

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

**Κλωνοποίηση του γονιδιακού τόπου των
α-εστερασών στη Μεσογειακή μύγα,
Ceratitis capitata (Wiedemann)**



Διπλωματική Εργασία
Ευσταθίου Γιώργος

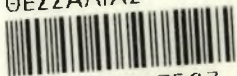
Λάρισα 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5196/1
Ημερ. Εισ.: 24-02-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΕΥΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087597

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή:

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αυγουστίνος Αντώνιος, Διδάσκων ΠΔ407, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1. ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΜΥΓΑ CERATITIS CAPITATA	5
1.1.1 Μορφολογία	7
1.1.2 Κύκλος ζωής της <i>Ceratitis capitata</i>	8
1.1.3 Επιπτώσεις της προσβολής από <i>Ceratitis capitata</i>	10
1.1.4 Μέθοδοι καταπολέμησης	11
1.2 ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	12
1.2.1 Τρόπος δράσης εντομοκτόνων	12
1.2.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	13
1.2.3 Γονίδια που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα	14
1.3 ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ	17
1.3.1 Μηχανισμός Δράσης Εστερασών	17
1.3.2 Ακετυλοχολινεστεράση και ανθεκτικότητα	17
1.3.3 Άλλες εστεράσες	19
1.4 ΣΚΟΠΟΣ	20
2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΜΥΓΑ	22
2.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	24
2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ	26
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ	28
2.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ DNA ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΦΟΡΕΑ	29
2.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	30
2.7 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	31
2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA (MINI PREPS)	33
2.9 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	34
2.10 ΣΗΜΑΝΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ	35
2.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN	36
2.11.1 Μεταφορά του DNA από gel αγαρόζης σε νάιλον μεμβράνη	37
2.11.2 Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή	38
2.11.3 Ανίχνευση σήματος	38
2.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA (SEQUENCING)	39
2.13 ΦΑΓΙΚΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ	40
2.14 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MRA	40
2.15 ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ MRA ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΦΑΓΟΥΣ	41
2.16 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΦΑΓΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ ΣΕ ΝΑΙΛΟΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ	42
2.17 SECONDARY SCREENING	43
2.18 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΓΙΚΟΥ DNA (PHAGE PREPS)	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	47
1.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ CLUSTER ΜΕ PCR	47
1.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	48
1.4 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΦΑΓΙΚΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ	50
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

1. Εισαγωγή

1.1. Μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*

Η Μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* (Wiedemann) είναι ένα από τα πιο καταστροφικά έντομα παγκοσμίως. Εξαιτίας της ευρείας κατανομής της, της ικανότητάς της να αντέχει σε ψυχρό κλίμα καλύτερα από τις περισσότερες άλλες μύγες των φρούτων και εξαιτίας του μεγάλου εύρους ξενιστών που προσβάλλει, κατατάσσεται πρώτη ανάμεσα στα είδη μυγών των φρούτων με μεγάλη οικονομική σημασία. Το έντομο αυτό προσβάλλει περισσότερα από 260 είδη φρούτων, λαχανικών, λουλουδιών και καρυδιών. Ο ξενιστής που προτιμά ποικίλλει σε διάφορες περιοχές, γενικά όμως προτιμά φρούτα με λεπτό περίβλημα, ώριμα και ζουμερά. Κατα κύριο λόγο προσβάλλει τα εσπεριδοειδή, κυρίως ροδάκινα, μήλα, λεμόνια, βερίκοκα, πορτοκάλια και φράουλες. Στους ξενιστές συμπεριλαμβάνονται το αβοκάντο, η μπανανιά, το καφεόδεντρο, το μάγκο, η πιπεριά και ο δίοσπυρος. Κάποιοι ξενιστές έχουν καταγραφεί ως ξενιστές της Μεσογειακής μύγας μόνο κάτω από εργαστηριακές συνθήκες και μπορεί να μην αποτελούν ξενιστές στον αγρό¹.



Εικόνα 1. *Ceratitis capitata*

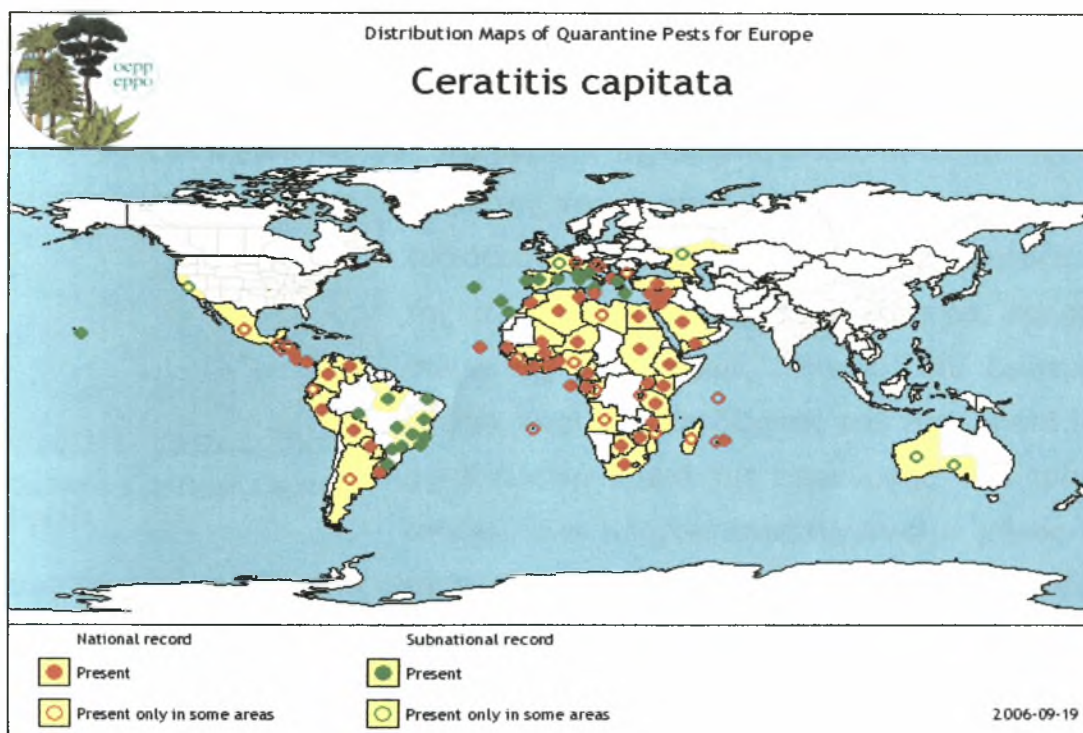
Ταξινομικά, ανήκει στην οικογένεια Tephritidae (μύγες των φρούτων)². Η οικογένεια αυτή αποτελείται από περίπου 5000 είδη μυγών των φρούτων εκ

Φύλο	Αρθρόποδα
Υπερκλάση	Εξάποδα
Κλάση	Έντομα
Υποκλάση	Pterygota
Τάξη	Δίπτερα
No Taxon	Acalyptatae
Υπεροικογένεια	Tephritoidea
Οικογένεια	Tephritidae
Suborder	Brachycera
Γένος	<i>Ceratitis</i>
Είδος	<i>capitata</i>

των οποίων τα 70 θεωρούνται σε σημαντικό βαθμό επιβλαβή για τις καλλιέργειες, όπως η φρουτόμυγα της Νότιας Αμερικής (*Anastrepha fraterculus*), ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*), το *Rhagoletis cingulata* (Loew) ή μύγα των κερασιών και η μύγα των μήλων (*Rhagoletis pomonella*). Από την άλλη, στην

οικογένεια ανήκουν και μύγες που είναι ωφέλιμες για τις καλλιέργειες, όπως είδη του γένους *Urophora*, τα οποία δρουν ενάντια σε ζιζάνια.

Η προέλευση της κερατίτιδας φαίνεται να είναι η Αφρική (υπο-Σαχάρα). Εγκαταστάθηκε στην περιοχή της Μεσογείου περίπου 200 χρόνια πριν. Η κατανομή της είναι ευρύτατη παγκοσμίως, συναντάται σε πολλές χώρες της Ευρώπης και της Αφρικής, σε Μεσογειακές χώρες της Ασίας (Ισραήλ, Ιορδανία, Λίβανος, Τουρκία), ακόμη και στην Αυστραλία. Μέσα στα τελευταία 100 χρόνια, εισήχθηκε σε πολλές χώρες της νότιας και κεντρικής Αμερικής (Αργεντινή, Βραζιλία, Χαβάη κ.α.). Πρόσφατα έχει εντοπιστεί στη Φλόριντα και στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ, όπου εφαρμόστηκαν μαζικές και εντατικές διαδικασίες ανίχνευσης και καταπολέμησης του εντόμου, ώστε να μην εγκατασταθεί¹.

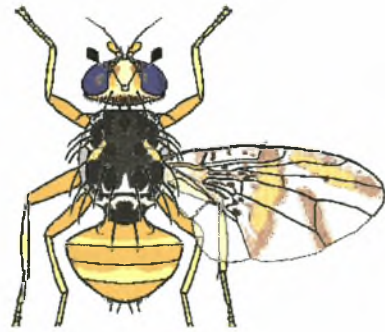


Εικόνα 2. Παγκόσμια κατανομή της Μεσογειακής μύγας, European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)

Πέρα από την οικονομική της σημασία, η Μεσογειακή μύγα χρησιμοποιείται ευρέως για μελέτες βασικής βιολογίας, γενετικής και μοριακής βιολογίας. Επίσης, η μελέτη της κατανομής της βοηθά στη δημογραφική έρευνα.

1.1.1 Μορφολογία

Η ενήλικη μεσογειακή μύγα έχει μήκος 4 με 5mm (περίπου τα 2/3 του μήκους της κοινής οικιακής μύγας). Γενικά, το χρώμα του σώματος είναι κιτρινωπό με ελαφρείς καφέ χρωματισμούς, ειδικά στην κοιλιά, στα πόδια και σε κομμάτια των φτερών. Η κοιλιά έχει οβάλ σχήμα, στο πάνω μέρος της καλύπτεται από διάσπαρτες τρίχες και έχει δύο στενά κομμάτια με ανοιχτό χρώμα, τοποθετημένα εγκάρσια στο κάτω μέρος της. Το θυληκό άτομο μπορεί να διακριθεί από τον μακρύ ωαποθέτη στην άκρη της κοιλιάς.



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση αρσενικού ατόμου *Ceratitidis capitata*

Η προνύμφη συνήθως είναι επιμήκης, με κιτρινωπό άσπρο χρώμα, κυλινδρική σε σχήμα κάμπιας. Το μέγεθός της εξαρτάται από τη δίαιτά της. Η



Εικόνα 4. Προνύμφη *Ceratitidis capitata*

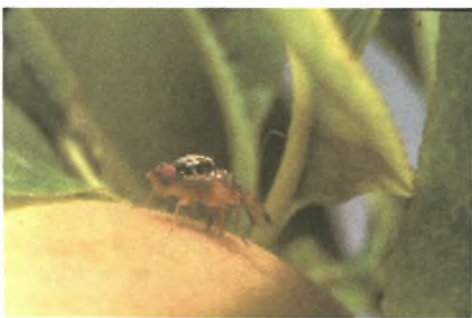
φάση της προνύμφης (λάρβα) αποτελείται από 3 ενδιάμεσα στάδια. Το μήκος του πρώτου σταδίου της προνύμφης είναι 1mm ή λιγότερο, και το σώμα της είναι κυρίως διάφανο. Στο δεύτερο στάδιο, είναι μερικώς διάφανο ενώ είναι ορατό το φρούτο στην κοιλιά της προνύμφης. Στο τρίτο στάδιο, είναι πλήρως αναπτυγμένη με μήκος 6 έως 8mm και το σώμα της είναι πλήρως αδιάφανο και άσπρο ή έχει το χρώμα της τροφής της.

Το βομβύκιο (πούττα) είναι κυλινδρικό, περίπου 3mm σε μήκος, και έχει σκούρο κοκκινωπό καφέ χρώμα. Το αυγό είναι πολύ λεπτό και λείο, έχει διάμετρο 1mm και χρώμα λαμπερό άσπρο^{1,3,4}.

1.1.2 Κύκλος ζωής της *Ceratitis capitata*

Ο κύκλος ζωής της Μεσογειακής μύγας κάτω από ιδανικές συνθήκες (κατάλληλο φρούτο, μέση θερμοκρασία 25-30 °C) μπορεί να διαρκέσει από 15 έως 30 ημέρες. Η διάρκεια αυτή μπορεί να αυξηθεί σημαντικά αν μειωθεί η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, ή ανάλογα με τα φρούτα που είναι διαθέσιμα. Είναι πολυκυκλικό έντομο, μπορεί δηλαδή σε θερμό κλίμα και αν υπάρχουν διαθέσιμοι καρποί, να πραγματοποιήσει περισσότερους από έναν κύκλους ζωής. Χαρακτηριστικά, στη νότια Ιταλία το έντομο ξεκινά την ανάπτυξή του προσβάλλοντας ροδάκινα και βερίκοκα τον Ιούνιο και συνεχίζει μέχρι το χειμώνα προσβάλλοντας εσπεριδοειδή, πραγματοποιώντας συνολικά 6-7 κύκλους ζωής σε ένα χρόνο. Το γεγονός ότι η μεσογειακή μύγα έχει την ικανότητα να προσβάλλει μια μεγάλη γκάμα φρούτων, της δίνει το πλεονέκτημα να μπορεί να επιλέγει ανάμεσα στα διαθέσιμα φρούτα, και να εγκαθίσταται γρήγορα, πραγματοποιώντας πολλούς κύκλους ζωής σε ένα χρόνο. Αντιθέτως, ένας πληθυσμός μονοφάγου εντόμου, θα αφανιζόταν αν για 2-3 συνεχόμενα χρόνια δεν υπήρχε παραγωγή του συγκεκριμένου είδους φρούτου που προσβάλλει.

Ο κύκλος ζωής του εντόμου ξεκινά όταν τα θηλυκά άτομα δημιουργούν με τον ωαποθέτη τους μια τρύπα στην επιδερμίδα του φρούτου σε σημείο όπου υπήρχε ήδη κάποια ρωγμή, και εναποθέτουν ένα έως δέκα αυγά σε μια

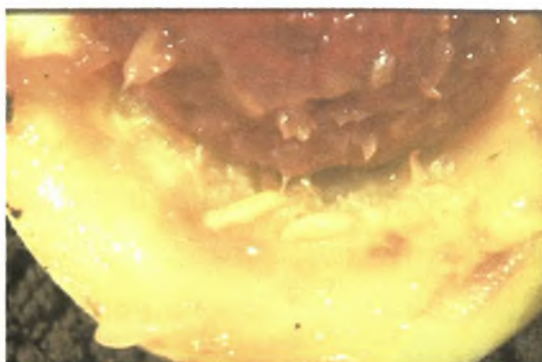


Εικόνα 5. Θηλυκό άτομο εναποθέτει αυγά σε ροδάκινο

κοιλότητα 1mm βαθιά. Αρκετά θηλυκά μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ίδια τρύπα για να εναποθέσουν τα αυγά τους, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται 75 ή και περισσότερα αυγά στο ίδιο σημείο. Συνήθως προτιμώνται φρούτα που μόλις έχουν αρχίσει να ωριμάζουν. Τα πολύ ώριμα φρούτα είναι πιο ζουμερά και

συνήθως προκαλούν μεγάλη θνησιμότητα των αυγών και των νεαρών προνύμφων. Κάτω από συνθήκες μέσης θερμοκρασίας γύρω στους 25 °C, τα αυγά εκκολάπτονται μέσα σε 1,5 έως 3 ημέρες.

Από τα αυγά προκύπτει η προνύμφη (λάρβα) η οποία ξεκινά και τρώει το φρούτο. Αρχικά, οι προνύμφες βρίσκονται στο σημείο όπου εναποτέθηκαν, ενώ καθώς μεγαλώνουν δημιουργούν τούνελ σε όλο τον καρπό, καταστρέφοντάς τον. Η ζωή στη μορφή της προνύμφης διαρκεί 6 έως 10 ημέρες ή και περισσότερο, ανάλογα με τη θερμοκρασία, το είδος και την κατάσταση του φρούτου. Οι προνύμφες αφού μεγαλώσουν, εγκαταλείπουν μαζικά το κατεστραμμένο πλέον φρούτο, κυρίως τις πρώτες ώρες της ημέρας, και πέφτουν στο έδαφος, όπου μετατρέπονται σε βομβύκια (πούπα).



Τα βομβύκια είναι ανθεκτικά, και διατηρούν το έντομο όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος δεν είναι ευνοϊκές, όπως σε συνθήκες έλλειψης τροφής, νερού καθώς και σε ακραίες θερμοκρασίες. Υπο ευνοϊκές συνθήκες, το στάδιο του βομβυκίου διαρκεί 6 έως 13 ημέρες, ενώ η διάρκειά αυτή αυξάνεται σημαντικά με μικρή πτώση της θερμοκρασίας.



Εικόνα 7. Βομβύκια στο έδαφος

Από το βομβύκιο γεννάται το ενήλικο έντομο, το οποίο τρέφεται με χυμούς φρούτων ή με το μελίτωμα φυτών. Στη μορφή αυτή το έντομο ζει συνήθως μέχρι δύο μήνες, ενώ μπορεί να επιβιώσει μέχρι και 6 μήνες. Αν δεν βρει τροφή, πεθαίνει μέσα σε 4 ημέρες. Το ενήλικο άτομο μπορεί να πετά μικρές αποστάσεις, ενώ οι άνεμοι μπορεί να το παρασύρουν 1-2 km ή και περισσότερο. Όταν η ημερήσια μέση θερμοκρασία



Εικόνα 8. Έξοδος του ενήλικου ατόμου από το βομβύκιο

είναι γύρω στους 25 °C τα αρσενικά άτομα ωριμάζουν σεξουαλικά μέσα σε 4 ημέρες και τα θηλυκά σε 6-8 ημέρες. Μετά τη γονιμοποίηση, το θηλυκό άτομο εναποθέτει μέχρι 22 αυγά την ημέρα και έως 800 αυγά κατά τη διάρκεια της ζωής της (συνήθως περίπου 300)^{1,3,4}.



Εικόνα 9. Ενήλικο άτομο

1.1.3 Επιπτώσεις της προσβολής από *Ceratitis capitata*

Η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*, προκαλεί όπως προαναφέρθηκε σημαντικές απώλειες στις καλλιέργειες. Η ζημιά που προκαλείται οφείλεται

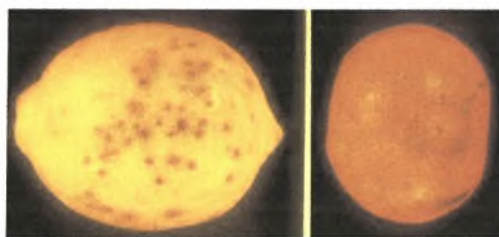


Εικόνα 10. Καταστροφή του ροδάκινου λόγω δράσης της Μεσογειακής μύγας

κατά κύριο λόγο στην εναπόθεση των αυγών και στην καταστροφή του φρούτου από τις αναπτυσσόμενες προνύμφες, καθώς αυτές τρέφονται από τον καρπό. Παράλληλα όμως, στα σημεία όπου υπάρχει κάποιο άνοιγμα στο φρούτο, εισβάλλουν μικροοργανισμοί, με αποτέλεσμα το φρούτο να αποσυντίθεται εντελώς.

Ωριμα φρούτα τα οποία έχουν προσβληθεί μπορεί να έχουν μουλιασμένη εμφάνιση, ενώ τα ανώριμα φρούτα παραμορφώνονται και συνήθως πέφτουν. Τελικώς, τα συλλεγόμενα φρούτα έχουν άσχημη εξωτερική εμφάνιση και δεν μπορούν να πουληθούν στο εμπόριο, ενώ συνήθως δεν είναι βρώσιμα.

Σε επίπεδο αγροτικής οικονομίας μιας χώρας, η ζημιά που προκαλείται από τη Μεσογειακή μύγα είναι τεράστια. Ενδεικτικά, έχει υπολογιστεί ότι η εξάπλωση της Μεσογειακής μύγας στην Καλιφόρνια της Αμερικής μπορεί να προκαλέσει απώλειες πάνω από ένα δισεκατομμύριο δολάρια το χρόνο. Για την αποφυγή ενός τέτοιου σεναρίου, σε ορισμένες πολιτείες της Αμερικής



Εικόνα 11. Λεμόνι και μανταρίνι που έχουν προσβληθεί από Μεσογειακή μύγα

(Καλιφόρνια, Φλόριντα), εφαρμόζονται αυστηρά προληπτικά μέτρα που αφορούν στην αποφυγή εισβολής κάποιου πληθυσμού του εντόμου μέσω του εμπορίου. Επίσης, εφαρμόζονται τεχνικές ανίχνευσης του εντόμου στον αγρό, ενώ σε περιπτώσεις εισβολής του εντόμου σε κάποια περιοχή, χρησιμοποιούνται εντατικές μέθοδοι καταπολέμησής του. Μόνο στην Καλιφόρνια τα τελευταία χρόνια έχουν δωθεί πάνω από 350 εκατομμύρια δολάρια για την αποφυγή εξάπλωσης της Μεσογειακής μύγας^{5,6}.

1.1.4 Μέθοδοι καταπολέμησης

Είναι προφανής η οικονομική καταστροφή που προκαλεί η Μεσογειακή μύγα, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικών μεθόδων καταπολέμησής της. Οι μέθοδοι αυτές μπορεί να είναι φυσικές, βιολογικές ή χημικές.

Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνονται η χρήση παγίδων με ελκυστικά, η προληπτική απόρριψη των μη-εμπορεύσιμων φρούτων, ο εγκλεισμός των φρούτων σε σακούλες και η συχνή συγκομιδή τους. Η χρήση παγίδων δεν προτείνεται για έλεγχο, αλλά για ανίχνευση του εντόμου. Στο εσωτερικό των παγίδων τοποθετείται είτε φερομόνη είτε κάποια πηγή τροφής και μπορεί να συνδυάζεται με κάποιο χημικό



Εικόνα 12. Παγίδα

εντομοκτόνο. Η απόρριψη των μολυσμένων φρούτων (καθώς και όλων των μη εμπορεύσιμων φρούτων προληπτικά) γίνεται με ταφή, βύθιση σε νερό, πάγωμα, μαγείρεμα ή λιώσιμο του φρούτου. Ο εγκλεισμός των φρούτων σε σακούλες είναι αρκετά αποτελεσματική μέθοδος αφού αποτρέπει την εναπόθεση των αυγών. Τέλος, η συγκομιδή των φρούτων εβδομαδιαίως μπορεί να μειώσει τον πληθυσμό του εντόμου αφού η ποσότητα των ώριμων φρούτων (στα οποία αναπτύσσονται οι προνύμφες) διατηρείται στο ελάχιστο.

Οι βιολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την Sterile Insect Technique (SIT). Στόχος της SIT είναι η απελευθέρωση στον αγρό μεγάλου αριθμού στείρων αρσενικών ώστε να ζευγαρώσουν με όλα τα άγρια θηλυκά άτομα και να παραχθούν άγονα αυγά. Πρόκειται για πολύ αποτελεσματική μέθοδο ελέγχου του εντόμου και χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια προληπτικά στην Καλιφόρνια και στη Φλόριντα. Άλλη μέθοδος βιολογικής καταπολέμησης είναι η απελευθέρωση φυσικών εχθρών της Μεσογειακής μύγας. Πρόκειται για παράσιτα που αφήνουν τα αυγά τους πάνω στα αυγά ή στις προνύμφες της Μεσογειακής μύγας και αναδύονται στο στάδιο του βομβυκίου καταστρέφοντάς το (*Opius longicaudatus var malaiaensis* Fullaway, *O. Vadenboschi* Fullaway και *O. Oophilus* Fullaway). Στη Χαβάη, έχει γίνει

αποτελεσματικός έλεγχος της Μεσογειακής μύγας με απελευθέρωση των σφηκών *Opius humilis* και *Diachasma tryoni*⁷.

Πιο ευρέως διαδεδομένες είναι οι χημικές μέθοδοι, λόγω της αποτελεσματικότητάς τους και της εύκολης εφαρμογής τους. Περιλαμβάνουν τη χρήση εντομοκτόνων ουσιών είτε σε συνδυασμό με κάποιο ελκυστικό (όπως το Nu-Lure) ή με απλό ψεκάσμο. Τα εντομοκτόνα αυτά συνήθως δρούν στο νευρικό σύστημα του εντόμου (Οργανοφωσφορικά, Καρβαμιδικά, Πυρεθροειδή, DDT, κυκλοδιένια, νεονικοτινοειδή), θανατώνοντάς το.



Εικόνα 13. Παγίδα με εντομοκτόνο που ελκύει τα έντομα

Παραδείγματα εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται συνήθως για την αντιμετώπιση της *Ceratitis capitata* αλλά και άλλων εντόμων είναι τα Spinosad, Malathion, thiamethoxam, imidacloprid, abamectin, emamectin, milbemectin, cyromazine, fipronil, indoxacarb^{1,3,4}.

1.2 Εντομοκτόνα και εμφάνιση ανθεκτικότητας

1.2.1 Τρόπος δράσης εντομοκτόνων

Στόχος δράσης των εντομοκτόνων είναι η νευρική σύναψη. Συγκεκριμένα, έχουν ως στόχο την ακετυλοχολινεστεράση, τον υποδοχέα ακετυλοχολίνης, τασεοεξαρτώμενα κανάλια νατρίου και τον υποδοχέα GABA του μετασυναπτικού νευρώνα.

Τα οργανοφωσφορικά (OPs) και καρβαμιδικά (CB) εντομοκτόνα δρούν στην ακετυλοχολινεστεράση. Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένζυμο που βρίσκεται στην νευρική σύναψη και φυσιολογικά υδρολύει την ακετυλοχολίνη που απελευθερώνεται από το προσυναπτικό κύτταρο, ώστε να σταματήσει η διέγερση του υποδοχέα ακετυλοχολίνης. Κατά συνέπεια η ακετυλοχολίνη αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα της, το κανάλι ιόντων του υποδοχέα κλείνει και σταματά η διέγερση της μετασυναπτικής μεμβράνης. Τα συγκεκριμένα

εντομοκτόνα προσδένονται μη-αντιστρεπτά στην ακετυλοχολινεστεράση και μ' αυτό τον τρόπο προκαλούν την συνεχή διέγερση των νευρικών κυττάρων και το θάνατο του εντόμου⁸.

Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα και το DDT δρουν στα τασεο-ελεγχόμενα κανάλια νατρίου του μετασυναπτικού κυττάρου. Οι δίαυλοι αυτοί φυσιολογικά ενεργοποιούνται από αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης που έχουν ως αποτέλεσμα να ανοίγει ο δίαυλος και να μετακινούνται ιόντα νατρίου στο μετασυναπτικό κύτταρο μεταβιβάζοντας το μήνυμα της νευρικής διέγερσης. Τα πυρεθροειδή και το DDT προσδένονται στο δίαυλο και επηρεάζουν το άνοιγμα και κλείσιμό του με αποτέλεσμα το θάνατο του εντόμου από παράλυση^{13,14,15}.

Τα κυκλοδιένια δρουν στον υποδοχέα GABA. Πρόκειται για προσδετο-ελεγχόμενο δίαυλο ιόντων που ενεργοποιείται από το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) ή από την ακετυλοχολίνη. Ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί άνοιγμα του διαύλου ιόντων με αποτέλεσμα να διέρχονται ιόντα χλωρίου, οπότε αναστέλλεται η μεταγωγή του δυναμικού και σταματά η διέγερση της μετασυναπτικής μεμβράνης¹⁴.

Τα νεονικοτινοειδή είναι μια νέα ομάδα εντομοκτόνων τα οποία προσομοιάζουν την ακετυλοχολίνη και προσδένονται στον υποδοχέα της ή στη θέση πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης στον υποδοχέα GABA επηρεάζοντας την νευρική διέγερση και προκαλώντας το θάνατο του εντόμου^{16,17}.

1.2.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Η χρήση εντομοκτόνων αναμφισβήτητα έλυσε πολλά προβλήματα όσον αφορά στην αντιμετώπιση εντόμων που προκαλούν καταστροφές στις καλλιέργειες. Εκτεταμένη χρήση των εντομοκτόνων όμως προκάλεσε την επιλογή ατόμων του πληθυσμού που ήταν ανθεκτικά στα συγκεκριμένα εντομοκτόνα. Η ανθεκτικότητα των ατόμων αυτών οφείλεται σε μεταλλάξεις που συνέβησαν σε συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία προσέδιδαν την ικανότητα ανοχής των ατόμων στα εντομοκτόνα. Οι μεταλλάξεις αυτές όμως δεν

επάγονται από την έκθεσή τους στο εντομοκτόνο. Τα άτομα που φέρουν εκ των πρωτέρων αυτά τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα επιβιώνουν, οδηγώντας έτσι στην επιλογή των συγκεκριμένων αλληλομόρφων σε επίπεδο πληθυσμού.

Έχουν παρατηρηθεί τρεις κύριοι μηχανισμοί που μπορούν να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα έπειτα από κάποια μετάλλαξη. Ο πρώτος αφορά στη μετάλλαξη ενός γονιδίου που προκαλεί κάποια δομική αλλαγή στο προϊόν του γονιδίου προσδίδοντας ανθεκτικότητα. Στην περίπτωση που η δομική αλλαγή βρίσκεται στην θέση πρόσδεσης του εντομοκτόνου, το εντομοκτόνο δεν μπορεί να δράσει με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας. Δομική αλλαγή μπορεί να συμβεί και σε κάποιο ένζυμο ώστε αυτό να μπορεί να χρησιμοποιήσει το εντομοκτόνο ως υπόστρωμα με αποτέλεσμα το εντομοκτόνο να μεταβολίζεται πριν προλάβει να δράσει.

Ο δεύτερος μηχανισμός έχει να κάνει με αύξηση του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου. Έχει παρατηρηθεί σε γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά για την παραγωγή μεταβολικών ενζύμων τα οποία διασπούν ξενοβιοτικές ουσίες, οι οποίες θα μπορούσαν να βλάψουν το έντομο. Με την αύξηση των αντιγράφων των γονιδίων παράγονται μεγάλες ποσότητες ενζύμου, με αποτέλεσμα να διασπάται όλη η ποσότητα του εντομοκτόνου, προσδίδοντας μ' αυτό τον τρόπο ανθεκτικότητα στο έντομο.

Ο τρίτος μηχανισμός ανθεκτικότητας που έχει παρατηρηθεί έχει να κάνει και αυτός με την αύξηση της ποσότητας κάποιου μεταβολικού ενζύμου, αυτή τη φορά όμως οφείλεται σε μετάλλαξη στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο. Στην περίπτωση των προ-εντομοκτόνων, τα οποία πρέπει να μεταβολιστούν για να δράσουν, ανθεκτικότητα μπορεί να εμφανιστεί με μετάλλαξη που μειώνει την ποσότητα του μεταβολικού ενζύμου που μεταβολίζει το προ-εντομοκτόνο.

1.2.3 Γονίδια που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα

Πρόκειται για γονίδια που υπάρχουν ενδογενώς για την παραγωγή πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταφορά νευρικών σημάτων, για την

παραγωγή ενζύμων αποτοξίνωσης ξενοβιοτικών ουσιών καθώς και ενζύμων που διασπούν ενδογενείς μεταβολικές ουσίες. Τα μετάγραφα αυτών των γονιδίων είναι οι κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες (P450), οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs), διάλυτοι Na^+ και υποδοχείς-κανάλια ιόντων της νευρικής σύναψης, καθώς και οι εστεράσες¹⁴.

1.2.3.1 Κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες (P450)

Οι κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες είναι ένζυμα που παράγονται από τα γονίδια Cyp τα οποία αποτελούν μια υπεροικογένεια γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό διαφόρων ουσιών. Είναι τα σημαντικότερα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού ξενοβιοτικών ουσιών, καταλύοντας ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων^{18,19}.

Από μελέτες που έχουν γίνει σε δίπτερα, φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα που προκύπτει από τις κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες οφείλεται κυρίως σε αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων cyp. Έτσι μπορεί το εντομοκτόνο να μεταβολίζεται πολύ γρήγορα λόγω αυξημένης ποσότητας κάποιου ενζύμου, όπως στην περίπτωση της *Drosophila melanogaster* η οποία παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, στα καρβαμιδικά και στο DDT λόγω υπερπαραγωγής του ενζύμου CYP6A1²⁰.

1.2.3.2 S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)

Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα κύτταρα από τοξικές ουσίες με την ένωσή τους με τη γλουταθειόνη. Τα σύμπλοκα γλουταθειόνης είναι λιγότερο τοξικά και έχουν γενικά μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό σε σχέση με τις ελεύθερες ουσίες, γεγονός που διευκολύνει την απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό. Κύρια λειτουργία των GSTs είναι η αποτοξίνωση του οργανισμού τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς ουσίες. Αυτό συμβαίνει είτε άμεσα είτε καταλύοντας το δευτερογενή μεταβολισμό ουσιών που ήδη έχουν οξειδωθεί από το P450²¹.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε ορισμένα εντομοκτόνα έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα των GSTs. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου συνήθως οφείλεται σε αύξηση της ποσότητάς του, που είναι αποτέλεσμα είτε γονιδιακής ενίσχυσης είτε, πιο συχνά, αυξημένου μεταγραφικού ρυθμού. Για παράδειγμα στη *Musca domestica* η εμφάνιση

ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά έχει συσχετιστεί με αυξημένη δράση κάποιας GST²².

1.2.3.3 Δίαυλοι Na⁺

Οι διάυλοι Na⁺ που συμμετέχουν στην εμφάνιση ανθεκτικότητας είναι τα σεοελεγχόμενοι διάυλοι, το άνοιγμα ή κλείσιμό τους επηρεάζεται δηλαδή από αλλαγές στο δυναμικό.

Μελέτες που έχουν γίνει σε διάφορα έντομα δείχνουν ότι η ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή και στο DDT μπορεί να οφείλεται σε δομικές αλλαγές λόγω σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί το διάυλο Na⁺. Η δομική αλλαγή που προκύπτει δεν επιτρέπει την πρόσδεση του εντομοκτόνου, είναι τέτοια όμως που επιτρέπει τη σωστή λειτουργία του διαύλου. Έτσι, ο διάυλος λειτουργεί κανονικά παρόλο που υπάρχει το εντομοκτόνο και έτσι το έντομο είναι ανθεκτικό^{13,14,15}.

1.2.3.4 Υποδοχείς – κανάλια ιόντων

Υποδοχείς – κανάλια ιόντων της νευρικής σύναψης που μπορεί να είναι η αιτία εμφάνισης ανθεκτικότητας είναι οι υποδοχείς GABA και ακετυλοχολίνης. Και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα που προκύπτει οφείλεται σε δομική αλλαγή του υποδοχέα λόγω σημειακής μετάλλαξης του αντίστοιχου γονιδίου.

Συγκεκριμένα στη *Drosophila melanogaster* έχει βρεθεί μια σημειακή μετάλλαξη στη θέση 302 του γονιδίου που κωδικοποιεί τον GABA υποδοχέα. Η μετάλλαξη αυτή συνδέεται με ανθεκτικότητα σε κυκλοδιένια τόσο στη δροσόφιλα όσο και σε άλλα έντομα²³.

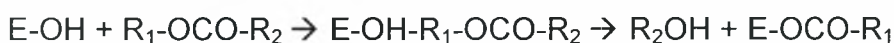
Σημειακές μεταλλάξεις που φαίνεται να προκαλούν ανθεκτικότητα, έχουν βρεθεί και στον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί σημειακή μετάλλαξη στον υποδοχέα ακετυλοχολίνης του *Nilaparvata lugens* (brown planthopper) η οποία επιβεβαιώθηκε ότι προκαλεί ανθεκτικότητα στο imidacloprid (neonicotinoid)¹⁷.

1.3 Εστεράσες

Οι εστεράσες είναι μια μεγάλη κατηγορία ενζύμων που διαφέρουν ως προς την ειδικότητα του υποστρώματος, την δομή και τη λειτουργία τους. Όλες οι εστεράσες όμως έχουν το κοινό χαρακτηριστικό ότι καταλύουν την υδρόλυση εστερικών δεσμών. Γενικά πιστεύεται ότι όλες οι εστεράσες προήλθαν εξελικτικά από μια κοινή εστεράση, αφού μπορεί μεν να διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση, ο μηχανισμός δράσης τους όμως είναι ο ίδιος. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι ο μεταβολισμός ενδογενών και εξωγενών ουσιών που περιέχουν κάποιο εστερικό δεσμό⁷.

1.3.1 Μηχανισμός Δράσης Εστερασών

Στο ενεργό κέντρο των περισσότερων εστερασών υπάρχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο σερίνης. Η -OH ομάδα της σερίνης αντιδρά με την καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος προς σχηματισμό άκυλο-ενζύμου το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται με τη συμμετοχή H₂O. Στο μηχανισμό της αντίδρασης πιστεύεται ότι συμμετέχει κι ένα κατάλοιπο ιστιδίνης καθώς και ένα όξινο κατάλοιπο (Asp ή Glu)⁷.

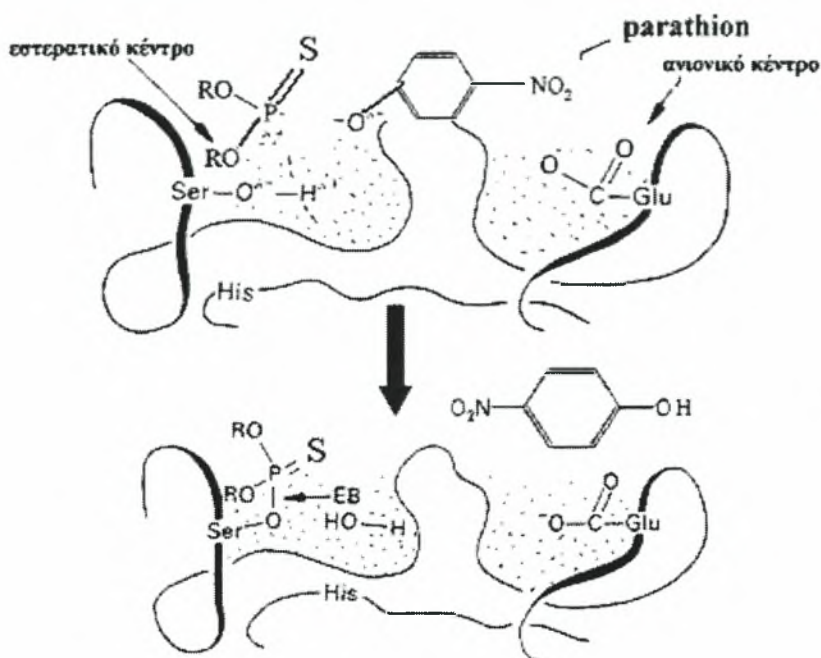


1.3.2 Ακετυλοχολινεστεράση και ανθεκτικότητα

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι μια από τις σημαντικότερες εστεράσες, αφού συναντάται στις νευρικές συνάψεις όπου διασπά τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, τερματίζοντας έτσι τη διέγερση των μετασυναπτικού κυττάρου^{8,9}.

Το ένζυμο αυτό αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, στόχο δράσης των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Το εντομοκτόνο

χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από την ακετυλοχολινεστεράση και διασπάται, οπότε το ένζυμο φωσφορυλιώνεται ή καρβαμιδιώνεται. Πρόκειται για μη αντιστρεπτές αντιδράσεις με αποτέλεσμα το ένζυμο να μην μπορεί πλέον να διασπάσει την ακετυλοχολίνη και το έντομο να πεθαίνει από τη συνεχή νευρική διέγερση^{10,11,12}.



Εικόνα 14. Μη αντιστρεπτή φωσφορυλίωση του ενεργού κέντρου της ακετυλοχολινεστεράσης

Αυξημένη χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων οδήγησαν στην επιλογή εντόμων που φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης, οι οποίες προσδίδουν κάποιο βαθμό ανθεκτικότητας στο έντομο χωρίς να επηρεάζουν την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Στη *Drosophila melanogaster* για παράδειγμα έχουν βρεθεί αρκετές μεταλλάξεις στο γονίδιο ace (που κωδικοποιεί την ακετυλοχολινεστεράση) και συνδέονται με ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή (Phe115Ser, Ileu199Val, Ileu199Thr, Gly303Ala, Phe368Tyr). Επίσης έχουν βρεθεί αντίστοιχες μεταλλάξεις σε ανθεκτικά άτομα *Bactrocera oleae* (Ileu214Val, Gly488Ser) καθώς και σε ανθεκτικά *Musca domestica* (Gly262Val, Phe327Tyr)^{10,11,12}.

1.3.3 Άλλες εστεράσες

Ανάλογα με το υπόστρωμά τους οι εστεράσες διαχωρίζονται σε κατηγορίες όπως καρβοξυλεστεράσες, χολινεστεράσες, ακετυλεστεράσες, λιπάσες κλπ²⁵. Μεγάλος αριθμός ενζύμων έχει ταυτοποιηθεί στη *Drosophila melanogaster* καθώς και σε άλλα είδη εντόμων και έχει μελετηθεί η σχέση που έχουν αυτές οι εστεράσες με την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα^{26,27,28,29}. Γενικά φαίνεται ότι οι εστεράσες προκαλούν ανθεκτικότητα κυρίως μέσω ενίσχυσης του γονιδίου που τις κωδικοποιεί, το οποίο μπορεί να υπάρχει σε 250 ή και περισσότερα αντίγραφα, αυξάνοντας την ποσότητα της παραγόμενης εστεράσης έως και 500 φορές²⁴. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το γονίδιο της καρβοξυλεστεράσης E4 των ανθεκτικών αφίδων *Myzus Persicae*²⁷.

Ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η ανθεκτικότητα οφείλεται σε δομική αλλαγή που μεταβάλλει τη δραστηριότητα της εστεράσης. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ali-εστεράση E3 της *Lucilia cuprina*³². Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί τα αυξημένα επίπεδα μιας εστεράσης να οφείλονται σε μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου μέσω μετάλλαξης στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου και όχι σε πολλαπλασιασμό του. Αυτό όμως είναι δύσκολο να μελετηθεί²⁴.

Το διάφορα γονίδια των εστερασών συχνά είναι συγκεντρωμένα σε γονιδιακές συστοιχίες (cluster) όπως το α- και το β- cluster. Αυτές οι γονιδιακές συστοιχίες έχουν προκύψει εξελικτικά από διπλασιασμούς ενός αρχικού κοινού γονιδίου. Τρεις εστεράσες της *Drosophila melanogaster* που διαπιστώθηκε ότι εμπλέκονται σε εμφάνιση ανθεκτικότητας βρέθηκε ότι εκφράζονται από γονίδια που βρίσκονται στη γονιδιακή συστοιχία των α-εστερασών. Το a-esterase cluster αποτελείται από 11 καρβοξυλεστεράσες και χολινεστεράσες σε ένα τμήμα 65kb²⁵. Τα 3 από τα γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας είναι η EST23, η MCE και η ALI. Ανάλογα αυτών των εστερασών ταυτοποιήθηκαν και σε άλλα είδη εντόμων, όπως η εστεράση E3 του *Lucilia cuprina* (ανάλογη της EST23) η οποία στα ανθεκτικά σε οργανοφωσφορικά έντομα έχει διαφορετική λειτουργία (λόγω δομικής μετάλλαξης)³².

Γενικά πιστεύεται ότι ο γονιδιακός αυτός τόπος των α-εστερασών μπορεί να περιέχει κι άλλες εστεράσες που να προσδίδουν κάποιου τύπου ανθεκτικότητα, οπότε η κλωνοποίηση του τόπου αυτού, σε έντομα που θέλουμε να μελετηθούν τα αίτια εμφάνισης ανθεκτικότητας, μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη.

1.4 Σκοπός

Η εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων για την αντιμετώπιση της Μεσογειακής μύγας προκαλεί την επιλογή ατόμων που είναι ανθεκτικά, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες. Η διερεύνηση της ανθεκτικότητας που οφείλεται σε εστεράσες είναι θεμελιώδους σημασίας, αφού από δημοσιευμένες εργασίες, που αφορούν σε άλλα έντομα, είναι φανερό πως οι εστεράσες σε ορισμένες περιπτώσεις παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ανθεκτικότητας. Τρία από αυτά τα γονίδια τουλάχιστο στη *Drosophila melanogaster* βρίσκονται στο cluster των α-εστερασών. Τα γονίδια αυτά, καθώς και ομόλογά τους σε άλλα είδη εντόμων, έχει επιβεβαιωθεί ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην ανθεκτικότητα των εντόμων στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Είναι πιθανό και τα άλλα γονίδια να εμπλέκονται με κάποιο τρόπο στην ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση τμήματος του γονιδιακού τόπου των α-εστερασών από τη Μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*, χρησιμοποιώντας στοιχεία από το συγγενικό έντομο *Musca domestica*.

2. Υλικά – Μέθοδοι

2.1 Απομόνωση DNA από Μεσογειακή μύγα

Εισαγωγή

Η απομόνωση DNA είναι το πρώτο βήμα για την διεξαγωγή πειραμάτων μοριακής βιολογίας. Πρωτίστως θα πρέπει με τη χρήση αλάτων, να ανοίξουν οι μεμβράνες ώστε να μεταφερθεί το DNA στο διάλυμα. Τα πειράματα που θα ακολουθήσουν περιλαμβάνουν PCR και κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος σε βακτηριακό φορέα. Γι' αυτό το σκοπό είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του παρασκευάσματος DNA όχι μόνο από τα διαλύματα αλάτων, αλλά και από πρωτεΐνες. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο λοιπόν περιλαμβάνει εκχύλιση του διαλύματος DNA με φαινόλη πριν την κατακρήμνισή του.

Υλικά

- Ενήλικο άτομο *Ceratitis capitata*
- Διάλυμα ομογενοποίησης (100mM NaCl, 200mM σουκρόζη, 100mM Tris pH 7.4, 50mM EDTA, 0.5% SDS)
- 8M οξικό κάλιο (CH₃COOK)
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- 2.31M οξικό νάτριο (CH₃COONa)
- 95% Αιθανόλη
- Γλυκογόνο
- 70% Αιθανόλη
- Διάλυμα επαναδιάλυσης TE/RNase (10mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 20μg/mL RNase)

Πειραματική Διαδικασία

Το έντομο φυλάσσεται σε σωληνάκι erpendorf στους -20 °C ώστε να μη δρουν οι DNAσες και να παραμένει το DNA κατά το δυνατόν ανέπαφο. Προστίθενται 50μL διαλύματος ομογενοποίησης και γίνεται μηχανική διάσπαση του εξωσκελετού του εντόμου με έμβολο. Ακολουθεί πλύση του εμβόλου με 50μL επιπλέον διάλυμα ομογενοποίησης και γρήγορη

φυγοκέντριση (spin). Στη συνέχεια γίνεται επώαση για 30min σε υδατόλουτρο στους 65 °C. Προστίθενται 14μL οξικού καλίου ενώ το erpendorf είναι ακόμη ζεστό και αναδεύεται ελαφρά. Ακολουθεί επώαση για 30min στον πάγο και φυγοκέντριση στις 13200 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.

Το υπερκείμενο, που περιέχει το DNA, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erpendorf και προστίθενται 300μL απιονισμένο νερό. Θα πρέπει σ' αυτή τη φάση το DNA να καθαριστεί από πρωτεΐνες. Γι' αυτό το σκοπό γίνεται εκχύλιση με φαινόλη. Προστίθεται ίσος όγκος (400μL) διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (200+200μL) και γίνεται απότομη ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 3.5min στις 13200rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου με σκοπό να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της φαινόλης. Γίνεται απότομη ανάδευση και φυγοκέντριση για 3.5min στις 13200rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά το τελευταίο στάδιο (προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, φυγοκέντριση, μεταφορά υπερκείμενου περίπου 300μL).

Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA και επαναδιάλυσή του σε διάλυμα TE/RNase. Για την κατακρήμνιση προστίθενται στο erpendorf 39μL οξικού νατρίου (τελική συγκέντρωση 0.3M), 2.5V αιθανόλης 95% (750μL) και 0.5μL γλυκογόνο. Γίνεται ανάδευση και στη συνέχεια το erpendorf παραμένει στους -20 °C για 30min ή στους -80 °C για 10min, και φυγοκέντριση για 15min στις 13200rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 0.5V (150μL) παγωμένης αιθανόλης 70%. Γίνεται φυγοκέντριση για 5min στις 13200rpm και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Αφού στεγνώσει καλά το ίζημα, εξατμιστεί δηλαδή όλη η αιθανόλη, προστίθενται 50μL διάλυμα επαναδιάλυσης και γίνεται έντονη ανάδευση (vortex) για να διαλυθεί το ίζημα. Τέλος, αποθηκεύουμε το erpendorf στους 4 °C.

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Εισαγωγή

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) περιλαμβάνει την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Ενώ λοιπόν στο έντομο, η αλληλουχία στόχος βρίσκεται σε ένα αντίγραφο, με την PCR προκύπτει *in vitro* μεγάλος αριθμός αντιγράφων τα οποία είναι ορατά σε πήκτωμα αγαρόζης. Έτσι μπορεί να γίνει πέψη με περιοριστικά ένζυμα, να ακολουθήσει ανάλυση κατά Southern ή να απομονωθούν αυτά τα αντίγραφα και να εισαχθούν σε πλασμίδια.

Επιλέγονται κατ' αρχήν δύο τμήματα DNA – εκκινητές (primers) που είναι συμπληρωματικά ως προς συντηρημένες αλληλουχίες εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου, σε διαφορετικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές αυτοί σε κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο από την πολυμεράση ώστε να συντεθούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες της αλληλουχίας στόχου.

Υλικά

DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) πολυμεράσης 10X

Διάλυμα MgCl₂ (25mM)

dNTPs (2.5mM το καθένα)

Εκκινητές

Taq πολυμεράση 5U/μL

ddH₂O

Συσκευή PCR

Πειραματική Διαδικασία

Σε σωληνάκι erppendorf με λεπτά τοιχώματα (ειδικό για PCR), αναμιγνύονται το DNA με όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια, στις κατάλληλες συγκεντρώσεις που μπορεί να διαφέρουν λίγο ανάλογα με το DNA στόχο. Γενικά, χρησιμοποιούνται 10-50ng DNA, το Buffer αραιώνεται στο 1X, τα dNTPs στα 200μM, το MgCl₂ στα 1.5-4mM και προστίθενται 20pmol από κάθε

εκκινητή. Τέλος, προστίθεται η Taq πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το *Thermus aquaticus*, η οποία έχει την ικανότητα να επιμηκύνει την αλυσίδα του DNA με ρυθμό 1500 νουκλεοτίδια / U / min.

Το eppendorf εισάγεται σε μηχανή PCR, η οποία εναλλάσσει τη θερμοκρασία, ώστε να πραγματοποιούνται διαδοχικά κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης και πολυμερισμού. Αρχικά, γίνεται αποδιάταξη (denaturation) του DNA στους 94-95 °C. Το δείγμα ψύχεται στους 40-65 °C (ανάλογα με τη σύσταση των εκκινητών και το βαθμό ομολογίας που έχουν με το DNA στόχο). Στη θερμοκρασία αυτή γίνεται υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών στις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Τέλος, η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 72 °C ώστε να δράσει η DNA πολυμεράση και να σχηματιστεί η συμπληρωματική αλυσίδα ως προς την μητρική.

Ο κύκλος αυτός πραγματοποιείται 30-40 φορές με αποτέλεσμα να παράγονται πολλά αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου. Στους 30 κύκλους, για παράδειγμα, παράγονται 2^{30} δηλαδή περίπου 10^9 αντίγραφα.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος των α-εστερασών χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές

Md1: 5'-TTCGAGGGIATICCITAYGCIMARCCICCBTNGG-3' και

Md2: 5'-ACYTGRTCYTTIARICCGICRTTICIGGNAC-3'

Η αντίδραση έγινε στα 25μL, χρησιμοποιώντας 100ng DNA, 50pmoles από κάθε εκκινητή, 1.5mM MgCl₂, 0.25mM από κάθε dNTP και 1U Taq πολυμεράση. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ήταν στους 40 °C, και ακολούθησε re-PCR με θερμοκρασία υβριδοποίησης 48 °C.

PCR

1 κύκλος	94 °C για 3min	Αρχική αποδιάταξη	
30 κύκλοι	{	94 °C για 1min	Αποδιάταξη
		40 °C για 1min	Υβριδοποίηση
		72 °C για 2min	Πολυμερισμός
1 κύκλος	72 °C για 7min	Τελικός πολυμερισμός	

re-PCR		
1 κύκλος	94 °C για 3min	Αρχική αποδιάταξη
25 κύκλοι		94 °C για 1min
		48 °C για 1min
		72 °C για 2min
1 κύκλος	72 °C για 7min	Τελικός πολυμερισμός

2.3 Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης

Εισαγωγή

Η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης είναι διαδικασία που διαχωρίζει θραύσματα DNA μήκους 100bp – 10kb, ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης, το μέγεθος του gel, το χρόνο και την ταχύτητα ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να κινείται προς τον θετικό πόλο αν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο (αυτό γιατί το DNA έχει αρνητικό φορτίο). Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA έπειτα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, ή για την ποσοτικοποίηση του προϊόντος της PCR και την απομόνωσή του (gel extraction). Για την οπτικοποίηση του DNA, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, καθιστώντας το ορατό σε υπεριώδες φως (UV). Ο φθορισμός είναι ανάλογος της ποσότητας του DNA επιτρέποντας έτσι την άμεση ποσοτικοποίηση του δείγματος.

Υλικά

Αγαρόζη

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 0.5X (Tris, βορικό οξύ, EDTA)

Βρωμιούχο αιθίδιο

DNA

Διάλυμα φόρτωσης με χρωστική

Μάρτυρας (ladder)

Πειραματική Διαδικασία

Για την παρασκευή 100mL gel αγαρόζης 1%, ζυγίζεται 1gr αγαρόζης και τοποθετείται σε κωνική φιάλη. Προστίθενται 100mL TBE 0.5X και το διάλυμα θερμαίνεται ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Κάποια ποσότητα νερού κατά τη θέρμανση εξατμίζεται οπότε πρέπει να μετρηθεί το βάρος πριν και μετά τη θέρμανση ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος νερού που εξατμίστηκε. Αφού πέσει η θερμοκρασία προσθέτουμε 2.5-3 μ L βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και αναδεύουμε.

Το διάλυμα μεταφέρεται στο πιάτο της ηλεκτροφορητικής συσκευής στο οποίο έχουν ήδη τοποθετηθεί τα χτενάκια και έχει στεγανοποιηθεί είτε μέσα στην ηλεκτροφορητική συσκευή χρησιμοποιώντας λαστιχάκια ή με τη χρήση χαρτοταινίας. Αφού κρυώσει και στερεοποιηθεί αφαιρούνται τα χτενάκια και τοποθετείται στη συσκευή ώστε τα «πηγαδάκια» που έχουν δημιουργηθεί να είναι προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο της συσκευής, η οποία θα πρέπει να περιέχει τόσο TBE ώστε να επικαλύπτει το gel.

Για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιείται διάλυμα φόρτωσης, το οποίο περιέχει χρωστική ώστε να ελέγχεται ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης και γλυκερόλη ώστε να μην διαχέεται το DNA κατά τη φόρτωση. 1-2 μ L χρωστικής αρκούν για δείγμα 3-5 μ L.

Δίπλα στα δείγματα φορτώνονται 3 μ L μάρτυρα (Ladder) που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που περιέχουν τα δείγματα. Επίσης ο μάρτυρας βοηθά στην ποσοτικοποίηση των δειγμάτων αφού η κάθε μπάντα του μάρτυρα αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο αριθμό ng (δίνεται από την εταιρία παρασκευής του).

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται συνήθως σταθερή τάση 80-110V η οποία επιλέγεται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που περιέχονται στα δείγματα. Για τμήματα 500bp – 3kb αρκούν περίπου 20 λεπτά στα 100V. Για τον διαχωρισμό ωστόσο τμημάτων 3-20kb χρησιμοποιείται μικρότερη τάση (60V) για μερικές ώρες

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι μπάντες είναι ορατές έπειτα από έκθεση του gel σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, η οποία απορροφάται από το DNA και το βρωμιούχο αιθίδιο και εκπέμπεται στα 590nm. Έτσι το DNA είναι ορατό στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος.

2.4 Απομόνωση DNA από gel αγαρόζης

Εισαγωγή

Για την απομόνωση του PCR προϊόντος ή μιας μπάντας που προκύπτει έπειτα από πέψη, ώστε να κλωνοποιηθεί σε έναν φορέα, είναι απαραίτητη η απομόνωση της μπάντας με κόψιμο του gel και ο καθαρισμός του DNA έπειτα από επαναδιάλυση του gel. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το HiYield Gel/PCR DNA Fragments extraction kit της Real Genomics

Υλικά

Δείγμα (τμήμα του gel)

DF Buffer

Wash Buffer

Elution Buffer

Πειραματική Διαδικασία

Το τμήμα που περιέχει την επιθυμητή μπάντα αποκόπτεται από το gel και εισάγεται σε σωληνάκι erpendorf. Το τμήμα αυτό δεν πρέπει να ξεπερνά τα 300mg. Προστίθενται 500μL DF Buffer και γίνεται επώαση στους 55 °C για 10min ώστε να λιώσει το gel. Το διάλυμα (έως 800μL) μεταφέρεται στην ειδική στήλη, η οποία τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής.

Ακολουθεί φυγοκέντριση για 1min στις 10000 στροφές ανά λεπτό (rpm). Το DNA προσδένεται στη στήλη, οπότε απορρίπτεται το περιεχόμενο του συλλέκτη. Έπειτα προστίθενται 500μL Wash Buffer στη στήλη, φυγοκεντρείται για 1min στις 10000rpm και απορρίπτεται το περιεχόμενο του συλλέκτη. Τέλος, γίνεται άλλη μια φυγοκέντριση στις 13200rpm για 2min.

Η στήλη μεταφέρεται σε νέο erpendorf, προστίθενται 50μL Elution Buffer στο κέντρο της στήλης κι έπειτα από 2 λεπτά φυγοκεντρείται για 2min στις 13200 rpm. Η στήλη απορρίπτεται, ενώ στο erpendorf περιέχεται το δείγμα διαλυμένο στο elution buffer. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση για τον προσδιορισμό της ποσότητας DNA που περιέχεται στο τελικό διάλυμα.

2.5 Αντίδραση σύνδεσης DNA μορίων σε φορέα

Εισαγωγή

Η σύνδεση του PCR προϊόντος, ή γενικότερα ενός τμήματος DNA, με ένα φορέα (π.χ. πλασμίδιο) χρησιμοποιείται ώστε να γίνει στη συνέχεια μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, και με καλλιέργειά τους να μπορούν να παραχθούν μεγάλες ποσότητες του DNA στόχου σε καθαρή μορφή, ώστε να γίνει αλληλούχιση της ακολουθίας του ή να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής.

Για τη σύνδεση των δύο μορίων χρησιμοποιείται φορέας ο οποίος έχει κοπεί με EcoRV και έχει προστεθεί θυμίνη στα 3' άκρα. Επίσης η Taq πολυμεράση στο τέλος προσθέτει αδενίνη. Έτσι τα δύο μόρια έχουν συμπληρωματικά άκρα και συνδέονται με την T4 DNA λιγάση. Η αναλογία του ενθέματος ως προς το φορέα θα πρέπει να είναι από 3:1 έως 8:1. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι:

$$\text{ng ενθέματος} = (\text{ng φορέα} + \text{kb ενθέματος} / \text{kb φορέα}) \times \text{αναλογία ενθέματος} / \text{φορέα}$$

Υλικά

Δείγμα DNA

Φορέας pGEM-Teasy

Διάλυμα σύνδεσης (Buffer 10X)

T4 DNA λιγάση

ddH₂O

Πειραματική Διαδικασία

Πριν την αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται κατακρήμνιση του φορέα με το δείγμα ώστε να έχουμε καλύτερη απόδοση. Στην κατακρήμνιση χρησιμοποιείται όπως προαναφέρθηκε CH₃COONa 2.31M (τελική συγκέντρωση 0.3M), αιθανόλη 95% (2V) και γλυκογόνο και αφήνονται τα δείγματα στους -20 °C για 15min. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13200rpm για 15-20min, προσθήκη 0.5V αιθανόλης 70%, φυγοκέντριση για άλλα 5min στις 13200rpm και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 8μL νερό.

Για την αντίδραση σύνδεσης προστίθεται 1μL Buffer και 1μL λιγάσης και το eppendorf επωάζεται στους 22 °C για 2.5 ώρες.

2.6 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

Εισαγωγή

Για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιούνται βακτηριακά κύτταρα *E. coli* με γενότυπο supE44, ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1. Τα κύτταρα αυτά καθίστανται δεκτικά με την παρακάτω διαδικασία. Η απόδοση των κυττάρων αυτών μπορεί να είναι από 5×10^7 - 1×10^8 μετασχηματισμένες αποικίες ανά μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA.

Υλικά

Stock *E. coli* DH5a

Θρεπτικό υλικό SOB (2% Bactotryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.05% NaCl, 10mL KCl 250mM. Ρύθμιση του pH στο 7, αποστείρωση και προσθήκη 5mL MgCl₂ 2M)

Διάλυμα MgSO₄ 2M

Διάλυμα FSB (10mL CH₃COOK (1M), 8.91gr MnCl₂·4H₂O (45mM), 1.47gr CaCl₂·2H₂O(10mM), 7.46gr KCl (100mM), 0.8gr Co(NH₃)₆Cl₃ (3mM) και 100mL 10% γλυκερόλη. Ρύθμιση του pH στο 6.4 και προσθήκη απιονισμένου νερού (τελικός όγκος 1L))

Διάλυμα DMSO

Πειραματική Διαδικασία

Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 2mL θρεπτικού υλικού SOB και 20mM MgSO₄ εμβολιάζεται μικρή ποσότητα DH5a κυττάρων. Ο σωλήνας επωάζεται για 12-14 ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση (220 στροφές).

Η καλλιέργεια αυτή εισάγεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100mL SOB και 20mM MgSO₄. Γίνεται επώαση για 2 περίπου ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση (220 στροφές) μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600nm να είναι 0.450-0.550. Ως τυφλό στη φωτομέτρηση χρησιμοποιείται διάλυμα SOB.

Η μεγάλη καλλιέργεια (100mL) χωρίζεται σε δύο παγωμένα falcon των 50mL και τα εισάγουμε στον πάγο για 10min. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10min στις 4000rpm (4 °C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το falcon μένει ανεστραμμένο για ένα λεπτό ώστε να στεγνώσει. Το ίζημα στη συνέχεια επαναδιαλύεται με 20mL παγωμένου διαλύματος FSB (διάλυμα μετασχηματισμού) και ψύχεται στον πάγο για 10min. Στη συνέχεια γίνεται και πάλι φυγοκέντριση στις 4000rpm για 10min και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 4mL παγωμένου διαλύματος FSB,

Προστίθενται 140μL DMSO (διμεθυλο-σουλφοξειδίο) το οποίο είναι κρυοπροστατευτικός παράγοντας, αναδεύεται ελαφρώς και επωάζεται στον πάγο για 15min. Έπειτα προστίθενται άλλα 140μL DMSO, γίνεται ήπια ανάδευση και το διάλυμα μοιράζεται σε παγωμένα σωληνάκια erpendorf, τα οποία τέλος διατηρούνται στους -80 °C για μήνες χωρίς να χάνεται η απόδοση μετασχηματισμού των κυττάρων.

Θα πρέπει πριν χρησιμοποιηθούν τα δεκτικά κύτταρα να γίνει μέτρηση της απόδοσης μετασχηματισμού χρησιμοποιώντας ως control κάποιο πλασμίδιο που περιέχει ένθεμα.

2.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

Εισαγωγή

Τα δεκτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή πλασμιδίων με κάποιο ένθεμα ήταν δεκτικά κύτταρα *E. coli* στελέχους DH5a. Αρχικά τα κύτταρα αυτά υφίστανται heat-shock ώστε να εισαχθούν τα πλασμίδια μέσα στα κύτταρα, στη συνέχεια καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό SOC και τέλος επιστρώνονται σε τρυβλία με προσθήκη X-gal και IPTG ώστε να γίνει επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων με πλασμίδιο που περιέχει κάποιο ένθεμα.

Υλικά

Δεκτικά κύτταρα DH5a

Θρεπτικό υλικό SOC (Θρεπτικό υλικό SOB με προσθήκη 20mM γλυκόζης 1M)

Τρυβλία LB-amp (10gr Bactotryptone, 5gr Bacto yeast extract, 15gr Agar, 5gr NaCl, προσθήκη νερού στο 1L και αποστείρωση)

X-gal

IPTG

Θρεπτικό υλικό LB (10gr Bactotryptone, 5gr Bacto yeast extract, 5gr NaCl, προσθήκη νερού στο 1L και αποστείρωση)

Πειραματική Διαδικασία

Τα δεκτικά κύτταρα από τους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν, ώστε να μην ξεπεράσουν τους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Εισάγονται 5μL ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και γίνεται επώαση για 30min στον πάγο και heat shock για 90 δευτερόλεπτα στους $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ και για άλλα 2min στον πάγο.

Στη συνέχεια εισάγεται θρεπτικό υλικό SOC (800μL) και γίνεται επώαση για 1-1.5 ώρα στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ υπό ανάδευση (175 στροφές). Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάθε 20 λεπτά.

Έπειτα επιστρώνονται 2 αραιώσεις των κυττάρων σε τριβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό LB-agar και αμπικιλίνη καθώς και 30μL X-gal και 3μL IPTG. Τέλος επωάζονται στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 16-18 ώρες.

Τα βακτήρια που δεν μετασχηματίστηκαν με την εισαγωγή κάποιου πλασμιδίου πεθαίνουν λόγω της παρουσίας αμπικιλίνης. Βακτήρια που προσέλαβαν πλασμίδιο το οποίο δεν περιέχει ένθεμα, έχουν ενεργό το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία μεταβολίζει το X-gal σε 5bromo-4chloroindigo το οποίο δίνει στις αποικίες μπλε χρώμα. Τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, δεν έχουν ενεργή β-γαλακτοσιδάση οπότε παραμένουν άσπρα.

Οι άσπρες αποικίες λοιπόν, επιλέγονται και καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό LB που περιέχει αμπικιλίνη στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 16-18 ώρες. Αφού μεγαλώσουν τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA ή να αποθηκευτούν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ αφού προστεθεί στο erpendorf γλυκερόλη (στα 800μL βακτηριακής καλλιέργειας προστίθενται 200μL γλυκερόλη).

2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps)

Εισαγωγή

Η παρακάτω διαδικασία περιγράφει τη μέθοδο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια. Χρησιμοποιείται το διάλυμα GET το οποίο διατηρεί ισοτονικό το διάλυμα ώστε να μην σπάνε τα κύτταρα, και διάλυμα alkali το οποίο δημιουργεί τρύπες στις μεμβράνες ώστε να βγει το πλασμιδιακό DNA από τα κύτταρα. Το οξικό κάλιο σταματά τη λύση των κυττάρων ώστε να μείνουν ανέπαφοι οι πυρήνες και να κατακρημνιστούν στην φυγοκέντριση ούτως ώστε στο υπερκείμενο να παραμείνει μόνο το πλασμιδιακό DNA. Για να απομακρυνθούν όλες οι πρωτεΐνες γίνεται εκχύλιση με φαινόλη.

Υλικά

Διάλυμα GET (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris pH 8)

Διάλυμα alkali (0.2N NaOH, 1% SDS)

Διάλυμα οξικού καλίου (CH₃COOK) pH 4.8

Φαινόλη

Χλωροφόρμιο

Διάλυμα οξικού Νατρίου (CH₃COONa) 2.31M

Γλυκογόνο

Αιθανόλη 95% και 70%

Πειραματική Διαδικασία

Μεταφέρονται σε erpendorf 1.5mL από την βακτηριακή καλλιέργεια και γίνεται φυγοκέντριση για 3min στις 3000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με 100μL παγωμένου διαλύματος GET. Γίνεται επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.

Προστίθενται 200μL διαλύματος alkali, γίνεται ήπια ανάδευση και εισάγεται το erpendorf στον πάγο για 10min. Έπειτα προστίθενται 150μL παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου και επώαση στον πάγο για άλλα 10min. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5min στις 13200 rpm, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και γίνεται εκχύλιση με φαινόλη, προσθέτοντας

ίσο όγκο φαινόλης : χλωροφορμίου. Έπειτα από φυγοκέντριση για 5min στις 13200rpm γίνεται απομάκρυνση της φαινόλης εισάγοντας χλωροφόρμιο και φυγοκεντρώντας για 5min στις 13200rpm.

Στη συνέχεια γίνεται κατακρήμνιση με 2V 95% αιθανόλη, οξικό νάτριο (CH_3COONa) 0.3M και 0.5μL γλυκογόνο και φυγοκέντριση για 5min στις 13200rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 0.5V 70% αιθανόλης. Έπειτα από φυγοκέντριση για 5min στις 13200rpm αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση σε 100μL TE-RNase.

2.9 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Εισαγωγή

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που έχουν απομονωθεί από βακτήρια, τα οποία τις χρησιμοποιούν για την αποικοδόμηση ξένου DNA προερχόμενο κυρίως από βακτηριοφάγους. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία 4-8 νουκλεοτιδίων και κόβουν το ξένο DNA στην αλληλουχία αυτή. Έτσι, γενωμικό DNA μπορεί να κοπεί σε πάρα πολλά κομμάτια, ενώ με την πέψη ενός πλασμιδίου και ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μπορεί να απομονωθεί το ένθεμα.

Υλικά

Δείγμα DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) ενζύμου

Ένζυμο

ddH₂O

Πειραματική Διαδικασία

Σε σωληνάκι erpendorf εισάγονται τα παραπάνω αντιδραστήρια. Το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώνεται στο 1X και βάζουμε τόσο ένζυμο, ανάλογα με την ποσότητα (ng) DNA του δείγματος (Συνήθως 1U είναι αρκετό). Έπειτα από ανάδευση το erpendorf επωάζεται στη θερμοκρασία δράσης του

ενζύμου. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από το είδος του ενζύμου και την ποσότητα του DNA που περιέχεται στο δείγμα.

Για παράδειγμα, η πέψη 3μL ενός πλασμιδίου με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI αν έχουμε 200ng/μL θα γίνει ως εξής:

DNA	3μL
Buffer	1.5μL
EcoRI	0.2μL
Νερό	10.3μL
Σύνολο	15μL

Το buffer είναι 10X και αραιώνεται 1/10, το ένζυμο έχει 5U/μL κι εφόσον έχουμε 600ng DNA, 1U είναι αρκετό και συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι τα 15μL. Επωάζουμε για 1ώρα στους 37 °C (ιδανική θερμοκρασία δράσης του EcoRI).

2.10 Σήμανση ανιχνευτή

Εισαγωγή

Το DNA το οποίο πρόκειται να σημειωθεί πρέπει να είναι καθαρό. Προέρχεται από πλασμίδιο το οποίο έχει εξαχθεί από καλλιέργεια ενός βακτηριακού κλώνου. Γίνεται δηλαδή απομόνωση πλασμιδιακού DNA, πέψη με κάποιο περιοριστικό ένζυμο, ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης και απομόνωση του ενθέματος με το gel extraction kit που προαναφέρθηκε. Επίσης γίνεται ποσοτικοποίηση του ενθέματος με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας DNA. Για τη σήμανση ενός μορίου DNA ώστε αυτό να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής απαιτούνται περίπου 1-1.5μg DNA.

Η σήμανση γίνεται με dUTPs τα οποία περιέχουν βιοτίνη. Πρόκειται για σήμανση τυχαίας εκκίνησης κατά την οποία το DNA αρχικά αποδιατάσσεται και αναμιγνύεται με τυχαία νουκλεοτιδικά εξαμερή, την Kleenow υπομονάδα της DNA πολυμεράσης, μίγμα μη σημασμένων νουκλεοτιδίων και dUTPs. Με τη δράση της πολυμεράσης δημιουργούνται νέες αλυσίδες με εκμαγείο το αρχικό αποδιαταγμένο DNA.

Υλικά

DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα (Hexa Buffer 5X)

Νουκλεοτίδια dNTPs

bio-UTP

Klenow polymerase

ddH₂O

Πειραματική Διαδικασία

Σε σωληνάκι erpendorf εισάγεται η κατάλληλη ποσότητα DNA, Hexa Buffer 1X και H₂O. Το μίγμα βράζεται για 10min ώστε να γίνει αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια προστίθενται τα μη-σημασμένα νουκλεοτίδια και τα bio-UTPs καθώς και η Klenow πολυμεράση. Γίνεται ανάδευση και στη συνέχεια επώαση για 12-14 ώρες στους 37 °C.

Μετά το τέλος της επώασης γίνεται κατακρήμνιση με CH₃COONa, γλυκογόνο και αιθανόλη όπως προαναφέρθηκε και επαναδιάλυση στην ίδια ποσότητα ddH₂O. Ο ανιχνευτής φυλάσσεται στους -20 °C.

Πριν χρησιμοποιηθεί ο ανιχνευτής θα πρέπει να ελεγχθεί (spotting). Γι' αυτό το σκοπό αραιώνεται 1μL του ανιχνευτή με 9μL νερού. Στη συνέχεια σε νάιλον μεμβράνη εμποτίζονται διαδοχικά 1μL ανιχνευτή + 5μL νερού, 3μL ανιχνευτή + 3μL νερού και 6μL ανιχνευτή. Μόλις στεγνώσει η μεμβράνη ακολουθούνται τα βήματα που αναφέρονται παρακάτω στην εμφάνιση σήματος (2.11.3):

1-2min διάλυμα A → 30-35min διάλυμα B → 30-35min διάλυμα B με αντίσωμα → 2 φορές για 15-20min διάλυμα A → 2-5min διάλυμα C → Διάλυμα C + NBT + BCIP

2.11 Ανάλυση κατά Southern

Εισαγωγή

Η ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών με τη βοήθεια ανιχνευτή, ο οποίος είναι κάποιο

ταυτοποιημένο μόριο DNA σημασμένο με βιοτίνη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση ότι το PCR προϊόν είναι το επιθυμητό, για το αν ο φορέας περιέχει το επιθυμητό ένθεμα κλπ.

Αρχικά, θα πρέπει το DNA να μεταφερθεί από το gel αγαρόζης σε νάιλον μεμβράνη, έπειτα γίνεται υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή και τέλος γίνεται ανίχνευση του σήματος.

Υλικά

Διάλυμα HCl 0.2N

Διάλυμα αποδιάταξης (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)

Διάλυμα εξουδετέρωσης (1.5M NaCl, 0.5M Tris pH 7.5)

Διάλυμα 10X SSC (NaCl, κιτρικό νάτριο)

Νάιλον μεμβράνη

Διάλυμα υβριδοποίησης (6X SSC, 0.5% SDS, 5X Denhard's)

Salmon Sperm DNA

Σημασμένος ανιχνευτής

Διάλυμα πλύσης 1 (2X SSC, 0.1% SDS)

Διάλυμα πλύσης 2 (0.2X SSC, 0.1% SDS)

Διάλυμα A (100mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl)

Διάλυμα B (Διάλυμα A και 1% Blocking solution σε αναλογία 5:1)

Αντίσωμα (σύμπλοκο streptavidine-alkaline phosphatase)

Διάλυμα C (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂)

Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)

X-phosphate (5bromo-4chloro-3indolyl-phosphate, BCIP)

Πειραματική Διαδικασία

2.11.1 Μεταφορά του DNA από gel αγαρόζης σε νάιλον μεμβράνη

Το gel αγαρόζης έπειτα από την ηλεκτροφόρηση μεταφέρεται σε διάλυμα 0.5N HCl ώστε να τμηματοποιηθούν τα μεγάλα κομμάτια DNA και να μεταφερθούν πιο εύκολα. Το στάδιο αυτό παρακάμπτεται αν υπάρχουν μόνο μικρά κομμάτια DNA.

Στη συνέχεια, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου το gel ξεπλένεται με διάλυμα αποδιάταξης δύο φορές για 15 λεπτά, έπειτα με αποιονισμένο νερό και άλλες δύο φορές για 20 λεπτά με διάλυμα εξουδετέρωσης. Στη συνέχεια γίνεται ξέπλυμα με SSC 6X για 2-3 λεπτά.

Το gel τοποθετείται σε επίπεδη επιφάνεια ανάποδα και πάνω τοποθετείται η νάιλον μεμβράνη αφού προηγουμένως έχει διαβρεχτεί με ddH₂O και με SSC 6X. Τοποθετούνται επίσης 2 χαρτιά Whatman τα οποία έχουν εμποτιστεί σε SSC 6X και άλλα 2 Whatman στεγνά. Από πάνω τοποθετούνται απορροφητικά χαρτιά και τέλος κάποιο βάρος περίπου 500 γραμμάρια. Η μεταφορά διαρκεί τουλάχιστο 3 ώρες. Μετά τη μεταφορά σημειώνεται ο προσανατολισμός της μεμβράνης και επωάζεται στους 80 °C για 30min-2 ώρες.

2.11.2 Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή

Η μεμβράνη τοποθετείται σε σωλήνα υβριδοποίησης και προστίθεται διάλυμα υβριδοποίησης (0.2mL για κάθε cm² μεμβράνης) και salmon sperm DNA το οποίο προηγουμένως έχει αποδιαταχτεί με βρασμό για 10min. Το salmon sperm χρησιμοποιείται ως μη ομόλογος ανταγωνιστής ώστε να μην προσδεθεί ο ανιχνευτής κατά την υβριδοποίηση σε μη ειδικές θέσεις. Η προυβριδοποίηση γίνεται για 1 έως 2 ώρες στους 65 °C αν ο ανιχνευτής είναι ομόλογος και στους 55 αν είναι μη ομόλογος.

Για την υβριδοποίηση, αποδιατάσσεται ο ανιχνευτής με βρασμό για 10min, αφαιρείται από το σωλήνα υβριδοποίησης ένα μεγάλο μέρος του διαλύματος υβριδοποίησης και προστίθεται ο ανιχνευτής. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία ίδια με τη θερμοκρασία προυβριδοποίησης για 16-18 ώρες. Μετά την υβριδοποίηση το διάλυμα υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή μπορούν να φυλαχθούν στους -20 °C και να επαναχρησιμοποιηθούν.

2.11.3 Ανίχνευση σήματος

Αρχικά γίνονται πλύσεις τις μεμβράνης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα πλύσης 1 δύο φορές για 5 λεπτά. Το διάλυμα αυτό απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος του ανιχνευτή που είναι ασθενώς

συνδεδεμένο στη μεμβράνη. Έπειτα στη θερμοκρασία υβριδοποίησης γίνονται 2 πλύσεις με διάλυμα πλύσης 2 ώστε να απομακρυνθεί ο ανιχνευτής που είναι συνδεδεμένος στη μεμβράνη σε μη ειδικές θέσεις.

Σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση ακολουθούν διαδοχικά:
1-2min διάλυμα A → 30-35min διάλυμα B → 30-35min διάλυμα B με αντίσωμα → 2 φορές για 15-20min διάλυμα A → 2-5min διάλυμα C.

Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιείται διάλυμα C με NBT και BCIP. Ανάλογα με το μέγεθος της μεμβράνης για κάθε 10mL διαλύματος C προστίθενται 50μL NBT και 37.5μL BCIP. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να επικαλύπτει τη μεμβράνη η οποία έχει τοποθετηθεί σε επίπεδο και σκιερό μέρος. Η εμφάνιση του σήματος μπορεί να γίνει στα πρώτα λεπτά ή μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από 1 ώρα. Μετά την εμφάνιση του σήματος γίνεται πολύ καλό πλύσιμο με απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί το NBT και το BCIP που δεν έχουν προσδεθεί στην μεμβράνη.

Η εμφάνιση του σήματος συμβαίνει γιατί το σύμπλοκο streptavidine – alkaline phosphatase προσδένεται στην βιοτίνη του ανιχνευτή. Η αλκαλική φωσφατάση χρησιμοποιεί το BCIP ως υπόστρωμα, ενώ τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης προσλαμβάνονται από το NBT για το σχηματισμό μιας αδιάλυτης ερυθροκυανής χρώσης.

2.12 Προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA (sequencing)

Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς αλληλουχίας του DNA γίνεται σε αυτόματο αναλυτή της εταιρίας Macrogen που εδρεύει στην Κορέα. Αρχικά γίνεται ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση και αποστέλλονται σε erpendorf (1μg DNA για κάθε αντίδραση). Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας γίνεται σύνθεση από την DNA πολυμεράση του συμπληρωματικού κλώνου χρησιμοποιώντας διδεοξυνουκλεοτίδια σημασμένα με διαφορετικό φθορίζων μόριο. Έτσι σε μια αντίδραση ο αυτόματος αναλυτής προσδιορίζει το τελευταίο νουκλεοτίδιο κάθε τμήματος DNA που συντίθεται, με αποτέλεσμα να μας παρέχει την πρωτοταγή αλληλουχία του DNA.

2.13 Φαγική γενωμική βιβλιοθήκη

Εισαγωγή

Εφόσον έχει απομονωθεί ένα τμήμα ενός γονιδιακού τόπου, μπορεί αυτό να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής σε μια φαγική γενωμική βιβλιοθήκη EMBL4 για την απομόνωση ολόκληρου του γονιδιακού τόπου. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε φαγική γενωμική βιβλιοθήκη της Μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata*.

2.14 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων MRA

Εισαγωγή

Για να πολλαπλασιαστούν οι φάγοι θα πρέπει να μολύνουν βακτήρια. Ξενιστές των φάγων που αποτελούν τη βιβλιοθήκη είναι τα MRA κύτταρα. Θα πρέπει λοιπόν να γίνει καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων MRA. Στην καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιείται μαλτόζη, η οποία προάγει την έκφραση υποδοχέων για λ φάγους στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων, και μαγνήσιο το οποίο βοηθά στην προσκόλληση των φάγων στα κύτταρα.

Υλικά

Stock MRA βακτηριακών κυττάρων

Θρεπτικό υλικό LB

Διάλυμα μαλτόζης

Διάλυμα $MgSO_4$ 1M

Πειραματική Διαδικασία

Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 5mL θρεπτικού υλικού LB, 50μL $MgSO_4$ (10mM) και 50μL μαλτόζη ενοφθαλμίζεται μικρή ποσότητα MRA κυττάρων από stock γλυκερόλης. Ακολουθεί επώαση για 4-6 ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση (210 στροφές).

Αφού αναπτυχθούν τα κύτταρα, γίνεται φυγοκέντρωση για 10min στις 3000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε

800μL MgSO₄ 10mM με ήπια ανάδευση. Όλη η ποσότητα των κυττάρων συλλέγεται σε falcon αφού μαζευτούν πιπετάροντας με άλλα 800μL MgSO₄.

Γίνεται φωτομέτρηση των κυττάρων στα 600nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό το MgSO₄ και προστίθεται MgSO₄ 10mM ώστε η οπτική απορρόφηση να είναι 0.5.

2.15 Επιμόλυνση των MRA κυττάρων με φάγους

Εισαγωγή

Τα MRA κύτταρα επιμολύνονται με τους φάγους και στη συνέχεια επιστρώνονται σε NZY agar, όπου πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί, και μόλις γίνει η λύση των κυττάρων δημιουργούνται διαφανείς περιοχές (πλάκες). Για την επίστρωση φαγικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιείται μεγάλο πιάτο, στο οποίο αν αναπτυχθούν σωστά οι φάγοι, υπάρχουν περίπου 60-80000 φαγικές πλάκες γεγονός που εξασφαλίζει την αντιπροσώπευση όλων των τμημάτων της βιβλιοθήκης τουλάχιστο μια φορά. Ο υπολογισμός των αποικιών που θα πάρουμε γίνεται με τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης, επιστρώνοντας 3 διαφορετικές αραιώσεις της βιβλιοθήκης σε τριβλία και καταμετρώντας τις πλάκες που προκύπτουν.

Υλικά

Φαγική γενωμική βιβλιοθήκη

SM buffer

Κύτταρα MRA

NZY agar (5gr NaCl, 2gr MgSO₄, 5gr Yeast extract, 10gr NZ amine, 15gr Agar, προσθήκη απιονισμένου νερού στο 1L και αποστείρωση)

NZY top agar (5gr NaCl, 2gr MgSO₄, 15gr Yeast extract, 7gr Αγαρόζη, προσθήκη νερού στο 1L και αποστείρωση)

Πειραματική Διαδικασία

Οι αραιώσεις γίνονται με εισαγωγή 2μL της φαγικής βιβλιοθήκης σε 98μL SM buffer (αραίωση 10⁻²). Ομοίως, 2μL από την αραιώση 10⁻² εισάγονται σε 98μL SM buffer και προκύπτει αραιώση της βιβλιοθήκης 10⁻⁴.

Σε erpendorf που περιέχει 600μL MRA κύτταρα εισάγονται τόσα μL από αραιώση της φαγικής βιβλιοθήκης ώστε να προκύψουν 60-80000 φαγικές πλάκες (με βάση την τιτλοδότηση που έχει γίνει). Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 15-20min. Έπειτα τα κύτταρα εισάγονται σε NZY top agar το οποίο έχει προηγουμένως θερμανθεί στους 50 °C ώστε να μην στερεοποιηθεί, αναδεύεται και επιστρώνεται σε πιάτο με θρεπτικό υλικό NZY agar. Αφού στερεοποιηθεί το NZY top agar, το πιάτο επωάζεται στους 37 °C για 12 ώρες.

2.16 Μεταφορά των φαγικών πλακών σε νάιλον μεμβράνη και υβριδοποίηση

Εισαγωγή

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη μεταφορά του φαγικού DNA από το πιάτο σε νάιλον μεμβράνη, ώστε να γίνει υβριδοποίηση με κάποιον ανιχνευτή και να εντοπιστούν οι φάγοι που περιέχουν το τμήμα της βιβλιοθήκης που μας ενδιαφέρει

Υλικά

Φαγική Βιβλιοθήκη (σε πιάτο με θρεπτικό υλικό NZY)

Διάλυμα αποδιάταξης (1.5M NaCl, 0.5N NaOH)

Διάλυμα εξουδετέρωσης (1.5M NaCl, 0.5M Tris pH 7.2)

Διάλυμα πλύσης (0.2M Tris-HCl pH 7.5, 2X SSC)

SM Buffer

Πειραματική Διαδικασία

Αφού έχουν μεγαλώσει οι φαγικές πλάκες, αφήνουμε το πιάτο στους 4 °C για 2 ώρες ώστε να μην κολλήσει η μεμβράνη στο top agar κατά τη μεταφορά. Χρησιμοποιώντας λαβίδες, η μεμβράνη τοποθετείται στην επιφάνεια του πιάτου για 2 λεπτά ώστε να μεταφερθούν οι φάγοι στη μεμβράνη και σημειώνεται ο προσανατολισμός της μεμβράνης με τη χρήση βελόνας.

Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται για 2min ανάποδα πάνω σε διάλυμα αποδιάταξης το οποίο βρίσκεται σε σελοφάν σε επίπεδη επιφάνεια. Έπειτα μεταφέρεται με προσοχή σε διάλυμα εξουδετέρωσης για 5min. Τέλος τοποθετείται στο διάλυμα πλύσης για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα και αφήνεται σε χαρτί Whatman για να στεγνώσει. Μόλις στεγνώσει τοποθετείται σε φούρνο στους 80 °C για 30min-2 ώρες ώστε να σταθεροποιηθεί το DNA στη μεμβράνη.

Ακολουθεί η υβριδοποίηση και η ανίχνευση σήματος ακριβώς όπως έχουν περιγραφεί στις παραγράφους 2.6.1 και 2.6.2 αντίστοιχα.

Οι πλάκες που έδωσαν κάποιο σήμα απομονώνονται με τη χρήση πιπέτας Pasteur. Έτσι απομονώνεται μια περιοχή του θρεπτικού NZY που μπορεί να περιέχει πολλούς φάγους με διαφορετικό γενότυπο. Η περιοχή αυτή εισάγεται σε 600μL SM buffer στο οποίο διαχέονται τα σωματίδια του φάγου και φυλάσσεται στους 4 °C.

2.17 Secondary screening

Εισαγωγή

Για να απομονωθεί ο φάγος που περιέχει το επιθυμητό DNA θα πρέπει να γίνει secondary screening χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά όχι ολόκληρη τη βιβλιοθήκη, αλλά το τμήμα της βιβλιοθήκης που απομονώθηκε. Ουσιαστικά, πρόκειται για την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη βιβλιοθήκη, απλά ο αριθμός των φάγων είναι πολύ μικρότερος, και στο τέλος γίνεται απομόνωση ενός μόνο φάγου.

Υλικά

Φαγική περιοχή από primary screening

Κύτταρα MRA

Τρυβλία NZY agar

NZY top agar

Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά γίνονται αραιώσεις 10^{-2} εισάγοντας 2μL από την φαγική περιοχή που βρίσκεται σε 600μL SM buffer σε 98μL SM buffer και η αραιώση 10^{-4} γίνεται αντίστοιχα με εισαγωγή 2μL από την αραιώση 10^{-2} σε 98μL SM buffer. Δοκιμάζεται η επίστρωση δυο ή τριών διαφορετικών αραιώσεων ώστε ο αριθμός των φάγων στο τρυβλίο να είναι τέτοιος ώστε να επιτρέπει την απομόνωση μεμονομένων φαγικών πλακών.

Σε erpendorf που περιέχει 200μL MRA κύτταρα εισάγεται η επιθυμητή φαγική αραιώση και γίνεται επώαση στους 37 °C για 15-20min. Έπειτα τα κύτταρα εισάγονται σε 3mL NZY top agar το οποίο έχει θερμανθεί στους 50 °C, αναδεύεται και επιστρώνεται σε τρυβλίο NZY agar. Το τρυβλίο επωάζεται στους 37 °C για 12 ώρες.

Ακολουθεί μεταφορά των φάγων σε μεμβράνη, υβριδοποίηση με τον επιθυμητό ανιχνευτή και εμφάνιση του σήματος ακριβώς όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.16. Στο τέλος επιλέγονται με πιπέτα Pasteur μεμονωμένες πλάκες οι οποίες εισάγονται σε 200μL SM buffer και φυλάσσονται στους 4 °C.

2.18 Απομόνωση φαγικού DNA (phage preps)

Υλικά

Φαγικά σωμάτια σε SM buffer

Θρεπτικό υλικό LB

MgSO₄ 1M

Μαλτόζη

MRA κύτταρα

Χλωροφόρμιο

RNAase (1μg/mL)

DNAase (1μg/mL)

NaCl

PEG 8000 10% w/V

SM buffer

20mM EDTA

0.5% SDS

πρωτεΐνάση K (50μg/mL)

φαινόλη

Αιθανόλη 95% και 70%

CH₃COONa 3M pH 7

ddH₂O

Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά επωάζονται 500μL MRA κύτταρα με 40μL εκλουόμενων φάγων για 20 min στους 37 °C ώστε να εισαχθούν οι φάγοι στα κύτταρα, και εισάγονται σε 20mL θρεπτικό υλικό LB που περιέχει 10mM MgSO₄. Γίνεται επώαση για 5-7 ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση (200rpm). Σ' αυτή τη φάση τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται (θολό διάλυμα) και τέλος γίνεται λύση των κυττάρων με αποτέλεσμα οι φάγοι να είναι ελεύθεροι στο διαυγές διάλυμα.

Προστίθεται χλωροφόρμιο (100μL στα 20mL καλλιέργειας) και φυγοκεντρείται για 10min (8000g). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon, και προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες RNAase και DNAase ώστε να καταστραφεί τυχόν DNA και RNA που προέρχεται από τα κύτταρα, με επώαση για 35-40min στους 37 °C.

Στη συνέχεια προστίθεται NaCl 1M και γίνεται επώαση στον πάγο για 1.5-2 ώρες τουλάχιστον (μπορεί να μείνει overnight στους 4 °C). Φυγοκεντρείται για 10min στους 4 °C (11000g). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon και προστίθεται PEG 8000 (10gr/100mL). Αφού διαλυθεί επωάζεται για 2 ώρες στον πάγο.

Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10min στους 4 °C (3000g), το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται αναδιάλυση του ιζήματος πιπετάροντας χαλαρά με 1mL SM buffer. Έπειτα μεταφέρεται σε erpendorf και αναδεύεται για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και φυγοκεντρείται για 10min στις 5000rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf.

Προκαλείται λύση των φάγων με 20mM EDTA, 0.5% SDS και 50μg/mL πρωτεΐνάση K και γίνεται επώαση για 1h στους 56 °C. Σ' αυτή τη φάση θα πρέπει να γίνει καθαρισμός από πρωτεΐνες, οπότε γίνεται εκχύλιση με φαινόλη, όπως έχει προαναφερθεί και κατακρήμνιση με CH₃COONa 3M pH 7 και Αιθανόλη 95%. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση σε 200μL ddH₂O.

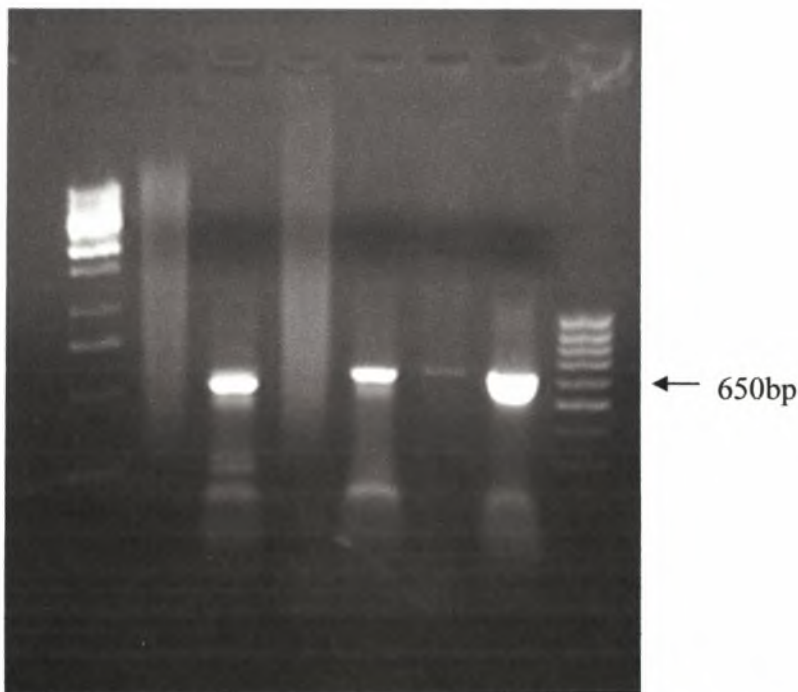
3. Αποτελέσματα

1.1 Εισαγωγή

Αρχική προσέγγιση των πειραμάτων ήταν η ενίσχυση με PCR και κλωνοποίηση ενός τμήματος του cluster των α-εστερασών, ώστε στη συνέχεια αυτό να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής για την επιλογή κλώνων από φαγική γενωμική βιβλιοθήκη που μπορεί να περιέχουν μεγαλύτερα τμήματα του cluster (10-15kb).

1.2 Ενίσχυση τμήματος του cluster με PCR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους Md1 και Md2 με τους οποίους στη *Musca domestica* ενισχύονται 6 διαφορετικά τμήματα των α-εστερασών που κυμαίνονται σε μέγεθος από 450bp μέχρι 1.6kb. Οι εκκινητές αυτοί είναι εκφυλισμένοι και μη-ειδικοί, οπότε στη Μεσογειακή μύγα έπρεπε να γίνει re-PCR του PCR προϊόντος. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών στην πρώτη PCR ήταν 40°C, ενώ στην re-PCR 48 °C. Παρακάτω φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

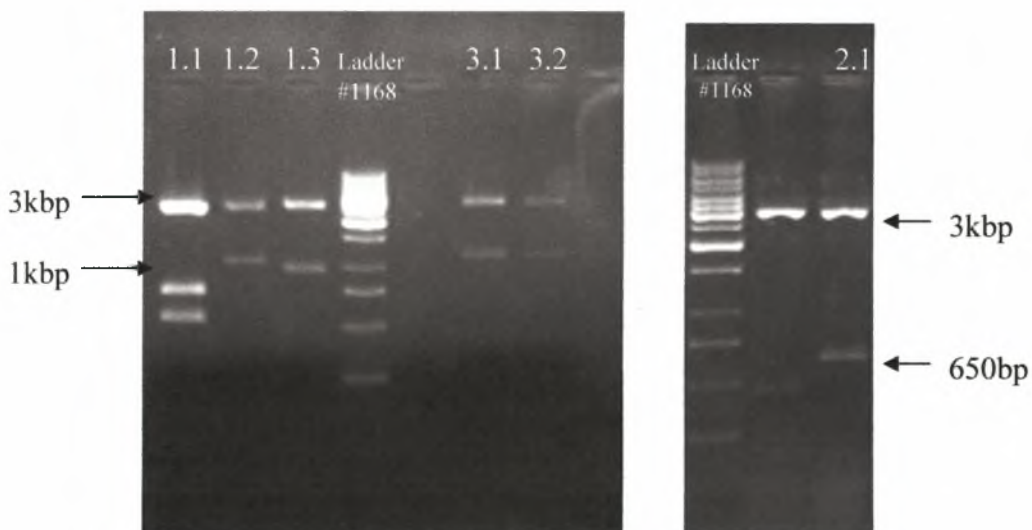


Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% της PCR και re-PCR

Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση κατά Southern της παραπάνω ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή τμήμα 1.6kb του γονιδίου MdaE7. Η ανάλυση κατά Southern δεν έδωσε κάποιο σήμα, προφανώς γιατί στην *Ceratitidis capitata* τα γονίδια που ενισχύονται δεν έχουν σημαντική ομοιότητα με το γονίδιο aE7 της *Musca domestica*.

1.3 Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR

Οι ορατές μπάντες, αποκόπηκαν από το gel και καθαρίστηκαν με το gel extraction kit. Στη συνέχεια έγινε κατακρήμνιση και σύνδεση των μορίων αυτών σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-Teasy. Ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Έπειτα έγινε καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κλώνων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Παρακάτω φαίνεται η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης έπειτα από πέψη των πλασμιδίων με PvuII:



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% των προϊόντων πέψης με PvuII

Αυτά τα έξι πλασμιδία στάλθηκαν στην εταιρία MacroGen για να γίνει ανάλυση της αλληλουχίας τους (Sequencing) χρησιμοποιώντας ως εκκινήτη τον Sp6 του πλασμιδίου pGEM.

Έπειτα από την αλληλούχιση ελέγχθηκε ο βαθμός ομοιότητας των δειγμάτων με τη βάση δεδομένων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα blast. Το δείγμα 1.1 έχει σημαντική ομοιότητα με μια αντίστροφη μεταγραφάση της *Drosophila subobscura* (E value = $6e^{-10}$). Στα δείγματα 1.2, 1.3, 3.1 και 3.2 οι κορυφές του sequencing ήταν αλληλεπικαλυπτόμενες και ήταν αδύνατο να διαβαστεί η αλληλουχία.

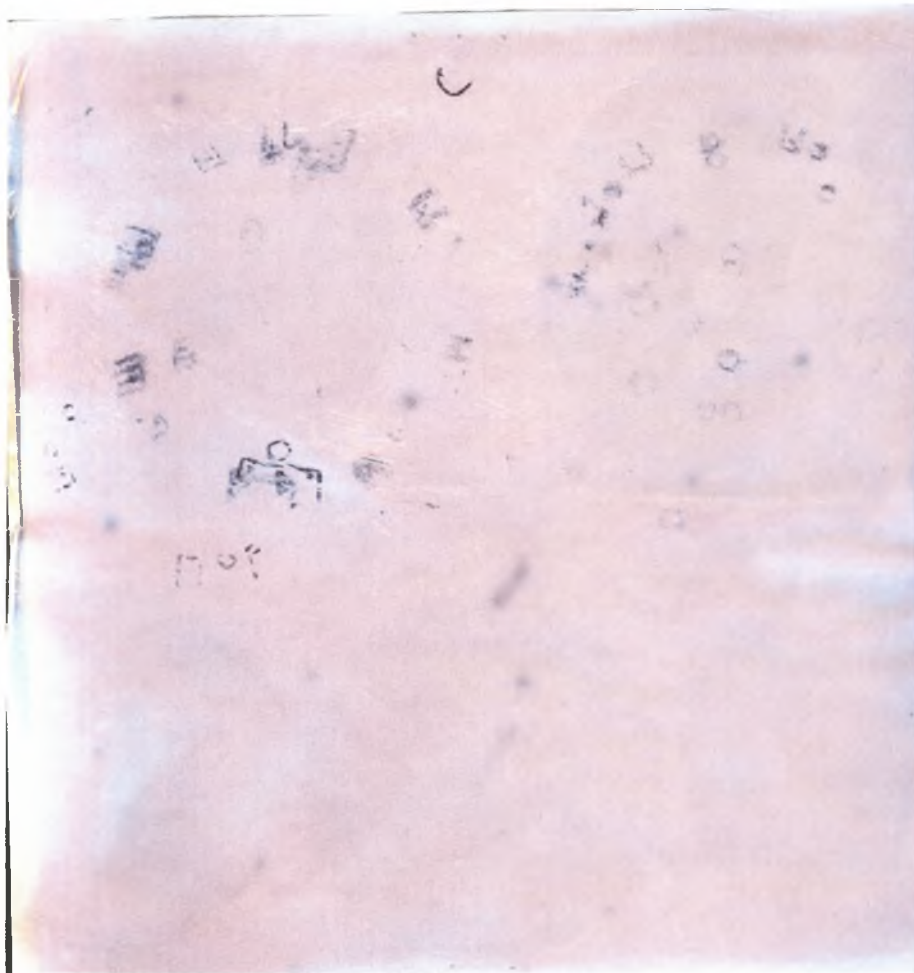
Το δείγμα 2.1 τέλος έχει σημαντική ομοιότητα με την α-εστεράση 1α της *Drosophila buzzatii* (E value = $4e^{-29}$), καθώς και μικρότερη ομοιότητα με αρκετές α-εστεράσες ειδών δροσόφιλας αλλά και άλλων εντόμων. Πρόκειται για ένα τμήμα 628 νουκλεοτιδίων. Το τμήμα αυτό, με ονομασία Cc1.3, σημάνθηκε με βιοτίνη με σκοπό να χρησιμοποιηθεί σε υβριδοποίηση για την ανίχνευση φαγικών κλώνων που περιέχουν τμήματα α-εστερασών.

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
gi 6716733 gb AAF26721.1	alpha-esterase 1a [Drosophila buzzatii	70.9	4e-29
gi 90823476 gb ABE01158.1	carboxylesterase [Spodoptera litura]	64.7	1e-22
gi 91717345 gb ABE57120.1	alpha-esterase 5 [Drosophila borborem	77.8	6e-18
gi 12723081 gb AAB01146.1	alpha esterase [Drosophila melanogaste	77.4	2e-17
gi 28573189 ref NP_524265.3	-Esterase-5 CG1089-PA [Drosophil...	77.4	2e-17
gi 6716744 gb AAF26727.1	alpha-esterase 5 [Drosophila buzzatii]	76.3	6e-17
gi 28571561 ref NP_524268.3	-Esterase-2 CG2505-PA [Drosophil...	73.6	7e-16
gi 1272302 gb AAB01143.1	alpha esterase [Drosophila melanogaste	73.6	7e-16
gi 6716737 gb AAF26723.1	alpha-esterase 2 [Drosophila buzzatii]	73.6	8e-16
gi 54639527 gb EAL28929.1	GA15379-PA [Drosophila pseudoobscura]	73.6	1e-15
gi 28573188 ref NP_524269.3	-Esterase-1 CG1031-PA [Drosophil...	72.0	7e-15
gi 1272300 gb AAB01142.1	alpha-esterase [Drosophila melanogaste	72.0	3e-14
gi 1911739 gb AAB50826.1	alpha-esterase, alpha E1 [Drosophil...	72.0	3e-14
gi 54635978 gb EAL25381.1	GA19300-PA [Drosophila pseudoobscura]	80.5	8e-14
gi 54639518 gb EAL28920.1	GA10886-PA [Drosophila pseudoobscura]	67.0	3e-13
gi 24658187 ref NP_611678.1	CG6018-PA [Drosophila melanogast...	75.5	3e-13
gi 25012653 gb AAN71422.1	RE48979p [Drosophila melanogaster]	75.5	3e-13
gi 6716735 gb AAF26722.1	alpha-esterase 10 [Drosophila buzzatii	62.4	4e-13
gi 92109990 gb ABE73319.1	IP03519p [Drosophila melanogaster]	66.6	5e-13
gi 17737813 ref NP_524258.1	-Esterase-9 CG1128-PB, isoform B...	66.6	5e-13
gi 24644835 ref NP_731165.1	-Esterase-9 CG1128-PA, isoform A...	66.6	8e-13
gi 1272320 gb AAB01152.1	alpha esterase [Drosophila melanogaste	66.6	8e-13
gi 6716752 gb AAF26731.1	alpha-esterase 9 [Drosophila buzzatii]	66.2	1e-12
gi 54639521 gb EAL28923.1	GA10768-PA [Drosophila pseudoobscura]	65.1	5e-12
gi 1272304 gb AAB01144.1	alpha esterase	71.2	8e-12
gi 24644854 ref NP_524267.2	-Esterase-3 CG1257-PA [Drosophil...	71.2	8e-12
gi 6502939 gb AAF14517.1	alpha E7 esterase [Haematobia irritans	67.0	1e-11
gi 6716748 gb AAF26729.1	alpha-esterase 7 [Drosophila buzzatii]	63.9	1e-11
gi 5726371 gb AAD48432.1	alpha-esterase 4a [Drosophila simulans	59.7	2e-11
gi 1272312 gb AAB01140.1	alpha esterase [Drosophila melanogaste	72.4	2e-11
gi 15291417 gb AAK92977.1	GH20431p [Drosophila melanogaster]	72.4	2e-11
gi 60678193 gb AAK33603.1	AT21153p [Drosophila melanogaster]	72.4	2e-11
gi 17737819 ref NP_524262.1	-Esterase-6 CG1108-PA [Drosophil...	72.4	2e-11
gi 5726374 gb AAD48434.1	alpha-esterase 4a [Drosophila yakuba]	59.7	2e-11
gi 54639519 gb EAL28921.1	GA10907-PA [Drosophila pseudoobscura]	71.6	4e-11
gi 54639523 gb EAL28925.1	GA10746-PA [Drosophila pseudoobscura]	71.2	5e-11

Εικόνα 17. Αποτελέσματα σύγκρισης αλληλουχιών με βάση δεδομένων

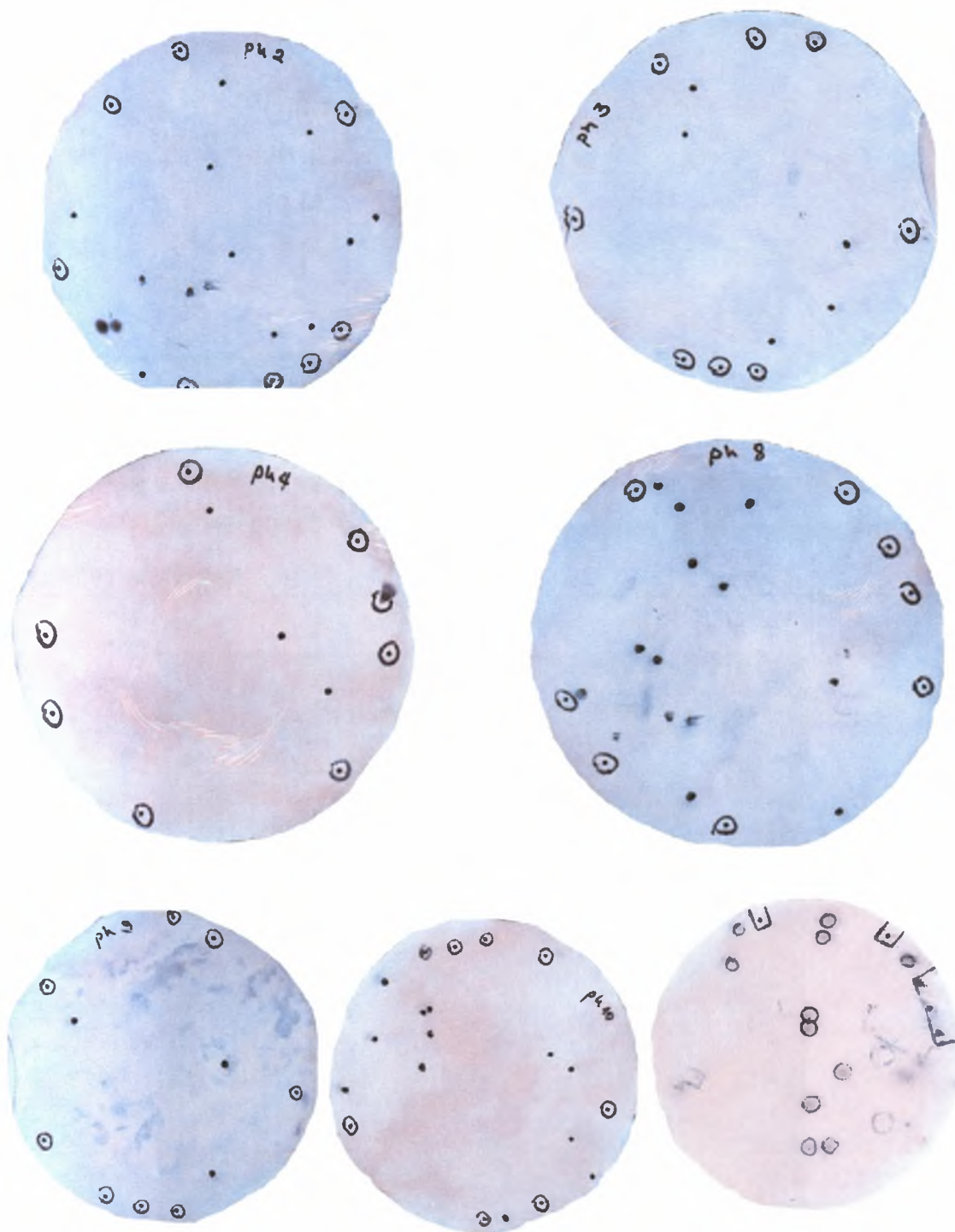
1.4 Υβριδοποίηση φαγικής γενωμικής βιβλιοθήκης

Φαγική γενωμική βιβλιοθήκη *Ceratitis capitata* επωάστηκε με MRA κύτταρα και στη συνέχεια καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό NZY. Στη συνέχεια έγινε μεταφορά των φαγοσωματιδίων σε νάιλον μεμβράνη και ακολούθησε υβριδοποίηση στους 62 °C, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το τμήμα DNA που προαναφέρθηκε (*Cc1.3*). Η εμφάνιση του σήματος έδωσε φαγικές περιοχές με έντονο και περιοχές με ασθενές σήμα. Η πιο πιθανή εξήγηση είναι πως στις περιοχές με έντονο σήμα υπάρχει κάποιος φαγικός κλώνος που περιέχει περισσότερα από ένα γονίδια α-εστερασών. Όλες οι φαγικές περιοχές που έδωσαν σήμα απομονώθηκαν ώστε να γίνει secondary screening και να επιλεγούν μεμονομένοι φαγικοί κλώνοι.



Εικόνα 18. Primary screening φαγικής γενωμικής βιβλιοθήκης με ανιχνευτή το *Cc1.3*

Επιλέχθηκαν 8 φαγικές περιοχές (pH2, pH3, pH4, pH8, pH9, pH10, pH13 και pH20) ώστε να γίνει secondary screening. Αφού εισήχθησαν σε κύτταρα MRA καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό NZY και έγινε υβριδοποίηση όπως παραπάνω.

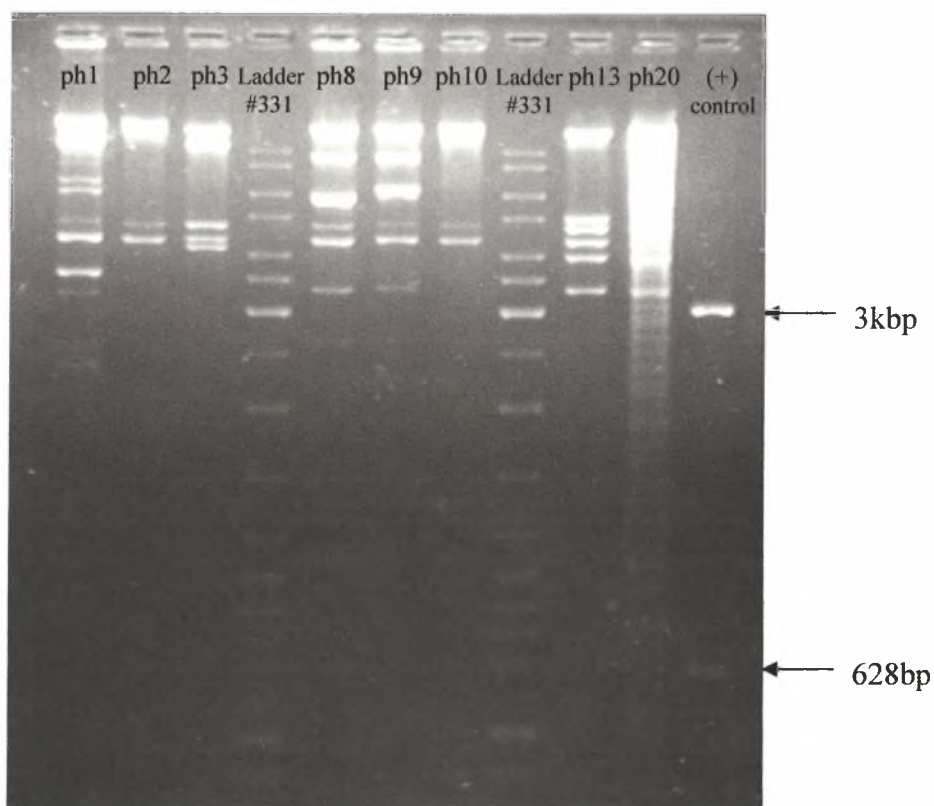


Εικόνα 19. Secondary screening

Από κάθε φαγική περιοχή επιλέχθηκε μία φαγική πλάκα που έδωσε σήμα μετά την υβριδοποίηση, και ακολούθησε απομόνωση φαγικού DNA. Στη συνέχεια έγινε πέψη όλων των δειγμάτων με EcoRI και HindIII, ώστε να γίνει ανάλυση κατά Southern και να επιβεβαιωθεί ποιοί κλώνοι περιέχουν κάποιο τμήμα α-εστεράσης. Η πέψη έγινε ως εξής:

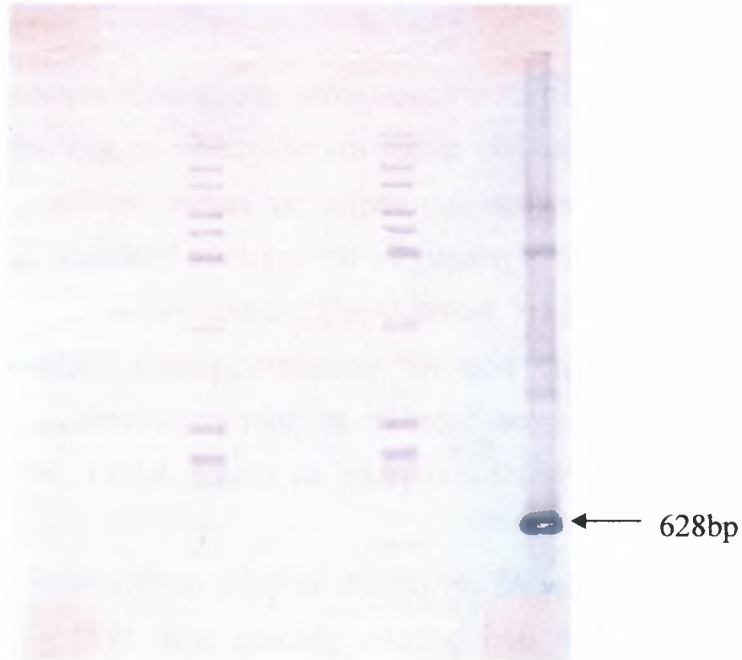
Φαγικό DNA	(1.5-1.8μg)
Buffer Tango	20 μL
EcoRI	1 μL
HindIII	1 μL
BSA	1 μL
H ₂ O	; μL
Σύνολο	100 μL

Τα δείγματα επωάζονται για 4h στους 37 °C, ακολουθεί κατακρήμνιση και επαναδιάλυση σε 20 μL νερό. Παρακάτω φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης:



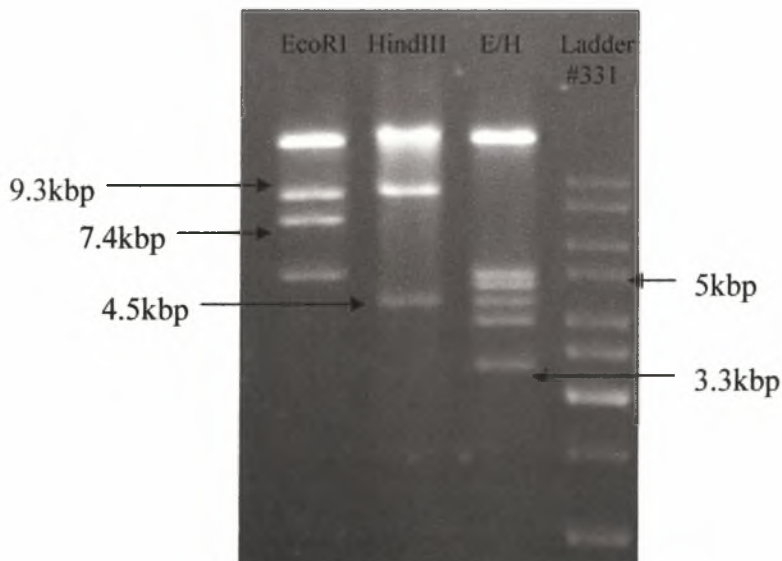
Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση πέψεων Ε/Η φαγικού DNA

Ανάλυση κατά Southern με ανιχνευτή το κλωνοποιημένο τμήμα α-εστεράσης (*Cc1.3*), δεν έδωσε σήμα, πράγμα που σημαίνει ότι κανένα από τα τμήματα που περιέχονται στους φάγους που απομονώθηκαν δεν εμφανίζει ομοιότητα με το τμήμα 628bp που έχει κλωνοποιηθεί.

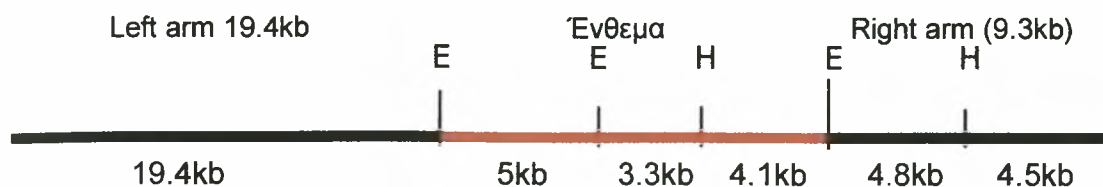


Εικόνα 21. Ανάλυση κατά Southern

Σε περίπτωση που κάποιοι από τους φάγους έδιναν σήμα, θα γινόταν τρεις πέψεις: *EcoRI*, *HindIII* και *E/H*, και θα κατασκευαζόταν ο χάρτης περιορισμού του φάγου. Ενδεικτικά κατασκευάστηκε ο χάρτης του φάγου ρh13.



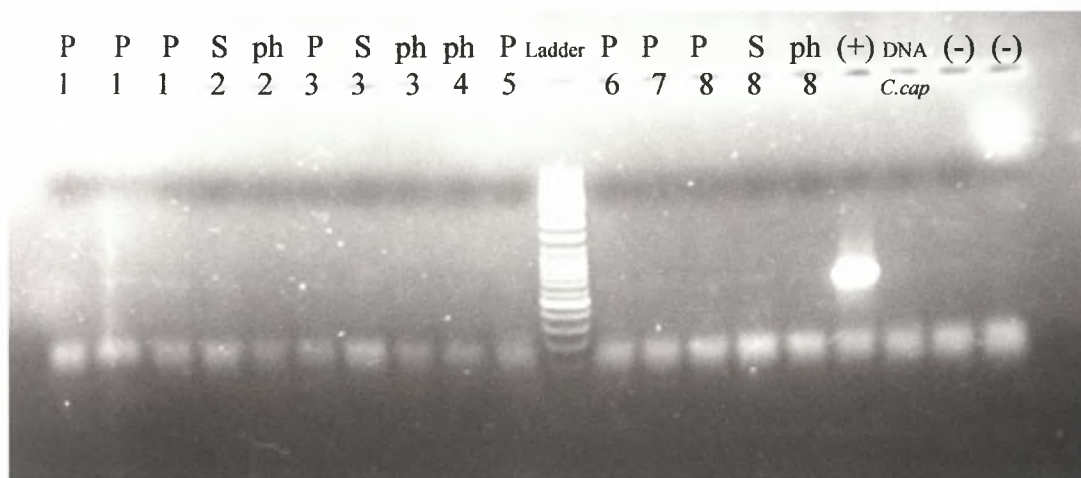
Εικόνα 19. Πέψεις *E*, *H* και *E/H* του φάγου ρh13



Εικόνα 20. Χάρτης περιοριστικών ενζύμων του φάγου ρh13

Με βάση τον παραπάνω χάρτη, υποκλωνοποιούνται οι 3 μπάντες (3.3, 4.1 και 5kb) του ενθέματος σε πλασμιδία και γίνεται ανάλυση της αλληλουχίας τους. Αν εντοπιστεί κάποιο τμήμα με σημαντική ομοιότητα με κάποια α-εστεράση, μπορεί να σημειωθεί αυτό για την ανίχνευση φάγων που περιέχουν τμήματα του cluster των α-εστερασών. Εναλλακτικά, αν υπάρχουν κι άλλοι φάγοι που δίνουν σήμα, χρησιμοποιώντας τον ήδη διαθέσιμο ανιχνευτή, μπορεί να γίνει υποκλωνοποίησή τους σε πλασμιδιακό φορέα και ανάλυση της αλληλουχίας τους, οπότε τελικά με αλληλεπικάλυψη κλώνων να γίνει σύνθεση του cluster.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε PCR με σκοπό τον έλεγχο της ύπαρξης του επιθυμητού τμήματος DNA στις φαγικές πλάκες που απομονώθηκαν. Οι συνθήκες της PCR ήταν ακριβώς ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την ενίσχυση του ανιχνευτή. Ο έλεγχος έγινε στις φαγικές πλάκες του primary (P) και secondary (S) screening καθώς και στους απομονωμένους φάγους (ρh). Όπως φαίνεται στην εικόνα 21, υπάρχει μεν κάποιο ίχνος γύρω στις 650bp, δεν αποτελεί όμως σίγουρο προϊόν



Εικόνα 21. PCR των φαγικών κλώνων με εκκινητές τους Md1, Md2

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση τμήματος του γονιδιακού τόπου των α-εστερασών στη Μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την κλωνοποίηση του ίδιου γονιδιακού τόπου στη *Musca domestica* με σκοπό την ενίσχυση με PCR τμήματος του γονιδιακού τόπου και κλωνοποίησή του²⁸.

Έπειτα από αλληλούχιση επιβεβαιώθηκε σημαντική ομοιότητα ενός δείγματος με την α-εστεράση α1 της *Drosophila buzzatii*. Επιτεύχθηκε επομένως κλωνοποίηση ενός τμήματος 628bp που αποτελεί μέρος του cluster των α-εστερασών. Το τμήμα αυτό (*Cc1.3*), εφόσον προέρχεται από την Μεσογειακή μύγα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ομόλογος ανιχνευτής, για την επιβεβαίωση με ανάλυση κατά Southern ότι ένα δείγμα DNA είναι ομόλογο με την α-εστεράση καθώς και για την ανίχνευση κλώνων από φαγική γενωμική βιβλιοθήκη, οι οποίοι περιέχουν τμήματα του cluster των α-εστερασών.

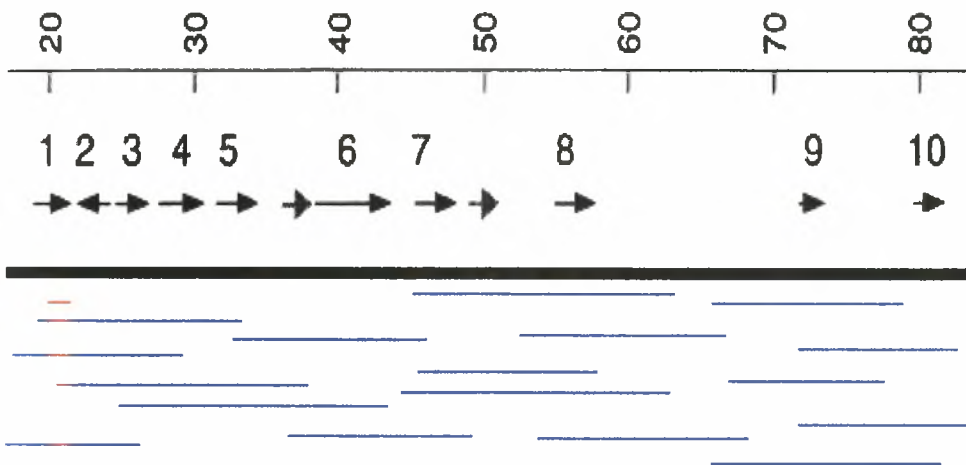
Επιτεύχθηκε η απομόνωση φαγικών κλώνων οι οποίοι εμφάνισαν σήμα σε υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή *Cc1.3*. Παρόλο όμως που το secondary screening δίνει σήμα, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη επιθυμητών κλώνων, έπειτα από απομόνωση DNA από τους κλώνους αυτούς, πέψη και ανάλυση κατά Southern, δεν εμφανίζεται σήμα. Πιθανές εξηγήσεις σ' αυτό είναι να απομονώνεται λάθος κλώνος ή να υπάρχει επιμόλυνση με κάποιο άλλο φάγο. Να έγινε δηλαδή λάθος εκτίμηση και να υπήρχε αλληλεπικάλυψη κλώνων κατά την απομόνωση των φαγικών πλακών. Επίσης είναι πιθανό σήματα που εμφανίζονται στο Primary και Secondary screening να είναι μη ειδικά.

Για την επιβεβαίωση αν οι φαγικές πλάκες και οι φάγοι που απομονώθηκαν περιέχουν το επιθυμητό ένθεμα, πραγματοποιήθηκε PCR. Παρόλο που εμφανίζεται κάποιο προϊόν, είναι πολύ αχνό για να επιβεβαιώσει την ύπαρξη του επιθυμητού τμήματος.

Προτείνεται να γίνει απομόνωση DNA από περισσότερους φάγους και να πραγματοποιηθεί για όλους ανάλυση κατά Southern αφού μπορεί κάποιοι από αυτούς να δώσουν θετικό σήμα. Επίσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άλλοι εκκινητές που ενισχύουν τμήμα του α-cluster. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος pooling ώστε να απομονωθούν οι επιθυμητοί φάγοι. Στη μέθοδο pooling γίνεται PCR σε 10 απομονωμένες φαγικές περιοχές οι οποίες στο σύνολό τους αντιπροσωπεύουν την φαγική γενωμική βιβλιοθήκη. Κάθε μια από αυτές

αντιστοιχεί σε 10 υποπεριοχές της βιβλιοθήκης και κάθε μια υποπεριοχή αντιστοιχεί σε 10 φαγικές ομάδες. Με 3 διαδοχικές PCR, επιλέγοντας την περιοχή, υποπεριοχή και ομάδα, οδηγούμαστε σε μια φαγική ομάδα η οποία μπορεί να επιστρωθεί σε τρυβλίο με NZY agar, και με υβριδοποίηση να επιλεγούν οι επιθυμητοί φάγοι.

Στη συνέχεια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι νέοι φάγοι ως ανιχνευτές για την εύρεση άλλων φάγων που αλληλεπικαλύπτονται, οπότε σταδιακά να βρεθούν φάγοι που συμπληρώνουν όλο το γονιδιακό τόπο των α-εστερασών. Στη φωτογραφία φαίνεται διαγραμματικά το cluster 65kb των α-εστερασών στη *Drosophila melanogaster*, και απεικονίζονται οι σχετικές θέσεις των 11 εστερασών. Εάν το cluster α-εστερασών στην *Ceratitis capitata* είναι παρόμοιο, και έχει πράγματι κλωνοποιηθεί τμήμα του γονιδίου α1 (κόκκινο χρώμα), μπορούν να απομονωθούν σταδιακά αλληλεπικαλυπτόμενοι φάγοι (μπλέ χρώμα) που στο σύνολό τους αντιπροσωπεύουν όλο το γονιδιακό τόπο των α-εστερασών.



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση του τόπου των α-εστερασών της *Drosophila melanogaster*

5. Βιβλιογραφία

1. R. F. L. Mau, J. L. M. Kessing; *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), 1992
2. L. E. Carroll, I.M. White, A. Freidberg, A.L. Norrbom, M.J. Dallwitz and F.C. Thompson; Pest fruit flies of the world
3. M. C. Thomas, J. B. Heppner, R. E. Woodruff, H. V. Weems and G. J. Steck; Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant industry and T. R. Fasulo, University of Florida, Mediterranean fruit fly
4. Global invasive species database – *Ceratitidis capitata*
5. M. D. Meixner, B. B Mcpheron, J. G. Silva, G. E Gasparich and W. S. Sheppard; The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability, *Molecular Ecology*, 11: 891-899, 2002
6. N. Davies, F. X. Villablanca, G. K. Roderick; Bioinvasions of the Medfly *Ceratitidis capitata*: Source Estimation using DNA sequences at multiple intron loci, *Genetics*, 163: 351-360, 1999
7. www.wikipedia.org
8. D. Fournier, J. Bride, F Hoffmann, F. Karch; Acetylcholinesterase, two types of modifications confer resistance to insecticide, *The journal of biological chemistry*, 267: 14270-14274, 1992
9. M. Weill, C. Malcolm, F. Chandre, K. Mogensen, A. Berthomieu, M. Marquine, M. Raymond; The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors, *Insect molecular biology*, 13: 1-7, 2004
10. P. Menozzi, M. A. Shi, A. Lougarre, Z. Hua Tang, D. Fournier; Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations, *BMC Evolutionary Biology*, 2004
11. J. G. Vontas, M. J. Hejazi, N. J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas, J. Hemingway; Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, *Insect Molecular Biology*, 11: 329-336, 2002
12. A. Mutero, M. Pralavorio, J.M Bride, D. Fournier; Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Sci. USA*, 91: 5922-5926, 1994

13. D. Martinez-Torres, S.P. Foster, L.M. Field, A.L. Devonshire, M.S. Williamson; A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Insect Molecular Biology*, 8: 33-346, 1999
14. R. H. ffrench-Constant, P. J. Daborn, G. Le Goff; The genetics and genomics of insecticide resistance, *Trends in genetics*, 20: 163-170
15. D. M. Soderlund, D. C. Knipple; The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33-563-577, 2003
16. K. Matsuda, S.D. Buckingham, D. Kleier, J. J. Rauh, M. Grauso, D.B. Sattelle; Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trends Pharmacol. Sci.*, 22: 573-580, 2001
17. Z. Liu, M. Williamson, S. J. Lansdell, I. Denholm, Z. Han, N. S. Millar; A Nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper)
18. J. G. Scott, Cytochromes P450 and insecticide resistance (Review), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 757-777, 1999
19. R. Feyereisen; Insect P450 enzymes, *Annual Review of Entomology*, 44: 507-533, 1999
20. C. Sabourault, M. Guzov, J. F. Koener, C. Claudianos, F. W. Plapp, R. Feyereisen; Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdaE7) gene in resistant house flies, *Insect Molecular Biology*, 10: 609-618, 2001
21. Krengel; Glutathion S-transferase (GSTA4-4), *FEBS Lett*, 422: 285-290, 1998
22. H. Ranson, J. Hemingway; Insect pharmacology and control: Glutathione S-transferases, Elsevier Ltd, Oxford, UK, 2004
23. R. H. ffrench-Constant; A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance, *Nature*, 363: 449-451, 1993
24. R. Feyereisen; Molecular biology of insecticide resistance, *Toxicology Letters* 82/83, 83-90, 1995

25. R. J. Russell, G. C. Robin, P. Kostakos, R. D. Newcomb, T. M. Boyce, K. M. Medveczky, J. G. Oakeshott; Molecular cloning of an α -esterase gene cluster on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster*, *Insect biochem. Molec. Biol*, 26: 235-247, 1996
26. K. Smyth, R. J. Russell, J. G. Oakeshott; A cluster of at least three esterase genes in *Lucilia cuprina* includes Malathion Carboxylesterase and two other esterases implicated in resistance to organophosphates, *Biochemical genetics*, 32: 437-453, 1994
27. L. M. Field, S. P. Foster; Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), *Pest Manag Sci*, 58: 889-894, 2002
28. C. Claudianos, R. J. Russell, J. G. Oakeshott; The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 675-686, 1999
29. P. M. Campbell, J. F. Trott, C. Claudianos, K. Smyth, R. J. Russell, J. G. Oakeshott; Biochemistry of Esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other diptera, *Biochemical Genetics*, 35:17-40, 1997
30. Comparison of esterase gene amplification, gene expression and esterase activity in insecticide susceptible and resistant strains of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal)
31. S. Rooker, T. Guillemaud, J. Berge, N. Pasteur, M. Raymond; Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes, *Heredity*, 77: 555-561, 1996
32. P. M. Campbell, R. D. Newcomb, R. J. Russell, J. G. Oakeshott; Two different amino acid substitutions in the α -esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 139-150, 1998
33. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis; Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition, 1989

