

Η ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΡΥΣΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΝΟΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΓΕΛΑΔΑΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΑΙΓΑΣ

Jose Manuel Llopis Ortiz, X. Τσουκνίδας, E. Τσάκαλη, Σ. Παπαθεοδώρου, Β. Στεφάνου, Σ Κουσίσης Ν. Σολομάκος, Jan Van Impe, και Δ. Χούχουλα*

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

*itsahouhoula@gmail.com

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης για την ανίχνευση της νοθείας του γάλακτος. Τα τελευταία χρόνια η χρήση νανοσωματιδίων έχουν εισαχθεί ως βιοανιχνευτές λόγω των οπτικών ιδιοτήτων τους. Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό την αξιολόγηση ενός διαγνωστικού πρωτοκόλλου βασισμένου σε νανοσωματίδια χρυσού συνδεδεμένα με ολιγονουκλεοτίδια για την ανίχνευση του DNA. Νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs, Nanopartz, USA) συνδέθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές τροποποιημένα στο 5' άκρο με θειούχα ομάδα, ειδικά για ένα του μιτοχονδριακού DNA της αγελάδας. Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εμπορικού κιτ Nucleospin Tissue (Macherey Nagel, Germany). Ελήφθησαν 20 μl DNA επαναρραιώθηκαν σε 10 mM PBS (pH 5) και πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 ° C για 5 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 15 μl του διαλύματος των νανοσωματιδίων-ολιγονουκλεοτιδίων και ακολούθησε επώαση στους 50° C για 5 min. Η παρουσία στο δείγμα συμπληρωματικού DNA στόχου οδηγεί σε υβριδισμό, τα AuNPs σταθεροποιούνται. Αν δεν υπάρχει συμπληρωματικό DNA στόχος τα AuNPs παραμένουν ελεύθερα. Η προσθήκη 0.1M HCl στο δείγμα οδηγεί στη μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς και στην κατακρήμνιση των ελεύθερων νανοσωματιδίων με αποτέλεσμα αν το δείγμα είναι θετικό να παραμένει κόκκινο ενώ να είναι αρνητικό να γίνεται ιώδες. Η μεταβολή του χρώματος μπορεί να φανεί οπτικά ή να μετρηθεί με απλό φωτόμετρο. Για αρνητικά controls χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS και κάποιου άλλου είδους DNA με σκοπό να αξιολογηθεί η ειδικότητα της μεθόδου. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τέσσερις φορές για έλεγχο της επαναληψιμότητας, ενώ η αναλυτική αυαισθησία της μεθόδου συγκρίθηκε με τη συμβατική PCR και την χρήση των ίδιων ολογονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών. Τα αρνητικά μίγματα και τα μίγματα αντίδρασης κατόικας εμφάνισαν ένα πορφυρό έγχρωμο διάλυμα με κορυφή > 570nm, ενώ τα δείγματα που περιείχαν βόειο DNA είχαν απορροφητικότητα πλησιέστερα στη χαρακτηριστική κορυφή των AuNPs στα 520-525 nm. Η παρουσία βόειου γάλακτος ανιχνεύθηκε ακόμη και στο επίπεδο των ιχνών, επιτυγχάνοντας ένα επίπεδο ανίχνευσης συγκρίσιμο με εκείνο της PCR σε συνδυασμό με την ηλεκτροφόρηση. Η χρήση των AuNPs για την χρωματομετρική ανίχνευση νοθείας κατσικίσιου γαλακτοκομικών προϊόντων με βόειο παρέχει μια ανέξοδη και εύκολη στην εκτέλεση εναλλακτική μέθοδο. Η ειδικότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν 100%. Η προτεινόμενη διαδικασία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος στην ανίχνευση του DNA και ταυτοποίηση της νοθείας σε περιπτώσεις έλλειψης τεχνικών μοριακής διαγνωστικής. Η αξιολόγηση της μεθόδου σε τρόφιμα βρίσκεται σε εξέλιξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Afzal A, Mahmood MS, Hussain I, Akhtar M. Adulteration and Microbiological Quality of Milk (A Review). Pakistan Journal of Nutrition. 2011; 10(12): p. 1195-1202.
- [2] Borkova M, Snašelova J. Possibilities of Different Animal Milk Detection in Milk. Czech Journal of Food Science. 2005; 23(2): p. 41-50.
- [3] Cheng YH, Chen SD, Weng CF. Investigation of goats' milk adulteration with cows' milk by PCR. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2006; 19: p. 1503-1507.
- [4] Haenlein, GFW. Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research. 2004; 51: p. 155-163.