



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Κλωνοποίηση γονιδιακών τύπων του νικοτινικού  
υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του Δάκου της Ελιάς  
(*Bactrocera oleae*), που σχετίζεται με την  
ανθεκτικότητα στο νατουραλίτη-εντομοκτόνο  
spinosad**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΧΑΪΝΟΓΛΟΥ ΕΙΡΗΝΗ**

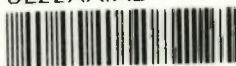
**ΛΑΡΙΣΑ 2008**



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

Αριθ. Εισ.: 6581/1  
Ημερ. Εισ.: 10-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2008  
ΧΑΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087357

**Αφιερωμένη στην οικογένεια μου που με αγαπάει αληθινά και βρίσκεται δίπλα μου  
όποτε τη χρειάζομαι.**

**Την αφιερώνω επίσης σε όλους τους ανθρώπους που με πλήγωσαν και με έκαναν  
πιο δυνατή.**

Το παρακάτω κείμενο είναι αφιερωμένο με πολύ θαυμασμό και εκτίμηση στον καθηγητή μου  
κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για την ευκαιρία που μου έδωσε.

Ο Νίκος Καζαντζάκης υποστηρίζει πως ιδανικός δάσκαλος είναι εκείνος που γίνεται γέφυρα για  
να περάσει αντίπερα ο μαθητής του κι όταν πια του έχει διευκολύνει το πέρασμα, αφήνεται  
χαρούμενα να γκρεμιστεί, ενθαρρύνοντας το μαθητή του να φτιάξει δικές του γέφυρες.

#### **ΓΚΑΙΤΕ**

<< Ό, τι είναι ο νούς και η καρδιά για τον άνθρωπο, είναι και η Ελλάς για την ανθρωπότητα >>

#### **ΛΕΝΙΝ**

<< Μόνον εκείνοι που ξέρουν Ελληνικά, μπορούν να σκέπτονται και να συζητούν σωστά >>

#### **ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΣΟΛΩΜΟΣ**

<< Κλείσε μέσα εις την ψυχήν σου την Ελλάδα και θα αισθανθής να λαχταρίζει μέσα σου  
καθ'είδους μεγαλείον >>

Σα βγείς στον πηγαϊμό για την Ιθάκη,  
να εύχεται να'ναι μακρύς ο δρόμος,  
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.  
Τους Λαιστρυγόνας και τους Κύκλωπας,  
τον θυμωμένο Ποσειδώνα μη φοβάσαι,  
τέτοια στον δρόμο σου ποτέ σου δεν θα βρείς,  
αν μεν' η σκέψις σου υψηλή, αν εκλεκτή  
συγκίνησις το πνεύμα και το σώμα σου αγγίζει.  
Τους Λαιστρυγόνας και τους Κύκλωπας,  
τον άγριο Ποσειδώνα δεν θα συναντήσεις,  
αν δεν τους κουβανείς μες στην ψυχή σου,  
αν η ψυχή σου δεν τους στήνει εμπρός σου.

Να εύχεται να'ναι μακρύς ο δρόμος.  
Πολλά τα καλοκαιρινά πρωΐα να είναι  
που με τι ευχαρίστηση, με τη χαρά  
θα μπαίνεις σε λιμένας πρωτοΐδωμένους·  
να σταματήσεις σ'εμπορεία φοινικικά  
και τες καλές πραγμάτειες ν'αποκτήσεις,  
σεντέφια και κοράλλια, κεχρμπάρια κι έβενους,  
και ηδονικά μυρωδικά κάθε λογής,  
όσο μπορείς πιο άφθονα ηδονικά μυρωδικά  
σε πόλεις Αιγυπτιακές πολλές να πας,  
να μάθεις και να μάθεις απ'τους σπουδασμένους.

Πάντα στον νου σου να'χεις την Ιθάκη.  
Το φθάσιμον εκεί ειν'ο προορισμός σου.  
Αλλά μη βιάζεις το ταξίδι διόλου.  
Καλύτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει·  
και γέρος πια ν'αράξεις στο νησί,  
πλούσιος με όσα κέρδισες στον δρόμο,  
μη προσδοκώντας πλούτη να σε δώσει η Ιθάκη.

Η Ιθάκη σ'έδωσε τ'ώραίο ταξίδι.  
Χωρίς αυτήν δεν θα' βγαινες στον δρόμο.  
Άλλα δεν έχει να σε δώσει πια.  
Κι αν πτωχική την βρείς, η Ιθάκη δεν σε γέλασε.  
Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα,  
ήδη θα το κατάλαβες, οι Ιθάκες τι σημαίνουν.

Κ.Π. ΚΑΒΑΦΗΣ

Το ποίημα πρωτοδημοσιεύτηκε στο περιοδικό Γράμματα του Οκτωβρίου-Νοεμβρίου 1911, όταν ο ποιητής ήταν σαράντα οκτώ ετών. Ανήκει στα διδακτικά ποιήματα του Καβάφη.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας του Κυρίου Ματθιόπουλου Κωνσταντίνου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και με εμπιστεύτηκε, τόσο όσον αφορά την παρουσία μου στο εργαστήριό του όσο και με το θέμα το οποίο μου ανέθεσε να φέρω εις πέρας. Θέλω επίσης να τον ευχαριστήσω για τον αμέριμο χαρακτήρα του, την υπομονή καθώς και την κατανόηση που έδειξε σε προσωπικά ζητήματα.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη Ζήση για την συμβολή του και τον κ. Αυγουστίνο Αντώνη για τις πρακτικές συμβουλές του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Κακάνη Ευδοξία, η οποία έχοντας αποκτήσει ένα εξαιρετικό επίπεδο γνώσεων και εμπειρίας μέσα στο εργαστήριο, έδειξε μεγάλη υπομονή και προθυμία, μεταλαμπαδεύοντας μου πάρα πολλές καινούργιες γνώσεις.

Ευχαριστώ επίσης τους υποψήφιους διδάκτορες Τσουμάνη Κωνσταντίνα και Ζυγουρίδη Νίκο, όπως επίσης και την συμφοιτήτριά μου Κατέχου Κατερίνα, για την βοήθειά τους στην ομαλή εισαγωγή μου στον εργαστηριακό χώρο και τις πρακτικές συμβουλές τους.

Ευχαριστώ και συγγαίρω όσους καθηγητές και καθηγήτριες φάνηκαν σωστοί στις υποχρεώσεις τους απέναντι στους φοιτητές και με προθυμία μετέδωσαν τις γνώσεις τους, και καθένας με τον τρόπο του με βοήθησε να συμπληρώσω την προσωπικότητα μου.

Τέλος ένα ευχαριστώ, αν και σίγουρα είναι πολύ λίγο, στους γονείς μου κυρίως για την οικονομική τους υποστήριξη σε όλη την διάρκεια της φοίτησης μου αλλά και για όλες τις ηθικές αξίες που μου έχουν δώσει και στάθηκαν οι βάσεις για το ξεκίνημά μου σε μια νέα ζωή πριν τέσσερα χρόνια.

Ευχαριστώ και τις “αδελφικές” μου φίλες Στέλλα, Αριάδνη και Κατερίνα που έστω και αν ήταν μακριά μου αυτά τα χρόνια, πάντα μού έδιναν απλόχερα ψυχολογική υποστήριξη που τόσο χρειάστηκα τα τελευταία χρόνια.

### **Τριμελής επιτροπή:**

#### **Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **Μαμούρης Ζήσης**

Καθηγητής Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **Αυγουστίνος Αντώνιος**

Διδάσκων ΠΔ407 του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
1.1. Η ελιά και η σημασία της.....	9
1.2. Ο δάκος της ελιάς ( <i>Bactrocera oleae</i> ) .....	10
1.2.1. Ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς .....	10
1.2.2. Οικονομική σημασία .....	11
1.2.3. Μορφολογία του δάκου.....	12
1.2.4. Κύκλος ζωής του δάκου .....	13
1.2.5. Μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου.....	14
1.3. Εντομοκτόνα και νευρικό σύστημα (χολινεργική σύναψη) .....	16
1.3.1. Τρόποι δράσης εντομοκτόνων .....	16
1.3.2. Ανθεκτικότητα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα .....	18
1.4. Το εντομοκτόνο spinosad .....	20
1.4.1. Δομή, μηχανισμός δράσης και ανθεκτικότητα στο spinosad .....	20
1.4.2. Συμπτώματα προκαλούμενα από το spinosad.....	22
1.4.3. Βιολογικές ιδιότητες του spinosad.....	22
1.5. Σκοπός.....	23
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>24</b>
2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου (fly preps).....	25
2.1.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από το έντομο <i>Bactrocera oleae</i> με χρήση kit .....	26
2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	26
2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	28
2.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).....	30
2.5. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού .....	31
2.5.1. Δημιουργία φορέα με συγκεκριμένα άκρα ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα .....	31
2.6. Αντίδραση σύνδεσης DNA μορίων σε φορέα (Ligation) .....	33
2.7. Παρασκευή <i>E.coli</i> DH5α δεκτικών κυττάρων .....	34
2.8. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.....	36
2.8.1. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο .....	36
2.8.2. Μετασχηματισμός <i>E.coli</i> DH5α δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation).....	36
2.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps).....	38
2.9.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση .....	38
2.9.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps) με χρήση kit.....	39
2.9.3. Δημιουργία αποθέματος (stock) βακτηριακών κυττάρων σε γλυκερόλη και ανάκτηση βακτηριακών κυττάρων.....	40
2.10. Καθαρισμός του DNA.....	40
2.11. Προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA (sequencing).....	41
2.12. Δημιουργία και σήμανση ανιχνευτή.....	41
2.13. Ανάλυση κατά Southern .....	42
2.13.1 Μεταφορά του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης σε νάylon μεμβράνη.....	43
2.13.2 Προϋβριδοποίηση.....	43
2.13.3. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή .....	44
2.13.4. Ανίχνευση σήματος υβριδοποίησης .....	44
2.14. Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων MRA.....	45

2.15. Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε φορέα βακτηριοφάγο λ (Primary screening)	45
2.15.1. Επιμόλυνση των MRA κυττάρων με φάγους	46
2.15.2. Μεταφορά των φαγικών πλακών σε νάιλον μεμβράνη και υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή	46
2.16. Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε φορέα βακτηριοφάγο λ (Secondary screening)	46
2.17. Απομόνωση φαγικού DNA (phage preps)	47
2.17.1. Λύση των MRA κυττάρων και πολλαπλασιασμός του φάγου	47
2.17.2. Απομόνωση DNA	48
2.18. Πρωτόκκολο μερικής πέψης ενζύμων περιορισμού Partial digestion	48
2.18.1. Μεθοδολογία του πρωτοκόλλου partial digestion	49
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>51</b>
3.1. Ενίσχυση γονιδιακών τόπων του Βοα6 γονιδίου του <i>Bactrocera oleae</i>	52
3.1.1 Απομόνωση και καθαρισμός των ενισχυμένων αλληλουχιών και αλληλούχιση τους	53
3.2. Εύρεση γονιδιακών τόπων του Βοα6 από γονιδιωματική βιβλιοθήκη του <i>Bactrocera oleae</i> σε φορέα βακτηριοφάγο λ	55
3.2.1. Διαλογή (screening) του θετικού κλάσματος	56
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>60</b>
4.1. Συζήτηση	61
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>63</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>66</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το έντομο *Bactrocera oleae*, ο κοινός δάκος της ελιάς, θεωρείται ως ένα από τα πλέον βλαβερά έντομα στη γεωργία, δεδομένου ότι προκαλεί τεράστιες καταστροφές στην ελαιοπαραγωγή. Ο έλεγχος του δάκου γίνεται ως επί το πλείστον με χρήση χημικών εντομοκτόνων, ιδιαίτερα οργανοφωσφορικών και, πρόσφατα, πυρεθρινών. Η χρήση χημικών εντομοκτόνων εμπεριέχει πολλούς κινδύνους. Μεταξύ αυτών είναι οικολογικές διαταραχές, η δημιουργία και εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, οι επιβλαβείς τοξικολογικές επιδράσεις, καθώς και βλαβερές συνέπειες στην υγεία του ανθρώπου, είτε αυτός είναι καλλιεργητής είτε καταναλωτής. Ένα νέο εντομοκτόνο της οικογένειας των νατουραλιτών, το spinosad, είναι ιδιαίτερα τοξικό στα έντομα-στόχους ενώ παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλή τοξικότητα προς τα ωφέλιμα έντομα, τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Η τελευταία αυτή ιδιότητα έχει καταστήσει τη χρήση του επιτρεπτή στη βιολογική καλλιέργεια της ελιάς. Η παρατεταμένη χρήση οποιουδήποτε εντομοκτόνου θα οδηγήσει αναπόφευκτα στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Παρά το γεγονός ότι μέχρι τώρα δεν έχει αναφερθεί ανάπτυξη ανθεκτικότητας του δάκου στο spinosad, γίνεται προσπάθεια κατανόησης ενός πιθανού μοριακού μηχανισμού ανθεκτικότητας στο spinosad στο εργαστήριο, ώστε να μπορέσουμε να προβλέψουμε την εξέλιξη της ανθεκτικότητας στη φύση. Για το λόγο αυτό στην παρούσα πτυχιακή έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης του γονιδιακού τόπου της Βο-α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στο βαθμό που ο αντίστοιχος γενετικός τόπος της *Drosophila melanogaster* εμπλέκεται στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στο spinosad του εντόμου αυτού. Η γνώση της αλληλουχίας του γονιδίου αυτού θα επιτρέψει την σύγκριση ανάμεσα σε ανθεκτικά και ευαίσθητα άτομα, με στόχο την αποκάλυψη μεταλλάξεων που συσχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Τέτοιες μεταλλάξεις αφενός θα υποδείξουν σημεία σύνδεσης του spinosad στον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, αφετέρου θα αποτελέσουν και τη βάση της δημιουργίας ενός μοριακού τεστ ανίχνευσης των μεταλλάξεων αυτών σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου. Έτσι, θα μπορούσε να προβλεφθεί έγκαιρα η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad στους φυσικούς πληθυσμούς, πράγμα που θα βοηθούσε στην ορθολογικότερη και αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των καταστροφών της ελαιοκαλλιέργειας από το δάκο αλλά και του προβλήματος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο αυτό.



# **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1. Η ελιά και η σημασία της

Η ελιά και το λάδι είναι άμεσα συνδεδεμένα με την καθημερινή ζωή των Ελλήνων από τα αρχαία χρόνια. Ευρήματα στην Κρήτη και τη Βοιωτία μας δηλώνουν ότι η ελαιοκαλλιέργεια ήταν γνωστή από τον 15<sup>ο</sup> αιώνα π.χ. Μικρές ποσότητες καρπού ελιάς βρέθηκαν μέσα σε αγγεία στα ανάκτορα της Ζάκρου στην Ανατολική Κρήτη. Μέσα σε δεξαμενή νερού βρέθηκαν ελιές, οι οποίες είχαν ακόμη τη σάρκα τους, πράγμα που οφείλεται στις ευνοϊκές συνθήκες διατήρησης (<http://el.wikipedia.org>).

Η ελιά ήταν το σύμβολο της ειρήνης, της ευημερίας και της γονιμότητας. Ήταν τόσο πολύτιμη, ώστε οι νικητές των αρχαίων Ολυμπιακών Αγώνων κέρδιζαν τον κότινο, ένα στεφάνι ελιάς. Ο Ιπποκράτης μιλούσε συνεχώς για τις ευεργετικές ιδιότητες του ελαιόλαδου και οι αρχαίοι Έλληνες άλειψαν το σώμα τους με λάδι ελιάς για περιποίηση και υγεία. Σήμερα οι επιστήμονες τονίζουν τη μεγάλη αξία του λαδιού στη διατροφή μας.

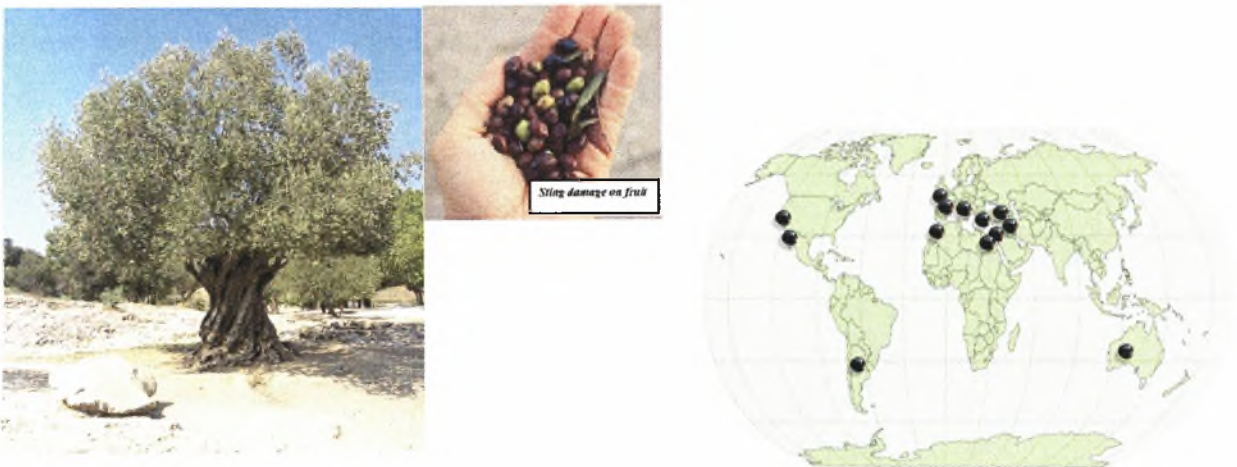


Η ελιά κατέχει την πρώτη θέση στη χώρα μας μεταξύ των δενδρωδών καλλιεργειών ως προς το μέγεθος των εκτάσεων που καταλαμβάνει και ως προς τον αριθμό των καλλιεργούμενων δένδρων. Η εξέχουσα θέση της καλλιέργειας αυτής στην Ελλάδα, οφείλεται στην ύπαρξη ευνοϊκών κλιματικών συνθηκών για την ανάπτυξή της και στη δυνατότητα αξιοποίησης μεγάλων εκτάσεων που θεωρούνται ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες. Η οικονομική σημασία της καλλιέργειας της ελιάς στην Ελλάδα είναι μεγάλη, αφού τα προϊόντα της αποτελούν βασικό στοιχείο διατροφής του πληθυσμού της χώρας και αξιόλογο παράγοντα εξασφάλισης συναλλάγματος από τις εξαγωγές. Το ελαιόδεντρο είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι στη ζωή των ανθρώπων της Μεσογείου. Ο ρόλος του είναι πολυσχιδής: διατροφικός, κοινωνικός, πολιτιστικός, οικονομικός και πολιτικός. Το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές είναι βασικά αγροτικά προϊόντα για τις περισσότερες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και σε πολλές ορεινές περιοχές αποτελούν το μοναδικό γεωργικό έσοδο. Η ελιά εκτός των άλλων παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του περιβάλλοντος, γιατί προσφέρεται για την αξιοποίηση των εδαφών που εξαρτώνται μόνο από βροχοπτώσεις. Σε τέτοιες περιοχές, η εγκατάσταση άλλων καλλιεργειών, εκτός της ελιάς, εκθέτει τα εδάφη στον κίνδυνο των διαβρώσεων, ενώ η ελαιοκαλλιέργεια, σε συγκαλλιέργεια με άλλα είδη, προσφέρεται για τη συντήρηση των προβληματικών αυτών εδαφών (<http://www.elia.org>).

## 1.2. Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*)

### 1.2.1. Ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς

Το έντομο *Bactrocera oleae*, κοινώς δάκος της ελιάς, είναι ο πιο σημαντικός εχθρός της ελιάς. Εμφανίζεται στη λεκάνη της Μεσογείου, τη Βόρεια, ανατολική και νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, Βόρεια Ινδία, βόρειο Πακιστάν και όπου αλλού υπάρχει ελαιόδεντρο στο Ανατολικό ημισφαίριο (Εικόνα 1). Πρόσφατα εντοπίστηκε και στην Καλιφόρνια. Τόσο τα ενήλικα έντομα όσο και οι προνύμφες, είναι σε θέση να προκαλέσουν ζημιές. Η προνύμφη του δάκου αναπτύσσεται και τρέφεται μέσα στον καρπό, καταστρέφοντας το σαρκώδες μέρος του και επιτρέποντας την εισχώρηση δευτερευόντων βακτηρίων και μυκήτων που προκαλούν σήψη στον καρπό και υποβαθμίζουν την ποιότητα και τη γεύση του ελαίου. Η σίτιση του εντόμου από τον καρπό προκαλεί την πρόωρη πτώση του καρπού και υποβαθμίζει την ποιότητα τόσο της επιτραπέζιας ελιάς όσο και την παραγωγή ελαιόλαδου. Το θηλυκό του εισάγει συνήθως στο μεσοκάρπιο της ελιάς τα αυγά όπου η εκκολαπτόμενη προνύμφη ορύσσει στοά και τρέφεται. Επιπλέον, οι οπές ωτοκίας βοηθούν στην εγκατάσταση παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων (π.χ. *Camarosporium dalmaticum*), ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο τις καταστροφικές συνέπειες. Υπολογίζεται ότι η μείωση στην παραγωγή του λαδιού ως συνέπεια του δάκου, μπορεί να φθάσει μέχρι και το 30% της ετήσιας παραγωγής με ανάλογες επιπτώσεις και στη ποιότητα της βρώσιμης ελιάς (<http://lesrosoline.gr>).



Εικόνα 1:α)Το δέντρο της ελιάς β) Καρποί της ελιάς γ) Περιοχές καλλιέργειας της ελιάς

Βασίλειο	Animal
Φύλο	Arthropoda
Υπόφυλο	Hexapoda
Κλάση	Insecta
Τάξη	Diptera
Οικογένεια	Tephritidae
Υποοικογένεια	Dacinae
Φύλη	Dacini
Γένος	Bactrocera
Είδος	Oleae

**Πίνακας 1:** Συστηματική κατάξη του δάκου της ελιάς

### 1.2.2. Οικονομική σημασία

Ο δάκος της ελιάς έχει 3-4 γενεές το έτος στις πιο πολλές περιοχές της χώρας μας. Ανάλογα με την περιοχή, διαχειμάζει ως ενήλικο σε προφυλαγμένες θέσεις ή ως νύμφη στο έδαφος. Όταν ο καρπός πλησιάζει στο τελικό του μέγεθος και γίνεται μαλακός τότε το θηλυκό ανοίγει με τον ωοαποθέτη του την οπή ωοτοκίας και εισάγει στο μεσοκάρπιο το αυγό. Κατά κανόνα εισάγει ένα αυγό ανά καρπό, σε περιπτώσεις όμως πολύ πυκνού πληθυσμού ή λίγων καρπών παρατηρούνται και περισσότερες από μία ωοαποθέσεις ανά καρπό. Η προνύμφη ορύσσει στοά στο μεσοκάρπιο και όταν συμπληρώσει την ανάπτυξη της νυμφώνεται το μεν θέρος συνήθως μέσα στον καρπό, το δε φθινόπωρο και τον χειμώνα στο έδαφος σε μικρό βάθος. Η οπή ωοτοκίας του δάκου βοηθάει τις δευτερογενείς προσβολές από μύκητες. Η προσβολή των ελαιόδεντρων από πληθυσμούς του δάκου μπορεί να προκαλέσει ζημιά τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο, ελαττώνοντας την εμπορευματική αξία της παραγωγής (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Πληγή του επικαρπίου, ως ένδειξη προσβολής του ελαιοκάρπου από ενήλικα άτομα

### 1.2.3. Μορφολογία του δάκου

Η διαφοροποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του διαφέρουν κατά τα διαδοχικά στάδια ανάπτυξής του.



**Αυγό:** Πολύ στενόμακρο, κάπως οξύ στον ένα πόλο, λευκό. Τοποθετείται μέσα στο μεσοκάρπιο του φυτού-ξενιστή και έχει μήκος 0.7mm και διάμετρο 0.2mm. **Προνύμφη:** Υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη, τελικού μήκους 7-8mm, με το πρόσθιο μέρος του σώματος στενότερο από το οπίσθιο. Δεν έχει κεφαλική κάψα και στο πρόσθιο μέρος του σώματος είναι σκοτεινόχρωμα μόνο τα στοματικά άγκιστρα και ο λοιπός κεφαλοφαρυγγικός σκελετός. **Νύμφη:** Ελλειψοειδής, ανοιχτοκάστανη, με περίβλημα το σκληρυμένο δερμάτιο της αναπτυγμένης προνύμφης.

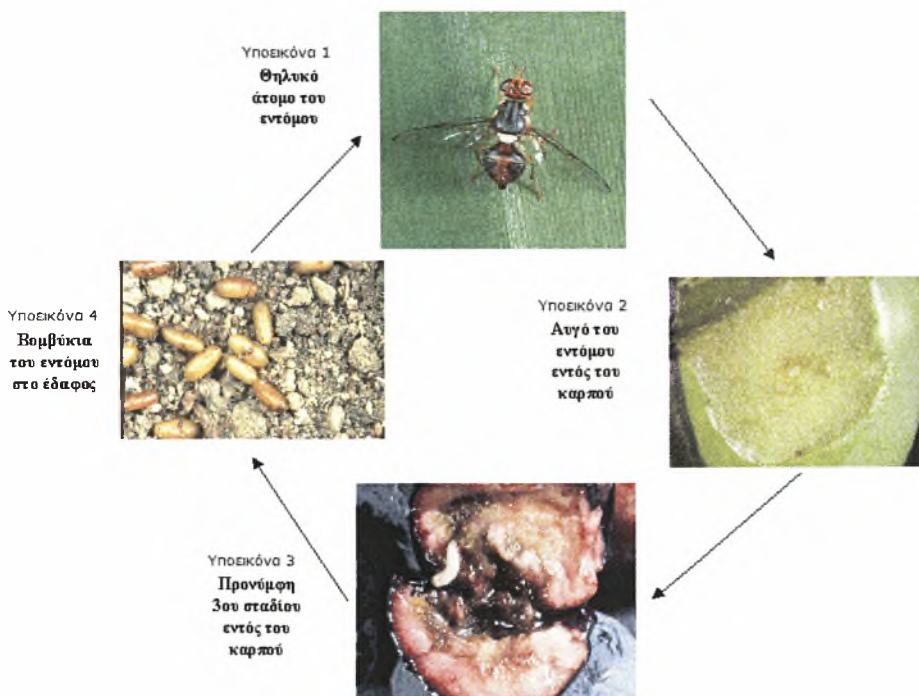
Το ενήλικο έντομο έχει μήκος 4-5mm και γενικό χρωματισμό σκούρο καστανό. Το κεφάλι, ο θώρακας και το υπογάστριο έχουν καφέ χρώμα, με σκουρότερα στίγματα και αρκετά λευκά ή κίτρινα μπαλώματα στην κορυφή και στα πλευρά του θώρακα. Τα φτερά του είναι τοποθετημένα οριζόντια, κυρίως διαφανή, με καφέ στίγματα και μακριά από το σώμα. Ο δάκος διακρίνεται από τα μαύρα στίγματα στις άκρες των φτερών και την απουσία λωρίδων στα φτερά. Τα θηλυκά έχουν μήκος 5 χιλ., άνοιγμα φτερών περίπου 10 χιλ. και διακρίνονται από τα αρσενικά από μια σκούρα σύνθεση στο άκρο του υπογαστρίου τους, που χρησιμεύει για να διατρυπούν τον ελαιόκαρπο και να εναποθέτουν εκεί τα αυγά (Εικόνα 3). Τα πτερύγια είναι διαφανή με ιριδίζουσες αποχρώσεις. Χαρακτηριστική είναι η μαύρη κηλίδα στις άκρες τους, που λειτουργεί ως στοιχείο διαφοροποίησης από τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας που εμφανίζουν σκοτεινές ζώνες ή σχέδια στην επιφάνεια των φτερών τους. Τα πόδια είναι κόκκινο-κίτρινα..



**Εικόνα 3:** α) θηλυκό έντομο με εμφανή ωσθέτη, β) αρσενικό έντομο

#### 1.2.4. Κύκλος ζωής του δάκου

Η διάρκεια της ζωής του εντόμου ποικίλει από ένα ως 6 ή 7 μήνες. Στην περιοχή της Μεσογείου, εμφανίζονται κάθε χρόνο δύο έως πέντε γενιές. Το έντομο περνά το χειμώνα στο κουκούλι, αρκετά εκατοστά κάτω από το έδαφος και το στρώμα των φύλλων. Τα ενήλικα έντομα εμφανίζονται την άνοιξη, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και τη θερμοκρασία. Τα αυγά εναποτίθενται στον ωριμάζοντα καρπό όταν αρχίζουν να σκληραίνουν τα κουκούλια. Τον Ιούλιο τα θηλυκά αρχίζουν να δραστηριοποιούνται και να εναποθέτουν τα αυγά τους στους πιο πρώιμα ώριμους καρπούς (Εικόνα 4). Μέχρι 12 αυγά μπορεί να εναποτίθενται κάθε μέρα, και περίπου 150-400 στη διάρκεια της ζωής του εντόμου. Το θηλυκό διατρύπα τον καρπό με τον ωσθέτη και αφήνει το αυγό κάτω από την επιδερμίδα το οποίο εκκολάπτεται σε 2-3 ημέρες. Οι προνύμφες τρέφονται με τον καρπό, προκαλώντας την πτώση του από το δέντρο. Το καλοκαίρι και ιδιαίτερα το φθινόπωρο, αναπτύσσονται 2-4 γενιές ανάλογα με το κλίμα και τη θερμοκρασία. Η δραστηριότητα του εντόμου συνεχίζεται κανονικά όσο η θερμοκρασία παραμένει στους 20-28°C. Οι υψηλές θερμοκρασίες (άνω των 30°C) και η χαμηλή υγρασία εξάλλου, δε βοηθούν την ανάπτυξη των προνυμφών [Fletcher BS et al.1978].



**Εικόνα 4:** Κύκλος ζωής του δάκου. Υποεικόνα 1: θηλυκό άτομο το οποίο έχει την ικανότητα εναπόθεσης αυγών, υποεικόνα 2: παρουσιάζεται αυγό του εντόμου εντός του καρπού, υποεικόνα 3: προνύμφη 3<sup>ο</sup> σταδίου εντός του καρπού, υποεικόνα 4: βομβύκια του εντόμου στο έδαφος.

### 1.2.5. Μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη μείωση των πληθυσμών του δάκου. Τα χημικά μέτρα (προληπτικά ή θεραπευτικά) είναι μία εκ των μεθόδων. Διάφορα μέτρα αντιμετώπισης όπως οι δολωματικοί ψεκασμοί από το χρώμα και οι αεροψεκασμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν και θεραπευτικά, όπως και οι ψεκασμοί κάλυψης. Ένα άλλο μέτρο είναι ο βιολογικός έλεγχος, αφού ο δάκος προσβάλλεται από πλήθος παρασιτικών σφηκών.

#### **Βιολογική καταπολέμηση**

Η πιο αποτελεσματική βιολογική μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η μαζική παγίδευση των ενήλικων εντόμων με δακοπαγίδες. Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η προσέλκυση του δάκου προς την δακοπαγίδα και η θανάτωσή του σε αυτήν. Ο ψεκασμός του δέντρου απαγορεύεται γιατί υπάρχει κίνδυνος συγκέντρωσης υπολειμμάτων των εντομοκτόνων στον καρπό και το λάδι.

Χρησιμοποιούνται σήμερα στις ελαιοκαλλιέργειες τρεις βιολογικές μέθοδοι με τη χρήση δακοπαγίδων.

#### **1) Δακοπαγίδα που περιέχει κολλητικές ουσίες**

Αυτή η κατηγορία δακοπαγίδων μπορεί να εξουδετερώσει τόσο τους αρσενικούς όσο και τους θηλυκούς δάκους. Πολλές φορές χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μια παρόμοια παγίδα η οποία περιέχει φερομόνες. Ο δάκος προσελκύεται από το κίτρινο ή το πράσινο χρώμα και μηχανικά παγιδεύεται από την κολλητική ουσία ή κολλητική ταινία. Οι δακοπαγίδες αυτές έχουν ως πλεονέκτημα ότι είναι μη τοξικές. Μειονεκτήματα τους είναι το αυξημένο εργατικό κόστος, καθώς κάθε δένδρο χρειάζεται 3 με 4 παγίδες για να είναι αποτελεσματική η μέθοδος και η υψηλή τιμή κάθε δακοπαγίδας.

#### **2) Δακοπαγίδα με φερομόνη/πρωτεΐνη ή/και αμμωνία**

Αυτές είναι παγίδες με φερομόνες οι οποίες προσελκύουν τους δάκους στην παγίδα. Κάποιες παγίδες περιέχουν συνδυασμό του spiroketal, μια φερομόνη ενάντια στα θηλυκά άτομα και αμμωνία σε μορφή πλαστικής αμπούλας ή ασκού έτσι ώστε να προσελκύνονται και τα δύο φύλα. Ένα πλεονέκτημα αυτών των παγίδων σε αντίθεση με την πρώτη κατηγορία είναι ότι κάθε δένδρο χρειάζεται μια δακοπαγίδα. Τα μειονεκτήματα είναι τα ίδια με αυτά της δακοπαγίδας που περιέχει κολλητικές ουσίες.

### 3) Δακοπαγίδα τύπου Mc Phail, η οποία φέρει σαν ελκυστικό υγρό υδρολυμένη πρωτεΐνη 3% ή θειικής αμμωνίας στην ίδια αναλογία

Είναι γυάλινες ή πλαστικές παγίδες με ρεζερβουάρ στο οποίο τοποθετείται σε υγρή μορφή το δόλωμα. Επίσης υπάρχει στον πάτο της παγίδας μια τρύπα η οποία επιτρέπει την είσοδο του εντόμου. Συγκεκριμένα η υδρολυμένη πρωτεΐνη και το διάλυμα αμμωνίας προσελκύουν τα έντομα και επιτρέπουν την αναγνώριση τους. Οι δάκοι που συλλαμβάνονται με αυτή την μέθοδο είναι σε καλύτερη κατάσταση για την χρήση τους σε πειράματα παρά με την δακοπαγίδα που περιέχει κολλητικές ουσίες. Πλεονεκτήματα είναι ότι οι δακοπαγίδες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αρκετό χρονικό διάστημα, είναι αποτελεσματικές έναντι παρασιτικών εντόμων και είναι μη-τοξικές. Τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι αυξημένο εργατικό κόστος και υψηλή τιμή.



Εικόνα 5: α) κίτρινη δακοπαγίδα που περιέχει κολλητικές ουσίες β) Δακοπαγίδα με φερομόνη γ) Δακοπαγίδα τύπου Mc Phail

### Χημική καταπολέμηση

Η χημική καταπολέμηση γίνεται με δύο μεθόδους, την προληπτική και την θεραπευτική.

#### **1) Προληπτική μέθοδος**

Συνεπάγεται την εκτέλεση δολωματικών ψεκασμών (εντομοκτόνο μαζί με ελκυστικό) με σκοπό την προσέλκυση, βρώση του ψεκαστικού μίγματος και θανάτωση των ενηλίκων πριν προλάβουν να ωοτοκήσουν στον ελαιόκαρπο.

#### **2) Θεραπευτική μέθοδος**

Με τη μέθοδο αυτή γίνεται πλήρης κάλυψη της κόμης των δένδρων με υγρό ψεκασμού από εδάφους, με σκοπό να σκοτωθούν όχι μόνο τα ενήλικα αλλά και οι προνύμφες μέσα στον καρπό.

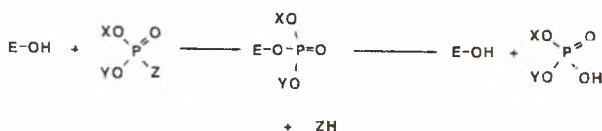


### 1.3. Εντομοκτόνα και νευρικό σύστημα (χολινεργική σύναψη)

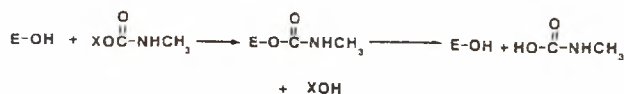
#### 1.3.1. Τρόποι δράσης εντομοκτόνων

Για τον χημικό έλεγχο του δάκου χρησιμοποιούνται διάφορα σκευάσματα δραστικών ουσιών που έχουν ως στόχο κυρίως πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετάδοση σήματος στο νευρικό σύστημα αλλά και αυτές που εμπλέκονται με την κυτταρική αναπνοή είτε την αύξηση και ανάπτυξη του οργανισμού. Συγκεκριμένα σε μια χολινεργική σύναψη κύριοι στόχοι των εντομοκτόνων είναι η ακετυλοχολινεστεράση, ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (νικοτινικός υποδοχέας), τα τασεοξαρτώμενα κανάλια νατρίου και ο υποδοχέας GABA του μετασυναπτικού νευρώνα. Τα εντομοκτόνα που έχουν στόχο την ακετυλοχολινεστεράση είναι τα οργανοφωσφορικά (OPs) και καρβαμιδικά (CB). Τα εντομοκτόνα τα οποία ανήκουν σε αυτές τις δυο κατηγορίες, προσδένονται μη-αντιστρεπτά στην ακετυλοχολινεστεράση και μ' αυτό τον τρόπο προκαλούν παρατεταμένη διέγερση των νευρικών κυττάρων με αποτέλεσμα την παράλυση και τέλος τον θάνατο του εντόμου (Εικόνα 6)

#### Organophosphorus Ester

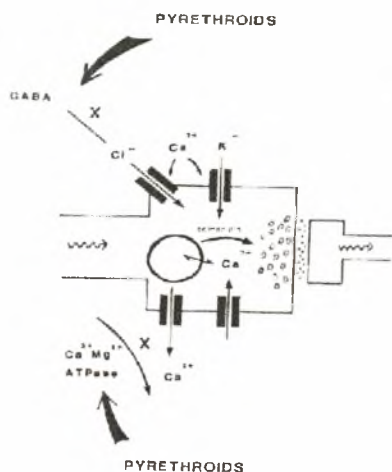


#### Carbamate Ester

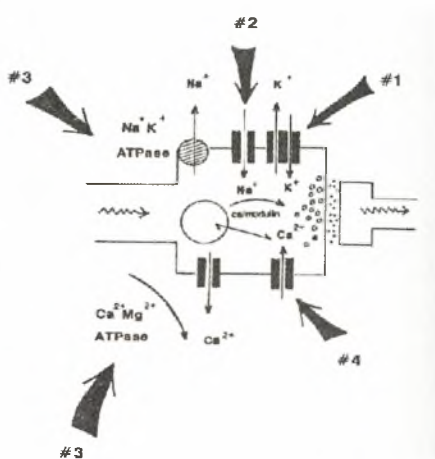


**Εικόνα 6 :** Η αλληλεπίδραση ενός οργανοφωσφορικού ή καρμικού εστέρα με την υδροξυλομάδα της σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση

Στα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια νατρίου του προσυναπτικού κυττάρου δρουν τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα και το DDT. Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα και το DDT επηρεάζουν τα κανάλια νατρίου στις μεμβράνες των νευρώνων, δημιουργώντας επαναλαμβανόμενες (αισθητικές, κινητικές) εκφορτώσεις και παρατεταμένο αρνητικό μεταδυναμικό με αποτέλεσμα το θάνατο του εντόμου από παράλυση (Εικόνες 7 και 8).

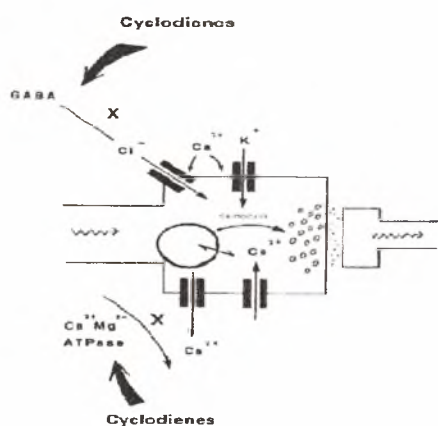


**Εικόνα 7:** Κυτταρικοί μηχανισμοί με τους οποίους οι εστέρες των pyrethroids παρεμβαίνουν στη νευρική λειτουργία



**Εικόνα 8:** Οι μηχανισμοί δράσης του DDT

Τα εντομοκτόνα της κατηγορίας των χλωριούχων κυκλοδιενίων, βενζολίων και κυκλοεξανίων ακολουθούν την επίδραση του χημικού πικροτοξίνη, ενός νευρικού διεγέρτη και ανταγωνιστή του νευροδιαβιβαστή γ-βουτυρικό οξύ που έχει βρεθεί στο νευρικό σύστημα. Η παρεμπόδιση αυτής της δράσης από τα εντομοκτόνα της πικροτοξίνης (picrotoxin), της πικροτοξίνης (picrotoxinin) και των κυκλοδιενίων (cyclodiene) έχει ως αποτέλεσμα την μερική μόνο επαναπόλωση των νευρικών κυττάρων και μια κατάσταση μη-ελεγχόμενης διέγερσης. (εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Μηχανισμοί δράσης των εντομοκτόνων της κατηγορίας των χλωριούχων κυκλοδιενίων, βενζολίων και κυκλοεξανίων

Τα νεονικοτινοειδή και το spinosad είναι μια νέα ομάδα εντομοκτόνων [Kazuhiko Matsuda et al., 2005] (Βιοχημική τοξικολογία, Κουρέτας) (Εικόνα 10).

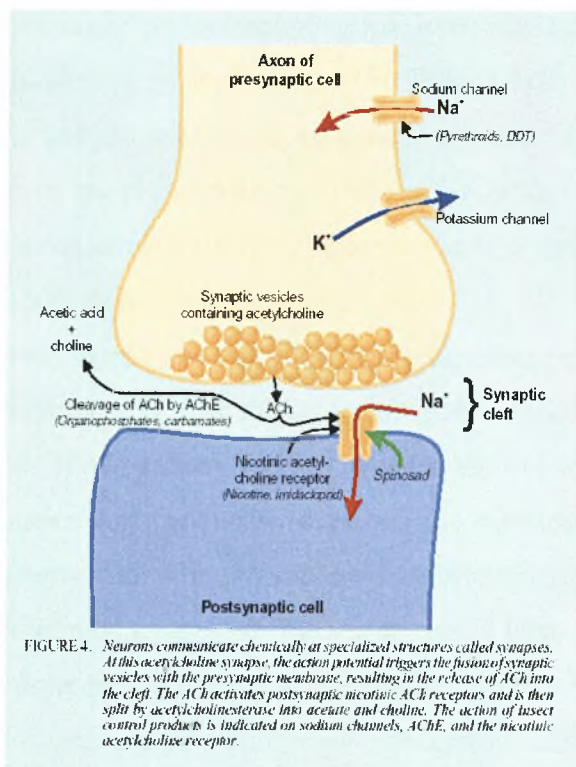


FIGURE 4. Neurons communicate chemically at specialized structures called synapses. At this acetylcholine synapse, the action potential triggers the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane, resulting in the release of ACh into the cleft. The ACh activates postsynaptic nicotinic ACh receptors and is then split by acetylcholinesterase into acetate and choline. The action of insect control products is indicated on sodium channels, AChE, and the nicotinic acetylcholine receptor.

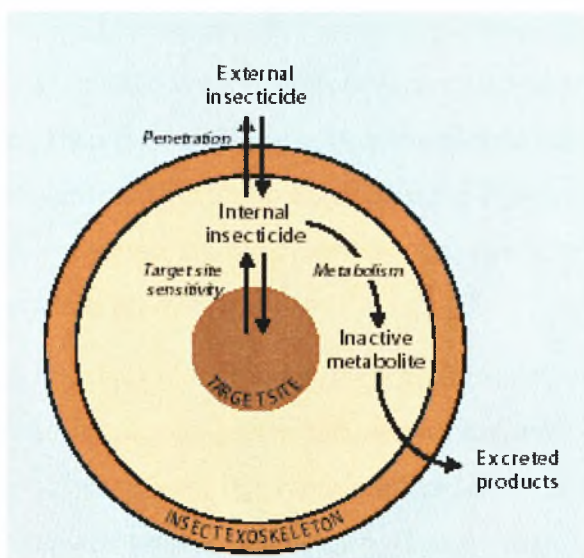
**Εικόνα 10 :** Στόχοι δράσης εντομοκτόνων

### 1.3.2. Ανθεκτικότητα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα

Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται μέσω της επιλογής των ανθεκτικών χαρακτηριστικών τα οποία προϋπάρχουν φυσικά στον πληθυσμό. Αποτελεί ένα φαινόμενο που έχει υιοθετηθεί από πριν και όχι αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης. Όταν ένας πληθυσμός επιβλαβών εντόμων εκτεθούν σε κάποιο εντομοκτόνο, κάποια χαρακτηριστικά καταφέρνουν να επιβιώσουν εξαιτίας ενός ή περισσοτέρων ανθεκτικών ιδιοτήτων που έχουν γενετική προδιάθεση. Μια αναλογία αυτών των σπάνιων χαρακτηριστικών μπορεί να επέλθει έπειτα από την εφαρμογή υψηλών δόσεων εντομοκτόνου. Οι απόγονοι από του επιζώντες θα έχουν την γενετική σύνθεση από τους γονείς και πολλά από αυτά θα κληρονομήσουν τα ανθεκτικά χαρακτηριστικά. Η συμμετοχή των ανθεκτικών χαρακτηριστικών θα γίνεται μεγαλύτερη για κάθε επόμενη γενιά του πληθυσμού και αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα σε μικρό χρονικό διάστημα ολόκληρος ο πληθυσμός των επιβλαβών εντόμων να είναι ικανός να επιβιώσει από την έκθεση στο εντομοκτόνο. Ο ρυθμός ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο είναι συνέπεια μεγάλου αριθμού παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του ρυθμού αναπαραγωγής (ο αριθμός γενεών κάθε χρόνο), της γενετικής μεταβλητότητας και γενετικής ροής στον άγριο πληθυσμό (ύπαρξη και διασπορά εκτός του ανθεκτικού χαρακτηριστικού), της

μετανάστευσης(εισαγωγή ευαίσθητων χαρακτηριστικών) και διαχείρισης στρατηγικών των επιβλαβών εντόμων(ρυθμός, συγχρονισμός και ο αριθμός εφαρμογών του εντομοκτόνου). Εκτός αυτού, τα φαινόμενα της πολλαπλής και διασταυρούμενης ανθεκτικότητας είναι ενδεχόμενος υπεύθυνα για την γρήγορη ανάπτυξη της ανθεκτικότητας. Η πολλαπλή ανθεκτικότητα είναι η ανθεκτικότητα σε παραπάνω από μια κατηγορίες εντομοκτόνων ενώ στην διασταυρούμενης ανθεκτικότητας η ιδιότητα που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα εντομοκτόνο επίσης προσδίδει ανθεκτικότητα και σε άλλα εντομοκτόνα (IRAC). Προς το παρόν, η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι εξαιρετικά διαδεδομένη [Georgiou, 1990].

Γενικά υπάρχουν τρεις πιθανές κατηγορίες ανθεκτικότητας τις οποίες ανέπτυξαν τα έντομα έτσι ώστε να αυξήσουν την ευαισθησία τους στις κύριες κατηγορίες εντομοκτόνων. 1) στη μειωμένη διείσδυση του εντομοκτόνου, 2) στη μείωση της ευαισθησίας της θέσης στόχου, 3) στην ενίσχυση του μεταβολισμού του εντομοκτόνου και 4) στην αποφυγή του εντομοκτόνου (Εικόνα 11). Έχουν παρατηρηθεί τρεις κυρίως μηχανισμοί που οδηγούν στην ανθεκτικότητα από κάποια μετάλλαξη. Πρώτη περίπτωση: η μετάλλαξη σε κάποιο γονίδιο να προκαλεί κάποια δομική αλλαγή στην εκφρασμένη πρωτεΐνη έτσι ώστε να μην μπορεί να προσδεθεί το εντομοκτόνο. Δεύτερη περίπτωση: μια μετάλλαξη ή συνδυασμός μεταλλάξεων να έχει οδηγήσει στην αύξηση αντιγράφων ενός γονιδίου. Τέτοιο γονίδιο μπορεί να κωδικοποιεί ένα ένζυμο το οποίο μεταβολίζει το εντομοκτόνο ως ξενοβιοτική ουσία στον οργανισμό του εντόμου. Τρίτη περίπτωση: η μετάλλαξη να έχει γίνει σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου του ενζύμου που μεταβολίζει το εντομοκτόνο με αποτέλεσμα να υπερπαράγεται το ένζυμο αυτό[Salgado V.L.,1997].

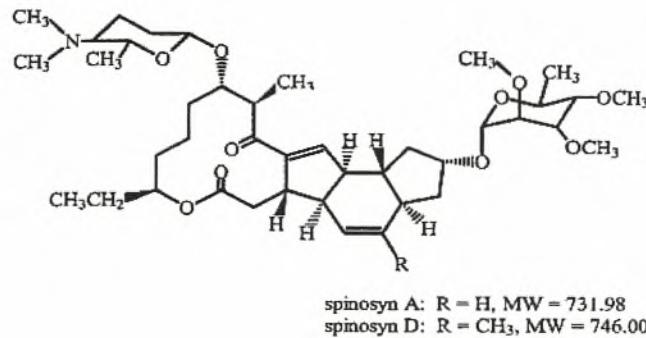


**Εικόνα 11** : Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα [Salgado V.L.,1997].

## 1.4. Το εντομοκτόνο spinosad

### 1.4.1. Δομή, μηχανισμός δράσης και ανθεκτικότητα στο spinosad

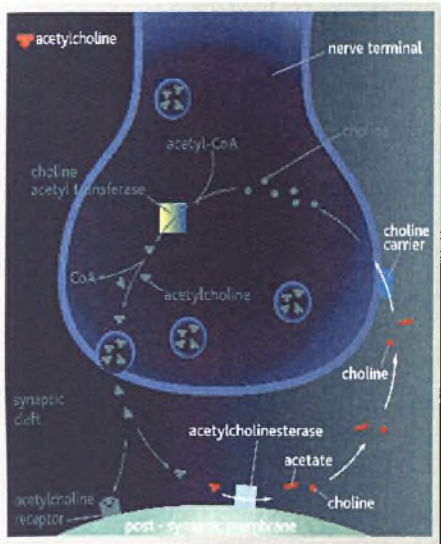
Το spinosad παράγεται από με τη μορφή μεταβολικού προϊόντος από τον ακτινομύκητα του εδάφους *Saccharopolyspora spinosa* (Thompson et al. 1997). Η αποτελεσματικότητά του στηρίζεται στον συνδυασμό δράσης του spinosyn A και spinosyn D (Εικόνα 12).



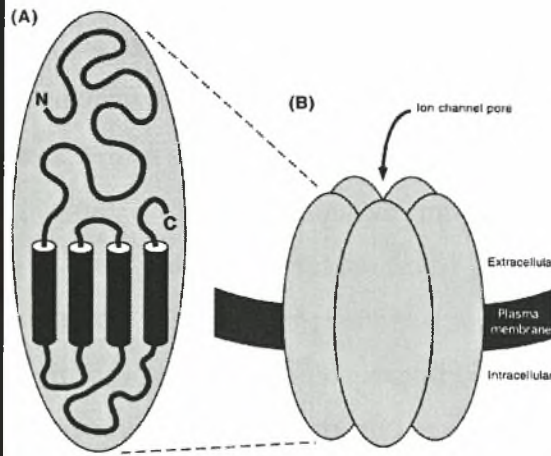
**Εικόνα 12:** Το spinosad είναι το πρώτο ενεργό συστατικό στην κατηγορία των νατουραλτών. Είναι ένα μίγμα spinosyn A και spinosyn D.

Ο νικοτινικός υποδοχέας αποτελείται από πέντε υπομονάδες α και μη-α ανάλογα με το αν διαθέτουν θέση σύνδεσης με την ακετυλοχολίνη ή όχι αντίστοιχα. Τουλάχιστον δυο α υπομονάδες απαιτούνται για την λειτουργία του υποδοχέα και η παρουσία μη-α ή άλλων α υποτύπων αυξάνουν την ποικιλία των φυσιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων του υποδοχέα [Karlin A., 2002; Sattelle DB et al., 2005]. Κάθε υπομονάδα έχει τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (Εικόνα 14) και προσδέτης του υποδοχέα είναι ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη [Scott G. Jeffrey (2008)]. Ο νικοτινικός υποδοχέας είναι ένα κανάλι ροής θετικών ιόντων νατρίου από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του μετασυναπτικού κυττάρου αλλάζοντας το δυναμικό δράσης (γίνεται πιο θετικό, φάση εκπόλωσης) και επάγοντας την ενεργοποίηση του κυττάρου και των μεταβολικών διεργασιών του [Motohiro Tomizawa et al. 2001].

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων, ένας αισθητήριος νευρώνας επικοινωνεί χημικά με έναν κινητήριο νευρώνα διαμέσου εξειδικευμένων χολινεργικών συνάψεων (Εικόνα 13). Σε μια τέτοια σύναψη, το δυναμικό δράσης έχει σαν αποτέλεσμα την έκλυση ακετυλοχολίνης (ACh) από το προσυναπτικό κύτταρο στη συναπτική σχισμή. Η ακετυλοχολίνη ενεργοποιεί το μετασυναπτικό νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και στη συνέχεια διασπάται από την ακετυλοχολινεστεράση σε οξικό οξύ και χολίνη.



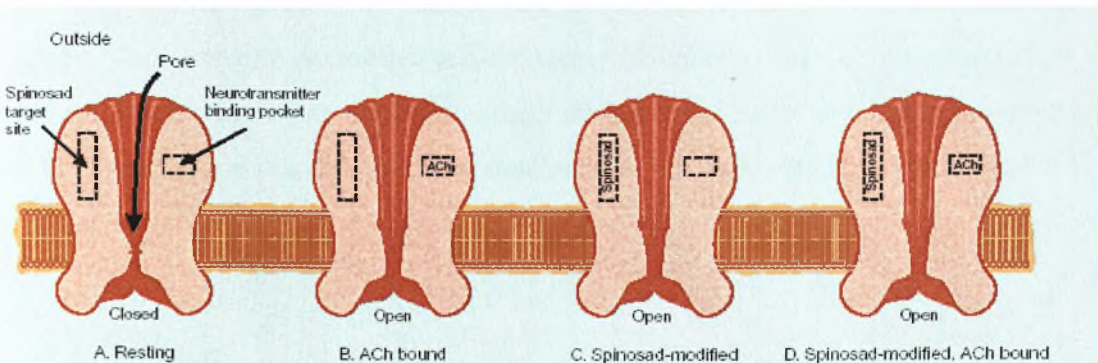
**Εικόνα 13:** Χολινεργική σύναψη



**Εικόνα 14:** Απεικόνιση του νικοτινικού υποδοχέα ο οποίος αποτελείται από 5 υπομονάδες και κάθε μια από αυτές δομείται από 4 διαμεμβρανικές περιοχές.

Το *spinosad* είναι ένα εντομοκτόνο που δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων. Στόχος του νατουραλτή *spinosad* στη *Drosophila melanogaster* είναι ο νικοτινικός υποδοχέας και συγκεκριμένα η Da6 υπομονάδα [Trent Perry et al. 2007]. Σε μια περιοχή αυτής της υπομονάδας πιθανολογείται ότι συνδέεται το *spinosad* και οδηγεί στην ενεργοποίηση του καναλιού.

Η δράση του εντομοκτόνου *spinosad* στο δάκο βασίζεται πιθανόν στην σύνδεσή του στην Βοα6 υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα μιμούμενο την ακετυλοχολίνη χωρίς όμως να συνδέεται απαραίτητα στην ίδια θέση με αυτή αλλά ούτε και σε αυτή τη θέση που συνδέονται τα νεονικοτινοειδή [Salgado VL, 1997; Shono T. et al., 2003]. Πιθανολογείται ότι όταν συνδέεται μόνο η ακετυλοχολίνη ή μόνο το *spinosad* ή και τα δύο μαζί τότε το αποτέλεσμα είναι το ίδιο, δηλαδή το κανάλι ενεργοποιείται (άνοιγμα καναλιού). Όταν ούτε η ακετυλοχολίνη ούτε το *spinosad* δεν συνδέονται με τον υποδοχέα το κανάλι παραμένει απενεργοποιημένο (κλειστό κανάλι) [Salgado 1997; Salgado 1998; Salgado et al. 1998], (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15:** Σε αυτό το σχεδιάγραμμα απεικονίζεται πως το εντομοκτόνο *spinosad* μπορεί να δρα στον νικοτινικό υποδοχέα.

#### 1.4.2. Συμπτώματα προκαλούμενα από το spinosad

Τα έντομα που εκθέτονται στο εντομοκτόνο spinosad, δεν πεθαίνουν ακαριαία καθώς δεν εμφανίζονται νεκρά από την αρχή της έκθεσής τους. Τα συνήθη συμπτώματα που παρατηρούνται είναι α) Παράλυση: Τα έντομα γίνονται άτονα και ανίκανα να κινηθούν καθώς επίσης δεν συσπώνται ούτε έχουν σπασμούς όπως συχνά παρατηρείται με τη χρήση συνθετικών εντομοκτόνων.2) Σταματούν να τρέφονται: Τα έντομα μπορεί να μην πεθαίνουν αμέσως αλλά σταματούν να καταστρέφουν το φυτό καθώς παύουν να τρέφονται.3) Τα έντομα σέρνονται και δεν έχουν σταθερό βάδισμα: Τα έντομα από την αρχή έκθεσής τους στο spinosad παρατηρείται ότι είναι ανίκανα να κινηθούν.4) Ευπαθές τρεμούλιασμα: Τα έντομα εμφανίζουν αδύναμους σπασμούς και 5) Δεν υπάρχει ανάκαμψη: Καθώς ξεκινούν τα συμπτώματα, τα έντομα-παράσιτα δεν ανακάμπτουν. [Bret et al., 1997; Salgado, 1998]

#### 1.4.3. Βιολογικές ιδιότητες του spinosad

Το Spinosad είναι νέο και φιλικό προς το περιβάλλον εντομοκτόνο και μπορεί σύντομα να γίνει μια ευρέως αποδεκτή εναλλακτική λύση στους ψεκασμούς με τα συμβατικά εντομοκτόνα, που χρησιμοποιούνται σήμερα, για την αντιμετώπιση των παρασίτων εντόμων, όπως η μύγα μεσογείου και ο δάκος. Όταν εφαρμόζεται στα συνιστώμενα ποσοστά, δημιουργεί σημαντικά μικρότερο κίνδυνο, από τα περισσότερα εντομοκτόνα, στα θηλαστικά, τα πουλιά, τα ψάρια, και τα ωφέλιμα έντομα. Το Spinosad έχει εγκριθεί ήδη για τη χρήση σε περισσότερες από 100 καλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένων των μήλων, των εσπεριδοειδών, της μελιτζάνας, της ντομάτας, του βαμβακιού και στη βιολογική καλλιέργεια της ελιάς. Εκτός από τη διάδοση στην επιφάνεια των φύλλων κατά την εφαρμογή, διαπερνά επίσης τον ιστό αυτών, μέσω της διαελασματικής κίνησης των υπονομευτών καθώς αυτοί τρέφονται. Ενώ το Spinosad αντιμετωπίζει τους υπονομευτές και τις κάμπιες στο εσωτερικό των φύλλων, επιδρά παράλληλα και στα σκουλήκια-παράσιτα και στους θρίπες στην εξωτερική επιφάνεια των φύλλων. Το Spinosad, το ενεργό συστατικό, είναι διαλυτό στο κερί της επιφάνειας των φύλλων, η οποία του επιτρέπει να κινηθεί πέρα και γύρω από την επιφάνεια αυτών. Αντίθετα από οποιαδήποτε άλλη κατηγορία προϊόντων ελέγχου εντόμων, ο μοναδικός τρόπος δράσης του και η ιδιαίτερα εκλεκτική δραστηριότητα του, παρέχουν σημαντική αποτελεσματικότητα χωρίς να περιορίζονται τα ωφέλιμα για την καλλιέργεια έντομα [Bret B.L., et al., (1997)]

## 1.5. Σκοπός

Η εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων για την αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς προκαλεί την επιλογή ατόμων που είναι ανθεκτικά, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες. Το spinosad, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των νατουραλτών και έχει ως πιθανό στόχο μια περιοχή της Βοαβ υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα. Η παρατεταμένη του χρήση όμως προβλέπεται στο μέλλον να δημιουργήσει, αναπόφευκτα προβλήματα ανθεκτικότητας. Η εμφάνιση μεταλλάξεων σε συγκεκριμένη περιοχή του Βοαβ γονιδίου θα οδηγήσει στην επιβίωση λιγιστών εντόμων τα οποία θα εμφανίζουν μεγάλα επίπεδα ανθεκτικότητας.

Μια μικρή μετάλλαξη στον νικοτινικό υποδοχέα (nAChR) του γονιδίου Da6 στην *Drosophila melanogaster* προκαλεί ανθεκτικότητα του εντόμου στο spinosad. Αυτή η μελέτη του μηχανισμού ανθεκτικότητας στο spinosad δείχνει ότι ο κύριος στόχος του εντομοκτόνου στην *Drosophila melanogaster* είναι το Da6 γονίδιο (Trent Perry et al. 2007).

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό την κλωνοποίηση του γονιδιακού τόπου της Βοαβ υπομονάδας, του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, χρησιμοποιώντας στοιχεία από το συγγενικό έντομο *Drosophila melanogaster*. Σχεδιάστηκαν εκκινητές σύμφωνα με την γονιδιακή αλληλουχία του Da6 γονιδίου της *Drosophila melanogaster* με σκοπό την ενίσχυση γονιδιακών τόπων της Βοαβ υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera oleae*.

Η εύρεση της Βοαβ υπομονάδας έχει ως απώτερο στόχο, αφενός την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού ανάπτυξης της ανθεκτικότητας και αφετέρου την αποκάλυψη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, μέσω της σύγκρισης αλληλουχιών DNA του τόπου αυτού (nAChR) σε ανθεκτικά και ευαίσθητα άτομα. Γνωρίζοντας αυτές τις μεταλλάξεις εύκολα μπορεί να χαρακτηριστεί η θέση σύνδεσης του spinosad στον νικοτινικό υποδοχέα και παράλληλα θα δοθεί η δυνατότητα δημιουργίας ενός μοριακού τέστ ανίχνευσης των μεταλλάξεων αυτών σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου.

Έτσι θα μπορούσε να προβλεφθεί έγκαιρα η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad στους φυσικούς πληθυσμούς, πράγμα που θα βοηθούσε στην ορθολογικότερη και αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των καταστροφών της ελαιοκαλλιέργειας από το δάκο αλλά και του προβλήματος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο αυτό.



## **2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου (fly preps)

### Υλικά

- Ενήλικο άτομο *Bactrocera oleae*
- Διάλυμα ομογενοποίησης (100mM NaCl, 200mM σουκρόζη, 100mM Tris pH 7.4, 50mM EDTA, 0.5% SDS)
- 8M οξικό κάλιο(CH<sub>3</sub>COOK)
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- 2.31M οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa, τελική συγκέντρωση 0.3M)
- 100% αιθανόλη
- Γλυκογόνο
- 70% αιθανόλη
- Διάλυμα επαναδιάλυσης TE-RNase (TE: 1mM EDTA pH= 8.0, 10mM Tris-HCl pH= 8.0, TE-RNase: 20μg RNase σε 1ml TE)

### Πειραματική διαδικασία

- 1) Σε erpendorf που περιέχει το έντομο εισάγονται 50μl δ/μα ομογενοποίησης και ακολουθεί ομογενοποίηση με χρήση εμβόλου
- 2) Το έμβολο ξεπλένεται με άλλα 50μl δ/τος ομογενοποίησης και φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα(quick spin) σε 14.000rpm
- 3) Το δείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά στους 65°C και στην συνέχεια προστίθενται 15μl οξικού καλίου, ενώ το erpendorf είναι ακόμη ζεστό. Ακολουθεί ανάδευση με ελαφρό χτύπημα.
- 4) Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά σε 14.000rpm.
- 5) Το υπερκείμενο(πάνω φάση) μεταφέρεται σε νέο erpendorf και εισάγονται επιπλέον 200μl H<sub>2</sub>O και 300μl φαινόλη (V<sub>TEλ</sub>=300μl). Ακολουθεί καλή ανακίνηση των δειγμάτων
- 6) Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 14.000rpm και μεταφέρεται η υπερκείμενη φάση σε νέο erpendorf(~260μl).
- 7) Εισάγονται 130μl φαινόλης και 130μl χλωροφορμίου. Καλή ανακίνηση των δειγμάτων
- 8) Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 14.000rpm και μεταφέρεται η υπερκείμενη φάση σε νέο erpendorf(~250μl)
- 9) Εισάγονται 250μl χλωροφορμίου. Καλή ανακίνηση των δειγμάτων
- 10) Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση του δείγματος για 5 λεπτά σε 14.000rpm και μεταφέρεται η υπερκείμενη φάση σε νέο erpendorf(~230μl)
- 11) Εισάγονται 2-2.5V αιθανόλης 100%(575μl), 30μl οξικό νάτριο και 0.5μl γλυκογόνο.
- 12) Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C για 15 λεπτά
- 13) Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 14.000rpm
- 14) Αφαιρείται το υπερκείμενο ενώ το DNA είναι σε ίζημα στον πάτο του erpendorf και προστίθενται 0,5V αιθανόλης 70%(115μl)
- 15) Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 14.000rpm
- 16) Αφαιρείται το υπερκείμενο και αφήνεται το DNA να στεγνώσει
- 17) Επαναδιάλυση του DNA σε 50μl TE-RNase και καλό vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- 18) Το DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C ή στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα

## 2.1.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από το έντομο *Bactrocera oleae* με χρήση kit

( kit: Wizard ® Genomic DNA Purification kit της promega )

### Υλικά

- **Nuclei Lysis Solution**
- **DNA Rehydration Solution**
- **Protein Precipitation Solution**
- **Ισοπροπανόλη**

### Πειραματική διαδικασία

- 1) Προσθήκη 200μl Nuclei Lysis Solution σε eppendorf που περιέχει το άτομο δάκου και ομογενοποίηση
- 2) Προσθήκη ξανά 200μl Nuclei Lysis Solution ξεπλένοντας το έμβολο και επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 25 λεπτά.
- 3) Προσθήκη 135μl Protein Precipitation Solution και ισχυρή ανάδευση για 20sec. Τοποθέτηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στον πάγο.
- 4) Φυγοκέντριση για 4 λεπτά σε 14.000rpm. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf
- 5) Προσθήκη 400μl ισοπροπανόλης και ανάδευση (3-5 φορές) των δειγμάτων.
- 6) Φυγοκέντριση για 1 λεπτό σε 14.000rpm και απόχυση του υπερκείμενου.
- 7) Προσθήκη 500μl 70% αιθανόλης και ανάδευση. Έπειτα φυγοκέντριση για 1 λεπτό, 14.000rpm. Συλλέγεται το ίζημα και αφήνεται να στεγνώσει
- 8) Προσθήκη 100μl DNA Rehydration Solution και επωάζονται τα δείγματα στους 65°C για 1 ώρα.

## 2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### Υλικά

- **DNA** (C τελικό: 50ng, όμως για πλασμιδιακό DNA C τελικό: 5ng)
- **Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης** [C τελικό: 1X (buffer)]
- **Διάλυμα MgCl<sub>2</sub>** (C τελικό: 1.5mM)
- **dNTPs** (C τελικό: 0.200mM το καθένα)
- **Ζευγάρι εκκινητών** (C τελικό: 0.4-0.8μM)
- **Taq πολυμεράση** (5U/μl)
- **ddH<sub>2</sub>O**

Τελικός όγκος αντίδρασης 15μl

## Πειραματική διαδικασία

Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR. Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA.



Ο εφευρέτης της μεθόδου (Kary Mullis) τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ή PCR – polymerase chain reaction) είναι μία τεχνική βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως η *E. coli* ή οι ζύμες). Η Taq πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι βακτηριακής προέλευσης αφού απομονώνεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, γεγονός που της προσδίδει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα DNA θραύσματα μπορούν να κλωνοποιηθούν σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (απουσία ζωντανών κυττάρων) με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή DNA θραύσματος) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του DNA θραύσματος που πρόκειται να ενισχυθεί. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension).

## Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

<u>Σταδια PCR</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Διάρκεια</u>	<u>Κύκλος</u>
Αποδιάταξη αρχικού DNA	94 °C	4min	1
Αποδιάταξη DNA	94 °C	30sec	30
Υβριδισμός εκκινητών	*	30sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων	72 °C	**	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C	7min	1

\*Υπολογισμός του  $T_a$ : Η θερμοκρασία επαναδιάταξης  $T_a$  των εκκινητών είναι κατά κανόνα 5-10°C χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξεως τους  $T_m$ . Εφόσον μετρηθούν οι βάσεις A και T από τον εκκινητή αθροίζονται και το άθροισμα πολλαπλασιάζεται με το 2,  $(A+T)*2=X$ . Ομοίως αθροίζονται οι βάσεις G και C από τον εκκινητή και το άθροισμα πολλαπλασιάζεται με το 4,  $(G+C)*4=Ψ$ . Το άθροισμα των αριθμών X και Ψ αποτελεί το  $T_m$  και αφαιρώντας 5°C προκύπτει το  $T_a$ ,  $(X+Ψ)- 5°C=T_a$ .

\*\* Η διάρκεια πολυμερισμού των αλυσίδων DNA εξαρτάται από το μέγεθος του DNA προϊόντος που αναμένουμε να ενισχυθεί. Όσο μεγαλύτερο είναι το τμήμα τόσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται το στάδιο.

## 2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

### Υλικά

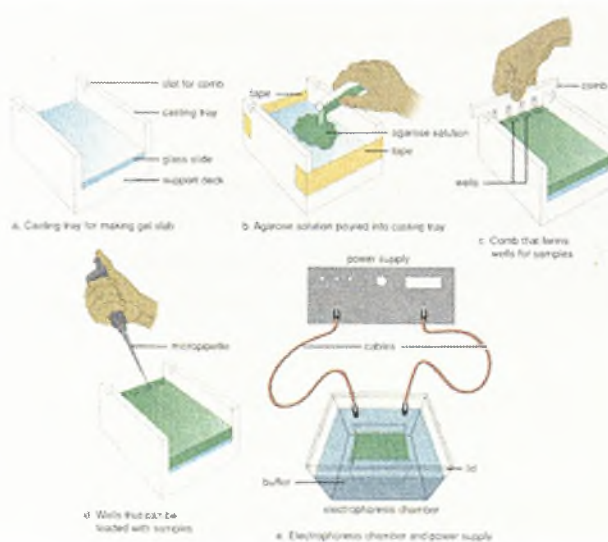
- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 5X (54gr Tris base, 27.5gr boric acid, 20ml 0.5M EDTA pH 8.0 για 1 λίτρο TBE 5X)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)
- Δείγματα DNA
- Διάλυμα φόρτωσης με χρωστική (Loading Buffer 10X: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικόλη σε νερό : 1μl ανά 10μl δείγματος)
- Μάρτυρας (Fermentas #SMO331)

## Πειραματική διαδικασία

Για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση (προσδιορισμός μεγέθους) και τον καθορισμό τμημάτων DNA χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροκινητική ικανότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: 1. Το μέγεθος του DNA, 2) Τη συγκέντρωση της αγαρόζης, 3) Την στερεοδιάταξη του DNA και 4) Την ένταση του ρεύματος.

### Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1% (gel)

- 1) Για την παρασκευή 150ml πηκτώματος, σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 150ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X με 1.5gr σκόνη αγαρόζης
- 2) Το διάλυμα θερμαίνεται με διαδοχικές ανακινήσεις μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη και γίνει διαυγές
- 3) Εφόσον κρυώσει λίγο το διάλυμα προστίθενται 3.5ml βρωμιούχου αιθιδίου
- 4) Το διάλυμα αγαρόζης μεταφέρεται σε στεγανοποιημένη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχει τοποθετηθεί το κατάλληλο "χτενάκι" και αφήνεται για περίπου 25min να στερεοποιηθεί
- 5) Όταν η αγαρόζη έχει πήξει εντελώς αφαιρείται το χτενάκι και το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- 6) Προετοιμάζονται τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν με την προσθήκη Loading Buffer (1μl ανά 10μl δείγματος). Το Loading Buffer περιέχει μια μπλέ χρωστική (μπλέ της βρωμοφαινόλης και/ή κυανούν της ξυλόλης) που φέρει αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα η κατευθυνση μετακίνησης του να είναι προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου όπως και του DNA. Με αυτόν τον τρόπο είναι εύκολη η παρατήρηση των δειγμάτων κατά την διαδικασία. Η ποσότητα που μπορούμε να φορτώσουμε εξαρτάται από το μέγεθος των δοντιών της χτένας, στην περίπτωση μας είναι 25μl.
- 7) Μετα το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτίθεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να γίνει ορατός ο διαχωρισμός των ζωνών του DNA.



## 2.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

### Υλικά

( kit: Wizard ® SV Gel and PCR Clean-up system της promega )

- **Δείγμα** (τμήμα του gel αγαρόζης το οποίο περιέχει το επιθυμητό DNA )
- **Membrane Binding Solution** (για κάθε 10mg αντιστοιχούν 10μl MBS)
- **Membrane wash Solution** (95% ethanol)
- **Nuclease – Free water** ( προθερμαίνεται στους 65°C)

### Πειραματική διαδικασία

Εφόσον απομονωθούν από το gel αγαρόζης οι επιθυμητές ζώνες του DNA, τοποθετούνται σε σωληνάκια erpendorfs.

- 1) Ζυγίζονται τα σωληνάκια erpendorfs τα οποία περιέχουν τις μπάντες DNA, καθώς επίσης και ένα κενό erpendorf. Αφαιρούνται τα γραμμάρια από κάθε erpendorf που περιέχει μπάντα από τα γραμμάρια του κενού erpendorf. Τα τμήματα αυτά δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 350mg.
- 2) Προσθήκη 200μl (για 0.200gr) Membrane Binding Solution και τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο (50-65°C) για 10 λεπτά. Στα 5 λεπτά βγαίνουν από το υδατόλουτρο τα δείγματα και ανάδευση για λίγα δευτερόλεπτα.
- 3) Μεταφορά με πιπέτα του περιεχομένου των erpendorfs σε collection tubes και αφήνονται τα δείγματα για 1.5 λεπτό
- 4) Φυγοκέντριση για 1.5 λεπτό σε 14.000rpm
- 5) Αφαίρεση του υγρού ενώ το DNA παραμένει στο φίλτρο και πλύσιμο του φίλτρου με 700μl Membrane wash Solution (95% ethanol)
- 6) Φυγοκέντριση για 1.5 λεπτό σε 14.000rpm
- 7) Αφαίρεση του υγρού ενώ το DNA παραμένει στο φίλτρο και πλύσιμο του φίλτρου με άλλα 500μl Membrane wash Solution (95% ethanol)
- 8) Φυγοκέντριση για 1.5 λεπτό σε 14.000rpm
- 9) Αφαίρεση του υγρού και τοποθέτηση των tubes για φυγοκέντριση για 2 λεπτά σε 14.000rpm με ανοιχτό το καπάκι της φυγόκεντρου(σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται η αιθανόλη) και τοποθετείται το φίλτρο από κάθε δείγμα σε νέο erpendorf
- 10) Πλύση με 20μl Nuclease – Free water(65°C) και αφήνονται τα δείγματα για 2 λεπτά
- 11) Φυγοκέντριση για 2 λεπτά σε 14.000rpm
- 12) Πλύση με άλλα 20μl Nuclease – Free water (65°C) και αφήνονται τα δείγματα για 2 λεπτά.
- 13) Φυγοκέντριση για 2 λεπτά σε 14.000rpm
- 14) Στα erpendorfs υπάρχει το DNA σε 40μl(απόρριψη των φίλτρων)
- 15) Διατήρηση των δειγμάτων στους 4°C

Ακολουθεί ποσοτικοποίηση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA που περιέχεται στο τελικό διάλυμα των 40μl.

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις που απομονώνουμε ένα ενισχυμένο προϊόν PCR ή μια μπάντα που προκύπτει από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, έτσι ώστε να μπορέσουμε να την κλωνοποιήσουμε σε φορέα.

## 2.5. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

### Υλικά

- Δείγμα DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X buffer)
- Περιοριστικό ένζυμο/α
- ddH<sub>2</sub>O

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και πέπτουν το DNA με επαναλήψιμο τρόπο, δηλαδή πάντοτε στο ίδιο σημείο. Αποτελούν ιδανικά αντιδραστήρια για την κλωνοποίηση και χαρτογράφηση του DNA, αφού κάθε αναγνωριζόμενη αλληλουχία (θέση περιορισμού) επέχει θέση ορόσημου πάνω στο DNA. Απομονώνονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η προστασία του βακτηρίου από ιούς. Τα ένζυμα αυτά πέπτουν το ξένο DNA, ενώ το DNA των βακτηρίων προστατεύεται λόγω της μεθυλίωσης που υφίσταται από τα ίδια τα ένζυμα περιορισμού (τύπου I, III) ή από ειδικές μεθυλάσες. Τα περισσότερα από τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες 4 έως 8 βάσεων και υδρολύουν έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής. Ανάλογα με τον τρόπο πέψης δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα.

### Πειραματική διαδικασία

- 1) Σε eppendorf τοποθετείται το δείγμα DNA και έπειτα προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου (Buffer) σε τελική συγκέντρωση 1X, το ddH<sub>2</sub>O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης και τελευταίο το ένζυμο/α (1 unit ενζύμου πέπτει 1μg λDNA). Κατά την προετοιμασία της διαδικασίας όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να διατηρούνται στον πάγο.
- 2) Το δείγμα επωάζεται για 1 ώρα στην θερμοκρασία που είναι κατάλληλη για την δράση του κάθε ενζύμου. Για την πέψη φαγικού DNA απαιτείται η προσθήκη BSA 1X και η διάρκεια της είναι 4 ώρες.

### 2.5.1. Δημιουργία φορέα με συγκεκριμένα άκρα ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από τις πέψεις με διάφορα περιοριστικά ένζυμα πρέπει να κλωνοποιηθούν σε φορείς (πλασμίδια) οι οποίοι έχουν κοπεί και αυτοί με τα αντίστοιχα ένζυμα.. Υπάρχει και η περίπτωση που ο φορέας θέλουμε να έχει άκρα από το ίδιο περιοριστικό ένζυμο. Σε αυτή την περίπτωση γίνεται προσθήκη αλκαλικής φωσφατάσης έτσι ώστε να μην ξανακυκλοποιηθεί το πλασμίδιο.



1) Πέψη του φορέα με τα ένζυμα εκείνα που δημιουργούν τα επιθυμητά άκρα . Π.χ. για να δημιουργηθεί ένας φορέας με άκρα *EcoRI* και *SacI*, θα πρέπει να υποστεί πέψη με τα ένζυμα αυτά.

2) Αφήνεται η πέψη στους 37°C για 12-16 ώρες.

3) Η πέψη ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώνεται η επιθυμητή ζώνη του φορέα και ακολουθεί ανάκτηση του DNA από το πήκτωμα. Επαναδιάλυση σε 50μl Nuclease – Free water.

4) Φυλάσσεται στους -20°C

#### Δημιουργία φορέα με άκρα θυμίνης (T) σε pBluescript

1) Πέψη του φορέα με το ένζυμο *EcoRV*, το οποίο πέμπει μόνο μία φορά το πολυσυνδέτη του φορέα και δημιουργεί τυφλά άκρα.

2) Αφήνεται η πέψη στους 37°C για 3 ώρες

3) Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλες/χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση και επαναδιάλυση σε 20μl H<sub>2</sub>O

4) Έπειτα πραγματοποιείται αντίδραση προσθήκης T- άκρων,

DNA	20μl
Buffer 10X	5μl
Διάλυμα MgCl <sub>2</sub>	3μl
dTTPs	1μl
Taq DNA πολυμεράση	0.5μl
ddH <sub>2</sub> O	<u>20.5μl</u>
Final V	50μl

5) Αφήνεται αυστηρά για 2.5 ώρες στους 72°C

6) Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλες/χλωροφόρμιο, κατακρίμνιση επαναδιάλυση σε 50μl H<sub>2</sub>O και ποσοτικοποίηση.

## 2.6. Αντίδραση σύνδεσης DNA μορίων σε φορέα (Ligation)

### Υλικά

- Δείγμα DNA (PCR προϊόν ή προϊόν πέψης)
- Φορέας (pBluescript ή pUC 19)
- Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης ( T4 Buffer 10X, τελική συγκέντρωση 1X)
- Ένζυμο T4 DNA λιγάση
- ddH<sub>2</sub>O
- Αιθανόλη 100% και 70%
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa 2.31M, τελική συγκέντρωση 0.3M)
- Γλυκογόνο (20mg/ml)

### Πειραματική διαδικασία

Προτού ξεκινήσει η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται κατακρήμνιση του φορέα με το δείγμα DNA και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο, έτσι ώστε να επιτύχουμε καλύτερη απόδοση.

- 1) Προσθήκη 50ng φορέα pBluescript ή pUC 19 (πλασμίδιο) της κατάλληλης ποσότητας ενθέματος (σύμφωνα με τον τύπο 1) και 150μl ddH<sub>2</sub>O
- 2) Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA(βλ. §2.1)
- 3) Επαναδιάλυση σε 8μl ddH<sub>2</sub>O
- 4) Ακολουθεί καλή ανάδευση και μεταφορά των 8μl σε σωληνάκι erpendorf με λεπτά τοιχώματα(αυτά που χρησιμοποιούνται στην PCR).
- 5) Κάθε δείγμα περιέχει τις παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων,

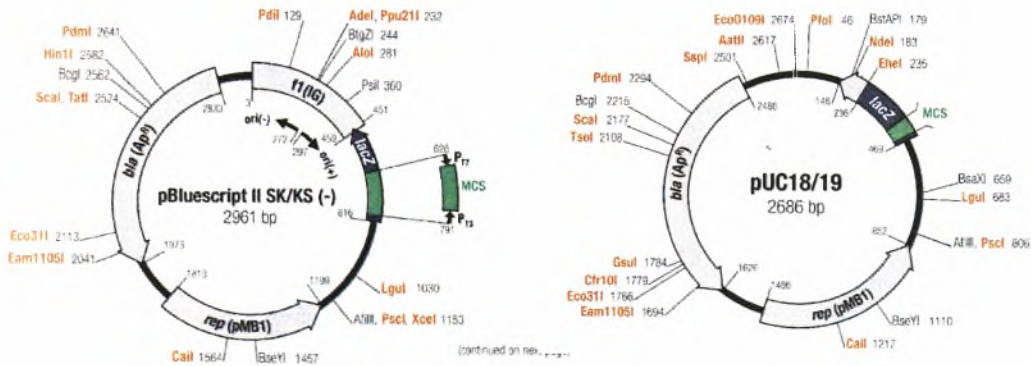
DNA	}	8μl
Φορέας (pBluescript ή pUC 19 )		
T4 Buffer 10X		1μl
T4 DNA λιγάση		1μl
ddH <sub>2</sub> O		-
Final V		10μl

- 14) Τα δείγματα επωάζονται για 2.5 ώρες, στους 22°C

Ανάλογα με τα άκρα του ενθέματος DNA , χρησιμοποιείται και ο κατάλληλος φορέας. Στην παρούσα πειραματική εργασία για την κλωνοποίηση προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκε ο φορέας-πλασμίδιο pBluescript, διότι ο φορέας αυτός έχει άκρα επαναλαμβανόμενων θυμινών (T). Η Ταq πολυμεράση στο τέλος της ενίσχυσης του κομματιού προσθέτει αδενίνες (A) και κατά αυτόν τον

τρόπο υπάρχουν συμπληρωματικά άκρα ενθέματος και φορέα τα οποία συνδέονται με την T4 DNA λιγάση. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν φορείς με άκρα τα οποία αντιστοιχούν σε κοπή με συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα και χρησιμοποιούνται όταν το ένθεμα προέρχεται από πέψη (οι θέσεις στις οποίες μπορούν να κόψουν τα περιοριστικά ένζυμα στους συγκεκριμένους φορείς απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα). Η αναλογία του ενθέματος ως προς τον φορέα θα πρέπει να είναι από 3:1 έως 8:1. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο(τύπος 1),

$$\text{ng insert} = (\text{ng φορέα} \times \text{kb ενθέματος} / \text{kb φορέα}) \times \text{αναλογία ενθέματος/φορέα} \quad (\text{τύπος 1})$$



## 2.7. Παρασκευή E.coli DH5α δεκτικών κυττάρων

### Υλικά

- stock *E.coli* DH5α (χρήση για electroporation)
- Θρεπτικό υλικό LB Broth( 15gr στο 1 λίτρο. Σύσταση : Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr και NaCl 5gr)
- 10% γλυκερόλη παγωμένη

### Πειραματική διαδικασία

- 1) Ετοιμάζονται 250ml θρεπτικό υλικό LB Broth σε κωνική φιάλη όγκου 1000ml, κλείνεται με αλουμινόχαρτο και αποστειρώνεται
- 2) Υπό ασηπτικές συνθήκες (φλόγα) πραγματοποιείται προσθήκη 2 ml από το αποστειρωμένο LB Broth σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα. Με μικροβιολογικό κρίκο ενοφθαλμίζεται ένα τμήμα από το stock γλυκερόλης *E.coli* DH5α και τοποθετείται στο σωλήνα. Ακολουθεί επώαση στους 37°C, στις 220 στροφές για 12-16 ώρες.
- 3) Από το αποστειρωμένο LB Broth γεμίζεται μια κυψελίδα, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί

ως τυφλό στις μετρήσεις OD<sub>600</sub> και φυλάσσεται στους 4°C

- 4) Το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα, υπό ασηπτικές συνθήκες προστίθεται στην κωνική φιάλη και ακολουθεί επώαση στους 37°C, στις 230 στροφές μέχρι να φτάσει το OD<sub>600</sub> μεταξύ 0.450-0.550. Κάθε μια ώρα περίπου γίνεται μέτρηση δείγματος της κωνικής φιάλης μηδενίζοντας με το τυφλό.
- 5) Όταν η συγκέντρωση των βακτηρίων φτάσει στο επιθυμητό OD<sub>600</sub>, τοποθετούνται από 50ml σε τέσσερα παγωμένα φάλκον και κατευθείαν τοποθετούνται στον πάγο για 20 λεπτά.
- 6) Φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 4.000g, στους 4°C. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται προσθήκη 50ml παγωμένης 10% γλυκερόλης σε κάθε φάλκον. Επαναδιαλύεται το βακτηριακό ίζημα
- 7) Φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 4.000g, στους 4°C. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται προσθήκη 25ml παγωμένης 10% γλυκερόλης σε κάθε φάλκον. Επαναδιαλύεται το βακτηριακό ίζημα. Τα δείγματα καθόλη την διάρκεια πρέπει αυστηρά στους 4°C.
- 8) Φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 4.000g, στους 4°C. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται προσθήκη 50ml παγωμένης 10% γλυκερόλης σε κάθε φάλκον. Επαναδιαλύεται το βακτηριακό ίζημα
- 9) Φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 4.000g, στους 4°C. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται προσθήκη 2ml παγωμένης 10% γλυκερόλης σε κάθε φάλκον. Έπειτα επαναδιαλύεται προσεκτικά το βακτηριακό ίζημα.
- 10) Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 4.000g, στους 4°C. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται προσθήκη 0,2ml παγωμένης 10% γλυκερόλης σε κάθε φάλκον. Έπειτα επαναδιαλύεται προσεκτικά το βακτηριακό ίζημα
- 11) Το περιεχόμενο από τα φάλκον μοιράζεται σε παγωμένα erpendorfs από 40μl σε καθένα και διατηρούνται στους -80°C

#### Μέτρηση απόδοσης EC κυττάρων

- 1) Γίνεται μετασχηματισμός (με electroporation) των βακτηρίων που φτιάχτηκαν (40μl) εισάγοντας 10pg πλασμίδιο pUC 19 το οποίο δεν περιέχει ένθεμα. Χρησιμοποιούνται 900μl SOC (§2.8.2).
- 2) Επιλέγονται 2μl, 4μl και 8μl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια και προσθέτω 198μl, 196μl και 192μl αντίστοιχα έτσι ώστε να έχω τελικό όγκο 200μl. Στρώνονται οι ποσότητες σε τριβλία.
- 3) Έπειτα μετρούνται όλες οι αποικίες (cfu) σε κάθε τριβλίο ως εξής:  
2μl = 61 cfu, 4μl = 62 cfu και 8μl = 149 cfu.  
Στα 8μl έχω 149 cfu  
Στα 900μl SOC  $\chi$  = 16762,5 cfu

Έχουμε 16762,5 cfu σε 1μl πλασμίδιο pUC 19 = 10pg  
 $\chi$  =  $1.49 \cdot 10^7$  cfu/μg ( $10^6$  pg)  $10^6$  pg = 1μg

Ομοίως και για τα άλλα δυο.

## 2.8. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

### 2.8.1. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο

#### Υλικά

- **Δεκτικά κύτταρα** (chemical, competent cells), διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$
- **Ανασυνδιασμένα πλασμίδια** (από αντίδραση ligation)
- **Θρεπτικό υλικό SOC medium** (20gr tryptone, 5gr εκχύλισμα ζύμης, 0.5gr NaCl 1M, 10ml KCl 250mM και 950ml ddH<sub>2</sub>O  $\implies$  αποστείρωση και προσθήκη 5ml MgCl<sub>2</sub> 2M, 20ml γλυκόζη 1M και συμπλήρωση απιονισμένου H<sub>2</sub>O μέχρι το 1L), διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$
- **Τριβλία LB agar-Amp** (30gr στο 1 λίτρο. Σύσταση :Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr, Agar 15gr και NaCl 5gr, Amp(100mg/ml): για κάθε 1ml LB agar αντιστοιχεί 1μl Amp έτσι ώστε να είναι η τελική συγκέντρωση 100mg/ml)
- **X-Gal** (20mg/ml), διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$
- **IPTG** (200mg/ml), διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$
- **Θρεπτικό υλικό LB Broth-Amp** (15gr στο 1 λίτρο. Σύσταση : Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr και NaCl 5gr, Amp(100mg/ml) : για κάθε 1ml LB agar αντιστοιχεί 1μl Amp έτσι ώστε να είναι η τελική συγκέντρωση 100mg/ml)

#### Πειραματική διαδικασία

##### 1. Μετασχηματισμός

- 1) Τα δεκτικά κύτταρα αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν
- 2) Προσθήκη 5μl (5-10% του όγκου των δεκτικών) από τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια (ligation) σε 200μl δεκτικών κυττάρων
- 3) Αφήνονται για 30 λεπτά στον πάγο
- 4) Τοποθετούνται για 90sec στους  $42^{\circ}\text{C}$  (heat sock),(σε αυτό το στάδιο ανοίγουν οι μεμβράνες των βακτηρίων και γίνεται εισαγωγή του πλασμιδίου)
- 5) Αφήνονται για 2 λεπτά στον πάγο
- 6) Τοποθέτηση σε κάθε σωλήνα (αποστειρωμένοι) καλλιέργειας βακτηρίων από 800μl θρεπτικού υλικού SOC και προθήκη όλης της ποσότητας των μετασχηματισμένων βακτηρίων τους αντίστοιχους σωλήνες
- 7) Επωάζονται οι σωλήνες στους  $37^{\circ}\text{C}$ , στις 175 στροφές για 1 ώρα.

### 2.8.2. Μετασχηματισμός *E.coli* DH5α δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

## Υλικά

Η μόνη διαφοροποίηση στα υλικά είναι ότι χρησιμοποιούνται κύτταρα διαφορετικά επεξεργασμένα απ' ό,τι στη κλασική μέθοδο μετασχηματισμού.



**Εικόνα 16:** Συσκευή

ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

## Πειραματική διαδικασία

### 1. Μετασχηματισμός

- 1) Τα δεκτικά κύτταρα αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν
- 2) Από τα 10μl της αντίδρασης ligation γίνεται αραιώση 1:10 και από αυτή την αραιώση προστίθενται 2μl σε 40μl δεκτικά κύτταρα
- 3) Αφήνονται για 1 λεπτό στον πάγο
- 4) Τοποθετείται το υγρό (βακτήρια και ανασυνδιασμένα πλασμίδια) σε κατάλληλη κυψελίδα η οποία είναι παγωμένη
- 5) Τοποθετείται η κυψελίδα στην θέση υποδοχής της συσκευής electroporator (εικόνα 16) οπότε διέρχεται το ρεύμα.
- 6) Αμέσως τοποθετούνται στην κυψελίδα 900μl θρεπτικό υλικό SOC, καλό πιπετάρισμα για να ανακατευτεί και προθήκη όλης της ποσότητας των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε δοκιμαστικό σωλήνα
- 7) Επώαση στους 37°C στις 175 στροφές για 1 ώρα.

### 2. Στρώσιμο τριβλίων υπό ασηπτικές συνθήκες

- 1) Φτιάχνεται 200ml LB agar και αποστειρώνεται. Εφόσον κρυώσει λίγο τοποθετούνται 200μl από το αντιβιοτικό αμικιλίνη
- 2) Υπό ασηπτικές συνθήκες (φλόγα) τοποθετείται το LB agar-Amp στα τριβλία και αφήνονται να στεγνώσουν
- 3) Τοποθέτηση ορισμένης ποσότητας από τα πολλαπλασιασμένα μετασχηματισμένα βακτήρια και 30μl X-Gal και 3μl IPTG στο τριβλίο
- 4) Ακολουθεί στρώσιμο των βακτηρίων επάνω στο άγαρ
- 5) Αφήνονται τα τριβλία να στεγνώσουν και έπειτα τοποθετούνται ανάποδα στους 37°C ,12-16 ώρες.

Το πλασμίδιο – φορέας περιέχει δεξιά και αριστερά της θέσης που θα πραγματοποιηθεί η εισαγωγή του ενθέματος(πολυσυνδέτης) το οπερόνιο της λακτόζης, το οποίο όταν μεταγράφεται και κατόπιν μεταφράζεται παράγει την β-γαλακτοζιδάση. Η β-γαλακτοζιδάση είναι ένα ένζυμο το οποίο μεταβολίζει την λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη. Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν αυξάνεται η λακτόζη στο περιβάλλον τότε η ίδια η λακτόζη δρα ως επαγωγέας και συνδέεται με τον καταστολέα απενεργοποιώντας τον. Αυτό έχει ως

συνέπεια να μεταγράφεται το οπερόνιο και να παράγεται η β-γαλακτοζιδάση. Σε εργαστηριακές συνθήκες χρησιμοποιείται IPTG ως επαγωγέας και X-Gal ως υπόστρωμα προς μεταβολισμό από την β-γαλακτοζιδάση δίνοντας μπλε χρώμα. Σε περίπτωση που έχει γίνει εισαγωγή του ενθέματος στο πλασμίδιο, θα έχει κοπεί η αλληλουχία του γονιδίου με αποτέλεσμα να μην παράγεται β-γαλακτοζιδάση οπότε να μην μεταβολίζεται το X-Gal και να μην δίνει το μπλε χρώμα στην αποικία. Ενώ οι αποικίες που δεν έχουν το ένθεμα στο πλασμίδιο έχουν μπλε χρώμα. Ακόμα υπάρχει και η περίπτωση να έχει γίνει για άγνωστο λόγω εισαγωγή μη επιθυμητού DNA στο πλασμίδιο και δίνει λευκή αποικία βακτηρίων [Biochemistry, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, πανεπιστημιακές εκδόσεις κρήτης, 2001, τόμος 1]

### 3. Υγρές καλλιέργειες βακτηριακών αποικιών

- 1) Παρασκευάζονται 200ml LB Broth και αποστειρώνεται. Εφόσον κρυώσει τοποθετούνται 200ml από το αντιβιοτικό αμικιλίνη
- 2) Τοποθετείται σε κάθε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα από 3ml LB Broth-Amp, εφόσον έχει γραφεί το όνομα του δείγματος σε κάθε σωλήνα
- 3) Επιλέγονται οι άσπρες αποικίες και υπό ασηπτικές συνθήκες (φλόγα) τοποθετούνται με μια οδοντογλυφίδα στον αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα
- 4) Αφήνονται οι σωλήνες στους 37°C, στις 210 στροφές, για 12-16 ώρες έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν τα βακτήρια

## 2.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps)

### 2.9.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

#### Υλικά

- Διάλυμα GET (50mM glucose, 10mM EDTA pH= 8.0, 25mM Tris-HCl pH 8.0)
- Διάλυμα alkali (0.2N NaOH, 1% SDS)
- Διάλυμα οξικού καλίου(CH<sub>3</sub>COOK)
- Αιθανόλη 100% και 70%
- TE-RNase (TE: 1mM EDTA pH= 8.0, 10mM Tris-HCl pH= 8.0, TE-RNase: 20μg RNase σε 1ml TE)

#### Πειραματική διαδικασία

- 1) Μεταφορά 1.5ml της πολλαπλασιασμένης βακτηριακής καλλιέργειας σε ένα eppendorf., πραγματοποιώντας πριν την μεταφορά μια ελαφρά ανάδευση στο σωλήνα.
- 2) Ακολουθεί φυγοκέντριση για 3 λεπτά σε 3.000 rpm
- 3) Αφαίρεση του υπερκείμενου κρατώντας το ίζημα(βακτήρια) και προσθήκη 100μl παγωμένου διαλύματος
- 4) Αφήνονται τα δείγματα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου(επώαση)
- 5) Προσθήκη 200μl διαλύματος alkali (δημιουργεί τρύπες στην μεμβράνη ώστε να εξέλθει το πλασμιδιακό DNA και όχι το χρωμοσωμικό)

- 6) Ήπια ανάδευση των δειγμάτων και αφήνονται για 5 λεπτά στον πάγο
- 7) Προσθήκη 150μl παγωμένου διαλύματος CH<sub>3</sub>COOK (αντιδρά με το NaOH που περιέχεται στο διάλυμα alkali και σταματά τη λύση των κυττάρων)
- 8) Ανάδευση και αφήνονται τα δείγματα για 8-10 λεπτά στον πάγο
- 9) Φυγοκέντριση για 7 λεπτά σε 14.000rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf.
- 10) Ακολουθεί κατακρίμνηση (βλ. §2.1) και επαναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA σε 50μl TE-RNase

## 2.9.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps) με χρήση kit

(kit: Invisorb® Spin Plasmid Mini Two)

### Υλικά

- **Solution A** (50mM glucose, 10mM EDTA pH= 8.0, 25mM Tris-HCl pH 8.0)
- **Solution B** (0.2N NaOH, 1% SDS)
- **Solution C** (60ml 5M CH<sub>3</sub>COOK, 11.5ml CH<sub>3</sub>COOH, 28.5ml H<sub>2</sub>O)
- **Wash Solution**
- **Elution Solution**

### Πειραματική διαδικασία

- 1) Μεταφορά 1.5ml της πολλαπλασιασμένης βακτηριακής καλλιέργειας σε ένα eppendorf, πραγματοποιώντας πριν την μεταφορά μια ελαφρή ανάδευση στο σωλήνα.
- 2) Φυγοκέντριση για 1.5 λεπτό σε 14.000 rpm
- 3) Αφαίρεση του υπερκείμενου κρατώντας το ίζημα(βακτήρια) και επαναδιάλυση σε 250μl Solution A και ακολουθεί καλή ανάδευση(vortex).
- 4) Προσθήκη 250μl Solution B και ακολουθεί ήπια ανάδευση των δειγμάτων 4-5 φορές αφήνονται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Προσθήκη 250μl Solution C και ακολουθεί ήπια ανάδευση των δειγμάτων 4-5 φορές
- 6) Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 14.000 rpm
- 7) Αφαίρεση του περιεχομένου των eppendorfs σε collection tubes(GFX Column) και αφήνονται τα δείγματα για 1 λεπτό έτσι ώστε να βραχεί καλά το φίλτρο. Φυγοκέντριση για 1 λεπτό σε 14.000rpm
- 8) Μεταφορά του υγρού ενώ το DNA παραμένει στο φίλτρο και πλύσιμο του φίλτρου με 750μl wash Solution. Φυγοκέντριση για 1.5 λεπτό σε 14.000rpm
- 9) Αφαίρεση του διαλύματος ενώ το DNA παραμένει στο φίλτρο και φυγοκέντριση για 3 λεπτά, 14.000rpm με ανοιχτό το καπάκι της φυγόκεντρου για να απομακρυνθεί η αιθανόλη
- 10) Απόχυση του διαλύματος σε νέο eppendorf και προσθήκη 100μl Elution solution
- 11) Αφήνονται τα δείγματα για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντριση για 2 λεπτά σε 14.000rpm



### 2.9.3. Δημιουργία αποθέματος (stock) βακτηριακών κυττάρων σε γλυκερόλη και ανάκτηση βακτηριακών κυττάρων

Η πολλαπλασιασμένη βακτηριακή καλλιέργεια, από την οποία έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί 1.5ml για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται για την κατασκευή glycerol stock.

#### Υλικά

- Βακτηριακή καλλιέργεια
- Γλυκερόλη 100%
- Θρεπτικό υλικό **LB Broth-Amp**(15gr στο 1 λίτρο. Σύσταση : Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr και NaCl 5gr, Amp(100mg/ml)

#### Πειραματική διαδικασία

- 1) Προσθήκη 850μl της βακτηριακής καλλιέργειας σε νέο erpendorf και 150μl γλυκερόλης
- 2) Καλή ανάδευση και φυλάσσονται τα δείγματα στους -80°C

#### Ανάκτηση βακτηριακών κυττάρων από glycerol stock

Υπό ασηπτικές συνθήκες με μικροβιολογικό κρίκο ενοφθαλμίζεται μια ποσότητα βακτηρίων από το glycerol stock και τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 3ml LB Broth-Amp. Τοποθέτηση του δοκιμαστικού σωλήνα στους 37°C στις 210 στροφές, για 12-16 ώρες.

## 2.10. Καθαρισμός του DNA

#### Υλικά

- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- ddH<sub>2</sub>O
- Αιθανόλη 100% και 70%
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa 2.31M, τελική συγκέντρωση 0.3M)
- Γλυκογόνο (20mg/ml)

## Πειραματική διαδικασία

- 1) Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και χλωροφορμίου. Πολύ καλή ανακίνηση των δειγμάτων έτσι ώστε να γίνει ανάμιξη των φάσεων και φυγοκέντριση για 5 λεπτά, στις 14.000rpm .Συλλέγεται προσεκτικά η φάση που περιέχει το DNA σε νέο eppendorf και γίνεται προσθήκη ίσο όγκου χλωροφορμίου.
- 2) Πολύ καλή ανακίνηση των δειγμάτων έτσι ώστε να γίνει ανάμιξη των φάσεων και φυγοκέντριση για 5λεπτά σε 14.000rpm.
- 3) Συλλέγεται προσεκτικά η φάση που περιέχει το DNA σε νέο eppendorf.
- 4) Ακολουθεί κατακρήμνιση(βλ. §2.1) και επαναδιάλυση σε 100μl ddH<sub>2</sub>O.

## 2.11. Προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA (sequencing)

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger μέσω αυτόματου αναλυτή της εταιρίας Magrogen που εδρεύει στην Κορέα. Αρχικά γίνεται ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση και αποστέλλονται σε eppendorf (πρέπει να σταλεί 1γ στα 10μl έχοντας τελική συγκέντρωση 100ng/μl για προϊόντα πέψης, ενώ για PCR προϊόν στέλνεται τελική συγκέντρωση 50ng/μl). Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας επιλέγονται είτε εσωτερικοί είτε εξωτερικοί εκκινητές και με την βοήθεια της Taq πολυμεράσης γίνεται σύνθεση του κλώνου χρησιμοποιώντας διδεοξυνουκλεοτίδια σημασμένα με διαφορετικό φθορίζον μόριο. Έτσι ο αυτόματος αναλυτής προσδιορίζει το τελευταίο νουκλεοτίδιο κάθε τμήματος DNA που συντίθεται, με αποτέλεσμα να μας παρέχεται η πρωτοταγής αλληλουχία του DNA.

### Χαρακτηρισμός της αλληλουχίας

Τα τμήματα DNA τα οποία έχουν αλληλουχιθεί, αρχικά επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Omiga (Oxford Molecular Ltd, 1996-1999). Στη συνέχεια με τη χρήση του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) που παρέχεται δικτυακά από το NCBI (National Center for Biotechnology Information) συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες με υπάρχουσες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων. Με βάση την τοπική ομοπαράθεση που χρησιμοποιεί μεταξύ νουκλεοτιδικών ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών με αποθηκευμένες στις βάσεις δεδομένων αλληλουχίες, εκτιμάται η στατιστική σημαντικότητα των ομολογιών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση λειτουργικών και εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των αλληλουχιών, αλλά και την ταυτοποίηση μελών σε οικογένειες γονιδίων.

## 2.12. Δημιουργία και σήμανση ανιχνευτή

### Υλικά

- DNA
- Buffer 5X (Hexanucleotide)
- Νουκλεοτίδια dNTPs
- bio-dUTP
- Klenow polymease
- ddH<sub>2</sub>O

## Πειραματική διαδικασία

- 1) Σε σωληνάκι erppendorf εισάγεται κατάλληλη ποσότητα DNA (500-1000ng), το Buffer το οποίο περιέχει νουκλεοτιδικά εξαμερή που έχουν ρόλο εκκινητή και ddH<sub>2</sub>O εάν χρειάζεται έτσι ώστε να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης(50μl)
- 2) Τοποθέτηση του erppendorf σε νερό που βράζει για 10 λεπτά (στο στάδιο αυτό αποδιατάσσεται το DNA) και έπειτα κατευθείαν στον πάγο για 2 λεπτά (για να μην κλείσουν οι αλυσίδες)
- 3) Προσθήκη των dNTPs, bio-dUTP και Klenow polymease (σε αυτό το στάδιο η Klenow polymease δημιουργεί νέες αλυσίδες χρησιμοποιώντας μη σημασμένα νουκλεοτίδια (dNTPs) και μόνο τα νουκλεοτίδια της ουρακίλης είναι σημασμένα με βιοτίνη (bio-dUTP).
- 4) Γίνεται ανάδευση και στη συνέχεια επώαση για 12-14 ώρες στους 37°C.
- 5) Ακολουθεί κατακρήμνιση και επαναδιάλυση του DNA σε 50μl ddH<sub>2</sub>O (βλ. §2.10)
- 6) Φυλάσσεται στους -20°C

## Spotting του ανιχνευτή

Πραγματοποιείται 1:10 αραιώση στον ανιχνευτή έχοντας τελικό όγκο 10μl. Στη συνέχεια σε νάιλον μεμβράνη εμποτίζονται διαδοχικά 1μl ανιχνευτή + 5μl νερού, 3μl ανιχνευτή +3μl νερού και 6μl ανιχνευτή. Εφόσον στεγνώσει η μεμβράνη ακολουθούνται τα βήματα της ανίχνευσης σήματος (βλ. §2.13 παράγραφος 4 απο το βήμα 7 και κάτω)

## 2.13. Ανάλυση κατά Southern

### Υλικά

- Διάλυμα HCl 0.2N
- Διάλυμα αποδιάταξης (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)
- Διάλυμα εξουδετέρωσης (1.5M NaCl, Tris-HCl pH=7.5)
- Διάλυμα 10X SSC Buffer( NaCl, κιτρικό νάτριο)
- Νάιλον μεμβράνη
- Διάλυμα προϋβριδοποίησης (6X SSC, 0.5% SDS, 5X Denhard's⇒φυλάσσεται στους -20°C)
- Salmon Sperm DNA (ssDNA:10mg/ml, τελική συγκέντρωση:100μg/ml)
- Σημασμένος ανιχνευτής (με βιοτίνη)
- Διάλυμα πλύσης 1 (2X SSC, 0.1% SDS)
- Διάλυμα πλύσης 2 (0.2X SSC, 0.1% SDS)
- Διάλυμα A (100mM Tris-HCl pH=7.5, 150mM NaCl)
- Διάλυμα B (Διάλυμα A και 1% Blocking solution(γάλα))
- Διάλυμα C (100mM Tris-HCl pH=9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>)
- Αντίσωμα (σύμπλοκο streptavidine-alkaline phosphatase: 5μl για κάθε 10ml δ/τος B)
- NBT (Nitro blue tetrazolium chloride: 50μl για κάθε 10ml δ/τος C)
- BCIP (X-phosphate, 5bromo-achloro-3indolyl-phosphate: 37.5μl για κάθε 10ml δ/τος C)

## Πειραματική διαδικασία

### 2.13.1 Μεταφορά του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης σε νάϊλον μεμβράνη

Εφόσον ηλεκτροφορηθεί το DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είτε τα προϊόντα της PCR είτε μια πέψη τοποθετείται χάρακας κατά μήκος του ηκτώματος και φωτογραφίζεται.

- 1) Το πήκτωμα τοποθετείται σε δοχείο
- 2) Εάν υπάρχουν τμήματα DNA μεγάλου μεγέθους (>10kb) στο πήκτωμα, τότε γίνεται προσθήκη διαλύματος HCl 0.2N. Αφήνεται με ανάδευση για 10 λεπτά. (Το HCl έχει την ιδιότητα να διασπά τα μεγάλα τμήματα DNA σε μικρότερα χωρίς να τα μετακινεί από την θέσης τους στο πήκτωμα. Κατά αυτόν τον τρόπο γίνεται πιο εύκολη η μετακίνηση τους από το πήκτωμα στην μεμβράνη)
- 3) Ξεπλένεται το πήκτωμα με απιονισμένο H<sub>2</sub>O και γίνεται προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης. Αφήνεται με ανάδευση για 20 λεπτά.
- 4) Αποχύνεται το υγρό και γίνεται ξανά προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης. Αφήνεται με ανάδευση για 20 λεπτά. Αποχύνεται το υγρό, ξεπλένεται με απιονισμένο H<sub>2</sub>O το πήκτωμα και γίνεται προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης. Αφήνεται με ανάδευση για 20 λεπτά.
- 5) Αποχύνεται το υγρό και γίνεται ξανά προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης. Αφήνεται με ανάδευση για 20 λεπτά.
- 6) Αποχύνεται το υγρό, ξεπλένεται με απιονισμένο H<sub>2</sub>O το πήκτωμα και προσθήκη διαλύματος SSC 10X. Αφήνεται με ανάδευση για 5 λεπτά. Εν τω μεταξύ ετοιμάζονται η μεμβράνη με διαστάσεις ίσες με το πήκτωμα (Παράδειγμα: για ένα πήκτωμα το οποίο έχει διαστάσεις 15εκ. x 6.5εκ., κόβονται αρκετά χαρτιά 13.5εκ. x 5εκ., 4 Whatwan 14εκ. x 5.5εκ. και μια μεμβράνη 14.5εκ. x 6εκ.)
- 7) Σε μια επιφάνεια τοποθετώ το πήκτωμα από την ανάποδη πλευρά (έτσι ώστε το DNA να βρίσκεται πιο κοντά στη μεμβράνη) και εφόσον η μεμβράνη έχει βραχεί σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O και έπειτα στο ήδη υπάρχον διάλυμα SSC 10X τοποθετείται προσεχτικά επάνω στο πήκτωμα.
- 8) Βρέχονται τα 2 χαρτιά Whatwan 3MM στο διάλυμα SSC 10X και τοποθετούνται επάνω στη μεμβράνη. Έπειτα τοποθετούνται τα άλλα 2 στεγνά Whatwan 3MM από επάνω και τέλος μια στοίβα από χαρτιά. Από επάνω συνήθως τοποθετείται ένα βάρος έτσι ώστε να διευκολυνθεί η μεταφορά.
- 9) Τοποθετείται γύρω από το πήκτωμα (όχι από επάνω) διάλυμα SSC 10X και αφήνεται να γίνει η μεταφορά. Μετά τη μεταφορά, εφόσον έχει σημειωθεί η μπρος και η πίσω πλευρά, αφήνεται η μεμβράνη για 10λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τοποθετείται στους 80°C για 1-2 ώρες έτσι ώστε να σταθεροποιηθεί καλά το DNA στη μεμβράνη.

### 2.13.2 Προϋβριδοποίηση

- 1) Τοποθετείται το Salmon Sperm DNA σε νερό που βράζει για 10 λεπτά, έτσι ώστε να γίνει μονόκλωνο. (Το ssDNA θα συνδεθεί στις μη ειδικές θέσεις, έτσι ώστε κατά την υβριδοποίηση ο ανιχνευτής να συνδεθεί στις ειδικές θέσεις)
- 2) Προσθήκη Salmon Sperm DNA σε διάλυμα προϋβριδοποίησης και προσθήκη του διαλύματος σε σωλήνα υβριδοποίησης. Έπειτα τοποθετείται και η μεμβράνη εντός του σωλήνα. (προσθήκη τόσο του όγκου ssDNA έτσι ώστε να είναι τελικός όγκος 100μg/ml).

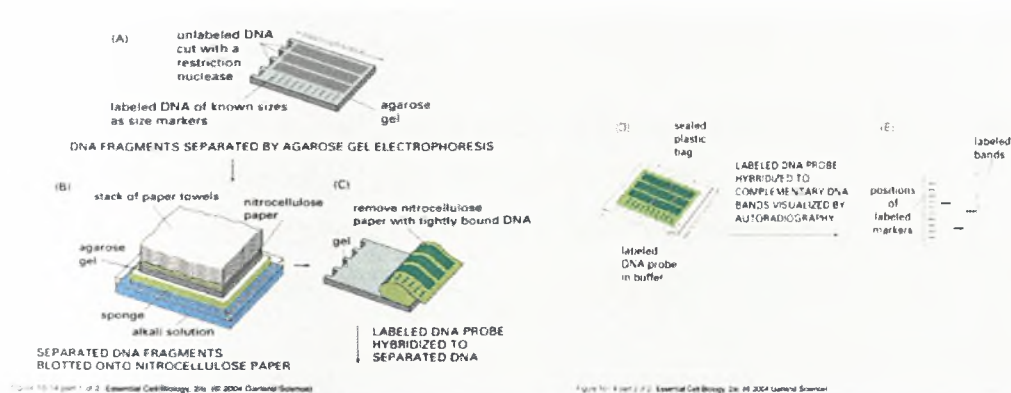
- 3) Αφήνεται να γίνει προϋβριδοποίηση για 1-2 ώρες στους 65°C (48-68°C ανάλογα με το αν ο ανιχνευτής είναι ομόλογος ή ετερόλογος).

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

- 1) Ο ανιχνευτής που έχει ήδη φτιαχτεί (§2.12), τοποθετείται σε νερό που βράζει για 10 λεπτά έτσι ώστε να γίνει μονόκλωνος και αμέσως μετά στον πάγο για 2 λεπτά.
- 2) Προσθήκη του διαλύματος υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή στο σωλήνα υβριδοποίησης (η μεμβράνη έχει παραμείνει στο σωλήνα) και αφήνεται να γίνει υβριδοποίηση για 12-14 ώρες στους στην κατάλληλη θερμοκρασία (ίδια με αυτή της προυβριδοποίησης).

### 2.13.4. Ανίχνευση σήματος υβριδοποίησης

- 1) Όταν τελειώσει η υβριδοποίηση συλλέγεται ο ανιχνευτής και φυλάσσεται στους -20°C. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ένα δοχείο. Προσθήκη διαλύματος πλύσης 1 μέσα στο δοχείο μέχρι να σκεπάζεται η μεμβράνη και αφήνεται με ανάδευση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2) Αποχύνεται το διάλυμα και επαναλαμβάνεται η προσθήκη διαλύματος πλύσης 1 μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Αποχύνεται το διάλυμα και προστείνεται διάλυμα πλύσης 2 μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 20 λεπτά στη θερμοκρασία που έχει γίνει η υβριδοποίηση.
- 4) Αποχύνεται το διάλυμα και προστείνεται διάλυμα πλύσης 2 μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 20 λεπτά στη θερμοκρασία που έχει γίνει η υβριδοποίηση.
- 5) Αποχύνεται το διάλυμα και προσθήκη διαλύματος A μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Αποχύνεται το διάλυμα και προσθήκη διαλύματος B (5ml γάλα και 45ml διάλυμα A) μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 35 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Αποχύνεται το διάλυμα και προσθήκη διαλύματος B στα οποία περιέχονται αντισώματος, μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 35 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Συλλέγεται το αντίσωμα για επόμενη χρήση και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος A μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9) Αποχύνεται το διάλυμα και προσθήκη διαλύματος A μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 10) Αποχύνεται το διάλυμα και παρασκευάζεται διάλυμα C το οποίο προστίθεται μέσα στο δοχείο και αφήνεται με ανάδευση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη διαλύματος C με NBT και BCIP . Τοποθέτηση του δοχείου σε σκοτεινό μέρος.



## 2.14. Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων MRA

### Υλικά

- stock MRA βακτηριακών κυττάρων
- Θρεπτικό υλικό LB Broth(15gr στο 1 λίτρο. Σύσταση : Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr και NaCl 5gr)
- Μαλτόζη 20%
- MgSO<sub>4</sub> 1M (αποστειρωμένο)

### Πειραματική διαδικασία

- 1) Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 5ml θρεπτικού υλικού LB, 50μl MgSO<sub>4</sub> και 50μl μαλτόζη ενοφθαλμίζεται μικρή ποσότητα MRA κυττάρων απο stock γλυκερόλης.
- 2) Ακολουθεί επώαση για 4-6 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση, 210 στροφές
- 3) Εφόσον αναπτυχθούν τα κύτταρα, γίνεται φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 3.000rpm
- 4) Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε MgSO<sub>4</sub> 10mM με ήπια ανάδευση
- 5) Φωτομετρούνται τα κύτταρα στα 600nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό το MgSO<sub>4</sub> 10mM, έτσι ώστε να έχει OD=0.5

## 2.15. Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε φορέα βακτηριοφάγο λ (Primary screening)

### Υλικά

- Δείγμα από φαγική γενωμική βιβλιοθήκη
- SM Buffer ( Σύσταση: 5.8gr NaCl, 2gr MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 50ml 1M Tris-HCl pH=7.5, 5ml 2% gelatin)
- Διάλυμα MRA
- NZY agar (5gr NaCl, 2gr MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 5gr yeast extract, 10gr NZ amine, 15gr agar για 1λίτρο)
- NZY top agar (5gr NaCl, 2gr MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 15gr yeast extract, 7gr αγαρόζη για 1λίτρο)
- Διάλυμα αποδιάταξης (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)
- Διάλυμα εξουδετέρωσης (1.5M NaCl, Tris-HCl pH=7.5)
- Διάλυμα πλύσης (0.2M Tris-HCl pH=7.5, 2X SSC)

## Πειραματική διαδικασία

### 2.15.1. Επιμόλυνση των MRA κυττάρων με φάγους

- 1) Δημιουργία τριβλίων NZY agar
- 2) Παρασκευάζονται διάφορες αραιώσεις:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  και  $10^{-6}$  από τη βιβλιοθήκη.
- 3) Από αυτές τις αραιώσεις τελικά επιλέγονται οι  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$  για να επιστρωθούν σε τριβλία.
- 4) 4μl και 8μl από τις επιλεγμένες αραιώσεις προστίθενται σε erpendorfs που περιέχουν 200μl διαλύματος MRA και τοποθετούνται στους  $37^{\circ}\text{C}$  με ανάδευση για 20 λεπτά.
- 5) Το NZY top agar προθερμαίνεται και αμέσως μετά τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους  $48^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$ . Προσθήκη 3ml NZY top agar στο καθέ δείγμα χωρίς να βγουν από το υδατόλουτρο για να μην στερεοποιηθεί το NZY top agar
- 6) Επίστρωση του κάθε δείγματος επάνω στο τριβλίο υπό ασηπτικές συνθήκες (με κυκλικές κινήσεις το NZY top agar- φάγοι απλώνεται στην επιφάνεια του τριβλίου).
- 7) Αφήνονται τα τριβλία για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα τοποθετούνται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 12 ώρες.

### 2.15.2. Μεταφορά των φαγικών πλακών σε νάιλον μεμβράνη και υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή

- 1) Γίνεται επιλογή των τριβλίων όπου θα χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά των φαγικών πλακών σε νάιλον μεμβράνη και υβριδοποίηση. Τοποθετείται η νάιλον μεμβράνη επάνω στην επιφάνεια του τριβλίου. Αφήνεται αυστηρά 2 λεπτά και έπειτα τοποθετείται ανάποδα σε διάλυμα αποδιάταξης για αυστηρά 2 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετείται ανάποδα σε διάλυμα εξουδετέρωσης και αφήνεται αυστηρά για 5 λεπτά.
- 2) Έπειτα η μεμβράνη τοποθετείται ανάποδα σε διάλυμα πλύσης για αυστηρά 20 δευτερόλεπτα. Έπειτα αφήνεται ανάποδα σε ένα χαρτί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η μεμβράνη τοποθετείται στους  $80^{\circ}\text{C}$  για 2 ώρες
- 3) Ακολουθεί προυβριδοποίηση, υβριδοποίηση και εμφάνιση σήματος
- 4) Μετά από την εμφάνιση σήματος οι πλάκες που έδωσαν κάποιο σήμα απομονώνονται. Κατά αυτόν τον τρόπο απομονώνεται μια περιοχή του NZY top agar που περιέχει πολλούς φάγους με διαφορετικά ενθέματα και ανάμεσα τους ο φάγος με το "επιθυμητό" ένθεμα. Η περιοχή τοποθετείται σε erpendorf και προστίθεται 500μl SM Buffer στο οποίο οι φάγοι διαχέονται και φυλάσσεται στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **2.16. Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε φορέα βακτηριοφάγο λ (Secondary screening)**

Ακριβώς τα ίδια με αυτά του primary sreening εκτός από το δείγμα από φαγική γενωμική βιβλιοθήκη. Εδώ χρησιμοποιείται η περιοχή με τους φάγους που απομονώθηκε από το NZY agar – plate και έδωσε σήμα στην υβριδοποίηση.

## 2.17. Απομόνωση φαγικού DNA (phage preps)

### Υλικά

- Μεμονωμένη πλάκα φάγου σε SM Buffer
- Θρεπτικό υλικό LB Broth ( 15gr στο 1 λίτρο. Σύσταση : Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr και NaCl 5gr )
- Μαλτόζη 20%
- MgSO<sub>4</sub> 1M (αποστειρωμένο)
- MRA κύτταρα (φυλάσσονται στους -80°C)
- φαινόλη
- χλωροφόρμιο
- RNase (τελική συγκέντρωση 1μg/ml)
- DNase (τελική συγκέντρωση 1μg/ml)
- NaCl (MB: 58.44)
- PEG 10% w/v
- SM Buffer ( Σύσταση: 5.8gr NaCl, 2gr MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 50ml 1M Tris-HCl pH=7.5, 5ml 2% gelatin)
- EDTA 20mM pH=8
- Πρωτεΐνάση K 50 μg/ml
- SDS 0.5%
- Αιθανόλη 70% και 100%
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa 0.31M,τελική συγκέντρωση 0.3M)
- Γλυκογόνο (20mg/ml)
- TE-RNase (TE: 1mM EDTA pH= 8.0, 10mM Tris-HCl pH= 8.0, TE-RNase: 20μg RNase σε 1ml TE)

### Πειραματική διαδικασία

#### 2.17.1. Λύση των MRA κυττάρων και πολλαπλασιασμός του φάγου

- 1) Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων MRA
- 2) Προσθήκη 500μl από την βακτηριακή MRA καλλιέργεια και 40μl από το δείγμα με την μεμονωμένη πλάκα φάγου σε SM Buffer, σε ένα αποστειρωμένο erpendorf
- 3) Αφήνεται το erpendorf στους 37°C, στις 170 στροφές για 20 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο ο φάγος εισέρχεται στο βακτήριο.
- 4) Στην κωνική φιάλη γίνεται προσθήκη 40ml αποστειρωμένου LB Broth , 400μl MgSO<sub>4</sub> 1M και 400μl από το δείγμα όπου επωάστηκε στους 37°C (βακτήριο-φάγος)
- 5) Αφήνεται η κωνική φιάλη στους 37°C, στις 210 στροφές για 6-7 ώρες. Σε αυτό το στάδιο



στα βακτήρια στα οποία είχε εισέλθει ο φάγος προκαλείται λύση με ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό του φάγου. Αρχικά το διάλυμα είναι διαυγές έπειτα κατά των πολλαπλασιασμό των βακτηρίων και την λύση αυτών προκαλείται θόλωση και έπειτα από 6-7 ώρες εφόσον έχουν λυθεί όλα τα βακτηριακά κύτταρα το διάλυμα γίνεται και πάλι διαυγές. Δημιουργείται σχηματισμός ινιδίων από τα βακτηριακά υπολείματα.

### **2.17.2. Απομόνωση DNA**

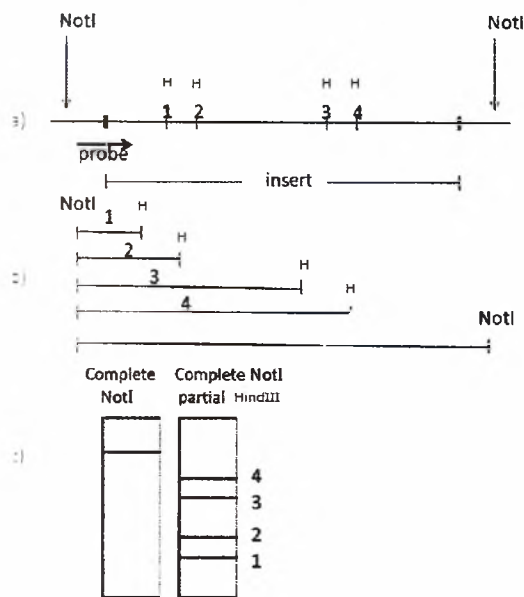
- 1) Προσθήκη σε δυο φάλκον από 20ml του πολλαπλασιασμένου φάγου και ακολουθεί προσθήκη 100μl χλωροφορμίου στο καθένα
- 2) Φυγοκέντριση στις 8.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Συλλέγονται 20ml από το υπερκείμενο και τοποθετούνται σε νέα φάλκον
- 3) Σε κάθε φάλκον γίνεται προσθήκη 2μl RNAse και 12μl DNAse. Έπειτα τα φάλκον τοποθετούνται στους 37°C με ανάδευση για 35 λεπτά.
- 4) Προσθήκη 1.17gr NaCl (ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1M) σε κάθε φάλκον ακολουθεί ελαφρή ανάδευση και αφήνονται στους 4°C για 1-2 ώρες.
- 5) Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 11.000rpm για 10 λεπτά, 4°C. Το ίζημα που σχηματίζεται είναι τα βακτηριακά υπολείματα. Τοποθετείται το υπερκείμενο σε δυο νέα αποστειρωμένα φάλκον
- 6) Προσθήκη 2gr PEG σε κάθε φάλκον και καλό vortex μέχρι να διαλυθεί. Αφήνονται στον πάγο για τουλάχιστον. Φυγοκέντριση στις 11.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- 7) Αποχύνεται το υπερκείμενο προσεκτικά, ενώ οι φάγοι είναι σε ίζημα στα τοιχώματα. Στραγγίζονται τα φάλκον σε ένα χαρτί για να απομακρυνθεί το πολύ υγρό
- 8) Προσθήκη 1ml SM Buffer υπό ασηπτικές συνθήκες (φλόγα) και ελαφρό πιπετάρισμα του υγρού επάνω στον φάγο έως ότου απομακρυνθεί όλο το ίζημα από τα τοιχώματα. Έπειτα τα φάλκον τοποθετούνται στον αναδευτήρα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο ο φάγος διαχέεται μέσα στο SM Buffer
- 9) Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου σε καθένα eppendorf. Φυγοκέντριση στις 3.000g (~4.000rpm) για 15 λεπτά.
- 10) Συλλέγεται η επάνω στιβάδα και εισάγεται σε νέο eppendorf.
- 11) Προσθήκη EDTA, πρωτεϊνάσης K και διαλύματος SDS σε κάθε eppendorf. Τα eppendorfs τοποθετούνται στο υδατόλουτρο 56°C για 1 ώρα. Αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- 12) Καθαρισμός με φαινόλη χλωροφόρμιο
- 13) Κατακρήμνιση και επανδιάλυση σε TE RNAase και ποσοτικοποίηση

### **2.18. Πρωτόκολλο μερικής πέψης ενζύμων περιορισμού Partial digestion**

Το πρωτόκολλο των μερικών πέψεων χρησιμοποιείται στην χαρτογράφηση γενετικού υλικού που έχει κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό ή φαγικό φορέα με ένζυμα περιορισμού (Mathiopoulos et al, 1995). Όταν πραγματοποιείται χαρτογράφηση ενός τμήματος DNA με ένζυμα περιορισμού υπάρχουν δυο επιλογές για να εντοπιστούν οι θέσεις κοπής των ενζύμων: α) είτε χρησιμοποιούνται πολλαπλά διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα, ώστε ο συνδιασμός των θραυσμάτων που προκύπτουν να οδηγεί στον εντοπισμό των θέσεων κοπής τους ή β) μπορεί να πραγματοποιηθεί το πρωτόκολλο μερικής πέψης ενζύμων περιορισμού.

### 2.18.1. Μεθοδολογία του πρωτοκόλλου partial digestion

Στο πρωτόκολλο αυτό, αρχικά χρησιμοποιείται ένα περιοριστικό ένζυμο που εμφανίζει θέσεις κοπής εκατέρωθεν του ενθέματος και όχι εσωτερικά, με αποτέλεσμα να εξάγεται το ένθεμα από τον φορέα. Έπειτα, γίνεται μια δεύτερη πέψη με ένα ένζυμο που περιέχει πολλαπλές θέσεις κοπής εσωτερικά του ενθέματος. Η πέψη αυτή, σε αντίθεση με την πρώτη δεν ολοκληρώνεται, είναι δηλαδή μερική (partial digestion). Αυτό επιτυγχάνεται διακόπτοντας τη διαδικασία της πέψης πρόωρα, προσθέτοντας EDTA σε μικρά κλάσματα. Το αποτέλεσμα, εκτος των άλλων, είναι και η δημιουργία θραυσμάτων που από τη μια μεριά έχουν σημείο κοπής το πρώτο ένζυμο και από την άλλη όλες τις πιθανές θέσεις του δευτέρου ενζύμου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται υβριδοποίηση κατά Southern με ανιχνευτή που δεσμεύεται στις πρώτες βάσεις των θραυσμάτων με άκρο το πρώτο ένζυμο. Έτσι, όλα εκείνα τα θραύσματα που από τη μια μεριά έχουν ένα κοινό άκρο (το πρώτο ένζυμο) και την άλλη όλες τις πιθανές θέσεις αναγνώρισης του δεύτερου ενζύμου αναμένεται να εμφανίσουν σήμα με τον συγκεκριμένο ανιχνευτή, δημιουργώντας έναν ακριβή χάρτη των σημείων πέψης του δευτέρου ενζύμου.



**Σχέδιο 1:** Παράδειγμα μερικής πέψης (partial digestion). α) Το ένθεμα αποκόπτεται με ολοκληρωμένη πέψη με το ένζυμο *NotI* (complete *NotI*). β) Τμήματα DNA που δημιουργούνται κατά τη μερική πέψη με το ένζυμο *HindIII* και φέρουν σταθερά άκρα *NotI*, όπως προέκυψαν από την πρώτη πέψη. γ) Υβριδοποίηση κατά Southern με χρήση ανιχνευτή (probe) που δεσμεύεται στην περιοχή μεταξύ της θέσης κοπής *NotI* και την αρχή της αλληλουχίας του ενθέματος. Σήμα εμφανίζεται μόνο στα τμήματα της μερικής πέψης που περιγράφηκαν.

### Πειραματική διαδικασία

- 1) Ως υλικό χρησιμοποιείται ο φάγος λDashII, ο οποίος δεξιά και αριστερά του ενθέματος έχει θέσεις κοπής του ενζύμου *NotI*
- 2) Αρχικά γίνεται μια δοκιμαστική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *NotI* για να διαπιστωθεί εάν το ένζυμο κόβει εσωτερικά του ενθέματος στον φορέα
- 3) Εφόσον διαπιστωθεί ότι το *NotI* είναι το κατάλληλο ένζυμο επαναλαμβάνεται η πέψη με 4γ DNA ανασυνδιασμένου φορέα με *NotI* στους 37 °C για 12-16 ώρες, έτσι ώστε να υπάρχει αρκετή ποσότητα για τις πέψεις που θα ακολουθήσουν. Τελικός όγκος 100μl και απαιτείται προσθήκη BSA.
- 4) Απενεργοποίηση του ενζύμου(20min στους 65°C υδατόλουτρο. Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλες/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση. Αναδιάλυση σε 30 μl νερό.
- 5) Σημαίνονται τρία eppendorf και τοποθετούνται οι εξής ποσότητες DNA: 5μl complete *NotI* πέψη, 20μl partial *HindIII* (0.5U) και 5μl complete *HindIII* (1U).
- 6) 5μl complete *NotI* πέψη: Κρατούνται άθικτα τα 5μl.
- 7) 5μl complete *HindIII* (1U): Ακολουθεί πέψη με *HindIII* (1U). Τελικός όγκος αντίδρασης

20μl παρουσία BSA.

- 8) 20μl partial *HindIII* (0.5U): Ακολουθεί πέψη με *HindIII* (0.5U). Τελικός όγκος αντίδρασης 30μl παρουσία BSA.
- 9) Κατά την partial *HindIII* συλλέγονται ποσότητες (aliquots) στους εξής χρόνους:  
5' : 13μl + προσθήκη 0.5μl EDTA  
10' : 8μl + προσθήκη 0.4μl EDTA  
20' : 4μl + προσθήκη 0.3μl EDTA  
30' : 3μl + προσθήκη 0.2μl EDTA

Η προσθήκη του EDTA (τελική συγκέντρωση 20mM) γίνεται για την απενεργοποίηση του ενζύμου και τον τερματισμό της αντίδρασης.

- 10) Αναμιγνύονται όλα τα aliquots σε ένα mix και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μαζί με τα 5μl complete *NotI* πέψη και τα 5μl complete *HindIII*
- 11) Ακολουθεί υβριδοποίηση κατά Southern με ανιχνευτή RNA.

#### Δημιουργία RNA ανιχνευτή (probe)

- 1) Ο φάγος λDAshII έχει δεξιά και αριστερά του ενθέματος την αλληλουχία για τον T3 και T7 υποκινητή ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ανιχνευτή με τη βοήθεια RNA πολυμεράσης
- 2) Γίνεται πέψη του φάγου που χρησιμοποιείται και στη partial (2γ) με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII* σε τελικό όγκο 100μl και αφήνεται στους 37 °C για 3-4 ώρες.
- 3) Απενεργοποίηση του ενζύμου (15 λεπτά στους 70°C υδατόλουτρο. Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλες/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση. Αναδιάλυση σε 20 μl H<sub>2</sub>O.
- 4) Χωρίζονται τα 20μl σε 10μl για τη παρασκευή του ανιχνευτή T<sub>3</sub> και 10μl για τον ανιχνευτή T<sub>7</sub>.
- 5) Ακολουθεί αντίδραση πολυμερισμού με τελικό όγκο 50μl:  
DNA 10μl  
H<sub>2</sub>O 17,7μl  
NTPs A: 1,5μl(τελ.συγκέντρωση 1mM), G: 0.90μl (τελ.συγκέντρωση 1mM),  
U:1.4μl(τελ.συγκέντρωση 1mM) και C: 0,5μl (τελ.συγκέντρωση 0,5mM)  
DDT: 2,5μl (τελ.συγκέντρωση 0,1mM)  
Buffer trans 10μl (τελ.συγκέντρωση 1X)  
RNAPol 2,5 T<sub>3</sub>pol (τελ.συγκέντρωση 50u/μl)  
Ομοίως και για τον ανιχνευτή T<sub>7</sub>
- 6) Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλες/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση. Αναδιάλυση σε 50μl H<sub>2</sub>O.

### **3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1. Ενίσχυση γονιδιακών τόπων του Βοα6 γονιδίου του *Bactrocera oleae*

Σχεδιάστηκαν 9 εκκινητές με τη βοήθεια δημοσιευμένων αλληλουχιών (Grauso M. et al. 2002) του γονιδίου nAChR (με τη χρήση του προγράμματος OMIGA), σύμφωνα με την γονιδιακή αλληλουχία του Da6 γονιδίου της *Drosophilla melanogaster* (Πίνακας 2) με σκοπό την ενίσχυση γονιδιακών τόπων της Βοα6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera oleae*.

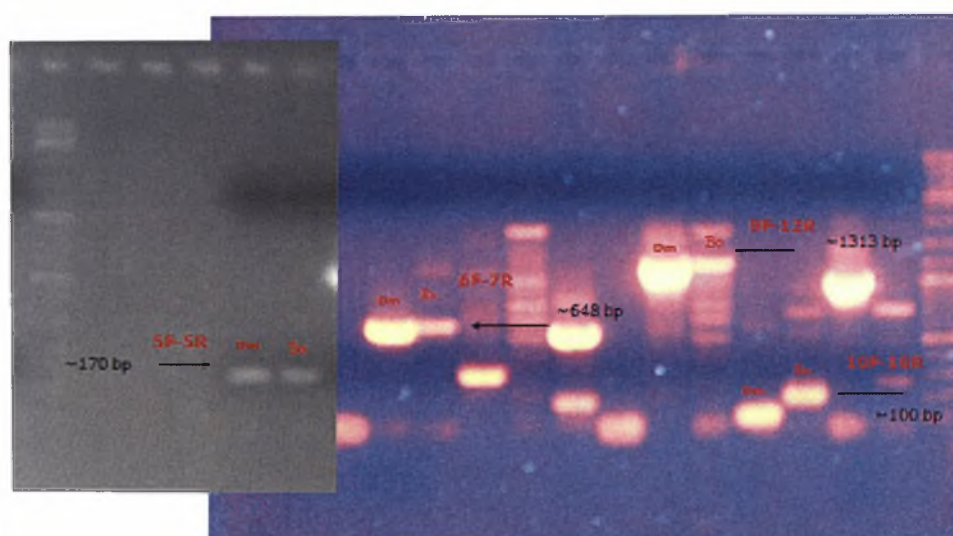
Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με τα ζευγάρια των εκκινητών όπως αναφέρονται στον Πίνακα 3 και το αποτέλεσμα ήταν μόνο τα τέσσερα από τα οκτώ ζευγάρια εκκινητών να δώσουν ενίσχυση (Εικόνα 17). Συγκεκριμένα τα τμήματα ~170bp από το ζευγάρι των εκκινητών 5F-5R, ~648bp από το 6F-7R, ~1313bp από το 9F-12R και ~100bp από το 10F-10R έδωσαν την αναμενόμενη ενίσχυση, δηλαδή το μέγεθος του προϊόντος ήταν παρόμοιο με αυτό από την αντιστοιχη ενίσχυση σε *Drosophilla melanogaster*.

Πίνακας 2

Όνομα του primer	Αλληλουχία του primer	θερμοκρασία πολυμερισμού (Τα)
Da6,11R a	5'-GCCGATCAATTCCGCTTCGTGCG-3'	65°C
Da6,10F b	5'-CCCGGTGCGCAAGATTACACGC-3'	63°C
Da6,12R c	5'-CGACGTATCCGTAGCTTAATGG-3'	66°C
Da6,9F d	5'-CGGTGGTCTGACAGTAGTGG-3'	68°C
Da6,5F e	5'-ACATTGTGGTCAAACATAAOGGC-3'	66°C
Da6,5R f	5'-TTCCATCGTAAGTCCAACTACC-3'	64°C
Da6,6F g	5'-GAAGATGGAGGGGATCTTCC-3'	64°C
Da6,7R h	5'-AGGGOCATCGATGAGATTAGC-3'	64°C
Da6,10R i	5'-TCGTCGATGTGAGGACATTGG-3'	68°C

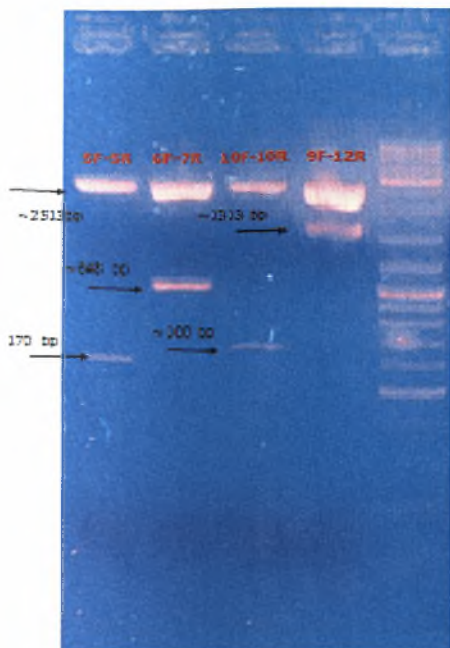
Πίνακας 3

Ζευγάρια εκκινητών
9F-10R
9F-11R
9F-12R
10F-10R
10F-12R
5F-5R
6F-7R
5F-7R



Εικόνα 17: Στην εικόνα αναγράφεται το ζευγάρι εκκινητών και το αντίστοιχο μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύθηκε με την βοήθειά τους. Bo= *Bactrocera oleae* και D<sub>m</sub>= *Drosophilla melanogaster*.





Το ένζυμο *PvuII* κόβει σε δυο θέσεις (527<sup>n</sup> και στην 975<sup>n</sup>) τον φορέα pBluescript II με αποτέλεσμα εφόσον έχουμε το επιθυμητό τμήμα να παίρνουμε 448bp+bp του ενθέματος και ένα τμήμα 2513pb.

Εικόνα 19: Πέψη με το ένζυμο *PvuII*

Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση και βρέθηκε ότι μόνο η αλληλουχία του εξονίου 5 (5F-5R) η οποία κλωνοποιήθηκε ανήκει πράγματι στην Βοα6 υπομονάδα του δάκου (Εικόνα 20).

5'-  
 CGCGGATGAGGGATTTCGATGGCACGTATCACACCAACATTGTGGTCAAACATAACGGCA  
 GTTGTCTGTACGTGCCCCCTGGTATCTTCAAGAGCACATGCAAGATAGACATCACGTGGT  
 TCCCATTTGATGACCAACACTGCGAAATGAAATTCGGTAGTTGGACTTACGATGGAAATC  
 AG-3'

Εικόνα 20: Η αλληλουχία του εξονίου 5 του *Bactrocera oleae* μεγέθους 181bp.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	$\frac{E}{valu}$	Max ident	Links
<a href="#">AF321445.1</a>	<i>Drosophila melanogaster</i> nicotinic acetylcholine receptor $\alpha$ Dalpha6 subunit variant type I (nAcRalpha-30D) mRNA, complete cds, alternatively spliced	<a href="#">329</a>	329	100%	$2e-87$	99%	<a href="#">U</a>

>ref|NM\_205953.1| [UG](#) *Drosophila melanogaster* nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 30D CG4128-RE, transcript variant E (nAcRalpha-30D), mRNA  
 Length=3143

GENE ID: 34304 nAcRalpha-30D | nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 30D  
 [*Drosophila melanogaster*] (Over 10 PubMed links)

Score = 329 bits (178), Expect = 2e-87  
 Identities = 180/181 (99%), Gaps = 0/181 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      CGCGGATGAGGGATTTCGATGGCAGCTATCACACCAACATTGTGGTCAAACATAACGGCAG 60
          |||
Sbjct 1774   CGCGGATGAGGGATTTCGATGGCAGCTATCACACCAACATTGTGGTCAAACATAACGGCAG 1833

Query 61     TTGTCTGTACGTGCCCCCTGGTATCTTCAAGAGCACATGCAAGATAGACATCACGTGGTT 120
          |||
Sbjct 1834   TTGTCTGTACGTGCCCCCTGGTATCTTCAAGAGCACATGCAAGATAGACATCACGTGGTT 1893

Query 121    CCCATTTGATGACCAACACTGCGAAATGAAATTCGGTAGTTGGACTTACGATGGAAATCA 180
          |||
Sbjct 1894   CCCATTTGATGACCAACATTGCGAAATGAAATTCGGTAGTTGGACTTACGATGGAAATCA 1953

Query 181    G      181
          |
Sbjct 1954  G      1954

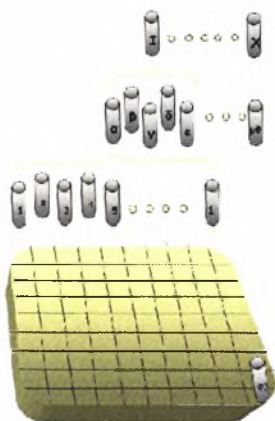
```

**Εικόνα 21:** Ομοπαράθεση του εξονίου 5 του *Bactrocera oleae* με το εξόνιο 5 της *Drosophilla melanogaster*. Βρέθηκε ομολογία 99% και ότι το εξόνιο αυτό ανήκει στην Βοαβ υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

Με τη βοήθεια του προγράμματος blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) βρέθηκε ότι η αλληλουχία του εξονίου 5 έχει 99% ομολογία με την αντίστοιχη της *Drosophilla melanogaster*, έχουν το ίδιο μέγεθος, 181 βάσεις και διαφορά μόνο σε μια βάση στην θέση 139 (στην Dm υπάρχει κυτοσίνη ενώ στον Βο μια θυμίνη) όπως φαίνεται στην Εικόνα 21. Επίσης βάση του προγράμματος βλέπουμε ότι το εξόνιο αυτό ανήκει στην Βοαβ υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

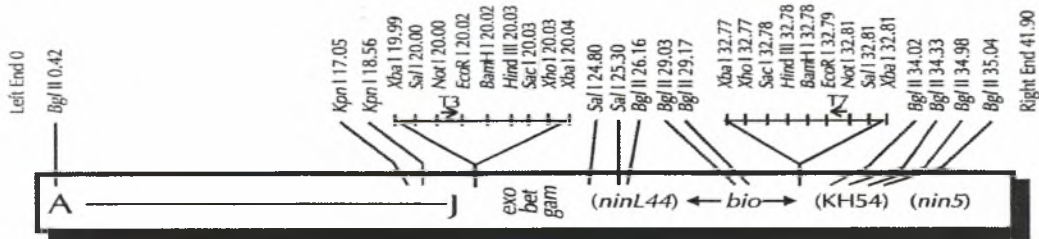
### 3.2. Εύρεση γονιδιακών τόπων του Βοαβ από γονιδιωματική βιβλιοθήκη του *Bactrocera oleae* σε φορέα βακτηριοφάγο λ

Από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη του δάκου (Εικόνα 22) η οποία έχει μετατραπεί σε συλλογή κλασμάτων (pools) είναι δυνατόν να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη συγκεκριμένων κλώνων με τη βοήθεια της PCR. Στη περίπτωση αυτή έγινε προσπάθεια εύρεσης φάγου ο οποίος περιέχει τους γονιδιακούς τόπους του Βοαβ γονιδίου. Οι εκκινητές 5F-5R (εσωτερικοί του εξονίου 5), χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την ενίσχυση του εξονίου 5 του δάκου από ολόκληρο το γονιδίωμα του. Με τη μέθοδο αυτή κάθε φορά καταλήγαμε στο θετικό εκείνο κλάσμα της βιβλιοθήκης που περιείχε το αντίστοιχο ενισχυμένο τμήμα του nAChR. Πραγματοποιήθηκε και η μέθοδος Souther κατά την οποία χρησιμοποιώντας ομόλογο ανιχνευτή του εξονίου 5 διαπιστώθηκε ότι υπάρχει αφενός ομολογία του ανιχνευτή ως προς το δείγμα κλάσματος και αφετέρου ότι πιθανότατα υπάρχει ο φάγος με το επιθυμητό ένθεμα σε μεγάλη ποσότητα στο συγκεκριμένο δείγμα (Εικόνα 24).

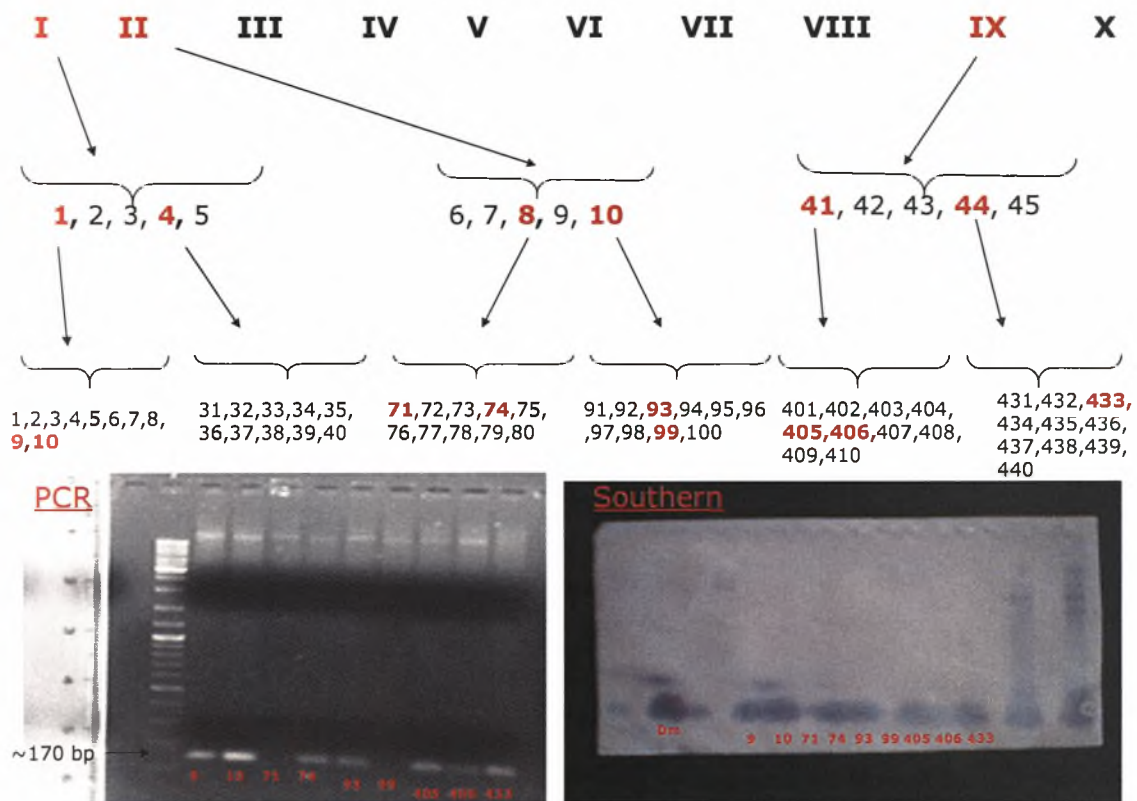


**Εικόνα 22:** Γονιδιωματική βιβλιοθήκη του δάκου η οποία έχει μετατραπεί σε συλλογή κλασμάτων (pools).





Εικόνα 23: Θέσεις κοπής του φάγου Lambda DASH II με διάφορα περιοριστικά ένζυμα

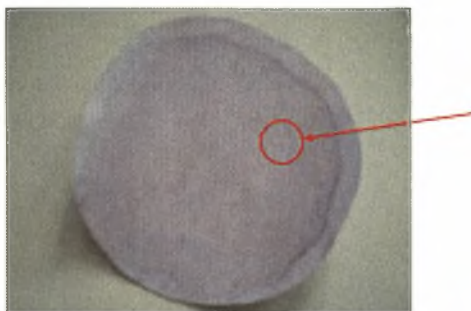


Εικόνα 24: Αναλυτική πορεία εύρεσης θετικών κλασμάτων απο τη γονιδιωματική κλασματική βιβλιοθήκη.

### 3.2.1. Διαλογή (screening) του θετικού κλάσματος

Στη συνέχεια εφόσον απομονώθηκαν τα δείγματα της φαγικής βιβλιοθήκης τα οποία έδωσαν θετικό σήμα επιλέχθηκε το κλάσμα με τον αριθμό 10, το οποίο και έδωσε το πιο έντονο σήμα στη Southern και πραγματοποιήθηκε διαλογή (primary and secondary screening) του κλάσματος. Μέσω του θετικού κλάσματος έγινε επιλογή του επιθυμητού κλώνου (Εικόνες 25 και 26).

### Primary screening

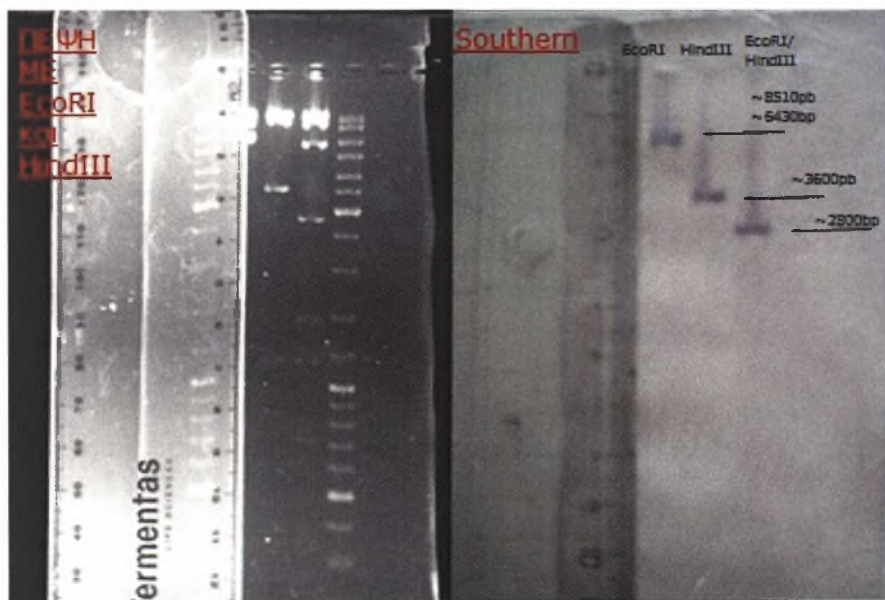


### Secondary screening



Εικόνες 25 και 26: Επιλογή του επιθυμητού κλώνου που περιέχει τμήμα DNA με το εξόνιο 5.

Ακολούθησε απομόνωση φαγικού DNA (phage preps) και πέψη αυτού με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *HindIII* (στον Πίνακα 4 παραθέτονται τα μεγέθη των τμημάτων των αντίστοιχων πέψεων). Η πέψη έτρεξε σε πήκτωμα αγαρόζης και έπειτα ακολούθησε Southern με ομόλογο ανιχνευτή του εξονίου 5 για να διαπιστωθεί εάν ο φάγος περιέχει πράγματι τμήμα του Βοα6 γονιδίου το οποίο συμπεριλαμβάνει και το εξόνιο 5 (Εικόνα 27). Στην εικόνα φαίνεται όταν έχουμε σήμα μόνο με *EcoRI* δίνει ένα τμήματα μεγέθους ~8510bp και ~6430bp, η πέψη μόνο με *HindIII* δίνει τμήμα μεγέθους ~3600bp και η διπλή πέψη δίνει τμήμα μεγέθους ~2800bp.

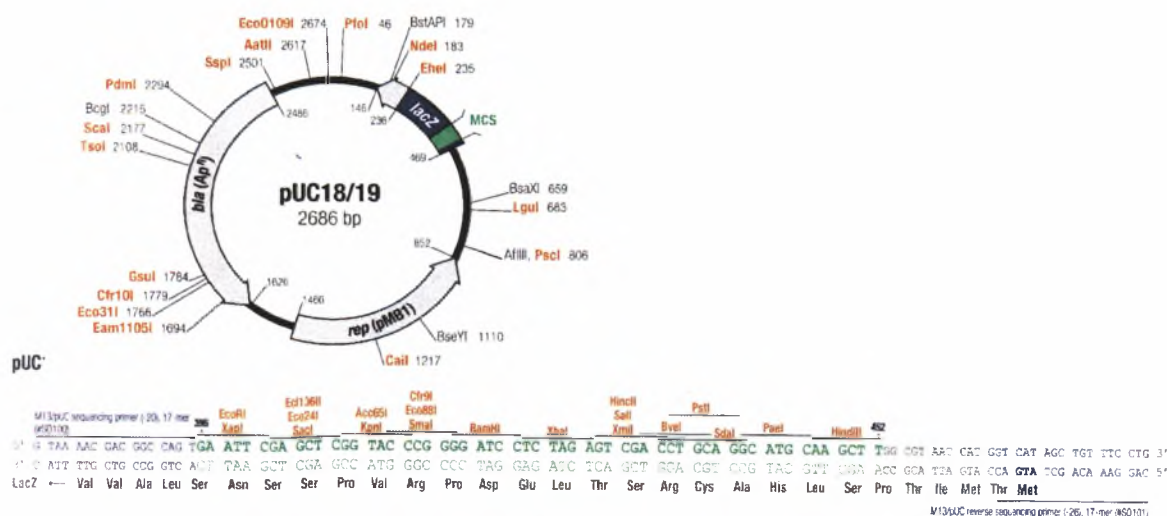


Εικόνα 27: Πέψη με περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *HindIII* φαγικού DNA με ενσωματωμένο τμήμα του Βοα6 γονιδίου. Ακριβώς δίπλα είναι η Southern με ομόλογο ανιχνευτή του εξονίου 5.

Ενδονουκλεάσες περιορισμού	Μεγέθη τμημάτων μετά την πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα									
	<i>EcoRI</i>	8.510bp	6.430bp	21kb	9kb					
<i>HindIII</i>	3.600bp	1200bp	390bp	340bp	240pb	~9.2kb	~21.2kb			
<i>EcoRI / HindIII</i>	7.800bp	2.800pb	1480bp	1200bp	700bp	390bp	340bp	240pb	21kb	9kb

**Πίνακας 4:** Στον πίνακα αναγράφεται το μέγεθος των ζωνών που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης, σύμφωνα με το πρότυπο του μάρτυρα μοριακού βάρους(L).

Στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η πέψη με τα ένζυμα *EcoRI* και *HindIII* και γίνεται απομόνωση όλων των τμημάτων της διπλής πέψης με *EcoRI* και *HindIII*. Ακολούθησε καθαρισμός του DNA και εισαγωγή του σε φορέα-πλασμίδιο pUC 19 (Εικόνα 28) με άκρα *EcoRI / HindIII* ή *HindIII / HindIII* ανάλογα με τα άκρα των τμημάτων.

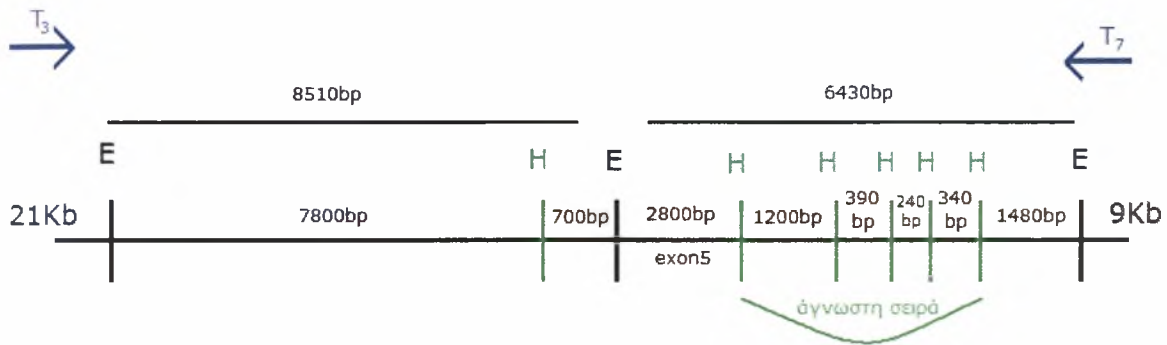


**Εικόνα 28:** Στην εικόνα παρατίθενται ο φορέας pUC19 και οι θέσεις περιοριστικών ενζύμων στον πολυσυνδέτη του φορέα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου σε ειδικά επεξεργασμένα βακτήρια *E. coli* με την διαδικασία του μετασχηματισμού και εν συνεχεία στρώθηκαν τα βακτήρια σε LB τριβλία. Επιλέχθηκαν οι λευκές αποικίες οι οποίες πιθανότατα έχουν ενσωματωμένο ένθεμα (ενδιάμεσα του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης βρίσκεται ο πολυσυνδέτης από την θέση 396<sup>11</sup> έως την 452<sup>11</sup> έτσι ώστε όταν εισαχθεί το ένθεμα να διακοπεί η έκφραση του και να σχηματίζονται λευκές αποικίες) και αναπτύχθηκαν υγρές βακτηριακές καλλιέργειες για κάθε λευκή αποικία. Έπειτα έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps) και πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *PvuII* αλλά και με τα ένζυμα *EcoRI* και *HindIII* για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του ενθέματος και καθαρισμός των δειγμάτων με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Τέλος πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες πέψεις έτσι ώστε να διαπιστωθεί ότι δεν έχει μείνει κάποια ποσότητα από φαινόλη η χλωροφόρμιο η οποία θα εμποδίσει το περιοριστικό ένζυμο να δράσει.

Το αποτέλεσμα είναι ότι κατάφεραν να κλωνοποιηθούν μόνο τα κομμάτια 2800bp, 1500bp, 700bp και δυο από τα μικρά τμήματα που κόβει το *HindIII*. Το εξόνιο 5 βρέθηκε ότι βρίσκεται εντός του τμήματος 2800bp επιβεβαιώνοντας ότι ο φάγος που απομονώσαμε περιέχει πράγματι ένα τμήμα του Βοα6 γονιδίου. Επίσης τα τμήματα 390bp, 340bp και 240bp βρίσκουμε με την βοήθεια του προγράμματος BLAST ότι ανήκουν σε ιντρόνιο του Βοα6 γονιδίου.

Έπειτα σύμφωνα με το πρωτόκολλο τα Partial digestion και χρησιμοποιώντας T<sub>3</sub> ανιχνευτή (Εικόνα 29) βρέθηκε σε πια άκρα βρίσκονται τα τμήματα DNA 7.800bp (αριστερός βραχίονας) και 1.480bp (δεξιός βραχίονας) που παίρνουμε από την πέψη με *EcoRI* και *HindIII* (Σχέδιο 2).



Σχέδιο 2: Χάρτης περιοριστικών ενζύμων *EcoRI* και *HindIII* του put-Βοα6 γονιδίου για το ένθεμα του φάγου Lambda DASH II. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το *EcoRI* και με πράσινο το *HindIII*. Το εξόνιο 5 βρίσκεται σχεδόν στο μέσον του ενθέματος.



Εικόνα 29: (Α): complete NotI (Β): partial *HindIII* (Γ): complete *HindIII*

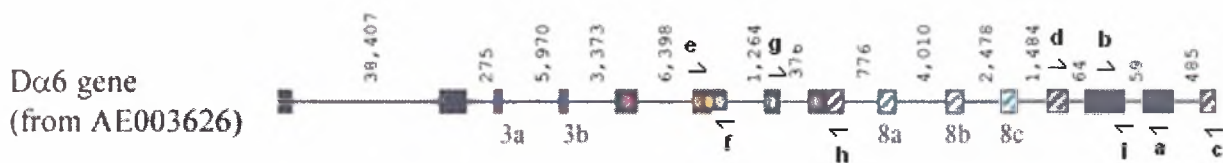
## **4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 4.1. Συζήτηση

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό την κλωνοποίηση γονιδιακών τόπων της Βοαβ υπομονάδας του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου, χρησιμοποιώντας στοιχεία από το συγγενικό έντομο *Drosophila melanogaster*. Αρχικά σχεδιάστηκαν 9 εκκινητές οι οποίοι ενισχύουν γονιδιακούς τόπους από το Da6 γονίδιο του έντομου *Drosophila melanogaster*, με σκοπό να ενισχυθούν αντίστοιχοι γονιδιακοί τόποι από το έντομο *Bactrocera oleae*. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμημάτων DNA από μερικά ζευγάρια εκκινητών και τα τμήματα αυτά απομονώθηκαν, καθαρίστηκαν, κλωνοποιήθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Αποτέλεσμα από την αλληλούχιση είναι ότι μόνο ένας γονιδιακός τόπος του Βοαβ γονιδίου ενισχύθηκε, δηλαδή ένα τμήμα του εξονίου 5 από τους Da6,5F: ACATTGGTGGTCAAACATAACGGC και Da6,5R: TTCCATCGTAAGTCCAACTACC εσωτερικούς εκκινητές. Με τη βοήθεια του προγράμματος blast βρέθηκε ότι η αλληλουχία του εξονίου 5 έχει 99% ομολογία με την αντίστοιχη της *Drosophilla melanogaster*, έχουν το ίδιο μέγεθος, 181 βάσεις και διαφορά μόνο σε μια βάση στην θέση 139 (στην Dm υπάρχει κυτοσίνη ενώ στον Βο μια θυμίνη) όπως φαίνεται στην Εικόνα 21. Το γεγονός ότι το εξόνιο 5 εμφανίζει τόσο μεγάλη συντηρητικότητα στα δυο είδη πιθανός να οφείλεται στο ότι η αλληλουχία αυτή κωδικοποιεί τμήμα του υποδοχέα με σημαντικό ρόλο, όπως είναι η σύνδεση της ακετυλοχολίνης. Το τμήμα αυτό (εξόνιο 5), εφόσον προέρχεται από το δάκο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ομόλογος ανιχνευτής, για την επιβεβαίωση με ανάλυση Southern ότι ένα δείγμα DNA είναι ομόλογο με το εξόνιο 5 καθώς και για την ανίχνευση κλώνων από φαγική γενωμική βιβλιοθήκη, οι οποίοι περιέχουν τμήματα του γονιδίου Βοαβ. Οι εκκινητές 5F-5R (εσωτερικοί του εξονίου 5), χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την ενίσχυση του εξονίου 5 του δάκου από ολόκληρο το γονιδίωμα του (φαγική βιβλιοθήκη). Με τη μέθοδο αυτή κάθε φορά καταλήγαμε στο θετικό εκείνο κλάσμα της βιβλιοθήκης που περιείχε το αντίστοιχο ενισχυμένο τμήμα του nAChR. Κατά αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε η απομόνωση φαγικών κλώνων οι οποίοι εμφάνισαν σήμα με τον ομόλογο ανιχνευτή.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαλογή ενός θετικού κλάσματος (primary and secondary screening) και το secondary screening δίνει σήμα, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη επιθυμητών κλώνων. Ακολούθησε απομόνωση φαγικού DNA (phage preps) και πέψη αυτού με τα περιοριστικά ένζυμα. Έπειτα έγινε ανάλυση κατα Southern με ομόλογο ανιχνευτή του εξονίου 5 για να διαπιστωθεί εάν ο φάγος περιέχει πράγματι τμήμα του Βοαβ γονιδίου το οποίο συμπεριλαμβάνει και το εξόνιο 5. Τα τμήματα της πέψης κλωνοποιήθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Σύμφωνα με τα μεγέθη των τμημάτων DNA που είχαμε από την πέψη μπόρεσε να χαρτογραφηθεί η περιοχή του Βοαβ γονιδίου που βρίσκεται εντός του φάγου. Έπειτα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Partial digestion και χρησιμοποιώντας T<sub>3</sub> ανιχνευτή βρέθηκε σε πια άκρα είναι τα διάφορα

τμήματα DNA που παίρνουμε από την πέψη (βλ.σχέδιο 2). Βρέθηκε ότι στον συγκεκριμένο φάγο βρίσκεται μόνο το εξόνιο 5 και ένα τμήμα του ιντρονίου 4 και 5. Το γονιδίωμα του δάκου είναι το διπλάσιο σε μέγεθος σε σχέση με της *Drosophilla melanogaster* και στα γονίδια του δάκου που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα τα εξόνια δεν διαφέρουν πολύ σε μέγεθος, επομένως πιθανόν ο λόγος που δεν βρέθηκαν άλλα εξόνια στον φάγο είναι ότι τα ιντρόνια του δάκου είναι πολύ μεγάλα σε μέγεθος. Στη συνέχεια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ο νέος φάγος ως ανιχνευτής για την εύρεση άλλων φάγων που αλληλεπικαλύπτονται, οπότε σταδιακά να βρεθούν φάγοι που συμπληρώνουν όλο το γονιδιακό τόπο του *Boa6* γονιδίου. Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης είναι το πλέον γνωστό σημείο όπου δρα το εντομοκτόνο *spinosad* (Salgado, 1997). Τα εντομοκτόνα είναι ένα ισχυρό και όλο ένα και αναπτυσσόμενο πρόβλημα στη διαχείριση πολλών εντόμων γεωργικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, και γι' αυτό ένα μεγάλο μέρος των ερευνών στοχεύει στην διασάφηση της μοριακής βάσης της ανθεκτικότητας. Είναι πολύ σημαντική η εύρεση όλων των γονιδιακών τόπων του γονιδίου *Boa6* αφενός γιατί οι πληροφορίες που υπάρχουν μέχρι σήμερα για το γονιδίωμα του δάκου είναι ελάχιστες και αφετέρου γιατί η γνώση αυτή θα δώσει την ευκαιρία για μια γενετική και μοριακή ανάλυση και επίσης θα επιτρέψει τον έλεγχο της ανθεκτικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς. Θα μπορούν να ανιχνευτούν μεταλλάξεις οι οποίες προσδίδουν ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο *spinosad* και να γίνεται εξέταση αυτών στους φυσικούς πληθυσμούς. Η μοναδική δράση του *spinosad* παρέχει ένα καινούργιο εργαλείο για τον έλεγχο των εντόμων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μείωση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας.



**Εικόνα 30:** Σχηματική απεικόνιση των γονιδιακών τόπων του *Da6* γονιδίου του εντόμου *Drosophila melanogaster*. Τα ορθογώνια απεικονίζουν τα 12 εξόνια (τα εξόνια 3 και 8 είναι περισσότερα καθώς επιδέχονται εναλλακτικό μάτισμα) και οι ενδιάμεσες ευθείες τα ιντρόνια. Τα βέλη απεικονίζουν τους εκκινητές (πίνακας 2) [Grauso M., 2002 et al.].

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### Διάλυμα ομογενοποίησης

100mM NaCl, 200mM σουκρόζη, 100mM Tris pH=7.4, 50mM EDTA, 0.5% SDS

### Διάλυμα επαναδιάλυσης TE-RNase

TE: 1mM EDTA pH=8.0, 10mM Tris-HCl pH=8.0

TE-RNase: 20μg RNase σε 1ml TE

### TBE 5X (ανά λίτρο)

54gr Tris base, 27.5gr boric acid, 20ml EDTA pH=8.0

### Διάλυμα γρωστικής 6X

0.25% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανούν της ξυλόλης, 15% φικόλλη σε H<sub>2</sub>O

### Διάλυμα 3M CH<sub>3</sub>COONa pH=5.2

Διαλύονται 408.1gr ένυδρου CH<sub>3</sub>COONa σε 800ml H<sub>2</sub>O. Ρυθμίζεται το pH στο 5.2 με κρυσταλλικό οξικό οξύ. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στο 1lit με επιπλέον H<sub>2</sub>O και το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο

### Θρεπτικό υλικό LB Broth (15gr στο λίτρο)

Σύσταση : Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr και NaCl 5gr

### Θρεπτικό υλικό LB Broth (30gr στο λίτρο)

Σύσταση :Bactrotryptone 10gr, Bacto-yeast extract 5gr, Agar 15gr και NaCl 5gr

### Διάλυμα GET

50mM glucose, 10mM EDTA pH= 8.0, 25mM Tris-HCl pH 8.0

### Διάλυμα alkali

0.2N NaOH, 1% SDS



### Διάλυμα 5M (CH<sub>3</sub>COOK) pH=4.8

Διαλύονται 49.1gr CH<sub>3</sub>COOK σε 90ml ddH<sub>2</sub>O. Ρυθμίζεται το pH στο 4.8 με 2M οξικό οξύ. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100ml με επιπλέον H<sub>2</sub>O

### Διάλυμα αποδιάταξης

1.5M, 0.5M NaOH

### Διάλυμα εξουδετέρωσης

1.5M NaCl, Tris-HCl pH=7.5

### Διάλυμα 20X SSC Buffer

3M NaCl, 0.3M κιτρικό νάτριο pH=7.0

### Διάλυμα προϋβριδοποίησης

6X SSC, 0.5% SDS, 5X Denhard's

### Διάλυμα 50X Denhard's

1% φικόλλη, 1% πολυβινυλλο-πυρρολιδόλη, 1% αλβουμίνη ορού βοός

### Διάλυμα πλύσης 1

2X SSC, 0.1% SDS

### Διάλυμα πλύσης 2

0.2X SSC, 0.1% SDS

### Διάλυμα A

100mM Tris-HCl pH=7.5, 150mM NaCl

### Διάλυμα B

Διάλυμα A και 1% Blocking solution(γάλα)

### Διάλυμα C

100mM Tris-HCl pH=9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>

### Θρεπτικό υλικό SOC medium (ανά λίτρο)

20gr tryptone, 5gr εκχύλισμα ζύμης, 0.5gr NaCl 1M, 10ml KCL 250mM και 950ml ddH<sub>2</sub>O

αποστείρωση και προσθήκη 5ml  $MgCl_2$  2M, 20ml γλυκόζη 1M και συμπλήρωση απιονισμένου  $H_2O$  μέχρι το 1L

### **SM Buffer**

Σύσταση: 5.8gr NaCl, 2gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 50ml 1M Tris-HCl pH=7.5, 5ml 2% gelatin

### **NZY agar (ανά λίτρο)**

5gr NaCl, 2gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5gr yeast extract, 10gr NZ amine, 15gr agar

### **NZY top agar(ανά λίτρο)**

5gr NaCl, 2gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15gr yeast extract, 7gr αγαρόζη

### **Διάλυμα πλύσης**

0.2M Tris-HCl pH=7.5, 2X SSC

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andrew k Jones and David B Sattelle (2007). The nicotinic acetylcholine receptor subunits Mda5 and Mdβ3 on autosome 1 of *Musca domestica* are not involved in spinosad resistance. *Insect Molecular Biology* 16(6), 691-701
- Βιοχημική τοξικολογία, Κουρέτας Δημήτριος, 2007
- Biochemistry, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, πανεπιστημιακές εκδόσεις κρήτης, 2001:τόμος 1
- Blaise Bossy, Marc Ballivet and Pierre spierer (1988). Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. *The EMBO Journal* vol.7 no.3 p.p.611-618
- Bret B.L., L.L. Larson (1997). Biological properties of spinosad Down to earth, vol.52, No 1
- Chris Bass, Stuart J. Lansolell, (2005). Molecular characterization of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea, *Ctenocephalides felis*(siphonaptera:pulicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36pp86-96
- Eckart D. Gundelfinger. How complex is the nicotinic receptor system of insects?
- Erich Sawruk, Irm Hermans- Borgmeyer (1988). Characterization of an invertebrate nicotinic acetylcholine receptor gene: the ard gene of *Drosophila melanogaster*. volume 235, number 1,2,40-46
- Fletcher BS, Pappas S, Kapatos E (1978). Changes in the ovaries of olive flies(*Dacus oleae*[Gmelin]) during the summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability. *Ecol Entomol* 3:99-107
- Goff G.Le, S. Boundy, P.J. Daborn (2003). Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:701-708
- Grauso M., R.A. Reenan, E.Culetto and D.B. Sattelle (2002). Novel Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor subunit Genes, Da5, Da6 and Da7 in *Drosophila melanogaster* identify a New and Highly Conserved Target of Adenosine Deaminase Acting on Rna-Mediated A-to-I Pre-mRNA Editing. *Genetics society of America*.
- Jian-Rong Gao, Juliane M.Deacutis and Jeffrey G. Scott(2007). Characterization of the Nicotinic Acetylcholine Receptor subunit Gene Mda2 from the House fly, *Musca domestica*. *Archives of insect Biochemistry and Physiology* 64:30-42
- John K Moulton, David A Pepper (2000). Beet armyworm (spodoptera exigna) resistance to spinosad. *Pest Manag sci* 56:842-848
- Ju-chun HSU and HAI-tung Feng (2006). Development of Resistance to spinosad in oriental fruit fly(Diptera: Tephritidae) in Laboratory selction and cross- Resistance J. *entomology*.99(3):931-936
- Ju-chun HSU et all(2004). Resstance and synergistic Effects of insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan J. *Econ Entomology*. 97(5):1682-1688
- Georgiou GP (1990). Overview of insecticide resistance. *ACS Symp Ser* 421:18-41.

- IRAC Organization. Resistance: The Facts-History & overview of resistance. [www.illac-online.org](http://www.illac-online.org)
- Hugo Ruben Arias(2008). Localization of agonist and competitive autagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochemistry International* 36, 595-645
- Kazuhiko Matsuda, (2005). Neonicotinoids show selective and Piverse Actions on Their Nicotinic Receptor Targets: Electrophysiology, Molecular Biology and Receptor Modeling Studies *Biosci. Biotechem*, 69(8), 1442-1452
- Kazuhiko Matsuda, steven D. Buckingham (2001). Neonicotinoids insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *TRENDS in pharmacological sciences* vol.22 No.11 November
- Karlin A. (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcoline receptors. *Nat Rev Neurosci* 3:102-114
- Mathiopoulos Kostas D., I Jeffrey D. Powell and Thomas F.McCutchan (1995). An Anchored Restriction-Mapping Approach Applied to the Genetic Analysis of the *Anopheles gambiae* Malaria Vector Complex 1 *Mol. Biol. Evol.* 12(1):103-112
- Motohiro Tomizawa and John E casida(2001). Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag sci* 57:914-922
- Motohiro Tomizawa and John E. Casida(2005). Neonicotinoid insecticide Toxicology: Mechanisms of selective Action. *Anny.Rer.Pharmacol.Toxicol.*45:247-68
- Natascha Rauch and Ralf Nauen (2003). Identification of Biochemical Markers Linked to Neonicotinoid cross Resistance in Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) *Archires of insect Biochemist and physiology* 54:165-176
- Neil S. Millar, Ian Denholm (2006). Nicotinic acetylcholine receptor targets for commercially important insecticides
- NS Mim Millar (2008). KIC-3 a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *British Journal of pharmacology*,1-7
- Salgado V.L. (1997). The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to earth* vol.52 No 1
- Salgado Vincent L. (1998). Studies on the Mode of Action of spinosad: Insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and physiology* 60, 91-102
- Salgado Vincent L., Joel J. Sheets (1998). Studies on the Mode of Action of spinosad:the iternal Effective concentration and pependene of Neural Excitation. *Pesticide Biochemistry and physiology* 60, 103-110
- Salgado Vincent L., Raimund Saar (2004). Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungrotoxin- sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Journal of insect physiology* 50:867-879
- Sattelle D. B, Jones A.K., Sattelle B.M., Matsuda K., Reenan R. and Biggin PC., (2005). Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays* 27:366-376
- Sayyed AI H, Dzolkhifli omar and Denis J wright (2004). Genetics of spinosad resistance in a multi-resistant field-selected population of *Plutella xylostella*. *Pest Manag sci* 60:827-832
- Scott G. Jeffrey (2008). Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects, Review, *J.Pestic. Sci.*33(3), 221-227

- Shono T. and Scott JG, (2003). Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pesticide Biochem Physiol* 75:1-7
- Stuart J. Lansdell and Neil S. Millar(2004). Molecular characterization of Da6 and Da7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Drosophila*: formation of a high-affinity a-bungarotoxin binding site revealed by expression of subunit chimeras. *Journal of Neurochemistry*, 90, 479-489
- Thany S.H., G.Lenaerst (2003). Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*12(3), 255-262
- Thompson G.D., Michel K.H., Yao R.C. (1997). The discovery of saccharopolyspora spinosa and a new class of insect control products. *Down to earth* vol 52.No1
- Tornoe C., D. BAI, L. HOLDEN-DYE (2003). Biology and genetics of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad crop protection 22:307-314
- Trent Perry, John A. McKenzie, Philip Batterham (2007). A Da6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:184-188.
- Wee L. Yee and Diane G. Alston (2006). Effects of spinosad, spinosad Bait, and chornicotiny insecticides on Mortality and control of Adult and Larral western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) , *J.Econ. Entomology* 99(5):1722-1732
- Xin-Geng Wang and Russeu H Messing(2006). Feeding and attraction of non- target flies to spinosad-based fruit fly bait. *Pest Manag sci* 62:933-939
- Ya-Ming Shao, ke Dong and Chuan- Xi Zhang (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyxmori*. *BMC Genomics*
- Yongfcng Jin, Nan Tian, Jun Cao, (2007). RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary couserration, dirergence and regulation. *BMC Evolutionary Biology*
- Zewen Liu, Martin S.Williamson (2004). A nicotinic acetylcholine receptor mutation couffering target-site resistance to imidacloprid in Nilaparvate lungs(brown plathopper). University of California



