

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΓΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΠΟΥ  
ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΤΟ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ *ACHILLES*  
ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ**

**ΚΑΤΕΧΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

ΛΑΡΙΣΑ 2012

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος  
Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Αυγουστίνος Αντώνης  
Διδάσκοντας ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μόσιαλος Δημήτριος  
Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξ' ολοκλήρου στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, για την ανάθεση της εκπόνησης της παρούσας εργασίας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της πραγματοποίησής της. Οι συμβουλές καθώς και η καθοδήγησή του υπήρξαν πολύτιμες.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη, Υποψήφια Διδάκτορα, για την άψογη συνεργασία. Η διαρκής στήριξη που μου παρείχε και οι συμβουλές της με βοήθησαν να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Το ελαιόδεντρο.....	6
1.2. Ο δάκος της ελιάς.....	7
1.2.1. Μορφολογία.....	7
1.2.2. Βιολογία.....	9
1.2.3. Μελέτη και έλεγχος του πληθυσμού.....	10
1.2.4. Καταπολέμηση.....	11
1.2.5. Γενετικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά.....	13
1.3. Μεταθετά στοιχεία.....	15
1.3.1. DNA τρανσποζόνια.....	16
1.3.2. Ρετρομεταθετά στοιχεία.....	17
1.3.2.1. LTR ρετρομεταθετά στοιχεία.....	17
1.3.2.2. Non-LTR ρετρομεταθετά στοιχεία.....	19
1.4. Σκοπός εργασίας.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR.....	21
2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	24
2.3. Πέψη DNA με ενζυμα περιορισμού.....	27
2.4. Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	29
2.5. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA.....	30
2.6. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυνασμένα πλασμίδια.....	32
2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	36
2.8. Μερική πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού.....	38
2.9. Σύνθεση μονόκλωνων RNA ανιχνευτών με την μέθοδο της μεταγραφής in vitro.....	41
2.10. Υβριδοποίηση κατά Southern.....	43

2.11. Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA, επεξεργασία της αλληλουχίας με το πρόγραμμα Omiga και ομοπαράθεση αλληλουχιών με το πρόγραμμα Blast.....	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
3.1. Χαρτογράφηση με την μέθοδο της μερικής πέψης του φάγου 443 (Φ443).....	50
3.2. Κλωνοποίηση τμήματος 1.9kb H/H.....	52
3.2.1. Υποκλωνοποίηση του τμήματος 1.9kb H/H.....	52
3.3. Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης των τμημάτων 1.0kb H/Hc, 0.9kb H/Hc, 1.350kb E/H και 0.9kb E/N.....	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	62

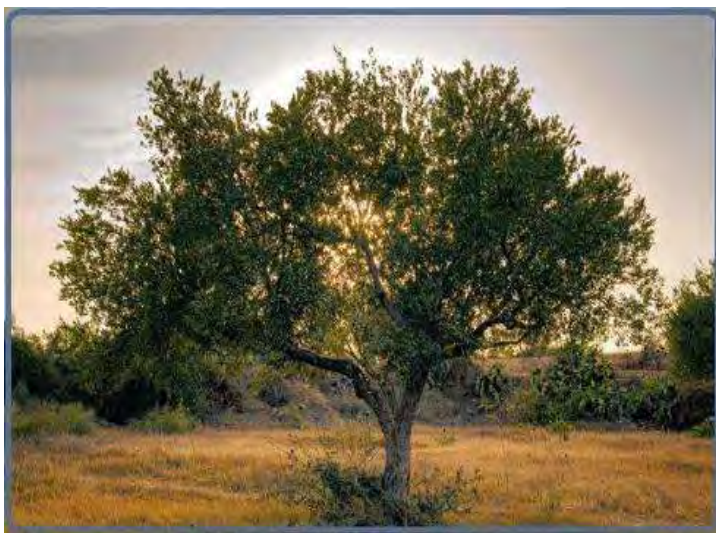
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι αδιαμφισβήτητα ο κυριότερος εχθρός των ελαιοκαλλιεργειών τόσο στην Ελλάδα όσο και στις άλλες ελαιοπαραγωγικές μεσογειακές χώρες. Η τεράστια οικονομική σημασία των ελαιοκαλλιεργειών, οδηγεί στην ανάπτυξη εναλλακτικών, πιο αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων δακοπροστασίας. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει επαρκής γνώση της μοριακής οργάνωσης του εντόμου, και αυτό αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη γενετικών μεθόδων διαχείρισης και ελέγχου του. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η συνεισφορά στην απόκτηση γνώσης της μοριακής οργάνωσης του δάκου μέσω της ολοκλήρωσης της δομής του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* του εντόμου. Στα πλαίσια της προσπάθειας αυτής επιτεύχθηκε η χαρτογράφηση του φάγου 443, ο οποίος από προηγούμενες μελέτες ήταν γνωστό ότι εμπεριείχε το εν λόγω ρετρομεταθετό στοιχείο. Η υποκλωνοποίηση και ανάλυση επιμέρους τμημάτων του φάγου 443, οδήγησε στην απομόνωση μέρους του γονιδίου gag-pol του στοιχείου *Achilles*.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Το ελαιόδεντρο

Παγκοσμίως η ελιά θεωρείται σύμβολο ειρήνης, ευημερίας, γνώσης, σοφίας και ελπίδας. Το ελαιόδεντρο σε άγρια μορφή υποστηρίζεται ότι πρωτοεμφανίστηκε στην Ελλάδα το 12000 π.Χ. και καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά, σύμφωνα με την ιστορία, από τους Σύριους ή από τον Μινωικό πολιτισμό μεταξύ 3500-2500 π.Χ. Οι χρήσεις του ελαιόλαδου στην



Ελλάδα ήταν πολλές από αρχαιοτάτων χρόνων και η ελιά είχε συνδεθεί με τον πολιτισμό, τη θρησκεία, τη διατροφή και την υγεία. Αυτό αποδεικνύεται από τα πάμπολλα αρχαιολογικά ευρήματα που μαρτυρούν την σπουδαιότητα της ελιάς για την Ελλάδα και την άμεση σχέση της με το κοινωνικό περιβάλλον.

Καλλιεργούνται περισσότερα από 750 εκατομμύρια ελαιόδεντρα παγκοσμίως, το 95% αυτών στις Μεσογειακές χώρες. Η μεγαλύτερη παραγωγή ελαιόλαδου προέρχεται από τη νότια Ευρώπη, τη βόρειο Αφρική και την Εγγύς Ανατολή. Από την Ευρωπαϊκή παραγωγή, το 93% προέρχεται από την Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα. Η ισπανική επαρχία Jaén είναι παγκοσμίως γνωστή ως η επαρχία με τους περισσότερους και μεγαλύτερους ελαιώνες. Η Ισπανία κατέχει την πρώτη θέση στην παραγωγή και την εξαγωγή ελιών και ελαιόλαδου ενώ στο έδαφός της καλλιεργούνται περισσότερα από 300 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Η Ιταλία είναι η δεύτερη ελαιοπαραγωγική χώρα της Ευρώπης, με τα 2/3 της παραγωγής της να ανήκουν στην κατηγορία “εξαιρετικά παρθένο”.

Η Ελλάδα είναι η τρίτη μεγαλύτερη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο. Με κριτήριο την ποιότητα όμως, η Ελλάδα κατατάσσεται πρώτη στον κόσμο, καθώς σύμφωνα με στοιχεία του Συνδέσμου Ελληνικών Βιομηχανιών Τυποποίησης Ελαιόλαδου (Σ.Ε.ΒΙ.Τ.Ε.Λ.), πάνω από το 70% της Ελληνικής παραγωγής ελαιόλαδου είναι εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Στην Ελλάδα σχεδόν το 60% του καλλιεργούμενου εδάφους της είναι ελαιώνες ενώ είναι η χώρα με τις περισσότερες ποικιλίες ελιάς. Στο έδαφός της καλλιεργούνται περισσότερα από

132 εκατομμύρια ελαιόδεντρα, από τα οποία παράγονται περίπου 350.000 τόνοι ελαιόλαδου ετησίως, εκ των οποίων το 82% ανήκει στην κατηγορία εξαιρετικά-παρθένο. Περίπου η μισή από την ετήσια ελληνική παραγωγή ελαιόλαδου εξάγεται προς τις χώρες της Ευρωπαϊκής



Ένωσης, κυρίως στην Ιταλία, η οποία απορροφά περίπου τα  $\frac{3}{4}$  του συνόλου της ελληνικής εξαγωγής. Οι πιο σημαντικές ελαιοπαραγωγικές περιοχές στην Ελλάδα είναι η Πελοπόννησος, η οποία παράγει το 65% της συνολικής παραγωγής, καθώς επίσης και η Κρήτη και τα νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου. Η περισσότερο βραβευμένη ελληνική ποικιλία ελιάς είναι η Κορωνέικη, προερχόμενη από την Κορώνη της Μεσσηνίας (Prosodol,2009).

Η ελαιοκαλλιέργεια έχει πολύ μεγάλη κοινωνική και οικονομική σημασία στην Ελλάδα, δεδομένου ότι περίπου 450.000 οικογένειες ασχολούνται με αυτή. Επομένως είναι επίσης σημαντική η καταπολέμηση των εχθρών και των ασθενειών του δέντρου της ελιάς. Ο δάκος της ελιάς είναι το σοβαρότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η ελαιοπαραγωγή. Η ζημιά που προκαλεί στον καρπό, αν δεν ληφθούν έγκαιρα τα κατάλληλα μέτρα προστασίας, είναι δυνατό να υπερβεί το 50-60%. Η ζημιά είναι ποσοτική και ποιοτική, διότι υποβαθμίζει την ποιότητα των ποικιλιών ελιάς, καθώς και την ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου με την αύξηση της οξύτητάς του (Πατσιάς Α.,2005).

## 1.2 Ο δάκος της ελιάς

### 1.2.1 Μορφολογία

Ο δάκος (βλ. εικόνα 1), *Bactrocera oleae*, αποτελεί το σημαντικότερο εχθρό της ελιάς στη χώρα μας, καθώς και σε όλες τις παραμεσόγειες χώρες. Προσβάλλει μόνο τον καρπό της καλλιεργούμενης ή άγριας ελιάς. Ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Δίπτερων, γένος *Bactrocera* και είδος *oleae*.



**Εικόνα 1:** Ο δάκος της ελιάς

Το τέλειο έντομο είναι μία μύγα που το μήκος του σώματός της είναι περίπου 4 - 5 mm, με κεφαλή κιτρινοκόκκινη, με σύνθετους οφθαλμούς ιριδίζοντες κυανοπράσινους και με δύο κηλίδες μαύρες κάτω από τις κεραίες. Ο θώρακας είναι κιτρινοκόκκινος και το ραχιαίο τμήμα είναι μαύρο με τέσσερις ταινίες γκριζές. Η πλευρά του μεσοθώρακα και το οπίσθιο χείλος του θυρεού είναι λευκά. Η κοιλιά έχει χρώμα καστανό με κοκκινωπά στίγματα. Ο ωοθέτης έχει χρώμα μαύρο και μήκος 1 mm.

Το αυγό (εικόνα 2i) είναι ελλειψοειδές επίμηκες, και έχει μήκος περίπου 0,8 mm.

Η προνύμφη (larva) (εικόνα 2ii) είναι υπόλευκη με τελικό μήκος 7 – 8 mm. Το πρόσθιο μέρος του σώματός της είναι στενότερο από το οπίσθιο, δεν έχει κεφαλική κάψα και τα στοματικά μόρια είναι του τύπου των γναθικών αγκίστρων. Χαρακτηριστικό των διπτέρων αυτών είναι ότι έχουν τρία προνυμφικά στάδια.

Η νύμφη (εικόνα 2iii) έχει σχήμα κυλινδρικό και μήκος 4 – 5 mm. Το χρώμα της είναι λευκό αλλά με την πάροδο των ημερών γίνεται καστανοκίτρινο. Για την έξοδο του ακμαίου γίνεται μια κυκλική σχισμή στο άκρο της πλαγγόνας όπου βρίσκεται η κεφαλή του νεαρού εντόμου (Γιαμβριάς Χ.,1998).



**Εικόνα 2:** Τα μορφολογικά στάδια του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*) i) το αυγό του δάκου, ii) η προνύμφη του δάκου και iii) η νύμφη του δάκου



## 1.2.2 Βιολογία

Ο δάκος της ελιάς έχει 3-4 γενιές το έτος στις πιο πολλές περιοχές της χώρας μας. Κατά τη χειμερινή περίοδο το μεγαλύτερο ποσοστό του δάκου βρίσκεται στο έδαφος ως νύμφη, χωρίς όμως να αποκλείεται και η παρουσία τέλειων εντόμων του δάκου, που παραμένουν κρυμμένα και αδρανοποιημένα σε ρωγμές του φλοιού των δέντρων. Σε περιοχές με ήπιο χειμώνα όταν υπάρχει στα δέντρα κατάλληλος καρπός, είναι δυνατό να υπάρχουν στον ελαιώνα όλα τα στάδια του εντόμου, σπάνια όμως το αυγό. Τον Φεβρουάριο αρχίζει η έξοδος των ακμαίων. Τα ακμαία τρέφονται από μελιτώδη εκκρίματα που βρίσκονται σε διάφορα φυτά και μπορεί να προέρχονται και από έντομα. Η σύζευξη στη φύση γίνεται 2-3 ημέρες μετά την έξοδο των ακμαίων. Το θηλυκό συζεύγνυται μία φορά, ενώ το αρσενικό είναι πολυγαμικό. Τον Ιούλιο, όταν ο καρπός πλησιάσει στο τελικό του μέγεθος και γίνει αρκετά μαλακός ώστε να μπορεί να τον τρυπήσει ο ωοθέτης του θηλυκού, αρχίζει η ωοτοκία. Το θηλυκό ανοίγει με τον ωοθέτη του την οπή ωοτοκίας και εισάγει στο μεσοκάρπιο ένα αυγό. Κατά βάση εισάγει ένα αυγό ανά καρπό, σε περιπτώσεις όμως πολύ πυκνού πληθυσμού ή λίγων καρπών παρατηρούνται και περισσότερες από μία ωοθεσίες ανά καρπό. Η προνύμφη του δάκου μετά την εκκόλασή της από το αυγό αρχίζει να τρέφεται από τη σάρκα του καρπού, δηλαδή από το μεσοκάρπιο, όπου ανοίγει στοά που σταδιακά διευρύνεται παράλληλα με την εξέλιξη της προνύμφης. Προς το τέλος της ανάπτυξής της, η προνύμφη κατευθύνεται προς την επιδερμίδα του καρπού όπου ανοίγει ένα κοίλωμα μέσα στο οποίο νυμφώνεται, προετοιμάζοντας έτσι την έξοδο του ακμαίου. Την θερινή περίοδο η νύμφωση γίνεται μέσα στον καρπό ενώ το φθινόπωρο η προνύμφη στο τέλος της ανάπτυξής της ανοίγει οπή και πέφτει στο έδαφος όπου και νυμφωνεται σε μικρό βάθος (Γιαμβριάς Χ., 1998).

Η εξέλιξη και η δραστηριότητα του δάκου της ελιάς εξαρτώνται κυρίως από τις κλιματολογικές συνθήκες της κάθε εποχής. Οι ευνοϊκές θερμοκρασίες περιβάλλοντος κυμαίνονται μεταξύ 20°C και 28°C ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 35°C διακόπτεται η δραστηριότητα του εντόμου. Η διάρκεια της προνυμφικής περιόδου είναι 12 έως 13 ημέρες στους 18°C, ενώ στους 25°C είναι 9 έως 14. Η οριακή θερμοκρασία για τις προνύμφες είναι οι 47,6°C με σχετική υγρασία 9%. Η διάρκεια της νυμφικής περιόδου είναι 11 ημέρες στους 25°C (Neuenschwander et al., 1986).

### 1.2.3 Μελέτη και έλεγχος του πληθυσμού

Ο δάκος είναι ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς στη χώρα μας και σε αρκετές άλλες παραμεσόγειες χώρες. Στην Ελλάδα έχει μελετηθεί όσο κανένα άλλο έντομο. Η χώρα μας εδώ και πολλά χρόνια δαπανά αξιόλογα ποσά ετησίως για την καταπολέμηση του δάκου και για έρευνες που έχουν σκοπό τη βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησής του (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 1998).

Ένας αποτελεσματικός τρόπος για την παρακολούθηση των πληθυσμών του δάκου στους ελαιώνες είναι η χρήση διαφόρων τύπων παγίδων με μία ή περισσότερες ελκυστικές πηγές. Αυτές οι πηγές μπορεί να είναι ελκυστικές ουσίες οσμής ή τροφής ή φύλου (φερομόνες) ή ελκυστικό χρώμα.

Ένας κλασικός τύπος δακοπαγίδας που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η γυάλινη ή πλαστική παγίδα McPhail (εικόνα 3), της οποίας η ελκυστική ουσία είναι υδατικό διάλυμα φωσφορικού διαμμώνιου ή θειικής αμμωνίας 2-3%. Τα ακμαία του δάκου ελκύονται από την αμμωνία, εισέρχονται στην παγίδα και πνίγονται στο διάλυμα. Σε πληθυσμιακές μελέτες χρησιμοποιείται συνήθως μία παγίδα McPhail ανά είκοσι περίπου δέντρα, ανάλογα με τη διάταξη των δέντρων και την περιοχή. Κάθε επτά ημέρες γίνεται έλεγχος των παγίδων και αλλαγή του ελκυστικού υγρού. Κατά τον έλεγχο γίνεται καταμέτρηση των δάκων και διαχωρισμός τους ανάλογα με το φύλο. Επιπλέον γίνεται έλεγχος για ώριμα ωάρια στις ωοθήκες των θηλυκών.



**Εικόνα 3:** Η παγίδα McPhail

Μια άλλη δακοπαγίδα είναι η κίτρινη κολλητική παγίδα (εικόνα 4) που αποτελείται από ένα κομμάτι ξύλου κοντραπλακέ ή σκληρού χαρτονιού με διαστάσεις 15X20cm περίπου. Αρχικά αυτό το κομμάτι ξύλου βάφεται σε κίτρινο χρώμα και στη συνέχεια προστίθεται η ειδική κόλλα που διαρκεί για πολλούς μήνες. Η βασική χρησιμότητα της παγίδας αυτής είναι ότι προσδιορίζει το χρόνο εμφάνισης του δάκου στον ελαιώνα και τις διακυμάνσεις των πληθυσμών του όλη την περίοδο μέχρι τη συγκομιδή του καρπού. Εναλλακτικά μπορεί να συνδυαστεί και με φιαλίδια που περιέχουν διάφορες μορφές υδρολυμένης πρωτεΐνης ως ελκυστική πηγή τροφής.



**Εικόνα 4 :** Η κίτρινη κολλητική παγίδα

Εκτός από τις γυάλινες παγίδες τύπου McPhail, οι άλλοι τύποι παγίδων χρησιμοποιούνται και για την καταπολέμηση του δάκου με την μαζική σύλληψη των ακμαίων (Γιαμβριας, 1998; Πατσιάς, 2005).

#### **1.2.4 Καταπολέμηση**

Η απόφαση για την καταπολέμηση του δάκου βασίζεται στα αποτελέσματα της πληθυσμιακής παρακολούθησής του. Τα στοιχεία που συλλέγονται από τις δακοπαγίδες προσδιορίζουν το χρόνο επεμβάσεως για την αντιμετώπιση των προσβολών. Τα δεδομένα των παγίδων θα πρέπει να συνδυάζονται και με δειγματοληψίες στον ελαιόκαρπο για τον προσδιορισμό του μεγέθους προσβολής καθώς επίσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι κλιματολογικές συνθήκες κάθε περιοχής και κάθε εποχής του χρόνου. Η κύρια μέθοδος καταπολέμησης που εφαρμόζεται με επιτυχία εδώ και χρόνια είναι η χημική, η οποία

περιλαμβάνει ψεκασμούς με εντομοκτόνα. Επίσης υπάρχουν βιολογικές μέθοδοι όπως η εισαγωγή και εξαπόλυση φυσικών εχθρών του δάκου και οι μαζικές εξαπολύσεις στειρωμένων με ακτινοβολία δάκων.

Στη χημική καταπολέμηση τα καλύτερα μέχρι σήμερα αποτελέσματα έχουν δώσει δύο οργανοφωσφορικά διασυστηματικά εντομοκτόνα το fenthion και το dimethoate. Η δράση των περισσότερων εντομοκτόνων έγκειται στο να σκοτώνουν τις προνύμφες του δάκου μέσα στον ελαιόκαρπο. Η χημική καταπολέμηση περιλαμβάνει δύο κατηγορίες ψεκασμών : τους προληπτικούς ψεκασμούς (δολωματικούς) και τους θεραπευτικούς ψεκασμούς (καθολικούς).

Οι προληπτικοί ψεκασμοί είναι ο κυριότερος και ο πιο οικονομικός τρόπος καταπολέμησης του δάκου. Το εντομοκτόνο έχει αναμειχθεί με μία ελκυστική ουσία, που συνήθως είναι μία υδρολυμένη πρωτεΐνη, με σκοπό την προσέλκυση και βρώση του από τα ενήλικα έντομα πριν προλάβουν να ωοτοκήσουν στον ελαιόκαρπο. Με αυτή την μέθοδο δεν χρειάζεται να ψεκαστεί όλο το δέντρο αλλά ούτε και όλα τα δέντρα του ελαιώνα. Οι ψεκασμοί μπορεί να γίνονται από το έδαφος ή και από αέρος (αεροψεκασμοί).

Οι θεραπευτικοί ψεκασμοί χρησιμοποιούνται σε περίπτωση μεγάλου πληθυσμού του δάκου ή εφόσον παρατηρηθεί προσβολή στον καρπό. Το δέντρο καλύπτεται πλήρως με το ψεκαστικό υγρό από το έδαφος με σκοπό να σκοτωθούν όχι μόνο τα ενήλικα αλλά και οι προνύμφες μέσα στον καρπό. Η μέθοδος των θεραπευτικών ψεκασμών όμως επιβαρύνει το περιβάλλον γιατί έχει ως συνέπεια τη θανάτωση πολλών ωφέλιμων εντομοφάγων εντόμων με αποτέλεσμα τις εξάρσεις πληθυσμών κοκκοειδών εντόμων και άλλων εχθρών της ελιάς.

Η βιολογική καταπολέμηση περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση παρασίτων του δάκου μετά από πολλαπλασιασμό τους σε τεχνητές συνθήκες. Για παράδειγμα το παράσιτο *Opius concolor* εξαπολύεται μαζικά στην περιοχή του ελαιώνα και προσβάλλει την προνύμφη του δάκου.

Ένας εναλλακτικός τρόπος καταπολέμησης του δάκου είναι η μαζική εξαπόλυση στειρωμένων αρσενικών δάκων. Η μέθοδος αυτή (S.I.T., Sterile Insect Technique) είναι μία μέθοδος βιολογικού έλεγχου πληθυσμού εντόμων, σύμφωνα με την οποία απελευθερώνεται μεγάλος αριθμός στειρωμένων αρσενικών εντόμων. Το ζευγάρι των στείρων αρσενικών με τα άγρια θηλυκά οδηγεί σε μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού των θηλυκών, εξαιτίας της μη επιβίωσης των απογόνων τους. Αυτό οδηγεί στην τοπική εξάλειψη ή καταστολή του πληθυσμού του συγκεκριμένου εντόμου. Είναι αρκετά περίπλοκη γιατί απαιτείται μαζική εκτροφή του εντόμου σε ειδικά εντομοτροφεία με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτός και σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Η στέρωση γίνεται

στο στάδιο της νύμφης με ακτινοβολία ακτίνων  $\gamma$ -. Ωστόσο η μέθοδος αυτή έχει υψηλό κόστος και απαιτεί εξειδικευμένες γνώσεις και σοβαρή προετοιμασία για πρακτική εφαρμογή στη φύση (Γιαμβριας, 1998; Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 1998).

### 1.2.5 Γενετικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά

Σύμφωνα με τα πιο πάνω στοιχεία είναι φανερό ότι η ζημία που προκαλείται από το δάκο στον τομέα της ελαιοκαλλιέργειας είναι μεγάλη. Για αυτό τον λόγο τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων, φιλικών προς το περιβάλλον, για τον βιολογικό έλεγχο του πληθυσμού του δάκου. Για την ανάπτυξη μεθόδων όπως η χρήση φυσικών εχθρών του δάκου, τα συστήματα μαζικής παγίδευσης και η τεχνική στείρωσης του εντόμου, απαιτείται η μελέτη της γενετικής του δάκου (Mavragani-Tsipidou P., 2002).

Σύμφωνα με παλαιότερες έρευνες, ο μιτωτικός καρυότυπος του *B. oleae* έδειξε την ύπαρξη πέντε ζευγών αυτοσωμικών και ενός φυλετικού ζεύγους χρωμοσωμάτων, με το αρσενικό να είναι το ετερογαμετικό φύλο. Τα φυλετικά χρωμοσώματα είναι τα μικρότερα χρωμοσώματα του *B. oleae*. Συγκεκριμένα το Y χρωμόσωμα είναι το πιο μικρό και το X έχει περίπου το μισό μέγεθος του μικρότερου αυτοσωμικού χρωμοσώματος (Frizzi και Springetti, 1953; Krimbas, 1963; Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1992).

Η ανάλυση των πολυταινικών χρωμοσωμάτων των σιελογόνων αδένων (Krimbas, 1963), του λιπώδους ιστού (Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1992) και των μαλπιγγειανών σωληναρίων (Zambetaki *et al.*, 1995) οδήγησε στον σχεδιασμό των αντίστοιχων φωτογραφικών χαρτών. Αναλυτικά παρατηρήθηκαν πέντε μακρά χρωμοσώματα (10 πολυτενικά άκρα) που αντιστοιχούν στα πέντε ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων του μιτωτικού πυρήνα και μια ετεροχρωματική μάζα που αντιστοιχεί στα φυλετικά χρωμοσώματα. Και στους τρεις ιστούς δεν υπήρχε το κεντρομερές, σαν συσσώρευση ετεροχρωματίνης, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια διαφορά στο μέγεθος και την πυκνότητα της ετεροχρωματίνης ανάμεσα στα δυο φύλα, καθώς στα θηλυκά το δίκτυο της ετεροχρωματίνης είναι πιο συμπαγή και μεγάλο σε σχέση με τα αρσενικά. Συμπερασματικά η μελέτη των πολυτενικών χρωμοσωμάτων μπορεί να οδηγήσει στην εγκαθίδρυση φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στα διαφορετικά είδη. Αναλυτικά, με τεχνικές όπως η υβριδοποίηση *in situ* (εφαρμογή στα πολυταινικά χρωμοσώματα) χαρτογραφήθηκαν δέκα

αλληλουχίες DNA που έδωσαν μοριακούς δείκτες για τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα του *B. oleae* με αποτέλεσμα τον καθορισμό των χρωμοσωμικών ομολογιών μεταξύ του εντόμου και των άλλων ειδών της οικογένειας του (Mavragani-Tsipidou P., 2002).

Πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην κατασκευή μιας γονιδιοματικής και δύο cDNA βιβλιοθηκών από ενήλικα άτομα δάκου και των δύο φύλων καθώς και στην απομόνωση και στον χαρακτηρισμό των γονιδίων φυλοκαθορισμού του *B. oleae* (Lagos *et al.*, 2005). Επίσης, οι Benos *et al.* (2000) απομόνωσαν το γονίδιο της αλκοολικής δεϋδρογονάσης (Adh) του δάκου.

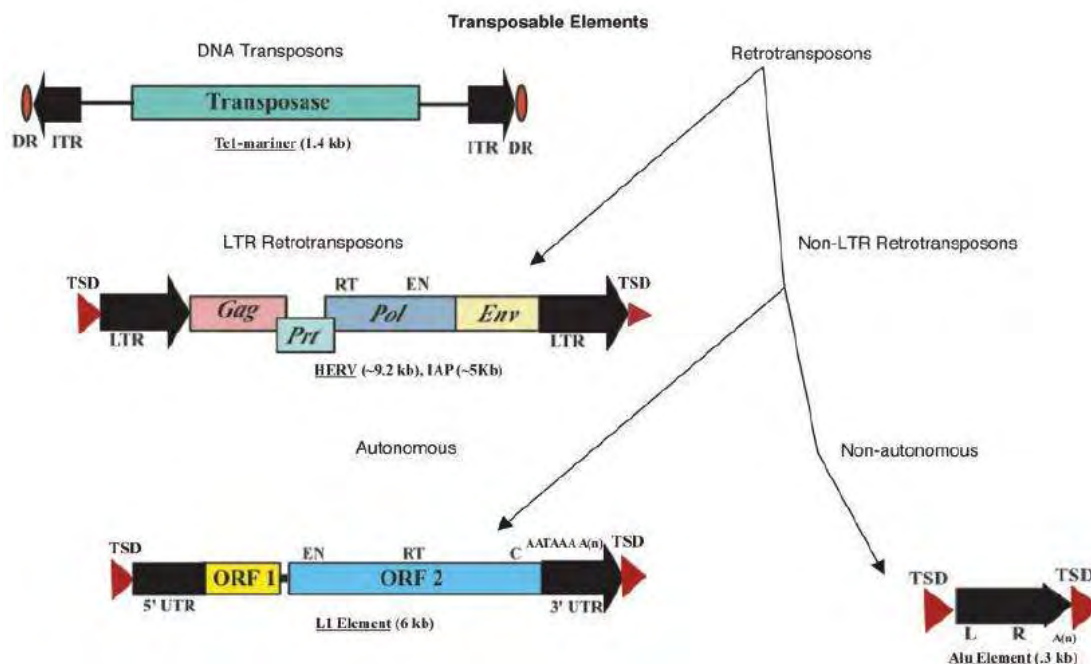
Σημαντική επίσης είναι η μελέτη του Y χρωμοσώματος του δάκου, γιατί εκτός του ότι διασαφηνίζεται η φύση του παράγοντα καθορισμού του φύλου, βοηθά στην κατανόηση της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων στην οικογένεια Tephritidae. Το Y χρωμόσωμα του δάκου είναι μικροσκοπικό με υψηλά επίπεδα ετερωχρωματισμού και παρουσιάζει υψηλό ετερομορφισμό με το X χρωμόσωμα. Περιέχει επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες οι περισσότερες από τις οποίες εντοπίζονται και στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Το Y χρωμόσωμα φαίνεται να έχει συσσωρεύσει μικρές και μεγάλες επαναλαμβανόμενες ενδοχρωμοσωμικές επικαλύψεις (interchromosomal duplications). Οι μεγάλες αυτές ενδοχρωμοσωμικές επικαλύψεις περιέχουν ένα κομμάτι του ιμφορτίνης-4-όμοιου γονιδίου. Εκτός από αυτές τις αλληλουχίες, οι υπόλοιπες Y επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δεν παρουσιάζονται στο X χρωμόσωμα. Επιπλέον απομονώθηκαν ένα ανενεργό *mariner* μεταθετό στοιχείο και ένα *Oswaldo*-όμοιο ρετρομεταθετό. Η συσσώρευση μεταθετών στοιχείων στην ετεροχρωματινική περιοχή του Y χρωμοσώματος είναι αποτέλεσμα της αρνητικής επιλογής από τις επιβλαβείς αναδιατάξεις που προκλήθηκαν από τον έκτοπο ανασυνδιασμό μεταξύ των αντιγράφων των στοιχείων στην ευχρωματίνη (Gabrieli *et al.*, 2011).

Πολλά βασικά γενετικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά του *B. oleae* είναι πλέον διαθέσιμα, όμως αρκετές βιολογικές και γενετικές πτυχές του εντόμου είναι ακόμα αδιευκρίνιστες. Για αυτό το λόγο μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να εστιάσουν στη κλασική και μοριακή γενετική του δάκου. Για παράδειγμα, η καλλιέργεια εργαστηριακών στελεχών με βιοχημικούς δείκτες και μεταλλάξεις είναι σημαντική για την ανάπτυξη μεθόδων γενετικού ελέγχου.

### 1.3 Μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία είναι διαδεδομένα στο γονιδίωμα όλων των φυτών και των ζώων. Η δομή του ευκαρυωτικού γονιδιώματος είναι πολύπλοκη και δυναμική αλλά το πιο δυναμικό τμήμα του γονιδιώματος είναι τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία (Morgante, 2006). Πράγματι η αλληλούχηση του γονιδιώματος έδειξε ότι τα γονίδια που έχουν ένα μόνο αντίγραφο είναι πολύ λιγότερα από τα επαναλαμβανόμενα μεταθετά στοιχεία. Η κατανομή και η αφθονία του κάθε μεταθετού στοιχείου εξαρτάται από το πόσο επιθετικό είναι το μεταθετό, δηλαδή πόσο γρήγορα μπορεί να πολλαπλασιαστεί, από την θέση ένθεσής του στο γονιδίωμα και από την αντίδραση του ξενιστή. Ως εκ τούτου το περιεχόμενο σε μεταθετά στοιχεία του κάθε είδους είναι μοναδικό (Han, 2010). Μαζί με τα γονίδια έχουν αναπτύξει μια αμοιβαία επωφελή σχέση. Τα μεταθετά στοιχεία επωφελούνται από τα γονίδια γιατί χωρίς αυτά δεν μπορούν να επιβιώσουν από τη μια γενιά στην άλλη. Από την άλλη μεριά η εξέλιξη και η λειτουργία των γονιδίων έχει επηρεαστεί από τα μεταθετά στοιχεία.

Τα μεταθετά στοιχεία είναι αλληλουχίες DNA οι οποίες έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται σε μια νέα θέση του γονιδιώματος μέσα στο κύτταρο προέλευσής τους. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες μεταθετών στοιχείων: τα DNA τρανσποζόνια, τα αυτόνομα ρετρομεταθετά και τα μη-αυτόνομα ρετρομεταθετά (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Οι κατηγορίες των μεταθετών στοιχείων.

### 1.3.1 DNA τραπεζοζόνια

Τα DNA τραπεζοζόνια επικρατούν στα βακτήρια αλλά τα συναντάμε και στο γονιδίωμα πολλών μεταζώων συμπεριλαμβανομένων των εντόμων. Αναπαράγονται μέσω ενός βασικού μηχανισμού αποκοπής και επικόλλησης. Τα DNA τραπεζοζόνια περιλαμβάνουν ανάστροφες τελικές επάκριες επαναλήψεις (ITRs) και ένα μόνο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί μία τραπεζοζάση. Αυτά τα στοιχεία των τραπεζοζονίων πλαισιώνονται από μικρές ομόρροπες επαναλήψεις (DRs). Η ειδική αλληλουχία της ενσωμάτωσης αποτελείται από ένα μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα η ενσωμάτωση να μπορεί να συμβεί σε ένα μεγάλο αριθμό θέσεων του γονιδιώματος. Ωστόσο τα περισσότερα DNA τραπεζοζόνια ενσωματώνονται σε θέσεις του γονιδιώματος που βρίσκονται κοντά στην αρχική τους θέση (λιγότερο από 100kb) (Kazazian, 2004). Τα ενεργά τραπεζοζόνια κωδικοποιούν την τραπεζοζάση η οποία συνδέεται ακριβώς ή κοντά στις ανάστροφες επαναλήψεις και στο DNA στόχο. Στη συνέχεια το ένζυμο καταλύει την αντίδραση αφαίρεσης του τραπεζοζονίου από την παλιά του θέση και την αντίδραση που οδηγεί στην εισαγωγή του στη νέα του θέση στο γονιδίωμα. Η πρώτη αντίδραση περιλαμβάνει την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στο τραπεζοζόνιο και στο DNA που το πλαισιώνει στη αρχική του θέση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των καταλοίπων 3-OH. Στη δεύτερη αντίδραση τα ελεύθερα υδροξυλικά κατάλοιπα προσβάλλουν το DNA στη νέα θέση. Οι δύο αλυσίδες του DNA στην νέα θέση προσβάλλονται τμηματικά δημιουργώντας μικρά κενά που περικλείουν το ενσωματωμένο τραπεζοζόνιο. Αυτά τα κενά καλύπτονται από ένζυμα του ξενιστή με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μικρές επαναλήψεις της αλληλουχίας στη θέση-στόχο (TSDs) (Craig, 2002).

Ένα παράδειγμα DNA τραπεζοζονίων είναι τα Tc1-mariner στοιχεία τα οποία κυμαίνονται σε μήκος από 1250bp έως 2400bp (εικόνα 5). Παρόλο που τα Tc1 και τα mariner στοιχεία μοιράζονται μόνο το 15% της αμινοξικής τους ταυτότητας, έχουν παρόμοια δομή και τρόπο μετάθεσης (Capy et al., 1996). Τα στοιχεία της mariner οικογένειας έχουν μέγεθος περίπου 1300bp ενώ οι ανάστροφες τελικές επαναλήψεις είναι περίπου 30bp. Αντίθετα τα στοιχεία της Tc1 οικογένειας έχουν μεγαλύτερο μήκος εξαιτίας των μακρότερων ανάστροφων τελικών επαναλήψεων και των περιστασιακά μικρών ιντρονίων που παρεμβάλλονται στο γονίδιο της τραπεζοζάσης (Robertson, 1995).



### 1.3.2 Ρετρομεταθετά στοιχεία

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι ευρέως διαδεδομένα στους ευκαρυώτες και συχνά αποτελούν ένα σημαντικό μέρος του πυρηνικού γονιδιώματος (SanMiguel *et al.*, 1996). Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι μεταγράφονται σε RNA και στη συνέχεια μεταγράφονται αντιστρόφως και εισάγονται στο γονιδίωμα με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό τους. Η μέθοδος αναπαραγωγής των ρετρομεταθετών στοιχείων προσφέρει τη δυνατότητα της εντυπωσιακής αύξησης του αριθμού των αντιγράφων τους. Ως εκ τούτου τα στοιχεία αυτά αυξάνουν το μέγεθος του γονιδιώματος του ξενιστή (SanMiguel και Bennetzen, 1998). Είναι άφθονα ιδιαίτερα στα φυτά όπου για παράδειγμα αντιπροσωπεύουν πάνω από το 50% του γονιδιώματος του καλαμποκιού, ενώ εκτιμάται ότι συνθέτουν τουλάχιστον το 15% του γονιδιώματος της *Drosophila* (Marsano *et al.*, 2004). Μελέτες έδειξαν ότι τα ρετρομεταθετά στοιχεία βρίσκονται σε όλο το γονιδίωμα και όχι μόνο στις μη- κωδικές περιοχές (Waugh *et al.*, 1997). Επιπλέον η κατανομή των στοιχείων δεν είναι ομοιόμορφη και παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλές πυκνότητες των ρετρομεταθετών που υφίστανται σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές θέσεις. Κάθε συγκεκριμένο στοιχείο μπορεί να έχει τη δική του προτιμώμενη θέση και παρόλο που μπορεί να μην είναι άφθονο στο σύνολο του γονιδιώματος είναι άφθονο τοπικά (Vitte και Panaud, 2005). Τα ρετρομεταθετά στοιχεία διαιρούνται στις τάξεις των αυτόνομων και των μη-αυτόνομων ανάλογα με το αν διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την ρετρομετατόπιση. Στα μη αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία ανήκει το στοιχείο Alu, το οποίο έχει μήκος περίπου 0.3 kb, αποτελείται από δύο συναφή μονομερή, το αριστερό (L) και το δεξί (R) και τελειώνει σε μια πολύ (A) ουρά. Στην τάξη των αυτόνομων ρετρομεταθετών στοιχείων συμπεριλαμβάνονται τα LTR και τα non-LTR ρετρομεταθετά.

#### 1.3.2.1 LTR ρετρομεταθετά στοιχεία

Τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία πήραν το όνομά τους από τις μακριές τελικές επαναλήψεις (LTR) που έχουν και στα δύο άκρα τους (Kazazian, 2004). Σύμφωνα με τους Abe *et al.* (2001), τα LTR ρετρομεταθετά χωρίζονται σε τρεις μεγάλες οικογένειες: τη gypsy-Ty3, τη Ty1-copia και τη Bel-Pao-like. Θεωρούνται ελαττωματικοί ρετροϊοί επειδή δεν κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη φάκελο που επιτρέπει την μεταφορά τους από το ένα κύτταρο

στο άλλο. Παρόλα αυτά διατηρούν τον αναπαραγωγικό τρόπο μετάθεσης των ρετροϊών, ο οποίος τους δίνει τη δυνατότητα να εισαχθούν εκ νέου στο πυρηνικό γονιδίωμα που βρίσκονται (Willhelm και Willhelm, 2001).

Αυτή η τάξη ρετρομεταθετών στοιχείων περιέχει ένα ή και περισσότερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή και την μετάθεσης τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα γονίδια gag, pol και env (Gomulski *et al.*, 2004). Τα gag γονίδια κωδικοποιούν τα πρωτεϊνικά δομικά συστατικά των ιοειδών σωματιδίων (VLP), που χρησιμοποιούνται σαν ενδιάμεσα στον κύκλο της μετάθεσης. Τα VLP περιέχουν επίσης μετάγραφα των μεταθέτων και διάφορα ένζυμα τα οποία παράγονται από τα ρετρομεταθετά στοιχεία (Flavell, 1995). Τα pol γονίδια περιλαμβάνουν επικράτειες που αντιστοιχούν σε ρετροϊκή πρωτεάση (PR), αντίστροφη μεταγραφάση (RT), ριβονοκλεάση Η καθώς και επικράτειες ιντεγράσης (IN), που παρέχουν τις ενζυμικές ενεργότητες για την κατασκευή του cDNA από το RNA και την ένθεσή του στο γονιδίωμα. Αναλυτικά η πρωτεάση διασπά την πρόδρομη πολύπρωτεΐνη στις επιμέρους πρωτεΐνες, η αντίστροφη μεταγραφάση μεταγράφει αντίστροφα το RNA σε δίκλωνο DNA, η ριβονοκλεάση Η αποικοδομεί το πρότυπο RNA και η ιντεγράση εμπλέκεται στη διαδικασία ένθεσης του δίκλωνου αντιγράφου DNA του ρετρομεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμα του ξενιστή (Robertson και Lampe, 1995). Τα env γονίδια κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη φάκελο η οποία επιτρέπει την μεταφορά των ρετροϊών από το ένα κύτταρο στο άλλο. Ωστόσο τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία είτε δεν διαθέτουν το env γονίδιο είτε έχουν ένα υπόλειμμα του και μπορούν να εισαχθούν μόνο στο γονιδίωμα από το οποίο προήλθαν (Kazazian, 2004).

Ο σχηματισμός ενός αποτελεσματικού VLP απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα δομικών πρωτεϊνών (προϊόντα των γονιδίων gag) και μικρότερη ποσότητα ενζύμων (προϊόντα των γονιδίων pol). Έτσι τα ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν αναπτύξει ένα μηχανισμό για τη ρύθμιση των σχετικών ποσοτήτων των γονιδιακών προϊόντων. Για παράδειγμα το LTR ρετρομεταθετό Ty-1 της ζύμης, το οποίο έχει δύο επικαλυπτόμενα ORFs: το TYA (gag) και το TYB (pol), πετυχαίνει τη ρύθμιση αυτή με την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης στο +1. Η ριβοσωμική μετατόπιση συμβαίνει στην περιοχή ανάμεσα στα TYA και TYB και συγκεκριμένα σε μια ακολουθία επτά νουκλεοτιδίων (CUUAGGC) με αποτέλεσμα την παραγωγή της TYA-TYB πολυπρωτεΐνης (Boeke και Charman, 1991). Η μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης ξεκινά όταν σταματάει το ριβόσωμα στο κωδικόνιο της αργινίνης. Τότε το tRNA<sup>L<sup>eu</sup></sup> γλιστράει από το CUU κωδικόνιο στο UUA στο +1 πλαίσιο, επιτρέποντας την έκφραση του TYB (Belcourt και Farabaugh, 1990).

Στα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία η αντίστροφη μεταγραφή συμβαίνει στα VLP στο κυτόπλασμα και είναι μια πολύπλοκη διαδικασία (Kazazian, 2004). Η μετάθεση των LTR ρετρομεταθετών στοιχείων ρυθμίζεται από τις LTR αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούνται από τις περιοχές U3, R και U5 (Laha et al., 2001). Πολλά LTR ρετρομεταθετά στοιχεία παρουσιάζουν στοχευόμενη ένθεση σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος. Για παράδειγμα τα Ty-3 στοιχεία στοχεύουν συγκεκριμένα σε μερικά νουκλεοτίδια των θέσεων έναρξης της μεταγραφής της RNA πολυμεράσης III (Pol III) (Chalker, 1992).

### 1.3.2.2 Non-LTR ρετρομεταθετά στοιχεία

Τα non-LTR ρετρομεταθετά στοιχεία, τα οποία είναι γνωστά και ως LINEs, δεν περιέχουν LTRs αλλά μια πολυαδενλική ακολουθία στο 3' άκρο τους. Είναι αρχαία γενετικά στοιχεία τα οποία εξακολουθούν να υφίστανται για εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια σε ευκαριωτικά γονιδιώματα (Han, 2010).

Το μήκος τους κυμαίνεται από 4kb έως 6kb και έχει ένα ή δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF 1 και ORF 2), που δίνουν μια πρωτεΐνη δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων, και μία ενδονουκλεάση και μια RT αντίστοιχα. Επιπλέον χαρακτηρίζονται από τις 3' και 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους στα διάφορα στοιχεία (Kazazian, 2004).

Ο αναπαραγωγικός κύκλος της non-LTR ρετρομετάθεσης ξεκινά με την αντιγραφή ολόκληρου του ενεργού στοιχείου και την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μετάφραση των πρωτεϊνών του ρετρομεταθετού στοιχείου και το πέρασμα τους από ένα κυτταροπλασματικό κοκκίο. Τέλος, το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίδιο εισέρχεται στον πυρήνα και η ενσωμάτωση γίνεται μέσω target-primed αντίστροφης μεταγραφής (TPRT) (Han, 2010).

Η ένθεση πολλών non-LTR ρετρομεταθετών λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα. Για παράδειγμα, τα στοιχεία TRAS1 και SART1 ενσωματώνονται στις τελομερικές επαναλήψεις του *Bombyx mori*. Αντιθέτως τα L1 στοιχεία των θηλαστικών ενσωματώνονται σε ένα μεγάλο εύρος γονιδιωματικών θέσεων επειδή η αλληλουχία στόχος της ενδονουκλεάσης τους είναι μικρή (5'-TTTT/A-3') (Kazazian, 2004).

#### 1.4 Σκοπός εργασίας

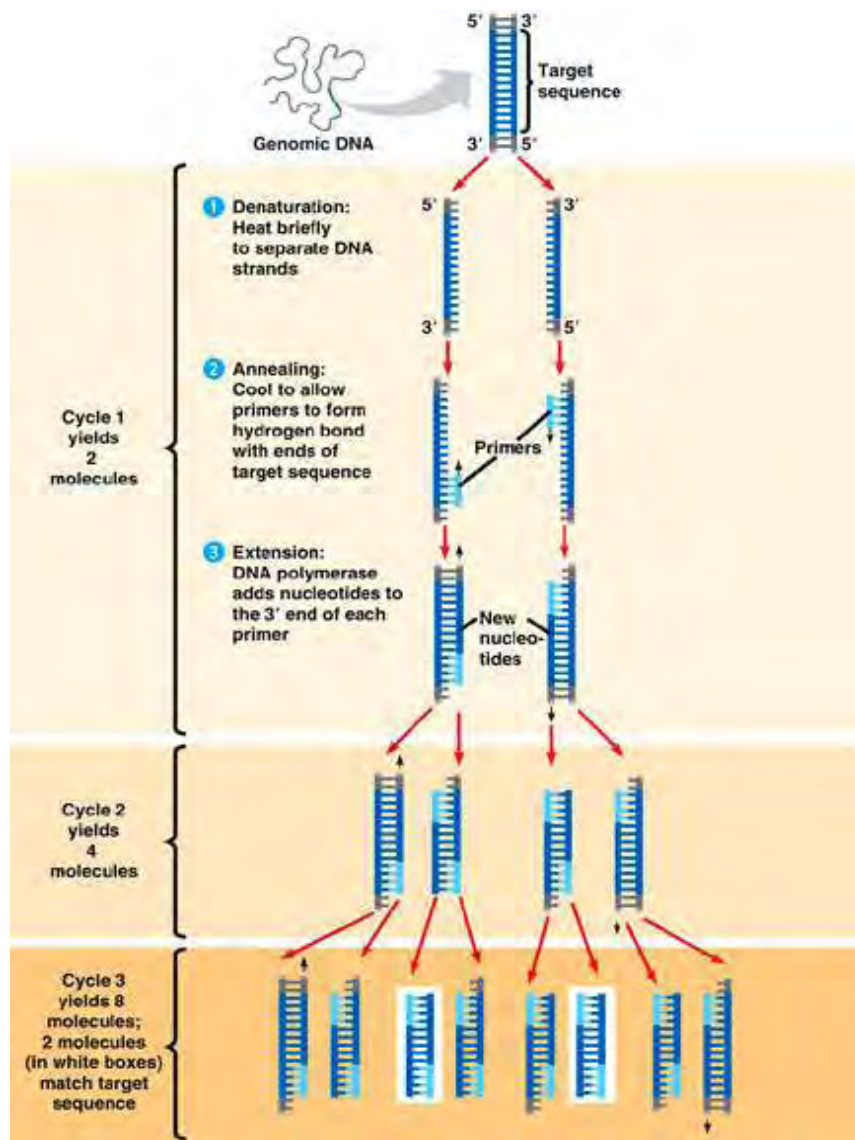
Ο δάκος της ελιάς είναι το σοβαρότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η ελαιοπαραγωγή και γι' αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό να αναπτυχθούν αποτελεσματικές βιολογικές μέθοδοι δακοπροστασίας. Καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων είναι η ολοκληρωμένη γνώση της μοριακής οργάνωσης του εντόμου. Η παρούσα εργασία είχε σαν στόχο τη συνεισφορά στην ολοκλήρωση της ανάλυσης της δομής του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*). Προς την κατεύθυνση αυτή πραγματοποιήθηκε η χαρτογράφηση του φάγου 443 καθώς και η ανάλυση επιμέρους τμημάτων του.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης προτάθηκε από τον G. Khorana και τους συνεργάτες του στις αρχές του 1970. Ωστόσο εκείνη την εποχή η ιδέα τους δεν είχε πρακτική εφαρμογή. Έτσι η μέθοδος PCR σχεδιάστηκε από Kary B. Mullis και τους συνεργάτες του το 1986 ως μια *in vitro* μέθοδος απομόνωσης και ενίσχυσης γονιδίων. Η μέθοδος PCR είναι απλή γρήγορη και χαρακτηρίζεται από ευελιξία.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA από ένα πολύπλοκο δείγμα DNA εφόσον είναι γνωστή η αλληλουχία τους. Απαραίτητος για την αντίδραση είναι ο σχεδιασμός ενός ζεύγους συνθετικών εκκινητών με βάση τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχυθεί. Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μήκος περίπου 20-30 νουκλεοτιδίων ο καθένας, να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C, να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόσταση μεταξύ τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου. Επιπλέον οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ). Η DNA πολυμεράση, που χρησιμοποιείται ευρέως στη συγκεκριμένη μέθοδο για την κατάλυση της σύνθεσης του DNA, είναι η θερμοανθεκτική *taq* DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το τον βακτήριο *T. aquaticus*. Η *taq* DNA πολυμεράση είναι σταθερή σε θερμοκρασίες έως και 95°C. Επίσης χρησιμοποιούνται διάλυμα 5'τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων, που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA, διάλυμα  $MgCl_2$ , και ρυθμιστικό διάλυμα *buffer* Tris-Cl για την ρύθμιση του pH στο 7.2 κατά την φάση της ενίσχυσης. Η PCR είναι μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία που αποτελείται από τρία στάδια (βλ. εικόνα 6). Το πρώτο στάδιο είναι η αποδιάταξη του δείγματος DNA σε θερμοκρασία 93-95°C. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η υβριδοποίηση του ζεύγους των εκκινητών στη μονόκλωνη αλληλουχία στόχο στους 50-70°C, ανάλογα με τη θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ) των αλυσίδων που αναμένονται να σχηματιστούν. Συνήθως η κατάλληλη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών υπολογίζεται με αρνητική απόκλιση 5°C από την αναμενόμενη  $T_m$ . Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών από την *taq* DNA πολυμεράση. Η σύνθεση του DNA γίνεται σε θερμοκρασία 72°C.



**Εικόνα 6:** Οι πρώτοι τρεις κύκλοι της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και τα τρία στάδια του κάθε κύκλου.

Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του δείγματος DNA στην αρχή της αντίδρασης και από την αποδοτικότητα των σταδίων της υβριδοποίησης και της επιμήκυνσης, και κυμαίνεται από 30 έως 40. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι πραγματοποιούνται σε έναν θερμικό κυκλοποιητή (συσκευή PCR) ο οποίος προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR είναι η εκθετική αύξηση της αρχικής αμελητέας ποσότητας DNA αφού διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Έτσι μετά την ολοκλήρωση  $n$  κύκλων η αρχική αλληλουχία στόχος θα έχει πολλαπλασιαστεί  $2^n$  φορές. Το κύριο προϊόν της

αντίδρασης είναι δίκλωνο DNA το οποίο περιβάλλεται από τους εκκινητές, των οποίων τα 5' άκρα είναι και τα άκρα του προϊόντος (Sambrook και Russell, 2001).

*Υλικά:*

- Υπόστρωμα DNA (10ng)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10x buffer)
- Διάλυμα MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- dNTPs (2.5 mM/dNTP)
- Εκκινητής P1 (10pmol/ μl)
- Εκκινητής P2 (10pmol/ μl)
- Taq DNA πολυμεράση (5u/ μl)
- ddH<sub>2</sub>O

*Μεθοδολογία:*

1. Αρχικά πραγματοποιείται η διαδοχική προσθήκη σε σωληνάκι erpendorf των υλικών με τη σειρά που παρουσιάζεται στον πίνακα 1, για αντίδραση τελικού όγκου 15 μl. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τα δείγματα και τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο.

	<b>Ποσότητες</b>
<b>DNA (443 φάγος )</b>	1μl
<b>ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου</b>	1.5μl
<b>διάλυμα MgCl<sub>2</sub></b>	0.9μl
<b>dNTPs</b>	1.2μl
<b>Εκκινητής AchII F</b>	0.6μl
<b>Εκκινητής AchII R</b>	0.6μl
<b>Taq πολυμεράση</b>	0.15μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	9.05μl

**Πινάκας 1:** Αντίδραση PCR

2. Στην συνέχεια το σωληνάκι τοποθετείται στην συσκευή PCR. Οι συνθήκες δίνονται στον πίνακα 2.

<b>Στάδιο PCR</b>	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Διάρκεια</b>	<b>Κύκλοι</b>
<b>Αποδιάταξη αρχικού DNA</b>	94°C	4min	1
<b>Αποδιάταξη DNA</b>	94°C	30sec	30
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	55°C	30min	
<b>Πολυμερισμός αλυσίδων</b>	72°C	2min	
<b>Τελικός πολυμερισμός</b>	72°C	10sec	1

**Πίνακας 2:** Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή ("PCR Sprint Thermal Cycler", Thermo Electron Corporation)

## 2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος τη ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη μορφή τους. Επιπλέον είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μεγέθους των κομματιών DNA καθώς και ο καθαρισμός τους. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα μετακίνησης των μορίων DNA σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροστατική δύναμη που εφαρμόζεται ωθεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA προς τα ηλεκτρόδια της ανόδου της ηλεκτροφορητικής συσκευής, με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Τα μεγάλα τμήματα DNA κινούνται πιο αργά σε σχέση με τα μικρά. Επίσης η γραμμική μορφή του DNA κινείται με διαφορετικό ρυθμό στο πήκτωμα αγαρόζης σε σχέση με την υπερελικωμένη κυκλική μορφή του. Η συγκέντρωση της αγαρόζης παίζει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό μετακίνησης των μορίων DNA στο πήκτωμα, αφού καθορίζει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Το μέγεθος των πόρων είναι ένας περιοριστικός παράγοντας του ρυθμού μετακίνησης, καθώς τα μεγαλύτερα μόρια DNA περνούν πιο δύσκολα μέσα από αυτούς με αποτέλεσμα να κινούνται πιο αργά. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα συγκέντρωσης αγαρόζης 1% επιτυγχάνεται ο



διαχωρισμός τμημάτων DNA μεγέθους 0,5-5 kb. Η ένταση του ρεύματος που εφαρμόζεται επηρεάζει την ταχύτητα της μετακίνησης των μορίων DNA. Σε χαμηλές τάσεις ο ρυθμός μετακίνησης γραμμικών τμημάτων DNA είναι ανάλογος με την τάση που εφαρμόζεται. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος. Για να είναι ορατές οι ζώνες του DNA που προκύπτουν από τον διαχωρισμό χρωματίζονται με μια φθορίζουσα χρωστική ουσία, το βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο, που χρησιμοποιείται σε μικρές συγκεντρώσεις, έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και να φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως. Το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους και της ποσότητας των τμημάτων DNA μετά από τη σύγκρισή τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους (Gene Ruler ladder mix) (Sambrook και Russell, 2001).

#### *Υλικά:*

- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE Buffer 0.5x\*
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)
- Δείγματα DNA
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων\*
- Μάρτυρας (DNA Ladder)

#### *Μεθοδολογία:*

##### A. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1%:

1. Για την Παρασκευή 40ml gel αγαρόζης αναμιγνύονται 40ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5x με 0.4gr σκόνη αγαρόζης.
2. Το διάλυμα θερμαίνεται, με διαδοχικές ανακινήσεις μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη και γίνει διαυγές, σε φούρνο μικροκυμάτων.

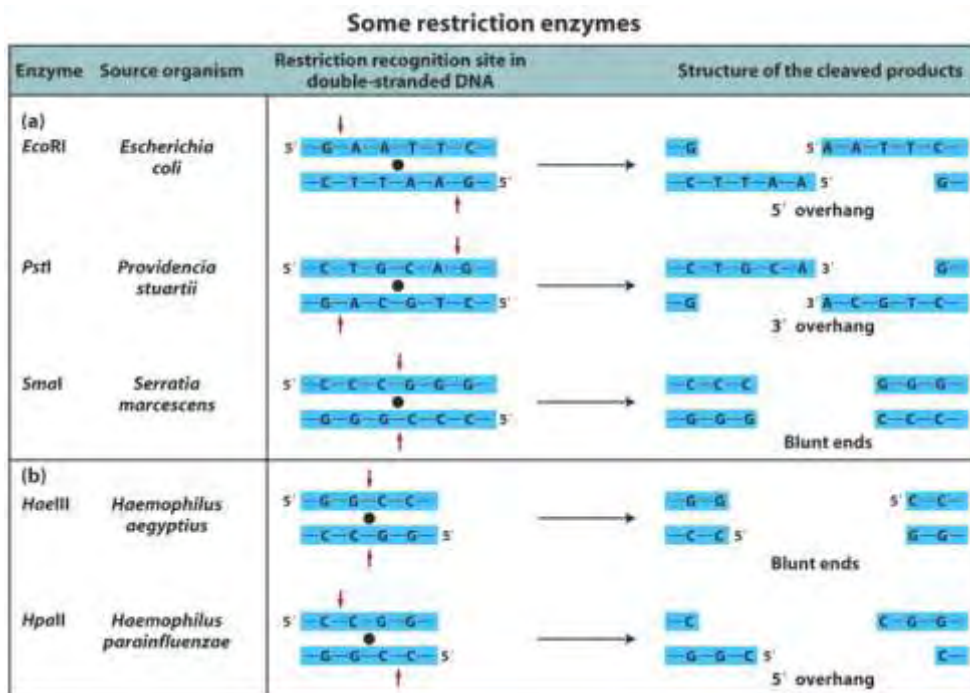
3. Όταν κρυώσει λίγο, δηλαδή όταν η θερμοκρασία μειωθεί στους 50°C προσθέτονται 1.2μl βρωμιούχου αιθιδίου.
4. Το διάλυμα αγαρόζης μεταφέρεται στην στεγανοποιημένη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχουν ήδη τοποθετηθεί ειδικά χτενάκια με κάθετη διεύθυνση που θα δώσουν τις ειδικές θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.
5. Όταν το διάλυμα αγαρόζης στερεοποιηθεί, μετά από περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, τα χτενάκια απομακρύνονται προσεκτικά και η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης μπορεί να ξεκινήσει.

#### B. Ηλεκτροφόρηση:

1. Το στερεοποιημένο πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται με τη βάση στο εσωτερικό της ηλεκτροφορητικής συσκευής.
2. Στην ηλεκτροφορητική συσκευή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα έως ότου καλυφθεί το πήκτωμα σε βάθος περίπου 1mm.
3. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθενται διάλυμα φόρτωσης 6x (δηλ. 1μl διαλύματος φόρτωσης ανά 6μl δείγματος). Το διάλυμα φόρτωσης αυξάνει τη πυκνότητα του δείγματος διασφαλίζοντας ότι το DNA θα βουλιάξει ομοιόμορφα στο πηγάδι καθώς επίσης προσθέτει χρώμα στο δείγμα απλοποιώντας την διαδικασία της φόρτωσης. Επιπλέον περιέχει μια μπλε χρωστική η οποία, σε ηλεκτρικό πεδίο, κινείται προς την άνοδο.
4. Πραγματοποιείται η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος.
5. Ακολούθως συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με την συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στην αντίθετη κατεύθυνση από τις θέσεις φόρτωσης. Εφαρμόζεται τάση 90V. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ολοκληρώνεται μετά από περίπου 30 λεπτά.
6. Το πήκτωμα εξετάζεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, όπου το πρότυπο των ζωνών DNA, που έχει προκύψει από τον διαχωρισμό, είναι πλέον ορατό.

### 2.3 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Οι πέψεις με ένζυμα περιορισμού πραγματοποιούνται μέσω της επώασης δειγμάτων DNA με την κατάλληλη ποσότητα περιοριστικού ενζύμου, στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και στη βέλτιστη θερμοκρασία για το συγκεκριμένο ένζυμο. Τα ένζυμα περιορισμού (εικόνα 7) είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν ειδικές μικρές ολιγονουκλεοτιδικές παλίνδρομες αλληλουχίες με συμμετρία (αλληλουχία αναγνώρισης), κατά μήκος του δίκλωνου DNA. Η δράση τους έγκειται στην υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της αλληλουχίας αναγνώρισης, πάντα στο ίδιο σημείο. Συνήθως προκύπτουν δύο τμήματα DNA με μονόκλωνες προεξοχές, τα συμπληρωματικά ή κολλώδη άκρα. Υπάρχουν όμως και ένζυμα περιορισμού που δίνουν τμήματα με άκρα χωρίς μονόκλωνες περιοχές (τυφλά άκρα). Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η προστασία των βακτηρίων από εξωγενή DNA μέσω της διάσπασης τους. Το βακτηριακό DNA προστατεύεται μέσω της μεθυλίωσης που υφίσταται.



**Εικόνα 7:** Χαρακτηριστικά μερικών ενζύμων περιορισμού.

Η βέλτιστη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου ποικίλει ανάλογα με το ένζυμο. Για αυτό χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου. Σε μια τυπική αντίδραση πέψης απαιτείται η χρήση μια μονάδας ενεργότητας του

ενζύμου (unit) ανά μικρογραμμάριο DNA. Ένα unit ενζύμου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη ενός μικρογραμμαρίου DNA σε μία ώρα στην κατάλληλη θερμοκρασία.

*Υλικά:*

- Δείγμα DNA
- Ένζυμο/α περιορισμού
- Ρυθμιστικό διάλυμα buffer 10x
- BSA (100x)
- dd H<sub>2</sub>O

*Μεθοδολογία:*

1. Σε σωληνάκι eppendorf τοποθετούνται διαδοχικά το DNA, το buffer, το ddH<sub>2</sub>O και το ένζυμο, σύμφωνα με τον πίνακα 3. Στην αντίδραση προστίθεται τέτοια ποσότητα νερού, ώστε ο τελικός όγκος της να είναι V. Το BSA προστίθεται κατά την πέψη φαγικού DNA και βοηθά στην καλύτερη λειτουργία του ενζύμου. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τα δείγματα και τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο.

<b>Αντίδραση πέψης</b>	<b>Φαγικού DNA</b>	<b>Πλασμιδιακού DNA</b>
<b>DNA</b>	3μg	200ng
<b>buffer</b>	1x	1x
<b>Ένζυμο περιορισμού</b>	25u	2u
<b>BSA</b>	1x	-
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως V	Έως V
<b>Τελικός όγκος</b>	V	V

**Πίνακας 3:** Αντίδραση πέψης.

2. Ακολουθεί επώαση του δείγματος σε κατάλληλη θερμοκρασία και για ορισμένη χρονική διάρκεια, ανάλογα με το ένζυμο περιορισμού και το είδος του DNA που χρησιμοποιούνται.

#### **2.4 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Τα μόρια DNA που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, μπορούν να ανακτηθούν με τη χρήση του Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit της εταιρίας Promega. Τα απομονωμένα μόρια DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, σε διάφορες τεχνικές όπως η πέψη με ένζυμο περιορισμού, η κλωνοποίηση, η μεταγραφή *in vitro* κ.α.. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προτείνεται στο εγχειρίδιο της εταιρίας.

*Υλικά:*

- Διάλυμα Membrane Wash (αιθανόλη 95%)
- Διάλυμα Membrane Binding
- Nuclease-free water
- Ειδικές στήλες (Wizard SV minicolumns)
- Σωλήνες συλλογής 2ml (Collection tubes)

*Μεθοδολογία:*

1. Απομονώνεται από το πήκτωμα αγαρόζης η περιοχή με το επιθυμητό τμήμα DNA χρησιμοποιώντας ένα καθαρό ξυράφι, έτσι ώστε να μειωθεί στον ελάχιστο ο όγκος του πηκτώματος. Το κομμάτι του πηκτώματος μεταφέρεται σε σωληνακι eppendorf προσδιορισμένου βάρους και ζυγίζεται. Το βάρος του υπολογίζεται καθώς δεν πρέπει να ξεπερνά τα 350mg.
2. Για κάθε 10mg πηκτώματος προστίθενται 10μl διαλύματος Membrane Binding.

3. Το δείγμα αναδεύεται με τη βοήθεια vortex και επωάζεται στους 50-65°C για 10min, με ταυτόχρονη ανάδευση στο vortex, έως ότου να διαλυθεί το κομμάτι του πηκτώματος.
4. Για κάθε δείγμα, μια ειδική στήλη τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται στη διάταξη της ειδικής στήλης και επωάζεται για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min στις 14.000rpm. Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η ειδική στήλη.
6. Προσθέτονται 700μl διαλύματος Membrane Wash στη διάταξη της ειδικής στήλης. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 14.000rpm. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η ειδική στήλη επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής.
7. Προσθέτονται 500μl διαλύματος Membrane Wash στη διάταξη της ειδικής στήλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στις 14.000rpm. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η ειδική στήλη επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 14.000rpm με το καπάκι της φυγόκεντρος ανοιχτό, ώστε να εξατμιστεί τυχόν εναπομένονσα αιθανόλη.
8. Η ειδική στήλη μεταφέρεται προσεκτικά σε σωληνάκι eppendorf. Προσθέτονται 50μl Nuclease-free water, χωρίς το tip της πιπέτας να ακουμπήσει τη μεμβράνη της στήλης. Το δείγμα επωάζεται για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min στις 14.000rpm.
10. Το σωληνάκι eppendorf, που περιέχει το DNA που έχει εκλουστεί, μπορεί να αποθηκευτεί στο 4°C ή στους -20°C.

## 2.5 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA

Η αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA είναι μια σημαντική τεχνική της μοριακής κλωνοποίησης. Επιτρέπει τη σύνδεση μιας αλληλουχίας DNA (ενθέματος) και ενός φορέα, όπως τα πλασμίδια, με ομοιοπολικούς δεσμούς. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ανασυνδισμένου πλασμιδίου το οποίο στη συνέχεια εισάγεται σε ένα ζωντανό βακτηριακό κύτταρο με τη μέθοδο του μετασχηματισμού. Οι μετασχηματισμένες αποικίες που προκύπτουν, υπόκεινται σε έλεγχο με πέψη με ένζυμα περιορισμού για τον εντοπισμό εκείνων που φέρουν την επιθυμητή αλληλουχία DNA.

Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά μόρια DNA τα οποία εντοπίζονται σε βακτήρια. Τα περισσότερα είναι δίκλινα κυκλικά μόρια που μπορούν να απομονωθούν από βακτηριακά κύτταρα σε υπερελικωμένη μορφή. Το μέγεθος τους ποικίλει από 1 έως και πάνω από 200kb και πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Στη μοριακή κλωνοποίηση χρησιμοποιούνται τεχνητά πλασμίδια (pBS-SK(+) ή pUC19) που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για τη βελτιστοποίηση της χρήσης τους ως φορείς. Έχουν μέγεθος περίπου 3kb και περιέχουν ένα γονίδιο που δίνει αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό, όπως η αμπικιλίνη, καθώς επίσης και μια περιοχή MCS (polylinker) που περιλαμβάνει θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού. Το ξένο τμήμα DNA εισάγεται στην MCS του φορέα εφόσον στα άκρα του τμήματος υπάρχει μία από τις θέσεις περιορισμού του polylinker.

Ο κυκλικός φορέας μετά από πέψη με ένα ή και περισσότερα περιοριστικά ένζυμα συνδέεται *in vitro* με τμήμα ξένου DNA που φέρει συμβατά άκρα. Κατά την αντίδραση σύνδεσης ο γραμμικός φορέας και το τμήμα DNA που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε επωάζονται παρουσία του ενζύμου T4 λιγάσης και του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) σε κατάλληλη θερμοκρασία. Η T4 λιγάση κωδικοποιείται από το γονίδιο 30 του βακτηριοφάγου T4 και καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ της 3-OH ομάδας και της 5'-φωσφορικής ομάδας παρακείμενων νουκλεοτιδίων στα άκρα δίκλωνων μορίων DNA.

Για την αποφυγή του σχηματισμού τυχαίων ολιγομερών κατά την αντίδραση σύνδεσης, απαιτείται ο ακριβής υπολογισμός των ποσοτήτων του ενθέματος και του φορέα που θα χρησιμοποιηθούν. Η αναλογία μεταξύ της αλληλουχίας που θα κλωνοποιηθεί και του φορέα είναι 3:1. Η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται από τον τύπο (Sambrook και Russell, (volume 1), 2001):

$$\text{Απαιτούμενη ποσότητα ενθέματος (ng)} = \frac{\text{ποσότητα φορέα (ng)} \times \text{μέγεθος ενθέματος (kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (kb)}} \times \frac{3}{1}$$

Υλικά:

- Δείγμα DNA
- 1.2μl πλασμιδιακού φορέα
- 1μl T4 DNA λιγάσης (1U/μl)

- Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10x (buffer)
- ddH<sub>2</sub>O

#### Μεθοδολογία:

1. Σε σωληνάκι erpendorf προστίθενται διαδοχικά η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται (υπολογίζεται με το πιο πάνω τύπο), 1.2μl πλασμιδιακού φορέα, 1μl buffer και ddH<sub>2</sub>O και τελευταίο προστίθεται το 1μl T4 DNA λιγάσης, για αντίδραση τελικού όγκου 10μl. Η ποσότητα του νερού που προστίθεται αντιστοιχεί σε αυτή που χρειάζεται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τα δείγματα και τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο.
2. Ακολουθεί επώαση του μίγματος αντίδρασης overnight στους 16°C ή για 2-2.5h στους 22°C.

## 2.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Ο μετασχηματισμός είναι μια διαδικασία κατά την οποία εξωγενές DNA εισάγεται σε ένα βακτηριακό κύτταρο. Τα νουκλεϊκά οξέα δεν έχουν την ικανότητα να εισέλθουν στα βακτήρια από μόνα τους, άλλα χρειάζονται βοήθεια για να περάσουν την μεμβράνη των κυττάρων και να φτάσουν στο ενδοκυτταρικό χώρο όπου μπορούν να αναπαραχθούν και να εκφραστούν. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη αυτού του στόχου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις χημικές και τις φυσικές.

Οι περισσότερες χημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για το μετασχηματισμό βακτηρίων βασίζονται στην επώαση κυττάρων *E. coli* σε ένα παγωμένο διάλυμα που περιέχει δισθενή κατιόντα, όπως το CaCl<sub>2</sub>, και στην μετέπειτα σύντομη θέρμανσή τους στους 37°C. Αυτή η απλή και αξιόπιστη διαδικασία παράγει κανονικά από 10<sup>5</sup> έως 10<sup>6</sup> αποικίες *E. coli* ανά μg πλασμιδιακού DNA.

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μη διεισδυτική, μη χημική μέθοδος και βασίζεται στο γεγονός ότι η έκθεση κυττάρων *E. coli* σε ηλεκτρικό παλμό αποσταθεροποιεί τη μεμβράνη των κυττάρων και επάγει τη δημιουργία παροδικών μεμβρανικών πόρων, από τους οποίους περνούν τα μόρια DNA. Η αποδοτικότητα της ηλεκτροδιάτρησης είναι 10 έως 20 φορές



μεγαλύτερη από αυτή της χημικής μεθόδου. Η υψηλότερη απόδοση (μετασχηματισμός έως 80% των κύτταρων που επέζησαν) του μετασχηματισμού επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση του εισαγόμενου DNA είναι υψηλή (1-10μg/ml) και όταν το μήκος και η ένταση των ηλεκτρικών παλμών είναι τέτοια ώστε να επιζούν μόνο το 30-50% των κυττάρων. Για τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιούνται πιο συχνά, τα ανώτατα ποσοστά μετασχηματισμού επιτυγχάνονται μετά από ένα μόνο ηλεκτρικό παλμό, με ένταση πεδίου 12.5-15kV/cm και διάρκεια 4.5-5.5msec. Υπό αυτές τις συνθήκες επιβιώνει το 50% των κυττάρων.

Μετά τον μετασχηματισμό τα κύτταρα επωάζονται σε πλούσιο θρεπτικό υλικό για 30-60 λεπτά έτσι ώστε να εκφραστεί το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό. Τέλος πραγματοποιείται η στρώση τους σε τρυβλία που φέρουν επιλεκτικό θρεπτικό υλικό.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής το βακτήριο *E. coli* και ως φορέας κλωνοποίησης τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν από την αντίδραση σύνδεσης και φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Ο polylinker του φορέα είναι ενσωματωμένος στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Παρουσία X-gal (5-bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactosidase) στο θρεπτικό μέσο, το προϊόν του γονιδίου *lacZ* οδηγεί στην εμφάνιση μπλε χρώματος στις βακτηριακές αποικίες λόγω του μεταβολισμού του X-gal. Η είσοδος του ενθέματος διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *lacZ* και εμποδίζει την έκφραση του, με αποτέλεσμα οι αποικίες να έχουν άσπρο χρώμα. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων που φέρουν τα ανασυνδυασμένα με το επιθυμητό ένθεμα πλασμίδια (Sambrook και Russell, 2001).

*Υλικά:*

- Διάλυμα δεκτικών κυττάρων *E. coli*
- Υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth\*
- Γλυκερόλη (10% v/v)
- d H<sub>2</sub>O
- Πλασμιδιακό DNA (ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από αντίδραση σύνδεσης)
- Υγρό θρεπτικό μέσο SOC\*
- LB άγαρ\*
- Διάλυμα X-gal (20mg/ml)

- Διάλυμα IPTG (200mg/ml)
- Falcon, σωληνάκια erpendorf και τριβλία Petri
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης και κυβέτες

#### Μεθοδολογία:

Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία των δεκτικών κυττάρων *E. coli* για την ηλεκτροδιάτρηση, μέσω διαδοχικών πλύσεων για την εξάλειψη των αλάτων. Δεκτικό κύτταρο ονομάζεται το βακτήριο που έχει την ικανότητα να δεχθεί πλασμίδιο. Όλη η διαδικασία πρέπει να γίνεται στον πάγο. Ακολουθεί ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων.

#### A. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *E. coli*:

1. Επώαση 1ml LB Broth με μια αποικία *E. coli* για 5h έως overnight στους 37°C στις 210rpm.
2. Σε 100ml LB Broth προστίθεται το 1ml και ακολουθεί επώαση στους 37°C στις 210rpm μέχρι  $O.D._{600} = 0.45-0.55$ .
3. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πάγο για 10-15min και στην συνέχεια μεταφέρονται σε παγωμένα falcon των 50ml (2 falcon).
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 4°C στις 4.000g.
5. Μετά την απόχυση του υπερκείμενου προστίθενται 100ml dH<sub>2</sub>O (ice-cold), από 50ml σε κάθε falcon. Ακολουθεί καλή ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση για 15min στους 4°C στις 4.000g.
7. Απόχυση του υπερκείμενου με προσοχή καθώς το ίζημα ενδέχεται να είναι χαλαρό.
8. Προσθήκη 100ml dH<sub>2</sub>O (ice-cold), από 50ml σε κάθε falcon. Ακολουθεί καλή ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15min στους 4°C στις 4.000g και τέλος απόχυση υπερκείμενου.

Σε περίπτωση που τα δεκτικά κύτταρα προορίζονται για αποθήκευση η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

9. Τοποθέτηση των κυττάρων σε κρύο σωλήνα με στεγνό πάτο.
10. Στη συνέχεια προστίθεται 8ml παγωμένης γλυκερόλης 10% (4ml ανά falcon).
11. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στους 2°C στις 4.200rpm.
12. Απόχυση υπερκείμενου και ζύγιση των falcon με τα ιζήματα.
13. Προσθήκη παγωμένης γλυκερόλης 10% και ανάκτηση κυττάρων (στον πάγο).
14. Μοιράζουμε από 40μl κυττάρων σε ηή παγωμένα erpendorf.
15. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε dry- ice ή ethanol bath για να παγώσουν. Η αποθήκευση γίνεται στους -80°C.

B. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση:

1. Αρχικά προστίθενται τα 2ml της αντίδρασης σύνδεσης (μετά από αραιώση 1:10) στο erpendorf που περιέχει 40μl δεκτικών κυττάρων και επώαση για 1min στον πάγο.
2. Ακολουθεί μεταφορά του δείγματος στην κυβέτα. Η κυβέτα πρέπει να είναι παγωμένη.
3. Στην συνέχεια η κυβέτα τοποθετείται στην συσκευή της ηλεκτροδιάτρησης και εφαρμόζεται 1.8kV.
4. Ακολουθεί προσθήκη 1ml SOC όσο πιο γρήγορα γίνεται και επώαση για 1h στους 37°C στις 200rpm.
5. Τα συνολικά 1000μl μοιράζονται σε erpendorf (200μl και 800μl). Τα 800μl φυγοκεντρώνται για 4min στις 2000rpm. Ακολουθεί αναδιάλυση των κυττάρων σε τελικό όγκο 200μl. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές ποσότητες μετασηματισμένων κυττάρων για την επίστρωση των τριβλίων.
6. Σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB άγαρ που περιέχει αμικικιλίνη, στρώνονται οι παραπάνω ποσότητες, αφού πρώτα προσθέσουμε σε αυτές 30μl X-gal και 3μl IPTG.
7. Τέλος τα τριβλία επωάζονται στους 37°C overnight.

## 2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από βακτήρια επιλέχτηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης με SDS. Η έκθεση βακτηριακού αιωρήματος σε ισχυρά ανιονικά απορρυπαντικά σε υψηλές τιμές pH οδηγεί στο άνοιγμα της κυτταρικής μεμβράνης, στην αποδιάταξη του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών και στην απελευθέρωση του πλασμιδίου στο υπερκείμενο. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA που έχουν αποδιαταχθεί καθώς και τα κυτταρικά υπολείμματα δημιουργούν σύμπλοκα, τα οποία κατακρίννιζονται όταν τα ιόντα νατρίου αντικαθίστανται από ιόντα καλίου. Το πλασμιδιακό DNA και το βακτηριακό RNA μπορεί να ανακτηθεί από το υπερκείμενο μετά από την απομάκρυνση των μετουσιωμένων υλικών με φυγοκέντριση. Στην συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη και τέλος , αναδιάλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα TE-RNase, για την απομάκρυνση του RNA (Sambrook και Russell, 2001).

*Υλικά :*

- Μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα
- Υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη
- Διάλυμα GET\*
- Διάλυμα alkali\*
- Διάλυμα οξικού καλίου\*
- Διάλυμα TE-RNase\*
- Διαλύματα φαινόλης και χλωροφορμίου
- Παγωμένη αιθανόλη 70% και 100%
- Διάλυμα CH<sub>3</sub>COONa 0.3M
- Γλυκογόνο (20mg/ml)

### Μεθοδολογία:

Αρχικά ακολουθείται διαδικασία για τη δημιουργία υγρών καλλιιεργειών βακτηριακών κυττάρων. Ακολουθεί η διαδικασία για την λύση των κυττάρων και την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Για την πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Τέλος πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη.

#### A. Υγρή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων:

1. Για την δημιουργία υγρών καλλιιεργειών ενοφθαλμίζονται αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB Broth που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (1 αποικία ανά 3ml LB Broth).
2. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών σε ένα σωλήνα στους 37°C overnight με ταυτόχρονη ανάδευση (220rpm).

Εάν είναι επιθυμητή η διατήρηση stock δείγματος, μεταφέρονται σε ένα erpendorf 850μl από την υγρή καλλιέργεια και ακολουθεί προσθήκη 150μl διαλύματος γλυκερόλης. Αποθήκευση στους -80°C.

#### B. Λύση των κυττάρων:

1. Μεταφορά 1.5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα erpendorf.
2. Φυγοκέντριση του δείγματος για 3min στις 3.000rpm. Ακολουθεί προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος, που περιέχει τα βακτήρια, στον πάγο.
3. Προσθήκη 100μl παγωμένου διαλύματος GET για την αναδιάλυση του ιζήματος. Ακολουθεί vortex για 1min και επώαση του δείγματος για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα GET εξαιτίας της γλυκόζης που περιέχει, διατηρεί ισοτονικό το διάλυμα εμποδίζοντας τη ρήξη των μεμβρανών.
4. Προσθήκη 200μl διαλύματος alkali. Ακολουθεί ήπια ανάδευση, αναποδογυρίζοντας το erpendorf 5 φορές, και το δείγμα αφήνεται στον πάγο για 5-3min. Το NaOH που περιέχεται στο διάλυμα alkali δημιουργεί οπές στις μεμβράνες με αποτέλεσμα την έξοδο του πλασμιδιακού DNA από το κύτταρο.

5. Προσθήκη 150μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου CH<sub>3</sub>COOK (pH 4.8). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 8-10min. Το CH<sub>3</sub>COOK σταματά τη λύση των κυττάρων καθώς αντιδρά με το NaOH.
6. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5min στις 13.200rpm. Μεταφορά του υπερκείμενου, που περιέχει το πλασμιδιακό DNA σε νέο σωληνάκι erpendorf.

Γ. Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο:

1. Στο δείγμα DNA προστίθενται ποσότητα ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου (1:1). Ακολουθεί έντονη ανάδευση με τη βοήθεια vortex.
2. Φυγοκέντριση για 5min στις 13.200rpm. Η υδατική φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωληνάκι.
3. Προστίθεται χλωροφόρμιο ίσου όγκου και επαναλαμβάνεται το στάδιο 2.
4. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 3 και ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Δ. Κατακρήμνιση με αιθανόλη:

1. Στο δείγμα DNA όγκου V προσθέτονται 2.5V αιθανόλης 100%, τέτοιος όγκος CH<sub>3</sub>COONa 2.31M ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 0.3M και 0,5μl γλυκογόνου 20mg/ml. Το μίγμα διατηρείται στους -20°C για 15min.
2. Φυγοκέντριση για 10min στις 13.200rpm.
3. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και προστίθεται 0.5V αιθανόλη 70%.
4. Φυγοκέντριση για 5min στις 13.200rpm και αφαίρεση του υπερκείμενου.
5. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και αναδιαλύεται σε 50μl TE-RNase. Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C.

## 2.8 Μερική πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Η μερική πέψη του DNA χρησιμοποιείται για την κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών καθώς και για την χαρτογράφηση περιορισμού. Για την χαρτογράφηση των θέσεων περιορισμού ενός τμήματος DNA πραγματοποιείται αρχικά η κλωνοποίησή του σε ένα φορέα (πλασμιδιακός ή φαγικός) με γνωστή αλληλουχία ενώ στην συνέχεια

εφαρμόζονται συνήθως οι δύο ακόλουθες τακτικές. Η πρώτη είναι η μέθοδος της διπλής πέψης κατά την οποία πραγματοποιείται πλήρης πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με δύο ένζυμα περιορισμού ξεχωριστά και στην συνέχεια ταυτόχρονα. Ακολουθεί η σύγκριση των προτύπων των θραυσμάτων του DNA που προκύπτουν σε μία γνωστή σειρά (Morales et al, 1993).

Η δεύτερη μέθοδος, η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, είναι η μερική πέψη του DNA όπου ο ανασυνδυασμένος φορέας υπόκειται αρχικά σε μια πλήρη πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού, το οποίο αναγνωρίζει μία σπάνια-κόπης θέση περιορισμού, με αποτέλεσμα την εξαγωγή του ενθέματος από τον φορέα.. Στην συνέχεια πραγματοποιείται μερική πέψη του δείγματος (δηλαδή η αντίδραση δεν ολοκληρώνεται με την προσθήκη EDTA) με ένα κατάλληλο ένζυμο περιορισμού το οποίο αναγνωρίζει και κόβει πολλές φορές μέσα στο ένθεμα. Το αποτέλεσμα της μερικής πέψης που προκύπτει και σε συνδυασμό με την εφαρμογή της μεθόδου της υβριδοποίησης κατά Southern οδηγεί στην χαρτογράφηση όλων των θέσεων περιορισμού του συγκεκριμένου περιοριστικού ενζύμου μέσα στο ένθεμα. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται στην υβριδοποίηση κατά Southern συντίθεται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι συμπληρωματικός προς τις πρώτες βάσεις της αλληλουχίας των θραυσμάτων με άκρο το πρώτο ένζυμο. Ως αποτέλεσμα εμφανίζουν σήμα τα θραύσματα του DNA τα οποία πλαισιώνονται από μία σπάνια θέση περιορισμού (λόγω της πέψης με το πρώτο ένζυμο περιορισμού) από τη μία πλευρά και από μία πιο συχνή (λόγω της μερικής πέψης με το δεύτερο ένζυμο περιορισμού) από την άλλη (Mathiopoulos et al, 1995).

*Υλικά:*

- Δείγμα DNA
- Ένζυμο περιορισμού
- EDTA 20mM
- Υλικά για τις αντιδράσεις πέψης (βλ. ενότητα 2.3)
- Υλικά για την κατακρήμνιση με αιθανόλη (βλ. ενότητα 2.7)

### Μεθοδολογία:

1. Αρχικά πραγματοποιείται αντίδραση πέψης 4γ φαγικού DNA με 15u κατάλληλου ένζυμου περιορισμού (π.χ SalI) για να γίνει εξαγωγή του ενθέματος. Η αντίδραση έχει τελικό όγκο 150μl και η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C overnight.
2. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65°C για 20min.
3. Στην συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση στα 30μl H<sub>2</sub>O.
4. Η παραπάνω ποσότητα DNA (30μl) χωρίζεται σε τρία σωληνάκια erpendorf όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 4:

Σωληνάκια erpendorf	Ποσότητα DNA
A	5μl
B	20μl
Γ	5μl

**Πίνακας 4:** Διαχωρισμός συνολικής ποσότητας DNA.

5. Το σωληνάκι A παραμένει ως έχει καθώς αντιπροσωπεύει την πλήρη πέψη του DNA με το ένζυμο περιορισμού SalI.
6. Στο σωληνάκι Γ γίνεται η αντίδραση πλήρους πέψης με 1.0u ένζυμου περιορισμού που έχει θέσεις αναγνώρισης εσωτερικά του ενθέματος (π.χ. EcoRI). Στην αντίδραση προστίθεται BSA (1x) για καλύτερη δράση του ενζύμου, ενώ η πέψη έχει τελικό όγκο 20μl. Η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C για 1h.
7. Στο σωληνάκι B πραγματοποιείται η μερική πέψη προσθέτοντας 0.5u EcoRI. Στην αντίδραση προστίθεται BSA (1x) για καλύτερη δράση του ενζύμου, ενώ η πέψη έχει τελικό όγκο 27.97μl. Η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C. Από αυτή την αντίδραση μεταφέρεται ποσότητα (aliquots) σε σωληνάκια (B1, B2, B3 και B4) που περιέχουν EDTA 20mM, σε χρόνους σύμφωνα με τον πίνακα 5. Στην συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αντίδρασης.



<b>Χρόνος</b>	<b>Ποσότητα (aliquots)</b>	<b>EDTA (20mM)</b>
5min	13μl	0.5μl
10min	8μl	0.4μl
20min	4μl	0.3μl
30min	2.97μl	0.2μl

**Πίνακας 5:** Χρονοδιάγραμμα της αντίδρασης μερικής πέψης.

8. Ακολουθεί ανάμιξη των ποσοτήτων των B1-B4 σε ένα mix (Δ).
9. Στην συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των δειγμάτων Α, Γ και Δ.
10. Τέλος ακολουθείται το πρωτόκολλο της υβριδοποίησης κατά Southern για την χαρτογράφηση περιορισμού.

## **2.9 Σύνθεση μονόκλωνων RNA ανιχνευτών με την μέθοδο της μεταγραφής in vitro**

Τα σημασμένα νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιούνται στην μοριακή κλωνοποίηση είτε ως αντιδραστήρια (π.χ. στη χημική και ενζυματική αλληλούχιση) είτε ως ανιχνευτές (π.χ. στις αναλύσεις Southern και northern). Οι μονόκλωνοι RNA ανιχνευτές όχι μόνο είναι ευκολότερο να παρασκευαστούν αλλά μπορούν να δώσουν ισχυρότερο σήμα από τους αντίστοιχους DNA ανιχνευτές. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για την παρασκευή των μονόκλωνων RNA ανιχνευτών είναι η μεταγραφή in vitro.

Το υπόστρωμα DNA που χρησιμοποιείται σε αυτή την μέθοδο προκύπτει από την γραμμικοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν έναν ισχυρό υποκινητή βακτηριοφάγου ανοδικά του κομματιού DNA που μας ενδιαφέρει. Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται φαγικοί φορείς οι οποίοι περιέχουν επίσης βακτηριοφαγικό υποκινητή (Sambrook και Russell, 2001).

#### *Υλικά:*

- Υπόστρωμα DNA
- Υλικά για την αρχική πέψη του δείγματος (βλ. ενότητα 2.3)
- Υλικά για την εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και για την κατακρήμνιση με αιθανόλη (βλ. ενότητα 2.7)
- Κατάλληλο ενζυμο περιορισμού
- RNase-free H<sub>2</sub>O
- NTP
- DDT
- Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 10x (T3 και T7)
- RNase inhibitor
- T3 και T7 RNA πολυμεράση
- Υλικά για την εμφάνιση σήματος σύμφωνα με την μέθοδο της υβριδοποίησης κατά Southern (βλ. ενότητα 2.10)

#### *Μεθοδολογία:*

1. Αρχικά πραγματοποιείται πέψη του δείγματος DNA (φαγικό DNA) με κατάλληλο ενζυμο περιορισμού το οποίο έχει την ικανότητα να κόβει σε πολλά σημεία το δείγμα DNA. Με αυτό τον τρόπο προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός κομματιών DNA, ένα από τα οποία περιέχει τον βακτηρικό υποκινητή και ένα μέρος του ενθέματος. Για την πέψη απαιτούνται 2μg DNA.
2. Ακολουθεί απενεργοποίηση του περιοριστικού ενζύμου στους 70°C για 15min.
3. Ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20μl ddH<sub>2</sub>O.
4. Σε σωληνάκι erpendorf τοποθετούνται διαδοχικά τα αντιδραστήρια όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 6, για αντίδραση τελικού όγκου 50μl:

		<b>T<sub>3</sub></b>	<b>T<sub>7</sub></b>
<b>DNA</b>		10μl	10μl
<b>RNase-free H<sub>2</sub>O</b>		17.7μl	17.7μl
<b>NTP:</b>	<b>A: 32.4mM</b>	1.5μl	1.5μl
	<b>G: 55mM</b>	0.9μl	0.9μl
	<b>U: 35.4mM</b>	1.4μl	1.4μl
	<b>C: 50mM</b>	0.5μl	0.5μl
	<b>Biotin C: 10mM</b>	2.5μl	2.5μl
<b>DDT 2M</b>		2.5μl	2.5μl
<b>Buffer transcr.: 5x</b>		10.0μl	10.0μl
<b>RNase inhibitor: 40u/μl</b>		0.5μl	0.5μl
<b>RNA πολυμεράση: 20u/μl</b>		2.5μl T <sub>3</sub> πολυμεράση	2.5μl T <sub>7</sub> πολυμεράση
<b>Τελικός όγκος</b>		50.0μl	50.0μl

**Πίνακας 6:** Αντίδραση μεταγραφής in vitro.

5. Επώαση του δείγματος στους 37°C για 2h, μετά από ελαφριά ανάδευση.
6. Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο.
7. Στην συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  7M → 1M). Αναδιάλυση σε 50μl H<sub>2</sub>O.

Για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου και να προσδιορισθεί η αποδοτικότητα των ανιχνευτών T<sub>3</sub> και T<sub>7</sub> ακολουθείται η μέθοδος spotting probes. Αρχικά πραγματοποιείται αραίωση 1:10 (δηλ. σε 0.5μl ανιχνευτή προσθέτονται 9.5μl H<sub>2</sub>O για τελικό όγκο 10μl). Οι διάφορες συγκεντρώσεις που προκύπτουν σύμφωνα με τον πίνακα 7 τοποθετούνται σε νάιλον μεμβράνη, υπό μορφή κηλίδων. Η μεμβράνη περνάει από το πρωτόκολλο εμφάνισης της υβριδοποίησης κατά Southern.

Αραιώσεις	Αρχική αραιώση 1:10 (10μl)	H <sub>2</sub> O	Τελικός όγκος
1	0.5μl	4.5μl	5μl
2	1.5μl	3.5μl	5μl
3	3μl	2μl	5μl
4	5μl	-	5μl

**Πίνακας 7:** Αραιώσεις του δείγματος για την μέθοδο spotting probes.

## 2.10 Υβριδοποίηση κατά Southern

Η τεχνική της υβριδοποίησης κατά Southern αναπτύχθηκε από τον E. M. Southern το 1975, από τον οποίο πήρε και τον όνομα της. Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται για την μελέτη της οργάνωσης των γονιδίων στο πλαίσιο του γονιδιώματος, μέσω της χαρτογράφησης θέσεων περιορισμού μέσα και γύρω από τα τμήματα του γονιδιωματικού DNA, για τα οποία είναι διαθέσιμοι ειδικοί ανιχνευτές. Το δείγμα DNA υφίσταται πέψη με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού, και τα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μέσω ενός τυπικού πηκτώματος αγαρόζης. Ακολουθεί αποδιάταξη του DNA in situ και μεταφορά του με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάιλον. Στην συνέχεια πραγματοποιείται η υβριδοποίηση με τον ειδικά σημασμένο ανιχνευτή και οι ζώνες που είναι συμπληρωματικές με τον ανιχνευτή εντοπίζονται από ένα κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης (Sambrook και Russell, 2001).

*Υλικά:*

Για την μεταφορά του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και την σταθεροποίηση απαιτούνται:

- Διάλυμα αποδιάταξης\*
- Διάλυμα εξουδετέρωσης\*
- Διάλυμα 10xSSC
- ddH<sub>2</sub>O

- νάilon μεμβράνη
- 4 χαρτιά Whatman
- Χαρτοπετσέτες

Για την υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης απαιτούνται:

- Διάλυμα υβριδοποίησης\*
- ssDNA (10mg/ml)
- Ανιχνευτής (Probe)

Για την εμφάνιση του σήματος απαιτούνται:

- Διάλυμα πλύσης 1 (Wash 1)\*
- Διάλυμα πλύσης 2 (Wash 2)\*
- Διάλυμα A\*
- Διάλυμα B\*
- Διάλυμα αντισώματος\*
- Διάλυμα C\*
- Διάλυμα NBT\*
- Διάλυμα BCIP\*

*Μεθοδολογία:*

A. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση από το πήκτωμα αγαρόζης

1. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο προστίθεται διάλυμα αποδιάταξης. Η ποσότητα του διαλύματος αποδιάταξης πρέπει να είναι επαρκής έτσι ώστε να καλύπτεται το πήκτωμα. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για 15min.
2. Το διάλυμα αποδιάταξης απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 1.
3. Αποχύνεται το διάλυμα αποδιάταξης και το πήκτωμα αγαρόζης ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O.
4. Προστίθεται το διάλυμα εξουδετέρωσης. Ακολουθεί ανάδευση για 20min.
5. Το διάλυμα εξουδετέρωσης απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.

6. Αποχύνεται το διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα αγαρόζης ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O.
7. Προσθήκη διαλύματος 10xSSC για <10min.
8. Ακολουθεί η προετοιμασία της μεμβράνης. Κόβουμε την μεμβράνη στις διαστάσεις του πηκτώματος μικρότερη κατά 0.1cm. Επίσης κόβουμε 4 χαρτιά Whatman και μία στοίβα χαρτοπετσέτες στις διαστάσεις του πηκτώματος μικρότερα κατά 0.5cm.
9. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται ανάποδα σε επίπεδη επιφάνεια (με τα πηγαδάκια προς τα κάτω).
10. Η μεμβράνη διαβρέχεται με απιονισμένο νερό και μετά με το διάλυμα 10xSSC και τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα. Τη μεμβράνη τη μεταφέρουμε χρησιμοποιώντας τσιμπιδάκια από τα άκρα.
11. Δύο χαρτιά Whatman διαβρέχονται με το διάλυμα 10xSSC και τοποθετούνται πάνω από το πήκτωμα. Πάνω από αυτά τοποθετούνται τα άλλα δύο χαρτιά Whatman στεγνά.
12. Πάνω από τα χαρτιά Whatman τοποθετούνται οι χαρτοπετσέτες
13. Στην επιφάνεια που είναι τοποθετημένο το πήκτωμα προστίθεται ικανή ποσότητα διαλύματος 10xSSC ώστε να καλύπτει το μισό πήκτωμα.
14. Η μεταφορά γίνεται είτε overnight είτε σε χρόνο >2h.
15. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς σημειώνουμε και αριθμούμε τα πηγαδάκια στη μεμβράνη. Η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει ανάμεσα σε χαρτιά Whatman σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως πραγματοποιείται ξήρανση στους 80°C για 2h.

## B. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή

### ➤ Προϋβριδοποίηση:

1. Η μεμβράνη τοποθετείται στο σωλήνα υβριδοποίησης έτσι ώστε η επιφάνεια που φέρει το DNA να είναι προς το εσωτερικό του σωλήνα.
2. Στο σωλήνα υβριδοποίησης προστίθεται διάλυμα υβριδοποίησης (0.2ml/cm<sup>2</sup> μεμβράνης) και ssDNA (100μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης). Πριν τη προσθήκη το ssDNA (Salmon Sperm) βράζεται για 10min ώστε να αποδιαταχθεί και τοποθετείται στον πάγο για 10min. Το ssDNA προσδένεται μη ειδικά σε μη ομόλογες περιοχές της

μεμβράνης, εμποδίζοντας τη μετέπειτα σύνδεση του ανιχνευτή σε μη ομόλογες αλληλουχίες.

➤ Υβριδοποίηση:

1. Αποδιάταξη ανιχνευτή με βράσιμο για 10min και επώαση στον πάγο για 10min.
2. Ακολουθεί αφαίρεση μικρής ποσότητας διαλύματος υβριδοποίησης ώστε η μεμβράνη να καλύπτεται από το εναπομείναν διάλυμα.
3. Προσθήκη του ανιχνευτή (25ml).
4. Επώαση στους 60°C για 16h.

Γ. Εμφάνιση σήματος

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη.

➤ Πλύσεις

Οι πλύσεις πραγματοποιούνται για την απομάκρυνση του μη ειδικά συνδεδεμένου ανιχνευτή σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

1. Το διάλυμα υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή αποχύνεται σε αποστειρωμένο falcon και φυλάσσεται στους -20°C. Ο ανιχνευτής μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αφού πρώτα αποδιαταχθεί.
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο.
3. Ακολουθεί η προσθήκη ικανής ποσότητας διαλύματος πλύσης 1 (Wash 1) ώστε να καλύπτεται η μεμβράνη. Επώαση υπό ανάδευση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος το διάλυμα αποχύνεται.
4. Επανάληψη του βήματος 3.
5. Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης με προσθήκη διαλύματος πλύσης 2 (Wash 2). Επώαση υπό ανάδευση για 20min στους 60°C. Το διάλυμα πλύσης 2 πρέπει να έχει προθερμανθεί στους 60°C. Τέλος το διάλυμα αποχύνεται.
6. Επανάληψη του βήματος 5.

## ➤ Εμφάνιση

1. Εξισορρόπηση μεμβράνης με προσθήκη διαλύματος Α. Επώαση υπό ανάδευση για 1min και απόχυση διαλύματος.
2. Προσθήκη διαλύματος Β και επώαση υπό ανάδευση για 35min.
3. Απόχυση διαλύματος Β και προσθήκη διαλύματος αντισώματος. Επώαση υπό ανάδευση για 35min.
4. Το διάλυμα αντισώματος αποχύνεται σε falcon και φυλάσσεται στους 4oC.
5. Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης σε διάλυμα Α για 15min.
6. Απόχυση του διαλύματος Α και επανάληψη του βήματος 5.
7. Απόχυση διαλύματος Α και εξισορρόπηση μεμβράνης με προσθήκη διαλύματος C για 2min.
8. Στην συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρεται σε τριβλίο με τέτοιο τρόπο ώστε η επιφάνεια που φέρει το DNA να είναι προς τα πάνω και τοποθετείτε σε σκιερό μέρος.
9. Η μεμβράνη καλύπτεται με 10ml διαλύματος C που περιέχει 50μl NBT και 37.5μl BCIP.
10. Η εμφάνιση ολοκληρώνεται μέσα σε λίγα λεπτά, ενώ η αντίδραση μπορεί να τερματίσει με πολλαπλά ξεπλύματα με απιονισμένο νερό.

### **2.11 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA, επεξεργασία της αλληλουχίας με το πρόγραμμα Omiga και ομοπαράθεση αλληλουχιών με το πρόγραμμα Blast.**

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen. Η MacroGen χρησιμοποιεί την μέθοδο Sanger. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αλληλούχισης απαιτούνται 1000ng DNA για κάθε δείγμα. Η επεξεργασία της κάθε αλληλουχίας που προσδιορίστηκε έγινε με το πρόγραμμα Omiga. Το πρόγραμμα αυτό επιτρέπει τη σύγκριση και την ομοπαράθεση αλληλουχιών. Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των αλληλουχιών, την εύρεση θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων και την σύνθεση ενθεμάτων από τα επιμέρους τμήματα των αλληλουχιών τους. Το πρόγραμμα Blast (Basic Local Aligment Tool) χρησιμοποιείται για τη σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με ακολουθίες από βάσεις



δεδομένων. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ταυτοποίηση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας.

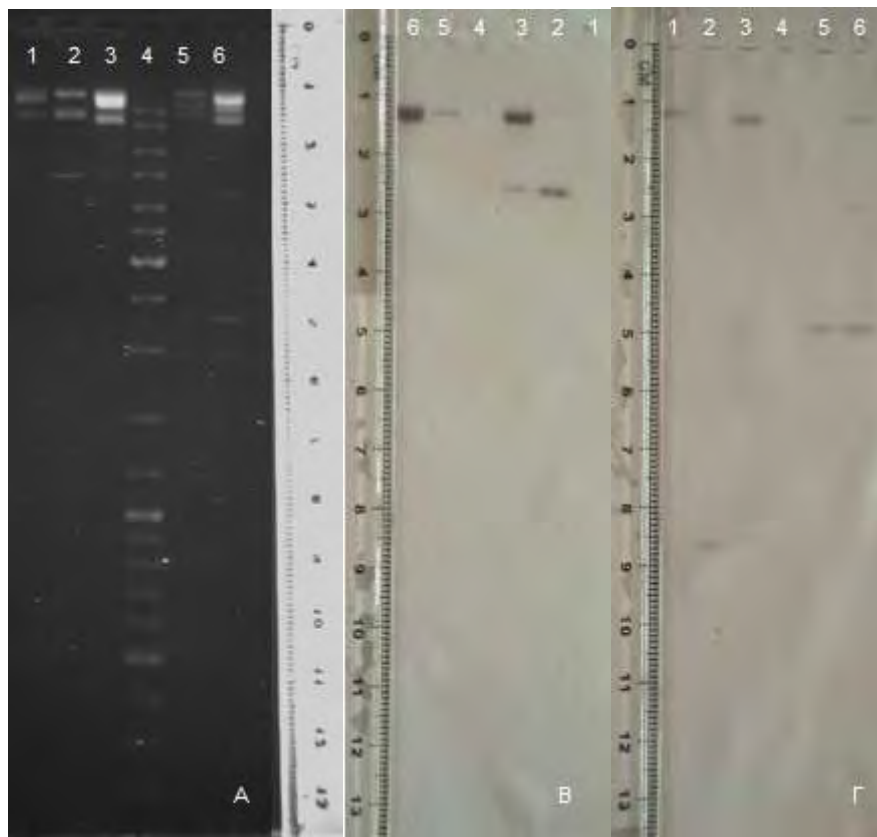
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η επιλογή του φάγου 443 (Φ443) έγινε με βάση προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου, στην προσπάθεια απομόνωσης φαγικών κλώνων που περιείχαν το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles* το οποίο παρουσιάζει μια ενδιαφέρουσα προτίμηση διασποράς στο Υ χρωμόσωμα του δάκου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR σε κλάσματα φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με εκκινητές που ενισχύουν συγκεκριμένη περιοχή του τμήματος 1.2kb που περιλαμβάνει το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles* (Achill400 primers). Το τμήμα αυτό των 1.2kb περιλαμβάνει επίσης μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 300bp στο τέλος του, η οποία αποδείχθηκε ότι αποτελεί μια κεντρομερική επανάληψη του γονιδιώματος. Αυτό οδήγησε στην απομόνωση φάγων που περιλαμβάνουν αυτή την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. Οι εκκινητές Achill400 ενισχύουν εσωτερικό τμήμα του αρχικού τμήματος των 1.2kb που εμφανίζει ομολογία με το ρετρομεταθετό MAX, ώστε να μη περιλαμβάνεται πλέον η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. Ακολούθησε η διαλογή των κλασμάτων που έδωσαν προϊόν ενίσχυσης με ανιχνευτή τον Achill400. Τελικά ένας από τους φάγους που απομονώθηκαν είναι ο 443 (Φ443). Στην συνέχεια μετά από την πέψη του Φ443 με τα ένζυμα EcoRI, HindIII και το συνδυασμό τους, πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern με ανιχνευτή τον Achill400, για την επιβεβαίωση του σήματος. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα, έδωσε σήμα μόνο ένα τμήμα 1.9kb.

#### 3.1 Χαρτογράφηση με την μέθοδο της μερικής πέψης του φάγου 443 (Φ443).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του Φ443 με την ενδονουκλεάση περιορισμού NotI, η οποία εμφανίζει θέσης κοπής εκατέρωθεν του ενθέματος. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μερικές πέψεις με τα ένζυμα EcoRI και HindIII και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 1%. (εικόνα 8A). Ακολούθησε υβριδοποίηση κατά Southern. Οι ανιχνευτές T3 και T7 που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευαστήκαν με μεταγραφή *in vitro* και δεσμεύονται στην περιοχή μεταξύ της θέσης του προαγωγέα και της πρώτης θέσης κοπής του ενζύμου HaeIII. Σήμα έδωσαν όλα εκείνα τα τμήματα στο ένα άκρο τους έχουν θέση αναγνώρισης για το NotI και στο άλλο άκρο θέσεις αναγνώρισης των EcoRI και HindIII (εικόνες 8B και 8Γ). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης κατά Southern (εικόνα), το ένθεμα έχει μέγεθος ~15kb και αποτελείται από τα 5 εξής τμήματα: τμήμα 6.0kb

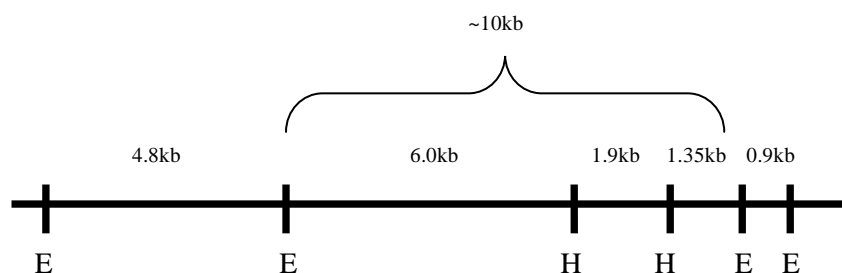
E/H, τμήμα 4.8kb N/E, τμήμα 1.9 H/H, τμήμα 1.350kb E/H και τμήμα 0.9kb E/N. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα έγινε ο σχεδιασμός του χάρτη περιορισμού του Φ443 (εικόνα 9).



Υπόμνημα εικόνας 8:

1 → Complete NotI  
 2 → Complete EcoRI  
 3 → Partial EcoRI  
 4 → Ladder  
 5 → Complete HindIII  
 6 → Partial HindIII

**Εικόνα 8:** Α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του Φ443 με σκοπό την μεταφορά του DNA σε νάιλον μεμβράνη. Β) Εμφάνιση των σημάτων μετά την υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή T3. Γ) Εμφάνιση των σημάτων μετά την υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή T7.



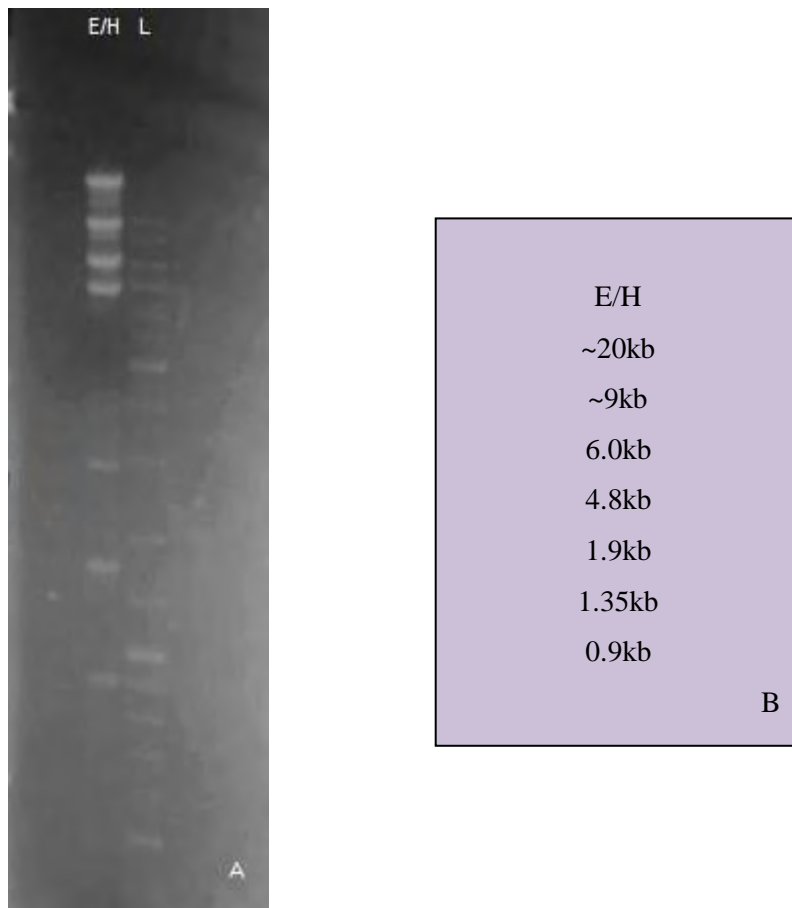
**Εικόνα 9:** Χάρτης ενζύμων περιορισμού του φάγου 443. E=EcoRI, H=HindIII.

### **3.2 Κλωνοποίηση τμήματος 1.9kb H/H**

Η κλωνοποίηση όλων των τμημάτων του ενθέματος που προκύπτουν από τη διπλή πέψη του Φ443 με τα ένζυμα EcoRI και HindIII είναι απαραίτητη για την πλήρη αλληλούχιση του φάγου. Το τμήμα 1.9kb H/H έχει αρκετά μεγάλο μέγεθος (> 1.55kb), με αποτέλεσμα να απαιτείται η υποκλωνοποίησή του, ώστε να είναι εφικτή η πλήρης αλληλούχιση.

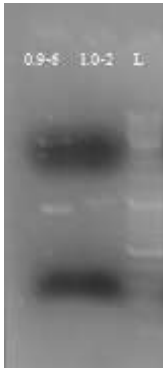
#### **3.2.1 Υποκλωνοποίηση του τμήματος 1.9kb H/H**

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του Φ443 με τα ένζυμα EcoRI και HindIII και μετά την ηλεκτροφόρηση του δείγματος, ανακτήθηκε από το πήκτωμα το τμήμα 1.9kb H/H (εικόνα 10A). Επιπλέον, από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διπλής πέψης, παρατηρείται το πρότυπο θέσεων κοπής του ενθέματος (εικόνα 10B). Οι ζώνες των 20kb και 9.0kb αντιστοιχούν στους βραχίονες του φάγου, ενώ οι υπόλοιπες παρουσιάζουν τις θέσεις κοπής των ενζύμων του ενθέματος που είναι κλωνοποιημένο σ' αυτόν. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική πέψη με διάφορα ένζυμα, ώστε να βρεθεί ένα ένζυμο που να δίνει ένα λογικό αριθμό τμημάτων του αρχικού 1.9kb H/H. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων (εικόνα 16/7) έδειξε ότι το ένζυμο HincII πέπτει το αρχικό τμήμα μία φορά, δίνοντας ένα τμήμα 1.0kb H/Hc και ένα 0.9kb H/Hc. Ακολούθησε η πέψη του Φ443 με τα ένζυμα HindIII και HincII, η ηλεκτροφόρηση της και η απομόνωση των τμημάτων 1.0kb H/Hc και ένα 0.9kb H/Hc από το πήκτωμα αγαρόζης.



**Εικόνα 10:** Α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διπλής πέψης του Φ443 με τα ένζυμα EcoRI και HindIII. Β) αναγραφή του μεγέθους των ζωνών που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης, σύμφωνα με το πρότυπο του μάρτυρα μοριακού βάρους.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης με φορέα pBS-SK(+) που φέρει άκρα για τα ένζυμα περιορισμού HincII και HindIII. Ακολούθησε ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εφαρμόζοντας τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Από τις υγρές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν πραγματοποιήθηκε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Η επιβεβαίωση της επιτυχία της κλωνοποίησης έγινε με διπλή πέψη των δειγμάτων του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα HincII και HindIII. Η πέψη αυτή αναμένεται να δώσει στην ηλεκτροφόρηση τη ζώνη του φορέα και τη ζώνη του ενθέματος. Τα δείγματα που επιβεβαιώθηκαν είναι τα 1.0-2 και 0.9-6 (εικόνα 11).

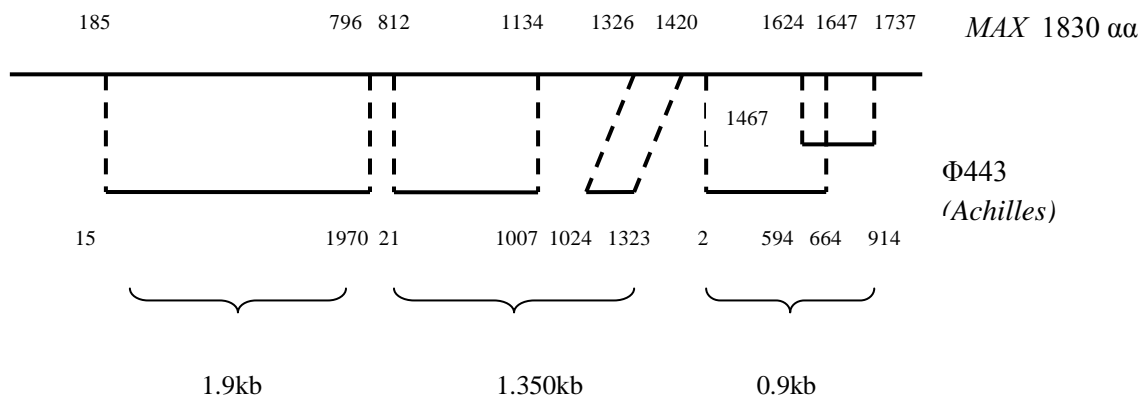


**Εικόνα 11:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης των δειγμάτων 0.9-6 και 1.0-2 με τα ένζυμα HincII και HindIII. Παρατηρείται η ζώνη του φορέα στις ~2.9kb, και οι ζώνες των ενθεμάτων στις 0.9kb και 1.0kb αντίστοιχα.

### **3.3 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης των τμημάτων 1.0kb H/Hc, 0.9kb H/Hc, 1.350kb E/H και 0.9kb E.**

Τα δείγματα sb443-1.9-1.0 και sb443-1.9-0.9, στάλθηκαν μαζί με τα 443-1350 και 443-0.9, που ήταν ήδη κλωνοποιημένα από παλαιότερες έρευνες, στην εταιρία MacroGen για τον καθορισμό της αλληλουχίας τους. Η επεξεργασία τους έγινε με το πρόγραμμα Omega και ακολούθως συγκρίθηκαν μέσω του προγράμματος BLAST με τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων. Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα blastn και blastx, που αντιστοιχούν σε ομολογία μεταξύ νουκλεοτιδίων και ομολογία μεταξύ νουκλεοτιδίων και αμινοξέων αντίστοιχα. Αρχικά έγινε η ανάλυση των δειγμάτων με το πρόγραμμα blastn. Στα δείγματα βρέθηκαν ομολογίες με διάφορες χρωμοσωμικές περιοχές του εντόμου *Drosophila melanogaster*. Αυτό συνέβη λόγω της ομοιότητας του στοιχείου *Achilles* με το ρετρομεταθετό MAX, το οποίο εντοπίζεται σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος του εντόμου. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το πρόγραμμα blastx, το οποίο μετατρέπει την νουκλεοτιδική αλληλουχία σε πιθανές αμινοξικές αλληλουχίες και έπειτα τις συγκρίνει με βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν ότι τα δείγματα είναι μέρος της πολύπρωτεϊνης gag-pol του ρετρομεταθετού MAX της οικογένειας BEL-Pao, με σημαντική ομοιότητα. Αναλυτικά, τα δείγματα sb443-1.9-1.0, sb443-1.9-0.9, 443-1350 και 443-0.9 εμφανίζουν ομολογία με αντίστοιχα αμινοξικά τμήματα της πολυπρωτεϊνης GAG-POL του στοιχείου MAX (εικόνα 12). Επιπλέον στο δείγμα 443-1350 εντοπίστηκε η συντηρημένη πρωτεΐνη RT\_perA17 (αντίστροφη τρανσκριπτάση). Αυτή η υποοικογένεια αντιπροσωπεύει την περιοχή RT ενός πολυλειτουργικού ενζύμου. Το C-

τελικό άκρο αυτής της περιοχής παρουσιάζει ομολογία με ασπαρτικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ρετρομεταθετά στοιχεία. Η πρωτεΐνη RT καταλύει την αντιγραφή του DNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το RNA και είναι υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό των ρετρομεταθετών. Τέλος το δείγμα sb443-1.9-0.9 εμφανίζει ομολογία με την πρωτεΐνη αγνώστου λειτουργίας DUF 1757.



Εικόνα 12: Οργάνωση μέρους του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* του δάκου σύμφωνα με τη δομή του ρετρομεταθετού στοιχείου *MAX* της *Drosophila melanogaster*.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος της μελέτης της μοριακής οργάνωσης του Y χρωμοσώματος του *Bactrocera oleae* που διεκπεραιώνεται στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σε προηγούμενες προσπάθειες απομονώθηκε ένα τμήμα DNA 1.2kb, το οποίο είναι μέρος ενός ρετρομεταθετού στοιχείου με προτίμηση στο Y χρωμόσωμα. Το στοιχείο αυτό ονομάστηκε *Achilles*. Τα μεταθετά στοιχεία που έχουν χαρακτηριστεί στην τάξη των διπτέρων εντόμων φαίνεται να εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η υβριδική δυσγένεση, το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων, η οριζόντια μεταφορά, η χρωμοσωμική αναδιάταξη, η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, η δημιουργία ετεροχρωματινής, ακόμα και στη δομή μιας νέας μορφής τελομερών. Εκτός από τις σημαντικές εφαρμογές τους, τα μεταθετά στοιχεία θεωρούνται όλο και περισσότερο σημαντικοί για την εξέλιξη των γονιδιωμάτων των διπτέρων (Yeates και Wiegmann, 2005). Κάποια από τα μεταθετά στοιχεία, όπως τα ρετρομεταθετά, εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές χρωμοσωμάτων και ιδιαίτερα στο Y χρωμόσωμα, που μπορεί να λειτουργεί είτε ως πηγή τους είτε ως περιοχή συσσώρευσής τους. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να παίζουν και εποικοδομητικό αλλά και καταστροφικό ρόλο στη διαμόρφωση του γονιδιακού περιεχομένου και της έκφρασης του Y χρωμοσώματος (Rohr *et al.*, 2002). Η σπουδαιότητα της λειτουργίας των μεταθετών στοιχείων, η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους ως φορέων γενετικού μετασχηματισμού και η προτίμηση που δείχνει στο Y χρωμόσωμα το μεταθετό *Achilles*, είναι οι λόγοι που θεωρήθηκε αναγκαία η προσπάθεια απομόνωσης ολόκληρης της αλληλουχίας του ρετρομεταθετού και ο χαρακτηρισμός του.

Η διαθέσιμη αλληλουχία του *Achilles* συγκρίθηκε μέσω του προγράμματος BLAST με τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης με μεγάλη ομοιότητα με τις τρانشποζάσες gag των ρετρομεταθετών στοιχείων της οικογένειας BEL-Pao, αλλά και ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο ανοδικά της gag με χαρακτηριστικές περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου. Σύμφωνα με τα παραπάνω το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles* ανήκει στην οικογένεια BEL-Pao, η οποία είναι πολύ διαδεδομένη μεταξύ διάφορων φύλων, ένα φαινόμενο που μπορεί να προκύψει από την οριζόντια μεταφορά. Ένα στοιχείο αντίστοιχο του *Achilles*, το ρετρομεταθετό MAX, χαρακτηρίστηκε στη *Drosophila melanogaster*. Το ρετρομεταθετό στοιχείο MAX ανήκει στην οικογένεια BEL-Pao των LTR- ρετρομεταθετών στοιχείων. Ανακαλύφθηκε εσωτερικά



του συμπλέγματος του μεταθετού Bari 1 στην h39 ετεροχρωματινική περιοχή του χρωμοσώματος 2 της *Drosophila melanogaster*. Το μέγεθος του είναι 8556bp και έχει δυο αναγνωστικά πλαίσια (ORF). Το ORF1 φαίνεται να κωδικοποιεί μια πολύπρωτεΐνη 1831 αμινοξέων που περιλαμβάνει τις περιοχές GAG και RT. Αναλυτικά την περιοχή GAG ακολουθεί η περιοχή του pol γονιδίου, η οποία περιλαμβάνει τις περιοχές prot, rt και int. Το ORF2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 288 αμινοξέων άγνωστης λειτουργίας. Το στοιχείο αυτό εντοπίζεται στις ετεροχρωματινικές περιοχές των αυτοσωμάτων και είναι διάσπαρτο στο Y χρωμόσωμα (Marsano et al., 2004). Η *in situ* υβριδοποίηση του *Achilles* σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου οδήγησε στη διαπίστωση ότι και αυτό εντοπίζεται σε ετεροχρωματινικές περιοχές των χρωμοσωμάτων.

Είναι βαρύνουσας σημασίας να απομονωθεί το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles* με σκοπό την πλήρη αποκάλυψη της δομής του, η οποία είναι πιθανό να είναι συντηρημένη σε όλα τα στοιχεία αυτής της οικογένειας. Επιπλέον, είναι σημαντικό να απομονωθούν γειτονικές περιοχές του και πιο συγκεκριμένα μοναδικά τμήματα DNA. Η προτίμηση του ρετρομεταθετού *Achilles* στο Y χρωμόσωμα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα τμήματα αυτά που θα απομονωθούν πιθανόν να είναι περιοχές του Y. Αυτές οι μοναδικές περιοχές μελλοντικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως Y ειδικοί ανιχνευτές. Οι Y ειδικοί ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της βιολογικής μεθόδου δακοπροστασίας SIT καθώς και για πληθυσμιακές αναλύσεις του δάκου. Η SIT είναι μία μέθοδος βιολογικού έλεγχου πληθυσμού εντόμων, σύμφωνα με την οποία απελευθερώνεται μεγάλος αριθμός στειρωμένων αρσενικών εντόμων.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, για την απομόνωση του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles*, πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές που σχεδιάστηκαν με σκοπό την ενίσχυση του τμήματος 1.2kb του ρετρομεταθετού, σε κλάσματα της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Επιπλέον το συγκεκριμένο τμήμα του στοιχείου χρησιμοποιήθηκε και ως ανιχνευτής για τη διαλογή των κλασμάτων που έδωσαν προϊόν ανίχνευσης. Όμως, μετά από ανάλυση διαπιστώθηκε η ύπαρξη μια αλληλουχίας 300bp στο τέλος του τμήματος των 1.2kb, η οποία αποτελεί ένα επαναλαμβανόμενο στοιχείο του γονιδιώματος και οδήγησε στην απομόνωση φάγων που περιλαμβάνουν αυτή την αλληλουχία. Για αυτό τον λόγο, σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές, που ενισχύουν συγκεκριμένη περιοχή του τμήματος 1.2kb του στοιχείου, μεγέθους 0.4kb (*Achill400*), ώστε να μην περιλαμβάνεται πλέον η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR με τους νέους εκκινητές σε κλάσματα της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου. Ακολούθησε η

διαλογή των κλασμάτων που έδωσαν προϊόν ενίσχυσης υβριδοποιώντας τα με ανιχνευτή το τμήμα των 0.4kb. Ένας από τους φάγους που απομονωθήκαν ήταν ο Φ443. Για επιβεβαίωση του σήματος πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern του Φ443 μετά από πέψη με τα ένζυμα EcoRI, HindIII και το συνδυασμό τους, με ανιχνευτή το τμήμα των 0.4kb. Σύμφωνα με την υβριδοποίηση, μόνο το τμήμα των 1.9kb εμφάνισε σήμα. Επομένως θεωρήθηκε σημαντική η χαρτογράφηση του Φ443, καθώς και η κλωνοποίηση των θραυσμάτων του ενθέματος με στόχο την πλήρη αλληλούχηση του.

Για την χαρτογράφηση περιορισμού του Φ443 επιλέχθηκε η μέθοδος της μερικής πέψης. Αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε μερική πέψη του Φ443 με τα ένζυμα EcoRI και HindIII και ακολούθησε η υβριδοποίηση κατά Southern. Το αποτέλεσμα της μερικής πέψης που προκύπτει και σε συνδυασμό με την εφαρμογή της μεθόδου της υβριδοποίησης κατά Southern οδηγεί στην χαρτογράφηση όλων των θέσεων περιορισμού των συγκεκριμένων ενζύμων στο εσωτερικό του ενθέματος (εικόνα 9). Το μέγεθος του ενθέματος είναι 15kb και αποτελείται από τα 5 εξής τμήματα: τμήμα 6.0kb, τμήμα 4.8kb, τμήμα 1.9kb, τμήμα 1.350kb και τμήμα 0.9kb.

Ακολούθησε η κλωνοποίηση του τμήματος 1.9kb. Εξαιτίας του μεγέθους του τμήματος των 1.9kb προχωρήσαμε στην υποκλωνοποίηση των επιμέρους τμημάτων του, 1.0 και 0.9kb, τα οποία προκύπτουν μετά από πέψη του αρχικού τμήματος των 1.9kb με το περιοριστικό ένζυμο HincII.

Ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής των 2 δειγμάτων που προέκυψαν από την υποκλωνοποίηση του τμήματος 1.9kb (1.0kb και 0.9kb) καθώς και των 2 δειγμάτων που αντιστοιχούν στα ήδη κλωνοποιημένα τμήματα των 1.350 και 0.9kb του Φ443, πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen. Η ανάλυση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα blastx έδειξε ότι τα δείγματα εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα με μέρος της πολυπρωτεΐνης gag-pol του ρετρομεταθετού MAX της οικογένειας BEL-Pao (εικόνα 12).

Μια μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να εστιάσει στην κλωνοποίηση του τμήματος των 6.0kb, που σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, αναμένεται να περιλαμβάνει την 5'LTR αλληλουχία του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles*, με στόχο τον εντοπισμό των σημείων ένθεσης του στο γονιδίωμα του δάκου.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, H., Ohbayashi, F., Sugasaki, T., Kanehara, M., Terada, T., Shimada, T., Kawai, S., Mita, K., Kanamori, Y., Yamamoto, M.T., Oshiki, T., (2001), «Two novel *Pao*-like retrotransposons (*Kamikaze* and *Yamato*) from the silkworm species *Bombyx mori* and *B. Mandarina*: common structural features of *Pao*-like elements», *Mol. Genet. Genomics*, **265**: 375-385.
- Belcourt, M.F., και Farabaugh, P.J., (1990), «Ribosomal frameshifting in the yeast: Retrotransposon Ty: tRNAs induce slippage on a 7 nucleotide minimal site», *Cell*, **62**: 339-352.
- Benos, P., Tavernarakis, N., Brogna, S., Thireos, G., Savakis, C., (2000), «Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast», *Mol. Gen. Genet.*, **263**: 90-95.
- Boeke, J.D., και Chapman, K.B., (1991), «Retrotransposition mechanisms», *Current Opinion in Biology*, **3**: 502-507.
- Capy, P., Vitalis, R., Langin, T., Higuert, D., Bazin, C., (1996), «Relationships between transposable elements based upon the integrase-transcriptase domains: Is there a common ancestor?», *Journal of Molecular Evolution*, **42**: 359-368.
- Chalker, D.L. και Sandmeyer, S.B., (1992), «Ty integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation», *Genes & Development*, **6**: 117-128.
- Γιαμβριάς, X., (1998), «*Εντομολογικοί εχθροί ελιάς*», Αθήνα: Εκδόσεις Α. Σταμούλης.
- Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.M., (2002), «*Mobile DNA II*», Washington DC: American Society for Microbiology press.
- Flavell, A.J., (1995), «Retroelements, reverse transcriptase and evolution», *Comparative Biochemistry and Physiology*, **110B** (1): 3-15.
- Frizzi, G. και Springetti, A., (1953), «Prime ricerche citogenetiche sul ‘*Dacus oleae* Gmel’». *Ric. Sci.*, **23**: 1613-1620.
- Gabrieli, P., Gomulski, L.M., Bonomi, A., Siciliano, P., Scolari, F., Franz, G., Jessup, A., Malacrida, A.R., Gasperi, G., (2011), «Interchromosomal Duplications on the *Bactrocera oleae* Y chromosome Imply a Distinct Evolutionary Origin of the Sex Chromosomes Compared to *Drosophila*», *PLoS ONE*, **6** (3): e17747.
- Gomulski, L.M., Torti, C., Murelli, V., Bonizzoni, M., Gasperi, G., Malacrida, A.R., (2004), «Medfly transposable elements: diversity, evolution, genomic impact and possible applications», *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**: 139-148.
- Han, J.S., (2010), «Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions», *Mobile DNA*, **1**: 15.
- Kazazian, H.H.Jr., (2004), «Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution», *Science*, **303**, 1626.
- Krimbas, C.B., (1963), «A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Trypetidae): the salivary gland and mitotic chromosomes», *Caryologia*, **16**: 371-376.

Lagos, D., Ruiz, M.F., Sánchez, L., Komitopoulou, K., (2005), «Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*», *Gene*, **348**: 111-121.

Laha, T., Loukas, A., Verity, C.K., McManus, D.P., Brindley, P.J., (2001), «Gulliver, a long terminal repeat retrotransposon from the genome of the oriental blood fluke *Schistosoma japonicum*», *Gene*, **264**: 59-68.

Marsano, R. M., Marconi, S., Moschetti, R., Barsanti, P., Caggese, C., Caizzi, R., (2004), «MAX, a novel retrotransposon of the BEL-Pao family, is nested within the Bari 1 cluster at the heterochromatic h39 region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*», *Mol. Gen. Genomics*, **270** (6): 477-484.

Mathiopoulos, K. D., Powell J. D., McCutchan T. F., (1995), «An Anchored Restriction-Mapping Approach Applied to the Genetic Analysis of the Anopheles gambiae Malaria Vector Complex 1», *Mol. Biol. Evol.*, **12** (1): 103-112.

Mavragani-Tsipidou, P., Karamanlidou, G., Zacharopoulou, A., Koliais, S., Kastritsis, C.D., (1992), «Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae)», *Genome*, **35**: 373-378.

Mavragani-Tsipidou, P., (2002), «Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae)», *Genetica*, **116**: 45-57.

Morales, J. C., Patton, J. C., Bickham, J. W., (1993), «Partial endonuclease digestion mapping of restriction sites using PCR-amplified DNA», *Genome Res.*, **2**: 228-233.

Morgante, M., (2006), «Plant genome organization and diversity: the year of the junk!», *Current Opinion in Biotechnology*, **17** (2): 168-173.

Neuenschwander, P., Michelakis, S., Kapatou, E., (1986), *Dacus oleae* (Gmel.). In «traité d'Entomologie Oléicole», Y. Arambourg ed., *Conseil Oléicole International*, Madrid, p. 115-159.

Robertson, H.M., (1995), «The Tc1-mariner superfamily of transposons in animals», *Journal of Insect Physiology*, **41**: 99-105.

Robertson, H.M. και Lampe, D.J., (1995), «Distribution of transposable elements in Arthropods», *Annual Review of Entomology*, **40**: 333-357.

Rohr, J. B., Ranson, H., Wang, X., Besansky, N. J., (2002), «Structure and Evolution of mtanga, a Retrotransposon Actively Expressed on the Y Chromosome of the African Malaria Vector *Anopheles gambiae*», *Mol. Biol. Evol.*, **19**(2): 149-162.

Sambrook J. και Russell D. W., (2001), «*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*», Τρίτη Έκδοση, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SanMiguel, P. και Bennetzen, J., (1998), «Evidence that recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons», *Annals of Botany*, **82** (1): 37-44.

SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Behan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z., Bennetzen, J.L., (1996), «Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome», *Science*, **273**: 765-769.

Τζανακάκης, Μ. Ε. και Κατσόγιαννος, Β. Ι., (1998), «Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου», Αθήνα: Εκδόσεις ΑγροΤύπος.

Vitte, C. και Panaud, O., (2005), «LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model», *Cytogenetic and Genome Research*, **110**: 91-107.

Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, W.T.B., Powell, W., (1997), «Genetic distribution of BARE-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP)», *Molecular and General Genetics*, **253**: 687-694.

Wilhelm, M. και Wilhelm, F.X., (2001), «Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons», *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**: 1246-1262.

Yeates, D. K. και Wiegmann, B. M., (2005), «*The Evolutionary Biology of Flies (Part II)*», New York: Columbia University Press.

Zambetaki, A., Kleanthous, K., Mavragani-Tsipidou, P., (1995), «Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae)», *Genome*, **38**: 1070-1081.

Δικτυακοί τόποι:

Πατσιάς, Α., (2005), «Η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς». Ανακτήθηκε: 26 Αυγούστου, 2011, από [http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/0/F1AFCF1451DE71D2C225711000525BD3/\\$file/KatapolemisiDakouElias.pdf](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/0/F1AFCF1451DE71D2C225711000525BD3/$file/KatapolemisiDakouElias.pdf)

Prosodol, (2009), «Παραγωγή ελαιόλαδου στη Μεσόγειο». Ανακτήθηκε: 4 Αυγούστου, 2011, από <http://www.prosodol.gr/?q=el/node/204>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 1. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 0.5x:

Για τελικό όγκο 10ml χρησιμοποιούνται:

- ❖ 54gr Tris-base
- ❖ 27.5gr βορικό οξύ
- ❖ 20ml EDTA 0.5M

Συμπλήρωση τελικού όγκου με απιονισμένο H<sub>2</sub>O και ρύθμιση του pH στο 8.0 με NaOH.

### 2. Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων ηλεκτροφόρησης (loading buffer):

- ❖ 0.25% bromophenol blue
- ❖ 0.25% xylene cyanol FF
- ❖ 15% Ficoll (Type 400; Pharmacia) in H<sub>2</sub>O

### 3. Υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth:

Για την παρασκευή 200ml χρησιμοποιούνται:

- ❖ 3gr LB Broth
- ❖ 1gr NaCl

Συμπλήρωση τελικού όγκου με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος και στην συνέχεια προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού (100μl/100ml LB).

### 4. Υγρό θρεπτικό μέσο SOC:

Για την παρασκευή 1L χρησιμοποιούνται:

- ❖ 20gr Tryptone
- ❖ 5gr yeast extract
- ❖ 0.5gr NaCl 1M
- ❖ 10ml KCl 250mM
- ❖ 950ml ddH<sub>2</sub>O

Ακολουθεί αποστείρωση και στη συνέχεια προσθήκη 5ml MgCl<sub>2</sub> 2M και 20ml γλυκόζης 1M. Τέλος γίνεται η συμπλήρωση του 1L με ddH<sub>2</sub>O.

### 5. LB άγαρ:

Για την παρασκευή 1000ml χρησιμοποιούνται:

- ❖ 10gr Bactotryptone
- ❖ 5gr Bacto-yeast extract
- ❖ 15gr Agar
- ❖ 5gr NaCl

Συμπλήρωση τελικού όγκου με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος και στην συνέχεια προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού (100μl/100ml LB).

6. Διάλυμα GET:

- ❖ 50mM γλυκόζη
- ❖ 25mM Tris-HCl (pH 8.0)
- ❖ 10mM EDTA (pH 8.0)

7. Διάλυμα alkali

Για τελικό όγκο 10ml χρησιμοποιούνται:

- ❖ 1ml NaOH 0.2N
- ❖ 1ml SDS 1%
- ❖ 7ml H<sub>2</sub>O

Συμπλήρωση τελικού όγκου με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται έως και 15 ημέρες.

8. Διάλυμα οξικού καλίου:

- ❖ 60ml CH<sub>3</sub>COOK 5M
- ❖ 11.5ml CH<sub>3</sub>COOH
- ❖ 28.5ml ddH<sub>2</sub>O

9. Διαλύμα TE-Rnase (20μg/ml):

- ❖ 10mM Tris-HCl (pH 7.5)
- ❖ 1mM EDTA (pH 8.0)
- ❖ 20μg Rnase

10. Διάλυμα αποδιάταξης:

- ❖ 1.5M NaCl
- ❖ 0.5M NaOH

11. Διάλυμα εξουδετέρωσης:

- ❖ 0.5M Tris (pH 7.5)
- ❖ 1.5M NaCl

12. Διάλυμα υβριδοποίησης

- ❖ 6X SSC
- ❖ 0.5% SDS
- ❖ 5X Denhardt's

13. Διάλυμα πλύσης 1 (Wash 1):

- ❖ 2X SSC
- ❖ 0.1% SDS

14. Διάλυμα πλύσης 2 (Wash 2):

- ❖ 0.2x SSC
- ❖ 0.1% SDS

15. Διαλύμα A:

- ❖ 100mM Tris-HCl (pH 7.5)
- ❖ 150mM NaCl

16. Διάλυμα B:

- ❖ Στο διάλυμα A προστίθενται 1% Blocking Solution

Για την παρασκευή Blocking Solution διαλύονται 10gr αποβουτυρομένου γάλακτος σε σκόνη σε 100ml διαλύματος A.

17. Διάλυμα αντισώματος:

- ❖ Στο διάλυμα B προστίθενται 25μl αντισώματος ανά 50ml διαλύματος B

Το διάλυμα αντισώματος διατηρείται στους 4°C το πολύ για ένα μήνα.

18. Διάλυμα C:

- ❖ 100mM Tris-HCl (pH 9.5)
- ❖ 100mM NaCl
- ❖ 50mM MgCl<sub>2</sub>

19. Διαλυμα NBT:

- ❖ 0.5gr σε 10ml 70% dimethylformanid

20. Διαλύμα BCIP:

- ❖ 0.5gr σε 10ml 100% dimethylformanid