



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Κλωνοποίηση του γονιδιακού τόπου της  
S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης  
του σημαντικότερου παράσιτου της ελιάς, το έντομο  
*Bactrocera oleae***

ΕΥΣΤΑΘΙΑ ΚΟΣΜΙΔΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4661/1  
Ημερ. Εισ.: 13-10-2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΚΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087881

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Καλλιόπη Κωστελίδου, Διδάσκουσα ΠΔ407, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

Εισαγωγή.....	6
1. Η ελιά.....	7
1.1 Η πολυδιάστατη σημασία της ελιάς.....	8
2. Ο δάκος της ελιάς.....	9
2.1 Μορφολογία του δάκου.....	11
2.2 Βιολογικός κύκλος του δάκου.....	12
2.3 Επιπτώσεις της δράσης του δάκου.....	13
2.4 Τρόποι καταπολέμησης του δάκου.....	14
3. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα.....	15
3.1 Γενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε ανθεκτικότητα.....	17
3.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	18
3.2.1 Μηχανισμοί μεταβολικής ανθεκτικότητας.....	20
3.2.1.α P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγάσες.....	20
3.2.1 β Μη ειδικές εστεράσες.....	22
3.2.1 γ S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης.....	23
3.2.2 Μηχανισμοί target site ανθεκτικότητας.....	25
3.2.2 α Προσδετο- ελεγχόμενοι δίαυλοι ιόντων.....	25
3.2.2 β Ταση-ελεγχόμενοι δίαυλοι ιόντων.....	26
3.2.2γ Ακετυλοχολινεστεράση.....	28
Σκοπός.....	30
Υλικά και Μέθοδοι.....	31
1. Γενωμική βιβλιοθήκη.....	32
2. Ανάπτυξη βακτηριακού στελέχους.....	32
3. Επίστρωση μολυσμένων με φάγους MRA κυττάρων.....	33
4. Μεταφορά των πλακών των βακτηριοφάγων σε νάιλον μεμβράνες και υβριδοποίηση.....	34
5. Έκλυση των σωματιδίων των φάγων.....	36
6. Απομόνωση φαγικού DNA.....	37
7. Εκχύλιση DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο.....	38
8. Κατακρύμνιση DNA με αιθανόλη.....	39
9. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	40
10. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	40

11. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	42
12. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	43
13. Υβριδοποίηση κατά Southern.....	44
14. Αποχρωματισμός μεμβράνης.....	47
15. Απομάκρυνση του ανιχνευτή από τη μεμβράνη.....	47
16. Σήμανση ανιχνευτή.....	47
17. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	48
18. <i>In vitro</i> μεταγραφή.....	50
19. Αντίδραση σύνδεσης μορίων.....	51
20. Δημιουργία δεκτικών κυττάρων.....	52
21. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	53
22. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	54
23. Δημιουργία αποθέματος (stock) βακτηριακών κυττάρων σε γλυκερόλη.....	55
24. Προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA.....	55
25. Παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων.....	56
Αποτελέσματα.....	60
1. Συλλογή φαγικών πλακών.....	61
1.1 Ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος με PCR.....	61
2. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και σχεδιασμός των χαρτών περιορισμού των ενθεμάτων.....	62
3. <i>In vitro</i> μεταγραφή.....	65
3.1 Αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Southern.....	67
4. Ανάλυση της αλληλουχίας.....	68
Συζήτηση.....	71
Βιβλιογραφία.....	74

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1. Η ελιά



Ανάμεσα στα καρποφόρα δέντρα της ελληνικής φύσης που έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην οικονομία, στην κοινωνική εξέλιξη, αλλά και στη λατρεία, στις δοξασίες και στα έθιμα, την πρώτη θέση κατέχει αναμφισβήτητα η ελιά.

Στο πρώτο είδος ελληνικής γραφής (γραμμική Β) βρίσκουμε πληροφορίες για το λάδι, το οποίο χρησιμοποιούσαν βέβαια στη διατροφή, αλλά αποτελούσε επίσης και βάση για αρώματα και αλοιφές του σώματος, που ίσως είχαν και θεραπευτικές ιδιότητες. Φαίνεται όμως ότι υπήρχαν και βιοτεχνικές χρήσεις του λαδιού, π.χ. στη βυρσοδεψία και στην υφαντική. Ακόμη το χρησιμοποιούσαν και για φωτισμό. Το ξύλο της ελιάς χρησιμοποιήθηκε και αυτό στην οικοδομική, στην κατασκευή διαφόρων αντικειμένων και ως καύσιμη ύλη. Η σπουδαιότητα, επομένως του λαδιού είναι φανερή από την προϊστορική ακόμα εποχή.

Σήμερα σε όλη την υδρόγειο υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδενδρα από τα οποία το 95% περίπου καλλιεργούνται στη λεκάνη της Μεσογείου, η οποία διαθέτει άριστες εδαφοκλιματικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ελιάς. Στην Ελλάδα η ελιά είναι καλλιέργεια με πολύ μεγάλη διάδοση. Η εξάπλωση της ελαιοκαλλιέργειας είναι μεγαλύτερη από κάθε άλλο είδος καρποφόρου δέντρου και καταλαμβάνει έκταση που αναλογεί στο 15% περίπου της καλλιεργούμενης γεωργικής γης και στο 75% των εκτάσεων των δενδρωδών καλλιεργειών.



Εικόνα 1. Η ελιά



## 1.1 Η πολυδιάστατη σημασία της ελιάς

Η καλλιέργεια της ελιάς έχει μεγάλη κοινωνική, οικονομική, πολιτιστική, πολιτική και οικολογική σημασία για τις χώρες της Μεσογείου. Καλύπτει σημαντικό μέρος της γεωργικής έκτασης και η καλλιέργειά της χρησιμοποιείται για την παραγωγή λαδιού και βρώσιμης ελιάς, προϊόντα που αποτελούν σπουδαίο μέρος της δίαιτας των μεσογειακών λαών. Η καλλιέργεια της ελιάς στην χώρα μας έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μάλιστα η Ελλάδα είναι η τρίτη χώρα στην παραγωγή ελαιολάδου και η δεύτερη στην παραγωγή βρώσιμης ελιάς.

Η ελιά παίζει πολύτιμο ρόλο στη διατήρηση του περιβάλλοντος. Προσφέρεται για την αξιοποίηση των εδαφών που εξαρτώνται μόνο από βροχοπτώσεις. Σε τέτοιες «ευαίσθητες» περιοχές η εγκατάσταση άλλων καλλιεργειών εκτός της ελιάς εκθέτει τα εδάφη στον κίνδυνο των διαβρώσεων. Η ελαιοκαλλιέργεια, αντιθέτως, σε συγκαλλιέργεια με χειμερινά σιτηρά (κριθάρι) ή ψυχανθή (βίκος) προσφέρεται για τη συντήρηση των προβληματικών αυτών εδαφών.

Ως προς τον κοινωνικό της ρόλο, η ελιά έχει αναπτυχθεί σε λιγότερο ευνοημένες ορεινές και ημιορεινές περιοχές και δύσκολα μπορεί να αντικατασταθεί με άλλες καλλιέργειες, λόγω των δυσμενών εδαφοκλιματικών συνθηκών (φτωχά και ξηρά εδάφη). Η ελαιοκαλλιέργεια, επομένως, θεωρείται ως η μόνη λύση για διατήρηση των γεωργικών πληθυσμών στις περιοχές αυτές και προσφέρει απασχόληση σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού.



Η καλλιέργεια της ελιάς έχει αποκτήσει έντονο οικονομικό ενδιαφέρον. Τα κυριότερα προϊόντα που παράγονται από την καλλιέργεια της ελιάς είναι το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές. Το ελαιόλαδο καταναλώνεται από όλους τους λαούς. Σήμερα η παγκόσμια ελαιοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει 810 εκατομ-

*Εικόνα 2. Το ελαιόλαδο.* μύρια ελαιόδεντρα. Το 98% των ελαιόδεντρων βρίσκονται στην περιοχή της Μεσογείου και από αυτό, το 70% είναι στις ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου. Στη χώρα μας καλλιεργούνται 100 εκατομμύρια ελαιόδεντρα με ετήσια παραγωγή περίπου 250.000 τόνους. Πρώτη χώρα σε

εξαγωγές ελαιολάδου είναι η Ισπανία και ακολουθούν η Ιταλία, η Ελλάδα και η Τυνησία. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενη παγκόσμια ζήτηση της ελιάς, που ανέρχεται σε 1.8% το χρόνο, και οφείλεται κυρίως στην αναγνώριση της αξίας της Μεσογειακής διατροφής.

Η παραγωγικότητα της ελιάς όμως μπορεί να διαταραχθεί από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών που προσβάλλουν το φυτό ή από τη δράση παρασίτων και εντόμων, που μπορούν να οδηγήσουν σε απώλειες που ανέρχονται έως και 30% της συνολικής παραγωγής. Οι ασθένειες προκαλούνται κυρίως από μύκητες, ενώ ο καρκίνος της ελιάς είναι η μόνη βακτηριακή πάθηση. Οι εχθροί της ελιάς είναι κυρίως έντομα όπως ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*), ο οποίος προκαλεί ζημιές στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, ο θρίπας (*Liothrips oleae*) ο οποίος προσβάλλει τους βλαστούς και τα φύλλα και πολλές φορές προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση καρπών και πτώση τους ή η μαργαρόνια (*Palpita unionalis*), η οποία προσβάλλει τα φύλλα. Ο σημαντικότερος όμως εχθρός παραμένει ο δάκος (*Bactrocera oleae*).

## 2. Ο δάκος της ελιάς



Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (στο παρελθόν *Dacus oleae*), θεωρείται γενικά ένα από τα πιο καταστρεπτικά έντομα στην περιοχή της Μεσογείου, προκαλώντας την πιο διαδεδομένη ζημία στις καλλιέργειες της ελιάς (Εικόνα 3). Η καταστροφή που

Εικόνα 3. Ο δάκος της ελιάς προκαλείται από το έντομο στο φρούτο οδηγεί σε απώλεια περίπου 30% της συγκομιδής ελιών στις Μεσογειακές χώρες και ιδιαίτερα στην Ελλάδα και την Ιταλία όπου γίνεται ευρεία εμπορική παραγωγή<sup>1</sup>.

Ο δάκος της ελιάς ανήκει ταξινομικά στην οικογένεια Tephritidae των Δίπτερων και είναι μονοφάγος, τρέφεται δηλαδή αποκλειστικά με τον καρπό

της ελιάς. Η οικογένεια αυτή, στην οποία ανήκουν πολλά έντομα, περιλαμβάνει τις λεγόμενες "μύγες των φρούτων" ("fruit flies") όπως η Μεσογειακή μύγα (*Ceratitis capitata*), η μύγα των κερασιών (*Rhagoletis cingulata*) και η μύγα των μήλων (*Rhagoletis pomonella*). Οι "μύγες των φρούτων" εναποθέτουν τα αυγά τους στα ώριμα ή ανώριμα φρούτα έτσι ώστε οι προνύμφες τους αναπτύσσονται μέσα σε αυτά με αποτέλεσμα έτσι την αποσύνθεση του φρούτου, καθώς επιτρέπεται και η είσοδος σε μύκητες και βακτήρια<sup>2</sup>.

Υπάρχουν αναφορές παρασιτισμού του δάκου σε φρούτα ελιάς ήδη από τον 3<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου. Ο δάκος σήμερα εντοπίζεται σε διάφορα σημεία της υδρογείου (Πίνακας 1)<sup>3</sup>. Κυρίως βρίσκεται στη λεκάνη της Μεσογείου, εντοπίζεται όμως και στην ανατολική και νότια Αφρική, τα Κανάρια Νησιά, την Ινδία, τη δυτική Ασία και προφανώς οπουδήποτε στο Ανατολικό Ημισφαίριο υπάρχουν ελιές (το γένος *Olea*). Στο Δυτικό Ημισφαίριο προς το παρόν περιορίζεται στην Καλιφόρνια<sup>1</sup>.

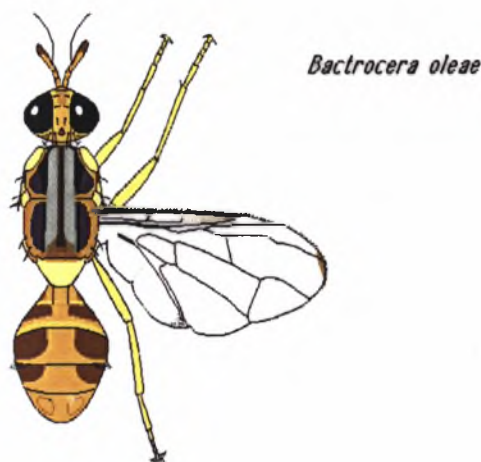
Πίνακας 1. Η παγκόσμια κατανομή του δάκου, *Bactrocera oleae*<sup>3</sup>.

---

Αίγυπτος	Ισπανία	Μεξικό
Αλβανία	Ισραήλ	Ν.Αφρική
Αλγερία	Ιταλία	Πακιστάν
Γαλλία	Κανάρια Νησιά	Πορτογαλία
Γιουγκοσλαβία	Κορσική	Σαρδηνία
Ελλάδα	Κύπρος	Συρία
Ερυθραία	Λίβανος	Τυνησία
Ηνωμένες Πολιτείες	Λιβύη	Τουρκία
Ιορδανία	Μαρόκο	

---

## 2.1 Μορφολογία του δάκου



Η μύγα της ελιάς είναι ένα από τα μικρότερα είδη του γένους. Το ενήλικο έντομο έχει μήκος περίπου 5mm. Η κεφαλή, ο θώρακας και η κοιλία έχουν καστανό χρώμα με σκούρα σημάδια και ορισμένες λευκές ή κίτρινες κηλίδες στην κορυφή και στα πλευρά του θώρακα. Τα φτερά

Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της μύγας της ελιάς. ΤΟΥ είναι τοποθετημένα σε οριζόντια θέση, μακριά από το σώμα και έχουν έκταση 10mm. Είναι συνήθως διαφανή και ιριδίζοντα με μία μικρή χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στις άκρες τους (Εικόνα 4). Η μύγα της ελιάς μπορεί να διακριθεί από τις άλλες μύγες των φρούτων από την έλλειψη ζωνώσεων κατά μήκος των φτερών, οι οποίες παρουσιάζονται στα περισσότερα συγγενικά είδη, αλλά και από την παρουσία μαύρων σημαδιών στις άκρες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα θηλυκά έντομα διακρίνονται από τα αρσενικά από την παρουσία του οργάνου εναπόθεσης των αυγών, μια μαύρη αιχμηρή δομή στο τέλος της κοιλίας, η οποία χρησιμοποιείται για το τρύπημα της ελιάς και την εναπόθεση των αυγών σε αυτή. Τα ποδιά της μύγας έχουν χρώμα κίτρινο. Το αυγό είναι λευκό με μήκος 0.7mm και διάμετρο 0.2mm. Η προνύμφη είναι λευκή και δεν έχει πόδια (Εικόνα 5). Αρχικά είναι πολύ μικρή και δύσκολα μπορεί κάποιος να τη διακρίνει, μετά όμως από ένα χρονικό διάστημα και αφού έχει τραφεί αρκετά εντοπίζεται πιο εύκολα, ιδιαίτερα όταν το φρούτο έχει αρχίσει να σαπίζει. Το στάδιο της προνύμφης συμβαίνει εξ' ολοκλήρου μέσα στο φρούτο. Τέλος το βομβύκιο είναι ωοειδές, με χρώμα που ποικίλει από κίτρινο ως καφέ και με μήκος 4-5mm<sup>4</sup>.



Εικόνα 5: Προνύμφη του δάκου

## 2.2 Βιολογικός κύκλος του δάκου

Ο βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς είναι στενά συνδεδεμένος με την εποχιακή ανάπτυξη του κυρίως ξενιστή του, την καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea*), και με το τοπικό κλίμα<sup>4</sup>. Πρόκειται για ένα έντομο πολυκυκλικό, που συμπληρώνει δηλαδή περισσότερους από έναν βιολογικούς κύκλους ανά έτος. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη του, υπάρχουν δηλαδή διαθέσιμοι καρποί για ωοτοκία, κατάλληλη θερμοκρασία, υγρασία κ.ά., οι γενεές μπορούν να διαδέχονται η μία την άλλη καθ' όλη τη διάρκεια του έτους χωρίς διακοπή<sup>3</sup>.

Στη περιοχή της Μεσογείου εμφανίζονται 2 έως 5 γενεές ετησίως. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα τα βομβύκια βρίσκονται στο έδαφος κάποια εκατοστά κάτω από το χώμα και από στρώματα φύλλων. Τα ενήλικα άτομα που προκύπτουν εμφανίζονται κυρίως το Μάρτιο και τον Απρίλιο ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και τη θερμοκρασία της κάθε περιοχής. Στις αρχές του Ιουνίου τα θηλυκά αναζητούν καρπούς ελιάς και εναποθέτουν τα αυγά τους σε αυτούς. Τα αυγά που εναποθέτει ένα καθημερινά είναι από 10 έως 12, συνήθως ένα για κάθε καρπό, και περίπου 200 με 250 σε όλη τη ζωή του εντόμου. Το θηλυκό τρυπά τον καρπό με τον εναποθέτη των αυγών και αφήνει ένα αυγό κάτω από το επικάρπιο. Οι προνύμφες που προκύπτουν τρέφονται από τον καρπό και προκαλούν την πτώση του από το δέντρο. Η πρώτη γενιά ενήλικων εμφανίζεται την άνοιξη. Τα στάδια του αυγού, της προνύμφης και του βομβυκίου διαρκούν 2 με 4, 10 με 14 και περίπου 10 μέρες αντίστοιχα. Η διάρκεια ζωής του εντόμου ποικίλει από 1 έως 6-7 μήνες<sup>1</sup>. Επιπλέον γενεές είναι δυνατόν να παραχθούν κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου μέχρι και το Δεκέμβριο εφόσον όμως υπάρχει διαθέσιμη τροφή. Τα περισσότερα άτομα της τελευταίας γενιάς του κάθε έτους (λίγο πριν το χειμώνα) εγκαταλείπουν τον καρπό και βομβυκιώνονται στο έδαφος, έτσι ώστε να δώσουν τη γενιά της άνοιξης και να συνεχίσουν τον βιολογικό κύκλο του εντόμου<sup>3</sup>.

## 2.3 Επιπτώσεις της δράσης του δάκου

Η καταστροφική δράση της μύγας της ελιάς ανέρχεται περίπου στο 50-60% της συνολικής καταστροφής που οφείλεται σε έντομα, προκαλώντας μείωση στον αριθμό και/ή στο μέγεθος των καρπών με επακόλουθη μείωση της παραγωγής και της ποιότητας των καρπών και του λαδιού. Η προνύμφη τρέφεται από τον καρπό, καταστρέφοντας τη σάρκα του φρούτου (Εικόνα 6) και επιτρέποντας την είσοδο βακτηρίων και μυκήτων που σαπίζουν το φρούτο και υποβιβάζουν την ποιότητα ή τη γεύση του λαδιού, αυξάνοντας την οξύτητά



Εικόνα 6. Η προνύμφη του δάκου στον καρπό της ελιάς.

του. Κάθε προνύμφη για να συμπληρώσει την ανάπτυξή της καταναλώνει από το 1/5 ως το 1/4 του μεσοκαρπίου ενός μέσου μεγέθους καρπού. Η καταστροφή αυτή μπορεί να προκαλέσει πρόωρη πτώση των καρπών και μείωση της παραγωγής τόσο της επιτραπέζιας ελιάς όσο και του λαδιού<sup>4</sup>.

Στις διάφορες περιοχές της Ευρώπης όπου η δράση του δάκου είναι εκτεταμένη, έχει αποδειχθεί ότι οι οικονομικές απώλειες των επιτραπέζιων ελιών ανέρχονται στο 100%, ενώ οι απώλειες του λαδιού κυμαίνονται στο 80% λόγω πτώσης των καρπών, καταστροφή της σάρκας τους και αυξημένης οξύτητας. Μια σειρά παραδειγμάτων για τη μεταβλητότητα της επίδρασης της μύγας της ελιάς στην παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς και του λαδιού στην περιοχή της Μεσογείου φαίνεται στον Πίνακα 2<sup>3</sup>. Για τους καλλιεργητές της επιτραπέζιας ελιάς η παρουσία ακόμη και ορισμένων μολυσμένων καρπών μπορεί να οδηγήσει σε απόρριψη μιας ολόκληρης σοδιάς. Κάποια μόλυνση των καρπών μπορεί να είναι ανεκτή στην παραγωγή του λαδιού μόνο όταν ο καρπός δεν έχει σαπίσει<sup>4</sup>.

Πίνακας 2. Η οικονομική επίδραση της δράσης του δάκου (Απώλειες στην παραγωγή της ελιάς)<sup>3</sup>.

Χώρα	Έτος	Απώλειες (%)
Ισπανία	1962	5%
Ιταλία	1962	25%
Ελλάδα	1962	30-35%
Ισραήλ	1962	20-60%
Κύπρος	1962	15-20%
Γιουγκοσλαβία	1962	20-40%
Λιβύη	1980/1981	27-72%/ 7-14%
Πορτογαλία	1994-96	17-19%

## 2.4 Τρόποι καταπολέμησης του δάκου

Μετά την αναγνώριση της οικονομικής σημασίας της καλλιέργειας της ελιάς δημιουργήθηκε η ανάγκη ανεύρεσης αποτελεσματικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου. Ο έλεγχος του πληθυσμού του εντόμου στηρίζεται στη χρήση εντομοκτόνων υπό τη μορφή ψεκασμών. Η επιλογή του εντομοκτόνου ποικίλλει ανάλογα με το στόχο: για ενήλικα άτομα (μύγες) πραγματοποιείται προληπτικός ψεκασμός, ενώ για ανήλικα άτομα (προνύμφες) που ήδη βρίσκονται μέσα στον καρπό πραγματοποιείται ψεκασμός καλύψεως. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες εντομοκτόνων, όπως τα χλωριωμένα, τα οργανοφωσφορικά, αυτά που προέρχονται από τοξίνες φυτών και άλλα. Οι κατηγορίες αυτές των εντομοκτόνων έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Ο έλεγχος του δάκου απαιτεί τη χρήση ακριβών χημι-



Εικόνα 7. Δακοπαγίδα

κών και μηχανισμού αλλά και τη χρήση τοξικών χημικών δημιουργώντας πολλά περιβαλλοντικά προβλήματα. Τα προβλήματα αυτά έχουν οδηγήσει στην ανάγκη χρήσης φιλικότερων μεθόδων<sup>7</sup>. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η χρήση δακοπαγίδων (Εικόνα 7) που εκμεταλλεύονται διάφορα ερεθίσματα για να προσελκύσουν το

έντομο και να παγιδευτεί εκεί, όπως φαγητό, οπτικά ερεθίσματα ή φερομόνη. Γενικά χρησιμοποιούνται και συνδυασμοί των παραπάνω παγίδων ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική η καταπολέμηση<sup>6</sup>.

### 3. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η εισαγωγή των εντομοκτόνων στην καλλιέργεια είναι ιδιαίτερα ευεργετική. Καθιστά τους αγρότες ικανούς να ελέγχουν καταστρεπτικά έντομα και να ελαττώνουν έτσι τις απώλειες της παραγωγής τους που προκαλούνται από αυτά με ένα ανεκτό οικονομικά κόστος. Όμως, μαζί με αυτά τα πλεονεκτήματα εμφανίζονται και κάποια αναπόφευκτα μειονεκτήματα, με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα των οργανισμών στόχων να είναι το κυριότερο. Η εισαγωγή νέων εντομοκτόνων έχει οδηγήσει σε ραγδαία αύξηση της ανθεκτικότητας, με πολλά είδη να είναι ανθεκτικά πλέον σε διάφορες ομάδες εντομοκτόνων. Η πρόβλεψη και ο έλεγχος της ανθεκτικότητας απαιτεί διάφορες πληροφορίες, σχετικά με την προέλευσή, την επιλογή και την εξάπλωση των γονιδίων που ευθύνονται για αυτήν<sup>7</sup>.

Η ανθεκτικότητα στην πραγματικότητα είναι ένα είδος αυτοάμυνας του εντόμου. Για το έντομο η έκθεση σε εντομοκτόνο είναι απλά ένας από τους μυριάδες κινδύνους τους οποίους πρέπει να αποφύγει ώστε να μπορέσει να επιβιώσει. Επομένως, η έκθεση σε εντομοκτόνο μπορεί να περιγραφεί ως ένα περιβαλλοντικό στρες και η ανθεκτικότητα σαν την έκφραση της φυσικής απόκρισης του εντόμου στο στρες. Τα έντομα αντιμετωπίζουν πολλούς κινδύνους και έχουν αναπτύξει αποτελεσματικούς μηχανισμούς άμυνας για να ανταπεξέλθουν.



Το στρες ορίζεται ως οποιαδήποτε περιβαλλοντική αλλαγή που δρα στη διατάραξη της ισορροπίας ενός οργανισμού. Τα τοξικά συστατικά του περιβάλλοντος αποτελούν κατάσταση στρες που μπορούν να επηρεάσουν τους πληθυσμούς διαφορετικά. Η ανθεκτικότητα, από την άλλη, ορίζεται ως η έκφραση ενός χαρακτηριστικού φαινοτύπου σε έναν πληθυσμό, ο οποίος φαινότυπος έχει ήδη εκφραστεί τουλάχιστον σε ορισμένα άτομα του πληθυσμού πριν την έκθεση σε κάποια τοξική ουσία. Η έντονη αλλαγή στην ευαισθησία ενός πληθυσμού σε κάποιο τοξικό οφείλεται στην εξειδικευμένη επιλογή αυτών των προ-προσαρμοσμένων ατόμων στο πληθυσμό. Έτσι, τα έντομα που μπορούν να αποτοξινώσουν κάποια φυτικά χημικά είναι προ-προσαρμοσμένα στην αποτοξίνωση και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, που εμφανίζουν ίδιο μοτίβο δράσης όπως τα φυτικά χημικά, πριν ακόμη εκτεθούν στα εντομοκτόνα.

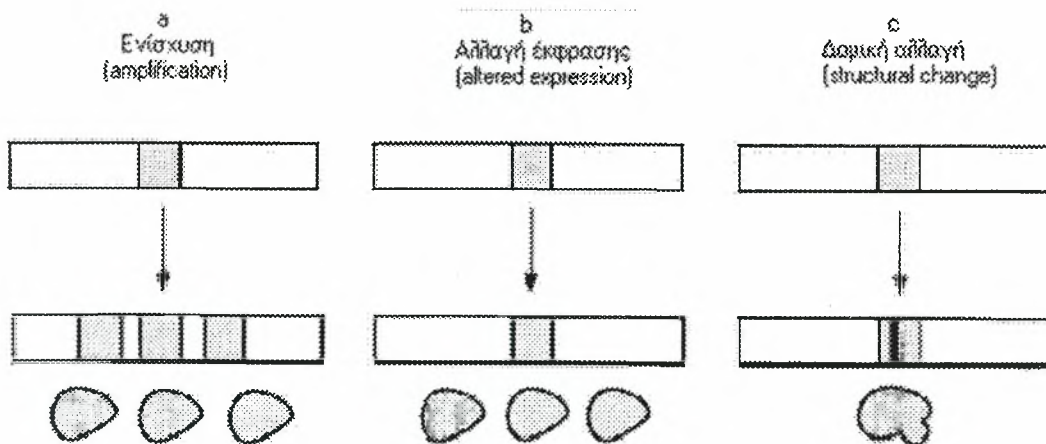
Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθούν οι όροι διασταυρωτή ανθεκτικότητα (cross-resistance) και πολλαπλή ανθεκτικότητα (multi-resistance). Με τον όρο cross-resistance αναφερόμαστε στην ανθεκτικότητα σε δύο ή περισσότερες κατηγορίες εντομοκτόνων που εμφανίζεται γιατί ο μηχανισμός δράσης των χημικών μέσων είναι ίδιος ή παρόμοιος. Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμικά δρουν με τον ίδιο τρόπο, γι' αυτό και όταν παρουσιάζεται ανθεκτικότητα στα πρώτα συνήθως εμφανίζεται και στα δεύτερα ή και το αντίστροφο. Με τον όρο multi-resistance αναφερόμαστε στην ανθεκτικότητα σε δύο ή περισσότερες κατηγορίες εντομοκτόνων που εμφανίζεται εξαιτίας της συνύπαρξης δύο ή περισσότερων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα, ένα ανθεκτικό έντομο μπορεί να εμφανίζει ανθεκτικότητα και στα οργανοφωσφορικά μέσω μεταβολισμού αλλά και στα πυρεθροειδή μέσω θέσης-στόχου (target-site)<sup>8</sup>.

Μελέτες έχουν δείξει ότι και η μύγα της ελιάς εμφανίζει ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα όπως για παράδειγμα στα οργανοφωσφορικά μέσω μεταλλάξεων σε κάποιο ένζυμο που συμμετέχει στη νευροδιαβίβαση<sup>9</sup>.

### 3.1 Γενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα των φυσικών πληθυσμών στα εντομοκτόνα είναι αποτέλεσμα επιλογής συγκεκριμένων αλληλομόρφων που προσδίδουν στα άτομα καλύτερη προσαρμοστικότητα. Τα αλληλόμορφα αυτά μεταβιβάζονται στις επόμενες γενεές με αποτέλεσμα αυτές είναι ανθεκτικές χωρίς να έχουν εκτεθεί καν στο εντομοκτόνο.

Υπάρχουν τρεις τύποι αλλαγής του γενετικού υλικού που μπορούν να συμβούν και να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα (Εικόνα 8). Ένα γονίδιο μπορεί να ενισχυθεί έτσι ώστε αντί για ένα μόνο αντίγραφο του να υπάρχουν πολλά στο γένωμα του εντόμου. Οπότε αν ένα έντομο έχει δέκα αντίγραφα ενός γονιδίου τότε θα παράγεται δέκα φορές το προϊόν του απ' ότι αν υπήρχε ένα αντίγραφο. Έτσι εάν το γονίδιο που ενισχύεται κωδικοποιεί ένα ένζυμο αποτοξίνωσης τότε το έντομο μπορεί να απενεργοποιεί δεκαπλάσια ποσότητα τοξικής ουσίας<sup>8</sup>. Τα γονίδια αυτά συνήθως είναι οργανωμένα σε γονιδιακές συστοιχίες (clusters) και όχι διασκορπισμένα σε όλο το γένωμα. Οι συστοιχίες αυτές των γονιδίων είναι διασκορπισμένες στους χρωμοσωμικούς βραχίονες<sup>11</sup>.



Εικόνα 8. Γραφική αναπαράσταση των γενετικών μεταλλάξεων που προκαλούν ανθεκτικότητα. α) Ένα γονίδιο ενισχύεται για να αυξήσει τον αριθμό των αντιγράφων στο γένωμα και να αυξήσει την ποσότητα του προϊόντος β) η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου για να αυξήσει ή να ελαττώσει την ποσότητα του προϊόντος γ) η γενετική πληροφορία αλλάζει και παράγεται δομικά διαφορετικό προϊόν.

Η έκφραση, επίσης, ενός γονιδίου μπορεί να αλλάξει με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας. Σε αυτή την περίπτωση στο μεταλλαγμένο

έντομο αυτό που αλλάζει δεν είναι ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου αλλά η ρύθμισή του. Το γονίδιο παράγει είτε περισσότερο είτε λιγότερο προϊόν σε σύγκριση με το φυσιολογικό ευαίσθητο έντομο. Όσον αφορά την εμφάνιση ανθεκτικότητας, όταν ένα εντομοκτόνο εφαρμόζεται στην τοξική του μορφή συμβαίνει μεγαλύτερη παραγωγή του ενζύμου αποτοξίνωσης, ενώ όταν εφαρμόζεται ένα προ-εντομοκτόνο, χημικό που χρειάζεται να μεταβολιστεί προκειμένου να παρουσιάσει τοξική δράση, συμβαίνει μικρότερη παραγωγή του ενζύμου αποτοξίνωσης.

Μία ακόμη μετάλλαξη που οδηγεί σε ανθεκτικότητα είναι μια αλλαγή σε ένα γονίδιο, η οποία προκαλεί μια δομική αλλαγή στο προϊόν του. Για παράδειγμα μια σημειακή μετάλλαξη σε ένα γονίδιο έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με κάποιο άλλο, που με τη σειρά της οδηγεί σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος (όταν η μετάλλαξη δεν είναι σιωπηλή ή ουδέτερη). Η μεταβολή αυτή της αμινοξικής αλληλουχίας οδηγεί σε διαφορετική τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, η οποία συμβάλλει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας. Η νέα δομή της πρωτεΐνης μπορεί να ελαττώσει την ικανότητα του εντομοκτόνου να συνδεθεί στη θέση δράσης του και ακόμη να αυξήσει ή να ελαττώσει την ικανότητα της πρωτεΐνης να μεταβολίσει το εντομοκτόνο. Οι δομικές αλλαγές δεν αλλάζουν την ποσότητα αλλά την ποιότητα του προϊόντος που παράγεται<sup>8,12</sup>.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτές οι αλλαγές στο γένωμα του εντόμου δεν δημιουργούν νέα γονίδια, απλά επηρεάζουν τα ήδη υπάρχοντα. Η άποψη ότι η έκθεση σε εντομοκτόνα "δημιουργεί" γονίδια ανθεκτικότητας έχει συζητηθεί εκτενώς. Το πλέον πιθανό είναι ότι τα αλληλόμορφα που προσδιορίζουν την ανθεκτικότητα υπάρχουν ήδη στον φυσικό πληθυσμό των εντόμων σε χαμηλή συχνότητα πριν την επιλογή από το εντομοκτόνο<sup>8</sup>.

### **3.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας**

Οι περισσότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας μπορούν να χωριστούν σε δυο ομάδες, την μεταβολική (αλλαγές στα επίπεδα ή στη δράση των πρωτεϊνών αποτοξίνωσης) και την target site ανθεκτικότητα (μεταλλάξεις στις θέσεις-στόχους των εντομοκτόνων)<sup>13</sup>. Οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για

τους παραπάνω μηχανισμούς συμμετέχουν ακόμη στη σύνθεση και αποσύνθεση ενός μεγάλου αριθμού ενδογενών μεταβολικών ουσιών, στην προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, στη μεταφορά νευρικών σημάτων και στη μεταφορά των ουσιών διαμέσου των κυττάρων<sup>11</sup>. Καθένας μηχανισμός ή και συνδυασμός τους προσδίδει ανθεκτικότητα, πολλές φορές σε εξαιρετικά υψηλό επίπεδο, στις διαθέσιμες ομάδες των εντομοκτόνων. Η μεταβολική ανθεκτικότητα μπορεί να χωριστεί σε τρία ενζυμικά συστήματα: P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες (P450s), μη ειδικές εστεράσες και S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Τα μέλη του κάθε ενζυμικού συστήματος μπορεί να μεταλλαχθούν επηρεάζοντας έτσι την αποτοξίνωση της χημικής ουσίας (Πίνακας 3)<sup>8</sup>.

Πίνακας 3. Οι γενετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με ένζυμα και υποδοχείς και οδηγούν σε διάφορους τύπους ανθεκτικότητας.

Τύποι ανθεκτικότητας	Γενετικές μεταλλάξεις		
	Ενίσχυση γονιδίου	Αλλαγή έκφρασης	Δομική αλλαγή
<b>Μεταβολική</b>			
P450 οξειδάσες	ΔΠ	-	ΔΠ
Εστεράσες	+	ΔΠ	+
GSTs	ΔΠ	-	?
<b>Target site</b>			
Ακετυλοχολινεστεράση	ΔΠ	ΔΠ	+
Υποδοχέας GABA	ΔΠ	ΔΠ	+
Δίαυλος νατρίου	ΔΠ	?	?

ΔΠ: Δεν Παρατηρήθηκε, +: έχει επιβεβαιωθεί, ?: δεν έχει επιβεβαιωθεί,  
-: δεν υπάρχουν στοιχεία

## 3.2.1 Μηχανισμοί μεταβολικής ανθεκτικότητας

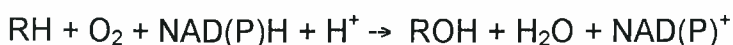
### 3.2.1α P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες

Οι P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες αποτελούν μια σημαντική οικογένεια υδροφοβικών ενζύμων που περιέχουν μια ομάδα αίμης στο μόριό τους και συμμετέχουν στο μεταβολισμό πολυάριθμων ενδογενών και εξωγενών συστατικών<sup>13</sup>. Τα συγκεκριμένα ένζυμα κωδικοποιούνται από μια υπεροικογένεια γονιδίων που ορίζεται ως *Cyp*. Τα γονίδια αυτά έχουν μια υψηλά διατηρημένη περιοχή στο τμήμα της πρωτεΐνης όπου συνδέεται η αίμη<sup>14</sup>.

Οι P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς των εντόμων και είναι τα πιο σημαντικά ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού, καθώς ολοκληρώνουν πολλές ουσιώδεις λειτουργίες από το μεταβολισμό ορμονών έως και το μεταβολισμό ξένων ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης. Αυτή η ποικιλία στη λειτουργία τους οφείλεται στην δομική τους ποικιλία. Τα έντομα φέρουν περίπου 100 γονίδια, που μερικές φορές είναι οργανωμένα σε γονιδιακές συστοιχίες, και καθένα από αυτά δίνει διαφορετικό P450 ένζυμο το οποίο έχει διαφορετικό υπόστρωμα.

Τα P450 γονίδια βρίσκονται κάτω από έναν πολύπλοκο έλεγχο, με τις ρυθμιστικές μεταλλάξεις να παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα<sup>15</sup>. Η ρύθμιση και η έκφραση των P450 γονιδίων δεν είναι πλήρως κατανοητή κυρίως γιατί τα P450 ένζυμα βρίσκονται συνήθως σε χαμηλές ποσότητες στα κύτταρα, ιδιαίτερα όταν ο οργανισμός δεν έχει εκτεθεί σε κάποιο στρες, φυσικοχημικό, φυσιολογικό ή ξενοβιοτικό<sup>14</sup>.

Η πλειοψηφία των P450 ενζύμων για να δράσουν χρειάζονται την NADPH P450 κυτοχρωμική ρεδοκτάση και ορισμένες φορές το κυτόχρωμα  $b_5$ <sup>13</sup>. Τα P450 ένζυμα καταλύουν συχνά αντιδράσεις μονοοξυγενάσης, που συνήθως καταλήγουν σε υδροξυλίωση, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν πολλές άλλες αντιδράσεις που καταλύονται από τα ίδια ένζυμα όπως αφυδρογόνωση, διμερισμός, απαμίνωση, αποϋδροξυλίωση, εποξειδωση, αναγωγή, διάσπαση δεσμών C-C ή C=N<sup>14</sup>.

Βασικά δεν υπάρχει κάποια ένδειξη που προτείνει ότι τα P450 γονίδια ενισχύονται ή αλλάζουν δομή προκειμένου να προκύψει ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Υπάρχουν όμως πολλαπλά παραδείγματα όπου παρατηρείται αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων από διάφορες ουσίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται σύνδεση ανάμεσα στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα και στα αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας των P450 ενζύμων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το ένζυμο CYP6D1 που υπερ-παράγεται *in vitro* στην *Musca domestica*, που παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή, λόγω αυξημένης μεταγραφής<sup>16</sup> και το CYP6A1 που ομοίως υπερ-παράγεται όταν παρουσιάζεται ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, στα καρβαμίδια και το DDT<sup>17</sup>. Στη *Drosophila melanogaster* το CYP6A2 που παράγεται είναι ικανό να μεταβολίζει διαζίνιο και κυκλοδιένια<sup>18</sup>. Υποκαταστάσεις αμινοξέων στο ανθεκτικό αλληλόμορφο *Cyp6a2* παρουσιάζουν αυξημένη δράση έναντι του DDT<sup>19</sup>. Αυξημένη δράση του *Cyp6g1* συνδέεται με την ανθεκτικότητα στο DDT τόσο στη *Drosophila melanogaster*<sup>20</sup> όσο και στο *D. simulans*. Το πλεονέκτημα επιλογής του συγκεκριμένου γενοτύπου έναντι της υπερ-παραγωγής άλλων P450 ενζύμων μπορεί να οφείλεται στην ευρεία cross-resistance (στα imidacloprid, malathion, lufenuron, neonicotinoid) που παρουσιάζει<sup>13</sup>.

Κάποιες άλλες περιπτώσεις σύνδεσης αυξημένων μεταγραφικών επιπέδων με την εμφάνιση ανθεκτικότητας είναι αυτές των *Cyp6z1*, *Cyp6f1* και της *Cyp4* οικογένειας. Η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή σχετίζεται με την αυξημένη μεταγραφή του *Cyp6z1* στο *An. gambiae*<sup>21</sup>. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται σε μια γονιδιακή συστοιχία 17 P450 γονιδίων στο χρωμοσωμικό βραχίονα 3R, το οποίο σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην περμεθρίνη σε αυτό το γένος εντόμου. Κάτι ανάλογο συμβαίνει και στο ανθεκτικό στην περμεθρίνη κουνούπι *C.p. quinquefasciatus* για το *Cyp6f1*<sup>22</sup>, στο ανθεκτικό στην δελταμεθρίνη *C.p. palens*<sup>23</sup> και στην ανθεκτική στα πυρεθροειδή *Drosophila*<sup>24</sup> για την *Cyp4* οικογένεια.

Ένα σημαντικό εμπόδιο στο να προσδιοριστούν ποία P450 γονίδια εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα είναι η ανικανότητα να διακριθούν οι δράσεις

των ξεχωριστών μη χαρακτηρισμένων P450 ενζύμων με μεγάλη ακρίβεια. Η ακριβής δράση ενός P450 ενζύμου πρέπει να καθοριστεί γιατί η υπέρ-έκφρασή του δεν αποδεικνύει απαραίτητα ότι το ένζυμο είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα. Κάτι τέτοιο συμβαίνει στην περίπτωση του CYP6A1 που υπερ-παράγεται στην *M. domestica*. Η υπέρ-έκφραση αυτή είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα στο DDT, τα οργανοφωσφορικά και στα καρβαμίδια, αλλά όχι στα κυκλοδιένεια.

### 3.2.1β Μη ειδικές εστεράσες

Οι εστεράσες συνιστούν μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που μεταβολίζουν μια ποικιλία υποστρωμάτων. Όλες οι εστεράσες είναι ικανές να υδρολύουν εστερικούς δεσμούς παρουσία νερού. Εφόσον πολλά εντομοκτόνα, ιδιαίτερα τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμίδια, περιέχουν εστερικούς δεσμούς, δεν είναι περίεργο που ο μηχανισμός ανθεκτικότητας πολλές φορές οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα των εστερασών<sup>25</sup>. Μέχρι τώρα δεν έχουν παρουσιαστεί στοιχεία ότι η έκφραση των γονιδίων της εστεράσης μεταβάλλεται για την εμφάνιση ανθεκτικότητας<sup>8</sup>.

Υπάρχουν, όμως, αξιόλογα δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι κάποια γονίδια μη ειδικών εστερασών υπερεκφράζονται, είτε μέσω αλλαγών στη γονιδιακή ρύθμιση είτε μέσω γονιδιακής ενισχύσης, και οδηγούν στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας. Ανθεκτικότητα λόγω γονιδιακής ενίσχυσης, και συχνά σε συνδυασμό με αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση, παρατηρείται στις αφίδες *Myzus persicae* και σε πολλά κουνούπια. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή μεγάλης ποσότητας εστερασών καθώς τα γονίδια ενισχύονται τόσο πολύ που μπορούν να βρεθούν έως και 250 αντίγραφα ενός γονιδίου σε κάποιο άτομο. Όσο ενισχύονται τα γονίδια των εστερασών τόσο περισσότερη ανθεκτικότητα προσδίδουν. Αυτή η αύξηση της ανθεκτικότητας φαίνεται να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των εστερασών με το εντομοκτόνο πιο γρήγορα από τους ίδιους τους στόχους των εντομοκτόνων. Όταν οι εστεράσες βρίσκονται σε περίπου ίση αναλογία με το εντομοκτόνο, είναι σε θέση να το απομονώσουν αποτελεσματικά και στη συνέχεια να το υδρολύσουν<sup>26,27</sup>.

Επιπλέον, αλλαγές στη δράση των εστερασών μπορεί να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να αλλάξουν δομή με αποτέλεσμα να είναι ικανά να μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα πιο αποτελεσματικά. Τέτοιου είδους αλλαγές παρατηρήθηκαν πρώτα στην ανθεκτική στα οργανοφωσφορικά *Musca domestica* στην οποία η δράση των καρβοξυλεστερασών είναι μειωμένη<sup>28,29,30</sup>. Αυτές οι παρατηρήσεις πρότειναν ότι τα μεταλλαγμένα ένζυμα είχαν χάσει την ικανότητα να υδρολύουν τα καρβοξυλεστερικά υποστρώματα αλλά είχαν αποκτήσει την ικανότητα να υδρολύουν οργανοφωσφορικά υποστρώματα<sup>31</sup>. Επίσης, στη μύγα του αυστραλιανού προβάτου *Lucilia cuprina* και στο κουνούπι *Culex tarsalis*, η δομή μιας καρβοξυλεστεράσης έχει αλλάξει στους ανθεκτικούς πληθυσμούς και παρατηρείται ανθεκτικότητα στο μαλάθιον. Σε καμία από τις δυο παραπάνω περιπτώσεις δεν παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου<sup>32,33</sup>.

### 3.2.1γ S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)

Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι ευρέως διαδεδομένα πολυλειτουργικά ένζυμα των αερόβιων οργανισμών που παίζουν ένα ρόλο κλειδί στην κυτταρική αποτοξίνωση. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα κύτταρα από τοξικές ουσίες με την ένωσή τους στη γλουταθειόνη. Τα σύμπλοκα της γλουταθειόνης συνήθως είναι λιγότερο τοξικά και γενικά έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό σε σχέση με τις ελεύθερες ουσίες, γεγονός που διευκολύνει την απομάκρυνσή τους από το κύτταρο<sup>34</sup>.

Οι GSTs μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο τάξεις σύμφωνα με τον εντοπισμό τους, τις μικροσωμικές και τις κυτοσολικές. Η πλειοψηφία των GSTs είναι κυτοσολικές διμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από δυο υπομονάδες, κάθε μια περίπου 24-28 kDa σε μέγεθος. Κάθε υπομονάδα φέρει δυο περιοχές σύνδεσης, την **G** και την **H** περιοχή. Η υψηλά διατηρημένη **G** περιοχή συνδέεται με το τριπεπτιδίο της γλουταθειόνης και αποτελείται κυρίως από αμινοξέα που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η **H** περιοχή είναι η περιοχή σύνδεσης με το υπόστρωμα και παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλία στη δομή ενώ αποτελείται από αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου<sup>35</sup>. Το ενεργό αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης



αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τη σουλφυδρυλομάδα της γλουταθειόνης για τη δημιουργία καταλυτικά ενεργών ανιόντωνθειόλης<sup>36</sup>. Το νουκλεοφιλικό αυτό ανιόν στη συνέχεια είναι ικανό να αντιδρά με τα υποστρώματα που συνδέονται στην Η περιοχή. Η ενεργή περιοχή είναι γενικά διατηρημένη στις τάξεις των GSTs αλλά διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τάξεων<sup>37</sup>.

Οι GSTs που παρουσιάζουν ομοιότητα στην αλληλουχία τους κατά 40% ταξινομούνται γενικά στην ίδια ομάδα, λαμβάνοντας υπόψη όμως και άλλες ιδιότητες όπως τις φυλογενετικές σχέσεις, τις ανοσολογικές ιδιότητες, την τριτοταγή δομή και την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή. Στα έντομα οι GSTs ανήκουν σε έξι ομάδες: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta, Zeta<sup>38</sup> και είναι οργανωμένες σε γονιδιακή συστοιχία.

Στη μεγάλη ποικιλία των λειτουργιών των GSTs συμβάλλει η εκτεταμένη φύση της υπεροικογένειας των GSTs στα έντομα και η εξειδίκευση για τα υποστρώματα του κάθε ενζύμου. Μεγάλες αλλαγές στην εξειδίκευση για το υπόστρωμα μπορεί να γίνουν ακόμη και από έναν μικρό αριθμό αμινοξικών υποκαταστάσεων. Η κύρια λειτουργία των ενζύμων γενικά θεωρείται ότι είναι η αποτοξίνωση τόσο από ενδογενή όσο και από εξωγενή συστατικά, είτε άμεσα είτε καταλύοντας το δευτερογενή μεταβολισμό των ουσιών που έχουν οξειδωθεί από το κυτόχρωμα P450. Οι GSTs επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο κάτω από συνθήκες στρες και συμμετέχουν στην κυτταρική μεταφορά και σε ποικίλα βιοσυνθετικά μονοπάτια<sup>13</sup>.

Αυξημένα επίπεδα των GSTs έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε ορισμένα εντομοκτόνα. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου συνήθως οφείλεται σε αύξηση της ποσότητας ενός ή περισσοτέρων ενζύμων, που είναι αποτέλεσμα είτε γονιδιακής ενίσχυσης είτε πιο συχνά αυξημένου μεταγραφικού ρυθμού<sup>39</sup>. Οι περισσότερες περιπτώσεις περιλαμβάνουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά στις μύγες *Musca domestica*. Έχουν αναφερθεί όμως και περιπτώσεις μεταλλαγμένων ενζύμων στο κουνούπι *An.gambiae* που αναγνωρίζουν τα πυρεθροειδή είτε σαν υποστρώματα είτε σαν αναστολείς και υπάρχουν ενδείξεις ότι οι GSTs εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή στο *N.lugens*<sup>40</sup>. Ο ρόλος των GSTs στο μεταβολισμό των πυρεθροειδών δεν είναι άμεσος, αλλά είναι πολύ σημαντικός στην ανθεκτικότητα σε αυτές τις ουσίες καθώς αποτοξινώνει τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, η οποία

επάγεται από τα πυρεθροειδή. Τα ένζυμα αυτά, ακόμη, προστατεύουν τον οργανισμό από την τοξικότητα των πυρεθροειδών με την απομόνωση του εντομοκτόνου<sup>41</sup>.

Επίσης, οι GSTs έχουν την ικανότητα να αποϋδροχλωριώνουν εντομοκτόνα όπως το DDT, με μια αντίδραση όπου δρουν σαν συμπαραγόντες παρά σαν συζευκτές<sup>42</sup>. Αυτός είναι πιθανώς ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας στο DDT στα κουνούπια. Στην σύζευξη των κύριων μεταβολιτών, η δράση των GSTs λειτουργεί σαν ένας δευτερογενής μηχανισμός ανθεκτικότητας σε συνδυασμό με το μηχανισμό ανθεκτικότητας μιας μονοοξυγενάσης ή μιας εστεράσης, όπως συμβαίνει στο *An.subpictus*<sup>40</sup>.

Ένας ακόμη ζωτικός μηχανισμός των GSTs είναι η απενεργοποίηση των τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού του οξυγόνου. Τα προϊόντα αυτά ενεργοποιούν μια αλυσίδα αντιδράσεων που μπορεί να είναι πολύ καταστρεπτικές για το κύτταρο.

### 3.2.2 Μηχανισμοί target site ανθεκτικότητας

#### 3.2.2α Προσδετο-ελεγχόμενοι διάυλοι ιόντων

Οι προσδετο-ελεγχόμενοι διάυλοι ιόντων δέχονται χημικά σήματα, νευροδιαβιβαστές, όπως η ακετυλοχολίνη ή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), και τα μετατρέπουν σε ηλεκτρικά σήματα μέσω ανοίγματος των διαύλων ιόντων. Στα έντομα ο GABA υποδοχέας αποτελεί σημείο δράσης των κυκλοδιένιων και των φαινυλπυραζολών εντομοκτόνων<sup>25</sup>. Οι υποδοχείς αυτοί ενώνονται για να σχηματίσουν ένα κανάλι ιόντων χλωρίου και παρουσιάζουν ανασταλτική δράση<sup>54</sup>. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα στα κυκλοδιένια οφείλεται στη μειωμένη ευαισθησία της A υπομονάδας του GABA υποδοχέα, που αποτελεί τμήμα του διαύλου ιόντων χλωρίου. Η μειωμένη αυτή ευαισθησία οφείλεται σε μια δομική αλλαγή της πρωτεΐνης. Δεν έχει παρατηρηθεί καμία ενίσχυση ή αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων του GABA υποδοχέα αλλά μόνο μια σημειακή μετάλλαξη που προκαλεί την αντικατάσταση ενός αμινοξέος με ένα άλλο με αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα.

Επιπλέον σημειακές μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί αλλά δεν φαίνεται να συνδέονται με την ανθεκτικότητα<sup>8,43</sup>.

Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια υπομονάδα του GABA υποδοχέα έχει κλωνοποιηθεί από δροσόφιλα που είναι ανθεκτική στο κυκλοδιένιο dieldrin και βρέθηκε ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται σε αντικατάσταση μιας αλανίνης στη θέση 302 με σερίνη ή γλυκίνη<sup>44</sup>. Μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία της αλανίνης στη θέση 302 είναι κρίσιμη για τη σύνδεση του εντομοκτόνου και μόνο η αλλαγή αυτού του αμινοξέος μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα<sup>45</sup>. Αντικατάσταση του ίδιου αμινοξέος έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ανθεκτικά έντομα, γεγονός που αποτελεί ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα παράλληλης εξέλιξης. Οι μελέτες αυτές αποδεικνύουν όχι μόνο ότι οι GABA υποδοχείς αποτελούν θέσεις δράσης των συγκεκριμένων εντομοκτόνων αλλά δείχνουν και ποιες ακριβώς είναι οι θέσεις πρόσδεσης των εντομοκτόνων<sup>27</sup>.

Οι προσδετο-ελεγχόμενοι δίαυλοι ιόντων αποτελούν θέσεις δράσης και σε νέες τάξεις εντομοκτόνων, όπως τα νεονικοτινοειδή (neonicotinoids) και οι ιβερμεκτίνες (ivermectins)<sup>46</sup>. Τα νεονικοτινοειδή (μιμητές της νικοτίνης) δρουν σε νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης πολλών υπομονάδων<sup>47</sup>. Παρόλο που η ανθεκτικότητα σε αυτά τα εντομοκτόνα χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, ουσιώδης πρόοδος έχει γίνει στην περίπτωση της δροσόφιλας. Κάποιες υπομονάδες του υποδοχέα έχουν κλωνοποιηθεί τόσο στη δροσόφιλα όσο και σε άλλα επιβλαβή έντομα, με αρκετές όμως από αυτές να μην έχουν ακόμη χαρακτηριστεί<sup>27</sup>.

### 3.2.2β Ταση-ελεγχόμενοι δίαυλοι ιόντων

Οι ταση-ελεγχόμενοι δίαυλοι ιόντων σε αντίθεση με τους προσδετο-ελεγχόμενους δίαυλους ιόντων ενεργοποιούνται από αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης και παίζουν σημαντικό ρόλο μεταφορά νευρικών ώσεων. Τα πυρεθροειδή και το DDT διακόπτουν τη νευρική μετάδοση με την εμπλοκή τους στη φυσιολογική λειτουργία των διαύλων ιόντων νατρίου<sup>48</sup>. Γι' αυτό, για την κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας χρησιμοποιούνται οι δίαυλοι ιόντων νατρίου. Οι δίαυλοι αυτοί αποτελούνται από τέσσερα τμήματα (I-IV) το

καθένα με έξι διαμεμβρανικές έλικες (S1-S6). Δυναμικά ενεργείας παράγονται κατά μήκος της μεμβράνης για την αγωγή της πληροφορίας στο νευρικό σύστημα. Στην ανενεργή κατάσταση, όταν η μεμβράνη είναι σε δυναμικό ηρεμίας, ο διάυλος νατρίου είναι κλειστός. Εντούτοις, κατά την ενεργοποίηση του διαύλου, η μεμβράνη εκπολώνεται και ο διάυλος ανοίγει δημιουργώντας ένα ρεύμα νατρίου προς την κατεύθυνση της ηλεκτροχημικής του βαθμίδωσης. Μετά από περίπου 1msec γίνεται απενεργοποίηση λόγω δομικής αλλαγής στο διάυλο που εμποδίζει τη δίοδο των ιόντων διαμέσου της μεμβράνης. Όταν το δυναμικό ηρεμίας επανέρχεται στη μεμβράνη ο διάυλος κλείνει<sup>13,54</sup>.

Τα πυρεθροειδή μεταβάλλουν την κινητική των διαύλων νατρίου ελαττώνοντας την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των διαύλων. Τα πυρεθροειδή χωρίζονται σε δυο ομάδες, τα τύπου I πυρεθροειδή (π.χ. περμεθρίνη) που δεν φέρουν κυανομάδα και τα τύπου II (π.χ. δελταμεθρίνη) που φέρουν. Αποτέλεσμα της δράσης των πυρεθροειδών είναι η παράλυση και ο θάνατος<sup>13</sup>.

Μέχρι στιγμής είναι πιθανό ότι η ανθεκτικότητα είναι αποτέλεσμα αλλαγής της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του διαύλου νατρίου ή/και μιας δομικής αλλαγής στο διάυλο νατρίου. Μελέτες στη *Musca domestica* επιβεβαίωσαν πως η ανθεκτικότητα οφείλεται σε λειτουργική αλλαγή των διαύλων νατρίου. Σε διάφορα είδη εντόμων βρέθηκε ότι η ανθεκτικότητα αποτελεί αποτέλεσμα αλλαγής της συγγένειας μεταξύ του εντομοκτόνου και της θέσης πρόσδεσής του στο διάυλο, που προκαλείται από μια ή πολλαπλές μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο του διαύλου. Σε πολλά είδη, όπως στο *An.gambiae* και το *An.stephensi*, η μετάλλαξη είναι μια αντικατάσταση της λευκίνης από φαινυλαλανίνη στην υδροφοβική περιοχή της έλικας S6 του τμήματος II του διαύλου. Μια δεύτερη μετάλλαξη στην ίδια θέση της λευκίνης από σερίνη βρέθηκε στο *An.gambiae* της ανατολικής Αφρικής. Και οι δυο μετελλάξεις παρατηρήθηκαν στην Τουρκία στο *An.sacharovi*<sup>8</sup>.

### 3.2.2γ Ακετυλοχολινεστεράση

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) είναι ένα ένζυμο κλειδί του νευρικού συστήματος γιατί ρυθμίζει τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη και τερματίζει τις νευρικές ώσεις με την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Στα έντομα είναι ένα γλυκοσυλιωμένο διμερές, το οποίο είναι προσκολλημένο στη μεμβράνη μέσω μιας γλυκολιπιδιακής άγκυρας<sup>11</sup>. Η αναστολή του ενζύμου οδηγεί σε συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στις συνάψεις με αποτέλεσμα οι υποδοχείς της να είναι συνεχώς ανοικτοί, γεγονός που τελικά οδηγεί στο θάνατο του εντόμου.

Εφόσον η αναστολή της AChE προκαλεί το θάνατο, μη αναστρέψιμοι αναστολείς έχουν αναπτυχθεί ως εντομοκτόνα: τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμίδια<sup>49</sup>. Η δομή των ουσιών αυτών είναι ανάλογη με το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου, την ακετυλοχολίνη. Το εντομοκτόνο, όπως το φυσικό υπόστρωμα, εισέρχεται στο ενεργό κέντρο, το οποίο φέρει μια σερίνη στη βάση του. Το εντομοκτόνο διασπάται και το ένζυμο φωσφορυλιώνεται ή καρβαμιώνεται. Η διαφορά στη συμπεριφορά των υποστρωμάτων αυτών εντοπίζεται στο επόμενο βήμα, όπου ενώ το ένζυμο υδρολύεται γρήγορα για να ξαναγίνει ελεύθερο, η αποφωσφορυλίωση και η αποκαρβαμίσωση γίνονται πολύ αργά. Γι' αυτό τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμίδια είναι ημι-υποστρώματα. Εντούτοις, καθώς το φωσφορυλιωμένο/καρβαμιωμένο ένζυμο δεν μπορεί να υδρολύσει το νευροδιαβιβαστή, η μετα-συναπτική μεμβράνη παραμένει μη πολωμένη και η συναπτική μετάδοση δεν λειτουργεί. Για το λόγο αυτό τα οργανοφωσφορικά θεωρούνται μη αναστρέψιμοι αναστολείς<sup>50</sup>.

Τα εντομοκτόνα αυτά, επομένως, οδηγούν το έντομο στο θάνατο. Η εντατική χρήση τους όμως για περισσότερο από 30 χρόνια είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πολλών ανθεκτικών ειδών που φέρουν AChEs, οι οποίες είναι λιγότερο ευαίσθητες σε αυτά<sup>51</sup>. Στη δροσόφιλα μόνο ένα γονίδιο κωδικοποιεί την AChE, *ace*<sup>52</sup>, και ποικίλες μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στα ανθεκτικά στελέχη (Phe115Ser, Ileu199Val, Ileu199Thr, Gly303Ala, Phe368Tyr). Δυο από αυτά τα κατάλοιπα (Gly262Val, Phe327Tyr) είναι επίσης μεταλλαγμένα στην ανθεκτική *Musca domestica*<sup>53</sup> και ένα (Ileu214Val) στον ανθεκτικό στα οργανοφωσφορικά δάκο, *Bactrocera oleae*<sup>9</sup>. Η παρουσία

των μεταλλάξεων αυτών σε διαφορετικά έντομα υποστηρίζει τη μεγάλη σημασία που έχουν στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας. Επιπλέον, οι κοινές αυτές μεταλλάξεις είναι υψηλά διατηρημένες και ευθύνονται για την ανθεκτικότητα μιας μεγάλης ποικιλίας εντόμων σε διαφορετικά εντομοκτόνα. Στη *Musca domestica* έχουν παρατηρηθεί τρεις επιπλέον μεταλλάξεις (Val180Leu, Gly262Ala, Gly365Ala) που οδηγούν σε ανθεκτικά είδη<sup>53</sup>. Μια νέα μετάλλαξη (Gly488Ser) στο δάκο προσδίδει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά<sup>9</sup>. Ξεχωριστά η κάθε μια μετάλλαξη προσδίδει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή. Συνδυασμοί, όμως, μεταλλάξεων προσδίδουν έντονη ανθεκτικότητα. Αυτές οι μεταλλάξεις εμποδίζουν την πρόσβαση των εντομοκτόνων στο ενεργό κέντρο, στη βάση του οποίου βρίσκονται τα καταλυτικά κατάλοιπα<sup>13</sup>. Στα κουνούπια, από την άλλη, δυο διαφορετικά γονίδια *ace-1* και *ace-2* κωδικοποιούν δυο διαφορετικές ακετυλοχολινεστεράσες. Στα ανθεκτικά κουνούπια *An. gambiae* και *Culex pipiens* βρέθηκε αντικατάσταση της γλυκίνης στη θέση 119 με μια σερίνη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου<sup>27</sup>.

## Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ανθεκτικότητα του δάκου στα εντομοκτόνα αποτελεί μεγάλο πρόβλημα σε πολλές περιοχές του κόσμου. Υπάρχει, επομένως, μεγάλη ανάγκη για την απόκτηση γνώσεων γύρω από τους μηχανισμούς που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Κάποιες πληροφορίες έχουν δημοσιευτεί για ορισμένα έντομα, όμως όσο αφορά το δάκο οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Στη συγκεκριμένη εργασία επιχειρήθηκε η απομόνωση του γονιδίου της GST από τη γενωμική βιβλιοθήκη του δάκου, *Bactrocera oleae*, με χρήση συγγενικού (ετερόλογου) εκκινητή, με σκοπό την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού ανθεκτικότητας που εξαρτάται από τη S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Γνωρίζοντας τις επιπτώσεις της ανθεκτικότητας του δάκου στην ελαιοκαλλιέργεια αλλά και λόγω των λιγοστών γνώσεων που διαθέτουμε για τη δράση των GSTs, οι πληροφορίες που θα αποκομίσουμε θα είναι πολύ σημαντικές.

# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## 2.1 Γενωμική βιβλιοθήκη

Η γενωμική βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε ήταν ευγενική προσφορά του εργαστηρίου της κυρίας Κομιτοπούλου από το Εργαστήριο Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο φορέας της βιβλιοθήκης είναι ο φάγος λDASH II (Stratagene) και τα ενθέματα βρίσκονται στη θέση EcoRI του πολυσυνδέτη του.

## 2.2 Ανάπτυξη βακτηριακού στελέχους

Ξενιστής του φάγου λDASH είναι το βακτηριακό στέλεχος XL1-Blue MRA, με γενότυπο:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac$ <sup>55</sup>.

### Υλικά

Stock γλυκερόλης XL1-Blue MRA

Θρεπτικό μέσο LB

Διάλυμα 20% μαλτόζη

Διάλυμα MgSO<sub>4</sub> 10mM

### Πορεία

1. Σε κωνική φιάλη που περιέχει 5ml θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 50μl MgSO<sub>4</sub> 1mM και 50μl μαλτόζη 20% ενοφθαλμίζεται ποσότητα κυττάρων XL1-Blue MRA από stock γλυκερόλης αποθηκευμένο στους - 80°C. Η μαλτόζη προάγει την έκφραση των υποδοχέων λ φάγων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων ξενιστών τους.
2. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C για 6 ώρες.
3. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 1.000g για 10 λεπτά.
4. Το ίζημα αναδιαλύεται ήπια σε 1ml διαλύματος 10mM MgSO<sub>4</sub>. 200μl του παραπάνω εναιωρήματος αραιώνονται με κατάλληλο όγκο διαλύματος 10mM MgSO<sub>4</sub>, έτσι ώστε να έχει οπτική απορρόφηση (OD) περίπου 0.5 σε μήκος κύματος 600nm. Το μαγνήσιο βοηθά στη

προσκόλληση των φάγων στα κύτταρα. Τα κύτταρα διατηρούνται στους  $-4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Επίστρωση μολυσμένων κυττάρων MRA με φάγους

Κάθε πλάκα που δημιουργείται προέρχεται από μόλυνση ενός μόνο βακτηρίου από ένα ιικό σωματίδιο. Τα σωματίδια που προκύπτουν μολύνουν τα γειτονικά βακτήρια, τα οποία με τη σειρά τους απελευθερώνουν νέες γενεές ιικών σωματιδίων. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το αποτέλεσμα διαδοχικών μολύνσεων είναι μια λυτική ζώνη, που γίνεται ορατή ως μια διαφανή περιοχή. Επειδή κάθε πλάκα αποτελείται από απογόνους ενός βακτηριοφάγου, είναι πιθανό να συλλέγονται πληθυσμοί βακτηριοφάγων που ουσιαστικά είναι γενετικά πανομοιότυποι ο ένας με τον άλλο<sup>55</sup>.

#### Υλικά

Γενωμική βιβλιοθήκη

Κύτταρα XL1-Blue MRF'

NZY top agar

Τρυβλία NZY άγαρ

Ρυθμιστικό διάλυμα SM

#### Πορεία

1. Παρασκευάζονται διάφορες αραιώσεις της βιβλιοθήκης προσθέτοντας 2μl από την αρχική βιβλιοθήκη σε 98μl ρυθμιστικού διαλύματος SM ( $10^{-2}$ ) και κατόπιν 2μl από την αραιώση αυτή σε 98μl SM buffer ( $10^{-4}$ ).
2. Σε σωληνάκια τύπου erpendorf αναμειγνύονται 1μl από κάθε αραιώση με 200μl εναιωρήματος XL1-Blue MRF' ( $\text{OD}_{600}=0.5$ ).
3. Επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά.
4. Το μείγμα από κάθε σωληνάκι προστίθεται σε 3ml NZY top agar ( $\sim 50^{\circ}\text{C}$ ) και επιχύνεται γρήγορα σε προθερμασμένα τρυβλία NZY άγαρ.

5. Τα τρυβλία, αφού στερεοποιηθούν, επωάζονται στους 37°C για 12 ώρες. Η λύση των βακτηριακών κυττάρων από τους φάγους έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαυγών πλακών στο τρυβλίο.

#### **2.4 Μεταφορά των πλακών των βακτηριοφάγων σε νάιλον μεμβράνες και υβριδοποίηση**

Με τη μέθοδο αυτή τμήματα DNA μεταφέρονται από το πήκτωμα σε νάιλον μεμβράνη μέσω ροής σε διαλύματα. Αυτή η τριχοειδική κίνηση διατηρείται με τη χρήση ενός σωρού απορροφητικών χαρτιών. Ο ρυθμός μεταφοράς των τμημάτων DNA εξαρτάται από το μέγεθος τους και τη συγκέντρωση του πηκτώματος<sup>55</sup>.

#### **Υλικά**

Νάιλον μεμβράνες Schleicher&Schuell

Διάλυμα αποδιάταξης (1,5M NaCl, 0,5M NaOH)

Διάλυμα εξουδετέρωσης (1M Tris, pH 7,4 , 1,5M NaCl)

Διάλυμα 2X SSC Διάλυμα 0,2M Tris-HCl, pH 7,5

Διάλυμα υβριδοποίησης (5X Denhards, 0,5% SDS, 6X SSC)

Salmon sperm DNA

Σημασμένος ανιχνευτής

Διάλυμα πλύσης 1 (2X SSC, 0,1% SDS)

Διάλυμα πλύσης 2 (0,2X SSC, 0,1% SDS)

Streptavidin-Alkaline Phosphatase

Διάλυμα C (100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5)

Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)

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

Χαρτί Whatman

## Πορεία

1. Τα τρυβλία στα οποία υπάρχουν οι αποικίες τοποθετούνται για περίπου 2 ώρες στους 4<sup>0</sup>C με σκοπό να μη κολλήσει η μεμβράνη στο top agar.
2. Χρησιμοποιώντας λαβίδες με πεπλατυσμένα άκρα, η μεμβράνη τοποθετείται στην επιφάνεια του τρυβλίου έτσι ώστε να διαβραχεί από το κέντρο προς την επιφάνεια χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες μεταξύ του θρεπτικού μέσου και της μεμβράνης. Μετά από 2 λεπτά και αφού έχουν μεταφερθεί τα φαγοσωματίδια στη μεμβράνη, δημιουργούνται οπές με τη χρήση βελόνας για τον εύκολο προσανατολισμό της μεμβράνης μετά την απομάκρυνσή της από το τρυβλίο.
3. Η μεμβράνη ξεπλένεται με ανάδευση με διάλυμα αποδιάταξης δύο φορές από 2 λεπτά.
4. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται με ανάδευση με διάλυμα εξουδετέρωσης δύο φορές από 2,5 λεπτά.
5. Ακολουθεί ξέπλυμα με διάλυμα 0,2M Tris-HCl και 2X SSC για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα και έπειτα η μεμβράνη αφήνεται σε χαρτί Whatman μέχρι να στεγνώσει τελείως.
6. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε σωλήνα υβριδοποίησης και προστίθεται διάλυμα υβριδοποίησης και ssDNA, το οποίο έχει προηγουμένως βραστεί ώστε να γίνει μονόκλωνο. Προστίθεται 0,2ml διαλύματος υβριδοποίησης για κάθε cm<sup>2</sup> και 10μg/μl. Στο βήμα αυτό το ssDNA συνδέεται μη ειδικά εμποδίζοντας έτσι τη σύνδεση του ανιχνευτή σε μη ομόλογες αλληλουχίες.
7. Επώαση για 1-2 ώρες στους 60<sup>0</sup>C για ομόλογο υβριδισμό ή στους 52<sup>0</sup>C για ετερόλογο υβριδισμό.
8. Στο στάδιο της υβριδοποίησης ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95-100<sup>0</sup>C (όταν πρόκειται για δίκλωνο ανιχνευτή) για 10 λεπτά.
9. Ακολούθως κάποια ποσότητα του διαλύματος υβριδοποίησης αφαιρείται έτσι ώστε να παραμείνουν περίπου 2,5 ml διαλύματος για κάθε 100cm<sup>2</sup> μεμβράνης.

10. Επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες.
11. Η μεμβράνη ξεπλένεται δυο φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα πλύσης 1. Το διάλυμα αυτό απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος του ανιχνευτή που είναι ασθενώς συνδεδεμένο στη μεμβράνη.
12. Ακολουθούν δύο ακόμη ξεπλύματα για 15 λεπτά το καθένα σε διάλυμα πλύσης 2 στους 60<sup>0</sup>C ή 52<sup>0</sup>C. Το διάλυμα αυτό απομακρύνει τον ανιχνευτή που είναι ισχυρότερα αλλά μη ειδικά συνδεδεμένος σε διάφορα σημεία στη μεμβράνη.
13. Για την εμφάνιση σήματος προστίθεται διάλυμα C με NBT και BCIP (για κάθε 10ml διαλύματος C 50μl NBT και 37,5μl BCIP). Η εμφάνιση σήματος μπορεί να γίνει σε λίγα λεπτά ή και περισσότερο από μια ώρα όταν είτε το DNA είτε ο ανιχνευτής είναι σε πολύ μικρή ποσότητα. Η εμφάνιση μπορεί να σταματήσει με πολλαπλά πλυσίματα με απιονισμένο νερό. Το BCIP χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση. Το NBT δρα ως δέκτης ηλεκτρονίων από το BCIP για το σχηματισμό μιας αδιάλυτης ερυθροκυανής χρώσης.

## 2.5 Έκλουση σωματιδίων των φάγων

### Υλικά

Ρυθμιστικό διάλυμα SM.

### Πορεία

1. Με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Pasteur εκτέμνονται από τα τρυβλία διάφορες πλάκες φάγων που έχουν δώσει θετικό σήμα και μεταφέρονται σε σωληνάκια errendorf. Κάθε πλάκα περιέχει και ένα κλωνοποιημένο τμήμα της βιβλιοθήκης.
2. Προστίθεται 200μl ρυθμιστικού διαλύματος SM.

3. Τα δείγματα είτε διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες είτε στους 4°C για 12 ώρες, ώστε να διαχυθούν τα σωματίδια του φάγου.

## 2.6 Απομόνωση φαγικού DNA

### Υλικά

Κύτταρα δεκτικά σε φάγους	Στερεό NaCl
Θρεπτικό μέσο LB	PEG 8.000 10% w/v
Διάλυμα MgSO <sub>4</sub> 1mM	
Ρυθμιστικό διαλύμα SM	
Χλωροφόρμιο	
Διάλυμα 20mM EDTA	
RNAase (1μg/ml)	
Πρωτεΐνάση K 50μg/ml	
DNAase I (1μg/ml)	
SDS 0,5%	

### Πορεία

1. Τα δεκτικά κύτταρα επωάζονται με τα εκλουόμενα φαγοσωματίδια για 20 λεπτά στους 37°C με ανάδευση με αποτέλεσμα την εισαγωγή των φάγων στα κύτταρα.
2. Η καλλιέργεια ενοφθαλμίζεται σε 25ml θρεπτικού μέσου με 250μl MgSO<sub>4</sub> και επωάζονται για περίπου 7 ώρες στους 37°C με αποτέλεσμα τη λύση τους.
3. Προστίθενται 125μl χλωροφόρμιο, το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 8.000g και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο καθώς το ίζημα περιέχει τα κυτταρικά υπολείμματα.
4. Στο υπερκείμενο προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες RNAase και DNAase I και επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C. Στο βήμα αυτό καταστρέφεται το DNA ή RNA που προέρχεται από τα κύτταρα.

5. Ακολουθεί προσθήκη στερεού NaCl σε συγκέντρωση 1M και επώαση στον πάγο για 1 ώρα.
6. Τα οποιαδήποτε κυτταρικά υπολείμματα που έχουν απομείνει απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 11.000g για 10 λεπτά στους 4°C.
7. Στο υπερκείμενο προστίθεται PEG 8.000 10% w/v και επωάζεται για στον πάγο για 1 ώρα.
8. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στα 11.000g για 10 λεπτά στους 4°C και το ίζημα αναδιαλύεται σε 1ml διάλυμα SM και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Ακολούθως προστίθεται 1ml χλωροφόρμιο (1 διάλυμα SM/1 χλωροφόρμιο) και η ανάμειξη διευκολύνεται με vortex.
10. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 3.000g για 15 λεπτά στους 4°C και στο υπερκείμενο προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες διαλύματος 20mM EDTA, πρωτεΐνάσης K 50μg/ml και διαλύματος SDS 0,5%
11. Επώαση στους 56°C για 1 ώρα.

## 2.7 Εκχύλιση DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Πρόκειται για μια συνηθισμένη μέθοδος απομάκρυνσης πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊικών οξέων. Η φαινόλη έχει την ικανότητα να αποδιατάσει τις πρωτεΐνες, ενώ η χρήση του χλωροφόρμιου γίνεται για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης που τυχόν έχουν απομείνει στο διάλυμα<sup>55</sup>.

### Πορεία

1. Στο διάλυμα του DNA προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφόρμιο (1/1) και ακολουθεί έντονη ανακίνηση έως ότου σχηματιστεί ομοιογενές γαλάκτωμα.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13.200rpm για 5 λεπτά, που οδηγεί στο διαχωρισμό των δυο φάσεων.
3. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου.

4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13.200rpm για 5 λεπτά, που οδηγεί στο διαχωρισμό των δυο φάσεων.
5. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με χλωροφόρμιο.
6. Το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

## 2.8 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη αποτελεί την πιο ευρεία μέθοδο συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων. Το νουκλεϊκό οξύ επανακτάται με φυγοκέντρηση ως ίζημα, το οποίο σχηματίζεται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων, και επαναδιαλύεται σε επιθυμητό όγκο κατάλληλου διαλύματος<sup>55</sup>.

### Υλικά

Διάλυμα 2,31M CH<sub>3</sub>COONa

Διάλυμα TE (10mM Tris-HCl pH 8,0 και 1mM EDTA)

Γλυκογόνο 20 mg/ml

Αιθανόλη 100% και 70%

### Πορεία

1. Στο διάλυμα DNA προστίθεται διάλυμα CH<sub>3</sub>COONa τελικής συγκέντρωσης 0,3M, 2-2,5 όγκοι του αρχικού διαλύματος παγωμένη αιθανόλη 100% και 0,5ml γλυκογόνο, το οποίο διευκολύνει την κατακρήμνιση.
2. Ακολουθεί ανάδευση και τοποθέτηση στους -80°C για 15 λεπτά.
3. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 13.200rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά.
4. Προστίθεται 0,5-0,6 όγκος του αρχικού διαλύματος παγωμένη αιθανόλη 70% και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13.200rpm για 5 λεπτά.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα ξηραίνεται.
6. Το ίζημα διαλύεται σε TE ή σε απιονισμένο νερό.



## 2.9 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που βρίσκονται σε διάφορα είδη βακτηρίων με κύριο ρόλο την αποικοδόμηση ξένου DNA αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούνται ως εργαλεία στη γενετική μηχανική και διακρίνονται ανάλογα με την αλληλουχία που αναγνωρίζουν και τα άκρα που δημιουργούν (τυφλά ή προεξέχοντα). Το ποσό του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από την ενεργότητα του και την ποσότητα του προς πέψη DNA. Ως μονάδα ενζύμου (unit) ορίζεται το ποσό του ενζύμου (σε αντίδραση 20μl) που απαιτείται για να πέψει 1 μg DNA (40kb) σε μια ώρα στην απαιτούμενη θερμοκρασία<sup>55</sup>.

### Υλικά

Ένζυμο

Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου

H<sub>2</sub>O

### Πορεία

1. Σε σωληνάκι errendorf προστίθονται με την ακόλουθη σειρά τα παρακάτω:  
X<sub>1</sub> μl DNA  
X<sub>2</sub> μl H<sub>2</sub>O  
X<sub>3</sub> μl Buffer ενζύμου (V<sub>τελ</sub>/10)  
X<sub>4</sub> μl Ένζυμο
2. Το διάλυμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται στους 37<sup>0</sup>C για 1-2 ώρες.
3. Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται με επώαση στους 65<sup>0</sup>C για 20 λεπτά.

## 2.10 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό, τον εικονισμό και την απομόνωση του DNA. Υπό την επίδραση

ηλεκτρικού πεδίου, το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και κινείται προς την άνοδο με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου ( $\log_{10}$ ) του μοριακού του βάρους. Η κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιείται πήκτωμα συγκέντρωσης 1% για το διαχωρισμό μορίων DNA μήκους 0,4-7kb<sup>55</sup>. Η οπτικοποίηση του DNA γίνεται με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου<sup>56</sup>. Η ουσία αυτή εισχωρεί ανάμεσα στις στοιβαγμένες βάσεις του DNA. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μονόκλωνο και για δίκλωνο νουκλεϊκό οξύ (DNA και RNA)

## Υλικά

Αγαρόζη

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0,5X TBE

Βρωμιούχο αιθίδιο

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% xylene cyanoι FF, 30% γλυκερόλη)

Μάρτυρας (DNA ladder)

## Πορεία

1. Σε 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης προστίθεται 1gr αγαρόζης και διαλύεται με θέρμανση στους 100°C. Το διάλυμα ζυγίζεται πριν και μετά τη θέρμανση και οποιαδήποτε απώλεια βάρους συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό, καθώς αυτό είναι που εξατμίζεται.
2. Μόλις η θερμοκρασία του διαλύματος έχει κατέβει στους 55°C προσθέτουμε 2ml βρωμιούχο αιθίδιο
3. Το διάλυμα στερεοποιείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, στην οποία έχουν τοποθετηθεί χτενάκια, σε θερμοκρασία δωματίου σε περίπου 20 λεπτά.
4. Τα χτενάκια απομακρύνονται όταν μορφοποιηθεί το διάλυμα και το καλούπι-εκμαγείο τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η

οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα TBE 0.5X τόσο ώστε να επικαλύπτει το gel.

5. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων (1μl ανά 6μl δείγματος). Το συγκεκριμένο διάλυμα προσθέτει χρώμα στο δείγμα και αυξάνει την πυκνότητά του λόγω της γλυκερόλης, ώστε να φορτωθεί ευκολότερα στο πηγαδάκι. Το διάλυμα είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA.
6. Τα δείγματα και ο μάρτυρας φορτώνονται στα πηγαδάκια και ηλεκτροφορούνται σε σταθερή τάση 100V για 20 περίπου λεπτά. Ο μάρτυρας μας διευκολύνει στον υπολογισμό της ποσότητας και του μεγέθους των διάφορων ζωνών.
7. Η εμφάνιση των μπαντών του DNA πραγματοποιείται με την έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία. Η UV ακτινοβολία, η οποία απορροφάται είτε από το DNA στα 260nm και μεταβιβάζεται στο βρωμιούχο αιθίδιο είτε από την ίδια τη χρωστική στα 300nm και 360nm, εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα να είναι ορατά τα διάφορα τμήματα του DNA ως ζώνες.

## **2.11 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται όταν δεν υπάρχει αρκετή ποσότητα DNA ή όταν το DNA είναι μολυσμένο με άλλα μακρομόρια που απορροφούν στο υπεριώδες. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στο φθορισμό που εκπέμπεται από τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στο DNA σε ποσότητα ανάλογη με τη συγκέντρωση του DNA, οπότε από το φθορισμό που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA μπορεί να εκτιμηθεί η ποσότητα του DNA, σε σύγκριση με το φθορισμό μιας γνωστής ποσότητας DNA. Έτσι ακόμη και 10ng DNA μπορούν να ανιχνευθούν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιέχει 0,5gr βρωμιούχο αιθίδιο/ml διαλύματος.

## 2.12 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για την απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται το kit Real Genomics™

### Υλικά

DF buffer

Wash buffer

ddH<sub>2</sub>O

### Πορεία

1. Το τμήμα του πηκτώματος που περιέχει την μπάντα που μας ενδιαφέρει δεν πρέπει να ξεπερνά τα 300ng.
2. Στο τμήμα του πηκτώματος προστίθενται 500μl DF buffer και γίνεται ανάμειξη με vortex.
3. Επώαση στους 55<sup>0</sup>C για 5-10 λεπτά έως ότου διαλυθεί το πήκτωμα.
4. Μια κολωνίτσα τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής, προστίθενται 800 μl του διαλύματος και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000rpm για 30 λεπτά.
5. Το διάλυμα που εκλούεται από την κολωνίτσα αποχύνεται, προστίθενται 500μl Wash buffer στην κολωνίτσα τοποθετημένη σε νέο σωλήνα συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000rpm για 30 λεπτά.
6. Το διάλυμα που εκλούεται από την κολωνίτσα αποχύνεται και η κολωνίτσα τοποθετημένη σε νέο σωλήνα συλλογής φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 13.200rpm.
7. Η κολωνίτσα τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf, προστίθενται 15μl ddH<sub>2</sub>O και μετά από 2 λεπτά φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 13.200rpm.
8. Προστίθενται άλλα 15μl ddH<sub>2</sub>O και μετά από 2 λεπτά ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.200rpm.

- Η απόδοση του kit εκτιμάται με ηλεκτροφόρηση και ποσοτικοποίηση μιας ποσότητας του διαλύματος που προκύπτει.

### 2.13 Υβριδοποίηση κατά Southern

Πρόκειται για μια από τις κλασικότερες μεθόδους μοριακής βιολογίας στην οποία ανιχνεύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες στο γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία περιλαμβάνει τις εξής φάσεις:

- I. Μεταφορά του DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε νάilon μεμβράνη και σταθεροποίησή του.
- II. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή.
- III. Ανίχνευση σήματος.

#### Υλικά

##### I. Διάλυμα 0,2N HCl

Διάλυμα αποδιάταξης (1,5M NaCl, 0,5M NaOH)

Διάλυμα εξουδετέρωσης (1M Tris, pH 7,4 , 1,5M NaCl)

Διάλυμα 6X SSC

Νάilon μεμβράνη Schleicher&Schuell

Χαρτί Whatman

##### II. Διάλυμα υβριδοποίησης (5X Denhards, 0,5% SDS, 6X SSC)

Salmon sperm DNA

Σημασμένος ανιχνευτής

##### III. Διάλυμα πλύσης 1 (2X SSC, 0,1% SDS)

Διάλυμα πλύσης 2 (0,2X SSC, 0,1% SDS)

Διάλυμα A (100mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5)

Διάλυμα B (Διάλυμα A, 1% Blocking solution)

Blocking solution 10% (10gr αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη σε 100ml διαλύματος A).

Streptavidin-Alkaline Phosphatase

Διάλυμα C (100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5)

Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)

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

## Πορεία

I. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίησή του από το πήκτωμα στη μεμβράνη.

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα αγαρόζης το DNA υδρολύεται με μεταφορά του πηκτώματος σε 0,2N για περίπου 5 λεπτά. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται όταν έχουμε κομμάτια μεγαλύτερα των 15kb με σκοπό την τμηματοποίησή τους καθώς είναι δύσκολο να μεταφερθούν.
2. Το πήκτωμα ξεπλένεται με ανάδευση με διάλυμα αποδιάταξης δύο φορές από 15 λεπτά.
3. Στη συνέχεια το πήκτωμα ξεπλένεται με ανάδευση με διάλυμα εξουδετέρωσης δύο φορές από 20 λεπτά.
4. Ακολουθεί ξέπλυμα με 6X SSC για 2-5 λεπτά.
5. Το πήκτωμα τοποθετείται σε επίπεδη επιφάνεια ανάποδα.
6. Η μεμβράνη, αφού έχει διαβρεχτεί με ddH<sub>2</sub>O και 6X SSC, τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα.
7. Σύμφωνα με τις διαστάσεις της μεμβράνης κόβονται 4 χαρτιά Whatman, από τα οποία τα δυο διαβρέχονται με 6X SSC και τοποθετούνται πρώτα πάνω στη μεμβράνη και μετά τα άλλα δυο.
8. Από πάνω τοποθετούνται απορροφητικά χαρτιά ύψους 2cm στο μέγεθος του πηκτώματος. Στην κορυφή του όλου συστήματος τοποθετείται κάποιο βάρος (500g).
9. Μετά από 18 ώρες και αφού έχει ολοκληρωθεί η μεταφορά του DNA στη μεμβράνη, αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και σημαδεύεται ο προσανατολισμός της μεμβράνης.

II. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή

1. Στο στάδιο της προϋβριδοποίησης η μεμβράνη τοποθετείται σε σωλήνα υβριδοποίησης και προστίθεται διάλυμα υβριδοποίησης και ssDNA, το οποίο έχει προηγουμένως βραστεί ώστε να γίνει

μονόκλωνο. Προστίθεται 0,2ml διαλύματος υβριδοποίησης για κάθε  $\text{cm}^2$  και 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Στο βήμα αυτό το ssDNA συνδέεται μη ειδικά εμποδίζοντας έτσι τη σύνδεση του ανιχνευτή σε μη ομόλογες αλληλουχίες.

2. Ακολουθεί επώαση για 1-2 ώρες στους 60 $^{\circ}\text{C}$  για ομόλογο υβριδισμό ή στους 52 $^{\circ}\text{C}$  για ετερόλογο υβριδισμό.
3. Στο στάδιο της υβριδοποίησης ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95-100 $^{\circ}\text{C}$  (όταν πρόκειται για δίκλωνο ανιχνευτή) για 10 λεπτά.
4. Στη συνέχεια κάποια ποσότητα του διαλύματος υβριδοποίησης αφαιρείται έτσι ώστε να παραμείνουν περίπου 2,5 ml διαλύματος για κάθε 100 $\text{cm}^2$  μεμβράνης.
5. Ακολουθεί επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες.

### III. Ανίχνευση σήματος.

1. Το διάλυμα υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή συλλέγεται σε καθαρό σωλήνα και μπορεί να φυλαχτεί στους -20 $^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια να επαναχρησιμοποιηθεί αφού πρώτα αποδιαταχθεί.
2. Η μεμβράνη ξεπλένεται δυο φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα πλύσης 1. Το διάλυμα αυτό απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος του ανιχνευτή που είναι ασθενώς συνδεδεμένο στη μεμβράνη.
3. Ακολουθούν δύο ακόμη ξεπλύματα για 15 λεπτά το καθένα σε διάλυμα πλύσης 2 στους 60 $^{\circ}\text{C}$  ή 52 $^{\circ}\text{C}$ . Το διάλυμα αυτό απομακρύνει τον ανιχνευτή που είναι ισχυρότερα αλλά μη ειδικά συνδεδεμένος σε διάφορα σημεία στη μεμβράνη.
4. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A για 1 λεπτό.
5. Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα B για 30 λεπτά.
6. Ακολουθεί προσθήκη του ίδιου διαλύματος το οποίο όμως περιέχει 5 $\mu\text{l}$  του συμπλόκου Streptavidin-Alkaline Phosphatase ανά 10ml και επώαση για 30 λεπτά.
7. Η μεμβράνη μετά ξεπλένεται με διάλυμα A για 15 λεπτά δυο φορές.

8. Εξισορρόπηση σε διάλυμα C για 2 λεπτά.
9. Για την εμφάνιση σήματος προστίθεται διάλυμα C με NBT και BCIP (για κάθε 10ml διαλύματος C 50μl NBT και 37,5μl BCIP). Η εμφάνιση σήματος μπορεί να γίνει σε λίγα λεπτά ή και περισσότερο από μια ώρα όταν είτε το DNA είτε ο ανιχνευτής είναι σε πολύ μικρή ποσότητα. Η εμφάνιση μπορεί να σταματήσει με πολλαπλά πλυσίματα με απιονισμένο νερό. Το BCIP χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση. Το NBT δρα ως δέκτης ηλεκτρονίων από το BCIP για το σχηματισμό μιας αδιάλυτης ερυθροκυανής χρώσης.

#### **2.14 Αποχρωματισμός μεμβράνης**

Η μεμβράνη αποχρωματίζεται με ξέπλυμα για 5-10 λεπτά σε N,N-Dimethylformamide στους 50°C.

#### **2.15 Απομάκρυνση του ανιχνευτή από τη μεμβράνη**

Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα 0,1X SSC/0,5 SDS, αφού αυτό έχει βραστεί, για 15 λεπτά με ανάδευση.

#### **2.16 Σήμανση ανιχνευτή**

Στη σήμανση τυχαίας εκκίνησης, αποδιαταγμένο DNA αναμιγνύεται στους 37°C με τυχαία νουκλεοτιδικά εξαμερή, την Klenow υπομονάδα της DNA πολυμεράσης και σημασμένα νουκλεοτίδια (δεοξυνουκλεοτίδια ή ριβονουκλεοτίδια), παρουσία αλάτων και ρυθμιστικού διαλύματος που ευνοούν τη λειτουργία της πολυμεράσης. Στις συνθήκες αυτές, τα εξαμερή λειτουργούν ως εκκινητές για την DNA πολυμεράση η οποία δημιουργεί νέες αλυσίδες πάνω στο εκμαγείο του αποδιαταγμένου DNA ενσωματώνοντας τα διαθέσιμα νουκλεοτίδια. Στην αντίδραση σήμανσης έχει χρησιμοποιηθεί το bio-ATP στη θέση του ATP. Έτσι, οι νέες αλυσίδες που δημιουργούνται φέρουν ένα μόριο βιοτίνης επικολλημένο στα μόρια της ATP που έχουν ενσωματωθεί. Η ανίχνευση σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στη βιοτίνη και τη στρεπταβιδίνη.



## Υλικά

DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα (Hexa 5X buffer)

ddH<sub>2</sub>O Νουκλεοτίδια (NTPs)

Σημασμένο νουκλεοτίδιο (bio-ATP)

DNA πολυμεράση (Klenow polymerase)

## Πορεία

1. Προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες DNA εκμαγείου, ρυθμιστικού διαλύματος και H<sub>2</sub>O και το μίγμα βράζεται για 10 λεπτά στους 100°C, με σκοπό την αποδιάταξη του DNA.
2. Το μίγμα τοποθετείται στον πάγο και προστίθενται το ένζυμο, τα νουκλεοτίδια και το σημασμένο νουκλεοτίδιο.
3. Επώαση στους 37°C για περίπου 15 ώρες για να δράσει το ένζυμο και να δημιουργηθούν οι νέες σημασμένες αλυσίδες. Ο σημασμένος ανιχνευτής μπορεί να διατηρηθεί στους -20°C.

### 2.17 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μία ενζυμική μέθοδος σύνθεσης και πολλαπλασιασμού του DNA που μπορεί να ενισχύσει μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA. Η αντίδραση PCR γίνεται *in vitro* παράγοντας ένα τμήμα DNA με τη δράση μιας ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης και το οποίο ορίζεται από ένα ζεύγος εκκινητών (primers) για το 5' και το 3' άκρο. Οι DNA πολυμεράσες απομονώνονται από θερμόφιλα βακτήρια, όπως το είδος *Thermus aquaticus* (Taq), ή από Αρχαιοβακτήρια που επιβιώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες (90°C). Η αντίδραση απαιτεί επιπλέον διάλυμα ελευθέρων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζινουκλεοτιδίων (dNTPs) για την επέκταση των νεοσχηματιζόμενων αλυσίδων καθώς και διάλυμα ιόντων Mg<sup>+2</sup>, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης<sup>57</sup>.

## Υλικά

DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10X

Διάλυμα  $MgCl_2$  (25Mm)

dNTPs (2.5mM το καθένα)

Εκκινητής εμπρόσθιος

Εκκινητής ανάστροφος

Taq πολυμεράση 5u/μl

dd H<sub>2</sub>O

## Πορεία

1. Το δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβοζινουκλεοτίδια, τα δύο ολιγονουκλεοτίδια (primers) και την DNA πολυμεράση.
2. Ακολουθεί θερμομανση στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation).
3. Το δείγμα ψύχεται στους 55-65°C (ανάλογα με την αλληλουχία των εκκινητών) για την υβριδοποίηση των εκκινητων στις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA (annealing). Η πρόσδεση των εκκινητών γίνεται σε θερμοκρασία περίπου 5°C πιο χαμηλά από τις θερμοκρασίες τήξης ( $T_m$ ) των ολιγονουκλεοτιδίων.
4. Στη συνέχεια σε θερμοκρασία 72°C δρα η DNA πολυμεράση ώστε να σχηματιστεί η συμπληρωματική αλυσίδα ως προς την αλυσίδα μήτρα.
5. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για αρκετούς κύκλους έως ότου συντεθούν πολλά αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου. Η αντίδραση είναι εκθετική, έτσι από ένα μόριο DNA μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης προκύπτουν  $2^{30}$  (περίπου  $10^9$ ) μόρια DNA.

## Πρόγραμμα PCR

Αρχική αποδιάταξη	:	94°C	για 4-5min	1 κύκλος
Αποδιάταξη DNA	:	94°C	για 30sec-1min	} 30-35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	:	47-51°C	για 30sec-1min	
Επιμήκυνση αλυσίδων	:	72°C	για 30sec-1min	
Τελική επιμήκυνση	:	72°C	για 6min	1 κύκλος

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται αν ο υβριδισμός είναι ομόλογος, οπότε και είναι υψηλή, ή αν είναι ετερόλογος, οπότε και είναι χαμηλή.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό ανακυκλωτή Thermo Electron Corporation.

Τα δείγματα διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν βάσει μιας συντηρημένης αλληλουχίας του γονιδίου της GST της *Drosophila melanogaster* 450 bp. Οι αλληλουχίες τους παρουσιάζονται παρακάτω:

Primer 1 (Forward)

5'-AACAAAGAAGCTGCTCAACC-3'

Primer 2 (Reverse)

5'-GCGTACTTGCTGATCTCG-3'

### 2.18 *In vitro* μεταγραφή

Χρησιμοποιώντας τμήμα DNA ως εκμαγείο, σημασμένα νουκλεοτίδια και το ένζυμο της RNA πολυμεράσης (T3 ή T7 RNA πολυμεράση) συντίθενται σημασμένα συμπληρωματικά κομμάτια RNA.

## Πορεία

1. Σε σωληνάκι errendorf προστίθενται τα ακόλουθα:

DNA	Buffer
H <sub>2</sub> O	RNAase inhibitor
DTT	T3 ή T7 RNA πολυμεράση
NTPs	

2. Επώαση στους 37°C για 2 ώρες.

### 2.19 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA

Ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κατασκευάζεται με τη σύνδεση των ελεύθερων άκρων (τυφλών ή συμπληρωματικών) ενός γραμμικού πλασμιδίου και του DNA στόχου με τη δράση μιας DNA λιγάσης. Η σύνδεση περιλαμβάνει το σχηματισμό *in vitro* φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των φωσφορικών ομάδων στα 5' άκρα και των υδροξυλομάδων στα 3' άκρα. Η λιγάση που χρησιμοποιείται είναι η T4 DNA λιγάση<sup>55</sup>.

Σε μια αντίδραση σύνδεσης η αναλογία του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε σε σχέση με τα μόρια του φορέα θα πρέπει να είναι από 1:3 έως 1:8. Σε αντιδράσεις με εξέχοντα άκρα χρησιμοποιούμε περίπου 10ng πλασμιδίου/μl αντίδρασης, ενώ σε αντιδράσεις με τυφλά άκρα χρησιμοποιούμε τριπλάσια ποσότητα. Ο γενικός τύπος για την ποσότητα του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε είναι:

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

## Υλικά

Διάλυμα σύνδεσης (buffer 10X)

ddH<sub>2</sub>O

T4 DNA λιγάση

## Πλασμιδιακός φορέας

### Πορεία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται στις κατάλληλες ποσότητες τα εξής:
  - Κομμένο γονιδιωματικό DNA
  - Γραμμοποιημένος πλασμιδιακός φορέας
  - Buffer 10X
  - T4 DNA λιγάση
  - H<sub>2</sub>O
2. Το μίγμα αναδεύεται ήπια με μια πιπέτα και επωάζεται στους 37<sup>0</sup>C για όλη νύκτα.
3. Το ένζυμο απενεργοποιείται στους 65<sup>0</sup>C για 20 λεπτά.
4. Το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη αφού προηγουμένως έχει γίνει εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

## 2.20 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells)

### Υλικά

Διάλυμα FSB

Θρεπτικό υλικό SOB

### Πορεία

1. Τρυβλίο με άγαρ εμβολιάζεται με *E.coli* στέλεχος από απόθεμα γλυκερόλης και επωάζεται όλη τη νύκτα (overnight, O/N) στους 37<sup>0</sup>C.
2. Μια αποικία από το παραπάνω πιάτο εμβολιάζεται σε 2ml θρεπτικού υλικού SOB που περιέχει 20mM MgSO<sub>4</sub> και επωάζεται O/N στους 37<sup>0</sup>C.
3. Από την προηγούμενη καλλιέργεια λαμβάνονται 0,2ml, εμβολιάζονται σε 50ml θρεπτικού υλικού SOB και επωάζονται

- στους 37<sup>0</sup>C με ανάδευση μέχρι η απορρόφηση να γίνει 0,5-0,6 στα 600nm.
4. Η παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρεται σε 2 falcon των 25ml και ψύχεται σε πάγο για 10 λεπτά.
  5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά στους 4<sup>0</sup>C, το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι σωλήνες αναστρέφονται και αφήνονται να στεγνώσουν για 1 λεπτό.
  6. Το ίζημα αναδιαλύεται με παγωμένο διάλυμα FSB και ψύχεται σε πάγο για 10 λεπτά.
  7. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά στους 4<sup>0</sup>C, το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι σωλήνες αναστρέφονται και αφήνονται να στεγνώσουν για 1 λεπτό.
  8. Το ίζημα αναδιαλύεται με παγωμένο διάλυμα FSB και προστίθενται 140μl DMSO. Το μίγμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά.
  9. Προστίθενται άλλα 140μl DMSO, αναδεύονται ήπια και το διάλυμα μοιράζεται σε παγωμένα σωληνάκια erpendorf, που διατηρούνται στους -80<sup>0</sup>C.

## **2.21 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA**

### **Υλικά**

Θρεπτικό υλικό SOC

Θρεπτικό υλικό LB

Τρυβλία LB-αμπικιλίνη

X-gal

IPTG

## Πορεία

1. Τα δεκτικά κύτταρα ξεπαγώνονται από τους  $-80^{\circ}\text{C}$ , χωρίς όμως να ξεπεράσει η θερμοκρασία τους  $4^{\circ}\text{C}$  και προστίθεται σε αυτά τα ανασυνδυσασμένα πλασμίδια.
2. Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια για 90 δευτερόλεπτα στους  $42^{\circ}\text{C}$ .
3. Επώαση για 2-3 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια για 1 ώρα υπό ανάδευση στους  $37^{\circ}\text{C}$ , αφού τα κύτταρα έχουν προστεθεί σε δεκαπλάσια του όγκου της αντίδρασης ποσότητα θρεπτικού υλικού SOC.
4. Η επιθυμητή ποσότητα επιστρώνεται σε τρυβλία LB-αμπικιλίνη με 3μl IPTG και 30μl X-Gal, που είναι απαραίτητα για το διαχωρισμό των μετασχηματισμένων και μη κλώνων. Το πλασμίδιο φέρει ως μάρτυρα επιλογής το γονίδιο της β λακταμάσης που προσδίδει στο βακτήριο που το διαθέτει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Επιπλέον φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης σε τέτοια θέση ώστε το γονίδιο να απενεργοποιείται όταν η ένθεση γίνεται με το σωστό τρόπο. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία αμπικιλίνης φέρουν το πλασμίδιο. Μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης λιγάσης υπάρχουν και επανακυκλοποιημένα μόρια πλασμιδίου χωρίς ένθετο. Τα βακτήρια που φέρουν τέτοιο πλασμίδιο διαθέτουν ενεργό το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και έτσι μπορούν να μεταβολίσουν το ανάλογο της λακτόζης, X-Gal, που υπάρχει στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, και να δώσουν μπλε ουσία ως παραπροϊόν (5-bromo-4-chloro-indigo) χρωματίζοντας τις βακτηριακές αποικίες. Οι λευκές αποικίες ανήκουν στα βακτήρια που φέρουν το ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο.
5. Τα τρυβλία επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για περίπου 16 ώρες και οι λευκές αποικίες, αφού απομονωθούν, αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο LB στους  $37^{\circ}\text{C}$  με ανάδευση σε 220 rpm.

## 2.22 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

## Υλικά

Θρεπτικό μέσο LB

Διάλυμα GET

Διάλυμα alkali

Διάλυμα οξικού καλίου pH 4,8

Αιθανόλη 100% και 70%

Διάλυμα TE RNAase

## Πορεία

1. Από τα τρυβλία με τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγουμε άσπρες αποικίες και τις αφήνουμε να αναπτυχθούν σε 2,5ml θρεπτικού μέσου LB κατά τη νύχτα.
2. 1,5ml των κυττάρων φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 2000rpm και το ίζημα αναδιαλύεται με 100μl παγωμένου διαλύματος GET. Το GET περιέχει γλυκόζη που διατηρεί ισοτονικό το διάλυμα και τα κύτταρα δεν σπάνε.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Στο διάλυμα προστίθεται 200μl διαλύματος alkali και επωάζεται στον πάγο για περίπου 10 λεπτά. Το NaOH του διαλύματος δημιουργεί τρύπες στις μεμβράνες ώστε να βγει έξω το πλασμιδιακό DNA, όχι όμως το χρωμοσωμικό.
5. Στη συνέχεια προστίθεται 150μl διαλύματος οξικού καλίου και το μίγμα επωάζεται στον πάγο για περίπου 10 λεπτά.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.200rpm και στο υπερκείμενο προστίθεται 1ml 100% αιθανόλη.
7. Επώαση στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για περίπου 10 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.200rpm και στο ίζημα προστίθεται 0,5ml 70% αιθανόλη.
9. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.200rpm και αφού το ίζημα στεγνώσει αναδιαλύεται σε 100μl TE RNAase.



## 2.23 Δημιουργία αποθέματος (stock) βακτηριακών κυττάρων σε γλυκερόλη

Σε 800μl βακτηριακής καλλιέργειας προστίθενται 200μl αποστειρωμένης γλυκερόλης. Στη συνέχεια το μίγμα αποθηκεύεται στους -80 °C έως και 2 χρόνια. Για να επανακτήσουμε το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος μεταφέρουμε λίγη ποσότητα από την πάνω επιφάνεια της παγωμένης καλλιέργειας με αποστειρωμένο κρίκο και εμβολιάζουμε το κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

## 2.24 Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του DNA

Ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA πραγματοποιείται με δύο κύριες μεθόδους, μια που βασίζεται στην ειδική χημική τροποποίηση συγκεκριμένης κάθε φορά βάσης (Maxam & Gilbert, 1976) και η άλλη βασίζεται στην ενζυμική σύνθεση σημασμένου DNA η οποία τερματίζει με τη χρήση τροποποιημένων νουκλεοτιδίων (Sanger *et al.*, 1977). Η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η δεοξυμέθοδος του Sanger. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιώντας ως μήτρα μονόκλωνο DNA συντίθεται μία αλυσίδα DNA από μία DNA πολυμεράση *in vitro*. Η σύνθεση της αλυσίδας αρχίζει από το 3' άκρο ενός εκκινήτη και σταματά με την ενσωμάτωση ενός τροποποιημένου νουκλεοτιδίου, ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) είναι ανάλογα των νουκλεοτιδίων στα οποία η 3-OH ομάδα έχει αντικατασταθεί με H και έτσι δε μπορεί να δημιουργηθεί νέος φωσφοδιεστερικός δεσμός με το επόμενο νουκλεοτίδιο που θα ενσωματωθεί στην αλυσίδα. Γίνονται 4 ξεχωριστές αντιδράσεις, αντίστοιχα για κάθε βάση, στις οποίες υπάρχει κάθε φορά ένα διαφορετικό ddNTP. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-ουρίας από όπου προκύπτει και η αλληλουχία των μορίων DNA<sup>57</sup>.

Για την αντίδραση της αλληλούχισης απαιτούνται 1μg DNA από κάθε δείγμα. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έχει γίνει από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.

## 2.25 Παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων

### **1.Διάλυμα alkali**

0,2N NaOH, 1% SDS

### **2.Διάλυμα 10% SDS**

Διαλύονται 100gr SDS σε 900ml H<sub>2</sub>O,θερμαίνονται για διαλυτοποίηση και ρυθμίζεται το pH στο 7,2 με προσθήκη σταγόνων HCl. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 1000ml με επιπλέον H<sub>2</sub>O.

### **3.Διάλυμα GET**

50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8,0

### **4.Διάλυμα οξικού καλίου 5M**

Διαλύονται 49,1gr CH<sub>3</sub>COOK σε 90ml ddH<sub>2</sub>O και ρυθμίζεται το pH στο 7,5. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100ml με επιπλέον H<sub>2</sub>O.

### **5.Διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 0.5X**

Αναμιγνύονται 54gr Tris-base, 27.5gr βορικό οξύ, 20ml EDTA 0.5M σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 8.0 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

### **6.Διάλυμα αποδιάταξης**

1,5M NaCl, 0,5M NaOH

### **7.Διάλυμα εξουδετέρωσης**

1M Tris, pH 7,4 , 1,5M NaCl

### **8.Διάλυμα υβριδοποίησης**

5X Denhards, 0,5% SDS, 6X SSC

### **9.Διάλυμα πλύσης 1**

2X SSC, 0,1% SDS

### **10.Διάλυμα πλύσης 2**

0,2X SSC, 0,1% SDS

### **11.Διάλυμα Α**

100mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5

### **12.Διάλυμα Β**

Διάλυμα Α, 1% Blocking solution

### **13.Blocking solution 10%**

10gr αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη σε 100ml διαλύματος Α

### **14.Διάλυμα C**

100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5

### **15.Διάλυμα FSB**

Σε 800ml H<sub>2</sub>O προστίθενται 10ml CH<sub>3</sub>COOK (1M), 8,91gr MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (45mM), 1,47gr CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (10mM), 7,46gr KCl (100mM), 0,8gr Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> (3mM) και 100ml 10% γλυκερόλη. Ρυθμίζεται το pH στο 6,4 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

### **16.Θρεπτικό μέσο NZY top agar**

Αναμειγνύονται 5gr NaCl, 2gr MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10gr NZ amine (casein hydrolysate), 0.7% (w/v) αγαρόζη σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση.

### **17.Θρεπτικό μέσο LB**

Προστίθενται 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10gr bacto-tryptone, 10gr NaCl σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση.

### **18.Θρεπτικό υλικό SOB**

Προστίθενται 2% βακτοτρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα μαγιάς, 0,05% NaCl και αφού διαλυθούν όλα τα συστατικά προστίθενται 10ml διαλύματος KCl 250mM και ρυθμίζεται το pH στο 7,0. Ακολουθεί αποστείρωση και στη συνέχεια προστίθενται 5ml διαλύματος 2M MgCl<sub>2</sub>.

### **19.Θρεπτικό υλικό SOC**

Είναι ίδιο με το SOB και περιέχει επιπλέον 20mM γλυκόζη. Μετά την αποστείρωση προστίθενται 20ml 1M γλυκόζης.

### **20.Ρυθμιστικό διάλυμα SM**

Αναμειγνύονται 5.8gr NaCl, 2.0gr MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 50ml 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5.0 ml 2% (w/v) ζελατίνη σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

### **21.Τρυβλία LB άγαρ/αμπικικιλίνη**

Αναμειγνύονται 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10gr bacto-tryptone, 10gr NaCl, 20gr άγαρ σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση. Το αντιβιοτικό προστίθεται λίγο πριν την επίστρωση των τρυβλίων όταν η θερμοκρασία έχει μειωθεί στους 55°C.

### **22.Τρυβλία NZY άγαρ**

Αναμειγνύονται 5gr NaCl, 2gr MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10grNZ amine (casein hydrolysate), 15gr άγαρ σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση.

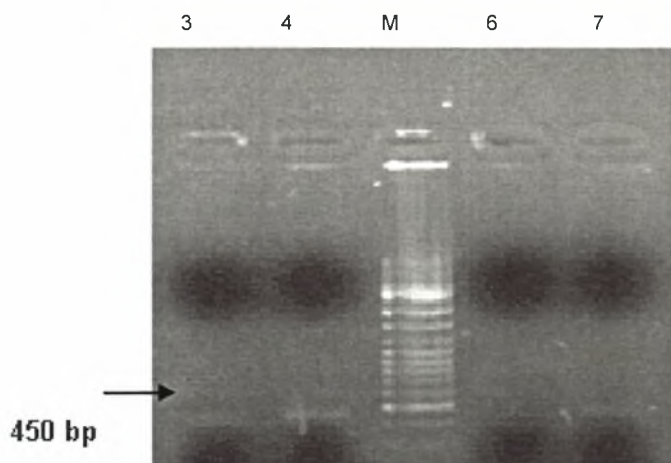
# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 1. Συλλογή φαγικών πλακών.

Με σκοπό την απομόνωση των γονιδίων της GST του δάκου, *Bactrocera oleae*, η γενωμική βιβλιοθήκη του δάκου στρώθηκε σε τρυβλία. Σχεδιάστηκε ένας ανιχνευτής με βάσει μια συντηρημένη αλληλουχία 450 bp του γονιδίου της GST της *Drosophila melanogaster* και χρησιμοποιήθηκε σε ανάλυση κατά Southern, ώστε να απομονωθούν φαγικοί κλώνοι (φαγικές πλάκες) που περιέχουν γονιδιακούς τόπους που υβριδίζονται με τον ανιχνευτή, δηλαδή τμήματα του γονιδίου της GST. Απομονώθηκαν, έτσι τέσσερις διαφορετικές πλάκες (φαγικοί κλώνοι 3,4,6,7) με διαφορετικά ενθέματα DNA. Το φαγικό DNA απομονώθηκε από κάθε πλάκα.

### 1.1 Ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος με PCR

Για την ενίσχυση του γονιδιακού τόπου που πιθανά σχετίζεται με το γονίδιο της GST πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές (primers) ειδικά σχεδιασμένους για το γονιδιακό τμήμα της GST των 450 bp και ενισχύθηκε το συγκεκριμένο κομμάτι στο φαγικό DNA που απομονώθηκε. Στην Εικόνα 9 φαίνεται το πήκτωμα ηλεκτοφόρησης των τεσσάρων δειγμάτων. Η ζώνη που διακρίνεται κάτω από τις 500 bp αντιστοιχεί στο τμήμα που μας ενδιαφέρει. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε ότι το φαγικό DNA που απομονώθηκε περιέχει το τμήμα του γονιδίου που αναζητούμε.



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων της PCR των τεσσάρων φαγικών κλώνων. Η αχνή ζώνη των 450 bp που φαίνεται αντιστοιχεί στο τμήμα που ενισχύθηκε. (M: Μάρτυρας)

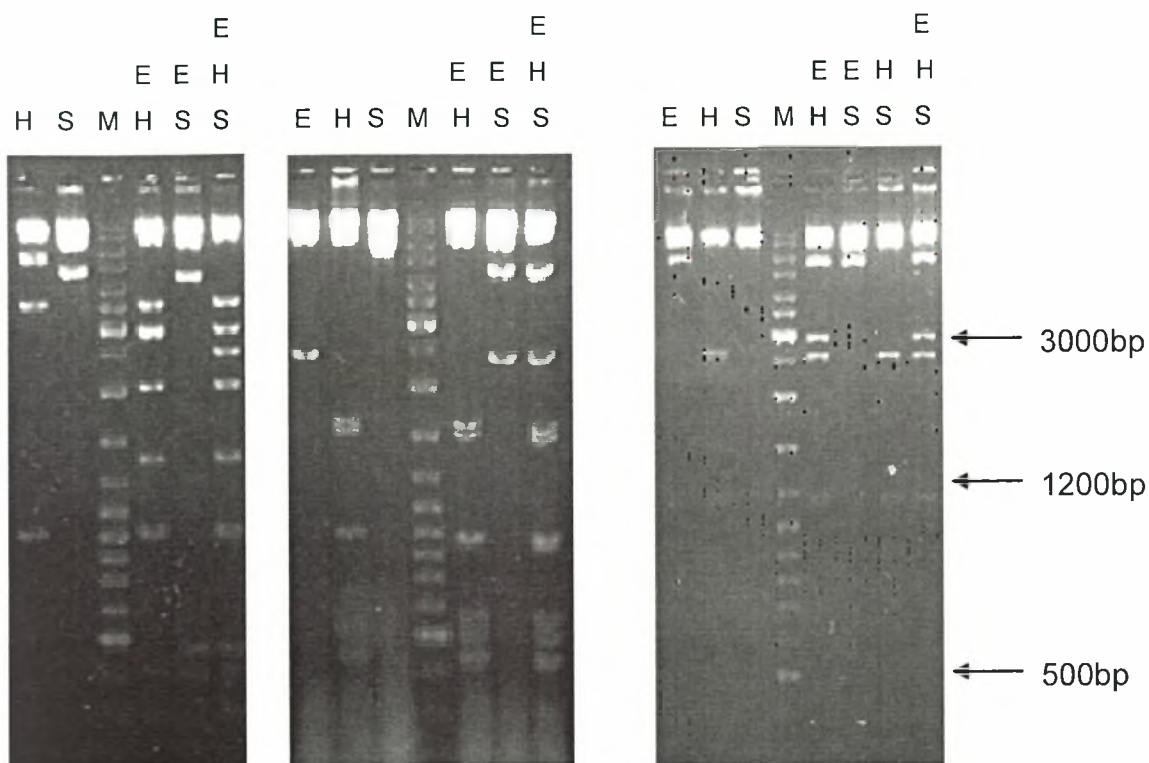
## 2. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και σχεδιασμός χαρτών περιορισμού των ενθεμάτων

Οι διαφορετικοί φαγικοί κλώνοι που απομονώθηκαν συλλέχθηκαν με τον ίδιο ανιχνευτή. Είναι λογικό, λοιπόν, το ένθεμα του κάθε φάγου να φέρει μια κοινή περιοχή με κάθε άλλο φάγο, δηλαδή τα φαγικά DNA να αλληλοκαλύπτονται. Για το σχεδιασμό χαρτών περιορισμού και τον έλεγχο πιθανής αλληλεπικάλυψης ανάμεσα στους φαγικούς κλώνους πραγματοποιήθηκαν πέψεις με διαφορετικά ένζυμα (*EcoRI*, *HindIII*, *Sall*) για (Εικόνα 10).

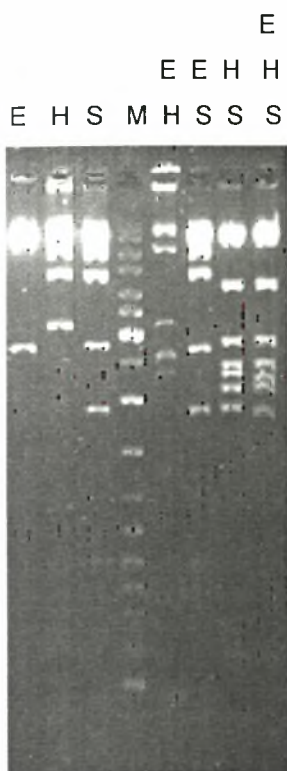
Κλώνος 3

Κλώνος 6

Κλώνος 4



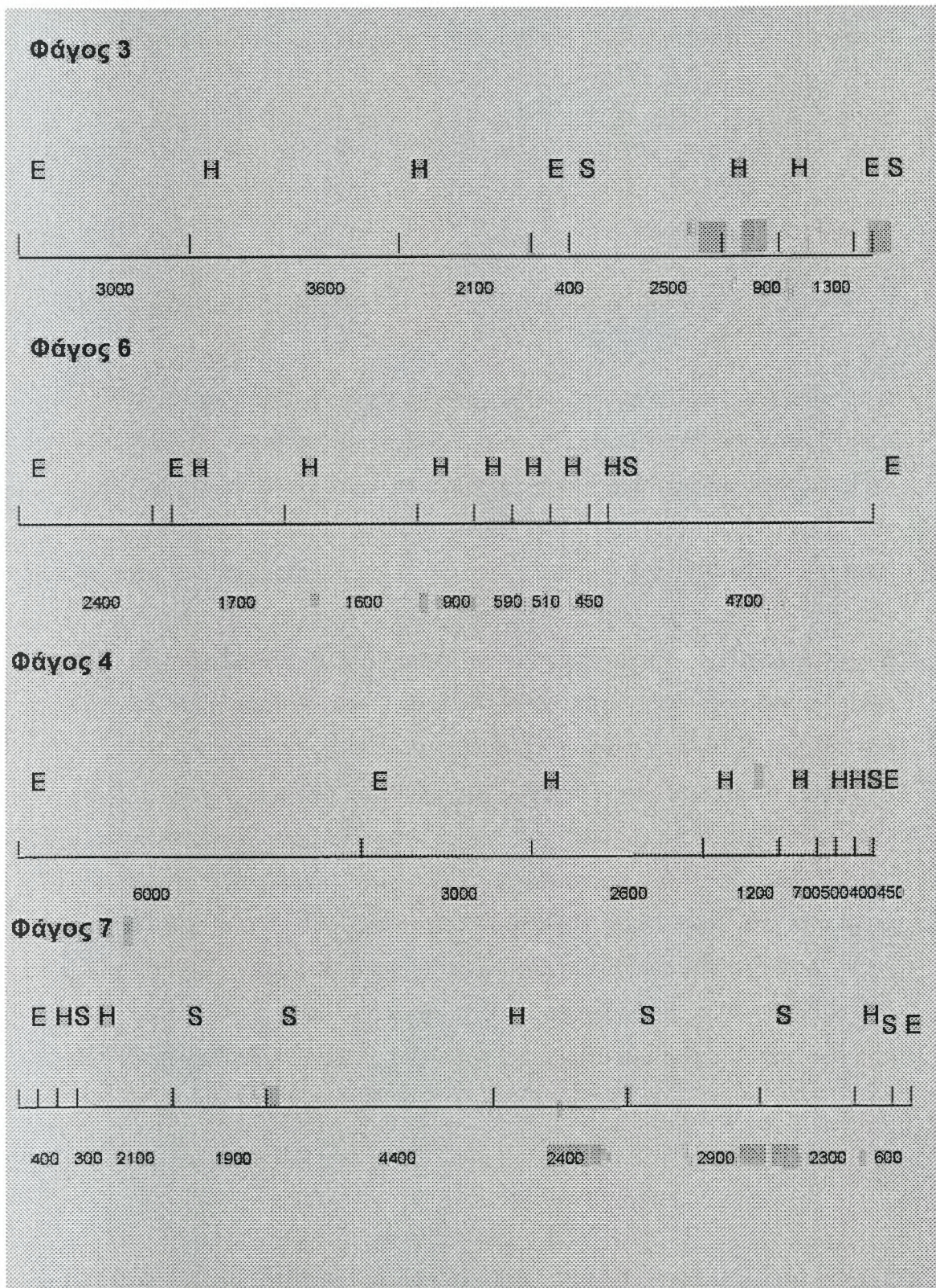
Κλώνος 7



Εικόνα 10. Πέψεις των τεσσάρων φαγικών DNA (3,4,6,7) με συνδυασμό ενζυμών. Σε κάθε διαδρομή αναγράφεται το/τα ένζυμο/α με το/τα οποίο/α έγινε η πέψη. Για κάθε πέψη χρησιμοποιήθηκε 1μg DNA και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.  
E:EcoRI H:HindIII S:Sall M:μάρτυρας



Από τις παραπάνω πέψεις προέκυψαν πιθανοί χάρτες περιορισμού που φαίνονται στην Εικόνα 11.

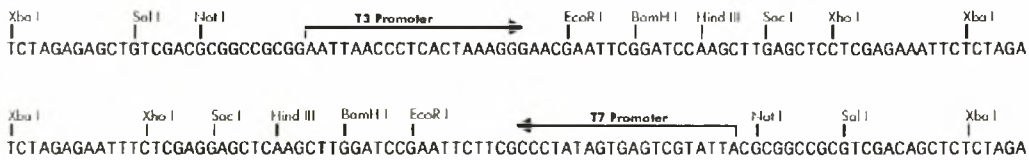


Εικόνα 11. Χάρτες περιορισμού που προκύπτουν από τις πέψεις των φαγικών DNA.

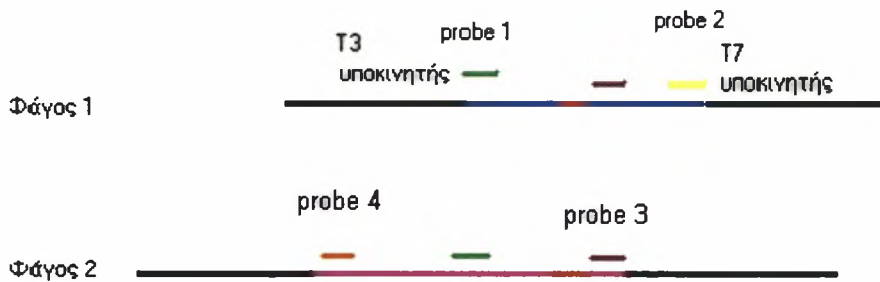
- Με βάση την παραπάνω εικόνα τα τμήματα DNA δεν είναι εύκολο να μελετηθούν και να επιβεβαιωθεί πιθανή αλληλεπικάλυψη ανάμεσα τους.

### 3. *In vitro* μεταγραφή

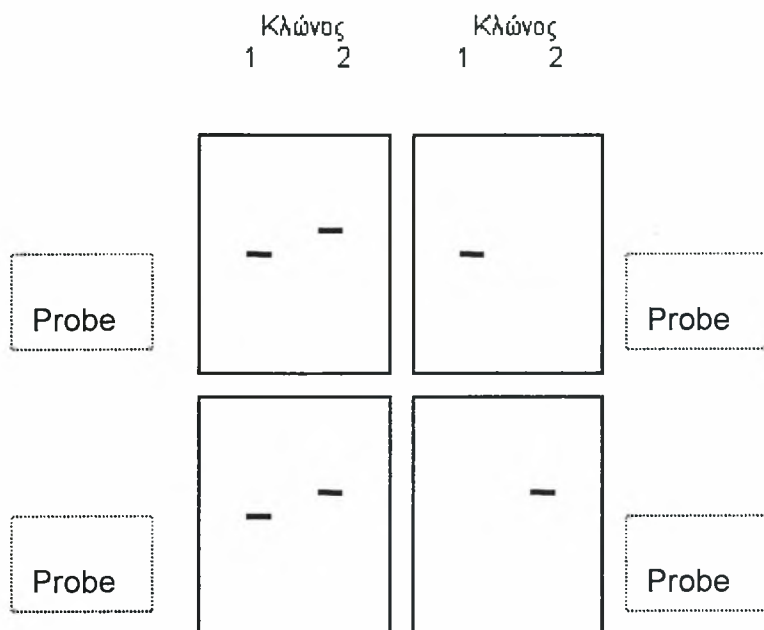
Ένας άλλος τρόπος για να διαπιστωθεί αν υπάρχει αλληλεπικάλυψη ή όχι είναι μέσω της δημιουργίας διαφορετικών ανιχνευτών από τον κάθε φαγικό κλώνο και χρησιμοποίησής τους σε ανάλυση κατά Southern. Οι συγκεκριμένοι φαγικοί κλώνοι μας δίνουν τη δυνατότητα, μέσω *in vitro* μεταγραφής των άκρων τους, να δημιουργήσουμε τέτοιους ανιχνευτές. Η διαδικασία αυτή μπορεί, μάλιστα, να οδηγήσει στην κατασκευή ενός contig των φαγικών κλώνων. Ο κάθε φορέας λDASH της βιβλιοθήκης φέρει τους υποκινητές T3 και T7, που εμπερικλείουν το ένθεμα (Εικόνα 12). Χρησιμοποιώντας RNA πολυμεράσες για καθέναν υποκινητή, σημασμένα ριβονουκλεοτίδια και μήτρα τον φάγο, ο οποίος έχει υποστεί πέψη, δημιουργήθηκαν σημασμένα τμήματα RNA από τα άκρα του ενθέματος. Με τον τρόπο αυτό σχηματίστηκαν ανιχνευτές για τα άκρα του κάθε ενθέματος. Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση κατά Southern που έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου έχει ηλεκτροφορηθεί το φαγικό DNA ύστερα από πέψη (Εικόνα 15α). Έτσι, εφόσον υπάρχει αλληλεπικάλυψη ο ανιχνευτής θα υβριδιστεί και θα δώσει σήμα σε περισσότερους από ένα φάγο, όπως φαίνεται και στο σχήμα των Εικόνων 13 και 14.



Εικόνα 12. Χάρτης που απεικονίζει τις θέσεις κλωνοποίησης του φορέα Lambda DASH. Στην εικόνα φαινεται επίσης και οι θέσεις των T3 και T7 υποκινητών (promoter).



Εικόνα 13. Ο ανιχνευτής (probe) που έχει σχεδιαστεί με καλούπι τον έναν φάγο, θα υβριδιστεί και με άλλον εφόσον υπάρχει αλληλεπικάλυψη. Οπότε, ο ανιχνευτής 1 που έχει σχεδιαστεί με μήτρα τον φάγο 1 και με τη δράση της T3 RNA πολυμεράσης θα υβριδιστεί και με τον φάγο 2. Αντίθετα, ο ανιχνευτής 2 που έχει σχεδιαστεί πάλι με μήτρα τον φάγο 1, αλλά με τη δράση της T7 RNA πολυμεράσης υβριδίζεται μόνο με τον κλώνο 1. Ομοίως και με τους ανιχνευτές 3 και 4. Ο ανιχνευτής 3 που έχει σχεδιαστεί με μήτρα τον φάγο 2 και με τη δράση της T7 RNA πολυμεράσης θα υβριδιστεί και με τον φάγο 1, ενώ ο ανιχνευτής 4 που έχει σχεδιαστεί πάλι με μήτρα τον φάγο 2, αλλά με τη δράση της T3 RNA πολυμεράσης υβριδίζεται μόνο με τον κλώνο 2.

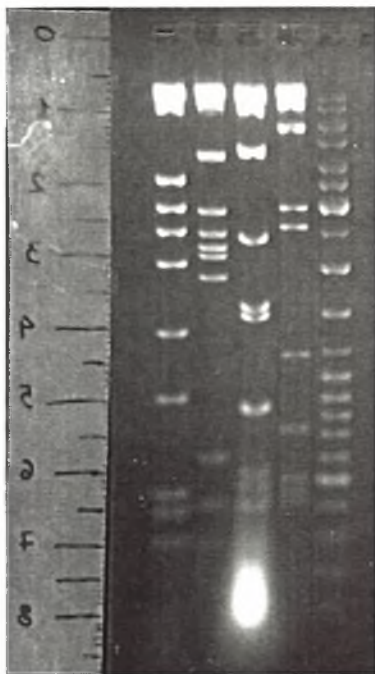


Εικόνα 14. Υβριδοποίηση κατά Southern και των δυο φαγικών DNA με τους ανιχνευτές που σχηματίστηκαν όπως φαίνεται στην εικόνα 6 με τη βοήθεια της *in vitro* μεταγραφής. Σχηματική αναπαράσταση των νάυλων μεμβρανών με τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης. Οι ανιχνευτές 1 και 3 δίνουν σήμα και στους δυο κλώνους. Αντίθετα, οι ανιχνευτές 2 και 4 δίνουν σήμα μόνο με έναν κλώνο, τον 1 και 4 αντίστοιχα.

### 3.1 Αποτελέσματα ανάλυσης κατά Southern

Συμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Southern (Εικόνα 15β,γ) δεν υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ των διαφορετικών κλώνων, αφού στις νάυλων μεμβράνες εμφανίστηκε μόνο ένα σήμα, δηλαδή εκείνο που αντιστοιχεί στον *in vitro* ανιχνευτή. Η ζώνη που σημάνθηκε βρίσκεται στην άκρη του ενθέματος.

3 4 6 7 M



α.



β.



γ.

Εικόνα 15. α. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των τεσσάρων διαφορετικών φαγικών DNA μετά από πέψη με τα ένζυμα *EcoRI*, *HindIII*, *Sall* (M:μάρτυρας). β. Νάilon μεμβράνη μετά από υβριδοποίηση με ανιχνευτή που έχει σχεδιαστεί χρησιμοποιώντας τον T3 υποκινητή και μήτρα τον φάγο 3. Με τη βοήθεια του μάρτυρα βρίσκουμε ότι η ζώνη που δίνει σήμα είναι 1300 bp. γ. Νάilon μεμβράνη μετά από υβριδοποίηση με ανιχνευτή που έχει σχεδιαστεί χρησιμοποιώντας τον T7 υποκινητή και μήτρα τον φάγο 3. Με τη βοήθεια του μάρτυρα βρίσκουμε ότι η ζώνη που δίνει σήμα είναι 400 bp.

#### 4. Ανάλυση της αλληλουχίας

Ακολούθησε διερεύνηση της αλληλουχίας του DNA των φαγικών κλώνων. Η ανάλυση αυτή έγινε στους δυο από τους τέσσερις κλώνους, τους κλώνους 3 και 4, και χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές μέθοδοι. Στην πρώτη μέθοδο το DNA του φαγικού κλώνου 4 ενισχύθηκε με την αντίδραση της PCR, με χρήση εκκινητών ειδικών για το τμήμα των 450 bp του γονιδίου

της GST (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Το κομμάτι των 450 bp απομονώθηκε και μετά από υποκλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pGEM έγινε η ανάλυση της αλληλουχίας του. Στη δεύτερη μέθοδο πραγματοποιήθηκε πέψη στο DNA του φαγικού κλώνου 3 με τα ένζυμα *EcoRI* και *HindIII* και σε δύο υποκλώνους, 2000 bp και 3500 bp, έγινε ανάλυση της αλληλουχίας, μετά από μετασχηματισμό σε πλασμιδιακό φορέα που έχει άκρα συμπληρωματικά με αυτά των υποκλώνων. Τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων μετά από σύγκριση με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST δεν έδωσαν κάποια ομοιότητα με γνωστές αλληλουχίες των γονιδίων της GST από άλλους οργανισμούς (Πίνακας 4). Συγκεκριμένα, η ανάλυση της αλληλουχίας του κλώνου 4 παρουσίασε ομοιότητα με την D ισομορφή της πρωτεΐνης CG31522-PD της *Drosophila melanogaster* και η ανάλυση της αλληλουχίας των υποκλώνων 3 παρουσίασαν ομοιότητα ο ένας των 2000 bp με ανενεργό μεταθετό στοιχείο *marginer* της *Drosophila erecta* και ο άλλος των 3500 bp με το χρωμόσωμα 2R, την περιοχή 70, της *Drosophila melanogaster*.

Επειδή τα αποτελέσματα των αναλύσεων των αλληλουχιών δεν ήταν αναμενόμενα, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε την αλληλουχία του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαλογή της βιβλιοθήκης. Ως ανιχνευτής είχε χρησιμοποιηθεί το προϊόν της PCR του γενωμικού DNA της *Drosophila melanogaster* με τους ειδικούς για τη GST εκκινητές. Το προϊόν αυτό στη συνέχεια είχε σημανθεί με το κατάλληλο kit. Ο έλεγχος της αλληλουχίας έγινε με δυο τρόπους: 1) ανάλυση της αλληλουχίας απευθείας του προϊόντος της PCR και 2) ανάλυση της αλληλουχίας του προϊόντος της PCR μετά από υποκλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pGEM. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης στην πρώτη περίπτωση με τη χρήση του προγράμματος BLAST απέδειξαν ότι το ενισχυμένο προϊόν ήταν πράγματι μέρος του GST γονιδίου της δροσόφιλας(Πίνακας 4). Αντιθέτως, στη δεύτερη περίπτωση η ανάλυση της αλληλουχίας παρουσιάζει ομοιότητα ( ) με το άλφα 1 πολυπεπτίδιο της ΑΤΡάσης, μεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  του αρουραίου *Rattus norvegicus* (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύγκρισης αλληλουχιών στη βάση δεδομένων.

Κλώνος	Γενετικός τόπος μέγιστης ομοιότητας	E value
Φ3 (υποκλωνοποιημένο τμήμα ~2000 bp)	ανενεργό μεταθετό στοιχείο <i>mariner</i> της <i>Drosophila erecta</i>	0,0
Φ3 (υποκλωνοποιημένο τμήμα ~3500 bp)	Περιοχή 70 χρωμοσώματος 2R της <i>D. melanogaster</i>	0,17
Φ4 (κλωνοποιημένο PCR προϊόν)	D ισομορφή της πρωτεΐνης CG31522-PD της <i>D. melanogaster</i>	$1e^{-44}$
<i>D. melanogaster</i> PCR προϊόν	GST γονίδιο της <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	0.0
Κλωνοποιημένο PCR προϊόν της <i>D.</i> <i>melanogaster</i>	άλφα 1 πολυπεπτίδιο της ATPάσης, μεταφορέα $Na^+/K^+$ του αρουραίου <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i>	$7e^{-29}$

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η απομόνωση τμημάτων του γονιδίου της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης από τη γενωμική βιβλιοθήκη του δάκου. Για το σκοπό αυτό επιστρώθηκε η βιβλιοθήκη και έγινε απομόνωση τεσσάρων διαφορετικών φάγων. Η επιλογή των φαγικών πλακών έγινε μετά από υβριδοποίηση με ανιχνευτή που σχεδιάστηκε βάσει μιας συντηρημένης αλληλουχίας του γονιδίου της GST της δροσόφιλας. Χρησιμοποιώντας το DNA των φάγων αυτών και με τη βοήθεια της *in vitro* μεταγραφής βρέθηκε ότι δεν υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ των τεσσάρων κλώνων. Ακολούθησε ανάλυση της αλληλουχίας των δυο φαγικών κλώνων.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του υποκλώνου των 2000 bp του φάγου 3 του δάκου παρουσίασε ομοιότητα με ανενεργό μεταθετό στοιχείο *marginer* της *Drosophila erecta* και του υποκλώνου των 3500 bp του φάγου 3 με την περιοχή 70 του χρωμοσώματος 2R, της *D. melanogaster*. Τα μεταθετά στοιχεία *marginer* έχουν εξεταστεί κυρίως σε διάφορα είδη εντόμων, παρόλο που βρίσκονται και σε σπονδυλωτά, αρθρόποδα και μύκητες. Το στοιχείο αυτό ήταν ανενεργό γιατί περιείχε ένα κωδοκόνιο λήξης στο πλαίσιο ανάγνωσης της τρανσποζάσης. Η ανάλυση της αλληλουχίας του κλωνοποιημένου PCR προϊόντος του φαγικού κλώνου 4 του δάκου έδωσε ομοιότητα με την D ισομορφή της πρωτεΐνης CG31522-PD της *Drosophila melanogaster*. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη η οποία δεν έχει χαρακτηριστεί και η λειτουργία της δεν είναι γνωστή.

Η ανάλυση της αλληλουχίας στο τμήμα των 450 bp της *Drosophila melanogaster* έδωσε δυο διαφορετικά αποτελέσματα. Όταν η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο προϊόν της PCR των 450 bp παρατηρήθηκε ότι το τμήμα αυτό αποτελεί μέρος του γονιδίου της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο κατάλληλος. Στην περίπτωση, όμως, που το προϊόν αυτό εισάγεται σε πλασμιδικό φορέα και μετασχηματίζεται σε βακτηριακά κύτταρα τα αποτελέσματα είναι εντελώς διαφορετικά. Παρουσιάζεται ομοιότητα με το άλφα 1 πολυπεπτίδιο της ATPάσης, μεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , του αρουραίου *Rattus norvegicus*.

Παρατηρήθηκε, λοιπόν πως όλες οι προσπάθειες υποκλωνοποίησης είτε του PCR προϊόντος είτε άλλων τμημάτων πέψης των φάγων δημιουργούσαν προβλήματα και τα αποκτηθέντα αποτελέσματα ήταν

σημαντικά διαφορετικά από τα αναμενόμενα. Πιθανή εξήγηση είναι η ανικανότητα/δυσκολία του συστήματος φορέα/ξενιστή (*Escherichia coli*) που χρησιμοποιήθηκε να δεχτεί το συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο. Στην περίπτωση των υποκλώνων του φάγου 3 αναλύθηκε η αλληλουχία μόνο ορισμένων τμημάτων του ενθέματος, τα οποία προέκυψαν από την πέψη. Επομένως, η ανάλυση της πρωτοδιάταξης του κλώνου αυτού δεν έχει ολοκληρωθεί αφού μόνο περίπου 5,5 kb αναλύθηκαν σε σύνολο 17-20 kb του ενθέματος. Άρα μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι υποκλώνοι που αναλύθηκαν δεν περιείχαν το τμήμα του γονιδίου της GST που μας ενδιαφέρει.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων προτείνονται μια σειρά πιθανών λύσεων. Η χρησιμοποίηση ενός διαφορετικού συστήματος φορέα/ξενιστή αποτελεί μια πιθανή λύση. Δοκιμές διάφορων συστημάτων μετασχηματισμού μπορούν να γίνουν ώστε να βρεθεί το κατάλληλο. Οι φαγικοί κλώνοι μετά από PCR έδωσαν προϊόν 450 βάσεων (βλ. Αποτελέσματα, Εικόνα 9), γεγονός που υποκνύει ότι μάλλον περιέχουν το αναμενόμενο γονιδιακό τμήμα. Η επιβεβαίωση θα μπορούσε να γίνει με υβριδοποίηση κατά Southern. Εφόσον παρατηρείται πρόβλημα στην κλωνοποίηση των γονιδιακών τμημάτων ένας τρόπος αντιμετώπισης είναι η ανάλυση της αλληλουχίας απευθείας των προϊόντων της PCR, όπως έγινε στην περίπτωση της *Drosophila melanogaster*. Μια επιπλέον λύση του προβλήματος είναι ο καθορισμός της αλληλουχίας του ενθέματος με τη μέθοδο primer walking. Στη μέθοδο αυτή σχηματίζονται πολλοί αλληλεπικαλυπτόμενοι εκκινητές (primers) χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φαγικό κλώνο και στη συνέχεια γίνεται ανάλυση της αλληλουχίας τους. Ο αρχικός εκκινητής είναι σχεδιασμένος βάσει της γνωστής αλληλουχίας του φορέα. Επίσης, στην περίπτωση του κλώνου 3 θα μπορούσε να γίνει μια ανάλυση κατά Southern για να διαπιστωθεί ποιοι είναι οι υποκλώνοι που φέρουν το τμήμα του γονιδίου της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και να ακολουθήσει ανάλυση της αλληλουχίας τους. Τέλος, η χρήση ανιχνευτή σχεδιασμένου βάσει κάποιου περισσότερο συγγενικού εντόμου, όπως η *Ceratitis capitata*, πιθανόν να αποτελεί ένα τρόπο αντιμετώπισης.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. H. V. Weems and J. L. Nation; Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta: Diptera: Tephritidae).
2. S.W. Romoser and G.J. Stoffolano; The science of entomology. *4th edition McGraw-Hill*, 1998.
3. R. Rice; Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*, *Olive Notes*, p.1-6, 2000.
4. F. G. Zalom, Davis R. A. Van Steenwyk, Berkeley and H. J. Burrack, Davis; Olive Fruit Fly, *UC ANR Publication 74112*.
5. B. E. Mazomenos, A. Pantazi-Mazomenou and D. Stefanou; Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system, *Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production*, Vol. 25, p.2, 2002.
6. P. Katsoyannos; Olive pests and their control in the Near East, *FAO Paper*, 1992.
7. Denholm, G. J. Devine, M. S. Williamson; Insecticide Resistance on the Move, *Science*, Vol 297, Issue 5590, p. 2222-2223, 27 September 2002.
8. Julie A. Scott; The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress, *Florida Entomologist*, vol. 78, no. 3, p. 399, September 1995.
9. J. G. Vontas, M. J. Hejazi, N. J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas and J.Hemingway; Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*, *Insect Molecular Biology*11, Vol 4, p. 329–336, 2002.
10. H. Ranson, C. Claudianos, F. Ortelli, C. Abgrall, J. Hemingway, M. V. Sharakhova, M. F. Unger, F. H. Collins, R. Feyereisen ; Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance, *Science*, Vol 298, Issue 5591, p. 179-181, 4 October 2002.
11. H. Ranson, C. Claudianos, F. Ortelli, C. Abgrall, J. Hemingway, M.V. Sharakhova, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R.; Evolution of supergene families associated with insecticide resistance, *Science* 298, p. 179–181, 2002.

12. T. Brown; Methods to Evaluate Adverse Consequences of Genetic Changes Caused by Pesticides, *Clemson University, Department of Entomology, South Carolina, USA*.
13. J. Hemingway; The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 34, Issue 7, p. 653-665, July 2004.
14. L. L. Van Eerd, R. E. Hoagland, R. M. Zablotowicz, J. C. Hall; Pesticide metabolism in plants and microorganisms, *Weed Science*, Vol 51, p. 472–495, 2003.
15. R. Feyereisen; Insect P450 enzymes, *Annual Review Of Entomology*, Vol 44, p. 507-533, 1999.
16. S. Kasai, J.G. Scott; Over expression of cytochrome P450 CYP6D1 is associated with monooxygenase-mediated pyrethroid resistance in houseflies from Georgia, *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol 68, p. 34–41, 2000.
17. C. Sabourault M. Guzov, J.F. Koener, C. Claudianos, F.W. Plapp Jr. and R. Feyereisen; Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdeltaE7) gene in resistant house flies, *Insect Molecular Biology*, Vol 10, p. 609–618, 2001.
18. J.B. Berge, R. Feyereisen, και M. Amichot; Cytochrome p450 monooxygenases and insecticide resistance in insects, *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, Vol 353, p. 1701–1705, 1998.
19. P.J. Daborn, J.L. Yen, M.R. Bogwitz, G. Le Goff, E. Feil, S. Jeffer, Tijet N., Perry T., Heckel D., Batterham P., Feyereisen R., Wilson TG., ffrench-Constant RH; A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*, *Science*, Vol 297, p. 2253–2256, 2002.
20. P. J. Daborn, J. L. Yen, M. R. Bogwitz, G. Le Goff, E. Feil, S. Jeffers, N. Tijet, T. Perry, D. Heckel, P. Batterham, R. Feyereisen, T. G. Wilson, R. H. ffrench-Constant; A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*, *Science*, Vol 297, Issue 5590, p. 2253-2256, 27 September 2002.

21. D. Nikou, H. Ranson, and J. Hemingway; An adult-specific CYP6 P450 gene is over expressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, *Gene*, Vol 318, p. 91–102, 2003.
22. S. Kasai, and J.G Scott; Over expression of cytochrome P450 CYP6D1 is associated with monooxygenase-mediated pyrethroid resistance in houseflies from Georgia, *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol 68, p. 34–41, 2000.
23. B. Shen, H.-Q. Dong, H.-S. Tian, L. Ma, X.-L. Li, G.-L. Wu; Cytochrome p450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and -resistant strains of *Culex pipiens pallens*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol 75, p. 19–26, 2003.
24. M. Amocot, A. Brun, A. Cuany, C. Helvig, J.P. Salaun, F. Durst; Expression study of *Cyp* genes in *Drosophila* strains resistant or susceptible to insecticides, Cytochrome p450 8th International Conference, Eurotext-John Libbey, Paris, p. 689–692, 1994.
25. D. Fournier, J. M. Bride, C. Mouchès, M. Raymond, M. Magnin, J-B. Bergé, N. Pasteur and G. P. Georghiou; Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in *Culex pipiens* L. complex, *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol 27, p. 211-217, 1987.
26. A. L. Devonshire, and G. D. Moore; Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house flies (*Musca domestica*), *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol 21, p. 336-340, 1984.
27. R. H. French-Constant, P. J. Daborn and G. Le Goff; The genetics and genomics of insecticide resistance, *Trends in Genetics*, Vol 20, Issue 3, p.163-170, March 2004.
28. K. Van Asperen; Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies, *Entomol Experimentalis et Applicata*, Vol 2, p. 48–57, 1959.
29. P.B. Hughes; Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera:Calliphoridae), *Bull. Entomol. Res.*, Vol 75, p. 535–544, 1985.

30. M.G. Townsend; The mechanism of malathion resistance in the blowfly *Chrysomya putoria*, *Entomol Experimentalis et Applicata*, Vol 12, p. 243–267, 1969.
31. F.J. Oppenoorth, van Asperen; Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance, *Science*, Vol 132, p. 298–299, 1960.
32. S. Whyard, R. J. Russell and V. K. Walker; Insecticide resistance and malathion carboxylesterase in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, *Biochem. Genet.*, Vol 32, p.9-22,1994a.
33. S. Whyard, A. E. Downe and V. K. Walker; Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol 24, p.819-827,1994b.
34. Kregel; Glutathion S-transferase (GSTA4-4), *FEBS Lett.*, Vol 422, p.285-290, 1998.
35. B. Mannervik; The isoenzymes of glutathione transferase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, Vol 57, p. 357–417, 1985.
36. R.N.Armstrong; Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function, *Chem. Res. Toxicol.*, Vol 4, p. 131–140, 1991.
37. B. Agianian, P.A. Tucker, A. Schouten, K. Leonard, B. Bullard and P. Gros; Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products, *J. Mol. Biol.*, Vol 326, p. 151–165, 2003.
38. D. Sheehan, G. Meade, V.M. Foley and C.A. Dowd; Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochem. J.*, Vol 360, p. 1–16, 2001.
39. H. Ranson and J. Hemingway; Insect pharmacology and control: glutathione S-transferases. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S., Editors, 2004. , Elsevier Ltd, Oxford, UK, 2004.
40. J. Hemingway; The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 30, Issue 11, p. 1009-1015, November 2000.
41. I.Kostaropoulos, A.I. Papadopoulos, A. Metaxakis, E. Boukouvala, E. Papadopoulou-Mourkidou; Glutathione S-transferase in the defence

- against pyrethroids in insects, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol 31, p.313–319, 2001.
42. A.G. Clark and N.A. Shamaan; Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol 22, p. 249–261, 1984.
43. R. H. ffrench-Constant, J. C. Steichen, T. A. Rocheleau, K. Aronstein and R. T. Roush; A single-amino acid substitution in a  $\gamma$ -aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 90, p.1957-1961,1993.
44. R.H. ffrench-Constant; A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance, *Nature*, Vol 363, p. 449–451,1993.
45. H.-G. Zhang, R.H. ffrench-Constant, MB Jackson; A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms, *J. Physiol.*, Vol 479, p. 65–75, 1994.
46. M. Tomizawa, JE. Casida; Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors, *Annu. Rev. Entomol.*, Vol 48, p. 339–364, 2003.
47. K. Matsuda, SD Buckingham, D Kleier, JJRauh, M Grauso, DB Sattelle; Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trends Pharmacol. Sci.*, Vol 22, p. 573–580, 2001.
48. D. M. Soderlund and D. C. Knipple; The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 33, Issue 6, p. 563-577, June 2003.
49. P. Menozzi, M. A. Shi, A. Lougarre, Z. Hua Tang, and D. Fournier; Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations, *BMC Evolutionary Biology*, Vol 4, p.4, 2004.
50. Y. Boublik, P. Saint-Aguet, A. Lougarre, M. Arnaud, F. Villatte, S. Estrada-Mondaca and D. Fournier; Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues, *Protein Engineering*, Vol. 15, No. 1, p.43-50, January 2002.



51. A. Mutero, M. Pralavorio, J.M. Bride and D. Fournier; Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, p. 5922-5926, June 1994.
52. D. Fournier, F. Karch, J.M. Bride, L.M.C. Hall, J.-B. Berge and P. Spierer; *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene, structure evolution and mutations, *J. Mol. Evol.*, Vol 210, p. 15–22, 1989.
53. S.B. Walse, T.A. Dolden, G.D. Moores, M. Kristensen, T. Lewis, A.L. Devonshire *et al.*; Identification and characterisation of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance, *Biochem. J.*, Vol 359, p. 175–181, 2001.
54. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter; Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
55. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis; Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition, 1989.
56. P.A. Sharp, B. Sugden J. Sambrook; Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, 12, 3055, 1973.
57. D. Casey; "Primer on Molecular Genetics", *DOE Human Genome, 1991-92 Program Report*, 1992.