



BIOLOGIE GENERALĂ

- moleculară și celulară -

CURS XII

Amplificarea și secvențializarea ADN

Amplificarea enzimatică *in-vitro* a ADN-ului

Clonarea unei secvețe de ADN de interes prin ligarea sa într-un vector cu obținerea unei molecule ADN recombinante și replicarea acestei molecule într-o gazdă **reprezintă o modalitate de copiere a secvenței (moleculei) de ADN de interes**. Această abordare utilizează sistemul de replicare ADN existent în celula gazdă. O modalitate mai directă de copiere a ADN-ului ce are la bază aceleași principii ca și replicarea este **amplificarea *in-vitro* a ADN-ului**.

Amplificarea *in-vitro* a ADN-ului – *polymerase chain reaction* – PCR

- descrisă pentru prima dată în 1983 de Kary Banks Mullis, acesta primind premiul Nobel pentru descoperirea sa
- o tehnică de copiere a ADN-ului printr-o reacție ciclică *in-vitro* ce se bazează pe reacția de replicare a ADN-ului catalizată de o **polimerază ADN-dependentă termorezistentă**

- elementele esențiale realizării unei reacții PCR sunt:

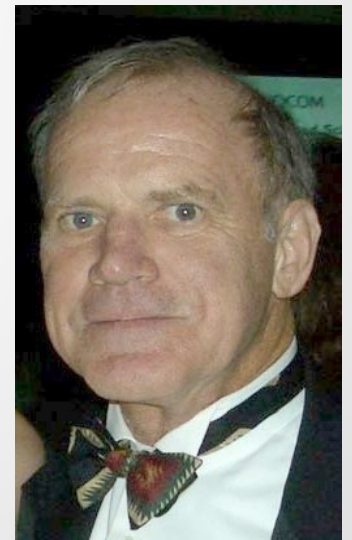
- molecula ADN de copiat** – o moleculă de ADN (circulară sau liniară) bicatenară numită **moleculă matriță (template)**
- deoxinucleotidele** ce vor fi încorporate în molecula nou sintetizată (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- oligonucleotide amorsă** (primer) complementare cu molecula matriță și care oferă un capăt 3' liber
- polimeraza ADN**



"highly original and significant, virtually dividing biology into the two epochs of before PCR and after PCR"

Wade, Nicholas (September 15, 1998), "Scientist at Work - Kary Mullis; After the 'Eureka', a Nobelist Drops Out", The New York Times.

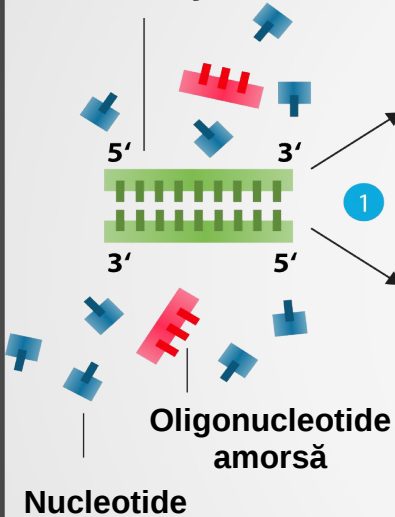
"What if I had not taken LSD ever; would I have still invented PCR?" He replied, "I don't know. I doubt it. I seriously doubt it."



Kary Banks Mullis

Etapele PCR

moleculă ADN
matriță



- 1 Denaturare la 94-96°C
- 2 Legarea nucleotidelor amorsă
- 3 Sinteza sau elongarea la 72°C

Polimeraza Taq – ADN polimeraza ADN dependentă
- izolată din *Thermus aquaticus* – microorganism ce trăiește la temperaturi de 70°C
- enzimă termorezistentă



Termociclor

Etapele PCR

Etapa 1. Denaturarea – moleculele de ADN matrită și un exces de oligonucleotide amorsă sunt încălzite la 95°C. La această temperatură **moleculele ADN dublu-catenare devin mono-catenare** – denaturarea ADN-ului

Etapa 2. Legarea (hibridizarea) nucleotidelor amorsă – soluția e răcită până la aprox. 60°C ceea ce permite ca moleculele ADN mono-catenare să **se reasocieze pe baza de complementaritate** cu formare unui molecule dublu-catenare. Excesul de oligonucleotide amorsă face ca fiecare catenă a moleculei matrită să se asocieze cu o oligonucleotidă amorsă (pe bază de complementaritate la nivel de secvență).

Etapa 3. Sinteza sau elongarea - se încălzește soluția la 72°C, temperatura la care polimeraza *Taq* devine activă. Pornind de la capătul 3' liber al oligonucleotidei primer, aceasta sintetizează noi catene de ADN prin același proces de polimerizare utilizat și în replicare. Oligonucleotidele primer sunt astfel elongate se sintetizează 2 noi catene de ADN.

Cele trei etape alcătuiesc 1 ciclu ce se repetă de până la 30 ori.

Etapa 1

100 molec primer
1 molec. ADN
matrită dublu-
catenară → 2
catene matrită)

Etapa 2

98 molec primer
2 complexe primer
– catenă ADN
matrită

Etapa 3

98 molec primer
2 molecule de ADN
dublucatenare,
fiecare alcătuită din
o catenă veche și
una nou sintetizată

Ciclul 1

98 molec primer
2 molec. ADN
matrită dublu-
catenară → 4
catene matrită)

94 molec primer
4 complexe primer
– catenă ADN
matrită

94 molec primer
4 molecule de ADN
dublucatenare,
fiecare alcătuită din
o catenă veche și
una nou sintetizată

Ciclul 2

94 molec primer
4 molec. ADN
matrită dublu-
catenară → 8
catene matrită)

86 molec primer
8 complexe primer
– catenă ADN
matrită

86 molec primer
8 molecule de ADN
dublucatenare,
fiecare alcătuită din
o catenă veche și
una nou sintetizată

Ciclul 3

După 30 cicluri 1 molec ADN este copiată în 536870912 exemplare

Secvențializarea ADN-ului

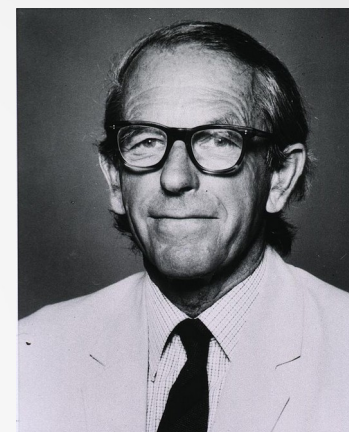
Secvențializarea ADN-ului - procesul de identificare a ordinii precise a nucleotidelor (ATCG) într-o moleculă de ADN.

În prezent există numeroase metode de secvențializare a ADN-ului clasificate în:

- metode derivate de la **metoda chimică** a lui **Maxam și Gilbert**
- metode derivate de la **metoda enzimatică** a lui **Sanger**
- **metode de "nouă generație"** – **pirosecvențiere**, **ion-torrent**, etc.

Metoda enzimatică Sanger

- una din primele metode de secvențializare a fost descrisă în 1977 de Frederick Sanger care a primit cel de-al doilea premiu Nobel pentru descoperirea sa
- se bazează tot pe reacția de replicare a ADN-ului catalizată de o **polimerază ADN-dependentă**



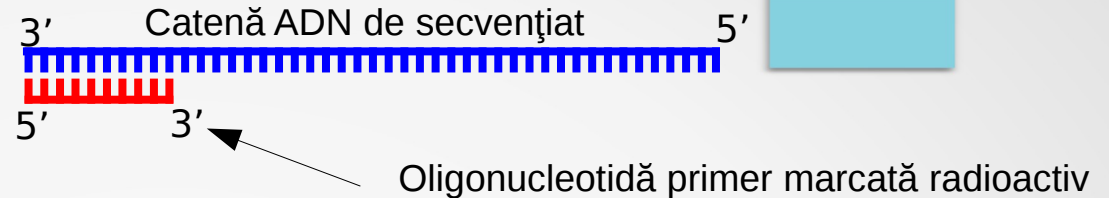
Frederick Sanger - 13 August 1918 – 19 November 2013

Elementele esențiale realizării unei reacții de secvențiere prin metoda Sanger

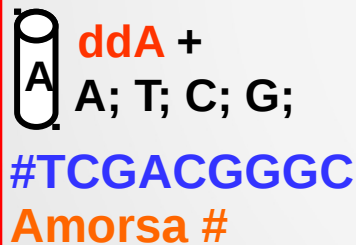
- fragment ADN de secvențiat** – o moleculă de ADN monocatenară
- polimeraza ADN**
- cele **4 deoxinucleotide** obișnuite (dNTP: A, T, C, G)
- o **oligonucleotide amorsă** (primer) complementare cu molecula de secvențiat marcată radioactiv și care oferă un capăt 3' liber
- 4 di-deoxinucleotide** (ddNTPs: ddA, ddC, ddG, ddT) – nucleotide ce nu au gruparea fosfat în pozițiile **2'** (**deoxi**) și **3'** (**di**).

Etapele reacției de secvențializare ADN prin metoda Sanger

1) Legarea oligonucleotidului primer

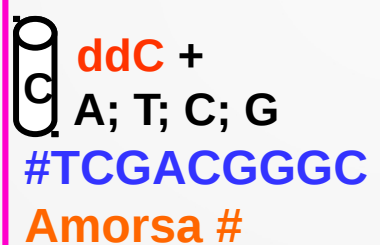


2) **Elongarea** primerului prin acțiunea ADN polimerazei în prezența dNTP și ddNTP cu sinteza unei catene noi. Reacția se realizează în **4 eprubete diferite**, fiecare conținând un singur tip de ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP sau ddTTP). **Încorporarea unui ddNTP în noua catenă face ca sinteza acestuia să se oprească** (ddNTP sunt "terminatori" de catenă). Încorporarea unui ddNTP de către ADN-polimeraza este un proces statistic ceea ce face ca prin elongare să se genereze în fiecare eprubetă câte o colecție de catene ADN nou sintetizate de dimensiuni diferite.



#ddA

#AGCTGCCCCG



#AGddC

#AGCTGddC

#AGCTGCddC

#AGCTGCCddC

#AGCTGCCCCG

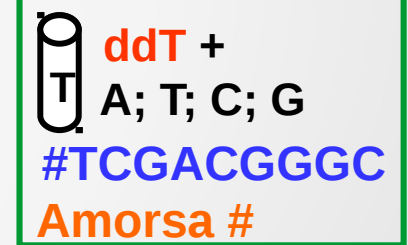


#AddG

#AGCTddG

#AGCTGCCCCddG

#AGCTGCCCCG

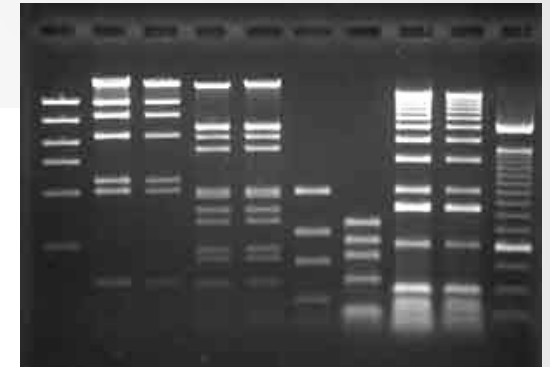
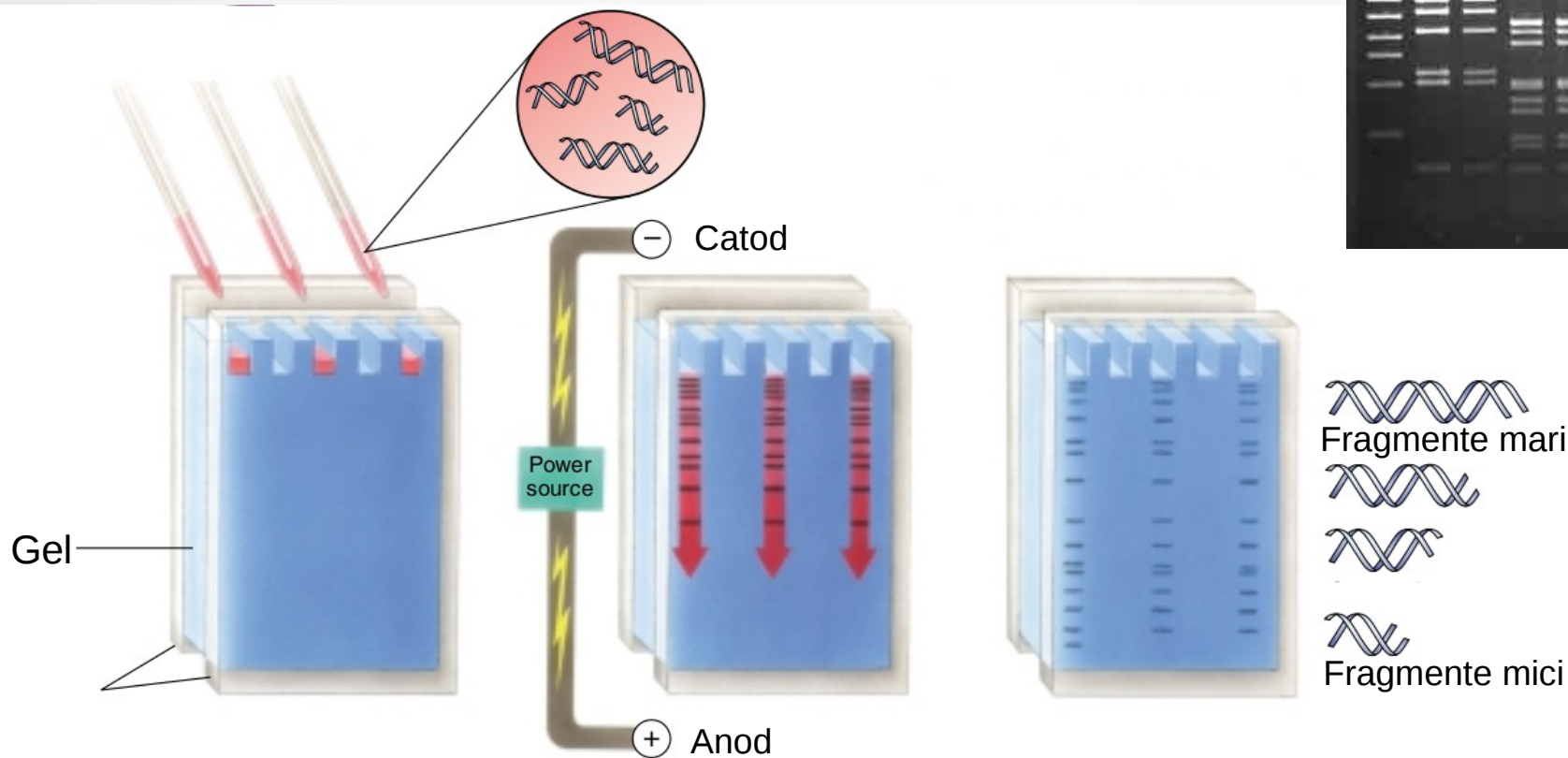


#AGCddT

#AGCTGCCCCG

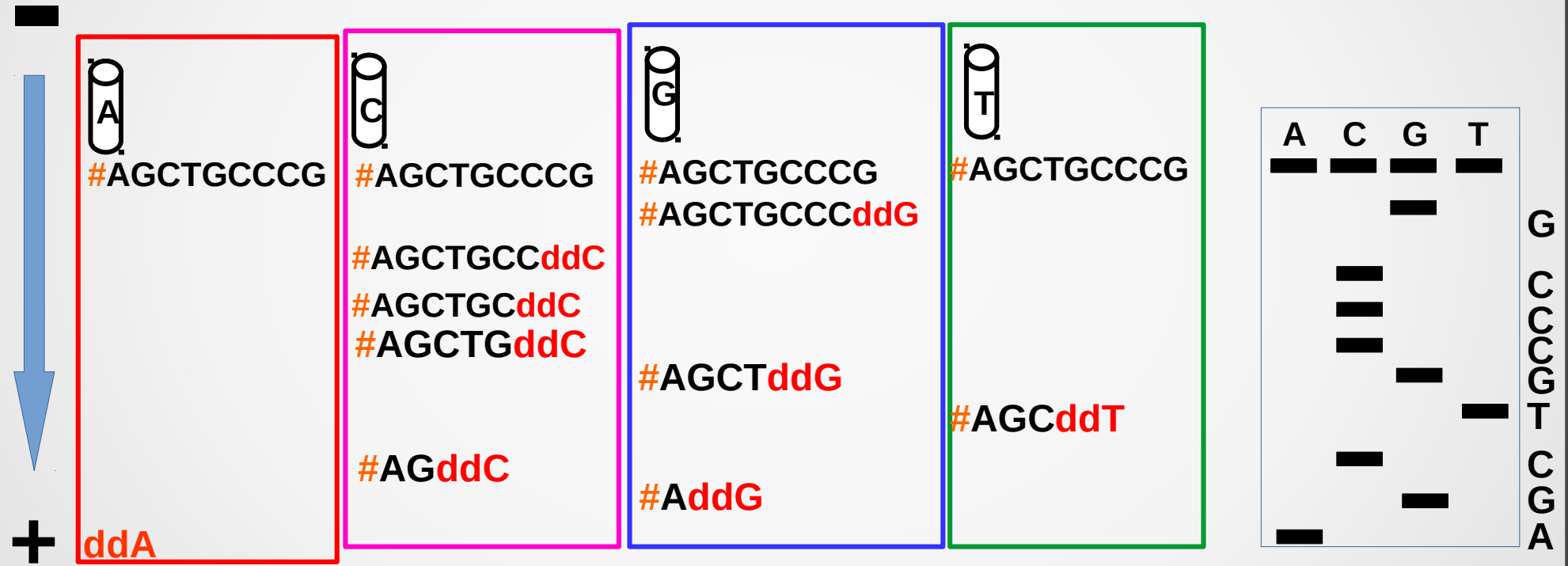
Etapele reacției de secvențiere ADN prin metoda Sanger

3) Separarea catenelor nou sintetizate funcție de dimensiune – se realizează prin **electroforeză** – moleculele de ADN sunt încărcate negativ și la aplicarea unui curent vor migra spre polul pozitiv. Electroforeza se în geluri de poliacrilamidă ce acționează ca o sită, frânând moleculele mari, astfel încât moleculele mici vor migra mai mult iar cele mari mai puțin.



Etapele reacției de secvențiere ADN prin metoda Sanger

4) **Vizualizarea catenelor nou sintetizate** – se realizează prin **autoradiografie** – pe baza marcajului radioactiv al oligonucleotidului amorsă.



Schema autoradiografiei unui gel de secvențializare

Secvențializarea ADN-ului



O variantă a metodei Sanger este:

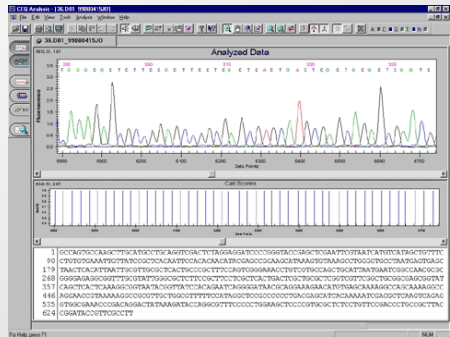
- **utilizarea de "terminatori" de catenă marcați fluorescenți**. Fiecare din cele 4 ddNTP sunt marcate cu câte un fluorocrom diferit (ddA – verde, ddT – roșu, ddG – galben, ddC – albastru). Reacția se desfășoară într-o singură eprubetă, iar fragmentele generate sunt separate prin electroforeză. Ordinea nucleotidelor este citită cu ajutorul unui laser și reprezentată ca "peak-uri".

ddA; ddT;
DdG; ddC +
A; T; C; G
TCGACGGGC

#ddA
#A^{ddG}
#AG^{ddC}
#AGC^{ddT}
#AGCT^{ddG}
#AGCTG^{ddC}
#AGCTGC^{ddC}
#AGCTGCC^{ddC}
#AGCTGCCC^{ddG}
#AGCTGCCCCG

Separare
funcție de
dimensiune

#AGCTGCCC^{ddG}
#AGCTGCC^{ddC}
#AGCTGC^{ddC}
#AGCT^{ddG}
#AGC^{ddT}
#AG^{ddC}
+ #A^{ddG}
#ddA



Aplicații ale ingineriei gentice

Metoda Sanger și variantele acesteia alături de metodele "de nouă generație" de secvențializare a ADN-ului au permis stabilirea secvenței de nucleotide a genomului unui număr mare de organisme (plante, fungi și animale).

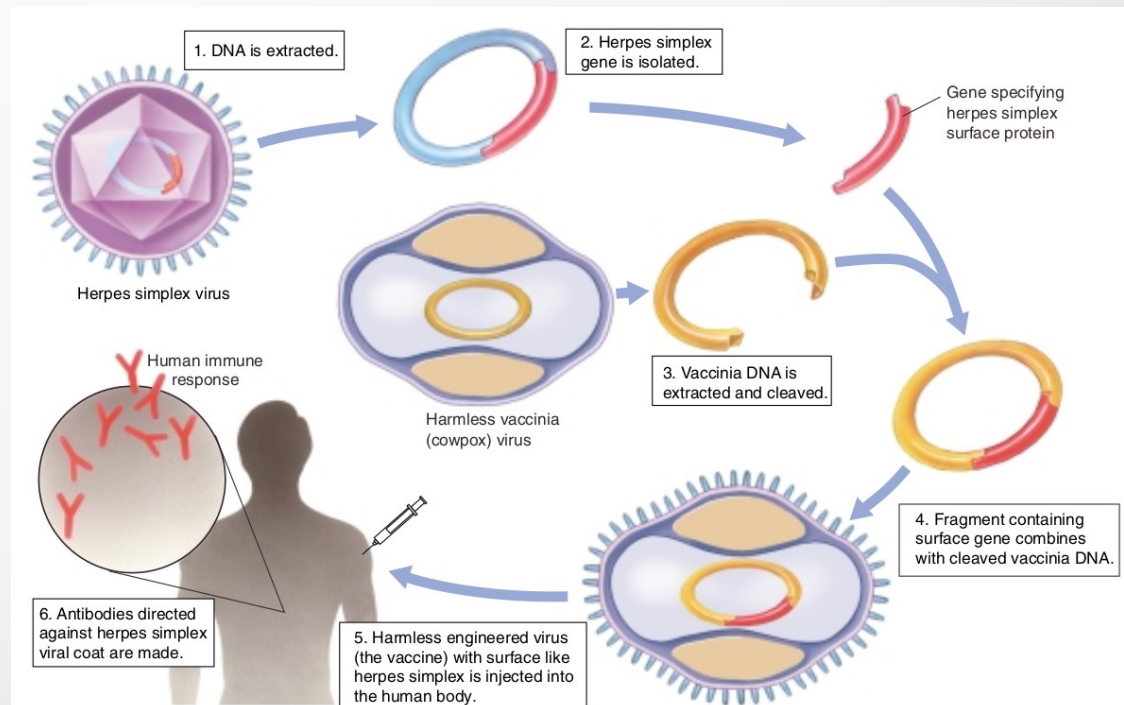
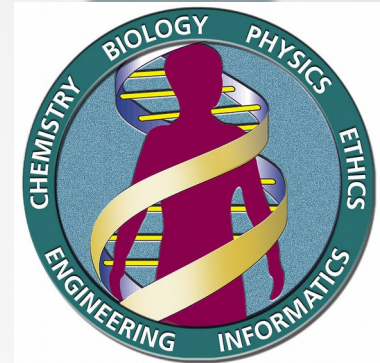
În 1990 a fost demarat proiectul internațional **Human Genome Project** (HGP) ce a fost declarat încheiat în 2003 și care a reușit secvențierea unui set haplod de cromozomi umani (**haploid reference genome**).

Toate aceste date legate de secvențele genelor au permis:

1) Producerea de compuși farmaceutici utili – prin introducerea în microorganisme a genelor umane, metabolismul acestora este deturnat pentru a sintetiza proteine utile – insulină, interferon, etc.

2) Terapia genică – în cazul bolilor genetice, introducerea unei copii "corecte" a genei afectate poate furniza o metodă de tratament.

3) Generarea de vaccinuri – prin utilizarea de virusuri inofensive ce exprimă proteine specifice unor virusuri periculoase.



Aplicații ale ingineriei genetice

4) **Producerea de plante modificate genetic** - prin introducerea în plantele de cultură a genelor pentru rezistența la frig sau pesticide, sinteza de insecticide, sau fixarea N_2 s-au obținut soiuri de plante cu productivitate crescută.

Orez transgenic - Golden Rice

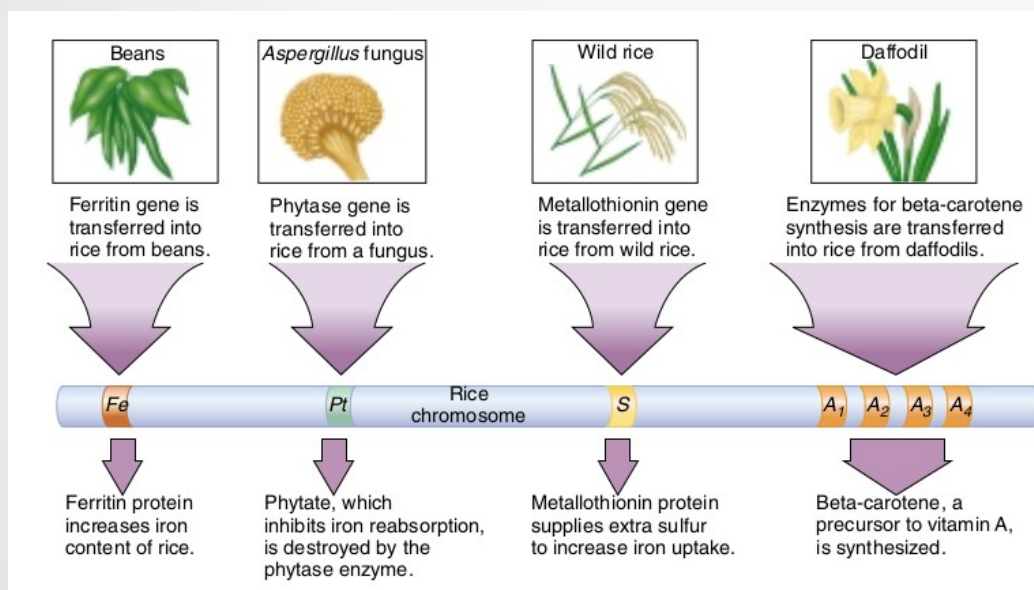


FIGURE 19.21
Transgenic rice. Developed by Swiss bioengineer Ingo Potrykus, transgenic rice offers the promise of improving the diets of people in rice-consuming developing countries, where iron and vitamin A deficiencies are a serious problem.

Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm

Xudong Ye,^{1*} Salim Al-Babili,^{2*} Andreas Klöti,^{1‡} Jing Zhang,¹ Paola Lucca,¹ Peter Beyer,^{2§} Ingo Potrykus^{1§}

Rice (*Oryza sativa*), a major staple food, is usually milled to remove the oil-rich aleurone layer that turns rancid upon storage, especially in tropical areas. The remaining edible part of rice grains, the endosperm, lacks several essential nutrients, such as provitamin A. Thus, predominant rice consumption promotes vitamin A deficiency, a serious public health problem in at least 26 countries, including highly populated areas of Asia, Africa, and Latin America. Recombinant DNA technology was used to improve its nutritional value in this respect. A combination of transgenes enabled biosynthesis of provitamin A in the endosperm.

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 287 14 JANUARY 2000

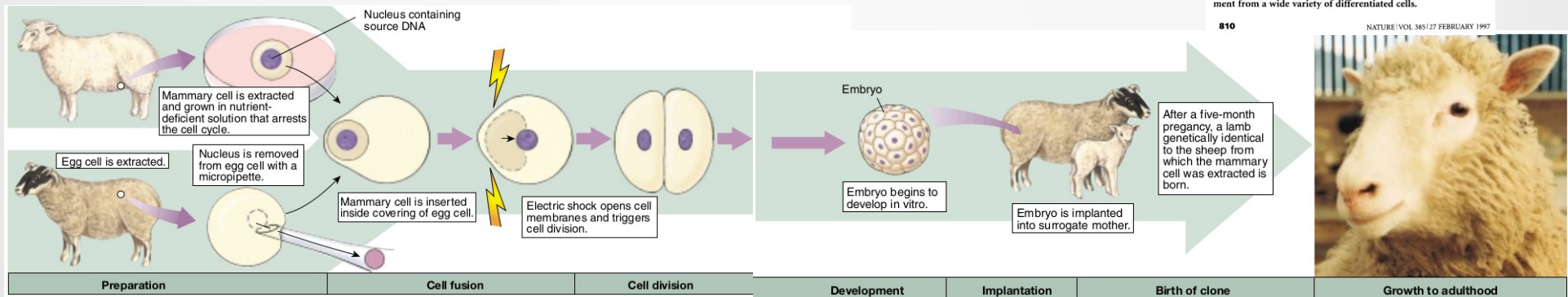
303



Aplicații ale ingineriei gentice

5) Clonarea unui animal adult - prin introducerea unui nucleu dintr-o celulă adultă în ovulul anucleat al altei celule și dezvoltarea unui embrion și apoi a organismului adult.

Oaia Dolly



Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells

I. Wilmut, A. E. Schnieke*, J. McWhir, A. J. Kind* & K. H. S. Campbell

Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK
* PPL Therapeutics, Roslin, Midlothian EH25 9PP, UK

Fertilization of mammalian eggs is followed by successive cell divisions and progressive differentiation, first into the early embryo and subsequently into all of the cell types that make up the adult animal. Transfer of a single nucleus at a specific stage of development, to an enucleated unfertilized egg, provided an opportunity to investigate whether cellular differentiation to that stage involved irreversible genetic modification. The first offspring to develop from a differentiated cell were born after nuclear transfer from an embryo-derived cell line that had been induced to become quiescent¹. Using the same procedure, we now report the birth of live lambs from three new cell populations established from adult mammary gland, fetus and embryo. The fact that a lamb was derived from an adult cell confirms that differentiation of that cell did not involve the irreversible modification of genetic material required for development to term. The birth of lambs from differentiated fetal and adult cells also reinforces previous speculation^{1,2} that by inducing donor cells to become quiescent it will be possible to obtain normal development from a wide variety of differentiated cells.

810

NATURE/VOL. 385/17 FEBRUARY 1997

nature International weekly journal of science

Correspondence

Nature 387, 754 (19 June 1997)

Is cloning an attack on human dignity?

John Harris¹

¹ Centre for Social Ethics and Policy, University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK
e-mail: Rebecca.Bennett@man.ac.uk

Appeals to human dignity, and to the moral obligation to protect it, have been a feature of responses to the cloning of Dolly the sheep (Nature 385, 810-813, 1997). Dr Hiroshi Nakajima, director general of the World Health Organization (WHO), said: "WHO considers the use of cloning for the replication of human individuals to be ethically unacceptable as it would violate some of the basic principles which govern medically assisted procreation."

ARTICLE TOOLS

- Send to a friend
- Export citation
- Rights and permissions
- Order commercial reprints

SEARCH PUBMED FOR

- John Harris

open innovation challenges