

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

**Βασιλειάδης Αναστάσιος
Βιολόγος**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΘΕΡΜΟΦΙΛΙΝΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
*STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

**Βασιλειάδης Αναστάσιος
Βιολόγος**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΘΕΡΜΟΦΙΛΙΝΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
*STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής του τμήματος
Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.**

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια Αμαλία-Σοφία Αφένδρα – Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Αναπληρωτής Καθηγητής Ευστάθιος Χατζηλουκάς – Συνεπιβλέπων Καθηγητής
Ομότιμος Καθηγητής Νικόλαος Πανόπουλος – Μέλος Τριμελούς συμβουλευτικής
επιτροπής
Αναπληρωτής καθηγητής Θεολόγος Μιχαηλίδης – Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής
Επιτροπής
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα-Ειρήνη Κούκκου – Μέλος Επταμελούς
Εξεταστικής Επιτροπής
Καθηγήτρια Χρυσάνθη Παπαδοπούλου – Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής
Επιτροπής
Λέκτορας Αναστάσιος Ακτύπης – Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 97 265, 97 277

FAX:(26510) 97 064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ : Άννα Υφαντή

Ιωάννινα 02-10-2008
Αριθμ.Πρωτ. 199

Προς τους κ.κ.:

- 1) Ευστάθιο Χατζηλουκά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών ΠΙ.
- 2) Κωνσταντίνο Δραΐνα, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας.
- 3) Αμαλία-Σοφία Αφένδρα, Λέκτορα του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών ΠΙ.

Σας πληροφορούμε ότι, μετά από εισήγηση του Επιβλέποντα κ. Ευσταθίου Χατζηλουκά και της Σ.Ε.Μ.Σ. του Τμήματος, η Προσωρινή Συνέλευση Ειδικής Σύνθεσης, στη Συνεδρίασή της αριθμ. 120/26-09-2008, σας όρισε μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής του κ. Αναστάσιου Βασιλειάδη.

Επίσης, ενέκρινε ως θέμα της διδακτορικής διατριβής το εξής: «Απομόνωση και χαρακτηρισμός γονιδίων παραγωγής θερμοφιλίνης του γαλακτικού βακτηρίου *Streptococcus thermophilus*».

Κοινοποίηση:

- κ. Αναστάσιος Βασιλειάδης

Με εντολή του Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος

ANNA YFANTH



Ιωάννινα, 16 Οκτωβρίου 2012

Αριθμ. Πρωτ.: 137

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451 10
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07336
FAX: (26510) 07064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Άννα Υφαντή

Προς τους κ.κ.

1. Αμαλία-Σοφία Αφένδρα, Λέκτορα του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Π.Ι. (Επιβλέπων)
2. Ευστάθιο Χατζηλουκά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Π.Ι. (Μέλος)
3. Νικόλαο Πανόπουλο, Ομότιμο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Παν/μίου Κρήτης και του Τμήματος Βιολογίας Φυτών και Μικροβιολογίας του Παν/μίου Καλιφόρνιας, Μπέρκλεϋ (Η.Π.Α.) (Μέλος)

Θέμα: «Τροποποίηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής»

Σας πληροφορούμε ότι, μετά από εισήγηση της κα. Αμαλίας-Σοφίας Αφένδρα, Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων, και της Σ.Ε.Μ.Σ. του Τμήματος, για τροποποίηση της σύνθεσης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, η Συνέλευση Ειδικής Σύνθεσης, στη Συνεδρίασή της αριθμ. 196/5-10-2012, σας όρισε μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής του κ. Αναστασίου Βασιλειάδη.

Κοινοποίηση:
- κ. Αναστάσιος Βασιλειάδης

Με απόφαση του Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος

ΒΕΤ

ΑΝΝΑ ΥΦΑΝΤΗ

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451 10
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07294
FAX: (26510) 07064
ΠΑΗΡΟΦΟΡΕΣ: Άννα Υφαντή

Προς τους κ.κ.

1. **Αμαλία-Σοφία Αφένδρα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων
2. **Ευστάθιο Χατζηλουκά**, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων
3. **Νικόλαο Πανόπουλο**, Ομότιμο Καθηγητή Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
4. **Θεολόγο Μιχαηλίδη**, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. **Άννα-Ειρήνη Κούκκου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. **Χρυσάνθη Παπαδοπούλου**, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
7. **Αναστάσιος Ακτύπης**, Λέκτορα Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΘΕΜΑ: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του κ. Αναστάσιου Βασιλειάδη

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνοψης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη Συνεδρίασή της αριθμ. 226/17-7-15, σας όρισε μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκπόνησε ο κος Αναστάσιος Βασιλειάδης με τίτλο «Απομόνωση και χαρακτηρισμός γονιδίων παραγωγής θερμοφιλίνης του γαλακτικού βακτηρίου *Streptococcus thermophilus*».

Πρόεδρος της Επιτροπής ορίζεται η Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος κα. Αμαλία-Σοφία Αφένδρα.

Κοινοποίηση:
- κο Αναστάσιο Βασιλειάδη

Με εντολή του Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος

ΑΝΝΑ ΥΦΑΝΤΗ

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗ, ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε σύμφωνα με την υπ' αριθμ. 226/17-7-2015 απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του κ. Αναστάσιου Βασιλείαδη, συνήλθε σε συνεδρίαση σήμερα στις 12-2-2016 και ώρα 12:30 μμ στην αίθουσα 4 του ΤΒΕΤ, και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής του υποψήφιου με τίτλο:

«Απομόνωση και χαρακτηρισμός γονιδίων παραγωγής θερμοφιλίνης του γαλακτικού βακτηρίου *Streptococcus thermophilus*».

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής υπέβαλαν ερωτήσεις προς τον υποψήφιο, τόσο γενικού περιεχομένου, όσο και σχετικές με το θέμα της διατριβής. Στη συνέχεια και μετά την αποχώρηση του ακροατηρίου και του υποψηφίου, ακολούθησε διεξοδική συζήτηση μεταξύ των μελών της επιτροπής.

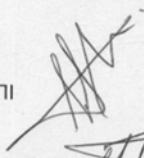
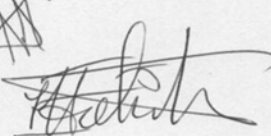
Τα μέλη της επιτροπής δήλωσαν ότι έμειναν απόλυτα ικανοποιημένα από την προφορική παρουσίαση, καθώς και τον όγκο και ποιότητα της ερευνητικής εργασίας.

Η επιτροπή μετά από ψηφοφορία έκρινε ομόφωνα μεταξύ των παρόντων (ο κ. Νικόλαος Πανόπουλος απουσίαζε - επισυνάπτεται επιστολή του) ότι η διατριβή του κ. Αναστάσιου Βασιλείαδη παρουσιάζει εξαιρετική πρωτοτυπία και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, ο δε υποψήφιος απέκτησε τόσο τις γνώσεις, όσο και την τεχνική κατάρτιση, ώστε να προσεγγίζει με ωριμότητα σύγχρονα ερευνητικά προβλήματα του επιστημονικού του πεδίου.

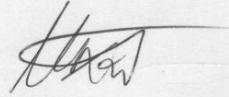
Μετά από αυτά απεφάσισε ομόφωνα μεταξύ των παρόντων να απονείμει τη διατριβή με το βαθμό "άριστα".

Ιωάννινα, 12-2-2016

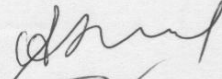
Η Επιτροπή

1. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΤΒΕΤ ΠΙ 
2. Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΤΒΕΤ ΠΙ 
3. Πανόπουλος Νικόλαος, Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΠΚ

4. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΤΒΕΤ ΠΙ



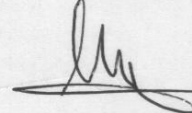
5. Κούκκου Άννα -Ειρήνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΠΙ



6. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Καθηγήτρια Τμ. Ιατρικής ΠΙ



7. Ακτύπης Αναστάσιος, Λέκτορας Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων
& Διατροφής ΓΠΑ



Περίληψη

Ο *Streptococcus thermophilus* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, μη παθογόνο, άλφα αιμολυτικό και μέλος της ομάδας viridians του γένους *Streptococcus*. Ανήκει στα θερμόφιλα βακτήρια γαλακτικού οξέος (L.A.B.) και θεωρείται ασφαλής για κατανάλωση (Generally recognized as safe, G.R.A.S.). Χρησιμοποιείται ευρέως ως εναρκτήριο καλλιέργεια για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων και θεωρείται ο δεύτερος πιο σημαντικός οργανισμός στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων. Το στελέχος *S. thermophilus* ACA-DC 0040 από τη συλλογή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών παράγει την βακτηριοσίνη θερμοφιλίνη T, η σύνθεση της οποίας φαίνεται ότι σχετίζεται με τον ρυθμό ανάπτυξης του οργανισμού και αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής.

Αρχικά διερευνήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους ACA-DC 0040 σε μία σειρά θρεπτικών μέσων συναρτήσει της παραγωγής βακτηριοσίνης, της απομόνωσης γενετικού υλικού και της επιδεκτικότητας σε πειράματα μετασχηματισμού και επιλέχθηκαν τα βέλτιστα κατά περίπτωση. Βάσει κατατεθειμένων αλληλουχιών DNA άλλων στελεχών *S. thermophilus*, διερευνήθηκε και ανιχνεύθηκε ένας αντίστοιχος γενετικός τόπος *blp* στο ACA-DC 0040 ο οποίος ενδεχομένως σχετίζεται με την παραγωγή της θερμοφιλίνης T, κλωνοποιήθηκε και ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία του. Ο γενετικός αυτός τόπος αποτελείται από 13092 ζεύγη βάσεων και εντοπίζονται σε αυτόν 16 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν πιθανά δομικά πεπτιδία της θερμοφιλίνης T και πεπτιδία ανοσίας, ένα ρυθμιστικό σύστημα 3 στοιχείων, πρωτεΐνες για την εξωκυττάρια μεταφορά της φερομόνης και της θερμοφιλίνης, και μία πρωτεΐνη τροποποίησης των δομικών πεπτιδίων της. Μεταξύ αυτών εδράζονται γονίδια τρανσποζασών και άγνωστης λειτουργίας.

Η έκφραση και η οργάνωση των γονιδίων της περιοχής *blp* μελετήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο με πειράματα RT-PCR και Northern, από τα οποία αποκαλύφθηκε η ύπαρξη 5 πιθανών οπερονίων. Επιπλέον, τα πιθανά δομικά γονίδια της βακτηριοσίνης *blpU* και *blpK* παρουσίασαν τόσο συμμεταγραφή, όσο και ξεχωριστή μεταγραφή τουλάχιστον στην περίπτωση του πρώτου και για το λόγο αυτό μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR). Τα

πειράματα αυτά αποκάλυψαν αυξημένα επίπεδα εμφάνισης των μεταγράφων σε συνθήκες παρουσίας αντιμικροβιακής δραστηριότητας και διαφορετικά επίπεδα εμφάνισης των συμμεταγραφόμενων πεπτιδίων b1pU-b1pK από την ανεξάρτητη μεταγραφή του b1pU ανά συνθήκη αλλά πάντα με μεγαλύτερα επίπεδα μεταγραφής του *b1pU*.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η εύρεση ενός κατάλληλου συστήματος μεταφοράς και έκφρασης στο ACA-DC 0040. Στα πλαίσια αναζήτησης ή και κατασκευής κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα εντοπίστηκε ένα φυσικό πλασμίδιο στο ACA-DC 0040 του οποίου η αλληλουχία ταυτοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία. Το πλασμίδιο, μεγέθους 2780 ζευγών βάσεων, ονομάστηκε pST0040 και διαθέτει τρία ORFs που ομοιάζουν με γονίδιο αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου, με γονίδιο παραγωγής πρωτεΐνης άγνωστης λειτουργίας και πρωτεΐνης θερμικού σοκ μικρού μοριακού βάρους, των οποίων οι ιδιότητες μελετήθηκαν. Το pST0040 χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή πλασμιδιακού φορέα με τον οποίο πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός, αν και σε πολύ μικρή συχνότητα, στο *S. thermophilus* LMG 18311. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα των μετασχηματισμών επιβεβαίωσαν τα δημοσιευμένα ευρήματα χαμηλών ποσοστών επιτυχίας του μετασχηματισμού και την ανάγκη για επιπρόσθετες έρευνες στον τομέα.

Τέλος, τα πιθανά δομικά πεπτίδια της θερμοφιλίνης T, b1pU και b1pK, κλωνοποιήθηκαν, το καθένα ξεχωριστά, σε φορέα υπερέκφρασης στο *E. coli* και τα ανασυνδυασμένα πεπτίδια που παρήχθησαν παρουσίασαν κάποιας μορφής αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι του ευαίσθητου στη θερμοφιλίνη T *Lactococcus lactis* CNRZ 117.

Abstract

Streptococcus thermophilus is a Gram-positive bacterium, facultative anaerobe, non pathogenic, alpha hemolytic and member of the *Streptococcus viridans* group. It belongs to the thermophilic lactic acid bacteria (L.A.B.) and is considered safe to consume (Generally Recognized As Safe, G.R.A.S.). It is used widely as a starter culture for the production of dairy products and is considered the second most important organism in the dairy industry. The strain *S. thermophilus* ACA-DC 0040 from the Agriculture University of Athens microorganism collection produces the bacteriocin thermophilin T, the production of which seems to be related to the growth rate of the organism and is the topic of this study.

Initially the growth of ACA-DC 0040 strain was tested with a series of growth mediums in relation to bacteriocin production, genetic material purification and competence in transformation experiments and the mediums were selected by case. Based on deposited DNA sequences of other *S. thermophilus* strains, a corresponding *blp* locus, possibly related to thermophilin T production, was found, cloned and sequenced. This genetic locus consists of 13092 base pairs and 16 open reading frames were found encoding putative structural thermophilin T peptides and immunity peptides, a three component regulatory system, transportation proteins and a modification protein for the structural peptides. Among these, transposase and unknown function genes were found.

The expression and organization of *blp* region genes were studied at transcriptional level using RT-PCR and northern experiments, revealing 5 possible operons. In addition, the possible structural bacteriocin genes *blpU* and *blpK* appeared to co-transcript as well as transcript independently, at least for the first one, and for this reason they were further studied with real time PCR experiments. Those experiments revealed higher levels of transcripts under conditions with antimicrobial activity and different levels of the co-transcribed peptides *blpU*-*blpK* in relation to independently transcribed *blpU* by condition but always with higher levels of *blpU* transcription.

Following, a suitable transfer and expression system for the ACA-DC 0040 strain was searched for. While searching for, or trying to create, a suitable plasmid vector a native plasmid was found in ACA-DC 0040 whose sequence was identified in the present study. The plasmid consisting of 2780 base pairs, was named pST0040 and has three ORFs resembling a rolling circle replication gene, an unknown function protein coding gene and a small molecular weight heat shock protein coding gene, whose properties were studied. The pST0040 was used to create a plasmid vector which was transformed, with a very small efficiency, in *S. thermophilus* LMG 18311. The results confirmed the published low success transformation rates of the species and the need for additional research in this domain.

Finally the putative structural thermophilin T peptides, blpU and blpK, were cloned separately in an *E. coli* overexpression plasmid vector and the produced recombinant peptides showed a form of antimicrobial activity against the thermophilin T sensitive strain *Lactococcus lactis* CNRZ 117.

Εισαγωγή.....	1
1.1 Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα.....	3
1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, L.A.B.).....	5
1.3 Το γένος <i>Streptococcus</i>	6
1.4 <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	11
1.5 Πλασμίδια <i>S. thermophilus</i> και H.S.P.....	13
1.6 Βακτηριοσίνες (bacteriocins).....	14
1.7 Βακτηριοσίνες των θετικών κατά Gram βακτηρίων.....	16
1.8 <i>Streptococcus thermophilus</i> και βακτηριοσίνες.....	19
1.9 Γενετική περιοχή <i>blp_{St}</i> στα στελέχη LMD9, LMG 18311 και CNRZ1066.....	21
1.10 Μεταγραφική οργάνωση γονιδίων <i>blp_{St}</i> στο στέλεχος <i>S. thermophilus</i> LMD9.....	24
1.11 Αίσθηση απαρτίας στο στέλεχος <i>S. thermophilus</i> LMD9.....	25
1.12 Λειτουργία των προϊόντων των γονιδίων <i>blp_{St}</i> στο στέλεχος LMD9.....	27
1.13 <i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0040 και παραγωγή βακτηριοσίνης.....	29
1.14 Θερμοφιλίνη T.....	30
Σκοπός.....	33
Υλικά και Μέθοδοι.....	37
3.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	39
3.2 Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν.....	40
3.3 Ανάπτυξη οργανισμών.....	42
3.4 Πείραμα διάχυσης σε άγαρ (agar diffusion test).....	43
3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i>	44
3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>S. thermophilus</i> σε μικρή κλίμακα (mini prep).....	45
3.6.1 Απομόνωση με πακέτο έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250).....	45
3.6.2 Απομόνωση με αλκαλική λύση (O’Sullivan et al., 1993 με τροποποιήσεις).....	46
3.6.3 Απομόνωση με βρωμιούχο κετυλοτριμέθυλαμμώνιο (CTAB) (Sambrook et al., 2001).....	47
3.6.4 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250) μετά από επεξεργασία των κυττάρων σύμφωνα με τους Somkuti et al. (1986).....	47

Περιεχόμενα

3.6.5 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250) με τροποποιήσεις.....	48
3.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>L. lactis</i> σε μικρή κλίμακα (mini prep).	49
3.7.1 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250).	49
3.7.2 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250) με τροποποιήσεις.....	49
3.7.3 Απομόνωση με αλκαλική λύση (Anderson et al., 1983).	50
3.8 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....	51
3.8.1 Απομόνωση ολικού DNA από <i>S. thermophilus</i> ανεπτυγμένο σε θρεπτικό μέσο M17 (Flamm et al., 1984 με τροποποιήσεις).....	51
3.8.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από καλλιέργειες <i>S. thermophilus</i> ή <i>L. lactis</i> όγκου 1-5 ml σε θρεπτικό μέσο M17 με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin Tissue (Macherey – Nagel, cat. No. 740952). ...	52
3.9 Απομόνωση RNA.....	52
3.9.1 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες <i>S. thermophilus</i> όγκου 1-5 ml σε θρεπτικό μέσο M17, GM17 και HJG με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin RNA II (Macherey – Nagel, cat. No. 740955) με τροποποιήσεις.	52
3.9.2 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες <i>S. thermophilus</i> όγκου 1-5 ml σε αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk) με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin RNA II (Macherey – Nagel, cat. No. 740955) με τροποποιήσεις.	53
3.9.3 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες <i>S. thermophilus</i> όγκου 5 ml σε αποβουτυρωμένο γάλα με βρασμό με Triton X-100 σύμφωνα με τους Sung et al., 2003 και Guimont et al., 2002.....	53
3.9.4 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες <i>S. thermophilus</i> όγκου 5 ml σε αποβουτυρωμένο γάλα με βρασμό με Hot Phenol σύμφωνα με τους Guimont et al., 2002 και την ηλεκτρονική διεύθυνση του UOHSC	55
3.10 Ηλεκτροφόρηση	56
3.10.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA και RNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	57
3.10.2 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης με ρυθμιστικό διάλυμα MOPS – φορμαδεΰδη για την χρήση τους σε πειράματα Northern. 58	
3.10.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα δωδέκυλο θειικού νατρίου – πολυακρυλαμίδιου.	60
3.11 Υπερέκφραση πρωτεϊνών	62

3.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	63
3.12.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)	65
3.12.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR).....	66
3.13 Απομόνωση ζωνών DNA και καθαρισμός από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης – καθαρισμός δειγμάτων DNA από ενζυματικές αντιδράσεις.	67
3.14 Πέψεις DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.	68
3.15 Κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA.	68
3.16 Αντίδραση δεσμοποίησης, ligation	69
3.16.1 Αντίδραση δεσμοποίησης, ligation με την χρήση του ενζύμου T4 DNA Ligase της εταιρείας Takara (cat.No. 2040.A)	69
3.16.2 Αντίδραση δεσμοποίησης, ligation με την χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, cat. No. K2750-20) 72	
3.17 Μετασχηματισμός.....	74
3.17.1 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα <i>E. coli</i>	74
3.17.2 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα <i>S. thermophilus</i> ... 76	
3.17.3 Μετασχηματισμός με θερμικό σοκ σε κύτταρα <i>E. coli</i> DH5a	78
3.17.4 Μετασχηματισμός Chung and Miller (1988) σε κύτταρα <i>E. coli</i> DH5a . 79	
3.18 Στύπωμα κατά Southern.	80
3.19 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA.....	82
3.19.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA – DNA με χρήση τροποποιημένου συστήματος ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA, DIG DNA Labeling and Detection kit (Boehringer Mannheim, cat. No. 11 093 657 910).....	82
3.19.2 Σήμανση του DNA.....	82
3.19.3 Υβριδοποίηση σημασμένου DNA με ιχνηθετημένο DNA.....	83
3.19.4 Ανοσολογικός εντοπισμός.....	84
3.20 Στύπωμα κατά Northern	85
3.21 Μη ραδιενεργός υβριδισμός RNA-DNA.....	86
3.21.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός RNA – DNA με χρήση τροποποιημένου συστήματος ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA, DIG DNA Labeling and Detection kit (Boehringer Mannheim, cat. No. 11 093 657 910).....	86
3.21.2 Σήμανση του DNA.....	86
3.21.3 Υβριδοποίηση σημασμένου DNA με ιχνηθετημένο RNA.....	87
3.21.4 Ανοσολογικός εντοπισμός.....	87

Περιεχόμενα

3.22 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα <i>E. coli</i> με μηχανική θραύση (Mojsin et al., 2005).....	87
3.23 Απομόνωση πρωτεϊνών από <i>E. coli</i> σημασμένων με ουρά ιστιδίνης με την χρήση του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων Protino Ni-IDA (Macherey Nagel, Cat. No. 745160.5).....	88
3.24 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford.....	89
3.25 Συμπύκνωση πρωτεϊνών	89
Αποτελέσματα	91
4.1 Επιλογή θρεπτικών μέσων ανάπτυξης.....	93
4.2 Παραγωγή βακτηριοσίνης και συσχέτιση με ανάπτυξη	98
4.3 Ταυτοποίηση περιοχής ανάλογης <i>blp</i> στο γονιδίωμα του <i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0040	103
4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση της περιοχής <i>blp</i> του στελέχους <i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0040	118
4.5 Οργάνωση περιοχής <i>blp</i> σε μεταγραφικό επίπεδο.....	140
4.5.1 Ανίχνευση δυνητικών μεταγράφων της περιοχής <i>blp</i> του ACADC0040 μέσω RT-PCR (Reverse Transcript – PCR, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση)	142
4.5.2 Πειράματα υβριδισμού στυπώματος κατά Northern.....	152
4.5.3 q-PCR (ποσοτική PCR ή PCR πραγματικού χρόνου, quantitative ή real time PCR)	162
4.6 Ετερόλογη έκφραση γονιδίων βακτηριοσίνης.....	181
4.6.1 Πλασμιδιακός φορέας pTOPOcatpT38	185
4.6.2 Ενδογενές πλασμίδιο pST0040	187
4.6.3 Συνθήκες μετασχηματισμού.....	203
4.7 Υπερέκφραση γονιδίων <i>blpU</i> και <i>blpK</i>	208
Συζήτηση.....	221
Επιλογή θρεπτικών υλικών για ανάπτυξη & δραστικότητα βακτηριοσίνης	223
Sequencing και ανάλυση της αλληλουχίας.....	228
Διερεύνηση της μεταγραφής: RT-PCR, Northern, Real Time PCR	231
Ετερόλογη έκφραση και υπερέκφραση	234
Βιβλιογραφία	239
Παράρτημα 1	255
Παράρτημα 2.....	271

Εισαγωγή

1.1 Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα

Το γάλα είναι το βιολογικό έκκριμα των μαστικών αδένων των θηλαστικών και χρησιμοποιείται για την διατροφή των νεογνών. Δεν είναι ομοιογενές και η σύστασή του ποικίλλει από οργανισμό σε οργανισμό με βασικά συστατικά νερό, λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, άλατα, ένζυμα και βιταμίνες.

Η εξημέρωση άγριων ζώων και η χρήση τους για την εκμετάλλευση του κρέατος, του δέρματος και του γάλακτος τους είναι ένας από τους ακρογωνιαίους λίθους της γεωργίας και της κτηνοτροφίας. Τα ζώα τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γάλακτος είναι τα μηρυκαστικά και έχουν σαν βασικό χαρακτηριστικό την παρουσία ενός προγαστρικού ζυμωτικού θαλάμου, την μεγάλη κοιλία, στον οποίο η πέψη των τροφών του ζώου επιβοηθείται με ζύμωση από συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη σύνθεση γάλακτος.

Με την ανάπτυξη της γεωργίας και της κτηνοτροφίας παρατηρήθηκε ότι η ζύμωση των τροφών όπως του γάλακτος, των φρούτων, των λαχανικών και του κρέατος βοήθησε στην καλύτερη διατήρηση των τροφών και στην ενίσχυση της γεύσης τους. Οι ζυμώσεις γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν σε γάλα σε μικρό επίπεδο αρχικά με μικρές και αργές βελτιώσεις και μετά την βιομηχανική επανάσταση τον 18^ο αιώνα σε μεγαλύτερο βαθμό με την ανάπτυξη των χημικών επιστημών (Dworkin, 2006).

Τα προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος δημιουργούνται από την οξίνιση του γάλακτος με φυσικές διαδικασίες. Τα προϊόντα της οξίνισης χρησιμοποιούνταν για μετέπειτα εμβολιασμό του γάλακτος με σκοπό την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων όπως γιαούρτη και τυριά, εντούτοις τα αποτελέσματα των ζυμώσεων ήταν ασταθή (Marth and Steele, 2001). Το 1857 ο Pasteur έδειξε ότι η ζύμωση ήταν μικροβιακής προέλευσης και το 1878 ο Lister απομόνωσε καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων γαλακτικού οξέος υπεύθυνες για την οξίνιση του γάλακτος (Brock, 1961). Από την αρχή του 20ού αιώνα ξεκίνησε η εμπορική παραγωγή και η χρήση

μικροοργανισμών ως εναρκτήριες καλλιέργειες με σκοπό την αποδοτικότερη παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων.

Το γάλα και τα προϊόντα του, κυρίως από βοοειδή και αιγοπρόβατα καταναλώνονται πλέον ευρέως από τον άνθρωπο και αποτελούν ένα πολύ θρεπτικό και ισορροπημένο διατροφικό μέσο. Σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό τροφίμων και γεωργίας η συνολική παραγωγή γάλακτος του 2013 ήταν 768,6 εκατομμύρια τόνοι και αναμένεται αύξηση των ποσοστών παραγωγής τα επόμενα χρόνια (FAO, 2015). Το γάλα και τα προϊόντα του όμως είναι ευπαθή και επιμολύνονται εύκολα από μικροοργανισμούς που είτε είναι παθογόνοι είτε αλλοιώνουν τη σύστασή τους. Λόγω του σπουδαίου διατροφικού ρόλου του γάλακτος, η παραγωγή και επεξεργασία του, στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, υπόκεινται σε αυστηρούς κανόνες. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα παράγονται στο εμπόριο από εναρκτήριες καλλιέργειες δηλαδή καλλιέργειες μικροοργανισμών που εμβολιάζονται σκόπιμα στο γάλα και συγκεντρώνουν επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως η γεύση ή η απουσία αυτής, η ταχύτητα οξίνισης, η ανθεκτικότητα σε αλατότητα, θερμοκρασία και βακτηριοφάγους, η παραγωγή πολυσακχαριτών και βακτηριοσινών. (Marth and Steele, 2001).



Εικόνα 1.1 Γραφική παράσταση παγκόσμιας παραγωγής γάλακτος σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO)

Για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν προέλθει από ζύμωση του γάλακτος, οι εναρκτήριες καλλιέργειες αποτελούνται από οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactic acid bacteria*), προπιονικά βακτήρια (*propionibacteria*), βακτήρια ωρίμανσης επιφάνειας (*surface ripening bacteria*) ζύμες και μύκητες. Έχουν την ικανότητα να παράγουν οξέα γρήγορα και να διαχωρίζονται από το πήγμα, συμβάλλουν στη γεύση και το άρωμα με την παραγωγή ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους και ενισχύουν την επιθυμητή υφή των προϊόντων, ενώ παράλληλα προάγουν και την συντήρηση των τροφίμων. (Marth and Steele, 2001). Μπορούν να διαχωριστούν σε μεσόφιλες και θερμοφιλες καλλιέργειες ανάλογα με την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, με τις μεσόφιλες να αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 10 – 40 °C, ενώ τις θερμοφιλες σε θερμοκρασίες 40 – 50 °C. Η σύστασή τους σε κάθε χρήση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε μονές καλλιέργειες (ένα στέλεχος), εναρκτήριες καλλιέργειες πολλαπλών στελεχών (του ίδιου είδους), εναρκτήριες καλλιέργειες πολλαπλών ανάμεικτων στελεχών (διαφορετικά στελέχη διαφορετικών ειδών) και ακατέργαστες ανάμεικτες εναρκτήριες καλλιέργειες (είδη και στελέχη μερικώς ή πλήρως άγνωστα). (Dworkin, 2006).

1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, L.A.B.).

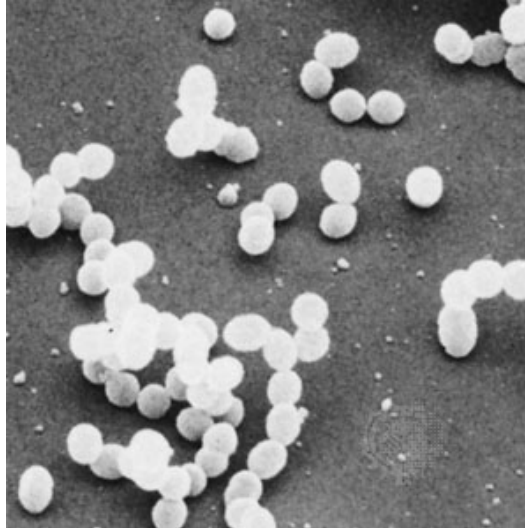
Οξυγαλακτικό βακτήριο σύμφωνα με το Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology ονομάζεται «κάθε βακτήριο στο οποίο το κύριο μεταβολικό προϊόν είναι το γαλακτικό οξύ. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus* και *Streptococcus* και μερικά έχουν εμπορική σημασία, π.χ. στην παρασκευή ζυμούμενων τροφίμων».

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν βακτήρια θετικά κατά Gram, μη σπορογόνοι κόκκοι, κοκκοβάκιλοι ή ραβδόμορφα βακτήρια με ποσοστό GC στο DNA τους λιγότερο από 50% (Stiles and Holzapfel, 1997). Μπορούν να ζυμώσουν την γλυκόζη είτε ομοζυμωτικά μετατρέποντας την σε γαλακτικό οξύ, είτε ετεροζυμωτικά μετατρέποντας την σε γαλακτικό οξύ, CO₂ και αιθανόλη ή οξικό οξύ ή και τα δύο.

Χρησιμοποιούνται για την ζύμωση τροφίμων, ενώ κάποια στελέχη αποτελούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του στόματος, του γαστρεντερικού συστήματος και του κόλπου στα θηλαστικά (Klein et al., 1998). Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που συμμετέχουν στις ζυμώσεις τροφίμων ανήκουν κυρίως στα γένη *Carnobacterium* (πρώην *Pediococcus halophilus*), *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* (πρώην *Pediococcus halophilus*), *Vagococcus* (πρώην motile streptococci) και *Weissella* με σημαντικότερα για την μικροβιολογία τροφίμων τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, (*Streptococcus*), *Leuconostoc* και *Pediococcus* ενώ το μεγαλύτερο γένος με διαφορά είναι το *Lactobacillus* (Dworkin, 2006).

1.3 Το γένος *Streptococcus*.

Το γένος *Streptococcus* ανήκει στην οικογένεια Streptococcaceae. Σε αυτό κατατάσσονται σφαιρικά βακτήρια θετικά κατά Gram, μη σποριογόνα, που σχηματίζουν αλυσίδες μεταξύ τους λόγω της κυτταρικής τους διαίρεσης σε έναν άξονα, εξ' ου και το όνομά τους από την ελληνική λέξη στρεπτός. Πολλά είδη του γένους είναι μη βλαβερά και εντοπίζονται στο γάλα, ενώ άλλα εμφανίζουν συμβιωτική σχέση στο έντερο των σπονδυλωτών. Τα είδη της ομάδας pyogenic είναι παθογόνα για τον άνθρωπο καθώς καταστρέφουν τα ερυθροκύτταρα, ενώ τα μέλη της ομάδας viridans ενδαιτούν στο άνω αναπνευστικό σύστημα και είναι δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο (Abercrombie et al., 1990).

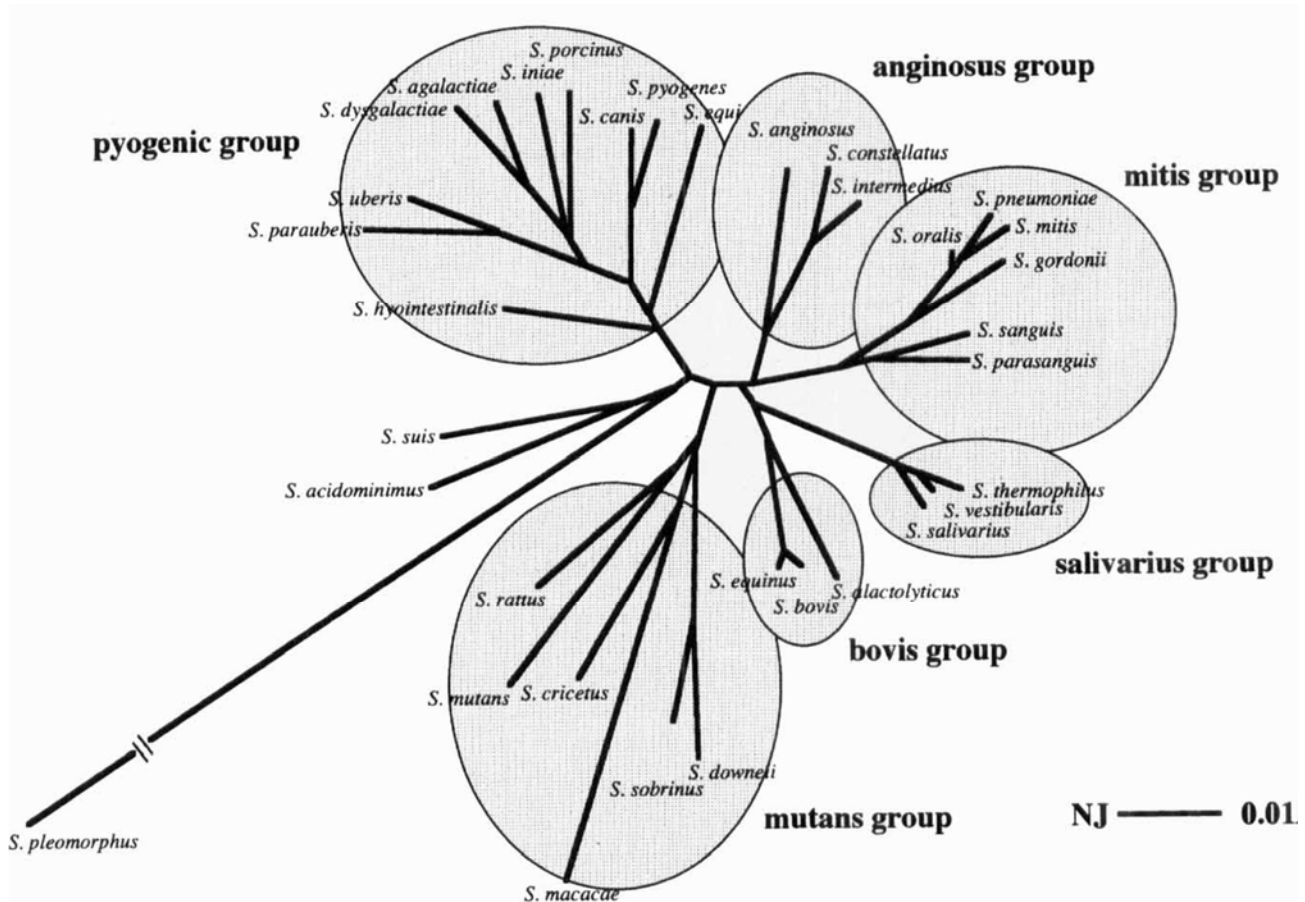


Εικόνα 1.2 Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του οργανισμού *Streptococcus mutans*. Encyclopædia Britannica

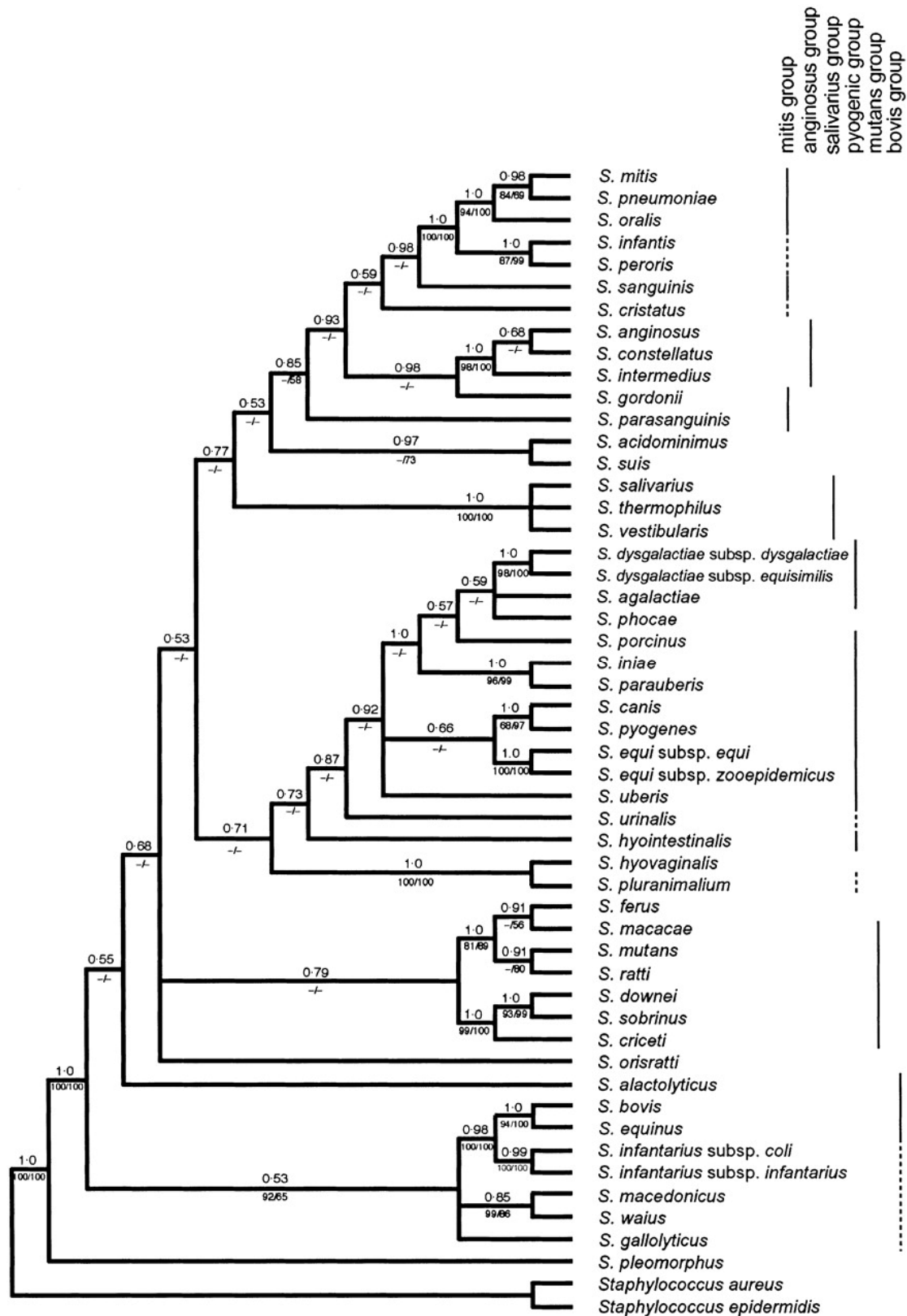
Από τη δεκαετία του '80, με την εφαρμογή μοριακών και χημικών τεχνικών για την ταξινόμηση των ειδών, έγιναν πολλές ανακατατάξεις στο γένος *Streptococcus*. Οργανισμοί που κάποτε είχαν ταξινομηθεί ως *Streptococcus* ταξινομήθηκαν στα νέα γένη των *Lactococcus* και *Enterococcus*. (Dworkin, 2006).

Τα είδη που παρέμειναν στο γένος *Streptococcus* περιελήφθησαν στην ομάδα που περιγράφηκε από τον Sherman (1937) ως “viridans group” ή με τον όρο κατά άλλους “oral streptococci” (Jones, 1978; Hardie and Bowden, 1976). Οι στρεπτόκοκκοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 ομάδες (α, β και γ) ανάλογα με την δυνατότητα αιμόλυσης που εμφανίζουν (μερική, πλήρης ή καθόλου αντίστοιχα) και αυτό κάνει τον χαρακτηρισμό “viridans” ή “oral” μη αντιπροσωπευτικό για το σύνολο των ειδών στην ομάδα αυτή, εντούτοις ο όρος παρέμεινε αποδεκτός λόγω της εμφάνισης (μη αποκλειστικά) αυτών των ειδών στο άνω αναπνευστικό σύστημα και στο στόμα (Dworkin, 2006).

Με την μετέπειτα εφαρμογή βιοχημικών μεθόδων ταξινόμησης και δεδομένα φυσιολογίας, σύστασης κυτταρικού περιβλήματος, γενετικών μετασχηματισμών και ταξινομικών μελετών προτάθηκε η διάκριση έξι σαφών ειδών στην ομάδα *viridans*, τα *S. salivarius*, *S. mitior*, *S. milleri*, *S. sanguis*, *S. mutans* και *S. pneumoniae* (Colman and Williams, 1972; Colman, 1976) η οποία εμφάνιζε μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τα μετέπειτα γενετικά ταξινομικά δεδομένα και κατά συνέπεια αμφισβητήθηκε. Με την εφαρμογή περισσότερων χημικών και μοριακών ταξινομικών κριτηρίων το γένος *Streptococcus* οδηγήθηκε στη διαίρεσή του σε τρία γένη, τα *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Lactococcus* (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984; Schleifer et al., 1985) ενώ στο γένος *Streptococcus* ταυτοποιήθηκαν τέσσερεις ομάδες ειδών, οι ομάδες *mutans*, *salivarius*, *anginosus* και *mitis* (Dworkin, 2006). Βάσει των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA το γένος *Streptococcus* μπορεί να χωριστεί σε 6 βασικές ομάδες, τις *pyogenic*, *anginosous*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* και *mutans* (Kawamura et al., 1995).



Εικόνα 1.3 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ 34 ειδών *Streptococcus*. Οι αποστάσεις υπολογίστηκαν με την μέθοδο neighbor-joining (NJ). Ο *S. pleomorphus* τοποθετήθηκε σε μεγάλη απόσταση από τα άλλα είδη: η απόστασή του απεικονίζεται με μια έλλειψη, ενώ η απόστασή του από την πρώτη διακλάδωση είναι 0,16944 (Kawamura et al., 1995).



Εικόνα 1.4 Φυλογενετικό δέντρο που συνοψίζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης Bayesian συνδυάζοντας δεδομένα από γονίδια *16S* και *rnpB*. Διακλαδώσεις με μεταγενέστερη πιθανότητα μικρότερη από 0,5 δεν φαίνονται. Οι αριθμοί πάνω από τις διακλαδώσεις είναι οι μεταγενέστερες πιθανότητες. Οι αριθμοί κάτω από τις διακλαδώσεις είναι τα ποσοστά εκκίνησης για τις αναλύσεις MP και ME αντίστοιχα. Οι ράβδοι απεικονίζουν τις ταξινομικές ομάδες του γένους *Streptococcus* (Kawamura *et al.*, 1995). Οι ευθείες γραμμές δείχνουν τις ταξινομικές ομάδες με την αρχική κατηγοριοποίηση, οι διακεκομμένες τις ομάδες που προστέθηκαν σε μετέπειτα αναλύσεις (Tapp *et al.*, 2003).

1.4 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Το 1906 οι Andrewes και Horder ονόμασαν ένα είδος βακτηρίων *Streptococcus salivarius* λόγω της συχνής παρουσίας του στο σίελο των ανθρώπων, ενώ εντοπίστηκε επίσης στα εντόσθια, καθώς και σε ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία και περιτονίτιδα. Χαρακτηριστικά σχημάτιζαν αλυσίδες σε θρεπτικά υγρά μέσα, στερεοποιούσαν το γάλα, παρήγαγαν οξέα από σακχαρόζη, λακτόζη και ραφινόζη, δεν ζύμωναν την μανιτόλη και δεν αναπτύσσονταν σε ζελατίνη σε θερμοκρασία 20° C (Dworkin, 2006).

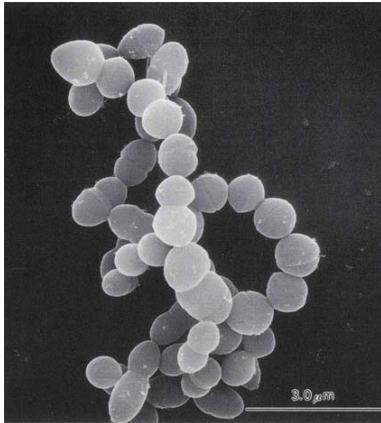
Με περαιτέρω χαρακτηρισμό του είδους από ιδιότητες της φυσιολογίας του, της παραγωγής εξωκυττάρων πολυσακχαριτών από σακχαρόζη και από τις διατροφικές απαιτήσεις του έγιναν σαφή τα τυπικά χαρακτηριστικά του. Τα στελέχη *S. salivarius* είναι γενικά μη αιμολυτικά, παράγουν οξύ από ινουλίνη, λακτόζη, ραφινόζη, σαλίσίνη και τρεχαλόζη, αλλά όχι από μανιτόλη, σερβιτόλη ή μελιβιόζη, υδρολύουν την εσκουλίνη, αλλά όχι την αργινίνη, και τέλος παράγουν ακετοΐνη και συχνά ουρεάση. (Dworkin, 2006).

Με πειράματα υβριδισμού DNA-DNA βρέθηκε ότι τα στελέχη *S. salivarius* έχουν στενή σχέση με τα *S. thermophilus* και προτάθηκε ο επαναπροσδιορισμός τους ως *S. salivarius* subspecies *salivarius* και *S. salivarius* subspecies *thermophilus*, ενώ αναλυτικότερες μελέτες υβριδισμών έδειξαν πως οι ομοιότητες,

Εισαγωγή

αν και φανερώνουν σύνδεση, τοποθετούν τα στελέχη αυτά ως διαφορετικά είδη καταλήγοντας στον διαχωρισμό των ειδών. (Dworkin, 2006).

Ο *S. thermophilus* είναι ένα θετικό κατά Gramm βακτήριο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 45 °C και έχει στο DNA του ποσοστό G+C 37 - 40%.



Θεωρείται προαιρετικά αναερόβιος και μπορεί να παράγει ενέργεια με την μορφή ATP τόσο αερόβια παρουσία οξυγόνου όσο και αναερόβια μέσω ζύμωσης. Δεν διαθέτει τα ένζυμα κυτοχρώματος (cytochrome), οξειδάσης (oxidase) και καταλάσης, δεν κινείται και δεν σχηματίζει σπόρια. Θεωρείται μη παθογόνος, άλφα αιμολυτικός και είναι μέλος της ομάδας viridans του γένους *Streptococcus*.

Εικόνα 1.5 Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του οργανισμού *Streptococcus thermophilus*. jpkc.njau.edu.cn

Ο οργανισμός *S. thermophilus* ανήκει στα θερμόφιλα βακτήρια γαλακτικού οξέος (L.A.B.) και θεωρείται ασφαλής για κατανάλωση (Generally recognized as safe, G.R.A.S.) παρόλη τη στενή σχέση που έχει με άλλα παθογόνα στελέχη *Streptococcus* όπως οι *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, και *S. agalactiae* τα οποία προκαλούν πνευμονία, βακτηριακή σήψη και μηνιγγίτιδα. Η έλλειψη παθογόνων χαρακτηριστικών οφείλεται στην έλλειψη γονιδίων ή στην παρουσία ψευδογονιδίων υπεύθυνων για την έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών (εκτός των λιποπρωτεϊνών) τις οποίες χρησιμοποιούν οι παθογόνοι streptococci για να προσκολληθούν στο βλεννογόνο και να αποφύγουν τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή.

Χρησιμοποιείται ευρέως ως εναρκτήριο καλλιέργεια για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων και θεωρείται ο δεύτερος πιο σημαντικός οργανισμός στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων μετά τον *Lactococcus lactis*, με ετήσια

αγορά περίπου 40 δισεκατομμυρίων δολαρίων και με υπολογιζόμενη ετήσια κατανάλωση περίπου 10^{21} κύτταρα από τον άνθρωπο (Hols et al., 2005).

Κατά την ζύμωση του γάλακτος μετατρέπει την λακτόζη σε γαλακτικό οξύ με γρήγορο ρυθμό μειώνοντας το pH, υδρολύει τις πρωτεΐνες του γάλακτος και παράγει εξωπολυσακχαρίτες οι οποίοι δίνουν την επιθυμητή υφή και γεύση στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Πολλές φορές χρησιμοποιείται με άλλους οργανισμούς ως εναρκτήρια καλλιέργεια όπως τον *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* για την παραγωγή γιαούρτης όπου αναπτύσσει ένα είδος συμβιωτικής σχέσης, ή τον *Lactobacillus helveticus* για συγκεκριμένες ποικιλίες τυριών (Fox, 1993).

1.5 Πλασμίδια *S. thermophilus* και H.S.P

Η εμφάνιση εξωχρωμοσωμικού DNA είναι πολύ συχνή στα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ειδικά στους μεσόφιλους λακτόκοκκους πολλές λειτουργίες ζύμωσης οφείλονται σε γονίδια πλασμιδίων, όπως μεταβολισμός προϊόντων λακτόζης και πρωτεϊνών, σύνθεση πολυσακχαριτών και αρωματικών ενώσεων καθώς και γονίδια άμυνας εναντίων βακτηριοφάγων και παραγωγής και ανοσίας βακτηριοσινών (Geis et al., 2003).

Στον οργανισμό *Streptococcus thermophilus* αντιθέτως, η εμφάνιση πλασμιδίων δεν είναι συχνή. Σε ποσοστό μικρότερου του 20 % στελεχών απομονωμένων από ζυμούμενα προϊόντα έχει διαπιστωθεί η παρουσία ενός ή δύο μικρών πλασμιδίων. Παρά την σταθερή διατήρηση των πλασμιδίων κατά την ανάπτυξη των στελεχών αυτών ακόμη και σε συνθήκες χωρίς παράγοντες επιλογής σε πλήρη θρεπτικά μέσα, η γνώση των φυσιολογικών λειτουργιών αυτών είναι περιορισμένη (Geis et al., 2003). Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών αντιγραφής των πλασμιδίων ομοιάζουν μεταξύ των πλασμιδίων του ίδιου είδους και γενικότερα θετικών κατά Gram βακτηρίων με μηχανισμό αντιγραφής τύπου κυλιόμενου κύκλου (Solow και Somkuti, 2000).

Σε πλασμίδια του είδους βρέθηκαν γονίδια πρωτεϊνών θερμικού σοκ μικρού μοριακού βάρους (low molecular weight Heat Shock Proteins, H.S.P.). Πρόκειται για πρωτεΐνες που παράγονται σε περιβαλλοντολογικές αλλαγές για να βοηθήσουν στην επιβίωση των κυττάρων. Εντοπίστηκαν πρώτα σε φυτικά κύτταρα και ο ακριβής ρόλος τους στα βακτήρια δεν είναι ακόμα γνωστός. Στο *S. thermophilus* που υπόκειται σε ακραίες περιβαλλοντικές αλλαγές κατά τη βιομηχανική του χρήση, όπως θερμοκρασία, αλατότητα και pH, είναι επιθυμητή η αναζήτηση στελεχών με μεγαλύτερες αντοχές σε αυτές. Αλληλουχίες γονιδίων H.S.P. από πλασμίδια *S. thermophilus* που μελετήθηκαν παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με αντίστοιχες σε μπιζέλι, καρότο, σόγια κ.α. αλλά πολύ περισσότερο μεταξύ των διαφόρων στελεχών *S. thermophilus* (Solow και Somkuti, 2000).

1.6 Βακτηριοσίνες (bacteriocins)

Βακτηριοσίνες γενικότερα ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες παράγονται από ένα βακτήριο και επηρεάζουν δυσμενώς ένα άλλο βακτήριο. Οι βακτηριακές αυτές τοξίνες με αντιμικροβιακή δράση ονομάστηκαν έτσι από τα ακρωνύμια των λέξεων βακτηριακές τοξίνες (bacterial toxins). Οι περισσότερες είναι πρωτεϊνικής σύστασης και συντίθενται στα ριβοσώματα των βακτηριακών κυττάρων, ενώ άλλες συντίθενται από συμπλέγματα ενζύμων ή με αλυσιδωτές ενζυμικές αντιδράσεις (Creighton, 1999).

Οι βακτηριοσίνες έχουν βρεθεί σχεδόν σε κάθε είδος βακτηρίου που έχει μελετηθεί για την ύπαρξή τους ενώ σε κάθε είδος εμφανίζονται δεκάδες ή εκατοντάδες είδη βακτηριοσινών. Η ύπαρξή τους έχει διαπιστωθεί σε όλες τις κυρίως συγγενικές σειρές των βακτηρίων ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι και μερικά μέλη των αρχαίων τις παράγουν. Ο γενετικός τόπος στον οποίο παρατηρούνται είναι τα πλασμίδια, συζευκτικά και μη, τα τρανσποζόνια αλλά και το χρωμόσωμα. Διαφέρουν από τα κλασικά αντιβιοτικά ευρέος φάσματος κυρίως ως

προς το φάσμα των οργανισμών που δρουν, καθώς επηρεάζουν μόνο βακτήρια συγγενικά προς τον οργανισμό από τον οποίο παράγονται (Riley and Chavan, 2007).

Η ποικιλία των βακτηριοσινών ως προς το μέγεθος, τον τρόπο λειτουργίας, τους στόχους και τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας είναι πολύ μεγάλη. Μία αρχική ομαδοποίηση μπορεί να γίνει από το διαχωρισμό των κατά Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην εξέλιξη και εξειδίκευση των βακτηριοσινών μεταξύ των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων οφείλονται στη διαφορά των μεμβρανών των δυο κατηγοριών (Creighton, 1999).

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν εξωτερικά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης έναν περιπλασματικό χώρο και μία εξωτερική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες προσδένονται ανταγωνιστικά σε υποδοχείς της μεμβράνης για να διαπεράσουν το κύτταρο με αποτέλεσμα να φέρουν εξειδικευμένες περιοχές που περιλαμβάνουν θέσεις πρόσδεσης στους υποδοχείς των μεμβρανών, μεταφοράς και δραστηκότητας, με αποτέλεσμα να έχουν μεγάλο μέγεθος (Creighton, 1999).

Τα θετικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν έξω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στρώμα πεπτιδογλυκάνης χωρίς εξωτερική μεμβράνη με αποτέλεσμα να ευνοείται η κίνηση των μικρών πεπτιδίων χωρίς πρόσδεση σε υποδοχέα και μεταφορά. Κατά συνέπεια, οι βακτηριοσίνες των θετικών κατά Gram βακτηρίων εμφανίζουν μικρότερο μέγεθος, ευρύτερο φάσμα δράσης (με δραστηκότητα σε μερικές περιπτώσεις σε μη συγγενικά γένη), μεγαλύτερη αφθονία και ποικιλομορφία, ενώ οι δομές τους συνήθως υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ώστε να σταθεροποιείται το μόριο (Creighton, 1999; Riley and Chavan, 2007).

Υπάρχουν δυο βασικές διαφορές μεταξύ των βακτηριοσινών των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. 1) Λόγω των συστημάτων μεταφοράς έξω από το κύτταρο στα κατά Gram θετικά βακτήρια η παραγωγή βακτηριοσίνης σε αυτά

δεν είναι απαραίτητα θανατηφόρα για τα ίδια τα κύτταρα, σε αντίθεση με τα κατά Gram αρνητικά όπου η έκκριση επιφέρει λύση του κυττάρου. 2) Τα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν αναπτύξει εξειδικευμένα συστήματα για την ρύθμιση των βακτηριοσινών τους, ενώ στα αρνητικά η ρύθμιση βασίζεται σε συστήματα ρύθμισης του κυττάρου του ξενιστή ατομικά (Creighton, 1999).

1.7 Βακτηριοσίνες των θετικών κατά Gram βακτηρίων.

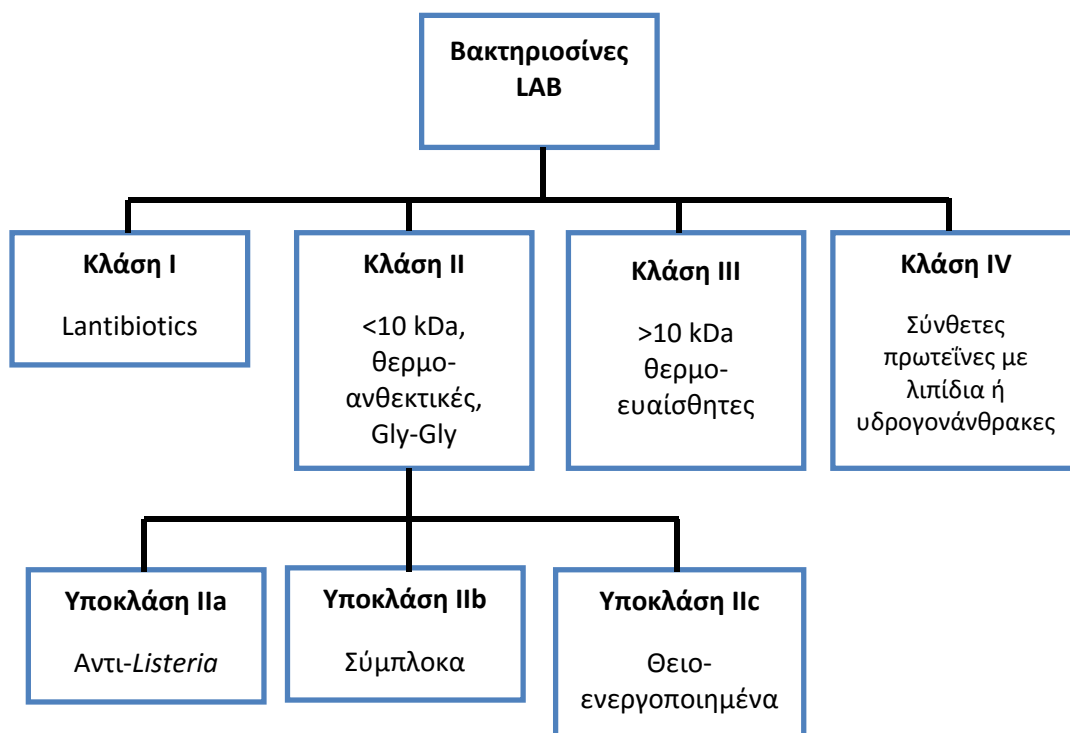
Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα θετικά κατά Gram βακτήρια και ιδιαίτερα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) ως προς τη παραγωγή και τη δραστικότητα βακτηριοσινών το οποίο συνδυάζεται με την πιθανή χρήση τους ως προβιοτικά ή για την συντήρηση τροφίμων.

Η πρώτη σχετική αναφορά παρουσιάστηκε το 1947 από τους Matttick και Hirsch για την ανασταλτική δραστικότητα ορισμένων λακτόκοκκων (streptococci, ομάδα N) έναντι άλλων LAB η οποία οφειλόταν σε έναν πρωτεϊνικό αντιμικροβιακό παράγοντα με το όνομα "group N inhibitory substance", γνωστό και ως νισίνη. Η νισίνη χρησιμοποιείται σήμερα σαν συντηρητικό τροφίμων σε πολλές χώρες και άνοιξε τον δρόμο για την μελέτη των βακτηριοσινών.

Οι βακτηριοσίνες των θετικών κατά Gram βακτηρίων εμφανίζουν πολύ μεγάλη ετερογένεια με μόνα κοινά χαρακτηριστικά την πρωτεϊνική τους σύσταση και τον επηρεασμό βακτηρίων συγγενικών προς το παραγωγό βακτήριο. Το 1993 προτάθηκε από τον Klaenhammer ο διαχωρισμός των βακτηριοσινών σε 4 κύριες κλάσεις, ως εξής: (Klaenhammer, 1993).

- Κλάση I: Lantibiotics, Μικρά (<5 kDa) μεμβρανο-ενεργά πεπτιδία που περιέχουν τα αμινοξέα λανθιονίνη, β-μεθυλ-λανθιονίνη και αφυδατωμένα κατάλοιπα

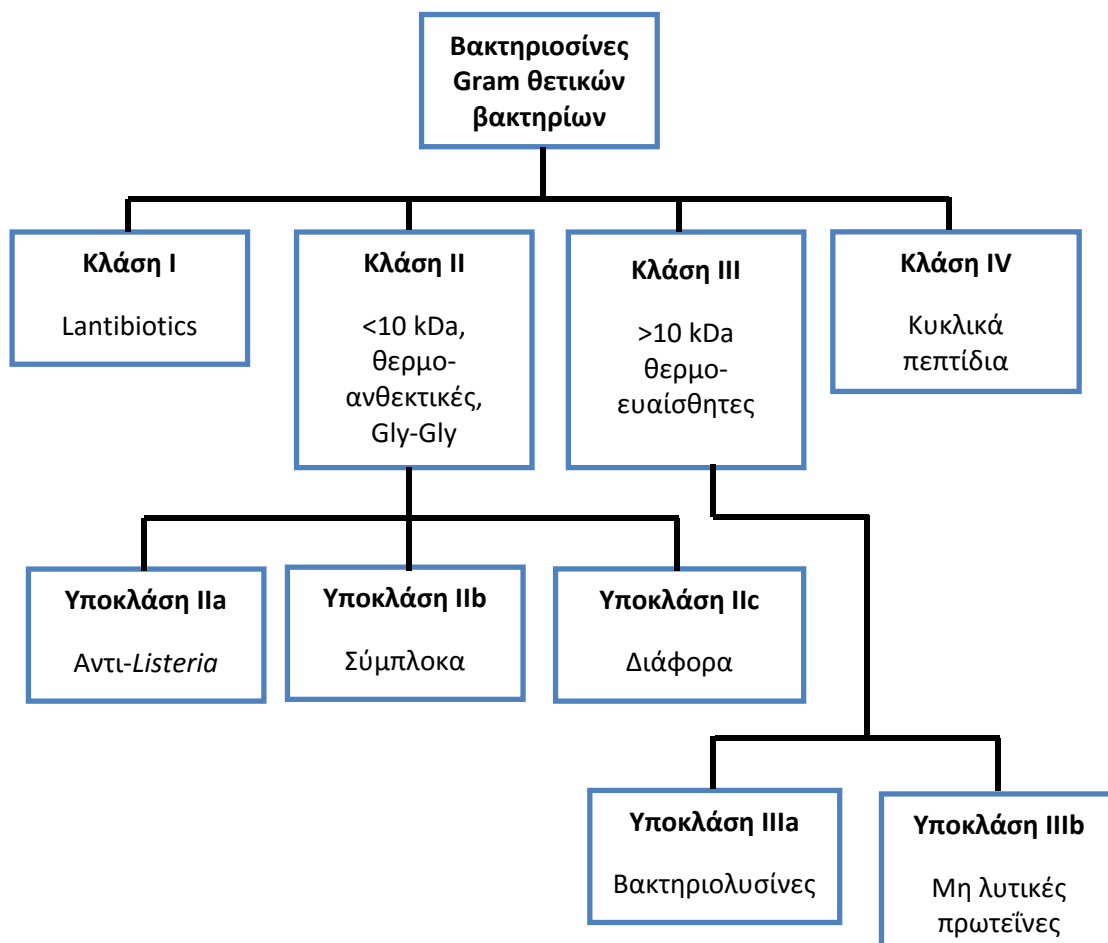
- Κλάση II: Μικρά (<10 kDa) θερμο-ανθεκτικά μεμβρανο-ενεργά πεπτιδία με την χαρακτηριστική ομάδα Gly-Gly τα οποία δεν περιέχουν λανθιονίνη.
 - Υποκλάση IIa: Πεπτιδία ενεργά σε *Listeria* με συντηρημένη αλληλουχία στο αμινο-τελικό άκρο Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-
 - Υποκλάση IIb: σύμπλοκα 2 πεπτιδίων με δραστικότητα που οφείλεται στη δημιουργία πόρων
 - Υποκλάση IIc: θειολο - ενεργοποιημένα πεπτιδία που απαιτούν αναγμένα υπολείμματα κυστεΐνης για δραστικότητα
- Κλάση III: Μεγαλύτερες (>10 kDa) θερμο-ευαίσθητες βακτηριοσίνες
- Κλάση IV: Σύνθετες βακτηριοσίνες συντιθέμενες από βασικά λιπίδια ή από χαρακτηριστικές ομάδες υδρογονανθράκων επιπροσθέτως των πρωτεϊνών.



Εικόνα 1.6 Διαχωρισμός βακτηριοσινών βακτηρίων γαλακτικού οξέος σύμφωνα με τον Klaenhammer (1993)

Ο διαχωρισμός αυτός υιοθετήθηκε από πολλούς ερευνητές. Εντούτοις έχει υποβληθεί σε διαδοχικές τροποποιήσεις λόγω των δεδομένων που προκύπτουν συνεχώς από νέες βακτηριοσίνες. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες (Riley and Chavan, 2007) προτείνεται:

- Η τροποποίηση της υποκλάσης IIc, η οποία θα περιλαμβάνει όλες τις βακτηριοσίνες της κλάσης II που δεν πληρούν τα κριτήρια για τις υποκλάσεις IIa και IIb
- Η υποδιαίρεση της κλάσης III στις υποκλάσεις IIIa (βακτηριολυσίνες (θερμοευσαίσθητες υδρολάσες μουρεΐνης)) και IIIb (μη λυτικές πρωτεΐνες)
- Η τροποποίηση της κλάσης IV η οποία θα περιλαμβάνει τις κυκλικές βακτηριοσίνες



Εικόνα 1.7 Διαχωρισμός βακτηριοσινών θετικών κατά Gram βακτηρίων σύμφωνα με Riley and Chavan (2007)

Ιδιαίτερο εμπορικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι περιπτώσεις των βακτηριοσινών των βακτηρίων γαλακτικού οξέος που εμφανίζουν μεγάλο φάσμα δράσης, αν και δεν είναι σύνηθες. Μία ιδιαίτερη περίπτωση είναι και η βακτηριοσίνη macedocin του οργανισμού *S. macedonicus* ACA-DC 198, ένα λαντιβιοτικό με ευρύ φάσμα δράσης που η παραγωγή του επάγεται από την παρουσία πρωτεϊνών του γάλακτος αλλά δεν παράγεται σε τεχνητά θρεπτικά μέσα. (Georgalaki et al., 2010)

1.8 Streptococcus thermophilus και βακτηριοσίνες

Σε αντίθεση με την πληθώρα των δεδομένων που υπάρχουν για τις βακτηριοσίνες των LAB, λίγα στοιχεία έχουν αναφερθεί για τις βακτηριοσίνες στελεχών *S. thermophilus*. Οι αναφορές αναδεικνύουν 9 στελέχη που παράγουν βακτηριοσίνες (thermophilins):

S. thermophilus ST134 - θερμοφιλίνη A (Ward and Somkuti, 1995)

S. thermophilus 347 – θερμοφιλίνη 347 (Villani et al., 1995),

S. thermophilus SFi13 – θερμοφιλίνη 13 (Marciset et al., 1997),

S. thermophilus 81 (Ivanova et al., 1998),

S. thermophilus ACA-DC 0040 - θερμοφιλίνη T (Aktypis et al., 1998),

S. thermophilus ACA-DC 0001 - θερμοφιλίνη ST1 (Aktypis and Kalantzopoulos, 2003),

S. thermophilus ADRIA 91 L580 (Mathot et al., 2003),

S. thermophilus ST110 – θερμοφιλίνη 110 (Gilbreth and Somkuti, 2005),

S. thermophilus SBT1277 – θερμοφιλίνη 1277 (Kabuki et al., 2009)

Σε 2 από αυτά, τα *S. thermophilus* SFi13 και *S. thermophilus* SBT1277 έχει χαρακτηριστεί η υπεύθυνη γενετική περιοχή για την παραγωγή των παραπάνω βακτηριοσινών.

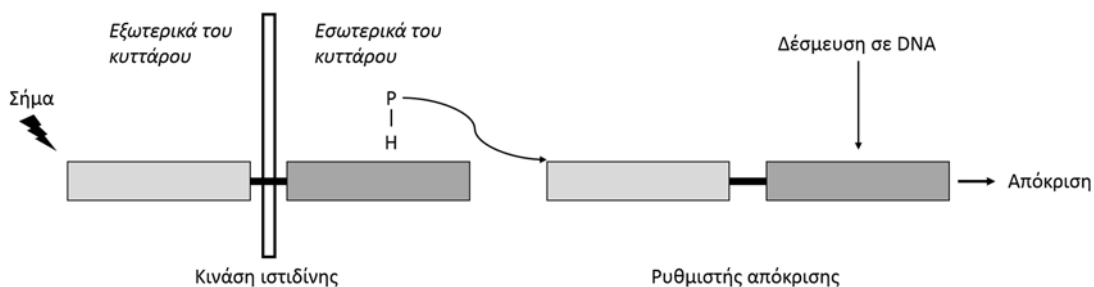
Οι Hols et al. (2005) χρησιμοποίησαν τις κατατεθειμένες αλληλουχίες των στελεχών *S. thermophilus* LMD-9, CNRZ1066 και LMG 18311, με σκοπό να εντοπίσουν γενετικές περιοχές υπεύθυνες για την παραγωγή θερμοφιλίνης. Βρέθηκαν 2 γενετικοί τόποι που θεωρούνται πιθανοί να σχετίζονται με την παραγωγή βακτηριοσινών. Η πρώτη περιοχή ονομάστηκε *lab* και φέρει γονίδια που ομοιάζουν με γονίδια για την παραγωγή λαντιβιοτικών. Το μικρό μέγεθος όμως των θεωρητικά παραγόμενων lantibiotics, μεγέθους 9 καταλοίπων, καθώς και η έλλειψη γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορείς ABC για εξωκυτάρια μεταφορά καθιστά αναξιόπιστη την υπόθεση ότι ευθύνεται για την παραγωγή βακτηριοσινών. (Hols et al., 2005).

Τα γονίδια της δεύτερης περιοχής εμφανίζουν τυπικά χαρακτηριστικά γονιδίων παραγωγής βακτηριοσινών δεύτερης κλάσης (Hols et al., 2005) και ομοιάζουν με την περιοχή *blp* (bacteriocin like peptide) του *Streptococcus pneumoniae* (*blp_{Sp}*) (Saizieu et al., 2000). Για τον λόγο αυτό ονομάστηκαν *S. thermophilus blp* (*blp_{St}*). Παρόμοια περιοχή έχει αναφερθεί και σε είδη *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* (*bsm*), *Streptococcus pyogenes* (*sil*), *Streptococcus equi* ενώ λειτουργική παρόμοια περιοχή αναφέρθηκε και σε *S. mutans* (mutacin IV και mutacin V) και *S. pneumonia* (*BlpM* και *BlpN*) (Fontaine et al. 2007).

Χαρακτηριστικό των γονιδίων αυτής της περιοχής είναι η παρουσία μιας αλληλουχίας που κωδικοποιεί ένα πιθανό πεπτιδίο οδηγό στο αμινοτελικό άκρο, ανοδικά των πεπτιδίων που θα εκκριθούν εξωκυτάρια, το οποίο αναγνωρίζεται και κόβεται κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά την εξωκυτάρια έκκριση. Μπορεί να αναγνωριστεί εύκολα στην αρχή της αμινοξικής αλληλουχίας από την παρουσία 2 καταλοίπων γλυκίνης στο τέλος της.

1.9 Γενετική περιοχή *blp_{St}* στα στελέχη LMD9, LMG 18311 και CNRZ1066

Στη περιοχή *blp_{St}* των στελεχών *S. thermophilus* LMD-9, CNRZ1066 και LMG 18311 εμφανίζονται γονίδια που κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα 3 στοιχείων. Ως ρυθμιστικό σύστημα 3 στοιχείων αναφέρεται συχνά η ομάδα των γονιδίων που κωδικοποιούν μία φερομόνη ως παράγοντα επαγωγής (induction factor, IF) και ένα ρυθμιστικό σύστημα 2 στοιχείων (two-component system) με μία κινάση ιστιδίνης (histidine kinase, HK) και έναν ρυθμιστή απόκρισης (response regulator, RR)). Επίσης εντοπίζονται γονίδια που θα μπορούσαν να κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την εξωκυττάρια μεταφορά της φερομόνης και των βακτηριοσινών καθώς, και γονίδια που θα μπορούσαν να κωδικοποιούν βακτηριοσίνες και τα γονίδια ανθεκτικότητας (Fontaine et al. 2007; Renye et al., 2013; Kleerebezem and Quadri; 2001).



Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση δράσης ρυθμιστικού συστήματος 2 στοιχείων

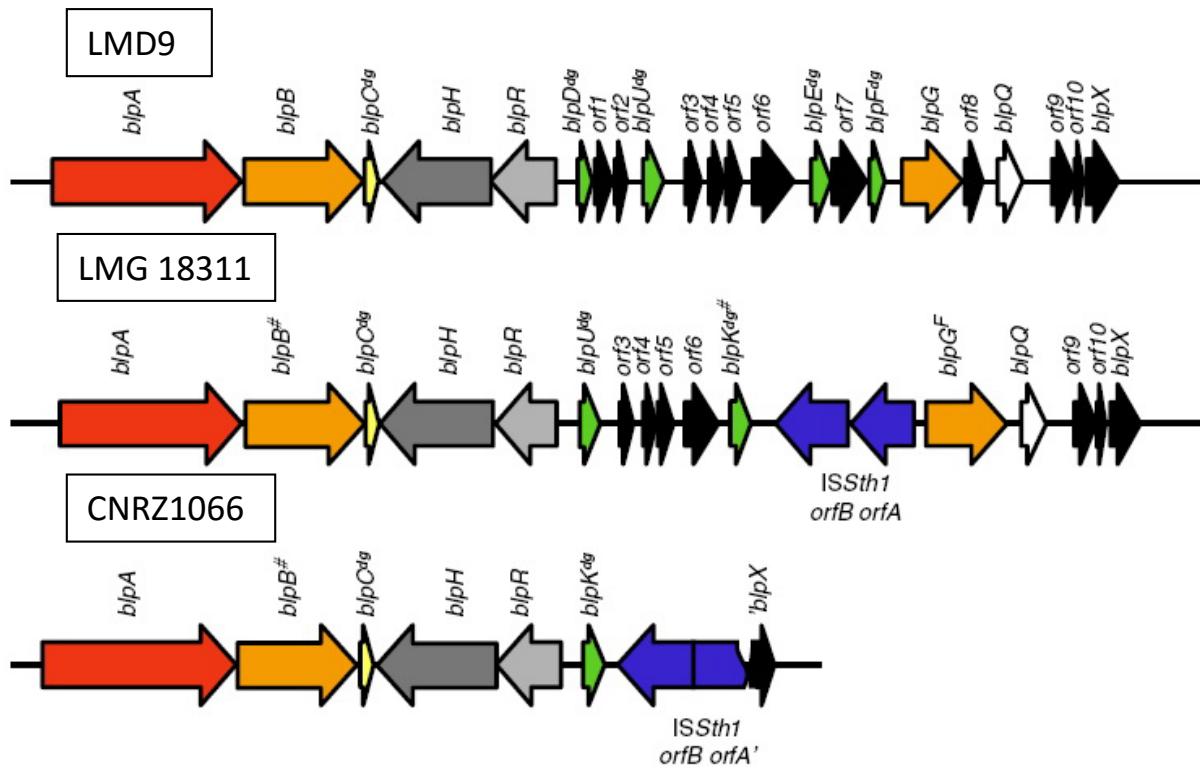
Τα γονίδια μπορούν να οργανωθούν σε 4 περιοχές βάσει των λειτουργιών τους, με κοινά σημεία και στα 3 στελέχη. Στην πρώτη περιοχή υπεύθυνη για την εξωκυττάρια μεταφορά και τον παράγοντα επαγωγής φαίνονται 3 γονίδια που κωδικοποιούν έναν μεταφορέα ABC (*blpA*), μία βοηθητική πρωτεΐνη μεταφοράς (*blpB*) και την φερομόνη του συστήματος απαρτίας (*blpC*) ως παράγοντα επαγωγής με το αναγνωριστικό πεπτιδίο με την ομάδα Gly-Gly.

Στην δεύτερη περιοχή υπεύθυνη για το ρυθμιστικό σύστημα 2 στοιχείων εμφανίζονται 2 γονίδια, μία υποδοχέας - κινάση (*blpH*) (HK) και το γονίδιο ρύθμισης της απόκρισης (*blpR*) ως ρυθμιστή απόκρισης (RR).

Στην τρίτη γονιδιακή περιοχή φαίνονται τα υπεύθυνα για την παραγωγή βακτηριοσίνης γονίδια με το αναγνωριστικό πεπτίδιο που φέρει την ομάδα Gly-Gly, καθώς και γονίδια με δομικές ομοιότητες με πρωτεΐνες που προσφέρουν ανοσία στο βακτήριο ξενιστή έναντι των βακτηριοσινών του.

Στη τέταρτη περιοχή παρατηρούνται γονίδια με άγνωστη λειτουργία καθώς και το γονίδιο *blpG* στα δύο από τα τρία στελέχη, του οποίου η πρωτεΐνη περιέχει ένα μοτίβο CXXC που δρα ως ισομεράση της θειορεδοξίνης (thioredoxin isomerase) για την δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών.

Τα στελέχη LMG 18311 και CNRZ1066 δεν παράγουν βακτηριοσίνη λόγω μίας μη νοηματικής μεταλλαγής του γονιδίου *blpB* που έχει ως αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης του, και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατή η εξαγωγή της παραγόμενης φερομόνης. Το στέλεχος LMD9 εμφανίζει άθικτα τα στοιχεία του συστήματος απαρτίας και με εμφάνιση μεγαλύτερης ποσότητας της φερομόνης προσφερόμενης εξωγενώς παράγει βακτηριοσίνη, την thermophilin 9, αλλά λόγω της αστάθειας του μετάγραφου *blpABC* η παραγόμενη φυσικά φερομόνη δεν είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει την παραγωγή της βακτηριοσίνης σε κλασικές συνθήκες ανάπτυξης (Fontaine et al., 2007).

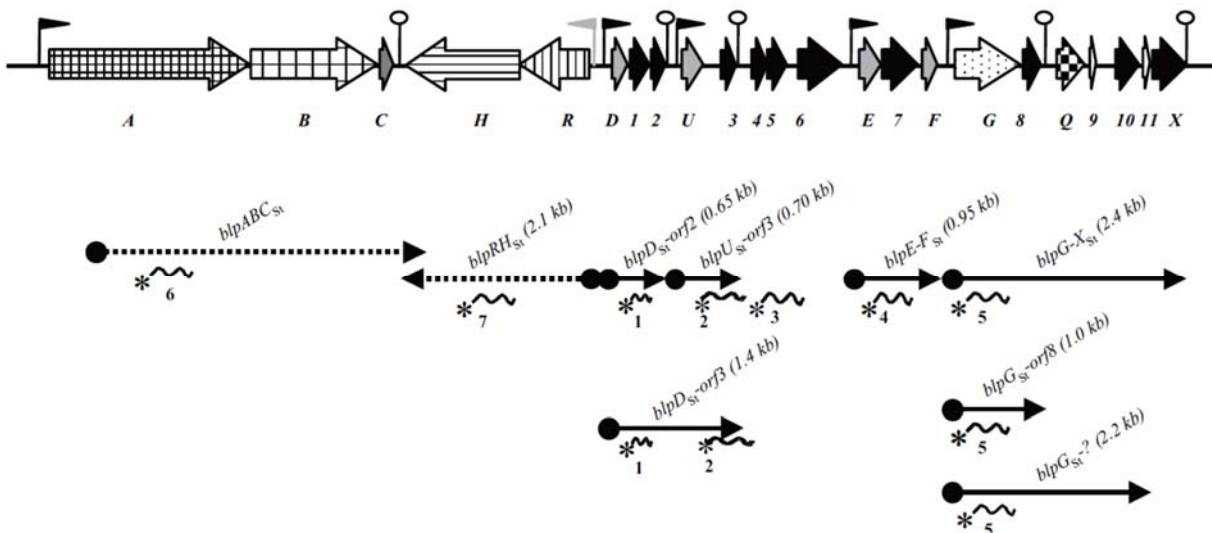


Εικόνα 1.9 Γενετική οργάνωση της περιοχής *blp* στα *S. thermophilus* LMD9 (a), LMG 18311(b) CNRZ1066 (c). Τα γονίδια που κωδικοποιούν πεπτιδία με παρόμοιες προβλεπόμενες λειτουργίες εμφανίζονται με ίδιο χρώμα στα βέλη: μεταφορέας ABC (κόκκινο), βοηθητική πρωτεΐνη μεταφοράς (πορτοκαλί), παράγοντας επαγωγής (κίτρινο), ρυθμιστής απόκρισης (γκρι), κινάση ιστιδίνης (σκούρο γκρι), πεπτιδίο που μοιάζει με βακτηριοσίνη (πράσινο), υδρόφοβα πεπτιδία άγνωστης λειτουργίας (μαύρο), υδρόφιλα πεπτιδία άγνωστης λειτουργίας (λευκό) και αλληλουχία ένθεσης (μπλε). Όσα γονίδια κωδικοποιούν και πιθανό πεπτιδίο-οδηγό με τα 2 κατάλοιπα γλυκίνης στο άκρο του συμβολίζονται επιπλέον με dg ως δείκτη. Τα *blpB* και *blpK* που συμβολίζονται με # περιέχουν μη νοηματικές μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης. *blpG^F* συμβολίζει την ένωση των *blpG* και *orf8* συγκριτικά με το LMD9 (Hols et al., 2005).

1.10 Μεταγραφική οργάνωση γονιδίων *blp*_{St} στο στέλεχος *S. thermophilus* LMD9

Η περιοχή *blp* του *S. thermophilus* LMD9 μελετήθηκε εκτενέστερα λόγω της δυνατότητάς του στελέχους αυτού να παράγει βακτηριοσίνη με επαγωγή. Η μεταγραφική ανάλυση της περιοχής αυτής στην οποία εδράζονται συνολικά 23 αναγνωστικά πλαίσια πραγματοποιήθηκε με πειράματα υβριδισμού Northern και κατέδειξε την ύπαρξη 6 ανεξάρτητων οπερονίων με συγκεκριμένες λειτουργίες ως προς την παραγωγή βακτηριοσίνης (εικόνα 1.10).

Το πρώτο οπερόνιο περιέχει γονίδια σχετικά με το σύστημα έκκρισης και την επαγωγή της βακτηριοσίνης. Το δεύτερο οπερόνιο περιλαμβάνει γονίδια σχετικά με το σύστημα απόκρισης 2 στοιχείων. Στη συνέχεια τα επόμενα τρία οπερόνια αποτελούνται από γονίδια σχετικά με τη σύνθεση της βακτηριοσίνης και την ανθεκτικότητα του ξενιστή σε αυτήν. Τέλος το έκτο οπερόνιο περιέχει γονίδια με ασαφή λειτουργία. Σε πειράματα υβριδισμού Northern εμφανίστηκε χαμηλό σήμα στα mRNA των πρώτων 2 οπερονίων, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτά τα mRNA κατακερματίζονται (Fontaine et al., 2007).



Εικόνα 1.10 Η περιοχή *blp_{St}* στο στέλεχος *S. thermophilus* LMD9 και η οργάνωση της σε μεταγραφικό επίπεδο. (Α) Σχηματική απεικόνιση της περιοχής *blp_{St}* στο στέλεχος LMD9. Με μαύρη σημαία σημειώνονται οι θέσεις των υποκινητών με ευθείες επαναλήψεις όπως βρέθηκαν στην αλληλουχία, ενώ με γκρι σημαία αλληλουχίες φυτικών υποκινητών. Με το σύμβολο φουρκέτας εμφανίζονται οι αλληλουχίες με αντίστροφη επανάληψη που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε περιοχές τερματισμού της μεταγραφής. (Β) Απεικόνιση της μεταγραφικής οργάνωσης της περιοχής από τα αποτελέσματα υβριδισμού Northern. Τα μαύρα βέλη αντιπροσωπεύουν τα εμφανιζόμενα mRNA στον υβριδισμό με ονόματα και μεγέθη πάνω από τα βέλη. Τα διακεκομμένα βέλη αντιπροσωπεύουν mRNA που εμφανίζονται κατακερματισμένα. Οι ραδιενεργοί ιχνηλάτες (1 - 7) εμφανίζονται με ελικοειδείς γραμμές σημασμένες με αστερίσκο (Fontaine et al. 2007).

1.11 Αίσθηση απαρτίας στο στέλεχος *S. thermophilus* LMD9

Η αίσθηση απαρτίας είναι ο τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια παρακολουθούν την αύξηση του πληθυσμού τους και επάγουν αναλόγως την έκφραση γονιδίων, όταν ο πληθυσμός είναι πολύ μεγάλος. Υπάρχουν συγκεκριμένοι μηχανισμοί τους οποίους χρησιμοποιούν τα βακτήρια για την λειτουργία αυτή (Streips and Yasbin, 2002). Η αίσθηση απαρτίας και συγκεκριμένα ο μεγάλος αριθμός κυττάρων επάγουν διεργασίες όπως η βιο-φωταύγεια, η έκφραση γονιδίων παθογένειας, η δημιουργία βιο-φιλμ, η ρύθμιση οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού, και άλλα (Demuth and Lamont, 2006).

Έχει διαπιστωθεί ότι η ρύθμιση της παραγωγής αντιμικροβιακών παραγόντων εξαρτάται από την απαρτία των κυττάρων. Συνήθως η παραγωγή αυτών των πεπτιδίων ξεκινά στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και κορυφώνεται στην αρχή της στατικής φάσης. Το όφελος που παρατηρείται είναι η εξασφάλιση ταχείας αύξησης της συγκέντρωσης του πεπτιδίου σε επίπεδο ικανό να εξοντώσει ανταγωνιστές έτσι ώστε να προλαμβάνεται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από αυτούς και να προστατεύονται τα κύτταρα παραγωγοί από αναποτελεσματική παραγωγή σε μεγάλα επίπεδα.

Η παραγωγή ενός εκκρινόμενου πεπτιδίου ή πεπτιδίου φερομόνης, η οποία όταν φτάσει σε ικανοποιητικά επίπεδα εκκινεί την παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων, πραγματοποιείται στα θετικά κατά Gram βακτήρια με την βοήθεια ενός ρυθμιστικού συστήματος δυο στοιχείων (two-component system) (Kleerebezem and Quadri, 2001).

Στο *S. thermophilus* LMD9 το γονίδιο *blpC* παράγει την πρόδρομη φερομόνη του συστήματος αίσθησης απαρτίας, η οποία πρέπει να ωριμάσει και να εκκριθεί για να αναγνωριστεί στη συνέχεια από την κινάση ιστιδίνης. Το προϊόν του γονιδίου *blpC* αντιστοιχεί σε ένα πεπτίδιο 53 αμινοξέων. Τα πρώτα 23 αμινοξέα αποτελούν το πεπτίδιο οδηγό, το οποίο καταλήγει σε Gly-Gly, ενώ τα υπόλοιπα 30 αντιστοιχούν στην ώριμη φερομόνη. Στην επιφάνεια του στελέχους LMD9 εντοπίστηκαν 2 πεπτίδια, αυτό των 30 αμινοξέων καθώς και ένα 19 αμινοξέων που αντιστοιχεί στα πρώτα 19 αμινοξέα του BlpC μετά το πεπτίδιο οδηγό. Επομένως φαίνεται ότι η φερομόνη υφίσταται επεξεργασία τέτοια, ώστε να προκύπτουν τρία πεπτίδια 30, 19 και 11 αμινοξέων εκ των οποίων παρουσιάζουν δραστηριότητα μόνο τα πρώτα δύο από αυτά (Fontaine et al., 2007).

Η βακτηριοσίνη στο *S. thermophilus* LMD9 παράγεται μόνο μετά από επαγωγή της με την προσθήκη του δραστικού πεπτιδίου στην έναρξη της καλλιέργειας ή στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Η μέγιστη δραστηριότητα της βακτηριοσίνης εμφανίστηκε κατά την στατική φάση ανάπτυξης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η παραγωγή της βακτηριοσίνης είναι πιο αποδοτική σε μεγαλύτερη πυκνότητα κυττάρων (Fontaine et al., 2007).

Τα γονίδια της περιοχής *blp_{st}* μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες ως προς την απόκριση μεταγραφής τους σε ερέθισμα επαγωγής με την προσθήκη του ώριμου BlpC μήκους 30 αμινοξέων στην αρχή της καλλιέργειας. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα γονίδια παραγωγής βακτηριοσίνης και ανοσίας *blpD-orf2*, *blpU-orf3* και *blpE-blpF*, των οποίων τα μετάγραφα αυξήθηκαν ισχυρά, έως και 6 φορές στην αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης. Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν τα γονίδια που εδράζονται στο οπερόνιο με το *blpG*, καθώς και τα γονίδια του οπερονίου *blpABC*, των οποίων τα μετάγραφα αυξήθηκαν αλλά σε μικρότερο βαθμό (έως 2 φορές) κατά

τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και μειώθηκαν στην αρχή της στατικής φάσης. Τέλος στην τρίτη ομάδα ανήκουν τα γονίδια *blpRH* στα οποία δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του αριθμού των μεταγράφων στην εκθετική φάση ανάπτυξης αλλά μείωση στην στατική φάση ανάπτυξης (Fontaine et al., 2007).

Όλα τα παραπάνω στοιχεία καταδεικνύουν ότι η παραγωγή της βακτηριοσίνης στο στέλεχος LMD9 ρυθμίζεται σε μεταφραστικό επίπεδο από την συγκέντρωση της ώριμης φερομόνης και την φάση ανάπτυξης, τυπικά χαρακτηριστικά της ρύθμισης ενός συστήματος απαρτίας (Fontaine et al., 2007).

1.12 Λειτουργία των προϊόντων των γονιδίων *blp_{st}* στο στέλεχος LMD9

Μελέτες στο *S. thermophilus* LMD9 κατέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *blpA* και *blpB* φαίνεται να είναι υπεύθυνες για την εξαγωγή των πρωτεϊνών που διαθέτουν την χαρακτηριστική πεπτιδική ομάδα με Gly-Gly, ενώ το πεπτίδιο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *blpC* είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του συστήματος απαρτίας ως φερομόνη. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια η βοηθητικές πρωτεΐνες μεταφοράς φέρονται ως υπεύθυνες για την έκκριση των πεπτιδίων που διαθέτουν πεπτίδιο-οδηγό με δυο γλυκίνες, αλλά η αναγκαιότητά τους ποικίλλει στα συστήματα έκκρισης βακτηριοσινών. Στο LMD9 η απαλοιφή του γονιδίου *blpB* που φαίνεται να κωδικοποιεί την βοηθητική πρωτεΐνη μεταφοράς, δεν επιφέρει απώλεια της βακτηριογόνου δράσης του κυττάρου, όμως μειώνει κατά πολύ την δραστηριότητά της. Αντίθετα, η απαλοιφή του σε συνδυασμό με την υπερέκφραση του γονιδίου *blpC* οδηγεί στην πλήρη απώλεια της βακτηριογόνου δράσης (Fontaine et al., 2007).

Τα προϊόντα των γονιδίων *blpH* και *blpR* θεωρούνται υπεύθυνα για την απόκριση του σήματος της φερομόνης με δράση αναγνώρισης του ώριμου πεπτιδίου *blpC* και ενεργοποίησης της παραγωγής της βακτηριοσίνης αντίστοιχα. Η

απαλοιφή ενός εκ των δύο ή και των δυο αυτών γονιδίων οδηγεί στην απώλεια βακτηριογόνου δράσης αλλά και ανοσίας στη βακτηριοσίνη (Fontaine et al., 2007).

Η δραστικότητα της βακτηριοσίνης και η ανθεκτικότητα σε αυτήν φαίνεται να οφείλεται στα προϊόντα των γονιδίων της περιοχής *blpD – blpF*. Η απαλοιφή αυτών οδηγεί στην απώλεια της βακτηριογόνου δράσης και ανοσίας. Η παρουσία του πεπτιδίου οδηγού με την ομάδα Gly-Gly στα πεπτίδια BlpD, BlpU, BlpE και BlpF, καθώς και η απώλεια της αντιμικροβιακής δράσης με την απαλοιφή της περιοχής *blpAB*, υποδηλώνουν ότι τα παραπάνω πεπτίδια χρησιμοποιούν το σύστημα έκκρισης BlpAB_{st} (Fontaine et al., 2007).

Η μελέτη του εύρους των οργανισμών που επηρεάζει η βακτηριοσίνη του στελέχους LMD9, σε συνδυασμό με πειράματα απαλοιφής οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η δράση του γονιδίου *blpD* είναι αυτή στην οποία οφείλεται η δραστικότητα έναντι των περισσότερων στελεχών. Όταν εκφράζεται με τα οπερόνια που περιέχουν τα γονίδια *blpU*, *blpE* και *blpF* τότε αυξάνεται η δραστικότητα της βακτηριοσίνης καθώς και το εύρος των μικροοργανισμών έναντι των οποίων δρα. Τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως η thermophilin 9 είναι μια σύνθετη βακτηριοσίνη που αποτελείται από το BlpD σε συνδυασμό με το BlpU, BlpE και/ή το BlpF.

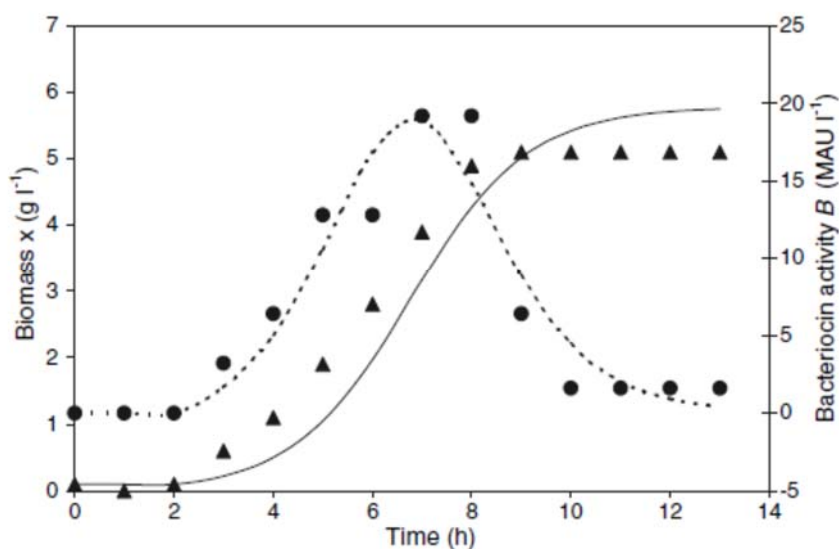
Τα γονίδια μετά το *blpF* δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην παραγωγή της βακτηριοσίνης ή στην ανοσία, καθώς η απαλοιφή τους δεν οδήγησε σε μεταβολή αυτών των φαινοτύπων. Το γονίδιο *blpG* φαίνεται να εμφανίζει μία δράση θειολ-δισουλφιδικής οξειδάσης, χωρίς όμως να έχει αποδειχτεί η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών με την σχετιζόμενη βακτηριοσίνη. Με απαλοιφή αυτού του οπερονίου δεν μεταβάλλεται η δραστικότητα της βακτηριοσίνης έναντι οργανισμών του ίδιου είδους, παρατηρήθηκε όμως απώλεια δραστικότητας σε μερικά στελέχη διαφορετικού είδους και σε μερικές περιπτώσεις πλήρης έλλειψη αυτής. Εκτενέστερες έρευνες υποδεικνύουν τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στα κατάλοιπα κυστεΐνης του BlpD από το BlpG (Fontaine and Hols, 2008).

1.13 *S. thermophilus* ACA-DC 0040 και παραγωγή βακτηριοσίνης

Το στέλεχος *S. thermophilus* ACA-DC 0040 είναι ένας οργανισμός της συλλογής μικροοργανισμών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών απομονωμένος από τυρί φέτα (Aktypis et al., 1998) καθώς και από παραδοσιακό ελληνικό γιαούρτι (Aktypis et al. 2007). Το στέλεχος αυτό παράγει την βακτηριοσίνη θερμοφιλίνη T.

Η σύνθεση της βακτηριοσίνης φαίνεται ότι σχετίζεται με τον ρυθμό ανάπτυξης του οργανισμού καθώς η καμπύλη εμφάνισης της δραστηριότητας της βακτηριοσίνης ακολουθεί και είναι παράλληλη με την καμπύλη ανάπτυξης του οργανισμού. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων εμφανίζεται η μέγιστη παραγωγή βακτηριοσίνης και στην στατική φάση ανάπτυξης η παραγωγή της σταματάει εμφανίζοντας μείωση της δραστηριότητάς της με την πάροδο του χρόνου (Aktypis et al., 2007).

Παραδόξως ο αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης και η αύξηση της κυτταρικής μάζας δεν εξασφαλίζουν απαραίτητα και την μέγιστη παραγωγή βακτηριοσίνης. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που οδηγούν σε αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης ενδέχεται να επηρεάζουν τα μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής της βακτηριοσίνης, με αποτέλεσμα, σε ανάπτυξη του οργανισμού υπό βέλτιστες συνθήκες για επίτευξη του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης και μέγιστης παραγωγής βιομάζας, να εμφανίζεται μικρότερη παραγωγή βακτηριοσίνης σε σύγκριση με συνθήκες πολύ κοντά στις βέλτιστες ή με την εμφάνιση παραγόντων stress (Aktypis et al., 2007).



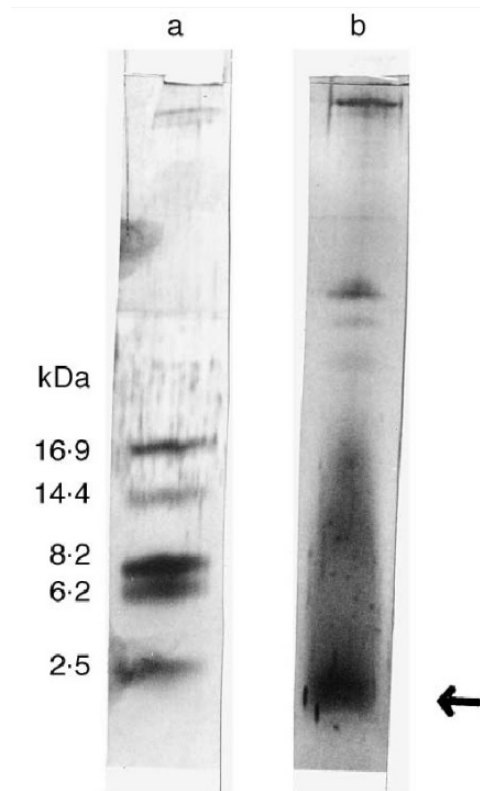
Εικόνα 1.11 Πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040 (▲) και παραγωγής θερμοφιλίνης T (●) σε καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα ασυνεχούς λειτουργίας (Aktypis et al., 2007).

1.14 Θερμοφιλίνη T

Η θερμοφιλίνη T είναι ένας αντιμικροβιακός παράγοντας που εμφανίζει δραστικότητα έναντι μεγάλου εύρους βακτηρίων γαλακτικού οξέος καθώς και μερικών βακτηρίων αλλοίωσης τροφίμων όπως τα *Clostridium sporogenes* C_{22/10} και *Cl. tyrobutyricum* NCDO-1754. Χαρακτηριστικά στελέχη βακτηρίων θετικών κατά Gram ευαίσθητων στην θερμοφιλίνη T είναι οι *Lactococcus lactis* ACA-DC 127, *Lactococcus cremoris* CNRZ 117, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 12842, *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 2318, *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 2322, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, *Streptococcus thermophilus* ST 20 και *Streptococcus thermophilus* ST112. Η δράση της φαίνεται να μη σχετίζεται με λύση κυττάρων ή καταστροφή της μεμβράνης, καθώς οι τιμές οπτικής πυκνότητας δειγμάτων μετά από πειράματα δράσης της ενάντια σε ευαίσθητους οργανισμούς δεν μεταβλήθηκαν (Aktypis et al. 1998).

Η δραστηριότητά της χάνεται μετά από επίδραση με πρωτεολυτικά ένζυμα και α-αμυλάση, ενώ παραμένει σταθερή μετά από επίδραση με λυσοζύμη ή λιπάσες. Το εύρος pH στο οποίο διατηρεί τις ιδιότητές της κυμαίνεται μεταξύ 1 και 9, ενώ εμφανίζει ανθεκτικότητα σε θερμοκρασία βρασμού με διατήρηση της δραστηριότητάς της μετά από 30 min και πλήρη απώλεια της δραστηριότητας μετά από 20 min σε θερμοκρασία 121 °C (Aktypis et al. 1998).

Η ακατέργαστη βακτηριοσίνη, (αφαίρεση των κυττάρων, εξισορρόπηση του pH και υπερδιήθηση) εντοπίζεται σε κλάσμα μεγέθους μεγαλύτερου των 300 kDa. Έπειτα από καθαρισμό της βακτηριοσίνης με χρωματογραφία στήλης ιονανταλλαγής DEAE και διήθηση από πήγμα το μοριακό βάρος της προσδιορίστηκε σε κλάσμα μορίων μεγαλύτερων από 150 kDa. Το κλάσμα με την μεγαλύτερη ενεργότητα ηλεκτροφορήθηκε σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου και στη συνέχεια το πήγμα χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των πρωτεϊνών έναντι ενός ευαίσθητου μικροοργανισμού στην θερμοφιλίνη T. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι οι πρωτεΐνες μεγέθους 2,4 kDa είχαν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η βακτηριοσίνη θερμοφιλίνη T εμφανίζεται σε μεγάλα σύμπλοκα στην ακατέργαστη μορφή της και συνεπώς κατατάσσεται στις βακτηριοσίνες 4^{ης} κλάσης σύμφωνα με τον διαχωρισμό κατά Klaenhammer (Aktypis et al., 1998; Aktypis et al., 2007).



Εικόνα 1.12 Ζώνη a) Πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου-τρισίνης με δείκτες μοριακών βαρών. Ζώνη b) θερμοφιλίνη T μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία. Το βέλος δείχνει τη θέση στην οποία εμφανίστηκε αναστολή ανάπτυξης του οργανισμού *Lactococcus cremoris* CNRZ 117 σε αντίγραφο πήγματος χωρίς χρώση (Aktypis et al. 1998).

Το μεγάλο εύρος της δράσης της σε διάφορες τιμές pH, η διατήρηση της ενεργότητάς της στο προαναφερόμενο θερμοκρασιακό εύρος καθώς και δυνατότητα διατήρησής και αποθήκευσής της, και η δραστικότητα της έναντι σε οργανισμούς αλλοίωσης τροφίμων καθιστούν τη θερμοφιλίνη T ένα καλό υποψήφιο για χρήση ως βιο-συντηρητικό σε τρόφιμα.

Σκοπός

2 Σκοπός

Η πιθανή χρήση των βακτηριοσινών σε ρόλο αντιμικροβιακού παράγοντα έναντι της προσθήκης συντηρητικών στα γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά και κατ' επέκταση και σε άλλα είδη τροφίμων, αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο. Για την επίτευξή του η συγκέντρωση πληροφοριών για την κατανόηση της εξέλιξης και της λειτουργίας τους καθώς και τον ρόλο τους στις μικροβιακές κοινότητες είναι απαραίτητη, προσφέροντας τη δυνατότητα για εκμετάλλευσή τους σε πληθώρα εφαρμογών.

Η βακτηριοσίνη θερμοφιλίνη T έχει μελετηθεί ως προς το αντιμικροβιακό της εύρος, τις ιδιότητες της ακατέργαστης μορφής της, τις βέλτιστες συνθήκες παραγωγής της και μεθόδους απομόνωσης και καθαρισμού της, όχι όμως ως προς τη γονιδιακή της προέλευση.

Η παρούσα εργασία έχει σκοπό την εύρεση του γονιδιακού τόπου υπεύθυνου για την παραγωγή της βακτηριοσίνης θερμοφιλίνης T από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040, την απομόνωση και τη μελέτη της αλληλουχίας του. Για το σκοπό αυτό θα επιχειρηθεί η κλωνοποίηση της περιοχής φερόμενης ως υπεύθυνη για την παραγωγή της και θα μελετηθεί σε επίπεδο αλληλουχίας DNA, μεταγραφής και μετάφρασης. Επίσης κρίνεται σκόπιμο να συγκεντρωθούν πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες παραγωγής βακτηριοσίνης και την βελτιστοποίηση αυτών σε εργαστηριακό περιβάλλον, βάσει των προηγούμενων μελετών, και τη συσχέτιση τους με την μεταγραφική πορεία της βακτηριοσίνης καθώς και την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών και φορέα ετερόλογης έκφρασης και υπερέκφρασης.

Η διερεύνηση αυτών των στοιχείων θα προσπαθήσει να δώσει πληροφορίες για τον μηχανισμό έκφρασης της βακτηριοσίνης και αν βασίζεται σε κάποιο σύστημα αίσθησης απαρτίας και για την πορεία της σύνθεσής της ξεκινώντας από τη γονιδιακή της προέλευση. Τέλος θα διερευνηθεί η δυνατότητα έκφρασης σε μεγάλες ποσότητες από τον ίδιο ή συγγενικούς οργανισμούς για πιθανή εκμετάλλευσή της.

Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 3.1 ενώ τα πλασμίδια στον πίνακα 3.2

Πίνακας 3.1 Βακτηριακά στελέχη

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά	Βιβλιογραφία
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	<i>F</i> ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> <i>Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K m_K⁺), λ-</i>	Hanahan, D., (1985)
BL21 (DE3)	<i>F</i> ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier FW and Moffatt BA. (1986)
XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K m_K⁺)</i>	Stratagene
<i>Streptococcus thermophilus</i>		
ACA-DC 0040	Φυσικός τύπος	Greek Coordinated Collections of Microorganisms-Agricultural College of Athens-Dairy Culture
LMG 18311	Φυσικός τύπος	BCCM/LMG Bacterial Database
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
CNRZ 117	Φυσικός τύπος	INRA-CNRZ collection

Πίνακας 3.2 Πλασμίδια

Πλασμίδιο	Ανθεκτικότητα	Περιγραφή	Μέγεθος (bp)	Αναφορές
pUC18	Ap ^R	Φορέας κλωνοποίησης	2686	
pUC19	Ap ^R	Φορέας κλωνοποίησης	2686	
pCR-Blunt	Km ^R	Φορέας κλωνοποίησης	3512	Invitrogen
pTOPOcatpT38 Ballester et al., 1986, Petrova et al., 2003.	Km ^R , Ap ^R , (<i>E. coli</i>), Cm ^R (<i>S. thermophilus</i>)		7978	Gloria del Solar (προσωπική επικοινωνία)
pET29c (+)	Km ^R	Φορέας υπερέκφρασης	5372	Novagen
pST0040	-	Φυσικό πλασμίδιο	2780	Παρούσα εργασία
pUCSTHXba	Ap ^R	pUC18::pST0040	5466	Παρούσα εργασία
pUCSTHXbacat	Ap ^R (<i>E. coli</i>), Cm ^R (<i>S. thermophilus</i>)	pUC18::pST0040, cat (fragment pTOPOcatpT38)	5949	Παρούσα εργασία

3.2 Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν

M17 Broth/agar

Σύσταση :

Τρυπτόνη	0.25%
Προϊόν πέψης κρέατος	0.25%
Παπαϊκή πέψη σογιάλευρου	0.5%
Εκχύλισμα ζύμης	0.25%
Εκχύλισμα κρέατος	0.5%
Λακτόζη	0.5%

Γλυκεροφωσφορικό νάτριο	1.9%
Θειικό μαγνήσιο	0.025%
Ασκορβικό οξύ	0.05%

Στερεό θρεπτικό μέσο με την προσθήκη

Άγαρ	2%
------------	----

pH του μέσου σε θερμοκρασία 25 °C: 7.1 ± 0.2.

Προσθήκη γλυκόζης έγινε όπου ήταν απαραίτητο σε ποσοστό μέχρι και 2% (συμβολίζεται ως GM17 με το ποσοστό της γλυκόζης).

Hogg Jago Broth/agar (HJ Broth/agar)

Τρυπτόνη	3%
Εκχύλισμα ζύμης	1%
KH ₂ PO ₄	0.5%
Εκχύλισμα βόειου κρέατος.....	0.2%

Στερεό θρεπτικό μέσο με την προσθήκη

Άγαρ	2%
------------	----

pH του μέσου σε θερμοκρασία 25 °C: 7.1 ± 0.2.

Προσθήκη γλυκόζης έγινε όπου ήταν απαραίτητο σε ποσοστό 0.5% (συμβολίζεται ως HJG).

Προσθήκη λακτόζης έγινε όπου ήταν απαραίτητο σε ποσοστό 0.5% (συμβολίζεται ως HJGL).

Προσθήκη D-σορβιτόλης έγινε όπου ήταν απαραίτητο (συμβολίζεται ως HJGLS)

Υλικά και μέθοδοι

Skim milk Broth

Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη..... 10%

Luria Bertani Broth/agar (LB Broth/agar)

Τρυπτόνη 1%

Χλωριούχο νάτριο..... 1%

Εκχύλισμα ζύμης 0.5%

Στερεό θρεπτικό μέσο με την προσθήκη

Άγαρ 2%

Ρύθμιση του pH σε θερμοκρασία 25°C: 7.0

3.3 Ανάπτυξη οργανισμών

Οι καλλιέργειες *Streptococcus thermophilus* και *Escherichia coli* επωάστηκαν υπό σταθερή θερμοκρασία 37 °C και ανάδευση 220 στροφών ανά λεπτό. Οι καλλιέργειες *Lactococcus lactis* επωάστηκαν σε συσκευή υπό σταθερή θερμοκρασία 30 °C χωρίς ανάδευση.

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των οργανισμών *Streptococcus thermophilus* ήταν τα M17 Broth, GM17 2% Broth, HJG Broth, HJGL Broth, HJGLS Broth και αποβουτυρωμένο γάλα. Για την ανάπτυξη κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε M17 agar, HJG agar και HJGL agar.

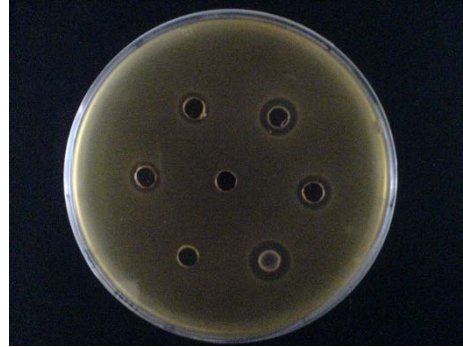
Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του οργανισμού *Lactococcus lactis* ήταν το M17 Broth και για την ανάπτυξη κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο M17 agar.

Το πλήρες θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του οργανισμού *E. coli* ήταν το Luria Bertani Broth, L.B. (Luria and Delbruk, 1943). Για την ανάπτυξη κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε Luria Bertani agar.

3.4 Πείραμα διάχυσης σε άγαρ (agar diffusion test).

Αρχή της μεθόδου

Το πείραμα διάχυσης σε άγαρ είναι ένα μέσο μέτρησης του αποτελέσματος ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που εκκρίνεται από ένα βακτήριο έναντι βακτηρίων ευαίσθητων σε αυτό, ανεπτυγμένων σε τρυβλία. Βασίζεται στην κίνηση των μορίων του αντιμικροβιακού παράγοντα μέσα στο πλέγμα που δημιουργείται από την πήξη του άγαρ. Η διάχυση του αντιμικροβιακού



Εικόνα 3.1 Agar Diffusion Test

παράγοντα παρεμποδίζει την ανάπτυξη ενός ευαίσθητου μικροβιακού στελέχους το οποίο επιστρώνεται ομοιόμορφα στην επιφάνεια ή και στο σώμα του πηκτώματος. Το αποτέλεσμα που παρατηρείται, όταν ο παράγοντας έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι του οργανισμού δείκτη, είναι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης. Όταν συμβαίνει υπό ελεγχόμενες συνθήκες, το μέγεθος των ζωνών αναστολής μπορεί να συσχετισθεί με την συγκέντρωση του μορίου. Συνήθως το αντιβιοτικό τοποθετείται σε ένα βοθρίο που δημιουργείται στο άγαρ αλλά μπορεί να τοποθετηθεί πάνω σε ειδικά πορώδη φίλτρα με συγκεκριμένο μέγεθος πόρων πάνω στο τρυβλίο, μέθοδος γνωστή και ως Kirby-Bauer disk-diffusion.

Πειραματικό μέρος

Θρεπτικό μέσο κατάλληλο για την ανάπτυξη του οργανισμού δείκτη με την προσθήκη άγαρ αποστειρώνεται και αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 40-50°C σε υδατόλουτρο. Τότε προστίθεται στο θρεπτικό μέσο ποσότητα κυττάρων του στελέχους δείκτη από πλήρως ανεπτυγμένη υγρή καλλιέργεια, σε αναλογία 1% ως προς την ποσότητα του θρεπτικού υλικού στο τρυβλίο και επιστρώνεται σε τρυβλία petri. Μετά τη πήξη του άγαρ κατασκευάζονται βοθρία με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur η οποία βυθίζεται στο θρεπτικό μέσο και όταν απομακρύνεται έχει

κατακρατήσει υλικό, αφήνοντας ένα κενό στη θέση του χωρητικότητας 50 ml. Στα βοηθία αυτά τοποθετείται ποσότητα του προς έρευνα αντιμικροβιακού παράγοντα και τα τρυβλίο επωάζεται στη θερμοκρασία βέλτιστης ανάπτυξης του οργανισμού δείκτη για 24 ώρες.

3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli*

3.5.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από *E. coli* με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα από καλλιέργειες 1-10 ml κυττάρων *E. coli* έγινε με τη χρήση του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel. Η μέθοδος βασίζεται στην αλκαλική λύση των κυττάρων παρουσία SDS ακολουθούμενη από εξουδετέρωση του διαλύματος και ειδική δέσμευσή του πλασμιδιακού DNA σε ειδικές στήλες πυριτίου. Οι πρωτεΐνες το γονιδιωματικό DNA, τα κυτταρικά θραύσματα, άλατα, μεταβολίτες και μακρομοριακά συστατικά των κυττάρων καθαρίζονται με πλύσεις με ειδικά διαλύματα και βήματα με φυγοκεντρήσεις. Το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα υπό συνθήκες που προσδίδουν χαμηλή ιοντική ισχύ.

3.5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας από *E. coli* με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoBond PC 100 (Macherey – Nagel, Cat. No. 740 573)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα από καλλιέργειες 10-50 ml κυττάρων *E. coli* έγινε με τη χρήση του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoBond PC100 της εταιρείας Macherey-Nagel. Η μέθοδος στηρίζεται στην

αλκαλική λύση των κυττάρων παρουσία SDS, ακολουθούμενη από εξουδετέρωση του διαλύματος. Μετά από εξισορρόπηση των ειδικών στηλών ιονανταλλαγής με μεμβράνη πυριτίου το πλασμιδιακό DNA δεσμεύεται σε αυτές και τέλος εκλούεται με το κατάλληλο διάλυμα μετά από πλύσεις των στηλών.

3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *S. thermophilus* σε μικρή κλίμακα (mini prep)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από στελέχη *S. thermophilus* εφαρμόστηκαν διαφορετικές μέθοδοι και τροποποιήσεις αυτών λόγω της ανθεκτικότητας του περιβλήματος των βακτηρίων, με συνέπεια τη χαμηλή απόδοση των μεθόδων. Σε κάθε περίπτωση, υγρή καλλιέργεια των στελεχών ποσότητας 5-10 ml φυγοκεντρήθηκε και το κυτταρικό ίζημα χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση.

3.6.1 Απομόνωση με πακέτο έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* (3.5.1), εντούτοις με κατάλληλες τροποποιήσεις που αναγράφονται στο εγχειρίδιο του πακέτου δύναται να εφαρμοστεί και για άλλους οργανισμούς. Η τροποποίηση που συνηθίζεται σε gram+ βακτήρια και εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή ήταν η επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος στο αντίστοιχο διάλυμα A1 με την προσθήκη λυσοζύμης σε ποσότητα από 20 mg/ml και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 45 min.

3.6.2 Απομόνωση με αλκαλική λύση (O'Sullivan et al., 1993 με τροποποιήσεις).

1. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 200 µl διαλύματος 25% σακχαρόζης – 30 mg/ml λυσοζύμης.
2. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 30 min.
3. Προστίθενται 400 µl διαλύματος SDS (3% SDS, 0.2N NaOH).
4. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 7 min.
5. Προστίθενται 300 µl παγωμένου διαλύματος 3M οξικού αμμωνίου.
6. Φυγοκεντρείται σε 11.000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C.
7. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι και προστίθενται 650 µl ισοπροπανόλης.
8. Φυγοκεντρείται σε 11000 x g για 5 min σε θερμοκρασία 4°C.
9. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 320 µl ds H₂O.
10. Προστίθενται 200 µl οξικού αμμωνίου 7.5 M.
11. Προστίθενται 350 µl φαινόλης/χλωροφόρμιου (1:1).
12. Φυγοκεντρείται σε 11.000 x g για 5 min.
13. Μεταφέρεται η υδατική φάση σε νέο σωληνάκι και προστίθενται 1 ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης.
14. Φυγοκεντρείται σε 11.000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C.
15. Ακολουθεί πλύση με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρωση σε 11.000 x g για 15 min.
16. Τέλος επαναδιαλυτοποιείται σε 50 µl ds H₂O ή ρυθμιστικού διαλύματος TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA).

Για την απομάκρυνση μορίων RNA προστέθηκε RNάση σε τελική συγκέντρωση 0.1 mg/ml στο πρώτο ή στο τελευταίο βήμα.

3.6.3 Απομόνωση με βρωμιούχο κετυλοτριμέθυλαμμώνιο (CTAB) (Sambrook et al., 2001)

1. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 200 µl διαλύματος STET (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 1mM EDTA (pH 8.0), 5% (v/v) Triton X-100, pH 8.0)
2. Προστίθενται 4µl λυσοζύμης (50 mg/ml).
3. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min .
4. Επωάζεται σε θερμοκρασία 100°C για 45 sec.
5. Φυγοκεντρείται σε 11.000 x g για 10 min.
6. Απομακρύνεται το ίζημα.
7. Προστίθενται 8 µl CTAB (5%).
8. Φυγοκεντρείται σε 11.000 x g για 5 min .
9. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προσθέτονται 300 µl NaCl 1.2 M.
10. Επαναδιαλυτοποιείται ισχυρά με vortex.
11. Προστίθενται 750 µl παγωμένης απόλυτης αιθανόλης.
12. Φυγοκεντρείται σε 11.000 g για 10 min.
13. Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
14. Ακολουθεί έκπλυση με 70% αιθανόλη 2 φορές και ξήρανση.
15. Προστίθενται 20 µl ρυθμιστικού διαλύματος TE και επαναδιαλυτοποιείται.
16. Προσθέτεται 1 µl RNάση A 1 mg/ml.
17. Επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 30 min.

3.6.4 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250) μετά από επεξεργασία των κυττάρων σύμφωνα με τους Somkuti et al. (1986).

1. Επαναιωρείται το κυτταρικό ίζημα σε 1 ml Tris 10 mM.
2. Φυγοκεντρείται σε 12000 x g για 2 min.

3. Επαναιωρείται σε 500 µl 20 mM Tris - 30 mg/ml λυσοζύμη - 24% PEG.
4. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 1h.
5. Φυγοκεντρείται σε 12000 x g για 5 min.

Στη συνέχεια η απομόνωση πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του πακέτου με τη διαφορά ότι τα διαλύματα A1, A2 και A3 προστίθενται στη διπλάσια από τη καθορισμένη ποσότητα.

3.6.5 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250) με τροποποιήσεις.

1. Επαναιωρείται το κυτταρικό ίζημα σε 1 ml ds H₂O.
2. Φυγοκεντρείται σε 12000 g για 1 min.
3. Επαναιωρείται το κυτταρικό ίζημα σε 500 µl διαλύματος A1 του NucleoSpin Plasmid με 25% σακχαρόζη - 20 mg/ml λυσοζύμη – 40 U/ml μουτανολυσίνη.
4. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 30 min.

Στη συνέχεια η απομόνωση πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του πακέτου με τη διαφορά ότι τα διαλύματα A2 και A3 προστίθενται στη διπλάσια από τη καθορισμένη ποσότητα.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν οι εξής τροποποιήσεις με χαμηλότερη απόδοση από τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω:

- Το βήμα 1 παραλείφθηκε.
- Στο βήμα 3 η ποσότητα του διαλύματος που προστέθηκε ήταν 250 µl.
- Μετά την επώαση του βήματος 4 προστέθηκαν 250 µl διαλύματος A.
- Η προσθήκη του ενζύμου μουτανολυσίνη παραλήφθηκε.
- Η επώαση του βήματος 3 δοκιμάσθηκε σε χρόνους 15-60 min.

3.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *L. lactis* σε μικρή κλίμακα (mini prep).

3.7.1 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250).

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του πακέτου, αφού προηγουμένως το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε στο διάλυμα A1 στο οποίο προστέθηκε λυσοζύμη σε συγκέντρωση 20 mg/ml και επωάστηκε στους 37°C για 30-60 min.

3.7.2 Απομόνωση με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin plasmid (Macherey – Nagel, cat. No. 740 588.250) με τροποποιήσεις.

1. Καλλιέργεια 5-10 ml φυγοκεντρείται σε 11.000 x g για 1 min.
2. Επαναδιαλυτοποιείται το κυτταρικό ίζημα σε 1 ml ds H₂O.
3. Φυγοκεντρείται σε 12.000 x g για 1 min.
4. Φυγοκεντρείται το ίζημα σε 250 µl διαλύματος A1 του NucleoSpin Plasmid με 25% σακχαρόζη - 20 mg/ml λυσοζύμη.
5. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 30 min.
6. Συνέχεια σύμφωνα με το εγχειρίδιο του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin Plasmid με την προσθήκη του διαλύματος A2 από το βήμα 2 του βασικού πρωτοκόλλου.

3.7.3 Απομόνωση με αλκαλική λύση (Anderson et al., 1983).

1. Καλλιέργεια 5-10 ml φυγοκεντρείται σε 11.000 x g για 1 min.
2. Επαναδιαλυτοποιείται το κυτταρικό ίζημα σε 379 μl 6.7% sucrose - 50 mM Tris – 1 mM EDTA, pH 8.0.
3. Θερμαίνεται σε θερμοκρασία 37°C.
4. Προσθέτονται 96,5 μl λυσοζύμης (10 mg/ml σε 25 mM Tris, pH 8.0).
5. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 5 min.
6. Προσθέτονται 48,2 μl 0.25 M EDTA - 50 mM Tris, pH 8.0.
7. Προσθέτονται 27,6 μl διαλύματος SDS (20% [wt/vol] σε 50 mM Tris-20 mM EDTA, pH 8.0).
8. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 10 min.
9. Αναδεύεται ισχυρά με vortex για 30 sec.
10. Προσθέτονται 27,6 μl 3 N NaOH.
11. Αναδεύεται ήπια για 10 min.
12. Προσθέτονται 49,6 μl 2 M Tris-HCL pH 7.0.
13. Αναδεύεται ήπια για 3 min.
14. Προσθέτονται 71,7 μl 5 M NaCl.
15. Προσθέτονται 700 μl φαινόλης κορεσμένης με 3% NaCl και αναδεύεται.
16. Φυγοκεντρείται σε 11000 x g για 5 min.
17. Παραλαμβάνεται η υδατική φάση και προστίθενται σε αυτήν 700 μl χλωροφόρμιου – ισοαμλικής αλκοόλης (24/1) και αναδεύεται.
18. Παραλαμβάνεται η υδατική φάση και κατακρημνίζεται με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
19. Επωάζεται σε θερμοκρασία 0°C για τουλάχιστον 30 min.
20. Φυγοκεντρείται σε 11000 x g για 5 min.
21. Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη και διαλυτοποιείται το ίζημα σε 20 μl 10 mM Tris - 1 mM EDTA, pH 7.5.

3.8 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

3.8.1 Απομόνωση ολικού DNA από *S. thermophilus* ανεπτυγμένο σε θρεπτικό μέσο M17 (Flamm et al., 1984 με τροποποιήσεις).

1. Καλλιέργεια 10 ml φυγοκεντρείται σε 11.700 g για 10 min.
2. Εκπλένεται το ίζημα με 5 ml 0.1 X SSC.
3. Επαναιωρείται σε 1 ml of 0.01 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου με 20% σακχαρόζη (pH 7.0) και λυσοζύμη (2.5 mg/ml).
4. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 45 min.
5. Προστίθενται 9 ml διαλύματος λύσης.
6. Επωάζεται σε 37°C για 30 min.
7. Προστίθενται 500 µl φαινόλης : χλωροφόρμιου (1:1).
8. Φυγοκεντρείται σε 11000 x g για 1 min και απομονώνεται η υδατική φάση.
9. Καταβυθίζεται το DNA με την προσθήκη 1 ml αιθανόλης.
10. Φυγοκεντρείται σε 11000 x g για 10 min.
11. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100 µl ρυθμιστικό διάλυμα TE.

Διαλύματα:

1 X SSC: 0.15 M χλωριούχο νάτριο, 0.015 M κιτρικό νάτριο.

Διάλυμα λύσης: 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1mM EDTA, 1% SDS, 500 µg/ml πρωτεΐνάση K.

Ρυθμιστικό διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

3.8.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από καλλιέργειες *S. thermophilus* ή *L. lactis* όγκου 1-5 ml σε θρεπτικό μέσο M17 με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin Tissue (Macherey – Nagel, cat. No. 740952).

Η μέθοδος βασίζεται στην λύση των κυττάρων σε διάλυμα με proteinase K / SDS, στην ειδική δέσμευσή του γονιδιωματικού DNA σε κατάλληλη στήλη με ιοντικές δυνάμεις και έκλουση με κατάλληλο αντιδραστήριο.

Προηγουμένως πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε διάλυμα 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 pH 8 συμπληρωματικά με 50 mg/ml lysozyme σε θερμοκρασία 37°C για 45 min και στη συνέχεια η προσθήκη πρωτεϊνάσης K και επώαση σε θερμοκρασία 56°C μέχρι να παρατηρηθεί η λύση (στη συγκεκριμένη περίπτωση 90 - 120 min). Τα στάδια αυτά προτείνονται για βακτήρια που εμφανίζουν δυσκολία στη λύση, όπως τα Gram θετικά.

3.9 Απομόνωση RNA

3.9.1 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες *S. thermophilus* όγκου 1-5 ml σε θρεπτικό μέσο M17, GM17 και HJG με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin RNA II (Macherey – Nagel, cat. No. 740955) με τροποποιήσεις.

Η μέθοδος βασίζεται στην λύση των κυττάρων με μεγάλη συγκέντρωση χαστροπικών ιόντων για την προστασία του RNA από ενδογενείς ριβονουκλεάσες, στην ειδική δέσμευσή του RNA σε κατάλληλη στήλη με ιοντικές δυνάμεις, και έκλουση με κατάλληλο αντιδραστήριο. Επίσης πραγματοποιήθηκαν οι τροποποιήσεις που προτείνονται για τη λύση Gram θετικών βακτηρίων με επώαση

των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) με 20 mg/ml λυσοζύμης σε θερμοκρασία 37°C για 20 min.

3.9.2 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες *S. thermophilus* όγκου 1-5 ml σε αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk) με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin RNA II (Macherey – Nagel, cat. No. 740955) με τροποποιήσεις.

Η απομόνωση ολικού RNA από *S. thermophilus* ανεπτυγμένο σε αποβουτυρωμένο γάλα απαιτεί ορισμένες τροποποιήσεις καθώς η απομόνωση των κυττάρων από το θρεπτικό μέσο είναι αδύνατη. Η παραλαβή των κυττάρων μετά από φυγοκέντρηση παρεμποδίζεται λόγω της περιεκτικότητάς του μέσου σε πρωτεΐνες.

Στην καλλιέργεια προστέθηκαν 0,33 όγκοι 1M κιτρικό τρινάτριο και 0.13 όγκων διαλύματος saline (0,145 M χλωριούχο νάτριο, 0.016 β-γλυκεροφωσφορικό νάτριο, 0,1% Tween 80, pH 7.0). Ακολούθησε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 5.000 g για 7 min, επαναδιαλυτοποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) με 20 mg/ml λυσοζύμη και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 20 min. Στη συνέχεια η μέθοδος εφαρμόστηκε σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης.

3.9.3 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες *S. thermophilus* όγκου 5 ml σε αποβουτυρωμένο γάλα με βρασμό με Triton X-100 σύμφωνα με τους Sung et al., 2003 και Guimont et al., 2002.

1. Προσθέτονται 0,33 όγκοι 1 M κιτρικό τρινάτριο και 0,13 όγκοι διαλύματος saline (0,145 χλωριούχο νάτριο, 0.016 β-γλυκεροφωσφορικό νάτριο, 0,1% Tween 80, pH 7.0).
2. Φυγοκεντρείται η καλλιέργεια σε 12.000 x g για 1 min.
3. Επαναιωρείται το κυτταρικό ίζημα σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA).
4. Φυγοκεντρείται σε 12.000 x g για 1 min.
5. Επαναιωρείται σε 1 ml TE buffer με 0.2% Triton X-100.
6. Επωάζεται σε θερμοκρασία 100°C για 10 min.
7. Επωάζεται σε παγόλουτρο για λίγα λεπτά και διαχωρίζεται σε 2 σωληνάρια.
8. Προσθέτεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου (500 µl σε κάθε σωληνάριο).
9. Ανακινείται 10-15 φορές.
10. Φυγοκεντρείται σε 12.000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
11. Παραλαμβάνεται η υδατική φάση σε νέο σωληνάριο.
12. Προσθέτεται 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5.2 (50 µl).
13. Προσθέτονται 2 όγκοι 100% παγωμένης αιθανόλης (1 ml).
14. Επωάζεται σε θερμοκρασία -80°C για 20 min.
15. Φυγοκεντρείται σε 12.000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
16. Εκπλένεται το ίζημα με 1 ml 70% αιθανόλης.
17. Φυγοκεντρείται σε 12.000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
18. Εκπλένεται το ίζημα με 1 ml 70% αιθανόλης.
19. Φυγοκεντρείται σε 12.000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
20. Εκπλένεται το ίζημα με 1 ml 100% αιθανόλης.
21. Φυγοκεντρείται σε 12.000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
22. Ξηραίνεται για 5 min.
23. Επαναδιαλυτοποιείται σε 100 µl H₂O επεξεργασμένου με DEPC.

3.9.4 Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από καλλιέργειες *S. thermophilus* όγκου 5 ml σε αποβουτυρωμένο γάλα με βρασμό με Hot Phenol σύμφωνα με τους Guimont et al., 2002 και την ηλεκτρονική διεύθυνση του UOHSC

1. Προσθέτονται 0,33 όγκοι 1 M κιτρικό τρινάτριο και 0,13 όγκοι διαλύματος saline (0,145 χλωριούχο νάτριο, 0.016 β-γλυκεροφωσφορικό νάτριο, 0,1% Tween 80, pH 7.0).
2. Προσθέτεται 1/10 του όγκου φαινόλη και 4/10 παγωμένη αιθανόλη (4,5 ml 100% παγωμένη αιθανόλη με 500 ml φαινόλη κορεσμένη σε H₂O).
3. Φυγοκεντρείται σε 8.000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
4. Απομακρύνεται το υπερκείμενο όσο το δυνατό σε μεγαλύτερη ποσότητα.
5. Επαναιωρείται σε 700 ml TE buffer pH 8.0 και μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια των 1.5 ml.
6. Προσθέτονται 7 ml διαλύματος 10% SDS.
7. Επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 1-2 min.
8. Προσθέτονται 77 ml 1 M οξικού νατρίου και 850 ml φαινόλης κορεσμένης σε H₂O προθερμασμένης σε θερμοκρασία 65°C.
9. Αναδεύεται 10 φορές.
10. Επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 6 min με ανάδευση κάθε 60 sec.
11. Φυγοκεντρείται 12.000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
12. Παραλαμβάνεται η υδατική φάση σε νέο σωληνάριο.
13. Προσθέτονται 850 ml χλωροφόρμιου και αναδεύονται.
14. Φυγοκεντρείται σε 12.000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
15. Η υδατική φάση παραλαμβάνεται και διαχωρίζεται σε 2 μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια των 1.5 ml.
16. Προσθέτονται σε κάθε σωληνάριο 800 ml 100% παγωμένης αιθανόλης και 35 ml 3 M οξικού νατρίου.
17. Επωάζονται σε θερμοκρασία -80°C για 2h με O/N.
18. Φυγοκεντρούνται σε 15.000 x g για 25 min σε θερμοκρασία 4°C.
19. Τα υπερκείμενα αποχύνονται προσεκτικά.

20. Τα ιζήματα εκπλένονται με 1 ml 80% παγωμένης αιθανόλης.
21. Φυγοκεντρούνται σε 15.000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C .
22. Τα υπερκείμενα αποχύνονται προσεκτικά.
23. Τα ιζήματα εκπλένονται με 1 ml 80% παγωμένης αιθανόλης.
24. Φυγοκεντρούνται σε 15.000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C .
25. Τα ιζήματα επαναδιαλυτοποιούνται σε 30 μl H₂O DEPC treated.

3.10 Ηλεκτροφόρηση

Αρχή της μεθόδου

Τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν και να αναλυθούν ως προς το μέγεθος, το ηλεκτρικό φορτίο και τη διαμόρφωση μέσω της ηλεκτροφόρησης. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε κατάλληλες συνθήκες στις οποίες μπορούν να διατηρηθούν ακόμα και οι βιολογικές τους ιδιότητες. Χρησιμοποιούνται ανθεκτικά υλικά και πηκτώματα που αποτελούνται από πολυμερή όπως η αγαρόζη και το πολυακρυλαμίδιο.

Η ταχύτητα της μετακίνησης και του διαχωρισμού μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συνάρτηση του μήκους, του φορτίου και της διαμόρφωσής τους καθώς τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Αντίστοιχα με τα απόλυτα μεγέθη των μορίων που θέλουμε να διαχωριστούν και τις διαφορές των μεγεθών μεταξύ τους χρησιμοποιούνται διαφορετικά υλικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Πηκτώματα αγαρόζης σε συγκέντρωση 1% χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων μεγέθους 100 μέχρι μερικών χιλιάδων ζευγών βάσεων όταν διαφέρουν κατά λίγες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων, ενώ πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου για διαφορές ακόμα και λίγων νουκλεοτιδίων και για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών (Watson et al., 2007).

3.10.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA και RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων. Πραγματοποιείται σε συσκευή οριζόντιας διάταξης και βασίζεται στην κίνηση των μορίων των νουκλεϊκών οξέων μέσα σε πήκτωμα του πολυμερούς αγαρόζη όταν ασκηθεί ηλεκτρική τάση λόγω του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών ομάδων τους (Sambrook et al., 1989; Watson et al., 2007).

Πειραματικό μέρος

Για την ηλεκτροφόρηση DNA χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ενώ για RNA 1,8% σε διάλυμα TAE.

1. Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης για τελική συγκέντρωση 1 % (w/v) για δείγματα DNA και 1.8% για δείγματα RNA σε κωνική φιάλη και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE για την εκάστοτε φόρμα υποδοχής του πηκτώματος
2. Θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Στο μεταξύ συναρμολογείται η φόρμα υποδοχής κατάλληλα ώστε να δημιουργηθεί ορθογώνιο πήκτωμα όταν κρυώσει, μαζί με ειδικά χτένια που θα δημιουργήσουν οπές στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα με τα νουκλεϊκά οξέα.
4. Όταν το διάλυμα κρυώσει σε θερμοκρασία 50°C, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου για τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml (w/v) σε πηκτώματα ηλεκτροφόρησης DNA και 1 µg/ml σε πηκτώματα ηλεκτροφόρησης RNA.
5. Στη συνέχεια αποχύνεται το διάλυμα αγαρόζης στη φόρμα, η οποία τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προστίθεται διάλυμα TAE μέχρι να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πηκτώματος.

6. Προστίθεται στα δείγματα DNA διάλυμα φόρτωσης (gel loading buffer, GLB) σε αναλογία 5:1. και τοποθετούνται στα φρεάτια.
7. Η συσκευή συνδέεται στη μονάδα τάσης όπου εφαρμόζονται 5 V/cm.
8. Όταν τα δείγματα διανύσουν την επιθυμητή απόσταση διακόπτεται η παροχή ρεύματος, αφαιρείται το πήκτωμα από τη συσκευή και τοποθετείται πάνω σε πλάκα με λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας όπου και φωτογραφίζεται το πήκτωμα με ειδική φωτογραφική μηχανή. Το ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Kodak 1D v. 3.6.0.

Διαλύματα:

TAE (Tris – acetate): Tris 40mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 με οξικό οξύ.

Βρωμιούχο αιθίδιο: 3 mg/ml (w/v)

Διάλυμα φόρτωσης GLB: 0.9% SDS, 0.05% κυανούν βρωμοφαινόλης, 50% γλυκερόλη.

3.10.2 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης με ρυθμιστικό διάλυμα MOPS – φορμαλδεΰδη για την χρήση τους σε πειράματα Northern.

Η ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με μερικές τροποποιήσεις όταν το πήκτωμα θα χρησιμοποιούνταν για μεταφορά τύπου Northern και υβριδισμό. Η συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα ήταν 1,8% και διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS με φορμαλδεΰδη ώστε να ηλεκτροφορηθεί υπό αποδιατακτικές συνθήκες για καλύτερο διαχωρισμό των μορίων (Ausubel et al., 2003).

1. Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης για τελική συγκέντρωση 1.8% και προστίθεται σε κωνική φιάλη μαζί με 84,6% (v/v) του τελικού όγκου του πηκτώματος που θέλουμε να δημιουργήσουμε H₂O κατεργασμένο με DEPC.

2. Θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Στο μεταξύ συναρμολογείται η φόρμα υποδοχής κατάλληλα ώστε να δημιουργηθεί ορθογώνιο πήκτωμα όταν κρυώσει, μαζί με ειδικά χτένια που θα δημιουργήσουν οπές στις οποίες θα τοποθετηθεί το RNA.
4. Αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία 60°C οπότε και προστίθεται 10% (v/v) του τελικού όγκου του πηκτώματος ρυθμιστικό διάλυμα MOPS και 5,4% (v/v) του τελικού όγκου φορμαλδεΐδη 37% σε απαγωγό.
5. Στη συνέχεια αποχύνεται το διάλυμα αγαρόζης στη φόρμα, η οποία τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε απαγωγό. Στη συσκευή προστίθεται διάλυμα 1X MOPS μέχρι να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πηκτώματος.
6. Προστίθεται στα δείγματα RNA διπλάσιος όγκος διαλύματος φόρτωσης (RNA loading buffer), τα οποία στη συνέχεια επωάζονται σε θερμοκρασία 65°C για 10 min, κατόπιν σε πάγο για 2 min και τέλος τοποθετούνται στα φρεάτια.
7. Η συσκευή συνδέεται στη μονάδα τάσης όπου εφαρμόζονται 5 V/cm.
8. Όταν τα δείγματα διανύσουν την επιθυμητή απόσταση διακόπτεται η παροχή ρεύματος, αφαιρείται το πήκτωμα από τη συσκευή και τοποθετείται σε δοχείο που έχει υποστεί κατεργασία για να απομακρυνθούν οι ριβονουκλεάσες μαζί με 300 ml H₂O κατεργασμένο με DEPC και 15 μl βρωμιούχο αιθίδιο 1%. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min υπό ήπια ανάδευση και τοποθετείται πάνω σε πλάκα με λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας όπου και φωτογραφίζεται με ειδική φωτογραφική μηχανή.

Διαλύματα:

10X MOPS: 0.4 M MOPS, pH 7.0, 0.1 M οξικό νάτριο, 0.01 M EDTA σε H₂O, κατεργασία με DEPC

RNA loading buffer (200 μl): 50% φορمامίδιο, 9.5% γλυκερόλη, 16.6% φορμαλδεΐδη, 10% 10X MOPS, 2,5% κυανούν βρωμοφαινόλης, 0,5% αναστολέας RNασών.

3.10.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα δωδέκυλο θειικού νατρίου – πολυακρυλαμίδιου.

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι μία διαδικασία που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενός μίγματος πρωτεϊνών, για τη διερεύνηση της σύστασης των πρωτεϊνών ως προς τις υπομονάδες τους, την επιβεβαίωση της ομογένειας πρωτεϊνικών δειγμάτων και τον καθαρισμό πρωτεϊνών για μετέπειτα χρήση.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε μία λεπτή κατακόρυφη πηκτή SDS πολυακρυλαμίδιου με κατεύθυνση ροής προς τα κάτω. Κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει τη μάζας τους καθώς το μείγμα πρωτεϊνών έχει πρώτα διαλυθεί σε διάλυμα ανιοντικού απορρυπαντικού δωδέκυλο θειικού νατρίου (SDS) το οποίο καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών, με την προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Με την δέσμευση του SDS στα αμινοξέα οι πρωτεΐνες αποκτούν ένα μεγάλο φορτίο ανάλογο περίπου της μάζας τους, και βάσει αυτού κινούνται υπό ηλεκτρικό πεδίο μέσα στο πήκτωμα, με την μετακίνηση να είναι ευθέως ανάλογη του λογάριθμου της μάζας τους. Οι πρωτεΐνες στο τέλος χρωματίζονται με κυανούν της Coomassie.

Πειραματικό μέρος

Προετοιμασία Δειγμάτων

Τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση διαλύθηκαν σε διάλυμα SAB και θερμάνθηκαν στους 100°C για 10 min την πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκαν και για 5 min σε κάθε επόμενη ηλεκτροφόρηση. Ως μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο Precision Plus Protein Standards All Blue της Bio-Rad σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας.

Προετοιμασία πηκτώματος SDS-PAGE**Πίνακας 3.3** Σύσταση πηκτώματος SDS-PAGE

	Πήκτωμα διαχωρισμού	Πήκτωμα επιστοίβασης
Ακρυλαμίδιο- δισακρυλαμίδιο 29:1	15 %	5%
Τρις-(υδροξυμέθυλο)- αμινομεθάνιο (Tris)	0.375 M pH 8.8	0.13 M pH 6.8
Δωδέκυλο θειικό νάτριο (SDS)	0.1 %	0.1 %
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0.05 %	0,04 %
Τετραμέθυλο αιθυλενοδιαμίνη (TEMED)	2 μl/ml	1 μl/ml

Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα SDS-PAGE 15% (Laemni U.K., 1970) τα οποία κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα Bio-rad mini PROTEAN tetra cell σύμφωνα με τον πίνακα. Κατά την παρασκευή των πηκτωμάτων τα APS και TEMED προστέθηκαν τελευταία ενώ το APS πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένο.

Χρώση των πηκτωμάτων

Τα πηκτώματα μετά την ηλεκτροφόρηση εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χρώσης για 1 h και ξεπλύθηκαν με διάλυμα αποχρωματισμού 2 φορές, την πρώτη για 10 min και την επόμενη αμέσως μετά κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Διαλύματα:

Διάλυμα χρώσης: 0.1% Coomassie brilliant-blue, 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού: 10% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ

3.11 Υπερέκφραση πρωτεϊνών

Για την υπερέκφραση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υπερέκφρασης *E. coli* BL21::DE3-pET29c(+). Το σύστημα αυτό προσφέρει την δυνατότητα υπερέκφρασης γονιδίων σε κύτταρα *E. coli* με την σύντηξη μιας ουράς 6 ιστιδινών στο τέλος της πρωτεΐνης. Το στέλεχος BL21 προσφέρει ανοσία στα κύτταρα έναντι του βακτηριοφάγου 21 με την προσθήκη του λυσιγόνου του βακτηριοφάγου λ, DE3. Το κρυπτικό λυσιγόνο DE3 φέρει ένα αντίγραφο του γονιδίου T7 (T7 RNA πολυμεράση) υπό τον έλεγχο του υποκινητή lacUV5. Τα προς υπερέκφραση γονίδια κλωνοποιούνται στο πλασμίδιο pET29c υπό τον ισχυρό έλεγχο των σημάτων μεταγραφής και μετάφρασης του βακτηριοφάγου T7 ενώ η έκφραση τους επάγεται με τη έναρξη παραγωγής της RNA πολυμεράσης του βακτηριοφάγου T7 στο κύτταρο με την προσθήκη IPTG, καθώς εμποδίζει την δέσμευση του αναστολέα LacI στον υποκινητή lacUV5.

Η προς υπερέκφραση αλληλουχία ενισχύθηκε με συγκεκριμένους εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν ώστε να φέρουν την αλληλουχία στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης αντίστοιχα με τον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) και παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4. Η ενισχυμένη αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt σε κύτταρα *E. coli* DH5a. Από υγρές καλλιέργειες κυττάρων *E. coli* DH5a με την κλωνοποιημένη αλληλουχία απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA και μετά από περιοριστικές πέψεις απομονώθηκε η τροποποιημένη από τους εκκινητές προς υπερέκφραση αλληλουχία και δεσμοποιήθηκε με πλασμιδιακό φορέα pET29c αφού πρώτα είχε υποστεί περιοριστικές πέψεις κατάλληλες ώστε να δεσμοποιηθούν. Οι πλασμιδιακοί φορείς pET29c με την τροποποιημένη προς υπερέκφραση αλληλουχία κλωνοποιήθηκαν σε κύτταρα *E. coli* BL21.

Υγρές καλλιέργειες κυττάρων *E. coli* BL21 που έφεραν τα πλασμίδια pET29c με την προς υπερέκφραση αλληλουχία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο L.B. παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη. Οι καλλιέργειες αυτές ανακαλλιεργήθηκαν με αναλογία 1/20 σε τελικό όγκο 30 ml, μέχρι η οπτική τους πυκνότητα στα 600 nm

να φτάσει την τιμή $O.D._{600}=0,6$. Στη συνέχεια προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM και συλλέχθηκαν δείγματα όγκου 1 ml από διαφορετικούς χρόνους ανάπτυξης στα οποία είχε μετρηθεί η οπτική πυκνότητα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 12,000 x G για 2 min όπου και διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από το ίζημα. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SAB με αναλογία 20 ml διαλύματος ανά $OD_{600}=0,1$ δείγματος. Το ίζημα και το υπερκείμενο φυλάχθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Διαλύματα:

SAB : 50 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0.1% κυανού της βρωμοφαινόλης, 10 % γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη (η β-μερκαπτοαιθανόλη προστίθεται ξεχωριστά στο τέλος λίγο πριν την επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος κυττάρων).

3.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**Αρχή της μεθόδου**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την αναπαραγωγή μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας με την χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση, συνθέτοντας αντίγραφα ενός συγκεκριμένου μονόκλωνου τμήματος DNA με την προσθήκη ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που το οριοθετούν, μετά από αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA.

Για την δημιουργία των αλυσίδων κλώνων χρησιμοποιούνται επαναλαμβανόμενα στάδια θέρμανσης του δείγματος τα οποία περιλαμβάνουν την αποδιάταξη των αλυσίδων σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, την πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο εκμαγείο σε διαφορετική θερμοκρασία και την επιμήκυνση των αλυσίδων από το 3' άκρο των εκκινητών στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση της τεχνικής είναι το μήκος και η αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί ενώ για την βελτιστοποίηση της τεχνικής είναι απαραίτητη η

ρύθμιση παραμέτρων όπως η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών, οι συγκεντρώσεις αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε βήματος (Watson et al., 2007).

Πίνακας 3.4 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Όνομα	Αλληλουχία	T _m (°C)	Μέγεθος (nt)	Χρήση
4-6L	CGCAGCAGTGATGGTTCTAA	51.3	20	PCR/RTPCR
4-6R	AGGGCTAACGGTGCCTTCTTT	52.4	20	PCR/RTPCR
blp0AL	GGGAGAAAAGTCCCAGAGTCC	51.5	20	PCR
blp0AR	AAGGTGGGCATTAAGGAAGG	52.4	20	PCR
blp0XL	TCAATGGTCGTGTCCACCTA	50.9	20	PCR
blp0XR	CCTTACGGCCATTGTTTTGT	51.8	20	PCR
BLP1F	CTATATCGTAATACTCTAAACGAC	42.4	24	PCR
BLP1R	AACTCTATATGTGTAGTGACAAAG	42.4	24	PCR
BLP2L	CTTGCCAAGTACGTGTTTTGATAC	52.7	24	PCR
BLP2R	GTTTTCGTTTTTCGTAGGACTTTTTGT	52.9	24	PCR/q-RTPCR
BLP3L	CAAATGATATAGCCAAGACAGTGG	52.5	24	PCR/RTPCR
BLP3R	ACTGAATCTATCGGTAGGAAGTGC	52.7	24	PCR/RTPCR
BLPAL	CCTGCGTTAGGCTAGATTGC	52.0	20	PCR/RTPCR
BLPBL	TAATCCATCCACCCACTTCC	51.1	20	PCR
BLPBR	TCCACAGTTGTTTTAAAAGCACA	50.3	22	PCR/RTPCR
BLPCL	TGGCCTTGCTAATGTCACAG	51.1	20	PCR/RTPCR
BLPCR	GCCCAAAATCTACGTTACGG	51.6	20	PCR/RTPCR
IPOK1L	CGCTAGCTCTGATAGAGACACTTG	52.3	24	PCR/q-RTPCR
orf3L	AAGGACGAAGCCCATAGACA	51.3	20	PCR/RTPCR
orf4L	GAGGCCCATTACGATGAGAA	51.6	20	PCR/RTPCR
overexp.blpKrev	TACCATAGATGAGCTCCACC	57.3	20	Υπερέκφραση
overexp.blpU-K	GGAGGTAGTTCATATGGCAAC	57.9	21	Υπερέκφραση
overexp.blpURev	CATAATCGAGCTCCACCAG	56.7	19	Υπερέκφραση
PCR1AL	CTACATTACCTCCAAACGCTCCT	53.5	23	PCR/q-RTPCR
PCR1AR	GGAGGTTTTGCTAAACAAGGAGTA	53.0	24	PCR/RTPCR
PCR1BL	GTCCAAAAGAAGTCCAAAATCTGT	52.6	24	PCR/RTPCR
PCR1BR	TTCAAATCATAGCACTCCGTCTTA	52.8	24	PCR/RTPCR
PCR3AL	GAACACTGGTAGGTAGGTCAGACA	51.7	24	PCR/RTPCR
PCR3AR	ACCGAAGAGAGTACGAAAGAGAAA	52.7	24	PCR/RTPCR
PCRAAL	TCAATAACCTGCTTTTCTGTCAAA	52.8	24	PCR/RTPCR
PCRAAR	GGCTTCGACGATATTACTTTTT	52.9	24	PCR/RTPCR
pcrABR	GTGAGTTGGCGAAGACCAAT	51.5	20	PCR/RTPCR
PCRHRAL	CTTTTGGCGTTACAGCCTATAAAT	53.3	24	PCR/RTPCR

PCRHRAR	TTTATGGTTTGTGAGTTTGAATGG	52.2	24	PCR/RTPCR
pcrHRBR	GCGATAGATGAAGGGATGGA	51.5	20	PCR
Realtime16SRevS.	CACTCTCCCTTCTGCACTC	61.4	20	qPCR
Realtime16SS.the	AGCGTTGTCCGGATTTATTG	55.3	20	qPCR
realtimeldhRevS.	ACAATAGCAGGTTGACCGATAA	56.5	22	qPCR
realtimeldhS.the	TAAAGCTATCCTTGACGATGAA	54.7	22	qPCR
realtimerporevS.	AGCTGAGGTTACTGCTGGAGAT	60.3	22	qPCR
realtimerpoS.the	ACTGTCATTGTTGCTTGGAATG	56.5	22	qPCR
U-3L	ACAAGGACGAAGCCCATAGA	51.3	20	PCR
U-3R	TAGCTGGGGAGGTTTTGCTA	51.8	20	PCR/qPCR

Πειραματικό μέρος

Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Phusion High-Fidelity της εταιρείας Finnzymes. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης του ενζύμου, ενώ οι εκκινήτες και η μέση θερμοκρασία αποδιάταξης τους (T_m) παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες αντιδράσεις PCR απουσία DNA για τον εντοπισμό τυχών επιμολύνσεων.

3.12.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)

Για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA από εκμαγείο RNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με την προσθήκη ενός βήματος μετατροπής του μονόκλωνου RNA σε μονόκλωνο DNA με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.

Η DNA πολυμεράση και η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μέρος του πακέτου με έτοιμα αντιδραστήρια RobusT I της εταιρείας Finnzymes. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης του πακέτου και οι εκκινήτες παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες αντιδράσεις RT-PCR χωρίς RNA και

αντιδράσεις χωρίς το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση για τον εντοπισμό τυχών μολύνσεων ή παρουσίας DNA στο δείγμα RNA.

3.12.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η real-time PCR είναι μία μέθοδος ενίσχυσης DNA από εκμαγείο DNA ή RNA κατά την οποία φθορίζουσες χρωστικές χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του παραγόμενου DNA κατά την αντίδραση PCR (Higuchi et al., 1992).

Η μέθοδος βασίζεται στην ποσοτική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας του διαθέσιμου υποστρώματος πριν την PCR και την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά τη διάρκεια της PCR. Η μεταβολή στις συγκεντρώσεις του παραγόμενου προϊόντος παρατηρούνται με την χρήση φθορίζοντων χρωστικών οι οποίες μπορούν να δεσμευτούν στη διπλή έλικα του DNA ή με σημασμένα φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια των οποίων η ένταση του σήματος φθορισμού διαφοροποιείται ανάλογα με την ενίσχυση του DNA. Το σήμα φθορισμού καταγράφεται με το πέρασμα κάθε κύκλου και η έντασή του συσχετίζεται με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος (Wong and Medrano, 2005; Kubista et al., 2006).

Πειραματικό μέρος

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν προσαρμοσμένη για την ενίσχυση τμημάτων μεγέθους 50-250 βάσεων από δείγματα ολικού βακτηριακού RNA σε 2 βήματα.

Αρχικά δημιουργήθηκε μονόκλωνο DNA από το ολικό δείγμα RNA (cDNA) με τυχαία εξανουκλεοτίδια με τη σειρά αντιδραστηρίων του πακέτου PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) της εταιρείας Takara σύμφωνα με της οδηγίες που

περιλαμβάνονταν. Στη συνέχεια τα cDNA που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την αντίδραση real-time PCR με τα αντιδραστήρια του πακέτου Kara Sybr Fast qPCR Kit της εταιρείας KaraBiosystems σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειρίδιου. Το μηχάνημα της real-time PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το CFX96 Touch της εταιρείας BioRad. Οι εκκινήσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4 με την ένδειξη “q PCR”. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό CFX manager της εταιρείας BioRad.

3.13 Απομόνωση ζωνών DNA και καθαρισμός από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης – καθαρισμός δειγμάτων DNA από ενζυματικές αντιδράσεις.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός ζωνών DNA από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και ο καθαρισμός δειγμάτων από ενζυματικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκε με την χρήση πακέτου με έτοιμα αντιδραστήρια NucleoSpin Extract II (Macherey – Nagel, cat. No. 740 609.250)

Η απομόνωση του DNA από πήκτωμα αγαρόζης γίνεται μετά από κοπή της επιθυμητής ζώνης και υπολογισμό της μάζας του τμήματος του πηκτώματος. Μετά από θέρμανση για διάλυση της αγαρόζης παρουσία χαστροπικών αλάτων το DNA δεσμεύεται σε στήλες οξειδίου του πυριτίου, καθαρίζεται με ειδικό διάλυμα και εκλούεται σε ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα με χαμηλή αλατότητα.

Ο καθαρισμός από ενζυματικές αντιδράσεις πραγματοποιείται με την ίδια διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του πακέτου.

3.14 Πέψεις DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλίνδρομες αλληλουχίες DNA, συνήθως μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων, και να κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Τα τμήματα που προκύπτουν έχουν πάντα τα ίδια άκρα και μπορεί να μονόκλωνα συμπληρωματικά («κολλώδη» άκρα, sticky ends) ή δίκλωνα (blunt ends). Κάθε περιοριστικό ένζυμο διαθέτει ένα σύνολο βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης in vitro που εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH, και τη σύσταση του διαλύματος στο οποίο διεξάγεται η αντίδραση.

Οι πέψεις έγιναν με ένζυμα και ρυθμιστικά διαλύματα της εταιρείας Takara. Σε κάθε πέψη χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη ποσότητα ενζύμου ανάλογα με την ποσότητα του προς πέψη DNA. Το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα προστέθηκε σε συγκέντρωση 1 x ή σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας σε περιπτώσεις πέψεων με 2 ένζυμα ταυτόχρονα και επωάστηκαν για τον απαιτούμενο χρόνο σύμφωνα με τις οδηγίες των ενζύμων στην βέλτιστη θερμοκρασία για το κάθε ένζυμο.

3.15 Κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA.

Για την επίτευξη κλωνοποίησης DNA σε κατάλληλο φορέα πρέπει αρχικά η αλληλουχία DNA που θα εντεθεί σε αυτόν να έχει τα κατάλληλα άκρα, ώστε να δεσμοποιηθεί στον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης. Αυτό επιτυγχάνεται με πέψη του τμήματος DNA και του πλασμιδιακού φορέα με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή με την δημιουργία τους μέσω των εκκινητών μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Επόμενο βήμα είναι η δεσμοποίηση του φορέα με το τμήμα DNA με τη χρήση του ενζύμου DNA λιγάση. Κατόπιν το μείγμα της δεσμοποίησης χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων. Οι αποικίες που προκύπτουν αναλύονται και επιλέγονται

αυτές που έχουν δεχθεί το φορέα με την ένθεση για περαιτέρω ανάλυση. Αυτές καλλιεργούνται και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -80°C με προσθήκη γλυκερίνης σε τελική συγκέντρωση 30%.

3.16 Αντίδραση δεσμοποίησης, ligation

Οι αντιδράσεις δεσμοποίησης DNA πραγματοποιούνται παρουσία των ενζύμων DNA λιγάσες (DNA ligases) τα οποία ενώνουν 2 τμήματα DNA στα άκρα τους. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη DNA λιγάση παράγεται από τον βακτηριοφάγο T4 και έχει την ιδιότητα να καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ του 3'-υδροξυ άκρου με ένα 5'-φωσφορικό άκρο ενός τμήματος DNA.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις κλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς η T4 DNA λιγάση της εταιρείας Takara και η T4 DNA λιγάση του πακέτου με έτοιμα αντιδραστήρια Zero-Blunt PCR Cloning kit της εταιρείας Invitrogen.

Ο υπολογισμός της αναλογίας των πλασμιδιακών φορέων και των ενθέσεων είναι σημαντικός ως προς την απόδοση της αντίδρασης. Προτιμήθηκε αναλογία ένθεσης-φορέα 10:1 με 100:1 σε επίπεδο μορίων σε περιπτώσεις δεσμοποίησης απότομων άκρων και 1:1 με 3:1 σε κολλώδη άκρα.

3.16.1 Αντίδραση δεσμοποίησης, ligation με την χρήση του ενζύμου T4 DNA Ligase της εταιρείας Takara (cat.No. 2040.A)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την επίτευξη της αντίδρασης δεσμοποίησης περιλάμβαναν:

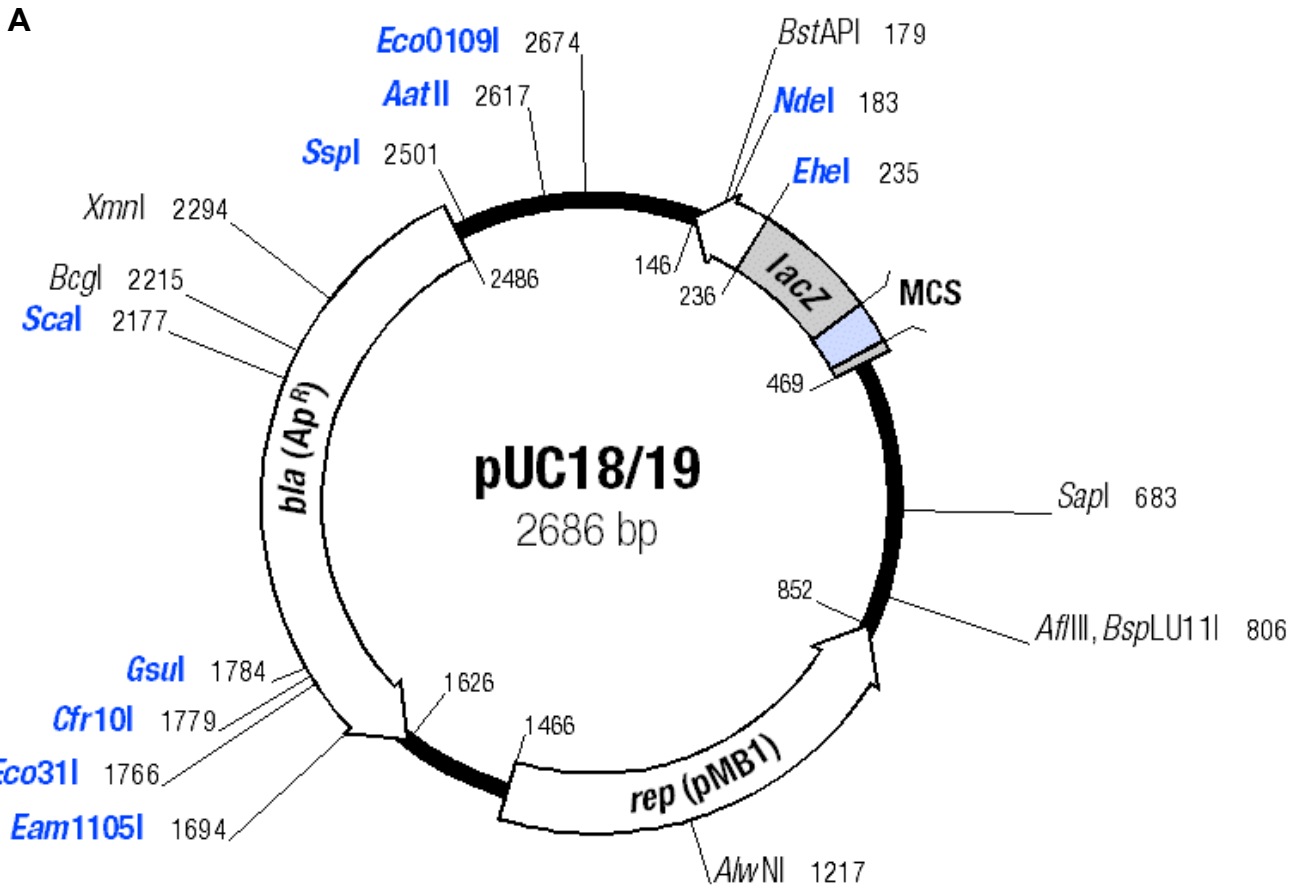
- την προσθήκη του γραμμοποιημένου πλασμιδιακού φορέα

Υλικά και μέθοδοι

- την προσθήκη της ένθεσης DNA προς κλωνοποίηση
- την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 x
- την προσθήκη 1 μl του ενζύμου (350 units)
- και τέλος την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας απεσταγμένου αποστειρωμένου H₂O όπου χρειαζόταν για την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης στο επιθυμητό.

Η προετοιμασία των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε σε παγόλουτρο και με την ολοκλήρωση των βημάτων, τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία 16°C για 12-16 h.

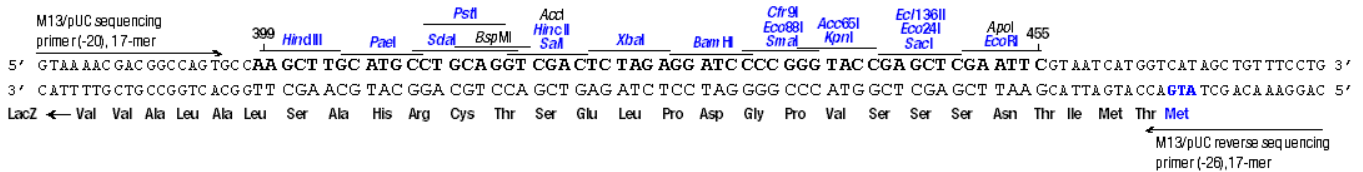
Οι πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pUC18 και pUC19.



MCS (MultiCloning Site, Πολυσυνδέτης)

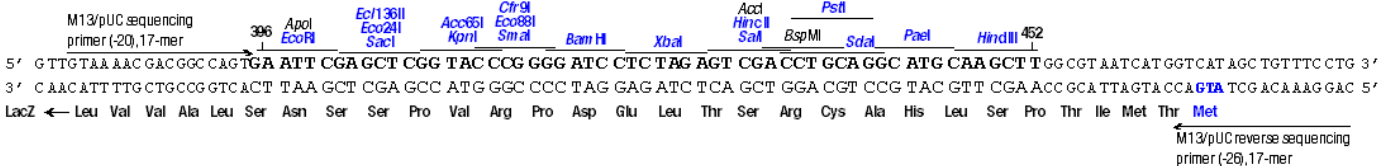
B

pUC18



Γ

pUC19



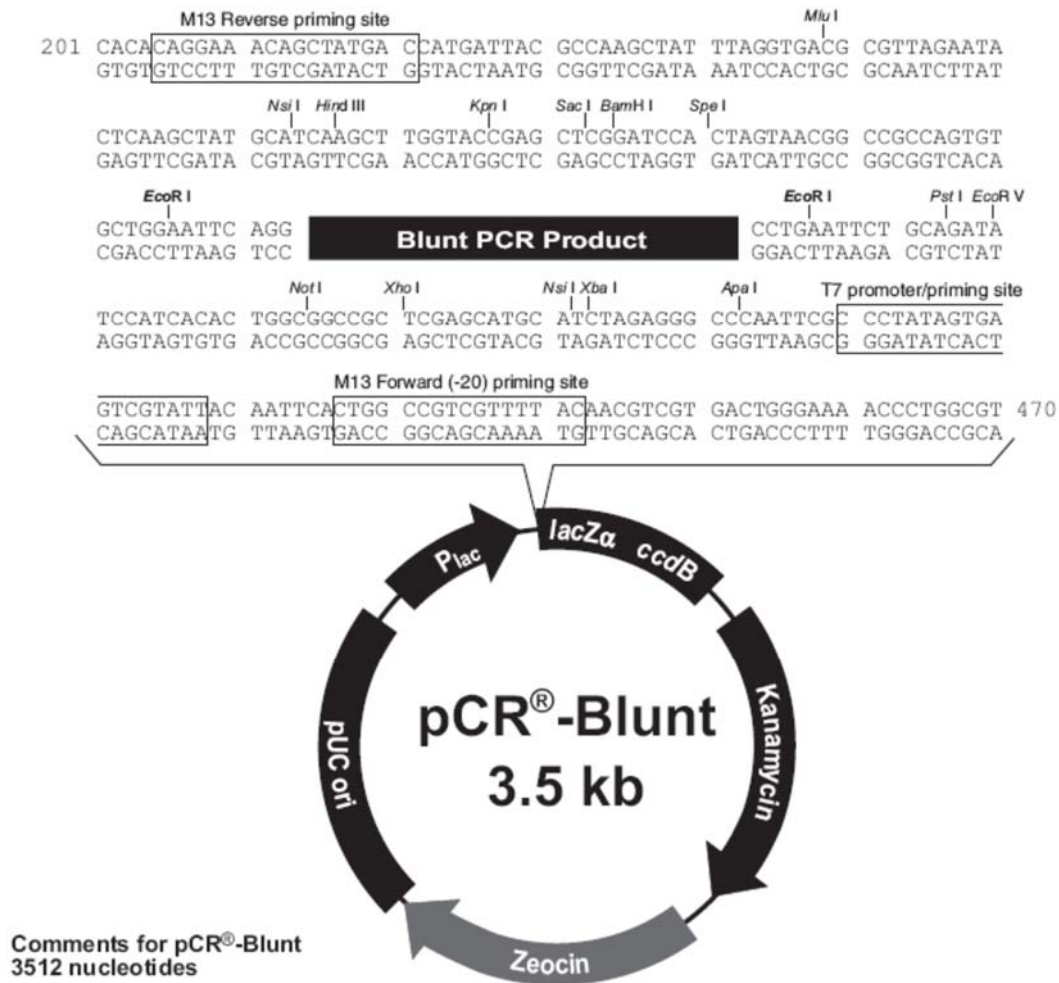
Εικόνα 3.2 Χάρτης πλασμιδιακών φορέων pUC18 και pUC19. **A)** Στην εικόνα παρουσιάζεται η κυκλική μορφή των πλασμιδίων pUC18 και pUC19 η οποία είναι κοινή στα δύο πλασμίδια, με εξαίρεση την περιοχή του πολυσυνδέτη (MCS) η οποία έχει αντίθετη φορά μεταξύ τους. Με βέλη εμφανίζονται τα γονίδια των πλασμιδίων και οι θέσεις περιορισμού προσδιορίζονται με γραμμές μαζί με τον αριθμό του ζεύγους βάσεων στο οποίο θα κοπεί το πλασμίδιο. **B** και **Γ)** Στις εικόνες εμφανίζονται οι αλληλουχίες των 2 αλυσίδων της θέσης πολυσυνδέτη των πλασμιδίων pUC18 και pUC19 αντίστοιχα. Εκατέρωθεν των 2 αλυσίδων με τις αλληλουχίες εμφανίζονται θέσεις εκκινήτων και περιορισμού καθώς και η αμινοξική αλληλουχία σε μεταγραφικό επίπεδο.

3.16.2 Αντίδραση δεσμοποίησης, ligation με την χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, cat. No. K2750-20)

Οι αντιδράσεις δεσμοποίησης πραγματοποιήθηκαν σε παγόλουτρο σύμφωνα με τις επισυναπτόμενες οδηγίες.

Συγκεκριμένα προστέθηκαν:

- η ένθεση DNA προς κλωνοποίηση
- ο ευθυγραμμισμένος πλασμιδιακός φορέας pCR-Blunt σε ποσότητα 25 ng
- T4 DNA λιγάση δραστηκότητας 4 U
- το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου σε ποσότητα κατάλληλη ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 1 x
- απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό όπου ήταν απαραίτητο για να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης στο επιθυμητό.



Εικόνα 3.3 Χάρτης του πλασμιδίου pCR-Blunt

3.17 Μετασχηματισμός

Αρχή της μεθόδου

Μετασχηματισμός ονομάζεται ένας από τους τρεις βασικούς μηχανισμούς οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού στα βακτήρια. Εμφανίζεται φυσικά σε κάποια είδη βακτηρίων ή μπορεί να εφαρμοστεί με τεχνικά μέσα όπου τα κύτταρα δέκτες δέχονται DNA μετά από φυσική, χημική ή ενζυματική επεξεργασία. Σε κάθε περίπτωση εξωγενές γενετικό υλικό εισέρχεται σε κύτταρα δέκτη και εγκαθίσταται σε αυτά εκφράζοντας τη γενετική πληροφορία του φορέα.

Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους περιλαμβάνει θερμικό σοκ στα κύτταρα δέκτες και επίδραση με ιόντα ασβεστίου που καταβυθίζουν το DNA στην επιφάνεια των κυττάρων ώστε να εισαχθεί σε αυτά. Μία άλλη πιο πρόσφατη τεχνική, η ηλεκτροδιάτρηση, χρησιμοποιείται επίσης συχνά για τεχνητό μετασχηματισμό. Σε αυτήν, ένα εναιώρημα επιδεκτικών κυττάρων αναμεμιγμένο με DNA προστίθεται σε μία ειδική κυψελίδα με μεταλλικές τις δύο απέναντι άκρες και εκτίθεται σε ηλεκτρικό πεδίο το οποίο δημιουργεί προσωρινά πόρους ή αντλίες στις κυτταρικές μεμβράνες επιτρέποντας στο DNA να εισέλθει στα κύτταρα πριν κλείσουν (Stewart., 2003).

Σε κάθε πείραμα μετασχηματισμού χρησιμοποιείται θετικός και αρνητικός μάρτυρας, όπου στο θετικό γίνεται μετασχηματισμός με τον φορέα που προσδίδει αντοχή στο εκάστοτε αντιβιοτικό επιλογής, ενώ στον αρνητικό πραγματοποιείται η διαδικασία του μετασχηματισμού χωρίς την προσθήκη DNA.

3.17.1 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα *E. coli*

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε στο Gene Pulser Xcell Electroporation System της εταιρείας Bio-Rad. Επιδεκτικά κύτταρα δημιουργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναγράφεται στον οδηγό του μηχανήματος (Ausubel et al., 1987; Miller and Nickoloff, 1995) ως εξής:

Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων

1. Εμβολιάζονται 500 ml θρεπτικού υλικού LB με 5 ml φρέσκιας πλήρως αναπτυγμένης καλλιέργειας *E. coli*.
2. Η καλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να βρίσκεται μεταξύ 0.5 – 0.7.
3. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε παγόλουτρο για 20 min. Όλες οι μετέπειτα διαδικασίες πραγματοποιούνται σε αυτό, ούτως ώστε τα κύτταρα να παραμένουν κατά το δυνατό κοντά σε θερμοκρασία 0°C.
4. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται σε 4000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C.
5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και το ίζημα επαναιωρείται σε 500 ml παγωμένου αποστειρωμένου διαλύματος 10 % γλυκερόλης.
6. Φυγοκεντρείται σε 4000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C.
7. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και το ίζημα επαναιωρείται σε 250 ml παγωμένου αποστειρωμένου διαλύματος 10 % γλυκερόλης.
8. Φυγοκεντρείται σε 4000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C.
9. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και το ίζημα επαναιωρείται σε 20 ml παγωμένου αποστειρωμένου διαλύματος 10 % γλυκερόλης.
10. Φυγοκεντρείται σε 4000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C.
11. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά, το ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml τελικού όγκου παγωμένου αποστειρωμένου διαλύματος 10 % γλυκερόλης, διαμοιράζεται σε ισομερή των 40 μl και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -80 °C.

Ηλεκτροδιάτρηση

1. Για κάθε μετασχηματισμό, ένα σωληνάριο με 40 μl επιδεκτικών κυττάρων, μία κυψελίδα των 0.2 cm και το DNA τοποθετούνται σε παγόλουτρο.
2. Σε ένα σωληνάριο προστίθενται το εναιώρημα επιδεκτικών κυττάρων μαζί με 1-2 μl από το DNA και επωάζονται σε παγόλουτρο για 1 min.
3. Το μείγμα κυττάρων - DNA μεταφέρεται στην κυψελίδα και τοποθετείται στο μηχανήμα ηλεκτροδιάτρησης.

4. Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση με ρυθμίσεις $C = 25 \mu\text{F}$; $PC = 200 \text{ ohm}$; $V = 2.5 \text{ kV}$
5. Αμέσως μετά τα κύτταρα αφαιρούνται από την κυψελίδα και προστίθενται σε ένα σωληνάριο το οποίο περιέχει 1 ml υγρού θρεπτικού υλικού SOC.
6. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 1 h, κατόπιν γίνονται σε αυτό 3 δεκαδικές αραιώσεις συνήθως και επιστρώνεται σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει το κατάλληλο μέσο επιλογής.

Διαλύματα:

SOC: 2 % τρυπτόνη, 0.5 % εκχύλισμα ζύμης, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM γλυκόζη pH 7.0

3.17.2 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα *S. thermophilus*

Εφαρμόστηκαν τα πρωτόκολλα Slos et al., 1991 και Buckley et al., 1999 για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων με διαφορετικούς συνδυασμούς ηλεκτρικών παλμών χωρίς επιτυχία, πιθανόν λόγω της καταγεγραμμένης εξειδίκευσης που παρουσιάζουν τα στελέχη του είδους σε πρωτόκολλα μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση (Buckley et al., 1999).

Μικρή απόδοση εμφάνισε το πρωτόκολλο των Blomqvist and Steinmoen, 2006 με κάποιες τροποποιήσεις, ως εξής:

Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων

1. Εμβολιάζεται θρεπτικό μέσο HJG με 5% φρέσκιας πλήρως ανεπτυγμένης καλλιέργειας *S. thermophilus* επίσης σε HJG.
2. Η καλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση μέχρι την τιμή της οπτικής πυκνότητας O.D. στα 660 nm να φθάσει 0.3.
3. Προστίθεται ίσος όγκος θρεπτικού μέσου HJG με 20% γλυκίνη και επωάζεται για 1 h επιπλέον σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση.

4. Η καλλιέργεια τοποθετείται σε παγόλουτρο για 10 min
5. Φυγοκεντρείται σε 5000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε ίσο όγκο κρύου διαλύματος μετασχηματισμού.
6. Φυγοκεντρείται σε 5000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται στο 1/2 του αρχικού όγκου κρύου διαλύματος μετασχηματισμού.
7. Φυγοκεντρείται σε 5000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 2% του αρχικού όγκου κρύου διαλύματος μετασχηματισμού.
8. Τέλος το κυτταρικό εναιώρημα διαμοιράζεται σε ισομερή των 80 μl μέσα σε παγόλουτρο τα οποία αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -80°C.

Διαλύματα:

Διάλυμα μετασχηματισμού: 5 mM φωσφορικό κάλιο pH 4.5, 0.4 M σορβιτόλη, 10% γλυκερόλη

Ηλεκτροδιάτρηση

1. Για κάθε μετασχηματισμό ένα σωληνάριο με 80 μl επιδεκτικών κυττάρων, μία κυψελίδα των 0.1 cm και το DNA τοποθετούνται σε παγόλουτρο.
2. Σε ένα σωληνάριο προστίθενται το εναιώρημα επιδεκτικών κυττάρων μαζί με 1-5 μl από το DNA και επωάζονται σε παγόλουτρο για 30 min.
3. Το μείγμα κυττάρων - DNA μεταφέρεται στην κυψελίδα και τοποθετείται στο μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης.
4. Εφαρμόζεται σταθερή ηλεκτρική τάση $V = 1.6 \text{ kV}$ για χρονικό διάστημα $t = 2.5 \text{ ms}$
5. Αμέσως μετά τα κύτταρα αφαιρούνται από την κυψελίδα και προστίθενται σε ένα σωληνάριο που περιέχει 1 ml υγρού κρύου θρεπτικού μέσου HJGLS.
6. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 3 h , κατόπιν γίνεται σε αυτό 1 δεκαδική αραίωση και επιστρώνεται σε στερεό θρεπτικό μέσο M17 άγαρ με την προσθήκη παραγόντων επιλογής.

3.17.3 Μετασχηματισμός με θερμικό σοκ σε κύτταρα *E. coli* DH5a

Μετασχηματισμός με τη μέθοδο Kushner, 1978 με κάποιες τροποποιήσεις.

1. Εμβολιάζεται θρεπτικό μέσο LB σε αναλογία 1:20 (v/v) από φρέσκια πλήρως ανεπτυγμένη καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* DH5a.
2. Η ανακαλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm OD₆₀₀ να φθάσει στα 0.45 (περίπου 2 ώρες).
3. Φυγοκεντρείται στις 8000 x g για 5 min.
4. Το υπερκείμενο αποχύνεται και προστίθεται 1ml διάλυμα I (πλύσης) για κάθε δείγμα μετασχηματισμού στο οποίο επαναιωρούνται τα κύτταρα και διαχωρίζονται για κάθε δείγμα σε ένα σωληνάριο των 1.5 ml.
5. Φυγοκεντρείται σε 8000 x g για 5 min.
6. Αποχύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται σε κάθε σωληνάριο 1 ml διαλύματος II (κατασκευής επιδεικτικών κυττάρων) στο οποίο επαναιωρούνται τα κύτταρα.
7. Τοποθετείται σε παγόλουτρο για 30 min.
8. Φυγοκεντρείται για 10 min σε 8000 x g.
9. Αποχύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 0,1 ml διαλύματος II (1:10 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας) στο οποίο επαναιωρείται το ίζημα με προσοχή.
10. Προστίθεται, αφού έχει τοποθετηθεί σε παγόλουτρο, το DNA σε κάθε δείγμα.
11. Επωάζεται σε παγόλουτρο για 30 min.
12. Πραγματοποιείται θερμικό σοκ με την προσθήκη των δειγμάτων σε θερμοκρασία 43.5°C για 45 sec.
13. Κάθε δείγμα εμβολιάζεται σε 0,9 ml θρεπτικού μέσου LB και επωάζεται για ανάπτυξη σε θερμοκρασία 37°C για 1 h υπό ήπια ανάδευση.
14. Ακολουθεί επίστρωση των δειγμάτων σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Luria agar και τον κατάλληλο παράγοντα επιλογής.
15. Τα τρυβλία τέλος επωάζονται για τουλάχιστον 18 h σε θερμοκρασία 37°C.

Διαλύματα:

Διάλυμα I (πλύσης): 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, pH 7.0

Διάλυμα II (κατασκευής επιδεικτικών κυττάρων): 10 mM RbCl, 100 mM MOPS, 50 mM CaCl₂, pH 6.5

3.17.4 Μετασχηματισμός Chung and Miller (1988) σε κύτταρα *E. coli* DH5a

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις που δεν ήταν απαραίτητη η υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού.

1. Για κάθε δείγμα μετασχηματισμού εμβολιάζεται 1 ml θρεπτικού μέσου L.B. με φρέσκια πλήρως ανεπτυγμένη καλλιέργεια *E. coli* DH5a σε αναλογία 1:20 και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να φτάσει 0.7.
2. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 1000 x g για 10 min και επαναδιαλυτοποιούνται σε 0.1 ml διαλύματος TSB ανά δείγμα μετασχηματισμού.
3. Τα κύτταρα επωάζονται σε παγόλουτρο για 10 min.
4. Σε κάθε κυτταρικό δείγμα προστίθενται 100 pg DNA και επωάζονται σε παγόλουτρο για 20 min.
5. Προσθέτονται 900 μl διαλύματος TSB + γλυκόζη σε κάθε δείγμα και τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C υπό ήπια ανάδευση.
6. Ακολουθεί επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο L.A. και τον κατάλληλο παράγοντα επιλογής.
7. Τα τρυβλία τέλος επωάζονται για τουλάχιστον 18 h σε θερμοκρασία 37°C.

Διαλύματα:

TSB: 1% τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl, 10% PEG, 5% DMSO, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6.1.

TSB + γλυκόζη: TSB με την προσθήκη 20 mM γλυκόζης

3.18 Στύπωμα κατά Southern.

Το στύπωμα κατά Southern είναι μία τεχνική που επινοήθηκε από τον Ed Southern το 1975 η οποία συνδυάζει την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα και την υβριδοποίηση με σκοπό την ανίχνευση συγγένειας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Με την μέθοδο αυτή το DNA σε ένα πήκτωμα αποδιατάσσεται με την εμβάπτιση του πηκτώματος σε αλκαλικό διάλυμα και μεταφέρεται αντιγραφικά σε ειδικό φίλτρο με κατάλληλους χειρισμούς ώστε να διατηρήσει τις ίδιες θέσεις που κατείχε στο πήκτωμα.

Το φίλτρο αυτό αργότερα υβριδοποιείται με ένα σημασμένο ιχνηθέτη DNA και οι συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA του φίλτρου με τον ιχνηθέτη δίνουν ένα πρότυπο ζωνών το οποίο είτε χρωματίζει ένα ακτινογραφικό φιλμ όταν πρόκειται για υβριδισμό με ραδιενεργά στοιχεία, είτε χρωματίζονται πάνω στο φίλτρο όταν πρόκειται για μη ραδιενεργό ανοσολογικό εντοπισμό.

Το στύπωμα Southern χρησιμοποιήθηκε για ανίχνευση αλληλουχιών DNA από πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% και η μεταφορά έγινε σε ειδικό φίλτρο νάιλον αρνητικά φορτισμένο, Roti-Nylon plus (Fiers Cat. No. K058.1)

1. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε 500 ml διαλύματος μετουσίωσης για τουλάχιστον 30 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανακίνηση.
2. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε 500 ml διαλύματος εξουδετέρωσης για τουλάχιστον 30 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανακίνηση.
3. Σε ένα δοχείο με διάλυμα 10xSSC στερεώνεται μια πλάκα μικρότερου μήκους από το δοχείο. Πάνω σε αυτήν τοποθετούνται 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM σε σχήμα γέφυρας, οι άκρες των οποίων ακουμπούν τον πυθμένα του δοχείου και είναι βυθισμένες σε διάλυμα 10 x SSC χωρίς όμως η επιφάνεια του διαλύματος να ξεπερνά την πλάκα με τα διηθητικά χαρτιά.
4. Επάνω στα διηθητικά φύλλα τοποθετείται το πήκτωμα αγαρόζης ανεστραμμένο. Αφαιρούνται οι φυσαλίδες αέρα με την πίεση μιας γυάλινης ράβδου κατά μήκος

και πλάτος όλης της επιφάνειας. Τα ακάλυπτα τμήματα των διηθητικών φύλλων καλύπτονται με αλουμινόχαρτο.

5. Στην επιφάνεια του πήκτωματος τοποθετείται, αφού έχει διαβραχεί με διάλυμα 2 x SSC, ειδική μεμβράνη μεταφοράς DNA Roti-Nylon plus ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα. Τυχόν φυσαλίδες αέρα αφαιρούνται με τον ίδιο τρόπο όπως πριν.
6. Το φίλτρο καλύπτεται με δύο φύλλα Whatman 3 MM ίδιων διαστάσεων, τα οποία έχουν και αυτά διαβραχεί με διάλυμα 2 x SSC. Τυχόν φυσαλίδες αέρα αφαιρούνται όπως πριν.
7. Στην επιφάνεια των φύλλων Whatman τοποθετείται παχύ στρώμα απορροφητικού χαρτιού με μια επιπλέον πίεση από επάνω με αντικείμενο βάρους 500g περίπου.
8. Λόγω διάχυσης του διαλύματος 10 x SSC στο διηθητικό χαρτί και στο στρώμα απορροφητικού χαρτιού από πάνω (τριχοειδής μετακίνηση), συμπαρασύρεται το DNA από το πήκτωμα και μεταφέρεται στο φίλτρο όπου προσδένεται με ασθενείς δεσμούς. Η μεταφορά διαρκεί 18-20 ώρες.
9. Όταν ολοκληρώνεται η μεταφορά αφαιρούνται το βάρος, το απορροφητικό χαρτί και τα 2 φύλλα Whatman. Το πήκτωμα με το φίλτρο αφαιρείται προσεκτικά, αναστρέφεται, τοποθετείται σε στεγνή επιφάνεια και σημειώνονται οι θέσεις των φρεατίων πάνω στο χαρτί με μαλακό μολύβι.
10. Το πήκτωμα απορρίπτεται, Το φίλτρο εμβαπτίζεται σε διάλυμα 6 x SSC και εκπλένεται για 5 min με ήπια ανακίνηση.
11. Στη συνέχεια το φίλτρο τοποθετείται στην επιφάνεια διηθητικού χαρτιού για να στεγνώσει, τυλίγεται σε διαφανή μεμβράνη και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) για 2-5 min. Με αυτόν τον τρόπο το DNA προσδένεται ισχυρά πάνω στη μεμβράνη.

Διαλύματα:

Διάλυμα μετουσίωσης: 0,5 N, NaOH, 1,5 M NaCl

Διάλυμα εξουδετέρωσης: 1 M Tris pH 8.0, 1,5 M NaCl

Διάλυμα 20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M κιτρικό νάτριο, pH 7

3.19 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA

3.19.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA – DNA με χρήση τροποποιημένου συστήματος ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA, DIG DNA Labeling and Detection kit (Boehringer Mannheim, cat. No. 11 093 657 910).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των μονόκλωνων αλυσίδων μορίων DNA να υβριδοποιούνται σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με άλλα μονόκλιωνα μόρια DNA. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ελεγχθούν δύο διαφορετικά μόρια DNA για το αν έχουν ομόλογες περιοχές. Με το συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιείται η διγοξυγενίνη (ένα στεροειδές απτένιο) για ιχνηθέτηση DNA και RNA. Η μέθοδος περιλαμβάνει 3 στάδια: σήμανση του DNA με Dig-11-dUTP, υβριδοποίηση του ιχνηθετημένου DNA με το DNA στόχο και ανοσολογικό εντοπισμό με χρωμογόνο αντίδραση.

3.19.2 Σήμανση του DNA.

1. Προστίθενται 10 ng – 3μg γραμμικού απομονωμένου DNA που θα σημανθεί, σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι των 1,5 ml.
2. Το DNA επωάζεται σε θερμοκρασία 100°C για 10 min ώστε να αποδιαταχτεί και αμέσως μετά τοποθετείται σε παγόλουτρο.
3. Προσθέτονται 2 μl μίγματος εξανουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως πριμοδοτικά μόρια αντιγραφής.
4. Προστίθενται 2 μl μίγματος σήμανσης.
5. Προτίθεται ποσότητα νερού (όπου χρειάζεται), για τελικό όγκο διαλύματος 19 μl.
6. Προσθέτεται 1 μl ένζυμου Klenow.
7. Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 20 h.
8. Τέλος προστίθενται 2 μl EDTA 0,2 M ώστε να τερματιστεί η αντίδραση

3.19.3 Υβριδοποίηση σημασμένου DNA με ιχνηθετημένο DNA.

1. Το φίλτρο με το ιχνηθετημένο DNA τοποθετείται μαζί με τουλάχιστον 20 ml διαλύματος προϋβριδισμού ανά 100 cm² φίλτρου σε ειδική φιάλη και πραγματοποιείται προϋβριδισμός σε συσκευή υβριδοποίησης σε θερμοκρασία 68°C για τουλάχιστον 1 h με ανακίνηση.
2. Λίγο πριν την ολοκλήρωση του προϋβριδισμού τοποθετείται το σημασμένο DNA σε θερμοκρασία 100°C για 10 min και αμέσως μετά σε πάγο για 2 min.
3. Αφαιρείται η φιάλη με το ιχνηθετημένο DNA στο φίλτρο από τη συσκευή προϋβριδισμού και αποχύνεται το διάλυμα προϋβριδισμού.
4. Το διάλυμα με το σημασμένο DNA προστίθεται σε 5 ml διαλύματος υβριδισμού (το οποίο έχει προθερμαθεί στους 68°C).
5. Το διάλυμα με το σημασμένο DNA τοποθετείται στη φιάλη με το φίλτρο και επωάζεται σε θερμοκρασία 68°C με ανακίνηση για τουλάχιστον 12-16 h.
6. Την επόμενη ακολουθούν 2 πλύσεις για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου με 50 ml διαλύματος πλύσης I ανά 100 cm² φίλτρου.
7. Τέλος, ακολουθούν επιπλέον 2 πλύσεις για 15 min σε θερμοκρασία 68°C με 50 ml διαλύματος πλύσης II ανά 100 cm² φίλτρου.

Διαλύματα:

Διάλυμα προϋβριδισμού – υβριδισμού: 5 x SSC, 0,1% w/v N-λαυρούλοσαρκοσινικό νάτριο, 0,02% w/v SDS, 1% αντιδραστήριο αποκλεισμού (blocking)

Διάλυμα πλύσης I: 2 x SSC, 0,1% w/v SDS

Διάλυμα πλύσης II: 0,1 x SSC, 0,1% w/v SDS

3.19.4 Ανοσολογικός εντοπισμός

- Το φίλτρο εκπλένεται με 50 ml washing buffer 1 για 1-5 min.
- Κατόπιν επωάζεται για 30 min με 100 ml blocking solution.
- Παρασκευάζεται το antibody solution.
- Το φίλτρο επωάζεται με το διάλυμα αντισώματος για 30 min.
- Ακολουθούν 2 πλύσεις των 15 min με 100 ml washing buffer.
- Το φίλτρο εξισορροπείται με επώαση σε 20 ml detection buffer για 2-5 min.
- Επωάζεται στο σκοτάδι με 10 ml διαλύματος με χρωμογόνο για 12-16 h.
- Τέλος, εκπλένεται με 50 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού αφού ολοκληρωθεί η εμφάνιση.

Όλα τα στάδια πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Οι παραπάνω ποσότητες αντιστοιχούν σε φίλτρο διαστάσεων 100 cm².

Διαλύματα:

Washing buffer: 100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, 0.3 % tween 20, pH 7.5

Maleic acid buffer: 100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, pH 7.5

Blocking solution: 1% blocking reagent διαλυμένο σε maleic acid buffer

Antibody solution: 4 μl Anti-Digoxigenin-AP σε 20 ml blocking solution

Detection buffer: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5

Διάλυμα χρωμογόνου: 200 μl NBT/BCIP σε 10 ml detection buffer.

3.20 Στύπωμα κατά Northern

Το στύπωμα Northern είναι η αντίστοιχη τεχνική με το στύπωμα Southern για την ανάλυση RNA. Με την μέθοδο αυτή μεταφέρεται RNA από πήκτωμα αγαρόζης αντιγραφικά σε ειδικό φίλτρο με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρήσει τις ίδιες θέσεις που κατείχε στο πήκτωμα με σκοπό να υβριδοποιηθεί με ένα σημασμένο ιχνηθέτη DNA ή RNA.

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης με ρυθμιστικό διάλυμα MOPS – φορμαλδεΰδης όπως περιγράφεται παραπάνω (§3.10.2) και η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε ειδικό φίλτρο νάιλον αρνητικά φορτισμένο, Roti-Nylon plus (Fiers Cat. No. K058.1)

1. Το πήκτωμα επωάζεται με ήπια ανάδευση σε 300 ml H₂O κατεργασμένο με DEPC για 30 min και 2 φορές σε 300 ml 20 x SSC για 15 min.

Στη συνέχεια τα βήματα είναι παρόμοια με αυτά της διαδικασίας στυπώματος κατά Southern από το βήμα 3 (§3.18). Οι διαφορές είναι ότι όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι πλυμένα με διάλυμα DMPC για την αποφυγή διάσπασης των RNA από ριβονουκλεάσες του περιβάλλοντος και ότι στα βήματα 3, 5, 6 και 8 χρησιμοποιήθηκε 20 x SSC και 2 x SSC στο βήμα 10.

3.21 Μη ραδιενεργός υβριδισμός RNA-DNA

3.21.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός RNA – DNA με χρήση τροποποιημένου συστήματος ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA, DIG DNA Labeling and Detection kit (Boehringer Mannheim, cat. No. 11 093 657 910).

Η μέθοδος αυτή δημιουργήθηκε τροποποιώντας την μέθοδο υβριδισμού DNA-DNA κατάλληλα ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί για υβριδισμό RNA-DNA. Βασίζεται στην ιδιότητα των μονόκλωνων αλυσίδων μορίων DNA και RNA να υβριδοποιούνται σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με άλλα μονόκλιωνα μόρια DNA ή RNA. Με το συγκεκριμένο πακέτο χρησιμοποιείται η διγοξυγενίνη (ένα στεροειδές απτένιο) για ιχνηθέτηση DNA και RNA. Η μέθοδος περιλαμβάνει 3 στάδια, σήμανση του DNA με Dig-11-dUTP, υβριδισμός του ιχνηθετημένου DNA με το RNA στόχο και ανοσολογικός εντοπισμός με χρωμογόνο αντίδραση.

3.21.2 Σήμανση του DNA.

Η σήμανση του DNA πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στον υβριδισμό DNA-DNA (3.2.17.2) με την διαφορά ότι το H₂O που ενδεχομένως να χρειάζεται να προστεθεί είναι επεξεργασμένο με DMPC.

Διαλύματα:

H₂O κατεργασμένο με DMPC: διάλυση DMPC σε H₂O σε συγκέντρωση 0,1%, επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 1 h και αποστείρωση

3.21.3 Υβριδοποίηση σηματομένου DNA με ιχνηθετημένο RNA.

Τα βήματα της διαδικασίας είναι παρόμοια με αυτά της διαδικασίας υβριδοποίησης DNA με ιχνηθετημένο DNA της παραγράφου 3.19.3 με τις διαφορές ότι η θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε στα βήματα 1, 4, 5 και 7 ήταν 50 °C και ότι όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται ήταν πλυμένα με διάλυμα DMPC.

3.21.4 Ανοσολογικός εντοπισμός

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν του ανοσολογικού εντοπισμού σε στύπωμα κατά Southern όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.19.4 με τη διαφορά ότι τα διαλύματα washing buffer και maleic acid buffer είχαν υποστεί κατεργασία με DMPC.

3.22 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα *E. coli* με μηχανική θραύση (Mojsin et al., 2005)

Για την απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιέργειες βακτηρίων *E. coli* χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος μηχανικής θραύσης των κυττάρων με σφαιρίδια ζirkονίου διαμέτρου 0,1 mm. Κυτταρικά ιζήματα βακτηριακών κυττάρων μετά από φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα και σε τοποθετήθηκαν μαζί με τα σφαιρίδια ζirkονίου σε ειδικά σωληνάρια. Στη συνέχεια με την επανειλημμένη χρήση της συσκευής Mini beadbeater της εταιρείας Biospec products τα κύτταρα λύθηκαν και συλλέχθηκε η υδατική φάση με τις ελεύθερες πρωτεΐνες του κυττάρου. Για την προστασία των πρωτεϊνών από πρωτεάσες προστέθηκε στο τέλος ο αναστολέας πρωτεασών PMSF σε συγκέντρωση 2 mM.

1. Προσθήκη σε ειδικά σωληνάρια των 2 ml αποστειρωμένα σφαιρίδια ζirkονίου διαμέτρου 0,1 mm μέχρι τα 2/3 του όγκου της φιάλης.
2. Επαναιώρηση των κυτταρικών ιζημάτων από 30 ml καλλιέργειας σε 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα A.
3. Προσθήκη των επαναιωρημένων κυτταρικών ιζημάτων στα σωληνάρια μαζί με επιπλέον ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος A ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στα φιαλίδια
4. Εφαρμογή σε beadbeatter 3 φορές για 1 min σε κάθε δείγμα με επώαση ενδιάμεσα σε πάγο για 1 min.
5. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1 min σε 15000 X g και απομόνωση υγρής φάσης σε νέα σωληνάρια.
6. Φυγοκέντρηση για 15 min σε 15000 X g στους 4 °C και απομόνωση υγρής φάσης.

Διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα A: 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X100

3.23 Απομόνωση πρωτεϊνών από *E. coli* σημασμένων με ουρά ιστιδίνης με την χρήση του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων Protino Ni-IDA (Macherey Nagel, Cat. No. 745160.5)

Η απομόνωση πρωτεϊνών σημασμένων με ουρά ιστιδίνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση του πακέτου Protino Ni-IDA. Η απομόνωση βασίζεται στην χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) κατά την οποία οι πρωτεΐνες δεσμεύονται λόγω της αλληλεπίδρασης της ουράς ιστιδίνης με ακινητοποιημένα ιόντα Ni²⁺ στην ρητίνη βάσει πυριτίου που περιέχουν οι ειδικές στήλες απομόνωσης. Οι χηλική ομάδα στις στήλες αυτές βασίζεται στο ιμινοδιοξικό οξύ που προσφέρει ισχυρή δέσμευση των στοχευμένων πρωτεϊνών με τρεις δεσμούς στα κατάλοιπα ιστιδίνης.

3.24 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών Bradford στηρίζεται στην αλλαγή χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 όταν προσδένεται με πρωτεΐνες σε αραιό όξινο περιβάλλον. Το σύμπλοκο της χρωστικής με τις πρωτεΐνες απορροφά το φως στα 595 nm.

Κατά την μέθοδο δημιουργήθηκε αρχικά μία πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595 nm δειγμάτων BSA με γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνης και βάσει αυτής υπολογίστηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών σε άλλα δείγματα.

Τα διαλύματα πρωτεϊνών δημιουργήθηκαν με σταθερό όγκο 40 μ l και προστέθηκαν σε 2.5 ml αραιωμένου διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford 0.2X. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν για 1 min πριν μετρηθεί η απορρόφηση σε φωτόμετρο ρυθμισμένο στα 595 nm.

3.25 Συμπύκνωση πρωτεϊνών

Για την συμπύκνωση δειγμάτων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε καταβύθιση τους με την προσθήκη ακετόνης και επαναδιαλυτοποίηση στον επιθυμητό όγκο του επιθυμητού διαλύματος.

Για την καταβύθιση των πρωτεϊνών προστέθηκαν στα διαλύματα 4 όγκοι παγωμένης ακετόνης και μετά από ανάδευση επωάστηκαν για τουλάχιστον 90 min στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 min σε 15000 X g σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και αποχύθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο. Το ίζημα αφού ξηράνθηκε επαναδιαλυτοποιήθηκε στον επιθυμητό όγκο.

Αποτελέσματα

4.1 Επιλογή θρεπτικών μέσων ανάπτυξης

Τέσσερα θρεπτικά μέσα εξετάστηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση:

- αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk)
- θρεπτικό μέσο M17
- θρεπτικό μέσο M17 + 2% γλυκόζη
- θρεπτικό μέσο HJG (Hogg Jago Glucose).

Αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk)

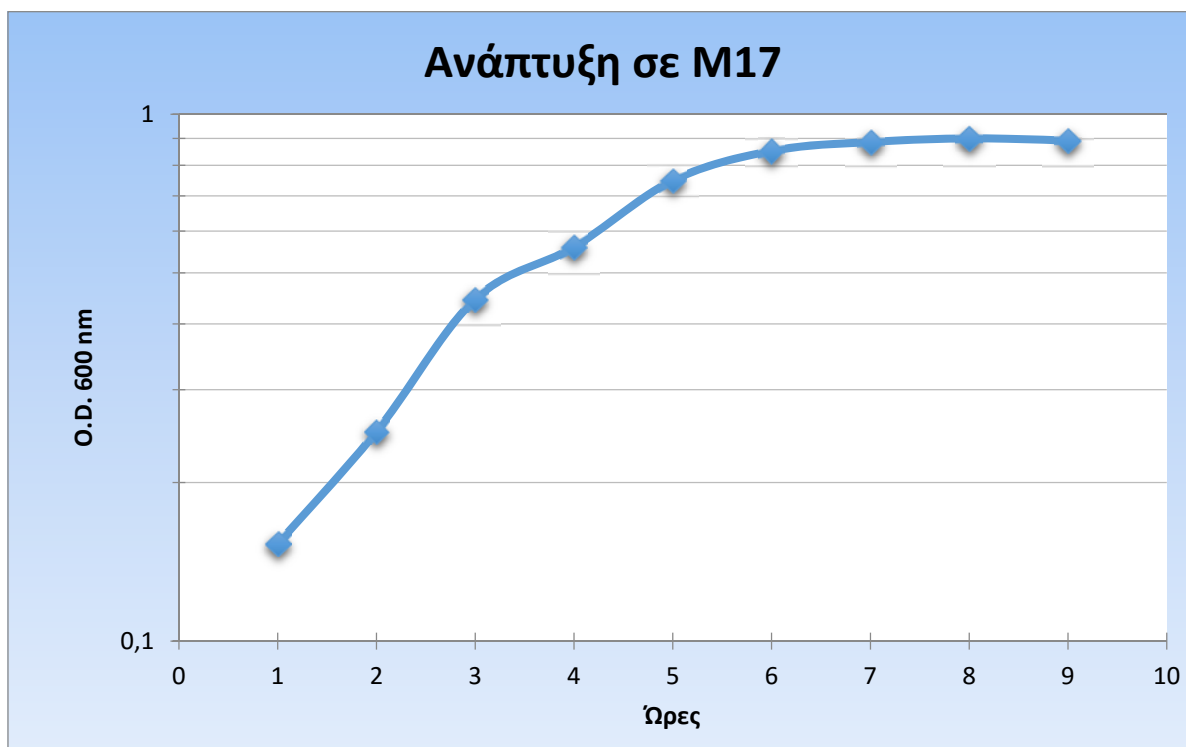
Το αποβουτυρωμένο γάλα αποτελεί ένα πολύ καλό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των οργανισμών της τάξης των Lactobacillales στην οποία ανήκει και ο οργανισμός *S. thermophilus*. Πρόκειται για γάλα από το οποίο έχει αφαιρεθεί το λίπος με χημική επεξεργασία ώστε να μην υπερβαίνει το 0,2 % και έχει κατόπιν παστεριωθεί. Ένα από τα πλεονεκτήματα της ανάπτυξης σε αποβουτυρωμένο γάλα είναι η συνεχής εμφάνιση υψηλής δραστηριότητας βακτηριοσίνης του οργανισμού όπως μετρήθηκε σε πειράματα agar diffusion test (A.D.T.) έναντι του στελέχους *Lactococcus lactis* CNRZ 117.

Εντούτοις παρουσιάζει κάποιες ιδιότητες οι οποίες δεν βοηθούν πτυχές της μελέτης του οργανισμού. Συγκεκριμένα, η μέτρηση οπτικής πυκνότητας σε αυτό το μέσο δεν είναι εφικτή καθώς αυτό δεν είναι διαυγές. Επίσης, η βαθμιαία ελάττωση του pH στο θρεπτικό μέσο μετά την ανάπτυξη του οργανισμού (λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος) οδηγεί σε μετουσίωση και καταβύθιση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πηγματος μετά από 5-6 ώρες ανάπτυξης. Υπό μορφή πηγματος τα κύτταρα του οργανισμού δεν μπορούν να απομονωθούν ώστε να χρησιμοποιηθούν σε τεχνικές όπου απαιτείται.

M17

Το θρεπτικό μέσο M17 είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών στρεπτόκοκκων, όπου το pH διατηρείται σταθερό μέσω του γλυκεροφωσφορικού νατρίου που περιέχεται σε αυτό. Το M17 προτείνεται από την διεθνή ομοσπονδία γάλακτος σε στερεά μορφή για την απομόνωση *S. thermophilus* από γιαούρτη (International Dairy Federation, 1981). Εντούτοις έχουν αναφερθεί προβλήματα στην απομόνωση λακτοβάκιλλων και κυρίως του *L. bulgaricus* από γιαούρτη λόγω του γλυκεροφωσφορικού νατρίου το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη τους. (Shankar and Davies., 1977).

Το *S. thermophilus* ACA-DC 0040 εμφανίζει ικανοποιητική ανάπτυξη στο M17 με την τιμή της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm στην εκθετική φάση να αγγίζει το 1 (εικόνα 4.1). Η εμφάνιση δραστηριότητας της βακτηριοσίνης σύμφωνα με τα A.D.T. δεν είναι ικανοποιητική: παρουσιάζει μικρή ή ανύπαρκτη δραστηριότητα σε πειράματα agar diffusion test έναντι του *L. lactis* CNRZ 117 (βλ. αποτελέσματα παρακάτω).

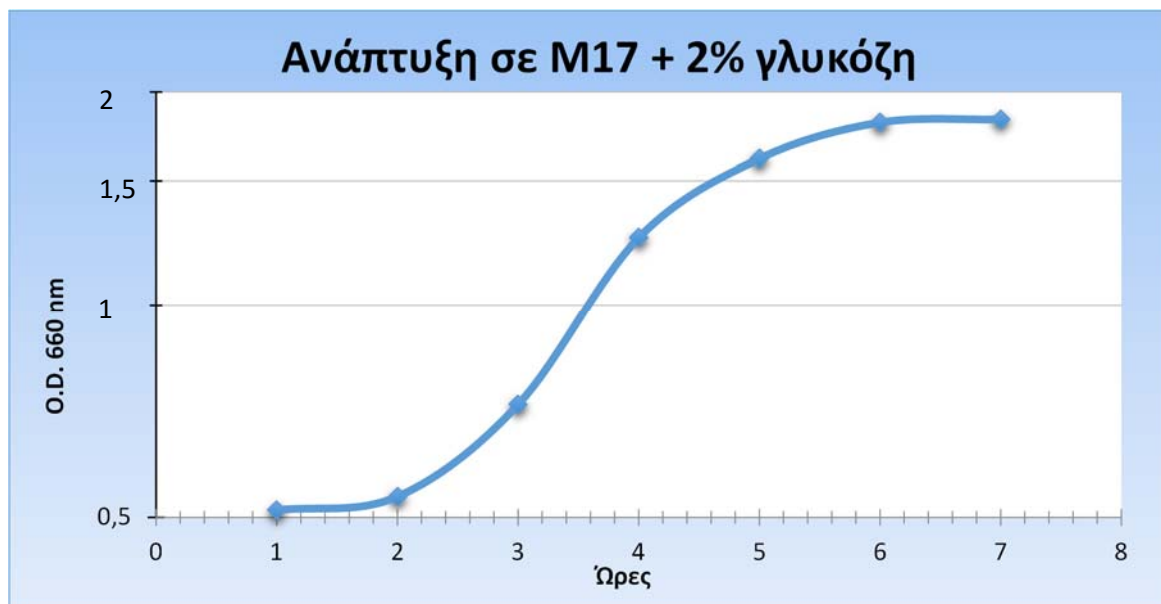


Εικόνα 4.1 Καμπύλη ανάπτυξης του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040 σε θρεπτικό μέσο M17 σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση.

M17 + 2% γλυκόζη

Το M17 ενισχύθηκε με προσθήκη γλυκόζης σε τελική συγκέντρωση 2% και χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για το *S. thermophilus* ACA-DC 0040. Η προσθήκη γλυκόζης στο μέσο M17 χρησιμοποιείται σε πρωτόκολλα ανάπτυξης κυττάρων σε πειράματα μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση (Marciset and Mollet, 1993; Powell et al., 1988). Το στέλεχος παρουσίασε πολύ καλή ανάπτυξη σε αυτό το θρεπτικό μέσο, με την τιμή της οπτικής πυκνότητας στα 660 nm στην εκθετική φάση να πλησιάζει το 2. Το στέλεχος παρήγαγε βακτηριοσίνη σε πειράματα agar diffusion test έναντι του *L. lactis* CNRZ 117 από την 4η μέχρι την 7η ώρα ανάπτυξης που αντιστοιχεί στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης μέχρι και την αρχή της στατικής φάσης (βλ. αποτελέσματα παρακάτω)..

Όταν το *S. thermophilus* ACA-DC 0040 αναπτύχθηκε σε M17 + 2% γλυκόζη, η απομόνωση κυτταρικού ιζήματος ήταν εφικτή. Εντούτοις, κατά την απομόνωση πλασμιδιακού ή γονιδιωματικού DNA προέκυψαν δυσκολίες, με μεγαλύτερο αρνητικό παράγοντα την μη επιτυχή λύση των κυττάρων, καθώς και την κακή ποιότητα του απομονωμένου γενετικού υλικού, το οποίο παρουσίασε πολλά θραύσματα.

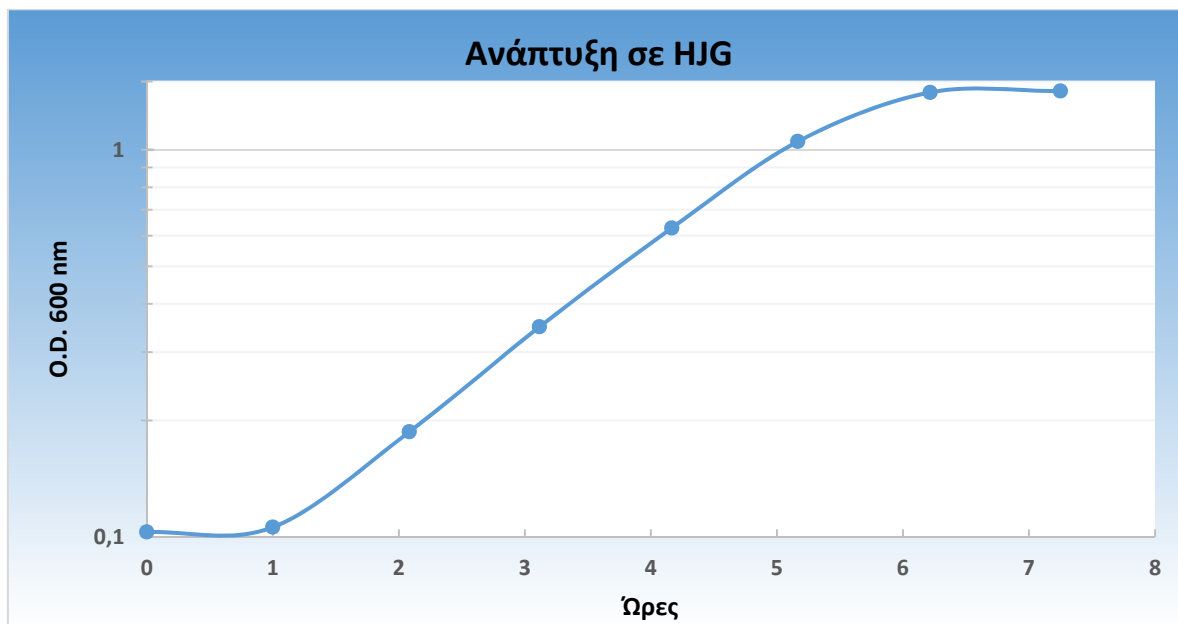


Εικόνα 4.2 Καμπύλη ανάπτυξης του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040 σε θρεπτικό μέσο M17 + 2% γλυκόζη σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση.

HJG (Hogg Jago Glucose)

Το θρεπτικό μέσο HJG είναι πολύ αποτελεσματικό στην ανάπτυξη του *S. thermophilus*. Χρησιμοποιείται σε πολλά πρωτόκολλα μετασχηματισμού *S. thermophilus* με ηλεκτροδιάτρηση για την προετοιμασία των επιδεκτικών κυττάρων καθώς και για την ανάρρωσή τους (Marciset and Mollet, 1994: Blomqvist and Steinmoen, 2006: Blomqvist et al., 2006). Το *S. thermophilus* ACA-DC 0040 εμφάνισε πολύ καλή ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο HJG με τιμή οπτικής πυκνότητας στα 600 nm μιας πλήρως ανεπτυγμένης καλλιέργειας μεταξύ 1,5 και 2. Η εμφάνιση δραστηριότητας βακτηριοσίνης στα A.D.T. ήταν συνεχής και υψηλή σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης (βλ. αποτελέσματα παρακάτω).

Εντούτοις, η πολύ καλή ανάπτυξη του στελέχους σε HJG συνοδεύεται από την ανάπτυξη και άλλων μικροοργανισμών σε αυτό, με αποτέλεσμα την πολύ εύκολη και συχνή επιμόλυνσή του. Το γεγονός αυτό καθιστά μη αξιόπιστα τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε καλλιέργειες με HJG. Επιπλέον, η απομόνωση γενετικού υλικού από *S. thermophilus* ACA-DC 0040 παρουσίασε δυσκολίες, ενώ τα τελικά προϊόντα των απομονώσεων ήταν ακάθαρτα και κατακερματισμένα.



Εικόνα 4.3 Καμπύλη ανάπτυξης του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040 σε θρεπτικό μέσο HJG σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση..

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα κάθε θρεπτικού μέσου οδήγησαν στη χρησιμοποίησή τους ανάλογα με τα πειράματα που θα ακολουθούσαν. Κατά συνέπεια:

- Το θρεπτικό M17 χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 με σκοπό την απομόνωση πλασμιδιακού ή γονιδιωματικού DNA.
- Το M17 + 2% γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης ανάπτυξης.
- Το αποβουτυρωμένο γάλα χρησιμοποιήθηκε κυρίως για καλλιέργεια του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 με σκοπό την απομόνωση RNA για την ανίχνευση μεταγράφων των πιθανών γονιδίων παραγωγής βακτηριοσίνης.
- Το θρεπτικό μέσο HJG χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μετασχηματισμού του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 με ηλεκτροδιάτρηση όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

4.2 Παραγωγή βακτηριοσίνης και συσχέτιση με ανάπτυξη

Η θερμοφιλίνη T, εμφανίζει δραστικότητα κατά μέσο όρο από το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 με κορύφωση στο τέλος της εκθετικής φάσης, όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε κλειστό βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό μέσο Elliker (Aktypis et al., 2007).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η δραστικότητα της παραγόμενης θερμοφιλίνης T από *S. thermophilus* ACA-DC 0040 ανεπτυγμένο στα προαναφερθέντα θρεπτικά μέσα.

Επιπλέον, επιλέχθηκαν δύο παράγοντες που πιθανόν να συνέβαλαν στην παραγωγή της θερμοφιλίνης, εφόσον δεν έχει μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο επάγεται η σύνθεσή της.

Ο ένας παράγων είναι η γλυκόζη, η προσθήκη της οποίας στο θρεπτικό μέσο M17 συνέβαλε σημαντικά στην αύξηση των κυττάρων και κατά πάσα πιθανότητα και στην παραγωγή της θερμοφιλίνης.

Ο δεύτερος παράγων που προστέθηκε στα θρεπτικά μέσα ήταν ποσότητα καλλιέργειας του οργανισμού *Lactococcus lactis* CNRZ 117 ελεύθερης κυττάρων (lactis free) σε συγκέντρωση 10% του τελικού όγκου μετά από διήθηση σε φίλτρα αποστείρωσης 0,45 μm . Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε αυτή η προσθήκη ήταν για να διαπιστωθεί, αν αυτό το εκχύλισμα ευνοεί την παραγωγή βακτηριοσίνης.

Ο *S. thermophilus* ACA-DC 0040 καλλιεργήθηκε επομένως στα εξής θρεπτικά μέσα προκειμένου να προσδιοριστεί η δραστικότητα της βακτηριοσίνης σε καθένα από αυτά:

- M17
- M17 + lactis free 10 %
- M17 + lactis free 20 %,

- M17 + γλυκόζη 1 %
- M17 + γλυκόζη 2 %
- HJG + γλυκόζη 1%
- HJG + γλυκόζη 2%
- Αποβουτυρωμένο γάλα

Καμπύλες ανάπτυξης σχεδιάστηκαν για όλες τις καλλιέργειες εκτός από αυτήν σε αποβουτυρωμένο γάλα καθώς η μεγάλη θολερότητα και πυκνότητα του εναιωρήματος δεν επιτρέπει τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.

Για τη μέτρηση της παραγωγής βακτηριοσίνης με agar diffusion test πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 50 μl κυτταρικής καλλιέργειας ανά χρονικά διαστήματα 0, 2, 3, 4 και 6 ωρών ανάπτυξης και ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Από την τελική τιμή της διαμέτρου των ζωνών αναστολής αφαιρέθηκε το μέγεθος του βοθρίου (5 mm).

Αποτελέσματα

Πίνακας 4.1 Ανάπτυξη του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 και μέγεθος ζωνών αναστολής από agar diffusion test. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης (O.D.) ελήφθησαν στα 600 nm, ενώ οι ζώνες αναστολής (Z.A.) μετρήθηκαν σε χιλιοστά (mm) διαμέτρου ζώνης από την οποία αφαιρέθηκε η διάμετρος του βοθρίου.

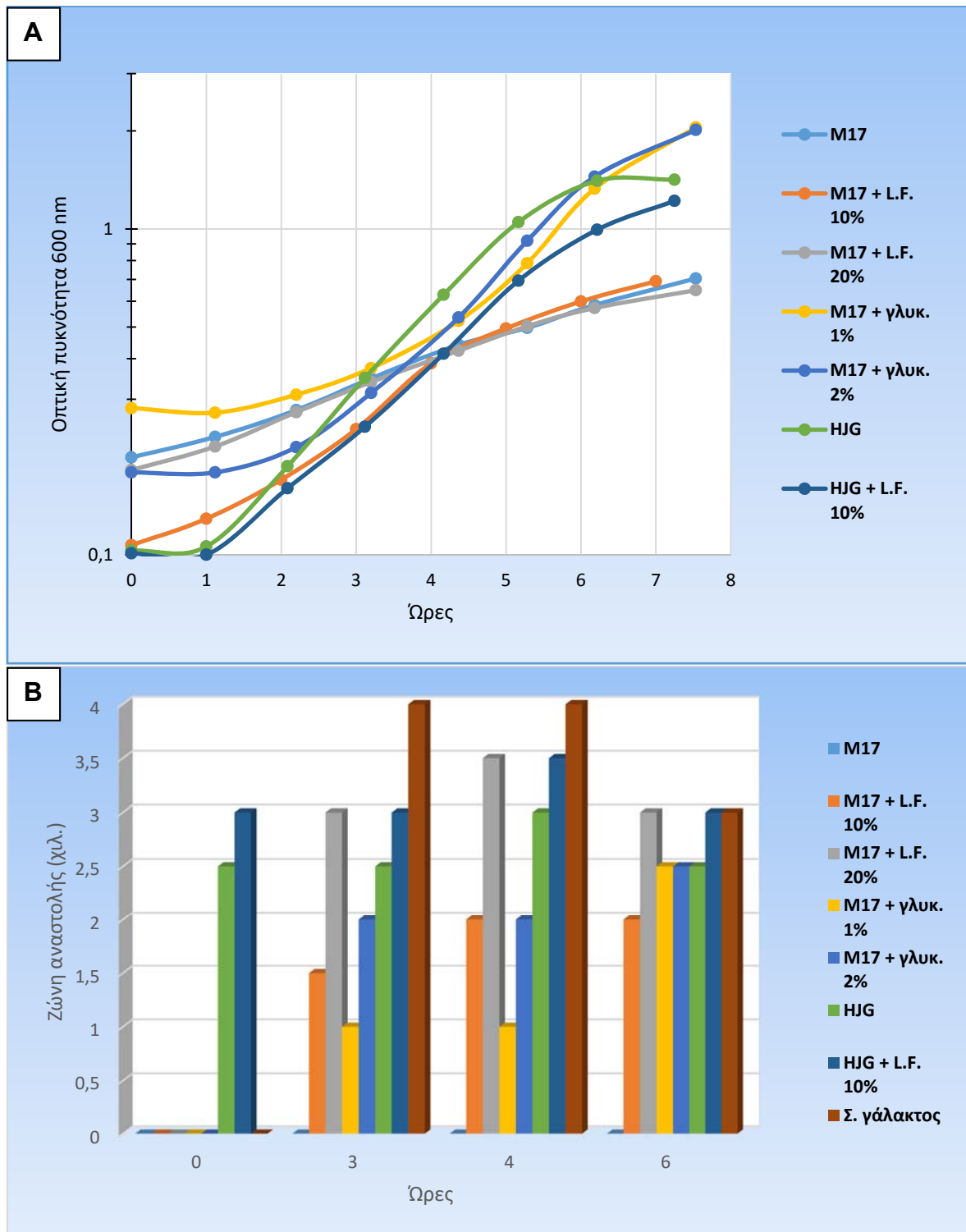
Χρόνος (ώρες)	M17		M17 + L.F 20%		M17 + γλυκ. 1%		M17 + γλυκ. 2%		Χρόνος (ώρες)	HJG		HJG + L.F. 10%		Χρόνος (ώρες)	M17 + L.F. 20%		Αποβουτυρωμένο γάλα
	O.D.	Z.A. (mm)	O.D.	Z.A. (mm)	O.D.	Z.A. (mm)	O.D.	Z.A. (mm)		O.D.	Z.A. (mm)	O.D.	Z.A. (mm)		O.D.	Z.A. (mm)	Z.A. (mm)
0	0,199	0	0,182	0	0,282	0	0,179	0	0	0,103	2,5	0,101	3	0	0,107	0	0
1,12	0,23		0,215		0,273		0,179		1	0,106		0,1		1	0,129	0	
2,2	0,278	0	0,274	4	0,31	0	0,214	0	2,08	0,187		0,16		2	0,17	0	4
3,2	0,348	0	0,339	3	0,374	1	0,314	2	3,12	0,349	2,5	0,247	3	3	0,243	1,5	4
4,37	0,441	0	0,423	3,5	0,522	1	0,535	2	4,17	0,628	3	0,414	3,5	4	0,387	2	3
5,28	0,497		0,503		0,785		0,92		5,17	1,05	2,5	0,694	2,5	5	0,495	2	
6,18	0,584	0	0,572	3	1,33	2,5	1,448	2,5	6,22	1,406	2,5	0,995	3	6	0,599	2	3
7,53	0,705		0,649		2,051		2,014		7,25	1,417		1,22		7	0,691	0,5	

Σε όλα τα δείγματα η ανάπτυξη φαίνεται να απεικονίζεται στην εκθετική της φάση. Στα δείγματα από καλλιέργειες ανεπτυγμένες σε M17 και M17 lactis free, ο πιθανός παράγοντας επαγωγής δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων όμως από την 2^η ώρα ανάπτυξης φαίνεται να επάγει την παραγωγή βακτηριοσίνης.

Στα δείγματα από καλλιέργειες σε M17 με την προσθήκη γλυκόζης έχει επαχθεί και η ανάπτυξη των κυττάρων σε μεγάλο βαθμό αλλά και η παραγωγή βακτηριοσίνης, σε μικρότερο βαθμό όμως από ότι με τον άλλον παράγοντα. Η δραστηριότητα της βακτηριοσίνης εμφανίζεται από την 3^η ώρα ανάπτυξης με μέγιστο στο, φαινομενικά, τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, συμβαδίζοντας με τα χαρακτηριστικά στοιχεία για τα συστήματα αίσθησης απαρτίας και έκφρασης βακτηριοσινών βασισμένα σε αυτά.

Τα δείγματα από καλλιέργειες ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο HJG και HJG με την προσθήκη παράγοντα πιθανής επαγωγής lactis free εμφανίζουν καλή ανάπτυξη. Η δραστηριότητα της βακτηριοσίνης εμφανίζεται σχετικά σταθερή από την αρχή της καλλιέργειας καθ' όλη την ανάπτυξη με μία ελαφρά αύξηση στην 4^η ώρα ανάπτυξης. Η δραστηριότητα από τα δείγματα ανάπτυξης σε αποβουτυρωμένο γάλα εμφανίζεται σταθερή από την 3^η ώρα ανάπτυξης και μετά.

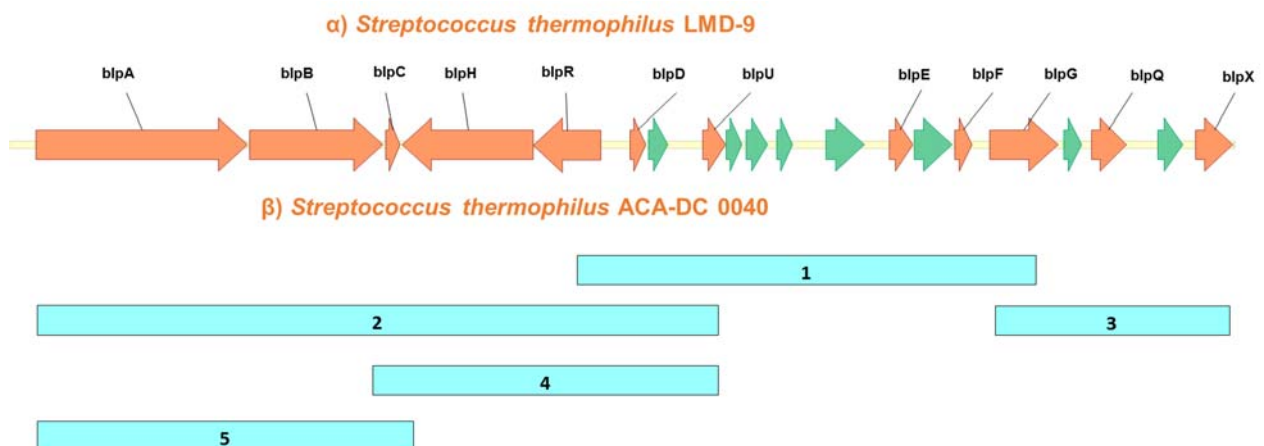
Από τα δεδομένα του πειράματος είναι φανερό πως μόνο η ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο M17 με την παρουσία γλυκόζης ακολουθεί τα τυπικά χαρακτηριστικά εμφάνισης βακτηριοσίνης σε σύστημα αίσθησης απαρτίας. Με την προσθήκη παράγοντα πιθανής επαγωγής lactis free η δραστηριότητα της βακτηριοσίνης εμφανίζεται από την αρχή της ανάπτυξης, σε χαμηλό αριθμό κυττάρων οδηγώντας στην υπόθεση πως κάποιο συστατικό από την καλλιέργεια του *L. lactis* που προστίθεται στις καλλιέργειες *S. thermophilus* επηρεάζει την παραγωγή της βακτηριοσίνης.



Εικόνα 4.4 Απεικόνιση δεδομένων ανάπτυξης του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040 μαζί με τιμές ζωνών αναστολής από agar diffusion test. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης (O.D.) εμφανίζονται στην εικόνα **A** και οι ζώνες αναστολής στην εικόνα **B**. Τα δεδομένα του πειράματος αναγράφονται στον πίνακα 4.1

4.3 Ταυτοποίηση περιοχής ανάλογης *blp* στο γονιδίωμα του *S. thermophilus* ACA-DC 0040

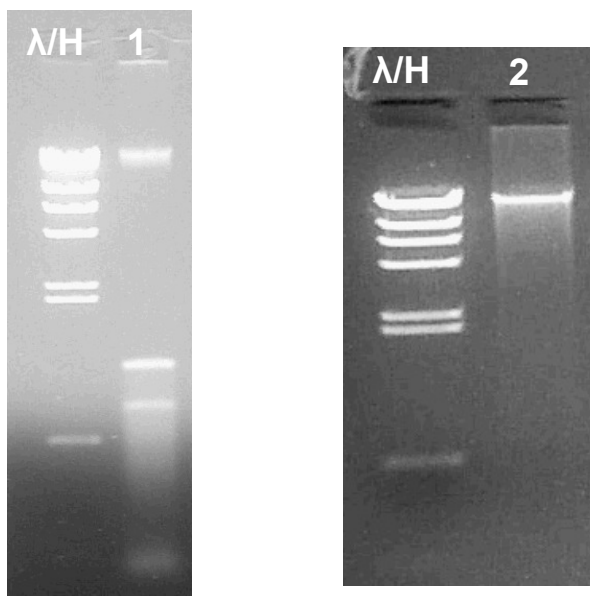
Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, η περιοχή *blp* που έχει χαρακτηριστεί ως υπεύθυνη για την επαγωγή, τη σύνθεση και την έκκριση της βακτηριοσίνης έχει εντοπιστεί *in silico* σε τρία στελέχη *S. thermophilus*, τα LMD9, LMD18311 και CNRZ1066, στα οποία έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία του γονιδιώματός τους. Αυτές χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών με σκοπό την απομόνωση πιθανής αντίστοιχης περιοχής *blp* από το γονιδίωμα του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 με πειράματα PCR. Επειδή η περιοχή αυτή στο LMD9 είναι μεγάλη, άνω των 13 kb και κατά συνέπεια είναι αδύνατον να ενισχυθεί ολόκληρη σε μία αντίδραση, σχεδιάστηκαν εκκινητές που να περιλαμβάνουν τις λειτουργικές υποπεριοχές του πιθανού *blp*, δηλαδή τις *blpABC*, *blpHR*, *blpABCHR*, *blpDUEF* (με τα ενδιάμεσα αναγνωστικά πλαίσια), και *blpGQX* (με τα ενδιάμεσα αναγνωστικά πλαίσια). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση συντηρημένες περιοχές των τριών γονιδιωματικών αλληλουχιών που περικλείουν κάθε λειτουργική υποπεριοχή. Αυτές οι συντηρημένες περιοχές εδράζονταν, όπως είναι αναμενόμενο, σε αναγνωστικά πλαίσια.



Εικόνα 4.5 Ενισχυμένες περιοχές του γονιδιώματος του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 συγκριτικά με την αντίστοιχη περιοχή του LMD-9

Αποτελέσματα

Το γονιδιωματικό DNA του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 απομονώθηκε από υγρή καλλιέργεια του οργανισμού σε θρεπτικό μέσο M17 με την χρήση των 2 μεθόδων που αναφέρονται στην Ενότητα Υλικά και μέθοδοι (§3.8.1 και §3.8.2) και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για αντιδράσεις PCR.

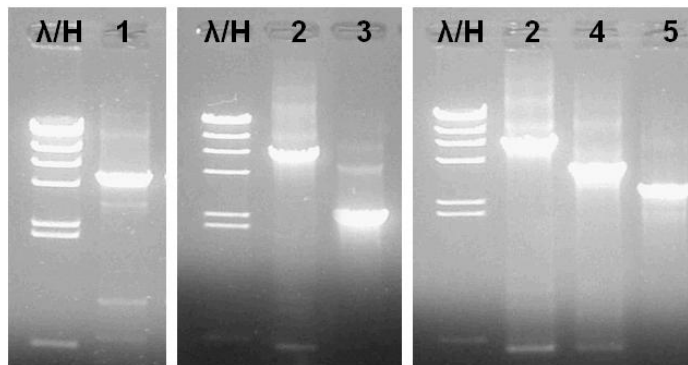


Εικόνα 4.6 Γονιδιωματικό DNA από *S. thermophilus* ACA-DC 0040 σε πήγμα αγαρόζης 1%. λ/H: λ-*Hind*III. Διαδρομή 1: 5 μl με μέθοδο Flamm et al., 1984 με τροποποιήσεις. Διαδρομή 2: 5 μl με χρήση πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin Tissue. Με την πρώτη κατά σειρά μέθοδο που παρουσιάζεται αποκαλύπτονται και ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους οι οποίες αντιστοιχούν πιθανότατα σε πλασμιδιακό DNA. Ο εντοπισμός του διερευνήθηκε περαιτέρω, όπως περιγράφεται σε επόμενη ενότητα της παρούσας διατριβής

Η ενίσχυση των περιοχών 1-5 όπως φαίνονται στην εικόνα 4.5 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πειράματα PCR που περιγράφονται στην ενότητα 3.12. Η αλληλουχία των εκκινητών παρατίθεται στον πίνακα 3.4 (Υλικά & Μέθοδοι). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.7 και στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 Περιοχές ενίσχυσης γονιδιωματικού DNA από *S. thermophilus* ACA-DC 0040

	Αντιστοιχία στο LMD9	Εκκινητές	Αναμενόμενο μέγεθος στο LMD-9 (bp)	Πειραματικό μέγεθος (bp)
Περιοχή 1	<i>blpDUEF</i>	BLP1F BLP1R	4688	5031
Περιοχή 2	<i>blpABCHR</i>	BLP2L BLP2R	6961	6214
Περιοχή 3	<i>blpGQX</i>	BLP3L BLP3R	2397	2398
Περιοχή 4	<i>blpCHR</i>	BLP2L BLPCR	3534	2787
Περιοχή 5	<i>blpABC</i>	BLPCL BLP2R	3840	3840

**Εικόνα 4.7** Αποτελέσματα ενίσχυσης γονιδιωματικού DNA από *S. thermophilus* ACA-DC 0040 σε πήγμα αγαρόζης 1%. λ/Η: λ-*Hind*III. Διαδρομή 1: 5 μl προϊόντος ενίσχυσης περιοχής 1. Διαδρομή 2: 5 μl προϊόντος ενίσχυσης περιοχής 2. Διαδρομή 3: 5 μl προϊόντος ενίσχυσης περιοχής 2. Διαδρομή 4: 5 μl προϊόντος ενίσχυσης περιοχής 4. Διαδρομή 5: 5 μl προϊόντος ενίσχυσης περιοχής 5.

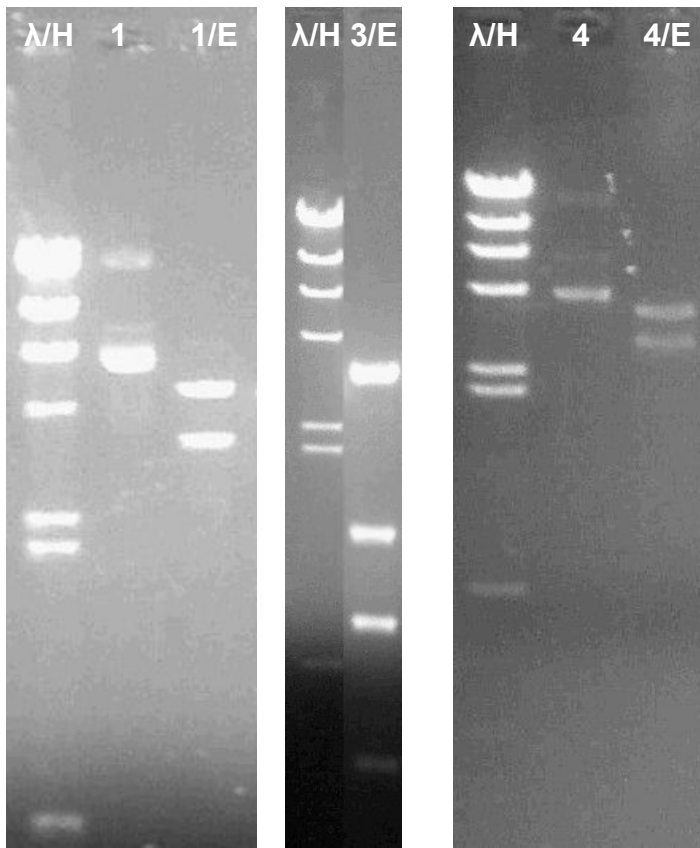
Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης καθίσταται εμφανές ότι ελήφθησαν προϊόντα ενίσχυσης σε όλες τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν. Από τον πίνακα 4.2 φαίνεται ότι οι περιοχές 3 και 5 παρουσιάζουν ίδιο μέγεθος με αυτό του LMD9, ενώ η περιοχές 1, 2 και 4 αποκλίνουν. Το αποτέλεσμα αυτό είναι βεβαίως σχετικό, εφόσον η αλληλουχία του ACADC0040 δεν είναι γνωστή και πιθανότατα υπάρχουν διαφοροποιήσεις ως προς αυτή του LMD9.

Αποτελέσματα

Τα πέντε προϊόντα ενίσχυσης απομονώθηκαν από το πήγμα αγαρόζης, καθαρίστηκαν σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην §3.13 και κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt όπως περιγράφεται στην §3.16.2. Τα προϊόντα ενίσχυσης διαθέτουν απότομα άκρα ως αποτέλεσμα της πολυμεράσης Phusion High-Fidelity που χρησιμοποιήθηκε και είναι συμβατά με το πλασμίδιο pCR-Blunt το οποίο παρέχεται ευθύγραμμο επίσης με απότομα άκρα. Ο σκοπός της κλωνοποίησης αυτής ήταν να ταυτοποιηθεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία στα άκρα κάθε ένθεσης και να διαπιστωθεί αν πρόκειται για αλληλουχίες που ομοιάζουν με αυτές της περιοχής *blp* του LMD9.

Τα προϊόντα της δεσμοποίησης καθαρίστηκαν ξανά όπως παραπάνω και χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* DH5a με 2 μεθόδους, τον μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση (§3.17.1) και μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (§3.17.3).

Οι καλλιέργειες επιστρώθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο L.B. που περιείχε καναμυκίνη. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία ανακαλλιεργήθηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου L.B. με καναμυκίνη και χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη, ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη της ένθεσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 4.8.



Εικόνα 4.8 Πέψεις πλασμιδιακού DNA κλώνων των ενισχυμένων περιοχών σε πήγμα αγαρόζης 1%. λ/H: λ-*Hind*III. Διαδρομή 1: πλασμιδιακό DNA κλώνου περιοχής 1. Διαδρομή 1/E: πλασμιδιακό DNA κλώνου περιοχής 1 μετά από πέψη με *Eco*RI. Διαδρομή 3/E: πλασμιδιακό DNA κλώνου περιοχής 3 μετά από πέψη με *Eco*RI. Διαδρομή 4: πλασμιδιακό DNA κλώνου περιοχής 4. Διαδρομή 4/E: πλασμιδιακό DNA κλώνου περιοχής 4 μετά από πέψη με *Eco*RI. Οι περιοχές 2 και 5 δεν κλωνοποιήθηκαν σε βακτηριακές αποικίες.

Οι κλώνοι στους οποίους διαπιστώθηκε ότι έχουν ενσωματώσει μία από τις περιοχές 1, 3 ή 4 (εικόνα 4.5) τουλάχιστον ως προς το μέγεθος υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των άκρων τους (πραγματοποιήθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο). Οι αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν στα άκρα κάθε κλωνοποιημένης ένθεσης παρουσίαζαν πολύ μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες του *blp* του LMD9. Κατά συνέπεια, υπήρξε ένας πρώτος εντοπισμός στο ACADC0040 περιοχής ανάλογης προς την *blp* του LMD9.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μελέτη αυτής της περιοχής, κρίθηκε αναγκαία η εύρεση ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν επιπλέον εκκινητές με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του LMD-9 με σκοπό να προκύψουν προϊόντα PCR μικρότερου μεγέθους, ώστε να συμπληρωθούν οι περιοχές που δεν είχαν διαβαστεί. Όπου κρίθηκε απαραίτητο, σχεδιάστηκαν εκκινητές επί της ήδη διαβασμένης αλληλουχίας, ώστε να ολοκληρωθεί ο προσδιορισμός της διαδοχικά (primer walking).

Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας της περιοχής *blr* στο ACA-DC 0040 χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα PCR από 14 αντιδράσεις τα οποία κλωνοποιήθηκαν στους πλασμιδιακούς φορείς pCRBlunt και pUC18. Όπου χρησιμοποιήθηκε ως πλασμιδιακός φορέας το pCR-Blunt, οι κλωνοποιήσεις και η ανίχνευση των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως για τις περιοχές 1, 3 και 4. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pUC18, απομονώθηκε από καλλιέργεια *E. coli* DH5a σε μικρή κλίμακα (§3.5.1) και υπέστη πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Sma*I (§3.14). Το ένζυμο αυτό δημιουργεί απότομα άκρα στο ευθύγραμμο πλασμιδιακό DNA. Έτσι εξασφαλίζεται η δεσμοποίηση με το προϊόν της PCR το οποίο διαθέτει και αυτό απότομα άκρα ως αποτέλεσμα της πολυμεράσης Phusion HiFi που χρησιμοποιήθηκε. Η αντίδραση δεσμοποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την §3.16 και ο μετασχηματισμός σε *E. coli* DH5a με 2 μεθόδους, τον μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση (§3.17.1) και μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (§3.17.3) ενώ η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό L.B. με την προσθήκη αμπικιλίνης και X-gal. Οι λευκές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία ανακαλλιεργήθηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου L.B. με αμπικιλίνη και χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη, ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη της ένθεσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 4.9.



Εικόνα 4.9 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA κλώνων σε φορέα pUC18. λ/H: λ/*Hind*III. 0X: πλασμιδιακό DNA κλώνου 0X1 αντίδρασης PCR0X. 0X/EP: πλασμιδιακό DNA κλώνου 0X1 αντίδρασης PCR0X μετά από πέψη με *Eco*RI και *Pst*I. 0A: πλασμιδιακό DNA κλώνου 0A1 αντίδρασης PCR0A. 0A/EP: πλασμιδιακό DNA κλώνου 0A1 αντίδρασης PCR0A μετά από πέψη με *Eco*RI και *Pst*I.

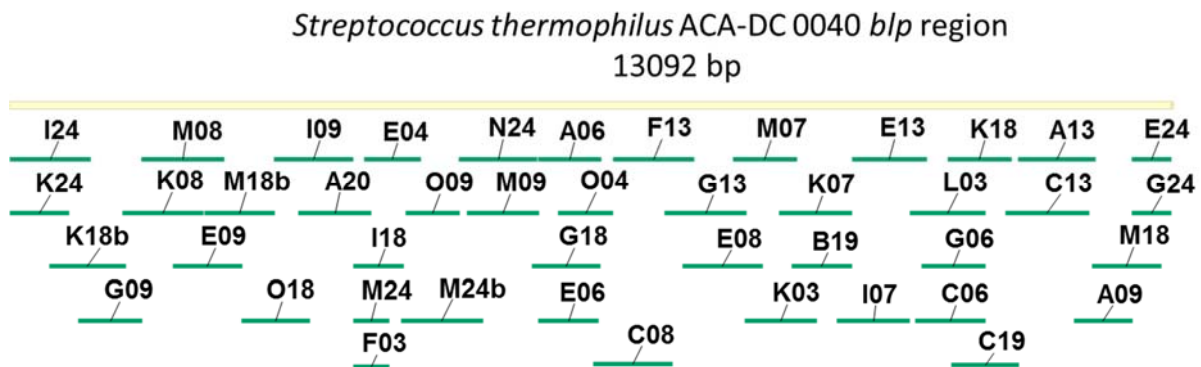
Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα PCR από 14 αντιδράσεις ενίσχυσης για την κατασκευή ισάριθμων κλώνων. Από αυτούς 26 παράγωγα χρησιμοποιήθηκαν σε 44 πειράματα εύρεσης αλληλουχίας. Τα στοιχεία αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 4.3

Πίνακας 4.3 Αποτελέσματα εύρεσης αλληλουχίας της περιοχής *blp* του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040, οι βακτηριακοί κλώνοι και οι αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης από τις οποίες προέκυψαν

A/A	Προϊόν PCR	Ζεύγος εκκινήτων	MB (bp)	Φορέας	Παράγωγοι κλώνοι	Αριθμός πειράματος sequencing Μήκος διαβάσματος Θέση στην αλληλουχία
1	PCR1	BLP1F BLP1R	5031	pCR-Blunt	1.6	C06, 793 bp, 2096-2888 A06, 707 bp, 6421-7127
					1.6.1	I07, 825 bp, 2941-3765
					1.6.2	K07, 817 bp, 3595-4411
					1.6.3	M07, 724 bp, 4218-4941
					1.6.4	O04, 617 bp, 6289-6905
					1.8	G06, 722 bp, 2096-2817 B19, 683 bp, 3594-4276 E06, 677 bp, 6451-7127
2	PCR3	BLP3L BLP3R	2398	pCR-Blunt	3.3	C19, 768 bp, 1714-2481
					3.4	M18, 775 bp, 114-888 K18, 714 bp, 1798-2511
					3.4.1	A09, 659 bp, 439-1097
3	PCRC	BLPCL BLPCR	413	pCR-Blunt	C1	M24, 413 bp, 8806-9218 F03, 413 bp, 8806-9218
4	PCR1A	PCR1AL PCR1AR	1942	pUC18	1A1	E08, 909 bp, 4598-5506 G13, 925 bp, 4786-5710 F13, 926 bp, 5368-6293 C08, 896 bp, 5615-5610
5	PCR1B	PCR1BL PCR1BR	1439	pUC18	1B1	E13, 840 bp, 2754-3593
6	PCR3A	PCR3AL PCR3AR	1042	pUC18	3A1	A13, 878 bp, 848-1725 C13, 933 bp, 928-1860
7	PCRA	BLPAL BLP2R	2543	pCR-Blunt	A3	M18b, 791 bp, 10103-10893 K18b, 871 bp, 11775-12648
					A3.1	E09, 780 bp, 10468-11247
					A3.2	G09, 714 bp, 11775-12648
8	PCRAA	PCRAAL PCRAAR	1146	pUC18	AA1	M08, 934 bp, 10667-11602 K08, 903 bp, 10909-11811
9	PCRHRA	PCRHRAL PCRHRAR	1538	pCR-Blunt	HRA13	N24, 890 bp, 7138-8027 M24b, 916 bp, 7760-8675
10	PCRYPOK1	BLP1F IPOK1L	2712	pCR-Blunt	YPOK1.3	L03, 846 bp, 2096-2941 K03, 814 bp, 3993-4806
11	PCRB	BLPBL BLPBR	1463	pCR-Blunt	B1	A20, 821 bp, 9011-9831 O18, 764 bp, 9709-10472
					B6.1	I09, 896 bp, 9215-10110
12	PCRCHR	BLP2L BLPCR	2787	pCR-Blunt	CHR11	G18, 765 bp, 6435-7199 I18, 574 bp, 8645-9218 E04, 641 bp, 8457-9097
					CHR11.1	M09, 808 bp, 7123-7930
					CHR11.2	O09, 610 bp, 8022-8631
13	PCR0X	blp0XL blp0XR	880	pUC18	0X1	E24, 440 bp, 1-440 G24, 441 bp, 1-441
14	PCR0A	blp0AL blp0AR	1030	pUC18	0A1	I24, 921 bp, 12172-13092 K24, 675bp, 12418-13092

Οι 44 αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της αλληλουχίας της περιοχής *blp* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 καθώς και η θέση τους επί αυτής παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Από τη διασταύρωση αλληλουχιών κλώνων διαφορετικών αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης, όταν ήταν εφικτό, ή και διαφορετικών πειραμάτων εύρεσης αλληλουχίας των ίδιων κλώνων προκύπτει η αλληλουχία της περιοχής *blp* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 ώστε κάθε τμήμα της να έχει προέλθει από τουλάχιστον 2 διαφορετικές αντιδράσεις εύρεσης αλληλουχίας.



Εικόνα 4.10 Σχηματική απεικόνιση της κάλυψης των αποτελεσμάτων των πειραμάτων εύρεσης αλληλουχίας. Με κίτρινη γραμμή απεικονίζεται η προσδιορισμένη αλληλουχία της περιοχής *blp* του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0040 και με μπλε γραμμές οι αλληλουχίες των πειραμάτων εύρεσης αλληλουχίας σε στοίχιση με την προσδιορισμένη αλληλουχία.

Στη συνέχεια εμφανίζεται η αλληλουχία της περιοχής *blp* του στελέχους ACA-DC 0040 όπως προέκυψε από τα παραπάνω δεδομένα.

***Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 *blp* region**

```

1   Tctttatcgcaaaaaatcccataggatgagaactcccatgggattttttt 50
51  attgtgtgaaaataaacaagatttgatcttcaatttttacgattcatttt 100
101 gatgttattttaacaaatgatatagccaagacagtggacaacaacacaaaga 150
151 tatgccagtaaaaaataaagcataaagctgtcagatttagtcaacatataa 200
201 aaaagaaaaattccaacaaataaaatggaaagccagagtgcttcttaac 250
251 gaataaaaagtattgatgccatatctctttatcactcaaagtgacttttag 300
301 attttttgccataggacaagatgcatcagaacctctgctatactgctaagt 350
351 actgttaaaaccagaatcttactaagaggaattcctaaaaagaatcccat 400
401 aactcaataagcaattgggacaaaacaatggccgtaagggcacgtagat 450
451 tttttgacataaaacttaaacctcacacttctctcaaacagaaagttttc 500
501 acaacgcctacaaagttaccaagcatagataagcacttacagcctcgct 550
551 atttttataggcgtgtctatcataaactgacattctaacctcgttcactt 600
601 tgtttaatgattttaagcactctagggtgtcagaaaagctagtaaaacaat 650
651 atccaaaacaatcacaacaataatgattagggcgcattcggcacctctca 700
701 ccgtcagcaaacgataaacaccagttaaaataatagccaaatgtgccaaag 750
751 cccataccagcgtaaatgtgttaggagtaaaactgtcgttcccagtgga 800
801 cgattgttcagctctcgtccgatgaacactggtaggttaggtcagacacag 850
851 taaggaaaccaaaccagggttaactaaaataagaaggaagaaccattat 900
901 ataataattctaaccaatattgccatctatcaaaccttaggcaacaacc 950
951 atgagttgtaataaaagtaactttcctgaacgaagtcggttaagataagg 1000
1001 catcgcactcaccttttatcacaatcacttgtccgcttgtcataatcata 1050
1051 actaggacttaaggttcttctctgctcctcaacagattggaaaagaacc 1100
1101 tttttgctccatcttccttttctcaatggacaactcaaccttaaaacca 1150
1151 agaaatcctccctaatgacatcaatagccataacgaatcgctagcaattt 1200
1201 tcgcaactctgccattcgctcctcgatacaggagacaaggttagctgggt 1250
1251 cttttctgaccactttggatatttccagtgacatcctgcttaagatatag 1300
1301 ggagtggtgaacgagagctgcaagttccggtcggtaggagtgaggac 1350
1351 ctgcttcaaatcagcataatctggcttatctccaatagtttcaattacct 1400
1401 catcgatgatagctactgctgttattgtctctctttgcctcctgcaaac 1450
1451 catttaagtcctttcattaagaaaacctccttatttctttcaactaattt 1500
1501 ttcaatcacatcttttagtatagcacactgatagtcatttaaaagccagcg 1550
1551 tcacaaaaagtggttatacgtcctgaatgggtcattcatatacaaaaatgaa 1600
1601 aaaaattgaggagatactcaatcttttaacctatttaataataatctc 1650
1651 agtgctaacaatgagtgaaagctaagattgctaattgccccacaaaagagac 1700
1701 aagtgattgctcacgctcatttgttttagggaattcttttgtgtctgcta 1750
1751 ctttatcagtcattgggtgccatttgcctggttgagcgttcagttccttc 1800
1801 tgaaccggtgacatcggctgtgggtgaacagttggcaagatttctcttt 1850
1851 cgtactctctcgggttactcgtgtaggacgaacagttttagtttgaggtt 1900
1901 cagagatgggtgtttgttctgattcaaagtcataaaacgtggactagag 1950
1951 ctggctaaatgggtcataaactgtttgagcaggtccaccaccaaccatcc 2000
2001 tgataatagctgaccattttccagataaaaatagtgtaggtgtacctggaa 2050
2051 taccaatctcaccaaacacatagtttccggtcaaaatcctcacgatctata 2100
2101 tcgtaataactctaaacgaccatccatcagttgggttcaagaccttcaactc 2150
2151 tgggtgaaaattgacgacaatagtaaacaggttccacgtccaaaataaatcg 2200

```

2201 tatgtgcctgaccatcctcggtaaaggcattacgcacatcatctaaactt 2250
 2251 attttaggtaaataagcaacattagcgtcgtattcctcacgagatactgc 2300
 2301 tgggatatcatttgcagtcctcctcagactcagccaaggttactgatt 2350
 2351 cagtcgctgctggcctctttatcttcaggaagcactgctcctgacta 2400
 2401 tctgatggttggttctactggagtagattcggttgcttcaacctttggaga 2450
 2451 attatcagctcccgtttctaccacctcatccgctaaagcagttcctaccg 2500
 2501 atagattcagtaacaaggctgaactcatcagccatagcgttaatgtcctt 2550
 2551 tttttcatcataaactcctttcgattacttagtctagtttaacaatttac 2600
 2601 aactctcatagaagctaactcctcaaaaagtgactatacgtcccgaatgg 2650
 2651 taagaatataaaaaatcccactatcaccatgatatactccccttatagtg 2700
 2701 gacagtgaaaaaataaaaaattttactagaaaactataaggggagtcttat 2750
 2751 tatgtccaaaagaagtccaaaatctgtatctgagaaaactagaaattgttc 2800
 2801 tgcttcacttggaagaaggtaaatcacttagttggttaactagaaaccaa 2850
 2851 ggtatctctaaagacaccctatcgaactgggttcggaagtacaaagaagc 2900
 2901 tgggtgtgatgggctagaggaaagccgtcaatggaagaagtatagtaagg 2950
 2951 aactaaaggaacaagctgtttccgactatcttaatggcttgggaagtctc 3000
 3001 aaagatctgacaaaaaatatggaatttctgacccttatgttctcagatc 3050
 3051 atggataaaaagttatactagtggtaaagaactgaaagctactagtaaag 3100
 3101 gaatgagacgcatgaagcaaggacgcaagacaacatttgaagaatgaatt 3150
 3151 gagattgtcaattttacccttgcccacgagaaagattaccaaggggctgt 3200
 3201 tgagaagtatgggtgtttcctaccagcagatctattcttgggtcagaaagt 3250
 3251 tcgagaaggacggttctaacggtctcctagatcgtcgtggaaaaggctt 3300
 3301 acaagtaaaccaaaccttactccagaagaagagttacgcctcaaaatcaa 3350
 3351 gcaacaggaagagcggatataagtatcttgaaatggagaacggcctgctaa 3400
 3401 aaaagttagaagaaatcaaacgcgaaaccgcggttaagacttggtcggc 3450
 3451 acttggaaaccttccaagcgattaaagaatatgcggatgagtatgaagag 3500
 3501 gtttttatcagccacttgtgccatattctaaaggatctcgcctcaggcta 3550
 3551 ttacaagtgggttacaacatcaagaacaacttctgaacaggaaaatttag 3600
 3601 gcttgatggatatcatcaagaaacttcatagccagcataatggattctt 3650
 3651 ggttatcgtcgtatgacgctatttgtcaatcgcaagcttgaacaaaacta 3700
 3701 caacaagaagcggattcgcagccttgatgcacattctaggtctacgttcca 3750
 3751 ttatcagaagagccaagggctattgtactaaaactagcttttgtcaatgta 3800
 3801 gaggacaacattctcaatcgtaattttacagccactgctccaaatcagaa 3850
 3851 atgggtgtacagatgtgactttcttgaagtaagggtttcagctgtaaagcct 3900
 3901 atttgagtgtatattaaggatctttacgcagcgtcaattgtcgcctatgta 3950
 3951 gttgggtcaatttaataatgataacgaattgggtattggaaacacttcgtaaagc 4000
 4001 acaaaaagctaatacctaatacgcgacaccattaattcacagcgaccgagggt 4050
 4051 cgcagtatacttcgaaagattattaccgtttaactaccagtatcagatg 4100
 4101 acccgctccatgtctcgtgttggtaagtgtattgacaatgcaccaattga 4150
 4151 gagtttctttgggcactttaagacggagtgtatgatttgaagaagtata 4200
 4201 agacttttgaggagctagtttcagatattgatgcctacatctatttttac 4250
 4251 aatcatcaacgttttcaagagcgcaataacggccttgccccctctgaaat 4300
 4301 gaggaacaaggccgctcgcctaataattttattatttcatgtccacttgac 4350
 4351 agggagctgttcagtatatgttcaagattattttttatgtttatttttat 4400
 4401 tgaccttttgaaaaagatattacctaacaagcaacaacaaaacctata 4450
 4451 ataaaatataccatagattagctccaccagcaggttgctccataggcaac 4500
 4501 agtaccacctgcaccacctagaacaccaccagctagataaccaggaactg 4550
 4551 agcctacaactggtaaaaactacattacctccaaacgctcctccgatagct 4600
 4601 cctccgatagctccttgaacagtcgctccacctgtgctctctccaactaca 4650
 4651 tccacctccttcaacactagcaagtggtttcgagggtcaaggggtgtaaagt 4700

Αποτελέσματα

4701 tttcaattgtttgagttgccatggtaactacctcctaaaatTTTTatcgt 4750
4751 gtgatctctcaatcacatctttagtatagcattcaagtgtctctatcaga 4800
4801 gctagcgtcccaaaaagtggctatatgtcccgaatggtaattcctaaaga 4850
4851 acatccttcaatcattggaaatcttcctctaattttcacatatttactta 4900
4901 atcactttcttattataacactttttagcaaatatcttatagattgctta 4950
4951 cagaataatcaagcaaatgcgtttattgtttaaaataTTTTtgacttga 5000
5001 aggtaagatagaaaatcacagaggattaacaaaagcattaatacggctag 5050
5051 tactatacggctctgtggtatcactgaatgttagtaatgtgtaaaaactcta 5100
5101 cactaagcactagaaatgtgatgacaggaaagacaatgaaggactgccgt 5150
5151 attgttaacagatttactgaatctggacgcttcttaagcatacggtagag 5200
5201 cagtcattaacaaaaatgactacgaaagctagtgtccgactgctagcc 5250
5251 aagttcctggcgagatcttgctttttagagagaaaaggctgatacttata 5300
5301 aggaaaactgccaacgcagcagtgatggttctaaaagatcgcaatacact 5350
5351 cgaactaatattctttaacttcatgataaaacacctaactatgaataac 5400
5401 ctcagtcagtcctgcaaacctaataagctattacatttaactctattcct 5450
5451 ctctgtattttattatacagctgtaagatttcaagtaagcccttagcgat 5500
5501 taaattctactggagatgtaatacagtagtgcattagtagtactgatacttt 5550
5551 aatagcgcactatacatatcttgttttctctattacaagatatgcaa 5600
5601 tcaaatataataatctccgctatcattagcaagaataattttacttcg 5650
5651 ggaacatcaaaaataagcatttgcaagcatcttacgttcaaagtgaccaa 5700
5701 aggttacttttgaaactgtaccactttttaaagtaagctataaaagaa 5750
5751 gcaccgttagccctagcaagttaatggatgggtgaactgcatccaagctt 5800
5801 ctaaatagattagcagggcccattacgatgagaatggtagccagtaata 5850
5851 cggttttgagtttttaaacatacttttctccttaaagtgttttagctag 5900
5901 tctgtgcataatctatgaattttattatagattggaagccgataaaaaag 5950
5951 tagtgacataaatgtcactacttgtctgaccttatatccttgataaccgt 6000
6001 acacataagaaagagaaaataaacataaccgataagatttaggcattgaa 6050
6051 gtccaaaattcagtttttctcaaagttatgtaaggcaacaaggacgaag 6100
6101 cccatagacatcattagagacactaggcgttttttggatcatgattacaaa 6150
6151 tacctcttctcttatatcgaaattttcaatcataattcacatgctattca 6200
6201 cagaccagcaattgacaagacatttcagttaggatttcttcttaacggaa 6250
6251 ttggtagccttggtgtttttcaagaaatgacataattggcttatctaaaaa 6300
6301 actcataacagccatggaaacctccctaaaatataacttttcaaatcaa 6350
6351 acataatccatcaccaccagcatgttgctccataaccaacaccacctagc 6400
6401 atagcacctccagctgctcctgacagcaccttgccaagtacgtgtttt 6450
6451 gatacctagtcgtaaacattaccaactcctgtagctactccttgtttag 6500
6501 caaacctcccagctacatccaccaccttcaacactagcaagtgtttcg 6550
6551 aggtcaaggggtgttaaagttttcaattgtttgagttgccatggcaactac 6600
6601 ctctaaaatTTTTatcgtgtgatctctcaatcacatctttagtatagca 6650
6651 ttcaagtgtctctatcagagctagcgtcccaaaaagtggctatatgtccc 6700
6701 gaatggtaattcctaattgtatattttctaaaattcagaaaaaaaaaaaa 6750
6751 atctcattttatactcataaaaaattgaaaaaccgttttctttatgttac 6800
6801 aatTTTTcaataaacagtatctcgtcataaaagagaggactagacctgaa 6850
6851 gatttacctattagaagataattctattcagatgggtcgcttggaagagg 6900
6901 ctgtggcacatgaacttaaactcttcgaaaagatctatcttgtgtccag 6950
6951 tcttttgacaaacctgaccagttgttatcagctatcacttctaatacaag 7000
7001 cgatcagatTTTcttcttgatattgaaattaaaggtgaagataagaagg 7050
7051 gacttgatatcgctaaaatcacacgtcaaaataacccttatgctatcatt 7100
7101 gcctttgtcactacacatatagagttcatgcctcaagcttttggcgttac 7150
7151 agcctataaatacatcaataaaaccttagatgaagctagcttttagaaaag 7200

7201 aaataggggaaaccattgctcaagtcttcctattaacgcaactaccacg 7250
7251 gatgagtttttctctacaaaacagagtctcaattaataaaccttcctat 7300
7301 ggatcaaattctatacctatccacatcagatatcaaacaccatggttcacc 7350
7351 tccagactatccataccctcatggatatccgagcaaactctggcagacttt 7400
7401 aaaaagatacacaaaaagctctaccatgccatcggctcctttatcgtcaa 7450
7451 tacagatatgatcatctctgtcaacaagaccaattatgaagctaccttaa 7500
7501 ttaatgggtcaagttctaccagatcccgtatgaagataggaaagattgca 7550
7551 cagattggtgaggaaagaggcagatgatgtaacaacgttatggctactt 7600
7601 tttctcacccttttaagtgcaggcctagaaaattattcttttcctttattt 7650
7651 aatgggacagaagattcgtctgaggtatttttcctactccttattttta 7700
7701 atttagcctttaattttatttataaccactcttcttggtttatcattaaa 7750
7751 ttctggggtgaggatatctactatcttctgctctccttccttttatccac 7800
7801 taagactaaaaaacattaaaaataaagattttcaatgggtctctccctg 7850
7851 atatcctcaacaaccttagtttaagactgattactttttttatctttcct 7900
7901 ttttttaatatattagtatcaccgattataaaaagctctctattaatatccat 7950
7951 cccttcatctatcgcacctcttgtctatcatttctctttattaaattat 8000
8001 tcaaggagagttttaccatacttcaaagcagaaatcaaattctccgatt 8050
8051 caacatattattatagttgctaacttttttatgttgggtacaccctact 8100
8101 gttacagtcacctcatgtatcttgaaaacactactcactcttcaactttgg 8150
8151 agcttcgaaaactctgtgtgttattttcacttgcctcttcttcattatg 8200
8201 attgtctttttagaaagaacattcgtgaaatgattcaaggacaattgga 8250
8251 cttccagaaaaatctccagctagagaatctctacacctacaataaacata 8300
8301 ttgaatgtctctacaattctgttcgtagttttagacacgattatagtaat 8350
8351 ctcttagtcacattacgattggggatagataaagacgatatggatattgt 8400
8401 caaagaagtctatgatagtggtcctcaagaatccgataaacgattaaata 8450
8451 caagaaactttgacttagctagactcgttaatatcaggataaactttg 8500
8501 aaaagccttctgtccgcaaaagttttacaagcagaagaagaaggattga 8550
8551 agctcagattagcatcccagaaccctcacttgattgggatggagattc 8600
8601 tggacttcattatcgtcacttctattttttagataacgctattgaagggt 8650
8651 gccattcaaactcaaaccataaaattactattagcttttgggaagatca 8700
8701 tcgttcacagctattatctatttagcaataaccataagtgaagaacaaacag 8750
8751 aaactaaaaccatatttgaaagagggtgtctccaacaagggacgagagcga 8800
8801 ggcattggccttgctaattgtcacagaaatcttagataactatatcaatgt 8850
8851 aaacttagaaacacagagtaacaatttctcattcacacaacaattaacia 8900
8901 taactaaaaaggcctaacagcctttttctatacctaaacttgaggaatg 8950
8951 ttatagtcttttgttggaagcgttctttgcccctccgaatccttttaggaa 9000
9001 accatttatataatccatccaccacttccacctacgacttgttcaagag 9050
9051 cgtggttatcaagtggttcaaagttattaatcgtattggttagccatcagt 9100
9101 aattctcctcctattgggtcttgcaagtttagtaacttgtctttaaagtaa 9150
9151 ttgaagtaggtcttttgggtcaataacgcttctcacacgaccttctagacc 9200
9201 gtaacgtagattttgggcttcttttctgaaataacttgccctagcagtta 9250
9251 ctctaaacacattcccccttctgtttccgtggcagaattatcaatactc 9300
9301 tcaagttttccaataattgtgggtaccgtgattaccaaccttatccaagggt 9350
9351 cagtcgaactgactggccttttgcagttttggcacataatccgaattca 9400
9401 cataataagtaaatggcaacttctgggtttgagtcatatcgggataaagc 9450
9451 tgggccaactcagttcctgtcgcagccatgggtgcttttttatcagcttg 9500
9501 actcaagtgtaagattccatcttctgggtgactggatgagggatttagtca 9550
9551 gaaggacatctgcctgattgattttactctcggtatcggtaatttgtggt 9600
9601 tccactgagctcaattgctgtcctgcattttgcaagaattgatttttttag 9650
9651 agcttcttttttagtgctatcactattgtcataagttacaactgtgcctg 9700

Αποτελέσματα

9701 tcccagcattttggatttctagattacctatggaagcattcaagctcгаа 9750
9751 atattggtattaacttgagataggtattggtctgttacactggcatccgg 9800
9801 tgtcgtagcatactgactggttataggcatttaagggtgcctgatgaggat 9850
9851 tgccttcaggtaaagtcgtttcatgattggtaatagcttgagagagcgcc 9900
9901 tcatactctgagacctgagtctgcaattgactaatctggttatcaatagc 9950
9951 agaaccgggtattactcgcaattgctgcttggttattaacctctgtatttg 10000
10001 ttttagccacacccaagtcaatatcctgtgcctgacttaggtagggtgtta 10050
10051 aaagtactctgataaccaaaactcgtcttctgttcttggaaaagattggg 10100
10101 tccttgogttaggctagattgcaaggcttcaaacctgattcctgtcttt 10150
10151 ttaaaagttctagttgcttttgaagccccctctttttgcgatgcctccatg 10200
10201 gtctctgaatactgaactaagggtgtccccttttttaacaaccttattagc 10250
10251 aaccagttgattatctatgatgggtattgtcactgggtgattggattactg 10300
10301 cgataaccttgggttggctctatacttctctagacgtgactgtaacttcc 10350
10351 ttcttagcaaaaaaagcgaaaaagaaaaaggaaaaataactaacaaaatcaa 10400
10401 gggagtaatacaaacagtagacatattgtggttagcgcgatggtaaaact 10450
10451 ctgtgcttttaacaactgtggattcatcgtgttctctttcctcacttt 10500
10501 ctaaataattgataatagaaacctggataagacatcaggctctgatgaga 10550
10551 acctgtctccactacgcgtccctgatcaatgactacgatacgggtcggctcc 10600
10601 gtcagcgcataactaagcctgtgtgctacaaagatgatcgttttatctttt 10650
10651 agtgctaggagggttatcaataacctgcttttctgtcaaagcatccaatcc 10700
10701 gctagttgcttcatctaagattagtacaggagatttcgtagtagtgac 10750
10751 gcgccaaagcgcatacgttgcttttgccctccagacagacctgctccatca 10800
10801 gacagctctgtctgaaaccccataggcatgttttcaatatcttgacgaat 10850
10851 ttctgctatttcacaagctttcaaaatatcagcttgcgtaataccccgtg 10900
10901 ctgcacctaaagtaagattttctaaaacactaccactaaatatataggat 10950
10951 tgctgagggagatagttaatatggtgacgaagagttttcttgtctatgcg 11000
11001 actaatattttgaccattaaaatctatgtgcccttatatgggttgataaa 11050
11051 aattgaccaacattttagctagagtagtcttaccagatccactgacacca 11100
11101 acaaaactgattttttctccttgtctaatacgtcaaactgacatcagtcaa 11150
11151 agtatcacgaccaaaccatattttataagataaatccgtaacagtgatat 11200
11201 ctccatccgcaatgccttcttgataggatcatcacttgtccaaactct 11250
11251 gattcaatcagatagacctcattgagcctagtagtagctaccttagcaga 11300
11301 ctgtaacttgggttgcaggtaaatgatattttccaaaggattcgtgaagt 11350
11351 aggaaagcaacatattaaaagtaatacattgtcctatcgaaatgggtattt 11400
11401 cccatcaccaactgagcacctgtccagaggataagtacatttaaaataag 11450
11451 ttgagcaccttgtttcaatgatgtttgtagtatagataacttagaaaggc 11500
11501 gaaaagaattgtctagatagtcacaaactcaccatcaatcttttgatag 11550
11551 catacttcttcgctgggttagtgactttatgggtttcaatccattaatgtc 11600
11601 ctcaatgatggctgaattaacctatagcattactctgcatgacgtcatgat 11650
11651 tcattcgctcaaaagggttcataaaggcaagacgataaggggtataaatt 11700
11701 ggaaccgaacaaagaactagcttgaagagattgctattttgatcaataa 11750
11751 cacgcctcctacgataatcacaatagagaaatcaaggaaaagtgataata 11800
11801 tcgtcgaagccagagcatcgataatagagttagcatcactaaaacgtgag 11850
11851 ataacctcccctgtacgtcttgtggcaaaaaagacattgggagttcaaa 11900
11901 gatatgtcgtatgtaggacaagataacgtcaatgggtcaatcgctgactca 11950
11951 gtatggttaagagataatctcttgcaaaagtcatttgttgtaaaaca 12000
12001 taggtcacaactaatccaattgagataattcctaaggtagacttcathtt 12050
12051 attagggacatattcgtctagaataccttgtaaataataggaacctaaaa 12100
12101 tattttataaagtaaccaagagactggcaagacaatattagctatcaag 12150
12151 gaccttggtttaagatcaaagggagaaagtcccagagtcatttttctt 12200

Αποτελέσματα

```

12201 atccttatgtgggtttataactgggttcgggtcccataaaaagagtaaacac 12250
12251 ctgtccactctttctcaaaacgctcttttagtcatttttagttacttttaca 12300
12301 cttggatcagggctctccaattatcagataatccttggtgctttttataaat 12350
12351 aacataataatggttgaagcttcccatctttattaacatgagcaataaaaag 12400
12401 gataaggaacatcttccatctcaagagcgcacatttcagcctttatagct 12450
12451 ctcgtttcaaagccaatttttttagcagcctctacaagacctaaggcagt 12500
12501 tgtcccttctttattgggtcttcgccaactcacgcagatgtgctaataat 12550
12551 aatctgaaccatagtagtacttggccactgatgcccaaggcagcaactccaca 12600
12601 tccctcatgtctatttgagggacaaaagtcctacgaaaacgaaacataacc 12650
12651 aaaccctttcatcacaattatcatatgattagtagtcatattttcagg 12700
12701 ataaaaagagccagcgtcccaaaaagttgccatacgtcccaaacggtaag 12750
12751 aaaaatcttaaagtcactctccactattaccatttaagccgtatttgggggt 12800
12801 catttaggacaagttcattgaaatcgatttcaaagttatacaaatagttat 12850
12851 tagaaggaaacattctaaaatagtcctacaagcatacgtatttgatctaa 12900
12901 ccattattactgtgccagccctggatatttccaaaggaaaccatgactgct 12950
12951 gatagcctcggagcctatctctatcgatgatgtcataatttgattattt 13000
13001 ttattccgaaaaggataaacattatgaaaaacgtcaatccatatctcaaa 13050
13051 aaatcctatcaaaaaggctaaatcagcctcttgagattcga 13100

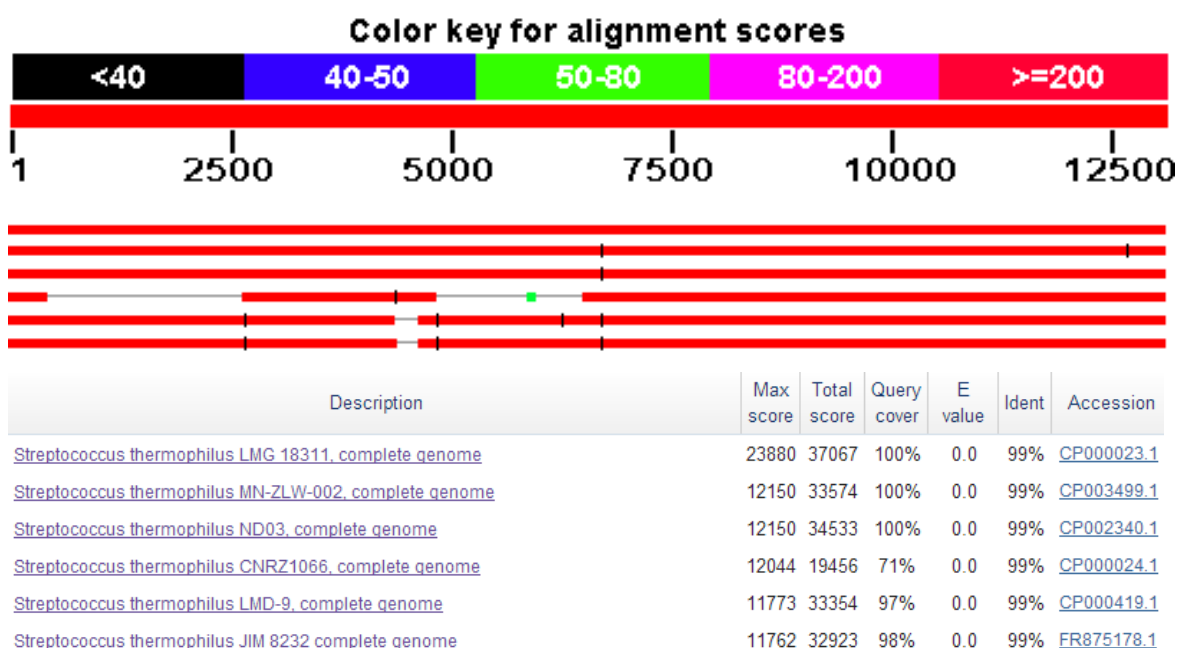
```

Για μεγαλύτερη ευκολία η αλληλουχία της περιοχής θα παρουσιάζεται στις εικόνες αντίστροφα σε σχέση με την αλληλουχία όπως καταγράφηκε.

4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση της περιοχής *blp* του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0040

Η αλληλουχία της περιοχής *blp*, όπως προσδιορίστηκε από τα πειράματα υποκλωνοποίησης, αποτελείται από 13092 ζεύγη νουκλεοτιδίων, με ποσοστό GC 37,62%.

Η ομοιότητα της περιοχής με την αντίστοιχη του στελέχους LMG 18311 αγγίζει το ποσοστό 99% στο 100% της αλληλουχίας, χωρίς όμως να εμφανίζει την μη νοηματική μεταλλαγή του γονιδίου *blpB* που οδηγεί το στέλεχος LMG 18311 στην μη παραγωγή βακτηριοσίνης. Η ομοιότητα με το στέλεχος CNRZ 1066 αγγίζει το 99% στο 71% της αλληλουχίας του και με το LMD9 το 99% στο 97% της αλληλουχίας του. Μεγάλη ομοιότητά εμφανίζεται και με τα στελέχη MN-ZLW-002 (Kang et al., 2012) με 99% στο 100% της αλληλουχίας του, ND03 (Sun et al., 2010) επίσης με 99% στο 100% της αλληλουχίας του και JIM 8232 (Delorme et al., 2011) με 99% στο 98% της αλληλουχίας του. Εντούτοις, δεν υπάρχουν στοιχεία ως προς την παραγωγή βακτηριοσίνης σε αυτά τα στελέχη (εικόνα 4.11).

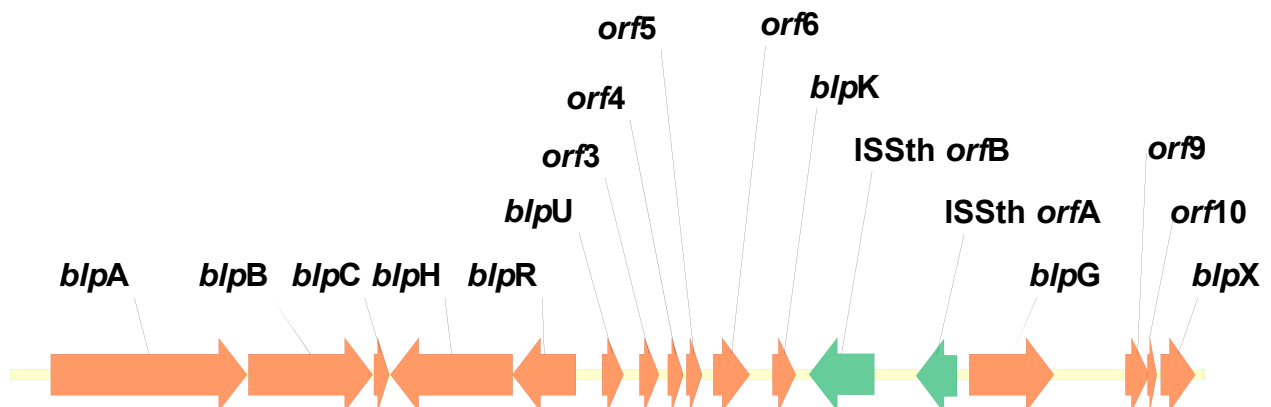


Εικόνα 4.11 Ομοιότητες της περιοχής *blp* του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0040 με άλλους οργανισμούς σε νουκλεοτιδικό επίπεδο σύμφωνα με την εφαρμογή στοίχισης nucleotide Blast την ημερομηνία 14/10/2013, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

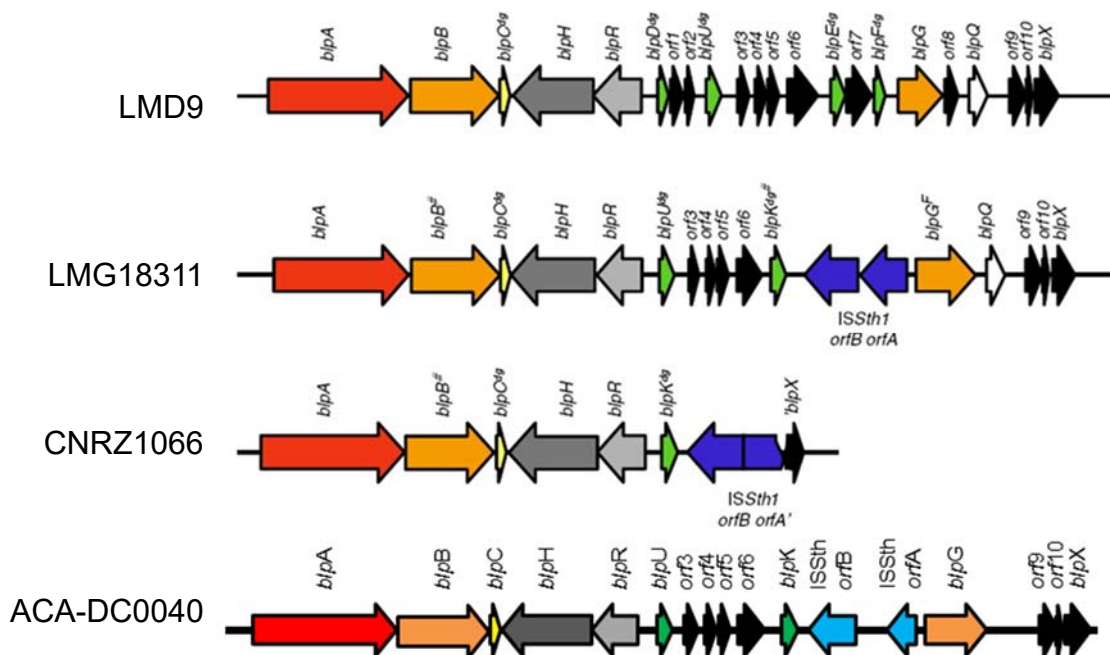
Με βάση αυτή την αλληλουχία, καθώς και τα στοιχεία για τις αντίστοιχες περιοχές *blp* των στελεχών *S. thermophilus* LMD9, LMG 18311 και CNRZ1066, η βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 αποκάλυψε την ύπαρξη 16 ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (Εικόνα 4.12), η οργάνωση των οποίων μοιάζει δομικά με αυτά και πλησιέστερα όλων με αυτή του LMG18311 (Εικόνα 4.13).

Στη συνέχεια παρατίθεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής *blp* του ACADC0040 μαζί με την αμινοξική αλληλουχία των αναγνωστικών πλαισίων, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά.

Η μεγάλη ομοιότητα των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης του στελέχους ACA-DC 0040 με αυτά του στελέχους LMD9 που έχει μελετηθεί ως προς την παραγωγή βακτηριοσίνης και την λειτουργία των γονιδίων της περιοχής *blp* (§1.12) οδηγεί στην υπόθεση ότι έχουν παρόμοιες προβλεπόμενες λειτουργίες.



Εικόνα 4.12 Οργάνωση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης στην περιοχή *blp* του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0040 και ονομασία σύμφωνα με τις ομοιότητες με τα γονίδια των στελεχών *S. thermophilus* LMD9, LMG 18311 και CNRZ 1066



Εικόνα 4.13 Στοιχισμός της εικόνας της οργάνωσης των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης της περιοχής *blp* του στελέχους ACA-DC 0040, με αυτήν των στελεχών LMD9, LMG18311 και CNRZ 1066. Γονίδια που κωδικοποιούν πεπτιδία με παρόμοιες προβλεπόμενες λειτουργίες εμφανίζονται με χρωματισμένα βέλη: ABC-transporter (κόκκινο), βοηθητική πρωτεΐνη μεταφοράς (πορτοκαλί), παράγοντας επαγωγής (κίτρινο), response regulator (γκρι), κινάση ιστιδίνης (σκούρο γκρι), πεπτιδίο bacteriocin-like (πράσινο), υδρόφοβα πεπτιδία άγνωστης λειτουργίας (μαύρο), υδρόφιλα πεπτιδία άγνωστης λειτουργίας (λευκό) και αλληλουχία ένθεσης (μπλε). Γονίδια που κωδικοποιούν πεπτιδία με εναρκτήρια περιοχή με την ομάδα Gly-Gly στα στελέχη LMD9, LMG 18311 και CNRZ 1066 εμφανίζονται με το σύμβολο dg. *blpB[#]* και *blpK[#]* συμβολίζει ότι αυτά τα γονίδια έχουν μη νοηματικές μεταλλάξεις οδηγώντας σε πρόωμη μετάφραση συγκριτικά με τα γονίδια *blpB* και *blpK*. *blpG^F* συμβολίζει την ένωση των *blpG* και *orf8* συγκριτικά με το LMD9.

Streptococcus thermophilus ACA-DC 0040 περιοχή blp

Παρακάτω παρουσιάζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής *blp* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 και η αμινοξική αλληλουχία των προβλεπόμενων ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης. Με κίτρινο χρώμα σημαδεύονται οι αλληλουχίες έναρξης και λήξης των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης. Με τα σύμβολα F1 - F6 αναγράφονται τα 6 πλαίσια ανάγνωσης.

Αριθμός πρόσβασης KU739420

```

1 tcgaatctcaagaggctgatttagcctttttgataggattttttgagatatggattgac 60
61 gtttttcataatggtatcccttttcggaataaaaaataatcaaattatgacatcatacgat 120
121 agagataggctccgaggctatcagcagtcagtggtttcctttggaaataccagggctggca 180
181 cagtaataatggttagatcaaatacgtatgcttgtaggactattttagaatgtttccttc 240
241 taataactattgtataactttgaaatcgatttcaatgaacttgtoctaaatgaccccaaa 300
301 tacggcctaaatggtaatagtgaggatgactttaagatttttcttaccgtttgggacgta 360
361 tggcaactttttgggacgctggctctttttatcctgaaaatgatgacataactaatcatatg 420

      V M K G F G M F R F R R T F V P Q I F2 blpA
421 ataatttgtgatgaaagggtttggtatgtttcgttttcgtaggacttttgtccctcaaat 480

      D M R D C G V A A L A S V A K Y Y G S D F2
481 agacatgagggattgtggagttgctgccttggcatcagtgcccaagtactatggttcaga 540

      Y S L A H L R E L A K T N K E G T T A L F2
541 ttattcattagcacatctgcgtgagttggcgaagaccaataaagaagggacaactgcctt 600

      G L V E A A K K I G F E T R A I K A E M F2
601 aggtctttagagggctgctaaaaaattggccttgaacgagagctataaaggctgaaat 660

      S L F E M E D V P Y P F I A H V N K D G F2
661 gtcgctctttgagatggaagatgttccttatccttttattgctcatgttaataaagatgg 720

      K L Q H Y Y V I Y K S T K D Y L I I G D F2
721 gaagcttcaacattattatgttatttataaaaagcaccaggattatctgataattggaga 780

      P D P S V K V T K M T K E R F E K E W T F2
781 ccctgatccaagtgtaaaagtaactaaaatgactaaagagcgttttgagaaagatggac 840

      G V T L F M G P E P S Y K P H K D K K N F2
841 aggtgttactctttttatgggaccggaaccagttataaaccacataaggataaagaaaa 900

      G L W D F L P L I F K Q R S L I A N I V F2
901 tggactctgggactttctccctttgatctttaaacaaggctccttgatagctaattattgt 960

      F A S L L V T L I N I L G S Y Y L Q G I F2
961 ctttgccagctctcttgggtactttaataaatattttagggtcctattatttacaaggat 1020

      L D E Y V P N Q M K S T L G I I S I G L F2
1021 tctagacgaatatgtccctaatcaaatgaagtctaccttaggaattatctcaattggatt 1080

      V V T Y V L Q Q M M T F A R D Y L L T I F2
1081 agttgtgacctatgttttacaacaaatgatgacttttgcaagagattatctcttaacct 1140

```

Αποτελέσματα

L S Q R L T I D V I L S Y I R H I F E L F2
1141 actgagtcagcgattgaccattgacggttatcttgctctacatacgacatatctttgaaact 1200

P M S F F A T R R T G E V I S R F S D A F2
1201 cccaatgtctttttttgccacaagacgtacaggggaggttatctcacggttttagtgatgc 1260

N S I I D A L A S T I L S L F L D F S I F2
1261 taactctattatcgatgctctggcttcgacgatattatcacttttcttgattttctctat 1320

V I I V G G V L L I Q N S N L F K L V L F2
1321 tgtgattatcgtaggagcgtgttattgatatacaaaatagcaatctcttcaagctagttct 1380

C S V P I Y T L I V F A F M K P F E R M F2
1381 ttgttcggttccaatttatacccttatcgtctttgcctttatgaaaccttttgagcgaat 1440

N H D V M Q S N A M V N S A I I E D I N F2
1441 gaatcatgacgtcatgcagagtaatgctatggttaattcagccatcattgaggacattaa 1500

G I E T I K S L T S E E V C Y Q K I D G F2
1501 tgggattgaaaccataaagtcactaaccagcgaagaagtatgctatcaaaagattgatgg 1560

E F V D Y L D N S F R L S K L S I L Q T F2
1561 tgagtttggtgactatctagacaattcttttcgcctttctaagttatctatactacaac 1620

S L K Q G A Q L I L N V L I L W T G A Q F2
1621 atcattgaaacaaggtgctcaacttatttttaaatgtacttatcctctggacaggtgctca 1680

L V M G N T I S I G Q L I T F N M L L S F2
1681 gtgggtgatgggaaataccatttcgataggacaattgattacttttaatatggtgctttc 1740

Y F T N P L E N I I N L Q T K L Q S A K F2
1741 ctacttcacgaatcctttggaaaatatcattaacctgcaaaccaagttacagtctgctaa 1800

V A N T R L N E V Y L I E S E F G Q S D F2
1801 ggtagctaatactaggctcaatgaggtctatctgattgaatcagagtttggaacaaagtga 1860

D T Y Q E G I A D G D I T V T D L S Y K F2
1861 tgatacctatcaagaaggcattgcggatggagatatcactggttacgatttatcttataa 1920

Y G F G R D T L T D V S L T I R Q G E K F2
1921 atatggttttggctgctgatactttgactgatgctcagtttgacgattagacaaggagaaa 1980

I S F V G V S G S G K T T L A K M L V N F2
1981 aatcagttttggtggtgctcagtgatctggtaagactactctagctaaaatggtggtcaa 2040

F Y Q P Y K G H I D F N G Q N I S R I D F2
2041 tttttatcaaccatataaggggcacatagatttttaatggtcaaaatattagtcgcataga 2100

K K T L R Q H I N Y L P Q Q S Y I F S G F2
2101 caagaaaactcttcgtcaacatattaactatctccctcagcaatcctatatatttagtgg 2160

S V L E N L T L G A A R G I T Q A D I L F2
2161 tagtgttttagaaaatcttacttttaggtgacgacaggggtattacgcaagctgatatttt 2220

K A C E I A E I R Q D I E N M P M G F Q F2
2221 gaaagcttgtaaatagcagaaattcgtcaagatattgaaaacatgcctatggggtttca 2280

T E L S D G A G L S G G Q K Q R I A L A F2
2281 gacagagctgtctgatggagcaggtctgtctggagggcaaaagcaacgtatcgctttggc 2340

Αποτελέσματα

```

R A L L T K S P V L I L D E A T S G L D F2
2341 gcgtgcactactaacgaaatctcctgtactaatcttagatgaagcaactagcggattgga 2400

A L T E K Q V I D N L L A L K D K T I I F2
2401 tgctttgacagaaaagcaggttattgataacctcctagcactaaaagataaaaacgatcat 2460

F V A H R L S I A E R T D R I V V I D Q F2
2461 ctttgtagcacacaggccttagtatcgctgagcggaccgaccgtatcgtagtcattgatca 2520

G R V V E T G S H Q D L M S Y P G F Y Y F2
2521 gggacgcgtagtgagacaggttctcatcaagacctgatgtcttatccaggtttctatta 2580

Q L F R K * M N P Q L F K S T F2 blpB
2581 tcaattatttagaaaagtgaaggaaaaggaaacagatgaatccacagttgtttaaaagcac 2640

E F Y H R R Y H N M S T V L I T P L I L F2
2641 agagttttaccatcgtcgctaccacaatatgtctactgttttgattactccttgatttt 2700

L V I F L F L F A F F A K K E V T V T S F2
2701 gttagttattttctttttcttttcgcttttttgctaagaaggaagtacagtcacgtc 2760

R G S I E P T K V I A V I Q S T S D N T F2
2761 tagaggaagtatagagccaaccaaggttatcgcagtaatccaatcaaccagtgacaatac 2820

I I D N Q L V A N K V V K K G D T L V Q F2
2821 catcatagataatcaactggttgctaataaagttgttaaaaaaggggacaccttagttca 2880

Y S E T M E A S Q K E G L Q K Q L E L L F2
2881 gtattcagagaccatggaggcatcgcaaaaagaggggcttcaaagcaactagaactttt 2940

K R Q E S G L K T L Q S S L T Q G T N L F2
2941 aaaaagacaggaatcaggttgaagacctgcaatctagcctaacgcaggggaaccaatct 3000

F Q E Q E D E F G Y Q S T F N T Y L S Q F2
3001 tttccaagaacaggaagacgagtttggttatcagagtacttttaacacctacctaagtca 3060

A Q D I D L G V A K T N T E V N N Q A A F2
3061 ggcacaggatattgacttgggtgtggctaaaaaatacagaggttaataaccaagcagc 3120

I A S N T G S A I D N Q I S Q L Q T Q V F2
3121 aattgcgagtaataaccggttctgctattgataaccagattagtcaattgcagactcaggt 3180

S E Y E A L S Q A I T N H E T T L P E G F2
3181 ctcagagtatgagggcgtctctcaagctattaccaatcatgaaacgactttacctgaagg 3240

N P H Q A T L N A Y N S Q Y A T T P D A F2
3241 caatcctcatcaggcaaccttaaatgcctataacagtcagtatgctacgacaccggatgc 3300

S V T D Q Y L S Q V N T N I S S L N A S F2
3301 cagtgtaacagaccaatacctatctcaagttaataccaatatttcgagccttgaatgcttc 3360

I G N L E I Q N A G T G T V V T Y D N S F2
3361 cataggtaatctagaaatccaaaatgctgggacagggcacagttgtaacttatgacaatag 3420

D S T K K E A L K N Q F L Q N A G Q Q L F2
3421 tgatagcactaaaaaagaagctctaaaaaatcaattcttgcaaaatgcaggacagcaatt 3480

S S V E T Q I T D T E S K I N Q A D V L F2
3481 gagctcagtggaacacaaaattaccgataccgagagtaaaatcaatcaggcagatgtcct 3540

L T N T L I Q S P E D G I L H L S Q A D F2
3541 tctgactaataccctcatccagtcaccagaagatggaatcttacacttgagtcaagctga 3600

```

Αποτελέσματα

K K A T M A A T G T E L A Q L Y P D M T F2
 3601 taaaaaagcaaccatggctgacaggaactgagttggcccagctttatccccgatatgac 3660
 Q T Q E V A I T Y Y V N S D Y V P K L Q F2
 3661 tcaaaaccaggaagttgccattacttattatgtgaattcggattatgtgccaaaactgca 3720
 K G Q S V R L T L D K V G N H G T T I I F2
 3721 aaaagggccagtcagttcgactgaccttggataaggttggaatcacgggtaccacaattat 3780
 G K L E S I D N S A T E T E R G N V F R F2
 3781 tggaaaacttgagagtattgataattctgccacggaaacagaaagggggaatgtgttag 3840
 V T A R A S I S E K E A Q N L R Y G L E F2
 3841 agtaactgctagggcaagatatttcagaaaaagaagcccaaatctacgttacggctctaga 3900
 G R V R S V I D Q K T Y F N Y F K D K L F2
 3901 agtgcgtgtgagaagcgttattgaccaaagacactacttcaattactttaagacaagtt 3960
 L N L Q D Q * M A N N T I N N F1 blpc
 3961 actaaacttgcaagaccaatagggaggagaattactgagggctaacaatacgattaataac 4020 F2
 F E T L D N H A L E Q V V G G S G W M D F1
 4021 tttgaaacacttgataaccacgctcttgaacaagtcgtaggtggaagtggtggatggat 4080
 Y I N G F L K G F G G Q R T L P T K D Y F1
 4081 tatataaatggtttccctaaaaggattcggagggcaaagaacgcttccaacaaaagactat 4140
 N I P Q V * F1
 4141 aacattcctcaagtttaggtatagaaaaaaggctgttaggcctttttagttattgttaat 4200
 * A K K T I T L F6
 4201 tgttgtgtgaatgagaaattgttactctgtgtttctaaagtttacattgatatagttatct 4260
 Q Q T F S F N N S Q T E L N V N I Y N D F6
 4261 aagatttctgtgacattagcaaggccaatgcctcgtctcgtcccttggtagacacct 4320
 L I E T V N A L G I G R E R G K N S V G F6
 4321 ctttcaaataatggtttttagtttctgtttgttcttcaacttatggatttgctaatagataat 4380
 R E F I T K T E T Q E E S I T N S I S L F6
 4381 agctgtgaacgatgatcttcccaaaagctaataagtaattttatggttttgagtttgaatg 4440
 L Q S R H D E W F S I T I K H N Q T Q I F6
 4441 gcaccttcaatagcgttatctaaaaaaatagaagtgacgataatgaagtccagaatctcc 4500
 A G E I A N D L F I S T V I I F D L I E F6
 4501 atcccaatcaagtgatgggttctgggatgctaactcgtgagcttcaataccttcttcttct 4560
 M G I L H I P E P I S I Q A E I G E E E F6
 4561 gcttgtaaaacttttgcggacagaaggccttttcaaagtattatcctgaatattaacgagt 4620
 A Q L V K A S L L S K L T N D Q I N V L F6
 4621 cttagtaagtcaaagtttctgtatattaatcgtttatcggattcttgaagcacactatca 4680
 R A L D F N R T N L R K D S E Q L V S D F6
 4681 tagacttctttgacaatatccatcgtctttatctatcccaatcgtaatgtgactaag 4740
 Y V E K V I D M D D K D I G L R L T V L F6

Αποτελέσματα

4741 agattactataatcgtgtctaaaactacgaacagaattgtagagacattcaatatgttta 4800
L N S Y D H R F S R V S N Y L C E I H K F6

4801 ttgtaggtgtagagattctctagctggagatTTTTctggaagtccaattgtccttgaatc 4860
N Y T Y L N E L Q L N K Q F D L Q G Q I F6

4861 atttcacgaatgtttctttctaaaaagacaatcataatgaagaagaggacaagtgaata 4920
M E R I N R E L F V I M I F F L V L S I F6

4921 acaacacagagttttcgaagctccaaagttgaagagtgagtgttttcaagatacatg 4980
V V C L K R L E L T S S H T T N E L Y M F6

4981 agggactgtaacagtaggggtgacccaaacataaaaaagttagcaactataataatgt 5040
L S Q L L L T Y G F M F F N A V I I I H F6

5041 tgaatcggagaatTTtgatttctgctTTTTgaagtatggtaaaactctccttgaataattta 5100
Q I P S N S K Q K Q L I T F S E K F L K F6

5101 ataaagagaaatgatagacaaagaggtgcatagatgaaggatggatattaatagagag 5160
I F L F S L C L P A I S S P I S I L L S F6

5161 cttttataatcggtgataactaatattaaaaaaaggaaagataaaaaaaagtaatcagtcct 5220
S K Y D T I S I N F F P F I F F T I L R F6

5221 aaactaaggttgttgaggatcaggggaagagaccattgaaaatctttatTTTTaatgggt 5280
L S L N N L I D P F L G N F I K I K L P F6

5281 tttttagtcttagtggataaaaaggaaggagagcagaagatagtagatcctcaccaccag 5340
K K T K T S L L F S L L L Y Y I D E G W F6

5341 aatttaatgataaaccaagaagagtgggttataaaataaaattaaaggctaaattaaaaata 5400
F K I I F W S S H N Y I F N F A L N F I F6

5401 aggagtaggaaaaaacctcagacgaatcttctgtccattaaataaaggaaaagaata 5460
L L L F F Y R L R I K Q G M L Y L F L I F6

5461 atttctagcctgcacttaaaaggggtgagaaaaagtagccataacgttgttaacat**tc**atc 5520
I E L G A S L L T L F L L W L T T L M M F6 **blpH**
* F5 (**blpR**)

5521 tgcctctttcctcaacaatctgtgcaatctttcctatcttcatacgggatactggtagaa 5580
R G R E E V I Q A I K G I K M R S V P L F5

5581 cttgaccattaattaaggtagcttcataattgggtcttgttgacagagatgatcatatctg 5640
V Q G N I L T A E Y N T K N V S I I M D F5

5641 tattgacgataaaggaccgatggcatgggtagagctTTTTgtgtatctTTTTaaagtctg 5700
T N V I F S R H C P Y L K K H I K K F D F5

5701 ccagatttgcctcgatccatgaggggtatggatagtctggaggtgaacatgggtgttga 5760
A L N A R I D M L T H I T Q L H V H H K F5

5761 tatctgatgtggataggtatagaatttgatccataggaaggtttattaattgagactctg 5820
I D S T S L Y L I Q D M P L N I L Q S E F5

5821 tttttagagaaaaaactcatccgtggtagttgctgtaaataggaagacttgagcaatgg 5880
T K Y L F F E D T T T A N I P F V Q A I F5

5881 tttcccctatttcttttctaaagctagcttcatctaaggttttattgatgtatttatagg 5940
T E G I E K R F S A E D L T K N I Y K Y F5

Αποτελέσματα

5941 ctgtaacgccaaaagcttgaggcatgaactctatatgtgtagtgacaaaaggcaatgatag 6000
A T V G F A Q P M F E I H T T V F A I I F5

6001 cataagggttattttgacgtatgatttttagcgatatcaagtccttcttatcttcacctt 6060
A Y P N N Q R I I K A I D L G K K D E G F5

6061 taatttcaatatcaagaaagaaaatctgatcgcttgattagaagtgatagctgataaca 6120
K I E I D L F F I Q D S T N S T I A S L F5

6121 actggtcagggtttgtcaaaagactggacacaagatagatcttttccgaaggatttaagtt 6180
L Q D P K D F S Q V C S L D K G F S K L F5

6181 catgtgccacagcctcttccaagcgacc**cat**ctgaatagaattatcttctaataaggtaaa 6240
E H A V A E E L R G M F5 **blpR**

6241 tcttcaaggcttagtcctctcttttatgacgaatactgtttattgaaaaattgtaacata 6300
6301 aagaaaacggttttcaattttttatgagtataaaatgagattttttttttctgaatt 6360
6361 ttagaataatatacattaggaattaccattcgggacatatagccactttttgggacgct 6420
6421 agctctgatagagacacttgaatgctataactaaagatgtgattgagatcacacgataa 6480

M A T Q T I E N F N T L D F1 **blpU**

6481 aaatttttaggaggtagttgcc**atg**gcaactcaacaattgaaaactttaacacccttgac 6540
L E T L A S V E G G G C S W G G F A K Q F1
6541 ctcgaaacacttgctagtggtgaagggtggatgtagctggggagggttttgctaaacaa 6600
G V A T G V G N G L R L G I K T R T W Q F1
6601 ggagtagctacaggagttggtaatggtttacgactaggtatcaaaacacgtacttggcaa 6660
G A V A G A A G G A I V G G V G Y G A T F1
6661 ggtgctgctgcaggagcagctggaggtgctatcgtaggtgggtgttggttatggagcaaca 6720
C W W * F1
6721 tgctgggtg**tga**tggattatgtttgatttgaaaagttatatttttagggatggtttccatg 6780
6781 gctgttatgagtttttagataagccaattatgtcatttcttgaaaaacacaaggctacc 6840
6841 aattccgttaagaagaaatcctaactgaaatgcttctgcaattgctggctgtgtaatagc 6900

M I E N F D I R E E V F V I M T K F1 **orf3**

6901 atgtgaatt**atg**attgaaaatttcgatataagagaagaggtatttgaatcatgaccaaa 6960
K R L V S L M M S M G F V L V A L H N F F1
6961 aaacgcctagtgctcctaataatgatgtctatgggcttcgctccttggtgccttacataacttt 7020
G E K L N F G L Q C L N L I G L C L F L F1
7021 ggagaaaaactgaattttggacttcaatgcctaataatcttatcgggttatgtttatttctc 7080
F L M C T V I K D I R S D K * F1
7081 tttcttatgtgtacggttatcaaggatataaggctcagacaag**tag**tgacatttatgtcac 7140
7141 tacttttttatcggcttccaatctataataaaattcatagattatgcacagactagctaa 7200

M F K N S K P Y L L A T I F1 **orf4**

7201 aaacactttaaggagaaaagt**atg**tttaaaaactcaaaaccgtatttactggctaccatt 7260
L I V M G L A N L F R S L D A V H H T I F1
7261 ctcacgtaatgggcctcgctaactctatttagaagcttggatgcagttcaccataaccatt 7320
N L L G L T V L L Y S L L F K K W V Q F F1
7321 aacttgctagggctaaccggtgcttctttatagcttacttttttaaaagtgggtacagttt 7380
Q K * M L I F D V F1 **orf5**
7381 caaaag**taa**cctttgggtcactttgaacgtaagatgcttgcaa**atg**cttattttttgatggt 7440

Αποτελέσματα

P E V K L F L L M I A E I I L Y L I A Y F1
 7441 cccgaagtaaaattattcttgctaataatgatagcggagattatattatattttgattgcatat 7500

L C N R E N K D M Y S R L F K V S V L M F1
 7501 ctttgtaatatagaaaaacaaagatatgtatagtcgcctatttaaagtatcagtactaatg 7560

T L L Y Y I S S R I * F1
 7561 acactactgtattacatctccagtagaatttaa^{taa}tcgctaagggcttacttgaaatcttac 7620
 7621 agctgtataataaaaatacacagagaggaatagagttaaatgtaaatagcttatttaggtttgca 7680

M K L K N I S S F3 orf6
 7681 agactgactgaggttattcatagtttaggtgttttatc^{atg}aagttaaagaatattagtt 7740

S V L R S F R T I T A A L A V F L I S I F3
 7741 cgagtgtattgcatcttttagaacatcactgctgcgttggcagttttccttataagta 7800

S L S L Y K S K I S P G T W L A V G A L F3
 7801 tcagcctttctctctacaaaagcaagatctcgccaggaacttggttagcagtcggagcac 7860

A F V V I F V N G L L Y R M L K K R P D F3
 7861 tagctttcgtagtcatttttgtaaatggactgctctaccgatgcttaagaagcgtccag 7920

S V N L L T I R Q S F I V F P V I T F L F3
 7921 attcagtaaatctgttaacaatacggcagtccttcattgtctttcctgtcatcacatttc 7980

V L S V E F Y T L L T F S D T T D R I V F3
 7981 tagtgcttagttagagttttacacattactaacattcagtgataccacagaccgtatag 8040

L A V L M L L L I L C D F L S Y L Q V K F3
 8041 tactagccgtattaatgcttttgtaatcctctgtgattttctatcttaccttcaagtca 8100

K Y F K Q * F3
 8101 aaaaatattttaacaa^{taa}acgcatttgcttgattattctgtaagcaatctataagata 8160
 8161 tttgcataaaagtgttataataagaaagtgattaagtaaatatgtgaaaattagaggaag 8220
 8221 atttccaatgattgaaggatgttcttttaggaattaccattcgggacatatagccactttt 8280
 8281 tgggacgctagctctgatagagacacttgaatgctataactaaagatgtgattgagagatc 8340

M A T Q T I E N F N F1 blpK
 8341 acacgataaaaatttttaggaggtagttacc^{atg}gcaactcaacaattgaaaactttaac 8400

T L D L E T L A S V E G G G C S W R G T F1
 8401 acccttgacctcgaaacacttgctagtggtgaaggaggtggatgtagttggagaggcaca 8460

G G A T V Q G A I G G A I G G A F G G N F1
 8461 ggtggagcactggttcaaggagctatcggaggagctatcggaggagcgtttggaggtaat 8520

V V L P V V G S V P G Y L A G G V L G G F1
 8521 gtagttttaccagttgtaggctcagttcctggttatctagctgggtggttcttaggtggt 8580

A G G T V A Y G A T C W W S * F1
 8581 gcaggtggtactggtgcctatggagcaacctgctgggtggagc^{taa}tctatggtatatttt 8640
 8641 attataggttttggtggtgctttggttaggtaatatctttttcaaaaagggtcaataaaaat 8700
 8701 aaacataaaaaataatcttgaacatatactgaacagctccctgtcaagtggaacaatgaaa 8760
 8761 taataaaaata^{tta}ggcgacggccttggttctcatttcaagaggggcaaggccgttattgc 8820
 * A V A K N R M E L P A L G N N F5

gctcttgaaaaacggttgatgattgtaaaaatagatgtaggcacatataatctgaaactagct 8880
 R E Q F R Q H N Y F Y I Y A D I D S V L F5

cctcaaaaagtcttatacttcttcaaatcatagcactccgtctttaaagtgcccaaagaaac 8940
 E E F T K Y K K L D Y C E T K F H G F F F5

Αποτελέσματα

8941 tctcaattgggtgcatgtcaatacacttaccaacacgagacatggagcgggtcatctgat 9000
 S E I P A N D I C K G V R S M S R T M Q F5

9001 actgggtagttaaacggtaataatctttcgaagtatactgcgaacctcggtcgctgtgaa 9060
 Y Q T T L R Y Y D K S T Y Q S G R D S H F5

9061 ttaatgggtgctgcattaggattagctttttgtgctttacgaagtgtttccaataccaatt 9120
 I L P T A N P N A K Q A K R L T E L V L F5

9121 cgttatcattaaattgaccaactacataggcgacaattgagccgtcgtaaagatccttaa 9180
 E N D N F Q G V V Y A V I S G D Y L D K F5

9181 tagcactcaaataggctttacagctgaaaccgtacttcaagaaagtcacatctgtacacc 9240
 I A S L Y A K C S F G Y K L F T V D T C F5

9241 atttctgatttggagcagtggtgtaaaattacgattgagaatgttgcctctacattga 9300
 W K Q N P A T A T F N R N L I N D E V N F5

9301 caaagctagttttagtacaatagcccttggctctttctgataatggaacgtagacctagaa 9360
 V F S T K T C Y G K A R R I I S R L G L F5

9361 tgtgcatcaagcgtcgaatccgcttcttgtttagttagtttcaagcttgcgattgacaa 9420
 I H M L R R I R K K N Y N T E L K R N V F5

9421 atagcgtcatacgcagataaccaagaataccattatgctggctatgaagtttcttgatga 9480
 F L T M R R Y G L I G N H Q S H L K K I F5

9481 tatc **cat** caagcctaaatcttctgcttcagaagtgttcttctgatgttgaaccacttgt 9540
 I D M F5 ISSth orfB

9541 aatagcctgagcagagatacctttagaatatggcacaagtggctgataaaaacctcttcat 9600
 9601 actcatccgcataattctttaatcgcttggagggttccaagtgccgaccaagtcttaccg 9660
 9661 tcggtttcgctcgtttgatttcttctaacttttttagcaggccgttctccatttcaagata 9720
 9721 cttaatccgctcttctcgttctgatttttagggcgtaactcttctctctggagtaaggtt 9780
 9781 tggtttacttgaagaccttttccacgacgatctaggagaccgttagaacctccttctc 9840
 9841 gaactttctgacccaagaatagatctgctggtaggaaacaccatacttctcaacagcccc 9900
 9901 ttggtaatcttctcgtgggcaagggtaaaattgacaatctcaat **tca**tttcttcaaatgt 9960
 * E E F T F4

9961 tgtcttgcgtccttgccttcatgcgtctcattcctttactagtagctttcagttctttacc 10020
 T K R G Q K M R R M G K S T A K L E K G F4

10021 actagataactttttatccatgatctgagaacataaggggtcagaaattccatatttttt 10080
 S T Y S K I W S R L V Y P D S I G Y K K F4

10081 ggtcagatctttgagacttcccaagccattaagatagtcggaaacagcttcttcttag 10140
 T L D K L S G L G N L Y D S V A Q E K L F4

10141 ttcttactatacttcttccattgacggcttttctctagcccatcaacaccagcttcttt 10200
 E K S Y K K W Q R S E E L G D V G A E K F4

10201 gtacttccgaaccagttcgatagggtgtcttttagagataccttggtttctagttaacca 10260
 Y K R V W N S L T D K S I G Q N R T L W F4

10261 actaagtgatttaccttcttccaagtgaagcagaacaatttctagtttctcagatacaga 10320
 S L S K G E E L H L L V I E L K E S V S F4

10321 ttttggacttcttttggacataataagactccccttatagtttctagtgaaaatttttat 10380
 K P S R K S M I L S G K Y N R T F I K I F4

10381 tttttcactgtc **cac** tataaggggagtatatcatgggtgatagtgggattttttatattct 10440
 K E S D V F4 ISSth orfA

10441 taccattcgggacgtatagtcactttttgggacgttagcttctatgagagttgtaaattg 10500

M M K K R T L T L W F2 blpG

10501 ttaactagactaagtaatcgaaaggagtttatgatgaaaaaaggacattaacgctatg 10560

L M S S A L L L N L S V G T A L A D E V F2

10561 gctgatgagttcagccttgttactgaatctatcggttaggaactgctttagcggatgaggt 10620

V E T G A D N S P K V E A T E S T P V E F2

10621 ggtagaaacgggagctgataattctccaaagggtgaagcaaccgaatctactccagtaga 10680

Q P S D S Q E Q S L P E D K E A P A A T F2

10681 acaaccatcagatagtcaggagcagtcgcttctgaagataaagaggcaccagcagcgac 10740

E S V T L A E S E E E T A N D I P A V S F2

10741 tgaatcagtaaccttggctgagtcctgaggagagactgcaaagatgatatcccagcagtatc 10800

R E E Y D A N V A Y L P K I S L D D V R F2

10801 tcgtgaggaatacagcgcctaatggttgcttatttacctaaaataagtttagatgatgtgcg 10860

N A F T E D G Q A H T I Y F G R G T C Y F2

10861 taatgcctttaccgaggatggtcaggcacatacagatttattttggacgtggaacctgtta 10920

Y C R Q F S P E L K V L N Q L M D G R L F2

10921 ctattgctgcaattttaccagagttgaaggtcttgaaccaactgatggatggctgcttt 10980

E Y Y D I D R E D F D R N Y V F G E I G F2

10981 agagtattacgatatagatcgtgaggatttgaccgaaactatgtggttggtgagattgg 11040

I P G T P T L F Y L E N G Q L L S G W V F2

11041 tattccaggtacacctactattttatctggaaaatggcagctattatcaggatgggt 11100

G G G P A Q T V Y D H L A S S S P R F M F2

11101 tgggtggaggacctgctcaaacagtttatgaccatttagccagctctagtccacgttttat 11160

T L N Q E Q T T I S E P Q T K T V R P T F2

11161 gactttgaaatcaggaacaaacaacctctctgaacctcaaaactaaaactgttcgctctac 11220

R V T E E S T K E K S L P T V Q P Q P M F2

11221 acgagtaaccgaagagagtacgaaagagaaatctttgccaactgttcaaccacagccgat 11280

S T V Q K E L N A Q T G Q M A P M T D K F2

11281 gtcaacgggtcagaaggaactgaacgctcaaacagggcaaatggcaccaatgactgataa 11340

V A D T K E F P K T N D G E Q S L V S F F2

11341 agtagcagacacaaaagaattccctaaaacaaatgacgggtgagcaatcacttgtctcttt 11400

V G A L A I L A S L M L A L R Y Y I K * F2

11401 tgtggggcattagcaatcttagcttactcatgtagcactgagatattatattaaaata 11460

11461 ggttaaaagattgagtatctccctcaattttttcattttgtatatgaatgaccattcag 11520

11521 gacgtatagccactttttgtgacgctggcttttaaatgactatcagtgctataactaaa 11580

11581 gatgtgattgaaaaattagttgaaagaaataaggaggttttctaatgaaaggactaaa 11640

11641 tggtttgacaggaggcaagagagacaataacaagcagtagctatcatcgatgaggtaatt 11700

11701 gaaactattggagataagccagattatgctgatttgaagcaggtcctgcactcctaccga 11760

11761 acggaacttgcagactctcgttcagccactccctatatcttaagcaggatgtcactggaa 11820

11821 atatccaaagtggctcagaaaagaccagctaaccttgtctcctgtatcgaggagcgaatg 11880

11881 gcagagttgcgaaaattgctagcgattcgttatggctattgatgtcattagggaggattt 11940

11941 cttggtttaagggttgagttgtccattgagaaaaggaagatggagcaaaaaagggtcttt 12000

12001 tccaatctgttgaggagcagagaaagaaccttaagtcctagttatgattatgacaagcgg 12060

12061 acaagtgattgtgataaaaagggtgagtgcgatgccttatcttaaccgacttcggtcaggaa 12120

12121 agttactttatttacaactcatggttgcttgcctaagggttgatagatggcaatattggtt 12180

Αποτελέσματα

```

12181 tagaattattatataaatgggttcttccttcttatttttagttaccctgggtttggtttcct 12240
      V S D L P T S V H R T R A E Q S S T W   F2 orf9
12241 tactgtgtctgacctaccctaccagtggtcatcggacgagagctgaacaatcgctccacttg 12300
      E R Q F T P K Q I Y A G M G L A H L A I   F2
12301 ggaacgacagtttactcctaacaataatttacgctggtatgggcttggcacatttggtat 12360

      I L T G V Y R L L T V R G A E W R L I I   F2
12361 tattttaactgggttttatcgtttgctgacgggtgagaggtgccgaatggcgcctaatacat 12420

      I V V I V L D I C L L A F L T P R V L K   F2
12421 tattgttggtgattgttttggatatttggttactagcttttctgacacctagagtgcttaa 12480

      I I K Q S E R G *                           F2
      V N E V R M S V Y D R H A Y K N           F3 orf10
12481 aatcattaacaacaaagtgaacgaggttagaatgtcagtttatgatagacacgcctataaaa 12540

      S E A V S A Y L C F G N F V G V V K T F   F3
12541 atagcgaggctgtaagtgccttatctatgctttgtaactttgtaggcggttgtaaaactt 12600

      C L R E V *                               M S K N L R A L T A   F3 blpX
12601 tctgtttgagagaagtgtagggttaagttttatgtcaaaaaatctacgtgcccttacgg 12660

      I V L S Q L L I E C M G F F L G I P L S   F3
12661 ccattgttttgtccaattgcttattgagtgatgggattccttttaggaattcctctta 12720

      K I L V L T V L S S I A E V L M H L V L   F3
12721 gtaagattctggttttaacagtacttagcagtatagcagaggttctgatgcatcttgcc 12780

      G K K S K V T L S D K E I W H Q Y F L F   F3
12781 taggcaaaaaatctaaagtcactttgagtgataaagagatatggcatcaatactttttat 12840

      V K K T L W L S I L F V G I F L F Y M L   F3
12841 tcgttaagaagacactctggctttccattttattgttggaatttttcttttttatatgt 12900

      T K S D S F M L Y F Y W H I F V L F H C   F3
12901 tgactaaatctgacagctttatgctttattttactggcatatctttgtggtgttccact 12960

      L G Y I I C L N N I K M N R K N *           F3
12961 gtcttggtatatacatttgtttaataaacatcaaaatgaatcgtaaaaatgtagatcaa 13020
13021 atcttgtttattttcacacaataaaaaaatcccatgggagttctcatcctatgggatttt 13080
13081 ttgcgataaagA                               13092

```

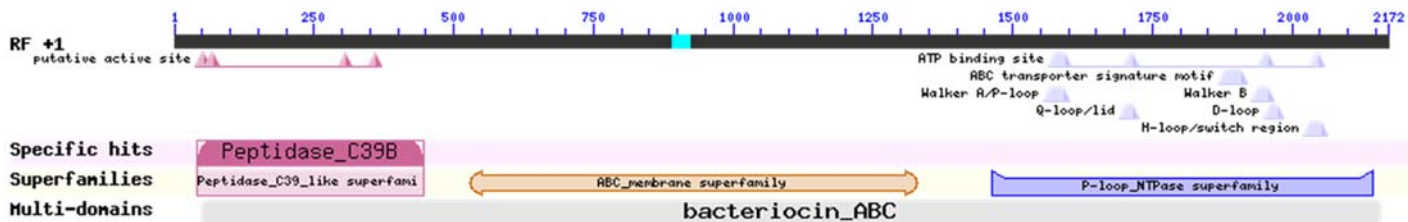
Το *blpA* του ACA-DC 0040 σε νουκλεοτιδικό επίπεδο ομοιάζει με γονίδια ABC-transporter σε μεγάλο βαθμό της αλληλουχίας του και ιδιαίτερα με το *blpA* των LMG 18311, CNRZ 1066 και LMD9 σε βαθμό που αγγίζει το 99% όλης της αλληλουχίας του. Σε αμινοξικό επίπεδο η ομολογία του με συντηρημένες αλληλουχίες πολυπεπτιδίων που ανήκουν στην οικογένεια των ABC-transporter βακτηριοσινών είναι φανερή ενώ η ομοιότητά του με το *blpA* του LMD9 είναι 712/717 αμινοξεία.

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpA* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, το *blpA* του *S. thermophilus* LMG 18311.

Query	4	MKGFGMFRFRRTFVPQIDMRDCGVAALASVAKYYGSDYSLAHLRELAKTNKEGTTALGLV	183
Sbjct	1	MKGFGMFRFRRTFVPQIDMR+CGVAALASVAKYYGSDYSLAHLRELAKTNKEGTTALGLV	60
Query	184	EAAKKIGFETRAIKAEMSLFEMEDVPYPPIAHVKNKGKLGQHYVVIYKSTKDYLIIIGDPDP	363
Sbjct	61	EAAKKIGFETRAIKAEMSLFEMEDVPYPPIAHVKNKGKLGQHYVVIYKSTKDYLIIIGDPDP	120
Query	364	SVKVTKMTKERFEKEWTGVTLMGPEPSYKPHKDKKNGLWDFLPLIFKQORSLIANIVFAS	543
Sbjct	121	SVKVTKMTKERFEKEWTGVTLMGPEPSYKPHKDKKNGLWDFLPLIFKQORSLIANIVFAS	180
Query	544	LLVTLINILGSYYLQGILDEYVNPQMKSTLGIISIGLVVTVYVLQQMMTFARDYLLTILSQ	723
Sbjct	181	LLVTLINILGSYYLQGILDEYVNPQMKSTLGIISIGLVVTVYVLQQMMTFARDYLLTILSQ	240
Query	724	RLTIDVILSYIRHIFELPMSFFATRRTGEVISRFSANSIIDALASTILSLFLDFSIVII	903
Sbjct	241	RLTIDVILSYIRHIFELPMSFFATRRTGEVISRFSANSIIDALASTILSLFLDFSIVII	300
Query	904	vggvllIQNSNLFKLVLCVPIYTLIVFAFMKPFERMNHDVMQSNAMVNSAIIEDINGIE	1083
Sbjct	301	VGGVLLIQNSNLFKLVLCVPIYTLIVFAFMKPFERMNHDVMQSNAMVNSAIIEDINGIE	360
Query	1084	TIKSLTSEEVCYQKIDGEFVDYLDNSFRLSKLSILQTSLKQGAQLILNVLILWTGAQLVM	1263
Sbjct	361	TIKSLTSEEVCYQKIDGEFVDYLDNSFRLSKLSILQTSLKQGAQLILNVLILWTGAQLVM	420
Query	1264	GNTISIGQLITFNMLLSYFTNPLENIINLQTKLQSAKVANTRLNEVYLIESEFGQSDDTY	1443
Sbjct	421	GNTISIGQLITFNMLLSYFTNPLENIINLQTKLQSAKVANTRLNEVYLIESEFGQSDDTY	480
Query	1444	QEGIADGDITVTDLSYKYGFGRDRTLTDVSLTIRQGEKISFVGVSGSGKTTLAKMLVNFYQ	1623
Sbjct	481	QEGIADGDITVTDLSYKYGFGRDRTLTDVSLTIRQGEKISFVGVSGSGKTTLAKMLVNFYQ	540
Query	1624	PYKGHIDFNGQNISRIDKKTLRQHINYLPQQSYIFSGSVLENLTLGAARGITQADILKAC	1803
Sbjct	541	PYKGHIDFNGQNISRIDKKTLRQHINYLPQQSYIFSGSVLENLTLGAARGITQADILKAC	600
Query	1804	EIAEIRQDIENMPMGFQTELSDGAGLSGGQKQRIALARALLTKSPVLILDEATSGLDALT	1983
Sbjct	601	EIAEIRQDIENMPMGFQTELSDGAGLSGGQKQRIALARALLTKSPVLILDEATSGLDVLT	660
Query	1984	EKQVIDNLLALKDKTIIIFVAHRLSIAERTDRIVVIDQGRVETGSHQDLMSYPGFYYQLF	2163
Sbjct	661	EKQVIDNLLALKDKTIIIFVAHRLSIAERTDRIVVIDQGRVETGSHQDLMSYPGFYYQLF	720
Query	2164	RK	2169
Sbjct	721	RK	722

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
1450 bits(3753)	0.0	Compositional matrix adjust.	720/722(99%)	721/722(99%)	0/722(0%)	+1

Αποτελέσματα



Εικόνα 4.14 Ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpA* του ACA-DC 0040 με συντηρημένες πεπτιδικές περιοχές.

Το *blpB* του στελέχους ACA-DC 0040, ενώ ομοιάζει σε νουκλεοτιδικό επίπεδο με τα αντίστοιχα *blpB* των στελεχών LMD9, CNRZ 1066 και LMG 18311 σε βαθμό 99% όλης της αλληλουχίας του, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του δεν διακόπτεται όπως των στελεχών CNRZ 1066 και LMG 18311. Σε αμινοξικό επίπεδο ομοιάζει περισσότερο με μία περμεάση ενός ABC-transporter της βακτηριοσίνης lactococcin A στο στέλεχος LMD9 καθώς και με συντηρημένη περιοχή της βοηθητικής πρωτεΐνης για το σύστημα εξαγωγής βακτηριοσίνης.

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpB* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, την βοηθητική πρωτεΐνη έκκρισης βακτηριοσίνης του *S. thermophilus* 1F8CT.

Query	1	MNPQLFKSTEFYHRRYHNMSTVLITPLlillviflflfaffakKEVTVTSRGSIEPTKVIA	180
Sbjct	1	MNPQLFKSTEFYHRRYHNMSTVLITPLILLVIFLFLFAFFAKKEVTVTSRGSIEPTKVIA	60
Query	181	VIQSTSDNTIIDNQLVANKVVKKGDTLVQYSETMEASqkeglqkqllellkrqeSGLKTLQ	360
Sbjct	61	VIQSTSDNTIIDNQLVANKVVKKGDTLVQYSETMEASQKEGLQKQLELLKRQESGLKTLQ	120
Query	361	SSLTQGTNLFQEQEDEFQYQSTFNTYLSQAQDIDLGVAKTNTTEVNNQAAIASNTGSAIDN	540
Sbjct	121	SSLTQGTNLFQEQEDEFQYQSTFNTYLSQAQDIDLGVAKTNTTEVNNQAAIASNTGSAIDN	180
Query	541	QISQLQTQVSEYEALSQAITNHETTLPEGNPHQATLNAYNSQYATTPDASVTDQYLSQVN	720
Sbjct	181	QISQLQTQVSEYEALSQAITNHETTLPEGNPHQATLNAYNSQYATTPDASVTDQYLSQVN	240
Query	721	TNISSLNASIGNLEIQNAGTGTVVTYDNSDSTKKEALKNQFLQONAGQQLSSVETQITDTE	900
Sbjct	241	TNISSLNASIGNLEIQKAGTGTVVTYDNSDSTKKEALKNQFLQONAGQQLSSVETQITDTE	300

Αποτελέσματα

```

Query  901  SKINQADVLLTNTLIQSPEDGILHLSQADKKATMAATGTELAQLYPDMTQTQEVAITYYV  1080
      SKINQADVLLTNTLIQSPEDGILHLSQADKKATMAATGTELAQLYPDMTQTQEVAITYYV
Sbjct  301  SKINQADVLLTNTLIQSPEDGILHLSQADKKATMAATGTELAQLYPDMTQTQEVAITYYV  360

Query  1081  NSDYVPKLQKGQSVRLTLDKVGNGHTTIIIGKLESIDNSATETERGNVFRVTARASISEKE  1260
      NSDYVPKLQKGQSVRLTLDKVGNGHTTIIIGKLESIDNSATETERGNVFRVTARASISEKE
Sbjct  361  NSDYVPKLQKGQSVRLTLDKVGNGHTTIIIGKLESIDNSATETERGNVFRVTARASISEKE  420

Query  1261  AQNLRYGLEGRVRSVIDQKTYFNYFKDKLLNLQDQ  1365
      AQNLRYGLE RV SVIDQKTYFNYFKDKLLNLQDQ
Sbjct  421  AQNLRYGLESRVTSVIDQKTYFNYFKDKLLNLQDQ  455
  
```

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
838 bits(2164)	0.0	Compositional matrix adjust.	452/455(99%)	452/455(99%)	0/455(0%)	+1



Εικόνα 4.15 Ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpB* του ACA-DC 0040 με συντηρημένες πεπτιδικές περιοχές.

Το *blpC* είναι ταυτόσημο με αυτό των CNRZ1066 και LMG 18311 σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο και διαφέρει στο τελευταίο αμινοξύ με το *blpC* του LMD9. Η παρουσία μιας εναρκτήρια αλληλουχίας πεπτιδίου με την χαρακτηριστική ομάδα gly-gly, είναι εμφανής στα πρώτα 23 αμινοξέα. Παρόλη τη διαφορά, σύμφωνα με πειράματα υπερέκφρασης του *blpC* του στελέχους LMG 18311 στο στέλεχος LMD9, η δραστηκότητά του σαν φερομόνη στο στέλεχος LMD9 έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες έρευνες (Fontaine et al., 2007).

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpC* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, την bacteriocin leader domain-containing protein των:

- signal peptide, putative [Streptococcus thermophilus LMG 18311]
- signal peptide, putative [Streptococcus thermophilus CNRZ1066]
- signal peptide putative [Streptococcus thermophilus CAG:236]
- signal peptidase [Streptococcus thermophilus 1F8CT]

Αποτελέσματα

Query	1	MANNTINNFETLDNHALEQVVGGSGWMDYINGFLKGFGGQRTLPTKDYNIPQV	159
Sbjct	1	MANNTINNFETLDNHALEQVVGGSGWMDYINGFLKGFGGQRTLPTKDYNIPQV	53
Score	Expect	Method	Identities Positives Gaps Frame
112 bits(279)	2e-30	Compositional matrix adjust.	53/53(100%) 53/53(100%) 0/53(0%) +1

Τα *blpH* και *blpR* ομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με τα αντίστοιχα των στελεχών LMG 18311, CNRZ1066 και LMD9 σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και σε αμινοξικό, όμως σε αμινοξικό επίπεδο η ομοιότητά τους με κινάση ιστιδίνης και ρυθμιστή απόκρισης και με άλλα είδη του γένους *Streptococcus*.

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpH* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, τον αισθητήρα κινάσης ιστιδίνης (Homolog to BlpH Spn) [*Streptococcus thermophilus* CAG:236].

Query	1302	SAGLEIILFLYLMGQKirlryffllllifnlafnfiYNHSSWFIKFWGEDIYYlllsfll	1123
Sbjct	15	SAGLEIILFLYLMGQKIRLRYFFLLLLIFNLA FNFIYNHSSWFIKFWGEDIYYLLLSFLL	74
Query	1122	stktkplkikifNGLFPDILNNSLRRLITFFIFPPFNISITDYKsllisipssiapl	943
Sbjct	75	STKTKKPLKIKIFNGLFPDILNNSLRRLITFFIFPPFNISITDYKSSLLISIPSSIAPLC	134
Query	942	LSFLFIKLFKESFTILQKQKSNSPIQHIIIVANFFMFGYTLLQLSLMYLENTTHSSTLEL	763
Sbjct	135	LSFLFIKLFKESFTILQKQKSNSPIQHIIIVANFFMFGYTLLQLSLMYLENTTHSSTLEL	194
Query	762	RKLCVVISLVLFFIMIVFLERNIREMIQQQLDFQKNLQLENLYTYNKHIECLYNSVRSFR	583
Sbjct	195	RKLCVVISLVLFFIMIVFLERNIREMIQQQLDFQKNLQLENLYTYNKHIECLYNSVRSFR	254
Query	582	HDYSNLLVTLRLGIDKDDMDIVKEVYDQESDKRLNTRNFDLRLVNIQDNTLKSLLS	403
Sbjct	255	HDYSNLLVTLRLGIDKDDMDIVKEVYDQESDKRLNTRNFDLRLVNIQDNTLKSLLS	314
Query	402	AKVLQAE EEGIEAQISIP EPIHLIGMEILDFIIVT SIFLDNAIEGAIQTQNHKITISFWE	223
Sbjct	315	AKVLQAE EEGIEAQISIP EPIHLIGMEILDFIIVT SIFLDNAIEGAIQTQNHKITISFWE	374
Query	222	DHRSQLLSISNTISEEQ TETKTIFERGVSNKGRERGIGLANVTEILDNYINVNLETQSNN	43
Sbjct	375	DHRSQLLSISNTISEEQ TETKTIFERGVSNKGRERGIGLANVTEILDNYINVNLETQSNN	434
Query	42	FSFTQQLTITKKA	4
Sbjct	435	FSFTQQLTITKKA	447
Score	Expect	Method	Identities Positives Gaps Frame
731 bits(1886)	0.0	Compositional matrix adjust.	433/433(100%) 433/433(100%) 0/433(0%) -1



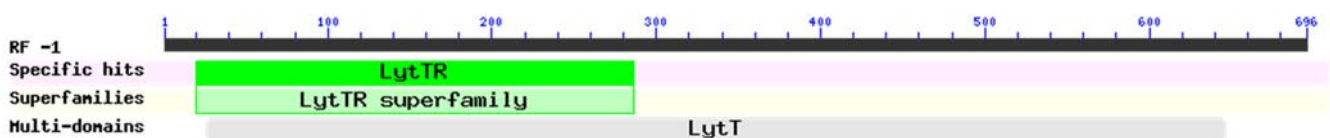
Εικόνα 4.16 Ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpH* του ACA-DC 0040 με συντηρημένες πεπτιδικές περιοχές.

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpR* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, τον αισθητήρα απόκρισης συστήματος δύο στοιχείων *των*:

- response regulator (homolog to BlpR Spn) [Streptococcus thermophilus CNRZ1066]
- Response regulator-like protein [Streptococcus thermophilus ND03]
- FasA [Streptococcus thermophilus CNCM I-1630]
- response regulator (Homolog to BlpR Spn) [Streptococcus thermophilus CAG:236]
- response regulator [Streptococcus thermophilus TH985]
- response regulator-like protein [Streptococcus thermophilus ASCC 1275]
- response regulator [Streptococcus thermophilus]
- response regulator [Streptococcus thermophilus]

Query	696	MGRLEEAVAHELKSF GKDLSCVQSF DKPDQLLSAITSNTSDQIFFLDIEIKGEDKKGLDI	517
Sbjct	13	MGRLEEAVAHELKSF GKDLSCVQSF DKPDQLLSAITSNTSDQIFFLDIEIKGEDKKGLDI	72
Query	516	AKIIRQNNPYAIIAFVTTTHIEFMPQAFGVTAYKYINKTLDEASFRKEIGETIAQVFPINA	337
Sbjct	73	AKIIRQNNPYAIIAFVTTTHIEFMPQAFGVTAYKYINKTLDEASFRKEIGETIAQVFPINA	132
Query	336	TTTDEFFLYKTESQLINLPMDQIILYLSTSDIKHHVHLQTIHTLMDIRANLADFKKIHKKL	157
Sbjct	133	TTTDEFFLYKTESQLINLPMDQIILYLSTSDIKHHVHLQTIHTLMDIRANLADFKKIHKKL	192
Query	156	YPCHRSFIVNTDMIISVNKTNYEATLINGQVLPVSRMKIGKIAQIVEERGR	4
Sbjct	193	YPCHRSYIVNTDMIISVNKTNYEATLINGQVLPVSRMKIGKIAQIVEERGR	243

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
476 bits(1226)	2e-168	Compositional matrix adjust.	230/231(99%)	231/231(100%)	0/231(0%)	-1



Εικόνα 4.17 Ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpR* του ACA-DC 0040 με συντηρημένες πεπτιδικές περιοχές.

Αποτελέσματα

Το *blpU* του ACA-DC 0040 εμφανίζει την εναρκτήρια πεπτιδική αλληλουχία με την χαρακτηριστική ομάδα gly-gly μήκους 23 αμινοξέων, που υποδηλώνει εξωκυτάρια έκκριση από το σύστημα εξαγωγής της περιοχής *blp* ενώ είναι ταυτόσημο με αυτό του LMD9, το οποίο συμμετέχει στη δομή της βακτηριοσίνης προσφέροντας ένα τμήμα του εύρους της ανοσίας, και έχει μεγάλη ομοιότητα με αυτό του LMG 18311.

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpU* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, τον αισθητήρα απόκρισης συστήματος δύο στοιχείων των:

pore-forming peptide, putative bacteriocin [Streptococcus thermophilus LMG 18311]
Uncharacterized conserved protein [Streptococcus thermophilus LMD-9]
bacteriocin [Streptococcus thermophilus TH1435]
bacteriocin [Streptococcus thermophilus TH1436]
bacteriocin [Streptococcus thermophilus M17PTZA496]
bacteriocin [Streptococcus thermophilus MTH17CL396]
Bacteriocin BlpU [Streptococcus thermophilus]

```
Query 1 MATQTIENFNTLDLETLASVEGGGCSWGGFAKQGVATGVGNLRLGIKTRTWQgavagaa 180
Sbjct 1 MATQTIENFNTLDLETLASVEGGGCSWGGFAKQGVATGVGNLRLGIKTRTWQGAVAGAA 60
```

```
Query 181 ggaiivggvgygaTCWW 228
Sbjct 61 GGAIVGGVGYGATCWW 76
```

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
107 bits(266)	6e-28	Compositional matrix adjust.	76/76(100%)	76/76(100%)	0/76(0%)	+1

Τα *orf3*, *orf4*, *orf5* και *orf6* επίσης εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με αυτά του LMG 18311 και του LMD9 σε ποσοστό 99% σε όλη την αλληλουχία τους. Τα προβλεπόμενα πεπτιδία αυτών των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης εικάζεται ότι συμμετέχουν στην ανοσία έναντι των βακτηριοσινών που παράγουν.

Το *blpK* εμφανίζει την εναρκτήρια πεπτιδική αλληλουχία με την χαρακτηριστική ομάδα gly-gly, υποδηλώνοντας εξωκυτάρια έκκριση και λόγω των ομοιοτήτων του με δομικά γονίδια βακτηριοσινών, η προβλεπόμενη λειτουργία του χαρακτηρίζεται και αυτή ως δομικό γονίδιο βακτηριοσίνης. Δεν έχει αντίστοιχο γονίδιο στο στέλεχος LMD9, όμως υπάρχουν αντίστοιχα στα στελέχη LMG 18311 και CNRZ 1066, καθώς και σε μεγαλύτερο βαθμό στα MN-ZLW-002 και ND03, όπου η ομοιότητα ξεπερνά το ποσοστό 94% σε όλο το μήκος της αλληλουχίας του. Το *blpK* στο ACA-DC 0040 διαφέρει από αυτό του LMG 18311 σε ένα κρίσιμο σημείο, καθώς το *blpK* του LMG 18311 εμφανίζει μία σημειακή μετάλλαξη, σε σχέση με αυτό του ACA-DC 0040, που προκαλεί την πρόωρη λήξη της μεταγραφής του. Το *blpK* του CNRZ 1066, αν και μικρότερο από αυτό του ACA-DC 0040, δεν εμφανίζει την ίδια μη νοηματική μετάλλαξη.

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpK* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, το πεπτίδιο βακτηριοσίνης δημιουργίας πόρων των:

bacteriocin-type signal sequence [Streptococcus sp. C150]
 pore-forming peptide bacteriocin [Streptococcus thermophilus MTCC 5461]
 pore-forming peptide bacteriocin [Streptococcus thermophilus MTCC 5460]
 pore-forming peptide, putative bacteriocin [Streptococcus sp. HSISS2]

```

Query 1 MATQTIENFNNTLDLETLASVEGGGCSWRgtggatvqgaiggaiggaifggNVVLPVVG SVP 180
Sbjct 1 MATQTIENFNNTLDLETLASVEGGGCSWRG GGATVQGAIGGAIGGAFGGNVVLPVVG SVP 60

Query 181 gylaggvlggaggtvaygatCWWS 252
Sbjct 61 GYLAGGVLGGAGGT VAYGATCWWS 84

```

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
76.3 bits(186)	1e-15	Compositional matrix adjust.	83/84(99%)	83/84(98%)	0/84(0%)	+1

Αποτελέσματα

Τα επόμενα 2 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που εμφανίζονται, ISSt_h *orfA* και ISSt_h2 *orfB*, ομοιάζουν με αλληλουχίες από τρανσποζάσες, κάτι που βλέπουμε να υπάρχει στην περιοχή *blr* των στελεχών LMG18311 και CNRZ 1066 καθώς και σε άλλα είδη *Streptococcus* σε μεγάλο βαθμό ομοιότητας.

Το *blrG* στο στέλεχος ACA-DC 0040 εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με το *blrG* του στελέχους LMG 18311 σε ποσοστό 99%. Το *blrG* του LMD9 φαίνεται να έχει και αυτό πολλές ομοιότητες αλλά λόγω κάποιας σημειακής μετάλλαξης φαίνεται να τερματίζεται νωρίτερα από το *blrG* του ACA-DC 0040 και να συνεχίζει με ένα δεύτερο στη σειρά ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, το *orf8*. Συμπυγμένα τα *orf8* και *blrG* του LMD9 έχουν ομοιότητα με το *blrG* του ACA-DC 0040 σε ποσοστό 99%. Η προβλεπόμενη λειτουργία του, βάσει ομοιοτήτων, είναι η παραγωγή μιας πρωτεΐνης τροποποιήσεων που δρα δημιουργώντας θειολ-δισουλφιδικής οξειδάσης για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών τροποποιώντας τα δομικά γονίδια της βακτηριοσίνης στα κατάλοιπα κυστεΐνης και μεγαλώνοντας το εύρος των οργανισμών στους οποίους δρα η βακτηριοσίνη (Fontaine and Hols., 2007).

Παρακάτω παρουσιάζεται μία συσχέτιση της αμινοξικής αλληλουχίας του *blrG* με την πλησιέστερη σε ομολογία αλληλουχία, το πεπτιδίο ανοσίας και τροποποίησης του *Streptococcus thermophilus* TH1435.

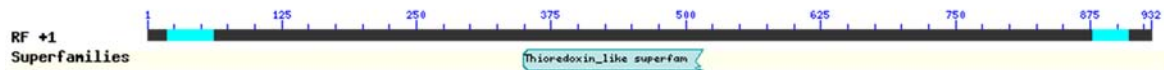
Query	1	MMKKRTl _t l _w l _m s _s a _l l _l n _l s _v g _t a _l a _d e _v v _e t _g a _d n _s p _k v _e a _t e _s t _p v _e q _p s _d s _q e _q s _l	180
Sbjct	1	MMKKRTLTLWLMSSALLLNLSVGTALADEVVETGADNSPKVEATESTPVEQPSSDSQEQL	60
Query	181	PEDKEAPAATESVTLAESEEEETANDIPAVSREEYDANVAYLPKISLDDVRNAFTEDGQAH	360
Sbjct	61	PEDKEAPAATESVTLAESEEEETANDIPAVSREEYDANVA LPKISLDDVRNAFTEDGQAH	120
Query	361	TIYFGRGTCYYCRQFSPELKVLNQLMDGRLEYYDIDREDFDRNYVFGEIGIPGTPTLFYL	540
Sbjct	121	TIYFGRGTCYYCRQFSPELKVLNQLMDGRLEYYDIDREDFDRNYVFGEIGIPGTPTLLYL	180
Query	541	ENGQLLSGWVGGGPAQTVYDHLASSSPRFMTLNQEQT _T I _S E _P Q _T K _T V _R P _T R _V T _E E _S T _K E _K	720
Sbjct	181	ENGQLLSGWVGGGPAQTVYDHLASSSPRFMTLNQEQT _T I _S E _P Q _T K _T V _R P _T R _V T _E E _S T _K E _K	240
Query	721	SLPTVQPQPMSTVQKELNAQTGQMAPMTDKVADTK _E F _P K _T N _D G _E Q _S L _V S _F V _G a _l a _i l _a s _l	900
Sbjct	241	SLPTVQPQPMSTVQKELNAQTGQMAPMTDKVADTK _E F _P K _T N _D G _E Q _S L _V S _F V _G A _I L _A L _A S _L	300

```

Query   901  mlalRYYIK  927
        MLALRYYIK
Sbjct   301  MLALRYYIK  309

```

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
570 bits(1470)	0.0	Compositional matrix adjust.	307/309(99%)	307/309(99%)	0/309(0%)	+1



Εικόνα 4.18 Ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας του *blpG* του ACA-DC 0040 με συντηρημένες πεπτιδικές περιοχές.

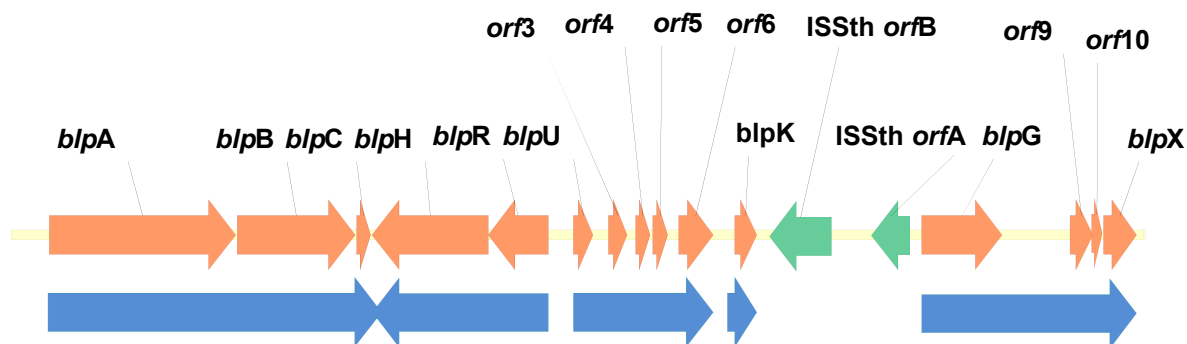
Τα *orf9*, *orf10* και *blpX* του στελέχους ACA-DC 0040 ομοιάζουν με τα αντίστοιχα των στελεχών LMG 18311 και LMD9 σε ποσοστό 99%, όμως η λειτουργία τους παραμένει άγνωστη. Σε σύγκριση σε αμινοξικό επίπεδο το *blpX* ομοιάζει με πεπτιδικές αλληλουχίες αυτό-ανοσίας των συστημάτων των βακτηριοσινών των στελεχών CAG:236, LMG 18311, CNRZ1066 και του *Streptococcus salivarius* JIM8777.

Το *blpU* στο στέλεχος LMD9 φάνηκε με πειράματα ελλείψεων αυτού ή και των υπολοίπων φερομένων ως δομικά γονίδια βακτηριοσίνης, πως η συνδρομή του στο εύρος της δραστικότητας της βακτηριοσίνης είναι μικρή υποδεικνύοντας ότι ενδεχομένως ισχύει και στο στέλεχος ACA-DC 0040. Η δραστικότητα του προβλεπόμενου πεπτιδίου *blpK* δεν έχει μελετηθεί και το μεγαλύτερο τμήμα του εύρους της δραστικότητας της βακτηριοσίνης ενδέχεται να οφείλεται σε αυτό ή στις τροποποιήσεις από το μεγαλύτερο πεπτίδιο BlpG, συγκριτικά με το LMD9.

4.5 Οργάνωση περιοχής *blp* σε μεταγραφικό επίπεδο

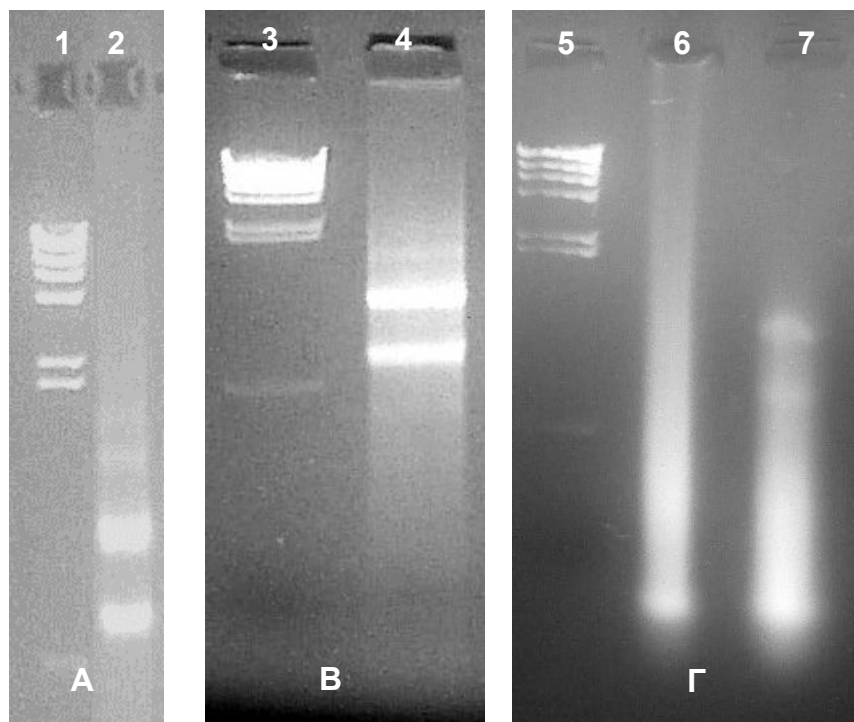
Βάσει μελετών που έχουν διεξαχθεί για την διερεύνηση της οργάνωσης των γονιδίων *blp* στο στέλεχος *S. thermophilus* LMD-9, έχει εντοπιστεί πειραματικά η ύπαρξη 6 οπερονίων (Fontaine et al., 2007). Η οργάνωση των γονιδίων στο στέλεχος ACA-DC 0040, σύμφωνα και με τις ομοιότητες που παρουσιάζονται με το στέλεχος LMD9, επιτρέπει την δημιουργία της υπόθεσης πως οργανώνεται σε 5 μεταγραφικές μονάδες.

Για την διερεύνηση της οργάνωσης της περιοχής *blp* σε μεταγραφικό επίπεδο, χρησιμοποιήθηκαν οι αναλύσεις με RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση), η μέθοδος υβριδισμού στυπώματος κατά Northern και τα πειράματα με q-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης real time).



Εικόνα 4.19 Προτεινόμενη οργάνωση των γονιδίων της περιοχής *blp* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 σε μεταγραφικό επίπεδο. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που βρέθηκαν στην αλληλουχία της περιοχής *blp* με βέλη πορτοκαλί χρώματος, 2 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που ομοιάζουν με τρανσποζάσες με πράσινο βέλος και σε στοίχιση με μπλε βέλη τα προτεινόμενα μετάγραφα της περιοχής.

Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν με ολικό RNA του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 το οποίο απομονώθηκε μετά από ανάπτυξη του οργανισμού σε διάφορα θρεπτικά μέσα, σε διαφορετικό χρόνο και με διάφορες μεθόδους απομόνωσης που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.9. Χαρακτηριστικά δείγματα απομόνωσης ολικού RNA φαίνονται στην εικόνα 4.20.



Εικόνα 4.20 Ηλεκτροφορήσεις δειγμάτων ολικού RNA από ACADC0040 σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8% με συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου 10 $\mu\text{g/ml}$. Διαφέρουν το θρεπτικό μέσο, ο χρόνος ανάπτυξης και η μέθοδος απομόνωσης RNA. (Α). 1: λ -*Hind*III. 2: M17, 4h, μέθοδος 3.9.1.

(Β). 3: λ -*Hind*III. 4: αποβουτυρωμένο γάλα, 2h, μέθοδος 3.9.2.

(Γ). 5: λ -*Hind*III. 6: αποβουτυρωμένο γάλα, 2h, μέθοδος 3.9.3. 7: αποβουτυρωμένο γάλα, 2h, μέθοδος 3.9.4.

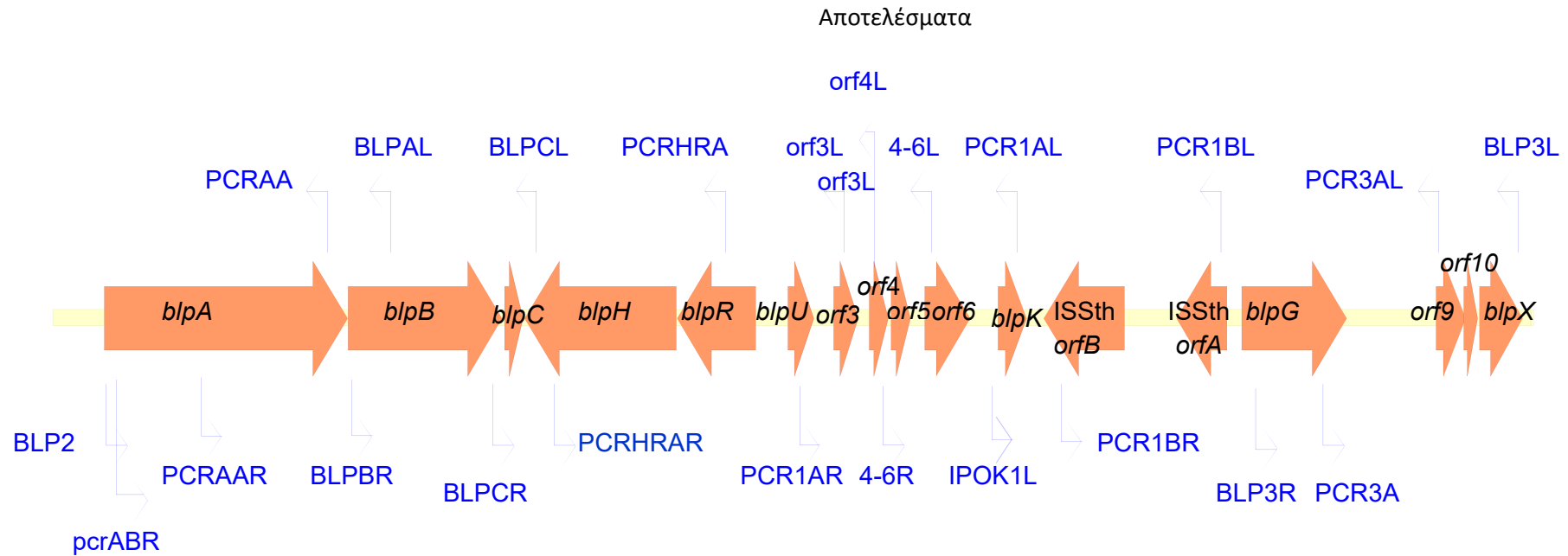
Οι δύο πρώτες μέθοδοι (3.9.1 και 3.9.2) χρησιμοποιήθηκαν κατά κόρον λόγω της μεγάλης καθαρότητας του απομονωμένου RNA και του μικρού ποσοστού κατάτμησής του σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των άλλων δύο μεθόδων (3.9.3 και 3.9.4).

4.5.1 Ανίχνευση δυνητικών μεταγράφων της περιοχής *b1p* του ACADC0040 μέσω RT-PCR (Reverse Transcript – PCR, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση)

Ο εντοπισμός μεταγράφων από αναγνωστικά πλαίσια της περιοχής *b1p* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 πραγματοποιήθηκε αρχικά με την μέθοδο RT-PCR. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ολικό RNA και εκκινητές που περιβάλλουν την προς μελέτη αλληλουχία για την ενίσχυση των παραγόμενων μορίων mRNA. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός της παρουσίας ακόμα και των μεταγράφων εκείνων που παράγονται σε μικρό αριθμό.

Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ολικό RNA από καλλιέργεια *S. thermophilus* ACA-DC 0040 που αναπτύχθηκε (i) σε θρεπτικό μέσο M17 με την προσθήκη 10% φιλτραρισμένου υπερκείμενου καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 για 4 ώρες (απομόνωση RNA § 3.9.1) ή (ii) σε αποβουτυρωμένο γάλα για 2 ώρες (απομόνωση RNA § 3.9.2). Στη συνέχεια υπέστη περαιτέρω επεξεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (rDNase, Takara) για την πλήρη απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DNA. Τα πειράματα έγιναν με την χρήση του πακέτου με έτοιμα αντιδραστήρια RobusT (§3.12.1) και με τη χρήση κατάλληλων θετικών και αρνητικών μαρτύρων για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των πειραμάτων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4 (κεφάλαιο Υλικά & Μέθοδοι) και η θέση τους πάνω στην αλληλουχία στην εικόνα 4.21.

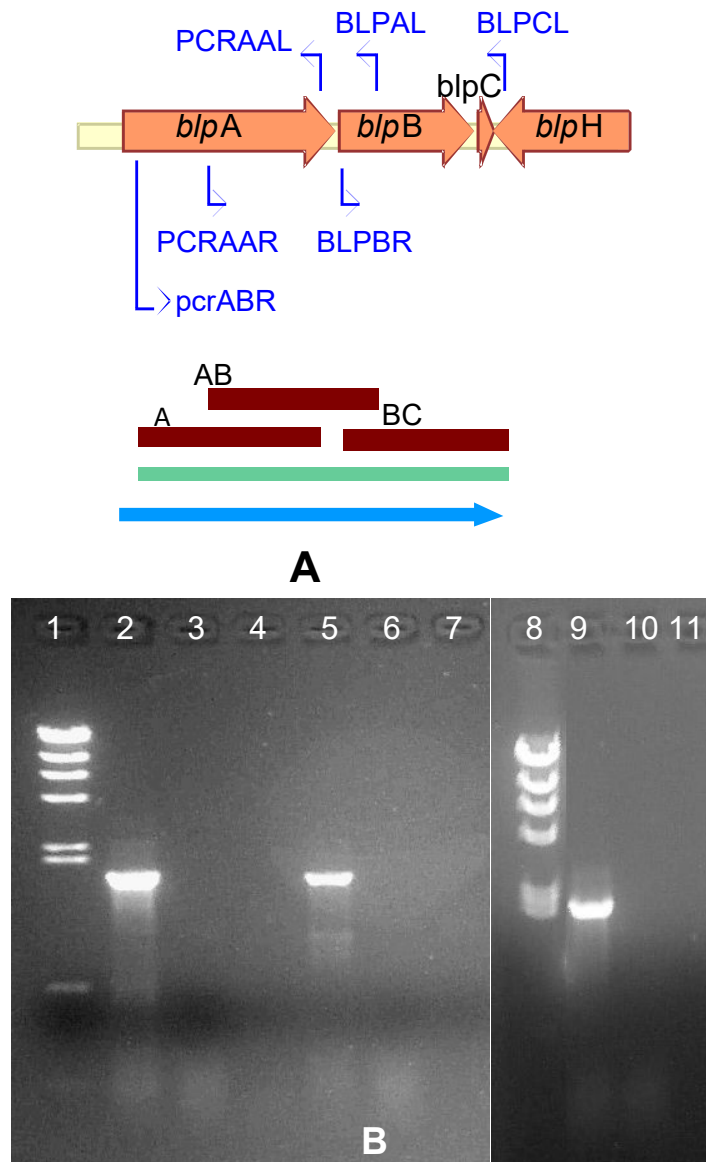
Στη συνέχεια παρουσιάζεται η πειραματική διαδικασία για καθεμία από τις 5 περιοχές που μελετήθηκαν ως προς τη μεταγραφή τους.



Εικόνα 4.21 Θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε RT-PCR, σε στοίχιση με την αλληλουχία της περιοχής *blp* του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040. Με πορτοκαλί βέλη εμφανίζονται τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης και με μπλε βέλη οι θέσεις των εκκινητών των πειραμάτων RT-PCR.

Η γονιδακή περιοχή *blpA-blpC*, φερόμενη ως υπεύθυνη για τη δημιουργία του συστήματος έκκρισης αλλά και της φερομόνης, μεταγράφεται σε ένα οπερόνιο σύμφωνα με τις μελέτες στην αντίστοιχη περιοχή στο στέλεχος LMD9. Για να διαπιστωθεί, αν αυτό συμβαίνει και στην αντίστοιχη περιοχή του ACADC0040, πραγματοποιήθηκε RT-PCR με ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν περιοχή ενός δυνητικού μεταγράφου και των τριών αναγνωστικών πλαισίων *blpABC* (PCRAAR-BLPCL). Από την αντίδραση αυτή δεν προέκυψε κάποιο αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών τα οποία ενισχύουν περιοχές του δυνητικού μεταγράφου που αντιστοιχούν σε μικρότερες περιοχές, το *blpA* (PCRAAL-PCRABR), *blpAB* (PCRAAR-BLPAL) και το *blpBC* (BLPBR-BLPCL). Τα αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων μαζί με το σχεδιασμό και τα αναμενόμενα προϊόντα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.22. Παρατηρείται ότι με αυτή την πειραματική διαδικασία προέκυψαν προϊόντα PCR στο αναμενόμενο μέγεθος. Η επικάλυψη αυτών των προϊόντων αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι από την περιοχή *blpABC* προκύπτει ένα μετάγραφο.

Η αδυναμία εντοπισμού του μεταγράφου που να αντιστοιχεί σε ολόκληρο το mRNA του οπερονίου *blpABC* ενδεχομένως να οφείλεται σε αστάθεια του μετάγραφου που έχει παρατηρηθεί και στο όμοιο του LMD9, καθώς και σε αντίστοιχα συστήματα έκκρισης των βακτηριοσινών plantaricin και sakacin (Fontaine et al., 2007).



Εικόνα 4.22 Αποτελέσματα πειραμάτων RT-PCR για την περιοχή *blpA-C* του ACADC0040.

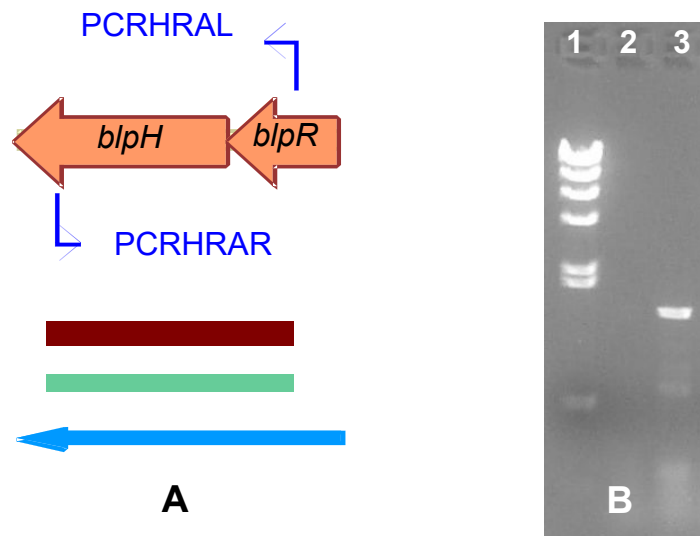
(A): Σχηματική απεικόνιση των αναγνωστικών πλαισίων, εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν με τις θέσεις τους επί της αλληλουχίας, μετάγραφο που ανιχνεύθηκαν (καφέ μπάρες), προτεινόμενο μετάγραφο για την περιοχή *blpA-C* (πράσινη μπάρα), μετάγραφο της περιοχής *blpA-C* σύμφωνα με την αρχική υπόθεση (μπλε βέλος).

(B): Ηλεκτροφόρηση RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου 10 μg/ml. 1, 8: λ -*Hind*III. 2: *blpAB* (αναμενόμενο μέγεθος 1709 bp). 3: *blpAB* χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση. 4: *blpAB* χωρίς RNA. 5: *blpBC* (αναμενόμενο μέγεθος 1668 bp). 6: *blpBC* χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση. 7: *blpBC*

Αποτελέσματα

χωρίς RNA. 9: *blpA* (αναμενόμενο μέγεθος 1867 bp) 10: *blpA* χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση. 11: *blpA* χωρίς RNA.

Η γονιδική περιοχή *blpRH*, φερόμενη ως υπεύθυνη για την απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα αίσθησης απαρτίας μέσω του συστήματος ρύθμισης δύο συστατικών, μεταγράφεται σε ένα οπερόνιο σύμφωνα με τις μελέτες στην αντίστοιχη περιοχή στο στέλεχος LMD9. Για να διαπιστωθεί, αν αυτό συμβαίνει και στην αντίστοιχη περιοχή του ACADC0040, πραγματοποιήθηκε RT-PCR με ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύει περιοχή ενός δυνητικού μεταγράφου των δύο αναγνωστικών πλαισίων *blpRH* (PCRHRAR-PCRHRAL). Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης μαζί με το σχεδιασμό και το αναμενόμενο προϊόν παρουσιάζονται στην εικόνα 4.23. Προέκυψε ένα προϊόν PCR στο αναμενόμενο μέγεθος, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μεταγράφου για τα δύο αυτά πιθανά γονίδια.



Εικόνα 4.23 Αποτελέσματα πειραμάτων RT-PCR για την περιοχή *blpRH* του ACADC0040.

(A): σχηματική απεικόνιση του αναγνωστικού πλαισίου, εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν με τις θέσεις τους επί της αλληλουχίας, μετάγραφο που ανιχνεύθηκε (καφέ μπάρα), προτεινόμενο μετάγραφο για την περιοχή *blpRH* (πράσινη μπάρα), μετάγραφο της περιοχής *blpRH* σύμφωνα με την αρχική υπόθεση (μπλε βέλος).

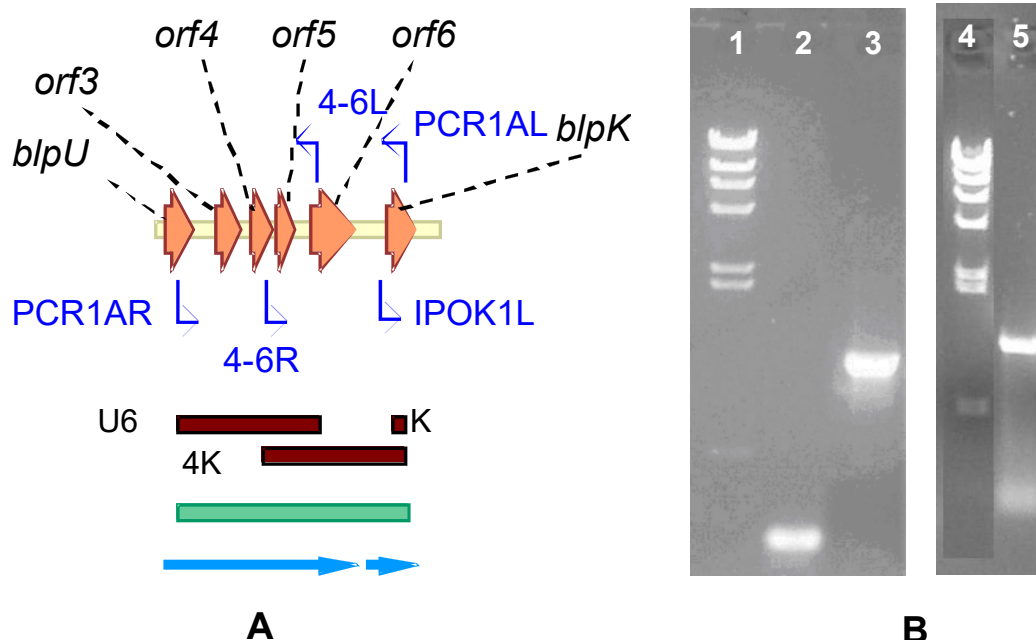
(B): Ηλεκτροφόρηση RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου 10 μg/ml. 1: λ -*Hind*III. 2: *blpRH* χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση. 3: *blpRH* (αναμενόμενο μέγεθος 1538 bp).

Η περιοχή *blpU-K* με τα φερόμενα ως δομικά γονίδια βιοσύνθεσης της βακτηριοσίνης καθώς και της ανοσίας σε αυτήν παρουσιάζει, όπως αναλύθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, ομοιότητες, αλλά και διαφορές σε ορισμένες περιοχές ως προς τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Κυρίως όμως παρουσιάζονται διαφορές ως προς την οργάνωση των αναγνωστικών πλαισίων τα οποία επιπλέον είναι λιγότερα σε αριθμό σε σύγκριση με την αντίστοιχη περιοχή του LMD9, ενώ εμφανίζει πολύ μεγάλη ομολογία στα προαναφερθέντα σημεία με αυτήν του LMG18311. Επομένως σχεδιάστηκαν εκκινητές για τη διερεύνηση της μεταγραφής όλων των αναγνωστικών πλαισίων τόσο σε ένα, όσο και σε περισσότερα mRNA και πραγματοποιήθηκαν πειράματα RT-PCR. Από την αντίδραση για την ανίχνευση μεταγράφου που να περιέχει όλα τα αναγνωστικά πλαίσια της περιοχής με τους εκκινητές PCR1AR-PCR1AL δεν προέκυψε αποτέλεσμα.

Αποτελέσματα

Κατά συνέπεια επιχειρήθηκε η τμηματική διερεύνηση περισσότερων αλληλεπικαλυπτόμενων μεταγράφων. Συγκεκριμένα, με το ζεύγος εκκινητών PCR1AR και 4-6L ανιχνεύθηκε ένα μετάγραφο που εκτείνεται από το *blpU* μέχρι το *orf6*, ενώ με το ζεύγος εκκινητών 4-6R και PCR1AL ένα μετάγραφο από το *orf4* μέχρι το *blpK*. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι πραγματοποιείται συμμεταγραφή των *blpUorf3orf4orf5orf6*, καθώς και των *orf4blpK*. Θα ήταν βεβαίως πιθανό να πραγματοποιείται συμμεταγραφή όλης της περιοχής. Το ότι το *blpK* συμμεταγράφεται τουλάχιστον με το ανοδικό του *orf6* καταδεικνύεται και από την αντίδραση με το ζεύγος εκκινητών IPOK1L και PCR1AL, όπου εμφανίζεται προϊόν PCR στο αναμενόμενο μέγεθος. Ο ανοδικός εκκινητής IPOK1L προσδένεται στην περιοχή ανοδικά του γονιδίου σε σημείο πριν από την έναρξη της μεταγραφής, επομένως θα εντοπιζόταν το αντίστοιχο μετάγραφο μόνο σε περίπτωση συμμεταγραφής με ανοδικό του γονίδιο.

Τα αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων μαζί με το σχεδιασμό και τα αναμενόμενα προϊόντα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.24.

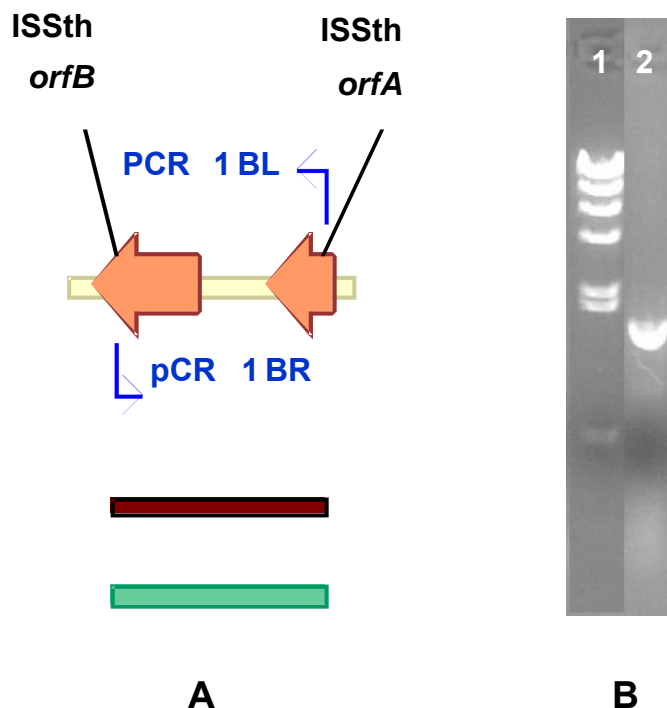


Εικόνα 4.24 Αποτελέσματα πειραμάτων RT-PCR για την περιοχή *blpU-K* του ACADC0040.

(A): σχηματική απεικόνιση των αναγνωστικών πλαισίων, εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν με τις θέσεις τους επί της αλληλουχίας, μετάγραφα που ανιχνεύθηκαν (καφέ μπάρες), προτεινόμενο μετάγραφο για την περιοχή *blpU-K* (πράσινη μπάρα), μετάγραφο της περιοχής *blpU-K* σύμφωνα με την αρχική υπόθεση (μπλε βέλη).

(B) Ηλεκτροφόρηση RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου 10 $\mu\text{g/ml}$. 1, 4: λ -*HindIII*. 2: *blpK*(IPOK1L-PCR1AL, αναμενόμενο μέγεθος 239bp). 3: *blpU6* (4-6L-PCR1AR, αναμενόμενο μέγεθος 1196 bp). 5: *blp4K* (4-6R-PCR1AL, αναμενόμενο μέγεθος 1196 bp).

Η περιοχή στην οποία εδράζονται αναγνωστικά πλαίσια με ομολογία προς αλληλουχίες τρανσποζασών μεταγράφεται σε ένα οπερόνιο, όπως διαπιστώθηκε από πειράματα RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών pCR1BR και PCR1BL που ενισχύουν την περιοχή ενός δυνητικού μεταγράφου των δύο αναγνωστικών πλαισίων *ISSthorfA-B*. Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης μαζί με το σχεδιασμό και το αναμενόμενο προϊόν παρουσιάζονται στην εικόνα 4.25, από την οποία συνάγεται ότι εντοπίστηκε ένα προϊόν PCR στο αναμενόμενο μέγεθος.



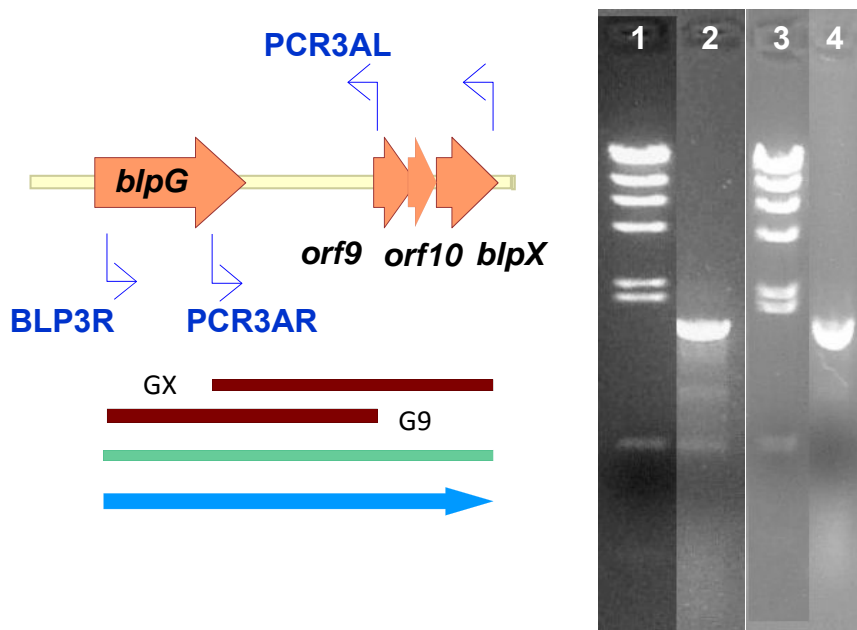
Εικόνα 4.25 Αποτελέσματα πειραμάτων RT-PCR για την περιοχή *ISSthorfA-B* του ACADC0040.

Αποτελέσματα

(A): σχηματική απεικόνιση του αναγνωστικού πλαισίου, εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν με τις θέσεις τους επί της αλληλουχίας, μετάγραφο που ανιχνεύθηκε (καφέ μπάρα), προτεινόμενο μετάγραφο για την περιοχή *blpRHISSthorfA-B* (πράσινη μπάρα).

(B): Ηλεκτροφόρηση RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου 10 µg/ml. 1: λ-*HindIII*. 2: *orfBA* (εκκινήτες pCR1BR και PCR1BL)

Για την περιοχή *blpG-blpX*, με φερόμενη ως λειτουργία την τροποποίηση των πεπτιδίων της βακτηριοσίνης με δισουλφιδικούς δεσμούς καθώς και με τα γονίδια *orf9-blpX* άγνωστης λειτουργίας ανιχνεύθηκαν στο στέλεχος LMD9 δύο μετάγραφα, ένα που αντιστοιχούσε στο *blpG-orf8* και ένα που αντιστοιχούσε στο σύνολο των γονιδίων *blpG-blpX*. Στην αντίστοιχη περιοχή των στελεχών ACA-DC0040 και LMG 18311, όπως έχει σχολιαστεί και σε προηγούμενη ενότητα, το *blpG* εκτείνεται κατά μήκος των *blpG* και *orf8*.



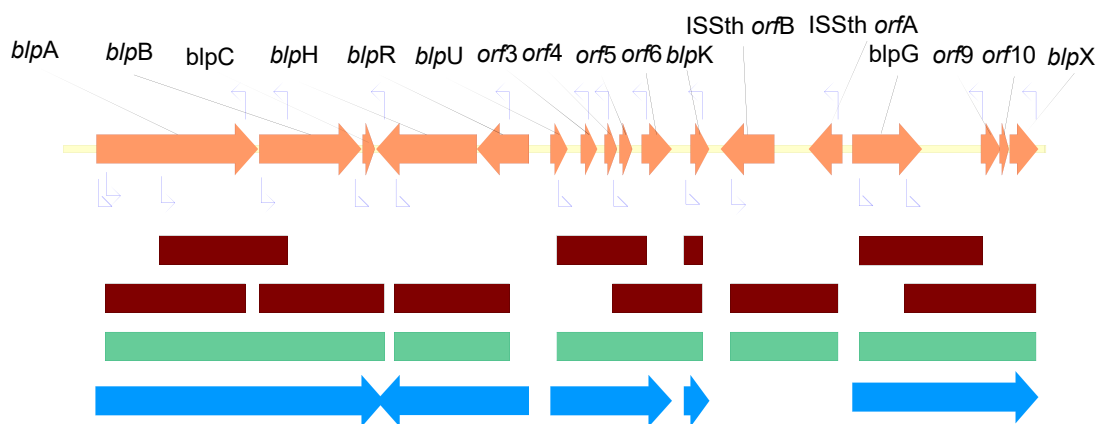
Εικόνα 4.26 Αποτελέσματα πειραμάτων RT-PCR για την περιοχή *blpG-blpX* του ACADC0040.

(A): σχηματική απεικόνιση του αναγνωστικού πλαισίου, εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν με τις θέσεις τους επί της αλληλουχίας, μετάγραφο που ανιχνεύθηκαν (καφέ μπάρα), προτεινόμενο μετάγραφο για την περιοχή *blpG-blpX* (πράσινη μπάρα), μετάγραφο της περιοχής *blpG-blpX* σύμφωνα με την αρχική υπόθεση (μπλε βέλος).

(B): Ηλεκτροφόρηση RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου 10 µg/ml. 1, 3: λ-*Hind*III. 2: *blpG-orf9* (PCR3AL-PCR3R, αναμενόμενο μέγεθος 1688 bp). 4: *blpG-X* (BLP3L-PCR3AR, αναμενόμενο μέγεθος 1865 bp).

Για το στέλεχος ACA-DC0040 πραγματοποιήθηκε RT-PCR με ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν δύο αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές ενός δυνητικού μεταγράφου του συνόλου των αναγνωστικών πλαισίων και συγκεκριμένα μία που θα κάλυπτε την περιοχή *blpG-blpX* και μία την περιοχή *blpG-orf9*. Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης μαζί με το σχεδιασμό και το αναμενόμενο προϊόν παρουσιάζονται στην εικόνα 4.26, από την οποία συνάγεται ότι εντοπίστηκαν δύο προϊόντα PCR στα αναμενόμενα μεγέθη, επομένως καταδεικνύεται η ύπαρξη τουλάχιστον ενός μεταγράφου του συνόλου της υπό μελέτη περιοχής.

Στην εικόνα 4.20 παρουσιάζονται σχηματικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε σύγκριση με την αλληλουχία της περιοχής *blp* και με την υποθετική οργάνωση σε μετάγραφα.



Εικόνα 4.27 Αποτελέσματα RT-PCR σε στοίχιση με την αλληλουχία της περιοχής *blp* του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040. Με πορτοκαλί βέλη εμφανίζονται τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, με μικρά μπλε βέλη οι θέσεις των εκκινητών των πειραμάτων RT-PCR, με κόκκινα τετράγωνα εμφανίζονται τα μετάγραφα που εντοπίστηκαν με τα πειράματα RT-PCR, με πράσινα τετράγωνα εμφανίζονται τα μετάγραφα που φαίνονται να υπάρχουν σε τελική μορφή με τα μέχρι τώρα δεδομένα και με μεγάλα μπλε βέλη τα αναμενόμενα μετάγραφα σύμφωνα με την αρχική υπόθεση.

4.5.2 Πειράματα υβριδισμού στυπώματος κατά Northern.

Η μέθοδος RT-PCR προσφέρει σημαντικά στοιχεία για την συμμεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων. Εντούτοις, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα μόνο για την περιοχή που περικλείεται από το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών και κατά συνέπεια δεν υπάρχει η δυνατότητα εξακρίβωσης του μεγέθους ολόκληρου του μετάγραφου. Επιπλέον, σε κάποια οπερόνια υπάρχει περίπτωση, εκτός της συμμεταγραφής, να πραγματοποιείται υπό ορισμένες συνθήκες επιπλέον μεταγραφή μεμονωμένων γονιδίων ή υποομάδας γονιδίων ξεχωριστά, γεγονός που δεν είναι δυνατόν να εξακριβωθεί μέσω RT-PCR.

Τα πειράματα υβριδισμού Northern πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον εντοπισμό μορίων mRNA που θα αντιστοιχούσαν σε μετάγραφα της περιοχής *blp* του ACADC0040, να συνδυαστούν με αυτά που προέκυψαν από τα πειράματα της RT-PCR και κατά συνέπεια να εξαχθούν συμπληρωματικά συμπεράσματα για τον τρόπο μεταγραφής των αναγνωστικών πλαισίων της. Κύριο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή στην οποία εδράζονται τα πιθανά δομικά γονίδια βιοσύνθεσης της βακτηριοσίνης μαζί με τα αντίστοιχα ανοσίας σε αυτήν, ως η πιο σύνθετη σε μεταγραφικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ολικό RNA από καλλιέργεια *S. thermophilus* ACA-DC 0040 που αναπτύχθηκε:

- σε θρεπτικό μέσο M17 με την προσθήκη 10% φιλτραρισμένου υπερκείμενου καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 για 3 ώρες και 30 λεπτά (απομόνωση RNA § 3.9.1)
- σε αποβουτυρωμένο γάλα για 2 ώρες (απομόνωση RNA § 3.9.2)

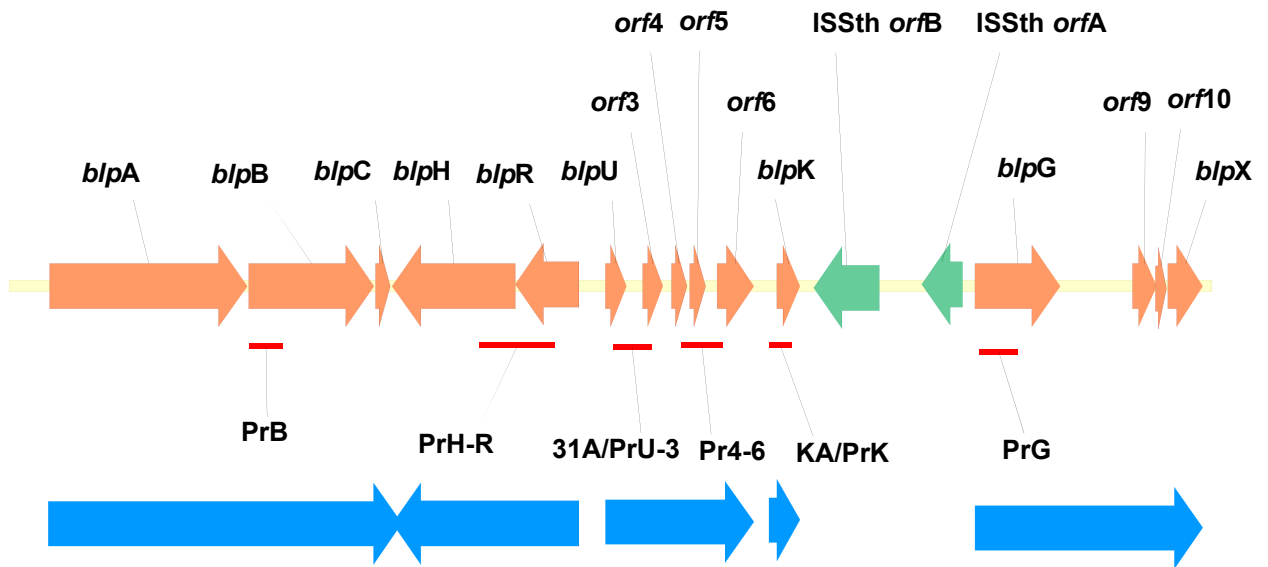
Το ολικό RNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε μαζί με τον μοριακό δείκτη βαρών λ -HindIII και τον εκάστοτε θετικό μάρτυρα (αφού υπέστησαν την κατάλληλη επεξεργασία) σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8% (§3.10.2). Ακολούθησε η μεταφορά του RNA σε μεμβράνη και η διαδικασία του μη ραδιενεργού υβριδισμού RNA-DNA (§3.21) με τον κάθε σημασμένο ιχνηθέτη.

Για τον υβριδισμό Northern κατασκευάστηκαν μία σειρά από ιχνηθέτες DNA που αντιστοιχούσαν σε συγκεκριμένα πεδία της περιοχής *blp* τα οποία δυνητικά εμπεριέχονται σε πιθανά μετάγραφα αυτής. Κάθε ιχνηθέτης συντέθηκε με ενίσχυση μέσω PCR ή RT/PCR. Οι ιχνηθέτες με τους εκκινητές κάθε αντίδρασης παρουσιάζονται στον πίνακα 4.4, ενώ οι θέσεις τους σε στοίχιση με την αλληλουχία της περιοχής *blp* στην εικόνα 4.21.

Θετικό (ασθενές) σήμα εμφανίστηκε μόνο στα πειράματα που αφορούσαν υβριδισμό RNA με τους ιχνηθέτες που αντιστοιχούσαν στα *blpU-orf3* (31A) και *blpK* (KA και PrK) της περιοχής *blpU-K* η οποία συγκέντρωσε άλλωστε και το κύριο ενδιαφέρον.

Πίνακας 4.4. Στοιχεία για την οργάνωση των πειραμάτων Northern.

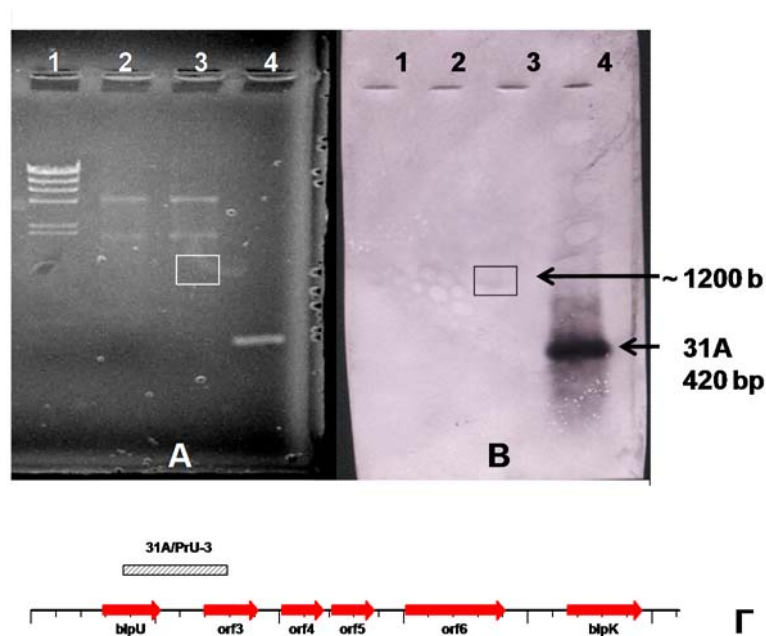
Όνομα ιχνηθέτη	Μετάγραφο/-α υπό ανίχνευση	Εκκινητές	Μέγεθος	Αντίδραση	Αποτέλεσμα
KA	<i>blpK</i>	IPOK1L PCR1AL	239 bp	RT-PCR	+
31A	<i>blpUorf3</i>	PCR1AR orf3L	420 bp	RT-PCR	+
PrK	<i>blpK</i>	IPOK1L PCR1AL	239 bp	PCR	+
PrU-3	<i>blpUorf3</i>	PCR1AR orf3L	420 bp	PCR	-
Pr4-6	<i>Orf456</i>	4-6R 4-6L	450 bp	PCR	-
PrB	<i>blpB</i>	BLPBR BLPAL	371 bp	PCR	-
PrH-R	<i>blpRH</i>	pcrHRBR PCRHRAL	828 bp	PCR	-
PrG	<i>blpG</i>	BLP3R BLP1F	416 bp	PCR	-



Εικόνα 4.28. Θέση των ιχνηθετών επί της περιοχής *blp* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040. Με πορτοκαλί βέλη εμφανίζονται τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, με πράσινα βέλη οι αλληλουχίες τρανσποζασών, με μπλε βέλη τα μετάγραφα σύμφωνα με την αρχική υπόθεση και με κόκκινες παύλες οι θέσεις των ιχνηθετών των πειραμάτων υβριδισμού στυπώματος κατά Northern.

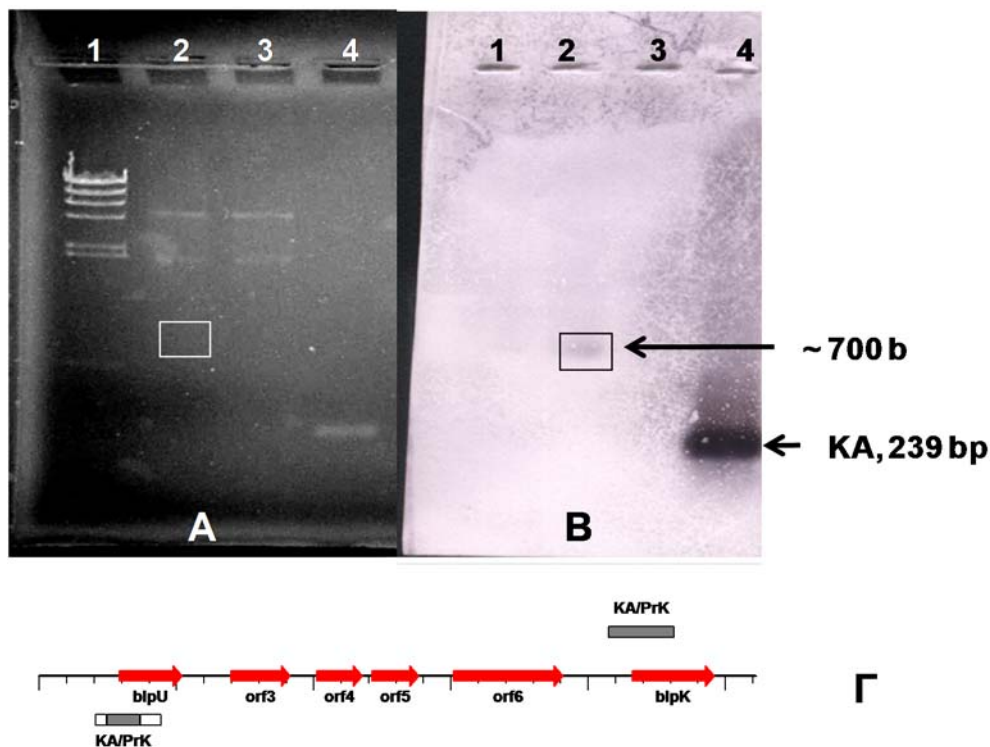
Συγκεκριμένα, σημειώθηκε υβριδισμός με ιχνηθέτη τον 31A (420 bp, εκτείνεται από το μέσον του *blpU* έως το μέσον του παρακείμενου *orf3*) σε ολικό RNA καλλιέργειας ACA ανεπτυγμένης σε M17 + 10% φιλτραρισμένου υπερκείμενου καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 για 3 ώρες (Εικόνα 4.29). Η ζώνη που εμφανίστηκε είχε μέγεθος περίπου 1200 b το οποίο θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε ένα δυνητικό μετάγραφο *blpUorf345*. Αυτό θα ήταν πιθανό, αν θεωρηθεί ότι το *orf6* ξεκινά σε ένα επόμενο ATG περίπου 180 bp καθοδικά αυτού που έχει μέχρι τώρα καθοριστεί. Μέσω αυτής της υπόθεσης θα μπορούσε να ερμηνευθεί και η ύπαρξη του προϊόντος RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών PCR1R / 4-6L (κεφ. 4.5.1): ο PCR1R προσδένεται στην αρχή του *blpU* και ο 4-6L στην αρχή του *orf6* που είχε αρχικά προβλεφθεί. Μία άλλη πιθανή ερμηνεία είναι ότι πρόκειται για μεγαλύτερο μετάγραφο που περιλαμβάνει και το *blpK* στο οποίο όμως δεν έχει ολοκληρωθεί η μεταγραφή (λαμβάνομένου υπόψιν ότι τα μεγάλα μετάγραφα είναι και πιο ασταθή). Αξίζει να

σημειωθεί εδώ ότι στον LMD9 δεν παρατηρήθηκε σήμα υβριδισμού σε πειράματα Northern το οποίο να περιλάμβανε τα αντίστοιχα *orf456*, ενώ δεν υπάρχει γονίδιο αντίστοιχο του *blpK* σε αυτόν τον οργανισμό.

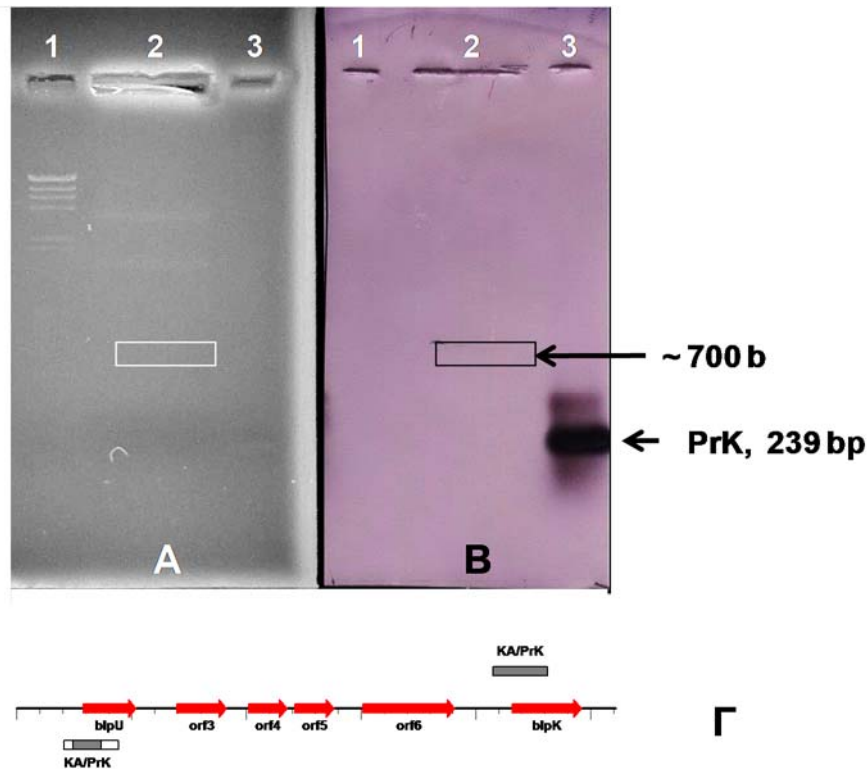


Εικόνα 4.29 Υβριδισμός Northern σε ολικό RNA του ACA-DC 0040 ανεπτυγμένου σε M17 + 10% φιλτραρισμένου υπερκείμενου καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 με ιχνηθέτη το 31A (*blpUorf3*), 420 bp. 1: λ -*Hind*III, 2: ολικό RNA απομονωμένο μετά από 30 min ανάπτυξης, 3: ολικό RNA απομονωμένο μετά από 3 h ανάπτυξης, 4: ιχνηθέτης 31A. **A**) Πήγμα ηλεκτροφόρησης, **B**) Φίλτρο υβριδισμού Northern, **Γ**) Θέση και ομολογία (γραμμωτή μπάρα) του ιχνηθέτη στην περιοχή *blpU-K*.

Στην περίπτωση των ιχνηθετών KA και PrK (*blpK*) παρουσιάστηκε υβριδισμός σε ολικό RNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια ACA ανεπτυγμένη τόσο σε θρεπτικό μέσο M17 με την προσθήκη 10% φιλτραρισμένου υπερκείμενου καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 για 30 min (Εικόνα 4.30), όσο και σε αποβουτυρωμένο γάλα για 2 ώρες (Εικόνα 4.31). Κι εδώ παρατηρήθηκε ασθενές σήμα υβριδισμού, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι εμφανίστηκε ζώνη ίδιου μεγέθους (700 b) και στις 2 περιπτώσεις.



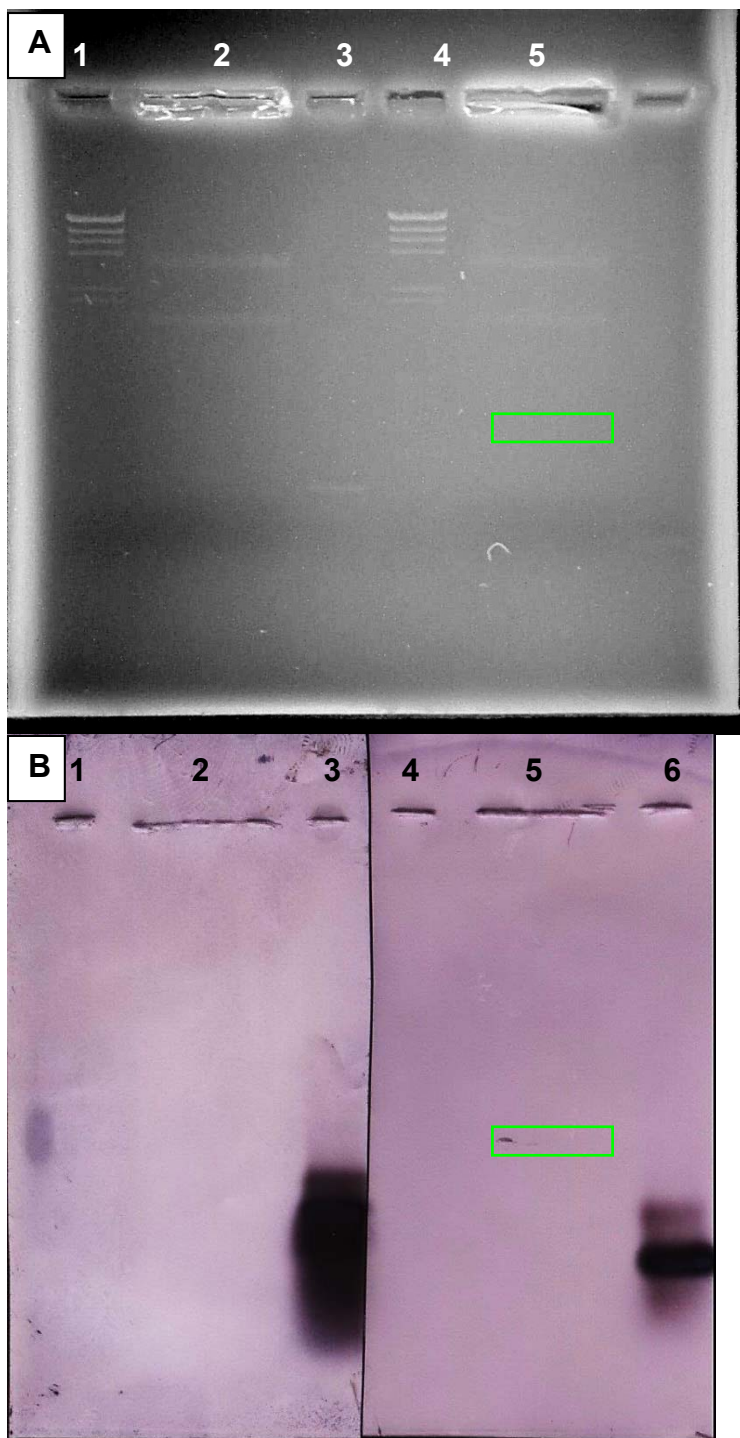
Εικόνα 4.30 Υβριδισμός Northern σε ολικό RNA του ACA-DC 0040 ανεπτυγμένου σε M17 + 10% φιλτραρισμένου υπερκείμενου καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 με ιχνηθέτη το KA (*blpK*), 239 bp. 1: λ -*Hind*III, 2: ολικό RNA απομονωμένο μετά από 30min ανάπτυξης, 3: ολικό RNA απομονωμένο μετά από 3 h ανάπτυξης, 4: ιχνηθέτης KA. **A)** Πήγμα ηλεκτροφόρησης, **B)** Φίλτρο υβριδισμού Northern, **Γ)** Θέση (δύο μπάρες) και ομολογία (σκούρα περιοχή της μπάρας) του ιχνηθέτη στην περιοχή *blpU-K*. Το σημείο στο φίλτρο όπου εμφανίστηκε το σήμα πλαισιώνεται με μαύρο τετράγωνο, ενώ με λευκό η θέση στην οποία αντιστοιχεί στο πήγμα αγαρόζης.



Εικόνα 4.31 Northern σε ολικό RNA του ACA-DC 0040 ανεπτυγμένου σε αποβουτυρωμένο γάλα με ιχνηθέτη το PrK (*blpK*), 239 bp. 1: λ -*Hind*III, 2: ολικό RNA απομονωμένο μετά από 2 h ανάπτυξης, 3: ιχνηθέτης PrK. **A)** Πήγμα ηλεκτροφόρησης, **B)** Φίλτρο υβριδισμού Northern, **Γ)** Θέση (δύο μπάρες) και ομολογία (σκούρα περιοχή της μπάρας) του ιχνηθέτη στην περιοχή *blpU-K*. Το σημείο στο φίλτρο όπου εμφανίστηκε το σήμα πλαισιώνεται με μαύρο τετράγωνο, ενώ με λευκό η θέση στην οποία αντιστοιχεί στο πήγμα αγαρόζης.

Ο ιχνηθέτης KA/PrK έχει την ιδιαιτερότητα να παρουσιάζει ομολογία με δύο περιοχές εντός του πεδίου *blpU-K*. Η ομολογία αυτή φαίνεται στις εικόνες 4.30 (ή 4.31) Γ. Στη μία περίπτωση ο ιχνηθέτης παρουσιάζει σε όλο το μήκος του (σκούρα μπάρα δεξιά) πλήρη ταύτιση με τμήμα του γονιδίου *blpK* (εκφράζει το πεπτιδίο οδηγό) μαζί με την ανοδική του περιοχή στην οποία εδράζεται ο πιθανός υποκινητής του. Στη δεύτερη περίπτωση ο ιχνηθέτης παρουσιάζει σε ένα μέρος του (σκούρο τμήμα της μπάρας αριστερά) πλήρη ταύτιση με τμήμα του γονιδίου *blpU* (εκφράζει το πεπτιδίο οδηγό) μαζί με την ανοδική του περιοχή μέχρι την πιθανή έναρξη της μεταγραφής στην οποία εδράζεται ο πιθανός υποκινητής του. Αυτό συμβαίνει, διότι έχει διαπιστωθεί από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ότι μεταξύ των γονιδίων *blpU* και *blpK* υπάρχει ομολογία σχεδόν 100 % στην περιοχή του υποκινητή μέχρι την έναρξη της μετάφρασης, καθώς και στην αλληλουχία του γονιδίου που αντιστοιχεί στο πεπτιδίο οδηγό.

Κατά συνέπεια, το σήμα υβριδισμού που εμφανίζεται μπορεί να αντιστοιχεί σε πρόσδεση του ιχνηθέτη με ένα από τα δύο πιθανά μετάγραφα που περιέχουν ή το *blpU* ή το *blpK*. Από το μέγεθός του (~ 700 b) συνάγεται ότι το μοναδικό μετάγραφο του οποίου η παρουσία μπορεί να δικαιολογηθεί σύμφωνα με την υπόθεση που διατυπώνεται για τη γενετική οργάνωση της περιοχής *blp* είναι το *blpUorf3*, γεγονός που συμβαδίζει και με τα ευρήματα για το στέλεχος LMD9.



Εικόνα 4.32. Πείραμα υβριδισμού κατά Northern με RNA απομονωμένο από αποβουτυρωμένο γάλα.

A) Πήγμα ηλεκτροφόρησης πριν από στύπωμα Northern.

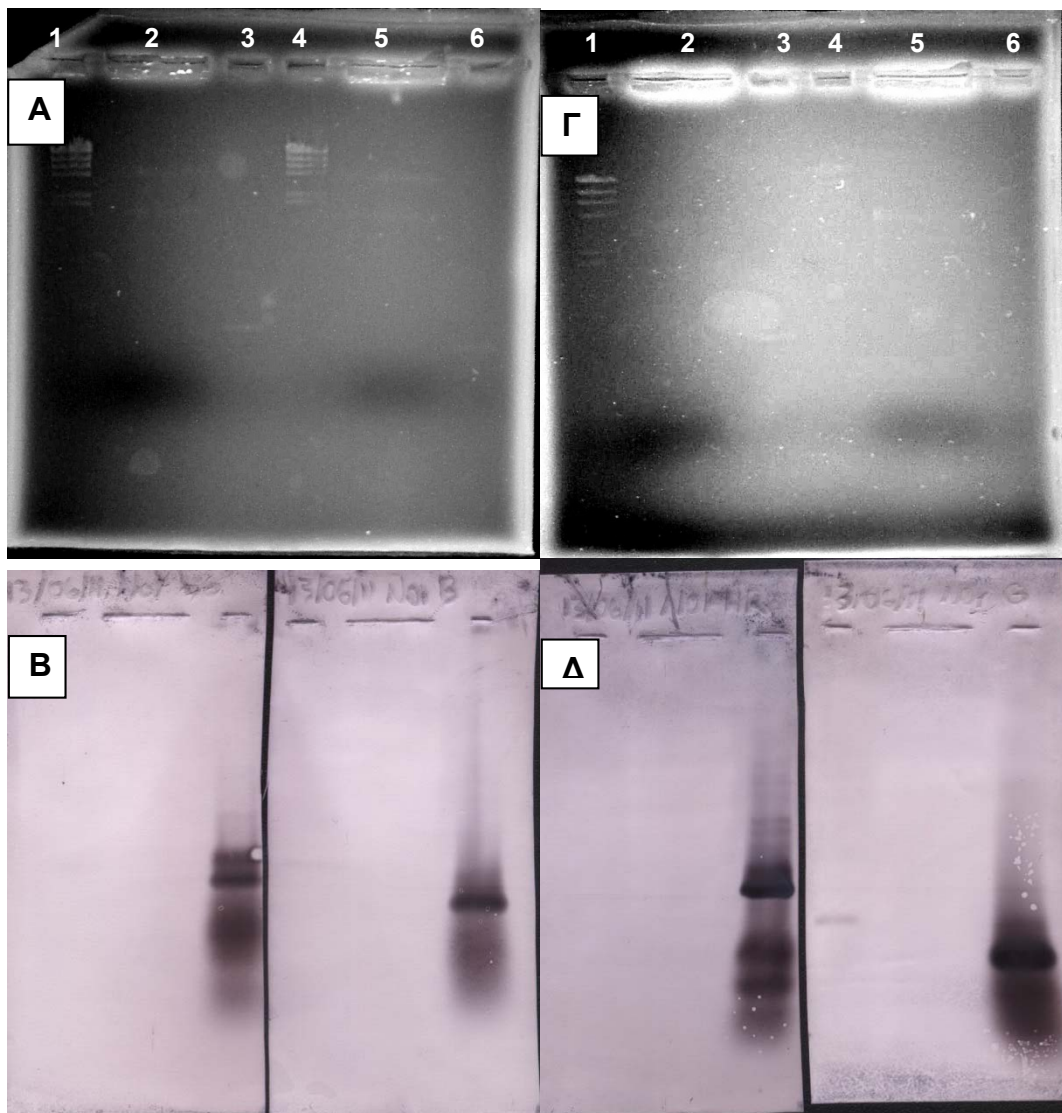
Διαδρομές 1: λ -HindIII, 2: RNA, 3: **PrU-3**, 4: λ -HindIII, 5:RNA, 6: **PrK**. Το πήγμα εμφανίζεται διαχωρίστηκε σε 2 ίσα τμήματα για την διεξαγωγή 2 υβριδισμών, οι

Αποτελέσματα

διαδρομές 1-3 σε ένα πείραμα με ιχνηθέτη το PrU-3 (*blpUorf3*) και οι διαδρομές 4-6 σε διαφορετικό με ιχνηθέτη το PrK (*blpK*).

Β) Τα φίλτρα με τα σήματα υβριδισμού του πηγματος στην εικόνα Α σε στοιχισμένο μέγεθος και με τις διαδρομές σε αντιστοιχία με τις διαδρομές της εικόνας Α.

Με το πράσινο τετράγωνο περιβάλλεται το ασθενές σήμα στο φίλτρο και η αντίστοιχη θέση του στο πηγμα, με υπολογισμένο μέγεθος περίπου 700 bp για το PrK



Εικόνα 4.33 Πείραμα υβριδισμού κατά Northern με RNA απομονωμένο από άπαχο γάλα.

Α) Πηγμα ηλεκτροφόρησης πριν από στύπωμα Northern.

Διαδρομές 1: λ -*Hind*III, 2: RNA, 3: Pr4-6, 4: λ -*Hind*III, 5:RNA, 6: PrB. Το πηγμα εμφανίζεται διαχωρίστηκε σε 2 ίσα τμήματα για την διεξαγωγή 2 υβριδισμών, οι

διαδρομές 1-3 σε ένα πείραμα με ιχνηθέτη το Pr4-6 και οι διαδρομές 4-6 σε διαφορετικό με ιχνηθέτη το PrB.

Β) Τα φίλτρα με τα σήματα υβριδισμού του πηγματος στην εικόνα Α σε στοιχισμένο μέγεθος και με τις διαδρομές σε αντιστοιχία με τις διαδρομές της εικόνας Α.

Γ) Πήγμα ηλεκτροφόρησης πριν από στύπωμα Northern.

Διαδρομές 1: λ-*Hind*III, 2: RNA, 3: PrH-R, 4: λ-*Hind*III, 5:RNA, 6: PrG. Το πήγμα εμφανίζεται διαχωρίστηκε σε 2 ίσα τμήματα για την διεξαγωγή 2 υβριδισμών, οι διαδρομές 1-3 σε ένα πείραμα με ιχνηθέτη το PrH-R και οι διαδρομές 4-6 σε διαφορετικό με ιχνηθέτη το PrG.

Δ) Τα φίλτρα με τα σήματα υβριδισμού του πηγματος στην εικόνα Γ σε στοιχισμένο μέγεθος και με τις διαδρομές σε αντιστοιχία με τις διαδρομές της εικόνας Γ.

4.5.3 q-PCR (ποσοτική PCR ή PCR πραγματικού χρόνου, quantitative ή real time PCR)

Η μέθοδος q-PCR χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη του επιπέδου μεταγραφής του γονιδίου *bipU* σε όλα τα πιθανά μετάγραφα συγκριτικά με το γονίδιο *bipK* σε ένα μετάγραφο στο οποίο συμμεταγράφεται αποκλειστικά μαζί με το *bipU*. Τα γονίδια αυτά φέρονται και ως δομικά γονίδια της βακτηριοσίνης thermophilin T στο στέλεχος ACA-DC 0040, και μελετήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Από τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τον αριθμό μεταγράφων που παράγονται από αυτές τις περιοχές συγκριτικά με τη δραστικότητα της βακτηριοσίνης υπό τις ίδιες συνθήκες, καθώς και για την συσχέτιση της παρουσίας των δύο αυτών μεταγράφων.

Οι βιολογικές συνθήκες προς εξέταση, στις οποίες αναπτύχθηκαν οι καλλιέργειες και απομονώθηκε RNA ήταν

- ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο M17 για 2 ώρες, όπου εμφανίζεται πολύ μικρή ή καθόλου δραστικότητα της βακτηριοσίνης, και απομόνωση RNA (**M17**)
- ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο M17 + 10% διηθημένης καλλιέργειας *L. lactis* για 45 λεπτά (πριν την εμφάνιση δραστικότητας βακτηριοσίνης) και απομόνωση RNA (**M17IF0**)
- ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο M17 + 10% διηθημένης καλλιέργειας *L. lactis* για 5 ώρες (μετά την εμφάνιση δραστικότητας βακτηριοσίνης) και απομόνωση RNA (**M17IF0**)
- Ανάπτυξη σε αποβουτυρωμένο γάλα για 2 ώρες και απομόνωση RNA (**Skim Milk**)

Πίνακας 4.5 Τα RNA και οι συγκεντρώσεις τους, από 1 µg των οποίων δημιουργήθηκαν cDNA που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις q-PCR.

Βιολογική συνθήκη	Τίτλος	Συγκέντρωση
M17	M17.1	170 ng/µl
	M17.2	181 ng/µl
	M17.3	250 ng/µl
M17IF0	M17IF0.1	91 ng/µl
	M17IF0.2	80 ng/µl
	M17IF0.3	301 ng/µl
M17IF1	M17IF1.1	892 ng/µl
	M17IF1.2	800 ng/µl
	M17IF1.3	786 ng/µl
Skim milk	Skim milk.1	316 ng/µl
	Skim milk.2	265 ng/µl
	Skim milk.3	142 ng/µl

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων από κάθε βιολογική συνθήκη απομονώθηκαν 3 διαφορετικά δείγματα RNA, από τα οποία συγκεκριμένη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία cDNA, και σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές αντιδράσεις q-PCR. Κάθε σειρά αντιδράσεων q-PCR για ένα δείγμα RNA ελέγχθηκε με έναν αρνητικό μάρτυρα που δεν περιέχει αντίστροφη μεταγραφάση, καθώς επίσης κάθε ζεύγος εκκινητών ελέγχθηκε με έναν αρνητικό μάρτυρα που δεν περιέχει υπόστρωμα. Συνολικά για κάθε βιολογική συνθήκη πραγματοποιήθηκαν 13 αντιδράσεις ανά ζεύγος εκκινητών.

Οι εκκινητές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην q-PCR υπόκεινται σε ένα περιορισμό ως προς το μέγεθος της αλληλουχίας που ενισχύουν, με το εύρος της να κυμαίνεται στις 50-250 bp. Για να ελεγχθούν τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *blpU* και του *blpK* χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένοι εκκινητές που ενίσχυσαν τμήματα των αλληλουχιών τους. Οι εκκινητές για το *blpU* ήταν οι U-3R – BLP2L που ενισχύουν μια αλληλουχία μήκους 86 bp στο μέσο του γονιδίου, και για το *blpK* οι IPOK1L – PCR1AL που ενισχύουν μία αλληλουχία μήκους 239 bp από ένα σημείο ανοδικά του γονιδίου *blpK* έως το μέσο του, εξασφαλίζοντας την ενίσχυση μόνο σε περίπτωση συμμεταγραφής των *blpU* και *blpK* σε ένα mRNA.

Οι αντιδράσεις q-PCR δύνανται να πραγματοποιηθούν σε ένα ή δύο βήματα. Στη διαδικασία με ένα βήμα απαιτείται η χρήση RNA ως υποστρώματος σε κάθε αντίδραση, ενώ στη διαδικασία των δύο βημάτων το RNA χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την δημιουργία cDNA και αυτό με τη σειρά του χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα σε κάθε αντίδραση. Η διαδικασία των 2 βημάτων, η οποία και ακολουθήθηκε, εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Για την παραγωγή cDNA χρησιμοποιήθηκε 1 µg από κάθε RNA με λόγο καθαρότητας A_{260}/A_{280} μεγαλύτερο του 1,8 σε μία αντίδραση με το ένζυμο PrimeScript RT reagent Ki (Perfect Real Time) της εταιρείας TaKaRa σύμφωνα με τις οδηγίες του ενζύμου.

Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο στρατηγικές. Στην πρώτη, την απόλυτη ποσοτικοποίηση, χρησιμοποιούνται οι καμπύλες ρύθμισης για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων ή τη συγκέντρωση ενός δείγματος. Στη δεύτερη, τη σχετική ποσοτικοποίηση, συγκρίνονται δεδομένα των προς μελέτη γονιδίων με δεδομένα ενός γονιδίου αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναλογίας μεταξύ τους, στρατηγική που ακολουθείται κυρίως για μελέτες έκφρασης γονιδίων. Εφαρμόστηκε η σχετική ποσοτικοποίηση στην οποία δοκιμάστηκαν 3 ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν γονίδια με σταθερή έκφραση, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, ώστε να επιλεγθεί το καταλληλότερο. Τα γονίδια ήταν τα *ldh*, που κωδικοποιεί την γαλακτική

αφυδρογονάση, το *rpoA* που κωδικοποιεί την άλφα υπομονάδα της RNA πολυμεράσης, και το *16S rRNA* (Ibrahim et al., 2007, La Gioia et al., 2011).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *realtimeldhS.the* – *realtimeldhRevS* για το *ldh*, οι *Realtime16SRevS* – *Realtime16SS.the* για το *16S rRNA* και οι *realtimerporevS.* – *realtimerpoS.the* για το *rpo*.

		Γονίδιο <i>blpU</i>		Γονίδιο <i>blpK</i>		Γονίδιο αναφοράς	
		Αντιδράσεις	NRT	Αντιδράσεις	NRT	Αντιδράσεις	NRT
M17	RNA1	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA2	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA3	Green	Red	Green	Red	Green	Red
M17IF0	RNA1	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA2	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA3	Green	Red	Green	Red	Green	Red
M17IF1	RNA1	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA2	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA3	Green	Red	Green	Red	Green	Red
Skim milk	RNA1	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA2	Green	Red	Green	Red	Green	Red
	RNA3	Green	Red	Green	Red	Green	Red
NT		Red	Red	Red	Red	Red	Red

Εικόνα 4.34 Γραφική απεικόνιση της κατηγοριοποίησης των αντιδράσεων στα πειράματα q-PCR. Τα τετράγωνα με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τις αντιδράσεις από τις οποίες διεξάγονται συμπεράσματα και με κόκκινο τις αντιδράσεις ελέγχου των αρνητικών μαρτύρων. Με το NRT (No Reverse Transcript) συμβολίζονται οι αντιδράσεις των αρνητικών μαρτύρων στις οποίες δεν έχει γίνει αντίστροφη μεταγραφή και δεν έχει χρησιμοποιηθεί cDNA ως υπόστρωμα αλλά RNA. Με το NT (No Template) συμβολίζονται οι αντιδράσεις των αρνητικών μαρτύρων στις οποίες δεν έχει προστεθεί υπόστρωμα.

Αποδοτικότητα της ενίσχυσης (amplification efficiency)

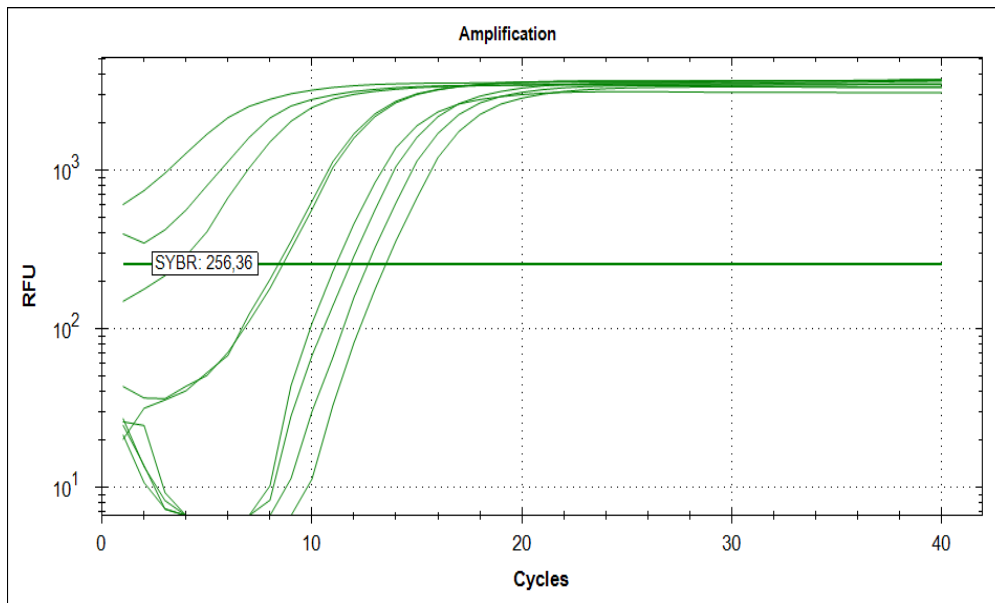
Πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η εύρεση της απόδοσης της ενίσχυσης (amplification efficiency). Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιούνται όλα τα δυνατά ζεύγη εκκινητών με υπόστρωμα cDNA από μία βιολογική συνθήκη σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις ώστε να εκτιμηθεί η καταλληλότερη συγκέντρωση υποστρώματος για μια δεδομένη συγκέντρωση εκκινητών καθώς και το καταλληλότερο γονίδιο αναφοράς. Η εκτίμηση βασίζεται στην τιμή Ct, η οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό των απαραίτητων κύκλων ενίσχυσης στον οποίο οι τιμές των σημάτων φθορισμού φανερώνουν την εκκίνηση της εκθετικής ενίσχυσης του προϊόντος, η οποία για βέλτιστα αποτελέσματα δεν πρέπει να υπερβαίνει τον αριθμό των 25 κύκλων.

Στο βήμα της αποδοτικότητας της ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ποσότητες cDNA που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 50 ng RNA ανά αντίδραση και 4 υποδεκαπλάσιες αραιώσεις αυτής, από την βιολογική συνθήκη ανάπτυξης σε άπαχο γάλα. Η ενίσχυση έγινε για τα 3 γονίδια αναφοράς *ldh*, *rpoA* και *16s* καθώς και για τα υπό μελέτη γονίδια *blpU* και *blpK* σε 2 αντίγραφα αντιδράσεων. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη συσκευή της q-PCR περιελάμβανε τα εξής βήματα:

- | | |
|----|--|
| 1. | 95 °C για 3 min |
| 2. | 95 °C για 5 sec, |
| 3. | 52 °C για 30 sec & ανάγνωση πλακέτας |
| 4. | επαναφορά στο βήμα 2 για 39 ακόμα φορές |
| 5. | καμπύλη τήξης από 65,0 μέχρι 95,0 °C με βήμα αύξησης 0,5 °C για 5 sec και ανάγνωση πλακέτας, |
| 6. | 4 °C για 10 min. |

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα αποτελέσματα για καθένα από τα τρία γονίδια αναφοράς.

- **16s rRNA**



Εικόνα 4.35 Καμπύλες ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *16s rRNA* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

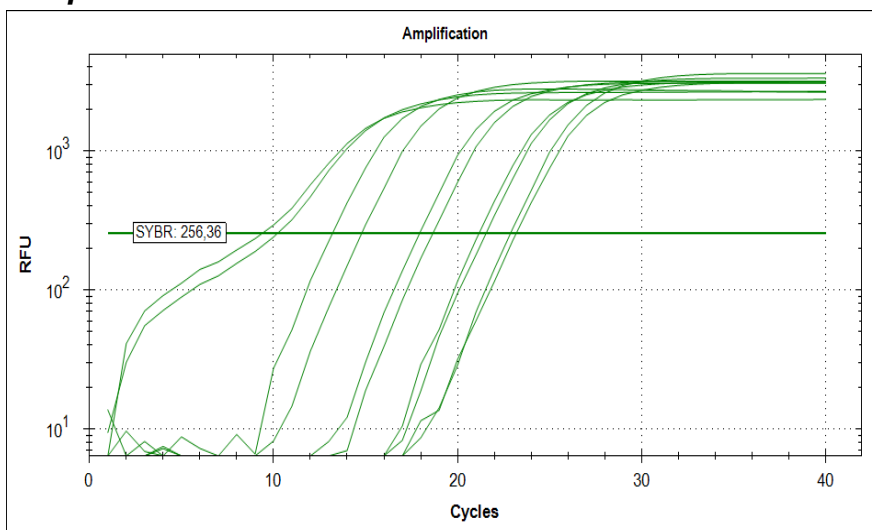
Πίνακας 4.6 Τιμές Ct των δειγμάτων ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *16s rRNA* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Αντίδραση	Στόχος	Δείγμα	Συγκριτική συγκέντρωση cDNA με RNA	C(t)	Μέση C(t)	Τυπική απόκλιση C(t)
Std-01	<i>16s rRNA</i>	skim milk	50 ng		0,00	0,000
Std-01	<i>16s rRNA</i>	skim milk	50 ng	1,29	1,29	0,000
Std-02	<i>16s rRNA</i>	skim milk	5 ng	4,36	5,21	1,201
Std-02	<i>16s rRNA</i>	skim milk	5 ng	6,06	5,21	1,201
Std-03	<i>16s rRNA</i>	skim milk	0.5 ng	10,19	10,11	0,121
Std-03	<i>16s rRNA</i>	skim milk	0.5 ng	10,02	10,11	0,121
Std-04	<i>16s rRNA</i>	skim milk	0.05 ng	12,50	12,85	0,493
Std-04	<i>16s rRNA</i>	skim milk	0.05 ng	13,20	12,85	0,493
Std-05	<i>16s rRNA</i>	skim milk	0.005 ng	14,05	14,49	0,618
Std-05	<i>16s rRNA</i>	skim milk	0.005 ng	14,93	14,49	0,618

Το γονίδιο αναφοράς *16s rRNA* φαίνεται να ενισχύεται σε πολύ μικρό αριθμό κύκλων ενίσχυσης, γεγονός που υποδηλώνει την έντονη παρουσία των μεταγράφων του και κατά συνέπεια το καθιστά μη κατάλληλο για χρήση στο εύρος τιμών cDNA που χρησιμοποιήθηκαν.

Αποτελέσματα

- *rpo*



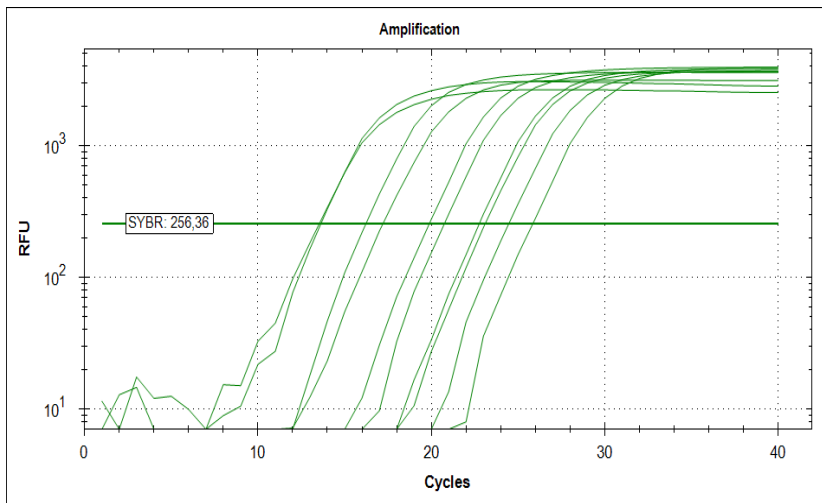
Εικόνα 4.36 Καμπύλες ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *rpo* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Πίνακας 4.7 Τιμές Ct των δειγμάτων ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *rpo* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Αντίδραση	Στόχος	Δείγμα	Συγκριτική συγκέντρωση cDNA με RNA	C(t)	Μέση C(t)	Τυπική απόκλιση C(t)
Std-06	<i>rpo</i>	skim milk	50 ng	12,83	12,63	0,276
Std-06	<i>rpo</i>	skim milk	50 ng	12,44	12,63	0,276
Std-07	<i>rpo</i>	skim milk	5 ng	14,67	15,47	1,128
Std-07	<i>rpo</i>	skim milk	5 ng	16,27	15,47	1,128
Std-08	<i>rpo</i>	skim milk	0.5 ng	19,39	19,76	0,518
Std-08	<i>rpo</i>	skim milk	0.5 ng	20,12	19,76	0,518
Std-09	<i>rpo</i>	skim milk	0.05 ng	23,03	22,82	0,301
Std-09	<i>rpo</i>	skim milk	0.05 ng	22,61	22,82	0,301
Std-10	<i>rpo</i>	skim milk	0.005 ng	24,68	24,50	0,257
Std-10	<i>rpo</i>	skim milk	0.005 ng	24,32	24,50	0,257

Το γονίδιο αναφοράς *rpo* εμφανίζει ένα καλό προφίλ ενίσχυσης με σχετικά επαναλήψιμα δεδομένα στο εύρος συγκεντρώσεων cDNA που δοκιμάστηκε με βέλτιστη αναλογική συγκέντρωση ως προς το αρχικό RNA τα 0,5 ng/αντίδραση.

- *ldh*



Εικόνα 4.37 Καμπύλες ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *ldh* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Πίνακας 4.8 Τιμές Ct των δειγμάτων ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *ldh* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Αντίδραση	Στόχος	Δείγμα	Συγκριτική συγκέντρωση cDNA με RNA	C(t)	Μέση C(t)	Τυπική απόκλιση C(t)
Std-11	<i>ldh</i>	skim milk	50 ng	15,06	15,05	0,013
Std-11	<i>ldh</i>	skim milk	50 ng	15,04	15,05	0,013
Std-12	<i>ldh</i>	skim milk	5 ng	18,70	18,15	0,779
Std-12	<i>ldh</i>	skim milk	5 ng	17,60	18,15	0,779
Std-13	<i>ldh</i>	skim milk	0.5 ng	21,27	21,71	0,618
Std-13	<i>ldh</i>	skim milk	0.5 ng	22,15	21,71	0,618
Std-14	<i>ldh</i>	skim milk	0.05 ng	24,52	24,35	0,240
Std-14	<i>ldh</i>	skim milk	0.05 ng	24,18	24,35	0,240
Std-15	<i>ldh</i>	skim milk	0.005 ng	25,92	26,58	0,941
Std-15	<i>ldh</i>	skim milk	0.005 ng	27,25	26,58	0,941

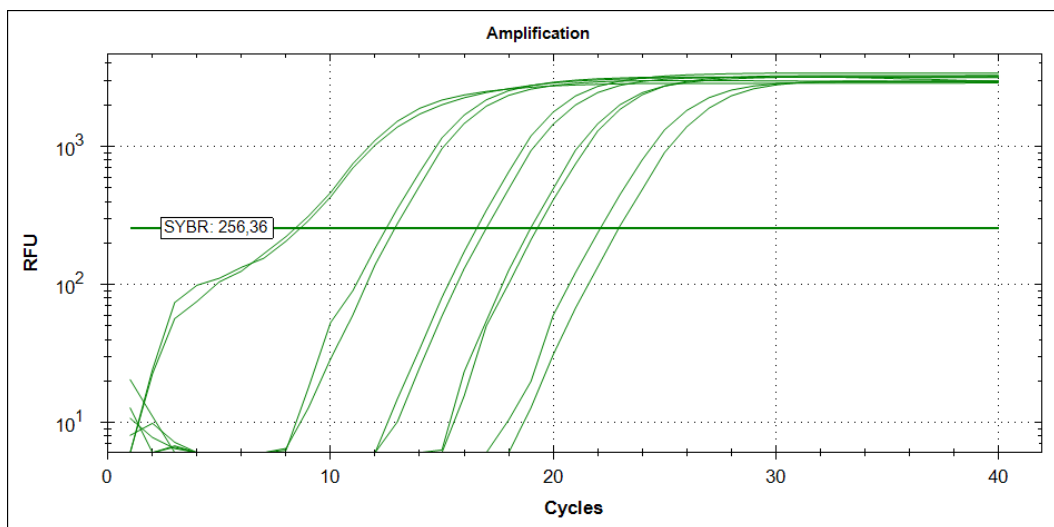
Αποτελέσματα

Το γονίδιο αναφοράς *ldh* εμφανίζει το καλύτερο προφίλ ενίσχυσης με επαναλήψιμα δεδομένα στο εύρος συγκεντρώσεων cDNA που δοκιμάστηκε. Οι καλύτερες αναλογικές συγκεντρώσεις cDNA ως προς το αρχικό RNA διακρίνονται στα 0,5 και 0,05 ng ανά αντίδραση.

Τα αποτελέσματα και των τριών γονιδίων κατέδειξαν ως καλύτερο γονίδιο αναφοράς το *ldh* το οποίο και χρησιμοποιήθηκε στις μετέπειτα αντιδράσεις. Η βέλτιστη συγκέντρωση cDNA στην οποία οι τιμές Ct φαίνονται επαναλήψιμες και μικρότερες του 25 κύκλου προσδιορίστηκε στην τιμή, αναλογικά με το αρχικό RNA, 0,25 ng/αντίδραση.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για καθένα από τα γονίδια *blpU* και *blpK*.

- ***blpU***

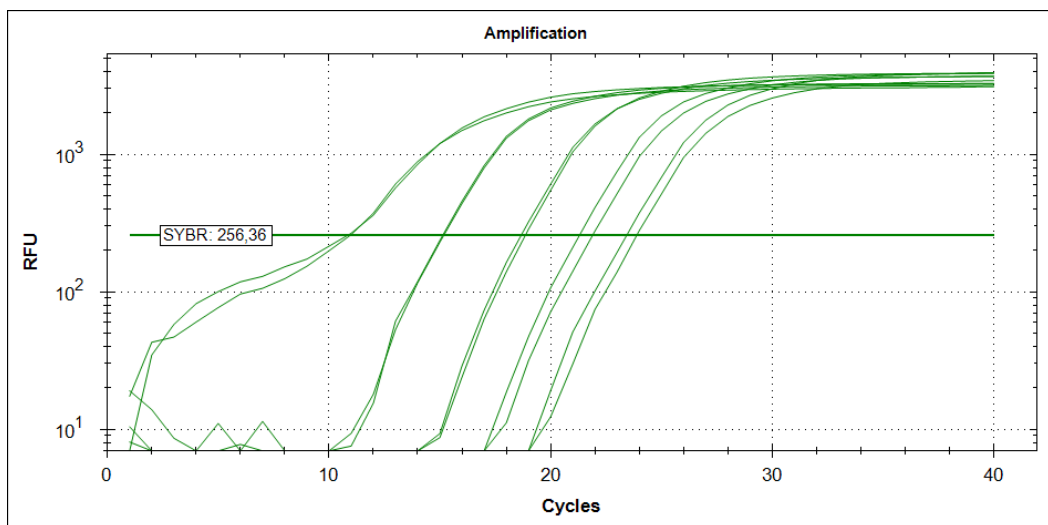


Εικόνα 4.38 Καμπύλες ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *blpU* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Πίνακας 4.9 Τιμές Ct των δειγμάτων ενίσχυσης τμήματος των γονιδίων *blpU* και *blpK* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Αντίδραση	Στόχος	Δείγμα	Συγκριτική συγκέντρωση cDNA με RNA	C(t)	Μέση C(t)	Τυπική απόκλιση C(t)
Std-16	<i>blpU</i>	skim milk	50 ng	10,96	10,86	0,139
Std-16	<i>blpU</i>	skim milk	50 ng	10,76	10,86	0,139
Std-17	<i>blpU</i>	skim milk	5 ng	13,98	14,15	0,240
Std-17	<i>blpU</i>	skim milk	5 ng	14,32	14,15	0,240
Std-18	<i>blpU</i>	skim milk	0.5 ng	18,40	18,18	0,305
Std-18	<i>blpU</i>	skim milk	0.5 ng	17,97	18,18	0,305
Std-19	<i>blpU</i>	skim milk	0.05 ng	20,39	20,54	0,219
Std-19	<i>blpU</i>	skim milk	0.05 ng	20,70	20,54	0,219
Std-20	<i>blpU</i>	skim milk	0.005 ng	24,43	23,99	0,615
Std-20	<i>blpU</i>	skim milk	0.005 ng	23,56	23,99	0,615

- *blpK*



Εικόνα 4.39 Καμπύλες ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *blpK* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Πίνακας 4.10 Τιμές Ct των δειγμάτων ενίσχυσης τμήματος των γονιδίων *blpU* και *blpK* για το πείραμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης

Αντίδραση	Στόχος	Δείγμα	Συγκριτική συγκέντρωση cDNA με RNA	C(t)	Μέση C(t)	Τυπική απόκλιση C(t)
Std-21	<i>blpK</i>	skim milk	50 ng	13,23	13,31	0,118
Std-21	<i>blpK</i>	skim milk	50 ng	13,40	13,31	0,118
Std-22	<i>blpK</i>	skim milk	5 ng	16,51	16,54	0,052
Std-22	<i>blpK</i>	skim milk	5 ng	16,58	16,54	0,052
Std-23	<i>blpK</i>	skim milk	0.5 ng	20,08	20,16	0,100
Std-23	<i>blpK</i>	skim milk	0.5 ng	20,23	20,16	0,100
Std-24	<i>blpK</i>	skim milk	0.05 ng	22,69	23,01	0,452
Std-24	<i>blpK</i>	skim milk	0.05 ng	23,33	23,01	0,452
Std-25	<i>blpK</i>	skim milk	0.005 ng	25,34	25,12	0,321
Std-25	<i>blpK</i>	skim milk	0.005 ng	24,89	25,12	0,321

Τα προς μελέτη γονίδια *blpU* και *blpK* εμφανίζουν πολύ καλό προφίλ ενίσχυσης με επαναλήψιμα δεδομένα στο εύρος συγκεντρώσεων cDNA που δοκιμάστηκε με βέλτιστες αναλογικές συγκεντρώσεις ως προς το αρχικό RNA τα 0,5 και 0,05 ng/αντίδραση.

Αποτελέσματα q-PCR

Μετά από τη βήμα της εύρεσης της απόδοσης της ενίσχυσης εφαρμόστηκε το δεύτερο και κυρίως τμήμα του πειράματος της q-PCR. Σε αυτό δοκιμάστηκαν, σε αναλογική συγκέντρωση με το αρχικό RNA 0,25 ng ανά αντίδραση, τα 12 υποστρώματα των 4 βιολογικών συνθηκών. Η ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων *blpU* και *blpK* έγινε μαζί με το γονίδιο αναφοράς *ldh* και το πρωτόκολλο ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο πρωτόκολλο 40 κύκλων ενίσχυσης με το βήμα απόδοσης της ενίσχυσης. Οι αρνητικοί μάρτυρες με υπόστρωμα RNA χρησιμοποιήθηκαν με την προσθήκη εκκινήτων για το γονίδιο *ldh*.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αποκλείστηκαν τα πειράματα που αφορούσαν το 3^ο RNA από τις βιολογικές συνθήκες M17 και M17IF0. Συγκεκριμένα,

στο M17.3 τα δείγματα με το γονίδιο αναφοράς *ldh* δεν εμφάνισαν ενίσχυση οπότε δεν υπήρχε μέτρο σύγκρισης για τα αντίστοιχα αποτελέσματα των γονιδίων *blpU* και *blpK*. Αφ' ετέρου, στο μάρτυρα με υπόστρωμα RNA στο M17IF0.3 προέκυψε τιμή Ct παρόμοια με αυτήν του γονιδίου αναφοράς, γεγονός που υποδηλώνει επιμόλυνση κατά πάσα πιθανότητα στον αρνητικό μάρτυρα με παρουσία cDNA. Εντούτοις, λόγω αδυναμίας εξακρίβωσης της έκτασης της επιμόλυνσης τα δεδομένα από αυτό το δείγμα αποκλείστηκαν.

Στα αποτελέσματα των πειραμάτων υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών Ct για τις τρεις αντιδράσεις με τους ίδιους εκκινητές και υπόστρωμα. Με σκοπό την πιστότερη εξαγωγή συμπερασμάτων από τα αποτελέσματα έγινε αποδεκτός ο περιορισμός των δεδομένων που είχαν την τιμή της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου των τιμών, σε ποσοστό μεγαλύτερου του 5% προς το μέσο όρο. Με τον περιορισμό αυτό αποκλείστηκαν τα αποτελέσματα τεσσάρων δειγμάτων: δύο από τη μελέτη του *blpU* στο πρώτο και δεύτερο RNA από ανάπτυξη σε άπαχο γάλα, ένα δείγμα από μελέτη του *blpK* στο πρώτο RNA από ανάπτυξη σε άπαχο γάλα και ένα δείγμα από μελέτη στο δεύτερο RNA από ανάπτυξη σε M17 με επαγωγή.

		Γονίδιο <i>blpU</i>			Γονίδιο <i>blpK</i>			Γονίδιο αναφοράς		
		Αντιδράσεις		NRT	Αντιδράσεις		NRT	Αντιδράσεις		NRT
M17	RNA1	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA2	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA3	■	■	■	■	■	■	■	■	■
M17IF0	RNA1	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA2	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA3	■	■	■	■	■	■	■	■	■
M17IF1	RNA1	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA2	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA3	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Skim milk	RNA1	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA2	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RNA3	■	■	■	■	■	■	■	■	■
NT		■			■			■		

Εικόνα 4.40 Γραφική απεικόνιση της κατηγοριοποίησης των αντιδράσεων στα πειράματα q-PCR σε συνδυασμό με τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν. Τα τετράγωνα με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τις αντιδράσεις από τις οποίες εξαγονται συμπεράσματα και με κόκκινο τις αντιδράσεις ελέγχου των αρνητικών μαρτύρων. Τα τετράγωνα με μαύρο χρώμα αντιπροσωπεύουν τα δείγματα στα οποία εμφανίστηκαν αρνητικά αποτελέσματα και με γκρι χρώμα τα δείγματα από τα οποία τα αποτελέσματα αποκλείστηκαν. Με NRT συμβολίζονται οι αντιδράσεις των αρνητικών μαρτύρων στις οποίες δεν έχει γίνει αντίστροφη μεταγραφή και δεν έχει χρησιμοποιηθεί cDNA ως υπόστρωμα αλλά RNA. Με το NT συμβολίζονται οι αντιδράσεις των αρνητικών μαρτύρων στις οποίες δεν έχει προστεθεί υπόστρωμα.

Ο μέσος όρος των τιμών Ct από κάθε έγκυρη αντίδραση για ένα υπόστρωμα μαζί με την τυπική απόκλιση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.10.

Πίνακας 4.11 Μέσος όρος τιμών Ct από κάθε αντίγραφο αντίδρασης μαζί με την τυπική απόκλιση κάθε μέσου όρου.

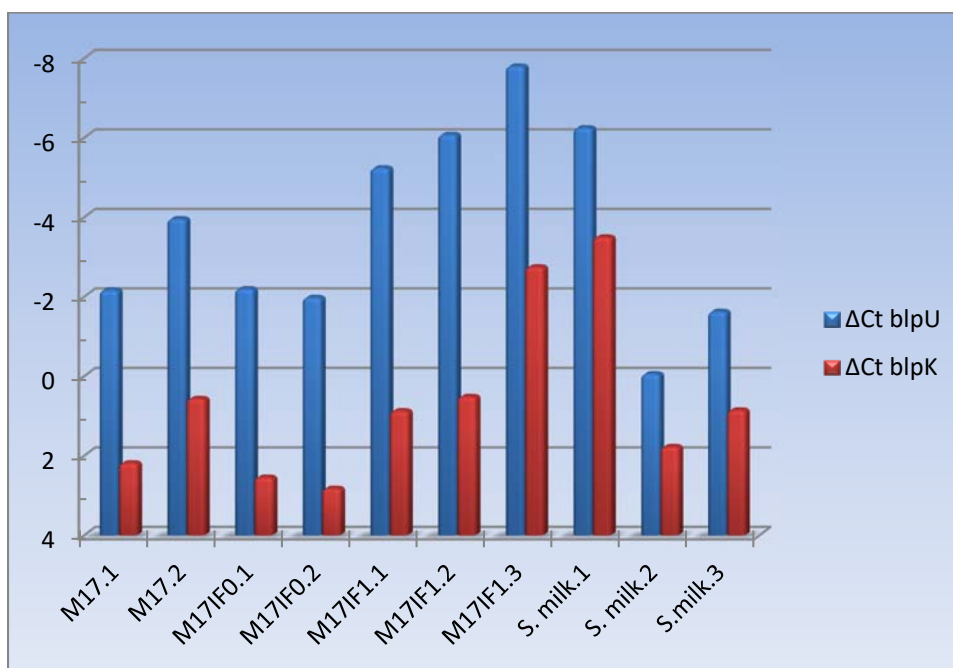
	Γονίδιο <i>blpU</i>		Γονίδιο <i>blpK</i>		Γονίδιο <i>ldh</i>	
	Μέσος όρος Ct	Τυπική απόκλιση	Μέσος όρος Ct	Τυπική απόκλιση	Μέσος όρος Ct	Τυπική απόκλιση
M17.1	22,69	0,250	27,04	0,112	24,86	0,146
M17.2	21,36	1,045	25,88	0,234	25,32	1,246
M17IF0.1	24,65	0,732	29,39	0,523	26,85	0,526
M17IF0.2	25,04	1,116	29,84	0,592	27,02	0,721
M17IF1.1	17,35	0,855	23,46	1,010	22,59	0,532
M17IF1.2	16,22	0,479	22,81	1,284	22,30	0,715
M17IF1.3	18,44	0,268	23,49	0,669	26,24	1,231
S. milk.1	15,69	0,482	18,44	0,225	21,94	0,379
S. milk.2	22,06	0,045	23,89	0,638	22,12	0,117
S.milk.3	21,04	1,033	23,52	0,691	22,67	1,025

Για να εξαχθούν συμπεράσματα από τις τιμές Ct των αντιδράσεων των υπό μελέτη γονιδίων, οι τιμές πρέπει να κανονικοποιηθούν με τις τιμές Ct των γονιδίων αναφοράς. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την κανονικοποίηση των τιμών ήταν η ΔCt, σύμφωνα με την οποία αφαιρείται από την τιμή Ct του γονιδίου στόχου η τιμή Ct του γονιδίου αναφοράς.

Με την μέθοδο ΔCt παρατηρείται η διαφορά των ελάχιστων απαιτούμενων κύκλων ενίσχυσης των γονιδίων *blpU* και *blpK* σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς *ldh*, για την έναρξη της εκθετικής φάσης ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Από τη διαφορά των ελάχιστων απαιτούμενων κύκλων ενίσχυσης συμπεραίνεται και η ποσοτική διαφορά των μεταγράφων στο δείγμα, και κατά συνέπεια η διαφορά του επιπέδου έκφρασης των υπό εξέταση περιοχών.

Πίνακας 4.12 Αποτελέσματα μελέτης έκφρασης γονιδίων *blpU* και *blpK* συγκριτικά με το γονίδιο *ldh* από πειράματα q-PCR με την μέθοδο ΔC_t .

	ΔC_t <i>blpU</i>	ΔC_t <i>blpK</i>
M17.1	-2,17	2,18
M17.2	-3,96	0,56
M17IF0.1	-2,20	2,54
M17IF0.2	-1,98	2,82
M17IF1.1	-5,24	0,87
M17IF1.2	-6,08	0,51
M17IF1.3	-7,80	-2,75
S. milk.1	-6,25	-3,5
S. milk.2	-0,06	1,77
S.milk.3	-1,63	0,85



Εικόνα 4.41 Σχηματική απεικόνιση των δεδομένων από μελέτη έκφρασης γονιδίων *blpU* και *blpK* συγκριτικά με το γονίδιο *ldh* από πειράματα q-PCR με την μέθοδο ΔC_t . Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται η διαφορά των κύκλων ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων με τον κύκλο ενίσχυσης του γονιδίου *ldh* σε αντίστροφη φορά για την ευκολότερη κατανόηση της έκφρασης των γονιδίων.

Η διαφορά των ελάχιστων απαιτούμενων κύκλων ενίσχυσης των υπό μελέτη μεταγράφων των γονιδίων *blpU* και *blpK* από αυτούς του γονιδίου αναφοράς *ldh* επιτρέπει τη σύγκριση των επιπέδων των ελάχιστων απαιτούμενων κύκλων ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων μεταξύ τους και μεταξύ όλων των δειγμάτων RNA. Οι τιμές της διαφοράς των υπό μελέτη γονιδίων εμφανίζονται αυξημένες στο θρεπτικό μέσο M17 και M17 με επαγωγή πριν παρατηρηθεί δραστικότητα βακτηριοσίνης, συγκριτικά με το θρεπτικό μέσο M17 με επαγωγή, μετά από εμφάνιση δραστικότητας βακτηριοσίνης, και κατ' επέκταση η ποσότητα των μεταγράφων μειωμένη, καθώς έχουν αντιστρόφως ανάλογη σχέση (εικόνα 4.41). Η αυξημένη παρουσία των μεταγράφων αυτών όταν παρατηρείται και η δραστικότητα της βακτηριοσίνης συμφωνεί με την θεωρία ότι τα γονίδια *blpU* και *blpK* είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των δομικών μονάδων της βακτηριοσίνης.

Τα μετάγραφα με το γονίδιο *blpU* σε εμφανίζονται σε μια σχετικά σταθερή ποσότητα στις συνθήκες όπου δεν εμφανίζεται δραστικότητα βακτηριοσίνης και αυξημένα στη συνθήκη M17IF1 όπου εμφανίζεται δραστικότητα. Αντίστοιχα, αλλά σε μικρότερη ποσότητα, εμφανίζονται να αυξάνονται και τα μετάγραφα με το γονίδιο *blpK* σε συμμετάγραφη με το *blpU*.

Η διαφορά της εμφάνισης των μεταγράφων των δυο υπό εξέταση περιοχών ανά υπόστρωμα δεν παραμένει σταθερή αλλά αυξομειώνεται στις διαφορετικές συνθήκες, φανερώνοντας ότι το *blpU* μεταγράφεται και σε διαφορετικό μετάγραφο από το συμμετάγραφο *blpU-blpK*.

Η μεγαλύτερη ποσότητα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στο δείγμα M17.2 σε σχέση με τα M17.1, M17IF0.1 και M17IF0.2 μπορεί να εξηγηθεί αν ληφθεί υπόψιν ότι μετά από 2 ώρες ανάπτυξης στο θρεπτικό μέσο M17, υπό τις οποίες συνθήκες απομονώθηκε το δείγμα RNA, μερικές φορές εμφανίζεται παραγωγή βακτηριοσίνες σε μικρό βαθμό.

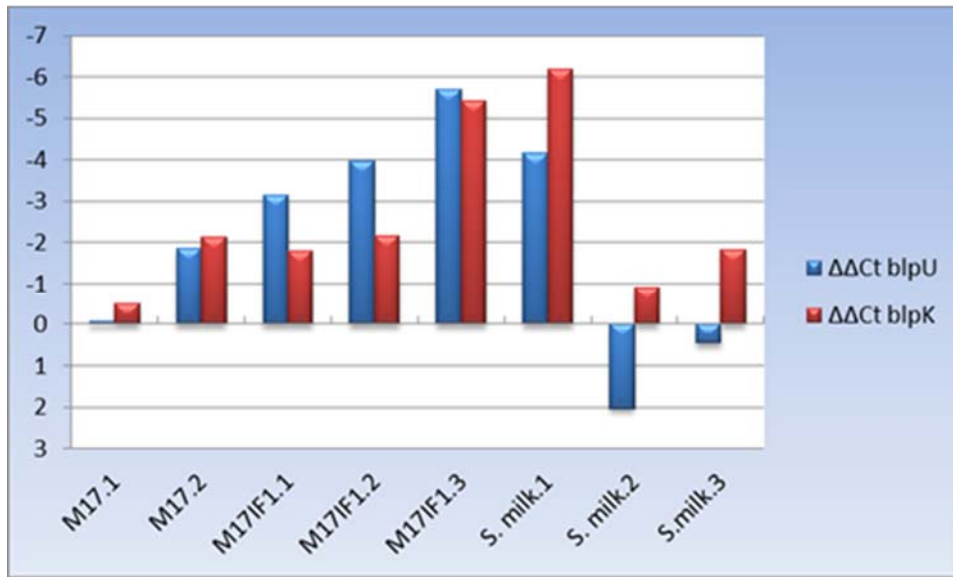
Αποτελέσματα

Η ποικιλία των διαφορών των Ct στα αποτελέσματα των δειγμάτων από ανάπτυξη του οργανισμού σε αποβουτυρωμένο γάλα μπορεί να εξηγηθεί από την μέθοδο απομόνωσης RNA, η οποία περιλαμβάνει συγκεκριμένη επεξεργασία της καλλιέργειας για να είναι δυνατή η απομόνωση των κυττάρων κατά την οποία οι συγκεντρώσεις των μετάγραφων ενδεχομένως να διαφοροποιούνται.

Τα δεδομένα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με την μέθοδο ΔCt μπορούν να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία με την μέθοδο $\Delta\Delta Ct$, στην οποία εφαρμόζεται και δεύτερη κανονικοποίηση αναφορικά με τα δεδομένα μίας κατάστασης στην οποία θεωρείται ότι δεν επάγεται η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Η μέθοδος $\Delta\Delta Ct$ εφαρμόστηκε με διαχωρισμό των τιμών για τα 2 γονίδια και προσαρμογή στον μέσο όρο των τιμών ΔCt του ίδιου γονιδίου, από τα δείγματα απομόνωσης σε M17 με επαγωγή πριν την παρατήρηση δραστηριότητας βακτηριοσίνης (εικόνα 4.42).

Πίνακας 4.13 Αποτελέσματα μελέτης έκφρασης γονιδίων *blpU* και *blpK* από πειράματα q-PCR συγκριτικά με το γονίδιο *ldh* και θεωρώντας ως συνθήκη μη έκφρασης των γονιδίων την M17IF0 με την μέθοδο $\Delta\Delta Ct$.

	$\Delta\Delta Ct$ <i>blpU</i>	$\Delta\Delta Ct$ <i>blpK</i>
M17.1	-0,08	-0,5
M17.2	-1,87	-2,12
M17IF1.1	-3,15	-1,81
M17IF1.2	-3,99	-2,17
M17IF1.3	-5,71	-5,43
S. milk.1	-4,16	-6,18
S. milk.2	2,03	-0,91
S.milk.3	0,46	-1,83



Εικόνα 4.42 Σχηματική απεικόνιση των δεδομένων από μελέτη έκφρασης γονιδίων *blpU* και *blpK* συγκριτικά με το γονίδιο *ldh* και σε δεύτερο βαθμό με το ίδιο γονίδιο αντίστοιχα από την συνθήκη απομόνωσης M17IF0 με την μέθοδο ΔΔCt. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται η διαφορά των κύκλων ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων με τον κύκλο ενίσχυσης των ίδιων γονιδίων, σε αντίστροφη φορά για την ευκολότερη κατανόηση της έκφρασης των γονιδίων.

Με την μέθοδο ΔΔCt παρατηρείται πιο άμεσα η διαφορά των επιπέδων των ελάχιστων απαιτούμενων κύκλων ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων *blpU* και *blpK*, έχοντας ως βάση τη συνθήκη απομόνωσης M17 με επαγωγή, πριν παρατηρηθεί δραστηριότητα βακτηριοσίνης και κατά συνέπεια, της αλλαγής του επιπέδου μεταγραφής των δύο περιοχών συγκριτικά μεταξύ τους σε κάθε αντίδραση αλλά και στις διάφορες συνθήκες που ελέγχθηκαν.

Τα αποτελέσματα του πειράματος φανερώνουν μία σχέση αυξημένης παρουσίας μεταγράφων με το γονίδιο *blpU* και με τα συμμεταγραφόμενα *blpK* και *blpU* σε συνθήκες απομόνωσης από καλλιέργεια M17 με επαγωγή μετά από την εμφάνιση δραστηριότητας βακτηριοσίνης (M17-IF1) συγκριτικά με τα δείγματα από θρεπτικό ίδιας σύστασης πριν εμφανιστεί η δραστηριότητα βακτηριοσίνης (M17-IF0) (εικόνα 4.42).

Αποτελέσματα

Σε δύο από τα τρία δείγματα της συνθήκης M17IF1 η παρουσία των μεταγράφων με το γονίδιο *blpU* αυξάνεται περισσότερο από το αυτά με τα συμμεταγραφόμενα *blpK-blpU*, ενώ στο τρίτο αυξάνονται με τον ίδιο ρυθμό. Αυτό φανερώνει ότι το μετάγραφο που συμμεταγράφονται τα γονίδια *blpU* και *blpK* δεν είναι το μόνο που φέρει το γονίδιο *blpU* αλλά το *blpU* μεταγράφεται και σε ένα μικρότερο mRNA, χωρίς την παρουσία του *blpK*.

Τα δεδομένα εμφάνισης μεταγραφών από συνθήκες ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο M17 και άπαχο γάλα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση αυτής της θεωρίας καθώς η σύσταση του θρεπτικού μέσου είναι διαφορετική, όμως μπορούν να χρησιμοποιηθούν, σε συνδυασμό με τα δεδομένα ανάπτυξης σε M17 με επαγωγή πριν και μετά την εμφάνιση δραστηριότητας της βακτηριοσίνης για διαφορετικά συμπεράσματα.

Στα δείγματα από αποβουτυρωμένο γάλα, παρά την ποικιλία του επιπέδου των τιμών Ct, εμφανίζεται μεγαλύτερη αύξηση των μεταγράφων με τα συμμεταγραφόμενα γονίδια σε σχέση με τα μετάγραφα με το *blpU*, διατηρώντας μια σχετικά σταθερή διαφορά στις τρεις αντιδράσεις. Η αύξηση του επιπέδου των μεταγράφων με τα συμμεταγραφόμενα *blpK* και *blpU* συγκριτικά με το *blpU* μπορεί να οφείλεται στην παράβλεψη της λήξης της μεταγραφής πριν το γονίδιο *blpK* από τις συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού.

4.6 Ετερόλογη έκφραση γονιδίων βακτηριοσίνης

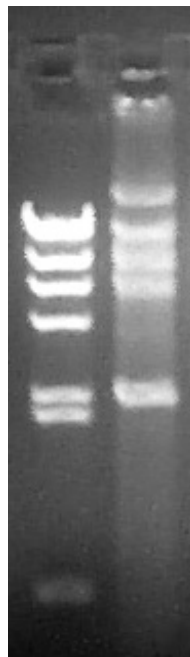
Το επόμενο στάδιο στα πλαίσια της μελέτης της περιοχής *blp* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 αποτελούνταν από την κλωνοποίηση της εκάστοτε προς μελέτη ομάδας γονιδίων σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και με σκοπό την ετερόλογη έκφραση αυτών σε συγγενικά βακτήρια που δεν παράγουν βακτηριοσίνη.

Τα πειράματα ετερόλογης έκφρασης περιλάμβαναν την επιλογή του κατάλληλου οργανισμού, την επιλογή ενός κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα στον οποίο θα εισαχθούν οι αλληλουχίες των γονιδίων, μαζί με άλλες απαραίτητες αλληλουχίες, ώστε να εκφραστούν σε συγγενικό στέλεχος, και την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών μετασχηματισμού του.

Επίσης ο κατάλληλος πλασμιδιακός φορέας σε συνδυασμό με τις βέλτιστες συνθήκες μετασχηματισμού θα ήταν χρήσιμα μακροπρόθεσμα για gene replacement στον ACA-DC 0040

Τα δύο διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές για την ετερόλογη έκφραση των γονιδίων της περιοχής *blp* ήταν οι *Lactococcus lactis* CNRZ 117 και *Streptococcus thermophilus* LMG 18311, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων αποτελεί η ευαισθησία στην θερμοφιλίνη T.

Το βακτήριο *L. lactis* CNRZ 117 είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο της συλλογής του ΓΠΑ το οποίο εξαιτίας της ευαισθησίας του στη θερμοφιλίνη T που εκκρίνεται από τον ACA-DC 0040 χρησιμοποιείται στη μέτρηση της δραστηριότητας αυτής της βακτηριοσίνης στα πλαίσια του agar diffusion test. Εντούτοις, πειράματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο αυτό αποκάλυψαν την ύπαρξη πλασμιδίων (Εικόνα 4.32). Τα δύο βακτηριακά γένη *Streptococcus* και *Lactococcus* παρουσιάζουν ομοιότητες, ενώ τα πλασμίδια τους διαθέτουν κοινούς τρόπους αντιγραφής και διατήρησης. Κατά συνέπεια, τα πλασμίδια του *L. lactis* CNRZ 117 πιθανόν να ήταν ασύμβατα με αυτά που θα επιλεγούν ως πλασμιδιακοί φορείς για ετερόλογη έκφραση γονιδίων στο CNRZ 117.

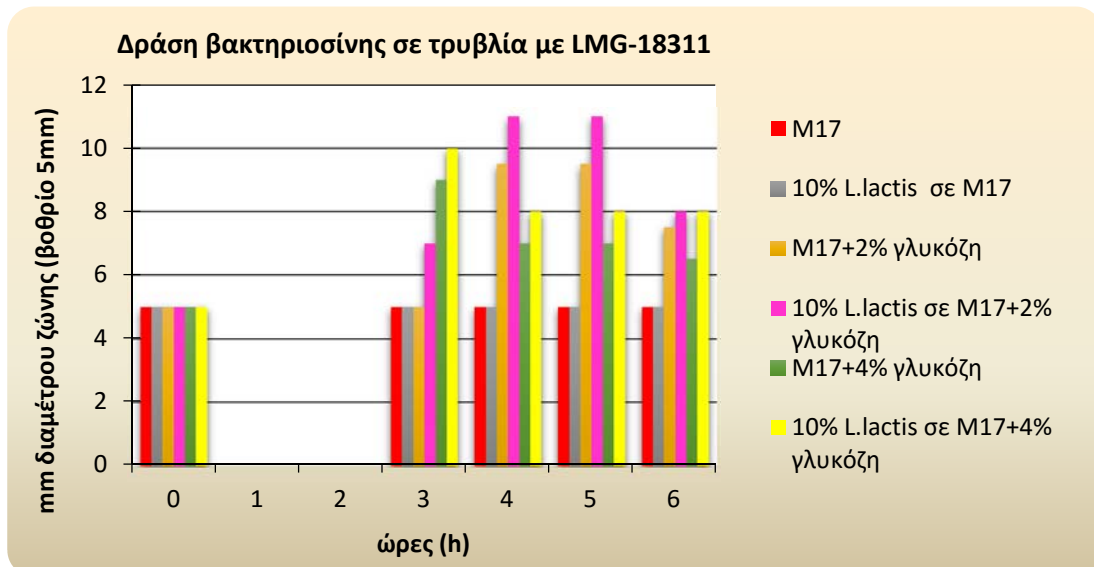


Εικόνα 4.43 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1% δείγματος 5 μl από απομόνωση πλασμιδιακού DNA του *L. lactis* CNRZ 117 με την μέθοδο 3.7.1.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό την εκδίωξη του πλασμιδιακού περιεχομένου του *L. lactis* CNRZ 117, στα οποία ο οργανισμός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο M17 με την προσθήκη νοβοβιοκίνης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 30, 40 και 50 μg/ml ή με την προσθήκη χλωραμφενικόλης σε συγκέντρωση 5 μg/ml, σε συνεχόμενες ανακαλλιέργειες, χωρίς όμως η απώλεια του πλασμιδιακού περιεχομένου να καταστεί εφικτή.

Έχει αναφερθεί σε προηγούμενες ενότητες της παρούσας διατριβής ότι το βακτήριο *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 διαθέτει περιοχή *blp* στο γονιδίωμά του με μεγάλη ομοιότητα τόσο σε ομολογία όσο και σε γενετική οργάνωση με αυτήν του ACA-DC 0040. Εντούτοις, ο LMG 18311 δεν παράγει βακτηριοσίνη, γεγονός που αποδίδεται σε μία μη νοηματική μεταλλαγή στο γονίδιο *blpB* με αποτέλεσμα τον πρώιμο τερματισμό της μετάφρασης του. Στο γεγονός αυτό

αποδίδεται και η ευαισθησία που παρουσιάζει στη θερμοφιλίνη T του ACA-DC 0040 (Εικόνα 4.33). Επιπλέον, ο LMG 18311 δεν διαθέτει ενδογενή πλασμίδια.



Εικόνα 4.44: Δράση της θερμοφιλίνης T ενάντια του LMG 18311 μετά από ανάπτυξη του στελέχους ACA-DC 0040 στα θρεπτικά που υποδεικνύονται στα δεξιά του διαγράμματος. Γνωρίζοντας ότι η διάμετρος του βοθρίου είναι 5mm στο διαγραμμα παρουσιάζονται οι συνολικές διάμετροι βοθρίου και ζώνης αναστολής. Το μέγεθος της ζώνης αναστολής είναι αντιπροσωπευτικό μέτρο της ενεργότητας της βακτηριοσίνης στις αντίστοιχες ώρες (Σαμαρά Ε., 2011).

Η καταλληλότητα ενός πλασμιδιακού φορέα για την εισαγωγή αλληλουχίας σε αυτό και την τοποθέτησή του σε έναν οργανισμό διακρίνεται από τα κριτήρια:

- Αφετηρία αντιγραφής *ori* η οποία θα αναγνωρίζεται από τον ξενιστή για την αντιγραφή και διατήρηση του πλασμιδίου, τον καθορισμό του αριθμού αντιγράφων του, το μέγεθος της αλληλουχίας του και κατ' επέκταση το μέγεθος της αλληλουχίας που μπορεί να δεχθεί καθώς και την ομάδα ασυμβατότητας στην οποία ανήκει. Επίσης και για την διαδικασία της αντιγραφής
- Δείκτης επιλογής, για την επιβεβαίωση επιλογής των κυττάρων που έχουν λάβει τον φορέα.

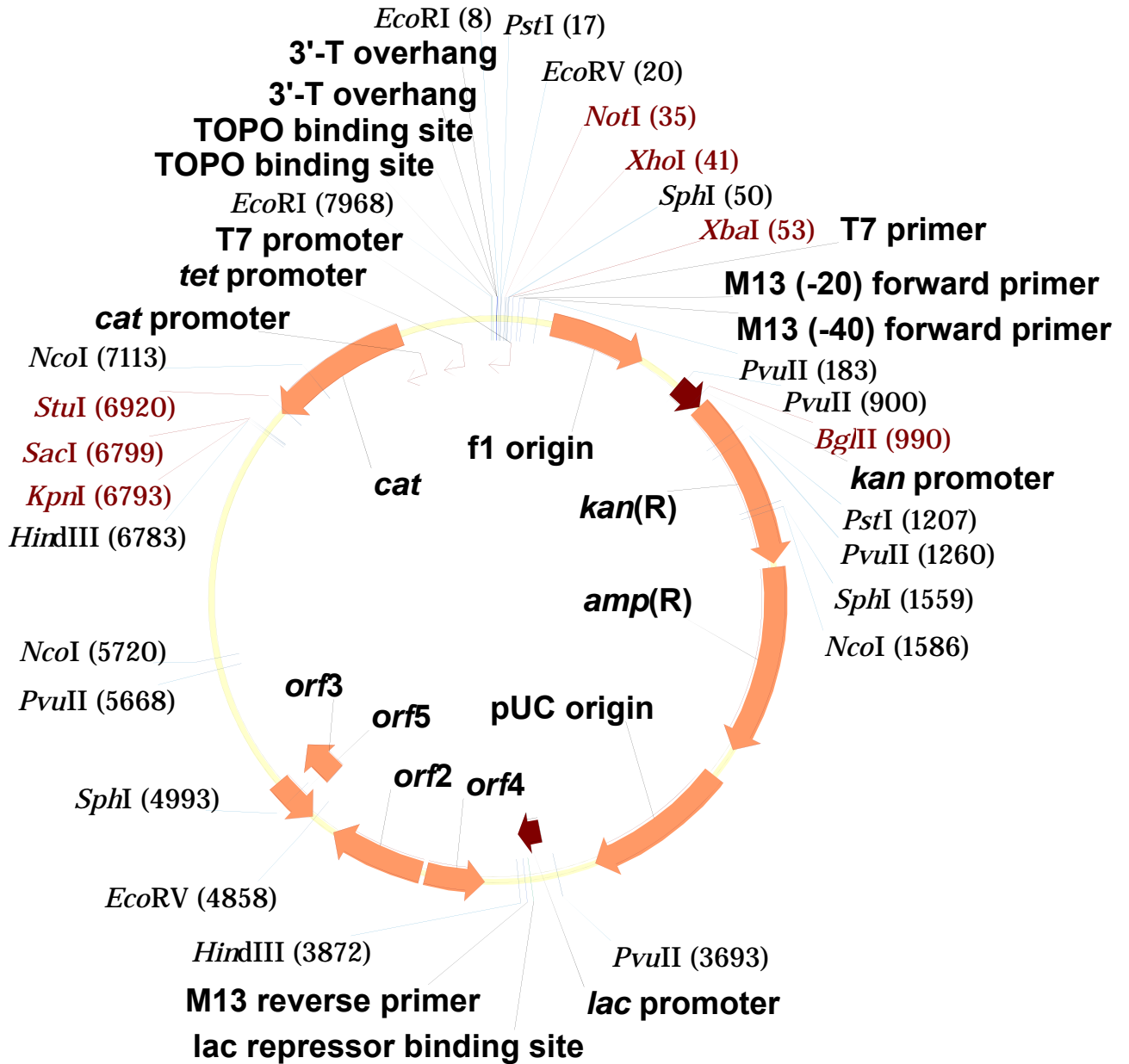
Αποτελέσματα

- Κατάλληλες θέσεις περιορισμού για την προσθήκη αλληλουχίας σε αυτές.
(Ausubel et. Al., Current Protocols in molecular biology)
Στην παρούσα διατριβή ακολουθήθηκαν δύο στρατηγικές:
- Χρησιμοποίηση έτοιμου πλασμιδιακού φορέα για *Streptococcus*
- Διερεύνηση του ACA-DC 0040 για την ύπαρξη ενδογενών πλασμιδίων και κατασκευή κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα για *Streptococcus thermophilus*.

4.6.1 Πλασμιδιακός φορέας pTOPOcatpT38

Ο πλασμιδιακός φορέας pTOPOcatpT38 (ευγενική προσφορά της Gloria del Solar) έχει δημιουργηθεί από την ένωση του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης για *E. coli* pCR2.1-TOPO της εταιρείας Invitrogen, ο οποίος περιέχει ως δείκτες επιλογής γονίδια αντίστασης σε καναμυκίνη και αμπικιλίνη και είναι υψηλού αριθμού αντιγράφων, με το τμήμα *cat* του υβριδικού πλασμιδίου pJS3, προερχόμενο από το φυσικό πλασμίδιο pC194 του *Staphylococcus aureus*, στο οποίο προσφέρει αντίσταση στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (Ballester et al., 1986). Το *cat* του pC194 παρουσιάζει ομολογία 100% με γονίδιο *cat* ίδιας δράσης που έχει εντοπιστεί στο γονιδίωμα στελεχών *Streptococcus pneumoniae* (Widdowson et al., 2000). Το υβριδικό αυτό πλασμίδιο pCR2.1-TOPO με το γονίδιο *cat* ενώθηκε με το φυσικό κρυπτικό πλασμίδιο pt38 μεγέθους 2911 bp του οργανισμού *S. thermophilus* ST2783 (Petrova et al., 2003) προσφέροντας τη δυνατότητα στο pTOPOcatpT38 να αντιγράφεται και να διατηρείται σε κύτταρα *S. thermophilus*.

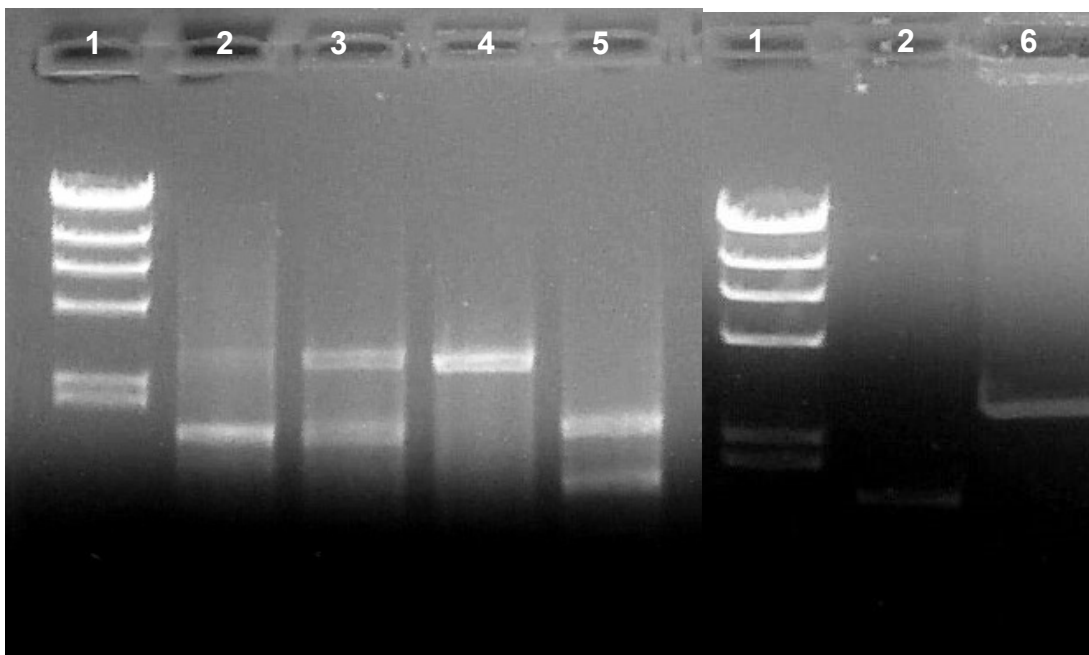
Τα πλεονεκτήματα αυτού του πλασμιδίου είναι ότι αναπτύσσεται τόσο σε *S. thermophilus* όσο και σε *E. coli*, διαθέτει δείκτες επιλογής και για τα δύο βακτήρια και αρκετές θέσεις περιορισμού για κλωνοποίηση ετερόλογου DNA με σκοπό την έκφρασή του στον επιθυμητό ξενιστή. Το μειονέκτημα που πιθανόν παρουσιάζει είναι ότι λόγω του μεγέθους του δεν μπορεί να λάβει μεγάλη ένθεση και κατά συνέπεια είναι πιο δύσκολο να εισαχθεί σε βακτήριο ξενιστή.



Εικόνα 4.45 Χάρτης του πλασμιδίου pTOPOcatpT38

4.6.2 Ενδογενές πλασμίδιο pST0040

Στα πλαίσια της αναζήτησης κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα για κύτταρα *S. thermophilus* διερευνήθηκε η ύπαρξη φυσικού πλασμιδίου στο στέλεχος ACA-DC 0040. Πειράματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από το εν λόγω στέλεχος (§3.6.1) αποκάλυψαν μία κύρια ζώνη μικρού μοριακού βάρους σε πηκτή αγαρόζης οι οποία ενδεχομένως αντιστοιχούσε σε πλασμίδιο. Το πλασμίδιο αυτό εξετάστηκε ως προς το περιοριστικό του προφίλ αρχικά με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* και *XbaI* και διαπιστώθηκε πως περιέχει θέσεις περιορισμού των ενζύμων *EcoRV*, *HindIII* και *XbaI* (εικόνα 4.46). Βάσει της εικόνας της ηλεκτροφόρησης προκύπτει μία θέση περιορισμού με τα ένζυμα *EcoRV* και *XbaI*, προσδιορίζοντας το μέγεθος του πλασμιδίου περίπου σε 2800 ζεύγη βάσεων, και δύο θέσεις περιορισμού με το ένζυμο *HindIII*, με μεγέθη των τμημάτων που προκύπτουν περίπου 1700 ζεύγη βάσεων και 1100 ζεύγη βάσεων.

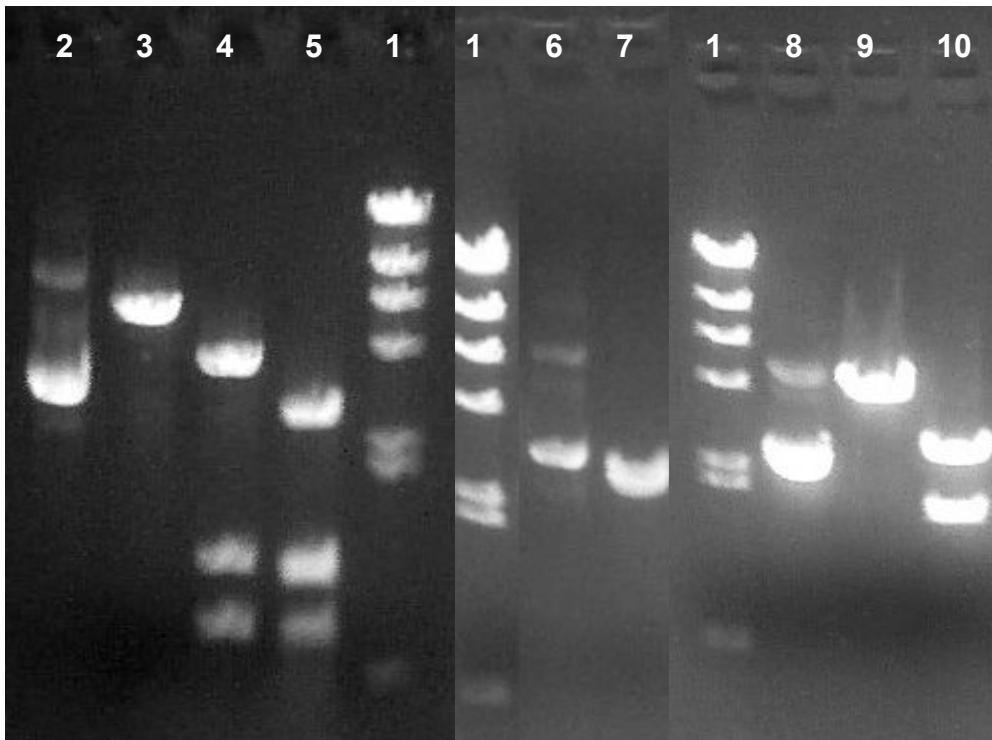


Εικόνα 4.46 Ηλεκτροφόρηση σε πηγμα αγαρόζης 1% του πλασμιδίου pST0040 και τμημάτων αυτού. 1: λ-*HindIII*, 2: πλασμιδιακό περιεχόμενο (pST0040) από καλλιέργεια ACA-DC 0040 15 ml σε θρεπτικό με την μέθοδο 3.6.1, 3: pST0040 – *EcoRI*, 4: pST0040 – *EcoRV*, 5: pST0040 – *HindIII*, 6: pST0040 – *XbaI*

Το τμήμα του πλασμιδίου pST0040, μετά από την επίδραση του περιοριστικού ενζύμου *EcoRV*, όπου φαίνεται να γραμμοποιείται, απομονώθηκε από το πηγάδι αγαρόζης με την μέθοδο 3.13 και δεσμοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC18, ο οποίος είχε νωρίτερα γραμμοποιηθεί με το ένζυμο *SmaI*. Το τμήμα του πλασμιδίου μετά από την επίδραση του περιοριστικού ενζύμου *XbaI*, όπου επίσης φαίνεται να γραμμοποιείται, απομονώθηκε από το πηγάδι αγαρόζης με την μέθοδο 3.13 και δεσμοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC18, ο οποίος είχε νωρίτερα υποστεί περιορισμό με το ένζυμο *XbaI*. Το μεγαλύτερο τμήμα του πλασμιδίου pST0040 μετά από περιορισμό με το ένζυμο *HindIII*, μήκους περίπου 1700 ζευγών βάσεων, απομονώθηκε από το πηγάδι αγαρόζης με την μέθοδο 3.13 και δεσμοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC18, ο οποίος είχε νωρίτερα υποστεί περιορισμό με το ένζυμο *HindIII*. Τα προϊόντα των δεσμοποιήσεων καθαρίστηκαν με την μέθοδο 3.13 και χρησιμοποιήθηκαν σε μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα *E. coli* DH5a. Από όλες τις αντιδράσεις προέκυψαν κλώνοι από τους οποίους επιλέχθηκε ένας για κάθε προϊόν δεσμοποίησης και στάλθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο για εύρεση της αλληλουχίας της ένθεσής του.

Στην εικόνα 4.47 παρουσιάζεται ένα περιοριστικό προφίλ των κλώνων που επιλέχθηκαν για αποστολή και εύρεση της αλληλουχίας τους. Ο κλώνος με το σημείο δεσμοποίησης στην περιοχή που τέμνει το ένζυμο *EcoRV* το pST0040, εμφανίζεται να τέμνεται σε 4 σημεία με τα ένζυμα *EcoRI* και *HindIII*. Οι ζώνες που παρατηρούνται αντιστοιχούν σε μεγέθη περίπου 2700 ζευγών βάσεων, το οποίο αντιστοιχεί στο τμήμα του pUC18 καθώς τα ένζυμα αυτά τέμνουν τις 2 άκρες του πολυσυνδέτη του pUC18 διαχωρίζοντάς το, και σε 3 τμήματα μεγέθους περίπου 700, 1000 και 1100 ζευγών βάσεων, των οποίων το άθροισμα αντιστοιχεί στο μέγεθος της ένθεσης που προσπαθήσαμε να εισάγουμε. Ο κλώνος με το σημείο δεσμοποίησης την περιοχή *XbaI* μετά από περιορισμό με το αντίστοιχο ένζυμο εμφανίζει δύο τμήματα μεγέθους 2700 και 2800 ζευγών βάσεων περίπου, όπως αναμένεται να είναι τα μεγέθη του πλασμιδίου pUC18 και της ένθεσης που προσπαθήσαμε να εισάγουμε. Ο κλώνος με το τμήμα του πλασμιδίου pST0040 των 1700 ζευγών βάσεων μετά από περιορισμό με το ένζυμο *HindIII*, εμφανίζει 2

τμήματα μετά από περιορισμό με το ίδιο ένζυμο, μήκους περίπου 2700 και 1700 ζευγών βάσεων, που αντιστοιχούν με τα μεγέθη της ένθεσης και του πλασμιδιακού φορέα pUC18.



Εικόνα 4.47 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 1% κλώνων του πλασμιδίου pST0040 και τμημάτων αυτού.

1: λ-*HindIII*, 2: κλώνος *EcoRV* (pUC18-pST0040-*EcoRV*), 3: κλώνος *EcoRV* - *EcoRI*, 4: κλώνος *EcoRV* - *HindIII*, 5: Κλώνος *EcoRV* - *EcoRI*-*HindIII*
 6: Κλώνος *XbaI* (pUC18-pST0040-*XbaI*), 7: Κλώνος *XbaI* - *XbaI*
 8: Κλώνος *HindIII* (pUC18-pST0040-*HindIII*) 9: Κλώνος *HindIII* - *EcoRI* 10: Κλώνος *HindIII* - *HindIII*

Από την συναρμολόγηση της αλληλουχίας που διαβάστηκε από κάθε ένθεση (παράρτημα 2) προέκυψε η αλληλουχία του πλασμιδίου μήκους 2780 bp.

Αλληλουχία pST0040

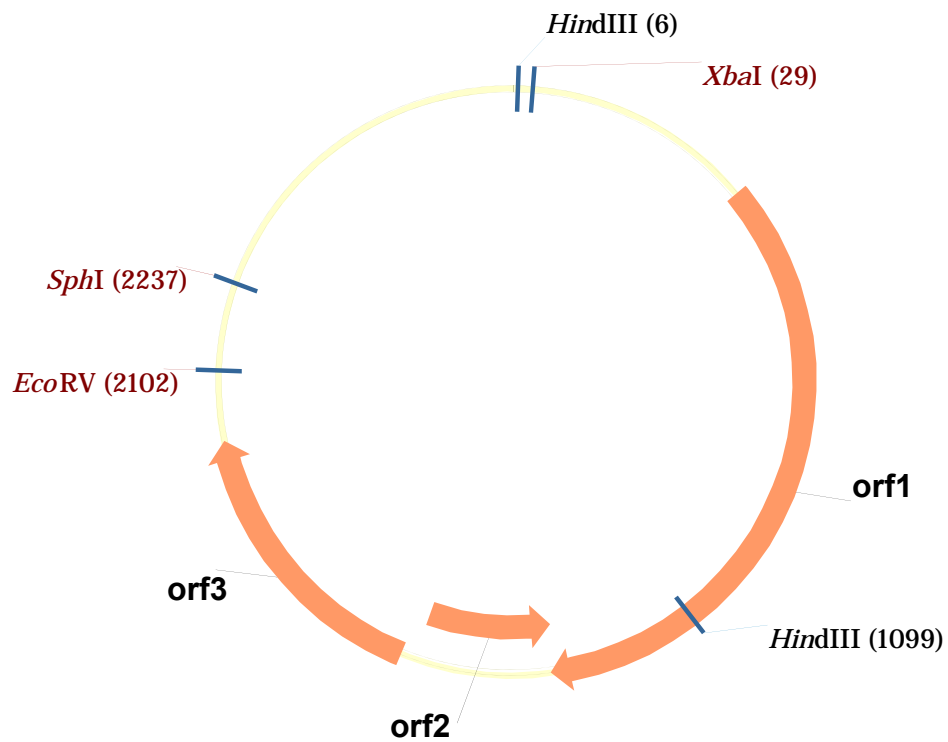
Αριθμός πρόσβασης KU574030

1	ctgaaagcttgcgataaggacacgaagtctagaaaatcagcgaaaggtta	50
51	cttgctgacaagaggaaattggaataaaaaagcgataagtttgatggtgaa	100
101	tttttactgaaaagaaaagagggttgaaagcccaaaaaagcaggccttttg	150
151	cctgcttttcttcttatcttgatactattagaaaataattcacggggatttt	200
201	tttagccccgtaggggttctaaaacccttgctcattactggttttttgggca	250
251	aaaaaaaaatccgtttctatttctgaaagggttctgtgttataattttatgtg	300
301	tcgaaggggaaaaatataacattcatgaaaggagaaatacggattttttt	350
351	gcatcgcaaatataatttgatatacatagtagcatgacggattttaaaaa	400
401	acaaggggaaattcttgctgataagaacagtcgaggaaaagaacgagact	450
451	ggcgaggacgaaaaatattaagtttgaaattagctgatatttttaaaagaa	500
501	ttgcagtacaagaagactttttggtgaaagagtaatatcgtgtggtgatac	550
551	tttacaatttattcaaaatcaagacggtaaccctaaagctctatcaagcct	600
601	atttttgtaaaaacaagctatgtcctatgtgcaactgggagacggtcaatg	650
651	aaatattcttatcagacatcaagaatcgttgatgaggcaataaaaacaaag	700
701	ccctaaaggacgcttttcttttctaacattgactgttaagaacgtcgagg	750
751	ggcaagcattgaaatagcacgatttagtcagctcacaaaatcatttgaccgt	800
801	ttatttaagcgtgctaaagttcaaaggaatctggtgggatatttgcgcttc	850
851	agttgaagtgaccacaatgaaaatgacaagacatatcacccctcatattc	900
901	atgttttgatgatggtgagacctagttattttcagtcaaaaaagattat	950
951	atcactcaaaaaagagtggagcgatatgtgggtctcaatcattgaaagttga	1000
1001	ttatgtccctatgatcgacattcgaacagtaaaagagactggcaaaggac	1050
1051	tgcgagggggcagtttttagagaccgcaaaaatccaactaagccgattaag	1100
1101	cttgatattgaaaataagcaagttggtgatgatctatacaacggtttgta	1150
1151	tcgaaaaagacaacttggttacgggtggtttatttaaaacctcaaaaaac	1200
1201	aactagcactagatgacgcccgaaaatggtgacttggtacatacgtctgag	1250
1251	gataaagaaaacatatcaaaggtacagaaaatagtcgctatatggaacgc	1300
1301	tagcaagcaaaattattatttgaaaaataaaaataaagctcctcgaaaga	1350
1351	ggggcttttttagtatcagaagaagagaataaaaaagctatcttctgctact	1400
1401	gttgataaatctgatttcaatatctgagtatctactagcgataaaaaata	1450
1451	tgctgataccatcacatgaaaaataattttacaattttttaaagagcataa	1500
1501	tacttgaaaactgactttttcggactataataatcatcgaaaagagaata	1550
1551	tagaaagaagtgactattatgctaaataagattcaacatcgtaacttaaa	1600
1601	cacatatagtgtagacaccttttgatttttttgaagaatttagtcgtaatt	1650
1651	tattcaatgatttttaagccaaatctcatcaaaacagatattcatgaaact	1700
1701	gataatgaatatcttgtagaagctgaactccctggtatccctaaagaaaa	1750
1751	cattcaagttacttacgaaaacggagtatcaacaatttagtggccaacaac	1800
1801	aaattgatgcagtaaacgaagataaaaaaggaaagttgattcgtagcgaa	1850
1851	cgtagtttaacaagtggtccaacgtcaatatatttagaaaaatgttaaaga	1900

1901	agacgaaataaaggcttcttatttcagatggagttcttaaagtaaccttgc	1950
1951	caaaagatagtaacaaagaaataaaaaatctatttcaattgagtagtaa	2000
2001	ttaaaaaatttacgaaaaaaggcgtctataaaattttataggcgccttttt	2050
2051	ttcgtaaaaataaattatTTTTTctttctccattcactatctaaatcaga	2100
2101	tatcataagttaggatTTTTgccttctTTTTgaagaatttctttgtatttc	2150
2151	cagagccttctaaattctgtgacatcacagattcttttggttcatctaaa	2200
2201	tgacacaccctataaaaaacttgaaaaattggcatgcatatacaagaaat	2250
2251	accttgctcgtggctctcctaaagccataataggggccccggggtcgttttt	2300
2301	aaactggcttaggtgaaaatatactgcccccttatataaaatcgtgctacg	2350
2351	ggcgttttagaggggtttaacgacttatctatttttagttcgtccaactgt	2400
2401	tgaataattgggggtgttttataagaccaacattttccaacaattaggggt	2450
2451	tttatataagtttttttcagcaattaaaaaagcgcctagtaatatctaagc	2500
2501	gcttgaattttttgtgaatgaatttagtcatatcttgtttttctagtacac	2550
2551	gttaatacaccttacaaaagtaccgtaccaaaaataaacgttgtcatatca	2600
2601	agggtttacacagttttgttttactacatatTTTTTgtttttctcgaagt	2650
2651	tttcttttttgatttgcttttgatttgccattattgtctcgtttcacctc	2700
2701	accattaagagcgatttatgcccagaaaaactcttgtcagtaagctgagcg	2750
2751	atthagactgagagtgctctgagtcgcaaga	2800

Το πλασμίδιο κατατάσσεται στην πρώτη από τις πέντε ομάδες των πλασμιδίων του *S. thermophilus* βάσει ομολογίας DNA. (Janzen et al., 1992). Η αλληλουχία του πλασμιδίου εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με άλλα πλασμίδια *S. thermophilus*. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη ομολογία σε όλο το μήκος της αλληλουχίας του παρουσιάζεται με το πλασμίδιο pST1 του *S. thermophilus* No 29 (Janzen et al., 1992) σε ποσοστό 93% στο 99% της αλληλουχίας του, ενώ σε κάπως μικρότερο ποσοστό και έκταση (95-97% στο 80% και άνω του ποσοστού των αλληλουχιών τους) με τα pCI165_{ST} του στελέχους NDI-6 (O'Sullivan et al., 1999), pND103 του ST2-1 (Su et al., 2002), pt38 του ST2783 (Petrova et al., 2003) και pER36 του ST136 (Solow and Somkuti, 2001)

Η βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας του πλασμιδίου κατέδειξε 3 πιθανά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, τα orf1, orf2 και orf3 μήκους 948, 222 και 438 bp αντίστοιχα, συμπεριλαμβανομένων των κωδικόνιων λήξης τους.



Εικόνα 4.48 Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pST0040 του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040

Το *orf1* εμφανίζει ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο με γονίδια αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου των πλασμιδίων *S. thermophilus* pER35, pER36, pST1, pST1, pND103, pJ34, pER16 και pt38.

Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του *orf1*:

```

M T D F K K Q G E I L V D K N S R G K E
1 atgacggatttttaaaaaacaaggggaaattcttgtcgcgataagaacagtcgaggaaaagaa 60
R D W R G R K I L S L K L A D I F K E L
61 cgagactggcgaggacgaaaaatattaagtttgaaattagctgatatttttaagaattg 120
Q Y K K T F V E R V I S C G D T L Q F I
121 cagtacaagaagacttttgttgaaagagtaatatcgtgtggtgatactttacaatttatt 180
Q N Q D G N L K L Y Q A Y F C K N K L C
181 caaaatcaagacggtaacctaagctctatcaagcctatttttgtaaaaaacaagctatgt 240
P M C N W R R S M K Y S Y Q T S R I V D
241 cctatgtgcgaactggagacttcaatgaaatattcttatcagacatcaagaatcgttgat 300
E A I K Q S P K G R F L F L T L T V K N
301 gaggcaataaaaaaaaagccctaaaggacgcttttctcttttctaacattgactgttaagaac 360
V E G Q A L N S T I S Q L T K S F D R L
361 gtcgaggggcaagcattgaatagcacgattagtcagctcacaaaatcatttgaccgttta 420
F K R A K V Q R N L L G Y L R S V E V T
421 ttttaagcgtgctaaagttcaaaggaatctggtgggatatttgcggttcagttgaagtgacc 480
H N E N D K T Y H P H I H V L M M V R P
481 cacaatgaaaatgacaagacatatcaccctcatattcatgttttgatgatggtgagacct 540
S Y F Q S K K D Y I T Q K E W S D M W S
541 agttattttcagtcaaaaaaagattatatcactcaaaaagagtggagcgatatgtggtct 600
Q S L K V D Y V P M I D I R T V K E T G
601 caatcattgaaagttgattatgtccctatgatcgacattcgaacagtaaaagagactggc 660
K G L R G A V L E T A K Y P T K P I K L
661 aaaggactgcgaggggagtttttagagaccgcaaaaatccaactaagccgattaagcctt 720
D I E N K Q V V D D L Y N G L Y R K R Q
721 gatattgaaaataagcaagttgttgatgatctatacaacggtttgtatcgaaaaagacaa 780
L G Y G G L F K T I K K Q L A L D D A E
781 cttggctacggtggtttattttaaaccatcaaaaaacaactagcactagatgacgccgaa 840
N G D L V H T S E D K E N I S K G T E I
841 aatggtgacttggtacatacgtctgaggataaagaacatatcaaggggtacagaaata 900
V A I W N A S K Q N Y Y L K K
901 gtcgctatatggaacgctagcaagcaaaattattattttgaaaaaa 945

```

Το *orf2* έχει αντίθετο προσανατολισμό σε σχέση με τα *orf1* και *orf3*, ενώ ένα μικρό μέρος της αλληλουχίας του επικαλύπτεται με αυτήν του *orf1*. Η αναζήτηση ομοιοτήτων με την εφαρμογή nucleotide blast και blastx, πέρα από την ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο με άλλα πλασμίδια, δεν φανέρωσε ομοιότητες με λειτουργίες γονιδίων άλλων οργανισμών. Οι ομοιότητες σε αμινοξικό επίπεδο με τα μεγαλύτερα ποσοστά αντιστοίχισης εμφανίζονται με υποθετική πρωτεΐνη στο σύνολο της αλληλουχίας με ποσοστό 98% και 97% των πλασμιδίων pND103 και pT38 αντίστοιχα.

Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του orf2:

```

M I I I V R K S Q F S S I M L F K N C K
1 atgattattatagtcgaaaaagtcagttttcaagtattatgctctttaaattgtaaa 60
I I F H V M V S A Y F L S L V N T Q I L
61 attattttcatgtagtgatcgatcagcatatttttatcgctagtaaatactcagatattg 120
K S D L S T V A E D S F L F S S S D T K
121 aaatcagatttatcaacagtagcagaagatagctttttattctcttctctgatactaaa 180
K P L F R G A L F Y F F K *
181 aagcccctctttcgaggagctttattttattttttcaataa 222

```

Το *orf3* εμφανίζει ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο με γονίδια μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (small heat shock proteins) πλασμιδίων *S. thermophilus*. Στο αμινοξικό επίπεδο, η εύρεση ομοιοτήτων με την εφαρμογή blastx συμφωνεί με τα αποτελέσματα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και επεκτείνει το φάσμα των οργανισμών με ομοιότητες σε μεγάλο βαθμό με πλασμίδια από *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* και *Pediococcus acidilactici*. Οι ομοιότητες σε αμινοξικό επίπεδο με τα μεγαλύτερα ποσοστά αντιστοίχισης εμφανίζονται με πρωτεΐνες θερμικού σοκ μικρού μοριακού βάρους στο 97% της αλληλουχίας με ποσοστά μεγαλύτερα του 80% των πλασμιδίων *S. thermophilus* pND103, pT38, pER16, pCI65st, p2992, p2 (LMD9), pER36, pST04, pJS33 και pER341

Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του orf3:

```

V T I M L N K I Q H R N L N T Y S V T P
1 gtgactattatgctaataagattcaacatcgtaacttaaacacatatagtgtagacacct 60
F D F F E E F S R N L F N D F K P N F I
61 tttgatttttttgaagaatttagtcgtaatttattcaatgattttaagccaaatttcac 120
K T D I H E T D N E Y L V E A E L P G I
121 aaaacagatattcatgaaactgataatgaatatctgtagaagctgaactccctggtatc 180
P K E N I Q V T Y E N G V L T I S G Q Q
181 cctaaagaaaaacattcaagttacttacgaaaacggagtattaacaattagtgcccaaca 240
Q I D A V N E D K K G K L I R S E R S L
241 caaattgatgcagtaaacgaagataaaaaaggaaagttgattcgtagcgaacgtagttta 300
T S V Q R Q Y L L E N V K E D E I K A S
301 acaagtgtccaacgtcaatatttattagaaaatgttaaagaagacgaaataaaggcttct 360
Y S D G V L K V T L P K D S N K E I K K
361 tattcagatggagttcttaagtaaccttgccaaaagatagtaacaagaataaaaaaa 420
S I S I E *
421 tctatttcaattgagtag 438

```

Πλασμιδιακός φορέας - παράγωγο του pST0040 (pUCSTHXbacat)

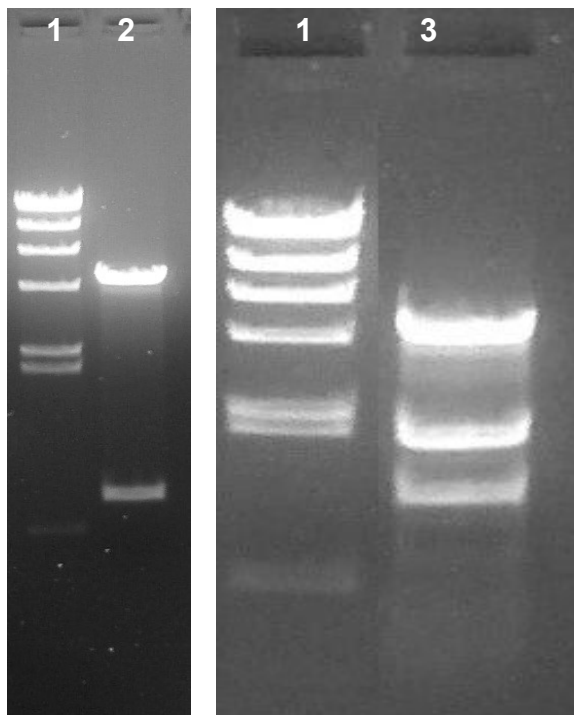
Το φυσικό πλασμίδιο του στελέχους ACA-DC 0040 διαθέτει τα πλεονεκτήματα του μικρού μεγέθους και της δυνατότητας αντιγραφής και διατήρησης σε κύτταρα *Streptococcus thermophilus*. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως βασικό στοιχείο σε μία σειρά πειραμάτων κατασκευής πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης και έκφρασης σε στελέχη του παραπάνω βακτηρίου. Η κατασκευή αυτή πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, ως εξής:

Στο πρώτο στάδιο, το πλασμίδιο υπέστη πέψη με το ένζυμο *Xba*I (εικόνα 4.46) και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC18 ο οποίος είχε γραμμοποιηθεί στην ίδια θέση (εικόνα 4.51). Το μίγμα της δεσμοποίησης χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5a με ηλεκτροδιάτρηση. Από τα μετασχηματισμένα κύτταρα απομονώθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCSTHXba που προέκυψε, μεγέθους 5466 bp (εικόνα 4.51). Η προσθήκη αυτή δίνει τη δυνατότητα στο πλασμίδιο να αντιγράφεται, να διατηρείται και να επιλέγεται στο *E. coli*, όπου πραγματοποιούνται όλες οι ενδιάμεσες κλωνοποιήσεις μέχρι να προκύψει το τελικό επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε στο παραπάνω πλασμίδιο η εισαγωγή του γονιδίου αντίστασης σε χλωραμφενικόλη *cat* του πλασμιδίου pTOPOcatpT38 το οποίο αποτελεί κατάλληλο δείκτη επιλογής για τα κύτταρα του γένους *Streptococcus*. Η κλωνοποίηση αυτή έλαβε χώρα ως εξής: Το πλασμίδιο pUCSTHXba υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Kpn*I και *Eco*RV με αποτέλεσμα να χωριστεί το πλασμίδιο σε δύο τμήματα (εικόνα 4.49). Από αυτά επιλέχθηκε το μεγαλύτερο, μήκους 4740 bp που περιέχει και τα τρία αναγνωστικά πλαίσια με τις ανοδικές και καθοδικές τους περιοχές. Παράλληλα, το πλασμίδιο pTOPOcatpT38 υπέστη πέψη με τα ίδια ένζυμα και ως εκ τούτου προέκυψαν τρία τμήματα (εικόνα 4.49), από τα οποία επιλέχθηκε αυτό στο οποίο εδραζόταν το γονίδιο *cat* μήκους 1205 bp. Τα δύο αυτά DNA υπέστησαν δεσμοποίηση και στη συνέχεια το μίγμα της δεσμοποίησης χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5a με ηλεκτροδιάτρηση. Από τα μετασχηματισμένα κύτταρα

Αποτελέσματα

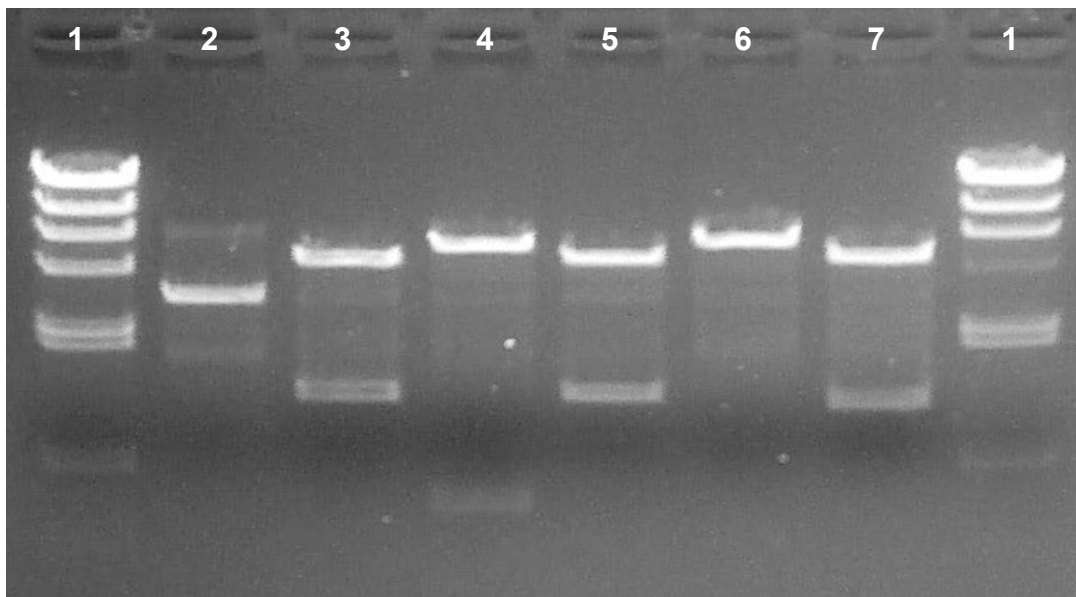
απομονώθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCSTHXbaat μήκους 5949 bp (εικόνα 4.50, εικόνα 4.52, εικόνα 4.53).



Εικόνα 4.49 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1% πλασμιδίων pUCSTHXba και pTOPOcatpT38 μετά από περιορισμό με *KpnI* και *EcoRV*

1: λ-*HindIII*, 2: pUCSTHXba *KpnI* - *EcoRV*, 3: pTOPOcatpT38 *KpnI* - *EcoRV*

Οι αναμενόμενες ζώνες μετά από τον περιορισμό των πλασμιδίων pUCSTHXba και pTOPOcatpT38 με τα ένζυμα *KpnI* και *EcoRV* είναι μήκους 4740 και 726 ζευγών βάσεων και 4838, 1935 και 1205 ζευγών βάσεων αντίστοιχα, γεγονός που συμφωνεί με την εικόνα της ηλεκτροφόρησης.



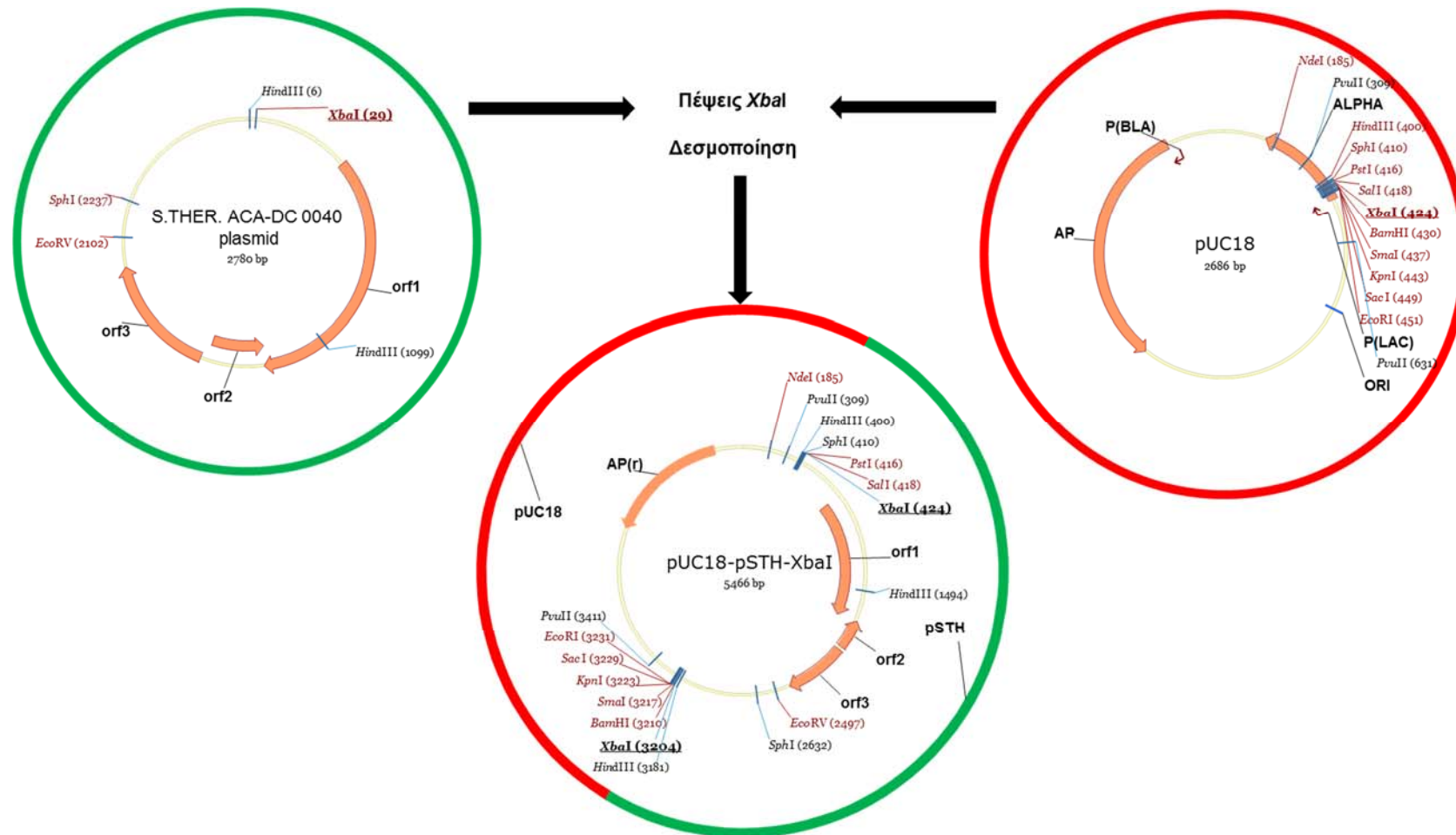
Εικόνα 4.50 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1% πλασμιδιακού φορέα pUCSTHXbacat

1:λ-*Hind*III, 2:pUCSTHXbacat, 3:pUCSTHXbacat - *Eco*RI, 4:pUCSTHXbacat - *Kpn*I & *Nco*I, 5:pUCSTHXbacat - *Kpn*I & *Eco*RV, 6:pUCSTHXbacat - *Xba*I, 7:pUCSTHXbacat - *Hind*III

Τα μεγέθη των αναμενόμενων ζωνών μετά από περιορισμό με τα παραπάνω ένζυμα είναι μήκους:

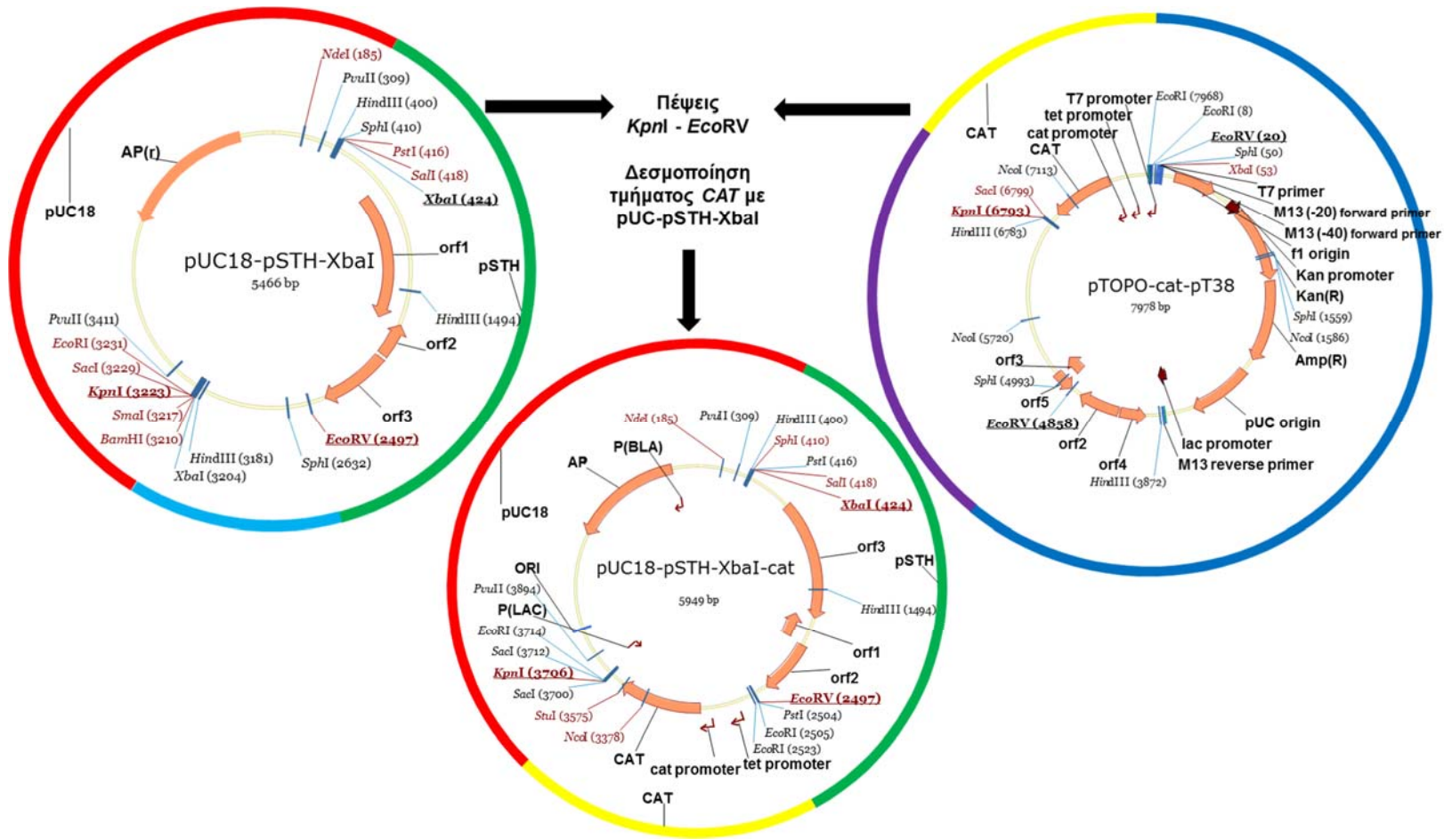
*Eco*RI 4740, 1191 και 18, *Kpn*I και *Nco*I 5621 και 237, *Kpn*I & *Eco*RV 4470 και 1209, *Xba*I 5949 και *Hind*III 4855 και 1094 ζευγών βάσεων, γεγονός που συμφωνεί με την εικόνα της ηλεκτροφόρησης.

Αποτελέσματα

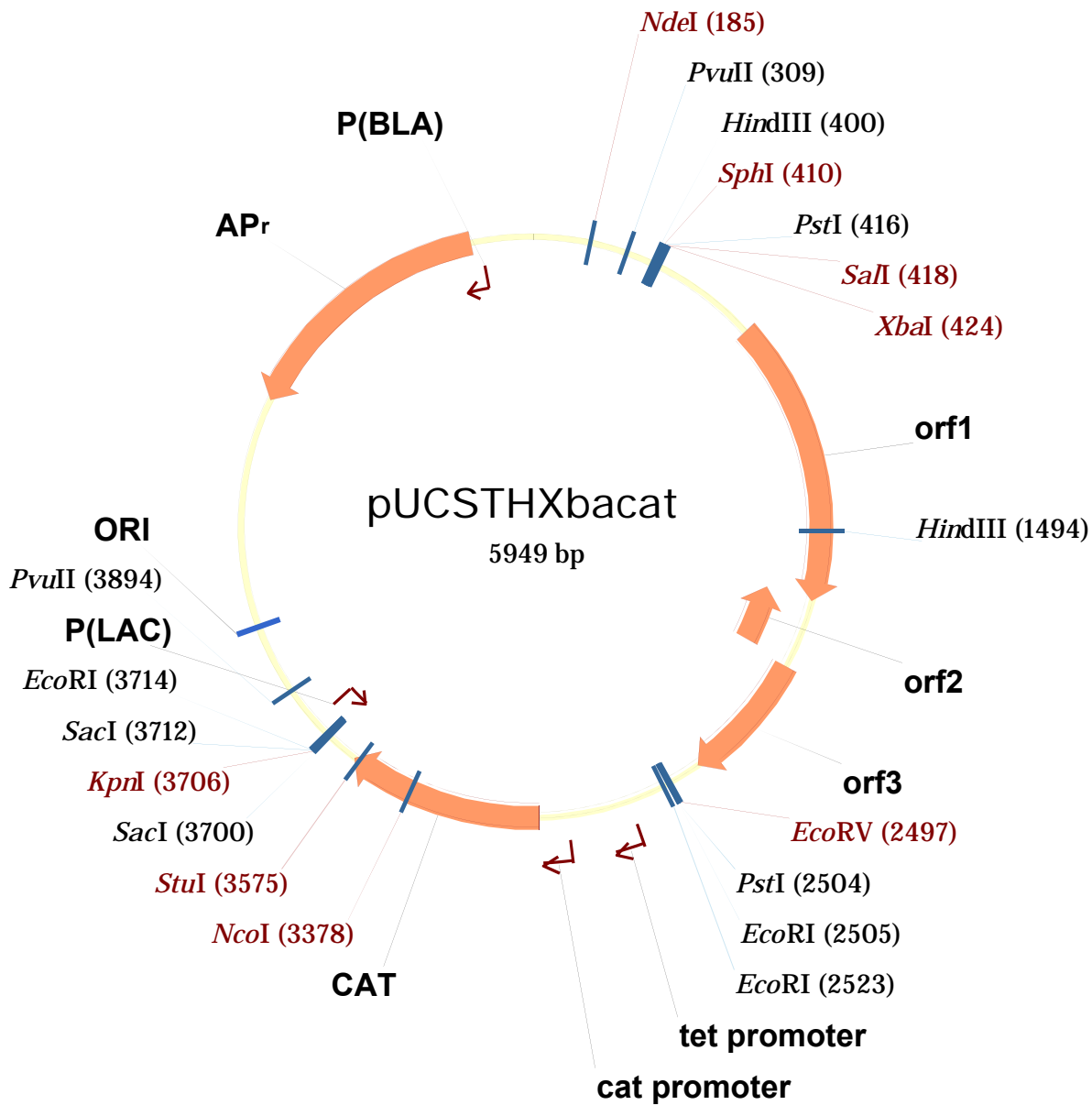


4.51 Πρώτο στάδιο δημιουργίας φορέα pUCSTHXbacat.

Αποτελέσματα



Εικόνα 4.52 Δεύτερο στάδιο δημιουργίας φορέα pUCSTHxbaCat



Εικόνα 4.53 Χάρτης πλασμιδίου pUCSTHXbacat

Για τη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης του γονιδίου πιθανής πρωτεΐνης απόκρισης σε θερμικό σοκ *orf2* ως δείκτη αναφοράς στον φορέα pUCSTHXbacat για κύτταρα *S. thermophilus*, σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων απόκρισης σε θερμικό σοκ.

Το πλασμίδιο pUCSTHXbacat απομονώθηκε από κύτταρα *E. coli* DH5a με την μέθοδο 3.6.1 και εισήχθη σε κύτταρα *S. thermophilus* LMG 18311 με μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση (§3.17.2) από τα οποία και απομονώθηκε (εικόνα 4.54).

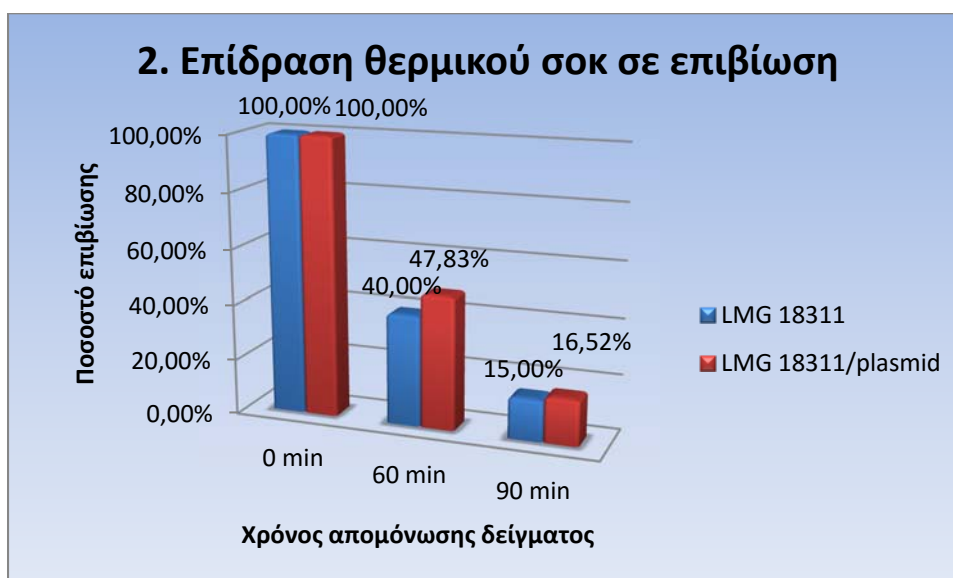
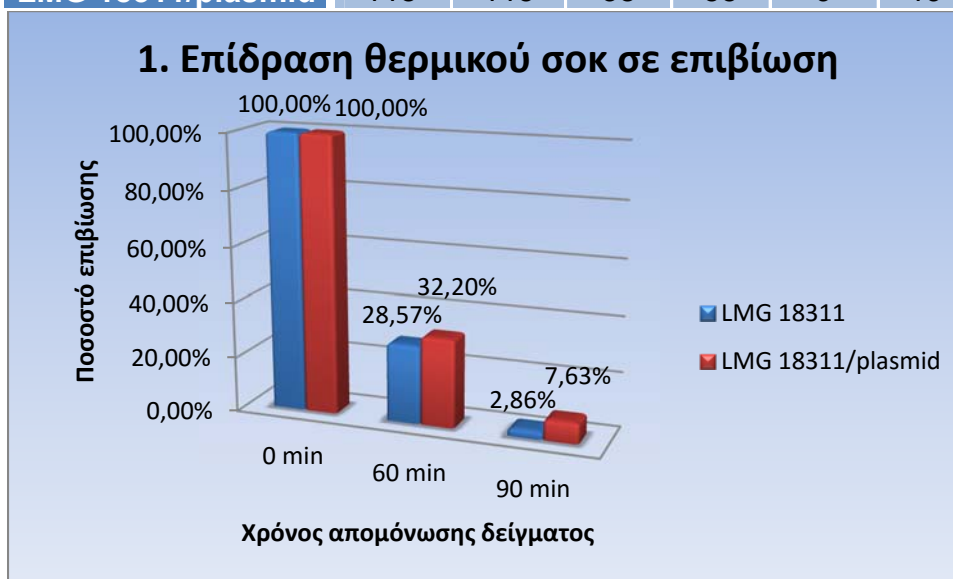


Εικόνα 4.54 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1% πλασμδιακού φορέα pUCSTHXbacat από απομόνωση από οργανισμό *S. thermophilus* LMG 18311 1:λ-*Hind*III, 2:pUCSTHXbacat

Καλλιέργειες *S. thermophilus* LMG 18311 και *S. thermophilus* LMG 18311 με το πλασμίδιο pUCSTHXbacat αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο M17 σε 37 °C με ανάδευση για 3 ώρες μέχρι να φθάσουν μετά το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για ανάπτυξη σε θερμοκρασία 60 °C και μελετήθηκε η επιβίωση των κυττάρων μετά από επίστρωση αραιώσεων των καλλιεργειών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο M17, τα οποία αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε θερμοκρασία 37 °C.

Πίνακας 4.14 Πειράματα επίδρασης θερμικού σοκ στην επιβίωση των οργανισμών *S. thermophilus* LMG 18311 δίχως και με την παρουσία το πλασμιδίου ρUCSTHΧbacat. Στα κελιά εμφανίζονται με τίτλο Π1 και Π2 οι αριθμοί των κυττάρων που επιβίωσαν από 100 μl καλλιιεργειών σε διαφορετικούς χρόνους επώασης στη θερμοκρασία σοκ (60°C). Τα 2 πειράματα είχαν τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης, με έναρξη του θερμικού σοκ όταν η οπτική πυκνότητα στα 600 nm ήταν 1 και 0,7 αντίστοιχα.

Οργανισμός	0 min		60 min		90 min	
	Π1	Π2	Π1	Π2	Π1	Π2
LMG 18311	35	40	10	16	1	6
LMG 18311/plasmid	118	115	38	55	9	19



Εικόνα 4.55 Ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων του πειράματος του πίνακα 4.14

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φανερώνουν ελαφρώς μεγαλύτερη επιβίωση των κυττάρων *S. thermophilus* LMG 18311 που έχουν το πλασμίδιο pUCSTHXbacat. Το δεδομένο αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης *orf2* του φυσικού πλασμιδίου pST0040 του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040 παράγει μία πρωτεΐνη απόκρισης σε θερμικό σοκ.

4.6.3 Συνθήκες μετασχηματισμού

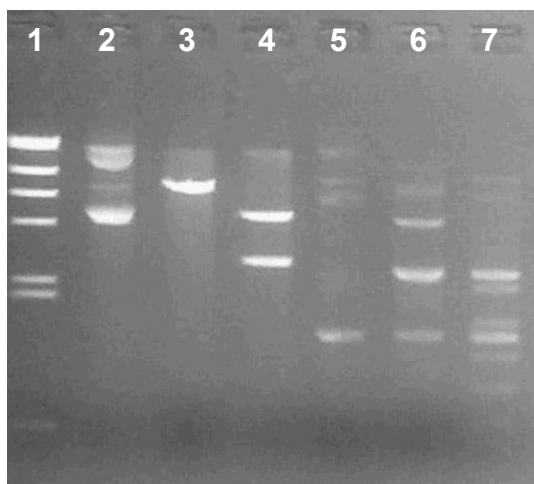
Για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών μετασχηματισμού στα διαθέσιμα στελέχη *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 και LMG 18311 και στο στέλεχος *Lactococcus lactis* CNRZ 117, πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά μετασχηματισμοί με ηλεκτροδιάτρηση με την χρήση των πλασμιδιακών φορέων pTOPOcatpT38 και pUCSTHXbacat. Η επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων έγινε με τη χρήση ως παράγοντα επιλογής του αντιβιοτικού χλωραμφενικόλη σε συγκέντρωση 5 µg/ml.

Στο στέλεχος ACA-DC 0040 επιχειρήθηκαν πολλές απόπειρες μετασχηματισμού με το πλασμίδιο pTOPOcatpT38, καθώς περιέχει το φυσικό πλασμίδιο pST0040 το ρεπλικόνιο του οποίου βρίσκεται στο pUCSTHXbacat και τα καθιστά αδύνατο να συνυπάρξουν, με διαφορετικές συνθήκες και τροποποιήσεις αυτών καθώς και διαφορετικούς τρόπους παρασκευής επιδεκτικών κυττάρων με ισχνή ή μηδενική απόδοση. Τα επιδεκτικά κύτταρα τα οποία κατασκευάστηκαν βάσει των αρχών του πρωτοκόλλου που προτείνεται από τον Slos et al. (1991), δοκιμάζοντας ως μέσο επαναιώρησης τα θρεπτικά υλικά HJG-0,5%Λακτόζη, M17-Dlthreonine, HJG-Dlthreonine, M17-Dlthreonine-2%Gluc και την επώαση σε μέσο με 10% γλυκίνη για μία ώρα και οι συνθήκες ηλεκτροδιάτρησης που δοκιμάστηκαν σε 25 πειράματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA, κυττάρων, τιμές τάσης, αντίστασης και πυκνότητας ρεύματος καθώς και μέγεθος κυβέτας δεν έδωσαν καμία αποικία σαν αποτέλεσμα μετασχηματισμού.

Αποτελέσματα

Μία μέθοδος παρασκευής επιδεκτικών κυττάρων και συνθήκες μετασχηματισμού που απέδωσαν πολύ λίγες μετασχηματισμένες αποικίες ήταν η μέθοδος των Blomqvist et al., (2006) με κάποιες τροποποιήσεις όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.17.2.

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα του στελέχους ACA-DC 0040 εμφανίζονται να λαμβάνουν ένα πλασμίδιο μαζί με αυτό που ήδη περιέχουν αλλά η σταθερότητά του μέσα στα κύτταρα είναι υπό αμφισβήτηση καθώς το περιοριστικό του προφίλ δεν ταιριάζει με αυτό του pTOPOcatpT38.

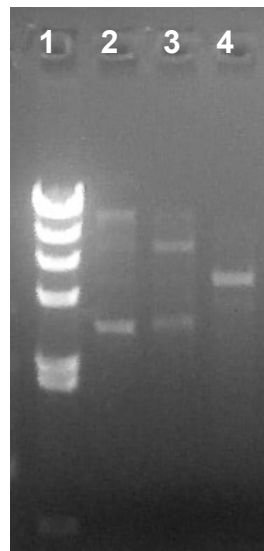


Εικόνα 4.56 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδίου pTOPOcatpT38 προς ένθεση με το περιοριστικό του προφίλ και δείγμα από απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *S. thermophilus* ACA-DC 0040 μαζί με περιοριστικό προφίλ.

Διαδρομή 1: λ -HindIII, Διαδρομή 2: pTOPOcatpT38, Διαδρομή 3: pTOPOcatpT38-EcoRI, Διαδρομή 4: pTOPOcatpT38-HindIII, Διαδρομή 5: πλασμιδιακό DNA μετασχηματισμένου κλώνου ACA-DC 0040, Διαδρομή 6: πλασμιδιακό DNA κλώνου ACA-DC 0040 - EcoRI, Διαδρομή 7: πλασμιδιακό DNA κλώνου ACA-DC 0040 - HindIII.

Στο στέλεχος LMG 18311 εφαρμόστηκαν επίσης οι ίδιες μέθοδοι με το ACA-DC 0040 με τροποποιήσεις καθώς και μία μέθοδος των Buckley et al. (1999) με πλασμίδια τα pUCSTHXbacat και pTOPOcatpT38. Η απόδοση στις περισσότερες μεθόδους μετά από τουλάχιστον 15 απόπειρες μετασχηματισμού ήταν μηδενική με εξαίρεση την μέθοδο των Blomqvist et al., (2006) με τροποποιήσεις που χρησιμοποιήθηκε με λίγα αποτελέσματα και στο στέλεχος ACA-DC 0040, πάλι με μικρή απόδοση.

Σε μετασχηματισμούς με το πλασμίδιο pTOPOcatpT38 τα μετασχηματισμένα κύτταρα του στελέχους LMG 18311 εμφανίζονται να λαμβάνουν ένα πλασμίδιο του οποίου το περιοριστικό του προφίλ δεν ταιριάζει με αυτό του pTOPOcatpT38 (εικόνα 4.57) ενώ το πλασμίδιο pUCSTHXbacat επιτεύχθει να μετασχηματιστεί όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.54.

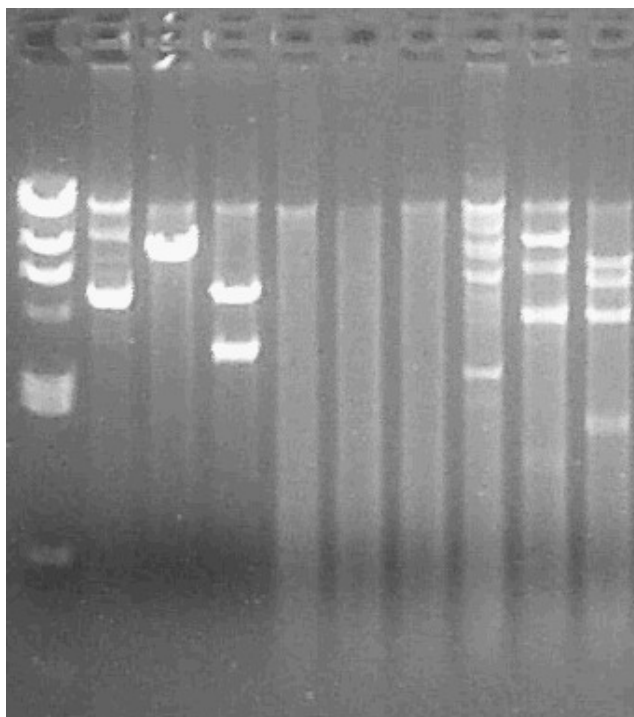


Εικόνα 4.57 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από απομονώσεις πλασμιδιακού DNA από κλώνους μετασχηματισμού με το πλασμίδιο pTOPOcatpT38 σε πήγμα αγαρόζης 1%.

Διαδρομή 1: λ-*Hind*III, Διαδρομή 2: πλασμιδιακό DNA κλώνου LMG, Διαδρομή 3: πλασμιδιακό DNA κλώνου LMG-*Sac*I-*Bgl*II, Διαδρομή 4: πλασμιδιακό DNA κλώνου LMG *Sac*I-*Eco*RI. Σύμφωνα με τον χάρτη του πλασμιδίου pTOPOcatpT38 οι αναμενόμενες ζώνες στην διαδρομή 2 ήταν μεγέθους 5809 bp και 2169 bp ενώ στην διαδρομή 3 6791 bp και 1169 bp.

Αποτελέσματα

Στο στέλεχος *Lactococcus lactis* CNRZ 117 οι μετασχηματισμοί που αποπειράθηκαν έγιναν με το πλασμίδιο pTOPOcatPT38 και με το πρωτόκολλο των Powell et al. (1987) σε διάφορες συνθήκες ηλεκτροδιάτρησης, χωρίς όμως καθαρά αποτελέσματα. Η ανάπτυξη του οργανισμού καθυστερεί από τον παράγοντα επιλογής χλωραμφενικόλη στη συνιστώμενη από τη βιβλιογραφία συγκέντρωση και όταν αυτό αναπτυχθεί η απομόνωση πλασμιδιακού DNA δεν αποδίδει, ενώ όταν αναπτυχθεί χωρίς το αντιβιοτικό, το πλασμίδιο δεν φαίνεται να υπάρχει στο πλασμιδιακό φορτίο (εικόνα 4.58). Το στέλεχος παρουσιάζεται να έχει ήδη πλασμιδιακό φορτίο, γεγονός που το καθιστά ακατάλληλο για δοκιμές συνθηκών μετασχηματισμού.



Εικόνα 4.58 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από απομονώσεις πλασμιδιακού DNA από κλώνους μετασχηματισμού με το πλασμίδιο pTOPOcatpT38 σε πύγμα αγαρόζης 1% στο στέλεχος *L. lactis* CNRZ 117 μετά από ανάπτυξη ή όχι σε χλωραμφενικόλη.

Διαδρομή 1: λ-*Hind*III, Διαδρομή 2: pTOPOcatpT38, Διαδρομή 3: pTOPOcatpT38 - *Eco*RI, Διαδρομή 4: pTOPOcatpT38 - *Hind*III., Διαδρομή 5: πλασμιδιακό DNA κλώνου *L. lactis* με cm, Διαδρομή 6: πλασμιδιακό DNA κλώνου *L. lactis* με cm - *Eco*RI, Διαδρομή 7: πλασμιδιακό DNA κλώνου *L. lactis* με cm - *Hind*III, Διαδρομή

8: πλασμιδιακό DNA κλώνου *L. lactis*, Διαδρομή 9: πλασμιδιακό DNA κλώνου *L. lactis* – *EcoRI*, Διαδρομή 10: πλασμιδιακό DNA κλώνου *L. lactis* - *HindIII*

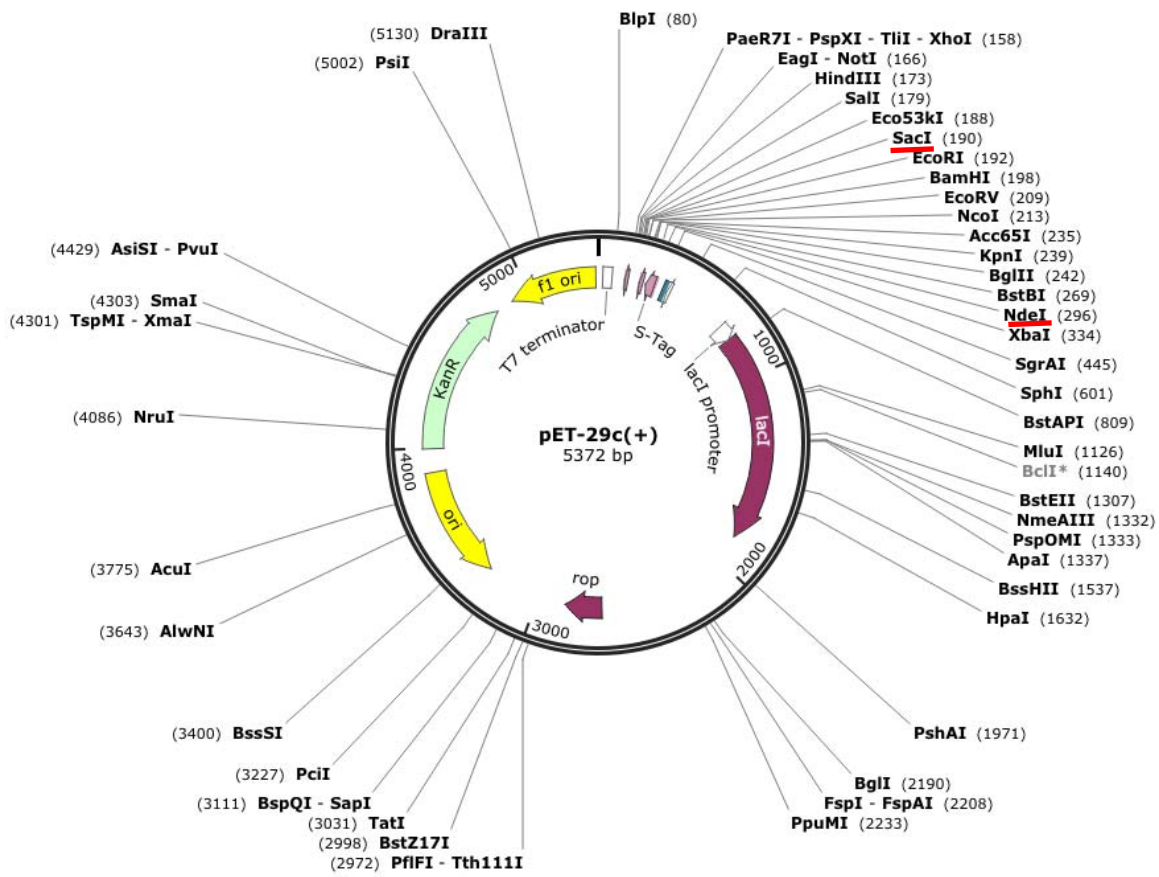
Παρόλο που η απόδοση του μετασχηματισμού ήταν μικρή και στα δύο στελέχη *S. thermophilus*, το πρωτόκολλο των Blomqvist et al., (2006) με τροποποιήσεις ήταν το μοναδικό πρωτόκολλο από όσα χρησιμοποιήθηκαν, από το οποίο προέκυψαν μετασχηματισμένες αποικίες. Η περαιτέρω τροποποίησή του κρίνεται απαραίτητη, ώστε να αυξηθεί η συχνότητα μετασχηματισμού.

Η διαφοροποίηση του πλασμιδίου στα στελέχη αυτά χρήζει περαιτέρω μελέτης για τα αίτια και τον τρόπο αποφυγής της καθώς καθιστά την όλη διαδικασία αναξιόπιστη για κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων.

4.7 Υπερέκφραση γονιδίων *blpU* και *blpK*

Στα πλαίσια της μελέτης που αφορούσε τη συσχέτιση της θερμοφιλίνης T του στελέχους ACA-DC 0040 με την αντιμικροβιακή δραστικότητα των πεπτιδίων που εκφράζονται από τα γονίδια *blpU* και *blpK*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης των γονιδίων αυτών σε πλασμιδιακό φορέα pET29c σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3). Το σύνολο των πεπτιδίων των κυττάρων μετά από την υπερέκφραση ηλεκτροφορήθηκε σε πήγματα πολυακρυλαμίδιου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εμφάνιση δραστικότητας των πεπτιδίων σε αυτά έναντι του οργανισμού *L. lactis* CNRZ 117.

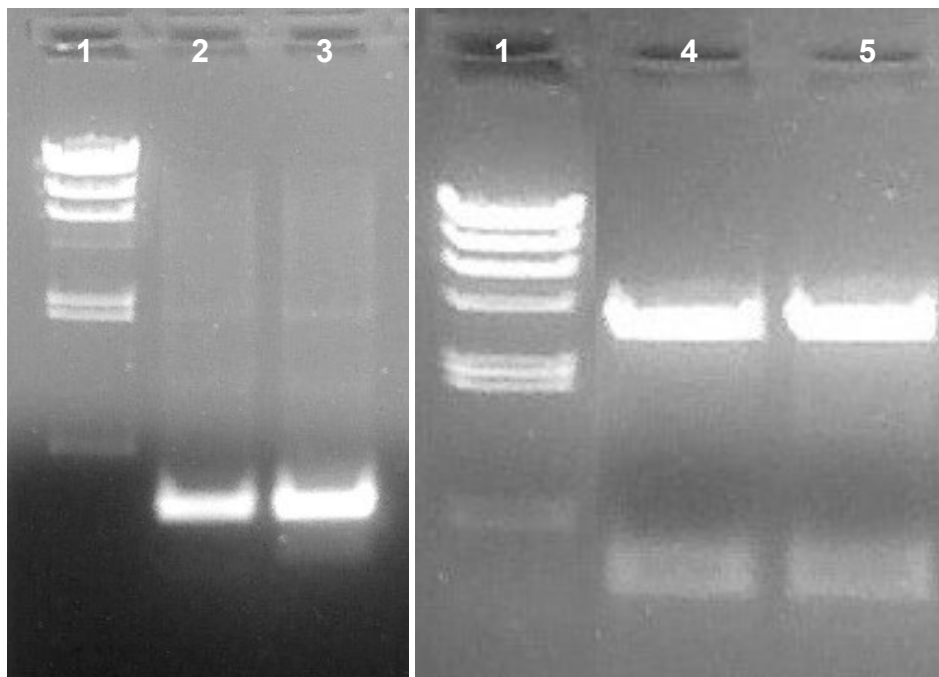
Τα γονίδια *blpU* και *blpK* απομονώθηκαν μετά από ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης από το γονιδιωματικό DNA του οργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0040. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης κάθε γονιδίου να ταυτίζεται με αυτό που προσφέρεται από την θέση *NdeI* του pET29c, ενώ το γονίδιο να βρίσκεται στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο για να χρησιμοποιείται το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης που εδράζεται στην περιοχή κλωνοποίησης του pET29c. Κατά συνέπεια, ο ανοδικός εκκινητής *overexp.blpU-K* (κοινός στα *blpU* και *blpK* λόγω της ομολογίας τους στην συγκεκριμένη περιοχή) περιέχει μία θέση *NdeI*, ενώ κάθε καθοδικός εκκινητής *overexp.blpURev* και *overexp.blpKrev* μία θέση *SacI*. Οι εκκινητές παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4 με ένδειξη «υπερέκφραση» στην στήλη «χρήση».



Εικόνα 4.59 Χάρτης πλασμιδίου pET29c. Με κόκκινο υπογραμμίζονται οι θέσεις περιορισμού στις οποίες κλωνοποιήθηκε η προς υπερέκφραση αλληλουχία.

Οι ενισχυμένες αλληλουχίες ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1% και απομονώθηκαν από αυτό πριν δεσμοποιηθούν στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt (Εικόνα 4.60). Τα προϊόντα της δεσμοποίησης κλωνοποιήθηκαν σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* DH5a με μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση (§3.17.1).

Αποτελέσματα



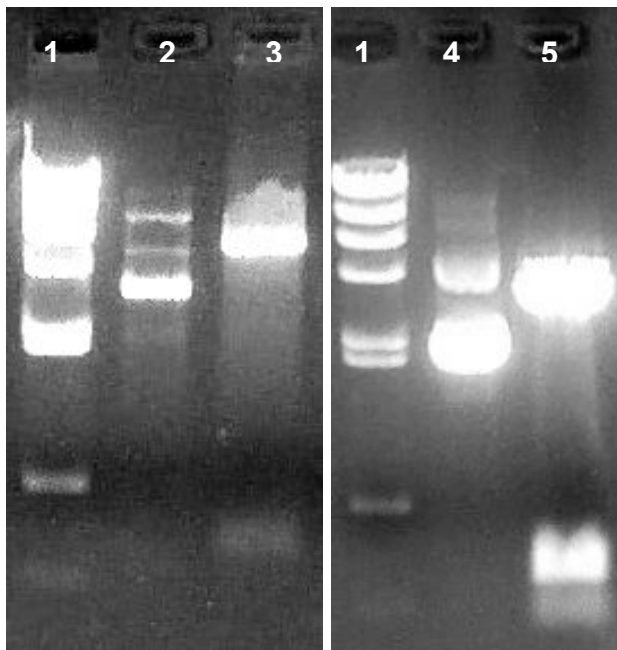
Εικόνα 4.60 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων πειράματος υπερέκφρασης σε πήγμα αγαρόζης 1%. Προϊόντα ενίσχυσης γονιδίων *blpU* και *blpK* και κλωνοποιημένες αλληλουχίες αυτών σε πλασμίδιο pCR-Blunt.

Διαδρομή 1: λ -*Hind*III, Διαδρομή 2: ενισχυμένη αλληλουχία *blpU*, Διαδρομή 3: ενισχυμένη αλληλουχία *blpK*, Διαδρομή 4: κλωνοποιημένη αλληλουχία pCR-Blunt-*blpU* – *Sac*I & *Nde*I, Διαδρομή 5: κλωνοποιημένη αλληλουχία pCR-Blunt-*blpK* – *Sac*I & *Nde*I.

Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της ενίσχυσης των γονιδίων *blpU* και *blpK* είναι 253 και 277 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης (διαδρομή 2 και 3). Οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες στο πλασμίδιο pCR-Blunt μετά από περιορισμό με τα ένζυμα *Sac*I και *Nde*I αναμένονται να εμφανίσουν μεγέθη 3538 και 227 ζεύγη βάσεων για το *blpU* και 3541 και 248 ζεύγη βάσεων για το *blpK*, όπως απεικονίζεται στην φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης.

Για επιβεβαίωση των αλληλουχιών των πλασμιδίων τους, δείγματα απομονώσεων πλασμιδιακού DNA από τους βακτηριακούς κλώνους στάλθηκαν σε εξωτερικό εργαστήριο για προσδιορισμό της αλληλουχίας τους.

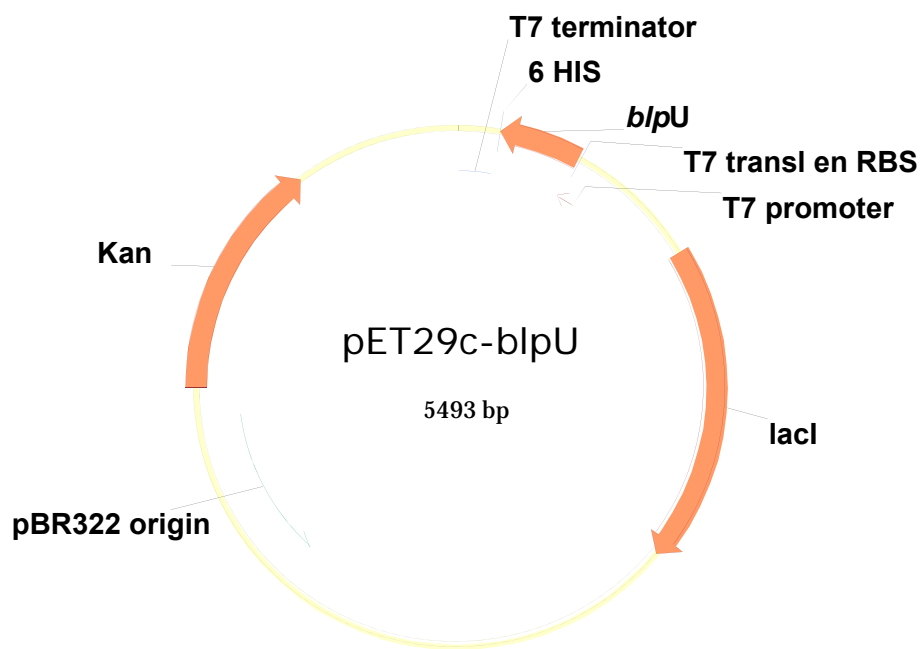
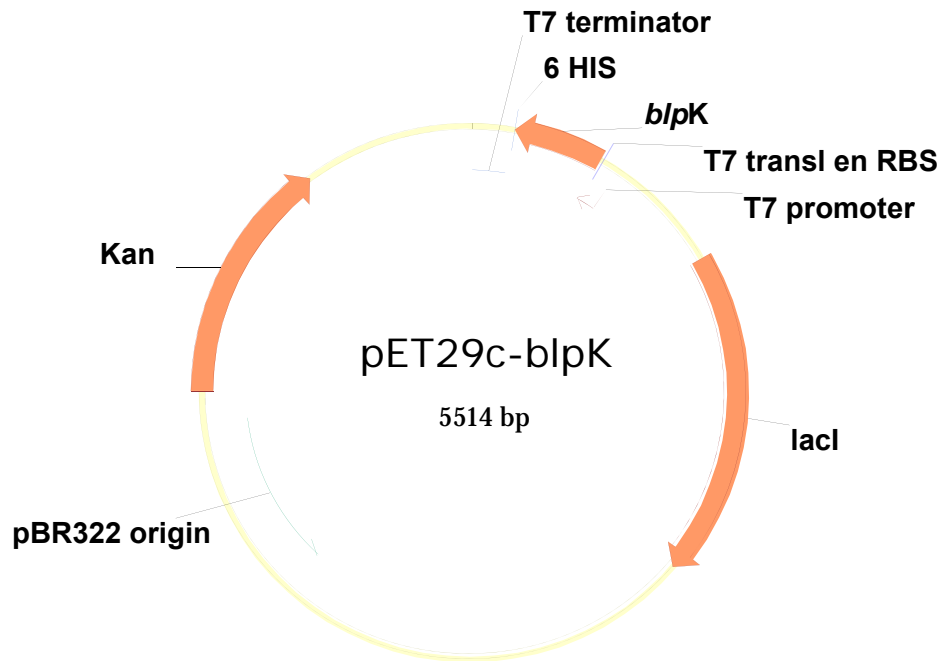
Μετά από την επιβεβαίωση της ορθότητας της αλληλουχίας τα πλασμίδια των βακτηριακών κλώνων επωάστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *SacI* και *NdeI* και τα τμήματα που αντιστοιχούσαν στις αλληλουχίες των γονιδίων *blpU* και *blpK* απομονώθηκαν από το πηγάδι αγαρόζης (εικόνα 4.60). Ο πλασμιδιακός φορέας για υπερέκφραση pET29c, απομονώθηκε από κύτταρα *E. coli* DH5a και επωάστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *SacI* και *NdeI*. Τα απομονωμένα τμήματα των γονιδίων *blpU* και *blpK* δεσμοποιήθηκαν με το τμήμα του πλασμιδίου pET29c που αντιστοιχεί στον κύριο όγκο αυτού και έχει απομονωθεί από πηγάδι αγαρόζης μετά την επίδραση με τα περιοριστικά ένζυμα. Τα προϊόντα της δεσμοποίησης κλωνοποιήθηκαν σε βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli* DH5a με την μέθοδο μετασχηματισμού των Chung and Miller (§3.17.4) (εικόνα 4.61). Από τους κλώνους που προέκυψαν επιλέχθηκαν 4 κλώνοι, 2 για κάθε δείγμα, των οποίων δείγματα από απομόνωση πλασμιδιακού DNA στάλθηκαν σε εξωτερικό εργαστήριο για εύρεση της αλληλουχίας τους με σκοπό την εξακρίβωση της ορθότητας των αλληλουχιών τους.



Εικόνα 4.61 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων πειράματος υπερέκφρασης σε πήγμα αγαρόζης 1%. Κλωνοποιημένες αλληλουχίες γονιδίων *blpU* και *blpK* σε πλασμίδιο pET29c από κύτταρα *E. coli* DH5a.

Διαδρομή 1: λ -*Hind*III, Διαδρομή 2: κλωνοποιημένη αλληλουχία pET29c-*blpU*, Διαδρομή 3: κλωνοποιημένη αλληλουχία pET29c-*blpU* – *Sac*I & *Nde*I, Διαδρομή 4: κλωνοποιημένη αλληλουχία pET29c-*blpK*, Διαδρομή 5: κλωνοποιημένη αλληλουχία pET29c-*blpK* – *Sac*I & *Nde*I.

Οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες στο πλασμίδιο pET29c μετά από περιορισμό με τα ένζυμα *Sac*I και *Nde*I αναμένονται να εμφανίσουν μεγέθη 5266 και 227 ζεύγη βάσεων για το *blpU* και 5266 και 248 ζεύγη βάσεων για το *blpK*, όπως απεικονίζεται στην φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 4.62 Χάρτες πλασμιδίων pET29c με τις προς υπερέκφραση αλληλουχίες των γονιδίων *blpU* και *blpK*

Αποτελέσματα

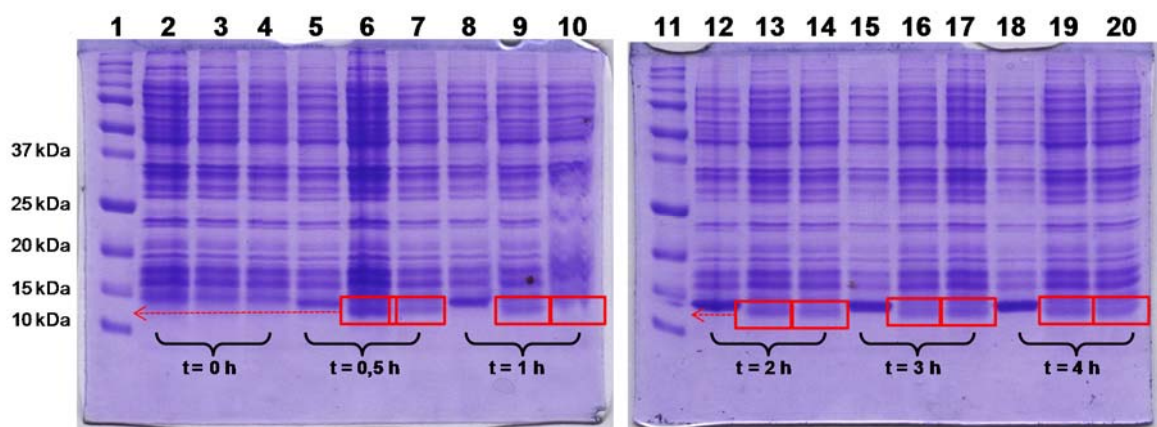
Με την επιβεβαίωση των πλασμιδιακών αλληλουχιών, τα πλασμίδια 2 κλώνων απομονώθηκαν και εισήχθησαν σε βακτηριακές καλλιέργειες κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) με την μέθοδο μετασχηματισμού με θερμικό σοκ (§3.17.3) μαζί με ένα δείγμα πλασμιδίου pET29c για μάρτυρα. Από τις κλωνοποιήσεις επιλέχθηκαν 4 βακτηριακοί κλώνοι, 2 για κάθε γονίδιο, καθώς και ένας από τον μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pET29c και χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα υπερέκφρασης.

Τα πειράματα υπερέκφρασης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο που παρουσιάζεται στην παράγραφο 3.2.9. Δείγματα από κάθε καλλιέργεια απομονώθηκαν από χρονικές στιγμές αμέσως μετά την προσθήκη IPTG, καθώς και ½, 1, 2, 3 και 4 ώρες μετά. Την απομόνωση των δειγμάτων ακολούθησε η φυγοκέντρωση τους και επαναδιαλυτοποίηση των κυτταρικών ιζημάτων σε διάλυμα SAB σε αναλογία 20 μl ανά 0,1 της τιμής της οπτικής απορρόφησης των καλλιεργειών τη στιγμή απομόνωσης, στα 600 nm.

Τα επαναιωρημένα κυτταρικά ιζήματα θερμάνθηκαν σε θερμοκρασία 100 °C για 10min. Μετά τη λύση τους, δείγματα αυτών, όγκου 10 μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα πολυακρυλαμίδιου 15% μαζί με 5 μl του δείκτη μοριακών βαρών Precision Plus Protein Standards All Blue της εταιρείας Bio-Rad.

Υπερέκφραση *blrU*

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων από την υπερέκφραση του γονιδίου *blrU* σε κύτταρα *E. coli* αποκάλυψε μια ζώνη μεγέθους ~ 12 kDa. Το πεπτιδίο του γονιδίου *blrU*, όπως παράγεται από τα το σύστημα υπερέκφρασης με το πλασμίδιο pET29c που προσθέτει μία ουρά από 17 αμινοξέα, περιέχει 93 αμινοξέα στην αλληλουχία του και ο υπολογισμός του μοριακού του βάρους αγγίζει τα 9484Da. Η διαφορά που παρατηρείται, ενδεχομένως οφείλεται σε συσσωματώματα που προκαλούνται από το SDS και εμποδίζουν την κινητικότητα των μικρών μορίων ή σε τροποποιήσεις των πρωτεϊνών από τα κύτταρα *E. coli*.



Εικόνα 4.63

Υπερέκφραση κλώνων pET29c-*blrU*: πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15%) απομονωμένα σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης της καλλιέργειας μετά την επαγωγή μετά

Διαδρομές 1, 11: ladder

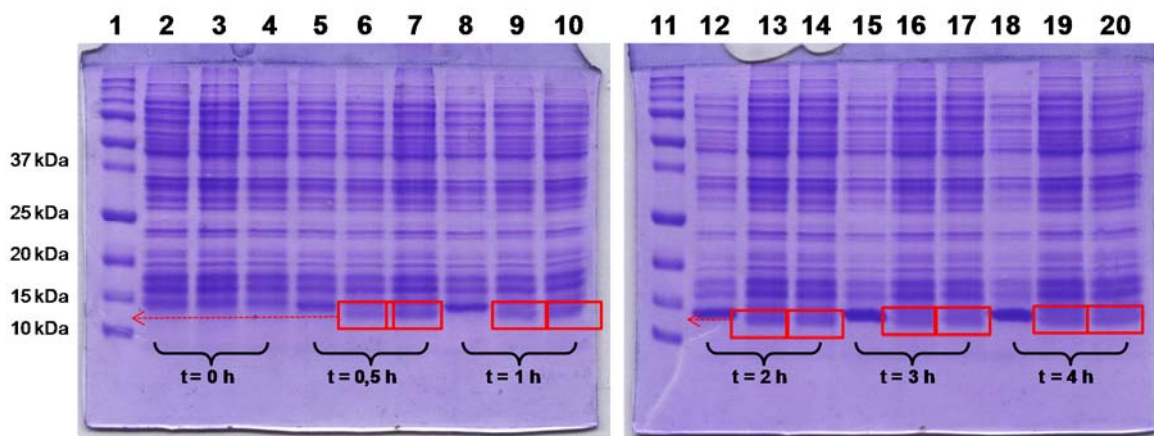
Διαδρομές 2, 5, 8, 12, 15, 18: πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21[DE3]/pET29c

Διαδρομές 3, 6, 9, 13, 16, 19: πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21[DE3]/pET29c-*blrU*1

Διαδρομές 4, 7, 10, 14, 17 20: πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21[DE3]/pET29c-*blrU*2

Υπερέκφραση *blpK*

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων από την υπερέκφραση του γονιδίου *blpK* σε κύτταρα *E. coli* αποκάλυψε μια ζώνη μεγέθους ~ 13 kDa. Το πεπτιδίο του γονιδίου *blpK*, όπως παράγεται από τα το σύστημα υπερέκφρασης με το πλασμίδιο pET29c που προσθέτει μία ουρά από 17 αμινοξέα, περιέχει 100 αμινοξέα στην αλληλουχία του και ο υπολογισμός του μοριακού του βάρους αγγίζει τα 9840 Da. Η διαφορά που παρατηρείται και σε αυτό, η οποία είναι της ίδιας τάξεως μεγέθους με αυτήν που προκύπτει υπερέκφραση του *blpU*, ενδεχομένως οφείλεται στους ίδιους λόγους με του *blpU*.



Εικόνα 4.64

Υπερέκφραση κλώνων pET29c-*blpK*: πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (15%) απομονωμένα σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης της καλλιέργειας μετά την επαγωγή μετά

Διαδρομές 1, 11: ladder

Διαδρομές 2, 5, 8, 12, 15, 18: πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21[DE3]/pET29c

Διαδρομές 3, 6, 9, 13, 16, 19: πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21[DE3]/pET29c-*blpK1*

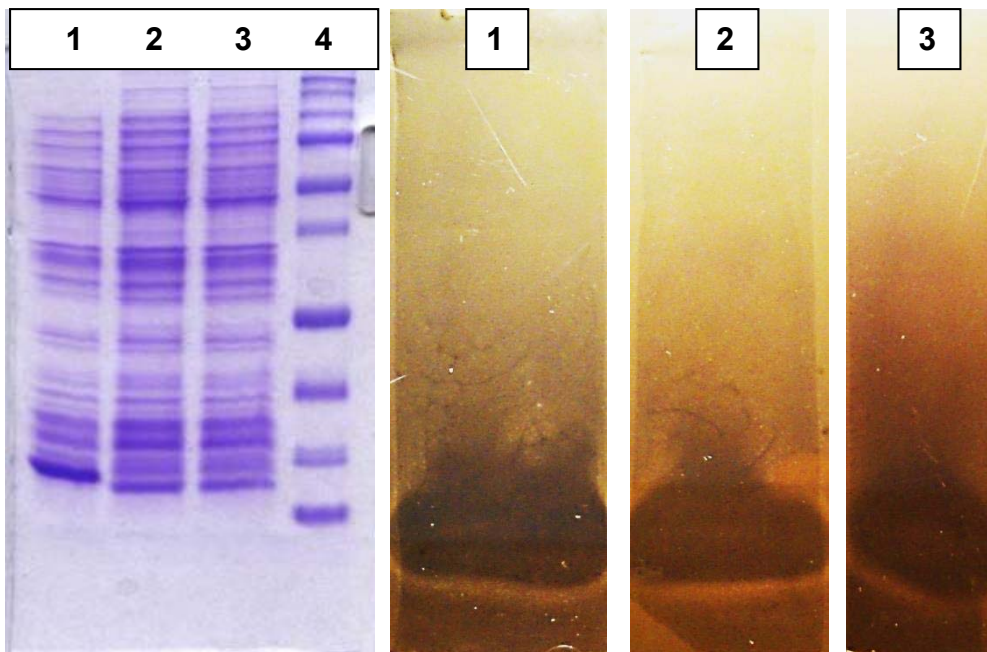
Διαδρομές 4, 7, 10, 14, 17 20: πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21[DE3]/pET29c-*blpK2*

Δοκιμή δραστικότητας πρωτεϊνών υπερέκφρασης

Για να διερευνηθεί αν τα υπερέκφρασμένα πεπτίδια των γονιδίων *blpU* και *blpK* παρουσιάζουν την αντιμικροβιακή δραστικότητα που εμφανίζει και η θερμοφιλίνη T, με σκοπό την συσχέτιση της βακτηριοσίνης με τα γονίδια *blpU* και *blpK*, εφαρμόστηκε ένα πείραμα δραστικότητας έναντι του οργανισμού *L. lactis* CNRZ 117.

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα *E. coli* BL21[DE3] / pET29c, BL21[DE3] / pET29c-*blpU* και BL21[DE3] / pET29c-*blpK* μετά από ανάπτυξη και επαγωγή με IPTG διάρκειας 3 ωρών ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα πολυακρυλαμίδιου 15%. Κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα ηλεκτροφορήθηκε σε δύο αντίγραφα. Το ένα υποβλήθηκε σε χρώση των πρωτεϊνών. Το δεύτερο τοποθετήθηκε σε ένα τρυβλίο και πάνω σε αυτό επιστρώθηκε θρεπτικό μέσο M17 agar μαζί με αναμεμιγμένη καλλιέργεια *L. lactis*. Το τρυβλίο επώαστηκε προς ανάπτυξη.

Τα αποτελέσματα αν και φανέρωσαν αντιμικροβιακή δραστικότητα, αυτή περιορίστηκε μόνο στην επιθυμητή ζώνη αλλά εμφανίστηκε κυρίως στο μέτωπο της ηλεκτροφόρησης και σε άλλες πρωτεΐνες των κυττάρων *E. coli*. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί με ενδεχόμενη τοξικότητα παραγόντων της ηλεκτροφόρησης ή πρωτεϊνών του *E. coli* έναντι του οργανισμού *L. lactis*.

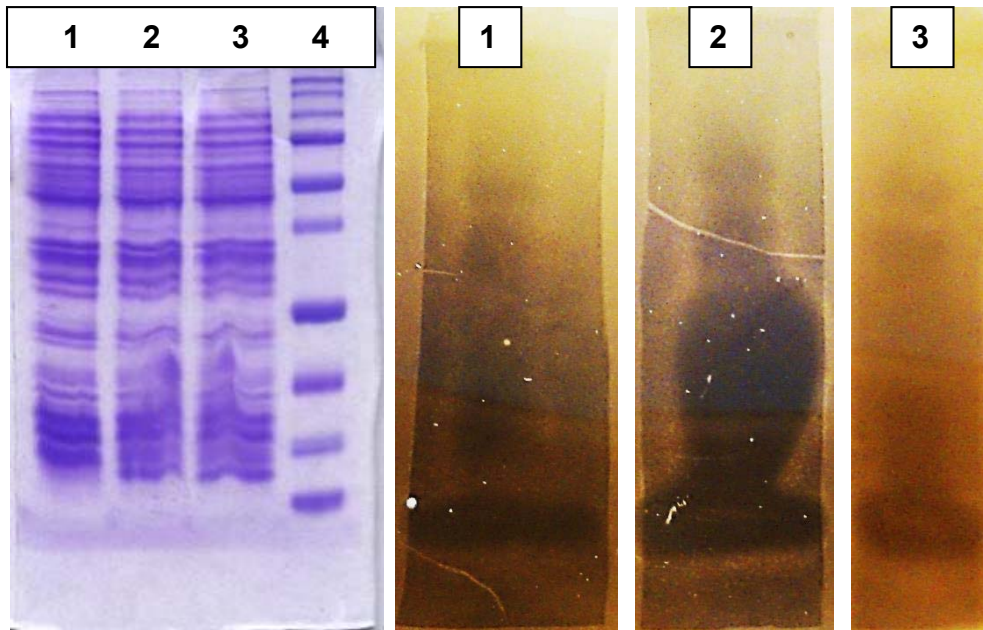


Εικόνα 4.65 Πείραμα δραστηριότητας πρωτεϊνών κυττάρων από υπερέκφραση *blpU*.

Στην εικόνα εμφανίζεται αριστερά το πήγμα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης 15%, στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί οι πρωτεΐνες κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) κλώνου με pET29c, κλώνου 1 με pET29c-*blpU* (U1) και κλώνου 2 με pET29c-*blpU* (U2) με το πέρασμα 3 ωρών από την επαγωγή με IPTG.

Δεξιά εμφανίζονται οι αντίστοιχες ζώνες μετά από κοπή τους από το πήγμα, τοποθέτηση σε τρυβλία, επίστρωση με θρεπτικό μέσο M17-agar με καλλιέργεια *L. lactis* CNRZ 117 και ανάπτυξη της καλλιέργειας. Η περιοχές αναστολής της ανάπτυξης είναι εμφανής με πιο σκούρο χρώμα.

Διαδρομή 1: pET29c, Διαδρομή 2: U1, Διαδρομή 3: U2, Διαδρομή 4: ladder.



Εικόνα 4.66 Πείραμα δραστηριότητας πρωτεϊνών κυττάρων από υπερέκφραση *blpK*.

Στην εικόνα εμφανίζεται αριστερά το πήγμα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης 15%, στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί οι πρωτεΐνες κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) κλώνου με pET29c, κλώνου 1 με pET29c-blpK (K1) και κλώνου 2 με pET29c-blpK (K2) με το πέρασ 3 ωρών από την επαγωγή με IPTG.

Δεξιά εμφανίζονται οι αντίστοιχες ζώνες μετά από κοπή τους από το πήγμα, τοποθέτηση σε τρυβλία, επίστρωση με θρεπτικό μέσο M17-agar με καλλιέργεια *L. lactis* CNRZ 117 και ανάπτυξη της καλλιέργειας. Η περιοχή αναστολής της ανάπτυξης είναι εμφανής με πιο σκούρο χρώμα.

Διαδρομή 1: pET29c, Διαδρομή 2: K1, Διαδρομή 3: K2, Διαδρομή 4: ladder.

Συζήτηση

Επιλογή θρεπτικών υλικών για ανάπτυξη & δραστικότητα βακτηριοσίνης

Το *S. thermophilus* ACA-DC 0040 παράγει μία βακτηριοσίνη, τη θερμοφιλίνη T, η οποία εμφανίζεται σε μεγάλα σύμπλοκα των 150 kDa και άνω στην ακατέργαστη μορφή της, ενώ η πρωτεΐνη με την αντιμικροβιακή δραστικότητα έχει μέγεθος περίπου 2,5 kDa (Aktypis et al., 1998). Η σύνθεσή της σχετίζεται με το ρυθμό ανάπτυξης του οργανισμού, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή χρήση μηχανισμού αίσθησης απαρτίας.

Η παραγωγή και η δραστικότητα της θερμοφιλίνης T του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 μελετήθηκε από τους Aktypis et al. (2007). Η παραγωγή της θερμοφιλίνης T σχετίζεται με την ανάπτυξη του οργανισμού, γεγονός που συμφωνεί με άλλες δημοσιευμένες εργασίες για οξυγαλακτικά βακτήρια που συνθέτουν βακτηριοσίνες (De Vuyst et al. 1996a, b; Leroy and De Vuyst 1999a, b) και μειώνεται σημαντικά στη στατική φάση. Εντούτοις, οι περιβαλλοντικές συνθήκες που εξασφαλίζουν μεγάλη κυτταρική ανάπτυξη δεν ευνοούν πάντα την παραγωγή της θερμοφιλίνης, ενώ η μεγάλη αύξηση της βιομάζας φαίνεται να επιδρά αρνητικά στα βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βακτηριοσίνης, όπως έχει αναφερθεί από τους Leroy and De Vuyst (1999a, b).

Συγκεκριμένα, η παραγωγή της βιομάζας αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης, ενώ η παραγωγή της θερμοφιλίνης T μειώνεται για συγκεντρώσεις γλυκόζης μεγαλύτερες του 4 %. Αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρήθηκαν και στα *Lactococcus brevis* OG1 (Ogunbanwo et al. 2003), *Streptococcus bovis* HC5 (Mantovani et al. 2002) και *Lactobacillus plantarum* (Todoron and Dicks 2006). Η μέγιστη τιμή της ευνοείται από θερμοκρασία κάτω της βέλτιστης (30) όπως έχει παρατηρηθεί και για άλλα βακτήρια (Leroy and De Vuyst 1999a, 2002). Η μείωση της δραστικότητάς της με την αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οφείλεται στη δράση πρωτεασών που ενεργοποιούνται, αλλά και από την

Συζήτηση

ίδια τη βακτηριοσίνη η οποία μπορεί να σχηματίζει λιγότερο ενεργά συσσωματώματα ή να προσροφάται στην επιφάνεια των κυττάρων.

Ακόμα, η προσθήκη αζώτου στο μέσο ανάπτυξης που προέρχεται από τρυπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σε αναλογία 4:1 συμβάλλει στην επιπλέον σύνθεση θερμοφιλίνης T γεγονός που οφείλεται πιθανόν σε ορισμένα πεπτίδια του μέσου απαραίτητα για τη την επαγωγή της σύνθεσης ή για την ίδια την παραγωγή της. Ανάλογο ευρήματα έχουν παρατηρηθεί και για άλλες βακτηριοσίνες, όπως π.χ. για την παραγωγή νισίνης από τους Cabo et al. (2001), αν και σε πολύ υψηλή συγκέντρωση τρυπτόνης η παραγωγή της μειώθηκε λίγο.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η περίπτωση του ACA-DC 0040 όπου η επαγωγή της θερμοφιλίνης παρατηρήθηκε μετά από προσθήκη γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης M17, με χρησιμοποίηση θρεπτικού μέσου HJG πλούσιου σε υδατάνθρακες, με ανάπτυξη σε αποβουτυρωμένο γάλα.

Έχει παρατηρηθεί ότι η παραγωγή βακτηριοσινών πυροδοτείται από αντίξοες συνθήκες καθώς και από ανταγωνιστικούς μικροβιακούς πληθυσμούς (De Vuyst et al. 1996b). Για να διερευνηθεί αυτή η πιθανότητα στον ACA-DC 0040, υγρή καλλιέργεια του *Lactococcus lactis* CNRZ 117 (ευαίσθητο στη θερμοφιλίνη T) η οποία είχε εισέλθει στη στατική φάση διηθήθηκε με φίλτρο 0,45 μm ώστε να αφαιρεθούν τα κύτταρα και το διήθημα προστέθηκε στην καλλιέργεια του ACA-DC 0040. Παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή βακτηριοσίνης του στελέχους ACA-DC 0040 ενισχύθηκε με την προσθήκη καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 ελεύθερης κυττάρων. Η ενίσχυση αυτή δεν συνοδευόταν με ενίσχυση της ανάπτυξης του οργανισμού, κατά συνέπεια δεν οφειλόταν στην παρουσία μεγαλύτερης βιομάζας. Η αύξηση της παραγωγής θερμοφιλίνης T μετά από αυτή την προσθήκη θα μπορούσε να εξηγηθεί με την έκκριση κάποιας παράγωγης χημικής ένωσης του *L. lactis* CNRZ 117 η οποία πυροδοτεί την δραστηριοποίηση της γενετικής περιοχής που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή και την έκκριση της θερμοφιλίνης T. Είναι χαρακτηριστικό του *Lactococcus lactis* να παράγει εκκρινόμενους πολυσακχαρίτες (εξωπολυσακχαρίτες, EPSs) που ενδεχομένως να εμπλέκονται με κάποιο τρόπο σε

αυτή τη διαδικασία. Η αυξημένη παραγωγή της θερμοφιλίνης μετά από αυτή την προσθήκη υποδηλώνει ότι στη φύση, η παραγωγή της βακτηριοσίνης δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την αίσθηση απαρτίας των κυττάρων αλλά ενδεχομένως ο οργανισμός να είναι σε θέση να αντιλαμβάνεται σήματα παρουσίας οργανισμών που μπορούν να καταλάβουν τον ίδιο οικολογικό θώκο με αυτόν.

Στα πλαίσια της μελέτης της παρούσας διατριβής που αφορά την παραγωγή της θερμοφιλίνης T από τον *S. thermophilus* ACA-DC 0040 διερευνήθηκε μία σειρά θρεπτικών μέσων ως προς την ανάπτυξη και τη σύνθεση βακτηριοσίνης, προκειμένου να επιλεγεί το κατάλληλο για κάθε διεργασία και να προσδιοριστεί η δραστικότητα βακτηριοσίνης σε αυτό με δοκιμασία διάχυσης σε άγαρ (agar diffusion test). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης M17, HJG με ή χωρίς προσθήκες, καθώς και αποβουτυρωμένο γάλα, και μελετήθηκε η παραγωγή της βακτηριοσίνης σε συνάρτηση με την ανάπτυξη του οργανισμού.

Στο μέσο ανάπτυξης M17 δεν παρατηρήθηκε παραγωγή βακτηριοσίνης ενώ η οπτική πυκνότητα δεν ξεπέρασε το 0,7. Αυτές οι συνθήκες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν όπου απαιτείτο αρνητικός μάρτυρας. Οι συνθήκες ανάπτυξης παρέμειναν σταθερές και μετά την προσθήκη καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 ελεύθερης κυττάρων 10 % ή 20 %. Ανιχνεύθηκε όμως δραστικότητα βακτηριοσίνης η οποία αυξάνεται και σταθεροποιείται με την πάροδο της ανάπτυξης στο 10 %, ενώ στο 20 % ανιχνεύεται διπλάσια ποσότητα η οποία αυξάνεται περαιτέρω και μειώνεται λίγο στις 6 ώρες ανάπτυξης. Αυτό υποδηλώνει ότι η παραγωγή της βακτηριοσίνης επάγεται από συγκεκριμένο παράγοντα που εκκρίνεται από τον *L. lactis* CNRZ 117 και προκαλεί έντονη μεταγραφή του υπεύθυνου γενετικού τόπου.

Με την προσθήκη γλυκόζης στο M17, η βιομάζα τριπλασιάζεται σχεδόν (OD 2), ενώ παράγεται μικρή ποσότητα βακτηριοσίνης που εξαρτάται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης, αυξάνεται με την αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας και μεγιστοποιείται σε μία σταθερή τιμή στις 6 ώρες ανάπτυξης. Δεν επιλέχθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης, διότι πάνω από 2 % παρατηρείται μείωση της παραγόμενης βακτηριοσίνης (Aktypis et al., 2007). Η δραστικότητα βακτηριοσίνης

Συζήτηση

αύξηση αυτή οφείλεται πιθανότατα στη μεγάλη ποσότητα των κυττάρων που αναπτύσσονται λόγω της γλυκόζης του θρεπτικού μέσου, κατά συνέπεια και η σύνθεση της βακτηριοσίνης είναι ανάλογη.

Όταν χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ανάπτυξης το πλούσιο σε σάκχαρα θρεπτικό μέσο HJG, η κυτταρική ανάπτυξη διπλασιάστηκε σχεδόν (OD 1,3). Η δραστικότητα βακτηριοσίνης ήταν μεγαλύτερη από την περίπτωση του M17 + γλυκόζη 2%, ενώ με προσθήκη καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 ελεύθερης κυττάρων 10 % όπως και στην περίπτωση του M17 με την ίδια προσθήκη. Παρατηρείται επομένως ότι η καλλιέργεια *L. lactis* CNRZ 117 ελεύθερης κυττάρων αποτελεί πιο ισχυρό επαγωγικό παράγοντα από την συγκέντρωση των σακχάρων.

Η μεγαλύτερη δραστικότητα βακτηριοσίνης ανιχνεύθηκε, όταν ο ACA-DC 0040 αναπτύχθηκε σε αποβουτυρωμένο γάλα. Αυτό είναι αναμενόμενο, εφόσον το αποβουτυρωμένο γάλα αποτελεί κατά κάποιον τρόπο το φυσικό μέσο ανάπτυξης αυτού καθώς και άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η παστερίωση που έχει υποστεί πριν την χρησιμοποίησή του σε εργαστηριακές καλλιέργειες εξοντώνει τους μικροοργανισμούς που περιέχονται σε αυτό, αλλά πολλά από τα συστατικά του παραμένουν αναλλοίωτα, στα οποία πιθανόν εμπεριέχονται και ουσίες που έχουν εκκριθεί από βακτήρια που πυροδοτούν την σύνθεση της βακτηριοσίνης από τον ACA-DC 0040.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το θρεπτικό μέσο M17 αποδείχτηκε το καταλληλότερο για την ανάπτυξη του οργανισμού με σκοπό την απομόνωση DNA. Για την ανίχνευση μεταγράφων RNA που εμπλέκονται στην παραγωγή της βακτηριοσίνης ο οργανισμός αναπτύχθηκε σε αποβουτυρωμένο γάλα ή σε θρεπτικό μέσο M17 με προσθήκη καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 ελεύθερης κυττάρων, όπου παρατηρήθηκε υψηλή δραστικότητα βακτηριοσίνης. Το θρεπτικό μέσο HJG χρησιμοποιήθηκε σε πρωτόκολλα μετασχηματισμού ως μέσο ανάρρωσης αλλά λόγω της εύκολης επιμόλυνσης του μέσου αποφεύχθηκε η χρήση του σε περαιτέρω πειράματα.

Η εμφάνιση δραστηριότητας της βακτηριοσίνης στα θρεπτικά μέσα που προσέφεραν εντονότερη ανάπτυξη των καλλιεργειών σε συνδυασμό με την κορύφωση της εμφάνισης στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων ακολουθεί τα τυπικά χαρακτηριστικά ελέγχου από σύστημα απαρτίας. Οι παράγοντες που ενεργοποιούν την διαδικασία παραγωγής της θερμοφιλίνης φαίνεται να είναι περισσότεροι του ενός και ο ρόλος τους ακόμα ακαθόριστος. Για να αποδειχτεί ότι η σύνθεση της θερμοφιλίνης T οφείλεται σε μηχανισμό αίσθησης απαρτίας είναι απαραίτητη μία πολύπλευρη γενετική και μοριακή μελέτη, και αφού προσδιοριστεί ο συγκεκριμένος παράγων να μελετηθεί σε περιβάλλον ανάπτυξης ελάχιστου θρεπτικού μέσου.

Sequencing και ανάλυση της αλληλουχίας

Η ανίχνευση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που εμπεριέχει τον υπεύθυνο γενετικό τόπο για τη σύνθεση της θερμοφιλίνης T βασίστηκε στους αντίστοιχους που έχουν εντοπιστεί *in silico* στα *S. thermophilus*, τα LMD9, LMG 18311 και CNRZ 1066 με κοινές περιοχές ως προς τη γενετική οργάνωση και μεταξύ τους ομολογία. Ως αλληλουχία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτή του LMD9, διότι είναι ο μόνος οργανισμός από τους τρεις που παρουσιάζει δραστικότητα βακτηριοσίνης μετά από κατάλληλη επαγωγή: όταν σε αυτό εισαχθεί το γονίδιο *blpC* υπό τον έλεγχο του ισχυρού λακτοκοκκικού υποκινητή P32 ανιχνεύεται αντιβακτηριακή δράση έναντι των LMG 18311 και CNRZ 1066, γεγονός που καταδεικνύει την παραγωγή βακτηριοσίνης και τον τρόπο επαγωγής της σε όλα τα πειράματα που έχουν σχεδιαστεί για το ως άνω στέλεχος. Το ίδιο επιτυγχάνεται με εξωγενή χορήγηση του ώριμου 30μερούς ή 19 μερούς ολιγοπεπτιδίου που αντιστοιχεί στο προϊόν του *blpC* (Fontaine et al. 2007). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν, όταν οι Blomqvist et al. (2006) συνέθεσαν το ώριμο πεπτίδιο που κωδικοποιείται δυνητικά από το *blpC* του LMG 18311 και το χρησιμοποίησαν για να επάγουν με επιτυχία την έκφραση του *blpU* του ίδιου στελέχους.

Λόγω του μεγάλου μεγέθους του παραπάνω γενετικού τόπου σχεδιάστηκαν εκκινήτες που να περιλαμβάνουν τις λειτουργικές υποπεριοχές του πιθανού *blp* με βάση τις συντηρημένες περιοχές των τριών γονιδιωματικών αλληλουχιών που τις περικλείουν. Μέσω ενίσχυσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης προέκυψαν προϊόντα αντίστοιχων μεγεθών, στα οποία προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία τους στα άκρα και διαπιστώθηκε ότι είχε πολύ μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του LMD9. Κατά συνέπεια, υπήρξε ένας πρώτος εντοπισμός στο ACA-DC 0040 περιοχής ανάλογης προς την *blp* του LMD 9 ο οποίος έδωσε το έναυσμα για την περαιτέρω ανάλυση όλης της περιοχής με πειράματα ενίσχυσης του DNA, κλωνοποίησης των προϊόντων της ενίσχυσης και προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Με τον τρόπο αυτό αποκαλύφθηκε μία περιοχή μεγέθους 13092 ζευγών βάσεων με ποσοστό GC 37,62% και νουκλεοτιδική ομολογία με την αντίστοιχη του στελέχους LMG 18311 η οποία αγγίζει το ποσοστό 99% στο 100% της αλληλουχίας. Η βιοπληροφορική ανάλυση κατέδειξε 16 αναγνωστικά πλαίσια με γενετική οργάνωση ανάλογη αυτής του LMG 18311. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι στον ACA-DC 0040 δεν εμφανίζονται οι δύο μη νοηματικές μεταλλαγές που εδράζονται στο *blpB* και το *blpK* του LMG 18311 και που ενδεχομένως το καθιστούν ανενεργό ως προς την παραγωγή της βακτηριοσίνης.

Τα 16 αναγνωστικά πλαίσια είναι οργανωμένα σε δύο κύριες περιοχές. Η μία εκ των δύο περιέχει τα πιθανά γονίδια *blpH* και *blpR* που εμπλέκονται σε μηχανισμό αίσθησης απαρτίας, το *blpC* με πιθανό προϊόν παράγοντα επαγωγής και τα *blpA* και *blpB* που και συμμετέχουν στην εξωκυττάρια έκκριση του BlpC και της βακτηριοσίνης. Αυτή η περιοχή είναι κοινή ως προς την οργάνωση και την νουκλεοτιδική ομολογία στα LMD 9, LMG 18311, CNRZ 1066 και ACA-DC 0040.

Στη δεύτερη εκ των δύο εδράζονται πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν πρόδρομα μόρια βακτηριοσινών και πεπτιδία ανοσίας, τρανσποζάσες, γονίδια άγνωστης λειτουργίας, καθώς και πιθανή πρωτεΐνη τροποποίησης για τη δημιουργία πολυπεπτιδίων από τα δομικά στοιχεία της βακτηριοσίνης ώστε να αυξάνεται το εύρος δράσης της (Fontaine et al. 2007, Fontaine and Hols 2008). Ενώ στο CNRZ 1066 αυτή η περιοχή είναι σχεδόν ανύπαρκτη, στο LMD9 καταλαμβάνει τη μεγαλύτερη έκταση σε σύγκριση με τα άλλα τρία και είναι η πιο πολύπλοκη. Συγκεκριμένα, διαθέτει τέσσερα γονίδια βακτηριοσίνης (*blpD*, *blpU*, *blpE* και *blpF*), ένα γονίδιο ισομεράσης της θειορεδοξίνης για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών (*blpG*) και γονίδια ανοσίας (*blpQ*, *blpX* και *orf*). Στο ACA-DC 0040 η περιοχή έχει ανάλογη δομή και οργάνωση με αυτήν του LMG 18311, δηλαδή διαθέτει γονίδια βακτηριοσίνης *blpU* και *blpK* (πλήρες), ένα γονίδιο ισομεράσης της θειορεδοξίνης για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών (*blpG*) το οποίο αντιστοιχεί σε ένα συντηγμένο γονίδιο και γονίδια ανοσίας (*blpQ*, *blpX* και *orf*). Συγκριτικά με το LMD9 λείπουν τα γονίδια *blpDorf1orf2* και *blpEorf7blpF*, ενώ εντοπίζονται γονίδια

Συζήτηση

τρανσποζασών μεταξύ των *blpK* και *blpG*. Κατά συνέπεια η σύνθεση της θερμοφιλίνης στο ACA-DC 0040 είναι πιθανόν λιγότερο πολύπλοκη, εφόσον φαίνεται να εξαρτάται μόνο από τα γονίδια *blpU* και *blpK*. Η παρουσία των γονιδίων *orfA* και *orfB* που κωδικοποιούν πιθανές τρανσποζάσες καθοδικά του *blpK* υποδηλώνει ότι πιθανόν εδράζονταν και άλλα γονίδια στη θέση αυτή τα οποία ενδεχομένως απαλείφθηκαν από την παρεμβολή των *orfA* και *orfB*

Διερεύνηση της μεταγραφής: RT-PCR, Northern, Real Time PCR

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων της αλληλουχίας *blp* πραγματοποιήθηκε με γνώμονα την υπόθεση ότι αυτά συνιστούν πέντε πιθανά οπερόνια, η οποία βασίστηκε στη βιοπληροφορική ανάλυση των 16 δυνητικών αναγνωστικών πλαισίων και στα ευρήματα για την αντίστοιχη περιοχή *blp* του LMD9. Μέσω πειραμάτων RT-PCR η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα 16 ORFs αποτελούν τα δυνητικά οπερόνια μεταφοράς πεπτιδίων και γονιδίου φερομόνης (*blpABC*), συστήματος ρύθμισης δύο συστατικών (*blpRH*), προδρόμων πεπτιδίων βακτηριοσίνης και ανοσίας (*blpUorf3456blpK*) καθώς και τροποποίησης και ανοσίας (*blpGorf910blpX*). Μεταξύ αυτών παρεμβάλλεται ένα οπερόνιο τρανσποζασών *orfAB*. Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύθηκε ένα μετάγραφο ανά πιθανό οπερόνιο. Για τα *blpABC* και *blpUorf3456blpK* δεν ανιχνεύθηκε άμεσα ένα μετάγραφο, αλλά δύο επικαλυπτόμενα.

Στην περιοχή *blpUorf3456blpK* εδράζονται τα πιθανά γονίδια βακτηριοσίνης *blpU* και *blpK*. Εφόσον ανιχνεύθηκε συμμεταγραφή των γονιδίων, δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστεί τυχόν ανεξάρτητη έκφρασή τους μέσω RT-PCR. Είναι αναγκαίο όμως να γνωρίζει κανείς αν τα γονίδια αυτά εκφράζονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Η ανασκόπηση της περιοχής αυτής δείχνει, όπως ήδη αναφέρθηκε, ότι η ανοδική αλληλουχία των γονιδίων *blpU* και *blpK* είναι πανομοιότυπη και παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις ανοδικές περιοχές των γονιδίων βακτηριοσίνης του LMD9 όπου έχουν εντοπιστεί χαρακτηριστικά στοιχεία υποκινητή. Ανάλογη ομολογία αλλά σε μικρότερο βαθμό παρουσιάζεται στην περιοχή ανοδικά του *blpA*. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα κοινά στοιχεία στις τρεις αυτές περιοχές χρησιμεύουν πιθανότατα για την πρόσδεση του ρυθμιστή απόκρισης BIpH, όπως και στην περίπτωση του LMD9 (Fontaine et al. 2007). Άρα θα αναμένεται, εκτός της συμμεταγραφής του συνόλου των γονιδίων που ανιχνεύθηκε, και ανεξάρτητη μεταγραφή καθενός από τα γονίδια *blpU* και *blpK*.

Ενώ όμως καθοδικά του γονιδίου *blpU* εδράζονται πιθανά γονίδια ανοσίας, με τα οποία είναι λογικό αυτό να συμμεταγράφεται, δεν συμβαίνει το ίδιο και με το γονίδιο *blpK*. Το γονίδιο αυτό διαθέτει κωδικόνιο τερματισμού (σε αντίθεση με αυτό του LMG18311 που τερματίζεται πρόωρα λόγω σημειακής μεταλλαγής), αλλά καθοδικά αυτού δεν εδράζεται γονίδιο ανοσίας. Η παρουσία των γονιδίων ανάλογων τρανσποζάσης *orfAB* υποδηλώνει ότι πιθανόν παρεμβλήθηκαν στην περιοχή αυτή με αποτέλεσμα την εξάλειψη κάποιου γονιδίου ανάλογου ανοσίας. Κατά συνέπεια, τυχόν μεταγραφή του *blpK* θα παρέμενε ημιτελής.

Από τα πειράματα Northern προέκυψαν ζώνες υβριδισμού σε δύο περιπτώσεις. Η μία εντοπίστηκε με ιχνηθέτη αυστηρά του *blpU* και το μέγεθός της (1200 b) υποδηλώνει ένα δυνητικό μετάγραφο *blpUorf345*. Στη δεύτερη, ο ιχνηθέτης παρουσιάζει ομολογία και με τα δύο γονίδια *blpU* και *blpK*. Το μέγεθός της (~ 700 b) υποδηλώνει ότι το πιθανότερο μετάγραφο του οποίου η παρουσία μπορεί να δικαιολογηθεί σύμφωνα με την υπόθεση που διατυπώνεται για τη γενετική οργάνωση της περιοχής *blp* είναι το *blpUorf3*, γεγονός που συμβαδίζει και με τα ευρήματα για το στέλεχος LMD9. Είναι γεγονός ότι παρατηρείται η μεταγραφή τουλάχιστον του *blpU* που είναι το πρώτο στη σειρά mRNA του οπερόνιου. Σε κάθε περίπτωση μπορεί να πρόκειται για μεγαλύτερα μετάγραφο που περιλαμβάνουν όλο το πιθανό οπερόνιο μέχρι και το *blpK* στο οποίο όμως δεν έχει ολοκληρωθεί η μεταγραφή (λαμβανομένου υπόψιν ότι τα μεγάλα μετάγραφα είναι και πιο ασταθή).

Για την περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *blpU* και *blpK* και την συμμεταγραφή τους καθώς και την σύγκριση του επιπέδου των μεταγράφων σε συνθήκες εμφάνισης ή μη δραστηριότητας βακτηριοσίνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική real time PCR. Εξετάστηκαν με ενίσχυση 2 περιοχές, μία που δείχνει την εμφάνιση του γονιδίου *blpU* σε ανεξάρτητη αλλά και σε συμμεταγραφόμενη μορφή και μία του γονιδίου *blpK* που υποχρεωτικά εμφανίζεται μόνο σε συμμεταγραφόμενη μορφή, σε 4 βιολογικές συνθήκες, ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο M17, M17 με προσθήκη καλλιέργειας *L. lactis* CNRZ 117 ελεύθερης κυττάρων και δειγματοληψία πριν την εμφάνιση δραστηριότητας βακτηριοσίνης, με δειγματοληψία μετά την εμφάνιση

δραστικότητας και ανάπτυξη σε αποβουτυρωμένο γάλα. Οι αντιδράσεις έγιναν σε 2 βήματα, προσδίδοντας μεγαλύτερη ευαισθησία στο πείραμα, και με σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, συγκρινόμενα με το γονίδιο της γαλακτικής αφυδρογονάσης που εκφράζεται με σταθερό ρυθμό (Ibrahim et al., 2007).

Από τα αποτελέσματα του πειράματος προκύπτει ότι στις συνθήκες μη εμφάνισης δραστηριότητας βακτηριοσίνης τα μετάγραφα με τα συμμεταγραφόμενα γονίδια *blrK* και *blrU* είναι λιγότερα και με σταθερή διαφορά από τα μετάγραφα με το ανεξάρτητο και το συμμεταγραφόμενο *blrU*. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από την πιθανή αστάθεια ενός μεγάλου μεταγράφου που περιλαμβάνει και τα δύο γονίδια.

Σε ανάπτυξη σε αποβουτυρωμένο γάλα αν και η διαφορά μεταξύ των αποκλειστικά συμμεταγραφόμενων *blrU* και *blrK* με τα συμμεταγραφόμενα και ανεξάρτητα μετάγραφα του *blrU* είναι σχετικά σταθερή και μικρότερη από αυτή των συνθηκών μη εμφάνισης δραστηριότητας βακτηριοσίνης, τα συνολικά επίπεδα των μεταγράφων συγκριτικά με το γονίδιο αναφοράς διαφέρουν κατά πολύ καθιστώντας τα μη αξιόπιστα για περαιτέρω συγκρίσεις με τις άλλες συνθήκες. Οι διαφορές που εμφανίζονται μπορούν να εξηγηθούν από την επεξεργασία της καλλιέργειας για την απομόνωση RNA. Η μειωμένη αλλά σταθερή διαφορά παρόλα αυτά υποδηλώνει μικρότερα επίπεδα μεταγραφής του ανεξάρτητου *blrU* σε σχέση με τα συμμεταγραφόμενα.

Στη συνθήκη ανάπτυξης σε M17 με προσθήκη καλλιέργειας *L. lactis* ελεύθερης κυττάρων και δειγματοληψία μετά την εμφάνιση δραστηριότητας, η αύξηση των επιπέδων των όλων των μεταγράφων είναι εμφανής, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τη θεωρία ότι η περιοχή *blr* είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της θερμοφιλίνης T. Η εναλλαγή της διαφοράς μεταξύ των επιπέδων των αποκλειστικά συμμεταγραφόμενων μεταγράφων με το σύνολο των μεταγράφων του *blrU*, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η λήξη της μεταγραφής μετά το *blrU* και πριν το *blrK* πραγματοποιείται αλλά όχι με σταθερό ρυθμό.

Ετερόλογη έκφραση και υπερέκφραση

Για τη μελέτη γενετικών τόπων, όπως αυτού που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή της θερμοφιλίνης T, είναι απαραίτητο να υπάρχει ένας κατάλληλος φορέας έκφρασης. Μέσω αυτού μπορεί να αναπτυχθεί ένα σύστημα μεταφοράς και έκφρασης γονιδίων σε αυτόν, που θα χρησιμεύει στις περιπτώσεις αντικατάστασης γονιδίων του γενετικού τόπου με τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα – ανενεργά γονίδια (gene replacement), έτσι ώστε να διαπιστωθεί πόσο αυτό επηρεάζει την παραγωγή της βακτηριοσίνης.

Ο φορέας αυτός θα πρέπει να φέρει στοιχεία αντιγραφής και δείκτες επιλογής τόσο για το *E. coli* (για την πραγματοποίηση της κατασκευής του φορέα) όσο και για το *S. thermophilus*. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η ύπαρξη αποδοτικών τρόπων μεταφοράς του φορέα με τα γονίδια στους οργανισμούς.

Παρά την πληθώρα διαθέσιμων μεθόδων μετασχηματισμού βακτηρίων, έχουν αναφερθεί ολόκληρα είδη, όπως το *S. thermophilus*, των οποίων τα μέλη μετασχηματίζονται δύσκολα, ενώ άλλα μέλη του γένους *Streptococcus* εμφανίζουν διαφορές στην απόδοση του μετασχηματισμού μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους (Buckley et al., 1999). Η φυσική επιδεκτικότητα που εμφανίζεται σε είδη *Streptococcus* τα οποία ανήκουν στις φυλογενετικές ομάδες, βάσει της αλληλουχίας του 16S RNA, mitis και anginosus, χρησιμοποιείται ως εργαλείο μετασχηματισμού, αλλά η ιδιότητα αυτή απουσιάζει από τα υπόλοιπα είδη *Streptococcus* (Buckley et al., 1999). Η έλλειψη των διαθέσιμων γενετικών εργαλείων για το στέλεχος *S. thermophilus* αποτυπώνεται στις εργασίες των Blomqvist και Steinmoen (2006) ενώ τα χαμηλά ποσοστά επιτυχίας μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση περιορίζουν την μεταχείριση του οργανισμού (Fontaine et al., 2010) και η μεγάλη ποικιλία των τεχνικών που εφαρμόζονται είναι απαραίτητη λόγω της επιτυχίας διαφορετικών τεχνικών μεταξύ των στελεχών του είδους (Buckley et al., 1999), (O'Sullivan και Fitzgerald, 1998). Οι δυσκολίες στην εφαρμογή της ηλεκτροδιάτρησης αποδίδονται στην ύπαρξη ενός συστήματος περιορισμού και τροποποίησης DNA των στελεχών

το οποίο ενδέχεται να εμποδίζει την συγκράτηση μετασχηματισμένων πλασμιδίων (O'Sullivan και Fitzgerald, 1998). Ένα επιπρόσθετο πρόβλημα αποτελεί ο κατάλληλος φορέας κλωνοποίησης λόγω του μικρού αριθμού φυσικών πλασμιδίων που έχουν βρεθεί σε στελέχη *S. thermophilus* (Su et al., 2002) καθώς η επιτυχία του μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση εξαρτάται όχι μόνο από το ποιο στέλεχος χρησιμοποιείται αλλά και ποιο πλασμίδιο (O'Sullivan και Fitzgerald, 1998).

Για την επίτευξη ετερόλογης έκφρασης των γονιδίων *blpU* και *blpK* ώστε να διερευνηθεί η συσχέτιση της περιοχής *blp* με την βακτηριοσίνη θερμοφιλίνη T σχεδιάστηκαν πειράματα που περιλάμβαναν την εύρεση κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα, βακτηριακού στελέχους *Streptococcus* ή *Lactococcus* και συνθηκών μετασχηματισμού.

Ένας πλασμιδιακός φορέας που εξετάστηκε ήταν ο pTOPOcatpT38, αποτελούμενος από ένα τμήμα του φυσικού πλασμιδίου pT38 από οργανισμό *S. thermophilus* (Petrova et al. 2003), ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφενικόλη από *Staphylococcus* (Ballester et al., 1989) με λειτουργία και σε *Streptococcus* (Ballester et al., 1985) και ένα τμήμα του pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) για λειτουργία σε *E. coli*. Ο φορέας αυτός εμφάνισε πολύ μικρή έως μηδενική συχνότητα μετασχηματισμού με τις συνθήκες μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση που εφαρμόστηκαν στα στελέχη *S. thermophilus* ACA-DC 0040 και LMG 18311. Η σταθερότητα του πλασμιδίου μέσα στα κύτταρα στις περιπτώσεις που υπήρξε μετασχηματισμός είναι αμφισβητήσιμη καθώς το περιοριστικό προφίλ του πλασμιδίου, μετά την εισαγωγή, παρουσίαζε μεταβολές στην ηλεκτροφόρηση εμφανίζοντας αυξημένο μέγεθος και μεγαλύτερα ή περισσότερα τμήματα DNA μετά από περιορισμό με ενδονουκλεάσες. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο καλά καταγεγραμμένο σύστημα περιορισμού και τροποποίησης DNA που έχουν ορισμένα στελέχη *S. thermophilus* (O'Sullivan και Fitzgerald, 1998), σε συστήματα ανασυνδυασμού του οργανισμού για τα οποία δεν υπάρχουν ευρήματα μέχρι στιγμής ή και σε ασυμβατότητα μεταξύ του πλασμιδίου με το φυσικό πλασμίδιο pST0040 του στελέχους ACA-DC 0040 στον μετασχηματισμό στο εν λόγω στέλεχος.

Επίσης εξετάστηκε το φυσικό πλασμίδιο του στελέχους ACA-DC 0040 ως προς τη δυνατότητα χρήσης του ως υλικό για τη δημιουργία πλασμιδιακού φορέα. Από την ταυτοποίηση της αλληλουχίας του pST0040 προέκυψε ότι ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ομοιάζει με γονίδιο απόκρισης σε θερμικό σοκ μικρού μοριακού βάρους. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του είδους *Streptococcus* και προσφέρουν αυξημένη επιβίωση σε στρεσογόνες συνθήκες (Solow and Somkuti, 2000). Αν και ο ακριβής μηχανισμός λειτουργίας στα βακτήρια δεν είναι γνωστός, τα οφέλη που προκύπτουν στην επιβίωση και ιδιαίτερα σε έναν οργανισμό που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη βιομηχανία με έντονες αλλαγές στις συνθήκες ανάπτυξης, όπως ο *Streptococcus thermophilus*, είναι σαφή και τα στελέχη που έχουν τέτοιες πρωτεΐνες προτιμούνται (Petrova and Gouliamova, 2006).

Μετά από την ταυτοποίηση της αλληλουχίας του, χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του ώστε να εξασφαλιστεί η λειτουργία του σε *Streptococcus*, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφενικόλη για οργανισμό *Streptococcus* από το pTOP0catpT38 και το pUC18 για λειτουργία σε *E. coli* για τη δημιουργία του πλασμιδιακού φορέα pUCSTHXbacat. Ο φορέας αυτός μεγέθους 5949 ζευγών βάσεων, είναι κατάλληλος για εισαγωγή σε κύτταρα *S. thermophilus* και *E. coli*, ανθεκτικός στον παράγοντα επιλογής χλωραμφενικόλη σε *S. thermophilus* και αμπικιλίνη σε *E. coli*.

Αφού επετεύχθει η εισαγωγή του στο στέλεχος *S. thermophilus* LMG 18311, μελετήθηκε η απόκριση σε θερμικό σοκ του φυσικού πλασμιδίου και η δυνατότητα χρήσης ενός πιθανού γονιδίου απόκρισης σε θερμικό σοκ ως γονίδιο αναφοράς και παρατηρήθηκε πως επιφέρει μια μικρή αύξηση των ποσοστών επιβίωσης των κυττάρων σε συνθήκες θερμικού σοκ σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Petrova and Gouliamova, 2006). Με περαιτέρω τροποποιήσεις και μελέτη του πλασμιδίου καθώς και με την εύρεση καλύτερων συνθηκών μετασχηματισμού με

μεγαλύτερη απόδοση, είναι ικανή η δημιουργία ενός κατάλληλου συστήματος ετερόλογης έκφρασης.

Για την εύρεση συνθηκών μετασχηματισμού επιχειρήθηκαν επτά διαφορετικά πρωτόκολλα στα διαθέσιμα στελέχη *S. thermophilus* ACA-DC 0040 και LMG 18311 και 2 διαφορετικά για το *L. lactis* CNRZ 117, με το πλασμίδιο pTOPOcatpT38 και ομοίως στα LMG 18311 και CNRZ 117 με το pUCSTHXbacat. Η απόδοση των μετασχηματισμών όμως δεν ήταν ικανοποιητική, επιτρέποντας ελάχιστα μετασχηματισμένα κύτταρα να επιβιώσουν και να εξετασθούν, επιβεβαιώνοντας μόνο τον μετασχηματισμό του pUCSTHXbacat στο LMG 18311 με ένα πρωτόκολλο των Blomqvist et al., (2006) με τροποποιήσεις (παράγραφος 3.12.2) με μικρή απόδοση. Η περαιτέρω τροποποίηση του κρίνεται απαραίτητη, ώστε να αυξηθεί η συχνότητα μετασχηματισμού με ταυτόχρονη μείωση της ποσότητας του μετασχηματίζοντος πλασμιδιακού DNA.

Τα γονίδια *blpU* και *blpK* υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) χρησιμοποιώντας τον πλασμιδιακό φορέα pET29c εμφανίζοντας πρωτεΐνες μεγέθους 12-13 kDa και 13 kDa, μεγαλύτερες κατά περίπου 3 kDa από το αναμενόμενο μέγεθος, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από τη δημιουργία συσσωματωμάτων με το SDS που χρησιμοποιήθηκε κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες εξετάστηκαν ως προς την αντιμικροβιακή δραστηριότητα τους έναντι του στελέχους *L. lactis* CNRZ 117 μέσα στο πήγμα ηλεκτροφόρησης ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων από τα οποία απομονώθηκαν. Το αποτέλεσμα δεν ανέδειξε σαφή συμπεράσματα καθώς εμφανίστηκε έντονη αντιμικροβιακή δραστηριότητα από το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης επάνω στο πήγμα όπως επίσης και από το σύνολο των κυτταρικών πρωτεϊνών σε κάποιες περιπτώσεις. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων με τα γονίδια προς υπερέκφραση εξετάστηκε και με πείραμα διάχυσης σε άγαρ στο οποίο προστέθηκαν συγκεκριμένες ποσότητες ολικών πρωτεϊνών έναντι του στελέχους *L. lactis* CNRZ 117 και εμφανίστηκε ελαφρώς αυξημένη δραστηριότητα

Συζήτηση

στα δείγματα με την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη *blpK*, γεγονός που φανερώνει την πιθανή αντιμικροβιακή δράση του γονιδίου *blpK* έναντι του συγκεκριμένου οργανισμού δείκτη.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

Άρθρα

Aktypis, A. and Kalantzopoulos, G. 2003. Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. Lait **83**:365–378.

Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J. H. J. and ten Brink, B. 1998. Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. J. Appl. Microbiol. **84**:568–576.

Aktypis, A. and Tychowski, M. 2007. Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. Antonie Van Leeuwenhoek **92**:207-220

Anderson, D. G. and McKay, L. L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol. **46(3)**:549–552

Ballester, S. Lopez, P. Alonso, J. C. Espinosa, M. and Lacks, S. A. 1986. Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol acetyltransferase gene expression in *Streptococcus pneumoniae* plasmids. Gene. **41**: 153-163

Blomqvist, T., and Steinmoen, H. 2006. Pheromone-induced expression of recombinant proteins in *Streptococcus thermophilus*. Arch Microb. **186**:465-473

Blomqvist, T., Steinmoen, H. and Havarstein, L. S. 2006. Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(10)**: 6751-6756

Buckley, N. D., Vadeboncoeur, C., LeBlanc, D. J., Lee, L. N. and Frenette, M. 1999. An Effective Strategy, Applicable to *Streptococcus salivarius* and Related Bacteria, To Enhance or Confer Electroporation Competence. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(9)** 9:3800–3804

Chung, C. T. and Miller, R. H. 1988. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Research.* **16(8)**:3580

Delorme C., Bartholini C., Luraschi M., Pons N., Loux V., Almeida M., Guedon E., Gibrat J.F. and Renault P. 2011. Complete genome sequence of the pigmented *Streptococcus thermophilus* strain JIM8232. *J. Bacteriol.* **193**: 5581-5582

Fontaine, L., Boutry, C., Guedon, E., Guillot, A., Ibrahim, M., Grossiord, B. and Hols, P. 2007. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **189**:7195–7205.

Fontaine, L. and Hols, P. 2008. The Inhibitory Spectrum of Thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 Depends on the Production of Multiple Peptides and the Activity of BlpGSt, a Thiol-Disulfide Oxidase *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1102-1110

Fontaine, L., Dandoy, D., Boutry, C., Delplace, B., de Frahan, M. H., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P. and Hols, P. 2010. Development of a versatile procedure based on natural transformation for market-free targeted genetic modification in *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. **76(23)**: 7870–7877

Flamm, R. K., Hinrichs, D. J. and Thomashow, M. F. 1984. Introduction of pAM31 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. Infect. Immun. **44**:157-161

Geis, A., El Demerdash, H. A. M. and Heller K. J. 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*. Plasmid. **50**: 53-69

Georgalaki, M., Papadelli, M., Chassioti, E., Anastasiou, R., Aktypis, A., De Vuyst, L., Van Driessche, G., Devreese, B. and Tsakalidou, E. 2010. Milk Protein Fragments Induce the Biosynthesis of Mucedocin, the Lantibiotic Produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. Appl Environ Microbiol. **76** (4): 1143-1151

Gilbreth, S. E. and Somkuti, G. A. 2005. Thermophilin 110: a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. Curr Microbiol. **51**:175-82

La Gioia, F., Rizzotti, L., Rossi, F., Gardini, F., Tabanelli, G. and Torriani, S. 2011. Identification of a tyrosine decarboxylase gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and analysis of its expression and tyramine production in milk. Appl. Environ. Microbiol. **77(3)**: 1140–1144

Guimont, C., Chopard, M. A., Gaillard, J. L. and Chamba, J. F. 2002. Comparative study of the protein composition of three strains of *Streptococcus thermophilus* grown either in M17 medium or in milk. *EDP Sciences*, **82**:645–656

Hardie, J. M. and Bowden, G. H. 1976. Some serological cross-reactions between *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, and other dental plaque streptococci. *J. Dent. Res.* **55** (Special Issue C):C50–C58.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)*. **10(4)**:413-417.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko, E. S., Guedon, E., Monnet, V., Renault, P. and Kleerebezem, M. 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:435–463.

Ibrahim, M., Guillot, A., Wessner, F., Algaron, F., Besset, C., Courtin, P., Gardan, R. and Monnet, V. 2007. Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: a new quorum-sensing system?. *J. Bacteriol.* **189(24)**: 8844-8854

Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, Ts., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I., Dousset, X. and Boyaval, P. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int. J. Food Microbiol.* **42**:147–158

Janzen, T., Kleinschmidt, J., Neve, H. and Geis A. 1992. Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from *Streptococcus thermophilus*. FEMS Microbiol. Letters **95**: 286-180

Kabuki, T., Uenishi, H., Seto, Y., Yoshioka, T. and Nakajima, H. 2009. A unique lantibiotic, thermophilin 1277, containing a disulfide bridge and two thioether bridges. J Appl Microbiol **106**:853–862

Kang X., Ling N., Sun G., Zhou Q., Zhang L. and Shenga Q. 2012. Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain MN-ZLW-002. J Bacteriol. **194** (16):4428-9

Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H. and Ezaki, T. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol **45**: 406–408

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **12**:39–85

Kleerebezem, M. and Quadri, L. E. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. Peptides **22**:1579–1596.

Klien, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol **41**:103

Kubista M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. and Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* **27(2-3)**:95-125.

Luria, S. E. and Delbrück, M. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28(6)**: 491–511

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**:680-5.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B. and Poolman, B. 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.* **272**:14277–14284.

Marciset, O. and Mollet, B. 1994. Multifactorial experimental designs for optimizing transformation: thermophilus. *Biotechnology and bioengineering.* **33**: 490-496

Mathot, A. G., Beliard, E. and Thuault, D. 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *J. Dairy Sci.* **86**:3068–3074

Mojsin, N., Nikcevic, G., Kovacevic, N., Savic, T., Petrovic, I. and Stevanovic, M. 2005. Purification and functional analysis of the recombinant protein isolated from *E. coli* by employing three different methods of bacterial lysis. *J. Serb.Chem Soc.* **70(7)** 943-950

O'Sullivan, T. and Fitzgerald, G. 1999. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. J Appl Microbiol **86**: 275-283.

O'Sullivan, D. J. and Klaenhammer, T. R. 1993. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. **59(8)**:2730

O'Sullivan, T., van Sinderen, D. and Fitzgerald, G. 1999. Structural and functional analysis of pCl65st, a 6.5 kb plasmid from *Streptococcus thermophilus* NDI-6. Microbiology. **145 (pt 1)**: 127-34

Petrova, P. and Gouliamova, D. 2006. Rapid screening of plasmid-encoded small *hsp*-genes in *Streptococcus thermophilus*. Curr Microbiol. **53**:422-427

Petrova, P., Miteva, V., Ruiz-Maso, J. A. and del Solar, G. 2003. Structural and functional analysis of pt38, a 2.9Kb plasmid of *Streptococcus thermophilus* yogurt strain. Plasmid. **50**:176-189

Powell, I. B., Achen, M. G., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. 1987. A simple and rapid method for genetic transformation of lactic streptococci by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. **54(3)**: 655-660

Renye, J. A. Jr. and Somkuti, G. A. 2013. BlpC-regulated bacteriocin production in *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol Lett. **35**:407–412

de Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K.E. and Lange, R. 2000. Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol* **182**: 4696–4703.

Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**:183–195.

Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:31–34.

Shankar, P. A. and Davies, F. L. 1977. Recent developments in yoghurt starters: a note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing β -glycerophosphate and application of such media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. *Int. J. of Dairy Technology.* **30**(1): 28-30

Slos, P., Bourquin, J. C., Lemoine, Y. and Mercenier, A. 1991. Isolation and characterization of chromosomal promoters of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Appl. Env. Microb.* **57**(5):1333-1339

Solow, B.T. and Somkuti, G.A. 2000. Comparison of Low-Molecular-Weight Heat Stress Proteins encoded on plasmids in different strains of *Streptococcus thermophilus*. *Cur. Microbiol.* **41**: 177-181

Solow, B.T. and Somkuti, G.A. 2001. Molecular properties of *Streptococcus thermophilus* plasmid pER35 encoding a restriction modification system. *Curr Microbiol.* **42**(2):122-8.

Somkuti, G. A. and Steinberg, D. H. 1986. General method for plasmid DNA isolation from thermophilic lactic acid bacteria. *Jour. Bacter.* **3**:323-332

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.*, **36**:1-29.

Su, P., Jury, K., Allison, G.E., Wong, WY., Kim, WS., Liu, CQ., Vancov, T. and Dunn, NW. 2002. Cloning vectors for *Streptococcus thermophilus* derived from a native plasmid. *FEMS Microbiol Lett.* **216**(1): 43-7.

Sun Z., Chen X., Wang J., Zhao W., Shao Y., Wu L., Zhou Z., Sun T., Wang L., Meng H., Zhang H. and Chen W. 2011 Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03 *Journal Of Bacteriology* **193**: 793–794

Sung, K and Ghan, S. A. 2003. A simple and efficient Triton X-100 boiling and chloroform extraction method of RNA isolation from Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEMS Microb. Lett.* **229**(1):97-101

Tapp, J., Thollessen, M. and Herrmann, B. 2003. Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene rnpB. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1861-1871.

Villani, F., Pepe, O., Mauriello, G., Salzano, G., Moschetti, G. and Coppola, S. 1995. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *Int J Food Microbiol* **25**:179–190

Ward, D. J. and Somkuti, G. A. 1995. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:330–335

Widdowson, C. A. Adrian, P. V. and Klugman, K. P. 2000. Acquisition of chloramphenicol resistance by the linearization and integration of the entire staphylococcal plasmid pC194 into the chromosome of streptococcus pneumonia

Wong, M. L. and Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* **39(1)**:75-85.

Βιβλία

Ausubel, F. M. Brent, R. Kingston, R. E. Moore, D. D. Seidman, J. G. Smith, J.A. and Struhl, K. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.

Abercrombie, M. Hickman, M. Johnson, M. L. Thain, M. 1990. The new Penguin Dictionary of Biology, 8th edition. Clays LTD, England.

Brock, T. D. 1961. Milestones in Microbiology. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ , U.S.A.

Colman, G. 1976. The viridans streptococci, p. 179-198. In J. de Louvois (ed.), Selected topics in clinical bacteriology. Balliere Tindall, London

Colman, G. and Williams, R. E. O. 1972. Taxonomy of some human viridans streptococci, p. 281-299. *In*: L. W. Wannamaker and J. M. Matsen (ed.), Streptococci and streptococcal diseases: recognition, understanding, and management. Academic Press, Inc., New York.

Creighton, T. E. 1999. The Encyclopedia Of Molecular Biology (Wiley Biotechnology Encyclopedias) Wiley-Interscience. U.S.A.

Demuth, D. R. and Lamont, R. J. 2006. Bacterial Cell-to-Cell Communication: Role in Virulence and Pathogenesis (Advances in Molecular and Cellular Microbiology) Cambridge University Press, UK

Dworkin, M. 2006. The prokaryotes – A handbook on the biology of bacteria, 3rd edition. Springer, N.Y., U.S.A.

Fox, P. F. 1993. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Chapman & Hall, London, UK.

Jones, D. 1978. Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*, p. 1-49. *In*: F. A. Skinner and L. B. Quesnel (Eds.) *Streptococci*. Academic Press, Inc. (London), Ltd. London.

Kushner, S. R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids, p. 17-23. *In*: H. W. Boyer and S. Nicosia (ed.), Genetic engineering. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Marth, E. H. and Steele, J. 2001. Applied Dairy Microbiology. Second Edition. CRC Press. Marcel Dekker Inc. N.Y. U.S.A.

Miller, E. M. and Nickoloff, J. A. 1995. *E. coli* electro-transformation. pp: 105–114 *In*: Electroporation Protocols for Microorganisms. Nickoloff, J.A. (eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey

Riley, M. A. and Chavan, M. A. 2007. Bacteriocins ecology and evolution. Springer. N.Y. U.S.A.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York

Smith, A., Datta, S. P., Smith, G. H., Campbell, P. N., Bentley, R. and McKenzie, H. A. 2000. Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revised edition. Oxford University press, New York, U.S.A.

Stewart, G. 2003. Transformation. p121-124. *In*: Genetics, Vol 4. Robinson R. (Ed). Thomson Gale. MacMillan Reference USA.

Streips, U. N. and Yasbin, E. R. 2002. Modern Microbial Genetics, Second Edition. Wiley-Liss, Inc. N.Y. U.S.A.

Watson, J. D., Myers, R. M., Caudy, A. A. and Witkowski, J. A. 2007. Ανασυνδιασμένο DNA Γονίδια και γονιδιώματα – μια συνοπτική παρουσίαση. Ακαδημαϊκές εκδόσεις, Ι. Μπάσδρα & Σία .

Σαμαρά, Ε. 2011. “Οργάνωση των γονιδίων βιοσύνθεσης της θερμοφιλίνης του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040.” Πτυχιακή εργασία.

Βιβλιογραφία

Ιστοσελίδες

jpkc.njau.edu.cn

www.britannica.com Encyclopædia Britannica

www.fao.org Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO

<http://research.ouhsc.edu> Office of the Vice President for Research, The University of Oklahoma Health Sciences Center, UOHSC

<http://www.fil-idf.org/> International Dairy Federation, IDF

Παράρτημα 1

Παρακάτω παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των πειραμάτων εύρεσης αλληλουχίας κάθε κλώνου που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση της αλληλουχίας της περιοχής *blr* του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 καθώς και η θέση των βάσεων στην τελική αλληλουχία.

1. PCR0X, Κλώνος OX1, Πείραμα E24

Θέση 1-440 bp

TCTTTATCGCAAAAAATCCCATAGGATGAGAAGCTCCCATGGGATTTTTTTTATTGTGTGAAAA
TAAACAAGATTTGATCTTCAATTTTTACGATTCATTTTGATGTTATTTAAACAAATGATATA
GCCAAGACAGTGGAAACAACACAAAAGATATGCCAGTAAAAATAAAGCATAAAGCTGTCAGATT
TAGTCAACATATAAAAAAGAAAAATTCCAACAAAATAAATGGAAAAGCCAGAGTGTCTTCTTA
ACGAATAAAAAGTATTGATGCCATATCTCTTTATCACTCAAAGTGACTTTTAGATTTTTTGCC
TAGGACAAGATGCATCAGAACCTCTGCTATACTGCTAAGTACTGTTAAAACCAGAATCTTAC
TAAGAGGAATTCCTAAAAAGAATCCCATACACTCAATAAGCAATTGGGACAAAACAATGGCC
GTAAGG

2. PCR0X, Κλώνος OX1, Πείραμα G24

Θέση 1-441 bp

TCTTTATCGCAAAAAATCCCATAGGATGAGAAGCTCCCATGGGATTTTTTTTATTGTGTGAAAA
TAAACAAGATTTGATCTTCAATTTTTACGATTCATTTTGATGTTATTTAAACAAATGATATA
GCCAAGACAGTGGAAACAACACAAAAGATATGCCAGTAAAAATAAAGCATAAAGCTGTCAGATT
TAGTCAACATATAAAAAAGAAAAATTCCAACAAAATAAATGGAAAAGCCAGAGTGTCTTCTTA
ACGAATAAAAAGTATTGATGCCATATCTCTTTATCACTCAAAGTGACTTTTAGATTTTTTGCC
TAGGACAAGATGCATCAGAACCTCTGCTATACTGCTAAGTACTGTTAAAACCAGAATCTTAC
TAAGAGGAATTCCTAAAAAGAATCCCATACACTCAATAAGCAATTGGGACAAAACAATGGCC
GTAAGGG

3. PCR3, Κλώνος 3.4, Πείραμα M18

Θέση 114-888 bp

CAAATGATATAGCCAAGACAGTGGAAACAACACAAAAGATATGCCAGTAAAAATAAAGCATAAAA
GCTGTCAGATTTAGTCAACATATAAAAAAGAAAAATTCCAACAAAATAAATGGAAAAGCCAGA
GTGTCTTCTTAACGAATAAAAAGTATTGATGCCATATCTCTTTATCACTCAAAGTGACTTTA
GATTTTTTGCCCTAGGACAAGATGCATCAGAACCTCTGCTATACTGCTAAGTACTGTTAAAAC
CAGAATCTTACTAAGAGGAATTCCTAAAAAGAATCCCATACACTCAATAAGCAATTGGGACA
AAACAATGGCCGTAAGGGCACGTAGATTTTTTTGACATAAACTTAAACCTCACACTTCTCTC
AAACAGAAAGTTTTTACACAACGCCTACAAAGTTACCAAAGCATAGATAAGCACTTACAGCCTC
GCTATTTTTTATAGGCGTGTCTATCATAAACTGACATTTCTAACCTCGTTCACTTTGTTAATG
ATTTTAAGCACTCTAGGTGTCAGAAAAGCTAGTAAACAAATATCCAAAACAATCACAACAAT
AATGATTAGGCGCCATTCGGCACCTCTCACCCTCAGCAAACGATAAACACCAGTTAAAATAA
TAGCCAAATGTGCCAAGCCATACCAGCGTAAATTTGTTTAGGAGTAACTGTCGTTCCCAA
GTGGACGATTTGTTTCTCAGCTCTCGTCCGATGAACACTGGTAGGTAGGTGAGTACAGACACAGTAAGGAA
ACCAAACCCAGGGGTAACATAAATAAGAAGG

4. **PCR3, Κλώνος 3.4.1, Πείραμα A09**

Θέση 439-1097 bp

GGGCACGTAGATTTTTTGGACATAAAACTTAAACCTCACACTTCTCTCAAACAGAAAGTTTTTC
ACAACGCCTACAAAGTTACCAAAGCATAGATAAGCACTTACAGCCTCGCTATTTTTTATAGGC
GTGTCTATCATAAACTGACATTTCTAACCTCGTTCACCTTTGTTTAAATGATTTTAAGCACTCTA
GGTGTGAGAAAAGCTAGTAAACAATATCCAAAACAATCACAAACAATAATGATTAGGCGCCA
TTCCGGCACCTCTCACCGTCAGCAAACGATAAACACCAGTTAAAATAATAGCCAAATGTGCCA
AGCCCATACCAGCGTAAATTTGTTTAGGAGTAAACTGTTCGTTCCCAAGTGGACGATTGTTCA
GCTCTCGTCCGATGAACACTGGTAGGTAGGTGAGACACAGTAAGGAAACCAAACCCAGGGGT
AACTAAAATAAGAAGGAAGAACCATTATATAATAATTCTAAACCAATATTGCCATCTATCAA
ACCTTAGGCAACAACCATGAGTTGTAATAAAGTAACTTTCCTGAACGAAGTCCGTTAAGAT
AAGGCATCGCACTCACCTTTTATCACAATCACTTGTCCGCTTGTCTATAATCATAACTAGGAC
TTAAGGTTCTTTCTCTGCTCCTCAACAGATTGGAAAAGA

5. **PCR3A, Κλώνος 3A1, Πείραμα A13**

Θέση 848-1725 bp

CAGTAAGGAAACCAAACCCAGGGGTAACATAAAATAAGAAGGAAGAACCATTATATAATAAATT
CTAAACCAATATTGCCATCTATCAAACCTTAGGCAACAACCATGAGTTGTAATAAAGTAAC
TTTCTGAACGAAGTCGGTTAAGATAAGGCATCGCACTCACCTTTTATCACAATCACTTGTCT
CGCTTGTCTATAATCATAACTAGGACTTAAGGTTCTTTCTCTGCTCCTCAACAGATTGGAAAA
GAACCTTTTTTGGCTCCATCTTCTTTTCTCAATGGACAACCTCAACCTTAAAACCAAGAAATC
CTCCCTAATGACATCAATAGCCATAACGAATCGCTAGCAATTTTCGCAACTCTGCCATTTCGC
TCCTCGATACAGGGAGACAAGGTTAGCTGGTCTTTTCTGACCCTTTGGATATTTCCAGTGA
CATCTGCTTAAAGATATAGGGAGTGGCTGAACGAGAGTCTGCAAGTTCCGTTCCGTTAGGAGT
GCAGGACCTGCTTCAAATCAGCATAATCTGGCTTATCTCCAATAGTTTCAATTACCTCATCG
ATGATAGCTACTGCTTGTATTGTCTCTCTTTGCCTCCTGCAAACCATTTAAGTCCTTTTCAT
TAAGAAAACCTCCTTATTTCTTTCAACTAATTTTTCAATCACATCTTTAGTATAGCACACTG
ATAGTCATTTAAAAGCCAGCGTCACAAAAAGTGGCTATACGTCCTGAATGGTCATTCATATA
CAAAATGAAAAAAATGAGGGAGATACTCAATCTTTTAACTATTTAATATAATATCTCAGT
GCTAACATGAGTGAAGCTAAGATTGCTAATGCCCCACAAAAGAGACAAGTGATTGCTCACC
GTCATTTGTT

6. **PCR3A, Κλώνος 3A1, Πείραμα C13**

Θέση 928-1860 bp

CTATCAAACCTTAGGCAACAACCATGAGTTGTAATAAAGTAACTTTCCTGAACGAAGTCGG
TTAAGATAAGGCATCGCACTCACCTTTTATCACAATCACTTGTCCGCTTGTCTATAATCATAA
CTAGGACTTAAGGTTCTTTCTCTGCTCCTCAACAGATTGGAAAAGAACCCTTTTTTGGCTCCAT
CTTCCTTTTCTCAATGGACAACCTCAACCTTAAAACCAAGAAATCCTCCCTAATGACATCAAT
AGCCATAACGAATCGCTAGCAATTTTCGCAACTCTGCCATTTCGCTCCTCGATACAGGGAGAC
AAGGTTAGCTGGTCTTTTCTGACCCTTTGGATATTTCCAGTGACATCCTGCTTAAAGATATA
GGGAGTGGCTGAACGAGAGTCTGCAAGTTCCGTTCCGTTAGGAGTGCAGGACCTGCTTCAAAT
CAGCATAATCTGGCTTATCTCCAATAGTTTCAATTACCTCATCGATGATAGCTACTGCTTGT
TATTGTCTCTCTTTGCCTCCTGCAAACCATTTAAGTCCTTTCATTAAGAAAACCTCCTTATT
TCTTTCAACTAATTTTTCAATCACATCTTTAGTATAGCACACTGATAGTCATTTAAAAGCCA
GCGTCACAAAAGTGGCTATACGTCCTGAATGGTCATTCATATACAAAATGAAAAAAATGA
GGGAGATACTCAATCTTTTAACTATTTAATATAATATCTCAGTGCTAACATGAGTGAAGCT
AAGATTGCTAATGCCCCACAAAAGAGACAAGTGATTGCTCACCGTCATTTGTTTTAGGGAA
TTCTTTTGTGTCTGCTACTTTATCAGTCATTTGGTGCCATTTGCCCTGTTTGGAGCGTTCAAGT
CCTTCTGAACCGTTGACATCGGCTGTGGTTGAACAGTTGGCAAAGATTTCTTTTCGTACTC
TCT

7. **PCR3, Κλώνος 3.3, Πείραμα C19**

Θέση 1714-2481 bp

CCGTCATTTGTTTTAGGGAATTCTTTTGTGTCTGCTACTTTATCAGTCATTGGTGCCATTTG
 CCCTGTTTGAGCGTTTCAGTTCCTTCTGAACCGTTGACATCGGCTGTGGTTGAACAGTTGGCA
 AAGATTTCTCTTTTCGTACTCTCTTCGGTTACTCGTGTAGGACGAACAGTTTTAGTTTGAGGT
 TCAGAGATGGTTGTTTGTTCCTGATTCAAAGTCATAAAACGTGGACTAGAGCTGGCTAAATG
 GTCATAAACTGTTTGGAGCAGGTCCACCACCAACCCATCCTGATAATAGCTGACCATTTTCCA
 GATAAAAATAGTGTAGGTGTACCTGGAATACCAATCTCACCAAACACATAGTTTCGGTCAAAA
 TCCTCACGATCTATATCGTAATACTCTAAACGACCATCCATCAGTTGGTTCAAGACCTTCAA
 CTCTGGTGAAAATTGACGACAATAGTAACAGGTTCCACGTCCAAAATAAATCGTATGTGCCT
 GACCATCCTCGGTAAAGGCATTACGCACATCATCTAAACTTATTTTAGGTAAATAAGCAACA
 TTAGCGTCGTATTCCTCACGAGATACTGCTGGGATATCATTTCAGTCTCCTCCTCAGACTC
 AGCCAAGGTTACTGATTCAGTCGCTGCTGGTGCCTCTTTATCTTCAGGAAGCGACTGCTCCT
 GACTATCTGATGGTTGTTCTACTGGAGTAGATTTCGGTTGCTTCAACCTTTGGAGAATTATCA
 GCTCCCGTTTCTACCACCTCATCC

8. **PCR3, Κλώνος 3.4, Πείραμα K18**

Θέση 1798-2511 bp

TTCTGAACCGTTGACATCGGCTGTGGTTGAACAGTTGGCAAAGATTTCTCTTTCGTA CTCTC
 TTCGGTTACTCGTGTAGGACGAACAGTTTTAGTTTGAGGTTTCAGAGATGGTTGTTTGTTCCT
 GATTCAAAGTCATAAAACGTGGACTAGAGCTGGCTAAATGGTCATAAACTGTTTGAGCAGGT
 CCACCACCAACCCATCCTGATAATAGCTGACCATTTTCCAGATAAAAATAGTGTAGGTGTACC
 TGGAATACCAATCTCACCAAACACATAGTTTTCGGTCAAAAATCCTCACGATCTATATCGTAAT
 ACTCTAAACGACCATCCATCAGTTGGTTCAAGACCTTCAACTCTGGTGAAAATTGACGACAA
 TAGTAACAGGTTCCACGTCCAAAATAAATCGTATGTGCCTGACCATCCTCGGTAAAGGCATT
 ACGCACATCATCTAAACTTATTTTAGGTAAATAAGCAACATTAGCGTCGTATTCCTCACGAG
 ATACTGCTGGGATATCATTTCAGTCTCCTCCTCAGACTCAGCCAAGGTTACTGATTCAGTC
 GCTGCTGGTGCCTCTTTATCTTCAGGAAGCGACTGCTCCTGACTATCTGATGGTTGTTCTAC
 TGGAGTAGATTTCGGTTGCTTCAACCTTTGGAGAATTATCAGCTCCCGTTTCTACCACCTCAT
 CCGCTAAAGCAGTTCCCTACCGATAGATTTCAGT

9. **PCR1, Κλώνος 8, Πείραμα G06**

Θέση 2096-2817 bp

CTATATCGTAATACTCTAAACGACCATCCATCAGTTGGTTCAAGACCTTCAACTCTGGTGAA
 AATTGACGACAATAGTAACAGGTTCCACGTCCAAAATAAATCGTATGTGCCTGACCATCCTC
 GGTAAGGCATTACGCACATCATCTAAACTTATTTTAGGTAAATAAGCAACATTAGCGTCGT
 ATTCCTCACGAGATACTGCTGGGATATCATTTCAGTCTCCTCCTCAGACTCAGCCAAGGTT
 ACTGATTCAGTCGCTGCTGGTGCCTCTTTATCTTCAGGAAGCGACTGCTCCTGACTATCTGA
 TGGTTGTTCTACTGGAGTAGATTTCGGTTGCTTCAACCTTTGGAGAATTATCAGCTCCCGTTT
 CTACCACCTCATCCGCTAAAGCAGTTCCCTACCGATAGATTTCAGTAACAAGGCTGAACATC
 AGCCATAGCGTTAATGTCCTTTTTTTCATCATAAACTCCTTTTCGATTACTTAGTCTAGTTTA
 ACAATTTACAACCTCTCATAGAAGCTAACGTCCAAAAGTGACTATACGTCCCGAATGGTAA
 GAATATAAAAAATCCCACTATCACCATGATATACTCCCTTATAGTGGACAGTGAAAAATA
 AAAATTTTCACTAGAACTATAAGGGGAGTCTTATATGTCCAAAAGAAGTCCAAAATCTGT
 ATCTGAGAACTAGAAATTGTTCTGCTTCACTTGGGAAGAA

10. **PCR1, Κλώνος 6, Πείραμα C06**

Θέση 2096-2888 bp

CTATATCGTAATACTCTAAACGACCATCCATCAGTTGGTTCAAGACCTTCAACTCTGGTGAA
AATTGACGACAATAGTAACAGGTTCCACGTCCAAAATAAATCGTATGTGCCTGACCATCCTC
GGTAAAGGCATTACGCACATCATCTAAACTTATTTTAGGTAAATAAGCAACATTAGCGTCGT
ATTCCCTCACGAGATACTGCTGGGATATCATTTCAGTCTCCTCCTCAGACTCAGCCAAGGTT
ACTGATTCAGTCGCTGCTGGTGCCTCTTTATCTTCAGGAAGCGACTGCTCCTGACTATCTGA
TGGTTGTTCTACTGGAGTAGATTCCGTTGCTTCAACCTTTGGAGAATTATCAGCTCCCGTTT
CTACCACCTCATCCGCTAAAGCAGTTCCTACCGATAGATTTCAGTAACAAGGCTGAACTCATC
AGCCATAGCGTTAATGTCCTTTTTTTTCATCATAAACTCCTTTCGATTACTTAGTCTAGTTTA
ACAATTTACAACCTCTCATAGAAGCTAACGTCCCAAAAAGTGACTATACGTCCCGAATGGTAA
GAATATAAAAAATCCCACTATCACCATGATATACTCCCTTATAGTGGACAGTGAAAAAATA
AAAAATTTTCACTAGAACTATAAGGGGAGTCTTATTATGTCCAAAAGAAGTCCAAAATCTGT
ATCTGAGAAACTAGAAATTGTTCTGCTTCACTTGGAAGAAGGTAAATCACTTAGTTGGTTAA
CTAGAAACCAAGGTATCTCTAAAGACACCCTATCGAACTGGGTTCCGAA

11. **PCRYPOK1, Κλώνος YPOK1.3, Πείραμα L03**

Θέση 2096-2941bp

CTATATCGTAATACTCTAAACGACCATCCATCAGTTGGTTCAAGACCTTCAACTCTGGTGAA
AATTGACGACAATAGTAACAGGTTCCACGTCCAAAATAAATCGTATGTGCCTGACCATCCTC
GGTAAAGGCATTACGCACATCATCTAAACTTATTTTAGGTAAATAAGCAACATTAGCGTCGT
ATTCCCTCACGAGATACTGCTGGGATATCATTTCAGTCTCCTCCTCAGACTCAGCCAAGGTT
ACTGATTCAGTCGCTGCTGGTGCCTCTTTATCTTCAGGAAGCGACTGCTCCTGACTATCTGA
TGGTTGTTCTACTGGAGTAGATTCCGTTGCTTCAACCTTTGGAGAATTATCAGCTCCCGTTT
CTACCACCTCATCCGCTAAAGCAGTTCCTACCGATAGATTTCAGTAACAAGGCTGAACTCATC
AGCCATAGCGTTAATGTCCTTTTTTTTCATCATAAACTCCTTTCGATTACTTAGTCTAGTTTA
ACAATTTACAACCTCTCATAGAAGCTAACGTCCCAAAAAGTGACTATACGTCCCGAATGGTAA
GAATATAAAAAATCCCACTATCACCATGATATACTCCCTTATAGTGGACAGTGAAAAAATA
AAAAATTTTCACTAGAACTATAAGGGGAGTCTTATTATGTCCAAAAGAAGTCCAAAATCTGT
ATCTGAGAAACTAGAAATTGTTCTGCTTCACTTGGAAGAAGGTAAATCACTTAGTTGGTTAA
CTAGAAACCAAGGTATCTCTAAAGACACCCTATCGAACTGGGTTCCGAAAGTACAAAGAAGCT
GGTGTGATGGGCTAGAGGAAAGCCGTCAATGGAAGAAGT

12. **PCR1B, Κλώνος 1B1, Πείραμα E13**

Θέση 2754-3593 bp

GTCCAAAAGAAGTCCAAAATCTGTATCTGAGAACTAGAAAATTGTTCTGCTTCACTTGGAAAG
AAGGTAAATCACTTAGTTGGTTAACTAGAAAACCAAGGTATCTCTAAAGACACCCTATCGAAC
TGGGTTCCGAAAGTACAAAGAAGCTGGTGTGATGGGCTAGAGGAAAGCCGTCAATGGAAGAA
GTATAGTAAGGAACATAAGGAACAAGCTGTTTCCGACTATCTTAATGGCTTGGGAAGTCTCA
AAGATCTGACCAAAAAATATGGAATTTCTGACCCTTATGTTCTCAGATCATGGATAAAAAAGT
TATACTAGTGGTAAAGAAGCTGAAAGCTACTAGTAAAGGAATGAGACGCATGAAGCAAGGACG
CAAGACAACATTTGAAGAATGAATTGAGATTGTCAATTTTACCCTTGCCCACGAGAAAGATT
ACCAAGGGCTGTTGAGAAGTATGGTGTTCCTACCAGCAGATCTATTCTTGGGTCAGAAAAG
TTCGAGAAGGACGGTTCTAACGGTCTCCTAGATCGTCGTGGAAAAGGCTTACAAGTAAACC
AAACCTTACTCCAGAAGAAGAGTTACGCCTCAAATCAAGCAACAGGAAGAGCGGATTAAGT
ATCTTGAATGGAGAACGGCCTGCTAAAAAAGTTAGAAGAAATCAAACGACGAAACCGACGG
TAAGACTTGGTCCGCACTTGGAAACCTTCCAAGCGATTAAGAATATGCGGATGAGTATGAA
GAGGTTTTTATCAGCCACTTGTGCCATATTCTAAAGGTATCTCGCTCAGGCTATTACAAGTG
GTTACAACATCAAGAAACAACCTTCTGAACAGGAA

13. **PCR1, Κλώνος 1.6.1, Πείραμα I07**

Θέση 2941-3765 bp

TATAGTAAGGAACTAAAGGAACAAGCTGTTTTCCGACTATCTTAATGGCTTGGGAAGTCTCAA
 AGATCTGACCAAAAAATATGGAATTTCTGACCCTTATGTTCTCAGATCATGGATAAAAAGTT
 ATACTAGTGGTAAAGAACTGAAAGCTACTAGTAAAGGAATGAGACGCATGAAGCAAGGACGC
 AAGACAACATTTGAAGAATGAATTGAGATTGTCAATTTTACCCTTGCCACGAGAAAAGATTA
 CCAAGGGGCTGTTGAGAAGTATGGTGTTCCTACCAGCAGATCTATTCTTGGGTGAGAAAAGT
 TCGAGAAGGACGGTTCTAACGGTCTCCTAGATCGTCGTGGAAAAGGTCTTACAAGTAAACCA
 AACCTTACTCCAGAAGAAGAGTTACGCCTCAAAAATCAAGCAACAGGAAGAGCGGATTAAGTA
 TCTTGAAATGGAGAACGGCCTGCTAAAAAAGTTAGAAGAAATCAAACGACGAAACCGACGGT
 AAGACTTGGTCGGCACTTGGAAACCTTCCAAGCGATTAAGAATATGCGGATGAGTATGAAG
 AGGTTTTTATCAGCCACTTGTGCCATATTCTAAAGGTATCTCGCTCAGGCTATTACAAGTGG
 TTACAACATCAAGAAACAACCTTCTGAACAGGAAAATTTAGGCTTGATGGATATCATCAAGAA
 ACTTCATAGCCAGCATAATGGTATTCTTGGTTATCGTCGTATGACGCTATTTGTCAATCGCA
 AGCTTGAAACAACACTACAACAAGAAGCGGATTCGACGCTTGATGCACATTCTAGGTCTACGT
 TCCATTATCAGAAGAGCCA

14. **PCR1, Κλώνος 1.8, Πείραμα B19**

Θέση 3594-4276 bp

AATTTAGGCTTGATGGATATCATCAAGAACTTCATAGCCAGCATAATGGTATTCTTGGTTA
 TCGTCGTATGACGCTATTTGTCAATCGCAAGCTTGAACAAACTACAACAAGAAGCGGATTC
 GACGCTTGATGCACATTCCTAGGTCTACGTTCCATTATCAGAAGAGCCAAGGGCTATTGTACT
 AAACTAGCTTTGTCAATGTAGAGGACAACATTCTCAATCGTAATTTTACAGCCACTGCTCC
 AAATCAGAAATGGTGTACAGATGTGACTTTCTTGAAGTACGGTTTCAGCTGTAAAGCCTATT
 TGAGTGTATTAAAGGATCTTTACGACGGCTCAATTGTGCGCTATGTAGTTGGTCAATTTAAT
 GATAACGAATTGGTATTGGAAACACTTCGTAAAGCACAAAAGCTAATCCTAATGCGACACC
 ATTAATTCACAGCGACCGAGGTTTCGCAGTATACTTCGAAAGATTATTACCGTTTAACTACCC
 AGTATCAGATGACCCGCTCCATGTCTCGTGTGGTAAGTGTATTGACAATGCACCAATTGAG
 AGTTTTCTTGGGCACTTTAAGACGGAGTGCTATGATTTGAAGAAGTATAAGACTTTTGAGGA
 GCTAGTTTCAGATATTGATGCCTACATCTATTTTTTACAATCATCAACGTTTTTCAAGAGCGCA
 A

15. **PCR1, Κλώνος 1.6.2, Πείραμα K07**

Θέση 3595-4411 bp

ATTTAGGCTTGATGGATATCATCAAGAACTTCATAGCCAGCATAATGGTATTCTTGGTTA
 CGTCGTATGACGCTATTTGTCAATCGCAAGCTTGAACAAACTACAACAAGAAGCGGATTCG
 ACGCTTGATGCACATTCCTAGGTCTACGTTCCATTATCAGAAGAGCCAAGGGCTATTGTACTA
 AAAGTAGCTTTGTCAATGTAGAGGACAACATTCTCAATCGTAATTTTACAGCCACTGCTCCA
 AATCAGAAATGGTGTACAGATGTGACTTTCTTGAAGTACGGTTTCAGCTGTAAAGCCTATTT
 GAGTGTATTAAAGGATCTTTACGACGGCTCAATTGTGCGCTATGTAGTTGGTCAATTTAATG
 ATAACGAATTGGTATTGGAAACACTTCGTAAAGCACAAAAGCTAATCCTAATGCGACACCA
 TTAATTCACAGCGACCGAGGTTTCGCAGTATACTTCGAAAGATTATTACCGTTTAACTACCCA
 GTATCAGATGACCCGCTCCATGTCTCGTGTGGTAAGTGTATTGACAATGCACCAATTGAGA
 GTTTCTTGGGCACTTTAAGACGGAGTGCTATGATTTGAAGAAGTATAAGACTTTTGAGGAG
 CTAGTTTCAGATATTGATGCCTACATCTATTTTTTACAATCATCAACGTTTTTCAAGAGCGCAA
 TAACGGCCTTGCCCTCTTGAATGAGGAACAAGGCCGTCGCTAATATTTTATTTATTTTAT
 TGTCCACTTGACAGGGAGCTGTTCAAGTATATGTTCAAGATTATTTTTTATGTTTATTTTAT
 TGACCTTTTTG

16. **PCRYPOK1, Κλώνος YPOK1.3, Πείραμα K03**

Θέση 3993-4806 bp

CGTAAAGCACAAAAAGCTAATCCTAATGCGACACCATTAATTCACAGCGACCGAGGTTTCGCA
GTATACTTCGAAAAGATTATTACCGTTTAACTACCCAGTATCAGATGACCCGCTCCATGTCTC
GTGTTGGTAAGTGTATTGACAATGCACCAATTGAGAGTTTCTTTGGGCACTTTAAAGACGGAG
TGCTATGATTTGAAGAAGTATAAGACTTTTGAGGAGCTAGTTTCAGATATTGATGCCTACAT
CTATTTTTACAATCATCAACGTTTTCAAGAGCGCAATAACGGCCTTGCCCCCTTTGAAAATGA
GGAACAAGGCCGTCGCCTAATATTTTATTATTTTCATTGTCCACTTGACAGGGAGCTGTTTCAG
TATATGTTCAAGATTATTTTTTATGTTTTATTTTTATTGACCTTTTTGAAAAAGATATTACCT
AACAAAGCAACAACAAAACCTATAATAAAAATATACCATAGATTAGCTCCACCAGCAGGTTGC
TCCATAGGCAACAGTACCACCTGCACCACCTAGAACCACCAGCTAGATAACCAGGAACTG
AGCCTACAACCTGGTAAAACCTACATTACCTCCAAACGCTCCTCCGATAGCTCCTCCGATAGCT
CCTTGAACAGTCGCTCCACCTGTGCCTCTCCAACCTACATCCACCTCCTTCAACACTAGCAAG
TGTTTCGAGGTCAAGGGTGTAAAGTTTTCAATTGTTTGAGTTGCCATGGTAACTACCTCCT
AAAATTTTTATCGTGTGATCTCTCAATCACATCTTTAGTATAGCATTCAAGTGTCTCTATCA
GAGCTAGC

17. **PCR1, Κλώνος 1.6.3, Πείραμα M07**

Θέση 4218-4941 bp

GTTTCAGATATTGATGCCTACATCTATTTTTACAATCATCAACGTTTTCAAGAGCGCAATAA
CGGCCCTTGCCCCCTTTGAAATGAGGAACAAGGCCGTCGCCTAATATTTTATTATTTTCATTGT
CCACTTGACAGGGAGCTGTTTCAGTATATGTTCAAGATTATTTTTTATGTTTATTTTTATTGA
CCTTTTTGAAAAAGATATTACCTAACAAAGCAACAACAAAACCTATAATAAAAATATACCATA
GATTAGCTCCACCAGCAGGTTGCTCCATAGGCAACAGTACCACCTGCACCACCTAGAACCACC
ACCAGCTAGATAACCAGGAACTGAGCCTACAACCTGGTAAAACCTACATTACCTCCAAACGCTC
CTCCGATAGCTCCTCCGATAGCTCCTTGAACAGTCGCTCCACCTGTGCCTCTCCAACCTACAT
CCACCTCCTTCAACACTAGCAAGTGTTCGAGGTCAAGGGTGTAAAGTTTTCAATTGTTTG
AGTTGCCATGGTAACTACCTCCTAAAATTTTTATCGTGTGATCTCTCAATCACATCTTTAGT
ATAGCATTCAGTGTCTCTATCAGAGCTAGCGTCCCAAAAAGTGGCTATATGTCCCGAATGG
TAATTCCTAAAGAACATCCTTCAATCATTGGAAATCTTCCCTCTAATTTTTCACATATTTACTT
AATCACTTTCTTATTATAACACTTTTTATGCAAATATCTTATA

18. **PCR1A, Κλώνος 1A1, Πείραμα E08**

Θέση 4598-5506 bp

GCTCCTCCGATAGCTCCTTGAACAGTCGCTCCACCTGTGCCTCTCCAACCTACATCCACCTCC
TTCAACACTAGCAAGTGTTCGAGGTCAAGGGTGTAAAGTTTTCAATTGTTTGAGTTGCCA
TGGTAACTACCTCCTAAAATTTTTATCGTGTGATCTCTCAATCACATCTTTAGTATAGCATT
CAAGTGTCTCTATCAGAGCTAGCGTCCCAAAAAGTGGCTATATGTCCCGAATGGTAAATCCT
AAAGAACATCCTTCAATCATTGGAAATCTTCCCTCTAATTTTTCACATATTTACTTAAATCACTT
TCTTATTATAACACTTTTTATGCAAATATCTTATAGATTGCTTACAGAATAATCAAGCAAATG
CGTTTATTGTTTAAAATATTTTTTGACTTGAAGGTAAGATAGAAAATCACAGAGGATTAACA
AAAGCATTAATACGGCTAGTACTATACGGTCTGTGGTATCACTGAATGTTAGTAATGTGTAA
AACTCTACACTAAGCACTAGAAAATGTGATGACAGGAAAGACAATGAAGGACTGCCGTATTGT
TAACAGATTTACTGAATCTGGACGCTTCTTAAGCATAACGGTAGAGCAGTCCATTAACAAAA
TGACTACGAAAGCTAGTGCTCCGACTGCTAGCCAAGTTCCCTGGCGAGATCTTGCTTTTGTAG
AGAGAAAGGCTGATACTTATAAGGAAAACCTGCCAACGCAGCAGTGATGGTTCTAAAAGATCG
CAATACACTCGAACCTAATATTTCTTTAACTTCATGATAAAAACCTAAACTATGAATAACCTC
AGTCAGTCTTGCAAACCTAATAAGCTATTACATTTAACTCTATTCCTCTCTGTATTTTTATTA
TACAGCTGTAAGATTTCAAGTAAGCCCTTAGCGATTAAAT

19. **PCR1A, Κλώνος 1A1, Πείραμα G13**

Θέση 4786-5710 bp

AGTGTCTCTATCAGAGCTAGCCTCCCAAAAAGTGGCTATATGTCCCGAATGGTAATTCCTAA
 AGAACATCCTTCAATCATTTGGAAATCTTCCTCTAATTTTTACATATTTACTTAATCACTTTT
 TTATTATAACACTTTTTATGCAAATATCTTATAGATTGCTTACAGAATAATCAAGCAAATGCG
 TTTATTGTTTTAAAATATTTTTTGAAGGTAAGATAGAAAATCACAGAGGATTAACAAA
 AGCATTAATACGGCTAGTACTATACGGTCTGTGGTATCACTGAATGTTAGTAATGTGTAAAA
 CTCTACACTAAGCACTAGAAATGTGATGACAGGAAAAGACAATGAAGGACTGCCGTATTGTTA
 ACAGATTTACTGAATCTGGACGCTTCTTAAGCATACGGTAGAGCAGTCCATTAACAAAAATG
 ACTACGAAAGCTAGTGCTCCGACTGCTAGCCAAGTTCCTGGCGAGATCTTGCTTTTGTAGAG
 AGAAAGGCTGATACTTATAAGGAAAACCTGCCAACGCAGCAGTGATGGTTCTAAAAGATCGCA
 ATACACTCGAACTAATATCTTTAACTTCATGATAAAACACCTAAACTATGAATAACCTCAG
 TCAGTCTTGCAAACCTAATAAGCTATTACATTTAACTCTATTCTCTCTGTATTTTATTATA
 CAGCTGTAAGATTTCAAGTAAGCCCTTAGCGATTAAATTTCTACTGGAGATGTAATACAGTAG
 TGTCAATTAGTACTGATACTTTAAATAGGCGACTATACATATCTTTGTTTTCTCTATTACAAA
 GATATGCAATCAAATATAATATAATCTCCGCTATCATTAGCAAGAATAATTTACTTCGGGA
 ACATCAAAAATAAGCATTTGCAAGCATCTTACGTTCAAAGTGACCAAAGGTTACTTT

20. **PCR1A, Κλώνος 1A1, Πείραμα F13**

Θέση 5368-6293 bp

ACTTCATGATAAAAACACCTAAACTATGAATAACCTCAGTCAGTCTTGCAAACCTAATAAGCT
 ATTACATTTAACTCTATTCCTCTCTGTATTTTATTATACAGCTGTAAGATTTCAAGTAAGCC
 CTTAGCGATTAAATTTCTACTGGAGATGTAATACAGTAGTGTCAATTAGTACTGATACTTTAAA
 TAGGCGACTATACATATCTTTGTTTTCTCTATTACAAAGATATGCAATCAAATATAATATAA
 TCTCCGCTATCATTAGCAAGAATAATTTACTTCGGGAACATCAAAAATAAGCATTTGCAAG
 CATCTTACGTTCAAAGTGACCAAAGGTTACTTTTTGAAACTGTACCCACTTTTTAAAAAGTAA
 GCTATAAAGAAGCACCGTTAGCCCTAGCAAGTTAATGGTATGGTGAAGTGCATCCAAGCTTC
 TAAATAGATTAGCGAGGCCATTACGATGAGAATGGTAGCCAGTAAATACGGTTTTGAGTTT
 TTTAAACATACTTTTTCTCCTTAAAGTGTTTTTGTAGCTAGTCTGTGCATAATCTATGAATTTAT
 TATAGATTGGAAGCCGATAAAAAAGTAGTGACATAAATGTCACTACTTGTCTGACCCTTATAT
 CCTTGATAACCGTACACATAAGAAAAGAGAAATAAACATAACCCGATAAGATTTAGGCATTGA
 AGTCCAAAATTCAGTTTTTCTCCAAAGTTATGTAAGGCAACAAGGACGAAGCCCATAGACAT
 CATTAGAGACACTAGGCGTTTTTTGGTCATGATTACAAATACCTCTTCTTTATATCGAAAT
 TTTCAATCATAATTCACATGCTATTACAGACCAGCAATTGACAAGACATTTAGTTAGGAT
 TTCTTCTTAAACGGAATGGTAGCCTTGTGTTTTTCAAGAAATGACATAATTTGGCTTAT

21. **PCR1A, Κλώνος 1A1, Πείραμα C08**

Θέση 5615-5610 bp

ATCTCCGCTATCATTTAGCAAGAATAATTTTACTTCGGGAACATCAAAAATAAGCATTGCAA
GCATCTTACGTTCAAAGTGACCAAAGGTTACTTTTGAAACTGTACCCACTTTTTAAAAAGTA
AGCTATAAAGAAGCACCCTTAGCCCTAGCAAGTTAATGGTATGGTGAAGTGCATCCAAGCTT
CTAAATAGATTAGCGAGGCCCATTACGATGAGAATGGTAGCCAGTAAATACGGTTTTGAGTT
TTTTAAACATACTTTTCTCCTTAAAGTGTTTTTAGCTAGTCTGTGCATAATCTATGAATTTTA
TTATAGATTGGAAGCCGATAAAAAAGTAGTGACATAAATGTCACTACTTGTCTGACCTTATA
TCCTTGATAACCGTACACATAAGAAAGAGAAAATAAACATAACCCGATAAGATTTAGGCATTG
AAGTCCAAAATTCAGTTTTTCTCCAAAGTTATGTAAGGCAACAAGGACGAAGCCCATAGACA
TCATTAGAGACACTAGGCGTTTTTGGTTCATGATTACAAATACCTCTTCTCTTATATCGAAA
TTTTCAATCATAATTCACATGCTATTCACAGACCAGCAATTGACAAGACATTTTCAGTTAGGA
TTTCTTCTTAACGGAATTGGTAGCCTTGTGTTTTTCAAGAAATGACATAATTGGCTTATCTA
AAAACTCATAACAGCCATGGAAACCATCCCTAAAATATAACTTTTTCAAATCAA
CATCACCACCAGCATGTTGCTCCATAACCAACACCACCTACGATAGCACCTCCAGCTGCTCC
TGCGACAGCACCTTGCCAAGTACGTGTTTTGATACCTAGTCGTAAACCATTACCAACTCCTG
TAGCTACTCCTTGTTTTAGCAAAAACCTCC

22. **PCR1, Κλώνος 1.6.4, Πείραμα O04**

Θέση 6289-6905 bp

CTTATCTAAAAAATCATAACAGCCATGGAAACCATCCCTAAAATATAACTTTTTCAAATCAA
ACATAATCCATCACCACCAGCATGTTGCTCCATAACCAACACCACCTACGATAGCACCTCCA
GCTGCTCCTGCGACAGCACCTTGCCAAGTACGTGTTTTGATACCTAGTCGTAAACCATTACC
AACTCCTGTAGCTACTCCTTGTTTAGCAAAAACCTCCCCAGCTACATCCACCACCTTCAACAC
TAGCAAGTGTTCGAGGTCAAGGGTGTAAAGTTTTCAATTGTTTGAGTTGCCATGGCAACT
ACCTCCTAAAATTTTTATCGTGTGATCTCTCAATCACATCTTTAGTATAGCATTCAAGTGTG
TCTATCAGAGCTAGCGTCCCAAAAAGTGGCTATATGTCCCGAATGGTAATTCCTAATGTATA
TTATTTCTAAAATTCAGAAAAAATAAATCTCATTTTTATACTCATAAAAAATTGAAAAACC
GTTTTCTTTATGTTACAATTTTTCAATAAACAGTATTCGTCATAAAAGAGAGGACTAGACCT
TGAAGATTTACCTATTAGAAGATAATTCTATTTCAGATGGGTCGCTTGGAAGAGGCTGTG

23. **PCR1, Κλώνος 6, Πείραμα A06**

Θέση 6421-7127 bp

TGCGACAGCACCTTGCCAAGTACGTGTTTTGATACCTAGTCGTAAACCATTACCAACTCCTG
TAGCTACTCCTTGTTTTAGCAAAAACCTCCCCAGCTACATCCACCACCTTCAACACTAGCAAGT
GTTTCGAGGTCAAGGGTGTAAAGTTTTCAATTGTTTGAGTTGCCATGGCAACTACCTCCTA
AAATTTTTATCGTGTGATCTCTCAATCACATCTTTAGTATAGCATTCAAGTGTCTCTATCAG
AGCTAGCGTCCCAAAAAGTGGCTATATGTCCCGAATGGTAATTCCTAATGTATATTATTTCT
AAAATTCAGAAAAAATAAATCTCATTTTTATACTCATAAAAAATTGAAAAACCGTTTTCTT
TATGTTACAATTTTTCAATAAACAGTATTCGTCATAAAAGAGAGGACTAGACCTTGAAGATT
TACCTATTAGAAGATAATTCTATTTCAGATGGGTCGCTTGGAAGAGGCTGTGGCACATGAAC
TAAATCCTTCGAAAAGATCTATCTTGTGTCCAGTCTTTTGACAAACCTGACCAGTTGTTAT
CAGCTATCACTTCTAATACAAGCGATCAGATTTTCTTTCTTGATATTGAAATTAAGGTGAA
GATAAGAAGGGACTTGATATCGCTAAAATCATACGTCAAAAATAACCCCTTATGCTATCATTGC
CTTTGTCACTACACATATAGAGTTC

24. **PCRCHR, Κλώνος CHR11, Πείραμα G18**

Θέση 6435-7199 bp

GCCAAGTACGTGTTTTGATACCTAGTCGTAAACCATTACCAACTCCTGTAGCTACTCCTTGT
 TTAGCAAAACCTCCCCAGCTACATCCACCACCTTCAACACTAGCAAGTGTTCGAGGTCAAG
 GGTGTTAAAGTTTTCAATTGTTTGAGTTGCCATGGCAACTACCTCCTAAAATTTTTATCGTG
 TGATCTCTCAATCACAATCTTTAGTATAGCATTCGAAGTGTCTCTATCAGAGCTAGCGTCCCAA
 AAAGTGGCTATATGTCCCGAATGGTAATTCCTAATGTATATTATTTCTAAAATTCAGAAAA
 AAAAAATCTCATTTTTATACTCATAAAAAATTGAAAAACCGTTTTCTTTATGTTACAATTTT
 TCAATAAACAGTATTCGTTCATAAAAAGAGAGGACTAGACCTTGAAGATTTACCTATTAGAAGA
 TAATTCATTCAGATGGGTTCGCTTGGGAAGAGGCTGTGGCACATGAACTTAAATCCTTCGGAA
 AAGATCTATCTTGTGTCCAGTCTTTTGACAAAACCTGACCAGTTGTTATCAGCTATCACTTCT
 AATACAAGCGATCAGATTTTTCTTTCTTGATATTGAAATTAAGGTGAAGATAAGAAGGGACT
 TGATATCGCTAAAATCATACGTCAAAAATAACCCTTATGCTATCATTCGCTTTGTCACTACAC
 ATATAGAGTTCATGCCTCAAGCTTTTGCGTTCACAGCCTATAAATACATCAATAAACCTTA
 GATGAAGCTAGCTTTAGAAAA

25. **PCR1, Κλώνος 8, Πείραμα E06**

Θέση 6451-7127 bp

GATACCTAGTCGTAAACCATTACCAACTCCTGTAGCTACTCCTTGTTTAGCAAAACCTCCCC
 AGCTACATCCACCACCTTCAACACTAGCAAGTGTTCGAGGTCAAGGGTGTAAAGTTTTCA
 AATTGTTTGAGTTGCCATGGCAACTACCTCCTAAAATTTTTATCGTGTGATCTCTCAATCACA
 TCTTTAGTATAGCATTCGAAGTGTCTCTATCAGAGCTAGCGTCCCAAAAAGTGGCTATATGTC
 CCGAATGGTAATTCCTAATGTATATTATTTCTAAAATTCAGAAAAAATAAATCTCATTTTT
 ATACTCATAAAAAATTGAAAAACCGTTTTCTTTATGTTACAATTTTTCAATAAACAGTATTC
 GTCATAAAAAGAGAGGACTAGACCTTGAAGATTTACCTATTAGAAGATAATTCTATTCAGATG
 GGTTCGCTTGGGAAGAGGCTGTGGCACATGAACTTAAATCCTTCGGAAAAGATCTATCTTGTGT
 CCAGTCTTTTGACAAAACCTGACCAGTTGTTATCAGCTATCACTTCTAATACAAGCGATCAGA
 TTTTTCTTTCTTGATATTGAAATTAAGGTGAAGATAAGAAGGGACTTGATATCGCTAAAATC
 ATACGTCAAAAATAACCCTTATGCTATCATTCGCTTTGTCACTACACATATAGAGTTC

26. **PCRCHR, Κλώνος CHR11, Πείραμα M09**

Θέση 7123-7930 bp

AGTTCATGCCTCAAGCTTTTGGCGTTACAGCCTATAAATACATCAATAAACCTTAGATGAA
 GCTAGCTTTAGAAAAGAAATAGGGGAAACCATTGCTCAAGTCTTCCCTATTAACGCAACTAC
 CACGGATGAGTTTTTTCTCTACAAAACAGAGTCTCAATTAATAAACCTTCCCTATGGATCAAA
 TTCTATACCCTATCCACATCAGATATCAAACACCATGTTACCTCCAGACTATCCATACCCTC
 ATGGATATCCGAGCAAAATCTGGCAGACTTTAAAAAGATACACAAAAAGCTCTACCCATGCCA
 TCGGTCCCTTATCGTCAATACAGATATGATCATCTCTGTCAACAAGACCAATTAAGGCTA
 CCTTAATTAATGGTCAAGTTCTACCAGTATCCCGTATGAAGATAGGAAAGATTGCACAGATT
 GTTGAGGAAAGAGGCAGATGATGTTAACAACGTTATGGCTACTTTTTCTCACCTTTTTAAGT
 GCAGGCCTAGAAATTAATCTTTTCTTTATTTAATGGGACAGAAGATTCGTCTGAGGTATTT
 TTTCTACTCCTTATTTTTAATTTAGCCTTTAATTTTATTTATAACCACTCTTCTTGTTTA
 TCATTAATTTCTGGGGTGAGGATATCTACTATCTTCTGCTCTCCTTCCCTTTTATCCACTAAG
 ACTAAAAAACCATTAATAAATAAAGATTTTCAATGGTCTCTTCCCTGATATCCTCAACAACCT
 TAGTTTAAGACTGATTACTTTTTTTATCTTTTCTTTTTTTAATATTAGTATCACCGATTATA
 AA

27. **PCRHR, Κλώνος HRA13, Πείραμα N24**

Θέση 7138-8027 bp

CTTTTGGCGTTACAGCCTATAAAATACATCAATAAAAACCTTAGATGAAGCTAGCTTTAGAAAA
GAAATAGGGGAAACCATTGCTCAAGTCTTCCCTATTAACGCAACTACCACGGATGAGTTTTT
TCTCTACAAAACAGAGTCTCAATTAATAAACCTTCCCTATGGATCAAATTCATACCTATCCA
CATCAGATATCAAAACCCATGTTACCTCCAGACTATCCATACCCTCATGGATATCCGAGCA
AATCTGGCAGACTTTAAAAAGATACACAAAAAGCTTACCCATGCCATCGGTCSTTTATCGT
CAATACAGATATGATCATCTCTGTCAACAAGACCAATTATGAAGCTACCTTAATTAATGGTC
AAGTCTACCAGTATCCCGTATGAAGATAGGAAAGATTGCACAGATTGTTGAGGAAAGAGGC
AGATGATGTTAACAACGTTATGGCTACTTTTTCTCACCCSTTTAAGTGCAGGCCTAGAAATT
ATTCTTTTTCCSTTTATTTAATGGGACAGAAGATTCGTCTGAGGTATTTTTCTTACTCCTTAT
TTTTAATTTAGCSTTTAATTTTATTTATAACCACCTTCTTGGTTTTATCATTAATTCCTGGG
GTGAGGATATCTACTATCTTCTGCTCTCCTTCCSTTTTATCCACTAAGACTAAAAACCATTA
AAAAATAAGATTTTCAATGGTCTCTTCCCTGATATCCCAACACCTTAGTTTAAGACTGAT
TACTTTTTTTATCTTTCCSTTTTTTTAATATTAGTATCACCGATTATAAAAGCTCTCTATTA
TATCCATCCCTTCATCTATCGCACCTTTTGTCTATCATTTCTCTTTATTAATTAATTCAG
GAGATTTTTACCATACTTCAA

28. **PCRHR, Κλώνος HRA13, Πείραμα M24b**

Θέση 7760-8675 bp

GAGGATATCTACTATCTTCTGCTCTCCTTCCSTTTTATCCACTAAGACTAAAAACCATTA
AATAAAGATTTTCAATGGTCTCTTCCCTGATATCCCAACACCTTAGTTTAAGACTGATTA
CTTTTTTTATCTTTCCSTTTTTTTAATATTAGTATCACCGATTATAAAAGCTCTCTATTAATA
TCCATCCCTTCATCTATCGCACCTCTTTGTCTATCATTTCTCTTTATTAATTAATTCAGGA
GAGTTTTACCATACTTCAAAGCAGAAATCAAATTCCTCCGATTCAACATATTAATTAAGTTG
CTAACTTTTTTATGTTTTGGGTACACCCTACTGTTACAGTCCCTCATGTATCTTGAAAACACT
ACTCACTCTTCAACTTTGGAGCTTCGAAAACCTCTGTGTTGTTATTTCACTTGTCTCTTCTT
CATTAATGATTGTCTTTTTAGAAAAGAAACATTCGTGAAATGATTCAAGGACAATTGGACTTCC
AGAAAAATCTCCAGCTAGAGAATCTCTACACCTACAATAAACATATTGAATGTCTCTACAAT
TCTGTTTCGTAGTTTTAGACACGATTATAGTAATCTCTTAGTCCATTACGATTGGGGATAGA
TAAAGACGATATGGATATTGTCAAAGAAGTCTATGATAGTGTGCTTCAAGAATCCGATAAAC
GATTAATACAAGAACTTTGACTTAGCTAGACTCGTTAATATTCAAGGATAATACTTTGAAA
AGCCTTCTGTCCGCAAAGTTTTACAAGCAGAAGAAGAAGGTATTGAAGCTCAGATTAGCAT
CCCAGAACCCATCCACTTGATTGGGATGGAGATTCTGGACTTCATTATCGTCACTTCTATTT
TTTTAGATAACGCTATTGAAGGTGCCATTCAAACCTCAAACCATAAAA

29. **PCRCHR, Κλώνος CHR11.2, Πείραμα O09**

Θέση 8022-8631 bp

TTCAAAGCAGAAATCAAATTCCTCCGATTCAACATATTAATTAATAGTTGCTAACTTTTTTATG
TTTTGGGTACACCCTACTGTTACAGTCCCTCATGTATCTTGAAAACACTACTCACTCTTCAAC
TTTTGGAGCTTCGAAAACCTCTGTGTTGTTATTTCACTTGTCCCTCTTCTTCAATTAATGATTGTCT
TTTTAGAAAAGAAACATTCGTGAAATGATTCAAGGACAATTGGACTTCCAGAAAAATCTCCAG
CTAGAGAATCTCTACACCTACAATAAACATATTGAATGTCTCTACAATTCGTTCGTAGTTT
TAGACACGATTATAGTAATCTCTTAGTCCATACGATTGGGGATAGATAAAGACGATATGG
ATATTGTCAAAGAAGTCTATGATAGTGTGCTTCAAGAATCCGATAAACGATTAAATACAAGA
AACTTTGACTTAGCTAGACTCGTTAATATTCAAGGATAATACTTTGAAAAGCCTTCTGTCCGC
AAAAGTTTTACAAGCAGAAGAAGAAGGTATTGAAGCTCAGATTAGCATCCCAGAACCCATCC
ACTTGATTGGGATGGAGATTCTGGACTTCATTATCGTCACTTCTATTTTTTTT

30. **PCRCHR, Κλώνος CHR11, Πείραμα E04**

Θέση 8457-9097 bp

ACTTTGACTTAGCTAGACTCGTTAAATATTCAGGATAATACTTTGAAAAGCCTTCTGTCCGCA
AAAGTTTTACAAGCAGAAGAAGAAGGTATTGAAGCTCAGATTAGCATCCCAGAACCCATCCA
CTTGATTGGGATGGAGATTCTGGACTTCATTATCGTCACTTCTATTTTTTTTAGATAACGCTA
TTGAAGGTGCCATTCAAACCTCAAAAACCATAAAAATTACTATTAGCTTTTGGGAAGATCATCGT
TCACAGCTATTATCTATTAGCAATACCATAAGTGAAGAACAAACAGAACTAAAACCATATT
TGAAAGAGGTGTCTCCAACAAGGGACGAGAGCGAGGCATTGGCCTTGCTAATGTCACAGAAA
TCTTAGATAACTATATCAATGTAAACTTAGAAAACACAGAGTAACAATTTCTCATTCACACAA
CAATTAACAATAACTAAAAAGGCCTAACAGCCTTTTTTCTATACCTAAACTTGAGGAATGTT
ATAGTCTTTTTGTTGGAAGCGTTCTTTGCCCTCCGAATCCTTTTAGGAAACCATTTATATAAT
CCATCCACCCACTTCCACCTACGACTTGTTC AAGAGCGTGGTTATCAAGTGTTC AAAGTTA
TTAATCGTATTGTTAGCCATC

31. **PCRCHR, Κλώνος CHR11, Πείραμα I18**

Θέση 8645-9218 bp

GAAGGTGCCATTCAAACCTCAAAAACCATAAAAATTACTATTAGCTTTTGGGAAGATCATCGTTC
ACAGCTATTATCTATTAGCAATACCATAAGTGAAGAACAAACAGAACTAAAACCATATTTG
AAAGAGGTGTCTCCAACAAGGGACGAGAGCGAGGCATTGGCCTTGCTAATGTCACAGAAATC
TTAGATAACTATATCAATGTAAACTTAGAAAACACAGAGTAACAATTTCTCATTCACACAACA
ATTAACAATAACTAAAAAGGCCTAACAGCCTTTTTTCTATACCTAAACTTGAGGAATGTTAT
AGTCTTTTTGTTGGAAGCGTTCTTTGCCCTCCGAATCCTTTTAGGAAACCATTTATATAATCC
ATCCACCCACTTCCACCTACGACTTGTTC AAGAGCGTGGTTATCAAGTGTTC AAAGTTATT
AATCGTATTGTTAGCCATCAGTAATTCCTCCTATTTGGTCTTGCAAGTTTAGTAACCTTGTC
TTTTAAAGTAATTGAAGTAGGTCTTTTGGTCAATAACGCTTCTCACACGACCTTCTAGACCGT
AACGTAGATTTTGGGC

32. **PCRC, Κλώνος C1, Πείραμα M24**

Θέση 8806-9218 bp

TGGCCTTGCTAATGTCACAGAAATCTTAGATAACTATATCAATGTAAACTTAGAAAACACAGA
GTAACAATTTCTCATTCACACAACAATTAACAATAACTAAAAAGGCCTAACAGCCTTTTTTTC
TATACCTAAACTTGAGGAATGTTATAGTCTTTTGTGGAAGCGTCTTTGCCCTCCGAATCC
TTTTTAGGAAACCATTTATATAATCCATCCACCCACTTCCACCTACGACTTGTTC AAGAGCGT
GGTTATCAAGTGTTC AAAGTTATTAATCGTATTGTTAGCCATCAGTAATTCCTCCTATTT
GGTCTTGCAAGTTTAGTAACCTTGTCTTTAAAGTAATTGAAGTAGGTCTTTTGGTCAATAACG
CTTCTCACACGACCTTCTAGACCGTAACGTAGATTTTGGGC

33. **PCRC, Κλώνος C1, Πείραμα F03**

Θέση 8806-9218 bp

TGGCCTTGCTAATGTCACAGAAATCTTAGATAACTATATCAATGTAAACTTAGAAAACACAGA
GTAACAATTTCTCATTCACACAACAATTAACAATAACTAAAAAGGCCTAACAGCCTTTTTTTC
TATACCTAAACTTGAGGAATGTTATAGTCTTTTGTGGAAGCGTCTTTGCCCTCCGAATCC
TTTTTAGGAAACCATTTATATAATCCATCCACCCACTTCCACCTACGACTTGTTC AAGAGCGT
GGTTATCAAGTGTTC AAAGTTATTAATCGTATTGTTAGCCATCAGTAATTCCTCCTATTT
GGTCTTGCAAGTTTAGTAACCTTGTCTTTAAAGTAATTGAAGTAGGTCTTTTGGTCAATAACG
CTTCTCACACGACCTTCTAGACCGTAACGTAGATTTTGGGC

34. **PCRB, Κλώνος Β1, Πείραμα Α20**

Θέση 9011-9831 bp

TAATCCATCCACCCACTTCCACCTACGACTTGTTCAGAGCGTGGTTATCAAGTGTTTCAA
GTTATTAATCGTATTGTTAGCCATCAGTAATTCTCCTCCTATTGGTCTTGCAAGTTTAGTAA
CTTGTCTTTAAAGTAATTGAAGTAGGTCTTTTGGTCAATAACGCTTCTCACACGACCTTCTA
GACCGTAACGTAGATTTTGGGCTTCTTTTTCTGAAATACTTGCCCTAGCAGTACTCTAAAC
ACATTCCCCCTTCTGTTTTCCGTGGCAGAATTATCAATACTCTCAAGTTTTCCAATAATTGT
GGTACCGTGATTACCAACCTTATCCAAGGTCAGTCGAACTGACTGGCCTTTTTGCAGTTTTG
GCACATAATCCGAATTCACATAATAAGTAATGGCAACTTCTGGGTTTTGAGTCATATCGGGA
TAAAGCTGGGCCAACTCAGTTCCTGTGCGAGCCATGGTTGCTTTTTTATCAGCTTGACTCAA
GTGTAAGATTCCATCTTCTGGTGACTGGATGAGGGTATTAGTCAGAAGGACATCTGCCTGAT
TGATTTTACTCTCGGTATCGGTAATTTGTGTTTCCACTGAGCTCAATTGCTGTCTGCATTT
TGCAAGAATTGATTTTTTAGAGCTTCTTTTTTAGTGCTATCACTATTGTCATAAGTTACAAC
TGTGCCTGTCCCAGCATTTTGGATTTCTAGATTACCTATGGAAGCATTCAAGCTCGAAATAT
TGGTATTAACCTTGAGATAGGTATTGGTCTGTTACACTGGCATCCGGTGTCTGATGACTGATACTGA
CTGTTATAGGCATTT

35. **PCRB, Κλώνος Β6.1, Πείραμα Ι09**

Θέση 9215-10110 bp

GGGCTTCTTTTTCTGAAATACTTGCCCTAGCAGTACTCTAAACACATTCCCCCTTCTGTT
TCCGTGGCAGAATTATCAATACTCTCAAGTTTTCCAATAATTGTGGTACCGTGATTACCAAC
CTTATCCAAGGTCAGTCGAACTGACTGGCCTTTTTGCAGTTTTGGCACATAATCCGAATCA
CATAATAAGTAATGGCAACTTCTGGGTTTTGAGTCATATCGGGATAAAGCTGGGCCAACTCA
GTTCTGTGCGAGCCATGGTTGCTTTTTTATCAGCTTGACTCAAGTGTAAGATTCCATCTTC
TGGTGACTGGATGAGGGTATTAGTCAGAAGGACATCTGCCTGATTGATTTTACTCTCGGTAT
CGGTAATTTGTGTTTCCACTGAGCTCAATTGCTGTCTGCATTTTGCAAGAATTGATTTTTT
AGAGCTTCTTTTTTAGTGCTATCACTATTGTCATAAGTTACAAGTGTGCCTGTCCCAGCAT
TTGGATTTCTAGATTACCTATGGAAGCATTCAAGCTCGAAATATTGGTATTAACCTTGAGATA
GGTATTGGTCTGTTACACTGGCATCCGGTGTCTGATGACTGTTATAGGCATTTAAG
GTTGCCTGATGAGGATTGCCTTCAGGTAAAAGTCGTTTTCATGATTGGTAATAGCTTGAGAGAG
CGCCTCATACTCTGAGACCTGAGTCTGCAATTGACTAATCTGGTTATCAATAGCAGAACCGG
TATTACTCGCAATTGCTGCTTGGTTATTAACCTCTGTATTTGTTTTAGCCACACCCAAGTCA
ATATCCTGTGCCTGACTTAGGTAGGTGTTAAAAGTACTCTGATAACCAAACCTCGTCTTCTG
TTCTTGGAAAAGATTGGTTCCCTGCGTT

36. **PCRB, Κλώνος B1, Πείραμα O18**

Θέση 9709-10472 bp

TTTTGGATTTCTAGATTACCTATGGAAGCATTCAAGCTCGAAATATTGGTATTAACCTTGAGA
TAGGTATTGGTCTGTTACACTGGCATCCGGTGTCTGATGACTGTTATAGGCATTTA
AGGTTGCCTGATGAGGATTGCCTTCAGGTAAAGTCGTTTCATGATTGGTAATAGCTTGAGAG
AGCGCCTCATACTCTGAGACCTGAGTCTGCAATTGACTAATCTGGTTATCAATAGCAGAACC
GGTATTACTCGCAATTGCTGCTTGGTTATTAACCTCTGTATTTGTTTTAGCCACACCCAAAGT
CAATATCCTGTGCCTGACTTAGGTAGGTGTTAAAAAGTACTCTGATAACCAAACCTCGTCTTCC
TGTTCTTGGAAAAGATTGGTTCCCTGCGTTAGGCTAGATTGCAAGGTCTTCAAACCTGATTC
CTGTCTTTTTTAAAGTTCTAGTTGCTTTTTGAAGCCCCTCTTTTTGCGATGCCTCCATGGTCT
CTGAATACTGAACTAAGGTGTCCCTTTTTTAAACAACCTTATTAGCAACCAGTTGATTATCT
ATGATGGTATTGTCACTGGTTGATTGATTACTGCGATAACCTTGGTTGGCTCTATACTTCC
TCTAGACGTGACTGTAACCTTCTTCTAGCAAAAAAGCGAAAAGAAAAGGAAAATAACTA
ACAAAATCAAGGGAGTAATCAAAAACAGTAGACATATTGTGGTAGCGACGATGGTAAAACCTCT
GTGCTTTTTAAACAACCTGTGG

37. **PCRA, Κλώνος A3, Πείραμα M18b**

Θέση 10103-10893 bp

CCTGCGTTAGGCTAGATTGCAAGGTCTTCAAACCTGATTCCTGTCTTTTTTAAAGTTCTAGT
TGCTTTTTGAAGCCCCTCTTTTTGCGATGCCTCCATGGTCTCTGAATACTGAACTAAGGTGTC
CCCTTTTTTAAACAACCTTATTAGCAACCAGTTGATTATCTATGATGGTATTGTCACCTGGTTG
ATTGGATTACTGCGATAACCTTGGTTGGCTCTATACTTCCCTCTAGACGTGACTGTAACCTCC
TTCTTAGCAAAAAAGCGAAAAGAAAAGGAAAATAACTAACAAAATCAAGGGAGTAATCAA
AACAGTAGACATATTGTGGTAGCGACGATGGTAAAACCTCTGTGCTTTTTAAACAACCTGTGGAT
TCATCGTGTTCCTTTTCCCTCACTTTCTAAATAATTGATAATAGAAACCTGGATAAGACATC
AGGTCTTGATGAGAACCTGTCTCCACTACGCGTCCCTGATCAATGACTACGATACGGTCCGGT
CCGCTCAGCGATACTAAGCCTGTGTGCTACAAAGATGATCGTTTTATCTTTTAGTGCTAGGA
GGTTATCAATAACCTGCTTTTCTGTCAAAGCATCCAATCCGCTAGTTGCTTCATCTAAGATT
AGTACAGGAGATTTCTGTTAGTAGTGCACGCGCCAAAGCGATACGTTGCTTTTGCCCTCCAGA
CAGACCTGCTCCATCAGACAGCTCTGTCTGAAACCCCATAGGCATGTTTTCAATATCTTGAC
GAATTTCTGCTATTTTACAAGCTTTCAAATATCAGCTTGCGTAATA

38. **PCRA, Κλώνος A3.1, Πείραμα E09**

Θέση 10468-11247 bp

TGTGGATTCATCGTGTTCCTTTTCCCTCACTTTCTAAATAATTGATAATAGAAACCTGGATA
AGACATCAGGTCTTGATGAGAACCTGTCTCCACTACGCGTCCCTGATCAATGACTACGATAC
GGTCGGTCCGCTCAGCGATACTAAGCCTGTGTGCTACAAAGATGATCGTTTTATCTTTTAGT
GCTAGGAGTTATCAATAACCTGCTTTTCTGTCAAAGCATCCAATCCGCTAGTTGCTTTCATC
TAAGATTAGTACAGGAGATTTCTGTTAGTAGTGCACGCGCCAAAGCGATACGTTGCTTTTGCC
CTCCAGACAGACCTGCTCCATCAGACAGCTCTGTCTGAAACCCCATAGGCATGTTTTCAATA
TCTTGACGAATTTCTGCTATTTTACAAGCTTTCAAATATCAGCTTGCGTAATACCCCGTGC
TGCACCTAAAGTAAGATTTTCTAAAACACTACCCTAAATATATAGGATTGCTGAGGGAGAT
AGTTAATATGTTGACGAAGAGTTTTCTTGTCTATGCGACTAATATTTTGACCATTAAAATCT
ATGTGCCCTTATATGGTTGATAAAAAATTGACCAACATTTTAGCTAGAGTAGTCTTACCAGA
TCCACTGACACCAACAAAACCTGATTTTTTCTCCTTGTCTAATCGTCAAACCTGACATCAGTCA
AAGTATCACGACCAAAACCATATTTATAAGATAAATCCGTAACAGTGATATCTCCATCCGCA
ATGCCTTCTTGATAGGTATCATCACTTTGTCCAAAC

39. **PCRAA, Κλώνος AA1, Πείραμα M08**

Θέση 10667-11602 bp

ATAACCTGCTTTTCTGTCAAAGCATCCAATCCGCTAGTTGCTTCATCTAAGATTAGTACAGG
AGATTTTCGTTAGTAGTGCACGCGCCAAAGCGATACGTTGCTTTTGCCCTCCAGACAGACCTG
CTCCATCAGACAGCTCTGTCTGAAACCCCATAGGCATGTTTTCAATATCTTGACGAATTTCT
GCTATTTTACAAGCTTTTCAAAAATATCAGCTTGCCTAATACCCCGTGCTGCACCTAAAGTAAG
ATTTTCTAAAACACTACCACTAAATATATAGGATTGCTGAGGGAGATAGTTAATATGTTGAC
GAAGAGTTTTCTTGTCTATGCGACTAATATTTTGACCATTAAAATCTATGTGCCCTTATAT
GGTTGATAAAAAATTGACCAACATTTTAGCTAGAGTAGTCTTACCAGATCCACTGACACCAAC
AAAACCTGATTTTTTCTCCTTGTCTAATCGTCAAACCTGACATCAGTCAAAGTATCACGACCAA
AACCATATTTATAAGATAAATCCGTAACAGTGATATCTCCATCCGCAATGCCTTCTTGATAG
GTATCATCACTTTGTCCAAACTCTGATTCAATCAGATAGACCTCATTGAGCCTAGTATTAGC
TACCTTAGCAGACTGTAACCTTGGTTTGCAGGTTAATGATATTTTCCAAAGGATTCGTGAAGT
AGGAAAGCAACATATTTAAAAGTAATCAATTGTCTATCGAAATGGTATTTCCCATCACCAAC
TGAGCACCTGTCCAGAGGATAAGTACATTTAAAATAAGTTGAGCACCTTGTTCATGATGT
TTGTAGTATAGATAACTTAGAAAGGCGAAAAGAATTGTCTAGATAGTCAACAAACTCACCAT
CAATCTTTTGATAGCATACTTCTTCGCTGGTTAGTGACTTTATGGTTTTCAATCCCATTAATG
TCCT

40. **PCRAA, Κλώνος AA1, Πείραμα K08**

Θέση 10909-11811 bp

AAAGTAAGATTTTCTAAAACACTACCACTAAATATATAGGATTGCTGAGGGAGATAGTTAAT
ATGTTGACGAAGAGTTTTCTTGTCTATGCGACTAATATTTTGACCATTAAAATCTATGTGCC
CCTTATATGGTTGATAAAAAATTGACCAACATTTTAGCTAGAGTAGTCTTACCAGATCCACTG
ACACCAACAAAACCTGATTTTTTCTCCTTGTCTAATCGTCAAACCTGACATCAGTCAAAGTATC
ACGACCAAAAACCATATTTATAAGATAAATCCGTAACAGTGATATCTCCATCCGCAATGCCTT
CTTGATAGGTATCATCACTTTGTCCAAACTCTGATTCAATCAGATAGACCTCATTGAGCCTA
GTATTAGCTACCTTAGCAGACTGTAACCTTGGTTTGCAGGTTAATGATATTTTCCAAAGGATT
CGTGAAGTAGGAAAGCAACATATTTAAAAGTAATCAATTGTCTATCGAAATGGTATTTCCCA
TCACCAACTGAGCACCTGTCCAGAGGATAAGTACATTTAAAATAAGTTGAGCACCTTGTTC
AATGATGTTTTGTAGTATAGATAAATAGAAAGGCGAAAAGAATTGTCTAGATAGTCAACAAA
CTCACCATCAATCTTTTGATAGCATACTTCTTCGCTGGTTAGTGACTTTATGGTTTTCAATCC
CATTAATGTCCTCAATGATGGCTGAATTAACCATAGCATTACTCTGCATGACGTCATGATTC
ATTCGCTCAAAAAGTTTTCATAAAGGCAAAGACGATAAGGGTATAAATTGGAACCGAACAAAG
AACTAGCTTGAAGAGATTGCTATTTTGTATCAATAACACGCCTCCTACGATAATCACAAATAG
AGAAATCAAGGAAAAGTGATAATATCGTCAAGCC

41. **PCRA, Κλώνος A3.2, Πείραμα G09**

Θέση 11598-12311 bp

GTCCTCAATGATGGCTGAATTAACCATAGCATTACTCTGCATGACGTCATGATTCATTCGCT
 CAAAAGGTTTCATAAAGGCAAAGACGATAAGGGTATAAATTGGAACCGAACAAAAGAACTAGC
 TTGAAGAGATTGCTATTTTGTATCAATAACACGCCTCCTACGATAATCACAATAGAGAAATC
 AAGGAAAAGTGATAATATCGTTCGAAGCCAGAGCATCGATAATAGAGTTAGCATCACTAAAAC
 GTGAGATAACCTCCCTGTACGTCTTGTGGCAAAAAAGACATTGGGAGTTCAAAGATATGT
 CGTATGTAGGACAAGATAACGTCAATGGTCAATCGCTGACTCAGTATGGTTAAGAGATAATC
 TCTTGCAAAAAGTCATCATTTGTTGTAAAACATAGGTCACAACCTAATCCAATTGAGATAATTC
 CTAAGGTAGACTTCATTTGATTAGGGACATATTCGTCTAGAATACCTTGTAAATAATAGGAA
 CCTAAAATATTTATTTAAAGTAACCAAGAGACTGGCAAAGACAATATTAGCTATCAAGGACCT
 TTGTTTAAAGATCAAAGGGAGAAAGTCCCAGAGTCCATTTTTCTTATCCTTATGTGGTTTAT
 AACTGGGTTCGGTCCCATAAAAAGAGTAACACCTGTCCACTCTTCTCAAAAACGCTCTTTA
 GTCATTTTAGTTACTTTTACACTTGGATCAGG

42. **PCRA, Κλώνος A3, Πείραμα K18b**

Θέση 11775-12648 bp

AGAGAAAATCAAGGAAAAGTGATAATATCGTTCGAAGCCAGAGCATCGATAATAGAGTTAGCAT
 CACTAAAACGTGAGATAACCTCCCTGTACGTCTTGTGGCAAAAAAGACATTGGGAGTTCA
 AAGATATGTCGTATGTAGGACAAGATAACGTCAATGGTCAATCGCTGACTCAGTATGGTTAA
 GAGATAATCTCTTGCAAAAGTCATCATTTGTTGTAAAACATAGGTCACAACCTAATCCAATTG
 AGATAATTCCTAAGGTAGACTTCATTTGATTAGGGACATATTCGTCTAGAATACCTTGTAAA
 TAATAGGAACCTAAAATATTTATTTAAAGTAACCAAGAGACTGGCAAAGACAATATTAGCTAT
 CAAGGACCTTTGTTTAAAGATCAAAGGGAGAAAGTCCCAGAGTCCATTTTTCTTATCCTTAT
 GTGGTTTATAACTGGGTTCGGTCCCATAAAAAGAGTAACACCTGTCCACTCTTCTCAAAA
 CGCTCTTTAGTCATTTTAGTTACTTTTACACTTGGATCAGGGTCTCCAATTATCAGATAATC
 CTTGGTGCTTTTATAAAATAACATAAATGTTGAAGCTTCCCATCTTTATTAACATGAGCAA
 TAAAAGGATAAGGAACATCTTCCATCTCAAAGAGCGACATTTTCAGCCTTTATAGCTCTCGTT
 TCAAAGCCAATTTTTTTAGCAGCCTCTACAAGACCTAAGGCAGTTGTCCCTTCTTTATTGGT
 CTTTCGCCAACTCACGCAGATGTGCTAATGAATAATCTGAACCATAGTACTTTGGCCACTGATG
 CCAAGGCAGCAACTCCACAATCCCTCATGTCTATTTGAGGGACAAAAGTCCTACGAAAACGA
 AAC

43. **PCR0A, Κλώνος 0A1, Πείραμα I24**

Θέση 12172-13092 bp

GGGAGAAAAGTCCCAGAGTCCATTTTTCTTATCCTTATGTGGTTTATAACTGGGTTCGGTCC
 CATAAAAAGAGTAACACCTGTCCACTCTTCTCAAAAACGCTCTTTAGTCATTTTAGTTACTT
 TTACACTTGGATCAGGGTCTCCAATTATCAGATAATCCTTGGTGCTTTTATAAATAACATAA
 TAATGTTGAAGCTTCCCATCTTTATTAACATGAGCAATAAAAAGGATAAGGAACATCTTCCAT
 CTCAAAGAGCGACATTTTCAGCCTTTATAGCTCTCGTTTCAAAGCCAATTTTTTTAGCAGCCT
 CTACAAGACCTAAGGCAGTTGTCCCTTCTTTATTGGTCTTTCGCCAECTCACGCAGATGTGCT
 AATGAATAATCTGAACCATAGTACTTGGCCACTGATGCCAAGGCAGCAACTCCACAATCCCT
 CATGTCTATTTGAGGGACAAAAGTCTTACGAAAACGAAACATAACCAACCCTTTCATCACAA
 ATTATCATATGATTAGTATGTCATATTTTCAGGATAAAAAGAGCCAGCGTCCCAAAAGTTG
 CCATACGTCCCAAACGGTAAGAAAAATCTTAAAGTCATCTCCACTATTACCATTAAAGCCGT
 ATTTGGGGTCATTTTAGGACAAGTTCAATTGAAATCGATTTCAAAGTTATACAATAGTTATTAG
 AAGGAAAACATTTCTAAAATAGTCTTACAAGCATAACGATTTTGATCTAACCATTATTAAGTGC
 CAGCCCTGGTATTTCCAAAGGAAACCATGACTGCTGATAGCCTCGGAGCCTATCTCTATCGT
 ATGATGTCATAATTTGATTATTTTTATTTCCGAAAAGGGATAACATTTATGAAAAACGTCAATC
 CATATCTCAAAAATCCTATCAAAAAGGCTAAATCAGCCTCTTGAGATTCTGA

44. **PCR0A, Κλώνος 0A1, Πείραμα K24**

Θέση 12418-13092 bp

ATCTCAAAGAGCGACATTTTCAGCCTTTATAGCTCTCGTTTCAAAGCCAATTTTTTTTAGCAGC
CTCTACAAGACCTAAGGCAGTTGTCCCTTCTTTATTGGTCTTCGCCAACTCACGCAGATGTG
CTAATGAATAATCTGAACCATAGTACTTGGCCACTGATGCCAAGGCAGCAACTCCACAATCC
CTCATGTCTATTTGAGGGACAAAAGTCCTACGAAAACGAAACATACCAAACCCTTTCATCAC
AAATTATCATATGATTAGTATGTCATATTTTCAGGATAAAAAGAGCCAGCGTCCCAAAAAGT
TGCCATACGTCCCAAACGGTAAGAAAAATCTTAAAGTCATCTCCACTATTACCATTTAAGCC
GTATTTGGGGTCATTTAGGACAAGTTCATTGAAATCGATTTCAAAGTTATACAATAGTTATT
AGAAGGAAACATTCATAAATAGTCCTACAAGCATACGTATTTGATCTAACCATTTACTGT
GCCAGCCCTGGTATTTCCAAAGGAAACCATGACTGCTGATAGCCTCGGAGCCTATCTCTATC
GTATGATGTCATAATTTGATTATTTTTATTCCGAAAAGGGATAACATTATGAAAAACGTCAA
TCCATATCTCAAAAAATCCTATCAAAAAAGGCTAAATCAGCCTCTTGAGATTCTGA

Παράρτημα 2

Παρακάτω παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των πειραμάτων εύρεσης αλληλουχίας κάθε κλώνου που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση της αλληλουχίας του φυσικού πλασμιδίου του *S. thermophilus* ACA-DC 0040 pST0040

1. Ένθεση από κλώνο τμήματος περιορισμού με *XbaI*

Θέση 29-1026 bp

CTAGAAAATCAGCGAAAGGTTACTTGTGACAAAGAGGAAATGGAAATAAAAAAGCGATAAGT
TTGATGGTGAATTTTACTGAAAAGAAAAGAGGGTTGAAAGCCCAAAAAAGCAGGCTTTTG
CCTGCTTTCTTCTTATCTTGATACTATTAGAAAATAATTCACGGGGATTTTTTTAGCCCCGT
AGGGTCTAAAACCCCTTGTCACTACTGGTTTTTTGGGCAAAAAAATCCGTTTCATTTCT
GAAAGGTTTTCGTGTATAAATTTATGTGTGCGAAGGGGAAAAATATAACATTCATGAAAGGA
GAAATACGGATTTTTTTGCATCGCAAATTAATTTGTATACATAGTATAGCATGACGGATTT
TAAAAACAAGGGGAAATCTTGTGCGATAAGAACAGTCGAGGAAAAGAACGAGACTGGCGA
GGACGAAAAATATTAAGTTTGAATTAGCTGATATTTTTAAAGAATTCAGTACAAGAAGA
CTTTTGTGAAAGAGTAATATCGTGTGGTGATACTTTACAATTTATTCAAAATCAAGACGG
TAACCTAAAGCTCTATCAAGCCTATTTTTGTAAAAACAAGCTATGTCCTATGTGCAACTGG
AGACGTTCAATGAAATATCTTATCAGACATCAAGAATCGTTGATGAGGCAATAAAACAAA
GCCCTAAAGGACGCTTTCTCTTTCTAACATTTGACTGTTAAGAACGTCGAGGGGCAAGCATT
GAATAGCACGATTAGTCAGCTCACAAAATCATTTGACCGTTTATTTAAGCGTGCTAAAGTT
CAAAGGAATCTGTTGGGATATTTGCGTTTCAGTTGAAGTGACCCACAATGAAAATGACAAGA
CATATCACCCCTCATATTCATGTTTTGATGATGGTGAGACCTAGTTATTTTCAGTCAAAAAA
AGATTATATCACTCAAAAAGAGTGGAGCGATATGTGGTCTCAATCATTGAAAGTTGATTAT
GTCCCTATGATCGACATTCGAA

2. Ένθεση από κλώνο τμήματος περιορισμού με *EcoRV* και ανάγνωση με κατά παραγγελία εκκινητή

Θέση 274-1270 bp

AAAGTTTTCGTGTATAAATTTATGTGTGCGAAGGGGAAAAATATAACATTCATGAAAGGAG
AAATACGGATTTTTTTGCATCGCAAATTAATTTGTATACATAGTATAGCATGACGGATTTT
AAAAACAAGGGGAAATCTTGTGCGATAAGAACAGTCGAGGAAAAGAACGAGACTGGCGAG
GACGAAAAATATTAAGTTTGAATTAGCTGATATTTTTAAAGAATTCAGTACAAGAAGAC
TTTTGTTGAAAGAGTAATATCGTGTGGTGATACTTTACAATTTATTCAAAATCAAGACGGT
AACCTAAAGCTCTATCAAGCCTATTTTTGTAAAAACAAGCTATGTCCTATGTGCAACTGGA
GACGTTCAATGAAATATCTTATCAGACATCAAGAATCGTTGATGAGGCAATAAAACAAAAG
CCCTAAAGGACGCTTTCTCTTTCTAACATTTGACTGTTAAGAACGTCGAGGGGCAAGCATTG
AATAGCACGATTAGTCAGCTCACAAAATCATTTGACCGTTTATTTAAGCGTGCTAAAGTTC
AAAGGAATCTGTTGGGATATTTGCGTTTCAGTTGAAGTGACCCACAATGAAAATGACAAGAC
ATATCACCCCTCATATTCATGTTTTGATGATGGTGAGACCTAGTTATTTTCAGTCAAAAAA
GATTATATCACTCAAAAAGAGTGGAGCGATATGTGGTCTCAATCATTGAAAGTTGATTATG
TCCCTATGATCGACATTCGAACAGTAAAAGAGACTGGCAAAGGACTGCGAGGGGCGATTTT
AGAGACCGCAAAAATATCCAACCTAAGCCGATTAAGCTTGATATTGAAAATAAGCAAGTTGTT
GATGATCTATACAACGGTTTTGTATCGAAAAAGACAACCTTGGCTACGGTGGTTTTATTTAAA
CCATCAAAAACAACCTAGCACTAGATGACGCCGAAAATGGTGACTTGGTACATACGTCTGA
GGATAAAGAAAACATATCAAA

3. Ένθεση από κλώνο τμήματος περιορισμού με *HindIII*

Θέση 1121-1888 bp

AGTTGTTGATGATCTATACAACGGTTTGTATCGAAAAAGACAACCTTGGCTACGGTGGTTTA
TTTAAAACCATCAAAAAACAACCTAGCACTAGATGACGCCGAAAATGGTGACTTGGTACATA
CGTCTGAGGATAAAGAAAAACATATCAAAGGGTACAGAAATAGTCGCTATATGGAACGCTAG
CAAGCAAAATTTATTTTGA AAAAATAAAAATAAAGCTCCTCGAAAGAGGGGCTTTTTAGTA
TCAGAAGAAGAGAATAAAAAGCTATCTTCTGCTACTGTTGATAAAATCTGATTTCAATATCT
GAGTATTTACTAGCGATAAAAAATATGCTGATACCATCACATGAAAAATAATTTTACAATT
TTTAAAGAGCATAATACTTGA AAACTGACTTTTTTCGGACTATAATAATCATCGAAAAGAGA
ATATAGAAAAGAAGTGACTATTATGCTAAAATAAGATTCAACATCGTAACTTAAACACATATA
GTGTGACACCTTTTTGATTTTTTTGAAGAATTTAGTCGTAATTTATTCAATGATTTTAAGCC
AAATTTTCATCAAAACAGATATTCATGAAACTGATAATGAATATCTTGTAGAAGCTGAACTC
CCTGGTATCCCTAAAGAAAACATTCAGTTACTTACGAAAACGGAGTATTAACAATTAGTG
GCCAACAACAAATTTGATGCAGTAAACGAAGATAAAAAAGGAAAGTTGATTCGTAGCGAACG
TAGTTTTAACAAAGTGTCCAACGTCAATATTTATTAGA

4. Ένθεση από κλώνο τμήματος περιορισμού με *EcoRV*

Θέση 1129-2101 bp

ATGATCTATACAACGGTTTGTATCGAAAAAGACAACCTTGGCTACGGTGGTTTATTTAAAAC
CATCAAAAAACAACCTAGCACTAGATGACGCCGAAAATGGTGACTTGGTACATACGTCTGAG
GATAAAGAAAACATATCAAAGGGTACAGAAATAGTCGCTATATGGAACGCTAGCAAGCAA
ATTTATTTTGA AAAAATAAAAATAAAGCTCCTCGAAAGAGGGGCTTTTTAGTATCAGAAGA
AGAGAATAAAAAGCTATCTTCTGCTACTGTTGATAAAATCTGATTTCAATATCTGAGTATTT
ACTAGCGATAAAAAATATGCTGATACCATCACATGAAAAATAATTTTACAATTTTTTAAAGA
GCATAATACTTGA AAACTGACTTTTTTCGGACTATAATAATCATCGAAAAGAGAATATAGAA
AGAAGTGACTATTATGCTAAAATAAGATTCAACATCGTAACTTAAACACATATAGTGTGACA
CCTTTTTGATTTTTTTGAAGAATTTAGTCGTAATTTATTCAATGATTTTAAGCCAAATTTCA
TCAAAACAGATATTCATGAAACTGATAATGAATATCTTGTAGAAGCTGAACTCCCTGGTAT
CCCTAAAGAAAACATTCAGTTACTTACGAAAACGGAGTATTAACAATTAGTGGCCAACAA
CAAATTTGATGCAGTAAACGAAGATAAAAAAGGAAAGTTGATTCGTAGCGAACGTAGTTTAA
CAAGTGTCCAACGTCAATATTTATTAGAAAATGTTAAAGAAGACGAAAATAAAGGCTTCTTA
TTCAGATGGAGTTCTTAAAGTAACCTTGCCAAAAGATAGTAACAAAGAAATAAAAAATCT
ATTTCAATTTGAGTAGTAATTA AAAAATACGAAAAAAGGCGTCTATAAAATTTTATAGGCG
CCTTTTTTTCGTAAAATAAATTTATTTTTCTTTCTCCATTCATCTAAATCAGAT

5. **Ένθεση από κλώνο τμήματος περιορισμού με *XbaI***

Θέση 1830-28 bp

GGAAAGTTGATTCGTAGCGAACGTAGTTTAAACAAGTGTCCAACGTCAATATTTATTAGAAA
 ATGTTAAAGAAGACGAAATAAAGGCTTCTTATTCAGATGGAGTTCTTAAAGTAACCTTGCC
 AAAAGATAGTAACAAAGAAATAAAAAAATCTATTTCAATTGAGTAGTAATTA AAAAATTAC
 GAAAAAAGGCGTCTATAAAATTTTATAGGCGCCTTTTTTTTCGTAAAAATAAATATTTTTT
 CTTTCTCCATTCACTATCTAAATCAGATATCATAAGTTAGGATTTTGCCCTCTTTTTGAAG
 AATTTCTTTGTATTTCCAGAGCCTTCTAAATTCGTGTGACATCACAGATTCTTTTGGTTTCA
 TAAATGACACACCCTATAAAAACTTGAAAAATTGGCATGCGATACAAGAAAATACCTTG
 TCGTGGCTCTCCTAAAGCCCATAATAGGGGCGGGGTTCGTTTTTAAACTGGTCTAGGTGAA
 AATATACTGCCCTTATATAAAATCGTGCTACGGGCGTTTTAGAGGGGTTAACGACTTAT
 CTATTTTAGTTTCGTCCAACCTGTTGAATAATTGGGGTGTTTTATAAGACCAACATTTTCCAA
 CAATTAGGGGTTTTATATAAGTTTTTTTTTCAGCAATTA AAAAAGCGCTAGTAATATCTAAGC
 GCTTGAATTTTTTGTGAATGAATTAGTCATATCTTGTTTTTCTAGTACACGTTAATACT
 TACAAAAGTACCGTACC AAAAATAAACGTTGTCATATCAAGGGTTTACACAGTTTTGTTTT
 ACTACATATTTTTTGTTTTTCTCGAAGTTTTCTTTTTTGATTTGCTTTTTGATTTGCCATTA
 TTGTCTCGTTTTCACCTCACCATTAAGAGCGATTTATGCCGAGAAAACCTTGTTCAGTAAGC
 TGAGCGATTTAGACTGAGAGTGTCTGAGTCGCAAGACTGAAAGCTTGCGATAAGGACACGA
 AGT

6. **Ένθεση από κλώνο τμήματος περιορισμού με *HindIII***

Θέση 1889-5 bp

AAATGTTAAAGAAGACGAAATAAAGGCTTCTTATTCAGATGGAGTTCTTAAAGTAACCTTG
 CCAAAAAGATAGTAACAAAGAAATAAAAAAATCTATTTCAATTGAGTAGTAATTA AAAAATT
 ACGAAAAAAGGCGTCTATAAAATTTTATAGGCGCCTTTTTTTTCGTAAAAATAAATATTTTT
 TTCTTTCTCCATTCACTATCTAAATCAGATATCATAAGTTAGGATTTTGCCCTCTTTTTGA
 AGAATTTCTTTGTATTTCCAGAGCCTTCTAAATTCGTGTGACATCACAGATTCTTTTTGGTTC
 ATCTAAATGACACACCCTATAAAAACTTGAAAAATTGGCATGCGATACAAGAAAATACCT
 TGTCGTGGCTCTCCTAAAGCCCATAATAGGGGCGGGGTTCGTTTTTAAACTGGTCTAGGTG
 AAAATATACTGCCCTTATATAAAATCGTGCTACGGGCGTTTTAGAGGGGTTAACGACTT
 ATCTATTTTAGTTTCGTCCAACCTGTTGAATAATTGGGGTGTTTTATAAGACCAACATTTTCC
 AACAAATTAGGGGTTTTATATAAGTTTTTTTTTCAGCAATTA AAAAAGCGCTAGTAATATCTAA
 GCGCTTGAATTTTTTGTGAATGAATTAGTCATATCTTGTTTTTCTAGTACACGTTAATAACA
 CTTACAAAAGTACCGTACC AAAAATAAACGTTGTCATATCAAGGGTTTACACAGTTTTGTT
 TTA CTACATATTTTTTGTTTTTCTCGAAGTTTTCTTTTTTGATTTGCTTTTTGATTTGCCAT
 TATTGTCTCGTTTTCACCTCACCATTAAGAGCGATTTATGCCGAGAAAACCTTGTTCAGTAA
 GCTGAGCGATTTAGACTGAGAGTGTCTGAGTCGCAAGACTGAA

7. Ένθεση από κλώνο τμήματος περιορισμού με *EcoRV*

Θέση 2102-311 bp

ATCATAAGTTAGGATTTTGCCTTCTTTTTGAAGAATTTCTTTGTATTTCCAGAGCCTTCTA
AATTCTGTGACATCACAGATTCCTTTTGGTTCATCTAAATGACACACCCTATAAAAAA
AAAAATTGGCATGCGATACAAGAAAATACCTTGTCTGGCTCTCCTAAAGCCATAATAGG
GGCGGGGGTCTTTTTTAAACTGGTCTAGGTGAAAATATACTGCCCTTATATAAAATCGTG
CTACGGGCGTTTTAGAGGGGTTTAACGACTTATCTATTTTAGTTTCGTCCA
ACTGTTGAATAATTGGGGTGTTTTTATAAGACCAACATTTTCCAACAATTAGGGGTTTTATATAAGTTTTTTT
CAGCAATTA
AAAAAGCGCTAGTAATATCTAAGCGCTTGAATTTTTTGTGAATGAATTAGTC
ATATCTTGTTTTTCTAGTACACGTTAATACACTTACAAAAGTACCGTACCAAAAAATAACG
TTGT
CATATCAAGGGTTTACACAGTTTTGTTTTACTACATATTTTTTGTTTTTCTCGAAGT
TTTCTTTTTT
GATTTGCTTTT
GATTTGCCATTATTGTCTCGTTT
CACCTCACCATTAAGAGCGATTTATG
CCGAGAAA
ACTCTTGT
CAGTAAGCTGAGCGATTTAGACTGAGAGTGTCTGAGTCGCAAGACTGAAAGCTT
GCGATAAGGACACGAAGCTAGAAAATCAGCGAAAGGTTACTTGCTGACAAGAGGAAAT
TGAATA
AAAAAGCGATAAGTTT
GATGGTGAATTTTTACTGAAAAGAAAAGAGGGTTGAAAGCCAAAAAAGCAGGCTTTTGCCTGCTTTCTTCTTATCTTGATACT
ATTAGAAATAATTCACGGGGATTTTTTTAGCCCCGTAGGGTTCTAAAACCCTTGT
CATTACTGGTTTTTTTGGGCAAAAAAAATCCGTTTCA
TTTCTGAAAGGTTTTCGTGTTATAATTTTATGTGTCGAAGGGGAA