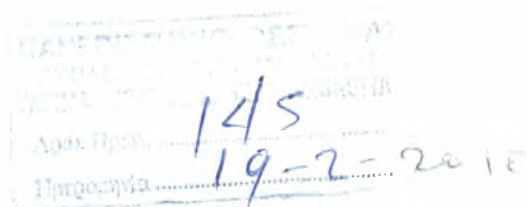




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

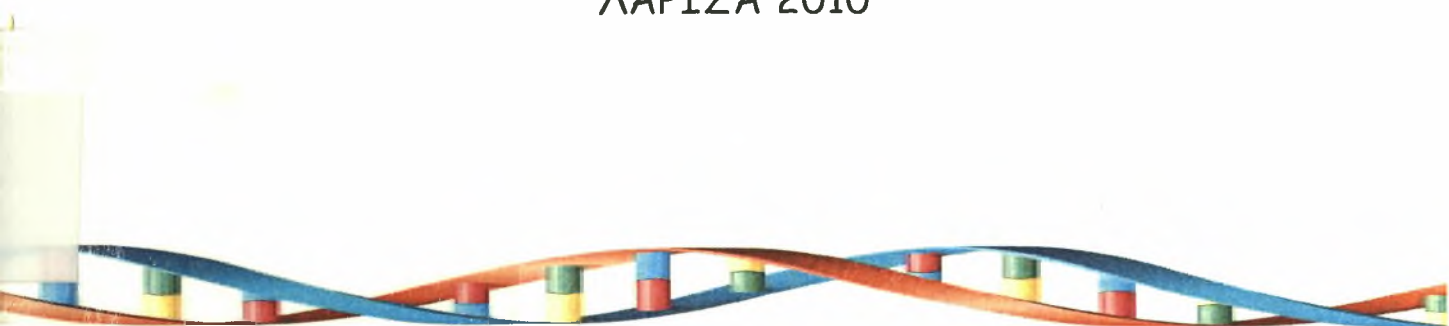
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



«ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΗΜΕΙΩΝ ΕΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ
ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ *Achilles* ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ
Bactrocera oleae»

ΞΗΡΟΜΕΡΙΤΗ ΕΛΛΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010





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

Αριθ. Εισ.: 8162/1
Ημερ. Εισ.: 06-05-2010
Δωρεά:
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΣΗΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

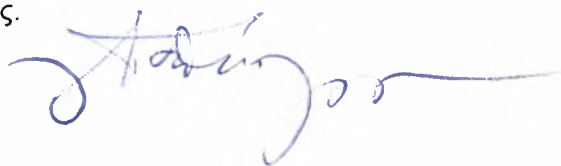


004000087078

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2009-2010, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του κ. Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή

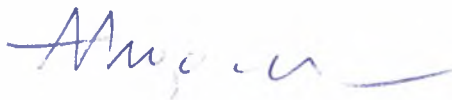
Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας φυτών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



Αυγουστίνος Αντώνιος, Διδάσκων ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



Ευχαριστίες

Τον καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και με εμπιστεύθηκε δίνοντάς μου τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Οι συμβουλές, η καθοδήγηση και η βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας υπήρξαν πραγματικά πολύτιμες,

τον καθηγητή μου κ. Αντώνιο Αυγουστίνο για τις συμβουλές και παρατηρήσεις του σε κάθε βήμα της πτυχιακής εργασίας,

την υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Τσουμάνη για τις καθοδηγήσεις της, τις πολύτιμες συμβουλές της και γενικά για την άψογη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο, τον υποψήφιο διδάκτορα Νίκο Ζυγουρίδη και την διδάκτορα Εύη Κακάνη για την εργαστηριακή βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, ευχαριστώ τον Αλέξανδρο, την οικογένειά μου και την Αθανασία για τις στιγμές που ήταν δίπλα μου όταν τους χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	- 3 -
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 4 -
1. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ.....	- 6 -
1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ.....	- 6 -
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	- 6 -
1.3 ΖΗΜΙΕΣ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ.....	- 8 -
1.4 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ.....	- 8 -
1.5 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΔΑΚΟ	- 9 -
1.6 ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ	- 10 -
1.7 ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ	- 13 -
1.8 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	- 14 -
ΣΚΟΠΟΣ	- 17 -
2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 18 -
2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	- 18 -
2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	- 20 -
2.3 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	- 22 -
2.4 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού	- 23 -
2.5 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)	- 25 -
2.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια	- 27 -
2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	- 29 -
2.8 Υβριδοποίηση κατά Southern.....	- 32 -
2.9 Απομόνωση γενωμικού DNA αρσενικών ατόμων <i>Bactrocera oleae</i>	- 36 -
2.10 Απομόνωση φαγικού DNA.....	- 38 -
2.11 Απομόνωση πλάκας βακτηριοφάγου λ	- 39 -
2.12. Αντίστροφη (Inverse) PCR.....	- 41 -
2.13. Long PCR.....	- 42 -
2.14 Klenow πολυμεράση.....	- 42 -
2.15 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA και επεξεργασία αλληλουχίας με το πρόγραμμα Omega και Blast	- 43 -
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	- 44 -
3.1 Κλωνοποίηση τμήματος 6.0kb και υποκλωνοποίηση τμημάτων 2.4kb και 3.6 kb του φάγου 443.....	- 44 -
3.2 Προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής του 443ph/6.0kb/2.4 _{E/EV} και ανάλυση αλληλουχίας.....	- 46 -
3.3 Κλωνοποίηση του 3.6 μέσω φαγικής ενίσχυσης	- 46 -
3.4 Inverse PCR στο φάγο ως θετικό control	- 47 -
3.5 Διερεύνηση θέσεων ένθεσης του ρετρομεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμα και Inverse PCR στο γονιδιωματικό DNA του εντόμου <i>Bactrocera oleae</i>	- 48 -
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 49 -
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 52 -

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιεργειών. Παραδοσιακά, οι πληθυσμοί του ελέγχονται με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Λόγω της οικονομικής σημασίας του, πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι δακοπροστασίας πιο αποτελεσματικές από αυτές που εφαρμόζονται μέχρι σήμερα. Ωστόσο, εμπόδιο για την ανάπτυξη γενετικών μεθόδων διαχείρισης αποτελεί η ελλιπής γνώση της μοριακής οργάνωσης του εντόμου. Η ανάλυση της οργάνωσης του Υ χρωμοσώματος, στο οποίο οφείλεται ο φυλοκαθορισμός, θα μπορούσε να οδηγήσει στη μοριακή διάγνωση του φύλου, συνεισφέροντας έτσι στη βελτιστοποίηση μεθόδων βιολογικού ελέγχου του εντόμου που βασίζονται στην απελευθέρωση στείρων αρσενικών ατόμων (Sterile Insect Technique, SIT). Επιπλέον, το γεγονός ότι το συγκεκριμένο χρωμόσωμα έχει προταθεί ως πηγή συσσώρευσης ρετρομεταθετών στοιχείων, καθιστά εύλογη την προσπάθεια ανάλυσης της δομής και λειτουργίας τους. Το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles* του δάκου εμφανίζει προτίμηση στο Υ χρωμόσωμα. Η απομόνωσή του αναμένεται να αποκαλύψει γονιδιωματικές αλληλουχίες γειτονικές των σημείων ένθεσής του, ορισμένες από τις οποίες θα προέρχονται από το χρωμόσωμα αυτό και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως Υ-ειδικοί ανιχνευτές. Η δυνατότητα σχεδιασμού εκκινητών με βάση τις τερματικές περιοχές του *Achilles* μπορεί να δώσει τη δυνατότητα απομόνωσης τέτοιων αλληλουχιών. Στόχος ήταν η ολοκλήρωση της δομής του *Achilles*, που κατ' επέκταση θα οδηγούσε στον εντοπισμό και τη διερεύνηση των πολυμορφισμών των σημείων ένθεσής του στο γονιδίωμα του δάκου. Στα πλαίσια της προσπάθειας αυτής επιτεύχθηκε η υποκλωνοποίηση και ανάλυση επιμέρους τμημάτων του φάγου 443, δίνοντάς μας τη δυνατότητα σχεδιασμού εκκινητών για την απομόνωση της περιοχής ανοδικά της τρανσποζάσης. Ωστόσο, η αδυναμία κλωνοποίησης αυτού του τμήματος του φάγου, όπου δυνητικά αναμενόταν και ο εντοπισμός της 5' LTR αλληλουχίας, μας οδήγησε σε συμπεράσματα σχετικά με τις ιδιότητες των LTR περιοχών των ρετρομεταθετών στοιχείων.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΕΛΙΑ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ



Εικόνα 1. «Μες στις ελιές τις ασημόκλωνες και στο γαλάζιο απόσκιο...» Οδύσσεια, Ν.Καζαντζάκης

Πολύτιμο δώρο της φύσης, η ελιά και ο καρπός της, έχουν συνοδέψει την ανθρωπότητα από τα προϊστορικά χρόνια στο μακράιωνα ταξίδι της ιστορίας της. Απολιθώματα φύλλων ελιάς αποδεικνύουν πως η καταγωγή του υπεραιώνobiου δέντρου προϋπάρχει κατά πολλές χιλιετίες της εμφάνισης του ανθρώπου πάνω στον πλανήτη. Η ελιά είναι δέντρο ιερό και πανάρχαιο, στενά συνδεδεμένο με τη ζωή των Ελλήνων αλλά και με όλη την υπόλοιπη λεκάνη της Μεσογείου. Το ήπιο κλίμα που επικρατεί στο χώρο αυτό ευνόησε τη διάδοση και καλλιέργειά της. Η καλλιέργεια της ήμερης ποικιλίας που δίνει το λάδι τοποθετείται

γύρω στο 3.500 π.Χ.. Οι Φοίνικες, λαός της ανατολικής Μεσογείου, διέδωσαν πιθανότατα την καλλιέργεια της ελιάς στην Κρήτη και στα παράλια της Ελλάδος και οι Έλληνες αργότερα στους λαούς της Δυτικής Μεσογείου.

Η ελιά, σύμβολο της ειρήνης και έπαθλο των νικητών στους Ολυμπιακούς αγώνες, δώρο της Αθηνάς, της θεάς της σοφίας, στην ίδρυση της πόλης των Αθηνών, επηρέασε με το πέρασμα του χρόνου τα έθιμα, τις παραδόσεις, τα τραγούδια, τις εικαστικές τέχνες, τις τέχνες του λόγου, τη λατρεία των θρησκειών όλων των λαών που συνδέονται μαζί της. Η ασημοπράσινη παρουσία της σφραγίζει το μεσογειακό τοπίο. Ένας ιδιαίτερος πολιτισμός, ο πολιτισμός της ελιάς, καταγράφεται στον ευρύτερο αυτό γεωγραφικό χώρο, συνδέοντας τους πολιτισμούς που αναπτύχθηκαν εκεί στη διάρκεια της ιστορίας της.

Η *Olea europaea*, το δένδρο των ελαιοπαραγωγών χωρών της Ευρώπης με τα προϊόντα του, τις μαύρες και πράσινες ελιές και το πολύτιμο για τη διατροφή και την υγεία ελαιόλαδο, στηρίζει την οικονομία και το εμπόριο των λαών που έζησαν ή ζούσαν στην σκιά του. Τα υποπροϊόντα της ελιάς, από τους αρχαίους χρόνους χρησιμοποιούνται στο χώρο της φαρμακευτικής και του καλλωπισμού. Ακόμη και η υγιεινή του σώματος γινόταν αρχικά με το λάδι και αργότερα με το σαπούνι. Για τον φωτισμό χρησιμοποιούσαν στα λυχνάρια λάδι και για τη θέρμανση τον πυρήνα των καρπών της ελιάς. Το γερό της ξύλο χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για την κατασκευή εργαλείων, επίπλων και ως οικοδομικό υλικό. Επιπλέον το φύλλωμά της αποτελεί πολύτιμο λίπασμα (Κόλλιας 2001).

Η ελιά είναι γένος καρποφόρων δένδρων της οικογένειας των ελαιοειδών (*oleidae*). Είναι δέντρο αειθαλές, έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχρωσα στην κάτω. Τα άνθη της είναι λευκωπά, μονοπέταλα και πολύ μικρά, σχηματίζουν ταξιανθία βότρυος και εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, ενώ ο καρπός ωριμάζει και συλλέγεται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και αρχές του χειμώνα. Ο κορμός της ελιάς είναι οζώδης και καλύπτεται από τεφρόφαιο φλοιό. Ευδοκιμεί σε κλίματα εύκρατα χωρίς ακρότητες θερμοκρασίας (με μέση ετήσια θερμοκρασία 16°C) και υγρασίας, για αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μεσογειακή ζώνη.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ως τη δημιουργία του καρπού της ελιάς

Η Μεσόγειος καλύπτει το 99% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου. Σήμερα στην Ελλάδα υπάρχουν περίπου 120.000.000 ελαιόδενδρα (για έναν πληθυσμό 10.000.000 περίπου) που καλύπτουν έκταση 6 περίπου εκατομμυρίων στρεμμάτων χαρίζοντας της την τρίτη θέση στη παραγωγή ελαιόλαδου παγκοσμίως. Περίπου 450.000 ελληνικές οικογένειες ασχολούνται με την καλλιέργεια και επεξεργασία του ελαιόδενδρου σε όλες τις περιοχές της χώρας. Η Ελλάδα είναι ο μεγαλύτερος εξαγωγέας Εξαιρετικού ή Έξτρα Παρθένου Ελαιόλαδου, που θεωρείται η καλύτερη ποιότητα ελαιόλαδου (Υπουργείο Εξωτερικών 2009).

Η ευρωστία και η παραγωγικότητα της ελιάς όμως μπορούν να διαταραχθούν από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών που προσβάλλουν το φυτό ή από την δράση παρασίτων και εντόμων. Οι ασθένειες έχουν προέλευση κυρίως μυκητιακή. Η μόνη βακτηριακή πάθηση είναι ο καρκίνος της ελιάς. Οι εχθροί της ελιάς είναι κυρίως έντομα όπως ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*) ο οποίος προκαλεί ζημιές στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, ο θρίπας (*Liothrips oleae*) ο οποίος προσβάλλει τους βλαστούς και τα φύλλα και πολλές φορές προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση καρπών και πτώση τους ή η μαργαρόνια (*Palpita unionalis*) η οποία προσβάλλει τα φύλλα. Ο σημαντικότερος όμως εχθρός παραμένει ο δάκος (*Bactrocera oleae*) (Κόλλιας, 2001).

Η ευρωστία και η παραγωγικότητα της ελιάς όμως μπορούν να διαταραχθούν από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών που προσβάλλουν το φυτό ή από την δράση παρασίτων και εντόμων. Οι ασθένειες έχουν προέλευση κυρίως μυκητιακή. Η μόνη βακτηριακή πάθηση είναι ο καρκίνος της ελιάς. Οι εχθροί της ελιάς είναι κυρίως έντομα όπως ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*) ο οποίος προκαλεί ζημιές στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, ο θρίπας (*Liothrips oleae*) ο οποίος προσβάλλει τους βλαστούς και τα φύλλα και πολλές φορές προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση καρπών και πτώση τους ή η μαργαρόνια (*Palpita unionalis*) η οποία προσβάλλει τα φύλλα. Ο σημαντικότερος όμως εχθρός παραμένει ο δάκος (*Bactrocera oleae*) (Κόλλιας, 2001).

Η ευρωστία και η παραγωγικότητα της ελιάς όμως μπορούν να διαταραχθούν από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών που προσβάλλουν το φυτό ή από την δράση παρασίτων και εντόμων. Οι ασθένειες έχουν προέλευση κυρίως μυκητιακή. Η μόνη βακτηριακή πάθηση είναι ο καρκίνος της ελιάς. Οι εχθροί της ελιάς είναι κυρίως έντομα όπως ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*) ο οποίος προκαλεί ζημιές στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, ο θρίπας (*Liothrips oleae*) ο οποίος προσβάλλει τους βλαστούς και τα φύλλα και πολλές φορές προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση καρπών και πτώση τους ή η μαργαρόνια (*Palpita unionalis*) η οποία προσβάλλει τα φύλλα. Ο σημαντικότερος όμως εχθρός παραμένει ο δάκος (*Bactrocera oleae*) (Κόλλιας, 2001).



1. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) ανήκει ταξινομικά στην οικογένεια Tephritidae των δίπτερων εντόμων. Αυτή περιλαμβάνει τις “μύγες των φρούτων”, όπως χαρακτηρίζονται εκείνες που εναποθέτουν τα αυγά τους στα ώριμα ή ανώριμα φρούτα έτσι ώστε οι προνύμφες τους να αναπτύσσονται μέσα σε αυτά καθιστώντας τα μη εμπορεύσιμα.

Ο δάκος της ελιάς είναι ένα από τα μικρότερα είδη στο γένος. Το ενήλικο θηλυκό έχει περίπου 5mm μήκος και έκταση φτερών 10mm. Η κεφαλή του είναι ξανθοκίτρινη και τα μάτια του τέλειου εντόμου έχουν πράσινες μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας



Εικόνα 3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά θηλυκού ατόμου δάκου



Εικόνα 4. Μορφολογικές διαφορές μεταξύ θηλυκού και αρσενικού ατόμου δάκου.

έχει χρώμα κιτρινοκαφέ και η κοιλιά είναι καστανοκίτρινη. Τα φτερά είναι διαφανή με μια μικρή καστανή κηλίδα. Οι αλτήρες είναι λευκοί και τα πόδια κιτρινοκόκκινα. Το αυγό έχει χρώμα λευκό με μήκος και διάμετρο 0.7mm και 0.2mm αντίστοιχα. Η προνύμφη είναι επίσης λευκόχρωμη, χωρίς πόδια και με μήκος 7 mm. Τέλος το βομβύκιο είναι ωσειδές, με χρώμα που ποικίλει από κίτρινο ως καφέ και με μήκος 4-5mm (Κυπριακή Δημοκρατία, Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος 2005).

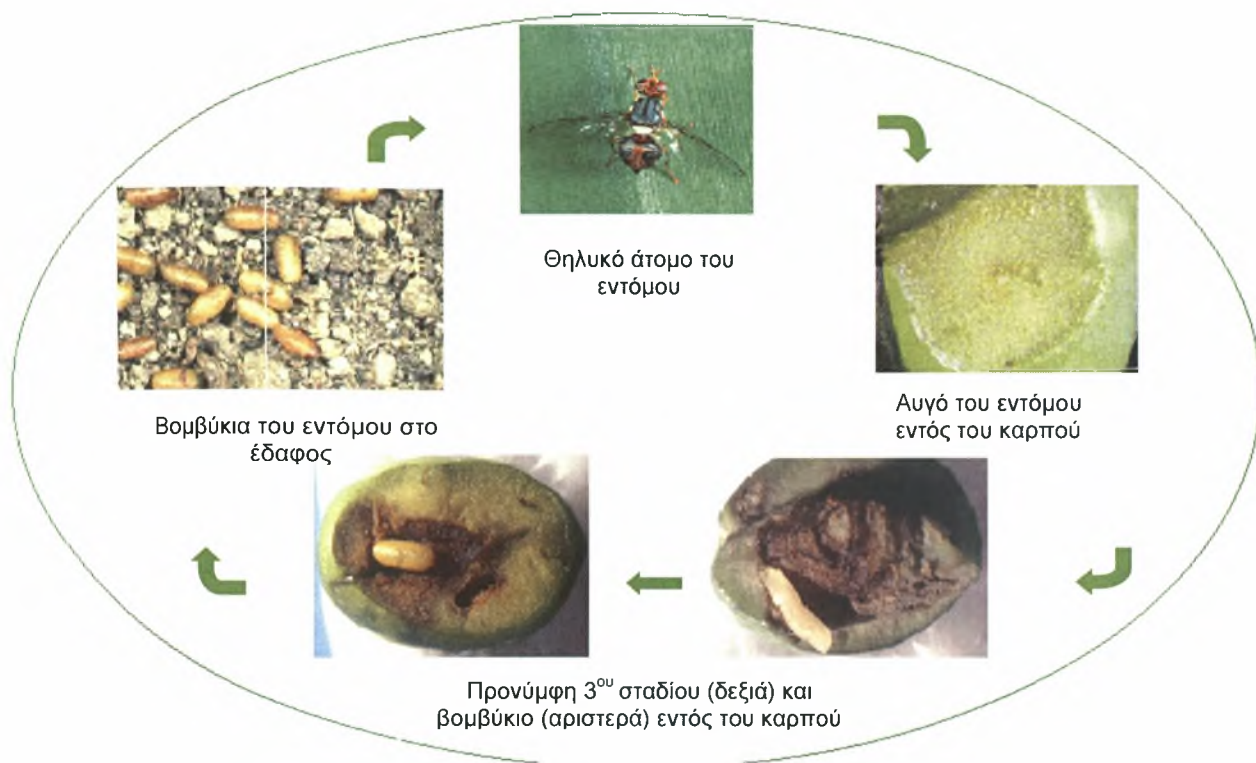
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο δάκος έχει 3 - 5 γενεές, δηλαδή ο κύκλος ζωής του με τα διάφορα στάδια (αυγό – προνύμφη – χρυσαλλίδα – τέλειο έντομο) επαναλαμβάνεται 3-5 φορές το χρόνο. Αυτό εξαρτάται από το χρονικό διάστημα που υπάρχει ελαιόκαρπος πάνω στα ελαιόδεντρα και από τις καιρικές συνθήκες. Για μια καλή ανάπτυξη του δάκου η μέση ημερήσια θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 24° C, ούτε να είναι κάτω των 9°C. Όταν οι θερμοκρασίες υπερβούν τους 35°C και είναι παρατεταμένες, μειώνονται οι πληθυσμοί του εντόμου, λόγω θνησιμότητάς του. Παράλληλα μειώνεται η δραστηριότητα και γονιμότητά του. Εκτός της θερμοκρασίας, η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία ευνοεί τη δράση και ανάπτυξη του δάκου.



Εικόνα 5. Εναπόθεση αυγών από θηλυκό άτομο

Ο δάκος διαχειμάζει στο στάδιο της χρυσαλλίδας στο έδαφος. Είναι δυνατό όμως να τον συναντήσουμε κρυμμένο και αδραντοποιημένο σε ρωγμές του φλοιού των δέντρων στο στάδιο του τελείου εντόμου. Από τον Ιούνιο, η χρυσαλλίδα μεταμορφώνεται σε τέλειο έντομο. Μετά την σύζευξη και αφού ξυλοποιηθεί ο πυρήνας και παρέλθουν οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, το θηλυκό τέλειο έντομο εναποθέτει ένα ή περισσότερα αυγά πάνω στον ελαιόκαρπο.



Εικόνα 6. Βιολογικός κύκλος του εντόμου

Τα τέλεια έντομα τρέφονται από μελιτώδη εκκρίματα των δέντρων. Κάθε θηλυκό γεννά περίπου 250 αυγά. Τα αυγά εκκολάπτονται εντός 2-3 ημερών σε προνύμφες. Το στάδιο αυτό του εντόμου προκαλεί τη ζημιά στον ελαιόκαρπο. Η προνύμφη αφού τραφεί ικανοποιητικά (περίπου 20 ημέρες) φτιάχνει το βομβύκιο εντός 8 ως 10 ημερών και μετατρέπεται σε χρυσαλλίδα. Από το βομβύκιο βγαίνει το τέλειο έντομο και κλείνει με αυτόν τον τρόπο ο κύκλος ζωής του εντόμου, δηλαδή 1 γενεά (30-35 ημέρες). Οι καλοκαιρινές γενεές μετατρέπονται σε χρυσαλλίδες στον ελαιόκαρπο και οι φθινοπωρινές στο έδαφος (Κυπριακή Δημοκρατία, Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος 2005).

1.3 ΖΗΜΙΕΣ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ

Η προκαλούμενη ζημιά από το δάκο ποικίλλει από έτος σε έτος, από περιοχή σε περιοχή και διακρίνεται σε ποιοτική και ποσοτική ζημιά. Το ενήλικο θηλυκό μπορεί να εναποθέσει έως και 400 αυγά, συνήθως ένα σε κάθε καρπό, σημαίνοντάς τον με τους ίδιους του τους χυμούς, έτσι ώστε να αποτραπεί η έλευση άλλων θηλυκών. Μετά από επώαση 2-6 ημερών, τα αυγά εκκολάπτονται σε μικρές λάρβες οι οποίες είναι δύσκολο να διακριθούν έως ότου τραφούν για λίγο και αναπτυχθούν. Καθώς τρέφονται όμως σχηματίζουν ακανόνιστες στοές μέσα στον καρπό καταστρέφοντας τη σάρκα και επιτρέποντας την είσοδο βακτηρίων και μυκήτων. Κάθε προνύμφη για να συμπληρώσει την ανάπτυξή της καταναλώνει από το 1/5 έως το 1/4 του μεσοκάρπιου ενός μέσου μεγέθους καρπού. Πολλοί καρποί οδηγούνται σε πρόωρη πτώση ενώ η παρουσία προνυμφών καταστρέφει την αξία της επιτραπέζιας ελιάς με προφανείς οικονομικές συνέπειες. Η ποιοτική υποβάθμιση οφείλεται στη ρύπανση από τα περιττώματα της προνύμφης και στη σήψη από την είσοδο βακτηρίων και μυκήτων. Οι οργανισμοί αυτοί αποσυνθέτουν την ελιά και αυξάνουν το επίπεδο των ελεύθερων λιπαρών οξέων (οξύτητα) του λαδιού (Muir et al 2003).



Εικόνα 7. Προσβολή του ελαιόκαρπου από ενήλικα άτομα

1.4 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ



Εικόνα 8. Δακοπαγίδα με ερεθίσματα το κίτρινο χρώμα και τη φερομόνη

Η μεγάλη οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας κάνει επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης μεθόδων καταπολέμησης του δάκου. Ο έλεγχος των φυσικών πληθυσμών του εντόμου στηρίζεται σε μεγάλο ποσοστό στον ψεκασμό. Όμως η παρατεταμένη χρήση των εντομοκτόνων έχει σοβαρές συνέπειες στην ισορροπία των οικοσυστημάτων αλλά και στη μόλυνση του περιβάλλοντος. Αυτό οδήγησε τον άνθρωπο στην αναζήτηση και εύρεση φιλικότερων

μεθόδων, όπως η χρήση δακοπαγίδων. Αυτές οι παγίδες εκμεταλλεύονται διάφορα ερεθίσματα (ερεθίσματα φαγητού, οπτικά ερεθίσματα, ορμόνες-φερορμόνη) για να προσελκύσουν το έντομο και να παγιδευτεί εκεί. Τέλος, μέσα στα πλαίσια ανεύρεσης ασφαλέστερων μεθόδων είναι η τεχνική στείρων εντόμων (S.I.T). Η τεχνική αυτή συνίσταται στη μαζική παραγωγή ή συλλογή ατόμων, στη στείρωσή τους με εφαρμογή ακτινοβολίας γ και στην απελευθέρωσή τους στον αγρό με ελεγχόμενο τρόπο έτσι ώστε να μειώνεται ο αριθμός των γόνιμων διασταυρώσεων στους φυσικούς πληθυσμούς και συνεπώς να περιορίζεται η αύξηση του πληθυσμού.

1.5 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΔΑΚΟ

Για την ανάπτυξη εναλλακτικών, εκλεκτικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου του παρασίτου, απαιτείται η έρευνα και η κατανόηση όχι μόνο της βιολογίας – οικολογίας του αλλά και της γενετικής του. Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία του παρασίτου περιορίζονται στους παράγοντες διατροφής και διαβίωσης (θερμοκρασία, υγρασία, κλπ), στη συμπεριφορά του κατά τη σύζευξη (επίδραση φυλετικών φερομονών) και την ωοτοκία (καταλληλότητα υποστρωμάτων), καθώς και στις τεχνικές παραμέτρους όσον αφορά την εργαστηριακή ανάπτυξη των στελεχών του (Mazomenos, 1989; Tzanakakis, 1989). Ακόμη, έρευνες σε βιοχημικό επίπεδο ενζυμικών πολυμορφισμών σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου αποτέλεσαν τις πρώτες γενετικές πληροφορίες, ενώ μοριακές μελέτες κατέληξαν στην κλωνοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της επιδερμίδας (Zouros and Loukas, 1989). Παρά το γεγονός ότι ο δάκος αποτελεί ένα έντομο εξαιρετικής οικονομικής σημασίας, η ανάλυσή του σε μοριακό και γενετικό επίπεδο υστερεί σε αντίθεση με άλλα είδη της οικογένειας Tephritidae, όπως η *Ceratitis capitata* που αποτελεί πλέον οργανισμό μοντέλο για την οικογένεια. Οι πρώτες κυτταρολογικές αναφορές στο δάκο σχετίζονταν με τον καρυότυπο των πυρήνων της μίτωσης, όπου διαπιστώθηκε η ύπαρξη πέντε ζευγών σωματικών χρωμοσωμάτων και ενός ζεύγους φυλετικών και επιπλέον καθορίστηκαν ως ετερογαμετικά τα αρσενικά άτομα (Frizzi and Springetti, 1953; Krimbas 1963; Mavragani – Tsipidou et al, 1992). Η ανάλυση των μεταφασικών πολυταινικών χρωμοσωμάτων αποτέλεσαν σημαντικά κυτταρογενετικά δεδομένα για την περαιτέρω αξιοποίηση τους σε τεχνικές όπως η *in situ* υβριδοποίηση. Η εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου στα πολυταινικά του χρωμοσώματα έδωσε τη δυνατότητα χαρτογράφησης 10 αλληλουχιών DNA (εννιά ετερόλογων δεικτών από την *C. capitata* και ενός από τη *D. melanogaster*) ώστε να είναι πλέον διαθέσιμοι μοριακοί δείκτες για όλα τα σωματικά χρωμοσώματα (Zampetaki et al, 1999). Με τον τρόπο αυτό έγινε εφικτή η συσχέτιση γενετικών και μοριακών πληροφοριών στα στελέχη του εντόμου καθώς και ο καθορισμός ομολογιών (φυλογενετικών σχέσεων) με άλλα είδη της οικογένειάς του. Πεδίο έρευνας αποτέλεσε ακόμη και η απόκριση του δάκου στο περιβαλλοντικό στρες. Οι μελέτες, που επικεντρώθηκαν στο πρότυπο των θερμοεπαγόμενων διογκώσεων που προκαλούνται στα

χρωμοσώματα, οδήγησαν στην χαρτογράφηση γονιδίων θερμικού σοκ (Zampetaki et al, 2000). Πρόσφατες προσεγγίσεις είχαν σαν αποτέλεσμα την κατασκευή μιας γονιδιωματικής και δύο cDNA βιβλιοθηκών που προέρχονταν από ενήλικα άτομα δάκου και των δύο φύλων και την κλωνοποίηση των γονιδίων φυλοκαθορισμού (*sex lethal, double sex*) (Lagos et al, 2005). Επιπλέον, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν 64 αλληλουχίες μικροδορυφορικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν σε αναλύσεις της πληθυσμιακής δομής και της γενετικής ροής Μεσογειακών πληθυσμών του εντόμου, καθώς και στη διερεύνηση της πορείας εξάπλωσής του στη λεκάνη της Μεσογείου (Augustinos et al, 2005). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί η απομόνωση του γονιδίου της αλκοολικής δεϋδρογονάσης (*Adh*) μετά από κλωνοποίησή του σε κύτταρα ζύμης, καθώς ο γονιδιακός αυτός τόπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης σε πειράματα μετασχηματισμού του εντόμου (Benos et al, 2000).

Ωστόσο εξακολουθούν να παραμένουν αδιευκρίνιστα στοιχεία που συνθέτουν τη βιολογία και τη γενετική του εντόμου, με μελλοντικές μελέτες να εστιάζουν τόσο στην κλασική όσο και στη μοριακή γενετική του. Για την ανάπτυξη μεθόδων γενετικού ελέγχου, ιδιαίτερης σημασίας κρίνεται η καλλιέργεια εργαστηριακών στελεχών που θα χαρακτηρίζονται από φαινοτυπικούς και βιοχημικούς δείκτες αλλά και μεταλλάξεις. Τα δεδομένα αυτά πρόκειται να διευκολύνουν περαιτέρω την αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος του δάκου, συμπεριλαμβανομένου των σημείων ένθεσης ρετρομεταθετών στοιχείων που έχουν σχέση με το φυλοκαθορισμό του εντόμου.

1.6 ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ

Η διαιώνιση των ειδών μέσω σεξουαλικής αναπαραγωγής αποτελεί τον κανόνα στο ζωικό βασίλειο. Αρσενικά και θηλυκά άτομα διαφέρουν τόσο σε μορφολογικό όσο και σε επίπεδο φυσιολογίας και συμπεριφοράς. Γι' αυτό το σεξουαλικό διμορφισμό ευθύνονται δυο διαδικασίες: ο καθορισμός και η διαφοροποίηση του φύλου. Ο όρος φυλοκαθορισμός αναφέρεται στην αναπτυξιακή πορεία που αποδίδει στο έμβρυο τον αρσενικό ή θηλυκό χαρακτήρα. Τα γονίδια στα οποία υπόκειται η αναπτυξιακή πορεία καλούνται γονίδια φυλοκαθορισμού. Ο όρος φυλετική διαφοροποίηση αναφέρεται στην έκφραση των γονιδίων της φυλετικής διαφοροποίησης (τα οποία ελέγχονται από αυτά του φυλοκαθορισμού), η έκφραση των οποίων δίνει το έναυσμα για το σχηματισμό των δομών που χαρακτηρίζουν τα αρσενικά και θηλυκά ενήλικα άτομα (Sanchez, 2008).

Το ζωικό βασίλειο διαθέτει έναν πλούτο μηχανισμών φυλοκαθορισμού (Bull, 1983) ιδιαίτερα εμφανή στο βασίλειο των εντόμων, όπου εμφανίζονται όλοι οι γνωστοί μηχανισμοί φυλοκαθορισμού. Μπορούμε να διακρίνουμε τρεις κύριες κατηγορίες αυτών των μηχανισμών ανάλογα με την προέλευση του πρωτογενούς γενετικού φυλοκαθοριστικού σήματος, το οποίο μπορεί να προέρχεται από το ζυγωτό, τη μητέρα ή το περιβάλλον. Ο φυλοκαθορισμός μπορεί να βασίζεται σε χρωμοσωμικές διαφορές, με το ένα φύλο να είναι ομοχρωμικό και το άλλο ετεροχρωμικό για τα φυλετικά χρωμοσώματα. Κάτι τέτοιο συμβαίνει στο είδος *Drosophila*, στο πιο καλά μελετημένο

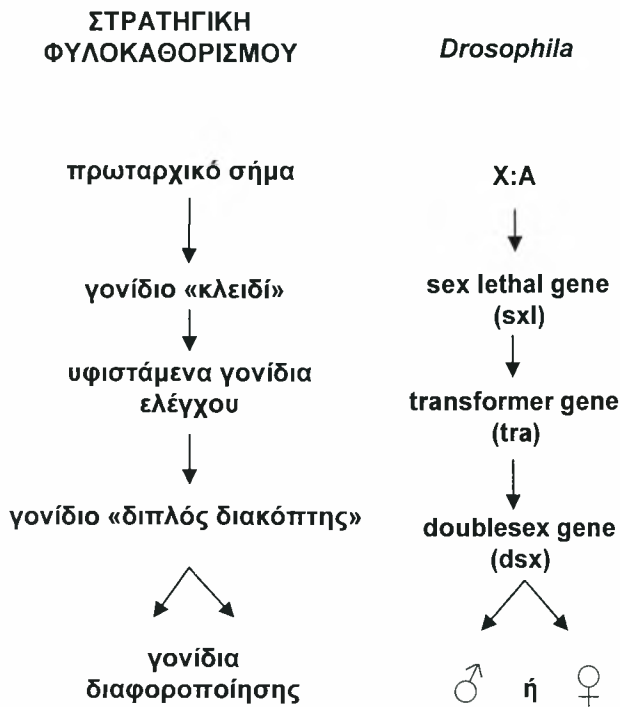
οργανισμό-μοντέλο στο βασίλειο των εντόμων. Ο φυλοκαθορισμός στη *Drosophila* οφείλεται στο λόγο των φυλετικών προς τα αυτοσωμικά (χρωμοσώματα: τα θηλυκά είναι 2X/2A και τα αρσενικά είναι X/2A (όπου X το X χρωμόσωμα και A μια απλοειδής σειρά χρωμοσωμάτων). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ο λόγος X/A έχει περισσότερο προγνωστικό παρά ενεργό καθοριστικό ρόλο στο καθορισμό του φύλου, έτσι ώστε φυλοκαθοριστικό ρόλο να έχει ο αριθμός των X χρωμοσωμάτων αντί του λόγου X/A (Erickson and Qunintero, 2007).

Σε άλλα είδη το ετεροχρωμικό φύλο φέρει τους αρρενοκαθοριστικούς παράγοντες στο Y χρωμόσωμα. Κάτι τέτοιο συμβαίνει στα γένη της οικογένειας Tephritidae (*Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha*) και στα είδη του γένους *Musca*. Σε μερικούς πληθυσμούς *Musca* οι αρρενοκαθοριστικοί παράγοντες μπορεί παρόλα αυτά να βρίσκονται σε ένα από τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Σε όλα αυτά τα παραδείγματα, το θηλυκό είναι το ομοχρωματικό φύλο (XX) και το αρσενικό το ετεροχρωματικό (XY). Εντούτοις υπάρχουν έντομα, όπως τα λεπιδόπτερα (πεταλούδες και σκώροι), στα οποία το αρσενικό είναι το ομοχρωματικό φύλο (ZZ) και το θηλυκό το ετεροχρωματικό (ZW) (η χρήση των Z και W χρησιμοποιείται για τη διάκριση από το X και Y) (Ezaz et al, 2006). Σε άλλα είδη η χρωμοσωμική διαφορά μεταξύ αρσενικού και θηλυκού βασίζεται στην απλοειδία ή τη διπλοειδία, π.χ. στα *Apis* τα θηλυκά είναι διπλοειδή και τα αρσενικά απλοειδή.

Στα περισσότερα είδη το φύλο ενός ατόμου καθορίζεται κατά τη γονιμοποίηση όπως π.χ. στη *Drosophila*, *Ceratitis*, *Bactrocera* και *Musca*, όπου η χρωμοσωμική σύσταση του ζυγωτού καθορίζεται από τη χρωμοσωμική σύσταση των γαμετών (Bull, 1983). Παρόλα αυτά σε άλλα είδη οι φυλοκαθοριστικές χρωμοσωμικές διαφορές ανακύπτουν από την εξειδικευμένη συμπεριφορά των φυλετικών χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της εμβρυονικής ανάπτυξης. Η εξάλειψη φυλετικών χρωμοσωμάτων ως μηχανισμός φυλετικού καθορισμού είναι εμφανής στο *Sciara* (*Sciaridae*) στο οποίο όλοι οι ζυγώτες ξεκινούν με σύσταση 3X/2A, με την απώλεια του ενός ή των δύο πατρικών X χρωμοσωμάτων να καθορίζει το κατά πόσο το ζυγωτό θα είναι θηλυκό (2X/2A) ή αρσενικό (X0/2A). Στα *Coccids* (*Hemiptera*) η εξάλειψη ή ο ετεροχρωματισμός όλων των πατρικών χρωμοσωμάτων παράγει λειτουργικούς διπλοειδείς ή απλοειδείς ζυγώτες οι οποίοι αναπτύσσονται σε θηλυκά ή αρσενικά αντίστοιχα. Τέλος, το περιβάλλον ενός εντόμου μπορεί να λειτουργήσει ως καθοριστής του φύλου (Gerbi, 1986). Η αναλογία που καθορίζει το φύλο σε μερικά είδη *Sciara* εξαρτάται από τη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται τα έμβρυα.

Σε γονιδιακό επίπεδο το φύλο ελέγχεται από ένα γονιδιακό τόπο ή από πολλούς. Ένα κλασσικό παράδειγμα φυλοκαθορισμού βασιζόμενου σε ένα μοναδικό γονιδιακό τόπο με αρκετά αλληλόμορφα - complementary sex determination CSD – είναι εμφανής στην μέλισσα *Apis mellifera*. Ετεροζυγώτες, για τον γονιδιακό τόπο που καθορίζει το φύλο, είναι φυσιολογικά γόνιμα θηλυκά, ενώ τα ομόζυγα διπλοειδή ζυγωτά αναπτύσσονται σε στείρα αρσενικά. Τα απλοειδή είναι ημιζυγωτικά στο γονιδιακό τόπο που καθορίζει το φύλο και αναπτύσσονται σε λειτουργικά αρσενικά. Η καλλιφόρος *Chrysomya rufifacies* αποτελεί παράδειγμα μητρικού φυλοκαθορισμού κατά τον οποίο δεν υπάρχει ετερομορφισμός των φυλετικών χρωμοσωμάτων, δηλαδή το φύλο του ζυγωτού καθορίζεται

αποκλειστικά από το γενότυπο της μητέρας. Σε αυτό το έντομο υπάρχουν δυο τύποι θηλυκών: αυτά που γεννάνε αποκλειστικά θηλυκούς απογόνους (gynogenetic) και αυτά που γεννάνε μόνο αρσενικούς (androgenic). Τα πρώτα είναι ετερόζυγα ως προς το γονίδιο F. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα μητρικό παράγοντα που συσσωρεύεται στα ωκύτταρα κατά την ωογένεση και επιβάλλει την ανάπτυξη θηλυκών ζυγωτών. Τα ανδρογονικά θηλυκά και τα αρσενικά είναι ομόζυγα για το υπολειπόμενο f αλληλόμορφο το οποίο δεν κωδικοποιεί τον μητρικό παράγοντα (Muller et al,1995).



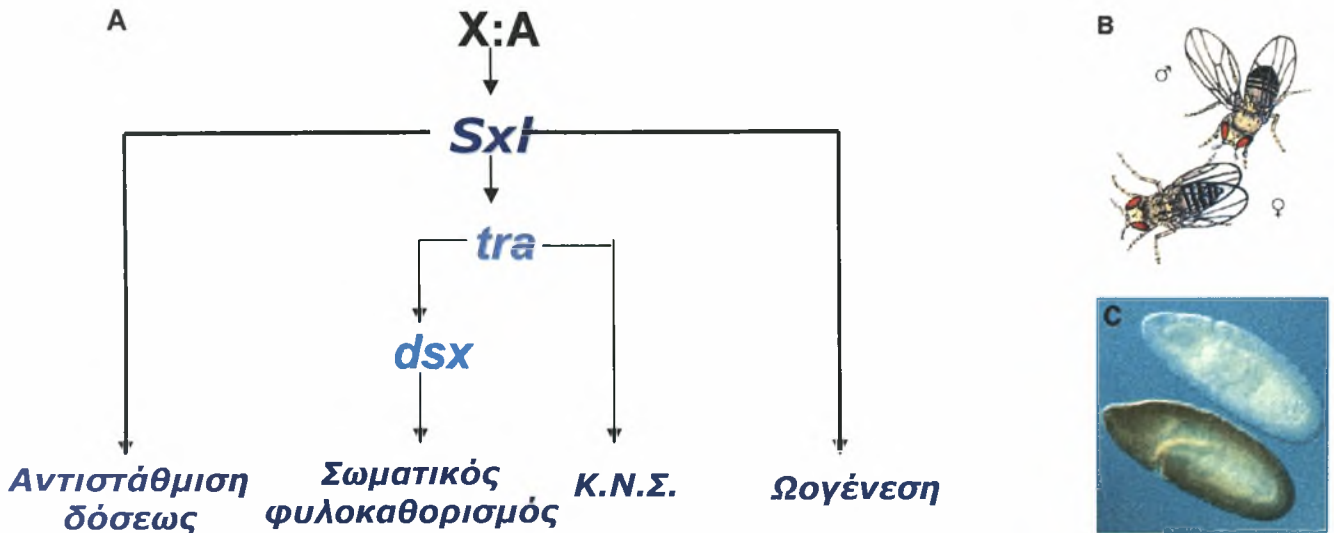
Εικόνα 9. Μια στρατηγική, αλλά διαφορετικοί μηχανισμοί φυλοκαθορισμού (π.χ. *Drosophila*)

ενεργοποιείται (2X:2A) ή απενεργοποιείται (1X:2A) το γονίδιο κλειδί (sex lethal gene) και οδηγεί στη δημιουργία θηλυκών και αρσενικών αντίστοιχα. Αυτό το γεγονός συμβαίνει νωρίς στην εμβρυογένεση αμέσως πριν το στάδιο του βλαστοδέρματος. Το Y χρωμόσωμα δεν έχει φυλοκαθοριστική λειτουργία αλλά είναι απαραίτητο για την ανδρική γονιμότητα (Bopp et al.,1991). Το γονίδιο *Sxl* ελέγχει το σωματικό φυλοκαθορισμό, την αντιστάθμιση δόσεως και την ωογένεση. Το *Sxl* γονίδιο ελέγχει το μάτισμα του πρώιμου mRNA του γονιδίου *tra*, το οποίο μεταγράφεται και στα δύο φύλα. Το πρώιμο mRNA του γονιδίου *tra* έχει δύο διαφορετικούς τρόπους εναλλακτικού ματίσματος στο 3' άκρο, με τον ένα να είναι ειδικός για τη δημιουργία θηλυκού και τον άλλο να μην είναι ειδικός για τον καθορισμό του φύλου. Το προϊόν του γονιδίου *tra* ελέγχει το μάτισμα του πρώιμου mRNA του γονιδίου *doublesex (dsx)*. Το γονίδιο αυτό μεταγράφεται και στα δύο φύλα αλλά παράγει διαφορετικές πρωτεΐνες στα θηλυκά και στα αρσενικά οι οποίες ελέγχουν την ενεργότητα των τελικών γονιδίων στόχων που ενέχονται στην φυλετική διαφοροποίηση. Το γονίδιο *Sxl* του *B. oleae (BoSxl)* εκφράζει το ίδιο μοτίβο μετάγραφων που κωδικοποιούν ένα μοναδικό πολυπεπτιδίο κοινό σε αρσενικά και θηλυκά άτομα. Το γονίδιο παρουσιάζει μεγάλο βαθμό ομοιότητας σε ακολουθία και έκφραση με το

Παρά τη φαινομενική ποικιλία των μηχανισμών φυλοκαθορισμού, όλα τα έντομα και φυσικά ο δάκος, βασίζονται στην ίδια στρατηγική όσον αφορά το φυλοκαθορισμό: ένα πρωταρχικό γενετικό σήμα, διαφορετικό σε αρσενικά και θηλυκά, ένα γονίδιο κλειδί που ανταποκρίνεται στο πρωταρχικό σήμα και ένα γονίδιο τύπου διπλού διακόπτη (double switch gene) το οποίο επιλέγει μεταξύ των δύο φύλων (Schütt et al.,2000).

Για παράδειγμα στη *Drosophila* ανάλογα με την αναλογία Χ:Α (πρωταρχικό σήμα)

ορθόλογο του της *Ceratitis capitata* και δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην φυλοκαθοριστική ακολουθία. Το γονίδιο *dsx* του *B. oleae* (*Boddsx*) εκτείνεται σε μια περιοχή του χρωμοσώματος μεγαλύτερη των 50 kb, με 6 εξόνια και 5 ιντρόνια, παράγοντας διαφορετικά φυλοειδικά mRNA, σε σχέση με το μοντέλο της *Drosophila*. Οι ακολουθίες της βιβλιοθήκης cDNA είναι σχεδόν ταυτόσημες με αυτές του ορθόλογου γονιδίου του *Bactrocera tryoni*. Στη μη μεταφραζόμενη περιοχή του θηλυκο-ειδικού εξονίου 4 βρέθηκαν τέσσερα επαναλαμβανόμενα στοιχεία ταυτόσημα με τις περιοχές πρόσδεσης των TRA/TRA-2 της *D. melanogaster*, υποδηλώνοντας έναν κοινό μηχανισμό ματίσματος σε όλα τα υπό μελέτη είδη διπτέρων (Lagos et al, 2005).



Εικόνα 10. Φυλετικός διμορφισμός στον οργανισμό-μοντέλο *Drosophila*. (A) Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου του γονιδίου *Sxl*, (B) Διαφορές θηλυκής και αρσενικής *Drosophila*, (C) Έκφραση της πρωτεΐνης SXL στα θηλυκά (καφέ), αλλά όχι και στα αρσενικά έμβρυα.

1.7 ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Η ανίχνευση του φυλοκαθορισμού στο δάκο μπορεί να συνεισφέρει στη βελτιστοποίηση των μεθόδων βιολογικού ελέγχου του εντόμου που βασίζονται στην απελευθέρωση στείρων αρσενικών ατόμων (Sterile Insect Technique, SIT). Ο φυλοκαθορισμός στα Tephritidae οφείλεται στο Y χρωμόσωμα. Τα πρώτα κυτταρολογικά δεδομένα του καρυότυπου του *B. oleae* στο στάδιο της μίτωσης δόθηκαν από τους Frizzi και Springetti το 1953, οι οποίοι ανέφεραν την παρουσία πέντε ζευγών τελοκεντρικών και ενός ζεύγους ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (Oliver, 2002)

Τα φυλετικά χρωμοσώματα αναγνωρίζονται εύκολα από το ετερομορφικό ζεύγος XX/XY και είναι τα μικρότερα σε μέγεθος του συνόλου των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Το Y είναι ένα πολύ μικρό χρωμόσωμα, σε σχήμα μικρής κουκκίδας, ενώ το X είναι μικρότερο σε σχέση με τα

αυτοσωμικά χρωμοσώματα (περίπου το μισό σε μήκος σε σχέση με το μικρότερο αυτοσωμικό). Ο λόγος μήκους Y/X είναι 0.20. Επιπλέον, τα αρσενικά στο Y χρωμόσωμα φέρουν γενετικούς παράγοντες που ορίζουν τον αρσενικό τρόπο διαφοροποίησης, οι οποίοι απουσιάζουν από τα θηλυκά (Graves, 2006).

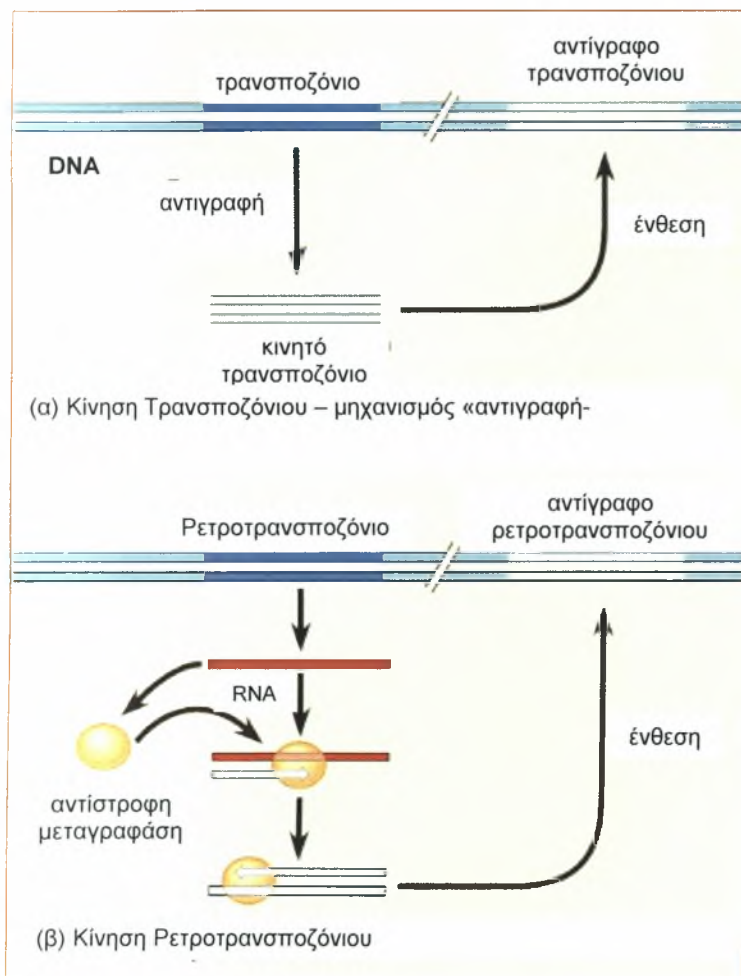
Η εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων παρέχει μια λογική και ικανοποιητική μίξη εμπειρικών δεδομένων και θεωρίας. Σύμφωνα με την κανονική θεωρία, τα Y και X χρωμοσώματα προέρχονται από ένα αυτοσωμικό ζεύγος χρωμοσωμάτων μέσω μιας διαδικασίας τριών σταδίων (White, 1973). Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την απόκτηση ενός ή περισσότερων φυλοκαθοριστικών γονιδίων από ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα, δημιουργώντας γεννώντας τα Y και X χρωμοσώματα (Charlesworth et al, 2000). Η φυσική επιλογή ευνοεί την καταστολή του ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο χρωμοσωμάτων. Η έλλειψη ανασυνδυασμού σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μετάλλαξης, τη φυσική επιλογή και τη γενετική παρέκκλιση, οδηγεί σε προοδευτικό εκφυλισμό και απώλεια των γονιδίων του Y χρωμοσώματος και τελικά στη διατήρηση μόνο των φυλοκαθοριστικών και κάποιων εναπομεινάντων γονιδίων (Skaletsky et al, 2003). Καθώς το X χρωμόσωμα γίνεται προοδευτικά απλοειδές στα αρσενικά (ομόζυγα), η φυσική επιλογή ευνοεί την αυξημένη μεταγραφή X - εξαρτώμενων γονιδίων στα αρσενικά διαμέσου μηχανισμών αντιστάθμισης δόσεως. Τελικά το Y χρωμόσωμα γίνεται συνήθως ετεροχρωματικό, συσσωρεύοντας μεγάλες ποσότητες επαναλαμβανόμενου DNA (Lahn et al, 1997). Μερικές φορές αποκτά και αρρενοειδικά γονίδια από τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Από πειραματική πλευρά δε μπορούμε να ανιχνεύσουμε εξονυχιστικά όλα τα γονίδια του Y χρωμοσώματος εξαιτίας της αφθονίας επαναλαμβανόμενου DNA που διαθέτει (Carvalho et al, 2005). Μια κατηγορία επαναλαμβανόμενου DNA που μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή και την οργάνωση του Y χρωμοσώματος είναι και τα ρετρομεταθετά στοιχεία.

1.8 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα μεταθετά στοιχεία ή τρανσποζόνια είναι ακολουθίες DNA που μπορούν να μετακινούνται σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο γονιδίωμα ενός κυττάρου. Αυτή η διαδικασία καλείται μετάθεση και τα τρανσποζόνια μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις και να αλλάξουν την ποσότητα του DNA στο γονιδίωμα. Τα τρανσποζόνια είναι παραδείγματα κινητών γενετικών στοιχείων και ανακαλύφθηκαν από την Barbara McClintock, στην οποία απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ το 1983 για την συνολική της προσφορά στον τομέα αυτό. Με βάση τον μηχανισμό μετάθεσης τους κατηγοριοποιούνται σε δύο τάξεις. Στην I τάξη, τα ρετρομεταθετά στοιχεία, αυτοαντιγράφονται ως εξής: πρώτα μεταγράφονται σε RNA, στη συνέχεια μεταγράφονται αντίστροφα σε DNA, μέσω αντίστροφης μεταγραφάσης, και κατόπιν εισάγονται σε κάποια άλλη θέση του γονιδιώματος. Στην τάξη II τα κινητά γενετικά στοιχεία κινούνται απευθείας από μία θέση του γονιδιώματος σε κάποια άλλη, χρησιμοποιώντας μία

τρανσποζάση η οποία ευθύνεται για την αποκοπή και περαιτέρω επικόλληση τους σε κάποια καινούργια θέση. Τα ρετρομεταθετά (μεταθετά II τάξης) είναι γενετικά στοιχεία που αυτοπολλαπλασιάζονται στο γονιδίωμα και απαντώνται σε αφθονία στο DNA πολλών ευκαρυωτικών οργανισμών. Είναι άφθονα ιδιαίτερα στα φυτά όπου για παράδειγμα στο σιτάρι το 90% του γενώματος αποτελείται από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες. Στα θηλαστικά, σχεδόν το μισό από το γένωμα (45% με 48%) αποτελείται από τρανσποζόνια ή απομεινάρια τρανσποζονίων. Το 42% του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από ρετροτρανσποζόνια, ενώ τα DNA τρανσποζόνια αριθμούν 2-3%. Τα ρετρομεταθετά υποκατηγοριοποιούνται στα LTR (μακριές επαναλαμβανόμενες τερματικές αλληλουχίες) και non-LTR (Lewin ,2004)

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια έχουν άμεσα LTR με εύρος μεγέθους από 100 bp έως πάνω από 5 kb και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε ομάδες Ty1-copia-like, Ty3-gypsy-like και Pao-BEL-like, βάσει αφενός του βαθμού ομοιότητας ακολουθίας και αφετέρου από την τάξη των κωδικοποιημένων παραγώγων των γονιδίων (McDonald,1993). Οι ομάδες ρετροτρανσποζονίων



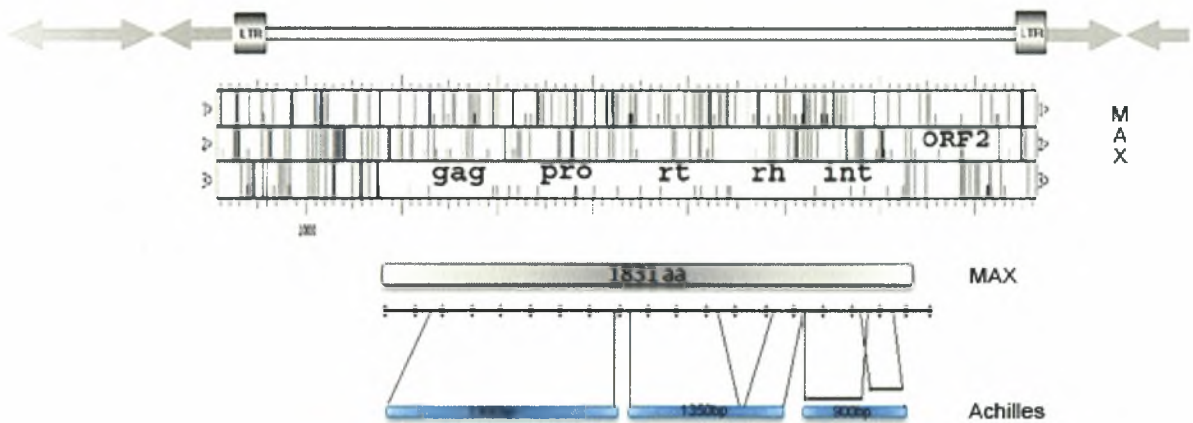
Εικόνα 11. (α) Κίνηση Τρανσποζόνιου και (β) Κίνηση Ρετροτρανσποζόνιου

Ty1-copia και Ty3-gypsy ανευρίσκονται σε μεγάλο αριθμό αντίγραφων (έως και μερικά εκατομμύρια αντίγραφα ανά απλοειδή πυρήνα) σε γονιδιώματα ζώων, μυκήτων, πρωτίστων και φυτών. Στοιχεία Pao-BEL like έχουν βρεθεί ως τώρα μόνο σε ζωικούς οργανισμούς. Περίπου το 8% του ανθρώπινου, το 10% του γονιδιώματος του επίμουσ και 15% της *Drosophila* αποτελείται από LTR τρανσποζόνια. Τα μη-LTR ρετροτρανσποζόνια αποτελούνται από δύο υπότυπους: τα μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (LINEs) και τα βραχεία διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (SINEs). Ανευρίσκονται σε πολλά αντίγραφα (πάνω από 250000) σε φυτικά είδη. (Berezikon, 2000).

Στην περικεντρομερική περιοχή h39 του 2^{ου} χρωμοσώματος της *Drosophila melanogaster* παρατάσσονται 80 διαδοχικές επαναλήψεις του μεταθετού στοιχείου

Bari 1. Το σύμπλεγμα *Bari 1* διακόπτεται από μια ένθεση 8556 ζευγών βάσεων. Μελέτες πάνω στην

ακολουθία του DNA ταυτοποίησαν αυτή την ένθεση ως ένα προηγουμένως άγνωστο ρετρομεταθετό στοιχείο που ονομάστηκε *MAX*. Το *MAX* έχει δύο αναγνωστικά πλαίσια (ORF): το ORF1, που φαίνεται να κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη 1831 αμινοξέων αποτελούμενη από περιοχές GAG και RT και το ORF2 που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 288 αμινοξέων άγνωστης λειτουργίας. Το *MAX* ανήκει στην οικογένεια *Bel-Pao*, η οποία είναι αξιοσημείωτη για την ευρεία κατανομή της σε διαφορετικές τάξεις συμπεριλαμβανομένων των κατώτερων χορδωτών. Τα *MAX* στοιχεία εντοπίζονται σε μεγάλο ποσοστό στην ετεροχρωματίνη όλων των αυτοσωμικών και του Y χρωμοσώματος της *Drosophila melanogaster* (Marsano et al., 2003). Αντίστοιχη κατανομή εμφανίζει και το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles* του δάκου που απομονώθηκε στο εργαστήριό μας και που παρουσιάζει ομολογία με το *MAX* της *Drosophila*. Σύμφωνα με τη δομή του *MAX*, ήταν εφικτός ο δυνητικός καθορισμός της δομής του *Achilles*. Η ανάλυση του παραπάνω στοιχείου αποσκοπούσε στην ολοκλήρωση της δομής του και στον εντοπισμό των σημείων ένθεσης του στο γονιδίωμα.



Εικόνα 12. Οργάνωση του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* του δάκου σύμφωνα με τη δομή του ρετρομεταθετού στοιχείου *MAX* της *Drosophila*..(βλέπε κείμενο)

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία είχε σαν στόχο την ολοκλήρωση της ανάλυσης της δομής του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*) και τον εντοπισμό των σημείων ένθεσής του στο γονιδίωμα του εντόμου. Συγκεκριμένα, εστιάστηκε στην κλωνοποίηση των επιμέρους τμημάτων του φάγου 443 - βασιζόμενη στην ομολογία του *Achilles* με το *MAX* της *Drosophila* - και στην ανάλυση αυτών για τον εντοπισμό της 5' LTR αλληλουχίας του. Οι τερματικές περιοχές του *Achilles* μπορούν να δώσουν τη δυνατότητα σχεδιασμού εκκινητών, ώστε να απομονωθούν γονιδιωματικές αλληλουχίες γειτονικές των θέσεων ένθεσής του και να διερευνηθούν οι πολυμορφισμοί σε αυτές. Αφού το ρετρομεταθετό έχει προτίμηση στο Υ χρωμόσωμα, ορισμένες από τις αλληλουχίες αυτές θα προέρχονται από το χρωμόσωμα αυτό. Τέτοια ανάλυση θα ρίξει φως στην οργάνωση του Υ χρωμοσώματος. Επιπρόσθετα, στο βαθμό που ο δάκος διαθέτει μικρό χρωμόσωμα Υ, η ανάλυση της οργάνωσής του θα μπορούσε να οδηγήσει στον εντοπισμό γονιδίων φυλοκαθορισμού και προοπτικά στην δυνατότητα γενετικής τροποποίησης του εντόμου.

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια *in vitro* τεχνική που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας μικρής αλληλουχίας DNA από ένα πολύπλοκο μίγμα. Η χρήση δύο πλευρικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (5' και 3' primers), μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επιμήκυνσής τους με τη βοήθεια μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, παρέχει τελικά την εκλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Η εκλεκτικότητα είναι αποτέλεσμα του σχεδιασμού των εκκινητών, που βασίζεται στις γνωστές αλληλουχίες εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί, ώστε να είναι ειδικοί προς αυτή. Έτσι καθορίζονται τα άκρα του επιθυμητού τμήματος. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι βακτηριακής προέλευσης εφόσον απομονώνεται από το θερμοφιλο *Thermus aquaticus* (Ταα πολυμεράση) γεγονός που της προσδίδει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες (έως 95°C). Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί το στάδιο της αντιγραφής από την πολυμεράση είναι απαραίτητη η προσθήκη διαλύματος 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζινουκλεοτιδίων (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου καθώς και διάλυμα ιόντων Mg^{2+} , ενώ για την συμπλήρωση του τελικού όγκου προστίθεται αποστειρωμένο H_2O . Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, ένωσης και αντιγραφής από την πολυμεράση πραγματοποιούνται σε ειδική PCR συσκευή, γνωστή ως θερμοκός κυκλοποιητής, που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ως αποτέλεσμα της διαδικασίας, η αρχική αμελητέα ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά, αφού διπλασιάζεται στο τέλος κάθε κύκλου. Με τον τρόπο αυτό μετά την ολοκλήρωση η κύκλων η αρχική αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί 2^n φορές, δηλαδή θα έχουν συντεθεί περίπου 2^n νέα δίκλινα μόρια DNA.

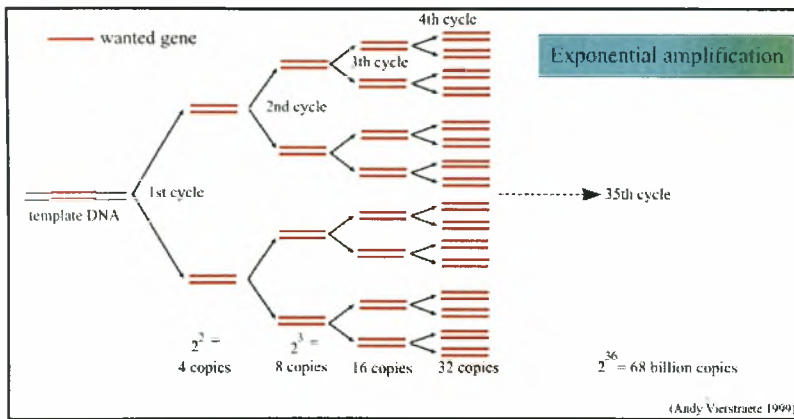
Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια που επαναλαμβάνονται κυκλικά (30-40 κύκλοι χωρίς ενδιάμεση ανανέωση αντιδραστηρίων) ως εξής.

1. Αφού αναμειχθούν όλα τα συστατικά, η αντίδραση ξεκινά με θέρμανση του δείγματος στους 93-95°C για λίγα λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation).
2. Ακολούθως, η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50-70°C (ανάλογα με τη θερμοκρασία τήξης – T_m – των αλυσίδων που αναμένονται να σχηματιστούν) και οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο συνολικό μίγμα του DNA (annealing). Συνήθως η κατάλληλη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών υπολογίζεται με αρνητική απόκλιση 5°C από το αναμενόμενο T_m .



Εικόνα 13. Συσκευή PCR

3. Τελικά η πολυμεράση ξεκινά να συνθέτει μια αλυσίδα από το τέλος κάθε εκκινητή, χρησιμοποιώντας το αρχικό DNA ως μήτρα (DNA synthesis). Η θερμοκρασία σταθεροποιείται στους 72°C έως ότου ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός από τη δράση του ενζύμου. (Sambrook J et al 1989)



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της PCR.

Υλικά:

Για αντίδραση τελικού όγκου 25 μl χρησιμοποιήθηκαν:

- 3 μl 443-φαγικό DNA (~50 ng)
- 2.5 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X buffer)
- 1.5 μl διάλυμα $MgCl_2$ (50 mM)
- 2 μl dNTPs (10 mM/ dNTP)
- 0.6 μl εκκινητής 443-1.9R (10 pmol/ μl)
- 0.6 μl εκκινητής 443-2.4 F (10 pmol/ μl)
- 0.4 μl Taq πολυμεράση (5 u/ μl)
- 14.4 μl ddH₂O

Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή ("PCR Sprint Thermal Cycler", Thermo Electron Corporation)

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

2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση (προσδιορισμός μεγέθους) και τον καθαρισμό τμημάτων DNA χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα μετακίνησης των γραμμικών δίκλωνων μορίων DNA σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, σύμφωνα με το φορτίο και το μέγεθός τους. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται λόγω του ηλεκτρικού πεδίου κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια προς τα ηλεκτρόδια της ανόδου της ηλεκτροφορητικής συσκευής, με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας της ταχύτητας μετακίνησης των μορίων, είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Συνδυαστικά, όσο μεγαλύτερα είναι τα μόρια τόσο πιο αργά μετακινούνται διαμέσου μικρών πόρων. Η συγκέντρωση της αγαρόζης (φυτικός πολυσακχαρίτης) που χρησιμοποιείται καθορίζει το μέγεθος των πόρων της πηκτής και συνεπώς ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα συγκέντρωσης αγαρόζης 1% επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τμημάτων μεγέθους 0.5-5 kb. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης από την ένταση του ρεύματος που παρέχεται, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης όταν αυξάνεται η τάση (volts) που εφαρμόζεται. Οι ζώνες του DNA που προκύπτουν από τον διαχωρισμό χρωματίζονται ώστε να είναι ορατές. Η μέθοδος χρώσης του DNA συνίσταται σε έκθεσή του σε μικρές συγκεντρώσεις μιας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου, που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως. Το πρότυπο των ζωνών που δημιουργείται επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους αλλά και της ποσότητας των τμημάτων μετά από σύγκρισή τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους (ladders) (Sambrook J et al 1989).

Υλικά:

- Αγαρόζη
- Διάλυμα TBE Buffer 0.5X
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων
- Δείγματα DNA
- Μάρτυρας (DNA ladder)

Μεθοδολογία:

Παρασκευή πηκτώματος (gel) αγαρόζης 1%

1. Για την παρασκευή 40 ml πηκτώματος, αναμιγνύονται 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5X με 0.4 gr σκόνη αγαρόζης.
2. Το διάλυμα θερμαίνεται με διαδοχικές ανακινήσεις μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη και γίνει διαυγές.
3. Αφού κρυώσει λίγο ώστε η θερμοκρασία του να είναι περίπου 50°C, προσθέτονται 1.2 ml βρωμιούχου αιθιδίου.
4. Το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης μεταφέρεται στη στεγανοποιημένη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα μετά από χρονικό διάστημα 20 περίπου λεπτών (θερμοκρασία δωματίου). Στη βάση αυτή έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί με κάθετη διεύθυνση “χτενάκια” που θα δώσουν τις ειδικές θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.
5. Όταν η αγαρόζη έχει πήξει εντελώς τα “χτενάκια” απομακρύνονται προσεκτικά και η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης μπορεί να αρχίσει.

Ηλεκτροφόρηση

1. Αρχικά προετοιμάζονται τα δείγματα και οι μάρτυρες (ladders) μοριακού βάρους που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, με την προσθήκη σε αυτά loading buffer 6X (1 ml ανά 6 ml δείγματος). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μια μπλε χρωστική και φέρει αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα η κατεύθυνση μετακίνησής του να είναι προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου, όμοια δηλαδή με εκείνη των μορίων του DNA. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την παρατήρηση της πορείας της διαδικασίας. Επιπλέον η ποσότητα γλυκερόλης που συμπεριλαμβάνεται στο διάλυμα εμποδίζει τη διάχυση των δειγμάτων διευκολύνοντας την φόρτωσή τους, καθώς αυξάνεται η πυκνότητα της σύστασής τους.
2. Το στερεοποιημένο πήκτωμα βυθίζεται με τη βάση στο εσωτερικό της ηλεκτροφορητικής συσκευής που έχει πληρωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να καλύπτεται πλήρως και δείγματα – μάρτυρες φορτώνονται στις θέσεις εκκίνησης της καθόδου.
3. Στη συνέχεια συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με την συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στην αντίθετη κατεύθυνση από τις θέσεις φόρτωσης και εφαρμόζεται τάση 90 V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μετά από περίπου 30 min.
4. Το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε είναι πλέον ορατό το πρότυπο των ζωνών του DNA που έχει προκύψει από τον διαχωρισμό.

TBE Buffer 0.5X (1000ml)

54gr Tris-base

27.5gr βορικό οξύ

20ml EDTA 0.5M

απιονισμένο H₂O

Ρύθμιση pH στο 8.0 με NaOH

Loading buffer:

0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης

0.25% xylene cyanol FF

15% Ficoll (type 400 Pharmacia)

Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

1gr βρωμιούχο αιθίδιο σε 100ml

2.3 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα μόρια DNA που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ανακτήθηκαν με χρήση του Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System της εταιρίας Promega. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προτείνεται στο εγχειρίδιο της εταιρείας.

Υλικά:

- Διάλυμα Membrane binding
- Διάλυμα Wash (με αιθανόλη 100%)
- Nuclease free water

Μεθοδολογία:

1. Αρχικά απομονώνεται με προσοχή από το gel αγαρόζης η ζώνη που αντιστοιχεί στο επιθυμητό τμήμα DNA, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος του gel.
2. Το κομμάτι του gel τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf και προσδιορίζεται το βάρος του, εφόσον δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 300mg.
3. Προστίθενται 10ml διαλύματος Membrane Binding (για κάθε 10 mg gel) και το δείγμα αναδεύεται με τη βοήθεια vortex.
4. Το δείγμα επωάζεται στους 50-65°C, με ταυτόχρονη ανάδευση στο vortex ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να επιτευχθεί η διάλυση του gel.
5. Προστίθενται το δείγμα σε ειδική στήλη (SV Minicolumn) και κατόπιν αυτή τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής.
6. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε στα 16000g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα απομακρύνεται από τον σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η

στήλη στο σωλήνα συλλογής.

7. Προστίθενται 700μl διαλύματος Membrane Wash Solution και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 16.000 g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα απομακρύνεται από τον σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη.
8. Προστίθενται 500μl διαλύματος Membrane Wash Solution και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 16.000 g για 5 λεπτά.
9. Αδειάζουμε το σωλήνα συλλογής και επαναφυγοκεντρούμε τη στήλη για 1 λεπτό με το καπάκι ανοιχτό ώστε να εξατμιστεί τυχόν εναπομένονσα αιθανόλη.
10. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα ώστε στη συνέχεια να εκλουστεί το DNA. Οι χαμηλής ισχύος ιοντικές συνθήκες και το ελαφρώς αλκαλικό pH του απιονισμένου νερού επιτρέπουν την έκλουσή του.
11. Προστίθενται στη στήλη 50 μl dd H₂O και επωάζεται για 1λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για να αυξηθεί η απόδοση της έκλουσης.
12. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 16.000 g.
13. Απορρίπτουμε τη στήλη και αποθηκεύουμε το DNA στους 4° C ή στους -20° C.

Membrane Wash solution:

10mM Potassium acetate pH 5.0

80% ethanol

16.7μM EDTA pH 8.0

Membrane Binding Solution:

4.5M Guinidine isothiocyanate

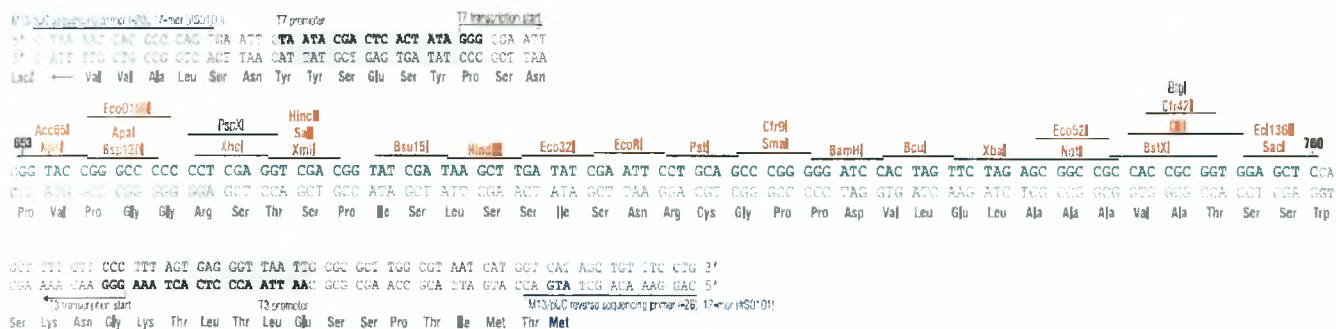
0.5M Potassium acetate pH 5.0

2.4. Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν ειδικές περιοχές (μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες) κατά μήκος των αλληλουχιών του DNA, ακολουθώντας έναν επαναλήψιμο τρόπο πέψης. Φυσιολογικά οι ενδονουκλεάσες περιορισμού απομονώνονται από βακτήρια, στα οποία παρέχουν προστατευτικούς μηχανισμούς, έναντι της εισβολής των φαγικών σωματιδίων των ιών στο εσωτερικό τους. Ο βιολογικός τους ρόλος συνίσταται στην ικανότητά τους να αποικοδομούν ξένα μόρια DNA. Αντίθετα το DNA του ίδιου του κυττάρου αποφεύγει τη διάσπαση, γιατί οι θέσεις – στόχοι των ενζύμων περιορισμού προστατεύονται λόγω της μεθυλίωσης που υφίστανται είτε από τα ίδια τα ένζυμα είτε από ειδικές μεθυλάσες που παράγονται σε συνδυασμό με αυτά. Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και υδρολύουν έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Τελικά, ανάλογα με τον τρόπο πέψης δημιουργούνται τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα. Για τη βελτιστοποίηση μιας αντίδρασης πέψης πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως η ιονική ισχύς του ρυθμιστικού

διαλύματος και οι μονάδες ενεργότητας (units) του ενζύμου, που καθορίζουν την ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται στην αντίδραση για μια ώρα στους 37°C.

pBluescript II SK(-), pBluescript II SK(+)



Εικόνα 15. Θέσεις ενζύμων περιορισμού στον polylinker του φορέα Bluescript II. Το τμήμα 2.4kb κλωνοποιήθηκε στην θέση Eco321 (EcoRV) του φορέα Bluescript II.

Υλικά:

- Δείγμα DNA
- Ένζυμο/α
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 10X
- BSA (100X)
- dd H₂O

Μεθοδολογία:

1. Σε σωληνάκι erppendorf τοποθετούνται διαδοχικά το DNA, το buffer, το ddH₂O και τελευταίο το ένζυμο. Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας τους τα δείγματα, αλλά και τα αντιδραστήρια, διατηρούνται σε πάγο.
2. Το δείγμα που σχηματίζεται επωάζεται για μία ώρα στους 37°C.

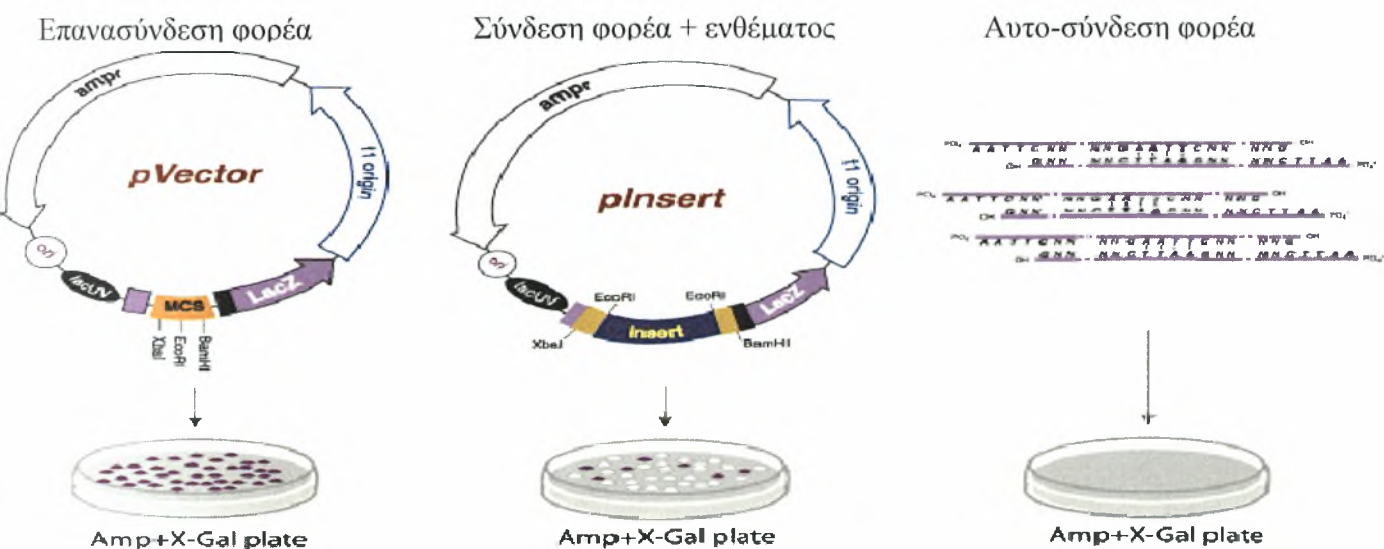
Αντίδραση πέψης	Γονιδιωματικού/πλασμιδιακού DNA	Φαγικού DNA
DNA	100ng	2μg
Buffer	1X	1X
Ένζυμο	2.0 u	40u
BSA	-	1X

ddH ₂ O	Μέχρι V	6.6 μl
Τελικός όγκος	V	10.0 μl

2.5 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης καθιστά δυνατή την κλωνοποίηση της αλληλουχίας ενός γονιδίου σε κατάλληλους φορείς, όπως είναι τα πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλινα κυκλικά μόρια DNA που πολλαπλασιάζονται αυτόνομα στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων. Η ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής κατέστησε αναγκαία την κατασκευή τεχνητών πλασμιδίων (με βάση τα φυσικά πλασμίδια) που φέρουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Τα τεχνητά πλασμίδια, με μέγεθος γύρω στα 3000 ζεύγη βάσεων (3 Kb), περιέχουν ένα γονίδιο που προσδίδει αντοχή σε κάποιο κοινό αντιβιοτικό (π.χ. αμπικιλίνη) και μια αλληλουχία (polylinker) 100 περίπου νουκλεοτιδίων που περιλαμβάνει τις θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού. Η αλληλουχία αυτή επιτρέπει την κλωνοποίηση στο πλασμίδιο τμημάτων DNA, με την προϋπόθεση ότι στα άκρα του τμήματος αυτού περιλαμβάνεται κάποια από τις περιοριστικές θέσεις του polylinker.

Ο γραμμικός φορέας (pBS ή PUC) και το τμήμα που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε –όπως έχουν προκύψει μετά από πέψη με ένα ή δύο κατάλληλα ένζυμα επωάζονται με προσθήκη του ενζύμου T4 λιγάσης, η οποία συνδέει τα ελεύθερα άκρα τους. Η T4 λιγάση κωδικοποιείται από τον βακτηριοφάγο T4 και καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ της 3-OH' ομάδας και της 5-φωσφορικής ομάδας παρακείμενων νουκλεοτιδίων στα άκρα δίκλωνων μορίων DNA.



Εικόνα 16. Ανάπτυξη σε τρυβλία άγαρ (Amp^r+X-Gal) και επιλογή αποικιών ανθεκτικών σε αντιβιοτικά. Μόνο η σύνδεση φορέα και ενθέματος παράγει λευκές αποικίες ανθεκτικών στην αμπικιλίνη βακτηρίων και ο μικρός αριθμός μπλε αποικιών που παρουσιάζεται οφείλεται στην επανασύνδεση του φορέα σ' αυτή

Ακόμη, απαιτείται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου και αποστειρωμένου H₂O για την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης σύνδεσης τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA όσο και τα πλασμίδια εμφανίζουν τάση επανακυκλοποίησης προς τον σχηματισμό τυχαίων ολιγομερών. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητος ο προσεκτικός προσδιορισμός των απαιτούμενων συγκεντρώσεων για τα δύο είδη DNA (ποσοτικοποίηση), ώστε να επιτευχθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα σύνδεσης. Η αναλογία μεταξύ της αλληλουχίας που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και του πλασμιδιακού φορέα καθορίστηκε 3:1. Επιπλέον η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται σε ng, εξαρτάται από το είδος του πλασμιδίου που χρησιμοποιείται κάθε φορά και υπολογίζεται από τον τύπο:

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

Ο φορέας pBS-T εμφανίζει στα 3' άκρα εκατέρωθεν της περιοχής εισαγωγής του ενθέματος μία βάση θυμίνης αντίστοιχα (3'-T overhangs). Η δομή αυτή αυξάνει την απόδοση της αντίδρασης, καθώς αποτρέπει την επανακυκλοποίηση του φορέα και καθιστά δυνατή τη σύνδεση των προϊόντων PCR λόγω συμπληρωματικότητας της 3' πολυ-A ουράς που διαθέτουν από τη δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση. Επιπλέον η ύπαρξη δύο θέσεων αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου I επιτρέπει στη συνέχεια την απομόνωση του ενθέματος με την μοναδική εφαρμογή του ενζύμου. (Sambrook J et al 1989)

Υλικά:

- Δείγμα DNA
- 1.2 μl πλασμιδιακός φορέας
- 1 μl T4 DNA λιγάση Fermentas (1 U/μl)
- 1 μl buffer 1X
- ddH₂O

Μεθοδολογία:

Η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται σε ng, εξαρτάται από το είδος του πλασμιδίου που χρησιμοποιείται κάθε φορά και υπολογίζεται από τον τύπο:

1. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf και διαδοχικά προστίθενται 1.2 μl πλασμιδιακού φορέα, 1 μl buffer 1X, το ddH₂O με τελευταία την προσθήκη 1 μl T4 DNA λιγάσης, για αντίδραση τελικού όγκου 10 μl. Η ποσότητα ddH₂O αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.
2. Ακολουθεί επώαση του δείγματος για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε κατάλληλη θερμοκρασία. Ορισμένες από τις αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με overnight επώαση στους 4°C ή 16°C, ενώ οι υπόλοιπες στους 22°C για δυόμιση ώρες. Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας τους τα δείγματα διατηρούνται σε πάγο, όπως επίσης και τα αντιδραστήρια.

2.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυσασμένα πλασμίδια

Μόρια DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε φορείς που επάγουν τη λειτουργική τους έκφραση σε ξενιστές όπως το βακτήριο *E.coli*. Τα βακτήρια αποτελούν ιδανικούς ξενιστές για τον πολλαπλασιασμό των μορίων DNA. Τα βακτηριακά κύτταρα είναι σε θέση να προσλαμβάνουν νουκλεϊκά οξέα σε μορφή ανθεκτική ως προς τη δράση νουκλεασών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής (εκλειπτική φάση) γίνεται ο ανασυνδυασμός του DNA με ομόλογες αλληλουχίες στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Μετά την ολοκλήρωσή του, η γενετική πληροφορία που έχει ενσωματωθεί μπορεί να εκφραστεί με αποτέλεσμα την εμφάνιση του



Εικόνα 17. Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης κυττάρων.

λειτουργικού μετασχηματισμένου κυττάρου. Ο φυσικός μηχανισμός μετασχηματισμού απουσιάζει από το βακτήριο *E.coli*, γι' αυτό και η ικανότητα αυτή επάγεται τεχνητά με έκθεση των κυττάρων σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) (προετοιμασία δεκτικών κυττάρων). Κατόπιν προστίθεται DNA – που σχηματίζει ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, ανθεκτικό στη δράση βακτηριο DNAσών – και το μίγμα εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία, οπότε τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν πλέον να ενσωματώσουν τα σύμπλοκα DNA. Μετά από καλλιέργεια σε πλούσιο θρεπτικό υλικό τα μεταβιβασμένα γονίδια εκφράζονται και τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται και εκφράζονται με στρώση σε τρυβλία που φέρουν επιλεκτικό θρεπτικό υλικό.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής το βακτήριο *E.coli* και ως φορέας κλωνοποίησης τα ανασυνδυσασμένα πλασμίδια που προέκυψαν από τις αντιδράσεις σύνδεσης και φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Η είσοδος του πλασμιδίου δημιουργεί μετασχηματισμένα βακτήρια με ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Ο polylinker στον οποίο έχει εισαχθεί το επιθυμητό ένθεμα, είναι ενσωματωμένος στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Παρουσία X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase) στο θρεπτικό μέσο, το προϊόν του γονιδίου *lacZ* συμβάλλει στην εμφάνιση χαρακτηριστικού μπλε χρώματος στις βακτηριακές αποικίες μέσω της διάσπασης του πρώτου. Η είσοδος του ενθέματος διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *lacZ* και εμποδίζει την έκφρασή του, με αποτέλεσμα το X-gal να μη διασπάται και οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο να εμφανίζονται άσπρες. Η παραπάνω διάκριση βρίσκει εφαρμογή στην επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων που περιέχουν τα ανασυνδυσασμένα με το επιθυμητό ένθεμα πλασμίδια. (Sambrook et al 1989)

Υλικά:

- Τρυβλία LB άγαρ
- Θρεπτικό μέσο LB Broth

- Διάλυμα SOC
- DNA (από αντίδραση ligation)
- Διάλυμα δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*
- Θρεπτικό μέσο LB
- Τριβλία LB άγαρ/αμπικιλίνη
- Διάλυμα X-gal (20 mg/ ml)
- Διάλυμα IPTG (200 mg/ ml)

Μεθοδολογία:

Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* για ηλεκτροδιάτρηση

1. Επώαση 1ml LB Broth με μία αποικία *E. coli* για 5 ώρες έως overnight στους 37°C και στις 210rpm.
2. Σε 100ml LB Broth προσθέτουμε το 1ml και ακολουθεί επώαση στους 37°C και στις 210rpm έως ότου $O.D._{600} = 0.45$ έως 0.55.
3. Τοποθετούμε τα κύτταρα σε πάγο για 10-15 λεπτά και τα μεταφέρουμε σε παγωμένα falcon των 50ml.
4. Φυγοκέντρηση στους 4 °C για 15 min και στις 4000g
5. Απόχυση υπερκείμενου και προσθήκη 100ml dH₂O (ice-cold) από 50 ml σε κάθε falcon και καλή ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C και στις 4000g.
7. Απόχυση υπερκείμενου.
8. Προσθήκη 100ml dH₂O (ice-cold) από 50 ml σε κάθε falcon και καλή ανάδευση. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C και στις 4000g και τέλος απόχυση υπερκείμενου.

Σε περίπτωση που επιθυμούμε να αποθηκεύσουμε τα κύτταρα ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Τοποθετούμε τα κύτταρα σε σωλήνα κρύο και με στενό πυθμένα.
2. Προσθέτουμε 8ml παγωμένη γλυκερόλη 10% (4ml ανά falcon).
3. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 4200rpm και στους 2°C.
4. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και ζυγίζουμε τα falcon με τα ιζήματα.
5. Προσθέτουμε παγωμένη γλυκερόλη 10% και ανακτούμε τα κύτταρα.
6. Σε ήδη παγωμένο erpendorf μοιράζουμε από 40μl κυττάρων.
7. Τα κύτταρα παγώνουν σε ξηρό πάγο ή ethanol bath και αποθηκεύονται στους -80°C.

Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

1. Σε 40 μl κυττάρων *E. coli* ειδικά για ηλεκτροδιάτρηση προστίθενται 2μl DNA (από αραιώση 1:10 του ligation) και το δείγμα επωάζεται σε πάγο για 1 min.
2. Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέτα η οποία τοποθετείται για ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων στην αντίστοιχη συσκευή.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 1000 μl SOC στο δείγμα και επωάζεται υπό ανάδευση (180 rpm) στους 37°C για μία ώρα έτσι ώστε να επουλωθούν οι “πληγές” που η ηλεκτροδιάτρηση προκάλεσε στην επιφάνεια του κυττάρου με σκοπό να ανοίξουν οπές ώστε να εισχωρήσει το ένθεμα μέσα στο κύτταρο.
4. Τα συνολικά 1000ml μοιράζονται σε σωληνάκια τύπου erpendorf, καθένα από τα οποία περιέχει 200 και 800 μl αντίστοιχα. Τα 800 μl φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 4 min και τα καθιζάνοντα κύτταρα αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 200 μl (αφαιρούνται 600 μl υπερκείμενου υγρού).
5. Οι παραπάνω ποσότητες επιστρώνονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB άγαρ που περιέχουν αμπικιλίνη. Πριν την επίστρωση των κυττάρων, στην επιφάνεια των τριβλίων προσθέτονται προσθήκη 30 μl X-gal και 3 μl IPTG, ώστε να είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών με το επιθυμητό πλασμίδιο.
6. Τέλος, τα τριβλία επωάζονται overnight στους 37°C.

LB άγαρ :

Bactotryptone 10gr
Bacto-yeast extract 5gr
Agar 15gr
Nacl 5gr

Αποστείρωση, προσθήκη 100
μg/ml αντιβιοτικού αμπικιλίνης

SOC υγρό θρεπτικό

μέσο:
Όμοια σύσταση με το
υγρό θρεπτικό μέσο
SOB για τελικό όγκο 1
L, με επιπλέον
προσθήκη μετά την
αποστείρωση 20 ml
γλυκόζης 1M

LB Broth (1lt):

15gr LB Broth
5gr NaCl

X-gal (20mg/ml):

Διάλυση X-gal MB=433 σε
dimethylformamide

IPTG (100mM):

2g IPTG σε 8ml H₂O

2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των πλασμιδίων μιας βακτηριακής καλλιέργειας, επιλέχθηκε η αλκαλική λύση Η αλκαλική μέθοδος συνίσταται στην αποδιάταξη, παρουσία NaOH και SDS, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών του βακτηρίου και ακολούθως τον σχηματισμό αδιάλυτου ιζήματος μετά από εξουδετέρωση του διαλύματος με οξικό κάλιο. Το πλασμιδιακό DNA και το βακτηριακό RNA στην πλειονότητά τους παραμένουν σε διαλυτή μορφή και παραλαμβάνονται με φυγοκέντρηση από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια

πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη – χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και τελικά αναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα RNάσης (ελεύθερο DNAσών), ώστε να αποικοδομηθούν τα μόρια RNA. Τα βακτηριακά κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, στα οποία είχαν εισαχθεί τα ενθέματα που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν στους -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης (850 μl κύτταρα υγρής καλλιέργειας σε 150 μl γλυκερόλη).

Υλικά:

- Μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα
- Θρεπτικό μέσο LB Broth/αμπικιλίνη
- Διάλυμα GET
- Διάλυμα Alkali lysis
- Διάλυμα οξικού καλίου (pH 4.8)
- Διάλυμα TE- Rnase
- Διαλύματα φαινόλης και χλωροφορμίου
- Παγωμένη αιθανόλη 70% και 100%
- Διάλυμα CH_3COONa 0.3 M
- Γλυκογόνο

Μεθοδολογία:

A. Καλλιέργεια και συλλογή βακτηριακών κυττάρων

1. Για τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών ενοφθαλμίζονται αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB Broth που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (1 αποικία / 3 ml LB Broth).
2. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες επωάζονται σε ένα σωλήνα υπό ανάδευση (220 rpm) στους 37°C overnight.
3. Από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε, φυγοκεντρώνται 1.5 ml στις 3.000 rpm για 3 min. Τα βακτηριακά κύτταρα που κατακρημνίζονται και συλλέγονται με αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού, διατηρούνται σε πάγο.

B. Λύση κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

1. Το ιζήμα αναδιαλύεται σε 100 ml παγωμένου διαλύματος GET μετά από έντονη ανάδευση σε vortex και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Η γλυκόζη που εμπεριέχεται στο διάλυμα συμβάλλει στη διατήρηση της ισοτονικότητάς του ώστε να αποφεύγεται η ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών λόγω ωσμωτικής πίεσης. Επιπλέον η παρουσία του χηλικού

παράγοντα EDTA παρεμποδίζει τη δράση των DNAσών εφόσον δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα Ca^{+2} και Mg^{+2} .

2. Στη συνέχεια προστίθενται 200μl από πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα Alkali lysis και αφού πραγματοποιηθεί ήπια ανάδευση (όχι vortex) αφήνεται στον πάγο για 3-5 min. Στο διάστημα αυτό τα κύτταρα λύνονται γι' αυτό και αυξάνεται το ιξώδες του διαλύματος. Το απορρυπαντικό SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διασπά τα μεμβρανικά τοιχώματα με την απομάκρυνση λιπιδίων ώστε να εξέλθουν τελικά τα μόρια του πλασμιδιακού και όχι του χρωμοσωμικού DNA. Το NaOH λειτουργεί ως αποδιατακτικό του DNA καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου και επιτρέπει την ελεγχόμενη ρήξη των μεμβρανών.
3. Ακολουθεί προσθήκη 150 ml παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο, αφού προηγηθεί ανάμειξη με ήπιο vortex. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων οξικού καλίου εξουδετερώνονται οι αλκαλικές συνθήκες λύσης, καθώς αυτό αντιδρά με τα NaOH και SDS, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζονται ως αδιάλυτα σύμπλοκα τα κυτταρικά υπολείμματα και οι πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με το SDS. Ταυτόχρονα κατακρημνίζεται και ένα μεγάλο ποσοστό του χρωμοσωμικού DNA που έχει προσδεθεί στις μεμβράνες.
4. Το υπόλοιπο χρωμοσωμικό DNA καθιζάνει με φυγοκέντριση στις 13.200 rpm για 5 min. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει σε διαλυτή μορφή στο υπερκείμενο, που μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι.
5. Για την πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο.

Γ. Εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο

1. Στο δείγμα DNA προστίθεται ποσότητα ίσου όγκου μίγματος φαινόλης – χλωροφορμίου (1:1) και το μίγμα αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια vortex.
2. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 13.200 rpm και η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι προσεκτικά ώστε να μη ληφθεί καθόλου μεσόφαση ή οργανική φάση.
3. Προστίθεται χλωροφόρμιο ίσου όγκου και επαναλαμβάνεται το στάδιο 2.
4. Η διαδικασία του σταδίου 3 πραγματοποιείται για ακόμα μία φορά και ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Δ. Κατακρήμνιση με αιθανόλη

1. Στο δείγμα DNA όγκου V προσθέτονται 2.5 V αιθανόλης 100%, τέτοιος όγκος διαλύματος CH_3COONa 3 M, ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0.3 M όταν έχει αρχική 2.31 M και 0.5 μl γλυκογόνου και το μίγμα διατηρείται για 15 min στους -20°C .
2. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 15 min στις 13.200 rpm.

3. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και προστίθεται αιθανόλη 70% ίση με 0.5 V.
4. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 min στις 13.200 rpm και αφαίρεση του υπερκείμενου.
5. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και αναδιαλύεται σε 100μl TE-RNase. Το δείγμα, που αποθηκεύεται στους -20°C, αποτελείται από καθαρό πλέον πλασμιδιακό DNA.

GET:
50 mM γλυκόζη
25 mM Tris-HCl pH 8.0
10mM EDTA pH 8.0

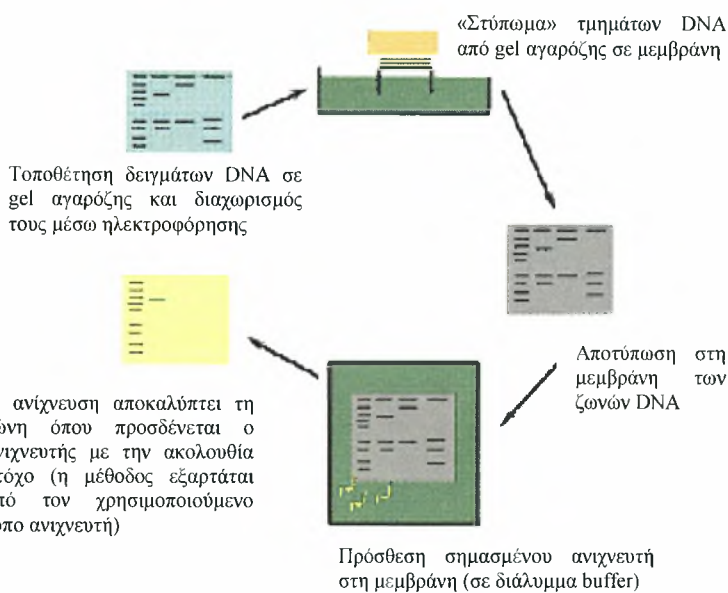
Διάλυμα CH₃COOK pH 4.8:
60 ml CH₃COOK 5M
11.5ml CH₃COOH
28.5ml ddH₂O

Διάλυμα SDS 10% (1L):
100g SDS
ddH₂O

Alkali lysis:
0.2N NaOH
1% SDS

2.8 Υβριδοποίηση κατά Southern

Η τεχνική Southern blot πήρε το όνομά της από τον Edward M. Southern που την ανέπτυξε στο πανεπιστήμιο του Εδιμβούργου τη δεκαετία 1970. Η τεχνική αυτή σχεδιάστηκε για να εντοπίζει μια συγκεκριμένη ακολουθία DNA από ένα σύνθετο μίγμα (π.χ. να εντοπίζει ένα συγκεκριμένο γονίδιο από ολόκληρο γένωμα). Η ποσότητα του DNA που χρειάζεται για αυτή την τεχνική εξαρτάται από το μέγεθος και την δραστικότητα του ανιχνευτή. Βραχείς ανιχνευτές τείνουν να είναι πιο ειδικοί. Υπό βέλτιστες συνθήκες αναμένεται να ανιχνευτεί έως 0.1 pg DNA.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση υβριδοποίησης κατά Southern

A. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση από το πήκτωμα σε νάυλον μεμβράνη

Υλικά:

- Διάλυμα αποδιάταξης: 1.5M NaCl, 0.5M NaOH
- Διάλυμα εξουδετέρωσης 0.5 Tris (pH 7.5), 1.5M NaCl



Εικόνα 19.: Μεταφορά του DNA σε νάυλον μεμβράνη

Μεθοδολογία:

1. Το gel τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο προστίθεται διάλυμα αποδιάταξης. Ακολουθεί ανάδευση για 15 min (το gel πρέπει να καλύπτεται από το διάλυμα)
2. Το διάλυμα απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 1.
3. Αποχύνεται το διάλυμα αποδιάταξης και το gel ξεπλένεται με dd H₂O.
4. Προστίθεται το διάλυμα εξουδετέρωσης και αναδεύεται για 20 λεπτά.
5. Το διάλυμα απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
6. Αποχύνεται το διάλυμα εξουδετέρωσης και το gel ξεπλένεται με dd H₂O.
7. Προσθήκη διαλύματος 10xSSC για t<10 min.
8. Τοποθετούμε το gel ανάποδα σε επίπεδη επιφάνεια (με τα πηγαδάκια προς τα κάτω).
9. Η μεμβράνη* διαβρέχεται με απιονισμένο νερό και μετά με το διάλυμα 10xSSC και τοποθετείται πάνω στο gel.

*Προετοιμασία μεμβράνης: κόβουμε τη μεμβράνη στις διαστάσεις του gel μικρότερη κατά 0.1cm. Επίσης κόβουμε τα 4 χαρτιά Whatman και τις χαρτοπετσέτες 0,5 cm μικρότερα από τις διαστάσεις του gel.

10. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετούνται δύο χαρτιά Whatman που τα έχουμε διαβρέξει με διάλυμα 10xSSC και πάνω από αυτά άλλα δύο χαρτιά Whatman στεγνά.
11. Πάνω από τα χαρτιά Whatman τοποθετούμε τις χαρτοπετσέτες.
12. Στην επιφάνεια που είναι τοποθετημένο το gel προστίθεται ποσότητα 10xSSC (ώστε να καλύπτεται το μισό gel).
13. Η μεταφορά** πραγματοποιείται είτε overnight είτε σε t>2h σε θερμοκρασία δωματίου.

**Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, σημειώνουμε και αριθμούμε τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.

14. Τέλος η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως πραγματοποιείται ξήρανση στους 80°C για 2 ώρες.

B. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή.

↓ Προϋβριδοποίηση

Υλικά:

- Διάλυμα υβριδοποίησης
 - ssDNA 10mg/ml

Μεθοδολογία:

1. Η μεμβράνη τοποθετείται στο σωλήνα υβριδοποίησης (η επιφάνεια που φέρει το DNA να είναι προς το εσωτερικό του σωλήνα)
2. Στο σωλήνα υβριδοποίησης προστίθεται διάλυμα υβριδοποίησης (0.2 ml/cm² μεμβράνης) και 100μg/ml ssDNA*

*Το ssDNA (Salmon Sperm) προσδένεται μη ειδικά σε μη ομόλογες περιοχές της μεμβράνης, εμποδίζοντας τη μετέπειτα σύνδεση του ανιχνευτή σε μη ομόλογες περιοχές. Πριν την προσθήκη του στο σωλήνα υβριδοποίησης, βράζεται για 10 λεπτά ώστε να γίνει μονόκλωνο και τοποθετείται στον πάγο για άλλα 10 λεπτά.

✚ Υβριδοποίηση

Υλικά:

- Ανιχνευτής (Probe)

Μεθοδολογία:

1. Αποδιάταξη ανιχνευτή με βρασμό για 10 λεπτά και επώαση στον πάγο για άλλα 10 λεπτά.
2. Αφαίρεση μικρής ποσότητας διαλύματος υβριδοποίησης ώστε η μεμβράνη να καλύπτεται από το εναπομείναν διάλυμα.
3. Προσθήκη αποδιαταγμένου ανιχνευτή (25μl).
4. Επώαση στους 65°C για 16h.

Γ. Εμφάνιση σήματος

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

✚ Πλύσεις (απομάκρυνση μη ειδικά συνδεδεμένου ανιχνευτή)

Υλικά:

- Διάλυμα Wash 1: 2xSSC, 0.1% SDS
- Διάλυμα Wash 2: 0.2xSSC, 0.1% SDS

Μεθοδολογία:

1. Αποχύνεται το διάλυμα υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή σε αποστειρωμένο falcon και φυλάσσεται στους -20°C . (Ο ανιχνευτής μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αφού πρώτα αποδιαταχθεί).
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο.
3. Προσθήκη διαλύματος πλύσης Wash 1 ώστε να καλύπτεται η μεμβράνη. Στη συνέχεια επώαση υπό ανάδευση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος το διάλυμα αποχύνεται.
4. Επανάληψη βήματος 3.
5. Ξέπλυμα με προσθήκη διαλύματος πλύσης Wash 2. επώαση υπό ανάδευση για 20 λεπτά στους 65°C (Το διάλυμα Wash 2 πριν χρησιμοποιηθεί πρέπει να έχει προθερμανθεί στους 65°C). Τέλος απόχυση του διαλύματος.
6. Επανάληψη βήματος 5.

✚ Εμφάνιση

Υλικά:

- Διάλυμα A: 100mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl
- Διάλυμα B: Διάλυμα A, 1% Blocking Solution
- Blocking Solution: 10gr αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη διαλυμένα σε 100 ml Διαλύματος A
- Διάλυμα C: 100mM Tris (pH 9.5), 100mM NaCl, 50mM MgCl_2
- Διάλυμα NBT
0.5gr σε 10ml 70% dimethylformanid
- Διάλυμα BCIP
0.5gr σε 10ml 100% dimethylformanid

Μεθοδολογία:

1. Εξισορρόπηση μεμβράνης με προσθήκη διαλύματος A για 1 λεπτό (υπό ανάδευση) και απόχυση διαλύματος.
2. Προσθήκη διαλύματος B και επώαση υπό ανάδευση για 35 λεπτά.
3. Απόχυση διαλύματος B και προσθήκη διαλύματος αντισώματος. Επώαση υπό ανάδευση για 35 λεπτά.
4. Το διάλυμα αντισώματος αποχύνεται σε falcon και φυλάσσεται στους 4°C .
5. Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα A για 15 λεπτά.
 6. Απόχυση διαλύματος και επανάληψη βήματος 5.

7. Απόχυση διαλύματος A και εξισορρόπηση μεμβράνης με προσθήκη διαλύματος C για 2 λεπτά.
8. Μεταφορά μεμβράνης σε τρυβλίο, ώστε η επιφάνεια που φέρει το DNA να είναι προς τα πάνω σε σκιερό μέρος.
9. Η μεμβράνη καλύπτεται με 10 ml διαλύματος C που περιέχει 50μl NBT και 37.5μl BCIP. Η εμφάνιση ολοκληρώνεται σε λίγα λεπτά, ενώ η αντίδραση σταματά με πολλαπλά ξεπλύματα με απιονισμένο νερό.

2.9 Απομόνωση γενωμικού DNA αρσενικών ατόμων *Bactrocera oleae*

A. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση γενωμικού DNA από μικρό αριθμό εντόμων. Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρίας Promega.

Υλικά:

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

Μεθοδολογία:

1. Προσθέτουμε 200μl Nuclei Lysis Solution σε erpendorf με δάκους και τους ομογενοποιούμε.
2. Προσθέτουμε 200μl Nuclei Lysis Solution σε erpendorf ταυτόχρονα ξεπλένοντας το έμβολο.
3. Επωάζουμε στους 65°C για 25 λεπτά.
4. Προσθέτουμε 135μl Protein Precipitation Solution. Στη συνέχεια αναδεύουμε το erpendorf σε vortex για 20 δευτερόλεπτα και τα αφήνουμε στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Φυγοκεντρούμε για 4 λεπτά στους 13000-16000 g και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf.
6. Προσθέτουμε 400μl ισοπροπανόλη και αναδεύουμε ελαφρά.
7. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 13000-16000 g και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 500μl από 70% αιθανόλη και αναδεύουμε στη συνέχεια για 1 λεπτό στις 13000-16000 g, κρατάμε το ίζημα και το αφήνουμε να στεγνώσει.
9. Προσθέτουμε 100μl DNA Rehydration Solution και επωάζουμε στους 65°C για 1h.

*Για 3 άτομα εντόμων χρησιμοποιούνται οι εξής ποσότητες: 600μl NLS, 200μl PPS, 600μl

ισοπροπανόλη, 600 μl 70% αιθανόλη, 100μl DRS.

B. Για την απομόνωση υψηλού μοριακού βάρους DNA, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω τεχνική:

Υλικά:

- 1gr αρσενικά άτομα *B.oleae*
- Υγρό άζωτο
- Buffer B
- Πρωτεϊνάση K
- Χλωροφόρμιο
- Αιθανόλη
- Φαινόλη
- Οξικό νάτριο
- TE-RNAase

Μεθοδολογία:

1. Πολτοποιούμε 0.5-1.0 gr εντόμων σε υγρό άζωτο με τη βοήθεια ενός εμβόλου και τοποθετούμε το πολτοποιημένο υλικό σε αποστειρωμένο falcon.
2. Προσθέτουμε 10 ml διαλύματος ομογενοποίησης (buffer B) και πρωτεϊνάσης K σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml και στη συνέχεια τα επωάζουμε στους 45°C για 1 ώρα.
3. Πραγματοποιείται καθαρισμός ρίχνοντας ίσο όγκο φαινόλης, ανακινούμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε σε χαμηλή ταχύτητα 8rpm για 10 λεπτά.
4. Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο falcon και επαναλαμβάνουμε το βήμα 3.
5. Καθαρίζουμε με χλωροφόρμιο όπως στα βήματα 3 και 4.
6. Προσθέτουμε 1/10 V, 2.5M οξικό νάτριο και σιγά σιγά προσθέτουμε 2 vol από παγωμένη αιθανόλη ρίχνοντας την στα τοιχώματα για να ξεπλυθούν από τυχόν υπολείμματα DNA. Τέλος τα τοποθετούμε για 20 λεπτά στους 4°C.
7. Φυγοκεντρούμε 10 λεπτά στις 8000rpm για να παραλάβουμε το DNA και ακολουθεί στέγνωμα.
8. Προσθέτουμε TE-RNAase (για 200 έντομα προσθέτουμε 2 ml TE-RNAase).
9. Επανάληψη των βημάτων 3-8 εάν επιζητούμε μεγαλύτερη καθαρότητα.

Buffer B:

Tris HCl pH 8.0
100 mM
NaCl 50mM
EDTA 50mM
SDS 1%
Leupeptin 5μg/ml
Apropeptin

Διάλυμα TE-RNase

(20pg/ml):

10mM Tris-HCl pH 8.0
1mM EDTA pH 8.0
20μg RNAase

2.10 Απομόνωση φαγικού DNA

Υλικά:

- | | | |
|------------------------|----------------|------------|
| ➤ LB Broth | ➤ SM-Buffer | ➤ TE-RNase |
| ➤ Μαλτόζη | ➤ PEG800 | ➤ Αιθανόλη |
| ➤ MgSO ₄ 1M | ➤ EDTA | ➤ Φαινόλη |
| ➤ Χλωροφόρμιο | ➤ Πρωτεϊνάση K | ➤ DNAase |
| | ➤ SDS | ➤ NaCl |
| | ➤ TE-RNASE | ➤ RNAase |

Μεθοδολογία:

Στάδιο 1^ο: Προετοιμασία των MRA κυττάρων

Διάλυμα 5ml LB-Broth, στο οποίο έχουν προστεθεί 50ml μαλτόζη και 50ml MgSO₄ 1M, επιμολύνεται με MRA κύτταρα, και η καλλιέργεια επωάζεται overnight στους 37°C με ανάδευση στις 220 rpm. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία μαλτόζης απορροφούν το βακτηριοφάγο λ πιο αποτελεσματικά. Το σάκχαρο ενεργοποιεί το σπερόνιο της μαλτόζης που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα του βακτηριοφάγου λ.

Στάδιο 2^ο: Λύση των φάγων.

1. Ενοφθαλμίζουμε 500ml MRA καλλιέργειας με 40ml φάγων και τα επωάζουμε για 20 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση.
2. Τοποθετούμε 200ml από τα παραπάνω σε 20ml προθερμασμένου (37°C) μέσου LB που περιέχει 200ml MgSO₄ 1M. Στη συνέχεια επωάζουμε στους 37°C υπό ανάδευση για περίπου 6 ώρες. Μετά από 2 ώρες το διάλυμα μας αρχίζει να παρουσιάζει μικρή θολότητα, ενώ μετά από 6 ώρες είναι διαυγές και παρατηρούμε μόνο ινίδια DNA που προέρχονται από τη λύση των φάγων.
3. Προσθέτουμε 100ml χλωροφόρμιο, φυγοκεντρούμε στις 8000xg για 10 λεπτά, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε αποστειρωμένο σωλήνα και το διατηρούμε στους 4°C.

Στάδιο 3^ο: Απομόνωση φαγικού DNA

1. Προσθέτουμε RNAase (5 units/ml) και DNAase με τελική συγκέντρωση 1μg/ml και επωάζουμε στους 37°C για 40 λεπτά.
2. Προσθέτουμε σκόνη NaCl σε συγκέντρωση 1M και επωάζουμε στον πάγο για 1 ώρα ή overnight στους 4°C.

3. Φυγοκεντρούμε στα 11000g για 10 λεπτά στους 4°C και παρατηρούμε ως ίζημα τα κυτταρικά υπολείμματα.
4. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε PEG800 σε συγκέντρωση 10% w/v και επωάζουμε για 1.5-2 ώρες στον πάγο.
5. Φυγοκεντρούμε στις 11000g για 10 λεπτά στους 4°C.
6. Αναδιαλύουμε το ίζημα σε 1ml SM-Buffer, το επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά το μεταφέρουμε σε eppendorf.
7. Προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο (ισοδύναμο όγκο με το μέσο SM 1:1) και αναδεύουμε σε vortex για 30".
8. Φυγοκεντρούμε στις 3000g για 15 λεπτά και στους 4°C.
9. Λαμβάνουμε το υπερκείμενο (την υδατική φάση), προσθέτουμε 0.5M EDTA (τελική συγκέντρωση 20mM), πρωτεΐνάση K (τελική c=50μg/ml), SDS 10% (τελική c=0.5%) και τα επωάζουμε για 1 ώρα στους 56°C.
10. Κάνουμε εκχύλιση με φαινόλες-χλωροφόρμιο, γίνεται καθαρισμός με αιθανόλη και τέλος κάνουμε αναδιάλυση σε 100μl TE-RNAase.

2.11 Απομόνωση πλάκας βακτηριοφάγου λ

Υλικά:

- Μαλτόζη
- MgSO₄ 1M και 10mM
- Κύτταρα MRA
- NZY Broth
- NZY Top Agar
- NZY Agar plates

Μεθοδολογία:

Στάδιο 1^ο: Προετοιμασία βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν για επίστρωση

1. Τοποθετούμε 5ml κύτταρα MRA σε αποστειρωμένο falcon και προσθέτουμε 50μl MgSO₄ 1M και 50μl μαλτόζη. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία μαλτόζης απορροφούν το βακτηριοφάγο λ πιο αποτελεσματικά. Το σάκχαρο ενεργοποιεί το σπερόνιο της μαλτόζης που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα του βακτηριοφάγου λ. Ακολουθεί επώαση για 6 ώρες στους 37°C ή overnight στους 30°C.
2. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 1000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και

μοιράζουμε το διάλυμα σε τρία erpendorf.

3. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml $MgSO_4$ (10mM) στο πρώτο erpendorf. Στη συνέχεια αναδιαλύουμε το ίζημα, η ποσότητα μεταφέρεται στο δεύτερο erpendorf, όπου γίνεται αναδιάλυση και τέλος η ποσότητα μεταφέρεται στο τρίτο erpendorf όπου γίνεται αναδιάλυση και μεταφορά σε 15ml falcon.
4. Τέλος ξεπλένουμε διαδοχικά το erpendorf με 1ml $MgSO_4$ 10mM και προσθέτουμε τόσο $MgSO_4$ ώστε το διάλυμα κατά τη φωτομέτρηση να έχει τελική $O.D._{600}:0.5$. Μπορούμε να αποθηκεύσουμε το εναιώρημα των κυττάρων στους $4^{\circ}C$ και να χρησιμοποιηθεί για πάνω από τρεις εβδομάδες. Όμως εάν χρησιμοποιήσουμε φρέσκα παρασκευασμένα κύτταρα τότε η αποδοτικότητα του πιάτου αυξάνεται.

Στάδιο 2^ο: Επίστρωση του βακτηριοφάγου λ σε τρυβλία

1. Προετοιμάζουμε διαδοχικές αραιώσεις 10^{-4} και 10^{-6} του stock βακτηριοφάγου που διαθέτουμε σε διάλυμα SM.
2. Παίρνουμε 3ml από τις παραπάνω αραιώσεις και προσθέτουμε 200ml MRA κυττάρων ($O.D._{600}:0.5$) και επωάζουμε για 20 λεπτά στους $37^{\circ}C$ υπό ανάδευση με σκοπό να επιτρέψουμε στα βακτήρια να απορροφήσουν τα τμήματα του βακτηριοφάγου.
3. Στα 203ml δείγματος (200ml MRA κυττάρων + 3ml αραιώσεων 10^{-4} και 10^{-6} του stock βακτηριοφάγου) προσθέτουμε 3ml NZY Top Agar στους $48^{\circ}C$.
4. Στη συνέχεια γίνεται γρήγορη επίστρωση του παραπάνω παρασκευάσματος σε προθερμασμένο NZY Agar τριβλίο προσπαθώντας να αποφύγουμε τη δημιουργία φυσαλίδων κατά την επίστρωση και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στερεοποιηθεί το NZY Top Agar.
5. Τέλος γίνεται επώαση στους $37^{\circ}C$ για 6-8 ώρες, ενώ οι πλάκες του βακτηριοφάγου αρχίζουν να εμφανίζονται περίπου στις 7 ώρες.

Στάδιο 3^ο: Απομόνωση της πλάκας φάγου

1. Αφού έχουμε εντοπίσει την επιθυμητή πλάκα φάγου με μία μικροπιπέτα και ασκώντας ελαφρά αναρρόφηση λαμβάνουμε την πλάκα από το τρυβλίο προσέχοντας να μην επιμολυνθεί το δείγμα από παρακείμενες πλάκες.
2. Η απομονωμένη πλάκα φάγου τοποθετείται σε 200ml SM-Buffer και αφήνεται για 24 ώρες στο ψυγείο ώστε να διαχυθούν οι φάγοι. Στη συνέχεια αποθηκεύουμε στους $4^{\circ}C$.

Πιάτα NZY agar (1000ml):

5g NaCl
2g $MgSO_4$
5g εκχύλισμα μαγιάς
10g NZY-αμίνη
15g άγαρ

NZY Top Agar (100ml):

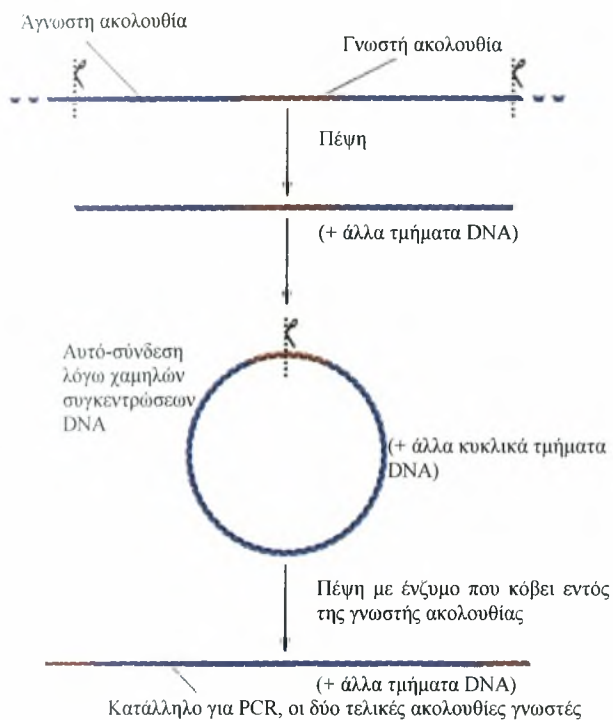
0.5g NaCl
0.2g $MgSO_4$
0.5g εκχύλισμα
μαγιάς
10g NZY-αμίνη

NZY Broth (1000ml):

5g NaCl
2g $MgSO_4$
5g εκχύλισμα μαγιάς
10g NZY-αμίνη

2.12. Αντίστροφη (Inverse) PCR

Η αντίστροφη PCR (Inverse PCR ή IPCR) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Ochman et al. (1988). Ένας από τους περιορισμούς της κλασσικής PCR είναι ότι πρέπει να είναι γνωστές οι 5' και 3' πλευρικές περιοχές του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει. Η αντίστροφη PCR μας επιτρέπει να κάνουμε PCR ακόμα και όταν έχουμε πληροφορίες για μια εσωτερική ακολουθία μόνο.



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση της Inverse PCR.

Αυτό την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στην ταυτοποίηση των πλευρικών ακολουθιών DNA γονιδιακών ενθεμάτων. Παρόμοια με τις άλλες τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, η IPCR πολλαπλασιάζει το DNA στόχο χρησιμοποιώντας DNA πολυμεράση.

Η IPCR βασίζεται στην κλασσική PCR έχοντας όμως τους εκκινητές προσανατολισμένους προς την αντίστροφη κατεύθυνση από τον κανονικό προσανατολισμό. Η μήτρα για τους αντίστροφους εκκινητές είναι ένα περιοριστικό θραύσμα το οποίο έχει αυτοκυκλοποιηθεί. Η IPCR έχει πολυάριθμες εφαρμογές στην μοριακή βιολογία συμπεριλαμβάνοντας τον πολλαπλασιασμό και ταυτοποίηση πλευρικών ακολουθιών σε μεταθετά στοιχεία και την ταυτοποίηση γονιδιακών ενθεμάτων.

Υλικά: Ίδια με το 2.1 με τη διαφορά ό,τι οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να ενισχύουν προς αντίθετη κατεύθυνση

Μεθοδολογία:

Η μέθοδος της IPCR περιλαμβάνει μια σειρά από πέψεις και αυτοκυκλοποιήσεις με το DNA να κόβεται από μία περιοριστική ενδονουκλεάση. Αυτό το κόψιμο έχει ως αποτέλεσμα να βρίσκονται γνωστά άκρα εκατέρωθεν μίας άγνωστης ακολουθίας.

1. Το DNA στόχος κόβεται σε μικρότερα τμήματα, αρκετών κιλοβάσεων το καθένα, μέσω πέψης από μια περιοριστική ενδονουκλεάση.
2. Υπό χαμηλές συγκεντρώσεις επάγεται αυτό-σύνδεση, προκαλώντας τον φωσφορικό σκελετό να αναδιαταχθεί, δίνοντας ένα κυκλικό τμήμα DNA.

3. Κατόπιν πέπτεται το DNA στόχος με μία γνωστή περιοριστική ενδονουκλεάση. Αυτή κόβει το DNA εντός της γνωστής ακολουθίας δίνοντας ένα γραμμικό προϊόν με γνωστές τελικές ακολουθίες, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για PCR.
4. Τελικά πραγματοποιείται αντίδραση PCR με εκκινητές συμπληρωματικούς προς τις γνωστές εσωτερικές ακολουθίες.

2.13. Long PCR

Υλικά:

Ίδια με την 2.1 παράγραφο και επιπλέον *Taq* πολυμεράση

Μέθοδος:

Η τεχνική Long PCR χρησιμοποιείται συχνά για να κλωνοποιήσουμε γονίδια ή μεγάλα τμήματα DNA τα οποία δεν μπορεί να κλωνοποιήσει η κλασική PCR. Υπό τις κατάλληλες συνθήκες μπορούν να κλωνοποιηθούν τμήματα έως 27 kb προερχόμενα από καλής ποιότητας DNA, ενώ τμήματα μεγέθους 10 - 20 kb κλωνοποιούνται με ευκολία. Η μέθοδος βασίζεται σε ένα μείγμα από θερμο-σταθερές DNA πολυμεράσες, συνηθέστερα την *Taq* DNA πολυμεράση, για υψηλή επεξεργασία (π.χ. ενεργότητα 5'-3') και μια άλλη DNA πολυμεράση με ικανότητες 3'-5' διόρθωσης (συνήθως η *Pwo*). Αυτός ο συνδυασμός ιδιοτήτων επιτρέπει μεγαλύτερη έκταση εκκινητών απ' ό,τι μπορεί να επιτευχθεί με μόνη την *Taq*.

2.14 Klenow πολυμεράση

Επιπλέον για να δημιουργήσουμε τυφλά άκρα σε ένα κομμάτι DNA χρησιμοποιούμε την Klenow πολυμεράση. Προσθέτουμε 1μl Klenow mix στο δείγμα DNA και επωάζουμε στους 37° C για 3 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 1μl dNTPs mix, επωάζουμε στους 37° C για 5 λεπτά και τέλος κάνουμε θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65° C για 10 λεπτά.

Klenow mix:

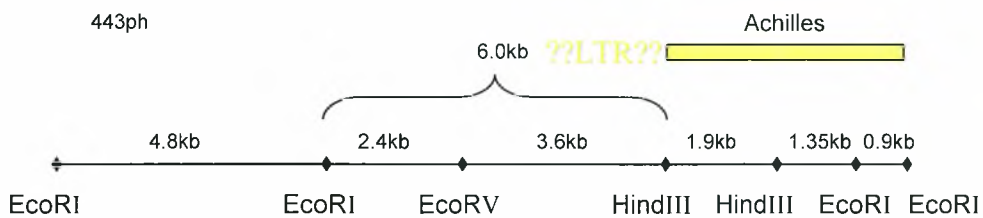
30 μl Klenow buffer 1X, 3-5 u Klenow pol

2.15 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA και επεξεργασία αλληλουχίας με το πρόγραμμα Omiga και Blast

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Sanger από την εταιρεία Macrogen. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αλληλούχησης κάθε δείγματος απαιτούνται 1000ng DNA. Κάθε αλληλουχία που προσδιορίστηκε, επεξεργάστηκε με το πρόγραμμα Omiga. Το Omiga είναι ένα πρόγραμμα επεξεργασίας της πρωτοταγούς δομής του DNA με δυνατότητα σύγκρισης και ομοπαράθεσης αλληλουχιών. Χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση ενθεμάτων από τα επιμέρους τμήματα των αλληλουχιών τους και για την εύρεση θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων. Με το σύστημα Blast (Basic Local Alignment Tool) επιτυγχάνεται η σύγκριση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας με ακολουθίες από βάσεις δεδομένων, καθώς και η ταυτοποίηση της συγκεκριμένης ακολουθίας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η επιλογή του φάγου 443 για ανάλυση βασίστηκε σε προγενέστερες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου, καθώς υπήρχαν ήδη διαθέσιμα δεδομένα και κλωνοποιημένα τμήματά του, που αντιστοιχούν σε τμήματα του ρετρομεταθετού *Achilles*. Το συνολικό μέγεθος του ενθέματος του φάγου αντιστοιχεί σε 15 kb (Εικ. 21), από τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί τα τμήματα που αντιστοιχούν σε 1.9, 1.35, 0.9 και 4.8kb. Για την κλωνοποίηση του τμήματος 6.0kb, το οποίο ήταν πιθανόν να περιλαμβάνει την 5' LTR αλληλουχία του ρετρομεταθετού, και ακολούθως τη διερεύνηση της θέσης ένθεσης του στοιχείου στο γονιδίωμα, ακολουθήθηκαν διάφορες προσεγγίσεις.

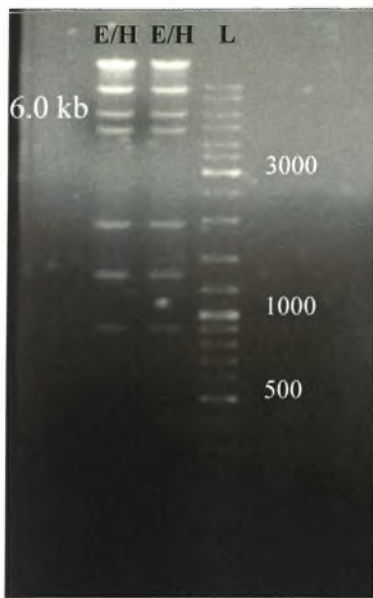


Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση του ενθέματος του φάγου 443 που πιθανόν περιλαμβάνει την 5' LTR αλληλουχία του ρετρομεταθετού.

3.1 Κλωνοποίηση τμήματος 6.0kb και υποκλωνοποίηση τμημάτων 2.4kb και 3.6 kb του φάγου 443

Η αρχική προσπάθεια εστίαστηκε στην απομόνωση φαγικού DNA και στην πέψη του φάγου 443 με τα ένζυμα EcoRI και HindIII με σκοπό την απομόνωση του τμήματος 6.0 kb_{E/H} στο οποίο είναι πιθανόν να περιλαμβάνεται η LTR περιοχή του *Achilles*. Ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης μικρή ποσότητα της πέψης του φάγου 443 με τα ένζυμα EcoRI και HindIII και στη συνέχεια έγινε απομόνωση (gel extraction) του τμήματος 6.0 kb. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων (Εικ.22) παρατηρήθηκε το πρότυπο θέσεων κοπής του ενθέματος (insert), στο οποίο είχε βασιστεί η διαδικασία της χαρτογράφησης. Οι ζώνες των ~20kb και ~9.0 kb αντιστοιχούν στους βραχίονες του φάγου. Οι υπόλοιπες παρουσιάζουν τις θέσεις κοπής των ενζύμων του ενθέματος (~15.0kb) που είναι κλωνοποιημένο σ' αυτόν.

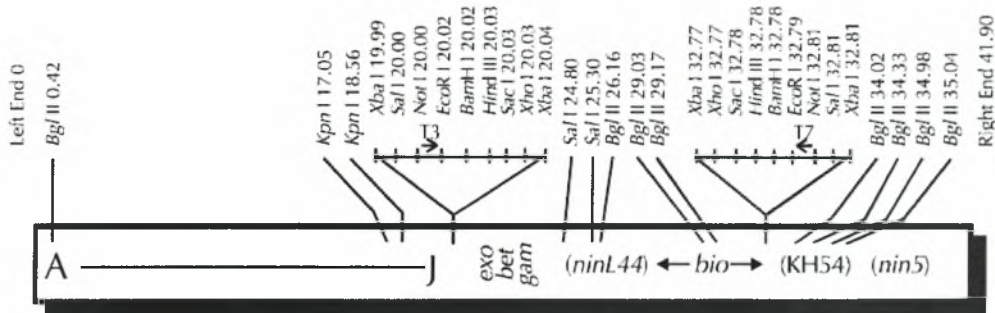
α)



β)

E/H
~20kb
~9.0 kb
6.0kb
4.8kb
1.9 kb
1.350 kb
0.9 kb

Εικόνα 22. α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του Φ443 με χρήση των ενζύμων EcoRI και HindIII αντίστοιχα β) Στον πίνακα αναγράφεται το μέγεθος των ζωνών που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης, σύμφωνα με το πρότυπο του μάρτυρα μοριακού βάρους (L).

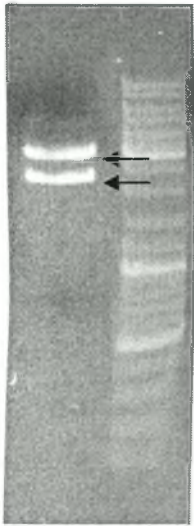


Εικόνα 23. Lambda dash II: περιοχή πολυσυνδέτη

Τα συνολικά 25 μl της έκλουσης του 6.0kb μοιράστηκαν σε δύο κλάσματα των 10μl και 15μl αντίστοιχα. Στο κλάσμα των 15μl πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο EcoRV, που αναγνωρίζει μια θέση κοπής εσωτερικά του τμήματος 6.0 kb E/H , ώστε τα τμήματα 2.4 E/EV και 3.6 E/VH kb που προέκυψαν να υποκλωνοποιηθούν. Το κλάσμα των 10μl χρησιμοποιήθηκε για την απευθείας κλωνοποίηση του 6.0kb. Στη συνέχεια και στις δυο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η Kleenow πολυμεράση με σκοπό την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων στα προεξέχοντα άκρα των τμημάτων που είχαν προκύψει από την αρχική πέψη με EcoRI-HindIII. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα και ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης σε φορέα pBS-EcoRV (blunt-end ligation) και μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων.

Στο απομονωμένο πλασμιδιακό DNA πραγματοποιήθηκε πέψη με XhoI και XbaI (βλέπε Εικ.15) και έγινε ηλεκτροφόρηση ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχής κλωνοποίηση του τμήματος

των 6.0 kb (443rh/6.0kb_{E/H}), αλλά και η υποκλωνοποίηση των τμημάτων 2.4kb (443rh/6.0kb/2.4_{E/EV}) και 3.6kb (443rh/6.0kb/3.6_{E/H}) (Εικ.24) Τελικά από αυτή τη διαδικασία μόνο το τμήμα 2.4 kb κλωνοποιήθηκε. Η κλωνοποίηση των 3.6 και 6.0 kb, δεν ήταν εφικτή μέσω της παραπάνω πορείας, παρά τις επαναλαμβανόμενες προσπάθειες, γι' αυτό και στη συνέχεια ακολουθήθηκε διαφορετική προσέγγιση.



Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης του δείγματος 443rh/6.0kb/2.4_{E/EV} με τα ένζυμα XhoI -XbaI. Στις 2.9kb παρατηρείται η ζώνη του φορέα pBS-EcoRV ενώ η ζώνη στις 2.4kb αντιστοιχεί στο ένθεμα.

3.2 Προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής του 443rh/6.0kb/2.4_{E/EV} και ανάλυση αλληλουχίας

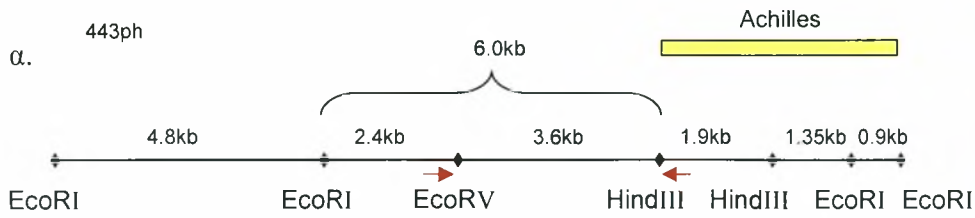
Ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής του κλώνου 443rh/6.0kb/2.4_{E/EV} πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές M13F(-20) και M13R(-20) σε πλασμιδικό DNA. Οι 5' και 3' αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Omega και ακολούθως συγκρίθηκαν μέσω του προγράμματος BLAST με τις υπάρχουσες σε βάσεις δεδομένων, σε αναζήτηση ομοιοτήτων με ήδη γνωστές αλληλουχίες. Η αναζήτηση δεν έδωσε στατιστικά σημαντική ομοιότητα με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες. Παρ' όλα αυτά, οι διαθέσιμες πλέον αλληλουχίες του κλώνου 443rh/6.0kb/2.4_{E/EV} χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό εκκινητών (2.4 F) ώστε να απομονωθεί το τμήμα 3.6 kb.

3.3 Κλωνοποίηση του 3.6 μέσω φαγικής ενίσχυσης

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του τμήματος 2.4 kb και η ήδη διαθέσιμη αλληλουχία του 1.9 kb έδωσε τη δυνατότητα σχεδιασμού εκκινητών (Εικ. 25) 2.4F και 1.9R, ώστε μέσω PCR να ενισχυθεί το τμήμα 3.6 kb, που αναμένεται να περιλαμβάνει την περιοχή ανοδικά του ORF1. Το προϊόν ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης και απομονώθηκε το τμήμα 3.6kb.

Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης σε φορέα pBS-T και μετασχηματισμός βακτηρίων. Ωστόσο

και αυτή η προσέγγιση δεν επέφερε το αναμενόμενο αποτέλεσμα, αφού δεν ήταν εφικτή η κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος.



Εικόνα 25: α) Σχηματική απεικόνιση του ενθέματος του φάγου 443. Με τα κόκκινα βέλη (→ ←) επισημαίνονται οι εκκινητές 2.4F και 1.9R αντίστοιχα για την ενίσχυση του τμήματος 3.6 kb. β) Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης 3.6 kb

β.

3.4 Inverse PCR στο φάγο ως θετικό control

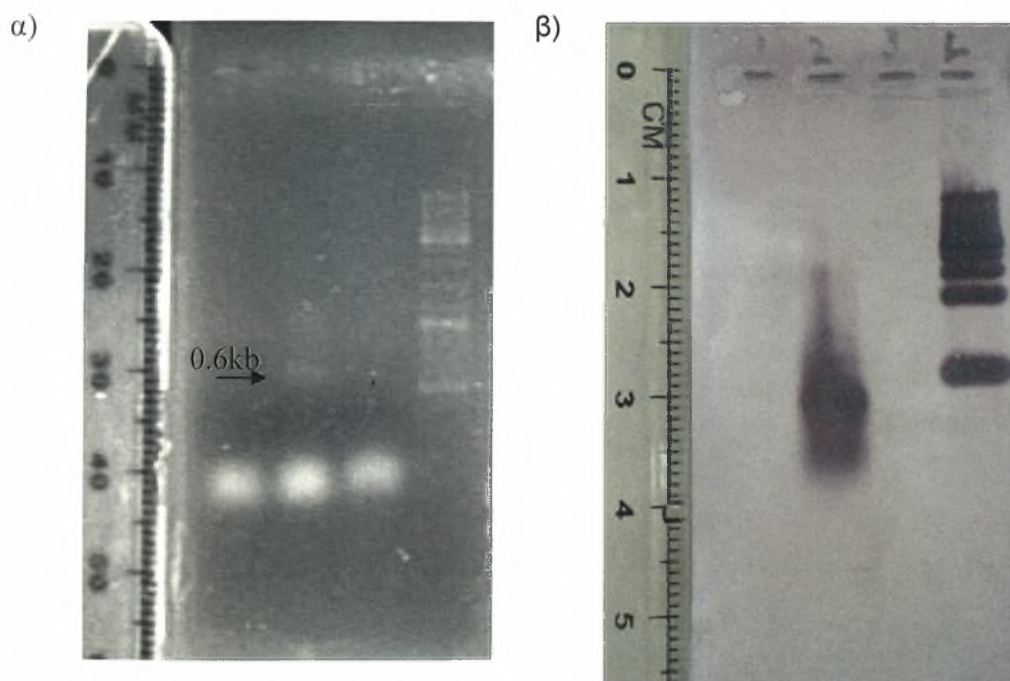
Σε θραύσματα φαγικού DNA, που προέκυψαν με χρήση του ενζύμου περιορισμού EcoRI, πραγματοποιήθηκε ανάστροφη (inverse) PCR, με εκκινητές τους 1.9R και 1.350F, με σκοπό να ενισχυθεί το τμήμα 6.0 kb. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση η προσπάθεια κλωνοποίησης είχε ανεπιτυχή αποτελέσματα, αφού δεν ενισχύθηκε το αναμενόμενο προϊόν 6.0 kb, αλλά παραπροϊόντα μικρότερου μεγέθους.



Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης inverse PCR με εκκινητές τους 1.9R και 1.350F

3.5 Διερεύνηση θέσεων ένθεσης του ρετρομεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμα και Inverse PCR στο γονιδιωματικό DNA του εντόμου *Bactrocera oleae*

Για τον εντοπισμό και κατέπείκταση τη διερεύνηση των θέσεων ένθεσης του μεταθετού πραγματοποιήθηκε inverse PCR σε θραύσματα γονιδιωματικού DNA, που προέκυψαν με χρήση του ενζύμου περιορισμού EcoRI. Πραγματοποιήθηκε ανάστροφη (inverse) PCR, με εκκινητές τους 1.9R και 1.350F, με σκοπό να ενισχυθεί το τμήμα 6.0 kb. Από την ακόλουθη ηλεκτροφόρηση, προσδιορίστηκαν τα μεγέθη των προϊόντων ενίσχυσης που αντιστοιχούν σε τμήματα 0.3, 0.6 και 0.8 kb, ενώ δεν ενισχύθηκε το αναμενόμενο των 6.0 kb. Για να ελεγχθεί η προέλευση αυτών των μικρότερων τμημάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το τμήμα 1.9kb. Επιπλέον, για να επιβεβαιώσουμε ότι η μη ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος δεν είναι αποτέλεσμα της πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε, επιλέχθηκε η Long Taq που είναι αποτελεσματική για την ενίσχυση μεγάλων τμημάτων. Παρ' όλα αυτά, δεν ήταν εφικτή η ενίσχυση.



Εικόνα 27 α) Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης inverse PCR σε θραύσματα γονιδιωματικού DNA που προέκυψαν με χρήση του περιοριστικού ενζύμου EcoRI. β) Εμφάνιση της υβριδοποίησης των προϊόντων ενίσχυσης με ανιχνευτή το τμήμα 443/1.9H.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή είναι μέρος της μελέτης της μοριακής οργάνωσης του Y χρωμοσώματος του *Bactrocera oleae* που διεκπεραιώνεται στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας. Σε προηγούμενες προσπάθειες απομονώθηκε ένα τμήμα DNA 1.2kb, το οποίο αποτελεί μέρος ενός ρετρομεταθετού στοιχείου με προτίμηση στο Y χρωμόσωμα. Το στοιχείο αυτό ονομάστηκε *Achilles*. Τα μεταθετά στοιχεία που έχουν χαρακτηριστεί στην τάξη των διπτέρων εντόμων έχουν φανεί να εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η υβριδική δυσγένεση, η οριζόντια μεταφορά, το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων, η χρωμοσωμική αναδιάταξη, η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, η δημιουργία ετεροχρωματίνης, ακόμα και στη δομή μιας νέας μορφής τελομερών (Kidwell et al., 2005). Επιπρόσθετα, ορισμένα από αυτά εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές χρωμοσωμάτων και ιδιαίτερα στο Y χρωμόσωμα, που έχει προταθεί είτε ως η πηγή των ρετρομεταθετών στοιχείων, είτε ως η περιοχή συσσωρεύσεώς τους (Rohr et al., 2002). Λόγω της σημαντικότητας της λειτουργίας των μεταθετών στοιχείων, της δυνατότητας χρησιμοποίησής τους ως φορέων γενετικού μετασχηματισμού, αλλά και διότι το συγκεκριμένο μεταθετό εμφανίζει προτίμηση στο Y χρωμόσωμα, θεωρήθηκε αναγκαία η προσπάθεια απομόνωσης ολόκληρης της αλληλουχίας του ρετρομεταθετού και ο χαρακτηρισμός του.

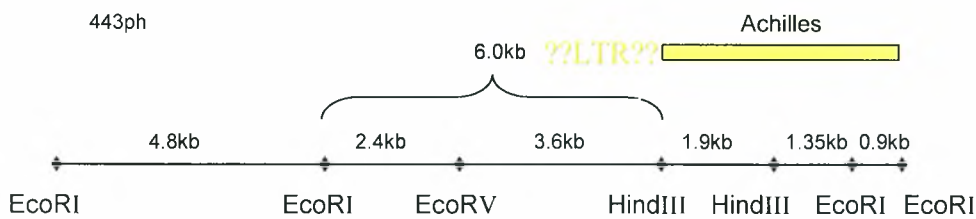
Μετά από σύγκριση της αλληλουχίας του *Achilles* με διαθέσιμες στη βάση δεδομένων (Blast search), η αλληλουχία του *Achilles* φάνηκε να περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης με μεγάλη ομοιότητα με τις τρανσποζάσες gag των ρετρομεταθετών στοιχείων της οικογένειας BEL-Pao, αλλά και ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο ανοδικά της gag με χαρακτηριστικές περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου. Προφανώς το ρετρομεταθετό στοιχείο που αντιπροσωπεύεται από το *Achilles*, ανήκει στα ρετρομεταθετά της οικογένειας BEL-Pao, τα οποία εμφανίζονται σε διάφορα φύλα, γεγονός που είναι αποτέλεσμα οριζόντιας μεταβίβασης (Marsano et al., 2003). Στη *Drosophila melanogaster* έχει χαρακτηριστεί ένα τέτοιο στοιχείο, το ρετρομεταθετό MAX που εντοπίζεται στις ετεροχρωματινικές περιοχές των αυτοσωμάτων και είναι διάσπαρτο στο Y χρωμόσωμα (Marsano et al., 2003). Μετά από *in situ* υβριδοποίηση του *Achilles* σε μιτωτικά χρωμοσώματα του δάκου διαπιστώθηκε ότι και αυτό εντοπίζεται σε ετεροχρωματινικές περιοχές των χρωμοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του Y.

Για τους λόγους αυτούς θεωρήθηκε σημαντικό να απομονωθεί το ρετρομεταθετό στοιχείο ώστε να αποκαλυφθεί η δομή του, η οποία πιθανό να είναι συντηρημένη σε όλα τα στοιχεία αυτής της οικογένειας. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να απομονωθούν γειτονικές περιοχές του *Achilles* και συγκεκριμένα μοναδικά τμήματα DNA. Αφού το ρετρομεταθετό έχει προτίμηση στο Y χρωμόσωμα πιθανόν τα τμήματα αυτά που θα απομονωθούν να είναι περιοχές του Y. Αυτές οι μοναδικές περιοχές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως Y ειδικοί ανιχνευτές. Όπως προαναφέραμε στην Εισαγωγή, η τεχνική S.I.T (Sterile Insect Technique) συνίσταται στη μαζική απελευθέρωση στείρων εντόμων. Η αποτελεσματική SIT, όμως, προϋποθέτει την απελευθέρωση μόνο αρσενικών

ατόμων, κάτι το οποίο προαπαιτεί τη δυνατότητα διαχωρισμού των φύλων σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Δεδομένου του γεγονότος ότι ο διαχωρισμός του φύλου στα Terphritidae δεν είναι δυνατός παρά μόνο στο στάδιο του ενηλίκου, καθίσταται εμφανής η σημασία ενός μοριακού διαγνωστικού του φύλου βασισμένου σε έναν Υ-ειδικό ανιχνευτή. Ταυτόχρονα, Υ-ειδικοί δείκτες θα ήταν χρήσιμοι σε πληθυσμιακές αναλύσεις.

Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, για την απομόνωση του *Achilles*, σχεδιάστηκαν εκκινήτες που ενισχύουν μια περιοχή 0.4kb του αρχικά απομονωμένου τμήματος 1.2kb και με αυτούς πραγματοποιήθηκε PCR σε κλάσματα φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου. Στη συνέχεια, έγινε διαλογή των κλασμάτων που έδωσαν προϊόν ενίσχυσης υβριδοποιώντας τα με ανιχνευτή το τμήμα των 0.4kb. Ένας από τους φάγους που απομονώθηκε ήταν ο Φ443. Για να προσδιοριστεί η αλληλουχία εκείνη του φάγου που ενισχύονταν κατά την PCR, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern του Φ443 μετά από πέψη με EcoRI, HindIII και το συνδυασμό τους, με ανιχνευτή το τμήμα των 0.4kb. Η υβριδοποίηση αποκάλυψε ζώνη 1.9 kb, η οποία και κλωνοποιήθηκε. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση του φάγου, για να προσδιοριστούν οι σχετικές θέσεις των επιμέρους τμημάτων στο συνολικό ένθεμα.

Το συνολικό μέγεθος του ενθέματος του φάγου, όπως προαναφέρθηκε, αντιστοιχεί σε 15 kb, από τις οποίες έχουν κλωνοποιηθεί τα τμήματα που αντιστοιχούν σε 1.9, 1.35, 0.9 και 4.8 kb. Λόγω της ομολογίας του ρετρομεταθετού *Achilles* με το MAX της *Drosophila* αναμένουμε ανοδικά της περιοχής 1.9 kb να βρίσκεται η 5' LTR αλληλουχία. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ουσιαστική η κλωνοποίηση του τμήματος 6.0 kb, στο οποίο ήταν πιθανόν να περιλαμβάνεται η 5' LTR αλληλουχία του ρετρομεταθετού.



Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση του ενθέματος του φάγου 443 που πιθανόν περιλαμβάνει την 5' LTR αλληλουχία του ρετρομεταθετού.

Κατά την προσπάθεια κλωνοποίησης των 6.0kb, έγινε και υποκλωνοποίηση του τμήματος 2.4 kb που περιλαμβάνεται στο τμήμα των 6.0kb, για να ολοκληρωθεί η ανάλυση της δομής του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* και να εντοπιστούν τα σημεία ένθεσής του στο γονιδίωμα του δάκου. Επανειλημμένες προσπάθειες κλωνοποίησης του τμήματος των 6.0 kb στον πλασμιδιακό φορέα pBS δεν καρποφόρησαν. Ανάμεσα στα πιθανά αίτια της αδυναμίας κλωνοποίησης του

τμήματος των 6.0 kb είναι το μεγάλο σχετικά μέγεθός του, αλλά ακόμα και η ακαταλληλότητα του φορέα κλωνοποίησης ή του ξενιστή. Δεν υπάρχει φορέας κατάλληλος για την κλωνοποίηση όλων των τμημάτων DNA. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να γίνει προσεκτική επιλογή του καταλληλότερου φορέα με βάση τα ένζυμα περιορισμού που θα χρησιμοποιηθούν και το μέγεθος του ενθέματος. Το τμήμα των 6.0 kb ίσως να ήταν αρκετά μεγάλο για το φορέα PBS και να μην επιτράπηκε η κλωνοποίηση, γι' αυτό και είναι σημαντικό να επιλεγεί φορέας που να ενσωματώνει αποδοτικότερα ενθέματα μεγάλου μεγέθους π.χ. pEF- BOS. Είναι επίσης πιθανό συγκεκριμένες αλληλουχίες στο τμήμα των 6.0 kb να αναστέλλουν την ανάπτυξη του ξενιστή, με αποτέλεσμα να μην παίρνουμε βιώσιμες μετασχηματισμένες αποικίες. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα πολλών ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχει ακολουθίες δυνητικά ιδανικές για ομόλογο ανασυνδυασμό και έτσι είναι πιθανό ότι το ευκαρυωτικό DNA που κλωνοποιείται σε βακτηριακούς φορείς να υποστεί επανατοποθέτηση κατά τον πολλαπλασιασμό της *E. coli*. Τέτοιες επανατοποθετήσεις είναι σπάνιες ακόμα και στις *rec⁺* σειρές της *E. coli*. Οι αναφορές αστάθειας του DNA (Lauer et al, 1980) είναι σπάνιες, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν θα μπορούσε να συμβεί. Τα ευκαρυωτικά γονίδια της ρεπλικάσης και της ελικάσης που είναι λειτουργικά κατά τον ανασυνδυασμό, είναι συχνά τοξικά για τα βακτήρια και δεν τα αφήνουν να αναπτυχθούν. Άλλοι λόγοι μπορεί να είναι η ύπαρξη Z-DNA στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα που προκαλεί μικρής έκτασης ελλείψεις στο βακτηριακό DNA (Gulian et al, 2005) με συνέπεια την αστάθειά του και το μη σχηματισμό αποικιών.

Άλλη προσέγγιση που ακολουθήσαμε για να κλωνοποιηθεί το τμήμα των 6.0 kb ήταν η *inverse PCR*, με αποτελέσματα εξίσου αρνητικά. Ίσως το πρόβλημα να έγκειται στους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, διότι οι εκκινητές αυτοί μπορεί να ενισχύουν και άλλα τμήματα εκτός από το επιθυμητό. Τέλος στην *inverse PCR* οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται έχουν μεγάλη σημασία όσον αφορά στην απόδοση της μεθόδου. Ξεκινώντας με $T_{an} = 55^{\circ}C$ οι εκκινητές δεν προσδένονταν ειδικά ώστε να ενισχύσουν το επιθυμητό κομμάτι των 6.0 kb. Αυξάνοντας την θερμοκρασία στους $65^{\circ}C$ εφαρμόστηκαν πιο αυστηρές συνθήκες έτσι ώστε οι εκκινητές να μην προσδένονται πλέον σε μη ειδικές θέσεις, χωρίς όμως το προϊόν ενίσχυσης και σε αυτή την περίπτωση να είναι το επιθυμητό. Επιπλέον, για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας θα έπρεπε να γίνει και επιλογή διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, ώστε το μέγεθος της αλληλουχίας που προκύπτει και θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα, να είναι μικρότερο και επομένως να ενισχύεται πιο εύκολα. Οι δυσκολίες που προέκυψαν τόσο για την κλωνοποίηση του τμήματος των 6.0 kb όσο και για την υποκλωνοποίηση του τμήματος των 3.6 kb, ενισχύουν την υπόθεση ότι στην συγκεκριμένη περιοχή εντοπίζεται η 5' LTR αλληλουχία του ρετρομεταθετού. Οι LTR επαναλήψεις είναι ανάστροφες δομές και γι' αυτό το λόγο δεν είναι εύκολη η κλωνοποίησή τους. Είναι πιθανό η περιοχή αυτή να σχηματίζει δευτεροταγείς δομές, υπερελικώσεις ή δομή φουρκέτας και έτσι να μην επιτρέπεται η κοπή της από ένζυμα περιορισμού και η περαιτέρω διαχείρισή της. Επίσης, αν και σπάνιο, δεν αποκλείεται οι ισχυροί υποκινητές των περιοχών αυτών να δράσουν στα κύτταρα της *E. coli* και να μην επιτρέπουν την ομαλή ανάπτυξή τους.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Augustinos A.A., Mamuris Z., Stratikopoulos E.E., D'Amelio S., Zacharopoulou A. & K.D. Mathiopoulos (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125: 231–241
2. Benos P., Tavernarakis N., Brogna S., Thireos G., Savakis C. (2000) Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, 263 (1): 90-5
3. Berezikov E, Bucheton A, Busseau I (2000) Non-LTR retrotransposons in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* 1: research 0011.1–0011.15
4. Bopp D., Bell, L.R., Cline, T.W. and Schedl P. (1991) Developmental distribution of female specific Sex – lethal proteins in *Drosophila melanogaster* *Genes Devel.* 5 : 403-415
5. Bull, J.B. (1983) Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, California, U.S.A.
6. Carvalho, A.B. and Clark, A.G. (2005) Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science* 307, 108–110
7. Charlesworth, B. and Charlesworth, D. (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355, 1563–1572
8. Corina Schütt and Rolf Nöthiger (2000) Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects *Development* 127, 667-677
9. Erickson, J.W. and Quintero, J.J. (2007) Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X :A ratio, signals sex in *Drosophila*. *Plos Biology* 5 (11): e332. doi: 10.1371/journal.pbio. 0050332
10. Frizzi G., Springetti A. (1953) Prime ricerche citogenetiche sul "Dacus oleae Gmel" *Ric.Sci.* 23 : 1613-1620
11. Gerbi, S.A. (1986) Unusual chromosome movements in sciarid flies In: Henning, W. (Ed), *Germ Line-Soma Differentiation* Springer-Verlag, Berlin, pp.71-104.
12. Graves, J.A. (2006) Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 124, 901–914
13. Guliang Wang, Laura A. Christensen, and Karen M. Vasquez*, (2005) Z-DNA-forming sequences generate large-scale deletions in mammalian cells
14. Kidwell MG. (2005) *Transposable Elements and the Evolution of Dipteran Genomes* New York: Columbia University Press. 2005:145-172.
15. Krimbas B., (1963) A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Tryptetidae): the salivary gland and mitotic chromosomes. *Caryologia*, 16: 371–376.
16. Lagos Dimitrios, M. Fernanda Ruiz, Lucas Sanchez, Katia Komitopoulou (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster* *Gene*, 348: 111 –121.

17. Lahn, B.T. and Page, D.C. (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278, 675–680
18. Lauer et al (1980) Instability of palindromic DNA in *Escherichia coli*.
19. Lewin B. (2004) *Genes VIII*, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα
20. Marsano RM, Moschetti R, Barsanti P, Caggese C, Caizzi R (2003) A survey of DNA sequences surrounding the Bari 1 repeats in the pericentromeric h39 region of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 307:167–174
21. Marsano R.M, Marconi S., Moschetti R., 2003. MAX, a novel retrotransposon of the BEL-Pao family, is nested within the Bari 1 cluster at the heterochromatic h39 region of the chromosomes 2 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genomics* 270:477-484.
22. Mavragani-Tsipidou P. (2002) Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 116: 45– 57
23. Mazomenos B.E. (1989) *Dacus oleae*. In: *World crop pests*. Vol 3B. Edited by A.S. Robinson and G.Hooper. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam . pp: 169-177
24. McDonald JF (1993) Evolution and consequences of transposable elements. *Curr Opin Genet Dev* 3:855–864
25. Muik Barbara, Bernhard Lendl, Antonio Molina-Díaz, María José Ayora-Cañada (2003) Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry *Analytica Chimica Acta*, Volume 487, Issue 2, Pages 211-220
26. Muller –Hotkam ,F. (1995) The Sex-lethal gene in *Chrysomya rufifacies* is highly conserved in sequence and exon-intron organization. *J.Mol. Evol.* 41, 467-477.
27. Oliver, B. (2002). Genetic control of germline sexual dimorphism in *Drosophila*. *Int. Rev. Cytol.* 219: 1–60.
28. Rohr Cherise, Hillary Ranson, Xuelan Wang and Nora Besansky, 2002. Structure of mtanga, a retrotransposon actively expressed on the Y chromosome of the African Malaria vector *Anopheles gambiae*. *Mol. Biol. Evol.*, 19(2):149-162.
29. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
30. Sanchez Lukas (2008) Sex-determining mechanisms in insects, *Int.J.Dev.Biol.* 52:837-856
31. Skaletsky, H. et al. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825–837
32. Tzanakakis M.E. (1989) Small- scale rearing: *Dacus oleae*. In: *Fruit flies. Their biology, natural enemies and control*. (Eds. A.Robinson and G.Hooper) *World Crop Pests*, ELSEVIER, Amsterdam 3(B) : 105-118
33. White, M.D.J. (1973). *Animal cytology and evolution*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
34. Zambetaki A., P.Mavragani Tsipidou and Z.G. Scouras. (2000) Heat shock response of *Bactrocera oleae* (Diptera:Tephritidae) genes and proteins. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93:

35. Zampetaki A., Zacharopoulou A., Scouras Z.G., Mavragani- Tshipidou P. (1999) The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Localization of molecular markers by in situ hybridization to salivary gland polytene chromosomes. *Genome* 42, 740-751
36. Zouros E., Loukas M. (1989) Biochemical and colonization genetics of *Dacus oleae* In: *World crop pests* . Vol 3B. Edited by A.S. Robinson and G.Hooper. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. pp: 75-87
37. Ezaz T., Stiglec R., Veyrunes F., Marshall Graves, J.A. (2006) Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology* 16 : R736-R743
38. Κόλλιας Ανδρέας. (1992) Πανεπιστήμιο Κρήτης, Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης, εργασία στα πλαίσια του μαθήματος «εκπαιδευτικές χρήσεις του διαδικτύου»
39. Κυπριακή Δημοκρατία, Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος (2005)
40. Υπουργείο Εξωτερικών Ελλάδος (2009)