

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη ενός πιο οικονομικού και αποδοτικού  
πρωτοκόλλου για την αλληλούχηση μοναδιαίων  
βακτηριακών κυττάρων.

Development of a cost effective and efficient  
bacterial single cell sequencing protocol.

Μιχελιουδάκης Βενέτιος του Αναστασίου  
ΛΑΡΙΣΑ 2022

# ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασιλειάδης Σωτήριος (Υπεύθυνος καθηγητής),  
Επίκουρος Καθηγητής,  
Μοριακή Μικροβιακή Οικολογία-Γονιδιωματική,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος,  
Πρόεδρος Τμήματος, Καθηγητής,  
Περιβαλλοντική Μικροβιολογία & Βιοτεχνολογία,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη,  
Καθηγήτρια,  
Βιοτεχνολογία Φυτών,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω κυρίως, τον υπεύθυνο Καθηγητή Βασιλειάδη Σωτήριο για την μετάδοση των γνώσεων, του κινήτρου για την εκπόνηση της πτυχιακής μου διατριβής. Επίσης για την συνολική επίβλεψη της πτυχιακής και την βοήθεια στην συγγραφή της. Τέλος την αμέριστη ανοχή του προς εμένα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Κύριο Καρπούζα Δημήτριο και την Κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αφροδίτη Κατσαούνη, τον Νίκο Ντελκή και την Μυρτώ Χατζηαγγέλου για την βοήθεια που προσέφεραν ως προκάτοχοι της εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για το εξαιρετικό κλίμα και την αποδοχή στον χώρο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ABSTRACT

Αναλύσεις μη καλλιεργήσιμων βακτηριακών κοινοτήτων με τεχνολογίες μαζικής αλληλούχησης, όπως αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης, χρησιμοποιούνται ευρέως για τον χαρακτηρισμό τους. Ένα από τα προβλήματα που διέπουν μεθόδους σαν και αυτήν είναι η δυσκολία/αδυναμία ομαδοποίησης των αλληλουχιών του συλλογικού γενετικού υλικού που αναλύεται σε διακριτά στελέχη. Μία λύση στο πρόβλημα έρχονται να δώσουν οι μέθοδοι αλληλούχησης μοναδιαίων κυττάρων. Οι ως τώρα αναπτυγμένες μέθοδοι ανάλυσης μοναδιαίων κυττάρων περιορίζονται από το υψηλό κόστος. Σε αυτή την Πτυχιακή εργασία αναπτύχθηκε σε μεγάλο βαθμό ένα πρώιμο πρωτόκολλο πιο οικονομικό, αποδοτικό, λιγότερο χρονοβόρο και με λιγότερο απαιτούμενο εξοπλισμό για την αλληλούχηση μοναδιαίων βακτηριακών κυττάρων. Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στην βακτηριακή κοινοπραξία ενδιαφέροντος καταβολισμού του thiabendazole (TBZ). Το κύριο πλεονέκτημα του πρωτοκόλλου είναι η πρώτη σήμανση των κυττάρων που γίνεται σε μία αντίδραση (tagmentation *in situ* σε βακτηριακά κύτταρα) αντί για το κάθε κύτταρο ξεχωριστά. Η αρχή της μεθόδου προήλθε από το Nextera XT της Illumina, το οποίο είναι πρωτόκολλο για DNA προετοιμασία βιβλιοθήκης για αλληλούχηση. Το παραπάνω πρωτόκολλο τροποποιήθηκε για προετοιμασία βιβλιοθήκης μέσα σε μονιμοποιημένα κύτταρα. Συνολικά πετύχαμε την μονιμοποίηση των κυττάρων, τον ενζυμικό κατακερματισμό και την προσθήκη προσαρμογέων ανά κύτταρο *in situ*, την επιτυχή ενίσχυση PCR και τιτλοποίηση στο σύνολο των κυττάρων, των τμημάτων που έφεραν προσαρμογείς (όπως επιβεβαιώθηκε από κλωνοποίηση των προϊόντων PCR και αλληλούχηση των ενθεμάτων). Λόγω έλλειψης χρόνου και άμεσης πρόσβασης σε όργανο διαχωρισμού κυττάρων (cell sorter), τα τελευταία βήματα του πρωτοκόλλου, αυτό του κυτταρικού διαχωρισμού, της τιτλοποίησης των κυττάρων κατά μόνας και της αλληλούχησης αναμένουν να πραγματοποιηθούν.

Non cultivated bacterial consortia are commonly characterized with high-throughput sequencing strategies, such as shotgun metagenome sequencing. One of the major pitfalls of such approaches is the difficulty/inability of distinction of the retrieved contiguous sequences of the total metagenome into groups of strain level bins. Single cell sequencing methods have the demonstrated capacity to solve this issue. Common single cell sequencing technologies, however, are costly. Here, we describe the near-complete development of a cost effective, efficient, quick and equipment-wise less demanding bacterial single cell sequencing protocol. This protocol, at its current state, was implemented on a bacterial consortium capable of thiabendazole (TBZ) degradation. The main advantage of this protocol is the batch performance of the costly reactions *in situ* (e.g. tagmentation) at the bacterial cells, instead of performing them individually for each cell. The principle of our protocol was acquired from the Nextera XT Illumina, a protocol for DNA library preparation. The aforementioned protocol was adjusted for library preparation inside the bacterial cells. Collectively, we have achieved the cell fixation, the tagmentation of the cell DNA *in situ*, the successful PCR amplification and labeling in the total sum of the cells, of the tagmented DNA pieces (as validated by cloning of the PCR product and sequencing of the cloned inserts). Due to time constraints and lack of access (in the given period) to a cell sorter, the last steps of the cell sorting, indexing of the genetic material of individual cells, and multiplex sequencing, are awaiting performance.

# ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Αλληλούχηση μοναδιαίων κυττάρων, cell tagmentation, *tn5*, αλληλούχηση γονιδιώματος, βακτηριακή κοινοπραξία thiabendazole.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

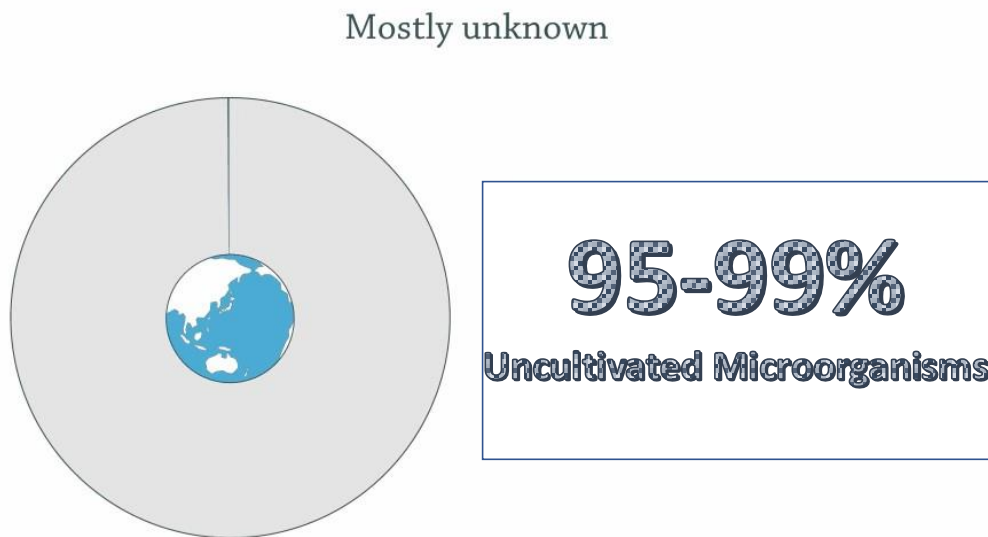
|   |    |
|---|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ  | 7  |
| Μέθοδοι Περιβαλλοντικής Μοριακής Μικροβιολογίας                         | 7  |
| Μέθοδοι ανάλυσης ταυτότητας και λειτουργίας σε περιβαλλοντικά δείγματα  | 7  |
| Οι δυσκολίες της καλλιέργειας και της οπτικοποίησης                     | 8  |
| Το 16S rRNA, οι ιδιότητές του και οι τεχνικές που βασίζονται σε αυτό    | 8  |
| Στρατηγικές μετα-ομικής   | 10 |
| Αδυναμίες των στρατηγικών μετα-ομικής και το πρόβλημα του μεταθετώματος | 14 |
| Ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων   | 17 |
| Ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων μεγάλης κλίμακας                            | 19 |
| Thiabendazole (TBZ), βακτηριακή κοινοπραξία thiabendazole.              | 22 |
| Πειραματικός σχεδιασμός   | 23 |
| Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν   | 24 |
| • ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ/ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)                      | 24 |
| • ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ   | 25 |
| • ΔΙΑΤΡΗΣΗ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ                                     | 26 |
| • ΤΥΧΑΙΑ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ (TAGMENTATION)         | 28 |
| • ΧΡΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ              | 28 |
| • ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)                                 | 30 |
| • ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΘΥΜΙΝΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ (TA)                                     | 31 |
| • ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA  | 32 |
| • ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ SANGER  | 33 |
| Στόχος της παρούσας μελέτης   | 34 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ   | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 1. Χημικά  | 34 |
| 2. Θρεπτικά, κύτταρα και DNA   | 35 |
| 3. Μέτρηση συγκέντρωσης thiabendazole  | 35 |
| 4. Προετοιμασία- επεξεργασία και μονιμοποίηση κυττάρων.                                  | 35 |
| 5. Διάτρηση και αποθήκευση των κυττάρων  | 36 |
| 6. Tagmentation  | 36 |
| 7. Παρατήρηση διάτρησης μορφολογίας και ευρωστίας κυττάρων                               | 38 |
| 8. Δημιουργία βιβλιοθήκης, πολυπλεξία τιτλοποίησης                                       | 38 |
| 9. Απομόνωση DNA από πηχτή και ποσοτικός προσδιορισμός.                                  | 40 |
| 10. Κλωνοποίηση για διαπίστωση ενθέματος   | 40 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ  | 41 |
| 1. Τυχαία θραυσματοποίηση, τιτλοποίηση και ενίσχυση DNA βισμένα στην Nextera XT Illumina | 41 |
| 2. Απεξάρτηση από την Illumina: <i>tn5</i> ένζυμο  | 42 |
| 3. Πηγαίνοντας από το DNA στο κυτταρικό tagmentation                                     | 44 |
| 4. Τροποποίηση επεξεργασίας σε διαφορετικά είδη κυττάρων                                 | 46 |
| 5. Απεξάρτηση από την Illumina: DNA πολυμεράση   | 48 |
| 6. Απεξάρτηση από την Illumina: Διάλυμα εξουδετέρωσης                                    | 49 |
| 7. Τελικό πρωτόκολλο   | 50 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ   | 51 |
| ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΔΟΥΛΕΙΑ   | 52 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ   | 53 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ  | 61 |

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Μέθοδοι Περιβαλλοντικής Μοριακής Μικροβιολογίας

Η ζωή στον πλανήτη ήταν αποκλειστικά μικροβιακή στο μεγαλύτερο ποσοστό ύπαρξής της. Η Περιβαλλοντική Μικροβιολογία ή Μικροβιακή Οικολογία είναι ο τομέας μελέτης των αλληλεπιδράσεων των μικροοργανισμών με το περιβάλλον, μεταξύ τους, και μεταξύ ανώτερων οργανισμών (ζωικών και φυτικών). Συμπεριλαμβάνει την μελέτη συμβίωσης, βιοχημικών κύκλων και την εκμετάλλευση από την ανθρώπινη δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Αυτή η χαρτογράφηση και η μοντελοποίηση της μικροβιακής ζωής-δραστηριότητας ήταν, είναι και θα παραμείνει ένα ανοιχτό πεδίο για την επιστήμη, καθώς εκτιμάται πως το 95-99% των μικροοργανισμών δεν έχει καλλιεργηθεί ακόμα και προσδιορίζεται ως σκοτεινή ύλη (Lok, 2015, "Microbiology by numbers", 2011).



Εικόνα 1: Το ποσοστό των μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών στην Γη.

## Μέθοδοι ανάλυσης ταυτότητας και λειτουργίας σε περιβαλλοντικά δείγματα

Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών είναι το ιδανικό για τον χαρακτηρισμό τους, καθώς παρέχει μεγάλες ποσότητες από κυτταρική μάζα και δίνει την δυνατότητα διενέργειας λειτουργικών τεστ σε βιοχημικό, γενετικό και επίπεδο φυσιολογίας. Είναι όμως γνωστό πως το κάθε βακτήριο αναπτύσσεται καλύτερα σε διαφορετικές συνθήκες. Η πλειονότητα των

μικροοργανισμών δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σύμφωνα με τις τεχνικές που υπάρχουν μέχρι σήμερα. Συνεπώς, οι πληροφορίες φυσιολογίας μικροοργανισμών έχουν αποκτηθεί από ένα πολύ μικρό υποσύνολο, εύκολων στην καλλιέργεια μικροοργανισμών, που προέρχονται από τον άνθρωπο όταν η πορεία του “διασταυρώθηκε” με αυτούς (Lagier et al., 2015).

## **Οι δυσκολίες της καλλιέργειας και της οπτικοποίησης**

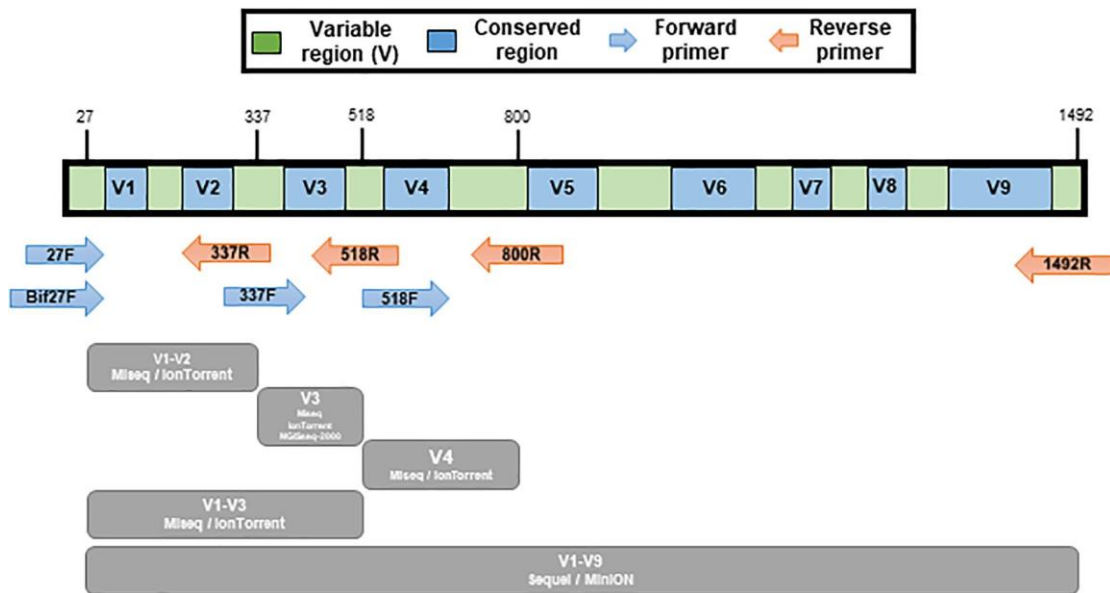
Η παρεμπόδιση μιας καλλιέργειας καθορίζεται από πολλούς παράγοντες. Κυρίως η απουσία γνώσης για το είδος του θρεπτικού μέσου που χρειάζεται, καθώς και οι άγνωστες απαιτήσεις του μικροοργανισμού. Εκτός των απαιτήσεων, πολλοί μικροοργανισμοί έχουν μικρό αναπαραγωγικό κύκλο (Lagier et al., 2015). Άλλοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν στο περιβάλλον μόνο σε συγκεκριμένες και πολύ μικρές περιόδους (Gilbert et al., 2011) ή μεγαλώνουν τόσο αργά που είναι σχεδόν που δεν παρατηρούνται ποτέ (Zengler et al., 2002). Οι συνθήκες του εργαστηρίου μπορεί να δημιουργήσει αφιλόξενες καταστάσεις, όπως το να παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Tanaka et al., 2004). Η έλλειψη ενός συστατικού που παρέχεται από κάποιον ή κάποιους άλλους μικροοργανισμούς μιας κοινοπραξίας ή από γειτονικά βακτήρια (Nye et al., 1999, D'Onofrio et al., 2010). Βιοαντιδραστήρες που μιμούνται το φυσικό περιβάλλον αποτυγχάνουν να καλλιεργήσουν μια ευρεία γκάμα μικροοργανισμών (Zengler et al., 2002, Nichols et al., 2010, Sizova et al., 2012) και προσεγγίσεις συγκαλλιέργειας που έχουν δοκιμαστεί είναι πολύ δεσμευτικές (Kaeberlein et al., 2002, Tanaka et al., 2004, Morris et al., 2008), καταλήγοντας πως η απομόνωση και η καλλιέργεια των βακτηρίων είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία.

Εναλλακτικά στις καλλιέργειες ήταν αρχικά η οπτικοποίηση μέσω μικροσκοπίας άμεσα στο περιβαλλοντικό δείγμα. Η χρήση τεχνικών με φθοροφόρα όπως η Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) σε μονιμοποιημένα ή ζωντανά δείγματα είναι αρκετά αποτελεσματική, αλλά αρκετά δύσκολη για την διάκριση λειτουργίας ή την ταξινομική κατάταξή τους (Coltharp & Xiao, 2012).

## **Το 16S rRNA, οι ιδιότητές του και οι τεχνικές που βασίζονται σε αυτό**

Τεράστια εξέλιξη στον κλάδο έφερε το γονίδιο που κωδικεύει το 16S rRNA. Η μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος 16S rRNA κυριάρχησε στην ταυτοποίηση των βακτηριακών κοινοτήτων και ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, κυρίως φυλογενετικά, συνεχίζοντας να είναι κυρίαρχο μέχρι και σήμερα για τους παρακάτω λόγους: (i) Το γονίδιο της μικρής υπομονάδας rRNA βρίσκεται σε όλες τις μορφές ζωής καθώς είναι όμοιος ο τρόπος παραγωγής πρωτεϊνών. (ii) Είναι ένα αρκετά συντηρημένο γονίδιο λόγω της σημασίας του, ενώ η στοχαστικότητα των μεταλλάξεων (που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή του DNA) εξυπηρετεί ως ένα μοριακό χρονόμετρο. (iii) Σπανίως μεταφέρεται οριζόντια (μιας και όλοι οι οργανισμοί φέρουν το γονίδιο και, επομένως, δεν μπορεί να αποτελέσει παράγοντα αντοχής σε κάποια εξελικτική πίεση). (iv) Περιέχει τόσο συντηρημένες όσο και μεταβλητές περιοχές-αλληλουχίες. Οι συντηρημένες χρησιμοποιούνται για την υβριδοποίηση εκκνητών για PCR και οι μεταβλητές ως δείκτες αναγνώρισης (Hugerth & Andersson, 2017).

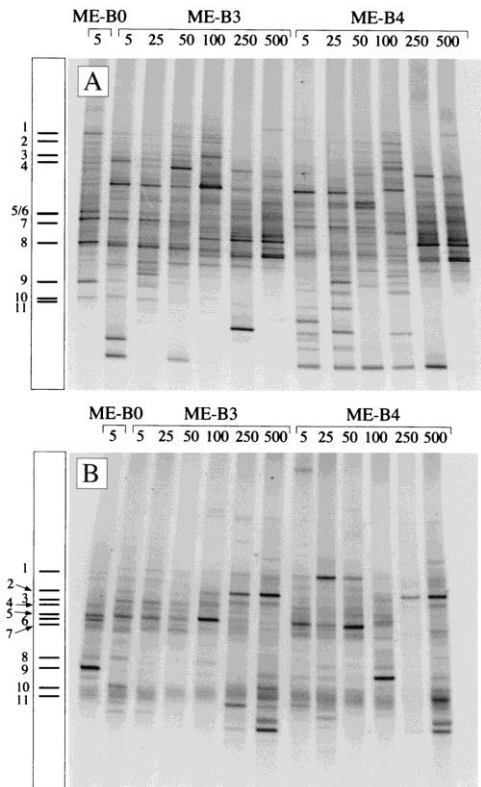




Εικόνα 2: Οι διατηρημένες, οι μεταβλητές περιοχές και ευρέως χρησιμοποιούμενοι.

Οι πρώτες αναλυτικές τεχνικές μαζικού τύπου βασίστηκαν στην ενίσχυση του DNA και στην περίπτωση της μοριακής μικροβιακής οικολογίας χρησιμοποιήθηκαν κατά κόρον σε εδαφικές αναλύσεις μικροβιωμάτων. Δύο κύριες κατηγορίες χωρίστηκαν αναλόγως με τον τύπο της πολυπλοκότητας των αλληλουχιών που εκμεταλλεύονταν. Η πρώτη κατηγορία χρησιμοποιούσε το μήκος των αλληλουχιών ως πολυμορφισμό, μέσω περιοριστικών τμημάτων μήκους πολυμορφισμών (T-RFLP, restriction fragment length polymorphism), Ανάλυση ριβοσωμικού DNA μέσω περιορισμού [ARDRA, amplified rDNA (ribosomal DNA) restriction analysis], ή Αυτοματοποιημένη ανάλυση διαγονιδιακών διαχωριστών στο ριβοσωμικό DNA (ARISA, automated ribosomal intergenic spacer analysis). Η δεύτερη κατηγορία βασίζονταν στον πολυμορφισμό της σύστασης των νουκλεϊκών οξέων, με κύρια τεχνική την ηλεκτροφόρηση βαθμιδωτής συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis). Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνταν ευρέως, καθώς είναι οικονομικά προσιτές και αρκετά γρήγορες. Ωστόσο, η ευαισθησία τους είναι περιορισμένη, καθώς ανιχνεύουν μόνο τα κυρίαρχα βακτήρια σε ένα δείγμα, και οι πληροφορίες μεταξύ των πηκτών είναι μη συγκρίσιμες (Djemiel et al., 2022).

Στην DGGE, τα κομμάτια DNA ίδιου μήκους αλλά διαφορετικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μπορούν να διαχωριστούν. Το DNA απομονώνεται από περιβαλλοντικά δείγματα και ενισχύεται με PCR στοχεύοντας το 16S ή το 18S rRNA. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην διαφορά της κινητικότητας των ημι-αποδιαταγμένων μορίων DNA σε μία πηκτή πολυακρυλαμίδης που εμπεριέχει μια γραμμική διαβάθμιση από αποδιατακτικές ουσίες για το DNA (ουρία και φορμαμίδη). Η διαφορά στην αλληλουχία μεταξύ των τμημάτων δημιουργεί διαφορά στην απαραίτητη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών για την αποδιάταξη τους, εμποδίζοντας την πορεία προς την άνοδο του apparatus (Mühling et al., 2008).



Εικόνα 3: Η Ηλεκτροφόρηση υπό διατακτικές συνθήκες.

## Στρατηγικές μετα-ομικής

Οι παραπάνω μέθοδοι πλέον είναι πλήρως ξεπερασμένες ύστερα από την τεχνολογική άνθιση και την οικονομική προσιτότητα των τεχνολογιών αλληλούχησης, ταυτόχρονα με αύξηση της υπολογιστικής δύναμης και της κοινότητας της βιοπληροφορικής (Goodwin et al., 2016). Οι ομικές τεχνολογίες είναι ένας διεπιστημονικός κλάδος που έχει πολλές απολήξεις, όπως η γονιδιωματική, επιγενωμική, μεταγραφομική, πρωτεομική και άλλες. Κάθε μία από τις απολήξεις εξερευνά την Βιολογία από διαφορετική οπτική. Η μεταγονιδιωματική και οι προσεγγίσεις γονιδίων αναφοράς κυριαρχούν στον χώρο της μικροβιακής οικολογίας. Το πρόθεμα μετα- συμβολίζει την χρησιμοποίηση της τεχνικής για μελέτη βιομορίων που προέρχονται από περισσότερους του ενός οργανισμούς περιβαλλοντικών δειγμάτων.

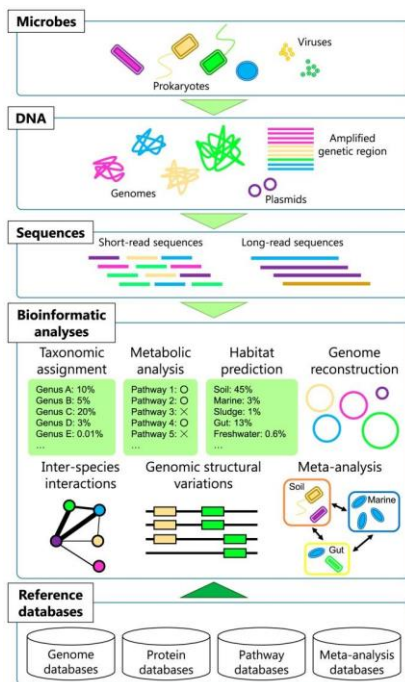
Η μεταγονιδιωματική είναι ένας τρόπος χαρακτηρισμού και ταυτοποίησης οργανισμών από όλων των ειδών περιβαλλοντικών δειγμάτων. Στα πλαίσια της μεταγονιδιωματικής η αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης (shotgun sequencing) αναλύει όλο το DNA από ένα δείγμα για τον προσδιορισμό της παρουσίας μικροοργανισμών και το γενωμικό τους περιεχόμενο. Μπορεί επίσης να φέρει στην επιφάνεια ενδείξεις από την λειτουργικότητα των πιθανών μικροοργανισμών που βρέθηκαν.

Η προσέγγιση μέσω γονιδίων αναφοράς (στοχευμένη μεταγονιδιωματική) βασίζεται στην αλληλούχηση συγκεκριμένων γονιδιακών περιοχών. Επιτρέπει την περιγραφή της μικροβιακής σύστασης ενός δείγματος βασισμένη στις ταξινομικές ομάδες παρούσες στο συγκεκριμένο δείγμα. Συνήθως χρησιμοποιείται για την ανάλυση της βιοποικιλότητας σε μικροβιακά οικοσυστήματα. Κάποια από τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιούνται είναι το 16S rRNA για την ανάλυση της παρουσίας και του φυλοκαθορισμού αρχαίων και βακτηρίων (Case et al., 2007), ο εσωτερικός μεταγραφόμενος διαχωριστής (internal transcribed spacer, ITS) για τον χαρακτηρισμό της σύστασης μιας κοινοπραξίας μυκήτων (Schoch et al., 2012), το 18S rRNA για την διαπίστωση παρουσίας ευκαρυωτών (Lindahl et al., 2013) και το *amoA* για την φυλογενετική και λειτουργική ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων που οξειδώνουν την αμμωνία (Malinowski et al., 2020).

Επίσης η μεταμεταγραφομική, που ανιχνεύει όλα τα RNAs που κωδικεύονται από μία ομάδα μικροοργανισμών σε ένα δείγμα. Η μεθοδολογία της μεταμεταγραφομικής δίνει την δυνατότητα στην αντιστοίχιση και ποσοτικοποίηση των μικροβιακών μεταγράφων. Κυτταρικό RNA απομονώνεται και μετατρέπεται σε cDNA, το οποίο χρησιμοποιείται για την δημιουργία βιβλιοθήκης για αλληλούχηση. Τα κομμάτια που αλληλουχούνται αντιστοιχίζονται στο γονιδίωμα αναφοράς, παρέχοντας ποιοτικές πληροφορίες για την μορφολογία των εξονίων, και κυρίως ποσοτικές από τα αντίγραφα των μεταγράφων.

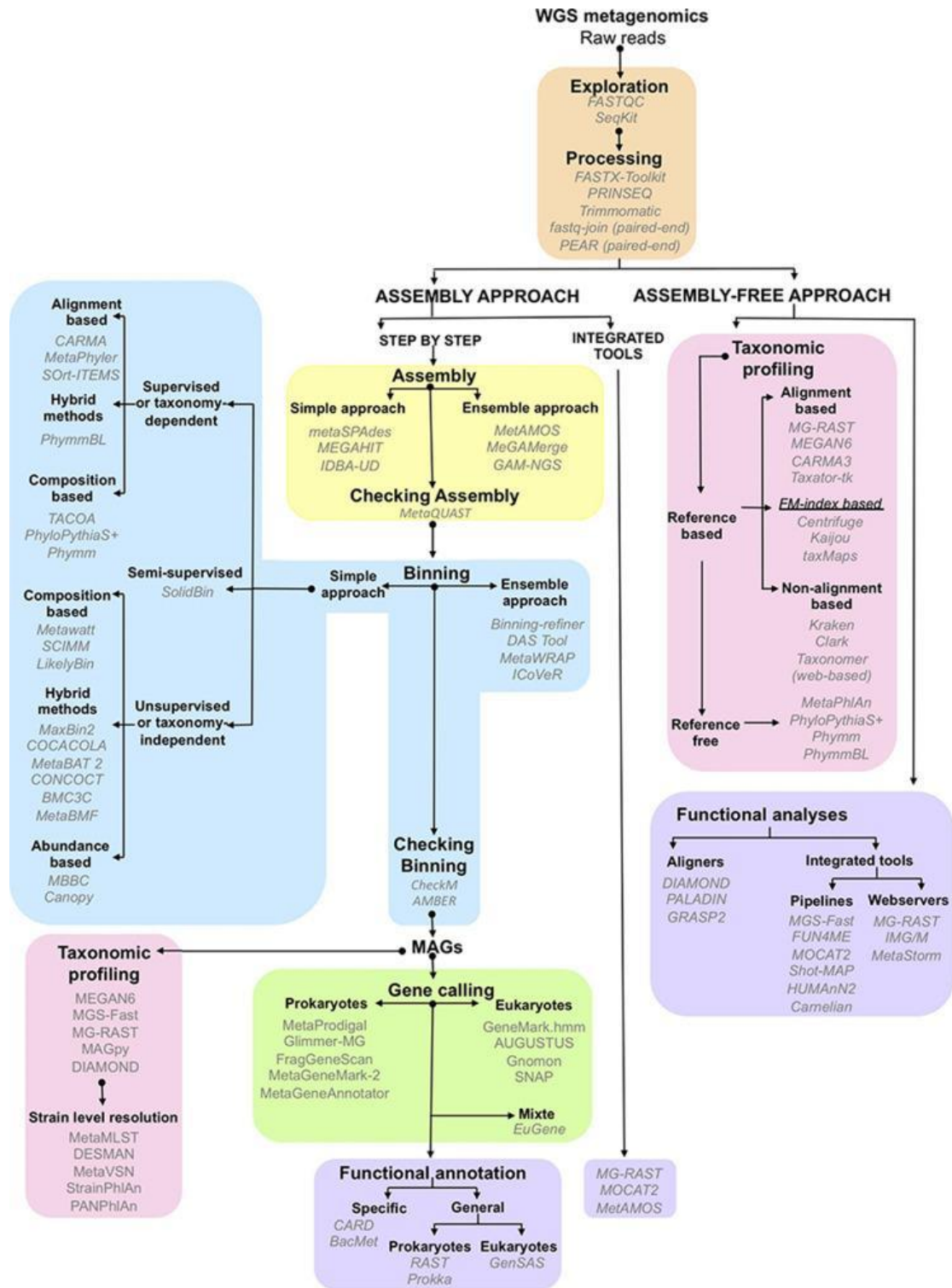
Για μια συνολική ανάλυση όλες οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνδυαστικά.

Περιεκτικά, στην μεταγονιδιωματική ύστερα από την απομόνωση DNA από το περιβαλλοντικό δείγμα γίνεται η επεξεργασία του DNA θραυσματοποιώντας το και προσθέτοντας προσαρμογείς της επιλογής. Το παραπάνω προϊόν αλληλουχείται. Ομοίως, στην ανάλυση γονιδίου δείκτη γίνεται απομόνωση DNA και ενισχύεται με PCR. Το ενισχυμένο προϊόν αλληλουχείται. Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αξιοποιούνται συγκρίνοντάς τα με βάσεις δεδομένων κατά τη ροή εργασίας που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.

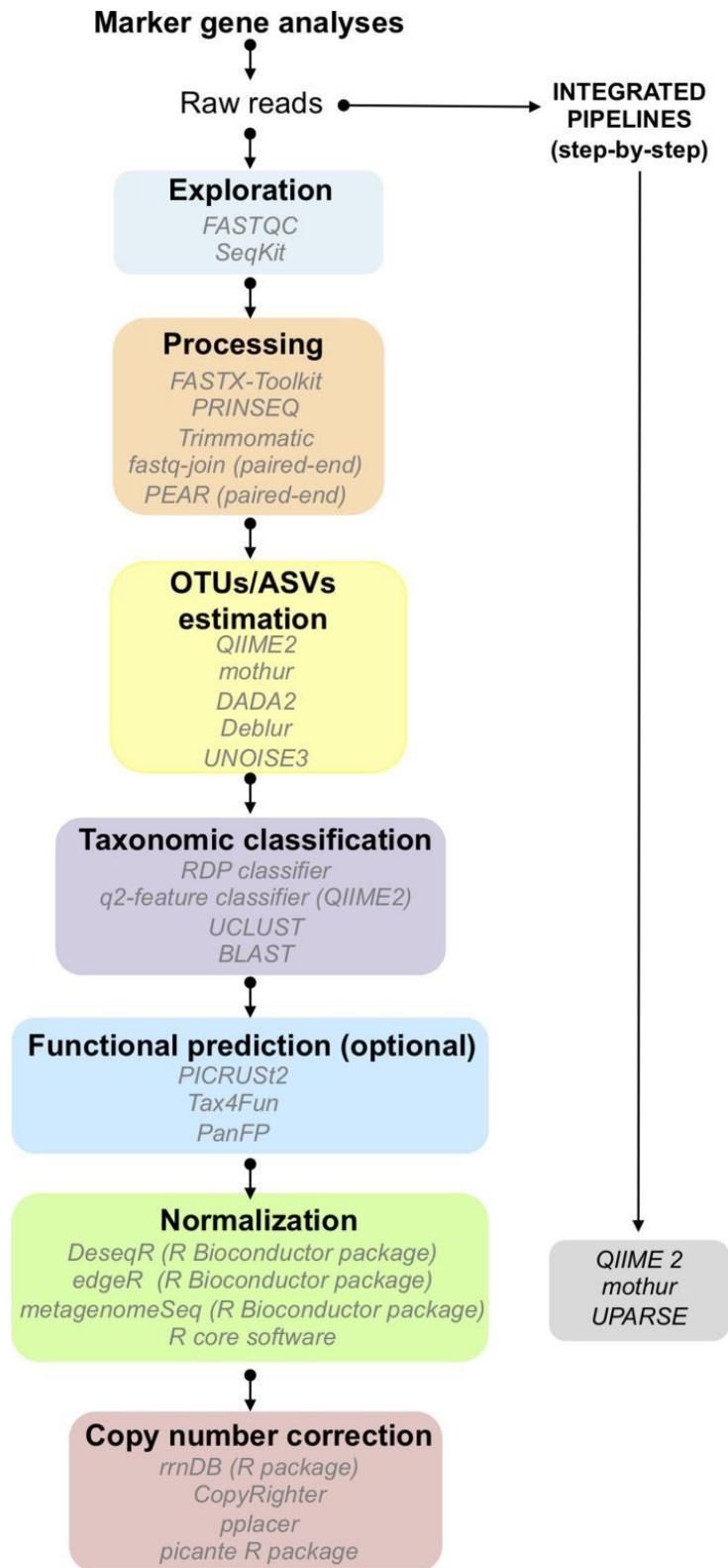


Εικόνα 4: Τα βασικά βήματα της πορείας μιας ανάλυσης μικροβιωμάτων.

Στην Εικόνα 5 και 6 είναι τα σχεδιαγράμματα της ροής βιοπληροφορικής ανάλυσης για μεταγονιδιωματική αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης και στοχευμένη μεταγονιδιωματική ανάλυση 16S rRNA αντίστοιχα (Pérez-Cobas et al., 2020).



Εικόνα 5: Πιθανές πορείες βιοπληροφορικής ανάλυσης μεταγονιδιωματικής με τους πλέον χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους και συλλογές αλγορίθμων για κάθε βήμα.



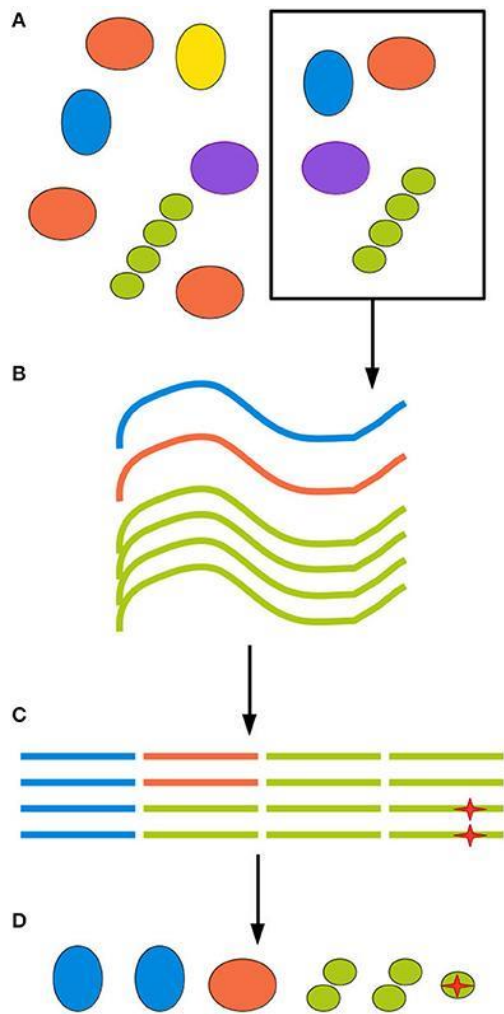
Εικόνα 6: Πιθανές πορείες βιοπληροφορικής ανάλυσης 16S με τους πλέον χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους ή συλλογές αλγορίθμων ανά βήμα της ανάλυσης.

## Αδυναμίες των στρατηγικών μετα-ομικής και το πρόβλημα του μεταθετώματος

Οι παραπάνω στρατηγικές έχουν κάποια μειονεκτήματα. Όλα τα αποτελέσματα συγκρίνονται με βάσεις δεδομένων οι οποίες είναι βασισμένες στα υπάρχοντα δεδομένα τα οποία είναι ελλιπή λόγω του πολύ μικρού ποσοστού των αλληλουχημένων γονιδιωμάτων (Ungaro et al., 2019). Κατά την βιοπληροφορική επεξεργασία τα αποτελέσματα της αλληλούχησης όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6 ύστερα από την αρχική επεξεργασία και περικοπή τους, ομαδοποιούνται σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational Taxonomic Units, OTUs). Τα χαμηλά σε σχετική αφθονία OTUs δεν συμπεριλαμβάνονται στην έρευνα καθώς αποκλείονται στο στάδιο του καθαρισμού. Ο καθαρισμός γίνεται για την εξάλειψη των τυχαίων ομαδοποιήσεων, με αυτόν τον τρόπο χάνονται όμως και πολύ σπάνιες ταξινομικές ομάδες μικροοργανισμών που θεωρούνται τυχαίες (Poretzky et al., 2014). Ακόμα πιο ολιγομελείς πληθυσμοί δεν αναγνωρίζονται καθώς δεν αλληλουχούνται καν όπως φαίνεται στην Εικόνα 7. Ο πεπερασμένος χώρος αλληλούχησης ακόμα και της πιο ενδεδειγμένης τεχνολογίας αλληλούχησης δεν μπορεί να καλύψει όλο το φάσμα του DNA που απομονώνεται από ένα περιβαλλοντικό δείγμα, καθώς τα 6 Tb αλληλούχησης του NovaSeq 6000 δεν επαρκούν (Modi et al., 2021). Τέλος η ποικιλομορφία του 16S rRNA στα βακτηριακά γονιδιώματα φέρει επιπτώσεις στις αναλύσεις βακτηριακών κοινοτήτων, λόγω του αριθμού των αντιγράφων του 16S κάθε στελέχους (Větrovský & Baldrian, 2013). Συγχρόνως με την σημαντικότητα που δείχνουν να προσφέρουν τα βακτήρια που δεν είναι σε αφθονία και ανιχνεύονται με δυσκολία (Dawson et al., 2017, Kurm et al., 2017, Han et al., 2022, Pust & Tümmler, 2022, Hibbing et al., 2009), πρέπει να βρεθούν εναλλακτικές.

Πέρα από αυτά τα προβλήματα, ένα βασικό πρόβλημα των μεθόδων μετα-ομικής και ιδιαίτερα της μεταγονιδιωματικής, αποτελεί η τοποθέτηση όλων των αλληλουχιών που αναλύονται στο ίδιο κύτταρο. Στην περίπτωση της μεταγονιδιωματικής ιδιαίτερα, κατά την συναρμολόγηση γονιδιωμάτων (genome assembly), ο συνδυασμός των συνεχειών αλληλουχίας DNA (contigs) που προέρχονται από το ίδιο χρωμόσωμα αποτελεί πρόβλημα δεδομένων ομοιοτήτων που μοιράζονται διάφορα συγγενικά στελέχη, που εν τέλει οδηγεί σε αδυναμία λήψης απόφασης ως προς τον συνδυασμό αναγνωσμάτων αλληλουχιών από τους αλγόριθμους. Ως αποτέλεσμα παρατηρούμε τον κατακερματισμό της συναρμολόγησης ενός πλήρους χρωμοσώματος ανά μικροοργανισμό με εξαίρεση πολύ σπάνιων περιπτώσεων όπου ολόκληρα χρωμοσώματα έχουν αναγνωστεί από μεθόδους αλληλούχησης 3<sup>ns</sup> γενιάς. Το φαινόμενο εντείνεται ακόμη περισσότερο στην περίπτωση που κάποιος προσπαθεί να λάβει ολόκληρο το γενετικό περιεχόμενο ενός στελέχους συμπεριλαμβανομένου του μεταθετώματος (π.χ. πλασμίδιων, ενσωματόνιων, μεταθετώνιων). Δεδομένου ότι τα γενετικά στοιχεία του μεταθετώματος φέρουν χαρακτηριστικά (π.χ. περιεχόμενο GC, συχνότητα τετρανουκλεοτιδίων, χρήση κωδικονίων, φυλλογενετικούς δείκτες) (Yang et al., 2021) που συνήθως διαφέρουν από τα αντίστοιχα του χρωμοσωμικού γενετικού περιεχομένου, καθίσταται υπερβολικά δύσκολη (ή σχεδόν αδύνατη) μία ταυτοποίηση του ξενιστή του μεταθετού στοιχείου βασιζόμενη σε αυτά τα χαρακτηριστικά (Beaulaurier et al., 2017). Μία λύση σε αυτό το πρόβλημα προσφέρουν οι

αναλύσεις μοναδιαίων κυττάρων καθώς αυτές φέρουν την εξειδίκευση στην αλληλούχηση από συγκεκριμένα στελέχη όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 ("TECHNOLOGY ▶ bitBiome, Inc.", 2022).



Εικόνα 7: Γραφική αναπαράσταση ελαττωμάτων των στατηγικών αλληλούχησης.

Πίνακας 1: Προτερήματα ανάλυσης μοναδιαίων κυττάρων έναντι σε metagenomics και 16S στρατηγικές.

| Μέθοδος              | Απομόνωση, καλλιέργεια και αλληλούχηση   | 16S rRNA αλληλούχηση  | (Shotgun) Μεταγονιδιωματική αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης | Ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων   |
|----------------------|--|---|---|---|
| Υπόστρωμα            | Απομονωμένα βακτήρια   | Περιβαλλοντικά δείγματα (μη καλλιεργήσιμοι μικροοργανισμοί) |   |   |
| Στόχος               | Πλήρως κατανόηση ενός είδους βακτηρίου   | Ανάλυση σε επίπεδο κοινότητας                               |   | Πλήρως κατανόηση του κάθε μοναδιαίου κυττάρου   |
| Αρχή της μεθόδου     | Αλληλούχηση του γονιδιώματος μιας συγκεκριμένης καλλιέργειας βακτηρίων   | Αλληλούχηση του 16S rRNA                                    | Αλληλούχηση μιας μίξης γονιδιωμάτων                         | Αλληλούχηση κάθε βακτηρίου ξεχωριστά  |
| Διακριτική ικανότητα | Στέλεχος   | Γένος   | Είδος   | Στέλεχος  |
| Αποτέλεσμα           | Αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος, πλασμιδιακές αλληλουχίες και λίστα γονιδίων του συγκεκριμένου στελέχους | Αναλογία των παρώντων μικροβίων                             | Αναλογία των παρώντων μικροβίων και γονιδίων                | Αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος, πλασμιδιακές αλληλουχίες και λίστα γονιδίων του κάθε μοναδιαίου κυττάρου |

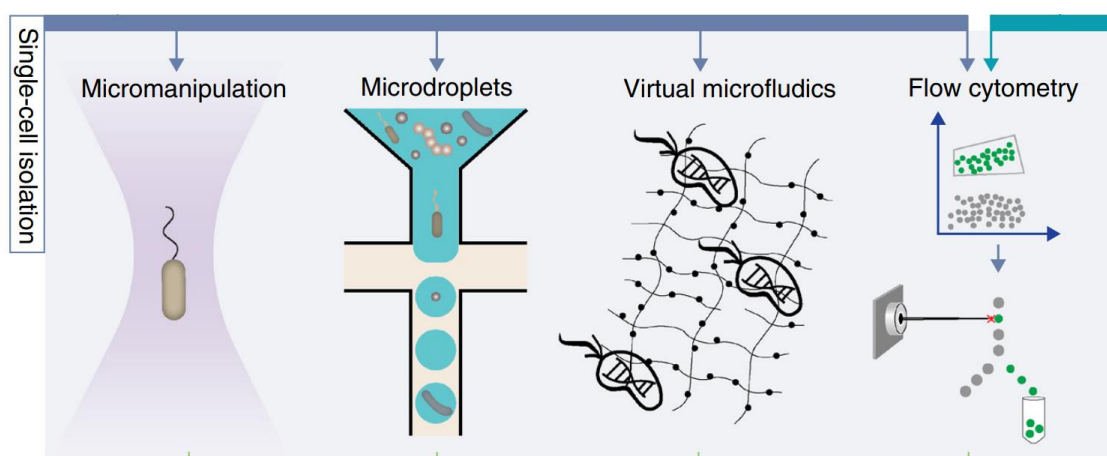


## Ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων

Η περιορισμένη-θραυσματοποιημένη μορφή των γονιδιωμάτων που προκύπτουν από τα δεδομένα μεταγονιδιωματικής χωλένου στην αναγνώριση μικροοργανισμών στο επίπεδο του στελέχους. Μικροβιακές κοινότητες δεν αναγνωρίζονται, καθώς έχουν μικρή ετερογένεια μέσα σε έναν πληθυσμό (διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους), και αυτό είναι το σημείο που αναλαμβάνει η ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων (Woyke et al., 2017).

Η πρώτη προτεραιότητα στην ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων από περιβαλλοντικά δείγματα, είναι η απομόνωση κυττάρων από το δείγμα. Τα κύτταρα θα πρέπει να είναι διασκορπισμένα και άθικτα. Σε δείγματα στα οποία τα κύτταρα δεν είναι επαρκώς διασκορπισμένα, όπως βιοφίλμ ή έδαφος, πρέπει να γίνει διαχωρισμός των συσσωματωμάτων και αποκόλληση των κυττάρων από τα μη κυτταρικά σωματίδια και υπολείμματα των κολλώδη δομών του δείγματος. Υπάρχουν γενικές οδηγίες που περιεκτικά εφαρμόζουν μηχανική πίεση όπως vortexing και sonication (Rinke et al., 2014), το κάθε δείγμα θα πρέπει να έχει το δικό τρόπο μεταχείρισης.

Ο διαχωρισμός μοναδιαίων κυττάρων είναι το σύνηθες επόμενο βήμα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8, υπάρχουν διάφοροι τρόποι διαχωρισμού των κυττάρων. Διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί είτε με μικρο-διαχωριστικό εξοπλισμό (micromanipulation), αλλά η πιο κοινές πρακτικές είναι κυτταρομετρία ροής ενεργοποιούμενη από φθορισμό (fluorescence-activated cell sorting, FACS) και η μικρορευστομηχανική (microfluidics). Στο FACS χρησιμοποιείται η ακτινοβολία για την μέτρηση χαρακτηριστικών όπως το μέγεθος των κυττάρων, η μορφολογία της κυτταρικής επιφάνειας, χρωστικές και φθορισμοφόρα (Sterpanauskas & Sieracki, 2007). Στην μικρορευστομηχανική γίνεται επικάλυψη των μοναδιαίων κυττάρων με ειδικό έλαιο, έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός από την υπόλοιπη μάζα κυττάρων και δίνεται η δυνατότητα διεξαγωγής αντιδράσεων σε έναν μονωμένο χώρο (Leung et al., 2012). Πρόσφατη τεχνολογία είναι η εικονική ρευστομηχανική, η οποία δημιουργεί στερεοχημική διαμερισματοποίηση των μοναδιαίων κυττάρων για την διεξαγωγή ξεχωριστών αντιδράσεων (Xu et al., 2016).

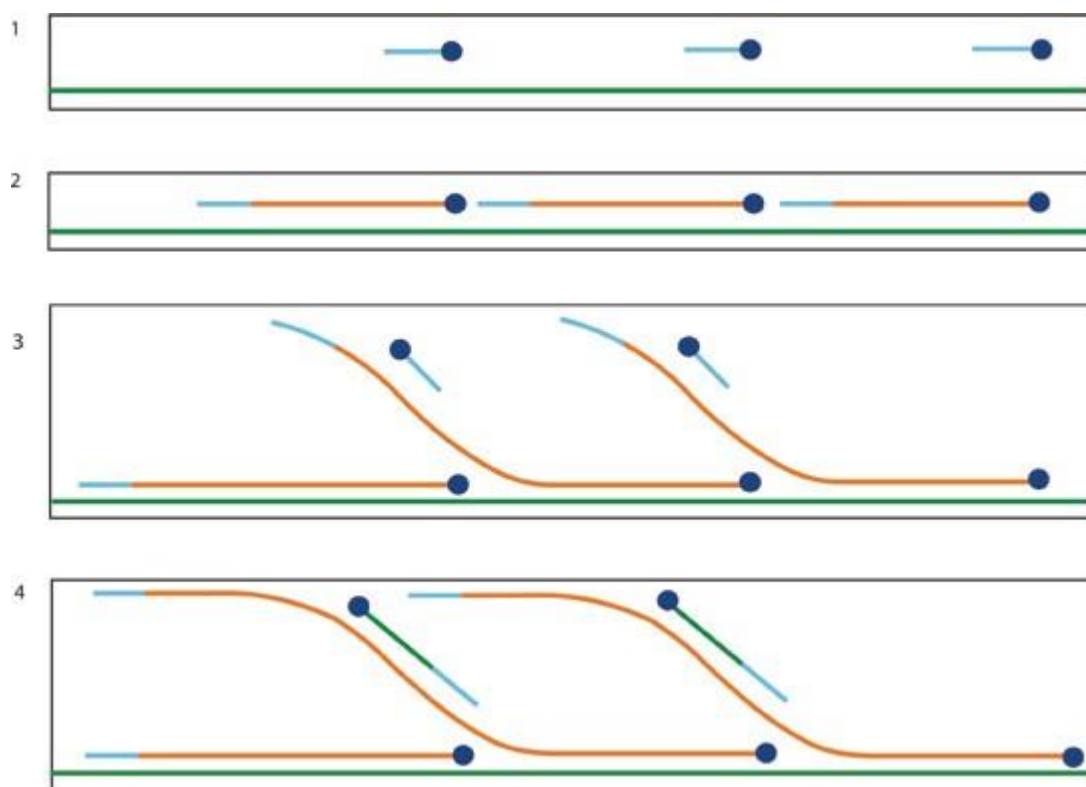


Εικόνα 8: Τρόποι διαχωρισμού κυττάρων.

Τα απομονωμένα κύτταρα πρέπει να διασπαστούν ώστε να είναι διαθέσιμο το DNA τους για ενίσχυση, καθώς τα fg DNA που περιέχει το κάθε κύτταρο είναι πολύ λίγο και πρέπει να

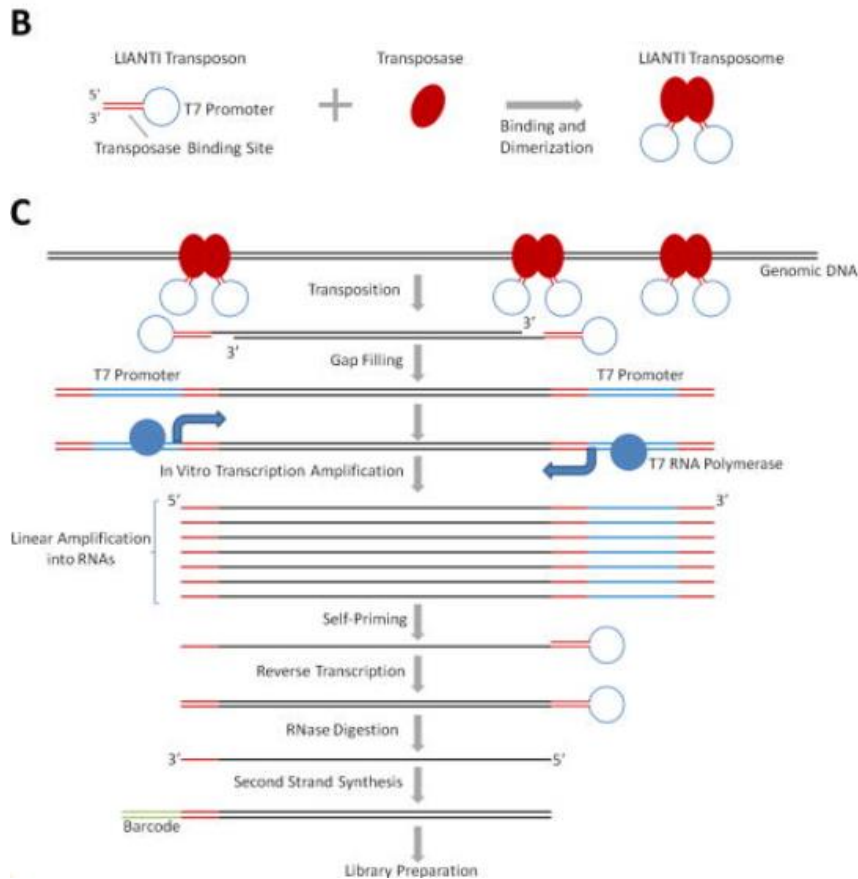
ενισχυθεί. Η λύση των κυττάρων πρέπει να είναι απαλή για την αποφυγή ρήξης του DNA. Δεν χρησιμοποιείται κάποια συγκεκριμένη τεχνική καθώς θα πρέπει να είναι συμβατή με την κάθε μεθοδολογία. Αλκαλική λύση και ενζυμική λύση είναι οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται (Blainey, 2013).

Η κάθε τεχνική συνήθως ονομάζεται από τον τρόπο ενίσχυσης του DNA. Η τεχνική της ενίσχυσης μέσω πολλαπλής αντικατάστασης (multiple displacement amplification, MDA) όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 (Spits et al., 2006) τυχαίοι εκκινητές υβριδίζουν και επιμηκύνονται από την φ29 DNA πολυμεράση (ισοθερμική ενίσχυση). Παραλλαγές του MDA υπάρχουν βασισμένοι στην ίδια τεχνική παράλληλης ισοθερμικής ενίσχυσης με τυχαίους εκκινητές MALBAC, eMDA (Wen & Tang, 2022).



Εικόνα 9: Η τεχνική της ενίσχυσης μέσω πολλαπλής αντικατάστασης (multiple displacement amplification, MDA).

Μια άλλη μέθοδος ενίσχυσης είναι η γραμμική ενίσχυση ύστερα από δράση τρανσποζάσης (Linear Amplification via Transposon Insertion, LIANTI). Η τρανσποζάση είναι ένα ένζυμο το οποίο σε μια αντίδραση κόβει το DNA και προσθέτει προσαρμογείς, μια διαδικασία που ονομάζεται tagmentation. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10 η τρανσποζάση είναι φορτωμένη με προσαρμογείς που φέρουν αλληλουχία για την υβριδοποίηση της T7 RNA πολυμεράσης για την δημιουργία των συμπληρωματικών βάσεων και ταυτόχρονα την κωδικοποίηση των τμημάτων DNA (Chen et al., 2017).



Εικόνα 10: Η τεχνική της γραμμικής ενίσχυσης ύστερα από δράση τρανσποζάσης (Linear Amplification via Transposon Insertion, LIANTI)..

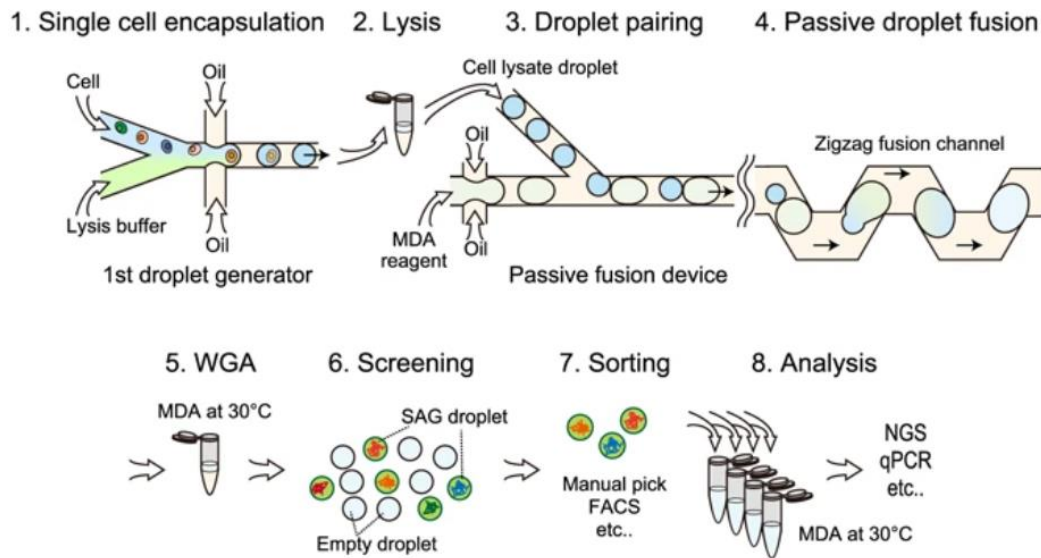
## Ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων μεγάλης κλίμακας

Ο συνδυασμός των κατάλληλων επιλογών έχει οδηγήσει σε κάποιες αρκετά ανεπτυγμένες μεθοδολογίες πολυπλεξίας.

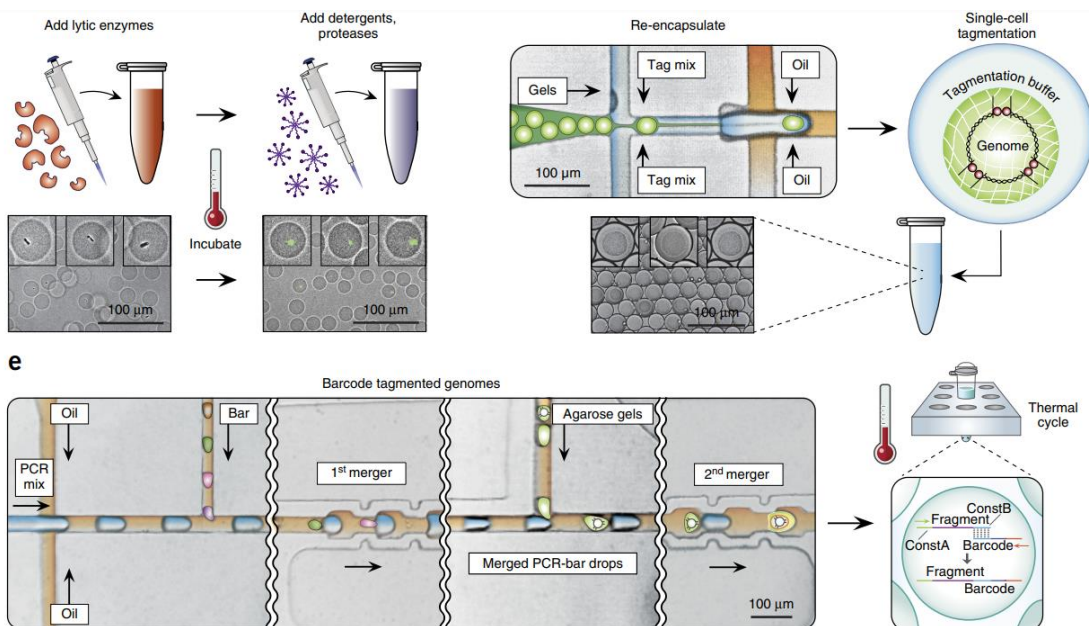
Παράλληλη ενίσχυση όλου του γονιδιώματος μοναδιαίων κυττάρων χρησιμοποιώντας σταγόνες μικρορευστομηχανικής (Hosokawa et al., 2017). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11 τα κύτταρα ύστερα από την απομόνωση τους από το δείγμα καλύπτονται με έλαιο με την χρήση της μικρορευστομηχανικής για την μοναδιαία απομόνωση τους. Ύστερα γίνεται μια επιπλέον επικάλυψη με υδρο-τζελ ή σφαιρίδια αγαρόζης και γίνεται απομάκρυνση του ελαίου. Τα καινούρια σφαιρίδια μπορούν να συγχωνευθούν με άλλες σταγόνες-σφαιρίδια που περιέχουν τα συστατικά της αντίδρασης. Κάνοντας παράλληλα πολλές χιλιάδες νανοαντιδράσεις (λύσης κυττάρων, MDA, και χρώση ενισχυμένου DNA). Τα χρωματισμένα σφαιρίδια διαχωρίζονται με FACS και ενισχύονται ξανά εκτός μικρορευστομηχανικής για κωδικοποίηση και αλληλούχηση. Ο συνδυασμός microfluidics, MDA, FACS και MDA ξανά.

Με παρόμοιο τρόπο, που φαίνεται στην Εικόνα 12, γίνεται ο συνδυασμός microfluidics, tagmentation και FACS (Lan et al., 2017). Ίδια τεχνική με σφαιρίδια πηχτής που

απομονώνουν τα κύτταρα και ενισχύεται το DNA ύστερα από θραυσματοποίηση με παράλληλες αντιδρασεις τρανσποζάσης.



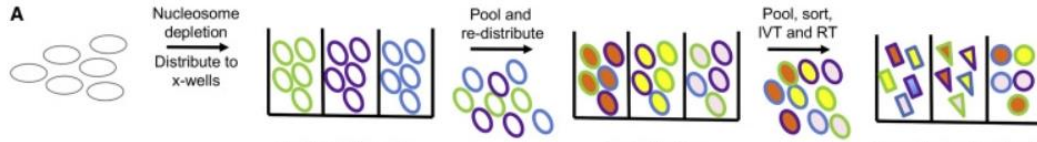
Εικόνα 11: 1. Επικάλυψη των μοναδιαίων κυττάρων 2. Λύση των κυττάρων 3-4. Συγχώνευση των σταγονιδίων με τα σφαιρίδια των κυττάρων 5. Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος μέσα στο σφαιρίδιο με την τεχνική MDA 6. Χρώση με φθορισμοφόρο που προσδέεται στο DNA 7. Διαλογή των κυττάρων με FACS και 8. Αλληλούχηση και ανάλυση.



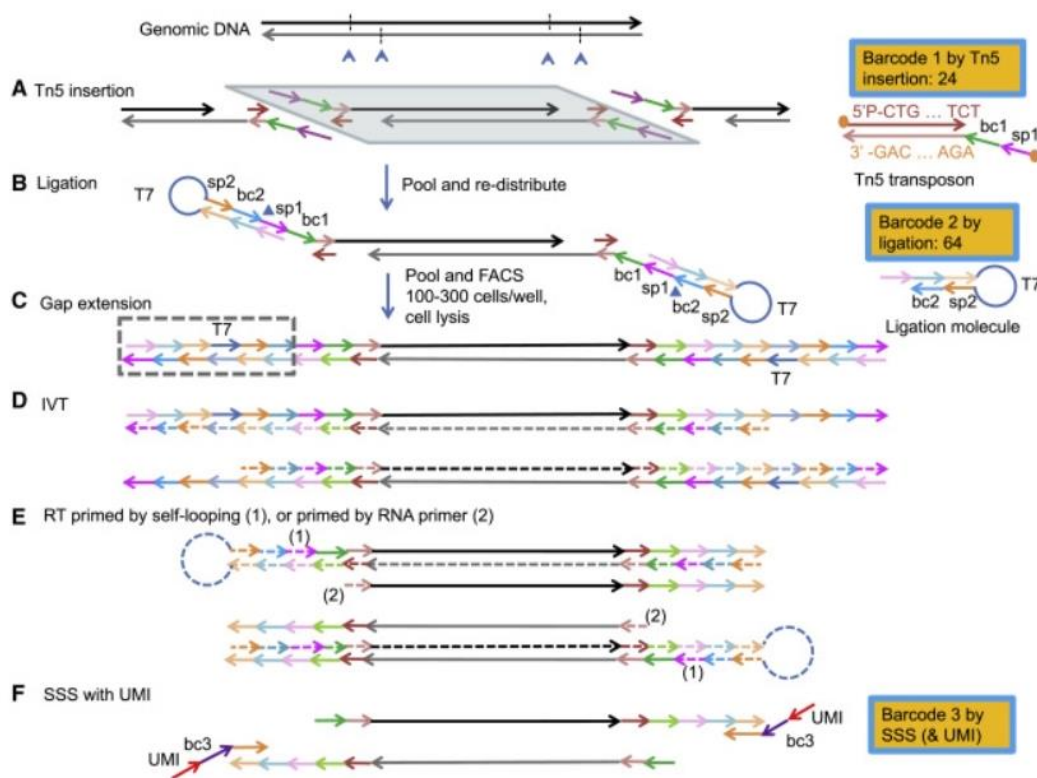
Εικόνα 12: Όμοια τεχνική με την Εικόνα 11 αλλά με ενίσχυση του DNA μέσω tagmentation μέσα στο σφαιρίδιο του κυττάρου.

Τέλος, μια επέκταση της τεχνικής LIANTI (Yin et al., 2019). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13 χρησιμοποιούνται πυρήνες κυττάρων ύστερα από απομόνωση μονιμοποιούνται και σε με την τεχνική διαχωρισμού- επανένωσης (split-pool) προστίθενται βαθμοί κωδικοποίησης για

υψηλή πολυπλεξία. Τα μονιμοποιημένα και διάτρητα κύτταρα υποβάλλονται σε tagmentation και πριν την συμπλήρωση με την T7 RNA πολυμεράση, προστίθενται με αντίδραση λιγάσης ένας ακόμα βαθμός κωδικοποίησης. Στο τέλος της διαδικασίας τα κύτταρα διαχωρίζονται με FACS και προστίθενται ακόμα ένας βαθμός κωδικοποίησης με PCR (Εικόνα 14). Ο συνδυασμός tagmentation, ligation, linear amplification, FACS και PCR.



Εικόνα 13: Η τεχνική του Split-pool.



Εικόνα 14: Α. Θραυσματοποίηση του DNA μέσα στους πυρήνες από το tagmentation και εισαγωγή των προσαρμογών της τρανσποζάσης. Β. Αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη του δεύτερου βαθμού τιτλοποίησης. C. Συμπλήρωση με την T7 RNA pol D-F. Ενίσχυση με PCR και προσθήκη 3 βαθμού τιτλοποίησης.

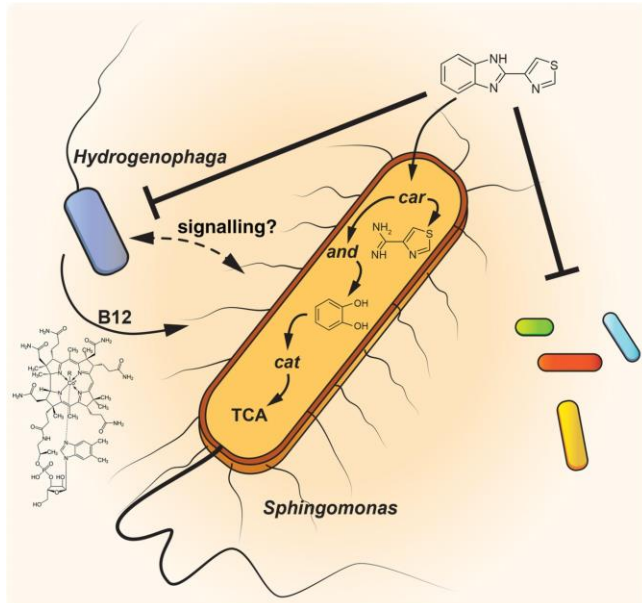
Οι τρεις παραπάνω τεχνικές είναι οι καλύτερες την παρούσα περίοδο καθώς τείνουν στην πολυπλεξία και έτσι την μείωση του κόστους, που είναι το κύριο πρόβλημα της ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων.

## Thiabendazole (TBZ), βακτηριακή κοινοπραξία thiabendazole.

Η παρούσα μελέτη έχει ως απώτερο σκοπό την γονιδιωματική ανάλυση της βακτηριακής κοινοπραξίας καταβολισμού του thiabendazole σε επίπεδο κυττάρου. Το thiabendazole (TBZ) είναι μια βενζυλιμιδαζόλη, η οποία χρησιμοποιούνταν ως μυκητοκτόνο σε καρπούς μετασυλλεκτικά (D'Aquino, Palma, Angioni and Schirra, 2013) και ως αντιπαρασιτικό στην κτηνοτροφία (Panic, Duthaler, Speich and Keiser, 2014). Η δράση του αναστέλλει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, και συνεπώς την κυτταρική ανάπτυξη. (Abongwa, Martin and Robertson, 2017, Özkay, Tunalı, Karaca and İzikdağ, 2011, Zhou et al., 2016). Με όμοια δράση αναστολής μικροσωληνίσκων, παρεμποδίζονται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες στους προκαρυώτες. Οι FtsZ πρωτεΐνες που διαμορφώνουν τον κύκλο διαχωρισμού, απαραίτητο για τον διαχωρισμό των κυττάρων-απογόνων (Kumar et al., 2010, Sarcina and Mullineaux, 2000, Slayden, 2006).

Το TBZ έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας ρύπανσης λόγω της υψηλής εμμονής του σε περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα (Χρόνος φυσικής διάσπασης κατά το ήμισυ [dissipation time 50% (DT50) > 365 ημέρες] (US EPA, 2002)

Βακτηριακά στελέχη με την ικανότητα καταβολισμού του thiabendazole είναι χρήσιμα στην βιοαποικοδόμηση και στην μείωση του περιβαντολλογικού αποτυπώματος. Η βακτηριακή κοινοπραξία που μελετάται στην παρούσα πτυχιακή είναι εμπλουτισμένη από έδαφος πλούσιο σε thiabendazole ύστερα από χρόνια χρήση και έχει την ικανότητα καταβολισμού του. Η κοινοπραξία αποτελείται κυρίως από πρωτεοβακτήρια με κύριο ρόλο στην αποικοδόμηση ένα στέλεχος *Sphingomonas* (Perruchon et al., 2017). Η μη απομόνωση κάποιου μεμονομένου στελέχους, αποτελεί ένδειξη για την συνεργατική διάσπαση του thiabendazole. Περεταίρω ανάλυση από (Vasileiadis et al., 2022) κατέδειξε πως συστατικά της κοινοπραξίας δεν έχουν απλά μια συνεργατική σχέση αλλά διακατέχονται από μια αλληλεξάρτηση για την επιβίωση, συμπεριλαμβάνοντας αμινοξέα και βιταμίνες. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15 ύστερα από συγκριτική μεταγονιδιωματική και μεταμεταγραφομική ανάλυση αποκαλύφθηκε το μονοπάτι καταβολισμού του thiabendazole και μεταφορά βιταμίνης B12 από άλλο στέλεχος για την επίτευξη του καταβολισμού, ώστε τα ίδια να επιβιώσουν.

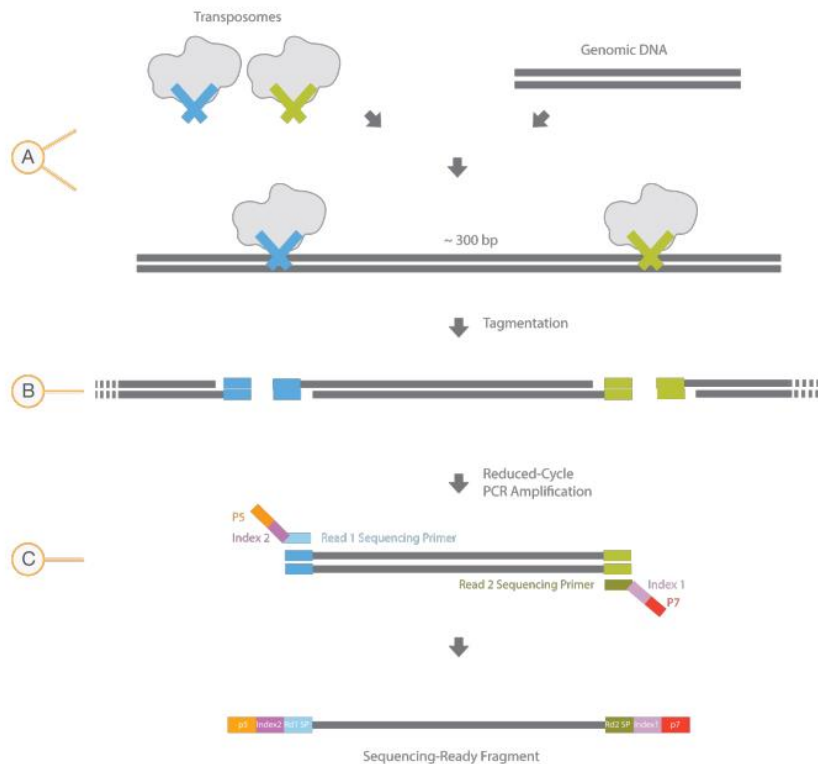


Εικόνα 15: Η βακτηριακή κοινοπραξία. Το κύριο στέλεχος *Sphingomonas* κωδικοποιεί το μονοπάτι καταβολισμού του TBZ. Τα οπερόνια *car/cat* εμπλέκονται, βασισμένα στον καταβολισμό κατεχολών. Τα τελικά προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον βακτηριακό κύκλο του *Krebs* και να παρέχουν ενέργεια για την επιβίωση της κοινοπραξίας μόνο με το TBZ.

## Πειραματικός σχεδιασμός

Για την μελέτη των μοναδιαίων κυττάρων μιας βακτηριακής κοινοπραξίας και την παρουσίαση αποτελεσμάτων σε μια πρώιμη μορφή στήθηκε ο παρακάτω πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήθηκε από την συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία.

- ✓ Ανάπτυξη των κυττάρων που καταβολίζουν thiabendazole
- ✓ Μονιμοποίηση των κυττάρων για την σταθεροποίηση των εσωτερικών υποκυτταρικών συστημάτων
- ✓ Διάτρηση των κυττάρων για την δημιουργία πόρων άρα και οδών για την είσοδο της τρανσποζάσης
- ✓ Τυχαία θραυσματοποίηση και προσθήκη προσαρμογέων στο DNA στο εσωτερικό των κυττάρων
- ✓ Ενίσχυση του DNA για την διαπίστωση ύπαρξης των επιθυμητών προσαρμογέων
- ✓ Κλωνοποίηση και αλληλούχηση Sanger για την αναγνώριση του DNA εσωτερικά των προσαρμογέων



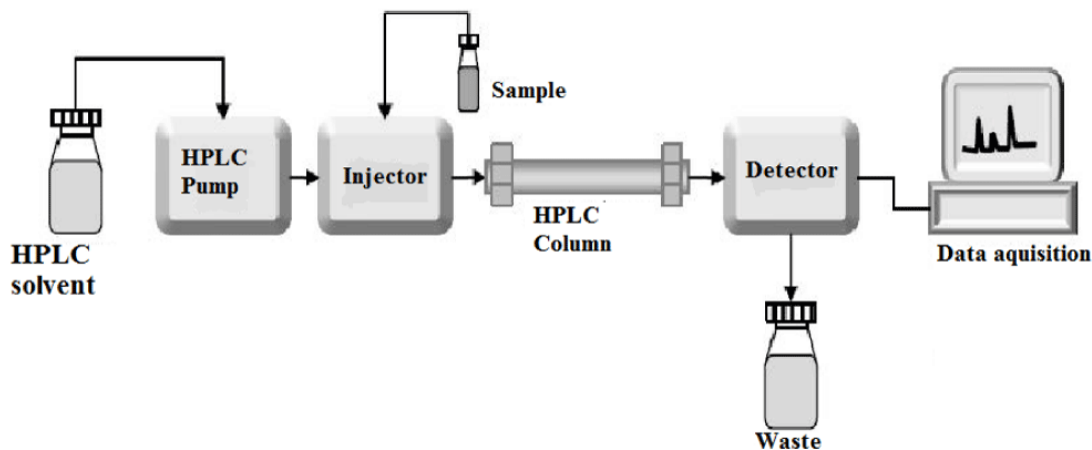
Εικόνα 16: Η περίληψη του πειραματικού σχεδιασμού που συμβαίνει μέσα στο κύτταρο.

## Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν

- **ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ/ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)**

Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) συνίσταται κυρίως από μία αντλία, έναν εγχυτήρα δείγματος, μία στήλη και έναν ανιχνευτή υπεριωδών ακτινών UV (Kiso et al., 1996). Όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές περιλαμβάνουν μία κινητή φάση (mobile phase or custom phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος- μέσω μιας στατικής φάσης (stationary phase). Η στατική φάση είναι πολική και η κινητή φάση είναι μη πολική. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής αγκιστείας των συστατικών με την κινητή και στατική φάση (Abdu Hussien, 2022). Στο τέλος, τα συστατικά εκλούνται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους ανάλογα με το βαθμό πολικότητας και ανιχνεύονται με φασματοσκοπικές τεχνικές κατά την έξοδο από τη στήλη. Η HPLC είναι η εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, με κύρια διαφορά την μη επίδραση της βαρύτητας, αλλά την έκλυση με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό προσδίδει ταχύτητα και μειώνει το μέγεθος της στήλης.

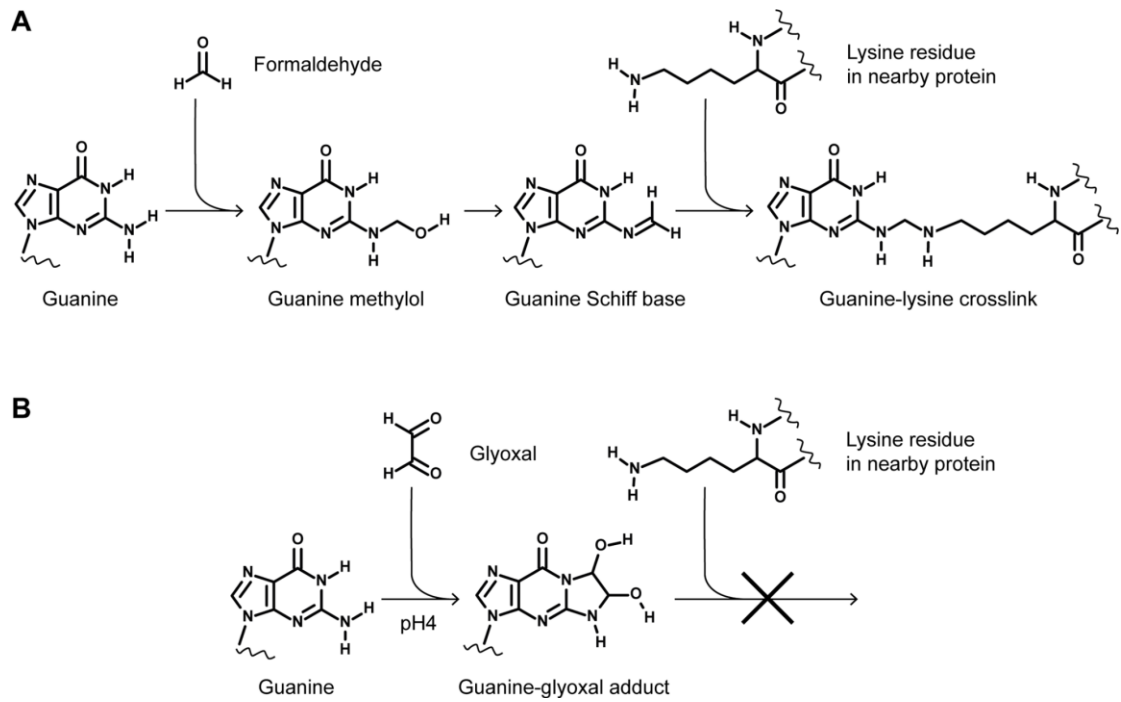




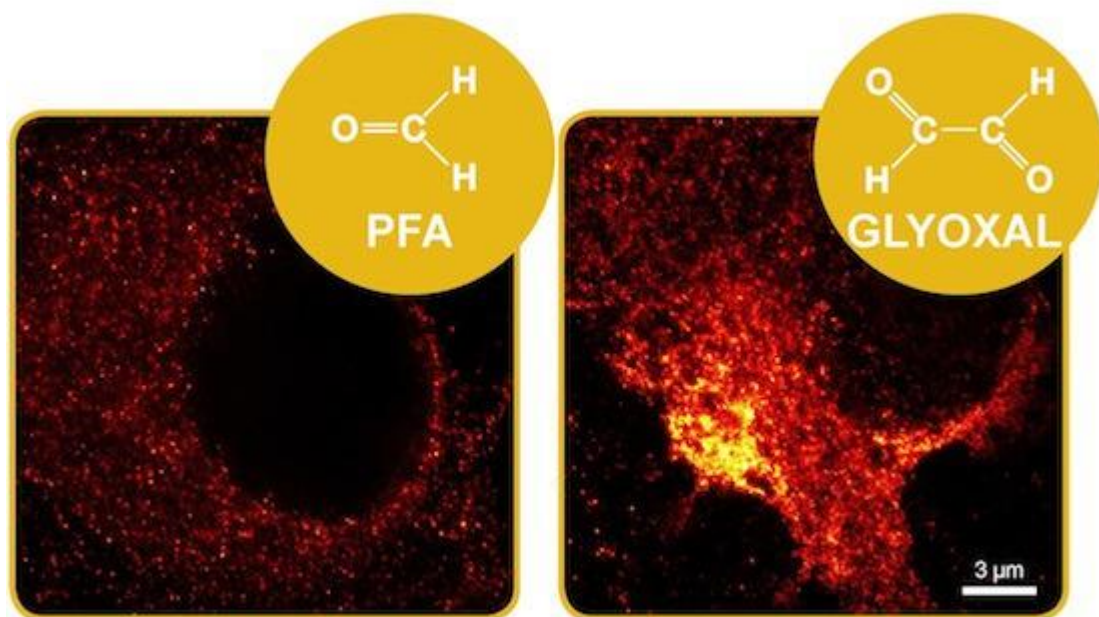
Εικόνα 17: Τα μέρη της HPLC

## ● ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μονιμοποίηση των κυττάρων είναι ένα απαραίτητο βήμα για την διατήρηση δειγμάτων που περιέχουν κύτταρα. Αυτή η διαδικασία γίνεται για μια ευρεία γκάμα βιολογικών πειραμάτων όπως ιστοχημική και κυτταροχημική ανάλυση. Για τις αναλύσεις αυτές η παραφορμαλδεΰδη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και έχει καθιερωθεί ως το καλύτερο μονιμοποιητικό χημικό λόγω της ικανότητας να συνδέει-μονιμοποιεί τα περισσότερα ενδοκυτταρικά και εξοκυτταρικά περιεχόμενα (Kim, Kim, Okajima and Cho, 2017). Η μονιμοποίηση των κυττάρων στοχεύει στην διατήρηση των κυτταρικών συστατικών σε ένα life-like state, αποτρέποντας μη αναμενόμενες αλλαγές και καθιστώντας τα κύτταρα διαθέσιμα για παρατήρηση και επεξεργασία. Η παραφορμαλδεΰδη εισχωρεί ανάμεσα στα μόρια μονιμοποιώντας-ενώνοντας μεταξύ τους την κυτταρική μεμβράνη, τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τον κυτταροσκελετό και τα νουκλεϊκά οξέα. Εναλλακτική στην παραφορμαλδεΰδη είναι η γλυοξάλη η οποία δρα με τον ίδιο τρόπο (περνώντας την μεμβράνη και ενώνοντας τα υποκυτταρικά συστατικά)(Richter et al., 2017). Η γλυοξάλη χρησιμοποιείται γιατί είναι λιγότερο τοξική, πιο γρήγορη, προσδένει πιο δυνατά τις πρωτεΐνες και λιγότερο τα νουκλεϊκά οξέα. Τα νουκλεϊκά οξέα καθίστανται πιο διαθέσιμα λόγω της διαφορετικής φυσικοχημικής σύστασης της γλυοξάλης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18 η γλυοξάλη δημιουργεί ενώσεις μεταξύ πρωτεϊνών πανομοιότυπα με την παραφορμαλδεΰδη. Διαφορετικά δρα με τα νουκλεϊκά οξέα, δημιουργώντας σταθερούς δεσμούς μόνο με την γουανίνη. Παράλληλα το προϊόν της σύνδεσης της γουανίνης με την γλυοξάλη δεν ενώνεται με τα κατάλοιπα των πρωτεϊνών (Channathodiyil and Houseley, 2021). Για τον σχηματισμό του συμπλόκου γουανίνης-γλυοξάλης η γουανίνη πρέπει να είναι αδέσμευτη. Μόνο στο RNA ή σε αποδιεταγμένο DNA μπορεί να γίνει η αντίδραση. Ο ένας δεσμός στο RNA και κανένας στο DNA καθιστά την γλυοξάλη κατάλληλο χημικό μονιμοποίησης για την μελέτη και επεξεργασία νουκλεϊκών οξέων σε μονιμοποιημένα κύτταρα (Nakaya, Takenaka, Horinishi and Shibata, 1968).



Εικόνα 18: Η σύνδεση της παραφορμαλδεΐδης και της γλυοξάλης μεταξύ πρωτεϊνικών καταλοίπων και αζωτούχων βάσεων.



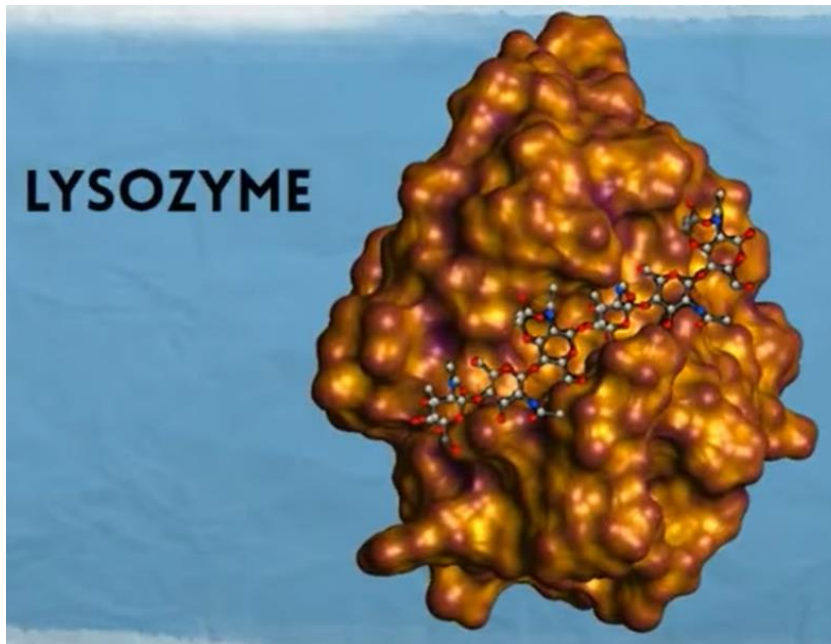
Εικόνα 19: Μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΐδη (PFA) και γλυοξάλη (GLYOXAL) και οι χημικοί τους τύποι.

## ● ΔΙΑΤΡΗΣΗ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

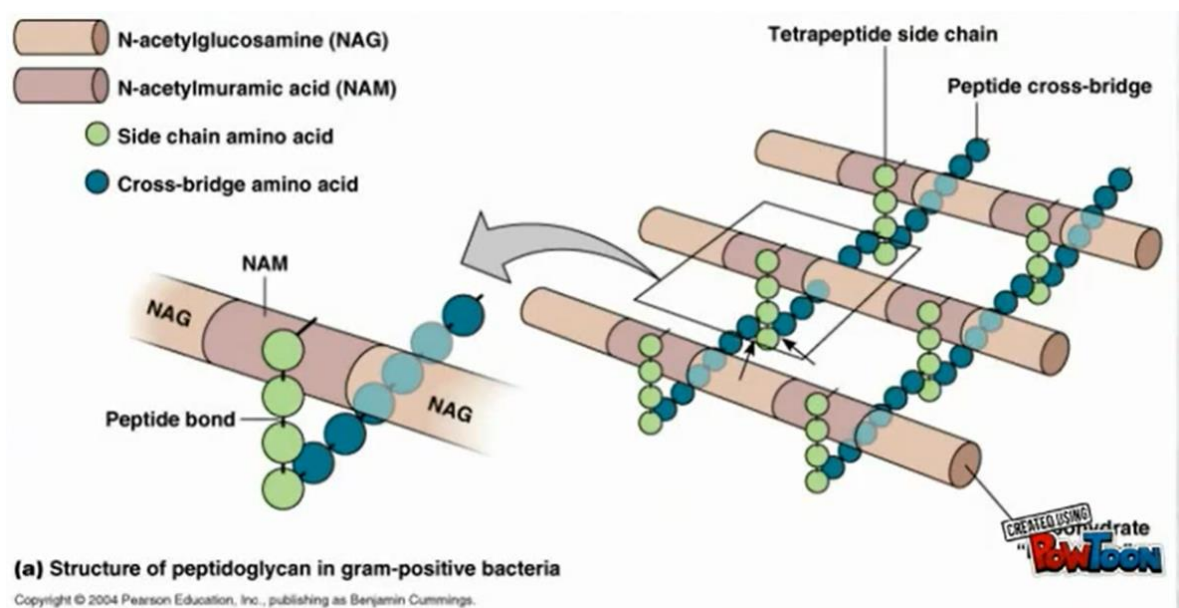
Η διάτρηση μονιμοποιημένων κυττάρων εξυπηρετεί στην προσβασιμότητα εντός του κυττάρου διατηρώντας την μορφή, τις ιδιότητες και το DNA του. Η διάτρηση γίνεται μέσω της λυσοζύμης. Η επιλογή της λυσοζύμης έγινε καθώς είναι μια κατιοντική πρωτεΐνη

μεγέθους 14 kDa και βρίσκεται σε αφθονία. Η λυσοζύμη υδρολύει τους β γλυκοσιδικούς δεσμούς ανάμεσα στον C1 άνθρακα του N-ακέτυλο μουραμικού (NAM) και του C4 άνθρακα της N-ακέτυλο γλυκοζαμίνης (NAG). Ο κύριος στόχος της είναι η πεπτιδογλυκάνη, ένα γλυκοσιδικό πολυμερές που απαρτίζει το κυτταρικό τοίχωμα της πλειονότητας των βακτηρίων. Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από αλυσίδες εναλλασσόμενων μορίων NAM και NAG που διασυνδέονται παράλληλα με μικρά πεπτίδια (Abdali, 2014).

Η λυσοζύμη ανακαλύφθηκε και ονομάστηκε από τον Sir Alexander Fleming και εμπεριέχεται κυρίως σε ανοσολογικά υγρά λόγω της ικανότητας διάσπασης των βακτηριακών κυττάρων. Η περιορισμένη, χρονικά, δράση της λυσοζύμης σε ένα μονιμοποιημένο κύτταρο δεν αποτελεί κίνδυνο καταστροφής της μορφολογίας του αλλά μόνο την δημιουργία οπών (Ganz, 2006).



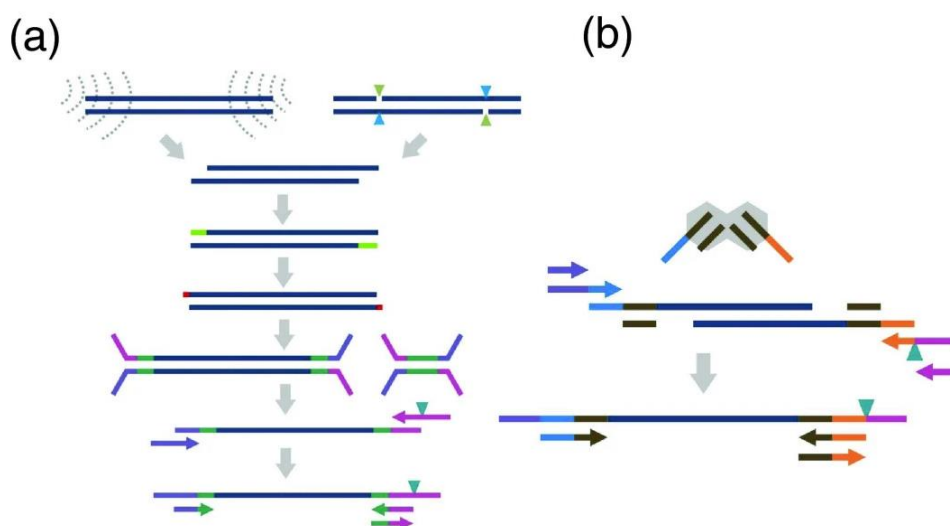
Εικόνα 20: Η πρωτεϊνική δομή της λυσοζύμης και το ενεργό της κέντρο διάσπασης πεπτιδίων.



Εικόνα 21: Η δομή της πεπτιδογλυκάνης στα gram θετικά βακτήρια.

- **ΤΥΧΑΙΑ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ (TAGMENTATION)**

Η τυχαία θραυσματοποίηση και τιτλοποίηση του DNA χρησιμεύει στην διαθεσιμότητα μικρών θραυσμάτων DNA με τους κατάλληλους προσαρμογείς για την αλληλούχηση νέας γενιάς. Οι δύο παραπάνω αντιδράσεις γίνονται ταυτόχρονα από τα ένζυμα τρανσποζάσες. Οι τρανσποζάσες αποτελούν μεταθετά στοιχεία του DNA. Αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν για αυτές έχουν ανακαλυφθεί με κυριότερο το *tn5*. Παραλλαγές αυτού του ενζύμου, ύστερα από την εισαγωγή συνώνυμων μεταλλάξεων που χάνουν την εξειδίκευση για συγκεκριμένα νουκλεοτίδια και η επιθυμητή αλληλουχία προσαρμογέων που προστίθενται ύστερα από την τμήση του DNA, το καθιστούν την τέλεια επιλογή για υψηλής κλίμακας πειράματα αλληλούχησης. Η διπλή αντίδραση αυτή αντικαθιστά την παλαιότερη και κατά πολύ πιο χρονοβόρα μέθοδο όπου το DNA έπρεπε να τεμαχιστεί είτε μηχανικά είτε από άλλες ενδονουκλεάσες, ακολουθούμενο από ευθυγράμμιση των άκρων, προσθήκη ουρές αδενινών, αντίδραση λιγάσης και PCR όπως φαίνεται στην Εικόνα 22. Η εξελικτική πίεση μέσα στους οργανισμούς έχει οδηγήσει την σχετικά αργή δράση του ενζύμου. Τα μεταλλαγμένα ένζυμα φέρουν συνώνυμες μεταλλάξεις που απελευθερώνουν την ταχύτητα δράσης τους, καθιστώντας τα υπερενεργά (Adey et al., 2010).

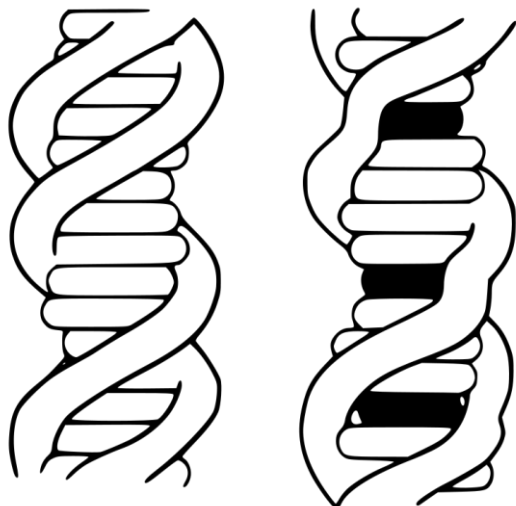


Εικόνα 22: (a) Η παλαιότερη τεχνική προετοιμασίας βιβλιοθηκών. (b) Η δύο σε ένα αντίδραση της τρανσποζάσης *tn5* τεμαχίζοντας και προσθέτοντας προσαρμογείς.

- **ΧΡΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ**

Η χρώση των δειγμάτων ή στην συγκεκριμένη περίπτωση η χρώση του ολικού DNA με ιωδιούχο προπίδιο εξυπηρετεί στην παρατήρηση μέσω του συνεστιακού μικροσκοπίου. Το ιωδιούχο προπίδιο (PI) είναι μια κόκκινη φθορίζουσα χρωστική η οποία δεν διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες ζωντανών κυττάρων, και συνήθως χρησιμοποιείται στη χρώση νεκρών κυττάρων ή πυρήνων. Το PI προσδένεται στο DNA και παρεμβάλλεται ανάμεσα στις

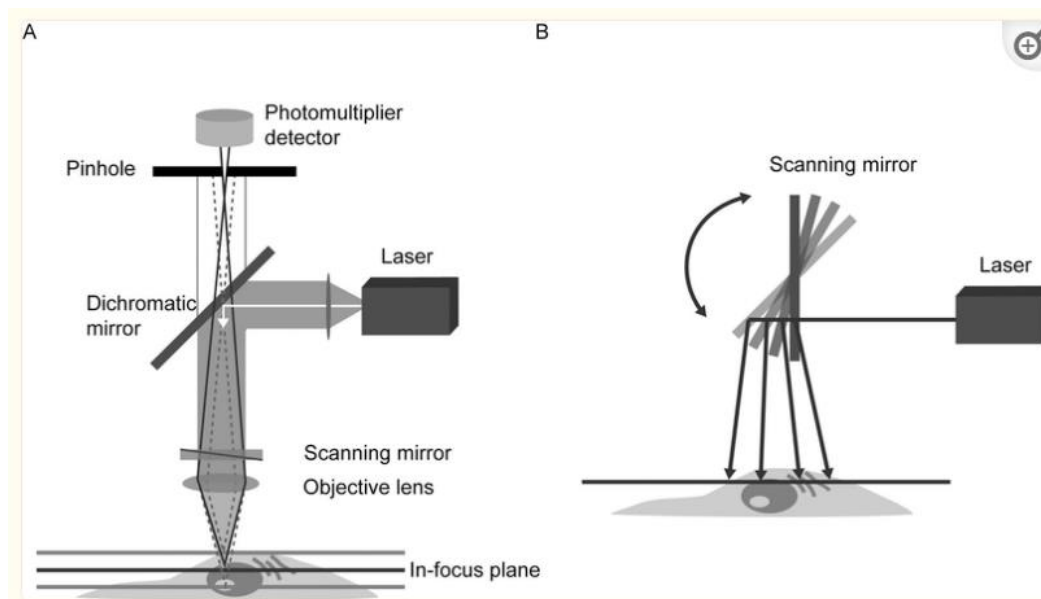
αζωτούχες βάσεις του DNA όπως φαίνεται στην Εικόνα 23, χωρίς προτίμηση σε κάποια αλληλουχία και πρόσδεση ενός μορίου PI ανά 4-5 βάσεις DNA. Το PI επίσης προσδέεται και στο RNA. Αφότου ενωθεί με τα νουκλεϊκά οξέα, ο φθορισμός του αυξάνεται 20 έως 30 φορές. Μέγιστη τιμή διέγερσης στα 535 nm και μέγιστη τιμή εκπομπής στα 617 nm. (Hare and Johnston, 2011).



Εικόνα 23: Η θέση που παρεμβάλλεται το ιωδιούχο προπίδιο στο DNA.

Στο οπτικό μικροσκόπιο το φως διαπερνά το δείγμα ομοιόμορφα στο πεδίο παρατήρησης. Για πιο ογκώδη δείγματα, ο αντικειμενικός φακός δεν έχει το επιθυμητό βάθος εστίασης, δηλαδή δεν μπορεί να εστιάσει ταυτόχρονα και στις κορυφές αλλά και στις κοιλάδες του δείγματος. Η διαφορετική μορφολογία του δείγματος επιτρέπει στο φως να διαπερνά από το πεδίο του δείγματος αλλά και εκατέρωθεν του πεδίου. Το φως εκτός πεδίου θα προσθέσει θολρότητα στην Εικόνα και θα μειώσει την ανάλυσή της. Στην μικροσκοπία φθορισμού, κάθε μόριο χρωστικής στο πεδίο παρατήρησης θα διεγερθεί, συμπεριλαμβανομένου και των εκτός εστίασης. Η συνεστιακή μικροσκοπία προσφέρει ένα τρόπο για την αποφυγή του εκτός εστίασης φωτός ή άλλης παρεμβολής από τον ανιχνευτή διατηρώντας την ανάλυση της Εικόνας. Αυτή η τεχνική δίνει την δυνατότητα της παρατήρησης και απαθανάτισης μεγάλου όγκου δειγμάτων. Σε ένα συνεστιακό μικροσκόπιο, η δεσμίδα φωτός και το σύστημα ανίχνευσης είναι εστιασμένα στο ίδιο σημείο του δείγματος, το οποίο είναι το μόνο σημείο που αναλύεται και απεικονίζεται από το σύστημα του ανιχνευτή κατά την διάρκεια της σάρωσης. Για την δημιουργία της ολοκληρωμένης Εικόνας, το σημείο σάρωσης μετακινείται συλλέγοντας, κομμάτι-κομμάτι, υψηλής ευκρίνειας δεδομένα. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι πως η οπτική επεξεργασία και παρατήρηση επιτρέπεται, η οποία βοηθάει στην τριδιάστατη ανακατασκευή του δείγματος, από ένα σύνολο εικόνων που συσσωρεύονται η μία πάνω στην άλλη (Paddock, 2000). Τα βασικά μέρη ενός συνεστιακού μικροσκοπίου, όπως φαίνονται στην Εικόνα 24, είναι η οπή παρατήρησης, οι αντικειμενικοί φακοί, οι χαμηλού θορύβου ανιχνευτές, οι καθρέπτες σάρωσης, φίλτρα για την απομόνωση συγκεκριμένων μηκών κύματος και ακτίνες λέιζερ ως πηγή φωτός και για την διέγερση. Καθώς τα λέιζερ αερίου (αργού και ηλίου-νέον) ακόμα χρησιμοποιούνται, λέιζερ διόδου, λέιζερ ινών και λέιζερ στερεάς φάση είναι πολύ διαδεδομένα. Αυτές οι πηγές φωτός είναι πιο σταθερές, πιο καθολικά χρησιμοποιούμενες, λιγότερο θερμοπαραγωγικές και εκπέμπουν σε ευρύ φάσμα. Οι ανιχνευτές είναι υψηλής ευαισθησίας φωτόπολλαπλασιαστές λόγω στην φωτο-

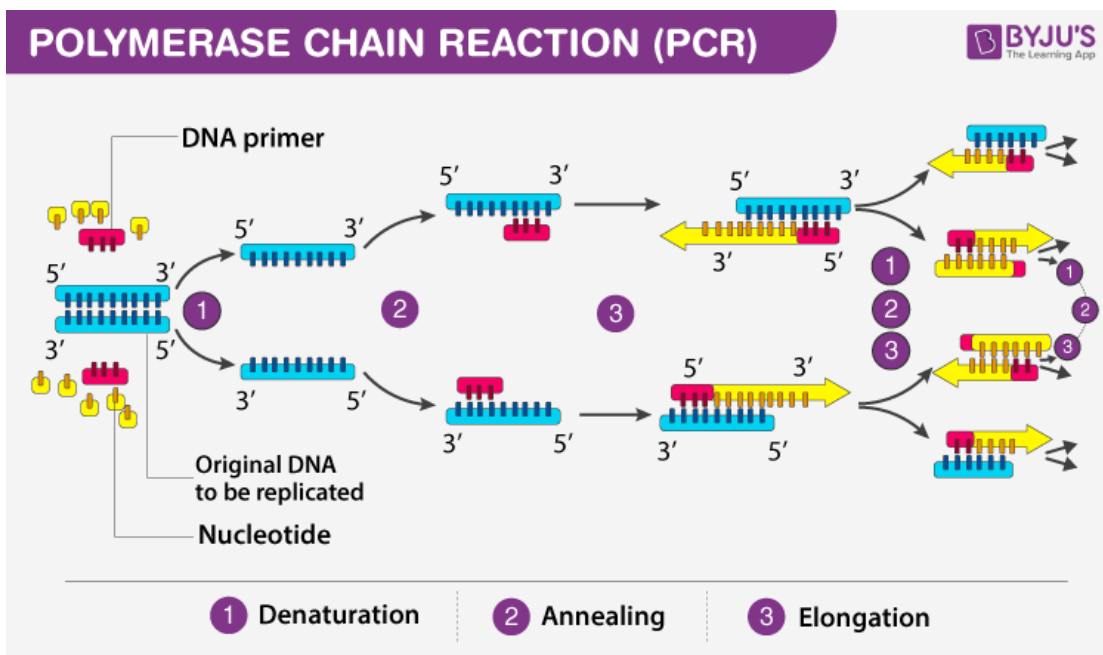
ανακλαστική φύση του συνεστιακού μικροσκοπίου. Αυτά είναι ουσιαστικά μικρές σημειακές κάμερες που μεγιστοποιούν την πτώση της ακτινοβολίας (Elliott, 2019).



Εικόνα 24: Α) Τα μέρη που απαρτίζουν το συνεστιακό μικροσκόπιο και η ροή του φωτός για την αποφυγή θολερότητας. Β) Ο τρόπος κίνησης του καθρέφτη σάρωσης για την λήψη των πολλαπλών εικόνων και δημιουργίας της τριδιάστατης Εικόνας του δείγματος.

## ● ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

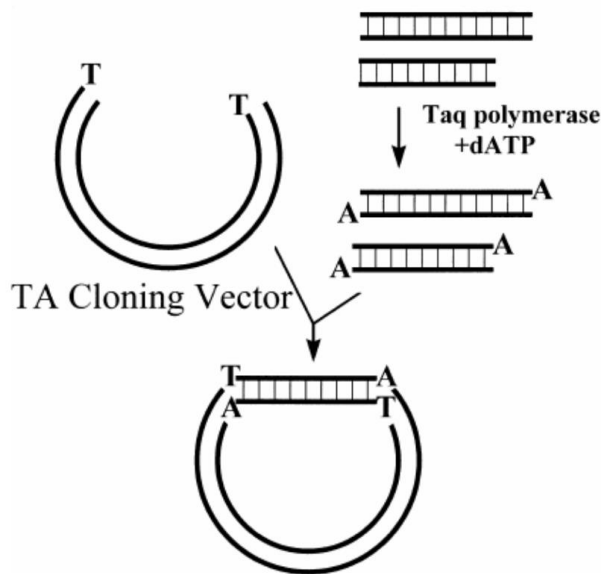
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης τμημάτων νουκλεϊκών οξέων *in vitro*. Η PCR χρησιμοποιείται κυρίως για τον πολλαπλασιασμό-ενίσχυση του DNA. Τα βασικά συστατικά για μια αντίδραση PCR είναι: DNA πολυμεράση, ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητές, νουκλεοτιδική αλληλουχία στόχος (εκμαγείο), ρυθμιστικό διάλυμα δράσης, άλατα μαγνησίου και δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Η PCR έχει κυρίως τρία βασικά στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά όπως φαίνεται στην Εικόνα 25: 1) Αποδιάταξη: Οι δύο κλώνοι του DNA αποδιάσσονται με τη βοήθεια της υψηλής θερμοκρασίας. 2) Υβριδισμός εκκινητών: Οι εκκινητές υβριδίζουν στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA στην κατάλληλη θερμοκρασία. 3) Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (προέκταση του εκκινητή) αυξάνουμε τη θερμοκρασία στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της συνήθως χρησιμοποιούμενης Taq πολυμεράσης (πολυμεράση απομονωμένη από το θερμοφίλο στέλεχος *Thermus aquaticus*). Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxy nucleotide triphosphates, dNTPs). Η συμπληρωματική αλληλουχία DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται σε θερμοκυκλοποιητή, συσκευή που φέρει θερμαινόμενες θέσεις για τα ειδικά σωληνάκια που μπορούν να εναλλάσσουν θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Πάνω από αυτές τις θέσεις υπάρχει μια πλάκα με σταθερή θερμοκρασία άνω των 95°C, η οποία αντικαθιστά την χρήση μηχανέλαιου που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα για την αποφυγή εξάτμισης των δειγμάτων. Ο θερμοκυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία ρυθμίσουμε την θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου (Green and Sambrook, 2018).



Εικόνα 25: Η αντίδραση PCR. Με μπλε εμφανίζεται το εκμαγείο DNA, με κόκκινο οι εκκινήτες και κίτρινο τα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Τα στάδια της PCR περιγράφονται 1) Αποδιάταξη 2) Υβριδοποίηση 3) Επιμήκυνση.

## ● ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΘΥΜΙΝΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ (TA)

Η κλωνοποίηση θυμίνης αδενίνης (TA) χρησιμεύει στην εισαγωγή σε πλασμιδιακούς φορείς ένα άγνωστο κομμάτι DNA ύστερα από PCR ενίσχυση. Η ικανότητα της Taq, και γενικότερα τις πολυμεράσες που δεν έχουν δράση 3' 5' εξωνουκλεάσης, να προσθέτουν στο 3' άκρο του κάθε ενισχυμένου προϊόντος μια αδενίνη, προσφέρει μία πολύ καλή μέθοδο για κλωνοποίηση άγνωστων προϊόντων PCR. Το μη συμπληρωμένο άκρο αδενίνης μπορεί να ενωθεί με έναν γραμμικό φορέα που φέρει ένα μη συμπληρωμένο κατάλοιπο θυμίνης όπως φαίνεται στην Εικόνα 26. Για προϊόντα PCR που δεν έχουν μονό κατάλοιπο αδενίνης μπορεί να γίνει μια αντίδραση προσθήκης δεοξαδενοσίνης (Kawata, Yano and Kojima, 1998). Τα δύο κύρια προτερήματα της κλωνοποίησης TA είναι η ταχύτητα και η αποφυγή χρήσης περιοριστικών ενδονουκλεασών (Green and Sambrook, 2021).



Εικόνα 26: Η κλωνοποίηση TA ύστερα από την προσθήκη μη συμπληρωμένης δεοξυαδενοσίνης .

## ● ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

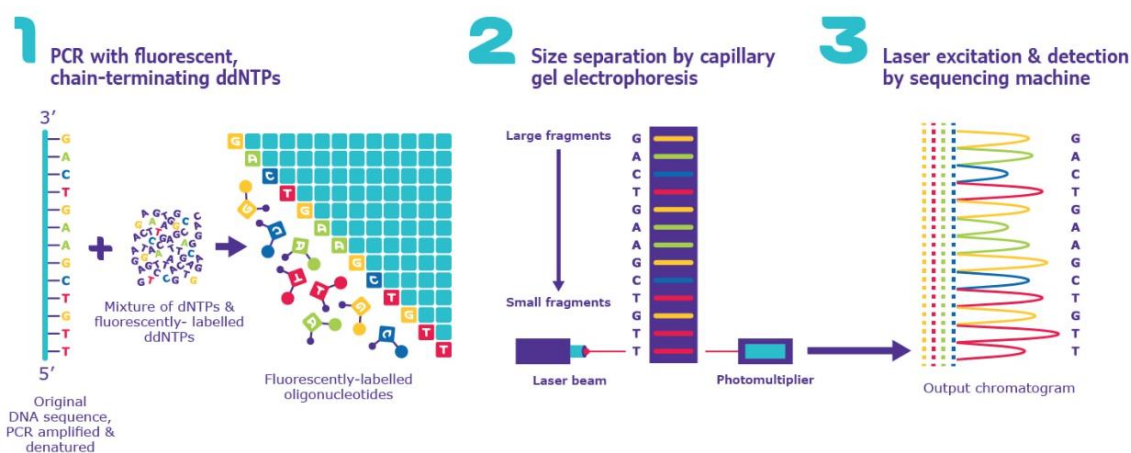
Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται πολλές μέθοδοι, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με την διαδικασία που θα πραγματοποιηθεί με απλά χημικά αντιδραστήρια ή με εμπορικά διαθέσιμα κιτ. Όλες οι μέθοδοι ακολουθούν τα παρακάτω κοινά βήματα με μικρότερες ή μεγαλύτερες τροποποιήσεις (Addgene, 2022):

1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών με αλκαλικό διάλυμα που περιέχει δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS). Λύση μπορεί να γίνει και με άλλο απορρυπαντικό που δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας για τις πρωτεΐνες.
2. Όλες οι παραλλαγές περιέχουν ένα βήμα το οποίο σταματάει την λύση, διότι εκτεταμένος χρόνος λύσης συνεπάγεται θραύση του γενωμικού DNA και επιμόλυνση του δείγματος μας με αυτό.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα και επεξεργασία με RNAάση για τον καταβολισμό του RNA. Το βήμα αυτό μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε στάδιο πριν από το τελικό στάδιο ανασύστασης-έκλουσης του πλασμιδίου.
4. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης, με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης χλωροφορμίου, με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής πυριτίου ή σε μαγνητικά σφαιρίδια.
5. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα αιθανόλης 70%.
6. Ανασύσταση-έκλουση του πλασμιδίου σε διάλυμα Tris-HCl ή ddH<sub>2</sub>O με (pH 8-9). Αν δεν έχει προηγηθεί βήμα με RNAάση, μπορεί να προστεθεί με διάλυμα Tris-EDTA (TE)



## • ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ SANGER

Η αλληλούχηση Sanger, είναι μια μέθοδος για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA. Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τον 2 φορές Νομπελίστα, Frederick Sanger και συνεργάτες το 1977, εξού και το όνομα Sanger αλληλούχηση. Η Sanger μπορεί να διενεργηθεί είτε χειρωνακτικά, είτε αυτοματοποιημένα. Σε κάθε περίπτωση ακολουθούνται τα τρία βασικά βήματα που φαίνονται στην Εικόνα 27.



Εικόνα 27: Τα βασικά στάδια αλληλούχησης Sanger. 1) PCR με νουκλεοτίδια ενδιάμεσου τερματισμού. 2) Διαχωρισμός μεγέθους με ηλεκτροφόρηση. 3) Ανάλυση της πηχτής και μετάφραση των δεδομένων.

1) Η DNA αλληλουχία ενδιαφέροντος χρησιμοποιείται σε μια ειδική αντίδραση PCR που τερματίζεται κατά την διάρκεια πολυμερισμού. Η PCR αυτή λειτουργεί όπως όλες με την μόνη διαφορά, πως εκτός από dNTPs υπάρχουν τροποποιημένα φθορισμοφόρα νουκλεοτίδια. Τα οποία είναι διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs). Στο βήμα της επιμήκυνσης στην PCR η πολυμεράση πολυμερίζει dNTPs δημιουργώντας έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του ελεύθερου 3'-OH του τελευταίου νουκλεοτιδίου και το 5' του επόμενου. Γίνεται η μίξη των δύο ειδών νουκλεοτιδίων με χαμηλότερο ποσοστό από τα ddNTPs. Τα ddNTPs δεν έχουν 3'-OH για τον σχηματισμό του δεσμού, συνεπώς η αντίδραση σταματάει. Το αποτέλεσμα πολλαπλών PCR που τυχαία σταματάει κάπου η αντίδραση, παράγει πολλαπλά αντίγραφα διαφορετικού μήκους. Στην χειρωνακτική Sanger, τέσσερις διαφορετικές PCR στήνονται με το κάθε τερματικό νουκλεοτίδιο (ddATP, ddTTP, ddGTP, και ddCTP). Στην αυτοματοποιημένη μέθοδο όλα τα ddNTPs είναι σε μια αντίδραση

2) Το δεύτερο βήμα είναι ο διαχωρισμός του μήκους με πηκτή ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης. Στην πηκτή ηλεκτροφόρησης τα δείγματα φορτώνονται από το ένα άκρο της πηχτής και εφαρμόζεται τάση ρεύματος. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο οπότε τα ολιγονουκλεοτίδια θα κινηθούν προς το θετικό πόλο, δηλαδή στην άλλη πλευρά της πηχτής. Όσο πιο μικρό είναι το τμήμα τόσο μικρότερη είναι η αντίσταση στην πηχτή άρα και ταχύτερη μεταφορά στον θετικό πόλο. Τα ολιγονουκλεοτίδια θα κατατάσσονται από το μικρότερο στο μεγαλύτερο. Στην χειρωνακτική Sanger τα ολιγονουκλεοτίδια από κάθε μία, από τις τέσσερις αντιδράσεις τρέχει σε τέσσερις διαφορετικές θέσεις της πηχτής. Αυτό επιτρέπει στον χρήστη να γνωρίζει ποιά ολιγονουκλεοτίδια αντιστοιχούν σε ποιο ddNTP. Στην αυτοματοποιημένη μέθοδο όλα τα ολιγονουκλεοτίδια είναι μαζί σε ένα τριχοειδή σωλήνα ηλεκτροφόρησης.

3) Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει την μελέτη της πηχτής για

τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Η πολυμεράση πολυμερίζει από το 5' στο 3'. Ξεκινώντας από τον εκκινητή κάθε τελικό ddNTP θα αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο. Διαβάζοντας τα θραύσματα από τα μικρότερα στα μεγαλύτερα καθορίζεται η 5' προς 3' αλληλουχία ενδιαφέροντος. Στην χειρωνακτική Sanger ο χρήστης διαβάζει και τις τέσσερις λωρίδες της πηχτής ταυτόχρονα από κάτω προς τα πάνω. Στην αυτοματοποιημένη Sanger ένας υπολογιστής διαβάζει κάθε ζώνη από την τριχοειδή σωλήνα, χρησιμοποιώντας φθορισμό για την ταυτοποίηση κάθε τελικού ddNTP. Ένα λέιζερ διεγείρει τα φθορίζοντα νουκλεοτίδια σε κάθε μπάντα και ένας ανιχνευτής αναλύει το φως που εκπέμπεται. Κάθε ένα από τα 4 ddNTPs είναι σημασμένο με διαφορετική φθορίζουσα, το φως που εκπέμπεται μπορεί να καθορίσει άμεσα το τελικό ddNTP. Το αποτέλεσμα ονομάζεται χρωματογράφημα, το οποίο δείχνει την κορυφή της φθορίζουσας για κάθε νουκλεοτίδιο σε όλο το μήκος της αλληλουχίας.

## Στόχος της παρούσας μελέτης

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός οικονομικά προσβάσιμου πρωτοκόλλου αλληλούχησης μοναδιαίων κυττάρων από ερευνητικά εργαστήρια μέσου-χαμηλού προϋπολογισμού.

Επί μέρους στόχους αποτέλεσαν: (i) η ανάπτυξη μεθόδου μονιμοποίησης του κυττάρου συμβατική με μετέπειτα ενζυμική χειραγώγηση του DNA του *in situ*, (ii) η ανάπτυξη οικονομικής μεθόδου *in situ* κατακερματισμού του DNA και προσθήκης προσαρμογών συμβατών με ακόλουθη ενίσχυση PCR με χρήση tagmetase, (iii) η επιτυχής ενίσχυση tagmented DNA.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Χημικά

Καρμπενικιλίνη (C1389) για την επιλογή βακτηριακών κλώνων, ιωδιούχο προπίδιο (81845) για χρώση ολικού γενετικού υλικού, thiabendazole (T8904) για την καλλιέργεια της βακτηριακής κοινοπραξίας που καταβολίζει thiabendazole, Γλυοξάλη 40% stock (128465) και παραφορμαλδεΐδη (158127) για μονιμοποίηση κυττάρων, ακετονιτρίλιο (900686), μεθανόλη (34860) και αμμωνία (499145) για την λειτουργία της HPLC. Όλα αγορασμένα από την Merck.

## 2. Θρεπτικά, κύτταρα και DNA

Το DNA που χρησιμοποιήθηκε για το DNA tagmentation είναι από ένα βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas* (Perruchon et al., 2017).

*E. coli* DH5a κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τις κλωνοποιήσεις και σαν υπόστρωμα για το tagmentation. Για τις υγρές καλλιέργειες των DH5a χρησιμοποιήθηκε LB Broth Miller (L3522). Καλλιέργειες 5 ml και επώαση ολονύκτια στους 37°C/210 rpm για κορεσμό των καλλιιεργειών ( $10^9$  κύτταρα/ml) και για πιάτα με άγαρ (L3147) ολονύκτια επώαση χωρίς ανακαίνιση.

Η βακτηριακή κοινοπραξία καλλιεργείται σε 5 ml εκλεκτικό θρεπτικό MSMN (Kargouzas and Walker, 2000) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3) με την προσθήκη thiabendazole σε τελική συγκέντρωση 25 µg/ml ως την μόνη πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων. Επώαση εβδομαδιαία στους 25°C/210 rpm, μέχρι τον πλήρη καταβολισμό του thiabendazole.

## 3. Μέτρηση συγκέντρωσης thiabendazole

Ο έλεγχος ανάπτυξης της κοινοπραξίας γίνεται μέσω της HPLC. Στην HPLC εκλούεται το thiabendazole η συγκέντρωση της οποίας δίνει πληροφορίες για τον καταβολισμό της από την βακτηριακή κοινοπραξία και κατά συνέπεια την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων ενδιαφέροντος. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή LabAlliance HPLC αποτελούμενη από μια αντλία Marathon III (Rigas Labs), έναν ανιχνευτή φάσματος FASMA 500 UV-Vis (Rigas Labs) και μια στήλη RP-C18 (RP-C18, 120 Å, 4.6 mm x 150 mm, 5 µm). Η ανίχνευση γινόταν στα 254 nm με κινητή φάση η οποία αποτελείται από 39% ακετονιτρίλιο, 60.5% ddH<sub>2</sub>O, 0.5% αμμωνία. Τα δείγματα πριν την ανάλυση προετοιμάζονται για την έγχυση στο μηχάνημα, αναμειγνύοντας 1:2 μέρος υπερκείμενου:μεθανόλης ύστερα από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 1 λεπτό στα 17000 g. Για την έγχυση στην HPLC χρησιμοποιήθηκαν 70µl του μίγματος. Κατά την πλήρη διάσπαση του TBZ, γινόταν ανακαλλιέργεια. Στην πλήρη διάσπαση του thiabendazole, γίνεται ανακαλλιέργεια για την παραγωγή αρκετής κυτταρικής μάζας για την ανάλυση αλληλουχίας.

## 4. Προετοιμασία- επεξεργασία και μονιμοποίηση κυττάρων.

Τα κύτταρα ξεπλένονται σε ρυθμιστικό διάλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με φωσφορικά (PBS) δύο φορές για την εξάλειψη του προηγούμενου μέσου καλλιέργειας. Τα *E. coli* φυγοκεντρώνονται στα 5000 g για 5 λεπτά και η βακτηριακή κοινοπραξία για 15 λεπτά. Τα 5000 g είναι η κατάλληλη επιτάχυνση ώστε τα κύτταρα να μην καταστρέφονται και να μειωθούν σε αποδεκτό επίπεδο οι απώλειες κυττάρων στο υπερκείμενο (Peterson, Sharma, van der Mei and Busscher, 2012). Η βακτηριακή κοινοπραξία χρειάζεται περισσότερο χρόνο καθώς τα κύτταρα είναι μικρότερα σε διάμετρο και δημιουργούν ένα είδος κροκίδωσης που πιθανόν να βοηθά στην πλεύση τους.

Από την 5 ml κορεσμένη καλλιέργεια των DH5a χρησιμοποιείται 1 ml για την μονιμοποίηση. Η βακτηριακή κοινοπραξία η οποία δεν είναι κορεσμένη λόγω του εκλεκτικού μέσου καλλιέργειας χρειάζεται 50 ml καλλιέργειας, ώστε να συσσωρευτεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων με τα DH5a.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι μονιμοποίησης των κυττάρων, με παραφορμαλδεΐδη και γλυοξάλη, βάση των διαφορετικών ιδιοτήτων τους. Και στις δύο περιπτώσεις όλοι οι χειρισμοί που εμπεριέχουν τα παραπάνω χημικά διενεργούνται στον απαγωγό.

Προετοιμασία παραφορμαλδεΐδης 4% stock διάλυμα σε 1X PBS, pH = 7.2

-Θέρμανση του 1X PBS στους 60°C για να διαλυθούν τα 0,4 g παραφορμαλδεΐδης

- Προσθήκη 6 ml of 5 M NaOH για να γίνει διαυγές το διάλυμα

- Έλεγχος pH= 7.2 (check with pH indicator paper).

-Φιλτράρισμα μέσω 0.22-μm filter (PES).

Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 300 μl διάλυμα παραφορμαλδεΐδης και 100 μl PBS

Επώαση στους 40C στο σκοτάδι για αυστηρά 16 ώρες με τελική συγκέντρωση παραφορμαλδεΐδης 3%. Ύστερα από την επώαση τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές για απομάκρυνση του χημικού. (Kim, Kim, Okajima and Cho, 2017)

Προετοιμασία για 4 ml διαλύματος γλυοξάλης:

-2.835 ml ddH<sub>2</sub>O, 0.789 ml αιθανόλη (absolute), 0.313 ml γλυοξάλη 40% stock, 0.03 ml οξικό οξύ.

-Ρύθμιση σε pH= 4

Μονιμοποίηση με 400 μl διαλύματος γλυοξάλης σε τελική συγκέντρωση 3% γλυοξάλη.

Επώαση στο σκοτάδι για μία ώρα στους 4°C και μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Ύστερα από την επώαση τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές για απομάκρυνση του χημικού (Richter et al., 2017).

## 5. Διάτρηση και αποθήκευση των κυττάρων

Η διάτρηση των κυττάρων γίνεται μέσω δράσης του ενζύμου λυσοζύμης (1.05281 Merck). Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 200 μl διαλύματος στο οποίο περιέχονται 10 mM Tris-HCl buffer, 100mM NaCl pH = 8.00, 5mM EDTA, 0.5 mg/mL λυσοζύμη τελικών συγκεντρώσεων. Επώαση στους 40C για 10 λεπτά στα DH5a ή 20 λεπτά για την βακτηριακή κοινοπραξία. Ύστερα από την επώαση γίνεται δύο φορές πλύση και επαναδιάλυση σε 400 μl ddH<sub>2</sub>O καθώς τα διάτρητα πλέον κύτταρα δεν έχουν ανάγκη την ισορροπία ωσμωμοριακότητας που προσδίδει το PBS.

## 6. Tagmentation

Το tagmentation γίνεται μέσω του ενζύμου τρικοζάσης *tn5* το οποίο παράγει τυχαία θραύσματα DNA στα οποία παράλληλα προσθέτει ένα ζεύγος συγκεκριμένων προσαρμογών. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η έτοιμη μίξη (ATM) Amplicon Tagment Mix από το πακέτο Nextera XT DNA Library Preparation Kit (FC-131-1024, Illumina) και ύστερα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο (C01070012, Diagenode) που εμπεριέχει τους παρακάτω προσαρμογείς συμβατούς με την κωδικοποίηση που χρησιμοποιεί η Illumina για αλληλούχηση. Η υπογραμμισμένη είναι η δίκλωνη περιοχή του κάθε προσαρμογέα και με *ITALICS* περιοχή που υβριδίζουν οι εκκινητές τιτλοποίησης

Προσαρμογέας A: 5' *TCGTCGGCAGCGTC**AGATGTGTATAAGAGACAG*

Προσαρμογέας B: 5' *GTCTCGTGGGCTCGG**AGATGTGTATAAGAGACAG*

Illumina tagmentation σε DNA :

-Tagmentation Buffer (10 μl)

-1 ng DNA (5 μl)

- ATM (5 μl)

Illumina tagmentation σε κύτταρα:

-Tagmentation Buffer (10 μl)

- Κύτταρα 1/400 μl από την προετοιμασία (1 μl)

- ddH<sub>2</sub>O (4μl)

- ATM (5 μl)

Diagenode tagmentation σε DNA (Picelli et al., 2014):

-Tagmentation Buffer X2 (10μl)

-1ng DNA (5μl)

-*tn5* (0,2μl)

- ddH<sub>2</sub>O (4,8 μl)

Diagenode tagmentation σε κύτταρα:

-Tagmentation Buffer X2 (10μl)

- Κύτταρα 1/400 μl από την προετοιμασία (1 μl)

-*tn5* (0,4μl)

- ddH<sub>2</sub>O (8,6 μl)

Σε όλες τις περιπτώσεις παραπάνω γίνεται επώαση στους 55°C για 5 λεπτά ακριβώς. Η τρανσποζιάση είναι υπερενεργή και έχει μειωμένη δραστηριότητα σε χαμηλότερους βαθμούς Κελσίου. Για την αποφυγή υπερθραυσματοποίησης του DNA γίνεται προσθήκη 5μl Neutralization Buffer (NT) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την διακοπή της αντίδρασης.

## 7. Παρατήρηση διάτρησης μορφολογίας και ευρωστίας κυττάρων

Τα κύτταρα θα πρέπει να διατηρήσουν την μορφή τους μετά την επεξεργασία που θα δεχτούν. Οπότε γίνεται παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο ύστερα από την δράσης της λυσοζύμης και ύστερα από την αντίδραση του tagmentation. Και στις δύο περιπτώσεις τα κύτταρα είναι διάτρητα οπότε γίνεται χρώση με ιωδιούχο προπίδιο το οποίο θα δεσμευτεί στο DNA που είναι διαθέσιμο μέσα στα κύτταρα. (Doherty et al., 2010)

Προσθήκη 1 μl ιωδιούχο προπίδιο (1 mg/ml) σε 100 μl κύτταρα και επώαση στους 4°C στο σκοτάδι για 5 λεπτά. Ύστερα ξεπλένονται και επαναδιαλύονται σε 80 μl ddH<sub>2</sub>O τα οποία θα τοποθετηθούν στην αντικειμενοφόρο πλάκα για την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Η παρατήρηση των κυττάρων με το Zeiss AXIO Observer.Z1 Fluorescence Motorized Microscope w/ Definite Focus.2 Pred 7 - AV και τις παρακάτω ρυθμίσεις:

-φακός 25X με νερό

-561 nm διέγερση

-1% δύναμη λείζερ

-35 μM οπή

-700 V γενική ενίσχυση

## 8. Δημιουργία βιβλιοθήκης, πολυπλεξία τιτλοποίησης

Η τελική δημιουργία βιβλιοθήκης γίνεται με την ενίσχυση των τμημάτων που έχουν παραχθεί από το tagmentation. Η ενίσχυση με διαφορετικές προεκτάσεις των εκκινητών προσδίδουν πολυπλεξία μέσω των διαφορετικών νουκλεοτιδικών βάσεων των προσαρμογών.

Το πρωτόκολλο ενίσχυσης δειγμάτων tagmentation είναι διαφορετικό από ένα κλασικό πρωτόκολλο ενίσχυσης PCR. Το αρχικό υπόστρωμα δεν είναι πλήρως δίκλωνο ύστερα από την δράση την τρανσποζάσης, καθώς το μεταβλητό μέρος του προσαρμογέα που προσθέτει το ένζυμο δεν είναι δίκλωνο. Το μεταβλητό μέρος του προσαρμογέα είναι το εκμαγείο στο οποίο υβριδίζουν οι εκκινητές για να ενισχύσουν και να τιτλοποιήσουν το κομμάτι DNA. Ένα έξτρα βήμα πριν την αποδιάταξη του DNA έχει προστεθεί το οποίο επιμηκύνει το υπάρχων DNA και γίνεται ολόκληρο δίκλωνο.

1. 72°C 7 λεπτά (για proof read βασιζόμενη πλήρωση των βάσεων του διακένου που αφήνει το *tn5*)
2. 95°C 5 λεπτά
3. 98°C 30 δευτερόλεπτα
4. 61°C 20 δευτερόλεπτα
5. 72°C 45 δευτερόλεπτα

Επανάληψη βήμα 3 – 5 X3 (για αποφυγή μη εξειδικευμένου υβριδισμού των εκκινητών που περιέχουν επέκταση ραβδοκώδικα)

6. 98°C 30 δευτερόλεπτα
7. 72°C 50 δευτερόλεπτα

Επανάληψη βήμα 6 – 7 X30 (για ενίσχυση)

8. 72°C 5 λεπτά

Το παραπάνω πρωτόκολλο είναι για υψηλής πιστότητας πολυμεράσες καθώς το διάλυμα δράσης του ενζύμου έχει διαφορετική σύσταση και συνεπώς διαφορετικές θερμοκρασίες.

Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της KAPA HiFi HotStart (KK2500, ROCHE) Η αντίδραση του παραπάνω προγράμματος:

5X HF Buffer (10 µl)

dNTPs (1,5 µl)

εμπρόσθιος εκκινητής i5 (1,5 µl)

ανάστορφος εκκινητής i7 (1,5 µl)

υπόστρωμα (12,5 µl)

Hotstart Taq HIFI (1 µl)

ddH<sub>2</sub>O (22 µl)

Το υπόστρωμα είναι η μισή αντίδραση tagmentation ύστερα από την προσθήκη του NT

Οι εκκινητές i5 και i7 έχουν το μέρος *υβριδισμού στο υπόστρωμα* και οι προεκτάσεις τους έχουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία τιτλοποίησης 10 νουκλεοτιδίων, διαφορετική σε κάθε ζεύγος εκκινητών για την πολυπλεξία, και στο 5' άκρο τις αλληλουχίες P5 και P7 αντίστοιχα για τον υβριδισμό στο flowcell της Illumina για αλληλούχηση νέας γενιάς. (MacConaill et al., 2018)

-i5 = 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(N<sub>10</sub>) TCGTCGGCAGCGTC 3'

-i7 = 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT(N<sub>10</sub>) GTCTCGTGGGCTCGG 3'

Το πακέτο της Illumina (FC-131-1024, Illumina) εμπεριέχει έτοιμη μίξη της πολυμεράσης Nextera PCR Master Mix (NPM) (15µl)

i5 (5µl)

i7 (5µl)

1. 72°C 3 λεπτά
2. 95°C 30 δευτερόλεπτα
3. 95°C 10 δευτερόλεπτα
4. 55°C 30 δευτερόλεπτα
5. 72°C 30 δευτερόλεπτα

Επανάληψη βήμα 3 – 5 X12

6. 72°C 5 λεπτά

Τα ενισχυμένα προϊόντα αναλύονται σε πηχτή αγαρόζης.

## 9. Απομόνωση DNA από πηχτή και ποσοτικός προσδιορισμός.

Η κλωνοποίηση ενός συγκεκριμένου μήκους βάσεων απαιτεί απομόνωση DNA από πηχτή.

Προετοιμασία 1% πηχτή αγαρόζης, φόρτωση των δειγμάτων, εφαρμογή τάσης, παρατήρηση και αποκοπή συγκεκριμένου κομματιού πηχτής. Το πακέτο NucleoSpin Gel and PCR Clean-up XS (740611.250, MACHEREY-NAGEL) εκκλύει το ενισχυμένο DNA.

Ποσοτικοποίηση του DNA των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Quant-iT™ dsDNA-HS kit & Qubit v2 fluorometer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)

## 10. Κλωνοποίηση για διαπίστωση ενθέματος

Όστε να υπάρχει μια γρήγορη και αδρή ιδέα για το τι εμπεριέχεται ανάμεσα από τους προσαρμογείς χρησιμοποιήθηκε η αλληλούχηση Sanger. Μία από τις μεθοδολογίες συμβατή με την Sanger είναι η κλωνοποίηση σε φορείς. Αφού το δείγμα έχει απομονωθεί και ποσοτικοποιηθεί, χρησιμοποιείται το Biomath calculator (Biomath Calculators | DNA Calculator | Vector Insert Ratio, 2022), το οποίο δίνει την δυνατότητα να υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA με βάση το μήκος των νουκλεοτιδίων. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pGEM t-easy (A1360, Promega). Ένας γραμμικός φορέας ιδανικός για TA κλωνοποίηση. Αναλογία 3 προς 1 απομονωμένο ένθεμα προς γραμμικό φορέα αντίστοιχα γίνεται μια αντίδραση λιγάσης. (M0202S, NEB)

pGEM (0,5μl)

ένθεμα (3μl)

T4 λιγάση (1μl)

T4 buffer 10X (1μl)

ddH<sub>2</sub>O (4,5 μl)

Γίνεται επώαση ολονύκτια στους 4°C. Ύστερα η μισή αντίδραση μετασχηματίζεται σε βακτήρια και στρώνονται σε πιάτα LB agar για μπλε-άσπρη επιλογή κλώνων. Λευκοί κλώνοι επιλέγονται και επωάζονται σε 5 ml υγρή LB καλλιέργεια.

Το πλασμίδιο απομονώνεται από κάθε καλλιέργεια μέσω του πακέτου NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA (740588.250, MACHEREY-NAGEL) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2). Αφού το πλασμίδιο εκλουστεί, ποσοτικοποιείται μέσω & Qubit v2 fluorometer. Μια διαγνωστική πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI (R3101S, NEB) για την διαπίστωση του σωστού ενθέματος.

πλασμδιακό DNA (άνω των 100ng) (1μl)

EcoRI (0,25μl)

Cutsmart 10X Buffer (1 μl)

ddH<sub>2</sub>O (7,75 μl)

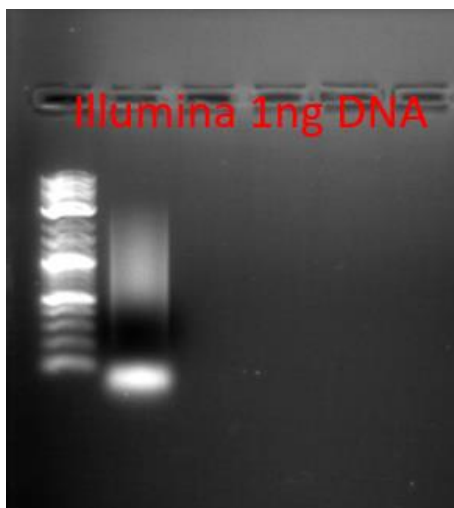


Το προϊόν ηλεκτροφορείται σε μια πηχτή αγαρόζης 1% και ύστερα της επιβεβαίωσης. Τα δείγματα στέλνονται για αλληλούχηση

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Τυχαία θραυσματοποίηση, τιτλοποίηση και ενίσχυση DNA βασισμένα στην Nextera XT Illumina

Το Nextera XT (FC-131-1024) είναι ένα πακέτο για την αλληλούχηση μικρών γονιδιωμάτων (προκαρυωτικών και αρχαίων), πλασμιδίων και αμπλικονίων. Αυτό ταιριάζει στις προδιαγραφές για την αλληλούχηση βακτηρίων, αλλά όχι για βακτηριακές κοινοπραξίες καθώς η τεχνική απαιτεί απομονωμένο DNA πριν την δράσης της τρανσποζάσης. Η Illumina προσφέρει τυποποίηση στην τεχνική καθώς έχει ένα πολύ αναλυτικό εγχειρίδιο {Nextera XT DNA Library Prep Kit Reference Guide (15031942)} και χρησιμοποιεί μόλις 1 ng DNA για την ανάλυση. Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας και σαν βάση για το χτίσιμο των νέων πρωτοκόλλων. Ακολουθώντας το πρωτόκολλο με τα τυποποιημένα συστατικά του πακέτου σε έτοιμα μείγματα (τρανσποζάσης, πολυμεράσης και διαλύματος εξουδετέρωσης), λήφθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα της τυχαίας θραυσματοποίησης του DNA. Το προϊόν του tagmentation ενισχύθηκε με το NPM και αποκτήθηκε το επίχρισμα μη συγκεκριμένης μπάντας (smear) από τα 300 μέχρι 3000 ζεύγη βάσεων στην πηχτή της Εικόνας 28. Ολόκληρη η αντίδραση χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα στην αντίδραση πολυμεράσης με το NPM, για την διαπίστωση του εύρους του μήκους των ζεύγων βάσεων.



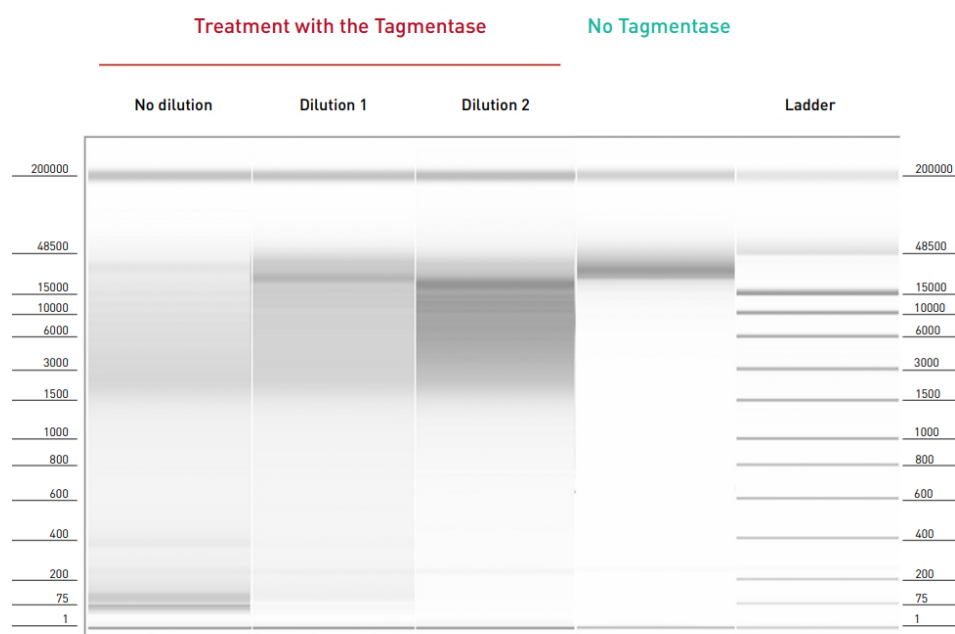
Εικόνα 28: Illumina tagmentation, θραύσματα DNA από 300 μέχρι 3000 ζεύγη βάσεων

Η συνέχεια του πρωτοκόλλου περιέχει βήματα καθαρισμού από τα συστατικά των αντιδράσεων και από τα μη επιθυμητά θραύσματα DNA . Ο επιθυμητός μέσος όρος μήκους ζευγών βάσεων για την αλληλούχηση είναι 500-600.

## 2. Απεξάρτηση από την Illumina: *tn5* ένζυμο

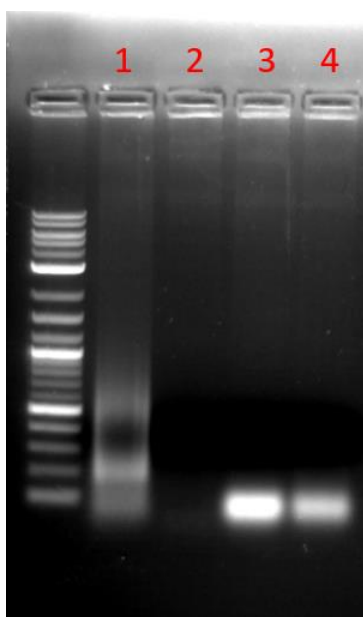
Η Illumina δεν δίνει πληροφορίες για την συγκέντρωση και την ποιότητα του ενζύμου, συνδυαστικά με την υψηλή τιμή του πακέτου και την έλλειψη δυνατότητας πώλησης μεμονωμένου του ενζύμου, πολλοί έχουν οδηγηθεί σε εναλλακτικές λύσεις. Εναλλακτικές λύσεις όπως παραγωγή, απομόνωση τρανσποζάσης και σύγκρισή της με αυτήν της Illumina (Picelli et al., 2014), (Kia et al., 2017). Ακόμα και στο διάλυμα δράσης της τρανσποζάσης (Hennig et al., 2018).

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η τρανσποζάση και το διάλυμα δράσης της Diagenode. Σε αντίθεση με την Illumina που χρησιμοποιεί 1 ng DNA, το εγχειρίδιο της Diagenode (Diagenode, 2022) αναφέρει πως 100 ng από βακτηριοφάγο λάμδα θραυσματοποιούνται από 1 μl τρανσποζάση σε 7 λεπτά στους 55°C.



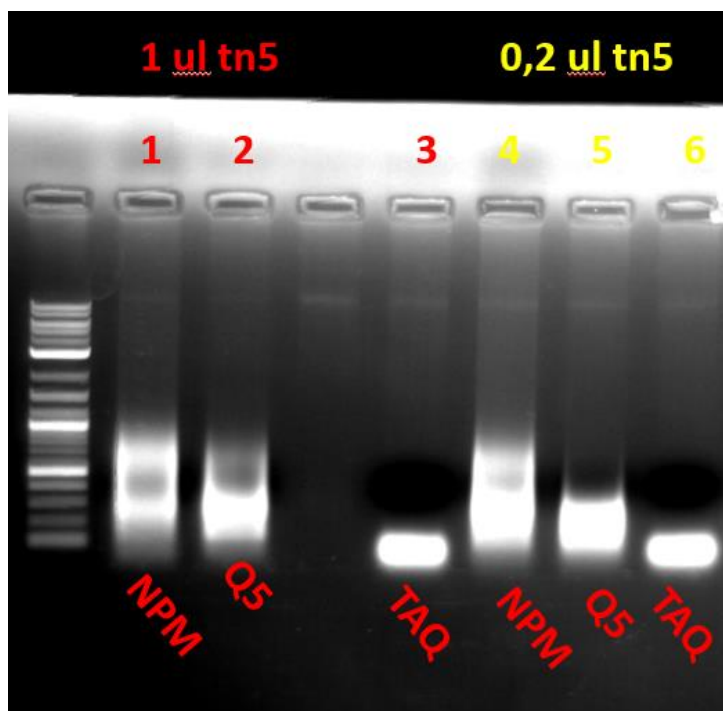
Εικόνα 29: Μεγέθη θραυσμάτων 100 ng DNA ύστερα από 7 λεπτά επώαση στους 55°C με μη αραιωμένη τρανσποζάση, με αραιώσεις 1/4 και 1/16. No Dilution, Dilution 1 και 2 αντίστοιχα.

Η τεράστια διαφορά στο DNA και οι αραιώσεις που προτείνει η Diagenode έδωσε την ιδέα πως πολύ λιγότερο ένζυμο θα χρειαζόταν να χρησιμοποιηθεί καθώς φέρει και την περιγραφή ως υπερενεργό. Αρχικά δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο της Diagenode με 100 ng DNA, 1 μl τρανσποζάση σε 7 λεπτά στους 55°C και μια δεύτερη αντίδραση με 0,2 μl τρανσποζάση. Η κάθε αντίδραση χωρίστηκε στα δύο και ενισχύθηκε με διαφορετική πολυμεράση (ταυτοχρόνως γινόταν προσπάθεια απεξάρτησης από το NPM).



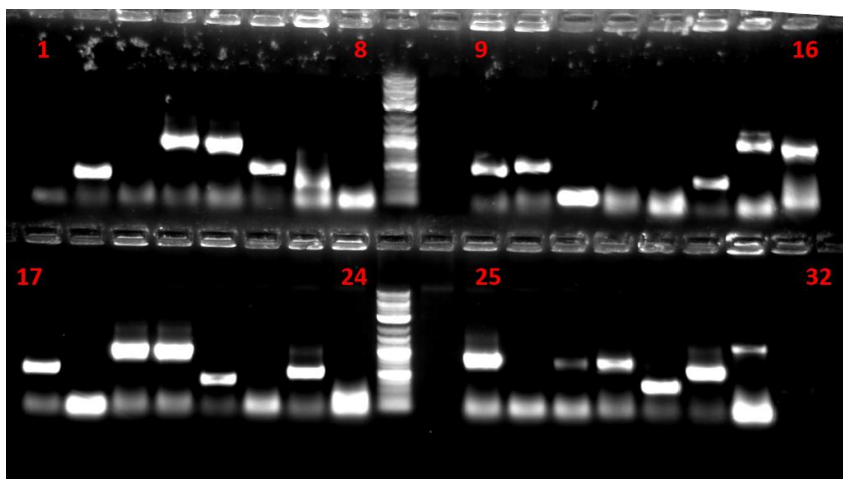
Εικόνα 30: Ενισχυμένα προϊόντα tagmentation. 1) 1 ul tn5-NPM, 2) 1 ul tn5-Q5, 3) 0,2 ul tn5-Καρα Ταq, 4) 0,2 ul tn5-Q5

Παρατηρείται στην Εικόνα 30 πως το δείγμα 1 ενισχυμένο με το NPM που θεωρείται σίγουρο πως θα ενισχύσει αν υπάρχει θραυσματοποιημένο προϊόν έχει ένα smear γύρω από τα 500 ζεύγη βάσεων, υποδεικνύοντας πως υπάρχουν κάποια κομμάτια με τους σωστούς προσαρμογείς αλλά η αντίδραση δεν είναι βέλτιστη. Έτσι ακολουθήθηκε το σκεπτικό της Illumina. Οι δύο καινούριες αντιδράσεις που στήθηκαν είχαν 1 αντί για 100 ng DNA και 5 αντί για 7 λεπτά στους 55°C. Η κάθε αντίδραση χωρίστηκε στα τρία και ενισχύθηκε με με NPM, Q5 και Καρα Ταq αντίστοιχα.



Εικόνα 31: Δείγματα 1-3 με 1μl τρανσποζάση. Δείγματα 4-6 με 0,2μl τρανσποζάση. Ενισχυμένα με NPM, Q5 και Καρα Ταq αντίστοιχα.

Παρατηρείται πώς τα ενισχυμένα με NPM έχουν βάσιμες υποψίες να δουλεύουν παρά το γεγονός πως δεν αποκτάται ένα όμοιο smear με το στανταρισμένο πρωτόκολλο και ένζυμο της Illumina στην Εικόνα 28. Παρατηρείται επίσης πως η αντίδραση με το 0,2 *tn5* δίνει μεγαλύτερο εύρος smear άρα και καλύτερα αποτελέσματα. Η επιτυχία επαληθεύτηκε ύστερα από κλωνοποίηση και αποστολή για αλληλούχηση Sanger. Η αλληλούχηση έδειξε το DNA που είχαμε χρησιμοποιήσει εσωτερικά των προσαρμογέων στους οποίους είχαν προστεθεί η κωδικοποίηση της τιτλοποίησης. Πριν την αλληλούχηση εξετάστηκαν με PCR οι αποικίες από τα μετασχηματισμένα πιάτα για την διαπίστωση εάν το smear που αποκτήθηκε δεν είναι τυχαίο και είναι όντως από την τυχαία θραυσματοποίηση του DNA.



Εικόνα 32: Ενίσχυση με PCR σε αποικίες *E. coli* από μετασχηματισμένα με το προϊόν του *tagmentation*.

Στην Εικόνα 32 φαίνεται οι ποικιλία στο μήκος των ζευγών βάσεων που έχουν κλωνοποιηθεί συνιστώντας την αρτιότητα της αντίδρασης και την μη τυχαιότητά της.

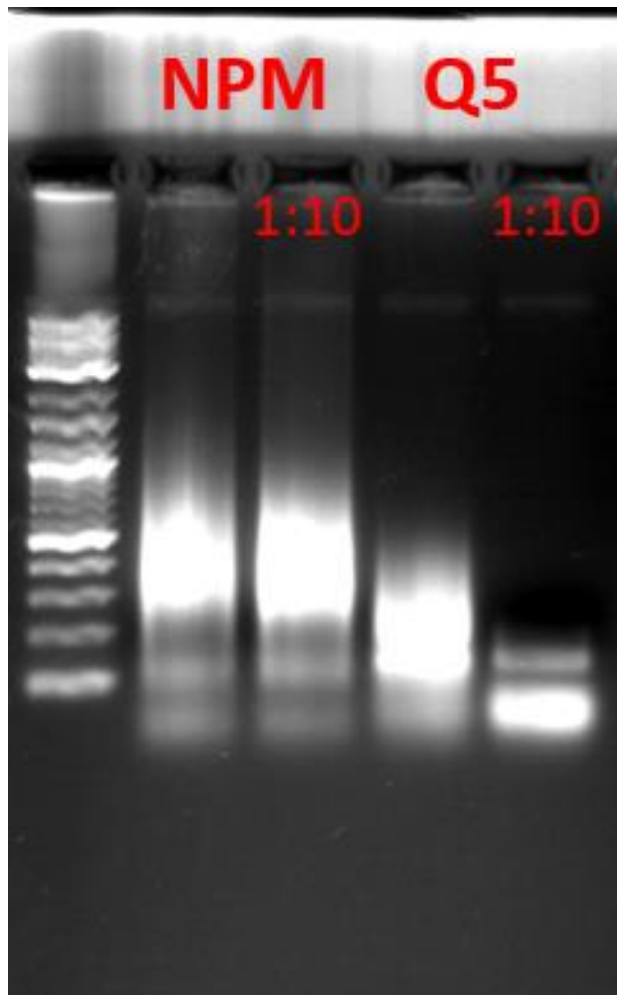
Αρκετές αποτυχημένες προσπάθειες που οδήγησαν στο παραπάνω αποτέλεσμα έφερε στην επιφάνεια δεδομένα που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Το 1 ng DNA λόγω του ότι είναι μικρή ποσότητα πρέπει να γίνεται αραιώση και να πιπετάρονται με μεγαλύτερους όγκους (5μl αντί για 1 μl). Επίσης να γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός μέσω Qubit λόγω της μεθόδου που χρησιμοποιεί έναν φθορισμοφόρο παρεμβολέα στο DNA που είναι πιο ακριβής από την φωτομετρική μέθοδο του nanodrop μέσω του λόγου 260/280 nm.

Άλλες αποτυχημένες προσπάθειες οφείλονταν στην ημερομηνία λήξης της τρानσποζάσης. Στα κοινά ένζυμα η απόκλιση από την μη ληγμένη φάση του ενζύμου δεν είναι τεράστια, σε αντίθεση με την συγκεκριμένη περίπτωση που γίνεται επώαση αυστηρά στα 5 λεπτά. Ο μειωμένος χρόνος αυξάνει την διαφορά δράσης εκθετικά.

### 3. Πηγαίνοντας από το DNA στο κυτταρικό *tagmentation*

Για την μετάβαση από το DNA *tagmentation* στο *E. coli* *tagmentation* αλλάζει η φύση του υποστρώματος για την αντίδραση του *tagmentation*. Έπρεπε λοιπόν να υπολογιστεί η ποσότητα του DNA που θα είναι διαθέσιμη μέσα στα κύτταρα. Ένα βακτηριακό κύτταρο περιέχει 0,5 -20 fg DNA (QIAGEN, 2022). Στην διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί  $10^9$  κύτταρα σε 400 μl διαλύματος. Θεωρώντας πως περίπου ένα κύτταρο έχει 1 fg DNA χρησιμοποιήθηκε 1 από τα 400μl διαλύματος άρα  $2,5 \times 10^6$  κύτταρα. Αυτό συνεπάγεται σε  $2,5 \times 10^6$  fg DNA = 2,5 ng DNA, δηλαδή 2,5 φορές περισσότερο DNA

που χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα για το DNA tagmentation. Ο παραπάνω υπολογισμός βασίστηκε στην αρχική εκτίμηση πως από τα 0,5 -20 fg DNA ενός βακτηριακού κυττάρου ο μέσος όρος είναι 1 fg, έγιναν δύο αντιδράσεις tagmentation, μια με την εκτίμηση των 1 fg και μια πως ο μέσος όρος είναι 10 fg DNA ανά κύτταρο. Δηλαδή μια 1:10 αραιώση των κυττάρων. Οι δύο αντιδράσεις εκτελέστηκαν με 0,5 μl τρανσποζάση, 0,3μl παραπάνω από το DNA tagmentation για την εκτιμώμενη μειωμένη δράση της λόγω ανταγωνιστικότητας για την εισαγωγή του ενζύμου στο κύτταρο μέσω των πόρων. Με αυτό το σκεπτικό η ποσότητα των κυτταρικών υποστρωμάτων σε αντίθεση με αυτήν των DNA υποστρωμάτων πρέπει να είναι στον μικρότερο δυνατό όγκο επαναδιαλυμένα για την αποφυγή ανασταλτικών παραγόντων από τα διάτρητα κύτταρα. Τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν από το μισό του καθενός ως υπόστρωμα για την ενίσχυση PCR με NPM και Q5 αντίστοιχα.



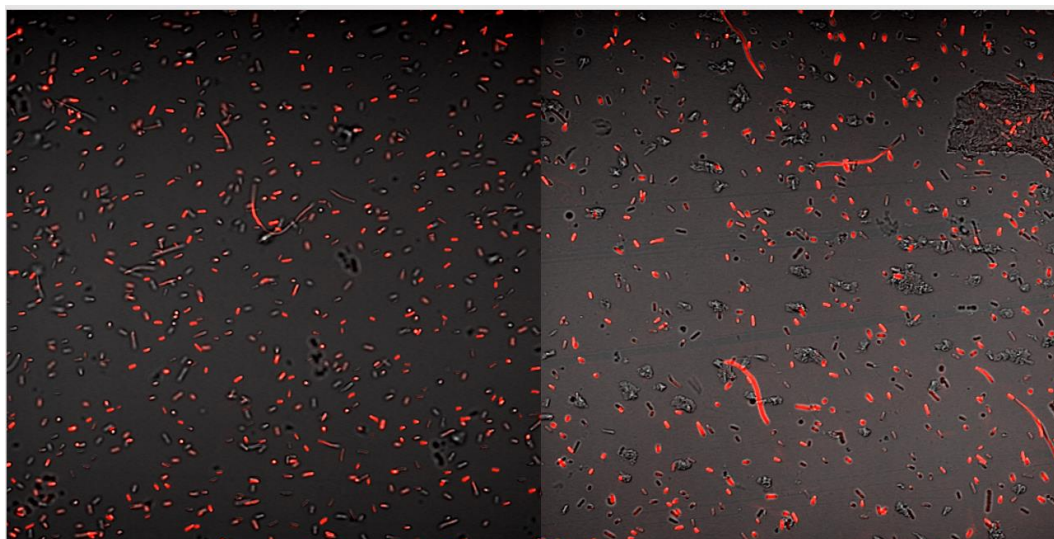
Εικόνα 33: Πηχτή αγαρόζη με τα πρώτα δύο ενισχυμένα με NPM και δεύτερα δύο με Q5. Το 1:10 ορίζει την αραιώση των κυττάρων.

Στην Εικόνα 33 αξιολογούνται τα ενισχυμένα με NPM που γνωρίζουμε πως σίγουρα ενισχύει και διαπιστώνεται πως ισχύει η θεωρία με το 1 fg DNA ανά κύτταρο. Όλες οι ζώνες

κλωνοποιήθηκαν και ορισμένοι κλώνοι αλληλουχήθηκαν. Θετικοί κλώνοι αλληλουχήθηκαν και από τις δύο συγκεντρώσεις κυττάρων ενισχυμένα μόνο από το NPM όχι από την Q5.

#### 4. Τροποποίηση επεξεργασίας σε διαφορετικά είδη κυττάρων

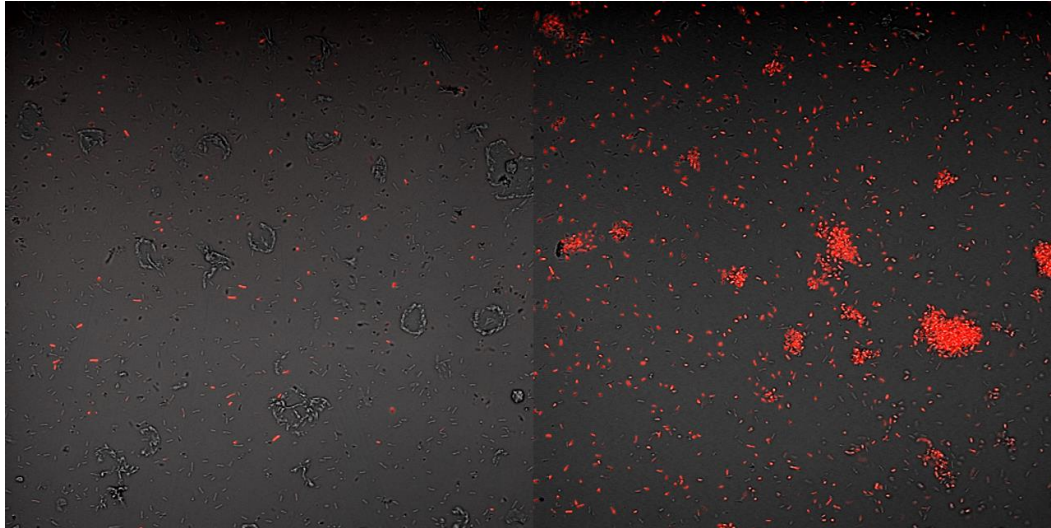
Στο *E. coli* tagmentation υπήρχαν αρκετές αποτυχημένες προσπάθειες οι οποίες αποδώθηκαν σε διαφορετική επεξεργασία των κυττάρων πριν την αντίδραση. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται και ύστερα επεξεργάζονται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα με λυσοζύμη για την δημιουργία πόρων. Το πιο διαδεδομένο χημικό για μονιμοποίηση είναι η παραφορμαλδεΐδη η οποία χρησιμοποιήθηκε, μονιμοποίησε και διατήρησε τον σκελετό των κυττάρων επιτυχώς ύστερα από την δράση της λυσοζύμης, αλλά δεν έφερε επιτυχή αποτελέσματα στο tagmentation. Η επεξήγηση που αποδόθηκε και η εναλλακτική που έλυσε το πρόβλημα ήταν η σύνδεση των μονιμοποιημένων υποκυτταρικών συστατικών με το DNA. Η εναλλακτική μονιμοποίηση έγινε με την γλυοξάλη η οποία δεν μονιμοποιεί μαζί με τα υποκυτταρικά συστατικά το DNA (Nakaya, Takenaka, Horinishi and Shibata, 1968). Το DNA ήταν διαθέσιμο για την τρανσποζάση να δράσει και να επισυνάψει προσαρμογείς καθώς δεν υπήρχαν και τα ανασταλτικά στοιχεία της παραφορμαλδεΐδης (Douglas and Rogers, 1998).



Εικόνα 34: Χρώση διάτρητων κυττάρων για την διαπίστωση της διατήρησης της μορφολογίας ύστερα από την επεξεργασία. Αριστερά μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΐδη και δεξιά με γλυοξάλη.

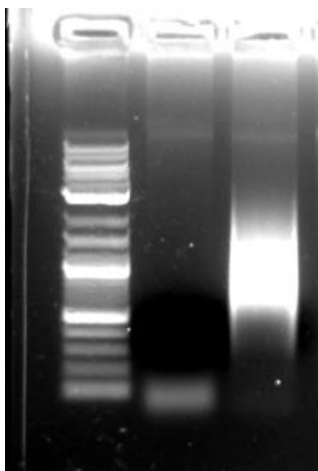
Τα κύτταρα της βακτηριακής κοινοπραξίας έχοντας ως μόνη πηγή άνθρακα το thiabendazole δεν είχαν εκθετική ανάπτυξη όπως θα είχαν σε ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο. Για την συγκέντρωση της ίδιας ποσότητας κυττάρων ( $10^9$ ) χρειάστηκαν 50 ml καλλιέργειας καθώς γινόταν ανακαλλιέργεια ύστερα από την πλήρη διάσπαση του thiabendazole (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1), τα οποία επεξεργάστηκαν αρχικά με τον ίδιο τρόπο με τα *E. coli*. Η αποτυχημένη αντίδραση tagmentation αποδόθηκε στην λανθασμένη επεξεργασία των κυττάρων. Η βακτηριακή κοινοπραξία έχοντας ως μόνη πηγή άνθρακα το thiabendazole αναπτύσει πολλά διαφορετικά είδη τα οποία συνεργάζονται για την διάσπαση του thiabendazole (Vasileiadis et al., 2022). Στα περισσότερα από τα είδη δεν ήταν αρκετή η 10<sup>7</sup> λεπτή επώαση με λυσοζύμη για την δημιουργία πόρων. Αυτό οδήγησε στην ελλιπή χρώση των κυττάρων και αντιμετωπίστηκε όπως φαίνεται στην Εικόνα 35 με επώαση 20 λεπτών

λυσοζύμης που οδήγησε σε διάτρηση της πλειονότητας των κυττάρων σε αντίθεση με την μειονότητα που είχαν διατρηθεί στα 10 λεπτά.



Εικόνα 35: Κύτταρα της βακτηριακής κοινοπραξίας ύστερα από μονιμοποίηση με γλυοξάλη και επώαση στα αριστερά για 10 λεπτά με λυσοζύμη και δεξιά για 20 λεπτά με λυσοζύμη.

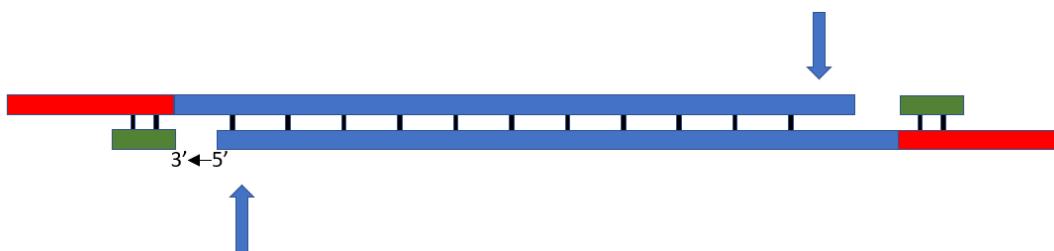
Τα 20 λεπτά επώαση οδήγησαν σε ένα επιτυχημένο tagmentation το οποίο ενισχύθηκε και έδωσε το αποτέλεσμα της πηχτής στην Εικόνα 36. Το προϊόν της ενίσχυσης κλωνοποιήθηκε και στάλθηκε για αλληλούχηση. Οι διάφοροι κλώνοι που αλληλουχήθηκαν κατέδειξαν κάποια από τα γένη που απαρτίζουν την βακτηριακή κοινοπραξία, *Sphingomonas*, *Sphingorhysis*, *Sphingobium* και *Thiobacillus* (Vasileiadis et al., 2022).



Εικόνα 36: Ενισχυμένο προϊόν tagmentation από διάτρητα κύτταρα βακτηριακής κοινοπραξίας. Πρώτο δείγμα με 0,1% SDS και δεύτερο δείγμα χωρίς SDS.

## 5. Απεξάρτηση από την Illumina: DNA πολυμεράση

Η Illumina έχει την έτοιμη μίξη πολυμεράσης με άγνωστο ένζυμο και διάλυμα δράσης. Αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει άλλες εναλλακτικές όπως η HIFI και Taq και η Q5 NEB Next (Hwang et al., 2019, Lu et al., 2020, Maynard et al., 2019, Zachariadis, Cheng, Andrews and Enge, 2020). Στην παρούσα έρευνα έγιναν διάφορες δοκιμές. Στην Εικόνα 30 και στην Εικόνα 31 φαίνονται 2 φορές που η Kara Taq είχε το σωστό υπόστρωμα αλλά δεν ενίσχυσε το προϊόν. Γίνεται ειδική αναφορά στην Kara Taq διότι τα χαρακτηριστικά της ομοιάζουν σε αυτά της NPM. Το βήμα αποδιάταξης του DNA είναι στους 95 °C σε αντίθεση με όλες τις υψηλής πιστότητας που προτείνεται η αποδιάταξη στους 98 °C. Επίσης η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών είναι 50-55 °C σε αντίθεση με τις υψηλής πιστότητας στις οποίες λόγω της διαφορετικής σύστασης του διαλύματος δράσης έχουν υψηλότερες θερμοκρασίες. Το αντικρουόμενο φαινόμενο που παρατηρήθηκε, είναι ότι παρά το χαρακτηριστικό της μη υψηλής πιστότητας της, μπορεί και ενισχύει 3000 βάσεις σε 30 δευτερόλεπτα (Q5 10-20 sec per kb/ Taq 1 min per kb) (New England Biolabs, NEB, 2022). Όλα τα προαναφερόμενα άρθρα χρησιμοποιούν υψηλής πιστότητας πολυμεράσες, διότι στοχεύουν στην αλληλούχηση άρα και στην εξάλειψη των λαθών από την ενίσχυση. Επίσης στην ίδια αντίδραση θα πρέπει να συμβεί η συμπλήρωση του κενού που αφήνει το *tn5* και η ενίσχυση (Εικόνα 37). Υπάρχει και έρευνα που συμπληρώνει το κενό με αντίδραση λιγάσης και ύστερα ενισχύει το προϊόν (Wang et al., 2013). Συνεπώς, η Illumina έχει δημιουργήσει ένα τροποποιημένο ένζυμο με άγνωστο τρόπο δράσης. Οι πολυμεράσες υψηλής πιστότητας αποκτούν αυτό το πλεονέκτημα μέσω της δράσης 3' 5' εξουνοκλεάσης (proofreading) με την οποία η πολυμεράση τοποθετεί νουκλεοτίδια από το 5' στο 3' και όταν εισάγει λάθος το αναγνωρίζει και το διορθώνει. Η ειδική αντίδραση πολυμεράσης που γίνεται ύστερα από το tagmentation χρειάζεται μια αρχική επιμήκυνση για την συμπλήρωση του κενού που αφήνουν οι προσαρμογείς της τρανσποζάσης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37 μια απλή DNA πολυμεράση θα χρησιμοποιούσε σαν εκκινητή εκεί που υποδεικνύουν τα μπλε βέλη συνδυάζοντας την ικανότητα 5' 3' πολυμεράσης και την 5' 3' εξουνοκλεάση θα έδωχνε το πράσινο κομμάτι και θα πολυμερίζε το συμπληρωματικό. Μια υψηλής πιστότητας αποκτά την ικανότητα 3' 5' εξουνοκλεάσης αλλά χάνει την 5' 3' εξουνοκλεάση. Ο τρόπος δράσης είναι πως χρησιμοποιείται το πράσινο κομμάτι ως εκκινητής και πολυμερίζει το συμπληρωματικό και το κενό αναγνωρίζεται και διορθώνεται με το proofreading.



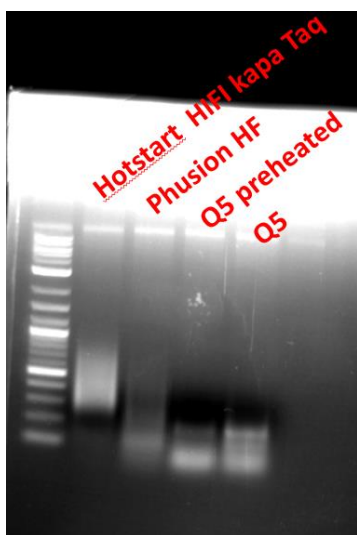
Εικόνα 37: Μορφολογία του DNA ύστερα από την αντίδραση tagmentation. Με μπλε χρώμα είναι το θραύσμα DNA, με το κόκκινο και πράσινο χρώμα είναι ο προσαρμογέας που προσθέτει η τρανσποζάση.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης από την Εικόνα 31 κατέδειξαν πως η Q5 δεν μπορεί να ενισχύσει με τον συγκεκριμένο τρόπο. Ύστερα από τις αρκετές έρευνες που χρησιμοποιούσαν την Q5 NEB Next (M0541, NEB). Έγινε επαφή με την τεχνική υποστήριξη



της NEB για την Q5 2X master mix (M0492S, NEB) που διατίθεται στο εργαστήριο. Η πληροφόρηση ήταν πως η NEB Next περιέχει την μη hotstart έκδοση του ίδιου ενζύμου. Η πληροφορία αυτή έφερε την ιδέα πως οι 72°C δεν είναι αρκετοί για την ενεργοποίηση του hotstart ενζύμου. Αντίθετα όλες οι εκδοχές των Kapa υψηλής πιστότητας πολυμεράσες είναι hotstart, ειδικά αυτές που χρησιμοποιούνται για ενίσχυση βιβλιοθηκών. Έτσι διενεργήθηκαν πειράματα και κατέληξαν στην Εικόνα 38. Εκτός από τις hotstart Kapa HiFi Taq και Q5 δοκιμάστηκε και μια μη hotstart υψηλής πιστότητας πολυμεράση Phusion (M0530S, NEB). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38 η hotstart Kapa HiFi Taq έχει την ικανότητα να ενεργοποιείται στους 72°C και να παρουσιάζει υψηλά επίπεδα επιτυχίας. Ύστερα από την αποτυχημένη δοκιμή της Q5 2X master mix να προθερμαθεί πριν την αντίδραση ώστε να ενεργοποιηθεί, ο λόγος που δεν ενισχύει παραμένει άγνωστος.

Τα πειράματα συνεχίστηκαν με την hotstart Kapa HiFi Taq στην ενίσχυση του tagmentation από την βακτηριακή κοινοπραξία επιτυχώς όπως φαίνονται στην Εικόνα 36. Επιπροσθέτως για την αρχική επιμήκυνση στα κύτταρα αυξήθηκε ο χρόνος στα 7 λεπτά καθώς η πολυμεράση πρέπει να εισέλθει στο κύτταρο ώστε να επιμηκύνει και ύστερα τα κύτταρα θα σπάσουν στο βήμα της αποδιάταξης.



Εικόνα 38: Δοκιμή πολυμερασών για την αντικατάσταση του NPM.

## 6. Απεξάρτηση από την Illumina: Διάλυμα εξουδετέρωσης

Ενδιάμεσα από το tagmentation και την ενίσχυση με PCR υπάρχει ένα βήμα εξουδετέρωσης της τρανσποζάσης. Σε όλα τα επιτυχή πειράματα η τρανσποζάση είχε εξουδετερωθεί από το NT διάλυμα της Illumina ή δεν είχε χρησιμοποιηθεί κάποιο διάλυμα εξουδετέρωσης καθώς ακριβώς μετά το tagmentation γινόταν η αντίδραση της ενίσχυσης. Αν πρέπει να αποθηκευτεί το προϊόν του tagmentation ή δεν χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά τα 5 λεπτά της αντίδρασης είναι απαραίτητο ένα διάλυμα εξουδετέρωσης. Σε όλες τις εξω-Illumina τεχνικές χρησιμοποιείται η αρχή του (Picelli et al., 2014) που χρησιμοποιεί τελική συγκέντρωση 0,1% SDS σε υδατικό διάλυμα για την εξουδετέρωση. Το σκεπτικό πίσω από το βήμα αυτό είναι πως το 0,1% είναι μικρότερη δυνατή συγκέντρωση για την αποδιάταξη της τρανσποζάσης. Η συγκέντρωση αυτή αραιώνεται όταν το εξουδετερωμένο προϊόν

χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα για την ενίσχυση ώστε να μην αναστέλλει την αντίδραση της πολυμεράσης. Όπως φαίνεται στο πρώτο δείγμα της Εικόνας 36 η δικιά μας αντίδραση αναστέλλεται ακολουθώντας το σκεπτικό αυτό.

## 7. Τελικό πρωτόκολλο

Το τελικό πρωτόκολλο κυρίως είναι πιο αποδοτικό και γρήγορο καθώς οι τροποποιήσεις στο DNA γίνονται εσωτερικά του κυττάρου χωρίς τον περιορισμό απομόνωσης DNA από πολλαπλά κύτταρα.

- **Προετοιμασία κυττάρων** (Χρόνος: 1 εβδομάδα)
  1. Εμβολιασμός θρεπτικού μέσου 50 ml MSMN με 25 µg/ml thiabendazole με καλλιέργεια της κοινοπραξίας σε στατική φάση σε αναλογία 1:20, επώαση 25°C/210 rpm μέχρι πλήρους καταβολισμού του thiabendazole.
- **Μονιμοποίηση των κυττάρων** (Χρόνος: 3,5 ώρες)
  2. Φυγοκέντρηση των 50 ml στα 5000 g για 15 λεπτά περισυλλογή και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 400µl PBS.
  3. Πλύση με PBS δύο φορές. 5000 g για 15 λεπτά απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση στα 400 µl.
  4. Επαναδιάλυση σε 400µl διάλυμα γλυοξάλης αποθηκευμένο για λιγότερο από 3 μήνες (για παρασκευή δείτε στις μεθόδους). Επώαση για μία ώρα στους 40°C και μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
  5. Πλύση με PBS δύο φορές. 5000 g για 15 λεπτά απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση στα 400 µl.
- **Διάτρηση μέσω λυσοζύμης** (Χρόνος: 1 ώρα)
  6. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 10 mM Tris-HCl (100mM Tris stock), 100mM NaCl (1M NaCl, pH = 8.00), 5mM EDTA (50mM stock), 0.5 mg/mL λυσοζύμη (5mg/ml stock) Επώαση στους 4°C για 20 λεπτά.
    - 20µl Tris stock
    - 20µl NaCl stock
    - 20µl EDTA stock
    - 2µl λυσοζύμη
    - 138µl ddH<sub>2</sub>O
  7. Πλύση με PBS δύο φορές για την απομάκρυνση της λυσοζύμης . 5000 g για 15 λεπτά απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση στα 400 µl.

ΚΡΙΣΙΜΟ ΒΗΜΑ: Η τελευταία επαναδιάλυση γίνεται σε 400µl ddH<sub>2</sub>O.

- **Tagmentation** (Χρόνος: 15 λεπτά)
  8. Επώαση της παρακάτω αντίδρασης για 5 λεπτά στους 55°C
    - Tagmentation Buffer X2 (10µl)
    - Κύτταρα 1/400 µl από την προετοιμασία (1 µl)
    - tn5 (0,4µl)
    - ddH<sub>2</sub>O (8,6 µl)

ΚΡΙΣΙΜΟ ΒΗΜΑ: Χρησιμοποιείται θερμοκυκλωποιητής και όχι υδατόλουτρο μιας και επηρεάζεται η ευαισθησία της αντίδρασης του tagmentation.

9. Ύστερα από τα 5 λεπτά του tagmentation γίνεται η προσθήκη του διαλύματος εξουδετέρωσης και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  - **Διαχωρισμός μοναδιαίων κυττάρων**
10. Ο διαχωρισμός των κυττάρων γίνεται σε κάποιο διαθέσιμο μηχάνημα διαχωρισμού κυττάρων.(πχ. Κυτταρομετρητής ροής)
  - **Ενίσχυση DNA και δημιουργία βιβλιοθήκης**
11. Τα μοναδιαία κύτταρα ενισχύονται από PCR το καθένα με το δικό ζεύγος εκκινητών.
  1. 72oC 7 λεπτά
  2. 95oC 5 λεπτά
  3. 98oC 30 δευτερόλεπτα
  4. 61oC 20 δευτερόλεπτα
  5. 72oC 45 δευτερόλεπτα
  - Επανάληψη βήμα 3 – 5 Χ3
  6. 98oC 30 δευτερόλεπτα
  7. 72oC 50 δευτερόλεπτα
  - Επανάληψη βήμα 6 – 7 Χ30
  8. 72oC 5 λεπτά

Τα ενισχυμένα προϊόντα συγκεντρώνονται όλα σε ένα δείγμα για μία αντίδραση αλληλούχησης νέας γενιάς.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επιλογή των βημάτων του τελικού πρωτοκόλλου γίναν ύστερα από την εξαγωγή συμπερασμάτων από την πειραματική διαδικασία και την βιβλιογραφική έρευνα.

- Η μονιμοποίηση των κυττάρων που γίνεται με γλυοξάλη και όχι παραφορμαλδεΐδη είναι συμβατή με το πρωτόκολλο τιτλοποίησης που αναπτύχθηκε, καθώς η διαφορετική συνδεσιμότητα του κάθε χημικού επηρεάζει τις αντιδράσεις tagmentation και PCR. Η γλυοξάλη δεν ενώνει το DNA καθιστώντας το προσβάσιμο για την τρανσποζάση. Επίσης η παραφορμαλδεΐδη έχει δειχθεί πως εμποδίζει και αναστέλλει τις ενζυματικές αντιδράσεις (Douglas and Rogers, 1998).
- Διάτρηση των κυττάρων με λυσοζύμη λόγω της δράσης της στην πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος είναι απαραίτητη για την μετέπειτα ενζυμική χειραγώγηση του DNA.
- Η τυχαία θραυσματοποίηση και προσθήκη προσαρμογέων στο DNA στο εσωτερικό των κυττάρων είναι επιτυχής με την πιο οικονομική τρανσποζάση της Diagenode σε

σύγκριση με το αντίστοιχο ένζυμο της Illumina, τιτλοποιώντας όλα τα κύτταρα σε μία αντίδραση και συνεπώς μειώνοντας το κόστος.

- Η ενίσχυση του DNA είναι επιτυχής με την εφαρμογή του προσαρμοσμένου πρωτόκολλου PCR τη παρούσα εργασία για ενίσχυση δύο βημάτων στην ίδια αντίδραση (ενίσχυση των υβριδίζοντων βάσεων χωρίς την ετικέτα κωδικοποίησης και ύστερα ολόκληρο το κομμάτι στη σωστή θερμοκρασία υβριδοποίησης, ίδια με την θερμοκρασία επέκτασης). Με την χρήση της πιο οικονομικής KAPA HIFI hotstart.

Συνολικά η μια αντίδραση για το tagmentation (σε αντίθεση με το κάθε κύτταρο ξεχωριστά) και οι 2 ώρες μονιμοποίηση με γλυοξάλη (αντί για 16 ώρες με παραφορμαλδεΐδη) καθιστούν το τελικό πρωτόκολλο σαφέστερα πιο γρήγορο, με λιγότερο απαιτούμενο εξοπλισμό λόγω της μη χρήσης μηχανήματος μικρορευστομηχανικής. Επιπρόσθετα το παρόν πρωτόκολλο, ως το παρόν σημείο είναι πιο οικονομικό, λόγω του μειωμένου απαιτούμενου εξοπλισμού, των μειωμένων αναλωσίμων από την μια αντίδραση tagmentation όλων των κυττάρων και την μειωμένη τιμή των υπόλοιπων αναλωσίμων που χρησιμοποιούνται συγκριτικά με τα εμπορικά διαθέσιμα πακέτα.

## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΔΟΥΛΕΙΑ

Στα μικρά χρονικά πλαίσια μιας πτυχιακής εργασίας κάποια βήματα για την ολοκληρωμένη ανάλυση μοναδιαίων κυττάρων δεν πραγματοποιήθηκαν, τα οποία θα πραγματοποιηθούν στο άμεσο μέλλον.

Τα tagmented κύτταρα της βακτηριακής κοινοπραξίας πρέπει να διαχωριστούν με FACS και ύστερα από τον διαχωρισμό τους να ακολουθήσει ενίσχυση με PCR με διαφορετικούς εκκινήτες για κάθε κύτταρο. Τα ενισχυμένα προϊόντα θα ενωθούν και θα αλληλούχηθούν σε μια αντίδραση αλληλούχησης νέας γενιάς.

Ύστερα από την παραπάνω διαδικασία θα πρέπει το πρωτόκολλο να δοκιμαστεί σε κύτταρα τα οποία να προέρχονται από ποικιλία περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Η ποσότητα της KAPA HIFI πολυμεράσης θα πρέπει να υπολογιστεί ώστε να μειωθεί ο όγκος, λόγω του κατά πολύ μειωμένου υποστρώματος που θα προέρχεται από ένα κύτταρο. Επίσης θα πρέπει να ρυθμιστεί η αντίδραση για την αλληλούχηση νέας γενιάς. Όπως χρησιμοποιεί και η Illumina θα πρέπει να υπολογιστεί ο κατάλληλος αριθμός κύκλων ενίσχυσης PCR για τον επαρκή αλλά όχι περίσσιο όγκο DNA. Επίσης θα πρέπει να γίνει και μία εκτίμηση για την αναγκαιότητα καθαρισμού από συγκεκριμένου μήκους ζευγών βάσεων με την βοήθεια παραμαγνητικών σφαιριδίων όπως (AMPure XP beads).

Ο κυριότερος περιορισμός της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι τα κύτταρα χρειάζονται διαχωρισμό με ένα κυτταρομετρητή ροής για την απόκτηση μοναδιαίων κυττάρων. Επίσης τα μοναδιαία κύτταρα θα πρέπει να ενισχυθούν με ξεχωριστές αντιδράσεις PCR. Μελλοντικά θα ήταν επιθυμητό να βρεθεί μια εναλλακτική ή μια προσθήκη μεθόδου για την αποφυγή των παραπάνω βημάτων που αυξάνουν το κόστος και την χρονική διάρκεια.

Οι αντιδράσεις tagmentation έγιναν για 5 λεπτά στους 55°C αν και αρκετές έρευνες κάνουν για 30 λεπτά στους 37°C (Henikoff, Henikoff, Kaya-Okur and Ahmad, 2020), άλλες έρευνες χρησιμοποιούν την διακύμανση την θερμοκρασίας για την ρύθμιση του χρόνου της αντίδρασης (Merrill et al., 2022), (Sahu, Basu and Tiwari, 2021). Αυτές οι έρευνες χρησιμοποιούν τους 37°C για την προστασία των κυτταρικών περιεχομένων σε tagmentation πυρήνων και χαρτογράφησης χρωματίνης. Μελλοντικά θα πρέπει να εξεταστεί αν στους 55°C τα διάτρητα κύτταρα επηρεάζονται, ώστε να αφομοιωθεί η μεθοδολογία των 37°C.

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή ύστερα από την αναστολή του tagmentation (προσθήκη 0,1% σύμφωνα με τον Picelli et al., 2014) το προϊόν ενισχύεται με PCR και εμπεριέχεται σε τελική συγκέντρωση 0,05% SDS το οποίο ανάσπειλε την αντίδραση PCR. Το SDS στις παρακάτω μελέτες ανέσπειλε την αντίδραση PCR σε 0,01% συγκέντρωση (Boiso and Hedman, 2017), (Sekikawa and Toshiki, 2015). Για την αποθήκευση των αντιδράσεων tagmentation θα πρέπει να μελετηθεί η πιθανότητα χρησιμοποίησης χαμηλότερης συγκέντρωσης SDS ή να γίνει περιορισμός του SDS με Tween20 (Chen, Miragaia, Natarajan and Teichmann, 2018) καθώς μην ιοντικά απορυπαντικά (e.g. Nonidet P-40, Tween 20, Triton X-100 and N-octyl glucoside) προκαλούν αναστολή της αντίδρασης PCR σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις (Schrader, Schielke, Ellerbroek and John, 2012). Μία τελευταία εναλλακτική είναι η προστεθεί ένα άλας καλίου για την αδρανοποίηση μέσω δημιουργίας ιζήματος SDS (Hejazi, Erfan and Mortazavi 2013).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdali Narges, 2014. Identification and characterization of channel-forming proteins in the cell wall of *Corynebacterium jeikeium* and *Corynebacterium urealyticum*.

Abdu Hussen, A., 2022. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6(1), pp.010-020.

Abongwa, M., Martin, R. and Robertson, A., 2017. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria*, 67(2), pp.137-152.

Addgene.org. 2022. *Addgene: Handling Plasmids from Addgene - Purifying Plasmid DNA*. [online] Available at: <<https://www.addgene.org/protocols/purify-plasmid-dna/>> [Accessed 23 August 2022].

Adey, A., Morrison, H., (no last name), A., Xun, X., Kitzman, J., Turner, E., Stackhouse, B., MacKenzie, A., Caruccio, N., Zhang, X. and Shendure, J., 2010. Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. *Genome Biology*, 11(12), p.R119.

Beaulaurier, J., Zhu, S., Deikus, G., Mogno, I., Zhang, X., & Davis-Richardson, A. et al. (2017). Metagenomic binning and association of plasmids with bacterial host genomes using DNA methylation. *Nature Biotechnology*, 36(1), 61-69. <https://doi.org/10.1038/nbt.4037>

Blainey, P. (2013). The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 407-427. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12015>

- Boiso, L. and Hedman, J., 2017. Overcoming sodium dodecyl sulfate induced PCR inhibition. *Forensic Science International: Genetics*, 29, pp.e16-e18.
- Case, R., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied And Environmental Microbiology*, 73(1), 278-288. <https://doi.org/10.1128/aem.01177-06>
- Channathodiyil, P. and Houseley, J., 2021. Glyoxal fixation facilitates transcriptome analysis after antigen staining and cell sorting by flow cytometry. *PLOS ONE*, 16(1), p.e0240769.
- Chen, C., Xing, D., Tan, L., Li, H., Zhou, G., Huang, L., & Xie, X. (2017). Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science*, 356(6334), 189-194. <https://doi.org/10.1126/science.aak9787>
- Chen, X., Miragaia, R., Natarajan, K. and Teichmann, S., 2018. A rapid and robust method for single cell chromatin accessibility profiling. *Nature Communications*, 9(1).
- Coltharp, C., & Xiao, J. (2012). Superresolution microscopy for microbiology. *Cellular Microbiology*, 14(12), 1808-1818. <https://doi.org/10.1111/cmi.12024>
- D'Aquino, S., Palma, A., Angioni, A. and Schirra, M., 2013. Residue Levels and Efficacy of Fludioxonil and Thiabendazole in Controlling Postharvest Green Mold Decay in Citrus Fruit When Applied in Combination with Sodium Bicarbonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), pp.296-306.
- D'Onofrio, A., Crawford, J., Stewart, E., Witt, K., Gavrish, E., & Epstein, S. et al. (2010). Siderophores from Neighboring Organisms Promote the Growth of Uncultured Bacteria. *Chemistry & Biology*, 17(3), 254-264. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.02.010>
- Dawson, W., Hör, J., Egert, M., van Kleunen, M., & Pester, M. (2017). A Small Number of Low-abundance Bacteria Dominate Plant Species-specific Responses during Rhizosphere Colonization. *Frontiers In Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00975>
- Diagenode, 2022. *Tagmentase Technical Datasheet*. [online] Diagenode.com. Available at: <<https://www.diagenode.com/files/products/reagents/C01070010-tagmentase.pdf>> [Accessed 12 August 2022].
- Djemiel, C., Dequiedt, S., Karimi, B., Cottin, A., Horrigue, W., & Bailly, A. et al. (2022). Potential of Meta-Omics to Provide Modern Microbial Indicators for Monitoring Soil Quality and Securing Food Production. *Frontiers In Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.889788>
- Doherty, S., Wang, L., Ross, R., Stanton, C., Fitzgerald, G. and Brodkorb, A., 2010. Use of viability staining in combination with flow cytometry for rapid viability assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG in complex protein matrices. *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), pp.301-310.
- Douglas, M. and Rogers, S., 1998. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 401(1-2), pp.77-88.
- Elliott, A., 2019. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry*, 92(1).

- Ganz, T., 2006. LYSOZYME. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, pp.649-653.
- Gilbert, J., Steele, J., Caporaso, J., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., McHardy, A., Knight, R., Joint, I., Somerfield, P., Fuhrman, J. and Field, D., 2011. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME Journal*, 6(2), pp.298-308.
- Goodwin, S., McPherson, J., & McCombie, W. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351.  
<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Green, M. and Sambrook, J., 2018. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), p.pdb.prot095117.
- Green, M. and Sambrook, J., 2021. Cloning Polymerase Chain Reaction (PCR) Products: TA Cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(6), p.pdb.prot101303.
- Han, G., Luong, H., & Vaishnav, S. (2022). Low abundance members of the gut microbiome exhibit high immunogenicity. *Gut Microbes*, 14(1).  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2104086>
- Hare, E. and Johnston, J., 2011. Genome Size Determination Using Flow Cytometry of Propidium Iodide-Stained Nuclei. *Methods in Molecular Biology*, pp.3-12.
- Hejazi, S. M., Erfan, M., & Mortazavi, S. A. (2013). Precipitation Reaction of SDS and Potassium Salts in Flocculation of a Micronized Megestrol Acetate Suspension. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 12(3), 239–246.
- Henikoff, S., Henikoff, J., Kaya-Okur, H. and Ahmad, K., 2020. Efficient chromatin accessibility mapping in situ by nucleosome-tethered tagmentation. *eLife*, 9.
- Hennig, B., Velten, L., Racke, I., Tu, C., Thoms, M., Rybin, V., Besir, H., Remans, K. and Steinmetz, L., 2018. Large-Scale Low-Cost NGS Library Preparation Using a Robust *Tn5* Purification and Tagmentation Protocol. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 8(1), pp.79-89.
- Hibbing, M., Fuqua, C., Parsek, M., & Peterson, S. (2009). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15-25.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hosokawa, M., Nishikawa, Y., Kogawa, M., & Takeyama, H. (2017). Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05436-4>
- Hugerth, L., & Andersson, A. (2017). Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Frontiers In Microbiology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561>
- Hwang, B., Heo, S., Cho, N., Seo, H. and Bang, D., 2019. Facilitated Large-Scale Sequence Validation Platform Using *Tn5*-Tagmented Cell Lysates. *ACS Synthetic Biology*, 8(3), pp.596-600.
- Kaeberlein, T., Lewis, K., & Epstein, S. (2002). Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science*, 296(5570), 1127-1129.  
<https://doi.org/10.1126/science.1070633>

- Karpouzias, D. and Walker, A., 2000. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epl and II to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, 89(1), pp.40-48.
- Kawata, Y., Yano, S. and Kojima, H., 1998. News & Notes: Efficient Library Construction with a TA Vector and Its Application to Cloning of the Phytoene Synthase Gene from the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Current Microbiology*, 37(4), pp.289-291.
- Kia, A., Gloeckner, C., Osothprarop, T., Gormley, N., Bomati, E., Stephenson, M., Goryshin, I. and He, M., 2017. Improved genome sequencing using an engineered transposase. *BMC Biotechnology*, 17(1).
- Kim, S., Kim, J., Okajima, T. and Cho, N., 2017. Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano Convergence*, 4(1).
- Kiso, Y., Li, H., Shigetoh, K., Kitao, T., & Jinno, K. (1996). Pesticide analysis by high-performance liquid chromatography using the direct injection method. *Journal of Chromatography A*, 733(1–2), 259–265.
- Kumar, K., Awasthi, D., Berger, W., Tonge, P., Slayden, R. and Ojima, I., 2010. Discovery of anti-TB agents that target the cell-division protein FtsZ. *Future Medicinal Chemistry*, 2(8), pp.1305-1323.
- Kurm, V., van der Putten, W., de Boer, W., Naus-Wiezer, S., & Hol, W. (2017). Low abundant soil bacteria can be metabolically versatile and fast growing. *Ecology*, 98(2), 555-564. <https://doi.org/10.1002/ecy.1670>
- Lagier, J., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M. and Raoult, D., 2015. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), pp.208-236.
- Lan, F., Demaree, B., Ahmed, N., & Abate, A. (2017). Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding. *Nature Biotechnology*, 35(7), 640-646. <https://doi.org/10.1038/nbt.3880>
- Leung, K., Zahn, H., Leaver, T., Konwar, K., Hanson, N., & Pagé, A. et al. (2012). A programmable droplet-based microfluidic device applied to multiparameter analysis of single microbes and microbial communities. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(20), 7665-7670. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106752109>
- Lindahl, B., Nilsson, R., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., & Kjøller, R. et al. (2013). Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. *New Phytologist*, 199(1), 288-299. <https://doi.org/10.1111/nph.12243>
- Lok, C. (2015). Mining the microbial dark matter. *Nature*, 522(7556), 270-273. <https://doi.org/10.1038/522270a>
- Lu, B., Dong, L., Yi, D., Zhang, M., Zhu, C., Li, X. and Yi, C., 2020. Transposase-assisted tagmentation of RNA/DNA hybrid duplexes. *eLife*, 9.
- MacConaill, L., Burns, R., Nag, A., Coleman, H., Slevin, M., Giorda, K., Light, M., Lai, K., Jarosz, M., McNeill, M., Ducar, M., Meyerson, M. and Thorner, A., 2018. Unique, dual-indexed



sequencing adapters with UMIs effectively eliminate index cross-talk and significantly improve sensitivity of massively parallel sequencing. *BMC Genomics*, 19(1).

Malinowski, M., Alawi, M., Krohn, I., Ruff, S., Indenbirken, D., & Alawi, M. et al. (2020). Deep amoA amplicon sequencing reveals community partitioning within ammonia-oxidizing bacteria in the environmentally dynamic estuary of the River Elbe. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74163-0>

Maynard, L., Smith, O., Tilmans, N., Tham, E., Hosseinzadeh, S., Tan, W., Leenay, R., May, A. and Paulk, N., 2019. Fast-Seq: A Simple Method for Rapid and Inexpensive Validation of Packaged Single-Stranded Adeno-Associated Viral Genomes in Academic Settings. *Human Gene Therapy Methods*, 30(6), pp.195-205.

Merrill, C., Pabon, M., Montgomery, A., Rodan, A. and Rothenfluh, A., 2022. Optimized assay for transposase-accessible chromatin by sequencing (ATAC-seq) library preparation from adult *Drosophila melanogaster* neurons. *Scientific Reports*, 12(1).

Microbiology by numbers. (2011), 9(9), 628-628. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2644>

Modi, A., Vai, S., Caramelli, D., & Lari, M. (2021). The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. *Methods In Molecular Biology*, 15-42. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1099-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1099-2_2)

Morris, J., Kirkegaard, R., Szul, M., Johnson, Z., & Zinser, E. 2008. Facilitation of Robust Growth of *Prochlorococcus* Colonies and Dilute Liquid Cultures by “Helper” Heterotrophic Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 74(14), 4530-4534.

Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J.C. and Joint, I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel 32 electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal* 2: 379–392.

Nakaya, K., Takenaka, O., Horinishi, H. and Shibata, K., 1968. Reactions of glyoxal with nucleic acids, nucleotides and their component bases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 161(1), pp.23-31.

New England Biolabs. (2022). International.neb.com. Retrieved 9 September 2022, from <https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>.

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E., Pham, L., Mehta, A., & Belanger, A. et al. (2010). Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. *Applied And Environmental Microbiology*, 76(8), 2445-2450. <https://doi.org/10.1128/aem.01754-09>

NYE, K., FALLON, D., GEE, B., MESSER, S., WARREN, R. and ANDREWS, N., 1999. A comparison of blood agar supplemented with NAD with plain blood agar and chocolate blood agar in the isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from sputum. *Journal of Medical Microbiology*, 48(12), pp.1111-1114.

Paddock, S., 2000. Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Molecular Biotechnology*, 16(2), pp.127-150.

Panic, G., Duthaler, U., Speich, B. and Keiser, J., 2014. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), pp.185-200.

Pérez-Cobas, A., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial Genomics*, 6(8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409>

Perruchon, C., Chatzinotas, A., Omirou, M., Vasileiadis, S., Menkissoglou-Spiroudi, U. and Karpouzias, D., 2017. Isolation of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole: the key role of a *Sphingomonas* phylotype. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(9), pp.3881-3893.

Perruchon, C., Patsioura, V., Vasileiadis, S. and Karpouzias, D., 2015. Isolation and characterisation of a *Sphingomonas* strain able to degrade the fungicide ortho-phenylphenol. *Pest Management Science*, 72(1), pp.113-124.

Peterson, B., Sharma, P., van der Mei, H. and Busscher, H., 2012. Bacterial Cell Surface Damage Due to Centrifugal Compaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), pp.120-125.

Picelli, S., Björklund, Å., Reinius, B., Sagasser, S., Winberg, G. and Sandberg, R., 2014. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome Research*, 24(12), pp.2033-2040.

Poretsky, R., Rodriguez-R, L., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. (2014). Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *Plos ONE*, 9(4), e93827.

Pust, M., & Tümmler, B. (2022). Bacterial low-abundant taxa are key determinants of a healthy airway metagenome in the early years of human life. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 20, 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.008>

QIAGEN, 2022. *How much DNA does a bacterial cell contain?* [online] Qiagen.com. Available at: <<https://www.qiagen.com/ca/resources/faq?id=3fd851fb-3a5e-4907-a5e1-8e6457f5ca27&lang=en>> [Accessed 14 August 2022].

Richter, K., Revelo, N., Seitz, K., Helm, M., Sarkar, D., Saleeb, R., D'Este, E., Eberle, J., Wagner, E., Vogl, C., Lazaro, D., Richter, F., Coy-Vergara, J., Coceano, G., Boyden, E., Duncan, R., Hell, S., Lauterbach, M., Lehnart, S., Moser, T., Outeiro, T., Rehling, P., Schwappach, B., Testa, I., Zapiec, B. and Rizzoli, S., 2017. Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *The EMBO Journal*, 37(1), pp.139-159.

Rinke, C., Lee, J., Nath, N., Goudeau, D., Thompson, B., & Poulton, N. et al. (2014). Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nature Protocols*, 9(5), 1038-1048. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.067>

Sahu, S., Basu, A. and Tiwari, V., 2021. Measuring Chromatin Accessibility:. *Methods in Molecular Biology*, pp.105-121.

Sarcina, M. and Mullineaux, C., 2000. Effects of tubulin assembly inhibitors on cell division in prokaryotes in vivo. *FEMS Microbiology Letters*, 191(1), pp.25-29.

- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., & Levesque, C. et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), pp.1014-1026.
- Sekikawa, T. and Toshiki, K., 2015. A new method for efficient detection of Cryptosporidium RNA by real-time reverse transcription-PCR with surfactants. *Water Supply*, 15(5), pp.1061-1068.
- Sizova, M., Hohmann, T., Hazen, A., Paster, B., Halem, S., & Murphy, C. et al. (2012). New Approaches for Isolation of Previously Uncultivated Oral Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(1), 194-203. <https://doi.org/10.1128/aem.06813-11>
- Slayden, R., 2006. Identification of cell cycle regulators in Mycobacterium tuberculosis by inhibition of septum formation and global transcriptional analysis. *Microbiology*, 152(6), pp.1789-1797.
- Stepanauskas, R., & Sieracki, M. (2007). Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 104(21), 9052-9057. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700496104>
- Tanaka, Y., Hanada, S., Manome, A., Tsuchida, T., Kurane, R., Nakamura, K. and Kamagata, Y., 2004. Catellibacterium nectariphilum gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus Sphingomonas for vigorous growth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), pp.955-959.
- TECHNOLOGY ▶ bitBiome, Inc.. bitBiome, Inc. (2022). Retrieved 31 August 2022, from <https://bitbiome.co.jp/en/technology/#bitmap>.
- US EPA. (2002) Registration eligibility decision (RED): Thiabendazole. In: US Environmental Protection Agency (Ed.). EPA-738-F-02-002: US Environmental Protection Agency.
- Vasileiadis, S., Perruchon, C., Scheer, B., Adrian, L., Steinbach, N., Trevisan, M., Plaza-Bolaños, P., Agüera, A., Chatzinotas, A. and Karpouzias, D., 2022. Nutritional inter-dependencies and a carbazole-dioxygenase are key elements of a bacterial consortium relying on a Sphingomonas for the degradation of the fungicide thiabendazole. *Environmental Microbiology*,.
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *Plos ONE*, 8(2), e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Vonesch, S., Li, S., Szu Tu, C., Hennig, B., Dobrev, N. and Steinmetz, a., 2020. Fast and inexpensive whole-genome sequencing library preparation from intact yeast cells. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 11(1), pp.1-12.
- Wang, Q., Gu, L., Adey, A., Radlwimmer, B., Wang, W., Hovestadt, V., Bähr, M., Wolf, S., Shendure, J., Eils, R., Plass, C. and Weichenhan, D., 2013. Tagmentation-based whole-genome bisulfite sequencing. *Nature Protocols*, 8(10), pp.2022-2032.

Wen, L., & Tang, F. (2022). Recent advances in single-cell sequencing technologies. *Precision Clinical Medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbac002>

Worldwide.promega.com. 2022. *Biomath Calculators | DNA Calculator | Vector Insert Ratio*. [online] Available at: <<https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>> [Accessed 9 August 2022].

Worldwide.promega.com. 2022. *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems*. [online] Available at: <<https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>> [Accessed 9 August 2022].

Woyke, T., Doud, D., & Schulz, F. (2017). The trajectory of microbial single-cell sequencing. *Nature Methods*, 14(11), 1045-1054.

Xu, L., Brito, I., Alm, E., & Blainey, P. (2016). Virtual microfluidics for digital quantification and single-cell sequencing. *Nature Methods*, 13(9), 759-762.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3955>

Yang, C., Chowdhury, D., Zhang, Z., Cheung, W., Lu, A., Bian, Z., & Zhang, L. (2021). A review of computational tools for generating metagenome-assembled genomes from metagenomic sequencing data. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 19, 6301-6314.  
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.028>

Yin, Y., Jiang, Y., Lam, K., Berletch, J., Disteche, C., & Noble, W. et al. (2019). High-Throughput Single-Cell Sequencing with Linear Amplification. *Molecular Cell*, 76(4), 676-690.e10.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.002>

Zachariadis, V., Cheng, H., Andrews, N. and Enge, M., 2020. A Highly Scalable Method for Joint Whole-Genome Sequencing and Gene-Expression Profiling of Single Cells. *Molecular Cell*, 80(3), pp.541-553.e5.

Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E., Short, J. and Keller, M., 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), pp.15681-15686.

Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y. and Zhou, M., 2016. Mechanism of Action of the Benzimidazole Fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with Polymerization of Monomeric Tubulin But Not Polymerized Microtubule. *Phytopathology*<sup>®</sup>, 106(8), pp.807-813.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Διάγραμμα μετρήσεων TBZ στο υπερκείμενο των καλλιεργειών της βακτηριακής κοινοπραξίας.
  - A. Η πρώτη καλλιέργεια προέκυψε από τα στοκ γλυκερόλης στους -80oC με 50 μL από το στοκ και 4950 μL MSMN+TBZ (Μία 5ml καλλιέργεια)
  - B. Η δεύτερη καλλιέργεια περιέχει 50 μL από την πρώτη καλλιέργεια και 4950 μL MSMN+TBZ (Μία 5ml καλλιέργεια)
  - C. Η τρίτη καλλιέργεια περιέχει 500 μL από την δεύτερη καλλιέργεια και 9500 μL MSMN+TBZ (Πέντε 10ml καλλιέργειες)

\*Οι ανακαλλιέργειες έχουν μια εβδομάδα διαφορά από τις οποίες πριν γίνεται η μέτρηση στην HPLC

\*Η συγκέντρωση του TBZ είναι περίπου ίσο με 25 μg/ml

\*Ο μάρτυρας είναι καλλιέργειες χωρίς κύτταρα

\*Τα δείγματα φωτρώνονται στην HPLC διαλυμένα 2-1 σε μεθανόλη, οπότε τη τιμή της HPLC πολλαπλασιάζεται X3 για την τιμή της συγκέντρωσης

Πίνακας 2: Τιμές συγκέντρωσης TBZ από HPLC σε καλλιέργειες βακτηριακής κοινοπραξίας καταβολισμού TBZ.

| Καλλιέργεια | Τιμή HPLC | Συγκέντρωση TBZ μg/ml | Στάδιο ανάπτυξης                             |
|-------------|-----------|-----------------------|--|
| Μάρτυρας    | 7,39      | 22,17                 | -  |
| A           | 7,29      | 21,87                 | Κατανάλωση γλυκερόλης                        |
| B           | 0,04      | 0,12                  | Προώθηση ανάπτυξης κυττάρων καταβολισμού TBZ |
| C           | 0,02      | 0,06                  | Παραγωγή κυτταρικής μάζας                    |

## 2. NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA (740588.250, MACHEREY-NAGEL)

Για απομόνωση πλασμιδίου από *E. coli*. Πριν την εκκίνηση έλεγχος για την παρουσία αιθανόλης στο διάλυμα A4. Καλλιέργεια κυττάρων 5 ml από κορεσμένη LB καλλιέργεια, φυγοκεντρήστε τα κύτταρα για 30' στα 11,000 x g. Αποχύστε το υπερκείμενο. Προσθέστε 250 μL διάλυμα A1. Επαναδιαλύστε τα κύτταρα με vortex. Προσθέστε 250 μL διάλυμα A2. Αναδεύστε ομαλά αναποδογυρίζοντας το τον σωλήνα 6-8 φορές. Μην χρησιμοποιείτε vortex για την αποφυγή ρήξης του γενωμικού DNA. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέστε 300 μL διάλυμα A3. Αναδεύστε έντονα αναποδογυρίζοντας το τον σωλήνα μέχρι πλήρους αποχρωματισμού. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 11,000 x g θερμοκρασία δωματίου. Επανάληψη αυτού του βήματος σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν είναι διαυγές. Φορτώστε το υπερκείμενο στην στήλη και φυγοκεντήστε για 1 λεπτό στα 11,000 x g. Αποχύστε τα υπολείμματα της στήλης και επανατοποθετήστε την στο σωλήνα περισυλλογής. Επανάληψη αυτού του βήματος μέχρι φόρτωσης όλου του υπερκειμένου. Ξεπλύνετε την στήλη με 500 μL διαλύματος AW και φυγοκεντρήστε για 1 λεπτό στα 11,000 x g. Προσθέστε 600 μL διαλύματος A4 και φυγοκεντρήστε για 1 λεπτό στα 11,000 x g. Αποχύστε τα υπολείμματα της στήλης και επανατοποθετήστε την στο σωλήνα περισυλλογής. Αποστράγγιση της στήλης από το προηγούμενο διάλυμα φυγοκεντρώντας χωρίς περιοχόμενο για 5 λεπτά στα 11,000 x g και πετάξτε το σωλήνα περισυλλογής. Τοποθετήστε την στήλη σε έναν άλλον σωλήνα και προσθέστε 50 μL διάλυμα έκλουσης AE. Επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήστε για 1 λεπτό στα 11,000 x g. Αποθηκεύστε το πλασμίδιο στους -20°C.

## 3. Προετοιμασία θρεπτικού μέσου minimal salts medium with nitrogen (MSMN) με thiabendazole:

Πρωτόκολλο για 1lt:

1) Ετοιμάστε τα ακόλουθα stocks σε :

Stock1 (x10 συγκέντρωση)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    22.7 g/lt

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O    59.7 g/lt

NH<sub>4</sub>Cl                        10.0 g/lt

Stock2 (x10)

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 g/lit

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g/lit

MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.2 g/lit

Stock3 (x50)

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O / FeSO<sub>4</sub> 0.46/0.25 g/lit

- 2) Αποστειρώστε τα stock 1 και 2 και φιλτράρετε το stock 3 (ελέγξτε και ίζημα)
- 3) Ενώστε 100 ml από το stock 1 με 780 ml ddH<sub>2</sub>O και αποστειρώστε ξανά για την παραγωγή του διαλύματος 1.
- 4) Σε ασηπτικές συνθήκες προσθέστε 100 ml από το stock 2 και 20 ml από το stock 3 στο 880 ml αποστειρωμένου διαλύματος 1.
- 5) Προσθέστε thiabendazole διαλυμένο σε DMSO σε τελική συγκέντρωση 25 μL/ml