

Α.Τ.Ε.ΙΘ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΧΑΡΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ
ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΖΙΟΥΤΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΧΑΤΖΗΠΛΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ.....	4
Οι σημαντικότερες ανακαλύψεις.....	5
1.1 Μοριακή Γενετική.....	8
1.2 Βασική Τεχνική Υπερφυγοκέντρισης.....	8
2.1 Μοριακές Τεχνικές.....	10
2.2 Ηλεκτοφόρηση.....	10
2.3 Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis...	12
2.4 Δύο διαστάσεων (2-D) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	14
2.5 Απεικόνιση Πρωτεϊνών.....	16
3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	17
3.2 Διαδικασία Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	18
3.3 Συσκευή Real- time PCR.....	19
4.1 Χρωμόσωμα.....	24
4.2 Γενετική σύνδεση.....	25
4.3 Χάρτες σύνδεσης.....	26
4.4 RFLP.....	27
4.5 Μικροδορυφορικοί Δείκτες.....	28
4.6 ISSR-PCR.....	29

4.7 Χαρτογράφηση γονίδιων με ανάλυση ανασυνδυασμού.....	29
4.8 Μέθοδος της τιμής Iod.....	31
5.1 Τμηματικός Γενετικός Χάρτης Σύνδεσης της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>).....	32
5.2 Υλικά Και Μέθοδοι	34
5.2 Αποτελέσματα	37
5.3 Σχολιασμός Αποτελεσμάτων και Συμπεράσματα	40
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γενετική αποτελεί τον κλάδο της βιολογίας που επιχειρεί να δώσει απαντήσεις σε ερωτήματα γύρω από τους μηχανισμούς της κληρονομικότητας και της βιοποικιλότητας. Ο όρος γενετική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Άγγλο επιστήμονα Γουίλλιαμ Μπέιτσον (William Bateson), σε ένα γράμμα του προς τον Άνταμ Σέντζγουϊκ, με ημερομηνία 18 Απριλίου 1905.

Σαν επιστήμη αλλά και σαν φιλοσοφία υπάρχει από την πρώτη στιγμή ύπαρξης οργανισμών στον πλανήτη μας, όμως μόλις πριν λίγες δεκαετίες έγινε αντιληπτή και μόνο πριν λίγα χρόνια αναλύθηκε σε βαθμό πλήρους κατανόησης.

Έτσι άρχισαν να γίνονται και τα πρώτα βήματα κατανόησής της και ουσιαστικής εμβάθυνσης στην επιστήμη της γενετικής, με απώτερο σκοπό την πλήρη κατάκτηση της και την εκμετάλλευσή της ως εργαλείο προς όφελος του ανθρώπου. Αρχικά σε μακροσκοπικό επίπεδο στην καθημερινή ζωή απλών ανθρώπων με την επιλογή φαινοτυπικά των καλύτερων ατόμων για την βελτίωση αυτών και μετά μικροσκοπικά στα εργαστήρια με την γενοτυπική επιλογή.

Ο μεγαλύτερος και πιο υπομονετικός γενετιστής είναι η ίδια η φύση όπου με την φυσική και συνεχή εξέλιξη αλλά και προσαρμογή των γενεών ανά τους αιώνες πέτυχε είτε τη διατήρηση των ειδών και την βελτίωση των πληθυσμών τους είτε την εξάλειψη τους όταν δεν μπόρεσαν να προσαρμοστούν σε ένα περιβάλλον συνεχώς μεταβαλλόμενο. Ο άνθρωπος αρχικά παρατηρώντας και στην συνέχεια εμπνεόμενος από αυτόν το μηχανισμό ανέλαβε ο ίδιος το έργο αυτό έτσι ώστε να βελτιώσει τους πληθυσμούς που εκμεταλλεύτηκε. Μικραίνοντας το μεσοδιάστημα των γενεών και επικεντρώνοντας στα χαρακτηριστικά που ήθελε να αναδείξει και κρύβοντας ή ακόμα και διαγράφοντας εκείνα που ήταν άχρηστα ή εμπόδιο για την βελτίωση που ήθελε να επιτύχει.

Στις μέρες μας και αφού ο κύκλος της αμφισβήτησης και δαιμονοποίησης της γενετικής αρχίζει να κλείνει και μετά από χρόνια μελετών και ερευνών έχουμε και

τον διαχωρισμό σε εξειδικευμένα τμήματα με απτά αποτελέσματα, όχι μόνο σε εργαστηριακό περιβάλλον ,αλλά και στην καθημερινότητα ακόμα και του ποιο απλού ανθρώπου μπορούμε να αναφερθούμε σε εξειδικευμένα κομμάτια της γενετικής. Ένα τέτοιο κομμάτι είναι η Μοριακή γενετική και οι μέθοδοι τεμαχισμού του DNA με διαφόρους τρόπους, το οποίο είναι και το αντικείμενο αυτής της εργασίας. (Μπακολίτσας, 2005)

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

Επίσημα, πατέρας της γενετικής θεωρείται ο Γκρέγκορ Μέντελ, ο οποίος το [1865](#) διατύπωσε τους [νόμους που φέρουν το όνομα του](#). Η αλήθεια όμως είναι πως το ζήτημα της μετάδοσης χαρακτηριστικών από γενιά σε γενιά έχει απασχολήσει τον άνθρωπο από την αρχαιότητα.

Για παράδειγμα, οι [αρχαίοι Βαβυλώνιοι](#) γνώριζαν ότι για να παραχθεί καρπός σε [φοινικόδεντρα](#) έπρεπε να μεταφερθεί [γύρη](#) από άρρενα φυτά στους υπέρους των ανθών θηλυκών φυτών. Επίσης, ένα βαβυλωνιακό πινακίδιο, του οποίου η ηλικία χρονολογείται πάνω από 6.000 έτη, παρουσιάζει γενεαλογίες [αλόγων](#) και υποδεικνύει πιθανά κληρονομικά χαρακτηριστικά.

Στην [αρχαία Ελλάδα](#), ο [Πυθαγόρας](#) διατύπωσε την υπόθεση ότι η ζωή ξεκινά με την ανάμιξη αρσενικών και θηλυκών σπερμάτων, τα οποία βρίσκονται σε τμήματα του [ανθρώπινου σώματος](#). Τον [4ο αιώνα π.Χ.](#) ο [Αριστοτέλης](#) υποστήριξε ότι φορέας των κληρονομικών χαρακτηριστικών είναι το [αίμα](#) (αρκετοί θεωρούν ότι κατάλοιπα αυτής της αντίληψης αποτελούν εκφράσεις όπως 'γαλαζοαίματος' ή 'συγγενείς εξ αίματος' που μέχρι τις μέρες μας χρησιμοποιούνται). Παράλληλα ο Αριστοτέλης θεωρούσε ότι η συμβολή καθενός από τους γονείς ήταν διαφορετική: το αρσενικό προσφέρει στους απογόνους την 'κίνηση', ενώ το θηλυκό την 'ύλη'.

Το [1651](#), ο [Άγγλος](#) γιατρός [Γουίλλιαμ Χάρβεϋ](#) (William Harvey) υποστήριξε μια διαφορετική άποψη. Μελετώντας τα [έμβρυα ελαφιών](#), διαπίστωσε ότι στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους έχουν τη μορφή [αυγού](#). Έτσι μέχρι το τέλος του [17ου](#)

[αιώνα](#) είχε διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα 'αυγά' παράγονται σε όργανα των θηλυκών (που γι'αυτό το λόγο ονομάζονται [ωοθήκες](#)) και ότι το σπέρμα μεταφέρει το κληρονομικό υλικό του αρσενικού.

Στις αρχές του [19ου αιώνα](#), ο [Γάλλος](#) φυσιολόγος [Ζαν Λαμάρκ](#) υποστήριξε ότι και τα επίκτητα χαρακτηριστικά κληρονομούνται. Αργότερα τον ίδιο αιώνα, ο [Κάρολος Δαρβίνος](#) τόνισε τη σημασία που έχει η κατανόηση των μηχανισμών της κληρονομικότητας για τη μελέτη της εξέλιξης των ειδών. Γύρω στο [1865](#), ο Γκρέγκορ Μέντελ (Gregor Mendel) παρουσίασε τις διάσημες πλέον εργασίες του πάνω στην κληρονομικότητα, οι οποίες αποτελούν κομβικό σημείο για την επιστήμη της γενετικής. Έτσι, ο [20ος αιώνας](#) αποτελεί τον αιώνα που η γενετική εξελίσσεται, μέσα από μία σειρά συναρπαστικών ανακαλύψεων γύρω από τους μηχανισμούς της κληρονομικότητας. (Μπακολίτσας, 2005)

Οι σημαντικότερες ανακαλύψεις

- [1859](#) : Ο [Κάρολος Δαρβίνος](#) δημοσιεύει το βιβλίο «[Η καταγωγή των ειδών](#)» (*The Origin of Species*).
- [1865](#) : Ο [Γκρέγκορ Μέντελ](#) δημοσιεύει τις εργασίες του.
- [1903](#) : Αποδεικνύεται ότι τα [χρωμοσώματα](#) είναι φορείς του κληρονομικού (γενετικού) υλικού.
- [1905](#) : Ο Γουίλλιαμ Μπέιτσον χρησιμοποιεί για πρώτη φορά τον όρο *γενετική*.
- [1910](#) : Ο [Τόμας Μόργκαν](#) (Thomas Hunt Morgan) δείχνει ότι το [γονίδιο](#) βρίσκεται στα χρωμοσώματα.
- [1913](#) : [Άλφρεντ Στούρτεβαντ](#) (Alfred Sturtevant) κατασκευάζει τον πρώτο [γενετικό χάρτη](#) ενός χρωμοσώματος.

- [1918](#) : Ο [Ρόναλντ Φίσερ](#) (Ronald Fisher) δημοσιεύει το άρθρο «*On the correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance*», η [μοντέρνα σύνθεση](#) ξεκινά.
- [1927](#) : Αποδίδεται ο όρος [μεταλλάξεις](#) στις αλλαγές που πραγματοποιούνται στην αλληλουχία του DNA.
- [1928](#) : Ο [Φρέντερικ Γκρίφιθ](#) (Frederick Griffith) πραγματοποιεί πειράματα που δείχνουν ότι στο [βακτήριο πνευμονιόκοκκος](#) υπάρχει ένα μόριο που μεταφέρει γενετική πληροφορία ([Πείραμα του Γκρίφιθ](#)).
- [1931](#): Η [Μπάρμπαρα Μακλίντοκ](#) (Barbara McClintock) αποδεικνύει ότι η [μειωτική διαίρεση](#) συνοδεύεται από ανταλλαγή χρωμοσωμικού υλικού.
- [1941](#): Οι [Έντουαρντ Τάτουμ](#) (Edward Lawrie Tatum) και [Τζωρτζ Μπιντλ](#) (George Wells Beadle) δείχνουν ότι ο ρόλος των περισσότερων γονιδίων είναι να κατευθύνουν τη σύνθεση [ενζύμων](#).
- [1944](#) : Οι [Όσβαλντ Άβερι](#) (Oswald Theodore Avery), [Κόλιν Μακλέοντ](#) (Colin McLeod) και [Μακλίν Μακάρτι](#) (Maclyn McCarty) επαναλαμβάνουν το πείραμα του Γκρίφιθ «*in vitro*» και αποδεικνύουν ότι το [DNA](#) είναι το γενετικό υλικό.
- [1950](#) : Ο [Έρβιν Τσάργκαφ](#) (Erwin Chargaff) εντοπίζει την ύπαρξη ορισμένων γενικών κανόνων που αφορούν τον αριθμό νουκλεοτιδίων σε κάθε μόριο DNA (πχ. ότι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που έχουν ως βάση την [αδενίνη](#) είναι ίσος με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που έχουν ως βάση τη [θυμίνη](#)).
- [1952](#) : Οι Χέρσεϋ και Τσείς δείχνουν ότι το γενετικό υλικό του [βακτηριοφάγου](#) T₂ είναι το DNA.
- [1953](#) : Οι [Τζέιμς Γουάτσον](#) (James D. Watson) και [Φράνσις Κρικ](#) (Francis Crick) προτείνουν το μοντέλο της [διπλής έλικας](#) για τη δομή του DNA.
- [1956](#) : Οι [Jo Hin Tjio](#) και [Άλμπερτ Λεβάν](#) (Albert Levan) καθορίζουν τον αριθμό 46 ως το πλήθος των χρωμοσωμάτων στον ανθρώπινο οργανισμό.

- [1958](#) : Οι Μέσελσον και Σταλ αποδεικνύουν ότι το DNA αντιγράφεται με [ημισυντηρητικό τρόπο](#).
- [1961](#) : Οι Κρικ και Νίρενμπεργκ ανακαλύπτουν τη [νουκλεοτιδική τριπλέτα](#) και αποκρυπτογραφούν εν μέρει το [γενετικό κώδικα](#).
- [1964](#) : Ο [Χάουαρντ Τέμιν](#) (Howard Temin) δείχνει (μετά από πειράματα με [ιούς RNA](#)) ότι η διατύπωση του Γουάτσον για το [κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας](#) είναι ελλιπής.
- [1970](#) : Ανακαλύπτεται στους ρετροϊούς το ένζυμο [αντίστροφη μεταγραφήση](#).
- [1972](#) : Δημιουργείται το πρώτο [ανασυνδυασμένο μόριο DNA](#) σε εργαστηριακές συνθήκες.
- [1974](#) : Επιτυγχάνεται η [κλωνοποίηση](#) ευκαρυωτικών γονιδίων σε βακτηριακά πλασμίδια.
- [1977](#) : Επιτυγχάνεται η ανάπτυξη τεχνικών προσδιορισμού της αλληλουχίας βάσεων του DNA, από ερευνητές που δούλεψαν ανεξάρτητα, όπως οι [Φρεντ Σάνγκερ](#) (Fred Sanger), [Γουόλτερ Γκίλμπερτ](#) (Walter Gilbert) και [Άλαν Μέιξαμ](#) (Allan Maxam). Η ερευνητική ομάδα του Σάνγκερ προσδιορίζει την αλληλουχία βάσεων του βακτηριοφάγου [Φ-X174](#).
- [1983](#) : Ο [Κέρι Μάλις](#) (Kary Banks Mullis) ανακαλύπτει τη [μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης \(PCR\)](#) που διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA.
- [1985](#) : Ο [Άλεκ Τζέφρις](#) (Alec Jeffreys) ανακαλύπτει τη [μέθοδο αποτυπωμάτων DNA](#) (DNA fingerprinting).
- [1989](#) : Για πρώτη φορά προσδιορίζεται η αλληλουχία βάσεων σε ανθρώπινο γονίδιο, από τους [Φράνσις Κόλλινς](#) (Francis Collins) και [Λαπ-Τσι Τσούι](#) (Lap-Chee Tsui). Πρόκειται για το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CFTR.
- [1990](#) : Ξεκινά το [Πρόγραμμα για τη χαρτογράφηση του Ανθρώπινου Γονιδιώματος](#).

- [1996](#) : Αποκρυπτογραφείται για πρώτη φορά το γονιδίωμα ενός [ευκαρυωτικού οργανισμού](#), του *Saccharomyces cerevisiae*.
- [1998](#) : Αποκρυπτογραφείται το γονιδίωμα του νηματοσκώληκα *Caenorhabditis elegans*.
- [2003 \(14 Απριλίου\)](#) : Ολοκληρώνεται, ως προς το σκέλος της χαρτογράφησης, το [Πρόγραμμα για το Ανθρώπινο Γονιδίωμα](#). Με ακρίβεια 99,99%, έχει αποκρυπτογραφηθεί το 99% του ανθρώπινου Γονιδιώματος.

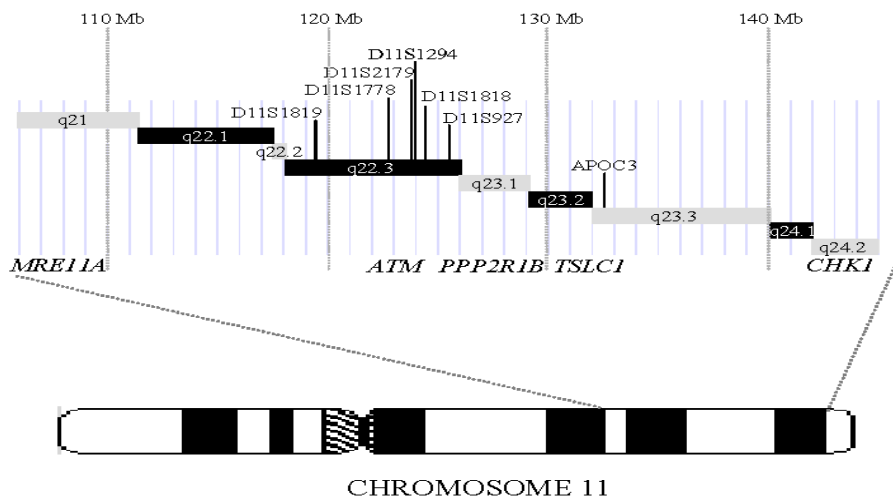
1.1 Μοριακή Γενετική

Η Μοριακή Γενετική είναι ο κλάδος της βιολογίας που μελετά τη δομή και τη λειτουργία των γονιδίων σε μοριακό επίπεδο. Σε αυτόν τον ειδικό κλάδο μελετάται η μεταφορά των γονιδίων από γενεά σε γενεά. Η μοριακή γενετική χρησιμοποιεί τις μεθόδους της **γενετικής** και της **μοριακής βιολογίας**. Ονομάζεται έτσι για να διαφοροποιείται από άλλα πεδία της γενετικής, όπως είναι η πληθυσμιακή γενετική. Ιδιαίτερα σημαντική περιοχή στον τομέα της έρευνας είναι η χρήση της μοριακής πληροφορίας για τον καθορισμό της καταγωγής και συνεπώς της ορθής επιστημονικής ταξινόμησης των οργανισμών: η συγκεκριμένη μέθοδος αποδίδει το μοριακό σύστημα ταξινόμησης.

Εκτός του ότι καθορίζει το πρότυπο καταγωγής, η μοριακή γενετική βοηθά στην κατανόηση γενετικών μεταλλάξεων που μπορούν να προκαλέσουν ορισμένους τύπους ασθενειών. Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της γενετικής και της μοριακής βιολογίας, η μοριακή γενετική ανακαλύπτει τις αιτίες της μεταφοράς συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ή των πιθανών μεταλλάξεών τους. (Ι. Παπαποστόλου, 2009)

1.2 Βασική Τεχνική Υπερφυγοκέντρισης

Η αναλυτική υπερφυγοκέντριση αναπτύχθηκε την δεκαετία του 1920 από τον Theodor Svedberg. Ο ρυθμός καθίζησης μιας ουσίας είναι συνάρτηση κυρίως του μεγέθους και κατά δεύτερο λόγο του σχήματος της. Η μονάδα καθίζησης S είναι έκφραση αυτών των παραμέτρων.



Με την εφεύρεση και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου την δεκαετία του 1930 κατέστη δυνατή η παρατήρηση όχι μόνο υποκυτταρικών δομών, αλλά επίσης και ιών και μικρομορίων. Έτσι αποδείχθηκε ότι οι κυκλικοί γενετικοί χάρτες των μικροοργανισμών έχουν την αντίστοιχη κυκλική φυσική δομή. Έγινε επίσης δυνατή η παρατήρηση πολλαπλών ριβοσωμάτων προσκολλημένων σε ένα μόριο mRNA (πολύσώματα).

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1950 και στις αρχές της δεκαετίας του 1960, μοριακοί βιολόγοι έχουν μάθει να χαρακτηρίζουν, και να απομονώνουν για να χειριστούν τα μοριακά συστατικά των κυττάρων και των οργανισμών. Αυτά τα στοιχεία περιλαμβάνουν το DNA και την αποθήκη της γενετικής πληροφορίας το RNA, ένα στενό συγγενή του DNA, όπου λειτουργεί ως προσωρινό αντίγραφο εργασίας του DNA, με τις πραγματικές διαρθρωτικές και ενζυματικές λειτουργίες, καθώς και τα λειτουργικά, δομικά μέρη, της μεταγραφικής αλυσίδας και των πρωτεϊνών. (Γούναρης, 2000)

2.1 Μοριακές Τεχνικές

- Μέθοδος Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

- Μέθοδοι PCR
 - Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

 - Rep-PCR genomic fingerprinting

 - Random amplified polymorphic PCR (RAPD)

 - Arbitrarily primed PCR(AP-PCR)

 - DNA amplification fingerprinting (DAF)

- Μέθοδος Ribotyping

- Μέθοδος Variable Number Tandem Repeats (VNTR)

- Μέθοδος Multilocus Sequence Typing (MLST)

- Μέθοδος Multilocus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA)

2.2 Ηλεκτοφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που ξεχωρίζει μόρια σύμφωνα με το καθαρό τους φορτίο σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, συνήθως πάνω σε στερεό ή ημιστερεό μέσο, όπως το χαρτί ή το άγαρ. Ο Linus Pauling χρησιμοποίησε αυτή την τεχνική για να

ξεχωρίσει την δρεπανοκυτταρική αιμοσφαιρίνη από την κανονική και βρήκε (με ανάλυση της ακολουθίας των αμινοξέων στην πρωτεΐνη) ότι η διαφορά στις ηλεκτροφορητικές κινητικότητας αυτών των πρωτεϊνών οφείλεται στη διαφορά σε ένα μόνο αμινοξύ στις αλυσίδες. Ο Walter Gilbert και ο Allan Mazham ανέπτυξαν μία ηλεκτροκινητική τεχνική που επιτρέπει τον προσδιορισμό της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων σε κομμάτια DNA που έχουν μήκος μέχρι 100 ζεύγη βάσεων. Η ηλεκτοφόρηση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για να γίνει η διάκριση των ισοενζύμων, δηλ. πρωτεϊνών που έχουν ίδιες ενζυματικές ιδιότητες, αλλά διαφέρουν στην δομή.

Η [ηλεκτροφόρηση](#) είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στην μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κ.ά. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο, προσδιορισμό μοριακού βάρους (M.B.) ενώ ως δείγματα μπορεί να είναι οτιδήποτε μπορεί να κουβαλάει φορτίο – από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα, φαρμακευτικές ουσίες, οργανικά οξέα και βάσεις και πολλά άλλα.

Η **βασική αρχή** στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η [ηλεκτροφόρηση](#).

Υπάρχουν 3 κύριες ηλεκτροφορητικές μέθοδοι:

- **Ηλεκτροφόρηση (zone electrophoresis – ZE)**
- **Ισοταχής ηλεκτροφόρηση (Isotachopheresis – ITP)**

- **Ισοηλεκτρικός εστιασμός (Isoelectric focusing – IEF)**

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε χαρτί, φιλμ και πηκτές (gels). Οι πιο γνωστές είναι η [ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών](#) και [DNA](#) σε πηκτές [ακρυλαμίδης](#) και αγαρόζης, αντίστοιχα. Παρακάτω θα ακολουθήσει η περιγραφή της πιο ευρέως χρησιμοποιούμενης ηλεκτροφορητικής μεθόδου πρωτεϊνών, της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση [SDS](#) (SDS-PAGE) και της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2-D electrophoresis).

2.3 Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον διαχωρισμό και ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων ενώ παράλληλα συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους (π.χ. western blotting, IEF, mass spectrometry).

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης είναι χημικά αδρανής και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης με το αντιδραστήριο N,N'-methylenebisacrylamide. Το μίγμα (ακρυλαμίδης, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED) χύνεται μέσα σε καλούπια και οι πηκτές μπορούν να είναι είτε κυλινδρικές (μέσα σε κυλινδρικούς γυάλινους σωλήνες) ή επίπεδες (ανάμεσα σε 2 επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά άκρα τους) ενώ τα δείγματα τοποθετούνται σε οπές (wells) στο πάνω μέρος της πηκτής.

Γενικά, στην PAGE οι πηκτές μπορούν να κατασκευαστούν με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer (continuous buffer systems) ή με τη δημιουργία ενός 'συγκεντρωτικού' gel (stacking gel) ακριβώς πάνω από το 'αναλυτικό' gel (resolving gel) (discontinuous buffer systems). Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το resolving (ή separation ή running) gel, στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Οι δυο αυτοί παράμετροι, δηλαδή η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer επιτρέπει δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτή όπου και θα διαχωριστούν. Αυτό βελτιώνει κατά πολύ την ανάλυση καθώς όλο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται

απο το ίδιο σημείο. Αντίθετα, τα συστήματα με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer επιβάλλουν τη συγκέντρωση του δείγματος σε πολύ μικρό όγκο.

Το 1970, ο Laemmli, εισήγαγε ένα σύστημα (Tris-glycine-SDS system) το οποίο χρησιμοποιείται περισσότερο στις μέρες μας. Στο σύστημα αυτό, το stacking gel έχει pH 6,8 και το δείγμα 'παγιδεύεται' ανάμεσα σε ιόντα Cl⁻, τα οποία προηγούνται, και μόρια γλυκίνης, τα οποία ακολουθούν, και έτσι το δείγμα σχηματίζει μια λεπτή μπάντα (band), σύμφωνα με τις αρχές της ισοταχής ηλεκτροφόρησης. Αυτό συμβαίνει διότι η γλυκίνη είναι διπολικό ιόν σε αυτό το περιβάλλον, καθώς η τιμή pKa της γλυκίνης είναι αρκετά υψηλότερη από το pH του gel, και έτσι η κινητικότητα των μορίων της είναι πολύ χαμηλή.

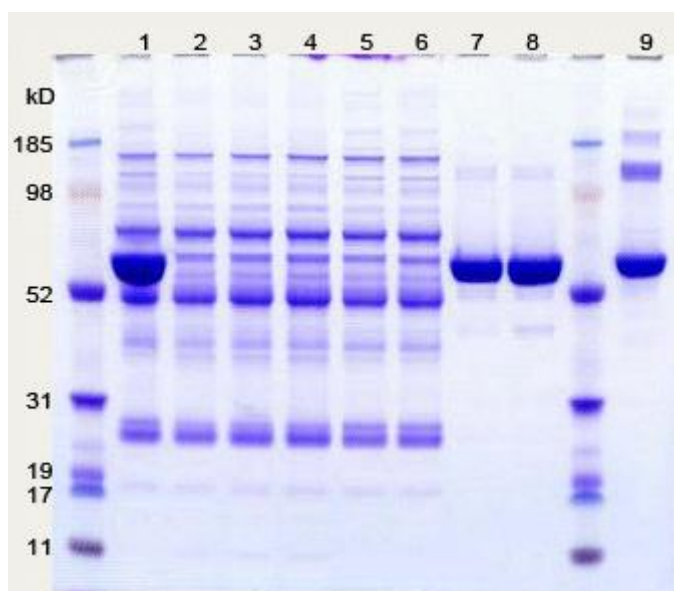
Τα ιόντα χλωρίου έχουν υψηλότερη κινητικότητα και προηγούνται αλλά δε μπορούν να απομακρυνθούν καθώς αφήνουν πίσω τους θετικά ιόντα δημιουργώντας μια διαφορά δυναμικού κρατώντας τα σε κοντινή απόσταση. Έτσι σχηματίζεται μια 'ζώνη' μέσα στην οποία βρίσκεται 'παγιδευμένο' το δείγμα. Με λίγα λόγια, η κινητικότητες των μορίων εξαρτώνται αποκλειστικά από το καθαρό τους φορτίο και όχι από το μέγεθος τους διότι οι πόροι της πηκτής είναι αρκετά μεγάλοι.

Το φαινόμενο αυτό στηρίζεται στο λεγόμενο Kohlrausch boundary . Όταν η 'ζώνη' αυτή εισέλθει στο resolving gel, το οποίο έχει pH 8,8 και μικρότερους πόρους, η κινητικότητα του δείγματος μειώνεται και αυτή των μορίων της γλυκίνης αυξάνεται κατά πολύ, καθώς ιοντίζονται, και προσπερνάνε τα μόρια του δείγματος. Από το σημείο αυτό (σταθερό pH και δυναμικό) ξεκινάει ο διαχωρισμός των μορίων του δείγματος. Όλη η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται μέσα σε buffer (Tris-Glycine-SDS) με pH περίπου 8,3.

Ένα άλλο πλεονέκτημα του συστήματος Laemmli, είναι η χρήση του [sodium dodecyl sulfate \(SDS\)](#). Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες (1,4g ανά g πρωτεΐνης). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναδιάταξη της τεταρτοταγούς και δευτεροταγούς δομής και την πρόσδοση αρνητικού φορτίου σε όλες τις πρωτεΐνες. Το τελευταίο εξαλείφει την επιρροή του φορτίου στην κινητικότητα και οι πρωτεΐνες κινούνται μόνο με βάση το M.B. τους.

Επίσης, γίνεται δυνατή η ανάλυση όλων των πρωτεϊνών του δείγματος καθώς τώρα θα κινηθούν όλες προς το ίδιο ηλεκτρόδιο (άνοδο) ενώ διαφορετικά οι πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικά σημεία (pI) μεγαλύτερα του 6,8 θα μετακινούνταν προς την κάθοδο και θα χάνονταν. (Καρκαλούσος Π, Laemmli, U.K.)

Εικόνα 1: Απεικόνιση gel με Coomassie Blue. Τα δείγματα (1-9) τοποθετήθηκαν στο πάνω μέρος του gel και αναλύθηκαν με SDS-PAGE. Η πρώτη και προτελευταία στήλη περιέχουν μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται ως δείκτες. Η ένταση του χρώματος είναι ενδεικτικό της συγκέντρωσης.



2.4 Δύο Διαστάσεων (2-D) Ηλεκτροφόρηση

Η χρήση δύο ανεξάρτητων ηλεκτροφορετικών μεθόδων έχει αυξήσει κατά πολύ την δυνατότητα ανάλυσης των πρωτεϊνών. Ο πιο κλασικός συνδυασμός είναι του ισοηλεκτρικού εστιασμού (IEF) και της SDS- PAGE.

Αρχικά, στην πρώτη διάσταση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το [ισοηλεκτρικό τους σημείο \(pI\)](#) ενώ στην δεύτερη, διαχωρίζονται με βάση το M.B. Το αποτέλεσμα

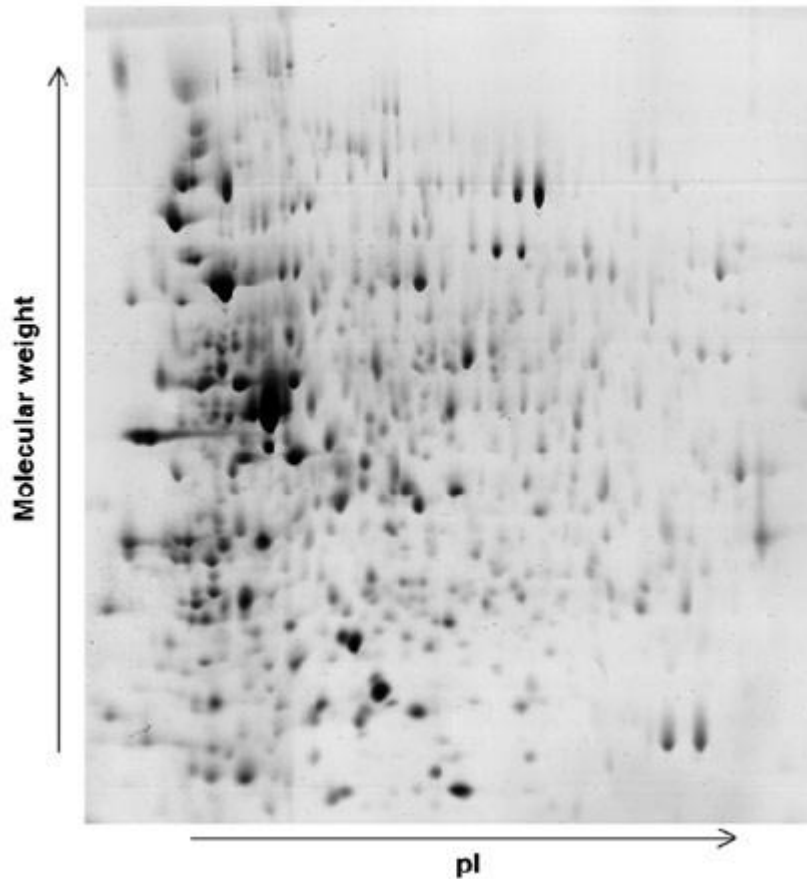
τώρα δεν είναι μια σειρά από μπάντες αλλά βούλες ή κηλίδες (spots) διασκορπισμένες στο gel, με την κάθε μία να αντιπροσωπεύει μια πρωτεΐνη. Αυτού του τύπου ο διαχωρισμός, παρέχει την καλύτερη ποιότητα ανάλυσης μέχρι σήμερα.

Ο IEF μπορεί να εφαρμοστεί σε μόρια τα οποία μπορούν να είναι είτε θετικά ή αρνητικά φορτισμένα. Τέτοια μπορεί να είναι οι πρωτεΐνες, πεπτίδια και ένζυμα. Το καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης είναι το άθροισμα όλων των φορτίων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, αλλά η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, [οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις](#) έχουν και αυτές σημαντικό ρόλο. Για τον διαχωρισμό, χρησιμοποιούνται ειδικές ταινίες (strips) με πολύ λεπτά gel αγαρόζης ή κυρίως πολυακρυλαμίδης με βαθμωτό pH.

Η κλίμακα του pH μπορεί να κυμαίνεται απο 3-9 ενώ στο εμπόριο κυκλοφορούν ταινίες με ποικιλία στην κλιμάκωση του pH (3-5, 5-7 κτλ.) για την καλύτερη ανάλυση συγκεκριμένων ομάδων πρωτεϊνών. Η δημιουργία των βαθμίδων του pH και η ικανότητα αξιόπιστης αναπαραγωγής των πειραμάτων ήταν πάντα ένα σημαντικό ζήτημα για τους επιστήμονες.

Χωρίς να εμβαθύνουμε με κουραστικές πληροφορίες, απλά να αναφερθεί ότι η χρήση ασθενών οξέων και βάσεων, που ονομάζονται Immobilines (ακινητοποιητές), έχουν εξαλείψει αρκετούς από τους περιορισμούς που υπήρχαν αρχικά στη σταθερότητα της βαθμωτής κλίμακας του pH. Τελικά, εφόσον ολοκληρωθεί ο IEF, οι διαχωρισμένες (κατα pI) πρωτεΐνες, διαχωρίζονται περαιτέρω με PAGE με βάση το M.B.

Η 2D ηλεκτροφόρηση, αν και είναι δύσκολη στη χρήση της και απαιτείται μεγάλη ποσότητα δείγματος, χρησιμοποιείται συνεχώς στον κλάδο της Πρωτεομικής, με σκοπό την σύγκριση ολόκληρων [πρωτεϊνωμάτων](#) και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην διάγνωση, πορεία και θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Θεωρείται η τεχνική που παρέχει την καλύτερη ανάλυση στις μέρες μας, παρόλο το γεγονός ότι ένας αριθμός πρωτεϊνών χάνεται (αυτές με pI <3 και >9). (Simpson, R.J.2003)



Εικόνα 2: 2D ηλεκτροφόρηση

2.5 Απεικόνιση Πρωτεϊνών

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες δεν φαίνονται και το αποτέλεσμα είναι ένα διάφανο gel, όπως ακριβώς και ένα 'αδειο' gel. Η απεικόνιση των πρωτεϊνών επιτρέπεται με τη χρήση διαφόρων χρωστικών, οι οποίες δίνουν την δυνατότητα ανίχνευσης από 2-300 ng πρωτεΐνης. Η επιλογή της κατάλληλης χρωστικής εξαρτάται από την ευαισθησία που απαιτείται άλλα κυρίως από την συμβατότητα της χρωστικής με τεχνικές που θα ακολουθήσουν την ηλεκτροφόρηση. Από αυτές, μερικά παραδείγματα είναι:

Coomassie Brilliant Blue – ευαισθησία έως 30 ng.

Colloidal Coomassie Blue – ευαισθησία έως 10 ng.

Zinc-imidazole – ευαισθησία έως 2 ng.

Silver stain – ευαισθησία έως 2 ng.

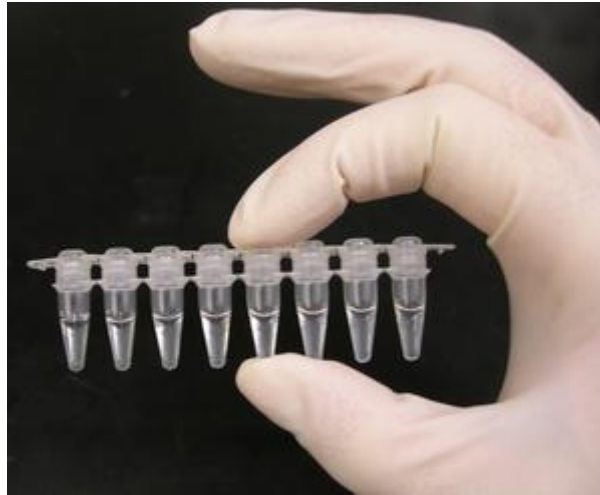
SYPRO Ruby – ευαισθησία έως 1 ng.

(Simpson, R.J.2003)

3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (αγγλ.: PCR, εκ του polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες.

Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων. Ουσιαστικά είναι μια πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR



Αναπτύχθηκε το 1983 από τον [Kary Mullis](#) ηPCR είναι πλέον μια κοινή και συχνά απαραίτητη τεχνική που χρησιμοποιείται σε ιατρικά και βιολογικά ερευνητικά εργαστήρια για μια ποικιλία εφαρμογών. Αυτά περιλαμβάνουν το DNA κλωνοποίησης για αλληλουχίες, με βάση το DNA, η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων, η διάγνωση κληρονομικών ασθενειών, ο εντοπισμός των γενετικών αποτυπωμάτων και η ανίχνευση και διάγνωση των λοιμωδών νόσων. Το 1993, στον Mullis απονεμήθηκε το Βραβείο Νόμπελ Χημείας μαζί με τον Michael Smith για την εργασία του σχετικά με τη μέθοδο PCR.

3.2 Διαδικασία

Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA χρησιμοποιώντας την PCR, το δείγμα του DNA αρχικά θερμαίνεται έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να διαχωριστεί σε δυο μονόκλινα τμήματα. Στη συνέχεια ένα ένζυμο, το οποίο λέγεται πολυμεράση TAQ, συνθέτει δυο συμπληρωματικούς κλώνους DNA χρησιμοποιώντας τους αρχικούς κλώνους ως πρότυπα (μήτρες). Αυτή η διαδικασία καταλήγει στον πολλαπλασιασμό του DNA, με κάθε ένα από τα καινούργια μόρια να περιέχει έναν παλιό και έναν καινούργιο κλώνο DNA. Ο κύκλος αυτός αποδιάταξης και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40 φορές, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο

ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Το υπόλοιπο γονιδίωμα δεν πολλαπλασιάζεται, και έτσι δεν ανιχνεύεται με τις μοριακές τεχνικές.

Σήμερα, η όλη διαδικασία της PCR έχει αυτοματοποιηθεί και με τα καινούργια και τελειότερα μηχανήματα μπορεί να τελειώσει σε λίγες μόνο ώρες. Η όλη διαδικασία των κύκλων της θέρμανσης και της μείωσης της θερμοκρασίας προγραμματίζεται από ένα μηχάνημα το οποίο ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (PCR thermal cycler) και το οποίο έχει τη δυνατότητα να αυξομειώνει την θερμοκρασία της αντίδρασης κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να επιτρέψει τη σύνθεση νέων τμημάτων DNA. Επίσης, είναι πολύ σημαντικό να έχουν καθοριστεί επακριβώς από τον ερευνητή οι χημικές συνθήκες υπό τις οποίες θα γίνει ο πολλαπλασιασμός του DNA, καθώς και να έχει γίνει η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που θα ξεκινήσουν την αντίδραση (εκκινήτες ή DNA primers) τα οποία πρέπει να έχουν έτσι σχεδιαστεί ώστε να είναι απόλυτα συμπληρωματικά στα άκρα των γονιδιακών τόπων που μας ενδιαφέρουν.

Παραγωγή πολυάριθμων αντιγραφών ενός γονιδίου (κλωνοποίηση γονιδίου) μπορεί να γίνει με την εισαγωγή του σε ένα βακτήριο και εν συνεχεία την κλωνοποίηση του βακτηρίου. Η διαδικασία αυτή πέραν του ότι είναι επίπονη απαιτεί την ύπαρξη πολλών αρχικών αντιγράφων του γονιδίου, ώστε να μεγιστοποιηθεί και η πιθανότητα ενσωμάτωσής τους στα βακτήρια. Αντιθέτως με την τεχνική που ανέπτυξε στα 1983 ο Kary Mullis είναι δυνατή η παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός μορίου DNA (γονιδίου) σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακόμη και αν υπάρχει στη διάθεσή μας ένα μόνο αρχικό μόριο DNA. Η μέθοδος ονομάστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης διότι κάνει δυνατή την διαδοχική παραγωγή πολυάριθμων μορίων DNA in vitro με τη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης. (Chamberlain, J.S. 1990)

3.3 Συσσκευή Real- time PCR

Η PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR) αποτελεί σήμερα ένα από τα πιο βασικά εργαλεία για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA και RNA.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, η άμεση παρατήρηση των αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο και η δυνατότητα άμεσης ποσοτικοποίησης των δειγμάτων.

Η διαδικασία έχει ως εξής

1. Το αρχικό δείγμα DNA που θέλουμε να το αντιγράψουμε αναμιγνύεται με δεσοξυριβονουκλεοτίδια και των 4 βάσεων, DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτίδια τμήματα που είναι συμπληρωματικά των 3' άκρων των κλώνων του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε (οπότε η αλληλουχία στα ακρα πρέπει να είναι γνωστή). Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια παίζουν ρόλο πρωταρχικών τμημάτων, καθώς στην *in vitro* διαδικασία δεν μπορούν να συντεθούν.



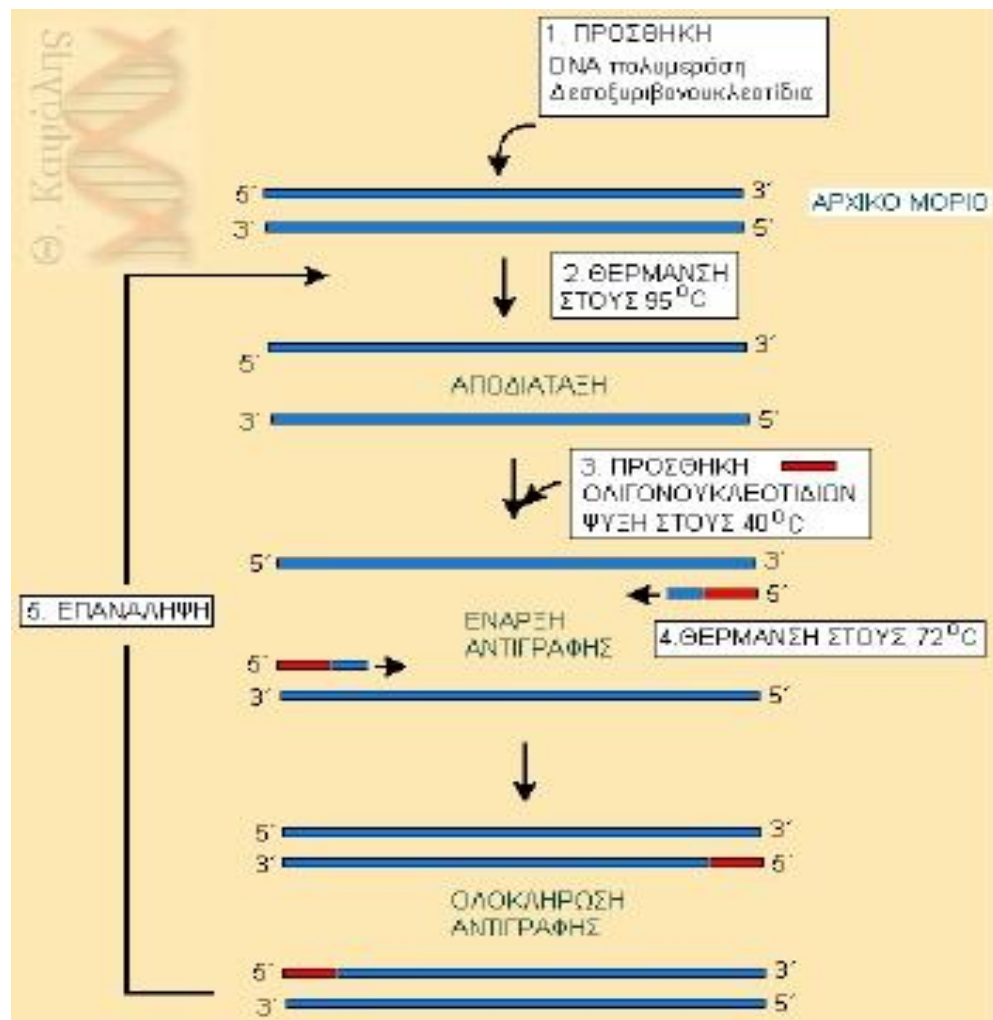
2. Ο δοκιμαστικός σωλήνας στον οποίο υπάρχει το μείγμα θερμαίνεται στους 950°C, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου (*in vivo* την εργασία αυτή θα την ανελάμβανε η ελικάση). Έτσι το DNA αποδιατάσσεται. Στη θερμοκρασία αυτή φυσιολογικά η DNA πολυμεράση θα υφίσταται μετουσίωση. Αυτό αποφεύγεται με τη χρησιμοποίηση ενός είδους πολυμεράσης που είναι θερμοανθεκτική. Η πολυμεράση αυτή προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* που επιβιώνει σε θερμοκρασία 90°C στις θερμοπηγές.

3. Στη συνέχεια το μείγμα ψύχεται στους 40°C ώστε να γίνει υβριδοποίηση μεταξύ των ολιγονουκλεοτιδίων και των συμπληρωματικών ως προς αυτά άκρων των δύο κλώνων. Το μείγμα όμως πρέπει να

θερμανθεί εκ νέου στη θερμοκρασία των 72°C καθώς στη θερμοκρασία αυτή το ένζυμο λειτουργεί άριστα

4. Έτσι το αρχικό μόριο έχει αντιγραφεί σε δύο θυγατρικά. Η διαδικασία από το 2 ως και το 3ο βήμα επαναλαμβάνεται για 20 με 30 φορές με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών αντιγράφων του αρχικού μορίου. (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD MANUAL)

Σχηματικά:



Η κεντρική επιστημονική ιδέα που καθιστά την PCR χρήσιμη είναι η εξής: Το γενετικό υλικό κάθε ζώντος οργανισμού –φυτού ή ζώου, βακτηρίου ή ιού- τις

περισσότερες φορές DNA, καμιά φορά RNA, είναι μοναδικό και ειδικά παρόν μόνο στο δικό του είδος. Πράγματι, πολύπλοκοι οργανισμοί όπως τα ανθρώπινα όντα, περιέχουν σειρές DNA που είναι αποκλειστικά παρούσες μόνο σε συγκεκριμένα άτομα. Αυτές οι μοναδικές διαφοροποιήσεις καθιστούν δυνατή την ανίχνευση της προέλευσης του γενετικού υλικού, προσδιορίζοντας με ακρίβεια τουλάχιστον, από ποιο είδος οργανισμού προέρχεται, και συχνά ποιο συγκεκριμένο μέλος αυτού του είδους. Μια τέτοια έρευνα προϋποθέτει ότι αρκετό από το υπό μελέτη DNA είναι διαθέσιμο για ανάλυση. Η PCR χρησιμοποιεί τη φυσική λειτουργία ενζύμων γνωστών ως πολυμεράσες. Αυτά τα ένζυμα είναι παρόντα σε όλα τα έμβια όντα, και ο ρόλος τους είναι η αντιγραφή του γενετικού υλικού. Η PCR απαιτεί το DNA ή το RNA προς αντιγραφή και δυο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές ή μόρια έναρξης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής. Οι εκκινητές είναι μονόκλωνες αλυσίδες μικρού μήκους των τεσσάρων βάσεων. Υπάρχουν τρία βασικά βήματα στην PCR. Πρώτον, το ζητούμενο γενετικό υλικό πρέπει να μετουσιωθεί- δηλαδή αποδιάταξη της έλικας- με θέρμανση στους 90-96 C

Το δεύτερο βήμα είναι ο υβριδισμός των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών στις συμπληρωματικές ακολουθίες. Τέλος, γίνεται σύνθεση του DNA με τη δράση της πολυμεράσης. Φυσικά, μπορούν να προκύψουν τεχνικά προβλήματα με την PCR. Το σημαντικότερο είναι η επιμόλυνση του δείγματος με εξωτερικό γενετικό υλικό, από όπου θα μπορούσαν να προκύψουν αναρίθμητα αντίγραφα κατάλληλου DNA. Η μέθοδος της PCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη γιατί από τη στιγμή που θα πολλαπλασιαστούν τα τμήματα του DNA, μπορούν να αναλυθούν με πολλές εργαστηριακές τεχνικές. Για παράδειγμα, οι περισσότερες τεχνικές της χαρτογράφησης του DNA που χρησιμοποιούνται στην αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) στηρίζονται πάνω στην τεχνική PCR. Επίσης, η PCR είναι πολύ χρήσιμη σε πολλές καινούργιες μεθόδους, όπως το DNA FingerPrinting, η διάγνωση βακτηριδίων και ιών και η διάγνωση γενετικών ανωμαλιών. Η δύναμη της PCR είναι τέτοια που είναι δυνατόν να γίνει ανάλυση από το γενετικό υλικό ενός και μόνο κυττάρου.

Μετά την πρώτη ανακοίνωση για την PCR, η τεχνική διαδόθηκε στην επιστημονική κοινότητα με την ταχύτητα αλυσιδωτής αντίδρασης. Καθώς όλο και περισσότεροι

επιστήμονες ήρθαν σε επαφή με την PCR, εισήγαγαν μετατροπές της μεθόδου και χρησιμοποίησαν την τεχνική σε νέες ασθένειες και με νέους τρόπους. Σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα η PCR έγινε μια τεχνική ρουτίνας για την έρευνα και ακολούθησαν και οι πρακτικές της εφαρμογές.

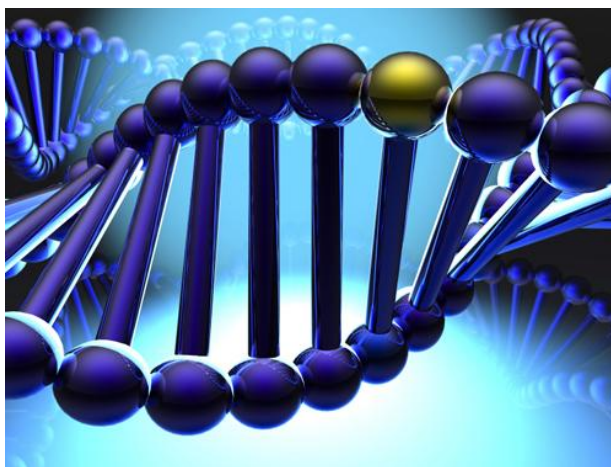
Η PCR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γενετικού υλικού ενός μικροοργανισμού που έχει προσβάλλει τον άνθρωπο. Τα συνηθισμένα τεστ που χρησιμοποιούνται όπως η καλλιέργεια των μικροοργανισμών ή την χρήση αντισωμάτων μπορεί να δώσουν αποτελέσματα ή είναι ιδιαίτερα περίπλοκα. Η μέθοδος της PCR είναι μια γρήγορη και πολύ απλή εναλλακτική λύση. Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση εφαρμογής της για την διάγνωση του ιού του AIDS. Η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει το μικρό ποσοστό των κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με τον ιό HIV. Έτσι μετά τον ειδικό πολλαπλασιασμό του γονιδιακού τόπου του HIV και ηλεκτροφόρηση, η παρουσία ενός προϊόντος της PCR του σωστού μεγέθους σηματοδοτεί την παρουσία της αλληλουχίας του HIV και συνεπώς την μόλυνση από HIV. Η ανιχνευτική ικανότητα της PCR είναι τόσο μεγάλη που μπορούμε να πάρουμε αποτέλεσμα ακόμα και από δείγματα DNA τα οποία έχουν σχεδόν καταστραφεί και πολύ συχνά και από ένα μόνο κύτταρο. Σήμερα έχουμε ήδη χρησιμοποιήσει την PCR με τον πολλαπλασιασμό DNA από μερικές ασυνήθιστες πηγές όπως ζώα τα οποία έχουν πια εξαφανιστεί, από Αιγυπτιακές μούμιες, από ένα τερμίτη 3.000.000 ετών ο οποίος είχε φυλακιστεί μέσα σε ήλεκτρο.

Η ανακάλυψη της PCR μεταμόρφωσε ουσιαστικά μέσα σε μια νύχτα ολόκληρες μουσειακές συλλογές βιολογικών ευρημάτων μέσα σε θησαυρούς γενετικής πληροφορίας για την εξέλιξη, εξαφάνιση και σημερινή πορεία των ειδών. Οι εξελικτικοί βιολόγοι χρησιμοποιούν αυτά τα δείγματα και την μέθοδο της PCR για να διερευνήσουν τις γενετικές διασυνδέσεις στον οργανισμό μεταξύ διαφόρων ειδών τώρα και στο παρελθόν.(BIOER TECHNOLOGY CO., LTD)

4.1 Χρωμόσωμα

Το χρωμόσωμα είναι μια οργανωμένη δομή DNA και πρωτεϊνών που βρίσκεται στα κύτταρα. Είναι ένα μοναδικό κομμάτι περιελιγμένου DNA που περιλαμβάνει πολλά γονίδια και άλλες ακολουθίες νουκλεοτιδίων. Τα χρωμοσώματα περιέχουν τις συνδεδεμένες πρωτεΐνες, οι οποίες χρησιμεύουν για να συσκευάσουν το DNA και να ελέγξουν τις λειτουργίες του. Η λέξη χρωμόσωμα προέρχεται από τις λέξεις χρώμα και σώμα και το όνομα που οφείλεται στην ιδιότητα του χρωμοσώματος να χρωματίζεται πολύ έντονα από ιδιαίτερες χρωστικές ουσίες.

Τα χρωμοσώματα ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών οργανισμών. Το μόριο DNA μπορεί να είναι κυκλικό ή γραμμικό, και μπορεί να αποτελείται από 10.000 έως 1.000.000.000 νουκλεοτίδια, σε μια μακριά αλυσίδα. Χαρακτηριστικά τα ευκαρυωτικά κύτταρα (κύτταρα που περιέχουν σχηματισμένο πυρήνα) έχουν μεγάλα, γραμμικά χρωμοσώματα. Τα προκαρυωτικά κύτταρα (κύτταρα χωρίς σχηματισμένο πυρήνα) έχουν μικρότερα κυκλικά χρωμοσώματα, αν και υπάρχουν πολλές εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα. Επιπλέον, τα κύτταρα μπορούν να περιέχουν περισσότερους από έναν τύπους χρωμοσώματος, για παράδειγμα τα μιτοχόνδρια στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα, και επίσης οι χλωροπλάστες των φυτών διαθέτουν το δικό τους DNA, γι' αυτό και αποκαλούνται ημιαυτόνομα οργανίδια.



Στην πράξη «χρωμόσωμα» είναι ένας μάλλον αόριστα καθορισμένος όρος. Στα προκαρυωτικά κύτταρα ένα μικρό κυκλικό μόριο DNA ονομάζεται είτε [πλασμίδιο](#) είτε μικρό χρωμόσωμα. Αυτά τα μικρά κυκλικά γονιδιώματα βρίσκονται επίσης στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες, απεικονίζοντας τη βακτηριακή προέλευσή τους. Τα απλούστερα χρωμοσώματα βρίσκονται στους ιούς: αυτά τα μόρια DNA ή RNA είναι κοντά γραμμικά ή κυκλικά χρωμοσώματα που στερούνται συχνά οποιεσδήποτε δομικές πρωτεΐνες.

4.2 Γενετική σύνδεση

Στην αρχή της φυσιολογικής μείωσης, ένα ζευγάρι χρωμοσωμάτων, που αποτελείται από ένα πατρικό και ένα μητρικό χρωμόσωμα, διασταυρώνονται και ανταλλάζουν χρωμοσωμικά τμήματα. Το ζευγάρι στην συνέχεια διασπάται για να δημιουργήσει δυο χρωμοσώματα με νέο συνδυασμό γονιδίων που ποικίλει ανάλογα με τον συνδυασμό που παρέχεται από τους γονείς. Έτσι παράγονται απόγονοι με νέους συνδυασμούς πατρικών και μητρικών χαρακτήρων πράγμα που ευνοεί την γενετική ποικιλομορφία και ως κατ επέκταση την επιβίωση. Αυτή η διαδικασία, που ονομάζεται επιχιασμός του DNA, μπορεί να οδηγήσει γονίδια που αρχικά βρίσκονταν στο ίδιο χρωμόσωμα να απομονωθούν και να καταλήξουν σε διαφορετικά θυγατρικά κύτταρα.

Μάλιστα όσο πιο μακριά πάνω στο χρωμόσωμα βρίσκονται τα δυο τόσο πιο μεγάλη είναι η πιθανότητα να συμβεί επιχιασμός μεταξύ τους και άρα να απομονωθούν. Η σχετική απόσταση μεταξύ δυο γονιδίων μπορεί να υπολογιστεί βρίσκοντας το ποσοστό των απογόνων οργανισμών, που εμφανίζουν δυο συνδεδεμένα γενετικά χαρακτηριστικά, στους οποίους τα δυο αυτά χαρακτηριστικά δεν εμφανίζονται μαζί. Όσο πιο μεγάλο είναι αυτό το ποσοστό τόσο πιο μακριά πάνω στο χρωμόσωμα βρίσκονται τα δυο αυτά γονίδια. Αν το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από 50 % θεωρούμε ότι τα δυο γονίδια είναι συνδεδεμένα. Ένας άλλος τρόπος κατανόησης της γενετικής σύνδεσης είναι η μελέτη των σχέσεων μεταξύ των φαινοτύπων των οργανισμών.

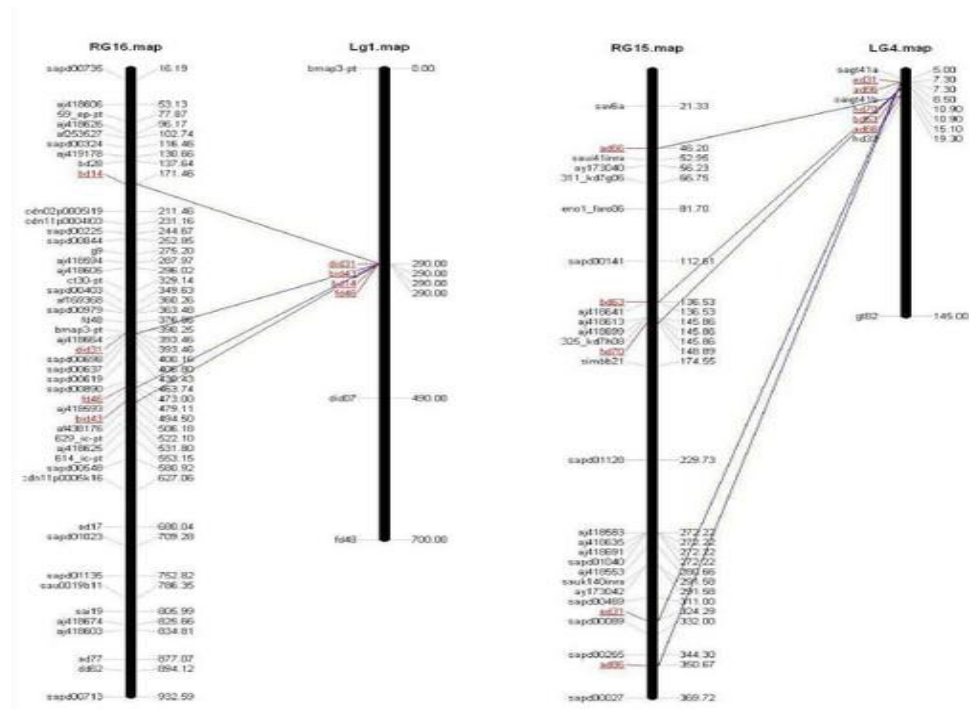
Στην περίπτωση που οι φαινότυποι ή τα χαρακτηριστικά εμφανίζονται τυχαία στα άτομα ενός είδους η πειραματικού πληθυσμού έχουμε τον ανεξάρτητο διαχωρισμό των γονιδίων όπως αυτός προβλέπεται από τον δεύτερο νόμο του Mendel. Στην περίπτωση αυτή τα γονίδια που καθορίζουν το χαρακτηριστικό που μελετάμε ή βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα ή στο ίδιο χρωμόσωμα αλλά σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους. Αντίθετα αν υπάρχει συσχέτιση στην κληρονόμηση διαφόρων χαρακτηριστικών ή φαινοτύπων έχουμε την γενετική σύνδεση και τα γονίδια βρίσκονται σε μικρή μεταξύ τους απόσταση πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα και κληρονομούνται σαν ενιαίες μονάδες που ονομάζονται ομάδες σύνδεσης. Παράδειγμα συνδεδεμένων γονιδίων στην φρουτόμυγα είναι τα γονίδια του χρώματος των ματιών και του μήκους των φτερών. (Paux E, Sourdille P, Salse J, 2008)

4.3 Χάρτες σύνδεσης

Οι χάρτες σύνδεσης φτιάχνονται βρίσκοντας τις αποστάσεις ανάμεσα σε ένα αριθμό χαρακτηριστικών, που ελέγχονται από γονίδια του ίδιου χρωμοσώματος, παραλείποντας τα μεταξύ τους κενά ώστε να αποφύγουμε τις ανακρίβειες που οφείλονται στους διάφορους ανασυνδυασμούς. Πρόκειται για γενετικούς χάρτες ενός είδους ή πειραματικού πληθυσμού που δείχνουν τις θέσεις γνωστών γονιδίων ή δεικτών που είναι συγγενικά μεταξύ τους όσον αφορά την συχνότητα ανασυνδυασμού και δεν εκφράζουν τις φυσικές αποστάσεις μεταξύ τους.

Οι χάρτες αυτοί είναι πολύ χρήσιμοι στην μελέτη της θέσεις γονιδίων που προκαλούν γενετικές ασθένειες. Οι χάρτες σύνδεσης βασίζονται στις συχνότητες ανασυνδυασμού μεταξύ δεικτών κατά τον επιχιασμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η συχνότητα τόσο πιο μακριά πάνω στο χρωμόσωμα θεωρούμε ότι βρίσκονται οι δείκτες αυτοί. Αντίθετα, όσο μικρότερη είναι η συχνότητα τόσο μικρότερη είναι και η φυσική τους απόσταση. Ως δείκτες χρησιμοποιήθηκαν κυρίως μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες DNA όπως το

μικροδορυφορικό DNA ή τα RFLPs. Οι χάρτες σύνδεσης βοηθούν επίσης τους ερευνητές να εντοπίσουν τις θέσεις άλλων δεικτών όπως άλλων γονιδίων ελέγχοντας την γενετική σύνδεση μεταξύ των ήδη γνωστών δεικτών.



4.4 RFLP

Με την κλωνοποίηση πολλών τυχαίων περιοχών ενός γονιδιώματος (π.χ. του ανθρώπου) και την χρησιμοποίησή τους σαν ανιχνευτές σε γενωμικά Southern blots διαπιστώθηκε ότι μία περιοχή μπορεί να μην δείχνει το ίδιο πρότυπο θραυσμάτων περιορισμού σε όλα τα άτομα ενός πληθυσμού - αυτή η ποικιλομορφία λέγεται restriction fragment length polymorphism ή RFLP. Το αίτιο αυτού του φαινομένου είναι η τυχαία ποικιλομορφία της DNA αλληλουχίας μιάς περιοχής η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις είναι χωρίς φαινοτυπικό αποτέλεσμα. Μία τέτοια σιωπηλή ποικιλομορφία μπορεί να γίνει ορατή με Southern blot όταν συμπέσει με κάποια περιοριστική θέση και έτσι την καταστρέψει (ή αντίστροφα όταν δημιουργήσει νέα περιοριστική θέση σε κάποιο σημείο).

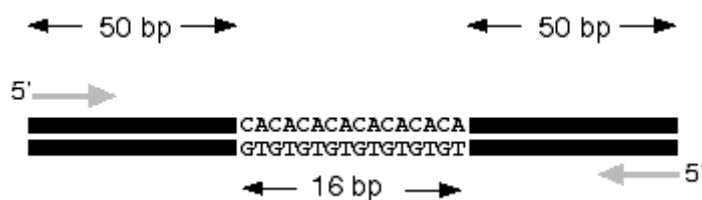
Μία RFLP είναι στην ουσία γενετικός δείκτης, και προέρχεται από ένα συγκεκριμένο σημείο σε ένα χρωμόσωμα. Έτσι η συχνότητα ανασυνδυασμού μεταξύ αλληλομόρφων μίας RFLP και ενός γονιδίου (με ορατό φαινότυπο) ή μεταξύ δύο διαφορετικών RFLPs μας δίνει πληροφορία για την σύνδεση των δύο τόπων. Τα μεγάλα γονιδιώματα των θηλαστικών σε συνδυασμό με την ανεφικτότητα κλασικής γενετικής ανάλυσης μεγάλης κλίμακας καθιστούν την κατασκευή γενετικών χαρτών δύσκολη. Έτσι με την χαρτογράφηση RFLPs έχουν κατασκευασθεί λεπτομερείς γενετικοί χάρτες.

Μία κύρια χρήση της γενετικής χαρτογράφησης με RFLPs είναι η προγεννητική διάγνωση γενετικών ασθενειών. Ορισμένες τέτοιες ασθένειες (π.χ. ασθένεια του Huntington) έχουν χαρτογραφηθεί κοντά σε κάποια RFLP και η παρουσία ενός αλληλόμορφου της συγκεκριμένης RFLP είναι ενδεικτική για την παρουσία του μεταλλαγμένου γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παθολογική κατάσταση. Για τέτοια διάγνωση δεν είναι απαραίτητο να έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο υπεύθυνο για την ασθένεια, απλά να έχει χαρτογραφηθεί γενετικά. Απαιτείται όμως γνώση της γενεαλογίας του πιθανού πάσχοντα / φορέα, ώστε να μπορεί να συσχετισθεί το αλληλόμορφο της RFLP με τον φαινότυπο της ασθένειας. Φυσικά πάντα υπάρχει (μικρή) πιθανότητα λάθος διάγνωσης, γιατί μπορεί να έχει λάβει χώρα συνδυασμός μεταξύ του RFLP τόπου και του γονιδίου της ασθένειας (γι' αυτό επιλέγονται RFLPs που είναι στενά συνδεδεμένα με το γονίδιο υπό έρευνα). (CONNOR M., FERGUSON M. 2004)

4.5 Μικροδορυφορικοί Δείκτες

Μικροδορυφόροι, επίσης γνωστή ως απλές επαναλήψεις Ακολουθίας (SSRS) ή σύντομες διαδοχικές επαναλήψεις (STRs), επαναλαμβάνοντας τα ακολουθίες 2-6 ζεύγη βάσεων του DNA .

Χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες στη γενετική, για την σύνδεση, τη διαφοροποίηση των πληθυσμών και άλλες μελέτες. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη διπλασιασμού γονιδίων ή διαγραφής. Μικροδορυφόροι είναι επίσης γνωστό ότι είναι αιτιολογικοί παράγοντες στις ανθρώπινες ασθένειες, ειδικά νευροεκφυλιστικών διαταραχών και καρκίνου.



4.6 ISSR-PCR

ISSR (για την απλή επανάληπτική ακολουθία) είναι ένας γενικός όρος για μια περιοχή του γονιδιώματος μεταξύ μικροδορυφορικών τόπων. Οι συμπληρωματικές ακολουθίες σε δύο γειτονικούς μικροδορυφόρους χρησιμοποιούν εκκινητές της αντίδρασης PCR. Η μεταβλητή περιοχή μεταξύ τους γίνεται ποιά ενισχυμένη.

Η περιορισμένη διάρκεια της ενίσχυσης κατά τη διάρκεια των κύκλων PCR, αποτρέπει την υπερβολική αναπαραγωγή και το υπερβολικά μεγάλο χρονικό διάστημα συνεχόμενων ακολουθιών DNA, έτσι το αποτέλεσμα θα είναι ένα μείγμα από μια ποικιλία ενισχυμένου κλώνους του DNA που είναι γενικά μικρή, αλλά διαφέρει πολύ σε μήκος.

4.7 Χαρτογράφηση γονιδίων με ανάλυση ανασυνδυασμού

Είναι δυνατόν να οργανωθούν διασταυρώσεις ελέγχου για αναλύσεις ανασυνδυασμού με σκοπό τη γενετική χαρτογράφηση. Μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις σε γενεαλογικά δέντρα πολλών γενεών έχουν συμπεριληφθεί άτομα με διαχωρισμό γονοτύπων οι οποίοι θα ήταν κατάλληλοι να επιτρέψουν κάποια

ανάλυση σύνδεσης μεταξύ αυτοσωμικών γονιδίων. Ωστόσο η ανάλυση του ανασυνδυασμού στον άνθρωπο είναι πιο απλή για τα γονίδια τα οποία είναι συνδεδεμένα με το γονίδιο X, επειδή η ημιζυγωτία αυτού του χρωμοσώματος στους άρρενες αποτελεί ένα πλούσιο απόθεμα χρήσιμων γονοτυπικών ζευγαριών στα γενεαλογικά δέντρα.

Ας αναλύσουμε ένα θεωρητικό παράδειγμα : Ένας άντρας με δύο σπάνια υποτελή αλληλόμορφα a και b συνδεδεμένα με το χρωμόσωμα X παντρεύεται μια γυναίκα που δεν εκφράζει κανένα από τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά. Επειδή τα χαρακτηριστικά είναι σπάνια , είναι πιθανό η γυναίκα να είναι ομόζυγη για το αλληλόμορφο άγριου τύπου $a^* b^* / a^* b^*$.Ένας θηλυκός απόγονος αυτών των γονιών θα ήταν διπλός ετεροζυγότης $a^* b^* / a b$. Ανασυνδυασμένοι γαμέτες αυτού του θηλυκού ατόμου θα παράγονταν με διασκελισμό μεταξύ των δύο γονιδίων που τα χωρίζει.

Αν ο θηλυκός απόγονος ζευγαρώσει ένα φυσιολογικό αρσενικό άτομο $a^* b^* / Y$ όλοι οι θηλυκοί απόγονοι θα έχουν το φαινότυπο $a^* b^*$ επειδή κληρονομούν το χρωμόσωμα από τον πατέρα τους. Οι αρσενικοί απόγονοι όμως θα εκφράζουν και τους 4 πιθανούς φαινοτύπους δηλαδή τους γονείς $a^* b^*$ και $a b$ και τους ανασυνδυασμούς $a^* b$ και $a b^*$ εξαιτίας της ημιζυγωτίας του χρωμοσώματος X. Έτσι η ανάλυση των αρσενικών απογόνων μιας διασταύρωσης σε μεγάλο αριθμό γενεαλογικών δέντρων θα μας δώσει μια τιμή για τη συχνότητα του ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο γενετικών τόπων και κατά συνέπεια μια εκτίμηση για της γενετικής χαρτογραφικής απόστασης που αυτά θα έχουν.

Με αυτή την προσέγγιση, οι ερευνητές χαρτογράφησαν έναν αριθμό γονιδίων στο χρωμόσωμα X. Για παράδειγμα, βρέθηκε πώς η απόσταση μεταξύ υποτελούς γονιδίου g ,που ευθύνεται για την αχρωματοψία στο πράσινο , και του γονιδίου h της αιμοφιλίας A ήταν * χαρτογραφικές μονάδες. Είναι βέβαια προφανές πως αυτή η προσέγγιση έχει περιορισμένες εφαρμογές. (CONNOR M., FERGUSON M 2004)

4.8 Μέθοδος της τιμής lod

Η δοκιμασία LOD ,που αναπτύχθηκε από τον Morton, είναι ένα στατιστικό τεστ που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της γενετικής σύνδεσης σε ανθρώπους, ζώα, ή φυτά. Η δοκιμασία LOD συγκρίνει την πιθανότητα να βγει στο τεστ ως αποτέλεσμα ότι δυο χρωμοσωμικές περιοχές είναι συνδεδεμένες όταν αυτές είναι όντως συνδεδεμένες σε σχέση με την πιθανότητα το ίδιο αποτέλεσμα να οφείλεται στην τύχη. Θετικές τιμές της δοκιμασίας δείχνουν ότι είναι πιθανή η ύπαρξη σύνδεσης ενώ αρνητικές δείχνουν ότι δεν είναι πολύ πιθανή η ύπαρξη σύνδεσης. Η δοκιμασία LOD με ανάλυση από υπολογιστή χρησιμοποιείται για την μελέτη σύνθετων γενεαλογικών δένδρων ώστε να μελετηθεί η σύνδεση μεταξύ μενδελικών χαρακτήρων ή δεικτών. Εν συντομία η μέθοδος περιγράφεται σε 4 βήματα:

1. Καθορισμός γενεαλογικού δέντρου.
2. Γίνεται μια σειρά εκτιμήσεων των συχνοτήτων ανασυνδυασμού.
3. Για κάθε εκτίμηση υπολογίζεται μια τιμή LOD.
4. Θεωρούμε καλύτερη εκτίμηση αυτή με τη ψηλότερη τιμή LOD.

Ο τύπος για τον υπολογισμό του είναι ο εξής :

$LOD = \log (\text{πιθανότητα γέννησης απογόνου με γενετική σύνδεση/πιθανότητα γέννησης απογόνου χωρίς γενετική σύνδεση}) = \log [(1-\theta)^{NR} * \theta^R / 0.5^{(NR+R)}]$

NR: Δηλώνει των αριθμό απογόνων με χαρακτηριστικά που προέκυψαν χωρίς ανασυνδυασμό. } R: Δηλώνει των αριθμό απογόνων με χαρακτηριστικά που προέκυψαν λόγω ανασυνδυασμού. } θ : Το ποσοστό των απογόνων με χαρακτηριστικά που προέκυψαν με ανασυνδυασμό. [$\theta = R / (NR + R)$]

Από την διερεύνηση της σχέσης προκύπτει ότι:

An LOD > 3 τότε έχω γενετική σύνδεση.

An LOD = 3 έχω πιθανότητες 1000 προς 1 η γενετική σύνδεση που παρατηρείται να είναι αληθινή.

Αν LOD<-2 τότε δεν έχω γενετική σύνδεση.

Να αναφερθεί ότι ο καθορισμός των ορίων είναι υποκειμενικός και εξαρτάται από τον τύπο της μελέτης. Επίσης, επιτρέπεται και ο συνδυασμός δεδομένων από διαφορετικά γενεαλογικά δένδρα. (Peter J Russell 1996)

5.1 Τμηματικός Γενετικός Χάρτης Σύνδεσης της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Φύλο: Χορδωτά (Chordata)

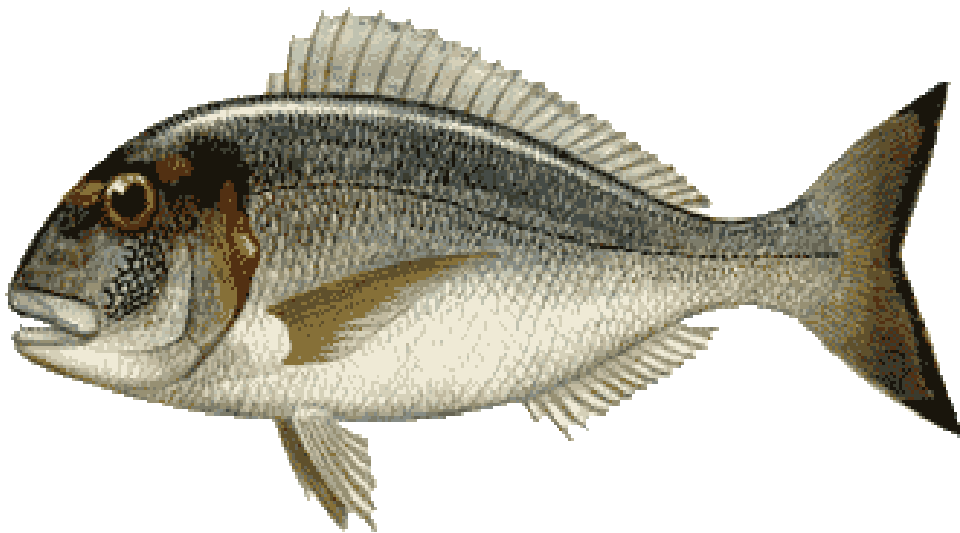
Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

Τάξη: Περκόμορφα (Perciformes)

Οικογένεια: Σπαρίδες (Sparidae)

Γένος: Sparus

Είδος: Sparus aurata



Η **τσιπούρα** (επιστημονική ονομασία: **Sparus aurata** - Σπάρος ο χρυσόχρους) είναι ένα [ψάρι](#) της οικογένειας των [Σπαρίδων](#) που απαντά στην [Μεσόγειο](#) και στις ακτές του βορειοανατολικού [Ατλαντικού](#). Είναι ένα από τα κύρια ψάρια για τις [ιχθυοκαλλιέργειες](#) και το πιο εκτροφεύσιμο είδος της Μεσογείου. Η τσίπουρα έχει συνήθως μήκος 35 εκατοστά, αν και έχουν βρεθεί ψάρια με μήκος 70 εκατοστά. Η βαρύτερη τσιπούρα που έχει αλιευθεί είχε βάρος 17,2 κιλά. Η μεγαλύτερη καταγεγραμμένη ηλικία τσιπούρας είναι (σε αιχμαλωσία) 11 έτη. Έχει ασημένιο χρώμα με μια χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στο τέλος του [βραγχιακού επικαλύμματος](#). Επίσης, χαρακτηριστικό είναι και το χρυσό τόξο που ενώνει τα μάτια, πιο έντονο στα ενήλικα ψάρα, και έδωσε στην τσιπούρα το όνομα «χρυσόφρυς». Υπάρχει μια κόκκινη γραμμή στο όριο του κάτω μισού του βράγχιου-καλύμματος. Η τσιπούρα έχει έντονα κυρτό προφίλ, οβάλ και ψηλό σώμα.

Η τσιπούρα είναι ψάρι [ευρύαλο](#) και [ευρύθερμο](#), αντέχει δηλαδή σε μεγάλες μεταβολές [αλατότητας](#) και [θερμοκρασίας](#) του νερού. Έτσι μπορεί να ζήσει τόσο στην ανοικτή θάλασσα όσο και στις [εκβολές ποταμών](#) και σε λιμνοθάλασσες. Πέρα από τους [αμμώδεις](#) πυθμένες και τα λιβάδια [ποσειδωνίας](#), όπου βρίσκει εύκολα τη τροφή της, η τσιπούρα απαντάται σε βραχώδεις πυθμένες που συνορεύουν με τα προαναφερθέντα οικοσυστήματα ενώ τσιπούρες έχουν βρεθεί και μέσα σε υποθαλάσσια σπήλαια.

Οι τσιπούρες είναι πρωτόγονοι [ερμαφρόδιτα](#) ψάρια, δηλαδή γεννιούνται πρώτα ως αρσενικά και μετά το πέρας περίπου 3 χρόνων κάνουν [αναστροφή φύλου](#) και γίνονται θηλυκά. Οι τσιπούρες ενηλικιώνονται σεξουαλικά ως αρσενικά όταν γίνουν 2 χρόνων (μήκος 20 - 30 εκατοστά, βάρος 350 με 400 γραμμάρια). Όταν γίνουν 3 χρόνων (μήκος 30 - 40 εκατοστά, βάρος 600 γραμμάρια περίπου) οι τσιπούρες γίνονται θηλυκά. Οι τσιπούρες αναπαράγονται από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο σε [λιμνοθάλασσες](#) και δεξαμενές αλμυρού νερού. Κάθε θηλυκό γεννά 20.000 με 80.000 [αυγά](#) την ημέρα. Τα ιχθύδια γεννιούνται στα ανοικτά νερά και στη συνέχεια κολυμπούν την άνοιξη μέχρι τα ρηχά νερά, όπου είναι πιο ασφαλή και η τροφή πιο άφθονη. Μένουν εκεί μέχρι τον Οκτώβριο. Μετά ενσωματώνονται στο αρχικό κοπάδι, λαμβάνουν μέρος στην αναπαραγωγή και θα το ακολουθούν στις μετακινήσεις του. Κάτι αξιοσημείωτο για την τσιπούρα είναι ότι ενώ μπορεί να είναι

σε διαδικασία αλλαγής φύλου από αρσενικό σε θηλυκό, μπορεί να τη διακόψει, και να αναπαραγάγει [σπέρμα](#) για την ερχόμενη αναπαραγωγική περίοδο.(Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιιεργειών)

5.1 Υλικά Και Μέθοδοι

Πάνελ χαρτογράφησης και Προσδιορισμός Γονοτύπου

Γενωμικό DNA απομονώθηκε από δείγμα πτερυγίων 125 γεννητόρων και 552 γόνων από το αρχικό πάνελ απογόνων (n = 2146), χρησιμοποιώντας τυποποιημένες μεθόδους πέψης με πρωτεΐνάση K, μετά τη διαδικασία εξαλάτωσης (Πίνακας 2), όπως περιγράφεται στον Miller et al. (1988). Οι επιλεγμένοι απόγονοι αποτελούνταν από 490, τυχαία επιλεγμένα, αρσενικά υποκείμενα και όλα τα θηλυκά ψάρια (n = 62, όπως περιγράφεται παραπάνω). Η ποιότητα και η ποσότητα του DNA ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ένα Φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, ΗΠΑ). Η συγκέντρωση DNA του κάθε ψαριού ρυθμίστηκε στα 20 ng/μl, μέσω αραιώσης με αποσταγμένο ύδωρ και διανεμήθηκε σε 96 πλάκες PCR.

Μικροδορυφορικοί δείκτες επελέγησαν από τους διαθέσιμους γενετικούς χάρτες σύνδεσης του *S.aurata*, προκειμένου να καλύψουν εννέα ομάδες σύνδεσης (LG 1, 2, 3, 6, 9, 10, 21, 23, 25). Αυτοί οι μικροδορυφόροι επιλέχθηκαν με τρόπο ώστε να αντιπροσωπεύουν μια εύλογη πυκνότητα δείκτη. Συνολικά, 74 μικροδορυφόροι από σχεδόν 100 που αρχικά ελέγχθηκαν, είχαν γονοτυπική ανάλυση όλων των δειγμάτων του φάγρου του κοινού (φαγγρί). Τα χαρακτηριστικά των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να εντοπιστούν στους Franch et al.(2006) και Vogiatzi et al.(2011). Για την ανάλυση σύνδεσης, διενεργήθηκε γονοτυπική ανάλυση των γεννητόρων και των γόνων με τη χρήση πολυσύνθετης PCR που ενισχύει ταυτοχρόνως εννέα μικροδορυφόρους δείκτες, εκ των οποίων έξι (CL2416Contig1, CL120Contig1, cDN14P0004O13.F.ab1, CL2598Contig1, CL2595Contig1, cDN08P0004J06.F) είχαν αναπτυχθεί πρόσφατα και οι άλλοι τρεις (Dd67, HD46, ELD36) προέρχονταν από την ακτινοβολημένη υβριδική ομάδα 18 (Sarroroulou et al., 2007).

Η επιλογή του συνόλου των τύπων βασίστηκε στον πολυμορφισμό τους και στο μονοσήμαντο μέγεθος προϊόν της PCR. Όλες οι πολυσύνθετες PCR εκτελέστηκαν σε όγκους 10 µl, συμπεριλαμβανομένης 1 μονάδας Taq πολυμεράσης (GenAxxon, Biberach, Germany), 1×Taq ρυθμιστικού διαλύματος S, 0.25 mM dNTPs μείγματος, 2.5-3.5 mM MgCl₂, 0.2-0.6 µM από κάθε εμπρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή και κατά προσέγγιση 20 ng εκμαγείου DNA. Οι συνθήκες επαναλήψεων για τις πολυσύνθετες διαδικασίες ενίσχυσης αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης 95 °C για 3 λεπτά, ακολουθούμενες από 35 κύκλους των 30s στα 94 °C, 90s στα 54-58 °C και 60s στα 72 °C, με μια τελική επέκταση στους 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR, επισημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές (VIC, PET, NED, FAM, LIZ), διαχωρίστηκαν με τη χρήση του Αναλυτή DNA ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Inc. [ABI], Carlsbad, CA, ΗΠΑ), χρησιμοποιώντας 5'-επισημασμένους ανάστροφους εκκινητές και την Τυποποιημένη Κλίμακα Μεγέθους GeneScan™-500 LIZ (ABI) ως εσωτερικό πρότυπο μεγέθους. Τα αλληλία ταξινομήθηκαν ως προς το μέγεθος και έγινε προσδιορισμός του γονοτύπου των υποκειμένων με τη χρήση του λογισμικού STRand 2.3.79

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Διαδικασία εξαλάτωσης για την εξαγωγή DNA (Miller et al., 1988)

1	Απομονώστε ένα μικρό τμήμα ιστού (πχ. 0.5 cm ² ιστού πτερυγίου) και τοποθετήστε το σε ένα επισημασμένο σωληνάριο Eppendorf.
2	Προσθέστε 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (10Mm Tris, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8.0), 0.5% SDS και 10 µl πρωτεΐνάσης K (απόθεμα 20mg/ml) σε κάθε σωληνάριο. Αναμείξτε με αναστροφή.
3	Αφήστε το διάλυμα να επωαστεί μια ολόκληρη νύκτα στους 55°C. Το σύνολο των ιστών πρέπει να αφομοιωθούν.
4	Προσθέστε 250 µl NaCl (5M) σε κάθε σωληνάριο.

5	Ανακινήστε ζωηρά (>20×).
6	Ανακατέψτε 10 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα.
7	Μεταφέρετε προσεκτικά το υπερκείμενο εναιώρημα σε καθαρό σωληνάριο με 700 μl διαλύματος παγωμένης αιθανόλης 100% και αναμείξτε ήπια μέσω αναστροφής.
8	Ανακατέψτε τα σωληνάκια για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα. Σε αυτό το στάδιο πρέπει να παρατηρήσετε ένα λευκό ίζημα.
9	Αφαιρέστε το υπερκείμενο εναιώρημα χωρίς να διαταραχθεί το DNA και αντικαταστήστε το με 1 ml διαλύματος αιθανόλης 70% (απομακρύνει το άλας). Αλλάξτε τα ρύγχη των πιπετών μεταξύ των δειγμάτων για να αποφευχθεί η επιμόλυνση.
10	Αναμείξτε με αναστροφή (50×).
11	Φυγοκεντρίστε για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα.
12	Αφαιρέστε το υπερκείμενο εναιώρημα. Να είστε προσεκτικοί ώστε να μη διαταραχθεί το ίζημα DNA, το οποίο πιθανότατα δεν θα προσκολλάται πλέον στα τοιχώματα. Αφαιρέστε όσο περισσότερο υπερκείμενο εναιώρημα είναι δυνατόν. Αλλάξτε ρύγχη στις πιπέτες μεταξύ των δειγμάτων για να αποφευχθεί η επιμόλυνση.
13	Αφήστε το δείγμα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά πριν από την επαναιώρηση.
14	Επαναιωρήστε το διάλυμα σε 100-200 μl TE (10mM Tris, 1mM EDTA). Η φυγοκέντριση σε χαμηλή ταχύτητα μπορεί να βοηθήσει.
15	Αποθηκεύστε το δείγμα στους 4°C (βραχυπρόθεσμα) ή στους -20°C (μακροπρόθεσμα).

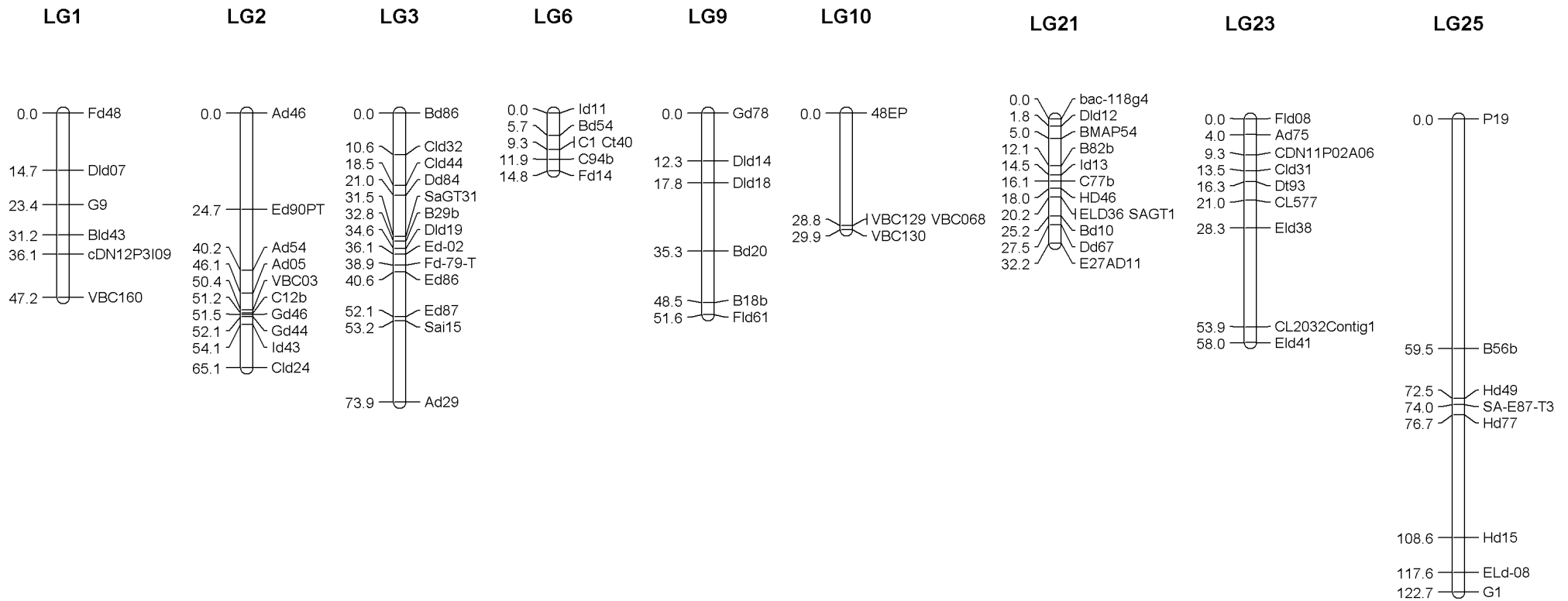
Ανάλυση Γενετικής Σύνδεσης

Για να καταρτιστεί ένας χάρτης γενετικής σύνδεσης, αντιπροσωπευτικός του πληθυσμού αναφοράς μας QTL και να αποφευχθεί οποιαδήποτε προηγούμενη προδιάθεση των αλληλίων - δεικτών, διεξήχθη μια ανάλυση γενετικής σύνδεσης με τη χρήση των διαθέσιμων γονοτυπικών δεδομένων (74 μικροδορυφόροι). Οι ομάδες γενετικής σύνδεσης, η τάξη και η απόσταση μεταξύ των μικροδορυφόρων δεικτών που προσδιορίστηκαν γονοτυπικά, δομήθηκαν και υπολογίστηκαν *de novo* από τα δεδομένα, με τη χρήση του λογισμικού CRI-MAP 3.0 (Green et al. 1990). Με τη ρήση της επιλογής «προετοιμασία» στο λογισμικό, ελέγξαμε επίσης για μη Μεντελική κληρονομικότητα. Η απόδοση δεικτών σε ομάδες γενετικής σύνδεσης διεξήχθη με ανάλυση ζευγών, χρησιμοποιώντας την επιλογή «δύο σημείων». Οι δείκτες με σκορ LOD > 3.0 αποδόθηκαν στην ίδια ομάδα γενετικής σύνδεσης. Όταν υπήρχαν περισσότεροι από τρεις δείκτες σε μια ομάδα γενετικής σύνδεσης, γινόταν επιλογή της τάξης με την υψηλότερη πιθανότητα από όλες τις πιθανές τάξεις (έως και έξι τύπους με τη χρήση της επιλογής «Flips6» στο CRI-MAP). Οποιοσδήποτε επιπρόσθετος δείκτης αποδιδόταν στην πιο πιθανή θέση σε μια ομάδα γενετικής σύνδεσης, παρατηρώντας όλες τις πιθανές τάξεις από μέγιστο αριθμό 6 γειτονικών θέσεων σε μια ομάδα γενετικής σύνδεσης. Οι ομάδες γενετικής σύνδεσης δομήθηκαν βάσει της υπόθεσης ενός όμοιου ποσοστού ανασυνδυασμών μεταξύ των φύλων· ωστόσο, η τάξη των τόπων ελέγχθηκε επίσης (με τη χρήση της επιλογής «Flips» στο CRI-MAP, βάσει της υπόθεσης ανόμοιων ποσοστών ανασυνδυασμών μεταξύ των φύλων. Οι αποστάσεις γενετικής σύνδεσης για το μέσο όρο των φύλων και τις φυλετικές ομάδες γενετικής σύνδεσης εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας τη λειτουργία χαρτογράφησης Kosambi.

5.2 Αποτελέσματα

Χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο 74 πληροφοριακών μικροδορυφόρων για να δομηθούν εννέα ομάδες γενετικής σύνδεσης του γονιδιώματος του *S. aurata* (LG1,

2, 3, 6, 9, 10, 21, 23 και 25) με συνολικό μήκος για τον μέσο όρο των φύλων στα 495.4 cM. Η χαρτογράφηση των δεικτών ήταν σύμφωνη με τους προϋπάρχοντες χάρτες LG και RH για τον φάγρο τον κοινό, αν και η τάξη και η απόστασή τους δεν διατηρήθηκαν απόλυτα στις περισσότερες ομάδες. Η μέση απόσταση των δεικτών ανά ομάδα γενετικής σύνδεσης κυμάνθηκε από 2,9 έως 17,5 cM με έναν μέσο όρο για τις εννέα ομάδες γενετικής σύνδεσης των 7 cM, με ικανοποιητική πυκνότητα δεικτών βάσει του απαιτούμενου μεσοδιαστήματος των 10-20 cM για επαρκή ισχύ της χαρτογράφησης QTL (Beckmann and Soller 1988; Massault et al., 2008). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ένας ελαφρώς μειωμένος ανασυνδυασμός στο άρρεν φύλο, με τη συνολική απόσταση των ομάδων γενετικής σύνδεσης για τα άρρενα στα 436,6 cM, συγκριτικά με τα 626,1 cM για τα θήλεα. Έτσι, η αναλογία θήλεα/άρρενα ήταν 1,43:1, η οποία είναι συγκρίσιμη με εκείνες που αναφέρει ο Franch et al. (2006) και μια προοπτική μελέτη (Τσιγενόπουλος et al, 2009) (1.24:1 και 1.61:1, αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην τάξη των τόπων όπου επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση γενετικής σύνδεσης, βάσει της υπόθεσης διαφορετικών ποσοστών ανασυνδυασμού μεταξύ των φύλων. Το πλήρες σύνολο ομάδων γενετικής σύνδεσης με τον προσανατολισμό και την απόσταση των δεικτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.



ΣΧΗΜΑ 4. Τμηματικός χάρτης γενετικής σύνδεσης (κατά μέσο όρο φύλων) του *Sparus aurata* σε cM, αποτελούμενος από εννέα ομάδες γενετικής σύνδεσης.

5.3 Σχολιασμός Αποτελεσμάτων Και Συμπεράσματα

Η ανάλυση γενετικής σύνδεσης 74 δεικτών μικροδορυφόρων που διεξήχθη στην παρούσα μελέτη, αποκάλυψε εννέα ομάδες γενετικής σύνδεσης. Ο αριθμός των οικογενειών που συμμετείχαν στην ανάλυση παρέχει επαρκείς πληροφοριακές μειώσεις και, κατά συνέπεια, έναν σχετικά σταθερό χάρτη γενετικής σύνδεσης για την εκτέλεση μερικής σάρωσης στο γονιδίωμα του φάγρου του κοινού. Όσον αφορά το ποσοστό κάλυψης του γονιδιώματος για την παρούσα μελέτη, αυτό φαίνεται σχετικά ικανοποιητικό, δεδομένου ότι καλύπτει περίπου το 30% του εκτιμώμενου γονιδιώματος (όπως εκτιμάται στον δεύτερο χάρτη γενετικής σύνδεσης του φάγρου του κοινού (Τσιγενόπουλος et al, 2009)), με ικανοποιητική πυκνότητα δεικτών (7 cM), ενώ μπορεί να χαρακτηρίσει την παρούσα μελέτη ως μερική σάρωση του γονιδιώματος του φάγρου του κοινού.

Επιπλέον, ο τμηματικός χάρτης γενετικής σύνδεσης που διαμορφώθηκε στην παρούσα μελέτη συμφωνεί με τους προϋπάρχοντες χάρτες (Franch et al., 2006; Massault et al., 2011; Boulton et al., 2011) και έναν δεύτερο χάρτη γενετικής σύνδεσης που προετοιμάζεται (Τσιγενόπουλος et al, 2009), καθώς και με τον υβριδικό χάρτη ακτινοβολίας (Σαρροπούλου et al, 2007), παρόλο που η τάξη και η απόσταση των δεικτών δεν διατηρήθηκαν απόλυτα στις περισσότερες ομάδες. Από την κατάρτιση του πρώτου δημοσιευμένου χάρτη γενετικής σύνδεσης (Franch et al., 2006) και τον δεύτερο χάρτη γενετικής σύνδεσης (Τσιγενόπουλος et al, 2009), οι οποίοι είναι βασισμένοι σε μια οικογένεια αναφοράς, αναμένονταν διαφορές στη θέση και την απόσταση μεταξύ των δεικτών στην παρούσα μελέτη, καθώς περισσότερες γενετικές πληροφορίες (δηλαδή πληροφοριακές μειώσεις) προσθέτονταν στην ανάλυση γενετικής σύνδεσης (δέκα οικογένειες έναντι μίας). Τέτοιες διαφορές προφανώς δεν οφείλονται στη διαφορετική κατανομή των ποσοστών ανασυνδυασμού του γονιδιώματος βάσει πληθυσμών, αλλά στην υψηλή στατιστική ισχύ που προσφέρει η ανάλυση γενετικής σύνδεσης μεταξύ πολλών οικογενειών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης γενετικής σύνδεσης έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην ανίχνευση των QTL που επηρεάζουν την ανάπτυξη,

τον καθορισμό του φύλου και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά σε ιχθυοκαλλιέργειες φάγγου του κοινού (Loukonitis et al. 2012, 2013).

6. Βιβλιογραφία

- Γούναρης Ι. (2000) Μοριακή γενετική Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας
- Καρκαλούσος Π.(2012) Αρχές Ηλεκτροφόρησης. Έκδοση Πρώτη, ΑΤΕΙ Αθήνας
- Μπακολίτσας Κ. (2005) Κύριοι σταθμοί μετάβασης από το μακρόκοσμο στο μικρόκοσμο και γένεσης των σύγχρονων βιοεπιστημών.
- Παπαποστόλου Ι. (2009) Βιοπληροφορική: Η ψηφιακή μορφή της βιολογίας
- Χατζηπλής Δ. Γεωργούδης Α. (2001) Η χρήση των γενετικών δεικτών στην βελτίωση των αγροτικών ζώων.
- Beckmann J.S. & Soller M. (1988) Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 228-236.
- BIOER TECHNOLOGY CO., LTD
- Boulton K., Massault C., Houston R.S., de Koning D.J., Haley C.S., Bovenhuis H., Batargias C., Canario A.V.M., Kotoulas G. & Tsigenopoulos C.S. (2011) QTL affecting morphometric traits and stress response in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 319, 58-66.
- Chamberlain, J.S., (1990) Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M.A. Innis, et al., eds.). Academic Press, New York
- CONNOR M., FERGUSON M. (2004) Βασικές αρχές ιατρικής Γενετικής ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ
- Costas S. Tsigenopoulos, Dimitris Chatziplis, Bruno Louro, Emmanouella Vogiatzi, Elena Sarropoulou, Luca Bargelloni, Tomaso Patarnello, Deborah M. Power, Adelino Canario, Antonios Magoulas and Georgios Kotoulas (2009) Second generation genetic linkage map

for the gilthead sea bream *Sparus aurata* L. GIA 2009. Genomics in Aquaculture international symposium. Bodo University College (Norway). 5-7 July 2009.

- Dimitrios Loukovitis, Elena Sarropoulou, Costas Batargias, Apostolos P. Apostolidis, Costas S. Tsigenopoulos, and Dimitrios Chatziplis (2013) Quantitative Trait Loci for morphometric traits in the Gilthead Sea Bream. *Animal Genetics* 44: 480-483
- Franch R., Louro B., Tsalavouta M., Chatziplis D., Tsigenopoulos C.S., Sarropoulou E., Antonello J., Magoulas A., Mylonas C.C., Babbucci M., Patarnello T., Power
- Green P., Falls K. & Crooks S. (1990) *Documentation for Crimap*, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage
- Loukovitis D., Sarropoulou E., Batargias C., Apostolidis A. P., Kotoulas G., Tsigenopoulos C. S. & Chatziplis D. (2012) Quantitative trait loci for body growth and sex determination in the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Animal Genetics*. 43: 753-759
- Massault C., Franch R., Haley C., de Koning D.J., Bovenhuis H., Pellizzari C., Patarnello T. & Bargelloni L. (2011) Quantitative trait loci for resistance to fish pasteurellosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Animal Genetics* 42, 191–203.
- Miller S.A., Dykes D.D. & Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.
- Peter J Russell (1996) *Genetics*
- Paux E, Sourdille P, Salse J, (2008) *A Physical Map*

- Simpson, R.J. (2003) Proteins and Proteomics: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sarropoulou E., Franch R., Louro B., Power D.M., Bargelloni L., Magoulas A., Senger F., Tsalavouta M., Patarnello T., Galibert F., Kotoulas G. & Geisler R. (2007) A gene-based radiation hybrid map of the gilthead seabream *Sparus aurata* refines and exploits conserved synteny with *Tetraodon nigroviridis*. BMC Genomics 8: 44.
- Vogiatzi E., Lagnel J., Pakaki V., Louro B., Canario A.V.M., Reinhardt R., Kotoulas G., Magoulas A. & Tsigenopoulos C.S. (2011) *In silico* mining and characterization of simple sequence repeats from gilthead seabream (*Sparus aurata*) expressed sequence tags (EST-SSRs); PCR amplification, polymorphism evaluation and multiplexing and cross-species assays. Marine Genomics 4: 83–91.