

Η Αξιολόγηση χρυσών νανοσωματιδίων για τον έλεγχο της νοθείας του γάλακτος αγελάδας στο γάλα αίγας.

**Χ. Τσουκνίδας, Ε. Τσάκαλη, Σ. Παπαθεοδώρου, Β. Στεφάνου, Δ. Αντωνόπουλος, Α. Μπατρίνου
Σ. Κουλούρης, Σ Κουσίσης και Δ. Χούχουλα***

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

*dhouhoula@uniwa.gr

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 kit 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 κασίικας 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 κασιικίου 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.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νοθεία των τροφίμων ήταν ανέκαθεν ένα σημαντικό πρόβλημα που αφορά τη βιομηχανία τροφίμων. Η αντικατάσταση των υλικών με άλλα χαμηλότερης εμπορικής αξίας ή η προσθήκη συστατικών που δεν σχετίζονται με τη φύση των προϊόντων είναι πρακτικές που αναφέρονται χρόνια και έχουν ως αποτέλεσμα την έλλειψη εμπιστοσύνης του καταναλωτή στη βιομηχανία τροφίμων^[1]. Η νοθεία του δεν αποτελεί μόνο μείωση της ποιότητάς του, αλλά και οικονομική απάτη και μπορεί ακόμη και να καταστεί επικίνδυνη προς τους καταναλωτές. Το αγελαδινό γάλα χρησιμοποιείται συνήθως για αυτές τις πρακτικές λόγω του φθηνότερου κόστους του σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη^[2]. Η νοθεία έχει σημαντικό αντίκτυπο δεδομένου ότι στις δυτικές χώρες, η κατανάλωση κασιικίου γάλακτος αποκτά μεγάλη εμπορική σημασία. Προηγούμενες μελέτες

έχουν δείξει ότι η νοθεία των γαλακτοκομικών προϊόντων με το αγελαδινό γάλα αποτελεί συνήθη πρακτική, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες^[3,4,5]. Λόγω των προαναφερθέντων συνεπειών της νοθείας του γάλακτος, υπάρχει μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων σχετικά με διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης. Με την πάροδο του χρόνου εμφανίστηκαν και έχουν τελειοποιηθεί νέες μέθοδοι, αλλά η πλειοψηφία τους βασίζεται στη μελέτη των κυριότερων πρωτεϊνών γάλακτος^[6]. Ακόμη, άλλες αναλυτικές τεχνικές είναι ανοσολογικές^[7,8], ηλεκτροφορητικές^[9] και χρωματογραφικές^[10]. Μεταξύ των τεχνικών που μελετήθηκαν, η PCR είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον εντοπισμό της νοθείας της γάλακτος^[11,12] λόγω του επιπέδου ευαισθησίας και της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται παραδείγματα ερευνητών που μπόρεσαν να ανιχνεύσουν έως και 0,5%^[13] και 0,1%^[14] γάλα αγελάδας σε γάλα άλλων ειδών. Η νανοτεχνολογία και ειδικότερα η χημεία των χρυσών νανοσωματιδίων (AuNPs), προσφέρει καινοτόμες ευκαιρίες για γρήγορη και εύκολη ανάλυση της αυθεντικότητας, ικανές να αποδείξουν μικρές ποσότητες νοθείας, χάρη στις ιδιαίτερες οπτικές τους ιδιότητες^[15]. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αποδειχθεί ότι τα χρυσά νανοσωματίδια (AuNPs) είναι κατάλληλα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της νοθείας του κατσικίσιου με αγελαδινό γάλα και να συγκριθεί η ευαισθησία τους με την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο, την PCR.

Μεθοδολογία

Αυθεντικά δείγματα γάλακτος από αγελάδα και αίγα λήφθηκαν από ζώα τοπικής γαλακτοπαραγωγής και συλλέχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία κατάψυξης έως ότου να χρησιμοποιηθούν. Παρασκευάστηκαν διαφορετικές αραιώσεις αγελαδινού γάλακτος στο γάλα κατσίκας (ίχνη, 1%, 2%, 5%, 10%, 20% και 50%). Κατσικίσιο γάλα χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό και αγελαδινό ως θετικό δείγμα.

Προετοιμασία των χρυσών νανοσωματιδίων

Χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) μεγέθους 20nm (BBI Solutions (Cardiff, UK)). Τα AuNPs συζεύχθηκαν με ειδικούς εκκινητές οι οποίοι είναι κατάλληλοι για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος στο κατσικίσιο.

Τα χρυσά νανοσωματίδια τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ληφθέν διάλυμα AuNP μετρήθηκε με φασματοφωτομέτρου BioTek®. Η μέγιστη απορρόφηση ήταν περίπου 520-530 nm, αποδεικνύοντας έτσι ότι υπήρξε σωστή σύζευξη των AuNPs με τα ολιγονουκλεοτίδια.

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε με το NucleoSpin Food® kit (Macherey- Nagel, GmbH & Co. KG, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το εκχυλισμένο DNA ποσοτικοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 260nm.

PCR και Ηλεκτροφόρηση

Η PCR διεξήχθη σύμφωνα με προηγουμένως δημοσιευμένο πρωτόκολλο. Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν δίνουν ένα προϊόν PCR 274bp.

Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης, βάφτηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 μg / ml) και τεκμηριώθηκαν υπό υπεριώδη φωτισμό χρησιμοποιώντας τη συσκευή MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel).

Υβριδοποίηση και ανίχνευση χρώματος στα δείγματα τροφίμων

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον υβριδισμό στόχο των AuNPs με μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Στη συνέχεια, είναι δυνατή η πρόκληση συσσωμάτωσης των AuNPs με προσθήκη οξέος, πράγμα που οδηγεί σε χρωματομετρική διάκριση. Σε γενικές γραμμές, τα κolloειδή διαλύματα των AuNPs με διαμέτρους 5 - 20 nm παρουσιάζουν ένα ροζ χρώμα (κόκκινο όταν είναι πολύ συμπυκνωμένο), λόγω της μέγιστης κορυφής οπτικής απορρόφησης γύρω στα 520-525 nm, που προκαλείται από το συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων [16,17,18].

Η συσσωμάτωση των AuNPs μετατοπίζει την κορυφή απορρόφησης σε ένα μεγαλύτερο μήκος κύματος ($\geq 570\text{nm}$) και το χρώμα του κolloειδούς διαλύματος γίνεται ιώδες ως αποτέλεσμα της σύζευξης στα επιφανειακά πλασμόνια των σωματιδίων στα συσσωματώματα^[19]. Συνεπώς, ο βαθμός συσσωμάτωσης των AuNPs σε αιώρημα καθορίζει το χρώμα του χρυσού κolloειδούς και η συσσωμάτωση αυτή μπορεί να προκληθεί απλά με την προσθήκη HCl^[20]. Τα AuNPs συζεύχθηκαν με θειωμένα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) για να ανιχνεύσουν μία ειδική αλληλουχία αγελαδινού DNA. Με την παρουσία του συμπληρωματικού στόχου, τα AuNPs υβριδίζονται στο αγελαδινό DNA και δεν συσσωματώνονται. Ως εκ τούτου, μετά την προσθήκη οξέος, εάν στο δείγμα υπάρχει DNA αγελάδας, το μείγμα της αντίδρασης παραμένει με τον αρχικό ροζ χρωματισμό, ενώ εάν δεν υπάρχει, το μείγμα γίνεται πορφυρό, λόγω της συσσωμάτωσης των AuNPs. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που ελήφθησαν από τη μέθοδο της συμβατικής PCR. Για να εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου για τα δείγματα, η δοκιμή επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε εκχύλισμα DNA.

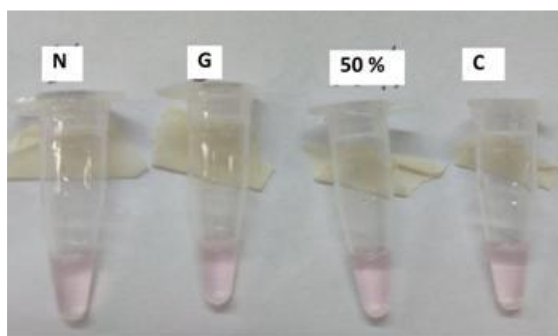
Το πρωτόκολλο σχεδιάστηκε ως εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 20μL DNA (20 μL νερού για το αρνητικό δείγμα), τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή (η ίδια συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της PCR) για 5 λεπτά στους 95°C. Στάδιο ανασύνδεσης: Προσθήκη 20μL διαλύματος AuNPs-ολιγονουκλεοτιδίων και 10μL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (που παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται από τους Hill & Mirkin, 2006). Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή: 5 λεπτά στους 55 ° C. Στάδιο συσσωμάτωσης: Προσθήκη 8 μL HCl 1 M για να προκαλέσει την συσσωμάτωση των AuNPs. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμονή 5 λεπτά ώστε να φανεί η αλλαγή χρώματος. Εάν η αλλαγή χρώματος δεν είναι αισθητή προσθήκη 1μL HCl κάθε 5 λεπτά μέχρι να παρατηρηθεί η αλλαγή χρώματος. Αν το χρώμα παραμένει ροζ, το δείγμα είναι θετικό (παρουσία αγελαδινού DNA), επειδή τα AuNPs έχουν βρει την αλληλουχία του DNA. Εάν το χρώμα γίνει μωβ, το δείγμα είναι αρνητικό (απουσία αγελαδινού DNA), επειδή τα AuNPs δεν έχουν βρει αλληλουχία DNA για να υβριδιστούν έτσι συσσωματώνονται προκαλώντας αλλαγή χρώματος. Είναι σημαντικό πάντα να προετοιμάζεται ένα αρνητικό δείγμα για να συγκριθούν. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα αποδεικνύονται με φασματοσκοπική ανάλυση UV-Vis.

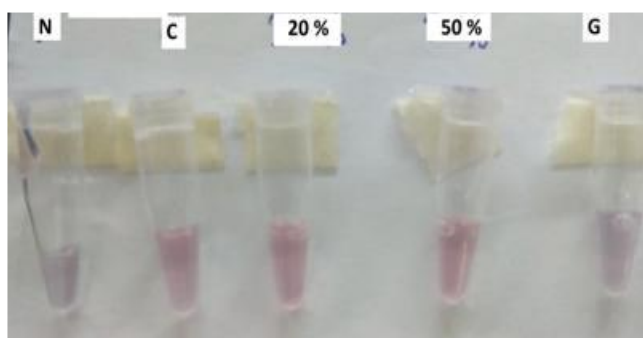
Αποτελέσματα

Η συγκέντρωση κάθε εκχυλισμένου DNA μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο στα 260nm. Η δοκιμή αποδείχθηκε ότι λειτουργεί όταν οι συγκεντρώσεις ήταν μεταξύ 10-12 ng / μL και όλα τα δείγματα πρέπει να έχουν παρόμοια συγκέντρωση. Εξαιρετικής σημασίας αποδείχθηκε ότι είναι η αποφυγή του σχηματισμού σταγόνων και φυσαλίδων μέσα στους σωλήνες της PCR. Όταν συμβεί αυτό, αποφεύγεται η σωστή αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιδραστηρίων, γι' αυτό είναι σημαντικό να εκτελεστούν πολύ προσεκτικά όλα τα στάδια του πρωτοκόλλου. Λόγω αυτού, είναι επιτακτική η

επισημάνση ότι κατά τη διάρκεια του σταδίου πρόσμιξης, μετά τα αρχικά 8 μL HCL, τα υπολειπόμενα μL πρέπει να προστεθούν ένα κάθε φορά καθώς ακόμη και ελάχιστη προσθήκη HCL μπορεί να μεταβάλει το αποτέλεσμα. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, πρέπει να διευκρινιστεί τι θεωρήθηκε ως θετικό και τι ως αρνητικό αποτέλεσμα. Θεωρητικά, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες^[25], τα μίγματα αντίδρασης θα μπορούσαν να μετατραπούν σε ιώδες (χωρίς αγελαδινό DNA) ή να παραμείνουν ροζ (παρουσία αγελαδινό DNA). Κατά τη διάρκεια αυτού του έργου αποδείχθηκε ότι μπορεί να συμβεί μια ενδιάμεση κατάσταση: το μίγμα αντίδρασης αλλάζει σε ροζ-πορφυρό (Σχήματα 1α και 1β).

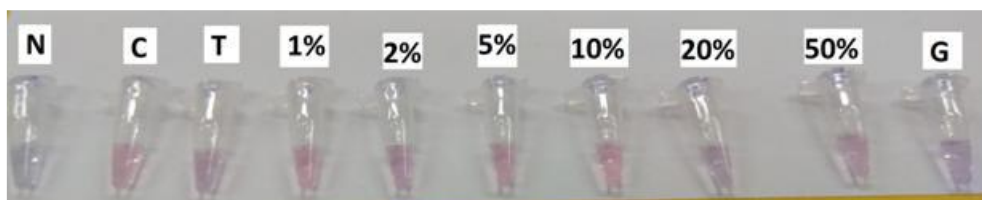


Εικόνα 1α: Δείγματα με το χαρακτηριστικό ανοιχτό ροζ χρώμα, πριν την προσθήκη HCL.



Εικόνα 1β: Θετικά δείγματα που παρουσιάζουν πιο σκούρο χρώμα από το χαρακτηριστικό ροζ ανοιχτό αλλά εξακολουθούν να διακρίνονται από το πορφυρό χρώμα των αρνητικών δειγμάτων.

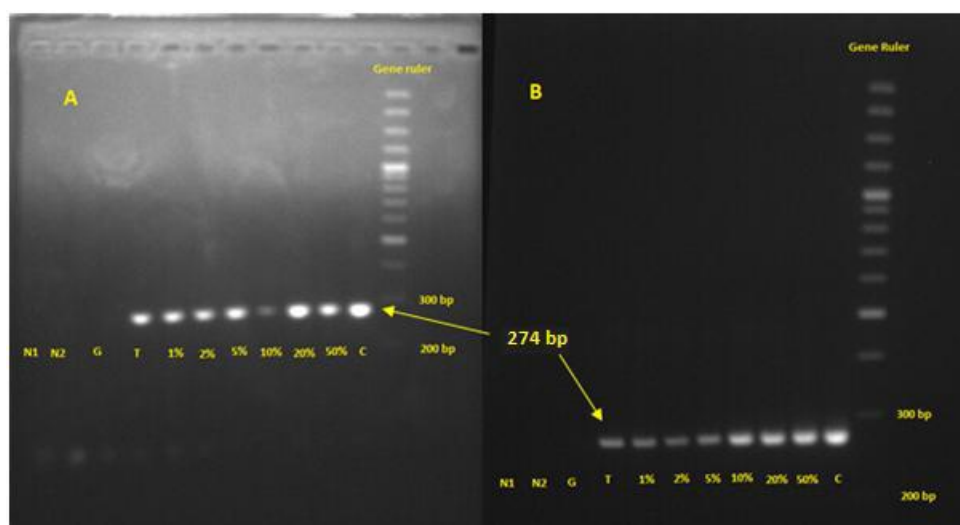
Αυτό προκύπτει επειδή ακόμη και στην παρουσία αγελαδινού DNA, μερικά AuNPs δεν συνδέονται με τις αλληλουχίες στόχους, έτσι προσμιγνύονται δίνοντας στο διάλυμα ένα σκοτεινότερο χρώμα από το πρότυπο ροζ. Έτσι, όλα τα δείγματα με χρώμα ελαφρώς σκοτεινότερο από το πρότυπο μίγμα (τα οποία διαχωρίζονται εύκολα με γυμνό μάτι από το μοβ χρώμα των αρνητικών δειγμάτων), θεωρήθηκαν θετικά. Ένα ακόμη τελευταίο πείραμα πραγματοποιήθηκε με όλες τις μελετημένες αραιώσεις, ώστε να αποδειχθεί πως όλες (έχοντας διαφορετικές αποχρώσεις ροζ χρώματος) μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα δείγματα χωρίς αγελαδινό DNA. (purple)(Figure 2).



Εικόνα 2: Το τελευταίο πείραμα που δείχνει τα αποτελέσματα του πρωτοκόλλου που εφαρμόστηκε σε όλες τις μελετηθείσες αραιώσεις.

Η διαφορά αυτή επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από τα φάσματα απορρόφησης. Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 3, οι κορυφές απορρόφησης των αρνητικών δειγμάτων καθώς και αυτών με κατσικίσιο γάλα, είναι υψηλότερη από εκείνες με το αγελαδινό DNA. Τα αρνητικά δείγματα παράγουν ένα διάλυμα μοβ χρώματος με μια μέγιστη απορρόφηση στα ≥ 570 nm, ενώ τα δείγματα που περιέχουν αγελαδινό DNA, έχουν μία απορρόφηση πιο κοντά στη χαρακτηριστική κορυφή των AuNPs στα 520-525 nm^[32]. Επομένως, επιβεβαιώθηκε ότι μετά από αυτό το πρωτόκολλο είναι δυνατό να βρεθούν ίχνη αγελαδινού γάλακτος στο γάλα κατσίκας. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι όταν αφέθηκαν όλη τη νύχτα στους 4 ° C, τα θετικά δείγματα άλλαξαν το χρώμα τους σε πορφυρό, υποδεικνύοντας ότι τα μίγματα της αντίδρασης δεν είναι σταθερά στο χρόνο.

Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν απόλυτα με αυτά που λήφθηκαν από την PCR, με την οποία επίσης ήταν δυνατό να ανιχνευθούν ίχνη γάλακτος αγελάδας σε γάλα κατσίκας (σχήμα 4).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. EU Science Hub - European Commission - New monthly report on food fraud and authenticity. [Online].; 2016 October 24. Available from: <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/new-monthly-report-food-fraud-and-authenticity>.
2. Neumann CG, Harris DM, Rogers LM. Nutrition Research (22) (2002) p. 193-220.
3. Afzal A, Mahmood MS, Hussain I, Akhtar M. Pakistan Jourv of Nutr. (12) (2011) p. 1195-1202.
4. Borková M, Snáselová J. Czech Journal of Food Science (23) (2005) p. 41-50.
5. Cheng YH, Chen SD, Weng CF. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (19) (2006) p. 1503-1507.
6. Haenlein, GFW. Small Ruminant Research (51) (2004) p. 155-163.
7. Pesic M, Barac M, Vrvic M, Ristic N, Macej O, Stanojevic S. Food Chemistry (125) (2011) p. 1443-1449.
8. Sampson HA. Food Allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology (111) (2003) p. 540-547.
9. Rance F, Grandmottet X, Grandjean H. Clinical Experimental Allergy (35) (2005) p. 165-172.
10. Darwish SF, Allam HA, Amin AS. World Applied Sciences Journal (7) (2009) p. 461-467.
11. Golinelli LP, Carvalho AC, Casaes RS, Lopes CS, Deliza R, Paschoalin VM, Silva JT. Journal of Dairy Science. (97) (2014) p. 6693-6699.

12. Salih MAM, Yang S. Common Milk Adulteration in Developing Countries Cases Study in China and Sudan Journal of Advances in Dairy Research (5) (2017).
13. Stanciuc, N, Rapeanu, G. Food and Agricultural Immunology (21) (2010) p. 157-164.
14. Xue, H, Hu, W, Son, H, Han, Y, Yang, Z. Journal of Food Science and Technology (31) (2010) p. 370-373.
15. Zeleňáková, L, Golian, J. Sci Monograph. SPU Nitra (98) (2008).
16. Hurley, IP, Coleman, RC, Ireland, HE, Williams, JHH. Journal of Dairy Science. (87) (2004) p. 215-221.
17. Mayer HK. International dairy journal (15) (2005) p. 595-604.
18. Enne G, Elez D, Fondrini F, Bonizzi I, Feligini M, Aleandri R. Journal of Chromatography A (1094) (2005) p. 169-178.
19. Poonia A, Jha A, Sharma R, Singh HB, Rai AK, Sharma N. International Journal of Dairy Technology (70) (2016).
20. Das, S, Goswami, B, Biswas, K. Sensor Letters (14) (2016) p. 4-18.