

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*Διπλωματική Εργασία*

---

Κλωνοποίηση του γονιδιακού  
τόπου του ριβοσωμικού RNA στο  
δάκο της ελιάς

**Βασιλική Λυγηρού**

**ΛΑΡΙΣΑ 2011**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου.

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **ΜΑΘΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Αναπληρωτής καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΚΑΚΑΝΗ ΕΥΔΟΞΙΑ**

Διδάσκουσα ΠΔ407 του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου, τη βοήθεια και την υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής αυτής, καθώς και για τη μεταβίβαση των γνώσεων, του τρόπου σκέψης και της αγάπης που είναι απαραίτητα να έχει ένας μοριακός βιολόγος για το αντικείμενό του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Νικόλαο Ζυγουρίδη, για την άψογη συνεργασία μας και την καθοδήγησή του, στη διδάσκουσα κ. Ευδοξία Κακάνη, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε, και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Μαρία-Ελένη Γρηγορίου για την ανεκτίμητη βοήθειά της.

Ακόμη, ευχαριστώ πολύ τις υποψήφιες διδάκτορες κ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη και κ. Έφη Σαγρή, το μεταπτυχιακό φοιτητή κ. Βαλάντη Κουϊμάνη και τις προπτυχιακές φοιτήτριες, συμφοιτήτριες και στενές μου φίλες κ. Ευαγγελία Κουβάτα και κ. Δέσποινα Μπαλιτζή για την αρμονική συνύπαρξη μέσα στο εργαστήριο αλλά και για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα το οποίο επικρατεί στο χώρο αυτό.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη στήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν σε κάθε κρίσιμο σημείο της ζωής μου, όπως και σε αυτό.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Ο γενετικός τόπος του rRNA.....	7
1.2 Εξέλιξη του rDNA και χρήση του στη φυλογενετική ανάλυση.....	9
1.2.1 Εξέλιξη των πυρηνικών rDNA.....	9
1.2.2 Εξέλιξη των μιτοχονδριακών rDNA.....	12
1.2.3 Συγχρονισμένη εξέλιξη.....	12
1.2.4 Η χρησιμότητα του rDNA στη φυλογενετική ανάλυση.....	15
1.3 Δυνατότητες ανάλυσης του IGS.....	16
1.3.1 Δομή του IGS.....	16
1.3.2 Εξέλιξη του IGS.....	17
1.3.3 Χρήση του IGS ως πηγή διαγνωστικών.....	19
1.4 Ο δάκος της ελιάς.....	19
1.4.1 Περιγραφή του δάκου.....	19
1.4.2 Κύκλος της ζωής του δάκου.....	20
1.4.3 Εξάπλωση του δάκου.....	21
2. Σκοπός.....	23
3. Μέθοδοι.....	25
3.1 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων.....	25
3.1.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο.....	25
3.1.2 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη.....	25
3.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	26
3.1.4 Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	27
3.1.5 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	28
3.2 Βακτηριοφάγος λ-DASH® II (Stratagene).....	29
3.2.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ξενιστών.....	30
3.2.2 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	30
3.2.3 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο.....	31
3.2.4 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ.....	31
3.2.5 Παρασκευή εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ.....	32
3.2.6 Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ.....	32
3.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	33
3.3.1 PCR για γονιδιακή ενίσχυση (DNA).....	33
3.3.2 PCR μεγάλου μήκους (Long PCR).....	35
3.4 Υβριδοποίηση.....	36
3.4.1 Σήμανση ανιχνευτών.....	36
3.4.2 Μεταφορά DNA σε νάilon μεμβράνη.....	37
3.4.3 Μεταφορά φαγικών πλακών σε νάilon μεμβράνη.....	38

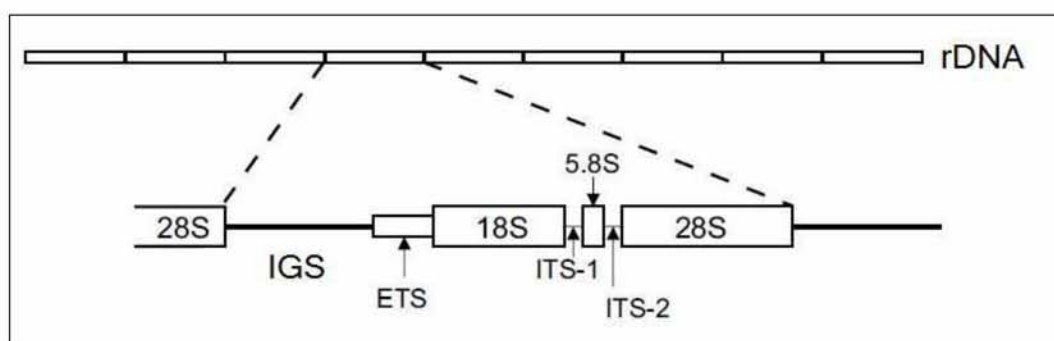
3.4.4	Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνες .....	39
3.4.5	Ανίχνευση σήματος .....	40
4.	<b>Υλικά</b> .....	43
4.1	Ηλεκτροφόρηση .....	43
4.2	Βακτηριοφάγος λ.....	43
4.3	PCR .....	43
4.4	Υβριδοποίηση .....	44
5.	<b>Αποτελέσματα</b> .....	45
5.1	Ενίσχυση του IGS σε γονιδιωματικό DNA δάκου με PCR.....	45
5.2	Απομόνωση και διερεύνηση της δομής του rDNA.....	45
5.2.1	Δημιουργία ανιχνευτών.....	45
5.2.2	Διαλογή φαγικής βιβλιοθήκης .....	46
5.2.3	Διερεύνηση της δομής του rDNA.....	46
5.3	Αλληλούχιση τμημάτων .....	48
6.	<b>Συζήτηση</b> .....	51
7.	<b>Βιβλιογραφία</b> .....	55
8.	<b>Παράρτημα</b> .....	61
8.1	Αλληλουχία 18S στο <i>Bactrocera oleae</i> .....	61
8.2	Αλληλουχία 28S στο <i>Bactrocera oleae</i> .....	61

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ο γενετικός τόπος του rRNA

Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, όπως αυτό αποτυπώθηκε από τον Francis Crick το 1958, ορίζει πως η γενετική πληροφορία είναι καταγεγραμμένη στις ακολουθίες του DNA και μέσω των διαδικασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης αποτυπώνεται στην αλληλουχία των αμινοξέων των πρωτεϊνικών μορίων. Η μεταγραφή μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA σε μόρια RNA. Τα προϊόντα της μεταγραφής είναι το mRNA (messenger RNA: αγγελιοφόρο RNA), το οποίο μεταφέρει τη γενετική πληροφορία για την παραγωγή μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας, το tRNA (transfer RNA: μεταφορικό RNA), το οποίο μεταφέρει αμινοξέα σε μια επεκτεινόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου, με βάση τις οδηγίες του mRNA, το snRNA (small nuclear RNA: μικρό πυρηνικό RNA), το οποίο συνδέεται με πρωτεΐνες σχηματίζοντας τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωμάτια τα οποία καταλύουν τη διαδικασία του ματίσματος του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το καταλυτικό RNA ή ριβοζύμη, το οποίο διαθέτει τριτοταγή δομή τέτοια που του επιτρέπει να καταλύει βιοχημικές αντιδράσεις (Zaher and Unrau, 2007), και το rRNA (ribosomal RNA: ριβοσωμικό RNA), το οποίο συνδέεται με πρωτεΐνες και σχηματίζεται το ριβόσωμα.

Τα ριβοσώματα αποτελούνται από δύο υπομονάδες, η καθεμία αποτελούμενη από συγκεκριμένα rRNA και ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα περιλαμβάνει ένα rRNA και περίπου 20 πρωτεΐνες, στους προκαρυώτες, και 30 πρωτεΐνες, στους ευκαρυώτες. Η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα περιλαμβάνει 2, στους προκαρυώτες, και 3, στους ευκαρυώτες, rRNA και περίπου 30, στους προκαρυώτες, και 40, στους ευκαρυώτες, ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Σε κάθε ριβόσωμα βρίσκεται μόνο ένα αντίγραφο από κάθε πρωτεΐνη.



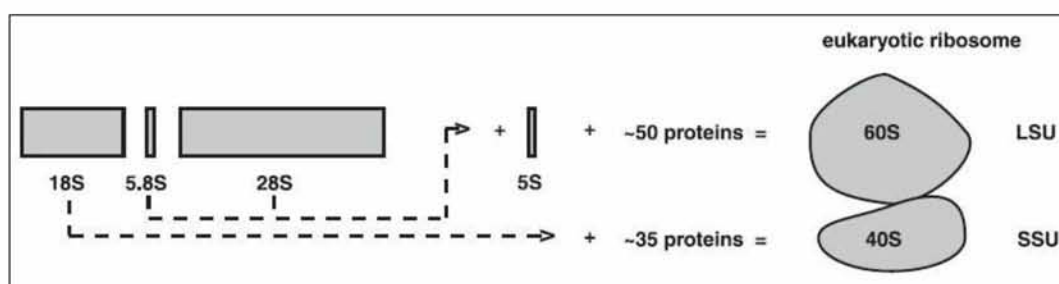
Εικόνα 1.1: Διαγραμματική απεικόνιση της οργάνωσης των συστοιχιών rDNA.

Λόγω της μεγάλης σημασίας των ριβοσωμάτων στην πρωτεϊνοσύνθεση, την κυτταρική αύξηση και την ανάπτυξη ενός οργανισμού, τα ριβοσωμικά γονίδια μεταγράφονται με υψηλούς ρυθμούς (Mateos and Markow, 2005). Το rRNA αποτελεί σχεδόν το 50% του συνόλου της μεταγραφής που συμβαίνει σε ένα κύτταρο, καθώς και το 80% του συνολικού RNA ενός κυττάρου ενώ το 45% αυτού βρίσκεται στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και το υπόλοιπο 55% βρίσκεται στη μεγάλη. Για την επίτευξη αυτών των υψηλών επιπέδων παραγωγής rRNA, οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν πολλαπλά αντίγραφα του rDNA, τα



οποία δε βρίσκονται σε ανεξάρτητες μεταξύ τους θέσεις στο γονιδίωμα αλλά διατεταγμένα σε συστοιχίες, στις περιοχές οργανωτή του πυρηνίσκου (NORs: Nucleolus Organizer Regions), σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα (Εικόνα 1.1).

Η συστοιχία του rDNA στο ευκαρυωτικό πυρηνικό γονιδίωμα αποτελείται, κατά κανόνα, από πολλές εκατοντάδες τυχαία επαναλαμβανόμενων αντιγράφων της μεταγραφικής μονάδας και του μη μεταγραφόμενου διαστήματος. Ο αριθμός των αντιτύπων αυτής της μεταγραφικής μονάδας μπορεί να είναι από ένα μέχρι μερικές χιλιάδες. Στους προκαρυώτες, υπάρχουν από ένα έως μερικά αντίγραφα των γονιδίων του rRNA, και μπορεί να οργανώνονται σε ένα οπερόνιο (συνήθως με γονίδια tRNA ανάμεσα) ή μπορεί να είναι διασκορπισμένα στο γονιδίωμα (Hofman et al., 1979). Συνήθως, υπάρχουν τρία ή τέσσερα διαφορετικά rRNA σε κάθε είδος (Long and Dawid, 1980; Gerbi, 1986). Τα διαφορετικά rRNA χαρακτηρίζονται από την ταχύτητα καθίζησής τους (S: Svedberg, μονάδα ταχύτητας καθίζησης). Η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα περιλαμβάνει δύο ή τρία rRNA: ένα rRNA με μέγεθος που κυμαίνεται από 16S ( $\approx 1500$  νουκλεοτίδια), στα περισσότερα προκαρυωτικά γονιδιώματα, σε 23S ( $\approx 2900$  νουκλεοτίδια), στα μιτοχόνδρια των σπονδυλωτών, και έως 28S ( $>4000$  νουκλεοτίδια), στο πυρηνικό γονιδίωμα των ευκαρυωτών (Gutell and Fox, 1988; Gutell et al., 1990), ένα 5.8S rRNA ( $\approx 160$  νουκλεοτίδια) στους ευκαρυώτες, το οποίο προέρχεται από ένα τμήμα του 23S των προκαρυωτών και εξακολουθεί να σχετίζεται λειτουργικά και δομικά με τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα και ένα 5S rRNA ( $\approx 120$  νουκλεοτίδια), το γονίδιο του οποίου είναι στενά συνδεδεμένο με τα υπόλοιπα rRNA σε πολλούς προκαρυώτες αλλά βρίσκεται μακριά από αυτά στο πυρηνικό γονιδίωμα των περισσότερων ευκαρυωτών (Wolters and Erdemann, 1989). Όσον αφορά τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα, αυτή περιλαμβάνει ένα rRNA, του οποίου το μέγεθος κυμαίνεται από 12S ( $\approx 900$  νουκλεοτίδια), στα μιτοχόνδρια των σπονδυλωτών, σε 16S ( $\approx 1500$  νουκλεοτίδια), στους προκαρυώτες, και έως 18S ( $\approx 1800$  νουκλεοτίδια), στους ευκαρυώτες (Neef et al., 1990) (Εικόνα 1.2). Αν και αυτές είναι οι κυριότερες μορφές rRNA, έχουν βρεθεί πολλές παραλλαγές. Τα rRNA των χλωροπλαστών και των μιτοχονδρίων μοιάζουν περισσότερο με αυτά των προκαρυωτικών προγόνων τους, παρά με αυτά των ευκαρυωτών (Evrard et al., 1990).



Εικόνα 1.2: Διαγραμματική απεικόνιση της σύστασης της μεγάλης και της μικρής υπομονάδας του ευκαρυωτικού ριβοσώματος.

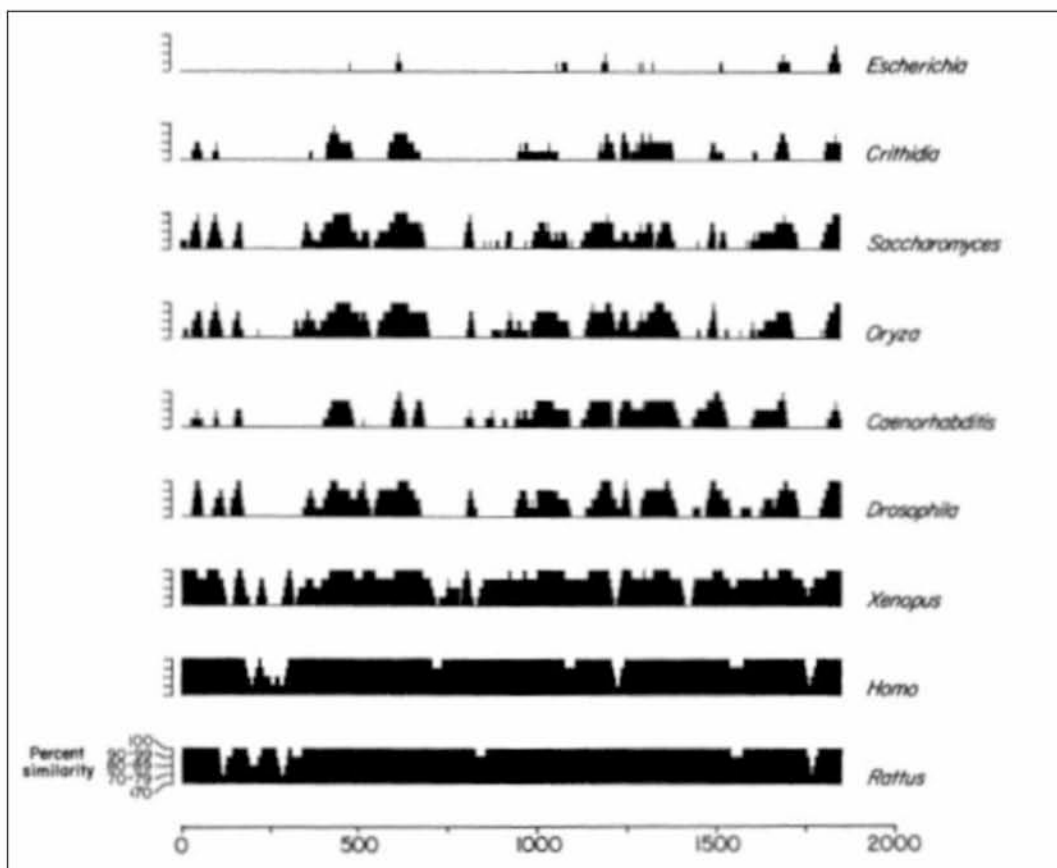
Στους ευκαρυώτες, δύο εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS: Internal Transcribed Spacer), ITS1 και ITS2, διαχωρίζουν το 18S από το 5.8S και το 5.8S από το 28S, αντίστοιχα. Ανοδικά του 18S υπάρχει ένα εξωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα, το ETS (External Transcribed Spacer). Τα μεταγραφόμενα διαστήματα περιέχουν σήματα για την επεξεργασία του rRNA μεταγράφου. Παρακείμενα αντίγραφα της rDNA συστοιχίας διαχωρίζονται από ένα μη μεταγραφόμενο διάστημα (NTS: Non Transcribed Space), που

αποκαλείται και διαγονιδιακό διάστημα (IGS: InterGenic Spacer) (Εικόνα 1.1). Αυτή η περιοχή περιέχει επαναλαμβανόμενα στοιχεία, τα οποία λειτουργούν ως ενισχυτές της μεταγραφής.

## 1.2 Εξέλιξη του rDNA και χρήση του στη φυλογενετική ανάλυση

### 1.2.1 Εξέλιξη των πυρηνικών rDNA

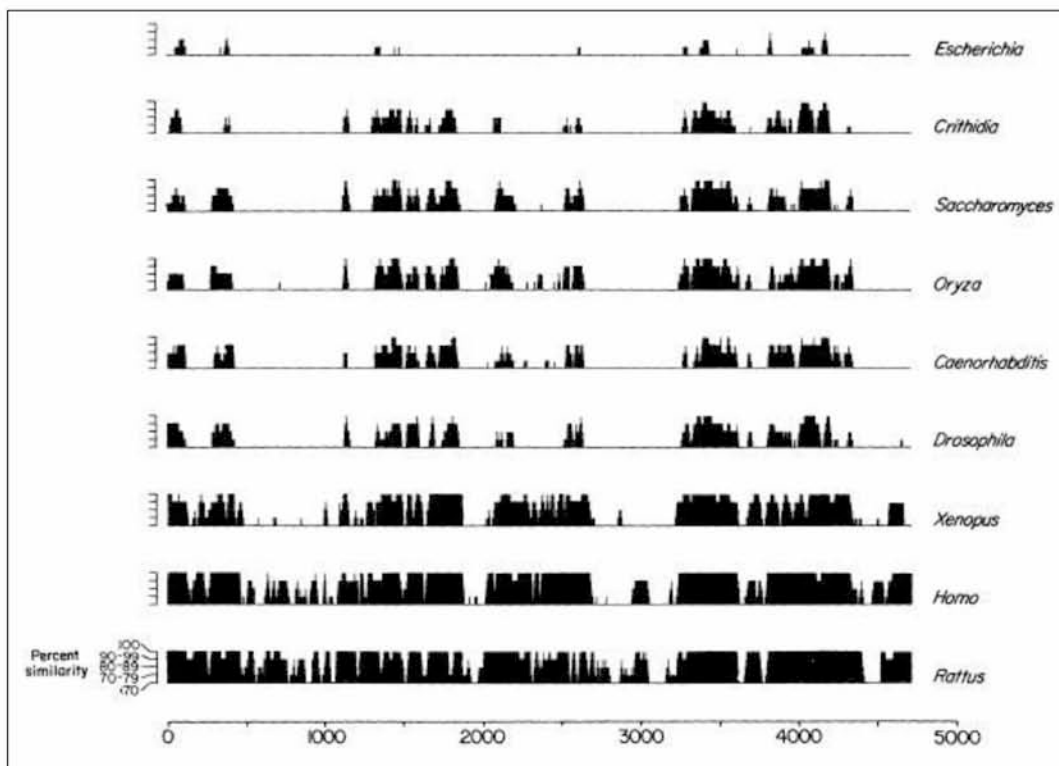
Ανάμεσα στις πολυγονιδιακές οικογένειες, η οργάνωση και η εξέλιξη των γονιδίων που κωδικοποιούν rRNA έχει μελετηθεί εκτενώς στους ευκαρυώτες. Το ενδιαφέρον για τη γονιδιακή οικογένεια του rRNA πηγάζει από τα εξής γεγονότα: (α) τα γονίδια rRNA μπορούν να αντιγράφονται ανεξάρτητα, είτε για την παραγωγή εξωχρωμοσωμικών μορίων rDNA σε πυρήνες βλαστικής σειράς είτε για την επίτευξη διαφορικής αντιπροσώπευσης του rDNA σε πολυπλοειδείς ή πολυταινικούς πυρήνες, (β) μερικά από γονίδια του 28S περιέχουν αλληλουχίες ένθεσης και (γ) ενώ η νουκλεοτιδική αλληλουχία των κωδικών περιοχών είναι διατηρημένη ανάμεσα ακόμα και σε εξελικτικά απομακρυσμένα είδη, η περιοχή του IGS διαφοροποιείται ακόμα και μεταξύ πολύ κοντινών ειδών (Beckingham, 1982).



Εικόνα 1.3: Συγκρίσεις ομοιότητας του πυρηνικού γονιδίου της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 16-18S. Οι αλληλουχίες έχουν στοιχηθεί με την αλληλουχία του *Mus musculus* (ποντικός). Η κλίμακα στον οριζόντιο άξονα δείχνει τις θέσεις των νουκλεοτιδίων στον *Mus musculus*. Τα γραφικά βασίζονται σε παράθυρο 30bp υπολογισμένο εκ νέου ανά 4bp. Οι περιοχές που είναι πιθανότερο να είναι χρήσιμες για φυλογενετική ανάλυση είναι εκείνες που παρουσιάζουν ομοιότητα από 70 έως 90%.

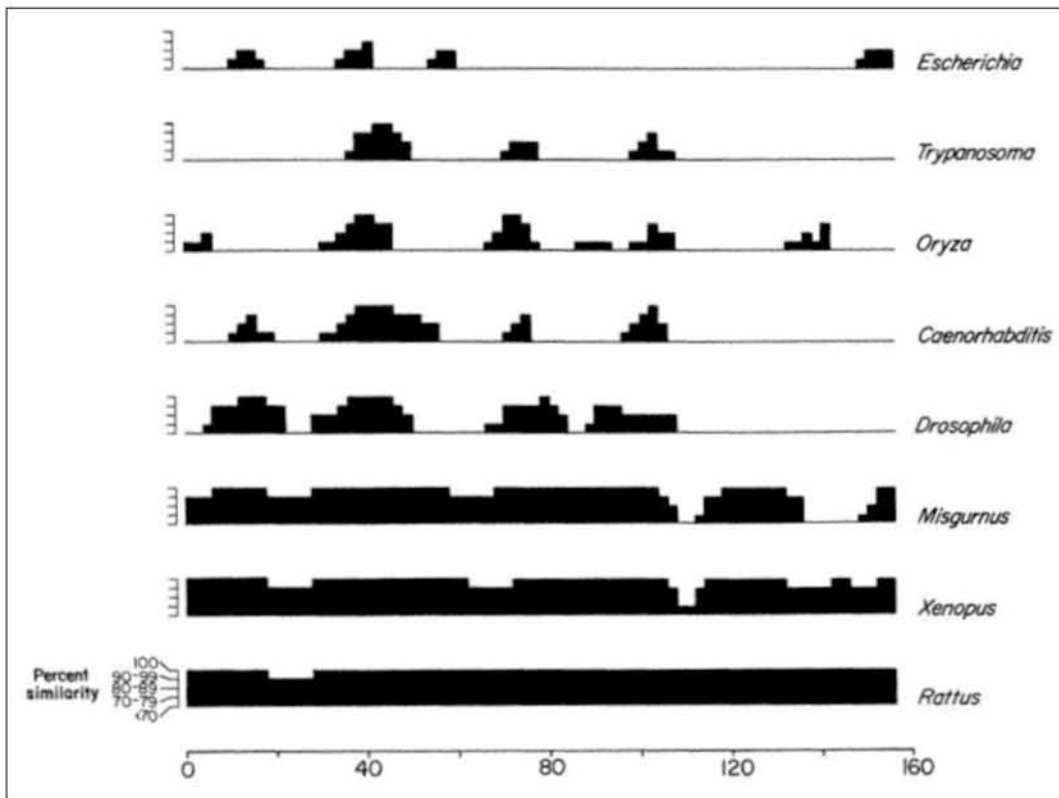
Το περισσότερο μελετημένο rDNA είναι το πυρηνικό γονίδιο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 16 ή 18S rRNA. Το γονίδιο αυτό έχει μελετηθεί περισσότερο επειδή συγκαταλέγεται στις πιο αργά

εξελισσόμενες αλληλουχίες που έχουν βρεθεί στους ζωντανούς οργανισμούς και, λόγω αυτού, έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμο για την εξέταση αρχαίων εξελικτικών γεγονότων. Επιπλέον, ο αργός ρυθμός της αλλαγής επιτρέπει το σχεδιασμό πολλών σχεδόν universal εκκινήτων, γεγονός που διευκολύνει τις προσπάθειες αλληλούχισης για είδη τα οποία δεν έχουν μελετηθεί πρωτίτερα. Όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 1.3*, η στοίχιση των αλληλουχιών του γονιδίου της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας δείχνει σχετικά λίγες μεταβλητές περιοχές ακόμη και ήδη από τη διαφοροποίηση των θηλαστικών και των αμφιβίων, περίπου 300-400 εκατομμύρια χρόνια πριν. Εάν οι συσχετισμοί στην *Εικόνα 1.3* είναι αντιπροσωπευτικοί, το γονίδιο αυτό πρακτικά δεν παρέχει χρήσιμες περιοχές για συγκρίσεις μεταξύ ταξινομικών ομάδων οι οποίες διαφοροποιήθηκαν από την Κρητιδική εποχή, ωστόσο, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία. Μεγάλο μέρος του γονιδίου είναι χρήσιμο για συγκρίσεις μεταξύ φύλων ευκαρυωτών αλλά είναι δυνατές και ορισμένες συγκρίσεις μεταξύ ευκαρυωτών και προκαρυωτών.

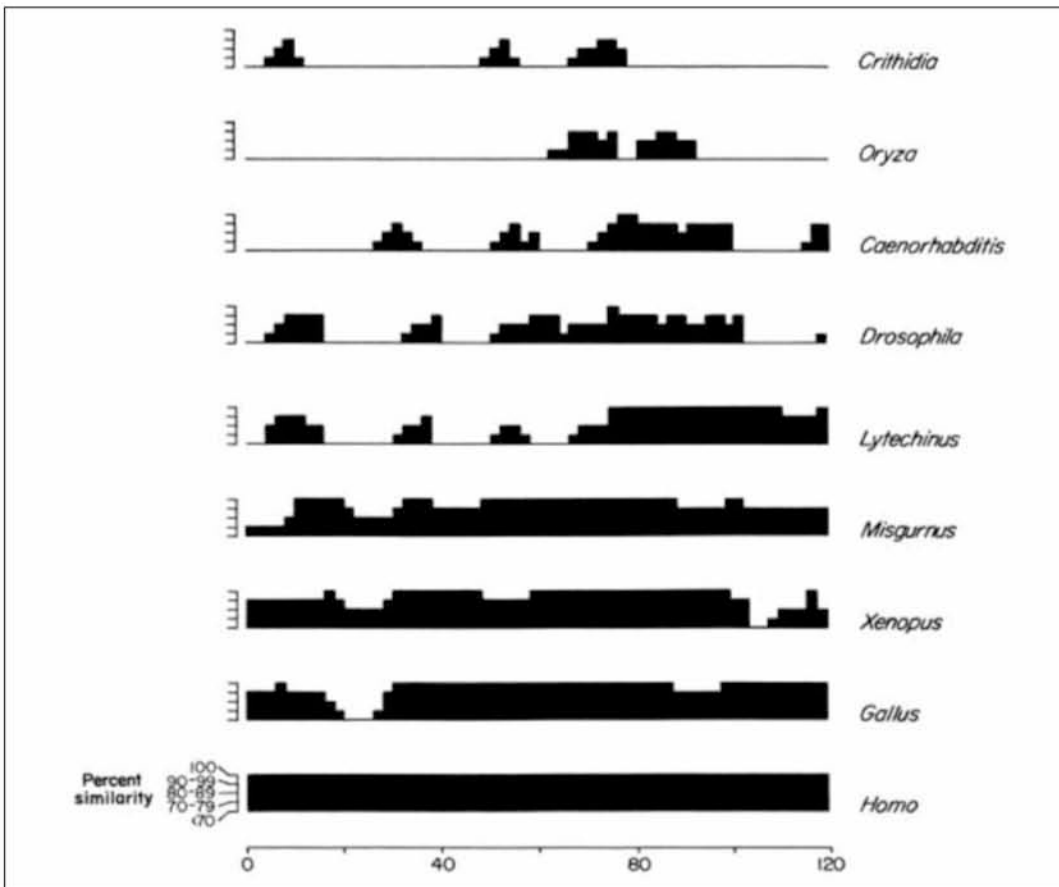


**Εικόνα 1.4:** Συγκρίσεις ομοιότητας του πυρηνικού γονιδίου της μεγάλης υπομονάδας 23-28S. (Ομοίως με *Εικόνα 1.3*).

Το πυρηνικό γονίδιο της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας 23 ή 28S rRNA είναι μεγαλύτερο και παρουσιάζει περισσότερη ποικιλομορφία στις διάφορες περιοχές του κατά την πορεία της εξέλιξης σε σχέση με αυτό της μικρής υπομονάδας (*Εικόνα 1.4*). Το γονίδιο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο για τη μελέτη γεγονότων κατά την Παλαιοζωική και τη Μεσοζωική περίοδο. Το rRNA γονίδιο της μεγάλης υπομονάδας έχει πολλές διαφορετικές περιοχές ή διευρυμμένα τμήματα (Hassouna et al., 1984), με αποτέλεσμα το μέγεθός του να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε διαφορετικά φύλα (Gutell and Fox, 1988). Αυτές οι ποικιλόμορφες περιοχές είναι χρήσιμες για την διερεύνηση σχετικά πρόσφατων γεγονότων (που συνέβησαν κατά την Καινοζωική περίοδο), ωστόσο για ταξινομικές ομάδες που έχουν διαφοροποιηθεί πιο πρόσφατα, θα πρέπει να γίνει προσεκτική επιλογή των περιοχών προς μελέτη.



Εικόνα 1.5: Συγκρίσεις ομοιότητας του πυρηνικού γονιδίου της μεγάλης υπομονάδας 5.8S. (Ομοίως με Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.6: Συγκρίσεις ομοιότητας του πυρηνικού γονιδίου της μεγάλης υπομονάδας 5S. (Ομοίως με Εικόνα 1.3).

Το γονίδιο του 5.8S rRNA των ευκαρυωτών (και η αντίστοιχη περιοχή της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας στους προκαρυώτες) μοιάζει με το γονίδιο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (16-18S) όσον αφορά τη μεγάλη φυλογενετική του χρησιμότητα (*Εικόνα 1.5*), παρόλο που το μικρό του μήκος περιορίζει την αποδοτικότητα του στην εξαγωγή συμπερασμάτων για φυλογένεση σε μεγάλες χρονικές περιόδους. Το γονίδιο αυτό παρουσιάζει πολύ μικρή ποικιλομορφία σε συγκρίσεις μεταξύ ταξινομικών ομάδων που διαφοροποιήθηκαν μετά την Παλαιοζωική περίοδο (Nazar et al., 1976). Το γονίδιο του 5S rRNA παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα ποικιλομορφίας αλλά είναι ακόμη μικρότερο σε μήκος σε σχέση με το 5.8S rRNA, με αποτέλεσμα να περιορίζεται ακόμα περισσότερο η φυλογενετική του χρησιμότητα (*Εικόνα 1.6*).

### **1.2.2 Εξέλιξη των μιτοχονδριακών rDNA**

Τα μιτοχονδριακά γονίδια rRNA εξελίσσονται με πολύ υψηλότερους ρυθμούς σε σχέση με τα πυρηνικά γονίδια rRNA και μπορούν, έτσι, να χρησιμοποιηθούν για περισσότερες συγκρίσεις μεταξύ γεγονότων που συνέβησαν κατά την Καινοζωική περίοδο. Τα γονίδια αυτά μπορούν εύκολα να ενισχυθούν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction) (Simon et al., 1991). Ακόμη και συγκρίσεις μεταξύ ταξινομικών ομάδων που έχουν διαφοροποιηθεί τα τελευταία είκοσι εκατομμύρια χρόνια μπορούν να εμφανίσουν πολλές διαφορές. Πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει επιτυχώς τα μιτοχονδριακά γονίδια rRNA για φυλογενετική ανάλυση λαμβάνοντας υπ' όψιν διάφορες πτυχές της εξέλιξης των αλληλουχιών αυτών όπως είναι η δευτεροταγής δομή και ο ρυθμός υποκατάστασης (e.g., Flook and Rowell, 1997).

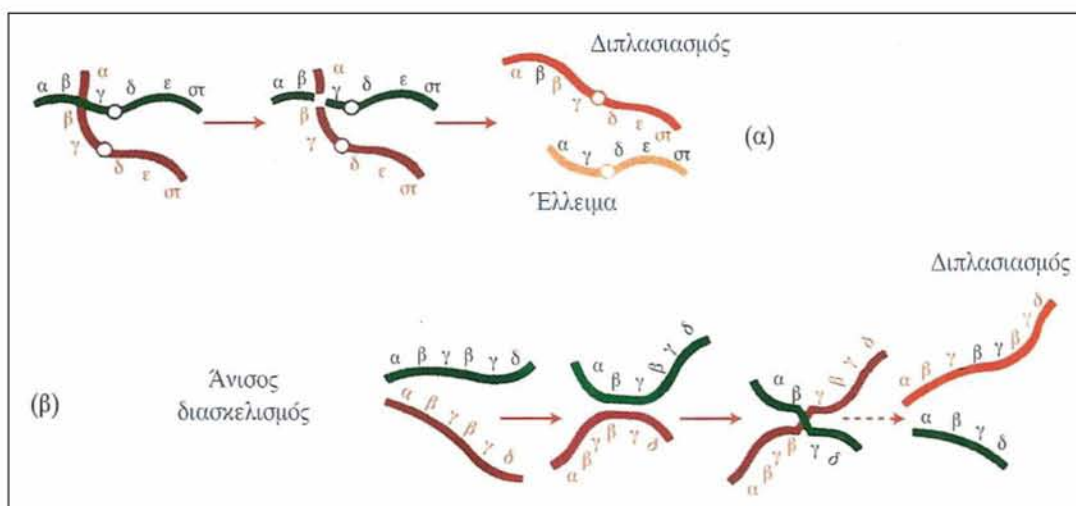
Τα διαστήματα των rDNA συστοιχιών των μιτοχονδρίων, από την άλλη, χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά σε φυλογενετικές μελέτες (Kjems and Garrett, 1990), εκτός από τις περιπτώσεις ανάλυσης περιορισμού ολόκληρων των συστοιχιών. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιοχές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα σε πολύ κοντινές ταξινομικές ομάδες (ταξινομικές ομάδες οι οποίες έχουν διαφοροποιηθεί τα τελευταία πενήντα εκατομμύρια χρόνια). Επιπλέον, η ποικιλομορφία στις περιοχές αυτές έχει χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση ειδών ή σειρών, για μελέτες υβριδισμού και ως δείκτες σε μελέτες πληθυσμιακής ανάλυσης (Baker, 1991). Μέσα στα διαστήματα αυτά, το μη μεταγραφόμενο διάστημα (NTS) εξελίσσεται γρηγορότερα (Hoshikawa et al., 1983) ενώ τα μεταγραφόμενα διαστήματα είναι πιο διατηρημένες περιοχές (Furlong and Maden, 1983). Η ενίσχυση των δύο εσωτερικών μεταγραφόμενων διαστημάτων μέσω PCR, διευκολύνεται από τις διατηρημένες παρακείμενες περιοχές των γονιδίων των 18S, 5.8S και 28S, με αποτέλεσμα τα διαστήματα αυτά να χρησιμοποιούνται εύκολα σε μελέτες που αφορούν συγγενικά είδη.

### **1.2.3 Συγχρονισμένη εξέλιξη**

Από τη στιγμή που τα πυρηνικά γονίδια rRNA ξεκίνησαν να μελετώνται εις βάθος, έγινε φανερό ότι τα πολλαπλά αντίγραφα δεν εξελίσσονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο αλλά σε συγχρονισμό (Arnheim, 1983). Με πιο απλά λόγια, κάθε αντίγραφο μιας rRNA συστοιχίας μοιάζει, συνήθως, πολύ με τα άλλα αντίγραφα εντός των ατόμων και των ειδών, παρόλο που οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ διαφορετικών ειδών συσσωρεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές της συστοιχίας. Οι διαφορές των συστοιχιών μεταξύ ατόμων οφείλονται κυρίως σε ποικιλομορφία μήκους (length variation) στις μη μεταγραφόμενες περιοχές

(NTS), ενώ σπανιότεροι πολυμορφισμοί μήκους συναντώνται, επίσης, εντός των ατόμων μεταξύ των πολλαπλών αντιγράφων των γονιδίων (Gonzales et al., 1985). Παρ' όλα αυτά, η μικρή ποικιλομορφία ανάμεσα στις συστοιχίες rDNA, εντός των ατόμων, υποδεικνύει ότι τα πολλαπλά αντίγραφα υπόκεινται σε ομογενοποίηση μέσω επιχιασμών ανάμεσα σε ομόλογα και μη ομόλογα χρωμοσώματα. Το φαινόμενο της ομογενοποίησης αυτής ονομάζεται συγχρονισμένη εξέλιξη.

Πολλές διαδικασίες φαίνεται να είναι υπεύθυνες για τη συγχρονισμένη εξέλιξη αλλά οι σημαντικότερες αυτών φαίνεται να είναι ο άνισος επιχιασμός και η γονιδιακή μετατροπή. Πιο συγκεκριμένα, ο άνισος επιχιασμός είναι το αποτέλεσμα λαθεμένου ζευγαρώματος και νέων διπλασιασμών, με ταυτόχρονη δημιουργία ελλείμματος μιας άλλης περιοχής (Εικόνα 1.7). Σε μοριακό επίπεδο, ο άνισος επιχιασμός και η γονιδιακή μετατροπή σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό, ενώ σε χρωμοσωμικό επίπεδο, έχουν διαφορετικές επιπτώσεις. Τόσο ο άνισος επιχιασμός όσο και η γονιδιακή μετατροπή προκαλούν άνιση ανταλλαγή επειδή αντανακλούν μη αμοιβαίο ανασυνδυασμό, ο οποίος συμβαίνει μεταξύ αλυσίδων, οδηγώντας σε σύγκλιση αλληλουχιών, και όχι μεταξύ χρωματίδων όπως γίνεται στον αμοιβαίο ανασυνδυασμό.

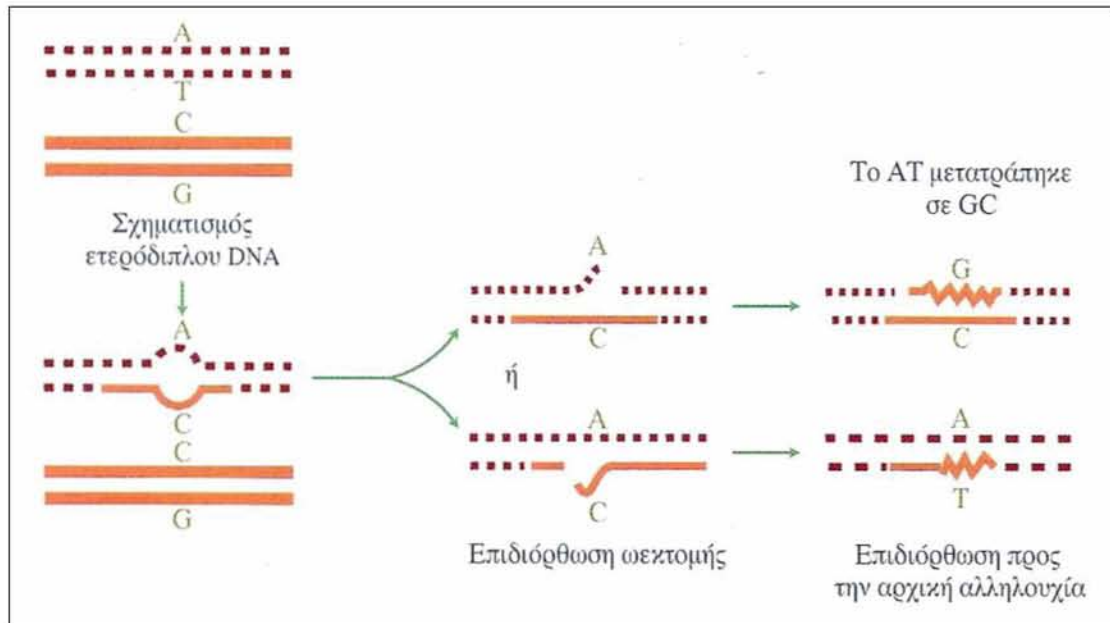


**Εικόνα 1.7:** Σχηματική αναπαράσταση του άνισου επιχιασμού. (α) Λαθεμένο ζευγάρι και διπλασιασμός. (β) Νέο λαθεμένο ζευγάρι που μπορεί να συμβεί με μεγαλύτερη πιθανότητα.

Κατά τη γονιδιακή μετατροπή, το ένα από τα αλληλόμορφα ενός γενετικού τόπου μετατρέπεται προς το άλλο, αλλά όχι με μετάλλαξη. Η γονιδιακή μετατροπή είναι μια μη αμοιβαία διεργασία ανασυνδυασμού, όπου δύο αλληλουχίες αντιδρούν με τέτοιο τρόπο που η μία μετατρέπεται από την άλλη, με αποτέλεσμα το ένα χρωμόσωμα να γίνεται πιο ομοιογενές, ενώ το άλλο να μην αλλάζει (Εικόνα 1.8). Σε σχέση με τον άνισο επιχιασμό, η γονιδιακή μετατροπή δεν προκαλεί αλλαγή του αριθμού των γονιδίων, αλλά της ταυτότητάς τους. Ο άνισος επιχιασμός επηρεάζει μόνο τα διαδοχικά επαναλαμβανόμενα γονίδια, ενώ η γονιδιακή μετατροπή μπορεί να συμβεί και μεταξύ γονιδίων που απέχουν πολύ μεταξύ τους (Αλαχιώτης, 2007).

Η σχετική συνεισφορά των δύο αυτών μηχανισμών είναι ακόμη αμφισβητούμενη αν και κάποιες από τις μέχρι τώρα μελέτες έχουν κάνει διάκριση ανάμεσα στις δύο διαδικασίες. Ο άνισος επιχιασμός είναι πιθανόν πιο σημαντικός λόγω του ότι μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό ή την εξάλειψη πολλών επαναλήψεων αμέσως ενώ τα γεγονότα της γονιδιακής μετατροπής φαίνεται να επηρεάζουν μία ή λίγες επαναλήψεις (Seperack et al. 1988). Από την άλλη, σύμφωνα με τους Lassner και Dvorak (1986), η

κατανομή των μεταλλάξεων στα επαναλαμβανόμενα στοιχεία των μη μεταγραφόμενων διαστημάτων (NTS) υποδεικνύει τη γονιδιακή μετατροπή ως μηχανισμό ομογενοποίησης.



**Εικόνα 1.8:** Γονιδιακή μετατροπή. Ένα λαθεμένα ταιριασμένο ετερόδιπλο μόριο (AC) επιδιορθώνεται πριν από τη μείωση προς GC.

Όποιος κι αν είναι ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την παρατηρούμενη συγχρονισμένη εξέλιξη των συστοιχιών rDNA, το φαινόμενο αυτό έχει πολλές επιπτώσεις στη φυλογενετική ανάλυση. Ένας ιδανικός φυλογενετικός δείκτης πρέπει να εξελίσσεται ανάμεσα σε διαφορετικά είδη αλλά να παρουσιάζει μικρή ενδοειδική ποικιλομορφία σε σχέση με τη διαειδική. Για τα περισσότερα γονίδια που βρίσκονται σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα, τα υψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών συνήθως συνοδεύονται με μεγάλη ποικιλομορφία και ενδοειδικά, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη εκτεταμένη δειγματοληψία (μεταξύ ατόμων και πληθυσμών) για το χαρακτηρισμό ειδών. Όσον αφορά τα rDNA γονίδια, παρόλο που υπάρχει ενδοειδική ποικιλομορφία, αυτή μειώνεται σημαντικά σε σχέση με αυτό που είναι αναμενόμενο με βάση τις παρατηρήσεις της διαειδικής ποικιλομορφίας, λόγω της συγχρονισμένης εξέλιξης. Έτσι, παρόλο που είναι σωστότερη η εκτεταμένη ενδοειδική δειγματοληψία για μελέτες συγγενικών ειδών, στις περισσότερες φυλογενετικές αναλύσεις του rDNA, είναι αρκετή η χρήση δείγματος σχετικά μικρού μεγέθους (Baverstock and Moritz, 1990).

Ένα ακόμα πλεονέκτημα μιας ομογενοποιημένης οικογένειας γονιδίων πολλών αντιγράφων είναι η ευκολία στην ανάλυση. Εφόσον το rRNA είναι τόσο άφθονο και ομοιόμορφο, μπορεί να αλληλουχηθεί άμεσα με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης. Επίσης, τα πολλαπλά αντίγραφα και οι διατηρημένες θέσεις περιορισμού βοηθούν στη γρήγορη κλωνοποίηση των rDNA επαναλήψεων και στην ενίσχυση περιοχών του rDNA με PCR. Τέλος, διευκολύνεται πολύ η ανάλυση περιορισμού με χρήση στυπώματος Southern λόγω του μεγάλου αριθμού σχετικά ομοιόμορφων θραυσμάτων.

Η συγχρονισμένη εξέλιξη, ωστόσο, αναμφίβολα θέτει και κάποιους περιορισμούς στη φυλογενετική ανάλυση. Υπάρχουν στοιχεία ότι η ομογενοποίηση μπορεί επίσης να συμβεί μέσα και ανάμεσα στις rDNA επαναλήψεις (Hancock and Dover, 1988). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η ομοιότητα στην αλληλουχία μεταξύ διαφορετικών περιοχών του rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας είναι συχνά μεγαλύτερη

από ό, τι θα αναμενόταν εάν οι περιοχές εξελίσσονταν ανεξάρτητα. Εάν αυτές οι περιοχές συν-εξελίσσονται, τότε οι θέσεις συγκεκριμένων αλληλουχιών μέσα στις περιοχές αυτές δεν μπορούν να ληφθούν ως ανεξάρτητοι χαρακτήρες στη φυλογενετική ανάλυση αφού παίζουν σημαντικό ρόλο στη δευτεροταγή δομή του rRNA στο ριβόσωμα.

#### **1.2.4 Η χρησιμότητα του rDNA στη φυλογενετική ανάλυση**

Ένας από τους λόγους για τους οποίους το rDNA είναι χρήσιμο στη φυλογενετική ανάλυση είναι το γεγονός ότι διαφορετικές περιοχές της rDNA επανάληψης εξελίσσονται με πολύ διαφορετικούς ρυθμούς. Έτσι, οι περιοχές των rDNA συστοιχιών οι οποίες είναι ικανές να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες μέσα από τη δομή και τη σύνθεσή τους μπορούν να χρησιμεύσουν στην ανάλυση. Ακόμη, οι περιοχές με πολύ διατηρημένη αλληλουχία στα περισσότερα rRNA γονίδια είναι πολύ χρήσιμες για το σχεδιασμό universal εκκινητών οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αλληλούχιση rRNA ή rDNA από διάφορα είδη, για την ενίσχυση περιοχών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον μέσω της PCR ή για τη χρήση του ως ανιχνευτές σε αναλύσεις περιορισμού. Παρόλο που η ενδοειδική ποικιλομορφία μήκους προκαλεί προβλήματα στην άμεση αλληλούχιση του ενισχυμένου DNA σε μερικές περιοχές της επανάληψης, το ενισχυμένο DNA μπορεί να κλωνοποιηθεί και να αλληλοχρηθεί σχετικά εύκολα.

Η διαδικασία επιλογής μιας περιοχής που είναι πιθανό να δώσει απαντήσεις σε ένα συγκεκριμένο ζήτημα είναι ίσως το πιο κρίσιμο βήμα στη φυλογενετική ανάλυση. Εάν η περιοχή που έχει επιλεγεί είναι εξελικτικά πολύ συντηρημένη, τότε η συλλογή μη πληροφοριακών δεδομένων θα πάρει πολύ χρόνο χωρίς να αποφέρει κάποιο αποτέλεσμα. Από την άλλη, περιοχές που διαφέρουν τόσο μεταξύ των ταξινομικών ομάδων ώστε να είναι αμφισβητούμενη ή και αδύνατη η στοίχισή τους, είναι επίσης απίθανο να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη φυλογένεια. Έτσι, από τη στιγμή που η στοίχιση ομόλογων αλληλουχιών βασίζεται στη φυλογενετική ανάλυση, είναι καλύτερο να μη λαμβάνονται υπ' όψιν περιοχές όπου η στοίχιση είναι αμφισβητούμενη. Κάποιες γενικές πληροφορίες σχετικά με τις περιοχές που είναι περισσότερο ή λιγότερο συντηρημένες στα rRNA γονίδια μπορούν αντληθούν από τις *Εικόνες 1.3-1.6*. Δεδομένα τέτοιου τύπου μπορούν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμα στην επιλογή κατάλληλων περιοχών προς μελέτη, ανάλογα με το ζητούμενο (Hillis and Dixon, 1991).

Πιο συγκεκριμένα, το rRNA γονίδιο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (16-18S) έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο από κάθε άλλη rDNA αλληλουχία, γεγονός που οφείλεται στο ότι είναι το rDNA γονίδιο που παρουσιάζει την πιο αργή εξέλιξη και παρ' όλα αυτά, είναι χρήσιμο είναι ικανό να δώσει απαντήσεις σε ζητήματα που αφορούν αρχαία εξελικτικά γεγονότα. Μελέτες πάνω στις παλαιότερες διακλαδώσεις της ζωής έχουν επικεντρωθεί στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και έχουν δείξει την εκτενή φυλογενετική ποικιλομορφία ανάμεσα στους προκαρυώτες. Ως αποτέλεσμα αυτών των μελετών είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι οι προκαρυώτες δεν αποτελούν μια φυσική ομάδα. Επιπλέον, οι rDNA αλληλουχίες της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας έχουν παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποσαφήνιση των σχέσεων μεταξύ των Αρχαιοβακτηρίων και των Ευβακτηρίων, καθώς και μεταξύ των βασικών ευκαρυωτών.

Όσον αφορά το γονίδιο του 28S rRNA, αυτό περιλαμβάνει περιοχές που εξελίσσονται γρηγορότερα σε σχέση με το rRNA γονίδιο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, καθώς και κάποιες περιοχές που εξελίσσονται το ίδιο αργά με αυτό. Έτσι, η αλληλουχία του 28S rRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για



την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ περισσότερο συγγενικών οργανισμών. Σε σχέση με το rRNA γονίδιο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, οι συγκριτικές μελέτες πάνω στο 28S rRNA είναι λιγότερες. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες συμφωνούν με τις παραδοσιακές αντιλήψεις για τη φυλογένεια των σπονδυλωτών, παρόλο που έχουν σημειωθεί και ορισμένες διαφωνίες.

Τα 5S και 5.8S rRNA γονίδια είναι πολύ μικρά σε μήκος με αποτέλεσμα ο αριθμός των πληροφοριακών περιοχών να είναι σχετικά περιορισμένος για τις περισσότερες μελέτες. Παρ' όλα αυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη διερεύνηση σχέσεων μεταξύ κύριων φύλων των ευκαρυωτών (e.g. Steele et al., 1991). Συγκρίσεις σε ένα ευρύ φάσμα της ζωής αποκαλύπτουν ότι τουλάχιστον κάποιες περιοχές εξελίσσονται αργά και μπορούν να στοιχηθούν σε όλους τους όλους οργανισμούς. Ωστόσο, αυτές οι αλληλουχίες συνήθως είναι πολύ μικρές για να χρησιμοποιηθούν από μόνες τους και να δώσουν βάσιμα φυλογενετικά αποτελέσματα.

Τέλος, τα rRNA γονίδια των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών έχουν παίξει κύριο ρόλο στην αποσαφήνιση της προέλευσης της ενδοσυμβίωσης από αυτά τα οργανίδια (e.g. Evrard et al., 1990). Επιπλέον, αυτές οι αλληλουχίες μπορούν να μελετηθούν εντός μιας συγκεκριμένης ομάδας για να διαφωτίσουν τις φυλογένειες περισσότερο συγγενικών ταξινομικών ομάδων.

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται μερικές περιοχές που χρησιμοποιούνται στη μοριακή ανάλυση και σε ποιους τομείς παρέχουν περισσότερη πληροφορία:

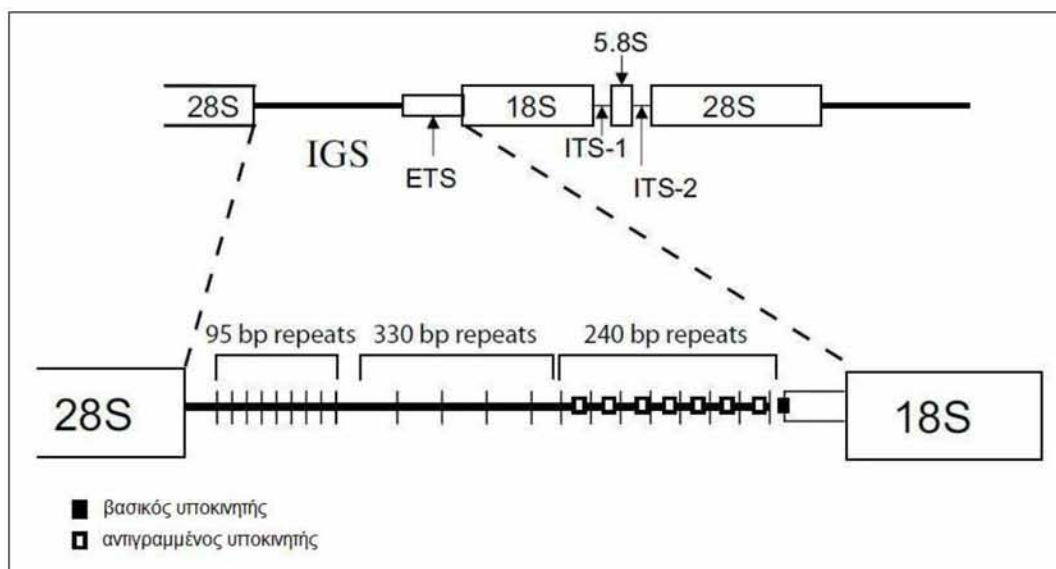
Περιοχή	Βέλτιστη χρήση
rDNA	φυλογενετική ανάλυση (διαφορετικές περιοχές, διαφορετική χρησιμότητα)
mtDNA	πληθυσμιακή/γυλογενετική ανάλυση
μικροδορυφόροι	γενετική χαρτογράφηση, πληθυσμιακή ανάλυση
μινιδορυφόροι	fingerprinting, ανάλυση σύνδεσης, χαρτογράφηση γονιδίων
γονίδια μονού αντιγράφου	μελέτη οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων
ιντρόνια	φυλογενετική ανάλυση, εξελικτικές αποστάσεις

## 1.3 Δυνατότητες ανάλυσης του IGS

### 1.3.1 Δομή του IGS

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα ριβοσωμικά γονίδια μεταγράφονται με υψηλούς ρυθμούς λόγω της μεγάλης σημασίας των ριβοσωμάτων στην πρωτεϊνοσύνθεση, την κυτταρική αύξηση και την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Η δομή του IGS φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επίτευξη αυτών των υψηλών ρυθμών. Το IGS ποικίλει σε μήκος από περίπου 2kb στις ζύμες έως 21kb στα θηλαστικά και, επίσης, είναι πολύ ποικιλόμορφο μεταξύ και εντός ατόμων του ίδιου είδους (Moss and Stefanovsky, 1995). Εκτείνεται από το 3' άκρο του 28S rRNA γονιδίου του πρώιμου μεταγράφου έως την αρχή του ETS και αποτελείται κυρίως από μοναδικές αλληλουχίες, στα 5' και 3' άκρα του, και από μία ή περισσότερες ομάδες ταυτόσημων ή σχεδόν ταυτόσημων εσωτερικών επαναλήψεων, στο εσωτερικό του. Αυτές οι εσωτερικές επαναλήψεις

μπορούν να κυμαίνονται, σε μήκος, από μερικές δεκάδες σε πολλές εκατοντάδες bp. Ο αριθμός των αντιγράφων μιας συγκεκριμένης εσωτερικής επανάληψης μπορεί, επίσης, να διαφέρει ανάμεσα στις rDNA συστοιχίες ενός οργανισμού, παρόλο που οι αλληλουχίες των εσωτερικών επαναλήψεων υπόκεινται στην ομογενοποίηση που ασκείται και στις ίδιες τις συστοιχίες (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Διαγραμματική απεικόνιση της rDNA συστοιχίας στη *Drosophila melanogaster* όπου φαίνονται κάποιες από τις εσωτερικές επαναλήψεις και τα αντίγραφα της αλληλουχίας του υποκινητή.

Στους ευκαρυώτες, μερικές από αυτές τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες περιέχουν αντίγραφα της αλληλουχίας του υποκινητή του rDNA τόπου (Moss and Stefanovsky, 1995). Αυτά τα αντίγραφα φαίνεται να ενισχύουν τη μεταγραφή του rDNA. Για παράδειγμα, στη *Drosophila melanogaster* (Εικόνα 1.9), η ενεργότητα του υποκινητή του rDNA σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των εσωτερικών επαναλήψεων του IGS που περιέχουν αντίγραφο αλληλουχίας του υποκινητή (Grimaldi and Nocera, 1988; Grimaldi et al., 1990). Μελέτες επιλογής επίσης, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η δομή του IGS είναι σημαντική για τη μεταγραφή του rDNA και συνεπώς και του ρυθμού ανάπτυξης. Από μελέτες πάνω σε σειρές *Drosophila melanogaster* και *Daphnia pulex* με γρήγορη ανάπτυξη, έχει βρεθεί κάποια σχέση μεταξύ του μήκους του IGS και του ρυθμού ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, οι σειρές αυτές είχαν κατά μέσο όρο μεγαλύτερο μήκος IGS, οφειλόμενο σε εσωτερικές επαναλήψεις με αντίγραφα της αλληλουχίας του υποκινητή, σε σχέση με τις σειρές που παρουσίαζαν χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης (Cluster et al., 1987; Gorokhova et al., 2002; Rocheford et al., 1990). Επιπλέον, μεγαλύτερα διαστήματα στις rDNA συστοιχίες έχουν συσχετισθεί με υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης σε πολλά είδη *Daphnia* (Weider et al., 2004). Παρόλο που αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι το μήκος του IGS έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ιστορία της ζωής, η εξελικτική σημασία του μήκους του IGS δεν έχει ακόμα κατανοηθεί πλήρως.

### 1.3.2 Εξέλιξη του IGS

Ακόμα και σε μικρές εξελικτικές αποστάσεις ο χιμαιρικός χαρακτήρας του IGS είναι προφανής. Για παράδειγμα, IGS αλληλουχίες από άτομα *Aedes* και *Chironomus* χαρακτηρίζονται από ταχεία επέκταση ή κατάργηση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Η πρόκληση είναι να προσδιοριστούν τα

χαρακτηριστικά των αλληλουχιών που προσδίδουν στο IGS τέτοια δυναμική συμπεριφορά. Προηγούμενες εξελικτικές μελέτες στο IGS, μεταξύ και εντός ατόμων και πληθυσμών του *Daphnia pulex*, έδειξαν ότι η γονιδιακή μετατροπή και ο άνισος επιχιασμός στο IGS συμβαίνουν στο επίπεδο των εσωτερικών επαναλήψεων αλλά και στο επίπεδο ολόκληρης της συστοιχίας του rDNA (Crease, 1995). Σε μερικές περιπτώσεις, η ομοιογένεια των επαναλήψεων μπορεί να είναι αποτέλεσμα πρόσφατων γεγονότων ενίσχυσης και όχι μακροχρόνιας ομογενοποίησης μιας υπάρχουσας αλληλουχίας (Liao, 1999). Αυτό, όμως, δεν μπορεί να διευκρινισθεί χωρίς να πραγματοποιηθεί σύγκριση με αλληλουχία από πολύ συγγενικό είδος. Οι επαναλήψεις που βρίσκονται στο τέλος μιας συστοιχίας εμπλέκονται πιο σπάνια στη διαδικασία της ομογενοποίησης, σε σχέση με τις ομόλογές τους που βρίσκονται πιο ανοδικά (Lassner and Dvorak, 1986; Dvorak et al., 1987; Da Rocha and Bertrand 1995).

Έχει δειχθεί ότι οι ρυθμοί ανασυνδυασμού παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομογενοποίηση ή στη διαφοροποίηση των επαναλαμβανόμενων αντιγράφων στις οικογένειες γονιδίων που βρίσκονται σε πολλά αντίγραφα στο γονιδίωμα (Dover and Tautz, 1986). Οι ρυθμοί ανασυνδυασμού μπορούν να επηρεαστούν από παραμέτρους, όπως το μήκος της συστοιχίας, η δομή και το μήκος των επαναλήψεων, οι επαναλήψεις που περιέχουν αντίγραφα της αλληλουχίας του υποκινητή καθώς και αλληλουχίες με δράση ενισχυτή (Ambrose and Crease, 2010). Δεν έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο μήκος των συστοιχιών και την ομοιογένεια, ωστόσο, η οργάνωση των εσωτερικών επαναλήψεων παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή. Επιπλέον, η ενδοειδική ποικιλομορφία μήκους του IGS εξαιτίας του διαφορετικού αριθμού εσωτερικών επαναλήψεων αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των ευκαρυωτών (Weider et al. 2005). Οι παράλληλες και συνεχείς επαναλήψεις είναι περισσότερο ομοιογενείς σε σχέση με τις διάσπαρτες, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο εφόσον ο ανασυνδυασμός συμβαίνει συχνότερα ανάμεσα σε αλληλουχίες που βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη.

Πέρα από την επίδραση στην ταξινόμηση, ο ρυθμός ανασυνδυασμού έχει σημαντική επίδραση και στην παρουσία αλληλουχιών με δράση ενισχυτή ή υποκινητή που φέρουν μοτίβα TATA. Εδώ, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι, σε αυτό το αποτέλεσμα της συγχρονισμένη εξέλιξης, συμβάλλει και η φυσική επιλογή που ωθεί στη διατήρηση αυτών των περιοχών. Επίσης, παρόλο που το IGS είναι μη κωδική περιοχή, τα «ενεργά» αντίγραφα του φέρουν περιοχές πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης I, καθώς και περιοχές που ελέγχονται με μεθυλίωση και φαίνεται να επηρεάζουν τον ανασυνδυασμό και την ομοιογένεια (Jiang and Liao, 1999).

Η παρουσία περιοχών με δράση ενισχυτή ή υποκινητή στο IGS ομόλογων rDNA συστοιχιών υποδεικνύει ότι η φυσική επιλογή όντως παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των επαναλήψεων του IGS. Μάλιστα, μελέτες έχουν δείξει ότι η ετερογένεια του αριθμού των επαναλήψεων του IGS μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό ανάπτυξης και την αντοχή σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μέσω της επίδρασης που έχει στο ρυθμό μεταγραφής του rDNA (Weider et al., 2005). Όσον αφορά τις επαναλήψεις IGS που δεν περιέχουν μοτίβα TATA, είναι πιθανό ο επαναλαμβανόμενος χαρακτήρας του IGS από μόνος του να προωθεί τη μεταγραφή (Grummit, 1999, Reeder, 1999). Από την άλλη, πάλι, υποστηρίζεται ότι δεν είναι απαραίτητο οι ενισχυτές να απαντώνται σε πολλά αντίγραφα για να δράσουν (Wang et al., 2003; Burton et al., 2005). Συνεπώς, είδη των οποίων το IGS φέρει εσωτερικές επαναλήψεις οι οποίες εμφανίζονται σε κάποιες συστοιχίες και σε άλλες όχι, μπορεί να έχουν εξελιχθεί σε έναν επιπλέον τρόπο ρύθμισης της μεταγραφής του rDNA.

### 1.3.3 Χρήση του IGS ως πηγή διαγνωστικών

Η ποικιλομορφία μήκους του IGS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη της δυναμικής πληθυσμών σε πολλούς οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του σε πληθυσμιακές μελέτες κουνουπιών του γένους *Anopheles*, των κύριων φορέων ελονοσίας, έχει βοηθήσει πολύ στη λήψη μέτρων για προφύλαξη από την ασθένεια, μέσω της κατανόησης της μετανάστευσης των κουνουπιών (e.g. Kumar and Rai, 1993; Collins and Paskewitz, 1996; Carlos et al., 2000; Caruto et al., 2011). Λόγω της ιδιαίτερης δομής του, το IGS έχει χρησιμεύσει στην εύρεση μοριακών δεικτών (e.g. Caruto et al., 2011), στο φυλοδιαχωρισμό (e.g. Collins and Paskewitz, 1996), στη μελέτη του ρυθμού της εξέλιξης, στην κατανόηση της δράσης της ομογενοποίησης μέσω της συγχρονισμένης εξέλιξης (e.g. Ambrose and Crease, 2009) καθώς και στην εύρεση χρήσιμων μονοπατιών για τη ρύθμιση της μεταγραφής του rDNA (e.g. Gonzalez-Barrera et al., 2002) και, συνεπώς, και της ανάπτυξης.

Το IGS δεν παρέχει πολλή πληροφορία για φυλογενετική ανάλυση, παρά μόνο για πολύ κοντινές ταξινομικές ομάδες (διαχωρισμός υποειδών). Από την άλλη, ως περιοχή γρήγορα εξελισσόμενη και με πολλές επαναλαμβανόμενες περιοχές και ποικιλομορφίες μήκους, φαίνεται να είναι ιδανική για την εύρεση διαγνωστικών δεικτών που θα οδηγήσει στον εύκολο διαχωρισμό ανάμεσα σε πολύ κοντινές ταξινομικές ομάδες (υποείδη), όταν, μάλιστα, είναι αδύνατη η διάκριση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του οργανισμού. Οι ειδοειδικές διαφορές που παρουσιάζονται στο IGS συχνά αντικατοπτρίζουν διαφορετικές προελεύσεις και ιδιότητες του οργανισμού (π.χ. προσβολή από παράσιτα, αντίδραση σε εντομοκτόνα – *Anopheles*).

## 1.4 Ο δάκος της ελιάς

### 1.4.1 Περιγραφή του δάκου

Ο δάκος (*Bactocera oleae*) είναι ο κύριος εχθρός της ελιάς αφού, με την απόθεση των αυγών του πάνω στον καρπό της ελιάς, προκαλεί απώλεια στη συγκομιδή ~30%. Προσβάλλει αποκλειστικά τους καρπούς της ήμερης και της άγριας ελιάς. Εμφανίζεται στη λεκάνη της Μεσογείου, τη βόρεια, ανατολική και νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, βόρεια Ινδία, βορειοδυτικό Πακιστάν και όπου αλλού υπάρχει ελαιόδεντρο στο Ανατολικό ημισφαίριο. Πρόσφατα, εντοπίστηκε και στην Καλιφόρνια (βλέπε παρακάτω). Τόσο τα ενήλικα έντομα όσο και οι κάμπιες, είναι σε θέση να προκαλέσουν ζημιές. Η κάμπια του δάκου διατρέφεται μέσα στον καρπό, καταστρέφοντας το σαρκώδες μέρος του και επιτρέποντας την εισχώρηση δευτερευόντων βακτηρίων και μυκήτων που προκαλούν σήψη στον καρπό και υποβαθμίζουν την ποιότητα και τη γεύση του ελαίου. Η σίτιση του εντόμου από τον καρπό προκαλεί την πρόωρη πτώση του καρπού και υποβαθμίζει την ποιότητα τόσο της επιτραπέζιας ελαίας όσο και την παραγωγή ελαιολάδου. Οι προσβεβλημένοι καρποί φέρουν μικρές τριγωνικές κηλίδες που δε φαίνονται με την πρώτη ματιά.

Το ενήλικο άτομο έχει μήκος περίπου 6mm και άνοιγμα φτερών περίπου 10mm. Το κεφάλι, ο θώρακας και το υπογάστριο έχουν καφέ χρώμα, με σκουρότερα στίγματα και αρκετά λευκά ή κίτρινα μπαλώματα στην κορυφή και στα πλευρά του θώρακα. Τα φτερά του είναι τοποθετημένα οριζόντια, κυρίως διαφανή, με καφέ στίγματα και μακριά από το σώμα. Ο δάκος διακρίνεται από τα μαύρα στίγματα στις άκρες

των φτερών και την απουσία λωρίδων στα φτερά. Τα θηλυκά έχουν μήκος περίπου 5mm, άνοιγμα φτερών περίπου 10mm και διακρίνονται από τα αρσενικά από μια σκούρα σύνθεση στο άκρο του υπογαστρίου τους, που χρησιμεύει για να διατρυπούν τον ελαιόκαρπο και να εναποθέτουν εκεί τα αυγά τους. Συνήθως μόνο ένα αυγό εναποτίθεται ανά καρπό (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10: Φωτογραφία εντόμων *Bactrocera oleae*. Αριστερά φαίνεται το αρσενικό και δεξιά το θηλυκό.

Συνήθως, εναποτίθενται πολλά αυγά σε εκείνες τις ποικιλίες της ελιάς που παράγουν μεγάλους καρπούς αφού τα θηλυκά τους προτιμούν για να εναποθέσουν τα αυγά τους. Οι κάμπιες είναι λευκοκίτρινες και άποδες. Όταν εκκολαφθούν, είναι λεπτές και δυσδιάκριτες, όταν, όμως, σιτιστούν για κάποιο χρονικό διάστημα εντοπίζονται ευκολότερα, ιδιαίτερα όταν ο καρπός αρχίσει να σαπίζει. Το στάδιο της κάμπιας διεξάγεται ολόκληρο εντός του καρπού (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11: Προσβεβλημένος καρπός ελιάς όπου φαίνεται η κάμπια του δάκου.

#### 1.4.2 Κύκλος της ζωής του δάκου

Στην περιοχή της Μεσογείου, εμφανίζονται κάθε χρόνο δύο έως πέντε γενιές. Το έντομο περνά το χειμώνα σε κουκούλι, αρκετά εκατοστά κάτω από το έδαφος και το στρώμα των φύλλων. Τα ενήλικα έντομα εμφανίζονται την άνοιξη, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και τη θερμοκρασία. Τα αυγά εναποτίθενται στον ωριμάζοντα καρπό όταν αρχίζουν να σκληραίνουν τα κουκούτσια (ένα αυγό ανά καρπό, ποτέ παραπάνω). Τον Ιούλιο, τα θηλυκά αρχίζουν να δραστηριοποιούνται και να εναποθέτουν τα αυγά τους στους πιο πρώιμα ώριμους καρπούς. Μέχρι 12 αυγά μπορεί να εναποτίθενται κάθε μέρα, και περίπου 150-400 στη

διάρκεια της ζωής του εντόμου. Το θηλυκό διατρυπά τον καρπό με την προβοσκίδα και εναποθέτει το αυγό κάτω από την επιδερμίδα του. Οι άποδες κάμπιες τρέφονται με τον καρπό, προκαλώντας την πτώση του από το δέντρο. Τα αυγά εκκολάπτονται σε 2-3 ημέρες. Τα στάδια κάμπιας και κουκουλιού διαρκούν αντίστοιχα 12-14 και 7-10 ημέρες. Η διάρκεια της ζωής του εντόμου ποικίλει από ένα έως 6 ή 7 μήνες. Τα αρσενικά παράγουν ένα στριγκό ήχο ή σήμα κατά τη διάρκεια της ερωτοτροπίας. Το καλοκαίρι, και ιδιαίτερα το φθινόπωρο, αναπτύσσονται 2-4 γενιές ανάλογα με το κλίμα και τη θερμοκρασία.

Η δραστηριότητα του εντόμου συνεχίζεται κανονικά όσο η θερμοκρασία παραμένει στους 20-28°C. Όταν η θερμοκρασία υπερβεί τους 30°C, αναστέλλεται η εναπόθεση αυγών, και πάνω από τους 35°C κάθε δραστηριότητα σταματά. Η εναπόθεση αυγών σταματά ακόμα και σε περιπτώσεις χαμηλής υγρασίας (50-60%). Έτσι, το καλοκαίρι, όταν οι μέρες είναι πολύ ζεστές και ξηρές, εμφανίζεται στους καρπούς δάκος που δεν εναποθέτει αυγά. Οι υψηλές θερμοκρασίες (άνω των 30°C) και η χαμηλή υγρασία εξάλλου, δε βοηθούν την ανάπτυξη της κάμπιας.

### **1.4.3 Εξάπλωση του δάκου**

**Εξάπλωση στη Μεσόγειο:** Η εξάπλωση του δάκου περιορίζεται αυστηρά στις καλλιεργημένες ζώνες ελαιόδεντρων. Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα δάκου από δεκαεννέα διαφορετικές περιοχές του Ευρωπαϊκού μέρους της Μεσογείου, αναλύοντας δώδεκα μικροδορυφορικούς τόπους, έδειξε ότι, παρά τα υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής στη Μεσόγειο, μπορούν να διακριθούν τρεις υποπληθυσμοί δάκου: ένας από την Ιβηρική χερσόνησο, ένας από την Ελλάδα και την Ιταλία και ένας από την Κύπρο (Augustinos et al., 2005). Επιπλέον, η βαθμιαία ελάττωση της ετεροζυγωτίας από τα ανατολικά προς τα δυτικά υποδεικνύει ότι η εξάπλωση του δάκου συνέβη με φορά προς τη δύση.

**Εισβολή στην Καλιφόρνια:** Παρόλο που η παραγωγή ελιάς στην Καλιφόρνια έχει ξεκινήσει εδώ και έναν αιώνα, ο δάκος ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στο Λος Άντζελες το 1998. Μέσα σε πέντε χρόνια από την πρώτη παρατήρησή του, ο δάκος αναφέρθηκε σε όλες τις περιοχές ελαιοκαλλιέργειας της πολιτείας. Έντομα που συλλέχθηκαν από χωράφια, από πέντε διαφορετικές περιοχές της Καλιφόρνια και από το Ισραήλ, μελετήθηκαν σε επίπεδο μικροδορυφορικών πολυμορφισμών σε δέκα μικροδορυφορικούς τόπους (Zygouridis et al., 2009). Τα αποτελέσματα από αυτή τη μελέτη, σε συνδυασμό με αυτά της προαναφερθείσας, που αφορούσε πληθυσμούς δάκου στο Ευρωπαϊκό μέρος της Μεσογείου (Augustinos et al., 2005), έδειξαν ότι η εισβολή στην Καλιφόρνια είχε αφετηρία την ανατολική Μεσόγειο. Επίσης, τα δείγματα της Καλιφόρνια παρουσίαζαν διαφορές σε σχέση με αυτά της Μεσογείου, γεγονός που υποδεικνύει τη συμμετοχή φαινομένων, όπως η γενετική παρέκκλιση, στην εισβολή και εξάπλωση του δάκου στην Καλιφόρνια.

**Αφρικανική προέλευση:** Υποστηρίζεται ότι ο δάκος της νότιας Ευρώπης έχει προέλευση είτε Αφρικανική είτε Ασιατική (Nardi et al., 2005). Είναι επίσης γνωστό ότι η απώλεια της συγκομιδής της ελιάς είναι πολύ μικρότερη στη νότια Αφρική σε σχέση με τις περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο, λόγω ύπαρξης φυσικών εχθρών του δάκου (Costa, 1998). Λογική απόρροια αυτών είναι ότι η μελέτη των παρασιτοειδών που προσβάλλουν το δάκο, στις περιοχές της νότιας χερσονήσου της Αφρικής, θα μπορούσε να βοηθήσει στην καταπολέμησή του (Mkize et al., 2008) και ειδικά στους πληθυσμούς της Καλιφόρνια, όπου το κλίμα

είναι παρόμοιο με αυτό της νοτίου Αφρικής και υπάρχουν μεγαλύτερες πιθανότητες ευδοκίμησης της μεθόδου. Τέλος, δεδομένα για τα διάφορα υποείδη δάκου έχουν προκύψει από πρόσφατες μελέτες (Copeland et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα, στην Αφρικανική ήπειρο έχουν αναφερθεί τρία είδη του γένους *Bactrocera*, τα *B. oleae*, *B. biguttula* και *B. munroi*, που τρέφονται ή ωοαποθέτουν σε ελιές, οι προτιμήσεις τους ως προς το είδος των καρπών με τους οποίους τρέφονται, οι μορφολογικές διαφορές και ομοιότητες και η προσβλησιμότητά τους από τα διάφορα παρασιτοειδή. Γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι είναι βαρύνουσας σημασίας η εύρεση μοριακών διαγνωστικών για την εύκολη, γρήγορη και έγκυρη διάκριση αυτών των ειδών αφού μορφολογικά είναι πολύ δύσκολο να ξεχωρίσουν.

## 2. Σκοπός

Ο δάκος αποτελεί τον κύριο εχθρό της ελιάς και είναι ένα από τα πιο καταστρεπτικά γεωργικά έντομα, προκαλώντας μεγάλη απώλεια της συγκομιδής που συνεπάγεται οικονομική ζημιά. Οι διαδεδομένες μέθοδοι καταπολέμησής του, είτε είναι αναποτελεσματικές, είτε έχουν υψηλό κόστος, είτε προκαλούν μόλυνση και ανισορροπία του περιβάλλοντος. Έτσι, η ανάγκη για φυσική αντιμετώπιση του δάκου είναι μεγάλη. Για την επίτευξη, όμως, αυτού, απαιτούνται χρήσιμα εργαλεία, διαγνωστικοί δείκτες, στο γονιδίωμα του δάκου, για τον εύκολο διαχωρισμό μεταξύ των υποειδών, που θα έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη διερεύνηση της προέλευσης και των ιδιοτήτων των πληθυσμών.

Οι κωδικοποιούσες περιοχές του rDNA αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για φυλογενετική ανάλυση, αφού απαντώνται σε πολλά αντίγραφα, περιλαμβάνουν περιοχές οι οποίες εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς και παρουσιάζουν μικρή ενδοειδική και μεγάλη διαειδική. Από την άλλη, το IGS (InterGenic Spacer), λόγω της ταχείας εξέλιξής του, των εσωτερικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και της ποικιλομορφίας μήκους που παρουσιάζει, φαίνεται να παρέχει πληροφορίες χρήσιμες για την εξαγωγή διαγνωστικών δεικτών.

Η εύρεση διαγνωστικών δεικτών στο IGS του δάκου θα επέτρεπε την εύκολη διάκριση ανάμεσα στα υποείδη και θα είχε πολύ μεγάλη σημασία για τη μελέτη της προέλευσης και του τρόπου εξάπλωσης του εντόμου και, συνεπώς, και για την καταπολέμησή του.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της δομής του γονιδιακού τόπου του rDNA του δάκου, η ολοκλήρωση της αλληλούχισής του, ώστε να καταστούν δυνατές τόσο οι φυλογενετικές συγκρίσεις με άλλα συγγενικά είδη, όσο και να αναπτυχθούν διαγνωστικά μοριακά τεστ για το διαχωρισμό τους.





## 3. Μέθοδοι

### 3.1 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων

#### 3.1.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Η διαδικασία έχει στόχο την απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, λόγω της ιδιότητας της φαινόλης να αποδιατάσσει και να διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα. Τα νουκλεϊκά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση, η οποία μετά από φυγοκέντρηση σχηματίζει την άνω φάση λόγω της μικρότερης πυκνότητάς της. Η παρουσία του χλωροφορμίου διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τα τυχόν εναπομείναντα υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα.

##### Διαδικασία:

- 1) Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (0,5V/0,5V) και ακολουθεί ανάδευση έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
- 2) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14.000g για 5 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική.
- 3) Η υδατική φάση, στην οποία περιέχονται τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1V), και αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 14.000 g για 5 λεπτά.
- 4) Ακολουθεί μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και επανάληψη της εκχύλισης με χλωροφόρμιο.
- 5) Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση σε αιθανόλη.

#### 3.1.2 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη έχει στόχο τη συμπύκνωση, την αφαλάτωση και την επανάκτηση νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η διαδικασία μπορεί να ποικίλλει στη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό ιζήματος, στον τύπο και τη συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων που προστίθενται, καθώς και στο χρόνο και την ταχύτητα της φυγοκέντρησης.

##### Διαδικασία:

- 1) Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) τελικής συγκέντρωσης 0,3 M και περίπου διπλάσιος όγκος (2 -2.5V) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%).
- 2) Το μείγμα, ύστερα από ισχυρή ανάδευση, τοποθετείται σε θερμοκρασία  $-80^\circ\text{C}$  για 15 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 14.000g για 20 λεπτά.
- 3) Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται μισός όγκος αιθανόλης 70% (0,5V), ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.

- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14.000g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 5) Το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε υδατικό διάλυμα.

#### Σημειώσεις:

- Η κατακρήμνιση μικρής ποσότητας νουκλεϊκών οξέων μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη φορέων συγκατακρήμνισης (όπως γλυκογόνο, tRNA ζύμης, γραμμικό πολυακρυλαμίδιο). Οι φορείς αυτοί είναι αδιάλυτοι σε διαλύματα αιθανόλης και κατά τη φυγοκέντρηση δημιουργούν ίζημα το οποίο παγιδεύει τα νουκλεϊκά οξέα.

### **3.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης τμημάτων DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους:

i. *το μέγεθος του DNA*: δίκλινα γραμμικά μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου (log) του μοριακού τους βάρους (Helling et al., 1974),

ii. *τη συγκέντρωση της αγαρόζης*: η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA ( $\mu$ ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα ( $\tau$ ) συνδέονται με τον τύπο  $\log\mu = \log\mu_0 - K_r\tau$ , όπου  $\mu_0$  η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και  $K_r$  ο συντελεστής επιβράδυνσης, ο οποίος έχει σχέση με τις ιδιότητες του πηκτώματος, το μέγεθος και το σχήμα των κινούμενων μορίων,

iii. *τη στερεοδομή των μορίων DNA*: οι διαφορετικές μορφές (η υπερελικωμένη κυκλική μορφή I, η ανοικτή κυκλική μορφή II και η γραμμική μορφή III) ενός μορίου DNA ίδιου μοριακού βάρους παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης (Thorne, 1966),

iv. *την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται*: σε χαμηλή τάση ρεύματος ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης τάσης, ενώ, όσο αυξάνεται η τάση, ο ρυθμός μετανάστευσης των τμημάτων του DNA μεγάλου μοριακού βάρους μεταβάλλεται με διαφορετικό συντελεστή για το κάθε τμήμα,

v. *την παρουσία χρωστικών*: το βρωμιούχο αιθίδιο μειώνει την ηλεκτροφορητική ικανότητα των γραμμικών μορίων περίπου κατά 15%, λόγω του ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο το μήκος τους και καθιστώντας τα πιο άκαμπτα,

vi. *τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Buffer)*: απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη με αποτέλεσμα το DNA να κινείται με αργό ρυθμό, ενώ υψηλή ιοντική ισχύς μπορεί να οδηγήσει σε τήξη του πηκτώματος και αποδιάταξη του DNA λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που προκαλείται από την αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα.

#### Διαδικασία:

- 1) Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης και θερμαίνεται έως ότου τηχθεί η αγαρόζη και το διάλυμα γίνει τελείως διαυγές.
- 2) Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml.

- 3) Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος της τηγμένης αγαρόζης κατέβει στους 50°C, μεταφέρεται σε μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχουν τοποθετηθεί, με κάθετη διευθέτηση "χτενάκια", ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις "πηγαδάκια" φόρτωσης των δειγμάτων.
- 4) Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα, τα "χτενάκια" απομακρύνονται και η βάση τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
- 5) Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται διάλυμα χρωστικής (με αναλογία 1:4)
- 6) Τα δείγματα τοποθετούνται στα "πηγαδάκια" και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση.
- 7) Η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία.

#### **Σημειώσεις:**

- Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών του DNA στο πήκτωμα παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορείται το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA (ladder).
- 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 ερυθροπορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα να είναι ορατά τα μόρια του DNA (Sharp, 1973).
- Το διάλυμα χρωστικής αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος λόγω της παρουσίας γλυκερόλης σε αυτό, ώστε να εισαχθεί ευκολότερα στο "πηγαδάκι". Το διάλυμα είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης.
- Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA. Ο ηλεκτροφορητικός ποσοτικός προσδιορισμός ενδείκνυται σε περιπτώσεις είτε χαμηλής συγκέντρωσης DNA, είτε μη καθαρότητας των προς ανάλυση διαλυμάτων. Η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Έτσι, σύγκριση του φθορισμού που εκπέμπεται από το προς ανάλυση δείγμα με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (ladder), παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της ποσότητας του προς ανάλυση διαλύματος. Η εκτίμηση πραγματοποιείται είτε εμπειρικά, είτε με ποσοτική σύγκριση σε προγράμματα επεξεργασίας εικόνας στον ΗΥ.

### **3.1.4 Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

Τα ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes) είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Τα ένζυμα περιορισμού προστατεύουν τους μικροοργανισμούς αυτούς από την εισβολή ξένου DNA, και έχουν ως ιδιότητα να πέπτουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Η προστασία του πυρηνικού DNA του ξενιστή (host) από τα ένζυμα περιορισμού χαρακτηρίζεται από τροποποιήσεις που επιφέρουν στις θέσεις στόχους αυτών. Υπάρχουν δυο κύριες ομάδες ενζύμων περιορισμού. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα ένζυμα που δημιουργούν κολλώδη μονόκλωνα άκρα (sticky ends). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ένζυμα που δημιουργούν μη κολλώδη δίκλωνα άκρα (blunt ends). Η δράση του κάθε ενζύμου εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία επώασης και

τη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί αποτελεί συνάρτηση της ενεργότητάς του και της ποσότητας και μεγέθους του προς κατάτμηση DNA.

#### **Διαδικασία:**

- 1) Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται διαδοχικά το DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) του ενζύμου, η κατάλληλη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O έως τον τελικό όγκο και το ένζυμο.
- 2) Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται στην κατάλληλη για το χρησιμοποιούμενο ένζυμο θερμοκρασία (συνήθως 37°C) για 1-2 ώρες.
- 3) Η αντίδραση πέψης τερματίζεται είτε με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10mM είτε με επώαση του μείγματος στη θερμοκρασία απενεργοποίησης του ενζύμου.

#### **Σημειώσεις:**

- Η συγκέντρωση του ενζύμου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης διότι μπορεί να προκληθεί αναστολή της δράσης του λόγω αυξημένης παρουσίας γλυκερόλης. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 50% και σε θερμοκρασία -20°C.
- Η ποσότητα του ενζύμου μπορεί να μειωθεί εάν αυξηθεί ο χρόνος επώασης της αντίδρασης.

### **3.1.5 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Η διαδικασία έχει στόχο την ανάκτηση μορίων DNA μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης και περιλαμβάνει την τήξη του πηκτώματος παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης που περιέχεται στο διάλυμα πρόσδεσης στη μεμβράνη (Membrane Binding Solution), τη σύνδεση του DNA σε μεμβράνες πυρητίου, παρουσία χαστροπικών αλάτων και την έκλουση του DNA σε ddH<sub>2</sub>O. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση του Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega)

#### **Διαδικασία:**

- 1) Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται από το πήκτωμα αγαρόζης, τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και προσδιορίζεται το βάρος του.
- 2) Προστίθενται 10μl Διαλύματος Πρόσδεσης στη Μεμβράνη (Membrane Binding Solution) για κάθε 10mg πηκτώματος.
- 3) Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου επιτευχθεί η τήξη του πηκτώματος.
- 4) Το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη (SV Minicolumn) η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής (Collection Tube) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση σε 16.000g για 1 λεπτό.
- 5) Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη. Προστίθεται Διάλυμα Πλύσης Μεμβράνης (700μl, Membrane Wash Solution) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 16.000g για 1 λεπτό.
- 6) Το έκλουσμα απομακρύνεται, προστίθεται στη στήλη Διάλυμα Πλύσης Μεμβράνης (500μl) και αυτή φυγοκεντρείται για 5 λεπτά.
- 7) Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής, επανατοποθετείται η στήλη και αυτή φυγοκεντρείται σε 14.000g για επιπλέον 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.

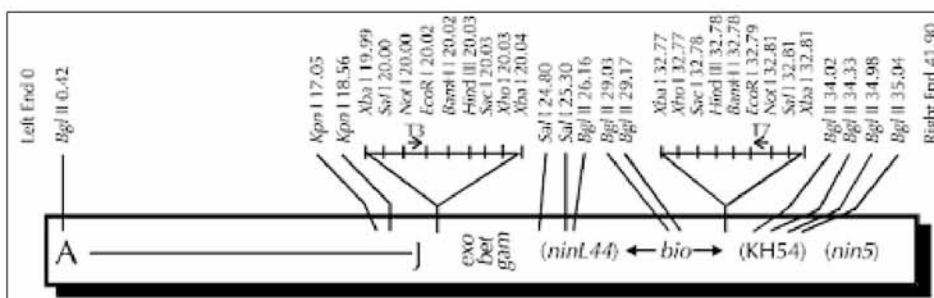
- 8) Η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου errendorf και προστίθεται υδατικό Διάλυμα Ελεύθερο Νουκλεασών (30-40μl, Nuclease-Free water), το οποίο έχει προθερμανθεί σε θερμοκρασία 60°C.
- 9) Ακολουθεί επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά ώστε να ενυδατωθεί και πραγματοποιείται έκλυση του DNA με φυγοκέντρηση σε 16.000g για 2 λεπτά.
- 10) Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C.

#### Σημειώσεις:

- Τα τμήματα DNA τα οποία έχουν μέγεθος μεγαλύτερο των 5kb πρέπει να αναδεύονται ήπια, κατά την επώαση τους με το διάλυμα πρόσδεσης στη μεμβράνη, ώστε να αποφευχθεί η κατάτμησή τους.
- Υψηλές συγκεντρώσεις αгарόζης απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο επώασης για να επιτευχθεί η τήξη τους.
- Το απομονωμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας σε αντιδράσεις αλληλούχισης, κλωνοποίησης, σήμανσης ή *in vitro* μεταγραφής.
- Όταν το βάρος του πηκτώματος είναι μεγαλύτερο από 500mg, κόβουμε το πήκτωμα σε δύο κομμάτια και ακολουθούμε τη διαδικασία ξεχωριστά για κάθε κομμάτι.

### 3.2 Βακτηριοφάγος λ-DASH® II (Stratagene)

Ο βακτηριοφάγος λ-DASH® II (Εικόνα 3.1) αποτελεί φορέα αντικατάστασης ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση μεγάλων τμημάτων γονιδιωματικού DNA και παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά: α. αναπτύσσεται σε κύτταρα XL1-Blue MRA' (P2) εκμεταλλευόμενος την επιλογή *srI* (*srI* selection-sensitive to P2 inhibition). Οι βακτηριοφάγοι λ, οι οποίοι περιέχουν ενεργά τα γονίδια *red* και *gam* δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε στελέχη ξενιστών που περιέχουν λυσιγόνους φάγους P2. Τα γονίδια *red* και *gam* στο βακτηριοφάγο λ DASH II εντοπίζονται στο τμήμα που απομακρύνεται κατά την εισαγωγή του ενθέματος (*stuffer*). Έτσι, ο αγρίου τύπου λ-DASH® II δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε κύτταρα XL1-Blue MRA', σε αντίθεση με τον ανασυνδυασμένο λ-DASH® II, ο οποίος καθίσταται *red*-/*gam*- μετά την απομάκρυνση του «*stuffer*» και την εισαγωγή του ενθέματος. Με τον τρόπο αυτό, κατά την επίστρωση της βιβλιοθήκης σε στέλεχος XL1-Blue MRA' P2 πραγματοποιείται *srI* επιλογή και αναπτύσσονται μόνο ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι. β. Επιπλέον, είναι κατασκευασμένος κατά τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει εκατέρωθεν του ενθέματος τους υποκινητές T3 και T7 και να επιτρέπει τη δημιουργία τελο-ειδικών (*end-specific*) RNA ανιχνευτών και γ. το ένθεμα μπορεί να απομακρυνθεί με κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI, καθώς αυτό είναι κλωνοποιημένο στις θέσεις EcoRI του φορέα.



**Εικόνα 3.1:** Γενετικός χάρτης του βακτηριοφάγου λ-DASH® II. Το ένθεμα κλωνοποιείται στις θέσεις EcoRI και μπορεί να αποχτηθεί με κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις πρόσδεσης των T3 και T7 RNA πολυμερασών.

### 3.2.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ξενιστών

Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται παρουσία μαλτόζης και ιόντων μαγνησίου. Ο βακτηριοφάγος λ για να εισαχθεί στο κύτταρο συνδέεται στον εξωμεμβρανικό υποδοχέα της μαλτοπορίνης (Schwartz, 1967), ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας είναι η διευκόλυνση της διάχυσης της μαλτόζης και της ματοδεξτρίνης μέσα στο κύτταρο (Szmelcman and Hofnung, 1975). Η σύνδεση του υποδοχέα, ο οποίος κωδικοποιείται από το βακτηριακό γονίδιο *lamb*, καταστέλλεται από τη γλυκόζη και επάγεται από τη μαλτόζη (Schwartz, 1967). Έτσι, η παρουσία της μαλτόζης στο θρεπτικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα ιόντα μαγνησίου χρησιμοποιούνται για τη διευκόλυνση της πρόσδεσης του βακτηριοφάγου στον υποδοχέα (Lieb, 1953).

#### Διαδικασία:

- 1) Βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5ml) εμπλουτισμένο με 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0.2% μαλτόζη είτε σε θερμοκρασία 37°C υπό ισχυρή ανάδευση (220rpm) για 4-6 ώρες είτε σε θερμοκρασία 30°C για 12-16 ώρες.
- 2) Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 4,000g για 10 λεπτά.
- 3) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται ήπια στην απαραίτητη ποσότητα διαλύματος 10mM MgSO<sub>4</sub>, ώστε η οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>) του εναιωρήματος των κυττάρων να παρουσιάζει τιμή 0,4-0,6 μονάδες.
- 4) Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4°C.

#### Σημειώσεις:

- Τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C για περίπου μία εβδομάδα.

### 3.2.2 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Κάθε εναιώρημα φάγων παρουσιάζει έναν «τίτλο» που εκφράζει τον αριθμό των φαγικών σωμάτων που περιέχει ανά ml (pfu / ml).

#### Διαδικασία:

- 1) Παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις (των τάξεων 10<sup>-4</sup>-10<sup>-7</sup>) της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε διάλυμα SM ώστε να χρησιμοποιηθούν στην τιτλοδότηση.
- 2) Ποσότητα των αραιώσεων αυτών (2-3μl) αναμιγνύεται με βακτήρια ξενιστές (plating cells) του στελέχους XL1-Blue MRA' (200μl από το απόθεμα με OD<sub>600</sub>=0,4-0,6) σε σωληνάκια τύπου erpendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.
- 3) Το μείγμα βακτηρίων/φάγων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 15ml, ο οποίος περιέχει NZY υπερκείμενη αραρόζη (3ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία ~ 47-49°C.
- 4) Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε προθερμασμένο (σε 37°C) τρυβλίο petri NZY – άγαρ διαμέτρου 90mm. Το τρυβλίο ανακινείται ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος.
- 5) Αφού στερεοποιηθεί η υπερκείμενη αραρόζη, τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 12 ώρες.

#### Σημειώσεις:

- Ο προσδιορισμός του τίτλου πραγματοποιείται σύμφωνα με τη σχέση: [(αριθμός πλακών (pfu) x συντελεστής αραιώσης) / όγκος που επιστρώθηκε (μl)] x 1000μl/ml.

- Ο όγκος που επιστρώθηκε (σε μl) αναφέρεται στον όγκο του διαλύματος των βακτηριοφάγων που αναμίχθηκε με τα βακτήρια-ξενιστές.

### **3.2.3 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο**

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη αποτελεί ένα τυχαίο άθροισμα τμημάτων DNA κλωνοποιημένων σε κατάλληλους και αντιπροσωπεύουν το γονιδίωμα ενός συγκεκριμένου οργανισμού. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη παρέχει τη δυνατότητα επιλογής συγκεκριμένων κλώνων μέσω υβριδοποίησης με κατάλληλους ανιχνευτές. Ο συνολικός αριθμός των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων (N) που απαιτείται να σαρωθεί για να επιτευχθεί η απομόνωση ενός κλώνου με 99% πιθανότητα (P) σε μία βιβλιοθήκη εξαρτάται από το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων και από το μέγεθος του ως προς διαλογή γονιδιώματος ακολουθώντας τη σχέση:  $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ , όπου f το κλάσμα του ενθέματος προς γονιδίωμα (Clarke & Carbon, 1976).

#### **Διαδικασία:**

- 1) Η επιθυμητή ποσότητα ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων αναμιγνύεται με βακτήρια ξενιστές του στελέχους XL1-Blue MRA' (600μl από το απόθεμα με  $OD_{600}=0,4-0,6$ ) σε σωληνάκι τύπου erpendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.
- 2) Το μείγμα βακτηρίων και φάγων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon (50ml), ο οποίος περιέχει NZY υπερκείμενη αгарόζη (30ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία ~ 47-49°C.
- 3) Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε τρυβλίο NZY-άγαρ διαστάσεων 22cm x 22cm. Το τρυβλίο ανακινείται ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος. Αφού στερεοποιηθεί η υπερκείμενη αгарόζη, το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 12 ώρες.

### **3.2.4 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ**

#### **Διαδικασία:**

- 1) Με τη χρήση υάλινης πιπέτας Pasteur απομονώνεται η επιθυμητή βακτηριοφαγική πλάκα μαζί με το άγαρ και την υπερκείμενη αгарόζη (Εικόνα 3.2) και τοποθετείται σε διάλυμα SM (200μl) το οποίο περιέχει χλωροφόρμιο (0,3%). Το χλωροφόρμιο παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών.
- 2) Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C για 12 ώρες ώστε να επιτευχθεί η διάχυση των φαγικών σωματιδίων στο διάλυμα.

#### **Σημειώσεις:**

- Μία πλάκα περιέχει περίπου  $10^6-10^7$  φαγικά σωματίδια, τα οποία μπορούν να αποθηκευτούν σε διάλυμα SM/χλωροφορμίου σε θερμοκρασία 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν τη βιωσιμότητά τους.
- Οι βακτηριοφάγοι λ διαχέονται σε μεγάλες αποστάσεις γι' αυτό συνίσταται η επιλογή απομονωμένων πλακών καθώς και η σύντομη απομόνωσής τους μετά την εμφάνισής τους.
- Η διαλογή της βιβλιοθήκης γίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη διαλογή γίνεται σε μεγάλο τρυβλίο, με την πλευρά της πιπέτας με τη μεγάλη διάμετρο, και οι πλάκες που απομονώνονται μένουν για 12-16 σε SM buffer και, στη συνέχεια, επιστρώνονται σε μικρά τρυβλία όπου και γίνεται η δεύτερη διαλογή. Η δεύτερη διαλογή, η οποία γίνεται με την πλευρά της πιπέτας με τη μικρή διάμετρο, έχει στόχο την απομόνωση της μοναδικής πλάκας που δίνει σήμα.





Εικόνα 3.2: Απομόνωση βακτηριοφαγικής πλάκας με υάλινη πιπέτα Pasteur.

### **3.2.5 Παρασκευή εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ**

#### **Διαδικασία:**

- 1) Βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA´ καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5ml) εμπλουτισμένο με 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0.2% μαλτόζη.
- 2) Ποσότητα (500μl) της βακτηριακής καλλιέργειας αναμιγνύεται με τη διαχυμένη φαγική πλάκα (40μl) σε σωληνάκι τύπου errendorf και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.
- 3) Μέρος (250μl) του μείγματος μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 250ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (20ml) εμπλουτισμένο με το 10mM MgSO<sub>4</sub>.
- 4) Η καλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C έως ότου πραγματοποιηθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων (5-7 ώρες) και όταν αυτή επιτευχθεί προστίθεται χλωροφόρμιο (100μl).
- 5) Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml και φυγοκεντρείται σε 8.000 g για 10 λεπτά ώστε να ιζηματοποιηθούν τα βακτηριακά υπολείμματα.
- 6) Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τα φαγικά σωματίδια, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C για χρονικό διάστημα έως και 6 μηνών.

### **3.2.6 Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ**

Η απομόνωση των λ βακτηριοφάγων πραγματοποιείται με κατακρήμνισή τους παρουσία 1M NaCl και 10% w/v πολυαιθυλενογλυκόλη 8000 (PEG 8000), αφού προηγηθεί επώαση με DNάση I και RNάση A. Η επώαση του εναιωρήματος με τις νουκλεάσες απαιτείται για την αποδόμηση των νουκλεϊνικών οξέων που ελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί η παγίδευση των φαγικών σωματιδίων σε αυτά. Η προσθήκη NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα, ενώ η πολυαιθυλενογλυκόλη 8000 προκαλεί την κατακρήμνισή τους.

### Διαδικασία:

- 1) Το εναιώρημα των βακτηριοφάγων επωάζεται με DNάση και RNάση σε συγκέντρωση 1μg/ml σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά.
- 2) Προστίθεται στερεό NaCl σε συγκέντρωση 1M, επωάζεται σε πάγο για τουλάχιστον μία ώρα και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 11.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
- 3) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml, προστίθεται PEG 8000 σε συγκέντρωση 10% w/v και επωάζεται σε πάγο για τουλάχιστον μία ώρα.
- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 11.000g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, ώστε να συλλεχθούν τα φαγικά σωματίδια.
- 5) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο σωλήνας τύπου falcon αναστρέφεται για 2 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα του υπερκειμένου.
- 6) Το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα SM (1ml), μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου erpendorf όγκου 2ml και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
- 7) Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (1ml), ανακινείται ισχυρά και φυγοκεντρείται σε 3.000g για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν η πολυαιθυλενογλυκόλη και κυτταρικά υπολείμματα από το εναιώρημα των βακτηριοφάγων.
- 8) Το αιώρημα των βακτηριοφάγων (υδατική φάση) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.

## **3.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

### **3.3.1 PCR για γονιδιακή ενίσχυση (DNA)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια απλή, ταχεία, επιλεκτική και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο ενζυμικού πολλαπλασιασμού *in vitro* γενετικού υλικού, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια του ένζυμου της πολυμεράσης και επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

i. μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, της Taq DNA πολυμεράσης η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα αναδιάταξης και επιμήκυνσης (ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου σε θερμοκρασία 95°C είναι περίπου 40 λεπτά). Η Taq πολυμεράση παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού 75-80°C και ταχύτητα σύνθεσης 150 νουκλεοτίδια/ μορίου ενζύμου το δευτερόλεπτο.

ii. ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές (primers) και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλης κατεύθυνσης με μήκος μεταξύ 18-24 νουκλεοτιδίων και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA. Επιπλέον, οι εκκινητές πρέπει να παρουσιάζουν αναλογία G/C και A/T περίπου 1:1, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους, να μην περιέχουν εσωτερικές παλινδρομες αλληλουχίες, να μην υπάρχουν επαναλήψεις 3 ή περισσότερων C ή G στο 3' άκρο και να παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές θερμοκρασίας τήξης Tm. Η συγκέντρωση των εκκινητών καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0,4-0,6μM ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη και ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων.

iii. κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), σε συγκέντρωση 0,2 mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λάθους νουκλεοτιδίου. Έλλειψη ισορροπίας στο μείγμα των dNTPs μειώνει επίσης την πιστότητα της Taq πολυμεράσης.

iv. κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος  $MgCl_2$ . Η παρουσία ιόντων  $Mg^{+2}$  είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα  $Mg^{+2}$  σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.

v. ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης.

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:

i. την αποδιάταξη του DNA (μήτρα). Ολική αποδιάταξη του DNA στόχου πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία 94°C για 30 δευτερόλεπτα.

ii. την αναδιάταξη των αλυσίδων του DNA με τους αντίστοιχους συμπληρωματικούς εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης ( $T_m$ ).

iii. τη σύνθεση (επιμήκυνση) από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο.

Ο πρώτος κύκλος οδηγεί στο σχηματισμό δύο νέων αλυσίδων απροσδιορίστου μήκους που, μαζί με τις πατρικές αλυσίδες, συμμετέχουν στους επόμενους κύκλους πολυμερισμού. Αντίθετα, από το δεύτερο κύκλο και μετά συντίθενται και αλυσίδες με καθορισμένο μήκος (ίσο με την απόσταση ανάμεσα στα 5' άκρα των δύο εκκινητών) οι οποίες συμμετέχουν ως μήτρα στους επόμενους κύκλους. Τα προϊόντα αυτά συσσωρεύονται εκθετικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου τμήματος DNA. Με τον τρόπο αυτό, μετά την ολοκλήρωση η κύκλων η αρχική αλληλουχία έχει πολλαπλασιαστεί  $2^n$  φορές. Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από την αρχική συγκέντρωση του DNA στόχου.

#### Διαδικασία:

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

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
DNA	5-40ng
Ρυθμιστικό διάλυμα	1X
dNTPs	0,2mM το καθένα
$MgCl_2$	1,5mM
Εκκινητής εμπρόσθιος	0,4-0,6μM
Εκκινητής οπίσθιος	0,4-0,6μM
Taq πολυμεράση	1 unit
H <sub>2</sub> O	μέχρι τελικού όγκου

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

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	4min
Αποδιάταξη DNA στόχου	30 κύκλοι	94°C
Υβριδισμός εκκινητών		Tm-5°C
Επιμήκυνση εκκινητών		72°C
Τελική επιμήκυνση		72°C
		30sec
		30sec
		~1min/kb
		7min

3) Τα προϊόντα της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

### 3.3.2 PCR μεγάλου μήκους (Long PCR)

Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR αντίδραση, η οποία ενισχύει προϊόν έως 3 kb, η PCR μεγάλου μήκους παρέχει τη δυνατότητα ενίσχυσης έως και 40kb. Η αρχή της μεθόδου είναι η ίδια με τη συμβατική PCR με τη διαφορά ότι χρησιμοποιεί μία υψηλής απόδοσης Taq πολυμεράση με δράση 3'5'έξωνουκλεάσης, ώστε να επιδιορθώνει την λανθασμένη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων, και DMSO, το οποίο λειτουργεί ως συνδιαλύτης και αυξάνει την απόδοση και αξιοπιστία της αντίδρασης. Η διαδικασία έγινε με χρήση του Long PCR Enzyme Mix (Fermentas).

#### Διαδικασία:

*Το πρωτόκολλο που ακολουθείται, αποτελεί τροποποίηση του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας.*

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

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
DNA	0,75-1μg
Ρυθμιστικό διάλυμα	1X
dNTPs	0,2mM το καθένα
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM
Εκκινητής εμπρόσθιος	0,6-1μM
Εκκινητής οπίσθιος	0,6-1μM
Taq πολυμεράση	2,5unit
DMSO	4%
H <sub>2</sub> O	μέχρι τελικού όγκου

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

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	3min
Αποδιάταξη DNA στόχου	94°C	30sec
Υβριδισμός εκκινητών	Tm-5°C	30sec
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	~1min/kb
Αποδιάταξη DNA στόχου	94°C	30sec
Υβριδισμός εκκινητών	Tm-5°C	30sec
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	~1min/kb+10sec/κύκλο
Τελική επιμήκυνση	72°C	7min

3) Τα προϊόντα της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

### 3.4 Υβριδοποίηση

Το φαινόμενο της υβριδοποίησης, δηλαδή της δυνατότητας ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο, αποτελεί τη βάση για πολλές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, μεταξύ αυτών και της υβριδοποίησης κατά Southern. Η υβριδοποίηση κατά Southern (φέρει το όνομα του E. M. Southern που την ανέπτυξε) χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε δείγμα DNA (Southern, 1975).

#### 3.4.1 Σήμανση ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλωνα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η σήμανση των διάφορων τύπων ανιχνευτών (DNA, RNA ανιχνευτών) πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs), εάν πρόκειται για DNA ή RNA ανιχνευτές αντίστοιχα. Τα βασικά στάδια της σήμανσης των ανιχνευτών περιλαμβάνουν την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος και την επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη κάθε αλυσίδας με τη βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random primers) και την πολυμεριστική δράση του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I (Feinberg and Volgelstein 1983). Η σήμανση των μορίων DNA γίνεται με τη συμπλήρωση των 3' υπολειμματικών άκρων του με βιοτινιωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP) και με εκκινητές τυχαία δεκανουκλεοτίδια. Η διαδικασία έγινε με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών με τη χρήση HexaLabel™ DNA Labelling kit (Fermentas).

#### Διαδικασία:

*Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας.*

- 1) Το DNA (100ng-1μg) που θα σημανθεί τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινητές (1X) και η ποσότητα του ddH<sub>2</sub>O που αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.

DNA	$V_{DNA}$ (100ng-1μg)
Ρυθμιστικό διάλυμα με δεξανουκλεοτίδια	$V_{buffer}=1X$
ddH <sub>2</sub> O	$V_{ddH_2O}$ =έως 50μl

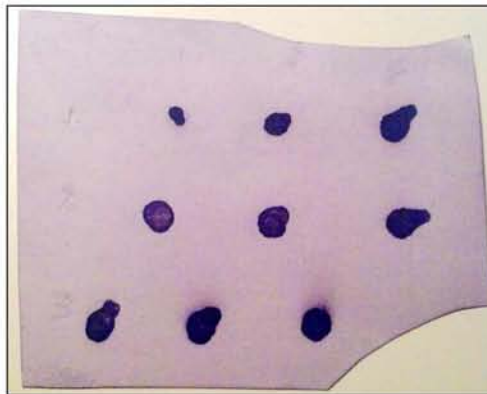
- 2) Το μείγμα αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 100°C για 10 λεπτά και αμέσως τοποθετείται σε πάγο.
- 3) Προστίθενται Biotin-11-dUTP (0,035mM), μείγμα μη σημασμένων νουκλεοτιδίων (dGTP, dATP, dCTP:0,1mM, dTTP: 0,065mM) και η DNA Klenow πολυμεράση (5u).

Biotin-11-dUTP	$V=0,035mM$
dNTPs (dGTP,dATP,dCTP: dTTP)	$V=0,1:0,065mM$
Klenow exonuclease	$V_{ενζύμου}=5units$
Τελικός όγκος	$V_{TEL}=50μl$

- 4) Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 ώρες.
- 5) Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH<sub>2</sub>O (50μl).

#### Σημειώσεις:

- Για την επαλήθευση της σήμανσης των ανιχνευτών, πραγματοποιούμε, πριν τη χρήση τους, spotting (δοκιμή υβριδοποίησης ανιχνευτών, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε νάιλον μεμβράνη, χωρίς DNA και εμφάνιση της μεμβράνης, βλέπε παρακάτω: 3.4.4 και 3.4.5) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Μembrάνη από spotting 3 ανιχνευτών σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις.

### **3.4.2 Μεταφορά DNA σε νάιλον μεμβράνη**

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξη τους ώστε να καταστούν μονόκλωνα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊκά οξέα, στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται ως «στόχοι» σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών. Η μέθοδος στην τριχοειδή

μεταφορά ενός ρυθμιστικού διαλύματος από μία περιοχή υψηλού υδατικού δυναμικού σε περιοχή χαμηλού δυναμικού, με αποτέλεσμα να συμπαρασύρει μαζί και το μονόκλωνο DNA. (Chomczynski, 1992).

#### **Διαδικασία:**

- 1) Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε.
- 2) Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και επωάζεται σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 15 λεπτά.
- 3) Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 2.
- 4) Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 20 λεπτά.
- 5) Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
- 6) Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 2X SSC σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά και τοποθετείται σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, του οποίου οι άκρες εμβαπτίζονται σε διάλυμα 10X SSC.
- 7) Η μεμβράνη με διαστάσεις λίγο μικρότερες από το πήκτωμα διαβρέχεται με  $dsH_2O$  και στη συνέχεια με διάλυμα 6X SSC και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
- 8) Φύλλα (2) διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, ίσων διαστάσεων με τη μεμβράνη, διαβρέχονται με  $ddH_2O$  και τοποθετούνται πάνω στη μεμβράνη, ακολουθούν επιπλέον φύλλα (2) διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 5mm. Στη κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
- 9) Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 16-18 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman 3MM και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των πηγαδιών.
- 10) Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

#### **Σημειώσεις:**

- Ο χειρισμός των μεμβρανών πρέπει να γίνεται με γάντια και με ειδικές λαβίδες τύπου Millipore με πεπλατυσμένα άκρα.
- Εάν τα τμήματα DNA υπερβαίνουν τις 15kb, το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 0,2N HCl, υπό ανάδευση, για 10 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί μερική υδρόλυση του DNA και να διευκολυνθεί η μεταφορά των θραυσμάτων DNA.

### **3.4.3 Μεταφορά φαγικών πλακών σε νάιλον μεμβράνη**

Η διαδικασία αποσκοπεί στη δημιουργία ενός αντιγράφου της επίστρωσης των βακτηριοφάγων. Η μεμβράνη-αντίγραφο περιέχει αρκετούς βακτηριοφάγους σχεδόν από κάθε πλάκα.

#### **Διαδικασία:**

- 1) Το τρυβλίο που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά των πλακών σε μεμβράνη πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία 4°C για τουλάχιστον 2 ώρες, ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά τμημάτων της υπερκείμενης αγαρόζης στη μεμβράνη.
- 2) Η μεμβράνη, με διαστάσεις σχεδόν όσο το τρυβλίο petri, τοποθετείται στην επιφάνεια του τρυβλίου petri, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διαβραχεί από το κέντρο προς την περιφέρεια και χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ υπερκείμενης αγαρόζης και μεμβράνης.
- 3) Όταν η μεμβράνη διαβραχεί πλήρως, προσανατολίζεται ως προς το τρυβλίο petri με τρυπήματα σε αντίστοιχα ασύμμετρα περιφερειακά σημεία της με αποστειρωμένη βελόνα ανατομίας.
- 4) Η μεμβράνη παραμένει πάνω στο τρυβλίο για 2 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται ανεστραμμένη, ώστε να μην έρθουν οι φάγοι σε άμεση επαφή, στην επιφάνεια διαλύματος αποδιάταξης για 2 λεπτά.
- 5) Ακολουθεί μεταφορά της μεμβράνης κατά τον ίδιο τρόπο σε διάλυμα εξουδετέρωσης όπου και παραμένει για 5 λεπτά.
- 6) Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα 0,2M Tris HCl (pH 7,5)/2X SSC για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα.
- 7) Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες, ώστε να σταθεροποιηθεί η πρόσδεση του DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

#### **Σημειώσεις:**

- Αν είναι επιθυμητή η δημιουργία αντιγράφου, μία δεύτερη μεμβράνη τοποθετείται στο ίδιο τρυβλίο και επαναλαμβάνονται τα βήματα. Στη περίπτωση αυτή η μεταφορά των φάγων πραγματοποιείται για +2 λεπτά κάθε φορά.

### **3.4.4 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνες**

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊκών οξέων συνίσταται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Το στάδιο της προϋβριδοποίησης πραγματοποιείται για την μείωση του background με την κάλυψη των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή. Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Church and Gilbert (1984).

#### **Διαδικασία:**

- 1) Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδό x 0,2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης).
- 2) Επιπλέον, προστίθεται DNA από σπέρμα σολομού (ssDNA) σε συγκέντρωση 100μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
- 3) Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή.
- 4) Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα προϋβριδοποίησης (10ml/100cm<sup>2</sup>) και ο ανιχνευτής (100-200ng/ml διαλύματος), ο οποίος έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.



- 5) Ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 16-18 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση.

#### Σημειώσεις:

- Εάν τα διαλύματα προϋβριδοποίησης και υβριδοποίησης περιέχουν φορμαμίδιο, η θερμοκρασία υβριδισμού είναι πολύ χαμηλότερη σύμφωνα με τη σχέση  $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log M + 0,41 (\%G+C) - 0,63 (\% \text{φορμαμίδιο}) - 500/n$ . Η χρήση φορμαμιδίου συνίσταται σε περιπτώσεις όπου η υβριδοποίηση πρέπει να γίνει σε χαμηλή θερμοκρασία έτσι ώστε να μειωθεί το background.
- Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι τα: Denhardt's (Denhardt's reagent), το SDS και το DNA από σπέρμα σολομού (ssDNA, salmon sperm DNA). Το αντιδραστήριο Denhardt's περιέχει φικόλη και PVP, τα οποία είναι μεγάλα μόρια και καταλαμβάνουν χώρο καθώς και BSA, η οποία είναι μη ειδική πρωτεΐνη.
- Η άριστη θερμοκρασία υβριδισμού στη περίπτωση DNA: DNA υβριδοποίησης είναι  $25^{\circ}\text{C}$  χαμηλότερη από τη θερμοκρασία στην οποία η μισή ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη  $T_m$  είναι η αναλογία των βάσεων (GC), η συγκέντρωση άλατος και το μέγεθος του ανιχνευτή, και συνδέονται μεταξύ τους με τη εξίσωση:  $T_M = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log M + 0,41 (\%G+C) - 500/n$  όπου M είναι η συγκέντρωση των ιόντων του άλατος  $[\text{Na}^+]$  και n ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν το υβρίδιο.
- Όσο μικρότερος είναι ο όγκος του διαλύματος υβριδοποίησης τόσο αποτελεσματικότερη είναι η υβριδοποίηση διότι η κινητική και η επανασύνδεση των νουκλειικών οξέων είναι πιο γρήγορη.

### **3.4.5 Ανίχνευση σήματος**

Η διαδικασία έχει στόχο την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου ανιχνευτή (βήμα 1-5), στη πρόσδεση της στρεπταβιδίνης (σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης) στη βιοτίνη (βήμα 6-8) και στην ανίχνευση του σήματος (βήμα 9-10). Η απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή, ο οποίος δεν έχει προσδεθεί καθόλου ή έχει ασθενώς υβριδοποιηθεί μη ειδικά, με αλληλουχίες με τις οποίες μπορεί να έχει μια μικρού βαθμού ομολογία επιτυγχάνεται με διαλύματα που περιέχουν άλατα (SSC) σε προοδευτικά μειούμενες συγκεντρώσεις και την κατάλληλη ποσότητα SDS. Η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη της σε διάλυμα που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα, ώστε να μειωθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος.

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στη βιοτίνη και την στρεπταβιδίνη, η οποία είναι συνδεδεμένη με αλκαλική φωσφατάση, και την ιδιότητα της να καταλύει μία χρωμογόνο αντίδραση με το X-phosphate και το NBT. Το X-phosphate (5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση και το 5-bromo-4chloro-3-indolyl που σχηματίζεται αντιδρά αυθόρμητα με το  $\text{O}_2$  για να δώσει μία αδιάλυτη ερυθροκυανή χρώση, ενώ το NBT χρησιμοποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων αντί του  $\text{O}_2$ . Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ανιχνευτή και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους.

#### Διαδικασία:

- 1) Το διάλυμα υβριδοποίησης όπου περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ , έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί.

*Όλες οι επόμενες διεργασίες πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.*

- 2) Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα πλύσης A και επωάζεται δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά.
- 3) Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα.
- 4) Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα πλύσης B υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση για 20 λεπτά.
- 5) Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
- 6) Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα B για τουλάχιστον 30 λεπτά.
- 7) Το διάλυμα B απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα B, το οποίο περιέχει 5μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10ml, και επωάζεται για 30 λεπτά.
- 8) Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα A για 15 λεπτά και επαναλαμβάνεται το βήμα.
- 9) Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα C για 2 λεπτά.
- 10) Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος C το οποίο περιέχει 50μl NBT και 37,5μl BCIP ανά 10ml διαλύματος.
- 11) Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με dH<sub>2</sub>O.

#### **Σημειώσεις:**

- Μετά την εμφάνιση, η μεμβράνη είναι δυνατόν να αποχρωματιστεί με επώαση σε διάλυμα DMF (διμέθυλο-φορμαμίδιο) σε θερμοκρασία 50°C για 10 λεπτά.
- Στη διαλογή των βακτηριοφάγων ο προσανατολισμός της μεμβράνης ως προς το τρυβλίο προσδιορίζεται με βάση τα σημεία διάτρησης, ώστε να εντοπιστούν οι πλάκες που αντιστοιχούν σε θετικά σήματα υβριδοποίησης. Αραίωση του φαγικού εναιωρήματος της πλάκας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δεύτερη διαλογή.



## 4. Υλικά

### 4.1 Ηλεκτροφόρηση

**Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X TBE (1L):** Tris-base (54gr), βορικό οξύ (27,5gr), 0,5M EDTA (20ml).

**Διάλυμα χρωστικής 6X:** 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανούν της ξυλόλης, 15% φικόλλη σε ddH<sub>2</sub>O.

### 4.2 Βακτηριοφάγος λ

**Υγρό LB (1L):** Βακτοτρυπτόνη (10gr), εκχύλισμα ζύμης (5gr), NaCl (5gr) pH 7. Αποστείρωση σε ολόκαυτο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).

**Διάλυμα SM:** 50mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 0,2% MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,01% ζελατίνη.

**NZY υπερκείμενη αγαρόζη (1L):** NaCl (5gr), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (2gr), εκχύλισμα ζύμης (5gr), NZ αμίνη (10gr), αγαρόζη (0,7% w/v), pH 7,5. Αποστείρωση σε ολόκαυτο.

**NZY Άγαρ (1L):** NaCl (5gr), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (2gr), εκχύλισμα ζύμης (5gr), NZ αμίνη (10gr), άγαρ (15gr), pH 7,5. Αποστείρωση σε ολόκαυτο.

### 4.3 PCR

Οι αλληλουχίες των εκκινητών δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

	Εκκινητής	Αλληλουχία
1	18S-5'-Rspace	5'-TAGCTCTAGAATTACCACAG-3'
2	18S-F1	5'-CTGGTTGATYCTRCCAGT-3'
3	18S-R1	5'-CYGCAGGTTCACCTACRG-3'
4	18S-end-F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
5	5.8-5'-F	5'-AAGAACGCAGCAAACCTGTGC-3'
6	5.8S-3'-R	5'-ATAGTCTTACAACCCTCAACC-3'
7	28S-rRNA-F	5'-CTACCCCCTGAATTTAAGC-3'
8	28S-rRNA-R	5'-CTCAACCACTTACAACACC-3'
9	28S-3'-Fspace	5'-CAATGACAAAGCCTAGAATC-3'
10	18S-Fw	5'-GTAATTCCAGCTCCAATAGCG-3'
11	18S-Rw	5'-CAGACAAATCACTCCACGAAC-3'
12	28Sw-I.I-F	5'-GCGAAAGATTGAGGATAC-3'
13	28Sw-I.I-R	5'-ACTATCAAGCAACACGAC-3'

14	28Sw-I.II-F	5'-AACGCCTCTAAGGTCGTATCCG-3'
15	28Sw-I.II-R	5'-AGATCAAGTCAGCATTGCG-3'
16	28Sw-2.1-F	5'-ACAACCTCATGCAGATACC-3'
17	28Sw-2.2-R	5'-TCTTCACTTTGACATTTCAGAGC-3'
*για τους εκφυλισμένους εκκινήτες: Y= C, T και R= A, G		

**Σημείωση:** Οι εκκινήτες 1-9 έχουν σχεδιαστεί με το πρόγραμμα OMIGA και με βάση τις αντίστοιχες περιοχές στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster* που έχουν ανακτηθεί από τη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων NCBI. Οι εκκινήτες 10 και 11 χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση τμήματος του 18S και οι εκκινήτες 12-17 για την αλληλούχηση τμημάτων του 28S.

#### 4.4 Υβριδοποίηση

**Διάλυμα Αποδιάταξης:** 0,5M NaOH, 1,5M NaCl.

**Διάλυμα Εξουδετέρωσης:** 0,5M Tris-HCl pH 7,5, 1,5M NaCl.

**Διάλυμα 20X SSC:** 0,3M κίτρικό νάτριο pH 7, 3M NaCl.

**Διάλυμα Υβριδοποίησης:** 6X SSC, 5X Denhardt's, 0,5% SDS.

**Διάλυμα 50X Denhardt's:** 1% φικόλλη, 1% PVP, 1% BSA.

**Διάλυμα πλύσης A:** 2X SSC, 0,1% SDS.

**Διάλυμα πλύσης B:** 0,2X SSC, 0,1% SDS.

**Διάλυμα A:** 100mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl.

**Διάλυμα B:** Διάλυμα A, 1% Διάλυμα Blocking.

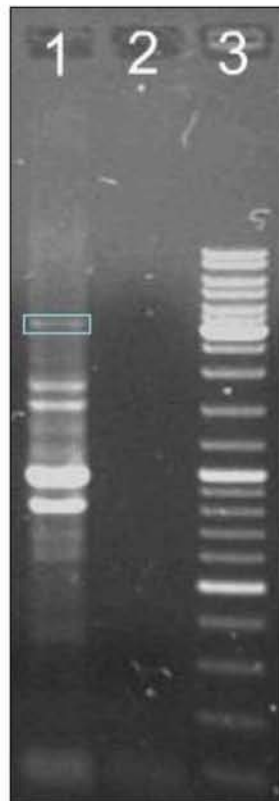
**Διάλυμα Blocking (10%):** Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (10gr) σε 100ml Διαλύματος A.

**Διάλυμα C:** 100mM Tris-HCl pH 9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>.

## 5. Αποτελέσματα

### 5.1 Ενίσχυση του IGS σε γονιδιωματικό DNA δάκου με PCR

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα γονιδιωματικό DNA δάκου (gene pool), πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών 28S-3'-Fspace/18S-5'-Rspace για την ενίσχυση του IGS. Η ζώνη που ανακτήθηκε από το πήκτωμα αντιστοιχεί σε τμήμα το οποίο, με βάση τη σύγκριση του με το ladder, έχει μέγεθος ~4kb (Εικόνα 5.1), αναμενόμενο μέγεθος με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία και το μέγεθος του IGS συγγενικών αρθρόποδων (π.χ. *Drosophila melanogaster*: 3,3-11,6kb). Οι υπόλοιπες ζώνες οφείλονται σε πιθανό υβριδισμό των εκκινητών και σε άλλες θέσεις ή σε πολυμορφισμούς μήκους του IGS, καθότι χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA και μάλιστα gene pool.



Εικόνα 5.1: Διαδρομές: 1: PCR products-γονιδιωματικό DNA δάκου, 2: PCR products-αρνητικό control, 3: ladder

### 5.2 Απομόνωση και διερεύνηση της δομής του rDNA

#### 5.2.1 Δημιουργία ανιχνευτών

Έγινε PCR σε γονιδιωματικό DNA δάκου με τα ζεύγη εκκινητών 18S-F1/18S-R1, 18S-end-F/5.8S-3'-R και 28S-rRNA-F/28S-rRNA-R τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τις περιοχές 18S, ITS1-5.8S και 28S,

αντίστοιχα. Τα προϊόντα της PCR, στη συνέχεια σημάνθηκαν με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων με τη χρήση HexaLabel™ DNA Labelling kit (Fermentas).

### 5.2.2 Διαλογή φαγικής βιβλιοθήκης

Πραγματοποιήθηκε τιλοδότηση της φαγικής βιβλιοθήκης η οποία έδωσε ως αποτέλεσμα  $3 \times 10^9$  rfu/ml. Επιστρώθηκαν σε τρυβλίο 2,3μl από αραιώση  $10^{-3}$  της αρχικής συγκέντρωσης άρα η διαλογή πραγματοποιήθηκε σε περίπου 7.500-8000 ανασυνδυασμένους φάγους. Με δεδομένο ότι οι rDNA συστοιχίες υπάρχουν σε πολλά αντίγραφα στο γονιδίωμα το δάκου (*Drosophila melanogaster*: ~200), το οποίο υπολογίζεται ότι έχει μήκος περίπου  $5,4 \times 10^5$  kb, και ότι το μέσο μέγεθος του ενθέματος του βακτηριοφάγου είναι 20kb, υπολογίζεται ότι οι περιοχές που αναζητούνται θα υπάρχουν σε περίπου 60 αντίγραφα στο τρυβλίο.

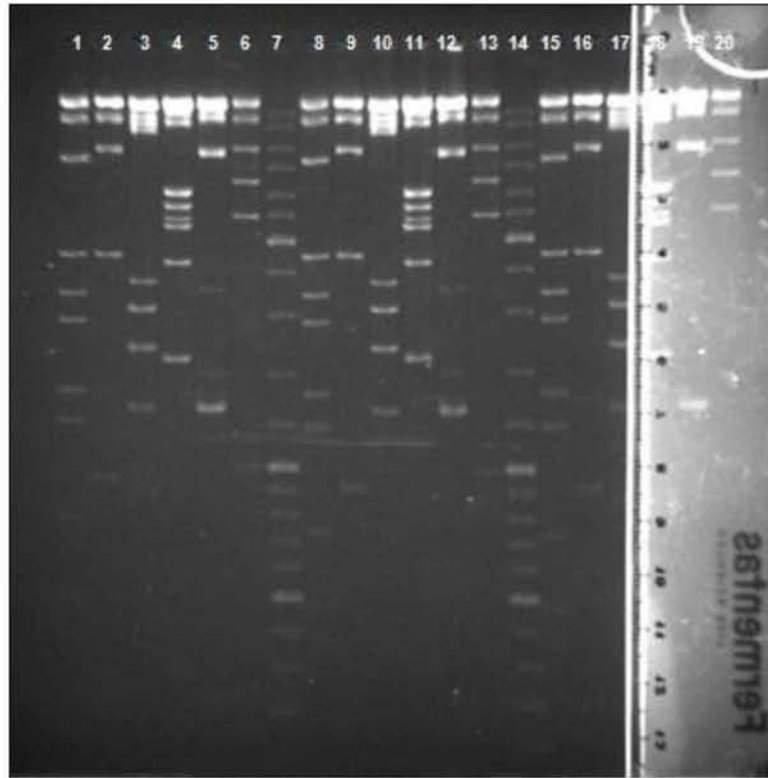


**Εικόνα 5.2:** Νάilon μεμβράνη με πλάκες βακτηριοφάγου μετά από υβριδοποίηση με ανιχνευτές και εμφάνιση.

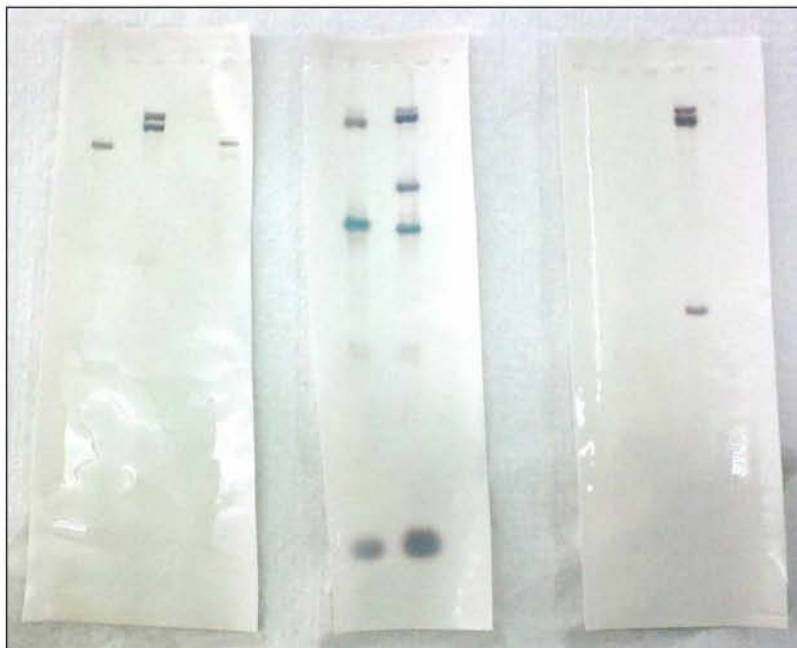
Από την πρώτη διαλογή συλλέχθηκαν 6 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 18S, 2 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή ITS1-5.8S και 3 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 28S. Από τη δεύτερη διαλογή συλλέχθηκαν 6 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 18S, 1 πλάκα που έδωσε σήμα με τον ανιχνευτή ITS1-5.8S, και 7 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 28S (Εικόνα 5.2). Μόνο μία πλάκα έδωσε σήμα και με τους τρεις ανιχνευτές, η ρh12. Από τις πλάκες που συλλέχθηκαν έγινε εξαγωγή DNA από τους φάγους.

### 5.2.3 Διερεύνηση της δομής του rDNA

Με στόχο τη διερεύνηση του περιεχομένου των φάγων που απομονώθηκαν, τη διερεύνηση της δομής της rDNA συστοιχίας του δάκου και τον εντοπισμό του IGS, έγιναν διπλές πέψεις στα φαγικά DNA με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και HindIII, τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν (Εικόνα 5.3) και μεταφέρθηκαν σε νάilon μεμβράνη η οποία υβριδοποιήθηκε με τους ανιχνευτές 18S, ITS1-5.8S και 28S (Εικόνα 5.4).



**Εικόνα 5.3:** Προϊόντα διπλής πέψης. Διαδρομές: 1-6, 8-13 και 15-20: 5 φαγικά DNA, 7 και 14: ladder.



**Εικόνα 5.4:** Νάιλον μεμβράνες με τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα της Εικόνας 5.3 μετά από υβριδοποίηση με τους ανιχνευτές (από αριστερά προς τα δεξιά) 28S, 18S και ITS1-5.8S και εμφάνιση.

Η διαδικασία αυτή έγινε για όλους τους απομονωμένους φάγους. Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των προϊόντων πέψης δεν παρουσίασαν καμία ομοιότητα μεταξύ των 15 φάγων (πέρα από τις αναμενόμενες ζώνες του φορέα), ένδειξη ότι οι 15 φάγοι είχαν διαφορετικά ενθέματα. Από την υβριδοποίηση με τους ανιχνευτές, πήραμε τα εξής σήματα:



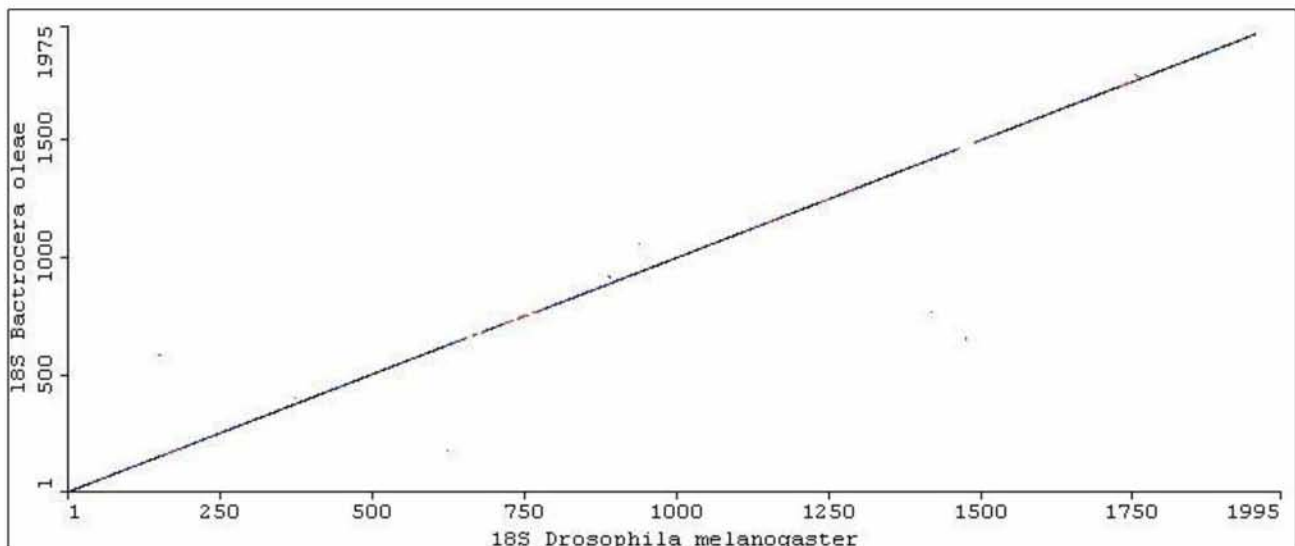
Ανιχνευτής	Σήμα σε φάγους
18S	ph: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14
ITS1-5.8S	ph: 12, 14, 15
28S	ph: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 15

Τα αποτελέσματα αυτά δίνουν μια επιβεβαίωση της οργάνωσης του rDNA, στο δάκο, σε συστοιχίες, χωρίς να επιβεβαιώνουν, όμως τη δομή τους. Όσον αφορά τον εντοπισμό του IGS, εάν η δομή της rDNA συστοιχίας είναι η αναμενόμενη (βλέπε *Εικόνα 1.1*), πιθανότατα οι φάγοι ph11 και ph12 να περιέχουν το IGS.

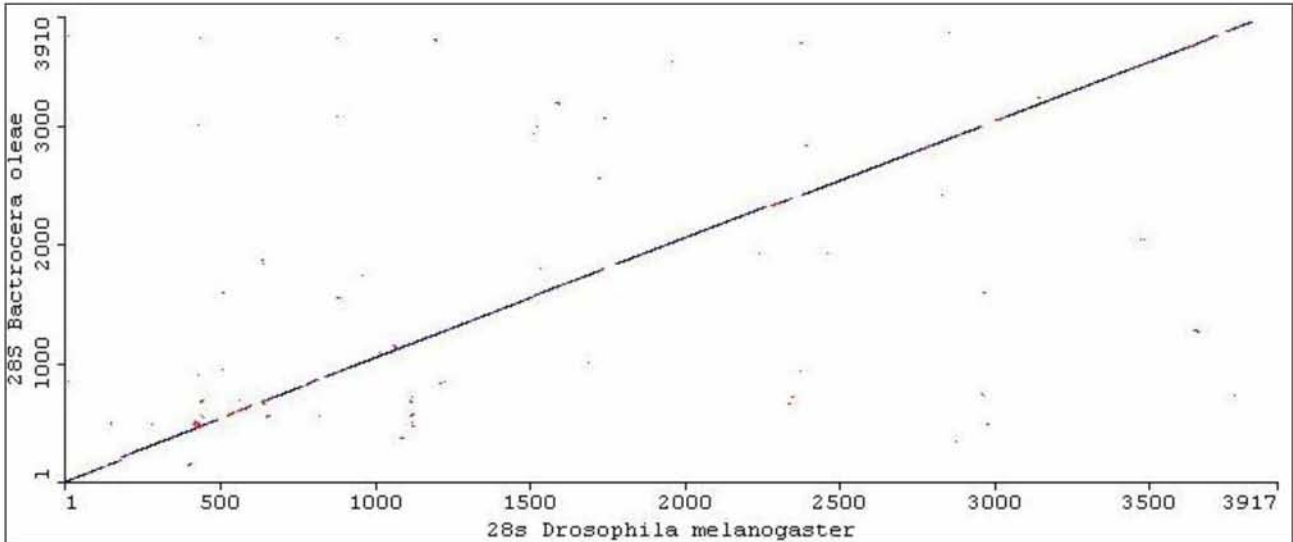
### 5.3 Αλληλούχιση τμημάτων

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα γονιδιωματικό DNA δάκου (gene pool), πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών 18S-F1/18S-R1 για την ενίσχυση του 18S, και long PCR με το ζεύγος εκκινητών 28S-rRNA-F/28S-rRNA-R για την ενίσχυση του 28S. Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων στάλθηκαν για ανάλυση της πρωτοδιάταξής τους με τη μέθοδο walk (ζεύγη εκκινητών: 18S-Fw/18S-Rw, 28Sw-I.I-F/28Sw-I.I-R, 28Sw-I.II-F/28Sw-I.II-R, 28Sw-2.1-F/28Sw-2.2-R).

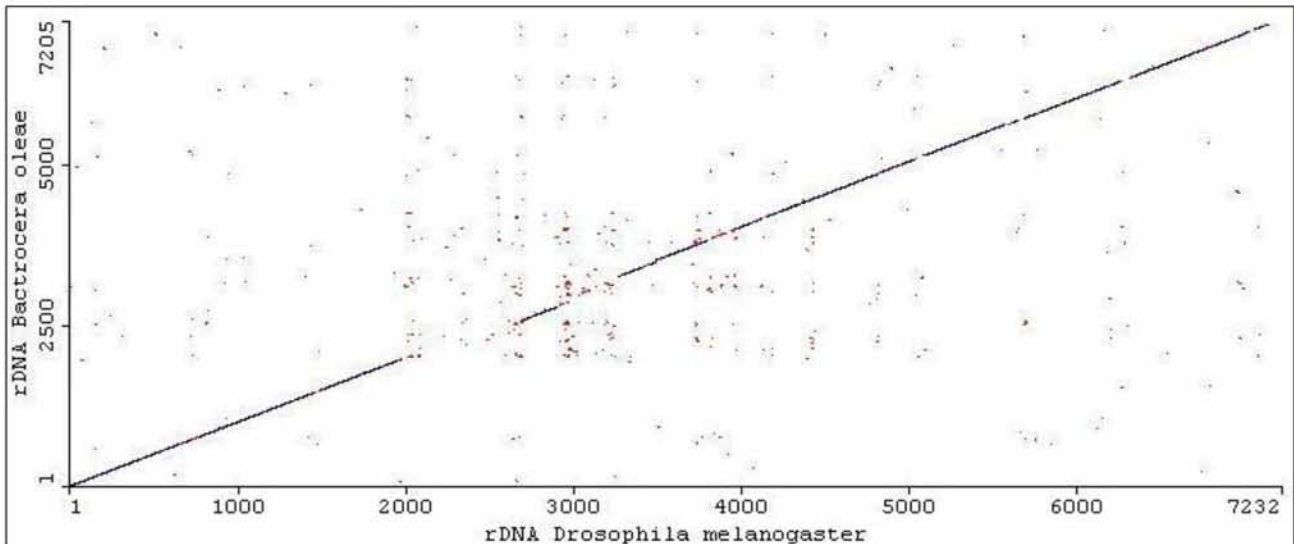
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (βλέπε Παράρτημα 8.1 και 8.2) επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα OMIGA. Παρακάτω παρατίθενται πίνακες συσχέτισης αλληλουχιών (dotplot) με αυτές τις αλληλουχίες (*Εικόνες 5.5, 5.6, 5.7*). Η αλληλουχίες της *Drosophila melanogaster* ανακτήθηκαν από τη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI.



**Εικόνα 5.5:** Πίνακας συσχέτισης των αλληλουχιών 18S από το *Bactrocera oleae* και τη *Drosophila melanogaster*.

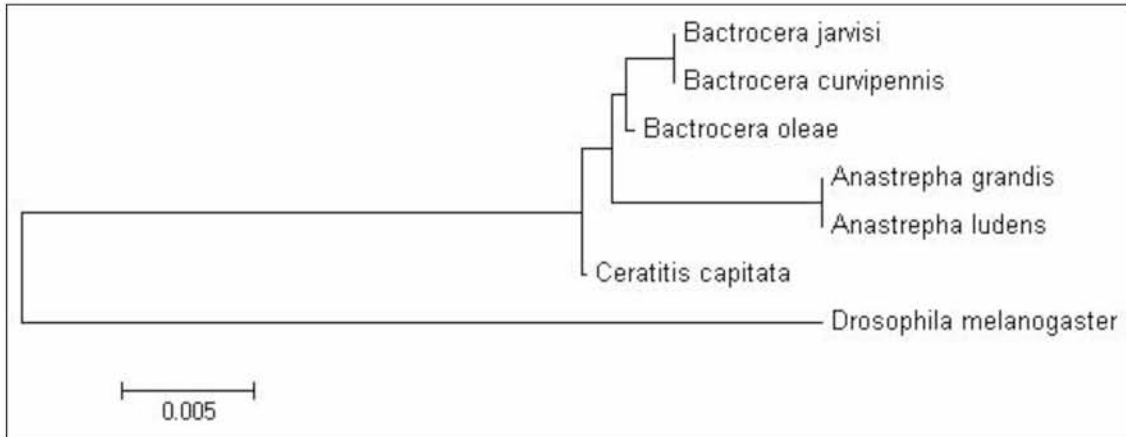


Εικόνα 5.6: Πίνακας συσχέτισης των αλληλουχιών ITS1-5.8S-ITS2 από το *Bactrocera oleae* και τη *Drosophila melanogaster*.

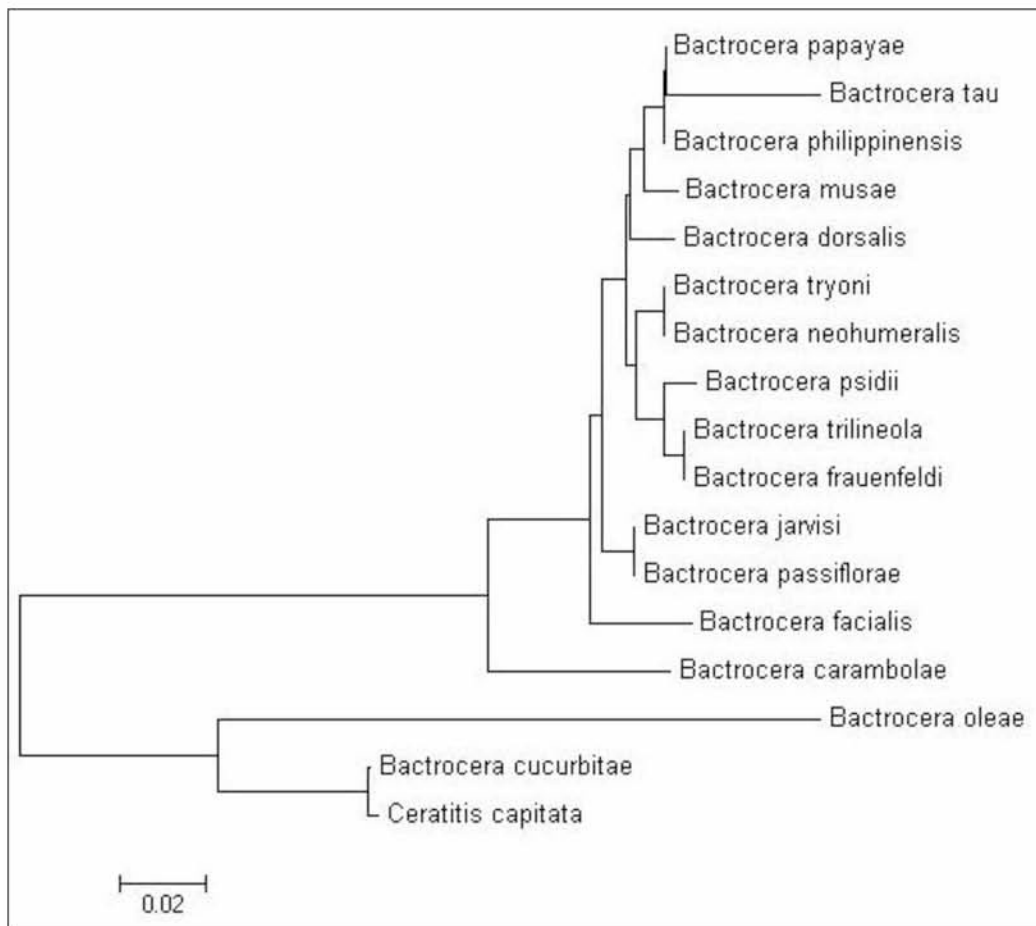


Εικόνα 5.7: Πίνακας συσχέτισης των αλληλουχιών 28S από το *Bactrocera oleae* και τη *Drosophila melanogaster*.

Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης του 18S, συγκρίναμε μέρος αυτού (18S:1114-1602b) στο *Bactrocera oleae* με το αντίστοιχο τμήμα σε άλλα έντομα και δημιουργήσαμε φυλογενετικό δέντρο με το πρόγραμμα MEGA (Εικόνα 5.8). Ομοίως, συγκρίναμε μέρος του τμήματος ITS1-5.8S-ITS2 (18S-28S:2168-2679b) στο *Bactrocera oleae* με το αντίστοιχο τμήμα σε άλλα έντομα (Εικόνα 5.9). Οι αλληλουχίες από τους οργανισμούς *Bactrocera jarvisi*, *Bactrocera curvipennis*, *Anastrepha grandis*, *Anastrepha ludens*, *Ceratitis capitata*, *Drosophila melanogaster*, *Bactrocera papaya*, *Bactrocera tau*, *Bactrocera philippinensis*, *Bactrocera musae*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera tryoni*, *Bactrocera neohumeralis*, *Bactrocera psidii*, *Bactrocera trilineola*, *Bactrocera frauenfeldi*, *Bactrocera passiflorae*, *Bactrocera facialis*, *Bactrocera carambolae* και *Bactrocera cucurbitae* ανακτήθηκαν από τη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI.



**Εικόνα 5.8:** Δενδρόγραμμα *neighbor joining* κατόπιν σύγκρισης 488bp του 18S. Συγκρίνονται οι οργανισμοί: *Bactrocera oleae*, *Bactrocera jarvisi*, *Bactrocera curvipennis*, *Anastrepha grandis*, *Anastrepha ludens*, *Ceratitis capitata* και *Drosophila melanogaster*.



**Εικόνα 5.9:** Δενδρόγραμμα *neighbor joining* κατόπιν σύγκρισης 511bp της περιοχής IT1-5.8S-ITS2. Συγκρίνονται οι οργανισμοί: *Bactrocera oleae*, *Bactrocera papaya*, *Bactrocera tau*, *Bactrocera philippinensis*, *Bactrocera musae*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera tryoni*, *Bactrocera neohumeralis*, *Bactrocera psidii*, *Bactrocera trilineola*, *Bactrocera frauenfeldi*, *Bactrocera passiflorae*, *Bactrocera facialis*, *Bactrocera carambolae*, *Bactrocera cucurbitae* και *Ceratitis capitata*.

## 6. Συζήτηση

Ο δάκος (*Bactocera oleae*) είναι ο κυριότερος εχθρός της ελιάς. Προσβάλλει αποκλειστικά τους καρπούς της ελιάς και προκαλεί απώλεια στη συγκομιδή ~30%. Εμφανίζεται στη λεκάνη της Μεσογείου, τη βόρεια, ανατολική και νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, βόρεια Ινδία, βορειοδυτικό Πακιστάν και Καλιφόρνια, όπου υπάρχουν ελαιόδεντρα. Η καταπολέμηση του δάκου, μέχρι σήμερα, δεν έχει καταστεί εφικτή αφού οι μέθοδοι που ακολουθούνται είναι επιβλαβείς, ακριβές ή αναποτελεσματικές. Προσπάθεια για μοριακή προσέγγιση της καταπολέμησής του έχει γίνει αλλά ακόμη δεν υπάρχει κάποια εφικτή και επιτυχής μέθοδος.

Η κατανόηση της προέλευσης των πληθυσμιακά διακριτών ομάδων *B. oleae*, αλλά και υποειδών του είδους, η σύγκριση αυτών μεταξύ τους και οι φυλογενετικές συγκρίσεις με άλλα συγγενικά είδη, είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη ενός πλάνου καταπολέμησης του εντόμου. Για να είναι αυτή η μέθοδος εφικτή, απαιτείται η εύρεση διαγνωστικών δεικτών, ως εργαλεία για τη γρήγορη και εύκολη ταυτοποίηση των υποειδών, και μια περιοχή του γονιδιώματος κατάλληλη για φυλογενετικές συγκρίσεις.

Μια περιοχή που φαίνεται να είναι κατάλληλη για την εξαγωγή διαγνωστικών είναι το IGS. Το IGS εκτείνεται από το 3' άκρο του 28S rRNA γονιδίου έως την αρχή του ETS και αποτελείται κυρίως από μοναδικές αλληλουχίες, στα 5' και 3' άκρα του, και από μία ή περισσότερες ομάδες εσωτερικών επαναλήψεων, στο εσωτερικό του. Αυτές οι εσωτερικές επαναλήψεις μπορούν να κυμαίνονται, σε μήκος, από μερικές δεκάδες σε πολλές εκατοντάδες bp, δημιουργώντας, έτσι, πολυμορφισμούς μήκους. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και οι πολυμορφισμοί μήκους, σε συνδυασμό με το γρήγορο ρυθμό εξέλιξής του, καθιστούν το IGS άριστο υποψήφιο για την αναζήτηση διαγνωστικών δεικτών στο δάκο.

Το rDNA, από την άλλη, είναι χρήσιμο εργαλείο για φυλογενετική ανάλυση αφού υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς και μάλιστα σε πολλά αντίγραφα, διαφορετικές περιοχές του εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς και εμφανίζει μικρή ενδοειδική και μεγάλη διαειδική ποικιλομορφία. Έτσι, οι περιοχές των rDNA συστοιχιών είναι ικανές να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες μέσα από τη δομή και τη σύνθεσή τους. Ακόμη, οι περιοχές με πολύ διατηρημένη αλληλουχία στα περισσότερα rRNA γονίδια είναι πολύ χρήσιμες για το σχεδιασμό universal εκκινητών οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αλληλούχιση rRNA ή rDNA από διάφορα είδη, για την ενίσχυση περιοχών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον μέσω της PCR ή για τη χρήση του ως ανιχνευτές σε αναλύσεις περιορισμού.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε διαλογή φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με στόχο τη διερεύνηση της δομής της rDNA συστοιχίας και του εντοπισμού του IGS. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε, δηλαδή η προσέγγιση μέσω φαγικής βιβλιοθήκης, επιλέχθηκε έναντι της ενίσχυσης με PCR σε γονιδιωματικό DNA λόγω της ύπαρξης της rDNA συστοιχίας σε πολλά αντίγραφα μέσα στο γονιδίωμα και ενδεχομένως διαφορετικά μεταξύ τους. Έτσι, το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των προϊόντων PCR δε θα ήταν ξεκάθαρη ζώνη αλλά smear. Η διαλογή που πραγματοποιήθηκε έδωσε επτά φάγους με σήμα με τον ανιχνευτή 18S, επτά φάγους με σήμα με τον ανιχνευτή 28S, έναν φάγο με σήμα με τον ανιχνευτή ITS1-5.8S και δύο φάγους, τους φάγους rh11 και rh12, ως πιθανούς για την περίληψη ολόκληρου του IGS, αφού έδωσαν σήμα με τους ανιχνευτές 18S και 28S. Ακόμη, ενισχύθηκε με PCR και ανακτήθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης τμήμα ίσο με ~4kb από γονιδιωματικό DNA (gene pool) *Bactocera*

*oleae* χρησιμοποιώντας εκκινητές οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί με βάση τις δημοσιευμένες αλληλουχίες της *Drosophila melanogaster* και ενισχύουν την περιοχή που περικλείεται από το 3' άκρο του 28S έως το 5' άκρο του 18S και πιθανώς αντιστοιχεί στο IGS.

Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των διπλών πέψων των φαγικών DNA αποκάλυψαν ότι οι φάγοι που απομονώθηκαν περιέχουν ο καθένας διαφορετικό ένθεμα. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα να βρεθεί συγκεκριμένη αλληλουχία και βοηθάει στη συναρμολόγηση της περιοχής. Ένα πιθανό επόμενο βήμα για τη διερεύνηση της δομής της rDNA συστοιχίας, είναι η δημιουργία RNA ανιχνευτών με T3/T7 primers με στόχο τη συναρμολόγηση του rDNA από τη φαγική βιβλιοθήκη. Επίσης, για μια πιο πλήρη εικόνα των rDNA συστοιχιών στο γονιδίωμα του δάκου, θα ήταν χρήσιμη και η *in situ* υβριδοποίηση.

Μέχρι τώρα, όσον αφορά το rDNA του δάκου, είχαν αλληλουχηθεί τμήματα των περιοχών: ITS1, 5.8S, ITS2 18S. Με τις προαναφερθείσες προσεγγίσεις ολοκληρώσαμε την αλληλούχιση όλης της μεταγραφόμενης περιοχής του rRNA τόπου, από το 5' άκρο του 18S έως το 3' άκρο του 28S. Οι αλληλουχίες παρατίθενται στο Παράρτημα, 8.1 και 8.2, αντίστοιχα.

Χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες που πήραμε από την ανάλυση πρωτοδιάταξης και αλληλουχίες από τις βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών κατασκευάσαμε με το πρόγραμμα OMIGA πίνακες συσχέτισεων αλληλουχιών (dotplot). Στην *Εικόνα 5.5*, φαίνεται η ομολογία που παρουσιάζει το 18S στη *Drosophila melanogaster* και στο *Bactrocera oleae*. Αντίστοιχα, στην *Εικόνα 5.6* φαίνεται η ομολογία του 28S.

Στην *Εικόνα 5.7* φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ των rDNA αλληλουχιών των *Drosophila melanogaster* και *Bactrocera oleae*. Αξίζει να παρατηρήσουμε, σε αυτή την εικόνα, την ομολογία που παρουσιάζουν οι κωδικοποιούσες και πιο διατηρημένες περιοχές (18S, 5.8S, 28S) σε σχέση με τα ενδιάμεσα διαστήματα (ITS1 και ITS2). Αυτό το αποτέλεσμα της στοίχισης είναι αναμενόμενο και συμφωνεί απόλυτα με αυτά που αναφέρθηκαν στις παραγράφους 1.2.1 και 1.2.4, για την εξέλιξη των πυρηνικών rDNA και τη χρησιμότητά τους στη φυλογενετική ανάλυση, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα τμήμα του 18S (~490kb) φτιάξαμε ένα δενδρογράμμα που δείχνει τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών *Bactrocera oleae*, *Bactrocera jarvisi*, *Bactrocera curvipennis*, *Anastrepha grandis*, *Anastrepha ludens*, *Ceratitis capitata* και *Drosophila melanogaster* (*Εικόνα 5.8*). Ομοίως, χρησιμοποιώντας ένα τμήμα της περιοχής ITS1-5.8S-ITS2 (~510bp) φτιάξαμε ένα δενδρογράμμα που δείχνει τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών *Bactrocera oleae*, *Bactrocera rapaya*, *Bactrocera tau*, *Bactrocera philippinensis*, *Bactrocera musae*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera tryoni*, *Bactrocera neohumeralis*, *Bactrocera psidii*, *Bactrocera trilineola*, *Bactrocera frauenfeldi*, *Bactrocera passiflorae*, *Bactrocera facialis*, *Bactrocera carambolae*, *Bactrocera cucurbitae* και *Ceratitis capitata*. (*Εικόνα 5.9*)

Τα αποτελέσματα του δενδρογράμματος της *Εικόνας 5.8* συμφωνούν απόλυτα με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Zhang et al., 2010; Smith et al., 2003), γεγονός που αποδεικνύει την εγκυρότητα του 18S, ως εργαλείου για φυλογενετική ανάλυση. Τα αποτελέσματα του δενδρογράμματος της *Εικόνας 5.9*, από την άλλη, δε συμφωνούν απόλυτα με άλλες φυλογενετικές αναλύσεις στα ίδια είδη. Εντοπίζονται κάποιες διαφορές στα φυλογενετικά δέντρα οι οποίες ενδεχομένως οφείλονται στο ότι το κομμάτι που χρησιμοποιήθηκε είναι μικρό και μέρος του αντιστοιχεί στα ενδιάμεσα διαστήματα ITS1 και ITS2 που λόγω

της γρήγορης εξέλιξης που παρουσιάζουν (Collins and Paskewitz, 1996) δεν είναι τόσο ενδεδειγμένα εργαλεία για φυλογενετική ανάλυση.

Τα αποτελέσματα αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτελούν μια βάση για την περαιτέρω διερεύνηση της rDNA συστοιχίας και τη μελέτη του IGS στο δάκο. Η διερεύνηση της δομής, του εντοπισμού και του πλήθους των rDNA συστοιχιών στο γονιδίωμα του *Bactrocera oleae* είναι διαδικασίες που πρέπει να γίνουν λόγω της μεγάλης σημασίας και της χρησιμότητας του τόπου αυτού στη φυλογενετική ανάλυση. Τέλος, η απομόνωση, η αλληλούχιση και η ανάλυση του IGS προς εύρεση διαγνωστικών δεικτών είναι τα επόμενα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν προς κατανόηση της προέλευσης και του τρόπου εξάπλωσης των πληθυσμών του *Bactrocera oleae* και των υποειδών του. Το IGS είναι μια πολλά υποσχόμενη περιοχή όσον αφορά την πληροφορία που μπορεί να παρέχει για τέτοιου είδους αναλύσεις.



## 7. Βιβλιογραφία

- **Ambrose, C. D., Crease, T. J. (2010)**, Evolution of Repeated Sequences in the Ribosomal DNA Intergenic Spacer of 32 Arthropod Species. *Journal of Molecular Evolution*, 70:247 -259.
- **Arnheim, N. (1983)**, Concerted evolution of multigene families. In M. Mei and R. K. Koehn (eds.). *Evolution of Genes and Proteins*, pp.38-61. Sinauer, Sunderland.
- **Augustinos, A. A, Mamuris, Z., Stratikopoulos, E., D'Amelio, S., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K. D. (2005)**. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125: 231 -241.
- **Baker, R. J., Honeycutt, R. L., Van Den Bussche, R. A. (1991)**, Examination of monophyly of bats: restriction map of the ribosomal DNA cistron. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 206:42-53.
- **Baverstock, P. R., Moritz, C. (1990)**, Sampling design. In D. M. Hillis and C. Moritz (eds.). *Molecular Systematics*, pp.13-24. Sinauer Associates, Sunderland.
- **Beckingham, K. (1982)**, Insert rDNA. In *The Cell Nucleus* (Edited by Busch, H. and Rothblum, L.), pp. 205-263, Academic Press, New York.
- **Burton, R. S., Metz, E. C., Flowers, J. M., Willett, C. S. (2005)**, Unusual structure of ribosomal DNA in the copepod *Tigriopus californicus*: intergenic spacer sequences lack internal subrepeats. *Gene*, 344:105 -113.
- **Caputo, B., Santolamazza, F., Vicente, J. L., Nwakanma, D. C., Jawara, M., Palsson, K., Jaenson, T., White, B. J., Manchini, E., Petrarca, V., Conway, D. J., Besansky, N. J., Pinto, J., della Torre, A. (2011)**, The "Far-West" of *Anopheles gambiae* Molecular Forms. *PLoS ONE*, 6(2):e16415.
- **Chomczynski, P. (1992)**, Solubilization of formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Research*, 20:3791-3792.
- **Church, G. M., Gilbert, W. (1984)**, Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81:1991-1995.
- **Cluster, P. D., Marinkovic, D., Allard, R.W., Ayala, F.J. (1987)**, Correlations between development rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes, and adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84:610-614.
- **Collins, F. H., Paskewitz, S. M. (1996)**, A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5(1), 1-9.
- **Copeland, R. S., White, I. M., Okumu, M., Machera, P., Wharton, R. A. (2004)**, Insects Associated with Fruits of the Oleaceae (Asteridae, Lamiales) in Kenya, with Special Reference to the Tephritidae (Diptera). *Bishop Museum Bulletin in Entomology*, 12:135–164.
- **Costa, C. (1998)**, Olive Production in South Africa: a Handbook for Olive Growers. Agricultural Research Council [Republic of South Africa], p.124.
- **Crease, T. J. (1995)**, Ribosomal DNA evolution at the population level: nucleotide variation in intergenic spacer arrays of *Daphnia pulex*. *Genetics*, 141:1327 -1337.



- **Da Rocha, P. S., Bertrand, H. (1995)**, Structure and comparative analysis of the rDNA intergenic spacer of *Brassica rapa*. Implications for the function and evolution of the Cruciferae spacer. *European Journal of Biochemistry*, 229:550 -557.
- **de Merida, A. M. P., de Mata, M. P., Molina, E., Porter, C. H., Black, W. C. (1966)**, Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, IV (in press).
- **Dover, G. A., Tautz, D. (1986)**, Conservation and divergence in multigene families: alternatives to selection and drift. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 312:275 -289.
- **Dvorak, J., Jue, D., Lassner, M. (1987)**, Homogenization of tandemly repeated nucleotide sequences by distance-dependent nucleotide sequence conversion. *Genetics*, 116:487 -498.
- **Evrard, J. L., Kuntz, M., Weil, J. H. (1990)**, The nucleotide sequence of five ribosomal protein genes from the *Cyanophora paradoxa*: implications concerning the phylogenetic relationship between *Cyanelles* and chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution*, 30:16-25.
- **Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983)**, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132:6-13.
- **Flook, P. K., Rowell, C. H. (1997)**, The effectiveness of mitochondrial rRNA gene sequences for the reconstruction of the phylogeny of an insect order (Ortoptera). *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 8, Issue 2, Pages 177-192.
- **Furlong, J. C., Maden, B. E. H. (1983)**, Patterns of major divergence between the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Xenopus borealis* and *Xenopus laevis*, and of minimal divergence within ribosomal coding regions. *EMBO J.*, 2:443-448.
- **Gerbi, S. A. (1986)**, The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *BioSystems*, 19:247-258.
- **Gonzales, I. L., Grski, J. L., Campen, T. J., Donrey, D. J., Erickson, J. M., Sylvester, J. E., Schmickel, R. D. (1985)**, Variation among human 28S ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82:7666-7670.
- **Gonzalez-Barrera, S., Garcia-Rubio, M., Aguilera, A. (2002)**, Transcription and double-strand breaks induce similar mitotic recombination events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 162:603-614.
- **Gorokhova, E., Dowling, T. A., Crease, T., Weider, L. J., Elser, J. J. (2002)**, Functional and ecological significance of rDNA IGS variation in a clonal organism under divergent selection for production rate. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 269:2373-2379.
- **Goutell, R. R., Fox, G. E. (1988)**, A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucleic Acids Research*, 16:r175-r269.
- **Grimaldi, G., Di Nocera, P. P. (1988)**, Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85:5502-5506.
- **Grimaldi, G., Fiorentini, P., Di Nocera, P. P. (1990)**, Spacer promoters are orientation-dependent activators of pre-rRNA transcription in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 10:4667-4677.
- **Grummt, I. (1999)**, Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology*, 62:109 -154.

- **Gutell, R. R., Fox, G. E. (1988)**, A compilation of large subunit RNA sequences presented in structural format. *Nucleic Acids Research*, 16:r175-r269.
- **Gutell, R. R., Schnare, M. N., Gray, M. W. (1990)**, A compilation of large subunit(23S-like) ribosomal RNA sequences presented in a secondary structure format. *Nucleic Acids Research*, 18s:2319-2330.
- **Hancock, J. M., Dover, G. A. (1988)**, Molecular coevolution among cryptically simple expansion segments of eukaryotic 26S/28S rRNAs. *Molecular Biology and Evolution*, 5:377-391.
- **Hassouna, N., Michot, B., Bachellerie, J.-P. (1984)**, The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 12:3563-3583.
- **Haubold, B., Wiehe, T. (2001)**, Statistics of divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, 18:1157 - 1160.
- **Hayworth, D. A. (2000)**, Hierarchical domains in concerted evolution of ribosomal DNA intergenic spacers in *Arabidopsis* (Brassicaceae). PhD Thesis, Washington University
- **Helling, R. B., Goodman, H. M., Boyer, H. W. (1974)**, Analysis of endonucleaseR-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *The Journal of Virology*, 14:1235-1244.
- **Hillis, D. M., Dixon, M. T. (1991)**, Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, Vol.66, No 4., pp.411-453.
- **Hofman, J. D., Lau, R. H., Doolittle, W. F. (1979)**, The number, physical organization and transcription of ribosomal RNA cistrons in an archaebacterium: *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acid Research*, 7:1321-1333.
- **Hoshikawa, Y., Iida, Y., Iwabuchi, M. (1983)**, Nucleotide sequence of the transcriptional initiation region of the *Dictyostelium discoideum* rRNA gene and comparison of the initiation regions of three lower eukaryotes' genes. *Nucleic Acids Research*, 11:1725-1734.
- **<http://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5430532>**
- **<http://www.oxitec.com/our-products/olive-fly-ox3713/>**
- **Jiang, C., Liao, D. (1999)**, Striking bimodal methylation of the repeat unit of the tandem array encoding human U2 snRNA (the RNU2 locus). *Genomics*, 62:508 -518.
- **Kjems, J., Garrett, R. A. (1990)**, Secondary structural elements exclusive to the sequences flanking ribosomal RNAs lend support to the monophyletic nature of the archaebacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 31:25-32.
- **Kumar, A., Rai, K. S. (1993)**, Molecular organization and evolution of mosquito genomes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 106B, No.3, pp. 495-504.
- **Lassner, M., Dvorak, J. (1986)**, Preferential homogenization between adjacent and alternate subrepeats in wheat rDNA. *Nucleic Acids Research*, 14:5499-5512.
- **Lassner, M., Dvorak, J. (1986)**, Preferential homogenization between adjacent and alternate subrepeats in wheat rDNA. *Nucleic Acids Research*, 14:5499 -5512.
- **Liao, D. (1999)**, Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics*, 64:24 -30.

- **Lieb, M. (1953)**, Studies on lysogenetion in *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 18:71-73.
- **Long, E. O., Dawid, I. B. (1980)**, Repeated genes in eukaryotes. Annual Review of Biochemistry, 49:727-764.
- **Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2005)**, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών, τόμος Ι, 10.16.
- **Mateos, M., Markow T. A. (2005)**, Ribosomal intergenic spacer (IGS) length variation across the Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae). BMC Evolutionary Biology, 5:46.
- **Mkizea, N., Hoelmerb, K. A., Villet, M. H. (2008)**, A survey of fruit-feeding insects and their parasitoids occurring on wild olives, *Olea europaea* ssp. *cuspidata*, in the Eastern Cape of South Africa. Biocontrol Science and Technology, 18:991-1004.
- **Moss, T., Stefanovsky, V. Y. (1995)**, Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology, 50:25-66.
- **Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K., Frati, F. (2005)**, Population Structure and Colonization History of the Olive Fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Molecular Ecology, 14:2729-2738.
- **Nazar, R. N., Sitz, T. O., Busch, H. (1976)**, Sequence homologies in mammalian 5.8S ribosomal RNA. Biochemistry, 15:505-508.
- **Neefs, J.-M., Van de Peer, Y. Hendrinks, L., Wachter, R. (1990)**, Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Research, 18s:2237-2318.
- **Polanco, C., Gonzalez, A. I., Dover, G. A. (2000)**, Patterns of Variation in the Intergenic Spacers of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Support a Model for Genetic Exchanges During X-Y Pairing. Genetics, 155:1221-1229.
- **Reeder, R. H. (1999)**, Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology, 62:293 -327.
- **Rocheford, T. R., Osterman, J. C., Gardner, C. O. (1990)**, Variation in the ribosomal DNA intergenic spacer of maize population massselected for high grain yield. Theoretical and Applied Genetics, 79:793-800.
- **Saiki, R. K., Gelfandm D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R. (1988)**, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239:487-491.
- **Schwartz, M. (1967)**, Sur l'existence chez *Escherichia coli* K12 d'une régulation commune à la biosynthesis des récepteurs du bactériophage λ at au métabolisme du maltose. Annales de l'Institut Pasteur, 113:685-704.
- **Seperack, P., Slatkin, M., Arnheim, N. (1988)**, Linkage disequilibrium in human ribosomal genes: implications for multigene family evolution. Genetics, 119:943-949.
- **Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook, J. (1973)**, Detection of two restriction edonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry, 12:3055-3063.

- **Simon, C., Franke, A., Martin, A. (1991)**, The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification In G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston, J. P. W. Young (eds.). *Techniques in Taxonomy*, pp. 329-355, Springer-Verlag, Berlin.
- **Smith, P. T., Kambhampati, S., Armstrong, K. A. (2003)**, Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26:8–17.
- **Southern, E. M. (1975)**, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Evolution*, 98:503-517.
- **Steele, K. P., Holsinger, K. E., Jansen, R. K., Taylor, D. W. (1991)**, Assessing the reliability of 5S rRNA sequence data for phylogenetic analysis in green plants. *Molecular Biology and Evolution*, 8:240-248.
- **Szmelcam, S., Hofnug, M. (1975)**, Maltose transport in *Escherichia coli* K12: Involvement of the bacteriophage lambda receptor. *The Journal of Bacteriology*, 124:112-118.
- **Thorne, H. V. (1966)**, Electrophoresis separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology*, 29:234-239.
- **Wang, S., Zhao, M., Li, T. (2003)**, Complete sequence of the 10.3 kb silkworm *Attacus ricini* rDNA repeat, determination of the transcriptional initiation site and functional analysis of the intergenic spacer. *DNA Sequence*, 14:95 -101.
- **Weider, L. J., Elser, J., Crease, T., Mateos, M., Cotner, J., Markow, T. (2005)**, The functional significance of ribosomal(r)DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annual Reviews on Ecology, Evolution and Systematics*, 36:219 -242.
- **Weider, L. J., Glenn, K. L., Kyle, M., Elser, J. J. (2004)**, Associations among ribosomal (r)DNA intergenic spacer length, growth rate, and C:N:P stoichiometry in the genus *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 49:1417-1423.
- **Wolters, J, Erdmann, V. A., (1986)**, Cladistic analysis of 5S rRNA and 16S rRNA secondary and primary structure - the evolution of eukaryotes and their relation to Archaeobacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 24:152-166.
- **Zaher, H. S., Unrau P. J. (2007)**, Selection of an improved RNA polymerase ribozyme with superior extension and fidelity. *RNA*, 13:1017 -1026.
- **Zhang, B., Liu, Y. H., Wu, W. X., Wang, Z. L. (2010)**, Molecular phylogeny of *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae: Dacini) inferred from mitochondrial sequences of 16S rDNA and COI. *Florida Entomologist*, 93(3).
- **Zygouridis, N. E., Augustinos, A. A., Zalom, F. G., Mathiopoulos, K. D. (2009)**, Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity*, 102, 402 -412.
- **Αλαχιώτης, Σ. Ν. (2007)**, Εκδοτικός Οίκος Α. Α. Λιβάνη, Εισαγωγή στην Εξέλιξη, 6:221-258.



## 8. Παράρτημα

### 8.1 Αλληλουχία 18S στο *Bactrocera oleae*

5'\_CTGGTTGATTCTGCCAGTAGTTATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTACAAACAAATTTAAAGTGA  
AACCGCAAAAGGCTCATTATATCAGTTATGGTTCCATAAAATCGTTAACAGTTACTTGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACAT  
ACAAAATAAACACGGACCTTTTGGAACGTGTGCTTTTATTAGGCTAAAACCAAGCGATTATTCGATCGTTATATTGGTTGAACTCTAG  
ATAACTTGCAGATCGTATGGTCTCGTACCGACGACAGATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTTTTGATGGTAGTATCTAGGACTAC  
CATGGTTGCAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAG  
CAGGCGCGTAAATTACCCACTCCCAGTTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGACTCATATCCGAGGCCCTGTAATTG  
GAATGAGTACACTTTAAATCCTTTAACAAGGACCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAG  
CGTATATTAAGTTGTTGCGGTTAAACGTTCTAGTTGAATTTGTGCTTCATACGGGTAGTACAACATAAATTGTGGTATGTACATTA  
CCTTATGTATGTAAGCGTATTACCGGTGGAGTTCCTATATATAATTAATACAATGATTTTTTATATATTCCTCCTATTTAAACCTGCTT  
CAGTGCTCTTCATCGAGTGTTGTTGTGGGCCGGTACAATTACTTTGAACAAATTARAGTGCTTAAAGCAGGCTCCAAATGCCTGAAT  
ATTTTGTGCATGGAATAATGAAATAAGACCTCTGTTCTACTTTCATTGGTTTTAGATCAAGAGGTAATGATTAATAGAAGCAGTTTGG  
GGGCATTAGTATTACGACGCGAGAGGTGAAATTCTTGACCGTCGTAAGACTAECTTAAGCGAAAGCATTGCCAAARATGTTTTCA  
TTAATCAAGAACGAAAGTTAKAGGTTCAAGGMKATCARATACCGCCCTARTTCTAACCATAAACGATGCCAGCTAGCAATTGGGTG  
TAGCTACTACTATGGCTCTCTCAGTCGCTTCCCGGGAACCAAAGCTTTTGGGCTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACT  
TAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGAGCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCGAACAT  
AAGCGTGTAAGACAGATTGATAGCTCTTCTCGAATCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTCGTGGAGTGATTTGTCTGG  
TTAATCCGATAACGAACGAGACTCAAATATATTAATAGATGCTTTCAGGATTATGGTGTTGAAGCTTATATAGCCTTCATTCATGCG  
TTCATCTTGAATGTACAAGTGTGTTGAATGTGTTTATATAAGTGGAGTCGTACCTGTTGGTTTGTCCCATTATAAGGACACTAGCTTCTT  
AAATGGACAAATTGCGTCTAGCAGTAACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCT  
ACAATGAAAGTATCAACGTGTATTTCTGACCGAGAGGTCCGGTAAACCGCTGAACCACTTTCATGCTTGGGATTGTGAACTGAA  
ACTGTTACATGAACCTTGAATTCCAGTAAGTGTGAGTCATTAACTCGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGT  
CGCTACTACCGATTGAATTTTAGTGAGGTCTCCGGACGTGATCACTGTGACGCCTTGTTGTTTACGGTTGTTTCGCAAAAGTTGA  
CCGAACCTTGATTTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCAG\_3'

### 8.2 Αλληλουχία 28S στο *Bactrocera oleae*

5'\_CTACCCCTGAATTTAAGCATATTAATGAGGGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTTTCTTAGTAGCGGCGAGCGAAA  
AGAAAATAGTTCAGCACTAAGTCACTTTGTCTATATGGCAAATGTGAGATGCAGTGTATGGAATATCTTAATATCTAGTATGAGAAAT  
TAACGATTTAAGTCCTTCTTAAATGAGGCCATTTACCCATAGAGGGTCCAGGCCGTATAACGTTAATGATTACTAGAAAGATATTT  
CCAAAGAGTCGTGTTGCTTGATAGTGCAGCACTAAGTGGGTGGTAACTCCATCTAAAACATAAATAACCATGAGACCGATAGTAA  
ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAAGTCTGAATAGAGAGTTAAATAGTACGTGAAACTGCTTAGAGGTTAAGCCCCGATGAAC  
CTGAATATCCATTATGAAAAATTCATCATTATAACTGTAGTATTTAATTTAAATATTATAATAATAGTGTGCATTTTTTTCATATAAGGA  
CATTGTAATCTATTAACATAATAAAATTTATCAAAGATCATTGGTTTTAAGTTTATTCAAATTAATTTGCTTTTAGCTTATTAACAT  
AGAATAACTGATGATTTGATAAAGTGTGATAGATTTTATTATATATAATGCTAAAATTCTTTGAATTTTACAATAATATTATTATC

ATTGATTTTAATATTAATTGTATGCATTTATATGATTAACAATGCGAAAGATTTCAGGATACCTTCGGGACCCGCTTGAAACACGGAC  
CAAGGAGTCTAACATATGTGCAAGTCATTGGGTTATATTAACCTAATGGCGAAATTAACCTTAAGTGTATTAATAATGGGATTAATTTT  
TTAATGTATTACATTATTAATTC AATCCCGGGGCGTTCCATATAGTTATGTATAATGATAATTTATTATTATTATACCTCTAACTGGAG  
CGTACCTTGAGCATATATGCTGTGACCCGAAAGATGGTGAECTATACTTGATCAGGTTGAAGTCAGGGGAAACCCTGATGGAAGAC  
CGAAACAGTTCTGACGTGCAAAATCGATTGTCAGAATTGAGTATAGGGGCGAAAGACCAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCCTC  
CGAAGTTTCCCTCAGGATAGCTGGTGCATTTAAAATTATGTAAAATAATCTTATCTGGTAAAGCGAATGATTAGAGGCCTTAGGGTC  
GAAACGACCTTAACCTATTCTCAAACCTTTAAATGGGTAAGAACCTCACCTTTCTTGATATGAAGGTTGAGGTTATGATAATGTGCC  
CAGTGGGCCACTTTTGGTAAGCAGAACTGGCGCTGTGGGATGAACCAAACGTAATGTTACGGTGCCTAAATTAACAACCTCATGCAG  
ATACCATGAAAGGCGTTGGTTGCTTAAAACAGCAGGACGGTGGACATGGAAGTCGTAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACC  
TGCCGAASCAAYTAGCCCTTAAAATGGATGGCGCTTAAGTTGTATACCTATACATTACCGCTAAAGTACATGATTTATAATACAATTC  
GGTTGGATTATAAATTTTGAACCTTTAGTGAGTAGGAGGGTACAATGGTGTGCTTAGAAGTGTGGCGTAAGCCTGCATGGAGCCG  
CTATTGGTACAGATCTTGGTGGTAGTAGCAAATAATCGAATGAGACCTTGGAGGACTGAAGTGGAGAAGGGTTTCGTGTGAACAGT  
GGTTGATCACGAGTTAGTCGGTCTAAGTTC AAGGCGAAAGCCGAAAATTTCAAGTTTTAATGAAATGAAATGAATGAATTTTTATT  
CCATAGTAATTAACACTTGAATAATTTTGAACGAAAGGGAATACGGTTCCAATCCGTAACCTGTTGAGTATCCGTTTGTATTAAAA  
ATGGGCCCTTGTGCTCATCTGGCAACAGGAACGACCATAAGAAGCCGTCGAGAGGTATCGGAAGAGTTTTCTTTCTGTTTTATAG  
TCGTA CTACCATGGAAGTCTTTCGAAGAGAGATATGGTAGATGGACTAGAAGAGCATGACATTTACTGTTGTGTCGATATTTTCTCCT  
CGGACCTTGAAAATTTATGGTGGGGTTACGCAAACCTTCTCAACAGGCCGTACCAATATCCGCAGCTGGTCTCCAAGGTGAAGAGTC  
TCTAGTCGATAGAATAATGTAGGTAAGGGAAGTCGGCAAATTAGATCCGTAACCTTCGGGATAAGGATTGGCTCTGAAGATTGAGATA  
GTCCGGCTTGATTGGGAAGCAATACCATGGTTTATGTA CTGTTCTGGGTAATAGAGAATTCGATTCTTGTTC CCGGATAGTAG  
TTACGYAGCCAATTGTGGMACTYTCTTGCTAAAATTTCTAAAGGATTTATTATTGTATAGATACTTTTTAAATTATAACGATTATCAATT  
AACATCAATTCAGAACTGGCACGGACTTGGGGAATCCGACTGTCTAATTAACAAAGCATTGTGATGGCCCTAACGGGTGTTGAC  
ACAATGTGATTTCTGCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGAAGAAATTC AAGTAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTC  
TCTTAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATCCCTCTGTCCCTATCTACTATCTAG  
CGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGAATAATTAGCGGGGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGACTCTAGTCTGGCAGTGTA  
GGAGACATAAGAGGTGTAGCATAAGTGGGAGATATATAATTCGGTTATATATCAACAATGAAATACCACTACTCTTATTGTTTCCTT  
ACTTACTTGATTAAGTGAACGTGTATCATTGCTTAGCCATTATGGGTATATTTATATATCTTATGGTATTGGGTTTTGATGCAAGC  
TTCTTGATCAAAGTACCACGAGTTTGTATATAATTGTA AACTTTTTTAAATGAAATGGTAGCACTTCGGTGTATTATTATAAATAAA  
ATTTGGTATAACTCCAACACTCAGGTATGATCCAATTC AAGGACATTGCCAGGTGGGGAGTTTGACTGGGGCGGTACATCTCTCAA  
TAATAACGGAGGTGCCAAGGCCAGCTCAGTGCGGACAGAAACCACACATAGAGCAAAGGGCAAATGCTGACTTGATCTCGGT  
GTTGAGTACACACAGAGACAGCAAAGCTCGGCCTATCGATCCTTTTGGTTTAAAGAGTTTTTAAACAAGAGGTGTCAGAAAAGTTAC  
CACAGGGATAACTGGCTTGTGGCGGCCAAGCGTTCATAGCGACGTGCTTTTTGATCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTATCATTGTG  
AAGCAAATTCACCAAGCGTTGGATTGTTCAACCATTCAAGGGAACGTGAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTTAC  
CCTACTAATGACAATTGTTATTGCGACAGCATTCTGCGTAGTACGAGAGGAACCGCAGGTACGGACCAATGGTACAATACTTGTTG  
GAGCGAACAGTGGTATGATGCTACGTCCGTTGGATTATGCCTGAACGCCTCTAAGGTCGATCCGTGCTGGACTGCAATGATAAAT  
ATGGGGCAATTGCATTGTATGGCTTCTCTAAACCATTTAAAGTTTATAAATTTTATTATAAACGACAATGGATATATGTGATGCCAAT  
GTTATTTGTAACATAGCAAATACGGGAGGATTAATATCACCTGTATGACSCGCTAGTTACTTATTAACATTATTTAATACAATGTC  
AATGCCTAGAATCAATTGTAACGACTTTGGTAACGGCAAGGTGTTGTAAGTGGTTGAGAA\_3'