μελέτης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) De Noni, Tirreli Masotti (1996). Detection of cow's milk in non-bovine cheese by HPLC of whey protein: application to goat milk cheese, 47, 7-17
- 2) Giovannacci I., Guizard C., Carlier M., Duval V., Martin J. L. & Demeulemester C., (2004) Species identification of meat products by ELISA. International Journal of Food Science and Technology, 39, 863-867
- 3) Hurley, I.P., Coleman R.C., Ireland H.E., & Williams, J. H.H (2004) Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration in dairy products. International Journal of Food Science and Technology, 39, 873-878
- 4) Ronriguez E., Martin R., Garcia T., Hernandez P.E., & Sanz B., (1994) Sandwich ELISA for detection of goat's milk in ewe's milk and cheese. Food and Agricultural Immunology, 6, 105-111
- 5) Plath, A., Krause, I., & Einspanier, R. (1997). Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung. A, Food Research and Technology, 205, 437-441.
- 6) Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Rosati, S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes, 18, 81-87
- 7) Kocher, T. D., Thomas, W. K., Mayer, A., Edwards, S. V., P. a. abo, S., Villablanca, F.X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with

conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 86, 6196-6200

- 8) Amills, M., Francino, O., Jansa, M., & Sanchez, A. (1997). Isolation of genomic DNA from milk samples by using chelex resin. Journal of Dairy Research, 64, 231-238
- 9) Lipkin, E., Shalom, Khatib, H., Soller, M., & Fredmann, A. (1993): Milk as a source deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. Journal of Dairy Science, 76, 2025-2032
- 10) Bania J., Ugorski M., Polanowski A., & Adamczyk E., (2000): Application of polymerase chain reaction for detection of goat's milk adulteration by milk of cow, Journal of Dairy Research 68, 333-336
- 11) Bottero M. T., Civera T., Nucera D., Rosati S., Sacchi P., Turi R.M (2003): A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's goat's and sheep's milk in dairy products / International Dairy Journal 13, 277-282
- 12) Ines M. Lopez-Calleja, Isabel Gonzalez, Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin (2007): Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cow's milk in sheep's and goat's milk cheeses. International Dairy Journal 17 87-93
- 13) Ines M. Lopez-Calleja, Isabel Gonzalez, Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa Garcia, Rosario Martin (2006): Real-time PCR for quantitative detection of cow's milk in ewe's milk mixtures. International Dairy Journal 17, 729-736
- 14) Kotowicz M., Adamczyk E., Bania J. (2007): Application of a Duplex-PCR for detection of cow's milk in goat's milk Ann Agrc Environ Med 14, 215-218

- 15) Sachinandan De., Biswajit B., Shamik P., ayan M., Deepak B., Moloya G., Karan P. S., Rameswar S., Tirtha K. D., Surender I. G., (2010) : Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. Food Control 22, 690-696

- 16) Spooner D., R. van Treuren and M. C. de Vicente (2005). Molecular Markers for Genebank Management. IPGRI technical bulletin No 10.

- 17) Bruford M., Bradley D., Luikart G., (2003). DNA Markers reveal the reveal the complexity of livestock domestication. Nature 2003. Vol.4 900-910

- 18) Stryer Lubert, BIOXHMEIA (916-917), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

- 19) Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.a. & Saunders N.C. (1987). Intraspecific phylogeography : the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Reviews of Ecology and Systematics 18, 489-522.

- 20) Benjamin Lewin, GENES VIII (230), Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. Αλεξανδρούπολη

- 21) Stryer Lubert, BIOXHMEIA (165-166), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

- 22) 33^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών. ΈΔΕΣΣΑ 19-21 Μαΐου 2011/ Ένας νέος μοριακός δείκτης για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών (barcoding), (Κωνσταντίνα Σαρρή, Κωνσταντίνος Σταμάτης, Θεολογία Σαραφείδου, Ζήσης Μαμούρης)

23)SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism (Τμήμα Βιοχ. & Βιοτ. Πανεπ. Θεσσαλίας)

24)(Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων – Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας)

25)(«Ροκ συνθήκες για Π.Ο.Π προϊόντα», Ελευθεροτυπία 30 Ιουλίου 2011)

26)Αναρτημένες Ανακοινώσεις Γ' μέρος «Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος»

27)Ιστότοποι

- en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis
- <http://greatmindsofscience.tumblr.com>
- <http://genesinfo.blogspot.com/2010/06/mitochondrial-dna.html>
- http://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RNA