



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

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Μ. ΚΟΣΚΙΝΙΩΤΗ

**Θέμα Διπλωματικής Μεταπτυχιακής Εργασίας
Απομόνωση και χαρακτηρισμός πολυμορφισμών μονού
νουκλεοτιδίου (SNPs) στη Μεσογειακή μύγα**

2013

**Απομόνωση και χαρακτηρισμός πολυμορφισμών μονού
νουκλεοτιδίου (SNPs) στη Μεσογειακή μύγα**

**Isolation and characterization of Single Nucleotide
Polymorphisms (SNPs) of the Mediterranean fruit fly**

Τριμελής Επιτροπή:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος:

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
(Επιβλέπων Καθηγητής)

Σαραφίδου Θεολογία:

Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών - Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη:

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών – Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | Σελ. |
|--|-----------|
| Περίληψη..... | 5 |
| I. Εισαγωγή..... | 6 |
| A. Η μύγα της Μεσογείου..... | 6 |
| A.1. Μορφολογία..... | 6 |
| A.2. Βιολογικός Κύκλος..... | 9 |
| A.3. Γεωγραφική Εξάπλωση και Καταγωγή..... | 10 |
| A.4. Ξενιστές της Μεσογειακής μύγας..... | 12 |
| A.5. Οικονομική σημασία – Αντιμετώπιση και διαχείριση του εντόμου..... | 13 |
| A.6. Η επιλογή του ξενιστή και η συσχέτιση της με το γενετικό προφίλ του εντόμου..... | 16 |
| B. Οσφρητικό Σύστημα..... | 18 |
| B.1. Ανατομία του οσφρητικού συστήματος..... | 18 |
| B.2. Οσφρητικά ερεθίσματα..... | 21 |
| B.3. Οσμο-δεσμευτικές πρωτεΐνες..... | 22 |
| B.4. Οσφρητικοί υποδοχείς..... | 22 |
| B.5. Φερομονικοί υποδοχείς..... | 24 |
| Γ. Ανίχνευση Πολυμορφισμών Μονού Νουκλεοτιδίου..... | 26 |
| Γ.1. Τεχνολογίες Ανίχνευσης SNPs – Τυχαία προσέγγιση..... | 26 |
| Γ.2. Τεχνολογίες Ανίχνευσης SNPs – Στοχευμένη προσέγγιση..... | 27 |
| Γ.3. Τεχνολογίες προσδιορισμού γενοτύπου για ήδη γνωστά SNPs..... | 30 |
| Σκοπός..... | 35 |
| II. Υλικά και Μέθοδοι..... | 36 |
| 1. Συλλογή δειγμάτων..... | 36 |
| 2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA..... | 36 |
| 3. Σχεδίαση εκκινητών..... | 37 |
| 4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR..... | 38 |
| 5. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης..... | 43 |
| 6. Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονού κλώνου, SSCP..... | 45 |
| 7. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης..... | 49 |
| 8. Μοριακή Κλωνοποίηση..... | 50 |
| 8.1. Ένθεση του προϊόντος της PCR σε πλασμιδιακό φορέα..... | 51 |
| 8.2. Μετασχηματισμός κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης..... | 54 |
| 8.3. Επίστρωση τρυβλίων..... | 56 |
| 8.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA..... | 57 |
| 8.5. Πέψη πλασμιδιακού DNA..... | 59 |
| 8.6. Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο-κατακρήμιση με αιθανόλη..... | 61 |
| 9. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας..... | 62 |
| III. Αποτελέσματα..... | 63 |
| 1. Αποτελέσματα PCR..... | 63 |
| 2. Αποτελέσματα SSCP..... | 63 |
| 3. Αποτελέσματα πέψης πλασμιδιακού DNA..... | 65 |
| 4. Αποτελέσματα Αλληλούχισης..... | 66 |
| IV. Συζήτηση..... | 76 |
| Ευχαριστίες..... | 79 |
| Βιβλιογραφία..... | 80 |

Περίληψη

Η Μύγα της Μεσογείου ανήκει στην οικογένεια Tephritidae και αποτελεί ένα από τα πιο επιβλαβή παράσιτα των φρούτων παγκοσμίως. Η κατανομή της Μεσογειακής μύγας εξαπλώνεται σε όλο σχεδόν τον κόσμο εξαιτίας της ικανότητάς της να προσαρμόζεται σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και ξενιστών. Οι προνύμφες του εντόμου μπορούν να αναπτυχθούν σε πάνω από 300 είδη φυτών, η πλειοψηφία των οποίων αποτελεί καλλιέργειες μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος. Η οικονομική σημασία της Μεσογειακής μύγας οδήγησε στην ανάπτυξη εκτεταμένων προγραμμάτων ελέγχου εκ των οποίων τα περισσότερα βασίζονται στη χρήση ισχυρών εντομοκτόνων. Μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος που έχει, επίσης, εφαρμοστεί για τον έλεγχο της Μεσογειακής είναι η Τεχνική του Στείρου Εντόμου (SIT), η οποία στηρίζεται στη μαζική απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων στη φύση. Η κατανόηση της βιολογίας και της οικολογίας της μύγας της Μεσογείου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία οποιουδήποτε προγράμματος ελέγχου, καθώς και για την καλύτερη διαχείριση των φυσικών πληθυσμών. Η συσχέτιση της γενετικής διαφοροποίησης με την επιλογή του φυτού-ξενιστή θα μπορούσε να αποδειχθεί υψίστης σημασίας για οποιαδήποτε προσπάθεια διαχείρισης του πληθυσμού επιβλαβών εντόμων. Για παράδειγμα, οι προτιμώμενοι ξενιστές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο προσέλκυσης ή ως «ασπίδα» για την αντιμετώπιση του εντόμου. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), που σχετίζονται με την επιλογή του ξενιστή. Τα έντομα βασίζονται στην όσφρηση προκειμένου να εκτιμήσουν την κατάσταση του ενδιαιτήματός τους, στο οποίο συμπεριλαμβάνονται και οι διατροφικές πηγές. Κατά συνέπεια, η αποκρυπτογράφηση των λεπτομερειών αυτής της συσχέτισης θα μπορούσε να παρέχει χρήσιμα εργαλεία για τον έλεγχο του εντόμου.

I. Εισαγωγή

A. Η μύγα της Μεσογείου

Η Μεσογειακή μύγα, *Ceratitis capitata* (Wiedeman), είναι ένα δίπτερο, ολομετάβολο έντομο, μέλος της οικογένειας Tephritidae και αποτελεί το πιο γνωστό από τα είδη του γένους *Ceratitis*. Θεωρείται ως ένα από τα πιο επιβλαβή παράσιτα των φρούτων παγκοσμίως, με ιδιαίτερα μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον, καθώς παρασιτεί σε μια ευρεία ποικιλία καλλιεργειών.¹

| Συστηματική ταξινόμηση | |
|------------------------|--------------------|
| Kingdom | Animalia |
| Phylum | Arthropoda |
| Class | Insecta |
| Order | Diptera |
| Family | Tephritidae |
| Genus | <i>Ceratitis</i> |
| Species | <i>C. capitata</i> |

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση της Μεσογειακής μύγας

A. 1. Μορφολογία

Η Μεσογειακή μύγα, ως ολομετάβολο έντομο υφίσταται διάφορες μεταμορφώσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής της. Το ενήλικο θηλυκό έντομο γεννά τα αυγά του, τα οποία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους μεταμορφώνονται σε προνύμφες. Η προνύμφη, μετά από μια σειρά εκδύσεων σχηματίζει μία θήκη (κουκούλι) γύρω από τον εαυτό της και μετατρέπεται σε νύμφη, από την οποία εξέρχεται τελικά το πλήρως ανεπτυγμένο ενήλικο έντομο.

Η ενήλικη μύγα (Εικ. 1) έχει μήκος περίπου 4-6mm και πλάτος 1,2-2mm. Η εμφάνισή της είναι αρκετά πολύχρωμη εξαιτίας των κίτρινων, καφέ, μαύρων, λευκών και υπόλευκων γραμμώσεων του θώρακα, της κοιλίας και των φτερών. Το σύνθετο μάτι του εντόμου, είναι ιριδίζον πορφυρό έως και μπλε-πρασινωπό και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κίτρινου κεφαλιού του. Οι κεραίες έχουν καφέ χρώμα και αρκετά μαύρα τριχίδια. Τα αρσενικά έντομα ξεχωρίζουν εύκολα από τα θηλυκά, λόγω ενός ζεύγους μακρόμισγων, ακιδωτών, μαύρο-γκρι διογκώσεων στην κορυφή του πρόσθιου τμήματος του κεφαλιού. Τα φτερά έχουν μήκος περίπου 4,5 mm και διαθέτουν κίτρινες, καφέ και κόκκινες ρίγες. Το οπίσθιο τμήμα του θώρακα έχει

χρώμα γυαλιστερό μαύρο με διακριτές υπόλευκες ρίγες, ενώ το στέρνο είναι κίτρινο. Η κοιλία είναι κίτρινο-πορτοκαλί με δύο κόκκινες εγκάρσιες ρίγες. Ο ωσθέτης (όργανο εναπόθεσης αυγών) έχει μήκος 0,9-1,3 mm. Τα πόδια είναι κίτρινο-κόκκινα με πολλά μακριά, κίτρινα τριχίδια στο πίσω μέρος τους.



Εικόνα 1: Μεσογειακή μύγα, *Ceratitidis capitata*.

Πηγή: <http://www.flickr.com/photos/eurythyrea/5376375122/in/photostream/>

Φωτογράφος: Nikola Rahmé

Τα **αυγά** έχουν σχήμα επίμηκες ελλειπτικό και χρώμα λευκό. Το μήκος τους είναι περίπου 0,9-1,1 mm και έχουν διάμετρο 0,2-0,3 mm. (Εικ. 2)



Εικόνα 2: Αυγά της Μεσογειακής μύγας, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). (Πηγή: Florida Division of Plant Industry Archive - Florida Department of Agriculture and Consumer Services, www.forestryimages.org)

Οι **προνύμφες (larvae)** (Εικ. 3) έχουν λευκό-κρεμ χρώμα, επίμηκες σχήμα με το πρόσθιο τμήμα τους να είναι πιο στενό από το οπίσθιο. Υπάρχουν τρία προνυμφικά στάδια, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν το ένα από το άλλο από το σχήμα, το μέγεθος και το χρώμα του στόματος. Γενικά, το πρώτο προνυμφικό στάδιο έχει μήκος 0,17-2,2 mm, το δεύτερο 2,3-5 mm και το τρίτο 6-10 mm.



Εικόνα 3: Pronύμφη της Μεσογειακής μύγας, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). (Πηγή: Florida Division of Plant Industry Archive - Florida Department of Agriculture and Consumer Services, www.forestryimages.org)

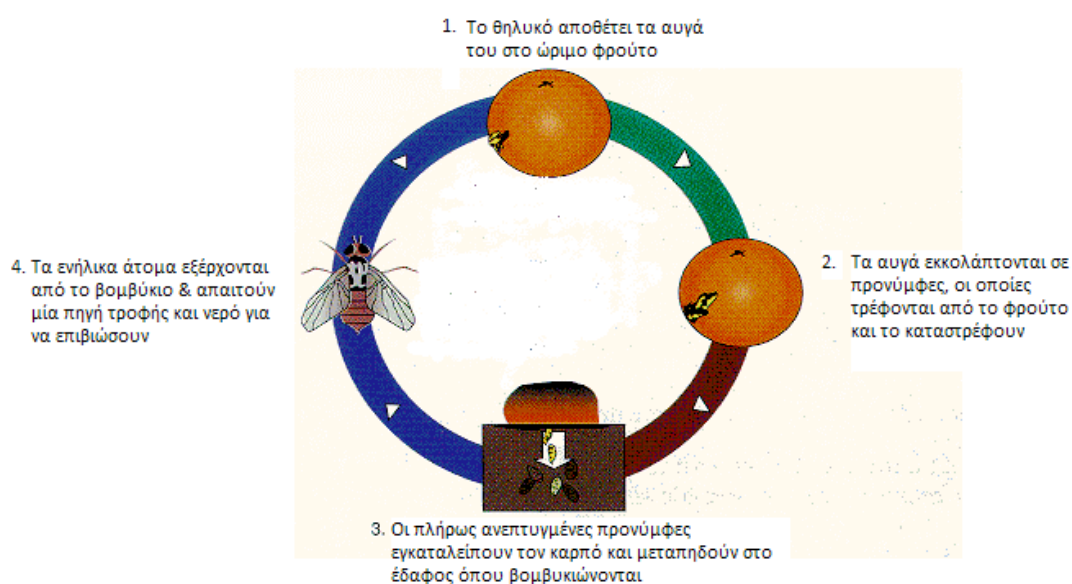
Το **βομβύκιο ή νύμφη (puparium/pupa)** (Εικ. 4) έχει ελλειπτικό και κυλινδρικό σχήμα. Το μήκος του είναι 4,4-4,5 mm και η διάμετρος 2-2,5 mm. Το χρώμα εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την τροφή της προνύμφης και κυμαίνεται από λευκό μέχρι και καφέ.²



Εικόνα 4: Νύμφη της Μεσογειακής μύγας, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). (Πηγή: Florida Division of Plant Industry Archive - Florida Department of Agriculture and Consumer Services, www.forestryimages.org)

A. 2. Βιολογικός κύκλος

Η Μεσογειακή μύγα είναι ένα είδος με πολλές γενεές (3 έως 7 γενεές σε ένα χρόνο). Ο αριθμός των γενεών καθορίζεται κυρίως από τη γεωγραφική περιοχή, τις κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία) καθώς και το είδος και τη διαθεσιμότητα του ξενιστή στο οποίο παρασιτεί. Η ανάπτυξη του εντόμου είναι συνεχής σε όλη τη διάρκεια του χρόνου, σε τροπικές και υπό-τροπικές περιοχές, καθώς και σε περιοχές της νότιας Μεσογείου, ακολουθώντας βραδύτερους αναπτυξιακούς ρυθμούς ως απόκριση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, στα βόρεια της Μεσογείου μόνο οι προνύμφες μπορούν να επιβιώσουν στο εσωτερικό των προσβεβλημένων φρούτων συμβάλλοντας στη διατήρηση του πληθυσμού κατά τη διάρκεια του χειμώνα.



Εικόνα 5: Βιολογικός κύκλος της *Ceratitidis capitata*.

(Πηγή: <http://agspsrv34.agric.wa.gov.au/ento/medfly.htm>)

Τα ενήλικα άτομα τρέφονται με υδατάνθρακες και άζωτο άμεσα μετά την εμφάνισή τους προκειμένου να επιτύχουν τη σεξουαλική και αναπαραγωγική τους ωριμότητα. Η σύζευξη βασίζεται κυρίως στην απόκριση του θηλυκού σε φερομόνες που εκκρίνει το αρσενικό έντομο. Τα θηλυκά αρχίζουν να γενούν τα αυγά τους σε ώριμα φρούτα, σε ηλικία 7-10 ημερών, αμέσως μετά στη σύζευξη. Η απόθεση των αυγών πραγματοποιείται ανοίγοντας μία μικρή τρύπα λίγων χιλιοστών στον καρπό του φρούτου, χρησιμοποιώντας τον ωαποθέτη του εντόμου. Κάθε θηλυκό εισάγει μέχρι και εννέα αυγά στη σάρκα του φρούτου και μπορεί να γεννήσει 250 έως και 1000 αυγά κατά τη διάρκεια της ζωής του. Η εκκόλαψη των αυγών διαρκεί 2-4 ημέρες (16-18 ημέρες σε χαμηλές θερμοκρασίες). Οι προνύμφες τρέφονται από τη σάρκα του καρπού για 6-11 ημέρες (σε θερμοκρασίες 13-28°C) και μόλις ολοκληρώσουν την ανάπτυξη τους, εγκαταλείπουν τον καρπό προκειμένου να

βομβυκιωθούν στο έδαφος που βρίσκεται κάτω από το φυτό στο οποίο παρασιτούν. Τα ενήλικα έντομα προκύπτουν μετά από 6-11 ημέρες (σε θερμοκρασίες 24-26°C), ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αυξάνεται ο χρόνος έκδυσης. Η διάρκεια ζωής ενός ενήλικου εντόμου μπορεί να φτάσει μέχρι και τους δύο μήνες. Σε εργαστηριακές συνθήκες (25°C και 75% υγρασία), ο κύκλος ζωής του εντόμου διαρκεί περίπου 25 ημέρες.¹

Η καταστροφή που προκαλείται στα φρούτα από τη Μεσογειακή μύγα οφείλεται, σε πρώτη φάση, στο δήγμα του θηλυκού που αποθέτει τα αυγά του, το οποίο ανοίγει το δρόμο σε δευτερογενείς μολύνσεις από μύκητες και βακτήρια, που ευνοούν την αποσύνθεση του φρούτου. Σε δεύτερη φάση, προκαλείται καταστροφή του καρπού από την ίδια την προνύμφη του εντόμου η οποία τρέφεται από τη σάρκα του φρούτου προκειμένου να αναπτυχθεί.

A. 3. Γεωγραφική Εξάπλωση και Καταγωγή

Η πρώτη περιγραφή της Μεσογειακής μύγας πραγματοποιήθηκε το 1824 από τον Wiedeman. Ο Wiedeman ανέλυσε ένα δείγμα το οποίο είχε συλλεχθεί από κάποιο πλοίο που ταξίδευε στον Ινδικό Ωκεανό και μετέφερε φρούτα από την Αφρική. Η εξάπλωση του εντόμου παρατηρείται κυρίως σε περιοχές με τροπικό και εύκρατο κλίμα. Οι μύγες του είδους *Ceratitis capitata* επιδεικνύουν πρότυπα συμπεριφοράς, που τους επιτρέπουν να ξεπερνούν τις δοκιμασίες της συνεχούς φυσικής επιλογής και να βελτιστοποιούν την αναπαραγωγική τους επιτυχία, με αποτέλεσμα να έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν συνεχώς σε νέες περιοχές.¹⁵

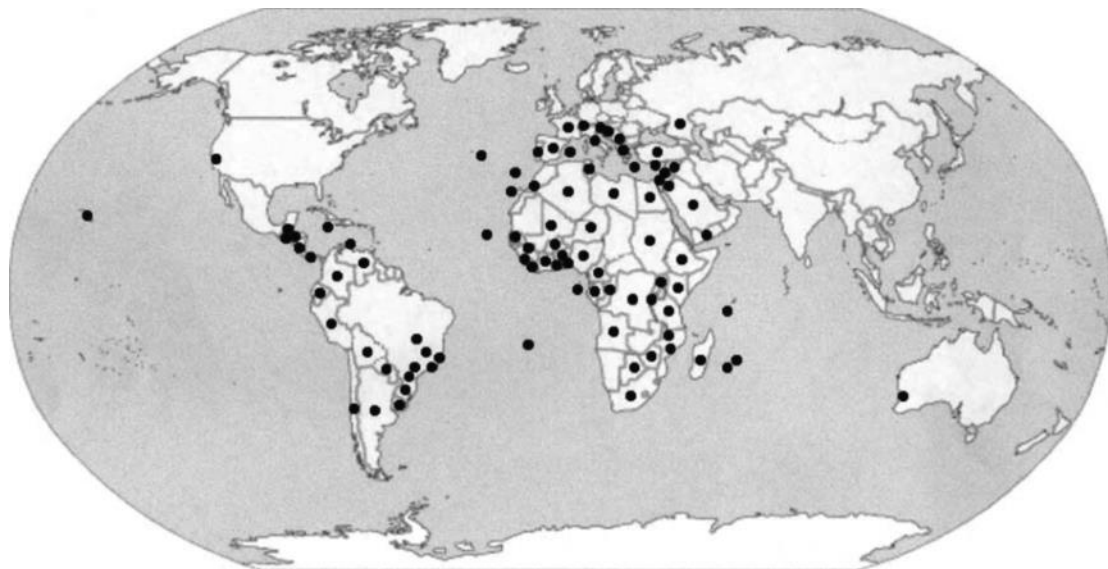
Γενικά, οι περιοχές στις οποίες έχει αναφερθεί η παρουσία της Μεσογειακής μύγας βρίσκονται κυρίως στην Αφρική, τη Μέση Ανατολή, τη Δυτική Αυστραλία, την Κεντρική και Νότια Αμερική, καθώς και σε νησιά του Ατλαντικού, του Ειρηνικού και του Ινδικού Ωκεανού (Εικ. 6). Επίσης, έχει εισβάλλει αρκετές φορές στη Β. Αμερική (Καλιφόρνια), ενώ βρίσκεται σε όλες σχεδόν τις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου. Πιο αναλυτικά, στον **Πίνακα 2** περιγράφονται οι περιοχές/χώρες στις οποίες έχει παρατηρηθεί εισβολή της Μεσογειακής μύγας, καθώς και οι χρονολογίες στις οποίες καταγράφηκε για πρώτη φορά.

Πίνακας 2: Χρονολογική καταγραφή του αποικισμού της *C. capitata* ανά τον κόσμο

| Γεωγραφική Περιοχή/χώρα | Ημερομηνία πρώτης αναφοράς εμφάνισης | Βιβλιογραφία |
|----------------------------|--------------------------------------|--|
| Αφρική | | |
| <i>Κένυα</i> | Αρχική πηγή | Fletcher, 1989 ⁸ |
| <i>N. Αφρική</i> | 1889 | Back & Pemberton, 1918 ⁹ |
| | | |
| Extra-Mediterranean | | |
| <i>Canary</i> | Αρχές 1800 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Madeira</i> | 1829 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| | | |
| Μεσόγειος | | |
| <i>Ισπανία</i> | 1842 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Αλγερία</i> | 1850 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Τυνησία</i> | 1855 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>N. Ιταλία</i> | 1863 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Γαλλία</i> | 1885 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Πορτογαλία</i> | 1898 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Ισραήλ</i> | Τέλος 1800 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Τουρκία</i> | 1904 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Ελλάδα</i> | 1915 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| <i>Πρώην Γιουγκοσλαβία</i> | 1947 | Fimiani, 1989 ¹⁰ |
| | | |
| Λατινική Αμερική | | |
| <i>Βραζιλία</i> | 1905 | Enkerlin et al., 1989 ¹¹ |
| <i>Κόστα Ρίκα</i> | 1955 | Enkerlin et al., 1989 ¹¹ |
| <i>Νικαράγουα</i> | 1960 | Enkerlin et al., 1989 ¹¹ |
| <i>Παναμάς</i> | 1963 | Enkerlin et al., 1989 ¹¹ |
| <i>Γουατεμάλα</i> | 1975 | Enkerlin et al., 1989 ¹¹ |
| <i>Μεξικό</i> | 1977 | Enkerlin et al., 1989 ¹¹ |
| | | |
| Η.Π.Α. | | |
| <i>Φλόριντα</i> | 1929 | www.cdffa.ca.gov/pests/medfly |
| <i>Καλιφόρνια</i> | 1975 | Carey et al., 1996 ¹⁴ |
| | | |
| Ειρηνικός | | |
| <i>Χαβάη</i> | 1910 | Harris, 1989 ¹² |
| | | |
| Αυστραλία | 1897 | Hooper & Drew, 1989 ¹³ |

Η γενετική δομή και συσχέτιση μεταξύ των πληθυσμών της Μεσογειακής μύγας ανά τον κόσμο, έχει διερευνηθεί σε μία σειρά από μελέτες που διεξήχθησαν τα τελευταία 20 χρόνια.^{3,4,5,6} Παρά το γεγονός ότι οι παραπάνω μελέτες στερούνται συγκεκριμένων στοιχείων για την Αφρικανική ήπειρο στο σύνολό της, ωστόσο, παρέχουν στοιχεία που υποδεικνύουν την καταγωγή της *C. capitata* από την υπο-Σαχάρια ανατολική περιοχή της Αφρικής (Κένυα). Έπειτα, η Μεσογειακή μύγα φαίνεται να συνέχισε την εισβολή της, εγκαθιδρύοντας προοδευτικά πληθυσμούς στην Ιβηρική Χερσόνησο και ακολούθως σε άλλες παραλιακές και ανατολικές

περιοχές της Μεσογείου.⁵ Η εισβολή της στην Αυστραλία αποτελεί, πιθανώς, ένα γεγονός δευτερογενούς αποικισμού από τη Μεσογειακή περιοχή,⁷ ενώ η εγκαθίδρυση σε πολλές περιοχές του Νέου Κόσμου αποδίδεται κυρίως στην ανάπτυξη του διεθνούς εμπορίου φρέσκων φρούτων και στην αύξηση της ανθρώπινης κινητικότητας.⁶



Εικόνα 6: Χάρτης παγκόσμιας εξάπλωσης της Μεσογειακής μύγας.

A. 4. Ξενιστές της Μεσογειακής μύγας

Η Μεσογειακή μύγα είναι το πιο πολυφάγο από τα μέλη της οικογένειας Tephritidae. Προσβάλλει φρούτα, άνθη, λαχανικά ή ακόμη και ξηρούς καρπούς. Ωστόσο, οι προτιμώμενοι ξενιστές είναι, συνήθως, ώριμα και σαρκώδη φρούτα με λεπτή επιδερμίδα. Η επιλογή του ξενιστή ποικίλει στις διάφορες περιοχές στις οποίες ενδημεί. Ορισμένα φυτά έχουν καταγραφεί ως ξενιστές της *C. capitata* μόνο σε εργαστηριακές συνθήκες και επομένως, είναι πιθανό να μην προσβάλλονται από το έντομο στη φύση. Γενικά, η Μεσογειακή μύγα προσβάλλει περίπου 353 είδη φυτών, που ανήκουν σε πάνω από 67 οικογένειες. Το 40% των ξενιστών της ανήκει στις οικογένειες 1) Myrtaceae (6%), 2) Rosaceae (10%), 3) Rutaceae (9%), 4) Sapotaceae (9%) και 5) Solanaceae (6%). Η *C. capitata* προσβάλλει τον καρπό πολλών φυτών που αναπτύσσονται σε τροπικό, υπο-τροπικό καθώς και εύκρατο κλίμα. Σε τροπικά και υπο-τροπικά κλίματα αποτελεί σημαντικό παράσιτο διάφορων φυτών, όπως ο καφές (*Coffea arabica*), το μάνγκο (*Manifera indica*), η παπάγια (*Carica papaya*), το αβοκάντο (*Persea americana*), το γκουάβα (*Psidium guajava*), οι καράμβολες (*Averrhoa carambola*), το γλυκό ποτροκάλι (*Citrus sinensis*), το νεράντζι (*Citrus aurantium*), το σύκο (*Ficus carica*), το γκρέιπφρουτ (*Citrus x paradisi*), το

φραγκόσυκο (*Opuntia vulgaris*), το μούσμουλο (*Eriobotrya japonica*) και ο λωτός (*Diospyros kaki*). Σε εύκρατα κλίματα προσβάλλει τόσο εμπύρηννα όσο και σαρκώδη φρούτα όπως το βερίκοκο (*Prunus armeniaca*), το ροδάκινο (*Prunus persicae*), το μήλο (*Malus domestica*), το αχλάδι (*Pyrus communis*), κ.α..¹⁶

Στην Ελλάδα, η Μεσογειακή μύγα αποτελεί πολύ σημαντική απειλή για τα είδη του γένους *Citrus* (*Citrus spp.*), τα αχλάδια, τα μήλα, τα ροδάκινα, τα βερίκοκα και τα σύκα.¹⁷

A.5. Οικονομική σημασία - Αντιμετώπιση και διαχείριση της μύγας του εντόμου

Η Μεσογειακή μύγα αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα παράσιτα των γεωργικών καλλιεργειών σε όλο σχεδόν τον κόσμο. Η παγκόσμια γεωγραφική της εξάπλωση, η ευρεία ποικιλία των ξενιστών, στους οποίους παρασιτεί, η ταχεία διασπορά της μέσω του διεθνούς εμπορίου φρέσκων φρούτων και η μεγαλύτερη ανοχή της σε ψυχρότερα κλίματα, σε σύγκριση με άλλες τροπικές μύγες, είναι οι σημαντικότεροι από τους λόγους που καθιστούν τη *C. capitata* ένα από τα πιο καταστροφικά παράσιτα των φρούτων σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, η Μεσογειακή μύγα, δικαίως καταλαμβάνει μία θέση στη λίστα με τα έντομα εξαιρετικά μεγάλης οικονομικής σημασίας και επομένως, καθίσταται αναγκαίος ο αποτελεσματικός έλεγχος των φυσικών πληθυσμών της.

Για την αντιμετώπιση και τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών του εντόμου έχει αναπτυχθεί μία ποικιλία μεθόδων, όπως διάφοροι μηχανισμοί παγίδευσης, χρήση ισχυρών εντομοκτόνων αλλά και φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές περιορισμού.

Ο συμβατικός έλεγχος της Μεσογειακής μύγας βασίζεται στην παρακολούθηση των φυσικών πληθυσμών με τη χρήση παγίδων ενήλικων εντόμων, στις οποίες εφαρμόζονται ουσίες που ελκύουν το έντομο. Οι δύο πιο διαδεδομένες είναι η παγίδα **Jackson** και η **McPhail**. Στις παγίδες Jackson χρησιμοποιείται η παραφερομόνη Trimedlure (t-Butyl-2-methyl-4-chlorocyclohexanecarboxylate), που προσελκύει τα αρσενικά έντομα. Στις παγίδες McPhail χρησιμοποιούνται ουσίες, όπως το οξικό αμμώνιο, η πουτρεσκίνη και η τριμεθυλαμίνη, οι οποίες προσελκύουν αποτελεσματικά τα θηλυκά έντομα.¹⁸



Εικόνα 7: Η νεότερη έκδοση της παγίδας McPhail χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό τριών ουσιών που προσελκύουν κυρίως τα θηλυκά έντομα της Μεσογειακής μύγας. Πηγή: USDA, Agricultural Research Service

Το επόμενο βήμα, μετά την ανίχνευση του εντόμου στις καλλιέργειες είναι η αντιμετώπισή του. Η **χρήση εντομοκτόνων** έχει αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματική στον έλεγχο της Μεσογειακής μύγας. Η εφαρμογή των εντομοκτόνων μπορεί να γίνει είτε με δολωματικούς ψεκασμούς είτε με ψεκασμούς καλύψεως. Για παράδειγμα, το μαλαθείο έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά προγράμματα ελέγχου του εντόμου και με αρκετά μεγάλη αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση του έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικών πληθυσμών με αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητάς του.¹⁹

Εκτός από τον χημικό έλεγχο των πληθυσμών, έχει αναπτυχθεί και μία σειρά από άλλα μέτρα, που εφαρμόζονται πριν και μετά τη συγκομιδή των φρούτων. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι η συλλογή και καταστροφή των μολυσμένων φρούτων αλλά και η καταστροφή όλων των άγριων φυτών-ξενιστών της ευρύτερης περιοχής.²⁰

Είναι γεγονός ότι τα εντομοκτόνα συμβάλλουν αποτελεσματικά στη μείωση του πληθυσμού της Μεσογειακής μύγας. Παρόλα αυτά, η συστηματική τους χρήση έχει σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον αλλά και στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Για το λόγο αυτό έχει γίνει πλέον επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων ελέγχου, που είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Το σημαντικότερο παράδειγμα των μεθόδων αυτού του είδους είναι η **Μέθοδος του Στείρου Εντόμου**

(SIT: Sterile Insect Technique). Η SIT αποτελεί μία ειδο-ειδική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο, η οποία στοχεύει στην ικανότητα αναπαραγωγής του εκάστοτε παρασιτικού εντόμου. Η εφαρμογή της στηρίζεται στη μαζική αναπαραγωγή, στείρωση και τελικά απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων στην περιοχή στόχευσης. Η στείρωση επιτυγχάνεται με τη χρήση γ-ακτινοβολίας και τα στείρα αρσενικά έντομα, που απελευθερώνονται, ανταγωνίζονται τα άγρια αρσενικά για τη σύζευξη με τα άγρια θηλυκά. Η σύζευξη ενός θηλυκού εντόμου αγρίου τύπου με ένα στείρο αρσενικό δεν οδηγεί σε δημιουργία απογόνων, με αποτέλεσμα τη μείωση του φυσικού πληθυσμού της περιοχής.²¹ Η δημιουργία αποκλειστικά αρσενικών στείρων εντόμων, και όχι θηλυκών, πραγματοποιείται με την ανάπτυξη των στελεχών γενετικού διαχωρισμού του φύλου GSS (Genetic Sexing Strains). Η κατασκευή των GSS βασίζεται στο φαινόμενο της αμοιβαίας μετατόπισης ανάμεσα στο χρωμόσωμα καθορισμού του αρσενικού ατόμου (χρωμόσωμα Y) και ενός αυτοσωμικού χρωμοσώματος το οποίο διαθέτει έναν δείκτη επιλογής.^{22,23} Με αυτόν τον τρόπο, ένας συγκεκριμένος γενετικός δείκτης συνδέεται με το Y χρωμόσωμα καθιστώντας εύκολη τη διάκριση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Τα αρσενικά άτομα φέρουν τη Y-συνδεδεμένη μετατόπιση, είναι ετεροζυγώτες και εμφανίζουν κανονικό φαινότυπο, επειδή φέρουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο του γενετικού δείκτη. Τα θηλυκά άτομα έχουν φυσιολογικό καρύοτυπο, άλλα παρουσιάζουν μεταλλαγμένο φαινότυπο, επειδή είναι ομοζυγωτικά για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Επί του παρόντος, χρησιμοποιείται σε σχεδόν όλα τα προγράμματα SIT κατά της *C. capitata*, ένα στέλεχος GSS, που βασίζεται σε μία θνησιγόνο μετάλλαξη ευαίσθητη στη θερμοκρασία (*tsl*: temperature sensitive lethal).²⁴ Ο διαχωρισμός του φύλου στο στέλεχος αυτό επιτυγχάνεται με την έκθεση των αυγών σε θερμοκρασία 34°C για 24 ώρες, με αποτέλεσμα το θάνατο των αυγών που είναι ομόζυγα για τη θνησιγόνο μετάλλαξη, δηλαδή των θηλυκών ατόμων.^{25,26}

Τέλος, μία τεχνική παρόμοια με την SIT, είναι η **μέθοδος κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας ΙΤ (Incompatible Insect Technique)**. Η ΙΤ βασίζεται στη δημιουργία στελεχών τα οποία είναι μολυσμένα με το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia* το οποίο προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σε συγκεκριμένες διασταυρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η σύζευξη μεταξύ αρσενικών ατόμων μολυσμένων με *Wolbachia* και μη μολυσμένων θηλυκών οδηγεί στον εμβρυικό θάνατο των απογόνων. Οι δοκιμές, που έχουν γίνει σε στελέχη της *C. capitata*, είναι αρκετά ενθαρρυντικές, καθώς αποδεικνύουν ότι είναι δυνατή η μόλυνση ενός στελέχους GSS με το βακτήριο *Wolbachia*, η οποία έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει ικανοποιητικά επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.²⁷

A. 6. Η επιλογή του ξενιστή και η συσχέτιση της με το γενετικό προφίλ του εντόμου

Η επιτυχία οποιουδήποτε προγράμματος ελέγχου της μύγας της Μεσογείου και η αποτελεσματικότερη διαχείριση των φυσικών της πληθυσμών προϋποθέτει την κατανόηση της βιολογίας, της οικολογίας και του γενετικού προφίλ του εντόμου. Ο ρόλος του ξενιστή στο γενετικό προφίλ των φυτοφάγων εντόμων έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικός. Η επιλογή του φυσικού περιβάλλοντος και των διατροφικών πηγών των διαφόρων ειδών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της εξειδίκευσης και της ειδογένεσης των φυσικών πληθυσμών. Είναι αρκετά τα παραδείγματα εντόμων, στα οποία έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ της πληθυσμιακής διαφοροποίησης και της επιλογής του φυτού στο οποίο παρασιτούν.^{28,29,30,31,32} Η αποκλίνουσα επιλογή, που απορρέει από την επιλογή διαφορετικού ξενιστή, μπορεί να οδηγήσει στην προσαρμοστική διαφοροποίηση ενός πληθυσμού και τελικά στην αναπαραγωγική απομόνωση του, μία διαδικασία που αναφέρεται και ως οικολογική ειδογένεση.^{33,34}

Η συσχέτιση της γενετικής διαφοροποίησης με την επιλογή του ξενιστή της *C. capitata*, που αποτελεί ένα έντομο εξαιρετικά μεγάλης σπουδαιότητας για την αγροτική οικονομία, θα μπορούσε να αποδειχθεί υψίστης σημασίας για οποιαδήποτε προσπάθεια διαχείρισης των πληθυσμών της. Για παράδειγμα, οι προτιμώμενοι ξενιστές της Μεσογειακής μύγας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο προσέλκυσης ή ως «ασπίδα» για την αντιμετώπιση του εντόμου. Μελέτες που έχουν ήδη γίνει σε συγκεκριμένα είδη της οικογένειας Tephritidae αποδεικνύουν ότι συγκεκριμένες γενετικές διαφοροποιήσεις συνδέονται με την επιλογή του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, στο είδος *Tephritis bardanae* η γενετική διαφοροποίηση εντοπίστηκε στη συχνότητα αλληλομόρφων συγκεκριμένων αλλοενζύμων (*Pep-A*, *Pgd*) και στη συχνότητα συγκεκριμένων απλοτύπων mtDNA.³⁵ Επίσης στο είδος *Acyrtosiphon pisum* εντοπίστηκε γενετική διαφοροποίηση σε 11 μικροδορυφορικούς τόπους, η οποία είχε άμεση συσχέτιση με την επιλογή του φυτού- ξενιστή.³⁶ Μάλιστα στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι 5 από τους 11 τόπους βρίσκονταν κοντά σε γονίδια που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση μεταξύ του εντόμου και του ξενιστή. Στα γονίδια αυτά συμπεριλαμβάνονται και ορισμένα που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του εντόμου (π.χ. οσφρητικοί υποδοχείς). Τα ευρήματα αυτά είναι αρκετά ενθαρρυντικά για την έρευνα της πληθυσμιακής και λειτουργικής γονιδιωματικής, που αφορά την προσαρμογή των φυτοφάγων εντόμων σε συγκεκριμένους ξενιστές, αλλά και γενικότερα για την ανακάλυψη των γονιδίων που εμπλέκονται στην προσαρμογή αυτή.

Η αίσθηση της όσφρησης βρίσκεται σε άμεση αλληλεπίδραση με το περιβάλλον του εντόμου και αποτελεί ένα ιδανικό σύστημα για τη μελέτη των αποκρίσεων προσαρμογής του οργανισμού σε οποιαδήποτε αλλαγή του προτιμώμενου ενδιαιτήματος. Όταν ένας οργανισμός εκτίθεται σε νέες συνθήκες, είναι πολύ πιθανό να διαφοροποιήσει το οσφρητικό του σύστημα σε βάθος εξελικτικού χρόνου, τόσο σε λειτουργικό όσο και σε γενετικό επίπεδο, προκειμένου να ανιχνεύσει τη σύσταση των νέων πτητικών χημικών ερεθισμάτων. Επομένως, η μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στη λειτουργία του οσφρητικού συστήματος εντόμων του ίδιου είδους, που δείχνουν προτίμηση σε διαφορετικό ξενιστή, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανεύρεση πολυμορφισμών (π.χ. SNPs, VNTRs, STRs, κλπ.) που σχετίζονται με την προτίμηση αυτή.

Παρακάτω περιγράφονται, αρχικά, οι μηχανισμοί, που χρησιμοποιούν τα έντομα για την ανίχνευση των οσφρητικών ερεθισμάτων, καθώς και τα μόρια που εμπλέκονται σε αυτούς, και στη συνέχεια, οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι ανεύρεσης πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου (SNPs).

B. Οσφρητικό Σύστημα

Η όσφρηση είναι η βασική αίσθηση που επιτρέπει σε όλους τους ζωικούς οργανισμούς να βρουν την τροφή τους, να προσδιορίσουν τα άτομα του αντίθετου φύλου προκειμένου να γίνει η σύζευξη και να αποφύγουν τους θηρευτές τους. Επιπλέον, η οσφρητική λειτουργία επιτρέπει στα έντομα να προσεγγίσουν το κατάλληλο υπόστρωμα, όπου θα αποθέσουν τα αυγά τους. Τα ερεθίσματα, που προκαλούν όλες αυτές τις καθοδηγούμενες από την όσφρηση συμπεριφορές, αποτελούνται από μίγματα ποικίλων πτητικών οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες διαφέρουν στο μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο και τις λειτουργικές ομάδες. Για παράδειγμα τα κυριότερα οσφρητικά συστατικά του τριαντάφυλλου αποτελούνται από 275 διαφορετικές χημικές ενώσεις, των οποίων η αναλογία είναι τόσο προσεκτικά βαθμονομημένη ούτως ώστε να παράγεται πάντα το χαρακτηριστικό του άρωμα.^{37,38}

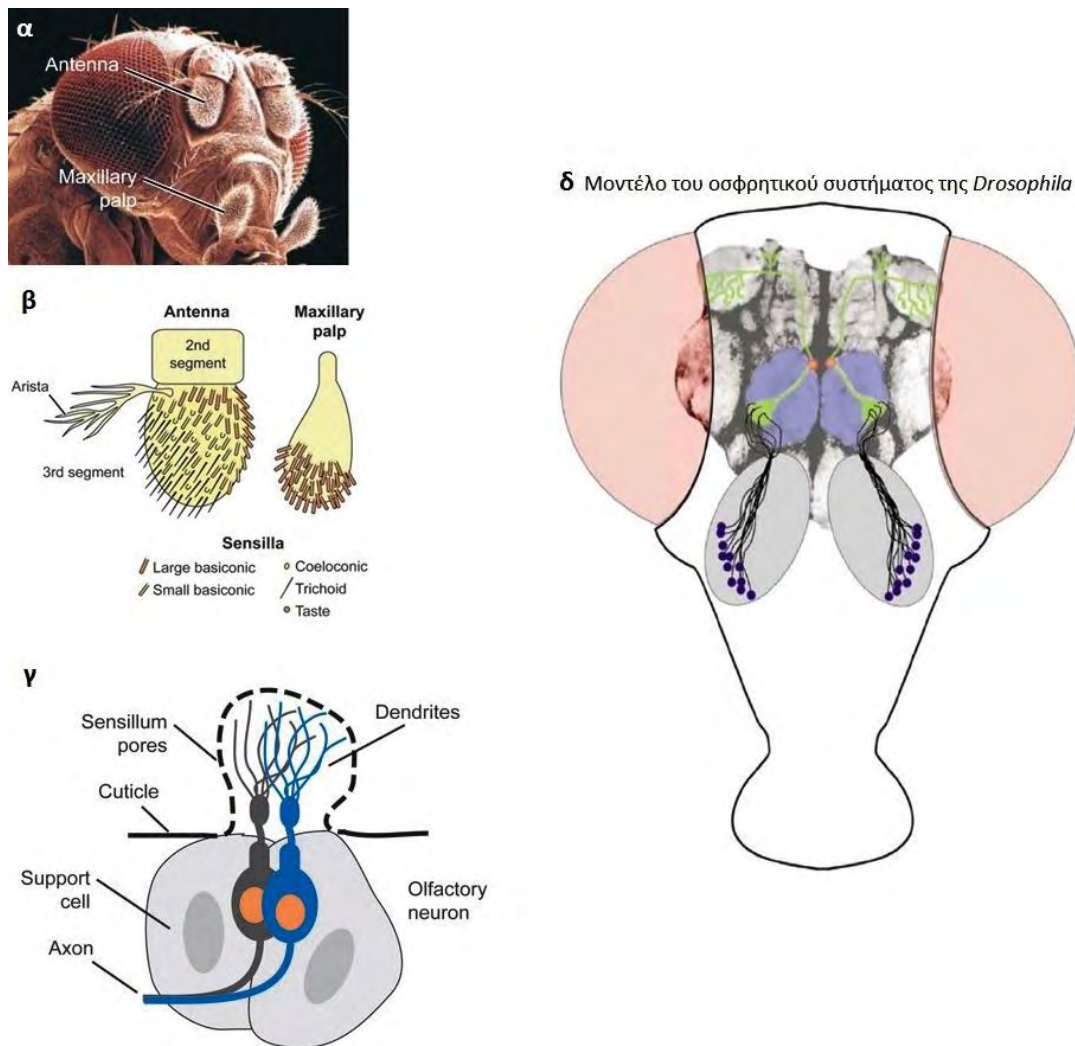
Οι κεντρικοί μηχανισμοί, με τους οποίους ο εγκέφαλος αναγνωρίζει και διακρίνει τα ελκυστικά ή τα απωθητικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος και ακολούθως, οδηγείται στην αντίστοιχη απόκριση, δεν είναι απόλυτα κατανοητοί σε κανέναν οργανισμό. Ωστόσο, πρόσφατες μοριακές και ανατομικές εξελίξεις στη *Drosophila* έχουν παράγει μία αρκετά ολοκληρωμένη εικόνα της περιφερικής νευρολογικής ανατομίας και της λειτουργίας της όσφρησης στα έντομα, η οποία περιγράφεται παρακάτω.

B. 1. Ανατομία του οσφρητικού συστήματος

Τα έντομα ανιχνεύουν τα οσφρητικά ερεθίσματα μέσω οργάνων που βρίσκονται στο κεφάλι. Τα βασικά οσφρητικά όργανα των εντόμων, μέσω των οποίων πραγματοποιείται αυτή η ανίχνευση είναι δύο: οι **κεραίες (antennae)** και οι **γναθικές προσακτρίδες (maxillary palps)**. Όλοι οι οσφρητικοί νευρώνες (Olfactory Receptor Neurons, ORNs) βρίσκονται στο τρίτο τμήμα της κεραίας και της γναθικής προσακτρίδας (Εικ. 8α). Τα δύο αυτά όργανα καλύπτονται από εξειδικευμένα **τριχοειδή αισθητήρια (sensilla)**, τα οποία προστατεύουν τους οσφρητικούς νευρώνες από οποιαδήποτε προσβολή από το περιβάλλον (Εικ. 8β). Οι οσφρητικοί νευρώνες (ORNs) είναι διπολικά κύτταρα, που εκτείνουν ένα μοναδικό νευρικό άξονα από τη βάση τους, ο οποίος καταλήγει στο εσωτερικό τμήμα του εγκεφάλου. Κάθε οσφρητικός νευρώνας εκτείνει δένδριτες, οι οποίες καταλήγουν σε βλεφαριδωτές προεξοχές στο εσωτερικό των τριχοειδών αισθητηρίων (Εικ. 8γ). Ένα συγκεκριμένο τριχοειδές αισθητήριο μπορεί να διαθέτει στο εσωτερικό του από έναν έως και τέσσερις νευρώνες, οι οποίοι περιβάλλονται από υποστηρικτικά κύτταρα (support cells). Ο ρόλος των υποστηρικτικών κυττάρων είναι να εκκρίνουν το λεμφικό υγρό που υπάρχει στο εσωτερικό των αισθητηρίων και να διατηρούν ηλεκτρικά απομονωμένο το κάθε αισθητήριο από τα γειτονικά του.³⁹

Οι **κεραίες** καλύπτονται από τρεις διαφορετικούς τύπους αισθητηρίων, τα βασικωνικά (basiconic), τα τριχοειδή (trichoid) και τα κοιλοκωνικά (coeloconic). Οι διάφοροι τύποι των αισθητηρίων διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος, τη μορφολογία και τις ουσίες που ανιχνεύουν. Τα αισθητήρια κατανέμονται σε ένα στερεότυπο πρότυπο με αμφίπλευρη συμμετρία, όπου τα μεγάλα βασικωνικά αισθητήρια είναι συγκεντρωμένα στο διάμεσο-εσωτερικό τμήμα της κεραίας και τα τριχοειδή αισθητήρια βρίσκονται στο ακραίο-πλευρικό τμήμα. Τα μικρά βασικωνικά και τα κοιλοκωνικά αισθητήρια είναι διάσπαρτα στη μεσαία περιοχή της κεραίας (Εικ. 8β).³⁹ Δεν είναι, ακόμη ξεκάθαρος ο λόγος για τον οποίο υπάρχουν αυτοί οι διαφορετικοί τύποι αισθητηρίων, ούτε και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν τη λειτουργία των οσφρητικών νευρώνων. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι κάθε τύπος διαφέρει στη σύσταση των πρωτεϊνών που περιέχονται στο λεμφικό υγρό, που περιβάλλει τους δενδρίτες των ORNs. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες, σημαντικές για τη διατήρηση της ευαισθησίας των συστημάτων ανίχνευσης των οσμών, όπως για παράδειγμα, την ενίσχυση της ενεργοποίησης των οσφρητικών νευρώνων. Πιθανόν, να παίζουν κάποιο ρόλο στην πρόσληψη και διαλυτοποίηση των οσμών προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μεταφορά των υδρόφοβων οσφρητικών μορίων διαμέσου του λεμφικού υγρού ή στην ταχεία απενεργοποίηση του ερεθίσματος, αμέσως μετά την ανίχνευσή του. Μια οικογένεια πρωτεϊνών που πιθανόν συμβάλλει σε αυτές τις λειτουργίες είναι οσμο-δεσμευτικές πρωτεΐνες⁴⁰ (βλ. παρακάτω).

Κάθε κεραία περιέχει περίπου 1300 οσφρητικούς νευρώνες (ORNs) στο εσωτερικό της. Οι άξονες των οσφρητικών νευρώνων συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες λειτουργικές μονάδες επεξεργασίας, που ονομάζονται **οσφρητικά σπειράματα (olfactory glomeruli)**, και βρίσκονται στον **αντεννικό λοβό (Antennal Lobe, AL)** του εγκεφάλου (Εικ. 8δ). Ο αντεννικός λοβός, AL, είναι το βασικό οσφρητικό κέντρο του εγκεφάλου των εντόμων. Τα σπειράματα είναι τα πρώτα συναπτικά κέντρα μετάδοσης της οσφρητικής πληροφορίας από τους ORNs και είναι, στην ουσία, σφαιρικές δομές του εγκεφάλου, που αποτελούνται από τις συνάψεις μεταξύ των νευρικών αξόνων των ORNs, των τοπικών διάμεσων νευρώνων και των δευτεροταγών νευρώνων προβολής (projection neurons, PNs). Η οργάνωση των σπειραμάτων είναι, στην ουσία, η προβολή των αξόνων των οσφρητικών νευρώνων με τη μορφή διακριτών, συμπυκνωμένων συναπτικών κέντρων στον εγκεφαλο, και είναι ιδιαίτερα συντηρημένη σε όλους τους οργανισμούς, που διαθέτουν διαφοροποιημένο οσφρητικό σύστημα. Στη *Drosophila*, οι 1300 ORNs συγκεντρώνονται σε ~50 οσφρητικά σπειράματα.⁴¹



Εικόνα 8: Ανατομία του περιφερικού οσφρητικού συστήματος των εντόμων.

α) Μικρογραφία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) του κεφαλιού ενός εντόμου, όπου υποδεικνύονται τα βασικά αισθητήρια όργανα της όσφρησης. β) Σχηματική αναπαράσταση της εξωτερικής επιφάνειας των βασικών οσφρητικών οργάνων, γ) Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού οσφρητικού αισθητηρίου, που φιλοξενεί δύο ORNs (με γκρι και μπλε χρώμα),³⁹ δ) Μετωπιαία όψη κεφαλιού της *Drosophila* που απεικονίζει το κύκλωμα του οσφρητικού συστήματος. Το ραχιαίο μέρος είναι πάνω. Τα μάτια απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα και οι κεραίες με γκρι. Ο εγκέφαλος είναι ορατός μέσα από το περίβλημα του κεφαλιού, ο αντεννικός λοβός (AL) έχει μπλε χρώμα. Οι OSNs αναπαριστώνται ως σκούρες μπλε κουκκίδες πάνω στις κεραίες. Οι νευρώνες εκτείνουν τους άξονές τους (μαύρο χρώμα) οι οποίοι συγκεντρώνονται στα οσφρητικά σπειράματα (πράσινο χρώμα) του AL του εγκεφάλου. Τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων προβολής, PNs που συνάπτονται με τους OSNs στον AL απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Οι δενδρίτες αυτών των κυττάρων νευρώνουν το οσφρητικό σπείραμα (πράσινες σφαιρικές δομές πάνω στον AL) και οι άξονές τους (πράσινο χρώμα) εκτείνονται προς τα ανώτερα τμήματα του εγκεφάλου.³⁸

Οι **γναθικές προσακτρίδες** έχουν πολύ πιο απλή δομή σε σχέση με τις κεραίες. Διαθέτουν μόνο μία κλάση βασικών αισθητηρίων. Η κορυφή της κάθε γναθικής προσακτρίδας καλύπτεται από περίπου 60 αισθητήρια, καθένα εκ των οποίων διαθέτει στο εσωτερικό του δύο οσφρητικούς νευρώνες. Η δομή των αισθητηρίων των γναθικών προσακτρίδων είναι παρόμοια με τη δομή των βασικών αισθητηρίων των κεραίων. Οι οσφρητικοί νευρώνες των γναθικών προσακτρίδων καταλήγουν, επίσης, στον αντεννικό λοβό, AL, ωστόσο δεν συγκεντρώνονται στο ίδιο σημείο με τους νευρώνες των κεραίων. Αντιθέτως, η συγκέντρωσή τους πραγματοποιείται σε σημεία του εγκεφάλου όπου συγκεντρώνονται, κατά κύριο λόγο, γευστικοί νευρώνες, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν οι γναθικές προσακτρίδες παίζουν κάποιο ρόλο και στην αίσθηση της γεύσης του εντόμου. Στην πραγματικότητα, ο βαθμός με τον οποίο κάθε αισθητήριο όργανο συμμετέχει στην αναγνώριση των οσφρητικών ή άλλων ερεθισμάτων (π.χ. γευστικά ή μηχανικά ερεθίσματα) διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών των εντόμων.³⁹

B. 2 Οσφρητικά ερεθίσματα

Το οσφρητικό σύστημα επεξεργάζεται δύο κύριες κατηγορίες ερεθισμάτων:⁴²

α) **τα γενικά οσφρητικά ερεθίσματα (odorants)**, που είναι πτητικές χημικές ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος και τα οποία προσλαμβάνονται ως οσμές από το οσφρητικό σύστημα των εντόμων. Τα μικρά αυτά μόρια προέρχονται από τις τροφές ή το περιβάλλον γενικότερα και σηματοδοτούν την παρουσία τροφής, φωτιάς, ή και θηρευτών. Επομένως, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση της τροφής, στην αποφυγή των θηρευτών αλλά και άλλων περιβαλλοντικών κινδύνων (π.χ. φωτιά)

β) **τις φερομόνες (pheromones)**, που είναι εξειδικευμένες ουσίες, οι οποίες εκκρίνονται από ένα άτομο και προσλαμβάνονται από ένα δεύτερο άτομο του ίδιου είδους. Συνήθως οι φερομόνες προκαλούν μια στερεότυπη ενδοκρινολογική απόκριση στα άτομα του ίδιου είδους, η οποία σχετίζεται με την αναπαραγωγή ή με την κοινωνική συμπεριφορά. Οι φερομόνες μπορεί να είναι πρωτεΐνες, μικρά μόρια ή συνδυασμός και των δύο.

Τα οσφρητικά ερεθίσματα και οι φερομόνες, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ανιχνεύονται από τους Οσφρητικούς Αισθητήριους Νευρώνες (Olfactory Sensory Neurons, OSNs). Κάθε οσφρητικός νευρώνας αποκρίνεται σε περισσότερα του ενός ερεθίσματα, και αντιστρόφως, κάθε οσφρητικό ερέθισμα μπορεί να διεγείρει πολλές κλάσεις οσφρητικών νευρώνων.⁴⁰ Στην πρόσληψη των οσφρητικών μορίων εμπλέκεται μια σειρά πρωτεϊνικών μορίων του οσφρητικού συστήματος (OBPs, ORs, κλπ.).

B. 3. Οσμο-δεσμευτικές πρωτεΐνες

Τα περισσότερα οσφρητικά μόρια είναι υδρόφοβα. Ωστόσο, οι δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων βρίσκονται μέσα στο λεμφικό υγρό των αισθητήριων τριχιδίων. Κατά συνέπεια, τα υδρόφοβα οσφρητικά μόρια θα πρέπει να περάσουν το υδάτινο εξωκυττάριο περιβάλλον της λέμφου, προκειμένου να φτάσουν στη μεμβράνη του νευρώνα. Η λέμφος περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις μια οικογένειας πρωτεϊνών, που ονομάζονται **οσμο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (odorant binding proteins, OBPs)**. Οι OBPs είναι σφαιρικές πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, που εκκρίνονται στο λεμφικό υγρό από τα υποστηρικτικά κύτταρα, που περιβάλλουν τους νευρώνες. Οι OBPs χαρακτηρίζονται από μια συγκεκριμένη περιοχή που αποτελείται από έξι α-έλικες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς.^{43,44} Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών δεν έχει, ακόμη, εξακριβωθεί, ωστόσο, πιστεύεται ότι δρουν ως μεταφορείς των οσφρητικών μορίων διαμέσου της λέμφου, προκειμένου να φτάσουν στον εκάστοτε οσφρητικό υποδοχέα (βλ παρακάτω). Επίσης, οι OBPs πιθανόν, να εμπλέκονται και στην αναγνώριση των οσφρητικών μορίων, συμβάλλοντας και αυτές στην καθιέρωση του οσφρητικού κώδικα.^{45,46,47,48} Παράλληλα, είναι πιθανή η συμμετοχή τους και στην απενεργοποίηση των οσφρητικών ερεθισμάτων.⁴⁹ Παρά την ξεκάθαρη συσχέτιση των πρωτεϊνών αυτών με τους οσφρητικούς ιστούς, υπάρχουν μελέτες ετερόλογης έκφρασης γονιδίων OR της *Drosophila*, οι οποίες υποδεικνύουν ότι οι OBPs δεν παίζουν κάποιο ιδιαίτερο ρόλο στην εξειδικευμένη δέσμευση του οσφρητικού ερεθίσματος.^{50,51} Ωστόσο η πρόσληψη των φερομονών αποτελεί εξαίρεση, καθώς η πρωτεΐνη LUSH, που είναι μια OBP, είναι απαραίτητη για την ανίχνευση της φερομόνης cVA (βλ. φερομονικοί υποδοχείς). Επομένως η εξακρίβωση του ρόλου των OBPs χρειάζεται περαιτέρω μελέτες.

B. 4. Οσφρητικοί υποδοχείς

Οι **οσφρητικοί υποδοχείς (olfactory receptors, ORs)** είναι τα βασικά μόρια που συμβάλλουν στην απόκριση των οσφρητικών νευρώνων σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των οσφρητικών νευρώνων. Διαθέτουν ένα ενδοκυτταρικό N-τελικό άκρο, 7 διαμεμβρανικές περιοχές, που συνδέονται μεταξύ τους με 3 εξωκυτταρικές και 3 ενδοκυτταρικές θηλιές, και ένα εξωκυτταρικό C-τελικό άκρο.⁵² Έχουν χαρακτηριστεί 60 διαφορετικά γονίδια, τα οποία αποτελούν μία ξεχωριστή οικογένεια γονιδίων, που κωδικοποιούν 62 διαφορετικούς οσφρητικούς υποδοχείς (λόγω εναλλακτικού ματίσματος) στη *D. melanogaster*. Οι προβλεπόμενες πρωτεΐνες παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλη απόκλιση σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, τόσο μεταξύ τους, όσο και σε σύγκριση με άλλους γνωστούς οσφρητικούς υποδοχείς άλλων οργανισμών.⁵³

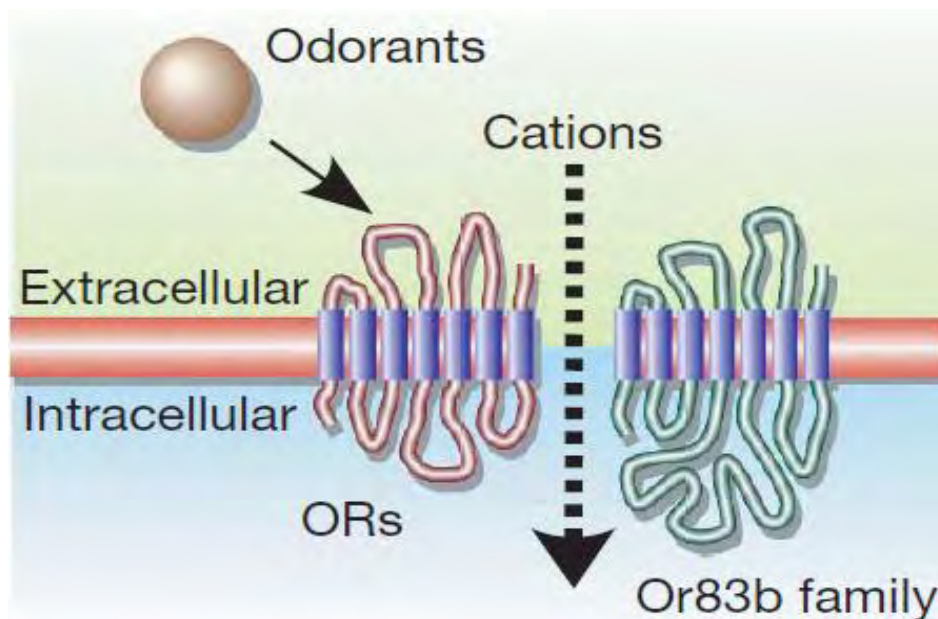
Κάθε υποδοχέας εκφράζεται σε ένα μικρό σταθερό υποσύνολο 3–50 οσφρητικών νευρώνων. Επιπλέον, η πλειοψηφία των νευρώνων εκφράζει μόνο έναν οσφρητικό υποδοχέα, εκτός από ορισμένες περιπτώσεις, που εκφράζει μέχρι και δύο.⁵⁴ Οι οσφρητικοί υποδοχείς είναι υπεύθυνοι για όλες τις ιδιότητες του νευρώνα, όπως, το φάσμα της οσφρητικής απόκρισης (σε ποιο οσφρητικό μόριο αποκρίνεται ο νευρώνας), την ένταση της απόκρισης (περισσότεροι υποδοχείς ενεργοποιούνται με υψηλότερες συγκεντρώσεις οσφρητικών μορίων), τη δυναμική της απόκρισης (απότομη ή παρατεταμένη απόκριση ή/και τερματισμός) και τον τρόπο μετάδοσης του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου (διέγερση ή αναστολή).⁴⁰

Όλα τα μέλη της οικογένειας των οσφρητικών υποδοχέων (Or) φαίνεται να λειτουργούν ως προσδετο-εξαρτώμενοι υποδοχείς, δηλαδή, ενεργοποιούνται μετά από την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένο οσφρητικό πρόσδεμα (ligand). Ωστόσο, ένα μέλος της οικογένειας, ο υποδοχέας **Or83b**, παρουσιάζει κάποια χαρακτηριστικά που διαφέρουν σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη. Η πρώτη διαφορά του Or83b έγκειται στο γεγονός ότι η έκφρασή του είναι σχεδόν καθολική, σε όλους τους οσφρητικούς νευρώνες και όχι μόνο σε κάποιο συγκεκριμένο υποσύνολο.⁵⁴ Επίσης, παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των διαφορετικών τάξεων των εντόμων, σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας.^{56,57,58} Η πιθανή λειτουργία του Or83b περιγράφεται παρακάτω.

Μετάδοση του σήματος μέσω των ORs

Παρά την χαρακτηριστική δομή τους (7 διαμεμβρανικές περιοχές), οι οσφρητικοί υποδοχείς δεν αποτελούν GPCRs (G-protein Coupled Receptors). Η τοπολογία τους διαφέρει σε σχέση με τους GPCRs και συγκεκριμένα είναι αντίστροφη, καθώς το N-τελικό άκρο τους είναι ενδοκυτταρικό και το C-τελικό άκρο τους είναι εξωκυτταρικό (σε αντίθεση με τους GPCRs, όπου το N-τελικό άκρο τους είναι εξωκυτταρικό και το C-τελικό άκρο τους είναι ενδοκυτταρικό). Μια σειρά από μελέτες υποδεικνύουν ότι το μονοπάτι μετάδοσης του σήματος από τους οσφρητικούς υποδοχείς δεν εμπλέκει τη λειτουργία G-πρωτεϊνών. Αντιθέτως, φαίνεται ότι οι ORs σχηματίζουν ετερομερή σύμπλοκα αποτελούμενα από έναν κλασσικό προσδετο-εξαρτώμενο OR και τον Or83b. Ο Or83b εκφράζεται σε όλους τους οσφρητικούς νευρώνες και φαίνεται να λειτουργεί ως συν-υποδοχέας των οσφρητικών υποδοχέων, για το λόγο αυτό ονομάζεται και Orco (Odorant receptors Co-Receptor). Το σύμπλοκο Or/Or83b δημιουργεί ένα προσδετο-εξαρτώμενο κανάλι ιόντων, το οποίο ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του οσφρητικού ερεθίσματος στον εκάστοτε OR και επιτρέπει τη μεταφορά ιόντων διαμέσου το πόρου του.^{59,60,61} Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί, ακόμη, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο δρα το σύμπλοκο αυτό, καθώς οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα δείχνουν δύο πιθανές εξηγήσεις. Σύμφωνα με την πρώτη εξήγηση, ο Or83b αποτελεί από μόνος του ένα κανάλι ιόντων και η ενεργοποίησή του πραγματοποιείται μετά από την αλληλεπίδρασή του με τον εκάστοτε ενεργοποιημένο OR. Σε μία πιο πρόσφατη

έρευνα υποστηρίζεται ότι οι δύο υποδοχείς (OR και Or83b) συμβάλλουν από κοινού στη δημιουργία του πόρου ενός καναλιού ιόντων, το οποίο ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του οσφρητικού μορίου στον OR.⁶² Σε οποιαδήποτε από τις δύο περιπτώσεις, η ενεργοποίηση του καναλιού οδηγεί στην άμεση μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης του οσφρητικού νευρώνα, με αποτέλεσμα τη μετατροπή του χημικού σήματος σε ηλεκτρικό και τη μετάδοσή του στο εσωτερικό του εγκεφάλου, μέσω των νευρικών συνάψεων με τους δευτεροταγείς νευρώνες PNs.



Εικόνα 9: Σχηματικό μοντέλο του προσδετο-εξαρτώμενου καναλιού ιόντων OR/Or83b.⁵⁹

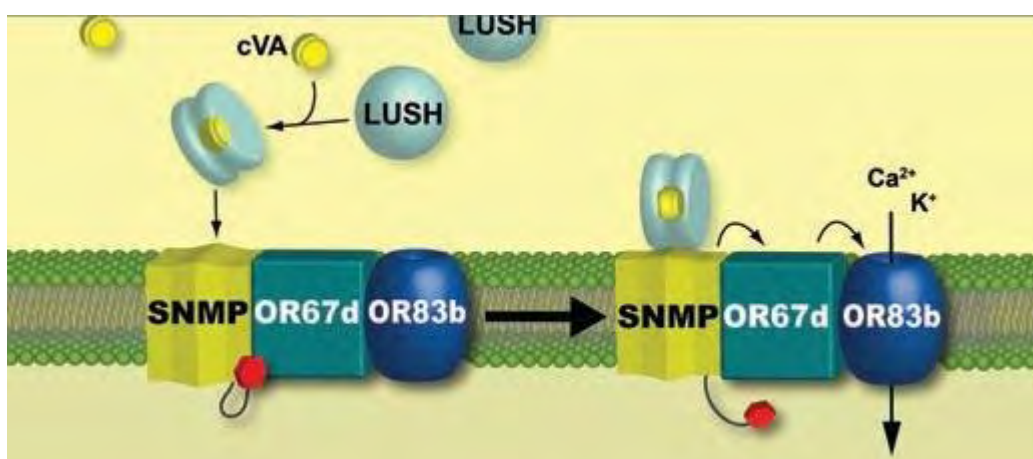
B. 5. Φερομονικοί υποδοχείς

Μια σειρά μελετών,^{63,64,65} που έχουν πραγματοποιηθεί στη *Drosophila* αλλά και σε άλλα είδη εντόμων, υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει κάποια διακριτή οικογένεια φερομονικών υποδοχέων, αλλά η ανίχνευση των φερομονών πραγματοποιείται, επίσης, μέσω υποδοχέων που προέρχονται από την οικογένεια των OR. Παρόλα αυτά, έχει διαπιστωθεί ότι οι νευρώνες, που εντοπίζουν τη φερομόνη 11-cis-vaccenyl acetate, (cVA) στη *Drosophila*, είναι εξειδικευμένοι και απαιτούν επιπρόσθετους παράγοντες για την ανίχνευση των φερομονών. Το cVA είναι η καλύτερα μελετημένη πτητική φερομόνη της *Drosophila* και παράγεται κυρίως από τα αρσενικά έντομα και σε μικρότερες ποσότητες από τα θηλυκά. Η δράση του είναι αποθητική για τα αρσενικά και πιθανόν εμποδίζει τη σύζευξη των θηλυκών που έχουν ήδη ζευγαρώσει και έχουν αποκτήσει το cVA του αρσενικού κατά τη διάρκεια της σύζευξης μαζί του.^{66,67,68} Επίσης, η ικανότητα των θηλυκών εντόμων να ανιχνεύουν το cVA, που εκκρίνουν τα αρσενικά, φαίνεται να ενισχύει την πιθανότητα σύζευξης.⁶⁹ Οι

επιπρόσθετοι παράγοντες που απαιτούνται για την πρόσληψη του cVA είναι η πρωτεΐνη **LUSH** και η πρωτεΐνη **SNMP** (sensory neuron membrane protein).

Η **LUSH** είναι μία πρωτεΐνη OBP και εκκρίνεται από τα υποστηρικτικά κύτταρα, που περιβάλλουν τους νευρώνες. Το cVA προσδένεται στη LUSH με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσής της. Η αλλαγή αυτή αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα OR με αποτέλεσμα να ακολουθεί η ενεργοποίησή του. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι το μόριο που τελικά προσδένεται στον υποδοχέα είναι η ενεργοποιημένη LUSH και όχι το cVA από μόνο του.⁷³

Η **SNMP** είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη με 2 διαμεμβρανικές περιοχές και είναι απαραίτητη για την αυτόματη απόκριση του υποδοχέα του cVA (Or67d), ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με τον Or83b.^{70,71} Δεν έχει εξακριβωθεί ο μηχανισμός με το οποίο δρα η SNMP, ωστόσο οι μελέτες, που έχουν γίνει έως τώρα, υποδεικνύουν ότι παίζει ένα γενικότερο βοηθητικό ρόλο στην πρόσδεση των φερομονών στους υποδοχείς τους. Η πιθανή της λειτουργία, ίσως, είναι η αναστολή του συμπλόκου Or67d/Or83b απουσία της φερομόνης cVA και παράλληλα, η ενεργοποίηση του παρουσία του cVA (Εικ. 10)



Εικόνα 10: Υποθετικό μοντέλο μηχανισμού ανίχνευσης της φερομόνης cVA. Η ανίχνευση του cVA διαμεσολαβείται από την εξωκυττάρια πρωτεΐνη LUSH. Το cVA προσδένεται στη LUSH, προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωσή της. Η ενεργοποιημένη LUSH προσδένεται στο σύμπλοκο SNMP/Or67d/Or83b, που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη του νευρώνα, και ακολούθως ενεργοποιεί το κανάλι ιόντων Or83b. Η SNMP πιθανόν να λειτουργεί ως ανασταλτική υπομονάδα του συμπλόκου Or67d/Or83b απουσία της ενεργοποιημένης LUSH. Μετά την σύνδεση του cVA στη LUSH, η SNMP σταματά την αναστολή του συμπλόκου Or67d/Or83b ενώ βοηθά, παράλληλα, στην περαιτέρω ενίσχυση της ενεργοποίησής του.⁷²

Γ. Ανίχνευση Πολυμορφισμών Μονού Νουκλεοτιδίου

Τα διάφορα προγράμματα αλληλούχισης του γονιδιώματος των εντόμων και οι βάσεις δεδομένων αλληλουχιών DNA, παρέχουν πρωτοφανείς ποσότητες πληροφοριών, που σχετίζονται με την ποικιλομορφία συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών βάσεων των διαφόρων γονιδίων. Οι **πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)** βρίσκονται σε αφθονία στο γονιδίωμα όλων των εντόμων, που έχουν εξετασθεί έως τώρα. Η μελέτη τους είναι ιδιαίτερα σημαντική σε πολλές αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής, σε μελέτες σύνδεσης, αλλά και στην εύρεση δεικτών επιλογής συγκεκριμένων χαρακτηριστικών. Για παράδειγμα, στον άνθρωπο, έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμοι στη γενετική σύνδεση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με πολύπλοκα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα πολλές ασθένειες που κληρονομούνται με μεντελικό τρόπο.^{74,75,76} Παράλληλα, έχουν συσχετισθεί με την ανθεκτικότητα των εντόμων σε συγκεκριμένα εντομοκτόνα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις στις οποίες συγκεκριμένες μεταλλάξεις προσδίδουν μειωμένη ευαισθησία σε αυτά,^{77,78,79,80} αλλά και με άλλα χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα ο αριθμός των τριχοειδών αισθητηρίων στη *Drosophila*.⁸¹

Οι τεχνολογίες ανίχνευσης των SNPs συμπεριλαμβάνουν δύο ευρύτερα πεδία: α) τη σάρωση αλληλουχιών DNA για την εύρεση νέων πολυμορφισμών, και β) τον καθορισμό των αλληλομόρφων ήδη γνωστών πολυμορφισμών σε μία αλληλουχία στόχο (SNP genotyping). Η ανίχνευση νέων πολυμορφισμών μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω στη σφαιρική (ή τυχαία) προσέγγιση και τη στοχευμένη προσέγγιση. Η ανάπτυξη των τεχνολογιών ανίχνευσης των SNPs χαρακτηρίζεται από την υιοθέτηση νέων βιολογικών μεθόδων, φθορίζοντων και άλλων μορίων αναφοράς, υπολογιστικών αλγορίθμων και αναλυτικών εργαλείων υψηλής ευαισθησίας.⁸² Στη συνέχεια περιγράφονται οι βασικότερες μέθοδοι ανίχνευσης, ταξινομημένες με βάση την παραπάνω κατηγοριοποίηση.

Γ. 1. Τεχνολογίες ανίχνευσης SNPs – Τυχαία προσέγγιση

Η πρώτη προσπάθεια τυχαίας ανίχνευσης πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου έγινε στον άνθρωπο για την εύρεση αλλαγών στα σημεία κοπής των περιοριστικών ενζύμων. Η μέθοδος αυτή ονομάστηκε ανάλυση **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphisms), δηλαδή, ανάλυση πολυμορφισμών μήκους τμημάτων περιορισμού και πραγματοποιήθηκε χωρίς την προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος. Η ανάλυση RFLP βασίζεται στην πέψη του γονιδιωματικού DNA με έναν αριθμό περιοριστικών ενδονουκλεασών, την ηλεκτροφόρηση των τμημάτων, που προκύπτουν σε πήκτωμα και τη μεταφορά σε νάιλον φίλτρα. Στη συνέχεια εφαρμόζονται στα φίλτρα ραδιενεργοί ανιχνευτές, προερχόμενοι από τυχαίους γονιδιωματικούς κλώνους, για την ταυτοποίηση των διαφορών στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των τμημάτων. Αν υπάρχει

αντικατάσταση έστω και μίας βάσης στο σημείο κοπής, τότε τα τμήματα που προκύπτουν έχουν διαφορετικό μήκος και άρα παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο στην ηλεκτροφόρηση. Τα μειονεκτήματα της ανάλυσης RFLP εντοπίζονται στο γεγονός ότι είναι μια αρκετά χρονοβόρα αλλά και ακριβή διαδικασία. Επίσης, μπορεί να ανιχνεύσει μόνο ένα μικρό μέρος των πολυάριθμων SNPs του γονιδιώματος.⁸³ Μετά την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), η μέθοδος εξελίχθηκε σε **PCR-RFLP ανάλυση**. Στην περίπτωση αυτή, σχεδιάζονται εκκινητές για την ενίσχυση συγκεκριμένων γενετικών τόπων και στη συνέχεια πραγματοποιείται η πέψη. Αυτή η παραλλαγή της μεθόδου είχε το μειονέκτημα ότι έπρεπε να υπάρχουν ήδη δεδομένα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για τη σχεδίαση των εκκινητών.⁸⁴

Η ανίχνευση των SNPs διευκολύνεται κατά πολύ όταν υπάρχουν δεδομένα **αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος** του προς μελέτη οργανισμού. Για παράδειγμα, η αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος⁸⁵ επέτρεψε τη σύγκριση αλληλουχιών του ίδιου γενετικού τόπου από διαφορετικά άτομα και την εύρεση εκατομμυρίων πολυμορφισμών.⁸⁶ Η πλειοψηφία των SNPs ανιχνεύθηκε από την **ανάλυση των αλληλεπικαλυπτόμενων κλώνων**, που προήλθαν από την αλληλούχιση του γονιδιώματος. Όταν οι κλώνοι αυτοί (bacterial artificial chromosome clones, BAC clones) προέρχονται από διαφορετικές βιβλιοθήκες, οι αλληλουχίες τους (20-30 kb) έχουν προέλευση από διαφορετικά άτομα. Η αλληλοεπικάλυψη των κλώνων αυτών με κατάλληλα προγράμματα βιοπληροφορικής επιτρέπει την ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών.

Γ. 2. Τεχνολογίες ανίχνευσης SNPs – Στοχευμένη προσέγγιση

Οι τεχνολογίες στοχευμένης προσέγγισης ανίχνευσης SNPs έχουν σκοπό την εύρεση πολυμορφισμών σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Η ιδανική μέθοδος στοχευμένης προσέγγισης είναι η **απευθείας αλληλούχιση** του προς ανάλυση γενετικού τόπου από πολλά διαφορετικά άτομα. Ωστόσο, πρόκειται για μία αρκετά χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία, που δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σε ένα εργαστήριο με σχετικά χαμηλό προϋπολογισμό. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε μια σειρά μεθόδων ανίχνευσης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, οι οποίες αξιοποιούν τις διαφορές μεταξύ ενός ετερο-δίκλωνου και ενός ομο-δίκλωνου μορίου DNA και περιγράφονται παρακάτω.

Ανάλυση DGGE

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα διαβάθμισης αποδιατακτικού παράγοντα, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η αποδιάταξη ενός δίκλωνου μορίου DNA εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την αλληλουχία του.⁸⁸ Ακόμη και μία νουκλεοτιδική διαφορά μπορεί να

αλλάζει τις συνθήκες αποδιάταξης ούτως ώστε να είναι δυνατή η διαφοροποίηση των μορίων.⁸⁹ Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός εν μέρει ανοιχτού δίκλωνου μορίου DNA επιβραδύνεται, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ακινητοποίηση ενός τμήματος DNA, που μετακινείται κατά μήκος ενός ηλεκτώματος, στο σημείο εκείνο όπου τα άκρα του αρχίζουν να αποδιατάσσονται. Με τη χρήση ηλεκτωμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση ενός χημικού αποδιατακτικού παράγοντα (π.χ. ουρία), είναι δυνατή η ακινητοποίηση του μορίου στη χαμηλότερη συγκέντρωση του αποδιατακτικού, που προκαλεί το διαχωρισμό των αλυσίδων του. Επομένως, τα τμήματα DNA, που έχουν διαφορές στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, ακινητοποιούνται σε διαφορετικό σημείο του ηλεκτώματος. Η διαφορά στην κινητικότητα αυξάνεται ακόμη περισσότερο όταν συγκρίνεται ένα ετεροδίκλωνο με ένα ομοδίκλωνο μόριο DNA. Το ετεροδίκλωνο μόριο, που περιέχει κάποιο αταίριαστο ζεύγος βάσεων, αποδιατάσσεται σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα σε σχέση με το ομοδίκλωνο, με αποτέλεσμα η τελική του θέση στο ηλεκτώμα να διαφέρει. Η μίξη των υπό δοκιμή δειγμάτων με ένα δείγμα αναφοράς, η αποδιάταξη τους και η επαναδιάταξη του μίγματος πριν την ηλεκτροφόρηση, αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου. Στη συνέχεια, απομονώνονται τα δείγματα με διαφορετική κινητικότητα προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός της αλληλουχίας τους και να ταυτοποιηθούν οι πολυμορφισμοί. Μια παραλλαγή της μεθόδου χρησιμοποιεί διαβάθμιση θερμοκρασίας αντί χημικού αποδιατακτικού παράγοντα. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης θερμοκρασίας, TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) και δίνει αποτελέσματα με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα.⁹⁰

Ανάλυση SSCP

Η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονού κλώνου, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) είναι μία μέθοδος που εκμεταλλεύεται την εξάρτηση της τρισδιάστατης δομής των μονόκλωνων αλυσίδων DNA από την αλληλουχία τους και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η μέθοδος βασίζεται στην προτίμηση που έχουν τα μόρια DNA να υπάρχουν σε δίκλωνη παρά σε μονόκλωνη κατάσταση. Απουσία της συμπληρωματικής τους αλυσίδας, τα μονόκλιωνα μόρια DNA αναδιπλώνονται στο χώρο, σχηματίζοντας όσο το δυνατόν περισσότερες ενδομοριακές δίκλωνες περιοχές. Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι σταθερές, οποιαδήποτε αλλαγή στη νουκλεοτιδική αλληλουχία αλλάζει την τρισδιάστατη δομή του μονόκλωνου μορίου. Η διατήρηση των μορίων DNA σε μονόκλωνη μορφή επιτυγχάνεται με την αποδιάταξη των δειγμάτων μέσω θέρμανσης για χρονικό διάστημα λίγων λεπτών και την επακόλουθη ταχεία ψύξη τους. Τα μονόκλιωνα μόρια DNA με διαφορετική διαμόρφωση, που ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικά ηλεκτώματα πολυακρυλαμιδίου, παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάκριση των μορίων με διαφορετική διαμόρφωση και άρα τον καθορισμό των μορίων εκείνων που παρουσιάζουν κάποια διαφορά στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία.⁹¹ Το σχήμα των μονόκλωνων μορίων

εξαρτάται από τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια, που είναι διαθέσιμα για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μέσα στο ίδιο το μόριο. Η διαφορά ακόμη και σε μία βάση μπορεί να προκαλέσει τη διαφορετική αναδίπλωση του μορίου, γεγονός που οδηγεί στη διαφοροποιημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η χρώση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης αποκαλύπτει το πρότυπο ηλεκτροφόρησης του κάθε δείγματος. Η αλληλούχιση των δειγμάτων που παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο ηλεκτροφορητικής κινητικότητας, επιτρέπει τον προσδιορισμό των πολυμορφισμών, που προκάλεσαν αυτές τις διαφορές. Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η απλότητα της. Ωστόσο, υπάρχει και ο περιορισμός ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση τμημάτων DNA με μέγεθος μεγαλύτερο των 300bp.⁹²

Πέψη ετερο-δίκλωνου DNA με την T4 ενδονουκλεάση VII

Η T4 ενδονουκλεάση VII είναι μέλος της οικογένειας των ρεζολβασών, οι οποίες κόβουν τις αλυσίδες DNA, που παρουσιάζουν αταίριαστα ζεύγη βάσεων. Η επώαση των ετεροδίκλωνων μορίων DNA με την T4 ενδονουκλεάση VII έχει ως αποτέλεσμα την πέψη του μορίου στο σημείο του αταίριαστου ζεύγους. Τα τμήματα που προκύπτουν μετά την πέψη διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Το μέγεθος των τμημάτων, που μπορεί να καθοριστεί από την ηλεκτροφόρηση, παρέχει πληροφορίες και για την θέση του πολυμορφισμού.^{93,94,95} Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η απλότητά της, η ανάλυση μεγαλύτερων τμημάτων DNA και η δυνατότητα προσδιορισμού της θέσης των πολυμορφισμών. Το μειονέκτημα της έγκειται στο γεγονός ότι δεν είναι δυνατή η ανίχνευση όλων των πιθανών πολυμορφισμών καθώς η T4 ενδονουκλεάση VII δεν κόβει πάντα όλα τα αταίριαστα ζεύγη βάσεων.

Αλληλούχιση μέσω Υβριδισμού

Η μέθοδος της αλληλούχισης μέσω υβριδισμού βασίζεται στο δεδομένο ότι η αλληλουχία ενός τμήματος DNA είναι γνωστή. Σε αυτή την περίπτωση είναι δυνατή η παράθεση μίας ομάδας ολιγονουκλεοτιδίων που αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το υπό ανάλυση τμήμα DNA σε μία πλάκα μικροσυστοιχειών (**DNA microarray or chip**). Το υπό ανάλυση δείγμα σημαίνεται με κάποια φθορίζουσα ουσία και στη συνέχεια μεταφέρεται στην επιφάνεια του DNA chip όπου και υβριδίζεται στην κατάλληλη θέση. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούμε να συμπεράνουμε την ακριβή αλληλουχία του δείγματος, αναλύοντας το πρότυπο υβριδοποίησης που προκύπτει μέσω υπολογιστή.⁹⁶ Είναι δυνατή η σύγκριση του προτύπου υβριδοποίησης που παράγεται από πολλά διαφορετικά δείγματα, προκειμένου να εντοπιστούν όλες οι διαφορές του DNA μεταξύ τους. Τα δείγματα μπορεί να είναι είτε μεγάλα προϊόντα PCR ή κλωνοποιημένα τμήματα DNA ή και ένα σύνολο μικρών προϊόντων PCR. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι επιτρέπει την ανάλυση μεγάλων

τμημάτων DNA (ή μεγάλο αριθμό μικρότερων τμημάτων) σε μία μόνο αντίδραση υβριδοποίησης. Ως εκ τούτου αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για την ανάλυση προϊόντων PCR μεγάλου μεγέθους και για τον εντοπισμό μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε γνωστά γονίδια.^{97,98,99,100} Τα μειονεκτήματα των μικροσυστοιχιών περιλαμβάνουν το γεγονός ότι πρέπει να είναι γνωστή η ακριβής αλληλουχία των υπό μελέτη τμημάτων DNA, το κόστος του σχεδιασμού και της κατασκευής του DNA chip, καθώς και την έλλειψη δυνατότητας εντοπισμού του ενδεχόμενου διπλασιασμού μίας περιοχής.

Άμεση αλληλούχιση του DNA

Με την ανάπτυξη νέων DNA πολυμερασών και τη βελτίωση της χημείας των μεθόδων αλληλούχισης, η ανίχνευση πολυμορφισμών με απευθείας αλληλούχιση του υπό μελέτη τμήματος DNA είναι πλέον πολύ πιο εύκολη και ανταγωνιστική, σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους. Η χρήση της Taq πολυμεράσης, που περιέχει τη μετάλλαξη F667Y, επιτρέπει την ενσωμάτωση των τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) και των σημασμένων αναλόγων τους στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA, με την ίδια συχνότητα που ενσωματώνονται και τα φυσιολογικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).¹⁰¹ Η χρήση αυτοματοποιημένων αναλυτών επιτρέπει τον αυτόματο προσδιορισμό της αλληλουχίας, η οποία μπορεί, στη συνέχεια, να συγκριθεί με άλλες αλληλουχίες μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της ανίχνευσης των SNPs με άμεση αλληλούχιση του DNA είναι το γεγονός ότι η εξαγόμενη πληροφορία είναι απόλυτα ολοκληρωμένη. Με τη διεξαγωγή ενός μόνο πειράματος είναι δυνατός ο προσδιορισμός του τύπου, της θέσης αλλά και του περιεχομένου του κάθε πολυμορφισμού. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η ανάγκη υψηλής ποιότητας ενισχυμένων δειγμάτων DNA και το κόστος των αυτόματων αναλυτών. Ωστόσο, το πρόβλημα της ποιότητας των προϊόντων μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση μεθόδων καθαρισμού των PCR προϊόντων. Το βασικότερο μειονέκτημα είναι η αδυναμία της μεθόδου να διαβάσει πάνω από 400 bp, κάτι που αντιμετωπίζεται με την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR και από τις δύο κατευθύνσεις.

Γ. 3. Τεχνολογίες προσδιορισμού γενοτύπου για ήδη γνωστά SNPs

Η ιδανική μέθοδος προσδιορισμού γενοτύπου γνωστών SNPs (**SNP genotyping**) θα πρέπει να είναι εύκολη, αξιόπιστη, χαμηλού κόστους, ευέλικτη, αυτοματοποιημένη και να παράγει αποτελέσματα, που μπορούν να αναλυθούν εύκολα. Παρότι δεν υπάρχει μια τόσο ιδανική μέθοδος, υπάρχουν αρκετές τεχνικές οι οποίες είναι πολλά υποσχόμενες. Όλες οι μέθοδοι, που περιγράφηκαν παραπάνω είναι ικανές για την παραγωγή των δεδομένων που χρειάζονται για τον γενοτυπικό

προσδιορισμό, όμως δεν είναι αποδεκτές για τη χρήση τους στον άμεσο προσδιορισμό του γενοτύπου, καθώς είτε είναι αρκετά δαπανηρές, είτε το αποτέλεσμα που προκύπτει από την εφαρμογή τους δεν είναι αξιόπιστο γιατί δε βασίζεται αποκλειστικά στην αλληλουχία του DNA.

Οι κυριότερες τεχνολογίες προσδιορισμού του γενοτύπου βασίζονται σε τέσσερις γενικούς μηχανισμούς διάκρισης των αλληλομόρφων: την αλληλόμορφο-ειδική ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου (allele-specific nucleotide incorporation), την αλληλόμορφο-ειδική σύνδεση ολιγονουκλεοτιδίου (allele-specific oligonucleotide ligation), την αλληλόμορφο-ειδική επεμβατική κατάτμηση (allele-specific invasive cleavage) και την αλληλόμορφο-ειδική υβριδοποίηση (allele-specific hybridization).¹⁰² Και οι τέσσερις μηχανισμοί είναι αρκετά αξιόπιστοι και περιγράφονται παρακάτω.

1. Επέκταση εκκινητή

Πρόκειται για έναν αρκετά ισχυρό μηχανισμό διάκρισης αλληλομόρφων. Η τεχνική είναι ιδιαίτερα ευέλικτη και απαιτεί ελάχιστο αριθμό εκκινητών/ανιχνευτών. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της προσέγγισης αυτής και όλες βασίζονται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να ενσωματώνει στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο συμπληρωματικό με τη μήτρα DNA. Οι παραλλαγές αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι η **αλληλόμορφο-ειδική ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου** (ή απλά αλληλούχιση, allele specific nucleotide incorporation), όπου καθορίζεται η ταυτότητα της πολυμορφικής βάσης στο DNA στόχο. Στη δεύτερη κατηγορία, την **αλληλόμορφο-ειδική PCR**, ο προσδιορισμός του αλληλομόρφου πραγματοποιείται με τη χρήση εκκινητών ειδικών για ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο (allele-specific primers), όπου η DNA πολυμεράση ενισχύει το στόχο μόνο όταν οι εκκινητές είναι απόλυτα συμπληρωματικοί με την αλληλουχία του μορίου-στόχου. Στην τρίτη κατηγορία ο προσδιορισμός γίνεται με την **αλληλόμορφο-ειδική επέκταση του εκκινητή** (allele specific primer extension), όπου προσθήκη βάσεων από την πολυμεράση γίνεται μόνο όταν το 3'-άκρο του εκκινητή ταιριάζει στην πολυμορφική θέση της αλληλουχίας στόχου. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή και ως «σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση», PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) ή ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλομόρφων, PASA (PCR Amplification of Specific Alleles).^{82,103}

2. Σύνδεση ολιγονουκλεοτιδίου

Η DNA λιγάση είναι ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο ένζυμο, που έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει τις εγκοπές στα μόρια DNA. Η χρήση της λιγάσης στον προσδιορισμό του γενοτύπου γνωστών SNPs μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικές

προσεγγίσεις. Στην πρώτη προσέγγιση, την PCR - αντίδραση ανίχνευσης λιγάσης, **PCR-LDR** (PCR-ligase detection reaction), κατασκευάζονται ολιγονουκλεοτίδια (24-30 bp), τα οποία είναι ειδικά για ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο και όταν συνδέονται στην αλληλουχία στόχο βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο, δηλαδή, το 3' άκρο του πρώτου είναι δίπλα στο 5' άκρο του δεύτερου. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά είναι συμπληρωματικά με την αλληλουχία στόχο, και το ένα εκ των δύο (συνήθως το πρώτο) φέρει στο 3'-άκρο του την πολυμορφική θέση. Όταν τα ολιγονουκλεοτίδια υβριδοποιούνται στην αλληλουχία στόχο, η DNA λιγάση πραγματοποιεί τη σύνδεση μεταξύ τους μόνο όταν η συμπληρωματικότητα με το στόχο είναι απόλυτη. Η αντίδραση σύνδεσης δεν πραγματοποιείται όταν το 3'-άκρο του ενός ολιγονουκλεοτιδίου δεν είναι συμπληρωματικό με την θέση του SNP. Μετά την αντίδραση σύνδεσης, τα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται ως μήτρα για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR. Η PCR πραγματοποιείται μόνο όταν έχει γίνει η αντίδραση σύνδεσης. Μια ξεχωριστή αντίδραση πραγματοποιείται για κάθε ένα από τα διαφορετικά νουκλεοτίδια στην περιοχή του SNP και τα προϊόντα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη δεύτερη προσέγγιση, την αλυσιδωτή αντίδραση σύνδεσης, **LCR** (ligase chain reaction), σχεδιάζονται ολιγονουκλεοτίδια (24-30 bp) με τον ίδιο τρόπο που κατασκευάζονται και στην PCR-LDR. Στην αντίδραση LCR δεν ακολουθεί PCR. Αντιθέτως, χρησιμοποιείται μια θερμοσταθερή λιγάση (*Thermus thermophilus* DNA ligase), η οποία συνδέει τα δύο ολιγονουκλεοτίδια μόνο όταν αυτά είναι απόλυτα συμπληρωματικά με το στόχο και στη συνέχεια, πραγματοποιούνται 35-40 κύκλοι αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνδεσης, προκειμένου να ενισχυθεί γεωμετρικά η μήτρα DNA που περιέχει τον υπό μελέτη πολυμορφισμό.¹⁰⁴ Διαφορετική αντίδραση πραγματοποιείται για κάθε ένα από τα διαφορετικά νουκλεοτίδια στη θέση του πολυμορφισμού και τα προϊόντα ελέγχονται, συνήθως, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στην τρίτη προσέγγιση, τη δοκιμή σύνδεσης ολιγονουκλεοτιδίου, **OLA** (oligonucleotide ligation assay), χρησιμοποιείται ένα βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο, που λειτουργεί ως ανιχνευτής ειδικός για ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο, και ένα ολιγονουκλεοτίδιο αναφοράς σημασμένο στο 3'-άκρο του με φλουοροσκεΐνη. Η σύνδεση μεταξύ των δύο ολιγονουκλεοτιδίων πραγματοποιείται μόνο όταν το νουκλεοτίδιο, που βρίσκεται στο 3'-άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου ανιχνευτή, είναι συμπληρωματικό με το υπό μελέτη SNP.¹⁰⁵ Τα προϊόντα σταθεροποιούνται σε πλάκες στρεπταβιδίνης και η επιτυχής σύνδεση ανιχνεύεται με τη χρήση αντισωμάτων για τη φλουοροεσκεΐνη σημασμένων με υπεροξειδάση.

3. Επεμβατική κατάτμηση

Η τεχνολογία αυτή ονομάστηκε SISAR (Serial invasive signal amplification reaction) και χρησιμοποιεί τρία ολιγονουκλεοτίδια, τον ανιχνευτή (probe), τον εισβολέα (invader) και το σήμα (signal). Ο ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός με το 5'-άκρο της αλληλουχίας στόχου, συμπεριλαμβανομένου και του υπό ανάλυση SNP. Το 5'-άκρο του ανιχνευτή, αποτελούμενο από λιγότερα από 10 νουκλεοτίδια, δεν

είναι συμπληρωματικό με την 3' περιοχή του SNP, με αποτέλεσμα να δημιουργεί μια προεξέχουσα αλληλουχία (flap) που δεν υβριδοποιείται στο στόχο. Το ολιγονουκλεοτίδιο-εισβολέας είναι συμπληρωματικό με την 3' περιοχή του SNP και υβριδοποιείται σε αυτή, ενώ παράλληλα είναι συμπληρωματικό (το 3'-άκρο του) και με 1-2 νουκλεοτίδια της προεξέχουσας αλληλουχίας του ανιχνευτή. Αφού πραγματοποιηθεί η υβριδοποίηση, δημιουργείται ένα τριπλό σύμπλοκο μεταξύ του μορίου στόχου, του ανιχνευτή και του εισβολέα. Το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζεται από μία εξειδικευμένη περιοριστική ενδονουκλεάση (cleavase), η οποία κόβει την προεξέχουσα αλληλουχία μόνο όταν ο ανιχνευτής είναι απόλυτα συμπληρωματικός με τη θέση του SNP. Η απελευθερωμένη πλέον αλληλουχία του ανιχνευτή μπορεί να υβριδοποιηθεί με το ολιγονουκλεοτίδιο-σήμα. Το 3'-άκρο του σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου είναι συμπληρωματικό με την προεξέχουσα αλληλουχία. Παράλληλα, το μεσαίο τμήμα του σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου είναι έτσι σχεδιασμένο, ώστε να σχηματίζει μια δομή φουρκέτας, το 3'-άκρο της οποίας είναι συνδεδεμένο με ένα μόριο απορρόφησης του φθορισμού (quencher). Επίσης, το 5'-άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου-σήματος αποτελείται από 10 νουκλεοτίδια, που δεν έχουν συμπληρωματικότητα με την προεξέχουσα αλληλουχία του ανιχνευτή και το τερματικό 5' νουκλεοτίδιο είναι συνδεδεμένο με μία φθορίζουσα ομάδα. Όταν απελευθερωθεί η προεξέχουσα αλληλουχία (flap), υβριδοποιείται με το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο, δημιουργώντας ένα άλλο τριμερές σύμπλοκο, το οποίο αποτελεί, επίσης, υπόστρωμα για την εξειδικευμένη ενδονουκλεάση. Η ενδονουκλεάση κόβει το 5'-άκρο του σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της φθορίζουσας ομάδας από το μόριο απορρόφησης του φθορισμού. Η ποσότητα της ελευθερωμένης προεξέχουσας αλληλουχίας αυξάνεται όσο αυξάνεται και η πέψη από την ενδονουκλεάση κάτι που οδηγεί στην όλο και πιο αυξημένη απελευθέρωση του σήματος φθορισμού. Άρα, η παρουσία του υπό μελέτη SNP αποκαλύπτεται από την αύξηση του σήματος φθορισμού.^{106,107}

4. Υβριδοποίηση ανιχνευτών

Η μέθοδος βασίζεται στην επιτυχημένη υβριδοποίηση ανιχνευτών ειδικών για συγκεκριμένα αλληλόμορφα (allele-specific probes) της αλληλουχίας-στόχου, κάτω από βελτιστοποιημένες και ιδιαίτερα εξειδικευμένες συνθήκες, ώστε να εμποδίζεται η υβριδοποίηση, όταν υπάρχει έστω και ένα αταίριστο ζεύγος βάσεων. Έχουν αναπτυχθεί τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις: η υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών ειδικών για συγκεκριμένα αλληλόμορφα, ASO (allele-specific oligonucleotide hybridization), η αντίστροφη υβριδοποίηση, και οι μοριακοί φάροι (Molecular Beacons). Στην ASO, η περιοχή που περιέχει το SNP ενισχύεται μέσω PCR, στην οποία είναι βιοτινυλιωμένος ο ένας από τους δύο εκκινητές. Τα προϊόντα της PCR αποδιατάσσονται με θέρμανση, ψύχονται γρήγορα ούτως ώστε να μην επανυβριδοποιηθούν, και ακολούθως δεσμεύονται σε μια πλάκα ELISA που έχει καλυφθεί με στρεπταβιδίνη. Στη συνέχεια οι σημασμένοι ASO ανιχνευτές (με βιοτίνη ή διγοξιγενίνη στο 3'-άκρο τους), οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στη θέση

που εντοπίζεται ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, προστίθενται στην πλάκα και υβριδοποιούνται με το στόχο τους. Μετά από μια σειρά πλύσεων πραγματοποιείται η ανίχνευση του σήματος με τη χρήση ενός ενζύμου συνδεδεμένου με ένα μόριο αναφοράς (π.χ. αντίσωμα στρεπταβιδίνης ή αντιδιγοξιγενίνης). Στην **αντίστροφη υβριδοποίηση** ο ανιχνευτής είναι αυτός που σταθεροποιείται στην πλάκα και τα σημασμένα PCR προϊόντα υβριδοποιούνται με αυτόν. Οι **μοριακοί φάροι** είναι στην ουσία ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές των οποίων τα 5' και 3' άκρα δημιουργούν μία δομή φουρκέτας. Η μεσαία περιοχή του ανιχνευτή είναι συμπληρωματική με την περιοχή της αλληλουχίας-στόχου που περιέχει το SNP. Οι μοριακοί φάροι φέρουν διπλή σήμανση με μία φθορίζουσα ομάδα δεσμευμένη στο ένα άκρο του ανιχνευτή και μία ομάδα απορρόφησης στο άλλο. Όταν ο ανιχνευτής έχει τη μορφή φουρκέτας, οι δύο ομάδες βρίσκονται σε εγγύτητα και οι ομάδα απορρόφησης δεν επιτρέπει τη δημιουργία σήματος από τη φθορίζουσα ομάδα. Όταν ο ανιχνευτής υβριδοποιείται στη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο, αποδιατάσσεται η δομή της φουρκέτας και οι δύο ομάδες απομακρύνονται η μία από τη άλλη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σήματος. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται και πάλι, μόνο στην περίπτωση που υπάρχει απόλυτη συμπληρωματικότητα.^{108,109}

Μικροσυστοιχίες

Ένα παράδειγμα μεθόδου μεγάλης κλίμακας για τον προσδιορισμό του γενοτύπου μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, που βασίζεται στην υβριδοποίηση ανιχνευτών, είναι οι **μικροσυστοιχίες (SNP Microarrays)**. Η μέθοδος των μικροσυστοιχιών περιλαμβάνει την ακινητοποίηση μια σειράς από εκατομμύρια ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, που λειτουργούν ως ανιχνευτές, σε ένα στερεό υπόστρωμα. Το στερεό υπόστρωμα μπορεί να είναι μια γυάλινη πλάκα ή μια πλάκα πυριτίου. Οι αλληλουχίες των ανιχνευτών είναι σχεδιασμένες με τέτοιο τρόπο, ώστε να είναι συμπληρωματικές με τις αλληλουχίες-στόχους, δηλαδή, τις αλληλουχίες DNA του βιολογικού δείγματος, που φέρουν τους υπό ανάλυση πολυμορφισμούς. Συνήθως, τα μόρια στόχοι σημαίνονται με κάποια φθορίζουσα χρωστική και η αφθονία τους μπορεί να χαρακτηριστεί από την ένταση του φθορισμού που προκύπτει όταν υβριδοποιηθούν στον κατάλληλο ανιχνευτή. Η ένταση φθορισμού που καταγράφεται, αποθηκεύεται σε υπολογιστικά αρχεία, τα οποία αποτελούν τα ακατέργαστα δεδομένα των μικροσυστοιχιών. Η περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων αυτών με εξειδικευμένα προγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης επιτρέπει τον προσδιορισμό του γενοτύπου του δείγματος που αναλύεται κάθε φορά.^{110,111}

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός πιθανών πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) σε γενετικούς τόπους του γονιδιώματος της *C. capitata*, καθώς και η εν δυνάμει συσχέτισή τους με τον ξενιστή τον οποίο επιλέγει το έντομο. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε PCR-SSCP ανάλυση σε τμήματα της αλληλουχίας πέντε διαφορετικών γενετικών τόπων του γονιδιώματος της μύγας της Μεσογείου. Η ανάλυση έγινε στο γονιδιωματικό DNA 50 διαφορετικών ατόμων, που προέρχονταν από τους καρπούς διάφορων ειδών ξενιστή και από περιοχές της Αφρικής (Κένυα) και της Ελλάδας (Χίος, Πήλιο και Θεσσαλονίκη). Οι τρεις από τους πέντε γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν, αντιστοιχούν σε εξόνια γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς λειτουργίας του οσφρητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του γονιδίου του οσφρητικού υποδοχέα **Or59a**, το οποίο αντιστοιχεί στην έκτη διαμεμβρανική περιοχή της κωδικοποιούσας πρωτεΐνης. Επίσης, μελετήθηκαν τμήματα κωδικών περιοχών των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες **Obp56d** και **Obp8a**. Τέλος, οι υπόλοιποι δύο γενετικοί τόποι, που μελετήθηκαν, αντιστοιχούν σε μη κωδικές περιοχές των γονιδίων **Kap3** (Kinesin Associated Protein 3) και **sgl** (sugarless). Αυτά τα δύο γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεν συμμετέχουν άμεσα στη λειτουργία του οσφρητικού συστήματος, ωστόσο, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται έμμεσα στην οσφρητική συμπεριφορά της *D. melanogaster*.^{112,113}

II. Υλικά και Μέθοδοι

1. Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα των 50 εντόμων Μεσογειακής μύγας, που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία συλλέχθηκαν από την Αφρική και συγκεκριμένα την Κένυα και από την Ελλάδα. Πιο συγκεκριμένα, 38 έντομα είχαν προέλευση από την Κένυα, 4 από τη Χίο, 4 από το Πήλιο και 4 από τη Θεσσαλονίκη. Η συλλογή των δειγμάτων της Κένυας έγινε από πέντε διαφορετικά είδη φρούτων (μάνγκο, παπάγια, μήλο, πορτοκάλι, γκρεϊπφρουτ). Τα έντομα της Χίου συλλέχθηκαν από καρπούς σύκου, του Πηλίου από κυδώνια και της Θεσσαλονίκης από μήλα. Η συλλογή των εντόμων από την Κένυα έγινε από τον Sunday Ekesi (Plant Health Division, African Insect Science For Food and Health, International Center of Insect Physiology and Ecology) και αντίστοιχα των ελληνικών από τον Νίκο Παπαδόπουλο (Εργαστήριο Εντομολογίας και Εφαρμοσμένης Ζωολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κάθε άτομο ξεχωριστά.

2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA των εντόμων πραγματοποιήθηκε με το Wizard® Genomic DNA Purification Kit της Promega. Τα έντομα φυλάσσονται σε διάλυμα αιθανόλης 100% στους -20°C. Πριν την έναρξη της διαδικασίας τα έντομα τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου πάνω σε χαρτί για την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης. Στη συνέχεια, το κάθε έντομο μεταφέρεται ξεχωριστά σε φιαλίδιο (1,5 ml) και ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα.

1. Προσθήκη 400 μl Nuclei Lysis Solution στο κάθε φιαλίδιο και ομογενοποίηση του περιεχομένου του.
2. Επώαση σε υδατόλουτρο, στους 65°C για 25 λεπτά. Μετά το πέρας των 25 λεπτών, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για ~5 λεπτά.
3. Προσθήκη 3μl RNase Solution και απαλή ανάδευση του δείγματος αναποδογυρίζοντας το φιαλίδιο 2-5 φορές. Επώαση για 15-30 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για ~5 λεπτά.
4. Προσθήκη 135 μl Protein Precipitation Solution και καλή ανάδευση για ~20 δευτερόλεπτα σε vortex. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 12000 rpm (full speed). Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρό φιαλίδιο και προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης. Προσεκτική ανάδευση αναποδογυρίζοντας το φιαλίδιο 3-4 φορές.

6. Φυγοκέντριση για 2 λεπτά στα 12000 rpm. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 500 μl αιθανόλης (70%) στο ίζημα.
7. Προσεκτική ανάδευση 3-4 φορές. Φυγοκέντριση για 2 λεπτά στα 12000 rpm.
8. Απόρριψη υπερκειμένου και επώαση του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.
9. Προσθήκη 100 μl DNA Rehydration Solution και επώαση στους 65°C για 1 ώρα μέχρι την πλήρη αναδιάλυση του ιζήματος.

3. Σχεδίαση εκκινήτων

Το DNA που εξήχθει από τα δείγματα των 50 εντόμων χρησιμοποιήθηκε, στη συνέχεια, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR προκειμένου να γίνει η ενίσχυση των προς ανάλυση γενετικών τόπων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε σχεδίαση εκκινήτων, χρησιμοποιώντας ως βάση το γονιδίωμα της *D. melanogaster*. Οι προσβάσιμες πληροφορίες, που αφορούν το γονιδίωμα της *C. capitata*, περιορίζονται μόνο σε μία σειρά αλληλουχιών ESTs (Expressed Sequence Tags), οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί σε επίπεδο οντολογίας (Gomulski et al., 2008)¹¹⁴ και έχουν δημοσιευθεί στη βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information). Προκειμένου να προσδιοριστεί η οντολογία των αλληλουχιών EST χρησιμοποιήθηκαν οι οντολογίες της βάσης δεδομένων FlyBase από το Website “The Gene Ontology”¹¹⁶ σε συνδυασμό με αλληλουχίες του γονιδιώματος της *D. melanogaster* από τη Flybase (www.flybase.org). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω.

1. Πολλαπλή ομοπαράθεση του συνόλου των αλληλουχιών ESTs της *C. capitata* με τις μεταφρασμένες αλληλουχίες της *D. melanogaster*, χρησιμοποιώντας το εργαλείο του Blast (Basic Local Alignment Search Tool) και συγκεκριμένα το Blastx, το οποίο συγκρίνει τις υπό ανάλυση νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με αμινοξικές ακολουθίες πρωτεϊνών.
2. Οι αλληλουχίες ESTs που είχαν μεγαλύτερη ομολογία με τη *Drosophila* χαρακτηρίστηκαν με βάση τις οντολογίες των αλληλουχιών της *D. melanogaster*.
3. Από τις αλληλουχίες ESTs που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία, επιλέχθηκαν εκείνες που οι οντολογίες τους υποδείκνυαν κάποια συμβολή στη λειτουργία του οσφρητικού συστήματος. Οι αλληλουχίες αυτές επεξεργάστηκαν και ομαδοποιήθηκαν προκειμένου να δημιουργηθούν νουκλεοτιδικές ακολουθίες Unigene, με τη χρήση του πακέτου iAssembler.¹⁴⁴ Οι ακολουθίες Unigene είναι στην ουσία ομαδοποιημένες αλληλουχίες ESTs που προέρχονται από τον ίδιο γενετικό τόπο.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν πέντε Unigenes για καθένα από τα οποία σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών ώστε να πραγματοποιηθεί η ενίσχυσή τους με την αντίδραση της PCR.

| Unigene | <i>D.melanogaster</i> gene | Εκκινητής | Αλληλουχία εκκινητή | Μέγεθος προϊόντος |
|---------|----------------------------|-----------|--------------------------|-------------------|
| UN10128 | <i>Or59a</i> | Forward | TCGATAAAATTGACCTTCATGCTG | 257 bp |
| | | Reverse | CGTTAGTTTCGTGAACATAGAAC | |
| UN00319 | <i>Obp56d</i> | Forward | GAGCAAAAAGCAAAAAGGTTACAG | 250 bp |
| | | Reverse | TGCACTTAGCTTGGATGGC | |
| UN05535 | <i>Obp8a</i> | Forward | TTTATCCAGACGAAGCGCCC | 252 bp |
| | | Reverse | CCTCCTTGAACCACTGACCC | |
| UN02486 | <i>Kap3</i> | Forward | CAAGAATGACAAGAATGTCC | 262 bp |
| | | Reverse | CTACGAACATGGACAAAAGC | |
| UN10817 | <i>sgl</i> | Forward | CCTGAGCAACAAGGTGTGAG | 262 bp |
| | | Reverse | GCGAATCCATTTTTGTTTTGATTG | |

Πίνακας 4: Εκκινητές των ενισχυόμενων γενετικών τόπων

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια διαδικασία η οποία επιτρέπει την παραγωγή περισσοτέρων των 10 εκατομμυρίων αντιγράφων μίας αλληλουχίας DNA στόχου από έναν μικρό μόνο αριθμό μορίων. Η μέθοδος αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους συντελείται σε διακριτά βήματα. Κάθε βήμα χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, προκειμένου να γίνει η θερμική αποδιάταξη και η αντιγραφή του DNA. Συνήθως, η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται με τη χρήση ενός ενζύμου που ονομάζεται Taq DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε από ένα θερμοφίλο βακτήριο που ονομάζεται *Thermus aquaticus* και ζει σε πολύ θερμά περιβάλλοντα (50-80°C).¹¹⁷ Η Taq πολυμεράση είναι πολύ σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες και παραμένει ενεργή ακόμη και μετά την αποδιάταξη του DNA, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη προσθήκης νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο.¹¹³ Η δράση του ενζύμου είναι να καταλύει τη δημιουργία μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA του προς ενίσχυση τμήματος (μήτρα DNA) με τη χρήση των δομικών μονάδων του DNA (δηλαδή, των νουκλεοτιδίων) καθώς και ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές), που απαιτούνται για την έναρξη της αντιγραφής.

Τα συστατικά που περιέχονται στο μίγμα της αντίδρασης είναι:

Μήτρα DNA: Είναι η προς ενίσχυση αλληλουχία DNA. Η ποσότητα της μήτρας γονιδιωματικού DNA που απαιτείται για την αντίδραση βρίσκεται συνήθως μεταξύ 0,1-1 μg σε τελικό όγκο 50 μl. Μεγαλύτερες ποσότητες DNA συνήθως οδηγούν στην παραγωγή μη ειδικών PCR προϊόντων.¹¹⁸

Εναρκτήρια μόρια (εκκινητές): Είναι τα μόρια που χρησιμοποιεί η DNA πολυμεράση προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έναρξη της αντιγραφής. Τα μόρια αυτά είναι συμπληρωματικά με τα 3'-άκρα καθεμιάς από τις αλυσίδες της μήτρας DNA. Το μήκος των εναρκτήριων μορίων είναι συνήθως 15-30 νουκλεοτίδια και όσο μεγαλύτερο είναι αυτό, τόσο μεγαλύτερη είναι και η εξειδίκευση της αντίδρασης. Το περιεχόμενο σε GC θα πρέπει να είναι 40-60% και τα νουκλεοτίδια αυτά θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλο το μήκος της αλληλουχίας του εκκινητή. Θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται η ύπαρξη περισσοτέρων των τριών G ή C βάσεων στο 3'-άκρο του εκκινητή, προκειμένου να αποτρέπεται η μη ειδική έναρξη της αντιγραφής. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που πρέπει να αποφεύγεται κατά την επιλογή των εκκινητών είναι η συμπληρωματικότητα μεταξύ τους προκειμένου να αποτρέπεται η δημιουργία διμερών-εκκινητών.

Το σημείο τήξης (T_m) των εκκινητών θα πρέπει, επίσης, να λαμβάνεται υπόψη. Ένας εμπειρικός υπολογισμός του T_m μπορεί να γίνει με βάση τον τύπο:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T),$$

όπου τα G, C, A και T αποτελούν τον αριθμό των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία του εκκινητή. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού (T_a) είναι περίπου 5°C χαμηλότερη από το T_m .

Το T_m μεταξύ των δύο εκκινητών δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 5°C, επομένως, το περιεχόμενο GC αλλά και το μήκος των εκκινητών θα πρέπει να επιλέγονται αναλόγως.¹¹⁸

MgCl₂: Τα δισθενή ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), που προέρχονται από το $MgCl_2$, είναι απαραίτητα για τη δράση της Taq πολυμεράσης, καθώς το ένζυμο αυτό είναι εξαρτώμενο από το μαγνήσιο και το χρειάζεται ως συμπράγοντα προκειμένου να δράσει.¹¹⁵ Συγκεκριμένα, τα ιόντα Mg^{2+} εξουδετερώνουν τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ εκκινητών-DNA στόχου, με αποτέλεσμα να διευκολύνουν την υβριδοποίηση. Επιπλέον, τα Mg^{2+} δημιουργούν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, γεγονός που φαίνεται να είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση των dNTPs στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.¹¹⁶ Υψηλότερη συγκέντρωση των κατιόντων Mg^{2+} μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, καθώς οι εκκινητές υβριδοποιούνται σε τμήματα DNA με τα οποία δεν έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα. Χαμηλότερη συγκέντρωση Mg^{2+} οδηγεί στην αύξηση των απωστικών δυνάμεων μεταξύ εκκινητών-DNA στόχου, δηλαδή, εμποδίζεται η σωστή υβριδοποίηση, με

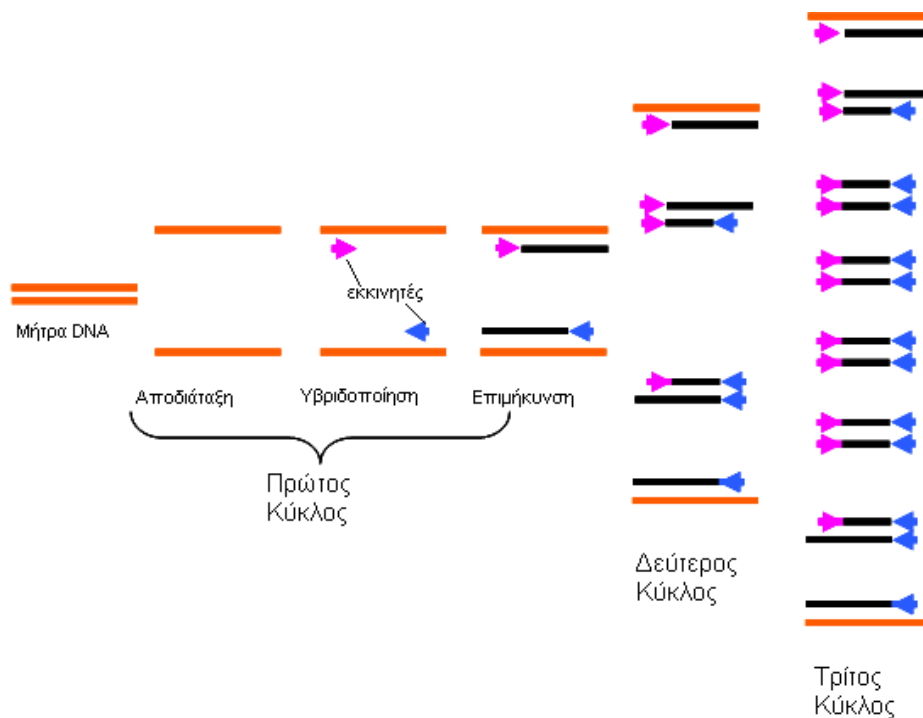
αποτέλεσμα την παραγωγή λιγότερου προϊόντος. Συνήθως, συνίσταται η συγκέντρωση του $MgCl_2$ να είναι 1-4 mM.¹¹⁸

PCR Buffer: Είναι το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης το οποίο παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα της Taq πολυμεράσης. Συνήθως, περιέχει KCl, (πηγή μονοσθενών κατιόντων K^+), προκειμένου να διευκολυνθεί η υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA στόχο. Άλλα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να είναι τα Tween 20, Triton X-100 ή Nonidet P-40 και πιθανόν κάποια επιπλέον πρωτεΐνη (π.χ. αλβουμίνη). Τα συστατικά αυτά βοηθούν στην αποφυγή της κατακρήμνισης της υδρόφοβης Taq πολυμεράσης μέσα στο υδατικό διάλυμα της αντίδρασης.¹¹⁹

dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια): Είναι οι δομικές μονάδες με τις οποίες συντίθεται το DNA. Η συγκέντρωση καθενός από τα dNTPs στο μίγμα της αντίδρασης είναι συνήθως 200μM. Είναι πολύ σημαντικό να είναι ίσες οι συγκεντρώσεις για κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), καθώς η ανακρίβεια στην αναλογία έστω και ενός dNTP σε σχέση με τα άλλα, μπορεί να αυξήσει δραματικά το επίπεδο της λανθασμένης ενσωμάτωσής τους στο νεοσυντιθέμενο DNA.¹¹⁸ Επίσης, η συγκέντρωση των dNTPs είναι ανάλογη με τη συχνότητα εισαγωγής λάθους νουκλεοτιδίου από την πολυμεράση. Πιο συγκεκριμένα, υπερβολική συγκέντρωση dNTPs μπορεί να αυξήσει τη συχνότητα λάθους της πολυμεράσης ή ακόμη και να αναστείλει την αντίδραση.¹²⁰

Taq DNA πολυμεράση: Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η Taq DNA πολυμεράση είναι το θερμικά σταθερό ένζυμο που καταλύει την αντίδραση PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού για την Taq πολυμεράση είναι στους 75-80°C. Συνήθως, χρησιμοποιούνται 1-1,5u του ενζύμου αυτού σε 50 μl όγκου αντίδρασης. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.¹¹⁸

Η αντίδραση της PCR αποτελείται συνήθως από μία σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων. Κάθε κύκλος τυπικά αποτελείται από 2-3 διακριτά βήματα, τα οποία πραγματοποιούνται σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία (Εικ. 11). Η θερμοκρασία και ο χρόνος κάθε βήματος εξαρτάται από ποικίλες παραμέτρους, όπως το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, η συγκέντρωση των δισθενών κατιόντων και των dNTPs και το T_m των εκκινητών.



Εικόνα 11: Τα βήματα της PCR.¹²¹

Πιο αναλυτικά, κατά την αντίδραση PCR πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

Αρχική αποδιάταξη: Η αρχική αποδιάταξη του DNA είναι το πρώτο βήμα της αντίδρασης. Η ολοκληρωμένη αποδιάταξη της μήτρας DNA στην αρχή της αντίδρασης είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς μια μη ολοκληρωμένη αποδιάταξη μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή χρησιμοποίηση της μήτρας DNA και επομένως σε χαμηλή απόδοση προϊόντος. Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιείται σε διάστημα 1-9 min στους 94-96°C.¹²²

Αποδιάταξη: Το βήμα της αποδιάταξης για κάθε κύκλο πραγματοποιείται στους 94-98 °C για 20-30 sec. Στο βήμα αυτό λαμβάνει χώρα η θερμική αποδιάταξη των μορίων DNA μέσω της διάσπασης των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δύο αλυσίδων.

Υβριδοποίηση: Στο βήμα της υβριδοποίησης πραγματοποιείται η σύνδεση των εναρκτηρίων μορίων στη μονόκλωνη μήτρα DNA. Συνήθως, η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) είναι 5°C χαμηλότερη από το T_m των εκκινητών και κυμαίνεται μεταξύ 50-65°C. Το βήμα της υβριδοποίησης διαρκεί συνήθως 20-40 sec. Σταθεροί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μήτρας DNA σχηματίζονται μόνο όταν η αλληλουχία του εκκινητή έχει μεγάλη συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία της

μήτρας. Η Taq πολυμεράση προσδένεται στο σύμπλοκο εκκινητή-μήτρας ώστε να ακολουθήσει η σύνθεση του DNA στο επόμενο βήμα.¹²³

Επιμήκυνση (πολυμερισμός): Στο βήμα της επιμήκυνσης πραγματοποιείται η σύνθεση DNA από την Taq DNA πολυμεράση (πολυμερισμός), η οποία παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα στους 75-80°C.¹¹⁷ Συνήθως το βήμα του πολυμερισμού πραγματοποιείται στους 72°C. Ο χρόνος που απαιτείται είναι 1 min για τη σύνθεση τμημάτων DNA μήκους μέχρι και 2 kb. Για την ενίσχυση αλληλουχιών μεγαλύτερου μήκους, ο χρόνος αυτός αυξάνεται περίπου κατά 1 min για κάθε 1000 bp.¹¹⁸ Στο βήμα αυτό, Taq πολυμεράση συνθέτει τη νέα αλυσίδα DNA προσθέτοντας dNTPs, που είναι συμπληρωματικά με τη μήτρα, με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Αριθμός κύκλων: Ο αριθμός των κύκλων της PCR εξαρτάται από την ποσότητα της μήτρας DNA στο μίγμα της αντίδρασης αλλά και από την απόδοση του προϊόντος που προσδοκάται. Σε περιπτώσεις που τα αντίγραφα της μήτρας DNA είναι λιγότερα από 10, θα πρέπει να πραγματοποιούνται 40 κύκλοι αντίδρασης. Αντίθετα, όταν η αρχική ποσότητα της μήτρας είναι υψηλότερη, η πραγματοποίηση 25-30 κύκλων είναι συνήθως επαρκής.¹¹⁸

Τελική επέκταση: Στο βήμα της τελικής επέκτασης λαμβάνει χώρα η συμπλήρωση των προεξεχόντων άκρων των νεοσυντιθέμενων προϊόντων της αντίδρασης. Επίσης, κατά τη διάρκεια του βήματος αυτού, προστίθενται επιπλέον νουκλεοτίδια αδερίνης (A) στο 3'-άκρο των PCR προϊόντων. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της δράσης τερματικής τρανσφεράσης που διαθέτει η Taq πολυμεράση.¹¹⁸

Τα βήματα της αντίδρασης PCR ήταν τα εξής:

1. 94°C για 4 min
2. 94°C για 30 sec
3. 60°C για 30 sec
4. 72°C για 30 sec
5. πίσω στο βήμα 2 για 29 φορές
6. 72°C για 5 min

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μl για κάθε δείγμα. Επειδή, η αντίδραση εκτελέστηκε ταυτόχρονα για όλα τα δείγματα, προετοιμάστηκε αρχικά ένα master mix το οποίο περιείχε νερό, PCR Buffer (περιέχει MgCl₂), dNTPs, εκκινητές και Taq πολυμεράση. Το μίγμα αυτό διαμοιράστηκε σε PCR tubes (ένα για κάθε δείγμα). Σε κάθε PCR tube προστέθηκαν 18μl master mix και 2μl δείγματος DNA. Όλα τα διαλύματα αναδεύτηκαν ελαφρώς και φυγοκεντρήθηκαν πριν εισαχθούν στα φιαλίδια της PCR. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται αναλυτικά η σύσταση του μίγματος της κάθε αντίδρασης.

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια PCR

| Αντιδραστήρια | Αρχικά | Τελικά | Όγκος (μl) |
|------------------|-----------|--------|------------|
| DNA | - | - | 2,0 |
| PCR Buffer | 10x | 1x | 2,0 |
| dNTPs | 10mM | 0,2mM | 0,4 |
| Forward primer | 10pmol/μl | 7pmol | 0,7 |
| Reverse primer | 50mM | 7pmol | 0,7 |
| Taq polymerase | 5u/μl | 1u | 0,2 |
| H ₂ O | - | - | 14,0 |
| Τελικός όγκος | - | - | 20,0 |

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5 %) προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός τους έλεγχος.

5. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των μορίων DNA (ή RNA) με βάση το μέγεθός τους. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA να μετακινούνται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου, μέσω ενός πηκτώματος αγαρόζης.¹²⁴

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες¹²⁵:

α) *Το μέγεθος του DNA.* Πιο συγκεκριμένα, τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια DNA μετακινούνται γρηγορότερα και περισσότερο σε σχέση με τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια.

β) *Τη στερεοδιάταξη του DNA.* Ένα γραμμικό μόριο, ένα ανοικτό κυκλικό μόριο και ένα κλειστό (υπερελικωμένο) κυκλικό μόριο DNA ίδιου μοριακού βάρους παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης.

γ) *Τη συγκέντρωση της αγαρόζης.* Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Στα πηκτώματα μεγάλης συγκέντρωσης (π.χ. 2% αγαρόζη) γίνεται καλύτερος διαχωρισμός των μικρότερων μορίων DNA, ενώ ο διαχωρισμός των μεγαλύτερων μορίων επιτυγχάνεται καλύτερα σε πηκτώματα μικρότερης συγκέντρωσης (π.χ. 0,7% αγαρόζη). Αυτό συμβαίνει γιατί η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια του DNA μειώνεται καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη. Άρα ο διαχωρισμός των μορίων DNA

μεγάλου μεγέθους, τα οποία έχουν εκ των πραγμάτων μικρότερη κινητικότητα, γίνεται ακόμη δυσκολότερος σε πήκτώματα μεγάλης συγκέντρωσης αγαρόζης.

δ) *Την τάση*. Γενικά, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η τάση του ρεύματος. Ωστόσο, η ηλεκτροφόρηση σε πολύ υψηλή τάση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαχωριστικής ικανότητας, όπως επίσης και στην τήξη του πηκτώματος.

Η οπτικοποίηση του DNA στο πήκτωμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική, που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), φθορίζει με πορτοκαλί χρώμα. Η προσθήκη του EtBr γίνεται κατά την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης.

Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με τη χρήση σκόνης αγαρόζης και ενός ρυθμιστικού διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το TBE (Tris Borate EDTA), το οποίο περιέχει Tris-βορικό και EDTA.

Το DNA που ηλεκτροφορείται στο πήκτωμα αναμιγνύεται με ένα διάλυμα χρωστικής (loading buffer), το οποίο περιέχει ένα είδος χρωστικής και έναν παράγοντα που αυξάνει την πυκνότητα του διαλύματος. Η χρωστική συνήθως είναι μπλε της βρωμοφαινόλης ή κυανού της ξυλόλης και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα, οι χρωστικές αυτές είναι ορατές από το ανθρώπινο μάτι, χωρίς τη χρήση ακτινοβολίας UV (όπως συμβαίνει με το EtBr), ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα να μετακινούνται στο πήκτωμα αγαρόζης με ταχύτητα παρόμοια με αυτή ενός τμήματος DNA συγκεκριμένου μεγέθους. Για παράδειγμα, το μπλε της βρωμοφαινόλης μετακινείται με την ταχύτητα μιας αλληλουχίας DNA 300bp και το κυανού της ξυλόλης με την ταχύτητα μιας αλληλουχίας 5000bp. Η ιδιότητα αυτή της χρωστικής δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της ταχύτητας με την οποία μετακινείται το DNA στο πήκτωμα, έτσι ώστε να σταματήσει η ηλεκτροφόρηση την κατάλληλη χρονική στιγμή. Το δεύτερο συστατικό είναι συνήθως η γλυκερόλη, η οποία προκαλεί την αύξηση της πυκνότητας του διαλύματος και με αυτό τον τρόπο υποβοηθά τη βύθιση του DNA στο πηγαδάκι του πηκτώματος.¹²⁵

Σε μία από τις θέσεις του πηκτώματος προστίθεται ο δείκτης μοριακού βάρους (DNA ladder), ο οποίος αποτελείται από μόρια DNA διαφόρων μεγεθών. Κάθε μόριο DNA του ladder μετακινείται με συγκεκριμένη ταχύτητα στο πήκτωμα και η θέση του αποτελεί αναφορά για όλα τα μόρια DNA του ίδιου μεγέθους. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών DNA που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση.

Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση:

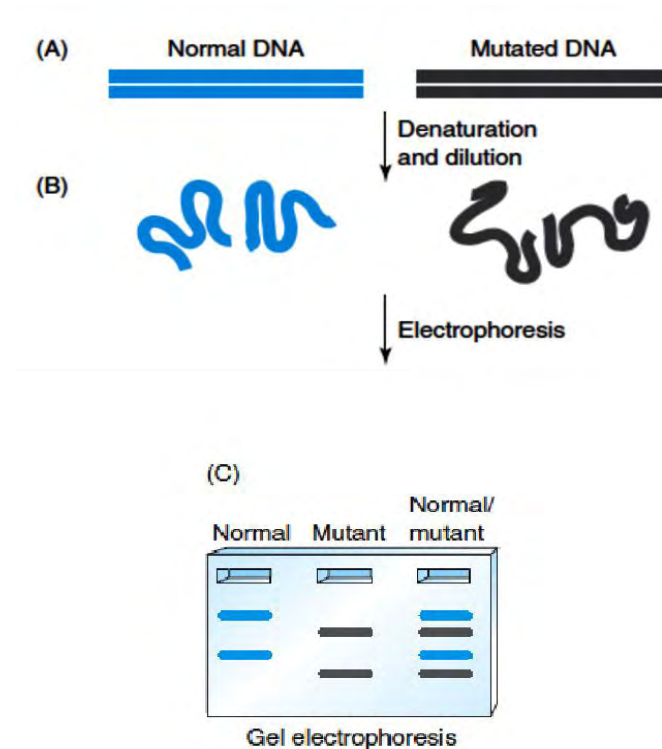
Το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε είχε περιεκτικότητα σε αγαρόζη 1,5% και παρασκευάστηκε ως εξής:

1. Προσθήκη 2,4gr αγαρόζης και 160ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE σε κωνική φιάλη και ανάδευση.
2. Θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Επώαση στον πάγκο προκειμένου να μειωθεί η θερμοκρασία του διαλύματος περίπου στους 55-60°C.
4. Προσθήκη 7μl βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα και ανάδευση.
5. Μεταφορά του διαλύματος της αγαρόζης στη βάση όπου στερεοποιείται το πήκτωμα. Προηγουμένως, έχει τοποθετηθεί κάθετα στην κατάλληλη θέση η "χτένα", ώστε να δημιουργηθούν οι θήκες για τη φόρτωση των δειγμάτων μετά την πήξη της αγαρόζης. Επώαση μέχρι τη στερεοποίηση.
6. Προσεκτική αφαίρεση της χτένας. Βύθιση του πηκτώματος στο δοχείο ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE.
7. Προσθήκη 2μl χρωστικής (loading buffer) και 10 μl από το προϊόν της PCR.
8. Φόρτωση των δειγμάτων και του DNA ladder στις θήκες του πηκτώματος.
9. Ηλεκτροφόρηση σε ~100V για περίπου 40 min.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε η οπτικοποίηση των ζωνών του DNA με τη χρήση ακτινοβολίας UV. Με τον τρόπο αυτό έγινε η εκτίμηση του αποτελέσματος της αντίδρασης PCR για καθένα από τα δείγματα.

6. Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονού κλώνου, SSCP

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ανάλυση SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), για την ανίχνευση των πιθανών πολυμορφισμών. Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο γεγονός ότι η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων μονόκλωνου DNA με σχετικά μικρό μήκος, διαμέσου μη αποδιατακτικών πηκτωμάτων, εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους, αλλά και από την αλληλουχία τους. Έτσι, μετά από την ενίσχυση μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA, τα ενισχυμένα τμήματα υποβάλλονται σε αποδιάταξη είτε με θέρμανση είτε με χημικούς παράγοντες, όπως το φορμαμίδιο. Κατόπιν, τα αποδιατεταγμένα τμήματα DNA ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μονόκλινα τμήματα παίρνουν ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία και συνεπώς αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση. Επομένως, η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα εξαρτάται από την τρισδιάστατη δομή τους. Ακόμη και η διαφορά μίας βάσης μεταξύ δύο αλληλουχιών, οδηγεί σε διαφορετική διαμόρφωση και άρα στη μετακίνηση σε διαφορετική θέση κατά την ηλεκτροφόρηση (Εικ. 12).



Εικόνα 12: SSCP ανάλυση. Τα δίκλινα προϊόντα PCR (A) μιας φυσιολογικής και μιας μεταλλαγμένης αλληλουχίας αποδιατάσσονται και δημιουργούν μονόκλωνες διαμορφώσεις (B). Οι διαμορφώσεις αυτές αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου όπου παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα (C)

Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμιδίου και ηλεκτροφόρηση

Η ανάλυση SSCP των PCR προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 8%. Για την παρασκευή του πηκτώματος χρειάστηκαν τα εξής:

- διάλυμα ακρυλαμιδίου 50%
- γλυκερόλη 87%
- TBE 5X
- APS (υπερθεϊκό αμμώνιο, Ammonium Persulfate) 10%
- TEMED (τετραμεθυλεθυλοδιαμίνη, Tetramethylethylenediamine)

Για την παρασκευή του διαλύματος ακρυλαμιδίου 50% ζυγίστηκαν 72,5 gr ακρυλαμίδης και 2,5gr δις-ακρυλαμίδης. Τα δύο συστατικά τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη μαζί με 60ml H₂O. Ακολούθησε διήθηση του διαλύματος και στη συνέχεια προστέθηκε H₂O μέχρι τελικό όγκο 150 ml.

Για την παρασκευή του διαλύματος APS 10%, ζυγίστηκαν 5 gr APS και διαλύθηκαν σε 50 ml H₂O.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κωνική φιάλη 11,2 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου 50% (τελική συγκέντρωση 8%), 8ml γλυκερόλης 87% (τελική συγκέντρωση 10%), 14 ml TBE 5x (τελική συγκέντρωση 1X), 700 μl APS 10%, 70 μl TEMED και 36,8 ml H₂O (τελικός όγκος 70 ml). Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος για την πλήρη ομογενοποίησή του. Το TEMED (τετραμεθυλενοδιαμίνη) και το APS (υπερθειικό αμμώνιο), είναι απαραίτητα για την κατάλυση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης. Το πολυακρυλαμίδιο είναι ένα μεγάλο μόριο που αποτελείται από μακριές αλυσίδες μορίων ακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Για να αρχίσει ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου απαιτείται ένας καταλύτης έναρξης όπως το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS), που δημιουργεί τις πρώτες ελεύθερες ρίζες και ένας ενεργοποιητής του καταλύτη όπως το TEMED. Για το σχηματισμό του πηκτώματος απαιτείται ένα επιπλέον μόριο, που σχηματίζει πλευρικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Το μόριο αυτό είναι η μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδη. Το πηκτώμα δημιουργήθηκε από την ένωση των μονομερών ακρυλαμίδης (CH₂=CH-CO-NH₂) σε μακριές αλυσίδες καθώς και από τη δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με N, N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδη (CH₂=CH-CO-NH-CH₂-NH-CO-CH₂).¹²⁶

Μετά την ομογενοποίηση του, το διάλυμα μεταφέρθηκε με γρήγορες κινήσεις στην ειδική συσκευή στήριξης στην οποία πραγματοποιείται στη συνέχεια και η ηλεκτροφόρηση. Τοποθετήθηκαν τα κατάλληλα χτενάκια για το σχηματισμό των βοθρίων του πηκτώματος. Το διάλυμα αφέθηκε για περίπου μισή ώρα ώστε να πολυμεριστεί.

Μέχρι τη στερεοποίηση του πηκτώματος, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων. Σε καθαρά eppendorfs χωρητικότητας 1,5 ml τοποθετήθηκαν 2μl PCR προϊόντος και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος, το οποίο περιέχει τις χρωστικές μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανού της ξυλόλης, EDTA 10 mM και φορμαμίδιο (αποδιατακτικός παράγοντας).

Ακολούθησε η αποδιάταξη των κλώνων των δειγμάτων με επώαση σε υδατόλουτρο στους 95°C για 5 min. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν αμέσως στον πάγο για να μην επανυβριδοποιηθούν οι κλώνοι και τοποθετήθηκαν με πιπέτα στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στα 180 V για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C.

Χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η οπτικοποίηση των τμημάτων DNA επιτεύχθηκε με χρώση νιτρικού αργύρου. Τα ιόντα του αργύρου αλληλεπιδρούν με τις πυρηνόφιλες ομάδες του DNA, γεγονός που οδηγεί στην κρυσταλοποίηση ή την ιζηματοποίηση του μετάλλου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες pH. Τα αδιάλυτα σύμπλοκα του αργύρου έχουν μαύρο χρώμα και καθιζάνουν παρουσία αναγωγικών παραγόντων όπως η φορμαλδεΐδη. Έτσι, οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές στο πήκτωμα καθώς αποκτούν σκούρο καφέ χρώμα.

Η χρώση του πηκτώματος πραγματοποιείται με τη χρήση τριών διαλυμάτων:

✓ **Διάλυμα 1 - Fix Solution**

Παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,5 ml Οξικού οξέος, 8 ml αιθανόλης 100% και H₂O σε τελικό όγκο 400 ml.

✓ **Διάλυμα 2 - Staining Solution**

Παρασκευάζεται με τη διάλυση 0,2 gr νιτρικού αργύρου σε 200 ml H₂O.

✓ **Διάλυμα 3 - Developing Solution**

Παρασκευάζεται με την διάλυση 3 gr NaOH και 0,01 gr NaBH₄ σε 200 ml H₂O. Επιπλέον στο διάλυμα προστίθεται και 1 ml φορμαλδεΐδης λίγο πριν ξεκινήσει η επώαση του πηκτώματος με αυτό.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αφαιρείται από τη συσκευή και ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης ως εξής:

1. Επώαση υπό ανάδευση του πηκτώματος σε 200 ml διαλύματος 1 για 3 λεπτά.
2. Αφαίρεση του υγρού και επανάληψη του βήματος 1 με τα υπόλοιπα 200 ml του διαλύματος 1.
3. Αφαίρεση του υγρού και πλύση με H₂O για 1 λεπτό.
4. Αφαίρεση του υγρού και επώαση υπό ανάδευση του πηκτώματος με 200 ml διαλύματος 2 για 15 λεπτά. Μετά την επώαση αφαιρέθηκε το υγρό και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις με H₂O για 1 λεπτό.
5. Επώαση υπό ανάδευση του πηκτώματος με το διάλυμα 3 (στο οποίο είχε προστεθεί η φορμαλδεΐδη λίγο πριν) για 10-15 λεπτά, μέχρι οι ζώνες του DNA να είναι ευδιάκριτες.
6. Αφαίρεση του υγρού και πλύση με H₂O για 1 λεπτό.

Τα αποτελέσματα παρατηρούνται με τη χρήση λάμπας λευκού φωτός.

7. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ανάλυση SSCP, επιλέχθηκαν κάποια αντιπροσωπευτικά δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο στο πήκτωμα, προκειμένου να υποβληθούν εκ νέου σε PCR με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες που έγινε και την πρώτη φορά. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη συνέχεια, έγινε η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα για τα δείγματα, τα οποία ήταν θετικά στην αντίδραση PCR, προκειμένου να ακολουθήσει κλωνοποίηση της αλληλουχίας που ενισχύθηκε.

Η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε με τη χρήση του "GF-1 Ambiclean Kit (PCR & Gel)" της Vivantis. Το σύστημα αυτό έχει σχεδιαστεί για την εξαγωγή και τον καθαρισμό τμημάτων DNA μεγέθους 100bp-20kb από πηκτώματα αγαρόζης. Το πρωτόκολλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης φαίνεται αναλυτικά παρακάτω:

I. Προετοιμασία του δείγματος

1. Μετά την ηλεκτροφόρηση, κόβεται η ζώνη του πηκτώματος που μας ενδιαφέρει και τοποθετείται σε eppendorf 1,5 ml.
2. Προσθήκη 100 μ l Buffer DB για κάθε 100 mg πηκτώματος. Επώαση στους 50°C μέχρι την πλήρη διάλυση του πηκτώματος.

II. Καθαρισμός του DNA

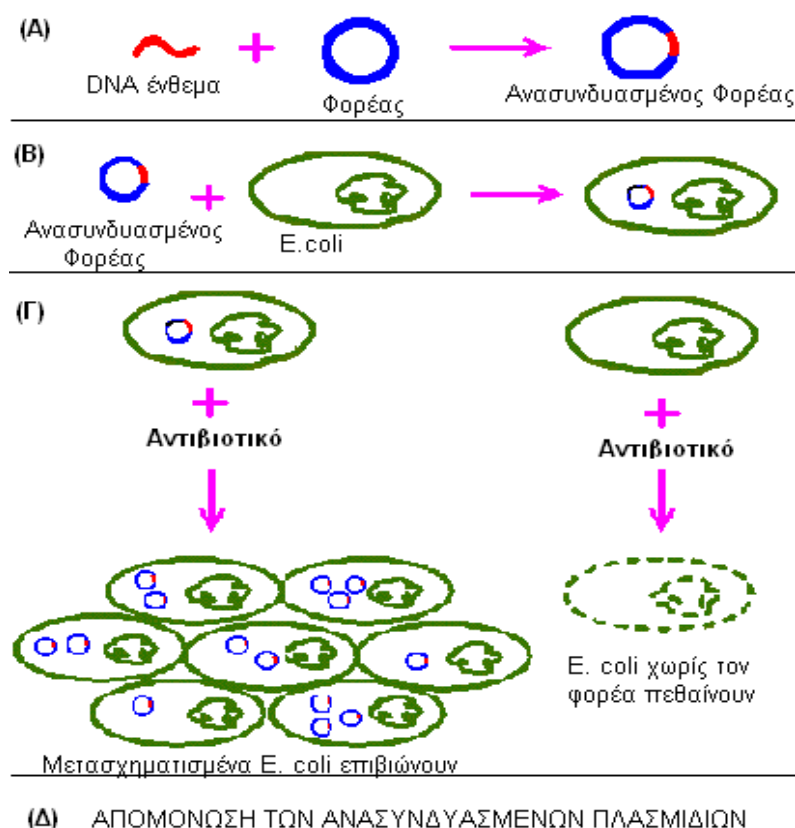
1. Μεταφορά του πηκτώματος, που έχει διαλυθεί, στην ειδική στήλη του kit και φυγοκέντρωση σε 10000 x g για 1 min. Απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, που βρίσκεται στο σωληνάκι συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάκι. Το DNA μας έχει δεσμευθεί στη στήλη.
2. Πλύση της στήλης με 750 μ l Wash Buffer (περιέχει αιθανόλη) και φυγοκέντρωση σε 10000 x g για 1 min. Απόχυση του υπερκείμενου και επανατοποθέτηση της ειδικής στήλης στο σωληνάκι συλλογής.
3. Φυγοκέντρωση της στήλης σε 10000 x g για 1 min για την απομάκρυνση της αιθανόλης που πιθανόν έχει μείνει στη στήλη.
4. Έκλυση: Προσεκτική μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf 1,5ml. Προσθήκη 50 μ l Elution Buffer στη στήλη. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min. Φυγοκέντρωση 10000 x g για 1 min. Το DNA μας μεταφέρεται στο διάλυμα.
5. Απόρριψη της στήλης και φύλαξη του DNA στους 4°C ή στους -20°C.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας (1 μ l) από το απομονωμένο DNA κάθε δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%), προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση του DNA. Το επόμενο βήμα ήταν η μοριακή κλωνοποίηση της αλληλουχίας DNA του κάθε δείγματος με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα.

8. Μοριακή Κλωνοποίηση

Τα δείγματα, που παρουσίασαν διαφοροποιημένο ηλεκτροφορητικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα, ούτως ώστε να ενισχυθούν περαιτέρω τα PCR προϊόντα και να πραγματοποιηθεί πιο αποδοτικά και αξιόπιστα η αλληλούχιση τους

Η μοριακή κλωνοποίηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται, αρχικά, η απομόνωση μιας καθορισμένης αλληλουχίας DNA και στη συνέχεια η *in vivo* δημιουργία πολλών αντιγράφων της αλληλουχίας αυτής. Για την διεξαγωγή της μεθόδου απαιτείται η χρήση ενός φορέα στον οποίο ενσωματώνεται η αλληλουχία DNA. Ως φορείς χρησιμοποιούνται συνήθως κυκλικά πλασμίδια. Στην Εικόνα 13 φαίνεται μια τυπική διαδικασία κλωνοποίησης με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα και βακτηριακών κυττάρων *E. coli*.



Εικόνα 13¹²⁷: Τα βασικά βήματα της μοριακής κλωνοποίησης με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα. (Α)Ανασυνδυασμός DNA: Το προς κλωνοποίηση DNA (ένθεμα) εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα. Ο φορέας περιέχει ήδη ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. (Β) Μετασηματισμός: Εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, τα οποία πολλαπλασιάζονται. (Γ) Επιλογή: Καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αντιβιοτικό, προκειμένου να επιβιώσουν μόνο όσα φέρουν το πλασμίδιο. (Δ) Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά, οι μέθοδοι με τις οποίες πραγματοποιήθηκε η μοριακή κλωνοποίηση των αλληλουχιών DNA που ενισχύθηκαν με την PCR.

8.1. Ένθεση του προϊόντος της PCR σε πλασμιδιακό φορέα

Μετά την απομόνωση του τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε ένθεση του τμήματος αυτού στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(+) (2961 bp) μέσω της αντίδρασης σύνδεσης.

Η αντίδραση σύνδεσης είναι μια διαδικασία η οποία οδηγεί στην ενσωμάτωση της προς κλωνοποίηση αλληλουχίας μέσα σε ένα πλασμιδιακό φορέα. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση, η οποία καταλύει την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ των δύο μορίων DNA.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μία αντίδραση σύνδεσης, χρειάζονται τα εξής:

- ✓ **Το ένθεμα:** Είναι η αλληλουχία DNA που πρέπει να κλωνοποιηθεί. Με την αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται η εισαγωγή του τμήματος αυτού στον πλασμιδιακό φορέα. Η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = \frac{\text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέματος (σε kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (σε kb)}} \times \text{Μοριακός λόγος} \frac{\text{ενθέματος}}{\text{φορέα}}$$

Ο μοριακός λόγος ενθέματος/φορέα είναι συνήθως 3:1.

- ✓ **Ο πλασμιδιακός φορέας:** Είναι το κυκλικό μόριο DNA στο οποίο εισάγεται η αλληλουχία DNA που πρέπει να κλωνοποιηθεί. Κάθε φορέας κλωνοποίησης διαθέτει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που του προσδίδουν ιδιότητες που διευκολύνουν τη διαδικασία της κλωνοποίησης¹²⁸:

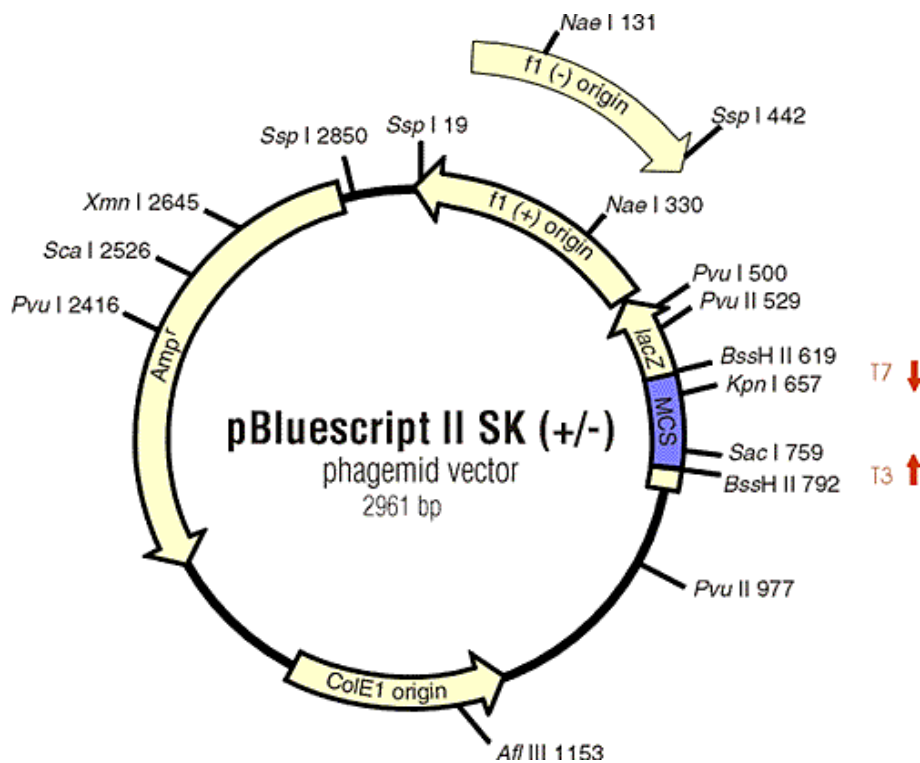
1. Μια περιοχή *ori*, η οποία προσδίδει στο πλασμίδιο την ικανότητα ανεξάρτητης αντιγραφής. Έτσι, το πλασμίδιο μπορεί να αντιγράφεται αυτόνομα μετά την είσοδό του στο βακτηριακό κύτταρο και να πολλαπλασιάζεται σε πολλά αντίγραφα.
2. Ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό όπως για παράδειγμα στην αμπικιλίνη (*Amp^r*). Το γονίδιο αυτό δίνει τη δυνατότητα εργαστηριακής επιλογής των βακτηρίων που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο.
3. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*), το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση και προσδίδει τη δυνατότητα της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Το

ένζυμο αυτό μεταβολίζει ένα υπόστρωμα (X-gal) που προστίθεται στο θρεπτικό υλικό των βακτηρίων. Ο μεταβολισμός του υποστρώματος αυτού οδηγεί στην παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος με αποτέλεσμα να προσδίδεται μπλε χρώμα στις αποικίες.

4. Μία περιοχή πολυσυνδέτη (MCS: Multiple Cloning Site region), η οποία περιέχει τις θέσεις αναγνώρισης πολλών περιοριστικών ενζύμων. Η περιοχή αυτή επιτρέπει την ένθεση τμημάτων DNA στο φορέα και τη στόχευσή τους σε συγκεκριμένο σημείο του φορέα.

- ✓ Η **T4 DNA λιγάση**, η οποία προέρχεται από τον βακτηριοφάγο T4. Το ένζυμο αυτό καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 5'-φωσφορικού άκρου ενός δίκλωνου μορίου DNA και του 3'-υδροξυλικού άκρου του ίδιου ή διαφορετικού δίκλωνου μορίου DNA. Η T4 λιγάση μπορεί να συνδέσει μεταξύ τους μόνο δίκλιωνα DNA, ενώ δεν έχει καμία δραστηριότητα σε μονόκλιωνα μόρια. Τα άκρα των μορίων DNA που συμμετέχουν στην αντίδραση λιγάσης μπορεί να είναι τυφλά ή ελεύθερα (προεξέχοντα). Επίσης, η T4 DNA λιγάση είναι ένα ATP-εξαρτώμενο ένζυμο, δηλαδή απαιτεί την παρουσία ATP προκειμένου να δράσει, ενώ χρειάζεται και ιόντα Mg^{2+} . Η συγκεντρώνση του ATP πρέπει να είναι χαμηλότερη στις αντιδράσεις σύνδεσης στις οποίες συμμετέχουν μόρια DNA με τυφλά άκρα και συγκεκριμένα δεν πρέπει να ξεπερνά τα 2,5mM. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ATP οδηγούν σε μειωμένη απόδοση.¹²⁹
- ✓ **To buffer** της αντίδρασης, το οποίο είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα της T4 DNA λιγάσης. Συνήθως περιέχει Tris-HCl, το οποίο χρησιμεύει για τη ρύθμιση του pH της αντίδρασης, και $MgCl_2$, το οποίο παρέχει στη λιγάση τα ιόντα Mg^{2+} που είναι απαραίτητα για τη δράση της.¹²⁴ Επίσης, στο buffer περιέχεται ATP προκειμένου να μπορέσει να δράσει η T4 λιγάση αλλά και DTT (διθειοθρεϊτόλη). Η διθειοθρεϊτόλη έχει την ικανότητα να μειώνει ποσοτικά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και να διατηρεί τις μονοθειόλες σε μειωμένα επίπεδα. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις το DTT σταθεροποιεί ένζυμο αλλά και άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν ελεύθερες σουλφυδρικές ομάδες και φαίνεται πως αποκαθιστά τη χαμένη δραστηριότητα που προκαλείται από την οξείδωση των ομάδων αυτών.¹²⁹

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ονομάζεται pBluescript II SK (+) και έχει μέγεθος 2961 bp. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα.



Εικόνα 14:¹³⁰ Ο φορέας pBluescript II

Ο pBluescript II SK (+) διαθέτει τα χαρακτηριστικά εκείνα που είναι απαραίτητα για έναν φορέα κλωνοποίησης. Συγκεκριμένα, περιέχει:¹³¹

- ✓ Την περιοχή *ColE1 origin* η οποία του δίνει τη δυνατότητα ανεξάρτητης έναρξης της αντιγραφής.
- ✓ Το γονίδιο *Amp^r*, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.
- ✓ Το γονίδιο *lacZ*, το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης.
- ✓ Την περιοχή πολυσυνδέτη MCS, η οποία περιέχει τις θέσεις αναγνώρισης διαφόρων περιοριστικών ενζύμων. Η περιοχή MCS παρεμβάλλεται στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης με τέτοιο τρόπο ώστε να μη διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο αλλά ούτε και την αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου. Η ενσωμάτωση ενός ξένου τμήματος DNA σε κάποια από τις θέσεις του πολυσυνδέτη οδηγεί σε αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου της β-γαλακτοσιδάσης με αποτέλεσμα την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Έτσι, το κύτταρο δεν μπορεί να μεταβολίσει το X-gal και οι αποικίες που προκύπτουν έχουν λευκό χρώμα.

Οι αλληλουχίες DNA, που κλωνοποιήθηκαν, ήταν το προϊόντα μιας αντίδρασης PCR. Τα προϊόντα PCR έχουν ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, που προέρχεται από τη δραστικότητα τερματικής μεταφοράς που έχει η Taq DNA πολυμεράση. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό προσθέτει μια βάση αδενίνης (A) στο 3'-άκρο των προϊόντων της αντίδρασης. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να εισαχθούν απευθείας σε έναν πλασμιδιακό φορέα που να περιέχει προεξέχοντα 3'-άκρα θυμίνης (T). Για το λόγο αυτό, ο φορέας μας είναι ήδη κατασκευασμένος ώστε να περιέχει τέτοιου είδους άκρα. Η δημιουργία ενός τέτοιου φορέα γίνεται, αρχικά, με τη χρήση ενός ενζύμου περιορισμού (π.χ. EcoRV), που κόβει το πλασμίδιο σε ένα σημείο της περιοχής MCS. Στη συνέχεια, με μια αντίδραση στην οποία χρησιμοποιείται Taq πολυμεράση και δεοξυνουκλεοτίδια θυμίνης (dTTP), δημιουργούνται 3'-άκρα θυμίνης στο φορέα. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η αντίδραση σύνδεσης, καθώς ο φορέας έχει πλέον συμπληρωματικά άκρα με τα προϊόντα PCR.

Τα συστατικά της αντίδρασης σύνδεσης, που πραγματοποιήθηκε σε 10 μl τελικού όγκου για την παρούσα μελέτη, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5: Αντίδραση σύνδεσης.

| Αντιδραστήρια | Αρχικά | Τελικά | Όγκος (μl) |
|---------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| Ένθεμα-DNA | 30 ng/μl | 30 ng | 1,0 |
| Φορέας | 50 ng/μl | 50 ng | 1,0 |
| Buffer | 10x | 1x | 2,0 |
| T₄ DNA ligase | 5 u/μl | 1 unit | 0,2 |
| H₂O | - | - | 15,8 |
| Τελικός όγκος | | | 20,0 |

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων ακολούθησε επώαση στους 22°C για 1 ώρα και στη συνέχεια overnight στους 4°C για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

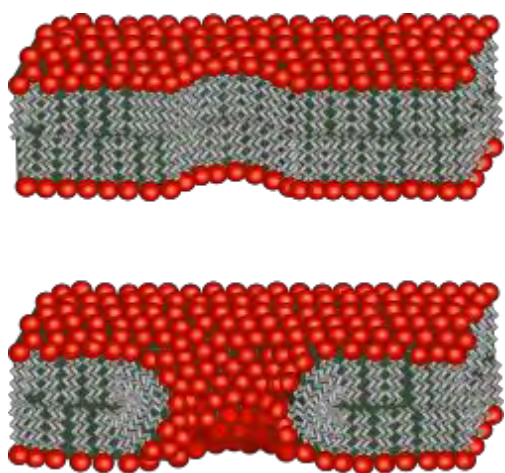
8.2. Μετασηματισμός κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης

Το επόμενο βήμα ήταν ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E. coli*) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο μετασηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης.

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πολικών μορίων σε ένα κύτταρο-δέκτη, διαμέσου της πλασματικής του μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται με την εξωτερική

εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο προκαλεί μια αρκετά σημαντική αύξηση στην ηλεκτρική αγωγιμότητα και διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης. Έτσι, είναι δυνατή η είσοδος φορτισμένων μορίων, όπως το DNA, μέσα στο κύτταρο.¹³²

Η αρχή της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης βασίζεται στη σχετικά ασθενή φύση των υδροφοβικών/υδροφιλικών αλληλεπιδράσεων της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας, αλλά και στην ικανότητά της να ανασυγκροτείται αυθόρμητα, μετά τη διαταραχή της. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου στα κύτταρα-δέκτες προκαλείται αλλαγή στο δυναμικό της πλασματικής μεμβράνης, η οποία στη συνέχεια φορτίζεται. Το γεγονός αυτό προκαλεί τοπική αναδιάταξη των λιπιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία υδρόφοβων πόρων που σταδιακά μετατρέπονται σε υδρόφιλους¹³³ (Εικ. 15).



Εικόνα 15:¹³⁴ Σχηματική απεικόνιση της διεύθεσης των λιπιδίων σε έναν υδρόφοβο πόρο (επάνω) και σε έναν υδρόφιλο πόρο (κάτω).

Μέσα από τους υδρόφιλους αυτούς πόρους μπορούν να περάσουν τα φορτισμένα ιόντα και μόρια που βρίσκονται στο διάλυμα που περιβάλλει τα κύτταρα. Καθώς συμβαίνει αυτή η μετακίνηση, η μεμβράνη αποφορτίζεται και οι πόροι αρχίζουν να κλείνουν, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Ωστόσο, η εφαρμογή της ηλεκτροδιάτρησης μπορεί να προκαλέσει ιοντική ανισορροπία, πιθανόν εξαιτίας της μη εξειδικευμένης εισροής και εκροής υλικού μέσα και έξω από τα κύτταρα. Η ανισορροπία αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ασταθή κυτταρική λειτουργία και τελικά στο θάνατο των κυττάρων.¹³⁵ Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα επωάζονται σε ειδικό θρεπτικό υλικό αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση. Το υλικό αυτό είναι συνήθως το SOC (2% w/v bacto-tryptone, 0.5% w/v bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂ και 20mM glucose), το οποίο οδηγεί και σε αύξηση της απόδοσης του μετασχηματισμού.¹³⁶

Το πρωτόκολλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

1. Προσθήκη 2 μl από το αραιωμένο προϊόν (1:10) της αντίδρασης λιγάσης σε ~ 40 μl κυττάρων (DH5a). Επώαση στον πάγο για 1 min.
2. Μεταφορά των κυττάρων σε παγωμένη κυψελίδα και στη συνέχεια ηλεκτροδιάτρηση, προκειμένου να προσλάβουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
3. Προσθήκη, αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση, 1000μl διαλύματος SOC το οποίο βοηθά τα κύτταρα να ανακτήσουν τη φυσιολογική τους κατάσταση (ωσμορύθμιση) και παράλληλα είναι και θρεπτικό υλικό.
4. Ανάδευση των κυττάρων με pipette mix και μεταφορά τους σε σωλήνα, όπου παρέμειναν για επώαση στους 37°C για περίπου 45 min.

Η επώαση των 45 min στους 37°C πραγματοποιήθηκε για την επούλωση των κυττάρων από την ηλεκτροδιάτρηση και την ανάπτυξή τους. Ακολούθησε η επίστρωση της υγρής καλλιέργειας των κυττάρων σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη τους.

8.3. Επίστρωση τρυβλίων

Η επίστρωση των κυττάρων έγινε σε τρυβλία Petri, τα οποία περιείχαν θρεπτικό μέσο LB άγαρ (10g/l Tryptone, 5g/l Yeast extract, 10g/l NaCl). Ένα επιπλέον συστατικό του θρεπτικού μέσου ήταν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (1μl/ml).

Τα βακτηριακά στελέχη, που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό, δεν διέθεταν στο γονιδίωμά τους κάποιο γονίδιο που να προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Αντιθέτως, ένα τέτοιο γονίδιο περιέχεται στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II. Έτσι, με τη χρήση της αμπικιλίνης επιτεύχθηκε ο θάνατος των μη μετασχηματισμένων κυττάρων και η επιβίωση όσων είχαν προσλάβει το πλασμίδιο.

Οι αποικίες που προέκυψαν, προήλθαν από δύο κατηγορίες κυττάρων. Στη μία κατηγορία ανήκουν τα κύτταρα που είχαν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Αντίθετα, τα κύτταρα της άλλης κατηγορίας είχαν προσλάβει το μη ανασυνδυασμένο φορέα. Για το διαχωρισμό των δύο αυτών κατηγοριών χρησιμοποιήθηκε το X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside). Το X-gal αποτελεί υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση, η οποία το διασπά σε γαλακτόζη και 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole. Το τελευταίο οξειδώνεται στη συνέχεια σε ένα αδιάλυτο και μπλε προϊόν (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo).¹³⁷ Εκτός από το X-gal, χρησιμοποιήθηκε και ο επαγωγέας IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalacto-pyranoside), ο οποίος προάγει την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ). Το μόριο του IPTG έχει την ικανότητα να προσδένεται στην πρωτεΐνη-καταστολέα, η οποία

καταστέλλει το lacZ σε συνθήκες απουσίας λακτόζης. Η πρόσδεση αυτή απενεργοποιεί τον καταστολέα με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του lacZ.¹³⁸

Επομένως, οι αποικίες, που προήλθαν από κύτταρα μετασηματισμένα με ανασυνδυασμένους φορείς, είχαν λευκό χρώμα, καθώς το lacZ δεν εκφράστηκε, λόγω του ενθέματος. Αντίθετα, οι αποικίες των κυττάρων με μη ανασυνδυασμένους φορείς εξέφραζαν κανονικά το lacZ και είχαν μπλε χρώμα.

Έτσι, μετά την επούλωση από την ηλεκτροδιάτρηση, μεταφέραμε από τους σωλήνες 200μl κυττάρων σε erpendorfs (των 1,5 ml), όπου προσθέσαμε, επιπλέον, 30 μl υποστρώματος X-gal και 3 μl του επαγωγέα IPTG. Ακολούθησε επίστρωση των τρυβλίων με το περιεχόμενο των erpendorf και επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες για την ανάπτυξη αποικιών.

Οι λευκές αποικίες, που προέκυψαν, μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από τις καλλιέργειες αυτές.

8.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Πρόκειται για μια μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα. Αρχικά, τα κύτταρα αυτά εναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα που περιέχει γλυκόζη, Tris και EDTA. Η γλυκόζη παρέχει οσμωτική σταθερότητα στο εναιώρημα. Παράλληλα, εμποδίζει την πλήρη λύση των κυττάρων, που θα οδηγούσε στην απελευθέρωση και του χρωμοσωμικού DNA. Το Tris χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH (=8,0) και το EDTA για τη δέσμευση των δισθενών κατιόντων και επομένως την αναστολή της δράσης των DNAασών. Η αλκαλική λύση συνίσταται στη χρήση διοξειδίου του νατρίου (NaOH) και SDS (sodium dodecyl sulfat), που περιέχονται στο διάλυμα II. Το NaOH προκαλεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών που διατηρούν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό, που προκαλεί τη μερική λύση της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας δημιουργώντας μικρές "τρύπες" σε αυτή. Οι τρύπες αυτές επιτρέπουν την έξοδο των πλασμιδίων από τα κύτταρα, αλλά συγκρατούν το χρωμοσωμικό DNA εντός των κυττάρων. Επιπλέον, το SDS δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με πρωτεΐνες και RNA. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα III που περιέχει οξικό κάλιο (CH₃COOK) με pH ~4,8. Το CH₃COOK μειώνει το pH του διαλύματος εξουδετερώνοντας το NaOH. Παράλληλα, προκαλεί την κατακρήμνιση των συμπλόκων SDS-RNA και SDS-πρωτεϊνών καθώς και των διαφόρων κυτταρικών υπολειμμάτων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με μια σειρά αναδεύσεων, κατακρημνίσεων, φυγοκεντρήσεων και απομάκρυνσης υπερκείμενου με αποτέλεσμα την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, το οποίο υπόκειται σε κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη.¹³⁹

Η κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και τη συμπύκνωση του DNA. Η βασική διαδικασία της μεθόδου είναι η κατακρήμνιση του DNA λόγω της προσθήκης ισοπροπανόλης και άλατος στο υδατικό διάλυμα.

Το DNA είναι ένα πολικό μόριο, λόγω των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών (PO^{3-}) ομάδων του. Έτσι, με βάση την αρχή "τα όμοια διαλύουν όμοια" τα μόρια DNA είναι ευδιάλυτα στο νερό, που είναι επίσης πολικό. Η υψηλή πολικότητα του νερού ανακλάται στην υψηλή τιμή διηλεκτρικής σταθεράς που διαθέτει. Αυτό σημαίνει ότι η ηλεκτρικές δυνάμεις μεταξύ δύο οποιωνδήποτε φορτίων, που βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα, είναι πολύ μειωμένες σε σχέση με εκείνες που δημιουργούνται στο κενό ή τον αέρα.

Ο ρόλος του άλατος στην κατακρήμνιση είναι για να εξουδετερώσει τα αρνητικά φορτία των μορίων του DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται το CH_3COONa (ή CH_3COOK). Τα κατιόντα του άλατος (Na^+) εξουδετερώνουν το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων, με αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να γίνονται λιγότερο υδρόφιλα και αδιάλυτα στο νερό.

Η ισοπροπανόλη είναι ένα λιγότερο πολικό μόριο με πολύ μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από εκείνη του νερού. Για το λόγο αυτό, διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο φορτισμένων μορίων, σε αντίθεση με το νερό, το οποίο την παρεμποδίζει. Επομένως, η προσθήκη ισοπροπανόλης στο διάλυμα επιτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων Na^+ ή (K^+) και PO^{3-} , με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερών ιονικών δεσμών. Η εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων του DNA έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πολικότητας του μορίου, η οποία οδηγεί, τελικά, στην κατακρήμνιση.

Προκειμένου να γίνει η απομόνωση του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου, πραγματοποιήθηκε, αρχικά, η μεταφορά των λευκών αποικιών σε υγρή καλλιέργεια για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.

Κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε έναν σωλήνα όπου υπήρχε 3 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth (10g/l Tryptone, 5g/l Yeast extract, 10g/l NaCl). Ακολούθησε επώαση με ήπια ανάδευση στους 37°C για 12 ώρες, προκειμένου να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα των αποικιών.

Μετά την πάροδο των 12 ωρών ήταν δυνατή η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (alkaline lysis) από τις καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Τα βήματα του πρωτοκόλλου της απομόνωσης ήταν τα εξής:

1. Μεταφορά της υγρής καλλιέργειας σε eppendorf (1,5 ml).
2. Φυγοκέντρηση στις 12000g για 1 min. Αφαίρεση του υπερκείμενου. Στο ίζημα βρισκόταν τα βακτήρια.
3. Προσθήκη 100 ml παγωμένου διαλύματος I, το οποίο περιείχε γλυκόζη. Αναδιάλυση του ιζήματος, ανάδευση με vortex για 1 min και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
4. Προσθήκη 200 ml διαλύματος II, το οποίο περιείχε NaOH και SDS. Απαλή ανάδευση γυρίζοντας ανάποδα το eppendorf 5 φορές και επώαση στον πάγο για 3-5 min.
5. Προσθήκη 150 ml παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου (CH₃COOK) (με pH ~4,8). Ανάδευση στο vortex και επώαση στον πάγο για 5 min.
6. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 5 min και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf. Στο υπερκείμενο περιεχόταν το πλασμιδιακό DNA.
7. Προσθήκη ισοπροπανόλης σε όγκο όσο και το υπερκείμενο (1V). Ανάδευση με Vortex για λίγα δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε η κατακρήμνιση του DNA. Δεν προστέθηκε άλας γιατί υπήρχε ήδη από το βήμα 5 (CH₃COOK).
8. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 7 min, αφαίρεση υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος, όπου βρίσκεται το DNA.
9. Προσθήκη αιθανόλης 70%, στο ίζημα σε όγκο 0,5V, για την απομάκρυνση των αλάτων που πιθανόν είχαν απομείνει. Ανάδευση γυρίζοντας ανάποδα το eppendorf και επανάληψη του βήματος 8.
10. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 5 min, αφαίρεση υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος, όπου βρίσκεται το DNA.
11. Πλήρης εξάτμιση της αιθανόλης διατηρώντας ανοιχτό το καπάκι του eppendorf για λίγα λεπτά και αναδιάλυση του ιζήματος σε 50 ml TE-RNAase, που περιείχε Tris-HCL, EDTA και RNAase (20μg/ml) και απομάκρυνε το RNA από το διάλυμα.. Διατήρηση στους 4°C.

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ακολούθησε η πέψη του με ένα ένζυμο περιορισμού, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την ένθεση του DNA μας στον πλασμιδιακό φορέα.

8.5. Πέψη πλασμιδιακού DNA

Η πέψη έγινε με τη χρήση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, που ονομάζεται PvuII. Τα περιοριστικά ένζυμα (ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες) έχουν την ιδιότητα να κόβουν δίκλωνα ή μονόκλωνα DNA σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που ονομάζονται θέσεις περιορισμού. Το PvuII είναι μια περιοριστική ενδονουκλεάση τύπου II που απομονώθηκε από το βακτήριο *Proteus vulgaris*. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CAGCTG-3' και διασπά το DNA στην περιοχή μεταξύ των δύο κεντρικών βάσεων GC της αλληλουχίας αυτής. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης περιορισμού από το PvuII είναι απαραίτητη

η παρουσία ιόντων Mg^{2+} . Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η δημιουργία τμημάτων DNA με τυφλά άκρα.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl με την προσθήκη 2μl πλασμιδιακού DNA. Το buffer της αντίδρασης περιείχε 10mM Tris-HCl (pH 7,5 στους 37°C), 10mM $MgCl_2$, 50mM NaCl και 0,1mg/ml BSA. Οι ποσότητες των συστατικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με PvuII

| | Αρχική συγκέντρωση | Τελική συγκέντρωση | Όγκος (μl) |
|------------------------|--------------------|--------------------|------------|
| Πλασμιδιακό DNA | - | - | 2,0 |
| Buffer | 10x | 1x | 1,0 |
| PvuII | 10 u/μl | 2 units | 0,2 |
| H₂O | - | - | 6,8 |
| Τελικός όγκος | - | - | 10,0 |

Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Ο φορέας pBluescript II διαθέτει δύο θέσεις περιορισμού για το ένζυμο PvuII. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής MCS και συγκεκριμένα στις νουκλεοτιδικές θέσεις 529 και 977 (βλ. Εικ. 14). Επομένως, η πέψη ανασυνδυασμένων φορέων με το PvuII οδήγησε στη δημιουργία δύο γραμμικών τμημάτων DNA μεγέθους περίπου (450 + ένθεμα) bp και 2500bp αντίστοιχα. Το πρώτο τμήμα αποτελείται από το ένθεμα καθώς και τις αλληλουχίες του φορέα που βρίσκονται εκατέρωθεν του ενθέματος και μεταξύ των θέσεων περιορισμού του PvuII. Το τμήμα των 2500bp είναι ο υπόλοιπος φορέας. Αντιθέτως, η πέψη μη ανασυνδυασμένων φορέων οδήγησε στη δημιουργία δύο τμημάτων μεγέθους περίπου 450bp (περιοχή μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης του ενζύμου) και 2500bp (υπόλοιπος φορέας).

Για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος της αντίδρασης πέψης, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 kV για περίπου 40 min.

Ακολούθησε καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA των δειγμάτων, στα οποία επιβεβαιώθηκε η κλωνοποίηση, μέσω εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

8.6. Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη

Η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από ένα δείγμα DNA. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δημιουργία δύο φάσεων και συγκεκριμένα, μιας οργανικής και μιας υδατικής φάσης. Ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιείται μετά από φυγοκέντρηση ενός μίγματος, που περιέχει ένα υδατικό διάλυμα (π.χ. DNA) και ένα οργανικό διάλυμα (π.χ. φαινόλη ή χλωροφόρμιο). Η προσθήκη φαινόλης οδηγεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τέτοιο τρόπο ώστε τα υδρόφοβα αμινοξέα να μεταφέρονται στο εξωτερικό του μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά των πρωτεϊνών στην οργανική φάση της φαινόλης, ενώ το υδρόφιλο DNA παραμένει στην υδατική φάση. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται ακόμη καλύτερα με την προσθήκη χλωροφορμίου το οποίο αυξάνει την πυκνότητα της οργανικής φάσης και βοηθά τη μεταφορά της στο κάτω μέρος του eppendorf.

Πρωτόκολλο εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο

1. Προσθήκη 150μl H₂O στα 50μl του DNA με την TE-RNAase για τελικό όγκο 200μl.
2. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης:χλωροφορμίου (1:1), δηλαδή 100μl φαινόλης και 100μl χλωροφορμίου. Καλή ανάδευση.
3. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 5 min.
4. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.
5. Προσθήκη χλωροφορμίου σε ίσο όγκο με το υπερκείμενο και ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 5 min.
7. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.
8. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ανάδευση.
9. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 5 min.
10. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.

Μετά την εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο, το DNA καθαρίστηκε και συμπυκνώθηκε με κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη. Το άλας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το CH₃COONa. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν όμοιο με αυτό της κατακρήμνισης μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Πρωτόκολλο κατακρήμνισης με ισοπροπανόλη

1. Προσθήκη 1V ισοπροπανόλης, άλατος CH₃COONa (1/10 V). Ανάδευση και επώαση θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
2. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 15 min και απόρριψη υπερκειμένου.
3. Προσθήκη 0,5V αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση σε 12000g για 5 min.
4. Απόρριψη υπερκειμένου και επώαση ιζήματος στους 37°C για την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης. Αναδιάλυση σε 50μl H₂O.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια ακόμη αντίδραση πέψης με PvuII, χρησιμοποιώντας μέρος του καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA και τα προϊόντα

ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Σκοπός της αντίδρασης ήταν αφενός η ποσοτικοποίηση του DNA και αφετέρου η επιβεβαίωση ότι είχε απομακρυνθεί όλη η φαινόλη από τα δείγματα.

9. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

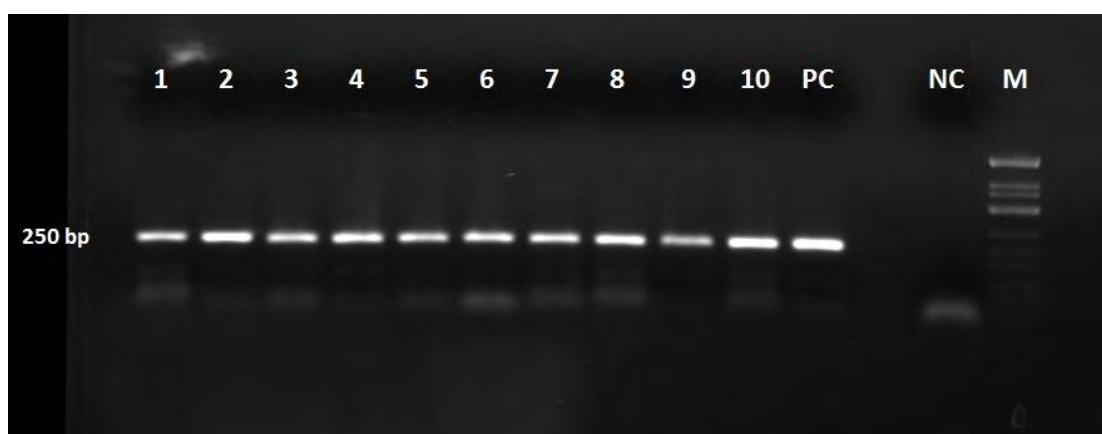
Το τελικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν η εύρεση της αλληλουχίας του ενθέματος. Τα δείγματα του πλασμιδιακού DNA στάλθηκαν στην εταιρία Macrogen, η οποία πραγματοποιεί τον προσδιορισμό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τη χρήση της μεθόδου Sanger (ή dideoxynucleotide sequencing). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs), εκτός των φυσιολογικών νουκλεοτιδίων (dNTPs). Η διαφορά των ddNTPs, σε σχέση με τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια που περιέχονται στο DNA, είναι ότι τα πρώτα διαθέτουν ένα υδρογόνο στον 3' άνθρακα αντί για μία υδροξυλομάδα (-OH). Τα νουκλεοτίδια αυτά (ddNTPs) τερματίζουν την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA καθώς δεν μπορούν να δημιουργήσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο.

Η μέθοδος ξεκινά με την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA με τη χρήση NaOH. Μια αντίδραση Sanger αποτελείται από τα ακόλουθα: α) μια μονόκλωνη αλυσίδα, που πρόκειται να αλληλουχηθεί, β) εκκινητές DNA (μικρά τμήματα DNA, που είναι συμπληρωματικά με το τμήμα που πρέπει να αλληλουχηθεί και ραδιενεργά σημασμένα στο 5'-άκρο τους), γ) ένα μίγμα από ένα συγκεκριμένο είδος ddNTP (π.χ. ddATP) με το αντίστοιχο dNTP (π.χ. dATP) και τα υπόλοιπα τρία dNTPs (dCTP, dGTP και dTTP). Ο πολυμερισμός ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη της DNA πολυμεράσης και σταματά μόλις ένα ddATP ενσωματωθεί στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Έτσι, σχηματίζεται μια σειρά από σημασμένες αλυσίδες, το μήκος των οποίων εξαρτάται από την τοποθεσία του ddATP σε σχέση με το 5'-άκρο. Η αντίδραση πραγματοποιείται τέσσερις φορές, με τη χρήση διαφορετικού ddNTP κάθε φορά. Τα προϊόντα καθεμιάς από τις τέσσερις αντιδράσεις μεταφέρονται σε ξεχωριστές σειρές ενός πήκτωματος πολυακρυλαμίδιου και ηλεκτροφορούνται, προκειμένου να διαχωριστούν τα τμήματα DNA διαφορετικού μήκους. Ακολουθεί μεταφορά του πηκτώματος σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια αυτοραδιογραφία, προκειμένου να εμφανιστούν μόνο οι ζώνες του πηκτώματος που διαθέτουν ραδιενεργό 5'-άκρο. Τα μικρότερα τμήματα DNA που προέκυψαν από την αντίδραση μεταφέρονται με μεγαλύτερη ταχύτητα και πιο μακριά σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Όταν, λοιπόν, η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων και των τεσσάρων αντιδράσεων γίνεται στο ίδιο πήκτωμα, είναι δυνατός ο καθορισμός της αλληλουχίας του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (με κατεύθυνση 5' προς 3') πραγματοποιείται διαβάζοντας το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση, ξεκινώντας από τον πάτο του πηκτώματος και τελειώνοντας στην κορυφή του. Η αλληλουχία που προσδιορίζεται με αυτό τον τρόπο είναι η συμπληρωματική του τμήματος DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα.^{140,141}

III. Αποτελέσματα

1. PCR

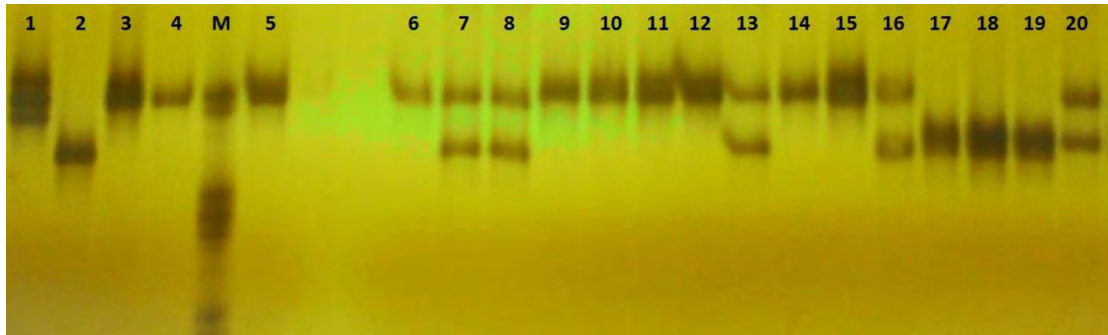
Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαροζης. Με την ηλεκτροφόρηση επιβεβαιώθηκε σε ποια δείγματα πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση, ούτως ώστε να συνεχιστεί η επόμενη διαδικασία της μελέτης των δειγμάτων. Παρακάτω, φαίνεται ενδεικτικά μία από τις φωτογραφίες της PCR για την ενίσχυση του γενετικού τόπου *Obr56d* σε ορισμένα από τα δείγματα (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γενετικού τόπου *Obr56d*. Οι πρώτες 10 διαδρομές αφορούν 10 από τα υπό ανάλυση δείγματα. Η διαδρομή PC είναι το θετικό control της αντίδρασης και η NC το αρνητικό control. Η τελευταία διαδρομή, M, αφορά τον μάρτυρα μοριακού βάρους.

2. SSCP ανάλυση

Η SSCP ανάλυση των προϊόντων της PCR αποκάλυψε τα δείγματα εκείνα που πιθανόν έφεραν κάποιο πολυμορφισμό στην αλληλουχία του προς ανάλυση γενετικού τόπου. Παρακάτω απεικονίζεται ενδεικτικά η SSCP ανάλυση του γενετικού τόπου *Or59a* σε ορισμένα από τα δείγματα (Εικόνα 17). Η κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτέλεσε ένδειξη για την πιθανή ύπαρξη πολυμορφισμών. Για παράδειγμα, τα δείγματα 1, 2, 3 και 7 της εικόνας 17 παρουσιάζουν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο μεταξύ τους και επομένως, επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 17: SSCP ανάλυση του γενετικού τύπου *Or59a*. (M: μάρτυρας μοριακού βάρους)

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 7** παρατηρήθηκαν τρία έως πέντε διαφοροποιημένα ηλεκτροφορητικά πρότυπα στους γενετικούς τύπους που αναλύθηκαν με SSCP ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 7: Αριθμός των ηλεκτροφορητικών προτύπων SSCP για κάθε γενετικό τόπο.

| Unigene | <i>D. melanogaster</i> gene | Αριθμός διαφορετικών προτύπων ηλεκτροφόρησης |
|---------|-----------------------------|--|
| UN10128 | <i>Or59a</i> | 4 |
| UN00319 | <i>Obp56d</i> | 5 |
| UN05535 | <i>Obp8a</i> | 5 |
| UN02486 | <i>Kap3</i> | 5 |
| UN10817 | <i>sgl</i> | 3 |

Μετά την ανάλυση SSCP, πραγματοποιήθηκε επαναληπτική PCR για τα δείγματα, που επιλέχθηκαν με βάση το ηλεκτροφορητικό τους πρότυπο και τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης για τα δείγματα, προκειμένου να ακολουθήσει η κλωνοποίηση των αλληλουχιών που ενισχύθηκαν. Η διαδικασία της κλωνοποίησης ξεκίνησε με την ένθεση των PCR προϊόντων στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(+). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E. coli*) με τον ανασυνδυασμένο φορέα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων και επιλογή των αποικιών που προήλθαν από κύτταρα μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένους φορείς (λευκές αποικίες), προκειμένου να μεταφερθούν σε υγρές καλλιέργειες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις καλλιέργειες αυτές, έτσι ώστε να ακολουθήσει η πέψη του με PvuII.

3. Πέψη πλασμιδιακού DNA

Η πέψη του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση PvuII έγινε προκειμένου να επιβεβαιώσουμε για ποια από τα δείγματά μας πραγματοποιήθηκε η ένθεση του DNA στον φορέα pBluescript II.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης οδήγησε στη δημιουργία δύο προτύπων ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα ήταν:

- ✓ Μία ζώνη μεγέθους (450 + ένθεμα) bp, όπου οι 450 bp αντιστοιχούν στην αλληλουχία του φορέα εκατέρωθεν του ενθέματος και μεταξύ των θέσεων περιορισμού του PvuII. Όταν για παράδειγμα πρόκειται για ένα ένθεμα μεγέθους 250 bp, η ζώνη αυτή θα είχε μέγεθος 700bp
- ✓ Μία ζώνη μεγέθους 2500bp, που αντιστοιχεί στον υπόλοιπο φορέα

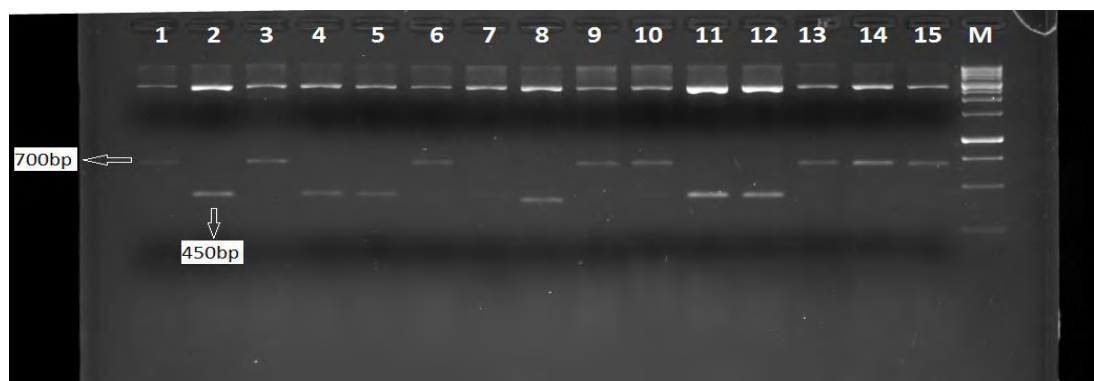
Για παράδειγμα, οι θέσεις 1, 3, 6, 9, 10, κ.λ.π. του πηκτώματος στην **εικόνα 18**.

Αντίθετα, το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης ενός μη ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα ήταν:

- ✓ Μία ζώνη μεγέθους περίπου 450bp, που αντιστοιχεί στην περιοχή μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης του ενζύμου
- ✓ Μία ζώνη μεγέθους περίπου 2500bp, που αντιστοιχεί στον υπόλοιπο φορέα

Για παράδειγμα, οι θέσεις 2, 4, 5, 8, κ.λ.π. στην **εικόνα 18**.

Παρακάτω φαίνεται ενδεικτικά μία εικόνα από την ηλεκτροφόρηση ορισμένων προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA.



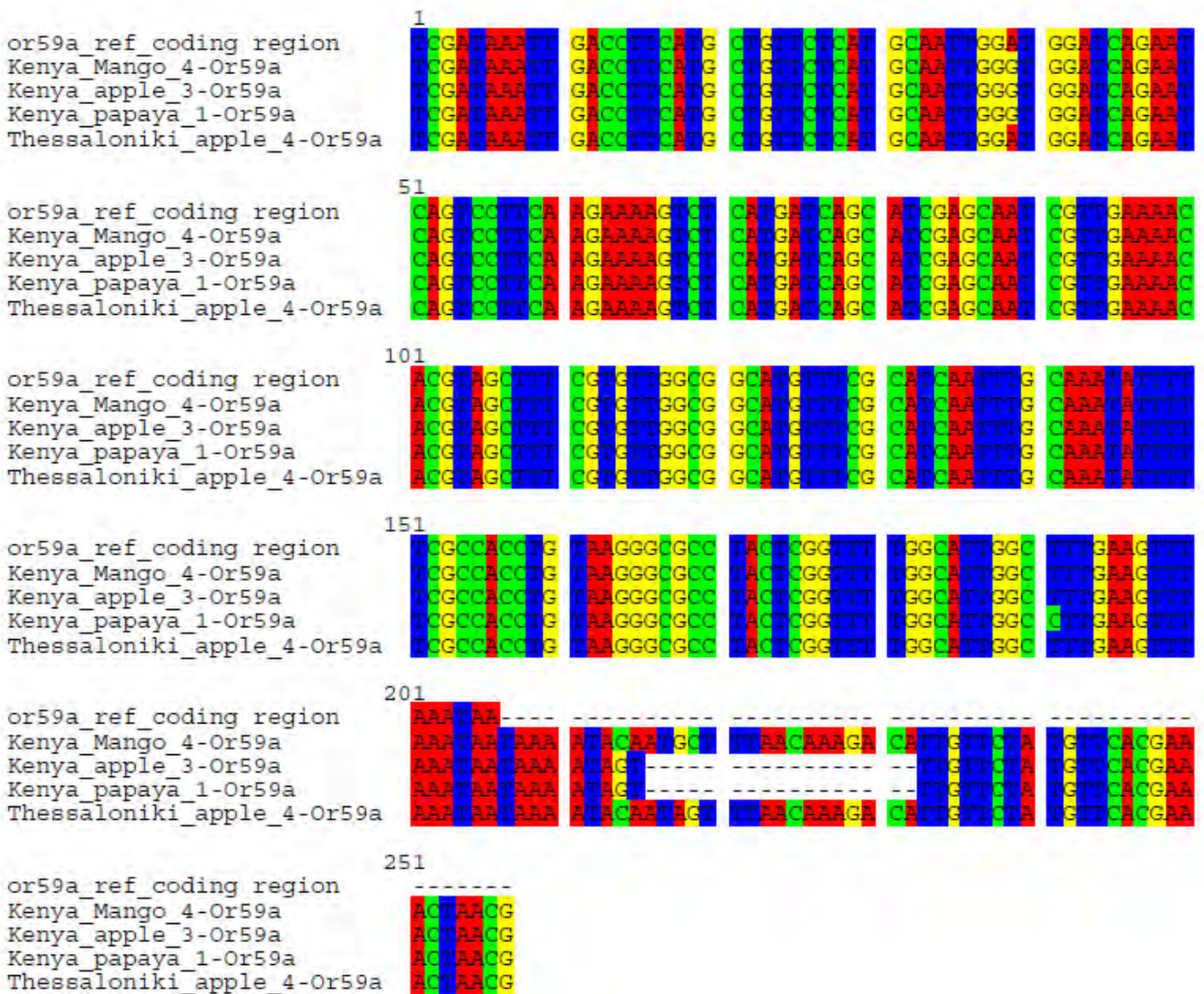
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση PvuII

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός, μέσω εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο, του πλασμιδιακού DNA των δειγμάτων, στα οποία επιβεβαιώθηκε η κλωνοποίηση, και τα δείγματα αυτά στάλθηκαν προς αλληλούχιση.

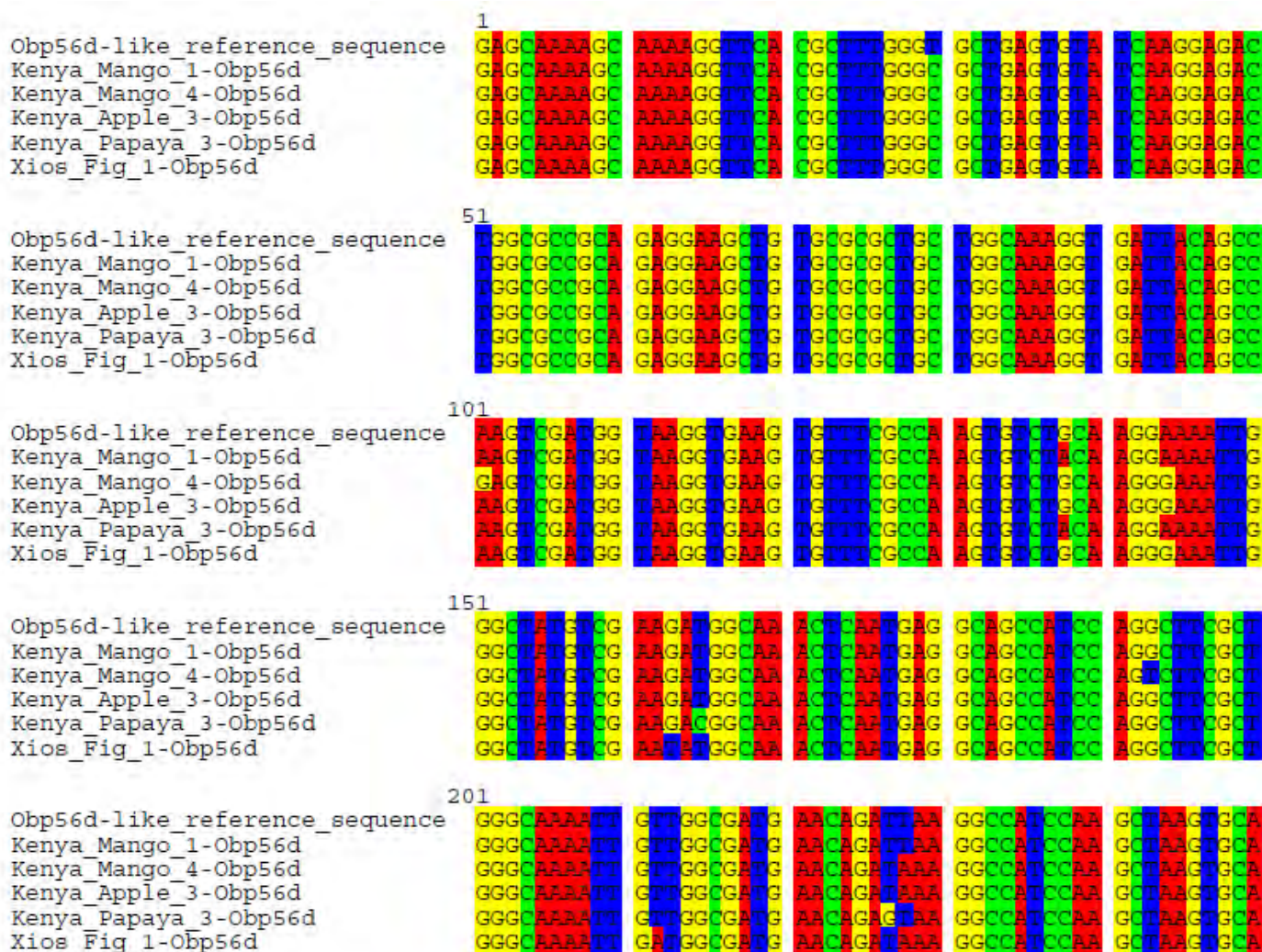
4. Αποτελέσματα Αλληλούχισης

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης έγινε, αρχικά, με τη χρήση του NCBI Blast, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το προϊόν, που ενισχύθηκε με την PCR και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε, είχε αντιστοιχία με τον υπό ανάλυση γενετικό τύπο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής Seaview4,¹⁴² χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW2,¹⁴³ προκειμένου να προσδιοριστούν οι πιθανοί πολυμορφισμοί μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων. Σε κάθε στοίχιση προστέθηκαν επιπλέον και οι αλληλουχίες αναφοράς (reference sequences) για τους τόπους για τους οποίους ήταν διαθέσιμες, όπως είναι δημοσιευμένες στη βάση δεδομένων GenBank. Για τους γενετικούς τόπους *Or59a*, *Obp56d* και *Obp8a*, πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών που προκύπτουν από τη μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που ενισχύθηκαν με PCR. Η διαδικασία αυτής της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε με το ίδιο πρόγραμμα βιοπληροφορικής (Seaview4). Για τους γενετικούς τόπους *Kap3* και *sgl* δεν πραγματοποιήθηκε αυτή η ανάλυση, καθώς τα προϊόντα της PCR αντιστοιχούν σε μη κωδικές περιοχές των γονιδίων. Στις **Εικόνες 19-23** φαίνονται τα αποτελέσματα της στοίχισης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για κάθε έναν από τους πέντε γενετικούς τόπους (*Or59a*, *Obp56d*, *Obp8a*, *Kap3* και *sgl*). Στις απεικονιζόμενες στοίχισεις, κάθε βάση είναι χρωματισμένη με διαφορετικό φόντο, με αποτέλεσμα να διακρίνονται οι αντικαταστάσεις των νουκλεοτιδίων. Αντίστοιχα, στις **Εικόνες 24, 25 και 26** φαίνονται τα αποτελέσματα της στοίχισης των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη μετάφραση των ενισχυόμενων προϊόντων για του τόπους *Or59a*, *Obp56d* και *Obp8a*. Κάθε αμινοξύ είναι, επίσης, χρωματισμένο με διαφορετικό φόντο, ούτως ώστε να διακρίνονται οι αντοκαταστάσεις που προκύπτουν.

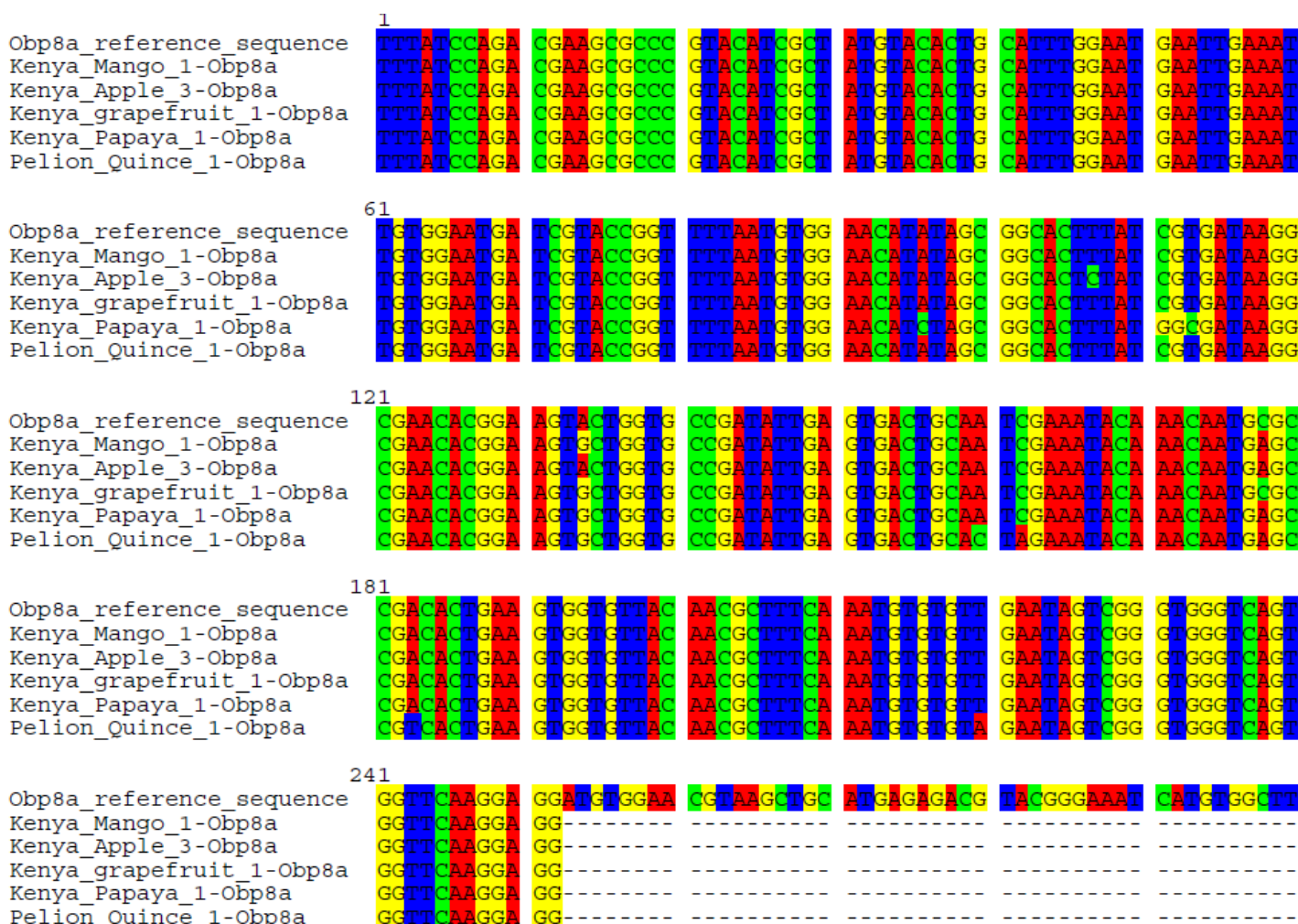
Εικόνα 19: Στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *Or59a*.



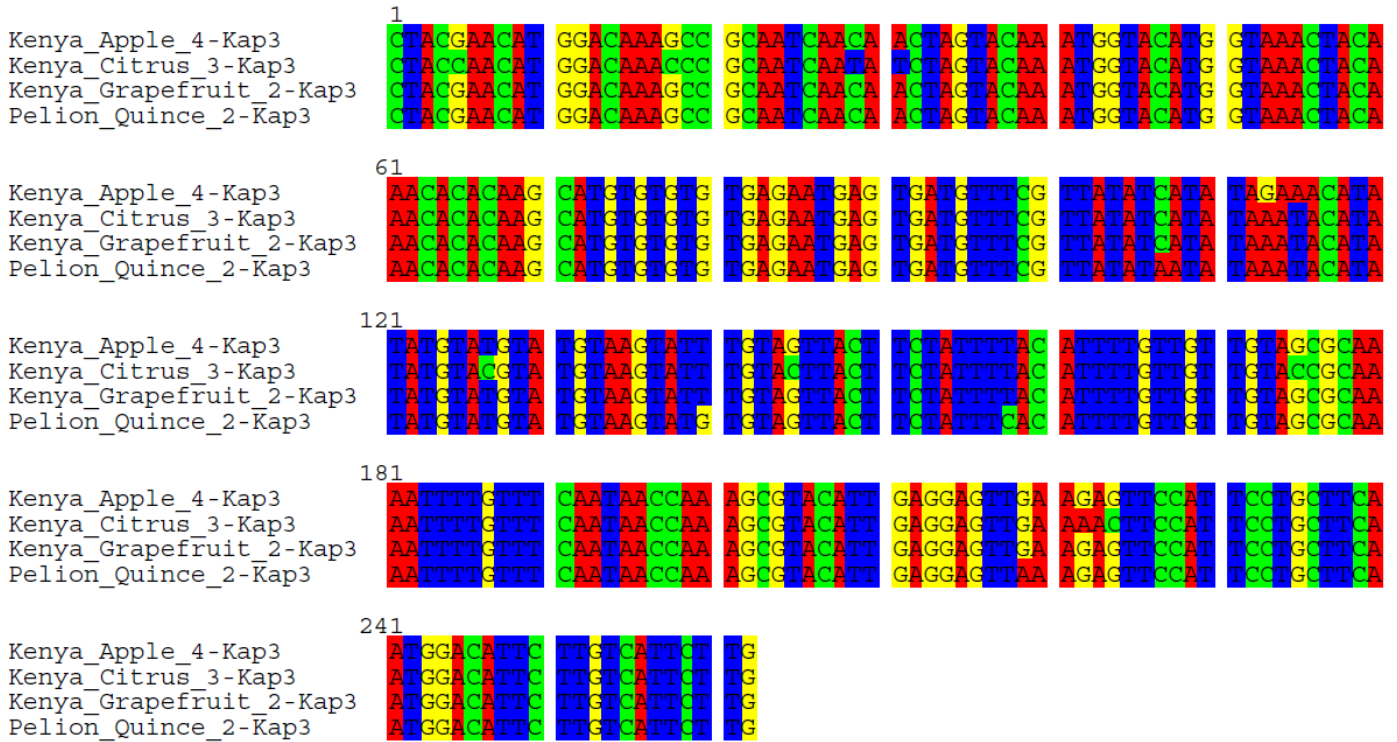
Εικόνα 20: Στοιχισή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *Obp56d*.



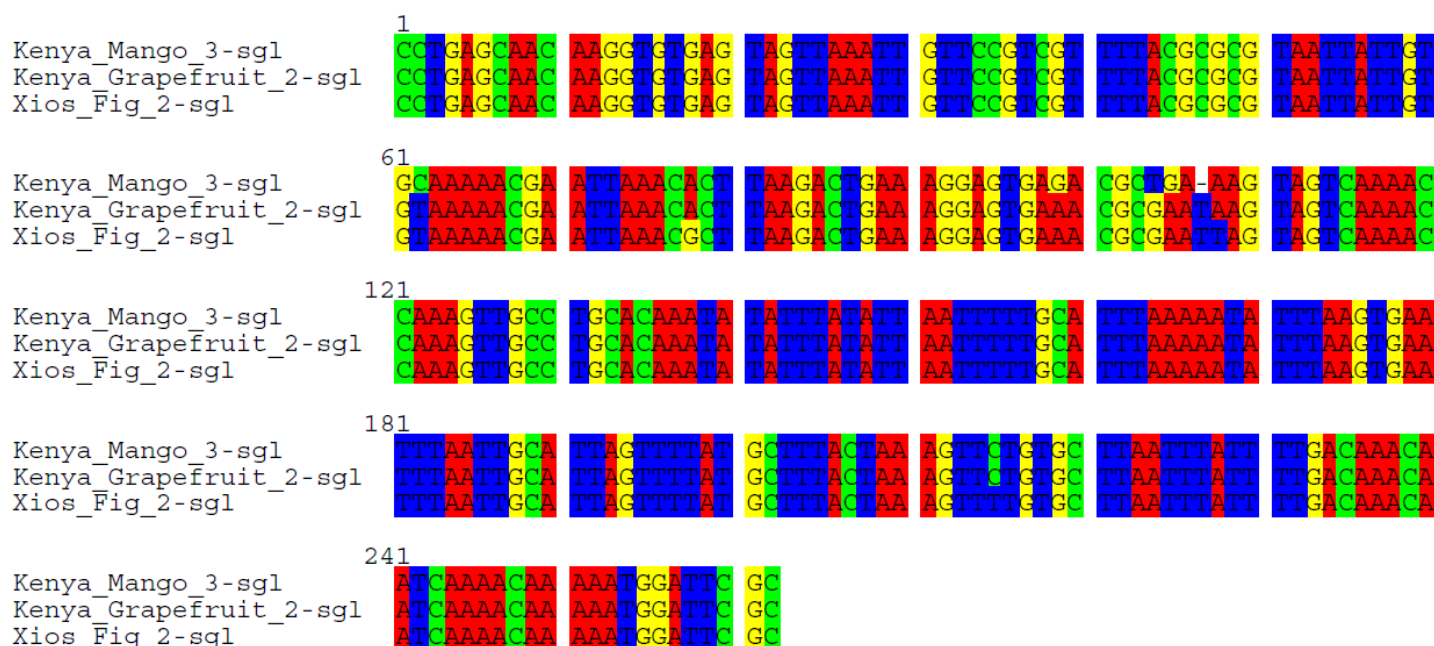
Εικόνα 21: Στοιχίση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *Obp8a*.



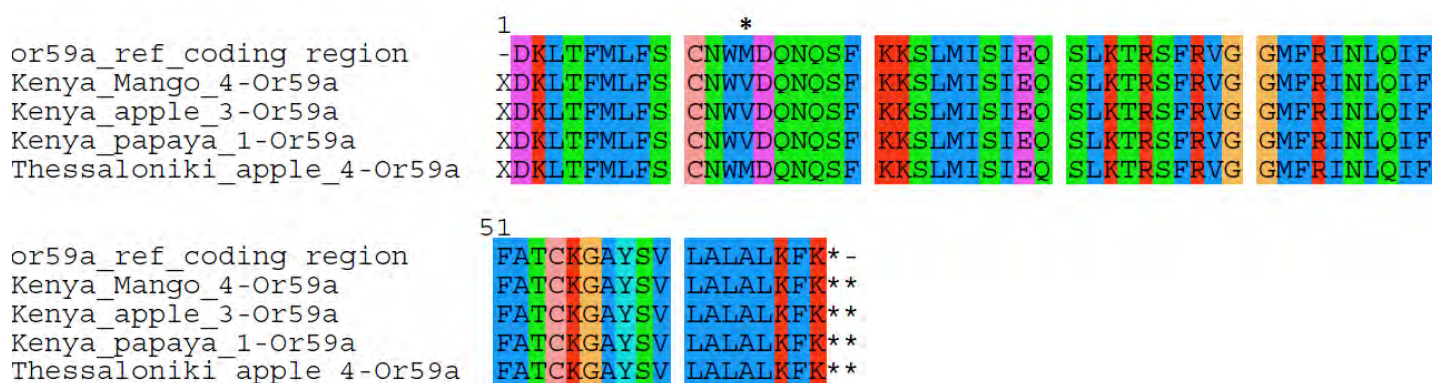
Εικόνα 22: Στοιχισή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *Kap3*.



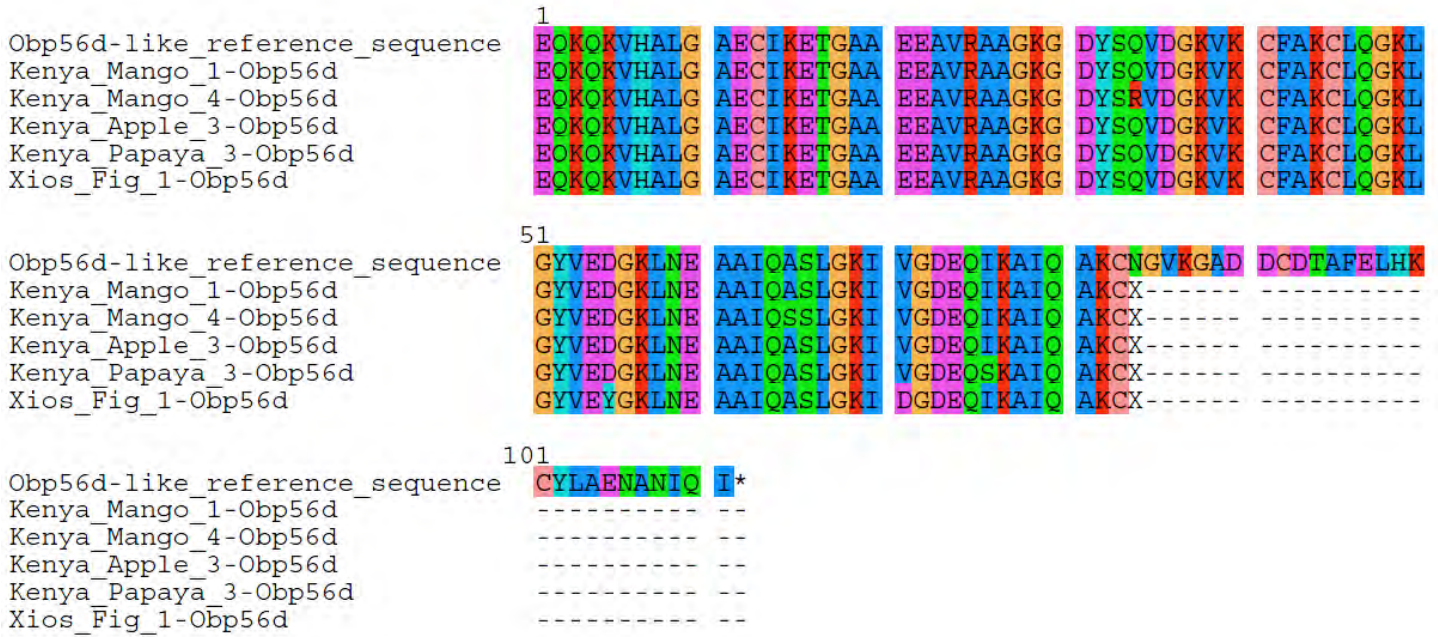
Εικόνα 23: Στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *sgl*.



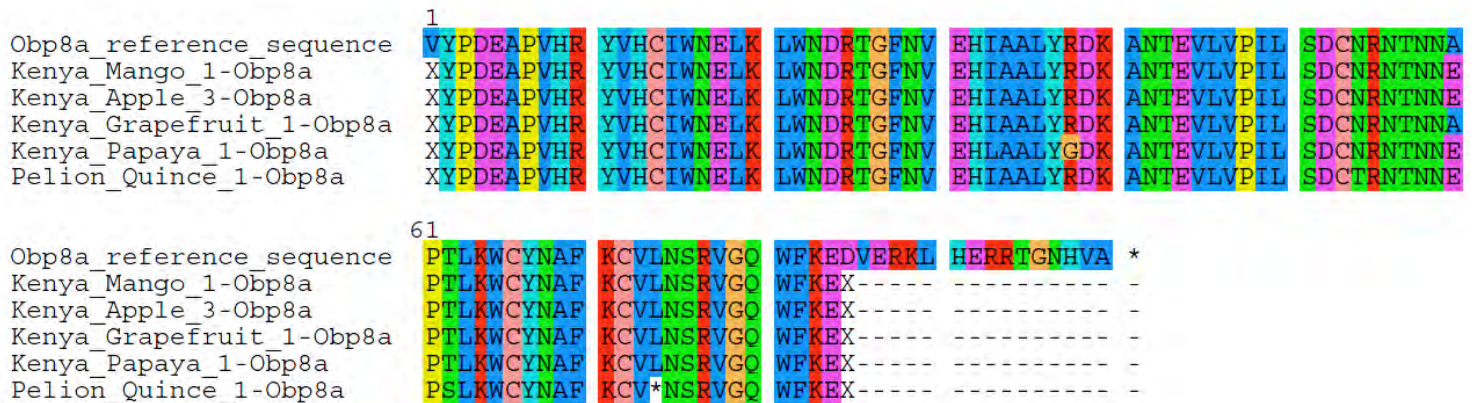
Εικόνα 24: Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών του *Or59a*.



Εικόνα 25: Στοιχισή των αμινοξικών αλληλουχιών του *Obp56d*.



Εικόνα 26: Στοιχισή των αμινοξικών αλληλουχιών του *Obp8a*.



Τα αποτελέσματα της στοίχισης συγκεντρώνονται, επίσης, στους **Πίνακες 8 και 9**, που ακολουθούν. Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται οι πολυμορφισμοί των **Or59a**, **Obp56d** και **Obp8a**. Οι αλληλουχίες αυτές αντιστοιχούν σε τμήματα εξονίων των αντίστοιχων γονιδίων, επομένως, στον πίνακα 8 παρατίθενται και οι αλλαγές που προκαλούν οι πολυμορφισμοί στην τριπλέτα των κωδικονίων και ακολούθως στο παραγόμενο αμινοξύ. Η αλληλουχία του **Or59a** από το νουκλεοτίδιο στη θέση 207 και μετά, αντιστοιχεί σε ιντρόνιο. Επομένως, οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν από το νουκλεοτίδιο 207 και έπειτα (θέσεις 214, 215, κ.λ.π.) δεν οδηγούν σε αντικατάσταση κάποιου αμινοξέος.

Πίνακας 8: Ανάλυση των SNPs που βρέθηκαν στους γενετικούς τόπους **Or59a**, **Obp56d** και **Obp8a**

Παρατίθενται όλοι οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν για τους γενετικούς τόπους **Or59a**, **Obp56d** και **Obp8a**, καθώς και οι αλλαγές που προκαλούνται από τους πολυμορφισμούς αυτούς σε επίπεδο τριπλέτας κωδικονίου και αμινοξικής αλληλουχίας (όταν πρόκειται για κωδικές περιοχές).

| Θέση | Αρχικά | | | Τελικά | | |
|-------------------------|----------------|-----------|---------------|--------|-----------|-----------------------|
| | Βάση | Κωδικόνιο | Αμινοξύ | Βάση | Κωδικόνιο | Αμινοξύ |
| UN10128 - Or59a | | | | | | |
| 39 | A | ATG | Μεθειονίνη | G | GTG | Βαλίνη |
| 191 | T | GCT | Αλανίνη | C | GCC | Αλανίνη |
| 214 | C | - | - | G | - | - |
| 215 | A | - | - | T | - | - |
| 216-232 | Προσθήκη 17 bp | | | | | |
| UN00319 - Obp56d | | | | | | |
| 101 | A | CAA | Γλουταμίνη | G | CGA | Αργινίνη |
| 138 | G | CTG | Λευκίνη | A | CTA | Λευκίνη |
| 144 | A | GGA | Γλυκίνη | G | GGG | Γλυκίνη |
| 163 | G | GAT | Ασπαρτικό οξύ | T | TAT | Τυροσίνη |
| 165 | T | GAT | Ασπαρτικό οξύ | C | GAC | Ασπαρτικό οξύ |
| 193 | G | GCT | Αλανίνη | T | TCT | Σερίνη |
| 212 | T | GTT | Βαλίνη | A | GAT | Ασπαρτικό οξύ |
| 227 | T | ATT | Ισολευκίνη | G | AGT | Σερίνη |
| 228 | T | ATT | Ισολευκίνη | A | ATA | Ισολευκίνη |
| UN05535 - Obp8a | | | | | | |
| 96 | A | ATA | Ισολευκίνη | C | CTA | Λευκίνη |
| 107 | T | CTT | Λευκίνη | C | CTC | Λευκίνη |
| 111 | C | CGT | Αργινίνη | G | GGC | Γλυκίνη |
| 113 | T | | | C | | |
| 134 | A | GTA | Βαλίνη | G | GTG | Βαλίνη |
| 160 | A | AAT | Ασπαραγίνη | C | ACT | Θρεονίνη |
| 162 | C | CGA | Αργινίνη | A | AGA | Αργινίνη |
| 178 | C | GCG | Αλανίνη | A | GAG | Γλυκίνη |
| 183 | A | ACA | Θρεονίνη | T | TCA | Σερίνη |
| 220 | T | TTG | Λευκίνη | A | TAG | Κωδικόνιο Τερματισμού |

Πίνακας 9: Ανάλυση των SNPs που βρέθηκαν στους γενετικούς τόπους *Kap3*, και *sgl*. Παρατίθενται όλοι οι πολυμορφισμοί, που βρέθηκαν για τα *Kap3* και *sgl*. Τα προϊόντα της PCR που πραγματοποιήθηκε για τους τόπους αυτούς αντιστοιχούν σε μη κωδικές περιοχές των αντίστοιχων γονιδίων, επομένως στον πίνακα φαίνονται μόνο οι αντικαταστάσεις βάσεων ή και τα ελλείματα/προσθήκες, όπου αυτά υπάρχουν.

| Θέση | Αρχική βάση | Τελική βάση |
|------------------------------|-------------|-------------------|
| UN02486 - <i>Kap3</i> | | |
| 5 | G | C |
| 18 | G | C |
| 29 | C | T |
| 31 | A | T |
| 107 | C | A |
| 113 | A | G |
| 115 | T | A |
| 127 | T | C |
| 140 | T | G |
| 145 | G | C |
| 158 | T | C |
| 175 | G | C |
| 219 | G | A |
| 222 | G | A |
| 224 | G | C |
| UN10817 - <i>sgl</i> | | |
| 62 | T | C |
| 78 | A | G |
| 99 | A | G |
| 104 | G | T |
| 105 | A | G |
| 107 | T | - (έλλειμα βάσης) |
| 108 | A | T |
| 215 | C | T |

Στη συνέχεια παρατίθενται συνοπτικά (**Πίνακας 10**) οι αντικαταστάσεις αμινοξέων που προκαλούνται από την επίδραση των SNPs, που ανιχνεύθηκαν στους γενετικούς τόπους *Or59a*, *Obp56d* και *Obp8a*, καθώς και οι βασικές χημικές ιδιότητες των αμινοξέων που αντικαθίστανται.

Πίνακας 10: Αντικαταστάσεις αμινοξέων στους γενετικούς τόπους *Or59a*, *Obp56d* και *Obp8a* και περιγραφή των ιδιοτήτων του κάθε αμινοξέος

| Θέση SNP | Αρχικό Αμινοξύ | Τελικό Αμινοξύ | | |
|-------------------------|----------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| UN10128 - Or59a | | | | |
| 39 | Μεθειονίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Βαλίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 191 | Αλανίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Αλανίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| UN00319 - Obp56d | | | | |
| 101 | Γλουταμίνη | Πολικό/ ουδέτερο | Αργινίνη | Πολικό/ Θετικά φορτισμένο |
| 138 | Λευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Λευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 144 | Γλυκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Γλυκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 163 | Ασπαραγινικό | Πολικό/ Αρνητικά φορτισμένο | Τυροσίνη | Πολικό/ ουδέτερο |
| 165 | Ασπαραγινικό | Πολικό/ Αρνητικά φορτισμένο | Ασπαραγινικό | Πολικό/ Αρνητικά φορτισμένο |
| 193 | Αλανίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Σερίνη | Πολικό/ ουδέτερο |
| 212 | Βαλίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Ασπαραγινικό | Πολικό/ Αρνητικά φορτισμένο |
| 227 | Ισολευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Σερίνη | Πολικό/ ουδέτερο |
| 228 | Ισολευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Ισολευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| UN05535 - Obp8a | | | | |
| 96 | Ισολευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Λευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 107 | Λευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Λευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 111-113 | Αργινίνη | Πολικό/ θετικό | Γλυκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 134 | Βαλίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Βαλίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 160 | Ασπαραγίνη | Πολικό/ ουδέτερο | Θρεονίνη | Πολικό/ ουδέτερο |
| 162 | Αργινίνη | Πολικό/ θετικό | Αργινίνη | Πολικό/ θετικό |
| 178 | Αλανίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Γλυκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο |
| 183 | Θρεονίνη | Πολικό/ ουδέτερο | Σερίνη | Πολικό/ ουδέτερο |
| 220 | Λευκίνη | Μη πολικό/ ουδέτερο | Κωδικόνιο Τερματισμού | - |

IV. Συζήτηση

Ο βασικός στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανίχνευση νέων πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου (SNPs), που σχετίζονται με την επιλογή του ξενιστή της Μύγας της Μεσογείου. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, προσανατολιστήκαμε στην ανάλυση γενετικών τόπων, που σχετίζονται με τη λειτουργία του οσφρητικού συστήματος της *C. capitata*. Η κατεύθυνση, που επιλέχθηκε, βασίστηκε και σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες άλλων ειδών εντόμων, στις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική γενετική διαφοροποίηση σε πληθυσμούς που έδειχναν προτίμηση σε διαφορετικούς ξενιστές.^{35,36}

Η στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αποκάλυψε την ύπαρξη μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε όλα τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο κατά τη διαδικασία της ανάλυσης SSCP. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει, σε πρώτη φάση, τον επιτυχημένο διαχωρισμό των προϊόντων PCR κατά την ηλεκτροφόρηση. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι σε κάθε ένα από τα πρότυπα ηλεκτροφόρησης που επιλέχθηκαν να αλληλουχηθούν, βρέθηκαν πάνω από ένας πολυμορφισμοί. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι με την προσέγγιση της ανάλυσης SSCP, χάνονται ορισμένοι πολυμορφισμοί που δεν μπορούν να διακριθούν κατά την ηλεκτροφόρηση.

Η περαιτέρω ανάλυση των πολυμορφισμών που ανιχνεύθηκαν αποκάλυψε την ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού πολυμορφισμών στις μη κωδικές περιοχές των υπό ανάλυση γενετικών τόπων. Η συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών στις μη κωδικές περιοχές υπολογίζεται σε ~ 1 SNP/20 bp. Ο αντίστοιχος υπολογισμός που αφορά τις κωδικές περιοχές είναι ~ 1 SNP/30 bp. Η διαφορά αυτή είναι φυσιολογική, εάν λάβουμε υπόψη μας, το γεγονός ότι η επιλεκτική πίεση επηρεάζει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό τις περιοχές των εξονίων, που κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποτροπή της γενετικής διαφοροποίησης των περιοχών αυτών και την εμφάνιση περισσότερο συντηρημένων περιοχών σε σχέση με τα ιντρόνια, τα οποία δε συμμετέχουν στον καθορισμό της αμινοξικής ακολουθίας. Επίσης, τα δείγματα που προέρχονταν από την Κένυα της Αφρικής, αποδείχθηκαν περισσότερο πολυμορφικά σε σχέση με τα ελληνικά δείγματα. Συνήθως, οι νεότεροι πληθυσμοί είναι λιγότερο πολυμορφικοί σε σχέση με τους προγονικούς πληθυσμούς λόγω διαφόρων εξελικτικών φαινομένων (π.χ. φυσική επιλογή, φαινόμενο του ιδρυτή, κ.λ.π.). Επομένως, το εύρημα αυτό συμβαδίζει με την θεωρία περί καταγωγής της *C. capitata* από την υπο-Σαχάρια ανατολική περιοχή της Αφρικής (Κένυα).

Μια επιπλέον παρατήρηση, που αφορά τη συχνότητα των πολυμορφισμών, που βρέθηκε κατά τη συγκεκριμένη ανάλυση (~ 1 SNP/20-30bp), είναι ότι πρόκειται για ένα ιδιαίτερα μεγάλο και ασυνήθιστο αριθμό SNPs. Για παράδειγμα, αν λάβει κανείς υπόψη του την αντίστοιχη συχνότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, που έχει υπολογιστεί σε ~ 1 SNP/1000bp, η διαφορά που προκύπτει είναι ιδιαίτερα σημαντική. Επομένως, μιλάμε για ένα ιδιαίτερα πολυμορφικό είδος, κάτι που αποδείχθηκε και σε μία πρόσφατη προσπάθεια αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος της

Μεσογειακής μύγας κατά τη διάρκεια του ερευνητικού προγράμματος GENOMIC SEQUENCING OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY, *CERATITIS CAPITATA* του USDA (United States Department of Agriculture). Στην προσπάθεια αυτή, προέκυψαν αρκετά προβλήματα κατά τη δημιουργία των συναρμολογημάτων, η οποία έγινε με πολλές δυσκολίες, λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού των πολυμορφισμών που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα.

Όσον αφορά την επιρροή των αντικαταστάσεων, που ανιχνεύθηκαν στους γενετικούς τόπους *Or59a*, *Obp56d* και *Obp8a* στο επίπεδο της αμινοξικής ακολουθίας, παρατηρείται ότι πολλές από αυτές είναι **σιωπηλές αντικαταστάσεις**, δηλαδή, η αλλαγή της βάσης δεν επηρεάζει το αντίστοιχο αμινοξύ στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Συνήθως, αυτό συμβαίνει όταν η αντικατάσταση λαμβάνει χώρα στο τρίτο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας του κωδικονίου. Επιπλέον, η πλειοψηφία των πολυμορφισμών, που ανιχνεύθηκαν και δεν ανήκουν στην κατηγορία των σιωπηλών αντικαταστάσεων, δεν οδηγούν σε κάποια υπερβολική αλλαγή στην αμινοξική ακολουθία, είναι, δηλαδή, **ουδέτερες αντικαταστάσεις**. Οι πολυμορφισμοί αυτοί οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος με ένα διαφορετικό αμινοξύ, το οποίο, ωστόσο, έχει παρόμοιες ιδιότητες με το αρχικό, με αποτέλεσμα να μην οδηγεί σε αλλαγές στη δευτεροταγή διαμόρφωση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Ένα γεγονός, που αξίζει να σημειωθεί, είναι ότι οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν στο γενετικό τόπο *Or59a* είναι πολύ λιγότεροι (μόνο δύο SNPs σε μια περιοχή ~200bp) σε σχέση με τους άλλους δύο τόπους (*Obp56d* και *Obp8a*). Ο ένας από τους δύο πολυμορφισμούς αποτελεί σιωπηλή αντικατάσταση. Ο δεύτερος είναι μια ουδέτερη αντικατάσταση, στην οποία η μεθειονίνη αντικαθίσταται από τη βαλίνη. Δηλαδή ένα υδρόφοβο αμινοξύ αντικαθίσταται από ένα, επίσης υδρόφοβο αμινοξύ. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι η περιοχή του *Or59a* αντιστοιχεί στην έκτη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα. Οποιαδήποτε αντικατάσταση διαφορετικού τύπου σε αυτή την περιοχή θα μπορούσε να οδηγήσει σε εντελώς διαφορετική δομή της πρωτεΐνης. Γενικότερα, οι διαμεμβρανικές περιοχές των πρωτεϊνών αποτελούνται κυρίως από υδρόφοβα αμινοξέα, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η είσοδος των πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη. Επομένως, η αντικατάσταση οποιουδήποτε υδρόφοβου αμινοξέος με κάποιο υδρόφιλο θα μπορούσε να διαταράξει ή και να εμποδίσει πλήρως την αγκυροβόληση του υποδοχέα στη μεμβράνη του νευρικού κυττάρου.

Η συσχέτιση των SNPs, που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη, με την επιλογή του ξενιστή της Μεσογειακής μύγας θα μπορούσε να εξαχθεί ως ένα γενικό συμπέρασμα των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης των δειγμάτων που επιλέχθηκαν, εφόσον, κάθε ένα από τα δείγματα, που επιλέχθηκαν να σταλούν προς αλληλούχιση, παρουσιάζει διαφορετικούς πολυμορφισμούς και προέρχεται από διαφορετικό ξενιστή. Ωστόσο, η συσχέτιση του κάθε SNP ξεχωριστά με την προτίμηση σε ένα συγκεκριμένο ξενιστή απαιτεί την ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, προκειμένου να εξαχθεί ένα στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα. Επομένως, η

ανάλυση περισσότερων δειγμάτων από μια ευρύτερη ποικιλία φυτών θα αναδείξει τη συσχέτιση αυτών (ή άλλων) SNPs με συγκεκριμένους ξενιστές.

Το γεγονός ότι δεν υπήρξε προηγούμενη γνώση του γονιδιώματος της *C. capitata* περιόρισε σε μεγάλο βαθμό τις επιλογές σε σχέση με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε. Παρότι η ανάλυση SSCP είναι αρκετά αποτελεσματική και όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μας παρείχε έγκυρα αποτελέσματα, τα οποία επιβεβαιώθηκαν και με την αλληλούχιση των δειγμάτων, ωστόσο, δεν παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων και αποτελεί μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία. Παράλληλα, χαρακτηρίζεται από το μειονέκτημα ότι δεν μπορεί να διακρίνει όλους τους πολυμορφισμούς των αλληλουχιών που αναλύονται. Η παρούσα εργασία αποτελεί την έναρξη μια ευρύτερης μελέτης που σκοπό θα έχει, μεταξύ άλλων, την συσχέτιση της προτίμησης του εντόμου για συγκεκριμένους ξενιστές με μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς από το σύνολο του γονιδιώματος της Μεσογειακής μύγας. Η ολοκλήρωση της αλληλούχισης του γονιδιώματος της *C. capitata* και η πρόσβαση σε αυτό, θα μας παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης πληθώρας πολυμορφισμών με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Οι πολυμορφισμοί αυτοί θα χρησιμοποιηθούν, στη συνέχεια για την κατασκευή ενός SNP chip που θα μπορεί να χρησιμεύσει στην ταυτοποίηση πολυμορφισμών συνδεδεμένων με επιλεγμένους χαρακτήρες, μεταξύ των οποίων είναι και η επιλογή του φυτού-ξενιστή.

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Υπεύθυνο του Εργαστηρίου Καθηγητή κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, που είναι και ο Επιβλέπων Καθηγητής της παρούσας Διπλωματικής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και κυρίως την πνευματική του καθοδήγηση, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η διεκπεραίωση της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κα. Σαραφίδου Θεολογία και κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη που αποδέχθηκαν την συμμετοχή τους στην επιτροπή. Επιπλέον ευχαριστίες στους κ. Παπαδόπουλο Νίκο και Sunday Ekesi για την ευγενική παραχώρηση των δειγμάτων των εντόμων, χωρίς τα οποία δεν θα ήταν δυνατή η διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τις υποψήφιες διδάκτορες Έφη Σαγρή και Μαριλένα Γρηγορίου και τη μετα-διδακτορική ερευνήτρια, Κων/να Τσουμάνη, για την άψογη συνεργασία και τη βοήθεια τους στις πειραματικές διαδικασίες, αλλά και για την υποστήριξη τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στα μέλη της οικογενείας μου, για την ηθική και συναισθηματική συμπαράσταση, που μου προσέφεραν απλόχερα όλον αυτόν τον καιρό, χωρίς εκείνους δεν θα είχε γίνει τίποτα από τα παραπάνω. Ευχαριστώ...

Βιβλιογραφία

1. Christenson, L. D., and R. H. Foote. 1960. Biology of fruits flies. *Annu. Rev. Entomol.* 5: 171-192.
2. White, I.M., Elson-Harris, M.M. (1992) Fruit flies of economic significance, their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK.
3. Malacrida, A. R., F. Marinoni, C. Torti, L. M. Gomulski, F., Sebastiani, C. Bonvicini, G. Gasperi, and C. R. Guglielmino. 1998. Genetic aspects of the worldwide colonization process of *Ceratitis capitata*. *J. Hered.* 89:501–507.
4. Bonizzoni, M., A. R. Malacrida, C. R. Guglielmino, L. M. Gomulski, G. Gasperi, and L. Zheng. 2000. Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9:251–261.
5. Gasperi, G., M. Bonizzoni, L. M. Gomulski, V. Murelli, C. Torti, A. R. Malacrida, and C. R. Guglielmino. 2002. Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitis capitata*. *Genetica* 116:125–135.
6. Malacrida, A. R., L. M. Gomulski, M. Bonizzoni, S. Bertin, G. Gasperi, and C. R. Guglielmino. 2007. Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica* 131:1–9.
7. Bonizzoni, M., C. R. Guglielmino, C. J. Smallridge, M. Gomulski, A. R. Malacrida, and G. Gasperi. 2004. On the origins of medfly invasion and expansion in Australia. *Mol. Ecol.* 13:3845–3855.
8. Fletcher, B.S., 1989. Movements of tephritid fruit flies, pp. 209–219 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3B, edited by A.S. Robinson & G.H. Hooper. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands.
9. Back, E.A. & C.E. Pemberton, 1918. The Mediterranean fruit fly. *USDA Bulletin* 640, US Department of Agriculture, Washington DC: 1–44.
10. Fimiani, P., 1989. Mediterranean region, pp. 39–50 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3A, edited by A.S. Robinson & G.H. Hooper. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands.
11. Enkerlin, D., L.R. Garcia & M. Fidel Lopez, 1989. Mexico, Central and south America, pp. 83–90 in *Fruit Flies: Their biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3A, edited by A.S. Robinson & G. Hooper. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands.
12. Harris, E.J., 1989. Hawaiian islands and North America, pp. 73–81 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3A, edited by A.S. Robinson & G.H. Hooper. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands.
13. Hooper, G.H.S. & R.A.I. Drew, 1989. Australia and South Pacific islands, pp. 67–72 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3A, edited by A.S. Robinson & G.H. Hooper. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands.
14. Carey JR (1996) The incipient Mediterranean fruit fly population in California: implications for invasion biology. *Ecology* 77:1690–1697
15. Carey JR (1991) Establishment of the Mediterranean fruit fly in California. *Science* 253:1369–1373
16. Liquido, N. J., G. T. McQuate and K. A. Suiter. 2013. MEDHOST: An Encyclopedic Bibliography of the Host Plants of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), Version 1.1. United States Department of

- Agriculture, Center for Plant Health Science and Technology, Raleigh, N.C.
<https://www.gpdd.info/MedHost/>
17. Papadopoulos NT, Katsoyannos BI, Kouloussis NA, Hendrichs J (2001) Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99:253-261
 18. Katsoyannos BI, Heath RR, Papadopoulos NT, Epsky ND, Hendrichs J (1999a) Field Evaluation of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Female Selective Attractants for Use in Monitoring Programs. *Journal of Economic Entomology* 92:583-589
 19. Magana, C., P. Hernandez-Crespo, F. Ortego, and P. Castanera. 2007. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. *J. Econ. Entomol.* 100: 1836-1843.
 20. Mitchell AC, Saul SH (1990) Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, and their application in the USA. *Rev Agric Entomol* 78:923-940
 21. Knippling, E.F., 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* 48: 459-462.
 22. Rössler, Y., 1979a. Automated sexing of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): the development of strain with inherited sex-limited pupal color dimorphism. *Entomophaga* 24: 411-416
 23. Robinson, A.S. & C. van Heemert, 1982. *Ceratitis capitata*: a suitable case for genetic sexing. *Genetica* 58: 229-237.
 24. Robinson, A.S., G. Franz & K. Fisher, 1999. Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: development, mass rearing and field application. *Trends Entomol.* 2: 81-104.
 25. Fisher, K. & C. Caceres, 2000. A filter rearing system for mass reared genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae), pp. 543-550 in *Area-Wide Management of Fruit Flies and Other Major Insect Pests*, edited by K.H. Tan. Universiti Sains Malaysia Press, Penang, Malaysia.
 26. Caceres, C., K. Fisher & P. Rendon, 2000. Mass rearing of the medfly temperature sensitive lethal genetic sexing strain in Guatemala, pp. 551-558 in *Area-Wide Management of Fruit Flies and Other Major Insect Pests*, edited by K.H. Tan. Universiti Sains Malaysia Press, Penang, Malaysia.
 27. Zabalou S., A. Apostolaki, I. Livadaras, G. Franz, A. S. Robinson, C. Savakis & K. Bourtzis, 2009. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain *Entomologia Experimentalis et Applicata* 132: 232-240.
 28. Ferrari J, Godfray HC, Faulconbridge AS, Prior K, Via S (2006) Population differentiation and genetic variation in host choice among pea aphids from eight host plant genera. *Evolution* 60:1574-1584
 29. Emelianov I, Simpson F, Narang P, Mallet J (2003) Host choice promotes reproductive isolation between host races of the larch budmoth *Zeiraphera diniana*. *Journal of Evolutionary Biology* 16:208-218
 30. Caillaud MC, Via S (2000) Specialized Feeding Behavior Influences Both Ecological Specialization and Assortative Mating in Sympatric Host Races of Pea Aphids. *The American Naturalist* 156:606-621
 31. Hawthorne DJ, Via S (2001) Genetic linkage of ecological specialization and reproductive isolation in pea aphids. *Nature* 412:904-907

32. Bethenod MT, Thomas Y, Rousset F, Frerot B, Pelozuelo L, Genestier G, Bourguet D (2004) Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner. II: assortative mating and host-plant preferences for oviposition. *Heredity* 94:264-270
33. Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 372–380.
34. Rundle HD, Nosil P (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8, 336–352.
35. Diegisser T, Johannesen J, Lehr C, Seitz A (2004) Genetic and morphological differentiation in *Tephritis bardanae* (Diptera: Tephritidae): evidence for host-race formation. *Journal of Evolutionary Biology* 17:83-93
36. Jaquièrey, J., Stoeckel, S., Nouhaud, P., Mieuze, L., Mahéo, F., Legeai, F., Bernard, N., Bonvoisin, A., Vitalis, R. and Simon, J.-C. (2012), Genome scans reveal candidate regions involved in the adaptation to host plant in the pea aphid complex. *Molecular Ecology*, 21: 5251–5264. doi: 10.1111/mec.12048
37. Ohloff G: *Scent and Fragrances: The Fascination of Odors and their Chemical Perspectives*. Berlin: Springer-Verlag; 1994;154-158.
38. Keller, A., and Vosshall, L. B. 2003. Decoding olfaction in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 103–110.
39. Vosshall, LB & Stocker, RE. 2007. Molecular Architecture of Smell and Taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, 30: 505-533.
40. Tunstall NE and Warr CG. 2012. Chemical communication in insects: the peripheral odour coding system of *Drosophila melanogaster*. *Adv Exp Med Biol.*, 739:59-77.
41. Hildebrand JG, Shepherd GM. Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Ann Rev Neurosci* 1997; 20:659-631.
42. Touhara K. and Vosshall, L. B. 2009. Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. *Annual Review of Physiology*, Vol. 71: 307 -332
43. Leal WS, Nikonova L, Peng G (1999). Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*. *FEBS Lett* 464: 85–90
44. Scaloni A, Monti M, Angeli S, Pelosi P (1999). Structural analysis and disulfide-bridge pairing of two odorant-binding proteins from *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 386–391.
45. Van den Berg MJ, Ziegelberger G (1991). On the function of the pheromone binding protein in the olfactory hairs of *Antheraea polyphemus*. *J Insect Physiol* 37: 79–85.
46. Maida R, Ziegelberger G, Kaissling KE (2003). Ligand binding to six recombinant pheromone-binding proteins of *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. *J Comp Physiol [B]* 173: 565–573.
47. Pophof B (2004). Pheromone-binding proteins contribute to the activation of olfactory receptor neurons in the silkworms *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *Chem Senses* 29: 117–125.
48. Matsuo T, Sugaya S, Yasukawa J, Aigaki T, Fuyama Y (2007). Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biol* 5: e118.
49. Kaissling KE (2001). Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model. *Chem Senses* 26: 125–150.
50. Wetzel CH, Behrendt H-J, Gisselmann G et al. Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9377-9380.

51. Hallem EA, Ho MG, Carlson JR. The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* 2004; 117:965-979.
52. Benton R, Sachse S, Michnick SW et al. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biology* 2006; 4:1-18.
53. Robertson HM, Warr CG, Carlson JR. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:14537-14542.
54. Goldman AL, van der Goes van Naters W, Lessing D et al. Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron* 2005; 45:661-666.
55. Larsson M, Domingos AI, Jones WD et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 2004; 43:703-714.
56. Hill CA, Fox AN, Pitts RJ et al. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; 298:176-178.
57. Melo ACA, Rutzler M, Pitts RJ et al. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chem Senses* 2004; 29:403-410.
58. Krieger J, Klink O, Mohl C et al. A candidate odorant receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J Comp Physiol A* 2003; 189:519.
59. Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T et al. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 2008; 452:1002-1006.
60. Smart R, Kiely A, Beale M et al. *Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 2008; 38:770-780.
61. Wicher D, Schafer R, Bauernfeind R et al. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 2008; 452:1007-1011.
62. Nakagawa T, Pellegrino M, Sato K, Vosshall LB, Touhara K (2012) Amino Acid Residues Contributing to Function of the Heteromeric Insect Olfactory Receptor Complex. *PLoS ONE* 7(3): e32372. doi:10.1371/journal.pone.0032372
63. Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, et al. 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:16653–58
64. Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K. 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* 307:1638–42
65. Syed Z, Ishida Y, Taylor K, Kimbrell DA, Leal WS. 2006. Pheromone reception in fruit flies expressing a moth's odorant receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:16538–43
66. Yew JY, Dreisewerd K, Luftmann H, Muthing J, Pohlentz G, Kravitz EA. A New Male Sex Pheromone and Novel Cuticular Cues for Chemical Communication in *Drosophila*. *Curr Biol* 2009.
67. Manes SD, Tompkins L, Richmond RC. Male esterase 6 catalyzes the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1983; 222:419-21.
68. Tompkins L, Hall JC. *Drosophila* males produce a pheromone which inhibits courtship. *Z Naturforsch* 1981; 36:694-6.
69. Kurtovic A, Widmer A, Dickson BJ. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature* 2007; 446:542-6.

70. Benton R, Vannice KS, Vosshall LB. 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450:289–93
71. Jin X, Ha TS, Smith DP. 2008. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:10996–1001
72. Ronderos D, Smith D. Diverse signaling mechanisms mediate volatile odorant detection in *Drosophila*. *Fly* 2009; 3:290 - 297; PMID: 19786837; <http://dx.doi.org/10.4161/fly.9801>
73. Laughlin JD, Ha TS, Jones DN, Smith DP. 2008. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133:1255–65
74. Kwok PY (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual review of genomics and human genetics* 2:235-258
75. Risch N (2001) Implications of multilocus inheritance for gene-disease association studies. *Theoretical population biology* 60:215-220
76. Botstein D, Risch N (2003) Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics* 33 Suppl:228-237
77. Ffrench-Constant RH, Steichen JC, Rocheleau TA, Aronstein K, Roush RT (1993) A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1957-1961
78. Andreev D, Rocheleau T, Phillips TW, Beeman RW, ffrench-Constant RH (1994) A PCR diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Pesticide Science* 41:345-349
79. Andrews MC, Callaghan A, Field LM, Williamson MS, Moores GD (2004) Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Molecular Biology* 13:555-561
80. Brun-Barale A, Bouvier J-C, Pauron D, Bergé J-B, Sauphanor B (2005) Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L, and development of a diagnostic test. *Pest Management Science* 61:549-554
81. Robin C, Lyman RF, Long AD, Langley CH, Mackay TFC (2002) hairy: A quantitative trait locus for *drosophila* sensory bristle number. *Genetics* 162:155-164
82. Kwok PY, Chen X: Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol* 2003, 5:43-60.
83. Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T.P., Bowden, D.W., Smith, D.R., Lander, E.S., et al. 1987. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51: 319-337.
84. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
85. International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
86. The International SNP Map Working Group. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.4 million SNPs. *Nature*. 409: 928-933.
87. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304- 51.

88. Fischer, S.G. and Lerman, L.S. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1579-1583.
89. Myers, R.M., Lumelsky, N., Lerman, L.S., and Maniatis, T. 1985b. Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 313: 495-498.
90. Henco, K., Harders, J., Wiese, U., and Riesner, D. 1994. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for the detection of polymorphic DNA and RNA. *Methods Mol. Biol.* 31: 211-228.
91. Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Applic.* 1: 34-38.
92. Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W., and Stone, E.M. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332.
93. Youil, R., Kemper, B.W., and Cotton, R.G.H. 1995. Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92: 87-91.
94. Youil, R., Kemper, B., and Cotton, R.G. 1996. Detection of 81 of 81 known mouse beta-globin promoter mutations with T4 endonuclease VII—the EMC method. *Genomics* 32: 431-435.
95. Babon, J.J., McKenzie, M., and Cotton, R.G. 2000. The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection. *Methods Mol. Biol.* 152: 187-199.
96. Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P., and Fodor, S.P. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5022-5026.
97. Hacia, J.G., Brody, L.C., Chee, M.S., Fodor, S.P.A., and Collins, F.S. 1996. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genet.* 14: 441- 447.
98. Hacia, J.G., Sun, B., Hunt, N., Edgemon, K., Mosbrook, D., Robbins, C., Fodor, S.P., Tagle, D.A., and Collins, F.S. 1998. Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays. *Genome Res.* 8: 1245-58.
99. Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C.R., Lim, E.P., Kalyanaraman, N., Nemes, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G.Q., and Lander, E.S. 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat. Genet.* 22: 231-238.
100. Halushka, M.K., Fan, J.B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., and Chakravarti, A. 1999. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat. Genet.* 22:239-247.
101. Tabor, S. and Richardson, C.C. 1995. A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92: 6339-6343
102. Kwok, P.Y. 2000. High-throughput genotyping assay approaches. *Pharmacogenomics.* 1: 95-100.
103. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C. and Markham, A.F. (1989) Analysis of any point mutation in DNA.

- The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503–2516.
104. Barany, F. 1991. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 189-193.
 105. Nickerson, D.A., Kaiser, R., Lappin, S., Stewart, J., Hood, L. and Landegren, U. (1990) Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8923–8927.
 106. Lyamichev, V., Mast, A.L., Hall, J.G., Prudent, J.R., Kaiser, M.W., Takova, T. et al. (1999) Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol* 17: 292–296.
 107. Hall, J.G., Eis, P.S., Law, S.M., Reynaldo, L.P., Prudent, J.R., Marshall, D.J. et al. (2000) Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8272–8277.
 108. Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lander, E.S., et al. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide Polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082.
 109. Tyagi, S., Bratu, D.P., and Kramer, F.R. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnol.* 16: 49-53.
 110. Hacia JG, Fan JB, Ryder O, Jin L, Edgemon K, et al. (1999) Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 22: 164–167.
 111. Li M, Wen Y, Lu Q, Fu WJ (2013) An Imputation Approach for Oligonucleotide Microarrays. *PLoS ONE* 8(3): e58677. doi:10.1371/journal.pone.0058677
 112. Jana SC, Girotra M, Ray K. Heterotrimeric kinesin-II is necessary and sufficient to promote different stepwise assembly of morphologically distinct bipartite cilia in *Drosophila* antenna. *Mol Biol Cell*. 2011 Mar 15;22(6):769-81.
 113. Sambandan D, Yamamoto A, Fanara JJ, Mackay TF, Anholt RR. 2006. Dynamic genetic interactions determine odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. Nov;174(3):1349-63.
 114. Gomulski LM., Dimopoulos G., Xi Z., Soares MB., Bonaldo MF., Malacrida AR., Gasperi G. Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genomics* 2008, 9:243 doi:10.1186/1471-2164-9-243
 115. NCBI: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 116. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25-9.
 117. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". *J. Bacteriol* 174: 1550–1557. PMID 8432.
 118. Protocol for PCR with Taq DNA Polymerase.
<http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>

119. PCR Buffers and MgCl₂. <http://www.studentsguide.in/animal-biotechnology/PCR-polymerase-chain-reaction/PCR-buffers-MGcl2.html>
120. Markoulatos P, Sifakos N, Moncany M (2002). "Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach". *J. Clin. Lab. Anal.* 16 (1): 47–51. doi:10.1002/jcla.2058. PMID 11835531.
121. <http://www.obgynacademy.com/basicsscience/fetology/genetics/>
122. D.J. Sharkey, E.R. Scalice, K.G. Christy Jr., S.M. Atwood, and J.L. Daiss (1994). "Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction". *Bio/Technology* 12: 506–509
123. Polymerase chain reaction. http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction
124. Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
125. Agarose gel electrophoresis. http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose_gel_electrophoresis
126. Shi Q & Jackowski G, 1998. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, pp 1–52 in Hames BD (ed) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 3rd edn.
127. DNA cloning. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9A.htm>
128. B. R. Glick and J. J. Pasternak (2005). *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. ASM Press Washington, D. C.
129. Rossi, R., et al., Functional characterization of the T4 DNA Ligase: a new insight into the mechanism of action, *Nucleic Acids Res.*, 25, 2106-2113, 1997
130. <http://www.xenbase.org/other/static/methods/vector-files/pBSSKplus>
131. Alting-Mees, M.A., Sorge, J.A. and Short, J.M., pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors, *Meth. Enzymol.*, 216, 483-495, 1992.
132. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields". *Embo J.* 1 (7): 841–5.
133. Weaver and Y. A. Chizmadzhev. "Theory of electroporation: A review " *Biochemistry and Bioenergetics.* 41. (1996) 135-160.
134. Electroporation. <http://en.wikipedia.org/wiki/Electroporation>
135. Weaver JC. 1995. Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 1-26.
136. Hanahan D, 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166(4):557-80.
137. B. R. Glick and J. J. Pasternak (2005). *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. ASM Press Washington, D. C.
138. Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ (June 1998). "The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*". *Curr. Microbiol.* 36 (6): 341–7.
139. Birnboim HC, Doly J (November 1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Res.* 7 (6): 1513–23. PMID 388356. PMC 342324.
140. Sanger F, Coulson AR (May 1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J. Mol. Biol.* 94 (3): 441–8.

141. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (December 1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74** (12): 5463–7.
142. Gouy, M. Guindon, S. & Gascuel., O. (2010) SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224
143. Larkin M.A. et al. (2007) "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* 23(21) 2947-2948.
144. Zheng Y, Zhao L, Gao J, Fei Z. (2011) iAssembler: a package for de novo assembly of Roche-454/Sanger transcriptome sequences. *BMC Bioinformatics* 12:453 (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/tool/iAssembler/>).