

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΑΥΓΑ ΨΑΡΙΩΝ, ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ
ΕΜΠΟΔΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΕ
ΟΞΙΝΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ»**

ΤΣΑΜΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΒΟΛΟΣ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2000



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 735/1

Ημερ. Εισ.: 01-07-2003

Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: Δ

597.178 8

ΤΣΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΑΥΓΑ ΨΑΡΙΩΝ, ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ
ΕΜΠΟΔΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΕ
ΟΞΙΝΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ»**

ΤΣΑΜΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΒΟΛΟΣ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2000

Στον πατέρα μου, Χρήστο
(ξέρω πως είναι ακόμη κοντά μας
αν και τόσο μακριά.....)

στην μητέρα μου, Καίτη

στην αδελφή μου, Γιώτα

στον αδελφό μου, Γιάννη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
1.1. Γενικά στοιχεία των ψαριών που εξετάστηκαν	4
1.1.1. Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	4
1.1.2. Λαυράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	5
1.1.3. Κέφαλος ή κεφαλόπουλο (<i>Mugil cephalus</i>)	7
1.1.4. Χριστόψαρο (<i>Zeus faber</i>)	8
1.2. Δομή και λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων	10
1.3. Πρωτεΐνες	13
1.3.1. Γενικά	13
1.3.2. Δομή των πρωτεϊνών	13
1.3.3. Ιδιότητες των πρωτεϊνών	16
1.3.4. Κατάταξη και ταξινόμηση των πρωτεϊνών	18
1.3.5. Αποδιάταξη της δομής των πρωτεϊνών	18
1.4. Πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA και το RNA	20
1.5. Πρωτεΐνες που εμποδίζουν την κατακρήμνιση του DNA και του RNA σε τριγλωροξικό οξύ (TCA).	22
1.6. Ποιότητα αυγών ψαριών	24
1.7. Γενικά στοιχεία για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών	28
1.8. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	30
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
2.A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
2.A.1. Υλικά	32
2.A.1.1. Συσκευές	32
2.A.1.2. Αναλώσιμα	32
2.A.2. Μέθοδοι	34

2.A.2.1.	Συλλογή και διατήρηση αυγών	34
2.A.2.2.	Παρασκευή κυτταροπλάσματος από τα αυγά των ψαριών	36
2.A.2.3.	Υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα	37
2.A.2.4.	Μέθοδος μέτρησης της δράσης της πρωτεΐνης στην αναστολή της κατακρήμνισης του DNA, παρουσία τριχλωροξικού οξέος (TCA)	38
2.A.2.5.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου	39
2.A.2.6.	Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)	42
2.B.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
2.B.1.	Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης	44
2.B.2.	Απομόνωση πρωτεϊνών	45
2.B.2.1.	Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών τσιπούρας	45
2.B.2.2.	Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών λαυρακιού	48
2.B.2.3.	Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών κέφαλου	50
2.B.2.4.	Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών χριστόψαρου	52
2.B.3.	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	54
2.B.3.1.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αναγωγικές συνθήκες.	54
2.B.3.2.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αναγωγικές συνθήκες.	55
2.B.4.	Επίδραση των πρωτεϊνών στην αντιγραφή του DNA με PCR	56
2.B.4.1	Πολλαπλασιασμός μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA.	56
2.B.4.2.	Πολλαπλασιασμός μιτοχονδριακής περιοχής D-loop με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA.	57
2.B.4.3.	Πολλαπλασιασμός μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Vent _R (exo ⁻) DNA.	58
2.B.4.4.	Επίδραση της ποσότητας DNA στον πολ/σμό του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA, παρουσία σταθερής ποσότητας πρωτεΐνης	59
2.B.5.	Επίδραση της συγκέντρωσης του TCA στην κατακρήμνιση του DNA	60
	α) Τσιπούρα	60
	β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	61
2.B.6.	Επίδραση NaCl στην κατακρήμνιση του DNA	62

α) Τσιπούρα	62
β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	63
2.B.7. Επίδραση της θέρμανσης στην δραστικότητα των πρωτεϊνών	65
α) Τσιπούρα	65
β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	66
2.B.8. Επίδραση δισθενών μετάλλων στη δραστικότητα των πρωτεϊνών	69
2.B.8.1. Επίδραση Mg	70
α) Τσιπούρα	70
β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	71
2.B.8.2. Επίδραση Mn	73
α) Τσιπούρα	73
β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	74
2.B.8.3. Επίδραση Co	76
α) Τσιπούρα	76
β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	77
2.B.8.4. Επίδραση Zn	79
α) Τσιπούρα	79
β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	80
2.B.8.5. Επίδραση Cu	82
α) Τσιπούρα	82
β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο	83
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	85
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94

Π Ρ Ο Λ Ο Γ Ο Σ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε από το Σεπτέμβριο του 1999, έως τον Ιούνιο του 2000 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ενώ κάποια πειράματα έγιναν στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένων Βιολογικών και Χημικών Επιστημών του Γενικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Είναι τιμή μου, που κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής συνεργάστηκα με εξαιρετικούς επιστήμονες οι οποίοι μου έδωσαν τις κατάλληλες κατευθύνσεις για την περάτωσή της. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους παρακάτω:

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Κουρέτα, επιβλέποντα καθηγητή για την ανάθεση της διατριβής αυτής, για την καθοριστική συμβολή του στη διαμόρφωση της, για την γενικότερη καθοδήγησή του, για τις υποδείξεις και συμβουλές του οι οποίες αποδείχθηκαν πολύτιμες, για το χρόνο τον οποίο μου διέθεσε και γενικότερα για όλα όσα αποκόμισα από αυτόν κατά την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ζ. Μαμούρη, μέλους της τριμελούς επιτροπής, για την βοήθειά του, για την παραχώρηση των χώρων του εργαστηρίου του, καθώς και για την διόρθωση των χειρογράφων.

Την Λέκτορα κ. Π. Παναγιωτάκη, μέλους της τριμελούς επιτροπής, για τις υποδείξεις και τις συμβουλές της, για την ηθική της συμπαράσταση, καθώς και για τη διόρθωση των χειρογράφων.

Τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κ. Σταμάτη, Γεωπόνο, για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε, όποτε του την ζητούσα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Οικογένειά μου, η οποία ήταν κάθε στιγμή στο πλευρό μου, για όλα όσα μου έχει προσφέρει έως σήμερα. Μακάρι να μπορέσω να τους το ανταποδώσω κάποτε.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εδώ και αρκετά χρόνια, ο άνθρωπος έχει αρχίσει να εμβαθύνει στο μυστήριο που καλείται ζωή σε μοριακό επίπεδο. Ανακαλύπτει συνεχώς νέα δεδομένα, τα οποία χρησιμοποιεί για να ολοκληρώσει και να αποσαφηνίσει τις γνώσεις του σχετικά με την λειτουργία των φυτικών και ζωικών οργανισμών. Η ορθή εφαρμογή των δεδομένων αυτών, είτε σε επίπεδο έρευνας, είτε σε επίπεδο παραγωγής έχει ως αποτέλεσμα την εξέλιξη του ανθρώπινου είδους, τόσο από πνευματικής απόψεως, όσο και από άποψη επιπέδου διαβίωσης. Έτσι, ο γεωτεχνικός του σήμερα καλείται να δώσει απαντήσεις σε καιρία ζητήματα, τα οποία πριν από μερικά χρόνια δεν φανταζόταν ότι θα τον απασχολούσαν και ότι θα αποτελούσαν αντικείμενο προς έρευνα και εφαρμογή.

Ένα τέτοιο αντικείμενο αποτελεί και η μελέτη των υδρόβιων οργανισμών και πιο συγκεκριμένα η μελέτη εκείνων των ειδών που είτε ήδη εκτρέφονται συστηματικά, είτε πρόκειται να αποτελέσουν είδη υποψήφια προς εκτροφή. Βέβαια, αναφέρομαι στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, ο οποίος τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει ραγδαία ανάπτυξη, όχι μόνο στη χώρα μας, αλλά και παγκοσμίως. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε το γεγονός πως η χώρα μας σήμερα βρίσκεται στη πρώτη θέση, μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών, στη παραγωγή και στις εξαγωγές ευρύαλων ειδών ψαριών, όπως είναι η τσιπούρα και το λαυράκι. Στην ανάπτυξη αυτή έχει συντελέσει κυρίως το γεγονός πως τα αλιευτικά πεδία εξασθενούν χρόνο με τον χρόνο, ενώ ο πληθυσμός της γης αυξάνεται συνεχώς. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα ψάρια των υδατοκαλλιεργειών αποτελούν μια πρώτης τάξεως τροφή για τον άνθρωπο από κάθε άποψη, εξηγούν την ανάπτυξη του κλάδου αυτού.

Βέβαια, η μελέτη των εν λόγω ειδών δεν θα πρέπει να περιορίζεται μόνο σε κάποια χαρακτηριστικά και ιδιότητες, αλλά να εμβαθύνει όσο το δυνατό περισσότερο και σε μοριακό επίπεδο. Πιστεύω πως τέτοιου είδους έρευνες θα γίνουν το κλειδί, έτσι ώστε οι υδατοκαλλιέργειες θα συνεχίσουν να αποτελούν ένα δυναμικό παραγωγικό κλάδο που θα στηρίζει διατροφικά την ανθρωπότητα για πολλά χρόνια.

Ο σκοπός της παρούσης διατριβής είναι η απομόνωση και ο προσδιορισμός πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών τσιπούρα (*Sparus aurata*), λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*), κέφαλος (*Mugil cephalus*) και χριστόψαρο (*Zeus faber*), οι οποίες παρουσιάζουν την ιδιότητα να προστατεύουν την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων παρουσία τριχλωροξικού οξέος (TCA), καθώς και η μελέτη της επίδρασης στην δραστηριότητα των πρωτεϊνών αυτών κάποιων παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, η παρουσία NaCl και η παρουσία δισθενών μετάλλων. Τέλος, εξετάστηκε εάν τα επίπεδα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή η δραστηριότητα αυτών είναι δυνατό να συσχετιστούν άμεσα και αποτελεσματικά με την εν γένει ποιότητα των αυγών των παραπάνω ψαριών. Έτσι, ίσως αναπτυχθούν μελλοντικά τέτοιες τεχνικές προσδιορισμού της ποιότητας των αυγών οι οποίες θα δώσουν πολύ μεγάλη ώθηση στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Για το λόγο αυτό, η επιλογή των ειδών που αποτέλεσαν το πειραματικό μας υλικό δεν έγινε τυχαία, αλλά περιλάμβανε τρία είδη τα οποία ήδη εκτρέφονται εντατικά και συστηματικά (τσιπούρα, λαυράκι και κέφαλος), καθώς και ένα είδος (χριστόψαρο), το οποίο ίσως μελλοντικά αποτελέσει νέο είδος προς εκτροφή, εξαιτίας της καλής ποιότητας του κρέατός του.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Γενικά στοιχεία των ψαριών των οποίων τα αυγά εξετάστηκαν

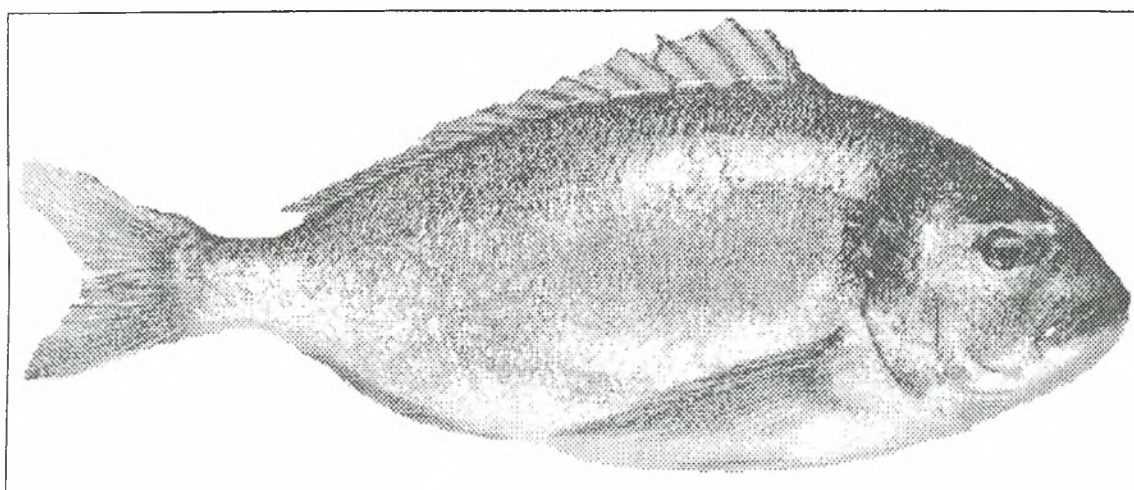
Τα ψάρια των οποίων τα αυγά εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία ήταν η τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*), ο κέφαλος (*Mugil cephalus*) και το χριστόψαρο (*Zeus faber*).

1.1.1. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα ανήκει στην οικογένεια *Sparidae*. Έχει σώμα επίμηκες και πλευρικά πιεσμένο. Η ράχη της είναι φουσκωμένη και το ρύγχος της μικρό (Εικόνα 1). Το χρώμα της είναι γενικά ασημένιο - γκρι με γκριζογαλάζια ράχη και πλευρά κίτρινο - ασημένια. Στην μετωπική επιφάνεια ανάμεσα στα μάτια έχει μια χρυσοκίτρινη λωρίδα, η οποία αποτελεί και το πιο χαρακτηριστικό της γνώρισμα, ενώ πάνω στο βραγχιοκάλυμμα έχει μια μαύρη κηλίδα. Το μήκος της μπορεί να φτάσει τα 70 cm, ενώ το βάρος της τα 6 Kg. Ζει σε παράκτιες θαλάσσιες περιοχές με βυθούς αμμώδεις ή σε φυκιάδες (*Posidonia oceanica*) και σε βάθη από 5-30 μέτρα το καλοκαίρι και έως 150 μέτρα το χειμώνα. Είναι μοναχικό είδος ή σχηματίζει μικρές ομάδες. Συναντάται και σε υφάλμυρα νερά. Είναι σαρκοφάγο και τρέφεται βασικά με δίθυρα μαλάκια, σπάζοντας το κοχύλι τους με μεγάλη ευκολία χάρη στην ισχυρή της οδοντοστοιχία, μαλακόστρακα και ψάρια. Αναπαράγεται από τον Οκτώβριο έως το Δεκέμβριο. Είναι ερμαφρόδιτο, πρωτανδρικό ψάρι. Οι τσιπούρες έως το 2ο έτος της ζωής τους είναι αρσενικές και στη συνέχεια γίνονται θηλυκές. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αλλαγή του φύλου της τσιπούρας δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Πιστεύεται ότι βασικό ρόλο παίζει το σωματικό μέγεθος των ψαριών, ενδεχομένως συνδυασμένο με την ηλικία τους. Η τσιπούρα είναι ευρύαλο αλλά στενόθερμο ψάρι. Εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία στο κρύο. Με τα πρώτα κρύα εγκαταλείπει τα ρηχά νερά και πηγαίνει στην ανοικτή θάλασσα. Προτιμά τα υφάλμυρα νερά (λιμνοθάλασσες), όπου και αναπτύσσεται πιο γρήγορα και το κρέας της παίρνει μια χαρακτηριστική γεύση. Εκτρέφεται με μεγάλη επιτυχία. Ειδικότερα, στη χώρα μας εκτρέφεται περίπου το 50 % της συνολικής

παραγωγής τσιπούρας στην Ευρώπη. Είναι είδος ευρέως διαδεδομένο και συναντάται στον τροπικό Ατλαντικό, έως την Μεγάλη Βρετανία, στη Μεσόγειο και σε όλες τις Ελληνικές θάλασσες. Έχει κρέας άσπρο, τρυφερό και εξαιρετικής ποιότητας. Κατά τον Soudan (1965) η απόδοση σε φιλέτο της τσιπούρας ανέρχεται σε 48%, ενώ η χημική σύσταση του κρέατός της κατά τους Patrizi και Gianì (1949) είναι 81,1% νερό, 17% πρωτεΐνες και 0,93% λίπη. Περιέχει δε 80 θερμίδες ανά 100 γραμμάρια βρώσιμου τμήματος (Παπαναστασίου, 1989).

Το μέγεθος των αυγών της τσιπούρας είναι 0,85-1,20 mm με μέση διάμετρο 1 mm (Χώτος και Ρογδάκης, 1992).



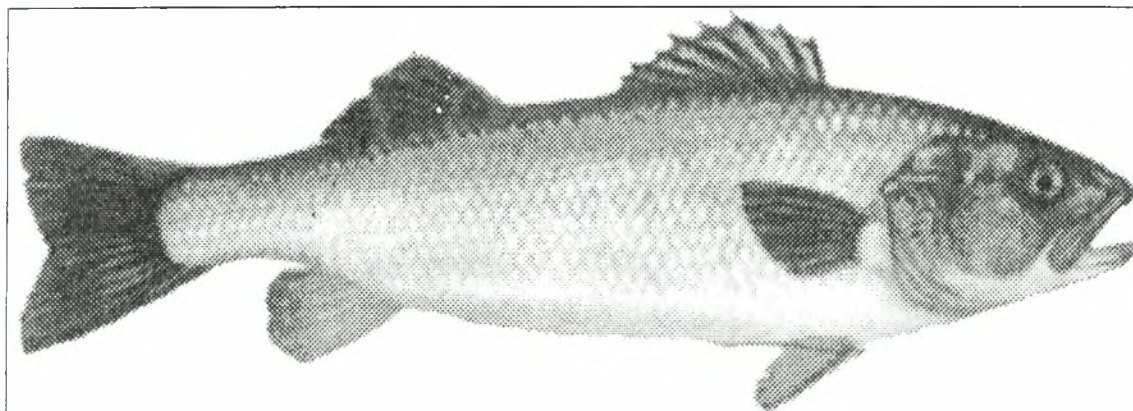
Εικ. 1: Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

1.1.2. Λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*)

Ανήκει στην οικογένεια *Moronidae*. Έχει σώμα ατρακτοειδές και χρώμα ασημένιο και γκριζο - μολυβί στην ράχη, ενώ έχει και μία διχαλωτή μαύρη ή σκοτεινή καφέ κηλίδα πάνω στο βραγχιοκάλυμμα (Εικόνα 2). Τα νεαρά ψάρια έχουν μερικές μαύρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματος, οι οποίες δεν υπάρχουν στα ενήλικα άτομα. Είναι ψάρι ευρύαλο που συναντάται και σε υφάλμυρα νερά ή καμιά φορά ακόμη και σε ποτάμια. Προτιμά βυθούς βραχώδεις ή αμμώδεις. Το εύρος της θερμοκρασίας

του νερού στο οποίο επιβιώνει κυμαίνεται από +2 °C έως και +35 °C. Είναι είδος κατάδρομο, δηλαδή μεταναστεύει και γεννά στην θάλασσα. Αναπαράγεται το χειμώνα από τον Ιανουάριο έως τον Φεβρουάριο στους φυσικούς του βιότοπους. Τα μικρά ψαράκια κάνουν την εμφάνισή τους το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Μάρτη ή νωρίς τον Απρίλη. Στα υφάλμυρα νερά αναπτύσσεται γρήγορα, φτάνοντας εύκολα τα 10 - 12 Kg και μερικές φορές τα 17 Kg. Είναι πολύ λαίμαργο, αρπακτικό, σαρκοφάγο ψάρι. Τρέφεται βασικά με γαρίδες, μαλάκια και ψάρια. Ψαρεύεται στην χώρα μας στις λιμνοθάλασσες του Μεσολογίου και της Μπουρούς σε μεγάλες ποσότητες, ιδιαίτερα κατά τους μήνες Σεπτέμβριο και Οκτώβριο, με όλους σχεδόν τους τρόπους της αλιείας (συρτή, καθετή, πεταχτάρι, καλάμι, δίχτυα κτλ.). Εκτρέφεται με μεγάλη επιτυχία. Στη χώρα μας, όπως συμβαίνει και με την τσιπούρα, εκτρέφεται περίπου το 50 % της συνολικής παραγωγής λαυρακίου της Ευρώπης. Συναντάται στον Ατλαντικό από τα Κανάρια νησιά έως την Νορβηγία, σε όλη Μεσόγειο, στις Ελληνικές θάλασσες και τα υφάλμυρα νερά και στην Μαύρη Θάλασσα. Είναι ένα από τα νοστιμότερα ψάρια, θεωρείται δε ο βασιλιάς των ψαριών από γαστρονομικής άποψης. Κατά τους Butler και Magnusson (1952) η απόδοση σε φιλέτο του λαυρακίου κυμαίνεται μεταξύ 60 και 69 %, ενώ το βρώσιμο τμήμα του είναι 53,9 %. Η χημική σύσταση του κρέατος του κατά τους Carteni και Aloii (1934) είναι νερό 78,8 %, πρωτεΐνες 19,06 % και λίπη 1,51, ενώ περιέχει 98 θερμίδες ανά 100 γραμμάρια βρώσιμου τμήματος (Παπαναστασίου, 1989).

Το μέγεθος των αυγών του λαυρακίου είναι 1,10-1,32 mm με μέση διάμετρο 1,25 mm (Χώτος και Ρογδάκης, 1992).

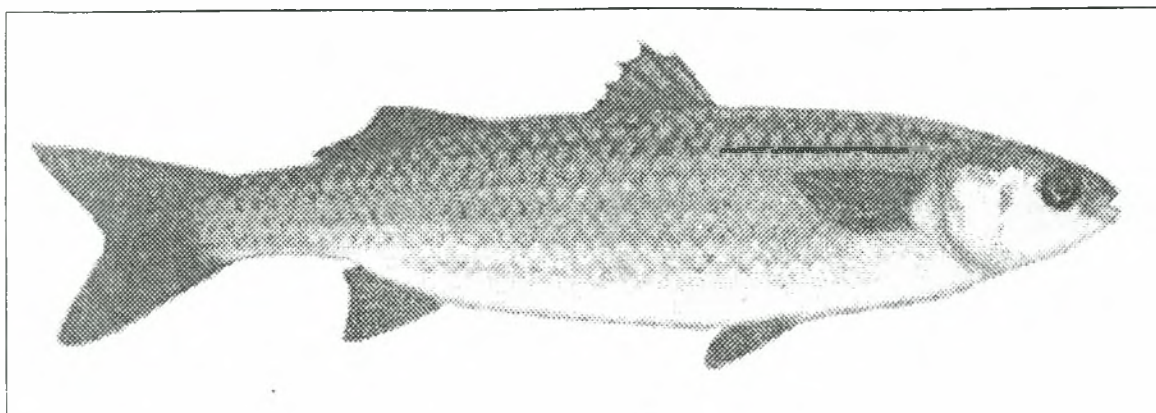


Εικ. 2: Λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*)

1.1.3. Κέφαλος ή κεφαλόπουλο (*Mugil cephalus*)

Ανήκει στην οικογένεια *Mugilidae* και είναι το σημαντικότερο είδος της. Έχει μεγάλο κεφάλι και ατρακτοειδές σχήμα σώματος. Το χρώμα του είναι γκρι με αποχρώσεις μπλε, πρασινωπές ή κιτρινωπές, ενώ έχει κίτρινη κηλίδα στο βραγχιοκάλυμμά της πολύ λίγο ευδιάκριτη (Εικόνα 3). Το μήκος του φτάνει τα 120 cm ενώ το βάρος του τα 8 Kg. Είναι πελαγικό και συνήθως παράκτιο είδος που μπαίνει σε υφάλμυρα και γλυκά νερά. Τρέφεται με μικρά ασπόνδυλα, νεαρά ψάρια και φύκια. Αναπαράγεται από Ιούλιο έως Οκτώβριο. Ψαρεύεται από τον Οκτώβριο έως τον Νοέμβριο. Συναντάται στον τροπικό Ατλαντικό έως τον Βискаϊκό κόλπο, στη Μεσόγειο και την Μαύρη θάλασσα. Στην χώρα μας εκτρέφεται υπό εκτατικές και ημιεντατικές συνθήκες. Το κρέας του είναι νόστιμο, άσπρο και τρυφερό. Καταναλώνεται νωπός, καπνιστός και κατεψυγμένος, Από τα αυγά των θηλυκών κέφαλων που λέγονται μπάφες, παρασκευάζεται το γνωστό αυγοτάραχο. Περίφημοι είναι οι καπνιστοί κέφαλοι που λέγονται λικουρίνοι ή νίτικα. Η απόδοση σε φιλέτο είναι κατά Soudan (1965) 68%, ενώ κατά τους Carteni και Aloi (1934) η απόδοση σε βρώσιμο τμήμα του κεφαλου ανέρχεται σε 48 %. Η χημική σύσταση της σάρκας του είναι νερό 72,24 %, πρωτεΐνες 21,81 % και λίπη 6,78 %, ενώ περιέχει 159 θερμίδες ανά 100 γραμμάρια βρώσιμου τμήματος (Παπαναστασίου, 1989). Η εκτροφή του γίνεται σε ημιεντατικές συνθήκες με μεγάλη επιτυχία.

Τα αυγά του κεφαλου είναι σφαιρικά και διαφανή με ένα ή περισσότερα ελαιώδη σταγονίδια. Η επιφάνειά τους είναι ομαλή χωρίς εσοχές ή εξογκώματα (Ogen, 1981). Η μέση διάμετρος των γονιμοποιημένων αυγών είναι περίπου 0,93 mm, με εύρος από 0,88 - 0,98 mm ενώ χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μίας μεγάλης ελαιώδους κηλίδας διαμέτρου 0,33 mm η οποία καθιστά τα αυγά εξαιρετικά επιπλεύσιμα (Κυο και συνεργάτες, 1973a, Nash και συνεργάτες, 1974). Τα αυγά δε συγκολλούνται μεταξύ τους.

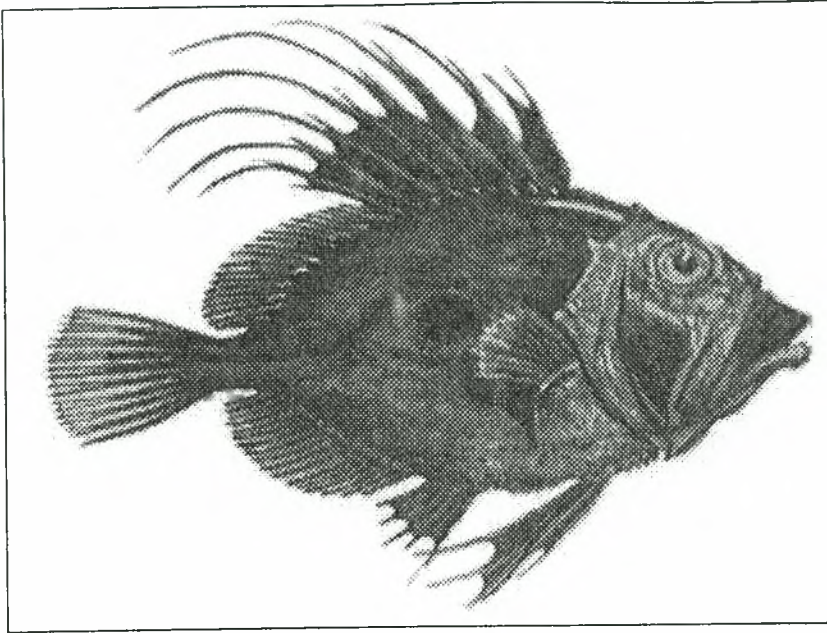


Εικ. 3: Κέφαλος (*Mugil cephalus*)

1.1.4. Χριστόψαρο (*Zeus faber*)

Ανήκει στην οικογένεια *Zeidae*. Χαρακτηριστικό του γνώρισμα αποτελεί μία μαύρη κηλίδα σε κάθε πλευρά του με ανοικτόχρωμο κύκλο (Εικόνα 4), που κατά την παράδοση αντιπροσωπεύουν τα αποτυπώματα των δακτύλων του Απόστολου Πέτρου που έπιασε το ψάρι, το οποίο σύμφωνα με εντολή του Χριστού έφερε χρυσό για να πληρώσουν οι χριστιανοί φόρους. Ζει μοναχικά ή σε μικρές ομάδες σε αμμώδεις και λασπώδεις βυθούς, καθώς και στις φυκιάδες (φύκια του είδους *Posidonia oceanica*) στα όρια της υφαλοκρηπίδας. Το καλοκαίρι πλησιάζει τις ακτές. Κολυμπά χαρακτηριστικά με συσπάσεις και πολλές φορές πλαγιασμένο στην μία πλευρά σαν τις γλώσσες. Τρέφεται με ψάρια και μαλακόστρακα. Είναι ωοτόκο και αναπαράγεται από το Μάη μέχρι τον Αύγουστο. Ψαρεύεται με δίχτυα, παραγάδια και με τις μηχανότρατες πυθμένα. Το χριστόψαρο είναι πολύ διαδεδομένο είδος. Συναντάται στον Ατλαντικό από τα Κανάρια νησιά έως την Νορβηγία, σε όλη Μεσόγειο και στην Μαύρη Θάλασσα. Έχει κρέας εξαιρετικής ποιότητας, εύγευστο και άπαχο. Έχει απόδοση σε φιλέτο 38%, ενώ το βρώσιμο τμήμα ανέρχεται στο 39,7%. Η χημική σύσταση του κρέατος κατά τους Carteni και Aloi (1934) είναι νερό 79,32%, πρωτεΐνες 19,06% και λίπη 0,87%, ενώ περιέχει 92 θερμίδες ανά 100 γραμμάρια βρώσιμου τμήματος (Παπαναστασίου, 1989).

Δεν έχουν αναφερθεί έως σήμερα προσπάθειες εκτροφής του είδους αυτού, είτε σε εκτακτής, είτε σε εντακτικής μορφής εκτροφές.



Εικ. 4: Χριστόψαρο (*Zeus faber*)

1.2. Δομή και λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων

Νουκλεϊκά οξέα είναι τα μακρομόρια-φορείς των γενετικών πληροφοριών (Αρσενάκης, 1999). Υπάρχουν δύο είδη νουκλεϊκών οξέων, το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ ή DNA και το ριβονουκλεϊκό οξύ ή RNA. Όπως και οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα είναι μακρομοριακές αλυσίδες που αποτελούνται από τέσσερις συνήθως δομικές μονάδες, οι οποίες ονομάζονται νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από τρία μέρη, μία φωσφορική ομάδα, μια πεντόζη και μία οργανική βάση. Όταν η πεντόζη είναι D-δεοξυριβόζη τότε το μακρομόριο είναι DNA, ενώ όταν η πεντόζη είναι D-ριβόζη τότε το μακρομόριο είναι RNA. Η οργανική βάση είναι αζωτούχος και μπορεί να ανήκει στις πουρίνες ή στις πυριμιδίνες. Οι βάσεις πουρίνης είναι η αδενίνη και η γουανίνη και οι βάσεις πυριμιδίνης είναι η κυτοσίνη, η ουρακίλη και η θυμίνη. Οι πουρίνες είναι ίδιες στο DNA και στο RNA, ενώ οι πυριμιδίνες που απαντώνται στο DNA είναι η κυτοσίνη και η θυμίνη και στο RNA η κυτοσίνη και αντί της θυμίνης η ουρακίλη. Εκτός αυτών των κυριότερων βάσεων, σε σπάνιες περιπτώσεις απαντώνται και άλλες όπως π.χ. η υποξανθίνη στο RNA και η 5-μεθυλοκυτοσίνη στο DNA.

Η ένωση της βάσης και της πεντόζης ονομάζεται νουκλεοζίτης. Έτσι αν η πεντόζη είναι δεοξυριβόζη, η ένωση ονομάζεται δεοξυριβονουκλεοζίτης, ενώ αν η πεντόζη είναι ριβόζη ονομάζεται ριβονουκλεοζίτης. Το νουκλεοτίδιο σχηματίζεται με την προσθήκη φωσφορικής ομάδας στον νουκλεοζίτη.

Τα νουκλεοτίδια που αποτελούν τις δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Ο δεσμός αυτός σχηματίζεται όταν το υδροξύλιο της θέσης 3' ενός νουκλεοτιδίου εστεροποιηθεί με τη φωσφορική ομάδα ενός άλλου νουκλεοτιδίου που βρίσκεται στην θέση 5'. Έτσι προκύπτει ένα δινουκλεοτίδιο και ένα μόριο νερού. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται τρινουκλεοτίδια, τετρανουκλεοτίδια κ.τ.λ. Οι βάσεις πουρίνες και πυριμιδίνες δεν σχηματίζουν μεταξύ τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Έτσι τα νουκλεϊκά οξέα είναι μια αλυσίδα πεντοζών και φωσφορικών ομάδων, που στο ένα άκρο έχουν ελεύθερο ένα 3' υδροξύλιο και στο άλλο μία 5' φωσφορική ομάδα. Συνήθως το μήκος των νουκλεϊκών οξέων είναι πολύ

μεγαλύτερο από αυτό των πρωτεϊνών. Το DNA είναι το πιο σύνηθες γενετικό υλικό, εκτός από μερικούς ιούς που χρησιμοποιούν το RNA.

Το DNA έχει συνήθως, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις δίκλωνη δομή που αποτελείται από δύο νουκλεοτιδικές αλυσίδες περιελιγμένες η μία γύρω από την άλλη, ώστε να σχηματίζουν μια δίκλωνη έλικα, ενώ στην περίπτωση του RNA η αλυσίδα είναι μονόκλωνη. Η κατεύθυνση των δύο αλυσίδων της έλικας του DNA είναι αντιπαράλληλη, δηλαδή η μία έχει κατεύθυνση 5' προς 3' και η άλλη 3' προς 5'. Οι αλυσίδες συγκρατούνται στην δομή της δίκλωνης έλικας με υδρογονικούς και υδροφοβικούς δεσμούς. Οι βάσεις βρίσκονται στο εσωτερικό της έλικας, σε ελικοειδή διάταξη, κάθετα προς τον άξονα της έλικας και είναι συμπληρωματικές, δηλαδή η αδενίνη βρίσκεται πάντοτε απέναντι στην θυμίνη, ενώ η κυτοσίνη πάντοτε απέναντι στην γουανίνη. Αυτός ο συνδυασμός των βάσεων είναι απόλυτο και έχει ιδιαίτερη σημασία για την σταθεροποίηση της δίκλωνης αλυσίδας. Ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις των δύο αλυσίδων (A - T και G - C) σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου που είναι δύο στην περίπτωση των ζευγών A - T και τρεις στην περίπτωση των ζευγών G - C. Η απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα είναι πάντοτε 3,4 Å και μία πλήρης στροφή της έλικας περιλαμβάνει 10 ζεύγη βάσεων. Το πλάτος της έλικας είναι 20 Å. Σαν αποτέλεσμα της δομής αυτής η έλικα σχηματίζει εξωτερικά δύο αυλακώσεις οι οποίες ονομάζονται μεγάλη και μικρή αυλάκωση αντίστοιχα. Η μεγάλη αυλάκωση είναι βαθύτερη από την μικρή.

Θεωρητικά η έλικα μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφη, είτε αριστερόστροφη, με πιο συνηθισμένη τη δεξιόστροφη η οποία ονομάζεται B-DNA. Σε ορισμένες περιπτώσεις και ιδιαίτερα σε περιοχές πλούσιες σε ζεύγη G - C, απαντάται και η αριστερόστροφη μορφή, η οποία ονομάζεται Z-DNA.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στους ζωντανούς οργανισμούς το DNA είναι πάντα δίκλωνο. Υπάρχουν όμως μερικοί ιοί οι οποίοι έχουν DNA γονιδίωμα το οποίο είναι μονόκλωνο. Επίσης, ενώ το RNA είναι τις περισσότερες φορές μονόκλωνο, υπάρχουν ιοί οι οποίοι έχουν ως γονιδίωμα δίκλωνο RNA. Στην περίπτωση του δίκλωνου RNA ισχύουν όσα αναφέρθηκαν για το δίκλωνο DNA με δύο διαφορές: α)

αντί της θυμίνης συμπληρωματική βάση της αδενίνης είναι η ουρακίλη, και β) οι βάσεις δεν είναι κάθετες προς τον άξονα της έλικας αλλά σε πλάγια θέση.

Το μέγεθος του DNA σε κάθε κύτταρο (εκτός των γεννητικών) ενός οργανισμού είναι πάντοτε το ίδιο και παραμένει σταθερό. Σε γενικές γραμμές το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων είναι μεγαλύτερο των πρωτεϊνών και του DNA μεγαλύτερο του RNA. Λόγω του μεγάλου μεγέθους το DNA είναι σχετικά δύσκολο να απομονωθεί ακέραιο, έτσι συνήθως κομματιάζεται κατά την απομόνωσή του.

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1970 έχουν ανακαλυφθεί δύο τεχνικές που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων στο DNA. Η μία ανακαλύφθηκε από τον ερευνητή F. Sanger, ο οποίος επίσης ανακάλυψε την τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των αμινοξέων στις πρωτεΐνες και η δεύτερη από τους R. Maxam και W. Gilbert. Αποτέλεσμα αυτών των σημαντικών ανακαλύψεων ήταν ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων μιας πληθώρας DNA από διαφορετικούς οργανισμούς, προκαριωτικούς και ευκαριωτικούς, και να καταστεί δυνατή η σύγκριση μεταξύ τους. Σήμερα στα πλαίσια της παγκόσμιας κοινωνίας των πληροφοριών υπάρχουν ειδικές ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων όπου οι ερευνητές καταθέτουν τα αποτελέσματα τους ώστε να είναι προσιτά σε όλους τους ενδιαφερόμενους. Από τις συγκρίσεις των DNA ακολουθιών διαπιστώθηκαν μεγάλες ομοιότητες αλλά και διαφορές ως προς τη δομή και τη λειτουργία των γονιδίων.

Το DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών έχει ελεύθερα άκρα και χαρακτηρίζεται ως ραβδόμορφο. Το DNA των βακτηρίων, μερικών ιών, καθώς και το DNA των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών έχουν κυκλική μορφή, δηλαδή δεν έχουν ελεύθερα άκρα. Κατά την απομόνωση κυκλικών DNA παρατηρούνται δεξιόστροφες συνήθως υπερέλικες και σε σπάνιες περιπτώσεις αριστερόστροφες. Οι δεξιόστροφες ονομάζονται και αρνητικές υπερέλικες

Στους ζωντανούς οργανισμούς δεν υπάρχουν πολλές υπερέλικες στα κυκλικά DNA επειδή συνήθως βρίσκονται σε στενή επαφή με ειδικές πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν τον σχηματισμό τους. Κατά την απομόνωση όμως του DNA, οι πρωτεΐνες αυτές αφαιρούνται και έτσι σχηματίζονται οι υπερέλικες. Ο σχηματισμός των

δεξιόστροφων υπερελίκων έχει ιδιαίτερη σημασία στη μέθοδο απομόνωσης κυκλικού DNA (πλασμιδίων ή ιών).

Ας δούμε τώρα κάποια στοιχεία της δομής του RNA. Υπάρχουν τέσσερα είδη RNA: α) ριβοσωμικό rRNA, β) αγγελιοφόρο mRNA, γ) κωδικό tRNA και δ) μικρό πυρηνικό snRNA, το οποίο είναι πολύ μικρό, βρίσκεται μόνο στα ευκαριωτικά κύτταρα και είναι οργανωμένο σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια. Σε μερικούς ιούς όμως, το RNA παίζει τον διπλό ρόλο του αγγελιοφόρου και του φορέα των γενετικών πληροφοριών. Στις περιπτώσεις αυτές το RNA είναι δίκλωνο ή μονόκλωνο. Το μονόκλωνο RNA έχει την ίδια πρωτοταγή δομή με το DNA με τη διαφορά ότι η πεντόζη είναι ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη. Το μονόκλωνο RNA επίσης μπορεί να σχηματίσει εσωτερικές δίκλωνες περιοχές οι οποίες δημιουργούνται λόγω υδρογονικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων (δηλαδή A-U και G-C) στην ίδια αλυσίδα. Έτσι παρατηρούνται και δίκλωνες περιοχές στα μονόκλιωνα RNA.

Τα διαλύματα των νουκλεϊκών οξέων απορροφούν το υπεριώδες με μέγιστο στα 260 nm (Γεωργάτσος, 1993). Πιο αναλυτικά, η απορρόφηση του DNA, αλλά και του RNA στο υπεριώδες, και μάλιστα στα 260 nm οφείλεται στο ότι όλες οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης απορροφούν ισχυρά στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος,

1.3. Πρωτεΐνες

1.3.1. Γενικά

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομοριακές ενώσεις αμινοξέων. Για να σχηματιστεί μια πρωτεΐνη η αμινομάδα ενός αμινοξέος αντιδρά με την καρβοξυλομάδα ενός άλλου σχηματίζοντας έτσι έναν πεπτιδικό δεσμό. Η σύνδεση πολλών αμινοξέων οδηγεί στον σχηματισμό μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Έτσι μια πρωτεΐνη είναι μια αλυσίδα στην οποία εναλλάσσονται οι καρβοξυλομάδες και οι αμινομάδες των διαδοχικών αμινοξέων. Συνήθως, οι πρωτεΐνες περιέχουν στο μόριό τους περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ίδιες ή διαφορετικές μεταξύ τους. Σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες που έχουν μοριακό βάρος πάνω από 50.000 αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Οι ομάδες R των αμινοξέων συνήθως δε συμμετέχουν σε ομοιοπολικούς δεσμούς εκτός από την ομάδα -SH (σουλφυδρυλομάδα) της κυστεΐνης η οποία μπορεί να αντιδράσει με μία δεύτερη κυστεΐνη, η οποία μπορεί να βρίσκεται είτε στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα, είτε σε άλλη, δημιουργώντας έτσι μια γέφυρα θείου (δεσμός S-S, δισουλφιδικός δεσμός). Αυτός ο δεσμός είναι σημαντικός για την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

1.3.2. Δομή των πρωτεϊνών

Οι δομές των πρωτεϊνών είναι τέσσερις, η πρωτοταγής δομή, η δευτεροταγής δομή, η τριτοταγής δομή και η τεταρτοταγής δομή (Αρσενάκης, 1999).

Πρωτοταγής δομή.

Η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών αναφέρεται στη διαδοχή των αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, στο είδος και στον αριθμό των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

Δευτεροταγής δομή.

Η δευτεροταγής δομή αναφέρεται στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και οφείλεται κυρίως σε υδρογονικούς δεσμούς οι οποίοι είναι πολύ ασθενείς. Επειδή όμως δεσμοί υδρογόνου μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ πολλών πλευρικών ομάδων R, καθώς επίσης και στην περιοχή των πεπτιδικών δεσμών, αν και ασθενείς από κοινού αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα σταθεροποίησης της δομής μιας πρωτεΐνης. Οι δεσμοί υδρογόνου μπορεί να σχηματιστούν είτε μεταξύ αμινοξέων στην ίδια αλυσίδα, είτε μεταξύ γειτονικών αλυσίδων. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσονται οι υδρογονικοί δεσμοί σχηματίζεται η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να είναι πριονωτό β-έλασμα ή α-έλικα.

β-έλασμα: Βρίσκεται κυρίως στις ινώδεις πρωτεΐνες. Στη διαμόρφωση αυτή η πεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η κάθε μονάδα 6 δεσμών, η οποία απαρτίζεται από τα 6 άτομα C-CO-NH-C που συνιστούν μία πρωτεΐνη, κάνει γωνία με το επίπεδο της γειτονικής μονάδας. Διαφέρει από την α-έλικα στο ότι αναπτύσσονται διαμοριακοί υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ γειτονικών ελασμάτων με αποτέλεσμα να δημιουργούνται, παράλληλα ή αντιπαράλληλα κατά το μήκος ενός άξονα, έτσι ώστε να δημιουργούνται ίνες ή φύλλα. Οι ομάδες R προεξέχουν κάθετα προς τη μία ή την άλλη πλευρά της έλικας ή του φύλλου.

α-έλικα: Βρίσκεται κυρίως στις σφαιρικές πρωτεΐνες. Η διάταξη της πεπτιδικής αλυσίδας είναι ελικοειδής. Σε αντίθεση με τα β-ελάσματα, οι υδρογονικοί δεσμοί είναι ενδομοριακοί, δηλαδή αναπτύσσονται μόνο μεταξύ αμινοξέων που βρίσκονται στην ίδια πεπτιδική αλυσίδα και διατάσσονται λίγο - πολύ παράλληλα προς τον επιμήκη άξονα. Αν και η α-έλικα μπορεί να είναι δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη, τις περισσότερες φορές είναι δεξιόστροφη.

Τριτοταγής δομή.

Αναφέρεται στην αναδίπλωση της πεπτιδικής αλυσίδας γύρω από τον εαυτό της και στο τελικό σχήμα που θα πάρει στο χώρο. Ουσιώδη ρόλο παίζουν οι αλληλεπιδράσεις των πλευρικών ομάδων R των αμινοξέων, όπως π.χ. οι ομοιοπολικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των σουλφυδρυλομάδων δύο κυστεϊνών (ονομάζονται

δισουλφιδικοί δεσμοί ή γέφυρες θείου S-S). Οι δεσμοί αυτοί είναι πιο ισχυροί και από τους πεπτιδικούς δεσμούς που ενώνουν δύο διαδοχικά αμινοξέα. Πιο σπάνια, εκτός των δισουλφιδικών δεσμών μπορούν να σχηματιστούν και άλλοι ομοιοπολικοί δεσμοί. Εκτός των ομοιοπολικών δεσμών σχηματίζονται και δευτερεύοντες δεσμοί μεταξύ των ομάδων R και οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως πολικοί και μη πολικοί. Οι πολικοί δεσμοί μπορούν να είναι ιονικοί δεσμοί ή δεσμοί υδρογόνου που είναι και οι πιο συνήθεις. Οι μη πολικοί δεσμοί, οι οποίοι ονομάζονται και υδροφοβικοί δεσμοί, σχηματίζονται μεταξύ υδρόφοβων μορίων σε υδατικά διαλύματα, ενώ συνήθως εντοπίζονται στο εσωτερικό σφαιρικών πρωτεϊνών, όπου αν και σχετικά ασθενείς συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της τριτοταγής δομής τους.

Τεταρτοταγής δομή.

Πολλές πρωτεΐνες αποτελούνται από περισσότερες από μία πεπτιδικές αλυσίδες, π.χ. η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από δύο αλυσίδες τύπου 'α' και από δύο τύπου 'β', οι οποίες έχουν μοριακό βάρος 16.000. Η φερριτίνη αποτελείται από 20 πανόμοιες αλυσίδες, κάθε μια από τις οποίες περιέχει 200 αμινοξέα. Έτσι το μοριακό βάρος της αιμοσφαιρίνης είναι 64.000 και της φερριτίνης 480.000. Η διάταξη των διαφόρων αλυσίδων στις πρωτεΐνες δεν είναι τυχαία και αποτελεί την τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

1.3.3. Ιδιότητες των πρωτεϊνών

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών είναι απόρροια των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αμινοξέων που τις συνιστούν. Οι πρωτεΐνες, όπως και τα αμινοξέα είναι αμφολύτες, δηλαδή συμπεριφέρονται τόσο σαν οξέα, όσο και σαν βάσεις. Σαν αμφολύτες που είναι οι πρωτεΐνες θα έχουν, η κάθε μία τους, ένα σημείο της κλίμακας του pH όπου δεν έχουν καθόλου καθαρό φορτίο. Το σημείο αυτό ονομάζεται ισοηλεκτρικό, το οποίο εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητα σε διάφορα αμινοξέα. Έτσι, εάν σε μια πρωτεΐνη υπερέχουν τα όξινα αμινοξέα από τα αλκαλικά, το ισοηλεκτρικό σημείο θα είναι συγκριτικά χαμηλό και αντιστρόφως. Στο ισοηλεκτρικό

σημείο οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση δεν κινούνται ούτε προς την άνοδο, ούτε προς την κάθοδο. Αυτό δεν οφείλεται στην έλλειψη φορτίου, αλλά απλώς σημαίνει ότι το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο είναι ανύπαρκτο, λόγω του ότι τα αρνητικά φορτία εξουδετερώνουν τα θετικά.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών στο νερό εξαρτάται άμεσα από το ισοηλεκτρικό σημείο, στο οποίο παρουσιάζουν την μικρότερη διαλυτότητα. Επίσης τα ανόργανα άλατα σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών (εναλάτωση), ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις την ελαττώνουν (εξαλάτωση). Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εκτός από τις ηλεκτροστατικές απωθητικές δυνάμεις, οφείλεται και στην ενυδάτωση των μορίων των πρωτεϊνών. Όταν αφαιρεθούν μόρια νερού από τις πρωτεΐνες, αυτές έχουν την τάση να καθιζάνουν.

Άλλος παράγοντας που ελαττώνει τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών στο νερό είναι οι ουδέτεροι υδατοδιαλυτοί οργανικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη και η ακετόνη. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στην κλασματική καθίζηση των πρωτεϊνών. Έχει αποδειχθεί ότι όταν το pH και η ιονική ισχύς είναι σταθερά, τότε η διαλυτότητα της πρωτεΐνης εξαρτάται από την διηλεκτρική σταθερά του μέσου στο οποίο βρίσκεται. Επειδή οι οργανικοί αυτοί διαλύτες έχουν χαμηλότερες διηλεκτρικές σταθερές από το νερό, η προσθήκη τους σε ένα υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση του βαθμού ιονισμού των ομάδων R των πρωτεϊνών, λόγω της αφαίρεσης μορίων νερού από τις πρωτεΐνες. Αυτό βέβαια έχει σαν συνέπεια την ελάττωση της διαλυτότητας και την καθίζηση των πρωτεϊνών.

Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνει την διαλυτότητα των πρωτεϊνών, αλλά έως ενός ορισμένου ορίου που είναι κοντά στους 40-50 °C για τις περισσότερες πρωτεΐνες. Πάνω από αυτή την θερμοκρασία αρχίζουν οι επιπτώσεις στις ανώτερες δομές των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται και η διαλυτότητά τους.

1.3.4. Κατάταξη και ταξινόμηση των πρωτεϊνών

Από πλευράς δομής, τις πρωτεΐνες μπορούμε να τις κατατάξουμε στις σκληροπρωτεΐνες και τις σφαιρικές πρωτεΐνες (Γεωργάτσος, 1993). Οι σκληροπρωτεΐνες είναι δυσδιάλυτες στο νερό και ιώδεις και τις συναντούμε κυρίως στο συνδετικό ιστό των ζώων (κολλαγόνα), ενώ οι σφαιρικές πρωτεΐνες είναι ευδιάλυτες στο νερό ή σε αραιά αλατούχα διαλύματα και είναι ευρύτατα διαδεδομένες.

Από πλευράς βιολογικού ρόλου μπορούμε να τις κατατάξουμε στις δομικές και τις λειτουργικές. Οι δομικές πρωτεΐνες συμβάλουν στην διαμόρφωση της υφής και στη διατήρηση της μορφολογικής σταθερότητας των ιστών ή ακόμη και των υποκυτταρικών στοιχείων. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι το κολλαγόνο, οι κερατίνες, καθώς και ορισμένες πρωτεΐνες των μεμβρανών. Οι λειτουργικές πρωτεΐνες έχουν ένα σημαντικό κοινό χαρακτηριστικό: μπορούν να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν εκλεκτικά ορισμένα μόρια που ονομάζονται ligands, η φύση των οποίων ποικίλλει από μεγάλο μοριακού βάρους ενώσεις, έως ανόργανα ιόντα. Κατατάσσονται σε καταλυτικές, μεταφέρουσες, κινητικές, αμυντικές, ρυθμιστικές και αποθηκευτικές.

1.3.5. Αποδιάταξη της δομής των πρωτεϊνών

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η διαμόρφωση της δομής των πρωτεϊνών μας ενδιαφέρουν κυρίως για τις επιπτώσεις που έχουν στη λειτουργικότητά τους. Έτσι, ενώ όλες οι πρωτεΐνες αποτελούνται από τα ίδια 20 αμινοξέα, εντούτοις εκτελούν χιλιάδες διαφορετικές λειτουργίες. Είναι φανερό ότι αυτό οφείλεται κυρίως στις ανώτερες διαμορφώσεις της δομής των πρωτεϊνών. Ακόμη και μικρές μετακινήσεις ομάδων στις πρωτεΐνες, της τάξης των λίγων Angstrom, μπορεί να έχουν δραματικές επιπτώσεις τόσο στις φυσικοχημικές, όσο και στις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών (Τρακατέλλης, 1990). Αυτή η διαδικασία ορίζεται ως αποδιάταξη της δομής των πρωτεϊνών, ενώ οι επιπτώσεις αυτές ονομάζονται πιο απλά μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η αποδιάταξη της δομής των πρωτεϊνών σε οποιαδήποτε φάση έχει ως αποτέλεσμα σχεδόν πάντα την απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης.

Οι δομές των πρωτεϊνών μπορούν να αποδιαταχθούν και να καταστραφούν με διάφορους τρόπους, όπως π.χ. με θέρμανση, με ακραίες τιμές του pH, με έκθεση σε μεγάλες συγκεντρώσεις ουρίας, με έκθεση σε απορρυπαντικά, όπως το νατριούχο άλας του θειϊκού δωδεκυλίου (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) κ.α. Έτσι καταστρέφονται δεσμοί υδρογόνου και ιονικοί δεσμοί, με αποτέλεσμα το πρωτεϊνικό μόριο από ένα οργανωμένο σύνολο που ήταν, να χάσει τις ανώτερες διαμορφώσεις του.

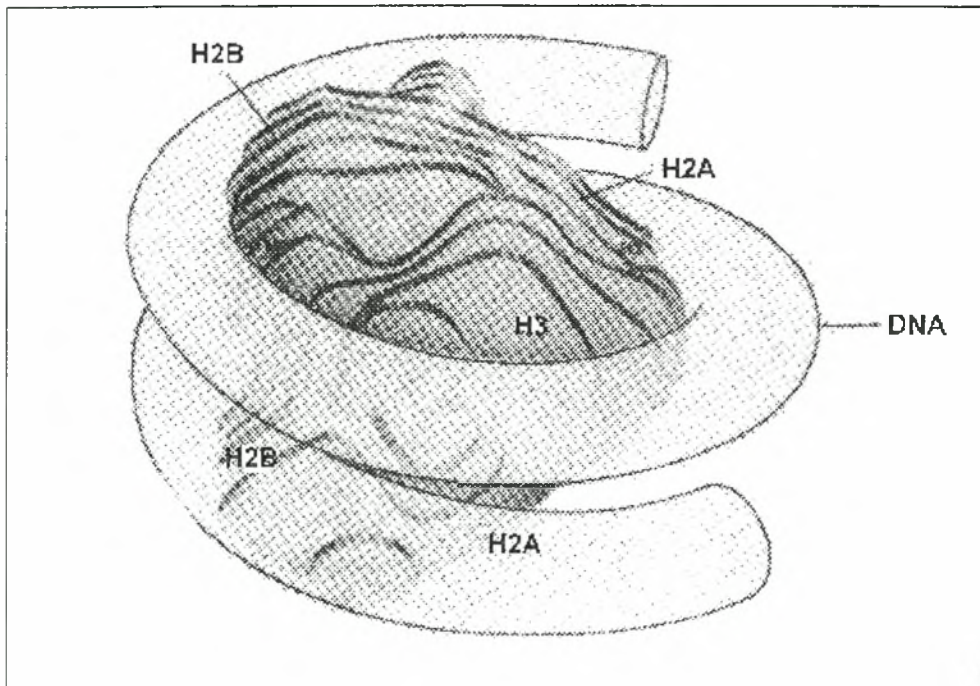
Η αποδιάταξη της δομής μιας πρωτεΐνης μπορεί να είναι αμφίδρομη ή μη αμφίδρομη. Όταν η μετουσίωση γίνεται με ήπια μέσα, όπως π.χ. με ουρία, η αφαίρεση του παράγοντα που προκαλεί τη μετουσίωση έχει συνήθως ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση της διαμόρφωσης της δομής και της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης. Εάν όμως η μετουσίωση γίνει με πιο ισχυρά μέσα, όπως π.χ. υψηλές θερμοκρασίες, ακραίες τιμές pH κ.α., τότε το πρωτεϊνικό μόριο συνήθως δεν μπορεί να επανέλθει στη δραστική του μορφή.

1.4. Πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA και το RNA (νουκλεοπρωτεΐνες)

Τα περισσότερα είδη των νουκλεϊκών οξέων στα ευκαρυωτικά κύτταρα, δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες (Αρσενάκης, 1999). Σύμπλοκα DNA με πρωτεΐνες ονομάζονται δεοξυριβονουκλεοπρωτεΐνες και σύμπλοκα RNA με πρωτεΐνες ονομάζονται ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Είναι γνωστό ότι το DNA του πυρήνα κατά τη μεσόφαση βρίσκεται σε μορφή χρωματίνης. Τα κυριότερα συστατικά της χρωματίνης είναι DNA και μια κατηγορία βασικών πρωτεϊνών, οι οποίες σε pH 7 είναι θετικά φορτισμένες, που ονομάζονται ιστόνες. Το DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι σθεναρά συνδεδεμένο με τις ιστόνες, οι οποίες πακετάρουν το DNA με οργανωμένη μορφή στον πυρήνα. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, δεδομένου του τεράστιου σχετικά μεγέθους του DNA των ευκαρυωτικών. Για παράδειγμα, το συνολικό μήκος του DNA ενός ανθρώπινου κυττάρου έχει μήκος περίπου 2 μέτρων, ενώ πρέπει να πακεταριστεί μέσα στον πυρήνα, ο οποίος έχει διάμετρο μόλις 5 έως 10 μm . Οι ιστόνες είναι από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες του ευκαρυωτικού κυττάρου και αθροιστικά η μάζα τους είναι περίπου ίση με την μάζα του κυτταρικού DNA. Επιπλέον στη χρωματίνη υπάρχουν και ορισμένες όξινες πρωτεΐνες, ίσης περίπου μάζας με τις ιστόνες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης των γενετικών πληροφοριών, μέσω της αντιγραφής του DNA και της γονιδιακής έκφρασης. Αυτές οι πρωτεΐνες ονομάζονται μη ιστόνες.

Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες χαμηλού σχετικά μοριακού βάρους (10.000 - 22.000 περίπου) και δημιουργούν ιονικά σύμπλοκα με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA (Τρακατέλλης, 1990). Έχουν υψηλό ποσοστό λυσίνης και αργινίνης, έως 30 %, αλλά πολύ λίγο γλουταμινικό και ασπαργινικό οξύ. Από εδώ εξάλλου προκύπτουν και οι βασικές ιδιότητες αυτών των πρωτεϊνών. Οι ιστόνες συνθέτονται μόνο κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA, κάτι που είναι απόλυτα συμβατό με τον συσκευαστικό τους ρόλο. Ενδιαφέρον φαινόμενο είναι πως η πρωτοταγής δομή ορισμένων ειδών ιστόνων είναι η ίδια σχεδόν σε διαφορετικά ζώα και φυτά. Η διατήρηση αυτής της δομής κατά την εξέλιξη, αντανακλά στην ανάγκη διατήρησης μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας αμινοξέων που είναι απαραίτητη για κάποια θεμελιώδη

λειτουργία της χρωματίνης. Υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι ιστόνων οι οποίοι ονομάζονται H1, H2A, H2B, H3 και H4. Οι H3 και H4 ιστόνες είναι πλούσιες σε αργινίνη, ενώ οι H1, H2A και H2B είναι πλούσιες σε λυσίνη (Γεωργάτσος, 1993). Η δέσμευση του DNA με τις ιστόνες (Σχήμα 1) έχει μελετηθεί και έχει παρατηρηθεί ότι περίπου 80 % των αμινοξέων στις ιστόνες βρίσκονται σε μορφή α-έλικας, ότι οι περιοχές αυτές συνδέονται στη μεγάλη αυλάκωση της έλικας του DNA και ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές σταθεροποιούνται από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των θετικά φορτισμένων λυσινών και αργινινών των ιστόνων και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA.



Σχήμα. 1: Σχηματική παράσταση του συμπλόκου DNA-ιστόνων στο πυρηνοσωμάτιο.

1.5. Πρωτεΐνες που εμποδίζουν την κατακρήμνιση του DNA και του RNA σε τριχλωροξικό οξύ (TCA).

Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια πως κάποιες πρωτεΐνες είναι δυνατό να προστατεύουν μακρομοριακά νουκλεϊκά οξέα από την κατακρήμνιση τους παρουσία οξέων, όπως είναι το τριχλωροξικό οξύ (TCA), το υπερχλωρικό οξύ και το υδροχλωρικό οξύ (Tunis and Weinfeld, 1960, Antonoglou and Georgatsos, 1971). Αυτές είναι κυρίως α - γλυκοπρωτεΐνες (Tunis and Weinfeld 1960) με σχετική μοριακή μάζα από 30 έως 75 KDa. Η πιο απλή ερμηνεία αυτού του φαινομένου είναι πως αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα νουκλεϊκά οξέα και δημιουργούνται έτσι συμπλέγματα τα οποία είναι διαλυτά σε οξέα, όπως το TCA. Οι α - γλυκοπρωτεΐνες μόνες τους, σε αντίθεση με τα νουκλεϊκά οξέα, είναι διαλυτές στο TCA σε ορισμένες συγκεντρώσεις (Tunis and Weinfeld 1960).

Ο Kouretas και οι συνεργάτες του (1988), αρχικά ανέφεραν την παρουσία πρωτεϊνών στον ορό ποντικών με καρκίνο οι οποίες προστατεύουν το RNA από όξινη κατακρήμνιση σε διάλυμα TCA, ενώ ο ίδιος με τους συνεργάτες του (1990) ανέφερε πως η προστατευτική δράση των πρωτεϊνών του ορού του αίματος ασθενών με καρκίνο, ενάντια σε όξινη κατακρήμνιση του RNA, είναι αυξημένη, σε σχέση με αυτή των υγιών ατόμων. Σε μια προσπάθεια προσδιορισμού εκείνων των συστατικών του ορού του αίματος που συντελούν στο παραπάνω φαινόμενο, ο Kouretas και οι συνεργάτες του (1995), απομόνωσαν και αναγνώρισαν μια πρωτεΐνη με σχετική μοριακή μάζα 150 KDa περίπου, η οποία αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, που σε συνδυασμό με ριβονουκλεάσες, εμποδίζει την κατακρήμνιση του RNA σε TCA. Με τον ίδιο τρόπο ο Kouretas και οι συνεργάτες του (2000) κατάφεραν να απομονώσουν και να αναγνωρίσουν μία πρωτεΐνη από τα αυγά του ψαριού μένουλα (*Spicara maena*) η οποία εμποδίζει επίσης την κατακρήμνιση του DNA σε TCA και η οποία σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις ανήκει στην υπεροικογένεια των φετοπρωτεϊνών.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως η πρωτεΐνη που απομόνωσαν ο Kouretas και οι συνεργάτες του (1995), μόνη της δεν παρουσιάζει καμία δραστικότητα, είτε νουκλεολυτική, είτε προστατευτική ενάντια στην κατακρήμνιση παρουσία οξέων, αλλά

παρουσιάζει δραστικότητα μόνο παρουσία κάποιων ριβονουκλεασών. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο δρα η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν είναι γνωστός. Φαίνεται όμως, πως όταν ενώνεται με τη ριβονουκλεάση είτε ενεργοποιεί κάποιες ομάδες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με το υπόστρωμα, είτε αποκαλύπτει κάποιες περιοχές σύνδεσης. Το αποτέλεσμα είναι να προκαλούνται σοβαρές μεταβολές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων, μεταβολές που εκφράζονται σαν αύξηση της διαλυτότητας και αντίσταση στην υδρόλυση. Επίσης, οι Kouretas and Antonoglou (1997) ανέφεραν πως κάποιες ριβονουκλεάσες μόνες τους μπορούν να αναστέλλουν την κατακρήμνιση του RNA σε οξέα, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένους υπολογισμούς της δραστικότητας των ριβονουκλεασών, όταν χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας ουσίες διαλυτές σε οξέα.

Θα πρέπει να αναφερθεί πως η προστατευτική δράση κάποιων πρωτεϊνών ενάντια στην κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων παρουσία διαφόρων οξέων, αποτελεί ένα τρόπο μέτρησης των ποσοτήτων των πρωτεϊνών αυτών, αλλά ο πραγματικός τους ρόλος και οι λειτουργίες τους *in vivo*, παραμένουν ακόμη άγνωστες.

1.6. Ποιότητα αυγών ψαριών

Η ποιότητα των αυγών αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα σε πολλά είδη ψαριών τα οποία εκτρέφονται εντατικά ή πρόκειται να αποτελέσουν νέα είδη προς εκτροφή. Η σημασία της είναι πάρα πολύ μεγάλη διότι καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό το ποσοστό εκκόλαψης των αυγών των ψαριών, αλλά και την βιωσιμότητα των νεοεκκολαφθέντων ιχθυδίων. Ο λόγος δεν είναι άλλος από την ανάγκη εξασφάλισης συνεχόμενης παραγωγής καλής ποιότητας ιχθυδίων, η οποία θα στηρίξει την εντατική εκτροφή κάποιου είδους, αλλά και την μείωση του κόστους παραγωγής του παραγόμενου προϊόντος. Γενικά, για είδη τα οποία ήδη εκτρέφονται, όπως είναι η τσιπούρα, το λαυράκι, το καλκάνι κ.α., το ποσοστό θνησιμότητας των αυγών είναι πολύ μεγάλο, ενώ η επιβίωση των ιχθυδίων (post-weaning) είναι συχνά μικρότερη από 5 %, γεγονός που δείχνει την σημασία των παραπάνω (Bromage και Roberts 1995).

Γενικά, δύο κατηγορίες παραγόντων καθορίζουν την ποιότητα των αυγών των ψαριών. Αυτοί είναι οι τροφικοί και οι μη τροφικοί (Χώτος και Ρογδάκης, 1992).

Οι τροφικοί παράγοντες αφορούν την ποιότητα της χορηγούμενης τροφής στους γεννήτορες. Στο φυσικό περιβάλλον η συχνότητα των γευμάτων των ψαριών, η ποσότητα και η ποιότητα της τροφής συνδέονται με την ικανότητα θήρευσης και τη διαθεσιμότητα των θηραμάτων. Έτσι, διατηρώντας το ποιοτικό επίπεδο της τροφής που προτιμά το ψάρι στη φύση, μπορούμε να πετύχουμε μια καλή διατροφή των γεννητόρων για τεχνητή αναπαραγωγή.

Οι μη τροφικοί παράγοντες, οι οποίοι καθορίζουν εν γένει τη σεξουαλική συμπεριφορά των γεννητόρων ειδικότερα σε συνθήκες αιχμαλωσίας είναι η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία, οι χειρισμοί των γεννητόρων, ο διαθέσιμος χώρος και ο χρόνος προσαρμογής των γεννητόρων.

Πολύ λίγα μας είναι γνωστά σχετικά με τους παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα των αυγών, ενώ πολύ μεγάλη σύγχυση επικρατεί μεταξύ των ερευνητών ως το ποια μέθοδος προσδιορισμού της ποιότητας των αυγών είναι η πιο κατάλληλη σε συνάρτηση με την εφαρμογή της και την αξιοπιστία της (Kjørsvik και συνεργάτες, 1990, Bromage και συνεργάτες, 1992). Έτσι, άμεσες ή έμμεσες πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα των αυγών μπορεί να προέλθουν με απλή οπτική παρατήρηση, π.χ. αριθμός και

μέγεθος των ελαιωδών σταγονιδίων, με την αφή, με διάφορα βιομετρικά χαρακτηριστικά π.χ. μέση διάμετρος, καθώς και με διάφορα κυτομορφολογικά ή βιοχημικά κριτήρια.

Για παράδειγμα, κάποιοι διαχωρίζουν την καλή από την κακή ποιότητα των αυγών σε συνάρτηση με το ποσοστό των πελαγικών γονιμοποιημένων αυγών που επιπλέουν (καλής ποιότητας) ή βυθίζονται (κακής ποιότητας) σε θαλασσινό νερό (McEnoy 1984, Carrillo και συνεργάτες, 1989, Kjørsvik και συνεργάτες, 1990). Άλλοι ερευνητές προτείνουν ως μέτρο ποιότητας την εμφάνιση του χορίου, το σχήμα του αυγού, την διαύγεια του, την κατανομή των ελαιωδών σταγονιδίων κ.α. Παρ'όλα αυτά, σε κάποια είδη, όπως π.χ. στο καλκάνι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο ποιότητας η πλευστότητα ή κάποιο άλλο μορφολογικό χαρακτηριστικό (Bromage και συνεργάτες, 1994), λόγω του ότι δεν προκύπτουν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Πολύ μεγάλη σημασία έχει και το γεγονός πως ακόμη και τα αυγά που προέρχονται από τον ίδιο γεννήτορα δεν έχουν την ίδια ποιότητα. Είναι πολύ συχνό το φαινόμενο η επιβίωση των αυγών ενός γεννήτορα, μετά από κάθε ωοαπόθεση κατά την ίδια αναπαραγωγική περίοδο να παρουσιάζει διακυμάνσεις από 100 % έως 0 %. Έτσι, είναι πολύ δύσκολο να προσδιορίσουμε με ακρίβεια, με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται ως σήμερα, την ποιότητα των αυγών που προέρχονται από μία ομάδα γεννητόρων.

Οι έρευνες που σχετίζονται με την ποιότητα των αυγών των ψαριών έχουν εντατικοποιηθεί την τελευταία κυρίως εικοσιπενταετία. Ο Vladimirov (1974a) αλλά και ο Kononov (1979, 1984), ανέφεραν πως υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της γονιμοποίησης και του ποσοστού εκκόλασης των αυγών με την ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης αυτών. Ο Fedorova (1976), μετά από έρευνες στο ρώσικο οξύρρυγχο, ανέφερε πως η ολική ποσότητα των αμινοξέων και των πρωτεϊνών στα αυγά επηρεάζει σημαντικά τη γονιμοποίηση των αυγών και τη βιωσιμότητα των νεοεκκολαφθέντων ιχθυδίων. Το γεγονός αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ποιότητας των αυγών. Την ίδια μέθοδο είχε χρησιμοποιήσει ο Golovanenko (1975) για να εκτιμήσει την ποιότητα των αυγών της αβραμίδας (*Abramis brama*). Οι Zhukinskiy και Gosh (1988) ανέφεραν μια μέθοδο πιστοποίησης της ποιότητας των αυγών η οποία βασίζεται σε πολυρογραφικές μετρήσεις της ανταλλαγής των αερίων τους. Ο Lam (1994) ανέφερε

πως τα επίπεδα των ορμονών στα αυγά των ψαριών και στα νεαρά ιχθυΐδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ποιότητας αυτών, λόγω του ότι οι ορμόνες οι οποίες περνούν άμεσα από τους γεννήτορες στα αυγά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στην οσμορύθμιση, στην αντίσταση σε στρεσογόνους παράγοντες, καθώς και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες πριν από το σχηματισμό του αυτόνομου ενδοκρινικού συστήματος κάθε νεοεκκολαφθέντος ιχθυΐδιου. Ο Kjorsvic (1994) ανέφερε πως τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων των αυγών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ποιότητας αυτών. Πιο συγκεκριμένα παρατήρησε ευθέως ανάλογη συσχέτιση μεταξύ δυσμορφιών και παραμορφώσεων κατά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις των εμβρύων του μπακαλιάρου (*Gadus morhua* L.) με την επιβίωση των αυγών και των νεαρών ιχθυΐδιων. Ο Fernandez - Palacios και οι συνεργάτες του (1995, 1996), καθώς και οι Bromage και Roberts (1995) ανέφεραν ότι η χορήγηση επαρκούς ποσότητας πρωτεϊνών, βιταμινών C και E, όπως και n-3 ακόρεστων λιπαρών οξέων (HUFA) μέσω της τροφής σε γεννήτορες τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης και εκκόλαψης των αυγών που παράχθηκαν από αυτούς, αλλά και της επιβίωσης των νεοεκκολαφθέντων ιχθυΐδιων. Άρα εμμέσως πλην σαφώς, όρισαν άλλον έναν δείκτη ποιότητας αυγών. Παρόμοια αποτελέσματα ανέφεραν ο Rodriguez και οι συνεργάτες του το 1998. Ήδη από το 1994 ο Harel και οι συνεργάτες του είχαν αναφέρει κάτι αντίστοιχο και επιπροσθέτως είχαν συμπεράνει πως όταν το ολικό ποσό των n-3 ακόρεστων λιπαρών οξέων (HUFA) στα αυγά της τσιπούρας βρίσκεται κάτω από τα 17 mg/g ξηρού βάρους, τότε η βιωσιμότητα και η εκκόλαψη τους μειώνεται κατά 53 % και 47 % αντίστοιχα. Οι Pascual και Yufega (1993) προσπάθησαν να συνδέσουν την ολική ενέργεια των αυγών της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) με την επιβίωση των νεοεκκολαφθέντων ιχθυΐδιων, υπολογίζοντας πως η μέση ολική ενέργεια των αυγών της είναι περίπου 1 J/αυγό, ενώ από την γονιμοποίηση έως την εκκόλαψη των αυγών χάνεται το 7,2 % αυτής. Ο Navas και οι συνεργάτες του (1997) αναφέρουν ότι γεννήτορες λαυρακίου (*Dicentrarchus labrax*) που ακολούθησαν δίαιτα με τροφές οι οποίες περιείχαν υψηλά επίπεδα των απαραίτητων λιπαρών οξέων (EFA), παρήγαγαν αυγά με υψηλή βιωσιμότητα και εκκολαψιμότητα. Ο Bromage και οι συνεργάτες του (1994) αναφέρουν πως το ποσοστό γονιμοποίησης, η συμμετρία των κυττάρων κατά τις

πρωτες κυτταρικές διαιρέσεις, καθώς και ο χρόνος υπερωρίμανσης των αυγών, ο οποίος συσχετίζεται άμεσα με τον χρόνο μέσα στον οποίο πρέπει να γίνει η γονιμοποίηση των αυγών από την στιγμή που αυτά θα εξαχθούν από τις γονάδες των θηλυκών, αποτελούν μέτρο ποιότητας για τον υπόγλωσσο του Ατλαντικού (*Hippoglossus hippoglossus*).

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι η προσπάθεια για τον προσδιορισμό της ποιότητας των αυγών των ψαριών δεν είναι μονοδιάστατη. Όμως, δεν είναι τυχαίο πως η πλειοψηφία των ερευνών περιστρέφονται γύρω από την ποιότητα και την ολική ποσότητα των πρωτεϊνών των αυγών ή γύρω από εκείνους τους παράγοντες που επιδρούν στην ποιότητα και την ποσότητα των πρωτεϊνών αυτών, άμεσα ή έμμεσα. Ο λόγος ίσως για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι πως το κύριο συστατικό της λεκίθου των αυγών των ψαριών είναι οι διάφορες πρωτεΐνες του. Το μεγαλύτερο μέρος της λεκίθου μετασχηματίζεται σε ιστούς, ενώ το υπόλοιπο παρέχει την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζονται οι νεοσχηματιζόμενοι οργανισμοί. Η εκατοστιαία αναλογία των πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών κυμαίνεται από 35 - 89 % της ξηράς ουσίας, με μέση τιμή 66,3 % της ξηράς ουσίας. Παρ'όλη αυτή την διακύμανση που παρατηρείται, η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες των αυγών των ψαριών είναι πολύ περισσότερο σταθερή σε σχέση με την εκατοστιαία περιεκτικότητα άλλων συστατικών των αυγών, όπως για παράδειγμα τα λιπίδια (Kamler, 1992).

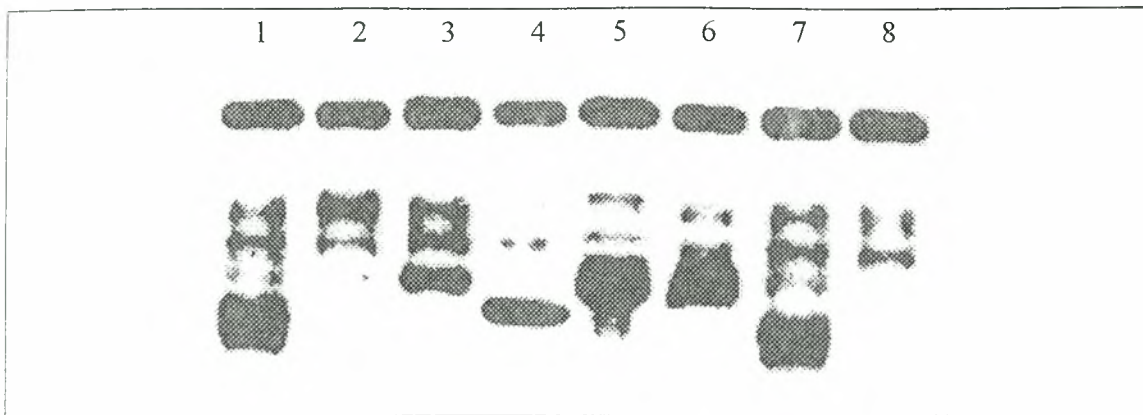
Τα αμινοξέα τα οποία συναντούνται συχνότερα σε αυγά ψαριών είναι η λευκίνη, η αλανίνη, η λυσίνη και το γλουταμινικό οξύ.

1.7. Γενικά στοιχεία για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών

Τα πρωτεϊνικά μόρια, όπως και κάθε άλλο φορτισμένο μόριο, μετακινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Tiselius το 1937 και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρύτατα (Τρακατέλλης, 1990). Η διεύθυνση της κίνησης των μορίων προς το θετικό ή προς τον αρνητικό πόλο εξαρτάται από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης. Όταν το pH του περιβάλλοντος είναι όξινο σχετικά με το pI της πρωτεΐνης, τότε τα μόρια της είναι φορτισμένα θετικά και οδεύουν προς την κάθοδο, ενώ όταν pH του περιβάλλοντος είναι βασικό σχετικά με το pI της πρωτεΐνης, τότε τα μόρια της είναι φορτισμένα αρνητικά και οδεύουν προς την άνοδο. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση εξαρτάται από το φορτίο τους και την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου.

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια από τις καλύτερες μεθόδους για το διαχωρισμό και την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα των πρωτεϊνών του πλάσματος του αίματος (Εικόνα 5). Η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική ηλεκτροφορήσεως είναι η ηλεκτροφόρηση ζώνης. Στην τεχνική αυτή η ηλεκτροφόρηση διαρκεί τόσο, ώστε οι διάφορες πρωτεΐνες να μετακινηθούν και να σχηματίσουν ξεχωριστές ζώνες. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάφορα ημιστερεά υλικά ή πηκτές, όπως είναι το χαρτί, η κυτταρίνη, η πηκτή αμύλου, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου κ.α. Πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της ηλεκτροφορήσεως σε πηκτή, είτε αμύλου, είτε πολυακρυλαμιδίου και αυτό διότι οι διαχωριστικές ικανότητες των πρωτεϊνών με τις τεχνικές αυτές αυξάνουν λόγω της δράσης της πηκτής ως μοριακού κόσκινου.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφορήσεως, το ηλεκτροφόρημα μετά από κατάλληλη επεξεργασία, μπορεί να μας δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την ποσότητα, το μοριακό βάρος, τη χημική σύσταση ή την ενζυμική δράση των πρωτεϊνών. Έτσι, ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών κάθε ζώνης μπορεί να γίνει μετά από χρώση με κατάλληλες χρωστικές. Οι λεγόμενες χρωστικές των πρωτεϊνών, όπως το αμιδομέλαν 10B, το κυανό του Coomassie, το ερυθρό του Ponceau και άλλες, είναι όξινες ενώσεις που αντιδρούν με τις βασικές ομάδες του μορίου των πρωτεϊνών.



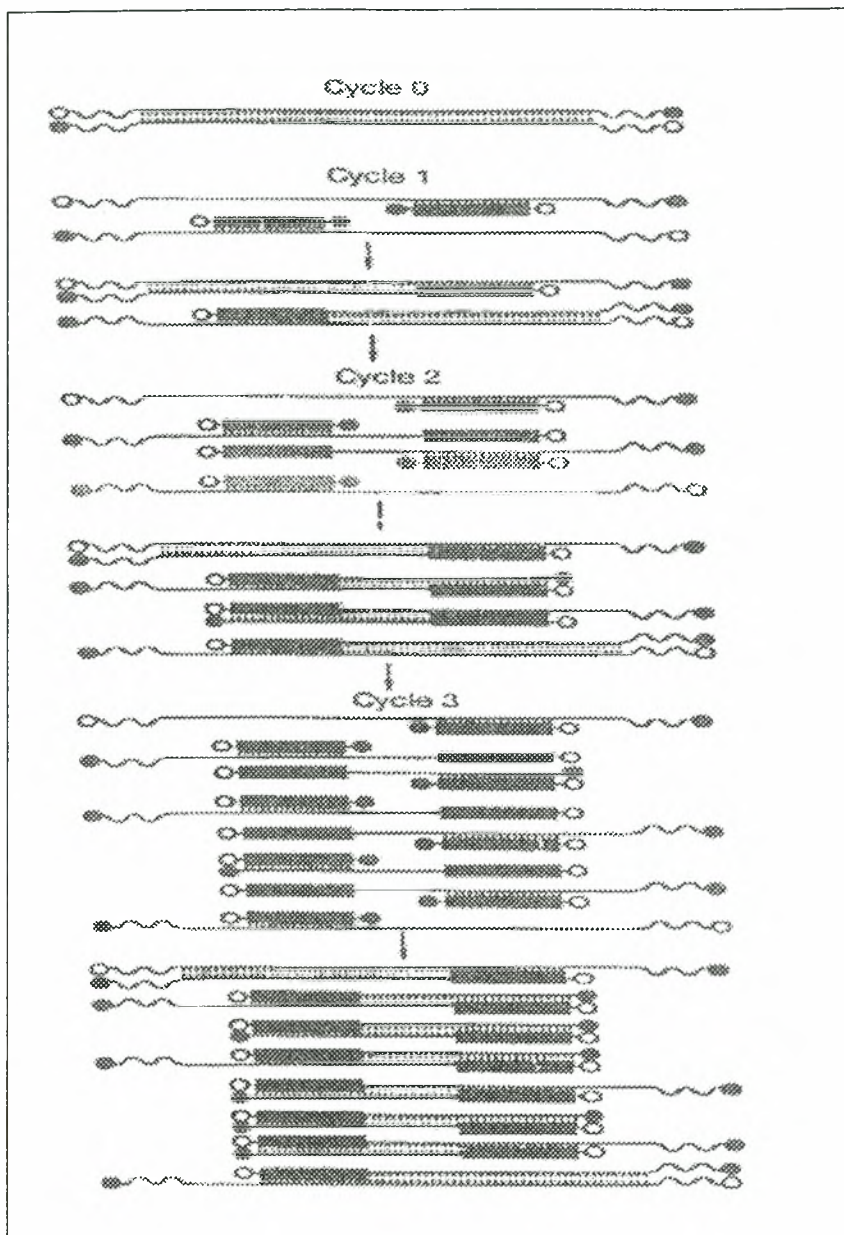
Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού αίματος ανθρώπου. 1: Φυσιολογικός ορός. 2: Υπερσφαιρινική πορφύρα. 3: Πολλαπλό μύελωμα με αύξηση β σφαιρινών. 4: Μακροσφαιριναιμία. 5: Πολλαπλό μύελωμα με αύξηση γ σφαιρινών. 6: Ιδιοπαθής παραπρωτεϊναιμία. 7: Αμυλοείδωση. 8: Νόσος ήπατος.

1.8. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Είναι μία *in vitro* μέθοδος με την οποία μπορεί να γίνει πολλαπλασιασμός μιας συγκεκριμένης DNA αλληλουχίας έως και αρκετά εκατομμύρια φορές σε 1-2 ώρες. Η αρχή λειτουργίας είναι η εξής (Εικ. 6, Κουρέτας, 1998): Σε μια ειδική συσκευή, σε ένα μικρό σωληνάκι από θερμοανθεκτικό πλαστικό θερμαίνεται για ένα λεπτό στους 95 °C ένα μίγμα που περιέχει DNA, DNA πολυμεράση ειδικής θερμοαντοχής, απομονωμένη από το μικροοργανισμό *Thermus aquaticus*, ειδικών ολιγονουκλετιδίων συμπληρωματικών ως προς τα δύο άκρα του τμήματος του DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιαστεί (εκκινητές, primers), καθώς και χλωριούχο μαγνήσιο. Κατά την διάρκεια της θέρμανσης το DNA υφίσταται αποδιάταξη της δίκλωνης δομής του, ανοίγει και μετατρέπεται σε μονόκλωνο, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Μετά η θερμοκρασία μειώνεται στους 55-65 °C για 30 δευτερόλεπτα, όπου οι δύο κλώνοι τείνουν να επανασυγκολληθούν. Στην φάση αυτή συμβαίνει σύνδεση των εκκινητών (primers) με την αλληλουχία-στόχο. Οι εκκινητές υβριδίζονται λόγω συμπληρωματικότητας στις κατάλληλες περιοχές του DNA στόχου. Έτσι, επειδή τα ολιγονουκλεοτίδια είναι σε περίσσεια, συγκολλούνται στις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες, όπως φαίνεται στην εικόνα 6. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ανεβαίνει έως 70 °C για ένα λεπτό, όπου η ανθεκτική στη θερμοκρασία πολυμεράση δουλεύει και αντιγράφει το DNA (επιμήκυνση του DNA), δημιουργώντας άλλους δύο κλώνους με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινητών. Εάν αυτός ο κύκλος (95 °C για ένα λεπτό, 55-65 °C για 30 δευτερόλεπτα, 70 °C για ένα λεπτό) επαναληφθεί 25-30 φορές έχουμε ένα εκλεκτικό πολλαπλασιασμό του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει, έως και αρκετά εκατομμύρια φορές.

Η μεγάλη χρησιμότητα της μεθόδου βρίσκεται στο γεγονός ότι μπορεί να γίνει πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA που βρίσκεται ίσως μόνο μια φορά μέσα στο γένωμα, με τρόπο ώστε να γίνει το συγκεκριμένο τμήμα ορατό στην ηλεκτροφόρηση. Οι εφαρμογές της μεθόδου PCR είναι, εκτός από την τυποποίηση των διαγενετικών ατόμων, η τυποποίηση των HLA αντιγόνων για τις μεταμοσχεύσεις οργάνων, η ανίχνευση πρακτικά όλων των γενετικών ανωμαλιών ή διαφορών ανάμεσα σε πολλά

άτομα ή ζώα, η ανίχνευση ιών και μικροβίων σε απειροελάχιστες ποσότητες, η ανίχνευση μεταλλάξεων σε όγκους κ.α.



Εικόνα 6: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.A.1. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση της πειραματικής διαδικασίας διαχωρίζονται σε συσκευές και αναλώσιμα:

2.A.1.1. Συσκευές

1. Ομογενοποιητής της εταιρίας IKA LABORTECHNIC
2. Συσκευή φυγοκέντρισης UNIVERSAL 16 R της εταιρίας HETTICH
3. Φασματοφωτόμετρο U-1500 της εταιρίας HITACHI
4. Συσκευή ρυθμικής ανακίνησης δειγμάτων τύπου VORTEX
5. Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων της εταιρίας SIGMA
6. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων της εταιρίας SIGMA
7. Συσκευή PCR Mastercycler της εταιρίας Eppendorf

2.A.1.2. Αναλώσιμα

1. Αυγά ψαριών (τσιπούρας, λαυρακίου, κέφαλου και χριστόψαρου)
2. Απεσταγμένο νερό
3. Χρωστική Coomassie blue
4. Μεθανόλη της εταιρίας J. T. BAKER
5. Φωσφορικό οξύ της εταιρίας MERCK
6. Αλβουμίνη

7. Τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA) της εταιρίας PANREAC
8. DNA από σπέρμα σολομού της εταιρίας MERCK
9. Tris της εταιρίας MERCK
10. Υδροχλωρικό οξύ της εταιρίας MERCK
11. Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) της εταιρίας MERCK
12. Χλωριούχο μαγγάνιο ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) της εταιρίας MERCK
13. Χλωριούχο κοβάλτιο ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) της εταιρίας MERCK
14. Χλωριούχος ψευδάργυρος ($ZnCl_2$) της εταιρίας MERCK
15. Θεικός χαλκός ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) της εταιρίας MERCK
16. Χλωριούχο νάτριο (NaCl) της εταιρίας Riedel de Haen
17. Νατριούχο άλας του θειϊκού δωδεκυλίου (Sodium Dodecyl Sulfate SDS) της εταιρίας MERCK
18. Ακρυλαμίδα της εταιρίας SIGMA
19. Αγαρόζη της εταιρίας SIGMA
20. Τετραμεθυλαιθυλαινεδιαμίνη(N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine, TEMED) της εταιρίας MERCK
21. Υπερθειικό αμμώνιο (APS) της εταιρίας SIGMA
22. Μερκαπταιθανόλη της εταιρίας SIGMA
23. Γλυκερίνη της εταιρίας MERCK
24. Κυανόν της βρωμοφαινόλης της εταιρίας SIGMA
25. Γλυκίνη (Aminoacetic acid) της εταιρίας SIGMA
26. Οξικό οξύ της εταιρίας Riedel de Haen
27. Γλουταραλδεύδη της εταιρίας MERCK
28. Διθειοθρεϊτολή (Dithiothreitol, DTT) της εταιρίας SIGMA
29. Νιτρικός άργυρος της εταιρίας SIGMA
30. Φορμαλδεύδη της εταιρίας MERCK
31. Ανθρακικό ασβέστιο της εταιρίας Riedel de Haen
32. Πολυμεράση Taq DNA της εταιρίας Minotech
33. Πολυμεράση Vent_R (exo⁻) DNA της εταιρίας Biolab (New England)
34. Βρωμιούχο αιθίδιο της εταιρίας MERCK

2.A.2. Μέθοδοι

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι εξής:

2.A.2.1. Συλλογή και διατήρηση αυγών

α) Αυγά τσιπούρας

Τα αυγά της τσιπούρας προσφέρθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρίας «SEA FARM IONIAN». Πιο συγκεκριμένα, τα αυγά συλλέχθηκαν από τις δεξαμενές ωοαπόθεσης του ιχθυογεννητικού σταθμού την 8η Νοεμβρίου 1999. Το εργαστήριο τα παρέλαβε παγωμένα την 1η Δεκεμβρίου 1999 σε συσκευασία των 100 γραμμαρίων. Τα αυγά διατηρήθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

β) Αυγά λαυρακιού

Όπως τα αυγά της τσιπούρας, έτσι και τα αυγά του λαυρακιού προσφέρθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρίας «SEA FARM IONIAN». Πιο συγκεκριμένα, τα αυγά συλλέχθηκαν από τις δεξαμενές ωοαπόθεσης του ιχθυογεννητικού σταθμού την 27η Νοεμβρίου 1999. Το εργαστήριο τα παρέλαβε παγωμένα την 1η Δεκεμβρίου 1999 σε συσκευασία των 100 γραμμαρίων. Τα αυγά διατηρήθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

γ) Αυγά χριστόψαρου

Τα αυγά του χριστόψαρου προήλθαν από ώριμο γενετικά θηλυκό άτομο του είδους *Zeus faber*. Πιο αναλυτικά, το άτομο από το οποίο προήλθαν τα αυγά είχε αλιευθεί στην περιοχή του Παγασητικού κόλπου την 23η Σεπτεμβρίου 1999 και προοριζόταν για πώληση στην ιχθυαγορά του Βόλου. Σε συνεργασία με τον ιχθυέμπορο στον οποίο το ψάρι άνηκε, διαπιστώθηκε ότι ήταν γενετικά ώριμο και αφαιρέθηκε η μια του γονάδα, βάρους 80 περίπου γραμμαρίων, από την οποία αντλήσαμε το πειραματικό μας υλικό. Η γονάδα τεμαχίστηκε σε τμήματα των 5 έως 6 γραμμαρίων, τα οποία συσκευάστηκαν σε αλουμινόχαρτο και διατηρήθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

δ) Αυγά κέφαλου

Τα αυγά του κέφαλου προήλθαν από ώριμο γενετικά θηλυκό άτομο του είδους, *Mugil Cephalus*. Το άτομο προήλθε από τον Παγασητικό κόλπο και αγοράστηκε στην ιχθυαγορά του Βόλου την 21η Σεπτεμβρίου 1999. Οι γονάδες του, οι οποίες ζύγιζαν από 60-65 γραμμάρια η κάθε μία, τεμαχίστηκαν σε τμήματα των 5 έως 6 γραμμαρίων, τα οποία συσκευάστηκαν σε αλουμινόχαρτο και διατηρήθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

2.A.2.2. Παρασκευή κυτταροπλάσματος από τα αυγά των ψαριών

Η διαδικασία παρασκευής κυτταροπλάσματος από τα αυγά ήταν η ίδια σε κάθε είδος ψαριού του οποίου το υλικό χρησιμοποιήσαμε. Η διαδικασία ήταν η εξής: Ποσότητα αυγών, από 5 έως 6 γραμμάρια τοποθετήθηκε σε ειδικό ποτήρι που περιείχε 20 περίπου ml Tris-HCl 50 mM σε pH 7,5 και 0,9% NaCl και εν συνεχεία ομογενοποιήθηκε με την βοήθεια ηλεκτροκίνητου περιστρεφόμενου γουδιού (10 περίπου φορές). Η ομογενοποίηση έγινε με τη χρήση συσκευής ομογενοποίησης. Μετά την ομογενοποίηση το μίγμα φυγοκεντρίθηκε σε συσκευή φυγοκέντρισης. Οι συνθήκες φυγοκέντρισης ήταν 10.000 RPM (Revolutions Per Minute, περιστροφές ανά λεπτό) σε θερμοκρασία 4 °C και για χρόνο 20 λεπτά. Ο σκοπός της φυγοκέντρισης ήταν η απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών, των πυρήνων και των μιτοχονδρίων, τα οποία λαμβάνονται υπό την μορφή ιζήματος μετά την φυγοκέντριση. Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε αποτέλεσε το κυτταρόπλασμα που μας ενδιέφερε.

2. A.2.3. Υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα

Ο υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στα παρασκευάσματά μας έγινε με την μέθοδο του Bradford (Bradford 1976), ως εξής:

Κατ' αρχάς, παρασκευάστηκαν 100 ml πυκνής χρωστικής, η οποία περιείχε 0,05 g χρωστικής Coomassie blue, 15 ml μεθανόλης 95 %, 65 ml φωσφορικού οξέος 85 % και 20 ml απεσταγμένο νερό. Στη μεθανόλη διαλύθηκε η χρωστική Coomassie blue και εν συνεχεία προστέθηκε το φωσφορικό οξύ και το απεσταγμένο νερό. Η πυκνή αυτή χρωστική αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:5 πριν από τον υπολογισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών στα παρασκευάσματά μας.

Εν συνεχεία, διάφορες ποσότητες των κλασμάτων του κυτταροπλάσματος (5 μl, 10 μl και 20 μl) εισήχθησαν σε 5 ml αραιωμένου διαλύματος χρωστικής και ύστερα μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο στα 595 nm (A_{595}) και ο υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης κάθε κλασμάτωσης. Ο υπολογισμός έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογισμού της πρωτεΐνης αλβουμίνης (10 mg/ml), η οποία είχε κατασκευαστεί στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (βλέπε Αποτελέσματα).

2.A.2.4. Μέθοδος μέτρησης της δράσης της πρωτεΐνης στην αναστολή της κατακρήμνισης του DNA, παρουσία τριχλωροξικού οξέος (TCA)

Η δράση της αναστολής της κατακρήμνισης του DNA σε τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA) υπολογίστηκε ως εξής: Σε 250 μl διαλύματος το οποίο περιείχε 200 μl DNA (1 mg/ml), 10 μl buffer Tris-HCl 1M σε pH 7.5, 5 έως 20 μl των κλασματώσεων που περιείχαν τις απομονωμένες πρωτεΐνες σε ποσότητες από 4,69 έως 18,75 μg πρωτεΐνης της κλασμάτωσης 1.1 της τσιπούρας, από 9,75 έως 39 μg πρωτεΐνης της κλασμάτωσης 1.5 της τσιπούρας, από 3,875 έως 15,5 μg πρωτεΐνης της κλασμάτωσης 1.5 του λαυρακίου, από 6,25 έως 25 μg πρωτεΐνης της κλασμάτωσης 1.5 του κέφαλου και από 20,625 έως 82,5 μg πρωτεΐνης της κλασμάτωσης 1.5 του χριστόψαρου, καθώς και απεσταγμένο νερό έως ότου ο όγκος γίνει 250 μl, προστέθηκαν 250 μl TCA το οποίο διατηρούνταν στους 4 °C. Η πρόσθεση του TCA γίνονταν 30 περίπου δευτερόλεπτα μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Η όλη διαδικασία έγινε στους 4 °C. Το τελικό διάλυμα παρέμεινε για δέκα λεπτά στους 4 °C. Στην συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση στις 6.000 RPM (Revolutions Per Minute, περιστροφές ανά λεπτό) στους 4 °C για 10 λεπτά. Ακολούθως, υπολογιζόταν η απορρόφηση του υπερκείμενου σε φασματοφωτόμετρο, στα 260 nm. Ως μονάδα δράσης ορίστηκε το ποσό του παράγοντα προστασίας το οποίο διατηρεί επαρκή ποσότητα DNA στο διάλυμα κάτω από τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω έτσι ώστε να δίνει ένδειξη 1.00 στα 260 nm. Ως ειδική δράση ορίστηκε η συνολική δράση ανά mg πρωτεΐνης.

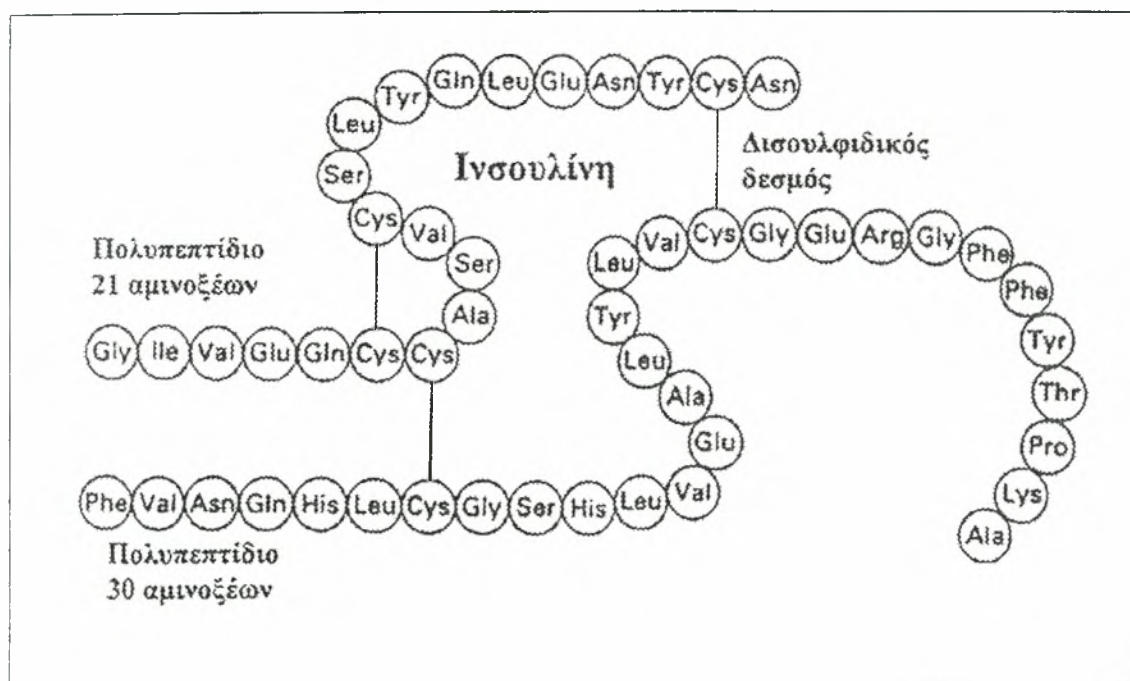
2.A.2.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης ,σε πήκτώματα πολυακρυλαμιδίου

Η τεχνική αυτή προσφέρει τη δυνατότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών, του ελέγχου της καθαρότητάς τους και του υπολογισμού του μοριακού τους βάρους. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση του απορρυπαντικού νατριούχου άλατος του θειϊκού δωδεκυλίου (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) και θέρμανση. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών που οφείλεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το SDS περιβάλλει τις πρωτεΐνες, με συνέπεια αυτές να αποκτούν αρνητικό φορτίο. Αποτέλεσμα αυτού είναι πως όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες μετακινούνται προς την άνοδο. Η κινητικότητά τους εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες με το μικρότερο μοριακό βάρος είναι αυτές που κινούνται γρηγορότερα. Η τάση του ρεύματος παίζει σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα της μετανάστευσης των πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Επιθυμούμε να μην είναι πολύ μεγάλη, έτσι ώστε οι ζώνες των πρωτεϊνών που σχηματίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση να διαχωρίζονται σωστά και να μη διαχέονται οι πρωτεΐνες στην πλάκα ηλεκτροφόρησης.

Η πλάκα του πήκτωματος είχε διαστάσεις 16,5 x 14,5 x 0,15 εκατοστά. Το πήκτωμα δημιουργήθηκε με πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N, N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου (bis) (16,6 ml). Το bis σε αναλογία 0,8 : 30 ως προς το ακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται στο πλέγμα σαν σύνδεσμος των αλυσίδων του ακρυλαμιδίου. Στο πήκτωμα επίσης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl 1,5 M pH 8,8 (16 ml), SDS 0,1 %, 30 μl TEMED, το οποίο χρησιμεύει στην μετάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού οι οποίες εμφανίζονται λόγω της παρουσίας του καταλύτη, 400 μl υπερθειϊκού αμμωνίου 20 % (APS), το οποίο παίζει το ρόλο καταλύτη και απεσταγμένο νερό έως ότου ο τελικός όγκος του μίγματος γίνει 50 ml. Το μίγμα τοποθετήθηκε μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών ηλεκτροφόρησης για 2 περίπου ώρες, μέχρι να πήξει.

Απαιτείται η χρήση γαντιών όταν δουλεύουμε το ακρυλαμίδιο, λόγω του ότι αυτό είναι νευροτοξικό. Το πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο δεν είναι τοξικό, εκτός και αν υπάρχει ακρυλαμίδιο το οποίο δεν πολυμερίστηκε.

Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα διαλύθηκαν σε δύο ρυθμιστικά διαλύματα (Sample Buffer) τα οποία χαρακτηρίζονταν από την ύπαρξη ή μη της μερκαπταιθανόλης, δηλαδή σε αναγωγικές ή μη αναγωγικές συνθήκες. Η μερκαπταιθανόλη χρησιμοποιείται διότι διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και επιτρέπει το διαχωρισμό των υπομονάδων της πρωτεΐνης, αν υπάρχουν (Σχήμα 2). Το ένα ρυθμιστικό διάλυμα (αναγωγικές συνθήκες) περιείχε Tris-HCl τελικής συγκέντρωσης 0,06 M και pH 6,8, 3 % SDS, 10 % γλυκερίνη, 5 % μερκαπταιθανόλη, 0,05 % κυανού της βρωμοφαινόλης (BPB), ενώ το άλλο (μη αναγωγικές συνθήκες) περιείχε ακριβώς τα ίδια συστατικά εκτός της μερκαπταιθανόλης. Τα διαλύματα των πρωτεϊνών που περιείχαν την μερκαπταιθανόλη θερμάνθηκαν στους 100 °C για περίπου πέντε λεπτά, έτσι ώστε να ανοίξουν οι δομές των πρωτεϊνών και να διαχωριστούν οι υπομονάδες τους.



Σχήμα 2 : Δισουλφιδικοί δεσμοί στην πρωτεΐνη ινσουλίνη. Με την διάσπασή τους, παρουσία μερκαπταιθανόλης και θέρμανσης, η πρωτεΐνη θα αποδομηθεί στις υπομονάδες από τις οποίες αποτελείται.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα δείγματα στις υποδοχές του πηκτώματος που δημιουργούνται με ειδικές χτένες για τον σκοπό αυτό και ηλεκτροφορήθηκαν σε ρεύμα

σταθερής έντασης 30 mA για 3 - 4 περίπου ώρες. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) αποτελούταν από 14,4 γραμμάρια γλυκίνης, 3,03 γραμμάρια Tris και 1 γραμμάριο SDS, σε απεσταγμένο νερό για ένα λίτρο διαλύματος. Για την στερέωση, τη χρώση και τον αποχρωματισμό της πλάκας ηλεκτροφόρησης έγιναν τα εξής βήματα:

1) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 50% μεθανόλη και 10% οξικού οξέος. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 min, σε διαρκή ανακίνηση.

2) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 5% μεθανόλη και 7% οξικού οξέος. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 min, σε διαρκή ανακίνηση.

3) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 10% γλουταραλδεϋδη. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 min, σε διαρκή ανακίνηση.

4) Ξέπλυμα του πηκτώματος σε απεσταγμένο νερό (dd-H₂O), όπου και παρέμενε για χρονικό διάστημα από δύο ώρες έως όλη τη νύκτα.

5) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα DTT, τελικής συγκέντρωσης 5μg/ml. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 min, σε διαρκή ανακίνηση.

6) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1%. Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 min, σε διαρκή ανακίνηση.

7) Γρήγορο ξέπλυμα 2 φορές με απεσταγμένο νερό (dd-H₂O).

8) Γρήγορο ξέπλυμα μία φορά με 250 ml εμφανιστικού υγρού (developer). Το διάλυμα αυτό περιείχε στα 500 ml απεσταγμένου νερού (dd-H₂O), 500 μl φορμαλδεϋδης 37% και 15 g ανθρακικού ασβεστίου.

9) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε 250 ml εμφανιστικού υγρού (developer), έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες ηλεκτροφόρησης, με διαρκή ανακίνηση.

10) Μετά την εμφάνιση των ζωνών προσθέταμε στο εμφανιστικό υγρό διάλυμα που περιείχε 5 ml οξικού οξέος και 45 ml απεσταγμένου νερού (dd-H₂O), (σύνολο 50 ml) για το σταμάτημα της χρώσης.

11) Ξέπλυμα του πηκτώματος 2-3 φορές με απεσταγμένο νερό (dd-H₂O), τοποθέτησή του σε ζελατίνα και διατήρηση του στο ψυγείο.

Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους έγινε με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες.

2.A.2.6. Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

Οι περιοχές που πολλαπλασιάστηκαν ήταν το μιτοχονδριακό γονίδιο 16S rRNA μήκους 600 ζευγών βάσεων (bp) και η μιτοχονδριακή περιοχή D-loop μήκους 1700 ζευγών βάσεων (bp).

Για τον πολλαπλασιασμό του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια (primers):

L2510: 5' - CGCCTGTTTATCAAAAACAT - 3'

H3080: 5' - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3'

Για τον πολλαπλασιασμό της μιτοχονδριακής περιοχής D-loop χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια.

L14841: 5' - AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA - 3'

H16498: 5' - CCTGAAGTAGGAACCAGATG - 3'

Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Taq DNA polymerase (3 U/μl) σε ποσότητα 0,5 μl και η Vent_R (exo⁻) DNA polymerase (2 U/μl) σε ποσότητα 0,75 μl, δηλαδή κάθε φορά χρησιμοποιούσαμε 1,5 μονάδες πολυμεράσης. Ο πολλαπλασιασμός των παραπάνω δίκλωνων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 50 μl το οποίο περιείχε εκτός των διαφόρων ποσοτήτων των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν, 1000 ng (1 μl) DNA, 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) PCR 10x του οποίου η σύσταση ήταν 500 mM KCl και 100 mM Tris pH 9.0, 4 μl dNTPs τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM, 4 μl MgCl₂ 25 mM, όταν χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA πολυμεράση και 1 μl MgSO₄ 100 mM όταν χρησιμοποιήθηκε η Vent_R (exo⁻) DNA πολυμεράση αντίστοιχα, καθώς και 50 pmoles από το κάθε ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο. Τέλος, το διάλυμα συμπληρώθηκε έως τα 50 μl με απεσταγμένο νερό.

Η συσκευή PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Mastercycler Personal της εταιρίας Eppendorf. Οι συνθήκες που ρυθμίστηκαν ήταν:

Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 4 λεπτά.

Αποδιάταξη: 94 °C για 40 δευτερόλεπτα.

Συγκόλληση primer 52 °C για 40 δευτερόλεπτα για το 16S rRNA και 52,5 °C για 45 δευτερόλεπτα για το D-loop.

Επέκταση: 72 °C για 1 λεπτό και 15 δευτερόλεπτα για το 16S rRNA και 72 °C για 1 λεπτό και 45 δευτερόλεπτα για το D-loop.

Τελική Επιμήκυνση: 72 °C για 10 λεπτά.

Οι φάσεις της αποδιάταξης, της συγκόλληση των εκκινητών και της επιμήκυνσης επαναλήφθηκαν 33 φορές για το 16S rRNA και 35 φορές για το D-loop.

Τα αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού των περιοχών που εξετάστηκαν λήφθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel) 2%, η οποία περιείχε 0,5 μl/ml βρωμιούχο αιθίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) TAE pH 8, του οποίου η σύσταση ήταν 40 mM Tris οξικό pH 8 και 1 mM EDTA.

2.Β. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.Β.1. Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

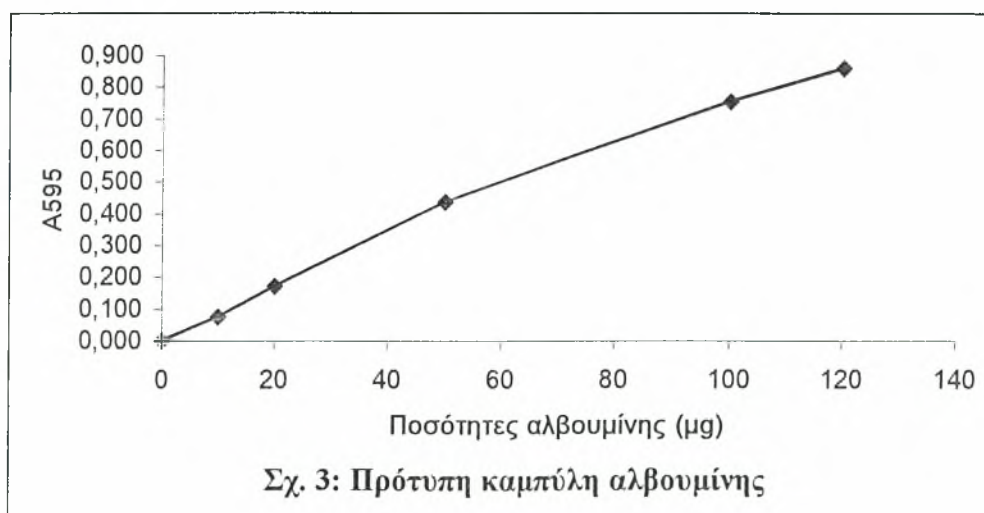
Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων πρωτεΐνης στα διάφορα διαλύματα με την χρήση του σπεκτοφωτόμετρου έπρεπε να κατασκευάσουμε κάποια καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη) κάποιου διαλύματος γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό διάλυμα αλβουμίνης περιεκτικότητας 10 mg/ml.

Οι τιμές της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο στα 595 νανόμετρα (nm) διαφόρων ποσοτήτων διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/ml φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Τιμές απορρόφησης διαφόρων ποσοτήτων αλβουμίνης

ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ 10 mg/ml	A ₅₉₅
0 μg	0
10 μg	0,075
20 μg	0,17
50 μg	0,435
100 μg	0,755
120 μg	0,860

Η πρότυπη καμπύλη (Σχ. 3) κατασκευάστηκε βάση των παραπάνω τιμών:



Σχ. 3: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

2.B.2. Απομόνωση πρωτεϊνών

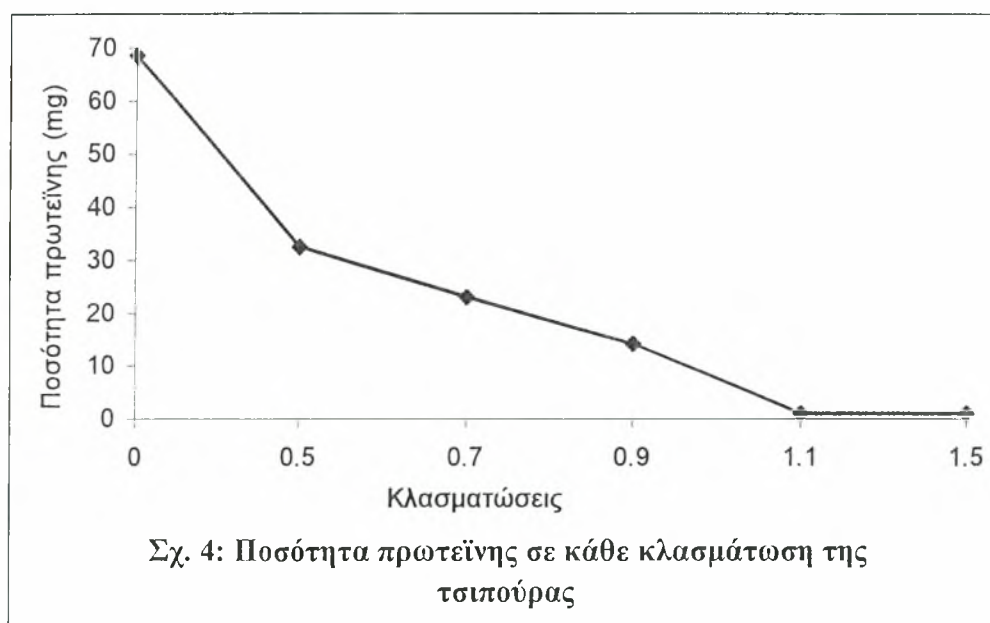
2.B.2.1. Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών τσιπούρας

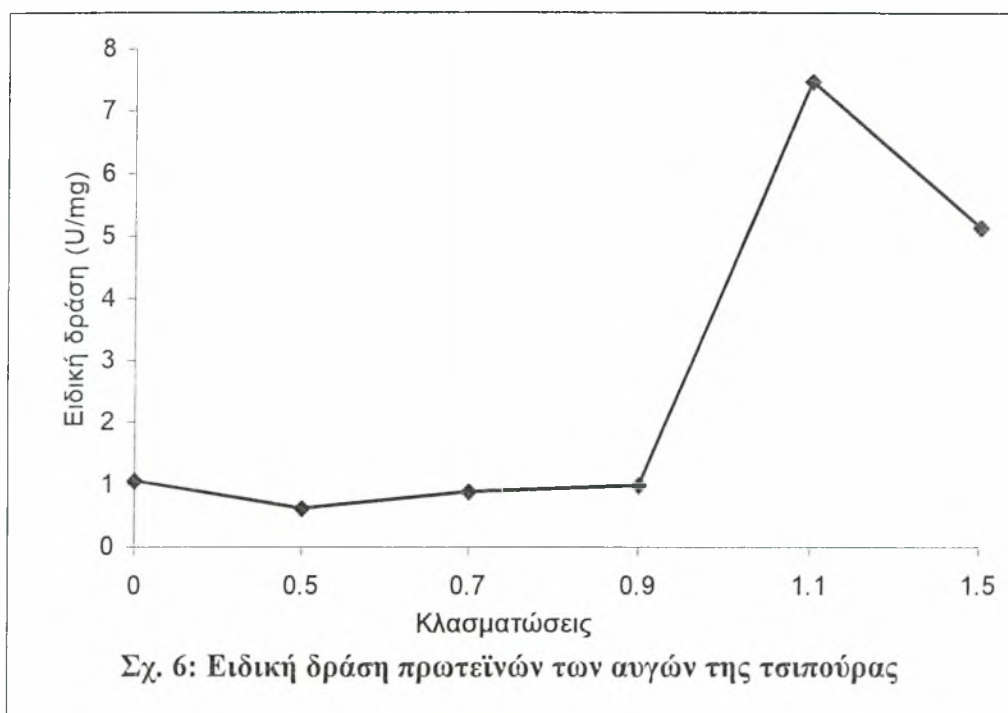
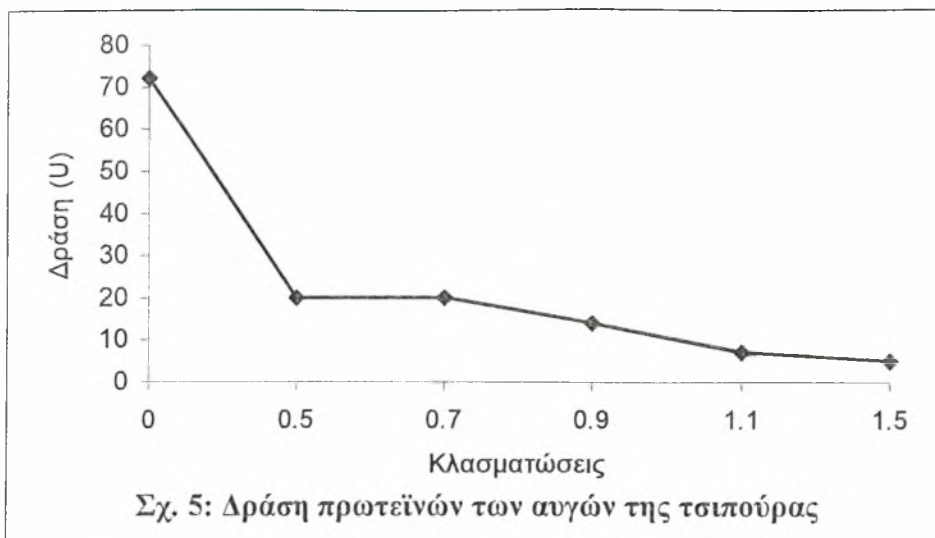
Το κυτταρόπλασμα που προήλθε από τα αυγά της τσιπούρας, όγκου 22 ml (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι) χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό υλικό από το οποίο κρατήθηκαν 2 ml και το υπόλοιπο (20 ml) υπέστη κλασμάτωση με ακετόνη καθαρότητας 98%, η οποία ήταν διατηρημένη στους -20 °C. Για την πρώτη κλασμάτωση χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ακετόνης ίση με το 0,5 του όγκου του αρχικού υλικού, δηλαδή 10 ml ακετόνης. Η προσθήκη της ακετόνης στο μίγμα γινόταν με πολύ αργό ρυθμό και υπό συνεχή ανάδευση για να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων. Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 RPM, για 15 λεπτά και σε θερμοκρασία 4 °C. Το ίζημα που προήλθε διαλύθηκε σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50 mM και pH 7,5. Το υπερκείμενο υπέστη νέα κλασμάτωση με τέτοια ποσότητα ακετόνης, ώστε ο τελικός της όγκος στο παρασκεύασμα να ήταν ίσος με το 0,7 του όγκου του αρχικού υλικού, δηλαδή με 4 ml ακετόνης και φυγοκεντρήθηκε ξανά κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα που προήλθε διαλύθηκε σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50 mM και pH 7,5. Το υπερκείμενο υπέστη νέα κλασμάτωση με τέτοια ποσότητα ακετόνης, ώστε ο τελικός της όγκος στο παρασκεύασμα να ήταν ίσος με το 0,9 του όγκου του αρχικού υλικού, δηλαδή με 4 ml ακετόνης και φυγοκεντρήθηκε ξανά κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα που προήλθε διαλύθηκε σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50 mM και pH 7,5. Το υπερκείμενο υπέστη νέα κλασμάτωση με τέτοια ποσότητα ακετόνης, ώστε ο τελικός της όγκος στο παρασκεύασμα να ήταν ίσος με το 1,1 του όγκου του αρχικού υλικού, δηλαδή με 4 ml ακετόνης και φυγοκεντρήθηκε ξανά κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα που προήλθε διαλύθηκε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50 mM και pH 7,5. Το υπερκείμενο υπέστη νέα κλασμάτωση με τέτοια ποσότητα ακετόνης, ώστε ο τελικός της όγκος στο παρασκεύασμα να ήταν ίσος με το 1,5 του όγκου του αρχικού υλικού, δηλαδή με 8 ml ακετόνης και φυγοκεντρήθηκε ξανά κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα που προήλθε διαλύθηκε σε 0,5 ml Tris-HCl 50 mM και pH 7,5.

Στην συνέχεια υπολογίστηκε η ποσότητα πρωτεΐνης στο αρχικό υλικό και στα διαλυμένα ιζήματα, η δράση της και η ειδική δράση της, σύμφωνα με τις μεθόδους που έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες από 2 και στα σχήματα 4, 5, 6.

Πίνακας 2: Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών από αυγά τσιπούρας

Κλασματώσεις Ακετόνης (Όγκοι)	Συνολική Πρωτεΐνη (mg)	Συνολική Δράση (U)	Ειδική Δράση (U/mg)
0	68,625	72	1,05
0.5	32,5	20	0,61
0.7	23	20	0,87
0.9	14,2	14	0,98
1.1	0,9375	7	7,47
1.5	0,975	5	5,13



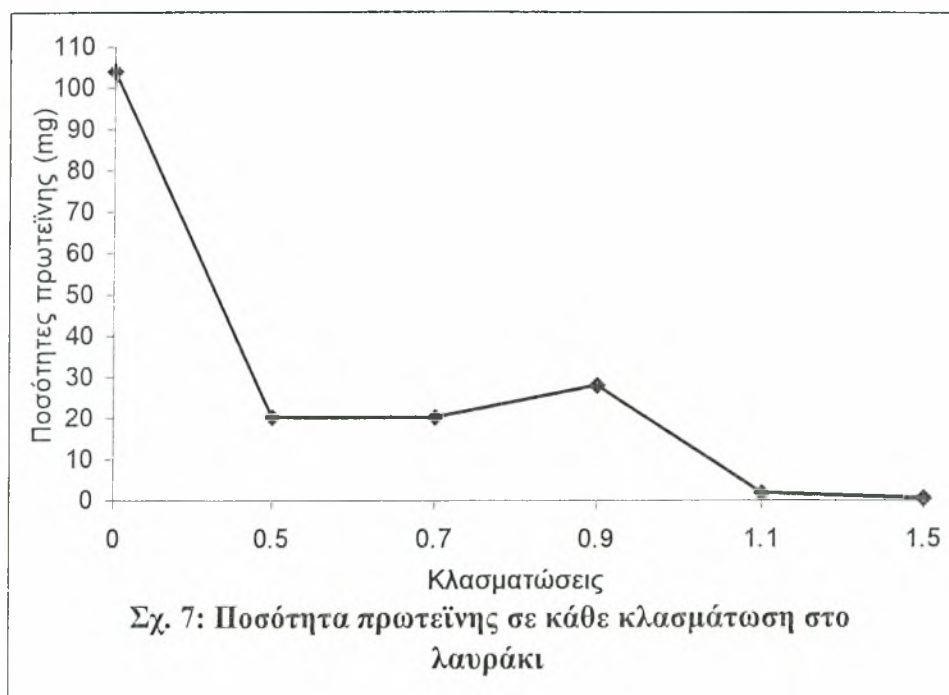


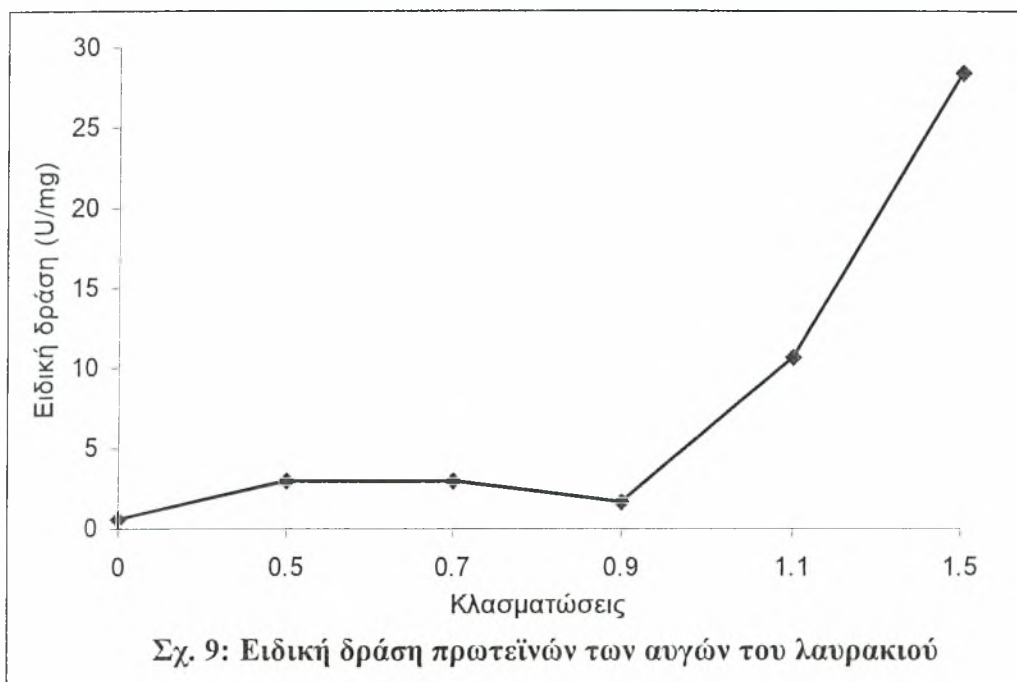
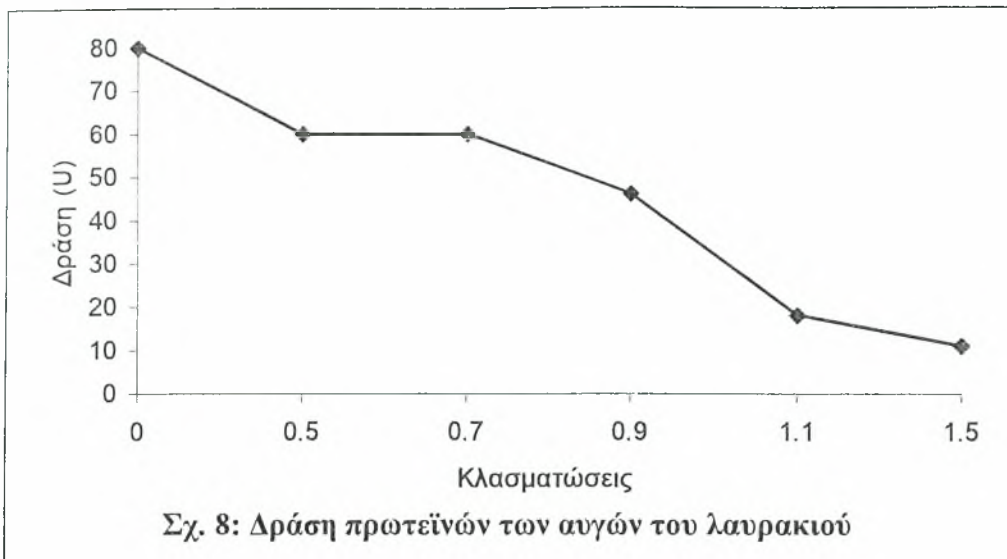
2.B.2.2. Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών λαυρακιού

Με τον ίδιο τρόπο έγινε η απομόνωση πρωτεϊνών στο λαυράκι. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3 και στα σχήματα 7, 8, 9.

Πίνακας 3: Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών από αυγά λαυρακιού.

Κλασματώσεις Ακετόνης (Όγκοι)	Συνολική Πρωτεΐνη (mg)	Συνολική Δράση (U)	Ειδική Δράση (U/mg)
0	104	80	0,58
0.5	20,25	60	2,96
0.7	20,25	60	2,96
0.9	28	46	1,64
1.1	1,6875	18	10,66
1.5	0,3875	11	28,39



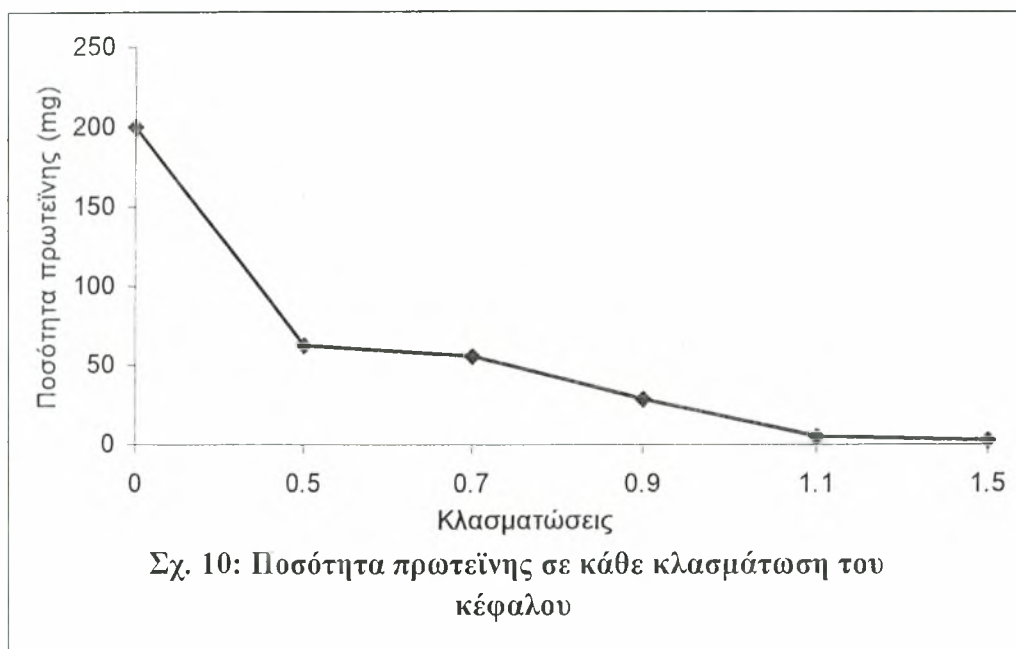


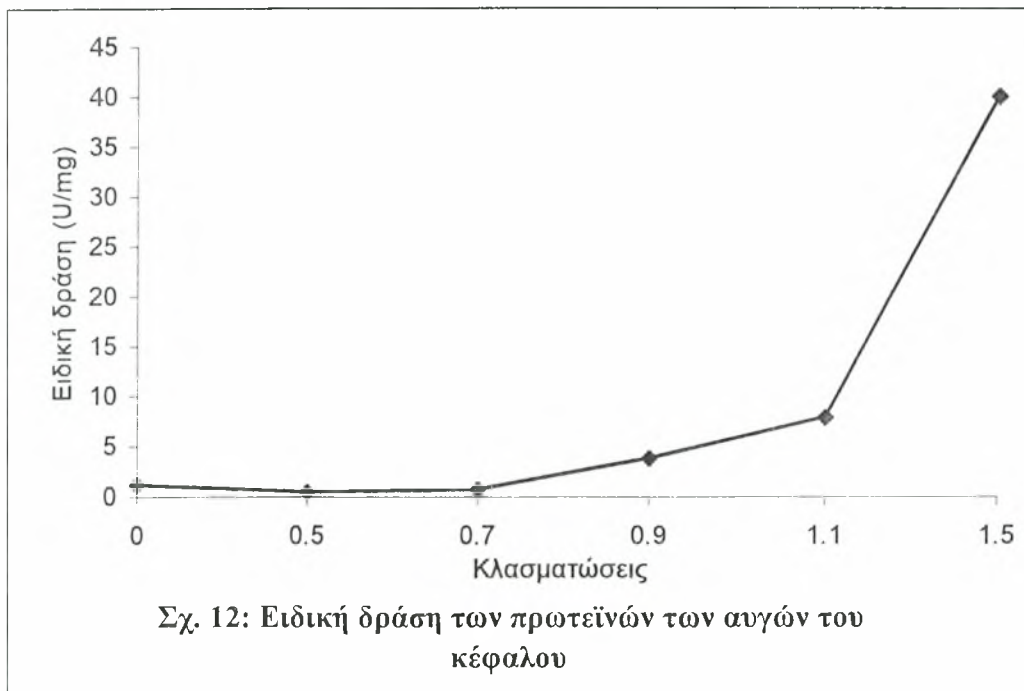
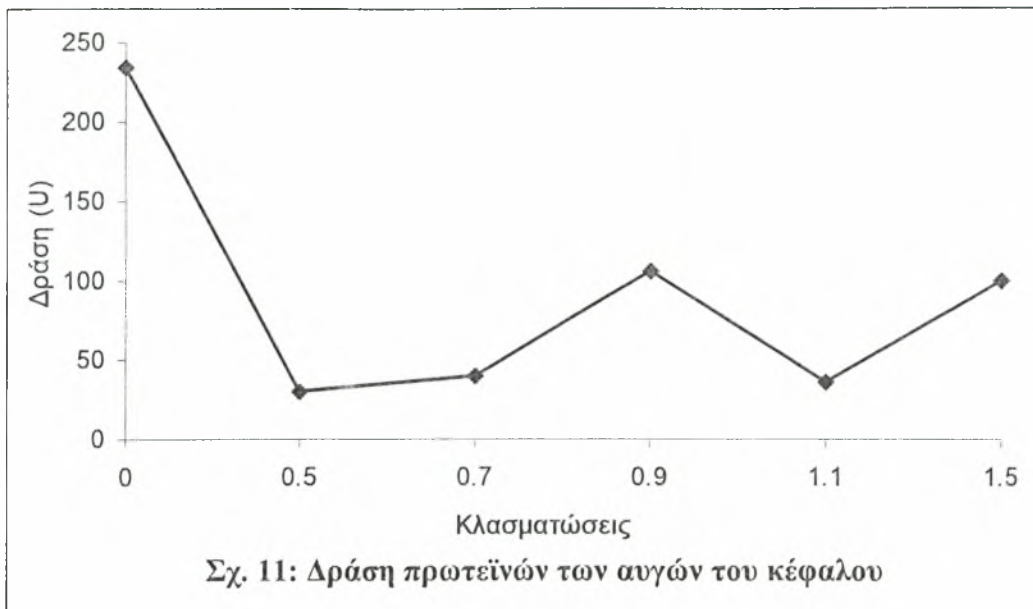
2.B.2.3. Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών κέφαλου

Με τον ίδιο τρόπο έγινε η απομόνωση πρωτεϊνών στον κέφαλο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 4 και στα σχήματα 10, 11, 12.

Πίνακας 4: Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών από αυγά κέφαλου.

Κλασματώσεις Ακετόνης (Όγκοι)	Συνολική Πρωτεΐνη (mg)	Συνολική Δράση (U)	Ειδική Δράση (U/mg)
0	200,2	234	1,17
0.5	62	30	0,48
0.7	55	40	0,73
0.9	28	106	3,79
1.1	4,65	36	7,83
1.5	2,5	100	40



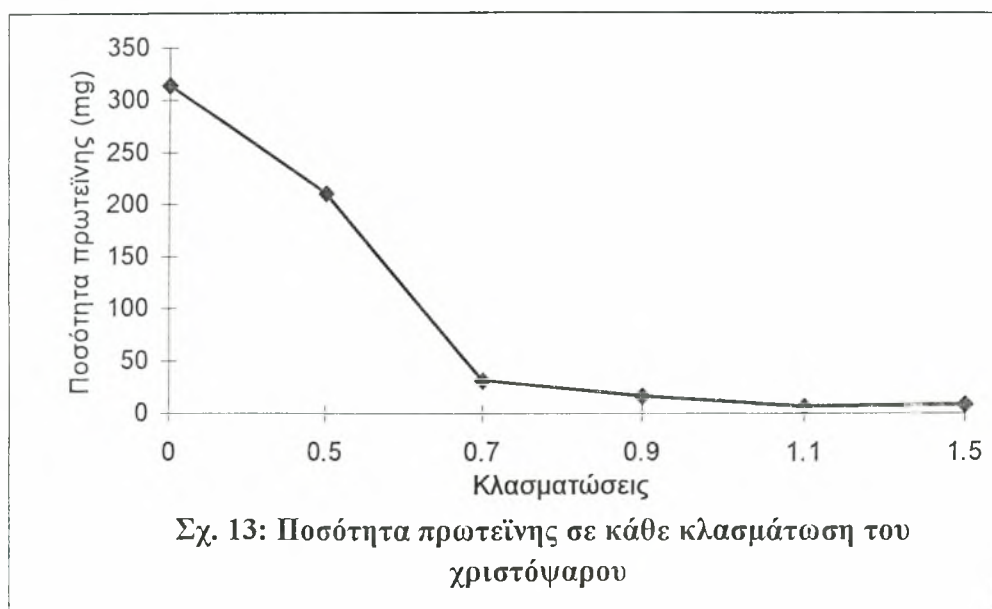


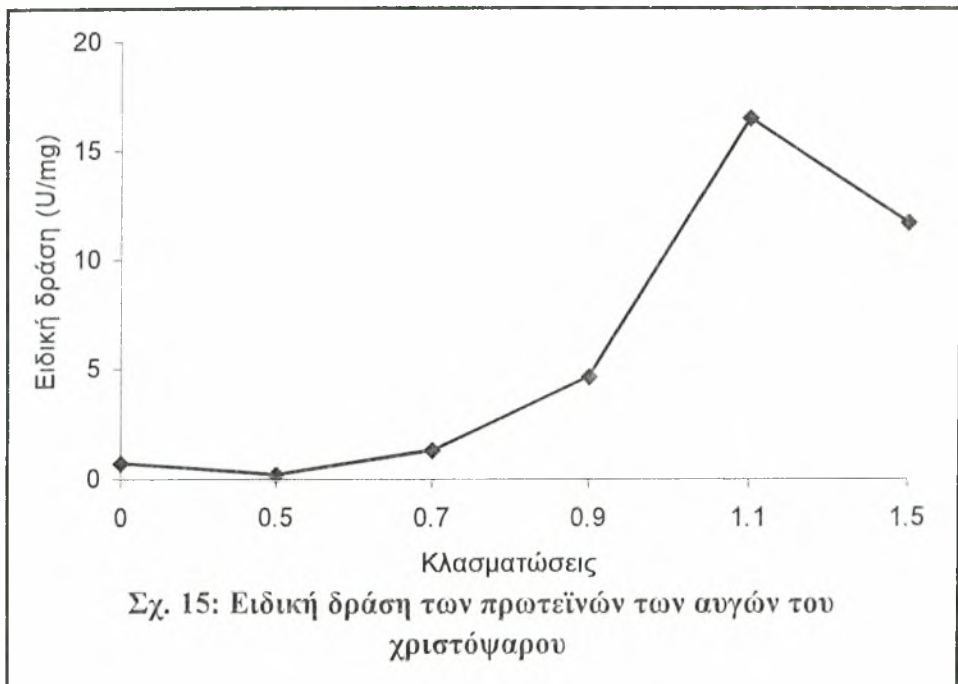
2.B.2.4. Απομόνωση πρωτεϊνών αυγών χριστόψαρου

Με τον ίδιο τρόπο έγινε η απομόνωση πρωτεϊνών στο χριστόψαρο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 5 και στα σχήματα 13, 14, 15.

Πίνακας 5: Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών από αυγά χριστόψαρου.

Κλασματώσεις Ακετόνης (Όγκοι)	Συνολική Πρωτεΐνη (mg)	Συνολική Δράση (U)	Ειδική Δράση (U/mg)
0	313,5	220	0,7
0.5	210	40	0,19
0.7	31	40	1,29
0.9	16	74	4,63
1.1	6,1	102	16,45
1.5	8,25	96	11,64

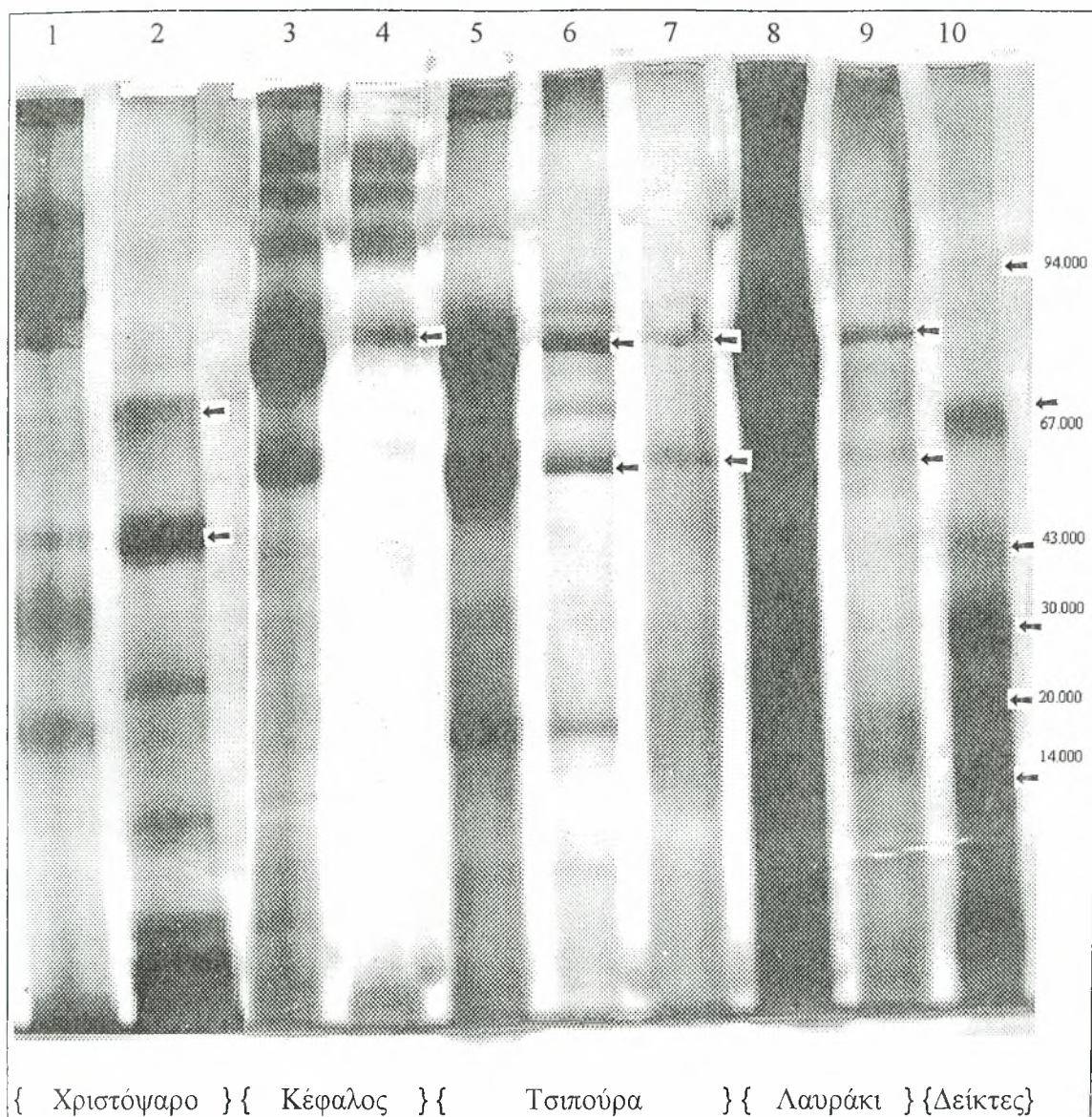




2.B.3. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

2.B.3.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αναγωγικές συνθήκες.

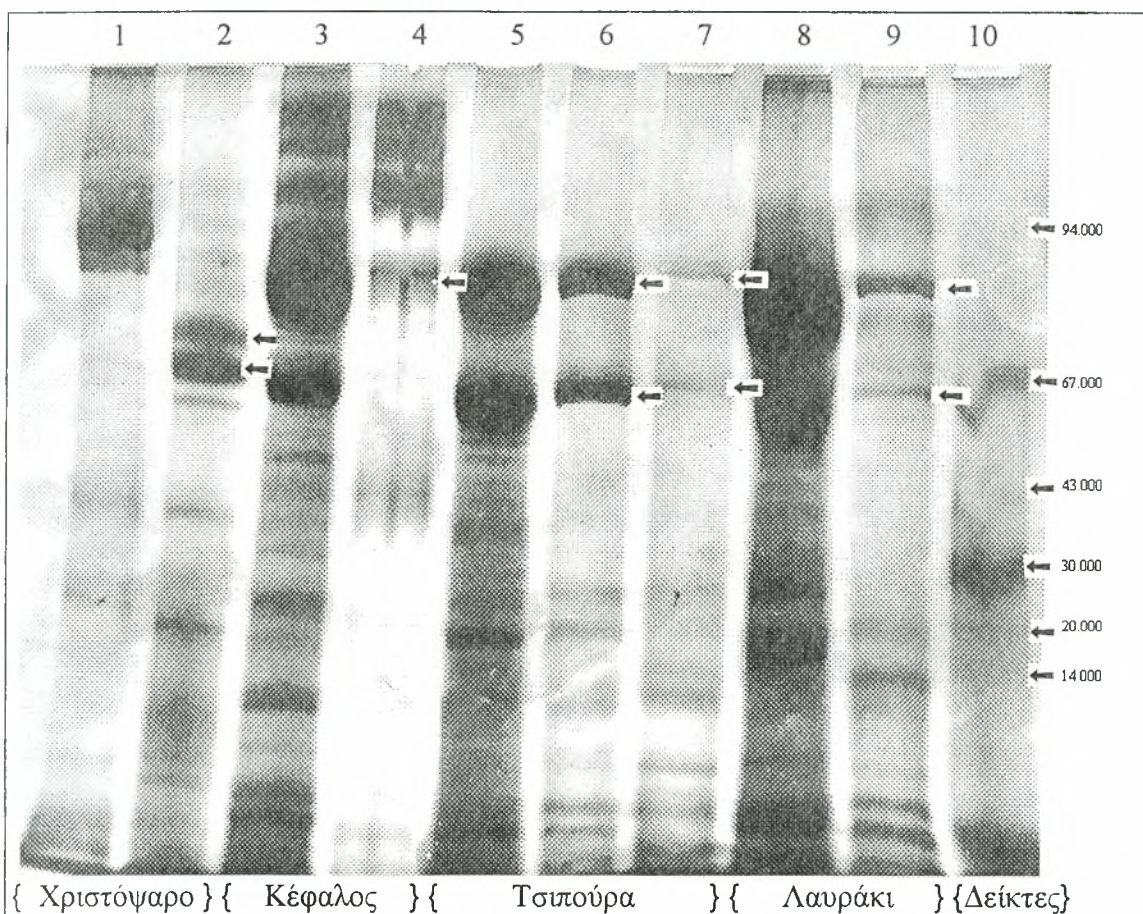
Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10 %, χωρίς την παρουσία μερκαπταιθανόλης, δηλαδή κάτω από μη αναγωγικές συνθήκες παρουσιάζονται στην εικόνα 7.



Εικ. 7: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, σε πηκτή πολυακρυλαμίδου 10 %, χωρίς παρουσία μερκαπταιθανόλης (μη αναγωγικές συνθήκες). Ζώνη 1: Ολικές πρωτεΐνες αυγών χριστόψαρου. Ζώνη 2: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών του χριστόψαρου. Ζώνη 3: Ολικές πρωτεΐνες αυγών κέφαλου. Ζώνη 4: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών του κέφαλου. Ζώνη 5: Ολικές πρωτεΐνες αυγών τσιπούρας. Ζώνη 6: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.1 των αυγών της τσιπούρας. Ζώνη 7: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών της τσιπούρας. Ζώνη 8: Ολικές πρωτεΐνες αυγών λαυρακίου. Ζώνη 9: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών του λαυρακίου. Ζώνη 10: Πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους.

2.B.3.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αναγωγικές συνθήκες

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, υπό την παρουσία μερκαπταιθανόλης, δηλαδή κάτω από αναγωγικές συνθήκες, παρουσιάζονται στην εικόνα 8.



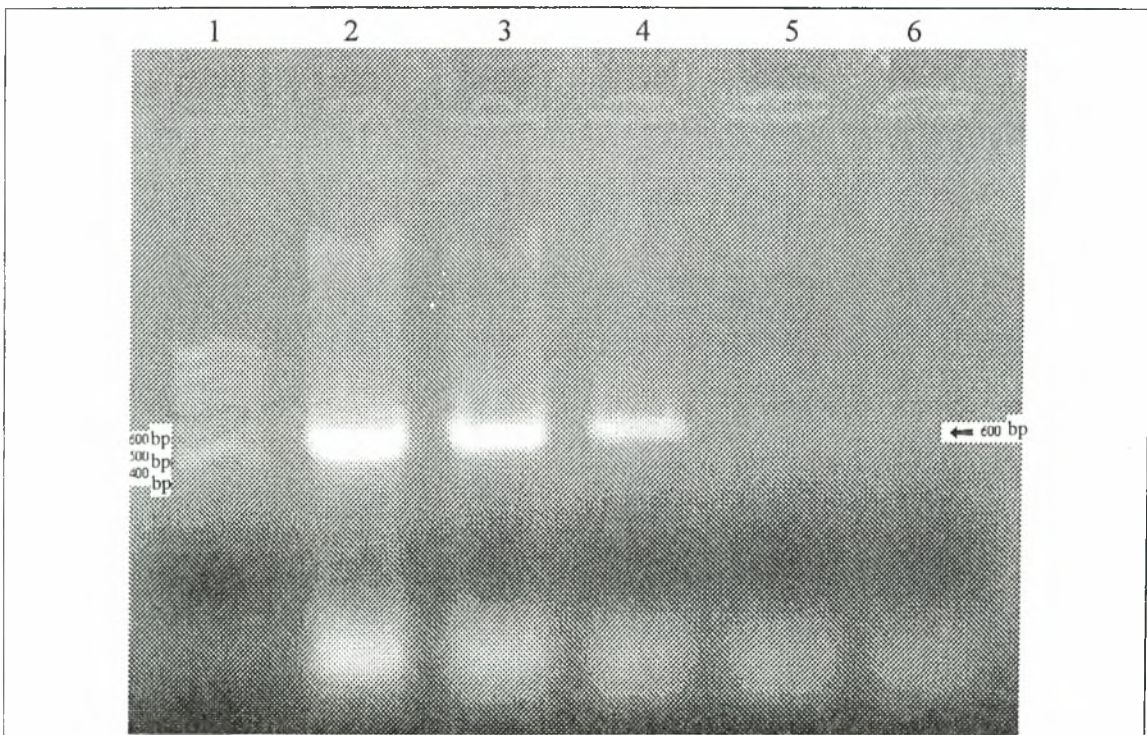
Εικ. 8: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία μερκαπταιθανόλης (αναγωγικές συνθήκες). Ζώνη 1: Ολικές πρωτεΐνες αυγών χριστόψαρου. Ζώνη 2: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών του χριστόψαρου. Ζώνη 3: Ολικές πρωτεΐνες αυγών κέφαλου. Ζώνη 4: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών του κέφαλου. Ζώνη 5: Ολικές πρωτεΐνες αυγών τσιπούρας. Ζώνη 6: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.1 των αυγών της τσιπούρας. Ζώνη 7: πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών της τσιπούρας. Ζώνη 8: Ολικές πρωτεΐνες αυγών λαυρακίου. Ζώνη 9: Πρωτεΐνες στην κλασμάτωση 1.5 των αυγών του λαυρακίου. Ζώνη 10: Πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους

2.B.4. Επίδραση των πρωτεϊνών στην αντιγραφή του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η δραστηριότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης των αυγών της τσιπούρας εξετάστηκε σε σχέση με την αναστολή του πολλαπλασιασμού του DNA με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Taq DNA και η Vent_R (exo⁻) DNA (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

2.B.4.1 Πολλαπλασιασμός μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA.

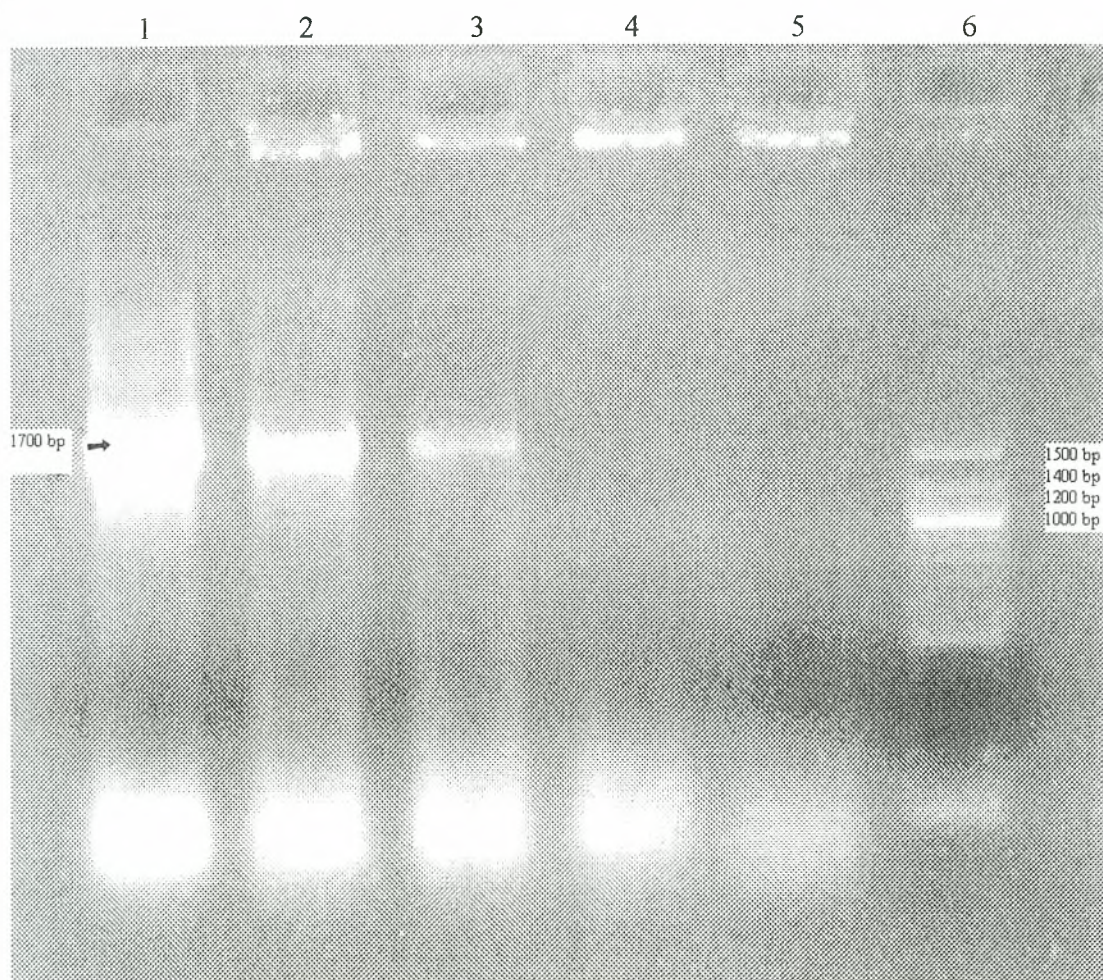
Η δραστηριότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης των αυγών της τσιπούρας σε σχέση με την αναστολή του πολλαπλασιασμού του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA φαίνεται στην εικόνα 9. Οι ποσότητες της απομονωμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 μg, 1 μg, 2 μg, 3 μg και 4 μg αντίστοιχα. Οι συνθήκες αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι.



Εικ. 9: Αναστολή του πολλαπλασιασμού του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA παρουσία των ακόλουθων ποσοτήτων της πρωτεΐνης: Δείκτες 100 bp DNA Ladder (γραμμή 1), 0 μg (γραμμή 2), 1 μg (γραμμή 3), 2 μg (γραμμή 4), 3 μg (γραμμή 5), 4 μg (γραμμή 6).

2.B.4.2. Πολλαπλασιασμός μιτοχondριακής περιοχής D-loop με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA.

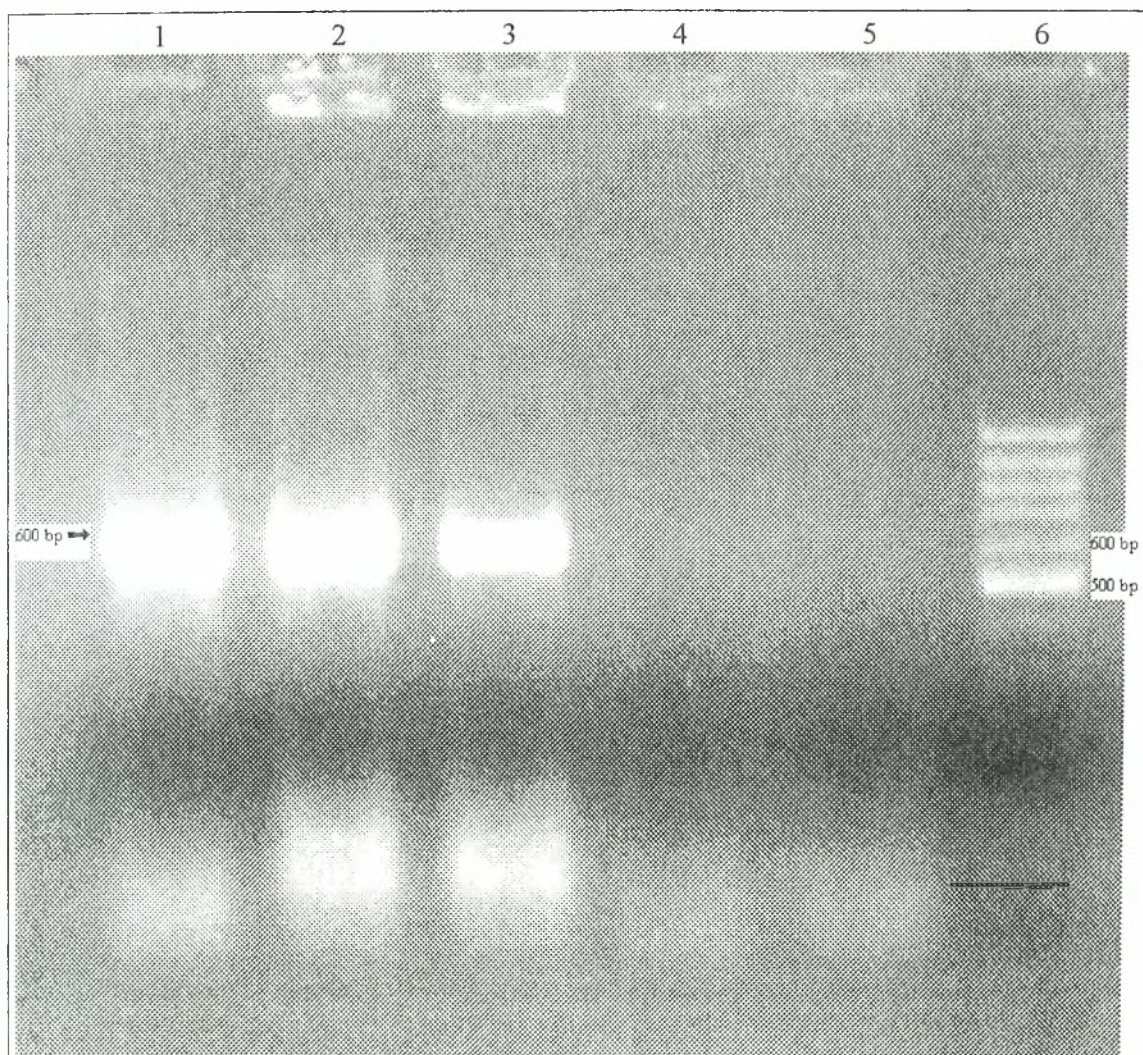
Η δραστικότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης των αυγών της τσιπούρας σε σχέση με την αναστολή του πολλαπλασιασμού της μιτοχondριακής περιοχής D-loop με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA φαίνεται στην εικόνα 10. Οι ποσότητες της απομονωμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 μg, 1 μg, 2 μg, 3 μg και 4 μg. Οι συνθήκες αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι.



Εικ. 10: Αναστολή του πολλαπλασιασμού της μιτοχondριακής περιοχής D-loop με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA παρουσία των ακόλουθων ποσοτήτων της πρωτεΐνης: 0 μg (γραμμή 1), 1 μg (γραμμή 2), 2 μg (γραμμή 3), 3 μg (γραμμή 4), 4 μg (γραμμή 5), δείκτες 100 bp DNA Ladder (γραμμή 6).

2.B.4.3. Πολλαπλασιασμός μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Vent_R (exo⁻) DNA.

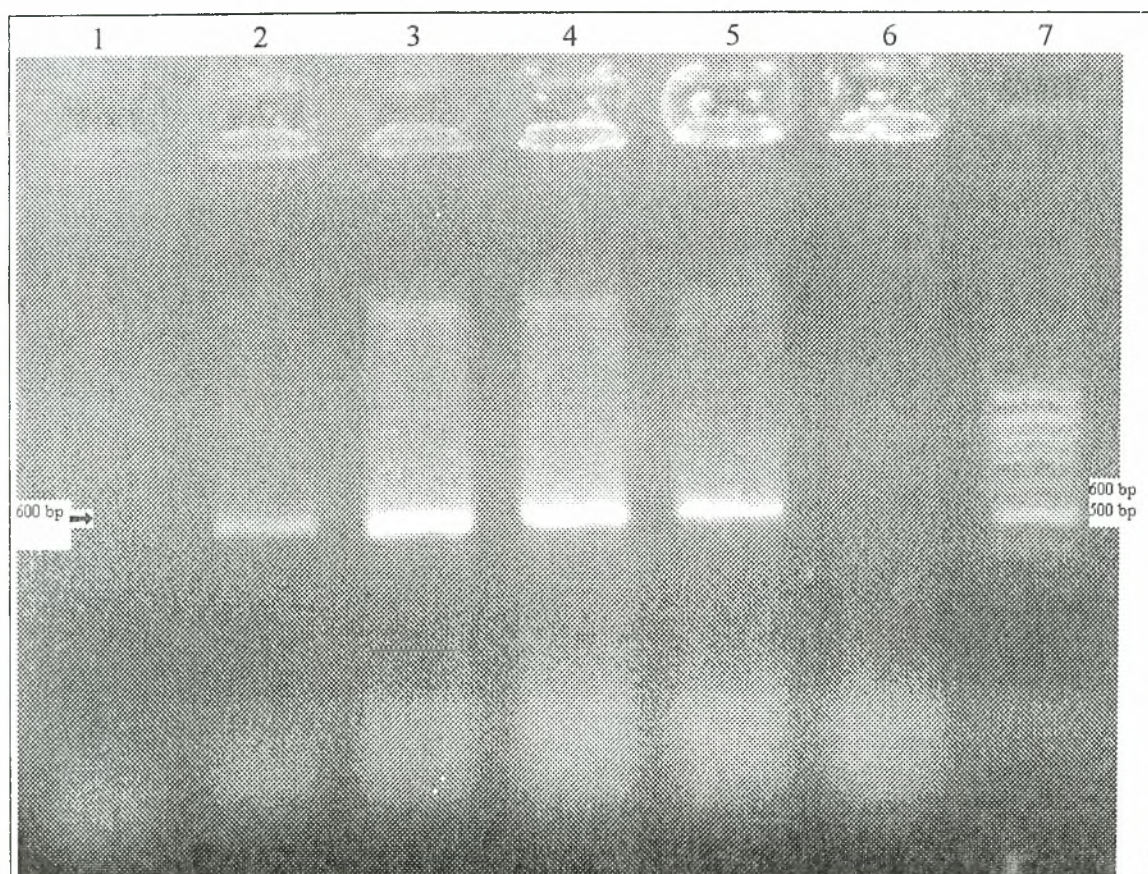
Η δραστηριότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης των αυγών της τσιπούρας σε σχέση με την αναστολή του πολλαπλασιασμού του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Vent_R (exo⁻) DNA φαίνεται στην εικόνα 11. Οι ποσότητες της απομονωμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 μg, 1 μg, 2 μg, 3 μg και 4 μg. Οι συνθήκες αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι.



Εικ. 11. Αναστολή του πολλαπλασιασμού του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με την χρήση της πολυμεράσης Vent_R (exo⁻) DNA παρουσία των ακόλουθων ποσοτήτων της πρωτεΐνης: 0 μg (γραμμή 1), 1 μg (γραμμή 2), 2 μg (γραμμή 3), 3 μg (γραμμή 4), 4 μg (γραμμή 5), δείκτης 100 bp DNA Ladder (γραμμή 6).

2.B.4.4. Επίδραση της ποσότητας του DNA στον πολλαπλασιασμό του μιτοχondριακού γονιδίου 16S rRNA υπό την παρουσία σταθερής ποσότητας πρωτεΐνης

Εξετάστηκε η επίδραση της ποσότητας του DNA στον πολλαπλασιασμό του μιτοχondριακού γονιδίου 16S rRNA υπό την παρουσία σταθερής ποσότητας πρωτεΐνης 2 μg . Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Taq DNA. Οι ποσότητες του DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,4 μg , 0,8 μg , 1 μg , 1,5 μg , 2 μg και 2,5 μg αντίστοιχα. Οι συνθήκες αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 12.



Εικ. 12. Επίδραση της ποσότητας του DNA στον πολλαπλασιασμό του μιτοχondριακού γονιδίου 16S rRNA υπό την παρουσία σταθερής ποσότητας πρωτεΐνης (2 μg) με την χρήση της πολυμεράσης Taq DNA. Οι ποσότητες DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 0,4 μg (γραμμή 1), 0,8 μg (γραμμή 2), 1 μg (γραμμή 3), 1,5 μg (γραμμή 4), 2 μg (γραμμή 5), 2,5 μg (γραμμή 6), και δείκτες 100 bp DNA Ladder (γραμμή 7).

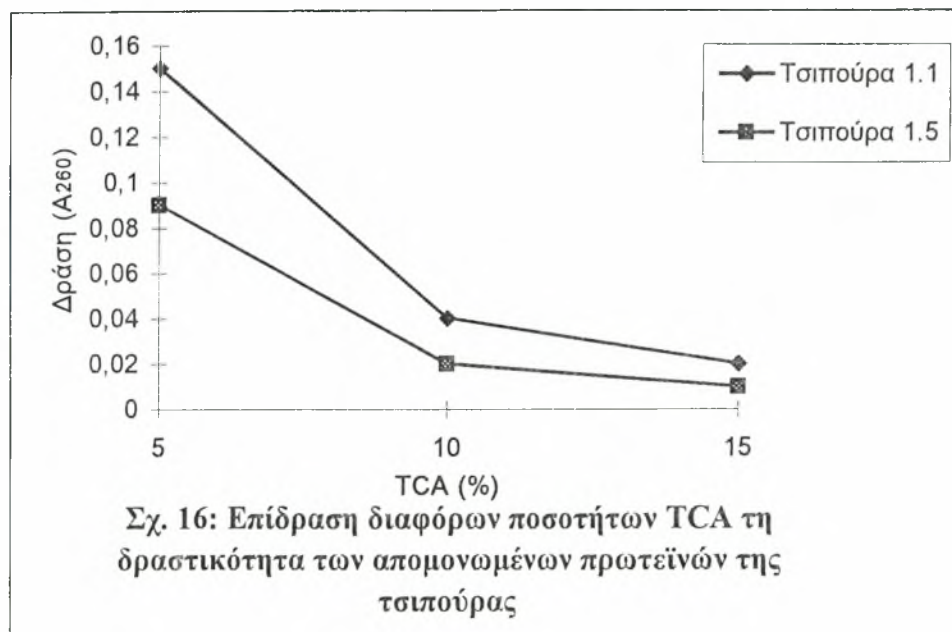
2.B.5. Επίδραση της συγκέντρωσης του τριχλωροξικού οξέος (TCA) στην κατακρήμνιση του DNA

α) Τσιπούρα

Η επίδραση διαφόρων ποσοτήτων TCA στην δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας φαίνεται στον πίνακα 6 και σχηματικά στο σχήμα 16.

Πίνακας 6: Επίδραση διαφόρων ποσοτήτων TCA στη δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας

TCA (%)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)
5	0.15	0,09
10	0.04	0,02
15	0.02	0,01

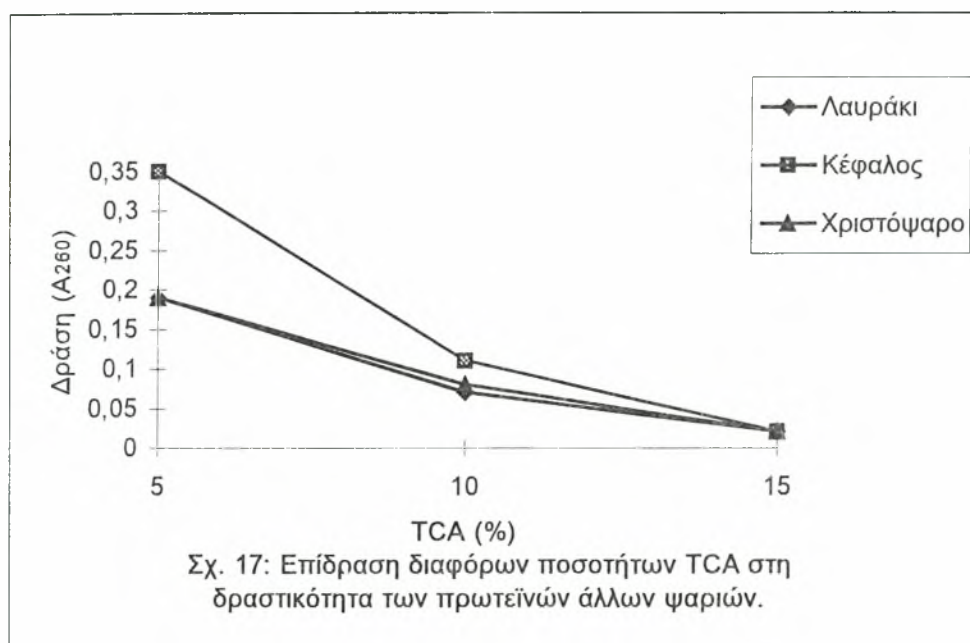


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο

Η επίδραση διαφόρων ποσοτήτων TCA στην δραστικότητα των πρωτεϊνών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου φαίνεται στον πίνακα 7 και σχηματικά στο σχήμα 17.

Πίνακας 7: Επίδραση διαφόρων ποσοτήτων TCA στη δραστικότητα των πρωτεϊνών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου

TCA (%)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)
5	0.19	0.35	0.19
100	0.07	0.11	0.08
15	0.02	0.02	0.01



2.B.6. Επίδραση NaCl στην κατακρήμνιση του DNA

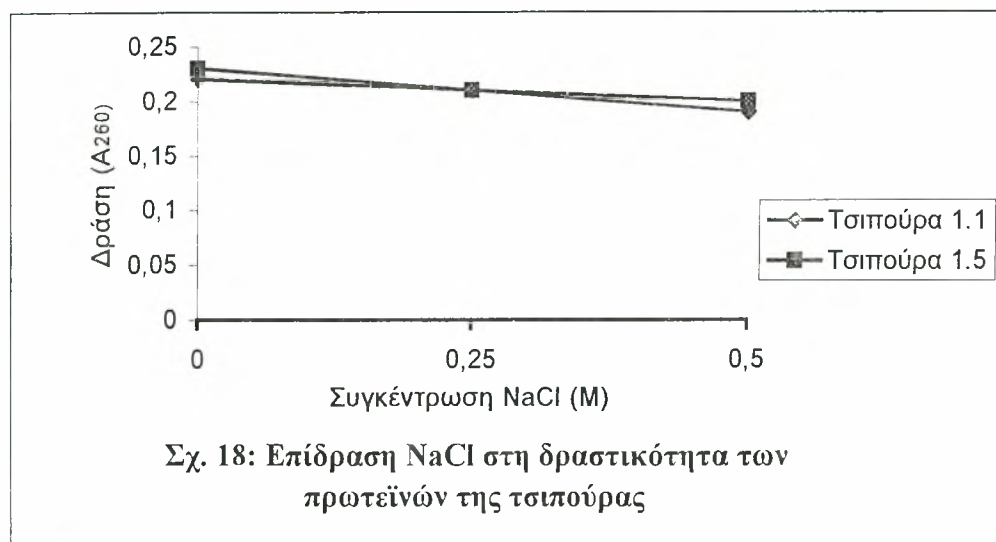
Η επίδραση του NaCl στην δράση των πρωτεϊνών κατά την αναστολή της κατακρήμνισης του DNA σε TCA εξετάστηκε ως εξής: Αρχικά παρασκευάστηκε ποσότητα NaCl 5M. Στην συνέχεια σε παρασκευάσματα που περιείχαν 200 μl DNA, 10 μl buffer και 20 μl διαλύματος που περιείχε τις απομονωμένες πρωτεΐνες, εισήχθησαν ποσότητες NaCl, τέτοιες ώστε η τελική τους συγκέντρωση στο διάλυμα να γίνει 0,25 M και 0,5 M. Μετά την προσθήκη του TCA η δράση υπολογίστηκε με την χρήση του φασματοφωτόμετρου, με την μέθοδο που έχει περιγραφεί παραπάνω.

α) Τσιπούρα

Εξετάστηκε η επίδραση του NaCl στη δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8 και γραφικά στο σχήμα 18.

Πίνακας 8. Επίδραση NaCl στη δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας

NaCl (M)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A ₂₆₀)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A ₂₆₀)
0	0.22	0,23
0,25	0.21	0,21
0.5	0.19	0,20

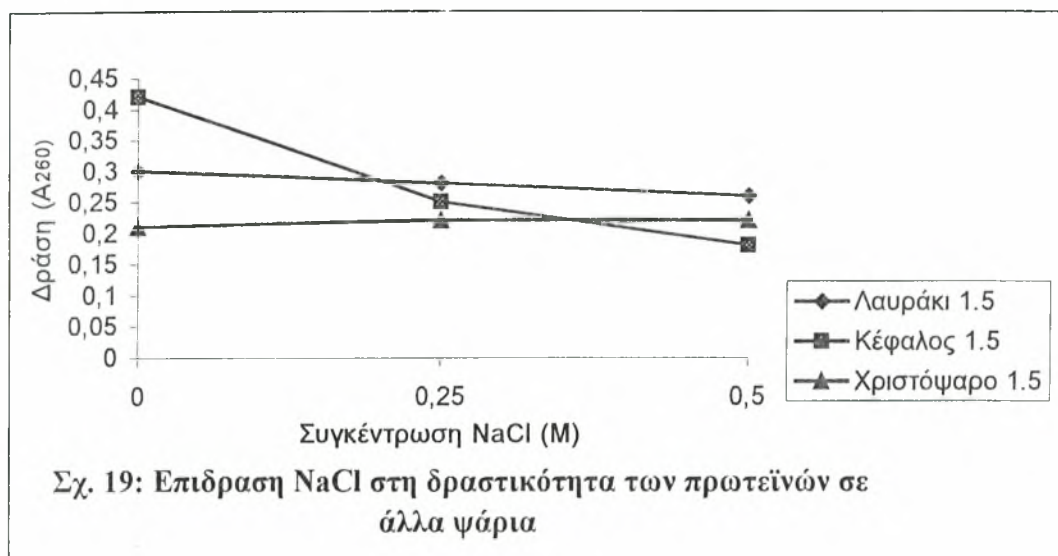


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο

Η επίδραση του NaCl στα υπόλοιπα ψάρια εξετάστηκε όπως και στη τσιπούρα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 9 και γραφικά στο σχήμα 19.

Πίνακας 9: Επίδραση NaCl στη δραστηριότητα των πρωτεϊνών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου.

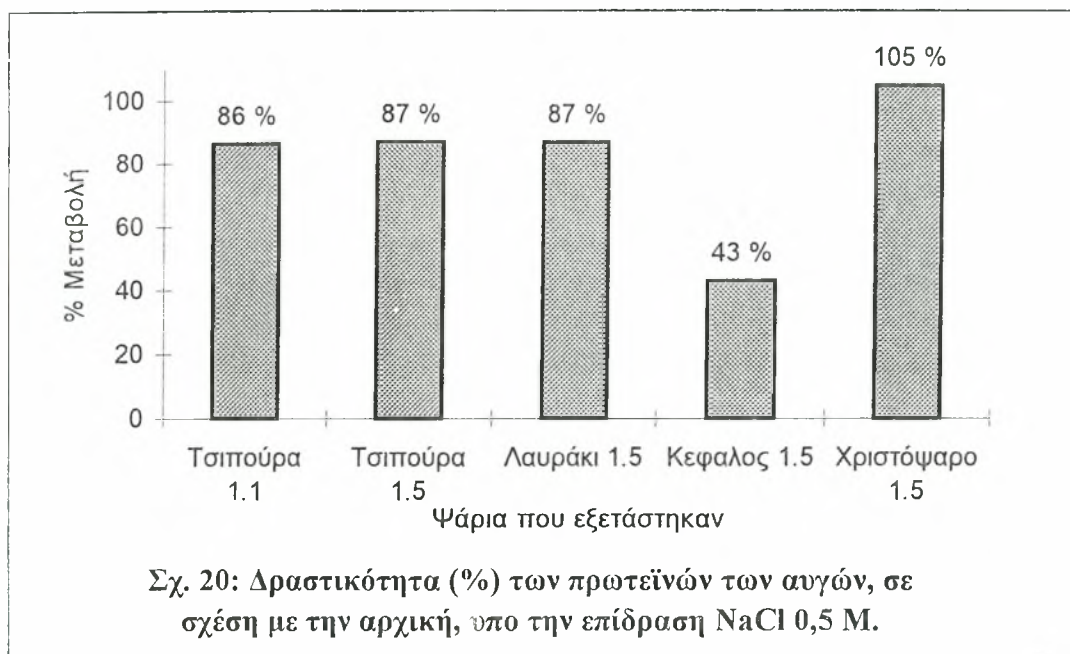
NaCl (M)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του χριστόψαρου (A260)
0	0.30	0.42	0.21
0,25	0.28	0.25	0.22
0.5	0.26	0.18	0.22



Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η επί τις εκατό μεταβολή της δραστικότητας των πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών που εξετάστηκαν, υπό την επίδραση NaCl συγκέντρωσης 0,5 M, σε σχέση με την αρχική. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 10 και στο σχήμα 20.

Πίνακας 10: Δραστικότητα (%) των πρωτεϊνών των αυγών, σε σχέση με την αρχική, υπό την επίδραση NaCl 0,5 M.

Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κεφαλού 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
86	87	87	43	105



2.B.7. Επίδραση της θέρμανσης στην δραστικότητα των πρωτεϊνών

Εξετάστηκε η επίδραση της θέρμανσης στους 60 και 80 °C αντίστοιχα, στις πρωτεΐνες των αυγών των ψαριών που μελετήθηκαν. Η εξέταση έγινε ως εξής:

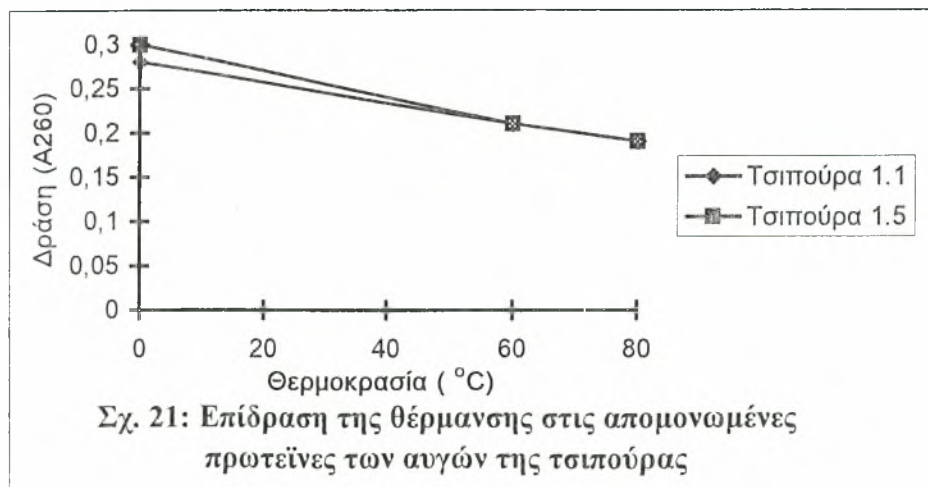
Ποσότητα 30 μl από τα παρασκευάσματα περιείχαν τις απομονωμένες πρωτεΐνες των αυγών των ψαριών που μελετήθηκαν θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60 °C και 80 °C αντίστοιχα για χρόνο 10 λεπτά. Εν συνεχεία, φυγοκεντρίθηκε στις 5.000 RPM στους 4 °C για 4 λεπτά. Από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν 20 μl για τον υπολογισμό της δράσης με την μέθοδο που έχει περιγραφεί παραπάνω.

α) Τσιπούρα

Εξετάστηκε η επίδραση της θέρμανσης στους 60 και 80 °C αντίστοιχα, στα παρασκευάσματα 1.1 και 1.5 αντίστοιχα των απομονωμένων πρωτεϊνών της τσιπούρας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 11, καθώς και γραφικά στο σχήμα 21.

Πίνακας 11: Επίδραση της θέρμανσης στις απομονωμένες πρωτεΐνες των αυγών της τσιπούρας.

Θερμοκρασία (°C)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)
0	0.28	0,3
60	0.21	0,21
80	0.19	0,19

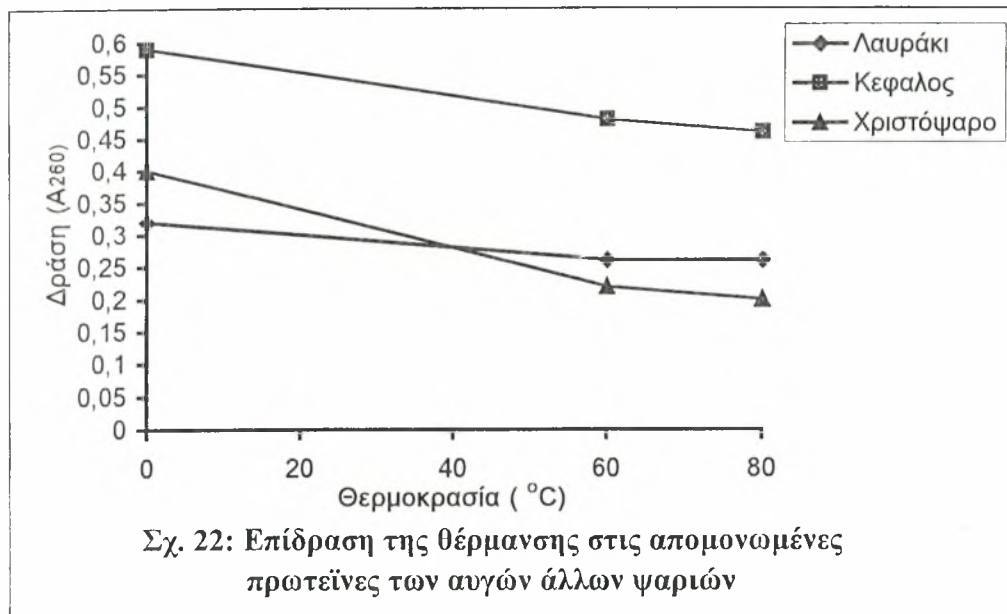


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο.

Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο εξετάστηκε η επίδραση της θέρμανσης στους 60 και 80 °C αντίστοιχα, στα παρασκευάσματα των απομονωμένων πρωτεϊνών 1.5 του λαυρακιού, 1.5 του κέφαλου και 1.5 του χριστόψαρου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 12 και στο σχήμα 22.

Πίνακας 12: Επίδραση της θέρμανσης στις απομονωμένες πρωτεΐνες των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου

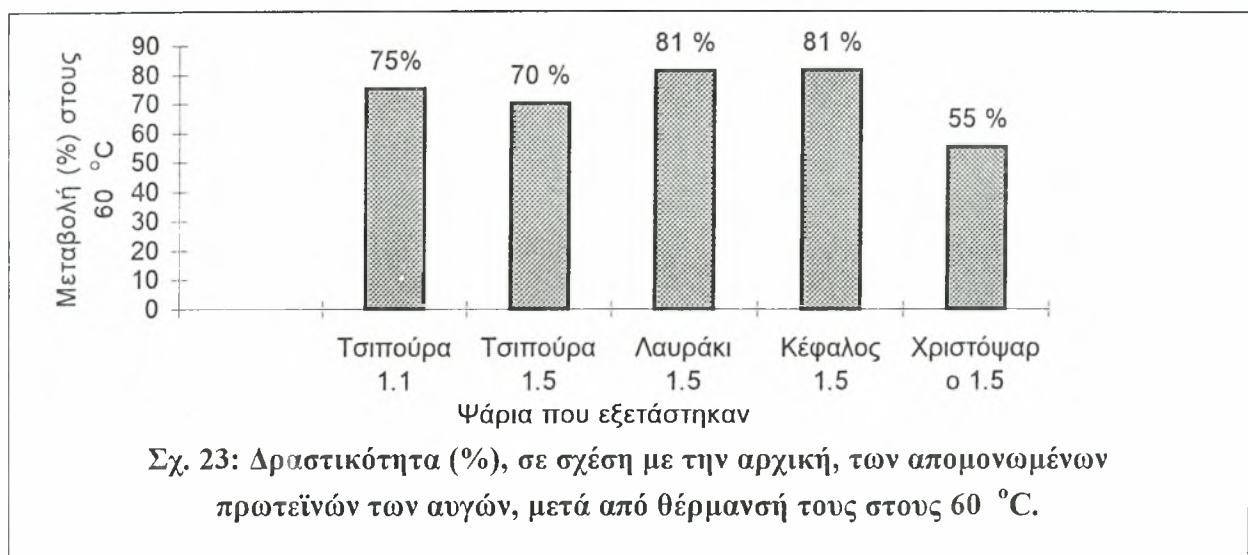
Θερμοκρασία (°C)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)
0	0.32	0.59	0.40
60	0.26	0.48	0.22
80	0.26	0.46	0.20



Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η δραστικότητα (%) των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών σε σχέση με την αρχική, μετά από θέρμανσή τους στους 60 °C και στους 80 °C αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 13 και 14, καθώς και στα σχήματα 23 και 24.

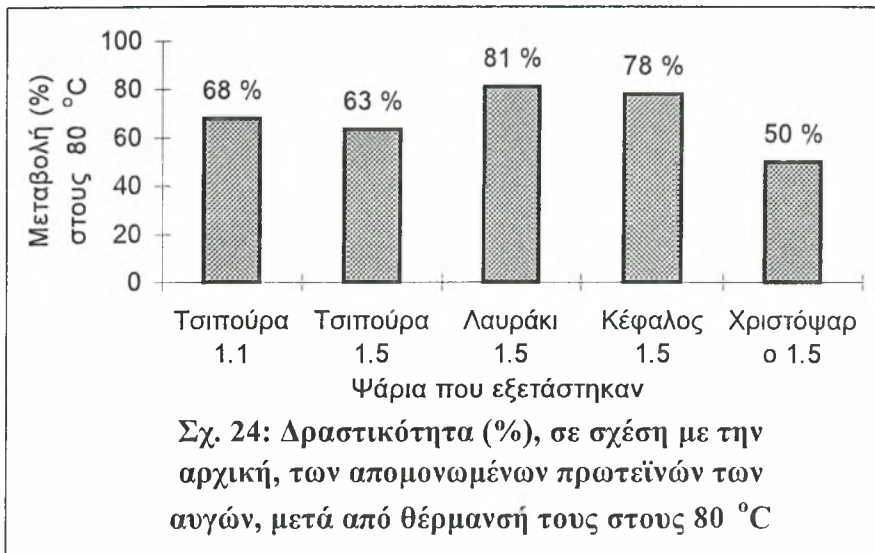
Πίνακας 13: Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, μετά από θέρμανση τους στους 60 °C.

Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κέφαλου 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
75	70	81	81	55



Πίνακας 24: Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, μετά από θέρμανση τους στους 80 °C.

Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κέφαλου 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
68	63	81	78	50



2.B.8. Επίδραση δισθενών μετάλλων στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 100 mM των εξής δισθενών μετάλλων: Μαγνησίου, το οποίο βρισκόταν υπο μορφή χλωριούχου μαγνησίου ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), μαγγανίου, το οποίο βρισκόταν υπο μορφή χλωριούχου μαγγανίου ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), κοβάλτιου, το οποίο βρισκόταν υπο μορφή χλωριούχου κοβάλτιου ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ψευδαργύρου, το οποίο βρισκόταν υπο μορφή χλωριούχου ψευδαργύρου (ZnCl_2) και χαλκού το οποίο βρισκόταν υπο μορφή θειϊκού χαλκού ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Οι ποσότητες των υδατικών διαλυμάτων των μετάλλων που εισήχθησαν στα διαλύματα που περιείχαν τις προς μελέτη πρωτεΐνες ήταν τέτοιες, ώστε οι τελικές τους συγκεντρώσεις να ήταν 1 mM, 5 mM και 10 mM, δηλαδή ήταν 2,5 μl, 12,5 μl και 50 μl αντίστοιχα. Η δράση υπολογίστηκε με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί παραπάνω. Η επίδραση των μετάλλων στις πρωτεΐνες συσχετίστηκε με τις αλλαγές που αυτά επέφεραν στην δράση των πρωτεϊνών .

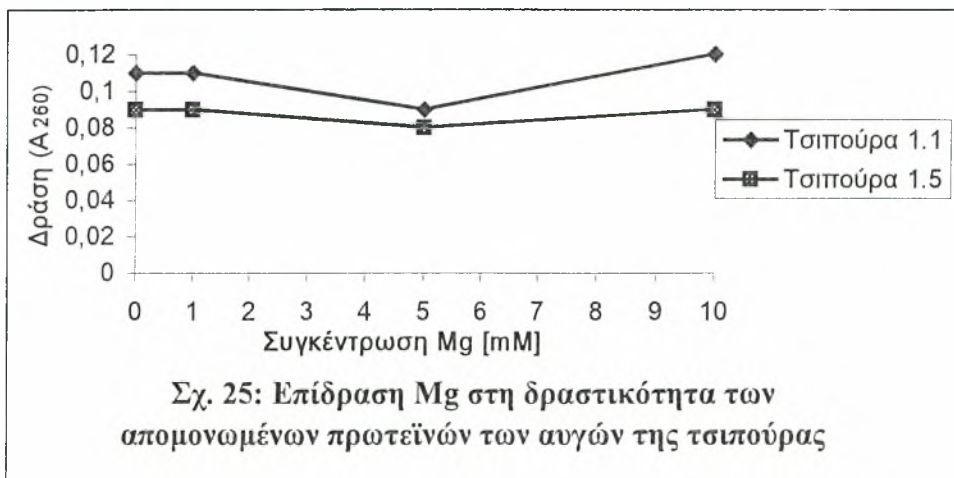
2.B.8.1. Επίδραση Mg

α) Τσιπούρα.

Η επίδραση του Mg στη δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας που απομονώθηκαν φαίνονται στον πίνακα 15 και γραφικά στο σχήμα 25.

Πίνακας 15: Επίδραση Mg στη δραστικότητα των πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας

[Mg] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A ₂₆₀)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A ₂₆₀)
0	0,11	0,09
1	0,11	0,09
5	0,09	0,08
10	0,12	0,09

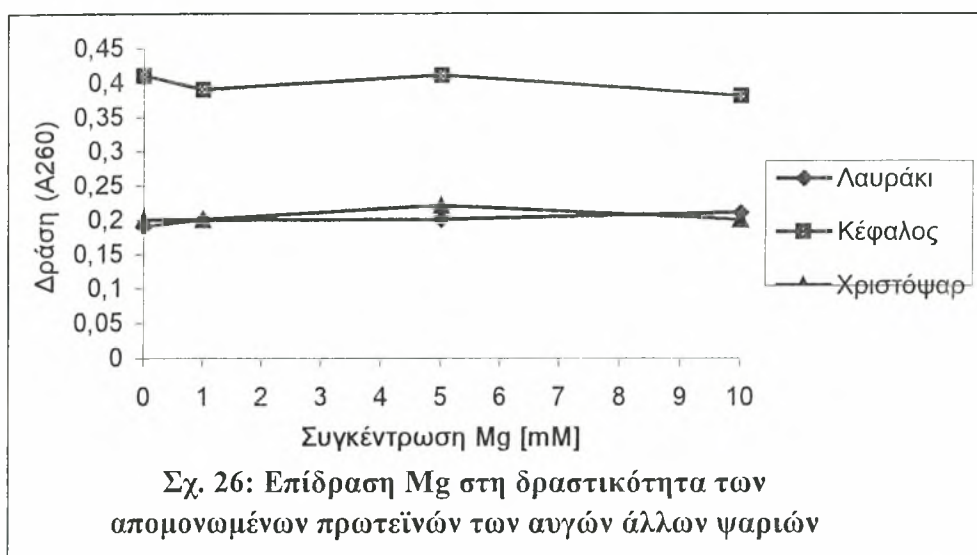


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο

Η επίδραση του Mg στις απομονωμένες πρωτεΐνες του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου φαίνεται στον πίνακα 16 και γραφικά στο σχήμα 26.

Πίνακας 16: Επίδραση Mg στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου

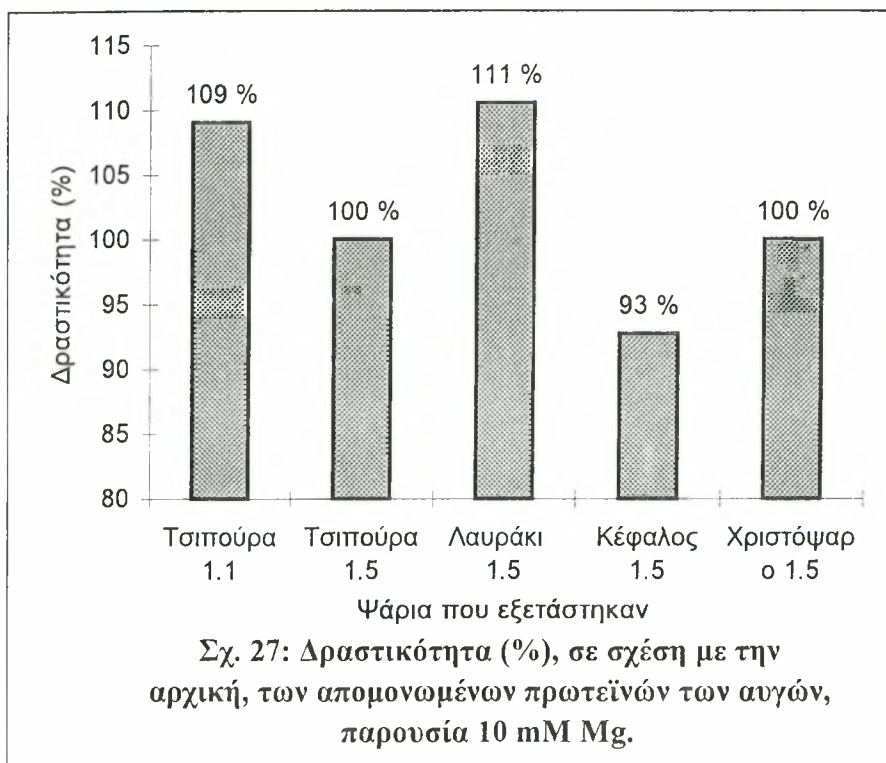
[Mg] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του χριστόψαρου (A260)
0	0,19	0,41	0,20
1	0,20	0,39	0,20
5	0,20	0,41	0,22
10	0,21	0,38	0,20



Στη συνέχεια υπολογίστηκε η μεταβολή στην δραστικότητα υπό την επίδραση 10 mM Mg, σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών των αυγών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 17 και γραφικά στο σχήμα 27.

Πίνακας 17: Δραστικότητα (%) των πρωτεϊνών των αυγών, σε σχέση με την αρχική, υπό την παρουσία 10 mM Mg.

Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κέφαλου 1.5	Δραστικότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
109	100	111	93	100



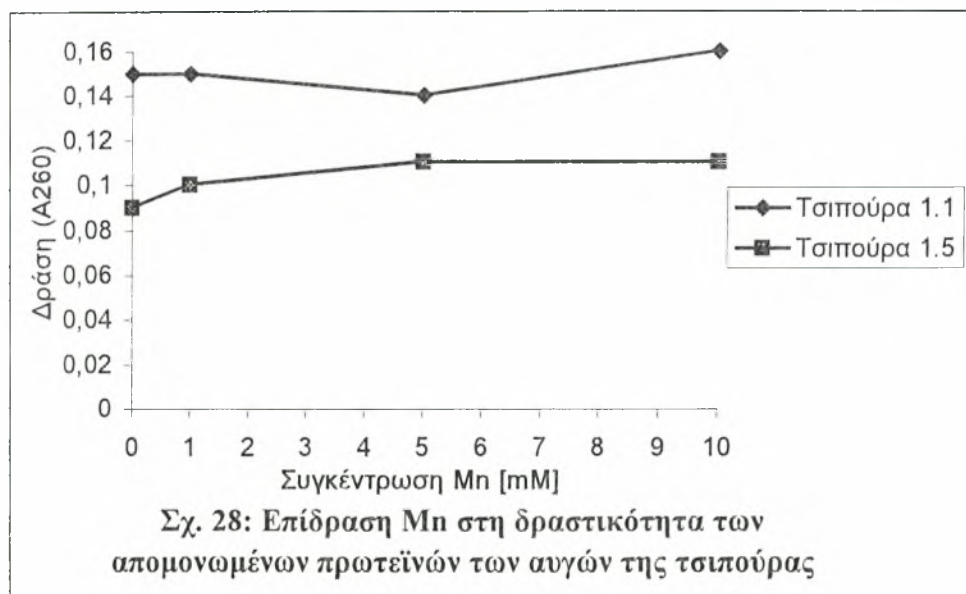
2.B.8.2. Επίδραση Mn

α) Τσιπούρα.

Η επίδραση του Mn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας φαίνεται στον πίνακα 18 και γραφικά στο σχήμα 28.

Πίνακας 18: Επίδραση Mn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας

[Mn] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)
0	0,15	0,09
1	0,15	0,10
5	0,14	0,11
10	0,16	0,11

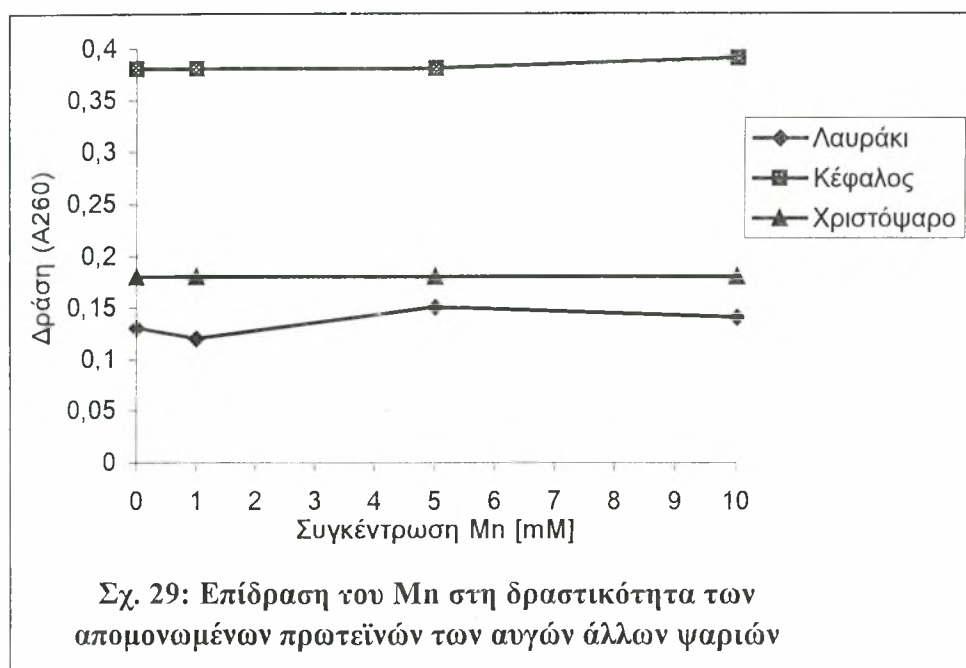


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο

Η επίδραση του Mn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου φαίνεται στον πίνακα 19 και γραφικά στο σχήμα 29.

Πίνακας 19: Επίδραση Mn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου

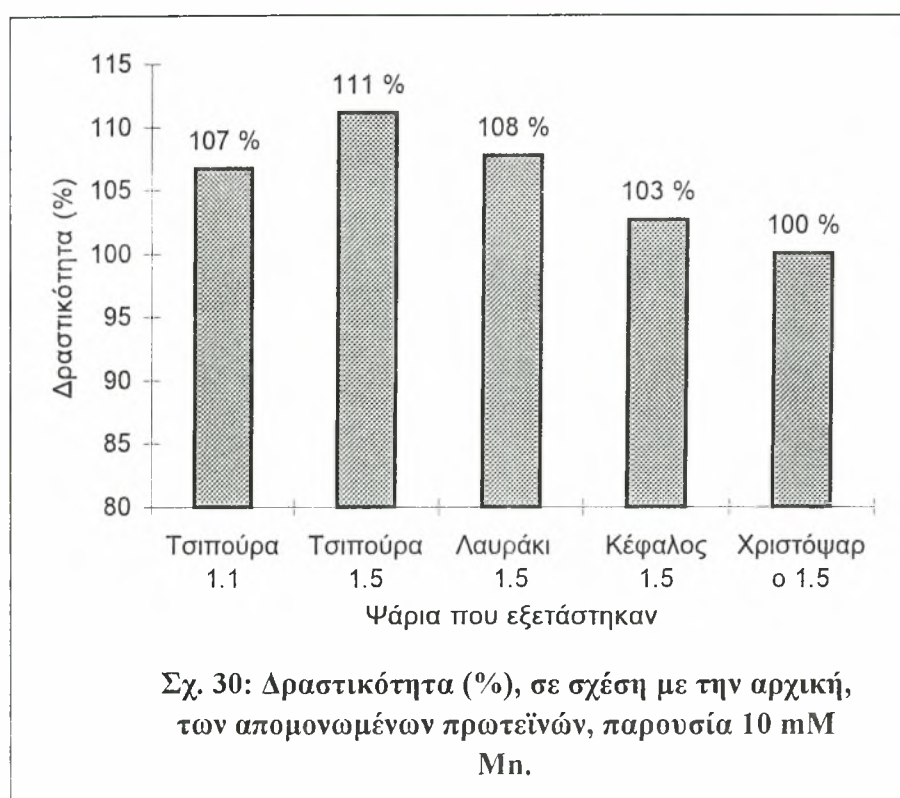
[Mn] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του χριστόψαρου (A260)
0	0,13	0,38	0,18
1	0,12	0,38	0,18
5	0,15	0,38	0,18
10	0,14	0,39	0,18



Στη συνέχεια υπολογίστηκε η εκατοστιαία μεταβολή, σε σχέση με την αρχική, της δραστηριότητας των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, υπό την επίδραση 10 mM Mn. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 20 και γραφικά στο σχήμα 30.

Πίνακας 20: Δραστηριότητα (%) των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών σε σχέση με την αρχική, υπό την παρουσία 10 mM Mn.

Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κέφαλου 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
107	111	108	103	100



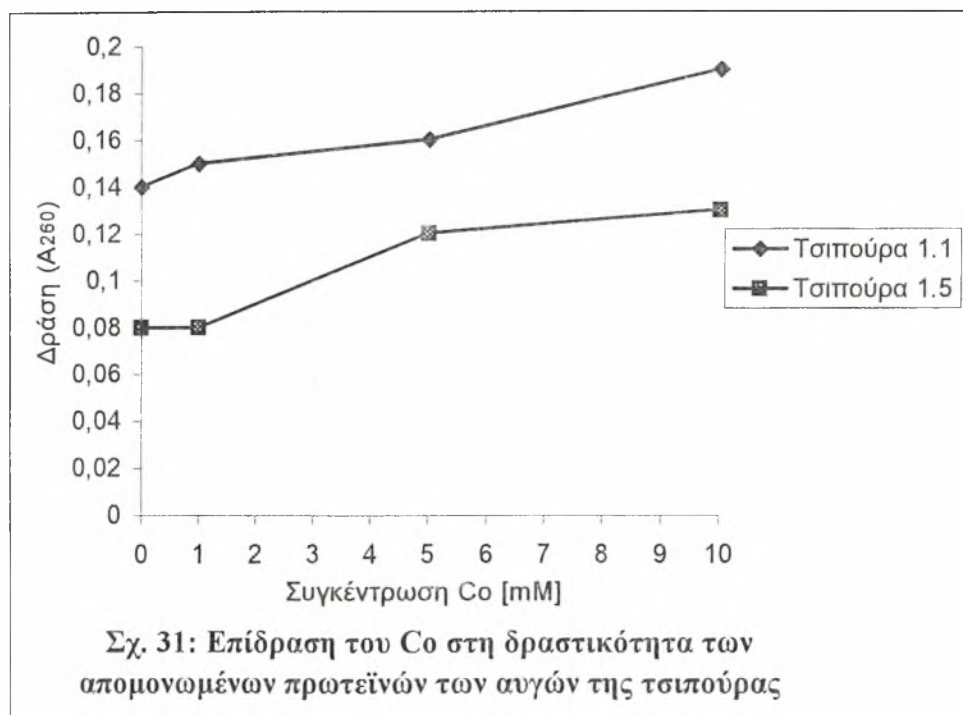
2.B.8.3. Επίδραση Co

α) Τσιπούρα.

Η επίδραση του Co στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας φαίνεται στον πίνακα 21 και γραφικά στο σχήμα 31.

Πίνακας 21: Επίδραση Co στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας

[Co] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)
0	0.14	0,08
1	0,15	0,08
5	0,16	0,12
10	0,19	0,13

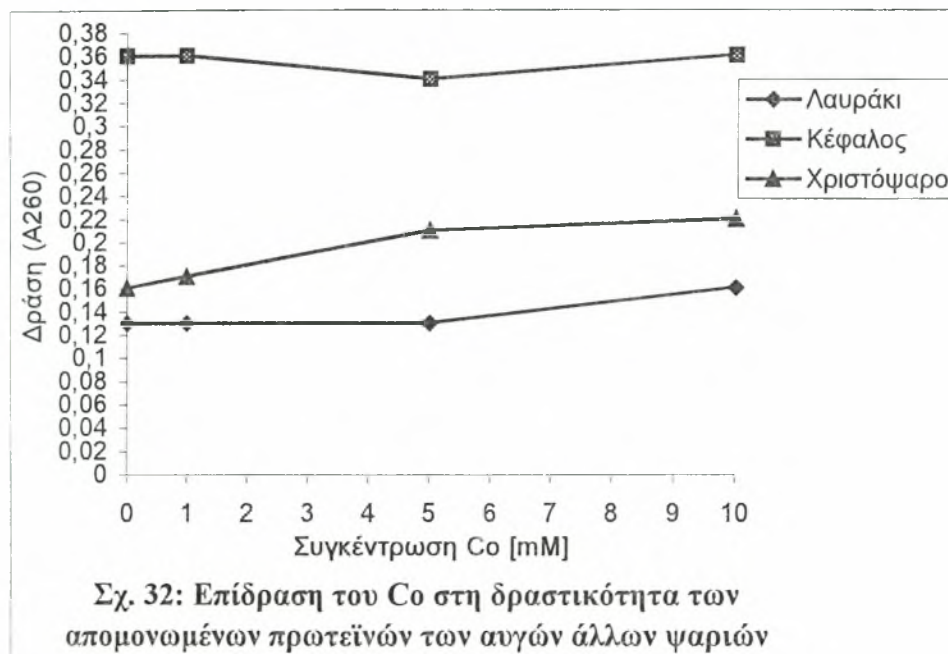


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο

Η επίδραση του Co στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου φαίνεται στον πίνακα 22 και γραφικά στο σχήμα 32.

Πίνακας 22: Επίδραση Co στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου

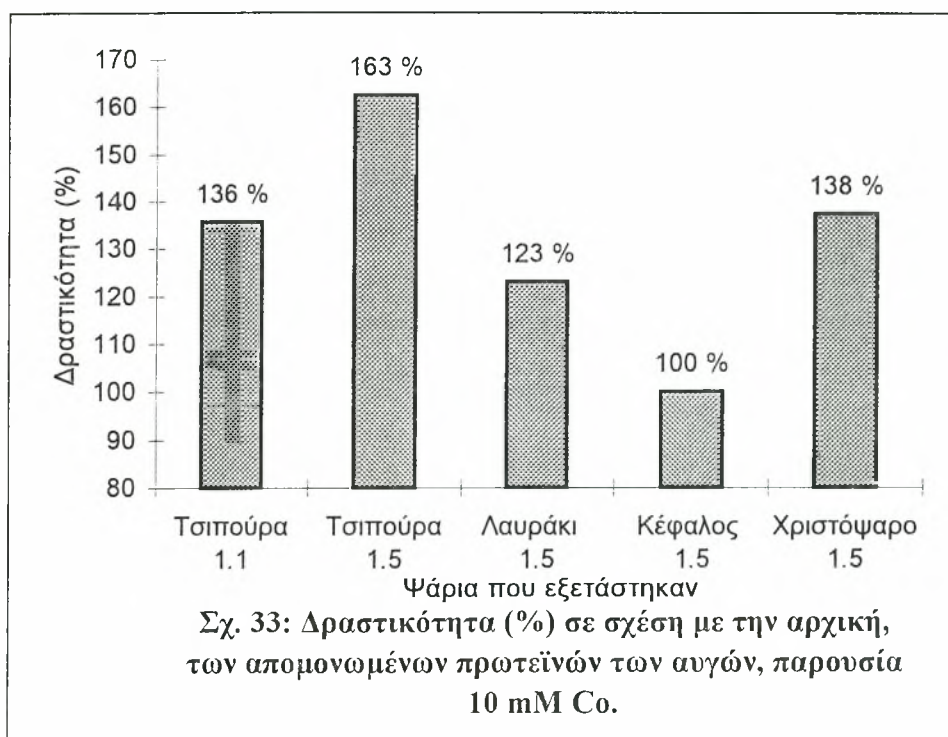
[Co] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του χριστόψαρου (A260)
0	0,13	0,36	0,16
1	0,13	0,36	0,17
5	0,13	0,34	0,21
10	0,16	0,36	0,22



Στη συνέχεια υπολογίστηκε η εκατοστιαία μεταβολή, σε σχέση με την αρχική, της δραστηριότητας των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, υπό την επίδραση 10 mM Co. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 23 και γραφικά στο σχήμα 33.

Πίνακας 23: Δραστηριότητα (%) των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, σε σχέση με την αρχική, υπό την παρουσία 10 mM Co.

Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κέφαλου 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
136	163	123	100	138



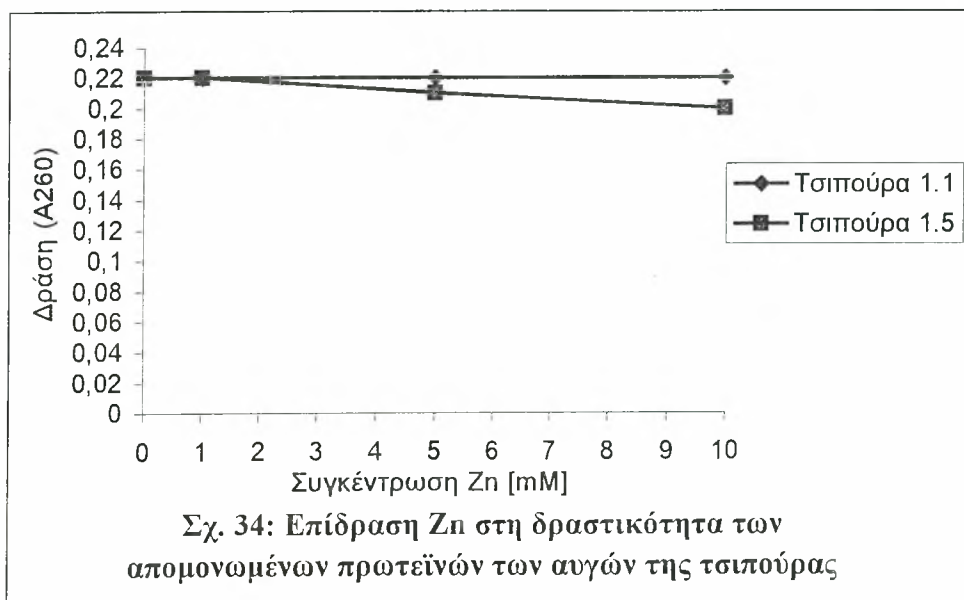
2.B.8.4. Επίδραση Zn

α. Τσιπούρα.

Η επίδραση του Zn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας φαίνεται στον πίνακα 24 και γραφικά στο σχήμα 34.

Πίνακας 24: Επίδραση Zn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας

[Zn] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A260)
0	0,22	0,22
1	0,22	0,22
5	0,22	0,21
10	0,22	0,20

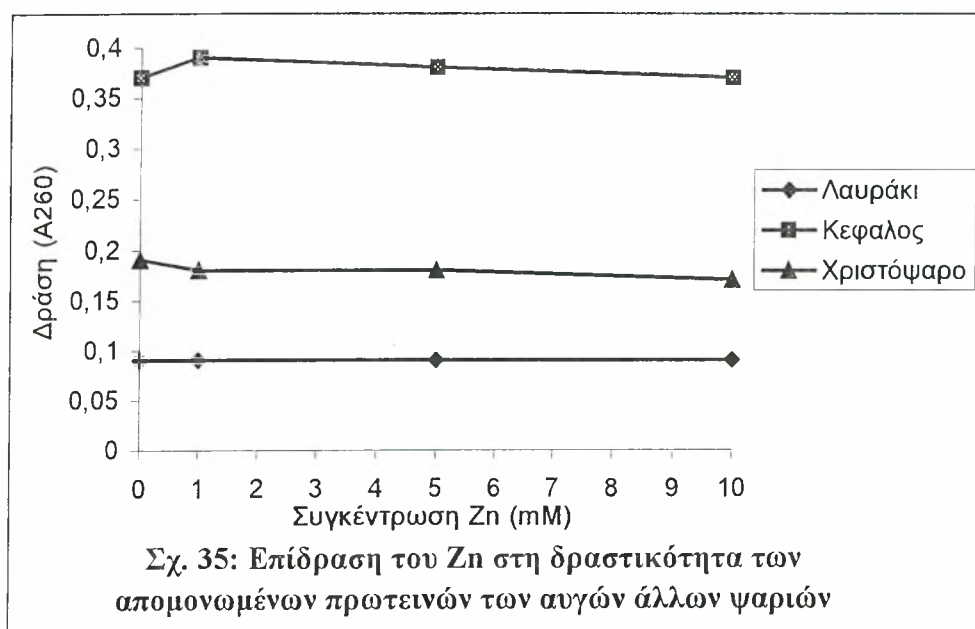


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο

Η επίδραση του Zn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου φαίνεται στον πίνακα 25 και γραφικά στο σχήμα 35.

Πίνακας 25: Επίδραση Zn στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου

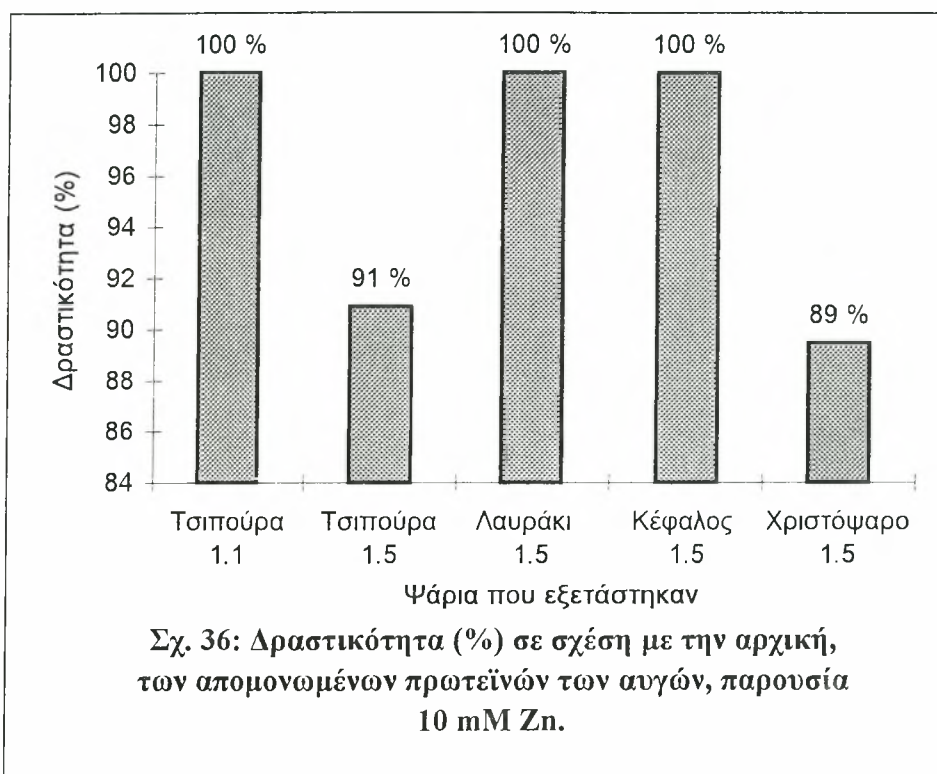
[Zn] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του χριστόψαρου (A260)
0	0,09	0,37	0,19
1	0,09	0,39	0,18
5	0,09	0,38	0,18
10	0,09	0,37	0,17



Στη συνέχεια υπολογίστηκε η εκατοστιαία μεταβολή, σε σχέση με την αρχική, της δραστηριότητας των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, υπό την επίδραση 10 mM Zn. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 26 και γραφικά στο σχήμα 36.

Πίνακας 26: Δραστηριότητα (%) των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών σε σχέση με την αρχική, υπό την παρουσία 10 mM Zn.

Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κέφαλου 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
100	91	100	100	89



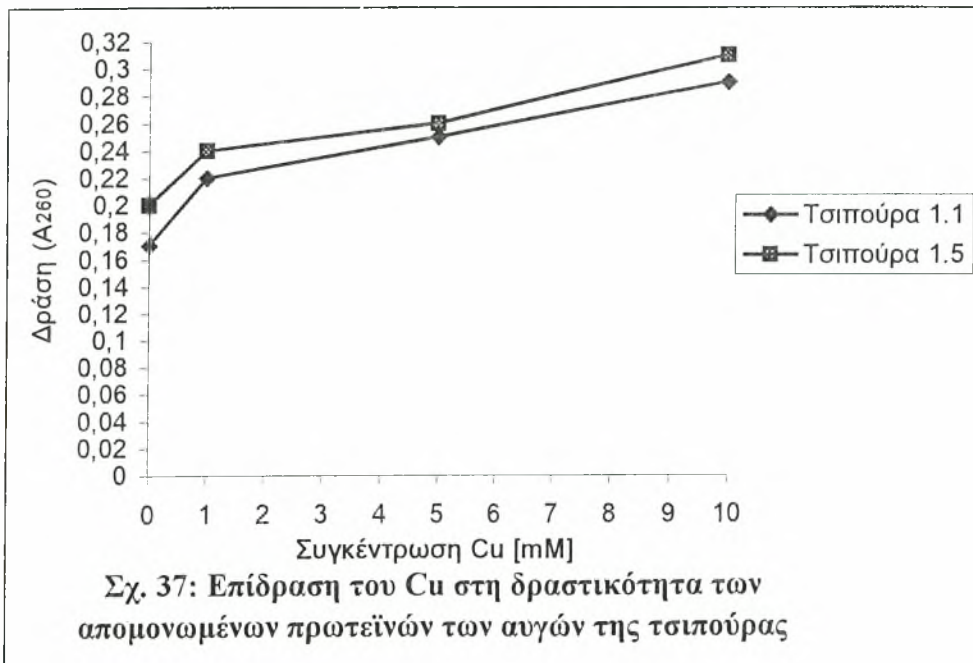
2.Β.8.5. Επίδραση Cu

α. Τσιπούρα.

Η επίδραση του Cu στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας φαίνεται στον πίνακα 27 και γραφικά στο σχήμα 37.

Πίνακας 27: Επίδραση Cu στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας

[Cu] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.1 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A ₂₆₀)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών της τσιπούρας (A ₂₆₀)
0	0.17	0,20
1	0,22	0,24
5	0,25	0,26
10	0,29	0,31

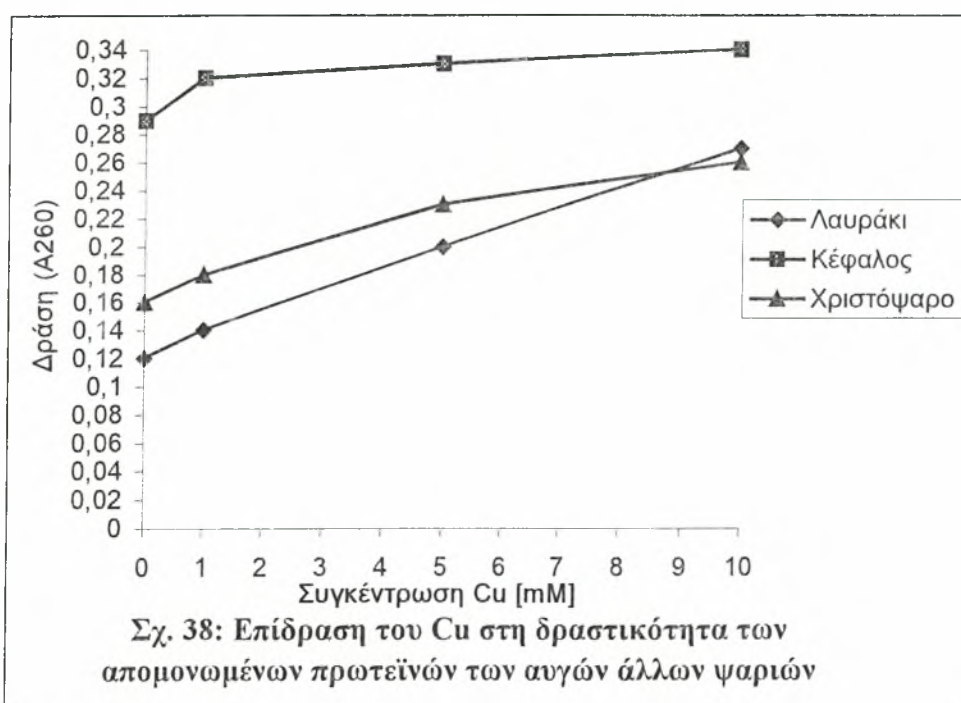


β) Λαυράκι, κέφαλος και χριστόψαρο

Η επίδραση του Cu στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου φαίνεται στον πίνακα 28 και γραφικά στο σχήμα 38.

Πίνακας 28: Επίδραση Cu στη δραστικότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών του λαυρακιού, του κέφαλου και του χριστόψαρου

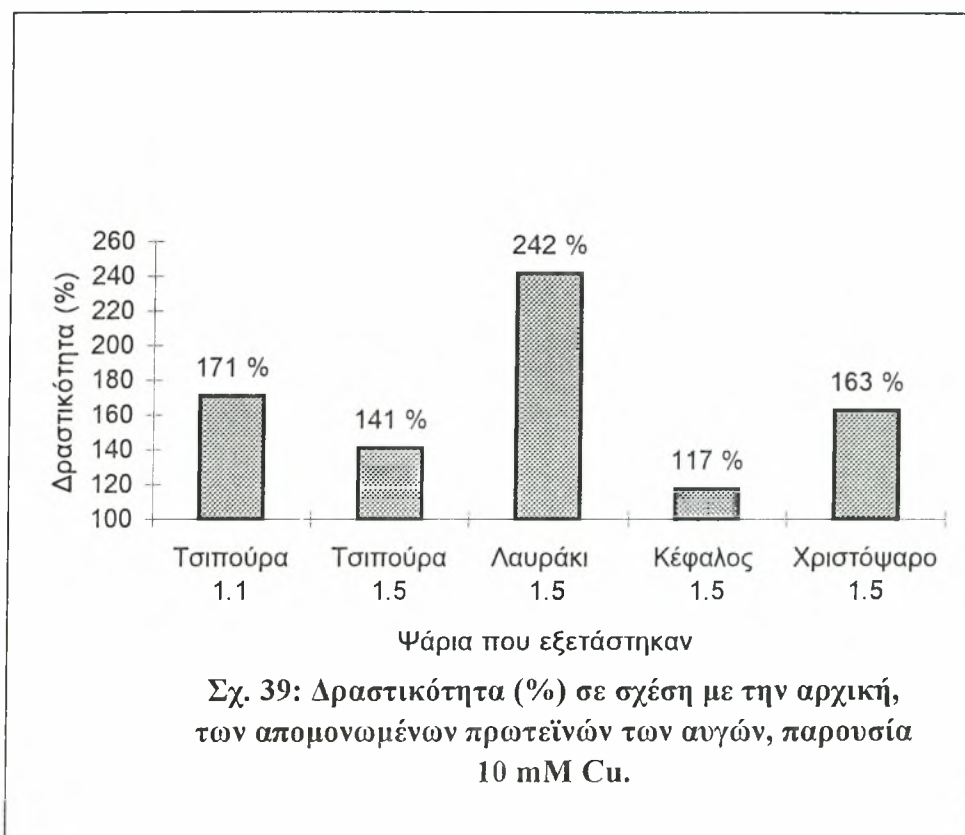
[Cu] (mM)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του λαυρακιού (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του κέφαλου (A260)	Δράση κλασμάτωσης 1.5 των πρωτεϊνών του χριστόψαρου (A260)
0	0,12	0,29	0,16
1	0,14	0,32	0,18
5	0,20	0,33	0,23
10	0,29	0,34	0,26



Στη συνέχεια υπολογίστηκε η εκατοστιαία μεταβολή, σε σχέση με την αρχική, της δραστηριότητας των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, υπό την επίδραση 10 mM Cu. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 29 και γραφικά στο σχήμα 39.

Πίνακας 29: Δραστηριότητα (%) των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών, σε σχέση με την αρχική, υπό την παρουσία 10 mM Cu.

Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.1	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών της τσιπούρας 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του λαυρακιού 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του κέφαλος 1.5	Δραστηριότητα (%), σε σχέση με την αρχική, των πρωτεϊνών του χριστόψαρου 1.5
171	141	242	117	163



3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Γενικό Μέρος, η ικανότητα κάποιων πρωτεϊνών του ορού του ανθρώπινου αίματος να εμποδίζουν την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων σε διάλυμα που περιείχε TCA, έχει μελετηθεί από τις αρχές της δεκαετίας του '60 (Tunis and Weinfield, 1960). Αυτές οι πρωτεΐνες βρέθηκε πως ανήκουν στις γλυκοπρωτεΐνες. Μερικά χρόνια αργότερα οι Antonoglou and Georgatsos (1971) βρήκαν πως ο ορός των εμβρύων του μοσχαριού περιείχε μεγάλες ποσότητες μίας γλυκοπρωτεΐνης η οποία εμπόδιζε την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων υπό την παρουσία οξέος και είχαν αρκετές ενδείξεις να υποθέτουν ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ίσως είναι μία α-φετοπρωτεΐνη. Ο Kouretas και οι συνεργάτες του (1988, 1990, 1995) απέδειξαν ότι ο ορός του αίματος των ανθρώπων αλλά και των ζώων (ποντίκια) περιέχει κάποια ή κάποιες πρωτεΐνες σχετικής μοριακής μάζας 150 Kb, η οποία ή οι οποίες αναστέλλαν την κατακρήμνιση του RNA σε διάλυμα που περιείχε TCA. Ο ίδιος με τους συνεργάτες του (2000), επιχείρησε να εξετάσει την ύπαρξη τέτοιων πρωτεϊνών στα αυγά του ψαριού μένουλα (*Spicara maena*). Κατάφερε έτσι να απομονώσει μία πρωτεΐνη η οποία παρουσίαζε και αυτή την παραπάνω ιδιότητα.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήσαμε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη πρωτεϊνών οι οποίες αναστέλλουν την κατακρήμνιση του DNA σε TCA, κυρίως σε αυγά του ψαριού τσιπούρα (*Sparus aurata*), αλλά εξετάστηκαν επίσης και τα αυγά κι άλλων ψαριών, όπως το λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*), ο κέφαλος (*Mugil cephalus*) και το χριστόψαρο (*Zeus faber*). Πράγματι, καταφέραμε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη τέτοιων πρωτεϊνών, οι οποίες στάθηκε δυνατό να απομονωθούν με την χρήση των τεχνικών που περιγράφηκαν. Η αύξηση της ειδικής δράσης κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών σε όλα τα ψάρια (6 περίπου φορές για την τσιπούρα, 28 περίπου φορές για το λαυράκι, 39 περίπου φορές για τον κέφαλο και 11 περίπου φορές για το χριστόψαρο) μας δείχνει πως η πρωτεΐνη ή οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν, όταν βρίσκονται σε μη απομονωμένη μορφή εμπλουτίστηκαν σημαντικά με την μέθοδο της διαφορικής κατακρήμνισης σε ψυχρή ακετόνη.

Η ηλεκτροφόρηση κάτω από μη αναγωγικές συνθήκες, των κλασματώσεων των πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών που παρουσίασαν την προστατευτική δράση απέδειξε πως για τη τσιπούρα και το λαυράκι οι πρωτεΐνες είναι μάλλον δύο, με σχετική μοριακή μάζα περίπου 83 και 63 KDa αντίστοιχα, στον κέφαλο μάλλον μία, με σχετική μοριακή μάζα περίπου 83 Kda ενώ στο χριστόψαρο δύο με σχετική μοριακή μάζα περίπου 75 και 70 KDa αντίστοιχα (Εικ. 7 & 8). Η ηλεκτροφόρηση κάτω από αναγωγικές συνθήκες των ίδιων κλασμάτων έδειξε πως οι πρωτεΐνες αυτές στη τσιπούρα, στο λαυράκι και στον κέφαλο δεν αποτελούνται από περισσότερες υπομονάδες.

Επίσης, αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη ή οι πρωτεΐνες της τσιπούρας που εμφανίζουν προστατευτική δράση στην κατακρήμνιση του DNA σε TCA, δεσμεύονται άμεσα με το DNA, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του DNA, παρουσία δύο διαφορετικών πολυμεράσεων. Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε πως ποσότητες 2 έως 3 μg πρωτεΐνης είναι αρκετές για να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA, παρουσία της πολυμεράσης Taq DNA (Εικ. 9), ή παρουσία της πολυμεράσης Vent_R (exo⁻) DNA για ποσότητα DNA 1 μg (Εικ. 11), καθώς επίσης πως ίδιες ποσότητες είναι αρκετές για να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό της μιτοχονδριακής περιοχής D-loop, παρουσία της πολυμεράσης Taq DNA, για την ίδια ποσότητα DNA (Εικ. 10). Ακόμη αποδείχθηκε πως παρουσία σταθερής ποσότητας 2 μg πρωτεΐνης, ο πολλαπλασιασμός του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA, παρουσία της πολυμεράσης Taq DNA, λαμβάνει χώρα για ποσότητες DNA από 0,8 μg έως 2 μg, όπου και αρχίζει να αναστέλεται ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου αυτού (Εικ. 12). Ουσιαστικά μπορούμε να πούμε πως όταν η αναλογία μεταξύ της ποσότητας πρωτεΐνης και του DNA γίνει 1:1, τότε αρχίζει να αναστέλεται η αντίδραση. Για ποσότητες DNA κάτω από 0,8 μg δεν παρατηρήθηκε ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου, ενώ για ποσότητες DNA πάνω από 2 μg ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου αναστέλεται, κάτι που ίσως οφείλεται στη μεγάλη ποσότητα του DNA που υπάρχει στην αντίδραση. Τα παραπάνω είναι πολύ πιθανό να είναι ενδείξεις για το ότι συμβαίνουν εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν προστατευτική δράση και της DNA πολυμεράσης. Κάτι ανάλογο παρουσίασαν οι Kouretas and Antonoglou (1997), όπου οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων Rnase ήταν φανερές κατά την προστασία του RNA από την κατακρήμνιση του σε οξέα,

καθώς και οι Kouretas με τους συνεργάτες του (2000), όπου η συμπεριφορά της απομονωμένης πρωτεΐνης των αυγών της μένουλας που προστατεύει το DNA από την κατακρήμνιση παρουσία TCA, στο πολλαπλασιασμό του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, είναι η ίδια με την συμπεριφορά της ή των απομονωμένων πρωτεϊνών των αυγών της τσιπούρας που μελετήσαμε.

Εξετάστηκε επίσης και η επίδραση της ποσότητας του TCA στην δραστικότητα των πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών και βρέθηκε ότι όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση TCA υπάρχει στο διάλυμα που περιέχει το DNA και τις πρωτεΐνες, τόσο πιο μικρή γίνεται η δραστικότητα αυτών. Έτσι για τελική συγκέντρωση TCA 15 %, η δραστικότητα των πρωτεϊνών γίνεται σχεδόν μηδενική (Πιν. 6 και 7, Σχ. 16 και 17). Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι υπάρχει κάποιο όριο στην συγκέντρωση του οξέος, πέρα από το οποίο η προστατευτική δράση των πρωτεϊνών δεν είναι σημαντική, και αυτό ίσως οφείλεται στο ότι μετουσιώνεται η δομή των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να μην δημιουργούν σύμπλοκο με το DNA και έτσι δεν εμποδίζεται η κατακρήμνιση του παρουσία οξέος.

Η επίδραση του NaCl για συγκεντρώσεις που έφταναν τα 0,5 M στο διάλυμα, στην δραστικότητα των πρωτεϊνών απεδείχθη πως σε όλα τα ψάρια, πλην του κέφαλου, ήταν σχετικά μικρή. Πιο συγκεκριμένα, στις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν με τις κλασματώσεις 1.1 και 1.5 της τσιπούρας, καθώς και στην κλασμάτωση 1.5 του λαυρακιού, εμφανίστηκε μια σχετικά μικρή πτώση της δραστικότητας, της τάξεως του 13-14 %, ενώ στις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν στην κλασμάτωση 1.5 του χριστόψαρου παρουσιάστηκε μια μικρή άνοδος της δραστικότητας, της τάξεως του 5 %. Αντίθετα, στις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν στην κλασμάτωση 1.5 του κέφαλου, παρουσιάστηκε πολύ μεγάλη πτώση της δραστικότητας, της τάξεως του 57 %. Το γεγονός αυτό ίσως να σχετίζεται με το ότι ο κέφαλος συχνά διαβιώνει σε νερά υφάλμυρα ή γλυκά, με αποτέλεσμα η απότομη έκθεση των πρωτεϊνών του σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις NaCl να επιφέρει πολύ μεγαλύτερες μεταβολές στην δραστικότητά του σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη που εξετάστηκαν, τα οποία διαβιώνουν σε σαφώς υψηλότερα επίπεδα αλατότητας.

Αναφορικά για της επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα των πρωτεϊνών που εξετάσαμε, μπορούμε να πούμε ότι γενικά παρατηρήθηκε πως η

δραστικότητα των πρωτεϊνών αυτών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ένα αξιοσημείωτο στοιχείο αποτελεί και το ότι η κυρίως μείωση της δραστικότητας των πρωτεϊνών αυτών συμβαίνει μέχρι τους 60 °C, ενώ περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας έως τους 80 °C επιφέρει πολύ μικρή ή ακόμη και μηδενική μείωση της δραστικότητάς τους (λαυράκι). Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, λόγω του ότι σε θερμοκρασίες πάνω από 40 - 50 °C αρχίζουν να μεταβάλλονται οι ανώτερες δομές των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να χάνουν την δραστικότητά τους, κάτι που έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα.

Αναλυτικότερα, (Πίν. 13 και 14, Σχ. 23 και 24). η δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.1 μειώνεται στους 60 °C κατά 25 %, ενώ η περαιτέρω μείωσή της στους 80 °C είναι σχετικά μικρή, της τάξεως του 7 %. Ομοίως, η δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.5 μειώνεται στους 60 °C κατά 30 %, ενώ η περαιτέρω μείωσή της στους 80 °C είναι ίδια με αυτή των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.1 (7%). Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε πως οι πρωτεΐνες της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.5 είναι πιο θερμοευαίσθητες σε σχέση με αυτές της κλασμάτωσης 1.1, κατά περίπου 5 %. Η μικρότερη μείωση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε σε αυτές του λαυρακιού και του κέφαλου, η οποία ήταν της τάξεως του 19 % και για τα δύο είδη στους 60 °C, ενώ η περαιτέρω μείωσή της στους 80 °C είναι σχετικά αμελητέα (0 % στο λαυράκι και 3 % στον κέφαλο.). Αντίθετα, η μεγαλύτερη μείωση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε σε αυτές του χριστόψαρου, η οποία ήταν της τάξεως του 45 % στους 60 °C, ενώ η περαιτέρω μείωσή της στους 80 °C είναι σχετικά πολύ μικρή, της τάξεως του 5 %. Γενικά όμως, λόγω του ότι σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούμε αξιοσημείωτη πτώση της δραστικότητας των πρωτεϊνών, σχετικά με τον προστατευτικό τους ρόλο, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ίσως η δευτεροταγής και η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών αυτών είναι που έχουν ιδιαίτερη σημασία για την προστασία του DNA, παρά η πρωτοταγής. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αυτά των Antonoglou and Georgatsos (1971), οι οποίοι υποστήριζαν πως η δραστικότητα των πρωτεϊνών παραμένει αναλλοίωτη υπό την επίδραση της θερμοκρασίας. Οι μεγάλες αυτές διαφορές μεταξύ της τσιπούρας, του λαυρακιού και του κέφαλου από την μία πλευρά, και του χριστόψαρου από την άλλη,

είναι πολύ πιθανό να οφείλονται σε παράγοντες που σχετίζονται με την προσαρμογή των ειδών αυτών γενικά στο περιβάλλον, καθώς και με τον τόπο διαβίωσής τους. Είναι γεγονός πως οι διάφορες μεταβολές στην θερμοκρασία της θάλασσας επηρεάζουν κυρίως τα ανώτερα στρώματα της υδάτινης στήλης και όχι τόσο την περιοχή κοντά στον πυθμένα. Έτσι, η τσιπούρα, το λαυράκι και ο κέφαλος που μπορούν να βρεθούν σε οποιοδήποτε σημείο της υδάτινης στήλης πρέπει να αναπτύσσουν κατάλληλες προσαρμογές έτσι ώστε να μπορούν να αντιμετωπίζουν τέτοιες καταστάσεις, ενώ το χριστόψαρο που διαβιώνει μόνο στον πυθμένα δεν είναι αναγκασμένο να αναπτύσσει τέτοιες προσαρμογές.

Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση των μετάλλων Mg, Mn, Co, Zn και Cu στη δραστικότητα των πρωτεϊνών των αυγών των ψαριών που απομονώσαμε. Η μέγιστη τελική συγκέντρωση των μετάλλων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,1 Mm. Γενικά μπορούμε να πούμε ότι η παρουσία των Mg, Mn, και Zn δεν είχε σημαντική επίδραση στην δραστικότητα των πρωτεϊνών, ενώ αντίθετα η παρουσία του Co και του Cu είχε (Πίν. 17, 20, 23, 26, 29, Σχ. 27, 30, 33, 36, 39). Πιο αναλυτικά, η παρουσία του Mg είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.1 κατά 9 %, καμία επίδραση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.5, αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του λαυρακιού κατά 11 %, τη μείωση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του κέφαλου κατά 7 % και τέλος, καμία επίδραση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών του χριστόψαρου. Ομοίως, η παρουσία του Mn είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.1 κατά 7 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.5 κατά 11 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του λαυρακιού κατά 8 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του κέφαλου κατά 3 % και καμία επίδραση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών του χριστόψαρου. Η παρουσία του Zn δεν είχε καμία επίδραση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.1, τη μείωση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.5 κατά 9 %, καμία επίδραση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών του λαυρακιού, καμία επίδραση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών του κέφαλου, καθώς και τη μείωση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του χριστόψαρου κατά 11 %. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό το

συμπέρασμα που αναφέρεται παραπάνω, ότι δηλαδή η παρουσία των συγκεκριμένων μετάλλων δεν επηρεάζει σημαντικά τη δραστικότητα των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν.

Αντίθετα, η παρουσία του Co είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.1 κατά 36 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.5 κατά 63 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του λαυρακιού κατά 23 %, καμία επίδραση στη δραστικότητα των πρωτεϊνών του κέφαλου και τέλος, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του χριστόψαρου κατά 38 %. Ομοίως, η παρουσία του Cu είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.1 κατά 71 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών της τσιπούρας της κλασμάτωσης 1.5 κατά 41 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του λαυρακιού κατά 142 %, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του κέφαλου κατά 17 %, και τέλος, την αύξηση της δραστικότητας των πρωτεϊνών του χριστόψαρου κατά 63 %. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι η παρουσία του Zn, με εξαίρεση τον κέφαλο, και του Cu επηρεάζει σημαντικά την δραστικότητα των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν και συγκεκριμένα, την αυξάνει.

Τα παραπάνω αποτελέσματα διαφέρουν από τα αντίστοιχα των Antonoglou and Georgatsos (1971), καθώς και των Kouretas and Antonoglou (1997), οι οποίοι διαπίστωσαν σημαντική μείωση της δραστικότητας του παράγοντα που εμποδίζει την κατακρήμνιση του DNA και του RNA αντίστοιχα, παρουσία μετάλλων. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι στις παραπάνω εργασίες χρησιμοποιήθηκαν πολύ πιο μεγάλες τελικές συγκεντρώσεις των μετάλλων σε σχέση με την παρούσα εργασία.

Από τα στοιχεία που έχουμε έως σήμερα για τις παραπάνω πρωτεΐνες, μπορούμε να υποθέσουμε με επιφύλαξη πώς αυτές ίσως ανήκουν στην οικογένεια των φετοπρωτεϊνών, σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος που υπολογίσαμε κατά προσέγγιση με την βοήθεια δεικτών, αλλά και από την εν γένει συμπεριφορά τους. Σε αυτό επίσης συνηγορεί και το γεγονός πως κάποια από τα αποτελέσματα παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με αυτά του Kouretas και των συνεργατών του (2000), ο οποίος με τον ίδιο τρόπο εξέτασε την ύπαρξη αυτών των πρωτεϊνών στα αυγά της μένουλας (*Spicara maena*). Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός αυτό, θα πρέπει να γίνουν κάποιες πιο εξειδικευμένες έρευνες, με τις οποίες θα γίνει εφικτός ο ακριβής προσδιορισμός του

μοριακού τους βάρους, καθώς και της ακολουθίας των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται.

Εάν πράγματι, οι πρωτεΐνες οι οποίες απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία, ανήκουν στην οικογένεια των φετοπρωτεϊνών, σύμφωνα με τις ενδείξεις του μοριακού τους βάρους, αυτό θα είναι ένα γεγονός ιδιαίτερης σημασίας. Επικρατεί τα τελευταία είκοσι χρόνια μια σημαντική προσπάθεια στην βιβλιογραφία, σχετικά με τη διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου της α-φετοπρωτεΐνης (Sell and Becker, 1978, Mizejewski 1995a). Έχει αναφερθεί ότι η α-φετοπρωτεΐνη περιέχει διάφορες περιοχές, οι οποίες ίσως καθορίζουν τον σχηματισμό απαραίτητων ακολουθιών αμινοξέων που έχουν κοινά χαρακτηριστικά με ακολουθίες που θυμίζουν «στοιχεία αναγνώρισης» για πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA (Mizejewski 1995b). Οι α-φετοπρωτεΐνες εμφανίζονται να έχουν πολλαπλές πρότυπες ακολουθίες αμινοξέων, σε κάθε περιοχή, οι οποίες αποτελούνται από: α) Μικρές, συμπαγείς ακολουθίες οι οποίες βρίσκονται σε υποδοχείς των στεροειδών και των θυρεοειδών, β) ακολουθίες - σήματα τα οποία θυμίζουν αυτά των υποδοχέων των στεροειδών, και γ) εκφυλισμένες ακολουθίες, παρόμοιες με υποδοχείς θυρεοειδών-ρετινοϊκού οξέως. Οι παραπάνω ακολουθίες ίσως έχουν μεγάλη σημασία σε ιδιότητες οι οποίες σχετίζονται με την ρύθμιση της ανάπτυξης στο εμβρυϊκό στάδιο, και οι οποίες συνδέονται άμεσα με την α-φετοπρωτεΐνη.

Τα παραπάνω είναι πολύ πιθανό να μαρτυρούν πως η α-φετοπρωτεΐνη δεσμεύεται στο DNA και ελέγχει διαδικασίες, όπως είναι η εμβρυογένεση και η οργανογένεση. Αν όντως διαπιστωθεί ότι πράγματι κάτι τέτοιο είναι αλήθεια, τότε θα είναι δυνατό η γνώση των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών να μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με μεγάλη επιτυχία, ως ένας αξιόπιστος δείκτης ποιότητας αυγών ειδών ψαριών, τα οποία έχουν τεράστια εμπορική σημασία στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Τα οικονομικά οφέλη που προκύπτουν από αυτή τη παραδοχή, τόσο για τους εκτροφείς, όσο και για τους καταναλωτές, αλλά και η ανάγκη κατανόησης εκ μέρους μας εκείνων των μηχανισμών που καθορίζουν το φαινόμενο «ζωή», μπορούν να γίνουν το εφαλτήριο για την περαιτέρω ανάπτυξη αυτής της έρευνας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται στα νουκλεϊκά οξέα και τα προστατεύουν από την κατακρήμνισή τους παρουσία οξέων έχουν απομονωθεί από ορό αίματος ανθρώπου και ποντικού (Kouretas και συνεργάτες, 1995), αλλά καθώς επίσης και από ομογενοποίημα αυγών του ψαριού μένουλα, *Spicara maena* (Κουρέτας και συνεργάτες, 2000).

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν πρωτεΐνες από κυτταρόπλασμα αυγών τσιπούρας (*Sparus aurata*), λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*), κέφαλου (*Mugil cephalus*) και χριστόψαρου (*Zeus faber*), με την μέθοδο της διαφορικής κατακρήμνισης παρουσία ψυχρής ακετόνης, οι οποίες προστατεύουν τα νουκλεϊκά οξέα από την κατακρήμνισή τους παρουσία οξέων. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν δύο πρωτεΐνες από τα αυγά της τσιπούρας και του λαυρακιού, με σχετική μοριακή μάζα περίπου 83 και 63 KDa αντίστοιχα η καθεμία, μια πρωτεΐνη από τα αυγά του κέφαλου με σχετική μοριακή μάζα περίπου 83 KDa, καθώς και δύο πρωτεΐνες από τα αυγά του χριστόψαρου με σχετική μοριακή μάζα η καθεμία περίπου 75 και 70 KDa αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών και της σχετικής μοριακής μάζας, κατά προσέγγιση, έγινε με ηλεκτροφόρηση παρουσία SDS, κάτω από αναγωγικές ή μη αναγωγικές συνθήκες. Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση των παραπάνω απομονωμένων πρωτεϊνών της τσιπούρας στον πολλαπλασιασμό του DNA με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και βρέθηκε πως αναστέλλεται η αντιγραφή του DNA, λόγω του ότι οι πρωτεΐνες αυτές πιθανότατα δεσμεύονται άμεσα με το DNA. Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων TCA, NaCl, διαφόρων τιμών θερμοκρασίας, καθώς και διαφόρων συγκεντρώσεων δισθενών μετάλλων, όπως Mg, Mn, Co, Zn και Cu στη δραστηριότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών όλων των ψαριών. Τα παραπάνω έδειξαν πως η δραστηριότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών όλων των ψαριών μειώνεται σημαντικά όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις του TCA, καθώς επίσης και όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Ακόμη, η δραστηριότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών παρουσιάζει μικρές σχετικά μεταβολές για διάφορες συγκεντρώσεις NaCl, πλην της απομονωμένης πρωτεΐνης του κέφαλου, της οποίας η δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά. Τέλος, η δραστηριότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών παρουσιάζει μικρές σχετικά μεταβολές για

διάφορες συγκεντρώσεις των δισθενών μετάλλων Mg, Mn και Zn και σχετικά μεγάλες για διάφορες συγκεντρώσεις των δισθενών μετάλλων Co και Cu.

Από τα αποτελέσματα υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν είναι πολύ πιθανό να ανήκουν στην υπεροικογένεια των Φετοπρωτεϊνών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Antonoglou O. and Georgatsos J. G. (1971). Studies on a glycoprotein of fetal calf serum that protects nucleic acids from acid precipitation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **136**, 1360-1362.
- Αρσενάκης Μ. (1999). Μοριακή Βιολογία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248 – 254.
- Bromage N., Jones J., Randall C., Thrush M., Springate J., Duston C. and Barker G. (1992). Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). *Aquaculture*. **100**, 141-166.
- Bromage N., Bruce M., Basavaraja N., Rana K., Shields R., Young C., Dye J., Smith P., Gillespie M. and Gamble J. (1994). Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of the World Aquaculture Society*. **25 (1)**, 2-5.
- Bromage N. and Roberts J. R. (1995). Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science. Oxford.
- Butler C. and Magnusson H. (1952). *Commercial Fish Review*. **14**, 26-29.
- Carrillo M., Bromage N., Zanuy S., Serrano R. and Prat F. (1989). The effects of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. **81**, 351-365.
- Carteni A. and Aloi G. (1934). Composizione chimica di animali marini del Golfo di Napoli. *Teleostei Quad. Di Nutriz*. **1**, 49.
- Γεωργάτσος Ι. Γ. (1993). Εισαγωγή στη Βιοχημεία. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.

- Fedorova L. S. (1976). Physiological and biochemical characters of the reproductive products and larvae of the surgeons during artificial rearing. *Journal of Ichthyology*. **16**, 427-436.
- Fernandez - Palacios H., Izquierdo M., Robaina L., Valencia A., Salhi M. and Vergara J. M. (1995). Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*. **132 (3-4)**, 325-337.
- Fernandez - Palacios H., Izquierdo M., Robaina L., Valencia A., Salhi M. and Montero D. (1996). The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*. **148 (2-3)**, 233-246.
- Golovanenko L. F. (1975). Qualitative evaluation of the sexual products of the bream (*Abramis brama*) from biochemical and histochemical indicators. *Journal of Ichthyology*. **15**, 499-502.
- Harel M., Tandler A., Kissil G. W. and Applebaum S. W. (1994). The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *British Journal of Nutrition*. **72 (1)**, 45-58.
- Kamler E. (1992). *Early Life History of Fish*. Chapman & Hall. London.
- Kjorsvik E., Mangor - Jensen A. and Holmefjord I. (1990). Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology*. **24**, 437-448.
- Kjorsvik E. (1994). Egg quality in wild and broodstock cod (*Gadus morhua*). *Journal of the World Aquaculture Society*. **25 (1)**, 22-25.
- Konovalov Yu. D. (1979). Viability of carp embryos and larvae as a function of the content of total protein and sulfhydryl groups in the gastrulation stage. *Gidrobiol. Zhurnal*. **15 (6)** (Transl. 1980 Scripta publishing Co. ISSN 0018-8166/79/0060-0065, pp 65-68).
- Konovalov Yu. D. (1984). Proteins and their reactive groups in the early ontogenesis of fishes. Naukova Dumka, Kiev. (In Russian).

- Kouretas D., Papageorgiou A. and Antonoglou O. (1988). Increased protective activity against acid precipitation of poly-(U) in the serum of tumor – bearing mice. *Anticancer Research*. **8**, 1307 – 1312.
- Κουρέτας Δ. (1989). Μελέτη των ριβονουκλεάσεων του ορού του αίματος σε υγιείς και ασθενείς με καρκίνο και μιας πρωτεΐνης που παρεμβαίνει στη δράση τους. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Kouretas D., Kountouras J., Tsapas G., Anastasiades N. Tsakiri I. and Antonoglou O. (1990). Value of serum protective activity against acid precipitation of poly-(U) in the differentiation between corrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*. **10**, 1025 – 1028.
- Kouretas D., Vaitopoulos J., Petropoulos P. and Antonoglou O. (1995). Characterization of a protein protecting RNA from acid precipitation and it's evaluation as tumor marker in gastrointestinal and gynecological cancer. *Oncology Reports*. **2**, 1107-1113.
- Kouretas D. and Antonoglou O. (1997). Ribonucleases protect RNA from acid precipitation. *Cellular and Molecular Biology*. **43 (8)**, 1181 – 1190.
- Κουρέτας Δ. (1998). Βιοτεχνολογία Αναπαραγωγής Ζωϊκών Οργανισμών. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Βόλος.
- Kouretas D., Mamuris Z., Stamatis C., Rodriguez – Burgos A., Tsamis V. and Neofitou C. (2000). Characterization of a DNA binding protein from *Mendole* (*Spicara maena*) eggs that inhibits replication and DNA acid precipitation. 6^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας. Χίος, 23-26 Μαΐου 2000. 12-17 σελ.
- Kuo C. M., Shehadeh Z. H. And Milisen K. K. (1973a). A preliminary report on the development, growth and survival of laboratory reared larvae of the grey mullet, (*Mugil cephalus* L.). *Journal of Fish Biology*. **5**, 459 - 470.
- Lam T. J. (1994). Hormones and egg/larval quality in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. **25 (1)**, 13-16.
- McEvoy L. A. (1984). Ovulatory rhythms and over - ripening of eggs in cultivated turbot (*Scophthalmus maximum* L.). *Journal of Fish Biology*. **24**, 437 - 448.

- Mizejewski G. J. (1995a). The phylogeny of Alpha - Fetoprotein in Vertebrates: Survey of Biochemical and Physiological Data. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. **5 (3 & 4)**, 281 - 316.
- Mizejewski G. J. (1995b). Alpha - Fetoprotein signal sequences: a proposed mechanism for subcellular localization and organelle targeting. *Journal Theoretical Biology*. **176 (1)**, 103 - 113.
- Nash C. E., Kuo C. M. and McConnel S. C. (1974). Operational procedures for rearing larvae of the grey mullet, (*Mugil cephalus* L.). *Aquaculture*. **3**, 15 - 24.
- Navas J. M., Bruce M., Thrush M., Farndale B. M., Bromage N., Zanuy S., Carrillo M., Bell J. G. and Ramos J. (1997). The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Fish Biology*. **51 (4)**, 760 - 773.
- Oren O. H. (1981). Aquaculture of grey mullets. Israel Oceanographic and Limnological Research. Cambridge University Press.
- Παπαναστασίου Π. Δ. (1989). Αλιεύματα (Τόμος Α'). Εκδόσεις ΙΩΝ. Αθήνα.
- Pascual E. and Yufera M. (1993). Energy content and chemical composition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) eggs. *Aquaculture and Fisheries Management*. **24 (3)**, 423-429.
- Patrizi F. and Giani G. (1949). Gli alimenti di origine animale. p. 370. Milano.
- Rodriguez C., Cejas J. R., Martin M. V., Badia P. and Lorenzo A. (1998). Influence of n-3 highly unsaturated fatty acids deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry*. **18 (2)**, 177-187.
- Sell S. and Becker F. F. (1978). Alpha - Fetoprotein. *Journal of National Cancer Institute*. **60 (1)**, 19 - 24.
- Soudan F. (1965). La conservation par le froid des poissons, crustacees et mollusques. Paris.
- Τρακατέλλης Αντώνης. (1990). Βιοχημεία. 2^η Έκδοση. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

- Tunis M. and Weinfeld H. (1960). Interactions of Glycoproteins with Nucleic Acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 87, 210-216.
- Vladimirov V. I. (1974a). Side variability and survival of fish early development al stages in Raznokachestvennost Rannego Ontogenea u Rub (ed. V. I. Vladimirov), Naukova Dumka. Kiev. Pp 227-254. (In Russian).
- Zhukinskiy V. N. and Gosh R. I. (1988). Criteria of biological quality of eggs of commercial fishes and a method for rapid assessment. *Journal of Ichthyology*. 28. (6) 106-114.
- Χώτος Γ. και Ρογδάκης Ι. (1992). Υδατοκαλλιέργειες Ευρύαλων Ψαριών.: Λαυράκι και Τσιπούρα. Εκδόσεις ΙΩΝ. Αθήνα.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000072420