

se poate realiza un screening complet al proteinelor celulare din punct de vedere al activității lor biochimice sau al interacțiilor de tip proteină-proteină, ADN-proteină, ARN-proteină în care pot fi implicate.

Cel mai important element în cadrul realizării cipurilor de *Protein Microarray* este imobilizarea moleculei sondă la nivelul substratului solid sub forma unui spot omogen sau heterogen. Cel mai frecvent, sondele pot fi reprezentate de anticorpi, peptide ori proteine recombinante sau lizate celulare, în timp ce suportul solid poate fi din sticlă sau din diferite tipuri de geluri cu porozitate mare.

Tehnica *Protein Microarray* are trei variante experimentale: *Analytical Arrays*, *Functional Arrays* și *Microarray* în fază inversată.

În prima variantă sondele sunt reprezentate de cele mai multe ori de anticorpi specifici, iar în a doua variantă de proteine funcționale întregi sau de domenii funcționale ale unor proteine. În cazul celei de-a treia variante, sonda nu este reprezentată de o singură moleculă proteică, ci de totalul moleculelor proteice prezente într-un țesut sau într-o populație de celule la un moment dat.

Detectia recunoașterii sondă-țintă de la nivelul cipului se face prin metode libere de coloranți (microscopie de forță atomică, spectrometrie de masă) sau prin metode clasice care utilizează un marcator și se bazează de obicei pe chemiluminescență.

## CAPITOLUL IV

### AMPLIFICAREA IN VITRO A SECVENTELOR DE ACIZI NUCLEICI

#### IV.1 Tehnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tehnica PCR a fost elaborată de către Kary Mullis și echipa sa de cercetători în anul 1985 și este cu siguranță metoda care a cunoscut cea mai rapidă și spectaculoasă dezvoltare din istoria biologiei moleculare. În 1991 a apărut primul număr dintr-o revistă dedicată în exclusivitate acestei tehnici, *PCR - Methods and Applications*, iar lui K. Mullis i-a fost decernat în 1993 Premiul Nobel pentru Chimie. Tehnica a avut un impact major asupra biologiei moleculare și o serie întreagă de interpretări asupra conceptului de bază au dus la introducerea mai multor inovații atât la nivelul etapelor acesteia, cât și la nivelul aparaturii utilizate în vederea realizării practice a acesteia.

În spatele unei simplități de principiu și realizare practică, tehnica PCR ascunde numeroase impedimente care pot conduce la rezultate finale eronate. Utilizarea sa presupune înțelegerea logică a etapelor care trebuie parcursă pentru obținerea unor rezultate finale concluzante, o dotare corespunzătoare a laboratorului și o experiență practică vastă.

Una dintre proprietățile ADN polimerazelor este că pot sintetiza monocatene *de novo* numai atunci când pornesc de la un primer. *In vivo* acesta este reprezentat de un oligonucleotid ARN complementar sintetizat de o enzimă specifică numită primază care este de fapt o ARN polimerază ADN dependentă. Primerul are rolul de a furniza polimerazelor un capăt 3'-OH liber pentru a putea iniția sinteza de ADN. Această proprietate este indispensabilă stabilității informației genetice. Dacă numai simpla prezență a ADN monocatenar ar fi suficientă pentru realizarea replicării, atunci celulele să confrunta cu o situație gravă în care mai multe secvențe de ADN să-să sintetizeze într-o manieră aleatorie, fără nici un control.

Această proprietate a ADN polimerazelor este utilizată *in vitro*, în tehnica PCR, pentru a amplifica, prin replicări succesive, o secvență de ADN țintă. Pentru punerea în practică este necesară alegerea unor primeri sintetici, capabili să hibridizeze la capetele secvenței de amplificat. Numărul de copii ale secvenței alese pentru amplificare este dublat la fiecare replicare, acesta crescând exponențial cu fiecare ciclu.

#### IV.1.1 Etapele tehnicii PCR

O reacție de amplificare *in vitro* se realizează în trei etape diferite (Figura 54):

1. Denaturarea ADN matriță.
2. Hibridizarea (anelarea) primerilor pe bază de complementaritate.
3. Sintea (elongarea) noii catene de ADN având drept matriță catena veche.

În prima etapă are loc de fapt o denaturare termică a macromoleculei de ADN dublucatenare. Astfel, temperatura amestecului de reacție, care conține și ADN, este ridicată până la o valoare care să conducă la ruperea punților de hidrogen stabilite pe bază de complementaritate între cele două catene. La final, în soluție vom regăsi ADN monocatenar.

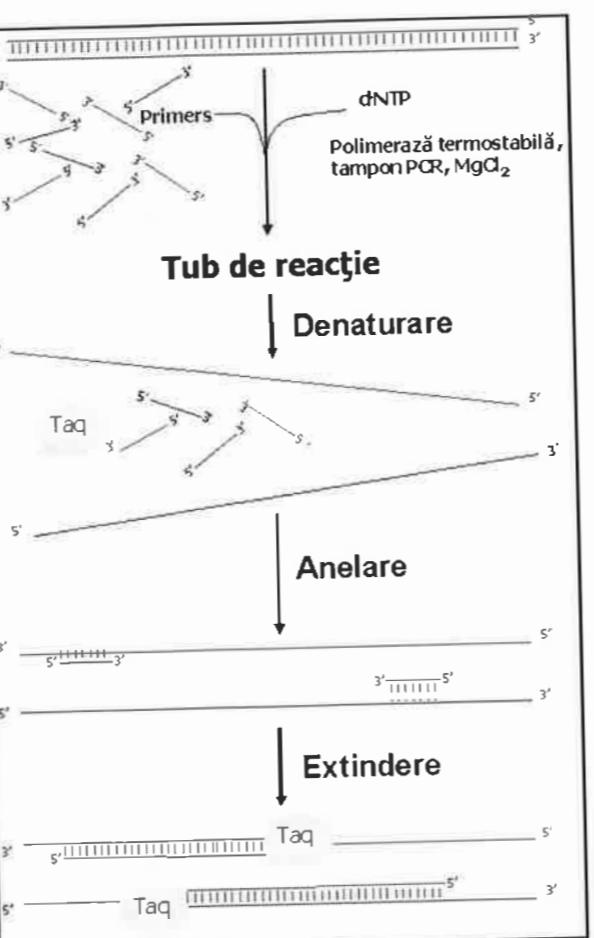


Figura 54. Etapele reacției PCR.

În cea de-a două etapă are loc legarea primerilor oligonucleotidi sintetici la catena de ADN, pe bază de complementaritate. Temperatura amestecului de reacție este coborâtă la valori care depind de lungimea primerilor și de compozitia lor în nucleotide. Primerii sunt monocatene scurte de ADN, desemnate pe bază de complementaritate cu secvența din ADN de interes. Hibridizarea primerilor se efectuează prin scăderea temperaturii până la o valoare care permite refacerea punților de hidrogen dintre aceștia și catena matriță.

În cea de-a treia etapă are loc sinteza unei noi catene de ADN pornind de la primeri cu ajutorul unei ADN polimeraze și în prezența deoxinucleotid-trifosfaților (dNTP). Acest proces va conduce la obținerea unor noi catene de ADN complementare cu matrița. La finalul acestei etape moleculele de ADN apar sub formă dublucatenară în amestecul de reacție.

Sintiza noilor catene poate fi repetată prin reluarea celor trei etape, iar această repetiție reprezintă intrarea într-un nou ciclu de amplificare. Fiecare catenă nou sintetizată devine matriță pentru noul ciclu de amplificare, astfel încât secvența ţintă de ADN este selectiv amplificată în fiecare pas al reacției. Produsul de reacție obținut se numește **amplicon** și va conține la capete secvențele primerilor folosiți la amplificare.

Primii produși rezultați prin copierea catenelor originale au o lungime diferită față de catenele pe care ADN polimeraza le sintetizează în continuare. În al doilea ciclu de amplificare produși au de asemenea o lungime nedeterminată. Abia din al treilea ciclu de amplificare fragmentele obținute vor avea o lungime definită, corespunzătoare poziției primerilor, respectiv distanței dintre aceștia. Odată cu cel de-al patrulea ciclu, numărul de copii al secvenței ţintă de interes va crește exponențial.

Ecuția care definește numărul de copii din amestecul final de reacție este prezentată mai jos:

$$(2^n - Z) \times Y \text{ copii ale secvenței ţintă,}$$

unde  $n$  este numărul de cicluri de amplificare,  $Z$  reprezintă produși cu lungime nedefinită, iar  $Y$  numărul de copii al secvenței originale.

Este de remarcat faptul că în practică, după un număr finit de cicluri de amplificare, acumularea produșilor de reacție intră într-o fază de platou. Deci, procesul foarte eficient de amplificare nu este chiar nelimitat, existând o serie întreagă de factori care fac ca randamentul acestuia să nu fie maxim.

Astfel, după circa 40-45 de cicluri de amplificare, cantitatea de polimerază activă începe să se diminueze iar valoarea activității enzimatiche totale suferă o scădere, în special datorită denaturării termice. Un alt factor limitant este și rehibrizarea catenelor matriță cu o viteză mai mare atunci când concentrația ampliconilor depășește un anumit prag, conducând astfel la scăderea eficienței de hibridizare a primerilor. De asemenea, după 40-45 de cicluri are loc și scăderea concentrației de dNTP și diminuarea eficienței tamponului de reacție. Toți acești factori vor conduce la un declin accentuat al acumulării de ampliconi și la intrarea într-o fază staționară, de platou, a reacției PCR.

#### IV.1.2 Componentele unei reacții PCR

Rezultatele amplificării prin tehnica PCR sunt dependente de mai multe componente care se adaugă de la început în amestecul de reacție. Cantitatea și concentrația optimă a acestora este determinată experimental.

**1. Matrița:** poate fi reprezentată de fragmente de ADN, ADN genomic sau ADNc. Modul în care sunt pregătite probele pentru reacția PCR poate face diferență între obținerea unor rezultate bune sau lipsa totală a amplificării. Atunci când pregătim proba trebuie să avem în vedere două aspecte extrem de importante: obținerea unei cantități suficiente de ADN și eliminarea oricărora substanțe potențial inhibitoare ale reacției de amplificare. De asemenea, la fel de importantă este și sursa biologică din care se realizează extracția și izolarea matriței. Spre exemplu, atunci când se extrage ADN dintr-o probă inclusă în parafină pot apărea fragmentări ale materialului genetic în timpul procedeelor de includere în parafină. În cazul matrițelor ADNc, provenite din ARN, este foarte important modul în care materialul biologic din care s-a realizat extracția a fost prelevat, stocat și manipulat și totodată, modul în care ARN extras a fost conservat, datorită marii fragilități a acestui tip de acid nucleic. Probele de ARN trebuie să fie libere de ribonucleaze și se pot stoca pe termen lung exclusiv la temperaturi de -80°C.

**2. Tamponul de reacție și clorura de magneziu:** majoritatea tampoanelor de reacție sunt furnizate sub formă concentrată fiind necesară diluarea lor înainte de utilizare. Tampoanele de reacție au următoarele roluri într-o amplificare prin tehnica PCR: mențin stabilă valoarea de pH în amestecul de reacție, protejează ADN polimeraza de scăderea prematură a activității enzimatiche, minimizează efectul eventualilor inhibitori și stabilizează matrița. Rolul tamponului de reacție este extrem

de important și datorită faptului că activitatea enzimatică a ADN polimerazelor este optimă într-un domeniu foarte îngust de pH, iar orice modificare, chiar și minoră, în afara limitelor acestuia poate conduce la scăderea puternică a amplificării.

În practică se utilizează mai multe tipuri de tampoane ale căror componente variază în funcție de tipul de polimerază utilizat. Cel mai comun tampon folosit conține TRIS-HCl (pH 8,3), clorură de potasiu și gelatină. Tampoanele de reacție pot include sau nu clorură de magneziu. Dacă aceasta nu este inclusă în tampon trebuie adăugată obligatoriu, separat, în amestecul de reacție. Prezența ionilor de magneziu este extrem de importantă deoarece ei sunt activatori ai ADN polimerazei, optimizează temperatura de topire a ADN dublu catenar și facilitează interacția primer-matriță. Cantitățile insuficiente de ioni bivalenti de magneziu duc la amplificări slabe, iar cantitățile crescute conduc la apariția de produși de amplificare nespecifici.

**3. Deoxinucleotid-trifosfatii (dNTP):** sunt livrați fie sub formă a patru soluții stoc individuale, fie sub formă de amestec. Soluțiile sunt ajustate la o valoare optimă de pH. Concentrațiile optime de dNTP introduse în reacție depind de mai mulți factori cum ar fi concentrația de clorură de magneziu, concentrația primerilor, lungimea fragmentului care urmează să fie amplificat și numărul de cicluri de reacție.

În optimizarea unei reacții de amplificare PCR concentrația de dNTP este determinată empiric. Concentrațiile crescute de dNTP pot inhiba ADN polimeraza, iar concentrațiile scăzute conduc la obținerea unei fidelități mai mari a reacției. De obicei, concentrația optimă de nucleotide este situată în jurul valorii de 200 µM/amestec de reacție. Această valoare este suficientă pentru a sintetiza aproximativ 12,5 µg ADN atunci când jumătate dintre nucleotide sunt incorporate în noile catene (Gerstein S.A., 2001). În anumite scopuri se pot utiliza deoxinucleotide marcate fluorescent sau radioactiv.

**4. ADN polimeraza:** la realizarea reacției PCR s-a folosit inițial fragmentul Klenow al ADN polimerazei I din *Escherichia coli*. Ulterior au fost descoperite, izolate, produse la scară industrială și utilizate ADN polimerazele termostabile. În tabelul 1 sunt prezentate principalele caracteristici ale cătorva dintre cele mai importante ADN polimeraze termostabile.

**Tabel 1.** Principalele proprietăți ale câtorva ADN polimeraze termostabile (după Gerstein S.A., Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide, 2001).

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

Una dintre cele mai importante proprietăți ale ADN polimerazelor este fidelitatea. Aceasta poate fi definită ca fiind abilitatea enzimelor de a încorpora nucleotidul coresponzător pe bază de complementaritate la nivelul noii catene și de a corecta eventualele erori apărute în timpul sintezei. Corectarea încorporărilor greșite se poate realiza exclusiv prin prezența activității 3'-5' exonucleazice (capacitate de corectare - *proofreading*). Conform lui Gerstein S.A., 2001, câteva dintre ADN polimerazele termostabile prezintă următoarele rate de fidelitate exprimate în frecvență a mutațiilor/ perechi de baze/ ciclu de replicare:

$$Pfu (1,3 \times 10^{-6}) > Vent (2,8 \times 10^{-6}) > Taq (8 \times 10^{-6})$$

De menționat că activitatea 3'-5' exonucleazică, responsabilă de repararea greșelilor, poate reduce semnificativ randamentul reacției PCR, mai ales atunci când secvența săntă are o lungime mare. Acest fapt se datorează fenomenului de degradare

a primerilor aflați înaintea sensului de înaintare a enzimei mai ales când intervalul de timp necesar etapei de extindere este crescut.

Câteva dintre principalele polimeraze termostabile utilizate pe scară largă în tehnica PCR sunt descrise în continuare:

i) *Taq/AmpliTaq* ADN polimeraza – a fost izolată din *Thermus aquaticus*, apoi modificată și clonată în *Escherichia coli*. Viteza de sinteză este de 60-150 nucleotide pe secundă la o temperatură optimă de 70-80°C. Enzimele au o activitate 5'-3' exonucleazică care permite înlăturarea nucleotidelor care sunt situate înaintea lanțului nucleotidic aflat în creștere. *AmpliTaq* polimeraza are aceleași proprietăți cu *Taq* polimeraza dar este produsă în *Escherichia coli* prin recombinare genetică. Reproductibilitatea și puritatea acesteia este mult mai mare decât a *Taq* polimerazei simple. Există și o variantă a acestei polimeraze căreia îi lipsește un fragment de 289 de aminoacizi de la capătul N-terminal. Această formă este lipsită de activitate 5'-3' exonucleazică și poate amplifica mai eficient matrițele ADN circulare. De asemenea, este de două ori mai stabilă la temperaturi înalte decât *Taq* polimeraza și acest fapt permite utilizarea ei în amplificarea unor matrițe bogate în GC.

ii) *Vent* ADN polimeraza – a fost izolată din *Thermococcus litoralis*. Enzima este mult mai stabilă decât alte polimeraze și este capabilă să producă ampliconi cu lungimi mari. Posedă și activitate 3'-5' exonucleazică (*proofreading*) ceea ce îi permite înlăturarea bazelor incorecte incorporate. Totuși acest tip de activitate exonucleazică are și dezavantaje putând conduce la degradarea primerilor.

iii) *Pfu* ADN polimeraza – izolată din *Pyrococcus furiosus*, are activitate 5'-3' și 3'-5' exonucleazică și o specificitate de 10 ori mai mare decât *Taq* polimeraza. Este utilizată frecvent în reacțiile de sevențializare.

iv) *Tth* ADN polimeraza – a fost izolată din *Thermus thermophilus*, apoi modificată și clonată în *Escherichia coli*. În prezența ionilor de mangan poate fi utilizată ca reverstranscriptază, iar în prezența ionilor de magneziu își reia activitatea ADN polimerazică. Deci enzima poate fi folosită la obținerea ADNc pornind de la ARN, în același tub de reacție. Pentru asta trebuie adăugăți în amestecul de reacție atât ioni de mangan, cât și de magneziu. Ulterior, ionii de mangan trebuie chelatați și inactivați pentru a permite reluarea activității ADN polimerazice a enzimei.

v) *Phusion™ High-Fidelity* ADN polimeraza – enzima a fost obținută prin inginerie genetică. În cazul acesteia, a fost adăugat la polimeraza propriu-zisă (similară cu cea izolată de la genul *Pyrococcus*) un domeniu suplimentar de legare a ADN dublucatenar. Acesta crește afinitatea polimerazei pentru dublul helix ADN,

permisând adiția nucleotidelor cu o viteză crescută. În plus, enzima este capabilă să amplifice cu succes secvențe cu lungimi foarte mari.

**5. Apă ultrapură:** se utilizează exclusiv apă ultrapurificată, liberă de nucleaze. Aceasta se poate obține din apă purificată de tip MilliQ™, care este ulterior sterilizată prin autoclavare.

**6. Primerii:** desemnarea primerilor este un proces sensibil de care depinde reușita reacției PCR. La alegerea acestora trebuie respectate câteva reguli generale:

i. lungimea optimă a primerilor poate fi cuprinsă între 19 și 28 de nucleotide. Totuși, intervalul de lungime poate fi modificat în funcție de necesități. În acest caz, trebuie să ținem cont că primerii cu lungimi foarte mari (între 28 și 36 de nucleotide) dă specificități foarte bune, dar hibridizează cu o eficiență scăzută, în timp ce primerii scurți (16-18 nucleotide) se vor lega cu randamente foarte crescute la matriță, dar vor genera produși nespecifici de amplificare tocmai datorită acestui fapt.

ii. primerii trebuie să conțină un număr aproximativ egal din cele patru nucleotide, evitându-se pe cât posibil regiunile cu secvență repetitivă. Aceasta va conduce la eliminarea regiunilor cu structuri secundare de tip „ac de păr” (*hairpin*) sau *stem-loop* (Figura 55). Conținutul în GC trebuie să fie cuprins între 40 și 60%, iar repetițiile de guanină sau citozină trebuie evitate.

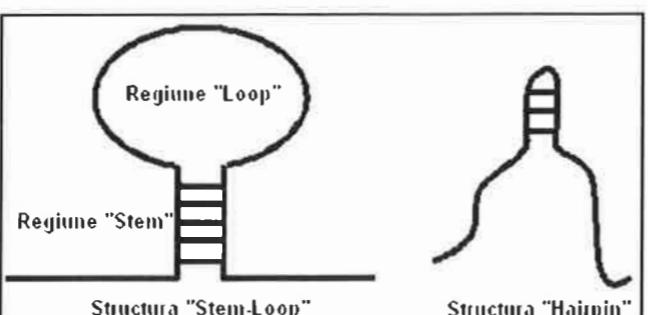


Figura 55. Tipuri de structuri secundare.

iii. perechile de primeri trebuie alese astfel încât să nu prezinte complementaritate la nivel intra- și interindividual, acest lucru permisând reducerea la minimum a posibilelor interacții dintre primeri (ex. dimeri de primeri).

iv. distanța dintre doi primeri la nivelul matriței trebuie să fie mai mică de 5-6 Kpb, dar s-a observat o eficiență foarte scăzută a reacției în cazul în care lungimea produsului de amplificare depășește 3 Kpb.

v. pentru utilizarea primerilor în bune condiții trebuie stabilită cu exactitate temperatura optimă de hibridizare. Aceasta se poate determina exclusiv experimental prin realizarea unei reacții PCR în gradient de temperatură.

La final, după desemnarea secvențelor perechilor de primeri, acestea trebuie verificate utilizând aplicația BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponibilă pe pagina de internet a NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Aceasta poate identifica automat toate potențialele similarități dintre secvențele stocate în baza de date și secvența desemnată a primerilor.

În practică, se pot folosi în anumite situații primeri degenerați. Aceștia sunt utili atunci când dorim amplificarea unei regiuni necunoscute dintr-o genă cu condiția de a cunoaște secvența genei respective la un organism foarte apropiat din punct de vedere filogenetic. Pentru desemnarea acestor primeri este ideal să deținem informații despre un număr cât mai mare de secvențe de interes de la organisme înrudite filogenetic (ex. specii aparținând unei anumite categorii taxonomici), să le traducem în aminoacizi, dacă este cazul, și apoi să le comparăm. Regiunile înalt conservate în ceea ce privește secvența de aminoacizi pot deveni ținte pentru desemnarea primerilor degenerați. Practic, acești primeri se desemnează în funcție de secvența de aminoacizi codificată (Figura 56).

Secvența proteica							
Met	Tyr	Cys	Asn	Thr	Arg	Fro	Gly
Codoni posibili							
ATG	TAA	TGT	AAA	ACT	AGA	GCT	GGT
TAT	TGC	AAA	ACC	AGT	GCA	GGC	
			ACA		GCA	GGA	
			ACG		GCT	GGG	
Primer rezultat							
ATG	TAA	TGT	AAA	ACT	AGA	GCT	GGT
T	C	A	C	C	G	C	C

Figura 56. Schemă de desemnare a primerilor degenerați.

Există și o reglementare internațională cu privire la folosirea unor prescurtări standard cu privire la nucleotide, prescurtări utilizate la desemnarea secvențelor primerilor degenerați (Tabel 2).

De asemenea, la realizarea unei reacții PCR trebuie să ținem cont de faptul că o concentrație crescută a primerilor poate conduce la formarea produșilor nespecifici de amplificare, mai ales atunci când concentrația matriței este scăzută.

**Tabel 2.** Prescurtări standard IUPAC pentru diferite combinații de nucleotide.

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

**IV.1.3 Parametri de timp și temperatură**

Aparatura necesară efectuării reacției PCR a suferit multe modificări de-a lungul timpului și a fost preabilă la automatizare abia în momentul introducerii polimerazelor termostabile. La ora actuală se folosesc aparate de PCR total automatizate.

În prima etapă trebuie realizată o denaturare a matriței ADN. Acest proces presupune ridicarea rapidă a temperaturii la 94-96°C pentru o perioadă de timp suficientă, care să permită separarea totală a dublei catene. Temperatura ridicată din timpul etapei de denaturare, repetată la fiecare ciclu de reacție, poate conduce la degradare parțială a matriței și implicit la unele erori de încorporare a nucleotidelor.

În cea de-a doua etapă are loc hibridizarea primerilor. În general, temperaturile de hibridizare variază între 49 și 62°C. O temperatură scăzută generează hibridizări nespecifice și ulterior obținerea unor produși nespecifici de amplificare, iar o temperatură crescută poate duce la absența procesului de anelare. Valoarea de temperatură depinde exclusiv de structura primerilor și de lungimea acestora. Temperatura optimă de hibridizare se stabilește practic printr-o reacție PCR în gradient de temperatură. În această reacție, ADN matriță este hibridizat concomitent la temperaturi diferite cu aceeași primeri, în scopul stabilirii temperaturii optime care să permită eliminarea amplificărilor parazite și realizarea cu un randament maxim a reacției. Totodată, în decursul optimizării pot fi variate și intervalele de timp în care sunt parcuse treptele de temperatură, cât și numărul de cicluri de amplificare.

Etapa a treia, de extensie, se realizează la 70-76°C, care este temperatura optimă de activitate pentru ADN polimerazele termostabile. Timpul necesar acestei etape variază în funcție de lungimea fragmentului care trebuie amplificat. În practică există și o etapă finală de amplificare în care are loc extensia completă a tuturor ampliconilor acumulați.

Numărul optim de cicluri care trebuie parcuse variază între 35 și 45. Un număr mai mare de cicluri este posibil, dar poate conduce la apariția unor erori de amplificare și la acumularea în cantități crescute a produșilor de reacție nespecifici.

**IV.1.4 Probleme în realizarea reacției PCR**

Principala limită a tehnicii PCR este legată de mărimea secvenței care urmează să fie amplificată. Practica a demonstrat că este foarte dificilă amplificarea unor secvențe mai mari de 3 Kpb. În general, într-o reacție PCR, pot fi amplificate în condiții bune secvențe cu o lungime de maximum 1,5-2,5 Kpb. O altă limită a tehnicii este reprezentată de numărul de copii ale secvenței de amplificat de la care pornim. Dacă în teorie putem porni amplificarea și de la o singură copie, în practică acest lucru este imposibil.

Gradul de eficiență și specificitatea reacției PCR sunt influențate de o serie de componente: profilul termic al ciclurilor de temperatură, concentrația ionilor de magneziu, structura și concentrația primerilor, concentrația de dNTP etc.

Una dintre mariile probleme ale tehnicii este contaminarea, aceasta putând conduce la obținerea amplificărilor fals pozitive. Principala sursă de contaminare a matriței este reprezentată de manipulările anterioare ale acesteia. De asemenea, impurificările pot să provină și de la ceilalți reactivi utilizați. Orice contaminare, cât de mică, a unuia dintre reactivii introdusi în reacție va conduce aproape sigur la obținerea unor rezultate eronate. O altă sursă de impurificare poate fi reprezentată de materialele folosite în realizarea tehnicii (vârfuri, tuburi, micropipete etc.). Pentru a putea controla problema contaminării este absolut necesară realizarea unui control negativ în care matrița ADN va fi înlocuită cu apă.

Există cazuri în care, în urma procedeelor de extracție ale matriței apar impurificări ale acesteia cu diferenții compuși chimici prezenti de la început la nivelul materialului biologic sau care au fost utilizați la izolare. Astfel, substanțe precum heparina, SDS, sarcozilatul de sodiu, citratul de sodiu, fenolul, cloroformul, xilenianolul și unele metale grele pot inhiba reacția PCR prin mecanisme diferite. Același

Tehnica poate fi aplicată cu succes în studiul transpozonilor, retrovirusurilor și tuturor secvențelor ADN susceptibile să se integreze la nivelul genoamelor, cu condiția de a avea informații parțiale asupra situsurilor de integrare.

#### IV.2.8 PCR pentru detecția metilărilor

Tehnica este utilizată pentru detectarea situsurilor metilate de la nivelul ADN. Metilarea secvențelor de ADN apare cu precădere la nivelul atomului de carbon din poziția 5 a citozinei. Această modificare este implicată în represia transcriptiei unumitor gene.

La început matrița este tratată cu bisulfat de sodiu care va converti citozinele nemetilite în uracil. Citozinele metilate nu vor fi afectate de acest tratament. Ulterior, se realizează două reacții PCR având drept matriță ADN modificat, folosind seturi de primeri identice. Una dintre perechile de primeri va amplifica ADN metilat deoarece recunoaște citozinele metilate. Cealaltă pereche recunoaște uracilul rezultat în urma tratamentului cu bisulfat de sodiu și amplifică ADN nemetilat. În acest fel, în urma analizei ampliconilor obținuți, se vor putea identifica zonele din ADN care conțin citozină metilată.

### IV.3 Tehnici derivate din reacția PCR

#### IV.3.1 PCR în timp real (Real-Time PCR)

Prin Real-Time PCR se realizează concomitent amplificarea și cuantificarea acumulării unei secvențe de ADN țintă. Metoda este folosită în principal pentru detectarea nivelului de expresie al unor gene cu ajutorul moleculelor fluorescente, dar și pentru a detecta prezența unor mutații la nivelul diferitelor regiuni din ADN.

Metodele tradiționale folosesc gelul de agaroză pentru detectarea și caracterizarea produșilor PCR. Această abordare ridică diverse probleme de rezoluție, sensibilitate sau precizie. Real-Time PCR este o tehnică mult mai eficientă datorită acurateței cantitative a amplificării și detecției acumulării ampliconului pe parcursul întregii reacții de amplificare. Astfel, proba este monitorizată în timp real și există avantajul că la ora actuală metoda este complet automatizată.

Principiul cuantificării. Real-Time PCR înglobează mecanismele de amplificare și detecție într-un singur proces folosind compuși fluorescenti care au capacitatea de a corela concentrația ampliconilor cu intensitatea semnalului luminos. Practic, tehnica are atât aplicații calitative (identificarea unor mutații), cât și cantitative (determinarea nivelurilor de expresie a genelor).

În mareea majoritate a cazurilor Real-Time PCR este cuplat cu tehnica RT-PCR, pentru realizarea cuantificării ARNm. În acest scop, tehnica poate fi realizată fie într-o singură etapă (întreaga reacție, de la sinteza ADNc până la amplificare, este realizată într-un singur tub), fie în două etape (revers-transcrierea și amplificarea se realizează ca procese diferite, în tuburi separate). Metoda realizată într-o singură etapă are avantajul că minimizează variațiile experimentale deoarece ambele reacții enzimatiche au loc într-un singur tub, dar prezintă dezavantajul degradării rapide a matriței ARN de la care se pornește. Metoda Real-Time PCR în două etape separă reacțiile de revers-transcriere și de amplificare, ceea ce permite optimizarea cantității de ADNc utilizată în reacție (prin realizarea unor diluții ale ADNc și analizarea lor) și posibilitatea reluatării procesului de amplificare pornind direct de la ADNc.

Dinamica reacției de amplificare. Dacă analizăm acumularea de ampliconi într-o reacție PCR observăm că există o diferență marcantă între teorie și practică în ceea ce privește profilul curbei de amplificare (Figura 60).

Analiza cinetică unei reacții PCR ne oferă imaginea unei curbe de amplificare având trei faze distincte:

- 1) Faza timpurie de acumulare, în care numărul de ampliconi este încă foarte scăzut.
- 2) Faza de creștere exponențială a numărului de produși de amplificare.
- 3) Faza de platou, marcată de o încetinire dramatică a producerii ampliconilor datorită unor factori fizici cum ar fi denaturarea ADN polimerazei, scăderea concentrației de dNTP, acumularea în exces a pirofosfatului sau inhibarea reacției de sinteză datorită acumulării în număr mare a catenelor nou sintetizate.

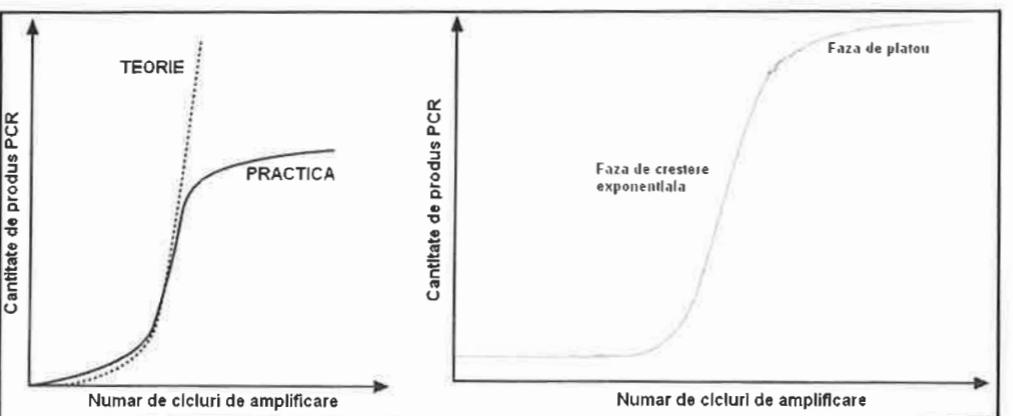


Figura 60. Dinamica unei reacții PCR și fazele de acumulare ale ampliconilor.

În faza timpurie de acumulare, detectia și implicit monitorizarea reacției este imposibilă datorită valorilor scăzute ale fluorescenței. Ciclul de reacție în care valoarea intensității fluorescenței depășește valoarea de fundal și devine detectabilă se numește Threshold Cycle (C<sub>t</sub>) și, practic, din acest moment este posibilă monitorizarea reacției PCR. În acest moment reacția intră în faza de creștere exponențială, iar numărul de copii amplificate este cuprins între  $10^{10}$  și  $10^{12}$ . Cu cât numărul de copii din secvența de interes este mai mare, la începutul reacției, cu atât mai puține cicluri de amplificare vor fi necesare pentru a genera numărul minim de ampliconi de la care este posibilă detectia. O cantificare corectă se obține atât timp cât monitorizarea se face în faza de creștere exponențială. Odată cu intrarea în faza de platou, cantificarea nu mai este relevantă.

**Curba de topire (Melting Curve).** Este utilizată pentru evaluarea acurateții cu care s-a desfășurat reacția Real-Time PCR. Analiza acesteia este extrem de utilă în caracterizarea produșilor PCR rezultați din reacția de amplificare. Curbele de topire se realizează la finalizarea reacției de amplificare prin creșterea treptată a temperaturii amestecului de reacție, din grad în grad, de la aproximativ 45°C până la 95°C, temperatură la care toate moleculele de ADN prezente în amestec se denaturează. Pe parcursul acestui proces, pe măsură ce dublele catene se denaturează, coloranții intercalanți prezenți la nivelul acestora vor fi eliberați în soluție.

Este cunoscut faptul că fiecare dublă catenă de ADN prezintă o temperatură de topire ( $T_m$  - Melting Temperature) unică, care depinde de secvența de nucleotide și de lungimea acesteia. Drept urmare, prin analiza curbei de topire pot fi identificați în primul rând produși de amplificare nespecifici sau eventualele contaminări cu ADN

genomic. Astfel, dacă în reacția de amplificare s-au format și alți produși nespecifici, pe curba de topire se va observa un număr corespunzător de semnale și nu doar unul singur cum ar fi normal (Figura 61).

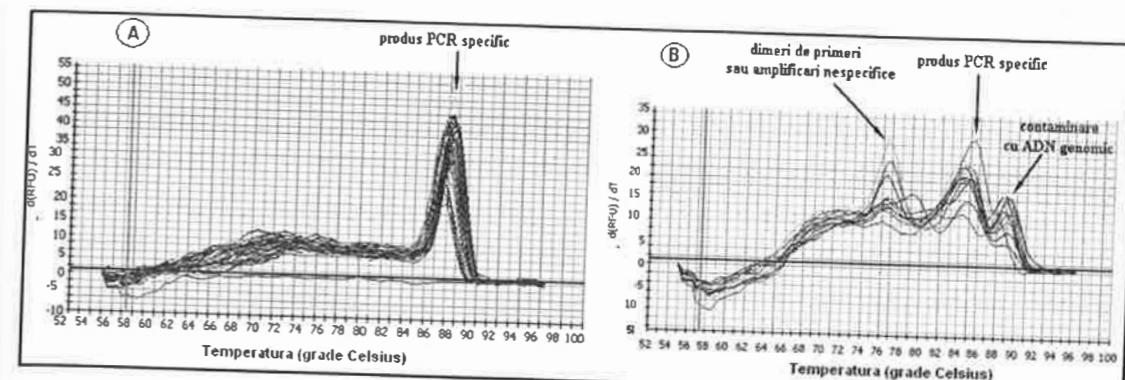


Figura 61. Curbe de topire într-o reacție Real-Time PCR. A. Curbă caracteristică unui singur produs de amplificare. B. Curbă specifică prezenței amplificărilor nespecifice și contaminării cu ADN genomic a amestecului de reacție (după Georgescu și Costache, Lucrări practice – biochimia acizilor nucleici și biologie moleculară, 2010).

O altă aplicație a curbelor de topire este legată de detectia mutațiilor de la nivelul fragmentului amplificat. Pentru aceasta este necesar să lucrăm cu sonde marcate fluorescent. Acestea sunt desemnate astfel încât să se lege în zona în care probabilitatea de a exista mutația de interes este cea mai mare. Practic, în prezența mutației punctiforme, omologia dintre sondă și țintă nu va fi perfectă și ca atare, duplexul se va destabiliza la o temperatură mai scăzută decât în cazul unei omologii complete, omologie prezentă numai atunci când secvența țintă nu este modificată. Deci, un posibil SNP la nivelul fragmentului amplificat va conduce la obținerea mai multor semnale la nivelul curbei de topire.

O metodă nou dezvoltată, numită topire de înaltă rezoluție (High Resolution Melting), este utilizată pentru identificarea diferențelor de secvență nucleotidică care apar între indivizi homo- și heterozigoți. Pentru aceasta se folosesc în loc de sonde marcate, coloranți fluorescenti intercalanți înalt saturați. În prezența acestora, duplexurile caracteristice heterozigoților se vor separa la temperaturi mai scăzute decât cele specifice homozigoților. Aceste diferențe se vor putea vizualiza la nivelul curbelor de topire realizate la intervale de temperatură de sub 1 grad Celsius. Chiar dacă diferențele de temperatură dintre punctele de topire ale dublelor catene sunt extrem de mici, rezoluția aparatelor și sistemele extrem de performante de detectie permit decelarea lor.

**Strategii de cuantificare.** Există două modalități de cuantificare – absolută și relativă. Cuantificarea absolută folosește standarde diluate seriat pentru a genera o curbă standard. În cazul cuantificării relative modificările expresiei genice sunt măsurate fie pe baza unui standard extern, fie pe baza unei probe de referință, numită și calibrator.

Eficiența amplificării reacției este foarte importantă atunci când se urmărește realizarea cuantificării relative. Eficiența amplificării variază astfel: în faza timpurie este relativ stabilă, în fazele următoare descrește gradual către 0. Această scădere este datorată inhibării în timp a reacției PCR. Calcularea eficienței amplificării folosind o curbă standard nu înregistrează aceste modificări și poate supraestima rezultatul. În vederea cuantificării se folosesc, ca și controale pentru analiza expresiei genice, genele de referință. Acestea sunt reprezentate de obicei de gene care se exprimă constitutiv în toate tipurile de celule (gene *house keeping*) și a căror expresie nu se modifică marcat în diversele tipuri celulare sau în diferite condiții fiziologice. La folosirea unor astfel de gene pentru normalizare apare necesitatea validării stabilității expresiei lor.

**Modalități de detecție a produșilor amplificați.** Există mai multe alternative tehnice disponibile care permit detectarea produșilor amplificați cu mare sensibilitate. Acestea pot fi directe, atunci când utilizează coloranți fluorescenti intercalanți, sau indirecte, când utilizează diferite tipuri de sonde marcate. Practic, metodele de detecție utilizate trebuie să certifice că intensitatea fluorescentei detectate este direct proporțională cu cantitatea de produs PCR care se acumulează în amestecul de reacție. Astfel, procesele de amplificare și detecție sunt combinate și este posibilă monitorizarea reacției PCR.

- **Coloranți fluorescenti intercalanți** – se folosesc compuși de tipul SYBR-Green care posedă o proprietate specială. Atunci când sunt liberi în soluție prezintă un nivel scăzut de fluorescentă, dar în momentul în care sunt încorporați la nivelul unei duble catene ADN, intensitatea fluorescentei lor crește de până la 200 de ori. Din această cauză, cu cât mai mulți amplificoni sunt formați în urma reacției PCR, cu atât mai mulți coloranți vor fi intercalați la nivelul dublelor catene formate și cu atât intensitatea fluorescentei va crește (Figura 62).

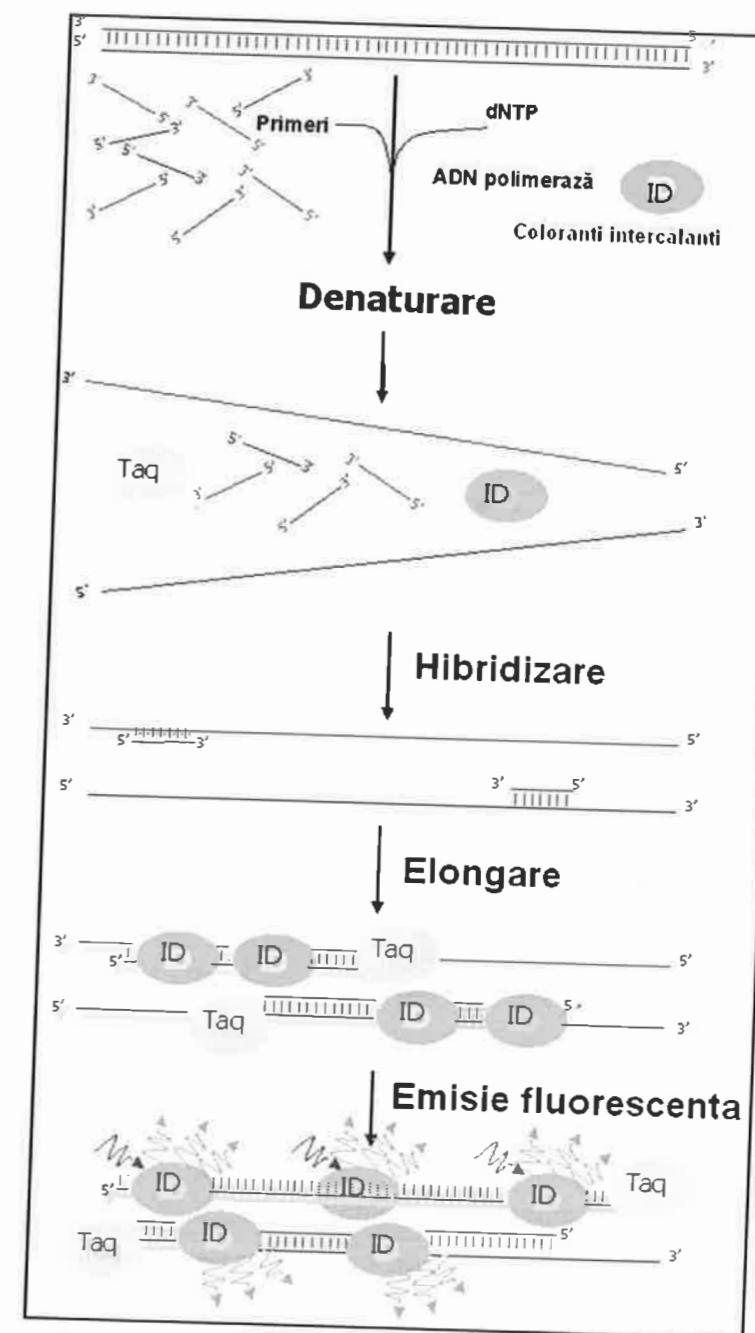


Figura 62. Detecția produșilor de amplificare utilizând fluorocromi intercalanți.

- **Sonde "Molecular Beacon"** – în acest caz se lucrează cu sonde ADN care formează structuri de tip tijă-buclă (*stem-loop*), regiunea buclă (*loop*) fiind complementară cu molecula de acid nucleic ţintă. Sondele au atașate la capete

fluorocromi. În stare liberă fluorescența nu este decelabilă ea devenind detectabilă atunci când sonda se leagă la ADN (Figura 63).

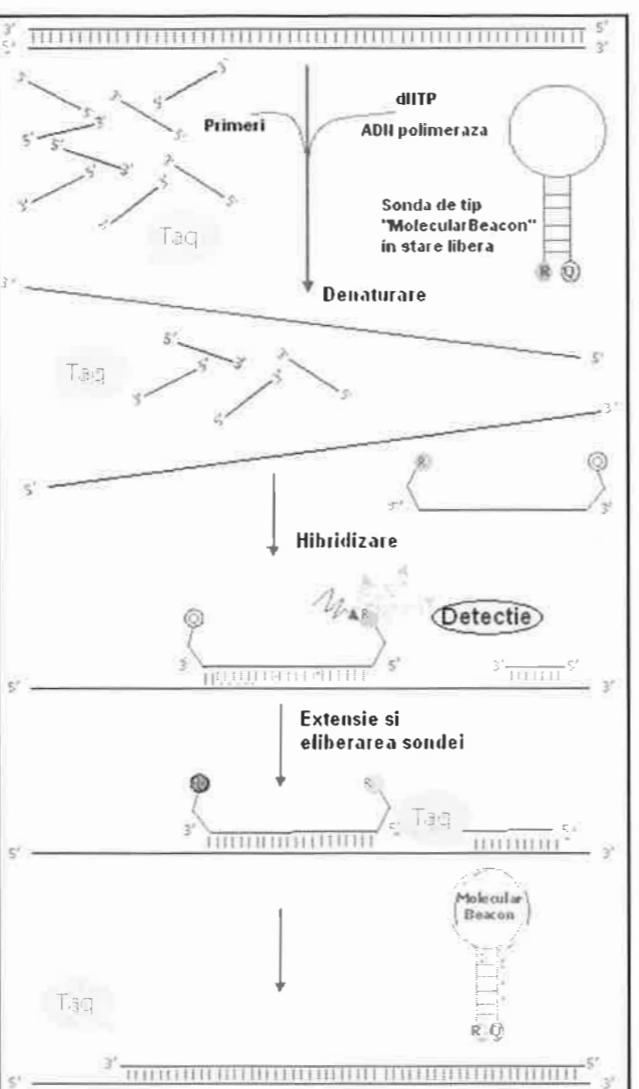


Figura 63. Utilizarea sondelor de tip *Molecular Beacon* pentru monitorizarea amplificării PCR.

O astfel de sondă are aproximativ 25 pb, dintre care cele situate la mijloc sunt complementare cu mătrița ADN, iar cele de la margini prezintă complementaritate una față de celălaltă. În structura sondei întâlnim patru regiuni distincte: o regiune *loop* complementară cu secvența ADN țintă, o regiune *stem* care este reprezentată de capetele complementare sondei, un fluorocrom dispus la capătul 5' terminal care

Tehnici de biologie moleculară - principii și aplicații practice

emite doar atunci când sonda este hibridizată cu ținta și un captator de fluorescență atașat covalent la capătul 3' al sondei care are rolul ca atunci când sonda este liberă să capteze fluorescența emisă de fluorocromul din 5'.

- *Sonde TaqMan™* – în această variantă, sonda este conjugată cu un fluorocrom și cu un captator de fluorescență capabil să absoarbă energia fluorocromului. Atât timp cât sonda este intactă ea nu va emite fluorescență. Odată începută amplificarea, sonda este hidrolizată, fluorocromul este separat de captator și în consecință fluorescența va crește, putând fi detectată. Pe măsură ce reacția avansează, semnalul fluorescent se va intensifica deoarece vor exista în mediul de reacție din ce în ce mai mulți fluorocromi liberi care emit semnal luminos (Figura 64). Metoda se bazează pe activitatea 5'-3' exonucleazică a ADN polimerazei.

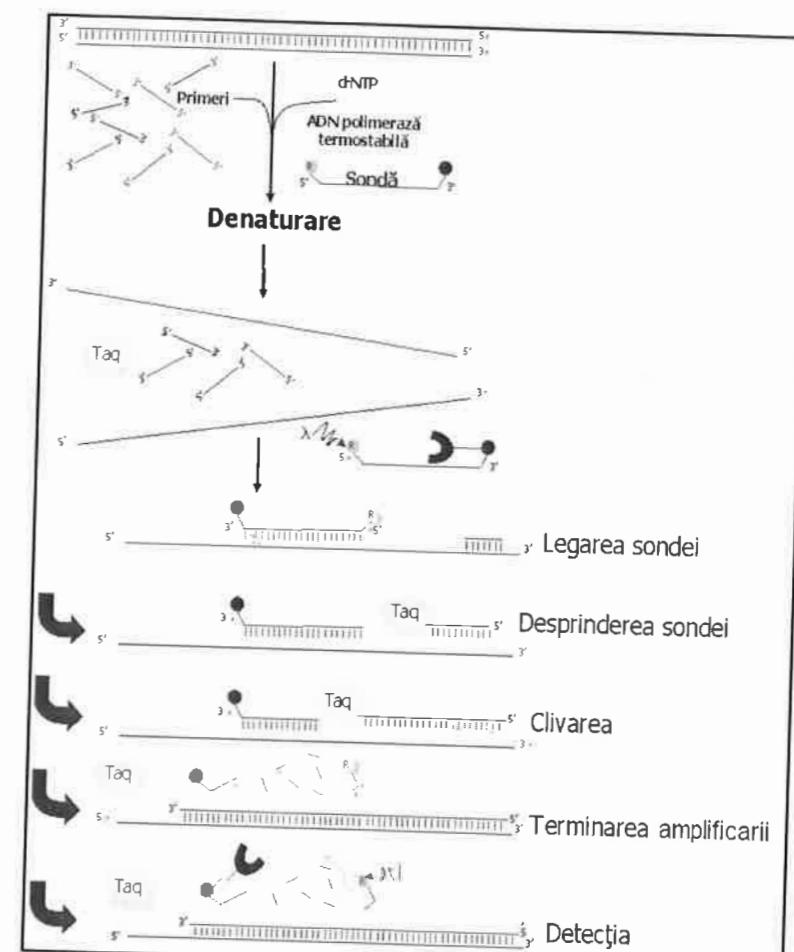


Figura 64. Detecția produșilor de amplificare utilizând sonde TaqMan™.

- *Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)* – în acest caz se utilizează două sonde, prima fiind marcată la capătul 5' cu un fluorocrom donor, iar a doua cu un fluorocrom acceptor. Când cei doi fluorocromi sunt în vecinătate (la o distanță de 1-5 nucleotide), lumina emisă de fluorocromul donor va excita fluorocromul acceptor, care va emite puternic (Figura 65). Emisia este detectată în faza de atașare și în prima parte a etapei de elongare. După fiecare ciclu PCR se atașează din ce în ce mai multe sonde, rezultând un semnal fluorescent din ce în ce mai intens.

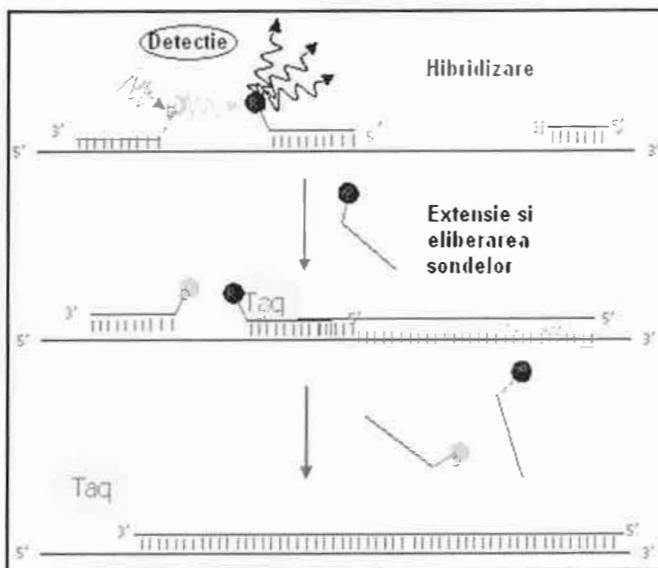


Figura 65. Detectia ampliconilor cu sonde FRET.

- *Primeri de tip Scorpion®* – constau în sonde cu structură tijă-buclă (*stem-loop*) atașate la nivelul primerilor folosiți la amplificare. Regiunea cu structură *stem-loop* este separată de primer printr-o secvență nucleotidică modificată chimic (PCR blocker) care blochează ADN polimeraza să copieze această zonă din compoziția sondei.

La nivelul acestei regiuni se regăsește un fluorocrom și un captator de fluorescență. La începutul reacției de amplificare, fluorescența este blocată datorită structurii specifice *stem-loop* a sondei. În etapa de hibridizare a primerilor și amplificare propriu-zisă, sonda formează o structură specifică prin hibridizarea cu o regiune distală a primerului. Astfel, ea își pierde conformația nativă, iar emisia fluorocromului nu mai va putea fi blocată de captator. În acest moment emisia sondei va deveni vizibilă, putând fi captată și cuantificată (Figura 66).

**Estimarea nivelului de expresie al unei gene prin utilizarea coloranților intercalanți:** După realizarea practică a reacției Real-Time PCR se obține curba exponentială de amplificare. Din analiza acesteia se poate calcula valoarea la care apare *Threshold Cycle* ( $C_t$ ), ciclul la care intensitatea fluorescenței probelor intersectează fluorescența prag. Totodată, cu ajutorul curbei de topire se determină și potențiala contaminare a probelor, prezența dimerilor de primeri și/sau a amplificărilor nespecifice.

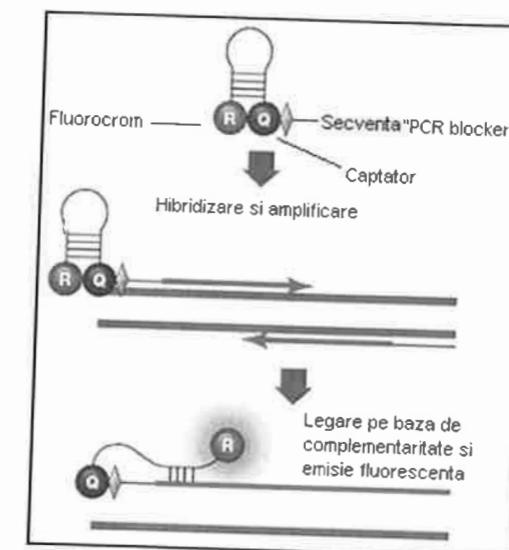


Figura 66. Detectia ampliconilor cu primeri de tip Scorpion®.

După obținerea valorilor  $C_t$  se realizează analiza rezultatelor. Astfel, se scrie ecuația amplificării pentru fiecare probă, atât pentru genă țintă cât și pentru genă de referință (Georgescu și Costache, 2010). Dacă A reprezintă proba analizată, iar B proba control, pentru o singură genă de referință vom avea ecuația:

$$N_{Ct} = N_0(1+E)^{Ct} \text{ unde,}$$

$N_{Ct}$  = numărul de molecule de ADNc la ciclul  $C_t$ ;

$N_0$  = numărul inițial de molecule de ADNc;

$E$  = eficiența reacției PCR.

Prin urmare, pentru probele noastre ecuațiile sunt următoarele:

$$(N_{Ct})_{Aref} = N_{0Aref}(1+E)^{CtAref} \quad (N_{Ct})_{Bref} = N_{0Bref}(1+E)^{CtBref}$$

$$(N_{Ct})_{Atar} = N_{oAtar} (1+E)^{CtAtar} \quad (N_{Ct})_{Btar} = N_{oBtar} (1+E)^{CtBtar}$$

Deoarece gena de referință este diferită de gena ţintă, iar produsul de amplificare are o mărime diferită și va îngloba un număr diferit de molecule de colorant intercalant, cele două valori  $(N_{Ct})_{Atar}$  și  $(N_{Ct})_{Aref}$  nu sunt egale și se va introduce un factor de corecție notat cu  $k$ . Astfel, ecuația devine:

$$(N_{Ct})_{Atar} = k^* (N_{Ct})_{Aref}$$

Normalizarea se realizează prin calcularea raportului dintre  $N_{oTar}$  și  $N_{oRef}$  pentru fiecare probă:

$$N_{oAtar}/N_{oAref} = k^*[(1+E)^{CtAref}/(1+E)^{CtAtar}] - probă A - analizată$$

$$N_{oBtar}/N_{oBref} = k^*[(1+E)^{CtBref}/(1+E)^{CtBtar}] - probă B - control$$

În cazul unei eficiențe de 100% se obține formula de mai jos:

$$N_{oAtar}/N_{oAref} = k^*2^{CtAref-CtAtar} = k^*2^{\Delta Ct} - probă A analizată$$

$$N_{oBtar}/N_{oBref} = k^*2^{CtBref-CtBtar} = k^*2^{\Delta Ct} - probă B control$$

Pentru determinarea diferenței de expresie a genei ţintă între cele două probe se realizează raportul acestora. Se obține ecuația:

$$\text{probaA/probaB} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

În cazul unei valori de 1 se consideră că gena are același nivel de expresie în cele două condiții (control și analizat). Pentru o valoare peste 1 gena este supraexprimată în probă A analizată comparativ cu probă B control, iar pentru o valoare sub 1 gena este subexprimată în probă A comparativ cu probă B control (Georgescu și Costache, 2010).

#### *IV.3.2 Tehnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

Atunci când dorim să realizăm analiza polimorfismului de la nivelul unor genoame diferite și nu există informații despre unul sau mai mulți markeri ADN dedicați, se poate folosi tehnica RAPD (Polimorfismul amplificării aleatoare a ADN).

poate determina poziția pirimidinelor, și respectiv întreaga secvență. Într-o altă variantă, se realiza determinarea inițială a poziției bazelor pirimidinice și ulterior a celor purinice.

Metoda de secvențializare chimică cuprinde mai multe etape. Astfel, fragmentul de ADN monocatenar care urmează să fie secvențializat este marcat la una dintre extremități printr-un semnal care va permite detectarea sa (marcare cu fosfor radioactiv  $^{32}\text{P}$ ). Urmează scindarea acidului nucleic care se realizează în mai multe etape și apoi separarea electroforetică a fragmentelor rezultate.

Scindarea uneia dintre cele patru baze azotate se face prin diferite metode specifice pentru purine sau pirimidine. Specificitatea tăierii este dată de reactivii utilizati și de condițiile de reacție. De exemplu, pentru degradarea bazelor purinice se folosește reacția cu dimetil-sulfat în condiții alcaline. Dimetil-sulfatul metilează adenina în poziție 3, respectiv guanina în poziție 7. Această modificare duce la instabilitatea legăturii N-glicozidice astfel încât, în prezența piperidinei, are loc desprinderea heterociclului bazei azotate. În cazul bazelor pirimidinice, eliminarea se face printr-o reacție cu hidrazina. Aceasta atacă atomii de carbon din pozițiile 4 și 6 deschizând heterociclul pirimidinic. Ulterior, baza azotată este eliminată, deoxiribosa scindată, iar legătura fosfodiesterică corespunzătoare devine sensibilă la hidroliză.

Hidroliza legăturilor fosfodiesterice are loc în regiunile în care au fost eliminate bazele azotate. În final se realizează electroforeza în gel de poliacrilamidă urmată de detectarea fragmentelor și reconstituirea secvenței.

## V.2 Metoda Sanger - prima generație de secvențializare

Esența tehnicii de secvențializare propusă de Frederick Sanger și colaboratorii a constituit-o generarea de fragmente a căror lungime era dependentă de ultimul nucleotid din structura secvenței. Colecții de astfel de fragmente au fost generate prin întreruperea controlată a sintezei enzimatice. Această tehnică s-a impus în fața celorlalte tehnici de secvențializare datorită simplității sale. Această împreună cu metoda Maxam-Gilbert sunt denumite la ora actuală drept secvențializarea de primă generație. Cu ajutorul metodei Sanger s-a reusit în 2003 secvențializarea în premieră a genomului uman (*Human Genomic Project*).

Sanger a utilizat inițial ADN polimeraza I bacteriană care sintetizează o copie complementară a catenei matriță ADN utilizând deoxinucleotid-trifosfați. Același procedeu este aplicat pentru patru amestecuri de reacție, corespunzătoare fiecărui tip

de dNTP, în același timp. În toate, ADN polimeraza este folosită pentru a sintetiza catena complementară unei secvențe matriță pornind de la un primer complementar cu unul dintre capetele matriței.

Etapele parcurse sunt următoarele:

a) Fragmentul care urmează să fie secvențializat este denaturat pentru obținerea de monocatene și adus în contact cu un primer specific. Hibridizarea primerului cu matrița monocatenară permite inițierea acțiunii ADN polimerazei în prezența substratelor nucleotidice.

b) În fiecare dintre cele patru loturi se adăugă o mică cantitate dintr-un 2'-3'dideoxiribonucleotid-trifosfat (ddNTP) diferit, analog cu unul dintre nucleotide (Figura 70). Încorporarea acestui analog în locul unui nucleotid normal blochează alungirea catenei datorită lipsei grupării hidroxil din poziția 3' terminală. Din acest considerent ddNTP au fost denumite molecule terminatoare de catenă. Concentrația lor este optimizată pentru a opri sinteza numai ocazional.

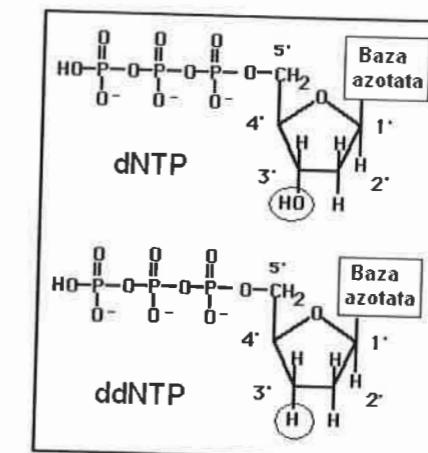


Figura 70. Structura generală a unui dideoxinucleotid.

c) Prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau electroforeză capilară se realizează separarea fragmentelor din cele patru loturi. Mărimea diferită a fragmentelor este datorată opririi copierii catenei matriță la un anumit nivel, corespunzător fiecărui dintre cele patru tipuri de ddNTP.

Etapa finală de determinare a secvenței era realizată de Sanger prin autoradiografia gelului, deoarece unul dintre ddNTP introduse în reacție era marcat radioactiv cu  $^{32}\text{P}$  sau  $^{35}\text{S}$ . Această metodă ingenioasă a permis, în 1977, stabilirea primei secvențe complete de 5386 de baze a bacteriofagului  $\Phi\text{X}174$ . Total

automatizată ulterior, tehnica a permis descifrarea completă a secvențelor genoamelor multor organisme procarioote și eucariote și a fost folosită cu succes în amplul proiect de secvențializare a genomului uman.

Secvențializarea clasică a acizilor nucleici inventată de Sanger are la ora actuală o serie de variante care au făcut-o să se impună ca o alternativă viabilă de determinare a secvenței acizilor nucleici. Toate aceste variante se bazează pe principiul inițial de sinteză de fragmente complementare cu matrița de analizat. Diferențele constau în evoluția spectaculoasă a modalităților de separare și identificare a acestor fragmente.

Detectarea fluorescentă reprezintă o alternativă viabilă pentru tehnica autoradiografică. La ora actuală se folosesc primeri sau nucleotid-trifosfați marcați fluorescent a căror separare se realizează prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau prin electroforeză capilară. Marcarea fluorescentă oferă posibilitatea combinării amestecurilor de reacție urmată de separarea electroforetică a ansamblului. Inițial, sistemele semiautomate de secvențializare se bazau pe separarea în gel și apoi pe citirea automată a fluorescenței. Sistemele actuale de analiză automată utilizează electroforeza capilară și detecția prin LASER a marcajelor fluorescente.

Pentru secvențializarea folosind detecția fluorescentă au fost utilizate două variante ale metodei Sanger: *Dye-primer* și *Dye-terminator*. Dintre acestea, varianta *dye-terminator* este folosită cel mai uzual, deoarece se pretează mai bine pentru sistemele automate de analiză.

**Varianta *Dye-primer*:** în acest caz primerul sens folosit pentru reacția de secvențializare este marcat cu un fluorocrom. Reacția este ulterior realizată în patru tuburi separate, fiecare dintre acestea conținând primerul marcat cu o culoare diferită, în prezența câte unui dideoxinucleotid. Urmează o amplificare PCR, iar produșii celor patru reacții sunt denaturați și analizați pe gel de poliacrilamidă (Figura 71).

Fluorescența marcatorilor este detectată cu ajutorul unui cititor laser automat, iar datele obținute sunt prelucrate pe computer. În final se obține cromatograma corespunzătoare secvenței analizate.

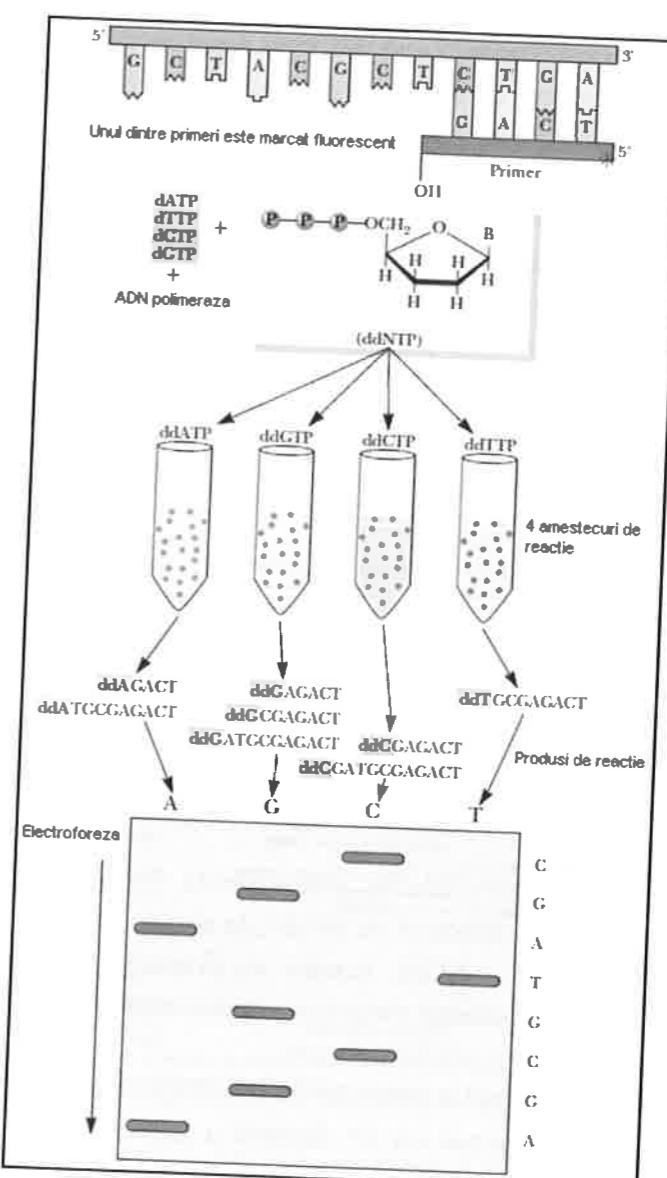


Figura 71. Principiul variantei *Dye-primer* (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

**Varianta „Dye-terminator”:** în acest caz ADN polimeraza sintetizează catena complementară în prezență de deoxinucleotide și dideoxinucleotide (ddNTP), plecând de la extremitatea 3'-OH a primerului oligonucleotidic desemnat pe bază de complementaritate cu fragmentul pe care dorim să-l secvențializăm. Fiecare dideoxinucleotid este marcat cu un colorant fluorescent diferit. La fiecare încorporare

a unui ddNTP elongarea catenei este stopată, ceea ce va genera o colecție de fragmente de mărimi diferite, dar care se termină cu același ddNTP (Figura 72).

Dacă se păstrează o proporție corectă între prezența celei patru tipuri de dNTP și ddNTP, se va obține o colecție de fragmente nou sintetizate de lungimi diferite, terminate printr-un ddNTP diferit, corespunzător nucleotidului complementar de pe catena matriță. Fluorescența acestora va fi detectată de un cititor automat, iar semnalul va fi prelucrat obținându-se în final electroforegrama corespunzătoare secvenței analizate.

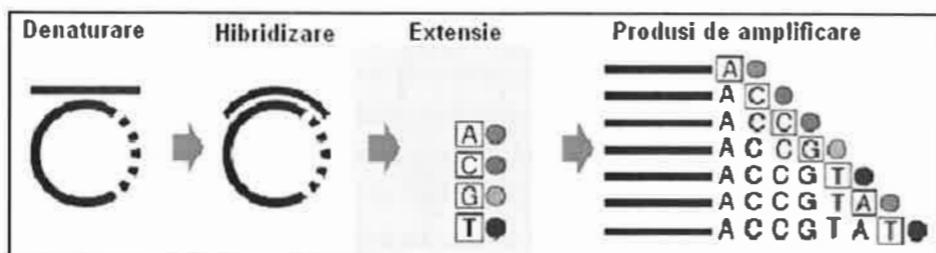


Figura 72. Principiul variantei Dye-terminator.

### V.3 Secvențializarea de nouă generație

La ora actuală, secvențializarea prin metoda Sanger, prima generație de secvențializare, este treptat înlocuită de tehnici de secvențializare de nouă generație (*Next Generation Sequencing - NGS*). Acestea au avantajul de a realiza mai multe reacții de secvențializare în același timp, generând o cantitate imensă de informație, și necesită analiza integrată a datelor obținute.

Primele tehnologii de nouă generație au fost disponibile în anul 2007 (*Illumina Genome Analyzer*), iar la numai un an distanță a fost finalizată cu succes prima secvențializare a unui genom uman complet. La ora actuală, tehnologia NGS evoluează foarte rapid, crescând progresiv capacitatea de analiză și prelucrare a datelor și reducând semnificativ și continuu costurile.

Tehnicile de NGS utilizează în general secvențializarea prin sinteză pentru a genera și a analiza multiple fragmente de ADN în același timp. Această abordare conduce la obținerea unei cantități uriașe de date care trebuie apoi prelucrate. Secvențializarea prin sinteză prezintă două abordări: una de „singură moleculă”, alta de „ansamblu molecular” (mai multe ţinte ADN amplificate și fixate apoi pe un suport solid). În cazul ambelor abordări, secvențializarea și detecția noilor baze