ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ *ESCHERICHIA COLI* ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ»

ΕΙΡΗΝΗ ΑΕΡΑΚΗ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ, 2020

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ,
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ,
2020

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΚΑΘ. Φ. ΒΕΡΒΕΡΙΔΗΣ

ΚΑΘ. Ε. ΤΡΑΝΤΑΣ

ΚΑΘ. Κ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ

ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στην ομάδα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Γεωπονίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημων. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Φίλιππο Βερβερίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο έργο.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Εμμανουήλ Τραντά για τη βοήθεια του στην ολοκληρωση του παρόντος έργου.

Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν στην συμφοιτήτρια μου Λίντια Μεχμετλάρη για την βοήθεια της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... **IV**

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ ..... **VI**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **VII**

ABSTRACT ..... **VIII**

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ **1**

1.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ 2

1.1.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΤΑ 2

1.1.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ 3

1.2 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ ESHERICHIA COLI 3

1.3 ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ 3

1.3.1 ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ (ΥΤ) 4

1.3.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ 4

1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ 5

1.4.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) 5

1.4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 6

1.5 ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ 6

1.6 ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 8

2 ΥΛΙΚΑ **9**

2.1 ΟΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ 9

2.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ 9

2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ 12

2.4 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ 12

2.4.1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ 12

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ 12

3 ΜΕΘΟΔΟΙ **14**

3.1 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ 14

3.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ LB 14

3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ 14

3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA 15

3.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ 15

3.6 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ 15

3.7 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ PCR 16

3.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 18

3.9 GLYCEROL STOCK OF BACTERIAL 18

3.10 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ ΤΑ IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 19
3.10.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ M9 19
3.10.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ 19
3.11 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ 21
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 22
4.1 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΗΜΕΝΗΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΗΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ pS4 ΚΑΙ pY3 ΣΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ E.COLI. 22
4.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ HMS174, 1T, 1A, 2,7T, 7A, 8, 9, 10 22
4.2.1 IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 24
4.3 ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ 27
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ 29
5.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ..... **ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.**
5.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ 31
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 33

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Πίνακας 1: *Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται μέσα στο κείμενο και στις Εικόνες / Σχήματα*

Σύντμηση	**Πλήρες όνομα**
E. coli	*Escherichia coli*
YT	*Υδροξυτυροσόλη*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
Tm	*Melting temperature*
Ta	*Annealing temperature*
Amp	*Ampicillin*
Spect	*Spectinomycin*
Kan	*Kanamycin*
Chl	*Chloramphenicol*
An	*Annealing*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μία από τις πιο άφθονες φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται στους ιστούς της ελιάς είναι η υδροξυτυροσόλη. Είναι μια ουσία η οποία φέρει πληθώρα ευεργετικών επιδράσεων, όπως η αντιοξειδωτική δράση, η ικανότητα προστασίας από το καρκίνο. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της υδροξυτυροσόλης είναι η δυνατότητα χρήσης της ως συμπλήρωμα διατροφής. Η απομόνωση της από την ελιά είναι αρκετά δύσκολη διαδικασία και στην παρούσα εργασία έγινε η προσπάθεια παραγωγής της μέσω ενός βιοσυνθετικού μονοπατιού που έχει εισαχτεί στο βακτήριο *Escherichia coli*.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται ανάλυση των ιδιοτήτων της υδροξυτυροσόλης, δίνονται πληροφορίες για το βακτήριο *Escherichia coli* και των μεθόδων της μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του γενετικά τροποποιημένου βακτηρίου. Επίσης γίνεται ανάλυση του βιοσυνθετικού μονοπατιού για την παραγωγή υδροξυτυροσόλης. Στο δεύτερο κεφάλαιο αναφέρονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος. Στη συνέχεια στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται αναλυτική παρουσίαση των μεθόδων που πραγματοποιήθηκαν. Μετέπειτα, στο τέταρτο κεφάλαιο αναφέρονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν όσα αναφορά την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών και την παραγωγή της υδροξυτυροσόλης. Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο επεξηγούνται τα αποτελέσματα και παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν.

ABSTRACT

One of the most common abundant phenolic compounds found in olive tissues is hydroxytyrosol. It is a substance that has a variety of beneficial effects, such as antioxidant action, the ability to protect against cancer, and its use as a dietary supplementation. Isolating this substance from the olive is quite a difficult process and in the present work an attempt is made to produce it through a bio-synthetic pathway introduced into the *E.coli* bacterium.

In the first chapter, the properties of hydroxytyrosol are analyzed, information is given about the *E.coli* bacterium and the methods of molecular biology used to produce the genetically modified bacterium. The biodegradable pathway for production of hydroxytyrosol is alsi analyzed. The second chapter lists the materials used to perform the experiment. Then in the third chapter a detailed presentation of the methods carried out is made. Moving on, the fourth chapter deals with the results regarding the identification of bacterial strains and the production of hydroxytyrosol. Finally, in the fifth chapter explains the results and presents the conclusion that emerged.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο τομέας της βιοτεχνολογίας τις τελευταίες δεκαετίες παρουσιάζει μεγάλη ανάπτυξη και αφορά τις τεχνικές για την τροποποίηση οργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή τροφίμων. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούν βιολογικά συστήματα και μπορεί να είναι ζωντανοί οργανισμοί δηλαδή φυτά, ζώα και μικροοργανισμοί (Μπατρίνου, 2001).

Ο όρος βιοτεχνολογία χρησιμοποιήθηκε το1919 για πρώτη φορά για να προσδιορίσει την διαδικασία παραγωγής ακατέργαστων υλικών με τη βοήθεια ζωντανών οργανισμών. Και στα μέσα της δεκαετίας του 1970 υπήρξε μεγάλη ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής. Και για αυτό το λόγο ο 21ος αιώνας θεωρείται ο αιώνας της βιοτεχνολογίας. Η επιστήμη της βιοτεχνολογίας βρίσκει πολλές εφαρμογές στην ιατρική, τη γεωργία, τη χημική βιομηχανία, την προστασία του περιβάλλοντος κ.α. (Μπατρίνου, 2001)

Όπως προαναφέρθηκε, μια κατηγορία οργανισμών που χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία είναι τα βακτήρια. Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί, μονοκύτταροι, ετερότροφοι οργανισμοί που κατά κανόνα πολλαπλασιάζονται με κυτταρικές διαιρέσεις (Μπαλατσούρας, 2006). Τα βακτήρια βρίσκονται στο έδαφος και στο νερό ενώ, μπορεί να βρεθούν και στο ανθρώπινο σώμα. (Καραγκούνη, 1999) Έχουν μικρό μέγεθος και η διάμετρος τους δεν ξεπερνά το 1μm. Ως ετερότροφοι οργανισμοί παρασιτούν σε ανώτερα φυτά και ζώα καθώς και σε ανθρώπους και σαπρόφυτα (Μπαλατσούρας, 2006) .

Ένα από τα κύρια συστατικά της μεσογειακής διατροφής είναι το ελαιόλαδο το οποίο είναι γνωστό για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Μια από τις πιο σημαντικές ουσίες του ελαιόλαδου στις οποίες οφείλονται οι ευεργετικές δράσεις είναι η υδροξυτυροσόλη. Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν στις αρχές τις δεκαετίας του 1990, αποδείχθηκε ότι μπορεί να απομονωθεί από το ελαιόλαδο. Η υδροξυτυροσόλη έχει αντιμικροβιακή δράση σε παθογόνα που υπάρχουν σε φυτά και στους ανθρώπους. Στις Μεσογειακές χώρες σε σχέση με χώρες της Βόρειας Ευρώπης αλλά και σε άλλες Δυτικές χώρες έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνου που κατά ένα μεγάλο ποσοστό οφείλεται στη μεσογειακή διατροφή και στην κατανάλωση ελαιολάδου που είναι πλούσια σε ΥΤ. Η ΥΤ είναι γνωστό ότι μπορεί να δρα ως αναστολέας της βακτηριακής δράσης αφού περιορίζει την παραγωγή τοξικών ουσιών. Επιπλέον έχει αντιοξειδωτική δράση, είναι

αντιφλεγμονώδες και προστατεύει από καρδιακές νόσους αφού μπορεί και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

1.1 Γενετική μηχανική

Μία από τις εφαρμογές της βιοτεχνολογίας είναι η γενετική μηχανική όπου είναι μια μεγάλη αλλαγή στην παγκόσμια γεωργία με αποτέλεσμα αυτής την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Καλτσίκης, 1989). Ήταν ένα επιστημονικό επίτευγμα των τελευταίων δεκαετιών που επιχείρησε ο άνθρωπος και ξεκίνησε αρχικά από μικροοργανισμούς ώστε να αποτελέσουν την πηγή πρωτεϊνών και εξελίσσεται σε πολυπλοκότερους οργανισμούς όπως τα φυτά (Τσαυτάρης, 1998). Η γενετική μηχανική είναι ένα σύνολο τεχνικών που μας επιτρέπει να χειριζόμαστε γονίδια από οποιοδήποτε οργανισμό και να τα μεταφέρουμε σε οποιοδήποτε άλλο (Τσαυτάρης, 2012). Πιο συγκεκριμένα, είναι μια τεχνική με την οποία γίνονται μεταβολές και τροποποιήσεις στο γονιδίωμα ενός οργανισμού σύμφωνα με την μέθοδο του ανασυνδιασμένου DNA (Directive 2001/18/EC, 2001) .

Σημαντικό ρόλο στη εξέλιξη της γενετικής μηχανικής έπαιξε η ανακάλυψη των περιοριστικών ενζύμων και της DNA λιγάσης. Τα περιοριστικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να διασπούν την αλυσίδα του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις και η DNA λιγάση έχει την ιδιότητα να συνδέει δύο τμήματα DNA. Συνεπώς, μπορούν να παρασκευαστούν εργαστηριακά τεχνητά μόρια DNA προερχόμενα από δύο ή περισσότερους οργανισμούς (π.χ. φυτό και βακτήριο) (Χατζόπουλος, 2001). Οι βασικές τεχνικές της γενετικής μηχανικής είναι η κλωνοποίηση του DNA, η απομόνωση γονιδίων από βιβλιοθήκες γενετικού υλικού, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η μέθοδοι εύρεσης της αλληλουχίας των βάσεων του DNA.

1.1.1 Γενετική μηχανική και απομόνωση ουσιών απευθείας από τα φυτά

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση ενός σημαντικού χαρακτηριστικού, μπορεί να απομονωθεί από οποιοδήποτε φυτό ή άλλο οργανισμό και να μεταφερθεί σε άλλο ή άλλους οργανισμούς. Με την γενετική μηχανική, χαρακτηριστικά που δεν μπορούσαν να μεταφερθούν στο παρελθόν με τις κλασικές μεθόδους τώρα μπορούν. Έτσι, για παράδειγμα ένα γονίδιο ανθεκτικότητας μπορεί να απομονωθεί από εξωτικά φυτά και να μεταφερθεί σε καλλιεργούμενες ποικιλίες. Όλοι λοιπόν οι περιορισμοί που υπήρχαν ξεπερνιούνται με τη βοήθεια της γενετικής

μηχανικής (Eckes, et., al, 1987).

1.1.2 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν σημαντικό εργαλείο της γενετικής μηχανικής. Είναι μικρά δίκλωνα μόρια DNA που υπάρχουν σε βακτήρια και σε κάποια είδη ζυμομυκήτων και αποτελούνται από χιλιάδες ζευγάρια βάσεων. Μέσα στα πλασμίδια υπάρχουν ειδικές περιοχές όπου είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή τους μέσα στους ξενιστές (Brown, 2010).

Τα πλασμίδια είναι απαραίτητα εργαλεία για την κλωνοποίηση των γονιδίων. Έτσι ώστε να μπορέσουν να διατηρηθούν μέσα στα κύτταρα του βακτηρίου. Τα πλασμίδια αυτά έχουν ανθεκτικότητα σε κάποια αντιβιοτικά ώστε να μπορούν να επιλεχθούν τα κύτταρα στα οποία έχουν εισαχθεί επιτυχώς τα διαγονίδια κατά την κλωνοποίηση (Brown, 2010).

1.2 Το βακτήριο Escherichia coli

Μια από τις οικογένειες των βακτηρίων είναι η Enterobacteriaceae. Τα βακτήρια που κατατάσσονται σε αυτή την οικογένεια ανήκουν στη φυσική χλωρίδα του εντέρου. Το πιο σημαντικό βακτήριο αυτής της οικογένειας είναι το *Escherichia coli*, που είναι κατά Gram αρνητικό. Ζουν στο πεπτικό σύστημα των ανθρώπων, των ζώων και στο νερό. Μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στα τρόφιμα και προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου (Καραγκούνη, 1999). Από πλευράς δομής χαρακτηρίζεται ως ένα ραβδόμορφο βακτήριο με μήκος 0,1- 10 μΜ και περιέχει ένα κυκλικό χρωμόσωμα. Το *E.coli* τρέφεται με θρεπτικά υποστρώματα που είναι σε στερεή και υγρή μορφή, ενώ ακόμα μπορεί και να πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτό (Siedler et al, 2014).

Τα στελέχη του *E.coli* χρησιμοποιούνται στην γενετική μηχανική για διαφόρους σκοπούς όπως, για την παραγωγή ζωικών πρωτεϊνών και προϊόντα ιατρικού ενδιαφέροντος. Επιπλέον χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενζύμων για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης και αρωματικών υδρογονανθράκων και την παραγωγή ενζύμων για δημιουργία βιοαιθανόλη (Prescott & Fricker, 1999).

1.3 Βιοενεργά στοιχεία

Βιοενεργά συστατικά ορίζονται τα στοιχεία των τροφίμων τα οποία είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο με έρευνες και μελέτες ότι μπορούν να

πραγματοποιήσουν μια συγκεκριμένη λειτουργία μέσα σε έναν οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα είναι ουσίες οι οποίες εμπεριέχονται μέσα στα συμβατικά τρόφιμα και συμβάλουν στη βελτίωση της υγείας αφού μειώνουν την εμφάνιση ασθενειών ή βοηθούν την βελτίωση λειτουργίας του οργανισμού. Στοιχεία με αυτές τις ιδιότητες μπορεί να είναι τα μακροστοιχεία, τα μικροστοιχεία, φυτοχημικές ουσίες, πολυφαινόλες και ταννίνες καθώς και άλλα στοιχεία (Kris-Etherton, 2002). Στην παρούσα πτυχιακή εργασία το βιοενεργό στοιχείο που θα μας απασχολήσει είναι φαινόλη που ονομάζεται υδροξυτυροσόλη.

1.3.1 Υδροξυτυροσόλη (ΥΤ)

Ένα από τα κύρια συστατικά της μεσογειακής διατροφής αποτελεί το ελαιόλαδο το οποίο είναι ευρέως γνωστό για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Μία από τις πιο σημαντικές ουσίες του ελαιόλαδου είναι η υδροξυτυροσόλη, μια φαινολική ένωση στην οποία οφείλετε μεγάλο μέρος της ευεργετικής δράσης που προέρχεται από την υδρόλυση της ελαιοευρωπαΐνης (Κυριτσάκης, 2007). Εμπεριέχεται στους καρπούς της ελιάς, στους ιστούς και στο εκχύλισμα του ελαιόλαδου αλλά και στα λύματα των ελαιοτριβείων (Agalias, 2007). Η ποσότητα της υδροξυτυροσόλης που εμπεριέχεται στην ελιά εξαρτάται από την ποικιλία, τις τεχνικές ανάπτυξης, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και στην διαχείριση του ελαιόκαρπου στην συγκομιδή και στην εκχύλιση (Alagna, 2012). Χαρακτηρίζεται ως μια ουσία που έχει αντιοξειδωτική και αντικαρκινική ικανότητα ενώ, καθίσταται ως το ιδανικό συμπλήρωμα ή συντηρητικό που πρέπει να χρησιμοποιείται στην τροφική και αγροχημική βιομηχανία τροφίμων (Trantas, 2019).

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μεγάλη αύξηση των επιστημονικών ερευνών που γίνονται με στόχο την υδροξυτυροσόλη.

1.3.2 Ιδιότητες υδροξυτυροσόλης

Μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες της είναι η αντιοξειδωτική δράση που συμβάλει στην μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων όπως η στεφάνια νόσος και η αρτιοσκλήρηνση. Με τη δράση της γίνεται η αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών που δημιουργούνται μέσα στα κύτταρα και έτσι προστατεύει από το μετασχηματισμό των κυττάρων σε καρκινικά (Granados, 2010). Επιπλέον, έχει την ιδιότητα να βοηθά στη διαμόρφωση και την συντήρηση των οστών, και έτσι χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την οστεοπόρωση (Visioli, 2002). Τέλος, έχει αντιμικροβιακή δράση σε παθογόνα που

παρουσιάζονται στους ανθρώπους αλλά και στα φυτά. Δηλαδή μπορεί να αναστείλει τη δράση των βακτηρίων (Bisignani, 1999).

1.4 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

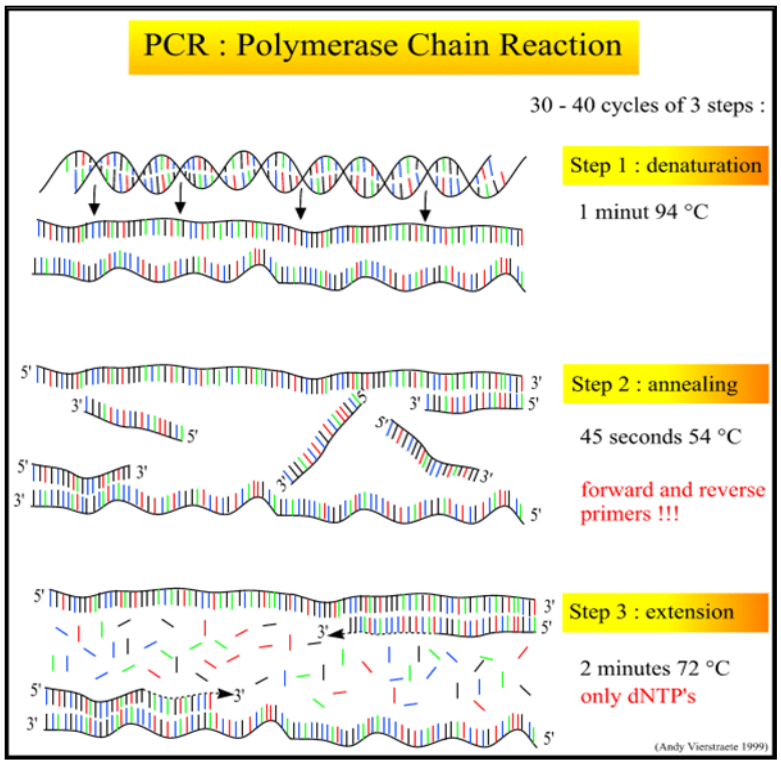
Η παρούσα πτυχιακή εργασία στηρίχτηκε σε μεθόδους και τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Οι κυριότερες τεχνικές είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

1.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ο Karry Mullis το 1984 δημιούργησε την τεχνική της PCR ενώ, το 1993 βραβεύτηκε με το βραβείο Νόμπελ. Η PCR είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία και στην ιατρική (Βερβερίδης, 2003). Η τεχνική αυτή δίνει την δυνατότητα να δημιουργούνται πανομοιότυπα αντίγραφα ενός DNA που προέρχεται από μικρή ποσότητα απομονωμένου DNA ενός οργανισμού (Ντούνη, 2010). Παρουσία του ενζύμου DNA Πολυμεράσης, και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος καθώς και άλλων σημαντικών αλάτων και κατάλληλων εκκινητών, που ορίζουν την αρχή και τέλος του τμήματος DNA του οποίου στοχεύετε η αναπαραγωγή, σε κατάλληλη θερμοκρασία, μπορεί το ένζυμο αυτό να αναπαράγει τμήματα DNA δημιουργώντας εκατομμύρια αντίγραφα, μέσα σε λίγες ώρες. Η αναπαραγωγή ενός νέου τμήματος DNA από ένα υπάρχον αντίγραφο (template) που υπάρχει στο δοκιμαστικό σωλήνα που πραγματοποιείται η PCR, αναφέρεται ως κύκλος της αντίδρασης. Κατά τη διαδικασία της λειτουργίας της αντίδρασης PCR πραγματοποιείται συγκεκριμένος αριθμός επαναλαμβανόμενων κύκλων της αντίδρασης.

Πρακτικά η μέθοδος αυτή εκτελεί μία συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που μέσα σε αυτών συμπεριλαμβάνονται τρία στάδια (Εικόνα 1):

- Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, δηλαδή γίνεται ο διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση στους 90-95°C (Tm, melting temperature)
- Υβριδοποίηση εκκινητών στις αλληλουχίες του DNA στόχου, στην οποία γίνεται η σύνδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές περιοχές των δύο αλυσίδων και μειώνεται η θερμοκρασία στους 35-55 ^{o}C (Ta, annealing temperature)
- Επιμήκυνση εκκινητών, όπου γίνεται η σύνδεση των συμπληρωματικών αλυσίδων με την δράση της ειδικής Taq DNA πολυμεράση στους 72 ^{o}C (Τσαυτάρης, 2012).



Εικόνα 1: Βασικά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Vierstraete, 1999). Αρχικά στο step 1 γίνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA. Στη συνέχεια στο step 2 γίνεται η σύνδεση τον εκκινητών στις συμπληρωματικές περιοχές. Και στο step 3 γίνεται η επιμήκυνση δηλαδή η σύνθεση των αλυσίδων.

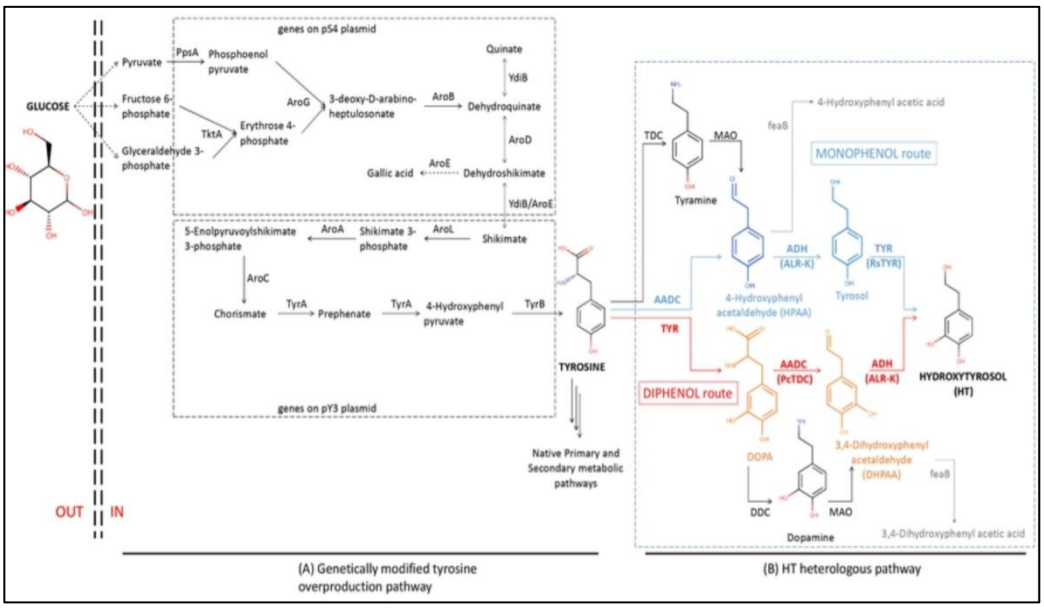
1.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μέθοδος που γίνεται για τον διαχωρισμό των μορίων DNA με βάση το μέγεθος τους. Τα δείγματα του DNA που έχουν εισαχθεί με τη διαδικασία της PCR τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις που έχουν δημιουργηθεί από πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα βρίσκεται μέσα σε διάλυμα αλάτων που δημιουργεί διαφορά δυναμικού στα άκρα του πηκτώματος. Η τάση έχει σαν αποτέλεσμα την μετακίνηση του δείγματος DNA από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο (Ντούνη, 2010).

1.5 Βιοσυνθετικό μονοπάτι υδροξυτυροσόλης

Για την παραγωγή της υδροξυτυροσόλης έχουν γίνει αρκετές έρευνες. Επιχειρήθηκε να παραχθεί με την χρήση τυροσίνης (TYR) ως βιοκαταλύτη αλλά και με τη χρήση μιας φαινολικής υδροξυλάσης από τον *Geobacillus thermoglucosidasius*. Ωστόσο τα αποτελέσματα παρουσίασαν αστάθεια του ενζύμου TYR αλλά υπήρχε και

μεγάλο κόστος (Espin, 2001). Σε άλλη επιστημονική έρευνα επιτεύχθηκε η παράγωγη HT χρησιμοποιώντας το βακτήριο *Escherichia coli*, αλλά σε μικρές ποσότητες (Satoh, 2012).



Εικόνα 2: Μεταβολικό σχήμα για την παραγωγή υδροξυτυροσόλης από το βακτήριο Escherichia coli απευθείας από τη γλυκόζη. Στο μέρος Α της εικόνα βλέπουμε ότι η τυροσίνη παράγεται μέσω του πρωτογενούς μεταβολισμού που είναι ο κύριος τρόπος για την μεταβίβαση στο μέρος Β. Το Β μέρος αποτελεί το νεοσύστατο μονοπάτι που είναι ικανό να μετατρέψει την τυροσίνη σε υδροξυτυροσόλη. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα να παραχθεί υδροξυτυροσόλη με δύο τρόπους. Από την κόκκινη διαδρομή μέσο του γονιδίου TYR όπου η υδροξυτυροσόλη προέρχεται μέσω της από την υδροξυλίωση της τυροσίνης σε λ- 3,4- διυδροξυφαιλαλανίνη (L-DOPA). Αλλά και από την διαδρομή του μπλε μονοπατιού μέσω του γονιδίου AAS όπου η παραγωγή της υδροξυτυροσόλης προέρχεται από την αποκαροξυλίωση και την αποαμίνωση της τυροσίνης (Trantas, 2019).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία γίνεται η προσπάθεια παραγωγής HT από το βακτήριο το *Escherichia coli*. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζεται μια διπλή προσέγγιση για την παραγωγή HT σε μεγάλες ποσότητες σε σχέση με άλλες έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής (Εικ.2). Έχει γίνει προσαρμογή ώστε να παράγεται η τυροσίνη πριν την HT χρησιμοποιώντας τρία γονίδια: α) αρωματική συνθάση ακεταλδεϋδης (AAS) β) αναγωγάση αλδεϋδης (ALRK) και γ) τυροσινάση (TYR). Για την πραγματοποίηση αυτών έχουν κατασκευαστεί στελέχη τα οποία εκφράζουν γονίδια για την παραγωγή HT αλλά και για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας ενδογενούς τυροσίνης που θα οδηγήσει με υψηλές ποσότητες HT απευθείας από τη γλυκόζη. (Juminaga, 2012). Η HT είναι ικανή να μετατρέψει την τυροσίνη σε HT. Λόγω του γονιδίου AAS που κλωνοποιήθηκε από μαϊντανό και της TYR που κλωνοποιήθηκε από την *Ralstonia solanacearum* δημιουργήθηκε μία διπλή οδός. Η οδός μέσω της

συνθάσης AAS η οδός της μονοφαινόλης απεικονίζει την ενζυμική οδό για τη βιοσύνθεση της HT που προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση της τυροσίνης, ενώ η οδός μέσω της TYR απεικονίζει την διαδρομή HT που προέρχεται από την υδροξυλίωση της τυροσίνης L-DOPA (λ- 3,4- διυδροξυφαιλαλανίνη).

1.6 Σκοποί της πτυχιακής εργασίας

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τον έλεγχο της λειτουργίας των βακτηριακών στελεχών του *E.coli* όσο αφορά την σύσταση τους, για την παραγωγή της φαινολικής ένωσης HT με τις κατάλληλες μεθόδους. Με άλλα λόγια, στόχος είναι η ταυτοποίηση των μετασχηματισμένων βακτηριακών στελεχών έτσι ώστε να εξακριβωθεί ότι τα πλασμίδια τα οποία έχουν εισαχθεί μετά από μετασχηματισμό υπάρχουν μέσα στα τροποποιημένα στελέχη. Πιο συγκεκριμένα θα χρησιμοποιηθούν υπάρχοντα κύτταρα στελεχών HMS 174 του *E.coli* που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση, διά της εισαγωγής γονιδίων βιοσυνθετικού μονοπατιού, μέσω κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων, που έχει σχεδιαστεί στην ομάδα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου. Στη συνέχεια τα τροποποιημένα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο υπόστρωμα και μετά την ανάπτυξη τους ακολουθεί η ταυτοποίηση τους, για το έλεγχο της ύπαρξης των νέων, ετερόλογων γονιδίων για όλα τα στελέχη με την μέθοδο PCR και ακολουθεί η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης. Ακολουθούν τα πειράματα έκφρασης και τα αποτελέσματα αυτών γίνονται οι μετρήσεις για την ποσότητα HT που έχει παραχθεί.

2 ΥΛΙΚΑ

2.1 *Όργανα – Συσκευές*

Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιακή εργασία και θα παρουσιαστούν στο Κεφάλαιο 3 χρησιμοποιήθηκαν τα όργανα:

- Επωαστικός θάλαμος (MMM Medcenter,)
- Επαγωγός εστία (Vircus lubro, IP66)
- Απαγωγός νηματικής ροής (Telstar, BIO-II-A)
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu, UV-1700)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Sue-plus, HU13)
- Συσκευή real time PCR (Strategene, MX 3005P)
- Φυγόκεντρος (KUBOTA corp, 7780)
- Κλίβανος αποστείρωσης (Raypa, AE-28 Dry)
- Μικροφασματοφωτόμετρο (Thermo scientific, 2000c)
- Φούρνος μικροκυμάτων (Sharp)

2.2 *Βακτηριακά στελέχη*

Το στέλεχος του βακτηρίου *E.coli* που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα είναι το HMS174. Πρόκειται για ένα στέλεχος μέσα στο οποίο έχουν εισαχθεί πλασμίδια με τη μέθοδο του μετασχηματισμού. Τα μεταβολικά τροποποιημένα στελέχη δόθηκαν από την ομάδα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας φυτών και παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2 που ακολουθεί. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι το HMS174 το οποία είχα προστεθεί μέσα σε αυτά πλασμίδια και γονίδια. Οι περιπτώσεις που υπάρχουν είναι 12 διαφορετικές και η κάθε μια περιέχει διαφορετικούς συνδυασμούς από πλασμίδια, γονίδια και βέκτορες επιπλέον, σε κάθε μια περίπτωση έχει δοθεί ένας αριθμός. Τα στελέχη των βακτηρίων μένουν αποθηκευμένα στους -80°C.

Πίνακας 2: : Μετασχηματισμένα στελέχη του βακτηρίου E.coli για το HMS174 με τα πλασμίδια που έχουν εισαχθεί.

Περιπτώσεις	Όνομα	Προέρχεται από	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	pY3	pS4	TYR	AAS	ALRK	pCDF	pRSF
1 A	HMS174-+ TYR^{op}- HT^{op}- +pCDF-ALR-K	TYR^{op}- HT^{op}- pCDF-ALR-K	Amp, Chl, Kan, Spect	√	√	√	√	√	√	√
1 T	HMS174-+ TYR^{op}- HT^{op}- +pCDF-ALR-K	TYR^{op}- HT^{op}- pCDF-ALR-K	Amp, Chl, Kan, Spect	√	√	√	√	√	√	√
2	HMS174-+ TYR^{op}- pRSF+pCDF	TYR^{op}- HT^{op}- pCDF-	Amp, Chl, Kan, Spect	√	√				√	√
3	**HMS174--** HT^{op}-**+pCDF-ALR-K**	HT^{op}- pCDF-ALR-K	Kan, Spect			√	√	√	√	√
4	**HMS174-- pRSF+pCDF**	**pRSF$^{(1)}$ pCDF**	Kan, Spect						√	√
5A	**HMS174--** HT^{op}-	HT^{op}-	Kan			√	√			√
5T	**HMS174-- HT^{op}-**	HT^{op}-	Kan			√	√			√
6	**HMS174-- pRSF**	**pRSF$^{(2)}$**	Kan							√
7A	HMS174+ TYR^{op}+HT^{op}	TYR^{op}- HT^{op}-	Amp, Chl, Kan	√	√	√	√			√
7T	HMS174+ TYR^{op}+HT^{op}	TYR^{op}- HT^{op}-	Amp, Chl, Kan	√	√	√	√			√
8	HMS174+ TYR^{op}+pRSF	TYR^{op}- pRSF-$^{(1)}$	Amp, Chl, Kan	√	√					√
9	HMS174- TYR^{op}+pCDF-ALR-K	TYR^{op}- pCDF-ALR-K	Amp, Chl, Spect	√	√			√	√	
10	HMS174- TYR^{op}+pCDF	TYR^{op}- pCDF-	Amp, Chl, Spect	√	√				√	

Σύμφωνα με το Πίνακα 2 έχουμε στη περίπτωση 1A όπου έχουμε το στέλεχος HMS174 μαζί με TYR^{op} και HT^{op} καθώς και τους φορείς pCDF και το γονίδιο *ALRK* όπου είναι υπεύθυνο για την αναγωγή των πρωτεϊνών. Η περίπτωση αυτή προέρχεται από την υπερπαραγωγή της τυροσίνης και της υδροξυτυροσόλης και το πλασμίδιο pCDF που περιέχει το γονίδιο *ALRK*. Επίσης έχει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Kan, Spect, Amp, Chl. Το ίδιο ακριβώς έχουμε και στην περίπτωση 1T. Η περίπτωση 2 λειτουργεί ως control για τις περιπτώσεις 1A και 1T. Περιέχει HMS174 μαζί με TYR^{op} και τους φορείς pCDF και προέρχεται από την υπερπαραγωγή της τυροσίνης και την υδροξυτυροσόλης και τον φορέα pCDF, ενώ έχει και ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Kan, Spect, Amp, Chl. Στην περίπτωση 3 έχουμε το στέλεχος HMS174 με HT^{op}, τον φορέα pCDF που φέρει το γονίδιο *ALRK*. Η περίπτωση 3 παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Kan, Spect. Η περίπτωση 4 λειτουργεί ως control για την περίπτωση 3 και περιέχει το στέλεχος HMS174 μαζί με τους φορείς pCDF και pRSF. Προέρχεται από τους φορείς pCDF και pRSF και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Kan και Spect. Στις περιπτώσεις 5A και 5T έχουμε το στέλεχος HMS174 και HT^{op} και προέρχεται από την υπερπαραγωγή της υδροξυτυροσόλης ενώ, παρουσιάζουν ανθεκτικότητα το αντιβιοτικό Kan. Στην περίπτωση 6 που είναι control για τις 5A και 5T έχουμε το στέλεχος HMS174 με τον φορέα pRSF από τον οποίο και προέρχεται και παρουσιάζει ανθεκτικότητα τον αντιβιοτικό Kan. Στις περιπτώσεις 7A και 7T περιέχετε το στέλεχος HMS174 καθώς και TYR^{op} και HT^{op} σε αυτές τις περιπτώσεις έχουμε ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Amp, Chl και Kan. Η περίπτωση 8 λειτουργεί ως control για τις περιπτώσεις 7A και 7T και περιέχει το στέλεχος HMS174 μαζί με TYR^{op} και τον φορέα pRSF, προέρχεται από την υπερπαραγωγή της υδροξυτυροσόλης και της τυροσίνης ενώ, παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Amp, Chl και Kan. Στην περίπτωση 9 έχουμε το στέλεχος HMS174, με TYR^{op}, με τον φορέα pCDF και το γονίδιο *ALRK* το οποίο προέρχεται, από την υπερπαραγωγή της τυροσίνης και τον φορέα pCDF που περιέχει το γονίδιο *ALRK* ενώ, παρουσιάζεται ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Amp, Chl και Spect. Και τέλος έχουμε την περίπτωση 10 που λειτουργεί ως control για την περίπτωση 9 και περιέχει το γονίδιο HMS174, με TYR^{op} και τον φορέα pCDF που προέρχεται από την υπερπαραγωγή της τυροσίνης και τον φορέα pCDF, ενώ παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Amp, Chl και Spect.

2.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι η χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) από την εταιρία Honeywell, η γλυκόζη ($C_6H_{12}0_6$) και θειαμίνη ($C_{12}H_{17}N_4OS$) από την εταιρία Sigma-Aldrich. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν επταένυδρο φωσφορικό νάτριο μονοϋδρογόνου (Na_2HPO_4+$7H_2O$), και χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) από την εταιρία Fulka . Επίσης χρησιμοποιηθήκαν θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και Χλωριούχο νάτριο (NaCl) από την εταιρία Sigma-Aldrich

2.4 Θρεπτικά μέσα

Για την παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων LB (Luria Betrani) χρησιμοποιήθηκαν τα χημικά αντιδραστήρια NaCl και Agar από την εταιρία Fulka,και τα αντιδραστήρια Yeast Extract και Tryptone από την εταιρία Sigma-Aldrich. Οι ποσότητες για την Παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος αναφέρονται στο Κεφάλαιο 3.2.

2.4.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι η αμπικιλλίνη (Ampicillin), σπεκτινομυκίνη (Spectinomycin) καναμυκίνη (Kanamycin) και χλωραφαινικόλη (Chloraphenicol). Για την παρασκευή των αντιβιοτικών Κεφάλαιο 3.3.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για τη διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του master mix buffer, kapa Taq και dNTPs από την εταιρία Kapa Biotech αναλυτικά η διαδικασία και οι ποσότητες αναφέρονται στο Κεφάλαιο 3.7. Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκες ήταν επίσης από την εταιρία Kapa Biotech. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε kit για τη απομόνωση πλασμιδίου (plasmid extraction) από την εταιρία Machenery Nagel (Κεφάλαιο3.4). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα πλασμίδια pY3, pS4 και οι φορεις πλασμιδίων pCDF και pRSF μαζί με τους αντιστοίχους εκκινητές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι βάσεις και οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing temperature) που παρουσιάζονται είναι σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πίνακας 3: Τα πλασμίδια με τους αντίστοιχους primers και τις αλληλουχίες τους, η annealing θερμοκρασία που χρειάζονται στην PCR και το μέγεθος των βάσεων.

Πλασμίδιο	Όνομα	Εκκινητές	Αλληλουχία	Θερμοκρασία υβριδοποίησης εκκινητών	Μέγεθος ενισχυμένου τμήματος
pY3	P1	pY3p1-f	AATGGTGCATGCAAGGAGAT	51	454
		pY3p1-r	TGGCTTGCAGTTGTGGAATAA		
	P2	pY3p2-f	AATGCCGATGTGAAGACTGA	51	476
		pY3p2-r	GAGCGATGGGTTGTAACGTC		
	P3	pY3p3-f	ATGCGCTATATCGCGAAGTT	51	466
		pY3p3-r	TTTGAGCGTCAGATTTCGTG		
pS4	P1	pS4p1-f	GGTGATGTCGGCGATATAGG	51	375
		pS4p1-r	TCACATTCGCACCTTTACCA		
	P2	pS4p2-f	TGCTGCGTGACAAGAAAGTC	51	338
		pS4p2-r	GTATTCGCGGCATTTTCAGT		
	P3	pS4p3-f	TACTGCCGAAAGCGGTTACT	53	478
		pS4p3-r	ATGTGCCGTGTTTTCTGGAC		
pCDF	ALRK	yahK-fw1	CCATGGGCAAGATCAAAGCTGTTGGTGCAT	62	1100
		yahK-rv1	ACAGTCTGCAGGAGAGCGAAGTTAATATGT		
pRSF	TYR	RsTYRfw1	AACATATGGTCGTGCGTAGAAC	50	1490
		RsTYRrv2	GCTCGAGCAATCCATCAATCAAAT		
	AAS	PcTDCpimp1	GGTGGTTGCTCTTCCAACATGGGCTCCATCGA TAATCTTACTG	64	1500
		PcTDCpimp4	GGTGGTTGCTCTTCCGCATGATAATACTTCC ACGAGCTTATTGGAC		

Όλα τα πλασμίδια που αναφέρονται στον Πίνακα 3 φέρουν γονίδια και ένζυμα. Σύμφωνα με την Εικόνα 2 για το πλασμίδιο pY3 τα γονίδια *AroA*, *AroL*, *AroC*, *TyrA* και *TyrB*. Για το πλασμίδιο pS4 αντιστοιχούν τα γονίδια *PpsA*, *AroG*, *AroB*, *AroE*, *AroD*, *YdiB* και *TktA*.

3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία τα μετασχηματισμένα στελέχη δόθηκαν έτοιμα από προηγούμενο πείραμα που είχε διεξαχθεί. Η μέθοδος για το μετασχηματισμό των βακτηρίων που πραγματοποιήθηκε αναφέρεται παρακάτω.

Αρχικά, χρησιμοποιούνται κύτταρα του βακτηρίου *E.coli* ήταν αποθηκευμένα στους -80^{0}C και παρέμειναν σε πάγο για 10min μαζί με τα πλασμίδια. Μετά το πέρας των 10min μεταφέρονται 40ngr πλασμίδια μέσα στα κύτταρα και αφήνονται για 30min. Στη συνέχεια μεταφέρονται στο headstock στους 40^{0}C για 1min ώστε να γίνει ο μετασχηματισμός και μεταφέρονται ξανά στον πάγο για 5min. Ύστερα, μέσα στην επαγωγό εστία προσθέτονται 900μl υγρού LB και μεταφέρονται στον επωαστικό θάλαμο με κινούμε βάση στους 37^{0}C στις 200rpm για 1 ώρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 6min και την συνέχεια μέσα στην επαγωγό εστία αφαιρούνται τα 900 μl υγρού LB που προστέθηκαν και επαναδιαλύονται τα βακτήρια. Τέλος σε Petri με τα κατάλληλα αντιβιοτικά γίνεται η καλλιέργεια προσθέτοντας 50μl από τα μετασχηματισμένα κύτταρα και επωάζονται για 16 ώρες στους 37^{0}C και γίνεται έλεγχος των αποικιών ώστε να διαπιστωθεί η λειτουργικότητα τους.

3.2 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος LB

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος LB σε 500ml H_20 διαλύονται 2,5gr Yeast extract, 5gr NaCl, 5gr Tryptone και 7,5gr Agar και αποστειρώνονται στον κλίβανο. Για την παρασκευή υγρού LB προστίθενται τα παραπάνω εκτός από το Agar και αποστειρώνονται στον κλίβανο.

3.3 Παρασκευή αντιβιοτικών

Για την παρασκευή της Αμπικιλίνης (100μg/ml): Διαλύουμε 1gr Ampicillin σε 10ml H_2O. Για την παρασκευή της καναμικύνης (50μg/ml): Διαλύουμε 0,5gr Kanamycin σε 10ml H_2O. Για την χλωραφαινικόλη(34μg/ml): Διαλύουμε 0,340gr Chloramphenicol σε 10ml αιθανόλη και τέλος για την σπεκτινομικύνη (100μg/ml): Διαλύουμε 1gr Spectinomycin σε 10ml H_2O. Όλα τα αντιβιοτικά περνιούνται από ειδικό φίλτρο και στη συνέχεια τοποθετήθηκε το περιεχόμενο σε δοχείο 1,5ml και

αποθηκεύονται στους -20^{0}C.

3.4 Απομόνωση πλασμιδιακου DNA

Για την απομόνωση του πλασμιδικού DNA χρησιμοποιείτε ειδικό kit από την εταιρία Macherey - Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά γίνεται υγρή καλλιέργεια (overnight) με 5ml υγρό LB, 5μl από τα αντιβιοτικά που χρειάζονται και τα κύτταρα. Πάρθηκε 1ml από την καλλιέργεια και φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα, 11.000g και αφαιρέθηκε όλο το υπερκείμενο. Στη συνέχεια προστίθενται 250μl από A1 και γίνεται vortex. Αμέσως μετά, προστίθενται 250μl από A2 και επαναδιαλύεται 6-8 φορές και παραμένει σε ηρεμία για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 300μl από A3 και επαναδιαλύεται 6-8 φορές. Γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 11.000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου το διάλυμα να είναι διαυγές. Τοποθετείται το Plasmid Columns στα Collection tubes και προστίθενται 750 μL από το υπερκείμενο, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1λεπτό, στις 11.000 στροφές. Ακολουθεί προσθήκη 600μL από A4 και φυγοκέντρηση για 1λεπτό, στις 11.000 στροφές και αφαιρείται ότι έχει μείνει στο collection tube. Γίνεται ξανά φυγοκέντρηση για 2 λεπτά 11.000 στροφές και πετάχτηκε το collection tube. Τέλος τοποθετείτε το Plasmid colum σε 1,5 eppendorf tube και γίνεται η προσθήκη 30 μL AE και αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Αμέσως μετά ακολουθεί φυγοκεντρήση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές, αφαιρείτε το plamsid column γίνεται μέτρηση τοθ πλασμίδιο στο μικροφασματοφωτόμετρο (NanoDrop).

3.5 Έλεγχος λειτουργικότητας αντιβιοτικών

Για να διαπιστωθεί η λειτουργικότητα των αντιβιοτικών Kan, Spect, Chl και Amp που υπάρχουν, καλλιεργήθηκε σε τρυβλίο Petri για κάθε περίπτωση από τον Πίνακα 2 σε κάθε αντιβιοτικό ξεχωριστά. Κάθε τρυβλίο περιείχε 25ml στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και 25μl από το αντιβιοτικό και η καλλιέργεια έγινε από τα στελέχη που ήταν αποθηκευμένα στους -80^{0}C με λούπα. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37^{0}C για 14-16 ώρες.

3.6 Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών

Για την καλλιέργεια των στελεχών φτιάχτηκαν σε Petri με LB και τα κατάλληλα αντιβιοτικά σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Έγινε η καλλιέργεια των περιπτώσεων στα αντίστοιχα τρυβλία με λούπα κατευθείαν από τα stock που διατηρούνται στους 80^{0}C.

Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο στους 37^0C για 14-16 ώρες.

3.7 Πρωτόκολλα προετοιμασίας για την PCR

Η διαδικασία που πραγματοποιείται για την προετοιμασία για την PCR γίνεται μέσα στην εστία νηματικής ροής. Σε κάθε PCR δοχείο προσθέτουμε 2μl H_2O και με οδοντογλυφίδα μολύνθηκε το νερό με μέρος της αποικίες από κάθε περίπτωση. Στη συνέχεια σε μεγάλο δοχείο παρασκευάστηκε το master mix το οποίο αποτελείται για 1 δοχείο:

- 2,5μl buffer
- 0,5μl dNTPs
- 0,5μl από τον εκκινητή forward
- 0,5μl από τον εκκινητή reverse
- 0,125μl Taq
- 17,9μl H_2O

Στο κάθε PCR tube προστέθηκαν 22μl από το master mix.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για το πλασμίδιο pY_3 για τα ζεύγη εκκινητών P1, P2, P3, και για το πλασμίδιο pS_4 για τα ζεύγη εκκινητών P1, P2, P3 pRSF-AAS, pRSF-TYR και pCDF-ALRK. Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση για τα στελέχη στα οποία αναμένεται να δώσουν θετικό αποτέλεσμα σύμφωνα με τον πίνακα 2. Σε κάθε περίπτωση υπήρχε ένα positive control (HMS174) και ένα negative control (H_2O). Πριν την πραγματοποίηση των PCR για τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε PCR με τα πλασμίδια pY_3 P1, pY_3 P2, pY_3 P3, pS_4 P1, pS_4 P2, pS_4 P3 για να ελεγχθεί η λειτουργικότητα τους με θερμοκρασία υβριδοποίησης 51^0C για 35 κύκλους.

Για κάθε PCR οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing temperature) που έπρεπε να χρησιμοποιηθούν στο δεύτερο στάδιο ήταν διαφορετικές, καθώς και οι επαναλήψεις των κύκλων. Κατά την διάρκεια της PCR υπάρχουν 5 βήματα. Για τα πλασμίδια pY_3 P1, pY_3 P2, pY_3 P3, pS_4 P1, pS_4 P2, pS_4 P3 και pCDF-ALRK έχουμε τα εξής στάδια:

1. 95^0C για 30min
2. 95^0C για 30sec
3. Annealing temperature ^{0}C για 30sec

4. 72^0C για 1min
5. 72^0C για 5min

Τα στάδια 2, 3 και 4 επαναλαμβάνονται στην διαδικασία της PCR σε κάθε περίπτωση σε διαφορετικούς αριθμούς κύκλων όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Ενώ για τις περιπτώσεις του pRSF-AAS και του pRSF-TYR ισχύουν τα ίδια στάδια με μοναδική διαφορά στο στάδιο 4 που η διάρκεια του είναι 1,5min.

Πίνακας 4: Θερμοκρασίες υβριδοποίησης που χρειάζονται τα πλασμίδια με τους εκκινητές τους, οι κύκλοι των επαναλήψεων και το μέγεθος των βάσεων που έχουν.

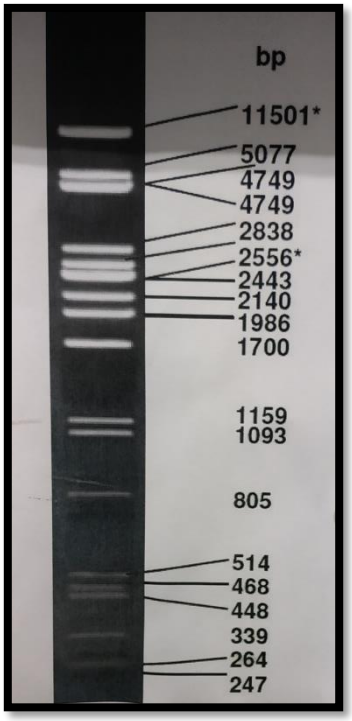
Πλασμιδιο-φορέας	**Ζεύγος εκκινητών**	**Θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (ºC)**	**Κύκλοι**	**Βάσεις (bp)**
pY3	P1	51	32	454
	P2	51	30	476
	P3	51	30	466
pS4	P1	51	35	375
	P2	51	32	338
	P3	53	35	478
RSF	AAS	64	35	1500
	TYR	50	35	1490
pCDF	ALRK	61	30	1100

Σύμφωνα λοιπόν με τον Πίνακα 4, το πλασμίδιο pY_3 για το ζευγάρι εκκινητών P1 η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι 51^0C οι κύκλοι που πραγματοποιούνται είναι 32 και τα ζευγάρια βάσεων που περιμένουμε είναι 454 bp. Για το πλασμίδιο pY_3 με το ζευγάρι εκκινητών P2 η θερμοκρασία είναι 51^0C, οι κύκλοι 30 και οι βάσεις είναι 476 bp. Για το pY_3 για το ζευγάρι εκκινητών P3 έχουμε θερμοκρασία υβριδοποίησης 51^0C, ο αριθμός των επαναλήψεων είναι 30 και οι αναμενόμενες βάσεις είναι 466 bp. Το πλασμίδια pS_4 για το ζευγάρι εκκινητών P1 και για το ζευγάρι εκκινητών P2 η an θερμοκρασία είναι 51^0C οι κύκλοι είναι 35 και 32 αντίστοιχα ενώ ο αριθμός των ζευγαριών βάσεων είναι 375bp και 338bp αντίστοιχα. Για το πλασμίδιο pS_4 για το ζευγάρι εκκινητών P3 η θερμοκρασία είναι 53^0C, ο αριθμός των κύκλων είναι 35 και ο αριθμός των βάσεων που περιμένουμε είναι 478bp. Για το pRSF-*AAS* η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι 64^0C ο αριθμός των κύκλων είναι 35 και ο αριθμός των βάσεων που περιμένουμε είναι 1500 bp. Για το pRSF-*TYR* η θερμοκρασία είναι 50^0C, με 35 κύκλους και 1490 ζευγάρια βάσεων. Και τέλος για το pCDF -*ALRK* η θερμοκρασία

είναι 61^0C με 30 επαναλήψεις και αναμενόμενο αριθμό βάσεων 1100bp.

3.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Σε κωνική προστέθηκαν 100ml αραιωμένο TAE και 1,2gr αγαρόζης και ζεστάθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί. Αφού έχει κρυώσει για λίγο προστέθηκε 0,005% βρωμιούχο αιθύδιο μέσα στην επαγωγό εστία και τοποθετήθηκε το μίγμα στην ειδική πλάκα ηλεκτροφόρησης. Αφού στερεοποιηθεί και γίνει σε μορφή gel τοποθετείτε η πλακά στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και στα πηγάδια που έχουν δημιουργηθεί από το χτενάκι με πιπέτα τοποθετούνται 10μl από της αντίδρασης PCR. Η πρώτη και η τελευταία θέση είναι για την προσθήκη του Molecular marker έτσι ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί το μέγεθος των βάσεων. Ρυθμίζεται η συσκευή στα 100 volt και αφήνεται περίπου 45min για το αποτέλεσμα. Ο μοριακός δείκτης (molecular marker) λ/PstI που χρησιμοποιήθηκε έχει την κατανομή των ζευγαριών βάσεων που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3 και μας δείχνει το μέγεθος.



Εικόνα 3:Μοριακός δείκτης λ/pstI. Γραφική απεικόνιση των μεγεθών, των ζευγαριών βάσεων.

3.9 Glycerol stock of bacterial

Μετά από τα αποτελέσματα που έχουν παρουσιαστεί από την ηλεκτροφόρηση, όταν διαπιστωθεί ότι οι αποικία που επιλέχθηκε για την μόλυνση είναι λειτουργική γίνεται η παρασκευή του stock και αποθηκεύεται έτσι ώστε να είναι έτοιμη να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, σε 5ml υγρού

LB προστίθενται 5μl από τα αντιβιοτικά που χρειάζονται (Πίν. 2) σε δοκιμαστικό σωλήνα. Με τη λούπα αποσπάται μέρος της λειτουργικής αποικίας και διαλύεται μέσα στο LB. Πραγματοποιείται υγρή καλλιέργεια (overnight) σε θερμοκρασία 37^0C, σε 200 στροφές για 14-16 ώρες. Στη συνέχεια σε δοχείο 2ml προστέθηκε 500μl από την υγρή καλλιέργεια και 500μl γλυκερόλης 30% και γίνεται αποθήκευση στους -80^0C.

3.10 Πρωτόκολλο για τα in vivo πειράματα έκφρασης

3.10.1 Παρασκευή M9

Για την προετοιμασία 100ml 20x πυκνού διαλύματος Α χρησιμοποιούνται: 127,977gr $Na2HPO_4 * 7H_2O$, 29,99gr KH_2PO_4, 5,0025gr NaCl,10,0026gr NH_4Cl και 100ml H_2O. Ανακινούνται ώστε να διαλυθούν και αποστειρώνεται στον κλίβανο. Το διάλυμα Α χρησιμοποιείται για τις πλύσεις των κυττάρων αφού πρώτα αραιωθεί. Για την αραίωση προστίθεται 50ml πυκνό διαλύματος Α σε 950ml H_2O.

Επίσης παρασκευάστηκε διάλυμα Β, το οποίο είναι διάλυμα γλυκόζης (Glucose) συγκέντρωσης 0,5M για την παρασκευή του διαλύονται 100gr σε 500ml H_2O. Γίνεται επιπλέον η παρασκευή διαλύματος Γ της θειαμίνης 10μM διαλύονται 0,067454gr θειαμίνης σε 20ml H_2O για να φτιαχτεί το stock. Στην συνέχεια φτιάχνεται το διάλυμα Δ που αφορά το $MgSO_4$, συγκέντρωσης 1M για την Παρασκευή του διαλύθηκαν 0,1248gr $MgSO_4$ σε 10ml H_2O. Τέλος, γίνεται το διάλυμα Ε που αφορά το $CaCl_2$ συγκέντρωσης 0,1M. Για την παρασκευή του διαλύονται 0,0110gr $CaCl_2$ σε 10ml H_2O. Όλα τα παραπάνω αποστειρώνονται με φίλτρο. Για το IPTG έγινε αραίωση έτσι ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 50μM και για την γλυκόζη πρέπει να έχουν τελική συγκέντρωση 50mM.

Τα διαλύματα Α, Β. Γ. Δ και Ε χρησιμοποιούνται για την Παρασκευή του υποστρώματος M9 που χρησιμοποιείται για τις πλύσεις των κυττάρων στο επόμενο υποκεφάλαιο (3.10.2)

3.10.2 Παραγωγή υδροξυτυροσόλης

Στα πειράματα έκφρασης για την ετερόλογη παραγωγή της υδροξυτυροσόλης μετρήθηκε η απορρόφηση (OD) σε διαφορετικές ώρες (0, 2, 16, 22, 40, 46) στο φασματοφωτόμετρο, αφού πριν είχαν γίνει διάφορες διεργασίες. Η απορρόφηση μετρήθηκε για όλες τις περιπτώσεις που συμμετείχαν στα πειράματα έκφρασης δηλαδή

το 1T, 1A, 2, 3, 4, 7T και 7A.

Σε δοχείο 1,5ml τύπου eppendorf τοποθετήθηκε 1ml υγρό υπόστρωμα LB χωρίς αντιβιοτικά έγινε η μόλυνση με το κατάλληλο στέλεχος που ήταν αποθηκευμένο στους -80°C. Τοποθετήθηκε στο shaker στους 37 ^{o}C με 200 rpm (over day) μέχρι να αναπτυχθούν τα βακτήρια. Περίπου 5 ώρες μετά και αφού είχε γίνει η ανάπτυξη των βακτηρίων έγινε η προετοιμασία της overnight. Δηλαδή, σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 10ml υγρού LB, 10μl αντιβιοτικά και τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν για κάθε στέλεχος στην over day. Επωάστηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες στο shaker στους 37°C με 200 rpm.

Την επόμενη μέρα σε κωνική φιάλη 1L προστέθηκαν 250ml LB, 250μl αντιβιοτικά και τα κύτταρα της υγρής καλλιέργειας overnight, για κάθε καλλιέργεια και μετρήθηκε το OD. Τοποθετήθηκαν στο shaker στους 37 ^{o}C με 200 rpm για 2 ώρες περίπου και μετρήθηκε ξανά το OD. Μετριέται ξανά το OD μέχρι η οπτική απορρόφηση OD_{600} να φτάσει στο 0.500. Όταν απορρόφηση έφτασε στο 0.500 τοποθετήθηκε κάθε καλλιέργεια σε ειδικά μπουκάλια της φυγόκεντρου και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 4 ^{o}C, 6000g για 10 λεπτά. Πετάχτηκε το υπερκείμενο και κρατήθηκαν τα κύτταρα σε πάγο. Σε κάθε μπουκάλι προστέθηκε ως υπόστρωμα το αραιωμένο διάλυμα A, διαλύθηκαν πολύ καλά τα κύτταρα με ανάδευση σε αυτό το υπόστρωμα και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 4 ^{o}C, 6000 g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, πετάχτηκε το υπερκείμενο και κρατήθηκαν τα κύτταρα σε πάγο. Προστέθηκε στα μπουκάλια το νέο θρεπτικό υπόστρωμα (Glucose, MgSO4, $CaCl_2$, Thiamine και το διάλυμα A), διαλύθηκαν τα κύτταρα μέσα σε αυτό και τοποθετήθηκε η υγρή καλλιέργεια σε κωνική φιάλη 1L, η οποία έχει όγκο 250ml και έγινε η προσθήκη του IPTG το οποίο θα είχε τελικό όγκο 100 μM. Μεταφέρθηκε κάθε καλλιέργεια στο shaker στους 30 ^{o}C με 200 rpm. Μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση OD_{600} μετά από 6 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκε ξανά η οπτική απορρόφηση OD_{600} κάθε 5-6 ώρες. Η διαδικασία μέτρησης του OD_{600} συνεχίστηκε για 46 ώρες. Κατά την λήξη του πειράματος κάθε καλλιέργεια αφού μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση OD_{600}, τοποθετήθηκαν σε μπουκάλια και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 4 ^{o}C, 6000g για 10 λεπτά. Τέλος, το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε σε μπουκάλια στους -80 ^{o}C ενώ τα κύτταρα συντηρήθηκαν στους -20 ^{o}C.

Τέλος, οι καλλιέργειες των κύτταρα που είχαν αποθηκευτεί συσκευάστηκαν και στάλθηκαν στο Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), έτσι ώστε να γίνει ανάλυση και μέτρηση της ποσότητας της υδροξυτυροσόλης που παράχθηκε.

3.11 Μέτρηση παραγόμενης ποσότητας υδροξυτυροσόλης

Η παρακάτω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), στο τμήμα Φαρμακευτικής. Αρχικά, αποψύχθηκαν 2ml καλλιέργειας, τα οποία χωρίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε 2 δοχεία τύπου eppendrofs και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10min σε 14.000rpm, στους 4^0C. Επίσης προζυγίστηκαν 3 φιαλίδια πενικιλλίνης. Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

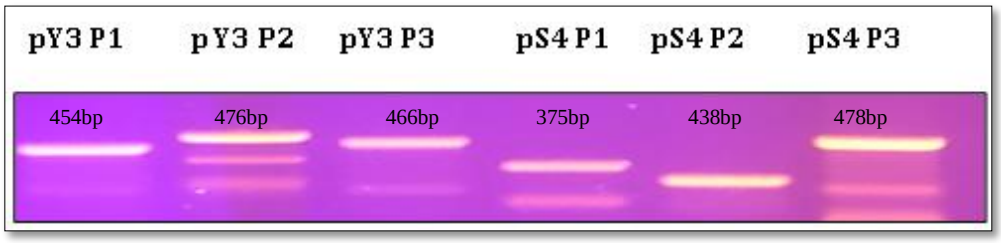
- 2ml MeOH 20%
- 2ml MeOH 50%
- 2ml MeOH 100%

Η στήλη RP C-18 τοποθετήθηκε σε κατάλληλη θέση της συσκευής SPE και είναι φιαλίδιο πενικιλλίνης για τα απόβλητα κάτω από αυτό. Στη συνέχεια η συσκευή συνδέθηκε με το κενό του πάγκου και η πίεση ρυθμίστηκε μέσω βαλβίδας του μανομέτρου της συσκευής στις 5mmHg. Η διαδικασία ξεκίνησε με την αύξηση της θερμοκρασίας για τη στήλη με 3ml MeOH. Ακολούθησε εξισορρόπηση με 3Ml H_2O και φόρτωση στη στήλη με το 1ml από την καλλιέργεια. Στο στάδιο αυτό αναμένετε η συγκράτηση της υδροξυτυροσόλης. Τέλος προστέθηκαν στο στηλάκι τα συστήματα διαλυτών που αναφέρθηκαν παραπάνω με τη σειρά. Τα εκλούσματα αυτά συλλέχθηκαν σε φιαλίδια πενικιλίνης τα οποία μεταφέρθηκαν σε αντλία αερίου N_2 και το περιεχόμενο τους εξατμίστηκε έως ότου να γίνει τελείως ξηρό. Στη συνέχεια τα εκλούσματα διαλύθηκαν σε 1ml υψηλής καθαρότητας MeOH H_2O 50:50 για να υποβληθούν σε ανάλυση LC- MS που θα δώσουν και της τελική ποσότητα υδροξυτυροσόλης που έχει παραχθεί.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 *Έλεγχος επιτυχημένης εισαγωγής την πλασμιδίων pS4 και pY3 στα αντίστοιχα στελέχη του E.coli.*

Η πρώτη ταυτοποίηση που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της λειτουργικότητας του πλασμιδίου pY_3 με τα ζευγάρια εκκινητών P1, P2, P3, του πλασμιδίου pS_4 με τα ζευγάρια εκκινητών P1, P2, P3 έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν λειτουργούν σωστά στις θερμοκρασίες που έχουν δοθεί, αλλά και για την εξακρίβωση της λειτουργικότητας τους. Στην Εικόνα 4 παρατηρούμε ότι όλα τα πλασμίδια είχαν το επιθυμητό μέγεθος και μας έδωσαν ζώνη στην αναμενόμενη περιοχή.



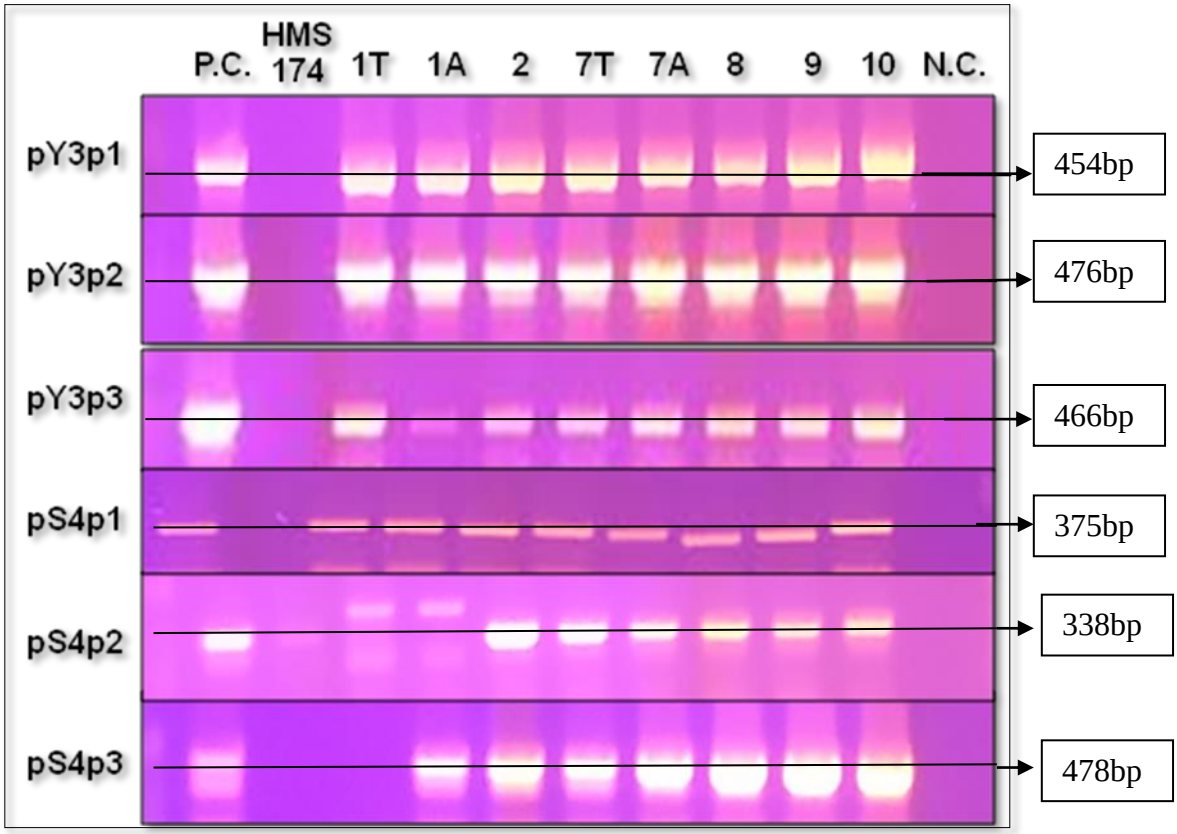
Εικόνα 4: Έλεγχος παρουσίας πλασμιδίων pY_3 και, pS_4 με τα ζευγάρια εκκινητών P1, P2, P3.

Πιο συγκεκριμένα για το pY_3 P1 είδαμε ζώνη στα 454bp, στο pY_3 P2 παρατηρήθηκε ζώνη στια 476bp και για το pY_3 P3 πήραμε ζώνη στα 466bp. Για το pS_4 P1 πήραμε 375bp για το pS_4 P2 το μέγεθος της ζώνης ήταν 338bp και στο pS_4 P3 παρατηρήθηκε 478bp.

4.2 *Έλεγχος λειτουργικότητας βακτηριακών στελεχών HMS174, 1T, 1A, 2, 3, 5T, 5A, 7T, 7A, 8, 9, 10*

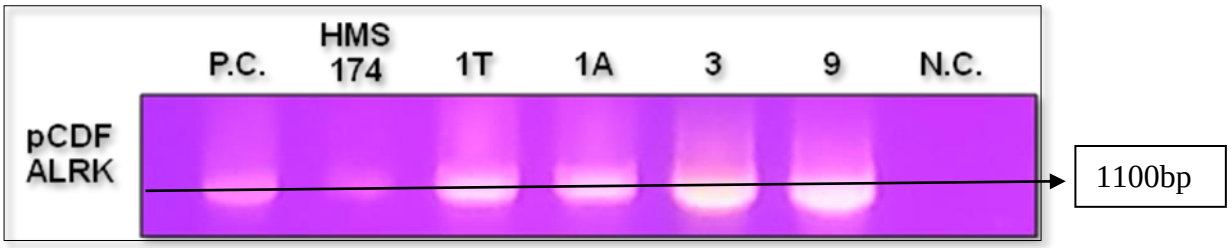
Ο έλεγχος της λειτουργικότητας ξεκίνησε για τα πλασμίδια pY_3 και για το πλασμίδιο pS_4. Όπως βλέπουμε και στην Εικόνα 5 έγινε έλεγχος για τον θετικό μάρτυρα (P.C.)τις περιπτώσεις HMS174, 1T, 1A, 2, 7T, 7A, 8, 9, 10 και για τον αρνητικό μάρτυρα (N.C.). Σε όλες τις περιπτώσεις είχαμε το επιθυμητό μέγεθος στις ζώνες που πήραμε. Για το πλασμίδιο pY_3 σε όλες τις περιπτώσεις μετασχηματισμένων

στελεχών πήραμε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Ωστόσο, στο ζεύγος εκκινητών P3 ενώ πήραμε ζώνες έχει που ήταν αναμενόμενο παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του στελέχους 1A έχουμε μια αχνή ζώνη.



Εικόνα 5: Ταυτοποίηση βακτηρικών στελεχών pY3P1, pY3 P2, pY3P3 και pS4 P1, pS4 P2, pS4 P).

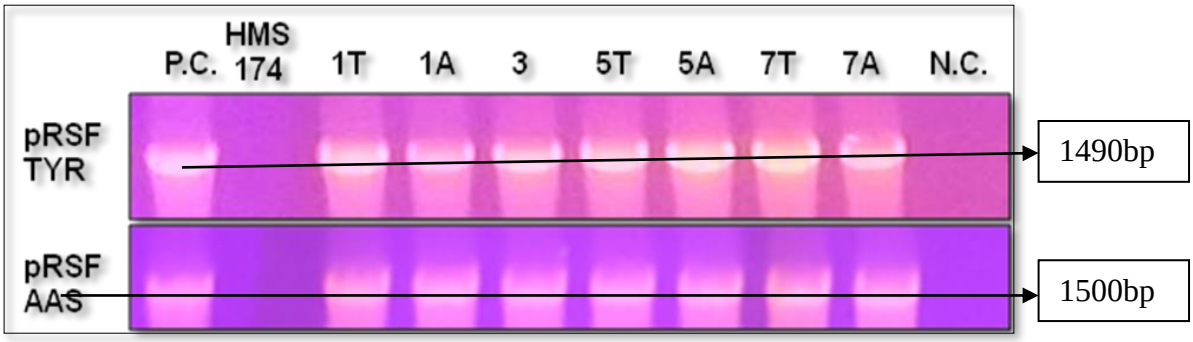
Για την περίπτωση του μετασχηματισμένου πλασμιδίου pS_4 είχαμε το επιθυμητό μέγεθος, σε όλα τα στελέχη που περιμέναμε. Στη συνέχεια για το ζευγάρι εκκινητών P2 όπως βλέπουμε και στην Εικόνα 5 οι ζώνες που έχουμε ως αποτέλεσμα στις περιπτώσεις 2, 7T, 7A, 8, 9, 10 ήταν στο επιθυμητό μέγεθος. Ωστόσο στις περιπτώσεις του 1T, 1A και το HMS174 έχουμε ανεπιθύμητες ζώνες που δεν περιμέναμε να δούμε. Και τέλος για το ζεύγος εκκινητών P3 πήραμε τα επιθυμητά αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από το 1T που δεν είχαμε καμία ζώνη. Ενώ λοιπόν περιμέναμε ζώνες στα ζευγάρια εκκινητών P2 και P3 για την ανίχνευση του pS_4, δεν πήραμε.



Εικόνα 6: Ταυτοποίηση βακτηρικών στελεχών για το φορέα pCDF που περιέχει τογονίδιο ALRK.

Η επόμενη ταυτοποίηση που έγινε ήταν για το φορέα pCDF- ALRK που φέρει το γονίδιο *ALRK* για τα στελέχη HMS174, 1T, 1A, 3 και 9 από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πήραμε ζώνη στο επιθυμητό μέγεθος δηλαδη στα 1100bp. Ωστόσο πέρα από τις επιθυμητές ζώνες όπως παρατηρούμε και στην Εικόνα 6 έχουμε και μία αχνή ζώνη στο ίδιο μέγεθος στο HMS174.

Οι τελευταίες ταυτοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν για το φορέα pRSF που φέρει τα γονίδια *TYR* και *AAS*. Η ταυτοποίηση αφορούσε τα στελέχη HMS174, 1T, 1A, 3, 5T, 5A, 7T και 7A. Και στις δύο περιπτωσεις, όπως παρατηρούμε και στην Εικόνα 7 ως αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης πήραμε τις επιθυμητές ζώνες στο επιθυμητό μέγεθος δηλαδη για το *TYR* πηραμε 1490bp και για το *AAS* 1500bp.



Εικόνα 7: Ταυτοποίηση βακτηρικών στελεχών για το φορέα pRSF που περιέχει το γονίδιο TYR και για το φορέα pRSF που περιέχει το γονίδιο AAS.

4.2.1 In vivo πειράματα έκφρασης

Στην διαδικασία για την παραγωγή της υδροξυτυροσόλης μετρήθηκε η απορρόφηση σε 6 διαφορετικούς χρόνους (0, 2, 16, 22, 40 και 46 ώρες) για τις περιπτώσεις 1T, 1A, 2, 3, 4, 7T και 7A. Σύμφωνα με το Πίνακα 6 για το στέλεχος 1T στην αρχή του πειράματος η απορρόφηση ήταν 0,365, στις 2 ώρες ήταν 0,375, στις 16

ώρες μετρήθηκε 0,57, στις 22 ώρες η μέτρηση ήταν 0,775 στις 40 ώρες ήταν 1,258 και στο τέλος του πειράματος, στις 46 ώρες ήταν 1,144. Για την περίπτωση του 1Α ή μέτρηση του OD στο φασματοφωτόμετρο ήταν 0,248, 0,33, 0,559, 0,753, 1,103 και 1,187 για τις ώρες 0, 2, 16, 22, 40 και 46 αντίστοιχα. Για την περίπτωση 2 μετρήθηκε η απορρόφηση OD 0,312, 0,397, 0,659, 0,809, 1,053 και 1,418 για τις ώρες 0, 2, 16, 22, 40 και 46 αντίστοιχα. Στην περίπτωση του 3 έχουμε απορρόφηση 0,298, 0,317, 0,763, 1,1017, 1,349 και 1,456 για τις ώρες 0, 2, 16, 22, 40 και 46 αντίστοιχα.

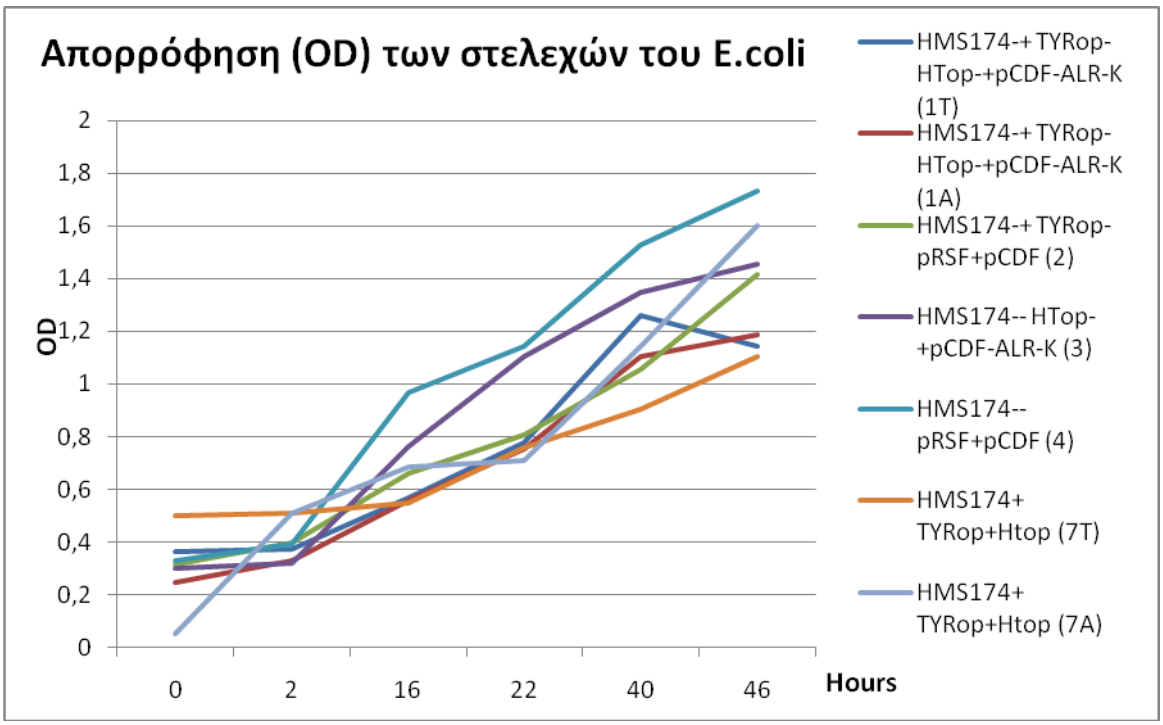
Πίνακας 5: Απορρόφηση (OD) των στελεχών E.coli στις 0, 2, 16, 22,40 και 46 ώρες για κάθε μία από τις περιπτώσεις που εξετάστηκε .

Ώρες	Περιπτωσεις μετασχηματισμένων στελεχών του *E.coli*						
	HMS174-+ TYRop-Top-+pCDF-ALRK (1T)	HMS174-+ TYR^{op}- HT^{op}-pCDF-ALRK (1A)	HMS174-+ TYR^{op}-pRSF+pCDF (2)	HMS174--HTop-+pCDF-ALRK (3)	HMS174--pRSF+pCDF (4)	HMS174+ TYR^{op}+Htop (7T)	HMS174+ TYR^{op}+Htop (7A)
0	0,365	0,248	0,312	0,298	0,328	0,05	0,53
2	0,375	0,33	0,397	0,317	0,393	0,509	0,509
16	0,57	0,559	0,659	0,763	0,97	0,546	0,686
22	0,775	0,753	0,809	1,1017	1,142	0,757	0,709
40	1,258	1,103	1,053	1,349	1,526	0,905	1,144
46	1,144	1,187	1,418	1,456	1,735	1,106	1,603

Για την περίπτωση 4, από την μέτρηση της απορρόφησης είχαμε 0,328, 0,393, 0,97, 1,142, 1,526 και 1,735 για τις ώρες 0, 2, 16, 22, 40 και 46 αντίστοιχα. για το 7Τ οι μετρήσεις OD ήταν 0,5, 0,509, 0,546, 0,757, 0,905 και 1,106 για τις ώρες 0, 2, 16, 22, 40 και 46 αντίστοιχα. Και τέλος για την περίπτωση 7Α από τη μέτρηση της απορρόφησης είχαμε OD 0,053, 0,509, 0,686, 0,709, 1,144 και 1,603 για τις ώρες 0, 2, 16, 22, 40 και 46 αντίστοιχα.

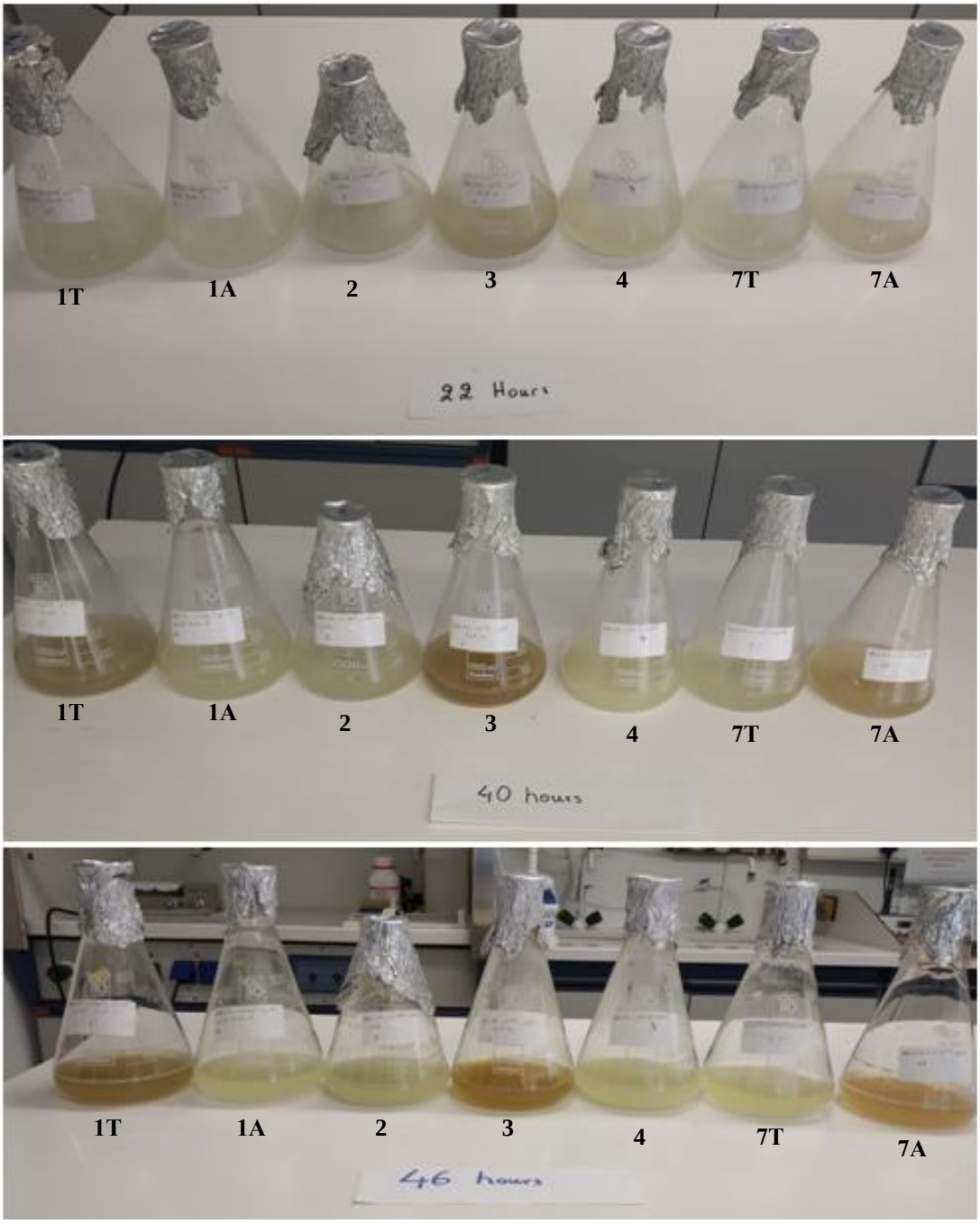
Έτσι λοιπόν από τον Πίνακα 6 και το Γράφημα 1 παρατηρούμε ότι για τα στελέχη 7Τ και 7Α η οπτική πυκνότητα έφτασε αρκετές ώρες νωρίτερα σε σχέση με τα υπόλοιπα στο 0,5. Επίσης παρατηρούμε ότι αν και έφτασαν πιο γρήγορα στο 0,5 οι επόμενες μετρήσεις ανεβαίνουν σταδιακά αντίθετα με τις περιπτώσεις 3 και 4 που μετά το 0,5 η αύξηση του OD ήταν πιο γρήγορη από τις 16 ώρες και μετά. Την μεγαλύτερη απορρόφηση την είχαμε στην περίπτωση του στελέχους 4 ενώ την μικρότερη στην περίπτωση του 1Τ. Τέλος, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι τα στελέχη 1Τ, 1Α, 7Τ και 7Α στις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας ήταν πολύ κοντά μεταξύ τους.

Γράφημα 1:Τιμές απορρόφησης OD των στελεχών του E.coli για τι περιπτώσεις 1T, 1A, 2,3, 4, 7T, 7A.



Στην Εικόνα 8 παρατηρούμε τις μεταβολές που έχουν οι περιπτώσεις των μετασχηματισμένων βακτηριακών στελεχών (1T, 1A, 2, 3,4 7T, 7A) στις 22, στις 40 και στις 46 ώρες. Στις 22 ώρες παρατηρούμε ότι τα στελέχη 1T, 4 και 7A έχουν αρχίσει και αλλάζουν χρώμα και μαυρίζουν. Αυτός ο μεταχρωματισμός οφείλεται στην προσθήκη του IPTG και με το πέρας των ωρών αναμένεται να αυξηθεί. Στις 40 ώρες τα στελέχη 1T, 4 και 7A έχουν μεταχρωματιστεί σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με τις 22 ώρες, ωστόσο τα υπόλοιπα δεν έχουν μεγάλη μεταβολή στο χρώμα σε σχέση με τις 22 ώρες .

Στις 46 ώρες που γίνεται και η λήξη του πειράματος, δηλαδή έχουμε το τελικό αποτέλεσμα όλα τα στελέχη έχουν αρκετή διαφορά στο χρώμα σε σχέση με τις 40 ώρες ωστόσο συνεχίζουν και έχουν διαφορά μεταξύ τους όσο αναφορά τα στελέχη 1T, 4 και 7A που συνεχίζουν να παρουσιάζουν πιο έντονο χρωματισμό σε σχέση με τα υπόλοιπα.



Εικόνα 8: Κωνικές φιάλες με τα στελέχη 1T, 1A, 2, 3, 4, 7T και 7A στις 22,40 και 46 ώρες από τα πειράματα έκφρασης.

4.3 Παραγόμενη ποσότητας υδροξυτυροσόλης

Η ποσότητα υδροξυτυροσόλης που παράχθηκε στο Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), στο τμήμα Φαρμακευτικής. Στον Πίνακα 4 γίνεται αναφορά για την ποσότητα που παράχθηκε και κάθε

περίπτωση.

Πίνακας 6: Ποσότητα υδροξυτυροσόλης (mg/L) καλλιέργειας που παράχθηκε από τα μετασχηματισμένα στελέχη 1A, 1T, 2, 3, 4, 7A και 7T.

Περιπτώσεις	***Όνομα***	***mg/L καλλιέργειας***
1A	HMS174-+ TYR^{op}- HT^{op}-+pCDF-ALRK	17,58
1T	HMS174-+ TYR^{op}- HT^{op}-+pCDF-ALRK	244,92
2	HMS174-+ TYR^{op}- pRSF+pCDF	X
3	HMS174-- HT^{op}-+pCDF-ALRK	75,84
4	HMS174--pRSF+pCDF	X
7A	HMS174+ TYR^{op}+HT^{op}	76,172
7T	HMS174+ TYR^{op}+HT^{op}	<LOQ

Από τον Πίνακα 6 παρατηρούμε ότι στο μετασχηματισμένο στέλεχος 1T παράχθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα HT ύψους 244,9264157mg/l καλλιέργειας. Στη συνέχεια την επόμενη μεγαλύτερη ποσότητα είχε το στέλεχος 7A με ποσότητα 76,17112142 mg/l καλλιέργειας και αμέσως μετά ακλουθεί το στέλεχος 3 με μικρή διαφορά από το στέλεχος 7A με ποσότητα 75,84710028 mg/l καλλιέργειας. Στη συνέχεια το στέλεχος 1T με αρκετά μικρότερη ποσότητα ύψους 17,58283536 mg/l καλλιέργειας. Τα στελέχη 2 και 4 που είναι control για τα στελέχη 1A,1T και 3 αντίστοιχα δεν έχουν παράγει HT. Τέλος το στέλεχος 7T έχει παράγει ποσότητα μικρότερη του LOQ, που είναι το κατώτερο όριο ανίχνευσης συνεπώς παρουσιάζεται η μικρότερη ποσότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στην ομάδα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο και ως στόχο είχε την παραγωγή της υδροξυτυροσόλης μέσω ενός βιοσυνθετικού μονοπατιού.

Τελικός στόχος αυτού του πειράματος είναι να μπορέσει να γίνει εργαστηριακά η παραγωγή της ουσίας αυτής σε επαρκείς ποσότητες. Έτσι ώστε να είναι εφικτή η χρήση της, για την αξιοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων της, αφού η απομόνωση της απευθείας από τον καρπό της ελιάς είναι αρκετά χρονοβόρα και μεγάλου κόστους διαδικασία. Η υλοποίηση του παρόντος έργου καθώς και μελλοντικών έργων που θα πραγματοποιηθούν στην ομάδα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας φυτών αποτελούν ελπιδοφόρα βήματα για τη χρήση της ευεργετικής αυτής ουσίας, της υδροξυτυροσόλης.

Η χρήση του βακτηρίου *E.coli* αποτέλεσε πολύ σημαντικό εργαλείο αφού ο χειρισμός των γονιδίων από το βακτήριο πλεονεκτεί σε σχέση από την απομόνωση βακτηρίων απευθείας από τα φυτά

5.1 . Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Οι ταυτοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν ώστε, να διαπιστωθεί η λειτουργικότητα των μετασχηματισμένων βακτηριακών στελεχών έτσι ώστε, να διαπιστωθεί περιέχουν τα πλασμίδια που αναφέρονται στον Πίνακα 2. Η διαδικασία της ταυτοποίησης επαναλήφθηκε αρκετές φορές για το κάθε πλασμίδιο διότι, αφού υπήρχαν πειραματικά σφάλματα κατά την διαδικασία προετοιμασίας της PCR. Πιο συγκεκριμένα όπως παρατηρούμε και στον Πίνακα 7 για τα πλασμίδια pY3 με τα ζεύγη εκκινητών P1, έγιναν δύο προσπάθειες ώστε να έχουμε το τελικό αποτέλεσμα. Στην πρώτη προσπάθεια δεν είχαμε ζώνες στα στελέχη που περιμέναμε, ενώ η δεύτερη προσπάθεια ήταν επιτυχής. Για το πλασμίδιο pY3 με τα ζεύγη εκκινητών P2, και για το πλασμίδιο pY3 με τα ζεύγη εκκινητών P3 η ταυτοποίηση ήταν επιτυχής. Για το πλασμίδιο pS4 με τα ζεύγη εκκινητών P1 στην πρώτη προσπάθεια ταυτοποίησης το στέλεχος 10 δεν έδωσε ζώνη στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ωστόσο, η δεύτερη προσπάθει ήταν επιτυχής. Για το φορέα pRSF-TYR που περιέχει το γονίδιο *TYR* και τον φορέα pRSF-AAS που περιέχει το γονίδιο *AAS* οι ταυτοποιήσεις ήταν επιτυχής (Εικ. 5).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων που πραγματοποιήθηκαν για κάθε στέλεχος με τις συνθήκες της PCR

ΗΜΕΡΩΜΙΝΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ	ΗΜΕΡΩΜΗΝΙΑ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	STRAIN	PLASMID	HMS174	1T	1A	2	3	4	5T	5A	6	7T	7A	8	9	10	NC	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR
20/2/2019	26/2/2019	pY3 P1														√			30 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
28/3/2019	1/4/2019	pY3 P1	√		√	√	√						√	√	√	√	√		35 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
20/2/2019	26/2/2019	pY3 P2			√	√	√						√	√	√	√	√		30 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
20/2/2019	28/2/2019	pY3 P3			√	√	√						√	√	√	√	√		30 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
20/2/2019	27/2/2019	pS4 P1			√	√	√						√	√	√	√			30 ΚΥΚΛΟΙ , 52^{0}C
13/3/2019	20/3/2019	pS4 P1	√		√	√	√						√	√	√	√	√		35 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
20/2/2019	28/2/2019	pS4 P2				√	√						√	√	√	√	√		30 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
21/3/2019	26/3/2019	pS4 P2																	35 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
21/3/2019	27/3/2019	pS4 P2	√				√								√	√	√		35 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
21/3/2019	28/3/2019	pS4 P2	√			√	√								√	√	√		35 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
20/2/2019	1/3/2019	pS4 P3											√	√	√	√	√		30 ΚΥΚΛΟΙ , 53^{0}C
21/3/2019	27/3/2019	pS4 P3	√			√	√						√		√				35 ΚΥΚΛΟΙ , 51^{0}C
20/2/2019	6/3/2019	ALRK			√	√		√								√			30 ΚΥΚΛΟΙ , 62^{0}C
28/3/2019	10/4/2019	ALRK	√	√	√	√		√								√			30 ΚΥΚΛΟΙ , 62^{0}C
20/2/2019	8/3/2019	TYR			√	√		√		√	√		√	√					30 ΚΥΚΛΟΙ , 58^{0}C
		AAS			√	√		√		√	√		√	√					35 ΚΥΚΛΟΙ, 640C

	δεν τα βάλαμε για ανάλυση σαν δείγματα της ηλετροφόρησης
	δείγματα που έτρεξαν σε κάθε πείραμα αλλά δεν δούλεψαν όπως αναφέρει η αναμενόμενη σύστασή τους
	δείγματα που ήταν αρνητικά σε κάθε πείραμα όπως αναφέρει η αναμενόμενη σύστασή τους
	ΕΠΙΘΥΜΗΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Ωστόσο, στο πλασμίδιο pS4 με τα ζεύγη εκκινητών P2, χρειάστηκε να γλινουν αρκετές προσπάθειες έτσι ώστε να φτάσουμε στο τελικό αποτέλεσμα, το οποίο δεν ήταν απόλυτα επιτυχής. Πιο συγκεκριμένα έχουμε την παρουσία ζώνης στο HMS174 που ενδεχομένως να ευθύνεται σε μόλυνση που έγινε κατά την διάρκεια προετοιμασίας της PCR ή η αποικία που επιλέχθηκε για την μόλυνση να μην ήταν λειτουργική. Ωστόσο, πέρα από την παρουσία των επιθυμητών ζωνών, παρατηρήθηκε και η εμφάνιση παραπροϊόντων στα στελέχη 1T και 1A κάτι που επίσης μπορεί επίσης να οφείλετε σε μόλυνση είτε κατά το στάδιο υβριδοποίησης κάποιο μέρος της αλυσίδας δεν κατάφερε να ολοκληρώσει τη διαδικασια. (Εικ. 5).

Στην περίπτωση του πλασμιδίου (Εικ. 5) pS4 με τα ζεύγη εκκινητών P3 δεν υπήρχε καθόλου ζώνη στο στέλεχος 1T ενώ, σε όλα τα υπόλοιπα στελέχη υπήρξαν οι επιθυμητές ζώνες. Λόγω λοιπόν των σφαλμάτων που προαναφέρθηκαν για τα πλασμίδια pS4 P2 και pS4 P3 πραγματοποιήθηκε gradient PCR για τα στελέχη 1T και 2 που λειτουργεί ως control σε πλήθος θερμοκρασιών ώστε να διαπιστωθεί εάν τα σφάλματα που παρουσιάστηκαν πραγματοποιήθηκαν λόγω λανθασμένης θερμοκρασίας. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι τα στελέχη λειτουργούν κανονικά σε ποικίλες θερμοκρασίες καθώς και στις θερμοκρασίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τα υπόλοιπα στελέχη σε κάθε περίπτωση. Έτσι λοιπόν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και η έλλειψη της επιθυμητής ζώνης καθώς και τα παραπροϊόντα οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα. Για το φορέα pCDF-ALRK που φέρει το γονίδιο *ALRK* παρατηρήθηκε η αχνή εμφάνιση ζώνης στο HMS174 ωστόσο, αυτό δεν πρόκειται για σφάλμα αφού το γονίδιο HMS174 περιέχει το γονίδιο *ALRK*.

Ωστόσο είναι χρήσιμο να αναφερθεί και ένα σφάλμα που παρατηρήθηκε κατά την διαδικασία της PCR όπου στις αρχικές ηλεκτροφορήσεις τα ζεύγη εκκινητών προστίθενται αμέσως μετά την μόλυνση του νερού με το στέλεχος. Όμως παρουσιαζόντουσαν αρκετά σφάλματα και δεν είχαμε σαν αποτέλεσμα τις επιθυμητές ζώνες. Έτσι στη συνέχεια οι εκκινητές ενσωματώθηκαν μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης και παρουσιάστηκαν πιο σταθερά αποτελέσματα.

5.2 Παραγωγή υδροξυτυροσόλης

Τα πειράματα έκφρασης πραγματοποιήθηκαν για τα στελέχη 1T, 1A, 2, 3, 4, 7T

και 7A (Πίνακας 5). Κατά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν η μέτρηση της απορρόφησης και παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα στα στελέχη 2,4 και 7A, σε σχέση με τα υπόλοιπα που ακολουθούν σε μικρότερες ποσότητες. Είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι το στέλεχος 2 και το 4 λειτουργούν ως control.

Με το πέρας των ωρών και μετά την προσθήκη του IPTG παρατηρήθηκε ο αναμενόμενος μεταχρωματισμός και ειδικότερα στα στελέχη 1T, 3 και 7A (Εικόνα 8). Αυτός ο μεταχρωματισμός αποτελεί δείγμα ότι παράγετε η ουσία και ότι γίνονται κάποιες μεταβολές. Έτσι λοιπόν σύμφωνα με τον Πίνακα 6 διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη με το πιο έντονο μεταχρωματισμό παρήγαγαν και την μεγαλύτερη ποσότητα υδροξυτυροσόλης. Η μεγαλύτερη ποσότητα παρατηρήθηκε στο στέλεχος 1T και με αρκετά μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα. Στη συνέχεια ακολουθούν τα στελέχη 3 και 7A με αρκετά μικρότερη ποσότητες σε σχέση με το 1T αλλά ήταν σε υψηλά επίπεδα. Όσο αναφορά τα υπόλοιπα τα στελέχη 2 και 4 που είναι τα control για το 1A, 1T και 3 αντίστοιχα δεν παρήγαγαν υδροξυτυροσόλη ενώ, το 7T παρουσίασε την μικρότερη ποσότητα υδροξυτυροσόλης.

Έτσι λοιπόν παρατηρούμε ότι το HMS174- TYR^{OP} - HT^{OP} -+ pCDF –ALRK είναι το ιδανικό μετασχηματισμένο στέλεχος σε σχέση με αυτά που ελέχθησαν για την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων υδροξυτυροσόλης. Σύμφωνα λοιπόν με όλα τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ευεργετική αυτή ουσία η υδροξυτυροσόλη μπορεί να παραχθεί εργαστηριακά σε ικανοποιητικές ποσότητες ώστε να μπορέσει να γίνει η χρήση της για ιατρικούς σκοπούς αλλά και για την ανθρώπινη υγεία.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

Βερβερίδης, Φ. 2003. *'Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών* '. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο. σ. 60-66.

Καλτικής Π., 1989. *Βελτίωση φυτών, αρχές και μέθοδοι*. Εκδ. Α.Σταμούλης

Κυριτσάκης, Α. 2007. *Ελαιόλαδο Συμβατικό και Βιολογικό Βρώσιμη*, Ελιά–Πάστα Ελιάς. *Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα* σ. 85-86

Μπαλατσούρας Γ., 2006. *Μικροβιολογία τροφίμων*. Εκδ. Έμβρυο. σ. 129-130.

Μπατρνού Α. 2001. *Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα: Παρόν και μελλον.* Εκδ. Πασχαλίση, Αθήνα.

Ντούνη Ε. 2010. *''Εργαστηριακές ασκήσεις βιοτεχνολογίας''* Τμήμα γεωπονικής βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών.

Τσαυτάρης Α.-Νιάνιου Ε.- Πολύδωρος Α., 2012. *Βελτίωση φυτών*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία. σ.164-213.

Τσαυτάρης, Α. 1998. *Βιοτεχνολογία: επιτεύγματα, προοπτικές, προβληματισμοί* σ. 11-20.

Χατζόπουλος Π. 2001. *Βιοτεχνολογία φυτών*. Εκδ. Έμβρυο, Αθήνα.

Αγγλική

Agalias A, Magiatis P, Skaltsounis AL, Mikros E, TsarbopoulosA, Gikas E, et al. 2007 *A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. J Agric Food Chem* 55(7):2671–6. Epub 2007/03/14. https://doi.org/10.1021/jf063091d PMID: 17348673.

Alagna F, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G, et al. 2012. *Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development.* BMC Plant Biol. 12:162. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-162 PMID: 22963618; PubMed Central PMCID: PMC3480905.

Bisignano G. Tomaino A. Lo Cascio R. Crisafi G. Uccella N. Saija A. 1999. ‘*’On the in-vitro activity of oleuropein and hydroxytyrosol*’’ Pharm Pharmacol Volume 59.

Brown, T. 2010. *Vectors for gene cloning: Plasmids and bacteriophages. Gene cloning and DNA analysis: An introduction*.

Eckes, P., Donn, G., & Wengenmayer, F. 1987. *Genetic engineering with plants. Angewandte Chemie International Edition in English*, 26(5), 382-402.

Espin JC, Soler-Rivas C, Cantos E, Tomas-Barberan FA, Wichers HJ. 2001. *Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst*. J Agric Food Chem. 49(3):1187–93. https://doi.org/10.1021/jf001258b PMID: 11312833.

Juminaga D, Baidoo EE, Redding-Johanson AM, Batth TS, Burd H, Mukhopadhyay A, et al. 2012. *Modular engineering of L-tyrosine production in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol.* 78(1):89–98. https://doi.org/10.1128/AEM.06017-11 PMID: 22020510; PubMed Central PMCID: PMC3255607.

Kris-Etherton p. , Hecker k., Bonanome A., Coval S., Binkoski A., Hilpert K., Griel A., Etherton T. 200. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. American Journal of Medecine 30,71s-88s.

Prescott, A. M., & Fricker, C. R. 1999. *Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of Escherichia coli in water.* Molecular and Cellular Probes, 13(4), 261-268.

Satoh Y, Tajima K, Munekata M, Keasling JD, Lee TS. 2012. *Engineering of L-tyrosine oxidation in Escherichia coli and microbial production of hydroxytyrosol*. Metab Eng. 14(6):603–10. Epub 2012/09/06. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.002 PMID: 22948011.

Schwartz H. Pritchett T. 1993. ‘*’Separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis: application to analytical biotechnology*’’ Beckman Instruments, Inc.

Siedler, S., Stahlhut, S. G., Malla, S., Maury, J., & Neves, A. R. 2014. *Novel biosensors based on flavonoid-responsive transcriptional regulators introduced into Escherichia coli*. Metabolic engineering, 21, 2-8.

Directive 2001/18/EC, 2001. "*Directive on the release of genetically modified*

organisms (GMOs) ANNEX I A". Official Journal of the European Communities, Directive 2001/18/EC p. 17

Trantas, E., Navakoudis, E., Pavlidis, T., Nikou, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, L., & Ververidis, F. 2019. *Dual pathway for metabolic engineering of Escherichia coli to produce the highly valuable hydroxytyrosol. PloS one*, *14*(11), e0212243.

Tuck K. Hayball P. 2002. ‘’*Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects*’’ The journal of Nutritional Biochemistry. Elsevier.

Vierstraete A., 1999. “*Principle of PCR*”. Εκδόσεις University of Ghent. Διαθέσιμο online: http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

Visioli F, Poli A, Gall C. 2002. *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil.* Medicinal research reviews. 22(1):65–75. PMID: 11746176.