



Μικροβιολογία Τροφίμων I Εργαστήριο

Ενότητα 10:

Μοριακή Βιολογία και Μικροβιολογία Τροφίμων (1/2), 1ΔΩ

Τμήμα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Του Ανθρώπου

Διδάσκοντες: Ευστάθιος Ζ. Πανάγου

Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου

Αναστάσιος Σταματίου



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
πρόγραμμα για την ανάπτυξη





Μαθησιακοί Στόχοι

- Η εξοικείωση των φοιτητών με όρους που άπτονται στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας.
- Η κατανόηση της δυναμικής των διαφόρων μοριακών τεχνικών με σκοπό την χρήση τους στην Μικροβιολογία τροφίμων.
- Η πραγματοποίηση επιλεγμένων μοριακών μεθόδων στο εργαστήριο και την επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής που μπορεί να εφαρμοστεί για την εξυπηρέτηση του σκοπού του κάθε πειραματικού σχεδιασμού.



Λέξεις Κλειδιά

- Μοριακές τεχνικές
- Γονιδιωματική ανάλυση (Genomics)
- Τρανσκριπτομική ανάλυση (Transcriptomics)
- Πρωτεομική ανάλυση (Proteomics)
- Ηλεκτροφόρηση
- Απομόνωση γενετικού υλικού
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- Αλληλουχία

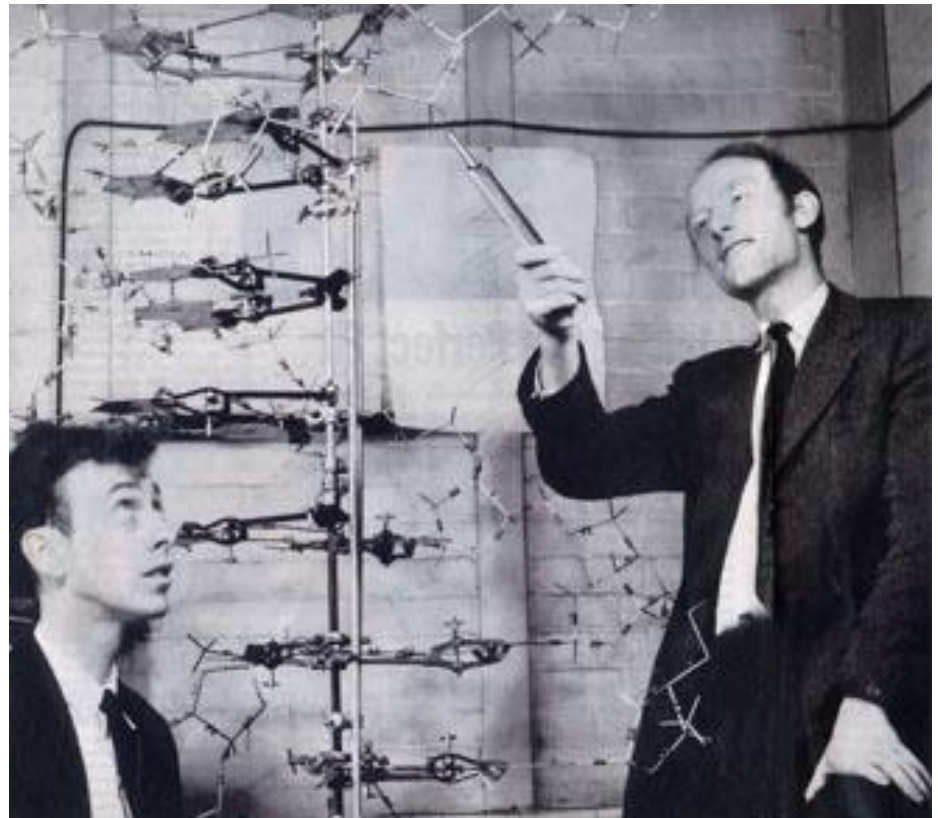


Η Αρχή



1953: ο **Francis Crick** και ο **James Watson** αποκαλύπτουν την δομή του DNA

1958: ο **Francis Crick** αναφέρεται στο κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας

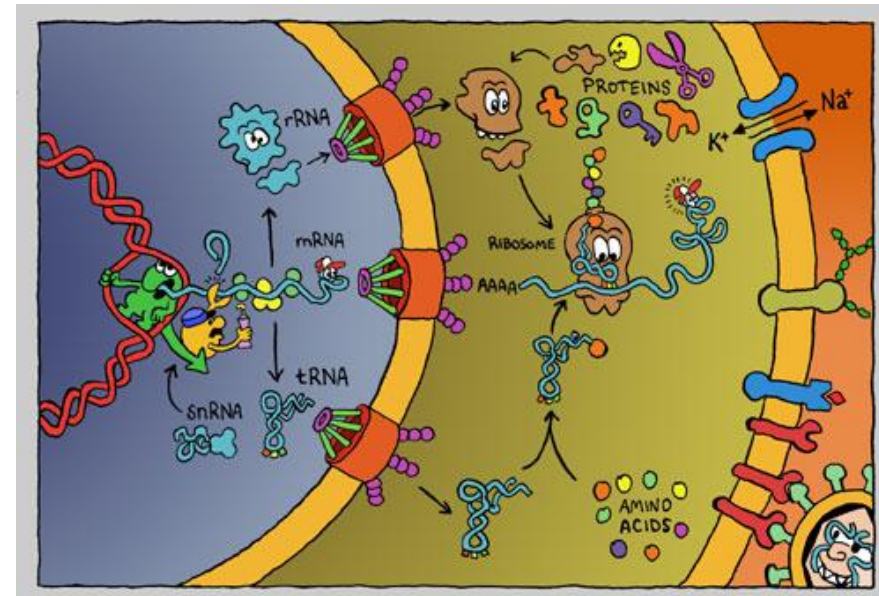




Κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας

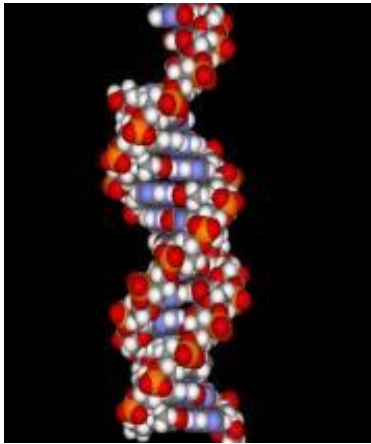


- Το DNA περιέχει αποθηκευμένες ακριβείς “οδηγίες” οι οποίες καθορίζουν τη δομή και λειτουργία του οργανισμού.
- Εξασφαλίζεται η μεταβίβαση των γενετικών πληροφοριών από ένα κύτταρο στα θυγατρικά του.
- Το RNA μεταφέρει την πληροφορία η οποία καθορίζει τι είδους πρωτεΐνη θα παραχθεί.
- Οι πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τη δομή και λειτουργία των κυττάρων και κατά επέκταση και των οργανισμών.





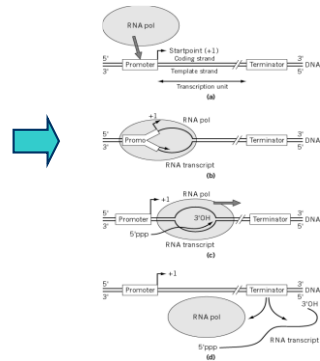
Πεδία έρευνας



DNA

genomics

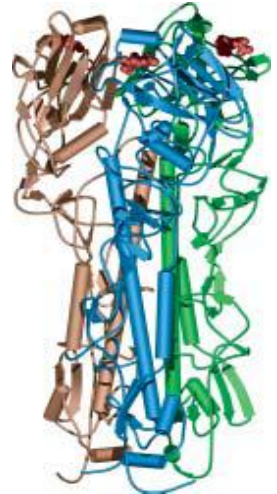
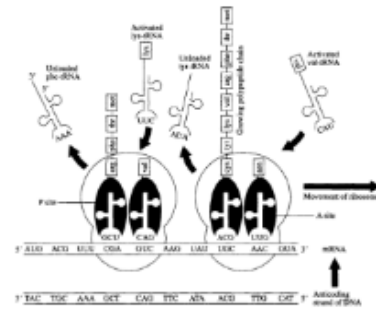
μεταγραφή



mRNA

transcriptomics

μετάφραση



Πρωτεΐνες

proteomics



Πλεονεκτήματα Μοριακών μεθόδων

- Αποφυγή των μειονεκτημάτων της χρήσης κλασικών μεθόδων όπως αβεβαιότητα αποτελεσμάτων, πληθώρα διαφορετικών δοκιμών, εξάρτηση αποτελεσμάτων από το τρόφιμο, τις εργαστηριακές συνθήκες ή και τον αναλυτή.
- Υπάρχουν γενετικοί δείκτες που μπορούν να διαχωρίσουν τους μικροοργανισμούς σε επίπεδο είδους ή ακόμα και σε επίπεδο στελέχους.
- Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που δεν απαιτούν απομόνωση μικροοργανισμών και ονομάζονται μέθοδοι ανεξάρτητης καλλιέργειας (culture independent methods).



Εφαρμογές στην Μικροβιολογία Τροφίμων

- Ανίχνευση / ταυτοποίηση αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών.
- Παρακολούθηση και περιγραφή της μικροχλωρίδας του τροφίμου.
- Περιγραφή των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών.
- Παρατήρηση των αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων ενός μικροοργανισμού σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (πχ. θερμοκρασία και μέσο ανάπτυξης, συνθήκες ανταγωνισμού ή stress).
- Ανίχνευση γονιδίων (πχ πρωτεόλυσης, γλυκόλυσης).
- Ενσωμάτωση γονιδίων (πχ φθορισμού).



Ανάλυση πρωτεϊνών (proteomics)

1. SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis): Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Πολυακρυλαμιδίου – Δωδεκανοθειικού Νατρίου
2. 2 - D (Two Dimensional): Δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση



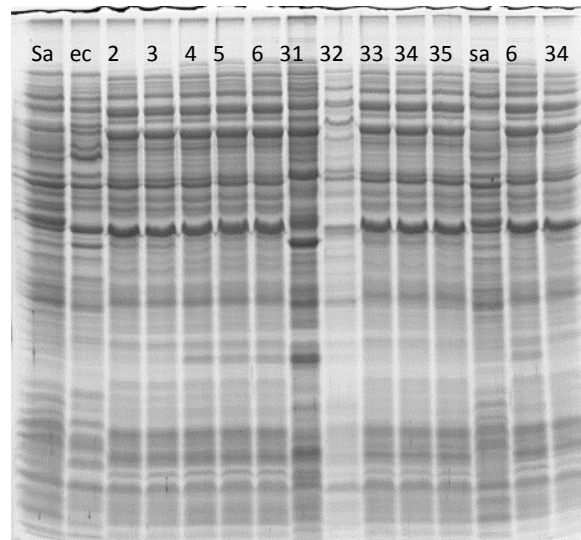
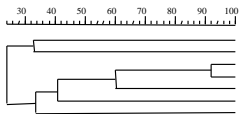
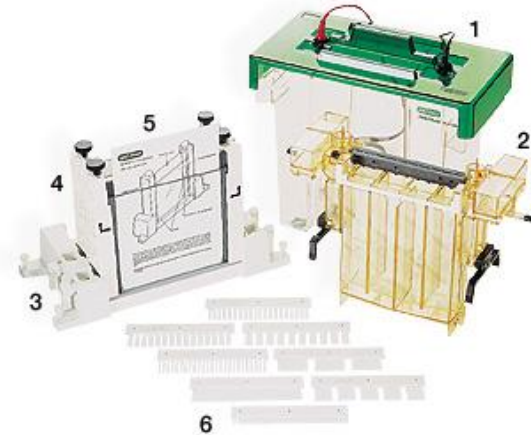
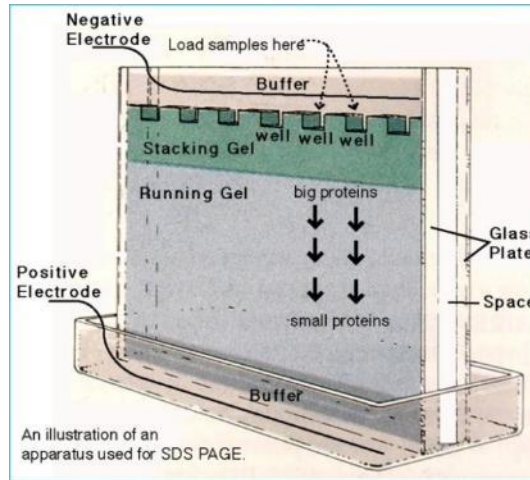
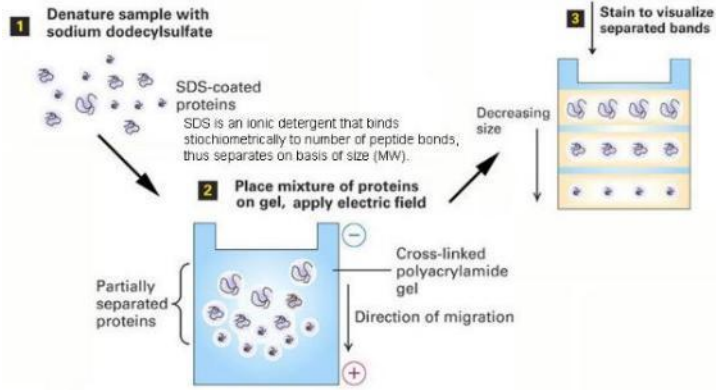
SDS – PAGE 1/2

Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

- Ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών της καλλιέργειας.
- Ανάλυση με βάση το μοριακό τους βάρος.
- Διαχωρισμός - ομαδοποίηση μικροοργανισμών σε επίπεδο είδους.



SDS – PAGE 2/2





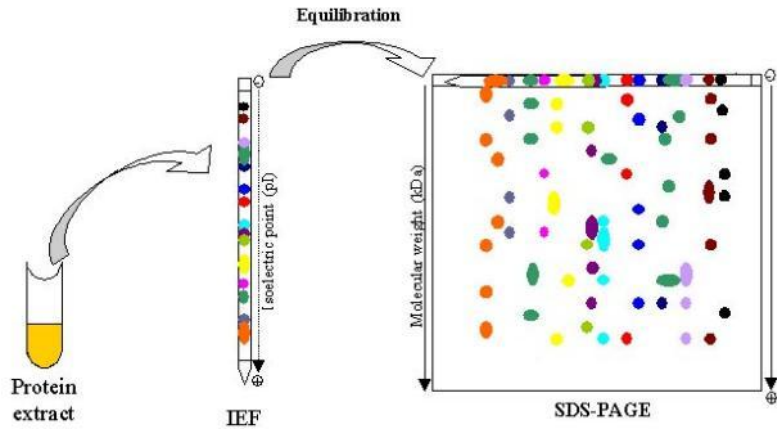
2 – D 1/2

Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

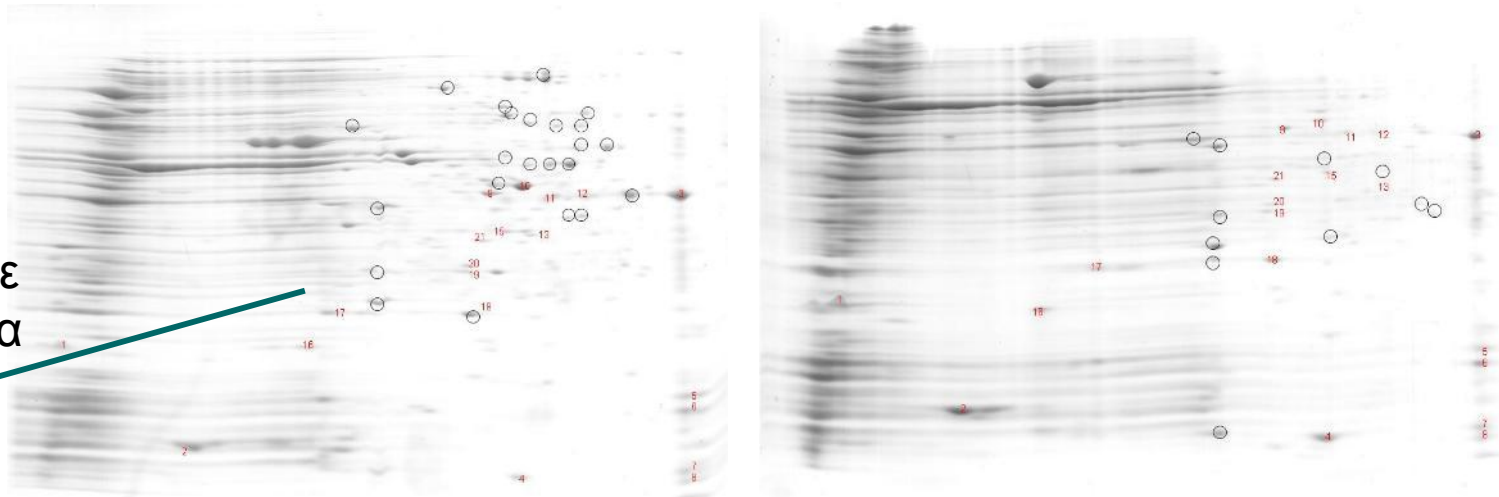
- Ανάλυση πρωτεϊνών.
- Ανάλυση αρχικά με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και σε δεύτερη φάση με βάση το μοριακό τους βάρος.
- Παρακολούθηση αλλαγών στις εκφραζόμενες πρωτεΐνες εξαρτώμενες από τις συνθήκες ανάπτυξης (πχ. θερμοκρασία και μέσο ανάπτυξης, συνθήκες ανταγωνισμού ή stress).



2 – D 2/2



Ταυτοποίηση με φασματοσκοπία μάζας





Γονιδιωματική ανάλυση (genomics)

1. PCR (Polymerase Chain Reaction): Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
2. RAPD (Random amplified polymorphic DNA)
3. PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
4. Sequencing analysis
5. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)
6. PFGE (Pulsed – field gel electrophoresis): Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης εναλλασσόμενου πεδίου
7. FISH (Fluorescence in situ Hybridisation)



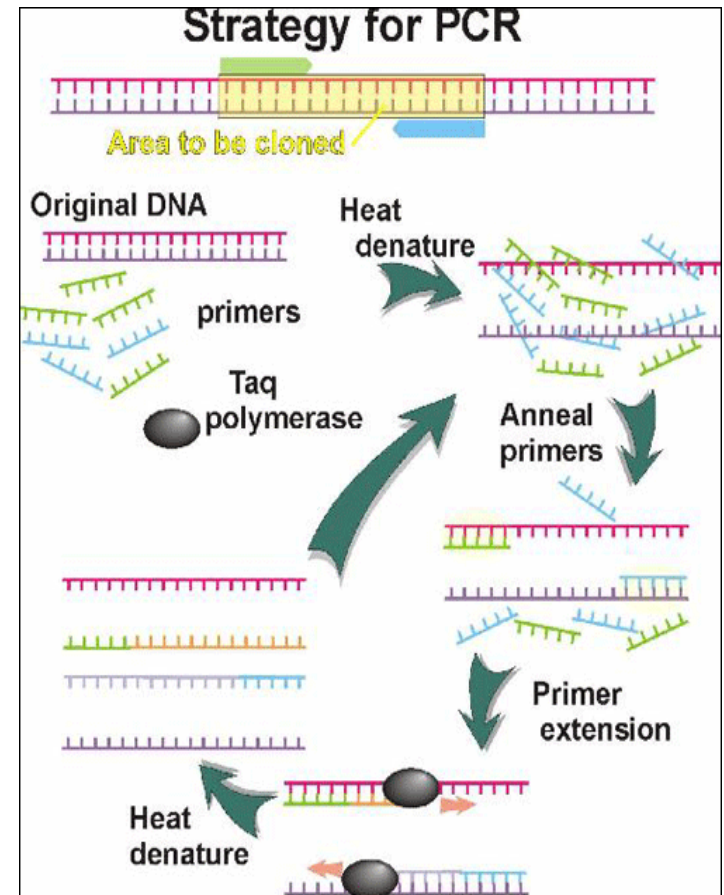
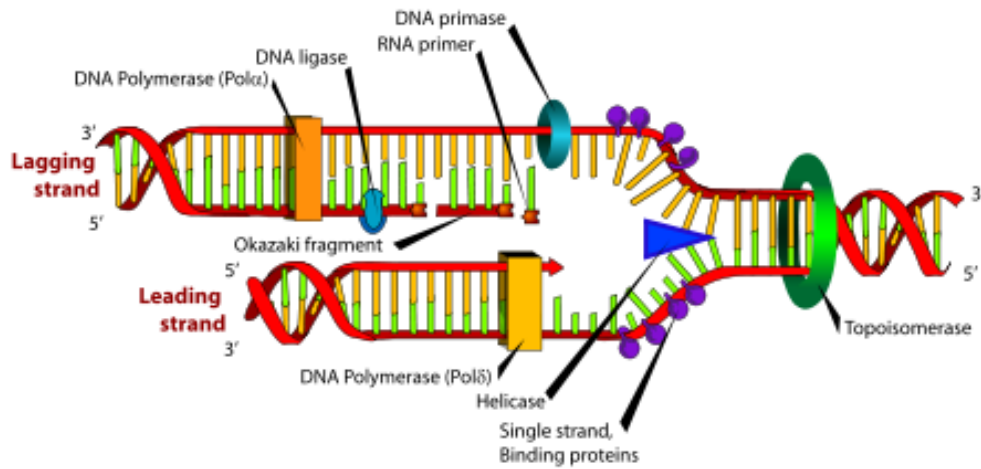
PCR 1/3

Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

- Χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA.
- Τα στάδια που περιλαμβάνει είναι : αποδιάταξη του DNA (denaturation), προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) και επιμήκυνση των εκκινητών (extension).
- Είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος.

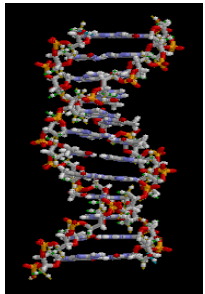


PCR 2/3

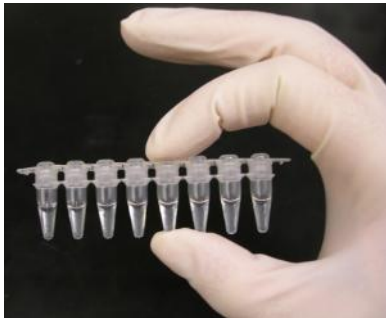




PCR 3/3



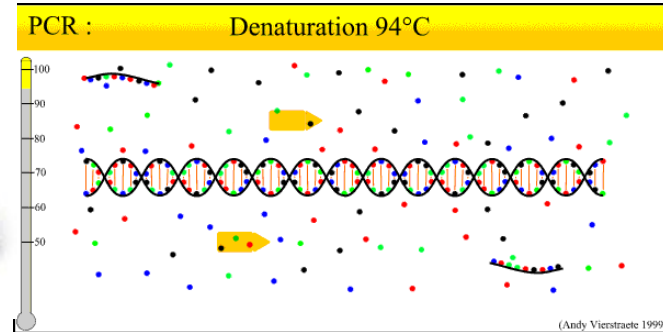
DNA



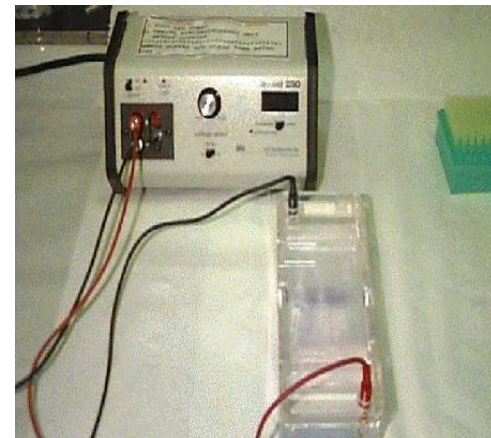
Ανάμιξη DNA, Εκκινητών (primers), πολυμεράσης (Taq), dNTP's (deoxynucleotide triphosphates), buffer solution



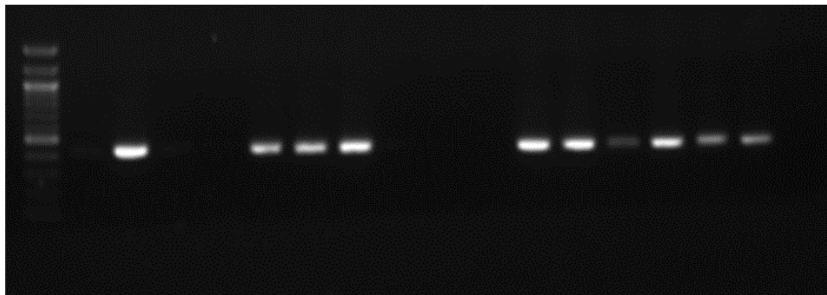
Thermocycler



Στάδια αντίδρασης PCR



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης





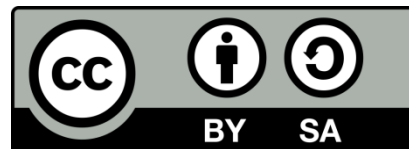
Βιβλιογραφία

- Νυχάς, Γ.Ι. Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Martin R. Adams and Maurice O. Moss (2008) Food Microbiology, 3rd Edition, RSC Publishing, London, UK.
- Jay, J.M. (2000) Modern Food Microbiology, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, USA.



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδεια χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.





Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.





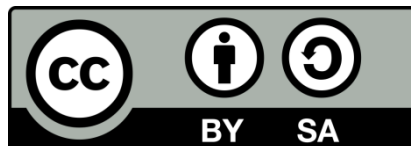
Σημείωμα Αναφοράς

- Copyright Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2015. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Ευστάθιος Πανάγου/ Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου/ Αναστάσιος Σταματίου, «Μικροβιολογία Τροφίμων Ι Εργαστήριο». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://mediasrv.aua.gr/eclass/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων, π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Η άδεια αυτή ανήκει στις άδειες που ακολουθούν τις προδιαγραφές του Ορισμού Ανοικτής Γνώσης [2], είναι ανοικτό πολιτιστικό έργο [3] και για το λόγο αυτό αποτελεί ανοικτό περιεχόμενο [4].

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

[2] <http://opendefinition.org/okd/ellinika/>

[3] <http://freedomdefined.org/Definition/EI>

[4] <http://opendefinition.org/buttons/>



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει) μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.