



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Τρανσκριπτομική ανάλυση στον δάκο της ελιάς



ΜΑΝΟΥΣΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΑΥΓΟΥΣΤΙΝΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ

Διδάσκων ΠΔ 407/80 του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να κάνω τα πρώτα μου βήματα στον τομέα στις έρευνας στο εργαστήριο του, όπως επίσης για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου πρόσφερε με προθυμία, σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Σαγρή Ευθυμία για την άψογη συνεργασία και τις συμβουλές της, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Γρηγορίου Μαριλένα, η βοήθεια της οποίας ήταν επίσης πολύτιμη.

Επιπλέον ευχαριστώ όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές που αποτέλεσαν μέλη του εργαστηρίου παράλληλα με εμένα, για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτρια και φίλη μου κ. Αλεξανδρή Χρυσάνθη για τη συμπαράσταση της και για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την συμπαράσταση και τη στήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1. Ο Δάκος της ελιάς.....	5
1.1 Γενικές πληροφορίες	5
1.2 Μορφολογία	5
1.3 Βιολογικός κύκλος	6
1.4 Ζημιά στην ελιά	7
1.5 Spinosad	8
1.5.1 Δομή-Μηχανισμός δράσης	8
1.5.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας	9
2. Τρανσκριπτομική.....	10
2.1 Μέθοδοι τρανσκριπτομικής ανάλυσης	11
2.1.1 Μικροσυστοιχίες	11
2.1.1.α Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων.....	11
2.1.1.β Στικτές μικροσυστοιχίες.....	12
2.1.2 ESTs (Expressed Sequence Tags)	13
2.1.3 MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing).....	14
2.1.4 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression).....	16
2.1.4α PCR-SAGE	18
2.1.4β SAGELite	19
2.1.4γ SAR-SAGE (Small Amplified RNA-SAGE)	20
2.1.4δ SADE (a SAGE Adaptation for Downsized Extracts).....	21
2.1.4ε microSAGE	22
2.1.4ζ superSAGE.....	23
2.1.4η longSAGE	24
2.1.5 RNA-Sequencing (RNA-Seq)	26
2.1.5α RNA-Seq βασισμένη στην τεχνολογία Applied Biosystems SOLiD.....	27
ΣΚΟΠΟΣ.....	37
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
1. Προέλευση των πληθυσμών <i>Bactrocera oleae</i>	38
2. SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)	38
2.1 Απομόνωση RNA (TRIZOL)	38
2.2 Σύνδεση του mRNA σε μαγνητικά σφαιρίδια.....	40
2.3 Σύνθεση cDNA.....	42
2.4. Πέψη των cDNA μορίων με το ένζυμο NlaIII	44
2.5 Σύνδεση των LS Adaptors	45
2.6 Πέψη με το Tagging Enzyme	47
2.7 Δημιουργία ditags	48
2.8 PCR ενίσχυση των ditags και εκτίμηση του προϊόντος	49
2.9 Scale-up PCR.....	51
2.10 Καθαρισμός των ditags (~130bp)	53
2.11 Πέψη των ditags με το ένζυμο NlaIII	56
2.12 Καθαρισμός των ditags (~34bp).....	57

2.13 Σχηματισμός αλυσσομερών.....	58
2.14 Κλωνοποίηση των αλυσσομερών σε φορέα	59
2.15 Μετασχηματισμός του βακτηρίου E. Coli.....	60
2.16 Mini Preps	64
3. RNA-Sequencing (RNA-Seq)	67
3.1 Απομόνωση RNA (TRIZOL)	67
3.2 Κατασκευή RNA βιβλιοθηκών, αλληλούχιση και βιοπληροφορική ανάλυση	69
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	84

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.0 Δάκος της ελιάς

1.1 Γενικές πληροφορίες

Το έντομο *Bactrocera oleae*, το οποίο είναι ευρέως γνωστό ως δάκος της ελιάς, είναι το πιο σημαντικό παράσιτο της ελιάς, *Olea europaea*. Ανήκει στην τάξη των δίπτερων και στην οικογένεια των Terphitidae [White et al, 1992]. Πληθυσμοί του εντοπίζονται κυρίως στις Μεσογειακές χώρες, όπου και ευδοκμεί το 90% των ελαιόδεντρων. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί εξάπλωση πληθυσμών σε νέες περιοχές όπου καλλιεργείται το δέντρο *O.europaea*. Σε αυτές περιλαμβάνονται περιοχές της Νότιας και Δυτικής Αφρικής, της Μέσης Αναστολής και τέλος της Βόρειας Αμερικής, με σημαντικότερη την Καλιφόρνια [FAOSTAT Agricultural Data, 2006].

Οι προνύμφες του εντόμου τρέφονται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς. Τα ενήλικα έντομα μπορούν να τραφούν από τον καρπό της ελιάς, από μέλι μελιτώματος και από άλλες πηγές ρευστής ή ημίρρευστης τροφής. Η ζημιά που προκαλεί στις ελιές έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ποσότητας της σοδειάς και της ποιότητας του ελαιολάδου [Weems et al, 1999].

Δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο δάκος της ελιάς προκαλεί σε παγκόσμια κλίμακα, απώλειες στις σοδειές σε ποσοστό 5-30%, γεγονός που μεταφράζεται σε οικονομικές ζημιές της τάξης των 800 εκατομμυρίων δολαρίων ετησίως [Montiel-Bueno, Jones O, 2002] [Mazomenos, 1989].

1.2 Μορφολογία

Το ενήλικο έντομο έχει μήκος περίπου 4-5mm και έκταση φτερών περίπου 10mm. Τα φτερά είναι διάφανα και διαθέτουν μία χαρακτηριστική καφέ κηλίδα στο άκρο τους. Η κεφαλή τους είναι ξανθοκίτρινη. Το έντομο έχει μικρές αντέννες και μεγάλα ερυθρωπά μάτια με πράσινες μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας του εντόμου είναι σκούρος καφέ με δύο έως τέσσερις, γκρι ή μαύρες διαμήκεις ρίγες, ενώ η κοιλιά του είναι καφέ με πιο σκούρες περιοχές πλευρικά. Τα θηλυκά μπορούν να διακριθούν από τα αρσενικά καθώς διαθέτουν μία προεξοχή στην άκρη της κοιλιάς τους, τον ωσθέτη. Το περίβλημα του ωσθέτη είναι μαύρο, ενώ ο ίδιος ερυθρωπός [Weems et al, 1999], [Vossen et al, 2004](εικόνα1.1).



Εικόνα 1.1 Αριστερά: θηλυκό ενήλικο *Bactrocera oleae*
Δεξιά: αρσενικό ενήλικο *Bactrocera oleae*

Το αυγό του εντόμου είναι λευκό με ελλειψοειδές σχήμα και διάμετρο 0,7mm (εικόνα1.2). Η προνύμφη είναι άποδη κάμπια, με χρώμα ανοιχτό κίτρινο και διάμετρο 7-8mm (εικόνα 1.3). Το βομβύκιο έχει ωοειδές σχήμα και ανοιχτό καφέ χρώμα (εικόνα 1.4)[Tzanakakis, 2005].



Εικόνα 1.2 Αυγό εντόμου



Εικόνα 1.3 Προνύμφη εντόμου



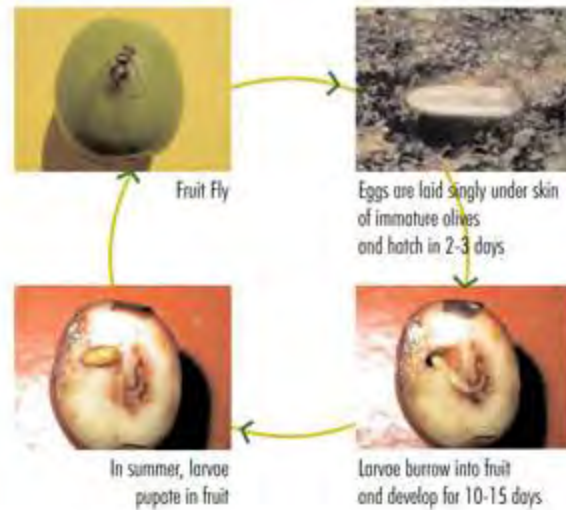
Εικόνα 1.4 Βομβύκιο εντόμου

1.3 Βιολογικός κύκλος

Ο κύκλος ζωής του δάκου συνδέεται με τα στάδια ανάπτυξης του δέντρου της ελιάς και με τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στον εκάστοτε τόπο. Μία γενιά, που περιλαμβάνει τα στάδια του αυγού (egg), της προνύμφης (larva), του βομβυκίου (pupa) και του ενήλικου εντόμου (adult), μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 30 ημέρες σε κατάλληλες καιρικές συνθήκες (εικόνα1.5).

Πριν την ωρίμανση των καρπών, τα θηλυκά εισέρχονται σε ένα στάδιο αναπαραγωγικής διάπαυσης, κατά τη διάρκεια του οποίου παράγονται λίγα έως καθόλου αυγά. Στο χρονικό αυτό διάστημα τα θηλυκά έντομα ωριμάζουν και έχουν τη δυνατότητα να εξαπλωθούν σε διάφορες περιοχές. Όταν εμφανιστούν ώριμοι ελαιόκαρποι (δεκτικοί καρποί), τα θηλυκά ελκύονται από τον καρπό και αρχίζουν να παράγουν σε αφθονία αυγά και να τα εναποθέτουν στον καρπό [Pommois et al, 2006]. Ένα θηλυκό γεννά 200-250 αυγά συνολικά στη ζωή του.

Τα αυγά εκκολάπτονται μέσα σε 2-3 ημέρες, η προνύμφη αναπτύσσεται σε χρονικό διάστημα 20 περίπου ημερών, ενώ το βομβύκιο σε διάστημα 8-10 ημερών. Το ενήλικο έντομο ζει 2-6 μήνες ανάλογα με τη θερμοκρασία και την διαθεσιμότητα τροφής. Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης του δάκου της ελιάς κυμαίνονται από 20°C έως 30°C, ενώ θερμοκρασίες άνω των 38°C δεν επιτρέπουν την επιβίωση του.



Εικόνα 1.5 Κύκλος ζωής του εντόμου

Κατά τη διάρκεια ενός χρόνου αναπτύσσονται 3-5 γενιές ανάλογα με τις εκάστοτε καιρικές συνθήκες. Ο δάκος της ελιάς διαχειμάζει είτε ως ενήλικο άτομο είτε ως βομβύκιο, στο έδαφος ή μέσα σε πεσμένους καρπούς. Ο πληθυσμός που θα επιβιώσει κατά τη διάρκεια του χειμώνα, μειώνεται σημαντικά σε αριθμό κατά τους μήνες Φεβρουάριο και Μάρτιο, ενώ νέα ενήλικα άτομα προκύπτουν από τα βομβύκια κατά τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο. Τα ενήλικα θηλυκά γεννούν τα αυγά τους στους περσινούς καρπούς που παρέμειναν πάνω στο δέντρο. Οι προνύμφες που προκύπτουν τρέφονται από τον καρπό και σχηματίζουν κουκούλι σε μία κοιλότητα κάτω από την επιδερμίδα του. Η πρώτη γενιά ενηλίκων εμφανίζεται την άνοιξη, ενώ η δεύτερη κατά τη μέση του καλοκαιριού ή προς το τέλος του. Επιπλέον γενιές εμφανίζονται τους φθινοπωρινούς μήνες και τον Δεκέμβριο ανάλογα με τη διαθεσιμότητα καρπών [Vossen et al, 2004].

Όπως αναφέρθηκε ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες κάθε περιοχής και τη διαθεσιμότητα των ελαιοκάρπων, η διάρκεια του κύκλου ζωής του εντόμου και η συχνότητα των αναπαραγωγής ποικίλλει. Παραδείγματος χάριν, στις μεσογειακές χώρες αναπτύσσονται 2-5 γενιές ετησίως, ενώ σε περιοχές της Καλιφόρνια με πιο ήπιο κλίμα τα ενήλικα άτομα μπορούν να παραμείνουν ενεργά καθόλη τη διάρκεια του χρόνου [Weems et al, 1999].

1.4 Ζημιά στην ελιά

Η προσβολή του ελαιοκάρπου από τον δάκο της ελιάς προκαλεί απώλειες στις σοδειές μέσω της πρόωρης πτώσης των καρπών, της άμεσης καταστροφής του καρπού ή της μείωσης της ποιότητας του ελαιόλαδου [Pereira et al, 2004].

Το ενήλικο θηλυκό γεννά τα αυγά του και τα εναποθέτει στον καρπό, όπου και εκκολάπτονται σε μικροσκοπικές προνύμφες, οι οποίες δεν είναι ορατές εως ότου τραφούν αρκετά από τον καρπό και αυξηθούν σε μέγεθος. Καθόσον τρέφονται από τον καρπό ανοίγουν μεγάλες τρύπες σε αυτόν, καταστρέφοντάς τον και επιτρέποντας την

πρόκληση δευτερογενούς μόλυνσης μέσω της εισόδου μυκήτων και βακτηρίων, που προκαλούν σήψη του καρπού και σημαντική αύξηση του ποσοστού περιεκτικότητας λιπαρών οξέων του ελαίου. Τα παραπάνω μπορούν να οδηγήσουν σε πρόωρη πτώση του καρπού [Vessel et al, 2004] και χαρακτηρισμό του ελαιολάδου από υψηλότερα επίπεδα οξύτητας και υπεροξειδίου, όπως επίσης και από μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες [Pereira et al, 2004].

Όπως αναφέρθηκε η προσβολή από τον δάκο της ελιάς μπορεί να προκαλέσει την πρόκληση δευτερογενούς μόλυνσης του ελαιοκάρπου. Την περίοδο που ο καρπός είναι πράσινος, η προνύμφη χρειάζεται την παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων του πεπτικού συστήματος, έτσι ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιήσει τις πρωτεΐνες του ελαίου του μεσοκαρπού. Αυτά τα βακτήρια εδράζονται σε ένα εκκόπλωμα του οισοφάγου του ενηλίκου θηλυκού και στην εσωτερική επιφάνεια του καλύμματος του ωοθήτη. Κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης των αυγών, τα βακτήρια αυτά είναι διασκορπισμένα στην επιφάνεια τους και εισέρχονται στο έντερο της προνύμφης κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης της.

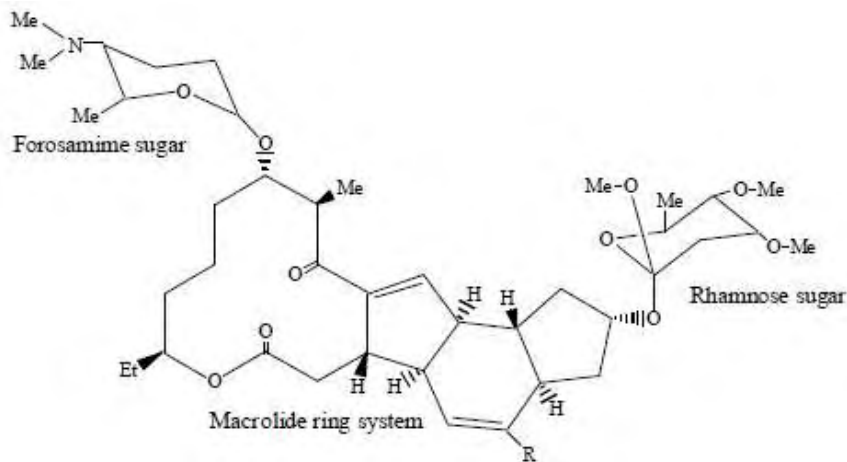
Επιπλέον, στο τελικό άνοιγμα του ωοθήτη και σε ένα μικρό χώρο που υπάρχει κάτω από αυτό, δημιουργούνται περιοχές μόλυνσης από τον μύκητα *Camarosporium dalmaticum*, που είναι επίσης γνωστός ως *Sphaeropsis* ή *Macrophoma dalmatica*. Ο μύκητας αυτός εξαπλώνεται στη μαλακή ουσία του καρπού προκαλώντας χαρακτηριστικά σημάδια, ενώ παράλληλα μειώνει την ποιότητα του ελαιολάδου και καθιστά του ελαιοκάρπους ακατάλληλους προς πώληση. Σύμφωνα με ισχυρισμούς επιστημόνων, ο φορέας του μύκητα αυτού είναι η σκνίπα *Prolasioptera berlesiana* *Raoli*, η οποία αφήνει ένα δικό της αυγό μέσα στον ωοθήτη του δάκου της ελιάς [Tzanakakis 2005].

Εμφανής είναι η ανάγκη για εξάλειψη του δάκου της ελιάς, έτσι ώστε να προστατευθούν οι καλλιέργειες. Για τον σκοπό αυτό έχουν εφαρμοστεί πολλές μέθοδοι στις οποίες περιλαμβάνονται οι κατασκευές παγίδευσης εντόμων [Mazomenos 2002] [Econoμopoulos 1979], βιολογικές προσεγγίσεις (πρόωρη συγκομιδή) [Tsolakis et al 2011], η Τεχνική Στείρου Εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) [Van der Voedt, Klassen 1991] και η χρήση χημικών εντομοκτόνων. Ευρέως χρησιμοποιούμενες κατηγορίες χημικών εντομοκτόνων, αποτελούν τα οργανοφωσφορικά [Reigart, 1999] και τα πυρεθροειδή [Matsuda, 2012]. Επιπλέον, το spinosad αποτελεί μια ακόμη χημική ουσία που χρησιμοποιείται εκτενώς για την εξάλειψη του δάκου της ελιάς.

1.5 Spinosad

1.5.1 Δομή-Μηχανισμός δράσης

Το spinosad αποτελεί ένα αποτελεσματικό εντομοκτόνο βιολογικής προέλευσης, που χρησιμοποιείται ευρέως για την εξάλειψη του δάκου της ελιάς. Προέρχεται από το ακτινοβακτήριο *Saccharopolyspora spinosa*, έναν βακτηριακό οργανισμό που έχει απομονωθεί από το έδαφος. Αποτελείται από δύο συστατικά, τα spinosyn A και spinosyn D (tetracyclic macrolides) [Kollman] (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Δομή Spinosad

Το spinosad είναι ένα δηλητήριο του στομάχου που είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα έντομα των τάξεων των λεπιδόπτερων και των δίπτερων. Αποτελεί νευροτοξίνη, η οποία διαθέτει έναν νέο μηχανισμό δράσης που έχει ως κύριο στόχο τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR) και κατά δεύτερο λόγο τους υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Μετά από έκθεση στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο το έντομο σταματά να διατρέφεται και 24 ώρες αργότερα παραλύει και πεθαίνει [Cisneros et al, 2002].

1.5.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης του εντομοκτόνου spinosad είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα έντομα μετά από παρατεταμένη χρήση του. Η ανθεκτικότητα αυτή σχετίζεται με μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν σημεία σύνδεσης του εντομοκτόνου σε μεμβρανικούς υποδοχείς. Συγκεκριμένα μελέτες σε διάφορα έντομα υποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γενετικούς τόπους που σχετίζονται με τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR).

Ο nAChR των εντόμων αποτελείται 5 υπομονάδες που έχουν όμοια δομή. Έχουν από ένα μεγάλο εξωκυτταρικό, αμινοτελικό άκρο, που περιέχει τη θέση σύνδεσης του νευροδιαβιβαστή, 4 διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-4) και ένα ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο. Ο nAChR των εντόμων αποτελείται από συνδυασμούς α και β υπομονάδων [Scott et al, 2008]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της $\alpha 6$ υπομονάδας σε έντομα όπως *Plutella xylostela* και *Drosophila melanogaster*, θεωρούνται υπεύθυνες για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο, προτείνοντας τον συγκεκριμένο γενετικό τόπο ως υποψήφιο για μελέτη και σε άλλους οργανισμούς.

Επιπλέον, η πρόκληση μεταλλάξεων σε αυτόν τον γενετικό τόπο προτείνει πιθανές θέσεις σύνδεσης του εντομοκτόνου στην συγκεκριμένη υπομονάδα. Συγκεκριμένα, σε αυτές περιλαμβάνονται αμινοξικά κατάλοιπα της ενδοκυτταρικής θηλιάς που βρίσκεται ανάμεσα στις διαμεμβρανικές περιοχές TM3 και TM4, το εξωκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο της υπομονάδας και η TM3 περιοχή [Baxter 2010][Perry 2007].

Αντίστοιχες μελέτες δεν έχουν αποδείξει ακόμη συσχέτιση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας με τους υποδοχείς GABA ή με ένζυμα μεταβολισμού του εντομοκτόνου, όπως οι μονο-οξυγενάσες, οι υδρολάσες και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης [Scott et al 2008][Jing Shi et al, 2010].

Τέλος από την υπάρχουσα βιβλιογραφία προκύπτει ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας κληρονομείται, πιθανώς με επικρατή ή ατελώς επικρατή τρόπο κληρονόμησης, σε οργανισμούς όπως *Plutella xylostella*, *Musca domestica*, *Bactrocera dorsalis*, *Spodoptera exigua* [Scott et al, 2008].

Όπως γίνεται εμφανές από τα παραπάνω, ο μοριακός μηχανισμός της ανάπτυξης της ανθεκτικότητας για το εντομοκτόνο spinosad, διαφέρει σε κάθε οργανισμό και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, ακόμη, σε κανέναν οργανισμό μοντέλο. Όσον αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον δάκο της ελιάς, οι μελέτες κατευθύνονται με βάση τα ευρήματα στους οργανισμούς που προαναφέρθηκαν, καθώς το γονιδίωμά του δεν έχει αλληλουχηθεί. Συνεπώς, προκύπτει η ανάγκη για ταυτόχρονη μελέτη πολλών γενετικών τόπων και συγκεκριμένα, η μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης σε οργανισμούς που έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να αποδείξουν την εμπλοκή διάφορων γενετικών τόπων στο μηχανισμό ανάπτυξης της ανθεκτικότητας. Η μελέτη της μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης, πραγματοποιείται μέσω της τρανσκριπτομικής ανάλυσης, η οποία μπορεί να βασίζεται στην γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος, ή και όχι.

2. Τρανσκριπτομική

Η τρανσκριπτομική ανάλυση αποτελεί τη μελέτη του μεταγραφώματος, δηλαδή όλων των μορίων RNA που παράγονται από το γονιδίωμα σε κάθε στιγμή, σε επίπεδο κυττάρου, ιστού ή οργανισμού. Η κυτταρική λειτουργία μεσολαβείται μέσω της έκφρασης των γονιδίων η οποία περιλαμβάνει τη σύνθεση του αγγελιαφόρου RNA (mRNA). Σχεδόν όλες οι λειτουργίες του κυττάρου, όπως η κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, ο κυτταρικός θάνατος και η απόκριση σε ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες σχετίζονται με αλλαγές στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Επιπλέον η αλληλουχία του RNA τροποποιείται και μέσω διεργασιών, όπως το εναλλακτικό μάτισμα και το RNA editing. Συνεπώς μέσω της τρανσκριπτομικής ανάλυσης παρέχονται πληροφορίες για τη μεταγραφή του RNA αλλά και για τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που υφίσταται, οι οποίες είναι χρήσιμες για την μελέτη της βιολογικής λειτουργίας σε επίπεδο κυττάρου, ιστού αλλά και οργανισμού [Tsarakis et al, 2004].

Τα επίπεδα του mRNA σε ένα δείγμα μπορούν να καθοριστούν με τη χρήση μεθόδων όπως η προστασία από νουκλεάση (nuclease protection), το στύπωμα κατά

Northern και η ποσοτική PCR. Οι συγκεκριμένες τεχνικές όμως επιτρέπουν τη μελέτη ενός ή λίγων μόνο γονιδίων ανά πείραμα. Για τη μελέτη ολόκληρου του τρανσκριπτόματος αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση χιλιάδων γονιδίων και τεχνικές που δεν προαπαιτούν γνώση της αλληλουχίας του οργανισμού. Σε αυτές τις τεχνικές συγκαταλέγονται οι μικροσυστοιχίες, οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs), η MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing), η σειριακή ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) και η RNA-Sec.

2.1 Μέθοδοι τρανσκριπτομικής ανάλυσης

2.1.1. Μικροσυστοιχίες

Η ανάπτυξη της μεθόδου ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Οι μικροσυστοιχίες βασίζονται στην υβριδοποίηση δεκάδων ή ακόμη εκατοντάδων χιλιάδων τμημάτων νουκλεϊκών οξέων σε ένα μόνο πείραμα, με τη χρήση αυτοματοποιημένων μεθόδων. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό των επιπέδων των μεταγράφων σε ένα δείγμα και συνεπώς για την ανάλυση της έκφρασης ολόκληρου του γονιδιώματος [Fodor et al, 1991]. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών, είναι σχετικά γρήγορη και δεν απαιτεί μεγάλο κόστος. Χαρακτηρίζεται όμως και από συγκεκριμένα μειονεκτήματα, όπως η ανικανότητα ανίχνευσης νέων γονιδίων. Επιπλέον περιλαμβάνει τη διαδικασία της υβριδοποίησης η οποία μπορεί να ευθύνεται για ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [Grskovic, Ramalho-Santos, 2008].

Υπάρχουν δύο βασικές προσεγγίσεις κατασκευής και χρήσης των μικροσυστοιχιών. Η πρώτη είναι οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων και η δεύτερη είναι οι στικτές μικροσυστοιχίες.

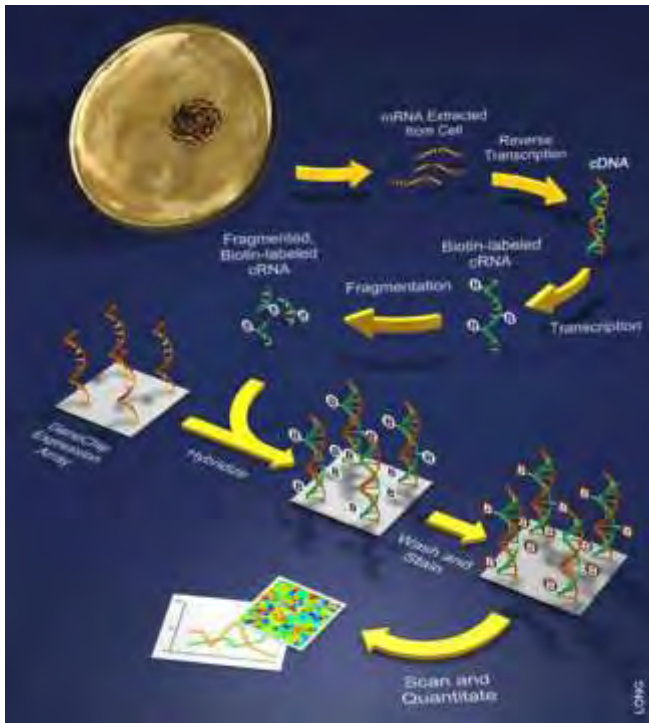
2.1.1.α Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 αναπτύχθηκε η διαδικασία της φωτολιθογραφίας, με την οποία κατασκευάζονται τσιπ μικροεπεξεργαστών, με βάση τα οποία κατασκευάζονται οι μικροσυστοιχίες συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Διάφορες εταιρίες έχουν αναλάβει την κατασκευή τους με πρώτη την Affymetrix. Οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων περιλαμβάνουν την σύνθεση και ταυτόχρονη καθήλωση διάφορων ολιγονουκλεοτιδίων, πάνω σε γυάλινο πλακίδιο, το ένα δίπλα στο άλλο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και όταν το γονιδίωμα είναι άγνωστο.

Αρχή της μεθόδου

Τα υπό εξέταση mRNA “τεμαχίζονται” και τα τμήματα που προκύπτουν σημαίνονται με μία φθορίζουσα χρωστική. Σε ορισμένες πειραματικές διαδικασίες πριν από αυτό το

βήμα το mRNA μετατρέπεται σε cDNA. Η μικροσυστοιχία εμβαπτίζεται στο μείγμα των σημασμένων τμημάτων και καθένα από αυτά υβριδοποιείται με το συμπληρωματικό του στο αντίστοιχο σημείο της μικροσυστοιχίας. Σε κάθε σημείο βρίσκονται καθηλωμένα εκατομμύρια αντίγραφα ενός συγκεκριμένου ολιγονουκλεοτιδίου. Ακολουθεί ξέπλυμα του τσιπ έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα μη υβριδοποιημένα τμήματα και η μικροσυστοιχία τοποθετείται σε ειδική συσκευή ανίχνευσης, η οποία σαρώνει το τσιπ και μετρά την ένταση του φθορισμού. Η διαφορετική ένταση σε κάθε ομάδα διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, αντιπροσωπεύει την ποσότητα του αντίστοιχου mRNA στο βιολογικό δείγμα που εξετάζεται [Fodor et al, 1991] (εικόνα 2.1).



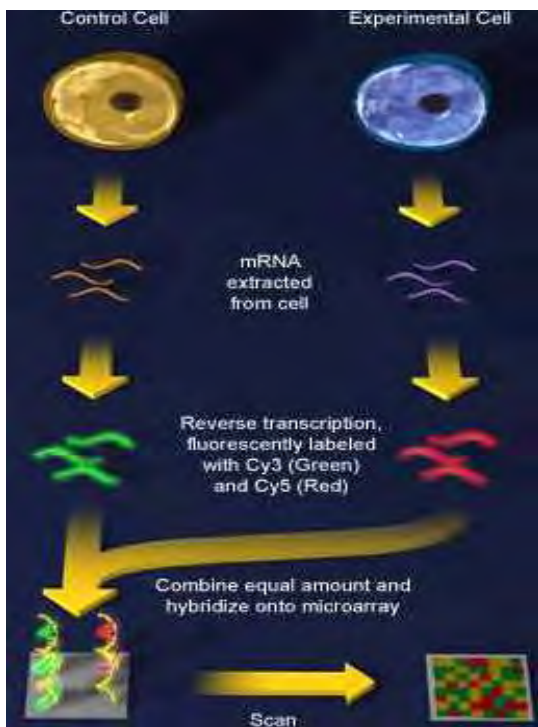
Εικόνα 2.1 Βασική διαδικασία χρήσης μίας μικροσυστοιχίας της Affymetrix

2.1.1.β Στικτές μικροσυστοιχίες

Οι στικτές μικροσυστοιχίες βασίζονται στην πρόσδεση σε γυάλινο πλακίδιο ολιγονουκλεοτιδίων, cDNA, ή προϊόντων PCR. Η τεχνική αυτή απαιτεί πρότερη γνώση του γονιδιώματος καθώς τα ακινητοποιημένα τμήματα αποτελούν μέρη γνωστών γονιδίων. Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε για την ταυτοποίηση διαφορών στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα σε διάφορα δείγματα, ενώ σήμερα βρίσκει εφαρμογή τόσο στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, όσο και στη μελέτη του γονιδιωματικού DNA [Auburn, 2005].

Αρχή της μεθόδου

Στις στικτές μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται ως δείγματα δύο διαφορετικοί πληθυσμοί mRNA. Συνήθως ο ένας αποτελεί το δείγμα αναφοράς και μία ποσότητα του χρησιμοποιείται σε κάθε πείραμα έτσι ώστε να γίνει σύγκριση με το υπό εξέταση δείγμα, του οποίου την έκφραση θέλουμε να μελετήσουμε. Τα mRNA μετατρέπονται σε cDNA και σημαίνονται με μία διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Τα σημασμένα δείγματα αναμειγνύονται και υβριδοποιούνται στη μικροσυστοιχία. Μία συσκευή ανίχνευσης φθορισμού προσδιορίζει την αναλογία των σημάτων υβριδοποίησης των δύο φθορίζουσών ουσιών που υπάρχουν, σε κάθε σημείο της μικροσυστοιχίας. Η διαφορετική ένταση φθορισμού της κάθε χρωστικής, σε κάθε σημείο της μικροσυστοιχίας, αντιπροσωπεύει τη διαφορετική έκφραση του γονιδίου στο δείγμα αναφοράς και στο υπό εξέταση δείγμα [Shalon et al, 1996] (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Βασική διαδικασία χρήσης στικτής μικροσυστοιχίας

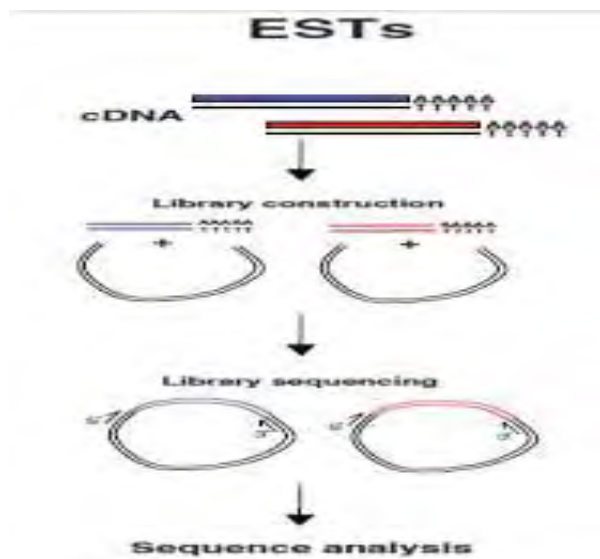
2.1.2 ESTs (Expressed Sequence Tags)

Οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (ESTs, Expressed Sequence Tags) είναι αλληλουχίες τμημάτων cDNA (200-800bp), κάθε μία από τις οποίες προέρχεται από μία ανάγνωση αλληλουχίας, τυχαία επιλεγμένων cDNA κλώνων. Μέχρι σήμερα έχουν αποκτηθεί περισσότερες από 45 εκατομμύρια ESTs, προερχόμενες από περισσότερα από 1400 διαφορετικά είδη ευκαρυωτών και η χρήση τους ξεκίνησε το 1980. Αποτελούν εργαλεία για την ταυτοποίηση γονιδίων και την επαλήθευση των προβλέψεων για τον ρόλο κάθε γονιδίου. Οι γνωστές ESTs δημοσιεύονται σε δημόσιες βάσεις δεδομένων (dbEST), έτσι ώστε να καθίστανται διαθέσιμες για την επιστημονική

κοινότητα. Στα θετικά της μεθόδου συγκαταλέγεται η ικανότητα ανίχνευσης νέων γονιδίων και εξονίων και η μεγάλη ευαισθησία της. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί, ο περιορισμός της χρήσης της για την ανίχνευση γονιδίων που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα [Parkinson, Blaxter 2009] [Grskovic, Ramalho-Santos, 2008].

Αρχή της μεθόδου

Η διαδικασία δημιουργίας των ESTs ξεκινά με την απομόνωση mRNA από ολόκληρο τον οργανισμό ή από συγκεκριμένους ιστούς. Το mRNA απομονώνεται με βάση την πολυ(A) ουρά και μετατρέπεται σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Έπειτα, cDNA βιβλιοθήκες δημιουργούνται μέσω της χρήσης κατάλληλων φορέων κλωνοποίησης. Μεμονωμένοι (συνήθως τυχαίοι) κλώνοι απομονώνονται από τις βιβλιοθήκες και υφίστανται μία αντίδραση αλληλούχισης είτε από το ένα άκρο είτε και από τα δύο, με τη χρήση καθολικών εκκινητών (universal primers). Στη συνέχεια, η βιοπληροφορική ανάλυση επεξεργάζεται τις αλληλουχίες και απορρίπτει τις μη αξιόπιστες και αυτές που ανήκουν στον φορέα. Το μέγεθος των αναγνώσεων ποικίλει ανάλογα με την τεχνολογία αλληλούχισης που χρησιμοποιείται [Parkinson, Blaxter 2009] (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Διαδικασία δημιουργίας ESTs

2.1.3 MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing)

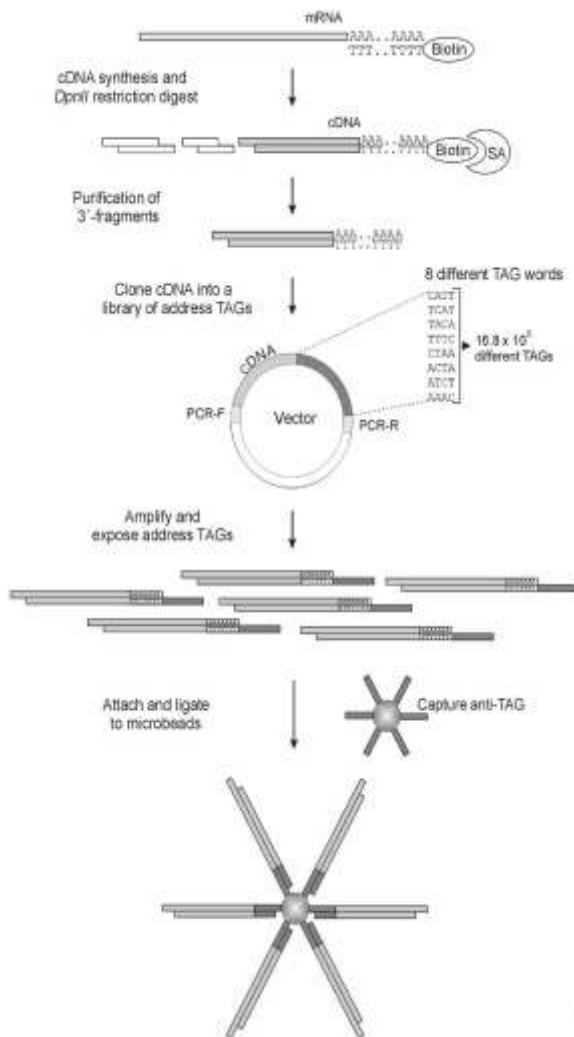
Η MPSS είναι μία μέθοδος ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης όλων των γονιδίων ενός δείγματος μέσω της καταμέτρησης των επιμέρους μορίων mRNA που παράγονται από κάθε γονίδιο. Όλα τα γονίδια αναλύονται ταυτοχρόνως και μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης εξάγεται ο αριθμός των μορίων mRNA που αντιστοιχούν σε ένα γονίδιο σε σχέση με τον συνολικό αριθμό μορίων του δείγματος. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να ανιχνεύσει νέα γονίδια και εξόνια, να παρέχει μεγάλες και μοναδικές ετικέτες και να ταυτοποιεί γονίδια που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα. Δεν προαπαιτεί τη γνώση της

αλληλουχίας του οργανισμού και έχει ευαισθησία της τάξεως λίγων μορίων mRNA ανά κύτταρο, ενώ μία τυπική ανάλυση περιλαμβάνει ένα εκατομμύριο μετάγραφα. Επιπλέον τα δεδομένα εξάγονται σε ψηφιακή μορφή, γεγονός που απλοποιεί τη διαχείριση και ανάλυση τους. Το υψηλό όμως κόστος και ο μεγάλος χρόνος που απαιτεί η συγκεκριμένη μέθοδος, αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα για την επιλογή της [Brenner et al, 2000] [Reinartz, 2001] [Grskovic, Ramalho-Santos, 2008].

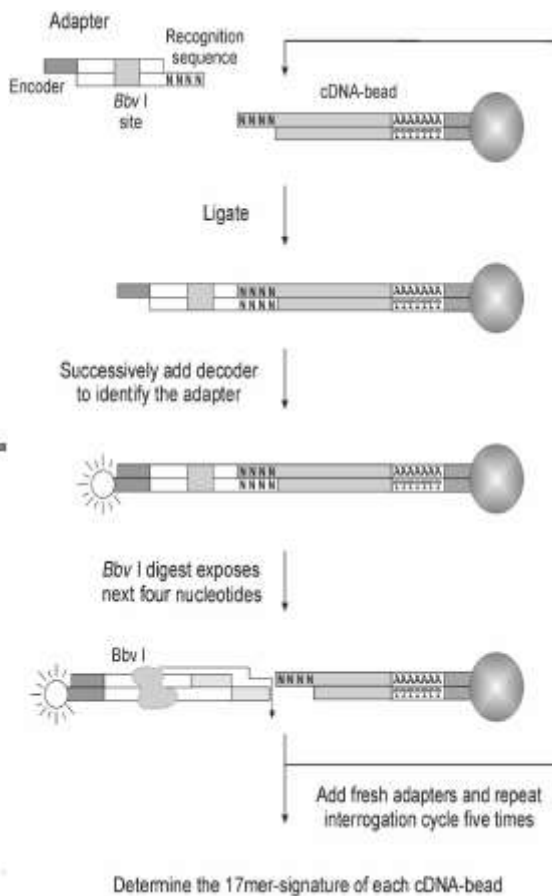
Αρχή της μεθόδου

Μόρια mRNA που διαθέτουν πολυ(A) ουρά μετατρέπονται σε δίκλινα cDNA μόρια, τα οποία υφίστανται πέψη με τον ένζυμο περιορισμού DpnII και κλωνοποιούνται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ο οποίος περιέχει μία ετικέτα 32bp. Κάθε κλώνος διαθέτει διαφορετική ετικέτα. Ακολουθεί ενίσχυση με PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), από όπου και προκύπτουν γραμμικά μόρια, τα οποία επεξεργάζονται με κατάλληλη εξωνουκλεάση η οποία μετατρέπει τις δίκλωνες ετικέτες σε μονόκλωνες. Στη συνέχεια, οι ετικέτες στο άκρο κάθε μορίου cDNA υβριδίζονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες, ομοιοπολικά συνδεδεμένες με μικροσφαιρίδια διαμέτρου 5μm. Όταν τα μόρια υβριδίζονται οι εγκοπές κλείνουν ενζυματικά. Το τελικό προϊόν είναι ένα μικροσφαιρίδιο με 100.000 πανομοιότυπα μόρια cDNA συνδεδεμένα ομοιοπολικά στην επιφάνεια του (εικόνα 2.4).

Το επόμενο στάδιο είναι η αλληλούχιση των βιβλιοθηκών. Η διαδικασία ξεκινά με τη σύνδεση ενός μορίου προσαρμογέα στην αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου DpnII (GATC) στο άκρο των μορίων cDNA. Το μόριο προσαρμογέας περιέχει μία θέση αναγνώρισης του ενζύμου τύπου II, BbvI, το οποίο κόβει το DNA 9-13 νουκλεοτίδια καθοδικά της αλληλουχίας αναγνώρισης. Από τη δράση αυτού του ενζύμου παράγονται μόρια με μονόκλινα άκρα μήκους 4 βάσεων δίπλα στην αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου DpnII. Στη συνέχεια υβριδίζεται ένα ακόμη σετ μορίων προσαρμογέων που καλούνται κωδικοποιημένοι (encoded), στα μονόκλινα άκρα. Οι προσαρμογείς αυτοί έχουν ένα προεξέχον άκρο 4 βάσεων με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς νουκλεοτιδίων και ο καθένας από αυτούς θα συνδεθεί σε ένα συμπληρωματικό μόριο cDNA. Η ακριβής αλληλουχία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων αποκωδικοποιείται μέσω 16 διαδοχικών αντιδράσεων υβριδισμού με ένα σετ φθοριζόντων ανιχνευτών. Από αυτή τη διαδικασία ταυτοποιούνται τα 4 πρώτα νουκλεοτίδια του κάθε μορίου cDNA. Για να ληφθούν δεδομένα για όλη την υπό εξέταση αλληλουχία (περίπου 17bp), απομακρύνεται ο πρώτος κωδικοποιημένος προσαρμογέας μέσω πέψης με το ένζυμο περιορισμού BbvI και η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Από μία πειραματική διαδικασία που περιλαμβάνει ένα εκατομμύριο μικροσφαιρίδια, προκύπτουν 250.000- 400.000 υψηλής ποιότητας αλληλουχίες 17 ζευγών βάσεων [Reinartz, 2001] (εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.4 Δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών.



Εικόνα 2.5 Αντιδράσεις αλληλούχισης

2.1.4 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

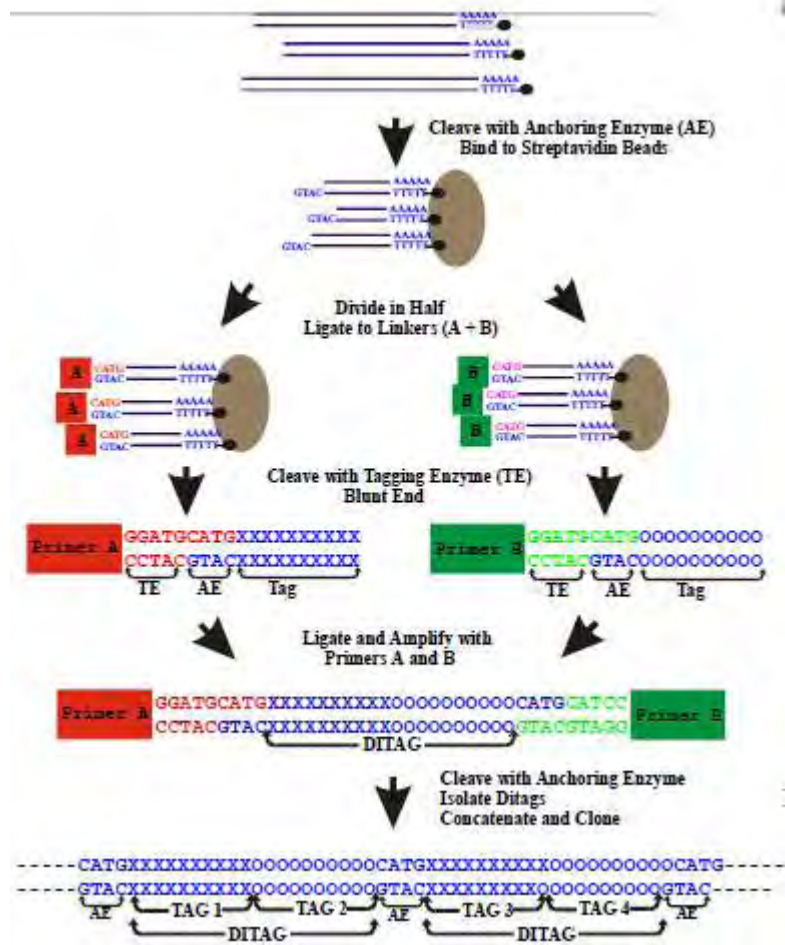
Η σειριακή ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης (SAGE, Serial Analysis of Gene Expression), προσφέρεται κυρίως για την μελέτη των προτύπων γονιδιακής έκφρασης, κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων. Αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση και σύγκριση μεταγραφωμάτων, χωρίς να απαιτεί πρότερη γνώση της αλληλουχίας των γονιδίων που εξετάζονται. Από την πρώτη περιγραφή της μεθόδου έως σήμερα, η SAGE έχει βρει εφαρμογή σε ένα εύρος πειραματικών ερευνών που ποικίλει από τη μελέτη του καρκίνου έως τη μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον προσδιορισμό της αφθονίας ενός mRNA, η οποία συνάγεται μετρώντας πόσες φορές εκπροσωπείται σε ένα δείγμα και μία αντίδραση αλληλούχισης, η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό έως και 50 μορίων mRNA [Velculescu et al, 1995][Vilain et al, 2003].

Αυτή η προσέγγιση στοχεύει στον εντοπισμό νέων γονιδίων και εξονίων και δεν περιλαμβάνει τη διαδικασία του υβριδισμού που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς

θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά όμως η χρήση της χαρακτηρίζεται από ορισμένους περιορισμούς, όπως το υψηλό κόστος, τις μεγάλες χρονικές απαιτήσεις, η παραγωγή αποτελεσμάτων με μειωμένη αξιοπιστία και τη μεγάλη ποσότητα αρχικού πολυαδενυλιωμένου RNA (2,5-5μg) που απαιτείται [Grskovic, Ramalho-Santos, 2008]. Πλέον πολλά από τα μειονεκτήματα της SAGE έχουν αντιμετωπισθεί μέσω ποικίλων τροποποιήσεων στο βασικό πρωτόκολλο. Οι σημαντικότερες από αυτές στοχεύουν στη μείωση της αρχικής ποσότητας RNA. Σημαντικές τροποποιήσεις αποτελούν η PCR-SAGE, η SAGELite, η SAR-SAGE (Small Amplified RNA-SAGE), η SADE (a SAGE Adaptation for Downsized Extracts), η microSAGE, η superSAGE και η longSAGE.

Αρχή της μεθόδου

Το αρχικό υλικό για τη διεξαγωγή της μεθόδου αποτελούν πολυαδενυλιωμένα mRNA, τα οποία έχουν απομονωθεί μέσω της πρόσδεσης της πολυ(A) ουράς τους σε σφαιρίδια που φέρουν όλιγο(dT). Τα μόρια μετατρέπονται σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης και κόβονται με ένα ένζυμο περιορισμού του οποίου η θέση κοπής συναντάται συχνά (συνήθως το *NotI*), ώστε να μείνει το 3' άκρο τους συνδεδεμένο στα σφαιρίδια. Στη συνέχεια προσδένεται στα ελεύθερα άκρα κάθε τμήματος, ένα δίκλωνο συνθετικό μόριο DNA μικρού μήκους (linker), με τη βοήθεια λιγάσης. Τα συνθετικά αυτά τμήματα φέρουν μια θέση αναγνώρισης μία ενδονουκλεάσης περιορισμού τύπου II (π.χ. *BsmFI*). Με την επίδραση του συγκεκριμένου ενζύμου προκύπτει η απελευθέρωση τμημάτων ετικετών (μήκους 10-14bp) από τα σφαιρίδια, καθώς έχει την ικανότητα να κόβει το DNA μερικές θέσεις καθοδικά της θέσης πρόσδεσης. Οι ετικέτες αυτές ενώνονται ανά δύο και σχηματίζουν διπλές ετικέτες (ditags) που έχουν θέση αναγνώρισης του *BsmFI* σε κάθε άκρο. Ακολουθεί ενίσχυση των ετικετών με PCR και σύνδεση μεταξύ τους ώστε να σχηματιστούν αλυσομερή (concatamers), κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει 20-25 διπλές ετικέτες. Τα αλυσομερή κλωνοποιούνται σε έναν πλασμιδιακό φορέα και αλληλουχίζονται. Επειδή οι ετικέτες διαχωρίζονται από γνωστές θέσεις περιορισμού, οι αλληλουχίες τους είναι εύκολο να καθοριστούν και να αντιστοιχηθούν σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, μετά από βιοπληροφορική ανάλυση. Τέλος, πραγματοποιείται καταμέτρηση των ετικετών και υπολογίζεται η συχνότητα εμφάνισης τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο γίνεται ο προσδιορισμός της σχετικής αφθονίας των αντίστοιχων mRNA στο αρχικό δείγμα [Velculescu et al, 1995] (εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6 Μεθοδολογία της μεθόδου SAGE

2.1.4α PCR-SAGE

Η συγκεκριμένη τροποποίηση του αρχικού πρωτόκολλου της SAGE, δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της γονιδιακής έκφρασης από κύτταρα που είναι διαθέσιμα σε περιορισμένο αριθμό, καθώς μειώνει την απαιτούμενη ποσότητα του αρχικού υλικού στα 900pg πολυαδενυλιωμένου RNA.

Αρχή της μεθόδου

Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA γίνεται με τη χρήση ενός όλιγο(dT) εκκινητή, ο οποίος υβριδοποιείται στην πολύ(A)ουρά του mRNA. Η σύνθεση του cDNA ολοκληρώνεται με την προσθήκη μιας μικρής αλληλουχίας επαναλαμβανόμενων κυτοσινών στο 5' άκρο του μορίου. Το τμήμα αυτό υβριδοποιείται με ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει μια μικρή αλληλουχία επαναλαμβανόμενων γουανινών και μια θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού SapI. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του μορίου cDNA και οι δύο αλυσίδες έχουν όμοια 3' άκρα, γεγονός που επιτρέπει την ενίσχυση PCR με έναν εκκινητή. Με τη χρήση ενός

βιοτινυλιωμένου εκκινητή μια ομάδα βιοτίνης συνδέεται στα άκρα του μορίου. Μετά από τη δράση του ενζύμου περιορισμού η ομάδα της βιοτίνης απομακρύνεται από το 5' άκρο. Τα ενισχυμένα μόρια που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της SAGE [Neilson et al, 2000].

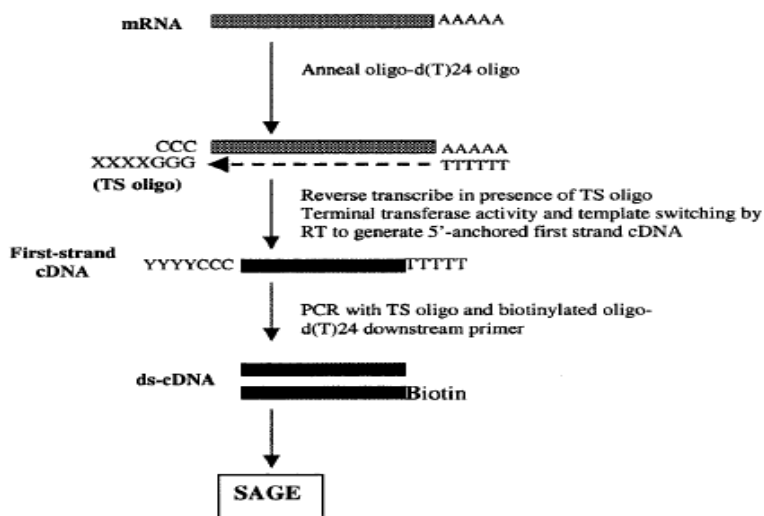
2.1.4β SAGELite

Η SAGE-Lite, αποτελεί μια ακόμη προσέγγιση που απαιτεί λιγότερο αρχικό υλικό (50ng συνολικού RNA) και συνεπώς επιτρέπει την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα που αποτελούνται από πολύ μικρές ποσότητες ιστών ή καλλιεργούμενων κυττάρων. Η προσέγγιση είναι παρόμοια με αυτή της PCR-SAGE.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην δραστικότητα τρανσφεράσης πολύ (C) τελικού τμήματος, της αντίστροφης μεταγραφάσης και στην ικανότητά της να αλλάζει εκμαγείο κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού του DNA. Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση ενός ολιγο(dT) εκκινητή, παρουσία ενός δεύτερου ολιγονουκλεοτιδίου «αλλαγής εκμαγείου» (TS oligo).

Το ολιγονουκλεοτίδιο έχει μια πολύ(G) αλληλουχία στο 3' άκρο του και υβριδοποιείται με το πολύ(C) άκρο που δημιουργήθηκε από την αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό αλλάζει συνεχώς εκμαγείο και προσθέτει στα νεοσυντιθέμενα 3' άκρα, TS ολιγονουκλεοτίδια. Συνεπώς κάθε πρώτη αλυσίδα του cDNA που παράγεται περιέχει μια κοινή αλληλουχία στο 3' άκρο της. Η αλυσίδα αυτή ενισχύεται με PCR με τη χρήση ολιγο(dT) και TS εκκινητών. Ομοίως με την PCR-SAGE, γίνεται χρήση βιοτινυλιωμένων εκκινητών και πέψη με ένζυμο περιορισμού, έτσι ώστε να προκύψει το βιοτινυλιωμένο 5' άκρο που απαιτείται για τη σύνδεση στα σφαιρίδια, σε επόμενο στάδιο. Η παραπάνω ενίσχυση οδηγεί στη δημιουργία βιβλιοθηκών που αποτελούνται από μόρια cDNA μήκους μεταξύ 500-6000bp [Peters et al, 1999] (Εικόνα 2.7).



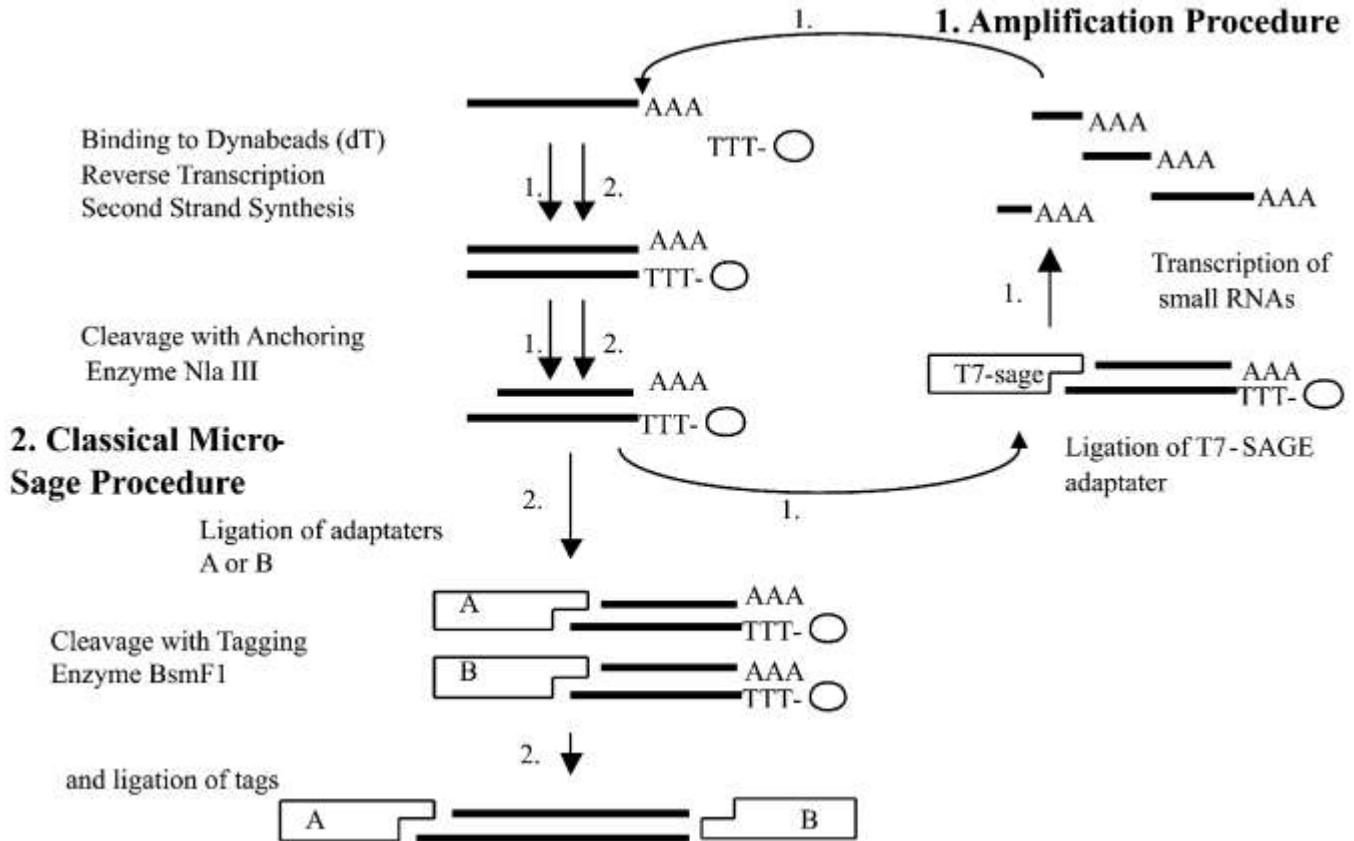
Εικόνα 2.7 Μεθοδολογία της SAGELite

2.1.4γ Small amplified RNA-SAGE

Η συγκεκριμένη τροποποίηση στοχεύει επίσης στη μείωση της απαιτούμενης ποσότητας του αρχικού RNA στα 50ng, χωρίς να περιλαμβάνει επιπλέον στάδια PCR ενίσχυσης. Το πρωτόκολλο αυτό περιλαμβάνει επιπρόσθετους κύκλους ενίσχυσης του mRNA.

Αρχή της μεθόδου

Τα πολυαδενυλιωμένα mRNA συνδέονται σε σφαιρίδια με βάση την πολύ(Α)ουρά, μετατρέπονται με αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA και ακολουθεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού NlaIII. Σε αυτό σημείο, συνδέεται ένα μόριο προσαρμογέας (adaptor) στο cDNA που έχει κοπεί με το ένζυμο NlaIII, το οποίο περιέχει τη θέση σύνδεσης του ενζύμου T7 RNA πολυμεράση. Από τη δράση του ενζύμου αυτού προκύπτουν τμήματα RNA που θα συνδεθούν εκ νέου σε σφαιρίδια για να ακολουθήσει το κλασικό πρωτόκολλο της SAGE [Vilain et al, 2003](εικόνα2.8).



Εικόνα 2.8 Μεθοδολογία της Small Amplified RNA-SAGE

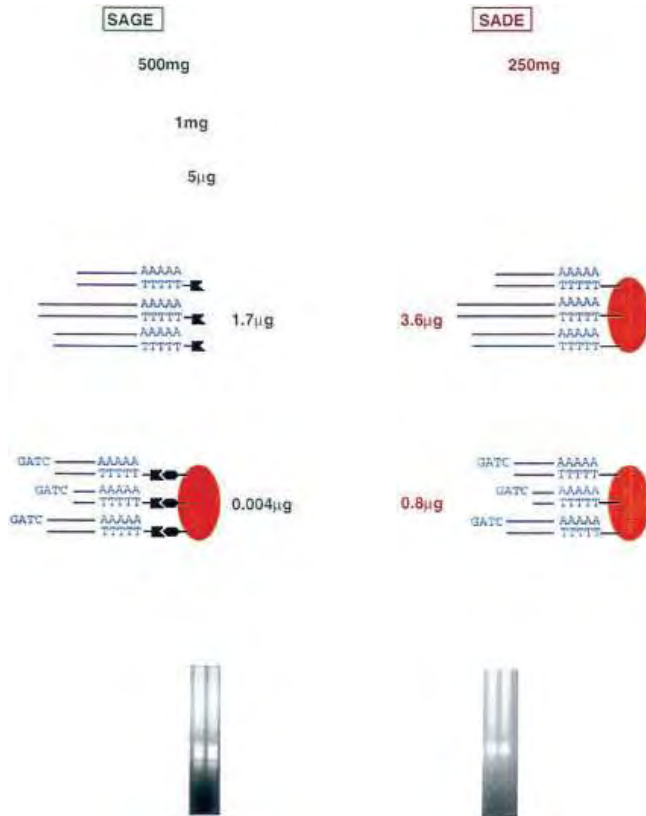
2.1.4δ SADE (a SAGE Adaptation For Downsized Extracts)

Το τροποποιημένο πρωτόκολλο της SAGE οδηγεί στη μείωση της ποσότητας του αρχικού RNA, μέσω της μείωσης της απώλειας υλικού κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σε σύγκριση με το κλασικό πρωτόκολλο της SAGE, η SADE παρέχει 4 φορές μεγαλύτερη ποσότητα cDNA και 400 φορές μεγαλύτερη απόδοση μετά το στάδιο της πέψης του cDNA με το ένζυμο αγκυροβόλησης.

Αρχή της μεθόδου

Η πρώτη βασική διαφοροποίηση γίνεται στο στάδιο απομόνωσης του mRNA. Το mRNA απομονώνεται απευθείας από τον ομογενοποιημένο ιστό μέσω όλιγο(dT) τμημάτων που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με μαγνητικά σφαιρίδια και η σύνθεση του cDNA ξεκινά αμέσως με τη χρήση βιοτινυλιωμένου όλιγο(dT) εκκινητή. Επιπλέον το ένζυμο περιορισμού NlaIII αντικαθίσταται από το ένζυμο Ssp3AI, το οποίο αναγνωρίζει 4 βάσεις και από τη δράση του προκύπτουν τμήματα 256 βάσεων (4^4) περίπου. Τα 3' άκρα απομονώνονται με σφαιρίδια συζευγμένα με στρεπταβιδίνη και χωρίζονται σε δύο μέρη. Κάθε μέρος συνδέεται με ένα από τα δύο μόρια συνδέτες (linkers). Οι linkers έχουν από μια θέση αναγνώρισης ενός ενζύμου περιορισμού (BsmFI), μέσω της δράσης του οποίου απελευθερώνονται οι ετικέτες. Οι ετικέτες αποκτούν τυφλά άκρα μέσω της

δράσης της T7 DNA πολυμεράσης και συνδέονται υπό την επίδραση μιας λιγάσης για να σχηματιστούν τμήματα DNA 110bp. Ακολουθεί καθαρισμός των τμημάτων με gel αγαρόζης και ενίσχυση PCR. Τα ditags που περιέχονται στο προϊόν της PCR, καθαρίζονται και σχηματίζουν αλυσσομερή (περίπου 350bp) τα οποία κλωνοποιούνται [Virion et al, 1999] (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9 Σύγκριση τεχνικών SAGE και SADE

2.1.4ε microSAGE

Οι τροποποιήσεις του βασικού πρωτοκόλλου της SAGE που περιλαμβάνονται στο πρωτόκολλο της microSAGE μειώνουν την αρχική ποσότητα mRNA που απαιτείται στα 1-5ng. Η χρήση ενός μοναδικού tube σε περισσότερα από ένα στάδια κάνει την διαδικασία πιο εύκολη και μειώνει τις απώλειες υλικού που παρατηρούνται κατά τη διεξαγωγή της βασικής μεθόδου.

Αρχή της μεθόδου

Την πρώτη βασική διαφοροποίηση αποτελεί η χρήση tubes που έχουν συνδεδεμένη στρεπταβιδίνη στα τοιχώματα τους. Τα βιοτινυλιωμένα μόρια cDNA που προκύπτουν από την ενίσχυση PCR με βιοτινυλιωμένους όλιγοd(T) εκκινητές ακινητοποιούνται στα τοιχώματα των tubes, όπου και πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA μορίου. Τα μόρια αυτά δεν εγκαταλείπουν τα αρχικά tubes έως το στάδιο της απελευθέρωσης των

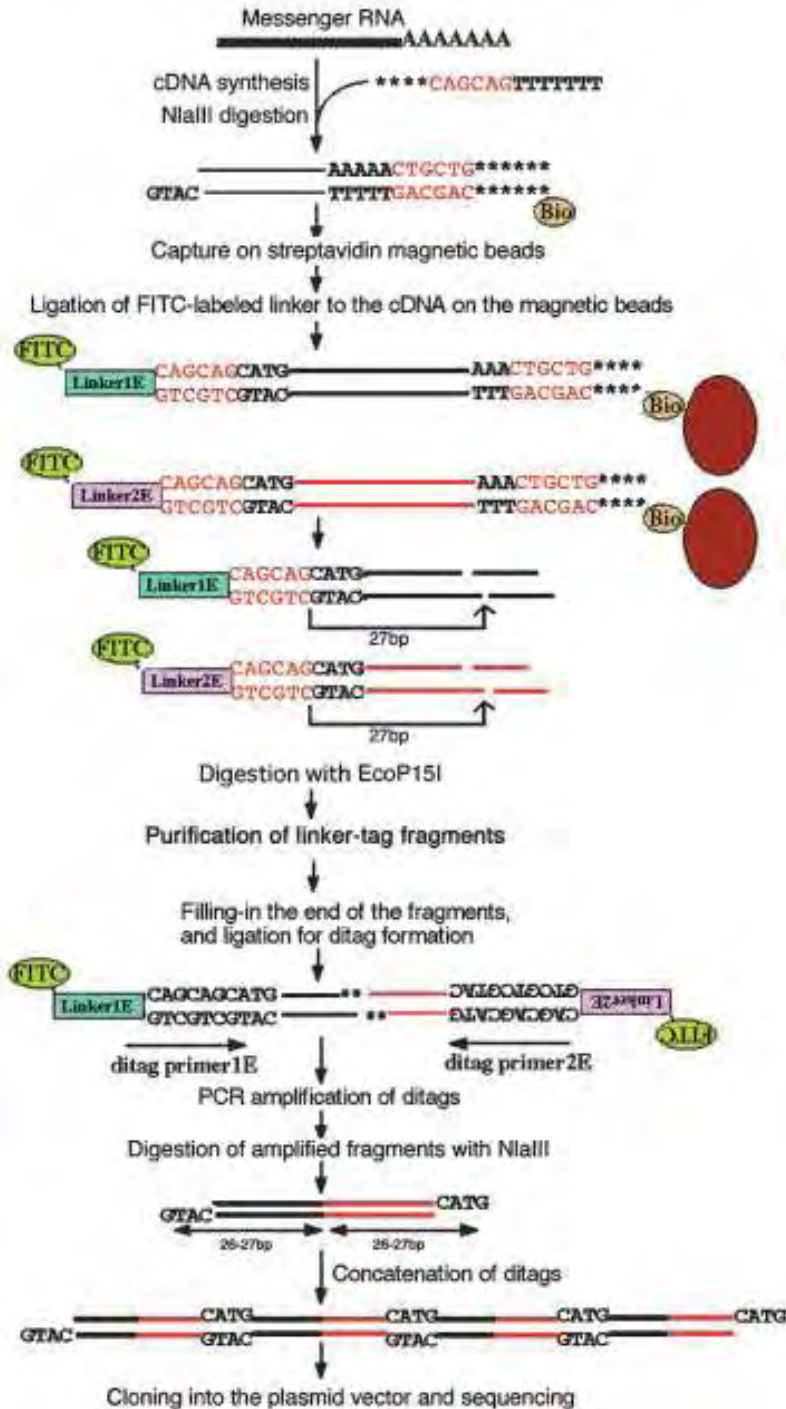
ετικετών, το οποίο πραγματοποιείται μέσω πέψης με το ένζυμο περιορισμού BsmFIII. Μία δεύτερη διαφοροποίηση που αυξάνει την ποσότητα των παραγόμενων ετικετών πραγματοποιείται στο στάδιο της ενίσχυσης των ditags. Ενώ στο βασικό πρωτόκολλο της SAGE πραγματοποιούνται 25-28 κύκλοι PCR, στη συγκεκριμένη προσαρμογή πραγματοποιούνται 28 κύκλοι PCR που ακολουθούνται από 8-15 κύκλους re-PCR [Datson et al, 1999].

2.1.4ζ SuperSAGE

Το πρωτόκολλο της superSAGE παρέχει ετικέτες μεγαλύτερου μήκους, μέσω της χρήσης διαφορετικού ενζύμου περιορισμού για την απελευθέρωση τους από τα μαγνητικά σφαιρίδια. Οι ετικέτες έχουν μήκος 26bp και η απόκτηση τους αυξάνει την απόδοση και την εγκυρότητα της μεθόδου. Η superSAGE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση οργανισμών χωρίς να απαιτείται πρότερη γνώση της αλληλουχίας του DNA τους.

Αρχή της μεθόδου

Η βασική διαφοροποίηση της superSAGE είναι η χρήση ενός διαφορετικού ενζύμου περιορισμού για την απελευθέρωση των ετικετών από τα μαγνητικά σφαιρίδια. Το ένζυμο BsmFI αντικαθίσταται από το ένζυμο περιορισμού EcoP15I, το οποίο αναγνωρίζει μία αλληλουχία έξι νουκλεοτιδίων και κόβει το DNA 25 νουκλεοτίδια καθοδικά της αλληλουχίας αναγνώρισης στη μία αλυσίδα και 27 νουκλεοτίδια στην άλλη. Κατά αυτόν τον τρόπο προκύπτει ένα προεξέχον 5' άκρο μήκους 2 βάσεων. Τυφλά άκρα δημιουργούνται από τη δράση της KOD πολυμεράσης (απομονώνεται από το αρχαίο *Thermococcus kodakaraensis*) και ακολουθεί η σύνδεση των ετικετών για την παραγωγή των ditags. Επιπλέον οι linkers που χρησιμοποιούνται είναι σημασμένοι με τη χρωστική FITC. Τα παραγόμενα τμήματα μήκους περίπου 69bp (linker 42bp, ετικέτες 27bp) διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και οπτικοποιούνται μέσω του φθορισμού που εκπέμπει η χρωστική μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV [Matsumura et al, 2003](εικόνα 2.10).



Εικόνα 2.10 Μεθοδολογία της superSAGE

2.1.4η longSAGE

Μία ακόμη προσαρμογή της SAGE που προσφέρει ετικέτες μεγαλύτερου μήκους (17-21bp), αποτελεί η longSAGE. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης ενός ιστού ή κυτταρικού τύπου, την ταυτοποίηση

νέων γονιδίων και τον χαρακτηρισμό μεταγραφωμάτων. Επιπλέον αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα που βρίσκονται σε φυσιολογική ή νοσηρή κατάσταση ή σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και την μεταξύ τους σύγκριση. Οι μεγαλύτερες ετικέτες αυξάνουν την αξιοπιστία της μεθόδου, επιτρέπουν την κλωνοποίηση ολόκληρης της αλληλουχίας στόχου και τον σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών PCR εκκινητών και ανιχνευτών υβριδοποίησης, για περαιτέρω εφαρμογές μετά την απομόνωση του γονιδίου.

Αρχή της μεθόδου

Το αρχικό δείγμα RNA συνδέεται σε όλιγοd(T) μαγνητικά σφαιρίδια. Μέσω αυτής της διαδικασίας απομονώνεται το mRNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η σύνθεση του δίκλωνου cDNA πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια με τη χρήση δύο ενζύμων, μίας αντίστροφης μεταγραφάσης και μίας DNA πολυμεράσης. Οι δύο ενζυμικές αντιδράσεις γίνονται στο ίδιο tube, μειώνοντας τις πιθανές απώλειες υλικού. Στη συνέχεια τα παραγόμενα μόρια cDNA πέπτονται με το ένζυμο περιορισμού NlaIII και χωρίζονται σε δύο μέρη. Κάθε μέρος υφίσταται μία αντίδραση σύνδεσης με δύο διαφορετικά μόρια προσαρμογείς (adaptors). Τα μόρια αυτά περιέχουν ένα προεξέχον άκρο τεσσάρων βάσεων συμπληρωματικό με τα άκρα των cDNA μορίων που προέκυψαν από την δράση του ενζύμου NlaIII, μία αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού τύπου III, MmeI, στο 3' άκρο και θέσεις υπεύθυνες για την εκκίνηση της ενίσχυσης PCR. Η χρήση αυτού του ενζύμου αποτελεί την κύρια διαφοροποίηση από το βασικό πρωτόκολλο της SAGE. Το MmeI συνδέεται στη θέση αναγνώρισης και κόβει το cDNA περίπου 21bp καθοδικά από το μόριο προσαρμογέα, απελευθερώνοντας μία ετικέτα μήκους περίπου 60bp με ένα προεξέχον άκρο 2bp. Η ετικέτα αποτελείται από την αλληλουχία μήκους 40bp του μορίου προσαρμογέα και μία μοναδική αλληλουχία μήκους περίπου 21bp που προέρχεται από ένα μετάγραφο. Στη συνέχεια τα δύο μέρη ενώνονται και προκύπτουν διπλές ετικέτες (ditags) μήκους περίπου 130bp. Οι ditags ενισχύονται με εκκινητές συμπληρωματικούς με ειδικές αλληλουχίες των μορίων προσαρμογέων και υφίστανται πέψη με το ένζυμο NlaIII, έτσι ώστε να απελευθερωθούν ditags μήκους 34bp. Αυτά τα μόρια αποτελούνται εξ ολοκλήρου από αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν το mRNA του δείγματος και απομονώνονται από τα μόρια προσαρμογείς μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Ακολουθεί σύνδεση των ditags για να σχηματιστούν τα αλυσομερή μήκους 500-800bp, τα οποία κλωνοποιούνται σε κατάλληλο φορέα. Κάθε μετάγραφο ταυτοποιείται από την μοναδική αλληλουχία 17bp και ποσοτικοποιείται με βάση τις φορές που απαντάται στον πληθυσμό των κλώνων. Τέλος τα δεδομένα αναλύονται από ένα ειδικό λογισμικό, το οποίο απομονώνει τις ετικέτες από τα αλυσομερή, καταγράφει την εμφάνιση κάθε ετικέτας και δημιουργεί μία αναφορά για κάθε μία από αυτές και την αφθονία της [I-SAGE™ Long Kit].

2.1.5 RNA-Sequencing (RNA-Seq)

Η τεχνική RNA-Sequencing (RNA-Seq) ανήκει στις τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing). Πρόκειται για μία νέα τεχνική τρανσκριπτομικής ανάλυσης, που χρησιμοποιεί τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης (deep-sequencing). Μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό τα συστήματα Illumina IG, Applied Biosystems SOLiD και Roche 454 Life Science. Η RNA-Seq αποτελεί την πρώτη μέθοδο που βασίζεται στην αλληλούχιση και η οποία επιτρέπει την ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος, με υψηλή απόδοση. Έχει ευαισθησία στο επίπεδο της μίας βάσης και παρέχει ψηφιακά δεδομένα για τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης που αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα, με κόστος που είναι συχνά χαμηλότερο από το κόστος των συμβατικών μεθόδων και το οποίο μειώνεται συνεχώς.

Η RNA-Seq πλεονεκτεί σε πολλά σημεία σε σχέση με τις υπάρχουσες τεχνικές τρανσκριπτομικής ανάλυσης. Πρώτον, αντίθετα από τις προσεγγίσεις που βασίζονται στην υβριδοποίηση (π.χ. Στικτές Μικροσυστοιχίες) δεν περιορίζεται στον εντοπισμό μεταγράφων που αντιστοιχούν σε γνωστές αλληλουχίες. Αυτό το χαρακτηριστικό την καθιστά εργαλείο για την ανάλυση οργανισμών που δεν αποτελούν οργανισμούς-μοντέλα και των οποίων το γονιδίωμα δεν έχει αλληλουχηθεί. Οι μικρού μήκους (30bp) αναγνώσεις αλληλουχίας που παρέχει, δίνουν πληροφορίες για την σύνδεση δύο εξονίων, ενώ μεγαλύτερες αναγνώσεις αποκαλύπτουν τον τρόπο σύνδεσης ανάμεσα σε πολλά εξόνια, επιτρέποντας τη μελέτη περίπλοκων μεταγραφωμάτων. Επιπλέον η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει την ταυτοποίηση πολυμορφικών περιοχών (π.χ. SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms). Ένα ακόμη θετικό χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι το μικρό έως ανύπαρκτο “background signal” που εμφανίζεται, καθώς οι αλληλουχίες DNA χαρτογραφούνται σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Τέλος δεν υπάρχει ανώτατο όριο στον αριθμό των ακολουθιών που καταγράφονται κατά την ποσοτικοποίηση.

Παρά τα ποικίλα πλεονεκτήματα της, η μέθοδος αυτή επιδέχεται βελτιώσεων, οι οποίες θα αυξήσουν την απόδοση και την αξιοπιστία της. Συγκεκριμένα το στάδιο της κατασκευής των cDNA βιβλιοθηκών περιλαμβάνει χειρισμούς που δυσκολεύουν την ανάλυση των αποτελεσμάτων και που μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Ο πρώτος προβληματισμός που αφορά τη διαδικασία κατασκευής των cDNA βιβλιοθηκών είναι η ανάγκη για πέψη είτε των μορίων RNA, είτε των μορίων cDNA. Η πέψη των μορίων RNA έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί σε μειωμένη απόδοση αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα άκρα των μεταγράφων, ενώ η πέψη των cDNA μορίων αποδίδει περισσότερες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο 3' άκρο, σε σύγκριση με αυτές που αντιστοιχούν στο υπόλοιπο μετάγραφο. Επιπλέον υπάρχει δυσκολία στο να αποφασιστεί εάν κάποια αντίγραφα αναγνώσεων ακολουθίας μικρού μήκους αντιστοιχούν σε αντίγραφα mRNA ή αποτελούν προϊόντα της ενίσχυσης των cDNA μορίων.

Δυσκολίες που θα πρέπει να ξεπεραστούν υπάρχουν και στο στάδιο την βιοπληροφορικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων, οι οποίες παρατηρούνται κυρίως κατά την ανάλυση μεγάλων ή πολύπλοκων μεταγραφωμάτων. Απαιτείται η ανάπτυξη

μίας μεθόδου η οποία μπορεί να αποθηκεύει, να ανακαλεί και να επεξεργάζεται μεγάλες ποσότητες δεδομένων, αποφεύγοντας σφάλματα κατά την ανάλυση και απομακρύνοντας τις αναγνώσεις αλληλουχίας χαμηλής ποιότητας [Wang et al, 2009][Costa et al, 2010].

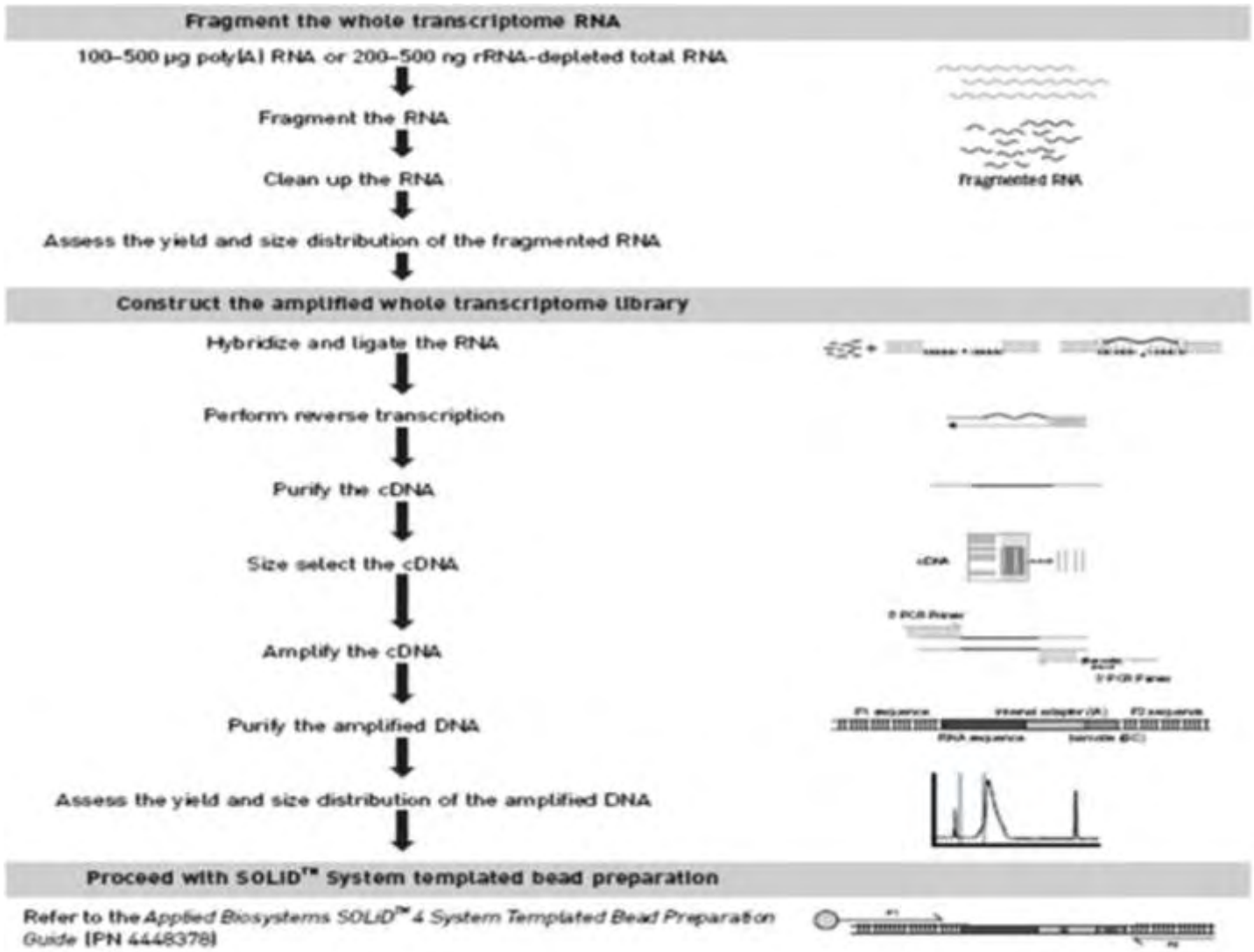
Αρχή της μεθόδου

Περιληπτικά η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά τη μετατροπή μορίων RNA (mRNA ή ολικό RNA- rRNA depleted) σε τμήματα cDNA που είναι συνδεδεμένα στο ένα ή και στα δύο άκρα με ειδικά δίκλινα μόρια προσαρμογείς (adaptors). Έπειτα ακολουθεί το στάδιο της ενίσχυσης των μορίων cDNA, το οποίο μπορεί να παραληφθεί. Τα παραγόμενα μόρια αλληλουχούνται έτσι ώστε να προκύψουν μικρές αναγνώσεις ακολουθίας μήκους 30-400bp ανάλογα με την τεχνολογία DNA αλληλούχισης που χρησιμοποιείται. Η ανάγνωση της ακολουθίας μπορεί να ξεκινάει από το ένα μόνο άκρο (single-end sequencing) ή και από τα δύο (pair-end sequencing). Τέλος, ακολουθεί βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων η οποία μπορεί να γίνει με *de novo* συναρμολόγηση των αναγνώσεων ή με βάση έναν συγγενικό οργανισμό του οποίου η ακολουθία του DNA είναι γνωστή.

2.1.5α RNA-Seq βασισμένη στην τεχνολογία Applied Biosystems SOLiD

Κατασκευή RNA βιβλιοθηκών.

[Η διαδικασία βασίζεται στο πρωτόκολλο SOLiD® Total RNA-Seq Kit] (εικόνα 2.11)

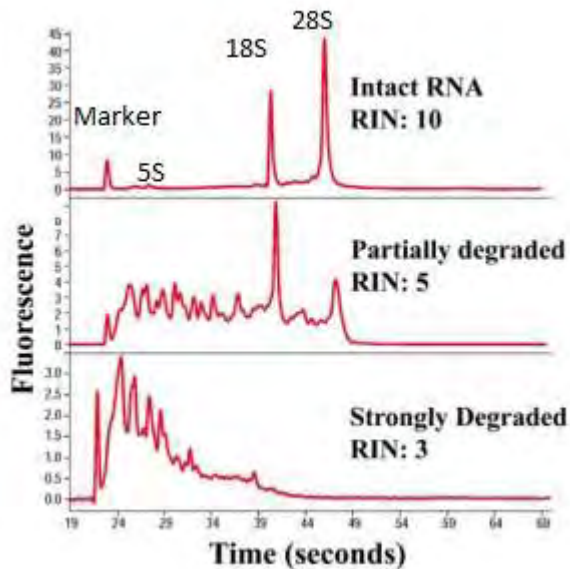


Εικόνα 2.11 Συνοπτική απεικόνιση των σταδίων κατασκευής των RNA βιβλιοθηκών

Α) Απομόνωση mRNA ή ολικό RNA- rRNA depleted, από το ολικό RNA.

Απομονώνεται το ολικό RNA από το υπό εξέταση δείγμα και ελέγχεται η ποιότητα του. Το RNA που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει αριθμό ακεραιότητας (RNA Integrity Number) μεγαλύτερο από 7. Ο RIN είναι ένας αλγόριθμος που παρέχει πληροφορίες για την ακεραιότητα του ευκαρυωτικού RNA που βρίσκεται σε ένα δείγμα. Χρησιμοποιεί ένα σύστημα βαθμολόγησης από το 1 έως το 10, με την τιμή 1 να αντιπροσωπεύει τελείως αποικοδομημένα δείγματα RNA και την τιμή 10 να αντιπροσωπεύει εντελώς ακέραια δείγματα. Οι τιμές RIN προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων στη συσκευή Agilent 2100 Bioanalyzer. Συγκεκριμένα, μικρές ποσότητες RNA διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης, μέσα σε ειδικά chips με βάση το μοριακό τους βάρος και στη συνέχεια εντοπίζονται από τον φθορισμό που εκπέμπουν μετά από έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκπέμπεται από συσκευή

laser. Τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα, όπου η ποσότητα του φθορισμού που καταγράφεται σχετίζεται με την ποσότητα του RNA που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Ο αριθμός RIN προκύπτει από την ανάλυση του ηλεκτροφερογράμματος [Mueller et al, 2004][Schroeder et al,2006] (εικόνα 2.12).



Εικόνα 2.12 Χαρακτηριστικά ηλεκτροφερογράμματα στα οποία αντιστοιχεί διαφορετικό RIN

Για τη κατασκευή των RNA βιβλιοθηκών απαιτούνται 100-500ng πολυ(A)RNA ή 200-500ng ολικού RNA απαλλαγμένο από το rRNA. Η απομόνωση του mRNA πραγματοποιείται με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στα οποία είναι συνδεδεμένα oligo(dT) μόρια. Η απομάκρυνση των μορίων rRNA από το δείγμα πραγματοποιείται με τη χρήση βιοτυνλιωμένων ανιχνευτών ειδικών για μόρια rRNA και μαγνητικών σφαιριδίων συζευγμένων με μόρια στρεπταβιδίνης [RiboMinus™ Eukaryote Kit for RNA-Seq].

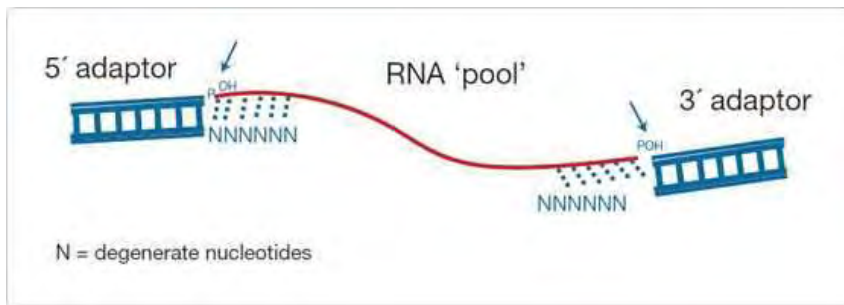
Β) Τεμαχισμός του RNA

Το συγκεκριμένο στάδιο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε ενζυμικά με το ένζυμο RNaseIII, είτε με χημική υδρόλυση, με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχουν δισθενή ιόντα (Mg^{+2} , Zn^{+2}) [Forconi and Herschlag, 2009]. Από τον τεμαχισμό του RNA προκύπτουν μόρια που ποικίλουν σε μήκος, με τα περισσότερα να έχουν μήκος 100-200nt. Έπειτα, τα παραγόμενα μόρια καθαρίζονται και ποσοτικοποιούνται.

Δ) Σύνθεση cDNA μορίων

Για τη σύνθεση των cDNA μορίων απαιτείται η σύνδεση ειδικών μορίων προσαρμογών (Adaptor A + Adaptor B). Οι Adaptors είναι δίκλινα RNA/DNA μόρια,

τα οποία έχουν στο ένα τους άκρο μία μονόκλωνη αλληλουχία εκφυλισμένων νουκλεοτιδίων και στο άλλο άκρο μία καθορισμένη αλληλουχία απαραίτητη για τη διαδικασία της αλληλούχισης. Η σύνδεση των Adaptors γίνεται μέσω της υβριδοποίησης της εκφυλισμένης αλληλουχίας στο 5' άκρο ή στο 3' άκρο των τμημάτων RNA. Για τη σύνδεση αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη 5'-PO και 3'-OH στα άκρα του μορίου. Γι αυτό το λόγο προηγείται ένα στάδιο επεξεργασίας των τμημάτων RNA με μία πολυνουκλεοτιδική κινάση και ορισμένες φορές με μία φωσφατάση, ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο έγινε ο τεμαχισμός του RNA. Για τη σύνδεση των Adaptors είναι επίσης απαραίτητη η παρουσία του ενζύμου λιγάση. Ο Adaptor A συνδέεται στο 5' άκρο του μορίου πραγματοποιείται για την αλληλούχιση με κατεύθυνση 5'→3', ενώ η σύνδεση του Adaptor B στο 3' άκρο για την αλληλούχιση με κατεύθυνση 3'→5'. Η σύνδεση και των δύο Adaptors σε ένα μόριο οδηγεί στην αλληλούχιση του και προς τις δύο κατευθύνσεις (εικόνα 2.13).



Εικόνα 2.13 Σύνδεση των Adaptors σε ένα τμήμα RNA

Ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή για να παραχθούν τα μόρια cDNA και επεξεργασία με ριβονουκλεάση για να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα μόρια των Adaptors. Σε αυτό το σημείο, τα δείγματα αποτελούνται από cDNA αντίγραφα των μικρών RNA θραυσμάτων που προέκυψαν από τον τεμαχισμό του RNA, στα άκρα των οποίων είναι συνδεδεμένοι οι Adaptors.

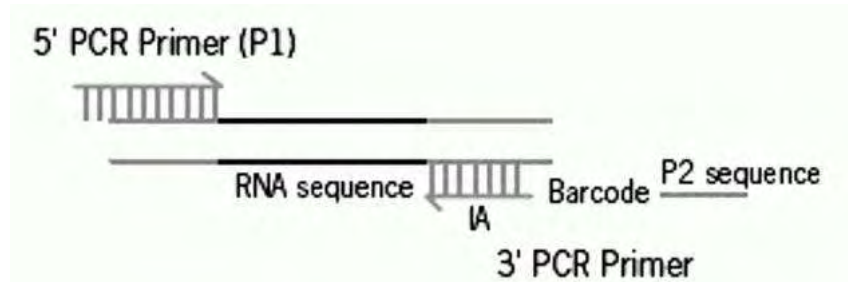
Ε) Καθαρισμός και επιλογή με βάση το μέγεθος των μορίων cDNA

Πραγματοποιείται ο καθαρισμός των προϊόντων από τα παραπροϊόντα και επιλέγονται όσα έχουν το ιδανικό μέγεθος (200-250bp). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων στα οποία συγκρατούνται μόρια DNA με συγκεκριμένο μήκος, επιτρέποντας την απομάκρυνση παραπροϊόντων όπως εκκινητές, άλατα, dNTPs και μόρια από το δείγμα που έχουν μη επιθυμητό μήκος. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην πραγματοποίηση δύο ή περισσότερων κύκλων προσθήκης των σφαιριδίων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε φορά. Για την απομόνωση τμημάτων μήκους 200-250bp πραγματοποιείται αρχικά ένας κύκλος προσθήκης διαλύματος σφαιριδίων 1,8X, όπου τμήματα μεγαλύτερα από 100bp συγκρατούνται στα σφαιρίδια. Ακολουθεί πλύσιμο των σφαιριδίων και έκλυση των μορίων cDNA με προσθήκη νερού, η οποία αλλάζει το pH και οδηγεί στην αποκόλληση

τους από τα σφαιρίδια. Ένας δεύτερος κύκλος προσθήκης διαλύματος σφαιριδίων 1,6X οδηγεί στην απομόνωση των μορίων που είναι μεγαλύτερα από 150bp, αυξάνοντας έτσι το ποσοστό των μορίων που έχουν το επιθυμητό μήκος.

ΣΤ) Ενίσχυση των μορίων cDNA

Η ενίσχυση των μορίων cDNA πραγματοποιείται με τη σύνδεση σε αυτά ειδικά κατασκευασμένων 5' και 3' PCR εκκινήτων. Ο 5' PCR εκκινήτης περιέχει μία αλληλουχία εκκινήτη (P1) ειδική για την emulsion PCR που ακολουθεί σε επόμενο στάδιο. Ο 3' εκκινήτης περιέχει μία αντίστοιχη αλληλουχία (P2), μία αλληλουχία «barcode» και ένα εσωτερικό μόριο προσαρμογέα (IA) απαραίτητο για την αλληλούχιση της αλληλουχίας «barcode». Οι αλληλουχίες «barcode» αποτελούν εργαλείο για την ταυτοποίηση των cDNA βιβλιοθηκών. [SOLiD™ RNA Barcoding Kit] (εικόνα 2.14)



Εικόνα 1.14 Σχηματική απεικόνιση μορίου cDNA στο οποίο είναι συνδεδεμένοι οι 5' και 3' PCR εκκινήτες.

Αφού ακολουθηθεί καθαρισμός των ενισχυμένων μορίων και καθορισμός του μεγέθους τους, οι cDNA βιβλιοθήκες είναι έτοιμες για αλληλούχιση (εικόνα 2.14).

Αλληλούχιση των RNA βιβλιοθηκών

A) Emulsion PCR

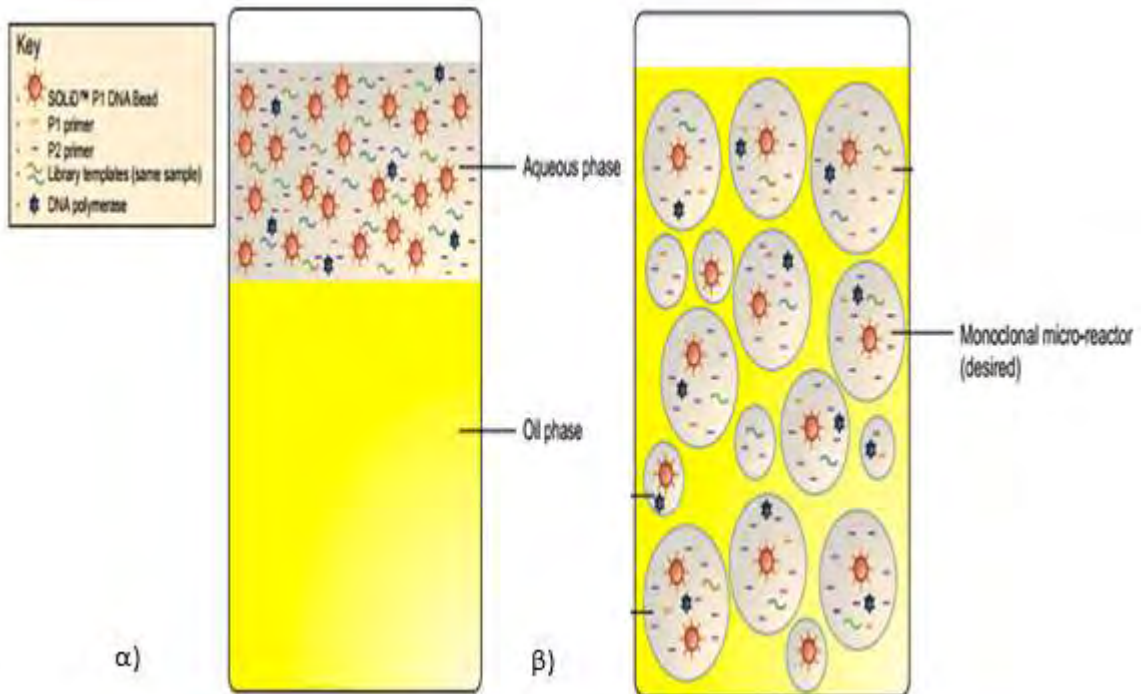
Το στάδιο της κλωνοποίησης σε φορέα που περιλαμβάνεται στις συμβατικές τεχνικές αλληλούχισης, αντικαθίσταται από την PCR ενίσχυση σε γαλάκτωμα (emulsion PCR) των cDNA μορίων, η οποία οδηγεί στην δημιουργία ενισχυμένων «κλώνων» πάνω σε μαγνητικά σφαιρίδια. Μετά το πέρας της διαδικασίας κάθε σφαιρίδιο έχει συνδεδεμένα στην επιφάνεια του πολλά αντίγραφα ενός μορίου cDNA. Η διαδικασία βασίζεται στη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στην επιφάνεια των οποίων είναι συνδεδεμένα δίκλινα τμήματα DNA στα οποία υβριδοποιείται η αλληλουχία P1 των cDNA μορίων και σφαιριδίων από πολυστυρένιο στην επιφάνεια των οποίων είναι συνδεδεμένα δίκλινα τμήματα DNA στα οποία υβριδοποιείται η P2 αλληλουχία.

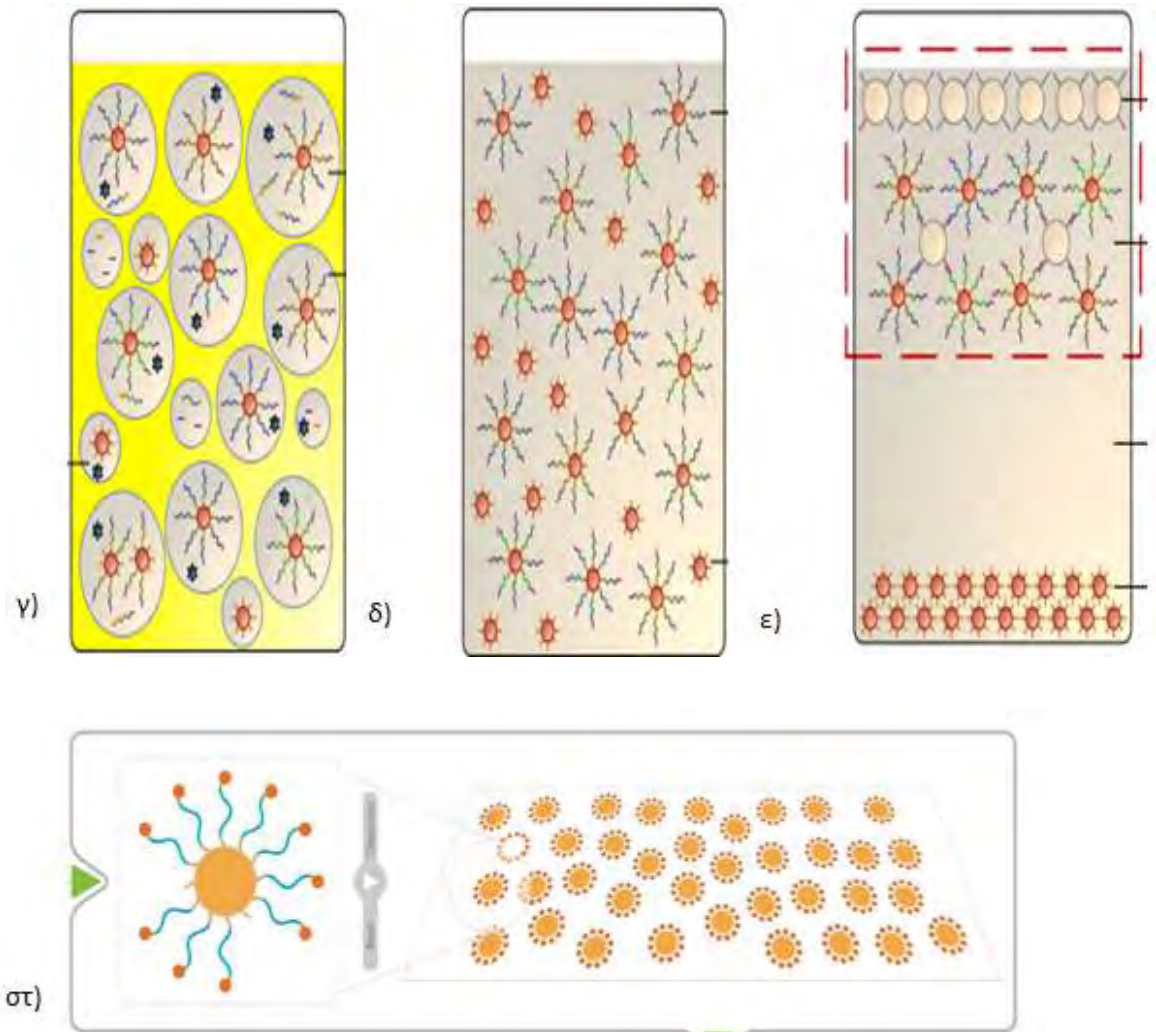
Το γαλάκτωμα αποτελείται από μία φάση λαδιού που περιέχει γαλακτωματοποιητές και από μία υδατινή φάση που περιέχει τα συστατικά της PCR, στα οποία περιλαμβάνονται τα cDNA μόρια και τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία πρέπει να

βρίσκονται σε κατάλληλη αναλογία (εικόνα 2.15α), έτσι ώστε όταν δημιουργηθούν οι φυσαλίδες, σε κάθε μία από αυτές να υπάρχει ένα μόριο cDNA και ένα μαγνητικό σφαιρίδιο (εικόνα 2.15β). Οι φυσαλίδες δρουν ως μικροαντιδραστήρες. Εάν η αναλογία είναι ιδανική μετά το περάς των κύκλων της PCR ενίσχυσης προκύπτουν σφαιρίδια, σε κάθε ένα από τα οποία θα είναι προσκολλημένα μόρια DNA, που προέρχονται από την αντιγραφή ενός μόνο αρχικού μορίου (εικόνα 2.15γ).

Ακολουθεί προσθήκη βουτανόλης για να διαλυθούν οι φυσαλίδες και πραγματοποιούνται πλύσεις για να αφαιρεθεί το γαλάκτωμα (εικόνα 2.15δ). Στη συνέχεια προστίθεται γλυκερόλη και νέα σφαιρίδια από πολυστυρένιο. Τα σφαιρίδια αυτά συγκρατούν τα μαγνητικά σφαιρίδια που έχουν στην επιφάνεια τους τα ενισχυμένα μόρια DNA, τα παρασύρουν στην επιφάνεια του διαλύματος και τα διαχωρίζουν από τα κενά μαγνητικά σφαιρίδια (εικόνα 2.15ε).

Τέλος τα 3' άκρα των μορίων cDNA τροποποιούνται με προσθήκη μίας τριφωσφορικής ουρακίλης, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύνδεση τους στο γυάλινο πλακίδιο που τοποθετείται στην συσκευή αλληλούχισης. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την Terminal Transferase, ένα ένζυμο που ανεξάρτητα από την αλυσίδα μήτρα καταλύει την προσθήκη τροποποιημένων νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο μορίων DNA (εικόνα 2.15στ) [Applied Biosystems SOLiD™4 System Templated Bead Preparation Guide].





Εικόνα 2.15 Emulsion PCR

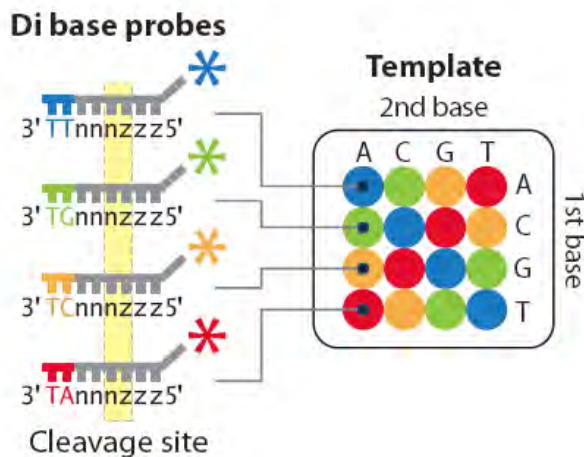
Β) Καταγραφή σήματος- Χρωματικός κώδικας

Τα πλακίδια με τα ακινητοποιημένα μόρια cDNA στην επιφάνεια τους τοποθετούνται στη συσκευή αλληλούχισης ABI SOLiD (εικόνα 2.16), όπου πραγματοποιείται η αλληλούχιση. Η λειτουργία της συσκευής βασίζεται στη συνεχή καταγραφή φθορίζοντων σημάτων και στην επεξεργασία τους. Η διαδικασία διαρκεί επτά ημέρες και η πορεία της μπορεί να ελέγχεται μέσω μίας οθόνης που απεικονίζει συνεχώς τα σήματα που καταγράφονται.



Εικόνα 2.16 Συσσκευή αλληλούχισης ABI SOLiD.

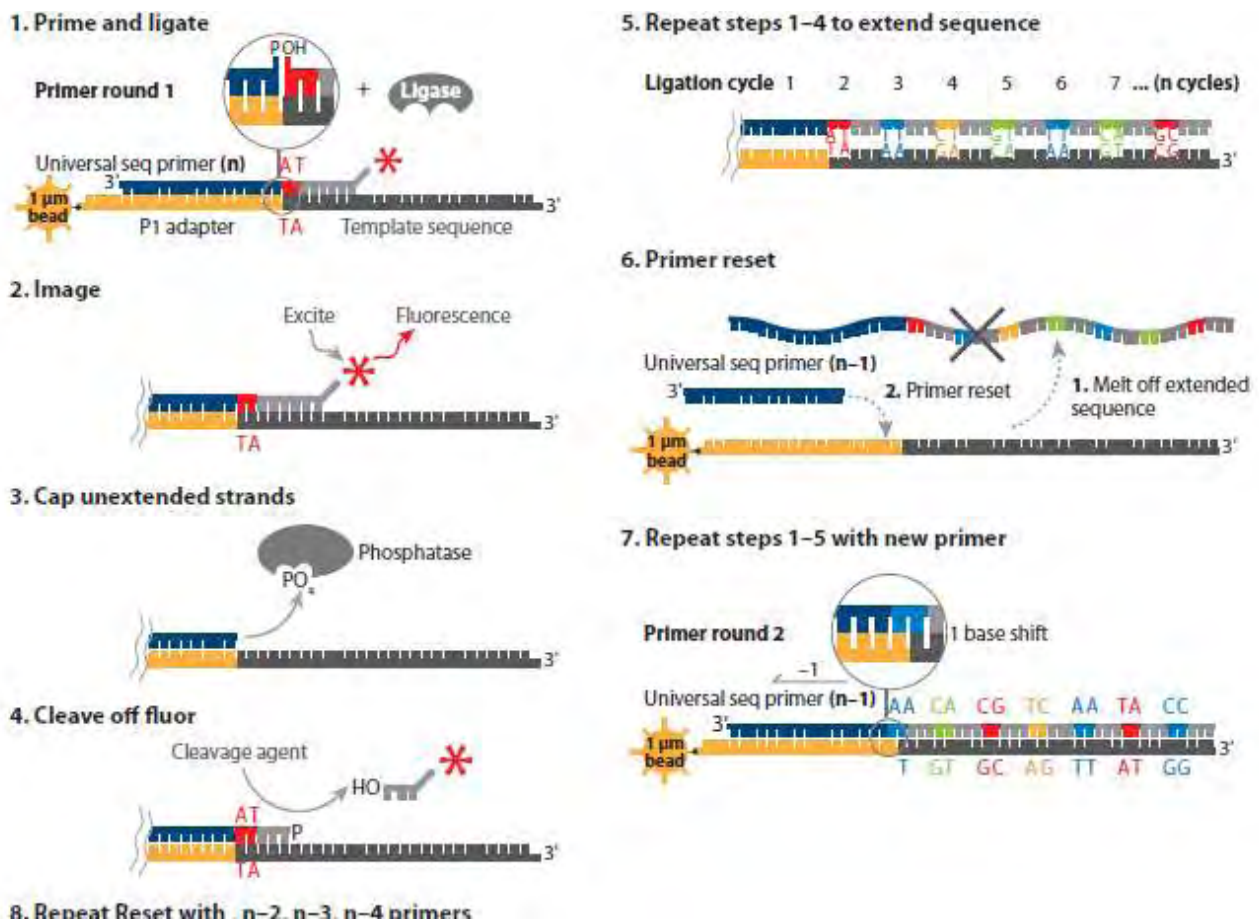
Η ανάγνωση της αλληλουχίας βασίζεται στη χρήση μορίων ανιχνευτών (probes) σημασμένων με τέσσερις διαφορετικές χρωστικές. Οι ανιχνευτές αποτελούνται από οχτώ νουκλεοτίδια, εκ των οποίων τα δύο πρώτα είναι γνωστά, τα επόμενα τρία είναι εκφυλισμένα και τα τρία τελευταία είναι κοινά σε όλους (εικόνα 2.17).



Εικόνα 2.17 Μόρια ανιχνευτές (probes)

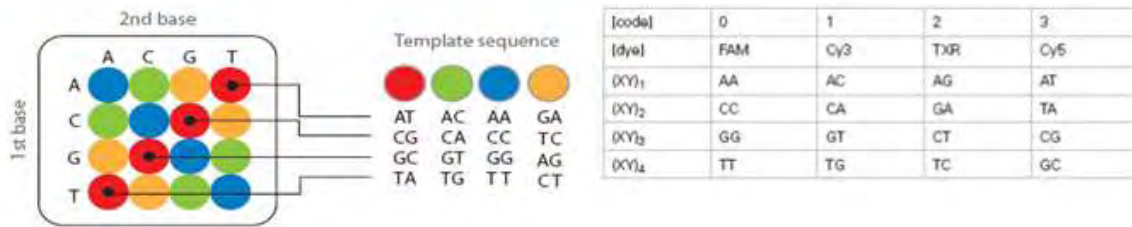
Στο ξεκίνημα της η διαδικασία της αλληλούχισης περιλαμβάνει την υβριδοποίηση ενός εκκινήτη στην P1 αλληλουχία του μορίου που πρόκειται να αλληλουχηθεί και έπειτα την υβριδοποίηση ενός probe του οποίου τα γνωστά νουκλεοτίδια είναι συμπληρωματικά με τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του υπό εξέταση τμήματος DNA. Αφού υβριδοποιηθεί ο probe, η συσκευή αλληλούχισης λαμβάνει το φθορίζον σήμα από τη χρωστική. Μετά την καταγραφή του σήματος πραγματοποιείται αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του εκκινήτη των τμημάτων στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση ενός probe και συνεπώς δεν παρείχαν σήμα στον

πρώτο κύκλο, έτσι ώστε να μην μπορούν να υβριδοποιηθούν άλλοι probes. Παράλληλα αποκόπτονται τα τρία τελευταία νουκλεοτίδια κάθε υβριδοποιημένου probe μαζί με τη συζευγμένη χρωστική. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί και έπειτα η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα αποκόπτεται για να υβριδοποιηθεί ένας νέος εκκινητής, στο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται μία θέση ανοδικά του νουκλεοτιδίου στο οποίο υβριδοποιήθηκε ο προηγούμενο. Η διαδικασία που περιγράφηκε για τον πρώτο εκκινητή επαναλαμβάνεται και για τον δεύτερο, με τη διαφορά ότι το πρώτο νουκλεοτίδιο τώρα είναι μέρος του P1 και συνεπώς γνωστό. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί, για την αποκωδικοποίηση των χρωμάτων είναι απαραίτητο ένα γνωστό νουκλεοτίδιο της υπό εξέταση αλληλουχίας (εικόνα 2.18).



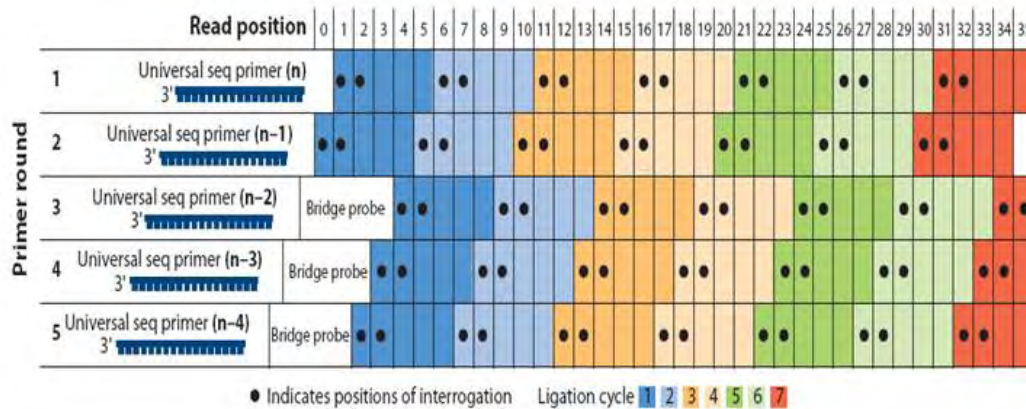
Εικόνα 2.18 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της αλληλούχησης.

Συγκεκριμένα κάθε χρωστική μπορεί να αντιπροσωπεύει τέσσερα διαφορετικά δινουκλεοτίδια της υπό εξέταση αλληλουχίας και για να διαπιστωθεί σε ποια αντιστοιχεί κάθε φορά πρέπει να είναι γνωστή η μία βάση από τις δύο πρώτες στις οποίες έχει υβριδοποιηθεί ο probe. Παραδείγματος χάριν, εάν καταγραφεί κόκκινο χρώμα και είναι γνωστό ότι η πρώτη βάση στην οποία υβριδοποιήθηκε ο probe είναι μία αδενίνη, τότε συμπεραίνεται ότι η δεύτερη βάση είναι μία θυμίνη (Εικόνα 2.19).



Εικόνα 2.19 Αντιστοίχιση των χρωστικών με τα πιθανά δινουκλεοτίδια που αντιπροσωπεύουν.

Τα αποτελέσματα από την παραπάνω διαδικασία μπορούν να απεικονιστούν σε έναν πίνακα, από τον οποίο φαίνεται ότι το φθορίζον σήμα που δίνει ο πρώτος probe που υβριδοποιήθηκε δίπλα στον δεύτερο εκκινητή οδηγεί στην ταυτοποίηση του πρώτου νουκλεοτιδίου της εξεταζόμενης αλληλουχίας. Έπειτα, το φθορίζον σήμα από τον πρώτο probe που υβριδοποιήθηκε δίπλα στον πρώτο εκκινητή ταυτοποιεί το δεύτερο νουκλεοτίδιο της εξεταζόμενης αλληλουχίας. Ακολουθώντας της πορεία που υποδεικνύει ο πίνακας και λαμβάνοντας υπόψη όλους τους κύκλους υβριδοποίησης ταυτοποιούνται όλα τα νουκλεοτίδια των εξεταζόμενων αλληλουχιών (εικόνα 2.20).



Εικόνα 2.20 Πίνακας απεικόνισης των αποτελεσμάτων της αποκωδικοποίησης των φθορίζουσών σημάτων.

Η παραπάνω διαδικασία αφορά την γενική αρχή της διαδικασίας της αλληλούχισης προς μία κατεύθυνση. Με βάση την ίδια αρχή μπορεί να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση και προς τις δύο κατευθύνσεις, για μεγαλύτερη εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Επιπλέον πραγματοποιείται αλληλούχιση της αλληλουχίας «barcode» για την ταυτοποίηση των κλώνων που βρίσκονται σε κάθε μαγνητικό σφαιρίδιο. Τέλος τα αποτελέσματα που παρέχει η συσκευή της αλληλούχισης υφίστανται βιοπληροφορική ανάλυση, που βασίζεται στην αρχή του προγράμματος Blast, για να προκύψει η ολοκληρωμένη αλληλουχία των RNA μορίων του δείγματος [Mardis, 2008] [SOLiD™ 4 System SETS Software, User Guide].

ΣΚΟΠΟΣ

Το θέμα της παρούσας εργασίας είναι η τρανσκριπτομική ανάλυση του δάκου της ελιάς, με σκοπό τον έλεγχο της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης σε ανθεκτικά έντομα στον εντομοκτόνο *spinosad* και σε ευαίσθητα. Η ταυτοποίηση των διαφορετικών προφίλ έκφρασης ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς, μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση των γενετικών τόπων και των βιοχημικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο. Από προηγούμενες μελέτες σε συγγενικούς οργανισμούς μοντέλα προκύπτουν ως κύριοι στόχοι για μελέτη και στον δάκο της ελιάς, ο γενετικός τόπος του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR), των υποδοχέων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), όπως επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του μεταβολισμού του εντομοκτόνου *spinosad*, όπως μονο- οξυγενάσες, εστεράσες και την τρανσφεράση της γλουταθειόνης.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας η γονιδιακή έκφραση ελέγχεται μέσω της τεχνικής Σειριακή Ανάλυση της Γονιδιακής Έκφρασης (SAGE) και της τεχνικής RNA-sequencing. Μετά την εξαγωγή των αποτελεσμάτων ακολουθεί σύγκριση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1) Προέλευση των πληθυσμών *Bactrocera oleae*

Ο εργαστηριακός πληθυσμός προέρχεται από την αποικία του Εργαστηρίου Εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» με κωδικό ΑΤ (από τα αρχικά της Αγίας Τριάδας Ευβοίας, περιοχή από όπου συλλέχθηκε ο φυσικός πληθυσμός που εγκαθιδρύθηκε στο εντομοτροφείο πριν από περίπου 40 χρόνια).

Ο ανθεκτικός εργαστηριακός πληθυσμός αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Προέρχεται από την ανάμιξη του στελέχους από το «Δημόκριτος» με άτομα από φυσικούς πληθυσμούς, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και από την Καλιφόρνια. Το στέλεχος αυτό αναπτύχθηκε κάτω από συνθήκες επιλογής, με συνεχή προσθήκη αυξανόμενης δοσολογίας του εντομοκτόνου Spinosad Success 8000στο νερό εκτροφής. Ανθεκτικότητα 1X αντιστοιχεί σε 1gr συμπυκνωμένου εντομοκτόνου διαλυμένο σε 50gr νερού βρύσης. Μετά από 36 γενιές υπό συνεχή επιλογή η ανθεκτικότητα υπολογίζεται στο ~ 30X.

2) SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

2.1 Απομόνωση RNA (TRIZOL)

Ως αρχικό υλικό χρησιμοποιείται RNA το οποίο απομονώνεται από κεφάλια αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae*. Χρησιμοποιήθηκαν έντομα από τον εργαστηριακό πληθυσμό (εργαστηριακός), και από τον ανθεκτικό στο εντομοκτόνο spinosad (ανθεκτικός). Το RNA είναι ένα ευαίσθητο μόριο το οποίο υφίσταται θραύσεις πολύ εύκολα. Γι αυτό το λόγο οι χειρισμοί θα πρέπει να είναι πολύ προσεκτικοί και να λαμβάνονται μέτρα (εργαστηριακή ποδιά, γάντια, αποστειρωμένος πάγκος και εργαλεία), έτσι ώστε να αποφευχθούν μολύνσεις από ριβονουλεάσες που προκαλούν υδρολυτική πέψη του RNA και από ρύπους γενικότερα.

Υλικά:

- DEPC-treated water
- TRIZOL Reagent
- Παγωμένο PBS
- 70% αιθανόλη
- Ισοπροπυλική αιθανόλη
- Χλωροφόρμιο
- Buffer DNase 10x
- DNase 2u/μl
- DNase Inactivation Reagent
- Πάγος

- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο στους 55°C
- Συσκευή μικροφυγοκέντρισης
- Vortex
- Ξυράφι
- Έμβολα
- Αγαρόζη
- TBE 5X Buffer: Tris-base 54gr, βορικό οξύ 27,5gr, 0,5M EDTA 20ml
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- 6X Loading buffer(0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό της ξυλόλης, 15% φικόλλη ddH₂O)
- 331 Ladder (Fermentas)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Μέθοδος:

A) Προετοιμασία δειγμάτων

1. Τα 10 έντομα από τον εργαστηριακό πληθυσμό τοποθετούνται για 10 λεπτά στους -20°C και ακολουθεί αποκεφαλισμός με τη χρήση ξυραφιού.
2. Τα κεφάλια τοποθετούνται σε σωληνάκι τύπου erpendorf (1,5ml) και ζυγίζονται.
3. Αρχικά προστίθενται 250μl TRIZOL Reagent (γενικά για κάθε 50-100mg ιστού απαιτείται 1ml TRIZOL) και πραγματοποιείται η ομογενοποίηση των ιστών με την χρήση των εμβόλων. Τα έμβολα ξεπλένονται με 250μl TRIZOL (προσοχή: ο όγκος του ιστού δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του όγκου του TRIZOL).
4. Το σωληνάκι παραμένει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (ώστε να γίνει πλήρης διάχυση των νουκλεοτιδίων).
5. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4°C σε 12000rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι με πιπέτα των 200μl.
6. Προστίθενται 100μl χλωροφόρμιου και ανακίνηση με το χέρι (γενικά 0,2ml χλωροφόρμιο για 1ml TRIZOL).
7. Το δείγμα παραμένει για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στους 4°C σε 12000g για 15 λεπτά. Το διάλυμα διαχωρίζεται στις εξής φάσεις:

- χαμηλή φάση με κόκκινο χρώμα η οποία αποτελεί την οργανική φάση (φαινόλη- χλωροφόρμιο) στην οποία περιέχονται οι πρωτεΐνες.
- μεσόφαση στην οποία περιέχεται το DNA
- άνω φάση η οποία αποτελεί την άχρωμη υδατική φάση που περιέχει το RNA. Η υδατική φάση αποτελεί περίπου το 45% του συνολικού όγκου.

B) Κατακρήμνιση του RNA

1. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι με πιπέτα των 200μl, προσεκτικά έτσι ώστε να μη μεταφερθεί μαζί δείγμα της μεσόφασης.
2. Προστίθενται 250μl ισοπροπανόλης (γενικά 0,5ml ισοπροπανόλη για κάθε 1ml TRIZOL) και ακολουθεί ανάδευση με απαλές κινήσεις.
3. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
4. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000g για 45 λεπτά. Το RNA σχηματίζει ένα gel-like ίζημα.
5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 500μl αιθανόλης 75% (γενικά 1ml αιθανόλη για 1ml TRIZOL).
6. Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντριση στους 4°C σε 7500g για 5 λεπτά.
7. Το υπερκείμενο αφαιρείται με πιπέτα των 200μl και τα δείγματα τοποθετούνται στον απαγωγό, με αέρα για περίπου 10 λεπτά έως ότου να στεγνώσουν. Το ίζημα αποχρωματίζεται ελαφρώς (προσοχή: το ίζημα δεν πρέπει να στεγνώσει τελείως γιατί σε αυτή την περίπτωση σκληραίνει πολύ και δεν επαναδιαλύεται).
8. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 30μl DEPC-treated water, σε υδατόλουτρο στους 55°C, για 10 λεπτά.
1. Παρασκευάζεται gel αγαρόζης 1%, 40ml ως εξής: 0,4 gr αγαρόζη σε 40ml 0,5X Buffer TBE + 1,6μl βρωμιούχο αιθίδιο.
9. 3μl από κάθε δείγμα(+1,8μl loading buffer) (προηγείται αραίωση στα 20μl) και 2μl 331 ladder ηλεκτροφορούνται στα 100V για μία ώρα.

2.2 Σύνδεση του mRNA σε μαγνητικά σφαιρίδια

Το mRNA απομονώνεται από το ολικό RNA μέσω της σύνδεσης σε μαγνητικά σφαιρίδια που έχουν συνδεδεμένα στην επιφάνεια τους όλιγοd(T) νουκλεοτίδια. Η

σύνδεση πραγματοποιείται μέσω της υβριδοποίησης των όλιγο(dT) νουκλεοτιδίων με την πολυ(A) ουρά των mRNA.

Υλικά:

- Μαγνητικό στατώ
- Dynal Oligo(dT) Magnetic Beads: 5 mg/ml in PBS containing 0.02% sodium azide
- Wash Buffer A: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% lithium dodecyl sulfate, 10 µg/ml glycogen
- Wash Buffer B: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA, 10 µg/ml glycogen
- Lysis/Binding Buffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% lithium dodecyl sulfate 5 mM DTT
- 1X First Strand Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 µg/ml mussel glycogen

Μέθοδος:

1. 100µl όλιγο(dT) μαγνητικά σφαιρίδια τοποθετούνται σε ένα σωληνάκι.
2. Το σωληνάκι τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
3. Ακολουθεί πλύση με 500µl Lysis/Binding Buffer. Τα μαγνητικά σφαιρίδια αναδιαλύονται στο buffer και πραγματοποιείται ανάδευση με το χέρι.
4. Το σωληνάκι τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
5. Τα βήματα 2 και 3 επαναλαμβάνονται 2-5 φορές.
6. Μετά την τελευταία πλύση τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 200µl Lysis/Binding Buffer
7. Στο δείγμα RNA (27µl) προστίθενται 473µl Lysis/Binding Buffer.
8. Τα 500 µl RNA προστίθενται στο διάλυμα των μαγνητικών σφαιριδίων, αναδεύονται και παραμένουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Το σωληνάκι τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
10. Πραγματοποιείται πλύση με 300µl Wash Buffer A, όπως περιγράφεται παραπάνω.
11. Ακολούθως πραγματοποιείται πλύση με 300µl Wash Buffer B.

12. Τέλος πραγματοποιούνται 4 πλύσεις με 200μl 1X First Strand Buffer. Το υπερκείμενο μετά την τελευταία πλύση απορρίπτεται αμέσως πριν την αντίδραση σύνθεσης της 1^{ης} αλυσίδας του cDNA.

2.3 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση των cDNA μορίων γίνεται με μήτρα τα mRNA που είναι συνδεδεμένα στα μαγνητικά σφαιρίδια. Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT).

Υλικά:

- Υδατόλουτρο στους 16°C, 37°C or 42°C, και 75°C
- Πάγο
- Platinum® Taq DNA Polymerase
- Μαγνητικό στατώ
- 5X First Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂
- dNTP Mix (2.5 each) (BIOLINE)
- Buffer της λιγάσης New England Biolabs
- 1X First Strand Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 μg/ml mussel glycogen
- RNaseOUT™: 40 U/μl in: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 8 mM DTT, 50% glycerol (w/v)
- SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT): 200 U/μl in: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% Nonidet-40 (v/v), 50% glycerol (w/v)
- 1X Buffer 4: 20 mM Tris-acetate, pH 7.9, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 1 mM DTT, 200 μg/ml BSA
- *E. coli* DNA Ligase (10u/μl) New England Biolabs
- *E. coli* DNA Polymerase (10u/μl) Fermentas
- *E. coli* RNase H₁ (3u/μl) Fermentas
- KCl 2M
- Ammonium sulfate 1M
- 0.5 M EDTA: 0.5 M EDTA σε απιονισμένο νερό.
- Wash Buffer C: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 μg/ml mussel glycogen
- Wash Buffer D: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 200 μg/ml BSA

Μέθοδος:

A) Σύνθεση 1^{ης} αλυσίδας

1. Προετοιμάζεται το mix της αντίδρασης ως εξής: 5X First Strand Buffer 18 μl

RNaseOUT™	1 μl
DEPC Water	50μl
<u>dNTP Mix (2.5 mM each)</u>	<u>18 μl</u>
Τελικός όγκος	87 μl

2. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επαναδιαλύονται στο μίχ της αντίδρασης, πραγματοποιείται ανάδευση με το χέρι και επώαση στους 37° C για 2 λεπτά.
3. Προστίθενται 3μl SuperScript™ II Reverse Transcriptase. Ακολουθεί ανάδευση για μία ώρα στους 42° C και ανακίνηση κάθε 15 λεπτά με το χέρι.
4. Η αντίδραση σταματάει με επώαση 1 λεπτού στον πάγο.

B) Σύνθεση της 2^{ης} αλυσίδας

1. Προετοιμάζεται το μίχ της αντίδρασης ως εξής:

DEPC Water	455,75 μl
Buffer της λιγάσης	75μl
KCl 2M	33,75μl
Ammonium sulfate 1M	7,5μl
dNTP Mix (2.5 mM each)	60 μl
<i>E. coli</i> DNA Ligase	5 μl
<i>E. coli</i> DNA Polymerase	20 μl
<u><i>E. coli</i> Rnase H</u>	<u>3 μl</u>
Τελικός όγκος	660 μl

2. Το μίχ προστίθεται στο περιεχόμενο της προηγούμενης αντίδρασης (90μl).
3. Η αντίδραση επωάζεται για 2 ώρες στους 16° C.
4. Κατά τη διάρκεια της επώασης θερμαίνεται το Wash Buffer C στους 75° C.
5. Η αντίδραση σταματά με επώαση στον πάγο και προσθήκη 45μl 0.5 M EDTA.
6. Το σωληνάκι τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προστίθενται 750μl θερμό Wash Buffer C για να απενεργοποιηθεί η πολυμεράση.
7. Το περιεχόμενο θερμαίνεται στους 75° C για 10-12 λεπτά, με τακτική ανακίνηση.
8. Το σωληνάκι τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Πραγματοποιείται άλλη μία πλύση με 750μl Wash Buffer C (προσοχή: η διαδικασία πραγματοποιείται γρήγορα για να

μην γίνει κατακρήμνιση του SDS, το οποίο μπορεί να παγιδεύσει τα σφαιρίδια).

9. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 750μl Wash Buffer D και επαναδιάλυση σε 750μl.
10. Το σωληνάκι τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 200μl 1X Buffer 4.
11. Το περιεχόμενο του σωληνάκι μεταφέρεται σε νέο (για να αποφευχθεί πιθανή δράση εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης). Πραγματοποιείται πλύση του παλιού με 200μl 1X Buffer 4, τα οποία μεταφέρονται στη συνέχεια στο νέο σωληνάκι.
12. Το σωληνάκι τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Το περιεχόμενο επαναδιαλύεται σε 200μl 1X Buffer 4.
13. Το σωληνάκι φυλάσσεται overnight (O/N) στους 4° C.

2.4. Πέψη των cDNA μορίων με το ένζυμο NlaIII

Την σύνθεση των cDNA μορίων ακολουθεί η πέψη με το ένζυμο αγκυροβόλησης (Anchoring enzyme) NlaIII. Το ένζυμο αυτό κόβει το DNA περίπου κάθε 250bp και αφήνει μονόκλωνα άκρα μήκους τεσσάρων νουκλεοτιδίων (GTAC). Το NlaIII είναι πολύ ευαίσθητο στις υψηλές θερμοκρασίες, γι αυτό το λόγο πρέπει η προσθήκη του να γίνεται γρήγορα και να επιστρέφει άμεσα στους -80°C.

Υλικά:

- Υδατόλουτρο στους 37°C
- Μαγνητικό στατώ
- 10X Buffer 4 (New England Biolabs)
- Nla III (New England Biolabs)
- 100X BSA: 10 mg/ml BSA in: 20 mM potassium phosphate, pH 7, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol (w/v)
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- Wash Buffer C: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 μg/ml mussel glycogen
- Wash Buffer D: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 200 μg/ml BSA

Μέθοδος:

1. Προετοιμάζεται το mix της αντίδρασης ως εξής:

LoTE	172 μl
100X BSA	2 μl
10X Buffer 4	20 μl
<u>Nla III</u>	<u>6 μl</u>
<hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/>	
Τελικός όγκος	200 μl
2. Το σωληνάκι με το δείγμα τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προστίθεται το mix της αντίδρασης.
3. Η αντίδραση επωάζεται στους 37° C για μία ώρα. Παράλληλα θερμαίνεται το Wash Buffer C στους 37° C.
4. Το σωληνάκι με την αντίδραση τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Πραγματοποιείται πλύση με 750μl Wash Buffer C (απενεργοποίηση του ενζύμου).
5. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 750 μl Wash Buffer D και ακολουθεί επαναδιάλυση σε 750 μl Wash Buffer D.

2.5 Σύνδεση των LS Adaptors

Ακολουθεί σύνδεση των LS Adaptors στα μονόκλωνα άκρα που προέκυψαν από την πέψη με το ένζυμο NlaIII. Οι LS Adaptors περιέχουν ένα μονόκλωνο άκρο μήκους τεσσάρων νουκλεοτιδίων συμπληρωματικό με τα μονόκλωνα άκρα των μορίων cDNA, θέσεις εκκίνησης για PCR ενίσχυση και μία θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού τύπου II MmeI (Tagging Enzyme), στο 3' άκρο τους. Η σύνδεση τους πραγματοποιείται μέσω της υβριδοποίησης των μονόκλωνων άκρων τους στα μονόκλωνα άκρα των cDNA μορίων.

Η αλληλουχία των LS Adaptors είναι η εξής:

LS Adapter A

5' TTTGGATTTGCTGGTGCAGTACAAGCTAGGCTTAATATCCGACATG 3'

3' amino(C7) CCTAAACGACCACGTCATGTTGATCCGAATTATAGGCT PO4 5'

LS Adapter B

5' TTTCTGCTCGAATTCAAGCTTCTAACGATGTACGTCCGACATG 3'

3' amino(C7) GACGAGCTTAAGTTCGAAGATTGCTACATGCAGGCT PO4 5'

Υλικά:

- Υδατόλουτρο στους 50°C, 37°C και 16°C
- Πάγος
- Μαγνητικό στατώ
- 10X Ligase Buffer (Fermentas)

- 1X Ligase Buffer: 10X Ligase Buffer αραιώνεται σε συγκέντρωση 1X σε DEPC water
- T4 DNA Ligase (1u/μl) (Fermentas)
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- Wash Buffer D: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 200 μg/ml BSA
- LS Adapter A: 40 ng/μl double-strand DNA in LoTE
- LS Adapter B: 40 ng/μl double-strand DNA in LoTE

Μέθοδος:

1. Το σωληνάκι με το δείγμα τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
2. Πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με 150 μl of 1X Ligase Buffer και επαναδιάλυση σε 150 μl of 1X Ligase Buffer.
3. Το δείγμα μοιράζεται με προσοχή σε δύο νέα σωληνάκια (A + B).
4. Κάθε σωληνάκι πλένεται με 50μl 1X Ligase Buffer και πραγματοποιείται αναδιάλυση με 50μl 1X Ligase Buffer.
5. Τα σωληνάκια τοποθετούνται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
6. Τα σωληνάκια μεταφέρονται στον πάγο και σε κάθε ένα προστίθεται το mix αντίδρασης σύνδεσης:

	Tube A	Tube B
LS Adapter A (40 ng/μl)	0.6 μl	—
LS Adapter B (40 ng/μl)	—	0.6 μl
LoTE	31.4 μl	31.4 μl
<u>10X Ligase Buffer</u>	<u>4.0 μl</u>	<u>4.0 μl</u>
Total Volume	36 μl	36 μl

7. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 50°C, για 1 λεπτό. Τα σωληνάκια παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο.
8. Προστίθενται 4μl T4 DNA ligase σε κάθε σωληνάκι και το περιεχόμενο αναδεύεται καλά.
9. Η αντίδραση επωάζεται για 2 ώρες στους 16° C, με συχνή ανάδευση.
10. Πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με 500μl Wash Buffer D και επαναδιάλυση σε 500μl Wash Buffer D.

2.6 Πέψη με το ένζυμο σήμανσης (Tagging Enzyme)

Το ένζυμο Mmef συνδέεται στη θέση αναγνώρισης που βρίσκεται στους LS Adaptors και κόβει τα cDNA μόρια περίπου 21bp καθοδικά της θέσης αναγνώρισης. Από την πέψη αυτή απελευθερώνονται μόρια ετικέτες (tags) με μήκος περίπου 60bp με ένα προεξέχον άκρο 2bp. Η ετικέτα αποτελείται από μία αλληλουχία περίπου 40bp του μορίου προσαρμογέα και μία αλληλουχία περίπου 21bp που αντιστοιχεί σε ένα τμήμα ενός mRNA μορίου.

Υλικά:

- Υδατόλουτρο στους 37° C
- Πάγος
- LoTE: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- Αιθανόλη 100%, 70%
- SAM 32 mM S-adenosylmethionine
- DEPC- treated water
- 10X Buffer 4 (New England Biolabs)
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- Mmef I (2u/μl) (New England Biolabs)

Μέθοδος:

1. Παρασκευή διαλύματος 10X SAM: SAM 32Mm 1μl
DEPC water σε 80μl
2. Παρασκευή διαλύματος 1X Buffer 4/ 1X SAM: SAM 32Mm 1μl
1X Buffer 4 σε 800μl
3. Τα σωληνάκια τοποθετούνται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
4. Πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με 200μl 1X Buffer 4/ 1X SAM, σε κάθε σωληνάκι. Προσεκτικά αφαιρείται το υπερκείμενο και τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο.
5. Σε κάθε ένα σωληνάκι προστίθεται το mix της αντίδρασης:
LoTE 70 μl
10X Buffer 4 10 μl
10X SAM (400 μM) 10 μl

$\frac{Mme I}{\text{Τελικός όγκος}} = \frac{10 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}$

6. Η αντίδραση επωάζεται στους 37° C για 2.5 ώρες με τακτική ανάδευση.
7. Το σωληνάκι με την αντίδραση τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό στατώ για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι. Το υπερκείμενο περιέχει τις ετικέτες.

2.7 Δημιουργία δι-ετικετών (ditags)

Μετά από την πέψη με το ένζυμο MmeI ακολουθεί μία αντίδραση σύνδεσης των ετικετών για να σχηματιστούν διπλές ετικέτες (ditags) μήκους περίπου 130bp.

Υλικά:

- Υδατόλουτρο στους 16°C και 37°C
- Πάγος
- Αιθανόλη 100% και 70%
- Φαινόλη/ Χλωροφόρμιο
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- DEPC- treated water
- 3mM Tris-HCl pH 7.5
- Mussel Glycogen 20 mg/ml in DEPC-treated water
- 10X Ligase Buffer (Fermentas)
- T4 DNA Ligase (1u/μl) (Fermentas)
- 7.5 M Ammonium Acetate in DEPC-treated water

Μέθοδος:

1. Το περιεχόμενο του σωληνάκι A μεταφέρεται στο σωληνάκι B (Vτελ=200μl)
2. Πραγματοποιείται πλύση του σωληνάκι A με 100μl LoTE, τα οποία μεταφέρονται στο σωληνάκι B.
3. 150μl φαινόλη και 150μl χλωροφόρμιο προστίθενται στο σωληνάκι B και αναδεύονται με vortex. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά, full speed σε συσκευή μικροφυγοκέντρισης.
4. Η υδατική φάση (300μl) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και αναδεύεται γρήγορα.
5. 200μl από το σωληνάκι μεταφέρονται σε νέο και αποτελούν το δείγμα.

6. Στα 100μl που περίσσεψαν στο αρχικό σωληνάκι προστίθενται 100μl DEPC water. Το περιεχόμενο αυτού του σωληνάκι αποτελεί το negative control.
7. Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 160 μl 7.5 M ammonium acetate, 3 μl mussel glycogen, and 1 ml 100% αιθανόλη.
8. Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση, επώαση στους -20° C και φυγοκέντριση full speed σε συσκευή μικροφυγοκέντρισης για 30 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο από κάθε σωληνάκι.
9. Το ίζημα σε κάθε σωληνάκι πλένεται 2 φορές με 1ml αιθανόλη 70%. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και το ίζημα στεγνώνει για 5-10 λεπτά.
10. Το δείγμα αναδιαλύεται σε 7 μl LoTE, ενώ το negative control σε 2μl.
11. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης των tags σε ditags ως εξής:

	2X Ditag Reaction	2X Negative Control
3 mM Tris-HCl, pH 7.5	2.4 μl	2.25 μl
10X Ligase Buffer	1.4 μl	0.75 μl
DEPC Water	1.4 μl	0.75 μl
T4 DNA Ligase(1u/μl)	1.8 μl	—

12. Προσθέτονται 7μl του mix 2X Ditag Reaction στο δείγμα και 2μl του 2X Negative Control στο negative control.
13. Έπεται επώαση στους 16° C overnight.

2.8 PCR ενίσχυση των ditags και εκτίμηση του προϊόντος

Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται PCR ενίσχυση των ditags για να γίνει προσδιορισμός της ποιότητας και της ποσότητας τους. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος περίπου 130bp. Για τον σκοπό αυτό ηλεκτροφορείται και ένα δείγμα ως θετικό control. Για την συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας απαιτούνται ditags σε ποσότητα 20-200μg. Κατά την ενίσχυση PCR η προσθήκη του ενζύμου πρέπει να γίνεται τελευταία.

Η αλληλουχία των εκκινητών είναι η εξής:

LS DTP-1 5'-GTGCTCGTGGGATTTGCTGGTGCAAGTACA-3'

LS DTP-2 5'-GAGCTCGTGTGCTCGAATTCAAGCTTCT-3'

Υλικά:

- HOT START KAPPA Taq DNA Polymerase 5u/μl

- DEPC-treated water
- Πάγος
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- DEPC water
- dNTP Mix (2,5 mM each) (BIOLINE)
- 5X Buffer της HOT START KAPPA *Taq* DNA Polymerase
- DMSO
- LS Ditag Primer-1 (LS DTP-1) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- LS Ditag Primer-2 (LS DTP-2) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- Αγαρόζη
- TBE 5X Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- 6X Loading buffer
- ΦX Ladder
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Μέθοδος:

2. Στο negative control προστίθενται 10μl LoTE ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τον όγκο του δείγματος (14μl).
3. Πραγματοποιούνται οι εξής αραιώσεις:
 - α) 1/40 δείγμα (1μl δείγμα + 39 νερό)
 - β) 1/100 δείγμα (1μl δείγμα + 99μl νερό)
 - γ) 1/20 negative control (1μl negative control + 10μl νερό)
4. Mix της αντίδρασης PCR (X3):

5X Buffer της HOT START KAPPA <i>Taq</i> DNA Pol	10μl
DMSO	3μl
dNTP Mix (2,5 mM each)	4μl
LS DTP-1	1μl
LS DTP-2	1μl
DEPC Water	26,5μl
HOT START KAPPA <i>Taq</i> DNA Pol	0,5μl
MgCl 25mM	3μl
Τελικός όγκος	49μl

5. 1μl από κάθε αραιωση προστίθεται σε κάθε ένα mix.

Συνθήκες της αντίδρασης

Θερμοκρασία Χρόνος Κύκλοι

95°C	2 min	1
95°C	30 sec	
55°C	1 min	
70°C	1 min	27
70°C	5 min	1

6. Παρασκευάζεται gel αγαρόζης 4%, 80ml ως εξής: 3,2 gr αγαρόζη σε 80ml 0,5X Buffer TBE + 5μl βρωμιούχο αιθίδιο.
7. 5μl από κάθε δείγμα(+3μl loading buffer) και 1 μl ΦX ladder ηλεκτροφορούνται στα 110V για 3 ώρες.

2.9 Scale-up PCR

Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει re-PCR αντιδράσεις των επιθυμητών προϊόντων του προηγούμενου σταδίου, έτσι ώστε να αποκτηθεί η κατάλληλη ποσότητα για τον σχηματισμό των αλυσομερών.

Υλικά:

- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit - Promega
- HOT START KAPPA Taq DNA Polymerase 5u/μl
- DEPC-treated water
- Πάγος
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- DEPC water
- dNTP Mix (2.5 mM each) (BIOLINE)
- 5X Buffer της HOT START KAPPA Taq DNA Polymerase
- DMSO
- LS Ditag Primer-1 (LS DTP-1) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- LS Ditag Primer-2 (LS DTP-2) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- Αγαρόζη
- TBE 5X Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- 6X loading buffer
- ΦX Ladder
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Μέθοδος:

1. Αρχικά ηλεκτροφορούνται τα 45μl των δειγμάτων (1/40, 1/100) και 20μl από το negative control σε gel αγαρόζης 4%, στα 110V.

2. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στις 134bp απομονώνονται από το gel με το kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit - Promega*, ως εξής:
3. Οι επιθυμητές ζώνες κόβονται από το gel, τοποθετούνται σε σωληνάκια (1,5ml) και προσδιορίζεται το βάρος τους.
4. Για κάθε 10ng πηκτώματος προστίθενται 10μl Membrane Binding Solution.
5. Το μίγμα επώζεται στους 65° C με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα έως ότου τηχθεί.
6. Επώαση σε στήλη CSV Minicolumn η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής Collection tube. Ακολουθεί επώαση για 1 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (απορρίπτεται το υπερκείμενο και ανατοποθετείται η στήλη στο tube συλλογής).
7. Προστίθενται 700μl Membrane Wash Solution και πραγματοποιείται φυγοκέντρου για 5 λεπτά στις 16000g.
8. Το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη 500μl Membrane Wash Solution.
9. Απορρίπτεται το περιεχόμενο του Collection tube και επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση για 1 λεπτό με ανοιχτό το καπάκι της φυγόκεντρου για να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.
10. Η Minicolumn μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθενται 50μl Nuclease-free water.
11. Το περιεχόμενο επώζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται σε ένα λεπτό στις 1600g έτσι ώστε να γίνει η έκλυση του DNA.
12. Τα δείγματα που απομονώθηκαν από το gel ενισχύονται με re-PCR με το παρακάτω mix (X2):

5X Buffer της HOT START KAPPA <i>Taq</i> DNA Pol	10μl
DMSO	3μl
dNTP Mix	5μl
LS DTP-1(350ng/μl)	1μl
LS DTP-2 (350ng/μl)	1μl
DEPC Water	22,5μl
HOT START KAPPA <i>Taq</i> DNA Pol	0,5μl
MgCl 3mM (αραίωση από 25mM)	6μl

Τελικός όγκος

49μl

13. Σε κάθε mix προστίθεται 1μl από τις αραιώσεις του δείγματος (1/40, 1/100)

Συνθήκες της αντίδρασης

Θερμοκρασία Χρόνος Κύκλοι

95°C	3min	1
95°C	30 sec	
55°C	1 min	
70°C	1 min	27
70°C	5 min	1

14. Τα προϊόντα της re-PCR ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 4%, με προσθήκη 3μl χρωστικής, και 1μl ΦX ladder.

15. Πραγματοποιείται ξανά re-PCR σε 48 δείγματα από το gel extraction (24 δείγματα (1μl) από την αραιώση 1/40 και 24 δείγματα (1μl) από τη αραιώση 1/100), όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.10 Καθαρισμός των ditags (~130bp)

Τα προϊόντα της PCR καθαρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%, έτσι ώστε να διαχωριστούν οι ditags (~130bp) από προϊόντα μόλυνσης (~100bp). Η ζώνη των ditags απομονώνεται, εκλούεται από το gel και καθαρίζεται με στήλη φυγοκέντρισης.

Υλικά:

- Φαινόλη/χλωροφόρμιο
- CH₃COONa
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%,100%
- Ακρυλαμίδιο
- Bis-ακρυλαμίδιο
- TAE 1X: 40 mM Tris, H 8.4, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA
- APS 10% w/v: 1 gr ammonium persulfate διαλύεται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 10 ml.
- TEMED
- TBE 5X Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Elution Buffer: 0,5M ammonium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM EDTA, 0,1% SDS
- Υαλοβάμβακας

- Γλυκογόνο
- Ladder Pbr32 DNA/ BsuR1
- Χρωστική: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό της ξυλόλης, 30% γλυκερόλη σε νερό
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- Αγαρόζη
- TBE 5X Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- 6X loading buffer
- Συσκευή κάθετης και οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Μέθοδος:

1. Τα προϊόντα της PCR ενώνονται σε 3 νέα σωληνάκια των 2 ml και υπολογίζεται ο όγκος.
2. Προστίθεται 1V φαινόλη/χλωροφόρμιο σε κάθε σωληνάκι και πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 10 min
3. Η πάνω φάση από κάθε σωληνάκι μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθενται τα παρακάτω:
 - 1° 760μl δείγμα + 76μl CH₃COONa + ισοπροπανόλη 760μl
 - 2° 650μl δείγμα + 65μl CH₃COONa + ισοπροπανόλη 650μl
 - 3° 800μl δείγμα + 80μl CH₃COONa + ισοπροπανόλη 800μl
4. Πραγματοποιείται πλύση με αιθανόλη 70%
5. Τα ιζήματα που σχηματίζονται επαναδιαλύονται σε LoTE και ενώνονται σε ένα σωληνάκι ώστε Vτελ= 300μl
6. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12%, 70ml. Η πηκτή παρασκευάζεται ως εξής:

Πολυακρυλαμίδιο 50%	17ml
TBE 5X	14ml
H ₂ O	39ml
TEMED	70ml
APS 10%	700μl (προστίθεται τελευταίο)

Το πολυακρυλαμίδιο 50% παρασκευάζεται ως εξής:

Τα 100ml διαλύματος περιέχουν 50gr ακρυλαμίδιο
Άρα Τα 150ml διαλύματος περιέχουν 75gr ακρυλαμίδιο.

Χρειάζονται 29 μέρη ακρυλαμιδίου και 1 μέρος Bis-ακρυλαμίδιο.
Συνεπώς 72,5gr ακρυλαμιδίου και 2,5gr Bis-ακρυλαμίδιο και 60ml νερό
προστίθενται σε μία φιάλη. Ακολουθεί ανάδευση με θέρμανση. Το διάλυμα
διηθείται και προστίθεται νερό ως τα 150ml. Το διάλυμα μεταφέρεται σε νέα
φιάλη.

7. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με 2,5 lit TBE 1X
8. Στο σωληνάκι με το δείγμα προστίθενται 72μl χρωστικής
9. Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 30μl δείγματος, και ηλεκτροφορούνται στα 160V για 5 ώρες
10. Ακολουθεί η χρώση του πηκτώματος με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 1μg/μl, για 30 λεπτά στο shaker.
11. Απομονώνονται οι ζώνες που έχουν μέγεθος περίπου 130bp με ξυράφι και τοποθετούνται σε 2 σωληνάκια.
12. Υπολογίζεται το βάρος των δειγμάτων: σωληνάκι A 0,402 gr + B 0,560 gr
13. Με ένα έμβολο ομογενοποιείται το gel και προστίθεται elution buffer, δύο φορές τον αρχικό όγκο.
14. Τα σωληνάκια καλύπτονται με parafilm και επωάζονται στους 37° C overnight.
15. Τα δείγματα από τους 37° C φυγοκετρώνονται για 1 λεπτό και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 2 νέα σωληνάκια.
16. Προστίθενται 500μl elution buffer στα ιζήματα, αναδεύονται με vortex και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό.
17. Το υπερκείμενο από κάθε σωληνάκι ενώνεται με το υπερκείμενο από το στάδιο 15.
18. Κατασκευάζονται στήλες έκλουσης ως εξής: δημιουργείται με βελόνα μία τρύπα στη βάση 2 σωληνάκια των 500μl και γεμίζονται με υαλοβάμβακα. Οι κολώνες τοποθετούνται μέσα σε σωληνάκια των 1,5ml.

19. Η στήλη γεμίζεται σιγά σιγά με 500μl του δείγματος και πραγματοποιείται φυγοκέντριση για μισό λεπτό σε χαμηλή ταχύτητα.
20. Στο διάλυμα που συλλέγεται προστίθεται 0,5μl γλυκογόνου και 2,5V αιθανόλη 100% (σε κάθε σωληνάκι).
21. Ακολουθεί επώαση στους -20° C για 2 ώρες και φυγοκέντριση για 25 λεπτά max speed.
22. Πραγματοποιείται πλύση με 200μl αιθανόλη 70% και τα δείγματα ενώνονται σε ένα σωληνάκι. Το περιεχόμενο φυγοκεντρείται για 5-7 λεπτά.
23. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα στεγνώνει για 5-10 λεπτά.
24. Επαναδιάλυση σε 50μl LoTE.
25. 2μl του δείγματος και 1,5 μl του ladder Pbr32 DNA/ BsuR1 ηλεκτροφορούνται σε gel αгарόζης 2%.

2.11 Πέψη των ditags με το ένζυμο NlaIII

Η πέψη των ditags 130 bp με το ένζυμο NlaIII παράγει ditags 34 bp. Είναι σημαντικό να επιτευχθεί ποσοστό πέψης μεγαλύτερο από 80% έτσι ώστε να αποκτηθεί επαρκής ποσότητα ditags 34 bp.

Υλικά:

- Υδατόλουτρο στους 37°C
- Πάγος
- Αιθανόλη 100%, 70%
- Φαινόλη/ Χλωροφόρμιο
- 10X Buffer 4 (New England Biolabs)
- Nla III (10u/μl) (New England Biolabs)
- 100X BSA: 10 mg/ml BSA in: 20 mM potassium phosphate, pH 7, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol (w/v)
- DEPC water
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- CH₃COONH₄ 7.5M
- Γλυκογόνο
- Αγαρόζη
- TBE 5X Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο

- 6X loading buffer
- Low Molecular DNA Ladder (New England Biolabs)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Μέθοδος:

1. Η αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής:

10X Buffer 4	45μl
<i>Nla</i> III	15μl
100X BSA	2μl
DEPC water	86μl
<u>Δείγμα</u>	<u>45μl</u>
Τελικός όγκος 150μl	
2. Η αντίδραση επώζεται για 2 ώρες στους 37° C.
3. Ο όγκος προσαρμόζεται στα 200μl με προσθήκη 50μl LoTE.
4. 5μl του δείγματος και 1,5μl low molecular ladder ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 4%.
5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη. Αρχικά προστίθενται 100μl φαινόλη και 100μl χλωροφόρμιο
6. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση και μεταφέρεται η πάνω φάση (περίπου 200μl) σε νέο σωληνάκι.
7. Σε αυτό το σωληνάκι 96,5μl CH₃COONH₄ 7.5M, 3μl γλυκογόνο και 850μl αιθανόλη 100%.
8. Το περιεχόμενο του σωληνάκι επώζεται στους -80° C για μία ώρα.
9. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 30 λεπτά και έπειτα δύο πλύσεις με αιθανόλη 70%.
10. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 32μl LoTE και παραμένει στους 4° C overnight.

2.12 Καθαρισμός των ditags (~34bp)

Οι ditags (~34bp) καθαρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδιου 12%.

Υλικά:

- Ακρυλαμίδιο
- Bis-ακρυλαμίδιο

2.14 Κλωνοποίηση αλυσομερών σε φορέα

Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει αρχικά την δημιουργία τυφλών άκρων στα μόρια DNA (αλυσομερή) και έπειτα την αντίδραση σύνδεσης των αλυσομερών στον φορέα κλωνοποίησης pBS EcoRV CIAP (40ng/μl). Η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο.

$$\text{ng ενθέματος} = [(\text{ng φορέα} \times \text{ng ενθέματος}) / \text{Kb φορέα}] \times 3/1$$

Υλικά:

- Φορέας κλωνοποίησης pBluescript II SK (40ng/μl)
- T4 DNA ligase (1u/μl) (Fermentas)
- Buffer ligase 10X (Fermentas)
- Νερό
- T4 DNA polymerase
- 5X Buffer της T4 DNA polymerase
- dNTPs (2.5mM each)

Μέθοδος:

1. Αντίδραση δημιουργίας τυφλών άκρων:

T4 DNA polymerase	0,2μl
5X Buffer της T4 DNA polymerase	4μl
dNTPs (2.5mM each)	0,8μl
<u>Δείγμα</u>	<u>15μl</u>
Τελικός όγκος	20μl

Η αντίδραση επωάζεται για 20 λεπτά στους 11° C και για 10 λεπτά στους 75° C για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο (φύλαξη στους 4° C O/N).

2. Στα 20μl του δείγματος των αλυσομερών προστίθενται 180μl νερό, ώστε να προκύψει τελικός όγκος 200μl.
3. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση σε 6,75μl νερό.
4. Αντίδραση σύνδεσης:

Δείγμα (7ng)	6,75μl
--------------	--------

Φορέας (50ng)	1,25μl
T4 DNA ligase (1u/μl)	1μl
Buffer ligase 10X	1μl
Τελικός όγκος	10μl

5. Η αντίδραση επωάζεται για 2,5 ώρες στους 22° C.

2.15 Μετασηματισμός του βακτηρίου E. Coli

Σε αυτό το στάδιο παρασκευάζονται δεκτικά κύτταρα E. Coli για κλωνοποίηση, από glycerol stock. Τα τοιχώματα των κυττάρων γίνονται διαπερατά σε μόρια DNA μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation). Έπειτα μετασηματίζονται με την είσοδο του φορέα. Έπειτα ακολουθεί διαλογή των κυττάρων που έχουν λάβει τον φορέα με βάση την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Επιπλέον επιλέγονται έχουν λάβει τον φορέα με το ένθεμα με βάση την αδυναμία μεταβολισμού της ουσίας X-gal.

2.15.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για κλωνοποίηση

Υλικά:

- LB Broth
- NaCl
- ddH₂O
- glycerol stock DH5α
- glycerol 10%
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Τρυβλία, Falcon, κυψελίδες για electroporation, κυψελίδες για φωτομέτρηση, κωνικές φιάλες, σωλήνες
- Bacto-tryptone
- Bacto-yeast extract
- NaCl
- KCl solution 250mM pH 7.2(αποστειρωμένο)
- MgCl₂ 2M
- Glucose 1M
- LB άγαρ
- Stock αμικικιλίνης (100mg/lit)
- Φορέας pUC-19
- X-gal, IPTG

Μέθοδος:

1. Παρασκευή θρεπτικού υλικού για την ανάπτυξη των κυττάρων LB Broth (χωρίς αμικικιλίνη):

Για μία δόση κυττάρων σε μία κωνική φιάλη προστίθενται τα παρακάτω και ακολουθεί αποστείρωση

LB Broth 1,5gr

NaCl 0,5gr

ddH₂O 100ml

Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρασκευάζεται διπλή δόση οπότε οι ποσότητες είναι διπλάσιες.

2. Σε δύο σωλήνες προστίθεται από 1ml θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός με μικροβιολογικό κρίκο από το glycerol stock και επωάζονται overnight στις 210rpm, στους 37° C. Τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται στον πάγο.
3. Προστίθεται 1ml καλλιέργειας ανά 100ml θρεπτικού υλικού σε 2 κωνικές φιάλες.
4. Μετά από 2,5 ώρες πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 600nm (επιθυμητή τιμή 0,46-0,6). Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται 1ml θρεπτικό υλικό.
5. Τα 200ml θρεπτικού υλικού μοιράζονται σε 4X50ml Falcon.
6. Τοποθετούνται στον πάγο για 10min.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στις 4200g, για 15 λεπτά, στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500μl ddH₂O ανά falcon. Ακολουθεί προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 50ml.
8. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση στις 4200g, για 15 λεπτά, στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται γρήγορα (για να μη ξεκολλήσουν τα κύτταρα). Έπεται επαναδιάλυση σε 500μl ddH₂O ανά falcon και προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 50ml.
9. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση στις 4200g, για 15 λεπτά, στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται γρήγορα και το ίζημα επαναδιαλύεται στο υγρό που απέμεινε.
10. Σε κάθε falcon προστίθενται 4ml 10% glycerol.
11. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στις 4200g, για 10 λεπτά, στους 2° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
12. Προστίθενται 250μl 10% glycerol ανά falcon, αναδιαλύεται το ίζημα και μοιράζονται 40μl ανά σωληνάκι.

13. Αποθήκευση στους -80°C .

14. Παρασκευή SOC medium:

	<u>Για 100ml</u>	<u>Για 50ml</u>
ddH ₂ O	950ml	47.5ml
Bacto-tryptone	20gr	1gr
Bacto-yeast extract	5gr	0.25gr
NaCl	0.5gr	0.025gr
KCl solution 250mM pH 7.2(αποστειρωμένο)	10ml	0.5ml
MgCl ₂ 2M	5ml	0.25ml
Glucose 1M	20ml	1ml

Φύλαξη στην κατάψυξη.

15. Παρασκευή LB άγαρ (40gr/lit) για 3 πιάτα

LB άγαρ 3,6gr

ddH₂O 90ml

Τα παραπάνω αναδεύονται καλά και αποστειρώνονται. Μόλις κρυώσουν τόσο ώστε να αντέχει το χέρι, προστίθενται 90ml από το stock αμπικιλίνης (100mg/lit).

16. 30ml LB άγαρ προστίθενται σε κάθε πιάτο και αφήνονται να κρυώσουν. Ακολουθεί τιτλοδότηση των κυττάρων για να διαπιστωθεί πόσα κύτταρα είναι ικανοποιητικά δεκτικά ανά ml (rfu/ml).

17. Το υδατόλουτρο θερμαίνεται στους 60°C , το SOC ξεπαγώνει, μία κυψελίδα ειδική για electroporation τοποθετείται στην κατάψυξη και ετοιμάζεται απιονισμένο νερό για ξέπλυμα της κυψελίδας.

18. Πραγματοποιείται electroporation με τη χρήση του φορέα pUC-19, που είναι ειδικός για τιτλοδότηση.

2μ από τον φορέα προστίθενται ανά 40ml κύτταρα και αναδεύονται με το χέρι. Τα σωληνάκια τοποθετούνται στην κατάψυξη για 1 λεπτό και στη συνέχεια στη σχισμή της κυψελίδας (καλό σκούπισμα της εξωτερικής επιφάνειας της κυψελίδας). Η κυψελίδα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης και πιέζεται το κουμπί pulse. Αμέσως μετά (μέσα σε 1 λεπτό) προστίθενται 700ml SOC medium. Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 45 λεπτά, στις 180 στροφές.

19. Στο δείγμα προστίθενται 30ml X-gal, 3ml IPTG/σωληνάκι.

20. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι εξής αραιώσεις: α) 5/100, β) 10/100, γ) 15/100, σε τελικό όγκο 100μl.
21. Τα κύτταρα επιστρώνονται στα πιάτα με βάση τις αραιώσεις. Ακολουθούν 2-3 στεγνώματα και επώαση overnight στους 37° C, ανάποδα.
22. Μετρούνται οι αποικίες σε κάθε πιάτο και υπολογίζεται ο τίτλος (επιτρεπτά όρια 10⁸-10¹⁰)

2.15.2 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli*

Τα δεκτικά κύτταρα που παράχθηκαν στο προηγούμενο βήμα μετασχηματίζονται με το ένθεμα (αλυσομερή) και επιλέγονται οι ανασυνδιασμένες αποικίες.

Υλικά:

- Μικροβιολογικός κρίκος
- Τρυβλία, Falcon, κυψελίδες για electroporation, κυψελίδες για φωτομέτρηση, κωνικές φιάλες, σωλήνες
- SOC Medium
- LB άγαρ
- Stock αμπικιλίνης (100mg/lit)
- Δεκτικά κύτταρα
- X-gal, IPTG
- Νερό

Μέθοδος:

1. Προετοιμάζονται 4 πιάτα με LB άγαρ(40gr/lit) και 100μl αμπικιλίνη όπως περιγράφηκε στο 2.15.1.
2. Το προϊόν της σύνδεσης αραιώνεται 1:10 (1μl δείγμα + 9μl νερό).
3. Πραγματοποιείται electroporation όπως περιγράφηκε στο 2.15.1.
4. Έπειτα 150μl δείγμα (+30μl X-gal, 3μl IPTG) επιστρώνονται σε κάθε πιάτο. Ακολουθεί επώαση overnight στους 37° C, ανάποδα.
5. Γίνεται έλεγχος για μπλε/άσπρες αποικίες και τα πιάτα τοποθετούνται για τουλάχιστον 2 ώρες στο ψυγείο.
6. Παρασκευάζεται LB άγαρ 100ml (+100μl αμπικιλίνη).

7. Σε 21 σωλήνες (όσες και οι λευκές αποικίες), προστίθεται 3ml LB άγαρ.
8. Με οδοντογλυφίδα επιλέγονται οι άσπρες αποικίες και προστίθεται μία σε κάθε σωλήνα. (Στα παραπάνω βήματα διατηρείται το περιβάλλον αποστειρωμένο με τη χρήση φλόγιστρου)
9. Οι σωλήνες επωάζονται overnight, στους 37° C, στις 210 στροφές.

2.16 Mini Preps

Σε αυτό το στάδιο απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA από τα μετασχηματισμένα βακτήρια και πραγματοποιείται πέψη με το ένζυμο PuVII 10u/μl, για να απελευθερωθούν τα αλυσομερή, τα οποία θα απομονωθούν και θα σταλούν για αλληλούχιση.

Υλικά:

- Glucose 50mM
- Tris HCl 25mM
- EDTA 10Mm
- NaOH 0,5M
- 1%SDS
- Αιθανόλη 100%
- CH₃COOK solution (5M οξικό κάλιο 60ml, 5M παγωμένο οξικό οξύ 11,5ml, νερό 28,5ml)
- TE-Rnase Buffer (200μl/ml) (Fermentas)
- PuVII 10u/μl (Fermentas)
- Buffer 10X (Fermentas)
- Νερό
- Φαινόλη/Χλωροφόρμιο
- 7.5 M Ammonium Acetate in DEPC-treated water

Μέθοδος:

Κύκλος A

1. Παρασκευή GET solution 50ml:

Glucose 50mM	2,5ml
Tris HCl 25mM	1,25ml
EDTA 10mM	1ml
Νερό	έως τα 50ml

Το διάλυμα αποστειρώνεται για 15 λεπτά και έπειτα κρύνει σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Παρασκευή alkali solution:
NaOH 0,5M
1%SDS
3. Τα διαλύματα CH₃COOK solution και GET solution μεταφέρονται στον πάγο.
4. Σε 21 σωληνάκια μεταφέρεται 1,5 ml από τον κάθε σωλήνα και πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 12000g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται σε χλωρίνη.
5. Ακολουθεί προσθήκη σε κάθε σωληνάκι 100μl cold GET solution και ανάδευση με vortex.
6. Προστίθενται 200μl alkali solution και τα σωληνάκια αναδεύονται 4-5 φορές με το χέρι και 150μl CH₃COOK solution και ακολουθεί ανάδευση με vortex.
7. Τα σωληνάκια τοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά.
8. Έπεται φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 1200g και συλλέγεται το υπερκείμενο.
9. Προστίθενται 2V αιθανόλης 100% και επώαση στους -20° C για 15 λεπτά.
10. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 7 λεπτά max speed. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
11. Προσθήκη 250μl αιθανόλη 100% και φυγοκέντριση για 5 λεπτά, max speed. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
12. Ακολουθεί επαναδιάλυση σε 50μl/σωληνάκι TE-Rnase Buffer (200μl/ml).
13. Ακολουθεί πέψη με το ένζυμο RuVII 10u/μl, σε κάθε σωληνάκι ως εξής:

RuVII 10u/μl	0,3μl
Buffer 10X	1,5μl
Νερό	10,7μl
<u>Δείγμα</u>	<u>2,5μl</u>
Τελικός όγκος	15μl

14. Η αντίδραση επώαζεται για 1 ώρα στους 37° C.
15. Τα δείγματα με τον ladder 331 ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 1%.
16. Επιλέγονται τα δείγματα που περιέχουν το ένθεμα και πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη 100%, το ίζημα αναδιαλύεται σε 50μl νερό και τα δείγματα στέλνονται για αλληλούχιση.

ΚΥΚΛΟΣ Β

1. Από τα 10μl του προϊόντος που προέκυψε από την αντίδραση σύνθεσης των αλυσομερών, μέρος αραιώνεται 1/10 (1μl δείγμα + 9μl νερό).
2. Ομοίως με τον κύκλο Α χρησιμοποιούνται 2μl της αραιώσης, επιστρώνονται 12 πιάτα και προκύπτουν 34 δείγματα. Τελικά 21 δείγματα στέλνονται για αλληλούχιση.

ΚΥΚΛΟΣ Γ

1. Πραγματοποιούνται νέες καλλιέργειες και mini preps και προκύπτουν 30 νέα δείγματα. Τελικά στέλνονται για αλληλούχιση 20 δείγματα.

ΚΥΚΛΟΣ Δ

1. Πραγματοποιούνται νέες καλλιέργειες και mini preps και προκύπτουν 18 νέα δείγματα. Τελικά στέλνονται για αλληλούχιση 11 δείγματα.

3.RNA-Sequencing (RNA-Seq)

3.1 Απομόνωση RNA (TRIZOL)

Ως αρχικό υλικό χρησιμοποιείται RNA το οποίο απομονώνεται από κεφάλια αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae*, τα οποία βρίσκονται στην Χ ημέρα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο αρχικοί πληθυσμοί. Ο πρώτος αποτελεί τον εργαστηριακό πληθυσμό (εργαστηριακός), ενώ ο δεύτερος έχει αποκτήσει ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad (ανθεκτικός). Ο σκοπός του συγκεκριμένου σταδίου είναι να απομονωθούν τουλάχιστον 20μg καθαρού RNA, το οποίο θα έχει υποστεί όσο το δυνατόν λιγότερες θραύσεις. Το πειραματικό πρωτόκολλο είναι όμοιο με στο πρωτόκολλο της παραγράφου 1.1 και πραγματοποιείται ένα επιπλέον στάδιο (Dnase treatment).

Υλικά:

- DEPC-treated water
- TRIZOL Reagent
- Παγωμένο PBS
- 70% αιθανόλη
- Ισοπροπυλική αιθανόλη
- Χλωροφόρμιο
- Buffer DNase 10x (Ambion)
- Dnase Turbo (Ambion) 2u/μl
- DNase αντιδραστήριο αδρανοποίησης (Ambion)
- Πάγος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Συσκευή μικροφυγοκέντρωσης
- Vortex
- Ξυράφι
- Έμβολα

Μέθοδος:

A) Προετοιμασία δειγμάτων

1. Τα έντομα τοποθετούνται για 10 λεπτά στους -20°C και ακολουθεί αποκεφαλισμός με τη χρήση ξυραφιού.
2. Οι ιστοί τοποθετούνται σε 4 eppendorfs (1,5ml) ως εξής:

Πληθυσμός	Φύλο	Αριθμός	Eppendorfs
Ανθεκτικός	Αρσενικά	40	1
Ανθεκτικός	Θηλυκά	40	2

Εργαστηριακός	Αρσενικά	40	3
Εργαστηριακός	Θηλυκά	40	4

3. Αρχικά προστίθενται σε κάθε erpendorf 500μl TRIZOL Reagent και πραγματοποιείται η ομογενοποίηση των ιστών με την χρήση των εμβόλων. Τα έμβολα ξεπλένονται με 500μl TRIZOL (προσοχή: ο όγκος του ιστού δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του όγκου του TRIZOL).
4. Τα erpendorfs παραμένουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ακολουθεί φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 4 νέα erpendorfs με πιπέτα των 200μl.
6. Προστίθενται 200μl χλωροφόρμιου και ανακίνηση με το χέρι.
7. Τα δείγματα παραμένουν για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000g για 15 λεπτά. Το διάλυμα διαχωρίζεται στις εξής φάσεις:
 - χαμηλή φάση με κόκκινο χρώμα η οποία αποτελεί την οργανική φάση (φαινόλη- χλωροφόρμιο) στην οποία περιέχονται οι πρωτεΐνες.
 - μεσόφαση στην οποία περιέχεται το DNA
 - άνω φάση η οποία αποτελεί την άχρωμη υδατική φάση που περιέχει το RNA. Η υδατική φάση αποτελεί περίπου το 45% του συνολικού όγκου.

B) Κατακρήμνιση του RNA

1. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέα erpendorfs με πιπέτα των 200μl, προσεκτικά έτσι ώστε να μη μεταφερθεί μαζί δείγμα της μεσόφασης.
2. Προστίθενται 500ml ισοπροπανόλη και ακολουθεί ανάδευση με απαλές κινήσεις.
3. Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
4. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000g για 45 λεπτά. Το RNA σχηματίζει ένα gel-like ίζημα.
5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 1ml αιθανόλης 75%.
6. Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντριση στους 4°C σε 7500g για 5 λεπτά.

7. Το υπερκείμενο αφαιρείται με πιπέτα των 200μl κ τα δείγματα τοποθετούνται στον απαγωγό, με αέρα για περίπου 10 λεπτά έως ότου να στεγνώσουν. Το ίζημα αποχρωματίζεται ελαφρώς.

Γ) Επεξεργασία με DNase

1. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 44μl DEPC-treated water.
2. Η αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής:

RNA/DEPC-treated water	44μl
Buffer DNase 10x	5μl
<u>DNase 2u/μl</u>	<u>1μl</u>
Τελικός όγκος	50μl

Και πραγματοποιείται επώαση στους 37°C για 25 λεπτά.
3. Προστίθενται 5μl DNase αντιδραστήριο αδρανοποίησης και ανάδευση με ελαφριά χτυπήματα (flip).
4. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ανάδευση (flip).
5. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση σε θερμοκρασία δωματίου σε 11000rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο φυλάγεται προσεκτικά (περίπου 45μl RNA/ependorf).
6. 1μl από κάθε δείγμα ηλεκτροφορείται σε gel αγαρόζης 1%.

3.2 Κατασκευή RNA βιβλιοθηκών, αλληλούχιση και βιοπληροφορική ανάλυση

Η ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του δείγματος RNA, η κατασκευή των RNA βιβλιοθηκών, η αλληλούχιση και η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ".

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

Πραγματοποιήθηκε ένας κύκλος longSAGE με αρχικό υλικό 5μg ολικό RNA, το οποίο απομονώθηκε με βάση το πρωτόκολλο TRIZOL (εικόνα 1).



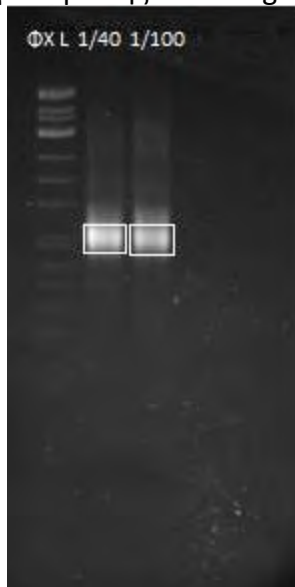
Εικόνα 1.1: Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 1%. Σύμφωνα με τον Ladder 331 στα 3 μl δείγματος (10% του ολικού δείγματος) περιέχονται 0,5μg RNA.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση του mRNA και σύνθεση των cDNA μορίων. Τα μόρια cDNA υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού NlaIII, συνδέθηκαν με κατάλληλα μόρια προσαρμογείς και τελικά συνδέθηκαν για να σχηματίσουν διπλές ετικέτες (ditags). Τα ditags ενισχύθηκαν με PCR και μέρος των προϊόντων της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 4% όπου και διαπιστώθηκε η ύπαρξη μορίων επιθυμητού μήκους (134bp) (εικόνα 1.2).



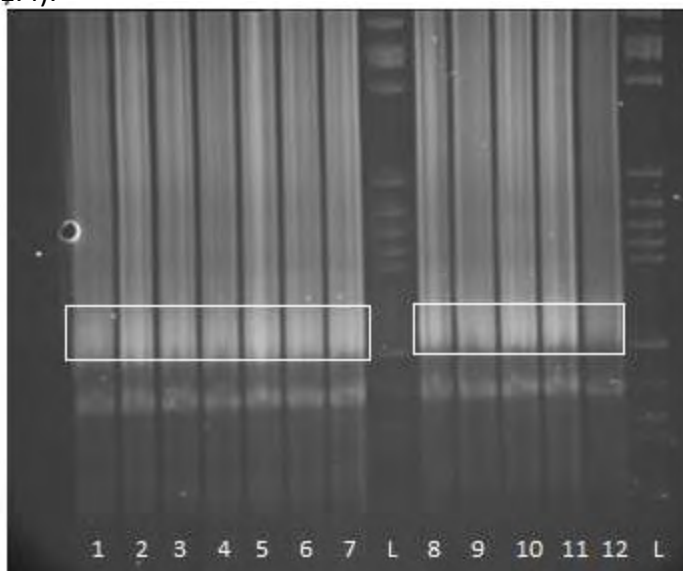
Εικόνα 1.2 Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 4% στα 110V για 3 ώρες. Ηλεκτροφορήθηκαν 5μl από κάθε αραιώση των ditags(+3μl loading buffer) και 1 μl ΦX ladder. Οι σημειωμένες ζώνες έχουν μήκος περίπου 134bp και οι κάτωτερες ζώνες αποτελούν το παραπροϊόν.

Στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε η ποσότητα των δειγμάτων που απέμεινε σε gel αγαρόζης 4% και πραγματοποιήθηκε gel extraction στις επιθυμητές ζώνες (134bp). Πραγματοποιήθηκε re-PCR στα δείγματα από το gel extraction για την αύξηση της συγκέντρωσης των ditags (εικόνα 1.3)



Εικόνα 1.3 Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 4%, στα 110V. Ηλεκτροφορήθηκαν τα 45μl που απέμειναν από τα αραιωμένα δείγματα και ο ΦΧ ladder και επιλέχθηκαν οι επιθυμητές ζώνες (134bp) (σημειωμένες) για gel extraction.

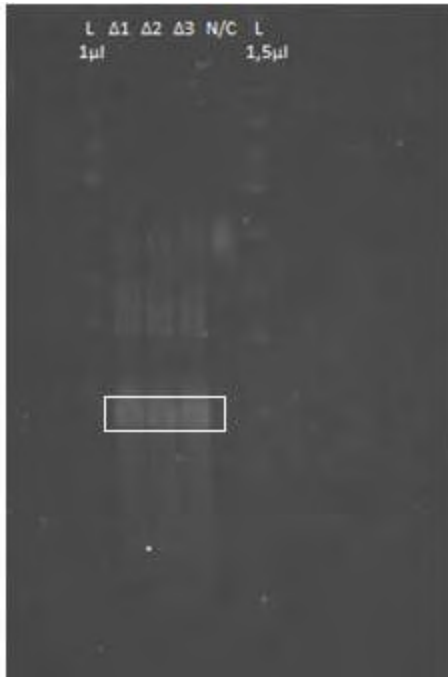
Τα προϊόντα από την παραπάνω ενίσχυση υπέστησαν ακόμη μία αντίδραση re-PCR και τα νέα προϊόντα καθαρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%, έτσι ώστε να διαχωριστούν οι ditags (~130bp) από προϊόντα μόλυνσης (~100bp) (εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4 Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12% για 5 ώρες στα 160V. Ηλεκτροφορήθηκαν 30μl από το δείγμα σε κάθε πηγαδάκι και χρησιμοποιήθηκε ο ΦΧ ladder. Οι σημειωμένες ζώνες είναι οι επιθυμητές και απομονώθηκαν ενώ οι κατώτερες ζώνες (περίπου 100bp) αποτελούν τα διμερή των linkers που προέκυψαν ως παραπροϊόντα.

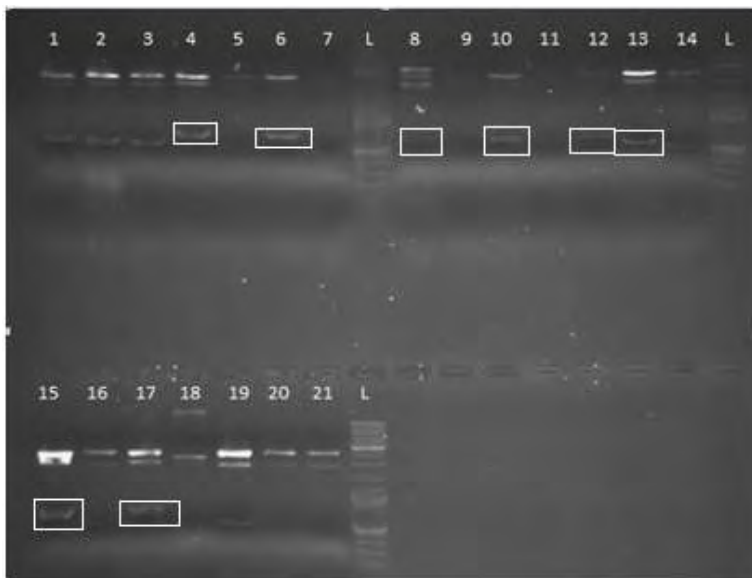
Η ζώνη των ditags απομονώθηκε εκλούστηκε από το gel και καθαρίστηκε με στήλη φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια τα ditags υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού NlaIII έτσι ώστε να προκύψουν ditags με μήκος 34bp. Τα προϊόντα της πέψης

ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και απομονώθηκαν οι επιθυμητές ζώνες (εικόνα 1.5).



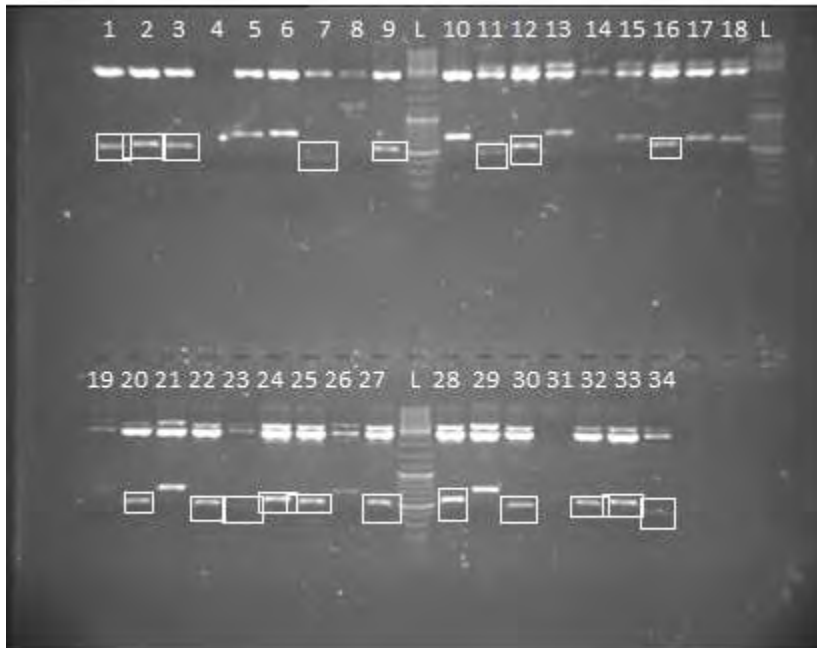
Εικόνα 1.5 Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%, για 4,5 ώρες, στα 160V. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε τρεις θέσεις (32μl+ 8μl χρωστική). Επιπλέον ηλεκτροφορείται σε μία θέση άκοπο δείγμα (ditags) (32μl+ 8μl χρωστική) και 1,5μl Low Molecular Ladder. Οι σημειωμένες ζώνες έχουν το επιθυμητό μήκος (34bp) και απομονώνονται από το gel, ενώ παρατηρείται η ζώνη που αντιπροσωπεύει τα άκοπα ditags στο άκοπο δείγμα.

Ακολούθησε σύνδεση των ditags για τον σχηματισμό αλυσομερών και απομόνωση με πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Τα αλυσομερή κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα και ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* με τους φορείς. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν mini preps για την απομόνωση των αλυσομερών από τους φορείς. Μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού PvuII, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1% και τα επιθυμητά υπέστησαν κατακρήμνιση και στάλθηκαν για αλληλούχιση(δείγματα 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 17) (εικόνα 1.6).

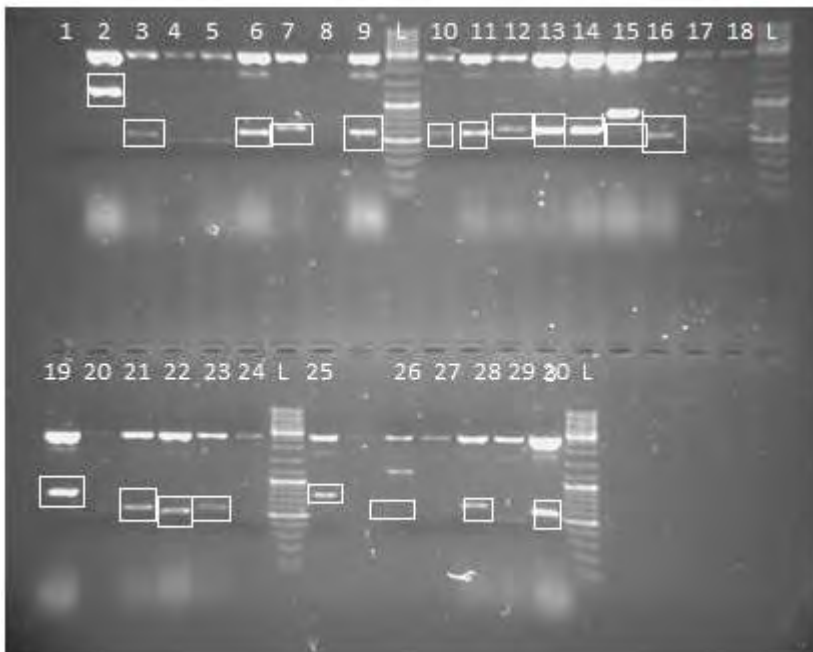


Εικόνα 1.6 Κύκλος Α. Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1%. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν μαζί με τον Ladder 331. Παρατηρούνται ζώνες στις 3000bp οι οποίες αντιστοιχούν στον άκοπο φορέα, στις 2500 που αντιστοιχούν στον φορέα μετά από πέψη, στις 500bp που αντιστοιχούν σε τμήμα του φορέα μετά από πέψη και στις 800bp οι οποίες είναι και οι επιθυμητές και αντιστοιχούν στο ένθεμα (αλυσομερή) (σημειωμένες).

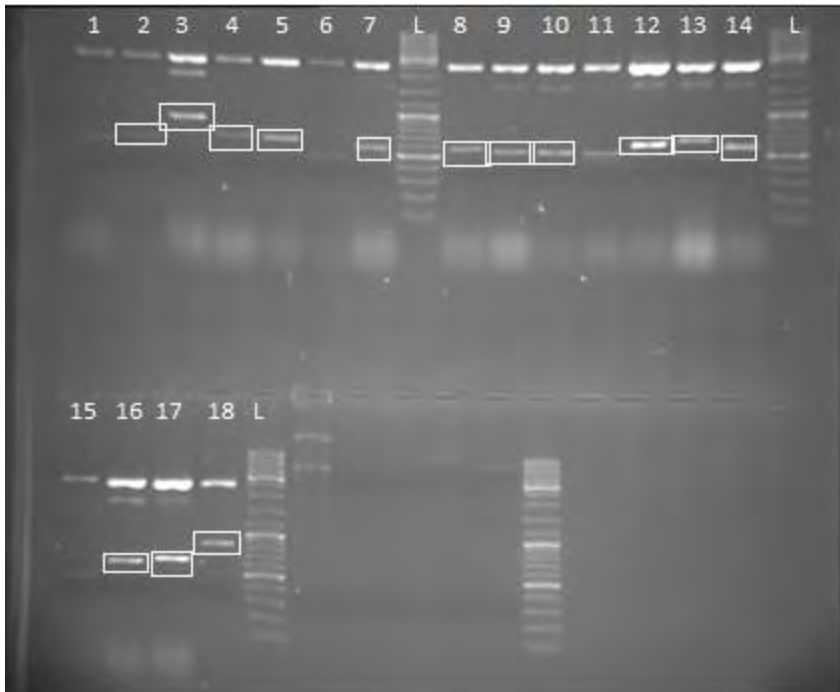
Ακολούθησαν ακόμη 3 κύκλοι mini preps και τα δείγματα που είχαν το ένθεμα στάλθηκαν για αλληλούχηση (εικόνες 1.7, 1.8, 1.9).



Εικόνα 1.7 Κύκλος Β. Ομοίως από την ηλεκτροφόρηση απομονώθηκαν τα δείγματα 1, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 16, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 34 και στάλθηκαν για αλληλούχηση.



Εικόνα 1.8 Κύκλος Γ. Ομοίως επιλέχθηκαν για αλληλούχηση τα δείγματα 2,3,6,7,9,10,11,12,13,14,15, 16,19,21,22,23,25,28,29,30.



Εικόνα 1.9 Κύκλος Δ. Ομοίως επιλέχθηκαν για αλληλούχιση τα δείγματα 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18.

Από την αλληλούχιση προέκυψαν οι αλληλουχίες ditags (66) και tags (124) (πίνακας 1). Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν, με το πρόγραμμα BLAST, με αλληλουχίες της *Drosophila melanogaster* και προέκυψαν ομολογίες για κάποιους γενετικούς τόπους. Οι γενετικοί τόποι εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 2L, 2R, X, 3R, 3L, στο μιτοχονδριακό DNA και στις ετεροχρωματινικές περιοχές chrU genomic scaffold (U), 3LHet genomic scaffold, 3RHet genomic scaffold, 2RHet genomic scaffold, XHet genomic scaffold (εικόνα 1.10).

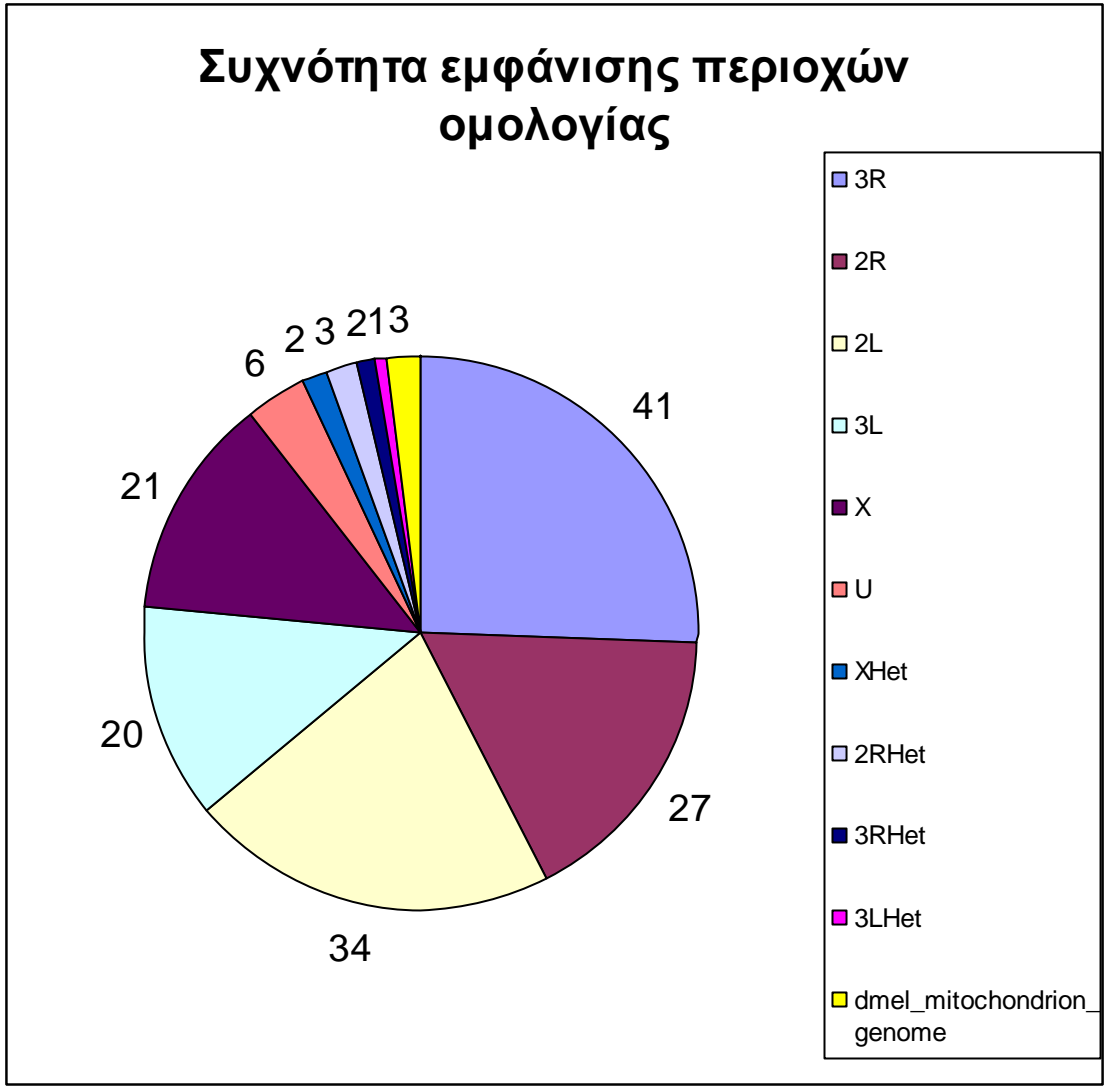
	Ditags	Tags	Ομολογία	Tags	Ομολογία
1	TTGTGGACTTCTCTTACGA AGTGAGTCGCTCGCTGTCT G	TTGTGGACTTCTCT TACGAA	3R	GTGAGTCGCTCGCTG TCTG	-
2	GATCAACAGGATATCGATC TCGGCAATGCC	GATCAACAGGATAT C	3R-2L	GATCTCGGCAATGCC	2R-3R
3	ATACTGGCATCCGCCAATA GAACGGCCGGTC	ATACTGGCATCCGC CA	3R-3L	ATAGAACGGCCGGTC	-
4	CCGCCATCGCCCGCTCGCG GCAACCGCACCC	CCGCCATCGCCCGC TC	X-2L- 2R	GCGGCAACCGCACCC	3R-2L
5	AAGCCCCATCCATTTCTCA TCCAACACAGC	AAGCCCCATCCATT T	2L-X- 3R-2R	CTCATCCAACACAGC	3R
6	GTTATGGCAGCACCGCAT AATTCTTACTGT	GTTATGGCAGCACCC GC	2L	CATAATTCTTACTG T	-
7	CAGCCAATCTCGAAACCAG CGCAGTCGATGAA	CAGCCAATCTCGAA AC	2L	CAGCGCAGTCGATGA A	-
8	CTGCTCGAATTCAAGCTTC TAAAGATGTACTTCCGA	CTGCTCGAATTCAA GCTT	3R	CTAAAGATGTACTTCC GA	-
9	CCGCTGGCCCTCGCCATCG GCGCGCCTTGG	CCGCTGGCCCTCGC C	-	ATCGGCGCGCCTTGG	-

10	CTCCATAGCAAGAGCGCC GCTCCCGCTCGCAGC	CTCCATAGCAAGAG CG	2L	CCGCTCCCGCTCGCA GC	X-3R- 2R-2L
11	ATGATGGACTGCGGTGGA GCCGCGATGATGATCGG	ATGATGGACTGCG GTGGA	2L	GCCGCGATGATGATC GG	-
12	AACATCGACATTTTGAACG CATATTGCGGTC	AACATCGACATTTT GA	XHet- U-3R- 2L-3L	ACGCATATTGCGGTC	2L
13	CAAGAGGAGTTTAT	CAAGAGGAGTTTAT	2L		
14	CTGCTCGAATTCAAGCTTC TAACGATGTACGTCCGA	CTGCTCGAATTCAA GCTT	3R	CTAACGATGTACGTC CGA	-
15	ATGGCCCTGGGGCAGTAC CAGGCGCACATCCG	ATGGCCCTGGGGC AGT	3R	ACCAGGCGCACATCC G	X-3R- 3L-2R- 2L
16	GTCTGCAGGCCGGGGCTG ATGCGCGGCGTGAACGC	GTCTGCAGGCCGG GGCTG	-	ATGCGCGGCGTGAAC GC	-
17	ATCCGAGTTCAGACCGGC CAAATTTTCAATAGT	ATCCGAGTTCAGAC CGG	-	CCAAATTTTCAATAGT	X-3R- 2R-2L
18	ATGCAGACGCCGGCTCC AGGGCGGCGCGACG	ATGCAGACGCCGG CGT	3R-2L	CCAGGGCGGCGCGAC G	-
19	AATGTGCTAGCCTCACGAA ACGCTAACACGGA	AATGTGCTAGCCTC AC	-	GAAACGCTAACACGG A	-
20	CTGCCGCTCGTCGCGCAG GGCAAGCTCGACAT	CTGCCGCTCGTCGC GC	3L-X- 3R	AGGGCAAGCTCGACA T	-
21	ACGCACGAGCTGTGGG	ACGCACGAGCTGT GGG	X		
22	GCCACCGGCGCGGTAGGT GCCGATTCAGCGGCGAC	GCCACCGGCGCGG TAGG	2L	TGCCGATTCAGCGGC GAC	3L-2R
23	TTTTCGTTAAACAGGCGAC TTTTAGATTCTTA	TTTTCGTTAAACAG GC	2R-X- 2RHet	GACTTTTAGATTCTTA	3L-2L- 2R-X-U
24	CACGGGGCTTCTCGCAATC CGAACTGGTGCTGCG	CACGGGGCTTCTCG CAA	-	TCCGAACTGGTGCTG CG	2R-2L
25	ATCTGAGTTCAGGCCGGC CGGTCTGAACTCAGAT	ATCTGAGTTCAGGC CGG	-	CCGGTCTGAACTCAG AT	-
26	ACTGTGCCAGCGCCGGTA ACGCCACGCCATTG	ACTGTGCCAGCGCC GG	-	TAACGCCACGCCATT G	3R
27	AGTTCAATGAGCGAGAAT CCGGTTGCGCG	AGTTCAATGAGCG AG	2R	AATCCGGTTGCGCG	-
28	CGCCAGCCGCGCGGCTCG CTGCGGCGGTGCGG	CGCCAGCCGCGCG GCT	2R-3R	CGCTGCGGCGGTGCG G	-
29	TGTTTGCCAGGCGGAGCG TTGACGTTCCGCCGCGG	TGTTTGCCAGGCGG AG	2R	CGTTGACGTTCCGCC TCGG	2R
30	ACCTGCGCCATCTGCGGAT CATCAAGCGTGCG	ACCTGCGCCATCTG CG	X-2R	GATCATCAAGCGTG G	-
31	CGCGCTATGCCGAGATCAT TCCCGATCTGCAG	CGCGCTATGCCGA GAT	3R	CATTCCCGATCTGCAG	3R-2R- 3L
32	AGCCGGCTGGAGTACCTG ACCTGCCGCGTGATG				

33	AAGTCGGTACCTTCGCGG ATGCGGCCCTGGGTCAG				
34	CTGTCCAAAGCACTTCATC GGACCGGCACGCCGT	CTGTCCAAAGCACT TCATC	2R	GGACCGGCACGCCGT	-
35	AAAGGTCAACGCAAGCTG AATGGTTAGCGGCG	AAAGGTCAACGCA AGC	2R-3R	TGAATGGTTAGCGGC G	2L
36	GACCGCAATATGCGTTCAA AATGTCGATGTT	GACCGCAATATGC GTT	2L	CAAAATGTCGATGTT	Xhet- U-3R- 2L-3L
37	CCCTCGTGTGAGGAACGG GTCTTTGCGCCGG	CCCTCGTGTGAGGA AC	-	GGGTCTTTGCGCCGG	X
38	TCGGCGTCGAGATGCGTG CCGTCGGCAAACCTG	TCGGCGTCGAGAT GCG	X-2L- 3L	TGCCGTCGGCAAACCT G	3L-2R
39	CGCGCGCGCTGGGGCTGA GCGCCGAGACCTTCGAG	CGCGCGCGCTGGG GCTGA	-	GCGCCGAGACCTTCG AG	-
40	TCGGATATTAAGCCTAGTT GTACTGCACCTGCAAATCC CACGAG	TCGGATATTAAGCC TAGTTGTA	3LHet	CTGCACCTGCAAATCC CACGAG	2L
41	TGCTCGAATTCAAGCTTCT AACGATGTACGTCCGA	TGCTCGAATTCAAG CTTC	-	TAACGATGTACGTCC GA	-
42	AGGAGCTTGGGCTTACCA GCATCTTCGTTACA	AGGAGCTTGGGCT TAC	X-3R-2R	CAGCATCTTCGTTACA	3L
43	GACCGCAATATGCGTTCAA AATGTCGACGTT	GACCGCAATATGC GTT	2L	CAAAATGTCGACGTT	2L
44	CCCGAGCCGTTGTCGCCG GCGATGGGCTTGGG	CCCGAGCCGTTGTC GC	3L	CGGCGATGGGCTTGG G	X-3L- 3R
45	ATGGGTGTGCTGAACTTC GCGCACGCCAGCTTCTA	ATGGGTGTGCTGA ACTTC	3L	GCGCACGCCAGCTTC TA	-
46	ATCTGAGTTCAGACCGGCC TTTGCCTCACAAT	ATCTGAGTTCAGAC CG	-	GCCTTTGCGTCACAAT	X
47	CGCTGATCAGCCAGAACG GCGCAGGCAAATCCAC	CGCTGATCAGCCAG AAC	3R	GGCGCAGGCAAATCC AC	-
48	TAAGTATTTAAAAGTCGCC TGTTTAAACAAAAA	TAAGTATTTAAAAG TC	X-3R- 2R-2L- 3L	GCCTGTTTAAACAAAA A	dmel_ mitoch ondrio n_gen ome- U-2L- 3L
49	TAAGAATTTAAAAGTCGAC TTTTAAATTCTTA	TAAGAATTTAAAAG TC	dmel_ mi tochondr ion_gen ome-U- 2L-3L- 2R-3R- 2Rhet- 3Rhet-X	GACTTTTAAATTCTTA	dmel_ mitoch ondrio n_gen ome- U-2L- 3L-2R- 3R-

					2RHet- 3RHet- X
50	GCCCACTATTCCGCTCGCT ACCCGGGCGTG	GCCCACTATTCCGC T	2R	CGCTACCCGGGCGTG	-
51	CCGCGTTCTTCGCGCAGGC GGCGCAGGCGCACGCC	CCGCGTTCTTCGCG CAG	3R	GCGGCGCAGGCGCAC GCC	X-2R- 3R
52	CGTGCTGCTCGAATTCAAG CTTCTAACGATGTACACCC GA	CGTGCTGCTCGAAT TCAAGC	2L-3R	TTCTAACGATGTACAC CCGA	-
53	GCGGCGACGGCCGCGTC GAGAAGGCGTCGA	GCGGCGACGGCCG CCG	3R	TCGAGAAGGCGTCGA	-
54	CATGAAGTGCCCCGGGAA CGCAATGCCCCGCG	CATGAAGTGCCCCG GG	2L	AACGCAATGCCCCGC G	3L
55	GTCTGCAGGCCGGGGCTG ATGCGCGGCGTGAACGC	GTCTGCAGGCCGG GGCTG	-	ATGCGCGGCGTGAAC GC	-
56	CGTATGACAGCATCTGCCG GTCCGAACTCAGAT	CGTATGACAGCATC TG	-	CGGTCCGAACTCAGA T	-
57	CTGCTCGAATTCAAGCTTC TAACGCTGTACGTCCGA	CTGCTCGAATTCAA GCTT	3R	CTAACGCTGTACGTCC GA	-
58	ATCTGAGTTTACGCCGTT TATCGCTTTGTCTT	ATCTGAGTTTACGCC CGG	2L	TTTATCGCTTTGTCTT	3L-3R- 2L
59	CGCCGCCACGGCGGGGGC GCCTTAGCGTCCGTGG	CGCCGCCACGGCG GGGGC	-	GCCTTAGCGTCCGT GG	-
60	ATGGACGCGTCACCACGC GCAGGCCCGAGAGGC	ATGGACGCGTCACC ACG	-	CGCAGGCCCGAGAGG C	3R
61	CTGCCCGCCTGACCACAGC CACGCCGACGCTGC	CTGCCCGCCTGACC ACA	3R	GCCACGCCGACGCT GC	-
62	TCGCACGTACATCGTTAGA AGCTTGAATTCGAGCA	TCGCACGTACATCG TTAG	-	AAGCTTGAATTCGAG CA	-
63	ACATGATGAGCATATACAA CGCGAGCCGGTCTGAACT CAGAT	ACATGATGAGCATA TACAACG	X-2R- 2L	CGAGCCGGTCTGAACT TCAGAT	-
64	GGGTGCCAGAATGACTAG TGGCTGTCT	GGGTGCCAGAATG A	-	CTAGTGGCTGTCT	-
65	CGGTGGCCAAACAAAAGC CGGTCTGAACTCAGAT	CGGTGGCCAAACA AAAG	3R-X	CGGTCTGAACTCAG AT	-
66	CGCTGCACACCCTTGTCT TGAACGCAGTGCCGCACA G	CGCTGCACACCCTT GTTCT	3R-X	TGAACGCAGTGCCGC ACAG	-

Πίνακας 1 Αλληλουχίες των ditags και των tags και περιοχές ομολογίας.

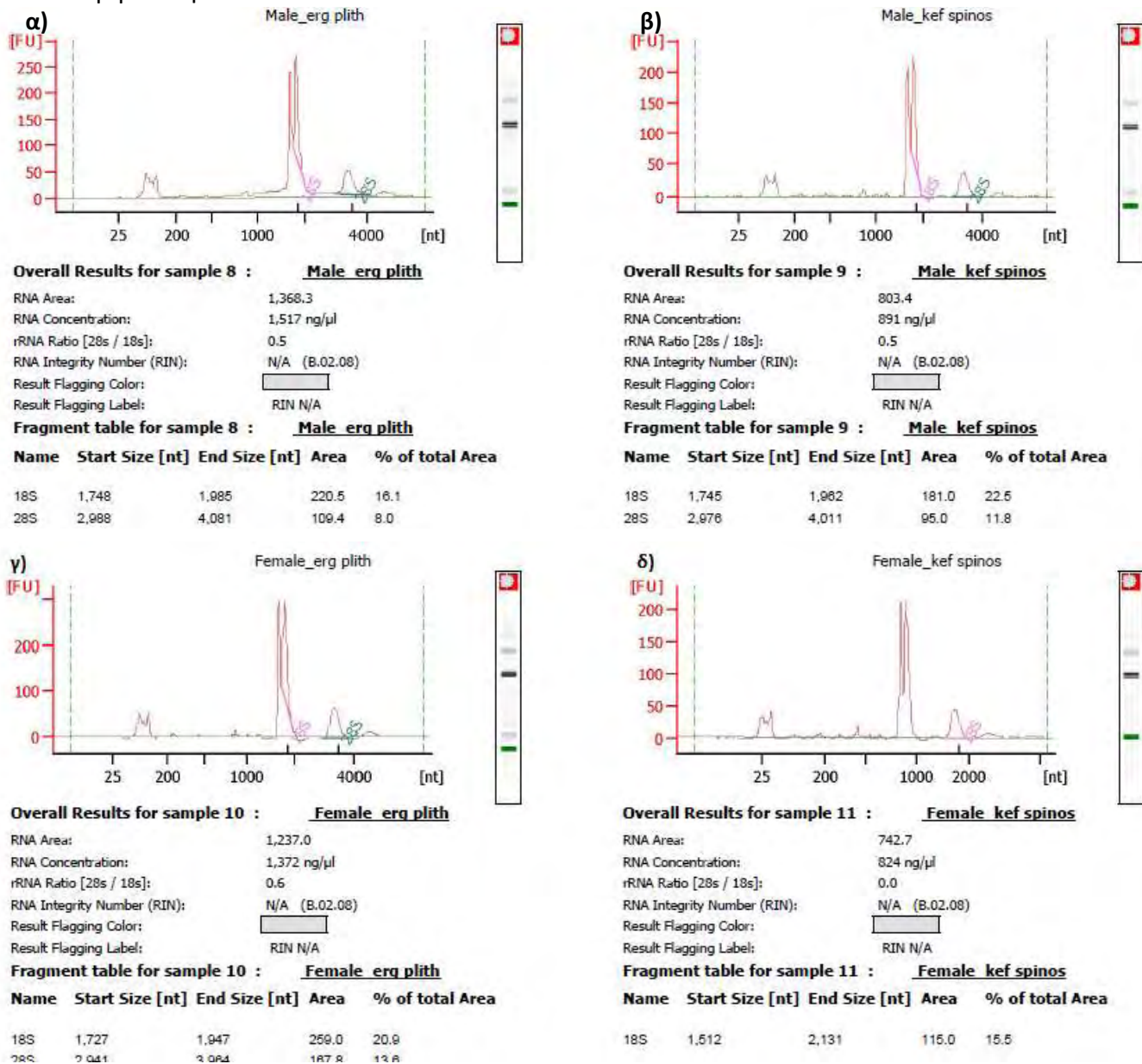


Εικόνα 2.10 Συχνότητα εμφάνισης περιοχών ομολογίας ανάμεσα στα tags και το γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster*.

2. RNA Sequencing

2.1 Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των RNA δειγμάτων.

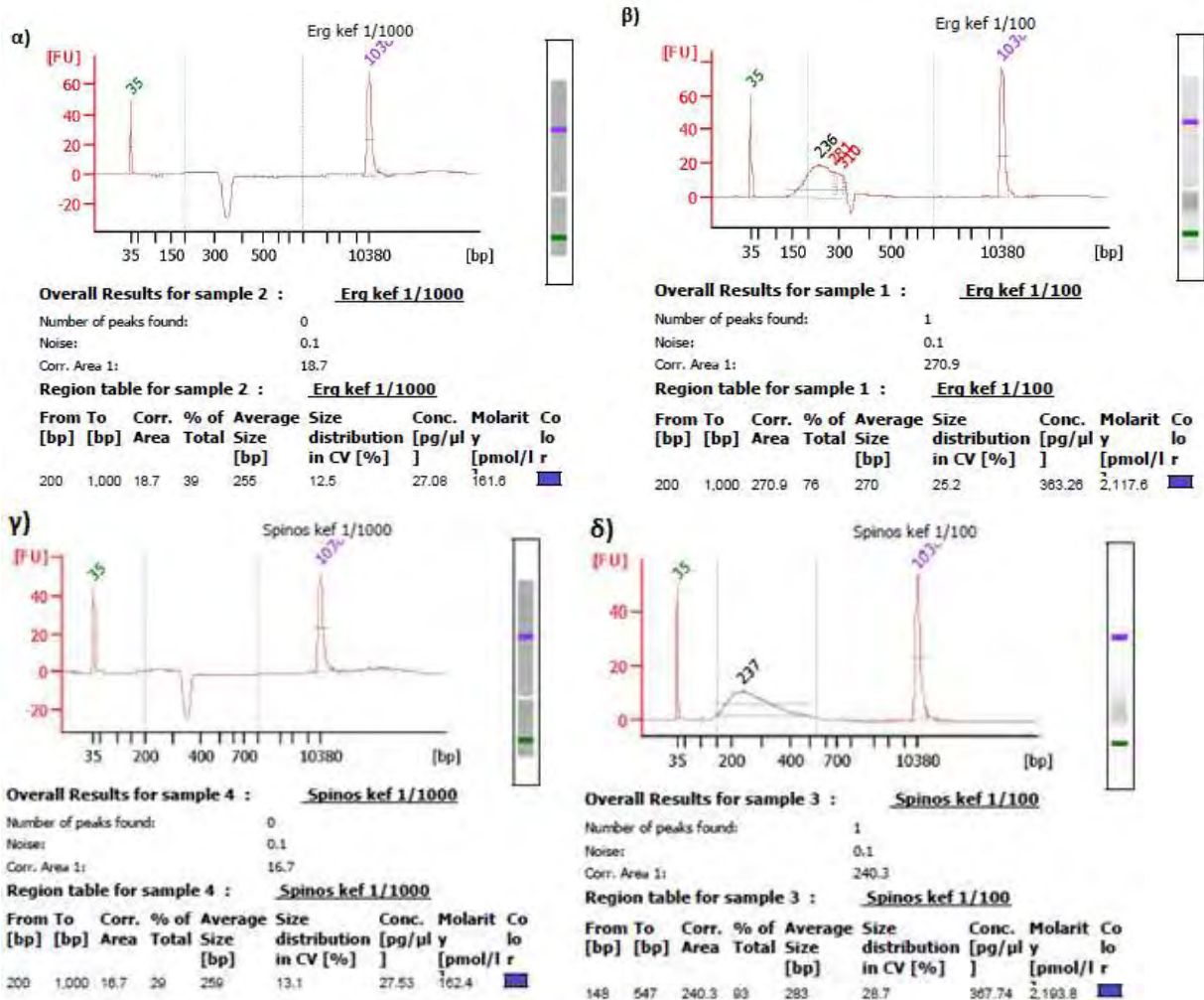
Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν στάλθηκαν στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ". Εκεί πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με τη συσκευή Agilent 2100 Bioanalyzer (εικόνα 2.1). Ο αριθμός RIN δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί, διότι η συσκευή δεν μπορεί να αναλύσει RNA εντόμων. Παρά το γεγονός αυτό, από τη μορφή του ηλεκτροφερογράμματος συμπεραίνεται ότι η ποιότητα των δειγμάτων επιτρέπει την κατασκευή των RNA βιβλιοθηκών.



Εικόνα 2.1 Απεικόνιση των ηλεκτροφερογραμμάτων, της συγκέντρωσης και των χαρακτηριστικών των RNA που περιέχονται στα δείγματα α) εργαστηριακός πληθυσμός-αρσενικά, β) ανθεκτικός πληθυσμός-αρσενικά, γ) εργαστηριακός πληθυσμός-θηλυκά, δ) ανθεκτικός πληθυσμός-θηλυκά.

2.2 Κατασκευή RNA βιβλιοθηκών, αλληλούχιση και βιοπληροφορική ανάλυση

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των RNA βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε, επίσης με τη συσκευή Agilent 2100 Bioanalyzer. Ο αριθμός RIN και πάλι δεν προσδιορίστηκε, αλλά η δομή των ηλεκτροφερογραμμάτων έδειξε ότι η δομή των βιβλιοθηκών επιτρέπει την αλληλούχιση τους. Τα peak του μεγέθους των cDNA τμημάτων εμφανίζονται κοντά στις 200-250bp όπως ήταν επιθυμητό (εικόνα 2.2).



Εικόνα 3.2 Απεικόνιση των ηλεκτροφερογραμμάτων, της συγκέντρωσης και των χαρακτηριστικών των cDNA μορίων που περιέχονται στα δείγματα α) εργαστηριακός πληθυσμός-αραίωση 1/1000, β) εργαστηριακός πληθυσμός-αραίωση 1/100, γ) ανθεκτικός πληθυσμός-αραίωση 1/1000, δ) ανθεκτικός πληθυσμός-αραίωση 1/100. Η πρώτη και η τελευταία κορυφή αντιστοιχούν στους markers, ενώ η μεσαία στα μόρια cDNA.

Τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση των RNA βιβλιοθηκών εκκρεμούν.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει την περιγραφή της εφαρμογής των μεθόδων long SAGE και RNA-sequencing (βασισμένη στην τεχνολογία Applied Biosystems SOLiD), στην τρανσκριπτομική ανάλυση του δάκου της ελιάς και την σύγκριση τους. Πρόκειται για δύο μεθόδους τρανσκριπτομικής ανάλυσης, για τις οποίες δεν υπάρχει ανάγκη πρώτερης γνώσης της αλληλουχίας του γονιδιώματος του οργανισμού και που βρίσκουν εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος πειραματικών διαδικασιών. Η μέχρι σήμερα εφαρμογή τους, έχει αποδείξει την ύπαρξη βασικών μειονεκτημάτων και πλεονεκτημάτων, που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους.

Long-SAGE

Η long-SAGE αποτελεί μία τροποποίηση του βασικού πρωτοκόλλου της SAGE, οποίο παρέχει ετικέτες μεγαλύτερου μήκους. Η SAGE, παρότι αποτελεί μία αποδοτική μέθοδο για την ανάλυση προφίλ γονιδιακής έκφρασης, χαρακτηρίζεται από μειονεκτήματα που περιορίζουν τη εφαρμογή της.

Το κύριο μειονέκτημα του βασικού πρωτοκόλλου της SAGE είναι η μεγάλη ποσότητα αρχικού υλικού που απαιτεί η εφαρμογή της (2-5μg mRNA). Το τροποποιημένο πρωτόκολλο της long-SAGE μειώνει την ποσότητα του αρχικού mRNA που απαιτείται στα 50-250ng. Η μείωση αυτή είναι σημαντική, αλλά πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι για το στήσιμο της μεθόδου απαιτείται επιπλέον αρχικό υλικό.

Η SAGE χαρακτηρίζεται ως πειραματικά απαιτητική μέθοδος, που περιλαμβάνει πολλά και πολύπλοκα στάδια. Μεταξύ άλλων περιλαμβάνει το στάδιο της κλωνοποίησης, το οποίο είναι χρονοβόρο και πολύπλοκο και μπορεί να παρέχει «background signal», το οποίο προέρχεται από το DNA του φορέα. Η χρήση βακτηριακών κυττάρων αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που αυξάνει την πολυπλοκότητα της μεθόδου. Επιπλέον, περιλαμβάνει πολλά στάδια ενίσχυσης PCR, τα οποία ορισμένες φορές οδηγούν σε ποιοτική και ποσοτική μείωση των ετικετών, εάν οι συνθήκες δεν είναι ιδανικές. Τέλος, η μέθοδος περιλαμβάνει αντιδράσεις σύνδεσης και πέψης τμημάτων DNA, τα οποία απαιτούν χρόνο και μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση των αποτελεσμάτων.

Εκτός από την εφαρμογή της μεθόδου, αρκετό χρόνο απαιτεί ο καθορισμός των συνθηκών που θα εφαρμοστούν. Για τον σκοπό αυτό απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις διάφορων σταδίων (π.χ. PCR) με διαφορετικές ποσότητες αρχικού υλικού, ένζυμα, διαλύματα και διαφορετικές συνθήκες. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από κάθε δοκιμή, συντελεί στο στήσιμο της μεθόδου, η οποία θα χαρακτηρίζεται από μεγάλη απόδοση σε αξιόπιστες ετικέτες.

Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί ο μεγάλος αριθμός πειραματικών βημάτων που δεν είναι πάντα εύκολο να ελεγχθούν πριν την ολοκλήρωση της διαδικασίας και η σχετικά μεγάλη ποσότητα αρχικού RNA που απαιτείται. Επίσης, λόγω του μεγάλου αριθμού σταδίων που περιλαμβάνει και των δοκιμών που πραγματοποιούνται για το στήσιμο της, απαιτεί μεγάλες ποσότητες αντιδραστηρίων

και ενζύμων. Επιπλέον, τα συστατικά που απαιτούνται (π.χ. εκκινητές) είναι πολύ ακριβά.

Η SAGE χαρακτηρίζεται από ένα βασικό πλεονέκτημα: το γεγονός ότι δεν υπάρχει η ανάγκη της πρώτερης γνώσης της αλληλουχίας του γονιδιώματος του υπό μελέτη οργανισμού και, ως εκ τούτου, τη δυνατότητα εφαρμογής σε οποιοδήποτε μη-μοντέλο οργανισμό. Τέλος, απαιτεί φθηνό βασικό εξοπλισμό, ο οποίος υπάρχει σε κάθε εργαστήριο που ασχολείται με την γονιδιωματική και τρανσκριπτομική ανάλυση. Το γεγονός αυτό, δίνει στον ερευνητή το πλεονέκτημα του ελέγχου του πειράματος, καθόλη τη διάρκεια του.

RNA-Sequencing

Η RNA-Seq είναι μία νέα τεχνική τρανσκριπτομικής ανάλυσης που βασίζεται σε τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης. Αποτελεί μία αυτοματοποιημένη μέθοδο που βασίζεται στην χρήση Kit και μεγάλο τμήμα των διαδικασιών πραγματοποιείται από μηχανήματα, συνεπώς δεν απαιτεί δοκιμές για τον προσδιορισμό των συνθηκών που θα εφαρμοστούν σε κάθε πείραμα. Αυτό το χαρακτηριστικό μειώνει τον χρόνο που απαιτείται για την εφαρμογή της.

Η τεχνική αυτή απαιτεί εξειδικευμένο ακριβό εξοπλισμό και πραγματοποιείται από εκπαιδευμένο προσωπικό. Συνεπώς ο ερευνητής δεν έχει την δυνατότητα να ελέγχει την πρόοδο του πειράματος καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του.

Το κόστος της RNA-Seq μειώνεται συνεχώς, γεγονός που συμβάλλει στην αύξηση της προτίμησης της από τους ερευνητές.

Σύγκριση τεχνικών

Η σύγκριση των τεχνικών αυτών βασίζεται στις παραμέτρους που αναφέρθηκαν και στην απόδοση των αποτελεσμάτων. Η πρώτη παράμετρος είναι το κόστος και σαφές πλεονέκτημα έχει η τεχνική RNA-Seq.

Όσον αφορά τις χρονικές απαιτήσεις, η RNA-Seq απαιτεί περίπου έναν με δύο μήνες μέχρι την εξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων, ενώ η SAGE χρειάζεται περισσότερο χρόνο δεδομένου ότι πραγματοποιούνται δοκιμές για τον καθορισμό των συνθηκών. Παρόλα αυτά λαμβάνεται υπόψη ότι η RNA-Seq δεν πραγματοποιείται από τον ίδιο τον ερευνητή αλλά από εξειδικευμένο προσωπικό, συνεπώς ο χρόνος εξαγωγής των αποτελεσμάτων δεν καθορίζεται από τον ίδιο.

Η RNA-Seq παρέχει αποτελέσματα με μεγάλη εγκυρότητα, τα οποία καλύπτουν όλο το τρανσκριπτομα, με μία μόνο εφαρμογή. Επιπλέον η ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει τον χαρακτηρισμό γονιδιωματικών ποικιλομορφιών, όπως γειτονικά SNPs, προσθήκες και απαλοιφές νουκλεοτιδίων και δομικές αναδιατάξεις. Αντίθετα η SAGE για να καλύψει όλο το τρανσκριπτομα, απαιτεί πολλές χιλιάδες ετικετών, οι οποίες αποκτώνται με περισσότερους από έναν κύκλο πειραμάτων. Επιπλέον η ταυτοποίηση των ετικετών απαιτεί την μελέτη ESTs ή αλληλουχιών DNA συγγενικών οργανισμών που είναι καταχωρημένα σε βάσεις δεδομένων.

Η ποσότητα του αρχικού υλικού που απαιτείται θεωρητικά είναι μικρότερη για την SAGE καθώς η RNA-Seq απαιτεί 100-500ng mRNA ή ~20μg ολικού RNA. Λαμβάνοντας υπόψη όμως, το στάδιο του στησίματος της μεθόδου και την επαναληψιμότητα της για να αποκτηθεί επαρκής αριθμός ετικετών, το αρχικό υλικό που απαιτείται για την SAGE είναι μεγαλύτερο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Auburn R. P., Kreil D. P., Meadows L. A., Fischer B., Matilla S. S., Russell S. Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarrays. *TRENDS in Biotechnology* Vol.23 No.7 July 2005

Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Drosopoulou E, Kakani EG, Mavragani-Tsipidou P, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9(1): 618

Baxter S.W, Mao Chen, Dawson A, Jian-Zhou Zhao, Vogel H., Shelton A. M., Heckel D. G. , Jiggins C. G. Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 6$ Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.) *PLoS Genet.* 2010 January; 6(1): e1000802

Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D. H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., Roth R., George D., Eletr S., Glenn A., Eric V., Steven R. W., Keith M., Burcham T., Pallas M., DuBridage R. B., Kirchner J., Fearon K., Mao J., and Corcoran K., 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *NATURE BIOTECHNOLOGY*

Cisneros J. , Goulson D. , Derwent L.C., Penagos D.I. , Herna´ndez O. , And Williams T. Toxic Effects of Spinosad on Predatory Insects. *Biological Control* 23, 156–163, (2002)doi:10.1006/bcon.2001.1000

Costa V., Angelini C., De Feis I., and Ciccodicola A. Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2010, Article ID 853916, 19 pages. doi:10.1155/2010/853916

Datson N. A., van der Perk-de Jong J., M. van den Berg P., de Kloet E. R. and Vreugdenhil E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. 1300–1307 *Nucleic Acids Research*, 1999, Vol. 27, No. 5

Economopoulos A.P. , Attraction of *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae) to odor and color traps, *Laboratory of Entomology, Dept. of Biology, "Demokritos" Nuclear Research Center, Attiki ,Greece.*

FAOSTAT Agricultural Data. [Online]. Available: <http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx> [06 September 2006].

Fodor S.P., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., and Solas D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-773.

Forconi M and Herschlag D. Metal Ion-Based RNA Cleavage as a Structural Probe. *Methods in Enzymology*, Volume 468 #, 2009 Elsevier Inc. ISSN 0076-6879, DOI: 10.1016/S0076-6879(09)68005-8

Grskovic, M. and Ramalho-Santos, M., The pluripotent transcriptome (October 10, 2008), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.24.1

Jing Shi, Lan Zhang, and Xiwu Gao. Characterisation of spinosad resistance in the housefly *Musca domestica*(Diptera:Muscidae) (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.2073

Kollman W.S., ENVIRONMENTAL FATE OF SPINOSAD. Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring Branch, P.O. Box 4015 Sacramento, California 95812-4015

Mardis E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2008. 9:387–402

Matsuda K. Pyrethrin biosynthesis and its regulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium*, Department of Applied Biological Chemistry, Kinki University, Nakamachi, Japan, *Top Curr Chem* 314:73-81. 2012.

Matsumura H., Reich D., Ito A., Saitoh H., Kamoun S., Winter P., Kahl G., Reuter M., Kruger D. H., and Terauchi R. Gene expression analysis of plant host–pathogen interactions by SuperSAGE. *PNAS* ,December 23, 2003,vol. 100, no. 26 , 15719

Mazomenos B, Pantazi-Mazomenou A, Stefanou D, Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system, *Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production, IOBC wprs Bulletin Vol. 25(•) 2002*

Montiel-Bueno A, Jones O: Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semio-chemicals. *IOBC Wprs Bull* 2002, 25:1-11.

Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. Agilent Technologies, Published May 1, 2004 ,Publication Number 5989-1165EN

Neilson L., Andalibi A., Douglas K., Coutifaris C., Strauss J. F., Stanton J. L., Green D. P. L., 2000. Molecular Phenotype of the Human Oocyte by PCR–SAGE. *Genomics* **63**, 13–24 (2000) doi:10.1006/geno.1999.6059

Pereira, J. A., Alves, M. R., Casal, S., & Oliveira, M. B. P. P. (2004). Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars Cobrancosa, Madural and Verdeal Transmontana. *Italian Journal of Food Science*, 16, 355–365.

Perry T, McKenzie JA, Batterham P (2007) A Δ alpha6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem Mol Biol* 37:184–188

Peters D. G., Kassam A. B., Yonas H., Heidrich O'Hare E., Ferrell R. E., Brufsky A. M. Comprehensive transcript analysis in small quantities of mRNA by SAGE-Lite. *Nucleic Acids Research*, 1999, Vol. 27, No. 24

Pommois P, Brunetti P, Bruno B, Mazzei A, Baldacchini V, Salvatore Di Gregorio: FlySim: A Cellular Automata Model of *Bactrocera Oleae* (Olive Fruit Fly) Infestation and First Simulations. *ACRI 2006*: 311-320

Reigart R, M.D. and Roberts J, M.D., M.P.H., Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 5th Edition (1999), Edited Section II: Insecticides, Chapter 4. Organophosphate Insecticides

Reinartz J., Bruyns E., Lin J., Burcham T., Brenner S., Bowen B., Kramer M., Woychik R. Massively Parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in depth quantitative gene expression profiling in all organisms. Date received (in revised form): 6th December 2001

Shalon D., Smith S.J., and Brown P.O. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color probe hybridization. *Genome Res.* 6: 639-645

Scott, J.G. (2008) Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects. *J Pestic Sci* 33: 221–227

Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M. and Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 2006, 7:3 doi:10.1186/1471-2199-7-3

Tsapakis E. M. , Basu A, Aitchison K. J. Transcriptomics and proteomics: advancing the understanding of psychiatric pharmacogenomics. *Clinical Neuropsychiatry* (2004) 1, 2, 117-124

Tsolakis H., Ragusa E., Tarantino P. Control of *Bactrocera oleae* by low environmental impact methods: NPC methodology to evaluate the efficacy of lure-and-kill method and copper hydroxide treatments pages 1-8 *Bulletin of Insectology* 64 (1) 2011

Tzanakakis M. E. Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (= *Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). 2005, *Encyclopedia of Entomology*, Pages 1589-1591

Van der Vloedt A.M., and W. Klassen, 1991. The development and application of the Sterile Insect Technique (SIT) for the New World screwworm eradication. Rome, Italy. Food and Agriculture Organization World Animal Review.

Vilain C., Libert F., Venet D., Costagliola S., Vassart G., 2003. Small amplified RNA-SAGE: an alternative approach to study transcriptome from limiting amount of mRNA. *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No. 6, DOI: 10.1093/nar/gng024

Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., and Kinzler K.W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.

Virion B., Cheval L., Buhler J. M., Billon E., Doucet A., Elalouf J. M. Serial microanalysis of renal transcriptomes. *PNAS*, December 21, 1999, vol. 96, no. 26

Vossen P, Varela L, Devarenne A. Olive Fruit Fly. University of California (April 2004)

Wang Z., Gerstein M., and Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 January ; 10(1): 57–63. doi:10.1038/nrg2484

Weems, H. V. and Nation J. L. Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Insecta:Diptera: Tephritidae) . EENY-113. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

White, I.M. and Wang, X.J. "Taxonomic notes on some dacine (Diptera, Tephritidae) fruit-flies associated with citrus, olives and cucurbits" *Bulletin of Entomological Research* 82: (2) 275-279 (June 1992)

Εγχειρίδια και Πρωτόκολλα

Applied Biosystems SOLiD™4 System Templated Bead Preparation Guide

I-SAGE™ Long Kit, Version D, 19 October 2010, 25-0656

RiboMinus™ Eukaryote Kit for RNA-Seq, Catalog #s A10837-08

SOLiD™ RNA Barcoding Kit, Module 33-48, Catalog #s 4452781

SOLiD™ 4 System SETS Software, User Guide

SOLiD® Total RNA-Seq Kit, Catalog #s 4445374