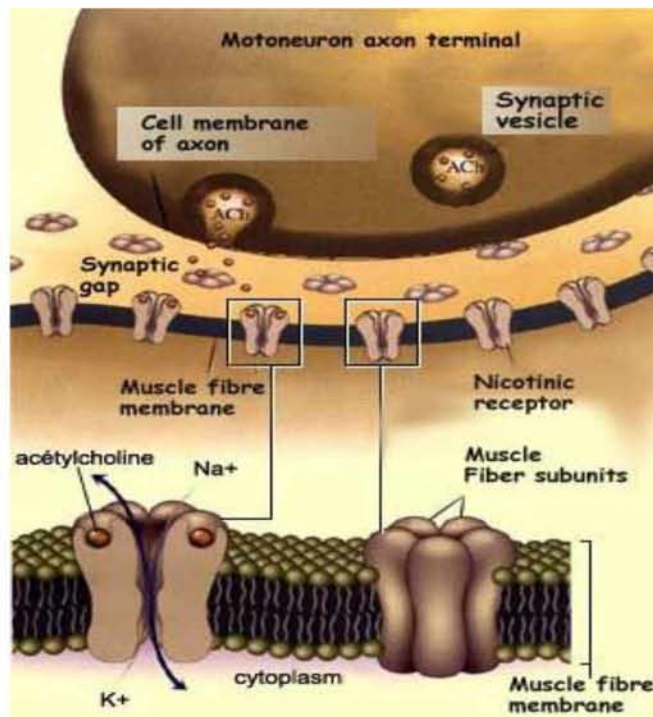




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ ΣΤΟ ΝΑΤΟΥΡΑΛΥΤΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ SPINOSAD

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΜΑΡΙΑ- ΕΛΕΝΗ



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2010

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

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ ΣΤΟ ΝΑΤΟΥΡΑΛΥΤΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ SPINOSAD**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΜΑΡΙΑ- ΕΛΕΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2010**

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής καθηγητής Μοριακής
Βιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αυγουστίνος Αντώνης

Καθηγητής Π.Δ. 407

Καρπούζας Δημήτριος

Επίκουρος καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Έντομα.....	7
1.2. Διαχείριση επιβλαβών εντόμων.....	8
1.2.1 Μη χημικές μεθόδους.....	8
1.2.2 Χημικές μεθόδους.....	9
1.2.2.1 Κατηγορίες εντομοκτόνων.....	10
1.2.2.2 Srinopsad.....	15
1.3 Νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης.....	17
1.3.1 Νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης των εντόμων.....	18
1.4 Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα.....	20
1.4.1 Ανθεκτικότητα στο srinopsad.....	21
1.5 <i>Bactrocera oleae</i> , ο δάκος της ελιάς.....	22
1.6 Σκοπός.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	24
2.2 Ηλεκτροφόρηση.....	26
2.3 Ανάκτηση μορίων του DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	28
2.4 Κατακρήμνηση DNA με αιθανόλη.....	29
2.5 Εκχύλιση DNA με φαινόλη- χλωροφόρμιο.....	30
2.6 Κατάτμηση DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	31
2.7 Δημιουργία πλασμιδιακού με άρκα θυμίνης.....	32
2.8 Αντίδραση σύνδεσης DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	34
2.9 Παρασκευή Δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.....	34
2.10 Ηλεκτροδιάτρηση.....	35
2.11 Δημιουργία stock γλυκερόλης και ανάκτηση.....	37
2.12 Διάκριση ανασυνδισμένων και μη ανασυνδισμένων κλώνων.....	38
2.13 Πλασμιδιακή απομόνωση.....	38
2.14 Φαγική λ βιβλιοθήκη.....	40
2.14.1 Επίστρωση φαγικής γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης σε τρυβλία.....	40
2.14.2 Διαλογή βιβλιοθήκης.....	41
2.14.3 Απομονωση φαγικού DNA- γονιδιωματική βιβλιοθήκη.....	42
2.14.4 Απομονωση φαγεμιδίου- cDNA βιβλιοθήκη.....	44
2.15 Δημιουργία ανιχνευτή.....	45
2.16 Σταθεροποίηση του DNA σε ναύλον μεμβράνη.....	46
2.17 Προϋβριδοποίηση.....	47
2.18 Υβριδοποίηση.....	48
2.19 Ανίχνευση σήματος υβριδοποίησης.....	48
2.20 Επεξεργασία αλληλουχιών DNA.....	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

Πρόλογος

Με το τέλος της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα, πρώτα, να ευχαριστήσω τον κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο για την ανάθεση του θέματος της εργασίας μου, καθώς και για τη μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αυγουστίνο Αντώνη και τον κ. Καρπούζα Δημήτριο που αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής και για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της διπλωματικής.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Λέκτορα Π.Δ. 407 κ. Κακάνη Εύη για τη συνεχή καθοδήγηση της τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο όσο και στη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου κ. Τσουμάνη Κωνσταντίνα και τον κ. Ζυγουρίδη Νίκο για την πολύτιμη βοήθεια τους στο πρακτικό μέρος της εργασίας αλλά και την κ. Λούρου Νίκη για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου και την οικογένεια μου για τη στήριξη και την βοήθεια που μου έδωσαν καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου αλλά και σε κάθε στάδιο της ζωής μου.

Περίληψη

Τα έντομα αποτελούν την πιο μεγάλη ομάδα οργανισμών στον πλανήτη γη. Ευδοκίμουν σε κάθε σημείο της γης και διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και τη διατήρηση ολόκληρης της βιομάζας. Υπάρχουν, όμως, και είδη εντόμων τα οποία προκαλούν μεγάλες οικονομικές ζημιές σε χώρες που στηρίζονται στη γεωργία ή στην εξαγωγή αγρονομικών αγαθών. Αυτά τα έντομα θεωρούνται παράσιτα από τους ανθρώπους και πολλοί εντομολόγοι ασχολούνται με τους διάφορους τρόπους διαχείρισης τους, κυρίως με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Με την πάροδο των χρόνων και με τη μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση της κοινωνίας απέναντι σε περιβαλλοντικά προβλήματα, η βιομηχανία προσηλώθηκε στην παραγωγή εντομοκτόνων φιλικότερων προς το περιβάλλον. Σημαντικός αντιπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι το Spinosad, το οποίο δρα στο νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Το spinosad χρησιμοποιείται στην Ελλάδα για την καταπολέμηση του κυριότερου εχθρού της ελιάς, το έντομο *Bactrocera oleae*, από το 2004. Η μακροχρόνια όμως επιλογική δράση του spinosad, όπως είναι φυσιολογικό και παρατηρείται για κάθε συμβατικό εντομοκτόνο, θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου της ελιάς ώστε να διερευνηθεί η μελλοντική πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η απομόνωση υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του εντόμου *Bactrocera oleae* μέσω διαλογής γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης του εντόμου. Η διαλογή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές ενισχυμένες αλληλουχίες του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster*. Η γονιδιωματική περιοχή του α1 νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου της ελιάς που απομονώθηκε με τη διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, παρουσίασε παρόμοια οργάνωση εξονίων και ιντρονίων μεταξύ των εντόμων *Bactrocera oleae* και *Drosophila melanogaster*. Αντίθετα, η απομόνωση πιθανών μεταγράφων του νικοτινικού υποδοχέα με διαλογή της cDNA βιβλιοθήκης κατέδειξε χαμηλή συντήρηση μεταξύ των διάφορων περιοχών του ενζύμου στα δύο έντομα.

Η μοριακή ανάλυση του νικοτινικού υποδοχέα σε ευαίσθητους και ανθεκτικούς φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου θα βοηθήσει στον προσδιορισμό του παράγοντα που ευθύνεται για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας του *Bactrocera oleae* στο spinosad και ίσως οδηγήσει στη δημιουργία ενός μοριακού διαγνωστικού τεστ. Η έγκαιρη πρόβλεψη της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο spinosad σε φυσικούς πληθυσμούς θα βοηθήσει τη λήψη ορθών αποφάσεων όσον αφορά στην επιλογή κατάλληλων εντομοκτόνων ή γενικότερα μεθόδων καταπολέμησης και θα αποτελέσει ουσιαστική συμβολή στη φυτοπροστασία της ελιάς.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

1.1 Έντομα

Τα έντομα αποτελούν την πιο μεγάλη ομάδα οργανισμών στον πλανήτη γη με περισσότερα από 800 000 γνωστά είδη. Συγκεκριμένα αποτελούν το 55% από το σύνολο όλων των ζωντανών οργανισμών που είναι γνωστό μέχρι σήμερα.

Η ομαδοποίηση των εντόμων πιστεύετε ότι άρχισε από τον Αριστοτέλη ο οποίος συμπεριέλαβε τα έντομα ως υποομάδα των ασπόνδυλων. Ανάμεσα στα έντομα τοποθέτησε και τα αρθρόποδα και τα εχινόδερμα. Οι μελετητές του Αριστοτέλη, όμως, αμφισβήτησαν την ομαδοποίηση αυτή εκτός από το σημείο του διαχωρισμού φτερωτών και μη φτερωτών εντόμων. Η επόμενη προσπάθεια για ομαδοποίηση έγινε μετά από 2000 χρόνια περίπου από τον Αλντροβάνο το 1602, ο οποίος διαχώρισε τα επονομαζόμενα ως «έντομα» σε επίγεια και υδρόβια ανάλογα με την παρουσία φτερών και τον αριθμό των ποδιών (Gillott, 1995). Το 1669 από τον Swammerdam έγινε ο πρώτος διαχωρισμός των εντόμων με βάση τις αλλαγές που υπόκεινται κατά την ανάπτυξη. Μεταξύ το 1735 και 1758 ο Λιναίος διαχώρισε τις 8 κατηγορίες εντόμων: Άπτερα, Ορθόπτερα, Πλατύπτερα, Κολεόπτερα, Ημίπτερα, Λεπιδόπτερα, Δίπτερα και Υμενόπτερα (Linaius, 1735). Κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα ένας μεγάλος αριθμός επιστημόνων πρότειναν τη δική τους άποψη για το πώς πρέπει να διαχωριστούν τα έντομα. Η πλειοψηφία υποστήριξε ότι πρέπει να διαχωριστούν με βάση την εμφάνιση και τη δομή των φτερών τους ενώ άλλοι, όπως ο Leach το 1815, υποστήριξαν ότι ο διαχωρισμός πρέπει να γίνει με βάση τη μεταμόρφωση των εντόμων. Η βάση των σημερινών συστημάτων ομαδοποίησης είναι στηριγμένη στον Brauer (1885) ο οποίος επηρεάστηκε από τους κανόνες της συγκριτικής ανατομίας και παλαιοντολογίας που καθορίστηκαν από το γάλλο ζωολόγο Cuvier και από την εργασία του Δαρβίνου (Gillott, 1995).

Τα έντομα ευδοκιμούν σε κάθε σημείο της γης και διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και τη διατήρηση ολόκληρης της βιομάζας. Τα έντομα αποτελούν τους πρώτους επικονιαστές των φυτών και η αναπαραγωγή τους είναι μια αμοιβαία συνεισφορά μεταξύ των εντόμων και των φυτών. Καθώς τα έντομα συλλέγουν νέκταρ από διάφορα φυτά του ίδιου είδους, μεταφέρουν τη γύρη από το ένα φυτό στο άλλο (Smith, 1991). Αυτό αυξάνει κατακόρυφα την ικανότητα των φυτών για διασταυρούμενη γονιμοποίηση διατηρώντας και βελτιστοποιώντας την εξελικτική προσαρμοστικότητα τους (Sanderson et al., 2002). Επίσης τα έντομα είναι αναπόσπαστα μέρη στην αλυσίδα διατροφής σπονδυλωτών και ασπόνδυλων. Σε κάποια μέρη της γης χρησιμοποιούνται ως τροφή και από τους ανθρώπους καθώς αποτελούν μεγάλη πηγή πρωτεϊνών ή έχουν στη διατροφή τους προϊόντα των εντόμων όπως είναι το μέλι. Επίσης πολλά

έντομα όπως το σκαθάρι, είχαν σημαντικό θρησκευτικό συμβολισμό σε αρχαίους πολιτισμούς όπως της Αιγύπτου, της Κίνας και της Ελλάδας (Gullan, 2005). Οι αρχαίοι Κινέζοι θεωρούσαν τα τζιτζίκια ως σύμβολο αναγέννησης και αθανασίας.

Υπάρχουν, όμως, και είδη εντόμων τα οποία προκαλούν μεγάλες οικονομικές ζημιές σε χώρες που στηρίζονται στη γεωργία ή στην εξαγωγή αγρονομικών αγαθών (π.χ. τουλίπες). Μπορούν να προκαλέσουν ζημιά σε τροφές και ρούχα καθώς και να μεταφέρουν ασθένειες βλαβερές στον άνθρωπο όπως είναι ο κίτρινος πυρετός, ο οποίος μεταφέρεται από το τσίμπημα των κουνουπιών, ή να αποτελέσουν τα ίδια έντομα καταστροφική ασθένεια σε συγκεκριμένες καλλιέργειες, όπως ο δάκος στο δέντρο της ελιάς (Metclaf, 1994). Αυτά τα έντομα θεωρούνται παράσιτα από τους ανθρώπους και πολλοί εντομολόγοι ασχολούνται με τους διάφορους τρόπους διαχείρισής τους.

1.2 Διαχείριση επιβλαβών εντόμων

Οι μέθοδοι διαχείρισης παρασιτικών εντόμων εξελίχθηκαν κατά τη διάρκεια των χρόνων και μπορούν να διαχωριστούν σε μη χημικές και χημικές μέθοδοι. Οι μοντέρνες μέθοδοι περιλαμβάνουν την άμεση ή έμμεση συμμετοχή του ανθρώπου αλλά όχι απαραίτητα τον πιο προηγμένο εξοπλισμό γιατί κάποιες φορές η πιο απλή μέθοδος είναι και η πιο αποτελεσματική.

1.2.1 Μη χημικές μέθοδοι

Οι άνθρωποι χρησιμοποίησαν ποικίλες μη χημικές μεθόδους για να απομακρύνουν τα παρασιτικά έντομα από τις καλλιέργειες τους. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να είναι από ένα απλό όργωμα για να βγουν στην επιφάνεια τα παρασιτικά έντομα που διαβιούν κάτω από τη γη μέχρι την προσθήκη φυσικών στοιχείων όπως το θείο (Metclaf, 1994).

Μια γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι οι παγίδες, οι οποίες είναι ειδικές κατασκευές, με τις οποίες γίνεται προσέλκυση, παγίδευση και επιλεκτικά θανάτωση των εντόμων. Ανάλογα με το σκοπό της χρησιμοποίησής τους οι παγίδες διαχωρίζονται σε δύο τύπους: αυτές για την προσέλκυση, την κατακράτηση και την παρακολούθηση των πληθυσμών των εντόμων και αυτές για την προσέλκυση και θανάτωση των εντόμων (Rechigl, 1999). Για την προσέλκυση τους χρησιμοποιούνται έντονα χρώματα, τροφή ή φερομόνες. Οι παγίδες φερομονών χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για να προσελκύσουν τα αρσενικά έντομα εμποδίζοντας την αναπαραγωγή τους. Μέσα στις μη χημικές μεθόδους συμπεριλαμβάνεται και η καύση των

καλλιεργειών μια φορά τον χρόνο με αποτέλεσμα να μειώνεται ο πληθυσμός των παρασιτικών εντόμων στην επόμενη σοδιά (Rechigl, 1999).

Μια άλλη βιολογική μέθοδος είναι ο έλεγχος των παρασίτων αυξάνοντας τους φυσικούς εχθρούς τους σε ένα ελεγχόμενο επίπεδο (Weeden et al., 2007). Ο παρασιτικός πληθυσμός των εντόμων μειώνεται μέσω της χρησιμοποίησης φυσικών εχθρών του είδους όπως θηρευτές, παράσιτα και παθογόνοι μικροοργανισμοί. Παράσιτα θεωρούνται τα είδη όπου για ένα στάδιο της ζωής τους παρασιτούν σε ένα έντομο, τρέφονται από αυτό προκαλώντας το θάνατο του, ενώ οι παθογόνοι οργανισμοί προκαλούν ασθένειες στους ξενιστές και μπορούν να είναι βακτήρια, ιοί και μύκητες. Με αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται φυσικά φαινόμενα προς όφελος των ανθρώπων και χωρίς να διαταράσσεται η φύση (Metclaf et. al., 1997).

Μια εξελισσόμενη, επίσης, τεχνική καταπολέμησης είναι η τεχνική στείρωσης των εντόμων (SIT). Η τεχνική αυτή έχει ως στόχο την απελευθέρωση στο περιβάλλον εργαστηριακών στείρων αρσενικών ατόμων ώστε να μειωθεί σταδιακά ο φυσικός πληθυσμός του εντόμου. Η στείρωση επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ακτινοβολίας γ σε ένα μεγάλο πληθυσμό εντόμων που μεγαλώνει εργαστηριακά. Αυτό όμως μπορεί να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα γιατί τα έντομα που μεγαλώνουν σε εργαστηριακές συνθήκες συνήθως δεν επιλέγονται από το θηλυκό άγριο πληθυσμό (Dyck et al, 2005). Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε επιτυχώς για την καταπολέμηση του εντόμου *Cochliomyia hominivorax* (Baumhover et al., 1955) που προσβάλλει τα βοοειδή στη Δυτική Φλόριδα των Η.Π.Α αλλά και για την καταπολέμηση της μύγας *Ceratitidis capitata* (Hendrichs et al., 1983) και της μύγας του πεπονίου *Bactrocera cucurbitae* (Steiner et al., 1965)

1.2.2 Χημικές μέθοδοι

Οι άνθρωποι ασχολούνται με την αντιμετώπιση παρασιτικών εντόμων από τότε που άρχισαν να ασχολούνται με την αγρονομία περίπου δηλαδή πριν 6000 χρόνια. Στις χημικές μεθόδους αντιμετώπισης εντόμων ανήκουν τα ευρέως χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα.

Το πρώτο γνωστό εντομοκτόνο είναι το σουλφίδιο που χρησιμοποιούνταν από τους Σουμέριους πριν 4 500 χρόνια στη Μεσοποταμία. Κατά τον 17^ο αιώνα απομονώθηκε το σουλφίδιο της νικοτίνης από τον καπνό για να χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνο ενώ κατά τον 19^ο αιώνα εμφανίστηκαν δυο φυσικά εντομοκτόνα το πυρεθρίδιο, που απομονώθηκε από το χρυσάνθεμο και η ροτενόνη, που απομονώθηκε από τροπικά φυτά (Krieger, 2001).

Η μεγάλη εποχή των εντομοκτόνων άρχισε κατά την περίοδο 1940- 1950 και συμπίπτει με την ανακάλυψη του πολύ γνωστού εντομοκτόνου, DDT. Το DDT ήταν φθηνό στην παραγωγή,

αρκετά τοξικό σε κουνούπια, ψύλλους και ψείρες και είχε μεγάλη αποτελεσματικότητα εναντίον σοβαρών για την υγεία ασθενειών όπως τη μαλάρια και τον τύφο. Το 1960 όμως ανακαλύφθηκε ότι το DDT και οι μεταβολίτες του συσσωρεύονταν στο οικοσύστημα, προκαλώντας προβλήματα στον άνθρωπο και το περιβάλλον (Hammond et al., 1978). Αφορμή αποτέλεσε η μείωση των πληθυσμών των αρπακτικών πουλιών, όπου δείχθηκε ότι το DDT εμπόδιζε την εναπόθεση ασβεστίου στο κέλυφος των αυγών τους με συνέπεια το σπάσιμο κατά την επώαση τους (Carson, 1962). Το DDT απαγορεύτηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1973 αν και σε κάποιες υποανάπτυκτες χώρες χρησιμοποιείται ακόμα εναντίον της μαλάριας. Το 1975 οι οργανοχλωρίνες αντικαταστάθηκαν από τα οργανοφωσφορικά και τις καρβαμίνες αφού τα πρώτα αποδείχθηκαν βλαβερά. Η χρήση των εντομοκτόνων αυξήθηκε 50πλάσια από το 1950 και σήμερα υπολογίζεται ότι χρησιμοποιούνται 2.3 εκατομμύρια τόνοι βιομηχανικού εντομοκτόνου ανά χρόνο (Metclaf, 1994).

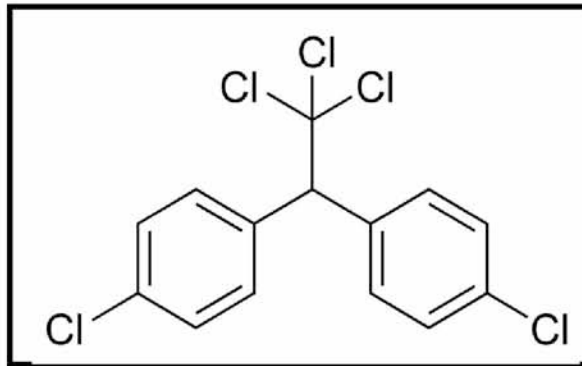
1.2.2.1 Κατηγορίες εντομοκτόνων

Τα εντομοκτόνα χωρίζονται σε έξι κύριες κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους φύση:

Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες

Αποτελούν την πιο παλιά και ευρέως χρησιμοποιημένη ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες είναι συγκεκριμένες υδρογονανθρακικές ομάδες που συνδέονται χημικά με άτομα χλωρίου (Matolcsy et al., 1988). Ανάλογα με τα άτομα χλωρίου που περιέχουν παρουσιάζουν και ανάλογες μοριακές ιδιότητες. Ο αριθμός των ατόμων άνθρακα και πώς αυτά είναι διευθετημένα στην τριτοταγή δομή καθορίζουν τις χημικές και φυσικές ιδιότητες τους (εικόνα 1).

Το πρώτο εντομοκτόνο αυτής της κατηγορίας είναι το DDT και παρασκευάστηκε το 1874 από τον Othmar Zeidler, ο οποίος όμως δεν αναγνώρισε τις εντομοκτόνες ιδιότητες του. Η ανακάλυψη των εντομοκτόνων ιδιοτήτων του DDT και η χρήση του ως εντομοκτόνου έγινε πολύ αργότερα, κατά τη δεκαετία του 1930 από τον Paul Hermann Muller ο οποίος βραβεύτηκε με Nobel ιατρικής και φυσιολογίας γι' αυτή την ανακάλυψη, το 1948 (Matolcsy et al., 1988).



Εικόνα 1.1: Το DDT χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό μετά το δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, αρχικά λόγω της αποτελεσματικότητάς του απέναντι στα κουνούπια που μετέφεραν μαλάρια και στις ψείρες που μετέφεραν τύφο. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας υπολόγισε ότι εκείνη την εποχή σώθηκαν 25 εκατομμύρια άνθρωποι (Carson, 2002).

Οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες παρεμποδίζουν την αξονική μετάδοση των νευρικών σημάτων, προκαλώντας πολλαπλές εκφορτίσεις, μεγάλη νευρική διέγερση, σπασμούς και τελικά θάνατο. Σε μοριακό επίπεδο κρατούν ανοικτές τις διαύλους των ιόντων νατρίου στις προσυναπτικές μεμβράνες των νευρικών κυττάρων του περιφερειακού νευρικού συστήματος λόγω της προσκόλλησης τους στις πρωτεϊνικές υπομονάδες (Srenpersen, 2004).

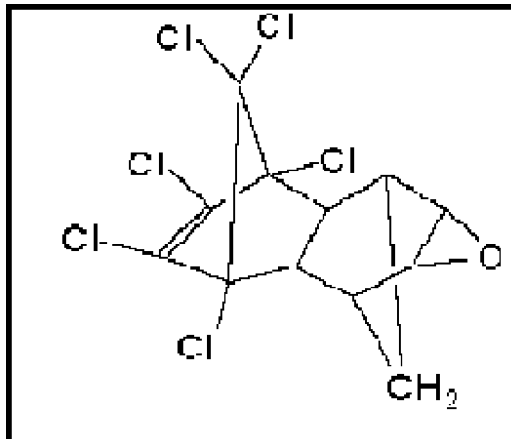
Η ανθεκτικότητα στο DDT σχετίζεται με τα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Na^+ που αποτελούν το στόχο του και αποδίδεται σε μία μετάλλαξη σε περιοχή της πρωτεΐνης που συμμετέχει στο σχηματισμό του διαύλου του καναλιού (Dong, 2007).

Κυκλοδιένια

Η παραγωγή των κυκλοδιενίων άρχισε κατά τη δεκαετία του '50 και γνωστά μόρια αυτής της κατηγορίας είναι τα aldrin, dieldrin, chlordane και heptachlor (Matolcsy et al, 1988) (εικόνα 2). Παρ' όλ' αυτά η υπολειμματικότητά τους στο έδαφος και η ανθεκτικότητα που αναπτύχθηκε στα έντομα οδήγησε την EPA να απαγορεύσει τη χρήση των κυκλοδιενίων στην αγροκαλιέργεια από το 1975 – 1980. Τα κυκλοδιένια είναι σταθερά στο έδαφος και στο υπεριώδες φως, ενώ η τοξικότητά τους αυξάνεται ανάλογα με τη θερμοκρασία (Schlenk and Benson, 2001).

Τα κυκλοδιένια είναι νευροτοξίνες και δρουν στους υποδοχείς GABA (gamma-aminobutyric acid). Οι GABA υποδοχείς αποτελούν ένα χημειοελεγχόμενο κανάλι ιόντων χλωρίου και ο ρόλος τους είναι ανασταλτικός, επιτρέποντας την είσοδο των ιόντων χλωρίου στο κύτταρο. Η είσοδος των αρνητικά φορτισμένων ιόντων χλωρίου δημιουργεί υπερπόλωση στο νευρώνα, η οποία μειώνει τη διεγερσιμότητα του και οδηγεί στη διακοπή της νευρικής ώσης (Stein, 1990) Τα

κυκλοδιένια ανταγωνίζονται τη φυσιολογική λειτουργία των GABA αναστέλλοντάς τους και εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την είσοδο των ιόντων χλωρίου στους νευρώνες με συνέπεια να οδηγούν σε υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος.



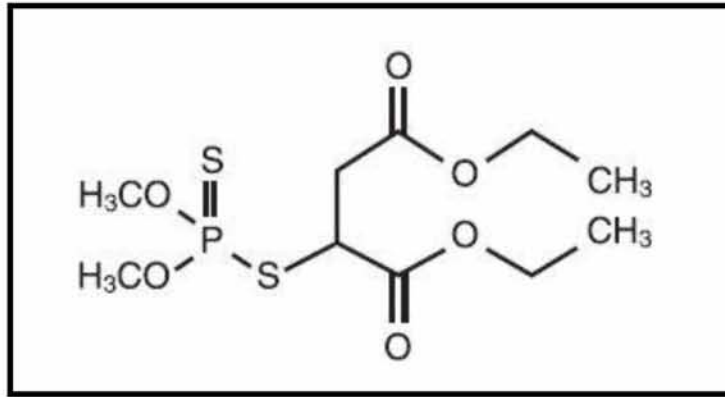
Εικόνα 1.2: Δομή της dieldrin

Η ανθεκτικότητα προς αυτά τα εντομοκτόνα έχει αποδοθεί σε μετάλλαξη που εντοπίζεται σε περιοχή της δεύτερης διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό του καναλιού και αποτρέπει τη σύνδεση του εντομοκτόνου (Buckingham et al., 2005).

Οργανοφωσφορικά

Τα οργανοφωσφορικά είναι μια μεγάλη κατηγορία που περιλαμβάνει όλους τους εστέρες του φωσφορικού οξέος. Παραδείγματα οργανοφωσφορικών είναι τα εντομοκτόνα parathion, malathion, diazinon, fenthion και αέρια νεύρων (Pope, 1999). Πρωτοσυντέθηκαν στις αρχές του 1800 ενώ χρησιμοποιήθηκαν ως εντομοκτόνα κατά το 1917.

Τα εντομοκτόνα αυτής της κατηγορίας δρουν στις χολινεργικές συνάψεις, δηλαδή στις συνάψεις που νευροδιαβιβαστής είναι η ακετυλοχολίνη. Συγκεκριμένα αναστέλλουν μη αναστρέψιμα το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση. Η φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου είναι η υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε οξικό οξύ και χολίνη. Αναστολή του ενζύμου έχει σαν αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή και τη «βραχυκύκλωση» του συστήματος μετάδοσης των νευρικών μηνυμάτων (Chambers, 1992).

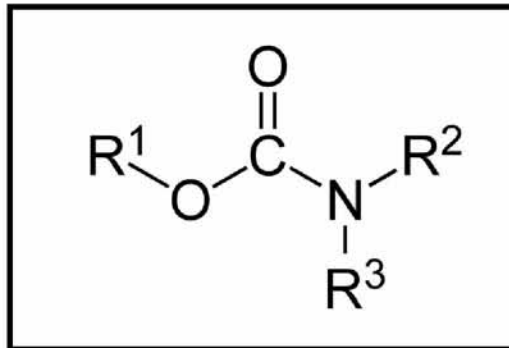


Εικόνα 1.3: Χαρακτηριστική δομή του malathion

Η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με τα οργανοφωσφορικά αποδίδεται στην απευαισθητοποίησή της ακετυλοχολινεστερασης λόγω μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγή της δομής της, ώστε το εντομοκτόνο να μην έχει πρόσβαση στο ενεργό της κέντρο (Smitsaert, 1964).

Καρβαμίδια

Τα καρβαμίδια είναι παράγωγα της φυσοσιγμίνης και αποτελούν εντομοκτόνα νεότερης γενιάς από τα οργανοφωσφορικά (εικόνα 2) (Cupra, 2005). Τα καρβαμίδια δεσμεύονται, όπως και τα οργανοφωσφορικά, στην ακετυλοχολινεστεράση .



Εικόνα 1.4: Βασική δομή καρβαμιδίων

Γενικά δρουν κατά κανόνα ως εντομοκτόνα επαφής και στομάχου και δεν έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους είναι η αναστρέψιμη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης. Συγκεκριμένα προσκολλάται το καρβαμιδικό μέρος στη σερίνη της εστερατικής θέσης του ενζύμου και παρεμποδίζεται η δράση του συνήθως για λίγες ώρες (Matolscy, 1988).

Η ανθεκτικότητα στα καρβαμιδικά εντομοκτόνα αναφέρεται σε μεταλλάξεις στο ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης. Οι μεταλλάξεις αυτές, όπως και στην περίπτωση των οργανοφωσφωρικών, αλλάζουν τη δομή της AChE κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να μην είναι δυνατή η σύνδεση του εντομοκτόνου και κατά συνέπεια το ένζυμο μπορεί να επιτελεί τη φυσιολογική του λειτουργία (Oakeshott et al., 2005).

Πυρεθροειδή

Τα πυρεθροειδή είναι συνθετικά ανάλογα φυσικών εντομοκτόνων που βρίσκονται στο λουλούδι *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Dolinsek, 2007). Χαρακτηρίζονται από μεγάλη εντομοτοξική δράση, μεγάλη λιποδιαλυτότητα και ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών εντόμων (Matolcsy, 1988).

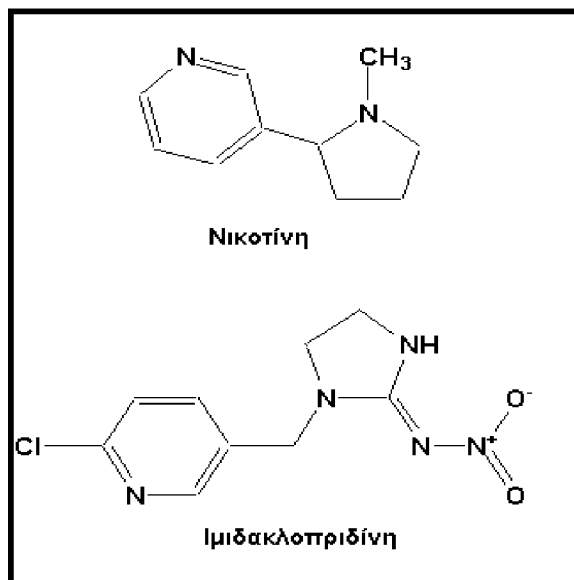
Ο τρόπος δράσης των πυρεθροειδών είναι η προσκόλληση τους στις υπομονάδες των διαύλων ιόντων νατρίου, στις μεμβράνες των τελικών κλωνίων του νευράξονα προκαλώντας παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων (Stenersen, 2004).

Η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή αποδίδεται σε μεταλλάξεις στα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Na^+ σε περιοχές της πρωτεΐνης που συμμετέχουν στο σχηματισμό των καναλιών Na^+ (Dong, 2007).

Νεονικοτινοειδή

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα των παραπάνω κατηγοριών, δημιούργησε την ανάγκη για την παραγωγή νέων εντομοκτόνων με διαφορετική δράση. Στα πλαίσια αυτά αναπτύχθηκε μια νέα κατηγορία εντομοκτόνων, τα νεονικοτινοειδή. Η νικοτίνη του καπνού χρησιμοποιούταν για πολλούς αιώνες για την απομάκρυνση εντόμων, παρόλο που δεν ήταν πολύ αποτελεσματική ενώ ήταν επικίνδυνη για τον άνθρωπο. Τα νεονικοτινοειδή έχουν παρόμοια δομή με τη νικοτίνη και δρουν ως αγωνιστές στο νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, ο οποίος αποτελεί ιοντικό κανάλι (Tomizawa and Casida, 2005).

Το πρώτο νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο είναι η ιμιδακλοπριδίνη που εμφανίστηκε τη δεκαετία του 90' (Εικόνα 1.5). Η δράση του οφείλεται στη δέσμευση των μετασυναπτικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στο κεντρικό σύστημα των εντόμων με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φυσιολογικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων μεταξύ των νευρικών κυττάρων (Stenersen, 2004).



Εικόνα 1.5: Δομή της νικοτίνης και του εντομοκτόνου ιμιδακλοπριδίνη

Ανθεκτικότητα στην ιμιδακλοπριδίνη αλλά και σε άλλα νεονικοτινοειδή έχει αναφερθεί σε διάφορα είδη όπως στη *Nilaparvata lugens*, παρασιτικό έντομο σε πολλά μέρη της Ασίας. Η ανθεκτικότητα στο έντομο αυτό οφείλεται κυρίως σε μια σημειακή μετάλλαξη σε δυο υπομονάδες του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, Nla1 και Nla3, η οποία μειώνει σημαντικά την πρόσδεση του εντομοκτόνου (Gorman et al., 2008; Tomizawa and Casida, 2009).

Νατουραλίτες

Με την πάροδο των χρόνων και τη μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση της κοινωνίας απέναντι σε περιβαλλοντικά προβλήματα όπως η τρύπα του όζοντος, η βιομηχανία προσηλώθηκε στην παραγωγή εντομοκτόνων φιλικότερων προς το περιβάλλον. Παρατήρησαν ότι τα φυσικά προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών μπορούν να έχουν ιδιότητες εντομοκτόνου. Ένα σημαντικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί το προϊόν Spinosad.

1.2.2.2 Spinosad

Το spinosad είναι το ενεργές συστατικό του Tracer* Naturalyte* και του Conserve (Salgado, 1998) και βγήκε για πρώτη φορά στην αγορά το 1997 (Thompson et al., 1997; Thompson et al., 2000). Μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται σε περισσότερες από 30 χώρες για αντιμετώπιση περισσότερων από 150 είδη εντόμων (Clevelant et al., 2001).

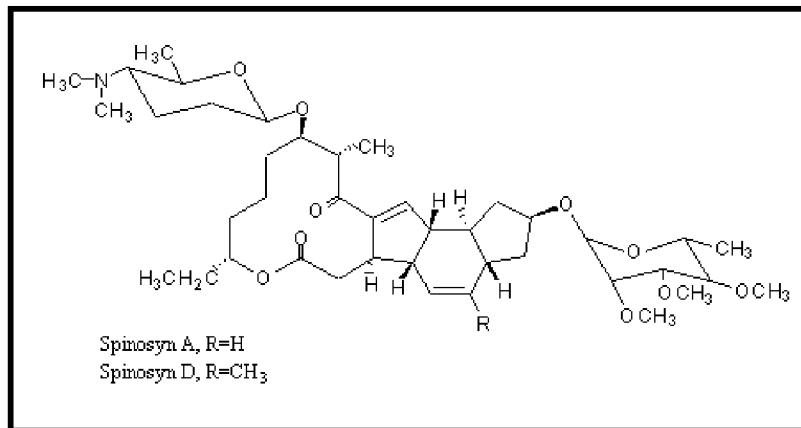
Αποτελείται από τις δύο ενεργές σπινოსίνες, τη spinosyn A και spinosyn D (Bret et al., 1997) που παράγονται κατά την αερόβια ζύμωση του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa* (εικόνα 1.6). Ο ακτινομύκητας αυτός απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1982 από ένα εγκαταλελειμμένο εργοστάσιο παρασκευής ρούμι απ' όπου ένας επιστήμονας της Eli Lilly πήρε μερικά εδαφικά δείγματα για διερεύνηση της ύπαρξης βιολογικής δράσης (DowAgroScience).



Εικόνα 1.6: Ο *Saccharopolyspora spinosa* είναι μέλος των ακτινομυκήτων. Οι ακτινομύκητες είναι προκαρυωτικά, αερόβια και gram-θετικά βακτήρια που σχηματίζουν νήματα (by Dr. Lakshmi Sridharan, TRN Science Editor)

Δομικά, αυτές οι ενώσεις είναι μακρολίδες και περιέχουν ένα τετρακυκλικό σύστημα όπου είναι ενωμένα δύο σάκχαρα (εικόνα 1.7). Μετά τη ζύμωση, το spinosad εξάγεται και μεταποιείται ώστε να σχηματίσει μια υψηλά συμπυκνωμένη υδατική μορφή για ευκολότερη χρήση.

Τα κύρια πλεονεκτήματά του είναι η αποτελεσματικότητα απέναντι στα στοχευόμενα έντομα, η χαμηλή τοξικότητά του στον άνθρωπο αλλά και στο περιβάλλον και η μειωμένη παρουσία ανθεκτικότητας. Αν και το spinosad χρησιμοποιείται κυρίως για λεπιδόπτερα και θυσανόπτερα, οι σπινოსύνες έχουν ένα μεγάλο φάσμα δράσης ενάντια των κολεόπτερων, των δίπτερων, των ομόπτερων, των υμενόπτερων, των ισόπτερων και των ορθόπτερων (Salgado, 1998).



Εικόνα 1.7: Η δομή των σπινωσίνων A και D

Στο περιβάλλον διασπάται μέσω της φωτοδιάσπασης και της μικροβιακής διάσπασης στα φυσικά συστατικά του και η ημιζωή του διαρκεί από μια έως δεκα επτά μέρες.

Σε μοριακό επίπεδο το spinosad έχει ως πρωταρχικό στόχο το νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης αλλά είναι ικανό να επιδρά και στον υποδοχέα GABA (Moulton, 2000). Πολύ σημαντικό είναι ότι δεν συνδέεται στην ίδια θέση με την ακετυλοχολίνη αλλά σε μια αλλοστερική. Πρόσφατες μελέτες μεταλλαγμένης στη *Drosophila* έδειξαν ότι το spinosad συνδέεται στην αβ υπομονάδα (Perry, 2007) του υποδοχέα. Το spinosad συνδέεται στο νικοτινικό υποδοχέα ενώ είναι συνδεδεμένη η ακετυλοχολίνη δηλ. συνδέεται όταν το κανάλι είναι σε ενεργή κατάσταση. Η σύνδεση του spinosad εμποδίζει την απομάκρυνση της ακετυλοχολίνης από τον υποδοχέα, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του καναλιού και τη συνεχή είσοδο ιόντων Na⁺, η οποία οδηγεί στην υπερόπλωση του κυττάρου και τελικά στο θάνατο.

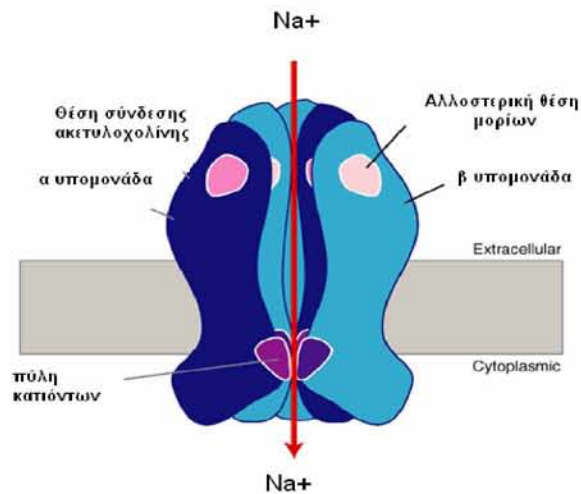
Η φαινοτυπική δράση του spinosad είναι αρχικά η ανύψωση του σώματος του εντόμου, η οποία οφείλεται στην επιμήκυνση των ποδιών του. Όσο η επίδραση του εντομοκτόνου προχωρά, τα πόδια του εντόμου επιμηκύνονται ασύμμετρα, με αποτέλεσμα να προκαλείται αναστροφή του εντόμου και τρέμουλο όπου ακολουθείται από παράλυση. Το έντομο δεν μπορεί να ανακάμψει σε κανένα στάδιο και τα συμπτώματα παραμένουν τα ίδια είτε αν χορηγηθεί μέσω ένεσης, είτε μέσω επαφής (Salgado, 1997).

1.3 Νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (nAChR)

Υπάρχουν δυο είδη υποδοχέων ακετυλοχολίνης. Ο νικοτινικός και ο μουσκαρινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης. Οι νικοτινικοί υποδοχείς είναι ιονοτροπικοί υποδοχείς που σχηματίζουν κανάλια ιόντων στις κυτταρικές μεμβράνες. Έχουν ως προσδέτες τους την ακετυλοχολίνη και τη νικοτίνη (Engel et al., 2003) και εντοπίζονται σε πολλούς ιστούς του

σώματος. Οι υποδοχείς νευρώνων βρίσκονται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και παραμένουν κλειστοί σε κατάσταση ηρεμίας ενώ ανοίγουν μετά τη σύνδεση του νευροδιαβιβαστή, την ακετυλοχολίνη, επιτρέποντας την είσοδο των μονοσθενών ιόντων Na^+ .

Δομικά οι υποδοχείς αποτελούνται από 5 υπομονάδες. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από 4 διαμεμβρανικές περιοχές διατεταγμένες σε α-έλικες, δημιουργώντας ένα κύλινδρο και σταθεροποιώντας τα τοιχώματα του καναλιού (Karlin, 2002). Η δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από αμινοξέα που δεσμεύουν όχι το νευροδιαβιβαστή αλλά μόρια τα οποία δρουν αρνητικά ή θετικά στη λειτουργία του υποδοχέα, δημιουργώντας αλλοστερικές θέσεις σύνδεσης στη δίοδο του καναλιού. Η εξωκυτταρική θηλιά είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του στομίου του καναλιού ενώ οι ενδοκυτταρικές θηλίες αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης του υποδοχέα (εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Υποδοχέας ακετυλοχολίνης

1.3.1 Νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης εντόμων

Αναλύσεις γονιδιωμάτων των εντόμων έδειξαν ότι οι νικοτινικοί υποδοχείς των εντόμων μεταξύ τους έχουν αρκετά κοινές αλληλουχίες σε σύγκριση με των θηλαστικών και αποτελούν τις πιο μικρές οικογένειες (Gundelfinger, 1992). Οι *Drosophila melanogaster* και *Anopheles gambiae* έχουν 10 nAChR γονίδια, ενώ η *Apis mellifera* έχει 11 (Kao et al., 1984). Γενικά οι nAChR υπομονάδες από διαφορετικά είδη εντόμων παρουσιάζουν περισσότερη από 60% ομοιότητα στις αμινοξικές αλληλουχίες τους (Jones, 2006). Επίσης οι υποδοχείς των εντόμων με των θηλαστικών διαφέρουν στη σημασία της ακετυλοχολίνης και της γλουταμίνης ως κεντρικός νευροδιαβιβαστής.

Στα θηλαστικά η γλουταμίνη είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής ενώ στα έντομα είναι η ακετυλοχολίνη.

Ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης μελετήθηκε εκτενέστερα στη *Drosophila melanogaster*, η οποία αποτελεί ένα σημαντικό οργανισμό μοντέλο. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν 10 nAChR γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν 7 α υπομονάδες (α1- α7) και 3 μη- α υπομονάδες (b1- b3). Οι υπομονάδες Da1, Da2, Da3, Da4, Dβ1, Dβ2 παρουσιάζουν 30-50% ομοιότητα μεταξύ τους και με τα σπονδυλωτά 25-40%, ενώ δεν έχουν ομοιότητα με υψηλότερους εξελικτικά οργανισμούς. Οι υπομονάδες Da5, Da6 και Da7 παρουσιάζουν ομοιότητα μεταξύ τους 53- 63% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και 63-71% σε αμινοξικό επίπεδο, ενώ παρουσιάζουν και ομοιότητα 45% με την α7 υπομονάδα των σπονδυλωτών. Η Dβ3 υπομονάδα έχει τη μικρότερη ομοιότητα που φτάνει το 20% με άλλους υποδοχείς σπονδυλωτών και ασπόνδυλων. Σημαντικό είναι ότι η Dβ2 υπομονάδα παρουσιάζει ομοιότητα με α- υπομονάδες άλλων εντόμων όπως με την α8 υπομονάδα του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (Sattelle et al., 2005).

Επίσης πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στην ποικιλία των υπομονάδων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης σημαντικό ρόλο παίζουν το εναλλακτικό μάτισμα και το RNA-I-editing (Lansdell and Millar 2000; Sattelle et al. 2005). Συγκεκριμένα στη γονιδιωματική αλληλουχία της α6 υπομονάδας της *Drosophila melanogaster* παρουσιάστηκαν δυο παραλλάγματα του εξονίου 3 (3a και 3b) και τρία παραλλάγματα του εξονίου 8 (8a, 8b, 8c). Το εξόνιο 3 κωδικοποιεί αμινοξέα γύρω από την D θηλιά και το εξόνιο 8 κωδικοποιεί την TM2 καθώς και την εξωκυτταρική θηλιά που ενώνει τις TM2 και TM3 διαμεμβρανικές περιοχές (Grauso et al., 2002). Τα παραλλάγματα αυτά διαφέρουν σε μικρά κατάλοιπα υποδεικνύοντας την ύπαρξη 6 εναλλακτικών μεταγραφών ανάλογα με τη φαρμακολογική και φυσιολογική ανάγκη του οργανισμού. Επίσης για την υπομονάδα Da4 εντοπίστηκαν δυο παραλλάγματα ενώ παρατηρήθηκε και απαλοιφή του εξονίου 2 (Lansdell, 2000).

Με βάση τα γονίδια των υπομονάδων της *Drosophila melanogaster* μελετήθηκε και η οικογένεια των νικοτινικών γονιδίων του *Anopheles gambiae*. Ταυτοποιήθηκαν 10 υπομονάδες που παρουσιάζουν ομοιότητα μεγαλύτερη από 94% με τις υπομονάδες της *Drosophila melanogaster*. Σύγκριση του γονιδιώματος των *Anopheles gambiae* και *Drosophila melanogaster* έδειξε ότι το χρωμόσωμα 2 του *Anopheles* έχει κοινό πρόγονο με το χρωμόσωμα 3 της *Drosophila* και το χρωμόσωμα 3 του *Anopheles* έχει κοινό πρόγονο με το χρωμόσωμα 2 της *Drosophila*. Επίσης πολλά γονίδια του *Anopheles* στο χρωμόσωμα X έχουν τα ορθόλογά τους στο αντίστοιχο χρωμόσωμα της *Drosophila* (Jones et al., 2005). Αυτή η χρωμοσωμική σχέση ισχύει και στα γονίδια των υπομονάδων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Για παράδειγμα το Agama1 γονίδιο βρίσκεται στο δεξί άκρο του χρωμοσώματος 2 και το ορθόλογο γονίδιο στη *Drosophila* βρίσκεται

στο δεξί άκρο του χρωμοσώματος 3. Στο *Anopheles* παρουσιάστηκε εναλλακτικό μάτισμα στις υπομονάδες Agama4 και Agama6, ενώ δεν παρατηρήθηκε RNA-I-editing (Jones et al., 2005).

Η μελέτη των υπομονάδων της ακετυλοχολίνης στα διάφορα έντομα είναι πολύ σημαντική για τη μελέτη τόσο της φυσιολογίας του εντόμου όσο και της επίδρασης των εντομοκτόνων και κατά συνέπεια για τηδειρεύνηση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα έντομα.

1.4 Ανθεκτικότητα στα Εντομοκτόνα

Η ανθεκτικότητα των εντόμων οφείλεται στην ικανότητα κάποιων ατόμων να επιβιώνουν σε μια τοξική δόση εντομοκτόνου, η οποία σε φυσιολογικούς πληθυσμούς θα ήταν θανατηφόρα. Το πρώτο παράδειγμα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα αναφέρθηκε το 1914, όταν διαπιστώθηκε ότι ένας πληθυσμός του κοκκοειδούς εντόμου *Aonidiella aurantiae*, που προσβάλλει τα εσπεριδοειδή, παρουσίαζε ανθεκτικότητα στις αναθυμιάσεις υδροκυανίου, που ως τότε χρησιμοποιούνταν για την καταπολέμηση του εντόμου (Miller and Davidson, 2005).

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας σε έναν πληθυσμό εντόμων εξαρτάται από την ύπαρξη συγκεκριμένων άτομων, τα οποία εφόσον επιβιώσουν μετά την εφαρμογή μιας δόσης εντομοκτόνου, θα αποτελέσουν τους γονείς της επόμενης γενιάς. Και αν αυτή η δυνατότητα επιβίωσης είναι κληρονομική τότε οι απόγονοί τους θα παρουσιάσουν επίσης ανθεκτικότητα με αποτέλεσμα με την πάροδο του χρόνου ο πληθυσμός των εντόμων να είναι στο σύνολό του ανθεκτικός.

Τα έντομα αναπτύσσουν ανθεκτικότητα μέσω τριών κύριων μηχανισμών:

1. λόγω συμπεριφοράς, δηλαδή τα έντομα αλλάζουν συμπεριφορά και αποφεύγουν το εντομοκτόνο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του μηχανισμού αποτελεί η ανθεκτικότητα που παρουσίασε στο DDT το κουνούπι *Anopheles maculipennis*. Ο έλεγχος της μαλάρια βασιζόταν στο ψεκάσμο των εσωτερικών χώρων των σπιτιών με DDT. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα μακροπρόθεσμα το υποείδος που διαβιούσε στο εσωτερικό των σπιτιών και ήταν ευαίσθητο στο DDT να αντικατασταθεί από ένα υποείδος που διαβιούσε μόνο εξωτερικά (Coluzzi, 1992).

2. με αυξημένο μεταβολισμό. Τα έντομα έχουν αναπτύξει φυσιολογικές λειτουργίες, οι οποίες έχουν ως στόχο την αποτοξίνωση του οργανισμού από ξενοβιοτικές ουσίες. Μέσα στις ξενοβιοτικές ουσίες συμπεριλαμβάνονται και τα εντομοκτόνα. Ο αυξημένος μεταβολισμός των εντομοκτόνων οφείλεται κυρίως σε υπερέκφραση των γονιδίων των ενζύμων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών (εστεράσες, κυτόχρωμα P-450, GST), είτε ως αποτέλεσμα αλλαγής της γονιδιακής έκφρασης είτε μετά από πολλαπλασιασμό του γονιδίου (Hemingway, 2000).

3. τροποποιώντας τη δομή του στόχου, όπου δρουν τα εντομοκτόνα μέσα στο έντομο (αλλαγή στόχου δράσης). Στη περίπτωση αυτή ο μηχανισμός ανθεκτικότητας αφορά στην τροποποίηση της δομής του στόχου μέσω μεταλλαγών των αμινοξέων, με τρόπο που να μειώνεται η ευαισθησία του ως προς το εντομοκτόνο (Buckingham et al, 2005).

1.4.1 Ανθεκτικότητα στο spinosad

Το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε προς τη μελέτη της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad όταν καταγράφηκαν ανθεκτικοί πληθυσμοί προς το σκεύασμα στις αγροκαλλιέργειες. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν ανθεκτικοί φυσικοί πληθυσμοί της *Plutella xylostella* (Zhao et al., 2002), του σκουληκιού *Spodoptera exigua* (Moulton, 2000) και της κάμπιας *Liriomyza trifolii* (Ferguson, 2004) στους αγρούς της Ιαπωνίας και των ΗΠΑ. Όσον αφορά στην εργαστηριακή μελέτη της ανθεκτικότητας του spinosad δημιουργήθηκαν ανθεκτικές εργαστηριακές σειρές εντόμων. Η αρχική παρατήρηση ήταν ότι η ανθεκτικότητα στις εργαστηριακές σειρές δεν μπορούσε να ξεπεραστεί με τη χορήγηση συνεργιστικών μορίων αποκλείοντας έτσι το ενδεχόμενο η ανθεκτικότητα να οφείλεται σε αύξηση του μεταβολισμού του εντομοκτόνου (Shono, 2003; Scott, 2008). Στη συνέχεια μελετήθηκε το ενδεχόμενο η ανθεκτικότητα να οφείλεται στην τροποποίηση του στόχου του εντομοκτόνου, δηλαδή του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

Μελέτες στη *Drosophila melanogaster* εντόπισαν μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη στην υπομονάδα Da6 με αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας του εντόμου στο Spinosad έως 1181 φορές. Συγκεκριμένα ανάλυση της ανθεκτικής σειράς της *Drosophila melanogaster* έδειξε «διακοπή» του γονιδίου της Da6 λόγω της εισαγωγής ενός μεταθετού στοιχείου στο εξόνιο 8, με αποτέλεσμα τη διακοπή της μεταγραφής του γονιδίου.. Αυτό είχε ως συνέπεια να παράγεται μια μη λειτουργική υπομονάδα Da6, η οποία διαθέτει τις διαμεμβρανικές περιοχές TM1 και TM2 αλλά στερείται τις διαμεμβρανικές περιοχές TM3 και TM4, την κυτταροπλασματική θηλιά και την εξωκυτταρική καρβοξυτελική ουρά (Perry, 2007).

Η ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο μελετήθηκε και στη *Musca domestica* όπου εντοπίστηκε ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανθεκτικότητα στο αυτόσωμα 1. Ένα άλλο γνωστό γονίδιο ανθεκτικότητας στο αυτόσωμα 1 είναι το γονίδιο που συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα μέσω CYP6D1 (Shono, 2003). Η ανθεκτικότητα όμως στο Spinosad δεν προκαλείται από το ίδιο γονίδιο γιατί η ανθεκτικότητα μέσω της μονοοξυγενάσης μπορεί να αντιμετωπισθεί με χορήγηση PBO και κληρονομείται ως επικρατές χαρακτηριστικό

Επίσης, μία πρόσφατη έρευνα για την ανθεκτικότητα στο Spinosad στο έντομο *Plutella xylostella*, έδειξε μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα Pxa6 η οποία παράγει μια μη λειτουργική υπομονάδα που στερείται τις TM3 και TM4 διαμεμβρανικές περιοχές και αυξάνει την ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο. Σημαντικό στοιχείο της έρευνας στο έντομο *Plutella xylostella* είναι ότι η μετάλλαξη εντοπίστηκε σε ανθεκτικές σειρές που απομονώθηκαν όχι εργαστηριακά αλλά από το περιβάλλον (Baxter et al., 2010).

Η παρουσία μη λειτουργικής Da6 υπομονάδας σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση ανθεκτικότητας στη *Drosophila melanogaster* και στη *Plutella xylostella* οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Da6 υπομονάδα μπορεί να είναι η μοναδική υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα που να εμπλέκεται στην πρόσδεση του spinosad στα έντομα ή να αποτελεί ένα απαραίτητο στοιχείο του υποδοχέα για τη δράση του εντομοκτόνου (Perry et al., 2007; Baxter et al., 2009). Λόγω των κοινών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν τα έντομα σε ότι αφορά την ανθεκτικότητα στο Spinosad, ο ακριβής προσδιορισμός του παράγοντα που ευθύνεται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο σε ένα είδος μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση του αντίστοιχου παράγοντα στα υπόλοιπα είδη, όπως και στο Δίπτερο *Bactrocera oleae* που μελετήθηκε σε αυτή τη διπλωματική.

1.5 *Bactrocera oleae*, ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παράσιτα της ελιάς. Ανήκει στην τάξη των εντόμων Diptera και στην οικογένεια Tephritidae (Romoser et al., 1998). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις λεγόμενες "μύγες των φρούτων" ("fruit flies"), δηλαδή τις μύγες εκείνες που εναποθέτουν τα αυγά τους στα ώριμα ή ανώριμα φρούτα έτσι ώστε οι προνύμφες τους αναπτύσσονται μέσα σε αυτά καθιστώντας τα μη εμπορεύσιμα.

Κάθε χρόνο προκαλεί σημαντική οικονομική ζημία στην ελαιοπαραγωγή, τόσο με την υποβάθμιση των ελαιοκομικών προϊόντων, ελαιόλαδο και βρώσιμες ελιές, όσο και με το κόστος πρόληψης των δακοπροσβολών. Η ποσοτική μείωση της ελαιοπαραγωγής λόγω του εντόμου, μπορεί να φτάσει έως 30%, ενώ η ποιοτική υποβάθμιση είναι ανυπολόγιστη (Montiel-Bueno & Jones, 2002). Ο έλεγχος των πληθυσμών του δάκου βασίζεται ακόμη και σήμερα σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Τα περιβαλλοντικά προβλήματα, όμως, που συνεπάγονται από τη χρήση των εντομοκτόνων οδήγησαν στην ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου με τη χρήση εντομοπαθογόνων οργανισμών ή βιολογικών

εντομοκτόνων, όπως το νατουραλύτη εντομοκτόνο spinosad, το οποίο άρχισε να χρησιμοποιείται για την προστασία της ελαιοκαλλιέργειας το 2004.

1.6 Σκοπός

Το spinosad είναι ένα σχετικά νέο εντομοκτόνο της κατηγορίας των νατουραλυτών, προερχόμενο από τον ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa*. Παρουσιάζει μεγάλη δραστικότητα ως προς τα έντομα-στόχους, χαμηλή τοξικότητα ως προς τους ωφέλιμους και άλλους μη-επιζήμιους οργανισμούς και μικρή υπολειμματική δράση. Ανάμεσα στα έντομα-στόχους του spinosad συγκαταλέγεται και ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Η περιορισμένη, μέχρι στιγμής, χρήση του και η αποτελεσματικότητα του συμβάλλουν στην παρατεταμένη παραμονή του στην αγορά. Η μακροχρόνια όμως επιλογική δράση του spinosad, όπως είναι φυσιολογικό και παρατηρείται για κάθε συμβατικό εντομοκτόνο, θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η κλωνοποίηση των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου μέσα στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου του γονιδίου στην πίεση επιλογής του spinosad. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι το εντομοκτόνο spinosad συνδέεται στην αδ υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στη *Drosophila*. Για τον εντοπισμό του μοριακού στόχου του spinosad στο δάκο της ελιάς χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές από τα αντίστοιχα γονίδια του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης της *Drosophila melanogaster* και πραγματοποιήθηκε διαλογή κλώνων από γονιδιωματική και cDNA βιβλιοθήκη του *Bactrocera oleae*.

Ο εντοπισμός της θέσης σύνδεσης του εντομοκτόνου spinosad στο νικοτινικό υποδοχέα του *Bactrocera oleae* και ο προσδιορισμός του παράγοντα που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αυτό αποτελεί κύρια γνώση για τη μετέπειτα διαχείριση του εντόμου. Η απομόνωση πιθανών μεταλλάξεων που οδηγούν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του δάκου θα επιτρέψει τη δημιουργία ενός μοριακού τεστ για την παρακολούθηση των επιπέδων ανθεκτικότητας στη φύση. Η έγκαιρη πρόβλεψη της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο spinosad μέσω του διαγνωστικού τεστ θα βοηθήσει στη λήψη ορθών αποφάσεων όσον αφορά στην επιλογή κατάλληλων εντομοκτόνων ή γενικότερα μεθόδων καταπολέμησης και θα αποτελέσει ουσιαστική συμβολή στη φυτοπροστασία της ελιάς.

ΜΕΘΟΔΟΙ - ΥΛΙΚΑ

2. Μέθοδοι- Υλικά

2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Τα πρώτα πρωτόκολλα για τη μέθοδο αυτή παρουσιάστηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '80, ενώ το 1993 ο K.Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Υλικά:

1. DNA: Η ποσότητα του γενετικού μας υλικού εξαρτάται από την αντιπροσώπευση των αλληλουχιών μας. Όταν έχουμε γονιδιωματικό DNA και μελετάμε μοναδική αλληλουχία (single copy), τότε η αντίδρασή μας θα περιέχει 5-50ng. Αντίθετα, όταν η υπό μελέτη αλληλουχία είναι κλωνοποιημένη σε πλασμιδιακό φορέα, η ποσότητα κυμαίνεται από 1pg έως 1ng διότι η αλληλουχία υπάρχει σε πολλά αντίγραφα.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των κατάλληλων συνθηκών (ιοντική ισχύ, pH) ώστε να έχουμε τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης. Η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση πρέπει να είναι 1X.
3. $MgCl_2$: Το ιόντα Mg^{2+} είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία της πολυμεράσης γιατί σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία θα αποτελέσουν το υπόστρωμα της πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του $MgCl_2$ μπορεί να κυμανθεί από 0.5mM έως 4mM. Όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση άλατος περιέχει η αντίδραση τόσο μειώνεται η ειδικότητα της πολυμεράσης.
4. 5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs): Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια αποτελούν τις βάσεις A,T,G,C που θα χρησιμοποιηθούν από την πολυμεράση για την επέκταση των εκκινητών. Η επιθυμητή ποσότητά τους είναι 0,2 mM/ αντίδραση από το καθένα.
5. Ειδική DNA πολυμεράση (Taq): Η θερμοσταθερή πολυμεράση του βακτηρίου *Thermus aquaticus* είναι υπεύθυνη για την προσθήκη των νουκλεοτιδίων στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες με ταχύτητα 1000bp/λεπτό (Watson, 2007). Μια ενζυμική μονάδα (1Unit) είναι αρκετή για μια αντίδραση.
6. Εκκινητές (Primers): Οι εκκινητές αποτελούν ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία συνιστούν τα εκκινητικά μόρια για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να είναι μεταξύ 0,4- 0,6 μ M.

Μέθοδος:

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια μοριακή τεχνική που έχει ως στόχο την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας από ένα μόριο-στόχο DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους με εναλλαγές στη θερμοκρασία που έχουν ως σκοπό:

α. Την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA-στόχου σχηματίζοντας δυο μονόκλωνες αλυσίδες ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία, 94-95 °C.

β. Την υβριδοποίηση των εκκινητών (primers) με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περίπου 5 °C κάτω από τη θερμοκρασία τήξης (Tm) των εκκινητών (Ta= Tm-5). Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace $Tm= 4*(\text{αριθμός βάσεων G+C}) + 2*(\text{αριθμός βάσεων A+T})$.

γ. Τον πολυμερισμό- επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων σε θερμοκρασία 72-74 °C. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται η Taq DNA πολυμεράση.

Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους (συνήθως 30 κύκλοι), έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική και ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης περίπου 10^9 μόρια DNA.

Το πρόγραμμα μιας τυπικής αντίδρασης PCR είναι:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	94 °C	4min	1
Αποδιάταξη	94 °C	30sec	
Υβριδισμός	Ta °C	30sec	30
Πολυμερισμός	72 °C	1kb/min	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C	5min	1
Διατήρηση	4 °C	-	-

Σε μια τυπική αντίδραση PCR τελικού όγκου 20 μl προστίθενται:

DNA	2.5 μl
Buffer (10X)	2 μl
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μl
dNTPs (10 mM)	1,6 μl
Εκκινητές F (10 mM)	0,7 μl
R (10 mM)	0,7 μl
Taq (5u/μl)	0,2 μl
ddH ₂ O	11,7 μl
Τελικός όγκος	20 μl

1. Προσθέτουμε σε αποστειρωμένα σωληνάκια PCR την επιθυμητή ποσότητα του DNA και των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης
2. Τοποθετούμε τα σωληνάκια PCR σε θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα

* Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένες συνθήκες

* Το ρυθμιστικό διάλυμα και το MgCl₂ χρειάζονται καλή ανάδευση πριν χρησιμοποιηθούν.

Η απόδοση μιας PCR αντίδρασης εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η συγκέντρωση των Mg²⁺, ο αριθμός των κύκλων και η χρονική τους διάρκεια, η πολυμεράση που χρησιμοποιείται, η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου και τέλος ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών.

2.2 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων DNA (Sambrook et al., 1989). Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος τότε το DNA θα μετακινηθεί προς το θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH.

Η μετακίνηση του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους. Όσο πιο μικρό το μέγεθος του DNA τόσο πιο γρήγορα μετακινείται προς το θετικό πόλο. Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όσο πιο πυκνή η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη τόσο πιο υψηλή η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος.

Το DNA είναι ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA σε ποσότητα ίση με τη συγκέντρωση του. Άρα με βάση το φθορισμό των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε και το γενετικό μας υλικό. Επίσης μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος του DNA έχοντας ως «χάρακα» ένα μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder). Αντιστοιχούμε το ύψος της ζώνης που μας ενδιαφέρει με την ζώνη του μάρτυρα που βρίσκεται στο ίδιο ύψος.

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X 1L: περιέχει 54g Tris-base, 27,5g Boric acid, 20ml EDTA 0,5M (pH 8.0)
2. Αγαρόζη: Η συγκέντρωση της αγαρόζης επηρεάζει την κινητικότητα των τμημάτων DNA στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τ) συνδέονται με τον τύπο $\mu = \log \mu_0 - K\tau$ όπου μ_0 είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και K ο συντελεστής επιβάρυνσης.
3. Μάρτυρας: Για τον προσδιορισμό των ζωνών του DNA στο πήκτωμα ηλεκτροφορούμε και το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA (Ladder).
4. Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X: περιέχει 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό. Η φικκόλη αυξάνει την πυκνότητα του DNA, ώστε να τοποθετηθεί στα πηγαδάκια και να μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ οι χρωστικές επιτρέπουν την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.
5. Βρωμιούχο αιθίδιο: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική το μόριο του οποίου περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Η UV ακτινοβολία μεταβιβάζεται είτε από το DNA στα 260nm είτε από την ίδια χρωστική στα 302nm και 366nm και εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να φθορίσουν όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στο πήκτωμα πρέπει να έχει τελική συγκέντρωση 1μg/ml.

Μέθοδος:

Για την παρασκευή 100ml πηκτώματος αγαρόζης 1% με 0,5X TBE:

1. Ζυγίζουμε 1gr αγαρόζης
2. Προσθέτουμε 100ml TBE 0,5X στην κωνική φιάλη που περιέχει την αγαρόζη.
3. Θερμαίνουμε την κωνική φιάλη με συνεχή παρακολούθηση μέχρι να παρατηρήσουμε ότι διαλύθηκε όλη η αγαρόζη.
4. Όταν διαλυθεί η αγαρόζη παγώνουμε τη φιάλη με τρεχούμενο νερό.
5. Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο και ανακινούμε.

6. Προσθέτουμε το διάλυμα αγαρόζης στις ειδικές βάσεις ηλεκτροφορητικής συσκευής αφού πρώτα έχουμε τοποθετήσει τα ειδικά χτενάκια (το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα, «πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης»).
7. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα, ετοιμάζουμε τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Αφαιρούμε το ειδικό χτενάκι και τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθέτουμε διάλυμα TBE 0,5X (ίδια συγκέντρωση με αυτό που περιέχει το πήκτωμα) ώστε να καλυφθούν τα πηγαδάκια.
3. Προσθέτουμε στα δείγματά μας διάλυμα φόρτωσης και αναδεύουμε.
4. Μεταφέρουμε τα δείγματά μας στα πηγαδάκια ενώ σε ένα πηγαδάκι προσθέτουμε και το μάρτυρα.
5. Ξεκινούμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζοντας την τάση στα 100V περίπου.

Στο τέλος παρατηρούμε σε υπεριώδη ακτινοβολία UV τις ζώνες μας και υπολογίζουμε το μέγεθος και την ποσότητά του προϊόντος μας.

2.3 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

(Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit της Promega)

Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι να απομονώσουμε το DNA των ζωνών που μας ενδιαφέρουν από το πήκτωμα ώστε να μπορέσουμε να το επεξεργαστούμε περαιτέρω σε διάφορες αντιδράσεις όπως αλληλούχιση, κλωνοποίηση ή σήμανση.

Υλικά:

1. Διάλυμα Πρόσδεσης στη Μembrάνη (Membrane binding solution): για κάθε 10mg διαλύματος έχουμε 10μl MBS.
2. Διάλυμα πλύσης Μembrάνης (Membrane wash solution)
3. Υδατικό διάλυμα ελεύθερο Νουκλεασών (Nuclease-free water)
4. Δείγμα του πηκτώματος

Μέθοδος:

1. Εντοπίζουμε την επιθυμητή μας ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης και το κόβουμε προσεχτικά τοποθετώντας το σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5ml.
2. Υπολογίζουμε το βάρος της ζώνης μας αφαιρώντας το βάρος ενός άδειου eppendorf.

3. Προσθέτουμε 10μl Membrane Binding Solution ανά 10mg gel. Αναδεύουμε και επωάζουμε στους 50-65°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα. Ελέγχουμε ανά διαστήματα και αναδεύουμε.
4. Όταν διαλυθεί πλήρως μεταφέρουμε το διάλυμα στη στήλη (SV mini column). Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα στο σωλήνα συλλογής (tube collection). Επωάζουμε για ένα λεπτό.
5. Φυγοκεντρούμε στις μέγιστες στροφές για ένα λεπτό. Απορρίπτουμε το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετούμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.
6. Προσθέτουμε 700μl Membrane Wash Solution.
7. Φυγοκεντρούμε στις μέγιστες στροφές για ένα λεπτό.
8. Απορρίπτουμε το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετούμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.
9. Προσθέτουμε 500μl Membrane Wash Solution και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά.
10. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό με ανοικτό το καπάκι της φυγοκέντρου για να απομακρυνθεί η αιθανόλη.
11. Μεταφέρουμε τη στήλη προσεκτικά σε καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf.
12. Προσθέτουμε 25μl Nucleases-free water στο κέντρο της στήλης χωρίς να αγγίζει το φίλτρο.
13. Επωάζουμε για ένα λεπτό και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό.
14. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 12 και 13.
15. Απορρίπτουμε τη στήλη και αποθηκεύουμε το DNA στους 4 °C.

* Η αιθανόλη περιέχεται στο Membrane Wash Solution, περιέχει 95%.

* Το Nucleases free Water προθερμαίνεται σε υδατόλουτρο 50-65 °C.

* Όταν το βάρος του πηκτώματος είναι πάνω από 500mg, κόβουμε το πήκτωμα σε δυο κομμάτια και το τοποθετούμε σε δυο διαφορετικά σωληνάκια τύπου erpendorf.

2.4 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

Στόχος αυτής της μεθόδου είναι η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη με σκοπό τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή την απομάκρυνση αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων ή άλλων προσμίξεων. Η μέθοδος είναι αρκετά εύκολη και πολύ αποδοτική και χρησιμοποιούνται παράγοντες όπως χαμηλή θερμοκρασία και αιθανόλη οι οποίοι μειώνουν τη διαλυτότητα των νουκλεϊκών οξέων.

Υλικά:

1. Διάλυμα οξικού νατρίου (CH_3COONa): είναι ασθενές άλας του οποίου τα ιόντα Na^+ θα συνδεθούν με το αρνητικά φορτισμένο DNA ώστε να κατακρημνιστεί. Θέλουμε τελική συγκέντρωση στο διάλυμα μας 0,3M.

2. Αιθανόλη: χρησιμοποιείται ώστε να απομακρύνει τα μόρια του H₂O και το pH του διαλύματος να γίνει βασικό. Το DNA με τα Na⁺ έχουν ουδέτερο φορτίο και κατακρημνίζονται πιο εύκολα. Θέλουμε τελική συγκέντρωση 70% αιθανόλης.
3. Γλυκογόνο: ο ρόλος του είναι να συμπαρασύρει το DNA καθώς κατακρημνίζεται παγιδεύοντας το στη δομή του λόγω του ότι είναι μεγαλομόριο με πόρους.

Μέθοδος:

1. Προσθέτουμε στο δείγμα μας δυόμιση όγκους (σε σχέση με τον όγκο του δείγματος) αιθανόλης 100%, CH₃COONa και γλυκογόνο.
2. Το επωάζουμε για περίπου 30 λεπτά στους -20 °C.
3. Φυγοκεντρούμε στις μέγιστες στροφές για 15-20 λεπτά.
4. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε μισό όγκο αιθανόλη 70% ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.
5. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές
6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και απομακρύνουμε τις τελευταίες σταγόνες αιθανόλης με την πιπέτα. Αφήνουμε ανοικτό το σωληνάκι μέχρι να ξηραθεί το ίζημα του DNA.
7. Επαναδιαλύουμε το ίζημα μας σε υδατικό διάλυμα.

* Την πρώτη φορά προσθέτουμε 100% αιθανόλη γιατί στο δ/μα μας υπάρχει ddH₂O το οποίο αραιώνει την αιθανόλη σε συγκέντρωση 70%.

* Για την εκτίμηση της ποιότητας και ποσότητας του DNA μας μπορούμε να ηλεκτροφορήσουμε ενδεικτική ποσότητα με παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους.

2.5 Εκχύλιση DNA με φαινόλη- χλωροφόρμιο

Στόχος της μεθόδου είναι η απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιώντας δυο οργανικούς διαλύτες, τη φαινόλη και το χλωροφόρμιο.

Υλικά:

1. Φαινόλη: Η φαινόλη αποδιατάσσει και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊνικά οξέα.
2. Χλωροφόρμιο: Το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τα τυχόν εναπομείναντα υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα.

Μέθοδος:

1. Προσθήκη μισού όγκου (σε σχέση με τον όγκο του δείγματος) φαινόλης και χλωροφορμίου στο δείγμα μας.
2. Ανακινούμε ώστε να πάρει γαλακτώδη μορφή το μείγμα μας
3. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις μέγιστες τροφές ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις (οργανική και υδατική).
4. Μεταφέρουμε προσεκτικά την υδατική φάση με πιπέτα σε καινούριο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου και αναδεύουμε απαλά.
6. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 3-5.

* Η υδατική φάση βρίσκεται στο πάνω μέρος του σωλήνα τύπου erpendorf και η οργανική φάση στο κάτω μέρος.

* Μετά τον καθαρισμό ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη για συλλογή και συμπύκνωση του DNA μας.

2.6 Κατάτμηση DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Η πέψη του DNA γίνεται με ένζυμα περιορισμού τα οποία έχουν τη δυνατότητα να κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες και να το διασπούν. Απομονώνονται από βακτήρια και αρχαία και έχουν ως βιολογικό ρόλο την άμυνα του οργανισμού απέναντι σε ιούς. Με την είσοδο του εξωγενούς DNA οι ενδονουκλεάσες περιορισμού το αποικοδομούν κόβοντάς το σε διάφορα σημεία ενώ το μητρικό DNA προστατεύεται μέσω μεθυλίωσης. Το πρώτο ένζυμο που απομονώθηκε είναι το *HindII* από τους H.O. Smith, K.W. Wilcox και T.J. Kelley το 1968.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς κατά τη διάρκεια γονιδιακής κλωνοποίησης και πρωτεϊνικής έκφρασης. Επίσης χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση αλληλομόρφων που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο (πολυμορφισμός).

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer): ανάλογα με τα ένζυμα περιορισμού χρειάζεται και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να έχουν τις κατάλληλες συνθήκες για να πέπτουν τα δείγματα μας. Ανεξάρτητα με την αρχική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος μας θέλουμε τελική συγκέντρωση 1X.
2. Ένζυμα περιορισμού: Μια ενζυμική μονάδα (unit) ενζύμου πέπτει 1μg DNA φάγου λ στη βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου σε μια ώρα.

Μέθοδος:

Σε μια τυπική πέψη 15μl έχουμε:

Υλικά	Αρχική συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	-	2,5μl
Buffer	10X	1,5μl
Ένζυμα περιορισμού	10u/μl	0,3μl
H ₂ O	-	10,7μl
		15μl

1. Προσθέτουμε την επιθυμητή ποσότητα του DNA, του ρυθμιστικού διαλύματος και το ενζύμου περιορισμού σε αποστειρωμένα σωληνάκια τύπου erpendorf.
2. Αναδεύουμε ώστε τα συστατικά της αντίδρασης μας να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα..
3. Επωάζουμε για το λιγότερο μια ώρα στην κατάλληλη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου, συνήθως 37°C.

* Αν έχουμε περισσότερα από ένα δείγματα μπορούμε να παρασκευάσουμε ένα μίγμα που να περιέχει όλα τα συστατικά μας εκτός από DNA.

* Για να ελέγξουμε την πέψη μας μπορούμε να ηλεκτροφορήσουμε τα δείγματά μας.

2.7 Δημιουργία πλασμιδιακού φορέα με άκρα θυμίνης

Οι φορείς χρησιμοποιούνται για να δέχονται και να μεταφέρουν ένα κομμάτι DNA (ένθεμα) σε ένα κύτταρο αποδέκτη (ξενιστής) με σκοπό την κλωνοποίησή του. Για να μπορέσει να ενσωματωθεί το DNA μας πρέπει να φέρει συμπληρωματικά άκρα με το φορέα μας. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούμε το φορέα pBlueScript II SK και του προσθέτουμε άκρα θυμίνης γιατί θέλουμε να εισάγουμε ένθεμα το οποίο έχει συμπληρωματικά άκρα αδερίνης .

Η προσθήκη των καταλοίπων θυμίνης γίνεται χρησιμοποιώντας Taq DNA polymerase η οποία έχει τη δυνατότητα να προσθέτει δεοξυνουκλεοτίδια στο 3'- άκρο μιας αλυσίδας. Όταν προσθέσουμε μόνο δεοξυθυμιδικά νουκλεοτίδια στην αντίδρασή μας τότε έχουμε τα μονόκλινα άκρα θυμίνης που επιθυμούμε.

Υλικά:

1. Ένζυμο περιορισμού: στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούμε το *EcoRV*.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer): Η τελική συγκέντρωση πρέπει να είναι 1X.
3. MgCl₂: Η τελική συγκέντρωση πρέπει να είναι 1,5mM.

4. dTTPs: Η τελική συγκέντρωση πρέπει να είναι 2mM.
5. Taq DNA polymerase: Η συγκέντρωση πρέπει να είναι 2-3 U.
6. Πλασμιδιακός φορέας: Η συγκέντρωση φορέα είναι περίπου 3μg.

Μέθοδος:

1. Πραγματοποιούμε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pBluescript II με το ένζυμο *EcoRV*. Το ένζυμο αυτό πέπτει το πολυσυνδέτη μια φορά και δημιουργεί τυφλά άκρα.
2. Επωάζουμε στους 37 °C για μια ώρα.
3. Εκχυλίζουμε το φορέα μας με φαινόλη χλωροφόρμιο.
4. Κατακρημνίζουμε και επαναδιαλύουμε τον πλασμιδιακό φορέα σε 20μl H₂O.
5. Πραγματοποιούμε την αντίδραση προσθήκης T-άκρων.

Σε μια τυπική αντίδραση προσθήκης T-άκρων των 50μl έχουμε:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Φορέας	20μl
MgCl ₂ (50mM)	3μl
Buffer (10X)	5μl
dTTPs (10mM)	1μl
Taq DNA polymerase (5u/μl)	0.5μl
ddH ₂ O	20.5μl
Τελικός όγκος	50μl

6. Επωάζουμε την αντίδραση προσθήκης άκρων θυμίνης στους 72 °C για 2.5 ώρες.
7. Πραγματοποιούμε εκχύλιση με φαινόλη/ χλωροφόρμιο.
8. Πραγματοποιούμε κατακρήμνιση.
9. Επαναδιάλουμε το προϊόν της κατακρήμνισης σε 50μl H₂O.

2.8 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Για την εισαγωγή του DNA μας στο φορέα που περιέχει άκρα θυμίνης πραγματοποιούμε μια απλή αντίδραση σύνδεσης. Προστέθηκαν άκρα θυμίνης στο φορέα γιατί όπως είναι γνωστό η Taq polymerase έχει το χαρακτηριστικό της προσθήκης αδερινών στο τέλος της ενίσχυσης μορίων DNA. Τα άκρα της θυμίνης του φορέα είναι συμπληρωματικά προς τα άκρα της αδερίνης του DNA (επιθυμητού ενθέματος).

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται με την παρουσία του ενζύμου DNA λιγάσης. Οι DNA λιγάσες είναι ζωτικής σημασίας ένζυμα απαραίτητα για σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες όπως αναδιπλασιασμό του DNA, επιδιόρθωση του DNA και ανασυνδυασμό. Συγκεκριμένα μεσολαβεί στο σχηματισμό δεσμού μεταξύ του –OH του 3'- άκρου και της φωσφορικής ομάδας του 5'- άκρου.

Υλικά:

1. Φορέας: χρησιμοποιείται ο φορέας pBlueScript II SK. Η αναλογία ενθέματος προς φορέα μπορεί να είναι από 1:1- 3:1.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) T4 λιγάσης 10X: Θέλουμε τελική συγκέντρωση 1X.
3. Ένζυμο T4 λιγάση (5u/ml) : Χρησιμοποιείται διότι έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών σε αντίθεση με τη λιγάση της *E.coli* που καταλύει τη σύνδεση μόνο τυφλών άκρων. Θέλουμε η αντίδραση να περιέχει 1U.

Μέθοδος:

1. Τοποθετούμε σε σωληνάκι τύπου erpendorf την απαραίτητη ποσότητα του ενθέματος.
2. Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα του πλασμιδιακού φορέα.
3. Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος και ενζύμου T4 λιγάσης.
4. Επωάζουμε για 2.5 ώρες στους 22°C.

* Όσο μικρότερος είναι ο όγκος της αντίδρασης τόσο καλύτερη θα είναι η απόδοση της σύνδεσης.

2.9 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος DH5a της *E.Coli*. Τα κύτταρα αυτά είναι εύκολα στην καλλιέργεια, στη διατήρηση και στην αποθήκευση. Επίσης είναι εύκολος ο διαχωρισμός των μετασχηματισμένων κυττάρων (περιέχουν και το φορέα με το ένθεμα) από των μη μετασχηματισμένων λόγω του ότι εκφράζεται το καρβοξυτελικό τμήμα της β γαλακτοσιδάσης με αποτέλεσμα να μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος της α- συμπληρωματικότητας.

Υλικά:

1. Θρεπτικό υλικό LB Broth 1L: περιέχει 10gr Bactrotryptone, 5gr Yeast extract και 5gr NaCl.
2. Stock DH5a κύτταρα.
3. Γλυκερόλη 10%

Μέθοδος:

1. Παρασκευάζουμε 250ml θρεπτικού υλικού.

2. Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε με πιπέτα 1ml θρεπτικού υλικού κάτω υπό ασηπτικές συνθήκες.
3. Ενοφθαλμίζουμε μικρή ποσότητα από το stock DH5a.
4. Επωάζουμε την καλλιέργεια στις 220 στροφές, στους 37 °C για 12-16 ώρες.
5. Μετά το τέλος της επώασης μεταφέρουμε τη βακτηριακή καλλιέργεια σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού υλικού και το επωάζουμε στους 37 °C στις 230 στροφές.
6. Ανά διαστήματα φωτομετρούμε ποσότητα της καλλιέργειάς μας ώστε να έχουμε οπτική πυκνότητα (OD) 0.450-0.550 σε 600nm.
7. Όταν έχουμε την επιθυμητή οπτική πυκνότητα μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε τέσσερα παγωμένα falcon των 50ml και τα επωάζουμε για 20min στον πάγο.
8. Μετά την επώαση φυγοκεντρούμε στις 4000g στους 4°C για 15min.
9. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 50ml H₂O.
10. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 8 και 9.
11. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 7 και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 10% γλυκερόλη.
12. Φυγοκεντρούμε σε 4200g, στους 4°C για 10min.
13. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 250μl 10% γλυκερόλης ανά falcon.
14. Μοιράζουμε τα κύτταρα σε κλάσματα σε παγωμένα erpendorfs (από 40μl).
15. Αποθήκευση στους -80 °C.

*Αποθηκεύουμε στους 4°C 2ml θρεπτικού υλικού για να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στην φωτομέτρηση.

Για να υπολογίσουμε την απόδοση των δεκτικών κυττάρων τα μετασχηματίζουμε με ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας πλασμίδια γνωστής συγκέντρωσης.

1. Μετασχηματισμός κυττάρων με την προσθήκη 10pg πλασμιδίου pUC19.
2. Προσθήκη 700μl SOC.
3. Σε 2μl, 4μl και 8μl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια προσθέτουμε 198μl, 196μl, 192μl dH₂O για τελικό όγκο 200μl και επιστρώνουμε σε τριβλία.
4. Επωάζουμε στους 37°C για 12-16 ώρες.
5. Μετά την επώαση μετρούμε τις αποικίες στα τριβλία και ανάγουμε σε μονάδες pfu/μg.

2.10 Ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά τη μέθοδο αυτή ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν τη φωσφολιπιδική στοιβάδα προκαλώντας το σχηματισμό πόρων επιτρέποντας το DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Purves et. al., 2001).

Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους α. είναι πολύ αποτελεσματική β. χρειάζεται μικρή ποσότητα DNA και γ. μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ιστούς που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία. Επιστήμονες κατάφεραν να μεταφέρουν DNA με ένα φωσφορίζον σημείο αναφοράς σε ένα μη επεξεργασμένο ιστό εγκεφάλου από ποντικό (Saito, 2001).

Σημαντική παράμετρος που είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη είναι ότι πρέπει η ένταση του ρεύματος που διέρχεται στο κύτταρο να είναι ελεγχόμενη. Εάν οι παλμοί δεν έχουν την κατάλληλη τάση τότε μπορεί οι πόροι που θα σχηματιστούν να είναι πολύ μεγάλοι ή να μην μπορούν να κλείσουν με αποτέλεσμα να προκληθεί ζημιά στο κύτταρο και η μέθοδος να αποτύχει.

Υλικά:

1. Δεκτικά κύτταρα
2. Πλασμίδια
3. Στερεό θρεπτικό μέσο LB agar 1L: 10g Tryptone, 15g agar, 15g Yeast extract, 5g NaCl.
4. Αμπικικιλίνη: αντιβιοτικό σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml.
5. Θρεπτικό υλικό SOC 1L: 20g Tryptone, 5g Yeast extract, 0,5g NaCl, 20ml glucose 1M.
6. X-Gal 20mg/ml
7. IPTG 200mg/ml

Μέθοδος:

1. Τοποθετούμε τα δεκτικά κύτταρα στον πάγο να ξεπαγώσουν.
2. Από την αντίδραση σύνδεσης μας παίρνουμε 1µl και προσθέτουμε 9µl H₂O για αραιώση 1:10 με τελικό όγκο 10µl.
3. Προσθέτουμε 2µl από την αραιώση μας στα δεκτικά κύτταρα.
4. Επώαση για ένα λεπτό στον πάγο.
5. Μεταφέρουμε το μίγμα μας (δεκτικά και ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) σε ειδική κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης.
6. Τοποθετούμε την κυψελίδα στην ειδική θέση στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης οπότε και διέρχεται ρεύμα εντάσεως 13.8Kv/ cm για 5-6 msec.
7. Προσθέτουμε γρήγορα 700µl SOC.
8. Αναδεύουμε με πιπέτα και μεταφέρουμε όλη τη ποσότητα σε αποστειρωμένο σωλήνα.
9. Επωάζουμε τους σωλήνες στους 37 °C στις 175 στροφές για μια ώρα.

Μετά το τέλος της επώασης επιστρώνουμε τα τριβλία μας υπό ασηπτικές συνθήκες.

1. Παρασκευάζουμε την επιθυμητή ποσότητα στερεού θρεπτικού υλικού LB agar και αποστειρώνουμε.
2. Μετά την αποστείρωση αφήνουμε να μειωθεί η θερμοκρασία του και όταν φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου προσθέτουμε την απαραίτητη ποσότητα αμπικικιλίνης.

3. Μοιράζουμε την ποσότητα του LB agar μας στα τριβλία υπό ασηπτικές συνθήκες και αφήνουμε να στερεοποιηθεί.
4. Προσθέτουμε στην επιθυμητή ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων της καλλιέργειας μας 30μl X-gal και 3μl IPTG και επιστρώνουμε τα τριβλία.
5. Επωάζουμε τα τριβλία στους 37°C για 12-16 ώρες.

2.11 Δημιουργία stock γλυκερόλης και ανάκτηση βακτηριακών από stock γλυκερόλης

Η αποθήκευση γίνεται στους -80 °C και χρησιμοποιείται γλυκερόλη η οποία προστατεύει τους οργανισμούς που φυλάγονται εμποδίζοντας το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου.

Υλικά:

1. Γλυκερόλη 100%
2. Βακτηριακή καλλιέργεια
3. LB Broth με αμπικιλίνη

Μέθοδος:

1. Σε σωληνάκι τύπου errendorf προσθέτουμε 850μl βακτηριακής καλλιέργειας και 150μl γλυκερόλης.
2. Αναδεύουμε καλά και αποθηκεύουμε στους -80 °C.

Η ανάκτηση βακτηρίων από stock γλυκερόλης είναι απλή.

1. Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 3ml θρεπτικού υλικού LB Broth με αμπικιλίνη.
2. Με μικροβιολογικό κρίκο ενοφθαλμίζουμε ποσότητα βακτηρίων από το stock στον δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Επώαση στους 37 °C στις 210 στροφές για 12-16 ώρες.

2.12 Διάκριση ανασυνδιασμένων και μη ανασυνδιασμένων κλώνων

Για να γίνει διάκριση των ανασυνδιασμένων κλώνων έχουμε δυο σημεία επιλογής. Πρώτο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που έχουν λάβει το πλασμίδιο (ανεξάρτητα αν περιέχει ένθεμα) και δεύτερο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που περιέχουν ένθεμα και αυτών που δεν περιέχουν ένθεμα.

Το πρώτο σημείο επιλογής οφείλεται στην παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνης. Η αμπικιλίνη είναι αντιβιοτικό το οποίο προκαλεί το θάνατο των δεκτικών κυττάρων. Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Άρα η παρουσία πλασμιδίου στα κύτταρα προσδίδει ανθεκτικότητα και επιβίωση. Αντίθετα αν στα δεκτικά κύτταρα δεν περιέχεται πλασμίδιο τότε δεν υπάρχει ανθεκτικότητα και προκαλείται θάνατος.

Το δεύτερο σημείο επιλογής, ο διαχωρισμός μεταξύ των δεκτικών κυττάρων που περιέχουν πλασμίδιο με ένθεμα και αυτών που δεν περιέχουν πλασμίδιο με ένθεμα, γίνεται με βάση το χρώμα των αποικιών. Αν έχουμε ανασυνδυασμένους κλώνους (που περιέχουν το πλασμίδιο με το ένθεμα) τότε οι αποικίες μας είναι λευκές. Αντίθετα αν έχουμε μη ανασυνδυασμένους κλώνους τότε οι αποικίες είναι μπλε. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή ή όχι ενός ενζύμου, της β-γαλακτοσιδάσης. Η β-γαλακτοσιδάση υπό φυσιολογικές συνθήκες μεταβολίζει τη λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη. Η γαλακτόζη σε υψηλές ποσότητες λειτουργεί και ως επαγωγέας.

Το πλασμίδιο περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Η θέση που θα εισαχθεί το ένθεμά μας βρίσκεται ανάμεσα στο οπερόνιο. Αν σε ένα πλασμίδιο έχουμε την εισαγωγή ενός ενθέματος τότε το οπερόνιο διακόπτεται και δεν μπορεί να μεταγραφεί και να μεταφραστεί με αποτέλεσμα να μην έχουμε παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης. Άρα οι αποικίες με το ένθεμα παραμένουν λευκές. Αντίθετα πλασμίδια χωρίς ένθεμα έχοντας το IPTG ως επαγωγέα εκφράζουν το γονίδιο *lacZ* μεταβολίζοντας το X-gal δίνοντας μπλε αποικίες.

2.13 Πλασμιδιακή απομόνωση

Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση και περιλαμβάνει: α. την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων, β. την τήρηση συνθηκών οι οποίες καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά την λύση των βακτηριακών κυττάρων και γ. το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

Συγκεκριμένα το Διάλυμα I (GET) επιτελεί την αναδιάλυση των βακτηριακών κυττάρων. Η αναδιάλυση πραγματοποιείται παρουσία Tris για διατήρηση του pH, EDTA για την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την παρεμπόδιση της δράσης των νουκλεασών και γλυκόζης για τη διατήρηση της οσμωτικότητας. Το Διάλυμα II (alkali) περιέχει SDS το οποίο διαλυτοποιεί τα φωσfolιπίδια ενώ το NaOH καταστρέφει τους δεσμούς της δίκλωνης δομής του DNA και των πρωτεϊνών. Η υψηλή συγκέντρωση των αλάτων στο Διάλυμα III προκαλεί την κατακρήμνιση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και των υπολειμμάτων του κυττάρου ενώ η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA παραμένει διαλυτή και μπορεί να συλλεχθεί μέσω φυγοκέντρησης του υπερκείμενου, εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Υλικά:

1. Διάλυμα I (GET): 50mM glucose, 25mM TrisCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0).
2. Διάλυμα II (alkali): 0.2N NaOH, 1% SDS.

3. Διάλυμα III: 5 M potassium acetate (CH_3COOK) 60 ml, glacial acetic acid 11,5ml, dH_2O 28,5 ml.
4. Ρυθμιστικό Διάλυμα TE: Περιέχει RNάση A σε συγκέντρωση 20μg/ml.

Μέθοδος:

1. Αναδεύουμε ήπια την βακτηριακή καλλιέργεια.
2. Εισάγουμε 1,5ml καλλιέργειας σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου erpendorf.
3. Φυγοκεντρούμε στις 3000rpm για 3 λεπτά.
4. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και εισάγουμε 100μl παγωμένου διαλύματος I.
5. Αναδεύουμε ισχυρά και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Τοποθετούμε σε πάγο το σωληνάκι τύπου erpendorf και εισάγουμε 200μl διάλυμα II (alkali) και αναδεύουμε ήπια.
7. Επωάζουμε το σωληνάκι τύπου erpendorf στον πάγο για 7- 8 λεπτά.
8. Εισάγουμε 150μl παγωμένου διαλύματος Διάλυμα III (CH_3COOK) και αναδεύουμε με έντονες κινήσεις..
9. Επωάζουμε το erpendorf στον πάγο για 7- 8 λεπτά
10. Φυγοκεντρούμε το υπερκείμενο για 10 λεπτά στις μέγιστες στροφές και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σημασμένο σωληνάκι erpendorf.
11. Εκχυλίζουμε το διάλυμα με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζουμε το πλασμιδιακό DNA με αιθανόλη.
12. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TE 50μl.
13. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

2.14 Φαγική λ Βιβλιοθήκη

2.14.1 Επίστρωση φαγικής γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης σε τριβλία

Για την επίστρωση και των δυο βιβλιοθηκών χρησιμοποιείται παρόμοια διαδικασία με κάποιες μικρές διαφορές. Στην cDNA Βιβλιοθήκη χρησιμοποιούμε κύτταρα του στελέχους MRF της *E.coli* ενώ στην γονιδιωματική χρησιμοποιούμε κύτταρα του στελέχους MRA της *E.coli*. Τα κύτταρα αυτά θα χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές για να εισαχθούν μέσα οι ανασυνδισασμένοι φάγοι και να καλλιεργηθούν.

Οι πλάκες στα τριβλία, οι φάγοι δηλαδή, εμφανίζονται ως διαυγή σημεία επάνω στο βακτηριακό υπόστρωμα. Οι πλάκες είναι το αποτέλεσμα των συνεχών κύκλων προσβολής και λύσης των βακτηρίων από τα φαγικά σωματίδια.

Υλικά:

1. Θρεπτικό υλικό LB Broth 1L: 15g LB-Broth και dH₂O
2. Διάλυμα 1M MgSO₄
3. Διάλυμα μαλτόζης 20%
4. Στερεό θρεπτικό υλικό NZY agar 1L: Περιέχει 5g NaCl, 2g MgSO₄·7H₂O, 5g εκχύλισμα ζύμης, 10g NZ αμίνη, 15g άγαρ (pH 7.5).
5. Top agar 1L: Περιέχει 5g NaCl, 2g MgSO₄·7H₂O, 5g εκχύλισμα ζύμης, 10g NZ αμίνη, 0.7% αγαρόζη.
6. Κύτταρο Ξενιστής: MRA, MRF
7. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) SM 1L: 5.8g NaCl, 2g MgSO₄·7H₂O, 50ml Tris HCl 1M(pH 7.5), 5ml ζελατίνη 2%
8. Γονιδιωματική ή cDNA βιβλιοθήκη

Μέθοδος:

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 5ml LB Broth, 50μl MgSO₄ 1M και 50μl μαλτόζη 20% ενοφθαλμίζουμε μικρή ποσότητα κυττάρων από το stock γλυκερόλης.
2. Επωάζουμε για περίπου 6 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση στις 210 στροφές.
3. Μετά το τέλος της επώασης μοιράζουμε την καλλιέργεια σε erpendorfs.
4. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 3000 στροφές.
5. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
6. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 10mM MgSO₄.
7. Φωτομετρούμε τα κύτταρα σε μήκος κύματος 600nm ώστε να έχουμε τιμή οπτικής πυκνότητας 0,400- 0,600.
8. Παρασκευάζουμε τριβλία NZY agar και διάλυμα Top agar.
9. Πραγματοποιούμε διάφορες αραιώσεις της βιβλιοθήκης μας (10⁻¹ μέχρι 10⁻⁶) σε ρυθμιστικό διάλυμα SM.
10. Σε σωληνάκια erpendorfs που περιέχουν 200μl κύτταρα (είτε MRA είτε MRF)προσθέτουμε 2μl από τις αραιώσεις 10⁻³ με 10⁻⁶.
11. Επωάζουμε στους 37°C υπό ανάδευση για 20 λεπτά.
12. Προθερμαίνουμε το Top agar για να επανέλθει σε υγρή μορφή και το τοποθετούμε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 48-50°C.
13. Σε 4 αποστειρωμένους σωλήνες που διατηρούνται στο υδατόλουτρο προσθέτουμε 3ml Top agar και στη συνέχεια μεταφέρουμε το μίγμα βακτηρίων και φάγων.
14. Με γρήγορες κινήσεις αναδεύουμε και επιστρώνουμε το μίγμα στο τριβλίο.
15. Επωάζουμε στους 37 °C για 12 ώρες.

- * Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες.
- * Απομακρύνουμε από το υδατόλουτρο τους δοκιμαστικούς σωλήνες πριν μεταφέρουμε τα κύτταρα μας γιατί η υψηλή θερμοκρασία του υδατόλουτρου θα προκαλέσει θάνατο των κυττάρων.
- * Για την επίστρωση τριβλίου (22cm x 22 cm) χρησιμοποιούμε 700μl (αντί 200μl) κύτταρα και 30ml Top Agar (αντί 3ml).

Για να υπολογίσουμε τον τίτλο της βιβλιοθήκης μας γίνεται καταμέτρηση των πλακών που έχουμε σε κάθε αραίωση και σύμφωνα με τον τύπο (αριθμός πλακών rfu X συντελεστής αραίωσης) / (όγκος που επιστρώθηκε σε μl X 1000μl /ml). Η διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου πραγματοποιήθηκε περίπου σε 80 000 πλάκες ανασυνδιασμένων βακτηριοφάγων λ.

2.14.2 Διαλογή Βιβλιοθήκης

Η διαλογή της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται σε δυο διαλογές. Αρχικά έχουμε τη πρώτη διαλογή κατά την οποία πραγματοποιείται μεταφορά σε μεμβράνη των φαγικών πλακών του μεγάλου τριβλίου, στη συνέχεια υβριδοποίηση και εμφάνιση και έπειτα έχουμε τη δεύτερη διαλογή δηλαδή τη μεταφορά σε μεμβράνη των πλακών που μας έδωσαν «σήμα» κατά την πρώτη διαλογή. Πραγματοποιούμε δεύτερη διαλογή με σκοπό την απομόνωση μιας μοναδικής πλάκας που αντιστοιχεί η υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή μας (το σήμα μας).

Υλικά:

1. Δ/μα αποδιάταξης: 0.5M NaOH, 1.5M NaCl
2. Δ/μα εξουδετέρωσης: 0.5M Tris-HCl, 1.5M NaCl
3. Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): 0.2M Tris-HCl (pH7.5) , 2X SSC.
4. SM Buffer
5. Μεμβράνη

Μέθοδος:

1. Μετά το πέρας της επώασης των τριβλίων τα μεταφέρουμε στο ψυγείο για το λιγότερο 2 ώρες.
2. Μεταφέρουμε τη μεμβράνη στο τριβλίο για 2 λεπτά και σημειώνουμε σημεία αναγνώρισης με βελόνα και μολύβι για να μπορούμε να αντιστοιχίσουμε το σήμα με την πλάκα μας.
3. Τοποθετούμε τη μεμβράνη ανάποδα σε 30ml δ/μα αποδιάταξης για 2 λεπτά.
4. Τοποθετούμε τη μεμβράνη ανάποδα σε 30ml δ/μα εξουδετέρωσης για 5 λεπτά.
5. Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε διάλυμα buffer το πολύ 30 δευτερόλεπτα.
6. Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε χαρτί μέχρι να στεγνώσει και ψήνουμε στους 80°C για 2 ώρες.
7. Πραγματοποιούμε προύβριδοποίηση, υβριδοποίηση και εμφάνιση σήματος.
8. Απομονώνουμε με γυάλινη πιπέτα Pasteur τις πλάκες που μας έδωσαν σήμα σε σωληνάκι eppendorf.

9. Προσθέτουμε 200μl SM Buffer.

10. Αποθηκεύουμε στους 4°C.

* Τα τριβλία τοποθετούνται στο ψυγείο πριν τη μεταφορά ώστε να μην επικολλάται το Top Agar στη μεμβράνη και να χάνονται οι πλάκες κατά τη μεταφορά

* Το ψήσιμο πραγματοποιείται ώστε να στερεοποιηθεί το DNA μας στη μεμβράνη.

* Οι πλάκες πριν να πραγματοποιηθεί η δεύτερη διαλογή είναι καλύτερα να μείνουν για 12-16 ώρες στο SM Buffer ώστε να μπορέσουν να διαχυθούν καλύτερα οι φάγοι στο διάλυμα.

2.14.3 Απομόνωση φαγικού DNA- Γονιδιωματική Βιβλιοθήκη

(Το πρωτόκολλο αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου του Yamamoto et al., (1970), όπως αυτό περιγράφεται στο βιβλίο «Molecular Cloning, A laboratory manual» Sambrook et al., 1989)

Υλικά:

1. Κύτταρα MRA
2. Μεμονωμένη πλάκα φάγου: βρίσκεται σε δ/μα SM Buffer.
3. Θρεπτικό υλικό LB Broth
4. Διάλυμα $MgSO_4$ 1M
5. Χλωροφόρμιο
6. DNAση I: αποικοδομεί δεοξυριβοζονουκλεοτιδικά αμινοξέα που απελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων
7. RNAση A: αποικοδομεί ριβοζονουκλεοτιδικά αμινοξέα που απελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων
8. Στερεό NaCl 1M: προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα.
9. Πολυαιθυνογλυκόλη 800 (PEG): προκαλεί την κατακρήμνιση των βακτηριακών υπολειμμάτων
10. SM Buffer

Μέθοδος:

1. Επωάζουμε καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων MRA σε θρεπτικό υλικό LB Broth για 12-16 ώρες .
2. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου erpendorf μεταφέρουμε 500μl από τα MRA.
3. Προσθέτουμε 40μl από τη μεμονωμένη πλάκα του φάγου μας στο σωληνάκι τύπου erpendorf.
4. Επωάζουμε υπό ανακίνηση στους 37°C για 20 λεπτά.
5. Σε μια κωνική φιάλη προσθέτουμε 20ml LB Broth, $MgSO_4$ σε τελική συγκέντρωση 0.01M και 300μl MRA

6. Επωάζουμε για 6 με 7 ώρες στις 220 στροφές στους 37 °C ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων.
7. Προσθέτουμε 100μl χλωροφόρμιο.
8. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε αποστειρωμένο falcon και φυγοκεντρούμε στις 8000g για 10 λεπτά.
9. Μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο σε καινούριο falcon.
10. Προσθέτουμε DNAάση και RNAση A σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml για 30 λεπτά στους 37°C.
11. Προσθέτουμε NaCl σε τελική συγκέντρωση 1M.
12. Ανακινούμε ισχυρά και επωάζουμε στον πάγο για 1-2 ώρες.
13. Φυγοκεντρούμε στις 11000g για 10 λεπτά.
14. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο falcon
15. Προσθέτουμε PEG σε τελική συγκέντρωση 10%.
16. Επωάζουμε στον πάγο για περίπου 2 ώρες.
17. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 1100g στους 4°C.
18. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και περιμένουμε να στεγνώσει.
19. Προσθέτουμε 1ml SM Buffer.
20. Αναδεύουμε ήπια για 30 λεπτά.
21. Προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο.
22. Ανακινούμε ισχυρά και φυγοκεντρούμε στις 3000g για 15 λεπτά.
23. Μεταφέρουμε το αιώρημα των φάγων σε καινούριο σωληνάκι τύπου erpendorf.
24. Προσθέτουμε EDTA σε τελική συγκέντρωση 20mM, SDS σε τελική συγκέντρωση 0,5% και πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml.
25. Επωάζουμε για 1 ώρα στους 56°C.
26. Πραγματοποιούμε εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο.
27. Πραγματοποιούμε κατακρήμνιση και αναδιάλυση σε δ/μα TE.
28. Αποθηκεύουμε στους 4 °C.

* Το θρεπτικό μας υλικό πρέπει να προθερμανθεί στους 37 °C.

* Κατά την επώαση της λύσης παρατηρείται στην αρχή διαυγές διάλυμα, μετά από κάποιο σημείο παρατηρείται θόλωση λόγω της ανάπτυξης των βακτηρίων ενώ στο τέλος το διάλυμα ξαναγίνεται διαυγές με υπολείμματα βακτηρίων γιατί παρατηρείται η λύση των βακτηρίων και η απελευθέρωση των πολλαπλασιασμένων φάγων.

* Το NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα.

* Το PEG προκαλεί κατακρήμνιση των φάγων.

2.14.4 Απομόνωση Φαγεμιδίου- cDNA Βιβλιοθήκη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν pBluescript II φαγεμίδια. Τα φαγεμίδια αποτελούν φορείς κλωνοποίησης καθώς διαθέτουν μια περιοχή πολυσυνδέτη δηλαδή μια περιοχή αλληλουχίες αναγνώρισης για 21 ένζυμα περιορισμού.

Υλικά:

1. Θρεπτικό υλικό LB Broth
2. Διάλυμα $MgSO_4$ 1M
3. Διάλυμα Μαλτόζη 20%
4. Κύτταρα MRF
5. Helper phage

Μέθοδος:

1. Επωάζουμε καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων MRF για 12-16 ώρες σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχουν θρεπτικό υλικό LB Broth, $MgSO_4$ και μαλτόζη σε τελική συγκέντρωση 10mM και 0,2% αντίστοιχα.
2. Φυγοκεντρούμε στις 2rpm για 10 λεπτά.
3. Αραιώνουμε με $MgSO_4$ 10mM.
4. Φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 600nm και αραιώνουμε μέχρι να έχουμε τιμή οπτικής πυκνότητας 1,000.
5. Σε αποστειρωμένο falcon προσθέτουμε 200μl MRF.
6. Προσθέτουμε 250μl από τη μεμονωμένη πλάκα του φάγου μας.
7. Προσθέτουμε 1μl helper phage ExAssist.
8. Επωάζουμε στους 37°C για 15 λεπτά.
9. Προσθέτουμε 3ml LB Broth.
10. Επωάζουμε για 2,5-3 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση.
11. Τοποθετούμε το falcon για 20 λεπτά σε 65-70°C.
12. Φυγοκεντρούμε για 1000g για 15 λεπτά.
13. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο falcon.

* Η αρχική επώαση για 15 λεπτά πραγματοποιείται ώστε ο φάγος να προσδεθεί στα κύτταρα.

* Η υψηλή θερμοκρασία 65-70°C προκαλεί λύση των φάγων και των κυττάρων.

* Μπορεί να αποθηκευτεί σε αυτή τη μορφή για 1-2 μήνες.

2.15 Δημιουργία ανιχνευτή

Ο ανιχνευτής είναι μια αλληλουχία DNA ή RNA που χρησιμοποιείται σε δείγματα DNA ή RNA για να εντοπίσει αλληλουχία που είναι συμπληρωματική με αυτό. Για να γίνει αυτό ο σημασμένος ανιχνευτής πρέπει πρώτα να αποδιαταχθεί (μέσω υψηλής θερμοκρασίας) και μετά να υβριδοποιηθεί με το DNA ή RNA.

Η σήμανση του ανιχνευτή σε αυτή τη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με μια μη ραδιενεργή μέθοδο κατά την οποία ο DNA ανιχνευτής σημαίνεται με βιοτίνη. Η μέθοδος στηρίζεται στη δράση του ενζύμου Klenow DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί ως μήτρα τις αλυσίδες αποδιαταγμένων μορίων DNA και ως εκκινητές τυχαία ολιγονουκλεοτίδια συνθέτοντας νέες αλυσίδες νουκλεοτιδίων, μεταξύ των οποίων και σημασμένα δηλαδή ενσωματώνοντας στο 3'- άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας βιοτυνιλιωμένα δεοξυνουκλεοτίδια.

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) 5X: περιέχει τους εκκινητές της αντίδρασης οι οποίοι είναι εκφυλισμένα δεκανουκλεοτίδια. Τελική συγκέντρωση 1X.
2. Μείγμα μη σημασμένων νουκλεοτιδίων (dNTPs) Τελική συγκέντρωση 0,1mM
3. bio-d-UTP: Τα βουτυνιλιωμένα δεοξυνουκλεοτίδια εισάγονται σε τελική συγκέντρωση 0,035mM.
4. Klenow πολυμεράση σε τελική συγκέντρωση 5 U.

Μέθοδος:

Σε μια τυπική αντίδραση σήμανσης έχουμε:

Συστατικά	Ποσότητα
DNA	32,25μl
Buffer	10l
Klenow	1μl
DNTPs	5μl
bio-d-Utp	1,75μl
ddH ₂ O	-
Τελικός όγκος	50μl

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προσθέτουμε το προς σήμανση DNA.
2. Προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα.
3. Θερμαίνουμε το μίγμα σε νερό 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί το DNA μας.
4. Αφήνουμε το μίγμα στον πάγο για ένα λεπτό.

5. Κάνουμε μια γρήγορη φυγοκέντρηση και τα ξανατοποθετούμε στον πάγο για ένα λεπτό
6. Προσθέτουμε τα υπόλοιπα συστατικά με την εξής σειρά: dNTPs, bio-d- UTP και Klenow πολυμεράση.
7. Ανακινούμε με πιπέτα και επωάζουμε στους 37°C για 16 ώρες.

* Προσθέτουμε νερό μόνο όταν είναι απαραίτητο για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης μας, τα 50μl.

Για να ελέγξουμε την επιτυχή σήμανση του ανιχνευτή μας πραγματοποιούμε σποτάρισμα.

1. Μετά από το πέρας της επώασης κατακρημνίζουμε τον ανιχνευτή μας και τον αναδιαλύουμε σε 50μl H₂O.
2. Προσθέτουμε 1μl ανιχνευτή και 9μl dH₂O (αραίωση 1:10).
3. Τοποθετούμε σε ειδική μεμβράνη υβριδοποίησης 1μl, 3μl και 6μl ανιχνευτή.
4. Πραγματοποιούμε τη διαδικασία ανίχνευσης σήματος.

2.16 Σταθεροποίηση του DNA σε ναύλον μεμβράνη

Στόχος μας είναι η ακινητοποίηση των νουκλειικών οξέων σε νάιλον μεμβράνη. Αρχικά αποδιάτασσουμε τις αλληλουχίες μας με το διάλυμα αποδιάταξης. Η αποδιάταξη σταματά με τη δράση του διαλύματος εξουδετέρωσης και στη συνέχεια πραγματοποιείται η μεταφορά. Η μεταφορά βασίζεται στο τριχοειδές φαινόμενο κατά το οποίο γίνεται μεταφορά ενός διαλύματος από μια περιοχή υψηλού δυναμικού (πήκτωμα) σε μια περιοχή χαμηλού δυναμικού (μεμβράνη). Με τη μεταφορά του διαλύματος συμπαρασύρονται και τα μονόκλιωνα νουκλειικά οξέα στη μεμβράνη η οποία έχει φορτίο θετικό και ευνοεί την πρόσδεση του DNA.

Υλικά:

1. Διάλυμα αποδιάταξης: 0,5M NaOH, 1,5M NaCl
2. Διάλυμα εξουδετέρωσης: 0,5M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5M NaCl
3. Διάλυμα 20X SSC: 0,3M κιτρικό νάτριο, 3M NaCl

Μέθοδος:

Αρχικά έχουμε τη μεταφορά του DNA του πηκτώματος αгарόζης σε νάιλον μεμβράνη:

1. Τοποθετούμε το πήκτωμα σε ένα βαθύ δοχείο.
2. Αν το DNA είναι μεγέθους μεγαλύτερο από 10kb τότε προσθέτουμε διάλυμα HCl 0,2N.
3. Αναδεύουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αφαιρούμε το διάλυμα και ξεπλύνουμε το πήκτωμα με απιονισμένο νερό.
5. Προσθέτουμε διάλυμα αποδιάταξης και αναδεύουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Αφαιρούμε το διάλυμα και επαναλαμβάνουμε το βήμα 5.
7. Αφαιρούμε το διάλυμα και ξεπλένουμε το πήκτωμα με απιονισμένο νερό.
8. Προσθέτουμε διάλυμα εξουδετέρωσης και αναδεύουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Αφαιρούμε το διάλυμα και επαναλαμβάνουμε το βήμα 8.
10. Αφαιρούμε το διάλυμα και ξεπλένουμε το πήκτωμα με απιονισμένο νερό.
11. Προσθέτουμε διάλυμα SSC 6X και αναδεύουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Τοποθετούμε το πήκτωμα σε μια επιφάνεια έχοντας προσανατολισμένα τα πηγαδάκια προς τα κάτω (αντίθετα από την ηλεκτροφόρηση).
13. Εμβαπτίζουμε τη μεμβράνη πρώτα σε απιονισμένο νερό και μετά σε SSC 6X και την τοποθετούμε πάνω από το πήκτωμα προσεκτικά.
14. Εμβαπτίζουμε 2 φύλλα Whatman σε απιονισμένο νερό και τα τοποθετούμε πάνω από τη μεμβράνη.
15. Τοποθετούμε επιπλέον 2 Whatman πάνω στα υπόλοιπα χωρίς να τα εμβαπτίσουμε πουθενά.
16. Τοποθετούμε μια στοίβα χαρτιών και ένα βάρος ώστε να διευκολυνθεί ακόμη περισσότερο η μεταφορά.
17. Προσθέτουμε γύρω από το πήκτωμα διάλυμα SSC 6X.
18. Αφήνουμε τη συσκευή ώστε να γίνει η μεταφορά το λιγότερο 2 ώρες.
19. Μετά το πέρας της μεταφοράς αποσυναρμολογούμε τη συσκευή και μεταφέρουμε προσεκτικά τη μεμβράνη για «ψήσιμο» στους 80°C για 2 ώρες ώστε να ακινητοποιηθούν τα νουκλειικά οξέα.

* Το HCl διασπά τα μεγάλα τμήματα DNA χωρίς να τα μετακινεί από τη θέση τους, έτσι ώστε να διευκολύνεται η μεταφορά στη μεμβράνη.

* Κατά τα χρονικά διαστήματα των αναδεύσεων ετοιμάζουμε στις κατάλληλες διαστάσεις χαρτιά, 4 Whatman και μεμβράνη. Πρέπει να έχουν περίπου μισό εκατοστό διαφορά δηλαδή αν ένα πήκτωμα έχει διαστάσεις 14 cm X 7cm τότε η μεμβράνη θα είναι 13.5 cm X 6.5 cm, τα Whatman 13.5 cm X 6 cm και τα χαρτιά 13 cm X 5.5cm.

* Όταν αγγίξει η μεμβράνη στο πήκτωμα δεν μπορούμε να τη μετακινήσουμε ξανά.

2.17 Προϋβριδοποίηση

Κατά την προϋβριδοποίηση στόχος είναι η μείωση του background ώστε να μειωθούν οι πιθανότητες μη ειδικής δέσμευσης του ανιχνευτή.

Υλικά:

1. Σπέρμα σολωμού (salmon sperm ssDNA): τελική συγκέντρωση 100μg/ml
2. Διάλυμα προϋβριδοποίησης: περιέχει 6X SSC, 5X Denhardt's, 0,5% SDS
3. Denhardt's 50X, 500ml: 5g Φικόλη, 5g polyvinylpyrrolidone, 5g BSA, dH₂O

Μέθοδος:

Μετά το τέλος του «ψησίματος» της μεμβράνης πραγματοποιούμε προϋβριδοποίηση.

1. Τοποθετούμε το salmon sperm (ssDNA) σε νερό που βράζει για 10 λεπτά για να αποδιαταχθεί.
2. Παρασκευάζουμε την επιθυμητή ποσότητα διαλύματος προϋβριδοποίησης
3. Μεταφέρουμε το salmon sperm για ένα λεπτό στον πάγο.
4. Τοποθετούμε τη μεμβράνη στο σωλήνα υβριδοποίησης έτσι ώστε το DNA να είναι τοποθετημένο στο εσωτερικό του σωλήνα.
5. Προσθέτουμε το salmon sperm στο διάλυμα προϋβριδοποίησης.
6. Μεταφέρουμε το διάλυμα στο σωλήνα υβριδοποίησης.
7. Επώαση για δυο ώρες υπό κυκλική κίνηση σε θερμοκρασία ανάλογη του ανιχνευτή.

* Η ποσότητα του διαλύματος υβριδοποίησης υπολογίζεται από τον τύπο: Τελικός όγκος = Εμβαδό μεμβράνης X 0,2.

* Το ssDNA συνδέεται στις μη ειδικές θέσεις.

* Το Denhardt's περιέχει φικκόλη και PVP που είναι μεγαλομόριακές ενώσεις και καταλαμβάνουν χώρο και BSA η οποία είναι μια μη ειδική πρωτεΐνη.

2.18 Υβριδοποίηση

Μετά το τέλος της προϋβριδοποίησης πραγματοποιούμε υβριδοποίηση της μεμβράνης με τον ανιχνευτή. Κατά την υβριδοποίηση έχουμε σχηματισμό υβριδίων μεταξύ της αλληλουχίας του ανιχνευτή και αλληλουχίας DNA.

Υλικά:

1. Ανιχνευτής
2. Διάλυμα υβριδοποίησης: περιέχει 6X SSC, 5X Denhardt's, 0,5% SDS

Μέθοδος:

1. Τοποθετούμε τον ανιχνευτή που παρασκευάσαμε σε νερό που βράζει για 10 λεπτά.
2. Μεταφέρουμε τον ανιχνευτή στον πάγο για 2 λεπτά.
3. Προσθήκη του ανιχνευτή στο δ/μα προϋβριδοποίησης.
4. Επώαση στην απαραίτητη θερμοκρασία για την υβριδοποίηση του ανιχνευτή (ίδια με προϋβριδοποίηση) υπό κυκλική ανάδευση για περίπου 16 ώρες.

2.19 Ανίχνευση σήματος υβριδοποίησης

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στη σύνδεση της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη. Η οποία στρεπταβιδίνη είναι συνδεδεμένη με την αλκαλική φωσφατάση και καταλύει μια χρωμογόνο αντίδραση

με το X-phosphate και το NBT. Το X-phosphate χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση και το προϊόν που σχηματίζεται αντιδρά με το O₂ για να δώσει μια αδιάλυτη ερυθροκυανή χρώση, ενώ το NBT χρησιμοποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων αντί το O₂. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ανιχνευτή.

Υλικά:

1. Διάλυμα πλύσης 1: περιέχει 2X SSC, 0.1% SDS
2. Διάλυμα πλύσης 2: περιέχει 0.2X SSC, 0.1% SDS
3. Διάλυμα A: περιέχει 100mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl
4. Διάλυμα B: περιέχει 1% Blocking Solution. Το Blocking Solution είναι διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη 10g ανά 100ml Διαλύματος A και συνδέεται στις μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος.
5. Διάλυμα C: περιέχει 100mM Tris HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂
6. Αντίσωμα: σύμπλοκο στρεπταβιδίνης- αλκαλικής φωσφατάσης: 5μl ανά 10ml δ/τος B
7. NBT: προσθέτουμε 50μl ανά 10ml δ/τος C
8. BCIP: προσθέτουμε 37.5μl ανά 10ml δ/τος C

Μέθοδος:

1. Αφαιρούμε προσεκτικά το διάλυμα υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή και το διατηρούμε σε αποστειρωμένο falcon στους -20°C.
2. Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε δοχείο.
3. Προσθέτουμε διάλυμα πλύσης 1 μέχρι να καλυφθεί η μεμβράνη και αναδεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Αφαιρούμε το διάλυμα πλύσης 1.
5. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 3 και 4.
6. Προσθέτουμε το διάλυμα πλύσης 2 μέχρι να καλυφθεί η μεμβράνη και αναδεύουμε στη θερμοκρασία υβριδοποίησης για 20 λεπτά.
7. Αφαιρούμε το διάλυμα πλύσης 2.
8. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 6 και 7.
9. Προσθέτουμε διάλυμα A μέχρι να καλυφθεί η μεμβράνη και αναδεύουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Αφαιρούμε το διάλυμα A.
11. Προσθέτουμε το διάλυμα B μέχρι να καλυφθεί η μεμβράνη και αναδεύουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Απορρίπτουμε το διάλυμα B και προσθέτουμε διάλυμα B με αντίσωμα.

13. Αναδεύουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Αφαιρούμε το διάλυμα Β με το αντίσωμα (φυλάγεται για επόμενη χρήση).
15. Προσθέτουμε διάλυμα Α μέχρι να καλυφθεί η μεμβράνη και αναδεύουμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Αφαιρούμε το διάλυμα Α.
17. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 15 και 16
18. Προσθέτουμε διάλυμα C για εξισορρόπηση 2 λεπτά.
19. Αφαιρούμε το διάλυμα C.
20. Καλύπτουμε τη μεμβράνη με διάλυμα C που περιέχει τις κατάλληλες ποσότητες NBT και BCIP σε σκοτεινό μέρος.
21. Αναμονή για εμφάνιση σήματος.
 - * Το διάλυμα πλύσης 2 διατηρείται σε υδατόλουτρο ώστε να έχει τη θερμοκρασία υβριδοποίησης.
 - * Το διάλυμα SSC έχει μικρότερη συγκέντρωση στο διάλυμα πλύσης 2 από ότι στο διάλυμα πλύσης 1 γιατί όσο πιο αραιό το διάλυμά μας τόσο πιο πολύ μειώνεται η ιοντικής ισχύ άρα αυξάνεται και η αποδέσμευση μορίων.
 - * Στο διάλυμα πλύσης 1 έχουμε ήπιες συνθήκες ενώ στο διάλυμα πλύσης 2 γίνονται πιο αυστηρές οι συνθήκες και περισσότερα μόρια μη ειδικά συνδεδεμένα απομακρύνονται.

2.20 Επεξεργασία αλληλουχιών DNA

Για την επεξεργασία αλληλουχιών DNA ώστε να εντοπιστούν αναγνωστικά πλαίσια, να σχεδιαστούν εκκινήτες ή να εντοπιστούν θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, χρησιμοποιούμε το πρόγραμμα OMIGA. Για την σύγκριση αλληλουχιών DNA με αλληλουχίες άλλων οργανισμών χρησιμοποιήθηκε το διαικτυακό πρόγραμμα BLAST του NCBI.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη της δομής και της οργάνωσης του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου, στο βαθμό που αυτός εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad.

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η σύνθεση των κατάλληλων ανιχνευτών με ενίσχυση γονιδιωματικής περιοχής των διάφορων υπομονάδων της *Drosophila melanogaster* και η διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου της ελιάς με στόχο την απομόνωση ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων που να αντιστοιχούν σε υπομονάδες του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου. Την απομόνωση των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων ακολούθησε η υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων τους και η μελέτη της γονιδιωματικής τους οργάνωσης. Μετά την επιτυχή διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε διαλογή cDNA βιβλιοθήκης του δάκου καθώς αυτό θα επέτρεπε την απομόνωση ολόκληρων μεταγράφων που κωδικοποιούν υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του εντόμου.

Ενίσχυση εξονίων των γονιδίων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου της ελιάς και της *Drosophila melanogaster*.

Η *Drosophila melanogaster* ανήκει στην ίδια τάξη εντόμων (Diptera) με το δάκο της ελιάς και είναι αναμενόμενο να παρουσιάζουν γονιδιωματική ομοιότητα. Επομένως είναι πολύ πιθανό ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένα για τη *Drosophila melanogaster* να ενισχύουν αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές και στο *Bactrocera oleae*. Με αυτή τη λογική σχεδιάστηκαν εκκινητές μέσω του προγράμματος OMIGA για τις δημοσιευμένες αλληλουχίες των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης της *Drosophila melanogaster* (πίνακας 1). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να ενισχύουν εξόνια που κωδικοποιούν διαμεμβρανικές περιοχές των υπομονάδων γιατί οι διαμεμβρανικές περιοχές είναι περισσότερο συντηρημένες κι επομένως υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα ενίσχυσης της αντίστοιχης αλληλουχίας και στο *Bactrocera oleae*.

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Θερμοκρασία Ta	Αναμενόμενο προϊόν
Da1-Ex7F	GACTCGGACAACATCGAGG	55°C	304bp
Da1-Ex7R	AGGAGGAAGAACACGGTAAGC	59°C	
Da2-Ex5F	TTGCTCTGTGCATCAGCATCC	59°C	364bp
Da2-Ex5R	CGAGTTCATTTGCATCTCGTCC	61°C	
Da3-Ex9F	TGCAAACCTACAACCTGATGG	57°C	354bp
Da3-Ex9R	GAGAAATTCGCCGAGCAGC	55°C	
Da4-Ex5F	TGACTCTTGCAACTAAAGC	49°C	152bp
Da4-Ex5R	GGCAGTTGGACTTATGATG	53°C	
Da5-Ex4F	GAATCTCCGCTGGAACACC	55°C	256bp
Da5-Ex4R	AACTGCCGAACCTCATCTCG	55°C	
Da7-Ex7F	CTATAATTGCTGCCCAGAACC	57°C	135bp
Da7-Ex7R	CAGTGTAACCCCTAGCAGTGC	59°C	
Db1-Ex6F	AAGATTCTGCCACCAACGTCG	59°C	512bp
Db1-Ex6R	ATCCTCGTTCGCAAGTGC	55°C	
Db2-Ex5F	GTAACCTGTGATGACGAAAGC	53°C	154bp
Db2-Ex5R	CATTGTAGGTCCATGAACC	51°C	
Db3-Ex2F	ATGTCAAGGCCCTGGATCG	55°C	141bp
Db3-Ex2R	TTGCCGTTCAACTCGTCG	51°C	

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών για ενίσχυση των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης σύμφωνα με τις αλληλουχίες της *Drosophila melanogaster*. Η ονομασία του κάθε εκκινητή αποτελείται από το γράμμα D για τη *Drosophila melanogaster*, τον αριθμό της υπομονάδας, τον αριθμό του εξονίου και τη φορά του εκκινητή αν είναι forward (εμπρός) ή reverse (πίσος). Η τρίτη στήλη αντιστοιχεί στη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ενώ η τέταρτη παρουσιάζει το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έχοντας ως μήτρα γονιδιωματικό DNA της *Drosophila melanogaster* και του *Bactrocera oleae*. Μετά το τέλος της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και παρατηρήθηκε η ενίσχυση όλων των αλληλουχιών που είχαν ως μήτρα γονιδιωματικό DNA της *Drosophila melanogaster*, ενώ όσον αφορά στο δάκο της ελιάς ήταν επιτυχής η ενίσχυση μόνο του δυνητικού εξονίου 7 της υπομονάδας α7.

Τα προϊόντα ανακτήθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και εισήχθησαν μέσω αντίδρασης σύνδεσης σε φορέα pBlueScript II με άκρα θυμίνης. Επιλέχθηκε ο φορέας pBlueScript II με άκρα θυμίνης γιατί τα ενθέματα μας είναι προϊόντα PCR που διαθέτουν πολυαδενυλικές ουρές από την Taq πολυμεράση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση και έγινε διάκριση των μετασχηματισμένων και ανασυνδυασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών.

Από τις αποικίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού PvuII. Ο συνολικός φορέας έχει μέγεθος 3000bp και το ένζυμο περιορισμού κόβει

το φορέα στις 427bp και 497bp. Από κάθε πέψη αναμένουμε δύο προϊόντα, μια ζώνη 2500bp που αντιστοιχεί στο φορέα και μια ζώνη 500bp μαζί με το μέγεθος του ενθέματος (αν δεν υπάρχει άλλη θέση κοπής στο ένθεμα για το ένζυμο). Στην ηλεκτροφόρηση της πέψης παρατηρήσαμε το επιθυμητό προϊόν στα δείγματα a1Dm3, a2Dm2, a3Dm3, a5Dm1, a7Bo1, a7Dm1, b1Dm2, b3Dm2 τα οποία στάλθηκαν για ανάλυση της πρωτοδιάταξής τους.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BLAST του διαδικτυακού τόπου NCBI και επιβεβαιώθηκε ότι κλωνοποιήθηκαν οι αντίστοιχες περιοχές του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης της *Drosophila melanogaster* a1Dm3, a2Dm2, a3Dm3, a5Dm1, a7Dm1, b1Dm2, b3Dm2 και του *Bactrocera oleae* a7Bo1 (εικόνα 3.1).

```
Drosophila melanogaster chromosome 3R, complete sequence
Length=27905053

Features in this part of subject sequence:
nicotinic acetylcholine receptor alpha 96Aa

Score = 564 bits (305), Expect = 1e-157
Identities = 305/305 (100%), Gaps = 0/305 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1          GACTCGGACAACATCGAGGTGGGCATCGACCTGCAGGACTACTACATCTCCGTGGAGTGG 60
|||||
Sbjct 20231121   GACTCGGACAACATCGAGGTGGGCATCGACCTGCAGGACTACTACATCTCCGTGGAGTGG
20231062

Query 61         GACATCATGCGTGTGCCGGCGGTGCGGAACGAGAAGTTCTACAGCTGCTGCGAGGAGCCG 120
|||||
Sbjct 20231061   GACATCATGCGTGTGCCGGCGGTGCGGAACGAGAAGTTCTACAGCTGCTGCGAGGAGCCG
20231002

Query 121        TATCTGGACATAGTGTTCAACCTGACGCTCCGCCGGAAGACGCTCTTCTACACGGTCAAC 180
|||||
Sbjct 20231001   TATCTGGACATAGTGTTCAACCTGACGCTCCGCCGGAAGACGCTCTTCTACACGGTCAAC
20230942

Query 181        CTGATCATAACCCTGCGTGGGCATCTCGTTCCTGTCCGTTCTGGTCTTCTACCTGCCCAGC 240
|||||
Sbjct 20230941   CTGATCATAACCCTGCGTGGGCATCTCGTTCCTGTCCGTTCTGGTCTTCTACCTGCCCAGC
20230882

Query 241        GACTCTGGCGAGAAGATCTCGCTCTGCATCAGCATCCTGCTCTCGCTTACCGTGTTCCTTC 300
|||||
Sbjct 20230881   GACTCTGGCGAGAAGATCTCGCTCTGCATCAGCATCCTGCTCTCGCTTACCGTGTTCCTTC
20230822

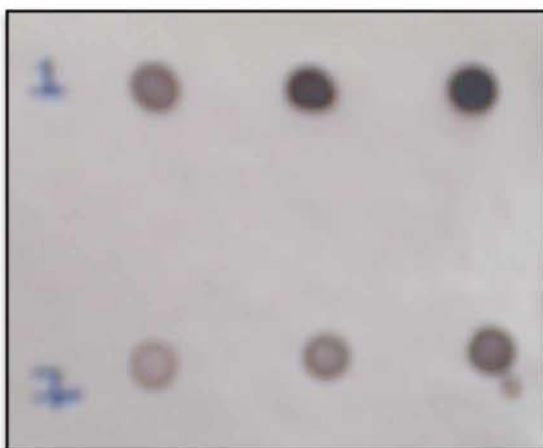
Query 301        CTCCT 305
|||||
Sbjct 20230821   CTCCT 20230817
```

Εικόνα 3.1: Νουκλεοτιδική σύγκριση με το πρόγραμμα BLAST κατέδειξε ομοιότητα 100% της αλληλουχίας a1Dm3 που κλωνοποιήσαμε με την αλληλουχία του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster*

Διαλογή φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου της ελιάς

Από τα πλασμίδια που προέκυψαν από την κλωνοποίηση των ενισχυμένων εξονίων των γονιδίων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης επιλέχθηκαν για τη δημιουργία ανιχνευτή το πλασμίδιο α1Dm3 με ένθεμα το εξόνιο 7 της *Drosophila melanogaster* και το πλασμίδιο α7Bo1 με ένθεμα το εξόνιο 7 της υπομονάδας α7 του *Bactrocera oleae*.

Τα ενθέματα των πλασμιδίων ενισχύθηκαν με αντίδραση πολυμεράσης, απομονώθηκαν από πήκτωμα αγαρόζης και σημάνθηκαν με τη μέθοδο τυχαίων εκκινήτων κατά την οποία ο DNA ανιχνευτής σημαίνεται ενσωματώνοντας στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας βιοτυνιλιωμένα δεοξυνουκλεοτίδια. Έπειτα πραγματοποιήθηκε σποτάρισμα για τον έλεγχο της επιτυχής σήμανσης των αλληλουχιών μας (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Εμφάνιση σποταρίσματος α1 και α7 ανιχνευτή.

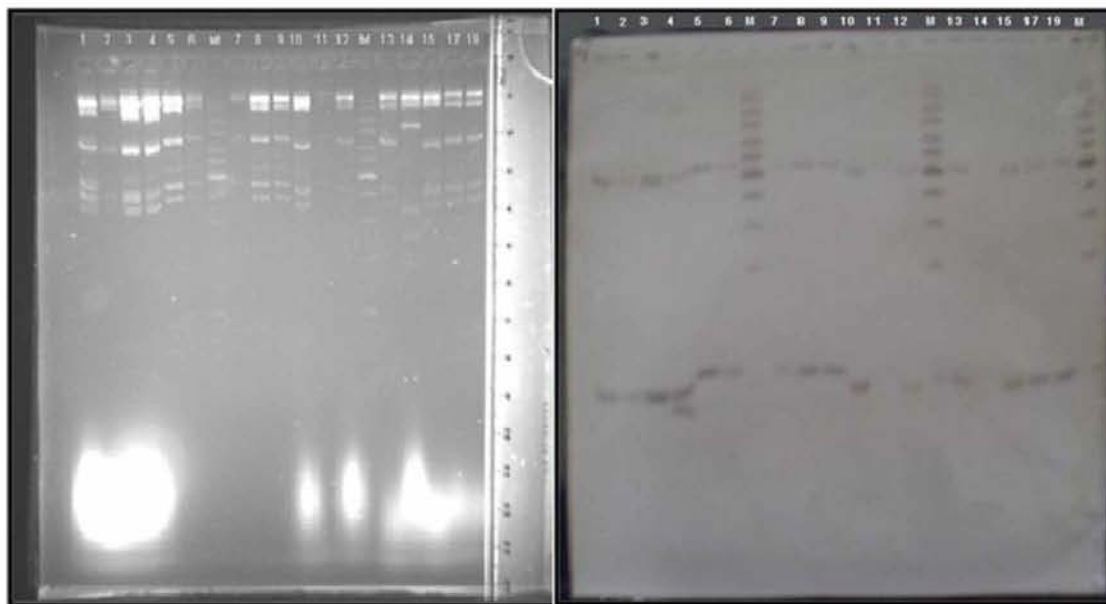
Τη σύνθεση του ανιχνευτή ακολούθησε η πιλοδότηση της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ώστε να επιστρωθεί ο κατάλληλος αριθμός ανασυνδιασμένων βακτηριοφάγων. Η απευθείας διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου πραγματοποιήθηκε περίπου σε 80 000 πλάκες ανασυνδιασμένων βακτηριοφάγων λ. Με βάση το νόμο $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ και με δεδομένα το μέγεθος του γονιδιώματος του δάκου της ελιάς [υπολογίζεται στο $5,4 \cdot 10^8$ bp (Gomulski et al., 1997)] και του μέσου μεγέθους του ενθέματος βακτηριοφάγου λ (20kb) υπολογίζεται ότι η διαλογή 80 000 φαγικών κλώνων θα επέτρεπε την απομόνωση ενός γονιδίου μονού αντιγράφου με πιθανότητα 99%.

Ο α1Dm3 ανιχνευτής ήταν ετερόλογος (δηλαδή ο ανιχνευτής αποτελούσε αλληλουχία της *Drosophila melanogaster*) ενώ ο α7Bo1 ανιχνευτής ήταν ομόλογος (δηλαδή αποτελούσε

αλληλουχία της *Bactrocera oleae*) γι αυτό και η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 55°C. Το αποτέλεσμα της εμφάνισης ήταν η απομόνωση 19 φαγικών πλακών με τον α1Dm3 ανιχνευτή και 5 φαγικών πλακών με τον α7Bo1 ανιχνευτή. Ακολούθησε δεύτερη διαλογή για την απομόνωση μοναδικού κλώνου από τις φαγικές πλάκες της πρώτης διαλογής με αποτέλεσμα την απομόνωση 17 πλακών με τον ετερόλογο ανιχνευτή ενώ απορρίφθηκαν οι επιλεγμένες πλάκες του ομόλογου ανιχνευτή αφού δεν έδωσαν θετικό σήμα κατά τη δεύτερη διαλογή.

Ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων

Κατά τη δεύτερη διαλογή απομονώθηκαν 17 φαγικές πλάκες με τον ανιχνευτή α1Dm3 με ονομασία g.α1.1, g.α1.2, g.α1.3, g.α1.4, g.α1.5, g.α1.6, g.α1.7, g.α1.8, g.α1.9, g.α1.10, g.α1.11, g.α1.12, g.α1.13, g.α1.14, g.α1.15, g.α1.17, g.α1.19. Από την κάθε μεμονωμένη πλάκα απομονώθηκε το φαγικό DNA και πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο *HindIII*. Η πέψη ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και οι 15 από τους 17 φαγικούς κλώνους παρουσίασαν το ίδιο προφίλ (εικόνα 3.3). Για την επιβεβαίωση ότι οι κλώνοι περιέχουν ένθεμα που αντιστοιχεί σε νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern με τον ίδιο ανιχνευτή που πραγματοποιήθηκε η διαλογή της βιβλιοθήκης (α1Dm3) και σε θερμοκρασία 55°C.



Εικόνα 3.3: Αριστερά παρουσιάζεται η πέψη των φαγικών κλώνων με το ένζυμο περιορισμού *HindIII* και δεξιά παρουσιάζεται η υβριδοποίηση κατά Southern. 1: g.α1.1, 2: g.α1.2, 3: g.α1.3, 4: g.α1.4, 5: g.α1.5, 6: g.α1.6, 7: g.α1.7, 8: g.α1.8, 9: g.α1.9, 10: g.α1.10, 11: g.α1.11, 12: g.α1.12, 13: g.α1.13, 14: g.α1.14, 15: g.α1.15, 17: g.α1.17, 19: g.α1.19 και M: μάρτυρας. Όπως παρουσιάζεται από όλους τους κλώνους διαφοροποιείται ο κλώνος g.a.1.4 ο οποίος δίνει σήμα σε διαφορετικές ζώνες. Επίσης ο κλώνος g.a.1.14 δεν εμφάνισε κανένα σήμα με τον ανιχνευτή μας.

Από την ανάλυση κατά Southern επιβεβαιώθηκε ότι όλοι οι κλώνοι, εκτός από το φάγο g.a.14, περιέχουν ένθεμα που αντιστοιχεί στην υπομονάδα α1 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης καθώς και ότι οι κλώνοι εκτός από τον φάγο 4 είναι ίδιοι μεταξύ τους (εικόνα 3.3).

Επιλέχθηκαν οι κλώνοι g.a.1.4 και g.a.1.5 για να αλληλουχηθούν και συγκεκριμένα από την πέψη με *HindIII* υποκλωνοποιήθηκαν όλα τα προϊόντα του κλώνου g.a.1.4 και το προϊόν των 3,5kb από τον κλώνο g.a.5. Αναλυτικά πραγματοποιήθηκε πέψη των επιλεγμένων κλώνων g.a.4 και g.a.5 με το ένζυμο πέψης *HindIII*, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ανάκτηση των επιθυμητών προϊόντων της πέψης, εισαγωγή τους σε πλασμίδιο και ύστερα από μετασχηματισμό απομόνωση των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων. Επαναλήφθηκε πέψη με το ένζυμο *HindIII* για να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή των επιθυμητών τμημάτων DNA και αλληλουχήθηκαν τα δείγματα (πλασμίδια) α1ph4_800, α1ph4_850, α1ph4_900, α1ph4_1500, α1ph4_1600, α1ph4_2000, α1ph4_4000, α1ph5_3,5(1), α1ph5_3,5(2).

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα OMIGA και στο πρόγραμμα BLAST του διαδικτυακού τόπου NCBI για να εντοπιστούν ομοιότητες στις αλληλουχίες μεταξύ των αποτελεσμάτων μας και άλλων οργανισμών. Συγκεκριμένα τα πλασμίδια α1ph4_1500, α1ph5_3,5(1) και α1ph5_3,5(2) δεν περιείχαν ένθεμα αλλά ήταν αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν σε φορέα, τα α1ph4_2000 και α1ph4_4000 περιείχαν ένθεμα το οποίο δεν είχε ομοιότητα με καμία καταχωρημένη αλληλουχία άλλου οργανισμού σε βάσεις δεδομένων, ενώ τα πλασμίδια α1ph4_800, α1ph4_850, α1ph4_900 και α1ph4_1600 παρουσίασαν σημαντική ομοιότητα με αλληλουχίες του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster* και άλλων εντόμων.

Τα πλασμίδια α1ph4_800 και α1ph4_850 περιείχαν το ίδιο ένθεμα μεταξύ τους. Η αλληλουχία του πλασμιδίου α1ph4_800 σύμφωνα με το πρόγραμμα ClustalW, με το οποίο έγινε ομοπαράθεση με την αλληλουχία της *Drosophila melanogaster*, αντιστοιχεί από τις βάσεις 280 μέχρι 740 στο εξόνιο 7, από τις βάσεις 1 μέχρι 279 στο τέλος του ιντρονίου 6 ενώ από τις βάσεις 741 μέχρι 776 αντιστοιχεί στην αρχή του ιντρονίου 7 (εικόνα 3.4). Η αναζήτηση ομοιότητας με το πρόγραμμα Blast της αλληλουχίας του δυνητικού εξονίου 7 του δάκου της ελιάς με την αλληλουχία του εξονίου 7 της α1 υπομονάδας της *Drosophila melanogaster* κατέδειξε ομοιότητα 81% (εικόνα 3.5). Συμπερασματικά, το ένθεμα των πλασμιδίων α1ph4_800 και α1ph4_850 αντιστοιχεί στο δυνητικό εξόνιο 7 της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου της ελιάς ενώ στα άκρα περιέχονται αλληλουχίες του δυνητικού ιντρονίου 6 και του δυνητικού ιντρονίου 7.

```

alph4_800      TAAGCTTTTTTAAACAAGCCTTTTCAAGTCAAATATATATAATATACATCAAGTTTTTTG 60
alexon7DM      -----

alph4_800      AAGTCATCTGTATAAAATTAACFTTAAAAAATTAACFTTCCCTAAATTATTGGGTGTCGG 120
alexon7DM      -----

alph4_800      TTATGTCTCTACTTCAACGCGACCATAGATTAAACTTTTTCCATCGAAAATTGTTCAAT 180
alexon7DM      -----

alph4_800      TTGTTAGAAAAATAAATAANATCGAGTTCAAAANTTTATGCAATTAATAAGTTATTATAT 240
alexon7DM      -----

alph4_800      TATAATFACTGTTTCTTNGCCTTTTTACTACTTAAACAGGTGGATCTGCGCCATTTGAAG 300
alexon7DM      -----GTGGACTTGAGGCACTTGAAG 21
                    ***** ** * ** *****

alph4_800      CAAACAGCGGATTCGGATAACATAGAAGTGGGCATCGATCTGCAGGACTACTACATATCT 360
alexon7DM      CAGACCCCGACTCGGACAACATCGAGGTGGGCATCGACCTGCAGGACTACTACATCTCC 81
                    ** ** * ** * ** ***** ** ***** ** ***** **

alph4_800      GTGGAGTGGGATATAATGCGTGTGCCGGCCGTGCGTAATGAGAAATTCATATAGTTGTGT 420
alexon7DM      GTGGAGTGGGACATCATGCGTGTGCCGGCGGTGCGGAACGAGAAGTCTACAGCTGTGTC 141
                    ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ** **

alph4_800      GAAGAGCCCTATTTGGATATCGTTTTCAATCTGACGTTGCGTCGAAAACACTCTTCTAC 480
alexon7DM      GAGGAGCCGTATCTGGACATAGTGTTCACCTGACGCTCCGCCGGAAGACGCTCTTCTAC 201
                    ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *****

alph4_800      ACTGTCAATCTAATCATACCATGTGTAGGTATCTCATTCCTATCGGTATTGGTCTTCTAT 540
alexon7DM      ACGGTCAACCTGATCATACCCCTGCGTGGGCATCTCGTTCCTGTCCGTCTGGTCTTCTAC 261
                    ** ***** ** ***** ** ** * ** ***** ** ***** ** *****

alph4_800      TTGCCAGCGGATTCGGCGGAGAAGATCTCACTTTGTATCAGCATTTTGCTATCGTTGACG 600
alexon7DM      CTGCCAGCGACTCTGGCGGAGAAGATCTCGCTCTGCATCAGCATCCTGCTCTCGCTTACC 321
                    ***** ** ***** ** ** ***** ** * ** * **

alph4_800      GTGTTTTTCTCCTGCTCGCCGAAATATACCGCCAACATCGCTGACGGTGCCGTTATTA 660
alexon7DM      GTGTTCTCCTCCTGCTGGCCGAGATCATTCGCCACGTCGCTGACGGTGCCGCTGCTG 381
                    ***** ** ***** ** * ** * ** ***** ** ***** ** * **

alph4_800      GGCAAATATTTGCTCTTCACTATGATGTTGGTAACGCTGTCGGTTGTGGTCACCATTGCG 720
alexon7DM      GGAAAGTATCTGCTCTTCAACATGATGCTGGTCACGCTCTCTGTCGTTGGTCACCATTGCC 441
                    ** ** * ** ***** ** ***** ** ***** ** ** *****

alph4_800      GTGCTTAATGTTAACTTTAGGTATGTAATAAAAAATTTATAAGCTTGATATCGAATT 776
alexon7DM      GTGCTCAATGTGAATTTAG----- 461
                    ***** ***** ** *****

```

Εικόνα 3.4: Η περιοχή με πορτοκαλί χρώμα αντιστοιχεί στο τέλος του δυνητικού ιντρονίου 6, η περιοχή με πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στην αρχή του δυνητικού ιντρονίου 7 και η περιοχή με μαύρο χρώμα αντιστοιχεί στο δυνητικό εξόνιο 7 της υπομονάδας α1 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου.


```

nicotinic acetylcholine receptor alpha 96Aa
Score = 446 bits (494), Expect = 8e-122
Identities = 379/467 (81%), Gaps = 0/467 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 277 CAGGTGGATCTGCGCCATTTGAAGCAAACAGCGGATTCGGATAACATAGAAGTGGGCATC 336
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20231154 CAGGTGGACTTGAGGCACTTGAAGCAGACC GCCACTCGGACAACATCGAGGTGGGCATC 20231095

Query 337 GATCTGCAGGACTACTACATATCTGTGGAGTGGGATATAATGCGTGTGCCGGCCGTGCGT 396
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20231094 GACCTGCAGGACTACTACATCTCCGTGGAGTGGGACATCATGCGTGTGCCGGCCGTGCGG 20231035

Query 397 AATGAGAAATCTATAGTTGTGTGAAGAGCCCTATTTGGATATCGTTTTCAATCTGACG 456
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20231034 AACGAGAAGTTCTACAGCTGCTGCGAGGAGCCGTATCTGGACATAGTGTTC AACCTGACG 20230975

Query 457 TTGCGTCGCAAAACTCTTCTACACTGTCAATCTAATCATACCATGTGTAGGTATCTCA 516
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230974 CTCCGCGGAAGACGCTCTTCTACACGGTCAACCTGATCATACCCTGCGTGGGCATCTCG 20230915

Query 517 TTCCTATCGGTATTGGTCTTCTATTTGCCAGCGATTCGGGCGAGAAGATCTCACTTTGT 576
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230914 TTCCTGTCCGTTCTGGTCTTCTACCTGCCAGCGACTCTGGGCGAGAAGATCTCGCTCTGC 20230855

Query 577 ATCAGCATTTTGTCTATCGTTGACGGTGT TTTTCTCCTGCTCGCCGAAATFATAACGCCCA 636
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230854 ATCAGCATCCTGCTCTCGCTTACCGTGT TCTTCTCCTGCTGGCCGAGATCATTCGCCCC 20230795

Query 637 ACATCGCTGACGGTGCCGTTAATAGGCAAATATTTGCTCTTCACTATGATGTTGGTAACG 696
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230794 ACGTCGCTGACGGTGCCGCTGCTGGGAAAGTATCTGCTCTTCAACCATGATGCTGGTCAAG 20230735

Query 697 CTGTGCGTGTGGTCAACCTTGCCTGCTTAATGTAACTTTAGGTA 743
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230734 CTCTCTGTGCTGGTCAACCTTGCCTGCTCAATGTGAATTTAGGTA 20230688

```

Εικόνα 3.5: Με τη μέθοδο Blast παρουσιάστηκε ομοιότητα 81% του εξονίου 7 της *Drosophila melanogaster* με το δυνητικό εξόνιο 7 του *Bactrocera oleae*.

Το ένθεμα του πλασμιδίου α1rh4_900 σύμφωνα με την ομοπαράθεση του προγράμματος ClustalW αντιστοιχεί στο εξόνιο 8 της α1 υπομονάδας της *Drosophila melanogaster* από τις βάσεις 71 έως 285, στο δυνητικό ιντρονίο 7 από τις βάσεις 1 μέχρι 70 και από τις βάσεις 286 μέχρι 941 στην αρχή του δυνητικού ιντρονίου 8 του δάκου της ελιάς (εικόνα 3.6). Επίσης η αναζήτηση ομοιότητας με το πρόγραμμα BLAST της αλληλουχίας του δυνητικού εξονίου 8 του δάκου της ελιάς με την αλληλουχία του εξονίου 8 της α1 υπομονάδας της *Drosophila melanogaster* κατέδειξε ομοιότητα 76% (εικόνα 3.7).

alph4_900	AATTCGATATCAAGCTTAGCAAAAGTAAATTTTGTATTGCTAATATTTCTGCACTTTAC	60
alexon8DM	-----	
alph4_900	TCTCGTGCTCTTTATAGATCGCCTGTGACACATAAAATGGCGCCATGGGTACAGCGTTTA	120
alexon8DM	-----ATCCCCTGTCACGCATCGCATGGCACCGTGGGTGCAGCGCCTC	43
	*** **	
alph4_900	TTTATACAAATTTTACCTAACTCCTTTGCATCGAACGACCGAAGAAAAACGAAGCCAAC	180
alexon8DM	TTTCATCCAGATCCTGCCCAAGCTGCTCTGCATCGAGCGGCCCAAGAAGGA-GGAGCC--C	100
	** ** *	
alph4_900	GAGGACGATCAACCGCCGAAGTGTCTACCGATGTCTTCCATTTGCCACCGGATGTGGAT	240
alexon8DM	GAGGAGGACCAGCCGCCGAAGTGTCTACCGATGTCTATCACCTGCCCGCGGATGTGGAC	160
	***** ** *	
alph4_900	AAATTCGTGAATTACGATTCGAAACGATTTAGTGGCGACTATGGTATACCAGGTAAGTTC	300
alexon8DM	AAGTTTGTCAACTACGATTCGAAGCGTTTCAGCGCGACTACGGCATTCAG-----	212
	** ** *	
alph4_900	TTAAGAGCACATCTTGAAAATACTAAATCTCACTCAAATGAAATTCGTAAATAAGTTATC	360
alexon8DM	-----	
alph4_900	ATTTTTTATCAATGAAAATAAGTTACTATTAGTATGAACTTTGCGGGAAAAAAGTGATTA	420
alexon8DM	-----	
alph4_900	TTCTGAAGTGGCTAGGCACATATTTGAATATAATAACAGATTGGATTTGTGTGCGTTAGT	480
alexon8DM	-----	
alph4_900	GTGTTTTAACATTACTTTTAACTATGCATTTAAAATTTATACAAATTTGCTCTATATCTAA	540
alexon8DM	-----	
alph4_900	AACTAGGCTACTAAGATACTAGAAAGATGCCAATAACTTTGTGGAAGTTATACTTTTTTT	600
alexon8DM	-----	
alph4_900	TTTTTAAGCGGATCAATTGTACGTCTGCATCCCTTAAAGTTTAAACAGAACTACTCTTA	660
alexon8DM	-----	
alph4_900	TACGTAGGTTGCCATTTATATTTTCAGGATTTGGCAACCCGAGTGTGCAATCTGGCCACT	720
alexon8DM	-----	
alph4_900	CACAACCTTATTTGTTAAGTTTAAAGTTTGTGATGCTGCACATACTCAGAACGTTTGTACA	780
alexon8DM	-----	
alph4_900	TACGAGCGCTATTTCGTGTTGCTTACAGTAACTTAAAATATTCATCTCGGCCAAAAAGTGG	840
alexon8DM	-----	
alph4_900	AATGAAATTTGCAACAAATTTGCGCATTTATTTTGTACAACGTGGATTAACCTCAGCAGCCAA	900
alexon8DM	-----	
alph4_900	AGCATCGATGAACTTAAATTTAAATTTTGGCGATGAAGCTTA	941
alexon8DM	-----	

Εικόνα 3.6: Η περιοχή με πορτοκαλί χρώμα αντιστοιχεί στο τέλος του δυνητικού ιντρονίου 7, η περιοχή με πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στο δυνητικό ιντρόνιο 8 και η περιοχή με μαύρο χρώμα αντιστοιχεί στο δυνητικό εξόνιο 8 της υπομονάδας α1 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

```

Drosophila melanogaster chromosome 3R, complete sequence
Length=27905053

Features in this part of subject sequence:
  nicotinic acetylcholine receptor alpha 96Aa

Score = 159 bits (176), Expect = 2e-35
Identities = 174/228 (76%), Gaps = 5/228 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 647      TACCTGGTATACCATAGTCGCCACTAAATCGTTTTCGAATCGTAATTCACGAATTTATCCA 706
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230401  TACCTGGAATGCCGTAGTCGCCGCTGAAACGCTTCGAATCGTAGTTGACAAACTTGTCCA 20230460

Query 707      CATCCGGTGGCAAATGGAAGACATCGGTAAGCACTTCGGGCGGTTGATCGTCCTCGTTGG 766
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230461  CATCCGGCGGCAGGTGATAGACATCGGTGAGCACTTCGGGCGGCTGGTCTCTCCTCG--GG 20230518

Query 767      CTTCGTTTTTCTTCGGTCGTCGATGCAAAAGGAGTTTAGGTAAAATTTGTATAAAATAAAC 826
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230519  C-TCCTCCTTCTTGGGCCGCTCGATGCAGAGCAGCTTGGGCAGGATCTGGATGAAGAGGC 20230577

Query 827      GCTGTACCCATGGCGCCATTTTATGTGTACAGGCGATCTATAAAGAG 874
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20230578  GCTGCACCCACGGTGCCATGCGATGCGGTGACAGGGGATC--TAAAGAG 20230623

```

Εικόνα 3.7: Με τη μέθοδο Blast παρουσιάστηκε ομοιότητα 76% του εξονίου 8 της *Drosophila melanogaster* με το δυνητικό εξόνιο 8 του *Bactrocera oleae*.

Όσον αφορά στο πλασμίδιο α1rh4_1600 σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής BLAST και ClustalW περιέχει μια περιοχή του δυνητικού εξονίου 7 της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου της ελιάς που εμπεριέχεται ολόκληρο στα πλασμίδια α1rh4_800 και α1rh4_850.

Διαλογή φαγικής cDNA βιβλιοθήκης του δάκου της ελιάς

Μετά την επιτυχή απομόνωση του εξονίου 7 και του εξονίου 8 του α1 νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου της ελιάς από τη διαλογή της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε διαλογή φαγικής cDNA βιβλιοθήκης του δάκου με στόχο την απομόνωση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα του εντόμου.

Η σύνθεση των ανιχνευτών ειδικών για την επιλογή των υπομονάδων α1, α2, α3, α5, α7 και b1 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως DNA τα προϊόντα της PCR των ενθεμάτων των πλασμιδίων α1Dm3, α2Dm2, α3Dm3, α5Dm1, α7Dm1 και b1Dm2, αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, και τα επιθυμητά προϊόντα απομονώθηκαν

και σημάνθηκαν με τη μέθοδο τυχαίων εκκινήτων. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής σήμανση πραγματοποιήθηκε σποτάρισμα των ανιχνευτών (εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8: Εμφάνιση σποταρίσματος των ανιχνευτών α1, α2, α5.

Αφού πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση της cDNA βιβλιοθήκης ακολούθησε απευθείας διαλογή της φαγικής cDNA βιβλιοθήκης του δάκου της ελιάς σε περίπου 30 000 πλάκες ανασυνδιασμένων βακτηριοφάγων λ, ώστε να υπάρχει πλήρη αντιπροσώπευση των μεταγράφων του εντόμου. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης για όλους τους ανιχνευτές ήταν 55°C λόγω του ότι όλοι οι ανιχνευτές ήταν ετερόλογοι. Είναι γνωστό ότι οι αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης όπως για παράδειγμα υψηλή θερμοκρασία (>62°C) μειώνουν την πιθανότητα υβριδοποίησης ετερόλογων ανιχνευτών.

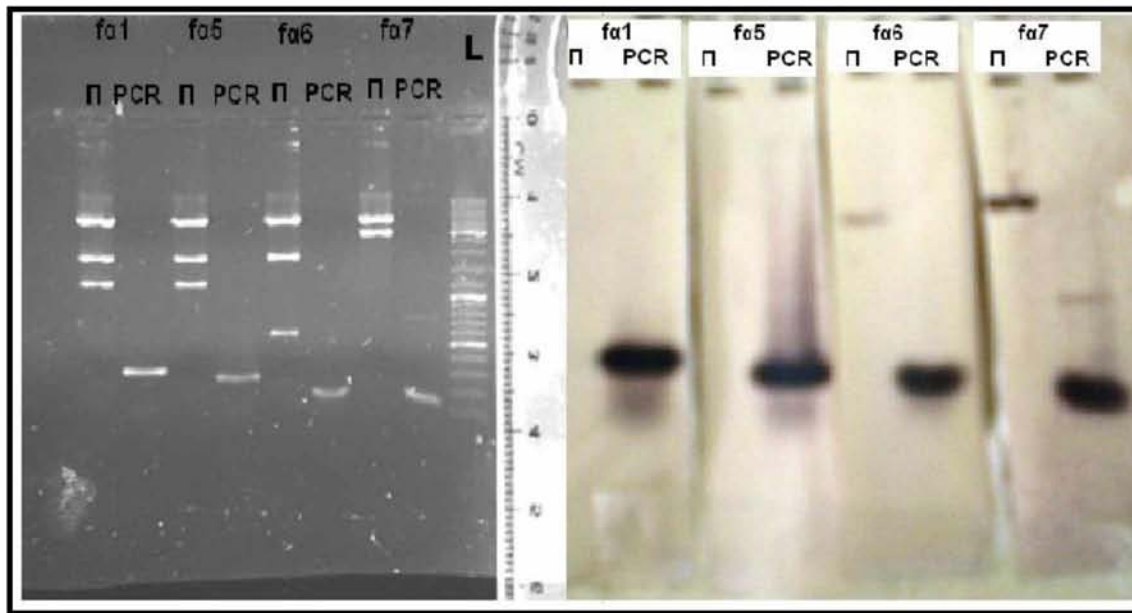
Κατά την πρώτη διαλογή επιλέχθηκαν 4 φαγικές πλάκες με τον ανιχνευτή α1, 3 φαγικές πλάκες με τον ανιχνευτή α2, 5 φαγικές πλάκες με τον ανιχνευτή α5, 7 φαγικές πλάκες με τον ανιχνευτή α6, 4 φαγικές πλάκες με τον ανιχνευτή b1, και 7 φαγικές πλάκες με τον ανιχνευτή α7.

Ανάλυση των απομονωμένων κλώνων

Για την απομόνωση μοναδικού κλώνου από τις φαγικές πλάκες της πρώτης διαλογής ακολούθησε δεύτερη διαλογή, με αποτέλεσμα την απομόνωση ενός φαγικού κλώνου με τον ανιχνευτή α1 ο οποίος ονομάστηκε c.α1.3, ενός φαγικού κλώνου με τον ανιχνευτή α5 ο οποίος ονομάστηκε c.α5.2, τριών φαγικών κλώνων με τον ανιχνευτή α6 που ονομάστηκαν c.α6.1.1, c.α6.2.1.1 και c.α6.2.1.2 και τεσσάρων φαγικών κλώνων με τον ανιχνευτή α7 που ονομάστηκαν c.α7.1.1.1, c.α7.1.1.2, c.α7.2.1.1 και c.α7.2.1.2 ενώ απορρίφθηκαν οι επιλεγμένες πλάκες των ανιχνευτών α2 και b1 αφού δεν έδωσαν θετικό σήμα κατά τη δεύτερη διαλογή.

Τα ενθέματα που είναι κλωνοποιημένα στον φορέα λ ZAP express μπορούν να απομονωθούν από το φάγο με τη μορφή φαγεμιδιακού φορέα ανθεκτικού στην καναμυκίνη. Με αυτό τον τρόπο απομονώθηκαν τα φαγεμίδια από κάθε επιλεγμένη πλάκα από τη δεύτερη διαλογή και πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *XhoI* και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1%. Κατά την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι τα φαγεμίδια που απομονώθηκαν από τον κάθε ανιχνευτή είχαν το ίδιο προφίλ, δηλαδή όλα τα φαγεμίδια από τον ανιχνευτή α6 παρουσίασαν δυο θέσεις κοπής και όλα τα φαγεμίδια από τον ανιχνευτή α7 παρουσίασαν 1 θέση κοπής γι αυτό και επιλέχθηκε ένα φαγεμίδιο από τον καθένα για περαιτέρω επεξεργασία (ο κλώνος fa6.2.1.2 και ο κλώνος f.α7.2.1.2). Επίσης εμφανίστηκε ίδιο πρότυπο πέψης στα φαγεμίδια f.α1.3 και f.α5.2 παρόλο που απομονωθήκαν από διαφορετικούς ανιχνευτές.

Στη συνέχεια επαναλήφθηκε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *XhoI* για να υπολογιστεί το μέγεθος του ενθέματος του κάθε φαγεμιδίου. Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 10 σε όλα τα φαγεμίδια εμφανίστηκε μια ζώνη 4,5kb που αντιστοιχεί στο φορέα και όσον αφορά στο ένθεμα για το φαγεμίδιο f.α7.2.1.2 παρατηρήθηκε μια ζώνη 3000bp, για το φαγεμίδιο f.α6.2.1.2 παρατηρήθηκαν δύο ζώνες περίπου 2000 bp και 600bp ενώ στα φαγεμίδια f.α1.3 και f.α5.2 που είχαν το ίδιο πρότυπο πέψης παρατηρήθηκαν δύο ζώνες περίπου 2000bp και 1200bp. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ομοιότητα του κάθε φαγεμιδίου με την αντίστοιχη υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των φαγεμιδίων με τους ειδικούς εκκινητές και ανάλυση κατά Southern με τους αντίστοιχους ανιχνευτές σε θερμοκρασία 55°C. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.9 υπάρχει ενίσχυση αλληλουχίας με τους ειδικούς εκκινητές δίνοντας τα αντίστοιχα μεγέθη των εξονίων κι επομένως το φαγεμίδιο περιέχει αλληλουχία που αντιστοιχεί στο νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Τα φαγεμίδια f.α1.3, f.α5.2, f.α6.2.1.2 και f.α7.2.1.2 στάλθηκαν για ανάλυση της πρωτοδιάταξής τους.



Εικόνα 3.9: Στα αριστερά παρουσιάζεται η πέψη των απομονωμένων φαγεμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *XhoI* και ενίσχυση των φαγεμιδίων με τους ειδικούς εκκινητές. Στα δεξιά παρουσιάζεται η υβριδοποίηση κατά Southern. L: Μάρτυρας, fa1: φαγεμίδιο α1.3, fa5: φαγεμίδιο α5.2, fa6: φαγεμίδιο α6.2.1.2, fa7: φαγεμίδιο α7.2.1.2, Π: προϊόν πέψης, PCR: προϊόν ενίσχυσης εξονίων.

Λόγω του μεγάλου μεγέθους των ενθεμάτων που υπολογίστηκε στα φαγεμίδια και επειδή όπως είναι γνωστό μια αντίδραση αλληλούχισης δίνει προϊόν μέχρι 800bp, επιλέχθηκαν για την ανάλυση της πρωτοδιάταξης του κάθε φαγεμιδίου οι εξωτερικοί εκκινητές (universal primers) T7 και T3 και οι εσωτερικοί εκκινητές των δυνητικών εξονίων. Η αλληλούχιση ήταν επιτυχής μόνο στην περίπτωση των εξωτερικών εκκινητών ενώ για τους εσωτερικούς εκκινητές υπήρξε αδυναμία σύνδεσης με το ένθεμα.

Η νουκλεοτιδική σύγκριση των αλληλουχιών που αποκτήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST έδειξε ότι οι αλληλουχίες μας δεν παρουσιάζουν ομοιότητα με υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Αντίθετα, οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν με τον εκκινητή T3 για τα φαγεμίδια fa1.3, fa5.2 και fa6.2.1.2 κατέδειξαν ομοιότητα έως 80% με αλληλουχίες οργανισμών που κωδικοποιούν ένα ένζυμο, την πουριβική καρβοξυλάση (εικόνα 3.10). Το φαγεμίδιο f.α7.2.1.2 δεν είχε ομοιότητα με καμία καταχωρημένη αλληλουχία άλλου οργανισμού σε βάσεις δεδομένων για αυτό δεν επεξεργάστηκε περαιτέρω.

Επιπλέον, ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης στο πρόγραμμα OMIGA έδειξε ότι οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν με τον εκκινητή T3 για τα φαγεμίδια fa1.3 και fa5.2 έχουν πλήρης ομοιότητα όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα συσχέτισης σημείων (dot plot) στην εικόνα 3.11.

GENE ID: 6638392 Dwil\GK20962 | GK20962 gene product from transcript GK20962-RA
 [Drosophila willistoni] (10 or fewer PubMed links)

Score = 773 bits (856), Expect = 0.0
 Identities = 662/818 (80%), Gaps = 0/818 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 ATGTTGATGGACACGTCGTTCCGTGATGCGCATCAATCGCTGTTGGCGACACGTGTCCGT 60
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1747 ATGCTGATGGACACAACCTTTCCGTGATGCCCATCAATCGTTGCTGGCCACCCGTGTGCGT 1806

Query 61 TCTCACGATCTGCTCAAAATCTCACCATATGTCGCACACAAATCAATAATCTCTACTCG 120
      || || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1807 TCCCATGATCTGTTGAAGATCTCTCCGTATGTGGCGCATAAGTTTAAACAATTTGTACTCA 1866

Query 121 TTGGAGAATTGGGGTGGTGCCACCTTCGATGTTGCATTGCGTTTCCTACACGAATGCCCG 180
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1867 TTGGAGAATTGGGGAGGTGCCACTTTCGATGTCGCCTGCGTTTCCTGCACGAATGCCCA 1926

Query 181 TGGGAACGTTTGGAGGAAATGCGTAAACATATAACAAATATTCCATTCCAGATGTTGTTG 240
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1927 TGGGAACGTTTGGAGGAGATGCGCAAGCGCATACCGAATATTCCATTCCAGATGCTCTTG 1986

Query 241 CGTGGTGCCCAACGCAGTTGGTTACACCAGTTATCCCGATAATGTCGTGCATAAAATCTGT 300
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1987 CGTGGCGCCAATGCCGTAGGCTATACCAGTTATCCCGATAATGTTGTTCTACAAGTTCTGT 2046

Query 301 GAATTGGCGGTACAAACTGGCATGGATATTTCCGTGTTTTCGATTCGCTTAATTATTTA 360
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2047 GAATTGGCGGTGCAAACTGGCATGGATATCTTCCGAGTTTTCGACTCTTTGAATTATTTG 2106

Query 361 CCCAACTTGATTTTGGGTATGGAAGCTGCCGGTAAAGCCGGTGGTGTGTTGAGGCTGCC 420
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2107 CCCAATTTGATTTTGGGGATGGAAGCAGCTGGTAAAGCTGGTGGTGTAGTTGAGGCAGCC 2166

Query 421 ATTTCTTACACCGGCGATGTAAGCGATCCTGCACGCACTAAATATGATCTCAATFACTAT 480
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2167 ATTTCTTATACTGGCGATGTCAGCGATCCCAAGAGAACCAATACGATCTGAAATFACTAT 2226

Query 481 ACAAATTTGGCCGATGAGCTGGTGAAGGCCGCGCACACACGTCCTTTCATCAAAGATATG 540
      || || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2227 ACCAATCTGGCCGATGAGCTGGTCAAGGCTGGAACCTCATGTGCTCTGTATTAAAGGATATG 2286

Query 541 GCGGGTTTGTGAAACCACAAGCGGCAAAATTACTTATCACCGCTATACGCGATAAGCAC 600
      || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2287 GCTGGTTTGTGAAACCCGAAGCCGCTAGACTTTTAACTACTGCCATTCTGTGATAAGCAT 2346

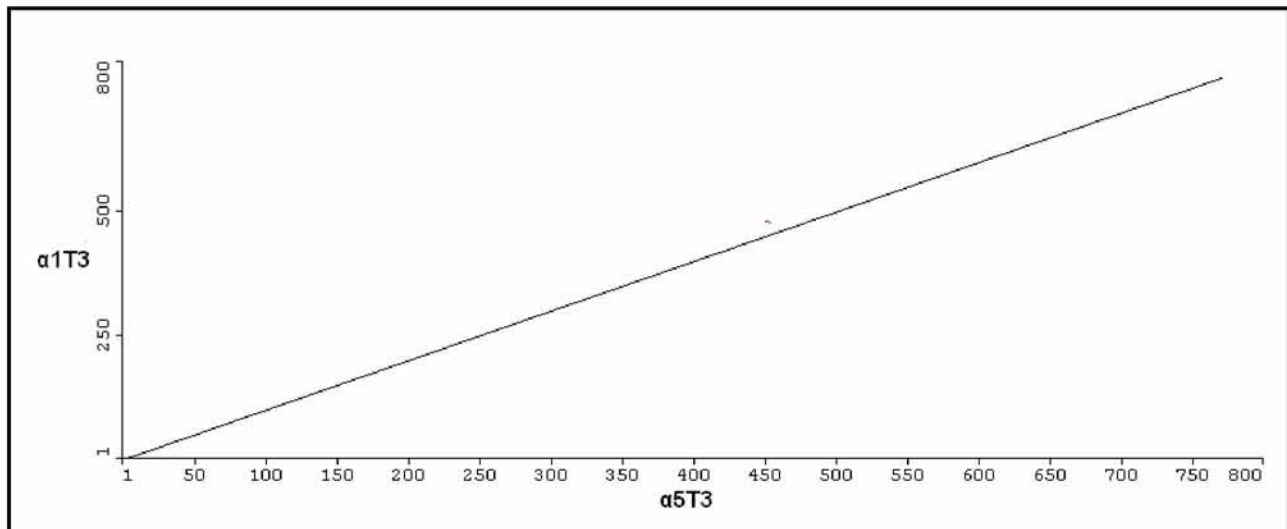
Query 601 CCCGATATACCAATACATATCCACACACGACACTTCGGGTGCCGGTGTGCGCTCTATG 660
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2347 CCCGATGTTCCAATCCATATCCATACCCATGACACTTCGGGAGCCGCGTGGCCTCTATG 2406

Query 661 CTCGCCTGTGCGAAGCTGGCGCTGATGTTGTTGATACAGCGGTGGACTCTATGTCCGGC 720
      || || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2407 CTGGCTTGTGCTCAGGCCGGTGCCGATGTAGTCGATGTTGCCGTCGATTCTATGAGCGGC 2466

Query 721 ATGACATCGCAGCCCAGCATGGGCGCTGTGGTAGCGTCGCTGCAAGGCACACCGCTCGAT 780
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2467 ATGACCTCGCAGCCCAGCATGGGTGCCGTGGTGGCTCCCTGCAGGGCACTCCTCTGGAT 2526

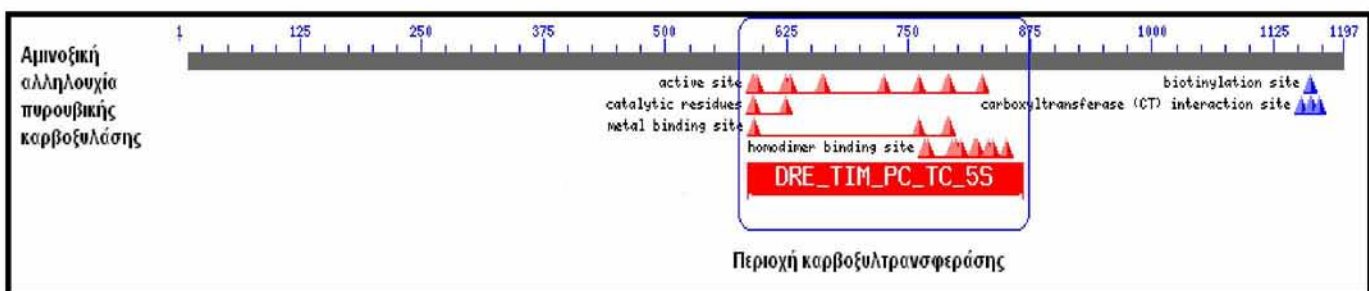
Query 781 ACACAGTTCGATTTGCGCGATATCTCCGAATATTCTGC 818
      || || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2527 ACCAATTTGGATTTGCGTGTGTGTCGGAATACTCGGC 2564
  
```

Εικόνα 3.10: Παρουσιάζεται ομοιότητα 80% της αλληλουχίας του α1T3 με το γονίδιο της *Drosophila willistoni* που κωδικοποιεί την πουριβική καρβοξυλάση.



Εικόνα 3.11: Πίνακας συσχέτισης των αλληλουχιών των φαγεμιδίων fa1.3 και fa5.2 που αποκτήθηκαν ύστερα από αλληλούχηση με τον εκκινητή T3.

Επίσης πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση στο πρόγραμμα ClustalW της αλληλουχίας που αποκτήθηκε με τον εκκινητή T3 για το φαγεμίδιο fa1.3 με την αλληλουχία του μεταγράφου της πυρουβικής καρβοξυλάσης της *Drosophila melanogaster*, η οποία κατέδειξε ομοιότητα από τη νουκλεοτιδική θέση 1748- 2567. Σε επίπεδο πρωτεΐνης αντιστοιχούν στα αμινοξέα 580- 725, τα οποία αποτελούν περιοχή της καρβοξυλτρανσφεράσης (CT) της πυρουβικής καρβοξυλάσης (εικόνα 3.12). Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 14, η ομοπαράθεση μεταξύ της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την CT και της αλληλουχία από τον εκκινητή T3 για το φαγεμίδιο fa1.3 είναι αρκετά μεγάλη. Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η ομοπαράθεση με το αποτέλεσμα του εκκινητή T3 για το φαγεμίδιο fa5.2 ενώ για το φαγεμίδιο fa6.2.1.2 παρατηρήθηκε ομοιότητα στη νουκλεοτιδική θέση 2310- 3156, η οποία αντιστοιχεί στο τέλος της περιοχής της καρβοξυλτρανσφεράσης και στην αρχή της HMG- like περιοχής της πυρουβικής καρβοξυλάσης.



Εικόνα 3.12: Η περιοχή στο μπλε κουτί αντιστοιχεί στην αμινοξική περιοχή της καρβοξυλτρανσφεράσης από τα 575aa μέχρι τα 875aa.

H3H1HZΛ3

4. Συζήτηση

Το spinosad είναι ένα νέο και φιλικό προς το περιβάλλον εντομοκτόνο που μπορεί σύντομα να γίνει μια ευρέως αποδεκτή εναλλακτική λύση στους ψεκασμούς με τα συμβατικά εντομοκτόνα για την αντιμετώπιση των παρασίτων εντόμων, όπως ο δάκος της ελιάς. Το spinosad έχει εγκριθεί ήδη για τη χρήση σε περισσότερες από 100 καλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένων των μήλων, των ακρόδριων, των εσπεριδοειδών, της μελιτζάνας, της ντομάτας, και του βαμβακιού. Στην Ελλάδα το εντομοκτόνο άρχισε να χρησιμοποιείται για την προστασία της ελαιοκαλλιέργειας από το δάκο το 2004. Ο δάκος αποτελεί το κυριότερο παράσιτο της ελαιοκαλλιέργειας, προκαλώντας σημαντική οικονομική ζημία στην ελαιοπαραγωγή που μπορεί να φτάσει έως 30%, ενώ η ποιοτική υποβάθμιση είναι ανυπολόγιστη (Montiel-Bueno & Jones, 2002).

Όπως είναι φυσιολογικό και παρατηρείται για κάθε συμβατικό εντομοκτόνο, η παρατεταμένη χρήση του Spinosad θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα μπορεί κυρίως να οφείλεται είτε στην αύξηση του μεταβολισμού του εντομοκτόνου από το έντομο, είτε στην αλλαγή της δομής του στόχου όπου δρουν τα εντομοκτόνα μέσα στο έντομο. Όσον αφορά στο spinosad, η ανθεκτικότητα των εντόμων οφείλεται κυρίως στην αλλαγή του στόχου δράσης. Συγκεκριμένα στόχος του εντομοκτόνου είναι ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης και δευτερεύον ο υποδοχέας GABA (Moulton, 2000). Ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης είναι μια πενταμερική μεμβρανική πρωτεΐνη που σχηματίζει ένα ολοκληρωμένο κανάλι ιόντων (Unwin, 1996). Τα έντομα διαθέτουν αρκετά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα π.χ. η *Drosophila melanogaster* διαθέτει 10 γονίδια που κωδικοποιούν 10 διαφορετικές υπομονάδες (Da1-Da7 και Dβ1- Dβ3). Παρόλο που υπάρχουν 10 διαφορετικά γονίδια το έντομο θα επιλέξει πέντε από αυτές τις υπομονάδες για να σχηματίσει ένα λειτουργικό υποδοχέα.

Σύμφωνα με μελέτες που διεξήγαγαν στη *Drosophila melanogaster* βρέθηκε ότι η ανθεκτικότητα που ανέπτυξαν εργαστηριακοί πληθυσμοί οφειλόταν στην ανικανότητα του εντόμου να σχηματίσει λειτουργική υπομονάδα Da6 λόγω της απαλοιφής ενός μέρους του γονιδίου της υπομονάδας (Perry, 2007). Η συμβολή της υπομονάδας α6 στη δράση του Spinosad ενισχύεται επίσης από μια πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο έντομο *Plutella xylostella*. Η ανθεκτικότητα στους φυσικούς πληθυσμούς της *Plutella* οφειλόταν σε μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα Pα6, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας μη λειτουργικής υπομονάδας Pα6 (Baxter, 2010). Η υπομονάδα α6 του νικοτινικού υποδοχέα, ωστόσο, δεν προσδιορίστηκε ως υπεύθυνη για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad σε όλα τα έντομα. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη *Musca domestica* έδειξε ότι η ανθεκτικότητα

οφειλόταν σε ένα υπολειπόμενο παράγοντα στο αυτόσωμα 1 και όχι στην υπομονάδα Mda6 (Shono, 2003).

Ο ρόλος και η εμπλοκή του γονιδίου στην πίεση επιλογής του *spinosad* και την εμφανιζόμενη ανθεκτικότητα διάφορων πληθυσμών εντόμων (Zhao, 2002; Moulton, 2000; Ferguson, 2004) καθόρισε τη βασική κατεύθυνση της παρούσας διπλωματικής εργασίας στη μελέτη της δομής και της οργάνωσης του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την ανάλυση του γονιδίου ήταν η απομόνωση υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του εντόμου *Bactrocera oleae* μέσω διαλογής γονιδιωματικής και cDNA βιβλιοθήκης του εντόμου. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση εξονίων που κωδικοποιούν διαμεμβρανικές περιοχές των υπομονάδων της *Drosophila melanogaster*. Οι αλληλουχίες που ενισχύθηκαν, κλωνοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως ετερόλογοι ανιχνευτές για τη διαλογή των βιβλιοθηκών του δάκου. Ως ανιχνευτές επιλέχθηκαν διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα γιατί σε αυτές τις περιοχές παρατηρούνται οι μικρότερες εξελικτικές μετατροπές (αντικαταστάσεις, απαλοιφές κτλ) μεταξύ των ειδών. Οι διαμεμβρανικές περιοχές κατέχουν ένα σημαντικό νευραλγικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του νικοτινικού υποδοχέα γι αυτό και αναμένεται να χαρακτηρίζονται από υψηλή εξελικτική συντήρηση.

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου για την κλωνοποίηση του γονιδίου της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του *Bactrocera oleae* και οι θετικοί φαγικοί κλώνοι αναλύθηκαν δομικά με υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων τους. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των υποκλώνων επιβεβαίωσε ότι οι κλώνοι που απομονώθηκαν αντιστοιχούν σε διακριτές γονιδιωματικές περιοχές της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα, περιέχοντας αλληλουχίες εξονίων που διακόπτονται από ιντρόνια. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν τα δυνητικά εξόνια 7 και 8 της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου, καθώς η ομοπαράθεση των υποκλώνων κατέδειξε 81% και 76% ομοιότητα, αντίστοιχα, με τα εξόνια 7 και 8 της α1 υπομονάδας της *Drosophila melanogaster*.

Το εξόνιο 7 της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera oleae* παρουσιάζει το ίδιο μέγεθος με το αντίστοιχο της *Drosophila melanogaster* (461bp) αναδεικνύοντας την υψηλή εξελικτική συντήρησή τους. Επίσης το εξόνιο 8 του δάκου παρουσιάζει μέγεθος 215bp ενώ το εξόνιο της *Drosophila melanogaster* έχει μέγεθος 217bp. Το κοινό μήκος των εξονίων είναι αναμενόμενο γιατί αποτελούν κωδικοποιούσα περιοχή, η οποία διατηρεί τα υψηλότερα ποσοστά ταυτότητας μεταξύ των ειδών.

Αυτή η συντήρηση των αλληλουχιών ανάμεσα στα είδη δεν ισχύει στα ιντρόνια διότι δεν υπόκεινται σε καμία εξελικτική πίεση. Τα ιντρόνια αποτελούν μη μεταφραζόμενες περιοχές, οι οποίες απέχουν μεταξύ των ειδών γιατί οι αλλαγές που μπορούν να υποστούν δεν επηρεάζουν τη

λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι γονιδιωματικές περιοχές των ενθεμάτων που υποκλωνοποιήθηκαν περιείχαν επίσης μέρος των δυνητικών ιντρονίων 6, 7 και 8. Συγκεκριμένα έχει κλωνοποιηθεί μέρος του 5' και 3' άκρου του ιντρονίου 7, μέρος του ιντρονίου 6 που συναντάμε καθοδικά του εξονίου 7 και μέρος του ιντρονίου 8 που συναντάμε ανοδικά του εξονίου 8. Άθροισμα αυτών των δυο αλληλουχιών παρουσιάζει ότι το δυνητικό ιντρόνιο 7 του *Bactrocera oleae* έχει μήκος το λιγότερο 105bp . Οι αλληλουχίες των άκρων δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα κι επομένως υπάρχει πιθανότητα το ιντρόνιο να μην έχει κλωνοποιηθεί πλήρως. Αντίθετα το μέγεθος του ιντρονίου 7 της *Drosophila melanogaster* έχει πολύ μικρότερο μέγεθος, με μήκος που φτάνει τα 75bp. Η διαφορά αυτή στο μέγεθος των δύο ιντρονίων επιβεβαιώνει το γεγονός ότι το μέγεθος και ο αριθμός των ιντρονίων σε πολλά ασπόνδυλα και σπονδυλωτά συμβαδίζει με το μέγεθος του γονιδιώματος τους (Vinogradov, 1999). Η διαφορά σε μήκος των ιντρονίων συνάδει με τη διαφορά του γονιδιώματος της *Drosophila melanogaster* που παρουσιάζει τιμή C 0.16 ($1.4 * 10^8$ bp) και του *Bactrocera oleae* που παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή C 0.55 ($5.4 * 10^8$ bp). Επίσης, οι αλληλουχίες γεινίασης των ιντρονιακών τμημάτων με τα εξόνια παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική για τη *D. melanogaster* συντηρημένη αλληλουχία GT-AG, που συμφωνεί με την αντίστοιχη για τους σπονδυλωτούς οργανισμούς.

Η διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου με ανιχνευτή εξόνιο της α1 νικοτινικής υπομονάδας του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης οδήγησε στο χαρακτηρισμό των δυνητικών εξονίων 7 και 8 της υπομονάδας α1 του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου της ελιάς. Τα εξόνια αυτά αποτελούν τις πρώτες αναφορές για τη δομή του νικοτινικού υποδοχέα για το δάκο, τα οποία μάλιστα μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα «εργαλεία» για την περαιτέρω μελέτη του γονιδίου. Για παράδειγμα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ομόλογοι ανιχνευτές για τη διαλογή γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης του δάκου, καθώς αυτό θα επιτρέψει την απομόνωση επιπλέον αλληλεπικαλυπτόμενων βακτηριοφάγων ώστε να χαρακτηριστεί πλήρως η δομή της α1 υπομονάδας του υποδοχέα. Ακόμη είναι πιθανό να οδηγήσει και στην απομόνωση βακτηριοφάγων με ενθέμα διαφορετική υπομονάδα από αυτή της α1, λόγω του ότι τα εξόνια αντιστοιχούν σε διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες όπως αναφέρθηκε παρουσιάζουν συντήρηση μεταξύ των ειδών αλλά και των διάφορων υπομονάδων του υποδοχέα.

Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε διαλογή cDNA βιβλιοθήκης του δάκου για την κλωνοποίηση των γονιδίων των α1, α5 και α6 υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές εξόνια των αντίστοιχων υπομονάδων της *Drosophila melanogaster*. Οι θετικοί φαγικοί κλώνοι αναλύθηκαν δομικά μετά την εξαγωγή του ενθέματος ως φαγεμίδιο. Η φαγική βιβλιοθήκη (λ ZAP II) που χρησιμοποιήθηκε παρέχει τη δυνατότητα κυκλοποίησης του ενθέματος και απομόνωσής του υπό τη μορφή του pBK-CMV φορέα

(φαγεμίδιο). Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης των επιλεγμένων φαγεμιδίων δεν παρουσίασε σημαντική ομοιότητα με υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Αντίθετα, οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν με εκκινήτη τον εξωτερικό (universal primer) T3 για τα φαγεμίδια fa1.3, fa5.2 και fa6.2.1.2 κατέδειξαν ομοιότητα έως 81% με αλληλουχία του γονιδίου της πυρουβικής καρβοξυλάσης της *Drosophila melanogaster*. Το συγκεκριμένο γονίδιο εντοπίζεται στο 2R χρωμόσωμα της *Drosophila melanogaster* και συμμετέχει σε ενζυμικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται στο μιτοχόνδριο. Η ύπαρξη του μεταγράφου της πυρουβικής καρβοξυλάσης στη cDNA βιβλιοθήκη δικαιολογείται καθώς αυτό αποτελεί πυρηνικό γονίδιο και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο για να επιτελέσει τις λειτουργίες του.

Η πυρουβική καρβοξυλάση αποτελείται από 4 υπομονάδες τοποθετημένες σε μια τετραεδρική δομή. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές: την καρβοξυλάση (BC) που βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή, την καρβοξυλτρανσφεράση (CT) και μια HMG- like περιοχή στην καρβοξυτελική περιοχή (Konndo, 2004). Η πυρουβική καρβοξυλάση καταλύει την καρβοξυλίωση του πυρουβικού για την παραγωγή του οξαλοξικού οξέος, διαδραματίζοντας ένα πολύ σημαντικό ρόλο σε μονοπάτια, όπως τη γλυκονεογένεση και την έκκριση της ινσουλίνης. Επίσης, η πυρουβική καρβοξυλάση εντοπίστηκε εκτός του μιτοχονδρίου και στο νευρικό σύστημα των εντόμων όπου λαμβάνει μέρος στην αναπλήρωση του γλουταμινικού στον προσυναπτικό νευρώνα (Hassel, 2001).

Μια εξήγηση για την απομόνωση θετικού φαγικού κλώνου που δεν περιέχει μέρος του νικοτινικού υποδοχέα μπορεί να αποτελέσει η θερμοκρασία υβριδοποίησης. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ήταν χαμηλή (55°C) λόγω του ότι ο ανιχνευτής μας ήταν ετερόλογος με αποτέλεσμα η πιθανότητα σύνδεσης των ανιχνευτών σε μη ειδικές κωδικοποιούσες περιοχές να αυξάνεται. Αυτό, όμως, αντισταθμίζεται από το γεγονός ότι ο ανιχνευτής α1 κατά τη διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης έδωσε θετικό σήμα με φαγικούς κλώνους που περιείχαν περιοχές του νικοτινικού υποδοχέα.

Επίσης, η μη απομόνωση του επιθυμητού βακτηριοφάγου μπορεί να οφείλεται στη cDNA βιβλιοθήκη του δάκου που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή της διαλογής. Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της βιβλιοθήκης εκφράζονται διαφορετικές πρωτεΐνες, επομένως ο αριθμός των αντιγράφων δεν θα είναι ίδιος για όλα τα γονίδια (Strode, 2006). Επίσης σημαντικό είναι ότι πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της βιβλιοθήκης πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Συνεπώς, εάν υποθέσουμε ότι η πυρουβική καρβοξυλάση βρισκόταν ήδη πριν την ενίσχυση, σε περισσότερα αντίγραφα από τις υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα τότε μετά την ενίσχυση θα ήταν ακόμη δυσκολότερο να εντοπιστούν από τον ανιχνευτή αντίγραφα των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα λόγω της αυξημένης αντιπροσώπευσης της πυρουβικής καρβοξυλάσης αλλά και των μη αυστηρών συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν.

Όσον αφορά στους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των φαγεμιδίων, αυτοί δεν εντοπίστηκαν στις αλληλουχίες των φαγεμιδίων που αποκτήθηκαν μετά την ανάλυση της πρωτοδιάταξης τους. Γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψη ότι δεν πραγματοποιήθηκε ολοκληρωτική νουκλεοτιδική ανάλυση των φαγεμιδίων λόγω της ανικανότητας σύνδεσης των εσωτερικών εκκινητών. Επομένως, ένα μεγάλο κομμάτι της αλληλουχίας των φαγεμιδίων παραμένει άγνωστο κι είναι πιθανό η αλληλουχία που βρήκε ομολογία ο ανιχνευτής και έδωσε θετικό σήμα να βρίσκεται στην άγνωστη νουκλεοτιδική περιοχή. Ωστόσο οι ανιχνευτές κωδικοποιούσαν εξόνια των νικοτινικών υποδοχέων της *Drosophila melanogaster*. Για να εξεταστεί αν υπάρχει ομοιότητα μεταξύ της αλληλουχίας της πυρουβικής καρβοξυλάσης και του ανιχνευτή πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση. Τυχόν παρουσία ομοιότητας μεταξύ των δυο αλληλουχιών μπορεί να δώσει μια πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση θετικού σήματος κατά την διαλογή της cDNA βιβλιοθήκης. Η ομοπαράθεση έδειξε ομοιότητα της τάξης του 50% μεταξύ των δυο αλληλουχιών, η οποία δεν αποκλείει το ενδεχόμενο ο ανιχνευτής να υβριδοποιήθηκε με το μετάγραφο της πυρουβικής καρβοξυλάσης.

Παρόλα αυτά δε μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο τα φαγεμίδια να περιέχουν τμήμα του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου. Καταρχήν, τα φαγεμίδια επιλέχθηκαν με ανιχνευτή τμήμα του νικοτινικού υποδοχέα και μάλιστα η επιλογή αυτή επιβεβαιώθηκε με τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις (πρώτη και δεύτερη διαλογή της βιβλιοθήκης, υβριδοποίηση κατά Southern των προϊόντων πέψης και PCR των ενθεμάτων των φαγεμιδίων). Δεύτερον, η PCR αντίδραση των φαγεμιδίων με εκκινητές των εξονίων του νικοτινικού υποδοχέα ενίσχυσε το αναμενόμενο προϊόν. Και τρίτον, η ομοπαράθεση της αποκτηθείσας αλληλουχίας των φαγεμιδίων και της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster* κατέδειξε περίπου 45% ομοιότητα, η οποία δεν απέχει από το ποσοστό ομοιότητας (48%) της αλληλουχίας με την πυρουβική καρβοξυλάση. Όλα τα παραπάνω μπορούν να δικαιολογήσουν τον ισχυρισμό ότι τα φαγεμίδια είναι δυνατό να περιέχουν πράγματι κάποιο μετάγραφο υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου. Ίσως οι υποδοχείς μεταξύ των δύο εντόμων να παρουσιάζουν μεγαλύτερες διαφορές από το αναμενόμενο. Μάλιστα, το γεγονός ότι ο ανιχνευτής εντοπίζεται εσωτερικά του ενθέματος υποδηλώνει ότι το τμήμα που αλληλουχήθηκε μπορεί να μην αντιστοιχεί σε διαμεμβρανική περιοχή (συντηρημένη περιοχή) αλλά για παράδειγμα σε ενδοκυτταρική θηλιά, η οποία είναι γνωστό ότι παρουσιάζει μικρή ομοιότητα μεταξύ των υπομονάδων αλλά και των ειδών (Grauso, 2002). Επομένως η 45% ομοιότητα της αλληλουχίας των φαγεμιδίων με το νικοτινικό υποδοχέα δεν αποκλείει την περίπτωση να έχει απομονωθεί πράγματι μετάγραφο του υποδοχέα και όχι της πυρουβικής καρβοξυλάσης.

Η απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα, εάν δηλαδή οι φαγικοί κλώνοι της cDNA βιβλιοθήκης αποτελούν τμήμα της πυρουβικής καρβοξυλάσης ή του νικοτινικού υποδοχέα του

δάκου, θα δοθεί μόνο με την ακριβή εξακρίβωση του ενθέματος. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η ολοκληρωμένη νουκλεοτιδική ανάλυση των φαγεμιδίων. Λόγω της ανικανότητας των εσωτερικών εκκινητών να συνδεθούν, τα ενθέματα των φαγεμιδίων μπορούν να υποκλωνοποιηθούν και να ακολουθήσει ανάλυση της πρωτοδιάταξης τους. Επίσης, μία άλλη προσέγγιση για την επιτυχή απομόνωση φαγικών κλώνων αποτελεί η κατασκευή καινούριας cDNA βιβλιοθήκη, ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της μη σωστής αντιπροσώπευσης των αντιγράφων και να πραγματοποιηθεί διαλογή της χρησιμοποιώντας ανιχνευτές τουλάχιστον για την υπομονάδα α1 τα εξόνια που απομονώθηκαν κατά τη διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Οι ανιχνευτές αυτοί θα είναι ομόλογοι κι επομένως μπορεί να αυξηθεί η θερμοκρασία υβριδοποίησης ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα της διαλογής.

Η κλωνοποίηση των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου της ελιάς είναι σημαντική όχι μόνο για τη διερεύνηση της φυσιολογίας του εντόμου αλλά και για τη διερεύνηση του στόχου του *srinosad* στο έντομο, και συνεπώς την κατανόηση της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας σε αυτό. Η μοριακή ανάλυση του νικοτινικού υποδοχέα σε ευαίσθητους φυσικούς και ανθεκτικούς (μέχρι στιγμής εργαστηριακούς) πληθυσμούς του εντόμου θα βοηθήσει στον προσδιορισμό του παράγοντα που ευθύνεται για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας του *Bactrocera oleae* στο *srinosad* και ίσως οδηγήσει στη δημιουργία ενός μοριακού διαγνωστικού τεστ. Η έγκαιρη πρόβλεψη της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο *srinosad* σε φυσικούς πληθυσμούς μέσω του διαγνωστικού τεστ θα βοηθήσει στη λήψη ορθών αποφάσεων όσον αφορά στην επιλογή κατάλληλων εντομοκτόνων ή γενικότερα μεθόδων καταπολέμησης και θα αποτελέσει ουσιαστική συμβολή στη φυτοπροστασία της ελιάς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. Βιβλιογραφία

- Baumhover A.H., Graham .J., Hopkins D.E., Dudley F.H., New W.D. et al. (1955) Control of screwworms through release of sterilized flies. *J. Econ Entomology* 48: 462-466.
- Baxter S.W., Chen Mao, Dawson Anna, Zhao Jian-Zhou, Vogel Heiko, Shelton M. Anthony, Heckel D G., Jiggins Chris D., 2009. Mis- Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.) *PLoS Genet* 6(1): e1000802
- Bret B.L., Larson L.L., Schoonover J.R., Sparks T.C., Thompson G.D., Biological properties of spinosad, *Down to Earth* Vol.52 No1, 1997
- Buckingham S.D., Biggin P.C., Satelle B.M., Brown L.A., Satelle D.B., 2005, Insect GABA Receptors: Splicing, Editing and Targeting by Antiparasitics and Insecticides. *Mol. Pharmacol* 68: 942-951
- Carson Rachel, 1962, *Silent Spring*, First Mariner Books, 40th Anniversary Edition
- Cendric Gillot, 1995, *Entomology* Second Edition, Plenum Press, New York
- Chambers J.e., Levi P.E., 1992, *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. Academic Press, Inc., NY, USA
- Cleveland B. Cheryl, Mayes A. Monte, Cryer A Steven, 2001, An ecological risk assessment for spinosad use on cotton. *Pest management science* Vol.58 1: 70-84
- Coluzzi M., 1992, *Malaria Vector Analysis and Control*. *Parasitologia today* 8: 113-118
- Gupta R.C., 2005, *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Pesticides* Academic Press, Inc., NY, USA
- Dolinsek Jane, 2007, *Pyrethrum (Tanacetum Cinerariifolium)* from the northern Adriatic as a potential source of natural insecticide *Ser. Hist. nat.* 39-46
- Dong K., 2007, Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* 7: 17-30
- Dow AgroSciences, *Spinosad Technical bulletin*, Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana, USA
- Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson S.A., 2005, *Sterile insect technique: principles and practice in area- wide integrates pest management*. Springer
- Engel A.G., Ohno K., Sine S.M., 2003, *Congenital myasthenic syndromes: Progress over the pas decade*. *Muscle Nerve* 27: 4-25

- Ferguson J.S., 2004, Development and stability of insecticide resistance in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to cyromazine, abamectin and spinosad. *J. Econ.Entomol.* 97: 112-119
- Ffrench- Constant Richard, Dabom Phillip J., Goff G.L., 2004, The genetics and genomics of insecticides resistance. *Trends in Genetics* Vol.20 3: 163- 170
- Gullan, P.J.; P.S. Cranston, 2005, *The Insects: An Outline of Entomology* Third Edition. Oxford: Blackwell Publishing.
- Gundelfinger E.D., Hess N., 1992, Nicotinic acetylcholine receptor of the central nervous system of *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* 1137: 299- 308
- Gorman Kevin, Liu Z., Denholm Ian, Bruggen Ki-Uwe, Nauen Ralf, 2008, Neonicotinoid resistance in rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* *Pest Management Science* Vol64 11: 1122- 1125
- Gomulski L.M., Torti C., Malacrida A.R., Gasperi G., 1997, Ccmar1, a full-length mariner element from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol Biol* 6: 241-153
- Grauso M., Reenan R.A, Gulletto E., Satelle D.B, 2002, Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, Da5, Da6, Da7 in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediates A-to-I Pre-mRNA editing *Genetics* 160: 241- 253
- Hammond K.A., Macinko George, Fairchild W.B., Association of American geographers, 1978, *Sourcebook on the environment: a guide to the literature*. The University of Chicago Press
- Hassel B., 2001, Carboxylation and anaplerosis in neurons and glia. *Molecular Neurobiology* 21-40
- Hendrichs J., Ortiz G., Liedo P., Schwarz A., 1983, Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala, In: *Fruit Flies of Economic Importance* A.A. Balkema, Rotterdam, 353- 365
- Hemingway J., 2000, The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 30: 1009- 1015
- Jones A.K., GrausoM., Satelle D.B., 2005b, The nicotinic achetylcholin receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* 85: 176- 187
- Jones A.K., Raymond- Delpech V., Thany H. Steeve, Gauthier Monique, Sattelle David B., 2006, The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* 16: 1422- 1430

- Jones K. Andrew, Brown Laurence, Satelle B. David, 2007, Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species. *Invert neuroscience* 7: 67- 73
- Kao P.N., Dwork A.J., Kaldany R.R., Silver M.L., Wideman J., Stein, Karlin A., 1984, Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 11662-11665.
- Karlin A., 2002, Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors, *Nat Rev Neurosci* 3:102- 114
- Kondo S, Nakajima Y, Sugio S, Yong-Biao J, Sueda S, Kondo H , 2004, Structure of the biotin carboxylase subunit of pyruvate carboxylase from *Aquifex aeolicus* at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* Vol 60 3: 486-492
- Krieger Robert Irving, 2001, *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press Vol.2
- Landsell S.J., Millar N.S., 2000, Cloning and heterologous expression of Dα4, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology* 39: 2604-2614
- Linaius Caroli, 1735, *Systema Naturae*. Bayer Staatsbibliothek
- Liu Zewen, Yao Xiangmei, Yixi Zwang, 2008, Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs): Important amino acid residues contributing to neonicotinoid insecticides selectivity and resistance. *African Journal of Biotechnology* 7: 4935- 4939
- Matolcsy G., Nadasy M., Andriská V., 1988, *Pesticide chemistry* Elsevier Science Publishers
- Matsuda Kazuhiko, Kanaoka Satoshi, Akamatsu Miki, Satelle David B., 2009, Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids: Structural Insights. *Molecular Pharmacology* Vol. 76 1: 1- 10
- Metcalf L. R., Luckmann W.H., 1994, *Introduction to insect pest management*. Vol.3
- Metcalf, C. L., W. P. Flint, and R. L. Metcalf, 1997, *Destructive and Useful Insects, Their Habitats, and Control*. New Delhi: Tata McGraw–Hill Publishing Company
- Millar Neil S., Denholm Ian, 2007, Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 7: 1354- 2516
- Miller R. Douglas, Davidson R. John, 2005, Armored scale insect pests of trees and shrubs (Hemiptera: Diaspididae), *Nature*
- Moulton John K., Pepper David A., Dennehy Timothy J., Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad, 2000, *Pest management Science* 56: 842- 848

- Montiel Bueno A., Gones O., Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals, IOBC wprs Bulletin Vol.25, 2002.
- Orr Nailah, Shaffner J. Andrew, Richey Kimberly and Crouse Gary D., 2009. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1: 1-5
- Oakeshott G.J., Devonshire L.A., Claudianos C., Sutherland T.D., Horne Irene, Campbell Peter M., Ollis L. David, Russel Robyn J., 2005, Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholinergic and carbocyl-esterases. *Chemico-Biological Interactions* Vol. 157-158 : 269-275
- Perry Trent, McKenzie John A., Batterham Philip, 2007, A *Da6* knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* Vol.37 2: 184- 188
- Pope N. Carey, 1999, Organophosphorus Pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health* Vol.2 2: 161- 181
- Rechcigl Jack E., Rechcigl Nancy A., 2000, *Insect pest management, Techniques for environmental protection.* CRC Press LLC
- Romoser S.W., Stoffolano G.J., 1998, *The science of entomology.* Fourth Edition McGraw- Hill
- Salgado V.L, 1997 The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to earth* 52. No1 : 35-43
- Salgado V.L 1998. Studies on the Mode of Action of Spinosad: Insect Symptoms and Physiological Correlates., *Pestic. Biochem. Physiol.* 60: 91-102
- Sanderson E.D., Jackson C.F., Fuchs Carl, 2002, *Super review entomology: insect life and behavior*
- Satelle D.B., Jones A.K., Satelle B.M., Matsuda K., R. Reenan, Biggin P.C., 2005, Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays* 27:366- 376
- Sattelle DB, 1980, *Advances in Insect Physiology.* Vol 15
- Schlenk Daniel, Benson W.H., 2001, Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. Vol.2
- Scott G. Jeffrey, 2008, Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects. *J.Pestic.Sct.* Vol 33 3: 221-277
- Shono T., Sott J.G., 2003, Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1 *Pestic. Biochem. Physiol.* 75: 1-7

- Smissaert H.R., 1964, Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate Science 143:407- 409
- Smith, Deborah T., 1991 Agriculture and the Environment: The 1991 Yearbook of Agriculture United States Government Printing
- Stein W.D , 1990, Channels, Carriers and Pumps: An introduction to Membrane Transport. New York: Academic Press
- Steiner L.F., Harris E.J., Mitchell W.C., Fujimoto M.S., Christenson L.D., 1965, Melon fly eradication by overflooding with sterile flies. J. Econ Entomol 519- 522
- Stenersen J., 2004, Chemical pesticides: mode of action and toxicology CRC Press, LLC, Boca Raton, Florida, USA
- Tomizawa M., Casida John E., 2005, Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. Annual Review of Pharmacology and Toxicology Vol.45: 247-268
- Tomizawa M, Casida JE, 2009. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death.
- Thompson Gary D., Dutton Robert, Sparks Thomas C., 2000. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme
- Thompson G.D., Michel K.H., Yao R.S., Mynderse J.S., Mosburg C.T., Worden T.V., Chio E.H., Sparks T.C., Hutchins S.H., 1997, The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products. Down to earth Vol.52. No1
- Vinogradov A.E., 1999, Intron- Genome size relationship on a large evolutionary scale
- Weeden, C.R., Shelton A.M., Hoffman M.P., 2007, Biological control: a guide to natural enemies in North America. Cornell University College of Agriculture and Life Sciences. J. Mol. Evol 49: 376- 384
- Wyss Christoph F., Young Hugh P., Shukla lyoti, Roe R. M., 2003 , Biology and genetics of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad Crop Protection Vol. 22 2: 307- 314
- Zhou Zhi- Hong, Liu Zhi- Heng, Qian Yu- Dong, Kim Seung Bum, Goodfellow Michael, 1998. *Saccharopolyspora spinosporotrichia* sp. nov., a novel actinomycete from soil
- Zhao J.Z., YX Li, H.L. Collins, Gusukuma-Minuto L. Mau L. F. R., Thompson G.D., Shelton A. M., 2002, Monitoring and Characterization of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) Resistance to Spinosad 95 (2): 430- 436
- Zhao J.Z, Li Y.X., Collins H.L., Gusukuma-minuto L., Mau R.F.L., Thompson G.D., Shelton A.M., 2002, Monitoring and characterization of diamond back moth resistance to spinosad. J. Econ. Entomol. 95: 430-436