

TEHNICI IN BIOLOGIA MOLECULARA

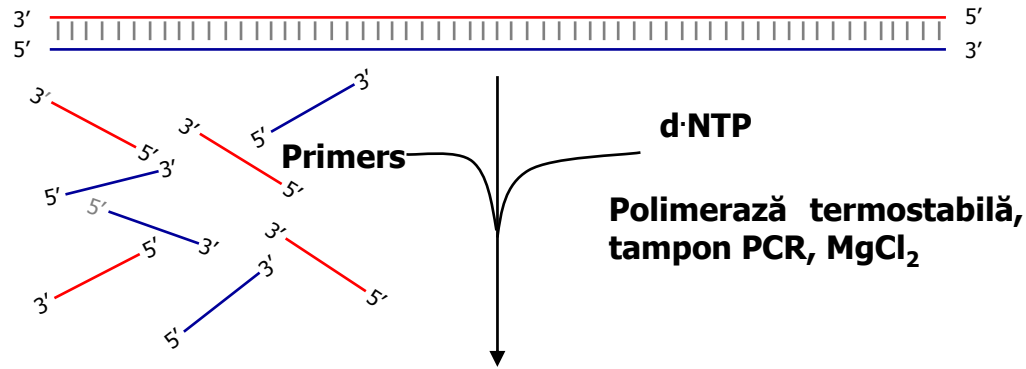
Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction) – variante și aplicații

- Pusă la punct de către K. Mullis și echipa sa. Nu se foloseau ADN polimeraze termostabile și nici aparate automate pentru reproducerea ciclurilor de temperatură.
- Publicarea cercetărilor se face în 1985.
- În 1991 apare primul număr dintr-o revistă consacrată în întregime tehnicii PCR (PCR - Methods and Applications).
- În 1993, Mullis primește Premiul Nobel pentru Chimie.

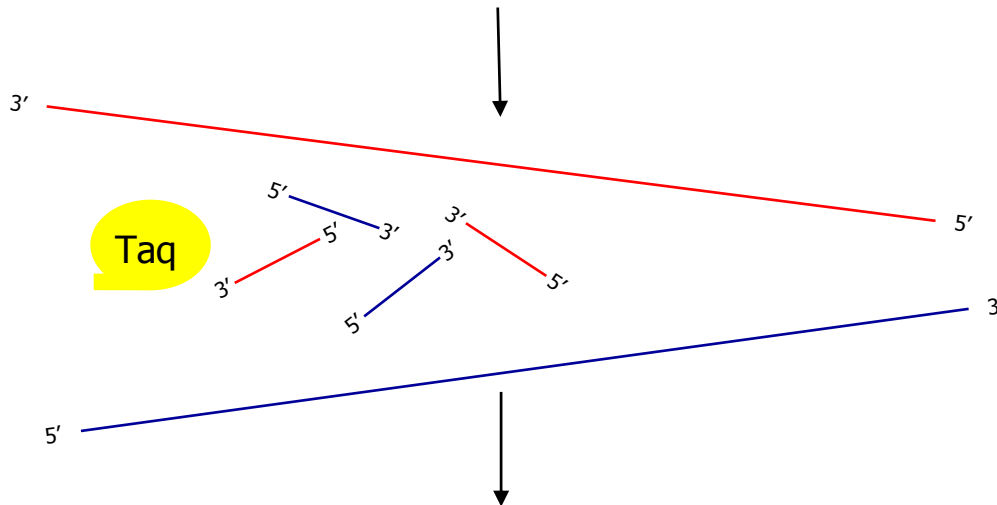
Principiu

- Practic are loc amplificarea unui fragment dintr-o matriță ADN utilizând primeri sintetici desemnați pe bază de complementaritate.
- Numărul de copii ale secvenței alese pentru amplificare este dublat la fiecare replicare.

Etapele reacției PCR

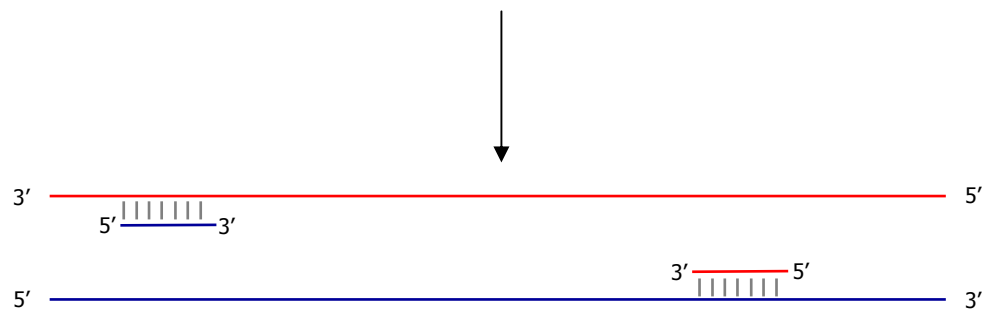


Tub de reacție

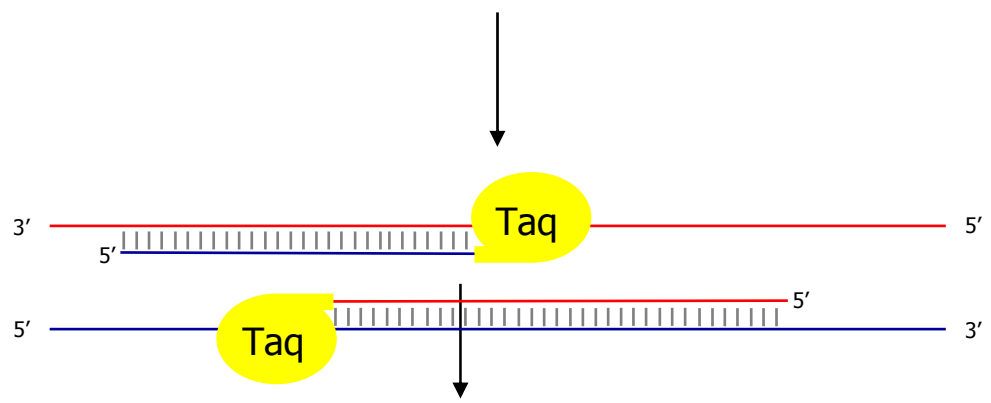


**Se adaugă ADN și
mixul de reacție, 4°C**

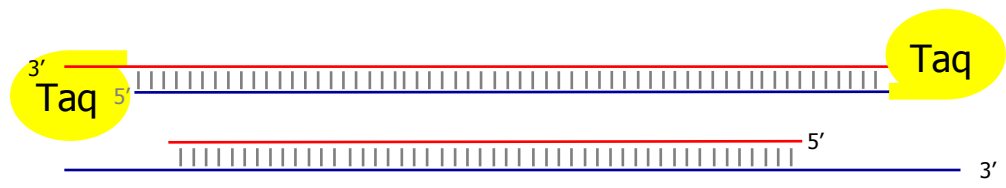
Denaturare, 95°C



Anelare (51-61°C)



Extindere (72°C)



Etapele se repetă

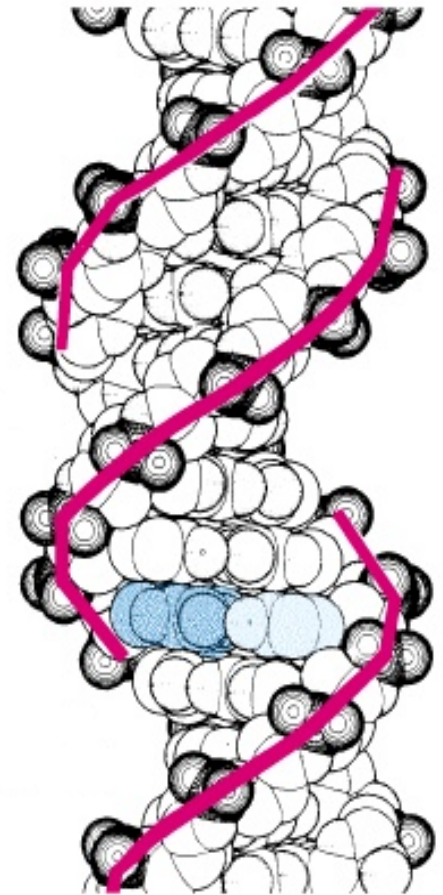
Componentele reacției PCR

Matrița ADN

Poate proveni dintr-o mare varietate de probe biologice.

Trebuie să aibă un grad înalt de puritate – verificare spectrofotometrică (A_{260}/A_{280}).

Cantitatea necesară poate scădea – forensic, ADN fosil, amplificarea fragmentelor marcate fluorescent, țesuturi împarafinate.



➤ ADN polimeraza

Polimeraze termostabile

Taq/Amplitaq ADN polimeraza – izolate din *Thermus aquaticus*, modificată și clonată în *E. coli*. Viteză – 35-100 nucleotide pe secundă, T optimă – 70-80°C, activitate 5'-3' exonucleazică.

Pfu ADN polimeraza – izolată din *Pyrococcus furiosus*, are activitate 5'-3' și 3'-5' exonucleazică (*proof reading*), specificitate de 10 ori mai mare decât *Taq* polimeraza, utilizare în reacțiile de secvențiere.

***Tth* ADN polimeraza – izolată din *Thermus thermophilus*, modificată și clonată în *E. coli*, în prezența ionilor de Mn poate fi folosită ca și reverstranscriptază, iar în prezența ionilor de Mg își revine activitatea ADN polimerazică.**

Enzima	Activitate 3'-5' exonucleazică	Activitate 5'-3' exonucleazică	Stabilitate termică (minute trecute până la înjumătățirea activității enzimaticice)	Viteza de sinteză a noii catene (dNTP/ secundă/mol)
<i>Taq</i> ADN polimeraza	absentă	prezentă	40 – 60 la 95°C	60 - 150
<i>Tth</i> ADN polimeraza	absentă	prezentă	-	25
<i>Pfu</i> ADN polimeraza (forma nativă sau recombinantă)	prezentă	absentă	1140 la 95°C	60
<i>Tli</i> polimeraza (Vent® Polimeraza)	prezentă	absentă	402 la 95°C	67
<i>Tbr</i> ADN polimeraza (Dynazyme)	absentă	prezentă	150 la 96°C	-
Platinum <i>Pfx</i>	prezentă	absentă	720 la 95°C	100 – 300
Platinum <i>Taq</i>	absentă	prezentă	96 la 95°C	60 – 150
<i>AdvanTaq</i> polimeraza	absentă	absentă	40 la 95°C	40
<i>Mth</i> polimeraza	prezentă	absentă	12 la 75°C	-

Amestec de nucleotide

Sunt livrate fie separat, sub formă de soluții stoc de dATP, dCTP, dGTP și dTTP, fie sub formă soluție amestec a celor patru nucleotide.

Concentrațiile optime depind de lungimea fragmentului ce trebuie amplificat și de numărul de cicluri de amplificare.

Soluția tampon a polimerazei

Conține TRIS, HCl, KCl și are pH 8,3.

Există și variante de tampon care includ clorura de magneziu.

MgCl₂

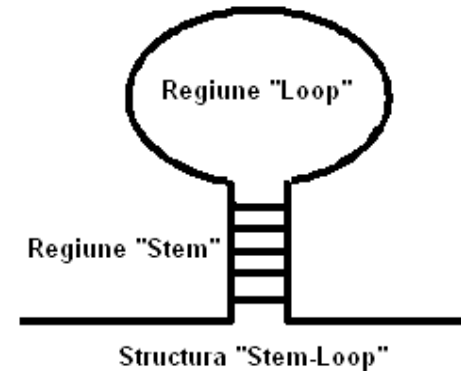
Ionii de magneziu sunt activatori ai polimerazelor.

Apă ultrapură – Nuclease Free

➤ Primeri

Reguli de desemnare a primerilor:

- sunt complementari cu matrița ADN;
- au de obicei între 18 și 33 de nucleotide;
- este recomandat să conțină un număr egal din cele 4 baze;
- trebuie evitată formarea de structuri secundare la nivelul lor;
- trebuie evitată formarea de dimeri între primeri;
- fragmentul amplificat trebuie să aibă maxim 1500 pb, pentru un PCR normal;
- trebuie optimizată T_a (Annealing Temperature) pentru a obține o amplificare corectă.



Secvența proteică

Met--Tyr--Cys--Asn--Thr--Arg--Pro--Gly

Codoni posibili

ATG TAC TGT AAT ACT AGA GCT GGT
TAT TGC AAC ACC AGG GCC GGC
ACA GCA GGA
ACG GCG GGG

Primer rezultat

ATG TAC TGT AAT ACT AGA GCT GGT
T C C C G C C
A A A
G G G

Primeri degenerați

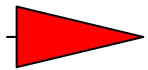
Prescurtare standard	Nucleotide corespunzătoare
R	G + A
Y	T + C
S	G + C
W	T + A
K	G + T
M	A + C
D	G + T + A
H	T + A + C
B	G + T + C
V	G + A + C
N	G + A + T + C

Principalele probleme ale tehnicii PCR



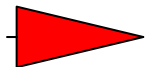
Contaminarea matricei ADN sau a reactivilor folosiți.

- **Lipsa amplificării.**
- **Imposibilitatea obținerii fragmentelor de interes.**



Lipsa de fidelitate a polimerazei.

- **Încorporarea greșită a unor baze.**



Amplificările parazite.

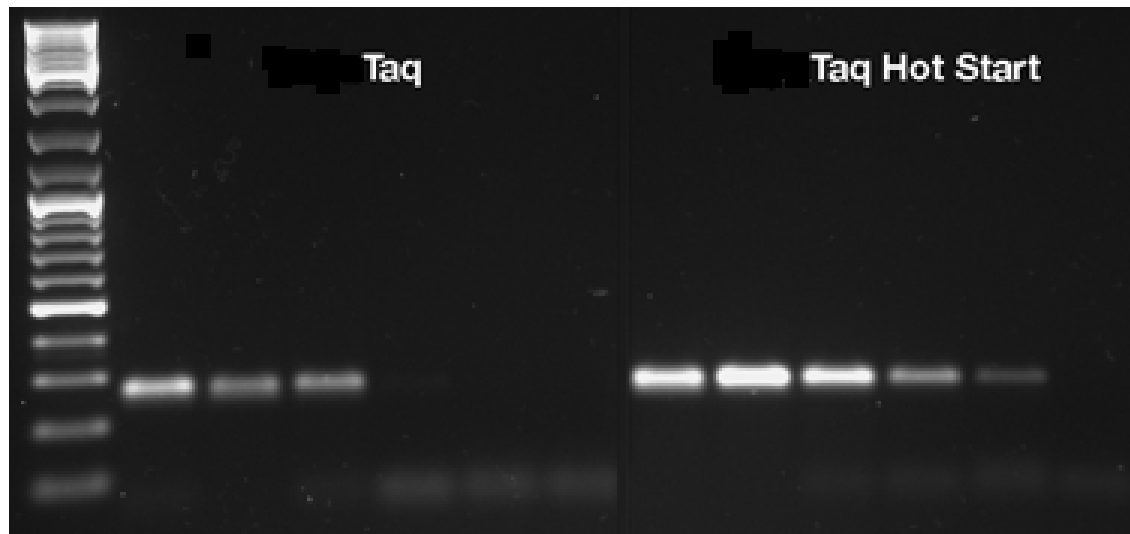
- **Obținerea de produși secundari de amplificare.**

Variante ale tehnicii PCR

Hot Start PCR

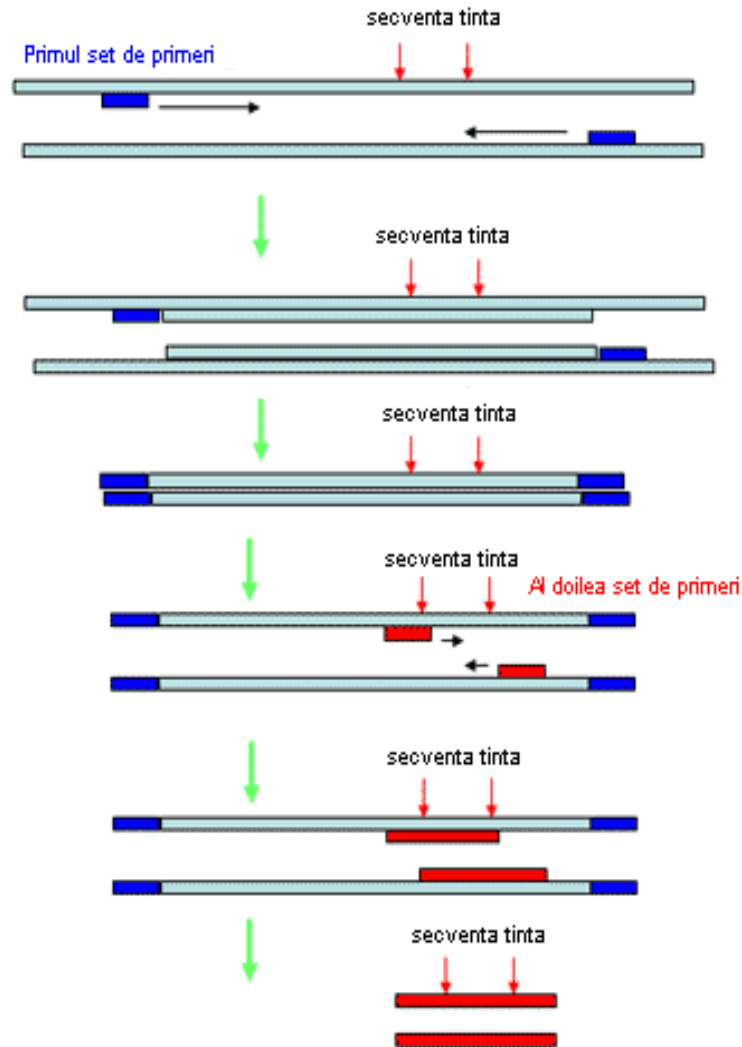
Principiul acestei variante este de a adăuga polimeraza după o primă etapă de denaturare. Astfel denaturarea poate fi mai lungă în timp și permite o bună separare a matriței ADN, fără a altera polimeraza.

- La ora actuală există enzime (AmpliTaq Gold) modificate genetic care au nevoie de o primă etapă de activare la 95°C.



Nested PCR

Constă în realizarea a două amplificări succesive, utilizând două perechi diferite de primeri, dintre care a doua flanchează o secvență inclusă în cea care a fost amplificată cu prima pereche.

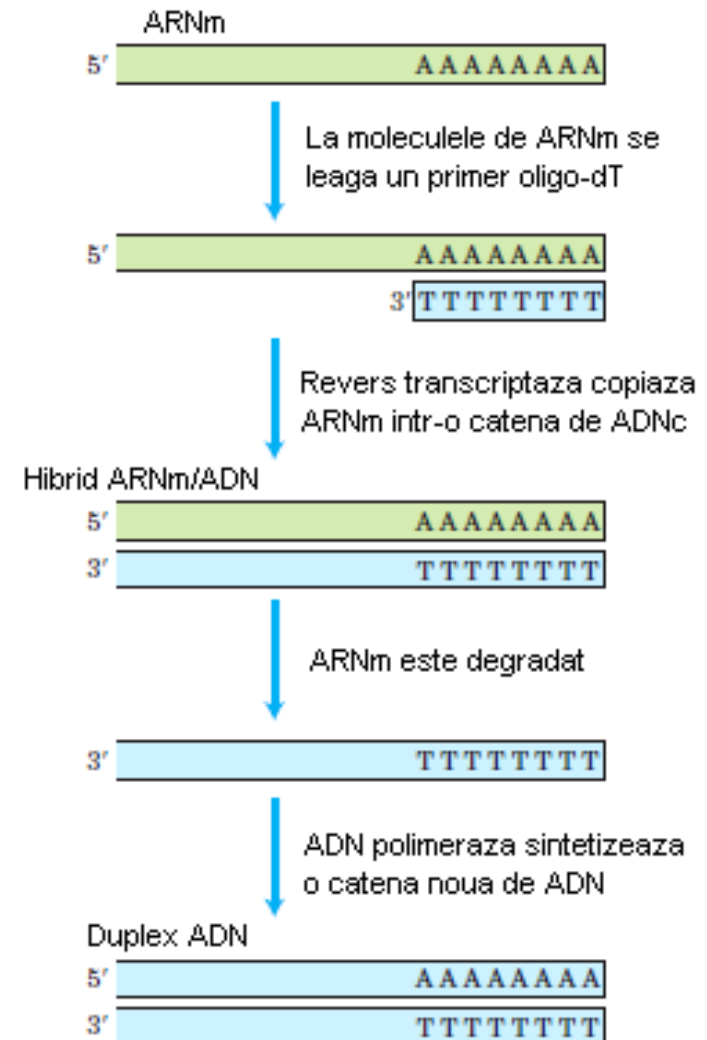


Prima reacție de
amplificare

A doua reacție de
amplificare

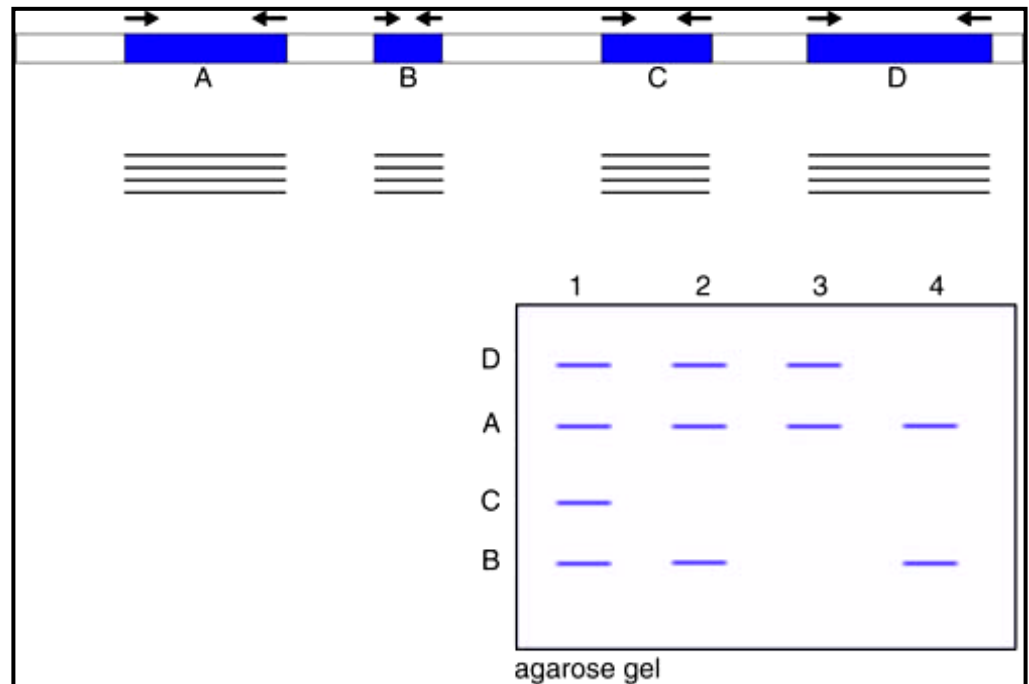
RT-PCR

Se pornește de la ARNm. Utilizează la început o revers transcriptază care copiază ARN într-un ADNc. Apoi urmează o reacție PCR clasică folosind drept matriță ADNc.



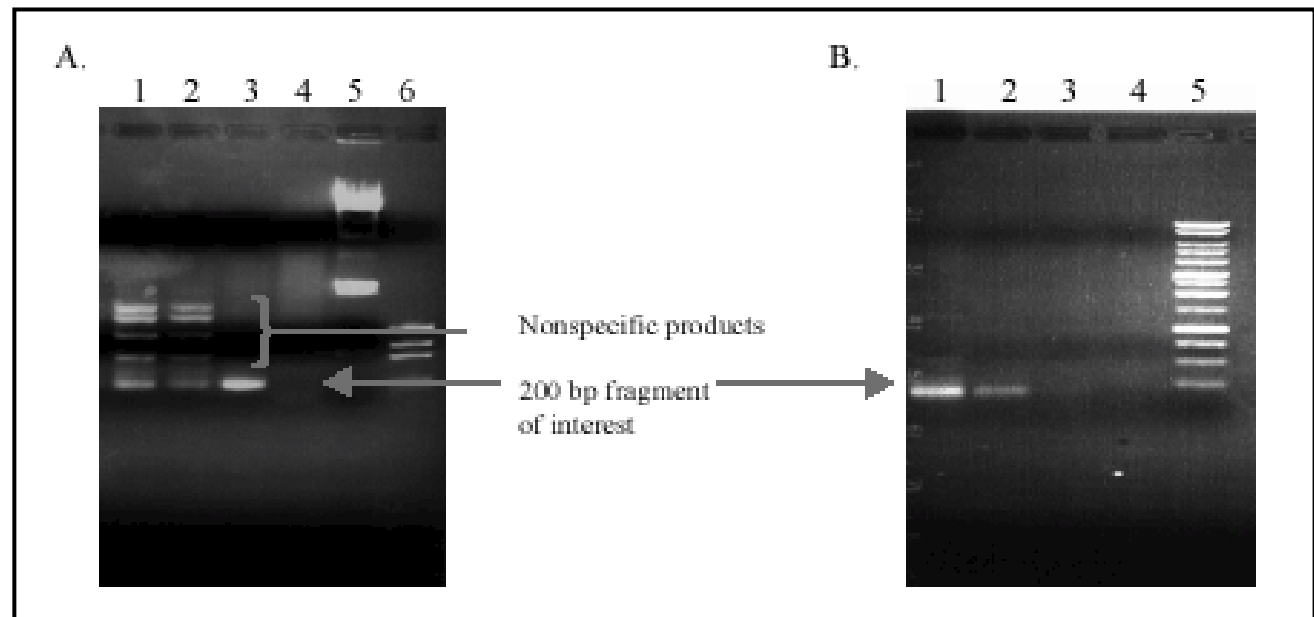
PCR Multiplex

- În acest caz, în reacție se introduc mai multe perechi de primeri. Acest lucru permite amplificarea mai multor secvențe de interes în același timp. Necesită o calculare foarte precisă “ramp time” și a T_a pentru fiecare pereche de primeri.



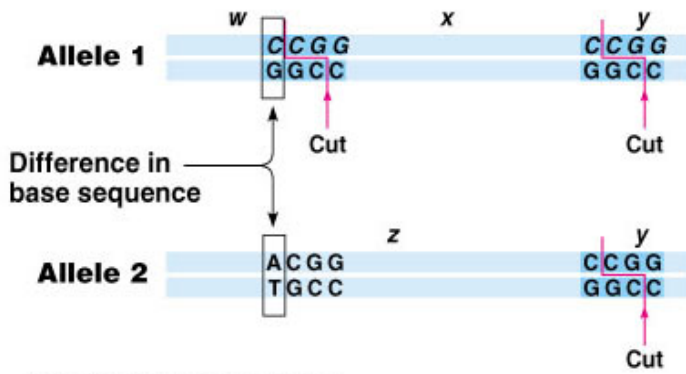
Touchdown PCR

- Tehnica urmărește eliminarea la maxim a amplificărilor nespecifice.
- Se pornește de la temperaturi crescute de hibridizare în primele cicluri, acestea scăzând treptat către sfârșitul reacției. De asemenea, se folosesc diverse substanțe cu rolul de a elimina supraîncălzirile ADN din zonele bogate în GC.

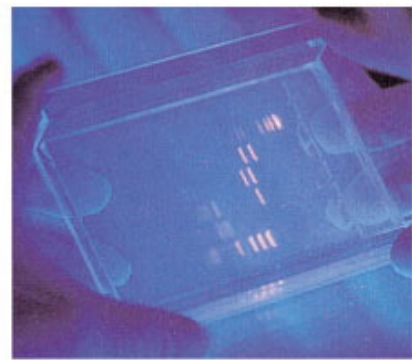


PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

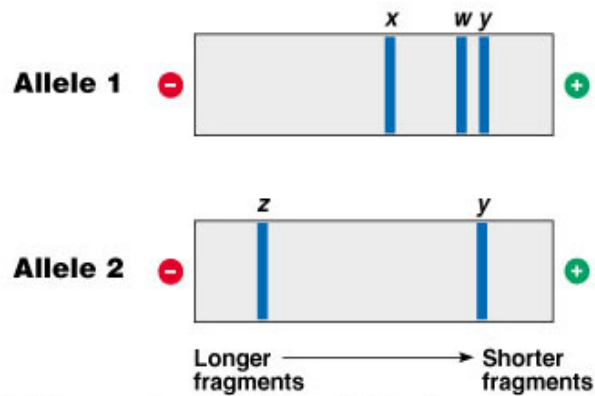
- **Izolarea și purificarea ADN: se poate face din probe de sânge, fire de păr, material seminal, etc. cu ajutorul kiturilor sau a procedurii clasice de extracție.**
- **Puritatea și concentrația ADN extras: este verificată spectrofotometric (DO₂₆₀/280 nm).**
- **ADN izolat este amplificat prin PCR.**
- **Ampliconii rezultați sunt supuși digestiei enzimatică cu ajutorul enzimelor de restricție.**
- **Vizualizarea produșilor rezultați în urma digestiei se face prin electroforeză în gel de agaroză sau de poliacrilamidă.**



(a) DNA from two alleles



(c) Completed gel



(b) Electrophoresis of restriction fragments

Diferențierea între două alele prin PCR-RFLP

Tehnica Real-Time PCR cantitativ

- Reacția PCR este o reacție în lanț deci produsul unui ciclu de amplificare servește ca substrat pentru următorul ciclu.
- Cantitatea de produs de reacție (amplimer) crește exponențial și nu linear
- În condiții teoretice, ideale, cantitatea de produs se dublează la fiecare ciclu de amplificare, conform ecuației 1:

$$N = N_0 \times 2^n \quad (1)$$

N = numărul de molecule amplificate după n cicluri

N_0 = numărul inițial de molecule ADN

- Abateri de la ecuația (1) sunt datorate în principal eficienței amplificării (E)

- Eficiența amplificării (E)-fracția de amplimer replicată în decursul fiecărui ciclu de amplificare. Experimental s-a determinat că eficiența amplificării este mai mică decât 100% și ca urmare s-a introdus în ecuația procesului PCR (1) sub forma:

$$N = N_0(1 + E)^n \quad (2)$$

Eficiența amplificării poate fi influențată de:

- natura secvenței țintă (structuri secundare locale care defavorizează replicarea),
- natura primerilor (temperatura de hibridizare a acestora, complementaritatea față de secvența recunoscută și stabilitatea legării la această secvență
- lungimea secvenței de amplificat,
- prezența impurităților
- calitatea ADN polimerazei termostabile folosite.

În condiții experimentale identice, apar variații de la reacție la reacție, așa numitele variații *tube-to-tube*, datorate variațiilor de transfer termic. Experimental E variază de la 0,46 la 0,99 pentru gene diferite și între 0,8 și 0,99 în cazul în care aceeași genă a fost amplificată în condiții identice.

Pentru fiecare pereche de primeri și ADN țintă trebuie determinată eficiența amplificării.

Principiul reacție Real-Time PCR

- Cinetica reacției PCR (amplificarea unui fragment ADN țintă) poate fi urmărită în timp real (Real-Time PCR) prin introducerea în amestecul de reacție a unor fluorocromi (compuși fluorescenți care se excită și emit cuante de energie la anumite lungimi de undă).
- Tehnică permite cuantificarea cantității inițiale a fragmentului ADN țintă dintr-o probă.
- Marcarea specifică fluorescentă a ADNdc se poate realiza prin mai multe metode, cea mai simplă metodă este utilizarea unui fluorocrom, de exemplu SYBR Green I, care se intercalează între bazele azotate ale ADNdc și astfel intensitatea fluorescenței crește direct proporțional cu acumularea ampliconilor în timpul reacției PCR.

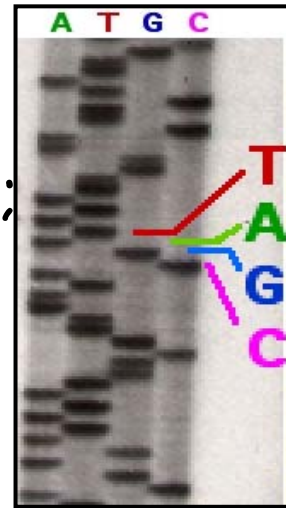
Fazele reacție Real-Time PCR

Reacția Real-Time PCR prezintă patru faze:

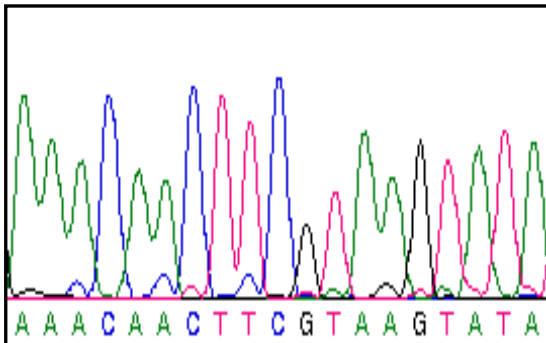
- În prima fază sau **faza liniară** care durează aproximativ 10-15 cicluri în funcție de cantitatea de ADNc inițială și/sau nivelul de exprimare al genei țintă, fluorescența emisă nu depășește valoarea zgomotului (background).
- În faza **exponențială timpurie**, nivelul fluorescenței atinge un prag (threshold) care depășește considerabil nivelul background-ului. Ciclul la care fluorescența ampliconului depășește considerabil nivelul de background se numește „threshold cycle” (Ct sau CP). Valoarea Ct este invers proporțională cu cantitatea inițială de ADN țintă din proba de analizat.
- În timpul **fazei trei-exponențială** sau **logaritmică liniară**, cantitatea de amplicon se dublează la fiecare ciclu în condiții ideale
- În ultima fază, cea de **platou**, reactanții devin limitați și măsurarea fluorescenței nu se mai justifică.

Secvențierea - determinarea structurii primare (ordinii nucleotidelor) la nivelul unei REGIUNI din ADN sau ARN;

Inițial - Fred Sanger: metoda "chain-termination";
- Maxam-Gilbert: metoda degradării chimice;



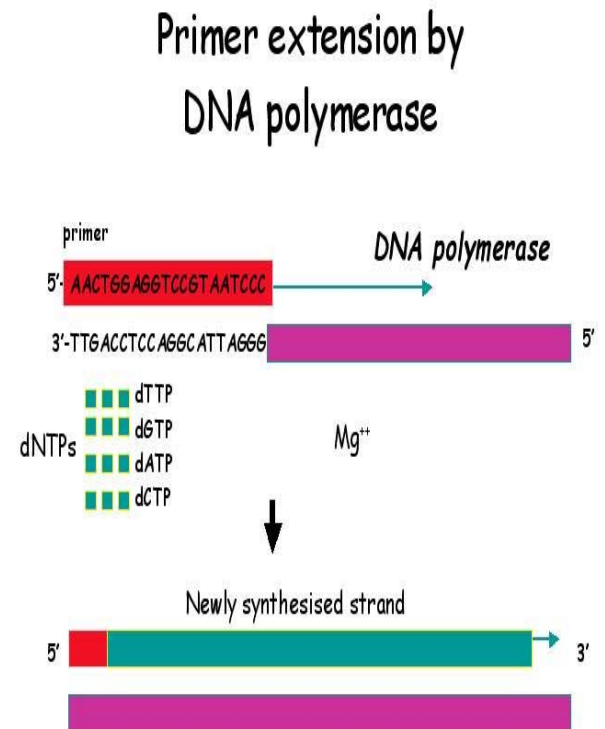
Metode moderne - secvențierea automatizată:



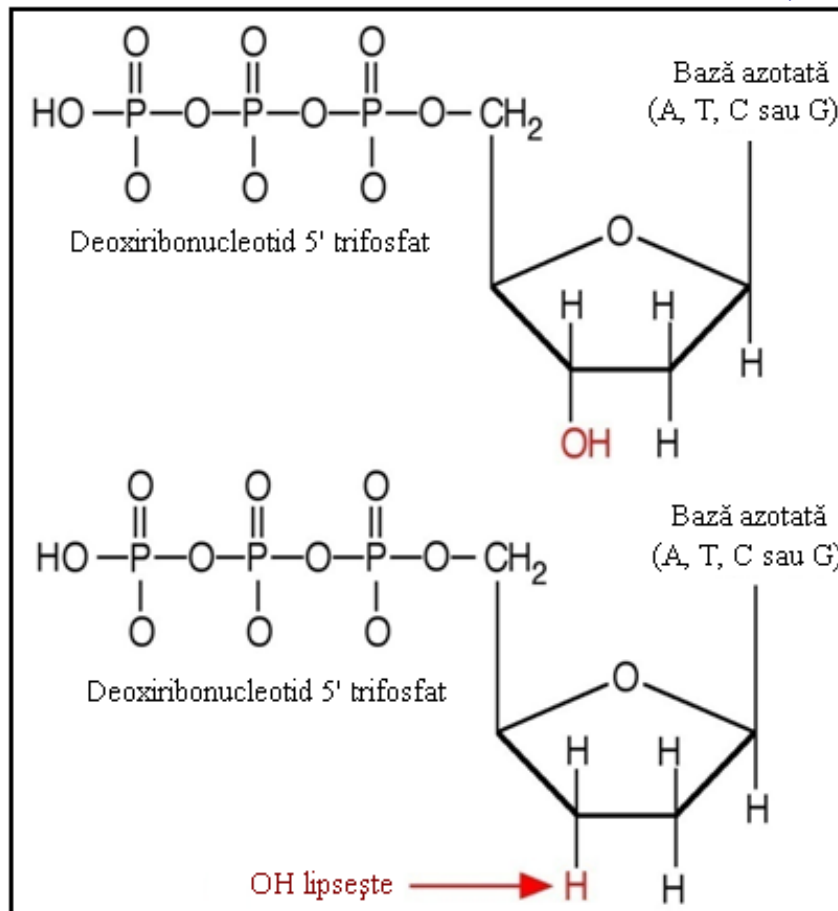
- i) metoda dye-terminator (Sanger);
- ii) secvențierea de nouă generație (NGS- New Generation Sequencing);

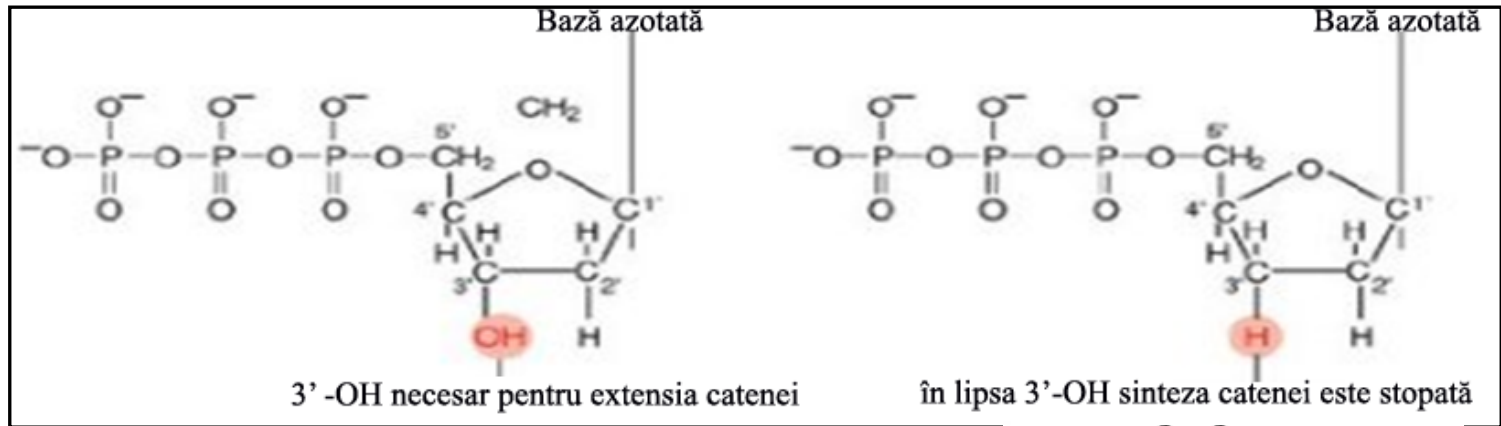
Metoda Sanger (“dye-terminator”): principiu

- Utilizează o ADN polimerază modificată pentru a sintetiza o catenă complementară monocatenei ADN ; ADN Pol adaugă nucleotide noi la capătul 3' al primerului complementar cu catena matriță.
- Utilizează dideoxinucleotide (ddNTP), caracterizate prin lipsa grupării -OH la C3' al deoxiribozei;
- Adăugarea unui ddNTP la nivelul noii catene = stoparea extensiei catenei.

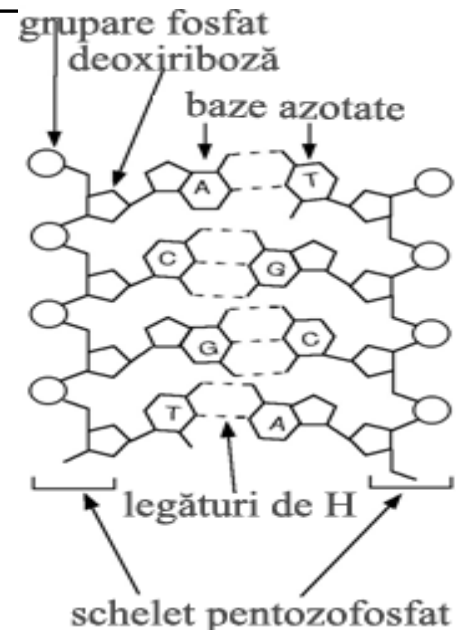


dd NTP → fără gruparea -OH în poziția 3'.





Deoarece ddNTP nu posedă -OH (care permite nucleotidelor să se atașeze la o catenă ADN în creștere), sinteza este stopată.



ETAPE DE LUCRU



**PREGĂTIREA
PROBELOR**

PCR



Purificare ampliconi



PCR secvențiere



Purificare produși secvențiere



Electroforeza capilară

Injecția probelor;

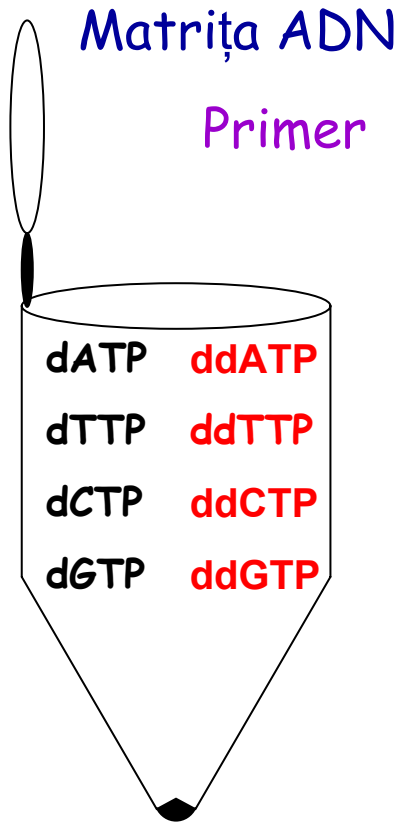
↓
Separarea fragmentelor prin electroforeza capilară;

↓
Excitarea fluorocromilor;

↓
Fluorescența emisă de marcatorii fluorescenți este separată în funcție de lungimea de undă și colectată de o cameră specială (CCD);

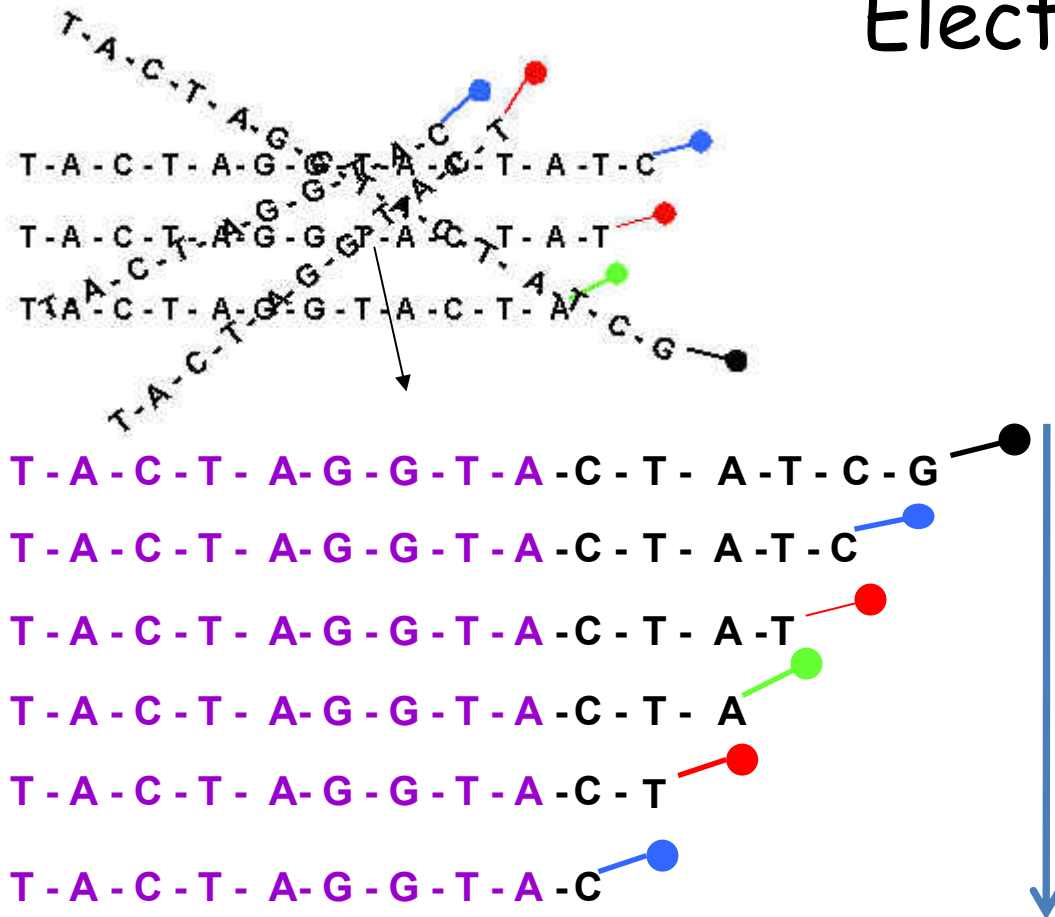
↓
Semnalul brut rezultat este prelucrat cu un software special rezultând o electroforegramă corespunzătoare secvenței analizate.

PCR SECVENȚIERE



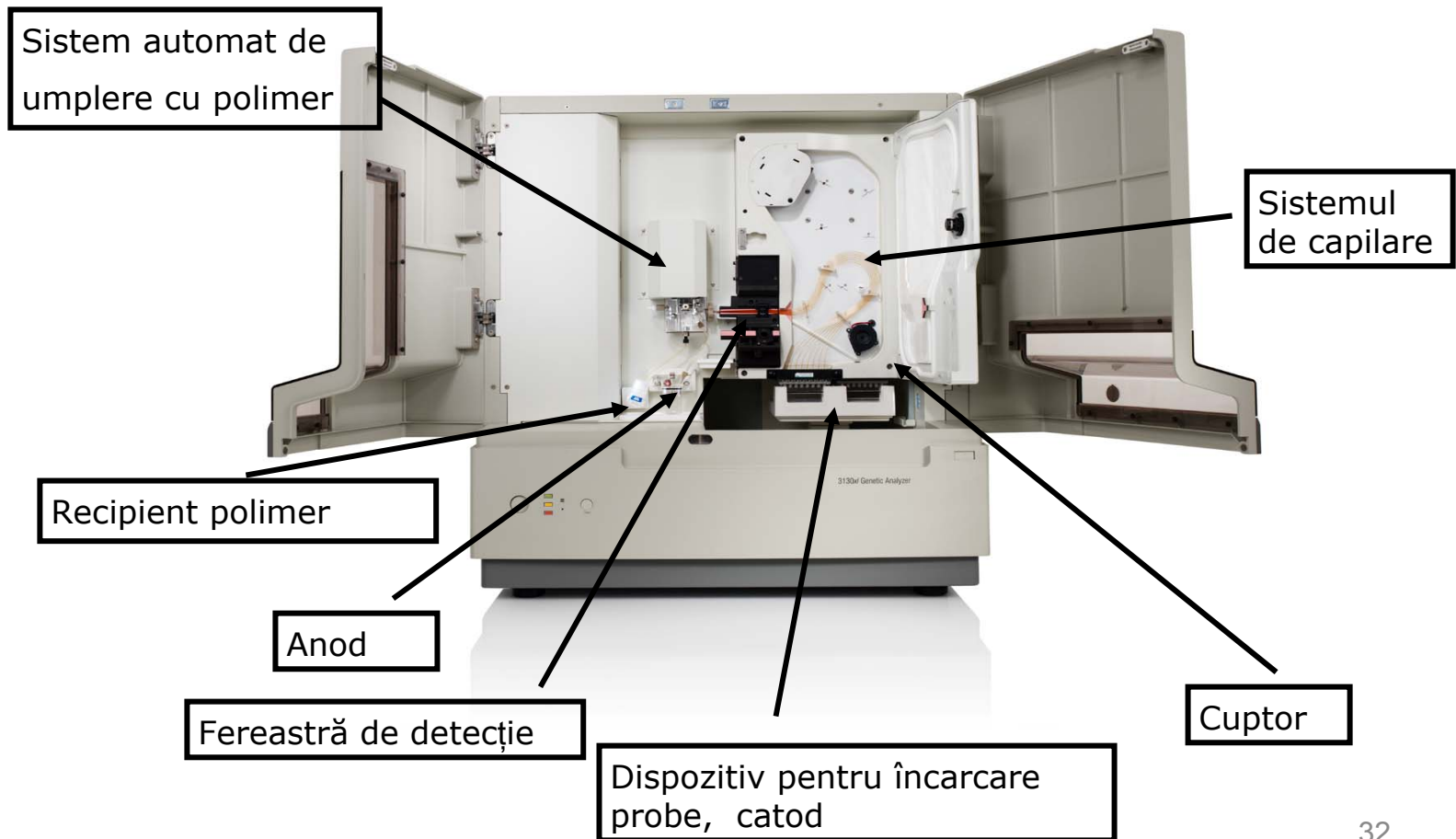
Electroforeza capilară

Separarea fragmentelor
de ADN m.c.
în funcție de mărime

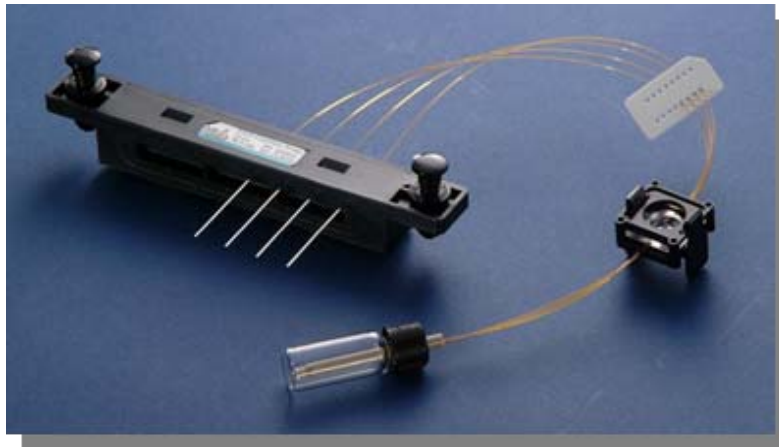


Matrice de separare:
gel sau polimer;
Rezoluție 1 pb.

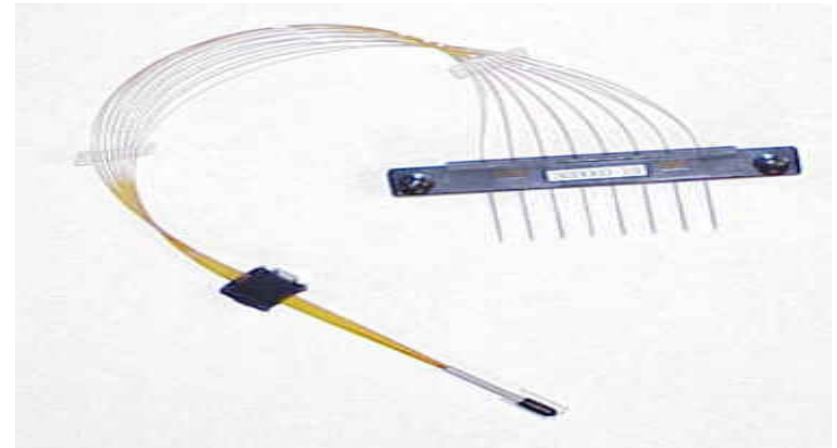
3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)



Sistem cu 4 capilare



- Diametrul interior:
50 μm
- Pentru cel puțin 100
de teste;

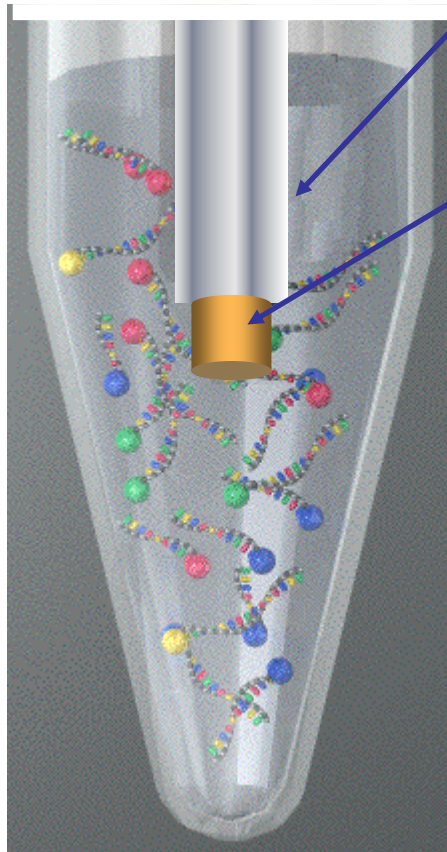


Sistem cu 16 capilare

Lungimi diferite:

- 22 cm
- 36 cm
- 50 cm
- 80 cm

Injecția probelor

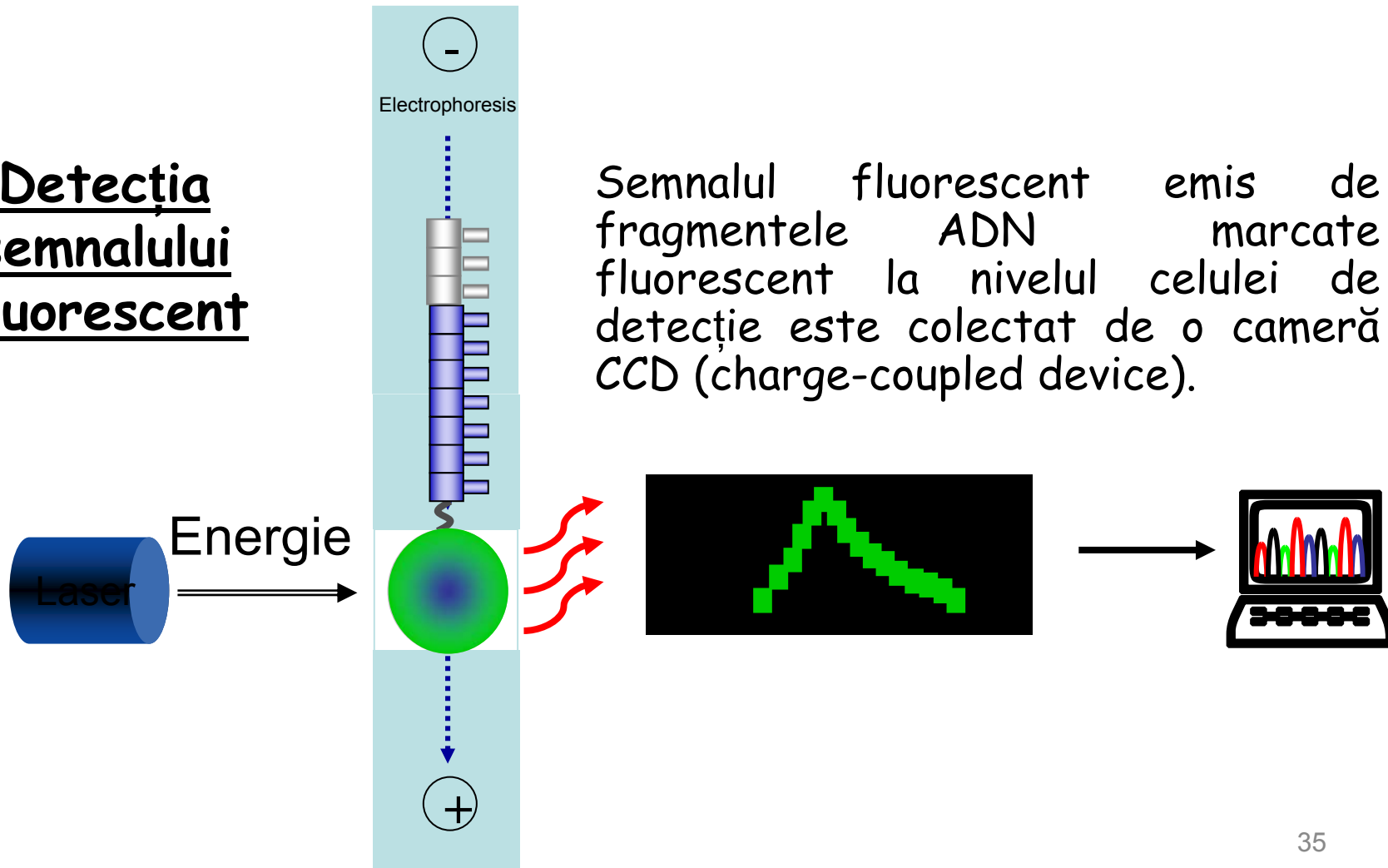


Electrod (Catod)

Capilar

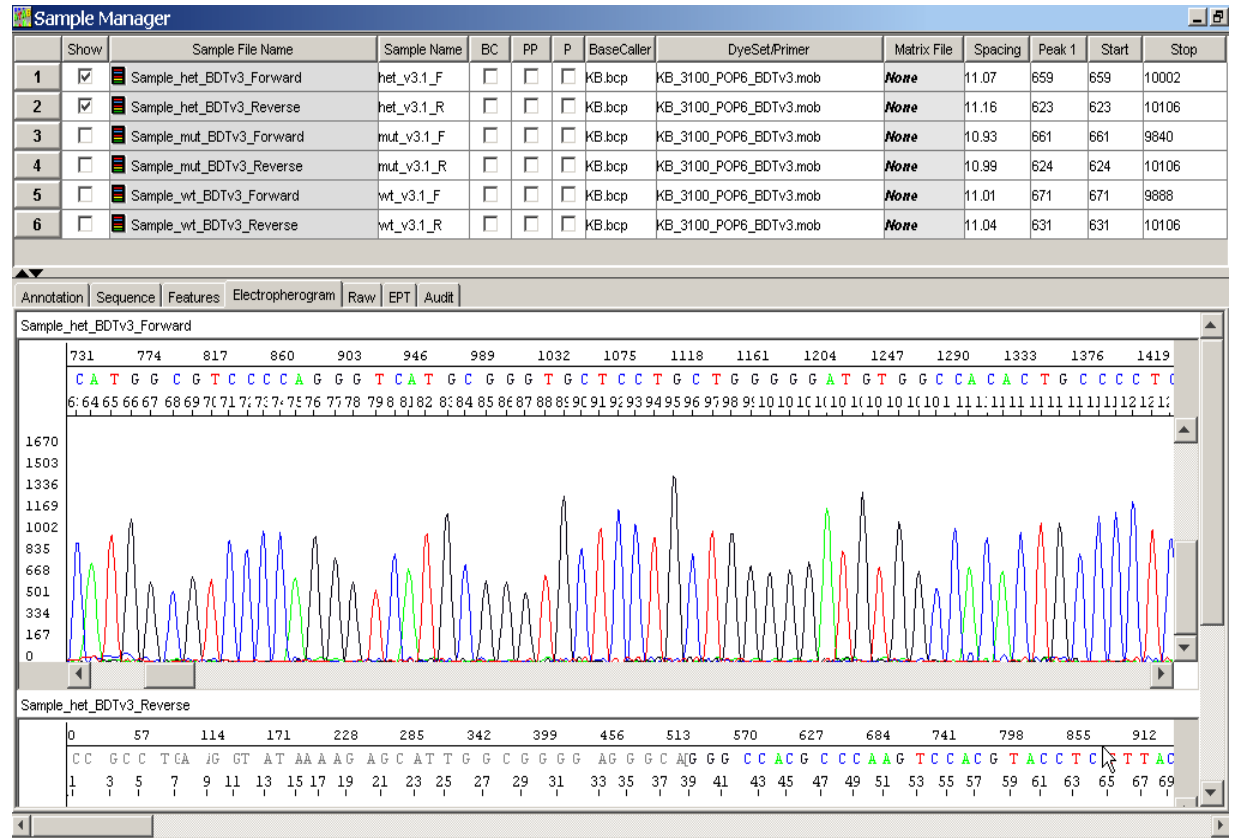
- Capilarul și electrodul sunt introduse în tubul ce conține proba ADN de secvențiat.
- Se aplică un anumit voltaj.
- Fragmentele ADN marcate fluorescent pătrund în capilar și migrează către anod (+), situat la celălalt capăt al capilarului.

Detecția semnalului fluorescent



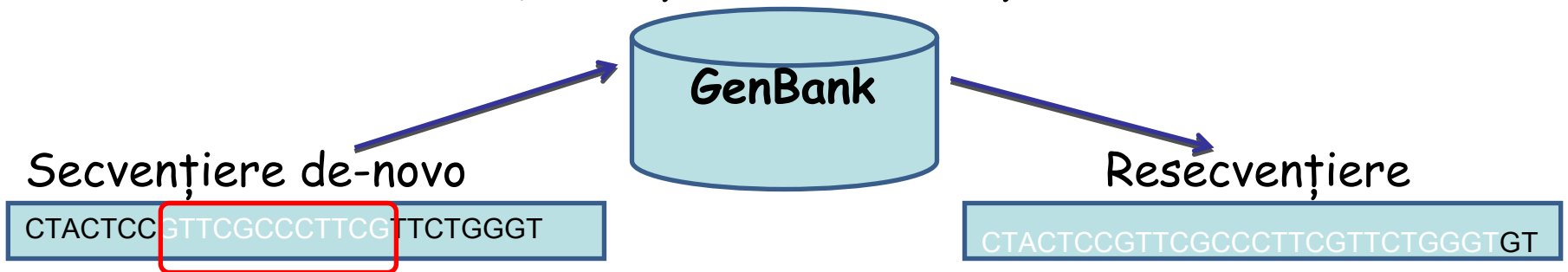
Semnalul fluorescent emis de fragmentele ADN marcate fluorescent la nivelul celulei de detecție este colectat de o cameră CCD (charge-coupled device).

Analiza și prelucrarea datelor



Vizualizarea datelor cu aplicatia Sample Manager View.

Aplicațiile secvențierii



Scop: obținerea de secvențe noi;

Probe: 500-900pb; BAC;

Rezultat: adăugarea de secvențe noi în bazele de date.

Scop: indentificarea variațiilor existente între secvența consens și secvența de referință;

Probe: produși PCR;

Rezultat: detecție SNP.

Aplicațiile resecvențierii:

- ✓ SNP: identificare/ validare;
- ✓ Subtipizarea unor tulpini patogene: HCV;
- ✓ Genotipare & identificare alele: HLA;
- ✓ Medicină legală: ADNmt;
- ✓ Genotipare CpG (metilare ADN).