

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«Καλλιέργεια του μικροφύκου *Jaagichlorella luteoviridis* σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας για την παραγωγή αμινοξέων που ομοιάζουν με μυκοσπορίνες»

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας (Α.Μ.)

Παπακώστα Ελευθερία (02501)

Επιβλέπων Καθηγητής

Μαδέσης Παναγιώτης

Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Βόλος, 2024

**«Καλλιέργεια του μικροφύκου *Jaagichlorella luteoviridis* σε συνθήκες αυξημένης
αλατότητας για την παραγωγή αμινοξέων που ομοιάζουν με μυκοσπορίνες»**
**«*Jaagichlorella luteoviridis* microalgae growth under elevated salinity conditions for
the production of mycosporine-like amino acids»**

Η εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Μαδέσης Παναγιώτης, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Λεβίζου Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών

Κατσούλας Νικόλαος, Καθηγητής Γεωργικών Κατασκευών-Θερμοκηπίων

Υπεύθυνη δήλωση:

«Πιστοποιώ ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής διατριβής που εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος ».

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μαδέση Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας, που μου έδωσε την ευκαιρία να διευρύνω τους ορίζοντες μου στον κλάδο της Μοριακής Βιολογίας και να εξοικειωθώ με πολλές τεχνικές, μεθόδους, πρωτόκολλα του εργαστηρίου. Επίσης, τον ευχαριστώ για την προθυμία που διέθετε ως προς την επεξήγηση αποριών που προέκυπταν κατά την πραγματοποίηση του πειράματος. Ένα σπουδαίο ρόλο στη διεκπεραίωση της παρούσας πτυχιακής κατείχε η κ. Τσίντζου Γεωργία, η οποία είναι Χημικός και Υποψήφια Διδάκτορας του Τμήματος, την οποία ευχαριστώ ολόψυχα για την υπομονή, επιμονή και για την απεριόριστη βοήθεια που μου προσέφερε, ώστε να καταφέρω να βγάλω εις πέρας τις δυσκολίες του πειράματος. Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την δεσποινίς Αθανασίου Άρτεμις, απόφοιτη και υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος, για την μοναδική συμβολή της στην διεκπεραίωση της πτυχιακής εργασίας μου. Η διατριβή αυτή είναι αφιερωμένη στους γονείς μου, Δημήτρη και Νεκταρία, καθώς και στα αδέρφια μου Φαίη, Γιώργο και Μυρτώ, για την απεριόριστη στήριξη τους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ το αγόρι μου, Δημήτρη, για την υπομονή που έδειξε τόσο καιρό και την στήριξη που μου προσέφερε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φύκη αποτελούν μια μεγάλη ομάδα μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών που έχουν την δυνατότητα να φωτοσυνθέτουν. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα μακροφύκη και τα μικροφύκη. Τα μικροφύκη έχουν μελετηθεί διεξοδικά και έχουν αποσπάσει το ενδιαφέρον από πολλούς ερευνητές, καθώς έχουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς, όπως είναι η χρήση τους για παραγωγή βιοκαυσίμων, ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης κ.λπ. Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκε ένα είδος μικροφύκους γλυκού νερού, το είδος *Jaagichlorella luteoviridis*. Το συγκεκριμένο μικροφύκος αναπτύχθηκε, στη συνέχεια υποβλήθηκε σε καταπόνηση αλατότητας και ελέγχθηκε η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που το βοηθούν να επιβιώσει από τη συγκεκριμένη καταπόνηση. Στόχος ήταν να μελετηθεί η ανάπτυξη του μικροφύκους κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας και να ελεγχθεί η έκφραση των γονιδίων που διεγείρουν την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών, με την χρήση 5 διαφορετικών ζευγών εκκινητών. Αρχικά, απομονώθηκε το RNA του συγκεκριμένου μικροφύκους, το RNA καθαρίστηκε με την βοήθεια του πρωτοκόλλου DNase I, ακολούθησε η κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης και πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης με 5 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν σε διαφορετικά γονίδια. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών, πιθανόν αμινοξέων που ομοιάζουν με μυκοσπορίνη (MAA), στο τέλος του οποίου, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομέτρηση UV-Vis που κατέληγε στο γεγονός ότι η υποβολή του μικροφύκους σε καταπόνηση αλατότητας επάγει την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πιθανόν MAA. Τελικά, από τα 5 ζεύγη εκκινητών, μόνο στα δύο αποδείχθηκε ότι τα γονίδια υπερεκφράζονται.

Λέξεις κλειδιά: απομόνωση RNA, cDNA βιβλιοθήκη, δευτερογενείς μεταβολίτες, MAA, PCR, φασματοφωτομέτρηση UV-Vis.

ABSTRACT

Algae are a large group of unicellular or multicellular organisms that have the ability to photosynthesize. They are divided into two major categories, macroalgae and microalgae. Microalgae have been thoroughly studied and attracted the interest of many researchers, as they have applications in various fields, such as their use for biofuel production, as an alternative source of protein, etc. In this thesis, a species of freshwater microalgae, the species *Jaagichlorella luteoviridis*, was studied. This particular microalga was grown, then subjected to salinity stress, and the production of secondary metabolites that help it survive this stress was tested. The aim was to study the growth of microalgae under conditions of increased salinity and to control the expression of genes that stimulate the production of secondary metabolites, using 5 different primer pairs. In addition, the protocol for the extraction of secondary metabolites, possibly mycosporin-like amino acids (MAA), was carried out, at the end of which, UV-Vis spectrophotometry was carried out, concluding that subjecting the microalga to salinity stress induces the production of secondary metabolites, possibly MAA. First, the RNA of the specific microalgae was isolated, the RNA was purified using the DNase I protocol, followed by the construction of a cDNA library and the Polymerase Chain Reaction method was performed with 5 different pairs of primers targeting different genes. Finally, of the 5 primer pairs, only in two of the primers, genes were shown to be overexpressed.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΦΥΚΗ.....	1
1.1.1 ΜΑΚΡΟΦΥΚΗ-ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....	1
1.1.2 <i>Jaagichlorella luteoviridis</i>	4
1.2 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ ΣΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ.....	5
1.3 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	6
1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	7
1.4.1 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ.....	7
1.4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ	8
1.4.3 cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ.....	8
1.4.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	10
1.4.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	11
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ-ΥΛΙΚΑ	13
2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	18
2.2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ	18
2.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ	21
2.2.3 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ ΣΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ.....	22
2.2.4 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ.....	22
2.2.5 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ (ΜΑΑ)	24
2.2.6 ΛΕΙΟΤΡΙΒΗΣΗ (ΥΓΡΟ ΑΖΩΤΟ).....	25
2.2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	26
2.2.8 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ	30
2.2.9 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	31
2.2.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	45

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47
5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια-Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανακαλλιέργεια του μικροφύκου	13
Πίνακας 2. Αντιδραστήρια-Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της φασματοφωτομέτρησης.	13
Πίνακας 3. Αντιδραστήρια- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της λειοτρίβησης.	14
Πίνακας 4. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.	14
Πίνακας 5. Αντιδραστήρια-Όργανα- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)	15
Πίνακας 6. Αντιδραστήρια- Όργανα- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πρωτόκολλο DNase I.	16
Πίνακας 7. Αντιδραστήρια-Όργανα- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση της cDNA βιβλιοθήκης.	16
Πίνακας 8. Αντιδραστήρια-Όργανα -Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA.	17
Πίνακας 9. Αντιδραστήρια-Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών (MAA).	17
Πίνακας 10. Απεικόνιση ονομασίας εκκινητών και τα αντίστοιχα T_M τους.	31
Πίνακας 11. Απεικόνιση γονιδίων που πολλαπλασιάζει κάθε ζεύγος εκκινητών.	31
Πίνακας 12. Αλληλουχίες των Reverse και Forward εκκινητών των 5 ζευγών.	32
Πίνακας 13. Οι ποσότητες κάθε αντιδραστηρίου για την παρασκευή του MasterMix. .	33
Πίνακας 14. Συνθήκες που απαιτούνται για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR εκκινητών με $T_M=56^{\circ}\text{C}$ (1 ^ο ζεύγος, 2 ^ο ζεύγος, 4 ^ο και 5 ^ο ζεύγος).	34

Πίνακας 15. Πίνακας ανάπτυξης βιομάζας. Αναγράφονται οι τιμές της οπτικής πυκνότητας (OD) των 6 κωνικών από την ημέρα 0(ημέρα εμβολιασμού) μέχρι την ημέρα 65.....	37
Πίνακας 16. Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης της βιομάζας του μικροφύκου σε 65 ημέρες.	38
Πίνακας 17. Απεικόνιση απορροφήσεων από την φασματοφωτομέτρηση UV-Vis του δείγματος που υποβλήθηκε σε καταπόνηση αλατότητας σε εύρος μήκους κύματος 300-400 nm.	41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Υποθαλάσσια δάση από Φαιοφύκη στον Ατλαντικό ωκεανό (ΕΛ.Φ.Ε, 2008). 1	
Εικόνα 2. Τα α,β,γ,ε,ζ,η,ι,κ,λ αποτελούν χλωροφύκη, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο (Figuerola-Torres, 2020).	3
Εικόνα 3. Ταξινόμηση του είδους Jaagichlorella luteoviridis (Neustupa, 2009).	4
Εικόνα 4. Κύτταρα στελέχους Jaagichlorella luteoviridis (Figuerola-Torres, 2020).	4
Εικόνα 5. Οι γενικές δομές των μυκοσπορινών και των ΜΑΑ.	6
Εικόνα 6. Eppendorf tubes σε διαφορετικό χρόνο φυγοκέντρωσης και διαφορετικό αριθμό σωματιδίων που έχουν καθιζάνει (Majekodunmi, 2015).	7
Εικόνα 7. Απεικόνιση σύνθεσης cDNA δεύτερου κλώνου (Harbers, 2007)	9
Εικόνα 8. Απεικόνιση της τεχνικής PCR (ERLICH, 1989).	11
Εικόνα 9. Προετοιμασία ενός πηκτώματος αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση (Giannakouris, 2015).	12
Εικόνα 10. Εμβολιασμός μικροφύκου Jaagichlorella luteoviridis σε θρεπτικό υπόστρωμα BG11 TE. Ημερομηνία εμβολιασμού 7/11/2023.	19
Εικόνα 11. Κωνικές Control 1,2,3 από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα.	20
Εικόνα 12. Κωνικές 4,5,6, από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα, που προορίζονται για καταπόνηση αλατότητας.	20
Εικόνα 13. Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας OD.	21
Εικόνα 14. Κωνική που έχει υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας.	22

Εικόνα 15. Μπουκάλι Falcon ύστερα από φυγοκέντρωση. Παρατηρείται το ίζημα και το υπερκείμενο διάλυμα.	23
Εικόνα 16. Απεικόνιση φυγοκέντρου με 4 μπουκάλια falcon που περιέχουν μικροφύκη, τα οποία έχουν καταπονηθεί σε αλατότητα.	23
Εικόνα 17. Απεικόνιση του οργάνου Rotary Evaporator που χρησιμοποιήθηκε στο πρωτόκολλο εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών (MAA).	25
Εικόνα 18. Απεικόνιση μεταφοράς του λειοτριβημένου ιστού με υγρό άζωτο σε Eppendorf σωληνάκι των 2.0 mL.	26
Εικόνα 19. Plant Total RNA kit που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση RNA από μικροφύκη.	26
Εικόνα 20. Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene ρυθμισμένος για την πραγματοποίηση της PCR.	34
Εικόνα 21. Συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει το gel αγαρόζης με τα φορτωμένα δείγματα της PCR.	36
Εικόνα 22. Απεικόνιση αποτελεσμάτων φασματοφωτομέτρησης UV-Vis δείγματος από κωνική Control.	39
Εικόνα 23. Απεικόνιση αποτελεσμάτων φασματοφωτομέτρησης UV-Vis δείγματος από κωνικές που καταπονέθηκαν σε αλατότητα.	40
Εικόνα 24. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκε RNA. Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και προς τα δεξιά διακρίνονται 6 δείγματα από κωνικές Control και 4 δείγματα από κωνικές που καταπονέθηκαν σε αλατότητα (NaCl).	42
Εικόνα 25. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά το πρωτόκολλο της DNase I. Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα από κωνικές Control (C) και τα δείγματα από κωνικές που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (NaCl).	43
Εικόνα 26. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά τη μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα της PCR με το 1 ^ο , 2 ^ο , 4 ^ο και 5 ^ο ζεύγος εκκινητών διαδοχικά. Πρώτα παρουσιάζεται δείγμα κωνικής Control	

(C) και μετά παρουσιάζεται το δείγμα κωνικής που καταπονήθηκε σε αλατότητα (NaCl).
..... 44

Εικόνα 27. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά τη μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα της PCR με 3ο ζεύγος εκκινητών διαδοχικά. Πρώτα παρουσιάζεται δείγμα κωνικής Control (C) και μετά παρουσιάζεται το δείγμα κωνικής που καταπονήθηκε σε αλατότητα (NaCl). 45

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

1. BG11: Blue green medium. Θρεπτικό υπόστρωμα μέσα στο οποίο αναπτύσσεται το μικροφύκος *Jaagichlorella luteoviridis*.
2. MAA: Mycosporine-like Amino Acids (αμινοξέα που ομοιάζουν με μυκοσπορίνη)
3. DNA: Deoxyribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεικό οξύ)
4. PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
5. RNA: Ribonucleic acid (ΡΙβονουκλεικό οξύ)
6. Taq Polymerase: Πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus Aquaticus*
7. dNTPs: deoxyriboNucleotide Triphoshates (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια)
8. DNase: Deoxybonuclease (Δεοξυριβονουκλεάση)
9. T_M: θερμοκρασία που περιέχει 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας
10. UV: Ultraviolet (Υπεριώδης ακτινοβολία)
11. Vis: Visible (ορατός)
12. DTT: Dithiothreitol (διθειοθρεϊτόλη)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΦΥΚΗ

Τα φύκη (στα αγγλικά, algae) αποτελούν μια ομάδα μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών, οι οποίοι ζουν συχνά στο νερό ή σε υγρά περιβάλλοντα. Οι οργανισμοί αυτοί έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν, δηλαδή, χάρη στην χλωροφύλλη που διαθέτουν, μια ομάδα χρωστικών, μετατρέπουν το ηλιακό φως σε ενέργεια. Επίσης, απορροφούν από την ατμόσφαιρα διοξείδιο του άνθρακα και να απελευθερώνουν οξυγόνο. Τα φύκη χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, σε μικροφύκη και μακροφύκη. (Pereira, 2021). Τα φύκη δεν διαθέτουν άνθη, βλαστούς, ρίζες, όπως τα ανώτερα φυτά, αλλά σχηματίζουν σπόρια αντί για σπέρματα (ΕΛ.Φ.Ε, 2008).

1.1.1 ΜΑΚΡΟΦΥΚΗ-ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Φύκη τα οποία είναι ορατά με γυμνό μάτι και παρατηρείται ο θαλλός, δηλαδή το σώμα του φύκου, ο οποίος μπορεί να φτάσει σε μήκος μεγάλων διαστάσεων, αποκαλούνται μακροφύκη. Μια μεγάλη ομάδα στην κατηγορία των μακροφυκών είναι αυτή των Φαιοφυκών, τα οποία είναι αποκλειστικά θαλάσσια φύκη, έχουν χαρακτηριστικό καφέ χρώμα και είναι τα πιο συνηθισμένα φύκη των βραχωδών ακτών, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1. Τα μακροφύκη βρίσκονται στην θάλασσα και έχουν την δυνατότητα να αντλούν από το νερό που τα περιβάλλει θρεπτικά συστατικά που θα τα βοηθήσει στην ανάπτυξη τους. (ΕΛ.Φ.Ε, 2008).

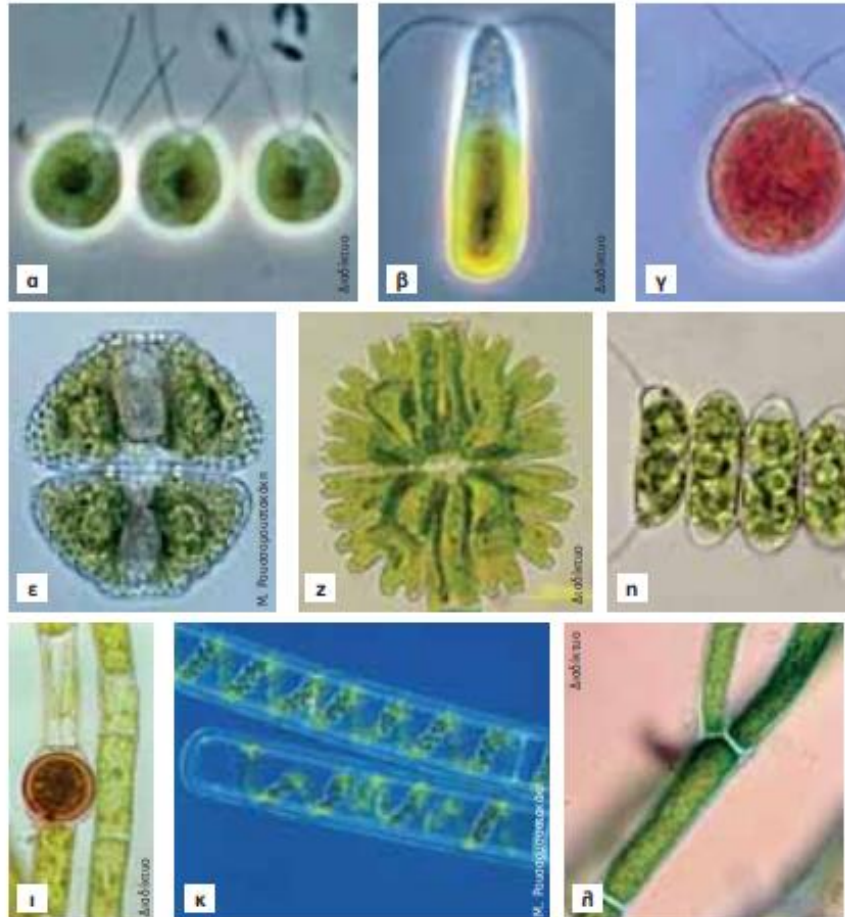


Εικόνα 1. Υποθαλάσσια δάση από Φαιοφύκη στον Ατλαντικό ωκεανό (ΕΛ.Φ.Ε, 2008).

Αντιθέτως, φύκη τα οποία δεν μπορούν να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι αποκαλούνται μικροφύκη, όπως για παράδειγμα αυτά της ομάδας των φυτοπλαγκτόν και παρατηρούνται με την βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου. Τα κύτταρα τους είναι μονοκύτταρα και μπορεί να είναι μεμονωμένα ή να σχηματίζουν αποικίες, καθώς και η μορφολογία των κυττάρων είναι χαρακτηριστική κάθε είδους. Η σύσταση τους χαρακτηρίζεται από την παρουσία χρωστικών ουσιών, κυτταρικών τοιχωμάτων, φωτοσυνθετικών προϊόντων, λιπαρών οξέων, λιπιδίων, υδρογονανθράκων, καθώς και δευτερογενών μεταβολιτών (Figuerola-Torres, 2020). Αυτά τα φύκη συναντώνται οπουδήποτε, είτε σε γλυκά, είτε σε αλμυρά νερά, σε θάλασσες, ποτάμια, λίμνες. Η ταξινόμηση των φυκών είναι δύσκολη, λόγω των διαφορετικών χρωστικών τους και της μορφολογικής ποικιλίας τους. Μερικές από τις ομάδες που υπάρχουν στα μικροφύκη είναι οι εξής:

- κυανοφύκη ή κυανοβακτήρια ή blue green algae, τα οποία είναι μικροφύκη, μικροσκοπικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί χωρίς πυρήνες, χλωροπλάστες και άλλα οργανίδια. Το χρώμα τους είναι συνήθως κυανοπράσινο, εξαιτίας της χρωστικής φυκοκυανίνης. Αναπαράγονται πάντα αγενώς.
- Χλωροφύκη, τα οποία συνήθως έχουν πράσινο χρώμα, εξαιτίας της χλωροφύλλης α. Έχουν κι άλλες χρωστικές, χλωροφύλλη b, καροτένιο α και β, καθώς και ξανθοφύλλες. Αναπαράγονται, είτε με αγενή, είτε με εγγενή τρόπο. Είναι μονοκύτταρα και μικροσκοπικά. Χαρακτηριστικά

γένη αποτελούν: το γένος *Chlamydomonas*, το γένος *Dunaliella*, το γένος *Chlorella* (ΕΛ.Φ.Ε, 2008).



Εικόνα 2. Τα α,β,γ,ε,ζ,η,ι,κ,λ αποτελούν χλωροφύκη, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο (Figuerola-Torres, 2020).

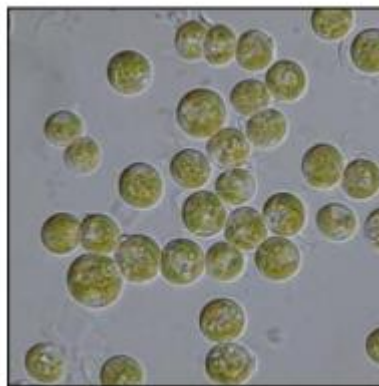
Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε συγκεκριμένα ένα είδος μικροφύκους γλυκού νερού, το είδος *Jaagichlorella luteoviridis*.

1.1.2 *Jaagichlorella luteoviridis*

Empire:
Eukaryota
Kingdom:
Plantae
Subkingdom:
Viridiplantae
Infrakingdom:
Chlorophyta
infrakingdom
Phylum:
Chlorophyta
Subphylum:
Chlorophytina
Class:
Trebouxiophyceae
Order:
Trebouxiales
Family:
Trebouxiaceae
Genus:
Heterochlorella

Το είδος *Jaagichlorella luteoviridis*, γνωστό και ως *Heterochlorella luteoviridis*, αποτελεί ευκαρυωτικό μικροφύκος της ομάδας των χλωροφυκών του γλυκού νερού και έχει αρκετά γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης. Χρησιμοποιείται για ζωοτροφή, καθώς και για συμπληρώματα διατροφής και ως βιοκαύσιμο. Έχει την δυνατότητα να καλλιεργηθεί αυτότροφα, μυξότροφα ή ετερότροφα (Figueroa-Torres, 2020). Τα νεαρά κύτταρα είναι σφαιρικά 4,6–6,4 μm ή μερικές φορές ελαφρώς ελλειψοειδή 5,5 x 4,6 μm ή 6,4 x 5,5 μm με σχετικό παχύ κυτταρικό τοίχωμα. Σε ορισμένα σημεία, ο χλωροπλάστης των νεαρών κυττάρων αφαιρείται από το κυτταρικό τοίχωμα, πολύ συχνά είναι πτυχωτός, με ένα μόνο πυρηνοειδές που περιβάλλεται από πολλούς κόκκους αμύλου (PRÖSCHOLD, 2019). Η κατάλληλη θερμοκρασία ανάπτυξης του συγκεκριμένου είδους κυμαίνεται από 22°C έως 25°C (Figueroa-Torres, 2020).

Εικόνα 3. Ταξινόμηση του είδους *Jaagichlorella luteoviridis* (Neustupa, 2009).



Εικόνα 4. Κύτταρα στελέχους *Jaagichlorella luteoviridis* (Figueroa-Torres, 2020).

1.2 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ ΣΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Τα μικροφύκη έχουν την τάση να συσσωρεύουν διάφορους μεταβολίτες. Διαφορετικοί τύποι καλλιέργειας (αυτοτροφία, μυξοτροφία, ετεροτροφία), συνθήκες καλλιέργειας (φως, ΡΗ, διαλυμένο οξυγόνο) και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών οδηγούν τους σκελετούς άνθρακα που αποτελούν τα μικροφύκη να έχουν σημαντικά διαφορετικές κυτταρικές συνθέσεις. Οι δυσμενείς καταπονήσεις, όπως η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, το έντονο φως, η καταπόνηση αλατότητας ή η καταπόνηση σε θερμότητα είναι βασικοί παράγοντες που ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς των μικροφυκών, με αποτέλεσμα τα μικροφύκη να συσσωρεύουν δευτερογενείς μεταβολίτες για να επιβιώσουν (Yuan Yuan Ren, 2021).

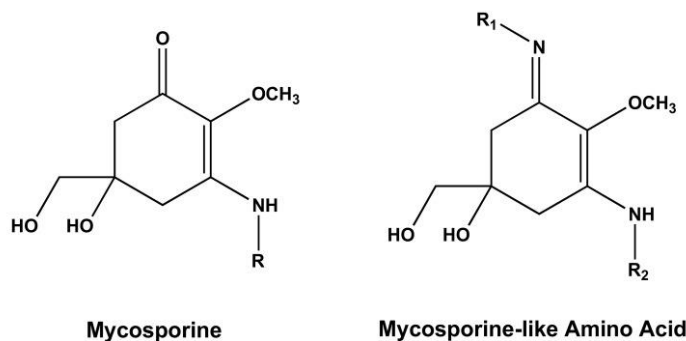
Η καταπόνηση της αλατότητας είναι ένας κοινός παράγοντας καταπόνησης που συναντάται στο φυσικό περιβάλλον, ιδιαίτερα για τα μικροφύκη του γλυκού νερού. Το αλατούχο στρες μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική βλάβη, αποικοδόμηση της χλωροφύλλης και αναστολή της φωτοσύνθεσης και της ανάπτυξης του μικροφύκου. Τα μικροφύκη, προκειμένου να προσαρμοστούν στην καταπόνηση αλατότητας, έχουν αναπτύξει μια στρατηγική επιβίωσης που εγγυάται την ισορροπία ανάπτυξης και των αποκρίσεων. Κατά τη διάρκεια της προσαρμογής στο στρες, ορισμένα μικροφύκη μπορεί να μετατραπούν σε κύστες και να συσσωρεύουν δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι η ασταξανθίνη και τριακυλογλυκερόλη. Παρ' όλα αυτά, η σοβαρή καταπόνηση αλατότητας μπορεί να αποβεί μοιραία για τα μικροφύκη όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση και κακή βιωσιμότητα (Yuan Yuan Ren, 2021).

Από το στρες αλατότητας επάγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και για την εξουδετέρωση των ριζών αυτών, τα μικροφύκη έχουν αναπτύξει δύο βασικούς μηχανισμούς, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως είναι η καταλάση, και τα αντιοξειδωτικά, όπως είναι τα καροτενοειδή. Η ασταξανθίνη (καροτενοειδές) μπορεί να εφαρμοστεί ευρέως σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά με τις εξαιρετικές δυνατότητες της να απορροφά τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, καθώς και για τις απίστευτες αντιγηραντικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες της (Yuan Yuan Ren, 2021).

1.3 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι εξειδικευμένα φυσικά προϊόντα που δεν εμπλέκονται άμεσα στον γενικό μεταβολισμό του οργανισμού, αλλά έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες, όπως αντιβιοτικές, φαρμακευτικές, φωτοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις δράσεις κ.λπ (Raj, 2021). Αρκετοί οργανισμοί και συγκεκριμένα τα μικροφύκη, όταν εκτίθενται σε υψηλές εντάσεις φωτός έχουν την δυνατότητα να παράγουν μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που καλούνται αμινοξέα που ομοιάζουν με μυκοσπορίνη (MAA), γνωστά και ως αντιμικροβιακά αντιηλιακά (Raj, 2021).

Τα MAA παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας πολλών οργανισμών. Επίσης, τα MAA έχουν την δυνατότητα να εντοπίζουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και να τις προσλαμβάνουν, με στόχο την μείωση της κυτταρικής βλάβης που παράγεται κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι τα MAA έχουν την ικανότητα να διεγείρουν παράγοντες, με στόχο την επούλωση των πληγών και έτσι οι οργανισμοί που παράγουν τέτοιους μεταβολίτες καταφέρνουν και επιβιώνουν από το συγκεκριμένο στρες που έχουν υποβληθεί. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα δεν είναι μόνο γνωστά για τις φωτοπροστατευτικές δραστηριότητες τους στα μικροφύκη, αλλά εμπλέκονται και στην προστασία τους από την καταπόνηση αλατότητας, ρυθμίζοντας την ωσμωτική ισορροπία (Raj, 2021). Τα αμινοξέα που μοιάζουν με μυκοσπορίνη απορροφούνται συνήθως στο υπεριώδες φάσμα, συγκεκριμένα στην περιοχή μεταξύ 300 και 360 nm. Παραδείγματα απορρόφησης είναι: μυκοσπορίνη- γλυκίνη: απορροφά περίπου στα 310 nm, η παλυθίνη: απορροφά περίπου στα 320 nm, η πορφυραμίνη: απορροφά περίπου στα 356 nm (Carole Anne Llewellyn, 2010).

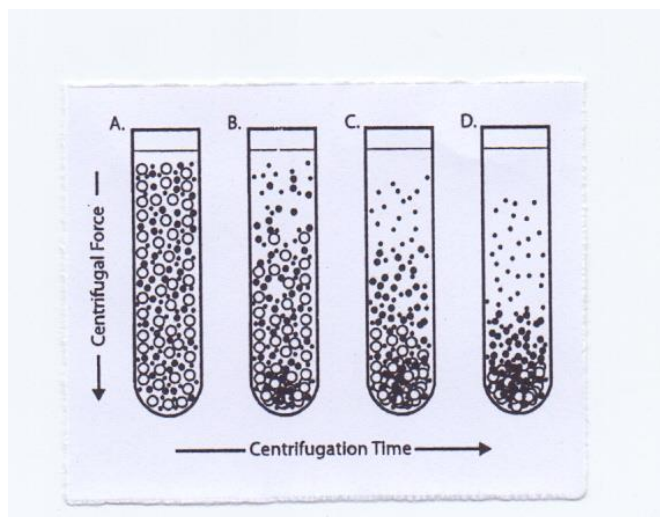


Εικόνα 5. Οι γενικές δομές των μυκοσπορινών και των MAA (Karl P. Lawrence, 2017).

1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.4.1 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Η φυγοκέντρωση αποτελεί μία ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική που χρησιμοποιείται στην βιοχημεία, στην κυτταρική και μοριακή βιολογία, στη φαρμακευτική και στην ιατρική. Το όργανο που χρησιμοποιείται ονομάζεται φυγόκεντρος, το οποίο χρησιμοποιεί την φυγόκεντρο δύναμη (g force) για να απομονώσει τα αιωρούμενα σωματίδια από το περιβάλλον μέσο τους, είτε σε συσσωμάτωμα, είτε σε βάση συνεχούς ροής. Τα σωματίδια ή κύτταρα μετά από κάποιο χρονικό διάστημα καθιζάνουν στον πυθμένα του μέσου λόγω βαρύτητας. Βέβαια, δεν χρειάζονται όλα τα σωματίδια τον ίδιο χρόνο και την ίδια φυγόκεντρο δύναμη για να καθιζάνουν, εξαιτίας του διαφορετικού μεγέθους τους.



Εικόνα 6. Eppendorf tubes σε διαφορετικό χρόνο φυγοκέντρωσης και διαφορετικό αριθμό σωματιδίων που έχουν καθιζάνει (Majekodunmi, 2015).

Όταν ένα αιώρημα περιστρέφεται με μια ορισμένη ταχύτητα ή στροφές ανά λεπτό, τα σωματίδια αναγκάζονται, εξαιτίας της φυγοκέντρου δύναμης, να απομακρυνθούν ακτινικά από τον άξονα περιστροφής. Η δύναμη που ασκείται στα σωματίδια ονομάζεται σχετική φυγόκεντρος δύναμη (RCF). Ύστερα από την διαδικασία της φυγοκέντρωσης, τα σωματίδια ή κύτταρα συσσωρεύονται στον πυθμένα, π.χ ενός δοκιμαστικού σωλήνα, και αποτελούν το ίζημα. Το υπόλοιπο διάλυμα ονομάζεται «υπερκείμενο» ή «υπερκείμενο υγρό». Στην συνέχεια, το υπερκείμενο διάλυμα, είτε μεταγγίζεται από τον σωλήνα με προσοχή για να μην διαταραχθεί το ίζημα, είτε απομακρύνεται με την βοήθεια πιπέτας (Majekodunmi, 2015).

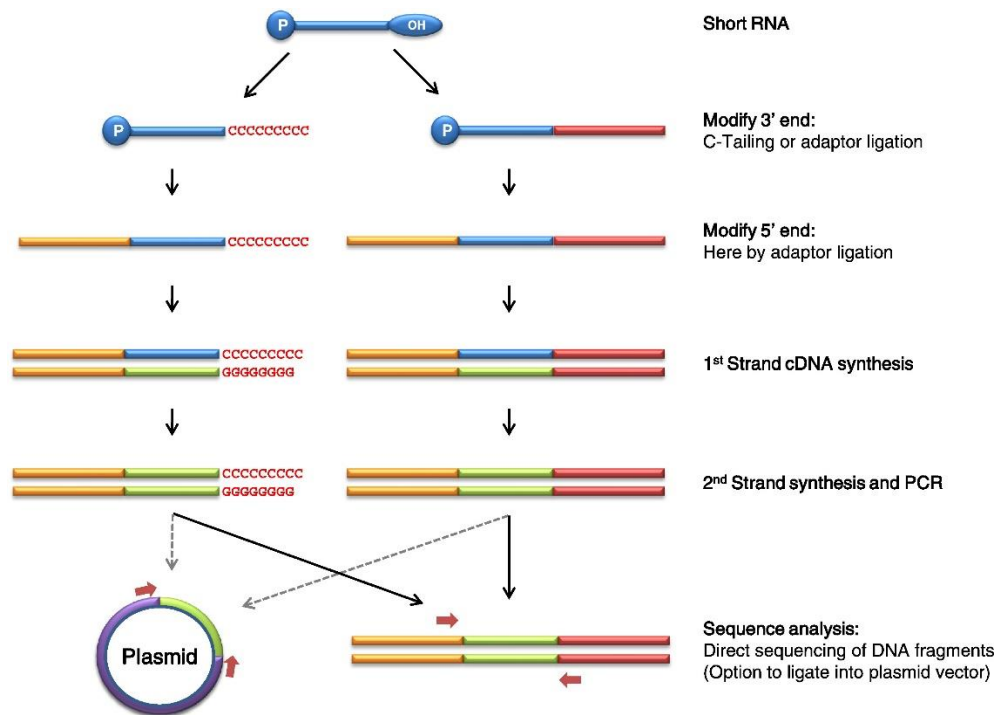
1.4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Η φασματοφωτομέτρηση είναι μία μέθοδος, κατά την οποία προσδιορίζεται η ποσότητα του φωτός που απορροφάται, ανακλάται, διασκορπίζεται ή εκπέμπεται σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η απορρόφηση είναι η πρόσληψη της φωτεινής ενέργειας από ένα μόριο όταν συναντά ένα φωτόνιο. Η ενέργεια αυτή μπορεί να εκπέμπεται εκ νέου ως φως ή να μετατραπεί σε θερμότητα. Το ποσό θερμότητας που απορροφάται εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των απορροφητικών μορίων σε ένα δείγμα (Morris, 2015). Εάν η μέτρηση γίνεται σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, ονομάζεται φωτομετρία, ενώ εάν η μέτρηση γίνεται για ένα εύρος μηκών κύματος, ονομάζεται φασματομετρία και η καμπύλη έντασης φωτός-μήκους κύματος που προκύπτει ονομάζεται φάσμα. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στην φασματοφωτομέτρηση ονομάζονται φασματοφωτόμετρα. Τα περισσότερα μετρούν την απορρόφηση, οπότε ονομάζονται φασματοφωτόμετρα απορρόφησης και το φάσμα που προκύπτει ονομάζεται φάσμα απορρόφησης. Υπάρχουν διάφοροι τύποι φωτός που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην φασματοφωτομετρία, όπως είναι ακτίνων X, υπεριώδους (UV), ορατού (Vis), υπέρυθρου (IR) κ.λπ. (Yoon, 2016).

1.4.3 cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Η βασική αρχή της PCR, τεχνικής που θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο, απαιτεί η αλληλουχία στόχος να αποτελείται από κάποιες γνωστές αλληλουχίες στις οποίες ειδικοί εκκινητές θα μπορέσουν να προσδεθούν και να ξεκινήσουν τον πολυμερισμό. Η ενζυματική μετατροπή του RNA σε δίκλωνο cDNA αποτελεί πλέον ρουτίνα μετά την ανακάλυψη των αντίστροφων μεταγραφασών το 1970 και αφού νέες βελτιωμένες συνθήκες για την σύνθεση του cDNA έγιναν διαθέσιμες. Οι αντίστροφες μεταγραφάσες είναι ένζυμα που χρησιμοποιούν, είτε το DNA, είτε το RNA για την έναρξη της σύνθεσης του DNA (Harbers, 2007). Για την προετοιμασία του συνολικού cDNA που θα χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή της τεχνικής PCR, γνωστές αλληλουχίες προστίθενται σε 2 στάδια. Το ένα άκρο αρχικά ορίζεται μέσω μιας αντίδρασης cDNA, χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο που καλείται αντίστροφη μεταγραφάση και έναν εκκινητή oligo(dT) που θα ξεκινήσει από την poly(A) ουρά που υπάρχει στο 3' άκρο των περισσότερων μορίων

mRNA. Για την σύνθεση του δεύτερου κλώνου cDNA απαραίτητη είναι η θέση εκκίνησης στο 5' άκρο του μορίου cDNA. Στην αρχή, οι δομές φουρκέτας στο 3' άκρο των μονόκλωνων cDNA χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις αυτόματης εκκίνησης και οι δεύτεροι κλώνοι συντέθηκαν με την βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης και της ιδιότητας που έχει να πολυμερίζει. Επίσης, τον πολυμερισμό της μεταγραφάσης ακολούθησε η απομάκρυνση των δομών φουρκέτας με τη βοήθεια νουκλεάσης S1. Η σύνθεση cDNA δεύτερου κλώνου αποτελεί πρωταρχικό βήμα για την διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για κλωνοποίηση μικρών ποσοτήτων RNA (Harbers, 2007).

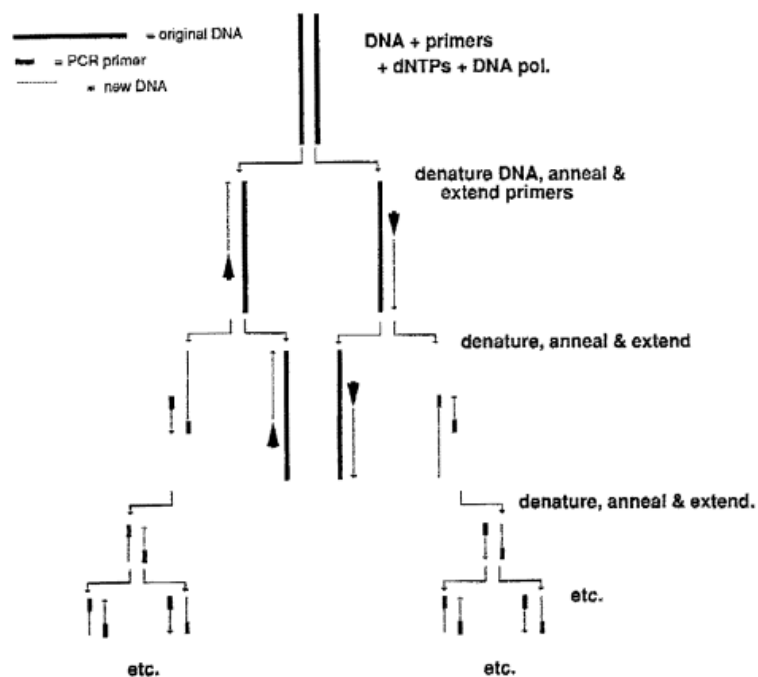


Εικόνα 7. Απεικόνιση σύνθεσης cDNA δεύτερου κλώνου (Harbers, 2007)

1.4.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μία επιστημονική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται πολύ συχνά στη μοριακή βιολογία. Έχει ως στόχο την σύνθεση χιλιάδων, έως και εκατομμυρίων αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, χρησιμοποιώντας ένα μόνο ή μερικά αντίγραφα ενός κομματιού DNA σε διάφορες τάξεις μεγέθους (Joshi, 2010). Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι πολύ απλή, γρήγορη και αυτοματοποιημένη (ERLICH, 1989). Υπάρχουν τρία βασικά στάδια που εμπλέκονται με την τεχνική PCR: η μετουσίωση, η θερμική κατεργασία, και η επιμήκυνση (Joshi, 2010). Η βασική αρχή της PCR είναι απλή: ένα μόριο DNA χρησιμοποιείται για την παραγωγή δύο αντιγράφων, μετά τέσσερα, μετά οκτώ κ.ο.κ.

Ο συγκεκριμένος διπλασιασμός επιτυγχάνεται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες γνωστές ως πολυμεράσες, ένζυμα ικανά να συνθέτουν μακριούς κλώνους. Τα ένζυμα αυτά τοποθετούν τα δομικά στοιχεία του DNA σε σειρά, δηλαδή τα νουκλεοτίδια που αποτελούνται από τις τέσσερις βάσεις αδενίνη (A), θυμίνη (T), κυτοσίνη (C) και γουανίνη (G) (Joshi, 2010). Εκτός από τα νουκλεοτίδια, χρειάζονται και μικρά τμήματα DNA, γνωστά και ως εκκινητές, οι οποίοι καθορίζουν την αρχή και το τέλος της περιοχής που θα επιμηκυνθεί. Επιπλέον, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη της Taq πολυμεράσης, η οποία αντιγράφει την περιοχή, και τέλος, ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο παρέχει ένα κατάλληλο περιβάλλον για την DNA πολυμεράση (MT Rahman, 2013). Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιείται στην διερεύνηση και διάγνωση πολλών ασθενειών, καθώς και σε εγκληματολογικά εργαστήρια και είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί απαιτείται μόνο μια ελάχιστη ποσότητα αρχικού DNA (Joshi, 2010).

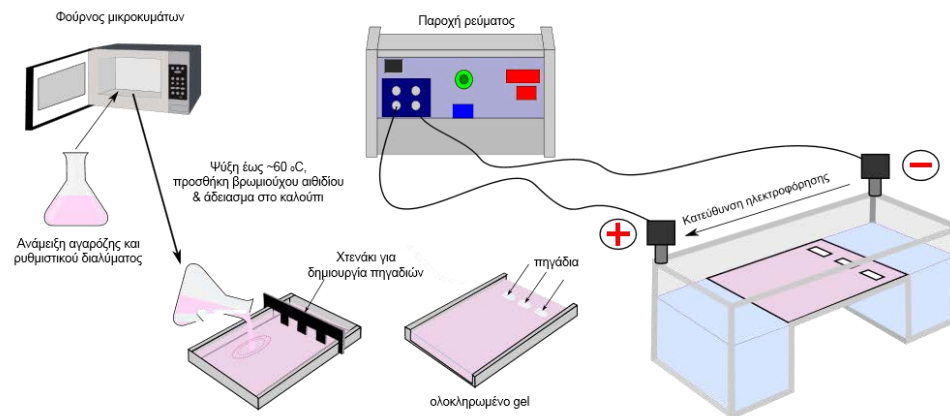


Εικόνα 8. Απεικόνιση της τεχνικής PCR (ERLICH, 1989).

1.4.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές στη μοριακή βιολογία αποτελεί ο διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, τα φορτισμένα μόρια διαχωρίζονται και μετακινούνται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Στον θάλαμο ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8-8,3 για να ρυθμίζει τις αλλαγές pH και να επιτρέπει την διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Ως αποτέλεσμα της διέλευσης του ρεύματος, σχηματίζεται αέριο υδρογόνο στην κάθοδο (αρνητική πλευρά) και αέριο οξυγόνο στην άνοδο (θετική πλευρά). Μόρια, όπως το DNA και το RNA, αποτελούνται από επαναλαμβανόμενους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που φέρουν αρνητικά φορτία σε ουδέτερο pH. Έτσι, αυτά τα μακρομόρια μετακινούνται προς τον θετικό πόλο του ηλεκτρικού θαλάμου, όταν εφαρμόζεται στο σύστημα σταθερή τάση. Όταν η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πηκτή αγαρόζης, τα πολυμερή νουκλεϊκών οξέων θα ηλεκτροφορηθούν με βάση το μέγεθος τους, με τα μικρότερα μόρια να διαπερνούν πιο γρήγορα μέσα από τους πόρους της πηκτής αγαρόζης. Μια πολύ υψηλή τάση έχει ως αποτέλεσμα μια κακή ανάλυση των αποτελεσμάτων και υπερθέρμανση, ενώ

αντίθετα, μια πολύ χαμηλή τάση μπορεί να οδηγήσει σε διάχυση των μικρότερου μεγέθους νουκλεϊκών οξέων (Schulz, 2008).



Εικόνα 9. Προετοιμασία ενός πηκτώματος αгарόζης για ηλεκτροφόρηση (Giannakouris, 2015).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ-ΥΛΙΚΑ

1) Μικροφύκη στελέχους *Jaagichlorella luteoviridis*

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια- Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανακαλλιέργεια του μικροφύκου

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
BG11 broth	HIMEDIA
TE (trace elements)	
Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 0,1M	Riedel de Haen
Απεσταγμένο νερό	
ΌΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας	MRC Ltd
Μετρητής pH	MRC PHS-3E
Αυτόκαυστο	
Αντλία αέρα	
ΥΛΙΚΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Γάντια	
Σιφόνιο 1ml	
Κωνικές φιάλες 1000ml	
Σπάτουλες	
Σκαφίδια	
Μπουκάλι τύπου DURAN 1L	DURAN
Βαμβάκι	
Γάζες	
Σωληνάκια για παροχή αέρα	
Αλουμινόχαρτο	

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια- Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της φασματοφωτομέτρησης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	
---------------	--

θρεπτικό υπόστρωμα BG11 TE	
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	PENTA
ΌΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΠΕΙΑ
Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer	Eppendorf-Netheir-Hirz GmbH
ΥΛΙΚΑ	ΕΤΑΙΠΕΙΑ
Κυψελίδες ορατού φωτός	Greiner bio-one
Πιπέτες	NICHIRYO
Απορροφητικό χαρτί	

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της λειοτρίβησης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
Υγρό άζωτο
ΥΛΙΚΑ
Γουδί
Γουδοχέρι
Πλαστική σπάτουλα
Eppendorf tubes

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΠΕΙΑ
50 bp DNA Ladder	NEW ENGLAND BioLabs Inc.
MIDORI Green DIRECT	Nippon Genetics Europe
Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1x) (Tris acetate - EDTA)	PanReac
Αγαρόζη (Agarose Type I : Low EEO)	SIGMA
ΌΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΠΕΙΑ
Συσκευή ηλεκτροφόρησης SCIE - PLAS	SCIE - PLAS
Πηγή ηλεκτρικού ρεύματος PowerPlus 300V	Fisherbrand
ΥΛΙΚΑ	ΕΤΑΙΠΕΙΑ
Κωνική φιάλη 100 mL	

Ογκομετρικός σωλήνας 50 mL	
Πουάρ	
Καλούπι	
Eppendorf tubes	
Πιπέτες	NICHIRYO

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια- Όργανα- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Νερό για έγχυση (injection water)	DEMO S.A.
PCR Rnx Buffer	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
50 mM MgCl ₂	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
dNTPs - Μείγμα νουκλεοτιδίων	Molecular biology
Taq Polymerase KapaTaq	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
1ο ζεύγος εκκινητή: algtrinLocDN377c0g2t2_mysD_Magnesium- protoporphyrin_IX_monomethyl_ester_oxidative_cyclase	Eurofins Genomics
2° ζεύγος εκκινητή: algtrinLocDN377c0g2t1_mysD_Oxidoreductases	Eurofins Genomics
3° ζεύγος εκκινητή: algtrinLocDN5734c0g1t2_mysD_Acting_on_ester_bonds	Eurofins Genomics
4° ζεύγος εκκινητή: algtrinLocDN2180c0g1t5_mysD_Malate_synthase	Eurofins Genomics
5° ζεύγος εκκινητή: algtrinLocDN1323c1g3t1_mysD_Phosphoribosyl- ATP_diphosphatase	Eurofins Genomics
ΌΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene	Nippon Genetics Europe
ΥΛΙΚΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Eppendorf tubes	

Πάγος	
Πιπέτες	NICHIRYO

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια- Όργανα- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πρωτόκολλο DNase I.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Total RNA	
Recombinant DNase I (RNase free)	TaKaRa
10X DNase Buffer	TaKaRa
0,5M EDTA	PanReac AppliChem
Νερό για έγχυση(injection water)	
Οξικό νάτριο 3M	CalbioChem
Παγωμένη αιθανόλη 70%	
ΌΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Επωαστήρας Dry bath	Ms major Science
Φυγόκεντρος	Frontier TM 5916
ΥΛΙΚΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Πιπέτες	NICHIRYO
Eppendorf tubes	

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια- Όργανα- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση της cDNA βιβλιοθήκης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Νερό έγχυσης (injection water)	
10 mM dNTPs	Molecular Biology
Εκκινητής Race RT	BioLabs
Total RNA	
Protoscript II Buffer	BioLabs
DTT 0,1M	BioLabs
Protoscript II Αντίστροφη μεταγραφή	BioLabs
ΌΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Επωαστήρας	Ms major science

Φυγόκεντρος	Frontier TM 5916
ΥΛΙΚΑ	ETAPEIA
Πιπέτες	NICHIRYO
Πάγος	

Πίνακας 8. Αντιδραστήρια- Όργανα -Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA.

ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ETAPEIA
Lysis Solution	Sigma Aldrich
2-μερκαπτοαιθανόλη	Sigma Aldrich
Binding Solution	Sigma Aldrich
Διάλυμα πλύσης 1	Sigma Aldrich
Διάλυμα πλύσης 2	Sigma Aldrich
Elution Solution	Sigma Aldrich
ΌΡΓΑΝΑ	ETAPEIA
Vortex	Nippon Genetics
Genius vortex	Scientific Industries
Επωαστήρας	Ms major Science
Φυγόκεντρος	Frontier TM 5916
ΥΛΙΚΑ	ETAPEIA
Απορροφητικό χαρτί	
Πιπέτες	NICHIRYO
Collection tubes 2ml	Sigma Aldrich
Filtration column blue retainer ring	Sigma Aldrich
Binding Column red retainer ring	Sigma Aldrich

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια- Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών (MAA).

ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ETAPEIA
Μεθανόλη	Riedel-de Haen
ΌΡΓΑΝΑ	ETAPEIA

Φυγόκεντρος	Frontier TM 5916
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco V-630 BIO Spectrophotometer
Rotary Evaporator	IKA VC 10 Lite
ΥΛΙΚΑ	ΕΤΑΠΕΙΑ
Πιπέτες	NICHIRYO
Κυψελίδες UV	Kisker
Νερό έγχυσης	

2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ

Για την ανακαλλιέργεια, ή αλλιώς τον εμβολιασμό του μικροφύκου *Jaagichlorella luteoviridis*, απαραίτητη προϋπόθεση αποτέλεσε η ύπαρξη θρεπτικού υποστρώματος. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BG11. Τα αντιδραστήρια, όργανα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανακαλλιέργεια παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος BG11 ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

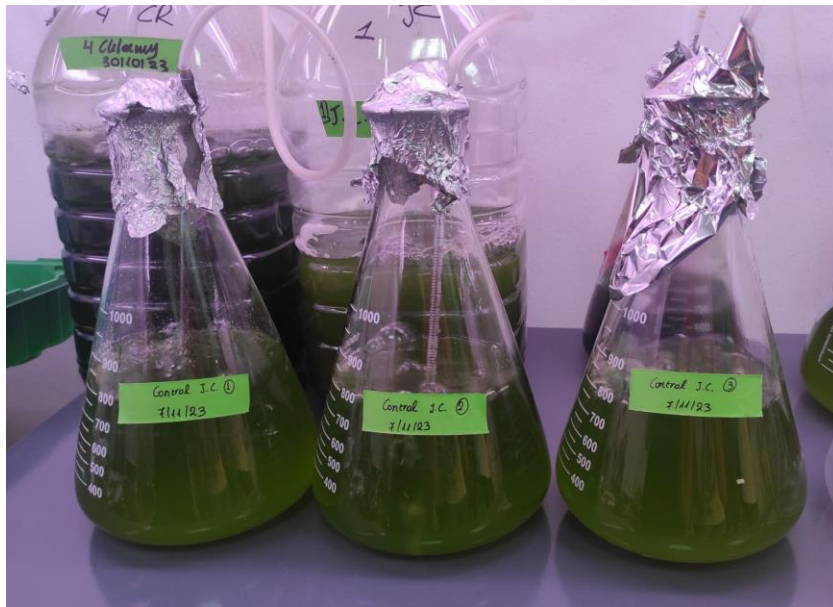
1. Σε μπουκάλι τύπου DURAN του ενός λίτρου, προστέθηκαν 900 mL απεσταγμένου νερού.
2. Αφού ζυγίστηκαν, προστέθηκαν 1,627 g BG11 broth, καθώς και 1 mL TE (trace elements).
3. Στην συνέχεια, ακολούθησε η μέτρηση του pH, όπου το θρεπτικό θα έπρεπε να σταθεροποιηθεί σε pH 7,1. Για να επιτευχθεί η συγκεκριμένη τιμή, έγινε χρήση διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,1 M. Έπειτα, το μπουκάλι DURAN συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι το 1 L.
4. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το αυτόκαυστο, προκειμένου να αποστειρωθεί το θρεπτικό υλικό.

Σε 6 κωνικές φιάλες των 1000 mL έγινε εμβολιασμός με αναλογία 1/10 (αρχική καλλιέργεια φύκους/τελικός όγκος νέας καλλιέργειας), δηλαδή 80 mL μικροφύκους και 720 mL θρεπτικού υποστρώματος, με τελικό όγκο 800 mL. Επίσης, επισημάνθηκαν από το 1 έως το 6 (όπως θα αναφερθεί παρακάτω, οι κωνικές 1 , 2 και 3 θα αποτελέσουν τις κωνικές Control, ενώ οι κωνικές 4 , 5 και 6 θα υποβληθούν σε καταπόνηση.



Εικόνα 10. Εμβολιασμός μικροφύκους Jaagichlorella luteoviridis σε θρεπτικό υπόστρωμα BG11 TE. Ημερομηνία εμβολιασμού 7/11/2023.

Οι κωνικές πωματίστηκαν με γάζα και υδρόφοβο βαμβάκι που επιτρέπει τον αερισμό της φιάλης και την ανανέωση του υπερκείμενου αέρα της καλλιέργειας με ατμοσφαιρικό αέρα. Από πάνω τοποθετήθηκε αλουμινόχαρτο. Μέσα στην αίθουσα καλλιέργειας υπήρχαν ευνοϊκές συνθήκες φωτισμού και αερισμού. Για την αποκατάσταση των απωλειών λόγω εξάτμισης, ανά τακτά χρονικά διαστήματα (όταν η στάθμη ήταν κάτω από 800 mL) γινόταν προσθήκη αποστειρωμένου νερού.



Εικόνα 11. Κωνικές Control 1,2,3 από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα



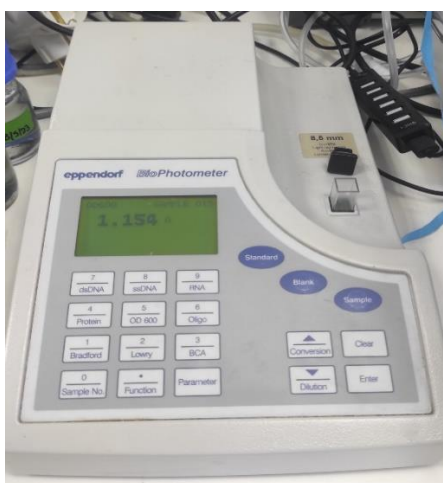
Εικόνα 12. Κωνικές 4,5,6, από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα, που προορίζονται για καταπόνηση αλατότητας.

2.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Κάθε 3-4 ημέρες , με την βοήθεια του φασματοφωτόμετρου, γινόταν μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm (optical density=οπτική πυκνότητα). Τα μικροφύκη αναπτύχθηκαν μέχρις ότου η απορρόφηση στα 600 nm έφτασε περίπου την τιμή 3 που αντιστοιχεί σε πυκνή και καλά αναπτυγμένη καλλιέργεια.

Για την φασματοφωτομέτρηση των δειγμάτων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

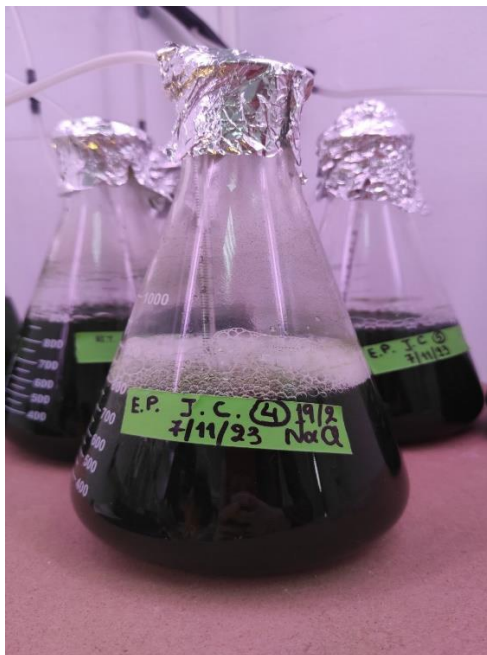
- 1) Το φασματοφωτόμετρο τέθηκε σε λειτουργία και επιλέχθηκε το κουμπί OD600, προκειμένου να μετρηθεί η οπτική πυκνότητα στα 600 nm.
- 2) Σε κυψελίδα ορατού φωτός προστέθηκε με την βοήθεια πιπέτας 1 mL θρεπτικού υποστρώματος BG 11 TE, το οποίο αποτέλεσε το blank ή τυφλό, και στη συνέχεια η κυψελίδα καθαρίστηκε με απορροφητικό χαρτί και τοποθετήθηκε στην εσοχή του φωτόμετρου. Επιλέχθηκε το κουμπί “Blank”.
- 3) Αφού αφαιρέθηκε από την εσοχή το τυφλό, παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα δείγματα. Λήφθηκε δείγμα 1 mL μικροφύκους από τις κωνικές και εισήχθει σε κυψελίδα ορατού φωτός. Η κυψελίδα καθαρίστηκε με απορροφητικό χαρτί και στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετήθηκε στην εσοχή και πατήθηκε το κουμπί “Sample”.
- 4) Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα που λάβαμε από όλες τις κωνικές 1,2,3,4,5 και 6 και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε πίνακα.



Εικόνα 13. Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας OD.

2.2.3 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ ΣΕ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Ακολούθησε η διαδικασία της καταπόνησης, κατά την οποία μέσα σε 3 κωνικές που καλλιεργήθηκαν, προστέθηκαν 29,22 g (1M) χλωριούχου νατρίου (NaCl). Οι κωνικές αναδεύτηκαν καλά και στην συνέχεια, ετικετοποιήθηκαν με την ονομασία NaCl και την ημερομηνία της καταπόνησης. Τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με φωτισμό για μία ημέρα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 13.



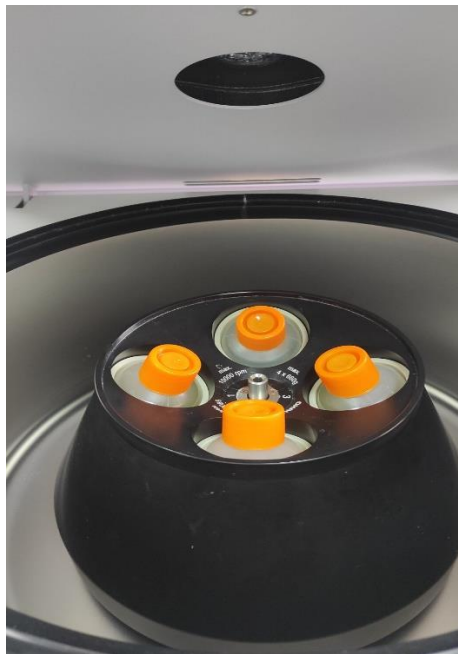
Εικόνα 14. Κωνική που έχει υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας.

2.2.4 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Μετά το πέρας της 1 ημέρας, το περιεχόμενο των κωνικών, και αυτών που καταπονέθηκαν σε αλατότητα και αυτών που δεν καταπονήθηκαν (Control), άδειασε σε μικρά μπουκάλια τύπου falcon, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η φυγοκέντρωση, με στόχο την λήψη βιομάζας του μικροφύκου. Πραγματοποιήθηκαν 2 φυγοκεντρήσεις στις 3.500 rpm για 5 λεπτά, στο τέλος των οποίων απορρίφθηκε το υπερκείμενο διάλυμα και απομονώθηκε το ίζημα. Τα ιζήματα από όλα τα μπουκάλια τύπου falcon ενώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε 1 μπουκάλι falcon, το οποίο και συντηρήθηκε απευθείας στην κατάψυξη στους -20°C.



Εικόνα 15. Μπουκάλι Falcon ύστερα από φυγοκέντρηση. Παρατηρείται το ίζημα και το υπερκείμενο διάλυμα.



Εικόνα 16. Απεικόνιση φυγοκέντρου με 4 μπουκάλια falcon που περιέχουν μικροφύκη, τα οποία έχουν καταπονηθεί σε αλατότητα.

2.2.5 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ (MAA)

Προκειμένου να εκχυλίσουμε περιεχόμενο που πιθανόν να περιέχει δευτερογενείς μεταβολίτες MAA από το μικροφύκος *Jaagichlorella luteoviridis* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών MAA.

1^η ημέρα

Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο, το περιεχόμενο μιας κωνικής που υπέστη καταπόνηση αλατότητας, καθώς και μιας κωνικής Control άδειασε σε μπουκάλια τύπου Falcon και φυγοκεντρήθηκε στα 3.000 rpm για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και κρατήθηκε το ίζημα. Στη συνέχεια, σε κάθε μπουκάλι τύπου Falcon προστέθηκαν 5 mL μεθανόλης και κάθε διάλυμα αναδεύτηκε γρήγορα (vortex) για 10 δευτερόλεπτα. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, τα μπουκάλια Falcon τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C για μια ημέρα και το πρωτόκολλο συνεχίστηκε την επόμενη μέρα.

2^η ημέρα

Κατά τη δεύτερη ημέρα, τα Falcon αφαιρέθηκαν από το ψυγείο και ακολούθησε η φυγοκέντρωση τους στα 8.000 g για 10 λεπτά. Μόλις τελείωσε η φυγοκέντρωση, πραγματοποιήθηκε η μετάγγιση μόνο του υπερκείμενου υγρού των Falcon σε καινούρια μπουκάλια τύπου Falcon, διότι εκεί βρίσκονταν οι δευτερογενείς μεταβολίτες MAA και το ίζημα απορρίφθηκε. Το επόμενο βήμα ήταν η φασματοφωτομέτρηση των υπερκείμενων υγρών σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis, διαδικασία η οποία στόχευε στην παρατήρηση παρουσίας δευτερογενών μεταβολιτών (MAA) με κυψελίδες UV και τυφλό (blank) με μεθανόλη. Έστερα, τα υπερκείμενα υγρά όλων των μπουκαλιών Falcon ενώθηκαν και χρησιμοποιήθηκε το όργανο Rotary Evaporator, κατά το οποίο απομακρύνθηκε οτιδήποτε υγρό περιείχε το διάλυμα και στην σφαιρική φιάλη έμειναν οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Στη συνέχεια, στην σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 3 mL νερού έγχυσης και το περιεχόμενο της φιάλης, με την βοήθεια πιπέτας μοιράστηκε σε 3 erpendorf σωληνάρια των 2.0 mL. Τέλος, ακολούθησε ξανά με τον ίδιο τρόπο φασματοφωτομέτρηση στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis, με την διαφορά ότι αυτή την φορά το blank ήταν νερό έγχυσης.



Εικόνα 17. Απεικόνιση του οργάνου Rotary Evaporator που χρησιμοποιήθηκε στο πρωτόκολλο εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών (MAA).

2.2.6 ΛΕΙΟΤΡΙΒΗΣΗ (ΥΓΡΟ ΑΖΩΤΟ)

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί το σπάσιμο των κυττάρων του μικροφύκου και να καταφέρουμε να απομονώσουμε RNA, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της λειοτρίβησης. Σύμφωνα μ' αυτήν, το περιεχόμενο του μπουκαλιού τύπου falcon, το οποίο ήταν παγωμένο, άδειασε σε γουδί και χρησιμοποιώντας το υγρό άζωτο και το γουδοχέρι η βιομάζα των μικροφυκών μετατράπηκε σε πούδρα. Έπειτα, με την βοήθεια μικρής πλαστικής σπάτουλας, ο λειοτριβημένος ιστός μεταφέρθηκε μέσα σε eppendorf σωληνάρια των 2.0 mL, όπως φαίνεται και στην εικόνα 17.

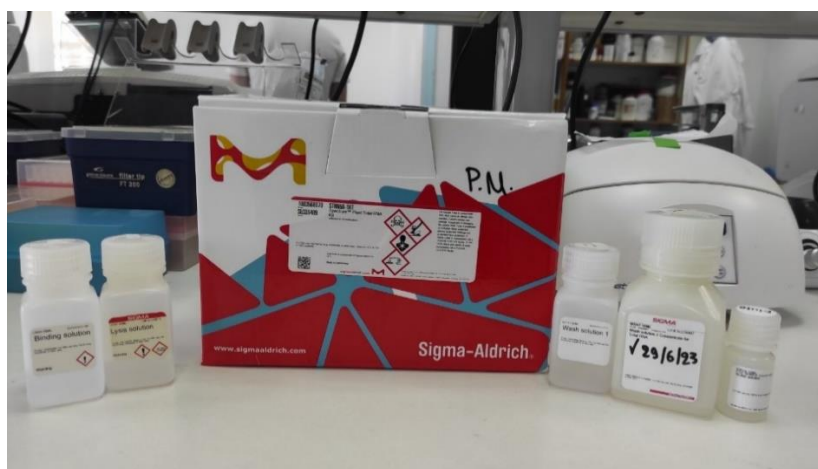


Εικόνα 18. Απεικόνιση μεταφοράς του λειοτριβημένου ιστού με υγρό άζωτο σε Eppendorf σωληνάκι των 2.0 mL.

Απευθείας μετά την διαδικασία της λειοτριβήσης ακολούθησε η απομόνωση RNA από τον λειοτριβημένο ιστό.

2.2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Για την απομόνωση RNA από μικροφύκη στελέχους *Jaagichlorella luteoviridis* χρησιμοποιήθηκε το RNA extraction kit της εταιρείας Sigma-Aldrich που φαίνεται στην εικόνα 19.



Εικόνα 19. Plant Total RNA kit που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση RNA από μικροφύκη.

Ακολουθήθηκαν με την σειρά τα βήματα που αναγράφονται στις οδηγίες του kit και αυτά είναι τα εξής:

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Αρχικά, σημαντικό βήμα αποτέλεσε το ζύγισμα 100 mg από τον λειοτριβημένο ιστό και η τοποθέτηση του σε ήδη παγωμένο eppendorf σωληνάκι των 2 mL. Το σωληνάκι διατηρήθηκε μέσα σε πάγο. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκε διάλυμα σε eppendorf σωληνάκι των 2 mL που περιείχε 10 μ L μερκαπτοαιθανόλης (2-ME) και 1000 μ L διαλύματος λύσης που περιέχονταν στο κουτί. Αφού το διάλυμα αναδεύτηκε με την μέθοδο ταχείας και επαναλαμβανόμενης αναρρόφησης-εκρόφησης ήταν έτοιμο για χρήση. Ετοιμάστηκαν eppendorf σωληνάκια των 2 mL στα οποία εισήχθη ειδική στήλη φιλτραρίσματος και Eppendorf σωληνάκια των 2 mL στα οποία εισήχθη ειδική στήλη δέσμευσης του RNA.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Πρώτον, μεταφέρθηκαν 500 μ L διαλύματος λύσης-μερκαπτοαιθανόλης σε κάθε δείγμα που προετοιμάστηκε προηγουμένως σε eppendorf σωληνάκια που περιείχαν 100 mg από τον λειοτριβημένο ιστό. Στη συνέχεια, έγινε vortex (ανάδευση) των tubes για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα και ύστερα προστέθηκαν beads. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε όργανο genius για την γρήγορη και έντονη ανακίνηση των δειγμάτων για 15 λεπτά. Ύστερα, τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 56°C για 3 λεπτά.
2. Μετά το πέρας των 3 λεπτών, τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τον επωαστήρα και φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 3 λεπτά για να δημιουργηθεί το ίζημα.
3. Στη συνέχεια, σε καινούργιο tube που προετοιμάστηκε στην αρχή με ειδική στήλη φιλτραρίσματος μεταφέρθηκε μέσα στην στήλη μόνο το υπερκείμενο υγρό με προσοχή. Το καπάκι έκλεισε και τα tubes φυγοκεντρήθηκαν ξανά σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, η στήλη αφαιρέθηκε και κρατήθηκε το διήθημα που διαπέρασε την στήλη φιλτραρίσματος.
4. Επόμενο βήμα αποτέλεσε η προσθήκη 500 μ L από το διάλυμα δέσμευσης του RNA μέσα στο σωληνάκι τύπου eppendorf με το διήθημα του προηγούμενου βήματος. Το μείγμα αναδεύτηκε καλά με vortex.

5. Από το μείγμα που δημιουργήθηκε στο προηγούμενο βήμα μεταφέρθηκαν 700 μL μέσα σε κάθε ένα από τα δύο Collection tubes των 2 mL με ειδική στήλη δέσμευσης του RNA. Τα σωληνάκια τύπου erpendorf φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό για να δεσμευτεί το RNA. Η στήλη αφαιρέθηκε με προσοχή, έγινε απόρριψη του διηθήματος και το σωληνάκι αναποδογυρίστηκε σε καθαρό απορροφητικό χαρτί για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα. Στην συνέχεια, η ίδια στήλη τοποθετήθηκε ξανά στο ίδιο σωληνάκι και μέσα στην στήλη μεταφέρθηκε το υπόλοιπο μείγμα του βήματος 4 και επαναλήφθηκε η διαδικασία.
6. Ακολούθησαν οι πλύσεις, κατά τις οποίες 500 μL από το διάλυμα πλύσης 1, που περιέχονταν στο kit, προστέθηκε μέσα στην στήλη. Το καπάκι έκλεισε και τα tubes φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, τα tubes άνοιξαν, οι στήλες αφαιρέθηκαν, έγινε απόρριψη του διηθήματος που διαπέρασε την στήλη και το tube αναποδογυρίστηκε σε απορροφητικό χαρτί για να απομακρυνθούν τα υπόλοιπα υγρά. Η στήλη τοποθετήθηκε ξανά στο tube.
7. Ύστερα, ακολούθησε η δεύτερη πλύση κατά την οποία μέσα στο σωληνάκι με την στήλη προστέθηκαν 500 μL του διαλύματος πλύσης 2. Το καπάκι έκλεισε και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα. Μετά την φυγοκέντρωση ακολούθησε η διαδικασία που περιεγράφηκε στο προηγούμενο βήμα.
8. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η τρίτη πλύση κατά την οποία προστέθηκαν ακόμη 500 μL από το διάλυμα πλύσης 2 και έγινε επανάληψη του βήματος 7.
9. Μετά το τέλος των πλύσεων, το σωληνάκι τύπου erpendorf με την στήλη φυγοκεντρήθηκε για τελευταία φορά για 1 λεπτό για να στεγνώσει τελείως. Μόλις τελείωσε η φυγοκέντρωση, η στήλη αφαιρέθηκε προσεκτικά από τα σωληνάκια και μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάκι τύπου erpendorf των 2.0 mL.
10. Τελευταίο βήμα αποτέλεσε η προσθήκη 50 μL από το διάλυμα έκλουσης μέσα και στο κέντρο της στήλης. Το καπάκι έκλεισε και το σωληνάκι αφέθηκε στον πάγκο για 1 λεπτό. Ακολούθησε η φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το απομονωμένο RNA βρισκόταν στο υγρό που διαπέρασε την στήλη, η στήλη απομακρύνθηκε και το σωληνάκι αποθηκεύτηκε στους -20°C .

Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα.

2.2.7.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ DNase I

Αφού κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της απομόνωσης RNA διαπιστώθηκε η ύπαρξη DNA, ακολούθησε η διεξαγωγή του πρωτοκόλλου της DNase I, κατά το οποίο DNA και τυχόν διάφορα υπολείμματα κατακερματίστηκαν από το ένζυμο DNase, τα δείγματα καθαρίστηκαν και απέμεινε μόνο η ποσότητα του RNA που μας ενδιέφερε.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

Αρχικά, τα 2 tubes που περιέχουν το RNA αφαιρέθηκαν από την κατάψυξη και αφέθηκαν να ξεπαγώσουν για λίγα δευτερόλεπτα.

1. Σε 2.0 mL tube προστέθηκε η συνολική ποσότητα RNA που απομονώθηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, 2 μ L από το ένζυμο Recombinant DNase I (RNase free) και 5 μ L από 10x DNase I Buffer.
2. Αφού ολοκληρώθηκε η δημιουργία αυτού του μείγματος, τα tubes τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα για μισή ώρα στους 37°C.
3. Προστέθηκαν 2,5 μ L από 0,5M EDTA και τα tubes επώαστηκαν ξανά για 2 λεπτά στους 80° C.
4. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μ L νερού για έγχυση (injection water), 10 μ L διαλύματος οξικού νατρίου συγκέντρωσης 3M και 250 μ L διαλύματος παγωμένης αιθανόλης (70%) και ακολούθησε ανάδευση των Eppendorf σωληναρίων.
5. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για 20 λεπτά στους -80°C.
6. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, τα tubes φυγοκεντρήθηκαν σε 12.000 RPM για 10 λεπτά στους 4°C.
7. Αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό, έγινε πλύση του ιζήματος με 1000 μ L chilled ethanol 70%.
8. Έγινε επανάληψη της φυγοκέντρωσης στα 12.000 rpm για 5 λεπτά.
9. Ακολούθως, απορρίφθηκε πάλι το υπερκείμενο υγρό και τα σωληνάκια αφέθηκαν ανοιχτά για να εξατμιστεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης που προστέθηκε προηγουμένως.
10. Τέλος, προστέθηκαν 50 μ L νερού για έγχυση και τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν για 5-10 λεπτά στον επωαστήρα στους 65°C.

Τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τον επωαστήρα και ακολούθησε η κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης.

2.2.8 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Ακολούθησε η κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης, διαδικασία απαραίτητη για την πραγματοποίηση της μεθόδου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

1. Στην αρχή, προετοιμάστηκε ο επωαστήρας στους 65°C.
2. Μέσα στα Eppendorf σωληνάκια των 1,5 mL προστέθηκαν και αναμείχθηκαν 2 μ L Nuclease free νερού έγχυσης, 1 μ L dNTPs συγκέντρωσης 10 mM, 2 μ L από τον εκκινητή Race RT και 5 μ L από το ολικό RNA που απομονώθηκε, ύστερα από το πρωτόκολλο της DNase I.
3. Επόμενο βήμα αποτέλεσε η επώαση των Eppendorf tubes στους 65°C για 5 λεπτά.
4. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, τα σωληνάκια αφαιρέθηκαν από τον επωαστήρα, τοποθετήθηκαν για λίγα δευτερόλεπτα στην φυγόκεντρο και ύστερα τοποθετήθηκαν στον πάγο.
5. Ακολούθως, προστέθηκαν 4 μ L από το Protoscript II Buffer, 2 μ L από το DTT συγκέντρωσης 0,1 M, 1 μ L από το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης και 3 μ L νερού έγχυσης.
6. Στη συνέχεια, τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν ξανά στον επωαστήρα στους 42°C για μια ώρα. Μόλις τελείωσε το χρονικό διάστημα της μιας ώρας, η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 65°C και τα tubes παρέμειναν στον επωαστήρα για άλλα 20 λεπτά.
7. Τέλος, αφαιρέθηκαν από τον επωαστήρα και η δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης ολοκληρώθηκε.
8. Τα Eppendorf σωληνάκια αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20°C.

Επόμενη τεχνική αποτέλεσε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, η οποία είναι κατάλληλη για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA.

2.2.9 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν 5 ζευγάρια εκκινητών (reverse/forward), τα οποία φαίνονται στον επόμενο πίνακα:

Πίνακας 10. Απεικόνιση ονομασίας εκκινητών και τα αντίστοιχα T_M τους.

ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	T_M
1ο	algtrinLocDN377c0g2t2_mysD_Magnesium-protoporphyrin_IX_monomethyl_ester_oxidative_cyclase	56°C
2ο	algtrinLocDN377c0g2t1_mysD_Oxidoreductases	56°C
3ο	algtrinLocDN5734c0g1t2_mysD_Acting_on_ester_bonds	54°C
4ο	algtrinLocDN2180c0g1t5_mysD_Malate_synthase	56°C
5ο	algtrinLocDN1323c1g3t1_mysD_Phosphoribosyl-ATP_diphosphatase	56°C

Πίνακας 11. Απεικόνιση γονιδίων που πολλαπλασιάζει κάθε ζεύγος εκκινητών.

ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
1°	D-Ala-D-Ala ligase Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase
2°	D-Ala-D-Ala ligase Oxidoreductases
3°	D-Ala-D-Ala ligase Acting_on_ester_bonds
4°	Malate_synthase
5°	Phosphoribosyl-ATP_diphosphatase

Πρώτα, ακολουθήθηκε μια σειρά βημάτων για την προετοιμασία των εκκινητών.

1. Στην αρχή, οι εκκινητές αφέθηκαν να ξεπαγώσουν, καθώς διατηρούνταν σε καταψύκτη με -20° C.
2. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για “pulse”, ώστε να καταφέρουν να διαλυθούν, διότι βρίσκονταν σε μορφή σκόνης.

3. Από τον καταψύκτη, αφαιρέθηκαν επίσης, με σκοπό το ξεπάγωμα και μικρά tubes που περιείχαν καθαρό νερό.
4. Σε δύο tubes των 1,5 mL μεταφέρθηκαν στο καθένα από 45 μ L καθαρού νερού.
5. Τέλος, στο ένα από τα δύο tubes που περιέχουν καθαρό νερό μεταφέρθηκαν 5 μ L από τον πρόσθιο εκκινητή, ενώ στο άλλο 5 μ L από τον οπίσθιο με την βοήθεια της τεχνικής επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης – εκρόφησης.

Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε και για τα 5 ζεύγη εκκινητών και αποτέλεσε την αραιώση των εκκινητών.

6. Στο επόμενο βήμα ρυθμίστηκε το μηχάνημα, στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης.
7. Για την ολοκλήρωση της προετοιμασίας των δειγμάτων, παρασκευάστηκε ένα Master mix, η προετοιμασία του οποίου θα αναφερθεί παρακάτω ξεχωριστά για κάθε εκκινητή.

Συγκεκριμένα, στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται τα 5 ζεύγη εκκινητών και οι αντίστοιχες αλληλουχίες τους.

Πίνακας 12. Αλληλουχίες των Reverse και Forward εκκινητών των 5 ζευγών.

ΖΕΥΓΗ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ
1ο	REVERSE	5'-CCCGAGGTTGCTGAGATGTT-3'
	FORWARD	5' GTTCTTGGTGAGGAAGCCCA-3'
2ο	REVERSE	5'- GCCCACACAGTCATCATCGA-3'
	FORWARD	5'-CTTAACGTCCAGGTCCACCA-3'
3ο	REVERSE	5'-AACATCACCTGCTACCGCAT-3'
	FORWARD	5'-GTGCCCTCACTCAATGGTGA-3'
4ο	REVERSE	5'-CGCTGTAGAGCAGGTGTTGA-3'
	FORWARD	5'-TGCCTGTCTCACTCCGAGTA-3'
5ο	REVERSE	5'-TTGTCCCACTTAAGGCGGTC-3'
	FORWARD	5'-CCACCGCGTTGTAACACATG-3'

Επομένως, σε 5 Eppendorf tubes των 2.0 mL παρασκευάστηκαν 5 διαφορετικά διαλύματα Master Mix τα οποία περιείχαν τα εξής:

Πίνακας 13. Οι ποσότητες κάθε αντιδραστηρίου για την παρασκευή του MasterMix.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ μL (1 δείγματος)	Συγκέντρωση
cDNA	4	
Buffer	2,5	1X
F εκκινητής	0,75	0,4 μM
R εκκινητής	0,75	0,4 μM
dNTPs	0,5	0,2 μM
KapaTaq polymerase	0,25	2 Units
H ₂ O έγχυσης	16,25	

Ιδιαίτερη προσοχή χρειάστηκε στην προσθήκη των εκκινητών, καθώς σε κάθε ένα από τα Eppendorf σωληνάκια έπρεπε να προστεθεί ένα μόνο ζεύγος εκκινητών. Αξίζει να σημειωθεί ότι, επειδή τα αντιδραστήρια είναι πολύ ευαίσθητα, αναγκαία αποτέλεσε η διατήρησή τους σε πάγο καθ' όλη την παραμονή τους στον πάγο. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων ήταν 25 μL . Για την παρασκευή του MasterMix το πρώτο αντιδραστήριο που προστέθηκε στο Eppendorf tube είναι το νερό έγχυσης, στη συνέχεια το buffer, ο forward και ο reverse εκκινητής, τα dNTPs, ενώ η Taq πολυμεράση KapaTaq προστέθηκε πριν το δείγμα cDNA.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 10 PCR tubes από τα οποία τα 1,3,5,7,9 περιείχαν cDNA από κωνικές Control και τα tubes 2,4,6,8,10 περιείχαν cDNA από κωνικές που καταπονήθηκαν σε αλατότητα.

Σε κάθε PCR tube, προστέθηκαν 21 μL από το MasterMix και 4 μL από το κάθε δείγμα cDNA. Τα δείγματα αναδεύτηκαν με την τεχνική επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης – εκρόφησης και στην συνέχεια, σφραγίστηκαν καλά και τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της PCR. Στον

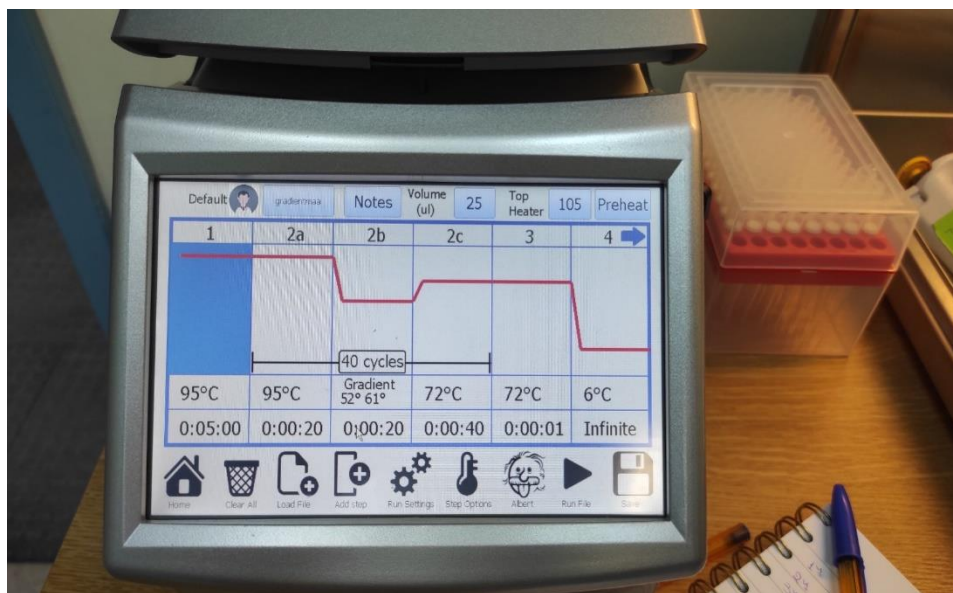
παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι συνθήκες που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR για τα ζεύγη εκκινητών 1,2,4 και 5.

Πίνακας 14. Συνθήκες που απαιτούνται για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR εκκινητών με $T_M=56^{\circ}\text{C}$ (1^ο ζεύγος, 2^ο ζεύγος, 4^ο και 5^ο ζεύγος).

ΒΗΜΑΤΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	95°C	5 min
ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	95°C	20 sec
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	56°C	20 sec
ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ	72°C	40 sec
ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ	6°C	ΑΠΕΙΡΟ

Η διαδικασία διήρκησε 40 κύκλους.

Ίδια λογική ακολουθήθηκε και για το 3^ο ζεύγος εκκινητών, με την διαφορά ότι η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών ρυθμίστηκε στους 54°C.



Εικόνα 20. Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene ρυθμισμένος για την πραγματοποίηση της PCR.

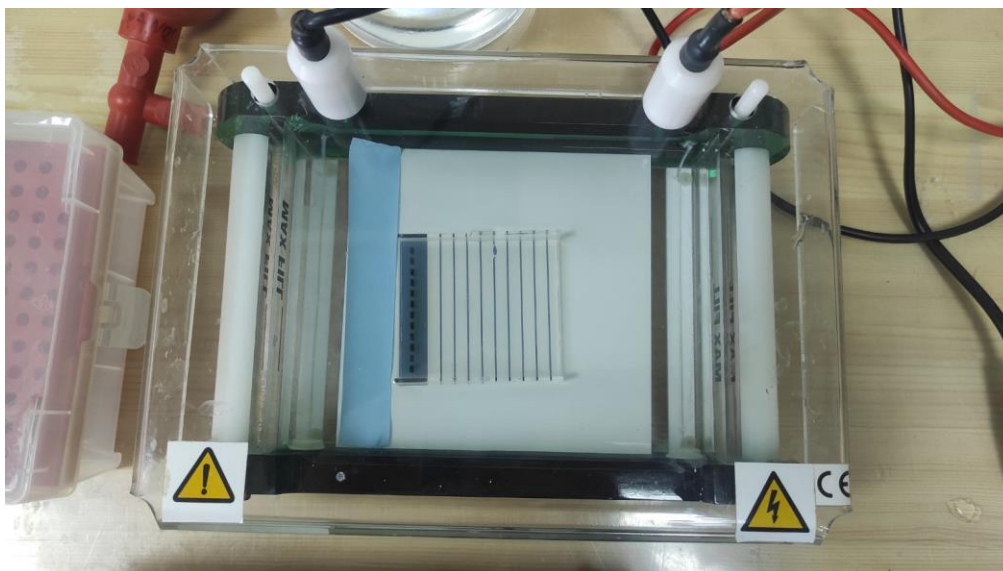
2.2.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Σε ηλεκτρικό ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν 0,2 g αγαρόζης και προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 mL.
2. Προστέθηκαν, μέσα στην κωνική, 20 mL διαλύματος TAE συγκέντρωσης 1x, με την βοήθεια σιφώνιου 25 mL και πουάρ.
3. Η κωνική τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
4. Όταν παρατηρήθηκαν φυσαλίδες και το μείγμα είχε ομογενοποιηθεί, η κωνική απομακρύνθηκε από τα μικροκύματα και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5- 6 λεπτά.
5. Ύστερα, το μείγμα άδειασε σε ειδικό καλούπι με χτενάκια, με σκοπό να σχηματιστούν τα «πηγαδάκια».
6. Το μείγμα αφέθηκε να σταθεροποιηθεί για 20 λεπτά.
7. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γέμισε μέχρι την ένδειξη MAX με διάλυμα TAE (1x).
8. Στην συνέχεια, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και το καλούπι, και το gel που είχε δημιουργηθεί τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
9. Μετά, 3 μ L πρότυπου δείκτη μοριακών βαρών (Ladder) και 1 μ L χρωστικής ουσίας προστέθηκαν σε eppendorf tubes του 1 mL και αναδεύτηκαν, με την βοήθεια πιπέτας, με την τεχνική επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης – εκρόφησης.
10. Στο επόμενο βήμα, ο Ladder τοποθετήθηκε στο πρώτο «πηγαδάκι» του gel.
11. Αφού πρώτα ονοματίστηκαν 10 eppendorf tubes με βάση τα δείγματα της PCR, 1 μ L χρωστικής ουσίας και 5 μ L από κάθε δείγμα προστέθηκαν και αναδεύτηκαν με την τεχνική της ταχείας και επαναλαμβανόμενης αναρρόφησης- εκρόφησης. Με την ίδια λογική όπως τοποθετήθηκε ο ladder, έτσι τοποθετήθηκαν και τα δείγματα στις εσοχές από τα πηγαδάκια με τη σειρά 1,2,3,4,5,6,7,8 (για τα ζεύγη εκκινητών 1,2,4,5) και σε άλλη ηλεκτροφόρηση ακολούθησαν τα δείγματα από το 3^ο ζεύγος (9,10), αφήνοντας ένα «πηγαδάκι» κενό ανάμεσα στον Ladder και στο 1^ο δείγμα κάθε ηλεκτροφόρησης.

12. Αφού ολοκληρώθηκε η φόρτωση των δειγμάτων, η συσκευή ηλεκτροφόρησης τέθηκε σε λειτουργία.
13. Τοποθετήθηκαν τα καλώδια στη σωστή θέση της συσκευής και επιλέχθηκε το πρόγραμμα για τάση ηλεκτρικού ρεύματος 100 V.
14. Μετά το χρονικό διάστημα των 20 λεπτών, το πρόγραμμα τέθηκε σε παύση, τα καλώδια αφαιρέθηκαν από την συσκευή και το gel απομακρύνθηκε.
15. Τέλος, το gel τοποθετήθηκε κάτω από UV φως, με στόχο την παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Η συγκεκριμένη διαδικασία ακολουθήθηκε μετά το τέλος της διαδικασίας απομόνωσης του RNA, μετά το τέλος του πρωτοκόλλου της DNase I και μετά την μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).



Εικόνα 21. Συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει το gel αгарόζης με τα φορτωμένα δείγματα της PCR.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υστερα από το πέρας 65 ημερών η καλλιέργεια των μικροφυκών ολοκληρώθηκε, καθώς οι μετρήσεις έφτασαν κοντά στην τιμή 3. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μετρήσεις της τιμής OD (optical density) που λαμβάνονταν περίπου κάθε 3 ημέρες.

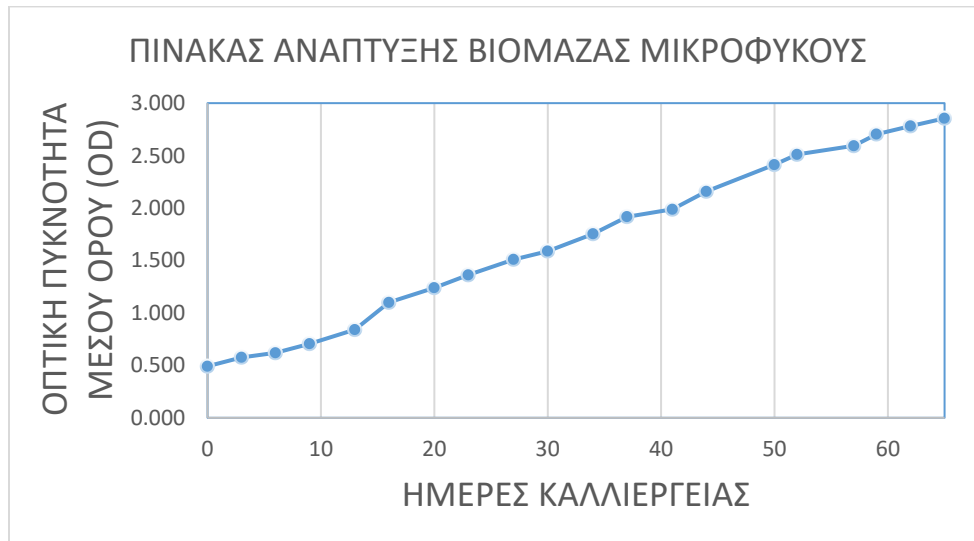
Πίνακας 15. Πίνακας ανάπτυξης βιομάζας. Αναγράφονται οι τιμές της οπτικής πυκνότητας (OD) των 6 κωνικών από την ημέρα 0 (ημέρα εμβολιασμού) μέχρι την ημέρα 65.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ *								
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΗΜΕΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΚΩΝΙΚΗ 1	ΚΩΝΙΚΗ 2	ΚΩΝΙΚΗ 3	ΚΩΝΙΚΗ 4	ΚΩΝΙΚΗ 5	ΚΩΝΙΚΗ 6	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ
7/11/2023	0	0.437	0.425	0.543	0.527	0.473	0.544	0.492
10/11/2023	3	0.567	0.467	0.634	0.623	0.529	0.634	0.576
13/11/2023	6	0.734	0.478	0.644	0.642	0.569	0.648	0.619
16/11/2023	9	0.879	0.529	0.698	0.799	0.642	0.686	0.706
20/11/2023	13	0.998	0.617	0.784	0.993	0.809	0.841	0.840
23/11/2023	16	1.543	0.802	0.886	1.264	1.149	0.955	1.100
27/11/2023	20	1.607	0.873	0.893	1.432	1.455	1.175	1.239
30/11/2023	23	1.659	1.084	1.202	1.620	1.428	1.182	1.363
4/12/2023	27	1.689	1.216	1.380	1.881	1.648	1.245	1.510
7/12/2023	30	1.694	1.364	1.463	1.855	1.678	1.479	1.589
11/12/2023	34	2.203	1.417	1.570	2.013	1.742	1.576	1.754
14/12/2023	37	2.622	1.576	1.680	2.074	1.810	1.738	1.917
18/12/2023	41	2.649	1.783	1.713	2.160	1.880	1.740	1.988
21/12/2023	44	2.650	1.997	1.920	2.269	2.237	1.880	2.159
27/12/2023	50	2.842	2.201	2.390	2.372	2.678	1.999	2.414
29/12/2023	52	2.871	2.312	2.456	2.380	2.690	2.358	2.511
3/1/2024	57	2.838	2.434	2.543	2.394	2.783	2.567	2.593
5/1/2024	59	2.839	2.613	2.739	2.579	2.803	2.651	2.704
8/1/2024	62	2.853	2.757	2.821	2.689	2.890	2.679	2.782
11/1/2024	65	2.815	2.802	2.913	2.886	2.913	2.801	2.855

*OD 600nm: Optical density

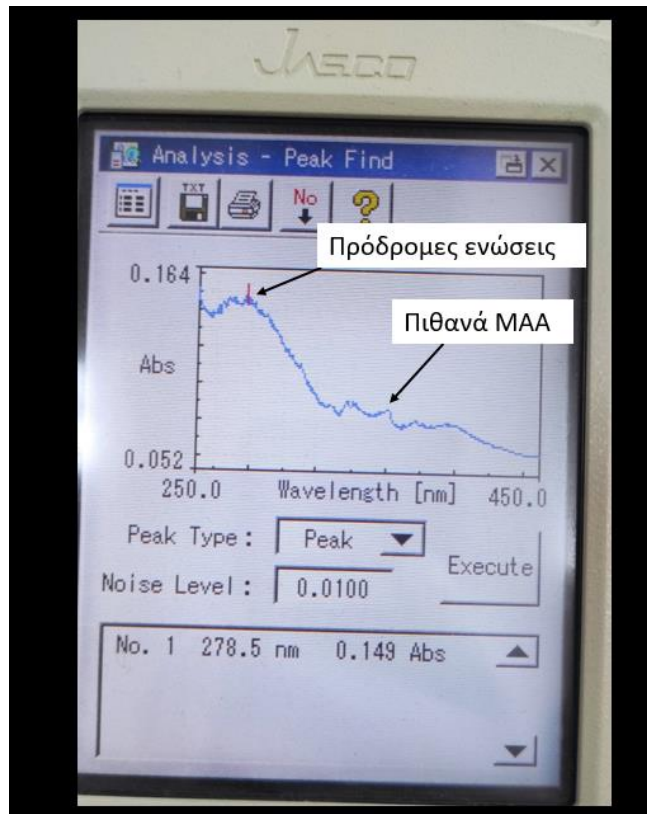
Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου όρου των τιμών της οπτικής πυκνότητας των 6 κωνικών, σε συνάρτηση με τις ημέρες καλλιέργειας.

Πίνακας 16. Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης της βιομάζας του μικροφύκου σε 65 ημέρες.



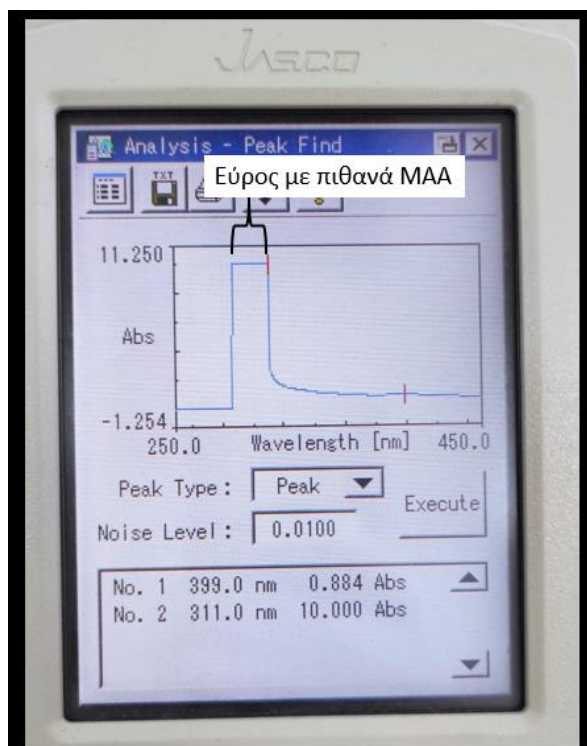
Αφού το μικροφύκος *Jaagichlorella luteoviridis* υποβλήθηκε σε καταπόνηση αλατότητας, πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών, με στόχο την εκχύλιση περιεχομένου που πιθανόν να περιέχει ΜΑΑ, στο τέλος του οποίου τα τελικά δείγματα κωνικών Control και κωνικών που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση

αλατότητας μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis, από το οποίο λήφθηκαν τα εξής αποτελέσματα:



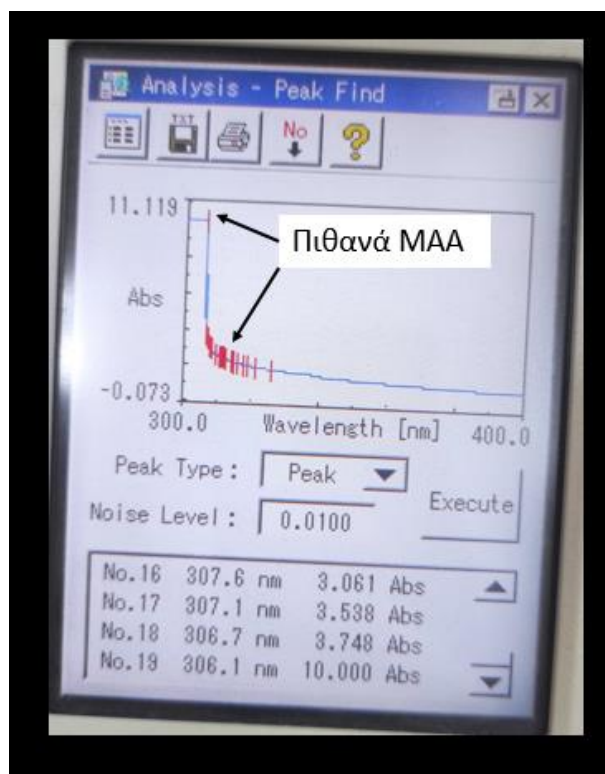
Εικόνα 22. Απεικόνιση αποτελεσμάτων φασματοφωτομέτρησης UV-Vis δείγματος από κωνική Control.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 21, παρατηρείται απορρόφηση στα 278,5 nm, γεγονός που σημαίνει ότι σε εκείνη την περιοχή απορροφούν ακτινοβολία άλλες πρόδρομες ενώσεις και όχι οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Στη συνέχεια, στην εικόνα 22 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης από κωνική που υποβλήθηκε σε καταπόνηση αλατότητας.



Εικόνα 23. Απεικόνιση αποτελεσμάτων φασματοφωτομέτρησης UV-Vis δείγματος από κωνικές που καταπονέθηκαν σε αλατότητα.

Παρατηρείται ότι η απορρόφηση στα 311 nm και συγκεκριμένα στο εύρος 289.2-311 nm ανήκει στην περιοχή που απορροφούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες, πιθανόν ΜΑΑ, ενώ η άλλη απορρόφηση που παρατηρείται στην περιοχή 399 nm η απορρόφηση είναι πάρα πολύ μικρή, δεν αντιπροσωπεύει περιοχή απορρόφησης των δευτερογενών μεταβολιτών. Επίσης, εξαιτίας της δημιουργίας πλατού έγινε προσπάθεια εξάλειψης του με αραιώση δείγματος $\frac{1}{2}$ με αποστειρωμένο νερό για καλύτερα αποτελέσματα. Τέλος, ρυθμίστηκε το εύρος μήκους κύματος από 300-400 nm. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 23.



Ύστερα από αραιώση του δείγματος με αναλογία $\frac{1}{2}$, παρατηρείται υψηλή απορρόφηση στα 306.1 nm, συγκεκριμένα απορρόφηση 10, περιοχή η οποία απορροφούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες.

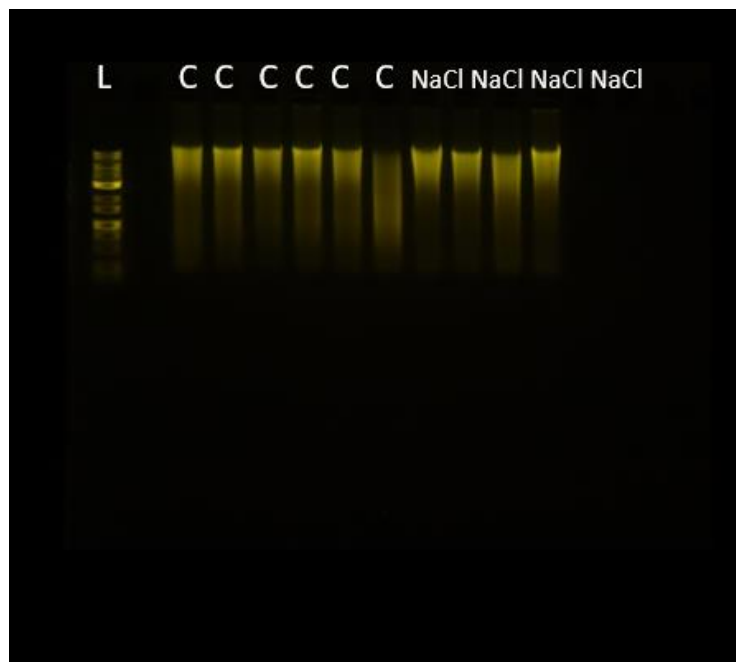
Στη συνέχεια ακολουθεί πίνακας που έχουν καταγραφεί όλες οι απορροφήσεις που δημιουργήθηκαν στη συγκεκριμένη φασματοφωτομέτρηση.

***Πίνακας 17.** Απεικόνιση απορροφήσεων από την φασματοφωτομέτρηση UV-Vis του δείγματος που υποβλήθηκε σε καταπόνηση αλατότητας σε εύρος μήκους κύματος 300-400 nm.*

ΚΟΡΥΦΕΣ	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ (nm)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (Abs)
1	326	1.864
2	321	1.989
3	318.9	2.06
4	317.7	2.097
5	315.6	2.172
6	315	2.206
7	314.7	2.249
8	314	2.267

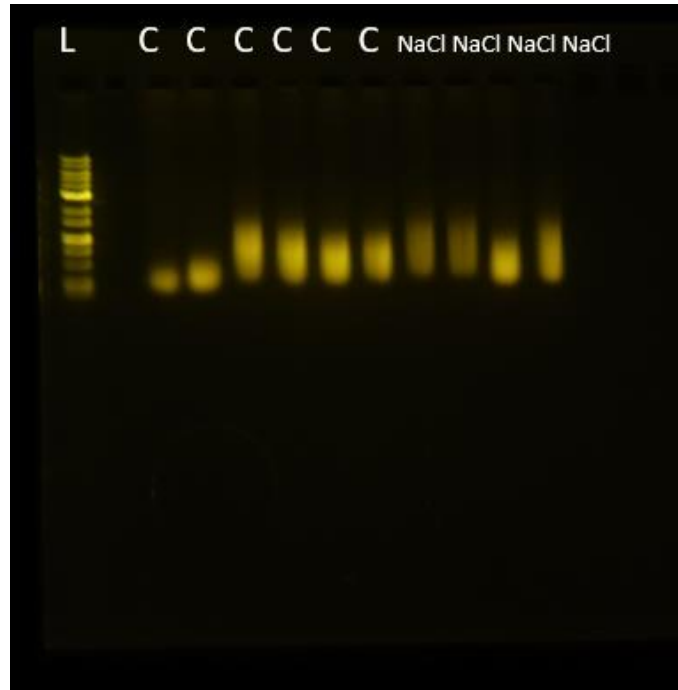
9	312.1	2.405
10	311.5	2.461
11	311	2.499
12	310.6	2.519
13	309.7	2.6
14	309.5	2.61
15	308	2.964
16	307.6	3.061
17	307.1	3.538
18	306.7	3.748
19	306.1	10

Έπειτα από την απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης για την πιστοποίηση της ύπαρξης RNA και ακολούθησε η τοποθέτηση της πηκτής κάτω από UV λάμπα, με στόχο την παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:



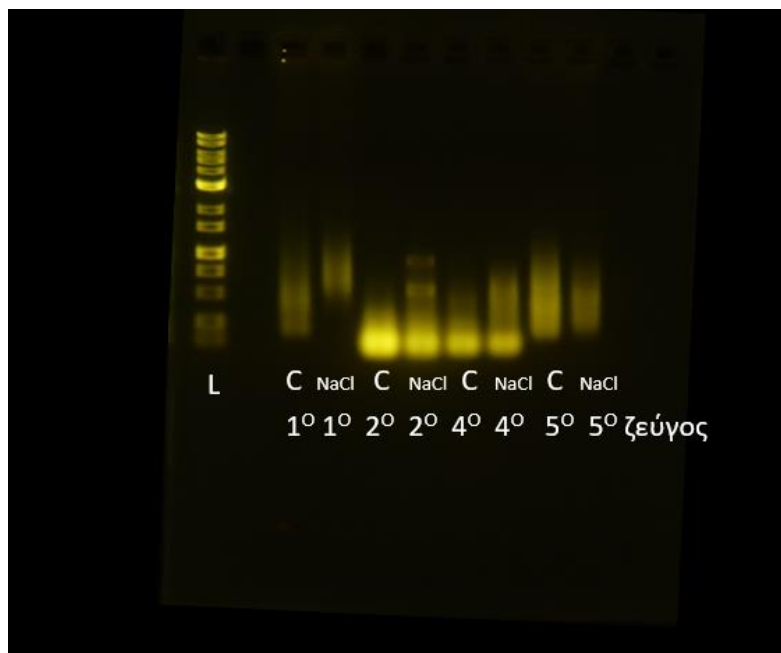
Εικόνα 24. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκε RNA. Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και προς τα δεξιά διακρίνονται 6 δείγματα από κωνικές Control και 4 δείγματα από κωνικές που καταπονέθηκαν σε αλατότητα (NaCl).

Από την συγκεκριμένη εικόνα γίνεται φανερό ότι υπήρχε μεγάλη ποσότητα DNA σε όλα τα δείγματα, γεγονός που δυσκόλευε την πιστοποίηση απομόνωσης RNA. Ως αποτέλεσμα, απαραίτητο βήμα αποτέλεσε το πρωτόκολλο DNase I και στην συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 25. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά το πρωτόκολλο της DNase I. Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα από κωνικές Control (C) και τα δείγματα από κωνικές που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας (NaCl).

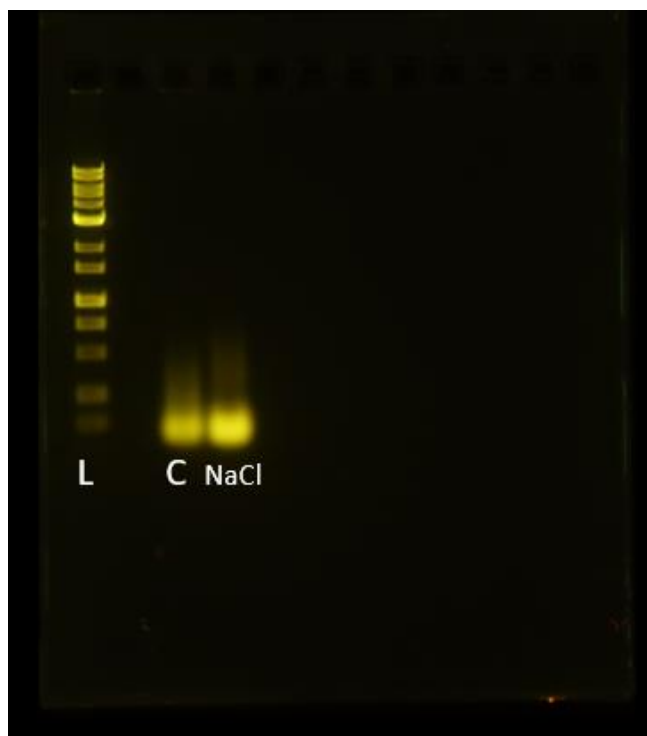
Στην εικόνα 25 παρατηρείται ότι σε όλα τα δείγματα υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα RNA, καθώς υπάρχουν χαρακτηριστικές ζώνες περίπου στα 300 ζεύγη βάσεων (bp) σύμφωνα με τον Ladder. Ύστερα, ακολούθησε η δημιουργία της cDNA βιβλιοθήκης, με στόχο τη πραγματοποίηση της μεθόδου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) με 5 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται στη συνέχεια:



Εικόνα 26. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά τη μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα της PCR με το 1^ο, 2^ο, 4^ο και 5^ο ζεύγος εκκινητών διαδοχικά. Πρώτα παρουσιάζεται δείγμα κωνικής Control (C) και μετά παρουσιάζεται το δείγμα κωνικής που καταπονήθηκε σε αλατότητα (NaCl).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 25, τα γονίδια που επάγουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πιθανόν MAA, υπερεκφράζονται στα ζεύγη εκκινητών 2 και 4. Παρατηρείται χαρακτηριστική ζώνη σε δείγματα κωνικών που έχουν καταπονεθεί σε αλατότητα. Επιπλέον, πιο εμφανής ζώνη παρατηρείται στο ζεύγος 2.

Στα ζεύγη εκκινητών 1 και 5 δεν παρατηρείται κάποια χαρακτηριστική ζώνη, γεγονός που σημαίνει ότι, με τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, τα ζεύγη εκκινητών 1 και 5 δεν κατάφεραν να πολλαπλασιάσουν την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πιθανόν αμινοξέων που ομοιάζουν με μυκοσπορίνη, σύμφωνα με την συμπληρωματικότητα των βάσεων του.



Εικόνα 27. Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά τη μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Από αριστερά διακρίνεται ο Ladder (L), ακολουθεί κενό «πηγαδάκι» και στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα της PCR με 3ο ζεύγος εκκινητών διαδοχικά. Πρώτα παρουσιάζεται δείγμα κωνικής Control (C) και μετά παρουσιάζεται το δείγμα κωνικής που καταπονέθηκε σε αλατότητα (NaCl).

Στην εικόνα 26 παρατηρείται ότι το 3^ο ζεύγος εκκινητών, με τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, δεν κατάφερε να πολλαπλασιάσει την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πιθανόν αμινοξέων που ομοιάζουν με μυκοσπορίνη, σύμφωνα με την συμπληρωματικότητα των βάσεων του.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η απομόνωση RNA ,συγκεκριμένα από μικροφύκη γλυκού νερού, είναι μία πολύ δύσκολη διαδικασία, εξαιτίας πολλών παραγόντων. Αρχικά, τα μικροφύκη διαθέτουν πολύ ισχυρά κυτταρικά τοιχώματα, γεγονός που καθιστά την εξαγωγή των εσωτερικών συστατικών τους πολύ δύσκολη. Επιπλέον, εκτός από το RNA, τα κύτταρα των μικροφυκών περιέχουν κι άλλες ενώσεις και μόρια σε μεγάλες ποσότητες, όπως είναι το DNA, πολυσακχαρίτες και οι φαινολικές ενώσεις, που μπορούν να παρεμποδίσουν την απομόνωση και την καθαρότητα του RNA. Συνεπώς, η διαδικασία εξαγωγής του RNA πρέπει να στηρίζεται σε ειδικά πρωτόκολλα και να χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια, ώστε να αποδομηθούν τα κυτταρικά τοιχώματα και να απομακρυνθούν

ανεπιθύμητες ενώσεις και μόρια. Το RNA θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες για να μην αποδομηθεί από διάφορες RNAσες, οι οποίες είναι ένζυμα που κατακερματίζουν το RNA. Συμπερασματικά, η απομόνωση RNA απαιτεί εξειδικευμένες γνώσεις για την επίτευξη αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Με την χρήση του πρωτοκόλλου DNase I, επετεύχθη η απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα χωρίς να καταστραφεί το RNA και με αυτόν τον τρόπο το πείραμα διεξήχθη με επιτυχία και εξήχθησαν έγκυρα αποτελέσματα. Σ' αυτήν την πτυχιακή διατριβή, η απομόνωση RNA, μετά την διεξαγωγή του πρωτοκόλλου DNase I ήταν επιτυχής σε όλα τα δείγματα κωνικών Control, αλλά και κωνικών που καταπονέθηκαν σε αλατότητα.

Απαραίτητο βήμα για την πραγματοποίηση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης, ήταν η κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης σε όλα τα δείγματα, η οποία πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης και άλλων αντιδραστηρίων και αποδείχτηκε επιτυχής.

Η ανάπτυξη του μικροφύκου *Jaagichlorella luteoviridis* σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης και πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του σε χλωριούχο νάτριο (NaCl) 1 M οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (MAA) από το μικροφύκος, όπως έδειξαν οι μετρήσεις με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis.

Η πραγματοποίηση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης αποδείχθηκε επιτυχής στα 2 από τα 5 ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, συγκεκριμένα στο 2^ο και στο 4^ο ζεύγος τα οποία αντιστοιχούν στα γονίδια D-Ala-D-Ala ligase Oxidoreductases και Malate_synthase. Στα συγκεκριμένα ζεύγη τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πιθανόν αμινοξέων που ομοιάζουν με μυκοσπορίνη, υπερεκφράστηκαν στο μικροφύκος που καταπονέθηκε σε αλατότητα, γεγονός που σημαίνει ότι η καταπόνηση του μικροφύκου *Jaagichlorella luteoviridis* σε αλατότητα επάγει την παραγωγή αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών, με στόχο την επιβίωση του. Στα ζεύγη εκκινητών 1,3 και 5 η έκφραση των γονιδίων (D-Ala-D-Ala ligase Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase, D-Ala-D-Ala ligase Acting_on_ester_bonds, Phosphoribosyl-ATP_diphosphatase του 1,3,5 ζεύγους εκκινητών αντίστοιχα) δεν ήταν επιτυχής και πολλοί είναι παράγοντες που θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές μπορεί να μην κατάφεραν να

πολλαπλασιάσουν την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών, πιθανόν λόγω διαφορών στην αλληλουχία των βάσεων, καθώς σχεδιάστηκαν με πρότυπο το είδος *Chlorella vulgaris*, ένα συγγενικό είδος μικροφύκους με την *Jaagichlorella luteoviridis*. Επίσης, μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι τα συγκεκριμένα γονίδια δεν εκφράζονται στο είδος *Jaagichlorella luteoviridis* όταν αυτό μεγαλώνει σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carole Anne Llewellyn, R. L. (2010). *Distribution and Abundance of MAAs in 33 Species of Microalgae across 13 Classes*. UK.
2. ERLICH, H. A. (1989). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*.
3. Figueroa-Torres, G. M. (2020). *Microalgae strain catalogue: A strain selection guide for microalgae users: cultivation and chemical characteristics for high added-value products*. Manchester.
4. Giannakouris, N. &. (2015). *Kallipos Open academic editions*. Ανάκτηση από Kallipos Open academic editions.
5. Harbers, M. (2007). *The current status of cDNA cloning*. Yokohama.
6. Joshi, D. (2010). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION.
7. Karl P. Lawrence, P. F. (2017). *Mycosporin-Like Amino Acids for Skin Photoprotection*. London.
8. Majekodunmi, S. O. (2015). A Review on Centrifugation in the Pharmaceutical Industry. σσ. 67-78.
9. Morris, R. (2015). *Spectrophotometry*. Florida.
10. MT Rahman, M. U. (2013). *Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review*.
11. Neustupa, J. N. (2009). *Kalinella bambusicola gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid Chlorella-like subaerial alga from Southeast Asia*. . Belgium.
12. Pereira, L. (2021). Macroalgae. σσ. 177-188.
13. PRÖSCHOLD, T. D. (2019). *The genus Jaagichlorella Reisingi (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and its close*. Austria.

14. Raj, S. (2021). *Microalgae as a Source of Mycosporine-like Amino Acids (MAAs); Advances and Future Prospects*. Tamil Nadu.
15. Schulz, J. A. (2008). Agarose Gel Electrophoresis. Στο I. ohn Wiley & Sons, *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*.
16. Yoon, J.-Y. (2016). *Spectrophotometry*.
17. Yuanyuan Ren, H. S. (2021). Παραγωγή καροτενοειδών από μικροφύκη:βιοσύνθεση, αντιδράσεις στην αλατότητα και νέες τεχνολογίες. Πεκίνο.
18. ΕΛ.Φ.Ε, Ε. Φ. (2008). *Μια βουτιά, μια ματιά στους κήπους του νερού.Γνωρίζοντας τα φύκη*. Αθήνα: ΣΤΑΜΟΥΛΗ Α.Ε.