

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΖΕΥΚΤΙΚΗΣ
ΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ
ΦΥΣΙΚΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ PZA1003 ΤΟΥ
Zymomonas mobilis NCIMB 11163**

Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης

ΜΑΥΡΟΜΜΑΤΗ ΜΑΡΙΑ
Βιολόγος



Ιωάννινα, Δεκέμβριος 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΖΕΥΚΤΙΚΗΣ
ΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ
ΦΥΣΙΚΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ PZA1003 ΤΟΥ
Zymomonas mobilis NCIMB 11163**

Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης

ΜΑΥΡΟΜΜΑΤΗ ΜΑΡΙΑ
Βιολόγος



Ιωάννινα, Δεκέμβριος 2018

Ευχαριστίες

Μερικές γραμμές σε ένα λευκό χαρτί δεν επαρκούν για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που με βοήθησαν στην περάτωση του μεταπτυχιακού και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ξεκινήσω από τα μέλη της επιτροπής του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοτεχνολογία» που με δέχτηκαν και μου έδωσαν τη δυνατότητα να το παρακολουθήσω.

Θα συνεχίσω με τους συμφοιτητές μου, τους καλούς μου φίλους Πέτρο Τσαλαγράδα και Ειρήνη Λάππα και φυσικά και τους Βανέσα Παπασταύρου, Μαρία Κλημοπούλου και Γιώργο Ορφανάκη, που με την παρουσία τους και την παρέα τους έκαναν την παρακολούθηση των μαθημάτων του μεταπτυχιακού λίγο πιο ευχάριστη.

Έπειτα χρωστάω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κυρία Αμαλία Αφένδρα, που ήταν και είναι δίπλα μου μέχρι τελευταία στιγμή καθοδηγώντας με και λύνοντάς μου οποιαδήποτε απορία και δυσκολία.

Λίγο περισσότερο από τους υπόλοιπους θέλω να ευχαριστήσω τους Μάριο Μητσόπουλο, Βαγγέλη Σφήκα και Ευγενία Καραμπίκα, με τους οποίους συμπορεύτηκα στο εργαστήριο και στάθηκαν δίπλα μου όσο κανείς σαν σύμβουλοι, συνεργάτες και πολύ καλοί φίλοι και με ανέχτηκαν στις καλές και στις κακές μου στιγμές.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τον Παναγιώτη Μαγκλάρα καθώς και τον Μάνο Ξυλάκη που βρίσκονταν στο εργαστήριο όλο αυτό τον καιρό, αλλά και όποιον άλλο έχει περάσει από το εργαστήριο με τους οποίους έχουμε συνυπάρξει έστω και για λίγο.

Τέλος, επιθυμώ να ευχαριστήσω τα μέλη της πενταμελούς επιτροπής, τον κύριο Χατζηλουκά, την κυρία Κούκκου, τον κύριο Φριλίγγο και τον κύριο Τζαβάρα που μου κάνουν την τιμή να είναι παρόντες στην παρουσίαση της διατριβής μου.

Η καλύτερη χρονική στιγμή να φυτέψεις ένα δέντρο είναι 20 χρόνια πριν. Η επόμενη καλύτερη στιγμή είναι τώρα.

Κινέζικη παροιμία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ- ABSTRACT.....	1
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
2.1 Βακτηριακή σύζευξη.....	6
2.1.1 Συζευκτικά πλασμίδια.....	9
2.1.2 Το οπερόνιο <i>tra</i>	9
2.1.3 Το ριλαξόσωμα.....	11
2.1.4 Η ριλαξάση.....	12
2.1.5 Ένα πιθανό μοντέλο για τη μεταφορά του DNA κατά τη σύζευξη.....	14
2.2 Το βακτήριο <i>Zymomonas mobilis</i>	18
2.2.1 Ιστορική αναδρομή.....	18
2.2.2 Βιολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Zymomonas mobilis</i>	19
2.2.3 Σύγχρονη ταξινόμηση.....	20
2.2.4 <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> στέλεχος NCIMB 11163.....	20
2.2.5 <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> στέλεχος CP4.....	20
2.2.6 <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> στέλεχος NCIMB 10988.....	21
2.3 Παραγωγή αιθανόλης από το βακτήριο <i>Zymomonas mobilis</i> και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.....	22
2.3.1 Πλεονεκτήματα του <i>Zymomonas mobilis</i> σε σύγκριση με το ζυμομύκητα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.3.2 Το μεταβολικό μονοπάτι Entner–Doudoroff.....	22
2.3.3 Υποστρώματα για την παραγωγή αιθανόλης.....	25
2.3.4 Άλλα προϊόντα που παράγονται από το <i>Zymomonas mobilis</i>	27
2.3.5 Γενετικές τροποποιήσεις του <i>Zymomonas mobilis</i>	28
2.4 Η σύζευξη στο <i>Zymomonas mobilis</i>	30
2.4.1 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης που έχουν κατασκευαστεί για το <i>Z. mobilis</i>	30
2.4.2 Συζευκτικά στοιχεία στο <i>Z. mobilis</i>	32
2.4.3 Το πλασμίδιο pZA1003 του <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> NCIMB 11163.....	33
2.5 Σκοπός της εργασίας.....	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
3.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	36
3.2 Θρεπτικά υλικά.....	40

3.3 Αντιβιοτικά.....	40
3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	43
3.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E.coli</i>	43
3.4.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Z. mobilis</i>	43
3.5 Ηλεκτροφόρηση DNA.....	43
3.6 Κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA (cloning).....	47
3.7 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα.....	47
3.8 Απομόνωση ζωνών από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).....	49
3.9 Αντίδραση δεσμοποίησης (ligation).....	49
3.10 Μετασχηματισμός.....	50
3.10. 1 Μετασχηματισμός Chung and Miller σε κύτταρα <i>E. coli</i> (1988).....	51
3.10.2 Χημικός μετασχηματισμός σε κύτταρα <i>E. coli</i>	52
3.11 Επιλογή των αποικιών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.....	53
3.12 Αντιγραφική μεταφορά με βελούδο (Replica plating).....	55
3.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	56
3.14 Στύπωμα κατά Southern.....	58
3.15 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA- DNA.....	60
3.15.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA – DNA με χρήση συστήματος ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA.....	60
3.15.2 Ανοσολογικός εντοπισμός.....	61
3.16 Απομάκρυνση ζωνών από φίλτρο υβριδισμού (stripping).....	62
3.17 Απομόνωση RNA.....	63
3.18 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT- PCR).....	65
3.19 Βακτηριακή σύζευξη.....	66
3.19.1 Βακτηριακή σύζευξη με δότες και δέκτες κύτταρα <i>E. coli</i>	67
3.19.2 Βακτηριακή σύζευξη με δότες κύτταρα <i>E. coli</i> και δέκτες κύτταρα <i>Z. mobilis</i>	68
3.19.3 Βακτηριακή σύζευξη με δότες και δέκτες κύτταρα <i>Z. mobilis</i>	69
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
4.1 Μελέτη της ικανότητας κινητοποίησης του γονιδίου <i>mob</i> του πλασμιδίου pZA1003 μεταξύ στελεχών <i>Escherichia coli</i>	72
4.1.1 Σύζευξη μεταξύ SM10/pUCBM21Zmob και HMS174.....	73
4.2 Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης για το <i>Zymomonas mobilis</i> που θα περιέχει γονίδια για την κινητοποίηση και την αντιγραφή του.....	75

4.2.1	Πρώτη υποκλωνοποίηση από τμήμα του ανασυνδυασμένου πλασμίδιου pUCBM2,7: κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμίδιου pBluescript2,7.....	76
4.2.2	Δεύτερη υποκλωνοποίηση από τμήμα του ανασυνδυασμένου πλασμίδιου pUCBM21rep στο pBluescript2,7: κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμίδιου pblueZA1003.....	80
4.2.3	Τρίτη υποκλωνοποίηση με την ένθεση της περιοχής <i>rep^{mob}</i> του pZA1003 στον πλασμιδιακό φορέα pBR328: κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμίδιου pBRZArm...	85
4.3	Πειράματα υβριδισμού στυπώματος κατά Southern στα παραχθέντα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	91
4.3.1	Προετοιμασία τμημάτων DNA που θα σημανθούν για να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες (probes) σε πειράματα υβριδισμού.....	91
4.3.2	Υβριδισμός με τον ιχνηθέτη - τμήμα του γονιδίου <i>mob</i> στα pBluescript2,7 και pBlueZA1003.....	93
4.3.3	Υβριδισμός με τον ιχνηθέτη - τμήμα του γονιδίου <i>mob</i> στο pBRZArm.....	94
4.3.4	Υβριδισμός με τον ιχνηθέτη - τμήμα του γονιδίου <i>rep</i> στο pBRZArm.....	95
4.4	PCR στο φορέα κλωνοποίησης pBRZArm.....	96
4.5	Μεταφορά του pBRZArm σε κύτταρα <i>E. coli</i> μέσω σύζευξης.....	98
4.5.2	Σύζευξη DH5a/pRK2013 +pBRZArm x HMS174.....	100
4.6	Μεταφορά του pBRZArm σε κύτταρα <i>Z. mobilis</i> μέσω σύζευξης.....	101
4.6.1	Σύζευξη DH5a/pRK2013+pBRZArm x CP4Rif.....	101
4.6.2	Μετασηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> με τα προϊόντα της σύζευξης.....	102
6.3	Υβριδισμός στυπώματος κατά Southern στα προϊόντα της σύζευξης.....	103
4.7	Σταθερότητα του pBRZArm στο <i>Z. mobilis</i>	104
4.8	Μεταφορά του pBRZArm μεταξύ διαφορετικών κυττάρων <i>Z. mobilis</i> μέσω σύζευξης.....	105
4.8.1	Πραγματοποίηση δοκιμής ανάπτυξης στο <i>Z. mobilis</i> CTZ1.....	105
4.8.2	Σύζευξη <i>Z. mobilis</i> CP4Rif/pBRZArm x <i>Z. mobilis</i> CTZ1.....	106
4.9	Έλεγχος ικανότητας συμμεταγραφής των αναγνωστικών πλαισίων <i>mob</i> και HP.....	108
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	111
6.	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	116

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ- ABSTRACT

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Zymomonas mobilis* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον εξαιτίας της αυξημένης ποσότητας αιθανόλης που παράγει εν συγκρίσει με το μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, η οποία συνοδεύεται από μικρότερη παραγωγή βιομάζας και μη απαίτηση οξυγόνου. Για τη γενετική βελτίωση του βακτηρίου έχουν κατασκευαστεί ανασυνδυασμένα πλασμίδια – φορείς, τα οποία φέρουν και μέρη από τα φυσικά πλασμίδια του βακτηρίου, εφόσον είναι γνωστό ότι τα στελέχη του διαθέτουν ένα πλούσιο προφίλ πλασμιδίων με μεγάλη ποικιλία σε αριθμό και μέγεθος.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι ιδιότητες κινητοποίησης που φέρει το φυσικό πλασμίδιο pZA1003 του *Z. mobilis* NCIMB 11163. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκε με τρεις διαδοχικές κλωνοποιήσεις ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με βάση τον πλασμιδιακό φορέα pBR328, στον οποίο ενσωματώθηκαν οι περιοχές του pZA1003 που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή στον ξενιστή του και για την κινητοποίησή του στα πλαίσια επιβοηθούμενης σύζευξης, όπως έχει διαπιστωθεί ότι συμβαίνει μεταξύ κυττάρων *Escherichia coli*. Το ανασυνδυασμένο αυτό πλασμίδιο ονομάστηκε pBRZArm, ενώ η ορθότητα της κατασκευής του επιβεβαιώθηκε με υβριδισμό Southern και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Αφού η ικανότητα κινητοποίησης του pBRZArm διαπιστώθηκε με επιβοηθούμενη σύζευξη μεταξύ κυττάρων *Escherichia coli*, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια σε πειράματα επιβοηθούμενης σύζευξης με κύτταρα δέκτες το *Z. mobilis* CP4Rif και βοηθητικό πλασμίδιο το pRK2013 που ανήκει στην ομάδα ασυμβατότητας *IncP*. Η επιτυχία της μεταφοράς του στο *Z. mobilis* επιβεβαιώθηκε με υβριδισμό Southern και μετασχηματισμό *E.coli* με το πλασμιδιακό εκχύλισμα των μετασυζευγμένων CP4Rif. Το pBRZArm μεταφέρθηκε με επιτυχία και πολύ καλή συχνότητα, ενώ η κληρονομική του σταθερότητα άγγιζε το 100 % για τουλάχιστον 130 γενεές σε συνθήκες ανάπτυξης χωρίς μέσο επιλογής για το πλασμίδιο. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν το pBRZArm κατάλληλο φορέα για την έκφραση ετερόλογης γενετικής πληροφορίας στο *Z. mobilis*.

Τέλος, μελετήθηκε η κινητοποίηση του pBRZAm μεταξύ κυττάρων *Z. mobilis* και συγκεκριμένα από το CP4Rif σε παράγωγο του ATCC 10988 ανθεκτικό στην τετρακυκλίνη. Αν και προέκυψαν αποικίες του κυττάρου δέκτη ανθεκτικές στη χλωραμφαινικόλη, το αντιβιοτικό επιλογής του pBRZArm, η ανάλυση του πλασμιδιακού περιεχόμενου και ο

μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με αυτές δεν αποκάλυψαν την ύπαρξη του pBRZA₁cm. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι ιδιότητες κινητοποίησης του pZA1003 δεν επάγονται παρουσία κάποιου από τα φυσικά πλασμίδια του *Z. mobilis* CP4Rif, είτε λόγω ασυμβατότητας μεταξύ τους, είτε λόγω μη ύπαρξης ολοκληρωμένης συζευκτικής λειτουργίας σε αυτά. Ωστόσο, η συζευκτική ικανότητα των ενδογενών πλασμιδίων του CP4 αλλά και των άλλων στελεχών του *Z. mobilis* χρήζει περαιτέρω μελέτης.

ABSTRACT

Zymomonas mobilis is a bacterium able to grow under both aerobic and anaerobic conditions. It is of great biotechnological interest due to the higher yield of ethanol production in comparison with the fungus *Saccharomyces cerevisiae*. This high yield of ethanol production is accompanied by less biomass production and the lack of need for oxygen for the growth of its cells. A strategy used for the genetic improvement of this bacterium is the creation of cloning vectors that bear regions of its natural plasmids, since it is known that its strains contain many natural plasmids with a variety of sizes.

In the present study, the ability of the natural plasmid pZA1003 of *Z. mobilis* NCIMB 11163 to mobilize has been examined. More precisely, a new cloning vector has been constructed, based on the broad host range plasmid pBR328, in which regions of the plasmid pZA1003 have been added. These regions are essential for its replication in its host and for its mobilization through helped conjugation, the same way it happens between *Escherichia coli* cells. The success of the construction of this new cloning vector, named pBRZArm, has been validated through Southern hybridization and Polymerase Chain Reaction.

The ability of pBRZArm to mobilize has been established primarily with helped conjugation between *Escherichia coli* cells. Consequently, it has been used for conjugation with *Z. mobilis* CP4Rif cells as recipients, with the aid of the helper plasmid pRK2013, which belongs to the INCP incompatibility group. The success of this second conjugation has been confirmed through Southern hybridization and transformation of *E. coli* cells with the conjugated CP4Rif cells. pBRZArm has been successfully transferred through conjugation, as well as with a great frequency. Also, it is almost 100 % stable in *Z. mobilis* cells for at least 130 generations, under non- selective conditions. According to those qualities, pBRZArm is a cloning vector appropriate for expression of foreign genetic information in *Z. mobilis*. Lastly, the ability of pBRZArm to mobilize between *Z. mobilis* cells has been examined, more precisely between CP4Rif and a tetracycline resistant derivative of ATCC 10988. Although colonies of the recipient cells have been observed, that were apparently resistant to the antibiotic of selection (chloramphenicol), plasmid DNA analysis and transformation of *E. coli* cells showed no presence of pBRZArm. This indicates that the mobilization abilities of pZA1003 cannot be induced in the presence of *Z. mobilis* CP4Rif natural plasmids, either due to incompatibility between the two, or to the lack of conjugational function in them. However, conjugative ability of endogenous plasmids of other *Z. mobilis* strains is yet to be examined.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Βακτηριακή σύζευξη

Η γενετική πληροφορία ρέει με υψηλούς ρυθμούς στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, με αποτέλεσμα τα βακτήρια και τα αρχαιοβακτήρια να διαθέτουν ένα μικρό βασικό γονιδίωμα (core genome) καλά διατηρημένο μεταξύ των διαφόρων ειδών, και ένα μεγάλο ολικό γονιδίωμα (pangenome) που είναι ιδιαίτερα μεταβλητό. Η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά έχει σημαντικές επιπτώσεις στην εξέλιξη: Πρώτον, επιτρέπει τον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ συγγενών στελεχών ή ειδών με μια διαδικασία που ομοιάζει με τη σεξουαλική αναπαραγωγή των ευκαρυωτικών οργανισμών. Δεύτερον, οδηγεί στην ενσωμάτωση καινούριας γενετικής πληροφορίας, δημιουργώντας μεγάλα λειτουργικά άλματα τα οποία επιτρέπουν γρήγορη προσαρμογή σε νέα περιβάλλοντα ή σε στρεσογόνες συνθήκες. Τέλος, έχει προταθεί ότι η κινητικότητα των γονιδίων ωθεί συλλογικές διεργασίες των μικροοργανισμών. (Smillie et. al 2010).

Οι τρεις κλασσικοί μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς είναι ο **μετασχηματισμός, η μεταγωγή και η σύζευξη.**

Κατά το **μετασχηματισμό**, DNA το οποίο προέρχεται κυρίως από τη λύση βακτηριακών κυττάρων προσλαμβάνεται από άλλα βακτήρια τα οποία διαθέτουν εξειδικευμένα γονιδιακά προϊόντα που εμπλέκονται στην πρόσληψη και τη διοχέτευση του DNA στο εσωτερικό τους. Η ενσωμάτωση του προσλαμβανόμενου DNA μέσω μετασχηματισμού στο γονιδίωμα του νέου ξενιστή βασίζεται σε επιδιορθωτικά ένζυμα (ρεκομπινάσες) του κυττάρου- δέκτη. (Johnston et. al 2014).

Μεταγωγή καλείται η μεταφορά DNA μεταξύ βακτηριακών κυττάρων με τη μεσολάβηση βακτηριοφάγων. Συγκεκριμένα, ένας βακτηριοφάγος κατά την αντιγραφή του μέσα σε ένα βακτήριο ξενιστή ενσωματώνει τμήματα DNA του οργανισμού στο καψίδιό του. Στη συνέχεια, απελευθερώνεται στο περιβάλλον και μπορεί να μεταβιβάσει το DNA σε νέα βακτήρια που θα μολύνει (Johnston et. al 2014)

Η **σύζευξη** θεωρείται ο ποσοτικά σημαντικότερος από τους μηχανισμούς οριζόντιας μεταφοράς. Αυτό συμβαίνει επειδή οι φάγοι έχουν περιορισμένο εύρος ξενιστών ενώ σύζευξη μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και μεταξύ πολύ διαφορετικών οργανισμών, όπως για παράδειγμα από βακτήρια σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Heinemann 1991). Τα

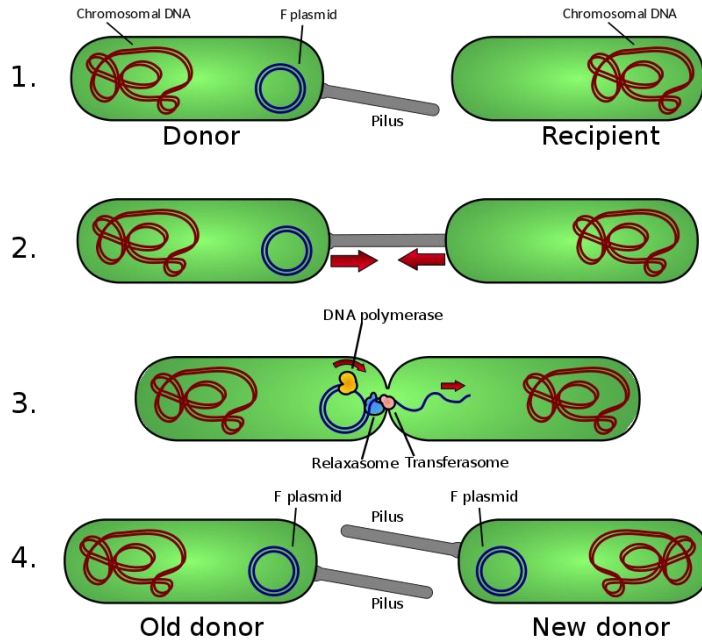
πλασμίδια παίζουν βασικό ρόλο στη διεργασία της σύζευξης. Ένα μεγάλο ποσοστό των γονιδίων που επιτρέπουν στα βακτήρια να μεταβολίζουν οργανικές ενώσεις, όπως τα αντιβιοτικά, βρίσκονται σε πλασμίδια. Με αυτό τον τρόπο τα πλασμίδια είναι τουλάχιστον εν μέρει υπεύθυνα για την άνοδο του αριθμού βακτηρίων με ανθεκτικότητα στα φάρμακα, τα οποία συνιστούν μεγάλο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Douard et. al 2010, Leclercq et. al 1988, Pangovan et. al 2010). Επίσης, τα πλασμίδια κωδικοποιούν πληροφορίες απαραίτητες για την αλληλεπίδραση βακτηρίων με ευκαρυωτικούς οργανισμούς στις εξής περιπτώσεις: στη δέσμευση αζώτου στο γένος *Rhizobium* (Long 1989), στην προσβολή φυτικών κυττάρων από είδη του γένους *Agrobacterium* (Gelvin 2003), και στη μεταδοτικότητα παθογόνων του ανθρώπου, όπως τα βακτήρια του γένους *Shigella* (Buchrieser et. al 2000). Τέλος, τα πλασμίδια, μέσω της κινητικότητάς τους, αποτελούν εργαλεία της μοριακής βιολογίας για γενετικές τροποποιήσεις.

Ο William Hayes το 1953 απέδειξε ότι η μεταφορά γενετικού υλικού κατά τη σύζευξη είναι μονόδρομη, και θεώρησε ότι το φαινόμενο προκαλείται από έναν παράγοντα που φέρουν τα κύτταρα δότες τον οποίο ονόμασε παράγοντα *F* (fertility). Αργότερα διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για πλασμίδιο, το οποίο ονομάζεται συζευκτικό (Griffiths et. al 2000).

Η σύζευξη πραγματοποιείται σε δύο στάδια: Στο πρώτο στάδιο γίνεται μια σειρά αντιδράσεων μεταξύ των κυτταρικών επιφανειών του κυττάρου- δότη και του κυττάρου δέκτη που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συζευκτικού ζεύγους. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η μεταφορά του πλασμιδιακού DNA.

Συνοπτικά, η διαδικασία της σύζευξης πραγματοποιείται ως εξής: το κύτταρο- δότη προσεγγίζει το κύτταρο- δέκτη και προσδένεται σε αυτό μέσω ειδικών συζευκτικών τριχιδίων (conjugative pili) του δότη. Πρόκειται για ινίδια που προεξέχουν της εξωτερικής επιφάνειας του κυττάρου δότη κατά 2 μm περίπου. Κάθε κύτταρο- δότη περιέχει 2 με 3 συζευκτικά ινίδια. Το ινίδιο συνίσταται από την πρωτεΐνη πιλίνη. Οι υπομονάδες της πιλίνης σχηματίζουν μία κυλινδροειδή δίοδο διαμέτρου 10 nm με εσωτερική διάμετρο 2 nm. Το συζευκτικό τριχίδιο αναγνωρίζει διάφορους υποδοχείς στο κύτταρο- δέκτη (π.χ. για την πρόσληψη πολυσακχαριτών) και προσδένεται επάνω τους. Ύστερα έλκεται προς τα πίσω, φέρνοντας έτσι τα δύο κύτταρα σε πολύ στενή επαφή, ούτως ώστε να αρχίσει να μεταφέρεται η μία αλυσίδα DNA του πλασμιδίου του κυττάρου- δότη στο κύτταρο- δέκτη με μια διαδικασία ανάλογη της αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου. Η αλυσίδα που μεταφέρεται στο δέκτη, αντιγράφεται. Παράλληλα, αντιγράφεται και η αλυσίδα που έχει παραμείνει στο δότη. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της μεταφοράς, οι δεσμοί που συγκρατούν τα δύο κύτταρα

αποκόπτονται και τα δύο κύτταρα αποχωρίζονται, έχοντας το καθένα από ένα αντίγραφο του συζευκτικού πλασμιδίου (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Βακτηριακή σύζευξη

Στάδια: 1. Προσέγγιση μεταξύ δότη και δέκτη 2. Ένωση μέσω συζευκτικών τριχιδίων 3. Άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων, αντιγραφή του συζευκτικού πλασμιδίου και μεταφορά του στο δέκτη 4. Το κάθε κύτταρο έχει από ένα αντίγραφο του συζευκτικού πλασμιδίου.

Τα πλασμίδια ως προς τις συζευκτικές τους ιδιότητες μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες: **συζευκτικά**, **κινητοποιήσιμα** και **μη κινητοποιήσιμα**. **Συζευκτικά** ονομάζονται τα πλασμίδια που μπορούν να πραγματοποιήσουν σύζευξη βασιζόμενα σε δικούς τους μηχανισμούς. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς κάποιου άλλου γενετικού στοιχείου για να κινητοποιηθούν μέσω σύζευξης ονομάζονται **κινητοποιήσιμα**. Τα κοινά στοιχεία μεταξύ των συζευκτικών και των κινητοποιήσιμων πλασμιδίων είναι τα **γονίδια *mob***, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη μεταφορά του DNA με τη **ριλαξάση** να κατέχει κυρίαρχο ρόλο, καθώς και η περιοχή ***oriT***, μια μικρή αλληλουχία DNA στην οποία προσδένεται η ριλαξάση ώστε να πραγματοποιηθεί η μεταφορά. Τα **γονίδια *tra*** εδράζονται μόνο στα συζευκτικά πλασμίδια και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της συζευκτικής γέφυρας με την οποία έρχονται σε επαφή τα κύτταρα δότης-δέκτης, αλλά εμπλέκονται βοηθητικά και στη διαδικασία της μεταφοράς στο κύτταρο δέκτη.

Μη κινητοποιήσιμα ονομάζονται τα πλασμίδια που δεν μπορούν να κινητοποιηθούν μέσω σύζευξης (Smillie et. al 2010).

2.1.1 Συζευκτικά πλασμίδια

Τα πλασμίδια διαθέτουν γονίδια, τα προϊόντα των οποίων εξασφαλίζουν τη συντήρηση αλλά και την εξάπλωσή τους. Συχνά τα γονίδια αυτά συνοδεύονται από *cis* δρώντα στοιχεία. Ακόμα και το απλούστερο πλασμίδιο που δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη περιέχει γενετικά στοιχεία που του δίνουν τη δυνατότητα να αντιγράφεται. Συνήθως τη δυνατότητα αντιγραφής του δίνει το γονίδιο *rep*. Σε πολλές περιπτώσεις, το γονίδιο *rep* συνοδεύεται από το γονίδιο *cop* που εξασκεί ρυθμιστικό έλεγχο στην αντιγραφή, ενώ ταυτόχρονα εξασφαλίζει τη συντήρηση σταθερού αριθμού αντιγράφων (Norman 2009). Τα γονίδια που εξασφαλίζουν την κληρονόμηση των πλασμιδιακών αντιγράφων στα θυγατρικά κύτταρα (καταμερισμού, μετακαταμεριστικής θανάτωσης) συνήθως γειτνιάζουν με τα γονίδια *rep* και *cop* (Norman 2009).

Τα συζευκτικά πλασμίδια είναι συνήθως σχετικά μεγάλα σε μέγεθος εξαιτίας των γονιδίων που απαιτούνται για το μηχανισμό της σύζευξης (*mob*, *tra*) καθώς και της επακόλουθης απαίτησης για πλασμιδιακή σταθερότητα. Πέρα από αυτά, διαθέτουν επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν προϊόντα χρήσιμα για το κύτταρο σε περίπτωση που πρέπει να αντιμετωπίσουν αντίξοες συνθήκες. Εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους τους, παρουσιάζουν μικρό αριθμό αντιγράφων (low copy) (Thomas 2000, Eberhard 1990).

Το μικρότερο γνωστό συζευκτικό πλασμίδιο είναι το R338 των πρωτεοβακτηρίων και έχει μέγεθος περίπου 34 kb (Norman 2009).

2.1.2 Το οπερόνιο *tra*

Κάθε συζευκτικό πλασμίδιο τύπου *F* κωδικοποιεί σχεδόν 40 γονίδια στην περιοχή που αφορά τη σύζευξη. Πάνω από 15 από αυτά εμπλέκονται στη σύνθεση του συζευκτικού τριγιδίου: το *traA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη- πρόδρομο της προπιλίνης, υπομονάδας του τριγιδίου· τα προϊόντα των γονιδίων *traQ* και *traX* βοηθούν στην ωρίμανση του *traA*· η πλειοψηφία των υπόλοιπων γονιδίων (*traL*, *traE*, *traK*, *traB*, *traV*, *traC*, *traW*, *traF*, *traH*,

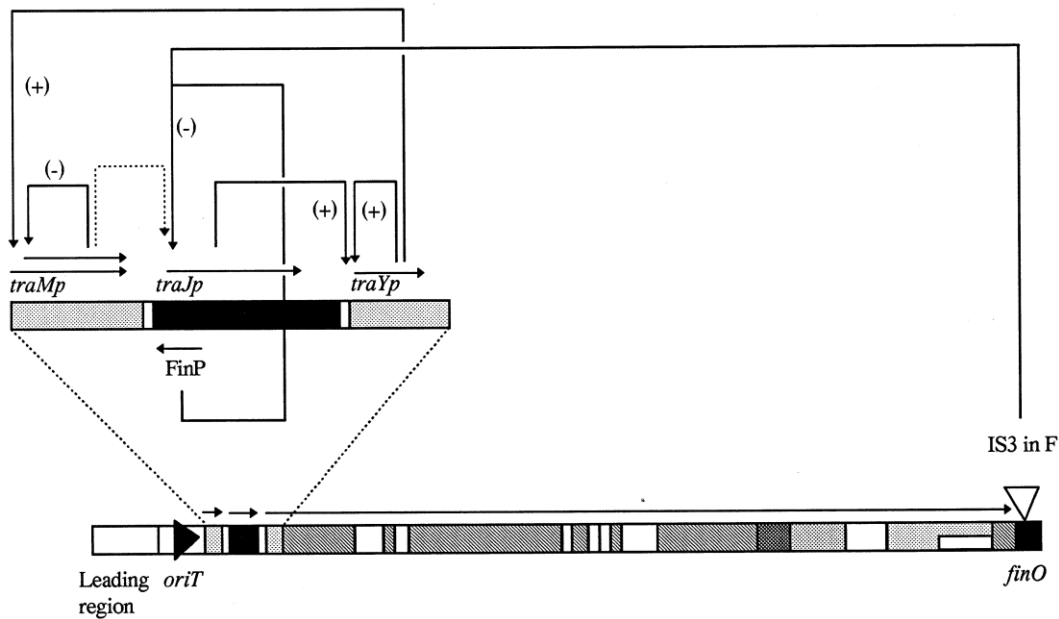
traG, *trbC*, *trbI*) συντελούν στη συναρμολόγηση του τριχιδίου. Η πρωτεΐνη TraI, δηλαδή η **ριλαξάση**, που δρα τέμνοντας (nicking) και ξετυλίγοντας (unwinding) τη μία αλυσίδα του DNA, παίζει κεντρικό ρόλο στη διαδικασία και παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο τέλος του κομμένου DNA κατά τη μεταφορά. Η TraY μαζί με τον IHF (integration host factor) προκαλούν in vitro την κάμψη του DNA και διεγείρουν την τομή στην περιοχή *oriT* μέσω της περιοχής *SbyA* που βρίσκεται δίπλα στο σημείο τομής (Zatyka και Thomas 1998).

Τα γονίδια *tra* οργανώνονται σε τρία βασικά οπερόνια: Δύο μονοκιστρονικά οπερόνια για το *traM* και το *traJ*, καθοδικά του *oriT* και ένα πολυκιστρονικό οπερόνιο μεγέθους περίπου 30 kb που κωδικοποιεί όλα τα υπόλοιπα προϊόντα, με πρώτο το γονίδιο *traY*. Η σύνδεση της TraM στο *oriT* μπορεί να αλλάξει την υπερελίκωση του DNA και άρα να τροποποιήσει τη μεταγραφή. Το *traYp* είναι απαραίτητο για την έκφραση των *tra* γονιδίων σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ οι υποκινητές μπορούν να ρυθμίσουν διαφορετικά την έκφρασή τους (Zatyka και Thomas 1998).

Ο έλεγχος της ρύθμισης περιλαμβάνει έναν αρνητικό κύκλο που παρέχεται από το σύστημα FinOP και έναν αυτοκαταλυτικό θετικό κύκλο, που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες TraM, TraJ και TraY (εικόνα 2.2)

Η μεταγραφή του οπερονίου από το *traYp* ρυθμίζεται θετικά από την TraJ αλλά και από το ίδιο το *traY*. Η TraJ ενεργοποιεί επίσης το *trbFp*.

Η έκφραση της TraJ καταστέλλεται σε μετα- μεταγραφικό επίπεδο από δύο αρνητικά στοιχεία, τα FinP και FinO ως εξής: Το FinP κωδικοποιεί ένα αντινοσηματικό RNA (micRNA) ειδικό για το πλασμίδιο, ενώ το προϊόν του FinO είναι ένα πολυπεπίδιο. Το RNA του FinP διπλώνεται σε δομές με δύο διχάλες εκ των οποίων η πρώτη είναι συμπληρωματική με την περιοχή σύνδεσης του μετάγραφου του *traJ* με το ριβόσωμα. Επομένως, συνδέεται με το mRNA του *traJ* και αναστέλλει τη μετάφρασή του. Το πολυπεπίδιο FinO σταθεροποιεί το FinP, οδηγώντας έτσι σε αύξηση του micRNA που παράγει.

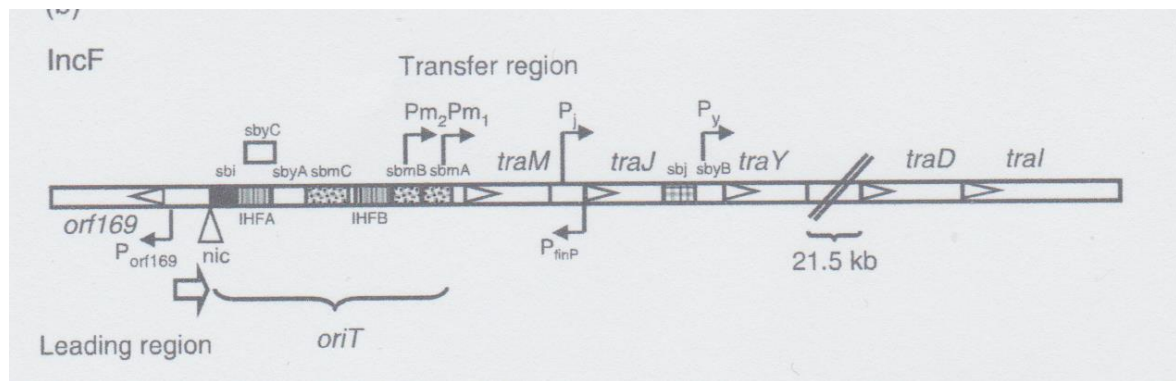


Εικόνα 2.2 Ρύθμιση των γονιδίων *tra* σε ένα συζευκτικό πλασμίδιο τύπου *F* (Zatyka και Thomas 1998) Ο βασικός έλεγχος παρέχεται από το σύστημα *FinOP* που αναστέλλει τη μετάφραση του *traJ* mRNA. Το *traY* ενεργοποιείται από την *TraJ* αλλά και από την ίδια του την πρωτεΐνη.

2.1.3 Το ριλαξόσωμα

Το ριλαξόσωμα είναι ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει τη **ριλαξάση** που κωδικοποιείται από τα γονίδια *mob*, το παράγοντα IHF (integration host factor), την περιοχή *oriT* και μια σειρά από βοηθητικές πρωτεΐνες (Ilangoan 2015)

Στην εικόνα 2.3 φαίνεται η γενετική οργάνωση του ριλαξοσώματος του συζευκτικού πλασμιδίου *F* όπως περιγράφηκε από τους Frost et. al το 1994. Η περιοχή *oriT* περιέχει το σημείο *nic* όπου πραγματοποιείται η τομή του DNA από τη ριλαξάση. Η περιοχή *oriT* περιλαμβάνει μια σειρά από επαναληπτικές αλληλουχίες, οι οποίες καθορίζουν τα σημεία σύνδεσης της ριλαξάσης και των πρωτεϊνών *TraM* και *TraY*, καθώς και μιας περιοχής πλούσιας σε AT που είναι σημαντική για το άνοιγμα των αλυσίδων του DNA. Η πρωτεΐνη *TraM* ρυθμίζει τη σηματοδότηση για την εκκίνηση της μεταφοράς του πλασμιδίου. Επίσης περιλαμβάνει δύο ενδογενείς πτυχές για τη σύνδεση του παράγοντα IHF (Tsai et al., 1990), καθώς και τρεις θέσεις για πρόσδεση του H-NS που προκαλεί καταστολή των υποκινητών του *traM* (Will et al., 2004)



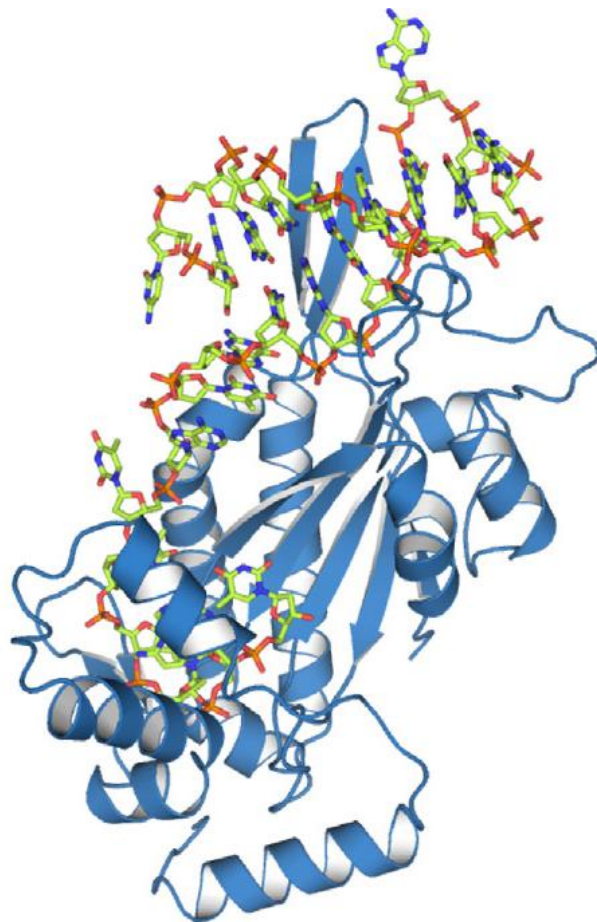
Εικόνα 2.3 Ριλαξόσωμα του συζευκτικού πλασμιδίου *F* (Frost et. al το 1994). Τα βέλη υποδηλώνουν τα σημεία εκκίνησης της μεταγραφής.

2.1.4 Η ριλαξάση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ριλαξάσες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mob*, και πραγματοποιούν την τομή του DNA στο σημείο *nic* κατά τη σύζευξη. Είναι, επομένως, κρίσιμες για την έναρξη της σύζευξης, τόσο στα συζευκτικά, όσο και στα κινητοποιήσιμα πλασμίδια. Είναι μεγάλες πρωτεΐνες και οι περισσότερες από αυτές λειτουργούν ως φωσφοδιεστεράσες, ελικάσες ή πριμάσες. Περιλαμβάνουν δυο διαφορετικές περιοχές: Μια περιοχή με ένα αμινοτελικό άκρο που έχει δράση τρανσεστεράσης, και μια περιοχή με ένα καρβοξυτελικό άκρο που έχει δράση ελικάσης/πριμάσης. Η πρώτη περιοχή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση της περιοχής *nic*, την πρόσδεση σε αυτή, την τομή της και την ομοιοπολική σύνδεσή του 5' κομμένου άκρου της στην καταλυτική τυροσίνη (Pangovan 2015).

Όλες οι ριλαξάσες περιέχουν τρία διαφορετικά μοτίβα: Το μοτίβο I περιλαμβάνει το καταλυτικό κατάλοιπο τυροσίνης που εμπλέκεται στην σχάση-ένωση του DNA και παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο του σημείου *nic*. Το μοτίβο II θεωρείται ότι εμπλέκεται στη σύνδεση DNA-πρωτεϊνών στο 3' άκρο του σημείου *nic* όπου συνήθως βρίσκεται και ένα κατάλοιπο σερίνης. Τέλος, το μοτίβο III περιλαμβάνει τρία συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης και γι' αυτό είναι γνωστό ως «μοτίβο 3H». Τα εν λόγω κατάλοιπα θεωρείται ότι βοηθούν την πυρηνόφιλη δράση του κατάλοιπου τυροσίνης του μοτίβου I μέσω συντονισμού των απαραίτητων ιόντων Mg^{2+} και της ενεργής τυροσίνης. Αυτά τα τρία μοτίβα είναι μέρος του καταλυτικού κέντρου της ριλαξάσης (Francia et. al 2004).

Μια ριλαξάση που έχει μελετηθεί εκτενώς είναι η TrwC του πλασμιδίου R388 (εικόνα 2.4). Η κρυσταλλική δομή του αμινοτελικού της άκρου που σχηματίζει σύμπλοκο με ένα 25μερές ολιγονουκλεοτίδιο, δείχνει ένα κεντρικό β φύλλο, το οποίο είναι επιστοιβαγμένο μεταξύ α ελίκων, με επιπρόσθετες έλικες στο καρβοξυτελικό άκρο. Το DNA συνδέεται στη μια μεριά του «σάντουιτς» α/β και επεκτείνεται σε ένα βαθύ στενό θώκο όπου βρίσκεται η ενεργή του θέση. Η TrwC προσδένεται σε μια περιοχή του *oriT* που λέγεται *sbcA*, η οποία βρίσκεται στο 5' άκρο του σημείου *nrc* και περιέχει μια ενδογενή επαναληπτική αλληλουχία που σχηματίζει μια δευτερογενή δομή φουρκέτας. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι αυτή η δευτερογενής δομή είναι σημαντική για την αποτελεσματική πρόσδεση του TrwC στο *oriT*. Η αποκοπή του DNA επιτυγχάνεται μέσω μιας πυρηνόφιλης αντίδρασης του καταλυτικού τυροσινικού κατάλοιπου (Tyr18), που παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο τέλος της μεταφερόμενης αλυσίδας κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του DNA στο κύτταρο- δέκτη, ενώ το 3' άκρο αποδεσμεύεται (Pangovan 2015).



Εικόνα 2.4 Κρυσταλλική δομή της ριλαξάσης TrwC του πλασμιδίου R388 που είναι συνδεδεμένη με ένα 25μερές *oriT* (Pangovan 2015).

Οι ριλαξάσες των πλασμιδίων ανήκουν σε 6 πρωτεϊνικές οικογένειες: MOB_P, MOB_F, MOB_V, MOB_Q, MOB_H και MOB_C. Σε 1730 πλασμίδια, εντοπίστηκαν συνολικά 741 γονίδια ριλαξασών σε 673 πλασμίδια. Οι MOB_H και οι MOB_C ήταν οι λιγότερο γνωστές οικογένειες (τα αντίστοιχα γονίδια βρέθηκαν σε μόνο 28 και 24 πλασμίδια αντίστοιχα), ενώ η MOB_P η πιο διαδεδομένη, αφού τα αντίστοιχα γονίδια εντοπίστηκαν σε 273 πλασμίδια (Smillie et. al 2010).

2.1.5 Ένα πιθανό μοντέλο για τη μεταφορά του DNA κατά τη σύζευξη

Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστός ο ακριβής τρόπος με τον οποίο γίνεται η μεταφορά του DNA από κύτταρο σε κύτταρο κατά τη σύζευξη. Έχουν παρ' όλ' αυτά προταθεί πολλά μοντέλα για τον πιθανό τρόπο με τον οποίο συμβαίνει αυτό. Στη συνέχεια αναφέρεται ένα σχετικά πρόσφατο μοντέλο που έχει προταθεί, βασισμένο σε ανάλυση της κρυσταλλικής δομής μιας ριλαξάσης της οικογένειας MOB_F, καθώς και σε βιοχημικές ιδιότητες που έχουν αποδειχθεί από αντιδράσεις *in vitro* αλλά και σε βιοχημικές λεπτομέρειες από αντιδράσεις κατεργασίας του DNA. (De la Cruz et. al 2009).

Σύμφωνα με το εν λόγω μοντέλο, η μεταφορά του DNA πραγματοποιείται σε 6 στάδια: Προετοιμασία (preinitiation), ενεργοποίηση, μεταφορά του κλώνου T, ενεργοποίηση της T4CP πρωτεΐνης, τερματισμός, σύνθεση καθυστερούντος κλώνου.

Εκκίνηση (σχηματισμός ριλαξοσώματος και αποκοπή του σημείου *nic*):

Το ριλαξόσωμα συνδέεται στο υπερσπειρωμένο DNA του *oriT* και δημιουργεί μια πολύπλοκα οργανωμένη δομή (που παραμένει αδιευκρίνιστη), η οποία καθορίζεται από το σύνολο τοπολογικών παραμορφώσεων που προκαλούνται από κάθε τελεστή που αλληλεπιδρά με το DNA (εικόνα 2.5 step I). Η πρωτεΐνη TraI του ριλαξοσώματος έχει τη δυνατότητα να κόβει και να ενώνει το σημείο *nic* και διεγείρεται από το IHF και τις πρωτεΐνες TraY και TraM (εικόνα 2.5 step II). Η πρωτεΐνη T4CP επίσης διεγείρει την αποκοπή του σημείου *nic* εφόσον η TraI δέχεται ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις στο σημείο ένωσης του ριλαξοσώματος με το συζευκτικό πόρο (εικόνα 2.5 step III).

Ενεργοποίηση (δημιουργία του κλώνου T): Η μεταφορά και είσοδος του μονόκλωνου DNA στο κύτταρο-δέκτη απαιτεί την ενεργοποίηση ενός μοριακού διακόπτη της ριλαξάσης

και, πιθανόν, μια επέκταση του σημείου αποκοπής *nic*. Αυτές οι αλλαγές κατά πάσα πιθανότητα προκύπτουν από διακυτταρικές επαφές μεταξύ βακτηρίων οι οποίες μεταδίδονται μέσω των συζευκτικών τριχιδίων στο T4SS (εικόνα 2.5 step IV). Σε αυτή την περίπτωση, η αγκυροβόληση του συμπλόκου εκκίνησης στο T4SS μέσω της T4CP θα βοηθούσε στην παραγωγή του κλώνου T. Η TraI μεταπηδά σε λειτουργία σύζευξης δημιουργώντας υψηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεις του αμινοτελικού άκρου της με τις περιβάλλουσες αλληλουχίες. Τα 3' και 5' άκρα του σημείου *nic* παραμένουν απομονωμένα από την TraI. Η πρωτεϊνική μετατόπιση ή η αυξημένη έκθεση σε μονόκλωνο DNA αλλάζει τη διαμόρφωση της T4CP και τις αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου (εικόνα 2.5 step V). Στη συνέχεια ενεργοποιείται το κρυμμένο αμινοτελικό άκρο της T4CP (εικόνα 2.5 step VI). Η μεταφορά του συμπλόκου της TraI και του κλώνου T μέσα στη δίοδο μετατόπισης της T4CP γίνεται μέσω αναγνώρισης ειδικών σημάτων της πρωτεΐνης TraI. Το τέλος του κύκλου εκκίνησης σηματοδοτείται από τη μεταβίβαση του 3' άκρου του σημείου *nic* στη DNA πολυμεράση III (εικόνα 2.5 step VII).

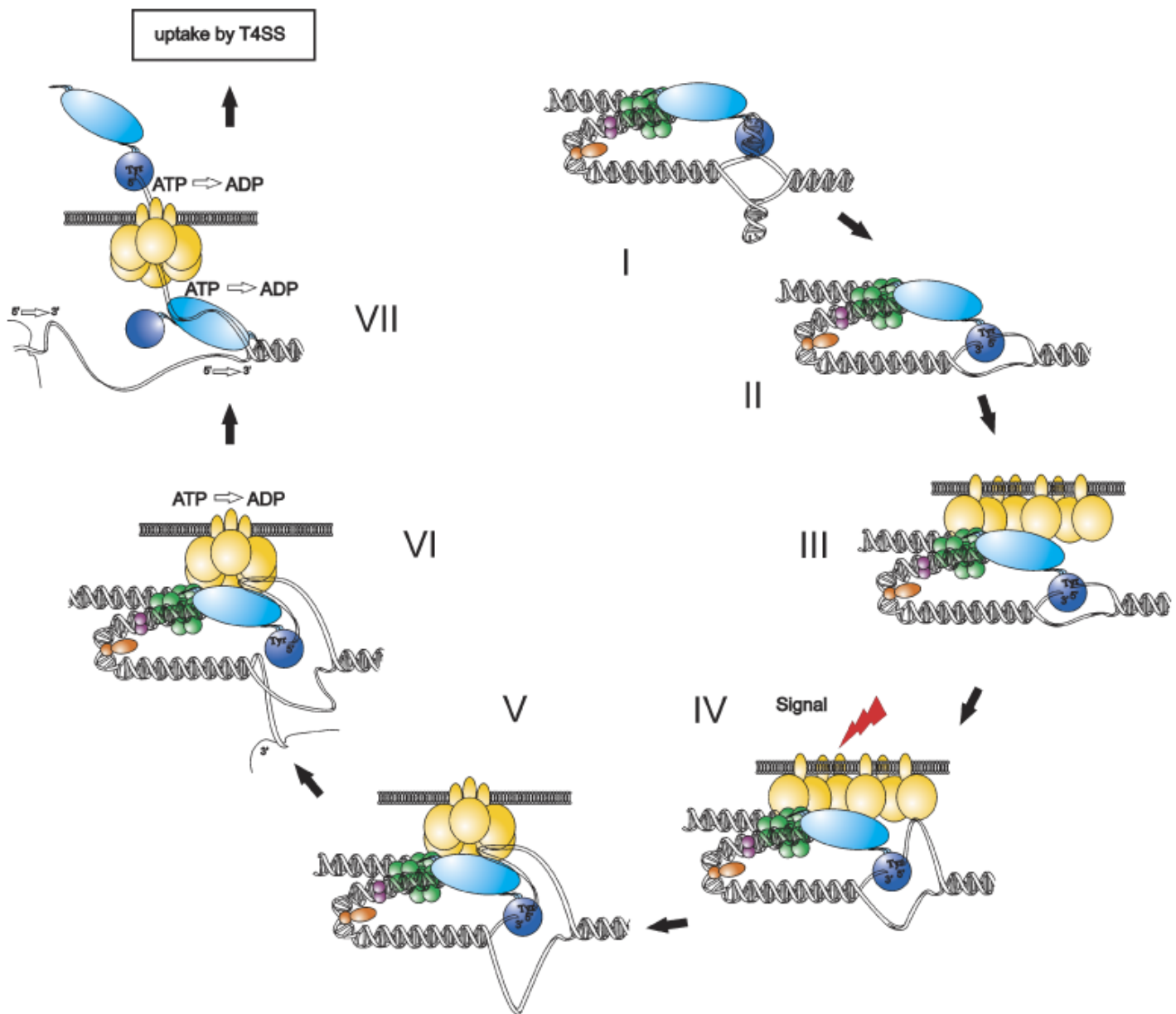
Μεταφορά του κλώνου T: Η συζευκτική κινητοποίηση ενός *F* πλασμιδίου του *E. coli* απαιτεί 100 λεπτά. Αυτό σημαίνει ότι ο ρυθμός ξετυλίγματος είναι τουλάχιστον 800 bp/s. Αναμένεται ταυτόχρονη σύνθεση αλυσίδας αντικατάστασης, για τη μέγιστη προστασία του γονιδιώματος του πλασμιδίου. Απουσία μιας ελικάσης που ξετυλίγει το DNA, η DNA πολυμεράση III συνθέτει DNA με σχετικά αργούς ρυθμούς. Επομένως, αν η σύνθεση της αλυσίδας αντικατάστασης συμβαίνει με αντίστοιχο ρυθμό, η καταλυμένη TraI στη σύνδεση των αλυσιδών των πλασμιδίων θα πρέπει να ενεργεί από κοινού με τη DNA πολυμεράση III. (Kim et al. 1996). Το σύμπλοκο της ριλαξάσης με τον κλώνο- T μεταφέρεται στο κύτταρο-δέκτη μέσω του T4SS (Christie et al., 2005). Δεν είναι γνωστές οι λεπτομέρειες της μεταφοράς, αλλά θεωρείται ότι η ριλαξάση λειτουργεί ως κατευθυντήρια πρωτεΐνη, μεταφερόμενη στο κύτταρο-δέκτη και «σείροντας» μαζί της και το DNA στη δίοδο μεταφοράς. Ο κλώνος- T εισέρχεται στο κύτταρο-δέκτη ως μονόκλωνο DNA, όπου εκφράζεται η πρόσθια περιοχή του, πιθανόν από ειδικούς εκκινητές μονόκλωνου DNA ή από πριμάσες.

Ενεργοποίηση της T4CP πρωτεΐνης: Θεωρείται ότι η μεταφορά του κλώνου- T τροφοδοτείται από την πρωτεΐνη T4CP που ενώνεται στο T4SS μέσω αλληλεπίδρασης με τη ριλαξάση, αλλά και άλλα συστατικά του ριλαξοσώματος. Οι T4CP είναι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν δύο διαμεμβρανικές α-έλικες στο αμινοτελικό άκρο τους. Η T4CP του πλασμιδίου R388, η TrwB, φαίνεται ότι είναι μια DNA-εξαρτώμενη ATPάση και η λειτουργία της ενισχύεται από την αλληλεπίδραση με τη βοηθητική πρωτεΐνη

TgwA. Θεωρείται ότι η TgwB συνδέεται στο DNA καθώς αυτό διαπερνά το T4SS. In vitro συνδέεται μη ειδικά σε μονόκλωνο DNA, δημιουργώντας εξαμερή που ενισχύουν τη λειτουργικότητα ATPάσης (Tato et al. 2005).

Η μεταφορά του κλώνου- T πιθανόν προκαλείται τόσο από ώθηση από το δότη μέσω της TgwB, όσο και από έλξη από το δέκτη μέσω της TgwC ελικάσης. Όταν εισέλθουν στο δέκτη, οι MOB_F ριλαξάσες εντοπίζουν το σημείο *nic* στο εισερχόμενο DNA που το αναγνωρίζουν ως σημείο τερματισμού. Το σημείο τερματισμού μπορεί επίσης να έχει ήδη αποκοπεί στο δότη, πριν μεταφερθεί, από μια δεύτερη ριλαξάση.

Σύνθεση καθυστερούντος κλώνου: Αυτό το βήμα δεν έχει διαλευκανθεί σχεδόν καθόλου, αλλά αναμένεται πρόοδος μέσω μελέτης του πλασμιδίου R1162.



Εικόνα 2.5 Μοντέλο ρύθμισης της παραγωγής του T- κλώνου και μεταφοράς του στο συζευκτικό σύστημα T4SS (De la Cruz et. al 2009) TraI (μπλε) με ενεργή θέση τυροσίνης (Tyr) και περιοχές TraI ελικάσης (γαλάζιο). IHF (πορτοκαλί), TraY (μωβ), TraM (πράσινο) και T4CP (κίτρινο).

2.2 Το βακτήριο *Zymomonas mobilis*

Η συνεχής ελάττωση των αποθεμάτων σε καύσιμα και κατά συνέπεια η αύξηση του κόστους τους, έχει στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στη δημιουργία εναλλακτικών τεχνολογιών και υποστρωμάτων, ώστε να καλυφθεί ή παγκόσμια ζήτηση σε ενέργεια. Σαν αποτέλεσμα, εναλλακτικές μορφές ενέργειας όπως το μεθάνιο, το υδρογόνο και η αιθανόλη, όλο και περισσότερο εξετάζονται σαν πιθανά υποκατάστατα καύσιμης ύλης. Ήδη από το 1890 η αιθανόλη θεωρήθηκε πολλά υποσχόμενη για χρήση ως εναλλακτικό υγρό καύσιμο, δεδομένου ότι μπορεί να παραχθεί από μια μεγάλη ποικιλία ανανεώσιμων γεωργικών υλικών όπως ο χυμός σακχαρότευτλου, η μελάσα, οι πατάτες, το καλαμπόκι και το κριθάρι.

Επί του παρόντος, ο ζυμομύκητας (*Saccharomyces cerevisiae*) χρησιμοποιείται παγκοσμίως ως ο βασικός μικροοργανισμός παραγωγής αιθανόλης. Εντούτοις, παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα, όπως η μεγάλη παραγωγή βιομάζας και η μικρή ανθεκτικότητα στην υψηλή θερμοκρασία και στην αιθανόλη. Συνεπώς, τα τελευταία χρόνια αναζητούνται και άλλοι μικροοργανισμοί για την παραγωγή αιθανόλης.

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* θεωρείται πολλά υποσχόμενο για αυτή τη χρήση. Ορισμένα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει σε σύγκριση με το ζυμομύκητα είναι η μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης, η μικρότερη παραγωγή βιομάζας και η μη απαίτηση οξυγόνου για την ανάπτυξη των κυττάρων του.

2.2.1 Ιστορική αναδρομή

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* έχει εντοπιστεί κυρίως σε τροπικά και υποτροπικά ενδαιτήματα σε φυτά με χυμούς πλούσιους σε σάκχαρα. Σε αγαύη στο Μεξικό (Lindner 1928), σε ζαχαρότευτλα στη Βραζιλία και στα νησιά Φίτζι (Falcao de Moraes et al., 1993) και σε φοινικόδεντρα της κεντρικής Αφρικής (Swings και DeLey, 1977). Άλλα σημεία όπου ανιχνεύτηκε ήταν σε χυμό από ζύμωση ζαχαρότευτλου (Goncalvesde Lima et al., 1970), σε σπόρους κακάο (Ostovar και Keeney, 1973) και σε μέλι που ωριμάζει (Ruiz-Argueso και Rodriguez- Navarro, 1975). Το *Zymomonas* είναι πολύ καλά προσαρμοσμένο σε αυτά τα υποστρώματα τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη περιεκτικότητα σε σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, αμινοξέα και αυξητικούς παράγοντες (Sahm et al. 2006). Το *Zymomonas mobilis*

συμμετέχει μαζί με άλλους μύκητες και βακτήρια στη ζύμωση για την παρασκευή ποτών όπως το pulque και το κρασί από φοινικόδενδρα. Τα ποτά αυτά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη και ιδιαίτερα αρώματα που οφείλονται μεταξύ άλλων και στις φρουκτάνες που παράγονται από το *Zymomonas* κατά τη ζύμωση της σακχαρόζης. Επιπλέον, τα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά που περιέχει μαζί με τα οξεογαλακτικά βακτήρια που συμμετέχουν στη ζύμωση προσδίδουν προβιοτικές ιδιότητες σε αυτά τα ποτά (Correa-Ascencio et. al, 2014).

Στην Ευρώπη εμφανίζεται σε αλλοιωμένη μύρα και μηλίτη. Συγκεκριμένα στο μηλίτη αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Lloyd το 1903 ο οποίος εντόπισε τη λεγόμενη «ασθένεια του μηλίτη». Η εν λόγω ασθένεια αναγνωρίζεται από τη δημιουργία φυσαλίδων και άφθονου αερίου, αλλαγή στο άρωμα και στη γεύση του ποτού, μείωση της γλυκύτητας και ανάπτυξη έντονης θολερότητας . Ο Millis το 1951 αναγνώρισε ότι ο μικροοργανισμός που ήταν υπεύθυνος για την ασθένεια του μηλίτη ήταν το βακτήριο *Zymomonas mobilis*.

Όσον αφορά τη μύρα ο Shimwell το 1937 απομόνωσε ένα στέλεχος *Zymomonas* από αποθήκες ζυθοποιίας και από βούρτσες πλυσίματος βαρελιών μύρας. Αργότερα, το 1965 ο Ault διαπίστωσε ότι το βακτήριο *Zymomonas* μολύνει τις βαρελίσιες μύρες, εξαιτίας των αναερόβιων συνθηκών και της παρουσίας σακχάρων. Τα βακτήρια αυτά παράγουν έντονη θολερότητα και δυσάρεστη οσμή σάπιων μήλων, η οποία οφείλεται σε ίχνη ακεταλδεϋδης και υδρόθειου. (Sahm et. al 2006)

2.2.2 Βιολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Zymomonas mobilis*.

Το *Zymomonas mobilis* είναι ένα αρνητικό κατά Gram προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που δε σχηματίζει ενδοσπόρια. Τα κύτταρά του είναι ραβδοειδή, μήκους 2-6 μm και πλάτους 1-1,5 μm και απαντώνται κυρίως σε ζεύγη. Οι αποικίες του σε στερεό θρεπτικό μέσο, μετά από δύο ημέρες καλλιέργειας είναι φακοειδείς, με βουτυρώδες, λευκό ή υπόλευκο χρώμα και έχουν διάμετρο 1 με 2 mm. Οι αποικίες που αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες είναι διάσπαρτες, κυρτές, διαμέτρου 3 - 4 mm (Swings και Delay 1977).

Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης για τα περισσότερα στελέχη κυμαίνεται μεταξύ 25 - 30°C και το ιδανικό pH μεταξύ 3,5 - 7,5. Τα κύτταρα πεθαίνουν αν εκτεθούν σε 60 °C για 5 λεπτά (Swings και Delay 1977).

Πάνω από το 95% της γλυκόζης που χρησιμοποιείται από αυτό το μικροοργανισμό μετατρέπεται σε ισομοριακό μείγμα αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Μόνο το 3%

ενσωματώνεται στην κυτταρική του μάζα, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό του 48% του κυτταρικού άνθρακα. Το υπόλοιπο ποσοστό κυτταρικού άνθρακα προέρχεται από το εκχύλισμα ζύμης και την πεπτόνη ή τρυπτόνη που βρίσκονται στο μέσο ανάπτυξης του (Swings και De Ley 1977).

Τα περισσότερα στελέχη είναι ανθεκτικά στην αιθανόλη μέχρι 10% και σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης μέχρι 40%. Επίσης, παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη, πενικιλίνη, γενταμυκίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη και νεομυκίνη (Swings και De Ley 1977).

Τα μόνα σάκχαρα που χρησιμοποιεί ως πηγές άνθρακα είναι οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη, καθώς και ο δισακχαρίτης σακχαρόζη. Ο καταβολισμός τους πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού Entner-Doudoroff, από το οποίο παράγεται 1 mole ATP ανά mole γλυκόζης. Στο *Zymomonas* δε συμβαίνει γλυκονεογένεση, ενώ πραγματοποιείται ένας ατελής κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέως. (Swings και De Ley, 1977).

2.2.3 Σύγχρονη ταξινόμηση

Το *Zymomonas* κατατάσσεται στην ομάδα *Sphingomonas* της τάξης των α πρωτεοβακτηρίων του φύλου των πρωτεοβακτηρίων (Panesar et. al 2006).

2.2.4 *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* στέλεχος NCIMB 11163

Το *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163 διαθέτει ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 2,124,771 bp και τρία πλασμίδια, τα p11163_1, p11163_2 και p11163_3 μεγεθών 53,380 bp, 40,818 bp και 4,551 bp αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα του χρωμοσώματος σε GC είναι 46.83% και των πλασμιδίων 42.32%, 43.80% και 36.37% αντίστοιχα. Ολόκληρο το γονιδίωμα του περιλαμβάνει 1884 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθώς και 51 tRNA και 9 rRNA γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα (Kouvelis et. al 2009).

2.2.5 *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* στέλεχος CP4

Το συγκεκριμένο στέλεχος είναι ιδιαίτερα οξυγονοανθεκτικό, αναπτύσσεται γρήγορα και έχει μεγάλη απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης. Μαζί με το συγγενές του στέλεχος ZM4, προέρχονται από ζυμώσεις σακχαρότευτλου στην πόλη Ρεσίφε της Βραζιλίας. Αμφότερα

είναι γνωστό ότι έχουν καλύτερη απόδοση σε παραγωγή αιθανόλης όταν αναπτύσσονται σε γλυκόζη. Επίσης, έχουν υποστεί πολλές γενετικές τροποποιήσεις με σκοπό να αξιοποιηθούν με καλύτερο τρόπο για ζυμώσεις παραγωγής λιγνοκυτταρινικής βιομάζας.

Το γονιδίωμα του CP4 είναι κατά 57,727 bp μικρότερο από αυτό του ZM4 και η ομολογία τους αγγίζει το 99% . Το γονιδίωμα του CP4 περιλαμβάνει ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 1,998,637 bp και 5 πλασμίδια pCP4_1, pCP4_2, pCP4_3, pCP4_4 και pCP4_5, μεγεθών 36,892 bp, 33,915 bp, 32,400 bp, 30,952 bp και 30,440 bp αντίστοιχα. Περιέχει 1860 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 48 tRNA γονίδια και 2 συμπλέγματα γονιδίων rRNA. (Kouvelis et. al 2014).

2.2.6 *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* στέλεχος ATCC 10988

Αυτό το στέλεχος αρχικά ταυτοποιήθηκε σε ζυμώσεις του μεξικάνικου ποτού “pulque”. Αρχικά ονομάστηκε “*Thermobacterium mobile*”. Αποτελεί ένα από τα καλύτερα μελετημένα στελέχη του *Zymomonas mobilis* και έχει χρησιμοποιηθεί για τις περισσότερες βιοχημικές μελέτες του. Η αποδοτικότητά του στη ζύμωση είναι παρόμοια με το βιομηχανικό στέλεχος CP4 σε θρεπτικό μέσο πλούσιο σε σακχαρόζη. Έχει προκαλέσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των πολλών μικρών πλασμιδίων του.

Το *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 περιλαμβάνει ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 2,021,773 bp και έξι πλασμίδια , τα p10988_1, p10988_2, p10988_3, p10988_4, p10988_5 και p10988_6 μεγεθών 32,479 bp, 32,283 bp, 31,692 bp, 18,461 bp, 4,023 bp και 2,750 bp, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα του χρωμοσώματος σε GC είναι 46.22% και των πλασμιδίων 43.46%, 45.41%, 43.23%, 41.79%, 37.63% και 41.31%, αντίστοιχα. Ολόκληρο το γονιδίωμα περιέχει 1875 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, και στο χρωμόσωμα απαντώνται 48 tRNA και 6 rRNA γονίδια. (Pappas et. al 2011)

2.3 Παραγωγή αιθανόλης από το βακτήριο *Zymomonas mobilis* και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

2.3.1 Πλεονεκτήματα του *Zymomonas mobilis* σε σύγκριση με το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Πρωτίστως, το γεγονός ότι το *Z.mobilis* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, το καθιστά ικανό να παράγει αιθανόλη ακόμα και υπό αερόβιες συνθήκες. Επίσης, το *Z.mobilis* παράγει μικρή ποσότητα βιομάζας παραπροϊόντων. Ο Karsch το 1983 απέδειξε ότι υπό εργαστηριακές συνθήκες, η συνολική απόδοση παραγωγής αιθανόλης του *Z.mobilis* είναι κατά 6% υψηλότερη από αυτή του *S.cerevisiae*. Στο εν λόγω πείραμα και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες για 144 ώρες και κάθε 24 ώρες αναλύονταν το περιεχόμενο τους σε αιθανόλη, βιομάζα, οξέα και παραπροϊόντα.

Κάτωθι αναφέρονται ορισμένα επιπλέον προτερήματα του *Z.mobilis* όσον αφορά την παραγωγή αιθανόλης (Rogers 2007):

- Αισθητά ταχύτερος ρυθμός πρόσληψης σακχάρων και παραγωγής αιθανόλης (2-3 φορές ταχύτερα από το *S.cerevisiae*)
- Υψηλότερη αναφερόμενη παραγωγικότητα σε συνεχείς διεργασίες ζύμωσης (120-200 g/L) εν συγκρίσει με τον *S.cerevisiae* (30- 40 g/L)
- Απλές συνθήκες ανάπτυξης: Δεν απαιτείται ελεγχόμενη προσθήκη οξυγόνου για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης.
- Αντοχή στην αιθανόλη συγκρίσιμη ή καλύτερη από το ζυμομύκητα.
- Σε εργαστηριακές μελέτες πολλών ετών με διάφορα στελέχη του *Z.mobilis*, δεν έχει ανιχνευτεί καμία προσβολή από βακτηριοφάγο.

2.3.2 Το μεταβολικό μονοπάτι Entner–Doudoroff

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* απαντάται κυρίως σε ζεστό, τροπικό κλίμα, σε φυτά που έχουν υψηλή συγκέντρωση σακχάρων στο χυμό τους. Ο ιδιαίτερος μεταβολισμός του είναι

πιθανόν μια προσαρμογή για ανάπτυξη σε αυτά τα ιδιαίτερα οικολογικά ενδιαιτήματα όπου αναπτύσσεται (Conway 1992). Το μονοπάτι Entner-Doudoroff αποτελεί τον κορμό του κεντρικού του μεταβολισμού.

Το μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff μπορεί να θεωρηθεί ως εναλλάκτικό γλυκολυτικό τέτοιο του μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas που χρησιμοποιείται για τη γλυκόλυση από τους περισσότερους οργανισμούς. Και στα δύο μονοπάτια, σάκχαρα με 6 άνθρακες φωσφορυλιώνονται και στη συνέχεια διασπώνται από αλδολάσες σε δύο ενδιάμεσα μόρια με 3 άνθρακες. Η διαφορά τους έγκειται στη φύση των σακχάρων που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα. Στο μονοπάτι Entner-Doudoroff το 2-κετο- 3- δεοξυ- 6- φωσφογλυκονικό οξύ (KDPG) διασπάται από την αλδολάση του KDPG σε φωσφορικό άλας της γλυκεραλδεΐδης-3 και πυροσταφυλικό οξύ. Το *Zymomonas mobilis* είναι ο μόνος γνωστός οργανισμός που χρησιμοποιεί αυτό το μεταβολικό μονοπάτι με αναερόβιο τρόπο.

Όπως προαναφέρθηκε, η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη είναι οι μόνες πηγές άνθρακα για το βακτήριο. Αυτές οι ενώσεις μεταφέρονται μέσα στο κύτταρο μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης και εισάγονται στο μονοπάτι Entner-Doudoroff μέσω ATP-εξαρτώμενης φωσφορύλιωσης από συγκεκριμένες κινάσες. Το μοναδικό μόριο 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης που παράγεται από κάθε εξόζη, αποδίδει δύο μόρια ATP καθώς μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Συνεπώς, αποκτά μόνο 1 mol ATP ανά μόριο γλυκόζης.

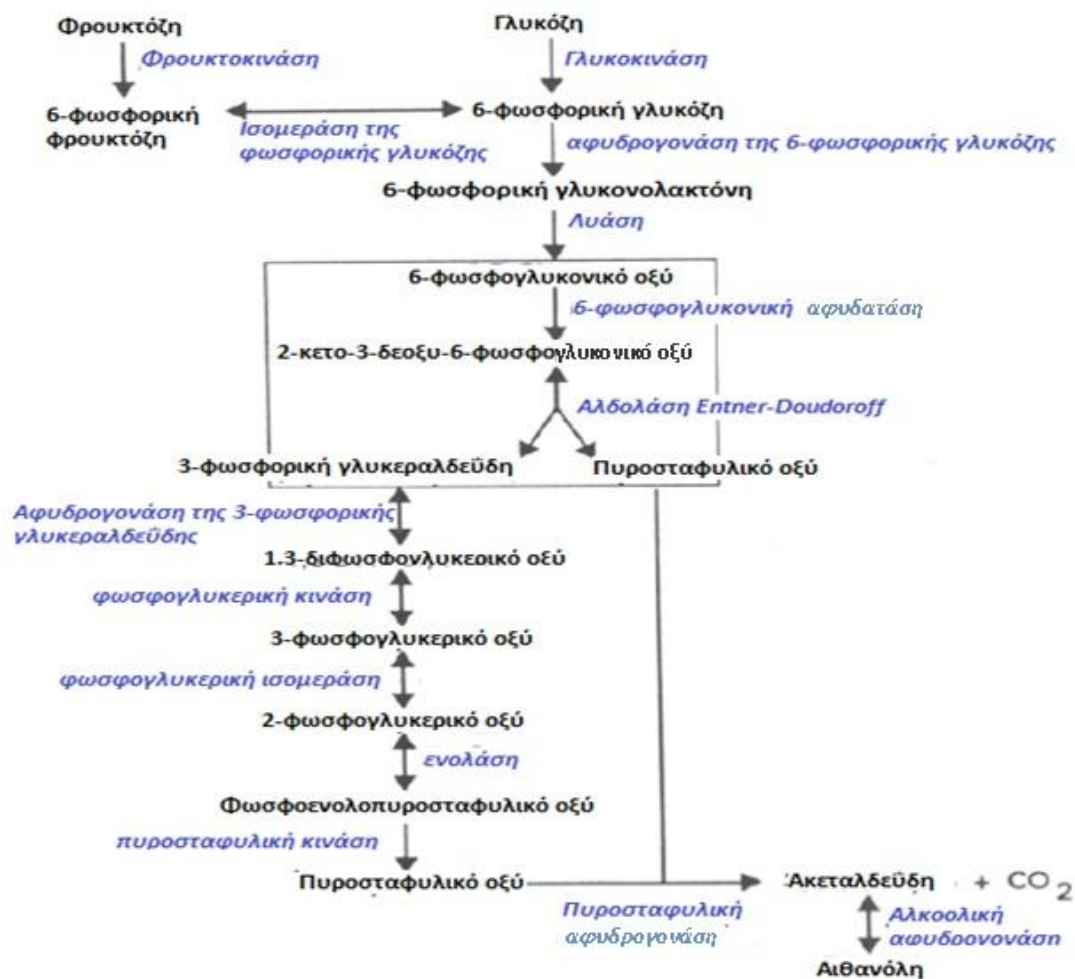
Για να αποκτήσει την απαιτούμενη ενέργεια για την ανάπτυξή του, το βακτήριο πρέπει να διατηρήσει μια ταχεία ροή άνθρακα που υπερβαίνει το 1 mol/min/mg ολικής πρωτεΐνης του κυττάρου. Αυτή η γοργή ροή διευκολύνεται από την υψηλή έκφραση γλυκολυτικών και αλκοολογενών ενζύμων, τα οποία συνιστούν σχεδόν το 50% της διαλυτής πρωτεΐνης. (Conway 1992)

Η φρουκτόζη εισέρχεται στο μονοπάτι μέσω μετατροπής της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε 3- φωσφορικής γλυκεραλδεΐδη από την ισομεράση της φωσφογλυκόζης. Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης του *Z. mobilis* δύναται να χρησιμοποιήσει NAD ή NADP με σχεδόν ίδια αποδοτικότητα, επομένως το ένζυμο μπορεί να παράξει ισοδύναμα του NADPH και να ισορροπήσει τις αντιδράσεις οξειδωσης- αναγωγής της ακεταλδεΐδης μέσω της αλκαλικής αφυδρογονάσης. Η ακεταλδεΐδη και το CO₂ δημιουργούνται από πυροσταφυλικό οξύ μέσω αποκαρβοξυλίωσης που καταλύεται από την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση. (Conway 1992). Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση είναι ένα μοναδικό ένζυμο για το *Z. mobilis*, δεδομένου ότι απαντάται σπάνια σε βακτήρια. Βρέθηκε ότι αποτελεί πάνω από 5% της διαλυτής πρωτεΐνης των κυττάρων που αναπτύσσονται με

γλυκόζη ως υπόστρωμα (Doelle 1993).

Ο δισακχαρίτης σακχαρόζη, όταν χρησιμοποιείται, διασπάται εξωκυττάρια σε φρουκτόζη και γλυκόζη οπότε δεν απαιτείται να μεταφερθεί πρώτα εντός του κυττάρου. Το *Z. mobilis* φαίνεται να είναι το μόνο βακτήριο που βασίζεται στην εξισορρόπηση εξωγενούς και ενδογενούς συγκέντρωσης σακχάρων για την πρόσληψη των σακχάρων του (Sahm και Bringer- Meyer 2006). Η ικανότητα υδρόλυσης της σακχαρόζης δεν είναι κοινό χαρακτηριστικό σε όλα τα στελέχη του βακτηρίου. Τα στελέχη που δύνανται να την υδρολύσουν, χρησιμοποιούν το ένζυμο λεβανосуκράση (Doelle 1993). Αυτά τα στελέχη, σύμφωνα με αντίστοιχες μελέτες, είναι τα *Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821) (Blackbeard and Doelle 1983), *Z. mobilis* ZM1 (Gunasekaran et. al 1990), *Z. mobilis* CP4 (O' Mullan et. al 1991) και *Z. mobilis* Z-C-6 (Yanase et. al 1991)

Αξίζει να τονιστεί ότι οι καλλιέργειες που προορίζονται για παραγωγή αιθανόλης δεν πρέπει να αερίζονται. Αν και το *Z. mobilis* είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, υπό αερόβιες συνθήκες παρατηρείται μειωμένο επίπεδο παραγωγής αιθανόλης μέσω του μονοπατιού Entner-Doudoroff. Συγκεκριμένα, παρουσία οξυγόνου είναι διαθέσιμο λιγότερο NADH για τη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη, επομένως η ακεταλδεΐδη συσσωρεύεται σε περιοριστικές για την ανάπτυξη του κυττάρου συγκεντρώσεις. (Bringer et al. 1984, Pankova et al. 1988). Αυτή η μείωση αιθανόλης συνοδεύεται από την αύξηση παραγωγής οξικού οξέος. Επιπλέον, παράγεται ένα μεγάλο εύρος παραπροϊόντων, που ποικίλουν ανάλογα με το στέλεχος και τις συνθήκες ανάπτυξης (Buchholz and Eveleigh 1990) .



Εικόνα 2.6 Μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff στο *Zymomonas mobilis* (Προσαρμογή από Conway 1992)

2.3.3 Υποστρώματα για την παραγωγή αιθανόλης

Έχουν γίνει ποικίλες προσπάθειες για να χρησιμοποιηθεί το *Zymomonas mobilis* στη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση ανανεώσιμων πηγών όπως η πατάτα, το σιτάρι, η βύνη, η κασάβα και το καλαμπόκι. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί δύο μέθοδοι: Η μέθοδος “Glucotech” από το πανεπιστήμιο του Queensland, και η μέθοδος “Bio-hol” από το πανεπιστήμιο του Toronto (Doelle 1993, Panesar 2006).

Σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο, το άμυλο ή η γλυκόζη μετατρέπονται σε αιθανόλη και ζωοτροφή μέσω μιας διαδικασίας ενός σταδίου με τη χρήση του *Zymomonas mobilis*.

Η δεύτερη μέθοδος είναι μια πρωτοποριακή μέθοδος συνεχούς ζύμωσης υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιεί το *Zymomonas mobilis*. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μια διαδικασία δύο σταδίων, όπου στο πρώτο στάδιο γίνεται η ανάπτυξη του βακτηρίου και στο δεύτερο η παραγωγή αιθανόλης. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η συνεχής ανάπτυξη του βακτηρίου.

Η μελάσα είναι το υπόλειμμα που απομένει μετά τον καθαρισμό της σακχαρόζης και αποτελεί το φθηνότερο υπόστρωμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης. Εντούτοις, ορισμένα συστατικά της, όπως υψηλά επίπεδα ανόργανων αλάτων (χλωρίδια του καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου) αναστέλλουν την ζύμωση. Το *Z. mobilis* χρησιμοποιείται για την αφαλάτωση της μελάσας η οποία στη συνέχεια οδηγεί σε γρηγορότερο ρυθμό παραγωγής αιθανόλης και εν συνόλω σε υψηλότερη απόδοση (Rhee et. al 1984). Η ζύμωση της μελάσας από το *Z. mobilis* για να είναι αποδοτική απαιτεί την προσθήκη μικρών ποσοτήτων μαγνησίου, θείου και φωσφορικού αμμωνίου. (Panesar 2006)

Έχουν γίνει κι άλλες προσπάθειες για να επεκταθεί το εύρος των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων. Ο μεταβολισμός της μαννιτόλης από το *Z. mobilis* είναι οξυγονοεξαρτώμενος και οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή αιθανόλης αλλά αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέως (Panesar 2006). Η άμεση ζύμωση κασάβας μπορεί να γίνει με τη χρήση ενός μίγματος του στελέχους ZM4 του *Z. mobilis* και της ζύμης *Endomycopsis fibuligera*. Την καλύτερη αποδοτικότητα είχε η μίξη των στελεχών *E.fibuligera* NRRL και *Z.mobilis* ZM4 με παραγωγή αιθανόλης 12,6 % v/v (Reddy and Basappa 1996). Ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος του *Z. mobilis* ZM4 (pZB5) έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει και την ξυλόζη σε αιθανόλη, εκτός από τη γλυκόζη. Συγκεντρώσεις γλυκόζης ή ξυλόζης 50 g/L παράγουν 5 g/L/h αιθανόλης (Joachimsthal and Rogers 2000, Panesar 2006). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το *Z. mobilis* μπορεί να παράγει αιθανόλη χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα εκχυλίσματα μήλων, πορτοκαλιών, ροδάκινων και καρπουζιών, χωρίς την προσθήκη άλλων θρεπτικών συστατικών, χωρίς όμως κάποιο βιομηχανικό ενδιαφέρον (Kollios et. al 1989).

2.3.4 Άλλα προϊόντα που παράγονται από το *Zymomonas mobilis*

Φυσικά παραγόμενα προϊόντα:

Παραγωγή σορβιτόλης. Όταν το *Z. mobilis* αναπτύσσεται σε σακχαρόζη ή σε μίγμα γλυκόζης με φρουκτόζη, η απόδοση σε αιθανόλη μειώνεται . Ανάλυση με φασματοσκοπία NMR απέδειξε ότι αυτή η μείωση οφείλεται στο σχηματισμό σορβιτόλης από τη φρουκτόζη (Barrow 1984). Εκτενείς μελέτες κατέδειξαν ότι η παραγωγή σορβιτόλης οφείλεται σε μια αντίδραση ενός βήματος μέσω της οξειδοαναγωγής της γλυκόζης- φρουκτόζης (GFOR) που μέχρι τώρα έχει ανιχνευτεί μόνο σε αυτό το βακτήριο. Επιπλέον, σε μεταγενέστερη μελέτη επισημάνθηκε ότι το ένζυμο GFOR θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμεύσει στην παραγωγή λακτοβιονικού οξέως (LBA), ένα παράγωγο της λακτόζης το οποίο έχει πολλές εφαρμογές σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα , στη βιοϊατρική καθώς και σε χημικές βιομηχανίες και στη βιομηχανία τροφίμων (Satory 1997).

Παραγωγή λεβάνης. Η λεβάνη είναι ένα πολυμερές φρουκτόζης με πιθανή εφαρμογή στην τεχνολογία τροφίμων και στην ιατρική. Παρατηρήθηκε ότι η μείωση παραγωγής αιθανόλης όταν το *Z. mobilis* αναπτύσσεται σε σακχαρόζη, οφείλεται στη δημιουργία λεβάνης. (Dawes και Ribbons 1966). Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι η λεβάνη που παράγεται από στελέχη *Z. mobilis* έχει αντικαρκινικές ιδιότητες (Calazans et al. 1997).

Παραγωγή οπανοειδών. Το *Z. mobilis* έχει τη μεγαλύτερη ολική περιεκτικότητα σε οπανοειδή ανάμεσα σε όλα τα βακτήρια (30 mg/g επί ξηρού βάρους). Επιπλέον, σε αυτό το βακτήριο έχει χαρακτηριστεί ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι οπανοειδών λιπιδίων, το οποίο βρέθηκε ότι σχηματίζει ένα βιοσυνθετικό οπερόνιο. Αυτές οι ενδείξεις θα μπορούσαν να πυροδοτήσουν νέες εφαρμογές σε σχέση με την παραγωγή οπανοειδών (Ming Xiong He et. al 2014).

Προϊόντα κατόπιν γενετικής τροποποίησης:

Παραγωγή ηλεκτρικού οξέως: Το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα πολύ σημαντικό χημικό στοιχείο. Πρόσφατα κατασκευάστηκε ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος *Z. mobilis* για παραγωγή του . Αυτό επιτεύχθηκε μέσω εξουδετέρωσης των γονιδίων *pdc* και *ldhA*. (Seo et al. 2007).

Παραγωγή ισοβουτανόλης. Τα τελευταία χρόνια δίνεται όλο και περισσότερη προσοχή στην παραγωγή βουτανόλης, λόγω των πολλών προτερημάτων της ως υγρό βιοκαύσιμο.

Πρόσφατα δημιουργήθηκε ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος *Z. mobilis* ZM4 για την παραγωγή ισοβουτανόλης. Τα γονίδια της 2- κετοϊσοβαλερικής αποκαρβοξυλάσης (*kivd*) και της αλοολικής αφυδρογονάσης (*adhA*) από το *Lactococcus lactis* εισήχθησαν στο γονιδίωμα του βακτηρίου (He et. al 2014).

Παραγωγή β- καροτενίου. Πρόσφατα εισήχθησαν τα γονίδια *crtB*, *crtE*, *crtI* και *crtY* μέσω σύζευξης στο *Z. mobilis* και αυτό είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή β- καροτενίου (Misawa et. al 1991).

2.3.5 Γενετικές τροποποιήσεις του *Zymomonas mobilis*

Στη συνέχεια αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένες περιπτώσεις γενετικής τροποποίησης του *Zymomonas mobilis* που αποσκοπούν στη βελτίωση των στελεχών του βακτηρίου με απώτερο σκοπό τη χρησιμοποίησή του σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή αιθανόλης.

α) Μεταλλαξιγένεση

Η υπεριώδης ακτινοβολία και η 1- μεθυλ- 3- νιτρο- 1- νιτρογουανιδίνη (NTG) έχουν υπάρξει αποτελεσματικά μεταλλαξιγόνα για αυτό το βακτήριο (Panesar 2006). Έχει αναπτυχθεί ένα μεταλλαγμένο στέλεχος μετά από επίδραση με NTG το οποίο παρουσίασε βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης σε μαννιτόλη. (Buccholz 1988). Επίσης, απομονώθηκε ένα το οσμοανθεκτικό μετάλλαγμα SBE 15 του στελέχους ZM4 που παρουσίαζε μεγάλη παραγωγή αιθανόλης όταν καλλιεργούνταν σε υδρολυμένη μελάσα από σακχαρότευτλο (Park and Baratti 1991). Ακόμα, απομονώθηκε ένα σταθερό θερμοανθεκτικό μετάλλαγμα του στελέχους ZM4 με σχεδόν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη από το φυσιολογικό στέλεχος (Sreekumar and Bassara 1995). Τέλος, με τη χρήση NTG απομονώθηκε το μετάλλαγμα *suc40* του στελέχους CP4 το οποίο είναι υπερανθεκτικό στη σακχαρόζη (δύναται να αναπτυχθεί σε ποσοστό σακχαρόζης 40% w/v) (Supple et. al 2000).

β) Κλωνοποίηση και μεταφορά ετερόλογου DNA

Ο γενετικός ανασυνδυασμός του *Z. mobilis* εν μέρει παρακωλύεται επειδή τα περισσότερα στελέχη του είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά κοινής χρήσης (Buccholz and Eveleigh 1986).

Ο ευκολότερος τρόπος για να ήταν επιτυχημένος ο ανασυνδυασμός στελεχών του, θα ήταν να υπήρχαν φυσικά στελέχη χωρίς πλασμίδια, δεδομένου ότι αυτό το βακτήριο είναι πολύ ανθεκτικό και τα πλασμίδια του κληρονομούνται πολύ σταθερά από γενιά σε γενιά. (Buccholz and Eveleigh 1990). Επίσης, τα «ξένα» πλασμίδια που εισάγονται μέσα στο κύτταρο δεν παραμένουν σταθερά, λόγω της παρουσίας των συστημάτων τροποποίησης I και IV που αποδομούν το ξένο DNA (Kerr et al. 2011, Typas and Galani 1992, Dunn 2015). Οι τρόποι με τους οποίους γίνεται μεταφορά πλασμιδίων στο *Z. mobilis* σε εργαστηριακό επίπεδο, είναι ο μετασχηματισμός και η σύζευξη.

Έχουν αναπτυχθεί ορισμένα πρωτόκολλα μετασχηματισμού τα οποία περιλαμβάνουν χρήση χλωριούχου μαγνησίου, διπλού θερμικού σοκ, κ. ά. (Buccholz and Eveleigh 1990). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης (Okamoto and Nakamura 1992, Lam 1993). Ωστόσο, οι παραπάνω μέθοδοι μετασχηματισμού είναι συχνά αναποτελεσματικές σε άλλα εργαστήρια.

Η σύζευξη παραμένει ένας αποτελεσματικός τρόπος μεταφοράς ετερόλογου DNA στο *Z. mobilis* (Buccholz and Eveleigh 1990, Skotnicki et. al 1982, Dunn 2015)

γ) Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων- φορέων (vectors)

Οι πλασμιδιακοί φορείς για το *Z. mobilis* διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: Σε πλασμίδια ευρέος φάσματος (broad host range plasmids), όπως το pBR325 (Yanase et. al 1986, Yoon and Pack 1987), το RSF 1010 και το RP4 (Panesar 2006) σε ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έχουν κατασκευαστεί από τροποποίηση των προαναφερθέντων πλασμιδίων και σε πλασμίδια που έχουν δημιουργηθεί από συνδυασμό πλασμιδίων του *Z. mobilis* και του βακτηρίου *Escherichia coli* (Panesar 2006). Για τη δεύτερη περίπτωση έχουν χρησιμοποιηθεί ως επί το πλείστον τα 4 φυσικά πλασμίδια pZMO1, pZMO2, pZM2 και pZM3 του *Z. mobilis* ATCC 10988, καθώς επίσης και φυσικά πλασμίδια από τα στελέχη ZM6100 και NCIMB 8827. (So et. al. 2014, Cao et. al. 2016)

Αργότερα σε αυτό το κεφάλαιο αναφέρονται αναλυτικά ορισμένοι φορείς για το *Z. mobilis*.

2.4 Η σύζευξη στο *Zymomonas mobilis*

2.4.1 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης που έχουν κατασκευαστεί για το *Z. mobilis*

Ο Conway το 1986 κατασκεύασε μερικούς φορείς που μπορούν να μεταφερθούν μέσω σύζευξης από κύτταρα *Escherichia coli* σε κύτταρα *Z. mobilis* με υψηλή συχνότητα, 10^{-2} ανά κύτταρο δέκτη (σε αντίθεση με το 10^{-5} με 10^{-4} από φορείς παλαιότερων μελετών). Επίσης αυτοί οι φορείς θα μπορούσαν να βοηθήσουν άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια με χαμηλή αποτελεσματικότητα στη σύζευξη.

Ο πρώτος φορέας, ο pLOI199 δημιουργήθηκε από σύντηξη ενός τμήματος του πλασμιδίου ευρέος φάσματος RSF1010 με το πλασμίδιο pXJ002, το οποίο περιέχει έναν εκκινητή για το γονίδιο *cat*. Τα τμήματα ήταν προϊόντα πέψης με το περιοριστικό ένζυμο *Pst*I.

Ο δεύτερος φορέας, ο pLOI193, δημιουργήθηκε από την προσθήκη ενός γονιδίου *mob* (βλ. παρακάτω) από το πλασμίδιο RP4, το οποίο άρθηκε από το πλασμίδιο pSUP205. Έτσι συμπληρώθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη. Τέλος, κατασκευάστηκε ένα παράγωγο του pLOI193, το pLOI201 στο οποίο αφαιρέθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη.

Ο Brestic- Goachet το 1987 κινητοποίησε τους φορείς ευρέος φάσματος pKT210, pKT212, pKT248, pKT240 και pGSS33 στο *Z. mobilis* με τη βοήθεια διάφορων συζευκτικών πλασμιδίων. Αυτοί οι φορείς παρέμειναν στο βακτήριο για πολλές γενιές.

Επίσης το 1987, οι Afendra et. al κατασκεύασαν ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεγέθους 7,9 kb, το pDS212. Αυτό το πραγματοποίησαν με σύντηξη τμημάτων του πλασμιδίου pBR325 του *Escherichia coli* και του φυσικού πλασμιδίου pZM02 του *Z. mobilis* ATCC 10988. Τα τμήματα ήταν προϊόντα πέψης με το περιοριστικό ένζυμο *Eco*RI. Το νέο πλασμίδιο μεταφέρθηκε αποτελεσματικά σε κύτταρα *Escherichia coli* και *Z. mobilis* με βακτηριακή σύζευξη, με τη βοήθεια του πλασμιδίου pRK2013.

Οι Cho et. al το 1989 κατασκεύασαν το pOK2, επίσης ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από σύντηξη πλασμιδίων *E. coli* - *Z. mobilis*, το pBR329 και το pNSW2 του στελέχους ZM6100 αντίστοιχα. Η σύζευξη επιτεύχθηκε επίσης με τη βοήθεια του πλασμιδίου pRK2013. Ο

συγκεκριμένος φορέας παρέμεινε σταθερός στο *Z. mobilis* χωρίς τη χρήση αντιβιοτικού για τουλάχιστον 300 γενιές.

Ο Reynen το 1990 κατασκεύασε τους φορείς pPTZ1, pPTZ3 και pPTZ4 οι οποίοι μεταγράφονται από τον υποκινητή για την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (*pdc*). Κατασκευάστηκαν από το πλασμίδιο pZM02 του *Z. mobilis*, και από τμήματα των πλασμιδίων pKK223-3 και pBR322 του *E. coli*, μαζί με τμήματα του φάγου M13mp18.

Ο Dong το 2011 κατασκεύασε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pHW20a, με σκοπό να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που παρουσίαζε το πλασμίδιο pLOI193 που κατασκεύασε ο Conway (χαμηλή αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού, πολύ μεγάλο μέγεθος και λίγες θέσεις ενζύμων περιορισμού). Το εν λόγω πλασμίδιο παρουσιάζει αισθητά μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού, σταθερότητα για περίπου 120 γενιές και τα γονίδια του είναι εύκολα διαχειρίσιμα. Περιλαμβάνει τα γονίδια *repA*, *repB* και *repC*, περιέχει την περιοχή αντιγραφής *oriV*, δύο γονίδια *mob*, το γονίδιο *lacZ* που χρησιμεύει στην επιλογή αποικιών, και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη. Το μέγεθός του μειώθηκε σε 9,9 kb, μέσω διαγραφής των γονιδίων *smrA*, *smrB* και *cmr* από το pLOI193 που είχε μέγεθος 13,4 kb. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι έγινε ενίσχυση με το γονίδιο *gfo* που παράγει την οξειδοοξειδοκτάση γλυκόζης- φρουκτόζης (GFOR). Το pHW20a-*gfo* μεταφέρθηκε στο *Z. mobilis* ZM4 για υπερέκφραση, εντούτοις τα μεταβολικά μονοπάτια που συνδέονται με την παραγωγή αιθανόλης δεν επηρεάστηκαν.

Οι So et. al το 2014 ανέπτυξαν ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *E. coli* - *Z. mobilis*, το pZ7C, που βασίζονταν στο πλασμίδιο pZMO7 (pZA1003) του *Z. mobilis* 11163. Σκοπός τους ήταν να μελετήσουν την πιθανή χρήση του σε έκφραση πρωτεϊνών και σε πρωτεομικές εφαρμογές μέσα στο *Z. mobilis*.

Τέλος, οι Cao et. al το 2016 κατασκεύασαν τρεις φορείς, τους pSUZM1, pSUZM2 και pSUZM3. Αυτοί οι φορείς δημιουργήθηκαν από τμήμα του χρωμοσώματος του *Z. mobilis* ZM4 καθώς και από δύο φυσικά πλασμίδια του, τα pZZM401 και pZZM402. Περιέχουν την περιοχή αντιγραφής *oriC* του χρωμοσώματος του *Z. mobilis* ZM4 και τον υποκινητή για την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (*pdc*). Ο συγκεκριμένος υποκινητής χρησιμοποιήθηκε για να εκφραστεί ένα γονίδιο για τη γλυκοαμυλάση από το μύκητα *Aspergillus awamori* που

επίσης υπάρχει στους νέους φορείς. Η γλυκοαμυλάση θεωρήθηκε ότι θα μπορούσε να βελτιώσει την παραγωγή αιθανόλης του *Z. mobilis*.

2.4.2 Συζευκτικά στοιχεία στο *Z. mobilis*

Σύμφωνα με στοιχεία από το National Center for Biotechnology Information (NCBI), μεταξύ των στελεχών *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NCIMB 11163 *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* CP4 και *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NCIMB 10988 βρέθηκαν συζευκτικά στοιχεία στα εξής πλασμίδια:

- 1) Στο πλασμίδιο pZMOB01 του 10988 γονίδιο που κωδικοποιεί τμήμα της πρωτεΐνης TraY.
- 2) Στο πλασμίδιο pZMOB04 του 10988 γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TraJ.
- 3) Στο πλασμίδιο pZA1001 του 11163 γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TraJ.
- 4) Στο πλασμίδιο pZA1003 του 11163 βρίσκεται ένα γονίδιο *mob* που κωδικοποιεί μια ριλαξάση.

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της ριλαξάσης ORF που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mob* του φυσικού πλασμιδίου pZA1003 του στελέχους NCIMB 11163 (εικόνα 2.7). Φαίνεται ότι η αμινοξική αλληλουχία της εν λόγω ριλαξάσης δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με καμία από τις 6 πρωτεϊνικές οικογένειες που έχουν μελετηθεί.



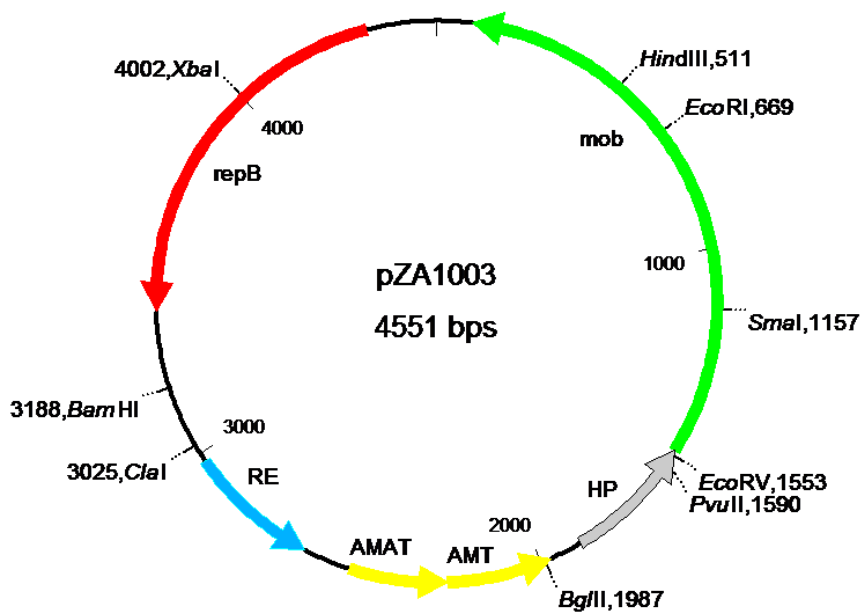
Εικόνα 2.7 Τεταρτοταγής δομή του προϊόντος του γονιδίου *mob* του φυσικού πλασμιδίου pZA1003 που υπάρχει στο NCIMB 11163 (από βιοπληροφορική ανάλυση στην πλατφόρμα i-tasser)

2.4.3 Το πλασμίδιο pZA1003 του *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NCIMB 11163

Πρόκειται για ένα κινητοποιήσιμο πλασμίδιο που έχει μέγεθος 4551 bp (εικόνα 2.8).

Περιέχει έξι αναγνωστικά πλαίσια τα οποία κωδικοποιούν δυνητικά τα εξής πιθανά γονιδιακά προϊόντα:

- μία ριλαξάση (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mob*) (εικόνα 2.7)
- μία πρωτεΐνη που έχει χαρακτηριστεί υποθετική και ο ρόλος της μπορεί να συνδέεται με την κινητοποίηση του πλασμίδιου στα πλαίσια σύζευξης,
- ζεύγος πρωτεϊνών που αποτελούν σύστημα τοξίνης- αντιτοξίνης τύπου II,
- μία ενδονουκλεάση περιορισμού
- μία πρωτεΐνη RepB για την εκκίνηση της αντιγραφής του πλασμίδιου



Εικόνα 2.8: Περιοριστικός και γενετικός χάρτης πλασμίδιου pZA1003

2.5 Σκοπός της εργασίας

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* έχει ελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει ως προς την παραγωγή αιθανόλης. Επειδή όμως αυτή περιορίζεται από τα 3 μόνο υποστρώματα (γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη) που καταβολίζει το βακτήριο, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι κλωνοποίησης και ετερόλογων γονιδίων σε αυτό με κύριο σκοπό την αύξηση του εύρους των ζυμώσιμων υδατανθράκων από αυτό.

Στο εργαστήριό μας και με τους πλασμιδιακούς φορείς που διαθέτουμε, ο μοναδικός αποτελεσματικός τρόπος μεταφοράς γενετικού υλικού στο *Z. mobilis* παραμένει η σύζευξη.

Το φυσικό πλασμίδιο pZA1003 του *Z. mobilis* NCIMB 11163 διαθέτει μεταξύ των άλλων και δύο περιοχές με αναγνωστικά πλαίσια εντός αυτών, η μία εκ των οποίων είναι απαραίτητη για την αντιγραφή και τη διατήρησή του στο *Z. mobilis*, ενώ η άλλη παρουσιάζει ιδιότητες κινητοποίησης στα πλαίσια επιβοηθούμενης σύζευξης μεταξύ κυττάρων *E. coli* βάσει προηγούμενων πειραμάτων που έχουν γίνει στο εργαστήριό μας.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η κατασκευή ενός πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης και μεταφοράς μέσω σύζευξης σε στελέχη *Z. mobilis* ο οποίος εκτός από την περιοχή *rep* να διαθέτει επιπλέον και την περιοχή *mob*. Συγκεκριμένα, θέλουμε να διερευνήσουμε:

Την ιδιότητα της περιοχής *mob* σε πειράματα επιβοηθούμενης σύζευξης μεταξύ *E. coli* x *Z. mobilis*. Οι πλασμιδιακοί φορείς που έχουν μεταφερθεί μέχρι τώρα μεταξύ των δύο βακτηρίων βασίζουν την ιδιότητα αυτή σε στοιχεία κινητοποίησης από πλασμίδια του *E. coli* που επιβοηθούνται από συζευκτικά πλασμίδια της ομάδας ασυμβατότητας IncP.

Την πιθανότητα επιβοηθούμενης κινητοποίησης μεταξύ κυττάρων *Z. mobilis* μέσω επιβοηθούμενης σύζευξης. Αυτό μπορεί να αποτελέσει μία ένδειξη για το αν τα πλασμίδια του *Z. mobilis* διαθέτουν συζευκτικές ιδιότητες, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν σχετικά στοιχεία, ενώ οι πληροφορίες από τις αλληλουχίες των πλασμιδίων είναι πολύ περιορισμένες. Η απελευθέρωση γενετικού υλικού από το *Z. mobilis* είναι ένα στοιχείο που αξίζει να διερευνηθεί, αν το βακτήριο αυτό χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία για παραγωγή αιθανόλης, ή αν χρησιμοποιηθεί σε ζυμώσεις λόγω των ιδιαίτερων αρωματικών γεύσεων που προσφέρει στα ποτά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

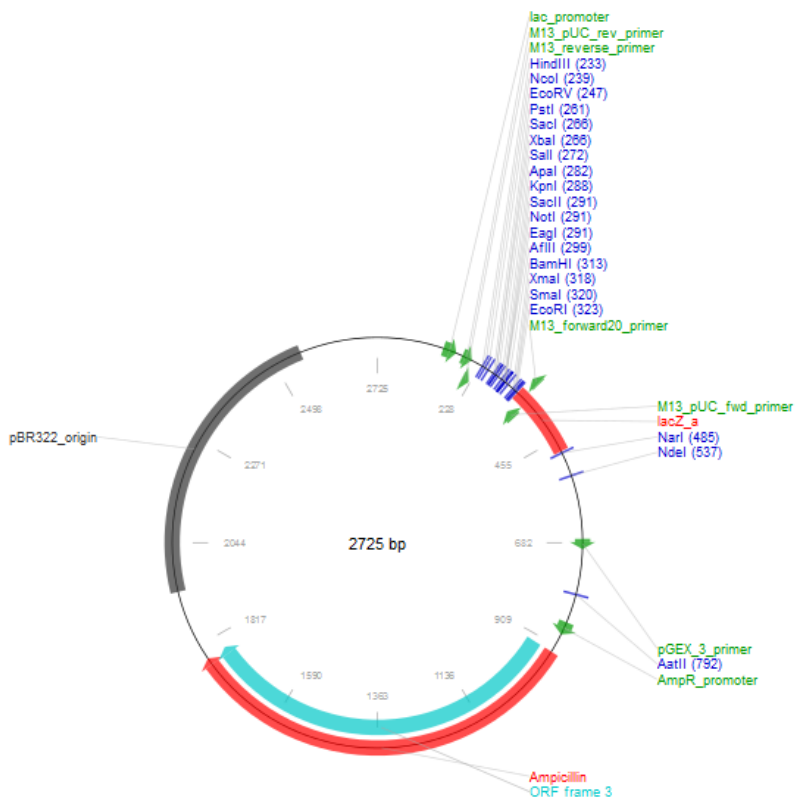
Πίνακας 3.1: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Στέλεχος	Γονότυπος	Βιβλιογραφία
<i>E. coli</i> DH5a	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> φ80 <i>dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169, <i>hsdR17(rK⁻mK⁺), λ⁻</i>	Sambrook et. al. 1989, Taylor et. al 1993
<i>E. coli</i> HMS174	F ⁻ <i>recA1 hsdR(rK12⁻mK12⁺)</i> (DE3) (Rif ^R)	Slater et. al. 1992
<i>E. coli</i> SM10	<i>pro, res2 hsdR17 (rK2 mK+)</i> <i>recA2</i> with an integrated RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7, T _p	Simon et al. 1983
<i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163	Αγρίου τύπου στέλεχος	So et. al. 2014
<i>Z. mobilis</i> CP4	Αγρίου τύπου στέλεχος	Skotnicki et. al. 1980, Savvides et. al. 2001
<i>Z. mobilis</i> CTZ1	Παράγωγο του ATCC10988, Tc ^R	Αφένδρα Α., προσωπική επικοινωνία

Πίνακας 3.2: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

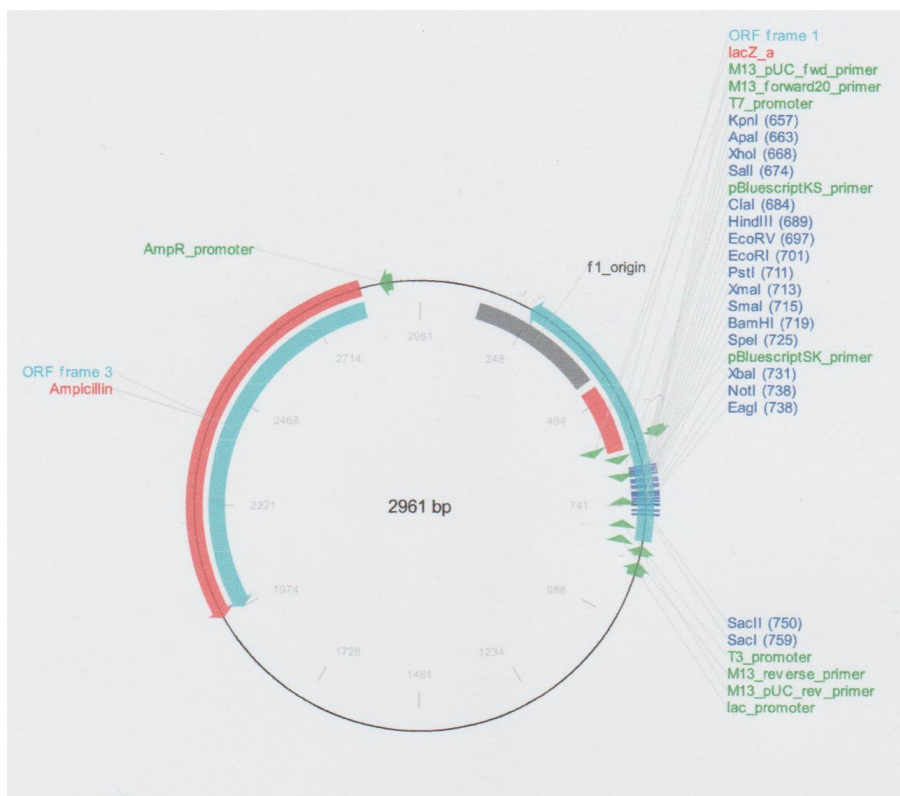
Πλασμίδιο	Φαινοτυπικός δείκτης	Μοριακό Μέγεθος (bp)	Βιβλιογραφία
pDB126	Cm ^R	22.666	Balzer et. al 1994
pRK2013	Km ^R	48.000	Figurski and Helinski 1979
pUCBM21	Amp ^R	2725	Boehringer Mannheim

pZA1003	-	4551	So et. al. 2014
pUCBM21rep	Amp ^R	4757	Κοτολόσι 2013
pBlueScript II SK (+)	Amp ^R	2961	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pBR328	Amp ^R , Tc ^R , Cm ^R	4907	Soberon et. al. 1980
pUCBM21Zmob	Amp ^R	5213	Καμπανός κ.ά. 2011
pUCBM2,7	Amp ^R	5321	Μητσόπουλος Μ., προσωπική επικοινωνία



Εικόνα 3.1: Περιοριστικός χάρτης πλασμιδίου pUCBM21

- ❖ Αν στο πλασμίδιο pZA1003 γίνει πέψη με τα ένζυμα *BamHI* και *EcoRI* προκύπτει ένα τμήμα που περιέχει το γονίδιο *repB* και μέρος του γονιδίου *mob*. Αυτό το τμήμα εντέθηκε στο πλασμίδιο pUCBM21, κατόπιν πέψης του με τα ίδια ένζυμα. Αυτή η αντικατάσταση οδήγησε στον σχηματισμό του pUCBM21rep.
- ❖ Αν στο πλασμίδιο pZA1003 γίνει πέψη με τα ένζυμα *XbaI* και *BglII* προκύπτει ένα τμήμα που περιέχει μέρος του γονιδίου *repB* το γονίδιο *mob* καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί την υποθετική πρωτεΐνη (HP). Αυτό το τμήμα εντέθηκε στο πλασμίδιο pUCBM21, κατόπιν πέψης του με τα ίδια ένζυμα. Αυτή η αντικατάσταση οδήγησε στον σχηματισμό του pUCBM21Zmob.



Εικόνα 3.2: Περιοριστικός χάρτης πλασμιδίου pBlueScript II SK (+)

- ❖ Το πλασμίδιο pBluescript είναι συνδυασμός πλασμιδίου και φάγου (phagemid). Περιέχει το γονίδιο *lacZ* εντός του οποίου βρίσκεται ένας πολυσυνδέτης. Το γονίδιο *lacZ* συμμετέχει στη διαδικασία επιλογής αποικιών βάσει λευκού και

μπλε χρώματος που περιγράφεται αργότερα. Επίσης περιέχει το γονίδιο που συμμετέχει στη μεταγραφή του φάγου f1.



Εικόνα 3.3: Περιοριστικός χάρτης πλασμιδίου pBR328 (Addgene 2018)

- ❖ Το πλασμίδιο pBR328 κατασκευάστηκε από σύντηξη των πλασμιδίων pBR325 και pBR322. Ο λόγος που το pBR328 προτιμήθηκε του pBR325 στην παρούσα διατριβή είναι το γεγονός ότι δεν περιέχει την περιοχή *oriT*. Όπως έχει αναφερθεί και στο κεφάλαιο «Εισαγωγή», η περιοχή *oriT* είναι μια μικρή αλληλουχία DNA στην οποία προσδένεται η ριλαξάση ώστε να πραγματοποιηθεί η σύζευξη. Επομένως, αν χρησιμοποιείτο το pBR325 για την πραγματοποίηση συζεύξεων, θα υπήρχε πιθανότητα να μεταφερθεί και αυτό μέσω σύζευξης, το οποίο θα ήταν ανεπιθύμητο.

3.2 Θρεπτικά υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης Luria Broth (LB) για τα στελέχη *E. coli* και ZymoBroth (ZB) για τα στελέχη *Z. mobilis*.

Πίνακας 3.3: Σύσταση του θρεπτικού μέσου Luria Broth

NaCl	1% w/v
Τρυπτόνη	1% w/v
Εκχύλισμα ζύμης	0,5% w/v

Πίνακας 3.4: Σύσταση του θρεπτικού μέσου ZymoBroth

Γλυκόζη	2% w/v
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1% w/v
KH ₂ PO ₄	0,1% w/v
MgSO ₄	0,05% w/v
Εκχύλισμα ζύμης	0,5% w/v

Για την παρασκευή των στερεών θρεπτικών μέσων προστίθεται 1,8% w/v άγαρ στο αντίστοιχο υγρό. Τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης αποστειρώνονται στους 121 °C και πίεση 15 p.s.i. σε αυτόκαυστο.

Τα στελέχη *E. coli* αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο με επώαση στους 37°C για 16-18 h υπό ανάδευση στα 225 rpm, ενώ τα στελέχη *Z. mobilis* με επώαση στους 30°C χωρίς ανάδευση για τουλάχιστον 18 h.

3.3 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα. Τα διαλύματα stock αντιβιοτικών αποθηκεύονται στους -20 °C. Τα υδατικά διαλύματα των αντιβιοτικών αποστειρώθηκαν με φίλτρο πόρων 0,2 μm.

Πίνακας 3.5: Συγκεντρώσεις αποθήκευσης και χρήσης αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό	Τελική συγκέντρωση	Συγκέντρωση αποθήκευσης-Stock
Τετρακυκλίνη	20 µg/ml	5 mg/ml αιθανόλης
Χλωραμφαινικόλη	20 µg/ml για <i>E. coli</i> 100 µg/ml για <i>Z. mobilis</i>	20 mg/ml αιθανόλης
Καναμυκίνη	50 µg/ml	50 mg/ml
Αμπικιλίνη	100 µg/ml	100 mg/ml
Ριφαμπικίνη	50 µg/ml για <i>E. coli</i> 40 µg/ml για <i>Z. mobilis</i>	50-100 mg/ml μεθανόλης

Πίνακας 3.6: Τρόπος δράσης των αντιβιοτικών και μηχανισμοί ανθεκτικότητας των αντίστοιχων γονιδίων που αναπτύχθηκαν

Αντιβιοτικό	Τρόπος δράσης	Μηχανισμός ανθεκτικότητας
Αμπικιλίνη (Amp)	Αναστέλλει τη δράση του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, εμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση γειτονικών μονάδων πεπτιδογλυκανών και προκαλώντας τον τερματισμό της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος	Το γονίδιο <i>bla</i> κωδικοποιεί τη β-λακταμάση, η οποία διασπά τον β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού
Καναμυκίνη (Km)	Προσδέεται στο 70S ριβόσωμα, με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA	Το γονίδιο <i>kan</i> κωδικοποιεί την τρανσφεράση αμινογλυκοσιδίων, η οποία τροποποιεί το αντιβιοτικό και παρεμποδίζει τη μεταφορά του στο εσωτερικό του κυττάρου

Χλωραμφαινικόλη (Cm)	Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση λόγω της πρόσδεσής του στην 50S υπομονάδα του ριβοσώματος, με αποτέλεσμα την αναστολή της πεπτιδυλοτρανσφεράσης των 50S, παρεμποδίζοντας έτσι το άμινο-ακυλο-tRNA να πλησιάσει το ριβόσωμα και να σχηματίσει πεπτιδικό δεσμό	Το γονίδιο <i>cat</i> κωδικοποιεί την χλωραμφαινικολική ακετυλοτρανσφεράση, η οποία αδρανοποιεί το αντιβιοτικό
Τετρακυκλίνη (Tc)	Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση με την πρόσδεσή του στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος, με συνέπεια την παρεμπόδιση του άμινο-ακυλο-tRNA στο ριβόσωμα	Το γονίδιο <i>tet</i> κωδικοποιεί ένα ένζυμο, το οποίο τροποποιεί την κυτταρική μεμβράνη και εμποδίζει τη μεταφορά του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου
ΡΙφαμπικίνη (Rif)	Αναστέλλει τη σύνθεση του RNA, δρα στην RNA-πολυμεράση. Δεσμεύεται στην β-υπομονάδα της RNA-πολυμεράσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση και δέσμευσή της πάνω στο DNA	1) Αλλαγή στη δομή της εξωτερικής μεμβράνης (ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του <i>Neisseria meningitidis</i> απέκτησε ανθεκτικότητα λόγω μείωσης της ποσότητας των C16 λιπιδίων) 2) Μία απλή σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο <i>rpoB</i> που κωδικοποιεί την RNA πολυμεράση. (Chandrasekaran and Lalithakumari 1998)

3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

3.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA που βρίσκεται τόσο σε υψηλό όσο και σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων από κύτταρα *E. coli* πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων Macherey-Nagel: Nucleospin plasmid kit με αριθμό καταλόγου 740588.250

Αρχή της μεθόδου

Τα κύτταρα επαναιωρούνται με το ρυθμιστικό διάλυμα A1 και το πλασμιδιακό DNA ελευθερώνεται από τα κύτταρα με αλκαλική λύση με SDS (ρυθμιστικό διάλυμα A2). Το ρυθμιστικό διάλυμα A3 ουδετεροποιεί το μίγμα και δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA στη μεμβράνη (silica membrane) των ειδικών φίλτρων του kit. Πιθανές επιμολύνσεις όπως άλατα, μεταβολίτες, και κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται με απλή πλύση με το ρυθμιστικό διάλυμα A4 που περιέχει αιθανόλη. Το καθαρό πλασμιδιακό DNA τελικά εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλών ιονικών δυνάμεων με το ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Όταν χρησιμοποιούνται στελέχη με υψηλά επίπεδα νουκλεασών, προτείνεται ένα επιπλέον βήμα πλύσης με προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα AW.

3.4.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Z. mobilis*

Τα κύτταρα *Z. mobilis* απαιτούν ιδιαίτερη μεταχείριση κατά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, εξαιτίας της ιδιαίτερης δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος. Πιο συγκεκριμένα, οι μεμβράνες των κυττάρων του *Z. mobilis* είναι εμπλουτισμένες με μεγάλη ποσότητα βαξενικού οξέος το οποίο αποτελεί το 78% των ακυλικών του αλυσίδων. Αυτή η σύσταση ίσως αντιπροσωπεύει την εξελικτική του προσαρμογή για επιβίωση παρουσία αιθανόλης (Carey 1983). Εξαιτίας αυτής της ιδιαίτερης δομής

της μεμβράνης τους, τα κύτταρά του *Z.mobilis* απαιτούν ιδιαίτερη μεταχείριση κατά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA (εν συγκρίσει με άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια). Πιο συγκεκριμένα, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- 1) Φυγοκέντρηση υγρής καλλιέργειας κυττάρων όγκου 5 ml στα 4.500 g για 15 min και απόρριψη υπερκειμένου.
- 2) Προσθήκη 20μL λυσοζύμης συγκέντρωσης 20mg/mL
- 3) Επώαση στους 37°C για 45min.
- 4) Συνέχιση του πρωτοκόλλου σύμφωνα με το Macherey-Nagel: Nucleospin plasmid kit όπως και πριν.

3.5 Ηλεκτροφόρηση DNA

Αρχή της μεθόδου (Voigtas 2001)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία απλή και πολύ αποτελεσματική μέθοδος για διαχωρισμό, αναγνώριση και καθαρισμό τμημάτων DNA μεγέθους από 0.25 έως 25kb. Η διαδικασία περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: 1) Προετοιμασία ενός πηκτώματος αγαρόζης, συγκέντρωσης κατάλληλης για τα μεγέθη των τμημάτων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν, 2) Τοποθέτηση («φόρτωση») των δειγμάτων DNA, σε ειδικές θέσεις (πηγαδάκια) του πηκτώματος, 3) Διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος στο πήκτωμα μέσω ηλεκτροδίων, ώστε το DNA να μετακινείται προς το θετικό πόλο λόγω του αρνητικού του φορτίου, 4) Έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία και φωτογράφησή του.

Σημείωση: Απαραίτητη προϋπόθεση για να οπτικοποιηθούν οι ζώνες, είναι η χρήση μιας ουσίας που να φθορίζει όταν εκτεθεί στην υπεριώδη ακτινοβολία. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Επειδή η εν λόγω ουσία είναι μεταλλαξιγόνος, ενίοτε χρησιμοποιείται και μία αβλαβής ουσία, η midori nucleic acid staining solution (<http://www.alexbiotechnology.com/PDF/Midori.pdf>).

Η μετακίνηση του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες:

- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης: Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0.3% to 0.5%) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων νουκλεϊκών οξέων (από 20 έως 60 kb), ενώ υψηλές συγκεντρώσεις (από 1% έως 1.5%) μπορούν να διαχωρίσουν μικρά τμήματα (από 0.2 έως 0.5 kb).
- Την εφαρμοζόμενη τάση πεδίου: Συνήθως εφαρμόζεται τάση ≤ 5 Volt/cm.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης: Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα είναι τα TAE και TBE. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά το TAE.
- Το μέγεθος του DNA: Τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται ταχύτερα δεδομένου ότι συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος. Συνεπώς, τα μικρότερα μόρια DNA καταλήγουν στο κάτω μέρος του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των τμημάτων, είναι απαραίτητος και ένας μάρτυρας DNA γνωστού μοριακού βάρους. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται DNA από φάγο λ που έχει υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII*.
- Τις διαμορφώσεις του DNA: Μόρια DNA ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα. Ταχύτερα κινούνται τα υπερελικωμένα μόρια, στη συνέχεια τα κυκλικά, ακολουθούν τα ευθύγραμμα και τέλος τα ανοιχτά κυκλικά μόρια.

Πειραματική πορεία

- 1) Σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE διαλύεται αγαρόζη συγκέντρωσης 0,8 - 1,2% w/v με θέρμανση μέχρι βρασμού.
- 2) Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι η θερμοκρασία να φτάσει περίπου τους 50°C (χωρίς να πήξει). Τότε προστίθεται σε αυτό βρωμιούχο αιθίδιο τελικής συγκέντρωσης 0,05% v/v ή midori nucleic acid staining solution.
- 3) Το υγρό αποχύνεται σε τράπεζα με κατάλληλα τοποθετημένα τα χτενάκια, ούτως ώστε όταν πήξει να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα.
- 4) Πραγματοποιείται φόρτωση των δειγμάτων αφού πρώτα έχει προστεθεί σε αυτά GLB (Gel Loading Buffer) σε αναλογία δείγμα DNA : GLB = 5:1. Η γλυκερόλη που περιέχεται στο GLB βοηθά τα δείγματα να καθιζάνουν στα πηγαδάκια, ενώ οι

χρωστικές κυανούν της βρωμοφαινόλης και κυανολικό ξυλένιο είναι φορτισμένες και μετακινούνται στην ίδια φορά με το DNA στην ηλεκτροφόρηση. Μαζί με τα δείγματα φορτώνεται και ο μάρτυρας λ /*Hind*III.

5) Συνδέεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης με την μονάδα τάσης και ασκείται τάση ίση με 5 V/cm.

Όταν τα δείγματα διανύσουν την επιθυμητή απόσταση, η οποία διαπιστώνεται από το μέτωπο των παραπάνω χρωστικών που περιέχει το GLB, η παροχή τάσης διακόπτεται και το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε θάλαμο με ακτινοβολία UV.

Διαλύματα:

GLB: 0.25% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v κυανολικό ξυλένιο και 30% w/v γλυκερόλη. Αποθήκευση στους 4 °C.

λ /*Hind*III: Παρασκευάζεται με την προσθήκη 400 μ l αποστειρωμένου dH₂O σε 100 μ l λ /*Hind*III. Ακολουθεί επώαση για 3 min στους 60°C ώστε να διαχωριστούν καλά οι ζώνες των 23,13 kb και 4,36 kb μεταξύ τους, προσθήκη 100 μ l GLB, ανάμιξη και αποθήκευση στους 4 °C.

50x TAE: Για 1 λίτρο TAE 50x: Σε 750 ml dH₂O προστίθενται 242 g Trizma Base. Ύστερα προστίθενται 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M (pH=8). Γίνεται προσαρμογή σε pH=8,5 (προαιρετικά) και συμπλήρωση με dH₂O μέχρι το 1 lt.

1x TAE: Προέρχεται από αραιώση του 50x TAE.

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): 3mg/ml, pH= 8. Αποθήκευση στους 4 °C σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο για προστασία από το φως.

Midori nucleic acid staining solution (Αριθμός καταλόγου αντιδραστηρίου: IMG03): Προσθήκη 6 μ l έτοιμου διαλύματος Midori Green Advance DNA stain σε 100 ml διαλύματος αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8-3%. Αποθήκευση στους 4 °C σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο για προστασία από το φως.

3.6 Κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA (cloning)

Κλωνοποίηση ονομάζεται η ένθεση αλληλουχιών DNA που μας ενδιαφέρουν σε συγκεκριμένους φορείς (πλασμίδια ή κοσμίδια) ώστε να δημιουργηθεί ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με μία επιθυμητή αλληλουχία DNA ώστε να επιτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες που μας ενδιαφέρουν. Για την επίτευξή της πρέπει αρχικά η αλληλουχία DNA που θα εντεθεί στο φορέα να έχει τα κατάλληλα άκρα, ώστε να δεσμοποιηθεί σε αυτόν. Αυτό επιτυγχάνεται με πέψη του τμήματος DNA και του πλασμιδιακού φορέα με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να προκύψει το επιθυμητό τμήμα DNA μέσω εκκινητών μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Στην περίπτωση χρησιμοποίησης πέψεων, μπορούν να προκύψουν τμήματα DNA είτε με τυφλά άκρα (blunt ends), είτε με κολλώδη άκρα (sticky ends) (βλ. παρακάτω). Στην περίπτωση πραγματοποίησης PCR, προκύπτουν μόνο τμήματα DNA με τυφλά άκρα. 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.

3.7 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Αρχή της μεθόδου (Watson 2011, Bloch and Grossman 2001)

Η πέψη του DNA πραγματοποιείται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που έχουν τη δυνατότητα να διασπών το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις. Αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες-στόχους μεγέθους 4-6 bp, συνήθως παλινδρομικές.

Τα σημεία τομής των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορεί να είναι ακριβώς απέναντι ή μετατοπισμένα κατά μερικά νουκλεοτίδια. Στην πρώτη περίπτωση τα θραύσματα που παράγονται έχουν «τυφλά/απότομα» άκρα (blunt ends) ενώ στη δεύτερη αφήνουν μονόκλιωνα προεξέχοντα, ή αλλιώς «κολλώδη» άκρα (sticky ends).

Τα μόρια του DNA που έχουν υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο, ή με διαφορετικά ένζυμα από τα οποία προκύπτουν συμπληρωματικά άκρα, μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους *in vitro* γιατί οι προεξοχές τους είναι συμπληρωματικές και με τη δράση του ενζύμου λιγάση μπορεί να επανασηματισθεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός του σκελετού κάθε αλυσίδας. Η δυνατότητα αυτή χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε φορείς (π.χ. πλασμίδια).

Πειραματική πορεία

Για κάθε πέψη χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα:

- 1) Μικρή ποσότητα περιοριστικής ενδονουκλεάσης, ανάλογα με την ποσότητα του DNA. 1 mg DNA μπορεί να υποστεί πέψη από 1μL περιοριστικής ενδονουκλεάσης.
- 2) Η απαιτούμενη ποσότητα DNA.
- 3) Το ρυθμιστικό διάλυμα από το οποίο συνοδεύεται κάθε ένζυμο και παρέχει τις βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασής του σε ποσότητα ίση με το 1/10 του τελικού όγκου. Σε περίπτωση ύπαρξης περισσοτέρων από μίας περιοριστικών ενδονουκλεασών, χρησιμοποιείται πάλι μόνο ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο να ευνοεί και τα δύο ένζυμα (στο βαθμό που αυτό είναι εφικτό). Η συγκέντρωση προσαρμόζεται αναλόγως.
(http://www.clontech.com/SV/Products/Molecular_Biology_Tools/Restriction_Enzymes/Double_Digestion_Buffers)
- 4) Αποστειρωμένο dH₂O, όταν είναι απαραίτητο για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.

Οι αντιδράσεις των πέψεων επωάζονται για 16-18 h στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (συνήθως στους 37 ή 30 °C).

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν είναι προϊόντα των εταιρειών TaKaRa και Minotech.

3.8 Απομόνωση ζωνών από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Η εν λόγω διαδικασία πραγματοποιείται προκειμένου να ανακτηθεί ένα χρήσιμο τμήμα DNA το οποίο έχει υποστεί ηλεκτροφόρηση.

Αρχικά το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε ειδική πλάκα UV, όπου η ζώνη που μας ενδιαφέρει αποκόπτεται με νυστέρι ή με ειδικό εργαλείο (band cutter). Στη συνέχεια ακολουθεί το πρωτόκολλο για τον καθαρισμό του DNA, ο οποίος στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit PCR clean-up/Gel extraction της εταιρείας Macherey-Nagel με αριθμό καταλόγου 740 609.250

Αρχή της μεθόδου

Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιείται με σκοπό να καθαριστούν τμήματα DNA από ενζυματικές αντιδράσεις, όπως η PCR καθώς και από πηκτώματα αγαρόζης. Το δείγμα αναμειγνύεται με το ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (binding buffer) NTI και όταν πρόκειται για πήκτωμα αγαρόζης, θερμαίνεται ώστε το πήκτωμα να διαλυθεί. Οι επιμολύνσεις απομακρύνονται με απλές πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 που περιέχει αιθανόλη. Τέλος, το καθαρό DNA εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλής αλατότητας με το ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

3.9 Αντίδραση δεσμοποίησης (ligation)

Αρχή της μεθόδου (Modorich και Lehman 1973)

Η δεσμοποίηση είναι μία διαδικασία κατά την οποία δύο τμήματα DNA συνενώνονται με τη βοήθεια του ενζύμου της λιγάσης. Η λιγάση καταλύει το σχηματισμό δύο φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ του 3' υδροξυλίου ενός νουκλεοτιδίου και της 5' φωσφορικής ομάδας ενός άλλου νουκλεοτιδίου με μια αντίδραση που απαιτεί ενέργεια μέσω ATP. Τα τμήματα αυτά μπορεί να έχουν συμπληρωματικά άκρα τα οποία οφείλονται στην πέψη με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο ή σε πέψη με διαφορετικά ένζυμα από τα οποία όμως προκύπτουν τα ίδια συμπληρωματικά άκρα.

Η δεσμοποίηση τμημάτων DNA με κολλώδη άκρα (sticky ends) είναι αρκετά αποτελεσματική, ενώ η δεσμοποίηση τυφλών άκρων (blunt ends) είναι αρκετά πιο απαιτητική. Στα πειράματα δεσμοποίησης χρησιμοποιείται η λιγάση του φάγου T4 (T4 DNA ligase) η οποία έχει τη δυνατότητα να δεσμοποιεί τόσο κολλώδη όσο και τυφλά άκρα.

Πειραματική πορεία

Για κάθε δεσμοποίηση χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα:

- 1) Τα μόρια DNA που πρέπει να δεσμοποιηθούν σε συγκεκριμένη ποσότητα. Συνήθως η εφαρμοζόμενη αναλογία είναι ένθεση : φορέας = 3:1.
- 2) Συγκεκριμένη ποσότητα λιγάσης, ανάλογα με την ποσότητα του DNA (συνήθως 20 ng).
- 3) Ρυθμιστικό διάλυμα που αντιστοιχεί στο 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης.
- 4) Αποστειρωμένο dH₂O, εφόσον είναι απαραίτητο για την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης.

Ακολουθεί επώαση για 16-18 h στους 16 °C για τη λιγάση T4.

3.10 Μετασχηματισμός

Αρχή της μεθόδου

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός είναι ένας από τους τρεις βασικούς μηχανισμούς οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού στα βακτήρια. Πρόκειται για τη γενετική τροποποίηση ενός κυττάρου που οφείλεται στην άμεση πρόσληψη και ενσωμάτωση εξωγενούς γενετικού υλικού από το περιβάλλον του μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. (Johnston 2014) . Στο εργαστήριο εφαρμόζεται με τεχνητά μέσα, σύμφωνα με τα οποία τα κύτταρα δέχονται πλασμιδιακό 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.

Σε κάθε πείραμα μετασχηματισμού χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας. Στον αρνητικό μάρτυρα πραγματοποιείται η διαδικασία του μετασχηματισμού χωρίς την προσθήκη DNA.

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

- 1) Εμβολιάζεται θρεπτικό μέσο LB σε αναλογία 1:20 (v/v) από φρέσκια πλήρως ανεπτυγμένη καλλιέργεια κυττάρων *E. coli*.
- 2) Η ανακαλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ να φθάσει στα 0.45 (περίπου 2 ώρες)
- 3) Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 1000 x g για 10 min και επαναδιαλυτοποιούνται σε 0.1 ml διαλύματος TSB ανά δείγμα μετασχηματισμού.
- 4) Τα κύτταρα επωάζονται σε πάγο για 10 min.
- 5) Σε κάθε κυτταρικό δείγμα προστίθενται 100 pg DNA και επωάζονται σε πάγο για 20 min.
- 5) Προστίθενται 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 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: προσθήκη 20 mM γλυκόζης στο ήδη παρασκευασμένο TSB

3.10.2 Χημικός μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. Coli*

Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού (Green and Rogers 2014)

- 1) Εμβολιάζεται θρεπτικό μέσο LB σε αναλογία 1:20 (v/v) από φρέσκια πλήρως ανεπτυγμένη καλλιέργεια κυττάρων *E. coli*.
- 2) Η ανακαλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ να φθάσει στα 0.45 (περίπου 2 ώρες).
- 3) Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε ψυγμένους σε πάγο φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50 ml και επωάζεται σε πάγο για 10 min.
- 4) Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται επί 5 min, στα 8000 g, στους 4 °C.
- 5) Το υπερκείμενο αποχύνεται προσεκτικά με πιπέτα.
- 6) Ακολουθεί ήπια επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 20 ml (0,4 του αρχικού όγκου) διαλύματος Tfb1.
- 7) Το μίγμα επωάζεται σε πάγο για 15min.
- 8) Το κυτταρικό αιώρημα φυγοκεντρείται επί 5 min, στα 8000 g, στους 4 °C.
- 9) Το υπερκείμενο αποχύνεται προσεκτικά με πιπέτα.
- 10) Το ίζημα επαναιωρείται ήπια σε 1 ml (0,02του αρχικού όγκου) διαλύματος TfbII.
- 11) Η ποσότητα των κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού μοιράζεται σε σωληνάρια erppendorf ανά 50μL και αποθηκεύονται στους -80 °C.

Μετασχηματισμός

- 1) Τα σωληνάρια με τα επιδεκτικά κύτταρα τοποθετούνται σε πάγο ώστε να ξεπαγώσουν ομαλά. Χρησιμοποιείται ένα επιπλέον σωληνάριο ως αρνητικός μάρτυρας.
- 2) Προστίθεται η ποσότητα του DNA προς μετασχηματισμό. Στον αρνητικό μάρτυρα δεν προστίθεται DNA.

- 3) Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30min.
- 4) Έπεται το θερμικό σοκ: τα σωληνάρια μεταφέρονται ταχύτατα στους 42 °C και επωάζονται επί 30 sec.
- 5) Τα σωληνάρια επιστρέφονται άμεσα στον πάγο και επωάζονται για 2 min.
- 6) Προστίθεται 1 ml διαλύματος θρεπτικού υλικού SOC και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 60min, υπό ανάδευση. Η επώαση επιτρέπει στα κύτταρα να αναρρώσουν από το θερμικό σοκ.
- 7) Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο L.A. και τον κατάλληλο παράγοντα επιλογής.
- 8) Τα τρυβλία επωάζονται για τουλάχιστον 18 h σε θερμοκρασία 37°C.

Διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα μετασχηματισμού I (Tfb I): 30mM οξικό κάλιο, 100mM RbCl₂, 10mM CaCl₂ – 2H₂O, 50mM MnCl₂, 15% v/v γλυκερόλη, pH 5,8

Ρυθμιστικό διάλυμα μετασχηματισμού II (Tfb II): 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂ – 2H₂O, 10mM RbCl₂, 15% v/v γλυκερόλη, pH 6,5

Θρεπτικό υλικό SOC: 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 2% τρυπτόνη, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20mM γλυκόζη.

3.11 Επιλογή των αποικιών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Η επιλογή των αποικιών που έλαβαν το πλασμίδιο μετά από το μετασχηματισμό γίνεται με τη βοήθεια αντιβιοτικών. Κάθε πλασμιδιακός φορέας διαθέτει τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό, οπότε η επίστρωση σε

τρυβλία με το εν λόγω αντιβιοτικό οδηγεί σε ανάπτυξη αποικιών στις οποίες το πλασμίδιο έχει εισέλθει επιτυχώς.

Κατά το μετασχηματισμό με το μίγμα DNA από την αντίδραση δεσμοποίησης, η χρήση αντιβιοτικών δεν επαρκεί, γιατί τα κύτταρα μπορεί να έχουν προσλάβει τον πλασμιδιακό φορέα με την ένθεση ή χωρίς αυτήν. Στην παρούσα διατριβή η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (με την ένθεση) πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1) Με το σύστημα της β- γαλακτοσιδάσης (μπλε- λευκές αποικίες):

Η β- γαλακτοσιδάση είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lacZ* του οπερονίου *lac* και στην ενεργή του μορφή είναι ένα ομοτετραμερές. Το πλασμίδιο pBlueScript II SK (+) περιέχει την αλληλουχία *lacZα* που το κωδικοποιεί το α- πεπτίδιο της β- γαλακτοσιδάσης. Μέσα σε αυτή την αλληλουχία βρίσκεται ένας πολυσυνδέτης. Κατά την κλωνοποίηση ο πολυσυνδέτης υφίσταται πέψη με περιοριστικά ένζυμα και το γονίδιο *lacZα* αποκόπτεται ώστε να εντεθεί το νέο τμήμα DNA. Επομένως, πλέον δεν μπορεί να συντεθεί η β- γαλακτοσιδάση.

Στα τρυβλία του μετασχηματισμού προστίθεται το χρωμογόνο X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδοϋλ β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο), ένα άχρωμο ανάλογο της λακτόζης. Το X-gal αποκόπτεται από τη β- γαλακτοσιδάση και σχηματίζει το 5-βρωμο-4-χλωρο-ινδοξύλιο το οποίο εν συνεχεία υφίσταται διμερισμό και οξειδώνεται ώστε να σχηματίσει το 5,5-διβρωμο-διχλωρο-ινδοξύλιο το οποίο έχει μπλε χρώμα. Σαν αποτέλεσμα, τα κύτταρα που περιέχουν λειτουργική β – γαλακτοσιδάση εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

Συμπερασματικά, τα κύτταρα με ολόκληρο το γονίδιο *lacZα* σχηματίζουν μπλε αποικίες, ενώ οι λευκές αποικίες υποδεικνύουν ότι το γονίδιο *lacZα* έχει αποκοπεί, άρα σε αυτά τα κύτταρα έχει πιθανότατα εισέλθει η ένθεση.

2) Βάσει Ανθεκτικότητας / ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Εφαρμόστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα κλωνοποίησης ο πλασμιδιακός φορέας pBR328 που διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη .

Η ενσωμάτωση της ένθεσης έχει σαν αποτέλεσμα τη διακοπή της αλληλουχίας του γονιδίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, άρα την απενεργοποίησή του. Η αντιγραφική μεταφορά των αποικιών σε νέα τρυβλία με τετρακυκλίνη, έχει σαν αποτέλεσμα οι αποικίες που έχουν προσλάβει την ένθεση να μην αναπτυχθούν. Αυτές οι αποικίες είναι διατηρημένες στα αρχικά τρυβλία με αμπικιλίνη ή χλωραμφαινικόλη. Η επιλογή των επιθυμητών αποικιών γίνεται με σύγκριση των αρχικών με τα νέα τρυβλία.

3.12 Αντιγραφική μεταφορά με βελούδο (Replica plating)

Αρχή της μεθόδου (Lederberg and Lederberg 1952)

Η αντιγραφική μεταφορά είναι μια μικροβιολογική τεχνική κατά την οποία οι αποικίες μικροοργανισμών από ένα ή περισσότερα αρχικά τρυβλία εμβολιάζονται σε νέα τρυβλία με διαφορετικά μέσα επιλογής, διατηρώντας το αρχικό μοτίβο διασποράς τους. Χρησιμοποιείται σε περίπτωση ύπαρξης μεγάλου αριθμού αποικιών λόγω της δυσκολίας μεταφοράς τους ανά μία σε νέο τριβλίο. Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, ένας δίσκος καλυμμένος με αποστειρωμένο ύφασμα από βελούδο πιέζεται πάνω στα αρχικά τρυβλία και στη συνέχεια αποτυπώνεται στα νέα τρυβλία. Το βελούδο εξασφαλίζει την απορρόφηση της υγρασίας των τρυβλίων η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει νεφέλωμα (smearing) κατά τη μεταφορά των αποικιών.

Πειραματική πορεία

- 1) Τα αρχικά τρυβλία (master plates) καθώς και τα νέα τρυβλία (replica plates) μαρκάρονται σε μία άκρη που θα αποτελέσει το σημείο αναφοράς.
- 2) Ένα κομμάτι αποστειρωμένο βελούδο τοποθετείται πάνω σε κυλινδρική βάση, μεγέθους λίγο μικρότερης σε διάμετρο από ένα τρυβλίο Petri.
- 3) Το αρχικό τρυβλίο (master plate) τοποθετείται ανεστραμμένο πάνω στο βελούδο με τη μαρκαρισμένη πλευρά στο άνω μέρος, έτσι ώστε μερικά κύτταρα από κάθε αποικία να αποτυπωθούν πάνω του.

4) Το νέο τρυβλίο (replica plate) τοποθετείται ανεστραμμένο πάνω στο ίδιο κομμάτι βελούδο, με τη μαρκαρισμένη πλευρά επίσης στο άνω μέρος. Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα που προσκολλήθηκαν στο βελούδο κατά το προηγούμενο βήμα εντυπώνονται πάνω στο νέο τρυβλίο στην αντίστοιχη θέση που κατείχαν στο αρχικό.

5) Όλα τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για τουλάχιστον 18 ώρες.

6) Ακολουθεί σύγκριση των αποικιών στα αρχικά και στα νέα τρυβλία. Οι αποικίες που δεν έχουν αναπτυχθεί στα νέα τρυβλία είναι αυτές που μας ενδιαφέρουν γιατί δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο νέο παράγοντα επιλογής.

3.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της μεθόδου (Watson et al., 2011)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος ενίσχυσης μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Για να ενισχυθεί η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει είναι απαραίτητοι δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που την οριοθετούν (forward και reverse primer). Η αναπαραγωγή της αλληλουχίας γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Εντούτοις, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε DNA πολυμεράση, αλλά κάποια θερμοανθεκτική που θα αντέχει τις υψηλές θερμοκρασίες της αντίδρασης. Πολύ δημοφιλής είναι η Taq DNA πολυμεράση η οποία έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*.

Για την δημιουργία των αλυσίδων κλώνων χρησιμοποιούνται επαναλαμβανόμενα στάδια θέρμανσης του δείγματος. Αρχικά γίνεται αποδιάταξη του DNA σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως στους 95 °C) και ύστερα η θερμοκρασία μειώνεται αρκετά ώστε να προσδεθούν οι δύο εκκινητές στις μονόκλωνες αλληλουχίες. Η θερμοκρασία πρόσδεσης κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 50-60 °C ή και παραπάνω και εξαρτάται από το μέγεθος των εκκινητών και το ποσοστό γουανινών και κυτοσινών που διαθέτουν. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η επιμήκυνση και η δημιουργία νέων δίκλωνων μορίων στους 72 °C.

Για την βελτιστοποίηση της τεχνικής είναι απαραίτητη η ρύθμιση παραμέτρων όπως η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών, η συγκέντρωση των αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε βήματος.

Πειραματική πορεία

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο HiFi της εταιρείας Kara. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 3.7: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Ζεύγη εκκινητών (κατεύθυνση 5'-3')	Tm	Μέγεθος τμήματος που ενισχύουν
HPMOBF: TCG CCA GTA AGG CAG GTA TC	59.4 °C	689 bp
HPMOBR: GTC TTC TGG GTC AGC AAA GC	59.4 °C	
MOBREPF: ACC GCA ACA TTG ATC GCT TT	60,6 °C	1639 bp
MOBREPR: TCG TCT CAA AGG CCA ACT CT	60,7 °C	

Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης του ενζύμου.

Συγκεκριμένα για το πρώτο ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες:

- 95 °C, 4 min
- 98 °C, 20 sec
- 63,8 °C , 30 sec
- 72 °C , 1 min
- Επανάληψη των τριών προηγούμενων βημάτων άλλες 29 φορές
- 72 °C, 3 min

Για το δεύτερο ζεύγος εκκινήτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες:

- 95 °C, 4 min
- 98 °C, 20 sec
- 62 °C , 30 sec
- 72 °C , 1,5 min
- Επανάληψη των τριών προηγούμενων βημάτων άλλες 29 φορές
- 72 °C, 5 min

Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες αντιδράσεις PCR απουσία DNA για τον εντοπισμό πιθανών επιμολύνσεων.

3.14 Στύπωμα κατά Southern

Αρχή της μεθόδου

Το στύπωμα κατά Southern είναι μία τεχνική που επινοήθηκε από τον Edwin Southern το 1975. Συνδυάζει την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και την υβριδοποίηση με σκοπό την ανίχνευση συγγένειας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Με την μέθοδο αυτή το DNA αποδιατάσσεται σε πήκτωμα αγαρόζης με την εμφάνισή του σε αλκαλικό διάλυμα και μεταφέρεται αντιγραφικά σε ειδικό φίλτρο με κατάλληλους χειρισμούς ώστε να διατηρήσει τις ίδιες θέσεις που κατείχε στο πήκτωμα. Στη συνέχεια το φίλτρο αυτό υβριδοποιείται με ένα σημασμένο ιχνηθέτη DNA. Οι συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA του φίλτρου με τον ιχνηθέτη δίνουν ένα πρότυπο ζωνών που εμφανίζονται πάνω στο φίλτρο με ανοσολογικό εντοπισμό μέσω χρωμογόνου αντίδρασης.

Πειραματική πορεία

Η ακόλουθη πειραματική πορεία αναφέρεται σε διαστάσεις φίλτρου 100 cm² x 100 cm²

1) Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε 500 ml (ισχύει για όλα τα διαλύματα της μεθόδου) 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 πηκτώματος 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 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 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

3.15 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA

3.15.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA – DNA με χρήση συστήματος ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA

Η μέθοδος 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 ως προς την ομολογία τους. Χρησιμοποιείται η διγοξυγενίνη (ένα στεροειδές απτένιο) για ιχνηθέτηση DNA και RNA. Η μέθοδος περιλαμβάνει 3 στάδια: σήμανση του DNA με διγοξυγενίνη, υβριδοποίηση του ιχνηθετημένου DNA με το DNA στόχο και ανοσολογικό εντοπισμό με χρωμογόνο αντίδραση.

Σήμανση του DNA

- 1) Προστίθενται 10 ng – 3μg γραμμικού DNA που πρόκειται σημειωθεί, 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) Προστίθενται 2 μl μίγματος εξανουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για την αντιγραφή.
- 4) Προστίθενται 2 μl μίγματος σήμανσης.
- 5) Προστίθεται dH₂O (όπου χρειάζεται), για τελικό όγκο διαλύματος 19 μl.
- 6) Προστίθεται 1 μl ένζυμου Klenow.
- 7) Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 20 h.
- 8.) Προστίθενται 2 μl EDTA 0,2 M ώστε να τερματιστεί η αντίδραση.

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. 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 φίλτρο με το ιχνηθετημένο DNA 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 προθερμανθεί 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) Ακολουθούν 2 πλύσεις για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου με 50 ml διαλύματος πλύσης I ανά 100 cm² φίλτρου.
- 7) Ακολουθούν 2 επιπλέον 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-λαυροϋλοσαρκοσινικό 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

3.15.2 Ανοσολογικός εντοπισμός

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

- 1) Το φίλτρο εκπλένεται με 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 για 1-5 min.
- 2) Κατόπιν επωάζεται για 30 min με 100 ml διαλύματος αποκλεισμού.
- 3) Παρασκευάζεται το διάλυμα αντισώματος.
- 4) Το φίλτρο επωάζεται με το διάλυμα αντισώματος για 30 min.

- 5) Ακολουθούν 2 πλύσεις των 15 min με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
- 6) Το φίλτρο εξισορροπείται με επώαση σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος εντοπισμού για 2-5 min.
- 7) Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι με 10 ml διαλύματος χρωμογόνου για 12-16 h.
- 8) Το φίλτρο εκπλένεται με 50 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού αφού ολοκληρωθεί η εμφάνιση.

Διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης: 100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, 0.3 % tween 20, pH 7.5

Ρυθμιστικό διάλυμα μαλαϊκού οξέος: 100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, pH 7.5

Διάλυμα αποκλεισμού: 1% αντιδραστηρίου αποκλεισμού διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα μαλαϊκού οξέος.

Διάλυμα αντισώματος: 4 μl Anti-Digoxigenin-AP σε 20 ml διαλύματος αποκλεισμού

Ρυθμιστικό διάλυμα εντοπισμού: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5

Διάλυμα χρωμογόνου: 200 μl NBT/BCIP σε 10 ml διαλύματος εντοπισμού.

3.16 Απομάκρυνση ζωνών από φίλτρο υβριδισμού (stripping)

Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει πιθανότητα να πρέπει πραγματοποιηθεί ένας νέος υβριδισμός με τα ίδια τμήματα ιχνηθετημένου DNA αλλά με διαφορετικό σημασμένο DNA. Σε αυτή την περίπτωση, δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί νέο στύπωμα κατά Southern, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου το ίδιο φίλτρο για υβριδισμό, αφού πρώτα απομακρυνθούν οι προηγούμενες ζώνες με την παρακάτω διαδικασία:

- 1) Θέρμανση 30mL διαλύματος DMF στους 50- 60 °C

Σημείωση: Το DMF είναι εύφλεκτο. Η θερμοκρασία δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να ξεπεράσει τους 67 °C. Η θέρμανση πραγματοποιείται σε απαγωγό

και μέσα σε κωνική φιάλη η οποία είναι βυθισμένη σε ποτήρι ζέσεως με κρύο H₂O.

- 2) Τοποθέτηση το φίλτρου που πρέπει να επαναχρησιμοποιηθεί μέσα στο ζεστό DMF έως ότου σβηστούν οι ζώνες. Ιδανικά δεν πρέπει να παραμείνει για πάνω από 20 min γιατί μπορεί να απομακρυνθεί το DNA.
- 3) Έκπλυση του φίλτρου με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.
- 4) Δύο διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 0,2 NaOH και 0,1% w/v SDS στους 37 °C για 20 min υπό ανάδευση.
- 5) Πλύση σε διάλυμα 2XSSC για 5 min υπό ανάδευση.

Το φίλτρο χρησιμοποιείται όσο το δυνατόν πιο γρήγορα για νέο υβριδισμό DNA-DNA.

3.17 Απομόνωση RNA

Προετοιμασία αναλωσίμων

Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός των αναλώσιμων με DMPC (Dimethyl Dicarboxylate), το οποίο απομακρύνει τις RNάσες που θα μπορούσαν να αποδομήσουν το δείγμα που θα απομονωθεί.

Σε ειδικό δοχείο προστίθενται 100 ml dH₂O και 0,1 ml (τελική συγκέντρωση 0,1 %) DMPC. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30-45 min. Ύστερα με το υγρό μίγμα πλένονται οι κασετίνες όπου θα τοποθετηθούν τα ρύγχη (tips). Ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C, για 30 min ώστε το DMPC να απενεργοποιηθεί. Το δοχείο και τα κουτιά αφήνονται να στεγνώσουν σε επωαστήρα των 60 °C και ύστερα συμπληρώνονται με τα αναλώσιμα για να αποστειρωθούν εκ νέου.

Η απομόνωση RNA από 10⁹ κύτταρα *Z. mobilis* NCIMB 11163 πραγματοποιείται με Macherey-Nagel- Nucleospin RNA του RNA Isolation kit. Με αριθμό καταλόγου 740955.50

Αρχή της μεθόδου

Μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις στην απομόνωση RNA είναι η αποφυγή της αποδόμησής του κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Με αυτό το kit, τα κύτταρα λύνονται με επώαση σε ένα διάλυμα που περιέχει μεγάλες ποσότητες χαιοτροπικών ιόντων. Το εν λόγω διάλυμα απενεργοποιεί τις RNάσες ακαριαία και δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες πρόσδεσης που ευνοούν την ενσωμάτωση του RNA στην ειδική μεμβράνη (silica membrane). Το DNA που επίσης προσδένεται στη μεμβράνη απομακρύνεται με ένα διάλυμα που περιέχει μια rDNάση το οποίο εφαρμόζεται απευθείας στη μεμβράνη. Άλατα, μεταβολίτες, και κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται με δύο απλές πλύσεις με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Τέλος, το καθαρό RNA εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος με αποστειρωμένο νερό από το οποίο έχουν απομακρυνθεί οι RNάσες. Η όλη διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί με ασφάλεια σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το RNA για να παραμείνει σταθερό καταψύχεται στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ακολουθεί επιπλέον κατεργασία του δείγματος RNA με DNάση (**TaKaRa-Recombinant DNase I**) ως εξής:

Πειραματική πορεία

- Συνθήκες αντίδρασης:
Ποσότητα απομονωμένου RNA
6,5 μl 10 x ρυθμιστικό διάλυμα DNase I
1 μl ανασυνδυασμένης DNase I,
0,5 μl αναστολέας RNάσης
DEPC αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 65 μl .
Επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 min.
- Τερματισμός της αντίδρασης: Προσθήκη 2,5 μl EDTA 0,5 M και επώαση στους $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2 min.
- Αύξηση του όγκου του δείγματος μέχρι 100 μl με προσθήκη DEPC νερού και καταβύθιση του RNA με 10 μl οξικού νατρίου 3 M και 250 μl παγωμένης αιθανόλης.
- Ανάδευση και παραμονή στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2 min.

- Φυγοκέντρωση στα 12.000 rpm, για 10 min, στους 4 °C και απόρριψη υπερκειμένου.
- Πλύση του ιζήματος με 150 μl παγωμένης 70% αιθανόλης και φυγοκέντρωση στα 12.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Ξήρανση ιζήματος.
- Διάλυση σε 50 μl DEPC νερού.
- Διαγνωστική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8 % w/v αγαρόζη και 0,1 % w/v βρωμιούχο αιθίδιο.

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

Αρχή της μεθόδου (Rio 2014)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση της παρουσίας μορίων mRNA, pre-mRNA, ή άλλων ειδών RNA. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που υβριδοποιείται στο RNA που μας ενδιαφέρει. Για το mRNA αυτός ο εκκινητής συνήθως είναι ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο (oligo dT) με 15-18 θυμίνες, ένα τυχαίο εξαμερές ή ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό ενός συγκεκριμένου μετάγραφου. Αυτό το υβρίδιο DNA:RNA χρησιμεύει ως εκμαγείο κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, στην οποία το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί μια μονόκλωνη αλυσίδα cDNA συμπληρωματική του συγκεκριμένου μορίου RNA. Τέλος αυτό το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) όπως περιγράφηκενωρίτερα. Χρησιμοποιούνται εκκινητές που οριοθετούν το cDNA ώστε να παραχθεί ένα τμήμα DNA συμπληρωματικό του τμήματος RNA που μας ενδιαφέρει σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων.

Πειραματική πορεία

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 (cDNA) με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.

Το πρωτόκολλο πραγματοποιείται με το RT-PCR Kit της εταιρείας TaKaRa με αριθμό καταλόγου RR014A.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι **HPMOBF** και **HPMOBR** που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν οι ίδιες που χρησιμοποιήθηκαν και στην PCR με τους ίδιους εκκινητές.

3.19 Βακτηριακή σύζευξη

Αρχή της μεθόδου (Αφένδρα 2015)

Η βακτηριακή σύζευξη είναι η μονόδρομη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ βακτηριακών κυττάρων. Το κύτταρο δότη προσεγγίζει το δέκτη και προσδένεται σε αυτό μέσω συζευκτικών τριχιδίων. Κατόπιν τα δύο κύτταρα έρχονται σε στενή επαφή και η μία από τις δύο αλυσίδες του πλασμιδίου αρχίζει να μεταφέρεται με μία διαδικασία παρόμοια με αυτήν της αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου. Σημαντικό ρόλο στη σύζευξη διαδραματίζει το ριλαξόσωμα, ένα σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών που έχει ως στόχο τη μεταφορά του DNA στο κύτταρο δέκτη.

Πειραματική πορεία

Για την πραγματοποίηση της σύζευξης επιλέγεται ως βακτήριο δότης ένα στέλεχος με δύο πλασμίδια, ένα **συζευκτικό** και ένα **κινητοποιήσιμο**, και ένα βακτήριο δέκτης. Σε κάθε πείραμα σύζευξης επίσης πραγματοποιείται μια επιπλέον σύζευξη, που χρησιμεύει ως αρνητικός μάρτυρας. Στη σύζευξη- αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιείται ως δότης ένα στέλεχος με το ίδιο συζευκτικό πλασμίδιο με την κανονική σύζευξη, και ένα **μη κινητοποιήσιμο** πλασμίδιο, ενώ ο δέκτης παραμένει ο ίδιος.

3.19.1 Βακτηριακή σύζευξη με δότες και δέκτες κύτταρα *E. coli*

- 1) Προκαλλιέργειες των 5 ml των επιθυμητών στελεχών επωάζονται στους 37 °C για 16-18 h με ανάδευση στα 225 rpm.
- 2) Την επόμενη μέρα γίνονται ανακαλλιέργειες με αραιώση 1:20 σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB. Επωάζονται στους 37 °C υπό ήπια ανάδευση, έως ότου φθάσουν στο μέσο της εκθετικής φάσης ($OD_{600} = 0,6$).
- 3) Βάσει της οπτικής πυκνότητας αναμειγνύονται συγκεκριμένες ποσότητες από την καλλιέργεια με τα κύτταρα δότες και από αυτήν με τα κύτταρα δέκτες ώστε η αναλογία τους να είναι 1:1
- 4) Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση για 5 min στα 7000 rpm.
- 5) Ακολουθεί έκπλυση με 0,5 ml θρεπτικού μέσου LB στις ίδιες συνθήκες.
- 6) Το ίζημα επαναιωρείται σε 50 μl LB και τοποθετείται πάνω σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης που έχει τοποθετηθεί με τη σειρά του σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο L.A. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h. Σε αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιείται η σύζευξη.
- 7) Στην συνέχεια το φίλτρο βυθίζεται σε σωληνάριο που περιέχει 1 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο H₂O και ακολουθεί έντονη ανάδευση ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από το φίλτρο και να επαναιωρηθούν στο νερό.
- 8) Πραγματοποιούνται αραιώσεις 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} του εναιωρήματος από το προηγούμενο βήμα.
- 9) Ακολουθεί επίστρωση ποσότητας 200 μl από το κάθε εναιώρημα των αραιώσεων 10^0 - 10^{-3} σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο L.A. και τα κατάλληλα αντιβιοτικά: ένα στο οποίο παρουσιάζει ανθεκτικότητα το κινητοποιήσιμο πλασμίδιο και ένα αντιβιοτικό στο οποίο έχουν ανθεκτικότητα τα κύτταρα δέκτες. Οι αρχικές καλλιέργειες επιστρώνονται επίσης σε τρυβλία με τα αντιβιοτικά επιλογής για τη σύζευξη ως αρνητικοί μάρτυρες.
- 10) Ακολουθεί επώαση για 16-18 h, στους 37 °C.

3.19.2 Βακτηριακή σύζευξη με δότες κύτταρα *E. coli* και δέκτες κύτταρα *Z. mobilis*

1) Ετοιμάζονται προκαλλιέργειες των 5 ml των επιθυμητών στελεχών και επωάζονται στους 37 °C για τα κύτταρα *E. coli* και στους 30 °C για τα κύτταρα *Z. mobilis* για 16-18 h με ανάδευση στα 225 rpm.

2) Την επόμενη μέρα πραγματοποιούνται οι εξής ανακαλλιέργειες: αραίωση 1:20 σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB για τα κύτταρα *E. coli*. Αραίωση 1:5 σε 5 ml θρεπτικού μέσου ZB για τα κύτταρα *Z. mobilis*. Επωάζονται στους 37 °C υπό ανάδευση και στους 30 °C χωρίς ανάδευση αντίστοιχα, έως ότου φθάσουν στο μέσο της εκθετικής φάσης ($OD_{600} = 0,6$).

3) Βάσει της οπτικής πυκνότητας αναμειγνύονται συγκεκριμένες ποσότητες από την καλλιέργεια με τα κύτταρα δότες και από αυτήν με τα κύτταρα δέκτες ώστε η μεταξύ τους αναλογία να είναι 1:1.

4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στα 7000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 0,5 ml θρεπτικού μέσου ZB.

5) Πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 min στα 7000 rpm και απόρριψη του υπερκειμένου. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται εκ νέου σε 0,5 ml ZB.

6) Το εναιώρημα των κυττάρων διηθείται υπό κενό σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm.

7) Το φίλτρο νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο Z.A. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 5 h. Σε αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιείται η δημιουργία των συζευκτικών τριχιδίων και η σύζευξη.

7) Στην συνέχεια το φίλτρο νιτροκυτταρίνης βυθίζεται σε 1 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο H₂O και ακολουθεί ανακίνηση.

8) Ακολουθεί επίστρωση ολόκληρης της ποσότητας του εναιωρήματος από το προηγούμενο βήμα σε 5 τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο Z.A. και τον επιθυμητό συνδυασμό αντιβιοτικών (200 μl σε κάθε τρυβλίο). Τα τρυβλία περιέχουν ένα αντιβιοτικό στο οποίο έχει ανθεκτικότητα το κινητοποιήσιμο πλασμίδιο και ένα αντιβιοτικό στο οποίο έχουν ανθεκτικότητα τα κύτταρα δέκτες. Επίσης γίνεται

επίστρωση τρυβλίων με αρνητικούς μάρτυρες οι οποίοι είναι όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη.

9) Ακολουθεί επώαση στους 30 °C για τουλάχιστον 6 μέρες.

3.19.3 Βακτηριακή σύζευξη με δότες και δέκτες κύτταρα *Z. mobilis*

Στην προκειμένη περίπτωση δεν χρησιμοποιήθηκε κινητοποιήσιμο πλασμίδιο. Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως δέκτες κύτταρα *Z. mobilis* που περιείχαν μόνο ένα κινητοποιήσιμο πλασμίδιο (πλην των φυσικών τους πλασμιδίων) και ως δέκτες κύτταρα *Z. mobilis* διαφορετικού στελέχους. Περισσότερες λεπτομέρειες θα αναφερθούν στο κεφάλαιο «Αποτελέσματα». Ακολουθεί η πειραματική διαδικασία:

1) Ετοιμάζονται προκαλλιέργειες των 5 ml των επιθυμητών στελεχών και επωάζονται στους 30 °C για 16-18 h με ανάδευση στα 225 rpm.

2) Την επόμενη μέρα γίνονται ανακαλλιέργειες με αραίωση 1:20 σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB. Επωάζονται στους 37 °C υπό ήπια ανάδευση, έως ότου φθάσουν στο μέσο της εκθετικής φάσης ($OD_{600} = 0,6$).

3) Βάσει της οπτικής πυκνότητας αναμειγνύονται συγκεκριμένες ποσότητες από την καλλιέργεια με τα κύτταρα δότες και από αυτήν με τα κύτταρα δέκτες ώστε η μεταξύ τους αναλογία να είναι δότης: δέκτης 2:1 και 3:1 (δύο διαφορετικά σωληνάκια).

4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση του κάθε σωλήνα για 5 min στα 7000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 0,5 ml θρεπτικού μέσου ZB.

5) Πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 min στα 7000 rpm και απόρριψη του υπερκειμένου. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται εκ νέου σε 0,5 ml ZB.

6) Το εναιώρημα των κυττάρων διηθείται υπό κενό σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm.

7) Το κάθε φίλτρο νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε ένα τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο Z.A. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 8 h. Σε αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιείται η σύζευξη.

7) Στην συνέχεια το κάθε φίλτρο νιτροκυτταρίνης βυθίζεται σε 1 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο H₂O και ακολουθεί ανακίνηση.

8) Ακολουθεί επίστρωση ολόκληρης της ποσότητας του εναιωρήματος από το προηγούμενο βήμα σε 5 τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο Z.A και τον επιθυμητό συνδυασμό αντιβιοτικών για κάθε φίλτρο (200 μl σε κάθε τρυβλίο). Τα τρυβλία περιέχουν ένα αντιβιοτικό στο οποίο έχουν ανθεκτικότητα τα κύτταρα δότες και ένα αντιβιοτικό στο οποίο έχουν ανθεκτικότητα τα κύτταρα δέκτες. Επίσης γίνεται επίστρωση τριβλίων με αρνητικούς μάρτυρες οι οποίοι είναι όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη.

9) Ακολουθεί επώαση στους 30 °C για τουλάχιστον 6 μέρες.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη της ικανότητας κινητοποίησης του γονιδίου *mob* του πλασμιδίου pZA1003 μεταξύ στελεχών *Escherichia coli*

Ένα από τα αναγνωστικά πλαίσια του φυσικού πλασμιδίου pZA1003 του *Z. mobilis* NCIMB 11163 κωδικοποιεί ένα πιθανό πολυπεπίδιο, του οποίου η πρωτοταγής αμινοξική αλληλουχία παρουσιάζει μοτίβο ανάλογο με αυτό των ριλαξασών που παίζουν τον κεντρικό ρόλο στη μεταφορά του πλασμιδιακού DNA στα πλαίσια σύζευξης (relaxase / mobilization nuclease family protein). Ανοδικά αυτού του γονιδίου εδράζεται ένα αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί μία υποθετική πρωτεΐνη. Η αμινοξική αλληλουχία της παρουσιάζει ομολογία με πρωτεΐνες MobC που δρουν βοηθητικά στο ξετύλιγμα του *oriT* μέχρι το σημείο *nic* όπου η ριλαξάση πραγματοποιεί την εκτομή στη μία από τις δύο αλυσίδες του πλασμιδίου προκειμένου να ξεκινήσει η μεταφορά του στα κύτταρα δέκτες (Zhang and Meyer, 1997)

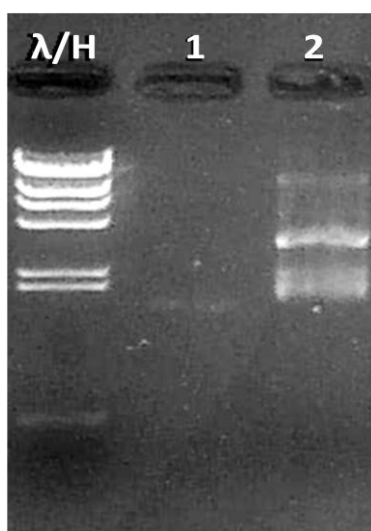
Σε προηγούμενη εργασία, το τμήμα *BglIII/XbaI* του πλασμιδίου pZA1003 στο οποίο εδράζονται τα δύο αυτά πιθανά γονίδια με την ανοδική τους περιοχή κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUCBM21 (Καμπανός κ. ά 2011). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCBM21Zmob που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα επιβοηθούμενης σύζευξης μεταξύ στελεχών *Escherichia coli*, όπου διαπιστώθηκε ότι είναι σε θέση να μεταφέρεται από ένα κύτταρο δότη σε ένα κύτταρο δέκτη στα πλαίσια σύζευξης που προκαλείται από συζευκτικό πλασμίδιο της ομάδας ασυμβατότητας IncP και συγκεκριμένα τα pDB126 (Balzer et. al 1994) και pRK2013 (Figurski and Helinski 1979).

Στην περίπτωση που ένα συζευκτικό πλασμίδιο συνυπάρχει με ένα άλλο στο ίδιο κύτταρο, όταν το πρώτο προκαλέσει τη διαδικασία της σύζευξης, το συνυπάρχον πλασμίδιο μπορεί να συμεταφερθεί με τους εξής τρόπους:

- Με τη διαδικασία της κινητοποίησης μέσω των λειτουργιών *mob* εφόσον διαθέτει το πλασμίδιο.
- Με τη διαδικασία της συνενσωμάτωσης (cointegration) κατά την οποία συμβαίνει ανασυνδυασμός μεταξύ του συζευκτικού και του άλλο πλασμιδίου. Κατά συνέπεια μεταφέρεται μεν το δεύτερο πλασμίδιο, αλλά όχι λόγω λειτουργιών *mob*.

Για να διερευνηθεί ποια από τις δύο περιπτώσεις ισχύει για το πλασμίδιο pUCBM21Zmob, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιβοηθούμενης σύζευξης όπου ως κύτταρο δότης χρησιμοποιήθηκε το *Escherichia coli* SM10. Το στέλεχος αυτό περιέχει τα συζευκτικά στοιχεία του συζευκτικού πλασμιδίου RP4 στο χρωμόσωμά του τα οποία ενσωματώθηκαν μέσω του βακτηριοφάγου Mu (Simon et al. 1983), επομένως μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες σύζευξης. Σε ένα τέτοιο στέλεχος μόνο ένα πλασμίδιο με λειτουργίες *mob* θα μπορούσε να μεταφερθεί με επιβοηθούμενη σύζευξη.

Για το σκοπό αυτό, κύτταρα του στελέχους SM10 μετασχηματίστηκαν ξεχωριστά με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCBM21Zmob καθώς και με το pUCBM21 το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα σύζευξης ως αρνητικός μάρτυρας. Η ύπαρξη των πλασμιδίων στο SM10 διαπιστώθηκε με πλασμιδιακή απομόνωση και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1



Εικόνα 4.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πλασμιδιακού DNA από SM10 Amp^R μετά από μετασχηματισμό με pUCBM21(διαδρομή 1) και pUCBM21Zmob (διαδρομή 2).

4.1.1 Σύζευξη μεταξύ SM10/pUCBM21Zmob και HMS174

Τα παραπάνω στελέχη χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα σύζευξης με κύτταρα δέκτες το *Escherichia coli* HMS174 σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι», ως εξής:

SM10/pUCBM21Zmob x HMS174

SM10/pUCBM21 x HMS174

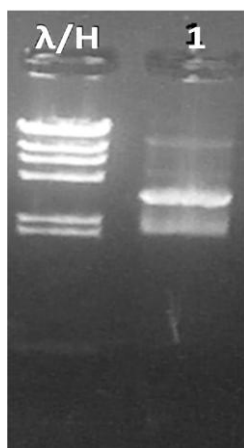
Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των συζευγμένων κυττάρων ήταν αμπικιλίνη για την επιλογή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και ριφαμικίνη για την επιλογή του κυττάρου δέκτη HMS174. Το HMS174 παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη ριφαμικίνη, ενώ το κύτταρο δότη SM10 παρουσιάζει ευαισθησία σε αυτήν.

Τα αποτελέσματα της σύζευξης ήταν τα εξής:

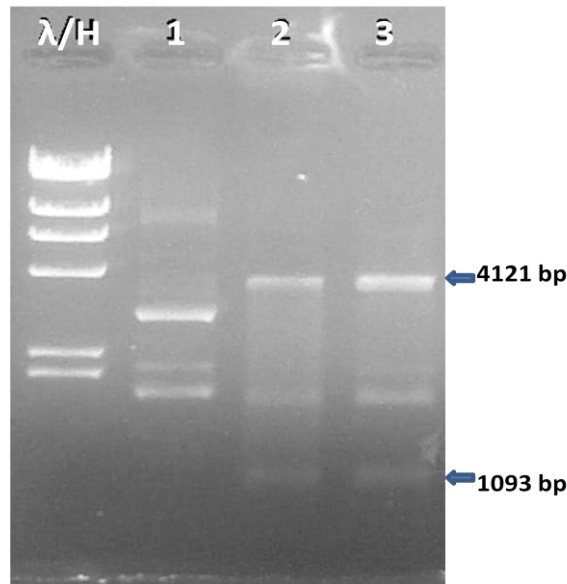
Αραίωση	Αριθμός αποικιών
10^0	(Πυκνό νέφος)
10^{-1}	(Πυκνό νέφος)
10^{-2}	(Νέφος)
10^{-3}	414

Τα τρυβλία του αρνητικού μάρτυρα παρουσίασαν νέφος αποικιών στη μηδενική αραίωση (10^0), ενώ δεν υπήρχε καθόλου ανάπτυξη αποικιών στις υπόλοιπες αραιώσεις.

Στη συνέχεια καλλιεργήθηκε μία από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία της αραιώσης 10^{-3} και εξετάστηκε ως προς το πλασμιδιακό της περιεχόμενο, το οποίο απομονώθηκε (Εικόνα 4.2) και υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III από την οποία αναμένονται δύο ζώνες μεγέθους 4121 bp και 1093 bp. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.3



Εικόνα 4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από μία αποικία από της σύζευξης SM10/pUCBM21Zmob x HMS174.



Εικόνα 4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα των πέψων του πλασμιδιακού DNA από την αποικία της σύζευξης. Διαδρομή 1: pUCBM21Zmob. Διαδρομή 2: pUCBM21Zmob / *Hind*III. Διαδρομή 3: πλασμιδιακό DNA από αποικία της σύζευξης SM10/pUCBM21Zmob x HMS174 μετά από πέψη με *Hind*III. Διακρίνονται οι αναμενόμενες ζώνες στις διαδρομές 2 και 3, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για το pUCBM21Zmob.

Κατά συνέπεια, το πλασμίδιο pUCBM21Zmob μεταφέρθηκε σε κύτταρα δέκτες μέσω επιβοηθούμενης σύζευξης που προκλήθηκε από λειτουργίες *tra* που εδράζονται στο χρωμόσωμα του κυττάρου δότη. Η κινητοποίησή του οφείλεται σε λειτουργίες που εδράζονται στο τμήμα του φυσικού πλασμιδίου pZA1003 που έχει κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pUCBM21. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι ο ίδιος ο πλασμιδιακός φορέας δεν παρουσίασε μεταφορά στα πλαίσια της παραπάνω επιβοηθούμενης σύζευξης.

4.2 Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης για το *Zyotomonas mobilis* που θα περιέχει γονίδια για την κινητοποίηση και την αντιγραφή του

Αφού επιβεβαιώθηκε ότι η περιοχή *mob* του πλασμιδίου pZA1003 έχει ιδιότητες κινητοποίησης, πραγματοποιήθηκε μια σειρά υποκλωνοποιήσεων με στόχο τη δημιουργία ενός κινητοποιήσιμου πλασμιδιακού φορέα που θα την περιέχει και θα

μπορεί να κινητοποιηθεί βάσει αυτής. Ο εν λόγω πλασμιδιακός φορέας θα πρέπει επίσης να περιέχει και την περιοχή *rep* του πλασμιδίου pZA1003 του στελέχους του *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αντιγραφή και η διατήρησή του σε κύτταρα *Zymomonas mobilis*.

Το pUCBM21 δεν ήταν δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την κατασκευή του πλασμιδιακού αυτού φορέα, διότι φέρει γονίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, ενώ το *Z. mobilis* παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε αυτό το αντιβιοτικό. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pBR328. Ο φορέας αυτός παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα για την εν λόγω κατασκευή:

- Διαθέτει γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη, στα οποία το *Z. mobilis* παρουσιάζει ευαισθησία.
- Έχει αφαιρεθεί από την αλληλουχία του η περιοχή *oriT* του πλασμιδίου pMB1 που διαθέτουν οι άλλοι φορείς της οικογένειας pBR, κατά συνέπεια δεν είναι σε θέση να κινητοποιηθεί στα πλαίσια επιβοηθούμενης σύζευξης.

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η κατασκευή, θα πρέπει να αποκοπεί από το πλασμίδιο pZA1003 η περιοχή στην οποία εδράζονται τα γονίδια αντιγραφής και κινητοποίησης συμπεριλαμβανομένων και των ανοδικών και καθοδικών περιοχών τους, ώστε να περιλαμβάνονται πιθανοί υποκινητές, τα *oriV* και *oriT* και τυχόν στοιχεία ελέγχου της αντιγραφής. Επομένως είναι απαραίτητη η απομόνωση του pZA1003 από το φυσικό ξενιστή του NCIMB 11163. Εντούτοις, παρ' όλες τις προσπάθειες, και επειδή το στέλεχος αυτό περιέχει και άλλα φυσικά πλασμίδια, η απομόνωση αυτή είχε μικρή απόδοση και μετά τον καθαρισμό δεν λαμβανόταν σχεδόν καθόλου προϊόν.

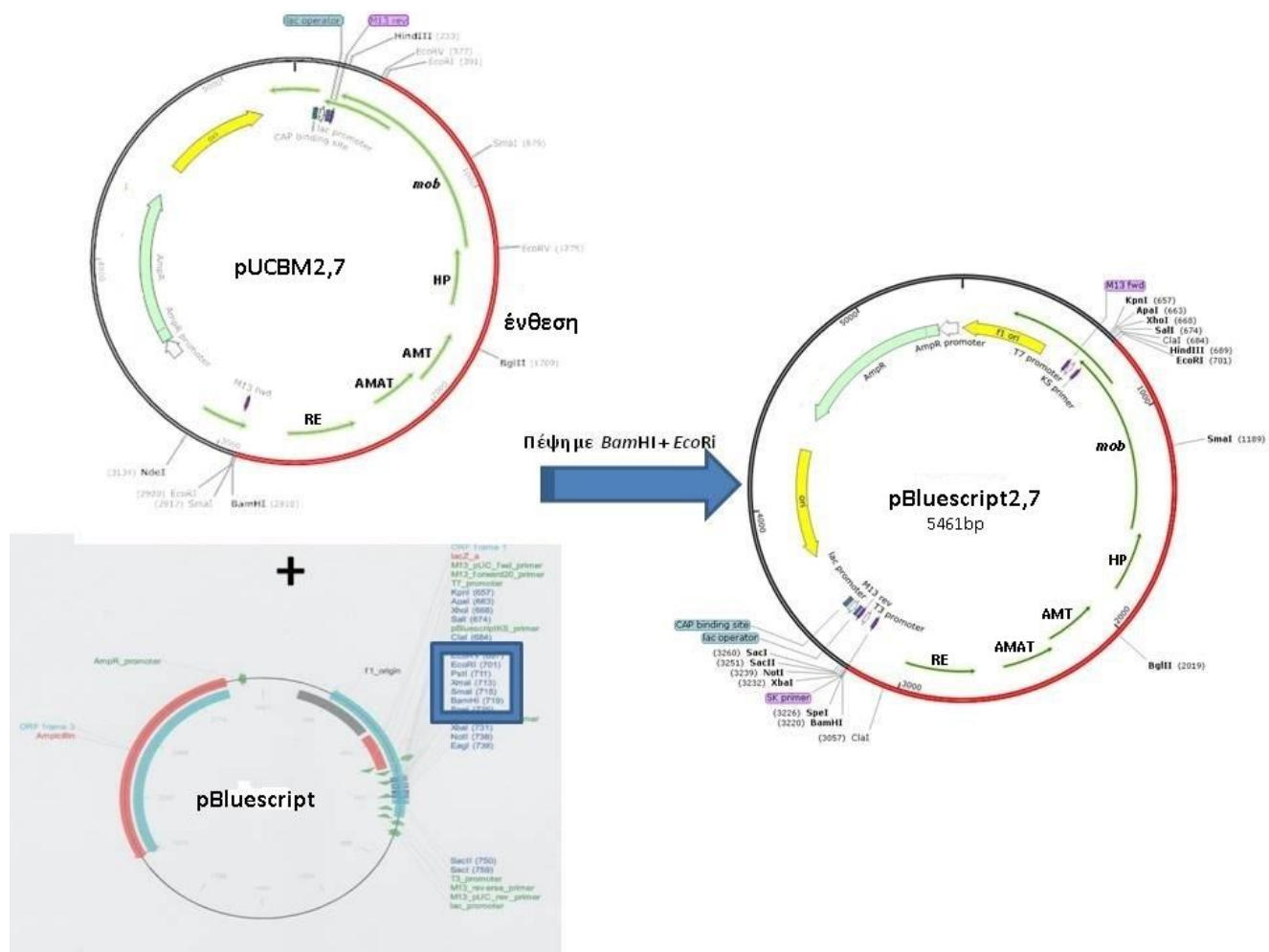
Κατά συνέπεια, για την κατασκευή αυτή χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια στα οποία έχουν κλωνοποιηθεί τμήματα του pZA1003 σε μία σειρά από τρεις συνδυαστικές υποκλωνοποιήσεις οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια.

4.2.1 Πρώτη υποκλωνοποίηση από τμήμα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUCBM2,7: κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBluescript2,7

Το πλασμίδιο pUCBM2,7 είναι ευγενική χορηγία του Μάριου Μητσόπουλου (αδημοσίευτα αποτελέσματα) και προέκυψε μετά από κλωνοποίηση του τμήματος *Bam*HI / *Hind*III μεγέθους 2,7 kb του pZA1003 στις αντίστοιχες θέσεις στον

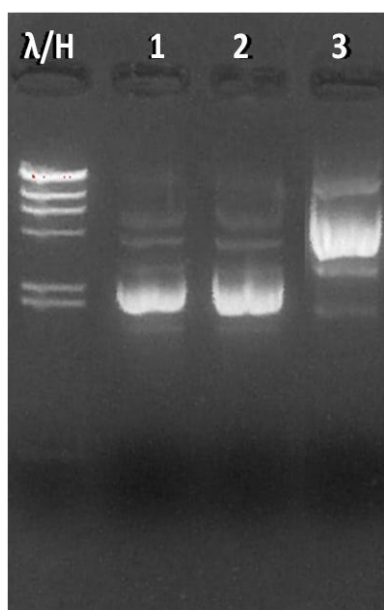
πλασμιδιακό φορέα pUCBM21. Το τμήμα αυτό περιέχει τα αναγνωστικά πλαίσια που φέρονται ως γονίδια ενδονουκλεάσης περιορισμού, τοξίνης – αντιτοξίνης, υποθετικής πρωτεΐνης (η οποία πιθανώς συμμετέχει στην κινητοποίηση) καθώς και μέρος του πιθανού γονιδίου *mob*. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη υποκλωνοποίηση.

Συγκεκριμένα, από το pUCBM2,7 παραλήφθηκε το τμήμα *Bam*HI / *Eco*RI με τα φερόμενα υποθετικά αναγνωστικά πλαίσια των πρωτεϊνών RE, AMAT-AMT, HP και μέρος του *mob* και εισήχθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBlueScript SK(+). Στην εικόνα 4.4 φαίνεται σχηματικά η διαδικασία.

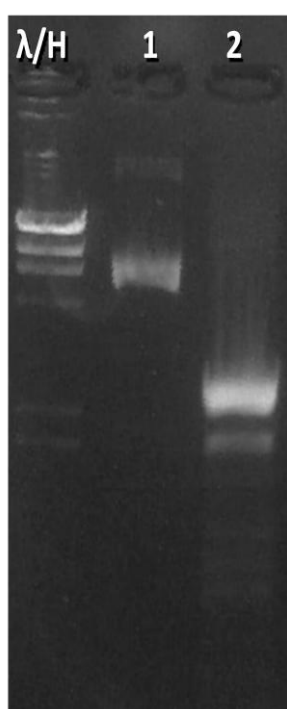


Εικόνα 4.4 Διαδικασία υποκλωνοποίησης για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBluescript2,7

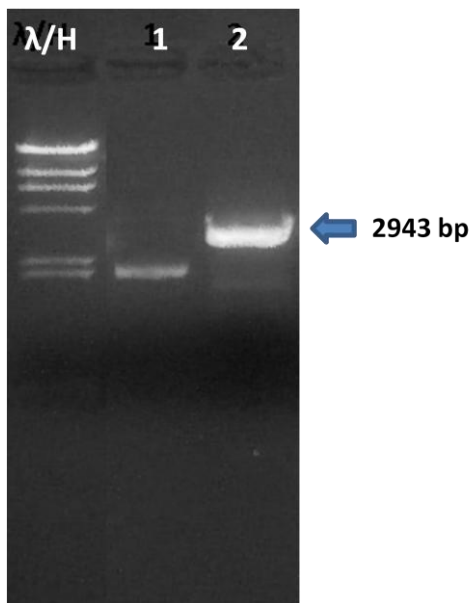
Για την κατασκευή του, πραγματοποιήθηκαν πέψεις του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUCBM2,7 και του πλασμιδιακού φορέα pBlueScript SK (+) με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Eco*RI. Στη συνέχεια φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης των αντίστοιχων πλασμιδίων που απομονώθηκαν (εικόνα 4.5) και των πέψεων για παραλαβή της ένθεσης και του φορέα (εικόνες 4.6, 4.7). Τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών για από την πέψη για την παραλαβή της ένθεσης ήταν 2518 bp και 2083 bp και χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη ζώνη. Το μέγεθος του φορέα ήταν 2943 bp.



Εικόνα 4.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης απομονωμένου πλασμιδιακού DNA: Διαδρομές 1 και 2: pBluescript2,7, Διαδρομή 3: pUCBM2,7



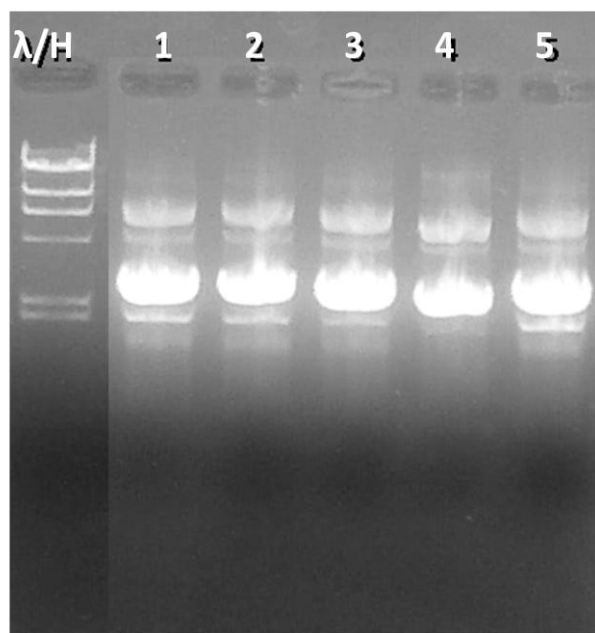
Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πέψεων του πλασμιδίου pUCBM2,7. Διαδρομή 1: πλασμίδιο pUCBM2,7 άθικτο. Διαδρομή 2: πέψη του πλασμιδίου pUCBM2,7 με *Bam*HI και *Eco*RI. Τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών για από την πέψη ήταν 2518 bp και 2083 bp. Η μεγαλύτερη ζώνη χρησιμοποιήθηκε ως ένθεση.



Εικόνα 4.7: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πένσεων του πλασμιδιακού φορέα pBluescript. Διαδρομή 1: πλασμίδιο pBluescript άθικτο. Διαδρομή 2: πέψη του πλασμιδίου pBluescript με *Bam*HI και *Eco*RI. Το μέγεθος του φορέα είναι 2943 bp.

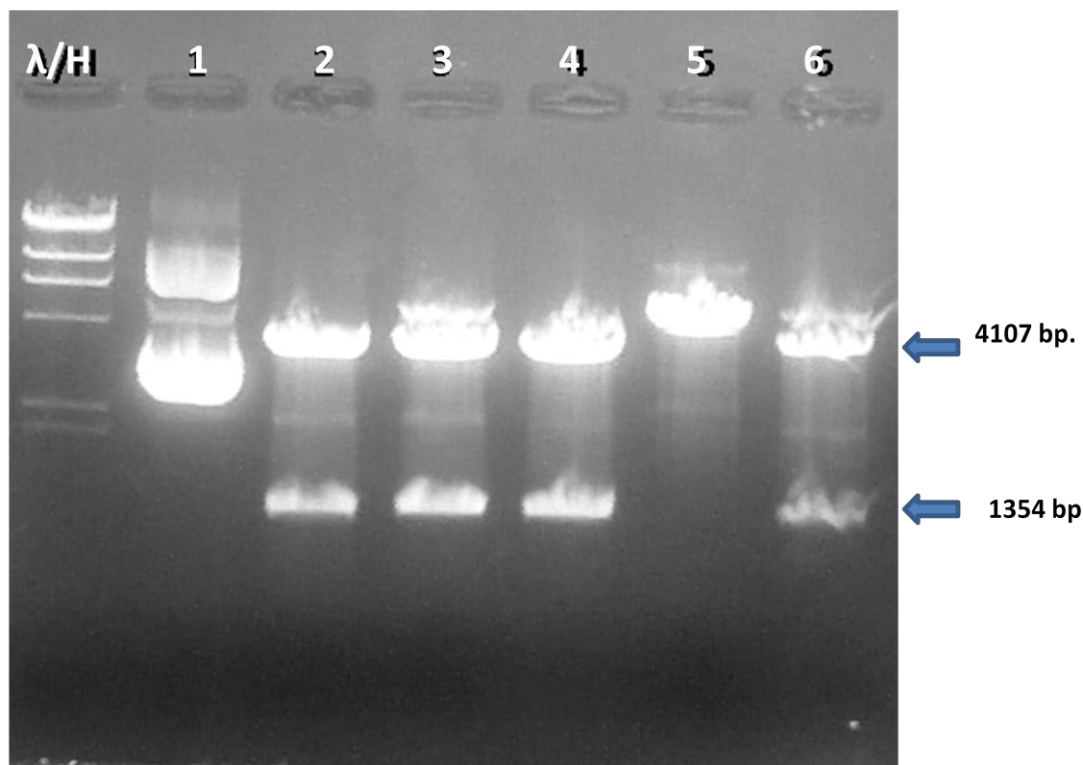
Μετά τον καθαρισμό και παραλαβή της ένθεσης και του φορέα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση δεσμοποίησης και μετασχηματισμός σε επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α. Ως παράγοντας επιλογής χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμικικιλίνη για τα μετασχηματισμένα κύτταρα και το χρωμογόνο x- gal για τις λευκές αποικίες που περιείχαν δυνητικά το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Ακολούθησε πλασμιδιακή απομόνωση σε 5 από τις λευκές αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία του μετασχηματισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το αναμενόμενο μέγεθος του νέου πλασμιδίου είναι 5461 bp.



Εικόνα 4.8: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του πλασμιδιακού DNA των 5 λευκών αποικιών από τον ανωτέρω μετασχηματισμό.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της δεσμοποίησης με τα περιοριστικά ένζυμα *XhoI* και *BglIII* τα οποία αναγνωρίζουν θέσεις εντός του φορέα και της ένθεσης, αντίστοιχα. Οι αναμενόμενες ζώνες από το νέο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBluescript2,7 είναι 1354 bp και 4107 bp. Τα αποτελέσματα των πέψεων, οι οποίες υποδεικνύουν επιτυχημένη δεσμοποίηση, παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



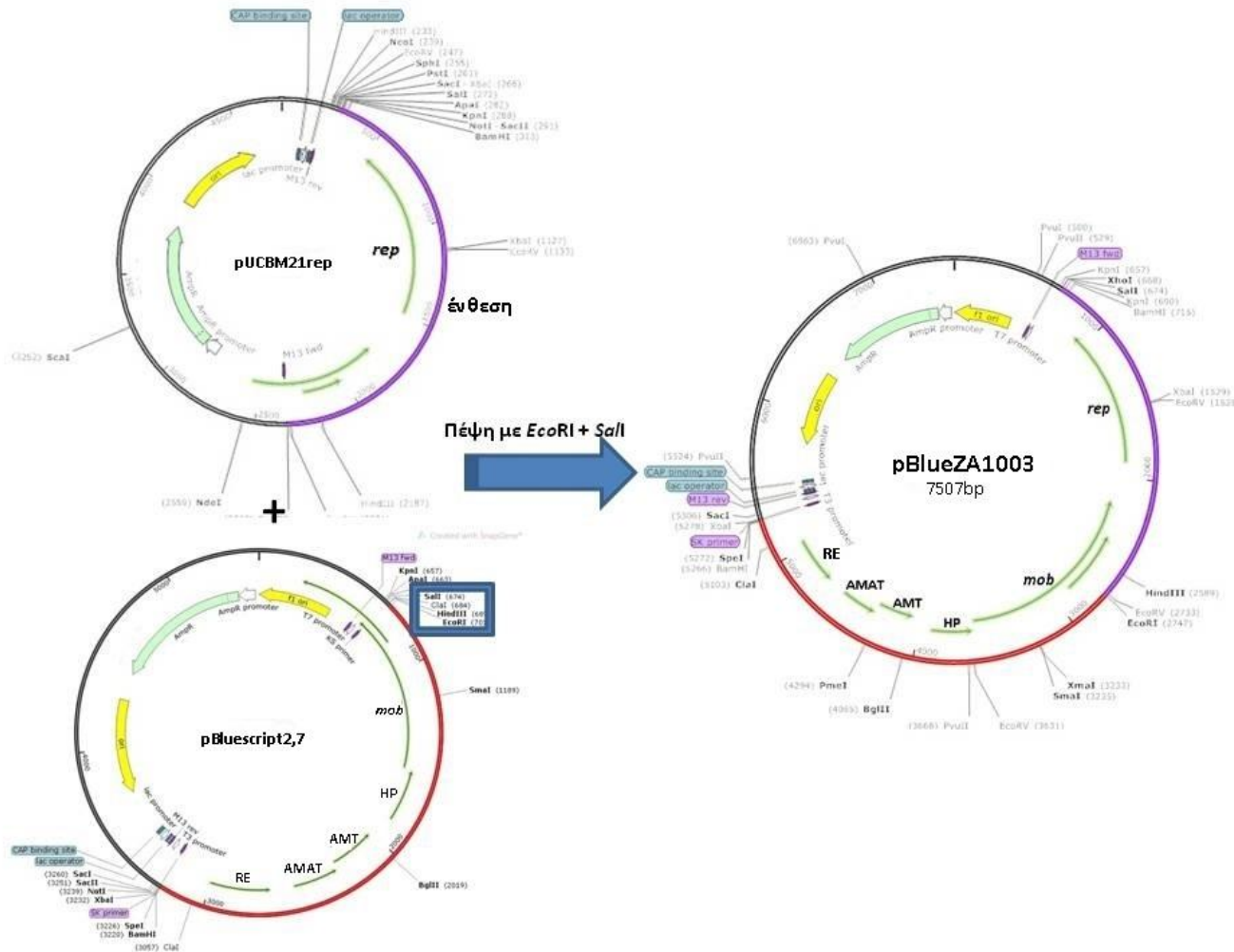
Εικόνα 4.9: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των πέψεων του πλασμιδιακού DNA των 5 λευκών αποικιών με *XhoI* και *BglIII*. Στη διαδρομή 1 φαίνεται το άθικτο πλασμιδιακό DNA από την αποικία 1. Οι πέψεις των διαδρομών 2, 3, 4 και 6 υποδεικνύουν επιτυχημένη δεσμοποίηση, εφόσον εμφανίστηκαν οι 2 ζώνες του αναμενόμενου μεγέθους.

4.2.2 Δεύτερη υποκλωνοποίηση από τμήμα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUCBM21rep στο pBluescript2,7: κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pblueZA1003

Το πλασμίδιο pUCBM21rep (Κοτολόσι κ. ά. 2015) προέκυψε μετά από κλωνοποίηση του τμήματος *EcoRI* / *BamHI* μεγέθους 2 kb του pZA1003 στις

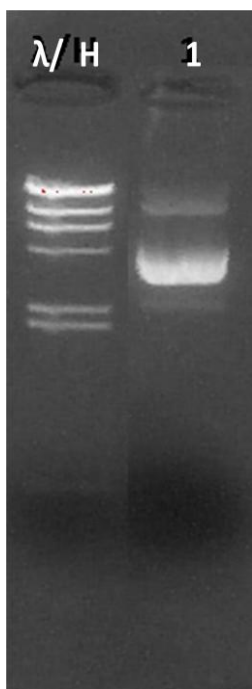
αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδιακού φορέα pUCBM21. Στο τμήμα αυτό εδράζεται η περιοχή που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του pZA1003. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε στη δεύτερη υποκλωνοποίηση.

Συγκεκριμένα, από το pUCBM21rep παραλήφθηκε το τμήμα *EcoRI* / *SalI* στο οποίο εδράζεται το γονίδιο *rep* με την ανοδική και καθοδική περιοχή του, καθώς και μέρος του γονιδίου *mob* και εισήχθη στις αντίστοιχες θέσεις του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBluescript2,7. Η ένθεση αυτή είχε ως αποτέλεσμα, εκτός από την προσθήκη της περιοχής που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή στο πλασμίδιο, και τη συμπλήρωση του γονιδίου *mob*, το οποίο πλέον εδράζεται ολοκληρωμένο στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που προκύπτει. Στην εικόνα 4.12 φαίνεται σχηματικά η διαδικασία.

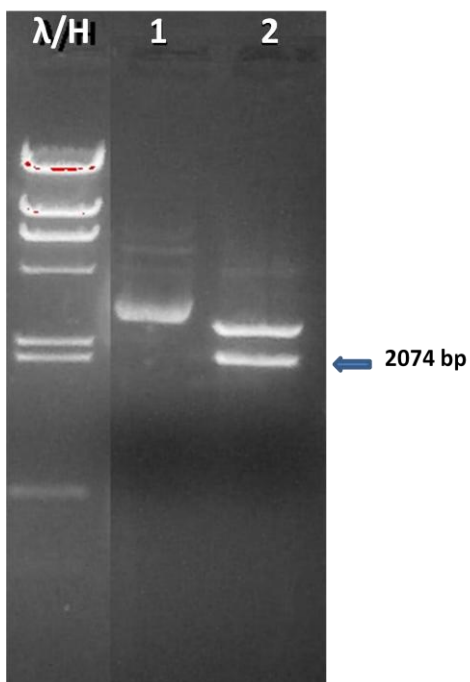


Εικόνα 4.10 Διαδικασία υποκλωνοποίησης για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBlueZA1003.

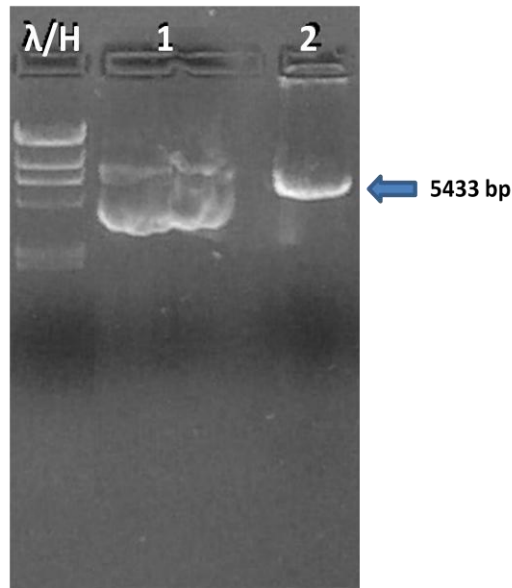
Για την κατασκευή του, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUCBM21rep και pBlueScript2,7 με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *SalI*. Στη συνέχεια φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης των αντίστοιχων πλασμιδίων που απομονώθηκαν (εικόνα 4.11) και των πέψεων για παραλαβή της ένθεσης και του φορέα (εικόνες 4.12, 4.13). Το μέγεθος της ένθεσης ήταν 2074 bp ενώ το μέγεθος του φορέα ήταν 5433 bp.



Εικόνα 4.11 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης απομονωμένου πλασμιδίου pUCBM21rep.



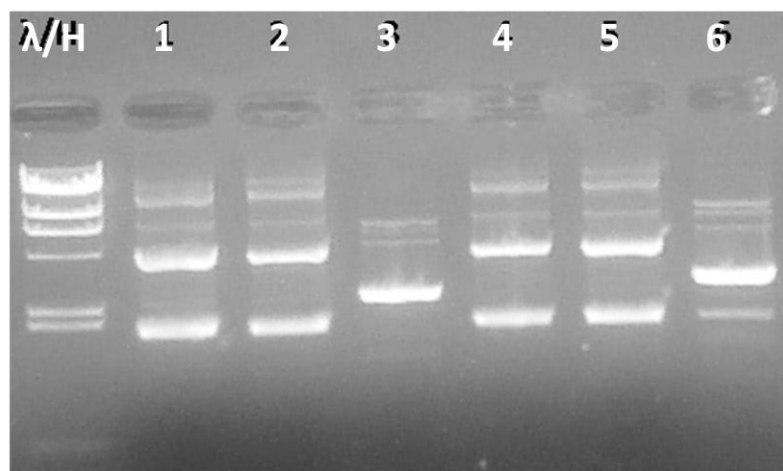
Εικόνα 4.12: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πέψεων του πλασμιδίου pUCBM21rep. Διαδρομή 1: πλασμίδιο pUCBM21rep άθικτο. Διαδρομή 2: πέψη του πλασμιδίου pUCBM21rep με *EcoRI* και *SalI*. Η ένθεση είναι η μικρότερη ζώνη με μέγεθος 2074 bp.



Εικόνα 4.13: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πέψεων του πλασμιδίου pBluescript2,7. Διαδρομή 1: πλασμίδιο pBluescript2,7 άθικτο. Διαδρομή 2: πέψη του πλασμιδίου pBluescript2,7 με *EcoRI* και *Sall*.

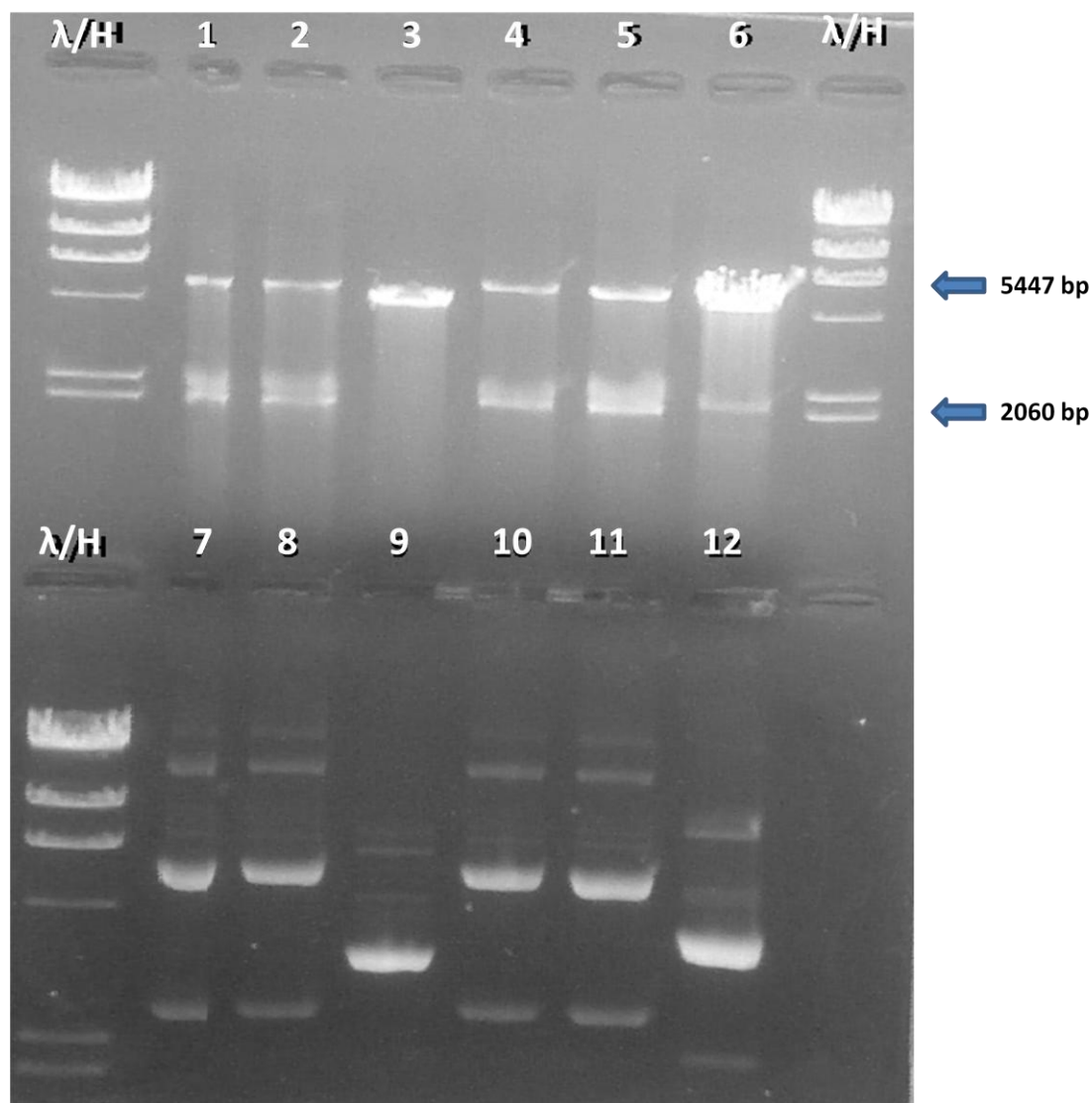
Μετά τον καθαρισμό και παραλαβή της ένθεσης και του φορέα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση δεσμοποίησης και μετασχηματισμός σε επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α. Ως παράγοντας επιλογής χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμικικιλίνη.

Ακολούθησε πλασμιδιακή απομόνωση από 6 αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία του μετασχηματισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το αναμενόμενο μέγεθος του νέου πλασμιδίου είναι 7507 bp.



Εικόνα 4.14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 6 διαφορετικών αποικιών του πλασμιδιακού DNA από την αντίδραση δεσμοποίησης που περιγράφηκε στο κείμενο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της δεσμοποίησης με τα περιοριστικά ένζυμα *XhoI* και *EcoRI*. Οι αναμενόμενες ζώνες από το νέο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBlueZA1003 είναι 2060 bp και 5447 bp. Τα αποτελέσματα των πέψεων, οι οποίες υποδεικνύουν επιτυχημένη δεσμοποίηση, παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



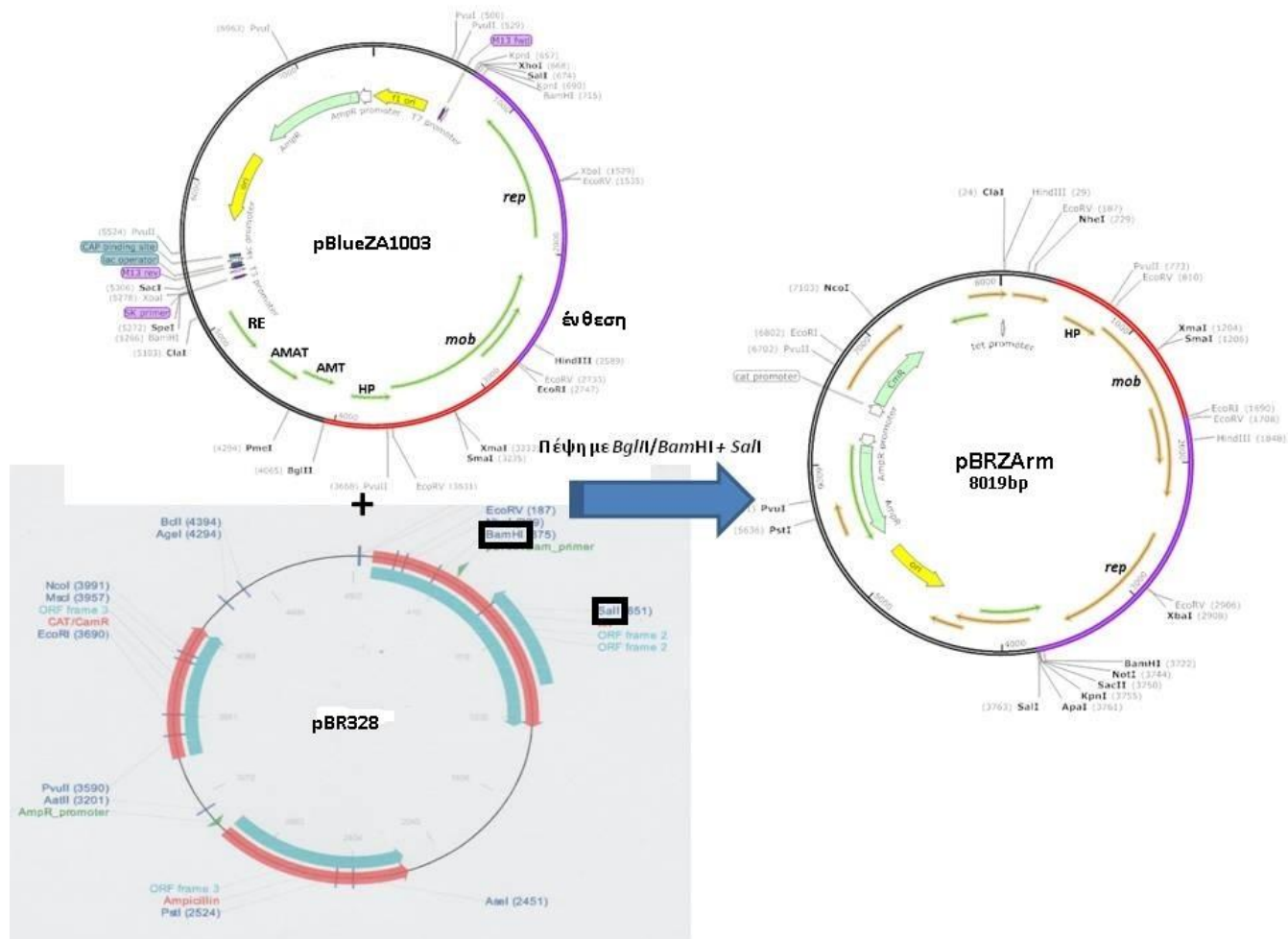
Εικόνα 4.15: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 6 διαφορετικών αποικιών του πλασμιδιακού DNA από την ανωτέρω αντίδραση δεσμοποίησης, που έχουν υποστεί πέψη με *XhoI* και *EcoRI*. Στις διαδρομές 7- 12 φαίνονται τα αντίστοιχα άθικτα πλασμιδιακά DNA. Οι αποικίες των διαδρομών 1-5 υποδεικνύουν επιτυχημένη δεσμοποίηση.

Με αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBlueZA1003 το οποίο περιέχει ολόκληρο το πλασμίδιο pZA1003 του *Z. mobilis* NCIMB 11163 με

όλες τις πιθανές κωδικές περιοχές του άθικτες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον σε μελέτες που απαιτούν την παρουσία όλων των γονιδίων του pZA1003.

4.2.3 Τρίτη υποκλωνοποίηση με την ένθεση της περιοχής *repmob* του pZA1003 στον πλασμιδιακό φορέα pBR328: κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBRZArm.

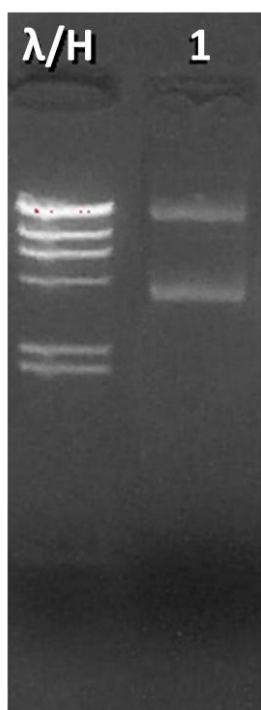
Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBRZArm προέκυψε μετά από κλωνοποίηση του τμήματος *Bgl*II / *Sal*I του pBlueZA1003 (στο οποίο εδράζονται οι περιοχές που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή και την κινητοποίηση του πλασμιδίου pZA1003 μαζί με τις ανοδικές και καθοδικές περιοχές τους) στις θέσεις *Bam*HI και *Sal*I του πλασμιδιακού φορέα pBR328. Στην εικόνα 4.16 φαίνεται σχηματικά η διαδικασία.



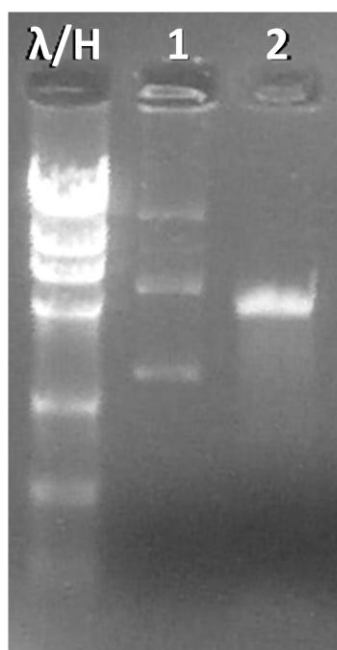
Εικόνα 4.16 Διαδικασία υποκλωνοποίησης για την κατασκευή του φορέα κλωνοποίησης pBRZArm.

Για την κατασκευή του πραγματοποιήθηκε πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBlueZA1003 με τα περιοριστικά ένζυμα *Bgl*III και *Sal*I, ενώ ο πλασμιδιακός φορέας pBR328 υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Sal*I.

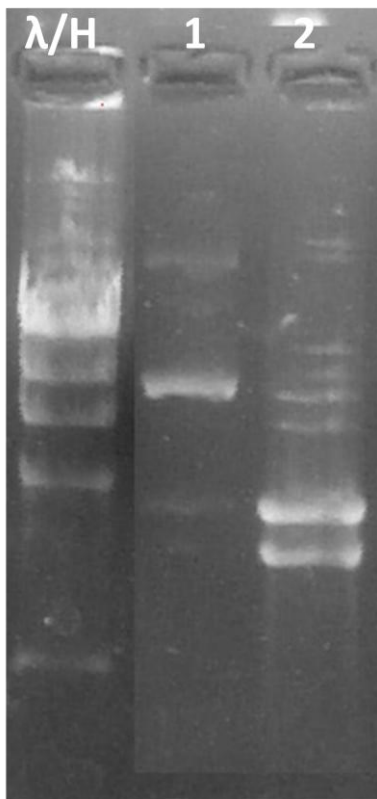
Στη συνέχεια φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης των αντίστοιχων πλασμιδίων που απομονώθηκαν (εικόνα 4.17) και των πέψεων για παραλαβή της ένθεσης και του φορέα (εικόνες 4.18, 4.19). Τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών για την παραλαβή του φορέα ήταν 4631 bp και 276 bp και χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη ζώνη. Τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών για την παραλαβή της ένθεσης ήταν 4115 bp και 3392 bp και χρησιμοποιήθηκε η μικρότερη ζώνη.



Εικόνα 4.17 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης απομονωμένου πλασμιδίου pBR328.



Εικόνα 4.18: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πέψεων του πλασμιδίου pBR328. Διαδρομή 1: πλασμίδιο pBR328 άθικτο. Διαδρομή 2: πέψη του πλασμιδίου pBR328 με *Bam*HI και *Sal*I. Οι αναμενόμενες ζώνες έχουν μέγεθος 4631bp και 276 bp. Η μεγαλύτερη ζώνη χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για τη δεσμοποίηση.



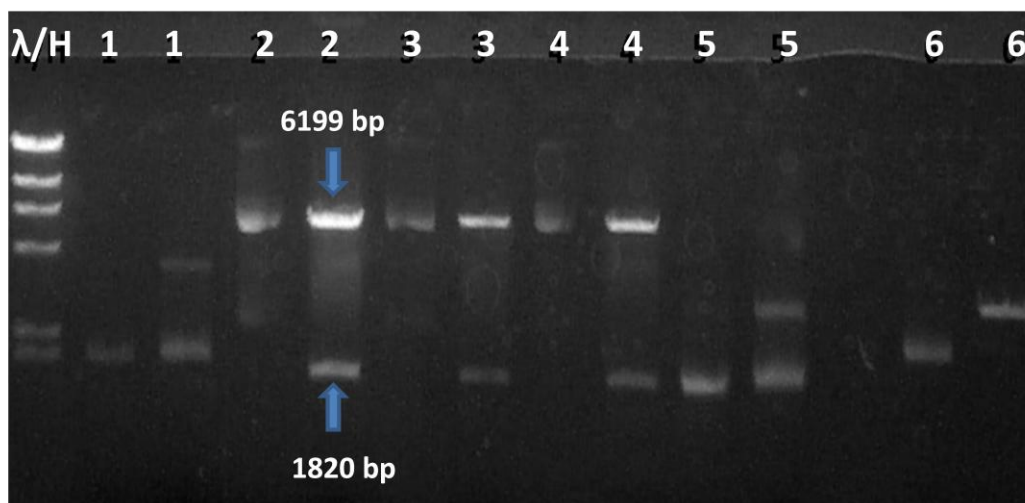
Εικόνα 4.19: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πέψεων του πλασμιδίου pBlueZA1003. Διαδρομή 1: πλασμίδιο pBlueZA1003 άθικτο. Διαδρομή 2: πέψη του πλασμιδίου pBlueZA1003 με *Bgl*III και *Sal*I. Η ένθεση είναι η μικρότερη ζώνη και το μέγεθός της είναι 3392 bp.

Ακολούθησε πλασμιδιακή απομόνωση από 6 αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία του μετασχηματισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το αναμενόμενο μέγεθος του νέου πλασμιδίου είναι 7507 bp.

Μετά τον καθαρισμό και παραλαβή της ένθεσης και του φορέα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση δεσμοποίησης και μετασχηματισμός σε επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α. Ως παράγοντας επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

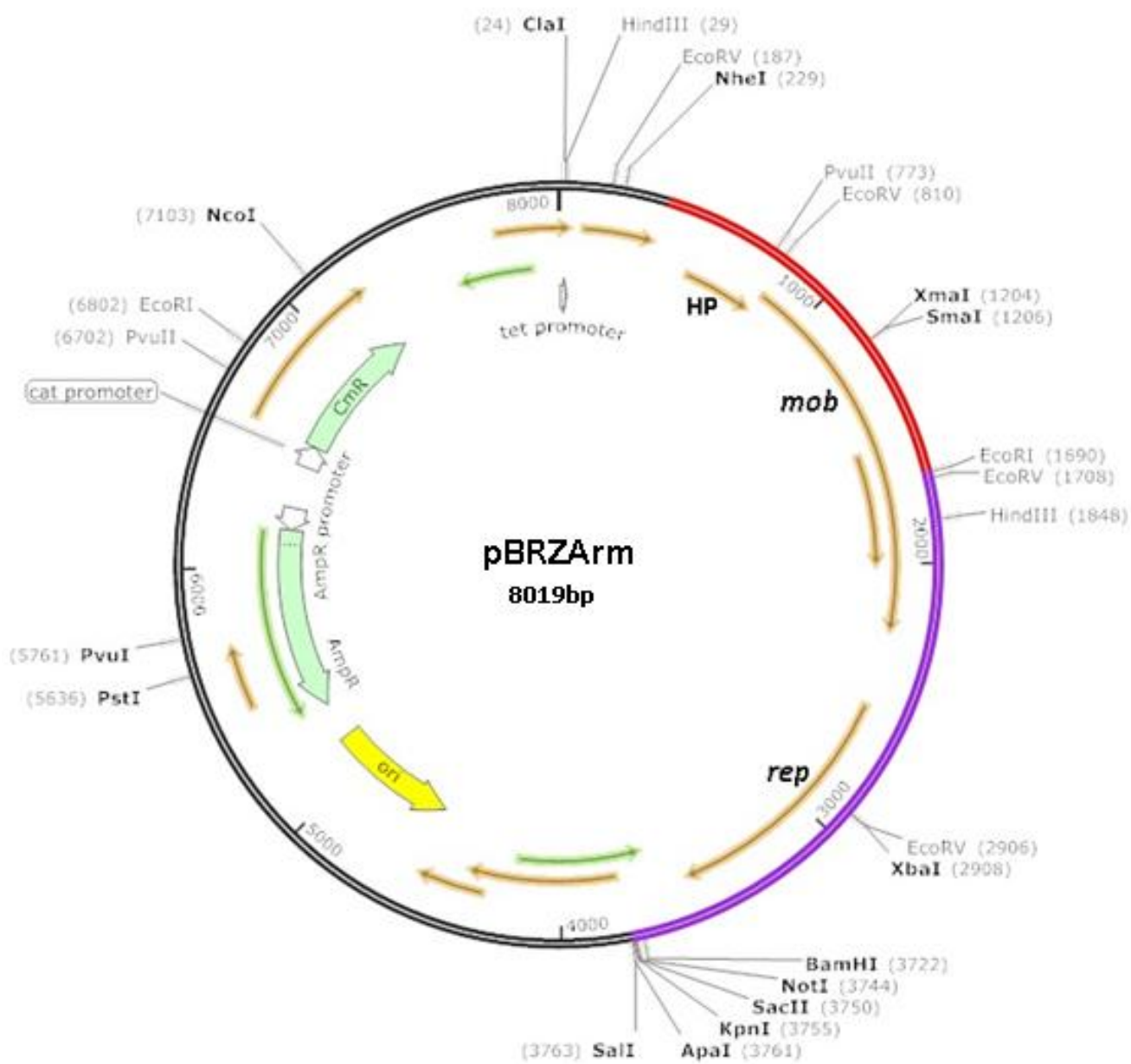
Η επιλογή των αποικιών με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιήθηκε ως εξής: Το pBR328 περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, το οποίο απενεργοποιείται μετά την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Sal*I, την αφαίρεση του ενδιάμεσου τμήματος και την ενσωμάτωση της ένθεσης στις παραπάνω θέσεις. Βάσει αυτού του γεγονότος, οι αποικίες μεταφέρθηκαν αντιγραφικά με αποστειρωμένο βελούδο σε νέα τρυβλία με τετρακυκλίνη. Οι αποικίες που προέκυψαν από την πρόσληψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου ήταν αναμενόμενο να μην αναπτυχθούν. Ακολούθησε σύγκριση των αρχικών τρυβλίων με αυτά που περιείχαν τετρακυκλίνη και επιλέχθηκαν 6 αποικίες που είχαν αναπτυχθεί σε

αμπικιλίνη αλλά όχι σε τετρακυκλίνη για περαιτέρω ανάλυση. Πραγματοποιήθηκε πλασμιδιακή απομόνωση από τις επιλεγμένες αποικίες και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το αναμενόμενο μέγεθος του φορέα κλωνοποίησης pBRZArm είναι 8019 bp. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της δεσμοποίησης με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III με αναμενόμενες ζώνες πέψης 1820 bp και 6199 bp. Η παρακάτω εικόνα ηλεκτροφόρησης υποδεικνύει ότι η δεσμοποίηση πέτυχε.



Εικόνα 4.20: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 6 διαφορετικών αποικιών του πλασμιδιακού DNA από την ανωτέρω αντίδραση δεσμοποίησης. Κατά σειρά φαίνονται τα άθικτα πλασμιδιακά DNA και αφού έχουν υποστεί πέψη με *Hind*III από τις αποικίες 1-6. Οι αποικίες 2, 3 και 4 υποδεικνύουν επιτυχημένη δεσμοποίηση.

Ο νέος φορέας κλωνοποίησης που κατασκευάστηκε, ο pBRZArm περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη, και τα γονίδια *mob* και *rep*, καθώς και το αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί την υποθετική πρωτεΐνη του πλασμιδίου pZA1003 του *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. Αυτός ο φορέας είναι ένα κινητοποιήσιμο πλασμίδιο και δημιουργήθηκε με σκοπό να μπορεί να κινητοποιηθεί μέσω βακτηριακής σύζευξης σε στελέχη του *Zymomonas mobilis*. Το γονίδιο *mob* του προσφέρει τη δυνατότητα κινητοποίησης, ενώ με το γονίδιο *rep* εξασφαλίζεται η αντιγραφή και η διατήρησή του σε κύτταρα *Zymomonas mobilis*.



Εικόνα 4.21: Ο φορέας κλωνοποίησης pBRZArm

Ακολουθεί ένα σχήμα που δείχνει συνολικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν για το σχηματισμό του φορέα κλωνοποίησης pBRZArm.

pUCBM2,7 με *Bam*HI και *Eco*RI (ένθεση)
+
pBluescript με *Bam*HI και *Eco*RI (φορέας) } pBluescript2,7

pUCBM21repZA1003 με *Eco*RI και *Sal*I (ένθεση)
+
pBluescript2,7 με *Eco*RI και *Sal*I (φορέας) } pBlueZA1003

pBlueZA1003 με *Bgl*II και *Sal*I (ένθεση)
+
pBR328 με *Bam*HI και *Sal*I (φορέας) } pBRZArm

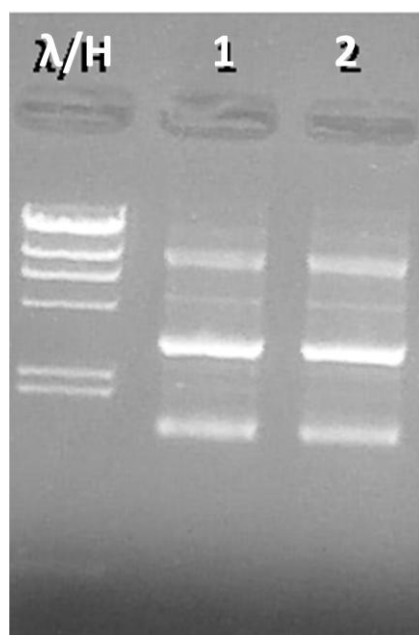
4.3 Πειράματα υβριδισμού στυπώματος κατά Southern στα παραχθέντα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά υβριδισμών στα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν ώστε να ταυτοποιηθεί η παρουσία των περιοχών *rep* και *mob* στο τελικό ανασυνδυασμένο pZA1003.

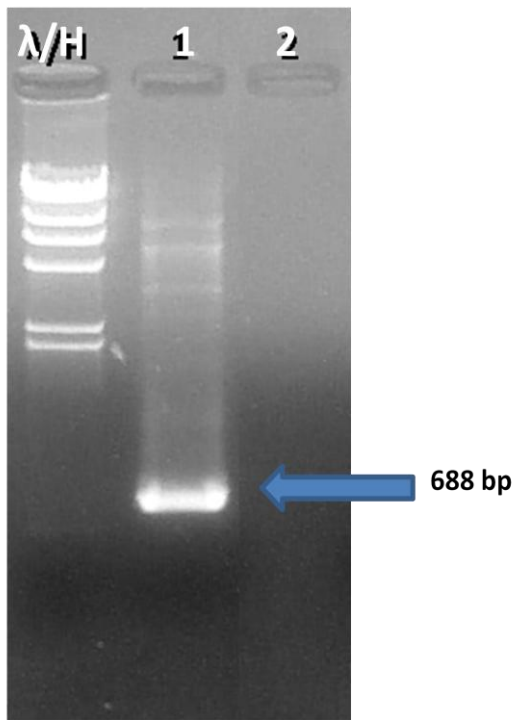
4.3.1 Προετοιμασία τμημάτων DNA που θα σημανθούν για να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες (probes) σε πειράματα υβριδισμού

Προετοιμασία του ιχνηθέτη για την περιοχή κινητοποίησης του pZA1003

Ο συγκεκριμένος ιχνηθέτης απομονώθηκε μετά από ενίσχυση με PCR τμήματος μεγέθους 688 bp με αρχή στο εσωτερικό του αναγνωστικού πλαισίου HP και τέλος στο εσωτερικό του γονιδίου *mob* με εκμαγείο DNA το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCBM21Zmob στο οποίο εδράζεται όλη η περιοχή κινητοποίησης του πλασμιδίου pZA1003. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές HPMOBF και HPMOBR και τις συνθήκες που περιγράφονται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται η απομόνωση του πλασμιδίου (Εικόνα 4.22) και τα αποτελέσματα της PCR (Εικόνα 4.23).



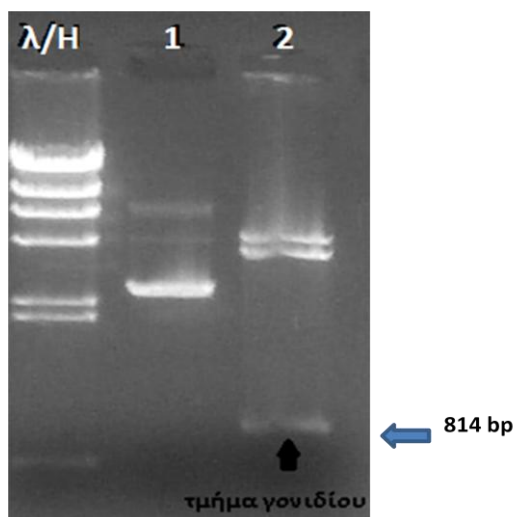
Εικόνα 4.22: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης πλασμιδιακής απομόνωσης του pUCBM21mob (δύο διαδρομές).



Εικόνα 4.23: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος PCR από pUCBM21mob (για δημιουργία probe). Στη διαδρομή 2 φαίνεται το αρνητικό κοντρόλ.

Προετοιμασία του ιχνηθέτη για το γονίδιο *rep* του pZA1003

Ο συγκεκριμένος ιχνηθέτης DNA απομονώθηκε μετά από πέψη του πλασμιδίου pUCBM21rep στο οποίο εδράζεται όλη η περιοχή αντιγραφής του πλασμιδίου pZA1003 με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Xba*I. Προκύπτει μία ζώνη μεγέθους 814 bp που είναι τμήμα του γονιδίου *rep* και χρησιμοποιήθηκε για υβριδισμό. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



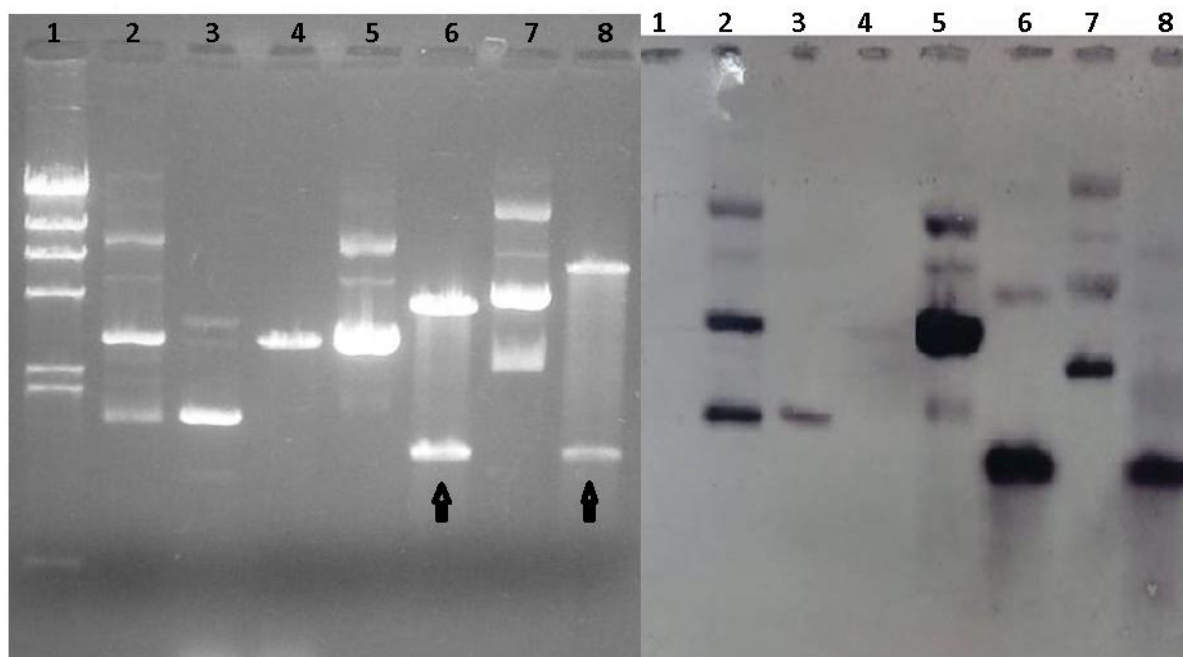
Εικόνα 4.24 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πέψεων του πλασμιδίου pUCBM21rep. Διαδρομή 1: πλασμίδιο pUCBM21rep άθικτο. Διαδρομή 2: πέψη του πλασμιδίου pUCBM21rep με *Bam*HI και *Xba*I για δημιουργία τμήματος για υβριδισμό. Διακρίνεται η ζώνη με το αναμενόμενο μέγεθος.

Τα δύο DNA απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης, καθαρίστηκαν και ιχνοθετήθηκαν όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη ενότητα του κεφαλαίου «Υλικά και μέθοδοι».

4.3.2 Υβριδισμός με τον ιχνηθέτη - τμήμα του γονιδίου *mob* στα pBluescript2,7 και pBlueZA1003.

Προκειμένου να ελεγχθεί αν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pBluescript2,7 και pBlueZA1003 πράγματι περιέχουν το γονίδιο *mob*, πραγματοποιήθηκε πέψη αμφότερων με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BglIII*. Τοιουτοτρόπως προέκυψαν δύο τμήματα DNA μεγέθους 1319 bp το καθένα, στα οποία εδράζεται το γονίδιο *mob*, προς υβριδισμό. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCBM21Zmob και ως αρνητικός μάρτυρας ο φορέας pBluescript.

Από τη σύγκριση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης με το φίλτρο υβριδισμού, διαπιστώθηκε ότι τα τμήματα DNA που ελέγχθηκαν έχουν υβριδιστεί με το γνωστό τμήμα του ιχνοθετημένου DNA, γεγονός που αποδεικνύει την παρουσία το γονιδίου *mob* σε αυτά. Το γεγονός ότι έχει πραγματοποιηθεί υβριδοποίηση και στο θετικό κοντρόλ, αποδεικνύει την πιστότητα της μεθόδου. Η ύπαρξη ηπιότερου σήματος στο αρνητικό κοντρόλ πιθανόν να οφείλεται σε μη ειδικό σήμα.



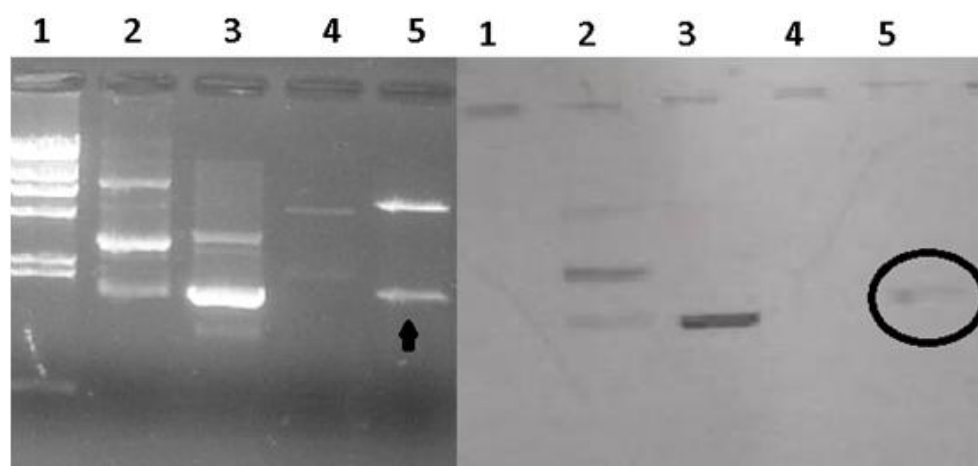
Εικόνα 4.25 Υβριδισμός Southern σε ανασυνδυασμένα πλασμίδια με probe τμήμα του γονιδίου *mob* του pZA1003 (Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και φίλτρο υβριδισμού). Διαδρομή 1: πέψη DNA λ φάγου με *HindIII*. Διαδρομή 2: pUCBM21mob (θετικό κοντρόλ). Διαδρομές 3 και 4: pBluescript άθικτο και κομμένο με *EcoRI* (αρνητικά κοντρόλ). Διαδρομή 5: pBluescript2,7 άθικτο. Διαδρομή 6: pBluescript2,7 με *EcoRI* και *BglIII*. Διαδρομή 7: pBlueZA1003 άθικτο. Διαδρομή 8: pBlueZA1003 με *EcoRI* και *BglIII*. Τα βέλη δείχνουν τα τμήματα DNA προς έλεγχο.

4.3.3 Υβριδισμός με τον ιχνηθέτη - τμήμα του γονιδίου *mob* στο pBRZArm

Για να πιστοποιηθεί η ύπαρξη του γονιδίου *mob* στο φορέα κλωνοποίησης pBRZArm, πραγματοποιήθηκε πέψη του με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III το οποίο το πέπτει σε δύο σημεία. Προέκυψε ένα τμήμα DNA μεγέθους 1820 bp , όπου θα έπρεπε να εδράζεται το γονίδιο *mob*, προς υβριδισμό. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCBM21*mob* και ως αρνητικός μάρτυρας ο φορέας pBluescript.

Η σύγκριση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης με το φίλτρο υβριδισμού, υποδεικνύει ότι τα τμήματα DNA που ελέγχθηκαν έχουν υβριδιστεί με το γνωστό τμήμα του σημασμένου DNA. Αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη παρουσίας το γονιδίου *mob* σε αυτά .

Εντούτοις, παρατηρείται σήμα υβριδισμού και στο αρνητικό κοντρόλ. Αυτό πιθανόν συμβαίνει επειδή οι ανασυνδυασμένοι φορείς, όπως το pBluescript που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση ως αρνητικό κοντρόλ, ορισμένες φορές δανείζονται τμήματα από φυσικά πλασμίδια. Ως εκ τούτου δεν είναι απίθανο να περιλαμβάνουν αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομοιότητα με μέρη αλληλουχιών φυσικών πλασμιδίων. Εξάλλου, ο υβριδισμός κατά Southern είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος που μπορεί να δώσει σήμα υβριδισμού ακόμα κι αν υπάρχει ομολογία λίγων βάσεων.

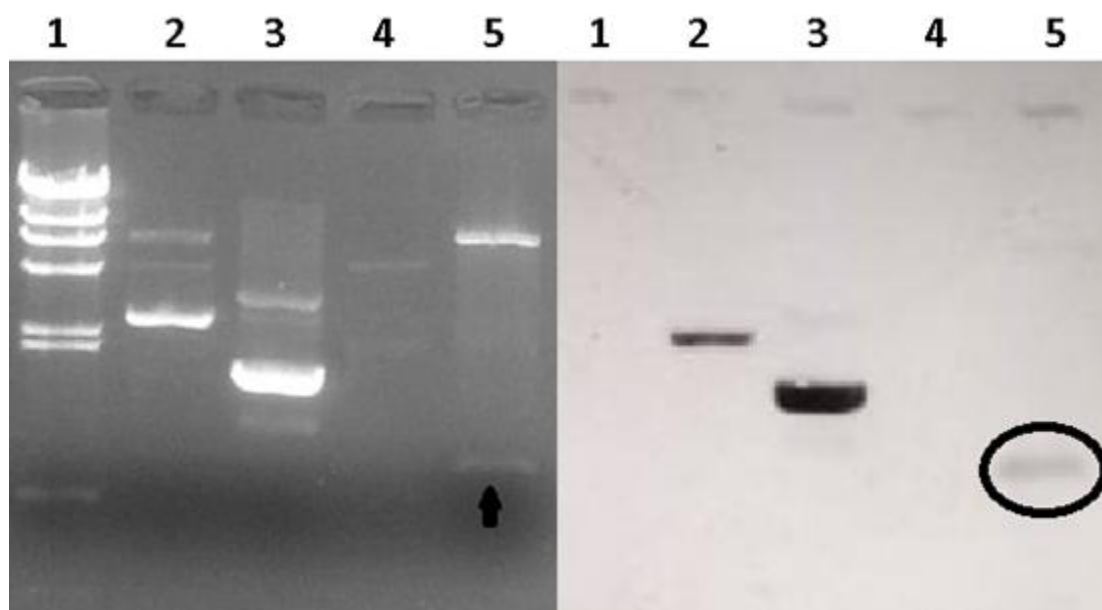


Εικόνα 4.26 Υβριδισμός Southern στο φορέα κλωνοποίησης pBRZArm με probe τμήμα του γονιδίου *mob* του pZA1003 (Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και φίλτρο υβριδισμού). Διαδρομή 1: πέψη DNA λ φάγου με *Hind*III. Διαδρομή 2: pUCBM21*mob* (θετικό κοντρόλ). Διαδρομή 3: pBluescript (αρνητικό κοντρόλ). Διαδρομή 4: pBRZArm άθικτο. Διαδρομή 5: pBRZArm με *Hind*III. Το βέλος δείχνει το τμήμα DNA προς έλεγχο. Σε κύκλο φαίνεται η ζώνη υβριδισμού.

4.3.4 Υβριδισμός με τον ιχνηθέτη - τμήμα του γονιδίου *rep* στο pBRZArm

Για να πιστοποιηθεί η ύπαρξη του γονιδίου *rep* στο φορέα κλωνοποίησης pBRZArm, πραγματοποιήθηκε πέψη του με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Xba*I. Προέκυψε ένα τμήμα DNA μεγέθους 815 bp , όπου θα έπρεπε να εδράζεται το γονίδιο *rep*, προς υβριδισμό. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUCBM21*rep* και ως αρνητικός μάρτυρας ο φορέας pBluescript.

Το συμπέρασμα που προέκυψε από τη σύγκριση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης με το φίλτρο υβριδισμού, ήταν ότι, τα τμήματα DNA που ελέγχθηκαν, υβριδίστηκαν με το γνωστό τμήμα του σημασμένου DNA. Επομένως, φαίνεται ότι περιλαμβάνουν το γονίδιο *rep*. Το σήμα υβριδισμού που παρατηρείται στο αρνητικό κοντρόλ μπορεί να ερμηνευτεί όπως και το αντίστοιχο σήμα στον προηγούμενο υβριδισμό.



Εικόνα 4.27 Υβριδισμός Southern στο φορέα κλωνοποίησης pBRZArm με probe τμήμα του γονιδίου *rep* του pZA1003 (Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και φίλτρο υβριδισμού). Διαδρομή 1: πέψη DNA λ φάγου με *Hind*III. Διαδρομή 2: pUCBM21*rep* (θετικό κοντρόλ). Διαδρομή 3: pBluescript (αρνητικό κοντρόλ). Διαδρομή 4: pBRZArm άθικτο. Διαδρομή 5: pBRZArm με *Bam*HI και *Xba*I. Το βέλος δείχνει το τμήμα DNA προς έλεγχο. Σε κύκλο φαίνεται η ζώνη υβριδισμού.

4.4 PCR στο φορέα κλωνοποίησης pBRZArm

Για μια επιπλέον πιστοποίηση, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα του υβριδισμού με στύπωμα Southern θα μπορούσαν να θεωρηθούν αμφισβητήσιμα λόγω της παρουσίας αρνητικού σήματος, πραγματοποιήθηκε ένας επιπλέον έλεγχος μέσω της διεξαγωγής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

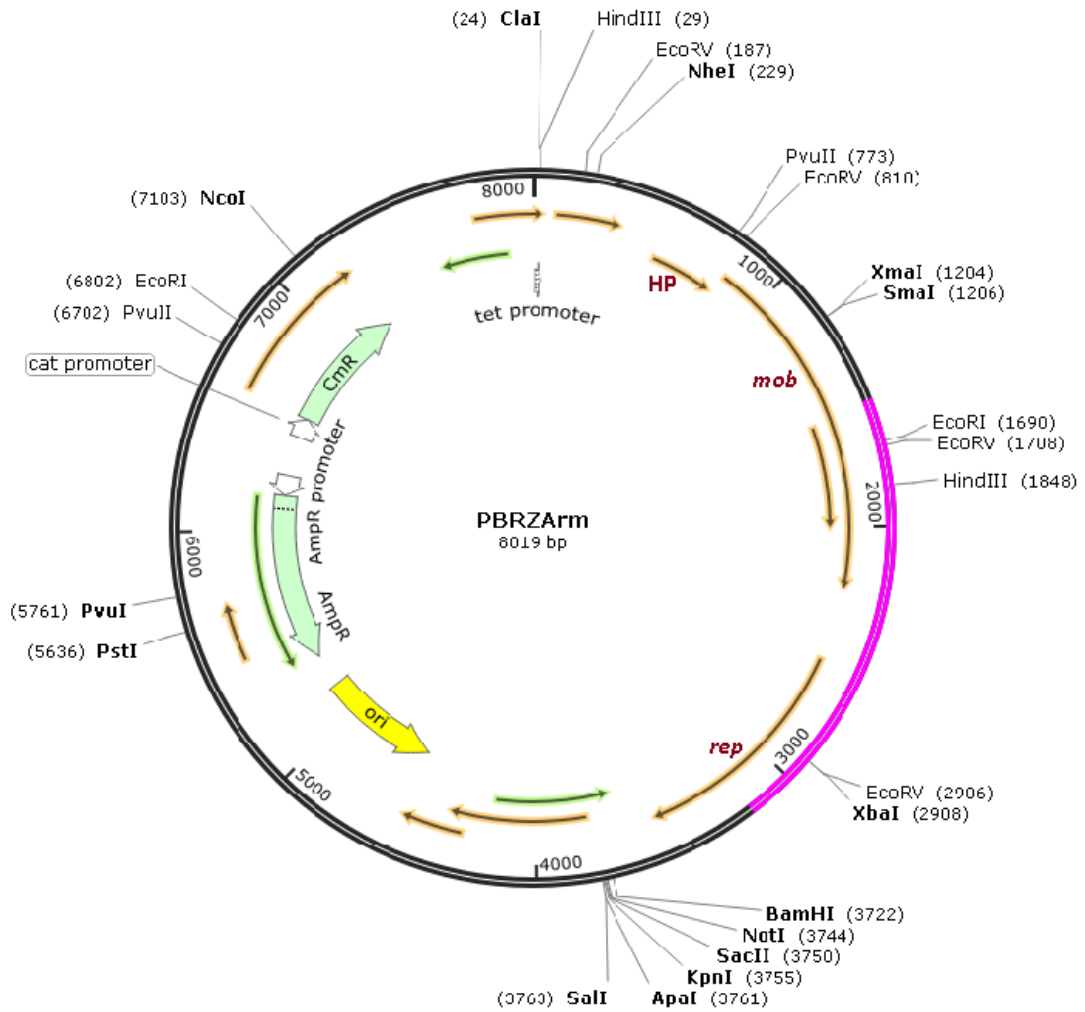
Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

MOBREPF: ACC GCA ACA TTG ATC GCT TT (T_m=60,6 °C)

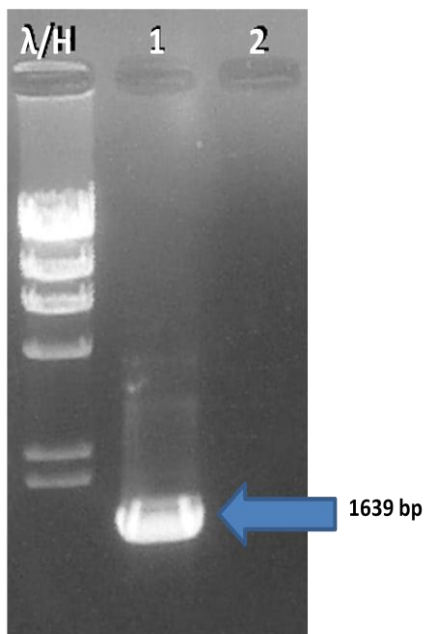
MOBREPR: TCG TCT CAA AGG CCA ACT CT (T_m=60,7 °C)

Αυτοί οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με σκοπό να ενισχύουν τμήμα του πλασμιδίου pZA1003 το οποίο να περιλαμβάνει τα γονίδια *mob* και *rep*. Εφόσον ενισχύουν αυτό το τμήμα, θα δύνανται να ενισχύσουν και το αντίστοιχο τμήμα με τα γονίδια *mob* και *rep* που έχει εντεθεί στο pBR328 για το σχηματισμό του πλασμιδίου pBRZArm. Επιτυχία της αντίδρασης συνεπάγεται πιστοποίηση ύπαρξης των δύο αυτών γονιδίων στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Η αλληλουχία που αναμενόταν να ενισχύσουν οι εν λόγω εκκινητές στο pBRZArm έχει μέγεθος 1639 bp και βρίσκεται μεταξύ των βάσεων 1536 και 3174. Στην εικόνα 4.28 φαίνεται η θέση αυτής της αλληλουχίας στο πλασμίδιο. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση της PCR.



Εικόνα 4.28 Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pBRZArm στον οποίο έχει επισημανθεί το τμήμα DNA μεγέθους 1639bp που αναμένεται να ενισχύουν οι εκκινητές MOBREP και MOBREPR.



Εικόνα 4.29 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης της PCR για πιστοποίηση ορθότητας της κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα pBRZArm . Στη διαδρομή 1 φαίνεται ενίσχυση της αλληλουχίας μεγέθους 1639 bp του pBRZArm. Στη διαδρομή 2 φαίνεται το αρνητικό κοντρόλ.

4.5 Μεταφορά του pBRZArm σε κύτταρα *E. coli* μέσω σύζευξης.

Ο νεοσχηματισθείς φορέας κλωνοποίησης είναι ένα κινητοποιήσιμο πλασμίδιο. Όπως έχει ήδη συζητηθεί αναλυτικά στα προηγούμενα κεφάλαια, ένα κινητοποιήσιμο πλασμίδιο, δύναται να κινητοποιηθεί μέσω σύζευξης, μόνο εφόσον συνυπάρχει με κάποιο συζευκτικό πλασμίδιο στο κύτταρο δότη. Αυτό συμβαίνει επειδή το κινητοποιήσιμο πλασμίδιο να μεν περιέχει το γονίδιο *mob* που κωδικοποιεί τη ριλαξάση, όμως η σύζευξη δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς τα υπόλοιπα γονίδια *tra* του συζευκτικού πλασμιδίου που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της συζευκτικής γέφυρας αλλά και για την ολοκλήρωση της μεταφοράς στο κύτταρο-δέκτη.

Το pBRZArm ελέγχθηκε κατ' αρχήν για την ικανότητα κινητοποίησής του μεταξύ κυττάρων *E. coli* με επιβοηθούμενη σύζευξη. Ως βοηθητικά συζευκτικά πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν τα pDB126 και pRK2013. Κατόπιν διεξαγωγής μιας σειράς πειραμάτων, το pRK2013 αποδείχτηκε το πλέον κατάλληλο.

Σχεδιάστηκαν οι συζεύξεις:

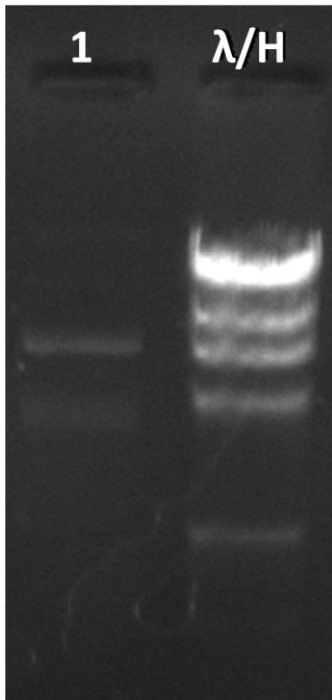
***E. coli* DH5a / (pRK2013 + pBRZArm) x *E. coli* HMS174**

και

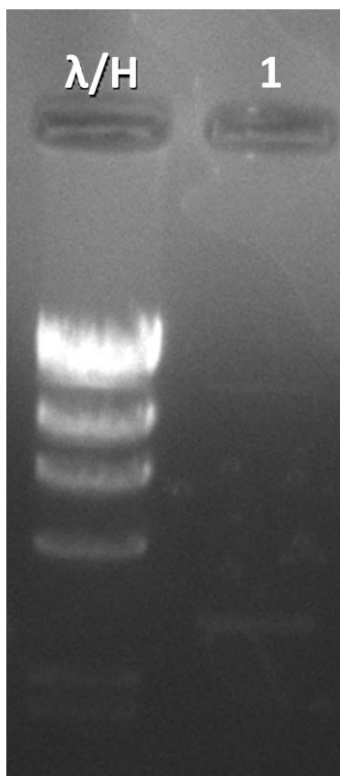
***E. coli* DH5a / (pRK2013 + pBR328) x *E. coli* HMS174**

Η δεύτερη σύζευξη χρησίμευσε ως αρνητικός μάρτυρας, δεδομένου ότι το pBR328 δεν είναι κινητοποιήσιμο πλασμίδιο οπότε δε θα πραγματοποιούνταν σύζευξη. Για να κατασκευαστούν τα στελέχη δότες πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του (DH5a/pRK2013) με τη μέθοδο Green and Rogers και με το καθένα από τα pBRZArm και pBR328. Ως παράγοντες επιλογής και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο αντιβιοτικά, η καναμυκίνη, στην οποία έχει ανθεκτικότητα το pRK2013, και η αμπικιλίνη, στην οποία έχουν ανθεκτικότητα το pBRZArm και το pBR328.

Ακολούθησε πλασμιδιακή απομόνωση αποικιών από τα τρυβλία του μετασχηματισμού και ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 4.30 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πλασμιδιακού DNA από το μετασχηματισμό DH5a/pRK2013 με pBRZArm.



Εικόνα 4.31 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πλασμιδιακού DNA από το μετασχηματισμό DH5a/pRK2013 με pBR328.

4.5.2 Σύζευξη DH5a/pRK2013 +pBRZArm x HMS174

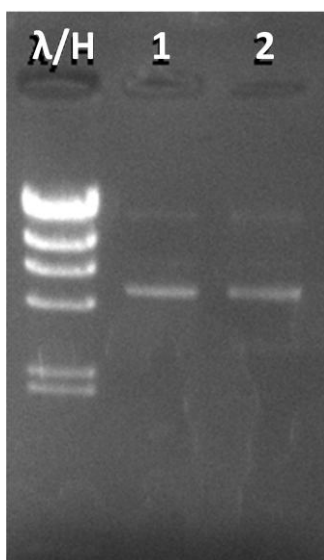
Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι». Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε η σύζευξη- αρνητικός μάρτυρας DH5a/pRK2013+pBR328 x HMS174.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των συζευγμένων κυττάρων ήταν αμικικιλίνη για την επιλογή του ανασυνδρασμένου πλασμιδίου και ριφαμπικίνη για την επιλογή του κυττάρου δέκτη. Το HMS174 παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη, ενώ το κύτταρο δότης DH5a παρουσιάζει ευαισθησία σε αυτήν.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο αριθμός των αποικιών κυττάρων που μετρήθηκαν σε κάθε τρυβλίο (ανά αραιώση) μετά από 24 ώρες επώασης. Τα τρυβλία του αρνητικού μάρτυρα ήταν κενά.

Αραιώση	Αριθμός αποικιών
10^0	(νέφος)
10^{-1}	296
10^{-2}	20
10^{-3}	3

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλασμιδιακή απομόνωση σε δύο αποικίες από την αραιώση 10^{-2} , από την οποία διαπιστώθηκε η επιτυχημένη μεταφορά του pBRZArm στο HMS174.



Εικόνα 4.32 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πλασμιδιακού DNA δύο αποικιών από τη σύζευξη DH5a/pRK2013 x pBRZArm με HMS174.

4.6 Μεταφορά του pBRZArm σε κύτταρα *Z. mobilis* μέσω σύζευξης.

Στη συνέχεια τα στελέχη δότες που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε σύζευξη με στελέχη δέκτες το *Z. mobilis* CP4Rif. Το στέλεχος αυτό είναι μία αυθόρμητη μεταλλαγή του αγρίου τύπου CP4 που παρουσιάζει αντοχή στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη το οποίο θα χρησιμοποιηθεί κι εδώ ως μέσο αποκλεισμού των κυττάρων δοτών *E. coli* DH5a..

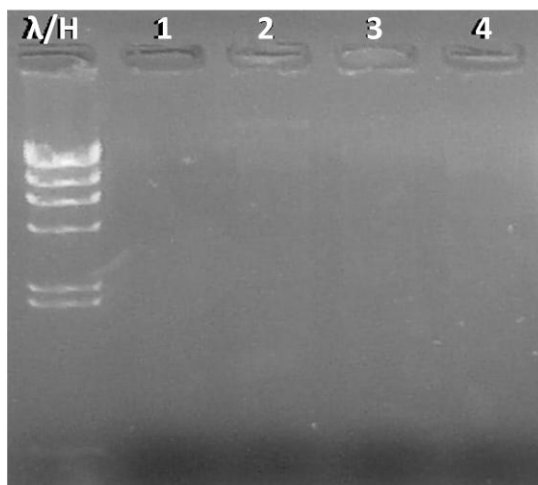
4.6.1 Σύζευξη DH5a/pRK2013+pBRZArm x CP4Rif

Η διαδικασία της σύζευξης με δέκτες κύτταρα *Z. mobilis* έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι». Η σύζευξη- αρνητικός μάρτυρας που πραγματοποιήθηκε ήταν μεταξύ DH5a/pRK2013+pBR328 και CP4Rif.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των συζευγμένων κυττάρων ήταν χλωραμφαινικόλη για την επιλογή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και ριφαμπικίνη για την επιλογή του κυττάρου δέκτη CP4Rif.

Μετά από 6 ημέρες επώασης στους 30°C εμφανίστηκαν αποικίες *Z. mobilis* στα τρυβλία της σύζευξης, ενώ στα τρυβλία από τη σύζευξη- αρνητικό μάρτυρα δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών. Οι αποικίες του *Z. mobilis* είναι πιο λευκές, στιλπνές και γεμάτες εν συγκρίσει με τις αποικίες του *E. coli*.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν 4 αποικίες από τη σύζευξη, στις οποίες πραγματοποιήθηκε πλασμιδιακή απομόνωση.



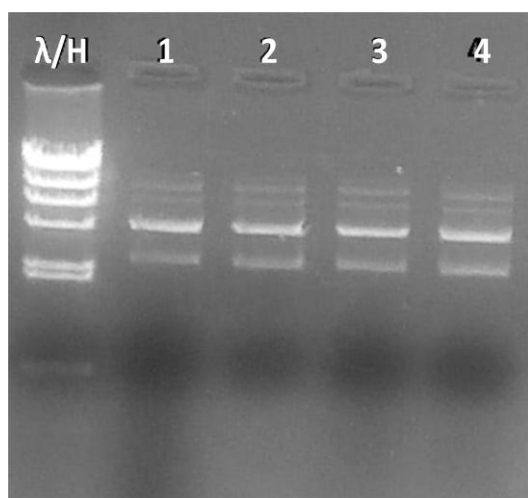
Εικόνα 4.33 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης πλασμιδιακού DNA τεσσάρων αποικιών από τη σύζευξη DH5a/pRK2013+pBRZArm x CP4Rif.

Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι βάσει προηγούμενης εμπειρίας στο εργαστήριο η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Z. mobilis* συχνά δεν έχει μεγάλη απόδοση, γεγονός που παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση. Επιπλέον, όταν μεταφέρεται κάποιο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε αυτή, δεν είναι εύκολο να διαπιστωθεί η ύπαρξή του μόνο από την παρατήρηση των ζωνών της ηλεκτροφόρησης του ολικού πλασμιδιακού εκχυλίσματος, λόγω του ότι τα στελέχη περιέχουν πλασμίδια σε ποικιλία μεγέθους και αριθμού, με περισσότερες της μιας διαμορφώσεις το καθένα.

4.6.2 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με τα προϊόντα της σύζευξης.

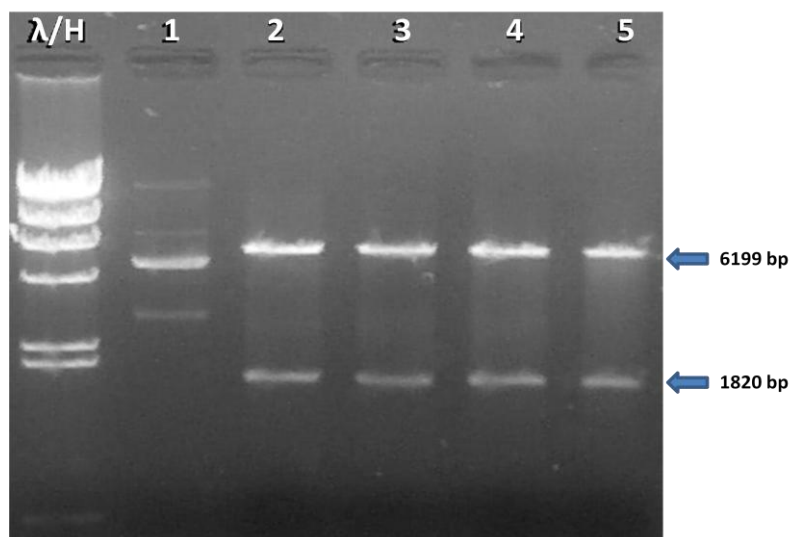
Λόγω του παραπάνω, προκειμένου να εξακριβωθεί ότι ο φορέας κλωνοποίησης pBRZArm όντως μεταφέρθηκε στα κύτταρα του στελέχους CP4Rif μετά τη σύζευξη, το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τις αποικίες της σύζευξης χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει επιλεκτικά κύτταρα στελέχους DH5a του *E. coli* με τη μέθοδο Green and Rogers. Ως παράγοντας επιλογής χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν 4 αποικίες από τα τρυβλία του μετασχηματισμού και πραγματοποιήθηκε πλασμιδιακή απομόνωση.



Εικόνα 4.34 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πλασμιδιακού DNA από το μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* με τα προϊόντα της σύζευξης DH5a/pRK2013+pBRZArm x CP4Rif.

Ακολούθησε διεξαγωγή πέψεων προκειμένου να ελεγχθεί αν το πλασμιδιακό DNA που φαίνεται στην παραπάνω ηλεκτροφόρηση περιέχει το φορέα pBRZArm. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III. Έχει αναφερθεί παραπάνω ότι το *Hind*III πέπτει το pBRZArm σε δύο σημεία και οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1820 bp και 6199 bp. Η εικόνα ηλεκτροφόρησης που φαίνεται παρακάτω υποδηλώνει ύπαρξη του φορέα pBRZArm.



Εικόνα 4.35 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης τεσσάρων αποικιών από το μετασχηματισμό που περιγράφεται στο κείμενο, που έχουν υποστεί πέψη με *Hind*III. Στη διαδρομή 1 φαίνεται το άθικτο πλασμιδιακό DNA της αποικίας 4 του μετασχηματισμού. Το μέγεθος των ζωνών υποδηλώνει ύπαρξη του φορέα pBRZArm.

6.3 Υβριδισμός στυπώματος κατά Southern στα προϊόντα της σύζευξης.

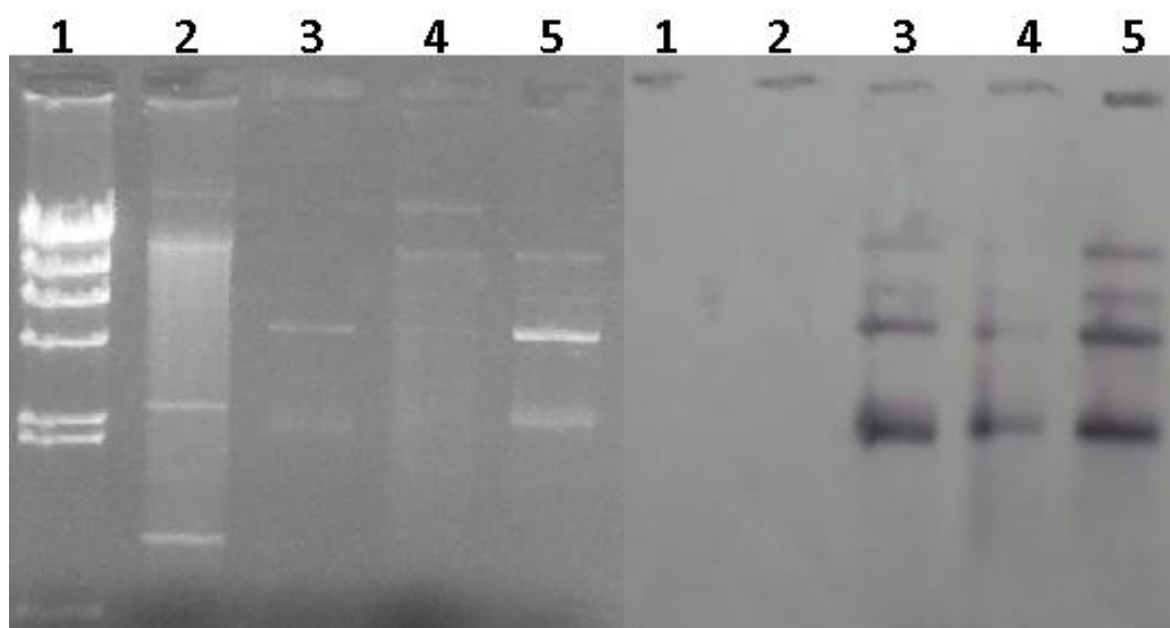
Μια τελική πιστοποίηση επιτυχίας της παραπάνω σύζευξης ήταν η διενέργεια υβριδισμού στυπώματος κατά Southern στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τις αποικίες της.

Το DNA που χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης (probe) ήταν ένα τμήμα του πλασμιδιακού φορέα pBR328 και συγκεκριμένα τμήμα του γονιδίου της β-λακταμάσης. Ως γνωστόν ο φορέας κλωνοποίησης pBRZArm δημιουργήθηκε από υποκλωνοποίηση στο pBR328, άρα η επιτυχία του υβριδισμού θα υποδηλώνει την επιτυχή μεταφορά του στο CP4Rif μέσω της σύζευξης.

Ως εκμαγεία προς έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA από την παραπάνω σύζευξη και τον παραπάνω μετασχηματισμό. Ως αρνητικός μάρτυρας

χρησιμοποιήθηκε ολικό απομονωμένο πλασμιδιακό DNA από το στέλεχος 11163 του *Z. mobilis*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φορέας κλωνοποίησης pBRZArm.

Ακολούθησε σύγκριση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης με το φίλτρο υβριδισμού, η οποία απέδειξε την επιτυχή μεταφορά του pBRZArm στο CP4Rif, δεδομένου ότι πραγματοποιήθηκε υβριδισμός μεταξύ των ύπο έλεγχο πλασμιδίων και του σημασμένου τμή



Εικόνα 4.38 Υβριδισμός Southern για πιστοποίηση επιτυχίας της σύζευξης DH5a/pRK2013+pBRZArm με CP4Rif (Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και φίλτρο υβριδισμού). Διαδρομή 1: πέψη DNA λ φάγου με *Hind*III. Διαδρομή 2: ολικό πλασμιδιακό DNA του στέλεχος 11163 του *Z. mobilis* (αρνητικό κοντρόλ). Διαδρομή 3: pBRZArm (θετικό κοντρόλ). Διαδρομή 4: Πλασμιδιακό DNA της σύζευξης. Διαδρομή 5: Πλασμιδιακό DNA του μετασηματισμού.

4.7 Σταθερότητα του pBRZArm στο *Z. mobilis*

Η σταθερότητα του pBRZArm στο CP4Rif μελετήθηκε με συνεχείς υγρές ανακαλλιέργειες του CP4Rif/ pBRZArm σε υγρό θρεπτικό μέσο Zymobroth χωρίς την προσθήκη των αντιβιοτικών αμπικιλίνη ή χλωραμφαινικόλη στα οποία είναι

ανθεκτικό το pBRZArm. Η έλλειψη αυτών των αντιβιοτικών εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα δεν θα διατηρήσουν το πλασμίδιο μόνο επειδή τους προσφέρει την ανθεκτικότητα που απαιτείται για να επιβιώσουν. Μετά από 21 ανακαλλιέργειες που αντιστοιχούν σε περίπου 130 κυτταρικές διαιρέσεις, πραγματοποιήθηκε επίστρωση αραιώσεων 10^{-6} και 10^{-7} του εναιωρήματος κυττάρων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο Zymoagar. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30°C για 4 ημέρες. Στη συνέχεια οι αποικίες μεταφέρθηκαν αντιγραφικά σε νέα τρυβλία με Zymoagar και χλωραμφαινικόλη. Μετά από νέα επώαση στους 30°C για 4 ημέρες, τα νέα τρυβλία παρουσίασαν ανάπτυξη αποικιών, το ποσοστό των οποίων ξεπερνούσε το 99 %. Η ύπαρξη αποικιών παρουσία χλωραμφαινικόλης υποδηλώνει ότι ο φορέας κλωνοποίησης pBRZArm βρίσκεται ακόμα μέσα στα κύτταρα, δεδομένου ότι διαφορετικά δεν θα επιβίωναν.

4.8 Μεταφορά του pBRZArm μεταξύ διαφορετικών κυττάρων *Z. mobilis* μέσω σύζευξης

Αφού πιστοποιήθηκε η επιτυχής μεταφορά του pBRZArm σε κύτταρα του CP4Rif, πραγματοποιήθηκε σύζευξη μεταξύ του CP4Rif/ pBRZArm και του *Z. mobilis* CTZ1. Η εν λόγω σύζευξη πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η πιθανή ύπαρξη συζευκτικών στοιχείων στο στέλεχος *Z. mobilis* CP4 ικανά να κινητοποιήσουν το pBRZArm και γι' αυτό διεξήχθη χωρίς τη χρήση του pRK2013 ή άλλου συζευκτικού πλασμιδίου. Η επιτυχής μεταφορά του pBRZArm σε κύτταρα του *Z. mobilis* CTZ1 θα υποδεικνυε ότι κάποιο συζευκτικό πλασμίδιο του *Z. mobilis* CP4 δύναται να εκκινήσει τη σύζευξη και να βοηθήσει στην πραγματοποίησή της .

4.8.1 Πραγματοποίηση ελέγχου ανάπτυξης στο *Z. mobilis* CTZ1

Το *Z. mobilis* CTZ1 είναι ένα παράγωγο του στελέχους αγρίου τύπου ATCC 10988 το οποίο παρουσιάζει αντοχή στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, διότι περιέχει ενσωματωμένο στο γονιδίωμά του το αντίστοιχο γονίδιο του πλασμιδιακού φορέα pBR325. Επιλέχθηκε ως κύτταρο δέκτης στα πειράματα συζεύξεων μεταξύ *Z. mobilis*

διότι, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, τα στελέχη του παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε ποικιλία αντιβιοτικών και κατά συνέπεια υπάρχει αδυναμία εύρεσης μέσου αποκλεισμού των κυττάρων δοτών.

Πριν χρησιμοποιηθεί το CTZ1, πιστοποιήθηκε εκ νέου η ανθεκτικότητά του στην τετρακυκλίνη με έλεγχο βιωσιμότητας σε τελική συγκέντρωση τετρακυκλίνης 40 µg/mL.

Για την πραγματοποίηση του ελέγχου ανάπτυξης το εναιώρημα κυττάρων που μας ενδιαφέρει, στην προκειμένη του στελέχους *Z. mobilis* CTZ1, υφίσταται αραιώσεις από 10^{-1} μέχρι 10^{-7} . Στη συνέχεια γίνεται επίστρωση του εναιωρήματος της κάθε αραιώσης σε τρυβλία με συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό και συγκεκριμένο αντιβιοτικό στην προκειμένη με Zymoagar και τετρακυκλίνη αντίστοιχα.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ακριβώς ο ίδιος έλεγχος ανάπτυξης σε κύτταρα *Z. mobilis* CP4Rif ώστε να διαπιστωθεί η μη ανθεκτικότητά του στην τετρακυκλίνη.

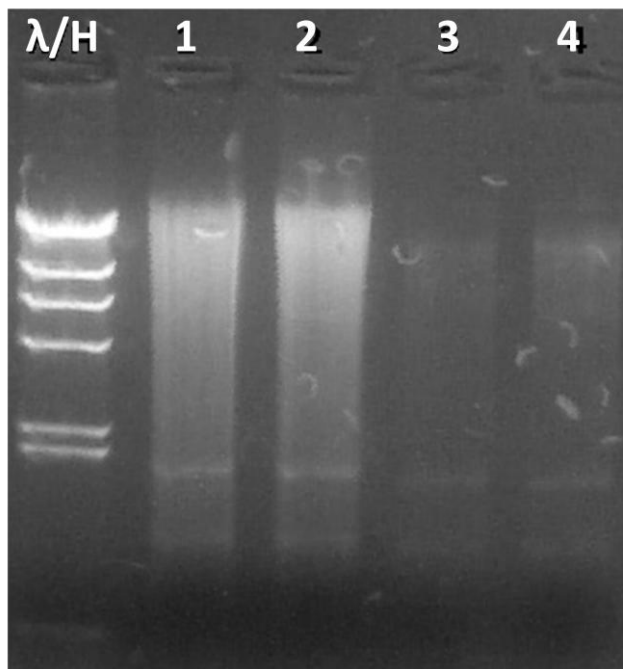
Μετά από μια εβδομάδα επώασης, τα τρυβλία με αραιώσεις από τα κύτταρα του *Z. mobilis* CTZ1 ήταν γεμάτα με διάσπαρτες αποικίες ενώ τα τρυβλία με αραιώσεις από τα κύτταρα του *Z. mobilis* CP4Rif ήταν κενά. Επομένως, απεδείχθη η ανθεκτικότητα του CTZ1 και η μη ανθεκτικότητα του CP4Rif στην τετρακυκλίνη.

4.8.2 Σύζευξη *Z. mobilis* CP4Rif/pBRZArm x *Z. mobilis* CTZ1

Η διαδικασία της σύζευξης μεταξύ κυττάρων *Z. mobilis* έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι». Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των συζευγμένων κυττάρων ήταν χλωραμφαινικόλη για την επιλογή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και τετρακυκλίνη για την επιλογή του κυττάρου δέκτη. Σύμφωνα με τον προαναφερθέντα έλεγχο ανάπτυξης, το CTZ1 παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη, ενώ το CP4Rif παρουσιάζει ευαισθησία σε αυτήν.

Μετά από 6 ημέρες επώασης στους 30°C εμφανίστηκαν αποικίες *Z. mobilis* στα τρυβλία της σύζευξης, ενώ στα τρυβλία από τη σύζευξη- αρνητικό μάρτυρα δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών.

Μετά από 6 ημέρες επώασης στους 30°C εμφανίστηκαν αποικίες στα τρυβλία της σύζευξης. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν 4 αποικίες από τη σύζευξη, στις οποίες πραγματοποιήθηκε πλασμιδιακή απομόνωση.



Εικόνα 4.39 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πλασμιδιακού DNA δείγματος 10μL τεσσάρων αποικιών από τη σύζευξη CP4Rif/pBRZArm με CTZ1.

Στην εικόνα τις ηλεκτροφόρησης, παρά το έντονο νεφέλωμα (smear), διαπιστώνεται η ύπαρξη πλασμιδιακών ζωνών μικρού μεγέθους που αντιστοιχούν στα μικρά πλασμίδια που διαθέτει το CTZ1, γεγονός που αποδεικνύει ότι πρόκειται πράγματι για κύτταρα δέκτες. Εντούτοις, δεν διαπιστώνεται η ύπαρξη του πλασμιδίου pBRZArm σε αυτά, δηλαδή πιθανότατα δεν πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η μεταφορά του στα κύτταρα του CTZ1 μέσω της σύζευξης.

Για να ελεγχθεί εάν υπήρχε ο πλασμιδιακός φορέας pBRZArm στις αποικίες των τριβλίων της σύζευξης, το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από αυτές, χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει επιδεκτικά κύτταρα στελέχους DH5a του *E. coli*. Τα επιδεκτικά κύτταρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Green and Rogers. Ως παράγοντας επιλογής χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη στο οποίο έχει ανθεκτικότητα το pBRZArm.

Πραγματοποιήθηκαν δύο μετασχηματισμοί με διαφορετική συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA κάθε φορά. Και στις δύο περιπτώσεις, τα τρυβλία μετά από 48 ώρες επώασης ήταν κενά.

Συμπερασματικά, δεν διαπιστώθηκε πειραματικά η μεταφορά του pBRZArm σε κύτταρα CTZ1.

4.9 Έλεγχος ικανότητας συμμεταγραφής των αναγνωστικών πλαισίων *mob* και HP.

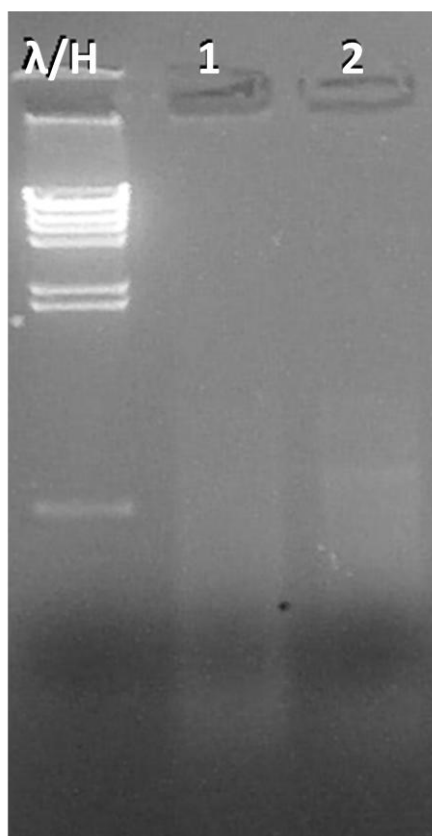
Το αναγνωστικό πλαίσιο HP του pZA1003 εδράζεται ανοδικά του γονιδίου *mob*, ενώ η αμινοξική του αλληλουχία παρουσιάζει ομολογία με πρωτεΐνες βοηθητικές προς τη ριλαξάση στην αναγνώριση ή/και την πρόσδεση στο *oriT*. Σε προηγούμενες μελέτες μεταγραφής των γονιδίων αυτών ανιχνεύθηκε μετάγραφο που αντιστοιχούσε στο γονίδιο *mob*, αλλά όχι συμμεταγραφή των δύο αναγνωστικών πλαισίων HP και *mob* (Μητσόπουλος κ.α)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή συμμεταγραφή αυτών των γονιδίων κατά τη διάρκεια της σύζευξης, όπου αναμένεται ότι θα είναι ενεργοποιημένα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σύζευξης με κύτταρα δέκτες το *Escherichia coli* HMS174, ως εξής:

DH5a/pRK2013+pBRZArm x HMS174

DH5a/pRK2013+pBR328 x HMS174

Λίγο πριν το πέρας του πειράματος, το φίλτρο της σύζευξης τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο νερό και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από το νειαιώρημα των κυττάρων της σύζευξης.



Εικόνα 4.40 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης απομόνωσης RNA από το εναιώρημα κυττάρων των συζεύξεων DH5a/pRK2013+pBRZArm x HMS174 (διαδρομή 1) και DH5a/pRK2013+PBR328 x HMS174 (διαδρομή 2).

Όπως διακρίνεται και στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης, η απομόνωση RNA δεν ήταν απόλυτα επιτυχημένη, δεδομένου ότι οι ζώνες της ηλεκτροφόρησης ήταν ελάχιστα εμφανείς. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές και το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο.

Παρ' όλ' αυτά, πραγματοποιήθηκε η μετατροπή του DNA σε cDNA και στη συνέχεια η RT-PCR. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές HPMOBF και HPMOBR οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και νωρίτερα.

Δεδομένου ότι στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης δεν εμφανίστηκε καμία ζώνη, είναι προφανές ότι δεν ανιχνεύτηκε συμμεταγραφή των γονιδίων ούτε και υπό τις συνθήκες στις οποίες υποτίθεται ότι το HP είναι ενεργοποιημένο εφόσον εμπλέκεται στη διαδικασία της κινητοποίησης.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* παρουσιάζει έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον χάρη στα πολλά πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει στην παραγωγή βιοαιθανόλης εν συγκρίσει με το μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Εντούτοις, οι μόνες πηγές άνθρακα που καταβολίζει είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη. Το εν λόγω βακτήριο έχει μελετηθεί αρκετά, και έχει επιχειρηθεί η βελτίωση της αποδοτικότητάς του με ποικίλους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων-φορέων για την κλωνοποίηση και έκφραση ετερόλογων γονιδίων σε αυτό με κύριο σκοπό την αύξηση του εύρους των ζυμώσιμων υδατανθράκων από αυτό.

Η μεταφορά γενετικού υλικού στο *Zymomonas mobilis* πραγματοποιείται με μετασχηματισμό και σύζευξη. Εντούτοις, οι μέθοδοι μετασχηματισμού που έχουν αναπτυχθεί για το βακτήριο αυτό δεν αναπαράγονται στο εργαστήριό μας, κατά συνέπεια ο μοναδικός αποτελεσματικός τρόπος μεταφοράς γενετικού υλικού στο *Z. mobilis* παραμένει η σύζευξη.

Η σύζευξη είναι ένας από τους τρόπους οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού μεταξύ των βακτηρίων και απαιτεί άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων δότη και δέκτη. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από ένα συζευκτικό πλασμίδιο και οφείλεται σε ένα σύνολο γονιδίων *tra* που εδράζονται σε αυτό και τα προϊόντα τους είναι υπεύθυνα για τη ζεύξη των δύο κυττάρων και τη μεταφορά του πλασμιδίου. Στα πλαίσια μιας σύζευξης μπορεί να μεταφερθούν και πλασμίδια, που ονομάζονται κινητοποιήσιμα. Αυτά είναι κατά κανόνα μικρότερα των συζευκτικών, δεν έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν κυτταρική επαφή μεταξύ των κυττάρων, μπορούν ωστόσο να μεταφέρουν ένα αντίγραφο τους, όταν η συζευκτική γέφυρα δημιουργηθεί από ένα συζευκτικό πλασμίδιο.

Όλα τα στελέχη του *Zymomonas mobilis* διαθέτουν πλασμίδια σε ποικιλία αριθμού και μεγέθους. Ορισμένα από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την κατασκευή φορέων κλωνοποίησης για το βακτήριο αυτό. Το φυσικό πλασμίδιο pZA1003 του *Z. mobilis* NCIMB 11163 διαθέτει μεταξύ άλλων και δύο περιοχές, η μία εκ των οποίων είναι απαραίτητη για την αντιγραφή και τη διατήρησή του στο *Z. mobilis*, ενώ η άλλη παρουσιάζει ιδιότητες κινητοποίησης στα πλαίσια επιβοηθούμενης σύζευξης μεταξύ κυττάρων *E. coli* βάσει προηγούμενων πειραμάτων που έχουν γίνει στο εργαστήριό μας.

Για να διερευνηθεί, αν η μεταφορά του κινητοποιήσιμου πλασμιδίου οφείλεται στις λειτουργίες *mob* και όχι σε τυχόν ανασυνδυασμό μεταξύ αυτού και του συζευκτικού

πλασμιδίου, πραγματοποιήθηκε επιβοηθούμενη σύζευξη μεταξύ κυττάρων *E. coli* με κύτταρα δότες από το στέλεχος SM10 του *E. coli*, το οποίο περιέχει τα συζευκτικά στοιχεία του συζευκτικού πλασμιδίου RP4 ενσωματωμένα στο χρωμόσωμά του (Simon et al. 1983). Σε ένα τέτοιο στέλεχος μόνο ένα πλασμίδιο με λειτουργίες *mob* θα μπορούσε να μεταφερθεί με επιβοηθούμενη σύζευξη, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε.

Στη συνέχεια σχεδιάστηκε η κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου – φορέα κατάλληλου για κλωνοποίηση και μεταφορά μέσω σύζευξης σε στελέχη *Z. mobilis*, ο οποίος θα διέθετε τις περιοχές *rep* και *mob*. Η κατασκευή αυτή απαιτήσε τρεις διαδοχικές κλωνοποιήσεις, στα πλαίσια των οποίων, αφού συνενώθηκαν κατάλληλα οι δύο παραπάνω περιοχές, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pBR328, με αποτέλεσμα να προκύψει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBRZArm. Η ορθότητα της κατασκευής του επαληθεύτηκε με υβριδισμό Southern και PCR. Το pBRZArm χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα επιβοηθούμενης σύζευξης μεταξύ *E. coli* x *E. coli*, καθώς και μεταξύ *E. coli* x *Z. mobilis* CP4Rif. Μεταξύ των βοηθητικών πλασμιδίων pDB126 και pRK2013 της ομάδας ασυμβατότητας IncP, επελέγη το δεύτερο κατόπιν σειράς πειραμάτων. Και στις δύο περιπτώσεις το πλασμίδιο κινητοποιήθηκε με επιτυχία. Η παρουσία του πλασμιδίου στους νέους ξενιστές διαπιστώθηκε με απομόνωση πλασμιδιακού DNA, μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* με αυτό και επιλογή ως προς τα αντιβιοτικά επιλογής του pBRZArm, καθώς και υβριδισμό Southern. Η σύζευξη στο CP4Rif είχε μεγάλη απόδοση και η σταθερότητά του ήταν πολύ υψηλή χωρίς μέσο επιλογής. Κατά συνέπεια, το pBRZArm μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας κλωνοποίησης και έκφρασης ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis* μέσω επιβοηθούμενης σύζευξης, εφόσον κινητοποιείται με ιδιαίτερη ευκολία, ενώ ταυτόχρονα παραμένει σταθερό στους νέους ξενιστές για τουλάχιστον 130 γενιές. Επίσης, περιέχει πολλές θέσεις ενζύμων περιορισμού, καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη, χαρακτηριστικά που το καθιστούν εύκολα διαχειρίσιμο σε πιθανή μελλοντική χρήση του για νέες κλωνοποιήσεις DNA, όπως για παράδειγμα γονίδια που θα βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο ενός ισχυρού ενδογενούς υποκινητή. Ένα τέτοιο παράδειγμα από τη βιβλιογραφία που αξίζει να αναφερθεί είναι οι πλασμιδιακοί φορείς στους οποίους έχει κλωνοποιηθεί ο υποκινητής του γονιδίου της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (*Ppdc*), όπως οι pPTZ1, pPTZ3 και pPTZ4 (Reynen 1990) καθώς και οι pSUZM1, pSUZM2 και pSUZM3 (Cao 2016). Ο εν λόγω υποκινητής στη δεύτερη περίπτωση

χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του γονιδίου της γλυκοαμυλάσης από το μύκητα *Aspergillus awamori* που θεωρήθηκε ότι θα μπορούσε να βελτιώσει την παραγωγή αιθανόλης του *Z. mobilis*. Μια βελτίωση του pBRZArm σε μελλοντικά πειράματα θα ήταν η προσθήκη του *P_{rdc}* για την έκφραση κάποιου γονιδίου το οποίο θα προσδώσει μια νέα δυνατότητα στα κύτταρα του *Z. mobilis* που να αφορά την απόδοσή του στην παραγωγή βιοαιθανόλης, το οποίο εξάλλου είναι και το απώτερο ζητούμενο σε μελέτες που αφορούν το εν λόγω αιθανολοπαραγωγό βακτήριο. Ένα χαρακτηριστικό του που θα μπορούσε να θεωρηθεί μειονέκτημα, είναι το αρκετά μεγάλο του μέγεθος, το οποίο πιθανόν να αποδειχθεί εμπόδιο αν χρησιμοποιηθεί για βακτηριακό μετασχηματισμό. Το αναγνωστικό πλαίσιο του pZA1003 που εδράζεται ανοδικά του γονιδίου *mob* παρουσιάζει ομολογία με βοηθητικές πρωτεΐνες της ριλαξάσης. Διερευνήθηκε εκ νέου η πιθανότητα συμμεταγραφής των δύο αυτών αναγνωστικών πλαισίων αλλά αυτή τη φορά τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της σύζευξης DH5a (pRK2013 + pBRZArm) x HMS174 και πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από το εναιώρημα κυττάρων της σύζευξης. Ούτε και αυτή τη φορά παρατηρήθηκε συμμεταγραφή των δύο πιθανών γονιδίων. Εφόσον έχει εντοπιστεί μετάγραφο μόνο του *mob* (Μητσόπουλος κ.ά 2017) θα μπορούσε μελλοντικά να ερευνηθεί και η τυχόν μεταγραφή μόνο του υποθετικού γονιδίου HP. Ακόμα, η ανάλυση της περιοχής αυτής θα πρέπει να προσεγγιστεί με άλλους τρόπους, όπως για παράδειγμα την PCR πραγματικού χρόνου για την παρακολούθηση της μεταγραφής των δύο αυτών αναγνωστικών πλαισίων. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBRZArm θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως εργαλείο ανίχνευσης τυχόν συζευκτικών ιδιοτήτων που εδράζονται σε πλασμίδια στελεχών του *Z. mobilis*. Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, βάσει των γονιδιωματικών αλληλουχιών που είναι κατατεθειμένες στο NCBI, υπάρχουν μεμονωμένα αναγνωστικά πλαίσια σε πλασμίδια των *Z. mobilis* ATCC 10988 και NCIBM 11163 που παρουσιάζουν κάποια ομολογία με γονίδια *tra*. Γενικά, οι συζευκτικές λειτουργίες δεν έχουν διερευνηθεί για το συγκεκριμένο βακτήριο. Για το σκοπό αυτό το *Z. mobilis* CP4 / pBRZArm χρησιμοποιήθηκε ως δότης σε πειράματα σύζευξης με δέκτη ένα παράγωγο του ATCC 10988 ανθεκτικό στην τετρακυκλίνη. Από τη σύζευξη αυτή προέκυψαν αποικίες ανθεκτικές στη χλωραμφαινικόλη (αντιβιοτικό επιλογής του pBRZArm). Εντούτοις, η ανάλυση του πλασμιδιακού περιεχόμενου και

ο μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με αυτό δεν αποκάλυψαν την ύπαρξη του pBRZArm. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι ιδιότητες κινητοποίησης του pZA1003 δεν επάγονται παρουσία κάποιου από τα φυσικά πλασμίδια του *Z. mobilis* CP4Rif, είτε λόγω ασυμβατότητας μεταξύ τους, είτε λόγω μη ύπαρξης ολοκληρωμένης συζευκτικής λειτουργίας σε αυτά. Τα στελέχη του *Z. mobilis* διαθέτουν ποικιλία από πλασμίδια, τα οποία κληρονομούνται σταθερά στους ξενιστές τους. Δεν έχει αναφερθεί μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ αυτών των στελεχών, παρόλο που ενδιααιτούν στο ίδιο περιβάλλον που είναι κυρίως ο χυμός τροπικών φυτών. Ωστόσο, η συζευκτική ικανότητα των ενδογενών πλασμιδίων του CP4 αλλά και των άλλων στελεχών του *Z. mobilis* αξίζει να διερευνηθεί, διότι πρόκειται για ανεξερεύνητο πεδίο και ενδεχομένως να αποκαλυφθούν μηχανισμοί με ενδιαφέρον. Αφετέρου, είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς κατά πόσο το *Z. mobilis* έχει την ιδιότητα να απελευθερώνει γενετικό υλικό. Το *Z. mobilis* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή αιθανόλης εφόσον υποστεί γενετική βελτίωση. Εκτός από αυτό όμως, εξετάζεται και η πιθανότητα χρήσης του μαζί με άλλους μικροοργανισμούς στη ζύμωση τοπικών χυμών για παραγωγή αλκοολούχων ποτών, λόγω των ιδιαίτερων αρωμάτων που απελευθερώνει από τα προϊόντα της ζύμωσης του, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή. Σε μελλοντικά πειράματα αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω η κινητοποίηση του pBRZArm μεταξύ διαφόρων συνδυασμών από στελέχη του *Z. mobilis*, καθώς επίσης και μεταξύ *Z. mobilis* και *E. coli*. Για να γίνει αυτό, θα πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθούν εκ νέου έλεγχοι βιωσιμότητας σε έναν αριθμό αντιβιοτικών ώστε να εντοπιστούν κάποια που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αποκλεισμού των κυττάρων δοτών, καθώς επίσης και η απομόνωση αυθόρμητα μεταλλαγμένων παράγωγων ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη από τα στελέχη ATCC 10988 και NCIMB 11163.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Afendra SA and Drainas C (1987) Expression and Stability of a Recombinant Plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli* Journal of General Microbiology , 133, 127-134.

Arvanitis N, Pappas K, Kolios G, Afendra SA, Milton A, Typas MA and Drainas C (2000) Characterization and Replication Properties of the *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 Plasmids pZMO1 and pZMO2 Plasmid Volume 44, Issue 2, Pages 127- 137.g

Ault RG (1965). Spoilage bacteria in brewing—a review. J. Inst. Brew. London 71:376–391.

Balzer D, Pansegrau W, Lanka E. (1994). Essential Motifs of Relaxase (TraI) and TraG Proteins Involved in Conjugative Transfer of Plasmid RP4. Journal of Bacteriology 176 (14): 4285-4295.

Barrow KD, Collins JG, Leight DA, (1984) Rogers PL, Warr RG: Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol, 20:225–232.

Blackbeard, J R. and Doelle HW, (1983) The effect of glucose on the sucrose hydrolyzing activity of *Zymomonas mobilis*, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.,17, 261,.

Bloch KD. and Grossmann B, (2001) “Digestion of DNA with restriction endonucleases,” Curr Protoc Mol Biol, Chapter 3, Unit3.1

Brestic-Goachet N, Gunasekaran P, Cami B and Baratti J (1987) Transfer and expression of broad host range plasmids in *Zymomonas mobilis* Biotechnology Letters, Volume 9, Issue 1, pp 13–18

Bringer S, Sahn H and Swyzen W (1984) Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. Biotech. Bioeng. Symp. 14:311-319.

Buchholz SE and Eveleigh DE (1986) Transfer of Plasmids to an Antibiotic-Sensitive Mutant of *Zymomonas mobilis* Applied and Environmental Microbiology 52(2):366

Buchholz SE, O'Mullan P and Eveleigh DE (1988) Growth of *Zymomonas mobilis* CP4 on mannitol. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:275–281.

Buchholz SE and Eveleigh DE. (1990) genetic modification of *Zymomonas mobilis* *Biotechnol Adv.* 1990;8(3):547-81.

Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, D'Hauteville H, Kunst F, Sansonetti P, and Parsot C (2000). The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 38:760–771.

Calazans G, Lopes C, Lima R, De Franc F (1997) Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol Lett*, 19:19–21

Cao Q, Li T, Shao H, Tan X, Zhang Y (2016) Three new shuttle vectors for heterologous expression in *Zymomonas mobilis* *Electron. J. Biotechnol.* vol.19 no.1 Valparaíso

Carey VC and Ingram LO (1983) Lipid Composition of *Zymomonas mobilis*: Effects of Ethanol and Glucose *J Bacteriol.* 154(3): 1291–1300.

Chandrasekaran S , Lalithakumari D (1998) Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens* *J Med Microbiol.* 47(3):197-200.

Chen C, Wu L, Cao Q, Shao H, Li X, Zhang Y, Wang H, Tan X (2018) Genome comparison of different *Zymomonas mobilis* strains provides insights on conservation of the evolution. *PLoS One.* 13(4): e0195994.

Cho DW, Rogers LP, Delaney FS (1989) Construction of a shuttle vector for *Zymomonas mobilis* *Appl Environ Microbiol.* Feb; 53(2): 235–241.

Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S and Cascales E (2005) Biogenesis architecture and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 59:451–485.

Conway T Byun KMO and Ingram LO (1987) Expression Vector for *Zymomonas mobilis*. Appl Environ Microbiol. 53(2): 235–241

Conway T (1992) The Entner- Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol Rev.9(1):1-27.

Correa-Ascencio M, Robertson GI, Cabrera-Cortés O, Cabrera-Castro R and Evershed PR, (2014), Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica, PNAS, vol.111 (39), 14223-14228

Cuong KL, O'Mullan P, Eveleigh ED (1993) Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation Applied Microbiology and Biotechnology Volume 39, Issue 3, pp 305–308

Dawes E, Ribbons D (1966) Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. Biochem , 98:804–812.

De La Cruz F, Frost LS, Meyer RJ, Zechner EL. (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 34(1):18-40. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00195.x.

Doelle HW, Kirk L, Crittenden R and Toh H (1993) *Zymomonas mobilis* - Science and Industrial Application Crit Rev Biotechnol. 13(1):57-98.

Dong HW, Bao J, Ryu DD, Zhong JJ (2010) Design and Construction of Improved New Vectors for *Zymomonas mobilis* Recombinants. Biotechnol Bioeng. 1616-27. doi: 10.1002/bit.23106.

Douard G, Praud K, Cloeckaert A, Doublet B (2010) The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. PLoS ONE 5, e15302

Drainas C, Typas A and Kinghornj R (1984). A derivative of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 with impaired ethanol production. Biotechnology Letters 6, 37-42

Dunn KL(2015) Engineering *Zymomonas mobilis* for the production of biofuels and other value-added products. (Ph.D thesis) University of Illinois

Eberhard WG (1990) Evolution in bacterial plasmids and levels of selection. Q. Rev. Biol. 65, 3–22.

Falcao de Moraes, JO., Rios EMMM, Calazans GMT and Lopes CE (1993). *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. J. Biotechnol. 31:75–91.

Figurski DH and Helinski DR (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sc. Vol. 76, No. 4, pp. 1648-1652.

Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F., (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. FEMS Microbiol Rev. 28(1):79-100.

Frost LS, Ippen-Ihler K and Skurray RA (1994) An analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. Microbiol Rev 58: 162–210.

Gelvin SB (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:16–37.

Gomis-Rüth F, Sola XM, de la Cruz F and Coll M (2004) Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. Curr Pharm Design 10: 1551–1565.

Goncalves de Lima O, De Araujo JM, Schumacher IE and Da Silva EC (1970). Estudos de microorganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. I: Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928). Rev. Inst. Antibiot. 10: 3-15.

Green R and Rogers EJ (2014) Transformation of chemically competent *E. coli*. *Methods Enzymol.* 529:329-36. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. (2000) *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition New York: W. H. Freeman;

Gunasekaran P, Karunakaran T, Cami B, Mukundan AG, Preziosi L, and Baratti J (1990) Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis*, *J. Bacteriol.*, 172, 6727,.

Haffie LT, Louie PW and Khachatourians GG (1985) Isolation of Noninhibitory Strains of *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol.* 1985 Apr; 49(4): 1007–1009.

Hayes W (1953) The mechanism of genetic recombination in *Escherichia coli* Cold Spring Harb. *Symb. Quant. Biol.* 18, 75-93

He MX, Wu B, Qin H, Ruan ZY, Tan FR, Wang LJ, Shui ZX, Dai LC, Zhu QL, Pan K, Tang XY, Wang WG and Hu QC (2014) *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnol Biofuels*. doi: 10.1186/1754-6834-7-101. eCollection 2014.

Heinemann, JA (1991). Genetics of gene transfer between species. *Trends Genet.* 7:181–185.

Ilangovan A, Connery S and Waksman G (2015) Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems *Trends Microbiol.* (5):301-10. doi: 10.1016/j.tim.2015.02.012. Epub 2015 Mar 27.

Joachimsthal EL and Rogers PL (2000) Characterization of a high productivity recombinant strain of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose mixtures. *Appl Biochem Biotechnol* 84:343–356.

Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP (2014). "Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control". *Nature Reviews. Microbiology*. 12(3):181-96. doi: 10.1038/nrmicro3199.

Karsch T, Stahl U and Esser K (1983) Ethanol Production by *Zymomonas* and *Saccharomyces*, Advantages and Disadvantages European. *Journal of applied microbiology and biotechnology* Volume 18, Issue 6, pp 387–391

Kerr AL, Jeon YJ, Svenson CJ, Rogers PL, Neilan BA (2011) DNA restriction-modification systems in the ethanologen, *Zymomonas mobilis* ZM4. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(3):761-9 doi:10.1007/s00253-010-2936-1

Kim S, Dallmann HG, McHenry CS & Mariani KJ (1996) Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau–DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* 84:643–650.

Kolios G, Lekka M, Typas MA and Drinas C (1989) Bioconversion of Fruit and Sugar Beet Extracts by *Zymomonas mobilis* to Ethanol and Other Fine Chemicals *Journal of fermentation and bioengineering* v o l . 6 7 , n o . 5 , 3 6 3 - 3 6 5 . 1 9 8 9

Kouvelis VN, Saunders E, Brettin TS, Bruce D, Detter C, Han C, Typas MA, Pappas KM (2009) Complete Genome Sequence of the Ethanol Producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. *Journal of Bacteriology*, 191(22): 7140-7141

Kouvelis VN, Teshima H, Bruce D, Detter C, Tapia R, Han C, Tampakopoulou VO, Goodwin L, Woyke T, Kyrpides NC, Typas MA, Pappas KM (2014). Finished Genome of *Zymomonas mobilis* subsp. *Mobilis* Strain CP4, an Applied Ethanol Producer. *Genome Announc.* 2(1):e00845-13. doi:10.1128/genomeA.00845-13.

Lawley TD, Gilmour MW, Gunton JE, Standeven LJ and Taylor DE (2002) Functional and Mutational Analysis of Conjugative Transfer Region 1(Tra1) from the IncHI1 Plasmid R27. *J Bacteriol.*184(8):2173-80.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988) Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* 319, 157–161

Lederberg J and Lederberg EM (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol.* 63: 399–406.

Lindner P. (1928) Gorungsstudien uber Pulque in Mexiko.Bericht des Westpreussischen Botanisch-Zoologischen Vereins. 50:253–255.

Llosa MF, Gomis-Ruth X, Coll M and De la Cruz F (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol.* 45(1):1-8.

Lloyd FJ (1903). Reports on the results of investigations into cider-making. HMSO for the Board of Agriculture and Fisheries. London, 107.

Long SR (1989) *Rhizobium*-legume nodulation—life together in the underground. *Cell* 56:203–214.

MacWilliams MP, Liao MK. (2013) Luria Broth (LB) and Luria Agar, Media and Their Uses Protocol. ASM MicrobeLibrary. Available from: <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3020-luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-their-uses-escherichia-coli>.

Millis NF. (1951). Some bacterial fermentations of cider (Ph.D. thesis). University of Bristol. Bristol, UK.

Misawa N, Yamano S, Ikenaga H (1991) Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. Appl Environ Microbiol, 57:1847–1849.

Modorich P, Lehman IR. (1973). "Deoxyribonucleic acid ligase. A steady state kinetic analysis of the reaction catalyzed by the enzyme from *Escherichia coli*". J Biol Chem. 248 (21): 7502–11.

Ninfa JA, Ballou DP, Benore M (1998). Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology. Fitzgerald Science Press. pp. 355–356. ISBN 1891786008. OCLC 38325074.

Norman A , Hansen LH and. Sørensen SJ (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 12;364(1527):2275–89. doi: 10.1098/rstb.2009.0037.

Okamoto T, Nakamura K (1992) Simple and Highly Efficient Transformation Method for *Zymomonas mobilis*: Electroporation. Biosci Biotechnol Biochem. 56(5):833. doi: 10.1271/bbb.56.833.

O'Mullan P, Szakacs-Dobozi M, and Eveleigh DE (1991) Identification of saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. Biotechnology Letters, Volume 13, Issue 2, pp 137–142

Ostovar K and Keeney PG (1973) Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cocoa beans. J. Food Sci. 38:611–617.

Panesar SP, Marwaha SS and Kennedy JF (2006) *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. J Chem Technol Biotechnol 81: 623–635.

Pankova LM, Shvinka JE and Beker MJ (1988) Regulation of intracellular H⁺ balance in *Zymomonas mobilis* 113 during the shift from anaerobic to aerobic conditions, Appl. Microbiol. Biotechnol., 28:583-588.25.

Pappas MK, Kouvelis VN, Saunders E, Brettin TS, Bruce D, Detter C, Balakireva M, Han CS, Savvakis G, Kyrpides NC and Typas MA (2011) Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Lectotype Strain ATCC 10988. J Bacteriol. 193(18):5051-2. doi: 10.1128/JB.05395-11.

Park SC and Baratti J (1991) Comparison of ethanol production by *Zymomonas mobilis* from sugar beet substrates. Appl Microbiol Biotechnol 35:283–291.

Plant and soil science e-library

<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=959197140&topicorder=8&maxto=17>

Reddy OVS and Basappa SC (1996) Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis* : synergism and limitations. Biotechnology Letters Volume 18, Issue 11, pp 1315–1318

Repaske R (1956). Lysis of gram-negative bacteria by lysozyme. Biochimica et Biophysica Acta. 22(1): 189–91.

Reynen M, Reipen I, Sahn H and Sprenger GA (1990) Construction of expression vectors for the gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis* Mol Gen Genet. 223(2):335-41.

Rhee SK, Pagan RJ, Lefebvre MF, Wong L and Rogers PL (1984) Ethanol production from desalted molasses using *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. J Ferment Technol 62:297–300.
Rio DC (2014) Reverse transcription-polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Protoc. 2014(11):1207-16. doi: 10.1101/pdb.prot080887.

Rogers PL, Jeon YJ, Lee KJ, Lawford HG (2007) *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Product Adv Biochem Eng Biotechnol. 108:263-88.

Roeland B , Russi S, Guasch A, Blanco MLAG, Pe´rez-Luque R, Coll M and de la Cruz F (2006) Unveiling the Molecular Mechanism of a Conjugative Relaxase: The Structure of TrwC Complexed with a 27-mer DNA Comprising the Recognition Hairpin and the Cleavage Site J Mol Biol. 358(3):857-69.

Ruiz-Argueso T and Rodriguez-Navarro A (1975) Microbiology of ripening honey. Appl. Microbiol.30:893–896.

Sahm H, Bringer-Meyer S and Sprenger GA (2006) The Genus *Zymomonas*. The Prokaryotes pp 201-221

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition, Cold Spring Harbor, New York, p: 1000

Satory M, Frlinger M, Haltrich D, Kulbe K, Pittner F, Nidetzky B (1997) Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. Biotechnol Lett 19:1205–1208.

Savvides AL, Chalkou KI, Typas MA, Karagouni AD (2001) Enzymes of the Entner-Doudoroff and pyruvate decarboxylation pathways in *Zymomonas mobilis* wild-type CP4 and mutant strains grown in continuous culture. Antonie Van Leeuwenhoek. 80(3-4):287-95.

Scordaki A and Drainas C (1987) Analysis of Natural Plasmids of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 Journal of General Microbiology, 133, 2541-2556.

Seo JS, Chong HY, Kim JH and Kim JY (2007) Method for mass production of primary metabolites, strain for mass production of primary metabolites, and method for preparation thereof. In: US: Patent; 2007:20090162910 A1.

Shimwell, JL (1937) Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium* sp. nov.) producing alcoholic fermentation of glucose. J. Inst. Brew. London, 43:501–509.

Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering - transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio-technology*. 1(9):784-791.

Skotnicki ML, Lee KJ, Tribe DE and Rogers PL (1980) Comparison of Ethanol Production by Different *Zymomonas* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(4): 889–893.

Skotnicki ML, Lee KJ, Tribe DE, Rogers PL (1982) Genetic alteration of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Basic Life Sci* 19:271-90

Slater S, Gallaher T and Dennis D (1992) Production of Poly-(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 58, No 4, p: 1089-1094.

Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC and de la Cruz F (2010) Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(3):434-52. doi: 10.1128/MMBR.00020-10

Soberon X, Covarrubias L, Bolivar F (1980) Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9:287-305.

So LY, Chen W, Bugler-Lacap DC, Seemann M, Watt RM (2014). pZMO7- Derived shuttle vectors for heterologous protein expression and proteomic applications in the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*. *BMC Microbiology* 14:68.

Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology.* 98

Sreekumar O and Basappa SC (1995) Effect of different nitrogen sources on ethanolic fermentation of glucose by *Zymomonas mobilis*. *J Food Sci Technol* 32:252–254.

Strand TA, Lale R, Degnes KF, Lando M, Valla S (2014) A New and Improved Host-Independent Plasmid System for RK2-Based Conjugal Transfer

Supple SG, Joachimsthal EL, Dunn NL and Rogers PL, (2000) Isolation and preliminary characterization of *Zymomonas mobilis* mutant with an altered preference for xylose and glucose utilization. *Biotechnol Lett* 22:157–164.

Swings J and De Ley J (1977) The Biology of *Zymomonas* *Bacteriol Rev.*41(1): 1–46.

Tato I, Zunzunegui S, de la Cruz F & Cabezon E (2005) TrwB the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation is a DNA-dependent ATPase. *P Natl Acad Sci USA*102: 8156–8161.

Taylor RG, Walker DC, McInnes RR (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing, *Nucleic Acids Res* 21(7): 1677–1678.

Thomas CM (2000) Paradigms of plasmid organization. *Mol. Microbiol.* 37, 485–491.

Tsai MM, Fu YH & Deonier RC (1990) Intrinsic bends and integration host factor binding at F plasmid *oriT*. *J Bacteriol* 172: 4603–4609.

Typas MA, Galani I (1992) Chemical and Uv Mutagenesis in *Zymomonas mobilis*. *Genetica* 87(1):37-45 doi:Doi 10.1007/Bf00128771

Varella CML, Ceotto H, Madureira ZD, Nes FI (2009) Mobilization functions of the bacteriogenic plasmid PRJ6 of *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol.* 47(3):327-36. doi: 10.1007/s12275-009-0044-7.

Voytas D (2001) Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 10:Unit 10

Wang P , Zhu Y, Zhang Y, Zhang C, Xu J, Deng Y, Peng D, Ruan L and Sun M (2016) *mob/oriT*, a mobilizable site-specific recombination system for unmarked genetic manipulation in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Microb Cell Fact*. 15(1):108. doi: 10.1186/s12934-016-0492-9.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. 2011. Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου.

Will WR, Lu J and Frost LS (2004) The role of H-NS in silencing the F transfer region during entry into stationary phase. *Mol Microbiol* 54: 769–782.

Wong JJW, Lu J and Glover JNM (2012) Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids – a structural biology perspective. *Mol Microbiol*. 602-17. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08131.x.

Yan S, Fei Q, Zhang Y, Contreras LM, Utturkar SM, Brown SD, Himmel ME and Zhang M (2016) *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microb Biotechnol*. (6):699-717. doi: 10.1111/1751-7915.12408.

Yanase H, Kurii J and Tonomura K, (1986) Construction of a promoter cloning vector in *Zymomonas mobilis*. *Agric Biol Chem* 50:2959–2961.

Yanase H, Fukushi H, Ueda N, Maeda Y, Toyoda A, and Tonomura K (1991) Cloning, sequencing and characterization of the intracellular invertase gene from *Zymomonas mobilis*, *Agric. Biol. Chem.*,55, 1383,.
Yanase H, Kotani T, Yasuda M, Matsuzawa A and Tonomura K (1991) Metabolism of galactose in *Zymomonas mobilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 364,.

Yoon KH and Pack MY, Construction of a shuttle vector between *Escherichia coli* and *Zymomonas anaerobia*. *Biotechnol Lett* 9:163–168 (1987).

Zatyka M and Thomas CM (1998) Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements FEMS Microbiol Rev. 21:291-319.

Zhang S, Meyer R (1997) The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer. Mol. Microbiol. 25(3):509-516

Αφένδρα Α (2015) Μικροβιακή γενετική, σημειώσεις παραδόσεων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Καμπανός Ε, Αφένδρα ΑΣ (2011) Μελέτη της περιοχής κινητοποίησης του πλασμιδίου pZA1003 του *Zymomonas mobilis* NCIB 11163. 4ο MBK Ιωάννινα, Βιβλίο περιλήψεων, σελ. 138

Κολιαής ΙΣ (2001) Μικροβιολογία. Τρίτη έκδοση. University studio press.

Κοτολόσι Ρ, Ζήνωνος Ε, Αφένδρα Α-Σ (2015) Μελέτη της περιοχής αντιγραφής του πλασμιδίου pZA1003 του *Zymomonas mobilis* NCIBM 11163. 6^ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας Μικροβιόκοσμος, Αθήνα, Βιβλίο Περιλήψεων σελ. 176-177

Μητσόπουλος Μ, Αντωνόπουλος Π, Αφένδρα ΑΣ (2017) Μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στην κινητοποίηση του πλασμιδίου pZA1003 του *Zymomonas mobilis* NCIB 11163. 7ο συνέδριο της επιστημονικής εταιρείας μικροβιόκοσμος

Χατζηλουκάς Ε (2012) Εργαστηριακός οδηγός ασκήσεων του μαθήματος Μοριακή Βιολογία. Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

[/www.slideshare.net/basimks/p-bluescript](http://www.slideshare.net/basimks/p-bluescript)

<http://www.alexbiotechnology.com/PDF/Midori.pdf>

<http://www.biologydiscussion.com/gene/mutations/isolation-of-microbial-mutants-4-techniques-microbiology/55472>

http://www.bulldog-bio.com/nippon_genetics/midorigreenprotocol.pdf

<https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/212205.pdf>

http://www.clontech.com/SV/Products/Molecular_Biology_Tools/Restriction_Enzymes/Double_Digestion_Buffers