

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος

Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΠΑΠΠΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

«Παραγωγή ανασυνδυασμένης θρυψίνης Ι της τσιπούρας: μελέτη
της ενζυμικής της δραστηριότητας»



ΛΑΡΙΣΑ, 2011

«Παραγωγή ανασυνδυασμένης θρυψίνης Ι της τσιπούρας:
μελέτη της ενζυμικής της δραστηριότητας»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αικατερίνη Μούττου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας
Σπονδυλωτών στο Τμήμα Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών στο
Τμήμα Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας

Θεολογία Σαραφίδου, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών στο Τμήμα Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής & Συγκριτικής Βιολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα Κατερίνα Μούτου, επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα και για τη βοήθειά της στην ολοκλήρωση της διατριβής. Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα Θεολογία Σαραφίδου για τη βοήθεια και την καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Ζήση Μαμούρη για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, καθώς και την υποψήφια διδάκτωρ Στέλλα Γεωργίου για τη συνεργασία που είχαμε στο τελευταίο κομμάτι της διατριβής. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Θεμιστοκλή Γιαννούλη και Κωνσταντίνο Σταμάτη καθώς και όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος που παρευρέθηκαν στο εργαστήριο την ίδια χρονική περίοδο, για την καλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα.

Περίληψη

Η παρούσα εργασία περιγράφει την επιτυχή παραγωγή της ανασυνδυασμένης θρυψίνης I (TRPI) της τσιπούρας μέσω συστήματος έκφρασης και απομόνωσής της από το βακτήριο *E.coli* και τον προσδιορισμό της ενζυμικής της δραστηριότητας με τη χρήση συνθετικών υποστρωμάτων. Η ανασυνδυασμένη πρωτεάση παρήχθη σε σύντηξη με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η απομόνωση της χμιαρικής αυτής πρωτεΐνης έγινε με χρωματογραφία συγγένειας. Η ενζυμική δραστηριότητα μελετήθηκε με τη χρήση δύο συνθετικών υποστρωμάτων, του N-benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide (BAPNA) και του N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE). Το ανασυνδυασμένο ένζυμο αντέδρασε και με τα δύο υποστρώματα, δείχνοντας μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για το BTEE. Οι κινητικές παράμετροι προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Graphprism και την εξίσωση Michaelis-Menten. Τα πειραματικά δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα πως τα υποστρώματα κρίνονται ακατάλληλα για την εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας των πεπτικών πρωτεασών της σερίνης των ψαριών και για τις μελέτες φυσιολογίας θρέψης ψαριών με μικτά ενζυμικά εκχυλίσματα.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	8
1.1 Η τσιπούρα	8
1.2 Σημασία της διατροφής των ψαριών στην ιχθυοκαλλιέργεια	11
1.3 Φυσιολογία Θρέψης	13
1.4 Πεπτικές πρωτεάσες της σερίνης	16
1.5 Θρυψίνη	20
1.6 Τεχνολογία ανασυνδυασμένων ενζύμων	21
1.7 Χιμαιρικές Πρωτεΐνες	23
1.8 Σκοπός της παρούσας εργασίας	24
Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι	25
2.1 Εξοπλισμός και υλικά του εργαστηρίου	25
<i>Εργαστηριακός εξοπλισμός</i>	25
<i>Υλικά</i>	25
2.2 Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου <i>TRPI</i> της τσιπούρας	
σε πλασμιδιακούς φορείς	26
<i>Πλασμιδιακοί φορείς</i>	26
<i>Βακτηριακά στελέχη Escherichia coli</i>	28
<i>Ενίσχυση γονιδίου με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης</i>	29
<i>Κλωνοποίηση του cDNA της TRPI στον πλασμιδιακό φορέα</i>	
<i>pGEM-T Easy</i>	30
<i>Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων Escherichia coli</i>	30
<i>Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli DH5a</i>	31
<i>Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση</i>	31
<i>Έλεγχος ανασυνδυασμένων κλώνων με πέψη με EcoRI</i>	32
<i>Απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ποσοτικοποίηση και αλληλούχηση</i>	33
<i>Κλωνοποίηση του cDNA της TRPI στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T2</i>	33
<i>Πέψη δειγμάτων με EcoRI</i>	34
<i>Πέψη ανασυνδυασμένων κλώνων με Pst I</i>	34
2.3 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης <i>TRPI</i> σε βακτήρια	
και απομόνωση με χρωματογραφία συγγένειας	35
<i>Συλλογή κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών</i>	35
<i>Απομόνωση χιμαιρικής πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας</i>	36
<i>Έκλυση της χιμαιρικής πρωτεΐνης</i>	36
<i>Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου</i>	37
<i>Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης</i>	
<i>(SDS-PAGE)</i>	38
<i>Χρώση πηκτής</i>	38
2.4 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας	39
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα	40
3.1 Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου <i>TRPI</i> σε πλασμιδιακούς φορείς	40

3.2 Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TRPI	42
3.3 Εκλεκτικότητα και κινητικές παράμετροι (K_m, V_{max}) της TRPI	44
Κεφάλαιο 4. Συζήτηση	48
Βιβλιογραφία	51
Παράρτημα	56

1. Εισαγωγή

1.1 Η τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Συστηματική Κατάταξη (Linnaeus, 1758)

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Φύλο: Χορδωτά (Chordata)

Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

Τάξη: Περκόμορφα (Perciformes)

Οικογένεια: Sparidae

Είδος: *Sparus aurata*

Η τσιπούρα ανήκει στο γένος *Sparus*, στην οικογένεια Sparidae. Η μορφολογία της χαρακτηρίζεται από επιμήκες και πλευρικά πεπιεσμένο σώμα, με μεγάλα κτενοειδή λέπια. Το ραχιαίο πτερύγιο αποτελείται από ακανθώδεις ακτίνες, ενώ το ουραίο πτερύγιο είναι διχαλωτό και εμφανίζει έντονο μαύρο χρώμα στις παρυφές του. Το χρώμα της είναι γκρι-ασημί, με τη ραχιαία περιοχή γκριζογαλάζια και την πλευρική κίτρινη-ασημένια. Στη μετωπική επιφάνεια μεταξύ των ματιών εμφανίζει μια χρυσοκίτρινη λωρίδα σχήματος V, η οποία αποτελεί και το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμά της. Επίσης, στην αρχή της πλευρικής της γραμμής και πάνω στο βραγχιακό επικάλυμμα υπάρχει μια μελανή κηλίδα που υπογραμμίζεται από κόκκινο χρώμα (Εικ. 1.1). Το στόμα της είναι ελαφρώς προεκτεινόμενο, με χοντρά χείλη (Χώτος και Ρογδάκης, 1992· Παπουτσόγλου, 1994). Η οδοντοστοιχία της αποτελείται από 6 κυνοειδούς μορφής δόντια στο εμπρόσθιο τμήμα των δύο σιαγόνων και από 3-5 σειρές γομφιοειδούς μορφής δόντια, ενώ εσωτερικά των κυνοδόντων υπάρχουν μικρότερα δόντια κωνικού σχήματος (Cataldi *et al.*, 1987). Το μέγιστο βάρος της μπορεί να είναι 16-18 kg και η μέγιστη ηλικία της περίπου 10-15 έτη (Παπουτσόγλου, 2008).



Εικ. 1.1 Το είδος *Sparus aurata* (www.fao.org)

Η τσιπούρα είναι κοινότατο είδος σχεδόν όλων των παράκτιων περιοχών, κυρίως της Μεσογείου θάλασσας, ενώ η παρουσία της θεωρείται περιορισμένη στη Μαύρη θάλασσα και ποικίλει στις νότιες ακτές των Βρετανικών νήσων καθώς και των δυτικών ακτών της Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής (κόλπος της Γουινέας) και των ακτών των Κανάριων νησιών (Εικ. 1.2). Στην Ελλάδα ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η εποχική παρουσία της σε αβαθείς λιμνοθαλάσσιες υδατοσυλλογές (Μεσολογίου, Αμβρακικού κόλπου, Πόρτο-Λάγος Ξάνθης) αλλά και η εποχική παρουσία σχετικά μεγάλου μεγέθους ατόμων σε βαθύτερα και έντονα κινούμενα νερά (π.χ. στενό Ευρίπου) (Παπουτσόγλου, 2008).



Εικ. 1.2 Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Sparus aurata*

Ενδημεί σε περιοχές ποικίλου βάθους και σε πυθμένες ποικίλης σύστασης (αμμώδεις, βραχώδεις, καλυμμένους με φύκια, λασπώδεις). Είναι κυρίως μοναχικό ψάρι, αλλά σε μερικές περιπτώσεις σχηματίζει αγέλες. Η κατά βάθος κατανομή του φτάνει τα 30 μέτρα για τα ιχθύδια και τα 150 μέτρα για τα ενήλικα άτομα (Fischer *et al.*, 1987).

Είναι ευρύθερμο είδος, με μέγιστη θερμοκρασία επιβίωσης τους 34°C και ελάχιστη θερμοκρασία επιβίωσης τους 5°C ενώ εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς αύξησης σε θερμοκρασία 25 °C (Barnabé, 1990). Η αναπαραγωγική της δραστηριότητα ευνοείται

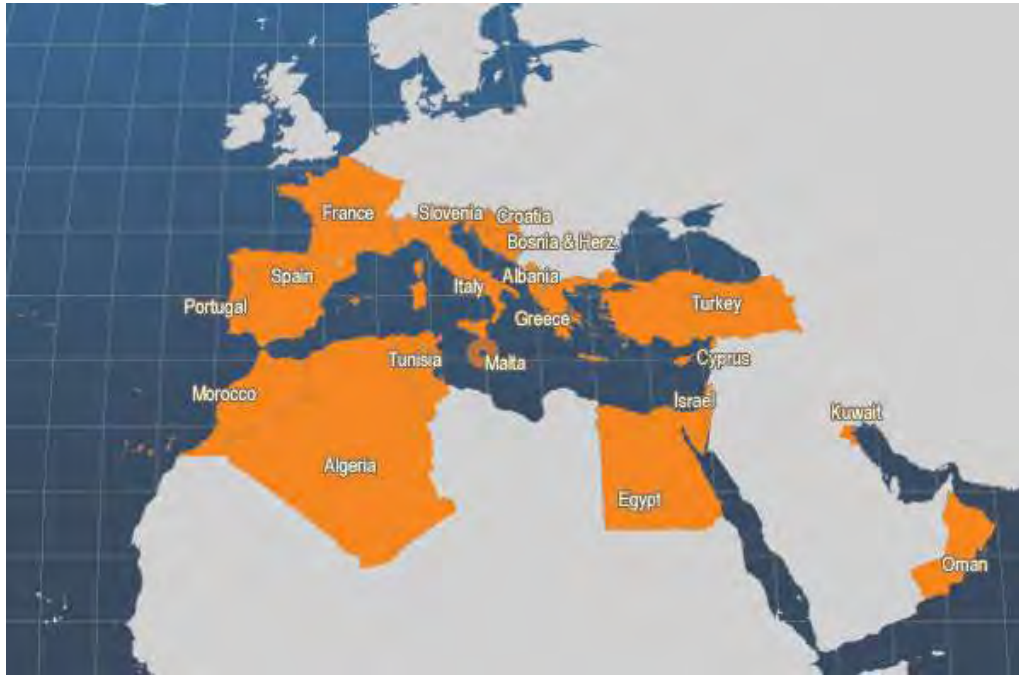
ιδιαίτερα στους 13-17°C περίπου (Παπουτσόγλου, 2008). Όντας ευρύαλο είδος, τα όρια αλατότητας των υδάτων στα οποία διαβιεί κυμαίνονται από 7 έως 42 psu, ενώ οι ιδανικές συνθήκες είναι μεταξύ 25 και 42 psu. Το ιδανικό επίπεδο κορεσμού του νερού σε διαλυμένο οξυγόνο συναρτήσει της θερμοκρασίας είναι 90%, ενώ σε συνθήκες εκτροφής έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις οξυγόνου τουλάχιστον 3,5 mg/l σε θερμοκρασία περίπου 25 °C (Barnabé, 1990).

Είναι σαρκοφάγο είδος που διατρέφεται ανάλογα με την ηλικία του με ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς, πολύχαιτους, αμφίποδα, γαστερόποδα μαλάκια, καρκινοειδή και κατάλληλου μεγέθους ψάρια.

Βασικό βιολογικό γνώρισμα της τσιπούρας αποτελεί ο πρωτανδρικός ερμαφροδιτισμός της. Όλα τα άτομα λειτουργούν ως αρσενικά μέχρι και το δεύτερο έτος της ζωής τους, ενώ αλλάζουν φύλο και λειτουργούν ως θηλυκά στο τέλος του τρίτου χρόνου ζωής τους (Pasquali, 1941; d'Ancona, 1941, 1949).

Η αναπαραγωγική της περίοδος λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο έως το Δεκέμβριο σε νερά ανοιχτής θάλασσας στα οποία μεταναστεύει, ενώ τα άτομα των νέων πληθυσμών επιστρέφουν στις λιμνοθάλασσες την περίοδο της άνοιξης. Η περίοδος της εκκόλαψης των αυγών διαρκεί έως 2 ημέρες σε νερά θερμοκρασίας 15-20 °C, ενώ η περίοδος των λεκιθοφόρων και των ατελών ιχθυδίων από περίπου 43 έως 50 ημέρες (Παπουτσόγλου, 2008).

Η τσιπούρα αποτελεί είδος μεγάλης εμπορικής σημασίας για τη Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια (Εικ. 1.3). Είναι ίσως το πρώτο από τα θαλάσσια είδη της Μεσογείου, στα οποία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία η εντατική ελεγχόμενη μαζική του εκτροφή, η έναρξη της οποίας χρονολογείται περίπου στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στην Ιταλία, στη Γαλλία και στην Ισπανία. Περίπου στο τέλος αυτής της δεκαετίας άρχισε η εκτροφή της με εντατικά συστήματα παραγωγής και στην Ελλάδα, και έκτοτε αναπτύχθηκε με ιδιαίτερα αυξανόμενο ρυθμό, καθιστώντας τη χώρα μας πρώτη σε παραγωγή στη Μεσόγειο, αλλά και στην Ευρώπη.



Εικ. 1.3 Κύριες χώρες παραγωγής της τσιπούρας (FAO Fisheries Statistics, 2006)

1.2 Σημασία της διατροφής των ψαριών στην ιχθυοκαλλιέργεια

Οι ιχθυοκαλλιέργειες καλύπτουν διεθνώς σχεδόν το 50% της συνολικής κατανάλωσης ψαριών και θαλασσινών, με παραγωγή 52 εκατ. τόνων το έτος 2009. Οι προοπτικές ανάπτυξης του κλάδου παραμένουν σημαντικές, καθώς σύμφωνα με στοιχεία του FAO (2005), εκτιμάται ότι το 2030 θα απαιτούνται πάνω από 70 εκατ. επιπλέον τόνοι προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας (αύξηση κατά 140%) για την κάλυψη της ζήτησης.

Η ευρωπαϊκή παραγωγή ιχθυοκαλλιέργειας παρουσιάζει επίσης αξιοσημείωτη ανάπτυξη (5% κατά μέσο όρο στο διάστημα 2000-2008), παρόλο που καταλαμβάνει μικρό μερίδιο – 4% της παγκόσμιας παραγωγής – με κυρίαρχο είδος τον σολομό.

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν έναν ταχέως αναπτυσσόμενο κλάδο της ελληνικής οικονομίας, ωθούμενο από τη σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια της κατανάλωσης προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας διεθνώς. Συγκεκριμένα, οι Έλληνες παραγωγοί - με έντονα εξαγωγικό προσανατολισμό - εκμεταλλεύονται τα ισχυρά συγκριτικά πλεονεκτήματα στην εκτροφή τσιπούρας και λαβρακίου. Σε αυτό το σημαντικό υποκλάδο, η ελληνική παραγωγή καλύπτει σχεδόν το 50% της διεθνούς αγοράς, ενώ παράλληλα αποτελεί σημαντικό εξαγωγικό αγαθό του πρωτογενούς τομέα (με τις εξαγωγές να ξεπερνούν τα $\frac{3}{4}$ της ελληνικής παραγωγής και να καλύπτουν το

12% των εξαγωγών της πρωτογενούς παραγωγής το 2008) (Εθνική Τράπεζα της Ελλάδος, 2010).

Η βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών στηρίζεται σε σημαντικό βαθμό στη χρήση ιχθυάλευρων και ιχθυέλαιων. Με την ολοένα και μεγαλύτερη επέκτασή της, είναι περισσότερο αναγκαία η ανάπτυξη εξειδικευμένων τροφών σχεδιασμένων ώστε να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένες συνθήκες παραγωγής. Οι διατροφολόγοι και οι παρασκευαστές ζωοτροφών έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους στην εύρεση εκείνων των συστατικών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή χαμηλού κόστους ζωοτροφών για την ιχθυοκαλλιέργεια. Από την άλλη πλευρά, η επιτυχής ιχθυογένεση έχει μεγάλη σημασία για την υδατοκαλλιέργεια. Συνεπώς, ένα μεγάλο μέρος της τρέχουσας έρευνας έχει αφιερωθεί στην παραγωγή τεχνητών διαιτολογίων για τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των ψαριών. Και στις δύο περιπτώσεις απαιτείται λεπτομερής γνώση της φυσιολογίας θρέψης των θαλάσσιων οργανισμών κατά το σχεδιασμό ζωοτροφών. Είναι λοιπόν απαραίτητες οι έρευνες που επικεντρώνονται στον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών του πεπτικού συστήματος των ψαριών, καθώς και στην αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης αντιδιατροφικών παραγόντων που υπάρχουν σε διάφορες ζωοτροφές. Επιπλέον, χρήζει σημασίας οι ερευνητικές προσπάθειες να επικεντρωθούν στην ανάπτυξη απλών *in vitro* τεχνικών πέψης για τη γρήγορη εκτίμηση της πεπτικότητας των θρεπτικών στοιχείων (Tacon, 1995).

Το ιχθυάλευρο αποτελεί παραδοσιακά τη βασική πηγή πρωτεΐνης για κάθε τύπο ζωοτροφής χάρις στην ισορροπημένη σύστασή του σε αμινοξέα και την καλή πεπτικότητα που παρουσιάζει. Ωστόσο, το αυξημένο κόστος του και η μειωμένη διαθεσιμότητά του, έχουν στρέψει τις ερευνητικές προσπάθειες στην εύρεση εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης. Μεταξύ των πηγών πρωτεΐνης που μελετήθηκαν, με ποικίλου βαθμού επιτυχία είναι οι γεωσκώληκες (Tacon *et al.*, 1983), η μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Davies and Wareham, 1988), τα πράσινα φύκη (*Cladophora glomerata*) (Appler & Jauncey, 1983), ζωικά προϊόντα (Alexis, 1997), φυτικά προϊόντα (Webster *et al.*, 1992a) και συνδυασμοί ζωικών και φυτικών προϊόντων (El-Sayed, 1994).

Η διατροφή των εκτρεφόμενων ψαριών περιλαμβάνει αρχικά ζωντανούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, οι λάρβες στο στάδιο της εξωγενούς τροφοληψίας τρέφονται αρχικά με τροχόζωα, στη συνέχεια η διατροφή τους εμπλουτίζεται με *Artemia*. Στο στάδιο των ιχθυδίων, η ζωντανή τροφή αντικαθίσταται από σύνθετη, αδρανή βιομηχανοποιημένη ιχθυοτροφή, η οποία παρέχεται υπό τη μορφή συμπύκτων

τα οποία παράγονται με ανάμειξη ιχθυάλευρου, ιχθυέλαιου, σόγιας, φυτικού αλεύρου και ανόργανων συστατικών.

Στην προσπάθεια μείωσης του κόστους παραγωγής στη διατροφή των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων, οι έρευνες έχουν στραφεί στην αντικατάσταση της ζωντανής τροφής από σύνθετη ιχθυοτροφή. Οι Cahu και Zambonino-Infante (2001) έδειξαν ότι οι λάρβες δύνανται να καταναλώσουν σύνθετη τροφή, στην οποία όμως η περιεχόμενη πρωτεΐνη έχει υποστεί υδρόλυση. Επιπλέον, η διατροφή των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων της τσιπούρας με σύνθετη ιχθυοτροφή σε συνδυασμό με *Artemia* έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, αποδεικνύοντας ότι συγκεκριμένοι διατροφικοί παράγοντες που υπάρχουν στη ζωντανή *Artemia* βοηθούν στην πέψη και απορρόφηση των τροφών (Koven *et al.*, 2001).

Η προσθήκη πρωτεολυτικών ενζύμων στη διατροφή των ψαριών αποτελεί έρευνα μεγάλης σπουδαιότητας, καθώς συμβάλλει στην καλύτερη απορρόφηση των πρωτεϊνών από το έντερο των ψαριών, χωρίς καμία αλλαγή στη θρεπτική αξία της πρωτεΐνης. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι το κόστος διατροφής της τσιπούρας και του λαβρακίου στην περιοχή της Μεσογείου, ανέρχεται στο 50% του συνολικού κόστους παραγωγής των δύο αυτών ειδών (Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών), γίνεται αντιληπτό πως η έρευνα πάνω στη χρήση ενζύμων είναι ιδιαίτερα σημαντική για το δυναμικό κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας.

1.3 Φυσιολογία Θρέψης

Τα ψάρια συνήθως επιδεικνύουν μεγάλη ευελιξία όσον αφορά στις διατροφικές τους συνήθειες, η οποία οφείλεται σε διαφορετικά ανατομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Τόσο η διατροφή όσο και η φυσιολογία τους, επιτρέπουν στα ψάρια την εκμετάλλευση ενός ευρέος φάσματος διατροφικών πηγών, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό την προσαρμογή τους σε μεταβλητές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ικανότητα των ψαριών να μεταβολίζουν τις τροφές τους εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των κατάλληλων πεπτικών ενζύμων που καταλύουν συγκεκριμένες καταβολικές οδούς, καθώς και από την ίδια τη φύση των τροφών (Phillips, 1969).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανομή και η δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων εντός του εντέρου, επηρεάζονται από τις διατροφικές συνήθειες του ψαριού (Smith, 1980; Reimer, 1982; Ugolev & Kuz'mina, 1994; Hidalgo *et al.*, 1999; Tengjaroenkul *et al.*, 2000; Lundstedt *et al.*, 2002). Τα φυτοφάγα ψάρια συνήθως

έχουν μακρύτερο έντερο από τα σαρκοφάγα και ένα πεπτικό ενζυμικό προφίλ προσαρμοσμένο στα συστατικά της τροφής τους, όπου κυριαρχούν ένζυμα όπως οι αμυλάσες, τα οποία επιτρέπουν την υδρόλυση των υδατανθράκων. Αντιθέτως, τα σαρκοφάγα ψάρια φέρουν κοντό έντερο, με υψηλότερα επίπεδα πρωτεασών σε σχέση με τα φυτοφάγα ψάρια, ενώ τόσο η αμυλάση (Hidalgo *et al.*, 1999; Seixa Filho *et al.*, 1999), όσο και η λιπάση (Chakrabarti *et al.*, 1995) βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό στον πεπτικό τους σωλήνα. Στην πραγματικότητα, στη διατροφή των περισσότερων σαρκοφάγων ψαριών, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια παίζουν σημαντικό ρόλο ως πηγή βασικών θρεπτικών στοιχείων και ενέργειας (Chou *et al.*, 2000). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μία διαφοροποίηση στην ενζυμική κατανομή εντός των πεπτικών οργάνων. Αρχικά, οι τροφές υδρολύονται στο στομάχι από την όξινη πρωτεάση πεψίνη, και στη συνέχεια τα αλκαλικά ένζυμα (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, καρβοξυπεπτιδάσες, λιπάσες) από το ηπατοπάγκρεας επιτρέπουν την εξέλιξη της πέψης εντός του εντέρου (Smith, 1980; Lovell, 1988; Halver, 1989).

Στα ψάρια, ο πεπτικός σωλήνας αρχίζει από το στόμα και τη στοματική κοιλότητα, συνεχίζει στο φάρυγγα και τον οισοφάγο, το στομάχι, τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο, για να καταλήξει στην έδρα. Η ανατομία του γαστρεντερικού σωλήνα και της στοματικής κοιλότητας της τσιπούρας ακολουθεί το τυπικό πρότυπο των σαρκοφάγων ψαριών. Η σύνθεση και η μορφολογία των δοντιών της υποδεικνύουν την προσαρμοστικότητα του ψαριού όσον αφορά στις διατροφικές του συνήθειες και μεταβάλλονται ανάλογα με την ηλικία της τσιπούρας. Τόσο όμως στα νεαρά όσο και στα ενήλικα άτομα, είναι χαρακτηριστική η παρουσία ισχυρών κυνόδοντων και γομφιοειδούς μορφής δοντιών. Με τους κυνόδοντες επιτυγχάνεται η αρπαγή της λείας τους, ενώ με τα γομφιοειδούς μορφής δόντια επιτυγχάνεται η σύνθλιψη των οστράκων των δίθυρων μαλακίων. Η διαδικασία της πέψης συνεχίζεται στον οισοφάγο, όπου συντελείται η παραγωγή βλέννας από τα επιθηλιακά κύτταρα. Ο οισοφάγος διαδραματίζει επίσης οσμωρυθμιστικό ρόλο, καθώς καθίσταται επιλεκτικά διαπερατός σε ιόντα Na^+ και Cl^- από το θαλασσινό νερό, συμβάλλοντας πιθανώς στην αφυδάτωση του νερού που το ψάρι καταναλώνει (Kirsch & Laurent, 1975; Kirsch *et al.*, 1975; Hirano & Mayer-Gostan, 1976; Kirsch & Meister, 1982). Στα παραπάνω τμήματα του πεπτικού σωλήνα δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα καμία έκκριση πεπτικών ενζύμων. Η πέψη συνεχίζεται στο στομάχι που είναι μορφολογικά ευδιάκριτο και έχει σχήμα Y. Στην καρδιακή μοίρα υπάρχουν γαστρικοί αδένες, οι οποίοι αυξάνονται σε αριθμό στο στομαχικό σάκο και απουσιάζουν παντελώς από την

πυλωρική μοίρα (Cataldi *et al.*, 1987). Η ενζυμική πέψη ξεκινά από το στομάχι με τη δράση όξινων πρωτεασών, των πεψινών. Οι πεψίνες εκκρίνονται ως ανενεργά ζυμογόνα και ενεργοποιούνται σε όξινες συνθήκες pH, μικρότερες του 6. Δεδομένης της ανάγκης ύπαρξης μιας κατάλληλης τιμής pH για τη δράση των πεψινών, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η όξινη πρωτεόλυση δεν συντελείται μέχρις ότου η έκκριση οξέος να είναι επαρκής για να μειώσει το pH του στομάχου (Alarcón *et al.*, 1998). Η πυλωρική περιοχή αποτελείται από τέσσερις τυφλές αποφύσεις του λεπτού εντέρου που ονομάζονται πυλωρικά τυφλά. Πρόκειται για τη θέση έκκρισης των παγκρεατικών ενζύμων και ο ρόλος τους είναι η αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας του πρόσθιου τμήματος του λεπτού εντέρου – συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην καλύτερη πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από το έντερο – καθώς και η έκκριση ενζύμων. Το έντερο της τσιπούρας είναι κοντό – με σχετικό μήκος 0,5-0,6 ως προς το συνολικό μήκος του πεπτικού σωλήνα – και καλύπτεται από επιθηλιακά και βλεννογόνα κύτταρα. Το μεγαλύτερο μέρος της ενζυμικής πέψης πραγματοποιείται καθώς η τροφή περνά από τα πυλωρικά τυφλά και κατά μήκος του εντερικού αυλού. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτή προέρχονται κυρίως από το πάγκρεας, τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, αλλά και από την εντερική χλωρίδα (Karoor *et al.*, 1975). Το πάγκρεας παράγει τη μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων (πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες), ενώ βίσκεται κάτω από τον έλεγχο φυσιολογικών διαδικασιών που συνδέονται με το διατροφικό καθεστώς, το εξωτερικό περιβάλλον, το φύλο και την ηλικία. Οι παγκρεατικές εκκρίσεις περιέχουν επίσης δικαυβονικά ιόντα, τα οποία σε συνεργασία με τα χολικά υγρά, δρουν προς εξουδετέρωση των οξέων που προέρχονται από το στομάχι (Karoor *et al.*, 1975; Kurakawa & Suzuki, 1995). Η διάσπαση της τροφής ολοκληρώνεται με τη δράση των πεπτικών ενζύμων που εκκρίνονται από το εντερικό επιθήλιο και συγκεντρώνονται κυρίως στην περιοχή των λαχών, δίνοντας τα τελικά προϊόντα της πέψης (δισακχαρίτες, διπεπτίδια και τριπεπτίδια, μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα) που απορροφούνται και μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των εντεροκυττάρων (Karoor *et al.*, 1975; Moyle & Cech, 1982; Halver, 1989).

Στην τσιπούρα, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός αριθμού πεπτικών ενζύμων, όπως η αμυλάση (Munilla-Moran & Sabonino-Rey, 1996a; Hidalgo *et al.*, 1999; Deguara *et al.*, 2003), η πεψίνη (*et al.*, 1998; Deguara *et al.*, 2003), η θρυψίνη (Alarcón *et al.*, 1998; Deguara *et al.*, 2003), η χυμοθρυψίνη (Alarcón *et al.*, 1998; Deguara *et al.*,

2003), η καρβοξυπεπτιδάση A (Deguara *et al.*, 2003) η καρβοξυπεπτιδάση B (Deguara *et al.*, 2003) και η ελαστάση (Psochiou *et al.*, 2007).

Στη διάρκεια των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων των ψαριών, το πεπτικό τους σύστημα είναι εξαιρετικά ανώριμο (Kolkovski, 2001). Στις λάρβες των τελεόστεων, το πεπτικό σύστημα είναι μορφολογικά, ιστολογικά και φυσιολογικά λιγότερο αναπτυγμένο απ' ό,τι στα ενήλικα άτομα. Στο στάδιο αυτό, η απορρόφηση των λιπών γίνεται στα επιθηλιακά κύτταρα του πρόσθιου τμήματος του εντέρου, ενώ η απορρόφηση των πρωτεϊνών γίνεται στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου μέσω του μηχανισμού της πινοκύττωσης (Elbal, *et al.*, 2004).

Συγκεκριμένα στην τσιπούρα, έχει διαπιστωθεί ότι η ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα περιλαμβάνει πέντε επιμέρους φάσεις: φάση I (από την εκκόλαψη έως την 1^η ημέρα)· η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός μεγάλου λεκιθικού σάκου, ενώ ο πεπτικός σωλήνας παραμένει αδιαφοροποίητος. Φάση II (2^η και 3^η ημέρα)· σχηματίζεται η έδρα και διαφοροποιούνται ο οισοφάγος, το στομάχι και το έντερο, εμφανίζεται δραστηριότητα θρυψίνης, ενώ η τροφοληψία παραμένει αποκλειστικά ενδογενής. Φάση III (4^η έως 7^η ημέρα)· ανοίγει το στόμα, συνεχίζεται η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου και το έντερο διαιρείται σε δύο επιμέρους περιοχές, ενώ συνυπάρχουν η ενδογενής και η εξωγενής τροφοληψία. Φάση IV (8^η έως 59^η ημέρα)· ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί, ενώ η τροφοληψία είναι αποκλειστικά εξωγενής. Φάση V (60^η έως 69^η ημέρα)· εμφανίζονται οι γαστρικοί αδένες και διαφοροποιούνται τα πυλωρικά τυφλά, ενώ στο εξής δεν παρατηρούνται αισθητές μεταβολές στον πεπτικό σωλήνα, ο οποίος είναι πλέον παρόμοιος με αυτόν ενός ενήλικου ατόμου (Sarasquete, *et al.*, 1993; Sarasquete, *et al.*, 1995; Elbal, *et al.*, 2004).

1.4 Πεπτικές πρωτεάσες της σερίνης

Οι πρωτεάσες κατατάσσονται σε δύο ομάδες με βάση το μηχανισμό κατάλυσης: (α) σε αυτές που σχηματίζουν ομοιοπολικά ενζυμικά σύμπλοκα, όπως οι πρωτεάσες της σερίνης και της κυστεΐνης και (β) σε αυτές που δε σχηματίζουν ομοιοπολικά ενζυμικά σύμπλοκα, όπως οι πρωτεάσες του ασπαραγινικού και οι μεταλλοπρωτεάσες (García-Carreño & del Toro, 1997).

Εν αντιθέσει με τα περισσότερα ένζυμα, οι πρωτεάσες δεν παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, και αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο ενός πεπτιδικού δεσμού, ανεξαρτήτως σε ποια

πρωτεΐνη ανήκει. Επιπλέον, δεν μπορούν να αναγνωρίσουν εάν ο πεπτιδικός δεσμός είναι μέρος μιας πρωτεΐνης, για το λόγο αυτό η δραστηρότητά τους αξιολογείται με τη χρήση συνθετικών υποστρώματων (Garcia-Carreño & del Toro, 1997).

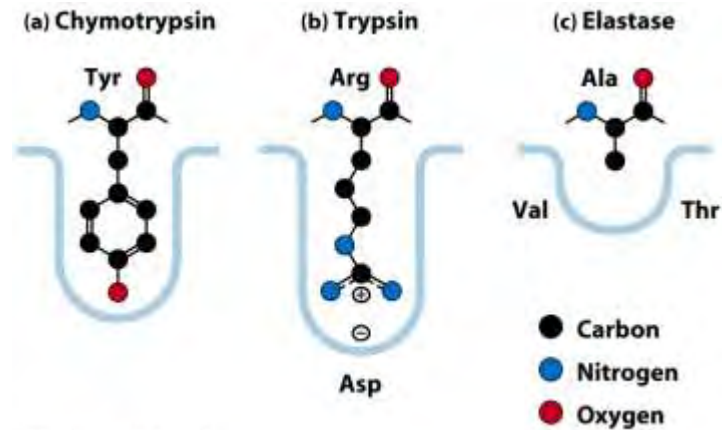
Οι πρωτεάσες της σερίνης συνιστούν τη μεγαλύτερη κατηγορία πρωτεασών, καθώς καταλαμβάνουν πάνω από το ένα τρίτο όλων των γνωστών πρωτεολυτικών ενζύμων. Χωρίζονται σε 13 ομάδες και 40 οικογένειες και οφείλουν την ονομασία τους στην ύπαρξη ενός καταλοίπου σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τρία από τα σημαντικότερα πεπτικά ένζυμα, η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η ελαστάση ανήκουν στην οικογένεια S1 της ομάδας PA των πρωτεασών της σερίνης και προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο. Ο μηχανισμός δράσης τους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας καταλυτικής τριάδας (His57–Asp102–Ser195), αλλά και από την παρουσία συγκεκριμένων αμινοξέων στην επιφάνεια των ενζύμων (Polgár, 2005; Di Cera, 2009).

Σχεδόν όλες οι πρωτεάσες της ομάδας PA χρησιμοποιούν την καταλυτική τριάδα και υδρολύουν τον πεπτιδικό δεσμό μέσω δύο τετραεδρικών ενδιάμεσων. Αρχικά, λαμβάνει χώρα μία πυρηνόφιλη προσβολή στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα του υποστρώματος από την υδροξυλομάδα της Ser195, η οποία καταλύεται από την ιμιδαζολική ομάδα της His57. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο σταθεροποιείται από τα αμιδικά άτομα αζώτου της Gly193 και της Ser195 του ενζύμου, τα οποία δημιουργούν μία θετικά φορτισμένη θέση πρόσδεσης, γνωστή ως κοιλότητα οξυανιόντος. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο διασπάται μέσω όξινης κατάλυσης σε ένα ακετυλοένζυμο, μία ιμιδαζολική βάση και ένα προϊόν αμίνης, ενώ η His57 συντελλεί στη σταθεροποίηση του νεοσυντιθέμενου αμινοτελικού άκρου. Στη διάρκεια της ακυλίωσης, η ιμιδαζολική ομάδα μεταφέρει το πρωτόνιο από το υδροξύλιο της σερίνης στην αμινική ομάδα. Το ακετυλοένζυμο τότε αποακυλιώνεται και στην επόμενη αντίδραση η πυρηνόφιλη προσβολή πραγματοποιείται από ένα μόριο νερού, αντί της σερίνης. Η κοιλότητα οξυανιόντος σταθεροποιεί το δεύτερο τετραεδρικό ενδιάμεσο και η διάσπαση του ενδιάμεσου αυτού δημιουργεί ένα νέο καρβοξυτελικό άκρο στο υπόστρωμα (Polgár, 2005; Di Cera, 2009).

Η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η ελαστάση παρουσιάζουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή και αλληλουχία αμινοξέων, και έχουν εξελιχθεί μέσω μιας διαδικασίας διπλασιασμού και μετάλλαξης των γονιδίων (Perona & Craik, 1997; Suzuki *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2004). Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των τριών ενζύμων αφορά στην εξειδίκευση του υποστρώματος και οφείλεται στην ύπαρξη μικρών

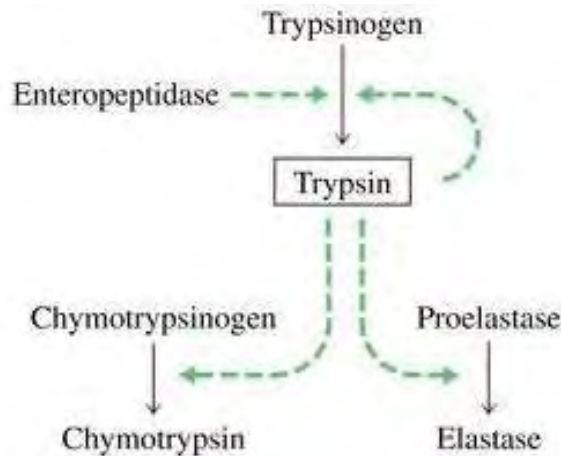
διαφορών στην περιοχή πρόσδεσής του. Στη χυμοθρυψίνη, η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος αποτελείται από μια μη πολική κοιλότητα, ενώ στη θρυψίνη η Ser189 έχει αντικατασταθεί από το Asp102 που σχηματίζει έναν ισχυρό ηλεκτροστατικό δεσμό με τη θετικά φορτισμένη Lys ή Arg. Στην ελαστάση, δύο αμινοξέα γλυκίνης, που υπάρχουν στη χυμοθρυψίνη, έχουν αντικατασταθεί από τα πιο ογκώδη βαλίνη και θρεονίνη (Σχήμα 1.1). Η θρυψίνη διασπά πεπτιδικούς δεσμούς στα αμινοξέα λυσίνη ή αργινίνη, η χυμοθρυψίνη σε αμινοξέα με αρωματική ή ογκώδη πλευρική αλυσίδα, ενώ η εξειδίκευση της ελαστάσης κατευθύνεται προς μικρότερες αφόρτιστες πλευρικές ομάδες (Perona & Craik, 1997; Berg *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2004).

Οι πεπτικές πρωτεάσες της σερίνης ελευθερώνονται από το πάγκρεας ως ανενεργά ζυμογόνα και η μεγαλύτερη διαφορά τους με την ενεργό μορφή του ενζύμου είναι η μη ύπαρξη της κοιλότητας οξυανιόντος (Berg *et al.*, 2002). Η θρυψίνη ενεργοποιείται από την εντεροκινάση ή αυτοενεργοποιείται με την απομάκρυνση ενός πεπτιδίου ενεργοποίησης. Η χυμοθρυψίνη ενεργοποιείται με τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ Arg15 και Ile16 από τη θρυψίνη, οπότε προκύπτει η ενεργός π-χυμοθρυψίνη, η οποία δρα σε μία άλλη π-χυμοθρυψίνη και με την απομάκρυνση δύο διπεπτιδίων προκύπτει η σταθερή ενζυμική μορφή της α-χυμοθρυψίνης. Η ελαστάση ενεργοποιείται με τη δράση της θρυψίνης (Daggett, *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2004) (Σχήματα 1.2, 1.3).

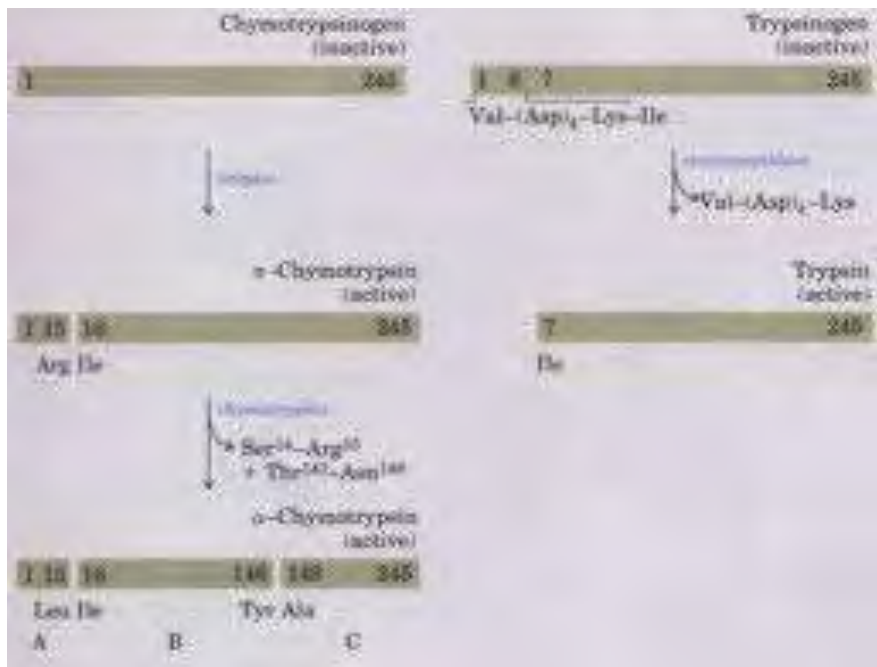


Σχήμα 1.1 Περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος των τριών κυριότερων πεπτικών πρωτεαών της σερίνης (Pearson Prentice Hall, 2006)

Τα επίπεδα δραστηριότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων του παγκρέατος, όπως η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη, μπορούν να θεωρηθούν καλοί δείκτες της διατροφικής κατάστασης του ψαριού. Ο ρυθμός έκκρισης των παγκρεατικών ενζύμων σχετίζεται με την πρόσληψη τροφής, τον κορεσμό του στομαχιού και τη σύσταση των θρεπτικών στοιχείων της τροφής (Rønnestad & Morais, 2008). Συνεπώς, η μειωμένη πρόσληψη τροφής ή μία μη ισορροπημένη δίαιτα από άποψη ελεύθερων αμινοξέων ή πρωτεϊνικού περιεχομένου μπορεί να επιφέρει μείωση στην έκκριση και στη δραστηριότητα της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης (Ueberschär, 1995; Applebaum & Holt, 2003; Cara *et al.*, 2007). Επιπλέον, έχει προταθεί η χρήση της αναλογίας θρυψίνης/χυμοθρυψίνης ως ένας καλύτερος δείκτης της διατροφικής κατάστασης των λαρβών, εφόσον θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη του βαθμού ενεργοποίησης της χυμοθρυψίνης από τη θρυψίνη, και αυτό με τη σειρά του να αποτελέσει ένδειξη της δυνατότητας ανάπτυξης του ψαριού (Cara *et al.*, 2007). Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία θρυψίνης/χυμοθρυψίνης τόσο υψηλότερος αναμένεται να είναι ο ρυθμός απορρόφησης των απαραίτητων αμινοξέων για πρωτεϊνοσύνθεση και δυνατότητα ανάπτυξης.



Σχήμα 1.2 Ενεργοποίηση ζυμογόνων των τριών κυριότερων πεπτικών πρωτεασών της σερίνης



Σχήμα 1.3 Ενεργοποίηση χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου

1.5 Θρυψίνη

Η θρυψίνη είναι μία σφαιρική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 25KDa, η οποία συντίθεται στο πάγκρεας ως ανενεργό ζυμογόνο (Εικ. 1.4). Οι αμινοξικές αλληλουχίες πολλών ισομορφών θρυψινογόνου έχουν καθοριστεί για ένα μεγάλο αριθμό σπονδυλωτών. Διαφορετικές ισομορφές συνεπάγονται και διαφορετικές κινητικές ιδιότητες και υπάγονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τη γενωμική τους θέση (Roach, *et*

al.1997), ενώ τα ένζυμα της θρυψίνης χαρακτηρίζονται ως ανιονικά ή κατιονικά ανάλογα με το φορτίο τους σε ουδέτερες συνθήκες pH (Roach, 2002).

Στην τσιπούρα, εκφράζονται οι μορφές I και II της θρυψίνης σε υψηλά επίπεδα σε όλο το μήκος του πεπτικού σωλήνα και του όξινου στομάχου (Psochiou, *et al.*, 2004). Όπως προαναφέρθηκε, η θρυψίνη έχει το ρόλο του κοινού ενεργοποιητή όλων των παγκρεατικών ζυμογόνων, ώστε η δράση τους να είναι ταυτόχρονη. Η εμφάνιση δραστηριότητας του ενζύμου από τη δεύτερη μέρα μετά την εκκόλαψη, πιστεύεται ότι αναπληρώνει την απουσία πεψίνης, όσον αφορά στην υδρόλυση των πρωτεϊνών, μέχρι να σχηματιστεί ένα πλήρως λειτουργικό στομάχι (Kamacı *et al.*, 2009).



Εικ. 1.4 Τρισδιάστατη δομή της θρυψίνης

1.6 Τεχνολογία ανασυνδυασμένων ενζύμων

Η παραγωγή ενζυμικών παρασκευασμάτων που προέρχονται από φυσικές πηγές χρονολογείται στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Οι εξελίξεις στη μοριακή γενετική και στην κυτταρική βιολογία τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, έχουν αλλάξει ριζικά την παραγωγή ενζύμων. Κατέστη δυνατή η κλωνοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα καθώς και η έκφρασή τους στον κατάλληλο ξενιστή. Σήμερα, τα ανασυνδυασμένα ένζυμα μπορεί να προέρχονται από μια πληθώρα πηγών που

περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς και φυτικούς ή ζωικούς ιστούς (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

Η διαδικασία παραγωγής ενός ανασυνδυασμένου ενζύμου σε γενικές γραμμές εμπεριέχει τα ακόλουθα στάδια: την εύρεση του κατάλληλου στελέχους του ξενιστή, την κατασκευή του φορέα κλωνοποίησης, το μετασχηματισμό του ξενιστή, την ταυτοποίηση του ανασυνδυασμένου στελέχους του ξενιστή, την επαγωγή του ενζύμου, την απομόνωση του ενζύμου και τον έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν ανασυνδυασμένα ένζυμα εισάγονται στο κατάλληλο στέλεχος του ξενιστή με τη χρήση φορέων κλωνοποίησης. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι συνήθως ένα πλασμίδιο, το οποίο φέρει έναν υποκινητή που επιτρέπει την ισχυρή μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου. Οι φορείς κλωνοποίησης μπορούν να σχεδιαστούν είτε για εισαγωγή στο χρωμόσωμα του ξενιστή, είτε για αυτόνομη αντιγραφή. Οι τελευταίοι περιέχουν θέσεις αντιγραφής συμβατές με εκείνες του βακτηρίου-ξενιστή, ώστε να μπορούν να αντιγραφούν πολλές φορές και να διασφαλίσουν υψηλή παραγωγή του επιθυμητού γονιδίου.

Η τεχνική που χρησιμοποιείται για να μεταφερθεί ο φορέας μέσα στα κύτταρα του ξενιστή εξαρτάται από τις ιδιότητες του ξενιστή και από τη φύση του φορέα κλωνοποίησης. Συνήθως, επιτυγχάνεται με θερμικό σοκ ή ηλεκτροδιάτρηση, αφού πρώτα τα κύτταρα του βακτηρίου-ξενιστή καταστούν επιδεκτικά. Οι φορείς κλωνοποίησης περιέχουν ένα ή περισσότερα γονίδια που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά, επιτρέποντας με την τρόπο αυτό την επιλογή των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με το επιθυμητό ένθεμα.

Γενικά, ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται εμπορικά παρασκευασμένα πλασμίδια, τα οποία φέρουν θέσεις αναγνώρισης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά κόβουν το πλασμίδιο σε ειδικά σημεία που αναγνωρίζουν, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την ένθεση του γονιδίου. Η αντίδραση σύνδεσης των άκρων του πλασμιδίου και του γονιδίου καταλύεται με τη δράση του ενζύμου DNA λιγάση.

Όσον αφορά στην αξιολόγηση της ασφάλειας ενός ανασυνδυασμένου ενζύμου, διέπεται από τις ίδιες αρχές που ισχύουν και για τα ένζυμα από «άγρια» στελέχη μικροοργανισμών. Το βασικό στοιχείο για την αξιολόγηση της ασφάλειας του ενζύμου είναι η εκτίμηση της πιθανής παθογένειας και τοξικότητας του στελέχους του μικροοργανισμού-ξενιστή (Pariza & Johnson, 2001)

1.7 Χιμαιρικές Πρωτεΐνες

Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες δημιουργούνται από την ένωση δύο ή περισσότερων γονιδίων, τα οποία φυσιολογικά κωδικοποιούν για διαφορετικές πρωτεΐνες. Η μετάφραση ενός χιμαιρικού γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα ένα πολυπεπίδιο με λειτουργικές ιδιότητες που προέρχονται από καθεμία από τις αρχικές πρωτεΐνες.

Μία ανασυνδυασμένη χιμαιρική πρωτεΐνη μπορεί να δημιουργηθεί με τις τεχνικές της γενετικής μηχανικής, όπου το επιθυμητό cDNA κλωνοποιείται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το cDNA μιας πρωτεΐνης, η οποία μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να προστεθούν ορισμένα πεπτίδια, τα οποία φέρουν θέσεις αναγνώρισης για κάποιες πρωτεάσες, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό το διαχωρισμό των δύο πρωτεϊνών.

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη γρήγορη απομόνωση καθώς και την αυξημένη σταθερότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που επιλέγονται για σύντηξη με τα επιθυμητά γονίδια είναι κατά κανόνα εκείνες που αναγνωρίζονται από πολύ εξειδικευμένους προσδέτες, έτσι ώστε η απομόνωσή τους να μπορεί να γίνει εύκολα.

Ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται ευρέως για το σκοπό αυτό είναι η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26 kDa, η οποία χρησιμοποιείται για την έκφραση και απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών που παράγονται στην *E. coli*, εφόσον στο βακτήριο αυτό η GST μπορεί να εκφραστεί με πλήρη ενζυμική δραστηριότητα. Οι παραγόμενες χιμαιρικές πρωτεΐνες φέρουν τη GST στο αμινοτελικό άκρο και την επιθυμητή πρωτεΐνη στο καρβοξυτελικό άκρο.

Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν από το βακτηριακό εκχύλισμα με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση ακινητοποιημένης γλουταθειόνης σε σφαιρίδια αγαρόζης ή σεφαρόζης. Λόγω της συγγένειας της γλουταθειόνης με τη GST οι πρωτεΐνες κατακρατούνται, ενώ οι προσμίξεις απομακρύνονται με εκπλύσεις. Η διαδικασία αυτή δεν επηρεάζει τη λειτουργικότητα και την αντιγονικότητα της πρωτεΐνης.

Η έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lac*, ο οποίος επάγεται από το ανάλογο της λακτόζης, το isopropyl β-D thiogalactoside (IPTG). Οι φορείς που χρησιμοποιούνται φέρουν το γονίδιο *lacI*, το προϊόν του οποίου είναι μία πρωτεΐνη καταστολέας που προσδένεται στην περιοχή του χειριστή του υποκινητή, εμποδίζοντας την έκφραση μέχρι αυτή να επαχθεί από το IPTG. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αυστηρός έλεγχος στην έκφραση του προϊόντος.

1.8 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

1. Η ανάπτυξη κατάλληλων μοριακών μεθόδων για την παραγωγή υψηλής ποσότητας ανασυνδυασμένης θρυψίνης I της τσιπούρας (TRPI)
2. Ο χαρακτηρισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της ανασυνδυασμένης θρυψίνης I (TRPI) με τη χρήση συνθετικών υποστρωμάτων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Εξοπλισμός και υλικά του εργαστηρίου

➤ Εργαστηριακός εξοπλισμός

Για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν πιπέττες ακριβείας (Gilson), φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415C), ψυχόμενη φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5810R), θερμοκυκλοποιητής (Eppendorf), φασματοφωτόμετρα (Eppendorf Biophotometer και Cary 50 Bio) υδατόλουτρο (Medingen), συσκευή ηλεκτροφόρησης (Scie-Plas) και συσκευή υπερήχων (sonicator) (Sartorius AG).

➤ Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη DH5a και BL21 (DE3) codon plus του βακτηρίου *E. coli* και οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T Easy (Promega) και pGEX-4T2 (Amersham). Οι πέψεις έγιναν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* (Fermentas) και *PSTI* (Takara). Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Taq DNA polymerase (Invitrogen) και για όλες τις αντιδράσεις σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση (Promega).

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια MgCl₂ (Sigma), CaCl₂ (Merck), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (Sigma), NaOH (Panreac), EDTA (Sigma), Acetic Acid (Riedel de-Haen), KOAc (Potassium Acetate Buffer Solution) (Sigma), Trizma Base (Tris) (Riedel de-Haen), APS (Sigma-Aldrich), TEMED (Sigma), acrylamide (Sigma) και bis-acrylamide (Sigma).

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκε LB agar (Scharlau) (C_T=30g/l) και για την παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκε LB broth (Scharlau) (C_T=15g/l). Για την τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης με ακινητοποιημένη γλουταθειόνη (GE Healthcare Biosciences) και διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης (L-reduced glutathione) (Sigma-Aldrich). Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (C_T=1mg/mL) και χλωραμφαινικόλη (C_T=34mg/mL).

Για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηρότητας χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα Na-benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide, BAPNA (Sigma B3279) και N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, BTEE (Sigma B 1625).

2.2 Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου *TRPI* της τσιπούρας σε πλασμιδιακούς φορείς

Η κλωνοποίηση περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός τμήματος DNA σε ένα πλασμίδιο. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια DNA που μπορούν να πολλαπλασιάζονται αυτόνομα μέσα σε ένα βακτήριο-ξενιστή. Φέρουν έναν ισχυρό υποκινητή για τη μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου, καθώς και γονίδια που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά. Στην αλληλουχία τους έχουν θέσεις αναγνώρισης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες, με τη δράση των οποίων κόβεται το πλασμιδιακό DNA σε συγκεκριμένα σημεία, επιτρέποντας την εισαγωγή του ενθέματος. Τόσο το ένθεμα όσο και ο πλασμιδιακός φορέας επωάζονται με τις ίδιες ή με συμβατές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ώστε τα άκρα τους να είναι συμπληρωματικά. Το ένθεμα μπορεί να κλωνοποιηθεί στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το cDNA μιας πρωτεΐνης, ώστε να παραχθεί μία χμιαϊκή πρωτεΐνη. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η εύκολη απομόνωση και η σταθερότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης.

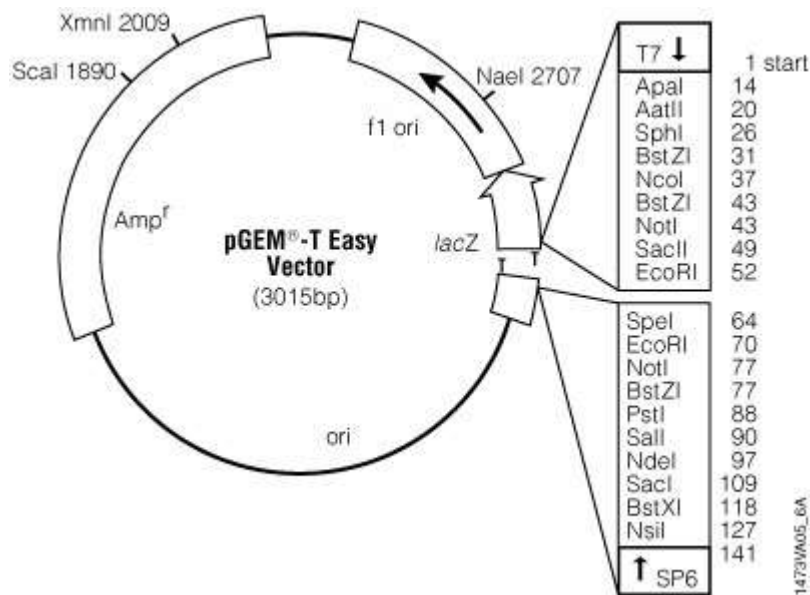
Στην παρούσα εργασία το cDNA του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη θρυψίνη I της τσιπούρας (*TRPI*) κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα, έτσι ώστε να παράγεται σε σύντηξη με τη GST και εκφράστηκε στο βακτήριο *Escherichia coli*. Η παραγόμενη χμιαϊκή πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και προσδιορίστηκε η ενζυμική της δραστηριότητα.

➤ Πλασμιδιακοί φορείς

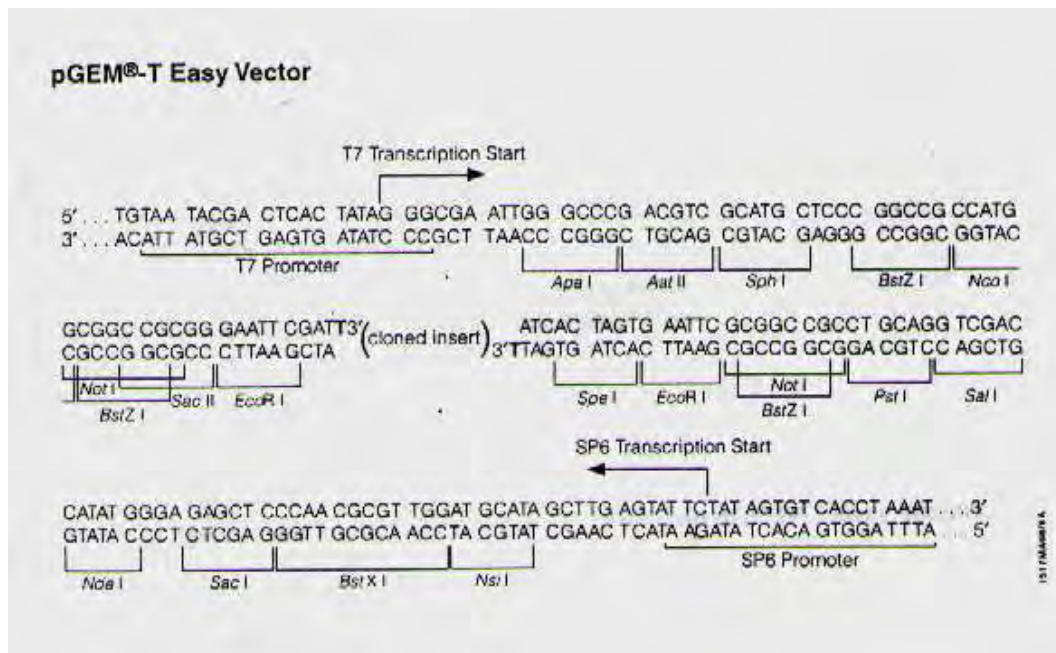
Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο pGEM-T Easy και ο pGEX-4T2. Ο φορέας pGEM-T Easy, μεγέθους 3015 bp, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και επιπλέον παρέχει τη δυνατότητα επιλογής κυανών-λευκών αποικιών, εφόσον διαθέτει το γονίδιο *LacZ* που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (Σχήμα. 2.1). Το χημικό ομόλογο IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) αποτελεί μεταγραφικό ενισχυτή του *LacZ*.

Η περιοχή κλωνοποίησης έχει ελεύθερες 3' θυμίνες και είναι τμήμα του *LacZ*. Εκατέρωθεν της κασέτας κλωνοποίησης βρίσκονται οι προαγωγοί T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης καθώς και αλληλουχίες αναγνώρισης από ένα ευρύ φάσμα ενδονουκλεασών περιορισμού. Ο φορέας παρέχεται σε γραμμική μορφή και συνδέεται

με τα προϊόντα PCR μέσω συμπληρωματικότητας A-T. Το κλωνοποιημένο τμήμα DNA εξάγεται με τη χρήση ενζύμων περιορισμού (Σχήμα 2.2).



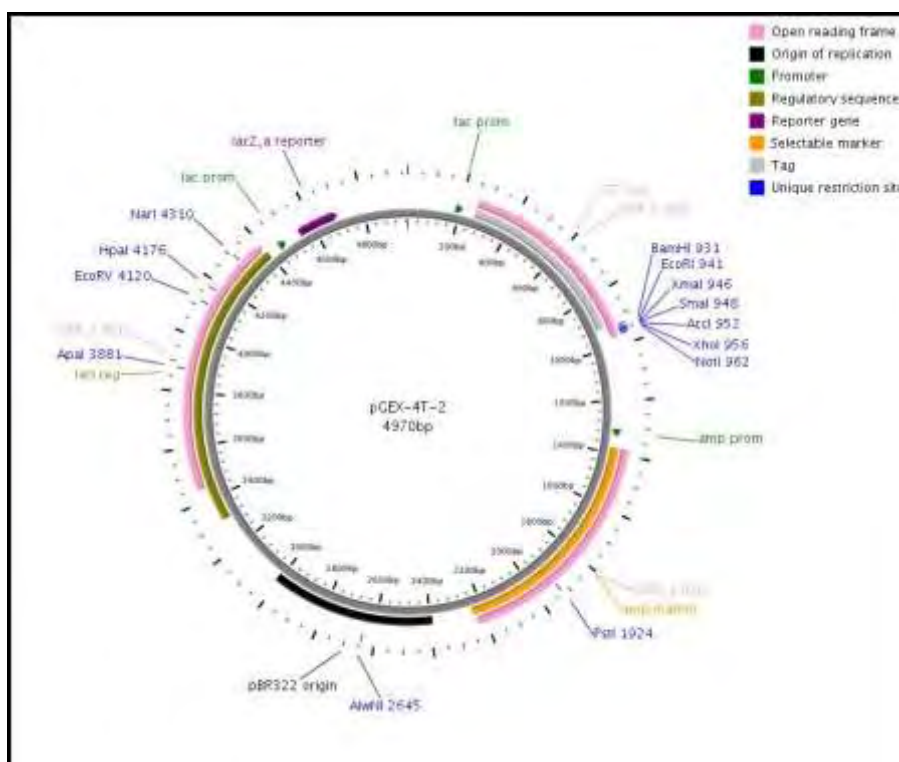
Σχήμα 2.1 Ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy



Σχήμα 2.2 Η αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης

Ο φορέας pGEX-4T2, μεγέθους 4970 bp, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε

σύντηξη με τη GST (Σχήμα 2.3). Οι χμαιρικές αυτές πρωτεΐνες φέρουν τη GST στο αμινοτελικό τους άκρο και την επιθυμητή πρωτεΐνη στο καρβοξυτελικό άκρο. Η έκφραση του χμαιρικού γονιδίου ελέγχεται από τον υποκινητή *tac*, ο οποίος επάγεται από το IPTG. Ο φορέας περιέχει επίσης το γονίδιο *lacI*, το προϊόν του οποίου είναι μία πρωτεΐνη καταστολέας του υποκινητή *tac*. Με την προσθήκη του επαγωγέα IPTG ενεργοποιείται ο υποκινητής *tac* και καθίσταται δυνατή η παραγωγή της χμαιρικής πρωτεΐνης.



Σχήμα 2.3 Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T2

➤ Βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli*

Για την κλωνοποίηση των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E.coli* DH5a. Χαρακτηριστικά του στελέχους αυτού είναι η υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού και η έλλειψη από το χρωμόσωμά τους της περιοχής D(LacZ)M15, κάτι ιδιαίτερα χρήσιμο όταν τα DH5a φέρουν πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούν για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Όταν τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται σε στερεό υπόστρωμα που περιέχει X-gal ή IPTG, σχηματίζουν αποικίες διαφορετικού χρώματος ανάλογα με το αν φέρουν το κλωνοποιημένο ένθεμα. Όταν φέρουν το ένθεμα, οι αποικίες είναι λευκές εφόσον το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης διακόπτεται

και δεν μπορεί να μεταφραστεί σε λειτουργική β-γαλακτοσιδάση. Αντιθέτως, όταν δε φέρουν το ένθεμα, οι αποικίες είναι κυανές ως αποτέλεσμα της μετάφρασης του γονιδίου σε λειτουργική β-γαλακτοσιδάση, η οποία διασπά το X-gal.

Για την υπερέκφραση του γονιδίου της θρυψίνης I χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E.coli* BL21 (DE3) codon plus. Το στέλεχος αυτό ενδείκνυται για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, καθώς δεν παράγει τις πρωτεάσες OmpT και Lon, οι οποίες θα μπορούσαν να τη διασπάσουν. Επιπλέον, φέρει πλασμίδιο με γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφαινικόλη, καθώς και γονίδια tRNA, τα οποία είναι απαραίτητα, εφόσον η πρωτεΐνη που εκφράζεται στο βακτήριο είναι ετερόλογη.

➤ Ενίσχυση γονιδίου με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αρχικά, δημιουργήθηκε με PCR το cDNA που κωδικοποιεί τη θρυψίνη I της τσιπούρας χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής σε ολικό RNA από ήπαρ η οποία πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενη ερευνητική εργασία (Γεωργίου, 2009). Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν θέσεις αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *KpnI* και *HindIII* αντίστοιχα (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Οι θέσεις αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα τονίζονται με υπογράμμιση.

Εκκινητές	
FW	5'-GGG <u>GTA CCA</u> GAT CGT CGG AGG GTA TGA G -3' <i>KpnI</i>
RV	5'-CCC <u>AAG CTT</u> TTA ATA GCT GGC CAT GGT G -3' <i>HindIII</i>

Οι συνθήκες διεξαγωγής της PCR είναι οι εξής:

95°C για 40 sec για την αποδιάταξη των δύο κλώνων	} 35 επαναλήψεις
58°C για 50 sec για την υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο	
72°C για 50 sec για τη σύνθεση των νέων κλώνων DNA	

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά πέντε πανομοιότυπες αντιδράσεις. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 15μl και η σύνθεση της αντίδρασης ήταν η ακόλουθη:

- ✓ 1μl αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής
- ✓ 1μl (50pmol) forward primer
- ✓ 1μl (50pmol) reverse primer
- ✓ 1,5μl PCR buffer (10x)
- ✓ 0,45μl δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs (50mM)
- ✓ 0,2μl Taq DNA polymerase (1 unit)
- ✓ 9,35μl ddH₂O

Στο τέλος κάθε αντίδρασης, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να διαπιστωθεί η παραγωγή προϊόντος. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός του προϊόντος της PCR με το εμπορικό kit της Invitrogen.

➤ Κλωνοποίηση του cDNA της TRPI στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T easy

Επειδή κατά τη διαδικασία της PCR, γίνεται συνήθως προσθήκη μορίων αδενίνης στα 5' άκρα του προϊόντος από τη DNA πολυμεράση, για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy ο οποίος φέρει συμπληρωματικά προεξέχοντα 3' νουκλεοτίδια με αδενίνη.

Η αντίδραση σύνδεσης έγινε σε τελικό όγκο 15 μl, με την ακόλουθη σύνθεση:

- | | |
|---|---|
| { | 11μl ενθέματος- προϊόντος PCR (~150 ng) |
| | 1,5μl pGEM-T Easy vector (75ng) |
| | 1,5μl buffer (10x) |
| | 1 μl T4 DNA λιγάση |

Το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία 4°C ολονύκτια.

➤ Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*

Η διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων συνοψίζεται στα εξής: Μη δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5a και BL21 που φυλάσσονται σε γλυκερόλη στους -80°C επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri με LB agar και επώαστηκαν στους 37 °C ολονύκτια. Από κάθε τρυβλίο επιλέχθηκε μία μοναδιαία αποικία η οποία αναπτύχθηκε σε υγρό LB στους 37 °C για 18 ώρες και στη συνέχεια, 1 ml από την υγρή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη που περιείχε 100 ml υγρού LB. Οι δύο φιάλες επώαστηκαν στους 37 °C με ανακίνηση στις 200 rpm, μέχρις η οπτική τους πυκνότητα

(OD₆₀₀) να γίνει 0,4. Στη συνέχεια, οι υγρές καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε falcon των 50 ml και επώστηκαν σε πάγο για 10 min. Ακολούθησε η φυγοκέντρησή τους στις 4000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και κάθε πελέττα βακτηρίων επαναιωρήθηκε σε 30ml κρύου διαλύματος MgCl₂-CaCl₂ (80mM MgCl₂, 20mM CaCl₂). Τα δείγματα επαναφυγοκεντρήθηκαν όπως προηγουμένως και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Κάθε πελέττα επαναιωρήθηκε σε 2 ml κρύου διαλύματος 0,1 M CaCl₂ και στη συνέχεια προστέθηκαν 70μl DMSO. Μετά από ήπια ανάμιξη, τα διαλύματα επώστηκαν σε πάγο για 15 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν επιπλέον 70μl DMSO και το περιεχόμενο κάθε διαλύματος τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα erpendorfs. Συνολικά, παρασκευάστηκαν 20 aliquots DH5a και 20 aliquots BL21, τα οποία φυλάσσονται στους -80°C.

➤ Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* DH5a

Η εισαγωγή του πλασμιδιακού φορέα με το κλωνοποιημένο ένθεμα στο βακτηριακό κύτταρο, επιτυγχάνεται με το μετασχηματισμό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο μετασχηματισμός έγινε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Ένα aliquot DH5a μεταφέρθηκε από τους -80 °C σε πάγο για 10 min. Προστέθηκαν 10 μl από την αντίδραση σύνδεσης, έγινε ήπια ανάμιξη και επώαση σε πάγο για 20 min. Στη συνέχεια, το erpendorf με το δείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 42 °C για 1 min και 30 sec και αμέσως μετά σε πάγο για 1 min. Έπειτα, προστέθηκε 1 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 2500 rpm για 10 min και ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλίο με LB, αμπικιλίνη και X-gal. Το τρυβλίο επώασθη στους 37 °C ολονύκτια.

➤ Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Από το τρυβλίο ελήφθησαν 6 λευκές αποικίες, οι οποίες μεταφέρθηκαν σε falcon με 3 ml υγρού LB με αμπικιλίνη και επώασθηκαν στους 37 °C στις 200 rpm για 18 ώρες. Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με αλκαλική λύση. Αρχικά, η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 12000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και η πελέττα επαναιωρήθηκε σε 300 μl διαλύματος P1, με ανάδευση στο vortex. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300 μl διαλύματος P2, το οποίο προκαλεί λύση των κυττάρων και έγινε ήπια ανάδευση των δειγμάτων για 10 min

μέχρις ότου κάθε δείγμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300 μl διαλύματος P3, το οποίο επιφέρει κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, τα δείγματα αναδεύτηκαν έντονα και επώαστηκαν σε πάγο για 20 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 min στις 12000 rpm στους 4 °C. Από κάθε δείγμα ελήφθη η υπερκείμενη διαυγής υγρή φάση σε καθαρό erpendorf και ακολούθησε μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 5 min. Για την κατακρήμνιση του DNA, η υπερκείμενη διαυγής φάση τοποθετήθηκε ξανά σε καθαρό erpendorf και προστέθηκε ισοπροπανόλη σε ποσότητα ίση με το 80% του όγκου. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 12000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η πελλέτα του DNA ξεπλύθηκε με 300 μl αιθανόλης συγκέντρωσης 70%. Ακολούθησε μία τελευταία φυγοκέντρηση στις 12000 rpm στους 4°C για 10 min. Η αιθανόλη απορρίφθηκε, οι πελέττες στέγνωσαν και επαναιωρήθηκαν σε 50μl αποστειρωμένου νερού. Στο τέλος, σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 μl RNάση και έγινε επώαση στους 37 °C για 1 ώρα, προκειμένου να αποικοδομηθεί το RNA.

➤ Έλεγχος ανασυνδυσμένων κλώνων με πέψη με *EcoRI*

Οι ανασυνδυσμένοι κλώνοι ελέγχθηκαν με πέψη του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*, η οποία κόβει σε δύο θέσεις εκατέρωθεν του ενθέματος, ώστε το ένθεμα να εξέρχεται από το πλασμίδιο.

Πραγματοποιήθηκαν 6 πανομοιότυπες πέψεις σε θερμοκρασία 37 °C, για 3 ώρες, σε τελικό όγκο 15 μl, υπό την ακόλουθη σύσταση:

{	10μl πλασμιδιακού DNA (~500ng)
	1μl <i>EcoRI</i> (10 units)
	1,5μl buffer με BSA (10x)
	2,5μl ddH ₂ O

Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5%, για να ελεγχθεί η ύπαρξη του ενθέματος (~700bp).

➤ Απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ποσοτικοποίηση και αλληλούχηση

Από έναν από τους ανασυνδυασμένους κλώνους έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με kit της Qiagen ώστε να προσδιοριστεί η αλληλουχία του. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA υπολογίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm και στα 280nm σε φασματοφωτόμετρο. Η φωτομέτρηση έγινε με αραιώση 1μl δείγματος σε 49μl ddH₂O. Η τιμή της απορρόφησης στα 260nm (OD₂₆₀) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του DNA στο δείγμα, ενώ η τιμή της απορρόφησης στα 280nm (OD₂₈₀) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα. Ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ αποτελεί δείκτη καθαρότητας του απομονωμένου DNA και πρέπει να έχει τιμές από 1,80 έως 2,00. Το πλασμιδιακό DNA που εξήχθη από τον ανασυνδυασμένο κλώνο αλληλουχήθηκε στο εργαστήριο Ιστολογίας-Ανοσοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας.

➤ Κλωνοποίηση του cDNA της TRPI στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T2

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο TRPI-pGEM-T Easy υπέστη πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*, ώστε το ένθεμα να εξέλθει από το πλασμίδιο. Συγχρόνως, με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση υπέστη πέψη και ο φορέας pGEX-4T2, ο οποίος διαθέτει μία θέση αναγνώρισης για την *EcoRI* στην κασέτα κλωνοποίησης ώστε να καταστεί γραμμικός.

Και οι δύο πέψεις έγιναν σε θερμοκρασία 37 °C για 3 ώρες σε τελικό όγκο 120μl, υπό τις ακόλουθες συστάσεις:

{	70μl pGEM-T Easy (~5μg)	{	70μl pGEX-4T2 (~5μg)
	10μl <i>EcoRI</i> (100 units)		10μl <i>EcoRI</i> (100 units)
	12μl buffer με BSA (10x)		12μl buffer με BSA (10x)
	28μl ddH ₂ O		1μl Rνάση (2mg/ml)
			27μl ddH ₂ O

Ολόκληρη η ποσότητα της πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,5%. Στη συνέχεια, με μία λεπίδα κόπηκε η ζώνη της πηκτής που περιείχε το ένθεμα και ακολούθησε καθαρισμός και απομόνωση του ενθέματος με kit της Qiagen.

Από το δείγμα της πέψης του φορέα pGEX-4T2 ελήφθησαν 3μl τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5%, δίπλα σε άκοπο φορέα, προκειμένου να

διαπιστωθεί η επιτυχία της πέψης. Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός του υπόλοιπου δείγματος με kit της Invitrogen.

Το ένθεμα και ο φορέας pGEX-4T2 έχουν συμπληρωματικά άκρα, εφόσον έχουν κοπεί με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο, για το λόγο αυτό είναι δυνατή η σύνδεσή τους. Η αντίδραση σύνδεσης έγινε σε τελικό όγκο 30μl, με την ακόλουθη σύσταση:

- 7μl pGEX-4T2 (~200 ng)
- 18,5μl ένθεμα (~800 ng)
- 3μl buffer (10x)
- 15μl T4 DNA λιγάση

Η αντίδραση επωάστηκε στους 4°C ολονύκτια και ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους DH5a.

➤ Πέψη δειγμάτων με *EcoRI*

Από το τρυβλίο ελήφθησαν 20 αποικίες, οι οποίες αναπτύχθηκαν για 18 ώρες σε 3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη. Έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση και στη συνέχεια πέψη με *EcoRI*, προκειμένου να διαπιστωθεί ποιες από τις αποικίες έφεραν ανασυνδρασμένους κλώνους. Έγιναν 20 πανομοιότυπες πέψεις σε τελικό όγκο 20μl, για 3 h στους 37 °C, με την ακόλουθη σύσταση:

- 10μl πλασμιδιακού DNA (~300ng)
- 2μl buffer με BSA (10x)
- 0,5μl Rνάση (2mg/ml)
- 1μl *EcoRI* (10 units)
- 6,5μl ddH₂O

Στη συνέχεια, τα 20 δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,5%. Τα δείγματα που παρουσίασαν δύο ζώνες – η μία εκ των οποίων ~700bp που αντιστοιχεί στο ένθεμα – ήταν εκείνα στα οποία η κλωνοποίηση του ενθέματος ήταν επιτυχής.

➤ Πέψη ανασυνδρασμένων κλώνων με *Pst I*

Το ένθεμα μπορεί να εισέλθει στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T2 με δύο κατευθύνσεις, είτε με τη σωστή (5'-3'), είτε με την αντίθετη (3'-5'). Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η κλωνοποίηση έγινε με τη σωστή κατεύθυνση, τα τέσσερα θετικά δείγματα υπέστησαν πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Pst I*. Ο φορέας pGEX-

4T2 φέρει μία θέση αναγνώρισης για την *Pst I* ενώ το ένθεμα φέρει δύο θέσεις αναγνώρισης. Στην περίπτωση σωστής ένθεσης, τα τμήματα DNA που αναμένονται είναι 4388bp, 1126bp και 156bp, ενώ στην περίπτωση λανθασμένης ένθεσης είναι 4130bp, 1384bp και 156bp.

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις πανομοιότυπες πέψεις σε τελικό όγκο 20μl, στους 37 °C για δύο ώρες, με την ακόλουθη σύσταση:

{ 11μl ανασυνδυασμένου πλασμιδίου
1μl *Pst I* (10 units)
2μl buffer (10x)
6μl ddH₂O

Στη συνέχεια, τα τέσσερα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,5% και διαπιστώθηκε ότι στα δύο από αυτά η κλωνοποίηση έγινε με τη σωστή κατεύθυνση. Το πλασμιδιακό DNA από τους δύο ανασυνδυασμένους κλώνους στους οποίους η κλωνοποίηση έγινε με τη σωστή κατεύθυνση, εξήχθη με kit της Invitrogen και αλληλουχήθηκε στο εργαστήριο Ιστολογίας-Ανοσοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας.

2.3 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TRPI σε βακτήρια και απομόνωση με χρωματογραφία συγγένειας

Ένας από τους δύο ανασυνδυασμένους κλώνους χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* στελέχους BL21. Η επαγωγή της παραγωγής πρωτεΐνης έλαβε χώρα με προσθήκη IPTG (0,1 mM) και επώαση της υγρής καλλιέργειας με αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη για 20 h, στους 13 °C, στις 200 rpm.

➤ Συλλογή κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 30 min στους 4 °C. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (Tris 50mM pH 8,0, NaCl 100mM, EDTA 1mM, NP-40 0,1%). Ακολούθησε προσθήκη λυσοζύμης (τελική συγκέντρωση 100μg/ml), η οποία διασπά το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων με ήπια περιστροφική ανάδευση ολονύκτια στους 4 °C. Την επομένη το διάλυμα έγινε ιξώδες και για την περαιτέρω επεξεργασία

του προστέθηκε Dithiothreitol (DTT) (τελική συγκέντρωση 5 mM), το οποίο διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών (επώαση 5 min σε πάγο) και απορρυπαντικό N-laurylsarcosine (sarkosyl) (τελική συγκέντρωση 1,5%). Το δείγμα επώαστηκε σε πάγο για 30 min και ακολούθησε καταστροφή των συσσωματωμάτων και σπάσιμο των νουκλεϊκών οξέων με υπερήχους (sonication) για 10 χρονικά διαστήματα των 10 sec. Ενδιάμεσα, μεσολαβούσε κάθε φορά μία παύση 40 sec, ενώ το δείγμα διατηρούνταν συνεχώς σε πάγο για αποφυγή της υπερθέρμανσης. Το τελικό δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 12000 rpm στους 4 °C και ελήφθη το υπερκείμενο εκχύλισμα των πρωτεϊνών. Στο τέλος, προστέθηκε Triton (C=2%) (Frangioni *et al.*, 1992).

➤ Απομόνωση χιμαιρικής πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας

Η απομόνωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης που περιείχαν ακινητοποιημένη γλουταθειόνη. Η χιμαιρική πρωτεΐνη δεσμεύεται στα σφαιρίδια αγαρόζης λόγω της σύνδεσης της GST με τη γλουταθειόνη και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Γενικά, 1 ml σφαιριδίων επαρκεί για τη δέσμευση 5 mg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε συνοψίζεται στα εξής:

Τα σφαιρίδια αγαρόζης εξισορροπήθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα με φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 2 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε, εκτός από μία μικρή ποσότητα η οποία παρέμεινε για να επαναιωρούνται τα σφαιρίδια. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια προστέθηκαν στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα και το μείγμα αυτό επώαστηκε στους 4 °C ολονύκτια με ήπια περιστροφική ανάδευση.

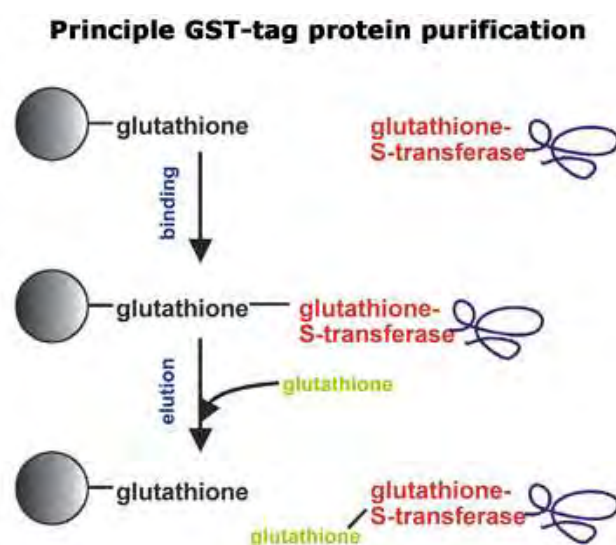
➤ Έκλυση της χιμαιρικής πρωτεΐνης

Η έκλυση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια αγαρόζης γίνεται με την προσθήκη διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης σε περίσσεια. Η γλουταθειόνη συνδέεται με τη GST της χιμαιρικής πρωτεΐνης, απομακρύνοντάς την εκλεκτικά από τα σφαιρίδια (Σχήμα 2.4). Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ποσοτική ανάκτηση της πρωτεΐνης, ενώ και οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται είναι πολύ ήπιες, ώστε ο κίνδυνος

μεταβολών στη δομή και στη δραστικότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης να είναι μηδαμινός.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η εξής:

Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 rpm για 2 min στους 4 °C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (50 mM glutathione, 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,5) και ακολούθησε ήπια περιστροφική ανάδευση στους 4 °C ολονύκτια. Την επομένη, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 rpm για 5 min στους 4°C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο περιείχε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Το τελικό αυτό δείγμα διατηρήθηκε στους -80 °C.



Σχήμα 2.4 Σχηματική απεικόνιση έκλουσης πρωτεΐνης από σφαιρίδια αγαρόζης με την προσθήκη περίσσειας γλουταθειόνης

➤ Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου

Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της ανασυνδυασμένης TRPI προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 από τα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μήκους κύματος της χρωστικής από τα 470 nm στα 595 nm. Η δέσμευση της χρωστικής είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης και το σύμπλοκο των δύο ουσιών διατηρεί σταθερό το χρώμα του για μία ώρα. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του συμπλόκου χρωστικής-πρωτεΐνης είναι υψηλός, γεγονός που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο προσδιορίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης, η

οποία κατασκευάζεται με τη χρήση διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin-BSA).

➤ Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης
(SDS-PAGE)

Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης, τα μόρια διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους. Αυτό οφείλεται στην παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS στην πηκτή, στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης και στο διάλυμα Laemmli που προστίθεται στα δείγματα. Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες (1,4g ανά g πρωτεΐνης). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της τριτοταγούς και δευτεροταγούς δομής και την πρόσδοση αρνητικού φορτίου σε όλες τις πρωτεΐνες. Το τελευταίο εξαλείφει την επιρροή του φορτίου στην κινητικότητα και οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες κινούνται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος προς την άνοδο. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο φάσεις: την ανώτερη (πηκτή ευθυγράμμισης), στην οποία πραγματοποιείται η ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο και την υποκείμενη (πηκτή διαχωρισμού), στην οποία συντελείται ο διαχωρισμός. Η ανώτερη φάση έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από την υποκείμενη. Η παράμετρος αυτή επιτρέπει σε δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτή πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτή όπου και θα διαχωριστούν. Αυτό βελτιώνει κατά πολύ την ανάλυση καθώς όλο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο. Τα πρωτεϊνικά δείγματα αποδιατάσσονται με προσθήκη διαλύματος Laemmli (5x) και θέρμανση στους 100 °C για 10 min.

Η πηκτή που χρησιμοποιήθηκε είχε διαστάσεις 8 x 7,3 cm, και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε σταθερή ένταση πεδίου 35 έως 45mA, σε ρυθμιστικό διάλυμα 10x.

➤ Χρώση πηκτής

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί χρώση και μονιμοποίηση των πολυπεπτιδίων με διάλυμα Coomassie brilliant blue, το οποίο ανιχνεύει 30-100ng πρωτεΐνης. Η πηκτή τοποθετήθηκε στο διάλυμα της χρωστικής και αναδεύτηκε ήπια, υπό ανάδευση, ολονύκτια. Στη συνέχεια έγινε έκπλυση της πηκτής με νερό και

τοποθέτησή της στο διάλυμα αποχρωματισμού ολονύκτια, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής.

2.4 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας

Ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της ανασυνδυνασμένης θρυψίνης I (TRPI) έγινε με τη χρήση των συνθετικών υποστρωμάτων Na-benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide (BAPNA), που είναι ειδικό για θρυψίνη και N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE), που είναι ειδικό για χυμοθρυψίνη. Όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο CARY 50 BIO, σε θερμοκρασία 25°C. Ο όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 1 ml και η ποσότητα του ενζύμου 50 pmol. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (1, 5, 10, 20, 50, 100 nM). Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράστηκε ως U/mg protein.

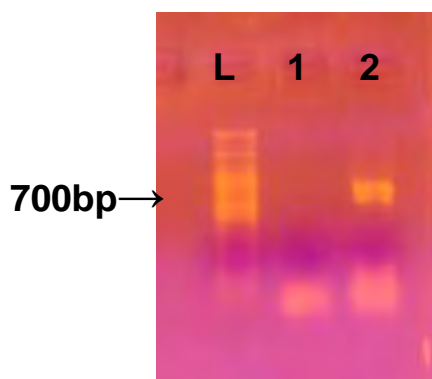
Το υπόστρωμα BAPNA χρησιμοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH=8,2 που περιείχε 10 mM CaCl₂ (Alarcón *et al.*, 1998). Η απορρόφηση προσδιορίστηκε στα 405 nm, και η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστηριότητας ορίστηκε ως το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol p-νιτροανιλίνης/min. Ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης της p-νιτροανιλίνης είναι 8800 M⁻¹ cm⁻¹.

Το υπόστρωμα BTEE χρησιμοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 44,4 mM Tris-HCl, pH=7,8 που περιείχε 55,5 mM CaCl₂ (Asgeirsson & Bjarnason, 1991). Η υδρόλυση του υποστρώματος μετρήθηκε στα 256 nm. Η μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίστηκε ως 1 nmol BTEE που υδρολύεται ανά min με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης $\epsilon=964 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3. Αποτελέσματα

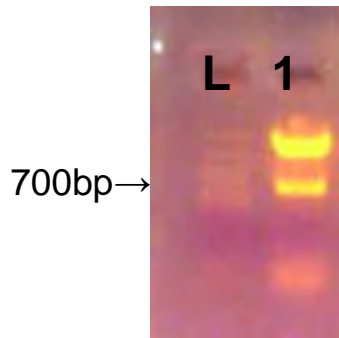
3.1 Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου *TRPI* σε πλασμιδιακούς φορείς

Το cDNA του γονιδίου *TRPI* παρήχθη με PCR με υπόστρωμα αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής από ολικό RNA ήπατος τσιπούρας. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά πέντε αντιδράσεις και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%, όπου διαπιστώθηκε η παραγωγή του προϊόντος της PCR. Το προϊόν της PCR είχε μέγεθος περίπου 700 bp, όπως αναμενόταν (Εικ.3.1).



Εικ. 3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντος PCR. L) ladder 100 bp, 1) αρνητικός έλεγχος, 2) προϊόν PCR

Τα προϊόντα καθαρίστηκαν με kit και ακολούθησε κλωνοποίηση στον γραμμικό πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy. Στη συνέχεια έγινε μετασηματισμός κυττάρων *E.coli* στελέχους DH5a. Η επιλογή των αποικιών που πήραν το ένθεμα έγινε με βάση το χρωματισμό τους, εφόσον το στερεό θρεπτικό μέσο περιείχε X-gal. Απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από 6 αποικίες και ένας από τους θετικούς κλώνους εστάλη για αλληλούχηση, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η κλωνοποίηση του ενθέματος. Στη συνέχεια, έγινε ταυτοποίηση της αλληλουχίας του ενθέματος στο πρόγραμμα BLAST, ότι όντως επρόκειτο για το cDNA που κωδικοποιεί για τη θρυψίνη I της τσιπούρας. Ακολούθησε απομόνωση του ενθέματος από τον φορέα pGEM-T Easy και ακόλουθη κλωνοποίηση στον pGEX-4T2. Για το σκοπό αυτό, οι δύο πλασμιδιακοί φορείς υπέστησαν πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*, ο μιν πρώτος για να αποβάλλει το ένθεμα και ο δεύτερος για να καταστεί γραμμικός. Η ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου pGEM-T Easy σε πηκτή αγαρόζης έδειξε την ύπαρξη δύο ζωνών, η μικρότερη εκ των οποίων αντιστοιχεί στο ένθεμα (Εικ. 3.2). Ο φορέας pGEX-4T2 ηλεκτροφορήθηκε δίπλα σε κυκλικό μόριο, προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της αντίδρασης πέψης (Εικ. 3.3).



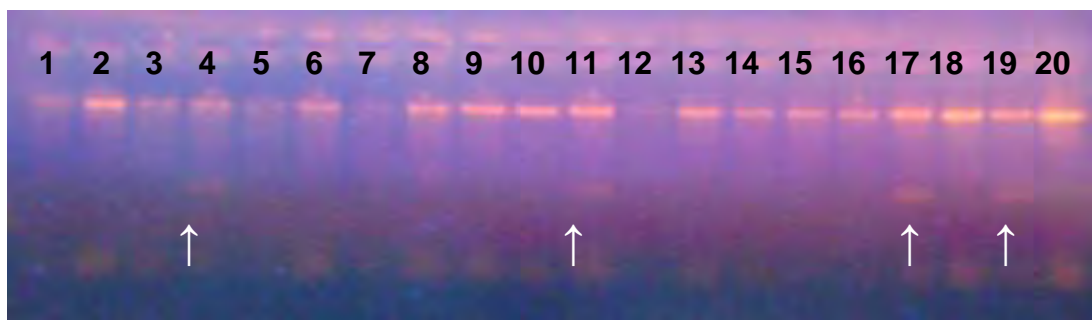
Εικ. 3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης του φορέα pGEM-T Easy που έχει υποστεί πέψη με *EcoRI*. L)ladder 100bp, 1) pGEM-T Easy/*EcoRI*



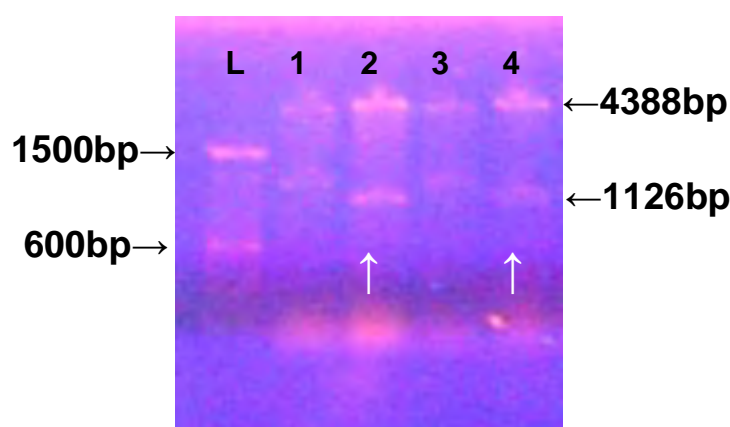
Εικ. 3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης του φορέα pGEX-4T2 που έχει υποστεί πέψη με *EcoRI*. 1) κυκλικό μόριο, 2) γραμμικό μόριο (pGEX-4T2/*EcoRI*)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους DH5a. Ελέγχθηκαν συνολικά 20 αποικίες με πέψη με *EcoRI*. Η ηλεκτροφόρηση των πέψεων έδειξε ότι σε 4 από τους κλώνους, η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής (Εικ. 3.4).

Τα 4 θετικά δείγματα υπέστησαν πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *PstI*, με σκοπό να διερευνηθεί ο προσανατολισμός του ενθέματος. Λαμβάνοντας υπόψη τις θέσεις αναγνώρισης στο ένθεμα και το φορέα, διαπιστώθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση, πως σε 2 δείγματα η κλωνοποίηση έγινε με τη σωστή κατεύθυνση (Εικ. 3.5).



Εικ. 3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των 20 κλώνων. Τα δείγματα 4, 11, 17 και 19 φαίνεται ότι έχουν και δεύτερη μικρότερη ζώνη που αντιστοιχεί στο ένθεμα.



Εικ. 3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των 4 θετικών δειγμάτων, όπου L) ladder 100bp και 1-4) τα θετικά δείγματα. Τα δείγματα 2 και 4 είναι αυτά που έχουν πάρει το ένθεμα με το σωστό προσανατολισμό.

3.2 Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδασμένης πρωτεΐνης TRPI

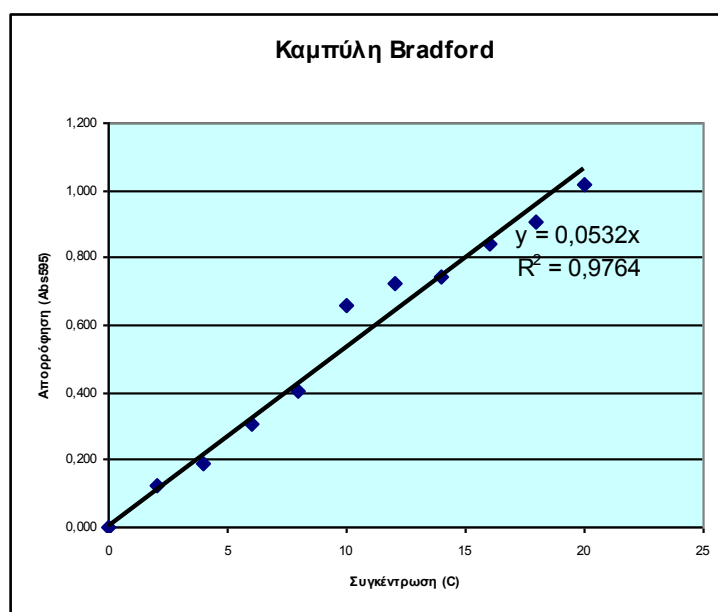
Ο ένας από τους δύο θετικούς κλώνους χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli* στελέχους BL21, προκειμένου να ακολουθήσει η υπερέκφραση της πρωτεΐνης TRPI.

Η επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδασμένης TRPI έγινε με προσθήκη IPTG (τελική συγκέντρωση 0,1 mM) και επώαση για 20 ώρες στους 13 °C υπό ανάδευση στις 200 rpm. Τα κύτταρα της υγρής καλλιέργειας συλλέχθηκαν και η ανασυνδασμένη πρωτεΐνη απομονώθηκε μαζί με το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα με βάση το πρωτόκολλο των Frangioni *et al.* (1992).

Στη συνέχεια, η TRPI απομονώθηκε από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα με την τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας, με χρήση σφαιριδίων αгарόζης με ακινητοποιημένη

γλουταθειόνη. Ακολούθησε η έκλουσή της με περίσσεια διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης.

Η συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε με τη βοήθεια δέκα πρότυπων διαλυμάτων BSA (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 Πρότυπη καμπύλη Bradford

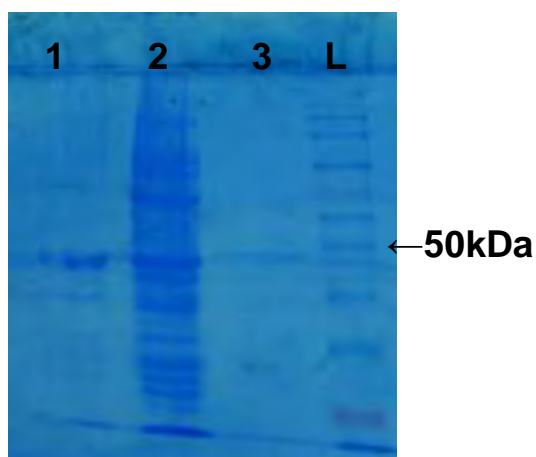
Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm για δύο ποσότητες TRPI, 14 και 18μl, οι οποίες ανιχνεύονται εντός της πρότυπης καμπύλης και έδωσαν τιμές 0,169 και 0,180 αντίστοιχα. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της εξίσωσης που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους και έπειτα η συγκέντρωση ανά μl. Στο τέλος, υπολογίστηκε ο μέσος όρος από τις δύο μετρήσεις και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της ανασυνδυασμένης TRPI ήταν 0,207 μg/μl (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 Συγκεντρώσεις απομονωμένης TRPI, βάσει της μεθόδου Bradford

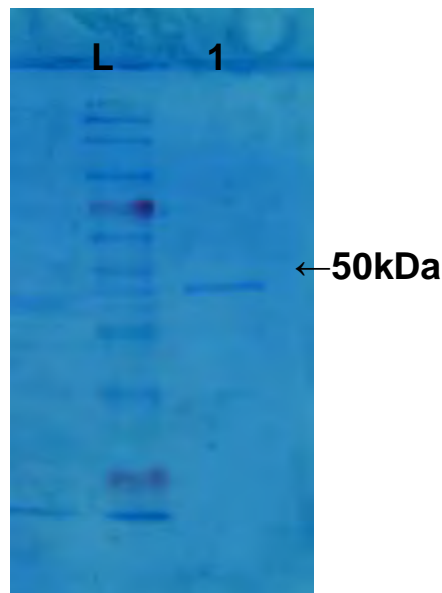
μl/ml	Abs595	μg	μg/μl	M.O. μg/μl
14	0,169	3,177	0,227	0,207
18	0,180	3,383	0,188	

Το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προέκυψε μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και την επεξεργασία με υπερήχους, η δεσμευμένη στα σφαιρίδια αγαρόζης

TRPI και η καθαρή ανασυνδυασμένη TRPI, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 12% και χρώση σε διάλυμα χρωστικής Coomassie brilliant blue (Εικόνες 3.6 και 3.7).



Εικ. 3.6



Εικ. 3.7

Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE. Στην εικ. 3.6 1)TRPI σε σφαιρίδια αγαρόζης, 2)ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, 3)TRPI (έκλουση), L)ladder πρωτεϊνών και στην εικ. 3.7 L) ladder πρωτεϊνών, 1) TRPI (έκλουση).

Η ανασυνδυασμένη TRPI έχει μοριακό βάρος 25 kDa και αν συνυπολογιστεί το μοριακό βάρος της GST (26 kDa), θεωρητικά η χημική πρωτεΐνη αναμένεται να έχει M.B.~50 kDa, κάτι που συμφωνεί και με τα δεδομένα της ηλεκτροφόρησης βάσει του πρωτεϊνικού δείκτη. Επιπλέον, στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα, παρατηρείται μία εντονότερη ζώνη μοριακού βάρους~50 kDa, γεγονός που υποδηλώνει την υπερπαραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης.

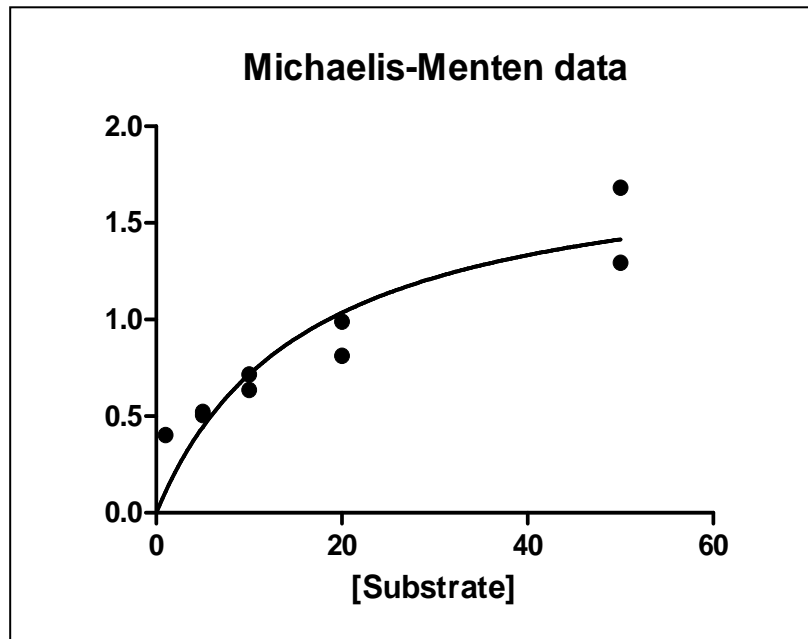
3.3 Εκλεκτικότητα και κινητικές παράμετροι (K_m , V_{max}) της TRPI

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TRPI ελέγχθηκαν δύο εκλεκτικά υποστρώματα και εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρωμάτων στη ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Η συγκέντρωση του ενζύμου, το pH, η θερμοκρασία και ο χρόνος της αντίδρασης παρέμεναν σταθερά ενώ ο μόνος μεταβλητός παράγοντας ήταν οι συγκεντρώσεις των

συνθετικών υποστρώματων. Επαναλαμβάνοντας τη δοκιμή για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος ήταν δυνατό να καθιερωθεί μια σχέση μεταξύ της ταχύτητας της αντίδρασης, η οποία αντιστοιχεί στο ποσό υποστρώματος που υδρολύεται σε σχέση με το χρόνο, και το αρχικό ποσό υποστρώματος που χρησιμοποιείται στην αντίδραση. Οι κινητικές παράμετροι K_M και V_{MAX} υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPrism και από την αναστροφή της εξίσωσης Michaelis-Menten.

Από τα υποστρώματα που ελέγχθηκαν η TRPI αντέδρασε τόσο με το BAPNA όσο και με το BTEE και οι κινητικές παράμετροι παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.2 και 3.3 αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρήθηκε αναστολή της ταχύτητας της αντίδρασης σε αυξημένες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Στην περίπτωση του BAPNA η αναστολή ήταν μετρήσιμη στη συγκέντρωση 100 nM, ενώ στην περίπτωση του BTEE στις συγκεντρώσεις 50-100 nM. Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων K_M και V_{MAX} εξαιρέθηκαν αυτά τα δεδομένα και χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα συγκεντρώσεων που αντιστοιχούσαν σε κινητική Michaelis-Menten.

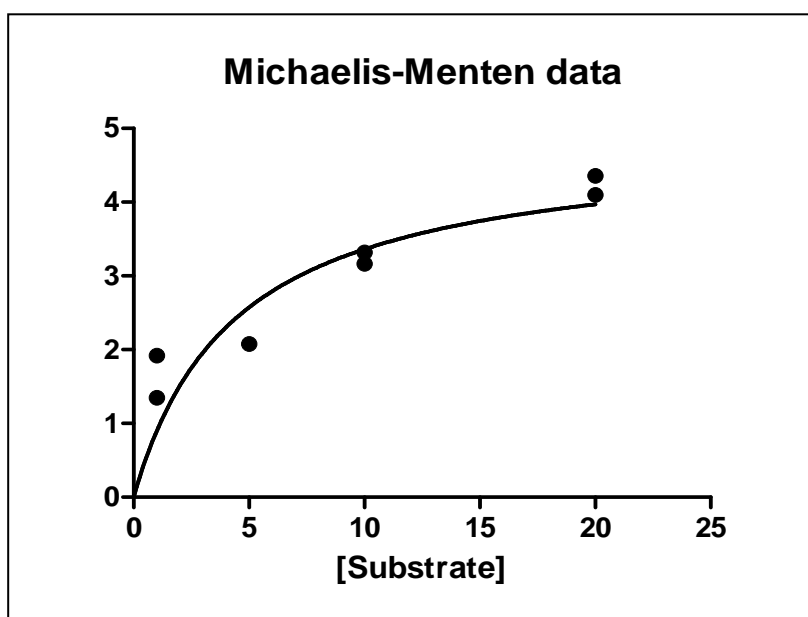
TRPI + BAPNA



	Τιμή	Τυπικό σφάλμα
K_M	16.160	7.195
V_{MAX}	1.872	0.346

Σχήμα 3.2 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης του BAPNA που υδρολύεται ανά λεπτό όταν αντιδρά με την ανασυνδυασμένη TRPI

TRPI + BTEE



Παράμετρος	Τιμή	Τυπικό σφάλμα
K_M	4.420	2.262
V_{MAX}	4.848	0.798

Σχήμα 3.3 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης του BTEE που υδρολύεται ανά λεπτό όταν αντιδρά με την ανασυνδυασμένη TRPI

Συγκρίνοντας τις κινητικές παραμέτρους της ανασυνδυασμένης TRPI σε σχέση με τον τρόπο που αυτή αντιδρά με τα δύο υποστρώματα παρατηρούμε ότι με υπόστρωμα το BAPNA η αντίδραση εξελίσσεται πολύ πιο αργά. Η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης με το BAPNA ($V_{MAX} = 1.872$ U/min) ήταν 2,5 φορές μικρότερη από αυτή με υπόστρωμα το BTEE ($V_{MAX} = 4.848$ U/min). Επιπρόσθετα, η σταθερά K_M που δείχνει τη συνάφεια ενζύμου και υποστρώματος υποδεικνύει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα της TRPI στο BTEE.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία παρήχθη μία ανασυνδυασμένη θρυψίνη της τσιπούρας (*Sparus aurata*), η TRPI μέσω συστήματος έκφρασης και απομόνωσής της από το βακτήριο *E.coli*. Το cDNA για την ενεργό μορφή της πρωτεάσης κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T2 στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με τη GST, ώστε η TRPI να παραχθεί σε σύντηξη με τη GST στο αμινοτελικό της άκρο. Η τεχνική αυτή προσφέρει το πλεονέκτημα της εύκολης και γρήγορης απομόνωσης της χμιαϊκής πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας, ενώ η επιθυμητή πρωτεΐνη μπορεί να διατηρήσει τη λειτουργικότητά της. Επιπλέον, η παραγωγή της χμιαϊκής πρωτεΐνης στο φορέα pGEX-4T2 στο στέλεχος *E.coli* BL21 ρυθμίζεται μέσω του επαγωγέα IPTG, η προσθήκη του οποίου ευνοεί την έκφρασή της σε σχέση με άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Με τον τρόπο αυτό, το επιθυμητό προϊόν παράγεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες και με υψηλή απόδοση. Η τεχνική αυτή επιτρέπει περαιτέρω βελτίωση, καθώς η GST μπορεί να απομακρυνθεί με πρωτεόλυση με τη δράση της θρομβίνης, καθώς ο φορέας pGEX-4T2 φέρει μία θέση αναγνώρισης για το ένζυμο αυτό. Το γεγονός αυτό χρήζει μεγαλύτερης προσοχής, εφόσον το μοριακό βάρος της GST είναι συγκρίσιμο με αυτό της TRPI και θεωρητικά θα μπορούσε να επηρεάσει τη δομή και τη δραστηριότητά της. Εναλλακτικά, η TRPI θα μπορούσε να κλωνοποιηθεί σε άλλο φορέα έκφρασης με μικρότερο μόριο σύντηξης.

Η ηλεκτροφόρηση της TRPI σε SDS-PAGE, η ποσοτικοποίησή της με τη μέθοδο Bradford και η μέτρηση της ενζυμικής της δραστηριότητας έδειξαν ότι η παραγωγή της είναι ποιοτικά και ποσοτικά επιτυχής. Η ενζυμική δραστηριότητα της ανασυνδυασμένης TRPI προσδιορίστηκε με τη χρήση δύο συνθετικών υποστρωμάτων, τα οποία έχουν σχεδιαστεί για το χαρακτηρισμό πρωτεασών των θηλαστικών. Η μελέτη της κινητικής του ανασυνδυασμένου ενζύμου έλαβε χώρα υπό σταθερές συνθήκες, με μόνο μεταβλητό παράγοντα κάθε φορά τη συγκέντρωση του εκάστοτε υποστρώματος, επιτρέποντας το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου. Η TRPI αντέδρασε τόσο με το υπόστρωμα BAPNA όσο και με το BTEE. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ανασυνδυασμένο ένζυμο έδειξε μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για το υπόστρωμα BTEE, σε σχέση με το BAPNA που θεωρείται εκλεκτικό για τη θρυψίνη. Παρόμοια πειραματικά δεδομένα που αφορούν στην ανασυνδυασμένη TRPII, έδειξαν ότι δεν αντέδρασε καθόλου με το υπόστρωμα BAPNA (Ταγαρίδη, 2009). Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα πως τα καθιερωμένα υποστρώματα κρίνονται πλέον

ακατάλληλα για τη μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεασών της σερίνης των ψαριών. Κρίνεται λοιπόν αναγκαίος, ο σχεδιασμός νέων εκλεκτικών υποστρωμάτων. Επιπροσθέτως, τα υποστρώματα αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται για τις μελέτες φυσιολογίας θρέψης ψαριών με μικτά ενζυμικά εκχυλίσματα, καθώς δεν μπορούν να δώσουν σαφή συμπεράσματα. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα, ενισχύουν επίσης την άποψη ότι εξελικτικά το έντερο των ψαριών είναι σε κατώτερο στάδιο σε σχέση με αυτό των ανώτερων θηλαστικών (Chakrabarti *et al.*, 1995), καθώς δεν παρουσιάζει επιμέρους διακριτά τμήματα (Ferraris & Ahearn, 1984; Buddington *et al.*, 1997). Η έλλειψη αυτή αφορά τόσο την έκφραση (Murray *et al.*, 2004) όσο και τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων (Chakrabarti *et al.*, 1995; Deguara *et al.*, 2003) και πιθανότατα απορρέει από την προσαρμοστικότητα που επιδεικνύουν τα ψάρια στην κατανάλωση ποικιλίας τροφών, επιτρέποντάς τους την αποτελεσματικότερη αξιοποίηση των διαθέσιμων διατροφικών πηγών στο ενδιαίτημά τους. Αν αναλογιστούμε επίσης το γεγονός πως η θρυψίνη προηγείται των άλλων πεπτικών πρωτεασών στην εμφάνιση δραστηριότητας πριν την εξωγενή τροφοληψία (Sarasquete, *et al.*, 1993; Sarasquete, *et al.*, 1995; Elbal, *et al.*, 2004), αντισταθμίζοντας την έλλειψη των άλλων αλκαλικών πρωτεασών, αλλά και της όξινης πεψίνης (Kamacı *et al.*, 2009) μέχρι το σχηματισμό ενός λειτουργικού στομαχιού, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η εξειδίκευσή της είναι αρκετά περιορισμένη.

Τα μέχρι τώρα δεδομένα για τη χρήση ενζύμων στο διαιτολόγιο των ψαριών είναι λιγοστά και απαιτείται επιπρόσθετη έρευνα προκειμένου να προσδιοριστεί ο τρόπος δράσης των ενζύμων και οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητά τους. Ωστόσο, λόγω του κόστους του ιχθυάλευρου και της δυσκολίας εύρεσής του, είναι αναπόφευκτη στο μέλλον η μείωση της χρήσης του στην παρασκευή ιχθυοτροφών, ιδιαίτερα σε εντατικά εκτρεφόμενα είδη, όπως η τσιπούρα. Αυτό θα έχει σα συνέπεια την αύξηση της ποσότητας των φυτικών πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές και είναι προφανές ότι θα χρειαστούν πολλές προσπάθειες για τη βελτίωση της χρησιμοποίησης των συστατικών αυτών. Οι δοκιμές που διεξήχθησαν μέχρι τώρα για τη βιομηχανία πτηνών και χοίρων αλλά και θαλάσσιων ειδών, δείχνουν ότι η χρήση ενζύμων έχει όντως τη δυνατότητα να αντισταθμίσει το πρόβλημα της ολοένα και αυξανόμενης ανάγκης σε ιχθυάλευρο. Η πρακτική εφαρμογή των δοκιμών αυτών σε εμπορική κλίμακα θα ήταν σημαντική. Κατά πρώτο λόγο, θα μειωνόταν το κόστος των ιχθυοτροφών εφόσον η περιεκτικότητα σε ιχθυάλευρο θα ήταν μικρότερη και κατά δεύτερο λόγο η αποδοτικότερη χρησιμοποίηση των ιχθυοτροφών θα είχε ως

αποτέλεσμα τη συντόμευση του χρόνου που απαιτείται μέχρι τα ψάρια να διατεθούν προς κατανάλωση στην αγορά.

Στο μέλλον, θα χρειαστεί περαιτέρω έρευνα πάνω στη χρήση ενζύμων στην παρασκευή ζωοτροφών, συμπεριλαμβανομένης και της βιομηχανίας παραγωγής ιχθυοτροφών, ώστε να διαλευκανθεί πλήρως η δυνατότητα της επικερδούς αυτής τεχνολογίας. Οι τομείς όπου θα πρέπει να επικεντρωθεί το ερευνητικό ενδιαφέρον είναι η ανάπτυξη δοκιμών μεγαλύτερης ευαισθησίας και ακρίβειας, καθώς και ο ακριβής προσδιορισμός των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων· επιπλέον, η διαλεύκανση του τρόπου με τον οποίο τα ένζυμα επιδεικνύουν την ευεργετική τους δράση και η φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενζύμων και άλλων θρεπτικών συστατικών· και τέλος, η ανάπτυξη μοντέλων τα οποία θα μπορούν να προβλέψουν την ‘αντίδραση’ των συστατικών στην προσθήκη ενζύμων (Marquard & Bedford, 2001).

Πολλά νέα ενζυμικά παρασκευάσματα αναμένεται να παραχθούν με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Τα προϊόντα αυτά αναμένεται να διατεθούν στην αγορά σε σχετικά χαμηλό κόστος και να παρουσιάσουν αυξημένη σταθερότητα και καλύτερες καταλυτικές ιδιότητες.

Βιβλιογραφία

➤ Διεθνής βιβλιογραφία

Alarcón FJ, Díaz M, Moyano FJ, Abellán E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol Biochem*; 19: 257-267.

Alexis, M.N. (1997). Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. In: feeding Tomorrow's Fish, Tacon, A. and Basurco, B. (eds). Proc. TECAM Workshop Fish Nutrition, Mazarron, Spain, 24-26 June, 1996. *Cah Options Mediterraneennes*, 22: 183-204

Applebaum, S. & Holt G.J., (2003) The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Biology*. 142,1159-1167.

Appler, H.N. & Jauncey, K. (1983). The utilization of a filamentous green alga (*Cladophora glomerata* (L) Kutzin) as a protein source in pelleted feeds for Sarotherodon (Tilapia) niloticus fingerlings. *Aquaculture*, 30: 21 -30.

Asgeirsson, B. & Bjarnason, B., (1991). Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Com. Biochem. Physiol. B99*, 327-335.

Barnabé, G. (1990). *Aquaculture*, Vol 1 and 2. Ellis Horwood ed.

Barrett, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. (2004). *Handbook of proteolytic enzymes*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, London.

Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Cara, B., Moyano, F.J. & Zambonino Infante, J.L., *et al.* (2007) Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *Journal of Fish Biology* 70(6), 1798-1808.

Cataldi, E., Cataudella, S., Monaco, G., Rossi, A. & Tancioni, L. (1987). A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.* 30, 135-145.

Chakrabarti I, Gani MdA, Chaki KK, Sur R, Misra KK. (1995). Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp Biochem Physiol*; 112A:167-177.

Chantal, C. & Zambonino-Infante, J.(2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.

- Chou R-L, Su M-S, Chen H-Y. (2001). Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*; 193: 81-89.
- D'Ancona U., (1941). Ulteriori osservazioni e considerazioni sull'ermafroditismo ed il differenziamento sessuale dell'orata (*Sparus auratus* L.). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 18, 313-336.
- D'Ancona U., (1949). 11 differenziamento della gonade e l'inversione sessuale degli sparidi. *Arch. Oceanogr. Limnol.*, 6, 97-163.
- Davies, S.J. and Wareham, H. (1988). A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters.). *Aquaculture*, 73: 9 198. 9-1
- Deguara S, Jauncey K, Agius C. (2003). Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *J Fish Biol.* 62: 1033-1043.
- Di Cera, E. (2009) Serine Proteases. *IUBMB Life.* 61, 510-515.
- Elbal, M.T., Garcia-Hernandez, M.P., Lozano, M.T., Agulleiro, B., (2004). Development of the digestive tract of gilthead sea-bream (*Sparus aurata*). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234, 215-238.
- El-Sayed, A.F.M. (1994). Evaluation of soyabean meal, spirulina meal and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. *Aquaculture*, 127: 169-176.
- Fischer, W., Bauchot, M.L. & Schneider, M. (1987). Fishes F.A.O. d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume II. Vertèbres. Publication préparée par la FAO, résultat d'un accord entre la FAO et la Commission des Communautés Européennes (Projet GCP/INT/422/EEC) financée conjointement par ces deux organisations. Rome, FAO, Vol. 2, 1374-1375.
- Frangioni, V.J. & Neel, B.G. (1992). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione-S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* 210, 179-187.
- Garcia-Carreño, F.L. & Del Toro, M.N. (1997). Classification of proteases without tears. *Biochem. Educ.* 25, 161-167.
- Halver JE. (1989). Fish nutrition, 2nd ed. Academic Press: San Diego.
- Hidalgo MC, Urea E, Sanz A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habitus. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*; 170: 267-83.
- Hirano, T. & Mayer-Gostan, N. (1976). Eel oesophagus as an osmoregulatory organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73,1348-1350.

- Kamacı, H.O., Suzer, C., Coban, D., Firat, K., Saka, S. (2009). Organogenesis and enzymatic functionality of exocrine pancreas in cultured gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *J. Anim. Veter. Adv.* 8, 2477-2484.
- Kapoor, B.G., Smit, H., Verighina, I.A., (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* 13, 109-239.
- Kirsch, R., Guinier, D. & Meens, R. (1975). L'équilibre hydrique de l'Anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) . Etude du rôle de l'oesophage dans l'utilisation de l'eau de boisson et étude de la perméabilité osmotique branchiale. *J. Physiol.* 70,605-626.
- Kirsch, R. & Laurent, P (1975). L'oesophage, organe effecteur de l'osmoregulation chez un teleostéen euryhalin, l'anguille (*Anguilla anguilla* L.). *C.R. Acad. Sci. Paris ZSOD*, 2013-2015.
- Kirsch, R. & Meister, M. F. (1982). Progressive processing of ingested water in the gut of sea-water teleosts. *J. exp. Biol.* 98,67-81.
- Kolkovski S. (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*;200: 181-201.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A. (2001). Advances in the development of microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194, 107-121.
- Kurokawa, T. & Suzuki, T. (1995). Structure of the exocrine pancreas of flounder, *Paralichthys olivaceus*: immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using antitrypsinogen antibody. *J. Fish Biol.* 46, 292-301.
- Lovell T. Nutrition and feeding of Fish. (1998).Chapman & Hall: New York.
- Lundstedt LM, Melo JFB, Santos Neto C, Moraes G. (2002). Diet influences proteolytic enzyme profile of the South American catfish *Rhamdia quelen*. In: International Congress on the Biology of Fish, Biochemical and Physiological Advances in Finfish Aquaculture. Vancouver, Canada.
- Marquardt R.R. & Bedford, M.R.(2001). Future Horizons. In: Bedford, M.R. and Partridge G.G. (eds) *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CAB international, Willingford, UK, pp. 389-398.
- Moyle, P.B. & Cech, J.J. (1982). Fishes. An introduction to ichthyology.5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Munilla-Morán R, Saborido-Rey F. (1996). Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp Biochem Physiol*; 113B: 395-402.

- Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., DiNovi, M.J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regul. Toxic. Pharm.* 45, 144-158.
- Pariza, M.W., Johnson, E.A., (2001). Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33, 173–186.
- Pasquali A., (1941). Contributo allo studio dell'ermafroditismo e del differenziamento della gonada nell'orata (*Sparus auratus* L.). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 18, 282-312.
- Perona, J.J. & Craik, C.S. (1997). Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J. Biol. Chem.* 272, 29987-29990.
- Phillips A.M. Jr. (1969). Nutrition, digestion and energy utilization. In: Hoar WS, Randall DJ, Ed. *Fish Physiology*. Academic Press: London. pp. 391-432.
- Polgàr, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2161-2172.
- Psochiou, E., Sarropoulou, E., Mamuris, Z., Moutou, K. (2007). Sequence analysis and tissue expression pattern of *Sparus aurata* chymotrypsinogens and trypsinogen. *Com. Biochem. Physiol., Part B* 147, 367-377.
- Reimer G. (1982). The influence of diet on the digestive enzymes of the amazon fish *Matrincha, Bricon cf. melanopterus*. *J Fish Biol*; 21: 637-42.
- Roach, J.C., Wang, K., Gan, L., Hood, L., (1997). The molecular evolution of the vertebrate trypsinogens. *J. Mol. Evol.* 45, 640,652.
- Roach, J.C. (2002). A clade of trypsins found in cold-adapted fish. *Proteins* 47, 31-44.
- Rønnestad I. & Morais S. (2008). Digestion. In: *Fish Larval Physiology* (ed. by R.N. Finn & B.G. Kapoor), pp. 201-262. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA.
- Sarasquete MC, Polo A, Gonzales De Canales ML.(1993). A histochemical and immunochemical study of digestive enzymes and hormones during larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. *The Histochem. J*; 25: 430-437.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yu'fera, M., (1995). Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata*, L. *Aquaculture* 130, 79–92.
- Seixa Filho JT, Oliveira MGA, Donzele JL, Gomide ATM, Menin E. (1999). Atividade de amilase em quimo de três espécies de peixes Telostei de água doce. *Rev Brasil Zootecnia*; 28: 907-913.
- Smith LS. Digestion in teleost fish. (1980). In: Lectures presented at the FAO/UNPD training course in fish feed technology. ADCP/REP/80/11, 3-17.

Suzuki, T., Sivastava, A.S. & Kurokawa, T. (2002). cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 131, 63-70.

Tacon, A.G.J., Stafford, E.A., Edwards, C.A. (1983). A preliminary investigation of the nutritive value of threete terrestrial lumbricid worms for rainbow trout. *Aquaculture*, 35: 187-199.

Tacon, A.G.J. (1995). Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. *J. Applied Ichthyol*, 11 : 205-214.

Tengjaroenkul B, Smith BJ, Caceci R, Smith SA. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*; 182: 317-27.

Ugolev AM, Kuz'mina VV. (1994). Fish enterocyte hydrolases. Nutrition adaptations. *Comp Biochem Physiol*; 107A: 187-93.

Ueberschär, B. (1995) The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES Marine Science Symposia* 201, 119–129.

Webster, C.D., Tidwell, J.H., Goodgame, L.S., Yancey, D.H., Mackey, L. (1992a). Use of soybean meal and distillers grains with solubles as partial or total replacement of fish meal in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 106:301-309.

➤ Ελληνικές πηγές

Παπουτσόγλου Σ.Ε (1994). Μαθήματα Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας. Ειδικό μέρος: Εκτροφές Υδρόβιων Οργανισμών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Παπουτσόγλου Σ.Ε (2008). Διατροφή Ιχθύων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

Ταγαρίδη Α. (2009). Παραγωγή, χαρακτηρισμός και εφαρμογές ανασυνδυασμένων πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Μεταπτυχιακή Διατριβή τμήματος Βιοχημείας και βιοτεχνολογίας. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Χώτος, Γ., Ρογδάκης, Ι. (1992). Υδατοκαλλιέργειες Ευρύαλων ψαριών. Εκδόσεις Ίων, Αθήνα.

➤ Πηγές από το διαδίκτυο

Food and Agriculture Organisation (www.fao.org)

Εθνική Τράπεζα της Ελλάδος (www.nbg.gr)

Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (www.hcmr.gr)

Παράρτημα

Σύσταση διαλυμάτων και πηκτών

Διαλύματα αλκαλικής λύσης

Διάλυμα P1

- Tris 15mM
 - EDTA 10mM
 - ddH₂O
- } pH=8.0

Διάλυμα P2

- NaOH 200mM
- SDS 1%
- ddH₂O

Διάλυμα P3

- CH₃COOH 3M
 - KOAc 5M
 - ddH₂O
- } pH=5.2

Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης πρωτεϊνών

- Tris 50mM, pH=8.0
- NaCl 100mM
- EDTA 1M
- NP-40 0.1%

Ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης πρωτεΐνης

- Glutathione 50ml
- NaCl 100mM
- Tris 50mM, pH=8.5

Διάλυμα Laemmli (5x)

- Tris-Cl 250mM, pH=6.8
- SDS 10%
- Γλυκερόλη 50%
- Μερκαπτοαιθανόλη 25%
- Bromophenol blue 0.5%

Ρυθμιστικό διάλυμα SDS-PAGE (10x)

- Tris 250mM
 - Γλυκίνη 1,92M
 - SDS 1%
- } pH=8.3 με προσθήκη HCl

Διάλυμα χρώσης πηκτής Coomassie Brilliant Blue

- Methanol 45% v/v
- CH₃COOH 10% v/v
- Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 σε αιθανόλη 0.25%

Πηκτή ευθυγράμμισης SDS-PAGE

- Acrylamide/bis-acrylamide 4,5% (29:1)
- Tris-Cl 0,125M, pH=6.8
- SDS 0.1%
- APS 0.1%
- TEMED 0.2%

Πηκτή διαχωρισμού SDS-PAGE

- Tris-Cl 0,375M, pH=8.8
- SDS 0.1%
- APS 0.1%

TEMED 0.05%