



# Μικροβιολογία Τροφίμων I

## Εργαστήριο

### Ενότητα 10:

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

Τμήμα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Του Ανθρώπου

Διδάσκοντες: Ευστάθιος Ζ. Πανάγου

Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου

Αναστάσιος Σταματίου



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





# 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



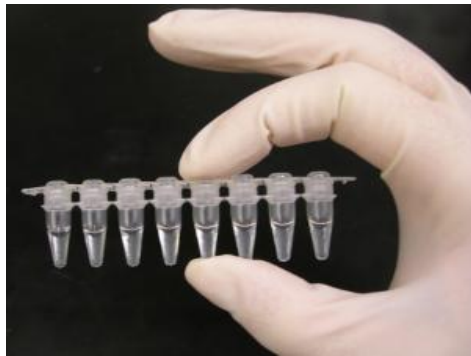
# RAPD (Random amplified polymorphic DNA ) 1/2

## Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

- Τεχνική εξαρτώμενης καλλιέργειας.
- Πρόκειται για τεχνική με μικρό κόστος αλλά με σχετικά μικρή επαναληψιμότητα.
- Χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών.



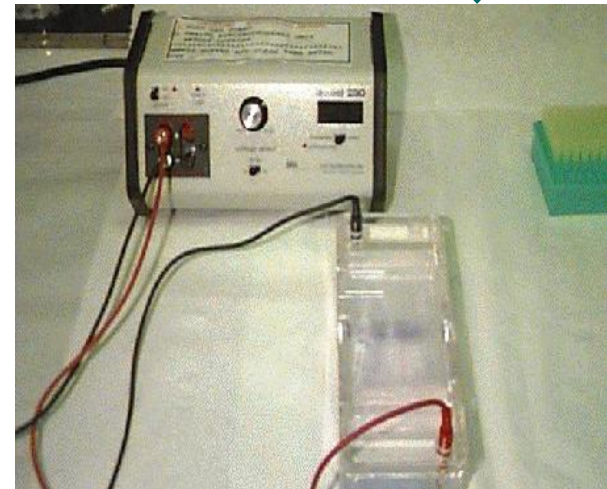
# RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 2/2



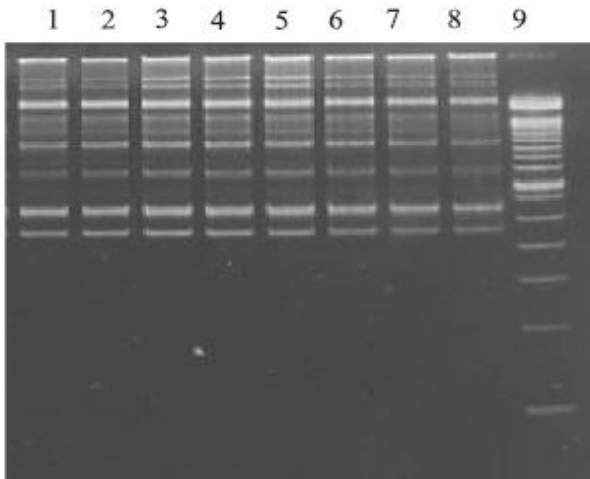
Ανάμιξη DNA, Εκκινητών (primers), πολυμεράσης (Taq), dNTP's (deoxynucleotide triphosphates), buffer solution



Thermocycler



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης





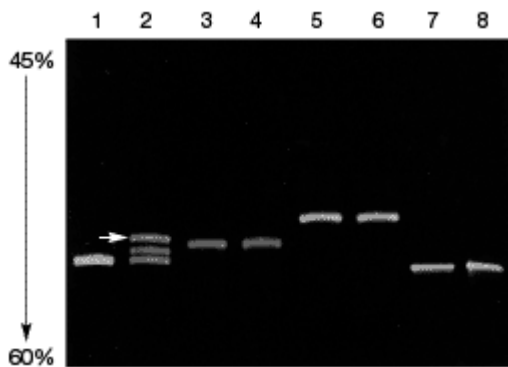
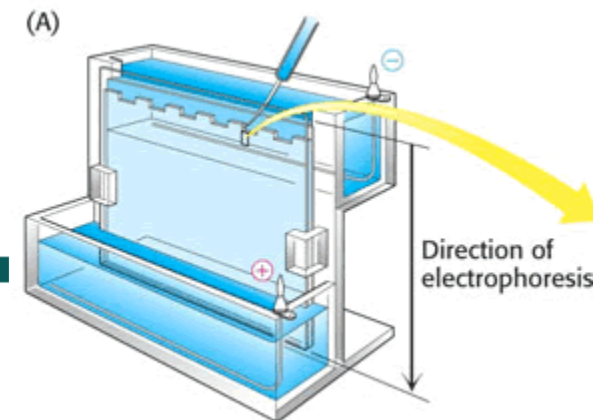
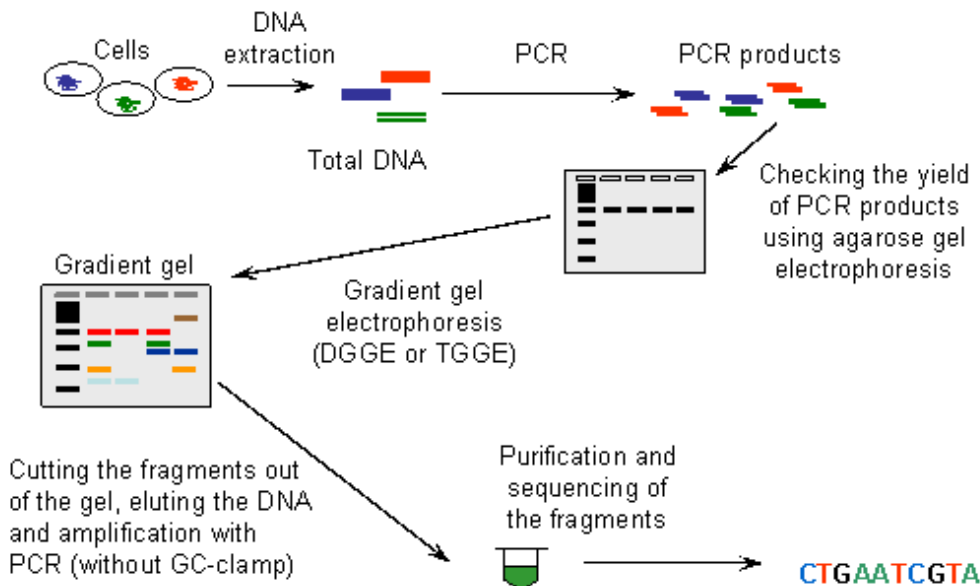
# PCR-DGGE 1/2

## Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

- Τεχνική ανεξάρτητης καλλιέργειας.
- Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με βάση την αλληλουχία του γονιδίου που έχει πολλαπλασιαστεί σε πηκτή ακρυλαμιδίου με βαθμιδωτή συγκέντρωση φορμαμιδίου.
- Τα διαφορετικά είδη βακτηρίων (διαφορετική αλληλουχία DNA) θα αποδιατακτούν σε διαφορετική συγκέντρωση φορμαμιδίου άρα θα εμφανιστούν σε διαφορετικό σημείο της πηκτής .



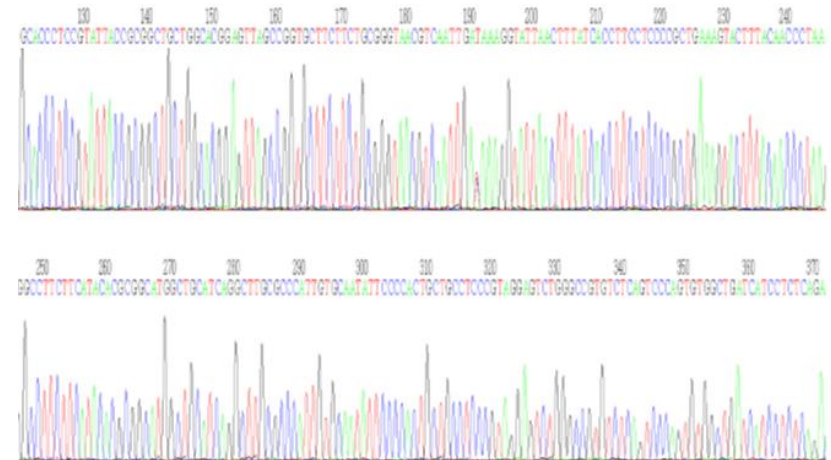
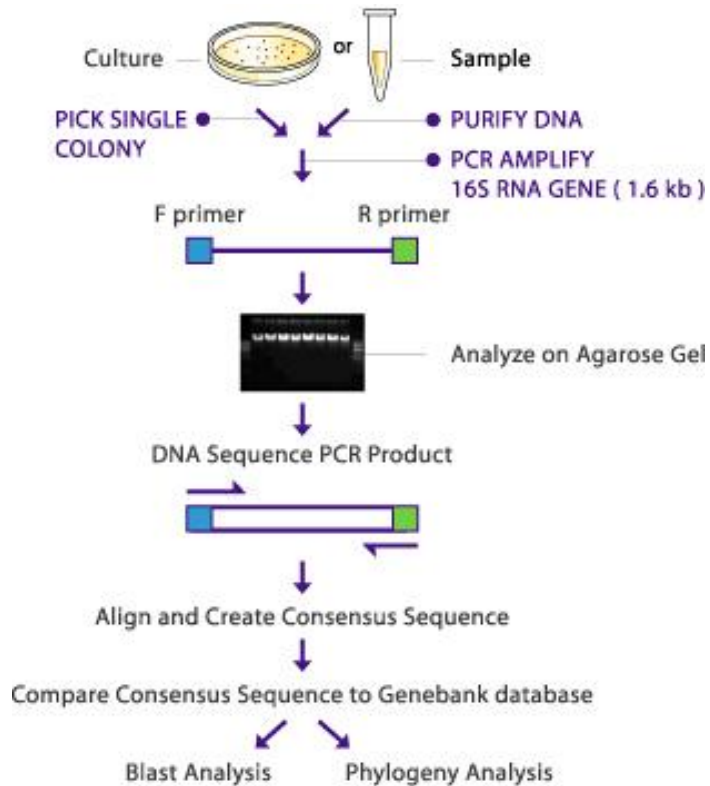
# PCR-DGGE 2/2



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου



# Sequencing analysis



```

ACAGACTCTAGCCACCAGTTTCAGATGCAATTCCTCAAGTTAAGCTCGGGGCTTTCACATCTGACTTAATTGACCGCCTGCGTGCGCTTACGCC
CAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCTCCGATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTGCAGGGTAAACGTC AATTGAT
AAAGGTATTAACCTTATCACCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCCTAAGGCCCTTCTTCATACACCGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTC
GCCATTGTGCAATATTCACACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTA
GAGATCGTTGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACTAGCTAATCCCATATGGGTTTCATCCGATAGCCGAAGTCCGAAGAGCCCTGCTTTG
GTCCGTAGACGTCATGCCGATTAGCCACCCTTCCAGTAGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCATACATTACTCACCCGTCGCCCGCT
CGTCAGCAAGAAAGCAAGCTTCTTCTGTTACCGCTCGACTTCATGTATAG
  
```





# BLAST\* analysis 1/3

- Εντοπίζει περιοχές όμοιες μεταξύ αλληλουχιών.
- Συγκρίνει αλληλουχίες με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων και υπολογίζει το ποσοστό ομοιότητας.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση μικροοργανισμών.

## Βάσεις Δεδομένων:

GenBank <http://www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/genbank/>

EMBL <http://www.Ebi.Ac.Uk/embl/>

DBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

\* **BLAST** = *Basic Local Alignment Search Tool*



# BLAST\* analysis 2/3

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - Windows Internet Explorer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)

**New** Aligning Multiple Protein Sequences? Try the COBALT Multiple Alignment Tool. [Go!](#)

### BLAST Assembled Genomes

Choose a species genome to search, or [list all genomic BLAST databases](#)

- Human
- Mouse
- Rat
- Arabidopsis thaliana
- Oryza sativa
- Rice taurae
- Danio rerio
- Drosophila melanogaster
- Gallus gallus
- Pan troglodytes
- Microbiase
- Apis mellifera

### Basic BLAST

Choose a BLAST program to run:

- nucleotide blast**: Search a nucleotide database using a nucleotide query  
Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast
- protein blast**: Search protein database using a protein query  
Algorithms: blastp, psi-blast, psi-blast
- blastx**: Search protein database using a translated nucleotide query
- tblastn**: Search translated nucleotide database using a protein query
- tblastx**: Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

Specialized BLAST

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (812 letters) - Windows Internet Explorer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#

### Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer

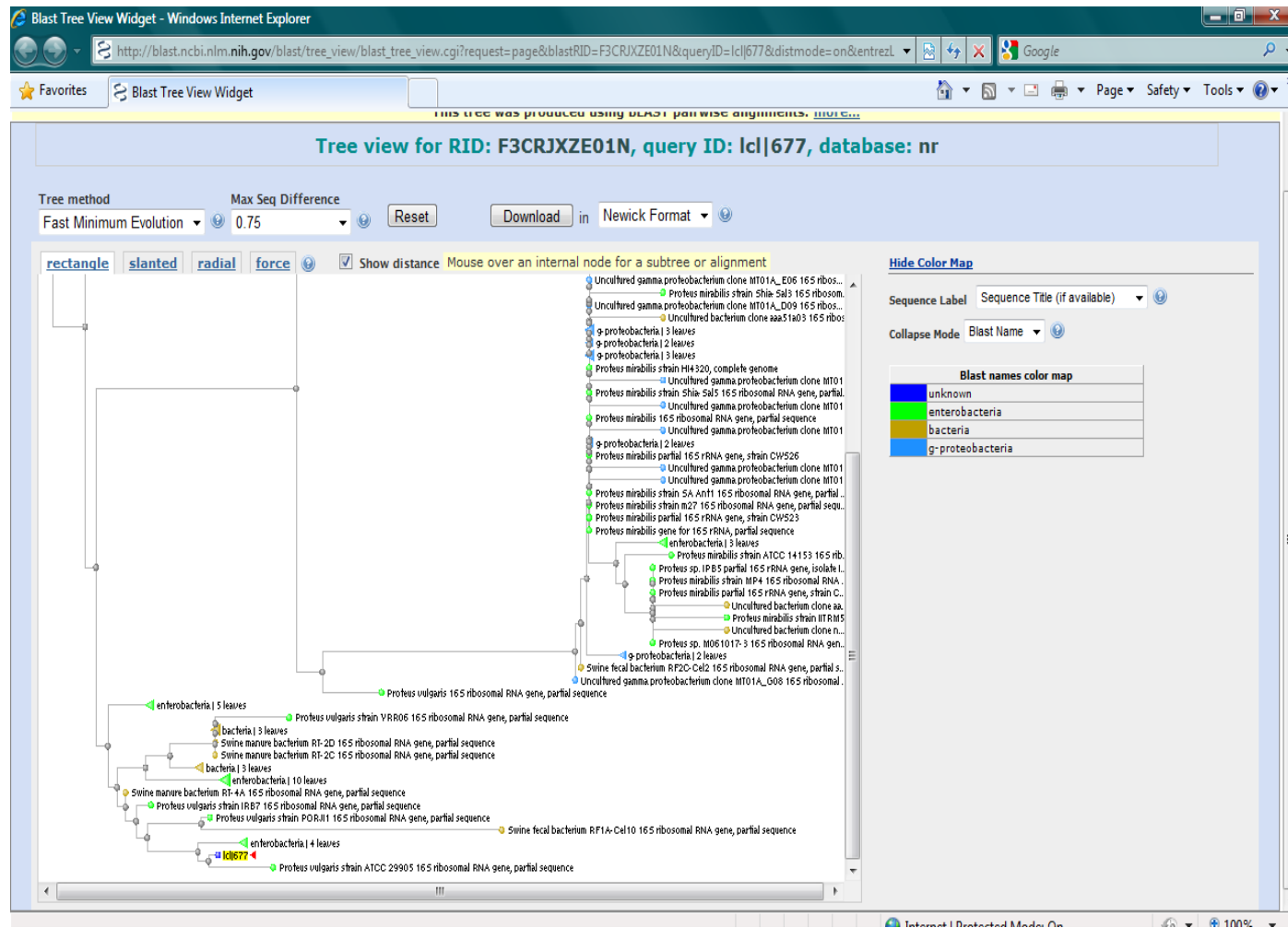
Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AY167924.1</a>	Proteus vulgaris strain 18B7 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1102	1109	99%	0.0	99%	
<a href="#">X02552.1</a>	Proteus vulgaris 16S rRNA gene	1102	1109	99%	0.0	99%	
<a href="#">F9271888.1</a>	Proteus vulgaris strain ATCC 9484 16S ribosomal RNA gene, partial	1102	1105	99%	0.0	99%	
<a href="#">F9271889.1</a>	Proteus pennisi strain ATCC 33519 16S ribosomal RNA gene, partit	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">DQ885262.1</a>	Proteus hauseri strain NCTC 4175 16S ribosomal RNA gene, partial	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">DQ885267.1</a>	Proteus vulgaris strain ATCC 29905 16S ribosomal RNA gene, partit	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167925.1</a>	Swine manure bacterium RT-13A 16S ribosomal RNA gene, partial s	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167926.1</a>	Swine manure bacterium RT-20 16S ribosomal RNA gene, partial se	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167927.1</a>	Swine manure bacterium RT-2C 16S ribosomal RNA gene, partial se	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">AJ334474.1</a>	Proteus pennisi partial 16S rRNA gene, strain ENT229	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">AJ301683.1</a>	Proteus vulgaris 16S rRNA gene, strain CIP103181T	1103	1103	99%	0.0	99%	
<a href="#">AJ363473.1</a>	Proteus pennisi partial 16S rRNA gene, strain ENT225	1101	1101	99%	0.0	99%	
<a href="#">EU373433.1</a>	Proteus vulgaris strain YR06 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1098	1098	99%	0.0	99%	
<a href="#">EF426446.1</a>	Proteus sp. L2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1098	1098	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167928.1</a>	Swine manure bacterium RT-10A 16S ribosomal RNA gene, partial s	1098	1098	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167929.1</a>	Swine manure bacterium RT-5A 16S ribosomal RNA gene, partial se	1098	1098	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167930.1</a>	Swine manure bacterium RT-4D 16S ribosomal RNA gene, partial se	1098	1098	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167940.1</a>	Swine manure bacterium RT-4A 16S ribosomal RNA gene, partial se	1098	1098	99%	0.0	99%	
<a href="#">GQ443106.1</a>	Uncultured bacterium clone FR_B_F9 16S ribosomal RNA gene, part	1092	1092	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167942.1</a>	Swine manure bacterium RT-4C 16S ribosomal RNA gene, partial se	1092	1092	99%	0.0	99%	
<a href="#">DQ205432.1</a>	Proteus vulgaris strain kno3 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1088	1088	99%	0.0	98%	
<a href="#">AY167938.1</a>	Swine manure bacterium RT-3B 16S ribosomal RNA gene, partial se	1088	1088	99%	0.0	99%	
<a href="#">AY167934.1</a>	Swine manure bacterium RT-2B 16S ribosomal RNA gene, partial se	1088	1088	99%	0.0	99%	
<a href="#">GQ383854.1</a>	Proteus sp. 3EAS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1086	1086	99%	0.0	99%	
<a href="#">EU124388.1</a>	Proteus vulgaris strain R57 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1081	1081	99%	0.0	98%	
<a href="#">GQ856254.1</a>	Proteus vulgaris 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1077	1077	99%	0.0	98%	
<a href="#">GQ292550.1</a>	Proteus vulgaris strain TEM11 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1077	1077	97%	0.0	99%	
<a href="#">AY167939.1</a>	Swine manure bacterium RT-3C 16S ribosomal RNA gene, partial se	1077	1077	98%	0.0	98%	
<a href="#">F477102.1</a>	Proteus vulgaris strain 345C 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1072	1072	97%	0.0	98%	
<a href="#">GQ264577.1</a>	Proteus pennisi clone S-9 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1072	1072	99%	0.0	98%	
<a href="#">EU107471.1</a>	Proteus sp. K107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	99%	0.0	98%	
<a href="#">EF012763.1</a>	Proteus vulgaris strain OTO-LP12.1 16S ribosomal RNA gene, partia	1070	1070	99%	0.0	98%	
<a href="#">EU103500.1</a>	Dinfus mirabilis strain Shio-Calc 16S ribosomal RNA gene, partial s	1064	1064	99%	0.0	98%	

\* **BLAST** = *Basic Local Alignment Search Tool*



# BLAST\* analysis 3/3



\* BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*



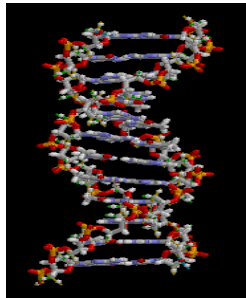
# RFLP 1/2

## Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

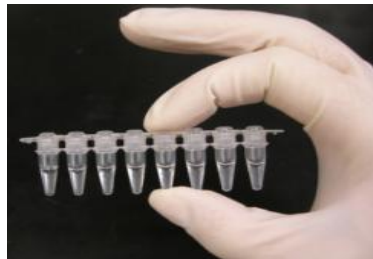
- Τεχνική εξαρτώμενης καλλιέργειας.
- Τα προϊόντα της PCR πέπτονται (κόβονται σε κομμάτια) με ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes) και τα προϊόντα αυτά (restriction fragments) διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.
- Πρόκειται για τεχνική με σχετικά μικρό κόστος.
- Χρησιμοποιείται ευρέως και θεωρείται σημαντική τεχνική για την χαρτογράφηση γονιδίων.



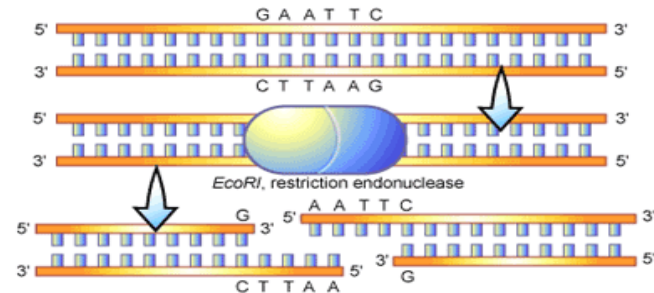
# RFLP 2/2



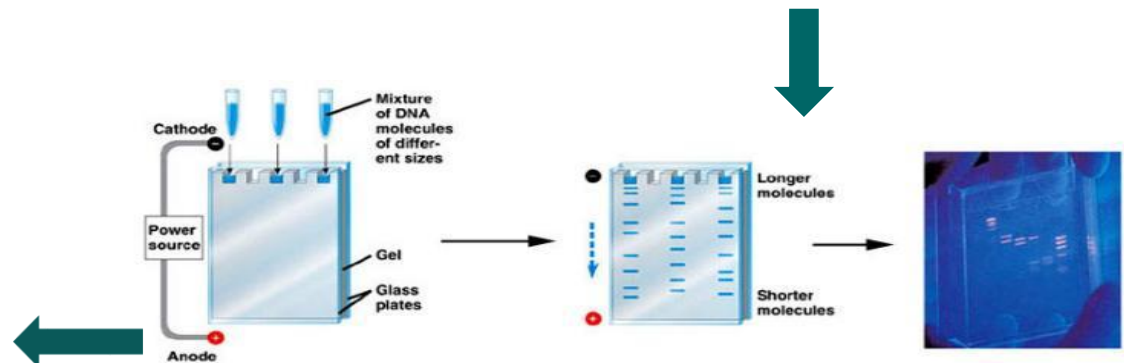
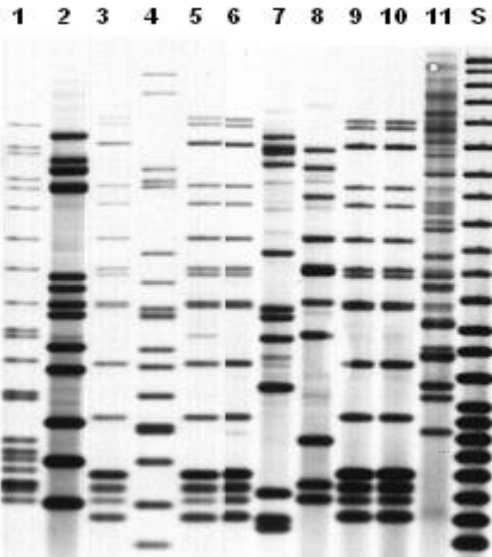
DNA



PCR



Πέψη με ένζυμο περιορισμού



Restriction Map - a type of physical "map" of the banding pattern seen in gel electropherograms made from treating chromosomal DNA with restriction enzymes and then electrophoresing the fragments  
... a kind of "fingerprint" of the DNA fragments from one restriction enzyme..

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης



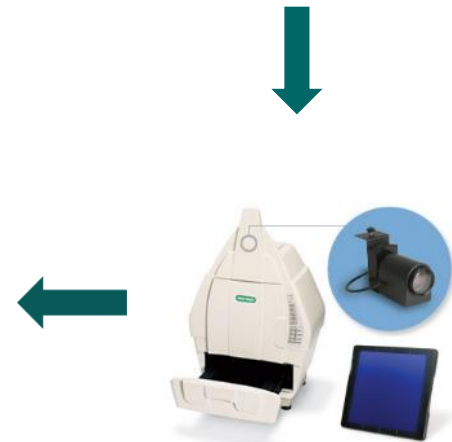
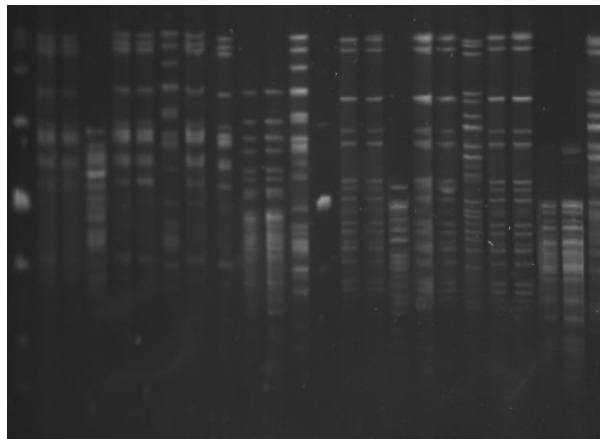
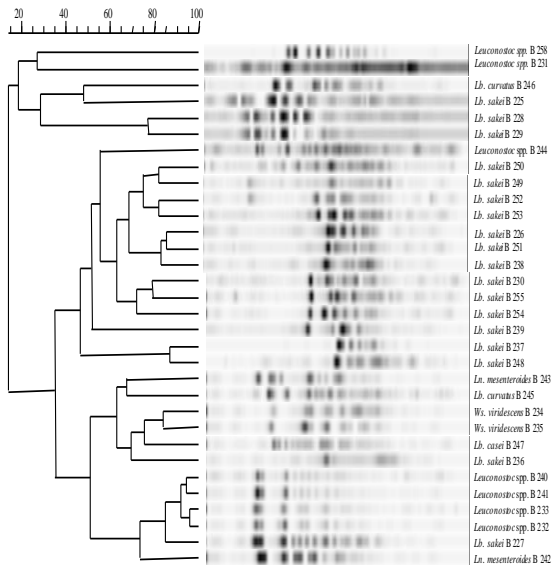
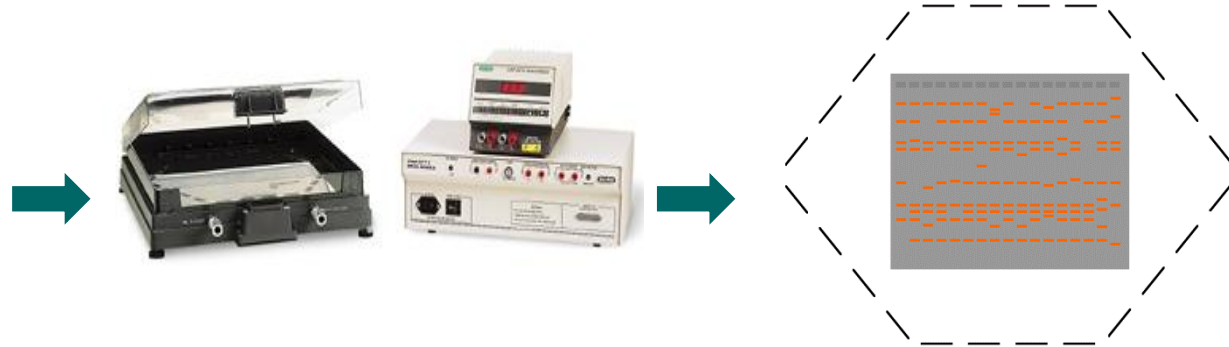
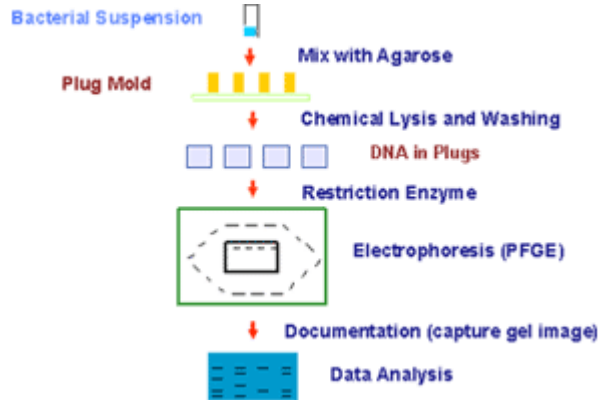
# PFGE 1/2

## Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

- Μέθοδος εξαρτώμενης καλλιέργειας.
- Δυνατότητα διαχωρισμού ακόμα και πολύ μεγάλων μορίων DNA καθώς κινούνται στην πηκτή (gel) αγαρόζης κατά την περιοδική εναλλαγή του πεδίου.
- Ανάλυση του συνόλου του γονιδιώματος.
- Δυνατότητα διαχωρισμού σε επίπεδο στελέχους .
- Ευαίσθητη και αναπαραγωγική μέθοδος με την υψηλότερη διακριτική ικανότητα.
- Πρότυπη μέθοδος.



# PFGE 2/2





# FISH 1/2

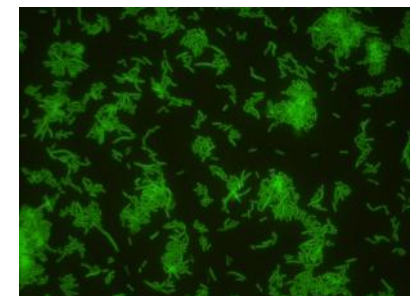
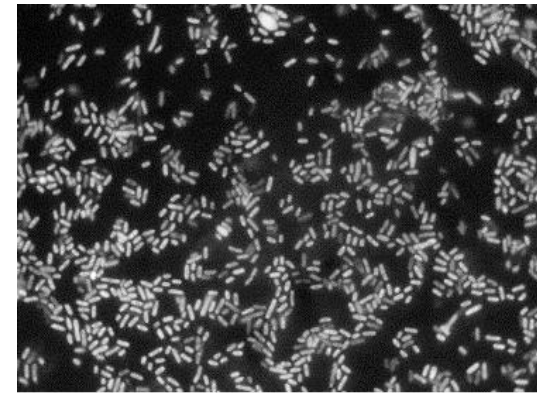
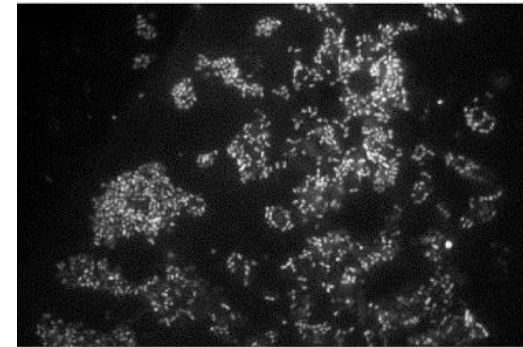
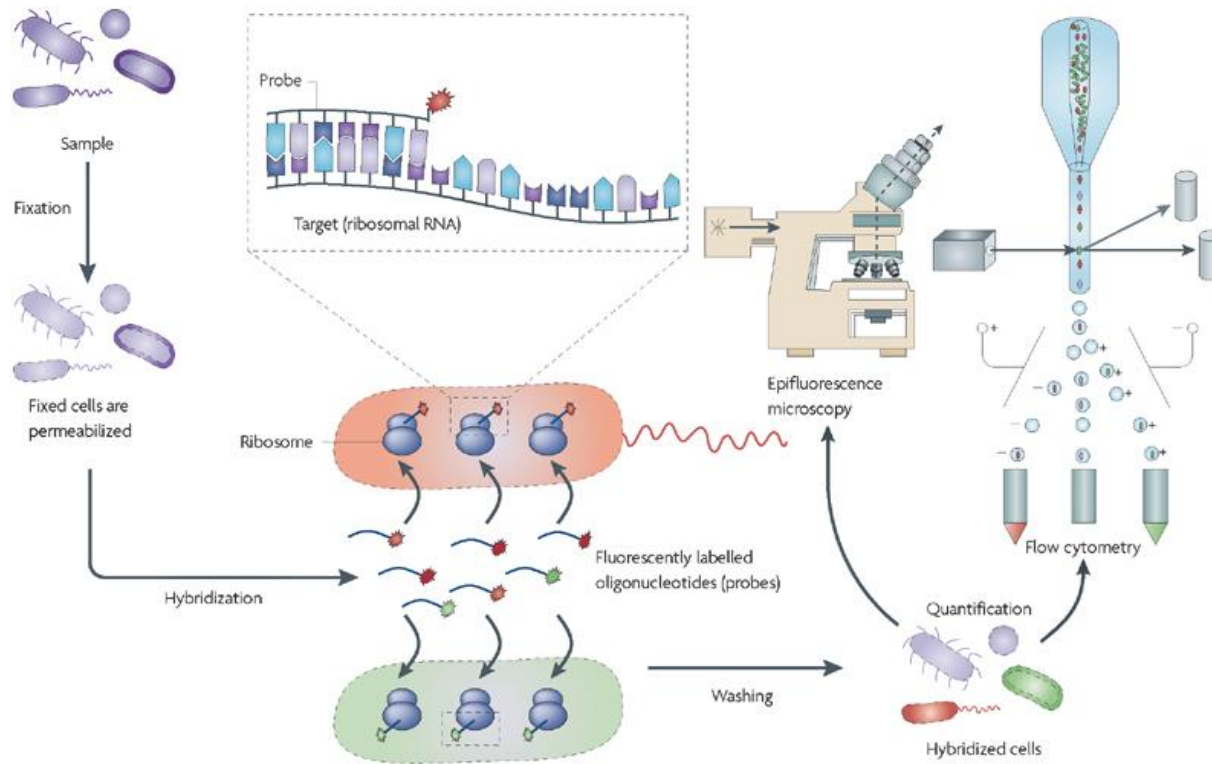
## Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

- Μέθοδος ανεξάρτητης καλλιέργειας.
- Χρησιμοποιεί ένα δείκτη φθορισμού για να εντοπίσει συγκεκριμένα γονίδια σε ένα κύτταρο ή ένα ιστό.
- Η παρατήρηση του αποτελέσματος γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού.
- Ως τεχνική διαθέτει μεγάλη διακριτική ικανότητα ενώ θεωρείται ότι είναι αρκετά ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος.





# FISH 2/2





# Transcriptomics

1. Real – Time PCR
2. Microarrays



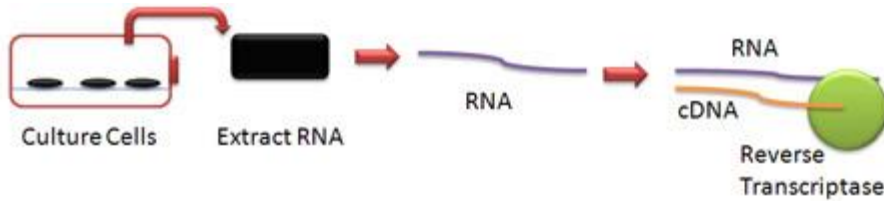
# Real time PCR 1/2

## Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

- Σε πραγματικό χρόνο παρατηρούμε λόγω της εμφάνισης φθορισμού τα προϊόντα της PCR για το γονίδιο στόχο που θέλουμε να μελετήσουμε.
- Θεωρείται ισχυρή τεχνική ανίχνευσης γονιδίων στόχων με ικανότητα ποσοτικοποίησης.
- Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παρουσίας/απουσίας γονιδίων (πχ για ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών) και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης γονιδίων στόχων ανάλογα με την φάση ανάπτυξης ή τις περιβαλλοντικές συνθήκες.



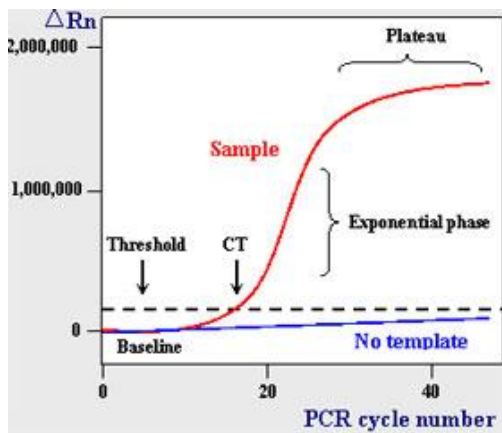
# Real time PCR 2/2



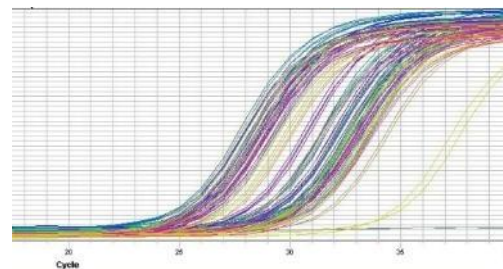
Απομόνωση RNA και παραλαβή cDNA με RT-PCR



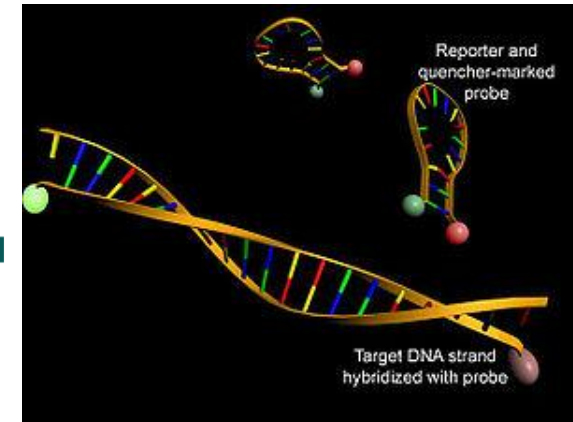
Real-Time PCR



Ανάλυση αποτελεσμάτων



Αποτελέσματα



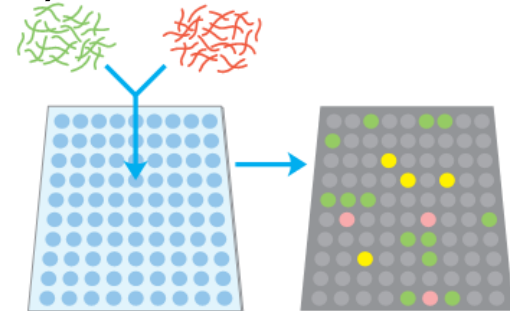
Εμφάνιση φθορισμού



# Microarrays 1/2

## Αρχές Λειτουργίας – Εφαρμογές

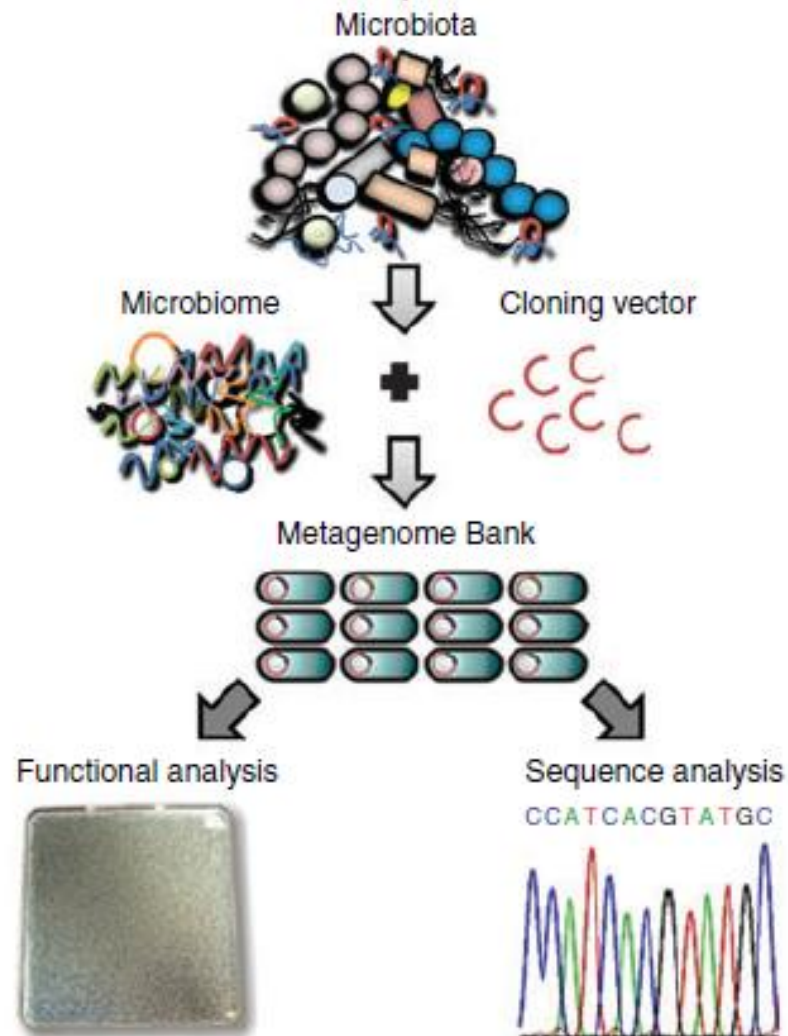
- Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο (ποιοτικό ή/και ποσοτικό) της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων καθώς και για την μικροβιακή ποικιλότητα ενός περιβαντολογικού δείγματος.
- Σε μια στερεή επιφάνεια (γυάλινη ή σιλικόνης) σε συγκεκριμένες κουκίδες έχουν τοποθετηθεί συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (probes) σε μικροποσότητες (picomoles).
- Βασίζεται στην παραγωγή φθορισμού από συγκεκριμένες κουκίδες (spots).





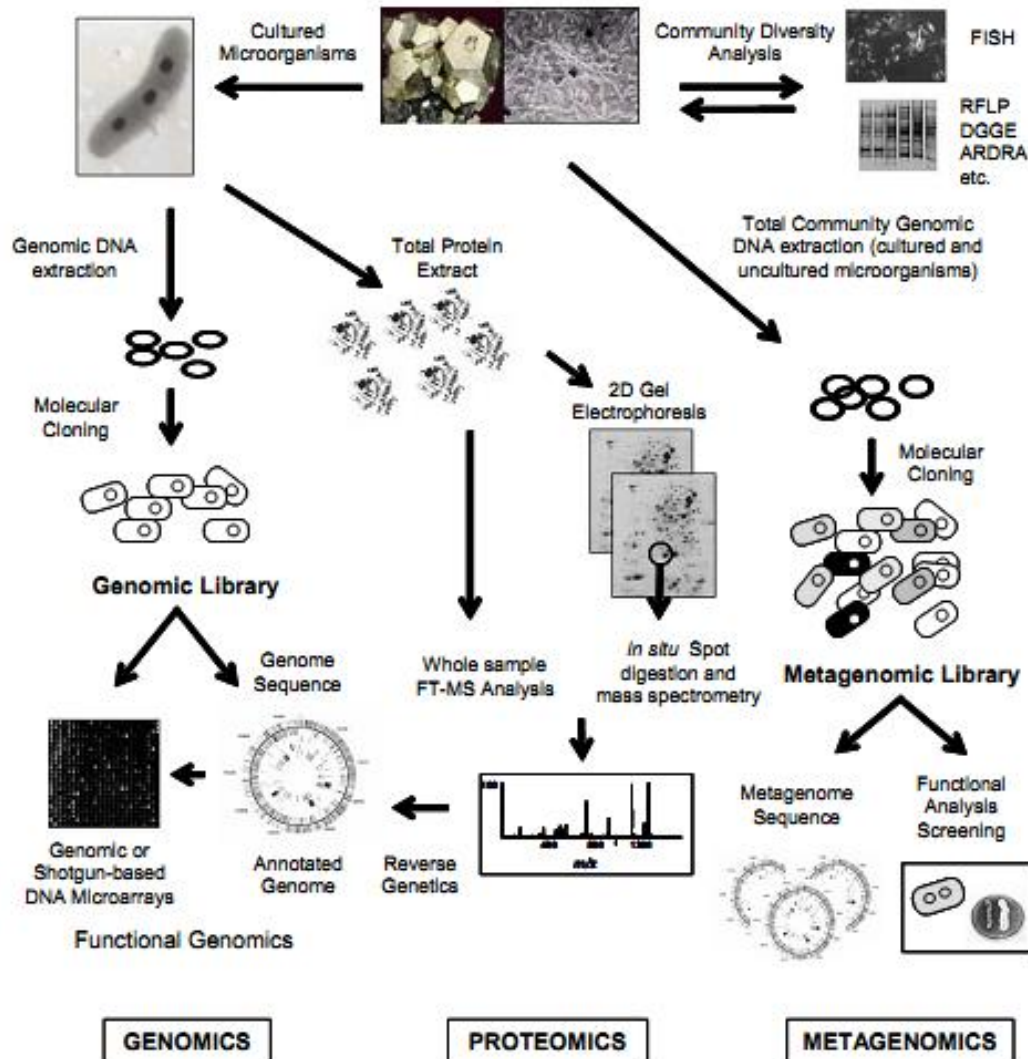


# Metagenomics 1/2





# Metagenomics 2/2







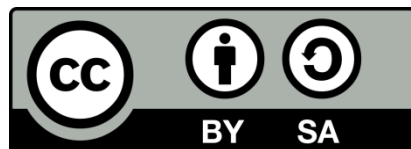
# Βιβλιογραφία

- 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.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



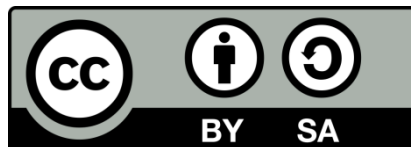
# Σημείωμα Αναφοράς

- 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.