

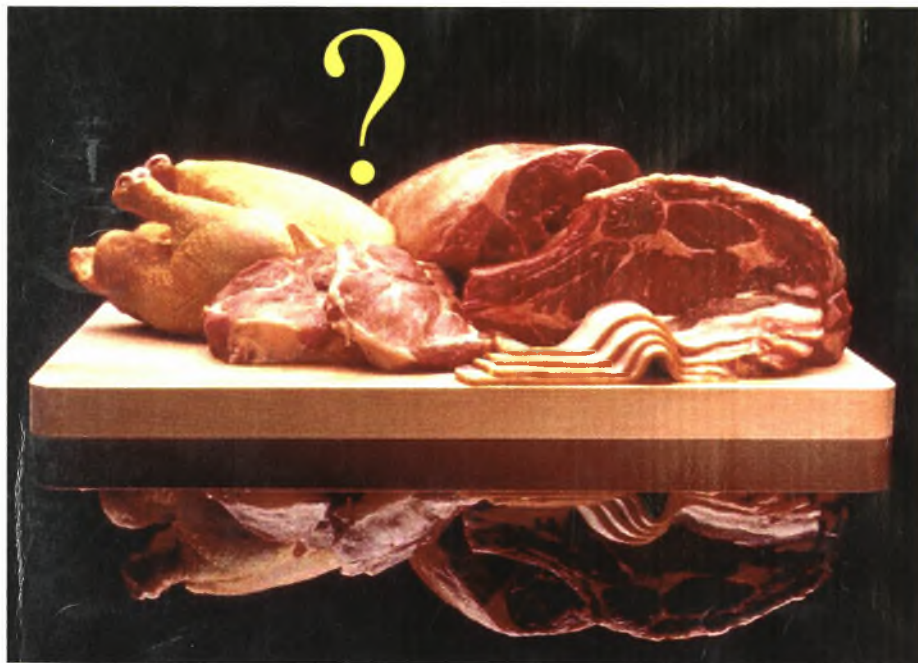


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παναγιώτης Σταμούλης

**Ανάπτυξη και Εφαρμογή Μοριακών Δεικτών
για την Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος
στην Αλυσίδα Εμπορίας τους**



**ΛΑΡΙΣΑ
2009**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6996/1

Ημερ. Εισ.: 11-05-2009

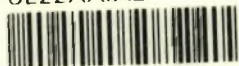
Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιδετικός Κωδικός: Δ

664.9

ΣΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087300

Ανάπτυξη και Εφαρμογή Μοριακών Δεικτών για την Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος στην Αλυσίδα Εμπορίας τους

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ζήσης Μαμούρης (Επιβλέπων): Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αικατερίνη Μούτου: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αιμιλία Ζίφα: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας).
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα έρευνα διεξήχθη στα πλαίσια της διπλωματικής διατριβής, των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πιο συγκεκριμένα στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το παρόν, ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα. Επίσης, τον υποψήφιο Διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη για την συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του πειράματος. Την Λέκτορα Θεολογία Σαραφίδου, τους υποψήφιους Διδάκτορες Κωνσταντίνο Βουδούρη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη, για την ουσιαστική τους βοήθεια. Ευχαριστώ επίσης την Επ. Καθηγήτρια Αικατερίνη Μούτου που με τιμά συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους με τους οποίους παρευρεθήκαμε, την ίδια χρονική περίοδο στο εργαστήριο, για την προθυμία τους και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία μοριακή τεχνική, στόχος της οποίας είναι ο εύκολος, γρήγορος και αποτελεσματικός προσδιορισμός της προέλευσης, σε επίπεδο είδους, του κρέατος που περιέχεται σε τρόφιμα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχondριακό DNA που απομονώθηκε από μυϊκό ιστό νωπού ή επεξεργασμένου κρέατος πουλερικών (όρνιθα, γαλοπούλα, πάπια, χήνα, φασιανός, πέρδικα, μπεκάτσα, στρουθοκάμηλος, ορτύκι και τσίχλα).

Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-RFLP. Αρχικά ενισχύθηκε με την μέθοδο PCR τμήμα των γονιδίων Cyt b μεγέθους 376bp και 12S rRNA μεγέθους 485bp. Οι ολιγονουκλεϊνικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινοί για τα παραγωγικά ζώα (universal primers). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέψεις με δεκατέσσερα διαφορετικά ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των τμημάτων περιορισμού σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι το γονίδιο 12S rRNA είναι περισσότερο πολυμορφικό έναντι του γονιδίου Cyt b όσον αφορά τα εξεταζόμενα είδη. Έτσι θεωρήθηκε καταλληλότερος μοριακός δείκτης για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού πουλερικών. Η πέψη του 12S rRNA με το ένζυμο περιορισμού AclI διαχώρισε επιτυχώς και τα δέκα πτηνά, παρουσιάζοντας ειδικά πρότυπα για το κάθε είδος ικανά να δώσουν μία μονοσήμαντη απάντηση για την προέλευση των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί. Η μέτρια επεξεργασία του κρέατος δεν εμπόδισε την ταυτοποίηση του, αφού παρουσίασε όμοια πρότυπα με το νωπό. Τέλος η μέθοδος αυτή κρίθηκε ικανή προς ανίχνευση μιγμάτων κρέατος, πράγμα που θα μπορούσε να την καταστήσει πολύτιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας στις βιομηχανίες κρέατος και τις επιχειρήσεις εστίασης.

ABSTRACT

In this study, we have developed an easy, quick and efficient molecular technique to identify the species origin of the meat contained in foods. The analysis was carried out in mitochondrial DNA isolated from muscle tissue of fresh or processed poultry meat (chicken, turkey, duck, goose, pheasant, partridge, woodcock, ostrich, quail and song thrush).

PCR-RFLP was the used technique. Firstly, using universal primers, amplified by the PCR method a 376bp region of Cyt b gene and a 485bp region of 12S rRNA gene. Then, digested by fourteen different restriction enzymes and the separation of the restriction fragments achieved through polyacrylamide gel electrophoresis. We conclude that the 12S rRNA gene is more polymorphic than Cyt b gene regarding this species. This was considered most appropriate molecular marker for use in studies of poultry segregation. Digestion of 12S rRNA with the enzyme *Acil* separate successfully the whole ten birds, giving specific patterns for each specie, that can give an unequivocal answer about the origin of the analyzed samples. Moderate meat treatment did not prevent the identification presented similar patterns as in the raw meat.

Finally this method was considered sufficient to detect mixtures of meat, which could make it a valuable tool for checking the adulteration in meat and restaurant industry.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
ΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ.....	7
Είδη Πουλερικών.....	7
Μεταποιημένα Προϊόντα Κρέατος.....	11
Η Αναγκαιότητα της Ταυτοποίησης του Κρέατος.....	11
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	13
RFLP.....	17
Southern Blotting RFLP.....	20
PCR-RFLP.....	20
Το Μιτοχονδριακό DNA.....	21
Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος-Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....	24
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	27
Εξοπλισμός για την Απομόνωση του DNA από Ιστό Κρέατος.....	27
Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση DNA σε Πηκτή Αγαρόζης.....	28
Εξοπλισμός για τον Ποσοτικό Προσδιορισμό του Εξαγόμενου DNA.....	28
Εξοπλισμός για τον Πολλαπλασιασμό των Γονιδίων (PCR).....	29
Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου RFLP.....	30
Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης.....	30
Εξοπλισμός για την Χρώση της Πηκτή Πολυακρυλαμίδης.....	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
Δείγματα.....	32
Ανάπτυξη Μεθόδου.....	32
Απομόνωση Μιτοχονδριακού DNA από Ιστό Πουλερικών.....	35
Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός Εξαγόμενου DNA.....	36
Ενίσχυση Επιθυμητών Τμημάτων mtDNA με την Μέθοδο PCR.....	38
Θεωρητικός Υπολογισμός RFLP.....	42
Ανάλυση RFLP.....	43
Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης.....	44
Χρώση των Πηκτών Πολυακρυλαμίδης με Νιτρικός Άργυρο.....	46
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
Ευρετήριο Πινάκων-Διαγραμμάτων-Εικόνων.....	62

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ^[37]

Γενικά ο όρος «Πουλερικά», αναφέρεται στην κατηγορία των οικόσιτων πτηνών που εκτρέφονται για το κρέας, τα αυγά ή τα φτερά τους. Πρόκειται κυρίως για μέλη των οικογενειών των Ορνιθόμορφων (όρνιθα, γαλοπούλα) και των Χηνόμορφων (υδρόβια πτηνά όπως πάπιες και χήνες). Επίσης, πολλές φορές αναφέρεται και σε θηράματα όπως είναι ο φασιανός και το ορτύκι.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση της κατανάλωσης κρέατος πουλερικών. Είναι χαρακτηριστικό ότι την πενταετία 1998-2003, η παγκόσμια κατανάλωση πουλερικών παρουσίασε αύξηση της τάξης του 5% ετησίως. Ο κλάδος των πουλερικών οδηγήθηκε σε αυτή την ανάπτυξη λόγω ορισμένων παραγόντων όπως:

- Η δημογραφική αύξηση και η αύξηση του βιοτικού επιπέδου, η οποία οδήγησε στην γενική αύξηση της κατανάλωσης κρέατος.
- Η ανταγωνιστικότερη τιμή κρεάτων πουλερικών σε σύγκριση με το χοιρινό ή βόειο κρέας, που οφείλεται στην μαζικότερη παραγωγή των πρώτων.
- Η ευρύτερη αποδοχή από τους καταναλωτές, του λευκού κρέατος ως υγιεινότερο, αφού περιέχει μικρότερες ποσότητες λιπών και χοληστερόλης έναντι των υπολοίπων (κόκκινου κρέατος). Ειδικά στην περίπτωση των θηραμάτων αποδίδεται και το χαρακτηριστικό της μη χρήσης αντιβιοτικών ή στεροειδών ορμονών που πιθανώς να έχουν χρησιμοποιηθεί στις διαδικασίες εκτροφής.
- Η διάθεση στην αγορά πληθώρας τυποποιημένων προϊόντων που περιέχουν κρέας πουλερικών προς κάλυψη των σύγχρονων καταναλωτικών αναγκών και της βιομηχανίας εστίασης.

Είδη Πουλερικών^[3]

Στα είδη που παρουσιάζονται σε αυτή την ενότητα αποδίδεται εμπορική αξία και είναι αυτά με τα οποία ασχοληθήκαμε στην συγκεκριμένη εργασία.

Η Όρνιθα (*Gallus gallus domesticus*)

Πρόκειται για το πτηνό με τον μεγαλύτερο πληθυσμό παγκοσμίως και μακράν την μεγαλύτερη κατανάλωση έναντι των υπολοίπων. Ανήκει στην τάξη των Ορνιθόμορφων (*Galliformes*) και στην οικογένεια των Φασιανίδων (*Phasianidae*). Εκτρέφεται κυρίως για το κρέας και τα αυγά του. Σήμερα η εκτροφή της κότας αποτελεί μια από τις βασικές οικονομικές δραστηριότητες, που έχει πια ξεπεράσει τα αγροτικά πλαίσια κι έχει πάρει καθαρά βιομηχανικό χαρακτήρα (ορνιθοτροφία).



Εικόνα 1: Η όρνιθα

Η Γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo*)

Ανήκει στην τάξη των Ορνιθόμορφων και στην οικογένεια των Μελεαγρίδων (*Meleagrididae*). Εκτρέφεται κυρίως για την μεγάλη ποσότητα λευκού κρέατος που μπορεί να δώσει από την περιοχή του στήθους (φιλέτο). Εθιμοτυπικά αποτελεί το πουλερικό που καταναλώνεται τα Χριστούγεννα.



Εικόνα 2: Η γαλοπούλα

Η στρουθοκάμηλος (*Struthio camelus*)

Πρόκειται για το μεγαλύτερο πτηνό που ζει σήμερα στον πλανήτη μας. Ανήκει στην οικογένεια Στρουθιονίδες (*Struthionidae*) και στην τάξη Στρουθιόμορφα (*Struthioniformes*). Ζει σε αγέλες και τρέφεται με σπόρους, φρούτα και έντομα. Εξαιτίας του κυνηγιού για το φτέρωμά της, παρατηρείται μείωση του πληθυσμού της τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στην Αφρική και στην Αραβική Χερσόνησο. Τα φτερά του πουλιού χρησιμοποιούνται για διακοσμητικούς σκοπούς, ενώ το κρέας και τα αυγά της τρώγονται. Σε πολλές περιοχές του κόσμου, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα υπάρχουν εκτροφεία στρουθοκαμήλων.



Εικόνα 3: Η στρουθοκάμηλος

Η Πάπια (*Anas sp.*)

Η πάπια ή αλλιώς νήσσα είναι η ονομασία που έχουν πτηνά της οικογένειας Ανατίδες (*Anatidae*), που ανήκουν στην τάξη των Χηνόμορφων (*Anseriformes*). Αποτελούν υδρόβια κυρίως πτηνά, μικρότερα ως επί το πλείστον σε σύγκριση με τα συγγενικά τους πουλιά, τους κύκνους και τις χήνες. Υπάρχουν περίπου 75 είδη πάπιας, τα οποία ζουν σε όλες τις περιοχές του πλανήτη. Η ήμερη πάπια



Εικόνα 4: Πάπιες διαφορετικού είδους

κατάγεται από την αγριόπαπια, η οποία είναι υδρόβιο και αποδημητικό πουλί. Η οικόσιτη πάπια διατήρησε τις συνήθειες και τα χαρακτηριστικά της αγριόπαπιας. Έτσι, μένει στα λιμναία ύδατα και σε ρυάκια για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

Θηρεύεται για το κρέας της. Επίσης, εκτρέφεται για τα αυγά και το φτέρωμά της. Όλες οι κατοικίδιες πάπιες προέρχονται από την αγριόπαπια (*Anas platyrhynchos*).

Η Χήνα (*Anser anser*)

Η χήνα αποτελεί γένος πτηνών που περιλαμβάνει περί τα 15 είδη, τα οποία ζουν σε ψυχρές περιοχές. Ανήκει στην ίδια τάξη και οικογένεια με τις πάπιες. Έχει σταχτί και άσπρο χρώμα, με μακρύ λαιμό. Ζει πάντα κοντά σε λίμνες, έλη και ποτάμια. Έχει εξημερωθεί εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Η κατοικίδια χήνα εκτρέφεται για τα αυγά της, το φτέρωμα και κυρίως το κρέας της.



Εικόνα 5: Η χήνα

Το Ορτύκι (*Coturnix coturnix*)

Ανήκει στην τάξη των Ορνιθόμορφων και στην οικογένεια των Φασιανίδων. Είναι μικρό πτηνό (μήκος 17cm) που διαβιεί σε μέρη με χαμηλή βλάστηση. Πρόκειται για ένα από τα πιο κοινά θηράματα, η εκτροφή του οποίου έχει αναπτυχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης που παρουσιάζεται για το κρέας του.



Εικόνα 6: Το ορτύκι

Η Πέρδικα (*Alectoris sp.*)

Η πέρδικα ανήκει στην τάξη των Ορνιθόμορφων, την οικογένεια των Φασιανίδων και στην υποοικογένεια των περδίκινων (*Perdicinae*) στην οπαία ανήκουν 132 είδη περίπου.

Ένα από τα είδη που διαβιούν στον Ελλαδικό χώρο είναι η Πετροπέρδικα ή Ορεινή ή σωστότερα *Alectoris graeca*. Αποτελεί εκλεκτό θήραμα το οποίο πλέον το συναντάμε και σε εκτροφές.



Εικόνα 7: Η πέρδικα

Ο Φασιανός (*Phasianus colchicus*)

Το πτηνό ήταν γνωστό από αρχαιοτάτων χρόνων, καθώς θεωρούνταν εκλεκτό κυνήγι. Ανήκει στην τάξη των Ορνιθόμορφων και στην οικογένεια των Φασιανίδων. Το μήκος του φθάνει τα 80 εκατοστά περίπου και έχει χαλκόχρωμο φτέρωμα, με μαύρες ραβδώσεις. Ο αρσενικός είναι μεγαλύτερος και έχει εντυπωσιακότερα χρώματα από τον θηλυκό. Η ουρά του είναι πολύ μακριά και φθάνει περίπου τα 40 εκατοστά.



Εικόνα 8: Ο φασιανός

Η Μπεκάτσα (*Scolopax rusticola*)

Οι μπεκάτσες ανήκουν στην τάξη *Charadriiformes* της οικογένειας *Scolopacidae*. Οι Σκολόπακες είναι μία πολυπληθής και πολύμορφη οικογένεια παρυδάτιων πουλιών, τα οποία παραμένουν συνήθως στις ακτές και τα έλη, αν και συχνά μερικά είδη όπως η μπεκάτσα αναζητούν δάση ή και ανοιχτά μέρη. Το χαρακτηριστικό της οικογένειας είναι το μακρύ και λεπτό ράμφος, καθώς επίσης και τα μακριά πόδια και η έλλειψη διμορφισμού μεταξύ αρσενικού-θηλυκού. Αποτελεί εκλεκτό θήραμα αλλά το κυνήγι του είναι αρκετά δύσκολο.



Εικόνα 9: Η μπεκάτσα

Η Τσίγλα (*Turdus philomelos*)

Ανήκει στην τάξη *Passeriformes* της οικογένειας *Turdidae* (Κιχλίδες). Το βάρος της φτάνει τα 80g και το μήκος της 23-24cm. Το στήθος είναι λευκό με μαύρες βούλες. Ζει σε μικτά δάση, πουρνάρια, πυκνά, αλσύλλια, πάρκα και κήπους. Αποτελεί γνωστό θήραμα στον ελλαδικό χώρο.



Εικόνα 10: Η τσίγλα

Μεταποιημένα Προϊόντα Κρέατος ^[24]

Η αλυσίδα εμπορίας του κρέατος περιλαμβάνει όλα τα στάδια από τα οποία θα περάσει το προϊόν για να φτάσει από το εκτροφείο έως το πιάτο του καταναλωτή. Τα βασικότερα στάδια είναι το εκτροφείο (αναπαραγωγή, εκτροφή), το σφαγείο, η βιομηχανία τροφίμων (τεμαχισμός, επεξεργασία, συσκευασία) και η διάθεση στην αγορά.

Μεταποιημένα προϊόντα κρέατος θεωρούνται εκείνα στα οποία οι ιδιότητες του ωπού κρέατος έχουν μεταβληθεί με τη χρήση μίας ή περισσοτέρων μεθόδων επεξεργασίας (άλεσμα, τεμαχισμός, προσθήκη καρυκευμάτων, θερμική επεξεργασία κλπ.).

Αν και κάθε κρεατοσκεύασμα έχει τη δική του σύνθεση και τα δικά του χαρακτηριστικά γνωρίσματα και μέθοδο παρασκευής, αυτά μπορούν να ταξινομηθούν ως:

1. Μεταποιημένα τεμάχια κρέατος.
2. Προϊόντα από κρεατομάζα (κυρίως αλλαντικά) τα οποία υποδιαιρούνται σε παστεριωμένα, βραστά και αλλαντικά ζυμώσεως.
3. Κονσερβοποιημένα κρεατοπαρασκευάσματα, αποστειρωμένα ή παστεριωμένα.

Στα μεταποιημένα προϊόντα κρέατος πρέπει να συμπεριληφθούν και τα διάφορα προ-μαγειρεμένα κατεψυγμένα και έτοιμα προς κατανάλωση φαγητά.

Η Αναγκαιότητα της Ταυτοποίησης του Κρέατος ^[44] ^[47]

Οι διατροφικές κρίσεις που ανά διαστήματα απασχόλησαν την παγκόσμια κοινότητα όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών και η γρίπη των

πουλερικών, οι μη ορθές πρακτικές που εσκεμμένα εφαρμόζονται από ορισμένους παραγωγούς τροφίμων (νοθείες ηλιέλαιου, γάλακτος, κρεατοσκευασμάτων), οι τροφικές αλλεργίες – δηλητηριάσεις και τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, είναι γεγονότα που έχουν αυξήσει την ανησυχία και κατ' επέκταση το ενδιαφέρον του καταναλωτικού κοινού σχετικά με τη σύσταση και την ποιότητα των τροφίμων. Δεδομένου ότι οι ετικέτες των προϊόντων δεν παρέχουν επαρκείς επεξηγήσεις και εγγυήσεις για την πραγματική τους σύσταση (π.χ. στο κονσερβοποιημένο κρέας), καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων πιστοποίησης της αυθεντικότητας των συστατικών των τροφίμων (επεξεργασμένων και μη), τόσο για την μη εξαπάτηση και την προστασία των καταναλωτών από παράνομα υποκατάστατα όσο και για οικονομικούς λόγους (έλεγχος αθέμιτου ανταγωνισμού μεταξύ των βιομηχανιών).

Ειδικότερα η αυθεντικότητα του κρέατος αποτελεί αντικείμενο πρωταρχικού ενδιαφέροντος για τις ελεγκτικές αρχές τροφίμων. Πολλά προϊόντα στον τομέα του κρέατος χαρακτηρίζονται ως υψηλής οικονομικής αξίας και είναι γνωστό επίσης, το μεγάλο εύρος τεχνικών επεξεργασίας που λαμβάνουν χώρα από το σφαγείο έως την κατανάλωση τους. Κατά των τεμαχισμό του, ο ιστός διατηρεί πολλά από τα ανατομικά χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν το ζώο προέλευσης του, αλλά μετά από το μαγείρεμα του, κατά το οποίο συμβαίνει ανάμιξη με άλλα συστατικά και θερμική επεξεργασία που έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της φυσιολογίας και της χημικής του σύστασης, η αναγνώριση του είδους ίσως γίνει πιο δυσχερής. Στην δυσκολία ταυτοποίησης οφείλονται και τα φαινόμενα νοθείας στην βιομηχανία κρέατος αλλά και στην βιομηχανία εστίασης. Για παράδειγμα είναι δύσκολο να αποφανθούμε αν προϊόντα όπως ένα σαλάμι γαλοπούλας περιέχει μόνο γαλοπούλα ή σε ένα εστιατόριο, να διακρίνουμε αν το μαγειρεμένο φαγητό που έχουμε μπροστά μας περιέχει φιλέτο φασιανού, όπως ισχυρίζεται ο εστιατορας ή κάποιο άλλο φθηνότερο πουλερικό.

Μέθοδοι όπως η οργανοληπτική εξέταση και οι ανατομικές διαφορές, οι ιστολογικές διαφορές της τρίχας των ζώων, οι φυσικές ιδιότητες του λιπώδους ιστού και τα επίπεδα γλυκογόνου στον μυϊκό ιστό που στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση της προέλευσης των κρεάτων σήμερα δίνουν την θέση τους σε μοριακές τεχνικές ανάλυσης (μοριακοί δείκτες) όπως το προφίλ ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του σαρκοπλάσματος, ανοσοβιολογικές μέθοδοι (ELIZA) και τεχνικές υβριδισμού του DNA. Αυτές οι μέθοδοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς

την ευαισθησία και την ειδικότητα και κάποιες απαιτούν την ύπαρξη εξειδικευμένου και ακριβούς εξοπλισμού. Ένας άλλος παράγοντας που περιορίζει την χρησιμότητα τους, είναι η αδυναμία αναγνώρισης επεξεργασμένου κρέατος όπως για παράδειγμα συμβαίνει με την τεχνική ELISA, η οποία μπορεί να αποτύχει στην αναγνώριση προϊόντων κρέατος που υπέστησαν κατεργασία με υψηλή θερμοκρασία εξαιτίας της μετουσίωσης των θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών στις οποίες στηρίζεται η μέθοδος (όπως συμβαίνει με τα προτηγανισμένα - κατεψυγμένα, έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα).

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ^[43]

Εξαιτίας της μεγάλης προόδου που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια στην μοριακή βιολογία, μπορούμε σήμερα να χρησιμοποιήσουμε τεχνικές που μας διευκολύνουν πολύ στη προσπάθεια ταυτοποίησης ατόμων, ομάδων πληθυσμών και ειδών. Η επιλογή αυτή γίνεται με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, 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.

Τα κριτήρια επιλογής μοριακών δεικτών είναι πολλά και σχετίζονται τόσο με αυτούς καθ' αυτούς του δείκτες όπως η αφθονία, ο πολυμορφισμός, η εξειδίκευση για ορισμένο γενετικό τόπο, τα συγκυρίαρχα αλληλόμορφα, όσο και με τη διαδικασία παραγωγής τους. Αναφορικά με τη διαδικασία παραγωγής τους, θα πρέπει να δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα, να έχει χαμηλές απαιτήσεις σε ανθρώπινο δυναμικό και τεχνική εξειδίκευση, να έχει μικρό κόστος εφαρμογής και ανάπτυξης, να απαιτεί μικρή ποσότητα DNA και να επιδέχεται αυτοματισμούς.

Στους πρωτεϊνικούς δείκτες, που εμφανίσθηκαν προτού εμφανισθούν οι DNA δείκτες, ανήκουν τα ισοένζυμα και τα αλλοένζυμα. Υπάρχουν μικρές διαφορές μεταξύ των ισοενζύμων και των αλλοενζύμων. Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου που καταλύουν την ίδια αντίδραση, αλλά διαφέρουν ελάχιστα στην αμινοξική τους σύσταση ή στην δομή τους, τόσο ώστε να μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση ή χρωματογραφία. Τα αλλοένζυμα αποτελούν διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα που βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο.

Η εφαρμογή πρωτεϊνικών δεικτών έχει τα εξής πλεονεκτήματα: δεν χρειάζεται εκκινητές ή σημαντές, είναι γρήγορη και εύκολη, με χαμηλό κόστος. Τα ζυμογράμματα που προκύπτουν από την εφαρμογή πρωτεϊνικών δεικτών, μπορούν να αφορούν σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα. Στην περίπτωση των πρωτεϊνικών δεικτών υπάρχει συγκυριαρχία αλληλομόρφων και τα αποτελέσματά τους είναι επαναλήψιμα. Τα μειονεκτήματα της εφαρμογής πρωτεϊνικών δεικτών είναι ότι δεν βρίσκονται σε αφθονία, έχουν χαμηλό πολυμορφισμό, τα ζυμογράμματα μερικές φορές ερμηνεύονται δύσκολα εξαιτίας «ζωνών» που οφείλονται σε πολυπλοειδία ή σε γονίδια που έχουν διπλασιασθεί, οι πρωτεΐνες που έχουν όμοια ηλεκτροφορητική ικανότητα μπορεί να μην είναι ομόλογες, ενώ δεν είναι «ουδέτεροι» στην επιλεκτική πίεση. Τέλος, συχνά απαιτείται η θανάτωση του ζώου, γεγονός που δεν είναι πάντα εφικτό ή λίαν επιθυμητό.

Η κατηγορία των DNA δεικτών είναι πολυπληθής (Πίνακας 1) και αφορά γενετικούς πολυμορφικούς τόπους, μοναδιαίους στο γονιδίωμα, με περισσότερα του ενός αλληλόμορφα, οι οποίοι είναι δυνατόν να ανιχνευτούν με μοριακή ανάλυση. Οι δείκτες με τις περισσότερες εφαρμογές είναι τα RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), τα RAPD (Randomly Amplified DNA Polymorphisms), τα AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), οι μινιδορυφόροι (minisatellites) και οι μικροδορυφόροι (microsatellites) ή αλλιώς SSR (Simple Sequence Repeats), τα SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), τα SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms) και η DNA αλληλούχιση (DNA ή PCR Sequencing).

Η διαδικασία παραγωγής των **RAPD** βασίζεται στην τυχαία ενίσχυση DNA με την χρήση PCR. Έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθούν πολλές θέσεις του γονιδιώματος ταυτόχρονα όσον αφορά την ύπαρξη πολυμορφικών αλληλουχιών. Τα πλεονεκτήματα των RAPD είναι ότι για την εφαρμογή τους απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση DNA, 5-50ng για κάθε αντίδραση, ενώ οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι τυχαίες. Η δοκιμή γίνεται εύκολα και γρήγορα, με χαμηλό κόστος. RAPD δείκτες υπάρχουν άφθονοι και τυχαία διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα. Σε κάθε αντίδραση παράγονται συνήθως πολλές ζώνες, ενώ υπάρχει η δυνατότητα αυτοματισμού. Τα μειονεκτήματά τους είναι ότι απαιτούν καθαρό DNA, μεγάλου μοριακού βάρους. Επίσης απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή μολύνσεων και κανονικοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, ενώ οι ζώνες που αναπαράγονται δεν μπορούν να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα.

Τέλος παράγουν κυρίως αλληλόμορφα, έχουν μικρή επαναληψιμότητα, ενώ τμήματα ίδιου μεγέθους μπορεί να μην είναι ομόλογα.

Η διαδικασία παραγωγής των **AFLP** (Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων) ξεκινάει με την απομόνωση και πέψη του DNA καθώς και την πρόσδεση ολιγονουκλεοτιδίων προσαρμοστών στα τμήματα του DNA που προκύπτουν από τη πέψη. Κατόπιν γίνεται, με PCR, επιλεκτική αναπαραγωγή τμημάτων DNA και διαχωρισμός του με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης. Η ανίχνευση των ζωνών που προκύπτουν γίνεται με αυτοραδιογραφία, χρώση με άργυρο ή φθορισμό. Οι εκκινητές δεν χρειάζεται να έχουν γνωστή αλληλουχία. AFLP βρίσκονται άφθονοι, διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα, αν και σε μερικές περιπτώσεις εντοπίζονται γύρω από τα κεντροσώματα. Μπορεί να γίνει αναπαραγωγή πολλών «ζωνών» σε κάθε αντίδραση. Τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα και υπάρχει η δυνατότητα αυτοματισμού. Απαιτούν όμως πολύ καθαρό DNA, μεγάλου μοριακού βάρους. Το DNA προφίλ δεν μπορεί να ερμηνευθεί σχετίζοντας αλληλόμορφο και γενετικούς τόπους. Είναι κυρίως αλληλόμορφα, ενώ παρόμοιου μεγέθους τμήματα, μπορεί να μην είναι ομόλογα.

Οι **μινιδоруφόροι** παράγονται με απομόνωση, πέψη και διαχωρισμό των τμημάτων DNA, μεγέθους 4-20kb, με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, υβριδοποίηση κατά Southern με ραδιοσημασμένο μινιδоруφορικό σημαντή και ανίχνευση πολυμορφισμού με αυτοραδιογραφία. Οι μινιδоруφόροι έχουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, παράγουν πολλές ζώνες, ενώ τα αποτελέσματά της εφαρμογής τους είναι επαναλήψιμα. Απαιτούν όμως μεγάλες συγκεντρώσεις DNA, 5-10μg, μεγάλου μοριακού βάρους και έχουν μεγάλο κόστος εφαρμογής. Η διαδικασία παραγωγής τους είναι χρονοβόρα και απαιτεί επιδεξιότητα. Η διασπορά των μινιδоруφόρων στο γονιδίωμα μπορεί να μην είναι τυχαία. Οι ζώνες που παράγουν δεν μπορεί να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα. Είναι κυρίως αλληλόμορφα, ενώ ζώνες ίδιου μεγέθους μπορεί να μην είναι ομόλογες. Επίσης είναι δύσκολο να συγκρίνει κανείς πολυμορφισμούς σε διαφορετικά πηκτώματα, ενώ δεν επιδέχονται αυτοματισμό.

Οι **μικροδоруφόροι** ή αλλιώς SSR παράγονται μετά από απομόνωση και αναπαραγωγή τμημάτων DNA με PCR. Ο διαχωρισμός «ζωνών» γίνεται με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης ή αγαρόζης και η ανίχνευση του πολυμορφισμού με αυτοραδιογραφία, χρώση με άργυρο ή χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η εφαρμογή μικροδоруφόρων απαιτεί χαμηλή

συγκέντρωση DNA, 10-100 ng/αντίδραση, με την οποία παράγονται «ζώνες» που μπορούν να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα. Μικροδορυφόροι βρίσκονται σε αφθονία και διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα. Είναι συγκυρίαρχα αλληλόμορφα, δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα, και υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής αυτοματισμού στην παραγωγή τους. Δυστυχώς αν δεν υπάρχουν γνωστοί εκκινητές, το κόστος τους είναι υψηλό. Επίσης ετερόζυγα άτομα μπορεί να θεωρηθούν ομόζυγα, όταν εμφανίζονται «μηδενικά» αλληλόμορφα, εξαιτίας μετάλλαξης σε θέση πρόσδεσης εκκινητή, ενώ «λάθος» ζώνες δυσχεραίνουν την βαθμολόγηση του πολυμορφισμού. Παρόμοιου μεγέθους τμήματα, μπορεί να μην είναι ομόλογα..

Πίνακας 1: Μοριακοί Δείκτες από Pushpendra et al. (2002) ^[35]

AFLP	Amplified fragment length polymorphism	RAHM	Randomly amplified hybridizing microsatellites
AMP-PCR	Anchored microsatellite primed PCR	RAMPO	Radomly amplified microsatellite polymorphisms
AP-PCR	Arbitarily primed PCR	RAPD	Radomly amplified polymorphic DNA
ASA	Allele-specific amplification	RBIP	Retrotransposon-based insertion polymorphism
ASSR	Anchored simple sequence repeat	REMAP	Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence	RFLP	Restriction fragments length polymorphism
DAF	DNA amplification fingerprint	SAMPL	Selective amplification of microsatellite polymorphic loci
DALP	Direct amplification of length polymorphism	SCAR	Sequence characterised amplified regions
DAMD-PCR	Direct amplification of microsatellite DNA byPCR	SNP	Single nucleotide polymorphism
DFLP	DNA fragment length polymorphism	SPAR	Singe primer amplification reaction
dRAMP	Digested RAMP	S-SAP	Sinquence-specific amplification polymorphism
IFLP	Intron fragment length polymorphism	SSCP	Single strand conformation polymorphism
IM-PCR	Inter-microsatellit PCR	SSLP	Single sequence length polymorphism
IRAP	Inter-retrotransposon amplified polymorphism	SSR	Simple sequence repeat
ISA	Inter-SSR amplification	STAR	Sequence tagged amplified region
ISSR	Inter-simple sequence repeats	STMS	Sequence-tagged microsatellite site
MAAP	Multiple arbitrary amplicon profiling	STR	Short tandem repeat
MP-PCR	Microsatellite-primer PCR	STS	Sequence-tagged-site
OLA	Oligonucleotide ligation assay	VNTR	Variable number of tandem repeat

Στην **DNA αλληλούχιση** το PCR προϊόν αναλύεται σε ειδικές συσκευές με στόχο την πλήρη ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του τμήματος DNA που μας αφορά και με την χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής επιτυγχάνεται η ανεύρεση πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου. Εδώ υπάρχει και η πιθανότητα εντοπισμού και μη γνωστών πολυμορφισμών. Πρόκειται για μέθοδο που απαιτεί εξειδικευμένο και ακριβό εξοπλισμό, που πολλές φορές δυσχεραίνει τη γρήγορη και χαμηλού κόστους ανάλυση σε μεγάλο αριθμό δεικτών.

Η μέθοδος **SSCP** (Πολυμορφισμός Διαμόρφωσης Μονόκλωνης Αλυσίδας) περιλαμβάνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των δίκλωνων αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων καθιστώντας τες μονόκλωνες. Βασίζεται σε πολύ μικρές διαφορές της αλληλουχίας (ακόμη και διαφορά σε μία βάση), ιδιότητα η οποία τροποποιεί τη δευτεροταγή δομή και επηρεάζει την κινητικότητα των μορίων όταν διαπερνούν μέσα από πήκτωμα κάτω από την δράση ηλεκτρικής τάσης.

RFLP^[30] (Restriction Fragments Length Polymorphism)
(Πολυμορφισμός Μήκους Τμημάτων Περιορισμού)

Αρχή της Μεθόδου και Γενικά Χαρακτηριστικά

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποικοδομώντας «ξένο» προς αυτά DNA (π.χ. DNA των φάγων), αναστέλλοντας έτσι την ικανότητά του να μολύνει το βακτηριακό κύτταρο.

Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων έως οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες, όπου υπάρχουν στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου, προστατεύονται χάρη στη μεθυλίωση μίας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης. Όταν οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού βρίσκονται σε «ξένο» ως προς το βακτήριο DNA, δεν είναι γενικώς μεθυλιωμένες και συνεπώς, αποκόπτονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Πολλές τέτοιες ενδονουκλεάσες έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη βακτηρίων, αναγνωρίζουν διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και είναι διαθέσιμες εμπορικά.

Τα ένζυμα περιορισμού ταξινομούνται βιοχημικά σε τρεις κατηγορίες: Τύπου I, Τύπου II και Τύπου III.

Στις κατηγορίες τύπου I και III η δραστηριότητα περιορισμού και μεθυλίωσης διεκπεραιώνεται από ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο. Παρ' όλο που αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα ακριβή σημεία που τέμνουν το DNA βρίσκονται σε ποικίλες αποστάσεις από αυτά τα σημεία αναγνώρισης και μπορεί να είναι ακόμα και εκατοντάδες νουκλεοτίδια μακριά.

Τα τύπου II ένζυμα περιορισμού είναι ανεξάρτητα από δραστηριότητες μεθυλίωσης και διεκπεραιώνουν τις τομές τους σε πολύ συγκεκριμένα σημεία που

βρίσκονται εντός, ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Επίσης, χρειάζεται ένα μόνο ένζυμο τύπου II για την τομή και των 2 κλώνων του DNA (όπως και τα τύπου III ένζυμα), σε αντίθεση με τα τύπου I ένζυμα, όπου χρειάζονται 2 μόρια για την τομή και των δύο κλώνων του DNA.

Η συντριπτική πλειοψηφία των γνωστών ενζύμων περιορισμού είναι τύπου II και είναι τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε στην συγκεκριμένη εργασία.

Μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού θα κόψει σε μία σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA που έχει απομονωθεί από ένα κύτταρο. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται τμήματα περιορισμού (restriction fragments). Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μία συγκεκριμένη γενετική περιοχή μετά την επεξεργασία της με έναν συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, δημιουργείται ένας χάρτης περιορισμού (restriction map) της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής, ο οποίος θα δείχνει την ακριβή τοποθεσία καθενός σημείου περιορισμού (restriction site), δηλαδή του σημείου που αναγνωρίζεται από ένα ένζυμο περιορισμού, σε σχέση με τα γειτονικά του σημεία περιορισμού που αναγνωρίζονται αντίστοιχα από άλλες ενδονουκλεάσες.

Επειδή κάθε ενδονουκλεάση περιορισμού αναγνωρίζει μία διαφορετική, μικρή αλληλουχία DNA, ένας χάρτης περιορισμού αντικατοπτρίζει τη διευθέτηση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στη γενετική περιοχή που μελετάμε. Αυτό σημαίνει ότι διαφορετικές περιοχές DNA μπορούν να συγκριθούν ως προς τους χάρτες περιορισμού τους που παράγονται με συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού.

Η διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ δύο, ή περισσότερων τμημάτων γενετικού υλικού, απόρροια των διαφορετικών τους νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού. Έτσι αντί να εξετάζεται ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, η ανάλυση RFLP παρέχει το πλεονέκτημα του απ' ευθείας προσδιορισμού του γονοτύπου ενός οργανισμού, όπως φανερώνεται από το χάρτη περιορισμού. Αυτός ο πολυμορφισμός είναι συχνός και κάθε οργανισμός έχει έναν μοναδικό και συγκεκριμένο συνδυασμό τμημάτων περιορισμού που τον χαρακτηρίζουν. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός τμημάτων περιορισμού που παρατηρείται σε μία συγκεκριμένη περιοχή του γενώματος ενός οργανισμού ονομάζεται και απλότυπος (haplotype).

Οι παράγοντες που αναφέρονται παρακάτω παίζουν σπουδαίο ρόλο στις πέψεις του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού (E.Π.).

- I. **Η ποσότητα του ενζύμου.** Θεωρητικά η μονάδα δραστηριότητας των Ε.Π. (U) αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που θα πέψει 1μg DNA σε όλες τις θέσεις αναγνώρισης σε 1h στους 37°C. Στην πράξη τα πράγματα είναι λίγο διαφορετικά. Όταν το DNA περιέχει πολλές θέσεις αναγνώρισης η ποσότητα ενζύμου που θα χρειαστεί είναι μεγαλύτερη. Για αυτό τον λόγο σε μια αντίδραση πέψης χρησιμοποιούμε 2-3 μονάδες Ε.Π. ανά 1μg DNA για τουλάχιστον 2h στους 37°C.
- II. **Η καθαρότητα του DNA.** Όσο πιο καθαρό είναι το δείγμα μας τόσο καλύτερα αναγνωρίζονται οι θέσεις δράσης από το ένζυμο και τόσο πιο ικανοποιητική και πλήρης είναι η πέψη. Ακόμη, η μεθυλίωση του DNA, η σύνδεση του με πρωτεΐνες και το υψηλό μοριακό του βάρος σε ένα πυκνό διάλυμα δυσχεραίνουν την απόδοση μιας αντίδρασης πέψης. Στις περιπτώσεις αυτές, γίνεται καθαρισμός του DNA και η αντίδραση πέψης επιτελείται σε μεγαλύτερο όγκο.
- III. **Το ρυθμιστικό διάλυμα πέψης.** Τα διαλύματα αυτά πρέπει να περιέχουν Mg^{++} και κατάλληλη ποσότητα άλατος ώστε να παρέχεται η βέλτιστη ιοντική ισχύς για την δράση της Ε.Π. Σε πολλές περιπτώσεις προστίθενται στο διάλυμα πέψης BSA, DTT και σπερμιδίνη για βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα.
- IV. **Η συσκευασία παράδοσης των Ε.Π.** Όλες οι Ε.Π. φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -20°C. Για την αποφυγή της καταστροφής των ενζύμων λόγω κατάψυξης, το ρυθμιστικό τους διάλυμα περιέχει 25-50% γλυκερόλη. Συγκέντρωση όμως γλυκερόλης πάνω από 5% επί του συνολικού όγκου όπου επιτελείται η αντίδραση μπορεί να αναστείλει την ενζυμική δράση. Επίσης η υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης μπορεί να δημιουργήσει τη λεγόμενη star activity, αποτέλεσμα της οποίας είναι η ακανόνιστη πέψη του DNA από τις Ε.Π. Για την αποφυγή όλων των παραπάνω ανεπιθύμητων φαινομένων θα πρέπει ο συνολικός όγκος μίας αντίδρασης πέψης να είναι τουλάχιστον 10 φορές περισσότερος από τον όγκο του διαλύματος του ενζύμου που θα προστεθεί στην αντίδραση.
- V. **Η κατάσταση του ενζύμου.** Οι Ε.Π., όπως άλλωστε και όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην μοριακή βιολογία, είναι πολύ ευαίσθητες. Η έξοδος του ενζύμου από την κατάψυξη, η κακή χρήση με την

χρησιμοποίηση ακάθαρτων ακρορυγχιών κλπ. έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου.

Southern blotting RFLP

Για τα τμήματα που προκύπτουν μετά την κοπή χρησιμοποιούνται τμήματα ανιχνευτών (probes) οι οποίοι προσκολλώνται ταυτόχρονα σε πολλές διαφορετικές θέσεις και υβριδοποιούνται με το τμήμα του γονιδίου που αναλύεται για την εύρεση πολυμορφισμών (minisatellites). Η μέθοδος δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα καθώς διαχωρίζονται πολύ εύκολα τα ετερόζυγα άτομα. Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί σχετικά μεγάλες ποσότητες γενωμικού DNA (5g) και η υβριδοποίηση των ανιχνευτών είναι αρκετά επίπονη εργαστηριακή διαδικασία. Παρ'ότι ανιχνεύεται ο πολυμορφισμός του εξεταζόμενου τμήματος του γονιδίου, δεν προσδιορίζεται η ακριβής θέση που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός, ενώ για να ανιχνευθεί πραγματικά ο πολυμορφισμός πρέπει να υπάρχει δημιουργία ή απώλεια θέσης κοπής του περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιείται σε σύγκριση με ήδη γνωστή θέση κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο.

PCR-RFLP

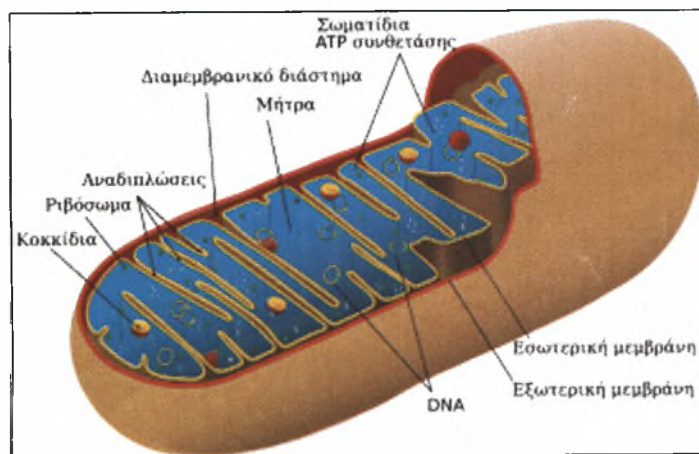
Η ανάλυση RFLP είναι μία από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR για τον προσδιορισμό διαφορών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας και της μοριακής ταυτοποίησης διαφόρων οργανισμών (θηλαστικά, πτηνά, ψάρια και μικροοργανισμοί). Πρώτα ενισχύεται η επιθυμητή DNA αλληλουχία και στην συνέχεια ακολουθεί πέψη με ένζυμο περιορισμού. Η ανάλυση RFLP για τις ανάγκες της μοριακής ταυτοποίησης βασίζεται στο ότι το σημείο περιορισμού που δημιουργείται από μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση σε ένα τμήμα DNA εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού. Ο πολυμορφισμός των τμημάτων περιορισμού δημιουργείται από τις διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία πιθανών σημείων αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, ή οροτύπων ενός οργανισμού, κάτι το οποίο οδηγεί στη δημιουργία τμημάτων περιορισμού με διαφορετικό αριθμό βάσεων τα οποία μπορούν να διαχωριστούν και να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου μετά από κατάλληλη χρώση. Ένας σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της εφαρμογής RFLP είναι ότι,

η κοπή των τμημάτων DNA που θέλουμε να αναλύσουμε με τα ένζυμα περιορισμού πρέπει να είναι πλήρης έτσι, ώστε προϊόντα μερικής κοπής να μην παρεμβαίνουν στη σωστή ανάλυση των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί.

Πρόκειται για την τεχνική που εφαρμόστηκε στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλό κόστος, είναι γρήγορη και δίνει καλά αποτελέσματα σε μελέτες πολυμορφισμού^[30].

Το Μιτοχονδριακό DNA ^{[33][42]}

Τα μιτοχόνδρια, η δομή των οποίων απεικονίζεται στην Εικόνα 11, είναι θεμελιώδη οργανίδια που συναντούνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπών τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια - μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) - μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κυτταρική



Εικόνα 11: Η δομή του μιτοχονδρίου

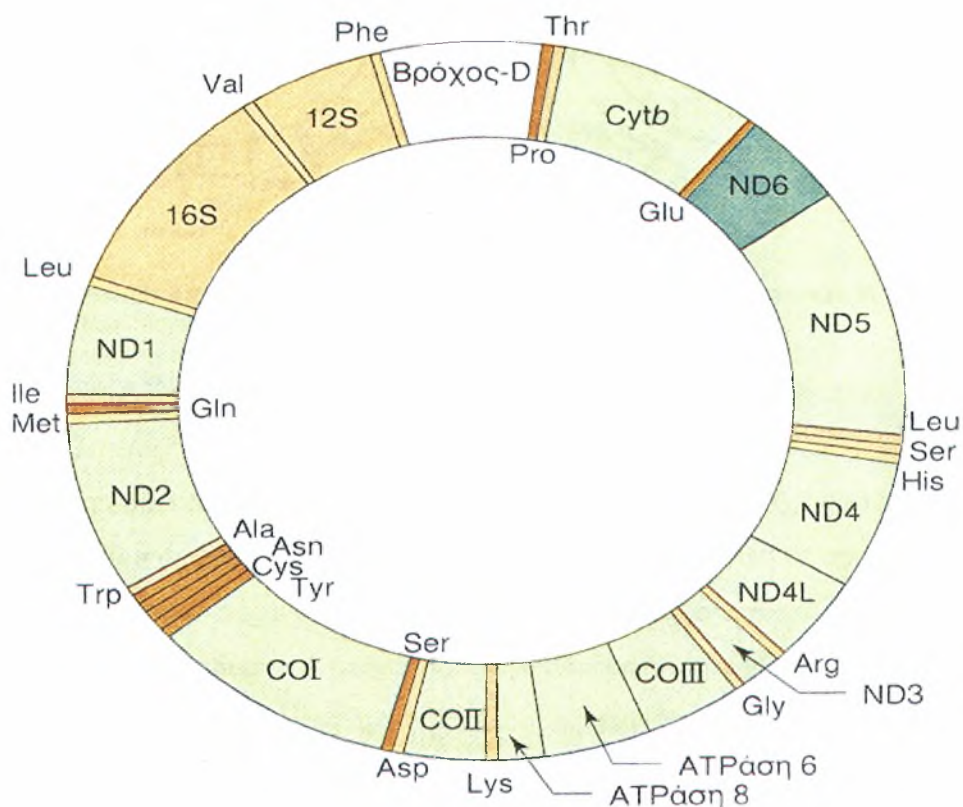
αναπνοή, είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν DNA έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Αυτή η σχετική αυτοδυναμία κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς που ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά.

Τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συνδέονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μόρια rRNA και tRNA που χρησιμοποιούνται στα μιτοχόνδρια και λίγες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάφραση.

Έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία τουλάχιστον 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν από 3 έως 37 πρωτεΐνες.

Τα μιτοχondριακά γονιδιώματα των ζώων (μέσα στα οποία περιλαμβάνονται και τα πτηνά), αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και έχουν κατά κανόνα μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (συν 22 tRNA και 2 rRNA).

Η κατωτέρω εικόνα δείχνει έναν χάρτη του μιτοχondριακού γονιδιώματος των θηλαστικών, αποτελούμενου από 16.569 ζεύγη βάσεων.

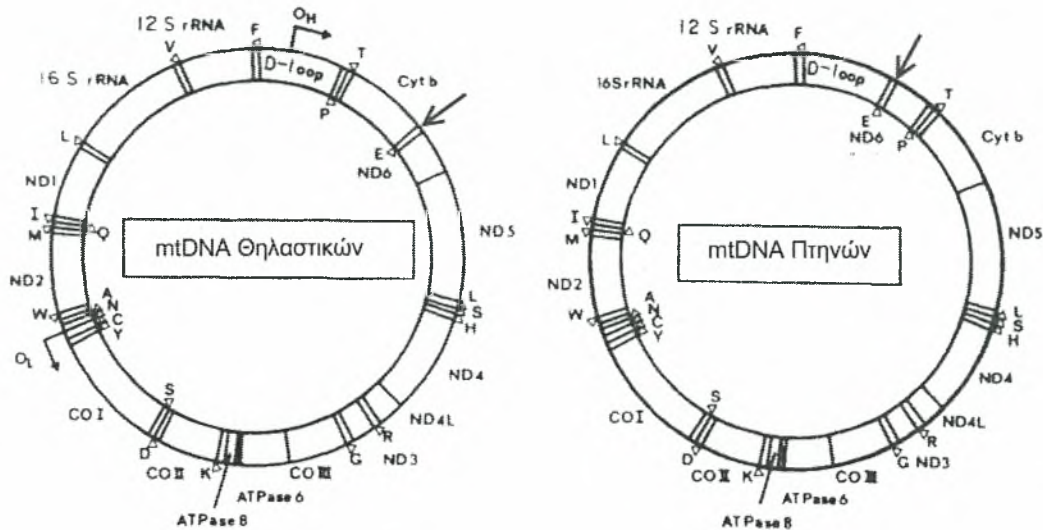


Εικόνα 12: Το μιτοχondριακό γονιδίωμα.

Το γονιδίωμα κωδικοποιεί τα 16S και 12S rRNA και τα 22 tRNA. Οι προσδιορισμοί των αμινοξέων για το tRNA σημειώνονται εξωτερικά του κύκλου για τα γονίδια που μεταγράφονται αριστερόστροφα και εσωτερικά του κύκλου για τα γονίδια που μεταγράφονται δεξιόστροφα. Ομοίως τα 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υποδεικνύονται με σκούρο πράσινο (μεταγράφονται αριστερόστροφα) και ανοικτό πράσινο (μεταγράφονται δεξιόστροφα). Τα γονίδια κωδικοποιούν: Cytb, κυτόχρωμα b. ND1-6, συστατικά του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του NADH. COI-III, υπομονάδες του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος. ATPάση 6 και 8, πολυπεπτίδια του συμπλόκου της μιτοχondριακής ATPάσης. Οι δύο υποκινητές εντοπίζονται στον βρόχο -D περιοχή η οποία εμπλέκεται και στην αντιγραφή του DNA.

Παρά την μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των ζώων, έχει βρεθεί^[13] ότι η δομή του μιτοχondριακού γονιδιώματος των πτηνών διαφέρει από τη αντίστοιχη των θηλαστικών ως προς την θέση του γονιδίου ND6 όπως φαίνεται στην ακόλουθη

εικόνα.



Εικόνα 13: Σύγκριση mtDNA θηλαστικών με το αντίστοιχο των πτηνών. Η διαφορά τους υποδεικνύεται με βέλος^[13].

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών για τους εξής λόγους^[42]:

- 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 ρυθμός μεταλλαγής του (10 φορές υψηλότερος του πυρηνικού) έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και την δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.

Τα γονίδια του mtDNA με την μεγαλύτερη προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα: Cyt b, 12S και 16S rRNA και το D-loop με το πρώτο να κατέχει την πρώτη θέση. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται αφενός στην μεγάλη εξελικτική συντήρησή τους και αφετέρου στις επιμέρους διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ των ειδών.

Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος – Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

Ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών που ασχολούνται με τον μοριακό διαχωρισμό ειδών ζώων είναι αρκετά μεγάλος (άνω των 100). Οι περισσότερες αναφέρονται σε βρώσιμα είδη και σε προστατευόμενα είδη ζώων των οποίων απαγορεύεται η εμπορία. Κατά κύριο λόγο εστιάζουν σε λίγα και συγκεκριμένα είδη που ανήκουν στις τρεις βασικές ομάδες των σπονδυλωτών. Ειδικότερα με τα θηλαστικά ασχολούνται το 36% των μελετών, με τα ψάρια το 34% και με τα πτηνά το 20% αυτών^[44].

Για τα θηλαστικά, οι περισσότερες μελέτες ασχολούνται με την ταυτοποίηση ειδών όπως η αγελάδα, ο χοίρος, το πρόβατο και η κατσίκα ενώ λίγες με άλλα είδη όπως ο ρινόκερος ή η τίγρης. Στα πτηνά η συντριπτική πλειοψηφία μελετά μόνο δύο είδη (κοτόπουλο και γαλοπούλα) και λίγες αναφέρονται σε άλλα όπως η χήνα και η πάπια. Οι μελέτες που εστιάζουν στα ψάρια ασχολούνται κυρίως με τον τόνο και το σολομό. Τέλος υπάρχει και ένας αριθμός μελετών (10%) που αναφέρεται σε διαχωρισμό ειδών ερπετών ή θαλάσσιων χελωνών.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών στις οποίες εφαρμόστηκε η τεχνική PCR-RFLP.

- Το 1995 οι *Meyer et al.*^[31] 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, κατσίκα, άλογο, κοτόπουλο και γαλοπούλα).
- Το 1999 οι *Horwood et al.*^[21] ταυτοποίησαν κρέας από κότα και γαλοπούλα, πέπτοντας τμήμα ενός πυρηνικού γονιδίου, του alpha-cardiac actin gene, με HaeIII και RsaI. Δεν μπόρεσαν όμως να διαχωρίσουν κρέας από πάπια, φασιανό, βόδι και αρνί.
- Το 2000 οι *Patris et al.*^[32] δημιούργησαν DNA αποτύπωμα για 22 είδη ζώων κόβοντας ένα τμήμα 359bp του Cyt b με δύο ένζυμα HaeIII και HinfI. Επίσης αναφέρουν ότι η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για ταυτοποίηση μιγμάτων κρέατος.
- Το 2001 οι *Hold et al.*^[20] τακτοποίησαν 36 είδη ψαριών χρησιμοποιώντας το Cyt b και έξι ένζυμα περιορισμού. Επίσης απέδειξαν ότι η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη και για επεξεργασμένα προϊόντα (στους 100°C για 15min) όπως ακόμα και για ορισμένα μίγματα ψαριών.

- Το 2005 οι *Girish et al.*^[18] 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.
- Τέλος η πιο αξιόλογη μελέτη που αναφέρεται στην ταυτοποίηση πουλερικών προέρχεται από τους *Girish et al* (2007)^[19] και πρόκειται για τον διαχωρισμό έξι κοινών ειδών (όρνιθας, φραγκόκοτα, γαλοπούλα, πάπια, ορτύκι). Χρησιμοποιήθηκε τμήμα 456bp του 12S rRNA και τα ένζυμα HinfI, Mph 1103I, MvaI, Eco47I. Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε επιτυχώς και σε επεξεργασμένα δείγματα στους 120°C για 30min.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας μελέτης, ήταν η ανάπτυξη μίας εύκολης και αξιόπιστης μεθόδου μοριακού διαχωρισμού, ορισμένων κοινών πουλερικών διατροφικού ενδιαφέροντος, προερχόμενα είτε από εκτροφές είτε από θήρευση. Επιπλέον εξετάστηκε η καταλληλότητα της μεθόδου για την ταυτοποίηση εμπορικών προϊόντων κρέατος πουλερικών τα οποία έχουν υποστεί κάποια κατεργασία.

Οι μοριακοί δείκτες που εξετάστηκαν ήταν γονίδια του μιτοχondριακού γονιδιώματος (Cyt b και 12S rRNA) και η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PCR-RFLP. Για τον λόγο αυτό διεξήχθη μία σειρά πειραμάτων με στόχο την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού, ενός γονιδίου και μίας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, με τον οποίο θα τυγγάναμε τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ δέκα διαφορετικών ειδών πουλερικών. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

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

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Εξοπλισμός για την Απομόνωση του DNA από ιστό κρέατος

Υλικά Εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια-Διαλύτες

- TNES-Urea Buffer
- Πρωτεΐνάση K (Proteinase K) (10μg/μl) [HT]
- Φαινόλη (Phenol) 90% [Applichem]
- Χλωροφόρμιο (Chloroform) [Merck]
- Ισοαμυλική Αλκοόλη (isoamyl alcohol) [Merck]
- NaOAc (Sodium Acetate Buffer Solusion) [Sigma], 3M.
- Απόλυτη αιθανόλη (EtOH) 100%
- Αιθανόλη καθαρότητας 70%
- Αποστειρωμένο, διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

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

Συσκευές

- Κυκλικός αναδευτήρας [Bio RS-24]

- Κλίβανος [ProBlot Hybridization Oven]
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος [Eppendorf – 5810R]
- Καταψύκτης [Pitsos]
- Απαγωγός εστία εργασίας
- Ανακινητής Vortex

Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση DNA σε Πηκτής (gel) Αγαρόζης

Υλικά εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

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

TAE 50X (500ml): 121g Tris Base + 28.5ml Acetic Acid + 50ml EDTA 0.5M + ddH₂O έως τελικό όγκο 500ml.

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

Loading buffer 6X (10ml): 1ml Bromophenol blue 1%w/v + 0.5ml TBE 20X + 5ml Glycerol + ddH₂O έως τελικό όγκο 10ml.

Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής του gel
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή παροχής υπεριώδους (U.V.) ακτινοβολίας [Ultra Lum]
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (και τροφοδοτικό μηχάνημα) /
[Bio-Rad (Scie plus)]

Εξοπλισμός για τον Ποσοτικός προσδιορισμό του εξαγόμενου DNA

Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέττες ακριβείας των 2 & 100 μl με τα αντίστοιχα tips
- Φιαλίδια erpendorf των 500μl
- Στατώ
- Πλαστικές κυβέττες φωτομέτρησης οπτικής διαδρομής 10 mm [erpendorf]

Αντιδραστήρια

- ddH₂O

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος [Eppendorf S414C]
- Φάσματοφωτόμετρο UV-VIS [Eppendorf BioPhotometer]

Εξοπλισμός για τον Πολλαπλασιασμό των γονιδίων (PCR)

Υλικά Εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR Buffer) [Bioline]
- Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl₂) 50mM [Bioline]
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM
- Εκκινητές (Primers)
- Taq DNA πολυμεράση 5U/μl [Bioline]

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Θερμικοί κυκλοποιητές [Eppendorf – Mastercycler epgradient S]

Εξοπλισμός για την εφαρμογή της μεθόδου RFLP

Υλικά Εργαστηρίου

- Πιπέττες ακριβείας των 10 & 100 μ l
- Φιαλίδια erpendorf των 500 μ l
- Στατώ

Αντιδραστήρια

- ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα πέψης (Buffer) ανάλογα για το κάθε ένζυμο
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: HaeIII (10U/ μ l), HinfI (10U/ μ l), Acil (10U/ μ l), HhaI (20U/ μ l), MboI (5U/ μ l), [MseI (10U/ μ l) & BSA], AvaII (10U/ μ l), DdeI (10U/ μ l), RsaI (10U/ μ l), MspI (20U/ μ l), aTaq I (20U/ μ l), AluI (10U/ μ l), Tsp509 (10U/ μ l) [New England BioLabs]

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Κλίβανος

Εξοπλισμός για την Ηλεκτροφόρηση των RFLP σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης

Υλικά Εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- Urea (Οουρία) [Merck]
- ddH₂O
- Acrylamide (ακρυλαμίδη) 99% [SIGMA]
- Bis-acrylamide [SIGMA]
- TBE 10X

- TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99% [SIGMA]
- APS 20% w/v
- Loading buffer
- Ακολουθίες DNA γνωστών μοριακών βαρών (Marker) των 25 & 100 bp [Bioline]

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

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

Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας (Yellow line)
- Συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης (και τροφοδοτικό) /
[Scie Plus U2-DC (Hoefler)]

Εξοπλισμός για την Εμφάνιση (Χρώση) των αποτελεσμάτων σε Πηκτή

Πολυακρυλαμίδης

Υλικά Εργαστηρίου

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

Αντιδραστήρια

- ddH₂O
- EtOH 100 %
- Acetic acid (Οξικό οξύ) 99% [Riedel-de Haen]
- Νιτρικός άργυρος (AgNO₃) 99.9% [sds]
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) 99% [Riedel-de Haen]

- Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄)
- Φορμαλδεΰδη (Formaldehyde) 37% [SIGMA]

Συσκευές

- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης – Ανακινούμενη πλάκα
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή προβολής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή [Sony Cybershot]

Επίσης για την θεωρητική ανάπτυξη του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής: BioEdit, REBsites^[49] και η ηλεκτρονική βάση δεδομένων GenBank^[48].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγματα

Πρόκειται για μυϊκό ιστό που συλλέχθηκε από (ωμό ή επεξεργασμένο) κρέας πουλερικών, το οποίο κυκλοφορεί στα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής της Λάρισας. Πιο συγκεκριμένα τα ωμά δείγματα προήλθαν από 10 είδη πουλερικών εκτροφής ή θήρευσης όπως: κοτόπουλο, γαλοπούλα, ορτύκι, πάπια, χήνα, στρουθοκάμηλος, πέρδικα, φασιανός, μπεκάτσα, τσίχλα. Τα επεξεργασμένα προήλθαν από μαγειρεμένο κρέας ορισμένων από τα παραπάνω είδη πτηνών αλλά και από βιομηχανικά προϊόντα όπως μπιφτέκια κοτόπουλου, κροκέτες κοτόπουλου, γύρος κοτόπουλου, παριζάκι κοτόπουλου, παριζάκι γαλοπούλας, σνίτσελ γαλοπούλας και λουκάνικα στρουθοκάμηλου. Τα παραπάνω αποτελούν 40 δείγματα ιστού (Πίνακας 2) η συντήρηση των οποίων έγινε στους -20°C.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και 3 δείγματα ιστού από πρόβατο, χοίρο και μοσχάρι, είδη από τα οποία προέρχεται η μεγαλύτερη ποσότητα βρωσίμου κόκκινου κρέατος. Σκοπός της ανάλυσης τους ήταν ο εντοπισμός, δια της μεθόδου που αναπτύξαμε, πιθανών προσμίξεων του κρέατος πουλερικών, με κρέας προερχόμενου από τα αναφερόμενα είδη θηλαστικών, σε εμπορικά προϊόντα τροφίμων.

Ανάπτυξη Μεθόδου

Η μέθοδος που εξ αρχής αποφασίσαμε να εξετάσουμε ήταν αυτή της PCR-RFLP με εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτική πολυακρυλαμίδης. Η πηκτική

πολυακρυλαμίδης αν και πιο χρονοβόρα της αντίστοιχης με αγαρόζη, επιλέχτηκε λόγω της μεγάλης διακριτικής ικανότητας που εμφανίζει, δηλαδή εξαιτίας της δυνατότητας να διαχωρίζει πολύ μικρά τμήματα DNA και τα αποτελέσματα της να παρουσιάζονται με ευδιάκριτο τρόπο.

Αρχικά δοκιμάστηκαν 2 διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης (εξαγωγής) mtDNA από μυϊκό ιστό, εκ των οποίων παρακάτω αναλύεται μόνον η επιλεγείσα. Μετά τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο του DNA πειραματιστήκαμε πάνω σε 2 μιτοχονδριακά γονίδια τα: Cyt b και 12S rRNA τμήμα των οποίων πολλαπλασιάσαμε με την τεχνική PCR και στην συνέχεια τα πέψαμε («κόψαμε») με 13 διαφορετικά ένζυμα περιορισμού τα οποία αναφέρονται πιο πάνω. Οι συνδυασμοί (γονίδιο-ένζυμο) που έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα επαναληφθήκαν τουλάχιστον άλλες 2 φορές ώστε να ελέγξουμε τα αποτελέσματα ως προς την επαναληψιμότητα τους (τριπλή επαναληψιμότητα).

Πριν από κάθε πέψη, προβάλαμε σε θεωρητικό επίπεδο τα αποτελέσματα αυτής, με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Δηλαδή, πραγματοποιήσαμε ανάλυση αλληλουχιών DNA επιθυμητών τμημάτων για το κάθε πουλερικό, με το πρόγραμμα BioEdit και στην συνέχεια εικονικές πέψεις με το πρόγραμμα REBsites. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται σε καταχωρημένες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στην βάση δεδομένων GenBank.

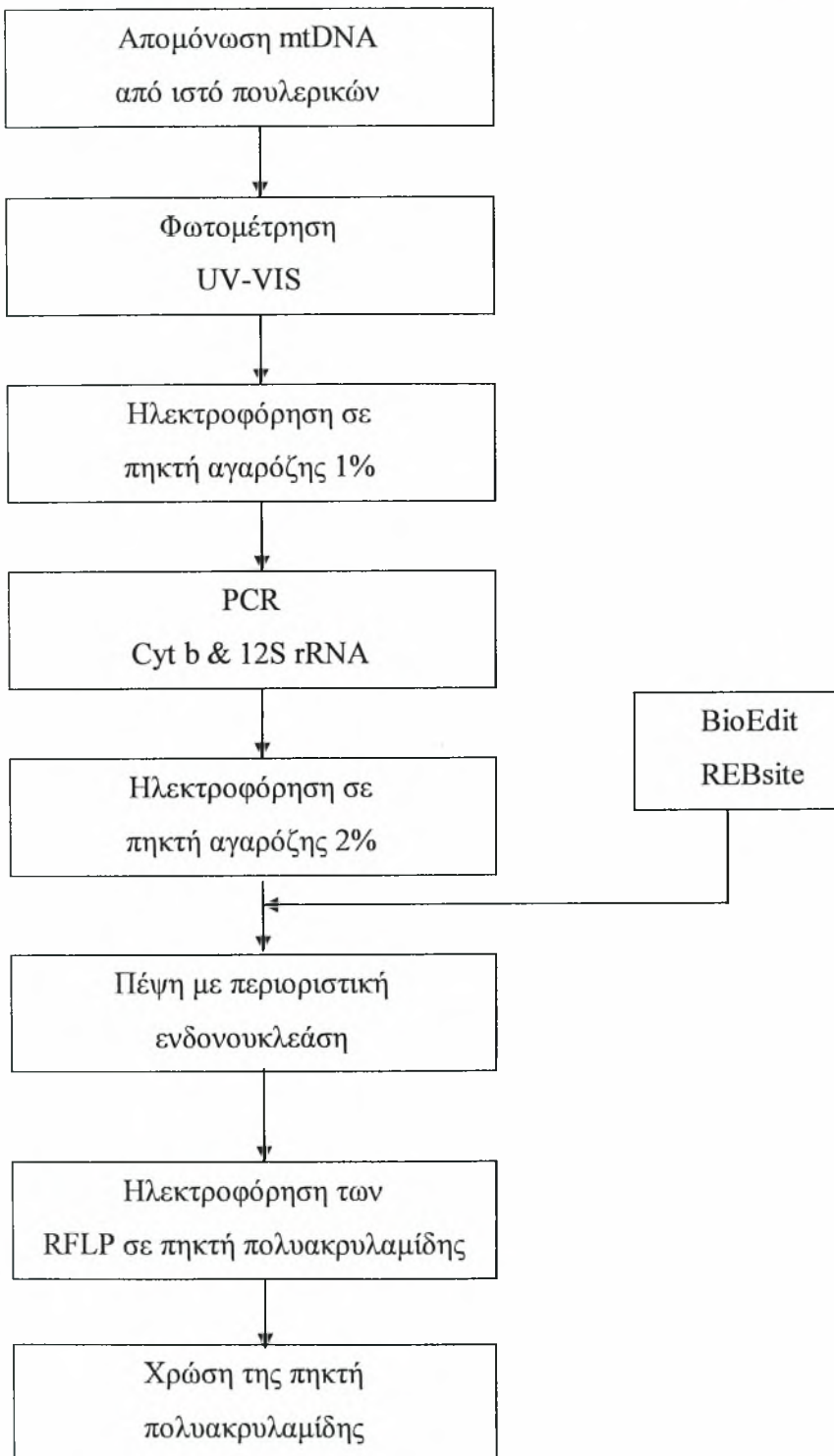
Πρέπει να επισημάνουμε ότι, αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε πέψεις στα δείγματα μας και με ένζυμα τα οποία δεν έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε θεωρητικό επίπεδο διότι υπάρχει η πιθανότητα η αλληλουχία που χρησιμοποιήσαμε να μην συμφωνεί απόλυτα με αυτή του είδους που εξετάζουμε: α) λόγω εσωτερικού πολυμορφισμού μεταξύ των ειδών ή β) λόγω της μειωμένης αξιοπιστία των αλληλουχιών DNA, οι οποίες πολλές φορές καταχωρούνται στις βάσεις δεδομένων με αρκετά λάθη.

Στην περίπτωση του Cyt b πραγματοποιήθηκαν πέψεις και με συνδυασμό δύο περιοριστικών ενζύμων μαζί.

Επίσης, χρησιμοποιήσαμε universal primers (και όχι species specific primers) διότι η επιδίωξη μας είναι η απλοποίηση της όλης διαδικασίας διαχωρισμού.

Παρακάτω παρουσιάζεται διαγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήσαμε:

Διάγραμμα 1: Απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήσαμε στην συγκεκριμένη μελέτη.



Απομόνωση Μιτοχονδριακού DNA από Ιστό Πουλερικών

Για την εξαγωγή του mtDNA χρησιμοποιήθηκαν από το κάθε δείγμα 50-100mg ιστού και ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία:

1. Τεμαχίζουμε και τοποθετούμε τον ιστό σε φιαλίδια erpendorf των 2ml.
2. Προσθέτουμε 700μl TNES-Urea Buffer και 10μl proteinase K (10mg/ml) – αναδεύουμε έντονα στο vortex.
3. Τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 55°C για 1h. Ταυτόχρονα τα δείγματα περιστρέφονται αφού πρώτα τα έχουμε τοποθετήσει στον κυκλικό αναδευτήρα.
4. Προσθέτουμε 350μl φαινόλη και 350μl χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη (24V:1V) και αναδεύουμε τα δείγματα στον κυκλικό αναδευτήρα (εκτός κλιβάνου) για 10min.
5. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C.
6. Λαμβάνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και το τοποθετούμε σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2ml.
7. Επαναλαμβάνουμε μία ακόμα φορά την διαδικασία που αναφέρεται στα βήματα 4, 5 & 6.
8. Προσθέτουμε 700μl χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη (24V:1V), αναδεύουμε στον κυκλικό αναδευτήρα για 10min και στην συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C.
9. Λαμβάνουμε το υπερκείμενο με πολύ προσοχή και το μεταφέρουμε σε φιαλίδιο erpendorf του 1,5ml.
10. Προσθέτουμε 50μl NaOAc και 1ml παγωμένη απόλυτη αιθανόλη-ανακινούμε ελαφρά και τα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20°C για 20min.
11. Στην περίπτωση όπου μετά την κατάψυξη εμφανίζονται πελέτες DNA καλό είναι να τις λάβουμε και να τις τοποθετήσουμε σε νέο φιαλίδιο. Αν κάτι τέτοιο δεν συμβεί, φυγοκεντρούμε (13000rpm για 10min στους 4°C), απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml παγωμένη αιθανόλη 70% και φυγοκεντρούμε παρομοίως.
12. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας παράλληλα να μην χάσουμε το ίζημα που έχει σχηματιστεί.
13. Στεγνώνουμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37°C για 1h.
14. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl αποστειρωμένο ddH₂O.

15. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

Η διάρκεια της απομόνωσης, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων και των δεξιοτήτων του ερευνητή, είναι περίπου 5 έως 5^{1/2} ώρες και πρόκειται για την πιο χρονοβόρο φάση της όλης διαδικασίας διαχωρισμού που εφαρμόσαμε.

Όσον αφορά τον ρόλο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο ισχύουν τα εξής: Το NaCl (που περιέχεται στο TNES-Urea Buffer) ρυθμίζει την οσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε pH 7.5 το οποίο ρυθμίζεται από το Tris-HCl. Ο ρόλος του χηλικού παράγοντα EDTA είναι η δέσμευση των ιόντων Ca⁺⁺ και Mg⁺⁺ τα οποία συμβάλουν στην δράση των νουκλεασών. Το SDS, το οποίο είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό, συμβάλει στην διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνάση K πέπτει τις πρωτεΐνες. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλει επίσης στην μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA στην αιθανόλη οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στον συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη.

Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός εξαγόμενου DNA

Φωτομέτρηση

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA υπολογίζεται μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 260nm και 280nm με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-Vis. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά την αραιώση 1μl δείγματος απομονωμένου DNA σε 49μl ddH₂O.

Η τιμή της απορρόφησης στα 260nm (OD260) αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του DNA στο δείγμα. Η τιμή της απορρόφησης στα 280nm (OD280) μετράει την ποσότητα πρωτεϊνών (μη επιθυμητές) στο δείγμα. Ο λόγος OD260/OD280 αποτελεί

δείκτη καθαρότητας του απομονωμένου DNA και πρέπει να έχει τιμές μεταξύ 1,80 – 2,00. Στην περίπτωση που είναι αισθητά μικρότερος το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεΐνες ή φαινόλη και η μέτρηση του DNA δεν είναι ακριβής.

Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη διαδικασία έδινε ένδειξη της απορρόφησης και στα 230nm (OD230). Υψηλές τιμές OD230 αποδεικνύουν ότι στο δείγμα υπάρχουν οργανικά υπολείμματα ή άλατα. Ο λόγος OD260/OD230 πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5.

Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης

Πρόκειται για την ευκολότερη μέθοδο διαχωρισμού και ελέγχου του DNA. Στηρίζεται στον καταμερισμό των νουκλεϊνικών οξέων, ανάλογα του μεγέθους τους, καθώς αυτά αρνητικά φορτισμένα, κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας της απομόνωσης αλλά και των προϊόντων που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της τεχνικής PCR. Στην πρώτη περίπτωση η εικόνα μας δίνει πληροφορίες για την ακεραιότητα ή τον κατακερματισμό του απομονωμένου DNA αλλά επίσης και για την ποσότητα η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται. Όσον αφορά το PCR προϊόν, εκτός από την οπτικοποίηση της ποσότητας του, πληροφορούμαστε και για το μέγεθος του χρησιμοποιώντας marker αλλά και για την καθαρότητα του σε περίπτωση που υπάρχει επιμόλυνση (μη επιθυμητά τμήματα DNA που ενισχύθηκαν κατά την PCR).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Εντός κωνικής φιάλης των 100ml ζυγίζουμε 0,6g αγαρόζης και προσθέτουμε 30ml διάλυμα TAE 1X. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε πηκτής αγαρόζης 2%.
2. Βράζουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων και ανακινούμε ανά διαστήματα, ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Αφήνουμε το περιεχόμενο να κρυώσει μέχρι την θερμοκρασία των 50°C και προσθέτουμε 3ml EtBr.
4. Προετοιμάζουμε το εκμαγείο στο οποίο θα σχηματιστή η πηκτή και τοποθετούμε το εξάρτημα («χτένα») που θα σχηματίσει τις θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το δείγμα («πηγάδια»).

5. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης, πριν αυτό στερεοποιηθεί, στο εκμαγείο και με την βοήθεια πλαστικού tip απομακρύνουμε τις φουσαλλίδες που πιθανώς έχουν δημιουργηθεί.
6. Περιμένουμε να πήξει η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρούμε τη χτένα και τοποθετούμε την πηκτή στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.
8. Γεμίζουμε την συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή.
9. Προετοιμάζουμε τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση:
 - Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 2μl DNA.
 - Στην περίπτωση ελέγχου της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA (PCR προϊόν). Χρησιμοποιούμε DNA marker για την εύρεση του μεγέθους του προϊόντος.
10. Τοποθετούμε («φορτώνουμε») τα δείγματα με μικροπιπέττα σε κάθε ένα από τα πηγάδια.
11. Εφαρμόζουμε σταθερή τάση 5V/cm.
12. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε την πηκτή πάνω από τη συσκευή υπεριώδους φωτός και την φωτογραφίζουμε (τήρηση αρχείων).

Το διάλυμα πλήρωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης που εξυπηρετεί ως δείκτης παρακολούθησης του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, γλυκερόλη για την καθίζηση των δειγμάτων στα πηγάδια και EDTA για την δέσμευση των κατιόντων και την παύση οποιασδήποτε ενζυμικής δραστηριότητας.

Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων DNA. Έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα DNA που δέσμευσε BrEt. Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση ρυθμίζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα.

Ενίσχυση Επιθυμητών Τμημάτων mtDNA με την Μέθοδο PCR.

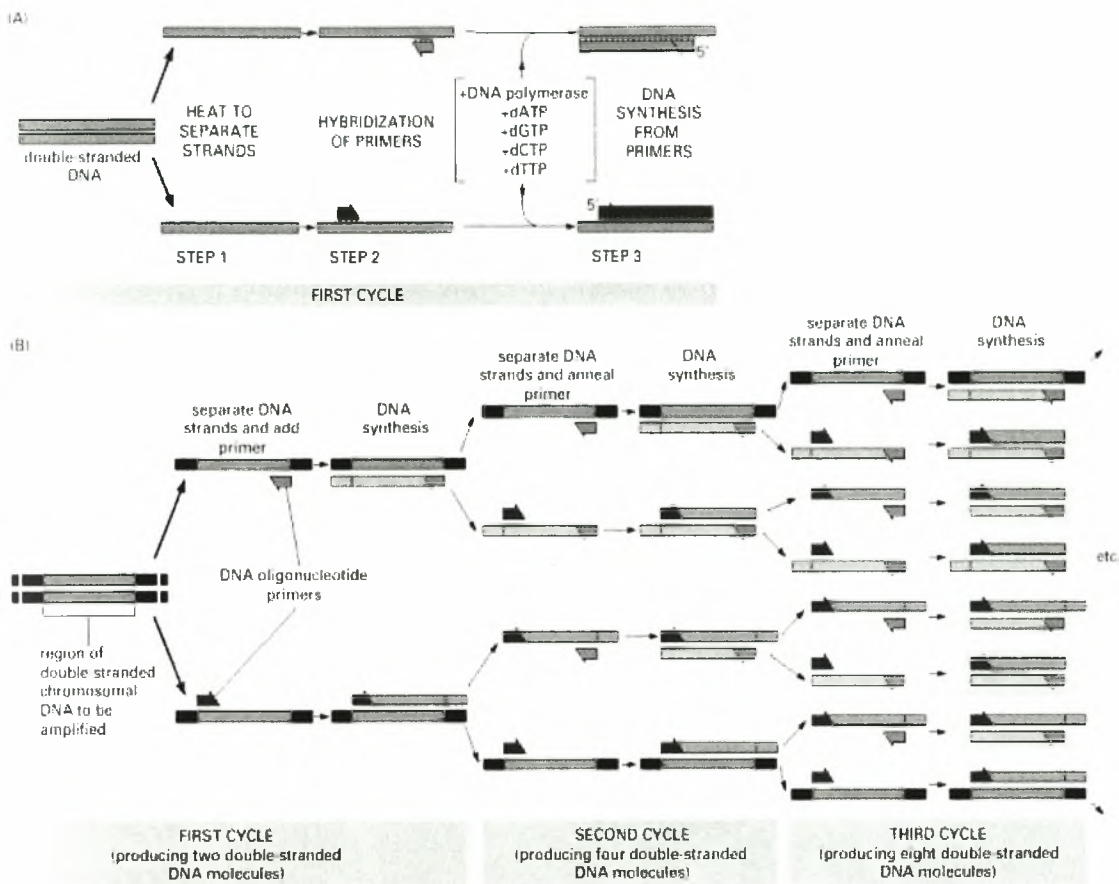
Αρχή της Μεθόδου και Γενικά Χαρακτηριστικά.^[30]

Με την PCR (Polymerase Chain Reaction - Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης) επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, “in vitro”. Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή

του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος.

Το DNA στόχος, επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η **μετουσίωση** του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο και επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95°C για 30 sec περίπου. Εν συνεχεία συνδέονται «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητές ή “primers” στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2ο στάδιο - **υβριδισμός**) και διεξάγεται ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία 50-65°C επί 1 min. Με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού (primer) και ο κλώνος επεκτείνεται (3ο στάδιο- **επιμήκυνση**). Η επέκταση των εκκινητών γίνεται στους 72-74°C επί 30sec έως 1 min ανάλογα του μεγέθους του προϊόντος της PCR και της ποιότητας της *Taq DNA* πολυμεράσης. Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιοι κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου ολοκληρώνοντας τον 1^ο κύκλο της αντίδρασης PCR. Οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA στόχου, 2ⁿ όπου n ο αριθμός των κύκλων.



Εικόνα 14: Απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, primers, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο *Taq DNA* πολυμεράση, ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα $pH \approx 8.2$ για τη δράση του ενζύμου.

Το ένζυμο *Taq DNA* είναι μια θερμοάντοχη DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus (Taq)* και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους $+95^{\circ}C$, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου, επί 40 τουλάχιστον λεπτά.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους **θερμοκυκλοποιητές**, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανεβοκατεβάζουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερομένων θερμοκρασιών, σε λιγότερο από 30 sec για αυξομείωση θερμοκρασίας $40^{\circ}C$.



Εικόνα 15
Θερμοκυκλοποιητής
Eppendorf – Mastercycler
epgradient S

Ενίσχυση Τμημάτων mtDNA από τα Γονίδια Cyt b & 12S rRNA

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου Cyt b ενισχύσαμε ένα τμήμα του, μεγέθους 376bp, με την βοήθεια της τεχνικής PCR, και για το γονίδιο 12S rRNA ένα τμήμα 485bp. [Στο εξής τα προϊόντα αυτά θα αναφέρονται απλά ως Cyt b και 12S rRNA.] Στην φάση αυτή, στοχεύοντας πάντα στην απλοποίηση της όλης μεθόδου ταυτοποίησης, χρησιμοποιήσαμε universal primers (Πίνακας 2) οι οποίοι μπορούν να δώσουν PCR προϊόν για πολλά διαφορετικά είδη.

Πίνακας 2: Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA από τα γονίδια Cyt b και 12S rRNA.

Εκκινητές για το Cyt b	Αλληλουχία ^[26]
L 14841	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'
H 15149	5'-CTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

Εκκινητές για το 12S rRNA	Αλληλουχία ^[26]
L 1091	5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'
H 1478	5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGGCGGTGTGT-3'

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1. Τοποθετούμε, σε φιαλίδια eppendorf των 200μl, 1μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης). Αυτό αντιστοιχεί σε ποσότητα DNA 200 – 700ng /μl.
2. Ανάλογα του αριθμού των δειγμάτων παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα (master mix) η σύσταση του οποίου περιέχει τις ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα:

Master Mix: 38,8μl αποστειρωμένο ddH₂O + 5μl Buffer 10X + 2μl MgCl₂ (50mM) + 1μl dNTPs (10mM) + 1μl Primer Fw (50pmol/μl) + 1μl Primer Rv (50pmol/μl) + 0,2μl Taq DNA polymerase (5U/μl).

3. Μοιράζουμε, σε κάθε eppendorf που περιέχει δείγμα, από 49μl του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.
4. Κλείνουμε καλά το καπάκι του φιαλιδίου και πραγματοποιούμε μία σύντομη φυγοκέντρηση (spin).

5. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου:

Πίνακας 3: Το πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου της κάθε PCR αντίδρασης.

Στάδιο Αντίδρασης	PCR στο Cyt b		PCR στο 12S rRNA		Αριθμός κύκλων
	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	5min	95	5min	
Αποδιάταξη	95	40sec	95	40sec	35
Συγκόλληση Εκκινητών	58	40sec	58	40sec	
Επιμήκυνση	72	40sec	72	40sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	72	10min	
Παραμονή	4		4		

13. Ελέγχουμε την επιτυχία της διαδικασίας κάνοντας ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2% (όπως έχουμε αναφέρει).
14. Παρατηρούμε την πηκτή πάνω από τη συσκευή υπεριώδους φωτός και την φωτογραφίζουμε (τήρηση αρχείων).

Θεωρητικός Υπολογισμός RFLP

Πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με την βοήθεια εξειδικευμένων προγραμμάτων βιοπληροφορικής και αποτελεί έναν τρόπο ελέγχου της επιτυχίας ή όχι της πέψης των PCR προϊόντων με συγκεκριμένο ένζυμο, πριν ακόμα αυτή πραγματοποιηθεί. Αναλυτικότερα:

1. Για τον κάθε οργανισμό-δείγμα, βρίσκουμε την αλληλουχία DNA του γονιδίου που θα εξετάσουμε (Πίνακας 4). Αυτές οι αλληλουχίες βρίσκονται καταχωρημένες σε βάσεις δεδομένων όπως η GenBank^[48].

Είδος	Κωδικός Αλληλουχίας	
	Cyt b	12S rRNA
Όρνιθα	NC_007236	NC_001323
Γαλοπούλα	NC_010195	NC_010195
Πάπια	NC_009684	NC_009684
Χήνα	EU932689	NC_011196
Φασιανός	AY368054	AM902515
Πέρδικα	AM850717	AM944503
Μπεκάτσα	AF172384	AM902519
Ορτύκι	DQ515811	X57245
Τσίχλα	AY495411	AF484935
Στρουθοκάμηλος	NC_002785	NC_002785

Πίνακας 4: Αλληλουχίες mtDNA που χρησιμοποιήθηκαν.

2. Επεξεργαζόμαστε την αλληλουχία με το πρόγραμμα BioEdit ώστε να πάρουμε το τμήμα DNA που θα αποτελέσει το προϊόν PCR.
3. Την κάθε αλληλουχία την επεξεργαζόμαστε με το πρόγραμμα REBSites^[49]. Αυτή η εφαρμογή μας δίνει μία οπτική απεικόνιση της πέψης του δοσμένου DNA με έναν πολύ μεγάλο αριθμό γνωστών ενζύμων περιορισμού καθώς και πληροφορίες για το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού.

Πρόκειται για μέθοδο με την οποία μπορούμε να μειώσουμε: αισθητά i) τον χρόνο αναζήτησης του κατάλληλου ενζύμου, αφού πλέον η έρευνά μας είναι πιο στοχευμένη αλλά και ii) τα έξοδα από την άσκοπη σπατάλη αντιδραστηρίων.

Ανάλυση RFLP

Πέψη των Cytb & 12S rRNA με Ένζυμα Περιορισμού

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήσαμε πέψη των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν με 14 διαφορετικά ένζυμα περιορισμού (Πίνακας 5) ώστε να διαλέξουμε το καταλληλότερο από αυτά. Επίσης στην περίπτωση του Cyt b δοκιμάσαμε και ορισμένες πέψεις με συνδυασμό δύο ενζύμων.

Πίνακας 5 ^[38]: Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μας. Οι πλάγιες γραμμές δείχνουν τα σημεία τομής των ενζύμων. Το γράμμα N στην αλληλουχία αναγνώρισης δείχνει ότι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο μπορεί να βρίσκεται στη συγκεκριμένη θέση ενώ το W ότι στην θέση αυτή μπορεί να βρίσκεται A ή T.

Ένζυμο Περιορισμού	Πηγή	Αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'GG / CC 3'CC / GG
HinI	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'G/ANTC 3'CTNA/G
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'A/AGCTT 3'TTCGA/A
HhaI	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'GCG/C 3'C/GCG
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5'T/CGA 3'AGC/T
AciI	<i>Arthrobacter citreus</i>	5'C/CGC 3'GGC/G

AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AG/CT 3'TC/GA
MboI	<i>Moraxella bovis</i>	5'/GATC 3'CTAG/
AvaII	<i>Anabaena variabilis</i>	5'G/GWCC 3'CCWG/G
MseI	<i>Micrococcus species</i>	5'T/TAA 3'AAT/T
AseI	<i>Aquaspirillum serpens</i>	5'AT/TAAT 3'TAAT/TA
DdeI	<i>Desulfovibrio desulfuricans Norway strain</i>	5'C/TNAG 3'GANT/C
Tsp509	<i>Thermus species</i>	5'/AATT 3'TTAA/
RsaI	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'GT/AC 3'CA/TG

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Σε φιαλίδιο erppendorf των 500μl προσθέτουμε 2μl από το PCR προϊόν.
2. Ανάλογα του αριθμού δειγμάτων, παρασκευάζουμε σε ένα φιαλίδιο erppendorf το διάλυμα πέψης, η σύσταση του οποίου περιέχει τις εξής ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα:

Διάλυμα Πέψης: 5μl ddH₂O + 0,6μl από το αντίστοιχο **Buffer** του ενζύμου + 0,3μl ενζύμου (ποσότητα που αναφέρεται σε δραστικότητα 10U/μl)

3. Μοιράζουμε στο κάθε δείγμα 5,9μl από το διάλυμα πέψης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 7,9μl.
4. Επωάζουμε σε κλίβανο στην άριστη θερμοκρασία για την δράση του ενζύμου (συνήθως στους 37°C) για τουλάχιστον 3h (με καλύτερο την overnight επώαση).

Όπως έχουμε αναφέρει, στην περίπτωση του Cyt b πραγματοποιήσαμε και πέψεις με συνδυασμό ενζύμων όπως για παράδειγμα (AciI + DdeI, AciI + RsaI).

Ηλεκροφόρηση σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδης

Η αρχή της μεθόδου δεν διαφέρει από την ηλεκροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης μόνο που εδώ μιλάμε για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Πλεονέκτημα έναντι της αγαρόζης είναι ότι η πηκτή πολυακρυλαμίδης αναλόγως της πυκνότητας της έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα, τα αποτελέσματα του διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα και

η πηκτή μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Αρχικά παρασκευάζουμε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%:

1. Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής της πηκτής.
2. Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 8g ουρία + 16ml μητρικού διαλύματος ακρυλαμίδης 30% + 5ml TBE 10X. Αναδεύουμε σε οριζόντιο αναδευτήρα μέχρι πλήρους διάλυσης των συστατικών.
3. Διηθούμε το διάλυμα με διηθητικό χαρτί εντός ογκομετρικού κυλίνδρου των 100ml.
4. Συμπληρώνουμε με ddH₂O έως τα 50ml και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
5. Προσθέτουμε 50μl TEMED και 300μl APS 20% και γρήγορα, πριν πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα και πήξει, περιχύνουμε το διάλυμα στην συσκευή παρασκευής της πηκτής.
6. Τοποθετούμε τη χτένα για την δημιουργία των πηγαδιών και περιμένουμε περίπου 45min ώστε η πηκτή να είναι έτοιμη προς ηλεκτροφόρηση.

Στην συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που έχουμε πέψει:

7. Τοποθετούμε στην συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης μία μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X (προέρχεται από αραιώση 1:10 του TBE 10X).
8. Τοποθετούμε την πηκτή πάνω στην συσκευή (αφού πρώτα της έχουμε αφαιρέσει την χτένα) και προσθέτουμε TBE 1X.
9. Προετοιμάζουμε τα δείγματα αναμιγνύοντας 4μl loading buffer με όλη την ποσότητα του διαλύματος που βρίσκεται στο eppendorf.
10. Φορτάνουμε τα δείγματα στην πηκτή. Στην πρώτη θέση τοποθετούμε marker των 100bp, στην μεσαία marker των 25bp και στην τελευταία 2μl από αντίστοιχο PCR προϊόν, χωρίς ένζυμο περιορισμού.
11. Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση με σταθερή τάση 200 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 2,5 ώρες.

Χρώση των Πηκτών Πολυακρυλαμίδης με Νιτρικό Αργυρο (Silver Staining)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στην συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο.

Η χρώση πραγματοποιείται σε πλάκα ανάδευσης και απαιτούνται 3 διαλύματα:

Διάλυμα 1 (400ml): 8ml EtOH + 0.5ml Acetic acid + ddH₂O έως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml): διάλυμα AgNO₃ 1g/lit

Διάλυμα 3 (200ml): 3g NaOH + 0.01g NaBH + 1ml Formaldehyde + ddH₂O έως τα 200ml

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη και πραγματοποιείται υπό ανάδευση:

1. Εμβαπτίζουμε την πηκτή σε 200ml Διαλύματος 1 για 3min.
2. Απομακρύνουμε το διάλυμα με την αντλία κενού.
3. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 1 & 2.
4. Ξεπλένουμε μία φορά με ddH₂O για 1min– απομακρύνουμε το νερό.
5. Προσθέτουμε το Διάλυμα 2 για 10-15min.
6. Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε 2 φορές με ddH₂O για 1min.
7. Απομακρύνουμε το νερό και προσθέτουμε το Διάλυμα 3 έως να εμφανιστούν ευκρινώς οι ζωνώσεις των RFLP.
8. Παρατηρούμε την πηκτή πάνω συσκευή προβολής και την φωτογραφίζουμε (τήρηση αρχείων).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε στην συγκεκριμένη μελέτη είναι τα ακόλουθα:

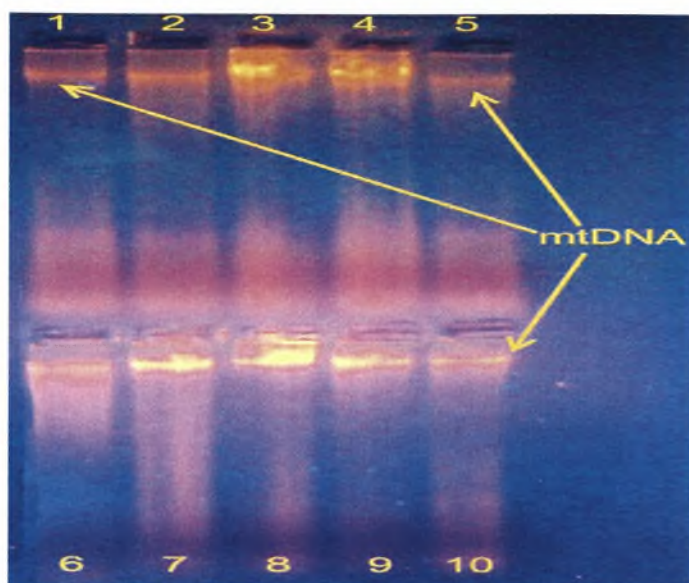
Πίνακας 6: Τα 40 δείγματα νωπού ή κατεργασμένου κρέατος πουλερικών τα οποία αναλύθηκαν.

<u>Νωπά Δείγματα</u>	<u>Κατεργασμένα Δείγματα</u>
ορτύκι 1 ορτύκι 2 ορτύκι 3 ορτύκι Ελλ 1 ορτύκι Ελλ 2	ορτύκι ψητό 1 ορτύκι ψητό 2 ορτύκι ψητό 3
στρουθοκάμηλος 1	λουκάνικο στρουθοκάμηλου 1 τηγανητό
στρουθοκάμηλος 2	λουκάνικο στρουθοκάμηλου 2 τηγανητό
στρουθοκάμηλος 3	λουκάνικο στρουθοκάμηλου 3 τηγανητό
κοτόπουλο 1 κοτόπουλο 2 κοτόπουλο χωριάτικο κοτοκροκέτες μπιφτέκι κοτόπουλο	κοτόπουλο ψητό παριζάκι κοτόπουλου γύρος κοτόπουλου κοτοκροκέτα τηγανητή μπιφτέκι κοτόπουλου ψητό
πάπια	πάπια βραστή
φασιανός	φασιανός βραστός
φιλέτο γαλοπούλας 1 φιλέτο γαλοπούλας 2	σνίτσελ γαλοπούλας παριζάκι γαλοπούλας 1 παριζάκι γαλοπούλας 2 ρολό γαλοπούλας
χήνα	
πέρδικα 1 πέρδικα 2	
μπεκάτσα	
τσίχλα 1 τσίχλα 2	

Επίσης χρησιμοποιήθηκε και δείγμα από νωπό κρέας χοίρου, μοσχαριού και προβάτου.

Με την διαδικασία απομόνωσης DNA που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο λάβαμε, μετά από φωτομέτρηση, αρκετά μεγάλες ποσότητες DNA που κυμάνθηκαν από 200 έως και 800 ng/μl. Το υλικό αυτό ήταν αρκετά καθαρό (απαλλαγμένο από πρωτεΐνες) και ικανό να δώσει ικανοποιητικά PCR προϊόντα. Ο

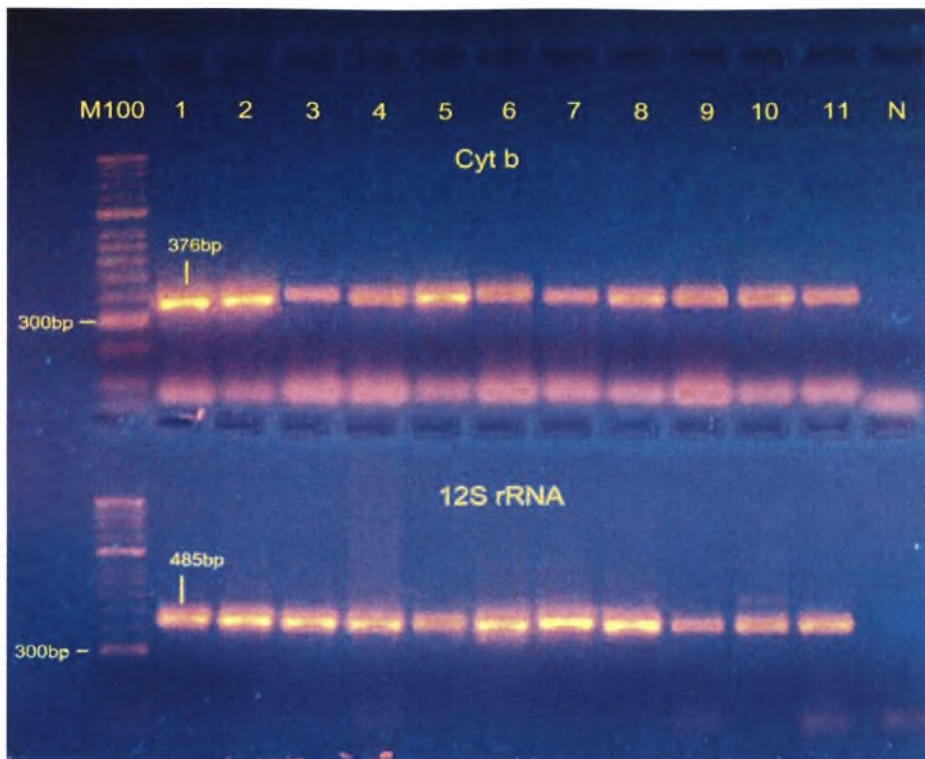
ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έγινε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης.



Εικόνα 16: Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης (1%) του DNA που απομονώθηκε από δείγματα κρέατος. 1: Κοτόπουλο, 2: Γαλοπούλα, 3: Πάπια, 4: Χήνα, 5: Φασιανός, 6: Πέρδικα, 7: Μπेκάτσα, 8: Τσίχλα, 9):Ορτύκι, 10: Στρουθοκάμηλος.

Στην Εικόνα 16 η ζώνες που υποδεικνύονται με βέλος εκπροσωπούν το μιτοχονδριακό DNA που προέκυψε μετά την απομόνωση. Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος της κάθε ζώνης αποτελούν κατά προσέγγιση ένδειξη της ποσότητας του DNA.

Με την τεχνική PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα 376bp του γονιδίου Cyt b και τμήμα 485bp για το γονίδιο 12S rRNA. Τα μόνα δείγματα που δεν καταφέραμε να ενισχύσουμε, για λόγους που θα αναφέρουμε στο κεφάλαιο της συζήτησης, ήταν από τυποποιημένα τρόφιμα και πιο συγκεκριμένα το παριζάκι κοτόπουλου και τα παριζάκια γαλοπούλας στην περίπτωση του 12S rRNA. Η επόμενη εικόνα είναι ενδεικτική της εμφάνισης των PCR προϊόντων σε πηκτή αгарόζης 2%.



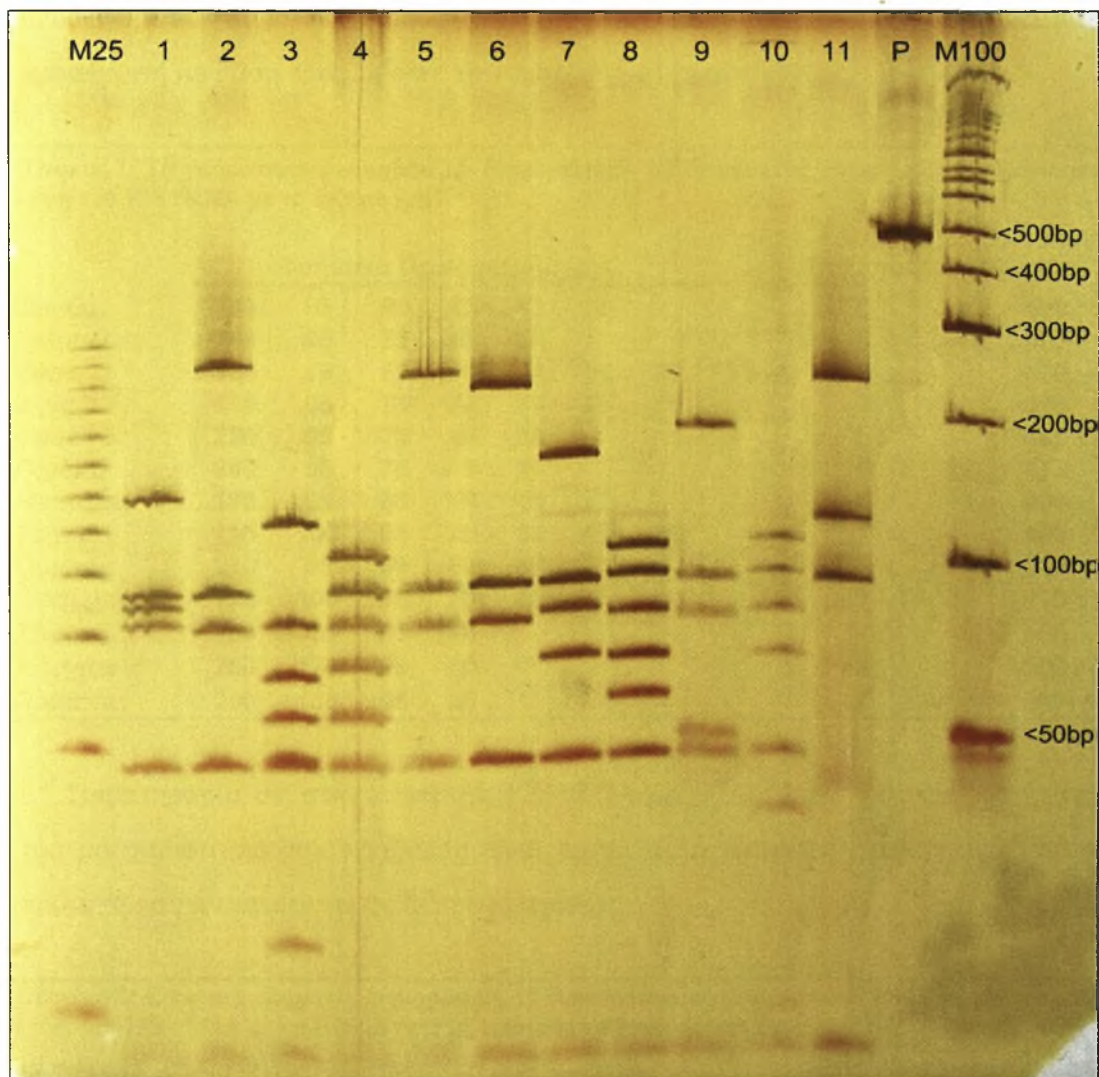
Εικόνα 17: PCR προϊόντα των γονιδίων Cyt b & 12S rRNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%. M100: Ladder 100bp, 1: Κοτόπουλο, 2: Γαλοπούλα, 3: Πάπια, 4: Χήνα, 5: Φασιανός, 6: Πέρδικα, 7: Μπεκάτσα, 8: Τσίγλα, 9):Ορτύκι, 10: Στρουθοκάμηλος, 11) Χοιρινό, N: Αρνητικός μάρτυρας.

Τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα από την εφαρμογή των RFLP, τα λάβαμε μετά την πέψη των γονιδίων (Cyt b & 12S rRNA) με το ένζυμο περιορισμού *Acil*. Για τον λόγο αυτό τα αποτελέσματα που θα παρουσιάσουμε παρακάτω αναφέρονται στις δύο αυτές περιπτώσεις με μία εξαίρεση που αναφέρεται στον συνδυασμό του Cytb με τα *HaeIII* και *HinfI*.

Τα υπόλοιπα 13 ένζυμα δεν κριθήκαν κατάλληλα διότι: α) είτε δεν έδωσαν καθόλου τμήματα περιορισμού αφού δεν αναγνώρισαν θέσεις περιορισμού στις συγκεκριμένες αλληλουχίες των δειγμάτων μας, β) είτε έδωσαν τμήματα περιορισμού όμοια για όλα τα είδη πουλερικών, γ) είτε στην καλύτερη των περιπτώσεων τα τμήματα περιορισμού που πήραμε να οδηγούσαν σε ευδιάκριτο διαχωρισμό μόνο δύο ή τριών ειδών, όπως στην περίπτωση της πέψης του Cyt b με *HinfI* και *HaeIII*. Τα είδη που διαχωρίζονταν συνήθως ήταν η όρνιθα και η γαλοπούλα.

Μετά την πέψη του 12S rRNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Acil* ακολούθησε η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης όπως φαίνεται στις εικόνες 18 και 19. Η συγκεκριμένη εφαρμογή αποδείχθηκε πολύ επιτυχής, αφού κατάφερε να διαχωρίσει στο νωπό κρέας και τα 10 είδη πουλερικών

με τα οποία ασχοληθήκαμε. Από τα επεξεργασμένα τρόφιμα δεν διαχώρισε τα παριζάκια αφού δεν καταφέραμε να πάρουμε PCR προϊόν όπως έχει αναφερθεί. Επιτυχία είχε και στο μαγειρεμένο κρέας το οποίο έδωσε ίδιες ζωνώσεις με το νωπό. Επίσης η μέθοδος αυτή εντόπισε στην περίπτωση του λουκάνικου από στρουθοκάμηλο πρόσμιξη με άλλο είδος κρέατος με πιο πιθανά το χοιρινό ή μοσχάρι (Εικόνα 20).



Εικόνα 18: Ενδεικτικά αποτελέσματα πέψης του 12S rRNA 11 διαφορετικών ειδών κρέατος με το ένζυμο AclI, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. M25: Ladder 25bp, 1: Κοτόπουλο, 2: Γαλοπούλα, 3: Πάπια, 4: Χήνα, 5: Φασιανός, 6: Πέρδικα, 7: Μπεκάτσα, 8: Τσίγλα, 9: Ορτύκι, 10: Στρουθοκάμηλος, 11: Χοίρος, P: PCR προϊόν, M100: Ladder 100bp.

Στην εικόνα διακρίνονται καθαρά τα πρότυπα (οι ζωνώσεις) που πήραμε για το κάθε είδος πτηνού. Τα τμήματα περιορισμού (τμήματα DNA) του κάθε είδους όπως προέκυψαν μετά την πέψη εμφανίζονται στον Πίνακα 7, ενώ στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αναμενόμενα τμήματα που θα έπρεπε να προκύψουν μετά από

εικονική πέψη που πραγματοποιήσαμε με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Εδώ θα πρέπει να διευκρινίσουμε ότι, στα RFLP είναι δύσκολο να προσδιοριστεί επακριβώς το μέγεθος του κάθε τμήματος περιορισμού. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την διαδικασία της αλληλούχησης των τμημάτων αυτών. Στα RFLP μας ενδιαφέρει πρωταρχικώς να παίρνουμε από την πέψη διαφορετικά αποτυπώματα για το κάθε είδος και στην συνέχεια το μέγεθος υπολογίζεται κατά προσέγγιση με βάση τους ladders που έχουμε χρησιμοποιήσει.

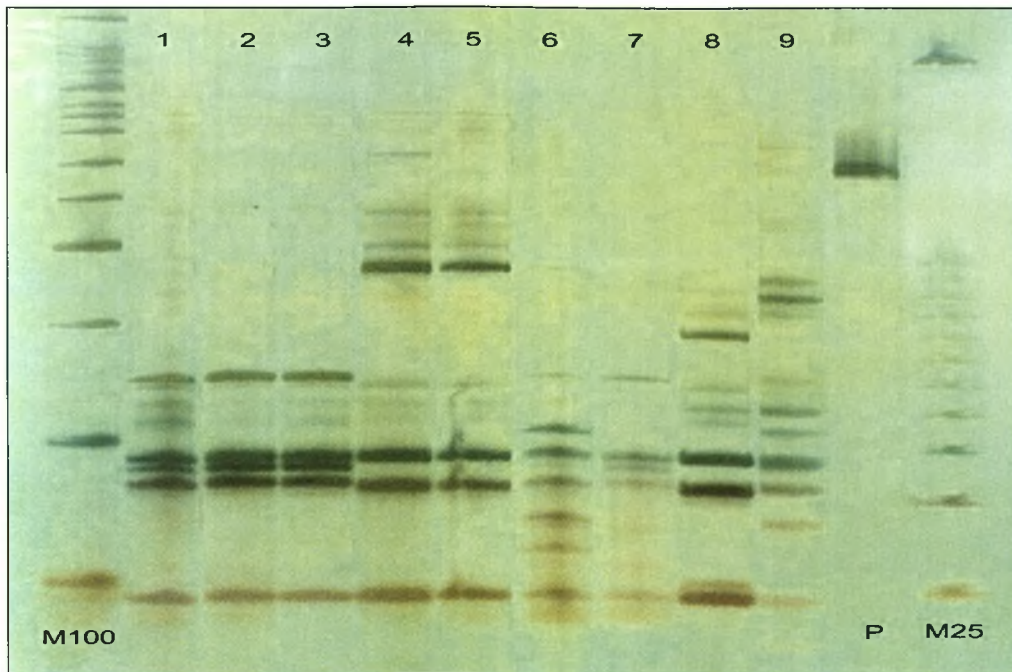
Πίνακας 7: Τα τμήματα περιορισμού 13 διαφορετικών ειδών κρέατος όπως προέκυψε μετά από πέψη του 12S rRNA με το ένζυμο AciI.

	Τμήματα Περιορισμού (bp)								Αριθμός Τμημάτων	Άθροισμα Τμημάτων
	150	95	90	80	45	20				
Όρνιθα	150	95	90	80	45	20			6	480
Γαλοπούλα	260	95	75	45	20				5	495
Πάπια	130	75	65	60	45	45	30	20	8	470
Χήνα	110	95	75	70	60	45	20		7	475
Φασιανός	250	95	75	45	20				5	485
Πέρδικα	240	95	75	45	20				5	475
Μπρεκάτσα	175	95	85	70	45	20			6	490
Τσίχλα	115	100	85	70	60	45	20		7	495
Ορτύκι	210	95	80	50	45	20			6	500
Στρίμυλος	125	100	90	70	45	40	20		7	490
Χοίρος	250	135	95	20					4	500
Μοσχάρι	250	135	95	20					4	500
Πρόβατο	250	135	95	20					4	500

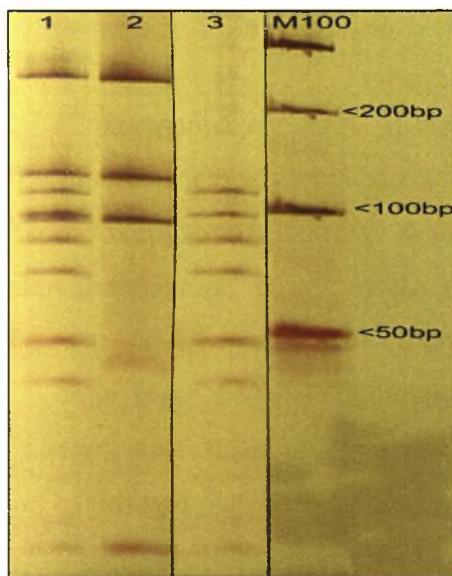
Παρατηρούμε ότι στην πέψη του 12S rRNA με το Aci I, τα πρότυπα του χοίρου, του μοσχαριού και του προβάτου είναι όμοια αλλά εμφανώς διαφορετικά από τα πρότυπα που αντιστοιχούν σε είδη πουλερικών.

Πίνακας 8: Εικονικά τμήματα περιορισμού 10 διαφορετικών ειδών κρέατος πουλερικών μετά από πέψη του 12S rRNA με το ένζυμο AciI με πρόγραμμα βιοπληροφορικής.

	Τμήματα Περιορισμού (bp)								Αριθμός Τμημάτων	Άθροισμα Τμημάτων
	145	89	83	76	46	25				
Όρνιθα	145	89	83	76	46	25			5	464
Γαλοπούλα	229	89	56	49	46				5	469
Πάπια	122	71	62	54	47	46	39	28	8	469
Χήνα	104	89	75	64	54	46	25		7	457
Φασιανός	228	89	74	46	25				5	463
Πέρδικα	224	89	74	46	26				5	459
Μπρεκάτσα	166	90	77	65	46	24			6	468
Τσίχλα	103	91	58	56	46	41			6	393
Ορτύκι	172	89	72	48	46	40			6	467
Στρίμυλος	105	88	68	64	46	43	39	14	8	467



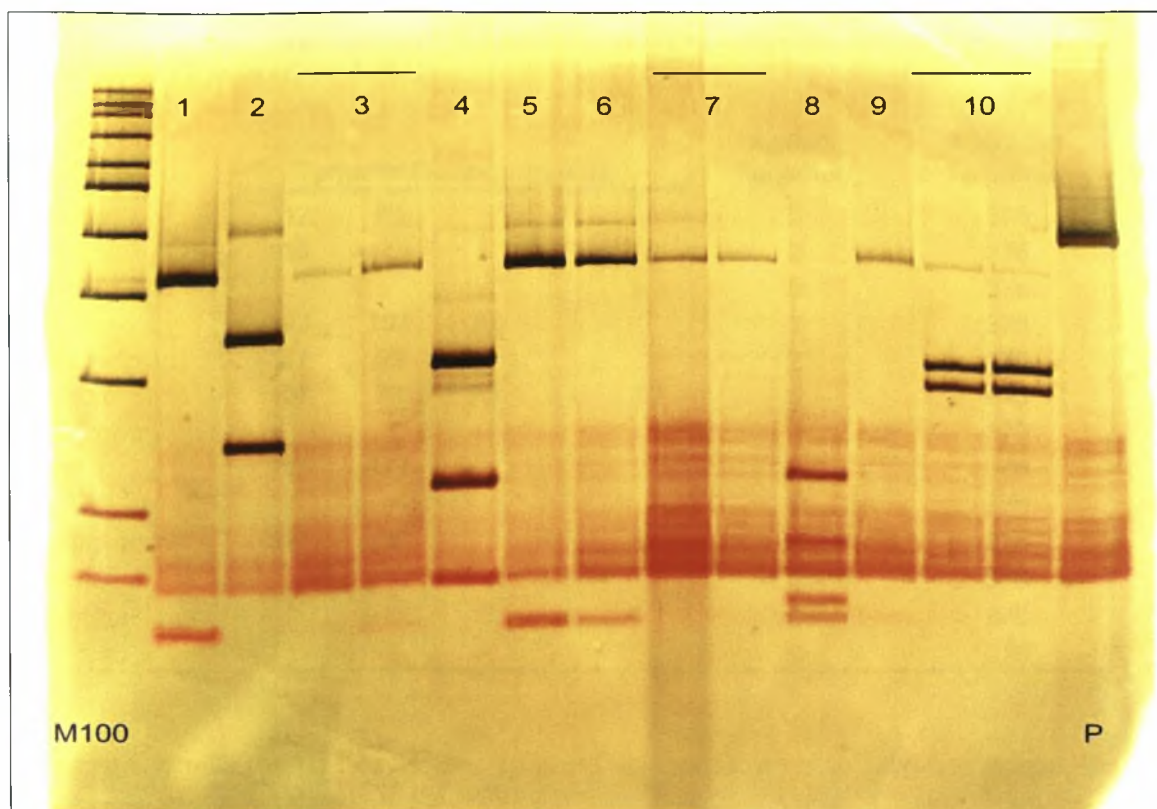
Εικόνα 19: Πέψη του 12S rRNA ορισμένων κατεργασμένων προϊόντων πουλερικών με το ένζυμο AciI. M100: Ladder 100bp, 1: Κοτόπουλο ψητό, 2: Μπιφτέκι κοτόπουλου, 3: Γύρος κοτόπουλου, 4: Σνίτσελ γαλοπούλας, 5: Ρολό γαλοπούλας, 6: Πάπια βραστή, 7: Φασιανός βραστός, 8: Ορτύκι ψητό, 9: Λουκάνικο στρουθοκάμηλου τηγανητό, P: PCR προϊόν, M25: Ladder 25bp.



Εικόνα 20: RFLP του 12S rRNA μετά από πέψη με το ένζυμο AciI των δειγμάτων: 1) Λουκάνικο στρουθοκάμηλου, 2) Χοιρινό νωπό, 3) Στρουθοκάμηλος, M100: Ladder 100bp.

Παρατηρούμε ότι στο λουκάνικο στρουθοκάμηλου (πρότυπο 1) εμπεριέχονται τα πρότυπα 2 & 3 που ανήκουν αντίστοιχα, σε νωπό κρέας ενός από τα θηλαστικά που αναλύθηκαν και στρουθοκάμηλο. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο συγκεκριμένο προϊόν έχει γίνει πρόσμιξη κρεάτων.

Μετά την πέψη του Cyt b με την περιοριστική ενδονουκλεάση AciI ακολούθησε η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης όπως φαίνεται στις εικόνες 21 και 22.



Εικόνα 21: Ενδεικτικά αποτελέσματα πέψης του Cyt b, 10 διαφορετικών ειδών κρέατος με το ένζυμο AclI. M100: Ladder 100bp, 1: Κοτόπουλο, 2: Γαλοπούλα, 3: Πάπια, 4: Χήνα, 5: Φασιανός, 6: Στρουθοκάμηλος, 7: Ορτύκι, 8: Πέρδικα, 9): Μπεκάτσα, 10: Τσίχλα, P: PCR προϊόν.

Παρατηρούμε ότι αυτή η εφαρμογή δίνει 5 διαφορετικά πρότυπα. Το πρώτο (δείγμα 1 – νωπό κοτόπουλο) είναι όμοιο με τα αποτυπώματα του φασιανού και της στρουθοκάμηλου (δείγματα 5 & 6) οπότε δεν μπορούμε να διαχωρίσουμε αυτά τα 3 είδη μεταξύ τους. Η γαλοπούλα (2), η χήνα (4), η πέρδικα (8) και η τσίχλα (10) δώσανε διαφορετικά πρότυπα οπότε ο διαχωρισμός τους είναι επιτυχής.

Στην περίπτωση των τυποποιημένων-μαγειρεμένων προϊόντων (Εικόνα 22), τα δείγματα από κοτόπουλο (παριζάκι, μπιφτέκι και κροκέτα) έδωσαν ίδια πρότυπα με τα αντίστοιχα δείγματα νωπού κρέατος. Επίσης ίδιο πρότυπο πήραμε και στην περίπτωση της μαγειρεμένης γαλοπούλας (σνίτσελ και ρολό) αλλά όχι στα παριζάκια γαλοπούλας στα οποία αν και καταφέραμε να πάρουμε PCR προϊόντα, δεν έδωσαν τμήματα περιορισμού μετά την πέψη με το συγκεκριμένο ένζυμο.

Τα τμήματα περιορισμού του κάθε είδους όπως προέκυψαν μετά την πέψη εμφανίζονται στον Πίνακα 9, ενώ στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αναμενόμενα τμήματα DNA που θα έπρεπε να προκύψουν μετά από εικονική πέψη που πραγματοποιήσαμε με προγραμμάτων βιοπληροφορική.

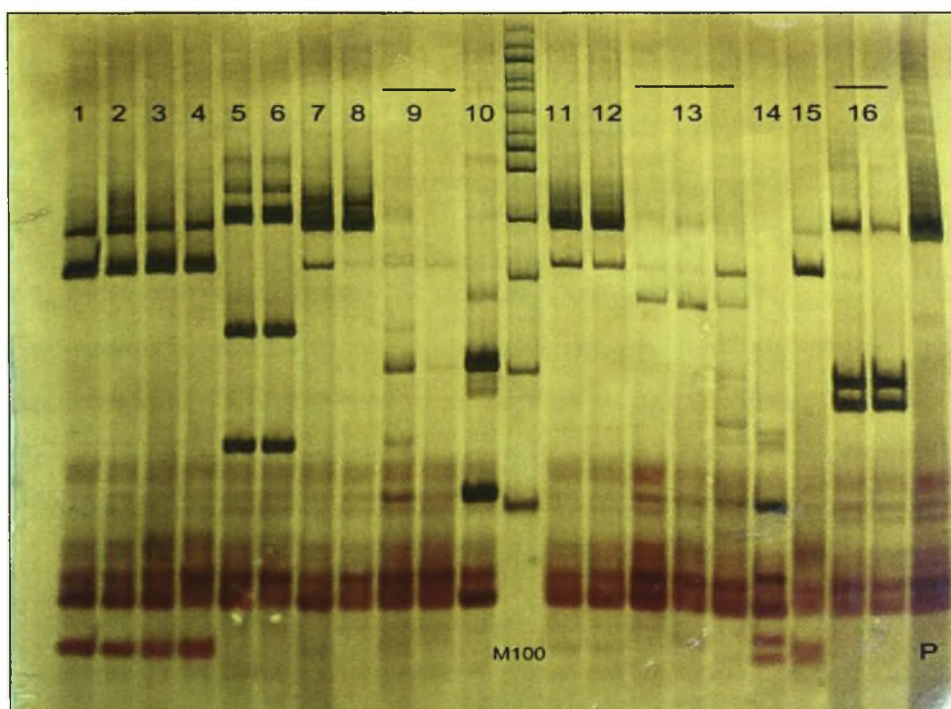
Πίνακας 9: Τμήματα περιορισμού 13 διαφορετικών ειδών κρέατος όπως προέκυψε μετά από πέψη του Cyt b με το ένζυμο AciI.

	<u>Τμήματα Περιορισμού (bp)</u>					Αριθμός Τμημάτων	Άθροισμα Τμημάτων
Ορνιθα	317	59				2	376
Γαλοπούλα	230	145				2	376
Πάπια						0	376
Χήνα	203	103	70			3	376
Φασσιανός	317	59				2	376
Πέρδικα	107	78	70	62	59	5	376
Μπεκάτσα						0	376
Τσίχλα	199	177				2	376
Ορτύκι						0	376
Στρ/μηλος	317	59				2	376
Χοίρος						0	376
Μοσχάρι						0	376
Πρόβατο						0	376

Η πέψη Cyt b με το Aci I δεν έδωσε τμήματα περιορισμού για τα δείγματα: πάπια, μπεκάτσα, ορτύκι, χοίρος, μοσχάρι, πρόβατο.

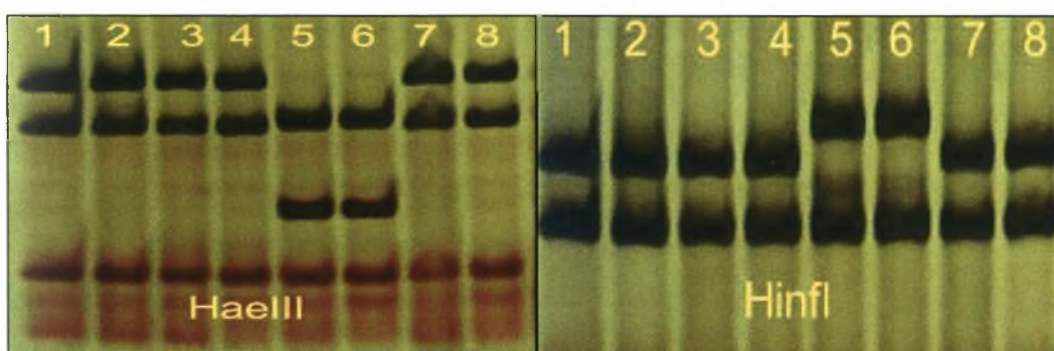
Πίνακας 10: Εικονικά τμήματα περιορισμού 10 διαφορετικών ειδών κρέατος πουλερικών μετά από πέψη του Cyt b με το ένζυμο AciI με πρόγραμμα βιοπληροφορικής.

	<u>Τμήματα Περιορισμού (bp)</u>					Αριθμός Τμημάτων	Άθροισμα Τμημάτων
Ορνιθα	320	56				2	376
Γαλοπούλα	242	134				2	376
Πάπια	231	75	70	5		3	376
Χήνα	231	75	70			3	376
Φασσιανός	132	102	78	59	5	5	376
Πέρδικα	91	78	75	70	62	5	376
Μπεκάτσα	316	60				2	376
Τσίχλα	196	180				2	376
Ορτύκι	227	79	70			3	376
Στρ/μηλος	196	180				2	376



Εικόνα 22: Πέψη του Cyt b ορισμένων κατεργασμένων προϊόντων πουλερικών με το ένζυμο AciI. M100: Ladder 100bp, 1:Κοτόπουλο ψητό, 2:Παριζάκι κοτόπουλου, 3:Μπιφτέκι κοτόπουλου ψητό, 4: Κοτοκροκέτα τηγανητή, 5: Ρολό Γαλοπούλας, 6: Σνίτσελ γαλοπούλας, 7: Παριζάκι Γαλοπούλας 1, 8:Παριζάκι γαλοπούλας 2, 9: Πάπια βραστή, 10: Χήνα, 11:Φασιανός βραστός, 12: Λουκάνικο στρουθοκάμηλου τηγανητό, 13:Ορτόκια ψητά, 14: Πέρδικα, 15:Μπεκάτσα, 16: Τσίχλα, P: PCR προϊόν.

Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση προκύπτει από την πέψη του Cyt b, των δειγμάτων κοτόπουλου και γαλοπούλας, με τα ένζυμα HaeIII και HinfI (Εικόνα 23).



Εικόνα 23 : Πέψη του Cyt b με HaeIII & HinfI στα δείγματα: 1)Κοτόπουλο νωπό, 2) Κοτόπουλο ψητό, 3) Μπιφτέκι κοτόπουλου, 4) Παριζάκι κοτόπουλου, 5) Γαλοπούλα νωπό, 6) Σνίτσελ γαλοπούλας, 7) Παριζάκι γαλοπούλας 1, 8) Παριζάκι γαλοπούλας 2.

Και στις δύο περιπτώσει φαίνεται ότι τα πρότυπα που λάβαμε από τα παριζάκια γαλοπούλας είναι όμοια με αυτά των προϊόντων από κοτόπουλο και όχι με της γαλοπούλας, όπως θα έπρεπε!

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κρέας πουλερικών αποτελεί τρόφιμο που κατέχει ιδιαίτερη θέση στις σύγχρονες διατροφικές συνήθειες. Η εμπορική αξία μάλιστα, ορισμένων προϊόντων, όπως του κρέατος από φασιανό ή πέρδικα είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Αυτό αποτελεί και την αιτία νόθευσης τροφών με την αντικατάσταση κρέατος υψηλής αξίας με ένα άλλο χαμηλότερης. Έτσι κρίνεται απαραίτητο, η ανάπτυξη μίας αξιόπιστης μεθόδου εύρεσης της προέλευσης του κρέατος και των προϊόντων κρέατος.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για την μοριακή ταυτοποίηση δέκα διαφορετικών ειδών κρέατος προερχόμενων από τα πιο κοινά πουλερικά, εκτροφής και θήρευσης, που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά. Η διαδικασία στηρίχτηκε στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και στον πολυμορφισμό που εμφανίζουν ορισμένοι γενετικοί του τόποι.

Η ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των ζωικών οργανισμών έχει μελετηθεί στο παρελθόν από αρκετούς ερευνητές οι οποίοι ανέπτυξαν ποικίλες μοριακές τεχνικές βασισμένες στους γενετικούς δείκτες όπως τα AFLP^[40], RAPD^[6], DNA Sequencing^[13], Species Specific PCR^[11], Multiplex PCR^[12]. Ελάχιστες των μελετών αυτών ασχολήθηκαν με είδη πουλερικών τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο της δικιάς μας μελέτης. Οι περισσότερες ασχολούνται με τον διαχωρισμό κρέατος από θηλαστικά και λίγες με τον διαχωρισμό της όρνιθας από την γαλοπούλα. Επίσης στις περισσότερες των περιπτώσεων, έχει χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης το γονίδιο Cyt b.

Στην παρούσα μελέτη αποδείξαμε ότι καταλληλότερος μοριακός δείκτης για την ταυτοποίηση ειδών πουλερικών (και ποιο συγκεκριμένα των δέκα ειδών* με τα οποία ασχοληθήκαμε) είναι τμήμα του γονιδίου 12S rRNA παρά του Cyt b και αυτό διότι, με το πρώτο ταυτοποιήσαμε εύκολα και τα δέκα διαφορετικά είδη κρέατος που είχαμε στην διάθεση μας ενώ με το δεύτερο μόνο τα μισά και από αυτά η όρνιθα (το βασικότερο είδος) συγχέεται και δεν διαχωρίζεται επιτυχώς με άλλα δύο είδη.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PCR-RFLP. Χαρακτηρίζεται από υψηλή επαναληψιμότητα, είναι αξιόπιστη, σχετικά γρήγορη και οικονομική^[31]. Πρόκειται για μία μέθοδο τεσσάρων σταδίων : i) Απομόνωση του mtDNA από ιστό κρέατος, ii) Ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών τόπων, iii) Πέψη με ένζυμο περιορισμού και

* Όρνιθα, γαλοπούλα, Ορτύκι, Πάπια, Χήνα, Στρουθοκάμηλος, Πέρδικα, Φασιανός, Μπεκάτσα, Τσίχλα.

iv) Εμφάνιση των τμημάτων περιορισμού με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Από μία πολύ μικρή ποσότητα ιστού, με την μέθοδος απομόνωσης που περιγράψαμε λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών δίνοντας μας την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για την ενίσχυση και των δύο γονιδίων, universal primers στους οποίους ανταποκριθήκαν όλα τα είδη. Η χρήση των universal εκκινητών απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της PCR. Ελαχιστοποιεί τον χρόνο σχεδίασης των εκκινητών και το κόστος απόκτησης τους σε συγκρίσει με την χρήση εκκινητών εξειδικευμένων στο κάθε είδος.

Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το ότι ο διαχωρισμός ενός τόσο μεγάλου αριθμού πουλερικών, επιτεύχθει κάνοντας χρήση μόνο ενός ενζύμου περιορισμού, του AclI. Κάτι παρόμοιο απ' όσο γνωρίζουμε δεν έχει αναφερθεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία που περιέχει μελέτες διαχωρισμού μέσω της τεχνικής PCR-RFLP. Όπως επίσης η χρήση συνδυασμών ενζύμων απεδείχθει ανεπαρκής και εγκαταλείφθηκε.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, έδωσε ευδιάκριτες ζωνώσεις που αντιστοιχούν στα τμήματα περιορισμού, ευκόλως συγκρίσιμες μεταξύ τους. Αναφέρουμε ότι στις περισσότερες μελέτες με RFLP η προβολή των αποτελεσμάτων γίνεται σε πηκτή αγαρόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου η οποία αν και πιο σύντομη, δεν έχει την διαχωριστική ικανότητα της πολυακρυλαμίδης.

Γνωρίζουμε ότι το DNA είναι αρκετά θερμοάντοχο μόριο πράγμα που του δίνει προβάδισμα στις μελέτες επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος έναντι των πρωτεϊνών. Η θερμική μετουσίωση του DNA εξαρτάται από τον χρόνο θέρμανση και την θερμοκρασία^[32]. Στην μελέτη αυτή εξετάστηκαν και επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος πουλερικών. Η επεξεργασία αναφέρεται τόσο σε βιομηχανικές πρακτικές, όσο και σε οικιακές όπως το απλό μαγείρεμα (βρασμός/τηγάνισμα/ψήσιμο).

Οι συμβατικές μέθοδοι μαγειρέματος αν και επηρέασαν την ποιότητα του εξαγόμενου DNA (εμφανίστηκε περισσότερο κατακερματισμένο) δεν επηρέασαν τα PCR προϊόντα και για τον λόγο αυτό τα τμήματα περιορισμού που λάβαμε από τα δείγματα μαγειρεμένου κρέατος πουλερικών ήταν όμοια με αυτά που προέρχονταν από τα αντίστοιχα δείγματα νωπού κρέατος.

Το ίδιο συνέβη και με τα περισσότερα από τα τυποποιημένα προϊόντα κρέατος με εξαίρεση τα παριζάκια (κοτόπουλου και γαλοπούλας) τα οποία στην περίπτωση του 12S rRNA δεν έδωσαν PCR προϊόν. Πρόκειται για προϊόντα έντονης κατεργασίας (μηχανικής και θερμικής) και για τον λόγο αυτό πιστεύουμε ότι το 12S rRNA έχασε την ακεραιότητα του με αποτέλεσμα να μην μπορέσουμε να ενισχύσουμε το επιθυμητό τμήμα. Στην περίπτωση του Cyt b στα παριζάκια πήραμε PCR προϊόν, αυτό πιθανολογούμε ότι συνέβη εξαιτίας του μικρότερου τμήματος που ενισχύσαμε (Cyt b:376bp / 12S rRNA:485bp). Οι Arslan et al^[4] υποστηρίζουν ότι για την μελέτη κατεργασμένων ειδών κρέατος, το τμήμα που ενισχύεται θα πρέπει να έχει μικρό μέγεθος (περίπου της τάξης των 200 bp).

Επίσης φαίνεται ότι με την μέθοδο που αναφέρουμε είναι εφικτός και ο εντοπισμός προσμίξεων σε κρεατοσκευάσματα όπως συνέβη στην περίπτωση του προϊόντος «λουκάνικο στρουθοκάμηλου» στο οποίο εκτός από το συγκεκριμένο πουλερικό εντοπίσαμε και άλλο είδος κρέατος με πιο πιθανό το χοιρινό κρέας. Τα πρότυπα που λάβαμε από την ανάλυση των τριών θηλαστικών διαφέρουν σημαντικά από αυτά των πουλερικών. Επιπλέον έρευνα, για την ανίχνευση προσμίξεων, θα πρέπει να διεξαχθεί στον τομέα των τυποποιημένων τροφίμων κρέατος καθώς επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και η μελέτη της προέλευσης των ζωοτροφών.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική PCR-RFLP και καταφέραμε να αναπτύξουμε μία αξιόπιστη μέθοδο για τον διαχωρισμό δέκα διαφορετικών ειδών κρέατος πουλερικών υψηλής εμπορικής αξίας. Ένα τμήμα 485bp του μιτοχondριακού γονιδίου 12S rRNA ενισχύθηκε με την τεχνική PCR και στην συνέχεια «κόπηκε» με το ένζυμο περιορισμού AciI. Το αποτέλεσμα ήταν η εμφάνιση διαφορετικών και ευκόλως συγκρίσιμων προτύπων για το κάθε είδος. Ο δείκτης αυτός διατηρεί την ευαισθησία του και στα μετρίως επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος καθώς επίσης θεωρείται ικανός να εντοπίσει διαφορετικά είδη κρέατος μέσα σε ένα τρόφιμο. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να τον καταστήσει πολύτιμο εργαλείο σε ελέγχους ρουτίνας, για την διαπίστωση της προέλευσης του κρέατος στις επιχειρήσεις εστίασης (όπως τα εστιατόρια) και την αυθεντικότητα ορισμένων τυποποιημένων προϊόντων κρέατος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aida.A.A, Che Man Y.B, Wong C.M.V.L, Raha A.R, Son R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Science* 69:47-52.
2. Akasaki T., Yanagimoto T., Yamkami K, Tomonaga H.(2006). Species Identification and PCR-RFLP analysis of Cytochrome b gene in cod fish (order Gadiformes) products. *Journal of Food Science* Vol.71 Nr.3.
3. Aliza Green .(2005). *Field Guide to Meat: How to Identify, Select, and Prepare Virtually Every Meat, Poultry, and Game Cut.* Hachette Book Group USA.
4. Arslan A., Ilhak I., Calicioglu M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science* 72:326-330.
5. Arslan A., Ilhak I.(2007). Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. *J.Vet.Anim.Sci.* 31:159-163.
6. Arslan A., Ilhak I., Calicioglu M.(2005). Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *Journal of Muscle Foods* 16:37-45.
7. Asensio L. (2007). Application of multiplex pcr for the identification of grouper meals in the restaurant industry. *Food Control* 1461.
8. Asensio L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18:558-566.
9. Borgo, R., Souty Grosset, C., Bouchon, D. and Gomot, L.(1996). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of quail meat species. *Journal of Food Science*, 61:1-4.
10. Calvo J., Rodella C., Zaragoza P., Osta R.(2002). Beef and bovine derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. *J.Agric.Food Chem.* 50:5262-5264.
11. Che Man Y.B, Aida.A.A, Wong C.M.V.L, Raha A.R, Son R (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Control* 18: 885-889.
12. Dalmaso A., Fontanella E., Piatti P., Civera T., Rosati S., Bottero M.(2003). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular probes* 18:81-87.
13. Desjardins P., Morais R., (1999). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J.Mol.Biol* 212:599-634.
14. Di Pindo A., Forte V.T., Conversano M.C., Tantillo G.(2004) Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from italian retail sources. *Food Control* 16:391-394.
15. Fajardo V., Gonzalez I., Calleja I., Martn I., Garga T. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from Red Deer (*Cervus elaphus*), Fallow Deer (*Dama dama*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), Cattle (*Bos taurus*), Sheep (*Ovis aries*), and Goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* 54:1144-1150.
16. Fumiere O., Dubois M., Baeten V., Holst C., Berben G.(2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem* 385:1045-1054.

17. Ghovvati S., Nassiri M.R., Mirhoseini S.Z., Moussavi H.(2008). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*.
18. Girish P.S., Anjaneyulu A.S.R., Viswas K.N., Shivakumar B.M. Anand M., Patel M. Sharma B.(2005). Meat species identification by polymerase chain reaction restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science* 70:107-112.
19. Girish P.S., Anjaneyulu A.S.R., Viswas K.N., Santhosh F.H., Bhilegaonkar K.N., Agarwal R.K.(2007). Polymerase chain reaction – restriction fragments length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: A simple method for identification of poultry meat species. *Veterinary research communication* 31:447-455.
20. Hold G.,(2001), Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *J.Agric. Food Chem* 49:1175-1179.
21. Hopwood A., Fairbrother K., Lockley A., Bardsley R.(1999). An actin-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat science* 53:227-231.
22. Hung-Sheng Hsieh, Tuu-jyi Chai, Deng-Fwu Hwang.(2007). Using the PCR–RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Control* 18:369-374.
23. Ishizaki S., Yokoyama Y., Oshiro N., Nagashima Y., Watabe S.(2005). Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene. *Comparative Biochemistry and Physiology D1*:139-144.
24. Ιωάννης Μεταξόπουλος.(1994). Τεχνολογία Κρέατος και Κρεατοσκευασμάτων. Γ.Π.Α.
25. Kesmen Z., Sahin F., Yetim H.(2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science* 77:649-653.
26. Kocher, S.F. et al (1989). Dynamic of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc.Natl.Acad.Sci* 86:6196-6200.
27. La Neve F., Civera T., Mucci n., Botero M.(2007). Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Science*.
28. Lahiff S., Glennon M., Brien L, Lyng J., Smith T. Maher M., Shilton N.(2000). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15:27-35.
29. Losio M., Ferrando M., Daminelli F., Chegiani M.(2004). Setting up a PCR based method to trace animal species in processed meat products. *Veterinary research communication* 28:253-255.
30. Μαρκουλάτος Π. (2007), Σημειώσεις του μαθήματος Ποιοτικές και Ποσοτικές Μέθοδοι Ανάλυσης-Βιοδείκτες, του ΜΠΣ. Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
31. Meyer R., Hofelein C., Luthy J., Candrian U.(1994). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of the AOAC* 78:1542-1551.
32. Partis L., Croan D., Guo Z., Clark R., Coldham T., Murby J.(2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science* 54:369-376.

33. Pereira S. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and molecular Biology* 23:745-752.
34. Pascoal A., Prado M., Castro J., Cepeda A., Barros J.(2004). Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by PCR-RFLP analysis. *Eur Food Res Technol* 218:306-312.
35. Pushpendra K., Rageev K., Prasad M.(2002). *Molecular markers:Principles and methodology*. Kluwer academic publishers. *Molecular techniques in crop improvement* 9-54.
36. Rea S., Storani G., Mascaro N., Stocchi., Loschi R.(2008). Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique. *Food Control*.
37. Richard H., Graeme R. *The World Poultry Industry*.(1995). IFC.
38. Richard J. Roberts (1980). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *CSHL Vol.8 N.1*.
39. Saez R., Sanz Y., Toldra F. (2004). PCR-based fingerprinting technique for rapid detection of animal species in meat product. *Meat Science* 66:659-665.
40. Sasazaki S., Itoha K., Arimitsua S., Imada T., Takasuga A., Nagaishi H., Takano S. (2003). Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Science* 67:275-280.
41. Sayer J., Wood C., Shanahan D., Gout S., McDowell D.(2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* 14:579-583.
42. Scheffler I. (2001). Mitochondria make come back. *Advanced Drug Delivery Review* 49:3-26.
43. Spooner D., Van Treuren R., Devincible M.(2005). *Molecular Markers for Genebank Management*. PGRI technical bulletin No 10.
44. Teletchea F., Maudet and Catherine Hanni.(2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology* Vol.23.
45. Unseld m., Beyermann B., Brandt P., Hiesel R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *CSHL Press* 4:241-243.
46. Wolf C., Rentsch J., Hubner P.(1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* 47:1350-1355.
47. Woolfe M., Primrose S.(2006). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* Vol.22
48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
49. <http://tools.neb.com/REBSites/index.php>

Ευρετήριο Πινάκων-Διαγραμμάτων-Εικόνων

- Πίνακας 1:** Μοριακοί Δείκτες από Pushpendra et al. (Σελ.16)
- Πίνακας 2:** Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA από τα γονίδια Cyt b και 12S rRNA. (Σελ.41)
- Πίνακας 3:** Το πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου της κάθε PCR αντίδρασης. (Σελ.42)
- Πίνακας 4:** Αλληλουχίες mtDNA που χρησιμοποιήθηκαν. (Σελ. 42)
- Πίνακας 5:** Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μας. (Σελ.43)
- Πίνακας 6:** Τα 40 δείγματα νωπού ή κατεργασμένου κρέατος πουλερικών τα οποία αναλύθηκαν. (Σελ.47)
- Πίνακας 7:** Τα τμήματα περιορισμού 13 διαφορετικών ειδών κρέατος όπως προέκυψε μετά από πέψη του 12S rRNA με το ένζυμο AciI. (Σελ.51)
- Πίνακας 8:** Εικονικά τμήματα περιορισμού 10 διαφορετικών ειδών κρέατος πουλερικών μετά από πέψη του 12S rRNA με το ένζυμο AciI με πρόγραμμα βιοπληροφορικής. (Σελ.51)
- Πίνακας 9:** Τμήματα περιορισμού 13 διαφορετικών ειδών κρέατος όπως προέκυψε μετά από πέψη του Cyt b με το ένζυμο AciI. (Σελ.54)
- Πίνακας 10:** Εικονικά τμήματα περιορισμού 10 διαφορετικών ειδών κρέατος πουλερικών μετά από πέψη του Cyt b με το ένζυμο AciI με πρόγραμμα βιοπληροφορικής. (Σελ.54)
- Διάγραμμα 1:** Απεικόνιση της πειραματικής πορεία που ακολουθήσαμε στην συγκεκριμένη μελέτη. (Σελ.34)
- Εικόνα 1:** Η όρνιθα. (Σελ.8)
- Εικόνα 2:** Η γαλοπούλα. (Σελ.8)
- Εικόνα 3:** Η στρουθοκάμηλος. (Σελ.8)
- Εικόνα 4:** Πάπιες διαφορετικού είδους.(Σελ.9)
- Εικόνα 5:** Η χήνα.(Σελ.9)
- Εικόνα 6:** Το ορτύκι.(Σελ.9)
- Εικόνα 7:** Η πέρδικα.(Σελ.10)
- Εικόνα 8:** Ο φασιανός.(Σελ.10)
- Εικόνα 9:** Η μπεκάτσα.(Σελ.10)
- Εικόνα 10:** Η τσίχλα. (Σελ.11)

- Εικόνα 11:** Η δομή του μιτοχονδρίου. (Σελ.21)
- Εικόνα 12:** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. (Σελ.22)
- Εικόνα 13:** Σύγκριση mtDNA θηλαστικών με το αντίστοιχο των πτηνών. (Σελ.23)
- Εικόνα 14:** Απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. (Σελ. 40)
- Εικόνα 15:** Θερμοκυκλοποιητής Eppendorf – Mastercycler epgradient S. (Σελ.40)
- Εικόνα 16:** Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (1%) του DNA. (Σελ.48)
- Εικόνα 17:** PCR προϊόντα των γονιδίων Cyt b & 12S rRNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. (Σελ.49)
- Εικόνα 18:** Ενδεικτικά αποτελέσματα πέψης του 12S rRNA 11 διαφορετικών ειδών κρέατος με το ένζυμο AciI, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. (Σελ.50)
- Εικόνα 19:** Πέψη του 12S rRNA ορισμένων κατεργασμένων προϊόντων πουλερικών με το ένζυμο AciI. (Σελ.52)
- Εικόνα 20:** RFLPs του 12S rRNA μετά από πέψη με το ένζυμο AciI των δειγμάτων: 1) Λουκάνικο στρουθοκάμηλου, 2) Χοιρινό νωπό, 3) Στρουθοκάμηλος, M100:marker 100bp. (Σελ.52)
- Εικόνα 21:** Ενδεικτικά αποτελέσματα πέψης του Cyt b, 10 διαφορετικών ειδών κρέατος με το ένζυμο AciI. (Σελ.53)
- Εικόνα 22:** Πέψη του Cyt b ορισμένων κατεργασμένων προϊόντων πουλερικών με το ένζυμο AciI. (Σελ.53)
- Εικόνα 23:** Πέψη του Cyt b με HaeIII και HinfI στα δείγματα:
1) Κοτόπουλο νωπό, 2) Κοτόπουλο ψητό,
3) Μπιφτέκι κοτόπουλου, 4) Παριζάκι κοτόπουλου, 5) Γαλοπούλα νωπό,
6) Σνίτσελ γαλοπούλας, 7) Παριζάκι γαλοπούλας 1, 8) Παριζάκι γαλοπούλας 2.
(Σελ.55)

