

Διπλωματική εργασία

**[Διερεύνηση των διαγονιδιακών διαστημάτων  
των ριβοσωμικών γονιδίων του δάκου της ελιάς]**

Μαρωνίτης Γεώργιος

Λάρισα 2012-2013

# **Study of the intergenic spacer of the olive fly ribosomal RNA locus**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου.

## **Τριμελής επιτροπή**

### **Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος**

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας το Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας φυτών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας το Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Σαραφίδου Θεολογία**

Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας το Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



# Πρόλογος

---

**Κάθε επιστήμη ξεκινάει σαν φιλοσοφία και τελειώνει σαν τέχνη**

**Will Durant  
(Αμερικανός ιστορικός  
και φιλόσοφος)**

Προσωπικά, θεωρώ ότι ένας σωστός επιστήμονας θα πρέπει να είναι ικανός να εφαρμόζει τις θεωρητικές γνώσεις που έχει αποκομίσει, στην πράξη του κάθε πειράματος. Γι' αυτό το λόγο θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο που συντέλεσε ώστε να μεταβώ από τις θεωρίες των αμφιθεάτρων στην εφαρμογή του πειράματος και από τη φοιτητική ιδιότητα σ' αυτή του επιστήμονα, με την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις γνώσεις που μας μετέδωσε καθώς και για την απλότητα και την ευγένεια που τον χαρακτηρίζει. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κυρίες Καλλιόπη Παπαδοπούλου και Θεολογία Σαραφίδου που αποτέλεσαν τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τη διδάσκουσα κ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη για την άψογη συνεργασία που είχαμε, για την καθημερινή δουλειά που βγάλαμε εις πέρας, για τις αναζητήσεις του σωστού δείγματος με το λάθος όνομα, για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε, αλλά κυρίως επειδή κατάφερε να με αντέξει για ένα χρόνο χάρη στην ανεξάντλητη υπομονή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Έφη Σαγρή, Μαριλένα Γρηγορίου και Γιώτα Κοσκινώτη και τους προπτυχιακούς φοιτητές Γιάννη Σαρρηγεωργίου, Άννα-Μαρία Μαυρίδου, Χριστίνα Μανακανάτα και Κωνσταντίνα Γεωργίου για τα υπέροχα πρωινά, μεσημέρια, απογεύματα (και κάποιες φορές βράδια) που περάσαμε εργαζόμενοι στο εργαστήριο.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω το φίλο και συμφοιτητή μου Αλέξανδρο Μπελαβίλα-Τροβά που βρεθήκαμε και στο ίδιο εργαστήριο. Μαζί στους αγώνες, μαζί στη διπλωματική, μαζί και στο πτυχίο.

Τελός, υπάρχουν ακόμα αρκετοί φίλοι μου που θα ήθελα να τους ευχαριστήσω τον καθένα ξεχωριστά, αλλά για οικονομία σελίδων και μελανιού δε θα το κάνω. Αντ' αυτού θα τους αφιερώσω την παρούσα διπλωματική άσκηση ευχαριστώντας τους για τα ωραιότερα 5 χρόνια που έχω ζήσει ως τώρα...

# Περιεχόμενα

---

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1 Εισαγωγή.....	9
1.1 Το ριβοσωμικό RNA.....	9
1.1.1 Τα είδη των RNAs .....	9
1.1.2 Η οργάνωση των γονιδίων των rRNA.....	10
1.1.3 Εξέλιξη των ριβοσωμικών RNAs και η χρησιμότητά τους σε φυλογενετικές μελέτες 11	
1.2 Το διαγονιδιακό διάστημα IGS.....	14
1.2.1 Δομή και λειτουργία του IGS .....	14
1.2.2 Εξέλιξη του IGS.....	15
1.3 Ο δάκος της ελιάς .....	16
1.3.1 Περιγραφή του δάκου.....	16
1.3.2 Ο κύκλος ζωής του δάκου και οι επιπτώσεις στην ελαιοπαραγωγή .....	17
1.3.3 Η εξάπλωση του δάκου της ελιάς.....	18
1.3.4 Η χρησιμότητα του IGS για τη διάκριση του δάκου.....	19
2 Σκοπός.....	20
3 Μέθοδοι.....	21
3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	21
3.1.1 PCR για την ενίσχυση γονιδιωματικού DNA .....	21
3.1.2 PCR μεγάλου μήκους (Long PCR) .....	23
3.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων.....	24
3.2.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	24
3.2.2 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης .....	25
3.2.3 Κατάτμηση του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	26
3.2.4 Κατακρήμνιση DNA με ισοπροπανόλη.....	27
3.2.5 Καθαρισμός DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο .....	28
3.3 Υβριδοποίηση κατά Southern (Southern blot) .....	28
3.3.1 Μεταφορά DNA σε νάιλον μεμβράνη .....	28
3.3.2 Σήμανση ανιχνευτή .....	29

3.3.3	Υβριδοποίηση του ανιχνευτή στη μεμβράνη.....	31
3.3.4	Εμφάνιση σήματος υβριδοποίησης.....	31
3.4	Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH® II (Stratagene).....	32
3.4.1	Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου lambda .....	33
3.4.2	Απομόνωση φαγικού DNA (Phage preps) .....	34
3.5	Κλωνοποίηση.....	35
3.5.1	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση .....	35
3.5.2	Δημιουργία φορέων με κατάλληλα άκρα .....	36
3.5.3	Αντίδραση σύνδεσης .....	37
3.5.4	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση .....	37
3.5.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini Preps) .....	38
4	Υλικά .....	39
4.1	PCR .....	39
4.1.1	PCR .....	39
4.1.2	Long PCR.....	40
4.2	Ηλεκτροφόρηση.....	40
4.3	Κατάτμηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....	41
4.4	Υβριδοποίηση κατά Southern .....	41
4.5	Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH® II.....	42
4.6	Κλωνοποίηση.....	42
5	Αποτελέσματα.....	43
5.1	Εντοπισμός και ενίσχυση περιοχών γειτονικών προς το IGS σε γονιδιωματικό DNA δάκου και σε φαγικούς κλώνους .....	43
5.2	Υβριδοποίηση κατά Southern για τον εντοπισμό του IGS.....	45
5.2.1	Δημιουργία και σήμανση ανιχνευτών.....	45
5.2.2	Κατάτμηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού και επώαση με τον ανιχνευτή 18S ..	45
6	Συζήτηση.....	48
7	Βιβλιογραφία .....	50

## Περίληψη

---

Ο δάκος της ελιάς, *B. oleae*, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παράσιτα που πλήττουν τις ελαιοκαλλιέργειες, καθώς το στάδιο της προνύμφης τρέφεται αποκλειστικά από τους καρπούς της ελιάς. Κατά συνέπεια, η εξάπλωση του δάκου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με εκείνη της ελιάς. Η προσαρμογή του εντόμου στα διαφορετικά περιβάλλοντα, έχει οδηγήσει αφενός στη δημιουργία υπο-πληθυσμών όπως έχει αποδειχθεί μετά από ανάλυση με χρήση μικροδορυφορικών δεικτών και αφετέρου σε πιθανά φαινόμενα ειδογένεσης κυρίως σε κάποιες περιοχές της Αφρικής (*B. munroi* στην Κένυα και *B. biguttula* στη νότια Αφρική). Οι μοριακοί δείκτες δυνητικά είναι εξαιρετικά χρήσιμοι για την αποτελεσματικότερη ταυτοποίηση ατόμων αυτών των συμπλεγμάτων ειδών (complex species). Ένας τέτοιος δείκτης θα μπορούσε να είναι η συστοιχία του rDNA που αποτελείται από αλληλουχίες εξαιρετικά συντηρημένες ανά τα είδη, όπως είναι οι κωδικές περιοχές των ριβοσωμικών γονιδίων, αλλά και από αλληλουχίες που παρουσιάζουν γρηγορότερους ρυθμούς εξέλιξης όπως είναι το διαγονιδιακό διάστημα IGS, του οποίου το μέγεθος και η δομή της αλληλουχίας διαφέρει ανάμεσα σε είδη, υποείδη, ακόμα και σε άτομα του ίδιου είδους. Στην παρούσα μελέτη, φαγικοί κλώνοι από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη του *B. oleae* εξετάστηκαν μέσω PCR για να διαπιστωθεί αν εντοπίζονται στο ένθεμά τους περιοχές του IGS ανοδικά του 5' άκρου του 18S rRNA και καθοδικά του 3' άκρου του 28S rRNA. Εντοπίστηκαν τέσσερα τμήματα από φαγικό DNA ύστερα από υβριδοποίηση κατά Southern και ένα τμήμα μεγέθους 3.4kb που δυνητικά αντιστοιχεί στο IGS, το οποίο αφενός παρέχει μια πρώτη εκτίμηση του συνολικού μεγέθους της αλληλουχίας του στο δάκο και αφετέρου βοηθά στην ανάπτυξη πιο στοχευμένων προσεγγίσεων για την ανάλυση της αλληλουχίας και της δομής του.



## Abstract

---

The fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the most important pest of the olive tree. It causes significant economic losses annually because its larvae feed exclusively on the olive fruit. Therefore, its worldwide distribution follows closely that of the olive tree, which is mainly restricted in the Mediterranean basin, parts of Africa and the Near East and, more recently, California. The fly's adaptation to local environments has led to population structuring (as evidenced by microsatellite analysis), as well as possible speciation events in the African continent (*B. munroi* in Kenya and *B. biguttula* in South Africa). A suitable molecular marker for the distinction of sibling species (such as *B. oleae*, *B. munroi* and *B. biguttula*) would be the rDNA array, as it contains sequences greatly conserved among species such as the ribosomal RNA genes, as well as sequences with great variability among species, subspecies or even individuals of the same species such as the intergenic spacer. In the present study, we searched for IGS sequences upstream of the 5'-end of the 18S and downstream of the 3'-end of the 28S rRNA genes in isolated phage clones of *B. oleae*. Our efforts yielded four DNA fragments derived from Southern blotting on phage clones and another 3.4kb PCR DNA fragment that may correspond to the entire IGS region. This finding provides a first insight into the IGS region's size in *B. oleae*, allowing us to design a more direct approach in order to unravel its sequence and analyze its structure.

# 1 Εισαγωγή

---

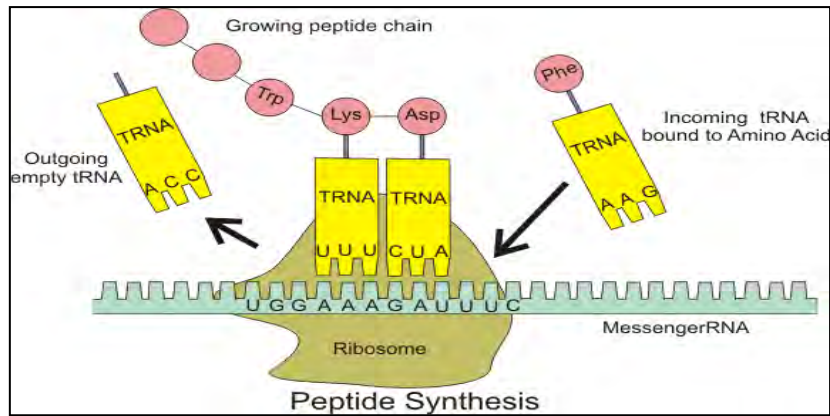
## 1.1 Το ριβοσωμικό RNA

### 1.1.1 Τα είδη των RNAs

Ο Francis Crick το 1958 διατυπώνοντας το Κεντρικό Δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, συσχέτισε τη ροή της γενετικής πληροφορίας στους ζωντανούς οργανισμούς με τις διαδοχικές διαδικασίες της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης. Απλούστερα, όπως είπε και ο Αμερικανός βιοχημικός και γενετιστής Marshall Nirenberg: “Το DNA φτιάχνει το RNA και το RNA φτιάχνει τις πρωτεΐνες”. Το DNA αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες σε μια σταθερή μορφή που μπορεί να αντιγραφεί. Ωστόσο, η έκφραση των πληροφοριών αυτών προϋποθέτει τη ροή από το DNA στο RNA στις πρωτεΐνες. Μέσω της μεταγραφής οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του DNA μεταγράφονται σε αλληλουχίες RNA (Berg, Tymoczko, Stryer). Κατά τη μεταγραφή παράγονται:

- το αγγελιοφόρο RNA ή mRNA (**messenger RNA**) που μεταφέρει την πληροφορία από το DNA στα ριβοσώματα
- το μεταφορικό RNA ή tRNA (**transfer RNA**) το οποίο μεταφέρει αμινοξέα σε μια αυξανόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα
- τα μικρά πυρηνικά RNAs (**small nuclear RNA**) που συνδέονται με ειδικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια, τα λεγόμενα σναρπς (snurps), και συμμετέχουν στο μάτισμα πρόδρομων μορίων mRNA
- το αυτοκαταλυτικό RNA ή ριβόζυμο που διαθέτει καταλυτικές ιδιότητες (Kruger et al. 1982)
- τα ριβοσωμικά RNAs ή rRNAs (**ribosomal RNA**) που αποτελούν δομικούς λίθους του ριβοσώματος και είναι απαραίτητα για την πρωτεϊνοσύνθεση

Η δομή του ριβοσώματος είναι εξαιρετικά συντηρημένη και στους ευκαρυώτες αποτελείται από δύο υπομονάδες οι οποίες ενώνονται για να σχηματίσουν ένα σωματίδιο 80S. Η μικρή υπομονάδα 40S σχηματίζεται από το 18S RNA και 33 πρωτεΐνες (Rabl et al. 2010) και η μεγάλη υπομονάδα 60S σχηματίζεται από το 5S RNA, το 28S RNA, το 5,8S RNA και 46 πρωτεΐνες (Klinge et al. 2011). Τα μόρια του rRNA διακρίνονται από την ταχύτητα καθίζησης τους κατά τη φυγοκέντρωση σύμφωνα με τον συντελεστή καθίζησης του Svedberg.



Εικόνα 1.1 Η δομή και οι λειτουργίες του ριβοσώματος. Ένα εισερχόμενο αμινοάκυλο-tRNA προσδένεται στη θέση A, ενώ η θέση P είναι κατειλημμένη από την αυξανόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Σχηματίζεται ένας πεπτιδικός δεσμός ανάμεσα στα αμινοξέα που βρίσκονται στις θέσεις A και P και το πεπτιδυλο-tRNA που προκύπτει στη θέση A, λόγω της μετατόπισης του ριβοσώματος μεταφέρεται στη θέση P

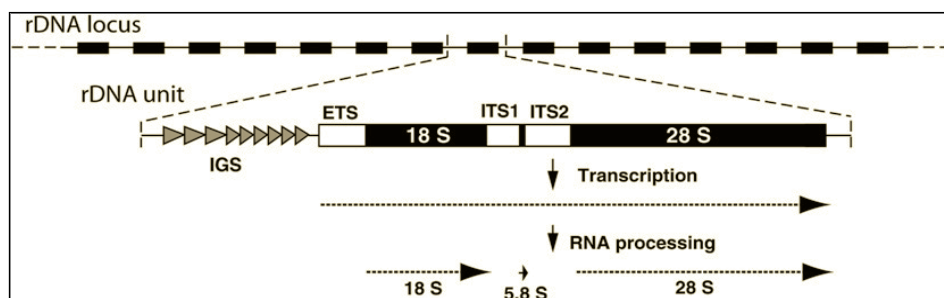
### 1.1.2 Η οργάνωση των γονιδίων των rRNA

Τα rRNAs καταλαμβάνουν το 50% της μεταγραφής που συμβαίνει στο κύτταρο και το 80% του συνολικού RNA του κυττάρου. Τα γονίδια που τα κωδικοποιούν αποτελούν γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes). Τα ριβοσωμικά γονίδια βρίσκονται στους πυρηνίσκους είτε ενός είτε περισσότερων χρωμοσωμάτων, στις περιοχές οργανωτή του πυρηνίσκου (**Nucleolus Organizer Regions, NORs**) και η μεταγραφή τους καταλύεται από την RNA πολυμεράση I. Τα ριβοσωμικά γονίδια κωδικοποιούν για το 18S rRNA που απαιτείται για το σχηματισμό της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος και για τα 5,8S rRNA και 28S rRNA που σχηματίζουν τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα σε συνδυασμό με το 5S rRNA. Η μεταγραφή τους γίνεται σε ένα πρώιμο πολυκιστρονικό μετάγραφο, από το οποίο ύστερα από επεξεργασία προκύπτουν τα ώριμα μόρια του rRNA. Τα γονίδια των ριβοσωμικών RNAs μπορούν να υπάρχουν σε δεκάδες μέχρι και σε εκατοντάδες αντίγραφα ανάλογα με τον οργανισμό και βρίσκονται διατεταγμένα εν σειρά σε συστοιχίες των οποίων ο αριθμός ποικίλλει ανάλογα με το είδος. Οι συστοιχίες αυτές αναφέρονται και ως rDNA (**ribosomal DNA**) (Εικόνα 1.2). Αντίθετα, το γονίδιο του 5S rRNA βρίσκεται στο πυρηνόπλασμα και η μεταγραφή του ενεργοποιείται από την RNA πολυμεράση III (Lewin, Tytoczko, Berg, Stryer). Το 5S rRNA συνδέεται με την πρωτεΐνη L5 του ριβοσώματος και θεωρείται ότι διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις 2 υπομονάδες του ριβοσώματος και συντονίζοντας τα γεγονότα που καταλύονται από το ριβόσωμα.

Από μελέτες στον αριθμό των αντιγράφων των ριβοσωμικών γονιδίων διάφορων ειδών φαίνεται ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στο μέγεθος του γονιδιώματος και στον αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων (Prokhorowich et al. 2002). Επιπλέον, στελέχη της *Drosophila melanogaster* στα οποία είχαν απαλειφθεί αντίγραφα των ριβοσωμικών γονιδίων παρουσίαζαν ανώμαλη ανάπτυξη των κοιλιακών χαρακτηριστικών τους (Ritossa et al. 1966, Templeton et al 1985). Κάθε συστοιχία περιλαμβάνει τα γονίδια του 18S, του 5,8S και του 28S ριβοσωμικού RNA και είναι οργανωμένη έτσι ώστε τα γονίδια σε κάθε συστοιχία να διαχωρίζονται μεταξύ τους από

τα διαστήματα που δεν μεταφράζονται αλλά καθοδηγούν την επεξεργασία του πρώιμου mRNA. Τα διαστήματα αυτά είναι το εξωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα ETS (External Transcribed Spacer) ανοδικά του γονιδίου του 18S και τα εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα ITS1 και ITS2 (Internal Transcribed Spacer) ανάμεσα από το 18S και το 5,8S και από το 5,8S και το 28S αντίστοιχα. Κάθε συστοιχία χωρίζεται από την επόμενη από ένα μη μεταγραφόμενο διάστημα NTS (Non Transcribed Spacer) ή αλλιώς διαγονιδιακό διάστημα IGS (Intergenic Spacer). Η δομή της συστοιχίας του rDNA παρουσιάζεται στην εικόνα 1.2 όπου απεικονίζονται οι κωδικές περιοχές των γονιδίων καθώς και τα ενδιάμεσα διαστήματα.

Ο ρυθμός μεταγραφής των ριβοσωμικών γονιδίων αυξάνεται ή μειώνεται ανάλογα με το αν το κύτταρο βρίσκεται στο στάδιο της αύξησης ή της διαφοροποίησής του αντίστοιχα (Warner 1989), ενώ κατά τη μίτωση η μεταγραφή τους σταματάει και ο πυρηνίσκος εξαφανίζεται (Prescott 1976). Σε κυτταροκαλλιέργειες έχει παρατηρηθεί μείωση στους ρυθμούς της μεταγραφής των ριβοσωμικών γονιδίων ύστερα από απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών από το θρεπτικό μέσο, ύστερα από την χορήγηση γλυκοκορτικοειδών και γενικότερα παραγόντων που ευνοούν τη διαφοροποίηση του κυττάρου (Zahradka et al. 1991, Cavanaugh et al. 1984, Yamamoto & Pellegrini 1990, Larson 1993), ενώ η ινσουλίνη, οι φορβολικοί εστέρες και οι παράγοντες που ευνοούν την αύξηση του κυττάρου αυξάνουν τα επίπεδα μεταγραφής τους (Haneda & Mc Dermott 1990, Vallett et al. 1993, Chao & Pellegrini 1993).



*Εικόνα 1.2 Η διάταξη της συστοιχίας του rDNA. Ανοδικά του γονιδίου του 18S rRNA βρίσκεται το εξωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα ETS, ακολουθούν τα ενδιάμεσα μεταγραφόμενα διαστήματα ITS1, ITS2 εκατέρωθεν του γονιδίου του 5,8S rRNA και στη συνέχεια το γονίδιο του 28S rRNA. Κάθε συστοιχία χωρίζεται από την προηγούμενη της με το μη μεταγραφόμενο διάστημα NTS ή αλλιώς διαγονιδιακό διάστημα IGS*

### 1.1.3 Εξέλιξη των ριβοσωμικών RNAs και η χρησιμότητά τους σε φυλογενετικές μελέτες

Σε όλα τα είδη υπάρχουν γονίδια τα οποία, επειδή ελέγχουν βασικές βιοχημικές διαδικασίες απαραίτητες για την επιβίωση τους, εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για τη διενέργεια φυλογενετικών αναλύσεων. Ως φυλογένεση ορίζεται η κατανόηση των εξελικτικών σχέσεων που αναπτύσσονται ανάμεσα στα είδη με την πάροδο του χρόνου.

Παλιότερα, για τον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στους οργανισμούς

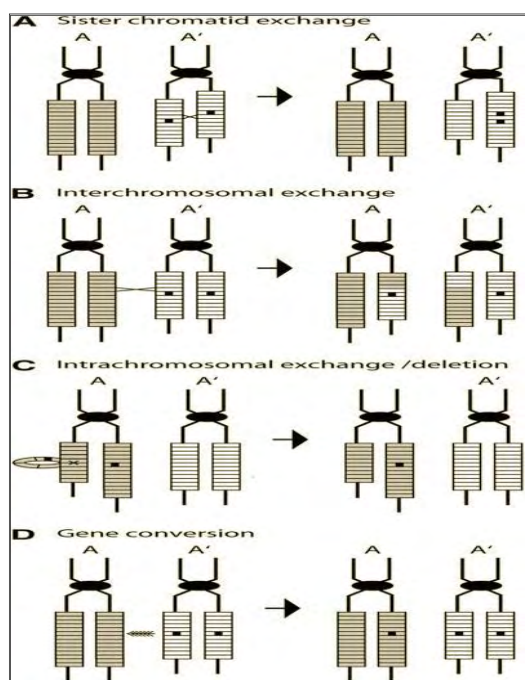
πραγματοποιούνταν συγκρίσεις φαινοτυπικών χαρακτήρων που σχετίζονταν με τη μορφολογία και τη φυσιολογία των οργανισμών, δεδομένου ότι ο φαινότυπος ενός οργανισμού είναι άμεση συνάρτηση του γενοτύπου του. Όμως, τέτοιες φαινοτυπικές μέθοδοι δεν είναι απολύτως αξιόπιστες γιατί οι μορφολογικοί χαρακτήρες αφενός δεν διακρίνονται πάντα με την ίδια ευκολία στους υπό σύγκριση οργανισμούς και αφετέρου τα πρότυπα κληρονόμησής τους δεν είναι πάντα ξεκάθαρα. Με την ανακάλυψη όμως των σύγχρονων μοριακών τεχνικών όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός αλληλουχιών στο DNA που σε αντίθεση με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αντανακλούν την εξελικτική ιστορία και την κληρονομικότητα ενός οργανισμού και αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για τις φυλογενετικές αναλύσεις. Τέτοιες αλληλουχίες ονομάζονται και μοριακοί δείκτες. Ένας μοριακός δείκτης για να χρησιμοποιηθεί στη φυλογενετική ανάλυση θα πρέπει να μπορεί να διακριθεί εύκολα, να έχει ξεκάθαρο τρόπο κληρονόμησης και να έχει γρήγορο ή αργό βαθμό εξέλιξης ανάλογα με τα είδη που μελετώνται.

Η συστοιχία των ριβοσωμικών RNAs αποτελεί ένα από τους καλύτερους μοριακούς δείκτες και χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη διενέργεια φυλογενετικών μελετών και για την εύρεση εξελικτικών σχέσεων ακόμα και ανάμεσα σε μακρινούς εξελικτικά οργανισμούς. Τα ριβοσωμικά RNAs υπάρχουν σε όλους τους τύπους κυττάρων επιτελώντας τις ίδιες λειτουργίες στον κάθε τύπο κυττάρου. Επιπλέον, περιέχουν αλληλουχίες που εξελίσσονται αργά όπως είναι οι κωδικές περιοχές των ριβοσωμικών γονιδίων όσο και αλληλουχίες που εξελίσσονται ταχύτατα όπως είναι οι περιοχές των ενδιάμεσων διαστημάτων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα σε μακρινά είδη αλλά και για τη διάκριση συγγενικών μεταξύ τους ειδών αντίστοιχα. Οι πιο έντονα συντηρημένες αλληλουχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ζευγών οικουμενικών εκκινήτων (universal primers) για την ενίσχυση των ίδιων αλληλουχιών σε συγγενικούς οργανισμούς ή και σε πιο μακρινούς εξελικτικά οργανισμούς (Hillis et al 1991).

Το γονίδιο του 18S rRNA (ή 16S rRNA στους προκαρυώτες) που απαιτείται για το σχηματισμό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας αποτελεί μια από τις πιο αργά εξελισσόμενες αλληλουχίες και έχει χρησιμοποιηθεί για φυλογενετικές μελέτες μεταξύ απομακρυσμένων εξελικτικά ειδών λόγω του υψηλού βαθμού συντήρησης που χαρακτηρίζει την κωδική περιοχή του. Ο γονιδιακός τόπος του 28S rRNA αν και είναι μεγαλύτερος σε μέγεθος, επειδή εξελίσσεται με πολύ γρηγορότερους ρυθμούς παρέχει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σχετικά με εξελικτικές σχέσεις ειδών συγγενικών μεταξύ τους. Τα γονίδια του 5S και του 5,8S έχουν χρησιμοποιηθεί σε φυλογενετικές μελέτες αλλά λόγω του μικρού μεγέθους τους δε δύνανται να παρέχουν απολύτως αξιόπιστα δεδομένα (Olsen 1993). Τέλος, τα ενδιάμεσα διαστήματα ITS1 & ITS2 και το διαγονιδιακό διάστημα IGS επειδή εξελίσσονται ταχύτερα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πληθυσμιακές μελέτες, ακόμα και για να διακριθούν μεταξύ τους κοντινά συγγενικοί οργανισμοί, υποείδη ή είδη που δεν είναι δυνατόν να διακριθούν βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η συστοιχία του rDNA βρίσκεται σε πολλαπλά επαναλαμβανόμενα εν σειρά αντίγραφα (Long & Dawid 1980), τα οποία μπορεί να είναι συγκεντρωμένα σε ένα χρωμόσωμα ή διασκορπισμένα σε περισσότερα χρωμοσώματα. Ο ακριβής αριθμός των αντιγράφων διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό, ακόμα και ανάμεσα σε άτομα

του ίδιου είδους και πληθυσμού. Αυτή η διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων ενδεχομένως οφείλεται σε φαινόμενα άνισου διασκελισμού μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων ή ομόλογων τμημάτων σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Εικόνα 1.3). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου χρωμοσώματος με αυξημένο αριθμό rDNA αντιγράφων και ένα ανασυνδυασμένο χρωμοσώμα με μειωμένο αριθμό αντιγράφων (Eickbush & Eickbush 2007). Τα χρωμοσώματα που θα φέρουν το έλλειμμα ως προς τον αριθμό των αντιγράφων χάρη στη φυσική επιλογή επιλέγονται αρνητικά.



*Εικόνα 1.3  
Οι πιθανότεροι μηχανισμοί ανασυνδυασμού που μπορούν να συμβούν στη συστοιχία του rDNA: άνισος διασκελισμός μεταξύ αδερφών χρωματίδων (A), άνισος διασκελισμός μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων (B), γονιδιακή μετατροπή (D)*

Τα γονίδια του rRNA παρόλο που βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα, παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιογένεια ως προς την αλληλουχία τους σε ένα οργανισμό, ενώ διαφέρουν από τα ομόλογα τους σε διαφορετικούς οργανισμούς. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται συχνά στα μέλη μιας γονιδιακής οικογένειας και ονομάζεται εναρμονισμένη ή οριζόντια εξέλιξη (Hurst & Smith 1998). Σύμφωνα με τη θεωρία της εναρμονισμένης εξέλιξης, μια νουκλεοτιδική αλλαγή σε ένα γονίδιο μιας γονιδιακής οικογένειας είτε απαλείφεται από όσα γονίδια έχει εμφανιστεί είτε μεταδίδεται και στα υπόλοιπα γονίδια με ένα συγχρονισμένο τρόπο. Έτσι, τα γονίδια της οικογένειας εξελίσσονται με τον ίδιο ρυθμό και όχι ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Τα μέλη της οικογένειας έχουν προέλθει από ένα κοινό προγονικό γονίδιο και η ομογενοποίηση αυτή, πραγματοποιείται μέσω άνισου διασκελισμού ή με τη γονιδιακή μετατροπή (Dover 1994; Elder & Turner 1995; Liao 1999), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.3. Ο άνισος διασκελισμός όπως αναφέρθηκε παραπάνω προκαλεί διπλασιασμούς και κατά συνέπεια χρωμοσώματα με διαφορετικούς αριθμούς και συνδυασμούς γονιδίων. Η γονιδιακή μετατροπή δεν προκαλεί αλλαγές στον αριθμό των γονιδίων αλλά στην ταυτότητά τους. Κατά τη γονιδιακή μετατροπή δύο αλληλόμορφα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με μη αμοιβαίο ανασυνδυασμό έτσι ώστε το ένα να γίνει πιο ομοιογενές και το άλλο να μην αλλάξει καθόλου.



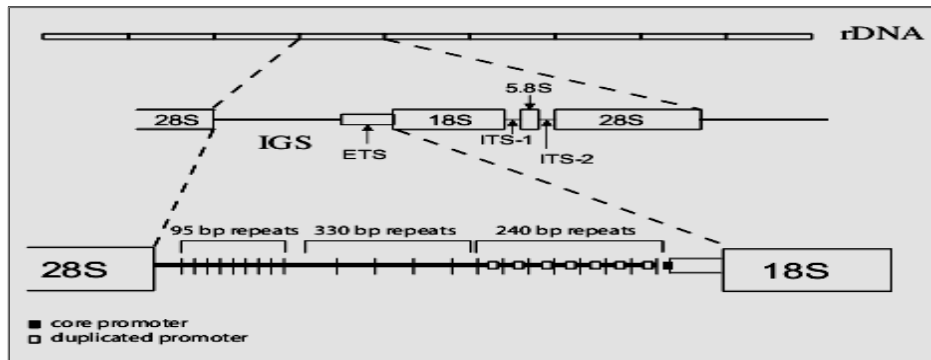
## 1.2 Το διαγονιδιακό διάστημα IGS

### 1.2.1 Δομή και λειτουργία του IGS

Κάθε συστοιχία του rDNA χωρίζεται από την πανομοιότυπη επόμενη της από το διαγονιδιακό διάστημα IGS (Intergenic Spacer). Το διαγονιδιακό διάστημα IGS παρεμβάλλεται ανάμεσα στο 3' άκρο του 28S rRNA και ανοδικά του εξωτερικά μεταγραφόμενου διαστήματος ETS. Το μήκος του ποικίλλει από 2kb στο *Saccharomyces cerevisiae* μέχρι 43kb στον ποντικό. Στη *Drosophila melanogaster*, που αποτελεί και το έντομο στο οποίο το rDNA έχει μελετηθεί εκτενέστερα, η συστοιχία του rDNA βρίσκεται στα φυλετικά χρωμοσώματα X-Y και το IGS έχει μέγεθος 3.6kb (Tautz et al. 1988). Στο δάκο της ελιάς *Bactrocera oleae*, που είναι και ο υπό μελέτη οργανισμός στην παρούσα διπλωματική εργασία, η συστοιχία του rDNA εδράζεται στα φυλετικά χρωμοσώματα επίσης (Drosorouliou et al. 2012), αλλά το μέγεθος του δεν έχει ακόμα καθοριστεί.

Μολονότι παλιότερα υπήρχε η αντίληψη ότι το IGS ως μη μεταγραφόμενο διάστημα, δεν επιτελεί σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή των γονιδίων της συστοιχίας του rDNA, σήμερα έχει βρεθεί ότι η παρουσία του IGS βοηθά ώστε να επιτευχθούν τα υψηλά επίπεδα μεταγραφής των ριβοσωμικών γονιδίων που απαιτούνται για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου. Σε πληθυσμούς της *Drosophila melanogaster* που παρουσίαζαν ταχύτατους ρυθμούς ανάπτυξης έχει βρεθεί ότι εκτός από τον αυξημένο αριθμό αντιγράφων των ριβοσωμικών γονιδίων, υπάρχει και αυξημένο μήκος του IGS γεγονός που συνδέεται με την αυξημένη ενεργότητα ενζύμων. Αντίθετα, πληθυσμοί με μικρότερο μήκος του IGS παρουσίαζαν επιβραδυσμένους ρυθμούς ανάπτυξης (Cluster et al. 1987). Επιπλέον, σε πληθυσμούς *Daphnia pullex* έχει βρεθεί συσχέτιση του μήκους του IGS τόσο με τους ρυθμούς ανάπτυξης του οργανισμού όσο και στα επίπεδα άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου (C: N: P) στους οργανισμούς αυτούς (Gorokhova et al. 2002, Kyle 2004).

Οι διαφορές στο μήκος του IGS οφείλονται στην παρουσία ομάδων εσωτερικών επαναλήψεων των οποίων ο αριθμός διαφέρει από είδος σε είδος και από άτομο σε άτομο (Mateos & Markow 2005). Στη *Drosophila melanogaster* το IGS αποτελείται από ομάδες εσωτερικών επαναλήψεων μήκους 95 βάσεων, 330 βάσεων και 240 βάσεων των οποίων ο αριθμός διαφέρει ανάλογα με το είδος και ανάμεσα τους παρεμβάλλονται μη μεταγραφόμενα τμήματα (Εικόνα 1.4). Από αυτές τις επαναλήψεις, οι επαναλήψεις των 240 βάσεων βρίσκονται ανοδικά του υποκινητή των ριβοσωμικών γονιδίων και περιέχουν αντίγραφα του που αυξάνουν τον ρυθμό της μεταγραφής της συστοιχίας ανάλογα με τον αριθμό τους (Grimaldi & DiNocera 1990), ενώ και οι υπόλοιπες ομάδες επαναλήψεων επιτελούν κάποιο ρόλο στη μεταγραφή του πρόδρομου mRNA των ριβοσωμικών γονιδίων πιθανότατα δρώντας ως στοιχεία με ενεργότητα ενισχυτή (Grimaldi & DiNocera 1988). Παρόμοιος τρόπος οργάνωσης, με την ύπαρξη ομάδων εσωτερικών επαναλήψεων, έχει παρατηρηθεί και στη μέλισσα *Apis mellifera* (Gillespie et al. 2006), στο κουνούπι *Anopheles aquasalis* (Perera et al. 1998) και στο παρασιτικό έντομο των φασολιών *Acyrtosiphon pisum* (Kwon & Ishikawa 1992).



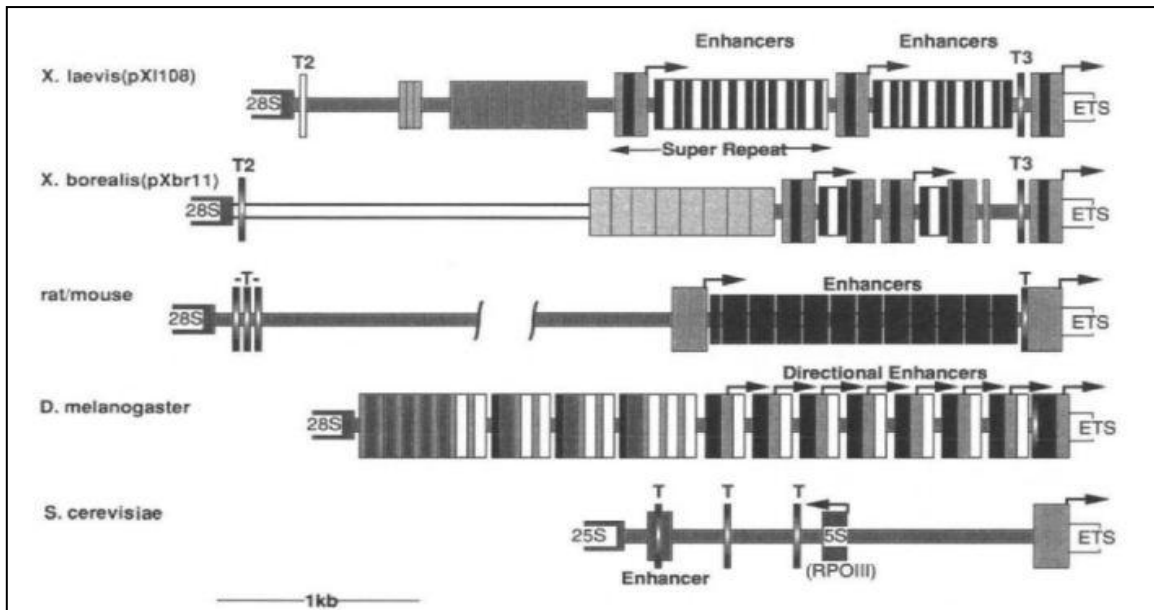
Εικόνα 1.4 Η συστοιχία του rDNA στη *Drosophila melanogaster* και η οργάνωση του διαγονιδιακού διαστήματος IGS με τις εσωτερικές ομάδες επαναλήψεων

## 1.2.2 Εξέλιξη του IGS

Παρόλο που το IGS βρίσκεται ανάμεσα στις κωδικές περιοχές των ριβοσωμικών γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν εξαιρετικά συντηρημένη δομή ακόμα και σε απομακρυσμένα μεταξύ τους είδη, το IGS παρουσιάζει ποικιλομορφία ως προς το μήκος του στα διάφορα είδη και υποείδη (Εικόνα 1.4).

Η αλληλουχία και το μέγεθος του IGS διαφέρει ανάμεσα στα είδη και ομολογίες ως προς τη δομή μπορούν να διαπιστωθούν μόνο ανάμεσα σε συγγενικά είδη. Αυτή η πολυμορφικότητα οφείλεται αφενός στο ότι το δεν υφίσταται τον ίδιο βαθμό εξελικτικής πίεσης, όσο οι κωδικές περιοχές των γονιδίων και εξελίσσεται γρηγορότερα και αφετέρου λόγω του διαφορετικού αριθμού των επαναλήψεων που υπάρχουν στο εσωτερικό του (Eickbush & Eickbush 2007). Οι εσωτερικές επαναλήψεις διαφέρουν σε αριθμό και έχουν δημιουργηθεί ως αποτέλεσμα άνισου διασκελισμού ( Εικόνα 1.3) που έχει ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό των ομάδων επαναλήψεων και τη δημιουργία IGS με διαφορετικό μήκος (Coen et al. 1982). Στη *Drosophila melanogaster* όπου τα ριβοσωμικά γονίδια και κατά συνέπεια και το IGS βρίσκονται στα φυλετικά χρωμοσώματα X-Y, η αλληλουχία του IGS παρουσιάζει ενδείξεις ομογενοποίησης που ενδεχομένως να οφείλονται σε άνισο διασκελισμό μεταξύ των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Gillings et al. 1987; Polanco et al. 2000). Επιπλέον, λόγω του πολυμορφισμού που παρατηρείται το IGS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να διακριθούν υποείδη μεταξύ τους και να προσδιοριστεί η γεωγραφική τους προέλευση (Williams et al. 1985) καθώς και να ταυτοποιηθούν είδη που δεν είναι δυνατό να αναγνωριστούν από τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Hill et al. 2008).





**Εικόνα 1.4** Το διαγονιδιακό διάστημα IGS στους ακόλουθους εξελικτικά απομακρυσμένους οργανισμούς: *Xenopus laevis*, *Xenopus borealis*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* και *Saccharomyces cerevisiae*. Με βέλη απεικονίζονται οι περιοχές που διαθέτουν ενεργότητα υποκινητή και αυξάνουν τους ρυθμούς της μεταγραφής

## 1.3 Ο δάκος της ελιάς

### 1.3.1 Περιγραφή του δάκου

Ο δάκος της ελιάς ή *Bactrocera oleae* όπως είναι γνωστός με την επιστημονική του ονομασία, είναι ένα έντομο δίπτερο που ανήκει στην οικογένεια *Tephritidae*, κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι οι σκοτεινότεφρες ζώνες που έχουν τα μέλη της στα φτερά τους. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και άλλα δίπτερα που προσβάλλουν καρπούς δέντρων και κηπευτικών, όπως άλλα είδη του γένους *Bactrocera* (*Bactrocera cucurbitae*, *Bactrocera dorsalis*), το *Ragoletis cerasi* και η *Ceratitis capitata*.

Το ενήλικο έντομο έχει μήκος 5mm και χρώμα που μπορεί να ποικίλλει, από ανοιχτό καστανό έως και πιο σκοτεινό καφέ. Ο θώρακας στο επάνω μέρος του είναι σκοτεινότερος με τρεις μαύρες γραμμές κατά μήκος, ενώ στα πλάγια διακρίνονται μερικές υπόλευκες ή υποκίτρινες κηλίδες. Τα φτερά είναι διάφανα και ιριδίζοντα με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη. Στην άκρη της ωοειδούς κοιλίας στα θηλυκά άτομα υπάρχει ένας οξύληκτος ωοθέτης που διευκολύνει την εναπόθεση των αυγών στο μεσοκάρπιο του ελαιοκάρπου. Το αυγό είναι στενόμακρο, κάπως οξύ στον ένα πόλο και λευκό. Το πρόσθιο μέρος του σώματος της προνύμφης είναι στενότερο από το οπίσθιο, χωρίς κεφαλική κάψα, αλλά μόνο με σκοτεινόχρωμα στοματικά άγκιστρα και τον κεφαλορυγγικό σκελετό. Η νύμφη είναι το ενδιάμεσο στάδιο στην ανάπτυξη του δάκου και ακολουθείται από το ενήλικο άτομο.

Για τη διάκριση των ειδών του δάκου που ανήκουν σε διαφορετικούς γεωγραφικά πληθυσμούς έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς μελέτες και συγκρίσεις των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Όμως, μ' αυτόν τον τρόπο δεν μπορούν να εξαχθούν πάντοτε ασφαλή

συμπεράσματα καθώς έχουν παρατηρηθεί είδη τα οποία παρόλο που είναι όμοια ως προς το φαινότυπο τους, διαφέρουν ως προς το γενότυπο τους (cryptic species) (Drew et al. 2008). Έτσι, για να γίνει δυνατή η διάκριση μεταξύ τέτοιων ειδών έχουν ακολουθηθεί γενετικές προσεγγίσεις που αποσκοπούν στον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών του εντόμου (Han & Ro 2009, Smith et al. 2003) καθώς και στην εύρεση μοριακών δεικτών χαρακτηριστικών για τον εκάστοτε πληθυσμό σε μία γεωγραφική περιοχή. Οι συχνότεροι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι είτε μιτοχονδριακό DNA είτε μικροδορυφορικές αλληλουχίες που είναι περιοχές με μεγάλο βαθμό παραλλακτικότητας ανά τους οργανισμούς.



*Εικόνα 1.5* Ενήλικο θηλυκό άτομο εναποθέτει αυγό στο εσωτερικό του ελαιοκάρπου

### **1.3.2 Ο κύκλος ζωής του δάκου και οι επιπτώσεις στην ελαιοπαραγωγή**

Κατ' αρχάς, είναι σκόπιμο να τονιστεί ότι ο κύκλος ζωής του δάκου διαφέρει από περιοχή σε περιοχή γιατί στη βιολογία του παίζουν σημαντικό ρόλο οι τοπικές κλιματολογικές συνθήκες και η θερμοκρασία (Yokoyama & Miller 2007).

Η μέση θερμοκρασία που απαιτείται για την ομαλή ανάπτυξη του δάκου θα πρέπει να κυμαίνεται ανάμεσα στους 24°C και τους 28°C. Όταν οι θερμοκρασίες υπερβούν τους 35°C, αυξάνεται η θνησιμότητα των πληθυσμών και μειώνεται η γονιμότητα των ατόμων καθώς τα θηλυκά δεν εναποθέτουν τα αυγά τους

Ο κύκλος ζωής του δάκου στη Μεσόγειο περιλαμβάνει 4-5 γενιές. Ο δάκος διαχειμάζει στο έδαφος όντας στο στάδιο της νύμφης και όταν αυξηθούν οι θερμοκρασίες προς τους τελευταίους μήνες της άνοιξης, η νύμφη εκδύεται και μεταμορφώνεται σε ενήλικο άτομο. Τα ενήλικα άτομα τρέφονται από τα μελιτώδη εκκρίματα των δένδρων και μπορούν να διατηρηθούν στη ζωή μέχρι και για 2 μήνες. Τους καλοκαιρινούς μήνες, η επιδερμίδα του ελαιοκάρπου μαλακώνει και οι ελιές γίνονται κατάλληλες για ωτοκία. Από τις αρχές μέχρι και τα μέσα του Ιουλίου παρατηρείται η δεύτερη γενιά του εντόμου, όποτε τα ώριμα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους στους καρπούς. Το θηλυκό, αφού ανοίξει με τον ωοθέτη του την οπή ωτοκίας, εισάγει στο μεσοκάρπιο ένα αυγό κατά κανόνα. Η εκκολαπτόμενη προνύμφη δημιουργεί στοά στον καρπό. Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες τρέφονται από την σάρκα του μεσοκάρπιου ανοίγοντας ακανόνιστες, επιμήκεις στοές σε βάθος. Όταν η προνύμφη ολοκληρώσει την ανάπτυξή της, μετακινείται προς την επιφάνεια του καρπού, και προετοιμάζει την έξοδό της, ανοίγοντας τη χαρακτηριστική οπή της εξόδου. Στη συνέχεια, μετατρέπεται σε νύμφη και ύστερα από λίγες μέρες διαρρηγνύει την οπή της εξόδου και ελευθερώνεται στο περιβάλλον ως ενήλικο άτομο. Τέλος, η τρίτη και η τέταρτη γενιά εμφανίζονται τον Αύγουστο και τον Σεπτέμβριο, και αν το καλοκαίρι είναι όψιμο μπορεί να υπάρξει και πέμπτη

γενιά.

Εκτός από τη ζημιά που προκαλείται από την ανάπτυξη της προνύμφης στο μεσοκάρπιο, προκαλείται και δευτερογενής προσβολή από την εγκατάσταση του μύκητα *Camarosporium dalmaticum* στη θέση της οπής ωτοκίας και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μαύρων νεκρωτικών κηλίδων στον καρπό (Iannotta et al. 2007). Εξαιτίας όλων των παραπάνω λόγων, ο δάκος προκαλεί τόσο ποσοτικές ζημιές, αφού μειώνεται η συνολική παραγωγή από την καταστροφή στο σαρκώδες μέρος του καρπού, όσο και ποιοτικές καθώς αυξάνεται η οξύτητα του ελαιόλαδου(5-15%) και καθίσταται ακατάλληλο για κατανάλωση(Tamendjari et al. 2009).

### 1.3.3 Η εξάπλωση του δάκου της ελιάς

Ο δάκος είναι μονοφάγο έντομο, δηλαδή προσβάλλει εξ ολοκλήρου τους καρπούς της ήμερης και της άγριας ελιάς. Γι' αυτό το λόγο πληθυσμοί του εντόμου διαβιούν αποκλειστικά σε περιβάλλοντα όπου φυτρώνουν καρποί της ήμερης και της άγριας ελιάς. Πληθυσμοί του εντόμου έχουν παρατηρηθεί στη λεκάνη της Μεσογείου, στη βόρεια, ανατολική και νότια Αφρική, στη Μέση Ανατολή, στην Ινδία, στην Καλιφόρνια και γενικότερα όπου υπάρχουν δέντρα ελιάς (Augoustinos et al. 2002, Copeland et al. 2004, Nardi et al. 2003, Rice et al. 2003, Zygouridis et al. 2009).

Χρησιμοποιώντας απλοτύπους από μιτοχονδριακό DNA καθώς και μικροδορυφορικούς δείκτες, αναγνωρίστηκαν αρχικά ένας αφρικανικός πληθυσμός δάκου και ένας πληθυσμός που απαντάται στην περιοχή της Μεσογείου (Nardi et al. 2005). Παρόλο που ο δάκος απαντάται περισσότερο στη Μεσόγειο, φαίνεται ότι η εξάπλωση του προς τη Μεσόγειο ξεκίνησε από την Αφρική, απ' όπου προέρχονται και τα δέντρα της άγριας ελιάς (Zohary 1994). Το παραπάνω γεγονός υποστηρίζεται και από τη μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια που παρουσιάζεται σε μικροδορυφορικούς δείκτες του αφρικανικού πληθυσμού σε σχέση με το μεσογειακό (Nardi et al. 2005). Στη συνέχεια, ύστερα από πληθυσμιακές μελέτες με μικροδορυφορικούς δείκτες σε έντομα του δάκου που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Μεσογείου, εντοπίστηκαν τρεις υπο-πληθυσμοί: της Ιβηρικής Χερσονήσου, της Κεντρικής Μεσογείου και της Ανατολικής Μεσογείου (Augoustinos et al. 2005). Με βάση την ίδια μελέτη φάνηκε ότι η εξάπλωση του εντόμου ξεκίνησε με κατεύθυνση από την Ανατολή προς τη Δύση, κατ' αντιστοιχία με την εξάπλωση της καλλιεργήσιμης ελιάς. Το γεγονός αυτό πιθανά συνδέει την εξάπλωση του δάκου στη λεκάνη της Μεσογείου με την εξάπλωση της ελαιοκαλλιέργειας στην περιοχή αυτή. Αντίθετα, ο Nardi και οι συνεργάτες τους (Nardi et al. 2010) υποστηρίζουν ότι πληθυσμοί του εντόμου στη Μεσόγειο βρίσκονταν αρχικά στα δέντρα της άγριας ελιάς και ύστερα, με την έλευση της ελαιοκαλλιέργειας και την αντικατάσταση των άγριων ελαιοδένδρων με ήμερες ποικιλίες, μεταπήδησαν σ' αυτήν και αποτέλεσαν τον πληθυσμό που δραστηριοποιείται στην περιοχή της Μεσογείου τα νεώτερα χρόνια. Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί πληθυσμοί δάκου και στην Καλιφόρνια και το Μεξικό (Rice et al. 2003). Μελετώντας πληθυσμούς της Καλιφόρνιας με μικροδορυφορικούς δείκτες βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη εισβολή πιθανά ξεκίνησε από την Ανατολική Μεσόγειο (Zygouridis et al. 2009).

### 1.3.4 Η χρησιμότητα του IGS για τη διάκριση του δάκου

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο δάκος προσβάλλει αποκλειστικά τους καρπούς της ελιάς. Στην Αφρικανική Ήπειρο, όμως, έχουν εντοπιστεί και άλλα συγγενικά είδη του γένους *Bactrocera* που προσβάλλουν τους καρπούς της ελιάς: το *Bactrocera biguttula* και το *Bactrocera munroi* (Copeland et al. 2004, Mkize 2008). Το *B. munroi* βρέθηκε ότι προσβάλλει τους καρπούς της άγριας ελιάς στην περιοχή της Κένυας (*O. europea subsp. cuspidata*) όπως και το *B. oleae*, ενώ το *B. biguttula* βρέθηκε στους καρπούς των *O. woodiana* και *O. europea subsp. Cuspidate* σε περιοχές της Νότιας Αφρικής και της Μοζαμβίκης (Copeland et al. 2004, Mkize 2008). Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά δεν είναι εύκολα διακριτά υποδηλώνει ότι πιθανοτατα προήλθαν από έναν κοινό πρόγονο και προσαρμόστηκαν στον καρπό της ελιάς (Copeland et al. 2004).

Τα παραπάνω είδη παρά τη φαινοτυπική τους ομοιότητα, ενδέχεται να διαφέρουν ως προς το γενότυπό τους. Για να εξακριβωθεί λοιπόν η εξελικτική τους σχέση καθώς και το αν αποτελούν υπογέννη του γένους *Bactrocera* ή υποείδη του *B. oleae*, θα ήταν σκόπιμη η μοριακή τους ανάλυση. Ένας χρήσιμος μοριακός δείκτης, σε τέτοιες περιπτώσεις, θα ήταν το διαγονιδιακό διάστημα IGS. Το IGS λόγω του μικρότερου βαθμού εξελικτικής πίεσης που δέχεται, συσσωρεύει μεταλλάξεις με μεγαλύτερο ρυθμό. Επιπλέον, διαφέρει και ως προς το μήκος του λόγω του μεταβλητού αριθμού των ομάδων επαναλήψεων που περιέχει στο εσωτερικό του. Για τους παραπάνω λόγους, το IGS αποτελεί έναν από τους καλύτερους μοριακούς δείκτες για τον καθορισμό των εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα σε πολύ κοντινά είδη, όπως είναι τα υποείδη του *Bactrocera*.

## 2 Σκοπός

---

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της δομής και της αλληλουχίας του διαγονιδιακού διαστήματος IGS του εντόμου *Bactrocera oleae*. Το IGS βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων 28S και του 18S δύο διαδοχικών μονάδων rDNA. Ο καθορισμός της οργάνωσής του θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ανάπτυξη εξειδικευμένων μοριακών δεικτών για πληθυσμιακές μελέτες ώστε να διακριθούν είδη και υποείδη του εντόμου, καθώς παρουσιάζει χαμηλό βαθμό συντήρησης ως προς την αλληλουχία του και συσσωρεύει μεταλλάξεις με μεγαλύτερο ρυθμό απ' ό,τι οι κωδικές περιοχές των ριβοσωμικών γονιδίων λόγω της χαλαρότερης εξελικτικής πίεσης που δέχεται.

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μεγάλου μήκους (Long PCR) σε φαγικούς κλώνους γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου, ώστε να ενισχυθούν δυνητικές περιοχές του IGS. Επιπλέον ελέγχθηκαν φαγικοί κλώνοι της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου ώστε να εξακριβωθεί ποιοι από αυτούς φέρουν περιοχές γειτονικές προς το IGS και συνεπώς, μεγαλύτερη πιθανότητα να περιέχουν τμήματά του. Προς την κατεύθυνση αυτή πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern, ώστε να εντοπιστούν οι περιοχές που υβριδοποιούνται με αλληλουχίες γειτονικές προς το IGS και να μελετηθούν περαιτέρω.

## 3 Μέθοδοι

---

### 3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

#### 3.1.1 PCR για την ενίσχυση γονιδιωματικού DNA

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR δημιουργήθηκε από την επιστημονική ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki. Γι' αυτή του την ανακάλυψη ο Kary Mullis βραβεύτηκε τον Οκτώβριο του 1993 με το Νόμπελ Χημείας. Η PCR αποτελεί μια *in vitro* ενζυμική μέθοδο πολλαπλασιασμού μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers). Η μέθοδος βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, όπως αυτή διατυπώθηκε από τους Britten και Kohne. Κατά τη διάρκεια ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος η αλληλουχία-στόχος πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων ανάλογα με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Τα απαραίτητα συστατικά για μια PCR είναι:

- Το DNA-στόχος (template DNA), που περιέχει τις επιθυμητές αλληλουχίες. Το DNA θα πρέπει να μην είναι κατεστραμμένο ώστε να είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός και να παρουσιάζει υψηλή καθαρότητα, χωρίς την παρουσία φαινολών, πολυσακχαριτών, EDTA και λοιπών αναστολέων. Η ποσότητα DNA που απαιτείται για μια αντίδραση κυμαίνεται μεταξύ 10 και 500ng.
- Οι εκκινητές που οριοθετούν τα νουκλεοτιδικά άκρα του στόχου και είναι απαραίτητοι για την πρόσθεση των υπόλοιπων νουκλεοτιδίων της αλληλουχίας. Οι ιδανικοί εκκινητές έχουν συνήθως μήκος 18-22 βάσεων και δεν πρέπει να περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, συμπληρωματικότητα μεταξύ τους, σημαντική δευτεροταγή δομή και αλληλεπικάλυψη στο 3' άκρο γιατί σχηματίζονται διμερή εκκινητων. Τέλος, θα πρέπει να περιέχουν παρόμοια αναλογία σε βάσεις G και C ώστε οι θερμοκρασίες  $T_m$  τους (melting temperature) να μη διαφέρουν σημαντικά.
- Τα dNTPS, τα τριφωσφορικά δεόξυνουκλεοτίδια (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) είναι απαραίτητα για την επέκταση της αλληλουχίας και για τη δέσμευση των ιόντων μαγνησίου και πρέπει να βρίσκονται σε ίσες μεταξύ τους συγκεντρώσεις. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλούν το σχηματισμό παραπροϊόντων από την πολυμεράση.
- Η Taq DNA πολυμεράση που προέρχεται από το θερμοφιλο δεινόκοκκο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία στους 72°C και σταθερότητα ακόμα και στους 94°C.
- Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  που συνδέονται με τα dNTPs και δημιουργούν το υποστρώμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση
- Το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που ρυθμίζει το pH και την ιονική ισχύ του διαλύματος της αντίδρασης.

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τρία στάδια: το στάδιο της αποδιάταξης, που πραγματοποιείται συνήθως στους 93-95°C για 30 δευτερόλεπτα, το στάδιο του υβριδισμού των εκκινητών (annealing step) με το DNA-στόχο του οποίου η θερμοκρασία καθορίζεται από την περιεκτικότητα των εκκινητών σε G και C και διαφέρει κατά 5°C από την υπολογισμένη T<sub>m</sub> και το στάδιο της επιμήκυνσης (extension step) όπου η πολυμεράση συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα του DNA-στόχου. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την επιμήκυνση είναι οι 72°C και για μια περιοχή μεγέθους 1kb προστίθενται 35-70 νουκλεοτίδια/δευτερόλεπτο.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

Σε σωληνάκι τύπου PCR (200μl) προστίθενται:

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση
DNA	5-40ng
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)	1X
dNTPs	0.2mM το καθένα
Εμπρόσθιος εκκινητής	0.4-0.6μM
Οπίσθιος εκκινητής	0.4-0.6μM
Taq DNA πολυμεράση	1 unit
H <sub>2</sub> O	ως τον τελικό όγκο

Η αντίδραση τοποθετείται σε συσκευή PCR με τις εξής συνθήκες:

	Θερμοκρασία	Χρόνος
1) Αρχική αποδιάταξη	94°C	3min
2) Αποδιάταξη DNA-στόχου	94°C	30sec
3) Υβριδισμός εκκινητών	T <sub>m</sub> -5°C	30sec
4) Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	1min/kb
5) Τελική επιμήκυνση	72°C	5min

Σημείωση: Τα στάδια 2,3 και 4 λαμβάνουν χώρα για 29 κύκλους.

Τέλος, τα προϊόντα της PCR οπτικοποιούνται σε πήκτωμα αγαρόζης

### 3.1.2 PCR μεγάλου μήκους (Long PCR)

Η PCR μεγάλου μήκους χρησιμοποιείται για τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών που ξεπερνούν σε μέγεθος τις 5kb και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA που φτάνουν σε μέγεθος μέχρι και τις 40kb. Σε αντίθεση με τις συμβατικές αντιδράσεις, στις Long PCR χρησιμοποιούνται πολυμεράσες που εκτός από δράση 5'→3' DNA πολυμεράσης, έχουν και ενεργότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης και συνεπώς μπορούν να διορθώνουν νουκλεοτίδια που έχουν ενσωματωθεί λάθος. Στην αντίδραση επίσης χρησιμοποιείται και DMSO (dimethylsulfoxide) το οποίο δρα ως συνδιαλύτης και αυξάνει την απόδοση της αντίδρασης μειώνοντας τη μη ειδική δέσμευση των εκκινητών στο DNA template. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν: το Long PCR EnzymeMix (Fermentas), το KAPA Long Range PCR Kit (KAPA Biosystems), το LongAmp Taq PCR Kit (New England Biolabs), το KAPA HIFI PCR Kit (KAPA Biosystems), το KAPA 2G Robust PCR Kit (KAPA Biosystems) και το Phusion High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes).

Το πειραματικό πρωτόκολλο τροποποιείται ανάλογα με τη δραστηριότητα της εκάστοτε πολυμεράσης και έχει ως εξής:

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR (200μl) προστίθενται:

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση
DNA	5-40ng
Ρυθμιστικό διάλυμα(Buffer)	1X
dNTPs	0.2mM το καθένα
Εμπρόσθιος εκκινητής	0.4-0.6μM
Οπίσθιος εκκινητής	0.4-0.6μM
DMSO	4%
Taq DNA πολυμεράση	1 unit/μl
H <sub>2</sub> O	ως τον τελικό όγκο

2. Η αντίδραση τοποθετείται σε συσκευή PCR με τις εξής συνθήκες:

	Θερμοκρασία	Χρόνος
1) Αρχική αποδιάταξη	94°C	3min
2) Αποδιάταξη DNA-στόχου	94°C	30sec
3) Υβριδισμός εκκινητών	Tm-5°C	30sec
4) Επιμήκυνση εκκινητών	68°C	10min
5) Αποδιάταξη DNA-στόχου	94°C	30sec
6) Υβριδισμός εκκινητών	Tm-5°C	30sec
7) Επιμήκυνση εκκινητών	68°C	10min + 5sec/cycle
8) Τελική επιμήκυνση	68°C	10min



Σημείωση: Τα στάδια 2, 3 και 4 λαμβάνουν χώρα για 9 κύκλους και τα στάδια 5, 6 και 7 για 25 κύκλους.

3. Τέλος, τα προϊόντα της PCR οπτικοποιούνται σε πήκτωμα αγαρόζης

## **3.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων**

### **3.2.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση, τον διαχωρισμό και την απομόνωση φορτισμένων μορίων (DNA, RNA, πρωτεΐνες) ύστερα από την εφαρμογή ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται ωθεί τα μόρια του DNA προς την άνοδο. Τα μόρια του DNA κινούνται με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με:

1. Το μέγεθος του DNA ( δίκλινα μόρια κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους).
2. Τη συγκέντρωση της αγαρόζης ( η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα με διαφορετική συγκέντρωση αγαρόζης).
3. Τη στερεοδομή των μορίων ( οι διαφορετικές στερεοδιατάξεις του ίδιου μορίου DNA παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα).
4. Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου.
5. Την παρουσία χρωστικών όπως το βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις και καθιστά τα μόρια άκαμπτα.
6. Τη σύσταση και την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης(Buffer) (μεταβάλλεται η ηλεκτρική αγωγιμότητα με επακόλουθες συνέπειες στην κινητικότητα των μορίων του DNA).

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης ζυγίζεται, αναμειγνύεται με το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης και θερμαίνεται μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να καταστεί διαυγές.
2. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml.
3. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος της αγαρόζης μειωθεί σε σημείο ώστε να είναι ανεκτό σε διαχείριση, μεταφέρεται σε μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχουν τοποθετηθεί, με κάθετη διεύθυνση «χτενάκια», ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις( «πηγαδάκια») φόρτωσης των δειγμάτων.
4. Με τη στερεοποίηση του πηκτώματος, τα «χτενάκια» απομακρύνονται και το πήκτωμα

τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, το εσωτερικό της οποίας έχει καλυφθεί με διάλυμα ηλεκτροφόρησης τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.

5. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται διάλυμα χρωστικής (gel loading buffer) με αναλογία **1:4** και ύστερα φορτώνονται στα «πηγαδάκια» σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση.
6. Η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης ελέγχεται με έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία.

### **Σημειώσεις:**

- ✓ Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των ζωνών του DNA στο πήκτωμα, εκτός από τα δείγματα προστίθεται και ένα δείγμα-μάρτυρας που περιέχει μόρια DNA με γνωστό μοριακό βάρος και μέγεθος (Ladder).
- ✓ Το βρωμιούχο αιθίδιο μειώνει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των γραμμικών μορίων επειδή παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις τους και με αποτέλεσμα να αυξάνεται το μήκος τους και να καθίστανται άκαμπτα.
- ✓ Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει κυανό της ξυλόλης, μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και dH<sub>2</sub>O. Το μπλε της βρωμοφαινόλης και το κυανό της ξυλόλης είναι χρωστικές ιχνηλασιμότητας που επιτρέπουν την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης και η γλυκερόλη αύξανει την πυκνότητα των δειγμάτων διευκολύνοντας την είσοδο τους στα «πηγαδάκια».

### **3.2.2 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Η διαδικασία αποσκοπεί στην απομόνωση και την ανάκτηση μορίων DNA ύστερα από ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτώματα αγαρόζης. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το Gel DNA Recovery Kit GF-1 της Vivantis.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η επιθυμητή ζώνη DNA αποκόπτεται από το πήκτωμα και συλλέγεται σε σωληνάκι τύπου erpendorf (1.5ml) και ζυγίζεται για τον προσδιορισμό του βάρους της.
2. Προστίθενται 100μl Buffer GB για κάθε 0.1g του πηκτώματος και ο σώληνας φυγοκεντρείται ελαφρά ώστε το πήκτωμα να παραμείνει στο κάτω μέρος του
3. Το μείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 50°C για 10 λεπτά, έως ότου επιτευχθεί η τήξη του πηκτώματος.
4. Το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη (Spin Filter), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής, και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000 rcf για 1 λεπτό.
5. Το έκλουσμα απομακρύνεται και αφού προστεθούν στη στήλη 650μl Wash Buffer, ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση στα 10.000 rcf για 1 λεπτό.

6. Το έκλουσμα απορρίπτεται και ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση στα 10.000 rcf, ώστε να απομακρυνθούν από τη στήλη τυχόν υπολείμματα του WashBuffer.
7. Το έκλουσμα απορρίπτεται, η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf και προστίθεται Elution Buffer ή ddH<sub>2</sub>O στο κέντρο της στήλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 10.000 rcf.
8. Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του DNA που απομονώθηκε και για να εκτιμηθεί η απόδοση της απομόνωσης, τοποθετείται 1μl από το DNA(αναμεμειγμένο με 2μl διαλύματος φόρτωσης και 2μl ddH<sub>2</sub>O) σε ηλεκτροφορητική συσκευή μαζί με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους.
9. Το DNA αποθηκεύεται στους 4°C ή στους -20°C.

#### Σημειώσεις:

- ✓ Για να αυξηθεί η απόδοση της απομόνωσης συνίσταται το μείγμα να αφήνεται να επωαστεί για 1-2 λεπτά, πριν από τη φυγοκέντρηση, ύστερα από τη μεταφορά του μείγματος στη στήλη και ύστερα από την προσθήκη του Elution Buffer ή του ddH<sub>2</sub>O.
- ✓ Το Elution Buffer ή το ddH<sub>2</sub>O προτείνεται να προθερμαίνονται στο υδατόλουτρο στους 50°C πριν την προσθήκη τους.

### **3.2.3 Κατάτμηση του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

Τα ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes) είναι εξειδικευμένες ενδονουκλεάσες απομονώμενες από προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Προστατεύουν τους μικροοργανισμούς από την είσοδο εξωγενούς DNA αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες σ' αυτό και αποικοδομώντας το στις αλληλουχίες αυτές. Υπάρχουν δύο κατηγορίες ενζύμων περιορισμού. Η πρώτη περιλαμβάνει ένζυμα που δημιουργούν κολλώδη μονόκλινα άκρα (sticky ends) και η δεύτερη περιλαμβάνει ένζυμα που δημιουργούν μη κολλώδη δίκλινα άκρα (blunt ends). Η δραστηριότητα τους επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και το χρόνο επώασης και από την περιεκτικότητα σε ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος επώασης του εκάστοτε ενζύμου

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf τοποθετούνται με τη σειρά το DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου (Buffer), ddH<sub>2</sub>O ως τον τελικό όγκο και το ένζυμο περιορισμού που θα χρησιμοποιηθεί.
2. Το μείγμα αναδεύεται απαλά με τη χρήση πιπέτας και επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία ( στους 37°C συνήθως) για 1-2 ώρες.
3. Η αντίδραση πέψη τερματίζεται είτε προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 10mM, είτε

με επώαση του μείγματος στη θερμοκρασία απενεργοποίησης του ενζύμου.

#### **Σημειώσεις:**

- ✓ Η συγκέντρωση του ενζύμου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης, καθώς σε αυξημένες συγκεντρώσεις προκαλείται αναστολή εξαιτίας της αυξημένης παρουσίας γλυκερόλης. Τα ένζυμα περιορισμού διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 50% στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερη ποσότητα ενζύμου.

### **3.2.4 Κατακρήμιση DNA με ισοπροπανόλη**

Η κατακρήμιση με ισοπροπανόλη αποσκοπεί στη συμπύκνωση, στην αφαλάτωση και στην επανάκτηση νουκλεϊκών οξέων. Πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η διαδικασία μπορεί να ποικίλλει στη θερμοκρασία που οδηγεί στο σχηματισμό ιζήματος, στον τύπο και τη συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων που προστίθενται, καθώς και στο χρόνο και την ταχύτητα της φυγοκέντρωσης.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Στο προς κατακρήμιση DNA προστίθενται οξικό νάτριο με σε τελική συγκέντρωση 0,3M, 0,5μl γλυκογόνο και ίσος όγκος ισοπροπανόλης με τον όγκο του διαλύματος που περιέχει το DNA (1V ισοπροπανόλης για 1V διαλύματος DNA).
2. Το μείγμα αφού αναδευτεί ισχυρά, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά και ύστερα φυγοκεντρείται στα 13.500 rpm(rpm max) για 30 λεπτά.
3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται 0.5V αιθανόλης 70%.
4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε rpm max και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
5. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και αναδιαλύεται σε ddH<sub>2</sub>O.

#### **Σημείωση:**

- ✓ Το γλυκογόνο δεσμεύεται πάνω στο DNA και αυξάνει την απόδοση της κατακρήμισης δρώντας ως φορέας συν-κατακρήμισης, ενώ η αιθανόλη χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών μορίων και των αλάτων από το διάλυμα.

### 3.2.5 Καθαρισμός DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Ο καθαρισμός με φαινόλη χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για να απομακρύνονται οι πρωτεΐνες και τα RNA από δείγματα νουκλεϊκών οξέων. Αυτό επιτυγχάνεται αφενός χάρη στην ιδιότητα να αποδιατάσσει και να διαχωρίζει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα και αφετέρου επειδή το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων αυξάνοντας την πυκνότητα της οργανικής φάσης και απομακρύνοντας τα υπολείμματα της φαινόλης. Έτσι, τα νουκλεϊκά οξέα, ύστερα από φυγοκέντρηση, περιορίζονται στην υδατική φάση που είναι η άνω φάση του διαλύματος.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθενται φαινόλη με όγκο 0.5V και χλωροφόρμιο με όγκο 0.5V.
2. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε rpm max για 5 λεπτά και η υδατική φάση μεταφέρεται με προσοχή σε καθαρό σωληνάκι τύπου errendorf και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε rpm max.
3. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι τύπου errendorf και αφού προστεθεί ίσος όγκος χλωροφορμίου, γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε rpm max.
4. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε τρίτο σωληνάκι τύπου errendorf και το DNA ανακτάται με κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη.

### 3.3 Υβριδοποίηση κατά Southern (Southern blot)

Με τον όρο υβριδοποίηση υποδηλώνεται η ικανότητα ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο με το οποίο παρουσιάζει συμπληρωματικότητα. Η υβριδοποίηση κατά Southern είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος υβριδοποίησης για την ανίχνευση επιθυμητών αλληλουχιών σε ένα δείγμα DNA. Η υβριδοποίηση κατά Southern χωρίζεται σε τέσσερα στάδια: το στάδιο της μεταφοράς του DNA και της σταθεροποίησης του σε nylon μεμβράνη, της σήμανσης του ανιχνευτή, της υβριδοποίησης του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή και τέλος της ανίχνευσης του σήματος.

#### 3.3.1 Μεταφορά DNA σε νάylon μεμβράνη

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξη τους ώστε να καταστούν μονόκλωνα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο

συνήθως είναι μεμβράνες. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς τα νουκλεϊκά οξέα σταθεροποιούνται στη μεμβράνη είτε με έκθεση σε UV ακτινοβολία είτε με ξήρανση σε υψηλές θερμοκρασίες, και στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται ως «στόχοι» σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών (Chomczynski, 1992).

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε.
2. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και επειδή το τμήμα του DNA που εξετάζεται υπερβαίνει τις 15kb επωάζεται για 10 λεπτά υπό ανάδευση σε 0.2N HCl.
3. Το διάλυμα, έπειτα, αποχύνεται και το πήκτωμα ξεπλένεται με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.
4. Επωάζεται σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 15 λεπτά.
5. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
6. Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 20 λεπτά.
7. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 6.
8. Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 6X SSC σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά.
9. Η μεμβράνη με διαστάσεις λίγο μικρότερες από το πήκτωμα διαβρέχεται με απιονισμένο H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια με διάλυμα 6X SSC και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
10. Δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman διαβρέχονται με διάλυμα 6X SSC και τοποθετούνται πάνω στη μεμβράνη. Ακολουθούν ακόμη δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman (στεγνά) και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 10mm. Στην κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
11. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 2 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των πηγαδιών.
12. Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

### 3.3.2 Σήμανση ανιχνευτή

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλινα μόρια με καθορισμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία και έχουν σημανθεί ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η σήμανση των DNA και RNA ανιχνευτών

πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs) αντίστοιχα. Η σήμανση των ανιχνευτών πραγματοποιείται με την μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων (Feinberg&Vogelstein 1983) και περιλαμβάνει την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος και την βαθμιαία αναδιάταξη κάθε αλυσίδας με τη βοήθεια τυχαίων εκκινήτων (random primers) και την πολυμεριστική δράση του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I. Η σήμανση των μορίων DNA γίνεται με τη συμπλήρωση των 3' υπολειμματικών άκρων του με βιοτυνλιωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP) και με εκκινήτες τυχαία δεκανουκλεοτίδια.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Το DNA (100ng – 1μg) που θα σημανθεί τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινήτες σε τελική συγκέντρωση 1X και ddH<sub>2</sub>O ώστε να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης (50μl).
2. Το μείγμα αποδιάσσεται με θέρμανση στους 100°C για 10 λεπτά και έπειτα τοποθετείται αμέσως σε πάγο.
3. Προστίθενται Biotin-11-dUTP (0.035mM), μείγμα μη σημασμένων νουκλεοτιδίων (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) και η KlenowDNA πολυμεράση (5units).
4. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται στους 37°C για 12 – 16 ώρες.
5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH<sub>2</sub>O (50μl).

### Σημειώσεις:

- ✓ Για την επαλήθευση της σήμανσης των ανιχνευτών, πραγματοποιήθηκε πριν τη χρήση τους δοκιμή υβριδοποίησης ανιχνευτών, σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε νάιλον μεμβράνη χωρίς DNA (στύπωμα κουκίδας, spotting) και εμφάνιση του σήματος (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Μεμβράνη από spotting δύο ανιχνευτών σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις

### 3.3.3 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή στη μεμβράνη

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊκών οξέων αποτελείται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Η προϋβριδοποίηση πραγματοποιείται για να καλυφθούν οι ελεύθερες θέσεις της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), ώστε να μειωθεί η πιθανότητα της μη ειδικής δέσμευσης του ανιχνευτή. Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδό x 0.2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης).
2. Επιπλέον, προστίθεται DNA από σπέρμα σολομού (ssDNA) σε συγκέντρωση 100μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
3. Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή (60°C).
4. Το διάλυμα υβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα υβριδοποίησης και ο ανιχνευτής (100 – 200 ng/ml διαλύματος), ο οποίος έχει πρώτα θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
5. Ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 14 – 16 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση (60°C).

### 3.3.4 Εμφάνιση σήματος υβριδοποίησης

Η διαδικασία συνίσταται στην απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου ανιχνευτή, στη δημιουργία του συμπλόκου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης και στην ανίχνευση του σήματος. Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ισχυρή σύνδεση ανάμεσα στη βιοτίνη και τη στρεπταβιδίνη που είναι ενωμένη με την αλκαλική φωσφατάση και στην ικανότητα του ενζύμου να καταλύει μια χρωμογόνο αντίδραση. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ανιχνευτή και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους του.

1. Το διάλυμα υβριδοποίησης που περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C, έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί.
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα πλύσης 1 και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για 5 λεπτά.
3. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 2.



4. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα πλύσης 2 υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση (60°C) για 20 λεπτά.
5. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
6. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα B για τουλάχιστον 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
7. Το διάλυμα B απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα B, το οποίο περιέχει 5μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης – αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10ml, και επωάζεται για 30 λεπτά υπό ανάδευση.
8. Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα A για 15 λεπτά, υπό κίνηση, και επαναλαμβάνεται το βήμα.
9. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα C για 2 λεπτά.
10. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με διάλυμα C το οποίο περιέχει 50μl NBT και 37.5μl BCIP ανά 10ml διαλύματος.
11. Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

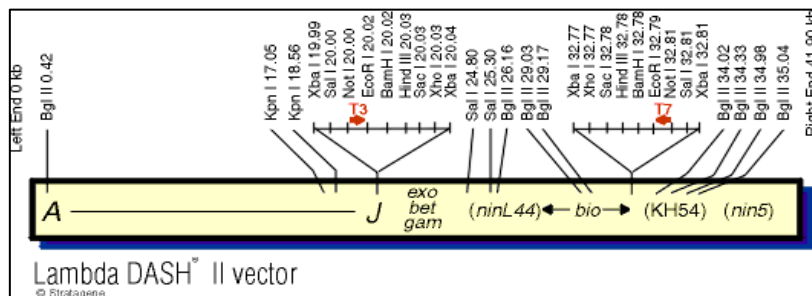
#### Σημειώσεις:

- ✓ *Το SSC στο διάλυμα πλύσης 2 βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση απ' ό,τι στο διάλυμα πλύσης 1, διότι η αραιότερη συγκέντρωση βοηθά στη μείωση της ιοντικής ισχύος. Όσο μειώνεται η ιοντική ισχύς, τόσο πιο εύκολα αποσυνδέονται τα μόρια. Στο διάλυμα πλύσης 1 επικρατούν ήπιες συνθήκες ώστε να συμβαίνει ελαφριά απομάκρυνση, ενώ στο διάλυμα πλύσης 2 οι συνθήκες είναι πιο αυστηρές ώστε να απομακρύνεται η πλειοψηφία των μορίων που είναι μη ειδικά συνδεδεμένα με τον ανιχνευτή.*

### **3.4 Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH® II (Stratagene)**

Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH® II (Εικόνα 3.2) είναι ένας πλασμιδιακός φορέας αντικατάστασης ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση μεγάλων τμημάτων γονιδιωματικού DNA. Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH® II έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε κύτταρα XL1-Blue MRA' (P2) χάρη στην επιλογή *spi* (*spi* selection-sensitive to P2 inhibition). Οι βακτηριοφάγοι λ αγρίου τύπου διαθέτουν ενεργά τα γονίδια *red* και *gam* και δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε στελέχη ξενιστών που περιέχουν λυσιγόνους φάγους P2. Τα γονίδια *red* και *gam* στο βακτηριοφάγο λ-DASH® II εντοπίζονται στο τμήμα που απομακρύνεται κατά την εισαγωγή του ενθέματος (*stuffer*). Έτσι, στελέχη αγρίου τύπου του βακτηριοφάγου lambda-DASH® II δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κύτταρα XL1-Blue MRA', σε αντίθεση με τα ανασυνδυασμένα lambda-DASH® II, τα οποία μετατρέπονται σε *red*<sup>-</sup>/*gam*<sup>-</sup> μετά την απομάκρυνση του «*stuffer*» και την εισαγωγή του DNA-ενθέματος. Με τον τρόπο αυτό, κατά την επιστροφή της βιβλιοθήκης σε στέλεχος XL1-Blue MRA' (P2) πραγματοποιείται *spi* επιλογή και αναπτύσσονται μόνο ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι. Επιπλέον, είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε να φέρει εκατέρωθεν του ενθέματος, τις αλληλουχίες των υποκινητών T3 και T7 και να επιτρέπει τη δημιουργία τελο-ειδικών (*end-*

specific) RNA ανιχνευτών. Τέλος, το ένθεμα μπορεί να απομακρυνθεί με κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI, καθώς αυτό είναι κλωνοποιημένο στις θέσεις EcoRI του φορέα.



**Εικόνα 3.2:** Ο γενετικός χάρτης του βακτηριοφάγου *lambda-DASH II* και οι θέσεις που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Το DNA-ένθεμα κλωνοποιείται στις θέσεις EcoRI και απομονώνεται με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης NotI.

### 3.4.1 Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου *lambda*

Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται παρουσία μαλτόζης και ιόντων μαγνησίου. Ο βακτηριοφάγος λ για να εισαχθεί στο κύτταρο συνδέεται στον εξωμεμβρικό υποδοχέα της μαλτοπορίνης (Schwartz, 1967), που φυσιολογικά διευκολύνει την διάχυση της μαλτόζης και της μαλτοδεξτρίνης στο κύτταρο (Szmelcman and Hofnung, 1975). Η παρουσία της μαλτόζης στο θρεπτικό μέσο προκαλεί την εμφάνιση υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων και τα ιόντα μαγνησίου χρησιμοποιούνται για τη διευκόλυνση της πρόσδεσης του βακτηριοφάγου στον υποδοχέα (Lieb, 1953).

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth με περιεκτικότητα 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0,2% μαλτόζη, ενοφθαλμίζονται βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' και επωάζονται για 4-6 ώρες στους 37°C υπό ισχυρή ανάδευση (210rpm) ή για 12-16 ώρες στους 30°C.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4.000g και τα κύτταρα που καθιζάνουν, συλλέγονται με απόρριψη του υπερκειμένου.
3. Το ίζημα επαναδιαλύεται ήπια στην απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος MgSO<sub>4</sub> ώστε η οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub> του κυτταρικού ελαιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 0,6
4. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4°C.

### 3.4.2 Απομόνωση φαγικού DNA (Phage preps)

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' ενοφθαλμίζονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5ml) εμπλουτισμένο με 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0,2% μαλτόζη υπό αποστειρωμένες συνθήκες.
2. Ποσότητα (500μl) της κατεργασμένης βακτηριακής βακτηριακής καλλιέργειας αναμιγνύεται με τη διαχυμένη φαγική πλάκα (40μl) σε σωληνάκι τύπου errendorf και επωάζεται στους 37°C για 20 λεπτά.
3. Μέρος (300μl) του μείγματος μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 250ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (20ml) εμπλουτισμένο με 10mMMgSO<sub>4</sub>.
4. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C για 5-7 ώρες έως ότου πραγματοποιηθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων) και όταν αυτή επιτευχθεί προστίθεται χλωροφόρμιο (100μl).
5. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml και φυγοκεντρείται σε 8.000g για 10 λεπτά, ώστε τα βακτηριακά υπολείμματα να καθιζάνουν.
6. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τα φαγικά σωματίδια, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml και επωάζεται ταυτόχρονα με DNAση και RNAση σε συγκέντρωση 1 μg/ml στους 37°C για 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
7. Προστίθεται στερεό NaCl 1M, και επωάζεται στους 4°C για τουλάχιστον 1-2 ώρες και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 11.000g για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml, προστίθεται PEG 8000 σε συγκέντρωση 10% w/v και επωάζεται σε πάγο για περίπου 2 ώρες.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 11.000g για 10 λεπτά στους 4°C, ώστε να συλλεχθούν τα φαγικά σωματίδια.
10. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο σωλήνας τύπου falcon αναστρέφεται προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα του υπερκείμενου.
11. Τα καθιζάνοντα φαγικά σωματίδια αναδιαλύονται σε διάλυμα SM (1ml), και αφού μεταφερθούν σε σωληνάκι τύπου errendorf όγκου 2ml, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
12. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (1ml), ανακινείται ισχυρά και φυγοκεντρείται σε 3000g για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν η πολυαιθυλενογλυκόλη και τα κυτταρικά υπολείμματα από το εναιώρημα των βακτηριοφάγων.
13. Το αιώρημα των βακτηριοφάγων, που αποτελεί την υδατική φάση, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου errendorf.
14. Έπειτα, προστίθενται EDTA σε τελική συγκέντρωση 20 mM, SDS σε τελική συγκέντρωση 0,5% και πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml.
15. Το διάλυμα επωάζεται στους 56°C για 1 ώρα, υπό ανάδευση.
16. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
17. Το φαγικό DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα TE (200μl), που περιέχει RNάση 20 μg/ml.
18. Το απομονωμένο φαγικό DNA αποθηκεύεται στους 4°C.

### Σημειώσεις:

- ✓ Η επώαση του εναιωρήματος με την DNAση και την RNAση απαιτείται για την αποδόμηση των νουκλεϊκών οξέων που ελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων.
- ✓ Η προσθήκη NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα.
- ✓ Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 8000) λειτουργεί ως οργανικός κατακρημνιστής των φαγικών σωματιδίων.

## 3.5 Κλωνοποίηση

Η κλωνοποίηση αποτελεί μια μέθοδο παραγωγής ενός συνόλου πανομοιότυπων οργανισμών ή κυττάρων (κλώνος) με το ίδιο ακριβώς γενετικό υλικό από ένα αρχικό οργανισμό ή κύτταρο. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα στάδια της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) και της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation).

### 3.5.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

1. Σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth (5ml) ενοφθαλμίζονται βακτηριακά κύτταρα *E. coli* DH5a και επωάζονται για 12-16 ώρες στους 37°C υπό ισχυρή ανάδευση σε 220rpm.
2. Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml LB Broth και επωάζεται στους 37°C σε 220rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub> να κυμαίνεται μεταξύ 0.4 και 0.6.
3. Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon(50ml) και επωάζεται για 10 λεπτά στον πάγο ώστε να ανασταλλεί η κυτταρική ανάπτυξη.
4. Γίνεται φυγοκέντρηση στα 4.000g για 10 λεπτά στους 4°C.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε προψυγμένο, αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O (50ml ανά σωλήνα falcon).
6. Τα στάδια 4 και 5 επαναλαμβάνονται.
7. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 10% (4ml ανά σωλήνα falcon) και φυγοκεντρείται στα 4.000g για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 10% (250μl ανά σωλήνα falcon)
9. Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε κλάσματα των 40μl σε προψυγμένους σωλήνες τύπου erpendorf.
10. Τα κλάσματα διατηρούνται μέχρι να χρησιμοποιηθούν στους -80°C.

### 3.5.2 Δημιουργία φορέων με κατάλληλα άκρα

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της κλωνοποίησης είναι μικρά, κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA που διαθέτουν πολλές μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες στην περιοχή του πολυσυνδέτη τους και διαθέτουν και ρυθμιστικά στοιχεία ώστε να αντιγράφονται ανεξάρτητα από το γονιδίωμα του ξενιστή. Εκτός απ' αυτά, διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που επιτρέπουν την επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η δημιουργία φορέων με κατάλληλα άκρα, αποσκοπεί στην ανάπτυξη γραμμικών πλασμιδιακών μορίων με εξειδικευμένα άκρα, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια στην αντίδραση σύνδεσης (ligation). Στην παρούσα διπλωματική εργασία κατασκευάστηκε ένας πλασμιδιακός φορέας με άκρα EcoRI και ένας πλασμιδιακός φορέας με άκρα EcoRI-HindIII.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Σε σωλήνα τύπου erpendorf τοποθετούνται ο πλασμιδιακός φορέας, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου ή των ενζύμων που θα χρησιμοποιηθούν, το ένζυμο ή τα ένζυμα που θα χρησιμοποιηθούν και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τη συμπλήρωση του τελικού όγκου.
2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με τη χρήση πιπέτας και το μείγμα επωάζεται στους 37°C για δύο ώρες.
3. Μετά το πέρας του παραπάνω διαστήματος, προκαλείται απενεργοποίηση του ενζύμου είτε θερμικά ανάλογα με τη θερμοκρασία απενεργοποίησης του κάθε ενζύμου, είτε με τη χρήση φαινολών-χλωροφορμίου (όπως περιγράφεται στο 3.2.5).
4. Τέλος, το DNA του πλασμιδιακού φορέα καθαρίζεται και απομονώνεται με κατακρήμνιση (όπως περιγράφεται στο 3.2.4).

#### Σημειώσεις:

- ✓ Όταν χρησιμοποιείται ένα ένζυμο περιορισμού, ανεξάρτητα από τη φύση των άκρων που παράγονται, ή όταν η συνδυαστική δράση δύο ενζύμων περιορισμού δημιουργεί στα άκρα μονόκλωνες συμπληρωματικές αλληλουχίες, τότε οι γραμμικοί πλασμιδιακοί φορείς επανακυκλοποιούνται. Για να παρεμποδιστεί η επανακυκλοποίηση, μετά την επώαση προστίθεται στο μείγμα αλκαλική φωσφατάση CIAP (1μl) και επωάζεται στους 37 °C για 15 λεπτά. Προστίθεται επιπλέον ποσότητα CIAP (1μl) και επωάζεται για άλλα 15 λεπτά. Η CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) καταλύει την απομάκρυνση φωσφορικών ομάδων από το 5' άκρο και έτσι γίνεται αδύνατη η δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών με τα ελεύθερα 3' άκρα.
- ✓ Η θερμοκρασία απενεργοποίησης του εκάστοτε ενζύμου ποικίλλει ανάλογα με το ένζυμο και παρέχεται από την παρασκευάστρια εταιρεία στο kit του ενζύμου.

### 3.5.3 Αντίδραση σύνδεσης

Ένας πλασμιδιακός φορέας και ένα DNA-ένθεμα μπορούν να συνδεθούν, αν έχουν τα ίδια, κολλώδη άκρα. Η σύνδεση τους θα είναι προσωρινή γιατί στηρίζεται μόνο σε 4 δεσμευμένα ζεύγη βάσεων, αλλά μπορεί να μονιμοποιηθεί με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση του ενζύμου DNA λιγάση που φυσιολογικά κλείνει τις εγκοπές στην ασυνεχή αλυσίδα (lagging strand) κατά την αντιγραφή του DNA.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR (200μl) τοποθετούνται με τη σειρά: ο πλασμιδιακός φορέας, το DNA-ένθεμα, το ρυθμιστικό διάλυμα της λιγάσης, ddH<sub>2</sub>O και η DNA-λιγάση.
2. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε συσκευή PCR ρυθμισμένη στους 22°C για 1 ώρα.

#### Σημειώσεις:

- ✓ Μετά το πέρας της αντίδρασης στη συσκευή της PCR, το μείγμα αφήνεται να επωαστεί στους 4 °C για καλύτερη απόδοση της αντίδρασης σύνδεσης.

### 3.5.4 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Κλάσμα (≈ 40μl) δεκτικών κυττάρων *E. coli* κατεργασμένων για ηλεκτροδιάτρηση και διατηρημένων στους -80°C τήκεται σε πάγο.
2. Το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης υφίσταται αραιώση 1:10 και από την αραιώση 2μl και αναμειγνύεται με το κλάσμα των κυττάρων.
3. Το μείγμα μεταφέρεται σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα διαμέτρου 0.2cm και τοποθετείται στη θέση υποδοχής, στη συσκευή της ηλεκτροδιάτρησης.
4. Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός 13.8KV/cm και διάρκειας 5-6msec.
5. Αμέσως μετά προστίθεται 1ml διαλύματος SOC, το μείγμα μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και επώαζεται για μία ώρα σε 180rpm στους 37°C.
6. Ύστερα απ' αυτό το διάστημα, σε τρυβλία petri που περιέχουν στερεό θρεπτικό μέσο LB-Agar και 100μg/ml αμπικιλίνη, προστίθενται 200μl κυττάρων, 30μl X-gal και 3μl IPTG υπό αποστειρωμένες συνθήκες.
7. Αφού στεγνώσουν τα τρυβλία επώαζονται ανεστραμμένα σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (στους 37°C) για 12-16 ώρες.

#### Σημειώσεις:

- ✓ Αφού αναμειχθεί ο πλασμιδιακός φορέας με τα κύτταρα ακολουθεί ένα λεπτό επώαση.
- ✓ Το διάλυμα SOC, προτού προστεθεί, συνίσταται να έχει προθερμανθεί. Το διάλυμα SOC πρέπει να προστίθεται μέσα σε 1 λεπτό από την εφαρμογή του παλμού καθώς λόγω της

γλυκόζης που περιέχει βοηθά στην ανάκαμψη των κυττάρων από το θερμικό σοκ, μειώνοντας τον ρυθμό του κυτταρικού θανάτου.

- ✓ Τα ng του DNA-ενθέματος που θα χρησιμοποιηθεί υπολογίζονται από τον τύπο :

$$\text{ng DNA-ενθέματος} = \text{ng φορέα} * \frac{\text{kb ενθέματος}}{\text{kb φορέα}} * \frac{3}{1}$$

[όπου ο λόγος 3:1 αποτελεί το μοριακό λόγο DNA ενθέματος προς DNA πλασμιδίων]

### 3.5.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini Preps)

Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Αφού επωαστούν τα τρυβλία, οι ανασυνδυασμένες, λευκές αποικίες διαλέγονται και τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth (3ml/δοκιμαστικό σωλήνα). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες.
2. Οι αποικίες από τις κορεσμένες βακτηριακές καλλιέργειες μεταφέρονται σε σωληνάκια τύπου erpendorf και φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στα 3000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
3. Προστίθενται 200μl διαλύματος GET (Glucose-EDTA-TrisCl) και αφού ακολουθηθεί έντονη ανάδευση για 1 περίπου λεπτό, ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Έπειτα, προστίθενται 200μl διαλύματος Alkali. Το μείγμα αναδεύεται αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι απαλά και αφήνεται να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 λεπτά.
5. Στη συνέχεια, προστίθενται 150μl παγωμένου διαλύματος CH<sub>3</sub>COOK και αφού ακολουθηθεί έντονη ανάδευση, το μείγμα επώαζεται για 8-10 λεπτά στον πάγο.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 13.500rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf.
7. Προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1 με το μείγμα, αναδεύεται ισχυρά και αφήνεται να επωαστεί για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 13.500rpm και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
9. Προστίθεται παγωμένη αιθανόλη 70% σε αναλογία 1:2 στα μείγμα και αφού αναδευθεί, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 13.500rpm και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
10. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και έπειτα, αναδιαλύεται σε 100μl TE-RNAσης.

#### Σημειώσεις:

- ✓ Το διάλυμα GET συμβάλλει στη διατήρηση της οσμωτικότητας της μεμβράνης, ώστε να μη γίνει απότομα η ρήξη της κατά τη λύση του κυττάρου.
- ✓ Το διάλυμα Alkali περιέχει NaOH και SDS τα οποία ευθύνονται για τη λύση της μεμβράνης, ενώ το διάλυμα CH<sub>3</sub>COOK χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση των επιδράσεων του διαλύματος Alkali.

## 4 Υλικά

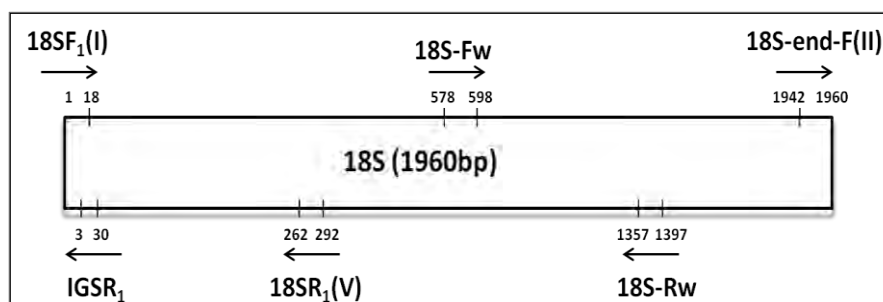
### 4.1 PCR

#### 4.1.1 PCR

- 10X Reaction Buffer Complete for Maximo DNA Polymerase, GeneOn
- Deoxynucleotide Solution Mix 10mM each, New England Biolabs
- Maximo Taq DNA Polymerase 5u/μl, 1kb/min, GeneOn
- Nuclease-free water

Εκκινητής	Αλληλουχία
18S-end-F	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCGG
28S-start-5'R	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
18SF <sub>1</sub>	5'-CTG GTT GAT TCT GCC ACT-3'
18SR <sub>1</sub>	5'-CTG TCG TCG GTA CGA GAC CAT ACG ATC TGC-3'
28SF <sub>1</sub>	5'-ATG CTA CGT CCG TTG GAT TAT GCC TGA ACG-3'
28S-rRNA-R	5'-CTC AAC CAC TTA CAA CACC-3'
28Sw-2.1-F	5'-AGA ACT CAT GCA GAT ACC-3'
28Sw-2.2-R	5'-TCT TCA CTT TGA CAT TCA GAGC-3'
18SFw	5'-GTA ATT CCA GCT CCA ATAG-3'
18SRw	5'-CAG ACA AAT CAC TCC ACG AAC-3'
28SF <sub>2</sub>	5'-AGT TAC CAC AGG GAT AAC TGG CTT GTGG-3'
28SF <sub>3</sub>	5'-TGC GAC AGC ATT CCT GCG TAG TAC GAG AGG-3'
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG-3'
T3	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
IGSR <sub>1</sub>	5'-AAG CAT ATA ACT ACT GGC AGG ATC AACC-3'
IGSF2	5'-GTG CTG GAC TGC AAT GAT AAA TAA GG-3'

Στις εικόνες 4.1 και 4.2 διακρίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι περιοχές που υβριδοποιούνται και ενισχύουν στα γονίδια του 18S και 28S rRNA αντίστοιχα.



Εικόνα 4.1 Οι εκκινητές που ενίσχυαν περιοχές του γονιδιακού τύπου του 18S rRNA





Εικόνα 4.2 Οι εκκινητές που ενίσχυαν περιοχές του γονιδιακού τόπου του 28S rRNA

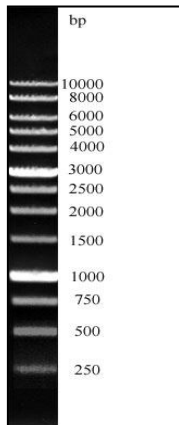
### 4.1.2 Long PCR

- F-519 5X Phusion GC Reaction Buffer, Finnzymes
- Phusion DNA Polymerase 2u/μl, Finnzymes
- 10X Long PCR Buffer with 15mM MgCl<sub>2</sub>, Fermentas
- Long PCR Enzyme Mix 5u/μl, Fermentas
- 5X KAPA LONG Range Buffer, KAPA BIOSYSTEMS
- KAPA Long Range DNA Polymerase 5u/μl, KAPA BIOSYSTEMS
- 5X Long AMP Taq Reaction Buffer, New England Biolabs
- Long AMP Taq DNA Polymerase 2,5u/μl, New England Biolabs
- 5X KAPA HIFI GC Buffer, KAPA BIOSYSTEMS
- KAPA HIFI DNA Polymerase 1u/μl, KAPA BIOSYSTEMS
- 5X KAPA 2G Robust GC Buffer, KAPA BIOSYSTEMS
- KAPA 2G Robust DNA Polymerase 5u/μl, KAPA BIOSYSTEMS
- KAPA 10mM dNTP Mix, KAPA BIOSYSTEMS
- Deoxynucleotide Solution Mix, New England Biolabs
- Dimethyl Sulfoxide 0,3ml, Fermentas
- Nuclease-free water

## 4.2 Ηλεκτροφόρηση

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5XTBE (1L) (54gTris-base, 27,5gBoricAcid, 0,5MEDTApH 8.0)
- Διάλυμα χρωστικής-Gel loading Buffer 6X (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικόλλη σε ddH<sub>2</sub>O)

- 1 kb/1000bp Blue DNA Ladder, GeneOn (2μl/ηλεκτροφόρηση)



*Εικόνα 4.3  
Ο μοριακός μάρτυρας γνωστού  
μοριακού βάρους (Ladder) από την  
εταιρεία GeneOn*

### 4.3 Κατάτμηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- 10X H Buffer, Takara
- 10X R Buffer, Fermentas
- 0,1% Bovine Serum Albumin, Takara
- NEB Buffer 2 10X, New England Biolabs
- EcoRI 15u/μl, Takara
- HindIII 10u/μl, Fermentas
- PvuII 10u/μl, New England Biolabs
- Xho 10u/μl, Takara
- PstI 15u/μl, Takara

### 4.4 Υβριδοποίηση κατά Southern

- Διάλυμα Αποδιάταξης Α (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)
- Διάλυμα Εξουδετέρωσης Ε (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.2)
- 20XSSC (3M NaCl, 0.3M Na<sub>3</sub>citrate)
- Διάλυμα υβριδοποίησης ( 6X SSC, 5X Denhardt's, 0.5% SDS, 100kg/ml denaturated salmon sperm DNA)
- Διάλυμα Denhardt's 50X (1% φικόλλη,1% PVP, 1% BSA)
- Διάλυμα Πλύσης 1 (2X SSC, 0.1%SDS)
- Διάλυμα Πλύσης 2 (0.2X SSC, 0.1%SDS)
- Διάλυμα Α (100mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5)
- Διάλυμα Β ( Διάλυμα Α, 1% Blocking solution.)

- Διάλυμα Blocking (διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος, 10gr αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη/ 100ml διαλύματος Α)
- Διάλυμα C (100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)

#### 4.5 Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH® II

- Υγρό Θρεπτικό μέσο LB ( LB Broth 0,15g/10ml, NaCl 0,05g/10ml) → Αποστείρωση για 20 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 151b/sq.in

#### 4.6 Κλωνοποίηση

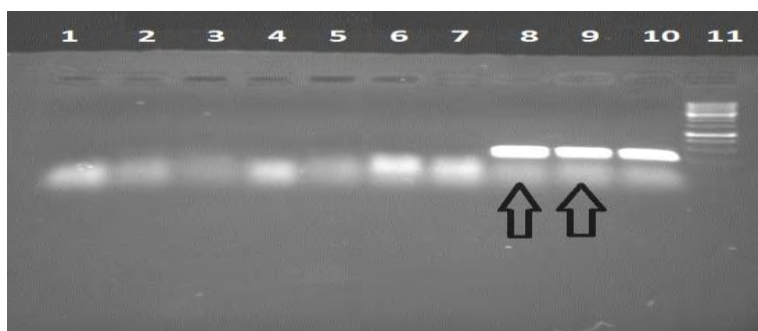
- Στερεό θρεπτικό μέσο LB ( LB Agar 40g/1L) → Αποστείρωση για 20 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 151b/sq.in → Προσθήκη Αμπικιλίνης 1μg/ml
- Υγρό Θρεπτικό μέσο LB ( LB Broth 15g/10L, NaCl 5g/10L) → Αποστείρωση για 20 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 151b/sq.in → Προσθήκη Αμπικιλίνης 1μg/ml
- Διάλυμα GET ( 50mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH 8.0. 10mM EDTA pH 8.0
- Διάλυμα Alkali ( 0,2N NaOH, 1% SDS)
- Διάλυμα CH<sub>3</sub>COOK ( 5M potassium acetate, glacial acetic acid)

## 5 Αποτελέσματα

### 5.1 Εντοπισμός και ενίσχυση περιοχών γειτονικών προς το IGS σε γονιδιωματικό DNA δάκου και σε φαγικούς κλώνους

Τα πρώτα βήματα της πειραματικής διαδικασίας αποσκοπούσαν στην ταυτοποίηση φάγων των οποίων τα ενθέματα θα περιέχουν είτε τμήματα από το 5' άκρο του 18S είτε από το 3' άκρο του 28S και οι οποίοι στη συνέχεια θα εξετάζονταν για το αν περιέχουν και την περιοχή του IGS. Το 5' άκρο του 18S και το 3' άκρο του 28S βρίσκονται εκατέρωθεν από την περιοχή του IGS, οπότε οι φάγοι που θα περιείχαν τις συγκεκριμένες περιοχές θα είχαν περισσότερες πιθανότητες να περιέχουν και την περιοχή του IGS. Στους φάγους 18S<sub>1</sub>1, 18S<sub>2</sub>2, 18S<sub>4</sub>1, 18S<sub>6</sub>2, 28S<sub>1</sub>4 B18S<sub>1</sub>1, B18S<sub>1</sub>2 και B28S<sub>1</sub>4 που είχαν απομονωθεί μετά από διαλογή με ανιχνευτές εξειδικευμένους για το 18S και το 28S κατά τη διάρκεια προηγούμενων διπλωματικών του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής (Σταυρόπουλος 2012, Λυγηρού 2011), πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με τους εκκινητές που περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 4.1.1.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών: 18S Fw-18S Rw, 28Sw-2.1-F, 28Sw-2.2-R, 28S F<sub>2</sub>-28S rRNA-R, 28SF<sub>1</sub>-28SrRNA-R, 18SF<sub>1</sub>-18SR<sub>1</sub>, 28SF<sub>3</sub>-28S rRNA-R. Από τα παραπάνω ζεύγη εκκινητών μόνο το 18SF<sub>1</sub>-18SR<sub>1</sub> ενίσχυσε αποτελεσματικά ένα τμήμα 300bp που εντοπίζεται στο 5' άκρο του 18SrRNA τόσο στους φάγους B18S<sub>1</sub>1 και B18S<sub>1</sub>2 όσο και σε γονιδιωματικό DNA *B. oleae* που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα θετικού ελέγχου. Έτσι, καθορίστηκαν τελικά δύο φάγοι που περιέχουν την περιοχή αυτή και ενδεχομένως και εκείνη του IGS (Εικόνα 5.1).



*Εικόνα 5.1 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR με χρήση των εκκινητών 18SF<sub>1</sub>-18SR<sub>1</sub>. Κατά σειρά οι φάγοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 1:Αρνητικό control, 2: 18S<sub>1</sub>1, 3: 18S<sub>2</sub>2, 4: 18S<sub>4</sub>1, 5: 18S<sub>6</sub>2, 6: 28S<sub>1</sub>4, 7: B28S<sub>1</sub>4, 8: B18S<sub>1</sub>1, 9: B18S<sub>1</sub>2 10: Θετικό control, γονιδιωματικό DNA *B. oleae**

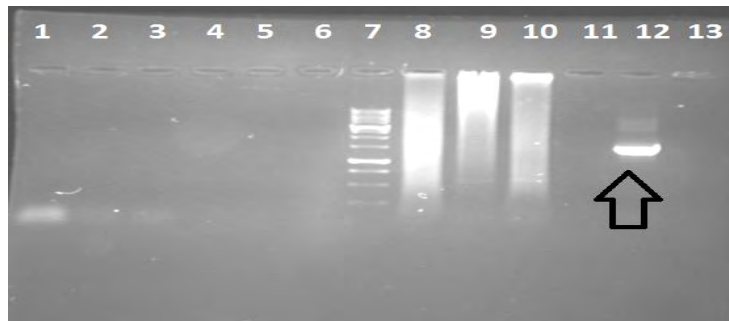
Στη συνέχεια, στους φάγους αυτούς καθώς και σε γονιδιωματικό DNA *B. oleae* πραγματοποιήθηκαν Long PCR με τα PCR Kits που αναφέρθηκαν στο 4.1.2 και με τα ζεύγη των εκκινητών T7-IGSR<sub>1</sub>, T3-IGSR<sub>1</sub> και 28SF<sub>2</sub>-IGSR<sub>1</sub>.

Με το ζεύγος T7-IGSR<sub>1</sub> ενισχύθηκε ένα τμήμα μεγέθους 1.6kb περίπου στο φάγο B18S<sub>1</sub>1 (Εικόνα 5.2). Οι εκκινητές T3 και T7 χρησιμοποιήθηκαν γιατί όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2 εκατέρωθεν του σημείου ενσωμάτωσης του ενθέματος στο βακτηριοφάγο lamda- DASH® II υπάρχουν θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών T3 και T7 αντίστοιχα. Έτσι, πραγματοποιώντας

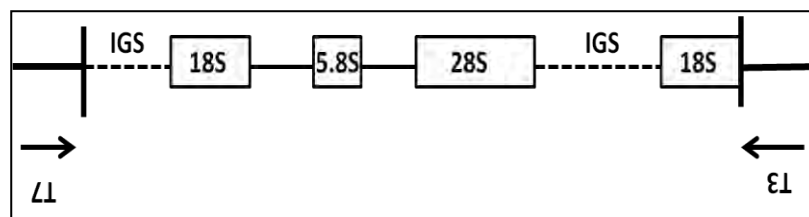
Long PCR με τα ζεύγη εκκινητών T3-IGSR<sub>1</sub> και T7-IGSR<sub>1</sub> θα ήταν δυνατή η εξακρίβωση της διάταξης του ενθέματος του φάγου, η ταυτοποίηση των τμημάτων του rDNA που έχουν ενσωματωθεί καθοδικά του αριστερού βραχίονα (που περιλαμβάνει την περιοχή T3) και ανοδικά του δεξιού βραχίονα (που περιλαμβάνει την περιοχή T7) αντίστοιχα αλλά και η ενίσχυση του IGS.

Με βάση τα παραπάνω θα αναμέναμε μετά από Long PCR με το ζεύγος T3-IGSR<sub>1</sub> να έχει ενισχυθεί ένα τμήμα που θα περιέχει το IGS. Όμως, το γεγονός ότι η PCR απέδωσε προϊόν με το ζεύγος T7-IGSR<sub>1</sub>, μαρτυρά ότι στο φάγο B18S<sub>1</sub>1 το ένθεμα του έχει τοποθετηθεί σε ανάποδη διάταξη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.4.

Αντίστοιχα, για να εξακριβωθεί η διάταξη και στο φάγο B18S<sub>1</sub> 2, μετά από PCR με το ζεύγος εκκινητών T3-18SF<sub>1</sub> ενισχύθηκε τμήμα DNA μεγέθους 1900bp που επιβεβαιώνει ότι και σ' αυτόν το φάγο, το DNA-ένθεμα έχει τοποθετηθεί σε αντίστροφη διάταξη, με το γονίδιο του 18S να βρίσκεται δίπλα στο σημείο του φάγου όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής T3 (Εικόνα 5.3)

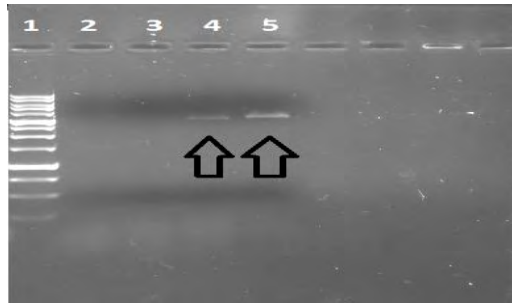


Εικόνα 5.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR με τη χρήση των πολυμερασών High Fidelity (διαδρομές 1-6) και Phusion (διαδρομές 8-13) και των ζευγών εκκινητών T3-IGSR<sub>1</sub> (διαδρομές 1-3, 8-10) και T7-IGSR<sub>1</sub> (διαδρομές 4-6, 11-13)



Εικόνα 5.3 Ένα πιθανό μοντέλο της διάταξης του ενθέματος των φάγων B18S<sub>1</sub>1 και B18S<sub>1</sub>2

Με το ζεύγος 28SF<sub>2</sub>-IGSR<sub>1</sub> ενισχύθηκε ένα τμήμα μεγέθους 3.4kb στο φάγο B18S<sub>1</sub> 2 και σε γονιδιωματικό DNA *B. oleae* (Εικόνα 5.4). Λαμβάνοντας υπόψιν τις θέσεις υβριδοποίησης που των εκκινητών 28SF<sub>2</sub> και IGSR<sub>1</sub> στα ριβοσωμικά γονίδια του δάκου (Εικόνα 4.1 & 4.2), φαίνεται ότι το τμήμα που ενισχύθηκε περιέχει ολόκληρη την περιοχή του IGS. Γι' αυτό το λόγο το προϊόν ενίσχυσης του γονιδιωματικού DNA με τους εκκινητές 28SF<sub>2</sub>-IGSR<sub>1</sub> χρησιμοποιήθηκε απευθείας, χωρίς να κλωνοποιηθεί σε φορέα, για ανάλυση της πρωτοδιάταξης του. Τελικά, ο καθορισμός της αλληλουχίας του δεν ήταν επιτυχής για λόγους που θα αναλυθούν παρακάτω στη συζήτηση.

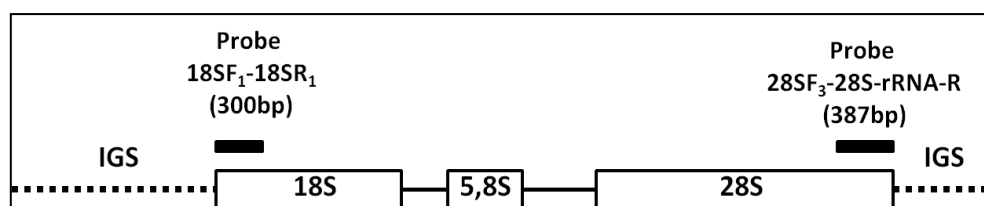


**Εικόνα 5.4** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών 28SF<sub>2</sub>-IGSR<sub>1</sub> και της πολυμεράσης KAPA HIFI. Στις διαδρομές 4 & 5 διακρίνονται τα προϊόντα ενίσχυσης στο φάγο B18S<sub>1</sub> 2 και σε γονιδιωματικό DNA *B. oleae* αντίστοιχα.

## 5.2 Υβριδοποίηση κατά Southern για τον εντοπισμό του IGS

### 5.2.1 Δημιουργία και σήμανση ανιχνευτών

Για την περαιτέρω ανάλυση των ενθεμάτων των υπό μελέτη φάγων, πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern. Ως ανιχνευτές επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν τα προϊόντα της PCR που ενισχύθηκαν με τα ζεύγη εκκινητών 18SF<sub>1</sub>-18SR<sub>1</sub> και 28SF<sub>3</sub>-28SrRNA-R. Τα τμήματα 300bp και 387bp που προέκυψαν από κάθε αντίδραση αντίστοιχα, απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και ποσοτικοποιήθηκαν ώστε να σημανθούν στη συνέχεια με τη διαδικασία που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.3.2. Η επιλογή των ανιχνευτών βασίστηκε στο ότι υβριδοποιούνται στο 5' άκρο του 18S και στο 3' άκρο του 28S αντίστοιχα (Εικόνα 5.5), δηλαδή στα σημεία τα οποία βρίσκονται εκατέρωθεν του IGS. Τελικά, χρησιμοποιήθηκε μόνο ο ανιχνευτής για το 18S, καθώς με τα ζεύγη εκκινητών του 28S δεν είχε παρατηρηθεί ενίσχυση στους υπό μελέτη φάγους (βλέπε υποκεφάλαιο 5.2.1), αλλά μόνο σε δείγμα από γονιδιωματικό DNA *B. oleae*.

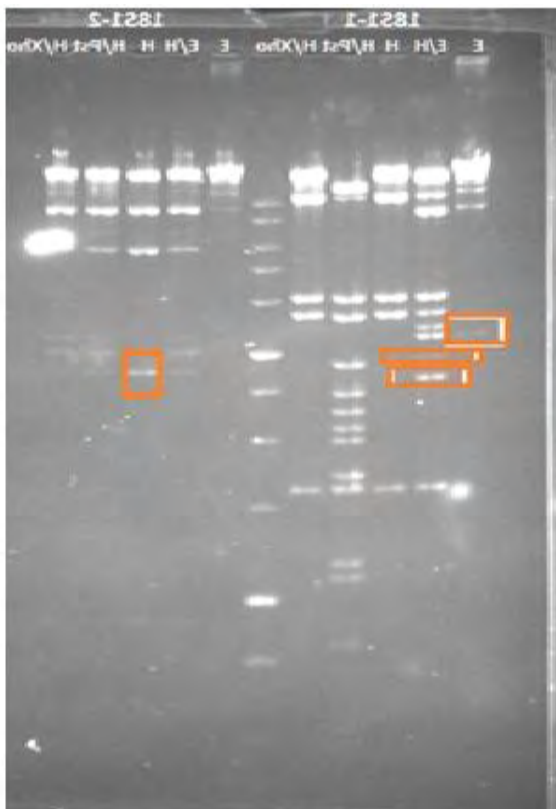


**Εικόνα 5.5** Οι ανιχνευτές (probes) που χρησιμοποιήθηκαν και θέσεις υβριδοποίησής τους στο rDNA.

### 5.2.2 Κατάτμηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού και επώαση με τον ανιχνευτή 18S

Για τον εντοπισμό και την περαιτέρω ανάλυση του IGS, πραγματοποιήθηκαν πέψεις στους φάγους B18S<sub>1</sub> 1 και B18S<sub>1</sub> 2, με τους ακόλουθους συνδυασμούς ενζύμων περιορισμού: EcoRI, EcoRI-HindIII, HindIII, HindIII-PstI και HindIII-Xho. Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν και

πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern με τον ανιχνευτή 18S. Ύστερα από την εμφάνιση του σήματος της υβριδοποίησης, παρατηρήθηκε ότι με τον ανιχνευτή 18S υβριδοποιήθηκαν ένα τμήμα με άκρα EcoRI μεγέθους περίπου 3.2kb, ένα τμήμα DNA με άκρα EcoRI-HindIII μεγέθους περίπου 3.0kb και ένα τμήμα με άκρα EcoRI-HindIII μεγέθους περίπου 2.5kb σε σύγκριση με το μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους, στο φάγο 18S<sub>1</sub> 1 και ένα τμήμα με άκρα HindIII μεγέθους 2.6kb στο φάγο B18S<sub>1</sub> 2 . Τα προϊόντα των πέψεων και τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης φαίνονται στις εικόνες 5.6 και 5.7 αντίστοιχα.



*Εικόνα 5.6 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων με τα ένζυμα περιορισμού. Σε κόκκινοπλαίσιο διακρίνονται τα τμήματα που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 18S*

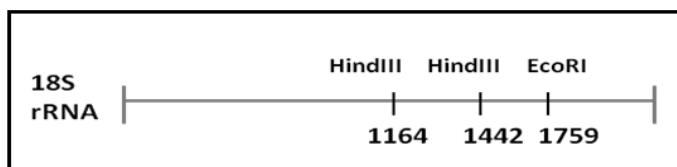


*Εικόνα 5.7 Τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης της μεμβράνης με τον ανιχνευτή 18S. Στην πρώτη, στη δεύτερη και στην ένατη διαδρομή από αριστερά διακρίνονται τα τμήματα που υβριδοποιήθηκαν με τον ανιχνευτή*

Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είναι γνωστή η αλληλουχία των ριβοσωμικών γονιδίων (Λυγηρού 2011) και έτσι είναι δυνατόν να ερμηνευθούν τα παραπάνω αποτελέσματα, λαμβάνοντας υπόψη της θέσεις αναγνώρισης για ένζυμα περιορισμού στο rDNA του δάκου. Στην εικόνα 5.8 φαίνονται οι θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού στο γονιδιακό τόπο του 18S.

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε υβριδοποιούνταν στις πρώτες 300 βάσεις του 5' άκρου του 18S. Στο 18S το μέγεθος του οποίου είναι 1960bp υπάρχει μια θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού EcoRI στις 1759bp.

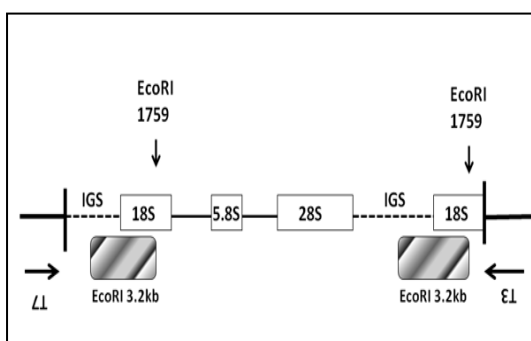
Συνεπώς, το τμήμα μεγέθους 3.2kb με άκρα EcoRI θα περιλαμβάνει την περιοχή αυτή μεγέθους 1759 βάσεων του 18S (στην οποία εντοπίζεται και η περιοχή υβριδοποίησης του ανιχνευτή) καθώς και ένα τμήμα ανοδικά του 18S μεγέθους περίπου 1400bp στο εσωτερικό του οποίου υπάρχει μια θέση αναγνώρισης του EcoRI.



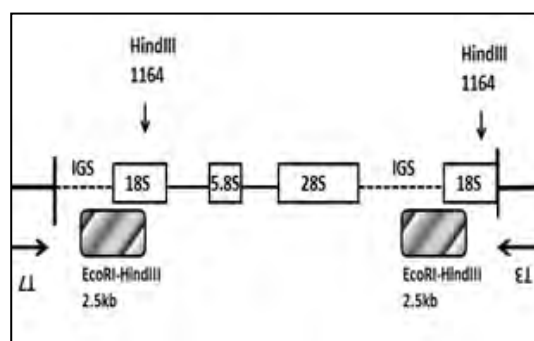
*Εικόνα 5.8 Οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού HindIII και EcoRI στο γονιδιακό τόπο του 18S*

Με βάση την ίδια προσέγγιση, στο 18S υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης του HindIII, στις 1164bp και στις 1442bp. Τα τμήματα DNA με άκρα EcoRI-HindIII επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μιας θέσης αναγνώρισης EcoRI στο εσωτερικό του IGS, καθώς με βάση την αλληλουχία του 18S ύστερα από διπλή πέψη με EcoRI-HindIII προκύπτει ή ένα τμήμα 317bp ανάμεσα στις θέσεις 1442 και 1759 ή ένα τμήμα μεγέθους 595bp (σε περίπτωση που έχει λάβει χώρα μερική πέψη και δεν έχει πεπτεί η θέση των 1442bp). Τα τμήματα αυτά βρίσκονται καθοδικά στο 18S και κατά συνέπεια δεν περιέχουν τη θέση υβριδοποίησης του ανιχνευτή. Άρα, το τμήμα μεγέθους 2.5kb με άκρα EcoRI-HindIII εκτείνεται από τη θέση 1164 και φτάνει έως και εσωτερικά του IGS. Παρόμοια, το τμήμα μεγέθους 3kb λόγω εκτείνεται από τη θέση 1442 του 18S έως εσωτερικά του IGS και λόγω της αχνότερης έντασης που παρουσιάζει σε σχέση με τα άλλα δύο τμήματα ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα μερικής πέψης. Η ζώνη μεγέθους 2.6kb με άκρα HindIII στο φάγο B18S<sub>1</sub> 2 περιλαμβάνει ένα τμήμα 1164 βάσεων (που περιέχει και το σημείο υβριδοποίησης του ανιχνευτή) και ένα τμήμα ανοδικά του 18S μεγέθους περίπου 1500bp. Τα σημεία πάνω στο ένθεμα του φάγου που μπορεί να βρίσκεται το τμήμα EcoRI 3.2kb και το τμήμα EcoRI-HindIII απεικονίζονται στις εικόνες 5.9 και 5.10 αντίστοιχα.

Τα προϊόντα που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς με κατάλληλα άκρα ώστε να αναλυθεί η πρωτοδιάταξή τους. Τα αποτελέσματα ωστόσο της αλληλούχησης ήταν δεν ήταν επιτυχή, για λόγους που σχολιάζονται στη συζήτηση.



*Εικόνα 5.9 Ο πιθανός εντοπισμός του τμήματος EcoRI (3.2kb) στο φάγο B18S<sub>1</sub>1*



*Εικόνα 5.10 Ο πιθανός εντοπισμός του τμήματος EcoRI-HindIII (2.5kb) στο φάγο B18S<sub>1</sub>1. Το τμήμα 2.6kb HindIII μπορεί να εντοπίζεται επίσης στις ίδιες περιοχές στο φάγο B18S<sub>1</sub>.*



## 6 Συζήτηση

---

Ο δάκος αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα έντομα-παράσιτα που πλήττουν τις ελαιοκαλλιέργειες. Η ζημιά που προκαλεί ετησίως ανέρχεται στο 30-50% της παραγωγής και επηρεάζει την ποιότητα του ελαιόλαδου και των καρπών της ελιάς.

Για την αποτελεσματικότερη όμως αντιμετώπιση του δάκου είναι απαραίτητο να κατανοηθεί η εξελικτική του προέλευση καθώς και η σχέση του με κοντινούς εξελικτικά οργανισμούς.

Η εξάπλωση του δάκου είναι συνδεδεμένη με εκείνη της ελιάς, η οποία ευδοκιμεί κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου, στην Αφρική, σε περιοχές της Ασίας και προσφάτα στην Καλιφόρνια. Η προσαρμογή του εντόμου στα περιβάλλοντα αυτά, έχει οδηγήσει αφενός στη δημιουργία υποπληθυσμών (population structuring) όπως έχει αποδειχθεί μετά από ανάλυση με χρήση μικροδορυφορικών δεικτών (Augoustinos et al. 2005, Zygouridis et al. 2009) και αφετέρου σε πιθανά φαινόμενα ειδογένεσης κυρίως σε κάποιες περιοχές της Αφρικής. Ως αποτέλεσμα τέτοιων φαινομένων μπορούν να ερμηνευθούν οι περιπτώσεις των ειδών *B. tunroi* στην Κένυα και *B. biguttula* στη νότια Αφρική (Copeland et al. 2004). Έτσι, με την εύρεση μοριακών δεικτών θα είναι εφικτή η αποτελεσματικότερη ταυτοποίηση ατόμων αυτών των συμπλεγμάτων ειδών (complex species) όπως επίσης και η διάκριση του δάκου από άλλα συγγενικά του είδη και υποείδη τα οποία δεν διαχωρίζονται βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους .σε αναπτυξιακά στάδια όπως αυτό της προνύμφης ή σε επίπεδο ενηλίκων.

Μια περιοχή που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης είναι η μεταβλητή περιοχή των διαγονιδιακών διαστημάτων των ριβοσωμικών γονιδίων που διαφέρει ως προς την αλληλουχία και το μέγεθος ακόμα και ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους. Συγκεκριμένα, η περιοχή του IGS έχει χρησιμοποιηθεί για την διάκριση υποειδών του κουνουπιού *Anopheles* μετά από ανάλυση κατά Southern (reverse Southern) με τη χρήση ιχνηθετών που υβριδοποιούνται εξειδικευμένα στις μεταβλητές περιοχές του rDNA συγκεκριμένων υποειδών (Perera et al. 1998). Αντίστοιχες προσεγγίσεις βασίστηκαν στην ενίσχυση μέσω PCR περιοχών του IGS, το οποίο λόγω της μεγάλης παραλακτικότητάς του, είναι χαρακτηριστικό για το κάθε είδος (Scott et al. 2008). Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τον εντοπισμό της αλληλουχίας του IGS σε φάγους που είχαν επιλεγεί σε προηγούμενες εργασίες του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, αλλά και σε γονιδιωματικό DNA δάκου. Γι' αυτόν το λόγο, πραγματοποιήθηκαν PCR ώστε να ταυτοποιηθούν οι φάγοι που έχουν στο εσωτερικό τους τμήματα από το 5' άκρο του 18S ή και από το 3' άκρο του 28S, που βρίσκονται εκατέρωθεν του IGS. Από τη διαδικασία αυτή, προέκυψαν δύο φάγοι που περιείχαν τμήμα του 5' άκρου του 18S. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε σ' αυτούς PCR μεγάλο μήκος για να διαπιστωθεί η ύπαρξη του διαγονιδιακού διαστήματος IGS στο εσωτερικό τους. Επιπλέον, με το ζεύγος των εκκινητών 28SF<sub>2</sub>-IGSR<sub>1</sub> ενισχύθηκε ένα τμήμα 3.4kb που σύμφωνα με τις θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών, υποδηλώνει την ύπαρξη του IGS. Το τμήμα αυτό δυνητικά αντιστοιχεί σε ολόκληρο το IGS. Συνεπώς σύμφωνα από τα δεδομένα

αυτά είναι εφικτή μια πρώτη εκτίμηση του συνολικού του μεγέθους της αλληλουχίας του IGS στο δάκο. Η εκτιμώμενη τιμή εμπίπτει στα όρια που έχουν καθοριστεί για τα μεγέθη του IGS στη *Drosophila melanogaster* (3.3-11.6kb, Mateos & Markow 2005) και στα κουνούπια *Anopheles sinensis* (3.2-4.3kb, Whang et al. 2002) και *Anopheles albopictus* (4.7kb, Baldridge & Fallon 1992).

Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τους παραπάνω φαγικούς κλώνους πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern με ανιχνευτή συμπληρωματικό προς το 5' άκρο του 18S rRNA, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για τη συστοιχία του rDNA βρίσκεται καθοδικά από το IGS. Ύστερα από πέψη με ένζυμα περιορισμού ανιχνεύθηκαν τέσσερα τμήματα DNA, που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 18S. Χάρη στη γνώση της αλληλουχίας των ριβοσωμικών γονιδίων καθώς και της θέσης υβριδοποίησης του ανιχνευτή, φαίνεται ότι τα τμήματα που προέκυψαν περιέχουν και μέρος της περιοχής του IGS. Έτσι, κλωνοποιήθηκαν σε ειδικούς πλασμιδιακούς φορείς, ώστε τελικά να αλληλουχηθούν. Επιπλέον, επιχειρήθηκε και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων των PCR μεγάλου μήκους με μήτρα το γονιδιωματικό DNA του δάκου.

Η αλληλούχηση των τμημάτων που ανιχνεύθηκαν κατά την υβριδοποίηση ωστόσο δεν απόφερε αποτέλεσμα. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στη μη καθαρότητα του δείγματος ή τη χαμηλή συγκέντρωσή του, καθώς χρησιμοποιήθηκε απευθείας το προϊόν από την PCR χωρίς να κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα. Συνεπώς, συνίσταται μελλοντικά η βελτιστοποίηση της αντίδρασης ώστε να ενισχυθεί τελικά το αναμενόμενο προϊόν στη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση και να εξασφαλιστεί τελικά η αποτελεσματική αλληλούχησης του. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι αποτέλεσμα δευτεροταγούς δομής με ιδιαίτερη δυσκολία ανάγνωσης κατά την αντίδραση αλληλούχησης. Όπως είναι ήδη γνωστό, το IGS περιέχει στην αλληλουχία του αυξημένο αριθμό εσωτερικών επαναλήψεων (Grimaldi & DiNocera 1990). Οι επαναλήψεις αυτές είναι δυνατόν να σχηματίζουν μεταξύ τους δευτεροταγείς δομές που εμποδίζουν την πρόοδο της αλληλούχησης προκαλώντας πρόωρη λήξη της ανάγνωσης πριν από το σημείο όπου έχει σχηματιστεί η δευτεροταγής δομή.

Συνολικά, η συνεισφορά της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγκειται στον εντοπισμό δύο φαγικών κλώνων των οποίων τα ενθέματα περιέχουν ενδείξεις για την ύπαρξη των διαγονιδιακών διαστημάτων IGS. Έτσι, παρέχεται υλικό και κατευθύνσεις για μια πιο στοχευμένη προσέγγιση της διερεύνησης της δομής του IGS, χωρίς να χρειάζεται η εκ νέου διαλογή φαγικών βιβλιοθηκών και η αναζήτηση ή ο σχεδιασμός ζευγών εκκινητών για την τέλεση PCR μεγάλου μήκους.

Μελλοντικές προσεγγίσεις θα πρέπει να εστιάσουν αφ' ενός στη χρήση νέων πλασμιδιακών φορέων και αφ' ετέρου στην ανάκτηση μεγαλύτερης συγκέντρωσης των τμημάτων που πρόκειται να κλωνοποιηθούν. Τέλος, για να ολοκληρωθεί η προσέγγιση του καθορισμού της δομής του IGS θα ήταν χρήσιμη η εύρεση στους υπάρχοντες φάγους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική, περιοχών του 3' άκρου του 28S έτσι ώστε να μπορεί να ταυτοποιηθεί μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας του IGS. Στο πλαίσιο αυτό, συνίσταται η εκ νέου ανάλυση κατά Southern, με τη χρήση του ανιχνευτή που αναγνωρίζει το 3' άκρο του 28S rRNA, το οποίο βρίσκεται ανοδικά του IGS, ώστε να εντοπιστούν επιπλέον δυνητικά τμήματα της περιοχής αυτής αλλά και του ETS, τα οποία θα αναλυθούν περαιτέρω.

## 7 Βιβλιογραφία

---

- **Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2002)**, Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes* vol. 2 pp. 278–80
- **Augustinos AA, Mamuris Z, Stratikopoulos EE, D'Amelio S, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2005)**, Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*. Vol. 125 pp. 231-41.
- **Besnard G, Henry P, Wille L, Cooke D, Chapuis E (2007)**, The origin of the invasive olives (*Olea europaea* L., Oleaceae). *Heredity* Vol. 99 pp. 608–619
- **Baldrige GD, Fallon AM (1992)**, Primary structure of the ribosomal DNA intergenic spacer from the mosquito, *Aedes albopictus*. *DNA and Cell Biology* 1992 Vol. 11 pp. 51-59.
- **Cavanaugh AH, Gokal PK, Lawther RP, Thompson EA Jr (1984)**, Glucocorticoid inhibition of initiation of transcription of the DNA encoding rRNA (rDNA) in lymphosarcoma P1798 cells. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of United States of America* Vol. 81 pp. 718-721
- **Cavanaugh AH, Thompson EA Jr (1985)**, Hormonal regulation of transcription of rDNA: glucocorticoid effects upon initiation and elongation in vitro. *Nucleic Acids Research* Vol. 13 pp. 3357-3369
- **Chao Y, Pellegrini M (1993)**, In vitro transcription of *Drosophila* rRNA genes shows stimulation by a phorbol ester and a serum. *Molecular Cellular Biology* Vol. 13 pp. 934-941
- **Chomczynski P (1992)**, Solubilization of formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Sciences*, 81:1991-3792.
- **Cluster PD, Marinkovic D, Allard RW, Ayala FJ (1987)**, Correlations between development rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes, and adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of United States of America* Vol. 84 pp. 610-614
- **Coen ES, Thoday GM, Dover G (1982)**, Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature* vol. 295 pp.564–568
- **Copeland RS, White IM, Okumu M, Machera P, Wharton RA (2004)**, Insects Associated with Fruits of the Oleaceae (Asteridae, Lamiales) in Kenya, with Special Reference to the Tephritidae (Diptera). *Bishop Museum Bulletin in Entomology* Vol. 12 pp. 135–164
- **Dover G (1994)**, Concerted evolution, molecular drive and natural selection. *Current Biology* Vol. 4 pp. 1165-1166
- **Drew RAI, Raghu S, Halcoop P (2008)**, Bridging the morphological and biological species concepts: studies on the *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in South-east Asia. *Biological Journal of the Linnean Society*, Volume 93, Issue 2, pages 217–226,
- **Drosopoulou E, Nakou I, Sichova J, Kubickova S, Marec F, Mavragani-Tsipidou P (2012)**, Sex chromosomes and associated rDNA form a heterochromatic network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* Vol. 140 pp. 169–180
- **Eickbush TH, Eickbush DG (2007)**, Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA genes. *Genetics* Vol. 175 pp. 477-485
- **Elder JF Jr, Turner BJ (1995)**, Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology* Vol. 70 pp. 297–320
- **Gillespie JJ, Johnston JS, Cannone JJ, Gutell RR (2006)**, Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera):

structure, organization, and retrotransposable elements. *Insect Molecular Biology* Vol. 15 pp. 657-686

- **Gillings MR, Frankham R, Speirs J, Whalley M. (1987)**, X-Y Exchange and the Coevolution of the X and Y rDNA Arrays in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* Vol. 116 pp. 241-251
- **Gorokhova E, Dowling TE, Weider LJ, Crease TJ, Elser JJ (2002)**, Functional and ecological significance of rDNA intergenic spacer variation in a clonal organism under divergent selection for production rates. *Proceedings Biological Sciences / The Royal Society* Vol. 269 pp. 2373-2379
- **Grimaldi G, Di Nocera PP (1988)**, Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of United States of America* Vol. 85 pp. 5502-5506
- **Grimaldi G, Fiorentini P, Di Nocera PP (1990)**, Spacer promoters are orientation-dependent activators of pre-rRNA transcription in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* Vol. 10 pp. 4667-4677
- **Han HY, Ro KE (2009)**, Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta: Diptera): new insight from combined analysis of the mitochondrial 12S, 16S, and COII genes. *Molecules and Cells*. Vol. 27 pp. 55-66..
- **Haneda T, Mc Dermott PJ (1991)**, Stimulation of ribosomal RNA synthesis during hypertrophic growth of cultured heart cells by phorbol ester. *Molecular Cellular Biochemistry* Vol. 104 pp. 169-177
- **Hill LA, Davis JB, Hapgood G, Whelan PI, Smith GA, Ritchie SA, Cooper RD, Van den Hurk AF (2008)**, Rapid Identification of *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris*, and *Aedes aegypti* Life Stages Using Real-time Polymerase Chain Reaction Assays. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* Vol. 79 pp. 866-875
- **Hillis, DM, Dixon MT (1991)**, Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, Vol.66, No 4., pp.411-453.
- **Hurst LB, Smith NGC (1998)**, The evolution of concerted evolution. *Proceedings of the Royal Society* Vol. 265 pp. 121-127
- **Iannotta N, Noce ME, Ripa V, Scalercio S, Vizzarri V (2007)**, Assessment of susceptibility of olive cultivars to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thüm.) Zachos & Tzav.-Klon. attacks in Calabria (Southern Italy). *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, Vol.42 pp.789-93.
- **Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N (2011)**, Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6. *Science* Vol. 334 no. 6058 pp. 941-948
- **Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE and Cech TR (1982)**, Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell* Vol. 31 pp. 147-157
- **Kwon OY, Ishikawa H (1992)**, Unique structure in the intergenic and 5' external transcribed spacer of the ribosomal RNA gene from the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *European Journal of Biochemistry / FEBS* Vol. 206 pp. 935-940
- **Larson DE, Xie W, Glibetic M, O'Mahony D, Sells BH, Rothblum LI (1993)**, Coordinated decreases in rRNA gene transcription factors and rRNA synthesis during muscle cell differentiation. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of United States of America* Vol. 90 pp. 7933-7936
- **Liao DQ (1999)**, Concerted Evolution: molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics* Vol. 64 pp. 24-30

- **Lieb M.** (1953), Studies on lysogenation in *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol. 18 pp. 71-73.
- **Long, EO, I. B. Dawid IB(1980)**, Repeated genes in eukaryotes. Annual Review of Biochemistry Vol. 49 pp. 727–764
- **Mateos M, Markow TA (2005)**, Ribosomal intergenic spacer (IGS) length variation across the Drosophilinae (Diptera : Drosophilidae). BioMed Central Evolutionary Biology 5: 46
- **Mkize N (2008)**, Insect Pests of Cultivated and Wild Olives, and Some of Their Natural Enemies, in the Eastern Cape, South Africa. Rhodes University, January 2008, pp. 2-4, 46-48
- **Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F (2003)**, The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. Insect Molecular Biology Vol. 12 pp.605-11
- **Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005)**, Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Molecular Ecology Vol. 14 pp. 2729-38.
- **Nardi F, Carapelli A, Boore JL, Roderick GK, Dallai R, Frati F (2010)**, Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes. Molecular Phylogenetics and Evolution Vol. 57 pp. 678–686
- **Olsen GJ, Woese CR (1993)**, Ribosomal RNA: a key to phylogeny. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology Vol. 1 pp. 113-123
- **Pererra OP, Cockburn AF, Mitchell SE, Conn J, Seawright JA (1998)**, Species-specific repeat units in the intergenic spacer of the ribosomal RNA cistron of *Anopheles aquasalis* curry. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Vol. 59 pp. 673-678
- **Polanco C, Gonzalez AI, Dover GA (2000)**, Patterns of Variation in the Intergenic Spacers of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Support a Model for Genetic Exchanges During X-Y Pairing. Genetics Vol. 155 pp. 1221-1229
- **Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ (2002)**, The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. Genome Vol. 46 pp. 48-50
- **Rabl J, Leibundgut M, Ataide SF, Haag A, Ban N (2010)**, Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. Science Vol. 331 no. 6018 pp. 730-736
- **Rice RE, Phillips PA, Stewart-Leslie J, Sibbert GS (2003)**, Olive fruit fly populations measured in central and southern California. California Agriculture Vol. 57 pp. 122–27
- **Ritossa FM, Atwood KC, Spiegelman S (1966)**, A molecular explanation of the bobbed mutants of *Drosophila melanogaster* as partial deficiencies of “ribosomal” DNA. Genetics Vol. 54 pp. 819-834
- **Schwartz M (1967)**, Sur l’existence chez *Escherichia coli* K12 d’une régulation commune à la biosynthesis des récepteurs du bactériophage  $\lambda$  et au métabolisme du maltose. Annales de l’Institut Pasteur Vol. 113 pp.685-704
- **Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993)**, Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Vol. 49 pp. 520-529
- **Smith PT, Kambhampati S, Armstrong KA (2003)**, Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution Vol. 26 pp. 8-17
- **Szmelcman S, Hofnung M (1975)**, Maltose transport in *Escherichia coli* K-12: involvement of the bacteriophage lambda receptor. Journal of Bacteriology Vol. 124 pp. 112-118
- **Tamendjari A, Angerosa F, Mettouchi S, Bellal MM (2009)**, The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*)

- on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil. *Grasas y Aceites*, Vol 60, No 5 (2009)
- **Tautz D, Hancock JM, Webb DA, Tautz C, Dover GA (1988)**, Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*. 1988 Vol. 5 pp.366-76.
  - **Templeton AR, Crease TJ, Shah F (1985)**, The molecular through ecological genetics of abnormal abdomen in *Drosophila mercatorum*. *Genetics* Vol. 111 pp. 805-818
  - **Vallet SM, Brudnak M, Pellegrini M, Weber HW (1993)**, In vivo regulation of rRNA transcription occurs rapidly in non dividing and dividing *Drosophila* cells in response to a phorbol ester and serum. *Molecular Cellular Biology* Vol. 13 pp. 928-933
  - **Warner JR (1989)**, Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae* . *Microbiological Reviews* Vol. 53 pp. 256-271
  - **Weider LJ, Glen KL, Kyle M, Elser JJ (2004)**, Associations among ribosomal (r)DNA spacer length, growth rate, and C : N : P stoichiometry in the genus *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* vol. 49 pp. 17-23
  - **Whang IJ, Jung J, Park JK, Min GS, Kim W (2002)**, Intragenomic length variation of the ribosomal DNA intergenic spacer in a malaria vector, *Anopheles sinensis*. *Molecules and Cells*. Vol. 14 pp. 158-62.
  - **White IM (2006)**, Taxonomy of the *Dacina* (Diptera: Tephritidae) of Africa and the Middle East. *Entomological Society of Southern Africa*
  - **Williams SM, Kennison AJ, Robbins LG, Strobeck C (1989)**, Reciprocal recombination and the evolution of the ribosomal gene family of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* Vol. 122 pp. 617–624.
  - **Williams SM, DeSalle R , Strobeck C (1985)**, Homogenization of Geographical Variants at the Nontranscribed Spacer of rDNA in *Drosophila mercatorum*. *Molecular Biology and Evolution* Vol. 2 pp.338-346
  - **Yamamoto KK, Pellegrini M (1990)**, Ribosome subunit to polysome ratios affect the synthesis of rRNA in *Drosophila* cells. *Biochemistry* Vol. 50 pp. 11029-11032
  - **Yokoyama VV, Miller GT (2007)**, Olive fruit fly biology and cultural control practices in California. *Integrated Projection of Olive Crops Bulletin* 30 pp. 263-269
  - **Zahradka P, Larson DE, Sells BH (1991)**, Regulation of ribosome biogenesis in differentiated rat myotubules. *Molecular and Cellular Biochemistry* Vol. 104 pp. 189-194
  - **Zohary D (1994)**, The wild genetic resources of the cultivated olive. *Acta Horticulturae* Vol. 356 pp. 62–65
  - **Zygouridis NE, Augustinos AA, Zalom FG, Mathiopoulos KD (2009)**, Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity (Edinb)* Vol. 102 pp. 402-12
  - **Lewin B (2004)**, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και σια Ο.Ε., *Genes VIII*, Πρώτος Τόμος, κεφ. 4, σελ. 140-148
  - **Tymozcko JL, Berg JM, Stryer L (2012)**, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, *Βιοχημεία*, κεφ. 28 σελ. 879-893, κεφ.29 σελ. 924-935
  - **Αλαχιώτης Σ.Ν. (2007)**, Εκδοτικός Οίκος Α. Α. Λιβάνη, *Εισαγωγή στην Εξέλιξη*, κεφ. 6 σελ. 221-258
  - **Λυγηρού Β (2011)**, Κλωνοποίηση του γονιδιακού τόπου του ριβωσωμικού RNA στο δάκο της ελιάς, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας
  - **Σταυρόπουλος Κ (2012)**, Ανάλυση της οργάνωσης του ριβωσωμικού RNA του δάκου της ελιάς, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας