



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ:
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

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

ΛΑΝΤΑΒΟΣ ΣΤΑΥΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού κρέατος
κοτόπουλου σε μίγματα κρέατος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. Το κρέας.....	7
1.2. Παραγωγή, κατανάλωση και εμπόριο.....	7
1.3. Θρεπτική αξία κρέατος.....	10
1.4. Τα πουλερικά.....	12
2. Επισήμανση και ιχνηλασιμότητα τροφίμων.....	14
2.1. Γενικά.....	14
2.2. Επισήμανση τροφίμων.....	15
2.3. Ιχνηλασιμότητα τροφίμων.....	16
2.4. Ταυτοποίηση κρέατος και προϊόντων με βάση το κρέας.....	17
3. Μοριακοί δείκτες.....	18
4. Μιτοχονδριακό DNA.....	19
5. Σκοπός της εργασίας.....	22
6. Πειραματική Πορεία – Μέθοδοι.....	22
6.1 Δείγματα.....	22
6.2 Απομόνωση του DNA.....	23
6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	24
6.4 Αναλυτική μέθοδος της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-PCR	26
6.5 Real – Time PCR.....	29
6.5.1 Διαφορετικές μεθοδολογίες της Real Time PCR (Taqman Probes, SYBR Green).....	32
7. Αποτελέσματα.....	39
7.1. Απομόνωση DNA.....	39
7.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	39
7.3. Έλεγχος συγκέντρωσης εκκινητών (Fw, Rv).....	41
7.4. Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.....	42
7.5. Έλεγχος της συγκέντρωσης εκκινητών σε μείγματα κρέατο.....	44
7.6. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA	46
8. Συζήτηση.....	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κρέας λόγω της ιδιαίτερα υψηλής διατροφικής αξίας του, κατέχει σημαντική θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών. Ταυτόχρονα, λόγω της υψηλής οικονομικής αξίας και των τεράστιων οικονομικών μεγεθών της εμπορίας και της διακίνησης κρέατος και προϊόντων κρέατος συχνά έχουν παρατηρηθεί κρούσματα νοθείας με σκοπό το παράνομο κέρδος.

Η νοθεία του κρέατος αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τους καταναλωτές αλλά και για τις υγιείς επιχειρήσεις από οικονομική, θρησκευτική, ηθική και διατροφική άποψη. Η σωστή επιλογή του καταναλωτή θα πρέπει να βασίζεται σε τεκμηριωμένη ενημέρωση για τα προϊόντα που καταναλώνει. Προς την κατεύθυνση αυτή η σωστή επισήμανση και ιχνηλασιμότητα του κρέατος και των προϊόντων κρέατος είναι σημαντική για τη σωστή εμπορία των προϊόντων καθώς και για την σωστά ενημερωμένη επιλογή τους από τους καταναλωτές.

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

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με την χρήση μοριακών δεικτών τμημάτων DNA, για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ειδών κρέατος σε μίγματα κρέατος. Οι τεχνικές αυτές αποσκοπούν στον έλεγχο προσμίξεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Τα είδη κρέατος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοτόπουλο και γαλοπούλα σε διάφορες προσμίξεις αλλά και σε προσμίξεις με μοσχάρι και χοιρινό. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε βασιζόμενη σε δείκτες του μιτοχονδριακού DNA που απομονώθηκε από μυϊκό ιστό των κρεάτων αυτών. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν η PCR και η real time PCR. Αρχικά, ενισχύθηκε με την μέθοδο PCR τμήμα του γονιδίου 12s rRNA για κοτόπουλο και ελέγχθηκε ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν ενισχύουν αλληλουχίες άλλων ειδών ζωικών ιστών. Στην συνέχεια προσδιορίστηκε η καταλληλότερη συγκέντρωση των εκκινητών η οποία θα μας έδινε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, E) και για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών κοτόπουλου, γαλοπούλας, χοιρινού, μοσχαριού, με την μέθοδο της real time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Τέλος, με την μέθοδο της real time PCR χρησιμοποιώντας ανιχνευτές Taqman δημιουργήθηκαν καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων DNA.

Με την χρήση του γονιδίου 12S rRNA και την μέθοδο Real Time PCR είναι εφικτή η δημιουργία καμπύλων αναφοράς για την ποσοτικοποίηση DNA σε άγνωστα δείγματα. Τέλος, η μέθοδος αυτή κρίθηκε ικανή για την ταυτοποίηση και ανίχνευση ειδών κρέατος σε μίγματα κρέατος, οπότε την καθιστά χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας σε προϊόντα κρέατος.

ABSTRACT

Meat due to the extremely high nutritional value, occupies an important position in consumer preferences. Moreover, due to the high economic value and enormous economics of processing, logistics and marketing of meat product, cases of fraud have often been recorded in order to gain illegal profit.

The adulteration of meat is an issue of crucial importance for the consumers and even for healthy companies in economic, religious, moral and nutritionally aspect. The correct choice of consumers should be based on factual information about the product they consume. For that to happen, proper labeling and traceability of meat and meat product is of high importance for the proper marketing of the product and for the well-informed choice by consumer.

Every year, large quantities of poultry meat are consumed, so the adulteration of either meat or its products with cheaper or inferior quality meats pose a major problem in meat industry, as well. For this reason efficient analysis techniques are required in order to identify the kinds of meat for the benefit of both consumers and responsible of meat-tradery.

In this study, molecular techniques were applied, with the use of molecular indicators of DNA sequences, for the qualitative and quantitative analysis of meat species in meat mixtures. These techniques aim at the detection of contaminants in food of animal origin.

The kinds of meat used were chicken and turkey in various other mixtures as well as in admixture with beef and pork. This study was performed on mitochondrial DNA, which had been isolated from muscle tissue of these species of meat. The techniques employed were the PCR and Real-time PCR.

Initially, a segment of the 12S rRNA gene for chicken was amplified, with the use of the PCR method, and was made sure that these specific primers do not amplify sequences of other species of animal tissues. The primers that were used were common for all the farm species (universal primers). Subsequently, verification was made for the ascertainment of the appropriate concentration of primers which would give us the best reaction efficiency. Also for the cross reactivity in between the species of chicken, turkey, pork, beef, and the method of real time PCR was applied, with the use of dye SYBR Green. At the end, applying the method of real time PCR, and with the use of taqman probes, there were created four different reference curves for the quantification of the unknown samples of DNA.

In the end we arrive at the conclusion that with the use of the 12S rRNA gene and the method of real time PCR is feasible for the construction of reference curves for the quantification of the DNA in unknown samples. In addition, this very method was deemed sufficient for the identification and detection of meat species inside meat mixtures, which makes it also a useful tool for monitoring the adulteration of meat products.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιολογίας Σπονδυλωτών, κας Αικατερίνης Μούτου. Πρωτίστως να την ευχαριστήσω, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου την εκτέλεση αυτής της εργασίας, αλλά επίσης και για την συνεχή, ακούραστη επιστημονική καθοδήγησή της, τις υποδείξεις, τις διορθώσεις αλλά και την υπομονή της, ώστε να ολοκληρωθεί όλη αυτή η εργασία. Να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, που από την αρχή με εμπιστεύτηκε για την όλη πορεία του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και την Επ. Καθ. Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία, για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ευχαριστώ, τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θέμη και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα στάδια της διατριβής μου αλλά και για την ευχάριστη ατμόσφαιρα συνεργασίας στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ τους συμφοιτητές μου Στέργιο Ανδρέου, Μπαλαγιάννη Χρήστο, Μωϋσιάδου Ελίζα, με τους οποίους εργαστήκαμε σε άρτιο κλίμα, και πραγματικά η συνεργασία και η ανταλλαγή απόψεων ήταν σε πολύ υψηλά επίπεδα, ώστε βοήθησε τα μέγιστα για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική στήριξη και επιμονή με την οποία με περιέβαλλαν σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

1. Εισαγωγή

1.1 Το κρέας

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 φωσφόρος και ο ψευδάργυρος, συμβάλλουν επίσης στην καλή υγεία. Το «ερυθρό κρέας» (κρέας βοοειδών και αιγοπροβάτων) και το «λευκό κρέας» (χοιρινό και κρέας πουλερικών) προσφέρουν μια ποικιλία ωφέλιμων χαρακτηριστικών και μια επιλογή γεύσεων και υφής. Επιπλέον, το κρέας παρέχει πολλές μαγειρικές δυνατότητες και έχει καταστεί βασικό στοιχείο της ευρωπαϊκής κουζίνας και κουλτούρας.

Λόγω της ποικιλίας των ειδών, των παραδόσεων κτηνοτροφικής παραγωγής και των εδαφών, η Ευρωπαϊκή Ένωση διαθέτει πολλά κτηνοτροφικά είδη και προϊόντα που παράγονται με βάση το κρέας. Τα κρέατα και τα προϊόντα με βάση το κρέας επωφελούνται σημαντικά από τα συστήματα ποιότητας που έχει αναπτύξει η Ευρωπαϊκή Ένωση, και έχουν καταβληθεί σοβαρές προσπάθειες από την αλυσίδα παραγωγής κρέατος για τη βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων όπως επίσης και της σήμανσής τους και εμπορίας τους.

1.2 Παραγωγή, κατανάλωση και εμπόριο

Ο υπό εξέταση τομέας αποτελείται από γεωργούς, γεωργικούς συνεταιρισμούς, σφαγεία και επιχειρήσεις που ασχολούνται με διάφορες πτυχές της διανομής και εμπορίας του κρέατος. Υπάρχουν πολλά είδη κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων και κτηνοτρόφων. Η διαφοροποίηση αυτή σημαίνει ότι, ενώ η κτηνοτροφία κατανέμεται σε ολόκληρη την ΕΕ, υπάρχουν περιοχές που ειδικεύονται σε ένα ή περισσότερα είδη παραγωγής κρέατος. Για παράδειγμα, η Ιρλανδία παράγει σχεδόν 7 % του βόειου κρέατος της ΕΕ (Agriculture in the European Union — Statistical and economic information 2013), που αντιπροσωπεύει άνω του 25 % της ακαθάριστης γεωργικής παραγωγής της Ιρλανδίας. Η εκτροφή χοίρων συγκεντρώνεται σε περιοχές του Βελγίου, της Γαλλίας, της Γερμανίας, των Κάτω Χωρών και της Ισπανίας, ενώ ο βασικός όγκος (54 %) της εκτροφής προβάτων λαμβάνει χώρα στην Ισπανία και το Ηνωμένο Βασίλειο («Agriculture in the European Union — Statistical and economic information 2013»). Σε άλλες περιοχές, όπως στη Φινλανδία και τη Σουηδία και τις ορεινές περιοχές της Αυστρίας και της Ιταλίας, η κτηνοτροφία αποτελεί ζωτική

οικονομική δραστηριότητα, δεδομένου ότι υπάρχουν πολύ λίγες εναλλακτικές οικονομικές δραστηριότητες.

Και οι μέθοδοι εμπορίας ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό σε ολόκληρη την ΕΕ. Σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχει παράδοση πώλησης ζώων σε αγορές ζώντων ζώων, ενώ σε άλλες η πώληση γίνεται κυρίως απευθείας σε σφαγεία. Τα ζώα διακινούνται συχνά περισσότερες από μία φορές στη διάρκεια της ζωής τους, καθώς οι εκτροφείς τα πωλούν σε άλλους κτηνοτρόφους οι οποίοι παραδίδουν τα ζώα έτοιμα για την αγορά κρέατος. Η μεταποίηση διενεργείται σε ορισμένες περιοχές από συνεταιρισμούς, ενώ σε άλλες κυριαρχούν οι ιδιωτικές επιχειρήσεις. Η ενοποιημένη διαδικασία παραγωγής είναι αρκετά συχνό φαινόμενο στον τομέα του κρέατος πουλερικών — οι τροφές ανήκουν στην ίδια την επιχείρηση η οποία παράγει και μεταποιεί το κρέας.

Στην ΕΕ καταναλώνονται ετησίως περίπου 35 εκατ.τόνοι διαφόρων ειδών κρέατος. Η ποσότητα αυτή αναλογεί περίπου, κατά μέσο όρο, σε 92 kg κατά κεφαλή και ετησίως (συν 5 kg κατά κεφαλή βρώσιμων εντοσθίων). Η κατανάλωση χοιρινού κρέατος ανέρχεται σε 44 kg, βόειου κρέατος σε 20 kg και πουλερικών σε 23 kg κατά κεφαλή, σε στρογγυλεμένους αριθμούς. Η κατανάλωση κρέατος υπήρξε γενικά σταθερή ή αυξανόμενη σε συνολικούς όρους τα τελευταία χρόνια.

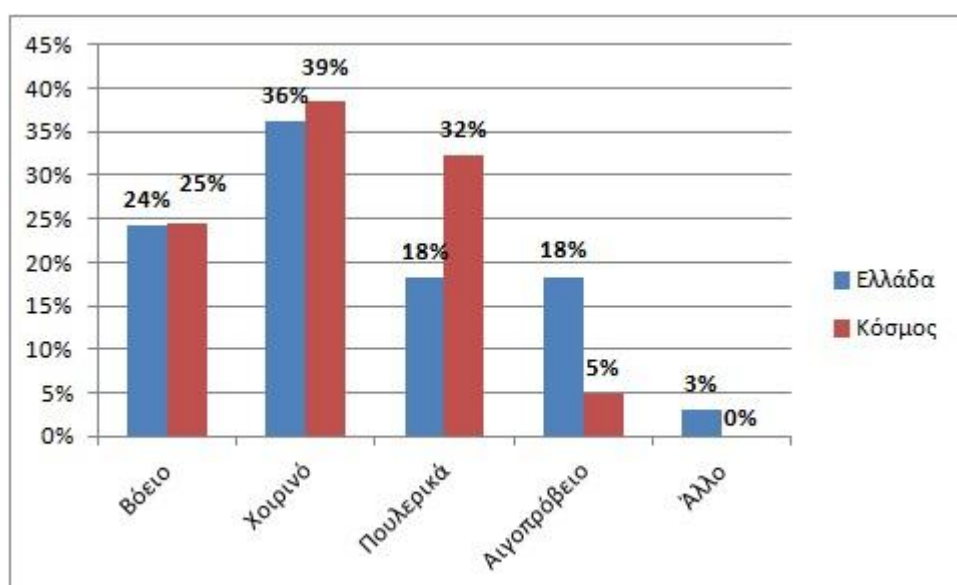
Ωστόσο, η διαπίστωση αυτή κρύβει σημαντικές τομεακές διακυμάνσεις. Οι πωλήσεις βόειου κρέατος επλήγησαν από την κρίση της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (ΣΕΒ-BSE) από το 1996, πλην όμως ανέκαμψαν μετά τη δεύτερη κρίση το 2000-2001.

Η κατανάλωση χοιρινού κρέατος και κρέατος πουλερικών ευνοήθηκε σε κάποιο βαθμό από τη μείωση της ζήτησης βόειου κρέατος λόγω της ΣΕΒ, παράλληλα όμως αποκόμισε σταθερά κέρδη λόγω της μεγαλύτερης ανταγωνιστικότητας σε σχέση με άλλα είδη κρέατος, εν μέρει ως αποτέλεσμα των μεταρρυθμίσεων της ΚΓΠ, οι οποίες κατέστησαν φθηνότερα τα δημητριακά που χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των ζώων. Διαφορετικά, το λευκό κρέας ακολούθησε ένα κανονικό κυκλικό πρότυπο παραγωγής, αν και με αυξητική τάση. Η κατανάλωση πρόβειου κρέατος επηρεάστηκε από τη μετατόπιση της προσφοράς λόγω της εμφάνισης αφθώδους πυρετού στο Ηνωμένο Βασίλειο (με περιστατικά επίσης στη Γαλλία, την Ιρλανδία και τις Κάτω Χώρες) το 2001.

Οι περισσότερες χώρες τώρα πια έχουν μεθόδους διασφάλισης ποιότητας, οι οποίες καλύπτουν όλα τα στάδια της παραγωγής του κρέατος, από το αγρόκτημα ως το

τραπέζι, και προωθούν τις ορθές γεωργικές πρακτικές και την ασφάλεια των τροφίμων. Επιπλέον, η νομοθεσία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε εθνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ). Για παράδειγμα, η χρήση των αυξητικών ορμονών απαγορεύεται στην ΕΕ και μερικές χώρες (π.χ. Δανία) επιτρέπουν τη χρήση αντιβιοτικών μόνο για ιατρικούς σκοπούς. Κατά τη διάρκεια, μάλιστα, της θεραπείας, τα ζώα δεν επιτρέπεται να σφαγιάζονται, μέχρι τα υπολείμματα των ουσιών αυτών να πέσουν κάτω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο.

Ενώ οι περισσότερες διατροφικές οδηγίες στην Ευρώπη συστήνουν την κατανάλωση κρέατος, πουλερικών ή ψαριών σε καθημερινή βάση, το Διεθνές Ίδρυμα Έρευνας για τον Καρκίνο (World Cancer Research Fund) συμβουλεύει να περιοριστεί η κατανάλωση κόκκινου κρέατος (όπως μοσχάρι, χοιρινό και αρνί) σε μια μέγιστη ποσότητα της τάξεως των 500mg την εβδομάδα (μαγειρεμένου κρέατος).



Διάγραμμα 1.1 Κατανάλωση κρέατος ανά κατηγορία στον ελλαδικό χώρο σε σχέση με την παγκόσμια κατανάλωση (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Γενική Δ/ση Γεωργίας, 2013

http://europa.eu.int/comm/food/animal/animalproducts/personal_imports/index_en.htm)

1.3 Θρεπτική αξία κρέατος

Ευρήματα απολιθωμάτων καταδεικνύουν ότι οι άνθρωποι καταναλώνουν κρέας εδώ και αρκετά χρόνια. Το κρέας περιέχει μια μεγάλη ποικιλία σημαντικών θρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας (βιολογικής αξίας), της βιταμίνη D, των βιταμινών του συμπλέγματος B, ιδιαιτέρως του B12, καθώς επίσης και του σιδήρου, του ψευδαργύρου και του σεληνίου. Όταν καταναλώνεται με μέτρο, το κρέας αποτελεί μέρος μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής.

Η πρωτεΐνη του κρέατος είναι υψηλής ποιότητας, καθώς περιέχει μια πλήρη και καλά ισορροπημένη ποικιλία αμινοξέων, που αποτελούν τον θεμέλιο λίθο για την αύξηση και ανάπτυξη του οργανισμού. Οι πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα απαραίτητες στα παιδιά και τους εφήβους, στους αθλητές και τις έγκυες γυναίκες, καθώς επίσης και στους ηλικιωμένους ανθρώπους, που βρίσκονται σε φάση ανάρρωσης από κάποιο χειρουργείο ή ασθένεια.

Το κρέας αποτελεί κύρια πηγή σιδήρου και, γενικά, όσο πιο κόκκινο είναι τόσο περισσότερο σίδηρο περιέχει. Αν και ο σίδηρος υπάρχει σε αρκετά τρόφιμα, το κρέας και τα θαλασσινά είναι οι μόνες πηγές αιμικού σιδήρου. Αυτός ο τύπος σιδήρου απορροφάται από το σώμα πολύ πιο εύκολα απ'ότι ο σίδηρος που υπάρχει στα λαχανικά και τα δημητριακά. Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την παραγωγή υγιούς αίματος, μέσα στο οποίο μεταφέρεται το οξυγόνο δεσμευμένο σε μία ,ου και των μυών. Η έλλειψη σιδήρου μπορεί να προκαλέσει κόπωση, δυσκολία συγκέντρωσης και μειωμένη άμυνα στις λοιμώξεις, ενώ αποτελεί μία από τις πιο κοινές διατροφικές ανεπάρκειες στην Ευρώπη. Η τακτική κατανάλωση κρέατος είναι ένας τρόπος για να αποφευχθεί η ανεπάρκεια σιδήρου (Williamson CS, Foster RK, Stanner SA and Buttriss JL 2005).

Όπως ο αιμικός σίδηρος, έτσι και ο ψευδάργυρος που υπάρχει στο κρέας προσλαμβάνεται και χρησιμοποιείται πιο αποτελεσματικά από τον οργανισμό σε σχέση με τον ψευδάργυρο που υπάρχει στα φυτικά τρόφιμα, καθιστώντας το κρέας μία σημαντική πηγή αυτού του ανόργανου στοιχείου και μία από τις πιο συνήθεις πηγές του στην Ευρώπη. Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή, καθώς επίσης και για την άμυνα του οργανισμού από τις λοιμώξεις, αλλά και για την επούλωση των τραυμάτων (Williamson CS, Foster RK, Stanner SA and Buttriss JL 2005).

Το κρέας είναι, επίσης, μια σημαντική πηγή σεληνίου. Η περιεκτικότητα του εδάφους

ενός βοσκότοπου σε σελήνιο καθορίζει και την περιεκτικότητα σε σελήνιο της βοσκής και των καρπών από τα οποία τρέφονται τα ζώα και, κατά συνέπεια, την περιεκτικότητα του κρέατός τους σε αυτό. Στο σώμα μας, συγκεκριμένες πρωτεΐνες που συνδεδεμένες με σελήνιο (σεληνιο-πρωτεΐνες) εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και στην επιδιόρθωση του DNA.

Το κρέας περιέχει μια σειρά από βιταμίνες του συμπλέγματος Β, αλλά η βιταμίνη Β12 είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς βρίσκεται στη φύση σε ζωικά κυρίως προϊόντα (π.χ. κρέας, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, αυγά και θαλασσινά). Η βιταμίνη Β12 είναι απαραίτητη για να δομηθεί το γενετικό μας υλικό, DNA, και έτσι έχει πολλές λειτουργίες στο σώμα, μερικές από τις οποίες είναι η παραγωγή υγιούς αίματος και η συμβολή της στην καλή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης αυτής μπορεί να προκαλέσει νευρολογικές δυσλειτουργίες και έχει γίνει αντικείμενο αυξανόμενου ενδιαφέροντος, ιδιαίτερα όσον αφορά τους ηλικιωμένους ανθρώπους, λόγω του μειωμένου ρυθμού απορρόφησης, αλλά και της ανεπαρκούς πρόσληψης της βιταμίνης στη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα.

Το λίπος του κρέατος είναι πολύ σημαντική πηγή ενέργειας, κάποιων λιποδιαλυτών βιταμινών και απαραίτητων λιπαρών οξέων. Τα είδη των λιπαρών που υπάρχουν στο κρέας είναι σχεδόν ομοιόμορφα κατανεμημένα ανάμεσα σε κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά. Μικρά ποσοστά πολυακόρεστων λιπαρών μπορεί να υπάρχουν στο κρέας · αυτά είναι υψηλότερα στο κρέας των ζώων ελεύθερας βοσκής ή στο κρέας ζώων που έχουν καταναλώσει συγκεκριμένου τύπου διαίτα, σε σύγκριση με αυτά που τρέφονται με παραδοσιακά σιτηρά (Honikel K-O (2008). Meat – an essential part of a balanced diet. Fleischwirtschaft International 4:21-26). Η ολική περιεκτικότητα του κρέατος σε λίπος έχει μειωθεί στο πέρασμα των χρόνων, εξαιτίας της εκτροφής των ζώων, των αλλαγών στο είδος των ζωοτροφών, καθώς και εξαιτίας του αυξημένου επιπέδου επεξεργασίας, πριν και μετά την αγορά. Η χρήση συγκεκριμένων μεθόδων μαγειρικής, όπως το ψήσιμο στο γκριλ, μπορεί να συμβάλλει ακόμα περισσότερο σε αυτή τη μείωση. Το άπαχο κρέας, που είναι απαλλαγμένο από την πέτσα, (συμπεριλαμβανομένων και των πουλερικών χωρίς πέτσα) είναι χαμηλό σε κορεσμένα λιπαρά. Μάλιστα, αρκετά μέρη κρέατος μπορεί να περιέχουν λιγότερο από 10% λίπος (Williamson CS, Foster RK, Stanner SA and Buttriss JL 2005).

Πίνακας 1.1 Θρεπτική σύσταση διαφόρων κρεατικών (WCRF International. *Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective – Online*)

Θρεπτικά συστατικά/Ενέργεια	Μοσχαρίσιο κρέας ^a	Χοιρινό κρέας ^a	Αρνί ^a	Κοτόπουλο ^b
Ενέργεια (Kcal/KJ)	108/455	105/443	117/491	145/607
Πρωτεΐνες (g)	22.0	22.0	20.8	22.2
Λίπος (g)	1.9	1.9	3.7	6.2
Σίδηρος (mg)	2.1	1.0	1.6	1.1
Ψευδάργυρος (mg)	4.3	2.4	2.9	Δεν υπάρχουν δεδομένα
Σελήνιο (μg)	5.4	12.0	4.1	6.2
Βιταμίνη B ₁₂ (μg)	5.0	2.0	2.7	0.4

^a μυϊκός ιστός, ^b στήθος με την πέτσα

1.4 Τα πουλερικά

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 21ου 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 21ου 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 Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (FAO) 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. Επισήμανση και Ιχνηλασιμότητα τροφίμων

2.1 Γενικά

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

Συστήματα με τα οποία, ο άνθρωπος, από αρχαιοτάτων χρόνων, προσπαθούσε να παράγει προς κατανάλωση, ποιοτικά προϊόντα. Απλά στην αρχή, τότε που ο προμηθευτής του Βασιλιά, προμηθεύονταν από έναν γεωργό, οποίος διάλεγε τα καλύτερα από το χωράφι του, τα καθάριζε και προμήθευε την βασιλική αυλή, έγιναν σύνθετα στην συνέχεια, στην εποχή μας, με την απαίτηση της χρήσης της τεχνολογίας, καθώς οι προμηθευτές, οι καταναλωτές και τα κανάλια ροής και επεξεργασίας πλήθηκαν, σε βαθμό που δεν ήταν δυνατόν να παρακολουθηθούν από ένα ανθρώπινο μυαλό. Έτσι, η ιχνηλασιμότητα, αναδείχτηκε ως απαραίτητος όρος

ασφαλείας για την εφοδιαστική αλυσίδα (κανάλια) των προϊόντων, και ειδικά των νωπών, και μάλιστα, με την αφορμή κάποιων γενικότερων διατροφικών κρίσεων, όπως αυτές της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας και των διοξινών του 1999, ώθησαν την Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης και στην «Λευκή Βίβλο», που εξέδωσε το 2000 για την ασφάλεια των τροφίμων, έθεσε σαν στόχο την ασφάλεια σε όλη την εφοδιαστική αλυσίδα «από το χωράφι στο πιάτο» όπως το περιέγραψε.

Η τεχνολογία, εισάγεται και υλοποιείται στην ιχνηλασιμότητα, μέσα από ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας, το οποίο αποτελείται από τεχνολογικό εξοπλισμό, ανθρώπινο δυναμικό και διαδικασίες με σκοπό την ιχνηλάτιση των προϊόντων. Η εισαγωγή ενός συστήματος ιχνηλασιμότητας, αποτελεί μια πρόκληση για τις επιχειρήσεις τροφίμων. Είναι γεγονός, ότι οι καλά οργανωμένες εταιρείες, που έχουν πλήρη έλεγχο των διαδικασιών τους, μπορούν να επωφεληθούν από τις δυνατότητες που προσφέρουν τα σύγχρονα συστήματα ιχνηλασιμότητας. Από την άλλη μεριά, η εισαγωγή ενός τέτοιου συστήματος μπορεί να αποτελέσει μια μοναδική ευκαιρία, για κάθε επιχείρηση τροφίμων, για την καλύτερη εσωτερική οργάνωσή της, την απόκτηση σημαντικών ανταγωνιστικών πλεονεκτημάτων και σε τελική ανάλυση, την προσαρμογή της στις νέες συνθήκες της αγοράς.

2.2 Επισήμανση τροφίμων

Με τον όρο σήμανση ή επίσημανση τροφίμων, εννοούμε τις πληροφορίες για ένα τρόφιμο που αναγράφονται πάνω στη συσκευασία τροφίμου ή σε ετικέτα επικολλημένη σε αυτή. Στην περίπτωση ασυσκευάστων τροφίμων, οι πληροφορίες αυτές μπορούν να αναγράφονται σε πινακίδα τοποθετημένη κοντά στα τρόφιμα.

Η σήμανση των τροφίμων απαιτείται να είναι λεπτομερής ώστε να περιγράφει την ακριβή φύση και τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και να είναι ταυτόχρονα εύκολα κατανοητή από τον καταναλωτή, επιτρέποντάς του έτσι να επιλέγει με πλήρη επίγνωση.

Η σήμανση των τροφίμων διέπεται από τους περί Σήμανσης, Παρουσίασης και Διαφήμισης των Τροφίμων Κανονισμούς του 2002 οι οποίοι τροποποιούνται συνεχώς για να εκσυγχρονίζονται και να εναρμονίζονται με τη σχετική νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ορισμένες κατηγορίες τροφίμων όπως οι χυμοί, οι μαρμελάδες, το μέλι, το ελαιόλαδο κ.ά. διέπονται και από ξεχωριστές λεγόμενες «κάθετες

νομοθεσίες» που ισχύουν μόνο γι' αυτές.

2.3 Ιχνηλασιμότητα τροφίμων

Είναι γνωστό, ότι όλες οι επιχειρήσεις που ασχολούνται με οποιονδήποτε τρόπο με τα τρόφιμα, τα ποτά και τις ζωοτροφές, είναι υποχρεωμένες να διαθέτουν συστήματα ιχνηλασιμότητας. Τι είναι όμως αυτός ο όρος; Παρακάτω, παρουσιάζονται μερικοί ορισμοί:

1. Ιχνηλασιμότητα, ορίζεται επίσημα ως: Η ικανότητα παρακολούθησης της διακίνησης ενός αγαθού κατά τις φάσεις της παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής του.
2. Είναι η ικανότητα ιχνηλάτησης της πορείας κάθε επιμέρους μονάδος προϊόντος.
3. Η ιχνηλασιμότητα, είναι η καταχώρηση όλης της διαδρομής του προϊόντος μεταξύ των τμημάτων της εταιρίας μέχρι τον τελικό καταναλωτή.
4. Η Ιχνηλασιμότητα, είναι ένα σύνολο διαφανών κανόνων και ενεργειών, που συνδέουν και συσχετίζουν, κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο, το τελικό παραδοτέο προϊόν με την προέλευσή του, έτσι ώστε να είναι δυνατή, από τον πελάτη, η ανίχνευση της πορείας παραγωγής και προέλευσής του.
5. Ως ιχνηλασιμότητα ορίζεται η ικανότητα ανίχνευσης (trace) του ιστορικού, της εφαρμογής και της θέσης μιας οντότητας (entity), μέσω καταγεγραμμένων πληροφοριών.
6. Ως Ιχνηλασιμότητα, ορίζεται η δυνατότητα εντοπισμού οποιουδήποτε προϊόντος έχει μετακινηθεί / παραχθεί / πωληθεί / καταναλωθεί από οποιαδήποτε επιχείρηση η οποία δραστηριοποιείται στους κλάδους Τροφίμων & Ποτών.

Διακρίνονται τα εξής είδη ιχνηλασιμότητας:

1. Προς τα εμπρός (downstream) ιχνηλασιμότητα:

Σε αυτό το είδος, μπορούν να εντοπιστούν όλα τα LOT Numbers (αριθμός παρτίδας) των προϊόντων που παρήχθησαν με τη χρησιμοποίηση ενός συγκεκριμένου LOT Numbers πρώτης ύλης. Με άλλα λόγια, ξεκινώντας από μία συγκεκριμένη παρτίδα πρώτης ύλης (Lot), μπορούν να εντοπιστούν όλα τα προϊόντα που παρήχθησαν από αυτήν και τους παραλήπτες τους.

2. Εσωτερική ιχνηλασιμότητα:

Μπορεί να παρακολουθηθεί το προϊόν σε όλα τα στάδια μεταποίησής του μέσα στην παραγωγική διαδικασία.

3. Προς τα πίσω (upstream) ιχνηλασιμότητα:

Γνωρίζοντας το LOT Numbers του προϊόντος, μπορούν να συγκεντρωθούν όλα τα δεδομένα για τις πρώτες ύλες και τις συνθήκες παραγωγής. Δηλαδή, γνωρίζοντας την παρτίδα του τελικού προϊόντος (Lot), μπορούν να ανιχνευτούν οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και τις συνθήκες παραγωγής του προϊόντος.

2.4 Ταυτοποίηση κρέατος και προϊόντων με βάση το κρέας.

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 κατσίκια και λιγότερο με άλλα είδη όπως ο ρινόκερος ή η τίγρη. 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, κατσίκια, 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 έξι 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, BsaJI, RsaI, MseI, και BstUI. Η τεχνική εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ταυτοποίηση των ειδών.

3. Μοριακοί δείκτες

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

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

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

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

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

Οι μοριακοί δείκτες 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.

4. Μιτοχονδριακό DNA

Το μιτοχονδριακό DNA των πολυκύτταρων οργανισμών παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της μοριακής εξέλιξης των οργανισμών.

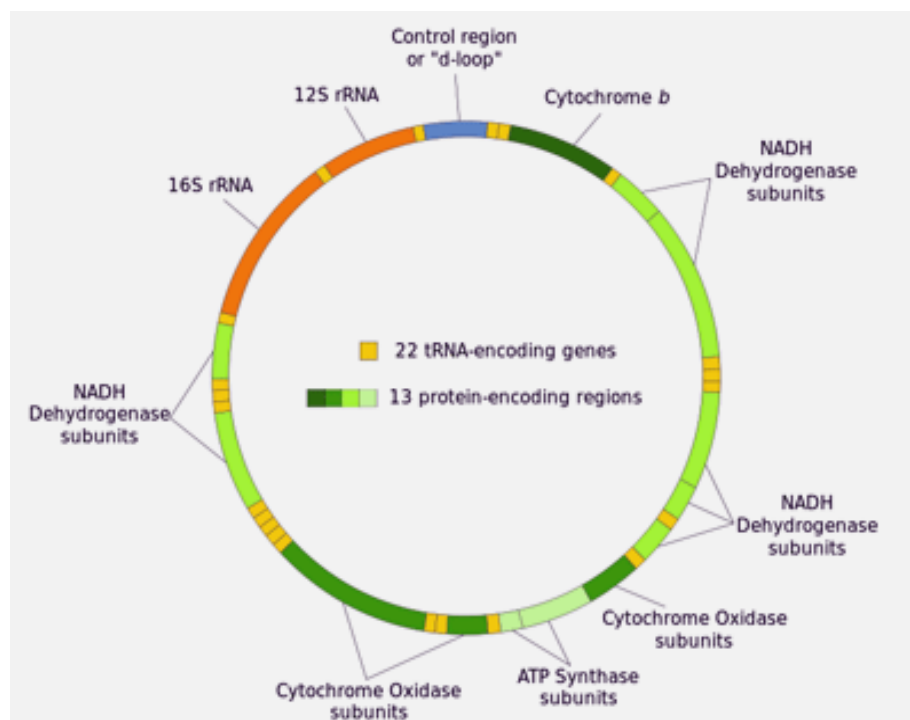
Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι μικρό και απλό σε σχέση με το μεγάλο μέγεθος και τη πολύπλοκη οργάνωση που παρουσιάζει το πυρηνικό γονιδίωμα. Μεταξύ των πολυκύτταρων οργανισμών το διπλοειδές πυρηνικό γονιδίωμα ποικίλλει σημαντικά σε μέγεθος έχοντας ένα εύρος από 4×10^8 μέχρι 4×10^{11} ζεύγη βάσεων τα οποία είναι οργανωμένα σε 4 έως 250 ευδιάκριτα χρωματοσώματα. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα σε σύγκριση με το πυρηνικό είναι περίπου 25.000 φορές μικρότερο ενώ το μέγεθός του παρουσιάζει σχετικά πολύ μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ των οργανισμών.

Το mtDNA αποτελείται από ένα απλό διπλό κυκλικό μόριο DNA, που σε αντίθεση με το πυρηνικό περιέχει κωδικές αλληλουχίες οι οποίες απαντούν μόνο μία φορά στο γονιδίωμα του. Χαρακτηριστική επίσης είναι η έλλειψη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ των γονιδίων καθώς και η απουσία ιντρονίων και ψευδογονιδίων.

Όλες οι γενετικές μεταβολές που είναι αποτέλεσμα της σεξουαλικής κληρονομικότητας δε λαμβάνουν χώρα στην περίπτωση του μιτοχondριακού γονιώματος δεδομένου ότι αυτό κληρονομείται κυτοπλασματικά κυρίως μόνο από το θηλυκό άτομο. Αρκετές εξαιρέσεις ως προς την αυστηρή μητρική κληρονομικότητα του mtDNA έχουν αναφερθεί (Avisé 1991, Gyllenstein et al. 1991, Kondo et al. 1990), όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του θαλάσσιου μυδιού *Mytilus* όπου η πατρική συμμετοχή φαίνεται να είναι πολύ συχνή (Ζούρος 1992). Ακόμα όμως και σε αυτή την περίπτωση τα μακρομόρια της πατρικής και της μητρικής προέλευσης δεν είναι γνωστό να υφίστανται γενετικό ανασυνδιασμόστους απογόνους (Hoeck et al. 1991). Έτσι οι γονότυποι του mtDNA αντιπροσωπεύουν μη ανασυνδυασμένους χαρακτήρες οι οποίοι μεταφέρονται κατά πλειοψηφία μητρικά στις επόμενες γενιές και για λόγους απλότητας οι γονότυποι αυτοί αναφέρονται ως κλώνοι ή απλότυποι και τα συμπεράσματα των φυλογενετικών τους σχέσεων εξηγούνται με βάση την μητριαρχική φυλογένεια.

Ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA στην περίπτωση των θηλαστικών υπολογίζεται ότι είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό εξέλιξης του πυρηνικού DNA (Brown et al. 1979, 1982, Miyata et al. 1982) κυρίως λόγω της έλλειψης επιδιορθωτικού μηχανισμού μεταλλάξεων οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής (Wilson et al. 1985). Ο ρυθμός εξέλιξης του ανθρώπινου mtDNA είναι πέντε με δέκα φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό εξέλιξης του πυρηνικού DNA (Powell et al. 1986). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από την μελέτη του νηματώδους *C.elegans* στην περίπτωση του πυρηνικού γονιδίου της καλμοδουλίνης και του μιτοχondριακού γονιδίου COII (Thomas & Wilson 1991). Στις περιπτώσεις όμως της δροσόφιλας (Powell et al. 1986, Solignac et al. 1986) και του θαλάσσιου αχινού (Vawter & Brown 1986) βρέθηκε ότι ο μέσος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA είναι παρόμοιος με τον αντίστοιχο του πυρηνικού DNA. Οι Sharp & Li (1989) μελετώντας υπάρχουσες αλληλουχίες DNA βρήκαν ότι ο ρυθμός εξέλιξης του πυρηνικού DNA στην περίπτωση της δροσόφιλας ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό εξέλιξης των θηλαστικών και ότι ο ρυθμός αντικαταστάσεων σε συνώνυμες θέσεις

στην περίπτωση γονισίων του πυρηνικού DNA της δροσόφιλας ήταν τρεις φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό σε γόνους του πυρήνα των θηλαστικών.



Εικόνα 1. Ο χάρτης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του ανθρώπου.

Στην παρούσα εργασία η τεχνική ανάλυσης της Real-Time PCR, που χρησιμοποιήθηκε, εφαρμόστηκε στην μιτοχονδριακή περιοχή 12S των κυττάρων κρέατος από βόειο, χοιρινό, κοτόπουλο και γαλοπούλα. Ο σκοπός ήταν η χρήση αυτού του γονιδίου για την διάκριση των παραπάνω ειδών σε μίγματα κρεάτων.

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

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

ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.

5. Σκοπός της εργασίας

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με την μέθοδο της Real Time PCR για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό κρέατος κοτοπουλού σε αναμείξεις.

Ο μοριακός δείκτης που εξετάστηκε ήταν το γονίδιο 12S rRNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η PCR και η Real Time PCR. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων με στόχο την δημιουργία πρότυπων καμπύλων αναφοράς με την χρωστική SYBR Green και με Taqman ανιχνευτές. Σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές (primers) και ανιχνευτές για κάθε δοκιμή και προσδιορίστηκε η απόδοση της αντίδρασης. Όλες οι μέθοδοι ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν το είδος στόχο (κοτόπουλο) όταν εμπλουτίζονταν από 1% έως 99% από άλλα είδη (γαλοπούλα). Οι αναλύσεις δοκιμάστηκαν σε μείγματα με βάση το κρέας για να αξιολογηθεί η διαγνωστική ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου.

6. Πειραματική Πορεία-Μέθοδοι

6.1 Δείγματα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ζωικά είδη: κοτόπουλο (*Gallus gallus*) και γαλοπούλα (*Melaebris gallopavo*). Πραγματοποιήσαμε αναμείξεις αυτών των δύο ειδών. Τα μείγματα περιείχαν τα δύο είδη σε διάφορες αναλογίες. Οι αναλογίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλυφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί, για να μπορέσουμε να εξάγουμε όσο το δυνατόν πιο χρήσιμα αποτελέσματα. Κάθε μίγμα περιείχε μικρή ποσότητα ιστού από κάθε είδος που κυμαινόταν 5-100mg. Για να σιγουρευτούμε ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε δεν πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες από άλλα είδη (χοιρινό, μοσχαρι) κάναμε αναμείξεις και με αυτά τα 2 είδη. Η συντήρησή τους έγινε στους -20 °C. Στον Πίνακα παρουσιάζονται τα μείγματα που δημιουργήθηκαν στις διάφορες αναλογίες.

Πίνακας 6.1. Αναμείξεις των δύο ζωικών ειδών (κοτόπουλο-γαλοπούλα) σε διάφορες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν

Μείγματα	Γαλοπούλα Κοτόπουλο		Μείγματα	Κοτόπουλο Γαλοπούλα	
1	95mg	5mg	7	95mg	5mg
2	90mg	10mg	8	90mg	10mg
3	80mg	20mg	9	80mg	20mg
4	70mg	30mg	10	70mg	30mg
5	60mg	40mg	11	60mg	40mg
6	50mg	50mg			

6.2 Απομόνωση του DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από τον ιστό (χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες ιστού που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα), ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Τεμαχίζουμε το δείγμα και τοποθετούμε τον ιστό σε φιαλίδια erpendorf των 1,5ml.
2. Προσθέτουμε 180μl Genomic Digestion buffer και 20 μl πρωτεϊνάση K και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55°C για περίπου 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση.
4. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2ml.
5. Προσθέτουμε 20μl RNase A και αναδεύουμε στο vortex.
6. Προσθέτουμε 200μl Genomic lysis binding buffer και αναδεύουμε ξανά στο vortex.
7. Προσθέτουμε 200μl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε έντονα.
8. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά erpendorf με στήλες διαχωρισμού.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 1 λεπτό.
10. Προσθέτουμε 500μl Wash buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 9.

11. Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέο φιαλίδιο, προσθέτουμε 500μl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 3'.
13. Τοποθετούμε τη στήλη σε eppendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 100μl Elution buffer.
14. Τέλος φυγοκεντρούμε, για 2 λεπτά στις 13000 στροφές
15. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

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

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

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

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς τους. Τα loading buffers περιέχουν ως επί το πλείστον

γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη έτσι ώστε να καταβυθίζεται το DNA καθώς και χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα κυριότερα buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αгарόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X

Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

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

Για την προετοιμασία της πηκτής αгарόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 0,6g αгарόζης και 30ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά τη θέρμανση πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.

5. Προστίθενται 3μl βρωμιούχου αιθιδίου C=10mg/ml.
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
7. Εισάγεται το χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι.
9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.
10. Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 2μl DNA, στην περίπτωση ελέγχου της αντίδρασης της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA (PCR προϊόν) και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.

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

6.4 Αναλυτική μέθοδος της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες.

Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.

Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension).

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα, τους θερμοκυκλωτές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται με θέρμανση στους 95° C. Στη συνέχεια οι εκκινητές σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητών από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών απόσταση. Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA θραύσματος σε ένα *in vitro* σύστημα (χωρίς κύτταρα) διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις *in vivo* διαδικασίες κλωνοποίησης.[1]

Πίνακας 6.2.. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA

Εκκινητής	Αλληλουχία
12S rRNA Fw	5'-CCC ACG AAA GTG ACT CTA ATA ATC CT-3'
12S rRNA Rv	5'-GTT TTG TTA TGT AAC TAT TTG G-3'

Για την διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.3. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Έπειτα τοποθετούμε σε φιαλίδια eppendorf 1μl εκμαγείου DNA το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα 200-700ng.

Πίνακας 6.3. Συστατικά αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Συγκεντρώσεις στην αντίδραση
DNA	1μl	200ng
ddH₂O	39,8μl	
Buffer 10x	5μl	1X
MgCl₂ (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

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

- **Αρχική αποδιάταξη:** 95 ° C για 4min
- **Αποδιάταξη:** 95 ° C για 40sec
- **Θερμική Επαναδιάταξη:** 53 ° C για 50sec

- **Επιμήκυνση:** 72 ° C για 40sec
- **Τελική επιμήκυνση:** 72 ° C για 10min

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

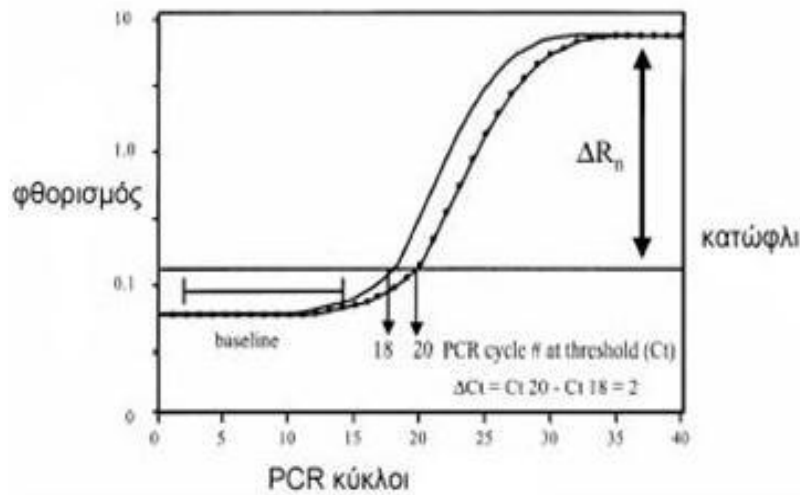
6.5 Real Time PCR

Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR και πρωτοεμφανίστηκε το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του. Η real-time PCR, απλά αναφέρεται στην ενίσχυση DNA με PCR που ελέγχεται ενώ συμβαίνει η ενίσχυση. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει στον ερευνητή να καθορίζει καλύτερα το ποσό του αρχικού DNA στο δείγμα πριν την ενίσχυση με PCR. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της γίνεται ολοένα και πιο ευρεία, χάρη στον αυξανόμενο αριθμό real-time PCR θερμοκυκλοποιητών στην αγορά και της επακόλουθης πτώσης των τιμών τους καθώς επίσης και των αντιδραστηρίων.

Η real-time PCR είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η ενίσχυση του DNA-στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της ενίσχυσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA.

Η real-time PCR μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των PCR προϊόντων σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, μια σήμανση φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το σημείο υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το χαρακτηρίζεται ως σήμανση κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος

και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA.



Εικόνα 6.1. Υποθετική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού σε πειράματα real-time PCR.

Το διάλυμα για την Real-Time PCR περιέχει τα ίδια αντιδραστήρια με αυτό της συμβατικής μεθόδου και επιπλέον κάποιες χρωστικές για την ανίχνευση του γονιδίου-στόχου (Houghton et al, 2006). Έτσι, η μέτρηση της ποσότητας DNA που παράγεται μετά από κάθε κύκλο γίνεται μέσω σήμανσης των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια ή ανιχνευτές (probes) που έχουν ενσωματωθεί στο τελικό προϊόν. Παρόλο που η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα σε μικρότερο χρόνο απ' ό,τι η PCR και δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Houghton et al, 2006).

Στην Real time PCR η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule), στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Stratagene, 2006)

Σε ένα διάγραμμα QPCR, η γραμμή Threshold διέρχεται από το σημείο όπου το φθορίζον σήμα των προϊόντων ξεχωρίζει έντονα από το φόντο, ενώ ο κύκλος που αντιστοιχεί σ αυτό το σημείο λέγεται Threshold cycle (Ct, Εικ. 1). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct που αντιστοιχεί στο δείγμα αυτό (Wong et al, 2005).

Η βασική αρχή είναι η χρήση, μιας φθορίζουσας ουσίας, στην αντίδραση, που μπορεί να είναι, είτε μια φθορίζουσα χρωστική ουσία η οποία φθορίζει όταν δεσμευτεί στο δίκλωνο DNA, είτε κατάλληλα σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική ανιχνευτής (probe), ο οποίος όταν υβριδιστεί με την κατάλληλη αλληλουχία που μας ενδιαφέρει, τότε απενεργοποιείται ο αναστολέας φθορισμού και φθορίζει. Οι τιμές της έντασης φθορισμού, οι οποίες είναι ανάλογες με τα προϊόντα που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, λαμβάνονται σε κάθε κύκλο (σε πραγματικό χρόνο-in “real time”), κατά την πορεία της αντίδρασης ενίσχυσης. Έτσι σε κάθε κύκλο της αντίδρασης η ένταση φθορισμού αυξάνει αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του αναδιπλασιασμένου DNA.

Η ένταση φθορισμού λοιπόν, αντανakλά την ποσότητα των σχηματισμένων προϊόντων. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός του πρότυπου δείγματος, ο οποίος βασίζεται στις τιμές φθορισμού κατά την εκθετική φάση της ενίσχυσης DNA, πριν εξαντληθούν τα αντιδραστήρια ή συσσωρευτούν αναστολείς ή η απενεργοποίηση της πολυμεράσης αρχίσει πλέον να επιδρά αρνητικά στην αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης. Οι τιμές φθορισμού σ’ αυτά τα πρώιμα στάδια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης μπορούν να αποτελέσουν ένα αξιόπιστο και επαναλήψιμο μέτρο ποσοτικού προσδιορισμού, των ενισχυμένων ποσοτήτων DNA από το πρότυπο δείγμα. Η συλλογή των μετρήσεων των δεδομένων φθορισμού, για κάθε δείγμα, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, γίνεται αυτόματα από κατάλληλο σύστημα, ανίχνευσης φθορισμού, PCR καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων από H/Y που είναι εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό.

Για να είναι πιο ακριβή τα αποτελέσματα, στις αντιδράσεις της Real-Time PCR, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δείγματα ελέγχου. Αυτά διακρίνονται σε θετικά ή αρνητικά δείγματα. Τα θετικά δείγματα ελέγχου, δίνουν συνεχείς αναδιπλασιασμούς με παραγωγή προϊόντων, άρα και συνεχή αναλογική αύξηση στην ένταση φθορισμού, ενώ σε διαφορετική περίπτωση θα υποδηλώνει κάποιο πρόβλημα στην αντίδραση ή στα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια. Τα αρνητικά δείγματα ελέγχου αντίθετα δεν

δίνουν προϊόντα αναδιπλασιασμού, άρα δεν παρατηρείται αύξηση φθορισμού, ενώ σε διαφορετική περίπτωση, υποδηλώνει πιθανή επιμόλυνση των δειγμάτων, μη ειδικό σχηματισμό προϊόντων ή υποβάθμιση ανιχνευτών. Τα αρνητικά δείγματα περιέχουν όλα τα υλικά του διαλύματος αντίδρασης, εκτός του DNA (συνήθως χρησιμοποιείται νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA).

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά δείγματα, δηλ δείγματα χωρίς παρουσία DNA, μαζί με τα προς εξέταση δείγματα.

Η διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στις διάφορες συσκευές Real Time PCR, είναι το λογισμικό που διαθέτει η κάθε συσκευή για την ανάλυση των δεδομένων και το σύστημα ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης χρωστικής φθορισμού (Gene-Quantification). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας εργασίας είναι το μοντέλο MX Pro 3005 P της εταιρείας Stratagene.

6.5.1 Διαφορετικές μεθοδολογίες της Real Time PCR (Taqman Probes, SYBR Green)

Στην ποσοτική PCR υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να εφαρμοστούν για την σήμανση των προϊόντων της Real time PCR (Stratagene, 2007). Η μια μέθοδος βασίζεται στην χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA (DNA binding dyes) π.χ. SYBR Green I, και η άλλη στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών (probes). Οι μεθοδολογίες αυτές περιγράφονται παρακάτω.

SYBR Green

Είναι η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη χρωστική για την μέθοδο της real time PCR, και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως σε ερευνητικές εφαρμογές. Είναι μία χρωστική κυανίνης που δεσμεύεται ειδικά στην ελάσσονα αύλακα της διπλής έλικας του DNA και σαν αποτέλεσμα, παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA. Μόλις δεσμευτεί, η χρωστική εκπέμπει ένα σήμα φθορισμού πάνω από χίλιες φορές μεγαλύτερο από εκείνο που εκπέμπεται από την αδέσμευτη χρωστική (Wilhelm et al, 2003). Τα πλεονεκτήματα της SYBR green περιλαμβάνουν τη σχετική ευκολία με την οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε υπάρχουσες δοκιμασίες PCR, έχει σχετικά χαμηλό κόστος και την ευκολία σχεδιασμού της διαδικασίας. Οι προσδιορισμοί με SYBR Green δεν απαιτούν την πρόσθετη πολυπλοκότητα και το κόστος του σχεδιασμού και της κατασκευής των ανιχνευτών που επισημαίνονται με

φθορίζουσες χρωστικές. Ένα μειονέκτημα, όμως, είναι η μη ειδική φύση της SYBR Green, η οποία επιτρέπει κάθε μη-ειδική ενίσχυση κατά την διάρκεια αντίδρασης PCR με αποτέλεσμα να αυξάνεται τεχνητά το σήμα φθορισμού και εσφαλμένα αυξάνονται η τιμές του δείγματος (Wilhelm et al, 2003; Bustin et al, 2002). Λόγω αυτής της μη ειδικής φύσης, οι ερευνητές συχνά υποχρεώνονταν να πραγματοποιήσουν συμπληρωματικές αναλύσεις επιβεβαίωσης, συμπεριλαμβανομένων των καμπυλών αποδιάταξης και την ηλεκτροφόρηση πηκτής, για να καθορίζουν την ποιότητα και την ακρίβεια των δεδομένων σε πραγματικό χρόνο, αυξάνοντας περαιτέρω το κόστος και τον χρόνο που απαιτείται για την εκτέλεση των μετρήσεων σε πραγματικό χρόνο (Wilhelm et al, 2003; Bustin et al, 2002). Ως εκ τούτου, ακόμη και αν η SYBR Green δοκιμασίες απαιτούν λιγότερο κόστος δημιουργίας στην αρχή της μεθόδου, απαιτείται πιο εκτεταμένη ανάλυση αργότερα.

Σε πειράματα στα οποία επιζητείται απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός με την Real-Time PCR, είναι απαραίτητο να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Από ένα αρχικό δείγμα γνωστής συγκέντρωσης DNA, κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις, τότε είναι δυνατό να σχεδιάσουμε μια πρότυπη καμπύλη, που συσχετίζει τις τιμές Ct για κάθε αραιώση, με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του αραιωμένου δείγματος. Με την προϋπόθεση ότι οι αραιώσεις έχουν γίνει με ακρίβεια και η αποτελεσματικότητα του αναδιπλασιασμού δεν μεταβάλλεται μέσα στο εύρος των συγκεντρώσεων των δειγμάτων, τότε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς που προκύπτει είναι μια ευθεία γραμμή.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών και μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς για να επιλέξαμε την με το καλύτερο efficiency (E). Στις παρακάτω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από διαδοχικές αραιώσεις κοτόπουλου όπως αναφέρονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

Για να είναι ακριβής ο ποσοτικός προσδιορισμός των αγνώστων δειγμάτων, θα πρέπει οι τιμές των Ct που δίνουν, να εμπίπτουν μέσα στο εύρος των συγκεντρώσεων της πρότυπης καμπύλης αναφοράς στο οποίο αυτή είναι ευθεία γραμμή. Εάν η καμπύλη

αναφοράς τείνει να γίνει μη γραμμική σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, τότε αυτό υποδηλώνει ότι έχει φτάσει στο όριο ανίχνευσης για την συγκεκριμένη δοκιμή. Η γραμμικότητα της καμπύλης, υποδηλώνεται με το συντελεστή συσχέτισης R^2 , οι τιμές του οποίου πρέπει να είναι $R > 0,985$.

Από την άλλη η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς, υποδηλώνει ότι η απόδοση του αναδιπλασιασμού (Efficiency, E) σε κάθε κύκλο της αντίδρασης είναι σταθερή και θα πρέπει να είναι μεταξύ 90-110%. Απόδοση της αντίδρασης (Efficiency, E) 100%, σημαίνει τέλει αναδιπλασιασμό σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η απόδοση μπορεί να υπολογιστεί από την κλίση της καμπύλης αναφοράς με την σχέση:


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


Εάν η απόδοση είναι χαμηλή $< 90\%$, ή υψηλή $> 110\%$, σημαίνει ότι η αντίδραση τείνει να επιβραδυνθεί, παρουσία αναστολέων, μη ιδανικών εκκινήτων ή ύπαρξη μη ευνοϊκών συνθηκών αντίδρασης. Τιμές αποτελεσματικότητας υψηλές $> 110\%$, δηλώνει πιθανά πειραματικά σφάλματα (πχ ακατάλληλα αντιδραστήρια, μη σωστές αραιώσεις).

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη όλα τα παραπάνω για την βελτιστοποίηση της αντίδρασης της καμπύλης αναφοράς αλλά και των δειγμάτων, μπορούμε να συγκρίνουμε τις τιμές Ct των δειγμάτων και από την καμπύλη αναφοράς, να υπολογίσουμε την αρχική συγκέντρωση του υπό μελέτη δείγματος.

Συμπερασματικά τα πλεονεκτήματα της Real-time PCR είναι (Broadmann & Moor, 2003, Chisholm et al., 2008):

- Η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού σε πρώιμα στάδια της αντίδρασης PCR, που είναι και πιο ακριβής σε σχέση με το τελικό στάδιο της αντίδρασης.
- Τα δεδομένα φθορισμού συλλέγονται απευθείας από το όργανο της Real-time PCR, αποφεύγοντας την ανάγκη για ηλεκτροφόρηση.
- Η μεγάλη ταχύτητα των αναλύσεων, επιτρέποντας την πραγματοποίηση

αναλύσεων ρουτίνας πολλαπλών δειγμάτων με υψηλή απόδοση. 

- Η σημαντική μείωση της πιθανότητας μόλυνσης των μειγμάτων της PCR με μόρια του DNA στόχου, εξαιτίας του ότι τα σωληνάρια της αντίδρασης παραμένουν κλειστά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. 

Πίνακας 6.4. Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών στα 200 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21,7 μ l
Primer Fw (200nM)	0,86 μ l
Primer Rv (200nM)	0,86 μ l
ddH₂O	16,86 μ l
DNA	3 μ l

Πίνακας 6.5. Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 300 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21,7 μ l
Primer Fw (300nM)	1,3 μ l
Primer Rv (300nM)	1,3 μ l
ddH₂O	16 μ l
DNA	3 μ l

Στην συνέχεια προσθέτουμε 3 μl DNA στα eppendorf και μοιράζουμε σε κάθε eppendorf που περιέχει το DNA, από 40μl από το παρασκευασμένο master mix. Επίσης, σε ένα eppendorf το οποίο δεν περιέχει DNA τοποθετούμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Αμέσως μετά χωρίζουμε την ποσότητα του κάθε eppendorf στην μέση δηλαδή 20 μl και την τοποθετούμε στα ειδικά eppendorf για την Real Time PCR και τα τοποθετούμε στην συσκευή η οποία προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου για 35 κύκλους.

95oC για 3min

95oC για 30sec

61oC για 1 min

72oC για 1 min

95oC για 1 min

55oC για 30sec

95oC για 30sec

Taqman Probe

Οι ανιχνευτές Taqman αποτελούν μια από τις πρώτες μορφές ανίχνευσης που βασίζονται σε ανιχνευτή και είναι διαθέσιμες για την real time PCR. Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιούν την εγγενή δραστικότητα της εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης (δηλαδή, την ικανότητα να υδρολύει το DNA) (Uhl, et al. 2002; Wilhelm et al, 2003; Uhl et al, 2004). Οι ανιχνευτές Taqman είναι μικρά ολιγονουκλεοτίδια (20-30 ζεύγη βάσεων) και περιέχουν μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς οι οποία επισυνάπτεται στο 5' άκρο και μία χρωστική απόσβεσης που επισυνάπτεται στο 3' άκρο (Uhl et al. 2002; Wilhelm et al, 2003; Uhl et al, 2004). Προσδένονται στο DNA στόχο μεταξύ των εκκινητών της PCR κατά την διάρκεια του σταδίου της υβριδοποίησης και διασπώνται από την δραστικότητα της

εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης κατά την διάρκεια επέκτασης του εκκινητή, διαχωρίζοντας τις δύο χρωστικές στον ανιχνευτή Taqman (Εικ. 5). Ενώ ο ανιχνευτής είναι άθικτος, η χρωστική αναφοράς δεν θα εκπέμπει σήμα φθορισμού διότι «αποσβέστηκε» με την παρουσία της χρωστικής απόσβεσης. Μόλις ο ανιχνευτής διασπάται, η χρωστική αναφοράς είναι απαλλαγμένη από την χρωστική απόσβεσης και εκπέμπει ένα σήμα (Uhl et al. 2002; Wilhelmet al, 2003; Uhlet al, 2004). Οι Taqman προσδιορισμοί είναι πιο ειδικοί από τους SYBR Green προσδιορισμούς, σχετικά πιο ακριβοί και δεν επιτρέπουν άμεσα ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (Wilhelm et al, 2003).

Η ενισχυμένη ειδικότητα των προσδιορισμών Taqman σε σύγκριση με τους προσδιορισμούς που χρησιμοποιούν χρωστικές παρεμβολής όπως η SYBR Green, οφείλεται σε τρία εξαιρετικά συγκεκριμένα γεγονότα που πρέπει να συμβούν πριν δημιουργηθεί ένα σήμα φθορισμού. Οι δύο εκκινητές (forward, reverse) πρέπει να δεσμευθούν και να επεκταθούν, αλλά επίσης και ο ανιχνευτής πρέπει να δεσμευθεί στην μήτρα μεταξύ των δύο εκκινητών. Εάν δεν εμφανιστούν αυτά τα τρία γεγονότα, δεν υπάρχει σήμα φθορισμού (Wilhelmet al, 2003; Uhl et al, 2004). Αυτές οι απαιτήσεις βελτιώνουν δραματικά την ειδικότητα της ανάλυσης και να μειώνουν τον χρόνο που απαιτείται για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση δοκιμασίας. Ένα μειονέκτημα σε σύγκριση με αναλύσεις που χρησιμοποιούν χρωστικές παρεμβολής, είναι μερικές φορές δύσκολο το έργο του σχεδιασμού των συνδυασμών εκκινητή-ανιχνευτή για μία αλληλουχία που μας ενδιαφέρει.

Για την διαδικασία της Real Time PCR με ανιχνευτές Taqman το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.6. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.

Τέλος με την μέθοδο της Real Time PCR χρησιμοποιώντας εσωτερικό ανιχνευτή Taqman και έχοντας καταλήξει σε ποια συγκέντρωση εκκινητών έχουμε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης μπορούμε να δημιουργήσουμε καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση άγνωστων δειγμάτων DNA.

Πίνακας 7.6. Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με Taqman Probe και συγκέντρωση εκκινητών 300 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
2X Taqman Probe	21,5 µl
Primer Fw (200 nM)	1,29 µl
Primer Rv (200 nM)	1,29 µl
Probe	0,645 µl
DNA	3 µl
ddH₂O	15,275 µl

Στην συνέχεια προσθέτουμε 3 µl DNA στα eppendorf και μοιράζουμε σε κάθε eppendorf που περιέχει το DNA, από 40µl του παρασκευασμένου master mix. Επίσης, σε ένα eppendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Αμέσως μετά χωρίζουμε την ποσότητα του κάθε eppendorf στην μέση δηλαδή 20 µl και την τοποθετούμε στα ειδικά eppendorf για την Real Time PCR και τα τοποθετούμε στην συσκευή η οποία προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου για 30 κύκλους.

95oC για 5 min

95oC για 30 sec

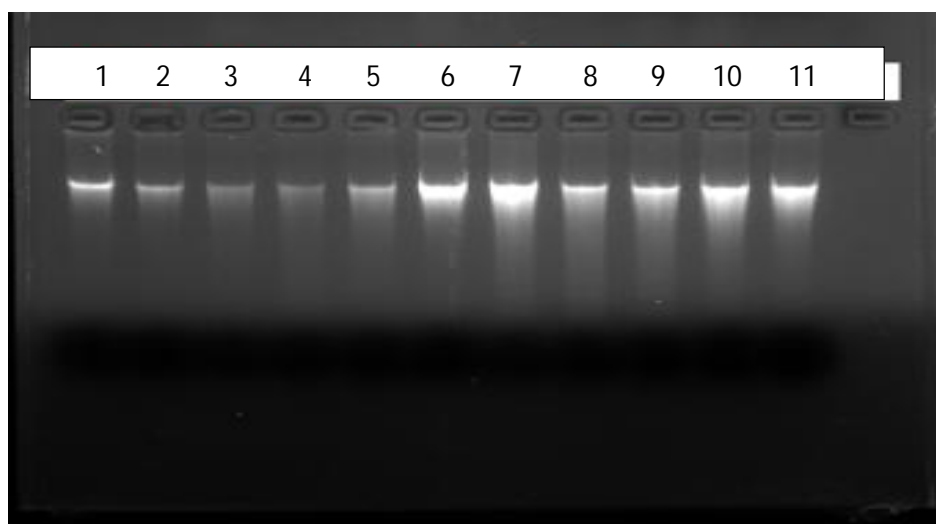
60oC για 1 min

72oC για 1 min

7. Αποτελέσματα

7.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με την διαδικασία που έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην Εικόνα 8.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης.



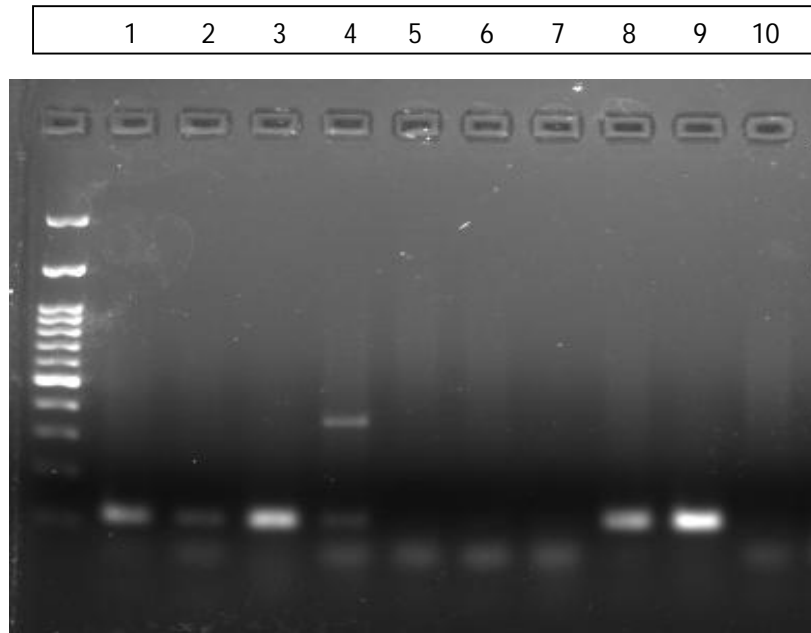
Εικόνα 7.1. Απομόνωση DNA μείγματος ιστού κοτόπουλου με γαλοπούλα. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.

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

7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στην συνέχεια με τη μέθοδο της PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 12s RNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα και κάναμε έλεγχο αν το τμήμα αυτό πολλαπλασιάζει αλληλουχίες άλλων ειδών. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% παράλληλα με μάρτυρα τμημάτων

γνωστών μοριακών μεγεθών, για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 12S rRNA και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος της PCR. Στην Εικόνα 8.2. παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου 12S rRNA σε διαφορετικά είδη ζώων.



Εικόνα 7.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης. 1. Χοιρινό 2. Μοσχάρι 3. Κοτόπουλο 4. Γαλοπούλα 5. Πρόβατο 6. Κατσίκι 7. Άλογο 8. Χοιρινό-μοσχάρι 9. Κοτόπουλο-γαλοπούλα 10. Πρόβατο- κατσίκι.

Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR παρατηρούμε ότι οι εκκινητές (Fw κ' Rv) που χρησιμοποιήσαμε πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες DNA χοιρινού(1), μοσχαριού(2), κοτόπουλου (3), γαλοπούλας(4), μείγματος χοιρινού-μοσχαριού(8) και μείγματος γαλοπούλας με κοτόπουλο (9).

Σύμφωνα με το σκοπός της παρούσας εργασίας πρέπει να δημιουργήσουμε καμπύλη αναφοράς με την μέθοδο της Real Time PCR και την χρήση ανιχνευτών Taqman. Για να φτάσουμε στον σκοπό μας χρειάστηκε να περάσουμε από τα παρακάτω πειραματικά στάδια.

7.3. Έλεγχος συγκέντρωσης εκκινητών (Fw, Rv)

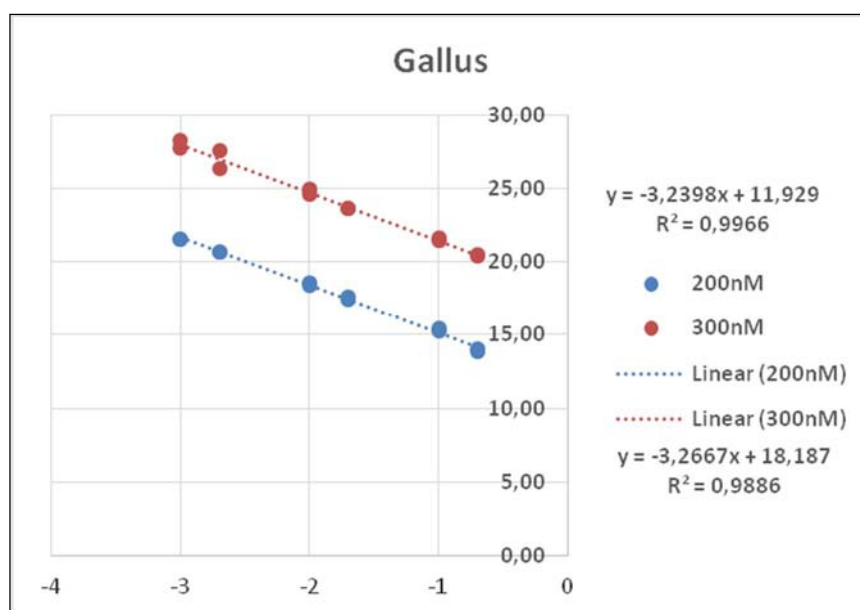
Αρχικά ελέγξαμε την επιθυμητή συγκέντρωση εκκινητών (Fw, Rv) η οποία θα μας έδινε και την καλύτερη απόδοση αντίδρασης. Γι' αυτόν τον λόγο δημιουργήθηκαν δύο αντιδράσεις, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις DNA κρέατος κοτόπουλου που φαίνονται στο Πίνακα 7.1. και δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών (200nM, 300nM). Το περιεχόμενο των δύο αντιδράσεων φαίνεται στους Πίνακες 6.4 και 6.5. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε στην αντίδραση με την μέθοδο της Real Time PCR την χρωστική SYBR Green και πήραμε τα αποτελέσματα του Πίνακα 7.1.

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

Dilution	log dilution	Gallus Fw/Rv 200/200nM (Ct)	Gallus Fw/Rv 300/300nM (Ct)
0,2	-0,69897	14,05	20,39
0,2	-0,69897	13,87	20,49
0,1	-1	15,28	21,45
0,1	-1	15,40	21,60
0,02	-1,69897	17,63	23,60
0,02	-1,69897	17,40	23,66
0,01	-2	18,58	24,62
0,01	-2	18,40	24,96
0,002	-2,69897	20,70	26,36
0,002	-2,69897	20,69	27,61

0,001	-3	21,53	27,76
0,001	-3	21,52	28,24

Από τον Πίνακα 7.1. χρησιμοποιώντας τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και τον λογάριθμο των αραιώσεων κατασκευάσαμε τις καμπύλες του Διαγράμματος 7.1. Σε όλες τις συγκεντρώσεις εκκινητών η καμπύλες απόδοσης ήταν γραμμικές όπως αποδεικνύεται από τους συντελεστές συσχέτισης R^2 .



Διάγραμμα 7.1. Καμπύλες απόδοσης της αντίδρασης με χρωστική SYBR Green για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών.

Από τον πίνακα που ακολουθεί, παρατηρούμε ότι η απόδοσης και των δύο αντιδράσεων είναι αρκετά ικανοποιητική ξεπερνώντας το 100%. Η απόδοση που πλησιάζει περισσότερο το 100% είναι αυτή με συγκεντρώσεις εκκινητών Fw/Rn = 300/300 nM. Γι αυτό τον λόγο επιλέγουμε αυτήν την συγκέντρωση εκκινητών για να συνεχίσουμε την υπόλοιπη πειραματική πορεία.

		R^2	intercept	slope		Efficiency
Gallus	200nM	0,9966	11,929	-3,2398	0,31	1,0355
Gallus	300nM	0,9886	18,187	-3,2667	0,31	1,0236

7.4. Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Χρησιμοποιώντας την συγκέντρωση εκκινητών η οποία μας έδωσε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (300 nM) έγινε έλεγχος για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών χοιρινού, βοδινού, γαλοπούλας και κοτόπουλου. Πιο συγκεκριμένα, ο έλεγχος έγινε με εκκινητές κοτόπουλου που χρησιμοποιήθηκαν τόσο σε DNA κοτόπουλου αλλά και σε DNA από τα υπόλοιπα τρία είδη για να ελέγξουμε αν πολλαπλασιάζονται οι αλληλουχίες των ειδών αυτών. Ο έλεγχος έγινε με την μέθοδο της Real Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Παρασκευάστηκε η αντίδραση του Πίνακα 6.4. και για δείγμα χρησιμοποιήθηκε DNA από χοιρινό, μοσχάρι, γαλοπούλα και κοτόπουλο σε ποσότητα 3μl. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) με εκκινητές κοτόπουλου (300 nM) σε DNA από κοτόπουλο, γαλοπούλα, μοσχάρι, χοιρινό.

DNA	Εκκινητές γαλοπούλας (300 nM), Ct
Κοτόπουλο	14.85
	14.72
Γαλοπούλα	No Ct
	27.70
Μοσχάρι	No Ct
	No Ct
Χοιρινό	No Ct
	No Ct

Από το Πίνακα 7.2., παρατηρείται ότι οι εκκινητές κοτόπουλου δεν ανιχνεύουν καθόλου DNA χοιρινού και μοσχαριού. Ανιχνεύουν μετά από πολλούς κύκλους (Ct), πλησιάζοντας στο τέλος της αντίδρασης, DNA από γαλοπούλα κάτι που μας επιτρέπει να συνεχίσουμε το πείραμα με τους συγκεκριμένους εκκινητές χωρίς να

έχουμε το πρόβλημα παρουσίας διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Για λόγους περιορισμού της διασταυρούμενης αντίδρασης, στη συνέχεια περιορίσαμε τον αριθμό κύκλων αντίδρασης στους 30.

7.5. Έλεγχος της συγκέντρωσης εκκινητών σε μείγματα κρέατος

Το επόμενο βήμα ήταν γίνει έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης με εκκινητές που είχαν συγκέντρωση 200 nM ή 300 nM σε μείγματα κρέατος. Για να σιγουρευτούμε ότι οι εκκινητές ανιχνεύουν το DNA κρέατος κοτόπουλου και σε μικρές ποσότητες μέσα σε μείγματα χρησιμοποιήθηκε DNA από μείγμα το οποίο προήλθε από την αναλογία μείγματος 95 mg γαλοπούλα και 5 mg κοτόπουλο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η Real Time PCR με χρωστική SYBR Green.

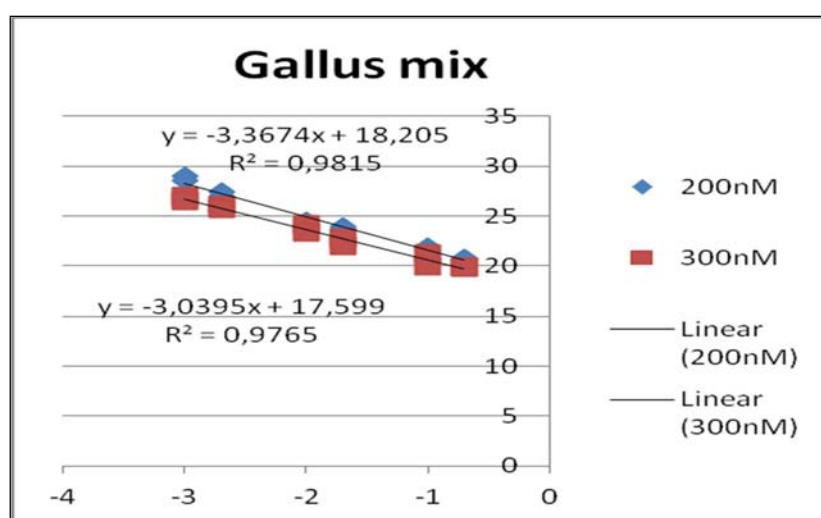
Δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστές αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές με συγκέντρωση 200 nM (Πίνακας 6.4) και στην δεύτερη αντίδραση εκκινητές με συγκέντρωση 300 nM (Πίνακας 6.5) και πήραμε τα αποτελέσματα του Πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) από τις διαδοχικές αραιώσεις μείγματος κρέατος κοτόπουλου σε συγκεντρώσεις 200 nM και 300nM

Dilution	log dilution	Gal 200nM (Ct)	Gal 300nM (Ct)
0,2	-0,698970004	20,76	19,92
0,2	-0,698970004	20,67	19,83
0,1	-1	21,94	21,24
0,1	-1	21,61	19,98
0,02	-1,698970004	23,97	22,85
0,02	-1,698970004	23,72	22,03
0,01	-2	24,53	24,17
0,01	-2	24,09	23,41
0,002	-2,698970004	27,42	26,01

0,002	-2,698970004	26,95	25,72
0,001	-3	28,98	26,95
0,001	-3	28,55	26,54

Από τον Πίνακα 7.3, χρησιμοποιώντας τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και τις αραιώσεις φτιάχνουμε το Διάγραμμα 7.2 για να βρούμε την κλίση της καμπύλης που δημιουργείται και να δούμε αν η καμπύλη μας είναι γραμμική. Ο συντελεστής συσχέτισης (R2) πρέπει να πλησιάζει στη τιμή του 1 για να είναι γραμμική η καμπύλη μας.



Διάγραμμα 7.2. Καμπύλες αναφοράς για συγκέντρωση εκκινητών κοτόπουλου 200 nM και 300 nM

		R2	intercept	slope	efficienc y
Gallus	200nM	0,9815	17,736	-3,3674	0,9814
Gallus	300nM	0,9765	17,434	-3,0395	1,1331

Παρατηρούμε ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση εκκινητών αυξάνει η απόδοση της αντίδρασης **E= 1,1331**. Αυτό σε συνδυασμό με τον πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης **R2 = 0,9765** μας επιτρέπουν να χρησιμοποιήσουμε τους εκκινητές με

συγκέντρωση 300 nM για το τελικό στάδιο του πειράματος μας δηλαδή για την ποσοτικοποίηση του DNA σε δείγματα, χρησιμοποιώντας πλέον την μέθοδο της Real-Time PCR με εσωτερικό ανιχνευτή (probe).

7.6. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA

Γνωρίζοντας από την προηγούμενη πειραματική πορεία ότι η καλύτερη απόδοση της αντίδρασης $E=1,1331$ προέρχεται από εκκινητές με συγκέντρωση 300 nM δημιουργήσαμε την αντίδραση του Πίνακα 6.6 και με την μέθοδο της Real Time PCR ορίζοντας την τιμή Threshold στις 2000 μονάδες και πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle), Φθορισμός, R_o και ποσότητας DNA από τις διαδοχικές αραιώσεις μείγματος κρέατος γαλοπούλας.

Αραιώσεις	Ct	Φθορισμός, R_o	ng DNA
0	No Ct	-	0,00
0	No Ct	-	0,00
0,05	17,69	0,30	1,06
0,05	17,06	0,49	1,06
0,2	15,32	1,83	4,24
0,2	14,57	3,23	4,24
0,5	14,84	2,63	10,60
0,5	14,74	2,84	10,60
0,8	13,71	6,21	16,96
0,8	13,42	7,73	16,96
0,95	13,27	8,66	20,14
0,95	13,75	6,02	20,14

Οι μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες μεθόδους για την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από την Real Time PCR που

προέρχονται από τη βασική φόρμουλα που περιγράφει την ενίσχυση PCR στην εκθετική φάση της αντίδρασης είναι η εξής:

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

όπου το X_n είναι ποσότητα του προϊόντος της PCR σε n κύκλους, X_0 είναι η αρχική ποσότητα του εκμαγείου και E είναι η απόδοση της αντίδρασης η οποία μπορεί να έχει τιμή μεταξύ 0 και 1. Στην Real Time PCR που χρησιμοποιείται φθορισμός γίνεται δεκτό ότι η συσσώρευση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς είναι ανάλογη προς την συσσώρευση του προϊόντος ενίσχυσης της PCR και η εξίσωση ένα μπορεί να γραφεί

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

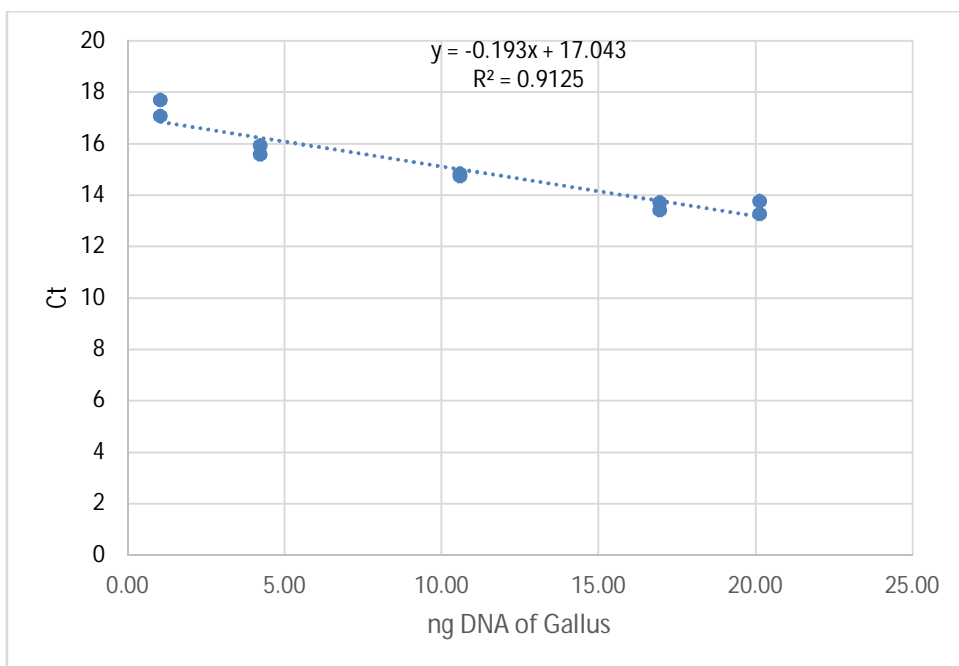
και ο αρχικός φθορισμός υπολογίζεται ως εξής

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

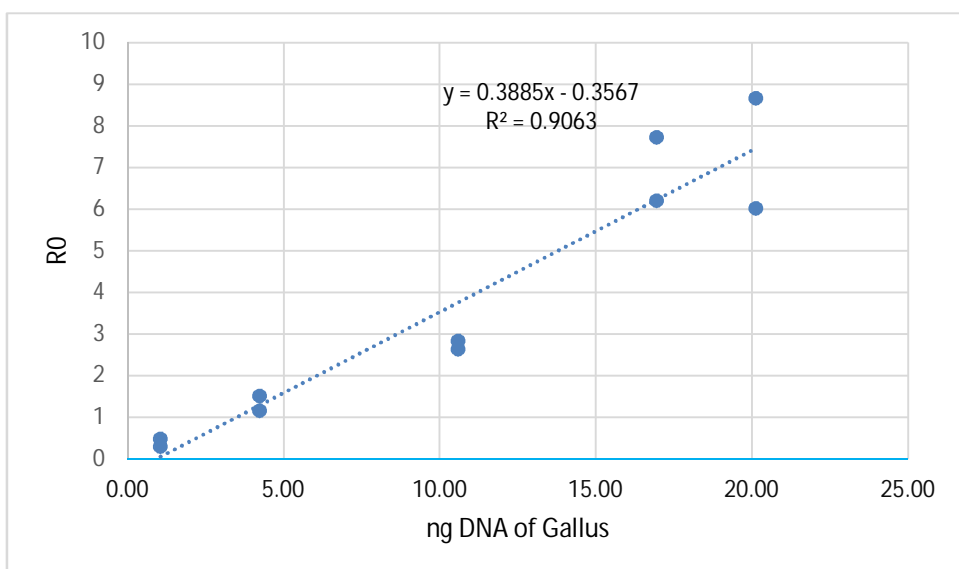
η παράμετρος R_n είναι η ένταση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς σε κύκλο n , και η παράμετρος R_0 είναι το θεωρητικό σημείο έναρξης του φθορισμού το οποίο είναι ανάλογο προς την ποσότητα του αρχικού εκμαγείου. Έτσι, η τιμή R_0 αντιπροσωπεύει την ποσότητα στόχου που εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού.

Η ποσότητα (ng) DNA του Πίνακα 7.4 προέρχονται από το γινόμενο της ποσότητας του DNA που υπάρχει στα δείγματα με τις αραιώσεις που δημιουργήσαμε.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 7.4 δημιουργήσαμε δύο διαγράμματα της ποσότητας DNA στο δείγμα σε σχέση με τις τιμές C_t (Διάγραμμα 7.3) και σε σχέση με τα επίπεδα φθορισμού R_0 (Διάγραμμα 7.4).



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

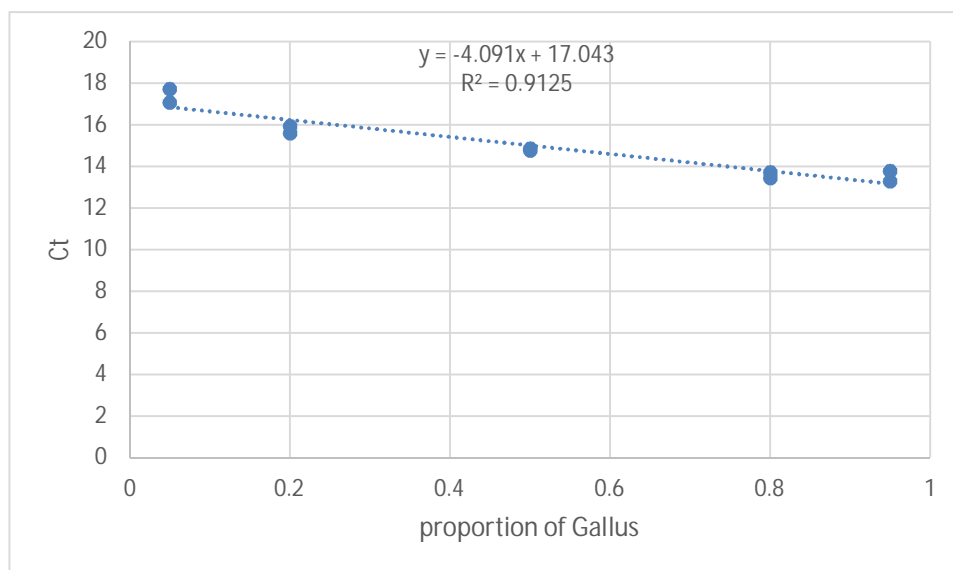


Διάγραμμα 7.4. Καμπύλη αναφοράς της ποσότητας DNA στο δείγμα σε σχέση με το αρχικό επίπεδο φθορισμού.

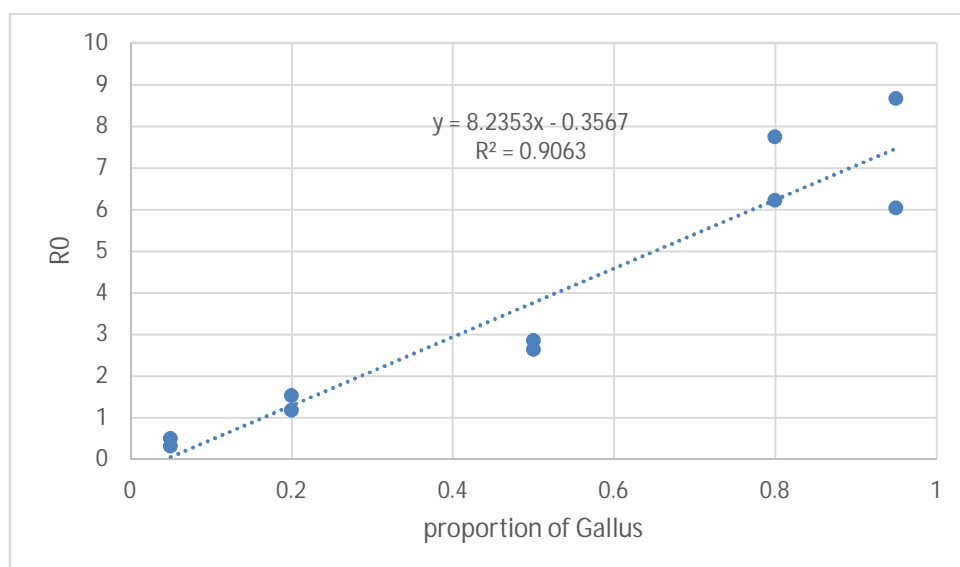
Το Διάγραμμα 8.3 έχει στον άξονα y τους αριθμούς Ct και στον άξονα x την ποσότητα DNA. Το Διάγραμμα 7.4 έχει στον άξονα y το αρχικό επίπεδο φθορισμού και στον άξονα x την ποσότητα DNA. Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 είναι μεγαλύτερος στην πρώτη καμπύλη αναφοράς (Ct, ng DNA). Έτσι λοιπόν συμπεραίνουμε ότι είναι προτιμότερο για ποσοτικούς προσδιορισμούς να

χρησιμοποιηθεί η καμπύλη αναφοράς του Διαγράμματος 7.3 (Threshold cycle) η οποία είναι πιο γραμμική από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού και μας δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Επίσης από τον Πίνακα 7.4 δημιουργήσαμε ακόμα δυο καμπύλες αναφοράς που φαίνονται στα Διαγράμματα 7.5 και 7.6.



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



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

Η πρώτη (Διάγραμμα 7.5) δημιουργήθηκε από τους αριθμούς Ct (Threshold cycle) και από το ποσοστό DNA κοτόπουλου στα δείγματα και η δεύτερη από τα αρχικά επίπεδα φθορισμού και το ποσοστό DNA στα δείγματα. Η καμπύλη αναφοράς των τιμών Ct δίνει μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης $R^2=0.91247$ από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού $R^2=0.90628$. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι είναι προτιμότερο για ποσοτικούς προσδιορισμούς να χρησιμοποιηθεί η καμπύλη αναφοράς του Διαγράμματος 7.5 σε σχέση με τις τιμές Ct (Threshold cycle) η οποία είναι πιο γραμμική από την καμπύλη αναφοράς φθορισμού και μας δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

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

8. ΣΗΖΗΤΗΣΗ

Το κρέας αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στις διατροφικές συνήθειες του σύγχρονου δυτικού κόσμου. Εξαιτίας της υποτιθέμενης βελτίωσης του επιπέδου ζωής, αλλά και της οικονομικής και κοινωνικής ανάπτυξης και στις αναπτυσσόμενες χώρες, η κατανάλωση κρέατος αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά τα επόμενα χρόνια. Επιπλέον, η χρήση σύγχρονων μεθόδων επεξεργασίας και παρασκευής έτοιμων προϊόντων με βάση το κρέας διεύρυνε σημαντικά την κατανάλωση κρέατος. Για αυτό το λόγο η εμπορία κρέατος απέκτησε τεράστια δυναμική.

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. Επιπλέον, λόγω της υιοθέτησης από τους καταναλωτές πιο υγιεινής διατροφής, τελευταία παρατηρείται έντονη στροφή προς

την κατανάλωση κρέατος πουλερικών. Όμως η μεγάλη ζήτηση και κατανάλωση κρέατος και προϊόντων κρέατος, οδήγησε και σε μη σωστές πρακτικές παραγωγής και εμπορίας με σκοπό να αποφέρει επιπλέον κέρδος στις βιομηχανίες κρέατος, σε βάρος όμως του υγιούς εμπορίου αλλά και εξαπατώντας τους καταναλωτές πιθανόν με δυσάρεστα αποτελέσματα για την υγεία τους. Έτσι κρίθηκε απαραίτητη η θέσπιση ενός νομοθετικού πλαισίου έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα των προϊόντων κρέατος σε όλα τα στάδια παραγωγής και εμπορίας του, με σκοπό την προστασία του καταναλωτή αλλά και του υγιούς εμπορίου. Οι πολλές περιπτώσεις νοθείας σε κρέας έκαναν αυτήν την ανάγκη ακόμα πιο επιτακτική. Αρχικά η προσπάθεια εστιάστηκε στη χρήση της επισήμανσης και της ιχνηλασιμότητας του κρέατος με σκοπό να ελεγχθεί η αυθεντικότητά τους χωρίς όμως να μπορέσει να περιορίσει τα φαινόμενα νοθείας. Η επιτηδευμένη ή εσφαλμένη επισήμανση, οι διάφορες διατροφικές κρίσεις (π.χ. γρίπη των χοίρων, αφθώδης πυρετός, κλπ) και η αυξημένη ανησυχία των καταναλωτών οδήγησε στην ανάγκη εξεύρεσης πιο ασφαλών και δραστικών μεθόδων. Έτσι κρίθηκε απαραίτητο, η υιοθέτηση και ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων που έχουν ως στόχο τον έλεγχο νοθείας και ταυτοποίησης προϊόντων κρέατος.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με σκοπό την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση ειδών κρέατος πουλερικών ειδικότερα κρέατος κοτόπουλου, που βρισκόταν σε μίγματα με άλλα πουλερικά (γαλοπούλα) αλλά και σε μείγματα ερυθρών κρεάτων (μοσχάρι, χοιρινό). Στόχος ήταν να επιτευχθεί ο έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με τη χρήση μοριακών δεικτών, και συγκεκριμένα γονιδίων. Η επιλογή του γονιδίου στην ανάλυση PCR εξαρτάται από την μεταβλητότητα της αλληλουχίας των γονιδίων. Η ταυτοποίηση των ειδών με την PCR απαιτεί την χρησιμοποίηση τουλάχιστον ενός σετ εξειδικευμένων εκκινητών που να αναγνωρίζει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία που είναι μοναδική για ένα είδος. Μολονότι οι εκκινητές και οι ανιχνευτές αναμφισβήτητα επηρεάζουν σημαντικά την εξειδίκευση και την ευαισθησία στην Real-Time PCR, για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ειδών, γίνεται πλέον παραδεκτό ότι και η επιλογή μεταξύ mtDNA και nDNA μπορεί να επηρεάσει την εξειδίκευση και την ευαισθησία στην Real-Time (Lopez-Andreo et al., 2005, Martin et al., 2009). Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου ανάλυσης, βασιζόμενο στο mtDNA (μιτοχονδριακό DNA), εξαιτίας των σημαντικών πλεονεκτημάτων που έχει έναντι του

nDNA, όπως αναφέρθηκαν και παραπάνω στο Κεφάλαιο 4

Το πιο κοινό γονίδιο-στόχος που χρησιμοποιείται στην PCR είναι το κυτόχρωμα-b, το οποίο βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε φυλογενετικές μελέτες αλλά και ως γονίδιο αναφοράς. Οι Zhang et al., (2007), ανέπτυξαν μια ποσοτική μέθοδο με την Real Time PCR χρησιμοποιώντας εσωτερικό ανιχνευτή TaqMan με βάση το κυτόχρωμα b για ανίχνευση και ποσοτική ανάλυση του DNA των βοοειδών στα κρέατα, γάλατα και τυριά. Η ενδοειδική μεταβλητότητα της αλληλουχίας του κυτοχρώματος b, έχει αξιοποιηθεί για το σχεδιασμό εξειδικευμένων εκκινητών βοοειδών που είναι άκρως επιλεκτικοί έναντι των προβάτων, χοίρων, αιγών, γαλοπούλας, κοτόπουλου, και βουβαλιών, αλλά οι εξειδικευμένοι εκκινητές DNA προβάτων, μπορούν να εντοπίσουν DNA κατσίκας με χαμηλή αποτελεσματικότητα. Το γονίδιο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση, πέντε ειδών ζώων σε μείγματα κρέατος από χοίρους, βοοειδή, πρόβατα, κοτόπουλο και γαλοπούλα (Dooley et al., 2004). Το όριο ανίχνευσης που αναφέρθηκε από τους Zhang et al., (2004), είναι 35pg για DNA βοοειδών, ενώ μπορεί να φτάσει στο 0.1% σε μείγματα κρεάτων βοοειδών, προβάτων και γαλοπούλας (περίπου 50pg DNA), σύμφωνα με τους Dooley et al. (2004). Ακόμη χαμηλότερο όριο ανίχνευσης 1pg μπορεί να επιτευχθεί στην ανίχνευση κρέατος λαγού χρησιμοποιώντας το γονίδιο κυτόχρωμα b, και κατασκευάζοντας εξειδικευμένους ανιχνευτές και εκκινητές για ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών άγριων ειδών που δεν είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους (Santos et al., 2012).

Ένα άλλο γονίδιο των μιτοχονδρίων που έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ειδών είναι το 12S rRNA, το οποίο κωδικοποιεί την μικρή υπομονάδα του μιτοχονδριακού ριβοσώματος. Αυτό το γονίδιο εμφανίζει σε ικανοποιητικό βαθμό ενδοειδική και διαειδική μεταβλητότητα και αρκετά μεγάλο αριθμό αντιγράφων ανά κύτταρο, αυξάνοντας σημαντικά την ευαισθησία της PCR, ειδικά όταν ένας ιστός υποβάλλεται σε ακραίες συνθήκες επεξεργασίας, όπως η αποστείρωση (Girish et al., 2004). Το γονίδιο έχει χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν εξειδικευμένοι εκκινητές για μερικά είδη ελαφιών, που δείχνουν την παρουσία ενδοειδικής μεταβλητότητας της γονιδιακής αλληλουχίας (Fajardo et al., 2008). Επίσης έχουν σχεδιαστεί ειδικοί εκκινητές για χοίρους με βάση το γονίδιο αυτό δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα με την μέθοδο της PCR για ένα ευρύ φάσμα ειδών, τόσο για ζώα όσο και για φυτά που υπάρχουν σε ζωοτροφές των χοίρων

(Martin et al., 2009). Οι τιμές του ορίου ανίχνευσης του 12S rRNA με βάση τη PCR που αναφέρθηκαν στις τρεις μελέτες, κυμαίνονται από λιγότερο από 5 fg έως 10 pg DNA.

Η περιοχή D-loop του mtDNA επιλέγεται συχνά για την διάκριση μεταξύ ειδών κρέατος λόγω του υψηλού ποσοστού υποκατάστασης και λόγω ότι είναι η πιο ταχέως εξελισσόμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Fajardo et al., 2008). Οι μεταλλάξεις εντός του πληθυσμού αλλά και μεταξύ των ατόμων είναι πολύ συχνές στην περιοχή αυτή (Fajardo et al., 2008). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί η περιοχή D-loop του mtDNA, για τον διαχωρισμό ειδών ζώων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του βοείου κρέατος σε μείγματα χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές και ανιχνευτές στοχεύοντας την περιοχή D-loop έχει αναφερθεί από τον Sawyer et al., (2003). Οι εκκινητές είναι σε θέση να ανιχνεύουν ειδικά το DNA των βοοειδών σε προσμίξεις βοείου κρέατος με αρνί σε ποσοστό 0.1%.

Τα γονίδια των υπομονάδων της αφυδρογονάσης NADH είναι επίσης χρήσιμα για την ταυτοποίηση ενός συγκεκριμένου είδους χρησιμοποιώντας Real Time PCR. Το γονίδιο της υπομονάδας 5 (ND5) της NADH αφυδρογονάσης, έχει χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό ειδικών εκκινητών για χοίρους για πολύ εξειδικευμένο σύστημα PCR (Farihah Liyana et al., 2009, Kesmen et al., 2009). Η υπομονάδα 2 (ND2) της NADH αφυδρογονάσης, με ειδικό εκκινητή για γαϊδούρι εμφανίζει επαρκή ενδοειδική μεταβλητότητα για την διάκριση κρέατος από γαϊδάρο από κρέας αλόγου (Kesmen et al., 2009) καθώς η διαφοροποίηση μεταξύ αλόγου και γαϊδάρου είναι αρκετά δύσκολη. Από την άλλη πλευρά ειδικοί εκκινητές αλόγου που προέρχονται από την γονιδιακή αλληλουχία ATPase6/ATPase8 είναι επίσης σε θέση να διαχωρίσουν αλόγο από γαϊδάρο, όμως, σε υψηλή τιμή Ct άνω των 30 κύκλων μπορεί να ανιχνευθεί DNA χοίρου οδηγώντας σε ασαφή αποτελέσματα (Kesmen et al., 2009). Το όριο ανιχνεύσεως του συστήματος PCR που αναπτύχθηκε με βάση ND2, ND5 και των γονιδίων ATPase6/ATPase8 είναι πολύ χαμηλό 0,1 pg DNA σε διάλυμα νερού το οποίο δίνει ένα εξαιρετικά ευαίσθητο σύστημα ανίχνευσης ειδών

Τα 16S rRNA γονίδια, χρησιμοποιούνται συνήθως ως καθολικοί εκκινητές καθώς οι αλληλουχίες τους είναι καλά προστατευμένες (Dalmasso et al., 2004) και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του κυττάρου, έχοντας ως αποτέλεσμα, τον μικρότερο αριθμό μετάλλαξης των γονιδίων. Η

προστατευμένη περιοχή στην 16S rRNA αλληλουχία είναι πιθανόν να διατηρείται σε στενά συγγενικά είδη, έτσι ώστε οι γονιδιακές αλληλουχίες σε είδη που έχουν μακρινή συγγένεια (αγελάδα και κοτόπουλο) να μπορούν να συνδυαστούν σε σειρά για να δημιουργήσουν το καθολικό εκκινητή που θα ενισχύσει τόσο είδη θηλαστικών όσο και πτηνών (Sawyer et al., 2003). Καθολικός εκκινητής με βάση το 16S rRNA, για θηλαστικά και πουλερικά χρησιμοποιήθηκε επίσης από τους Kesmen et al., (2009) για τον έλεγχο της ενισχύσεως. Ειδικοί εκκινητές αναπτύχθηκαν για μηρυκαστικά για το γονίδιο 16S rRNA για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε ένα πολύ περίπλοκο μείγμα DNA από κρέας και οστεάλευρα (MBM) μηρυκαστικών, που συμπεριελάμβανε πρόβατο, βοοειδή και αίγες (Chiappini et al., 2005). Έχει επιλεγεί ως αλληλουχία στόχος επειδή το ενδοειδικό επίπεδο μεταβλητότητας είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με την μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών (Chiappini et al., 2005).

Τα όρια ανίχνευσης που έχουν επιτευχθεί με την χρήση mtDNA στις αναλύσεις PCR, είναι γενικά πολύ χαμηλά, χαμηλότερα και από 5fg DNA όταν στόχος-γονίδιο ήταν το 12S rRNA (Rojas et al., 2010) και 40 fg DNA σε περιπτώσεις με το κυτόχρωμα b (Lopez-Andreo et al., 2006). Επιπρόσθετα, με εξειδικευμένους εκκινητές που σχεδιάστηκαν από άλλα κωδικοποιούμενα μιτοχονδριακά γονίδια ανιχνεύθηκαν έως και 0.1pg DNA (Kesmen et al., 2009).

Στο παρελθόν έχει μελετηθεί η ποσοτικοποίηση DNA με την μέθοδο της Real Time PCR σε μείγματα διαφόρων ειδών κρέατος από πολλούς ερευνητές. Όμως στις περισσότερες από αυτές δεν χρησιμοποιήθηκε ως γενετικός δείκτης το γονίδιο 12S rRNA. Το κωδικοποιημένο γονίδιο 12S rRNA του mtDNA, επιλέχτηκε ως γονίδιο-στόχος, εξαιτίας της υψηλής μεταβλητότητας μεταξύ των ειδών αλλά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εξαιτίας και των χαμηλών ορίων ανίχνευσης DNA που έχουν επιτευχθεί.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου ανάλυσης, βασισμένο στο μιτοχονδριακό γονίδιο 12S rRNA.

Με τη μέθοδο της απομόνωσης λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA από μικρή ποσότητα ιστού κρέατος. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών δίνοντας έτσι την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε

για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου γενικούς εκκινητές (universal primers). Η χρήση των universal primers απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR και της Real Time PCR.

Αρχικά με την μέθοδο της PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 12S RNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα και κάναμε έλεγχο εάν οι εκκινητές γαλοπούλας πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες άλλων ειδών.

Έπειτα χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της Real Time PCR για την ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών DNA στο δείγμα. Στην ποσοτική Real Time PCR υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να εφαρμοστούν για την σήμανση των προϊόντων της Real Time PCR. Η μια μέθοδος βασίζεται στην χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA, SYBR Green, και η άλλη στη χρήση εσωτερικών ολιγονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών (probes).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο Real Time PCR με χρήση χρωστικής SYBR Green, ώστε αφενός να γίνει έλεγχος της καταλληλότερης συγκέντρωσης των εκκινητών και αφετέρου για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς η οποία θα μας έδινε καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, E) και μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης. Καταλήξαμε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση εκκινητών, η οποία μας έδινε και την καλύτερη απόδοση ($E=1,1331$), ήταν 300nM. Επίσης με την μέθοδο αυτή έγινε έλεγχος για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ DNA κοτόπουλου, γαλοπούλας, χοιρινού, μοσχარიού, όπου διαπιστώσαμε ότι οι εκκινητές κοτόπουλου δεν ανιχνεύουν σε καμιά περίπτωση DNA από τα άλλα τρία είδη κρέατος.

Χρησιμοποιώντας την απόδοση της αντίδρασης που πήραμε από την καμπύλη αναφοράς με SYBR Green προχωρήσαμε στην δημιουργία καμπύλων αναφοράς για την ποσοτικοποίηση του DNA των δειγμάτων μας. Με την μέθοδο της Real Time PCR και την χρήση εσωτερικών ανιχνευτών Taqman (probes), δημιουργήσαμε μία αντίδραση η οποία μας έδωσε τιμές Ct (Threshold Cycle). Χρησιμοποιώντας τις τιμές Ct, την τιμή της απόδοσης της αντίδρασης που αναφέραμε παραπάνω, το ποσοστό DNA σε γνωστά δείγματα, τα ng DNA σε γνωστά δείγματα και τον φθορισμό που παράγουν τα αρχικά επίπεδα DNA στο δείγμα δημιουργήσαμε τέσσερις διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Η πρώτη δημιουργήθηκε από τις τιμές Ct και τα ng DNA στο

δείγμα, η δεύτερη από τα αρχικά επίπεδα φθορισμού και τα ng DNA στο δείγμα, η τρίτη από τις τιμές Ct και από το ποσοστό DNA στο δείγμα και η τέταρτη καμπύλη αναφοράς από τα αρχικά επίπεδα φθορισμού και το ποσοστό στο δείγμα. Για πιο αξιόπιστες ποσοτικές εκτιμήσεις θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε την καμπύλη που εκφράζει τις τιμές Ct, ως προς τη ποσότητα DNA στο δείγμα.

Με τις μεθόδους που αναφέραμε φαίνεται πως είναι εφικτή η δημιουργία καμπύλων αναφοράς για την ποσοτικοποίηση DNA σε δείγματα. Από τις τέσσερις καμπύλες αναφοράς που δημιουργήσαμε φαίνεται καθαρά ότι η καμπύλες που προκύπτουν σε σχέση με τις τιμές Ct είχαν καλύτερο συντελεστή συσχέτισης με αποτέλεσμα να έχουμε πιο ακριβή αποτελέσματα, με κατώτερο όριο ανίχνευσης περίπου 1,06ng DNA κοτόπουλου στο δείγμα, όριο αρκετά ικανοποιητικό αν και όχι τόσο χαμηλό που αναφέρθηκε παραπάνω (5fg DNA, Rojas et al., 2010). Μπορούμε λοιπόν να ανιχνεύσουμε σε άγνωστα δείγματα μίγματα κρεάτων με κοτόπουλο, με σύγκριση των τιμών Ct (Threshold Cycle) των υπό μελέτη δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση τους. Τέλος για πιο κατανοητά αποτελέσματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί η καμπύλη που συσχετίζει ποσοστό DNA στο δείγμα με τις τιμές Ct, με όριο ανίχνευσης σε ποσοστό ως 5%.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

Andréasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *BioTechniques*, 33, 402–411.

Applied Biosystems (2003). “Real-Time PCR vs Traditional PCR”. Applied Biosystems. pp 1-15.

Ayuso, R., Lehrer, S. B., Tanaka, L., Ibanez, M. D., Pascual, C., Burks, A. W., et al. (1999). Ig-E antibody response to vertebrate meat proteins including tropomyosin. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 83, 399–405.

Birky, C. W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* 35: 125-148.

Bogenhagen, D. F. (2009). Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal Cells. In J. A. Stuart (Ed.), *Mitochondrial DNA: Methods and protocols* (pp. 3–14). (2nd ed.). New York: Humana Press.

Bohler, E., Schafer, T., Ruhdorfer, S., Weigl, L., Wessner, D., Heinrich, J., et al. (2001). Epidemiology of food allergy in adults. *Allergo Journal*, 10, 318–319.

Broadmann, P. D., & Moor, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase chain reactin system for the detection of beef (*Bos Taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Science*, 65(1), 599-607.

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

Cesare C., Marco Di Domenico, Federica M. (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 23, 400-404.

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

Chisholm, J., Sanchez, A., Brown, J., & Hird, H. (2008). The development of spiecies- specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food. *Food Analytical Methods*, 1(3), 190-194.

Clayton, D.A. (1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann Rev Biochem*, 53, 573-94.

Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., 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.

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

Ergun S., Abasiyanik M. F. (2012). The development of duplex real-time PCR based on SYBR Green florescence for rapid identification of ruminant and poultry origins in foodstuff. *Food Chemistry*, 130,1050-1054.

Everstine K., Spink J., Kennedy S. (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection* 76:723-35. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-399.

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

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

Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meat from game animal species. *Trend in Food Science & Technology*, 21, 408-421.

Fariyah Liyana, K., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Sazili, A. Q., Aida, A. A., & Raha, A. R. (2009). Porcine specific real-time polymerase chain reaction (PCR) for Halal verification. Proceeding paper presented at the 3rd IMT-GT International Symposium on Halal Science and Management, 21–22 December 2009, pp. 24–28, KLIA Sepang, Selangor, Malaysia

Fraga D., Meulia T. and Fenster S., (2008). “Real Time PCR”. John Wiley & Sons, Inc. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Unit 10.3., 1-34.

Gefrides, L., Welch, K. (2011). Forensic biology: Serology and DNA. In A. Mozayani, & C. Noziglia (Eds.), *The forensic laboratory handbook procedures and practice* (pp. 16–49). (2nd ed.). London: Humana Press.

Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 65, 757-763.

Gloffke W., 2003. “Quantitative PCR Update”. *The Scientist*. Vol 17, No 8, 41

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352(6332):255-7

Hagelberg, E., Goldman, N., Lio, P., Whelan, Schiefenhovel, W., Clegg, J.B., Bowden, D.k (1999). Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Malanesia. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*, 266(1418): 485-492

Houghton S., Cockerill F., (2006). “RealTime PCR: Overview and applications”. *Surgery*, Vol 139, No 1, 1-5.

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

Kortbaoui, R., Locas, A., Imbeau, M., Payment, P., Villemur, R. (2009). Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal- contaminated surface water. *Water Research*, 43, 2001–2010.

Kvist, L. (2000). *Phylogeny and phylogeography of European Parids* (pp. 51). Oulu, Finland: University of Oulu.

LAWRENCE KAZAK, AURELIO REYES & IAN J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact .*NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY* 13, 659-671

Lagoudakis, E. D., Zouros, E. (2001). Direct evidence for homologous recombination in the Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1168-1175.

Lenstra, J. A. (2010). Detection of adulterations: Identification of animal species. In L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), *Safety Analysis of Foods of Animal Origin* (pp. 601– 617). Boca Raton, FL: CRC Press

López-Andreo M., Aldeguer M., Guillén I., Gabaldón J., Puyet A. (2012). Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA. *Food Chemistry*, 134, 518–523.

López-Andreo M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3978–7973.

López-Andreo M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I., & Puyet, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339, 73–82.

Magoulas, A. (2005). Mitochondrial DNA. In S. X. Cadrin, K. D. Friedland, & J. R. Waldman (Eds.), *Stock identification methods: Applications in fishery science* (pp. 311–330). Burlington, MA: Elsevier Academic Press.

Mamikoglu, B. (2005). Beef, Pork, and Milk Allergy (Cross reactivity with each other and pet allergies). *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 133, 534–537.

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

Mohd Hazim, M. Y., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Abdul, O., & Nur Fadhilah, K. M. (2012). Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial Cytochrome B gene by molecular beacon probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Analytical Methods*, 5, 422–429.

Moran, C. (2011). Molecular genetics. In M. F. Rothschild, & A. Ruvinsky (Eds.), *The genetics of the pig* (pp. 73–100). Cambridge, MA: CAB International.

Mullis, K., Fallona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350.

Nurhidayatul Asma Mohamad, Aly Farag El Sheikha, Shuhaimi Mustafa, Nur Fadhilah Khairil Mokhtar (2013). Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*, 50, 330– 338,

Rodriguez, M., Garcia, T., Gonzalez, I., Hernandez P, Martin, R. (2005). TaqMan

real- time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113–120

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

Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., et al. (2011). Development of a real-time PCR assay to control the illegal trade of meat from protected capercaillie species. *Forensic Science International*, 210, 133-138

Rural Development Group Sierra de Avarena y Picos de Aoche S.A., *The Iberian Pig Rearing, Products and Gastronomy*, Acarena 2002

Saccone, C., Pesole, G., Sbisa, E. (1991). The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-Function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33:83-91.

Santos, C. G., Melo, V. S., Amaral, J. S., Estevinho, L., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2012). Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. *Meat Science*, 90, 836–841.

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579–583.

Seuss, J (1990) The nutritional value of meat and meat products. A critical look at their constituents as compared with other foods. *Fleischwirtschaft* 70(12), 1444-1447.

Shackeell, G.H. (2008). Traceability in the meat industry – the farm to plate continuum. *International journal of Food Science and Technology*, 43(12), 2134-2142.

S. Soares, J. S. Amaral , M. Beatriz P.P. Oliveira, I. Marfa (2013). A SYBR Green real- time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, 94, 115-120

Stratagene, 2007. “Mx Pro QPCR Software”. Stratagene, La Jolla, CA. pp. 4-5, 231-236, 241-243.

Stratagene, 2006. “Introduction to Quantitative PCR”. Stratagene, La Jolla, CA. pp. 3-8, 9-11, 23-26.

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

Thyagarajan, B., Padua, R. A., Campbell, C. (1996). Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *Journal of Biological Chemistry* 271: 27536-27543.

Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. (1995). *Meat and meat products*. Chapman & Hall, London, pp 10-24.

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

Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, A.O., Pogson, G.H. (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*, 389(6394):412-4

Ελληνική Βιβλιογραφία

Διαμαντίδης Χρ. Γρηγόρης (1994). *Εισαγωγή στη Βιοχημεία*. Εκδόσεις University Studio Press. Θεσσαλονίκη.

Κανονισμός (ΕΚ) 178/2002 «για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφάλειας των τροφίμων». Επίσημη Εφημ. Ευρωπ. Κοινот. αριθ. L 31, 01/02/2002 σ. 1-24.

Κουτσουνιάνης, Κ. (2008). *Σημειώσεις : Ποιοτικός Έλεγχος και Διασφάλιση της Ποιότητας των Τροφίμων*. Εκδόσεις : ΑΠΘ

Μπλούκας Ι. (2007), *Τεχνολογία Κρέατος*, εκδ. οργ. Σταμούλη, Αθήνα.

Συστήματα διαχείρισης της ποιότητας - Θεμελιώδεις αρχές και λεξιλόγιο (2000).

Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 9000