



ΑΤΕΙ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ SER 531 ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MSN4
ΤΟΥ ΖΑΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*



ΓΚΑΣΙ ΓΚΙΣΕΛΝΤΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΒΑΜΒΑΚΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ - ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή για την πολύτιμη καθοδήγησή του . Επιπλέον , θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές κ. Καπόλο Ιωάννη και την κ. Παπαδέλλη Μαρίνα για τη διάθεση των εργαστηριακών χώρων τους 83 και 63 προκειμένου να εκπονηθεί η παρούσα πτυχιακή εργασία. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και το Ε.Δ.Τ.Π. μέλος του εργαστηρίου 83, την κ. Σταματελοπούλου Ευγενία για την βοήθεια που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας , καθώς επίσης τους γονείς μου, που μου συμπαραστάθηκαν όλα τα χρόνια της φοίτησής μου όπως επίσης και τα αγαπημένα μου πρόσωπα για την υπομονή και την στήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζύμες παραδοσιακά αλλά και σήμερα παίζουν σπουδαίο ρόλο στις βιομηχανικές ζυμώσεις. Αν και στη φύση ανευρίσκονται πολλά είδη ζυμών ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι υπεύθυνος για τις ζυμώσεις των σακχάρων, και τη μετατροπή αυτών σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Συγκεκριμένα η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης, που είναι μια καθολική διεργασία. Η πορεία που ακολουθεί στην συνέχεια εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου ή και απουσία του. Κατά την αερόβια διεργασία επικρατεί η λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος κατά την οποία το πυροσταφυλικό καταβολίζεται σε CO₂ και H₂O ενώ κατά την αναερόβια διεργασία το πυροσταφυλικό μπορεί καταβολίζεται σε αιθανόλη κατά την αλκοολική ζύμωση. Ο ζαχαρομύκητας θεωρείται θαυμάσιος παραγωγός αιθανόλης παρουσιάζοντας όμως διάφορες ευαισθησίες σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, σε ωσμωτικές πιέσεις κ.ά. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αρχικά η κατασκευή ενός στελέχους ζύμης που φέρει τη μετάλλαξη Ser531Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 χρησιμοποιώντας την κατευθυνόμενη μεταλαξιγένεση μέσω PCR. Το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN4 εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή της εν λόγω μετάλλαξης σε κύτταρα ζύμης μέσω της διαδικασίας του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η Ser531 εντοπίζεται στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)). Με την μετάλλαξη γίνεται απόπειρα αποκάλυψης του ρόλου της συγκεκριμένης Σερίνης στην καταστολή του ελέγχου της μετανάστευσης της πρωτεΐνης Msn4, από την PKA καθώς και πρωταρχική μελέτη της απόκρισης σε διάφορες συνθήκες κυτταρικού stress. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δύναται να συμβάλλουν στην δημιουργία ενός στελέχους ζύμης που θα εμφανίζει καλύτερα χαρακτηριστικά ζύμωσης και θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων

Λέξεις κλειδιά : *Saccharomyces cerevisiae*, συνθήκες στρες, Msn4, γονιδιακή έκφραση, πρωτεΐνη κινάση A (PKA), PCR, παράγοντας μεταγραφής, μεταλαξιγένεση.

ABSTRACT

Traditionally Yeasts play an important role in industrial fermentations. Although naturally found many yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for the fermentation of sugars, and conversion into ethanol and carbon dioxide. Specifically, glucose converted to pyruvate via glycolysis, which is a universal process. In aerobic conditions, pyruvate is used for the production of energy, CO₂ and H₂O by citric acid cycle (Krebs cycle), while in anaerobic condition pyruvate is decarboxylated to acetaldehyde and then reduced to ethanol (ethanol fermentation). *Saccharomyces cerevisiae* shows different sensitivities to extreme environmental conditions such as osmotic pressure, temperature, ethanol presence etc. The primary purpose of this study is to construct a yeast strain carrying the mutation Ser531Ala on Msn4 protein, using PCR site-directed mutagenesis. The mutated MSN4 gene subsequently will be used for the introduction of mutation into yeast cells by homologous recombination. The Ser531 residue is located in Nuclear Localization Signal (NLS). By this mutation, is attempted to disclose the role of this Serine in controlling the migration of the Msn4 protein to the nucleus. The generated strain will be investigated for the ability to grow against various conditions of cellular stress, hoping that these results will help for the production of a yeast strain with better ethanol production characteristics that can be used in food industry.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

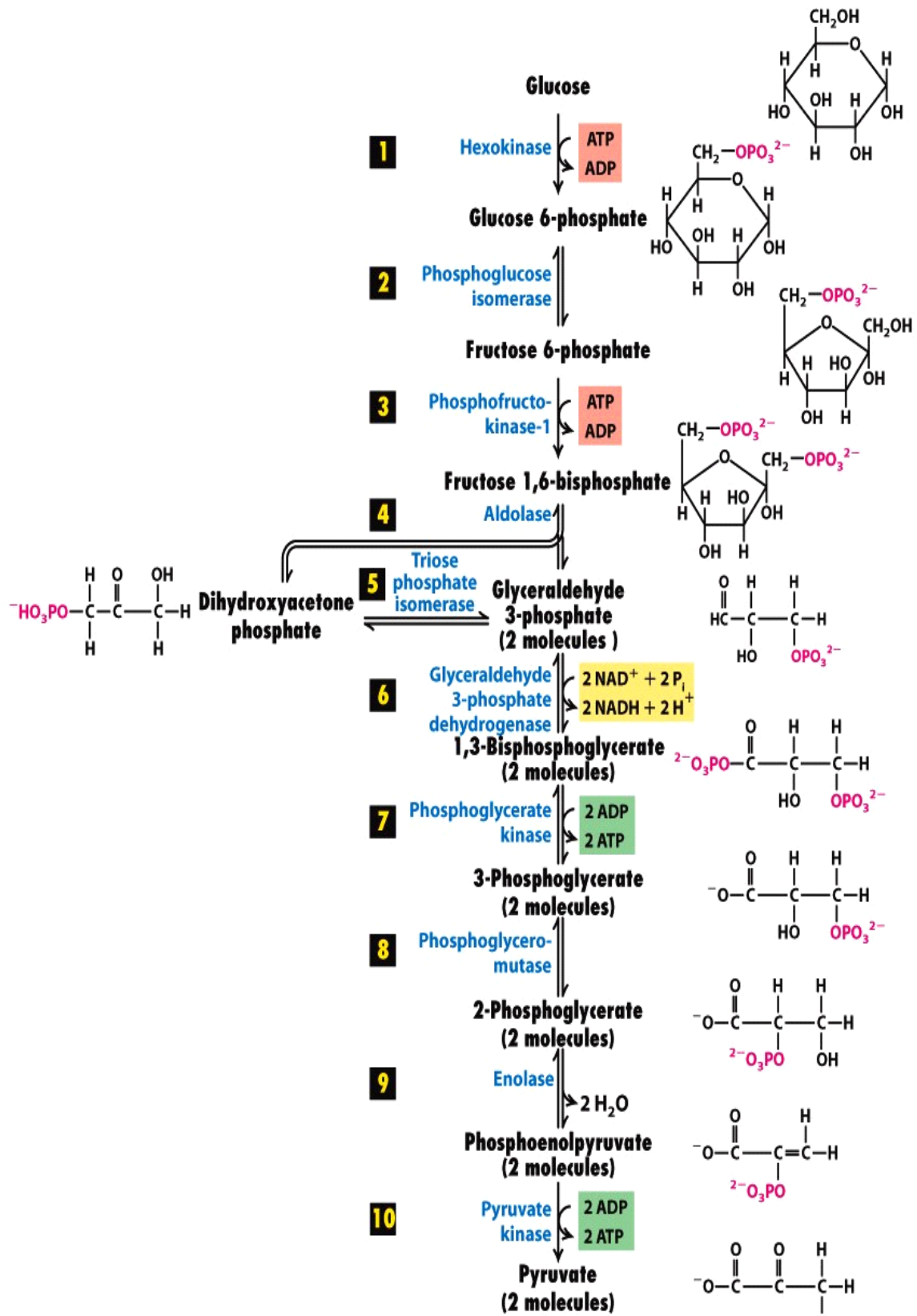
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Η πορεία μεταβολισμού της γλυκόζης	8
1.2 Αλκοολική ζύμωση	9
1.3 Ζύμες και μύκητες	10
1.4 Το γένος <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.5 Ο ρόλος της πρωτεΐνης Msn2/Msn4 στον ζαχαρομύκητα <i>S. cerevisiae</i>	12
1.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)	14
1.7 Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση μέσω τριών διαδοχικών PCR... ..	19
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.1 Υλικά	22
3.1.1 Γενικά Εμπορικά Υλικά	23
3.1.2 Αντιδραστήρια για μετασχηματισμό ζύμης.....	24
3.1.3 Αντιδραστήρια για μετασχηματισμό βακτηρίων	24
3.1.4 Αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση	24
3.1.5 Συστατικά διαλύματος Tfb1.....	24
3.1.6 Συστατικά διαλύματος Tfb2.....	24
3.1.7 Συστατικά διαλύματος STET	25
3.1.8 Βιολογικά Υλικά	26
3.1.9 Ένζυμα	26
3.2 Μέθοδοι.....	26
3.2.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών	26
3.2.2 Παρασκευή τριβλίων petri με θρεπτικό υπόστρωμα SC+URA+5-FOA	28
3.2.3 Παρασκευή μάρτυρα	28

3.2.4 Παρασκευή TAE 1%.....	29
3.2.5 Παρασκευή αγαρόζης.....	29
3.2.6 Απομόνωση γνωμικού DNA από κύτταρα ζύμης	30
3.2.7 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR	30
3.2.8 Αντιδράσεις PCR.....	31
3.2.9 Ηλεκτροφόρηση νουκλεικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	33
3.2.10 Μετασχηματισμός (transformation).....	34
3.2.11 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης	35
3.2.12 Plasmid DNA purification, User manual NucleoSpin Plasmid ..	36
2.4.12.1 Isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli	36
3.2.13 PCR clean-up, Gel extraction, User manual NucleoSpin GEL and PCR Clean-up.....	37
3.2.13.1 PCR Clean- up	37
3.2.13.2 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	37
3.2.14 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης.....	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	38
4.1 Μετάλλαξη του γονιδίου Msn4 μέσω τριών διαδοχικών PCR	38
4.2 Η εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης με PCR στον ζαχαρομύκητα <i>S. cerevisiae</i>	44
4.3 Έλεγχος του μεταλλαγμένου στελέχους	46
4.4 Καμπύλες ανάπτυξης ζαχαρομύκητα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ..	47
4.4.1 Επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων	47
4.4.2 Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων.....	49
5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	50
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

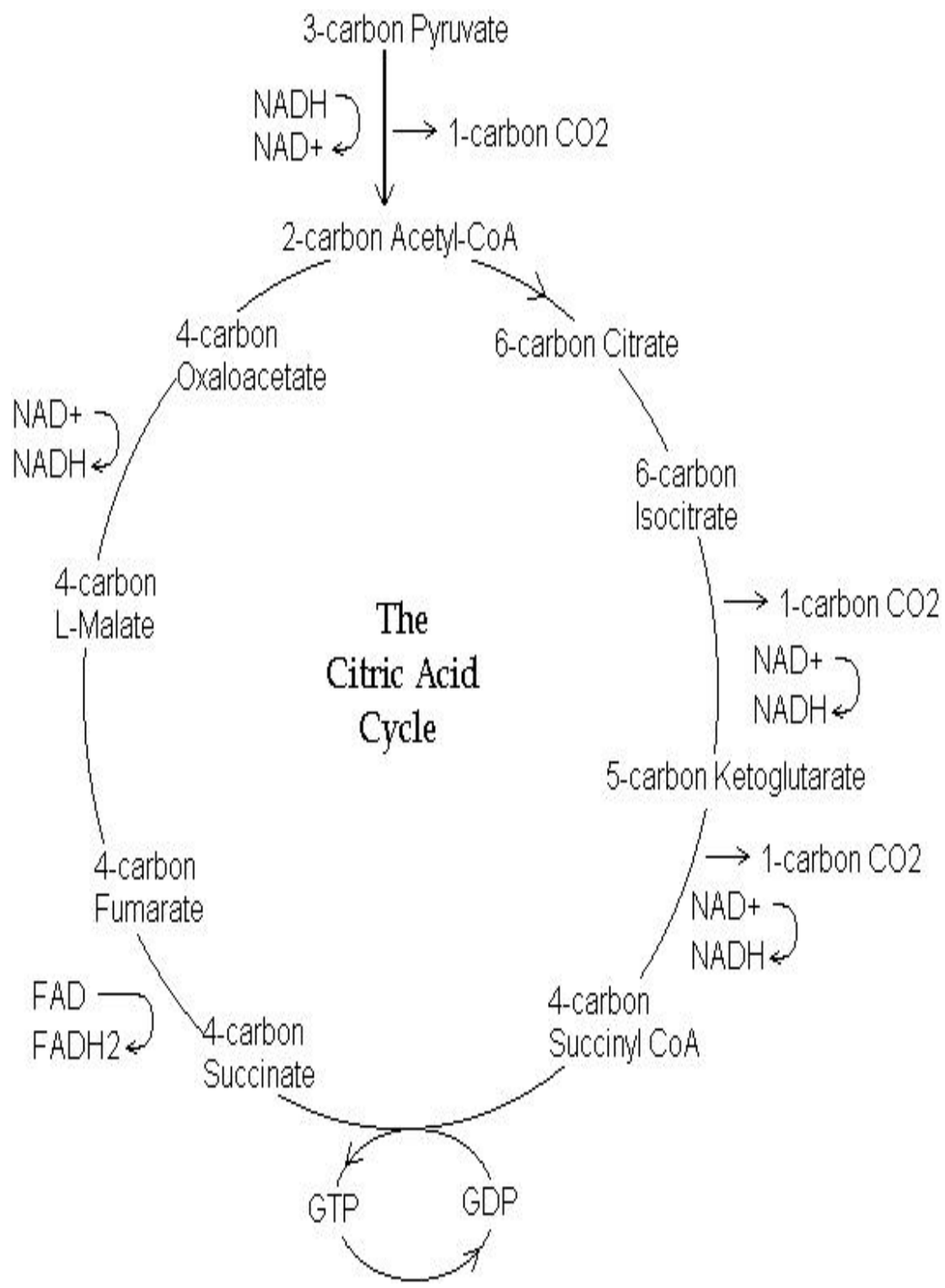
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η πορεία μεταβολισμού της γλυκόζης

Ζύμωση χαρακτηρίζεται κάθε μεταβολική διεργασία μετασχηματισμού οργανικών ουσιών σε απλούστερες, με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας. Η ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε παρουσία οξυγόνου είτε απουσία του. Η αλκοολική ζύμωση ανήκει στην κατηγορία των αναερόβιων ζυμώσεων. Με την πάροδο των χρόνων προτάθηκαν πολλές θεωρίες για την αλκοολική ζύμωση όμως αυτός που απέδειξε πειραματικά ότι η αλκοολική ζύμωση είναι αποτέλεσμα της αναερόβιας μεταβολικής δραστηριότητας των ζυμών ήταν ο Luis Pasteur το 1864 (7). Συγκεκριμένα η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης, που είναι μια καθολική διεργασία (εικόνα1). Κατά τον καταβολισμό ενός μορίου γλυκόζης παράγονται 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Η πορεία που ακολουθεί στην συνέχεια εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου ή και απουσία του. Κατά την αερόβια διεργασία (εικόνα 2) επικρατεί η λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος κατά την οποία το πυροσταφυλικό καταβολίζεται σε CO₂ και H₂O ενώ κατά την αναερόβια διεργασία το πυροσταφυλικό μπορεί να καταβολίζεται είτε σε γαλακτικό οξύ κατά την γαλακτική ζύμωση είτε σε αιθανόλη κατά την αλκοολική ζύμωση (1,8,4,10)



Εικόνα 1 Σχηματική πορεία γλυκόλυσης



Εικόνα 2 Σχηματική πορεία του κύκλου του κίτρικού οξέος

1.2 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση θεωρείται η σπουδαιότερη και πληρέστερα μελετημένη ζύμωση. Η έρευνα επί της μετατροπής των σακχάρων σε αιθανόλη ξεκίνησε ουσιαστικά το 1897, όταν απεδείχθη από τον Buchner ότι το προϊόν σύνθλιψης των κυττάρων ζύμης προκαλεί αλκοολική ζύμωση. Η έρευνα που ακολούθησε ήταν επίπονη και μεγάλης διάρκειας, αποτέλεσε δε τη βάση της Βιοχημείας και άνοιξε το δρόμο για την έρευνα και την διευκρίνιση και των άλλων σχημάτων διάσπασης των σακχάρων (1,4). Οι ζύμες ακόμα και κάτω από ιδεώδεις συνθήκες μετατρέπουν σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα μόνον το 95% του σακχάρου, το δε υπόλοιπο 5% χρησιμοποιείται για βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών. Εξαιρέση αποτελούν κάποια ήδη βακτηρίων που πραγματοποιούν και αυτά αλκοολική ζύμωση. Ανάλογα με τον μικροοργανισμό που πραγματοποιεί κάθε φορά την αλκοολική ζύμωση μεταβολίζει και το συγκεκριμένο είδος σακχάρου (π.χ. το είδος *Zymomonas mobilis* ζυμώνει αποκλειστικά γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη) ενώ στις βιομηχανίες τροφίμων όπως αναφέραμε χρησιμοποιούνται αποκλειστικά ζύμες του γένους *Saccharomyces* (7). Πέρα από την παραγωγή της αιθανόλης που είναι ένα επιθυμητό προϊόν κατά την διεργασία της αλκοολικής ζύμωσης παράγονται και διάφορων ειδών παραπροϊόντα τα οποία είναι είτε προϊόντα της πορείας αυτής είτε προϊόντα παράλληλων αντιδράσεων με αυτή είτε και χημικές ουσίες που προέρχονται από την ωρίμανση των προϊόντων της ζύμωσης. Παράγονται σε μικροποσότητες όπως είναι η μεθανόλη, το ηλεκτρικό οξύ, οι ανώτερες αλκοόλες, η γλυκερίνη, ακεταλδεΐδη, εστέρες, οξικό οξύ, ακετάλες κ.ά. Ανασταλτικοί παράγοντες της αλκοολικής ζύμωσης αποτελούν τα σάκχαρα, η αιθανόλη, η φορμαλδεΐδη ο θειώδης ανυδρίτης και ορισμένα μέταλλα που πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις διότι μπορούν και να τερματίσουν την διαδικασία της ζύμωσης. Η αιθανόλη παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον ως πηγή ενέργειας, ιδίως για τις χώρες που δεν είναι ενεργειακά αυτάρκεις (1,4).

1.3 Ζύμες και Μύκητες

Οι μύκητες (*fungi*) αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που ποικίλουν στην φυσιολογία και στη δομή. Αυξάνονται επί οργανικών υποστρωμάτων και εξελικτικά είναι περισσότερο κοντά στα αρχαία, με τα οποία έχουν κοινό πρόγονο, παρά στα βακτήρια. Τα κύτταρά τους προστατεύονται από κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται από χιτίνη (*chitin*) ή άλλους πολυσακχαρίτες. Οι μύκητες παράγουν εξειδικευμένα κύτταρα, τα σπόρια μέσω των οποίων αναπαράγονται και τα οποία τους βοηθούν να επιβιώνουν σε περιβαλλοντικά αντίξοες συνθήκες. Οι μύκητες είναι δυνατόν να είναι μονοκύτταροι (ζύμες- *yeasts*) ή πολυκύτταροι (νηματοειδείς ή μυκηλιακοί μύκητες – *filamentous fungi*). Οι μύκητες κατά κανόνα δεν διαθέτουν αυτόνομη κίνηση και αναπτύσσονται υπό μορφή διακλαδιζόμενων νηματίων που ονομάζονται υφές (*hyphae*) οι οποίες διαφοροποιούνται περιορισμένα μεν μορφολογικά, καθόλου όμως λειτουργικά. Μερικοί μύκητες έχουν χάσει το μυκηλιακό τρόπο ανάπτυξης τους και έχουν μετατραπεί σε μονοκύτταρους οργανισμούς. Οι οργανισμοί αυτοί είναι γνωστοί ως ζύμες. Οι ζύμες αποτελούνται από μικρά σε σχήμα αυγού κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Τα εκβλαστήματα μεγεθύνονται μέχρι να φτάσουν το μέγεθος του μητρικού κυττάρου και στη συνέχεια γίνεται η διαίρεση του πυρήνα και μετά η διαίρεση του κυτταροπλάσματος.(5,1). Οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα υψηλής ωσμωτικής πίεσης. Με ελάχιστες εξαιρέσεις είναι σαπρόφυτα, προαιρετικά αναερόβια και δεν παράγουν τοξικούς μεταβολίτες . Οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί μεγάλης σπουδαιότητας για τη βασική βιολογική έρευνα, την βιομηχανία τροφίμων και ποτών την ιατρική και τη βιοτεχνολογία αλλά και ως τρόφιμα. (1) Η σημαντικότερη οικονομικά εφαρμογή είναι του γένους *Saccharomyces cerevisiae* καθώς και άλλων ζυμών και νηματωδών μυκήτων στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών (3).

1.4 Το γένος *Saccharomyces*

Ο *S. cerevisiae* (εικόνα 3), ανήκει στην τάξη *Saccharomycetales* (ασκοσποριογόνες ζύμες). Επειδή αποτελεί εδώ και χρόνια μοντέλο για την έρευνα μοριακής βιολογίας και γενετικής, είναι ο πιο καλά μελετημένος και χαρακτηρισμένος ευκαρυωτικός οργανισμός (από την εποχή του Luis Pasteur 1850 έως σήμερα). Το γεγονός αυτό καθώς και το ιστορικό ασφαλούς χρήσης του (έχει χαρακτηριστεί ως GRAS, Generally Regarded As Safe) έχει οδηγήσει σε πολυάριθμες εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων. Οι ζυμομύκητες καλλιεργούνται με στόχο την παραγωγή της ζύμης αρτοποιίας, την χρήση τους στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών καθώς και την παραγωγή διαφόρων άλλων προϊόντων όπως ενζύμων, βιταμινών κ.ά. Τα βασικότερα χρήσιμα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae* είναι η ταχεία ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες και η αποτελεσματική παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης σε αναερόβιες συνθήκες καθώς και μη παραγωγή ανεπιθύμητων αρωμάτων ή γεύσεων. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει εστιάσει στις γενετικές προσεγγίσεις των χαρακτηριστικών της βιομηχανικής ζύμης. Με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας έχουμε καταφέρει να αποκωδικοποιήσουμε το γονιδίωμα για 46 διαφορετικά στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*. Η μοριακή γενετική έρευνα έχει επίσης περιλάβει μελέτες της γενετικής έκφρασης στη ζύμη του κρασιού κατά τη ζύμωση, όταν αυτή πραγματοποιείται σε καταστάσεις στρες όπως υψηλή συγκέντρωση σακχάρων ή τοξικότητα της αιθανόλης και όταν οι ζύμες είναι αφυδατωμένες ή ενυδατωμένες (1,4,3).

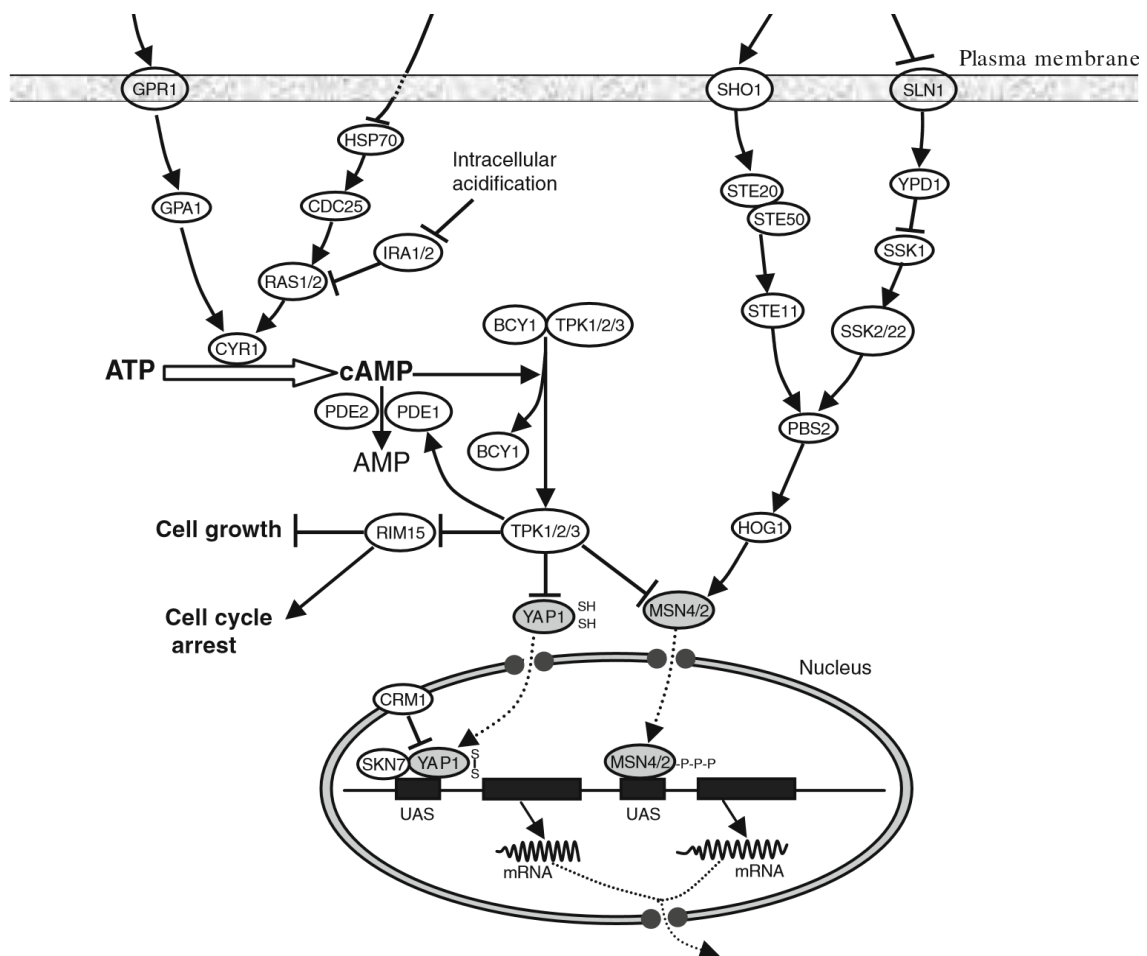


Εικόνα 3 Κύτταρα του ζαχαρομύκητα *S. cerevisiae*

1.5 Ο ρόλος της πρωτεΐνης Msn2/Msn4 στον ζαχαρομύκητα *S. cerevisiae*

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Σημαντική έρευνα επιτελείται για την βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων είτε με την τροποποίηση των συνθηκών είτε με τη γενετική βελτίωση των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. Η αλκοολική ζύμωση είναι γνωστή και εφαρμόζεται από την αρχαία Ελλάδα μέχρι σήμερα για την παραγωγή οίνου. Η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει σήμερα την χρήση της αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων όπως καλλιεργήσιμα φυτά, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων κ.ά. Ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να μεταβολίσει σάκχαρα όπως η γλυκόζη, είτε εξ' ολοκλήρου σε CO₂ και H₂O παρουσία οξυγόνου (αεροβίωση), είτε σε αιθανόλη και CO₂ απουσία οξυγόνου (αναεροβίωση). Η πορεία η οποία χρησιμοποιείται από το κύτταρο είναι αυτή της γλυκόλυσης κατά την οποία τα σάκχαρα όπως η γλυκόζη μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ. Στη συνέχεια το πυροσταφυλικό οξύ υπό αναερόβιες συνθήκες αποκαρβοξυλώνεται ενζυμικά από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού και μετατρέπεται σε ακεταλδεύδη και ακολούθως ανάγεται σε αιθανόλη με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης (7). Όταν ο *S.cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη αφ' ενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφ' ετέρου τα ίδια μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand). Η αδενυλική κυκλάση Cyr1 ενεργοποιείται είτε από το σύμπλεγμα G πρωτεϊνών που είναι δεσμευμένες στους υποδοχείς σακχάρων (Gra1p, Gra2p). Η ενεργοποίηση της αδενυλική κυκλάσης έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Η πρωτεΐνη Bcy1 δεσμεύει με την μορφή συμπλόκου το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών Trk 1/2/3 που αποτελούν την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η cAMP χρησιμοποιείται για την φωσφορυλίωση της Bcy1 και εν συνεχεία την απελευθέρωση της ενζυμικά

ενεργής PKA. Η PKA είναι η φωσφοκινάση σερίνης/θρεονίνης και οι στόχοι της είναι ένας τεράστιος αριθμός πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων πολλών ενζύμων που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στις μεταβολικές διεργασίες. Μεταξύ των μορίων στόχων της PKA είναι και μεταγραφικοί παράγοντες όπως η Msn4 πρωτεΐνη (14). Οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίσεων από άλλες κινάσες όταν το κύτταρο βρίσκεται υπό συνθήκες κυτταρικού στρες μεταναστεύουν στο πυρήνα μπλοκάρουν το κυτταρικό κύκλο και επάγουν την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται στο στρες. Η φωσφορυλίωση του Msn4 στην περιοχή των σημάτων πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal) (NLS)) από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μετανάστευσης της στον πυρήνα. Η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του ζυμομύκητα αποτελεί ένα παράγοντα κυτταρικού στρες, όμως η ενδοκυττάρια σηματοδότηση της αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και τελικά της PKA μέσω των Ras 1/2 πρωτεϊνών. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, ότι προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης από τον *S.cerevisiae* χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα θα ήταν χρήσιμο να επιτευχθούν κατάλληλες γενετικές τροποποιήσεις με σκοπό την αποτροπή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Msn4 από την PKA (20,18,17,13,16)



Εικόνα 4 Αντίδραση στο στρες

1.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος διεθνώς γνωστή ως PCR από τα αρχικά των λέξεων **Polymerase Chain Reaction**. Πρόκειται για μία γρήγορη, οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρές αλληλουχίες DNA που υπάρχουν ακόμη και σε ελάχιστα αντίγραφα μέσα σε ένα δείγμα, καθώς επίσης και να απομονώσει μία αλληλουχία από ένα πολύ μικρό δείγμα. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να εντοπιστούν συγκεκριμένα γονίδια που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Πρόκειται για μία ενζυμική μέθοδο σύνθεσης γονιδιακού DNA. Βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής (25- 35) που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

- Αποδιάταξη της μήτρας
- Πρόσδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες
- Επιμήκυνση των εκκινητών-σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'-3'

Η PCR περιγράφηκε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1985 από τους Saiki και συνεργάτες του και βελτιώθηκε αργότερα από Faloona και Kary Mullis (ο οποίος τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993) (3). Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μία από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει με επιστημονικό τρόπο τη μελέτη του DNA. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της PCR όπως είναι η ποσοτική Real-Time PCR, Hot-start PCR, Multiplex (Πολυσύνθετη) PCR, Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR), Nested PCR, Intersequence specific (ISSR) PCR, FISSR-PCR, Ligation-mediated PCR, Inverse PCR, Vecorette-PCR, Assembly PCR, Asymmetric PCR-Late PCR, Quantitative PCR, Touchdown PCR, Colony PCR, Race-PCR, ειδικής μεθυλίωσης PCR, In Situ PCR, AFLP PCR κ.ά. .

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα στην έρευνα και τις εφαρμογές της Μοριακής Γενετικής, καθώς διευκόλυνε ιδιαίτερα την κλωνοποίηση τμημάτων για την δημιουργία κατασκευών, την μεταλλαξιγένεση, την αλληλούχιση κ.ά. Ιδιαίτερα σημαντική στις φυλογενετικές μελέτες με δείγματα που απομονώνονται από αρχαίους ιστούς (αρχαιολογικός τομέας), ανίχνευση, γενοτύπηση συγκεκριμένων μεταλλαγών των κληρονομικών ασθενειών, κλωνοποίηση γονιδίων, δοκιμή πατρότητας, γενετική δακτυλοσκόπια, σύγκριση της έκφρασης γονιδίων καθώς και σε άλλους τομείς της Υγείας, του Περιβάλλοντος, της Γεωργίας, των Τροφίμων κ.ά. Απαραίτητη είναι η παρουσία ενός ενζύμου που συμμετέχει ενεργά στην αντιγραφή του DNA, της πολυμεράσης. Στις πρώτες δημοσιεύσεις για τη αντιγραφή του DNA γινόταν χρήση της πολυμεράσης Klenow. Καθώς το ένζυμο αυτό είναι θερμοευαίσθητο, χρειαζόταν σε κάθε κύκλο αντιγραφής να προστίθεται νέα ποσότητα πολυμεράσης, πράγμα που καθιστούσε την όλη διαδικασία πολύπλοκη και δαπανηρή. Με την πάροδο των χρόνων απομονώθηκε (το

1988 περίπου) η πρώτη θερμοσταθερή DNA πολυμεράση από θερμόφιλο οργανισμό *Thermus aquaticus*. Το γεγονός αυτό έδωσε ιδιαίτερη ώθηση καθώς επέτρεψε το σχεδιασμό θερμοκυκλοποιητών, μηχανημάτων δηλαδή που προγραμματίστηκαν έτσι ώστε εκτελούν αυτόματα τις αλλαγές της θερμοκρασίας και των κύκλων στους επιθυμητούς χρόνους, οδηγώντας έτσι στην ευρεία χρήση της (5). Πλέον οι περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες τυποποιούνται σε συστήματα αντιδραστηρίων (kit) τα οποία παρέχουν ιδιαίτερα ικανοποιητική επαναληψιμότητα ενώ παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονου χειρισμού πολλών δειγμάτων. Για την εκτέλεση μιας αντίδρασης PCR χρειάζονται:

- Μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό καταλύει την σύνθεση του DNA. Σήμερα υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες μια ποικιλία θερμοσταθερών DNA πολυμερασών από διάφορους θερμόφιλους οργανισμούς.
- Ένα ζευγάρι εκκινητών. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως εναρκτήρια τμήματα για την σύνθεση του DNA. Σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιούνται (προσδένονται) στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου με ελεύθερο 3'υδροξύλιο τους προσανατολισμένο προς το εσωτερικό του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί κατά την αντίδραση της PCR. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο για την επιτυχία της αντίδρασης. Οι δύο εκκινητές πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξης (T_m) ώστε να υβριδοποιούνται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου στην ίδια θερμοκρασία.
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Τυπικά χρησιμοποιείται κάθε dNTP σε συγκέντρωση 200-250 μ M. Η ποσότητα αυτή είναι υπεραρκετή καθώς αν αξιοποιηθεί όλη θα συντεθούν 6-6.5 μ g DNA. Ειδικά λοιπόν όταν το προϊόν της αντίδρασης είναι σχετικά μικρό (της τάξης των μερικών εκατοντάδων ζευγών βάσεων είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί χαμηλότερη συγκέντρωση dNTPs (100 μ M ή και μικρότερη).

- Δισθενή κατιόντα. Όλες οι θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στην PCR χρειάζονται δισθενή κατιόντα προκειμένου να λειτουργήσουν, συνήθως Mg^{2+} . Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 1-5 mM ανάλογα με την αντίδραση. Έχει διαπιστωθεί πως σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Mg^{2+} μεταβάλλεται η κινητική της πρόσδεσης των εκκινητών, στη συμπληρωματική προς αυτούς αλληλουχία την οποία αναγνωρίζουν. Σχετική υψηλή συγκέντρωση Mg^{2+} σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αναφερθεί πως μειώνει την ειδικότητα της πρόσδεσης, ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχει αναφερθεί πως την αυξάνει. Στην πράξη η ιδανική συγκέντρωση Mg^{2+} για κάθε δεδομένη αντίδραση PCR προσδιορίζεται εμπειρικά.
- Ρυθμιστικό διάλυμα. Συνήθως ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται Tris-Cl τυπικά σε συγκέντρωση 10 mM, προκειμένου το pH να διατηρείται μεταξύ 8,3 και 8,5 σε θερμοκρασία δωματίου. Στην θερμοκρασία των 72°C στην οποία επιτελείται ο πολυμερισμός, το pH πέφτει κατά μία περίπου μονάδα φθάνοντας στο 7,2 που είναι η κατάλληλη τιμή για τη δράση των περισσότερων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών.
- Το DNA-μήτρα. Πρόκειται για το DNA που περιλαμβάνει την αλληλουχία-στόχο. Θεωρητικά, αλλά και πρακτικά κάτω από ιδανικές συνθήκες, η PCR μπορεί να δώσει ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος ξεκινώντας ακόμα και από ένα μόριο DNA-μήτρας. Συνήθως όμως χρησιμοποιούνται ως μήτρα μερικές χιλιάδες αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου. Στην πράξη αυτό σημαίνει πως όταν ως μήτρα χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA θηλαστικών, στην αντίδραση περιλαμβάνονται 200 ng DNA. Όταν ως μήτρα χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA από ζυμομύκητα, από βακτήρια ή καθαρό πλασμιδιακό DNA, στην αντίδραση περιλαμβάνονται 10 ng DNA, 1 ng DNA και 1 ng DNA αντίστοιχα.

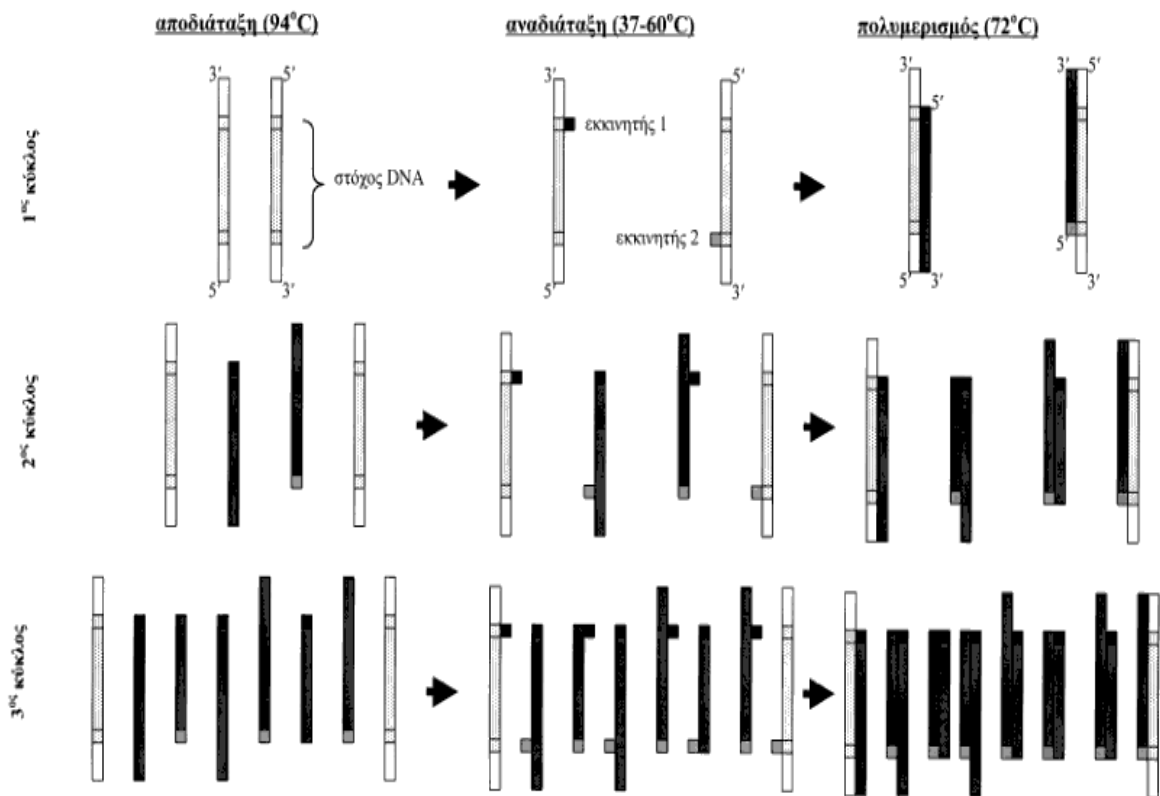
Τα στάδια της αντιγραφής είναι :

- Στάδιο μετουσίωσης του δίκλωνου DNA- προτύπου(Denaturation). Το μίγμα θερμαίνεται στους 95 °C για 20 s, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου, που συνδέουν τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Έτσι προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύει ως μήτρα για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Η θερμοκρασία, που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται από 90 °C έως και 98 °C.
- Στάδιο ένωσης των αφετηριών στη μήτρα (primer annealing). Η θερμοκρασία του μίγματος μειώνεται στους 55 °C για 30 s. Έτσι επιτυγχάνεται η ειδική ένωση των αφετηριών με τις συμπληρωματικές προς αυτές μονόκλωνες DNA αλυσίδες- μήτρα που προέκυψε στο πρώτο στάδιο. Οι αφετηρίες εντοπίζουν το προς αντιγραφή τμήμα DNA και προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το 5' άκρο της καθεμιάς να ενώνεται με το 3' άκρο της αλυσίδας- μήτρα. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται από 40 °C έως 60 °C.
- Στάδιο σύνθεσης αντιγράφων DNA (primer extension). Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C για 1 s και η Taq Πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις μονόκλωνες αρχικές DNA αλυσίδες, επιμηκύνει τις αφετηρίες. Κατά αυτόν τον τρόπο συνθέτονται δύο καινούργιες DNA αλυσίδες, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό των δύο αρχικών. Η διαδικασία αντιγραφής εξελίσσεται, όπως προαναφέρθηκε στην κατεύθυνση 5'3'. Η θερμοκρασία κυμαίνεται από 70-75 °C.

Τα τρία παραπάνω στάδια αντιπροσωπεύουν ένα κύκλο PCR, ο οποίος ολοκληρώνεται σε 2-3 λεπτά περίπου. Μετά το τέλος του 1^{ου} κύκλου η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95 °C και ξεκινά ο 2^{ος} κύκλος αντιγραφής (συνήθως 25-30 κύκλοι). Επομένως μετά το τέλος του κάθε κύκλου η προυπάρχουσα ποσότητα DNA- προτύπου διπλασιάζεται (2,3,5).



Εικόνα 5 Συσκευή PCR (θερμοκυκλοποιητής)



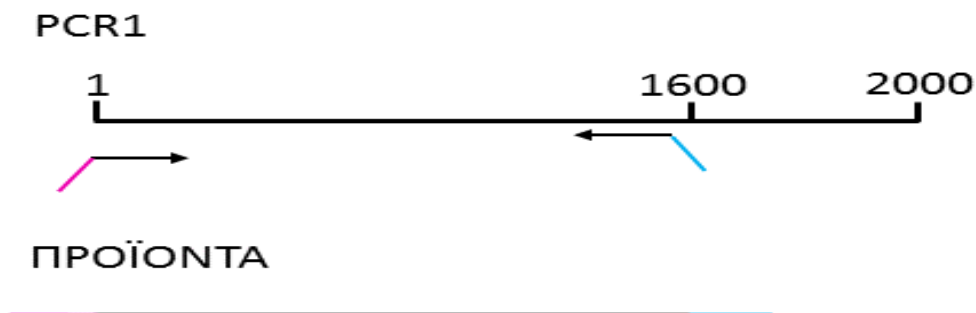
Εικόνα 6 Στάδια της PCR

1.7 Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω PCR (ή εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης με PCR, PCR Site-Directed mutagenesis)

Προκειμένου να εισάγουμε μια σημειακή μετάλλαξη σε ένα γονίδιο έτσι ώστε να αλλάξουμε ένα αμινοξύ στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο αυτό χρησιμοποιούμε την τεχνική της PCR.

- **1^η PCR**

Η πρώτη PCR (σχήμα 2.1) γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γονίδιο στο οποίο είναι επιθυμητή η εισαγωγή της μετάλλαξης. Ως ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) χρησιμοποιείται ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (forward primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο, υβριδοποιείται στην αρχή του γονιδίου στόχου και φέρει ανοδικά στο 5' άκρο του κατάλληλη αλληλουχία που αναγνωρίζεται περιοριστική ενδονουκλεάση για μετέπειτα κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου.

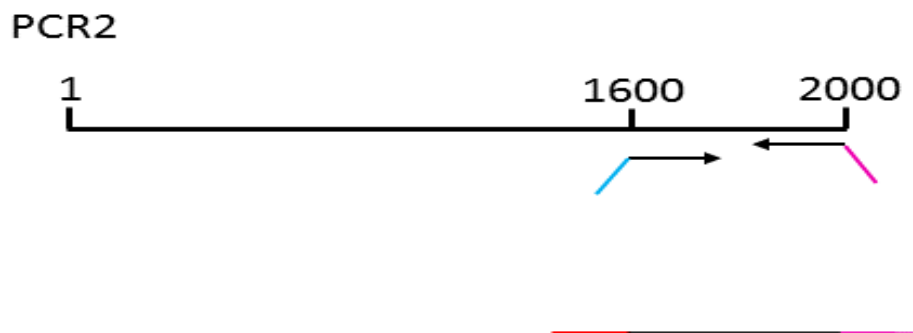


Εικόνα 7 Πρώτη PCR

- **2^η PCR**

Η δεύτερη PCR (σχήμα 2.2) γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γονίδιο στο οποίο είναι επιθυμητή η εισαγωγή της μετάλλαξης . Ως

εμπρόσθιος εκκινητής (Forward primer) χρησιμοποιείται ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο υβριδοποιείται στο τέλος του γονιδίου στόχου και φέρει καθοδικά στο 3'άκρο του την κατάλληλη αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση για μετέπειτα κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου.

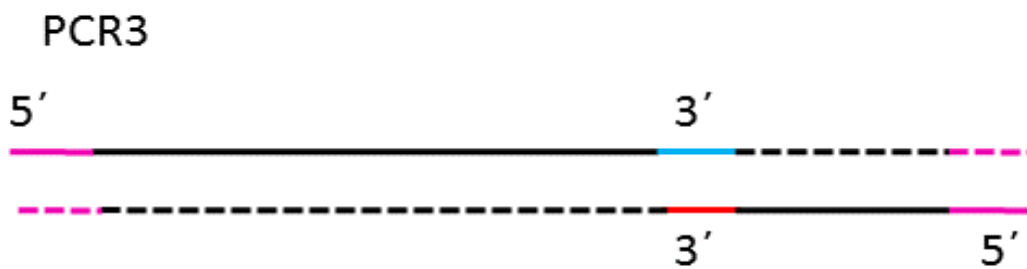


Εικόνα 8 Δεύτερη PCR

- **3^η PCR**

Η τρίτη PCR γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα προϊόντα της πρώτης και της δεύτερης PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται ολιγονουκλεοτίδια που υβριδοποιούνται στο 5' και 3' άκρο του γονιδίου και φέρουν στο 5' άκρο τους αλληλουχίες 40 νουκλεοτιδίων που είναι όμοιες με αυτές που βρίσκονται στο γενωμικό DNA της ζύμης ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου. Κατά την διάρκεια του πρώτου κύκλου της τρίτης PCR, αρχικά στους 95°C τα δίκλινα προϊόντα των δυο προηγούμενων PCR αποδιατάσσονται. Στη συνέχεια σε χαμηλότερη θερμοκρασία επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση. Από τους δυο δυνατούς συνδυασμούς μόνο ο ένας είναι δυνατόν να συνεχίσει. Αυτό συμβαίνει διότι η DNA πολυμεράση μπορεί και διαβάζει μόνο με κατεύθυνση 3'-

>5' και συνθέτει με κατεύθυνση 5'→3'. Έτσι η επιμήκυνση σε θερμοκρασία 72°C συμβαίνει μόνο για την περίπτωση (A) (σχήμα 2.3) . Το αποτέλεσμα της επιμήκυνσης είναι η δημιουργία εκμαγείου που θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι επόμενοι κύκλοι της PCR θα πολλαπλασιάσουν το εκμαγείο αυτό.



Εικόνα 9 Τρίτη PCR

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η δημιουργία στελεχών ζύμης ανθεκτικών στην αιθανόλη και σε συνθήκες γενικού stress τα οποία μελλοντικά υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία τροφίμων. Βασικός στόχος είναι η γενετική τροποποίηση του στελέχους *S. cerevisiae* W303-1a-ΔMSN4::URA3 (το οποίο έχει προέλθει από το στέλεχος W303-1a όπως θα αναφερθεί παρακάτω) δημιουργώντας μια μετάλλαξη επί γονιδίου MSN4. Με την τροποποίηση αυτή γίνεται αντικατάσταση του αμινοξέος σερίνη που βρίσκεται στη θέση 531 με το αμινοξύ Αλανίνη (Ser531Ala). Η θέση εντοπίζεται στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)) και είναι αμινοξύ το οποίο πιθανόν φωσφορυλιώνεται από την PKA. Η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Msn4 στον πυρήνα του κυττάρου, παίζει σημαντικό ρόλο για την απόκριση του σακχαρομύκητα σε συνθήκες stress. Προκειμένου ο ζυμομύκητας να είναι σε μεγαλύτερη ετοιμότητα για την απόκρισή του στο stress, πιθανόν η παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας του Msn4 μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα του κυττάρου να δρα ευεργετικά. Προκειμένου να συμβεί αυτό, υπάρχει η πιθανότητα, η αδυναμία φωσφορυλίωσής του από την PKA να είναι η λύση. Με την μετάλλαξη αυτή γίνεται απόπειρα αποκάλυψης του ρόλου της συγκεκριμένης σερίνης στην καταστολή του ελέγχου της μετανάστευσης της πρωτεΐνης Msn4, από την PKA καθώς και αξιολόγησης της απόκρισης σε διάφορες συνθήκες κυτταρικού stress.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Γενικά Εμπορικά Υλικά :

Πίνακας 1 Γενικά Εμπορικά Υλικά

Κωδικός	Περιγραφή	Εταιρεία
MC001	Yeast Extract	LABM
P-3504	Ponceans His Tris	SIGMA
	TRITEN-X100	
	MnCl ₂ -4H ₂ O	
	EDTA	
	CaCl ₂	
	MnCl ₂	
R-2252	Rubium Chloride	SIGMA
	Trizma Base TiSO ₃	
	MgSO ₄ Anyclrous	
	CH ₃ COOH	
	AT	
	EDTA	
	LEU	
A 7495	Cloramphenical	Applichem
	HIS	
H4034	HEPES	
A4789	Kanamycin Sulfate	Applichen
	URA MB:112	
	TRP MB:2047	
P-7626	PHENYLMETHYLSUFONYL FLURIDE C ₇ HFO ₂ S	SIGMA
	NaN ₃	
	ADE MB:102	
>1g	ORANGE G	SIGMA
Y0626-25G	Yeast Nitrogen Base without Amino Acids	SIGMA
Q32520/294	Yeast Powder Extract	LAB
A183,0500	Bacto Peptone	Applichen
L-3022	LB BROTH	SIGMA
G7021, 227000	Glucose	SIGMA- Aldrich,SERVA
R0811	5-FOA (5-Fluoroorotic Acid), (5 φθόρο- οροτικό οξύ)	THERMO SCIENTIFIC

11392	Agar- Agar	SERVA
Y0626-250G	Yeast Nitrogen Base:	SIGMA- ALDRICH
A3721	Asparagine	APPLICHEM
A3712	Glumatic acid	FLUKA
A3496	Leucine	APPLICHEM
T3379	Tyrosine	SIGMA- ALDRICH
1084950100	Valine	MERCK
32191	Phenylalanine	SERVA
A3715,0250	Aspartate	APPLICHEM PANREAC
A3709,0100	Arginine	APPLICHEM PANREAC
A0939,00010	Adenine	APPLICHEM
A3677,0025	Isoleucine	APPLICHEM PANREAC
A3946,0025	Threonine	APPLICHEM
A3694,0050	Cysteine	APPLICHEM PANREAC
81710	Proline	Sigma- Aldrich
T8941	Tryptophan	SIGMA- ALDRICH
L9037	Lysine	SIGMA- ALDRICH
M-5308	Methionine	SIGMA- ALDRICH
11482	Alanine	SERVA
A3719,0050	Histidine	APPLICHEM
A3734,0100	Glutamine	APPLICHEM
84960	Serine	FLUKA
MC005	Tryptone	LAB M
56406	Glycine	SERVA
A0839,0010	Αμπικιλίνη (Ampicillin sodium salt) :	Biochemica
L 3771-100G	Μετά νατρίου άλας του Θεϊκού Δωδεκακυλίου(SDS):	SIGMA
603117000	Isopropanol	PENTA
A0667	Uracili	AppliChem

3.1.2 Αντιδραστήρια για μετασχηματισμό ζύμης:

Πίνακας 2 Αντιδραστήρια για μετασχηματισμό ζύμης

Κωδικός	Περιγραφή	Εταιρεία
A1249,1000	Πολυαιθυλενογλυκόλη (Polyethylene glycol 4000)	Biochemica
A3478	Lithium Acetate dehydrate	AppliChem
A2160,0001	Salmon Sperm DNA Sodium salt (carrier DNA)	

3.1.3 Αντιδραστήρια για μετασχηματισμό βακτηρίων:

Πίνακας 3 Αντιδραστήρια για μετασχηματισμό βακτηρίων

Κωδικός	Περιγραφή	Εταιρεία
A2087,0100	MnCl ₂	Biochemica
BP229	Glycerol	Fisher, Scientific
M124	MOPS	Sigma-Aldrich
R2252	RbCl ₂	Sigma-Aldrich
BP364500	CH ₃ COOK	Sigma-Aldrich
328507	CaCl ₂	Sigma-Aldrich

3.1.4 Αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση:

Πίνακας 4 Αντιδραστήρια για ηλεκτροφόρηση

Κωδικός	Περιγραφή	Εταιρεία
AG02	Agarose	Nippon genetics
9157	10X Loading Buffer	Takara
00002820	EDTA	TITRIPLEX III
T1501.1000	Trisma Base ultra plus	Duchefa Biochemie
607002006	Glacial acetic acid	PENTA
41003	Gel red	Biotium

3.1.5 Συστατικά διαλύματος Tfb1:

Πίνακας 5 Συστατικά διαλύματος TFb1

100mM	RbCl ₂
50mM	MnCl ₂
30mM	CH ₃ COOK
10mM	CaCl ₂

PH 5,8 ρυθμίζεται με 0,2M CH₃COOH,

3.1.6 Συστατικά διαλύματος Tfb2 :

Πίνακας 6 Συστατικά διαλύματος Tfb2

10Mm	MOPS
10Mm	RbCl ₂
80Mm	CaCl ₂
15%	Glycerol

pH: 7 , ρυθμίζεται με 0.1N ΚΟΗ
Δεν αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο
Αποστειρώνεται με χρήση φίλτρου 0,22μm.

3.1.7 Συστατικά διαλύματος STET

Πίνακας 7 Συστατικά διαλύματος STET

100 mM	NaCl 0,1 M
10 mM	Tris- HCl PH:8
1 mM	EDTA PH:8
5 %	Triton X-100

3.1.8 Βιολογικά Υλικά

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω πτυχιακή εργασία είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* w303-1a-ΔMSN4-URA3. Η διατήρηση του στελέχους γινόταν σε μορφή stock μέσα σε erpendorfs στους -80 C.

3.1.9 Ένζυμα :

Πίνακας 8 Ενζυμα

Κωδικός	Ένζυμα	Εταιρεία
KK2601	HiFi Polymerasy	Kapa Biosystems
KK1006	Taq Polymerasy	Kapa Biosystems
1040A	EcoRI	Takara
1037A	PstI	Takara
1085A	SmaI	Takara
1060AH	HindIII	Takara
1010A	BamHI	Takara

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Πίνακας 9 Αντιδραστήρια θρεπτικού υλικού YEP

YEP	Ποσότητα
Yeast Extract	10g
Bacto Peptone	20g
Glucose	20g
Agar	20g
H ₂ O (συνολικός όγκος)	1 L

Πίνακας 10 Αντιδραστήρια θρεπτικού υλικού SC

SC	Ποσότητα
Yeast Nitrogen Base	6,7
Glucose	20g
Synthetic Complete (LUHTA)	2g
Agar	20
H ₂ O (συνολικός όγκος)	1L

Πίνακας 11 Αντιδραστήρια θρεπτικού υλικού LB

LB	Ποσότητα
Tryptone	10g
Yeast extract	5g
NaCl	5g
Agar	20g
1N NaOH	1ml
H ₂ O (συνολικός όγκος)	1L

Πίνακας 12 Αντιδραστήρια θρεπτικού υλικού Synthetic Complete

Synthetic Complete (-U)	Ποσότητα
Ασπαραγίνη (Asparagine):	2g
Γλουταμινικό οξύ (Glutamate):	2g
Λευκίνη (Leucine):	4g

Τυροσίνη (Tyrosine):	2g
Βαλίνη (Valine):	2g
Φαινιλαλανίνη (Phenylalanine):	2g
Ασπαραγινικό οξύ (Aspartate):	2g
Αργινίνη (Arginine):	2g
Αδενίνη (Adenine):	1g
Ισολευκίνη (Isoleucine):	2g
Θρεονίνη (Threonine):	2g
Κυστεΐνη (Cysteine):	2g
Προλίνη (Proline):	2g
Τρυπτοφάνη (Tryptophan):	2g
Λυσίνη (Lysine):	2g
Μεθειονίνη (Methionine):	2g
Γλουταμίνη (Glutamine):	2g
Αλανίνη (Alanine):	2g
Σερίνη (Serine):	2g
Ιστιδίνη (Histidine):	2g
Γλυκίνη (Glycine):	2g

3.2.2 Παρασκευή τριβλίων petri με θρεπτικό υπόστρωμα SC+URA+5-FOA

1. Σε κωνική φιάλη του 1L υπό ανάδευση με μαγνήτη προστίθενται 10 g άγαρ σε 300 ml H₂O στη συνέχεια ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού υλικού.
2. Σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 195 ml H₂O προστίθενται yeast nitrogen base without amino acids 3.35g, glucose 10g, amino Acids mix (w/o uracil) 1.15g, 5-FOA 0.5g.
3. Ακολουθεί θέρμανση του μείγματος με το 5-FOA πάνω σε θερμοαντική πλάκα στους 55-65 °C, μέχρι να διαλυθούν όλα τα συστατικά πλήρως (~ 1 ώρα).

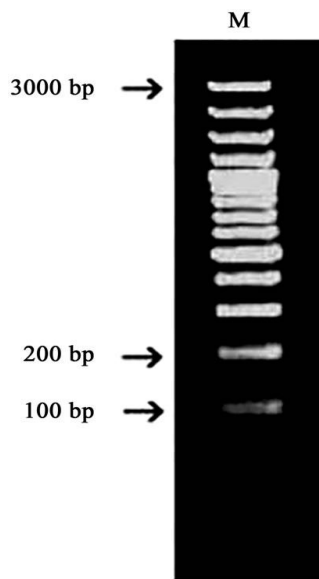
4. Το μείγμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα μέσω φίλτρου πόρου 0,22μm και το φιλτραρισμένο υλικό συλλέγεται και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60 °C.
5. Τοποθέτηση την κωνικής φιάλης με το αποστειρωμένο άγαρ πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και ανάδευση έως ότου η θερμοκρασία του μειωθεί έως τους 65 °C.
6. Προσθήκη του αποστειρωμένου μείγματος 5-FOA καθώς και 5ml από αποστειρωμένο διάλυμα 100X ουρακίλης (2mg/ml). Όλες αυτές οι μεταγγίσεις υγρών στην κωνική γίνονται υπό στείρες συνθήκες.
7. Ακολουθεί μοίρασμα του υλικού σε τριβλία petri.
- 8 Για την παρασκευή υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων δεν προστίθεται άγαρ.

3.2.3 Παρασκευή του μάρτυρα

Πίνακας 13 Αντιδραστήρια παρασκευής μάρτυρα

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
λ DNA (60 μg)	200μl
10 x buffer (M)	40 μl
EcoRI	12 μl
HindIII	16 μl
H ₂ O	132 μl
Σύνολο	400 μl

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2,5-3 ώρες και προσθήκη 140 μl H₂O και 60 μl 10 x loading buffer. Φυλάσσεται στους -20°C.



Πίνακας 14 Μάρτυρας μοριακού βάρους

3.2.4 Παρασκευή TAE 1%

Πίνακας 15 Αντιδραστήρια παρασκευής TAE

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (g, ml)
Trisma base	242g
Glacial acetic acid	57,1 ml
EDTA	18,6g
ΣΥΝΟΛΟ	1000ml

3.2.5 Παρασκευή αγαρόζης

Σε μία κωνική των 250 ml διαλύονται 0,5g αγαρόζης σε 50 ml 1xTAE με βρασμό. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 2,5ml gel red στο διάλυμα. Καλή ανάδευση, και ψύξη κάτω από τη βρύση (να μην στερεοποιηθεί το τζελ) και απόχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθέτηση χτενιού για την δημιουργία πηγαδιών. Αφού το διάλυμα στερεοποιηθεί (περίπου 25 min) είναι έτοιμο για χρήση.

3.2.6 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα ζύμης

1. Λήψη μιας μονήρους αποικίας από τριβλίο petri ή φυγοκέντριση 200μl υγρής καλλιέργειας στα 15.000 xg για 3 min, απομακρύνοντας στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό (O.D.600≈0.4).
2. Επαναδιάλυση κυττάρων σε 100μl διαλύματος (200mM LiOAc, 1% SDS).
3. Επώαση για 5 min στους 70°C.
4. Προσθήκη 300μl απόλυτης Αιθανόλης και ισχυρή ανάδευση (vortex).
5. Φυγοκέντριση του DNA και των κυτταρικών υπολειμμάτων στα 15000xg για 3min.
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 200μl 70% αιθανόλης για έκπλυση ιζήματος.
7. Φυγοκέντριση για 2 min στα 15000xg. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
8. Στέγνωμα ιζήματος για 2 min και στη συνέχεια προσθήκη 100μl H₂O και επαναδιάλυση ιζήματος.
9. Φυγοκέντρωση στα 15000xg για 15 sec ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
10. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και φύλαξη αυτού στους -20°C.
11. 1μl χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR.

3.2.7 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Στην **πρώτη PCR** ως εκμαγείο χρησιμοποιείται πλασμίδιο pUC19-Msn4. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (Forward primer) χρησιμοποιήθηκε το ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει την μετάλλαξη, δηλαδή ο Msn4_Ser531Ala με αλληλουχία 5' AGAAAG**GCG**TCAAGTGTAC 3' . Ως ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer) χρησιμοποιήθηκε το ολιγονουκλεοτίδιο Msn4-Reverse

(Reverse _BamHI), με αλληλουχία 5'
CGGGATCCAAAATCACCGTGCTTTTTGTG 3'.

Στην **δεύτερη PCR** χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμίδιο pUC19-Msn4. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (Forward primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο MSN4_forward, με αλληλουχία 5' **AAACTGCAG**ATGCTAGTCTTCGGACCTAA 3'. Ως ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο Msn4_Ser531Ala_R με αλληλουχία 5' GTAACACTTGAC**CGC**CTTTCT 3' .

Στην **τρίτη PCR** επιδιώχθηκε να γίνει η λήψη ενός προϊόντος ~1600 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το γονίδιο Msn4 το οποίο φέρει τη μετάλλαξη Ser531Ala. Ως εκμαγείο λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα της πρώτης και της δεύτερης PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια που υβριδοποιούνται στα 5' και 3' άκρα του γονιδίου της Msn4 και φέρουν επιπλέον αλληλουχίες 58 νουκλεοτιδίων που είναι ως Forward ο primer Forward MSN4_F 5' **CAGTTCGGCTTTTTTTCTTTTCTTCTTATTA**AAAAACAATATAATGCTAGCTTCGGACCTAA 3' και ως Reverse ο MSN4-R 5' **CCGTAGCTTGTCTTGCTTTTATTTGCTTTTGACCTTATTTTTT**TCAAAAATCACCGTGCTTTTTGTG 3'.

3.2.8 Αντιδράσεις PCR

Για όλες τις PCR που έγιναν η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδοποίησης έγινε με βάση τον σχεδιασμό των εκκινητών ενώ ο χρόνος της επιμήκυνσης του νέο συντιθέμενου DNA, λαμβάνοντας υπόψη το συνοδευτικό φυλλάδιο του προϊόντος (HiFi) το οποίο αναφέρει ότι το ένζυμο έχει την ικανότητα να ενσωματώνει ~2000 βάσεις ανά 1 λεπτό σε συνδυασμό με το μέγεθος του επιθυμητού τμήματος DNA.

- Στην **πρώτη PCR** πραγματοποιήθηκε η αντίδραση:

Οι συνθήκες για την αντίδραση ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα : 3 λεπτά στους 95 °C, 20 δευτερόλεπτα στους 98 °C, 10 δευτερόλεπτα στους 58 °C ,

30 δευτερόλεπτα στους 72 °C (από το 2ο βήμα μέχρι το 4ο έγιναν 30 κύκλοι) , 5 λεπτά στους 72 °C και 4 °C για πάντα.

Πίνακας 16 Αντιδραστήρια πρώτης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA (pUC19-MSN4)	2 µl
Primer F. Msn4_Ser531Ala	1µl
Primer Reverse _BamHI	1 µl
2xKapa HiFi HotStart ReadyMix	12.5 µl
H ₂ O	8.5 µl
Τελικός όγκος	25µl

- Στην **δεύτερη PCR** πραγματοποιήθηκε η αντίδραση :

Οι συνθήκες για την αντίδραση ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα : 3 λεπτά στους 95 °C, 20 δευτερόλεπτα στους 98 °C , 15 δευτερόλεπτα στους 58 °C , 90 δευτερόλεπτα στους 72 °C (από το 2ο βήμα μέχρι το 4ο έγιναν 30 κύκλοι) , 5 λεπτά στους 72 °C και 4 °C για πάντα.

Πίνακας 17 Αντιδραστήρια δεύτερης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA (pUC19-MSN4)	1 µl
Primer F. Msn4_Ser531Ala_R	1.5 µl
Primer Reverse _BamHI	1.5 µl
2xKapa HiFi HotStart ReadyMix	12.5 µl
H ₂ O	8.5 µl
Τελικός όγκος	25 µl

- Στην **τρίτη (η τέταρτη) PCR** πραγματοποιήθηκε η αντίδραση :
Οι συνθήκες για την αντίδραση ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα : 3 λεπτά στους 95 °C, 15 δευτερόλεπτα στους 98 °C , 10 δευτερόλεπτα στους 58 °C , 1 λεπτό στους 72 °C (στο 2ο βήμα και κάνει 5 κύκλοι), 15 δευτερόλεπτα στους 98 °C , 10 δευτερόλεπτα στους 60 °C , 1 λεπτό στους 72 °C (από το 2ο βήμα μέχρι το 4ο έγιναν 25 κύκλοι) , 5 λεπτά στους 72 °C και 4 °C για πάντα. Οι primers σε αυτή την περίπτωση μπαίνουν μετά την ολοκλήρωση του 4ου βήματος.

Πίνακας 18 Αντιδραστήρια τρίτης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA (1η και 2η PCR)	4μl(2μl+2μl αντίστοιχα)
Primer F. Msn4 EGFP	1,5μl
Primer R. Msn4 REVERSE	1,5 μl
2xKapa HiFi HotStart ReadyMix	25 μl
H ₂ O	5.5μl
Τελικός όγκος	25 μl

3.2.9 Ηλεκτροφόρηση νουκλεικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

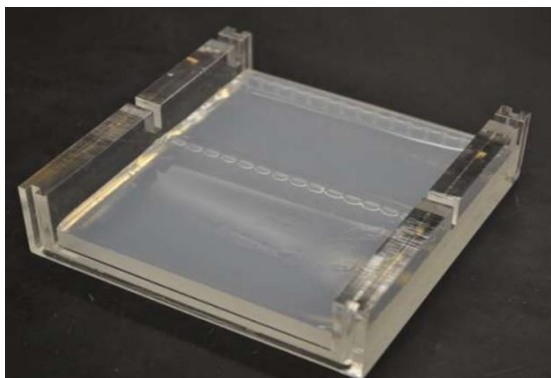
Στις αρχές της δεκαετίας του 70 βρέθηκε ότι το μήκος και η καθαρότητα των μορίων του DNA μπορούσε να προσδιοριστεί σωστά με τις ίδιες μεθόδους ηλεκτροφόρησης σε πηκτές που είχαν αποδειχθεί πολύ χρήσιμες στην ανάλυση πρωτεϊνών. Η διαδικασία είναι στην πραγματικότητα απλούστερη από ότι στις πρωτεΐνες επειδή κάθε νουκλεοτίδιο στα νουκλεικά οξέα περιέχει ένα αρνητικό φορτίο (λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό) οπότε δεν χρειάζεται να προστεθεί το αρνητικά φορτισμένο SDS, που απαιτείται στην περίπτωση των πρωτεϊνών, για να κάνει τα μακρομόρια να κινηθούν ομοιόμορφα προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Για τμήματα DNA μικρότερα από 500 νουκλεοτίδια ειδικά σχεδιασμένες πηκτές πολυακρυλαμιδίου επιτρέπουν σε μόρια που διαφέρουν σε μήκος έως και ένα

νουκλεοτίδιο να διαχωριστούν. Παρόλα αυτά οι πόροι στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου, είναι πολύ μικροί και δεν επιτρέπουν σε πολύ μεγάλα μόρια DNA να περάσουν. Για να διαχωριστούν αυτά κατά μέγεθος, χρησιμοποιούνται οι πολύ πορώδεις πηκτές που σχηματίζονται από αραιά διαλύματα αγαρόζης (ενός πολυσακχαρίτη που απομονώνεται από φύκη). Οι ζώνες του DNA σε πηκτές αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου δε φαίνονται εκτός κι αν το DNA επισημανθεί ή βαφεί με κάποιον τρόπο. Μια ευαίσθητη μέθοδος βαφής του DNA είναι η έκθεσή του στη χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο, που φθορίζει κάτω από φθοριώδες φως UV όταν συνδέεται στο DNA. Μία ακόμα πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης περιλαμβάνει την ενσωμάτωση ενός ραδιοισοτόπου στα μόρια του DNA πριν την ηλεκτροφόρηση. Ο ^{32}P χρησιμοποιείται συχνά μια και μπορεί να ενσωματωθεί στις φωσφορικές ομάδες του DNA και εκπέμπει β σωματίδια που ανιχνεύονται εύκολα με αυτοραδιογραφία. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε gel red. Η διαδικασία είναι η εξής: Απαιτούνται το τροφοδοτικό, η συσκευή και η παρασκευή πηκτής. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με διάλυση κατάλληλης ποσότητας στερεής αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η στερεή αγαρόζη διαλύεται με βρασμό και στη συνέχεια στερεοποιείται αφού γίνει απόχυση σε ειδική φόρμα σχηματισμού όπου στερεοποιείται και μετατρέπεται σε ένα πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Πριν στερεοποιηθεί προστίθεται κατάλληλη ποσότητα gel red. Κατά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα εβαπτίζεται σε μία συσκευή η οποία περιέχει ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια στα δείγματα DNA προστίθεται κατάλληλη ποσότητα loading buffer και φορτώνονται σε ειδικές εσοχές που έχουν δημιουργηθεί στο πήκτωμα, πριν αυτό στερεοποιηθεί με την τοποθέτηση ενός κατάλληλου χτενιού. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο οπότε καθώς το DNA είναι μόριο αρνητικά φορτισμένο μετακινείται προς από τον θετικό στον αρνητικό πόλο. Πολλοί είναι οι παράγοντες επηρεάζουν το ρυθμό της μετανάστευσης του DNA. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου, το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος (συγκέντρωση αγαρόζης) και το μέγεθος των μορίων του DNA. Μικρά μόρια DNA μεταναστεύουν ταχύτερα στους πόρους του πηκτώματος

τα μεγαλύτερα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που επιλέγεται για την ανάλυση κατά την ηλεκτροφόρηση εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να αναλυθούν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0.4-1.2 w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρότερων μορίων DNA. Τα μόρια DNA δεν είναι ορατά στο πήκτωμα αγαρόζης και γίνονται με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το EtBr παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και μετά την έκθεσή του στο υπεριώδες φως φθορίζει. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε μια συσκευή που εκτίθεται στο UV. Ο φθορισμός που παράγεται ανιχνεύεται με κατάλληλη συσκευή απεικόνισης που αποθηκεύει την εικόνα του πηκτώματος. Μάρτυρες Μοριακού Βάρους πρέπει πάντα να συμπεριλαμβάνονται μαζί με τα δείγματα για την εκτίμηση του αποτελέσματος (5).



Εικόνα 10 Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 11 Πήκτωμα αγαρόζης

3.2.10 Μετασχηματισμός

Μετασχηματισμός ονομάζεται η πρόσληψη από μικροοργανισμούς (δέκτες), τμημάτων DNA που προέρχονται είτε από άλλους μικροοργανισμούς (δότες) είτε από τμήματα DNA που έχουν παραχθεί *in Vitro*. Τα τμήματα DNA που προσλαμβάνονται ενσωματώνονται στις ομόλογες περιοχές του χρωμοσώματος του δέκτη. Η διαδικασία σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει

- Πρόσληψη από το βακτήριο δέκτη ενός μικρού κομματιού δίκλωνου DNA που προέρχεται από το βακτήριο δότη.
- Μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο μέσα στο δέκτη.
- Άνοιγμα της ομόλογης περιοχής στο χρωμόσωμα του δέκτη και την ενσωμάτωση του μονόκλωνου DNA στη θέση αυτή με επιχιασμό.
- Αποικοδόμηση του μονόκλωνου κομματιού DNA του δέκτη που αποκόπτεται.

Με το σύστημα μεταφοράς γενετικού υλικού μπορεί να μεταφερθεί οποιοδήποτε τμήμα DNA του δότη (6).

3.2.11 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

- Εμβολιασμός 50ml καλλιέργειας ζύμης αργά το απόγευμα (για 5 μετασχηματισμούς).
- Επόμενο πρωί όταν $OD_{600}=0.4-0.6 \sim 10^7 \text{cells/ml}-5 \cdot 10^8 \text{cells/ml}$ φυγοκέντριση σε 6000 rpm για 5min στους 4 °C.
- Επαναδιάλυση σε 1ml 10mM LiOAc (Οξικό Λίθιο), στον πάγο.
- Επαναδιάλυση σε 25 ml αποστειρωμένο H₂O και φυγοκέντριση στους 4 °C.
- Μεταφορά σε erpendorf.
- Φυγοκέντριση στις 4000rpm 30sec-1min στους 4 °C.
- Επαναδιάλυση 100mM LiOAc Τελικός όγκος=500μl (κύτταρα +διάλυμα).
- Μοίρασμα σε 5 erpendorfs (100μl).
- Σύντομη φυγοκέντριση (4-5 sec).

- Επαναδιάλυση ιζήματος σε:
 - 240 μl PEG(4000) 50%,
 - 36μl 1MLiOAc,
 - 10μl carrier DNA (10 μg/μl),
 - 74μlH₂O+DNA (0.1-1μg).
- Vortex 1'.
- Επώαση στους 30 °C για 30 min.
- Επώαση στους 42 °C για 15min.
- Φυγοκέντριση στις 2000rpm για 1min.
- Προσθήκη 200μl αποστειρωμένου H₂O και ήπια επαναδιάλυση.
- Τοποθέτηση επί κατάλληλου στερεού θρεπτικού μέσου.

3.2.12 Plasmid DNA purification, User manual NucleoSpin Plasmid (NoLid) protocols

3.2.12.1 Isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli

- Συλλέγονται 1-5ml μίας πλήρους καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* σε θρεπτικό μέσο LB με φυγοκέντριση στα 11.000xg για 30s. και πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 250μl ρυθμιστικού διαλύματος A1. και πλήρης επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος με ανάδευση (vortex) ή με χρήση της πιπέτας.
- Προσθήκη 250μl ρυθμιστικού διαλύματος A2. Ήπια ανάμιξη με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου έως 5 λεπτά ή μέχρι το λύμα να γίνει διαυγές.
- Προσθήκη 300μl ρυθμιστικού διαλύματος A3. Πολύ καλή ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές. Όχι βίαιες κινήσεις να μην ξεφύγει το γνωμικό DNA.
- Φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 11.000 xg σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά υπερκειμένου στη στήλη NucleoSpin Plasmid.

- Φυγοκέντριση για 1 λεπτό στα 11.000 xg . Απόρριψη διηθήματος και επανάληψη αυτού του βήματος, εάν απαιτείται, για το υπόλοιπο του προϊόντος λύσης.
- Προσθήκη 600μl ρυθμιστικού διαλύματος A4 και φυγοκέντριση για 1 λεπτό στα 11.000 xg. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200μl διαλύματος A4.
- Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 11.000 xg για πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος A4.
- Έκλυση DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (erpendorf) των 1,5ml. Προσθήκη 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος AE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 1 λεπτό. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στα 11.000 x g.

3.2.13 PCR clean-up, Gel extraction, User manual NucleoSpin GEL and PCR Clean-up

3.2.13.1 PCR clean- up

- Αν ο όγκος της αντίδρασης είναι μικρότερος των 100μl απαιτείται η προσθήκη απιονισμένου H₂O έως όγκου 100μl. Προσθήκη στο δείγμα διπλάσιου όγκου διαλύματος NT1. (100μl δείγμα 200μl NT1)
- Τοποθέτηση του δείγματος εντός των στηλών και φυγοκέντριση για 30 s στις 11,000 x g. Απόρριψη διηθήματος διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να διηθηθεί όλος ο όγκος του δείγματος.
- Προσθήκη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκέντριση για 30 s στις 11,000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200μl διαλύματος NT3.
- Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 11.000 xg για πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
- Έκλυση του DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (erpendorf) των 1,5ml. Προσθήκη 15-30 μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 1 λεπτό. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στα 11.000 x g

3.2.13.2 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

- Αποκοπή τμήματος πηκτώματος που περιέχει το DNA καθορισμός του βάρους του τμήματος της πηκτής και μεταφορά σε καθαρό erpendorf. Για κάθε 100 mg πηκτώματος αγαρόζης < 2 % και 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT1. Ακολουθεί επώαση δείγματος για 5-10 λεπτά στους 50°C. Ανακίνηση δείγματος με vortex κάθε 2-3 λεπτά μέχρι το τμήμα του πηκτώματος να διαλυθεί πλήρως.
- Τοποθέτηση του δείγματος εντός των στηλών και φυγοκέντρωση για 30 s στις 11,000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να διηθηθεί όλος ο όγκος του δείγματος.
- Προσθήκη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκέντρωση για 30 s στις 11,000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200 μl διαλύματος NT3.
- Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 11.000 xg για πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
- Έκλυση DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγόκεντρου (erpendorf) των 1,5ml. Προσθήκη 15-30 μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 1 λεπτό. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στα 11.000 x g.

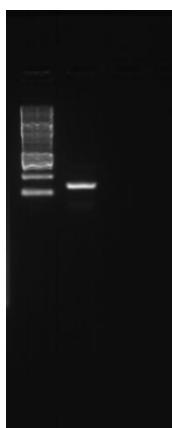
3.2.14 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης.

Θρεπτικό μέσο που περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης ή αιθανόλης εμβολιάζεται με υπό ανάπτυξη κύτταρα ζύμης έτσι ώστε η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm των δειγμάτων να έχει τιμή περίπου 0,005. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιούνται κύτταρα αγρίου τύπου (W303-1a) και κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη Ser531Ala της πρωτεΐνης msn4 (W303-1a_MSN4_Ser531Ala). Η ανάπτυξη των καλλιεργειών εκτιμάται με τη λήψη δείγματος που λαμβάνεται σε καθορισμένη χρονική στιγμή από το χρόνο εμβολιασμού και φωτομετρείται σε μήκος κύματος 600 nm.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

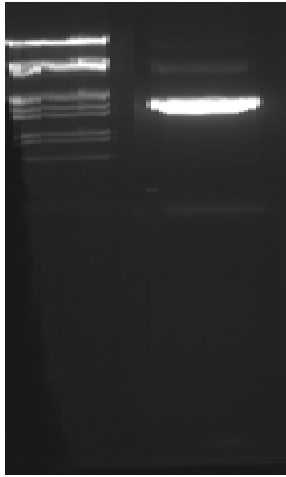
4.1 Μετάλλαξη του γονιδίου Msn4 μέσω τριών διαδοχικών PCR (PCR Site-Directed mutagenesis)

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση της 1^{ης} PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% TAE, του πηκτώματος στο ίχνος του DNA τμήματος και καθαρισμός με την διαδικασία του Gel extraction και PCR Clean up kit, ξανά ηλεκτροφόρηση και φωτογράφιση με ακτίνες UV. Το αποτέλεσμα της 1^{ης} PCR είναι ένα προϊόν ~ 1600 ζεύγη βάσεων του γονιδίου Msn4 (ισάριθμο ως προς τον αριθμό των βάσεων) αλλά με διαφορά ως προς την αλληλουχία των βάσεων, δηλαδή αλλαγή ως προς την τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ Ser που βρίσκεται στο άκρο της τριπλέτας βάσεων που πλέον κωδικοποιεί το αμινοξύ Ala στο άκρο 3'.



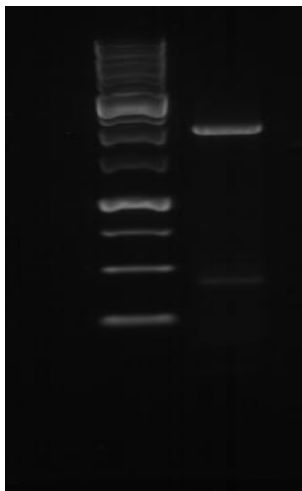
Εικόνα 12 Πρώτη PCR

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση της 2^{ης} PCR ακολούθησε καθαρισμός με την διαδικασία Gel extraction και PCR Clean up kit, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% TAE και φωτογράφιση με ακτίνες UV. Το αποτέλεσμα της 2^{ης} PCR είναι ένα μικρό τμήμα DNA αντιπαράλληλο ως προς τον εκκινητή Msn4_531Ala άκρο 5'.



Εικόνα 13 Δεύτερη PCR

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση της 3^{ης} PCR ακολούθησε καθαρισμός με την διαδικασία Gel extraction και PCR Clean up kit, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% TAE και φωτογράφιση με ακτίνες UV. Το προϊόν αυτής της PCR είναι το Msn4-531, το οποίο φέρει την μετάλλαξη Ser-531-Ala. Επίσης οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν φέρουν αλληλουχίες 40 νουκλεοτιδίων ανοδικά και καθοδικά οι οποίες είναι ίδιες με αυτές που υπάρχουν στο γενωμικό DNA της ζύμης στη θέση όπου φυσιολογικά βρίσκεται το Msn4 γονίδιο.



Εικόνα 14 Τρίτη PCR

4.2 Η εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης με PCR στον ζαχαρομύκητα *S. cerevisiae*

Στο στέλεχος W303-1a, το γονίδιο URA3 έχει απενεργοποιηθεί, ως αποτέλεσμα το συγκεκριμένο στέλεχος να μην έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης ουρακίλης, οπότε και να μην μπορεί να αναπτυχθεί απουσία αυτής. Το στέλεχος αυτό έχει προέλθει από το στέλεχος W303-1a στο οποίο το αγρίου τύπου γονίδιο της Msn4 έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο URA3. Στη συνέχεια, το γονίδιο MSN-531 χρησιμοποιείται για να αντικατασταθεί το URA3 γονίδιο στο στέλεχος ΔMSN4::URA3, μέσω της διαδικασίας του ομόλογου ανασυνδυασμού. Αρχικά τα κύτταρα στρώθηκαν σε τριβλία με YEP που είναι ένα πλούσιο και πλήρες θρεπτικό υλικό προκειμένου να μπορέσει να δοθεί η δυνατότητα στα μετασχηματισμένα κύτταρα να επιτελέσουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Ακολούθως η επιλογή των κυττάρων όπου έχει τελεσθεί η αντικατάσταση του URA3 από το MSN4-531 γίνεται με την επίστρωσή τους σε τριβλία με θρεπτικό υλικό SC+URA+5FOA. Συγκεκριμένα ως υπόστρωμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο URA3 είναι το αντιδραστήριο 5-φθορο-οροτικό οξύ (5-Fluoro-Orotic Acid (5-FOA)). Η δράση αυτής της πρωτεΐνης ura3 επί του 5-FOA έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της 5-φθορο-ουρακίλης (5-Fluoro-Uracil (5-FU)) η οποία είναι τοξική για τα κύτταρα του ζαχαρομύκητα και έχει ως αποτέλεσμα την θανάτωσή τους. Η παρουσία λοιπόν του 5-FOA στο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης επιλογής των κυττάρων στα οποία έχει γίνει με επιτυχία ο ομόλογος ανασυνδυασμός και η αντικατάσταση του URA3 από τη μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου στόχου, αφού μόνο αυτά τα κύτταρα που δεν φέρουν το URA3 κατάφεραν να επιβιώσουν. Στη συνέχεια ακολούθησε η συλλογή των δύο αποικιών του ζαχαρομύκητα και εμβολιασμός με υπόστρωμα YEP. Ακολούθησε η απομόνωση του γενωμικού DNA με το υποψήφιο μεταλλαγμένο γενετικό υλικό και τέλος έγινε ο έλεγχος της επιτυχίας του ομόλογου ανασυνδυασμού με PCR, δείγμα ελέγχου ως θετικώς μάρτυρας. Στην συγκεκριμένη PCR ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA που προήλθε από το στέλεχος w303-1a στο οποίο υπάρχει το Msn4.

4.3 Έλεγχος του μεταλλαγμένου στελέχους

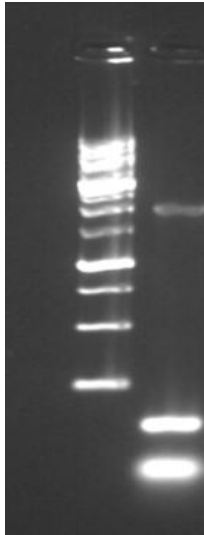
Προκειμένου να ελεγχθεί η ορθότητα του στελέχους που αναπτύχθηκε επί του θρεπτικού μέσου παρουσία του 5-FOA, ακολούθησε απομόνωση του γενομικού DNA και εν συνεχεία έλεγχος με αντίδραση PCR (πίν. 19).

Οι συνθήκες για την αντίδραση ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα : 2 λεπτά στους 95 °C, 30 δευτερόλεπτα στους 95 °C , 30 δευτερόλεπτα στους 56 °C , 2 λεπτά και 10 δευτερόλεπτα στους 72 °C (από το 2ο βήμα μέχρι το 4ο έγιναν 30 κύκλοι) , 2 λεπτά στους 72 °C και 4 °C για πάντα.

Πίνακας 19 Αντιδραστήρια ελέγχου PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA (pUC19-MSN4)μεταλλαγμένο	2 μl
Primer F. MSN4_PstI_F	0.8 μl
Primer R. MSN4_BamHI_R	0.8 μl
Taq Mix	10 μl
H ₂ O	6.4 μl
Τελικός όγκος	20 μl

Το προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μέγεθος ~1950 ζευγών βάσεων (εικ. 15). Η ανάπτυξη αυτού του τμήματος DNA υποδηλώνει την επιτυχή είσοδο της μεταλλαγμένης μορφής του MSN4 γονιδίου στο στέλεχος W303-1a-ΔMSN4::URA3, από το οποίο απουσιάζει το γονίδιο MSN4.



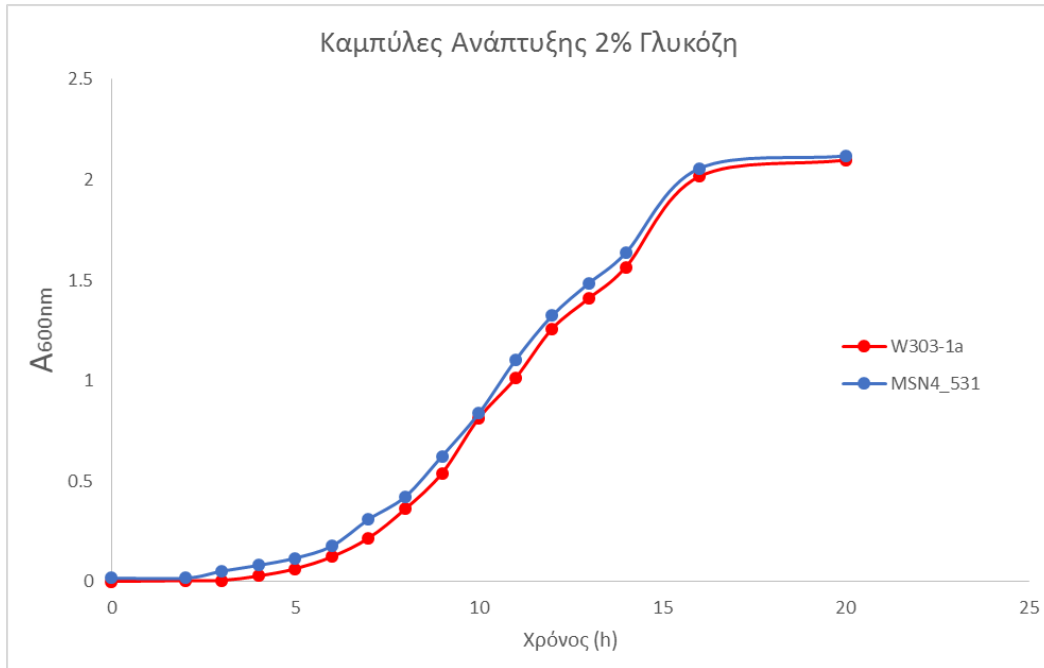
Εικόνα 15 Προϊόν PCR από γενομικό DNA που έχει προέλθει από μετασχηματισμένα κύτταρων ζύμης W303-1a-ΔMSN4::URA3.

4.4 Καμπύλες ανάπτυξης ζαχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

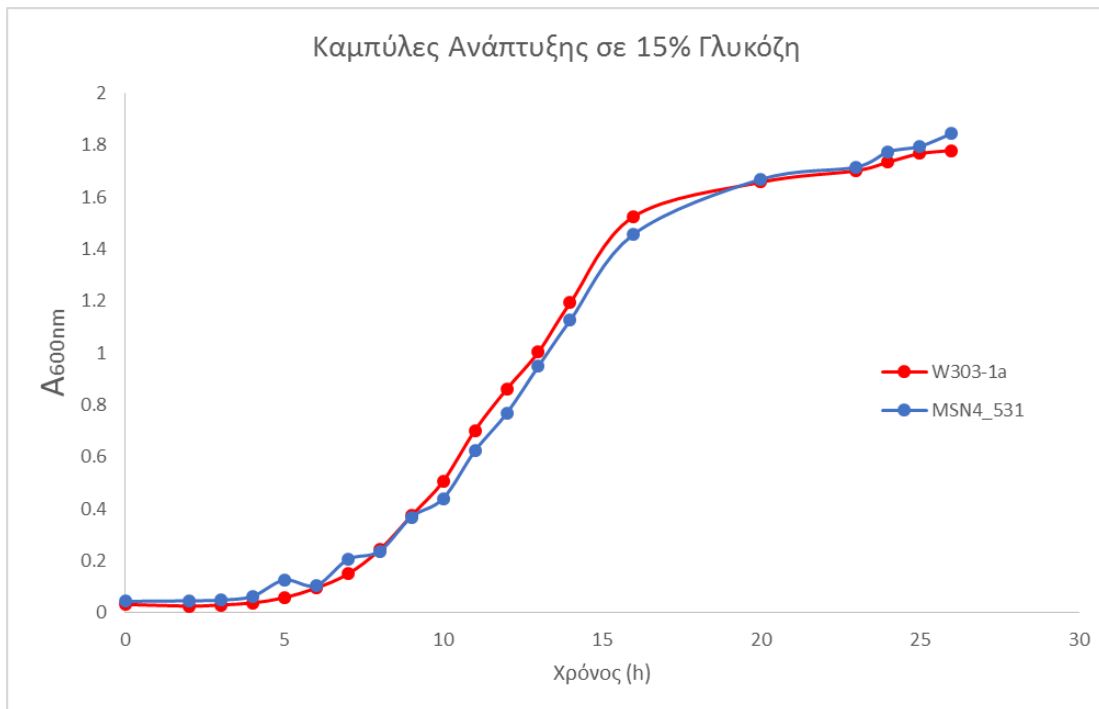
Προκειμένου να γίνει μια πρωταρχική μελέτη του στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a_Msn4_531), μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξής τους σε διάφορες συνθήκες συγκρίνοντας τη με αυτή των αγρίου τύπου κυττάρων.

4.4.1 Επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων.

Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο προσομοιάζει το περιβάλλον στο οποίο ο ζυμομύκητας καλείται να ξεκινήσει την ζύμωση, βρισκόμενος ουσιαστικά σε κατάσταση ωσμωτικού στρες. Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (εικ.16,17). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser531Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του σε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης.



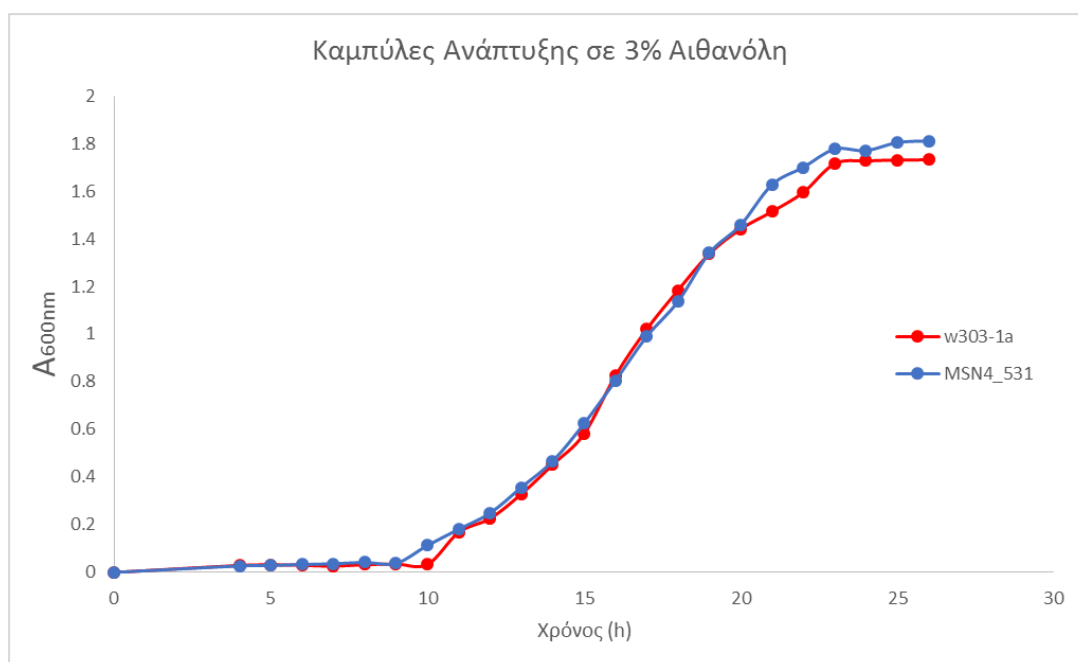
Εικόνα 16 Καμπύλη ανάπτυξης του ζαχαρομύκητα W303-1a_Msn4_531 σε 2% w/v γλυκόζη



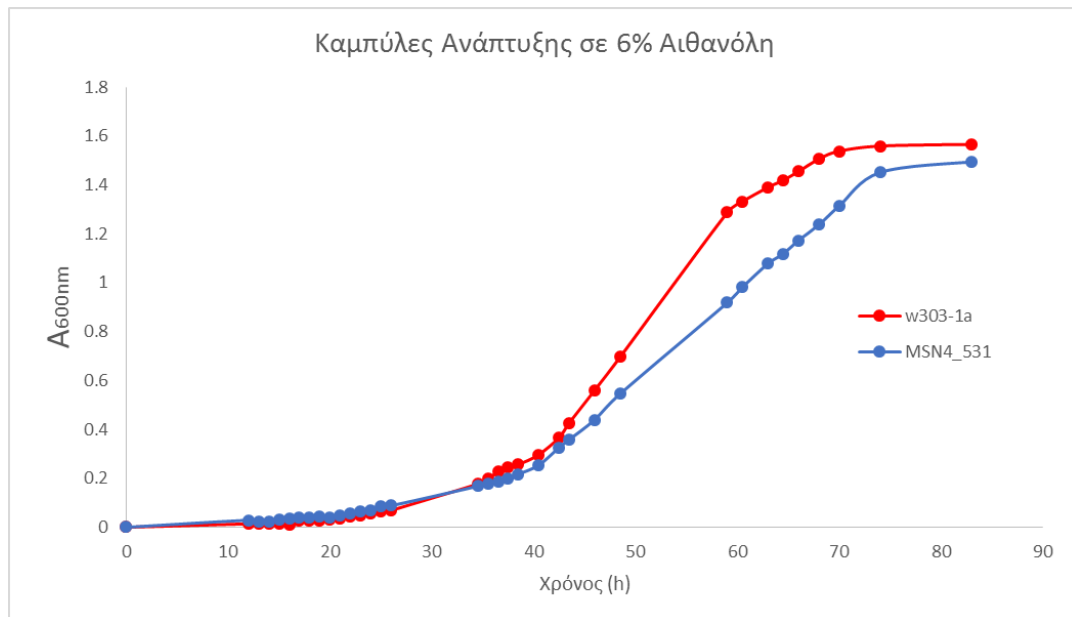
Εικόνα 17 Καμπύλη ανάπτυξης του ζαχαρομύκητα W303-1a_Msn4_531 σε 15% w/v γλυκόζη

4.4.2 Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων.

Η παρουσία της αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο προσομοιάζει το περιβάλλον στο οποίο ο ζυμομύκητας λειτουργεί εφόσον έχει ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση. Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (εικ.18, 19). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser531Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του παρουσία αιθανόλης. Αυτό το οποίο παρατηρείται είναι μια μικρή καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μεταλλαγμένου στελέχους, όπως αυτό φαίνεται από την κλίση της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης των κυττάρων.



Εικόνα 18 Καμπύλη ανάπτυξης του ζαχαρομύκητα W303-1a_Msn4_531 σε 3% v/v αιθανόλη



Εικόνα 19 Καμπύλη ανάπτυξης του ζαχαρομύκητα W303-1a_Msn4_531 σε 6 % v/v αιθανόλη.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η κατασκευή του γενετικώς τροποποιημένου στελέχους W303-1a_MSN4_531 γονιδίου που φέρει τη μετάλλαξη Ser531Ala. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η εισαγωγή της μετάλλαξης ήταν η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω PCR (site-directed mutagenesis). Το στέλεχος αυτό δημιουργήθηκε με την εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου στο ζυμομύκητα με τον μετασχηματισμό κυττάρων από τα οποία είχε αφαιρεθεί το αγρίου τύπου γονίδιο MSN4 και αντικαταστάθηκε μέσω της διαδικασίας του ομόλογου ανασυνδυασμού στα κύτταρα ζύμης. Ακολούθησε μια πρωταρχική μελέτη της απόκρισης του συγκεκριμένου στελέχους, συγκρίνοντάς το με το στέλεχος που φέρει το φυσιολογικό γονίδιο της πρωτεΐνης Msn4. Από τα αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης φάνηκε ότι η μετάλλαξη Ser531Ala, δεν επηρεάζει την ικανότητα ανάπτυξης του ζυμομύκητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης ενώ βρίσκεται σε κατάσταση ωσμωτικού στρες. Αντιθέτως, σε αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης (6% v/v), παρατηρείται μια μικρή μεταβολή καθυστέρηση στην ανάπτυξη των κυττάρων που φέρουν τη μετάλλαξη. Μελλοντικά, απαιτείται διερεύνηση τόσο της ικανότητας επιβίωσης των κυττάρων σε αντίξοες συνθήκες όσο και η αποκάλυψη πιθανών διαφορών σε μεταγραφικό επίπεδο έτσι ώστε να καταδειχθεί η επίδραση της εν λόγω μετάλλαξης στην απόκριση της ζύμης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- There are no sources in the current document.**
1. Αγγελής Γεώργιος, Μικροβιολογία και μικροβιακή τεχνολογία, εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα 2007
 2. Παπαναστασοπούλου Μ. , Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, Περιγραφή της μεθόδου και εφαρμογή της στην ανίχνευση ιών, Δελτίον Ελλ. Κτην.Εταιρείας 1997 48(2): 61-69
 3. Μπατρινού Μ. Ανθυμία ,Σύγχρονη Βιοτεχνολογία : Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, εκδόσεις Πασχαλίδης, 2011.
 4. Μπαλατσούρης Γιώργος, Μικροβιολογία Τροφίμων, εκδόσεις Σταμούλης , 2007.
 5. Κυριακίδη Α. Δ. Βιοτεχνολογία, εκδόσεις Τήτη, Θεσσαλονίκη 2000
 6. Χατζηαντωνίου- Αλεξανδρινή Ε. , Βιολογία: Η μελέτη της ζωής , β΄ έκδοση,εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα 2004.
 7. Πολίτη Κατερίνας Β., Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του pH στην καταλυτική δραστηριότητα εμπορικών στελεχών ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*2012..
 8. Serra A., Strehaiano P., Taillandier P., International Journal of Food Microbiology, 104, 257-265, (2005) 31. Cooney C. L., Growth of microorganism, in: Biotechnology, Rehm H.J., Reed G., Eds., Verlag Chemie, Weinheim, 163-203, 1983.
 - 9.Cooney C. L., Growth of microorganism, in: Biotechnology, Rehm H.J., Reed G., Eds., Verlag Chemie, Weinheim, 163-203, 1983.
 - 10.Krebs EG, Beavo JA “Phosphorylation/dephosphorylation of enzymes”. Annu. Rev. Biochem. 48: 923–59. doi:10.1146/annurev.bi.48.070179.004423. PMID38740, 1979
 - 11.Codruta Ignea, Marianna Pontini,, Massimo E. Maffei, Antonios M. Makris, and Sotirios C. Kampranis, Engineering Monoterpene Production in Yeast Using a Synthetic Dominant Negative Geranyl Diphosphate Synthase
 12. Sotirios C. Kampranis a, Antonios M. Makris, Developing a yeast cell factory for the production of terpenoids, Volume No: 3, Issue: 4, October 2012
 - 13.Menggen Ma & Z. Lewis Liu, Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl Microbiol Biotechnol (2010) 87:829–845 DOI 10.1007/s00253-010-2594-3
 14. Wolfram Gormer, Erich Durchschlag , Julia Wolf et ,Acute glycose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. The EMBO Journal Vol, 21Nos1& 2pp.135-144

15. Y. Kyogoku and K. Ouchi, Isolation of a Cold-Sensitive Fermentation Mutant of a Baker's Yeast Strain and Its Use in a Refrigerated Dough Process, Received 15 August 1994/Accepted 21 November 1994
16. Kyung Man You,† Claire-Lise Rosenfield, and Douglas C. Knipple, Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content, Received 26 July 2002/Accepted 19 November 2002
17. Russell Higuchi, Barbara Krummell and Randall K.Saiki, A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, Received May 19, 1988; Revised and Accepted July 8, 1988
18. Carlos CASADO, Asier GONZ'ALEZ, Maria PLATARA, Amparo RUIZ1 and Joaquín ARIN, The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast, *Biochem.J.*(2011)438,523–533(Printed in Great Britain).
19. Menggen Ma^{1,2} and Lewis Z Liu, Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, Ma and Liu *BMC Microbiology* 2010.