

Τίτλος: ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Συγγραφείς: Ε. Χρονοπούλου, Ν. Λάμπρου

Έδρα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Προφορική ομιλία

Poster

ΣΚΟΠΟΣ

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs, EC 2.5.1.18) είναι ένζυμα τα οποία αποτελούν κύρια συστατικά του σημαντικότερου μηχανισμού αποικοδόμησης και απομάκρυνσης τοξικών ουσιών από το κύτταρο. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη νέων και απλοποιημένων μεθόδων ανίχνευσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα, βασισμένων στο ένζυμο GST.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελέτη GST δραστηριότητας εκχυλισμάτων από φυτά καταπονημένα και μη, των ειδών *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max*, ως προς πέντε υποστρώματα. Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης από τα καταπονημένα φυτά και *In vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη GST γονιδίων (DNA shuffling). Επιλογή του καταλληλότερου κλώνου και ετερόλογη έκφραση του σε *E.coli*. Καθαρισμός με χρωματογραφία, κινητική ανάλυση, μελέτη ειδικής δραστηριότητας ως προς 20 υποστρώματα και ενζυμικής αναστολής ως προς 63 φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δημιουργήθηκε cDNA βιβλιοθήκη από τα καταπονημένα φυτά *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max* χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκφυλισμένους εκκινητές και αντίστροφη μεταγραφή-PCR. Τα GST γονίδια υποβλήθηκαν σε *in vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη. Η βιβλιοθήκη χιμαιρικών GST γονιδίων που προέκυψε κλωνοποιήθηκε σε φορέα κατάλληλο για έκφραση σε *E. coli*. Σάρωση της βιβλιοθήκης οδήγησε στην επιλογή μιας νέας μορφής GST ενζύμου. Η μορφή αυτή εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή δράση μεταφοράς και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Μελετώντας 63 διαφορετικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα βρέθηκαν κυρίως τα μυκητοκτόνα να είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου. Το ένζυμο στην ακινητοποιημένη του μορφή εφαρμόζεται για την ανάπτυξη οπτικού βιοαισθητήρα προσδιορισμού των μυκητοκτόνων αυτών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέθοδοι όπως η *In vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη και μεταλλαξογένεση μπορούν να οδηγήσουν σε πιο δραστικούς φυτικούς κλώνους GSTs και μεγαλύτερης εκλεκτικότητας σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Συνεπώς μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη απλών τεχνικών ανάλυσης υπολειμματικότητας τοξικών ουσιών σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα και στην κατασκευή βιοαισθητήρων.