

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE ȘI BIOLOGIE MOLECULARĂ

LUCRĂRI PRACTICE
BIOCHIMIA ACIZILOR NUCLEICI ȘI
BIOLOGIE MOLECULARĂ

Sergiu Emil GEORGESCU

Marieta COSTACHE

BUCUREȘTI 2009

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR

CAPITOLUL I: ACIZII NUCLEICI – STRUCTURĂ, PROPRIETĂȚI, TRANSMITEREA ȘI EXPRIMAREA INFORMAȚIEI GENETICE

- I.1. Structura și compoziția acizilor nucleici
- I.2. Parametrii de mărime ai moleculelor de acizi nucleici
- I.3. Hidroliza acizilor nucleici
- I.4. Purificarea și evaluarea cantitativă a acizilor nucleici
- I.5. Proprietățile fizico-chimice ale acizilor nucleici
- I.6. Transmiterea informației genetice – procesul de replicare
- I.7. Exprimarea informației genetice - transcripția

CAPITOLUL II: METODE DE IZOLARE ȘI PURIFICARE ALE ACIZILOR NUCLEICI

- II.1. Izolarea ADN genomic total din țesut vegetal folosind metoda cu SDS/Acetate de potasiu
- II.2. Izolarea ADN genomic total din țesut vegetal folosind metoda cu CTAB
- II.3. Izolarea ADN din țesut animal cu fenol-cloroform (metoda Taggart)
- II.4. Izolarea ADN din suspensii de culturi celulare
- II.5. Izolarea ADN genomic din sânge
- II.6. Izolarea ADN din material seminal
- II.7. Izolarea ADN din țesuturi împarafinate
- II.8. Izolarea ADN din plasmă sau ser
- II.9. Izolarea ADN de la nivelul celulelor somatice din lapte
- II.10. Izolarea ARN total cu guanidin-tiocianat (metoda Chomczynski)
- II.11. Izolarea ARN din sânge

CAPITOLUL III: METODE DE ANALIZĂ ALE BAZELOR AZOTATE ȘI ACIZILOR NUCLEICI

III.1. Spectrele de absorbție ale bazelor azotate

III.2. Spectrul de absorbție al ADN. Determinarea spectrofotometrică a purității și concentrației ADN.

III.3. Efectele hipocromic și hiperchromic ale ADN

III.4. Verificarea integrității ADN prin electroforeză în gel de agaroză

III.5. Electroforeză ADN în gel de poli(acrilamidă)

III.6. Verificarea integrității ARN prin electroforeză în gel denaturant de agaroză

CAPITOLUL IV: REACȚIA PCR – VARIANTE ȘI TEHNICI DERIVATE

IV.1. Realizarea reacției PCR în gradient de temperatură pentru optimizarea hibridizării primerilor

IV.2. Touch-Down PCR cu adăugare de adjuvant

IV.3. Tehnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

IV.3.1 Diagnosticarea unor maladii genetice prin tehnica RFLP

A. Diagnosticarea deficienței de adeziune leucocitară bovină

B. Diagnosticarea deficienței în uridin-monofosfat sintază bovină

IV.3.2 Evidențierea unor polimorfisme la nivelul ADN prin tehnica RFLP

A. Evidențierea polimorfismului genei care codifică pentru β -lactoglobulină la bovine

B. Analiza polimorfismului locusului *Extension* la cabaline

IV.3.3 Identificarea speciei utilizând tehnica RFLP

A. Identificarea speciilor de sturioni din genurile *Acipenser* și *Huso*

IV.4. Tehnica de analiză a fragmentelor marcate fluorescent

IV.4.1 Identificarea delețiilor folosind tehnica analizei fragmentelor marcate fluorescent (diagnosticarea Imunodeficienței severe combinate la cabaline)

IV.4.2 Identificarea inserțiilor folosind tehnica analizei fragmentelor marcate fluorescent (diagnosticarea Epidermolizei joncționale severe la cabaline)

IV.4.3 Identificarea mutațiilor punctiforme utilizând tehnicile RFLP și de analiză a fragmentelor marcate fluorescent (diagnosticarea Paraliziei hiperkalemice periodice la cabaline)

IV.5. Tehnica PCR multiplex

IV.5.1 Analiza prin PCR multiplex a microsateleților la sturioni

IV.5.2 Analiza prin PCR multiplex a microsateleților la suine

IV.5.3 Aplicații ale tehnicii PCR multiplex - Genotiparea la cabaline în vederea testării paternității

IV.6. Tehnica RT-PCR (PCR revers transcris)

IV.7 Tehnica Real-Time PCR

IV.7.1 Cuantificarea relativă a expresiei genei leptinei la suine

Capitolul V: SECVENȚIALIZAREA ADN

V.1 Secvențializarea prin metoda „Dye-terminator”

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

LISTA ABREVIERILOR

2-ME – 2-mercaptoetanol.

6-FAM, ROX, VIC, NED, PET, LIZ – coloranți fluorescenți.

ADN – acid deoxiribonucleic.

ADNc – acid deoxiribonucleic complementar.

ARN – acid ribonucleic.

ARNr – acid ribonucleic ribozomal.

ARNt – acid ribonucleic de transfer.

ASIP – proteina de semnalizare Agouti (Agouti Signaling Protein).

BLAD – deficiența de adeziune leucocitară bovină.

BSA - albumină serică bovină.

CTAB – bromura de cetil-trimetil-amoniu.

ddNTP – dideoxinucleotid trifosfat.

DEPC – dietilpirocarbonat.

DMSO - dimetil sulfoxid.

dNTP – deoxinucleotid trifosfat.

DTT – ditioneitol.

DUMPS – deficiența în uridin 5' monofosfat sintază.

EDTA – acid etilen-diamino-tetraacetic.

GAPDH – gliceraldehid fosfat dehidrogenază.

HYPP – paralizia periodică hiperkalemică (Hyperkalemic Periodic Paralysis).

JEB – epidermoliza jonțională severă (Junctional Epidermolysis Bullosa).

Kpb – kiloperechi de baze.

MC1R - receptorul pentru melanocortină.

MOPS – acid 3-[N-Morfolino]-propan-sulfonic.

Pb – perechi de baze.

PBS – tampon fosfat salin.

PCR – reacție de polimerizare în lanț (Polymerase Chain Reaction).

RFLP – polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (Restriction Fragment Length Polymorphism).

rpm – rotații pe minut.

RT-PCR – revers-transcris PCR.

SCID – imunodeficiența severă combinată (Severe Combined Immunodeficiency).

SDS – sodiu dodecil-sulfat.

TAE – TRIS-Acid acetic-EDTA.

TBE – TRIS-Acid boric-EDTA.

TE – tampon TRIS-EDTA.

TEMED - N,N,N',N'- tetrametiletildiamină.

TRIS – tris(hidroximetil)aminometan.

UMP – uridin 5' monofosfat sintază.

UV – ultraviolet.

VIS – vizibil.

CAPITOLUL I

ACIZII NUCLEICI – STRUCTURĂ, PROPRIETĂȚI, TRANSMITEREA ȘI EXPRIMAREA INFORMAȚIEI GENETICE

I.1. Structura și compoziția acizilor nucleici

Acizii nucleici sunt substanțe care au fost pentru prima dată izolate din nucleii celulelor. Ulterior, s-a evidențiat existența acizilor nucleici atât în nucleu cât și în citoplasma celulelor dar denumirea a fost păstrată din considerente istorice.

Există două tipuri de acizi nucleici:

a) ADN (acid deoxiribonucleic) localizat în principal în nucleul celulelor dacă acesta este individualizat, cum este cazul eucariotelor;

b) ARN (acid ribonucleic), prezent în principal în citoplasma celulelor dar și în nucleu.

În celulă, acizi nucleici se găsesc asociați cu proteinele în complexe numite nucleoproteine. Prin tratare, în anumite condiții, cu acizi sau cu săruri, acizii nucleici se pot separa de proteinele respective. Odată separați, acizii nucleici sub forma lor de polimeri pot fi hidrolizați, în condiții adecvate până la nucleotide, unitățile de bază ale alcătuirii acizilor nucleici. Mai departe, nucleotidele pot fi hidrolizate până la fosfat și nucleozide sau până la fosfat, pentoze și baze purinice și pirimidinice. Pentozele sunt glucide. În ADN pentoza se numește deoxiriboză, iar în ARN poartă numele de riboză.

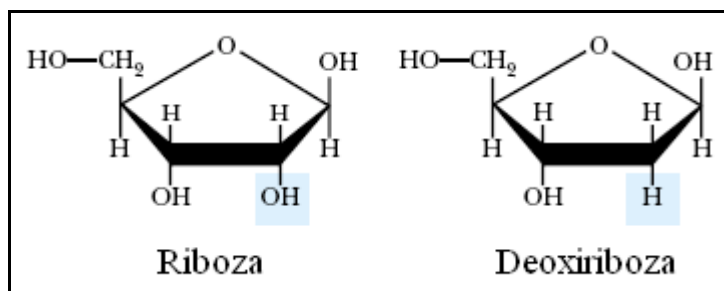


Figura 1: Pentozele din structura acizilor nucleici.

Acizii nucleici au rol esențial în conservarea și transmiterea informației genetice necesară funcționării „programului” sintezei proteinelor celulare, suportul mării majorități a activităților biologice. Aceștia sunt responsabili de dictarea ordinii în care aminoacizii se leagă între ei pentru a da naștere unei proteine adecvate.

ADN este un element permanent al celulei, informațiile conținute în structura sa fiind transmise descendenților. Din acest motiv se afirmă că ADN este suportul eredității. Acizii ribonucleici, ARNr, ARNt și ARNm, sunt moleculele implicate în realizarea directă a sintezei proteice.

Din punct de vedere structural, acizii nucleici sunt molecule polinucleotidice foarte mari formate din repetiția unor subunități numite nucleotide. Unitățile nucleotidice sunt formate din acid fosforic, un monozaharid cu cinci atomi de carbon (riboza în ARN și deoxiriboza în ADN) și o bază purinică (adenina sau guanina) sau pirimidinică (citozina și timina în ADN, respectiv citozina și uracilul în ARN).

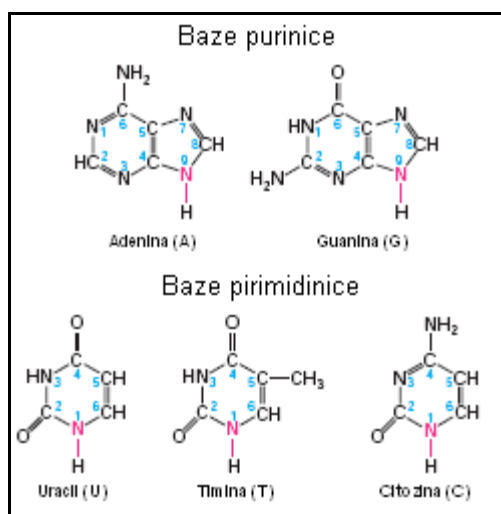


Figura 2: Bazele azotate din structura acizilor nucleici.

Unitatea structurală formată prin legarea unei pentoze de o bază azotată prin intermediul legăturii N-glicozidice se numește nucleozid. Prin legarea unei grupări fosfat la o nucleozidă se va obține o nucleotidă (Figura 3). În structura acizilor nucleici, unitățile

nucleotidice sunt înlănțuite prin legături fosfo-diesterice stabilite între hidroxilul din poziția 3' al unei nucleotide și gruparea fosfat din poziție 5' a nucleotidei următoare.

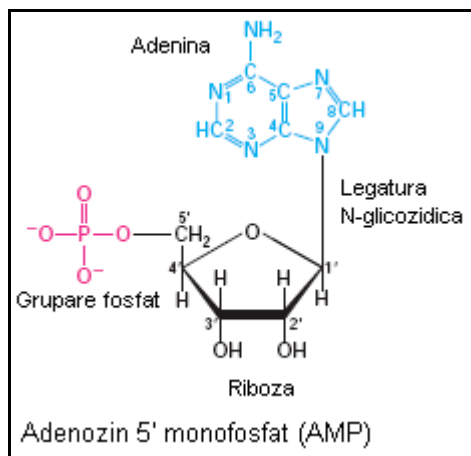


Figura 3: Structura unei nucleotide.

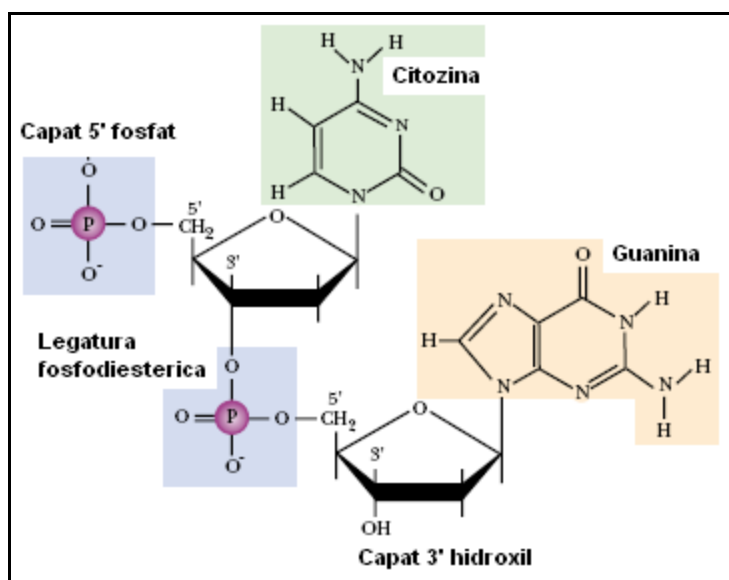


Figura 4: Legatura fosfodiesterică.

Acizii nucleici sunt, asemeni proteinelor, polimeri neramificați care pot fi liniari sau circulari. Demonstrată de Levene în 1925 și confirmată după 1950 de către Todd, înlănțuirea covalentă a nucleotidelor este de tip ester. Depolimerizarea se poate realiza prin hidroliză de diferite tipuri (acidă, bazică, enzimatică) și este destul de folosită în tehnicile de biologie moleculară.

Indiferent de tipul de acid nucleic (ribonucleic sau deoxiribonucleic), reacția de asamblare polinucleotidică este aceeași: hidroxilul din poziția 3' al unui nucleozid monofosfat este esterificat de către 5'-fosfatul din structura nucleozid trifosfatului care participă la formarea legăturii. Faptul că acizii nucleici sunt polimeri fosfodiesterici ai nucleozid-monofosfaților (NMP) are următoarele consecințe directe:

a) asemeni polipeptidelor, catena este orientată (vectorizată). Sensul convențional 5'-3' a fost adoptat pentru lectura și scrierea polinucleotidelor ca și pentru reprezentările prescurtate sau simbolice.

b) bazele fixate regulat în funcție de o secvență specifică speciei moleculare, sunt purtate de un schelet covalent pentozo-fosfat. Cu toate că imaginea este asemănătoare cu cea a scheletului polipeptidic purtător al catenelor laterale ale aminoacizilor, există o serie de diferențe față de acesta: - scheletul acizilor nucleici este un polianion cu o sarcină pe unitate care are o densitate totală de sarcină negativă foarte mare; - varietatea bazelor este mult mai redusă (patru baze azotate față de 20 de aminoacizi).

Consecințele acestor diferențe sunt foarte importante pentru sistemele de informație genetică. Înțelegem astfel, de ce pentru codificarea aminoacizilor de către secvențele nucleotidice nu este nevoie numai de o simplă echivalență bază/aminoacid, ci de un limbaj ternar format din ansambluri de trei baze adiacente a căror asociere determină existența a 64 de combinații posibile, care stau la baza codului genetic.

I.2. Parametrii de mărime ai moleculelor de acizi nucleici

Mărimea acizilor nucleici se exprimă prin trei tipuri de unități:

- lungime;

- masă moleculară exprimată în Daltoni (Da);

- număr de nucleotide sau de baze ale acestora pentru monocatene (b) și în perechi de baze (pb) dacă molecula este constituită din două catene asociate. Multiplul cel mai folosit este cel de kilobaze sau kilo-perechi de baze (1000 b sau 1000 pb).

Numărul nucleotidelor din structura ARN variază de la mai multe zeci de baze la mai multe mii de baze.

ARN ribozomal (ARNr) 100 - 5000 b

ARN de transfer (ARNt) 75 - 90 b

ARN mesager (ARNm) numărul de baze depinde de mărimea genei copiate

Mărimea ADN variază în funcție de regn și specie. Aceasta acoperă toată gama de la 5000 la mai mult de un milion de perechi de baze.

Metode de determinare a mărimii acizilor nucleici

Metodele de determinare a mărimii acestor macromolecule se bazează pe diferite caracteristici și poate fi determinată prin mai multe metode:

1. Microscopie electronică: datorită dimensiunilor lor acizii nucleici pot vizualizați prin această tehnică. Metoda se potrivește foarte bine moleculelor de ADN de mărime medie (câteva mii la 200000 pb).

2. Electroforeză: este o tehnică de separare a moleculelor în funcție de masa lor moleculară. Condițiile de densitate de sarcină asemănătoare, caracteristice pentru electroforeza în SDS a proteinelor, sunt realizate în mod natural, de către scheletul pentozo-fosfat. De asemenea, dependența logaritmică, distanță de migrare în funcție de mărime, este bine respectată.

Pentru separarea moleculelor de acizi nucleici de diferite dimensiuni sunt folosite geluri de agaroză cu porozități variate. Pentru facilitarea estimărilor cantitative există colecții de polimeri „marcheri de masă moleculară” utilizați pentru etalonarea separărilor. De altfel, această metodă de separare este omniprezentă în manipulările de biologie moleculară. Electroforeza se poate realiza și în geluri de poliacrilamidă pentru situațiile în care este necesară separarea moleculelor polinucleotidice mici sau oligonucleotidelor. Prin electroforeza în gel de poliacrilamidă este posibilă identificarea unor fragmente care diferă numai printr-un singur nucleotid. Din acest motiv tehnica este foarte utilă în secvențializarea acizilor nucleici și în determinarea regiunilor de polimorfism normal sau patologic determinat de existența unor mutații.

Moleculele ADN de mărime mare sunt analizate și prin:

a) ultracentrifugare: forțele de frecare existente între aceste molecule limitează câmpul aplicațiilor molecule de până la $1,5 \times 10^6$ pb. Prin această tehnică pot fi separate fragmente de ADN care au un conținut diferit în guanină și citozină; ADN genomic bacterian; ADN plasmidial; ARN total, diferite tipuri de ARN ribozomal, etc.

b) electroforeza în câmp pulsatoriu (sau alternant). Prin această tehnică care a fost imaginată la începutul anilor 1980, două câmpuri electrice se aplică alternativ pe două direcții diferite. Principul de separare se bazează pe viteza diferită de reorientare a moleculelor în momentul alternării celor două câmpuri electrice. Ele impun moleculelor de ADN etape de reorientare diferite înainte de migrarea lor efectivă. Aceste etape de reorientare sunt dependente de mărimea moleculelor.

Hidroliza acizilor nucleici

Degradarea unui polinucleotid poate să se refere la: i) legătura fosfodiester atunci când se produce o depolimerizare; ii) unitățile nucleotidice dacă se rupe legătura glicozidică și se degradează componentele. În ambele cazuri hidroliza poate fi de natură chimică sau enzimatică.

I.3. Hidroliza acizilor nucleici

Hidroliza chimică

Deși sunt printre cele mai stabile molecule, în condiții fiziologice celulare, acizii nucleici prezintă totuși, *in vitro*, rezistențe diferite la condițiile de pH și de temperatură.

Tratamentul acid afectează în mod similar cele două tipuri de acizi nucleici. Astfel sunt necesare condiții drastice pentru a degrada scheletul pentozo-fosfat (încălzire, acizi concentrați). În aceste condiții celelalte legături din structură nu rezistă și obținem un amestec de fosfați, pentoze și baze azotate. Acest protocol, urmat de o fracționare cromatografică, a fost una dintre tehnicile care au permis analiza compoziției acizilor nucleici. În condiții relativ blânde (pH 4,0), se vor rupe numai legăturile N-glicozidice cu purinele care sunt cele mai fragile. În acest caz, se obține un derivat de acid nucleic apurinic care prezintă interes pentru anumite analize.

Comportamentul ARN și ADN la hidroliză bazică este foarte diferit. ADN rezistă la valori extreme de pH bazic. La pH 13,0 și 37°C se înregistrează aproximativ zece scindări pe oră și pentru milion de punți fosfo-diester. Cu toate acestea, punțile fosfodiester din ADN devin sensibile la hidroliză alcalină dacă bazele sunt înlăturate sau degradate. Această proprietate este utilizată în tehnica de secvențializare chimică.

ARN este total hidrolizat în ribonucleotidele componente în câteva minute, la 37°C și pH 11. Încă de la pH 8, se constată începerea unei degradări semnificative.

Diferența dintre reactivitatea ARN și inerția ADN este dată de existența grupării hidroxil din poziția 2'. Deprotonarea sa în condiții alcaline produce un anion alcoxid, puternic nucleofil care atacă gruparea fosfo-diester adiacentă. Absența hidroxilului în 2' din scheletul ADN este un factor determinant al stabilității sale chimice în condiții celulare, normale sau agresive.

Hidroliza enzimatică

Enzimele care catalizează hidroliza legăturii fosfodiester din structura acizilor nucleici, fosfodiesterazele, sunt numite și nucleaze. Acestea sunt prezente în toate celulele și sunt foarte utile în metabolismul acizilor nucleici și proteinelor. O parte dintre aceste nucleaze sunt secretate de către pancreasul exocrin, în intestin, și participă direct la digestie hranei. Aceste enzime prezintă niveluri de specificitate comparabile cu cele ale peptidazelor și proteazelor. Ele se pot clasifica în funcție de:

a) modul lor de atac al catenei: - exonucleaze, enzimele care acționează la nivelul extremității catenelor; - endonucleaze, enzimele care atacă în interiorul catenelor.

b) specificitatea lor față de substrat: - pentru tipul de acid nucleic: ribonucleaze pentru ARN, deoxiribonucleaze pentru ADN și nucleaze pentru ambele; - pentru tipul de structură: mono- sau dublu catenară.

c) specificitatea lor de recunoaștere a situsurilor de acțiune: - specificitate pentru baze; - specificitate pentru secvențe.

d) tipul de rupere a legăturii fosfodiester: - exonucleazele și endonucleazele de tip d scindează extremitatea 5' și duc la formarea de 3'NMP; - exonucleazele și endonucleazele de tip p scindează extremitatea 3' și determină formarea 5'NMP.

Descoperirea enzimelor de restricție, în 1970, de către W. Harber, H. Smith și D. Nathans, a însemnat un pas gigantic pentru evoluția tehnicilor de biologie moleculară. Acestea au permis înlăturarea principalului obstacol tehnologic privind manipularea ADN, deoarece pot reduce într-o manieră reproductibilă, un genom întreg la o serie de fragmente caracteristice pentru o specie dată. Astfel, genele sau părți ale genelor devin entități fizice izolabile. Aceste enzime sunt responsabile pentru fenomenul de restricție de unde și numele lor.

Enzimele recunosc și taie secvențe de baze cu structuri caracteristice de pe catena ADN, numite palindroame, a căror lungime variază între 4 și 10 pb. Se observă că secvența de pe una din catene reprezintă palindromul secvenței celeilalte catene. În urma acțiunii enzimelor de restricție, se pot obține capete coezive sau capete drepte pentru fragmentele eliberate, în funcție de poziția situsurilor de scindare (Figura 5).



Figura 5: Exemple de enzime de restricție și situsurile recunoscute de acestea.

I.4. Purificarea și evaluarea cantitativă a acizilor nucleici

Un procedeu clasic de purificare constă în tratarea soluției apoase de acid nucleic cu soluție fenolică care denaturează proteinele. De obicei este folosit amestecul fenol-cloroform care este destul de eficient. După separarea fazelor prin centrifugare, este recuperată faza apoasă care constituie supernatantul și care conține acizii nucleici. Urmele de fenol (care ar putea să inhibe activitatea enzimelor din etapele următoare) sunt

eliminate printr-un nou tratament cu cloroform/alcool izopropilic. Dacă acizii nucleici provin din extracte celulare, proteinele sunt în prealabil hidrolizate cu ajutorul unei enzime proteolitice numită proteinaza K.

În ultimii ani au fost puse la punct procedee de purificare pe bază de rășini. Reactivii sunt livrați sub formă de „kituri” gata de întrebuințare simplificând mult procesul de purificare și crescând adesea randamentul acestuia.

Metode spectrofotometrice

Determinarea absorbției în ultraviolet cu ajutorul unui spectrofotometru permite verificarea purității unei soluții de ADN sau ARN. În urma determinării densității optice se va obține un semnal la 260 nm. Pentru estimarea purității este necesară calcularea raportului densităților optice la 260 nm/280 nm care, în mod normal, trebuie să fie cuprins în intervalul 1,8-2,0. În cazul ADN, un raport mai ridicat indică o contaminare cu ARN. Dacă există o contaminare cu proteine (280 nm), raportul va fi net inferior valorii de 1,8.

Concentrația acizilor nucleici poate fi apreciată astfel:

unitatea DO (260 nm) = 50 ng/μl pentru ADN dublu-catenar

unitatea DO (260 nm) = 40 ng/μl pentru ADN monocatenar

unitatea DO (260 nm) = 30 ng/μl pentru ARN

Determinarea secvenței primare a acizilor nucleici

Strategia curentă de secvențializare a acizilor nucleici este formată din trei etape, conforme cu principiile comune de analiză a polimerilor:

a) acidul nucleic este întotdeauna prea lung pentru a fi secvențializat direct și trebuie fracționat în fragmente repetabile de mărime adecvată. Acestea sunt separate, fiecare fiind apoi supus secvențializării;

b) prin scindarea diferită a fragmentului de secvențializat, se produc amestecuri de segmente de oligonucleotide, de diferite lungimi care se suprapun;

c) separarea și identificarea componentelor fiecăruia dintre aceste amestecuri și apoi compararea lor în scopul reconstituirii secvenței inițiale a fragmentului.

Începuturile în secvențializarea acizilor nucleici au fost tributare modalităților de scindare și de fracționare a oligonucleotidelor. Înainte de 1970 cercetătorii nu dispuneau

nici de endonucleaze și nici de modalități de scindare echivalente degradării Edman. Secvențializarea realizată pentru ARNt^{Ala} a constat în scindarea parțială cu ajutorul ribonucleazelor T1 și A, suprapunerea fragmentelor obținute în urma acțiunii secvențiale a unei exonucleaze și analiza produșilor obținuți prin cromatografie.

Anii 1970 marchează descoperirea endonucleazelor de restricție și primele realizări ale tehnicilor de biologie moleculară, printre care și clonarea care permitea multiplicarea moleculelor de ADN disponibile.

La baza evoluției ulterioare a secvențializării ADN au stat două metode. Diferența dintre cele două constă în modul de obținere a ansamblurilor de fragmente: una din metode se bazează pe scindarea chimică (metoda introdusă de A. Maxam și W. Gilbert), cealaltă se inspiră din procesul de replicare și se bazează pe tehnologia sintezei enzimatică (metoda Sanger).

Cu toate că metoda Maxam și Gilbert a cedat de mult locul metodei Sanger, pentru care la ora actuală există numeroase variante, confruntarea dintre cele două concepții rămâne interesantă.

Metoda „dideoxi” a lui F. Sanger

Sanger, pionierul secvențializării insulinei, a conceput o metodă genială de secvențializare care se bazează pe principiul replicării. Analiza structurii ADN și a rolului său în exprimarea genelor a fost ușurat enorm de punerea la punct a acestei tehnici de secvențializare. Esența tehnicii de secvențializare a ADN, propusă F. Sanger și colaboratorii, a constituit-o generarea de fragmente a căror lungime era dependentă de ultima bază din structura secvenței. Colecții de astfel de fragmente au fost generate prin întreruperea controlată a sintezei enzimatică. Această tehnică s-a impus în fața celorlalte tehnici de secvențializare datorită simplității sale.

Inițial, fragmentul care urmează a fi secvențializat (matriță), este denaturat, pentru obținerea de monocatene, și adus în contact cu un primer. Hibridizarea primerului cu matrița monocatenară permite inițierea acțiunii ADN polimerazei, în prezența substratelor nucleotidice dNTP. În fiecare dintre cele în patru loturi se adăugă o mică cantitate dintr-un 2'-3'dideoxinucleotid trifosfat (ddNTP) diferit, analog cu una dintre nucleotide.

Încorporarea acestui analog, în locul unei nucleotide normale, blochează alungirea datorită lipsei hidroxilului din poziția 3' terminală. Din acest considerent ddNTP au fost denumite molecule terminatoare de catenă (Figura 6). Concentrația lor este destul de mică pentru a opri sinteza numai ocazional.

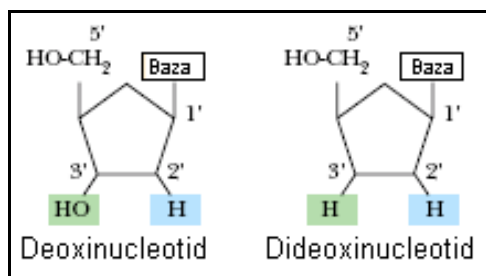


Figura 6: Structurile deoxi- și dideoxinucleotidelor.

Ulterior, prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau prin 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 fiecăruia dintre cele patru tipuri de ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP și ddTTP).

Această metodă ingenioasă i-a permis lui F. Sanger, în 1977, să stabilească prima secvență completă de 5386 baze a bacteriofagului Φ X174. Total automatizată ulterior, tehnica a permis descifrarea completă a genoamelor multor organisme procariote 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 singura alternativă viabilă de determinare a secvenței acizilor nucleici.

La ora actuală se folosesc primeri sau dideoxinucleotid trifosfați marcați fluorescent ce conduc la obținerea unor fragmente a căror separare se realizează prin electroforeză în gel de acrilamidă sau prin electroforeză capilară. Marcarea fluorescentă oferă posibilitatea combinării amestecurilor de reacției urmată de separarea electroforetică a ansamblului. Benzile obținute pot fi detectate independent în funcție de reactivul fluorescent cu care au fost marcate. Folosirea marcării fluorescente și evoluția interesantă

a sistemelor de detectare și a programelor de interpretare a rezultatelor a permis automatizarea tehnicii și extinderea aplicațiilor acesteia.

I.5. Proprietățile fizico-chimice ale acizilor nucleici

Pentru a extrage acizii nucleici și pentru a le evalua masa moleculară, sunt utilizate anumite proprietăți determinate de natura fibroasă și de mărimea ADN și anume:

a) sărurile de sodiu ale acizilor nucleici sunt solubile în apă și dau soluții cu vâscozitate ridicată;

b) alcoolii, dintre aceștia cel mai folosit este etanolul, sunt utilizați pentru precipitarea acizilor nucleici din soluție;

c) densitatea acizilor nucleici este destul de mare pentru a permite separarea lor prin ultracentrifugare. Centrifugarea în gradient de densitate la echilibru permite determinarea masei moleculare și evaluarea conținutului în G/C.

Dintre proprietățile datorate compoziției reținem:

a) Caracterizarea și dozarea ADN pentru conținutul în deoxiriboză. Hidroliza acidă parțială la cald înlătură purinele demascând resturile de 2-dezoxiriboză. O fracțiune suficientă dintre deoxiriboze atașate pe schelet, sub forma lor furanozică, sunt convertite în forma aldehydică care poate reacționa cu reactivul Schiff și îl recolorează. Produsul obținut precipită pe scheletul macromoleculei și poate fi cuantificat spectrofotometric.

b) Absorbția în UV a ADN la 260 nm datorită conținutului lui în baze. Această absorbție este de aproximativ 30 de ori mai importantă decât a proteinelor cu o concentrație egală, dar totuși inferioară bazelor libere.

Denaturarea acizilor nucleici

Procesul denaturarea reprezintă o alterare a structurii spațiale a unei macromolecule fără ruperea legăturilor covalente. Denaturarea și renaturarea termică a ADN sunt pe de o parte modalități de studiu ale acestor molecule dar și unelte necesare în manipularea acestora.

Fenomenul de denaturare se manifestă la încălzirea unei soluții de ADN. Acest fenomen este însoțit de modificări spectaculoase ale proprietăților fizice cum ar fi pierderea vâscozității și amplificarea absorbției în UV. Efectul de hiperchromicitate este o modificare foarte importantă și informativă pentru studiul fenomenului de denaturare. Din stare nativă, dublu catenară, molecula trece în stare denaturată prin ruperea legăturilor de hidrogen și a contactelor Van der Waals care asigură stivuirea. Temperatura separă complet sau incomplet cele două catene care își pierd forma elicoidală și adoptă o conformație statistică aleatoare. În aceste condiții crește absorbția în UV a bazelor care până în acel moment erau mascate.

Un factor important este concentrația în săruri a mediului, un factor extrinsec care are efect protector spectacular. Ionii minerali neutralizează sarcinile scheletului fosfat și anulează repulsiile electrostatice care destabilizează dublul helix. De reținut că în apă pură ADN se poate denatura la temperatura ambiantă.

Fenomenul de renaturarea se referă la restaurarea stării inițiale de dublă catenă, plecând de la ADN denaturat. Succesul acestei renaturări depinde de condițiile de mediu (pH, tărie ionică), de starea mai mult sau mai puțin avansată a denaturării; de protocolul adoptat pentru revenirea la temperatura nedenaturantă.

Procesul de denaturare/renaturare parcurge diferite etape în funcție de protocolul utilizat:

a) dacă soluția este răcită prea repede, timpul de căutare al catenelor complementare este prea scurt, iar moleculele sunt „înghețate” în starea imperfectă de cupluri inter- și intramoleculare;

b) dacă soluția este răcită treptat s-a observat, din contră, o revenire gradată la proprietățile caracteristice structurii bicatenare. Acest fenomen are loc deoarece este asigurată durată necesară pentru explorarea bazelor prezente pe cele două catene. Aceste condiții au fost denumite „de anelare” sau „annealing”.

Dacă se pornește de la o soluție complet denaturată, reîmperecherea se realizează în două etape de cinetică diferite: în prima catenele separate se întâlnesc la întâmplare și o scurtă regiune se poate împerechea pe bază de complementaritate și forma începutul unei

duble elice. În a doua etapă, plecând de la aceste puncte de inițiere a procesului, împerecherile se vor efectua foarte rapid, după modelul închiderii unui fermoar, impunând structura de dublu helix pe toată lungimea moleculei.

Denaturările și renaturările sunt etape cheie pentru numeroase tehnici de biologie moleculară. Hibridizarea, etapă tehnică foarte importantă, presupune formarea de duplexuri artificiale între ADN din diferite surse sau între ADN și ARN.

Regiunile de ARN al căror lanț monocatenar se repliază pentru a forma o structură de dublu helix prezintă același fenomen de denaturare, dar aceste duplexuri ARN sunt mult mai stabile.

Există o serie de alți factori care au acțiune denaturantă asupra ADN. Astfel, valorile extreme de pH dezorganizează împerecherile modificând ionizarea grupelor de baze.

Tratamentul alcalin este o metodă importantă care este folosită în tehnicile de biologie moleculară pentru denaturarea ADN. Prin aceasta se separă rapid catenele fără a se produce degradare. Este o modalitate reversibilă de a obține molecule de ADN monocatenare care sunt foarte utile etapelor de hibridizare din tehnicile Southern și Northern blotting.

Compușii organici ca aldehida formică, formamida, ureea, au capacitatea de a stabili legături de hidrogen și sunt utilizați în ca agenți denaturanți în tehnicile de separare a ADN. Faptul că acțiunea lor necesită accesibilitatea grupelor de baze implicate în împerecheri a condus la concepția unei structuri dinamice pentru ADN, în care există regiuni care se desfac tranzitoriu și monocatene care se reîmperechează. În ADN linear, desfacerea spontană a bazelor este totuși rară la temperaturi fiziologice.

Trebuie să reținem că *in vivo* probabilitatea de denaturare a ADN în condiții de pH, forță ionică și temperatură celulară este minimă. Cu toate acestea existența procesului activ de împerechere parțială este obligatoriu pentru replicare și transcripție. De asemenea, proteinele care se leagă la ADN inhibă, pentru cea mai mare parte, denaturarea. Cu toate acestea, în funcție de starea fiziologică a celulei, numeroase proteine destabilizează dubla elice.

I.6. Transmiterea informației genetice – procesul de replicare

ADN este supus unor procese celulare esențiale (replicări, reparări, rearanjări și recombinări) catalizate de enzime și care asigură transmiterea corectă, conservarea și unicitatea informației genetice a fiecărui individ.

Replicarea ADN, un proces fundamental care are loc în celulele organismelor vii și stă la baza eredității biologice. Prin acesta se realizează copierea, mai precis duplicarea, moleculelor de ADN. Replicarea este semiconservativă, deoarece o moleculă de ADN este duplicată (replicată) prin polimerizarea unei noi catene complementare pe fiecare dintre vechile catene ale dublei helice de ADN. Fiecare din acestea devine un model pentru sinteza unei noi catene complementare, rezultând două molecule ADN identice.

Replicarea este bidirecțională. Practic, în momentul replicării unei molecule de ADN, catenele sale sunt depărtate pentru a forma una sau mai multe furci de replicare în formă literei Y. Enzima ADN polimeraza, care se poziționează la nivelul fiecărei furci, este responsabilă de sinteza noii catene de ADN complementare cu fiecare din catenele parentale. Replicarea ADN începe la nivelul mai multor situsuri cromozomiale specifice numite origini de replicare. În funcție de organism, originile de replicare sunt segmente de ADN unice care contin mai multe unități repetitive scurte care sunt recunoscute de proteine multimerice denumite “Origin Binding Proteins”.

Polimerazele care realizează sinteza unor noi molecule ADN necesită asocierea cu un complex multiproteic de inițiere a reacției de polimerizare nucleotidică. Toate ADN polimerazele cunoscute au numai capacitatea de a elonga o catenă preexistentă de ADN sau de ARN și sunt incapabile să inițieze sinteza *de novo* a unei noi catene. Din acest motiv în complexul multiproteic de inițiere există enzime, numite primaze care realizează sinteza unui primer complementar la nivelul fiecărei origini de replicare. De asemenea, polimerazele pot cataliza numai reacția de adăugare de nucleotide la capătul 3'-hidroxil al catenei în formare determinând creșterea lanțului numai în direcția 5'-3'.

În acest context, numai una dintre catenele furcii de replicare, cea directă, poate fi sintetizată continuu. Sinteza celeilalte catene, denumită întârziată, necesită mai mulți

primeri și este sintetizată discontinuu de polimerază, sub forma unor fragmente scurte de ADN, numite fragmente Okasaki, care sunt ulterior conectate cu ajutorul ADN ligazei pentru a obține o singură catenă continuă.

Replicarea ADN necesită cooperarea mai multor proteine, care constituie o mașină de replicare multienzimatică la nivelul furcii de replicare, responsabilă de sinteza ADN. ADN polimeraza realizează replicarea unei matrițe ADN cu o remarcabilă fidelitate, înregistrând mai puțin de o eroare pentru fiecare 10⁹ baze parcurse. Acest lucru este posibil deoarece enzima elimină propriile sale erori de polimerizare deplasându-se în lungul ADN (etapă de “proofreading” sau de autocorectare a greșelilor).

Activitatea de corectare/editare pe care o realizează ADN polimeraza face ca enzima să fie incapabilă să realizeze sinteza *de novo* a unei noi catene ADN. Sinteza ADN este amorșată de către o ARN polimerază, numită primază, care sintetizează fragmente scurte de ARN numite primeri care sunt apoi (la sfârșitul procesului) înlăturate și înlocuite cu fragmentele similare de ADN.

Rarele erori de copiere care scapă mașinăriei de replicare și editare a ADN și leziunile determinate de către reacțiile chimice care modifică nucleotidele în ADN sunt identificate și corectate de sistemele proteice de reparare a neîmperecherilor. Acestea controlează secvențele de ADN nou sintetizate sau pe cele afectate de modificări și repară erorile de copiere. Leziunile ADN datorate reacțiilor chimice și radiațiilor UV sunt corectate de diferite enzime care recunosc ADN modificat și excizează un fragment scurt din catena care îl conține. Secvența de ADN înlăturată este resintetizată de către o ADN polimerază de reparare, care folosește drept matriță catena fără leziuni. ADN ligaza sudează fragmentele de ADN pentru a completa procesul de reparare.

I.7. Exprimarea informației genetice – transcripția

Procesul prin care o genă conduce producerea unei gene este numit expresie genică. Genele sunt exprimate prin transcriere din ADN în ARNm și prin traducerea

acestui în proteine. Nivelul de expresie al unei gene este fin acordat de o serie de mecanisme de control corelate permanent cu nevoile temporale ale fiecărei celule.

Atât celulele procariote cât și cele eucariote posedă mecanisme, pe de o parte comune și pe de altă parte distincte, pentru reglarea expresiei genelor și a fluxului de informație de la ADN la proteine. Transcripția ADN realizată de ARN polimeraze constituie prima etapă, comună la toate organismele.

La celulele procariote, ribozomii se fixează pe molecula de ARNm, în curs de sinteză și realizează traducerea imediată a informației în proteine, la nivelul citoplasmei.

Din contră, la eucariote, membrana nucleară separă locul în care se realizează transcripția de cel în care are loc traducerea. Transcriptul primar, ARNm imatur, conține o succesiune de secvențe netraduse, numite introni, care vor fi eliminate prin procedeul de scindare a intronilor și sudare a exonilor („splicing”) în procesul de maturare a ARNm. În urma acestei etape, localizată în nucleu, ARNm trece în citoplasmă unde este tradus. Maturarea ARNm prin „splicing” conferă celulei eucariote posibilitatea diversificării informației prin combinarea alternativă a exonilor.

Genele procariote și eucariote sunt structurate după aceeași logică de bază, dar cu diferențe importante în detaliile moleculare. O definiție sintetică a unei gene eucariote poate fi utilă pentru a rezuma esența acestor diferențe. Este general admis că o singură definiție dată genei eucariote nu poate satisface pe toată lumea sau nu poate corespunde tuturor exemplurilor practice. Definiția adoptată de noi este rezultatul structurii moleculare a genelor și ține cont de diferențele de localizare și de tipurile de secvențe care influențează expresia genelor.

Astfel, definim gena ca fiind o combinație de segmente de ADN care, împreună, constituie o unitate de expresie, o unitate care determină formarea unui produs specific și funcțional care poate fi o moleculă de ARN sau un polipeptid. Segmentele de ADN care definesc gena includ:

1. Unitatea de transcripție care este constituită dintr-un segment ADN continuu care codifică pentru secvența transcriptului primar. Acesta conține secvența codantă a ARN matur sau a proteinei produse, intronii și secvențele început 5' și coadă 3' prezente

la nivelul ARNm matur ca și secvențele de separare care sunt eliminate în timpul maturării transcripturilor primari care codifică pentru molecule de ARN.

2. Secvențele minimale necesare pentru inițierea corectă a transcripției (promotorul) și pentru a da naștere extremității 3' particulare din structura ARN matur.

3. Elementele secvenței care determină frecvența de inițiere a transcripției. Acestea cuprind secvențele responsabile de inducerea și represia transcripției și de specificitatea celulară, tisulară și temporală a transcripției. Aceste regiuni sunt foarte variate structural, ca poziție și ca funcție pentru a putea purta un singur nume. Dintre acestea enumerăm elementele activatoare (enhancers) și elementele moderatoare (silencers), care sunt secvențe ce influențează inițierea transcripției la distanță, independent de localizarea lor în raport cu situsul de inițiere.

În această definiție a genei nu sunt incluse secvențele ADN care influențează configurația unei gene în cromatină și nici cele care codifică proteine sau ARN care modulează expresia unei anumite unități de transcripție.

Controlul vitezei de transcripție la eucariote nu este complet înțeles. Datorită mărimii genomului eucariotelor, este necesară o selectivitate crescută a utilizării ARN polimerazei la transcrierea genelor decât la ADN necodant (non-coding DNA). O transcripție eficientă necesită, de regulă, ca două sau mai multe proteine diferite să se lege în poziții apropiate începutului transcripției. Anumite poziții de legătură numite intensificatori pot fi localizate la aproximativ 3kb de la începutul transcripției și activarea lor poate crește viteza de transcripție de o sută de ori (transcrierea este un proces rapid de ordinul 60 nucleotide pe secundă). Intensificatorii se pot întinde atât înainte cât și după startul transcrierii și pot exista mai mulți intensificatori care să afecteze o singură genă.

CAPITOLUL II

METODE DE IZOLARE ȘI PURIFICARE ALE ACIZILOR NUCLEICI

II.1. Izolarea ADN genomic total din țesut vegetal folosind metoda cu SDS/Acetat de potasiu

Principiul metodei

Metoda este folosită pe scară largă pentru realizarea extracției de ADN din țesuturi vegetale proaspete. Sodiu dodecil-sulfat (SDS), un detergent neionic, este utilizat pentru a elibera acizii nucleici din celulă. Moleculele de ARN din extract sunt îndepărtate prin utilizarea ribonucleazelor, iar contaminanții proteici eliminați cu ajutorul proteinazei K. Precipitarea ADN se realizează utilizând etanol, iar îndepărtarea totală a contaminanților se va face după etapa de spălare a ADN cu etanol 70%. Realizarea practică a metodei este relativ simplă și se poate adapta pentru cantități variate de material vegetal.

Material biologic: diferite tipuri de țesut vegetal cum ar fi frunze sau semințe. Probele trebuie să fie proaspete și înghețate pe azot lichid.

Reactivi și aparatură: i) tampon de extracție: 100 mM TRIS (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8), 500 mM NaCl. Reactivul se stochează la temperatura camerei și este stabil o perioadă îndelungată; ii) soluție SDS 20%; iii) soluție acetat de potasiu 5 M; iv) soluție NaCl 5 M; v) soluție ribonuclează 20 mg/ml; vi) soluție proteinază K; vii) etanol 100% și 70%; viii) izopropanol 100%; ix) tampon salin TRIS-EDTA (TE): 1 mM TRIS-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA (pH 8). Reactivul se stochează la temperatura camerei și este stabil o perioadă îndelungată; x) 2-mercaptoetanol (2-ME); xi) amestec 24:1 (v/v) cloroform alcool izoamilic; xii) apă ultrapură: apă purificată, deionizată și lipsită de nucleaze; xiii) termobloc; xiv) agitator; xv) microcentrifugă; xvi) omogenizator sau mojar steril.

Mod de lucru

1. Țesutul vegetal înghețat pe azot lichid este omogenizat sau mojarat până la

obținerea unei paste omogene.

2. Într-un tub de centrifugă de 2 ml se adaugă: 300 mg omogenat, 900 μl tampon de extracție (la care se adaugă *extemporaneum* β-mercaptoetanol până se ajunge la o concentrație de 2% -v/v- a acestuia) și 80 μl SDS (20%).

3. Amestecul se agită puternic și se incubează 10 minute la 65°C.

4. După adaugarea a 300 μl acetat de potasiu 5 M, amestecul este plasat 20 minute pe gheață.

5. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 10 minute, la 4°C.

6. Supernatantul este transferat într-un tub de centrifugă nou și se adaugă un volum egal de alcool izopropilic. Se amestecă ușor prin înclinarea tubului și se plasează amestecul 30 de minute pe gheață.

7. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 10 minute, la 4°C.

8. Supernatantul se aruncă și peste sediment se adaugă 100 μl soluție TE încălzită la 65°C. Se amestecă puternic până când sedimentul se dizolvă complet.

9. După adăugarea a 10 μl soluție ribonuclează se incubează 60 de minute la 37°C.

10. Se adaugă un volum egal de amestec de cloroform:alcool izoamilic 24:1 și se omogenizează prin inversia tubului timp de 5 minute.

11. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 5 minute, la 4°C.

12. Se adaugă 10 μl proteinază K și se incubează 60 de minute la 37°C.

13. Se adaugă un volum egal de amestec cloroform:alcool izoamilic 24:1 și se omogenizează prin inversia tubului timp de 5 minute.

14. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 5 minute, la 4°C.

15. Supernatantul se transferă într-un tub de microcentrifugă nou și se adaugă peste acesta două volume de etanol 100% și ½ volume de soluție NaCl 5 M. Se omogenizează energetic timp de 20-30 de secunde.

16. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 5 minute, la 4°C.

17. Supernatantul este înlăturat prin inversia tubului, iar peste sediment se adaugă etanol 70%. Se spală prin agitare ușoară, timp de 30-60 minute.

18. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 5 minute, la 4°C.

19. Etanolul este îndepărtat prin înclinarea tubului. Sedimentul se lasă la uscat timp de 15-20 minute la 37⁰C în curent de aer.

20. Sedimentul uscat este resuspendat într-un volum adecvat de apă ultrapură sau de tampon TRIS-EDTA.

II.2. Izolarea ADN genomic total din țesut vegetal folosind metoda cu CTAB

Principiul metodei

Acest procedeu este folosit pe scară largă pentru realizarea extracției de ADN din diverse surse vegetale. Inițial, protocolul de extracție a fost folosit la bacterii (Jones, 1953), ulterior el fiind adaptat la plante (Murray and Thonpson, 1980).

Bromura de cetil-trimetil-amoniu (CTAB), care este un detergent neionic, este utilizat în acest caz pentru a elibera acizii nucleici din celulă și, ulterior, pentru a forma un complex insolubil cu aceștia, la concentrații de NaCl sub 0,5 M. În acest timp, polizaharidele, compușii fenolici și alții contaminanți specifici plantelor vor precipita și vor putea fi îndepărtați. Complexul acizi nucleici-CTAB este solubil numai în soluții saline concentrate. Prin creșterea treptată a concentrației de NaCl, complexul disociază și CTAB poate fi îndepărtat.

Precipitarea ADN se realizează utilizând izopropanol, iar îndepărtarea totală a CTAB se face după etapa de spălare a ADN cu etanol. Cantitatea de ADN care poate fi obținută variază între 100 și 500 μg per gram de țesut vegetal inițial. Cele mai mari cantități se obțin în cazul țesuturilor proaspete care au fost în prealabil înghețate pe azot lichid. Realizarea practică a metodei este relativ simplă și se poate adapta pentru cantități variate de material vegetal.

Material biologic: diferite tipuri de țesut vegetal cum ar fi frunze, semințe, cotiledoane, polen. Probele pot fi proaspete, liofilizate, deshidratate sau înghețate pe azot lichid.

Reactivi și aparatură: i) soluție de extracție CTAB: 2% CTAB, 100 Mm TRIS-

HCl (pH 8), 20 Mm EDTA (pH 8), 1,4 M NaCl. Reactivul se stochează la temperatura camerei și este stabil pe o perioadă îndelungată; ii) soluție de precipitare CTAB: 1% CTAB, 50 Mm TRIS-HCl (pH 8), 10 Mm EDTA (pH 8). Reactivul se stochează la temperatura camerei și este stabil o perioadă îndelungată; iii) tampon salin TRIS-EDTA (TE): 10 Mm TRIS-HCl (pH 8), 0,1 Mm EDTA (pH 8), 1 M NaCl. Reactivul se stochează la temperatura camerei și este stabil pe o perioadă lungă; iv) 2% (v/v) 2-mercaptoetanol (2-ME); v) soluție CTAB/NaCl: 10% CTAB în soluție 0,7 M NaCl; vi) amestec 24:1 (v/v) cloroform:octanol sau cloroform alcool izoamilic; vii) etanol 80%; viii) izopropanol 100%; ix) apă ultrapură; x) agitator; xi) microcentrifugă; xii) omogenizator sau mojar steril.

Mod de lucru

1. Țesutul vegetal înghețat pe azot lichid este omogenizat sau mojarat până la transformarea în pulbere fină și apoi este transferat într-un tub de microcentrifugă.

2. La soluția de extracție CTAB se adaugă 2-mercaptoetanol într-un volum adecvat astfel încât concentrația finală a acestuia să fie de 2%. Soluția proaspăt obținută este încălzită la 65⁰C. De asemenea se încălzește și soluția CTAB/NaCl.

3. Peste țesutul vegetal proaspăt pulverizat se adaugă tampon de extracție 2-ME/CTAB și soluție CTAB/NaCl. Amestecul se vortexează foarte puternic până la omogenizarea completă. Se incubează între 10 și 60 de minute la 65⁰C. Pentru obținerea unei cantități crescute de ADN este necesar un timp de 60 de minute. Pentru fiecare 100 mg de țesut vegetal proaspăt se adaugă câte 400 μl de tampon 2-ME/CTAB și câte 50 μl de soluție CTAB/NaCl. În cazul folosirii unor țesuturi deshidratate, liofilizate sau uscate (ex. semințe), tamponul de extracție 2-ME/CTAB trebuie diluat 1:1 cu apă ultrapură.

4. Se adaugă un volum egal de amestec cloroform: octanol sau cloroform: alcool izoamilic 24:1 și se vortexează puternic.

5. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 5 minute, la 4⁰C. Se recuperează faza apoasă superioară și se transferă într-un tub curat.

6. Se adaugă un volum de 1/10 soluție CTAB/NaCl din cantitatea totală recuperată peste faza apoasă. Se amestecă energic prin inversia tubului.

7. După adaugarea unui volum egal de amestec cloroform:octanol sau cloroform:alcool izoamilic 24:1 se vortexează puternic.

8. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 5 minute, la 4°C. Se recuperează faza apoasă superioară și se transferă într-un tub curat. Aceasta poate avea o culoare galben-maronie.

9. Se adaugă exact un volum de soluție de precipitare CTAB și se amestecă energic prin inversie. ADN precipitat trebuie să devină vizibil în soluție. Dacă acest lucru nu se observă se incubează amestecul 30 minute la 65°C.

10. Centrifugare la 2000-3000 rpm, 5 minute, la 4°C. Viteza de centrifugare nu trebuie crescută foarte mult deoarece sedimentul va fi foarte greu de resuspendat. Dacă sedimentul nu este vizibil se adaugă încă 1/10 soluție de precipitare CTAB din volumul total și se incubează între 1 și 12 ore, la 37°C. Ulterior se repetă etapa de centrifugare.

11. Supernatantul se reia într-un tub curat de microcentrifugă și este păstrat. Sedimentul este resuspendat în tampon salin TRIS-EDTA (se adaugă între 0,5 și 1 ml de tampon salin pentru fiecare gram de material vegetal supus extracției). Dacă sedimentul nu se resuspendă se trece la o incubare timp de 30 de minute la 65°C și se reia operația până la resuspendarea totală.

ATENȚIE: Este posibil ca ADN să se regăsească în supernatant. În acest caz etapele ulterioare se vor continua folosind supernatantul. Pentru a verifica prezența ADN în supernatant este recomandată citirea absorbției acestuia la 260 nm.

12. ADN este precipitat prin adăugarea unui volum egal de izopropanol rece. Se omogenizează bine conținutul prin agitarea tubului.

13. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 15 minute, la 4°C. Izopropanolul este îndepărtat prin înclinarea tubului.

14. Sedimentul obținut se spală cu 1 ml etanol 80%, 60 de minute prin agitare.

15. Centrifugare la 8000-11000 rpm, 15 minute, la 4°C. Etanolul este îndepărtat prin înclinarea tubului. Sedimentul se lasă la uscat timp de 15-20 minute, la 37°C, în curent de aer.

OPȚIONAL: Pentru o mai bună spălare a ADN și pentru îndepărtarea totală a CTAB se repetă etapele 14-15.

16. Sedimentul uscat este resuspendat într-un volum adecvat de apă ultrapură sau de tampon TRIS-EDTA.

II.3. Izolarea ADN din țesut animal cu fenol-cloroform (metoda Taggart)

Principiul metodei

Acest protocol descrie una dintre cele mai simple metode de extracție și purificare de ADN genomic.

Izolarea ADN se realizează având la bază un proces de extracție în trei etape. În prima etapă are loc liza celulelor și a nucleelor acestora într-o soluție conținând detergent și EDTA. Concomitent are loc clivarea enzimatică a proteinelor folosind proteinază K sau amestecuri de enzime proteolitice. Eliminarea ARN din extractul de acizi nucleici se realizează cu ajutorul unei soluții de ribonuclează.

În etapa următoare sunt precipitate proteinele folosind un amestec de solvenți organici (fenol/cloroform/alcool izoamilic), în timp ce ADN genomic este extras în soluție. Fenolul realizează o denaturare foarte eficientă a proteinelor, solubilizându-le ulterior în faza organică. De asemenea, cloroformul este un agent denaturant al proteinelor destul de eficient. Totodată el are și proprietatea de a stabili interfața instabilă dintre faza apoasă și cea fenolică, separate prin centrifugare. Amestecul fenol-cloroform are și rolul de a reduce cantitatea de soluție apoasă reținută la nivelul fazei organice, realizând astfel concentrare a ADN și deci o creștere a randamentului de extracție. Alcoolul izoamilic previne amestecarea celor două faze, organică și apoasă.

În ultima etapă, ADN este concentrat și desalifiat prin precipitare cu etanol absolut. În prezența unei concentrații relativ crescute de cationi monovalenți (între 0,1 și 0,5 M), etanolul induce o modificare conformațională a ADN, aceasta cauzând agregarea și precipitarea ADN din soluție. Precipitarea cu etanol absolut este extrem de eficientă

pentru concentrarea ADN și pentru eliminarea reziduurilor de fenol și cloroform din soluția apoasă deproteinizată.

În final, sedimentul de ADN este spălat cu etanol 70% pentru a înlătura total sărurile și moleculele organice mici iar apoi este resuspendat într-un volum adecvat de tampon sau apă.

Pasul de spălare cu etanol 70% se realizează datorită faptului că majoritatea sărurilor și unele molecule organice mici sunt solubile în această soluție.

Material biologic: probe biologice provenite din diferite țesuturi: ficat, mușchi, aripioară înotătoare, etc.

Reactivi și aparatură: i) EDTA 0,2 M; ii) N-lauroylsarcosinat de sodiu 5%; iii) pronază 20 mg/ml; iv) ribonuclează 2 mg/ml; v) fenol redistilat (pH 8); vi) amestec cloroform:alcool izoamilic 24:1; vii) etanol absolut și 70%; viii) apă ultrapură; ix) agitator; x) microcentrifugă; xi) termobloc.

***ATENȚIE:** Fenolul este toxic și poate cauza arsuri sau iritații în zonele de contact cu acesta.*

Mod de lucru

Ziua I

1. Într-un tub de microcentrifugă de 2 ml se adaugă 350 μ l EDTA (etilen diamin-tetraacetic acid, tetrasodic \times 2 H_2O) 0,2 M, 800 μ l N-lauroylsarcosinat de sodiu 0,5% și 25 μ l pronază sau proteinază K 20 mg/ml.

2. Se adaugă țesut în fiecare tub (50 mg aripioară înotătoare/ 20 mg ficat/ 100 mg țesut muscular).

3. După amestecarea ușoară, se incubează peste noapte, 15-16 ore, la 37°C.

Ziua II

1. Se adaugă 10 μ l de ribonuclează în fiecare tub, se amestecă și se incubează la 37°C timp de o oră.

2. În fiecare tub se adaugă 400 µl fenol redistilat (pH 8), se agită puternic aproximativ 20 secunde și mult mai ușor timp de 10 minute (prin inversia repetată a tubului sau prin vortexare la viteză mică).

3. Se adaugă 400 µl cloroform:alcool izoamilic (24:1) în fiecare tub. Se agită puternic timp de 20 secunde și mult mai ușor timp de 10 minute.

4. Se centrifughează tuburile la 13400 rpm timp de 3 minute.

5. Cu o pipetă automată, se îndepărtează, cu atenție, stratul apos superior și conținutul se transferă într-un tub nou.

6. **OPȚIONAL:** *Se repetă etapele 3, 4, 5 pe faza superioară nou transferată. Pentru a extrage ADN de calitate superioară și pentru a asigura o deproteinizare eficientă este recomandată repetarea, cel puțin o dată, a celor trei etape. În caz contrar, se va obține un ADN parțial impurificat cu proteine.*

7. După adăugarea a două volume de etanol 100% rece peste faza apoasă transferată în tub, se realizează amestecarea prin inversia rapidă a tubului de 5-6 ori.

8. Se centrifughează 3 minute la 13400 rpm și se îndepărtează etanolul prin inversia tubului.

9. Se adaugă 1 ml de etanol 70% și se spală pentru cel puțin o oră prin agitare ușoară, urmată de centrifugare 3 minute la 13400 rpm și îndepartarea etanolului 70% prin înclinarea tubului.

10. ADN se usucă la 37°C timp de 10-15 minute și se resuspendă în apă ultrapură. Se lasă cel puțin 24 de ore pentru solubilizarea completă la 4°C. Se stochează la 4°C, pe termen scurt, sau la -20°C, pe termen lung.

II.4. Izolarea ADN din suspensii de culturi celulare

Principiul metodei

Metoda descrisă în continuare este simplă și conduce la obținerea unei cantități relativ mari de ADN. Sedimentul de celule aflate în cultură este plasat într-o soluție care conține SDS și proteinază K și este incubat până când membranele celulare sunt lizate iar

proteinele sunt degradate. Soluția este tratată cu fenol/cloroform/alcool izoamilic în vederea deproteinizării, iar ADN este precipitat cu etanol. În final, ADN precipitat este spălat cu etanol, uscat și resuspendat în tampon specific sau în apă ultrapură.

Material biologic: diferite tipuri de celule animale în cultură.

Reactivi: i) tampon fosfat salin (PBS) 10X: 1,37 M NaCl, 27 Mm KCl, 43 Mm Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 14 mM KH₂PO₄. Se prepară sub forma unei soluții 10X și se diluează înainte de folosire. Soluția diluată are un pH de aproximativ 7,3. Se stochează la temperatura camerei pe termen nelimitat; ii) tampon de digestie: 100 Mm NaCl, 10 Mm TRIS-HCl (Ph 8), 25 Mm EDTA (pH 8), 0,5% SDS, 0,1 mg/ml proteinază K. Reactivul se poate stoca la temperatura camerei. Proteinaza K este instabilă la temperaturi ridicate și trebuie adăugată proaspătă înainte de fiecare folosire; iii) ribonuclează 2 mg/ml; iv) amestec fenol: cloroform:alcool izoamilic 25:24:1; v) acetat de amoniu 7,5 M; vi) etanol 100% și 70%; vii) apă ultrapură; viii) agitator; ix) microcentrifugă; x) termobloc.

Mod de lucru

1. Flascurile cu celule în cultură sunt tratate cu tripsină iar conținutul este reluat în tuburi de centrifugă de 15 sau 50 ml care sunt centrifugate 5 minute la 800 rpm și 4⁰C.

2. Supernatantul se aruncă și sedimentul se resuspendă într-un volum de 1 până la 10 ml de PBS rece.

3. Se repetă etapele de centrifugare-resuspendare de două-trei ori, până când sedimentul de celule este bine spălat.

4. Sedimentul de celule se resuspendă într-un volum adecvat de tampon de digestie. Acest volum poate varia între 300 și 1000 μl, în funcție de cantitatea de celule.

5. Celulele sunt incubate în tamponul de digestie timp de 12-16 ore, la 50⁰C, cu agitare ușoară.

6. Se adaugă 10 μl de ribonuclează și se lasă la incubat o oră la 37⁰C, după care se adaugă un volum egal de amestec fenol/cloroform/alcool izoamilic și se vortexează puternic circa 20-30 de secunde.

7. Centrifugare la 10000 rpm timp de 4 minute. Dacă după centrifugare se observă un strat subțire de material alb la interfața dintre faza apoasă superioară și cea organică inferioară se va repeta etapa 6.

8. Faza apoasă este transferată într-un tub nou, evitându-se impurificarea acesteia cu fază inferioară. Se adaugă ½ volum acetat de amoniu și 2 volume de etanol absolut și se agită prin inversia tubului. ADN trebuie să înceapă imediat să precipite din soluție.

9. Centrifugare 3 minute la 10000 rpm. Supernatantul este aruncat prin înclinarea tubului, iar sedimentul este spălat cu etanol 70% timp de 30-40 minute, cu agitare ușoară.

10. Centrifugare 3 minute la 10000 rpm. Supernatantul este decantat prin înclinarea tubului. Sedimentul este uscat la 37°C timp de 15-20 de minute.

11. ADN se resuspendă în apă ultrapură. Se lasă cel puțin 24 de ore pentru dizolvare completă la 4°C. Se stochează la 4°C, pe termen scurt și la -20°C, pe termen lung.

II.5. Izolarea ADN genomic din sânge

Principiul metodei

Protocolul de față asigură izolarea ADN genomic din sânge în două etape. În prima etapă se face o izolare a limfocitelor din probele proaspete de sânge. În a doua etapă se realizează practic izolarea ADN din limfocite. Deproteinizarea se face folosind o soluție salină saturată iar ADN este precipitat cu etanol.

Etapa I: Izolarea limfocitelor

Material biologic: probe proaspete de sânge recoltate în recipiente speciale vidate având drept anticoagulant EDTA, heparină sau citrat de sodiu.

Reactivi și aparatură: i) tampon clorură de amoniu: clorură de amoniu 140 mM, TRIS 17 mM (pH 7,5); ii) tampon fosfat salin (PBS) 10X: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 14 mM KH₂PO₄. Se prepară sub forma unei soluții concentrate

10X și se diluează înainte de folosire. Soluția diluată are un pH de aproximativ 7,3 și se stochează la temperatura camerei pe termen nelimitat; iii) microcentrifugă; iv) agitator.

Mod de lucru

1. Într-un tub de centrifugă de 50 ml se amestecă 10 ml sânge cu 40 ml tampon clorură de amoniu.

2. Amestecul se plasează pe gheață timp de între 30 de minute și o oră, până când soluția devine închisă la culoare. Se centrifughează 10 minute, la 800 rpm și la temperatura camerei.

3. Se îndepărtează supernatantul și sedimentul se usucă pe hârtie de filtru. Se spală prin agitare cu 20 ml PBS.

4. Centrifugare 10 minute la 700 rpm și la temperatura camerei. Se îndepărtează supernatantul și sedimentul se usucă pe hârtie de filtru. Se spală prin agitare cu 5 ml PBS.

5. Centrifugare 10 minute, la 700 rpm și la temperatura camerei.

6. Se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul de limfocite este folosit imediat la extracția ADN.

7. **OPȚIONAL:** Dacă dorim să realizăm extracția în altă zi limfocitele trebuie păstrate la -20°C . Sedimentul este resuspendat într-un volum de 1 ml PBS și limfocitele se transferă într-un tub nou de centrifugă de 2 ml. Se realizează o a doua spălare cu 1 ml PBS a tubului în care s-a realizat izolarea și conținutul se transferă în același tub.

8. Centrifugare 10 minute la 700 rpm. Supernatantul este îndepărtat și sedimentul se stochează la -20°C .

Etapa II: Extracția ADN

Material biologic: sediment de limfocite proaspăt sau înghețat.

Reactivi și aparatură: i) tampon de liză: 10 mM TRIS-HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8), 0,5% SDS. Reactivul se poate stoca la temperatura camerei; ii) soluție salină saturată: NaCl 18%; iii) proteinază K 10 mg/ml; iv) tampon de resuspendare TRIS-EDTA (pH 8): 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA; v) ribonuclează 2 mg/ml; vi) apă ultrapură; vii) etanol 100% și 70%; viii) microcentrifugă; ix) agitator.

Mod de lucru

1. Peste sedimentul de limfocite proaspăt sau înghețat se adaugă 1 ml PBS și se vortexează până se aduc toate celulele în suspensie.
2. Se adaugă 10 ml tampon de liză și 100 μl proteinază K. Se amestecă ușor.
3. Amestecul este incubat o oră la 65°C sau peste noapte la 37°C. Pentru un randament mai bun al extracției și pentru o mai bună calitate a ADN extras este de preferat incubarea peste noapte a amestecului.
4. Se adaugă 10 μl soluție ribonuclează, se amestecă prin inversia tubului și se incubează o oră la 37°C.
5. Se adaugă 4,3 ml soluție salină saturată și se amestecă puternic 30 de secunde.
6. Centrifugare 10 minute, la 5000 rpm și 4°C. Supernatantul se transferă într-un tub nou de 50 ml.
7. Peste supernatant se adaugă încet, pe pereți și prin rotirea constantă a tubului, 30 ml de etanol absolut. Se amestecă ușor, prin inversia tubului până când ADN precipită.
8. Se centrifughează 3 minute la 10000 rpm. Supernatantul se înlătură prin înclinarea tubului, iar sedimentul este spălat cu etanol 70%, 30-40 minute, cu agitare ușoară.
9. Centrifugare 3 minute la 10000 rpm. Supernatantul este înlăturat prin înclinarea tubului. Sedimentul este uscat la 37°C timp de 15-20 de minute.
10. ADN se resuspendă în 2 ml tampon TE. Se lasă cel puțin 24 de ore pentru dizolvare completă la 4°C. Se stochează la 4°C pe termen scurt și la -20°C pe termen lung.

II.6. Izolarea ADN din material seminal

Principiul metodei

Izolarea ADN genomic din material seminal se realizează printr-un proces de extracție salină. În prima etapă are loc liza celulelor seminale într-un tampon de liză, urmată de precipitarea proteinelor cu o soluție de NaCl 6M. ADN genomic cu masă

moleculară mare rămâne în soluție fiind apoi concentrat și desalifiat prin precipitare cu izopropanol.

Material biologic: paiete cu material seminal proaspete sau crioconservate.

Reactivi și aparatură: i) soluție de precipitare a proteinelor: NaCl 6 M; ii) tampon de liză: 10 mM EDTA (pH 8), 1% Sodium dodecil sulfat (SDS) și 100 mM NaCl; iii) soluție ditiotreitol (DTT) 500 mM; iv) soluție proteinază K 20 mg/ml; v) ser fiziologic: NaCl 0,9%; vi) izopropanol 100%; vii) etanol 70%; viii) apă ultrapură; ix) agitator; x) microcentrifugă; xi) termobloc.

Mod de lucru

Ziua I

1. Conținutul unei paiete de material seminal (aproximativ 25 μl) este introdus într-un tub de microcentrifugă steril de 1,5 ml, peste care se adăugă 0,5 ml ser fiziologic.
2. Se omogenizează probele după care se centrifughează 3 minute la 6500 rpm.
3. Supernatantul este îndepărtat iar sedimentul de celule seminale este resuspendat din nou cu 1 ml de ser fiziologic.
4. Se centrifughează probele 3 minute la 6500 rpm și se îndepărtează supernatantul.
5. Peste sedimentul de celule seminale se adăugă 450 μl tampon de liză după care acesta este resuspendat în supernatant prin aspirare ușoară cu ajutorul unei micropipete.
6. Se adaugă 50 μl DTT, se omogenizează și apoi se adaugă 10 μl proteinază K.
7. Probele se omogenizează printr-o inversie ușoară după care se incubează 12-14 ore la 60°C.

Ziua II

1. Se adaugă 160 μl NaCl și se amestecă viguros timp de 1-2 minute prin vortexare. La sfârșit vor apărea vizibile agregatele de resturi proteice.

2. Centrifugare 10 minute la 13000 rpm. Supernatantul se transferă în alt tub de microcentrifugă conținând 500 μ l izopropanol 100% la temperatura camerei și se agită ușor prin inversarea tubului până la precipitarea ADN din soluție.

3. Centrifugare 1 minut la 13000 rpm. Se îndepărtează supernatantul prin inversia tubului și se adaugă 500 μ l etanol 70% la temperatura camerei. Se inversează ușor tubul timp de câteva minute pentru a spăla sedimentul de ADN și se centrifugează 1 minut la 13000 rpm.

4. Etanolul se înlătură complet prin inversia tubului pe o hârtie de filtru. Se usucă precipitatul, 15 - 20 minute, la 37°C.

5. Precipitatul de ADN se rehidratează într-un volum adecvat de apă ultrapură. ADN astfel obținut se păstrează la 4°C pe termen scurt sau la -20 °C pe termen mai lung.

II.7. Izolarea ADN din țesuturi împarafinate

Principiul metodei

Țesuturile împarafinate sunt folosite la ora actuală în multe metode de diagnostic și de analiză a bolilor. Ca atare apare necesitatea dezvoltării unor tehnici de extracție a ADN din aceste tipuri de probe. Principalul impediment care apare în acest caz este eliminarea totală a urmelor de parafină de la nivelul secțiunilor, aceasta putând bloca procedeele de extracție a ADN. În cazul tehnicii prezentate mai jos se va realiza o deparafinare cu xilen a probelor, urmată de o extracție a ADN prin metoda clasică care utilizează fenol/cloroform. Precipitarea materialului genetic se face utilizând izopropanol.

Material biologic: secțiuni împarafinate.

Reactivi și aparatură: i) tampon de liză: proteinază K 20 mg/ml, 50 μ l, soluție Tris-HCl 1 M, 10 μ l, EDTA 0,5 M 2 μ l, SDS 10%, 100 μ l, apă distilată 838 ml; ii) amestec fenol/ cloroform/ izopropanol 25:24:1; iii) acetat de sodiu 3 M; iv) apă ultrapură; v) xilen; vi) etanol absolut și etanol 75%; vii) izopropanol; viii) agitator; ix) microcentrifugă; x) termobloc.

Mod de lucru

1. La început se realizează deparafinarea țesuturilor. Pentru aceasta, într-un tub de 2 ml conținând câteva secțiuni împarafinate, se adaugă 1 ml de xilen și se lasă 30 minute la 37°C.

2. Se înlătura xilenul și se adaugă din nou 1 ml peste țesuturile împarafinate. Se incubează 30 minute la 37°C. Etapa poate fi repetată încă de o dată pentru asigurarea unei bune deparafinări.

3. Se înlătura xilenul și se fac alte două spălari de câte 30 de minute folosind etanol absolut. Etanolul absolut este îndepărtat și se fac alte două spălari de câte 30 de minute folosind etanol 75%.

4. Etanolul 75% este înlăturat și se fac alte două spălari de câte 15 minute folosind tampon fosfat salin.

5. Se adaugă 500 μl de tampon de liză și se incubează la 52°C peste noapte. Liza trebuie să se desfășoare până când secțiunile deparafinate sunt total dizolvate în tampon.

6. Se adaugă 500 μl amestec cloroform/alcool izoamilic/izopropanol. Se agită puternic și se centrifughează 10 minute la 12000 g.

7. Supernatantul este transferat într-un tub nou de centrifugă. Peste acesta se adaugă un volum egal de cloroform. Se agită puternic și se centrifughează 5 minute la 12000 g.

8. Faza apoasă superioară este transferată cu atenție în alt tub de centrifugă. Peste acesta se adaugă 1/10 volume de acetat de sodiu 3 M. Se agită puternic.

9. Se adaugă 1 volum de izopropanol, se agită și se incubează la -20°C peste noapte.

10. Centrifugare 4 minute, la 4°C și 12000 g. Supernatantul se aruncă, iar precipitatul este spălat cu 1 ml de etanol 75% prin agitare ușoară.

11. Centrifugare 4 minute la 12000 g. Etanolul este îndepărtat prin înclinarea tubului și sedimentul ADN este uscat prin centrifugare la vid 3 minute sau prin plasare la 37°C timp de 15 minute.

12. ADN se resuspendă în apă ultrapură iar apoi se lasă cel puțin 24 de ore pentru solubilizarea completă la 4°C. Se stochează la 4°C, pe termen scurt, sau la -20°C, pe termen lung.

II.8. Izolarea ADN din plasmă sau ser

Principiul metodei

La indivizii normali, cantitățile de ADN din astfel de probe sunt foarte scăzute dar suficiente pentru a servi drept matrice la o reacție de amplificare în lanț (**PCR – Polimerase Chain Reaction**). De asemenea, o cantitate sporită de ADN în ser sau plasmă este întâlnită în cazul unor afecțiuni precum cancerul, bolile autoimune sau infecțioase. Protocolul următor reprezintă o metodă simplă și eficientă de izolarea ADN din astfel de probe.

Material biologic: plasmă sau ser.

Reactivi și aparatură: i) tampon de liză 10X: SDS 10%, proteinază K 0,5%. Se prepară sub formă concentrată și se diluează înainte de folosire; ii) tampon Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8; iii) amestec fenol/cloroform 1:1; iv) glicogen 10 mg/l; v) acetat de amoniu 7,5 M; vi) etanol absolut și etanol 70%; vii) agitator; viii) microcentrifugă; ix) termobloc.

Mod de lucru

1. Într-un tub de centrifugă de 15 ml se adaugă 1,5 ml ser sau plasmă, 1,5 ml tampon de liză 1X și se agită energic. Se lasă la incubat peste noapte la 55°C.

2. Peste amestecul incubat se adaugă 3 ml de amestec fenol/cloroform. Se agită puternic timp de 30 de secunde și se centrifughează 10 minute la 1000 g folosind rotor „swing-out”.

3. Faza superioară apoasă se transferă într-un tub centrifugă și se repetă etapa 2.

4. Faza superioară apoasă este transferată într-un tub nou și peste aceasta se adaugă 5 μl glicogen, 1 ml soluție acetat de amoniu și 8 ml de etanol absolut. Se amestecă prin inversarea tubului de mai multe ori și se centrifughează 40 de minute la 2500 g.

5. Supernatantul este îndepărtat prin înclinarea tubului iar sedimentul este spălat în 10 ml de etanol 70% prin agitare ușoară.

6. Se centrifughează 10 minute la 2500 g. Se îndepărtează etanolul prin înclinarea tubului. Sedimentul se usucă în curent de aer sau prin incubare 15 minute la 37°C.

9. Sedimentul uscat este reluat într-un volum adecvat de tampon TE sau de apă ultrapură.

II.9. Izolarea ADN de la nivelul celulelor somatice din lapte

Principiul metodei

Laptele poate reprezenta un material biologic bun pentru izolarea de material genetic. Astfel, în lapte se găsesc mai multe tipuri de celule somatice reprezentate în principal de celule epiteliale, limfocite, macrofage și polimorfonucleare. Aceste celule pot servi drept sursă pentru extracția ADN.

Protocolul dezvoltat de d'Angelo *et al.* (2007) necesită în prealabil realizarea unei degresări a laptelui prin centrifugare. Ulterior are loc o liză a celulelor somatice, o deproteinizare, iar precipitarea ADN se realizează utilizând izopropanolul. Metoda poate fi folosită cu succes în locul extracției ADN din sânge deoarece laptele poate fi procurat mult mai ușor, prin metode neinvazive.

Material biologic: probe de lapte.

Reactivi: i) tampon fosfat salin (PBS) 10X: 1,37 M NaCl, 27 Mm KCl, 43 Mm Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 14 Mm KH₂PO₄. Se prepară sub forma unei soluții 10X și se diluează înainte de folosire. Soluția diluată are un pH de aproximativ 7,3. Se stochează la temperatura camerei pe termen nelimitat; ii) tampon de liză: 0,32 M sucroză; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1% Triton X-100; iii) SDS 10%; iv) proteinază K 10 mg/ml;

v) tampon de extracție: 10 mM Tris-HCl, pH 8 și 2 mM EDTA; vi) tampon Tris-EDTA (TE): Tris 10 mM, 1 mM EDTA, pH 7,5; vii) NaCl 5 M; viii) izopropanol; ix) apă ultrapură; x) microcentrifugă; xi) agitator; xii) termobloc.

Mod de lucru

1. O cantitate de 40 ml de lapte este centrifugată timp de 30 de minute la 2000 g și 4°C. Ulterior, stratul superior de grăsime și supernatantul sunt îndepărtate.

2. Sedimentul este resuspendat în 1 ml tampon fosfat salin și apoi centrifugat 10 minute la 400 g și 4°C.

3. Sedimentul este resuspendat în 49 ml de tampon de liză, este agitat puternic și apoi este centrifugat la 2500 g, timp de 10 minute, la 4°C.

4. Supernatantul este îndepărtat prin înclinarea tubului iar sedimentul este resuspendat în soluție de spălare. Se agită ușor și se centrifughează la 2500 g, timp de 10 minute, la 4°C. Etapa de spălare poate fi repetată.

5. Sedimentul spălat este resuspendat în 3 ml tampon de extracție la care se adaugă 100 μl de SDS 10% și 40 μl de proteinază K. Amestecul este incubat o oră la 65°C.

6. Se adaugă 500 μl soluție clorură de sodiu și se agită energic timp de 20-30 de secunde. Se centrifughează 10 minute la 3500 g.

7. Supernatantul este transferat într-un tub nou de centrifugă și peste acesta se adaugă 6 ml de izopropanol rece. Se agită tubul prin înclinare pentru a precipita ADN.

8. Centrifugare la 3500 g, 10 minute. Supernatantul este îndepărtat, iar sedimentul ADN este resuspendat într-un volum adecvat de tampon TE sau apă ultrapură.

I.10. Izolarea ARN total cu guanidin-tiocianat (metoda Chomczynski)

Principiul metodei

Celulele în cultură sau fragmentele de țesut sunt bine omogenizate într-o soluție denaturantă care conține guanidin-tiocianat. Acesta este unul dintre cei mai eficienți agenți denaturanți ai proteinelor. Omogenatul este ulterior amestecat în mai multe etape cu soluții de acetat de sodiu, fenol și cloroform/ alcool izoamilic. În urma centrifugării, în

faza superioară apoasă separată, se va regăsi ARN total, iar în faza inferioară, organică, se vor găsi proteinele și ADN. ARN astfel separat va fi precipitat cu izopropanol și ulterior, spălat cu etanol 75%.

La baza metodei stă proprietatea ARN de a rămâne solubilizat într-o soluție apoasă care conține guanidin-tiocianat și amestec de fenol/ cloroform/ alcool izoamilic, în jurul valorii de pH 4,0. În aceleași condiții proteinele și fragmentele mici de ADN (cu mărimi între 50 pb și 10 Kpb) trec în faza organică, iar fragmentele mai mari de ADN se regăsesc la interfața celor două faze.

Se recomandă ca extracția ARN prin această metodă să se realizeze din țesuturi și celule proaspete. Dacă acest lucru nu este posibil apare necesitatea crioconservării în azot lichid imediat după prelevare. Toate soluțiile sunt preparate cu apă tratată cu DEPC (dietil-pirocarbonat), inhibitor specific al ribonucleazelor. De asemenea, recipientele de lucru sunt spălate cu același tip de apă.

Material biologic: probe din diferite tipuri de țesuturi, celule animale în cultură.

Reactivi și aparatură: i) soluție denaturantă: Guanidin-tiocianat 4 M, Citrat de sodiu 25 mM, 0,5% N-lauroilsarcozină, 2-mercaptoetanol 0,1 M. Pentru prepararea soluției stoc se amestecă 293 ml de apă cu 17,6 ml soluție citrat de sodiu 0,75 M (pH 7) și cu 26,4 ml soluție N-lauroilsarcozină 10%. Se adaugă apoi 250 g guanidin-tiocianat și se încălzește sub agitare continuă la 65⁰C, pentru dizolvare. Soluția se poate stoca timp de maxim 3 luni la temperatura camerei. Soluția de lucru se prepară prin adăugarea a 0,35 ml 2-mercaptoetanol la 50 ml de soluție stoc. Se poate stoca maxim o lună la temperatura camerei; ii) izopropanol 100%; iii) etanol 75% (preparat cu apă tratată cu DEPC); iii) soluție acetat de sodiu 2 M (pH 4). Se adaugă 16,42 g acetat de sodiu anhidru în 40 ml apă și apoi se mai adaugă 35 ml acid acetic glacial. Se aduce la pH 4 cu acid acetic glacial, iar apoi se completează la 100 ml cu apă; iv) soluție de fenol saturată în apă: se dizolvă 100 g fenol în 100 ml apă la 65⁰C. La final se înlătură faza apoasă superioară. Se poate stoca la 4⁰C și întuneric timp de o lună; v) amestec cloroform/ alcool izoamilic 49:1 (v/v); vi) apă tratată cu DEPC: se adaugă 0,2 ml DEPC la 100 ml apă. Se amestecă

puternic câteva minute, iar soluția obținută se autoclavează pentru a inactiva eventualele urme de DEPC; vii) minicentrifugă; viii) agitator; ix) termobloc.

ATENȚIE: Fenolul este toxic și cauzează arsuri sau iritații în zonele de contact.

Mod de lucru

1a. Pentru țesuturi: se adaugă 500 μl de soluție de denaturare la 50 mg de țesut și se omogenizează energetic.

1b. Pentru culturi de celule: se centrifughează suspensia celulară și se înlătură supernatantul. Se adaugă 500 μl de soluție de denaturare la 10^4 celule și se agită aproximativ 10 minute cu pipeta automată prin aspersie-dispersie.

2. Omogenatul se transferă într-un tub steril de 2 ml. Se adaugă 50 μl de soluție de acetat de sodiu și 500 μl fenol și se vortexează puternic timp de 20-30 de secunde.

3. Se adaugă 100 μl de amestec cloroform/ alcool izoamilic și se vortexează puternic timp de 20-30 de secunde. Tuburile se incubează 15 minute pe gheață.

5. Centrifugare 20 minute la 10000 g și 4°C . Faza apoasă superioară se transferă într-un tub nou.

6. Se realizează precipitarea ARN adăugând un volum egal de izopropanol 100%. Tuburile se incubează 30 de minute la -20°C .

7. Centrifugare 10 minute la 10000 g și 4°C . Supernatantul este înlăturat. Sedimentul este resuspendat și dizolvat în 200 μl de soluție de denaturare și este transferat într-un tub nou.

8. Se realizează precipitarea ARN adăugând 300 μl izopropanol 100%. Tuburile se incubează 30 de minute la -20°C .

10. Centrifugare 10 minute la 10000 g și 4°C . Supernatantul este înlăturat. Sedimentul ARN este resuspendat în 900 μl etanol 75%, vortexat și incubat 10 - 15 minute la temperatura camerei.

11. Centrifugare 5 minute la 10000 g și 4°C . Supernatantul este înlăturat. Sedimentul ARN este uscat la 37°C , 10 - 15 minute. Acesta nu trebuie uscat total deoarece aceasta va duce la scăderea solubilității ARN.

12. Sedimentul ARN este solubilizat în 100-200 µl apă tratată cu DEPC. Se incubează 10-15 minute la 55⁰C. ARN astfel obținut este păstrat la -80⁰C.

I.11. Izolarea ARN din sânge

Principiul metodei

Tehnica se bazează pe extracția ARN după metoda adaptată de Chomczynski și Sacchi în 1987. La baza metodei stă proprietatea ARN de a rămâne solubilizat într-o soluție apoasă care conține guanidin-tiocianat și amestec de fenol/ cloroform/ alcool izoamilic, la pH acid. În aceleași condiții proteinele și fragmentele mici de ADN trec în faza organică, iar fragmentele mai mari de ADN se regăsesc la interfața celor două faze.

În cadrul metodei este recomandată folosirea sângelui proaspăt, recoltat pe anticoagulant. De asemenea, este necesară tratarea tuturor soluțiilor de lucru și a recipientelor cu apă care conține DEPC (dietil-pirocarbonat).

Material biologic: probe proaspete de sânge recoltate pe anticoagulant.

Reactivi și aparatură: i) tampon de liză al eritrocitelor: sucroză 1,6 M, Triton X-100 5%, MgCl₂ 25 mM, Tris-HCl 60 mM (pH 7,5). Se păstrează la 4°C și se utilizează rece; ii) tampon de extracție: guanidin tiocianat 5,25 M, Tris-HCl 50 mM (pH 6,4), EDTA 20 mM, Triton X-100 1%, 2-mercaptoetanol 0,1% (se adaugă *extemporaneum*); iii) acetat de sodiu 2 M (pH 4); iv) fenol (saturat cu soluție Tris-HCl 1 M, EDTA 0,1 M), pH 8; v) amestec cloroform/ alcool izoamilic 24:1; vi) izopropanol; vii) etanol 70%; viii) apă ultrapură; viii) microcentrifugă; viii) agitator; ix) termobloc.

Mod de lucru

1. Într-un tub de microcentrifugă se amestecă 100 µl de sânge cu 1 ml de tampon de liză al eritrocitelor. Se lasă la temperatura camerei timp de 5-10 minute, cu agitare ocazională, până când eritrocitele sunt lizate în totalitate.

2. Centrifugare 45 de secunde la 13000 rpm. Se înlătură supernatantul prin înclinarea tubului. Sedimentul de celule este reluat prin agitare în lichidul rezidual rămas în tub.

3. Se adaugă 200 μ l tampon de extracție peste celulele resuspendate și se amestecă cu vârful pipetei. Peste celulele resuspendate se adaugă 20 μ l acetat de sodiu 2 M și se agită ușor.

4. Se adaugă 220 μ l fenol și se agită ușor prin inversie. Peste amestec se adaugă 60 μ l de amestec cloroform/ alcool izoamilic și se agită puternic timp de 20-30 de secunde. Tuburile se plasează pe gheață 15 minute.

5. Centrifugare 5 minute la 13000 rpm. Faza superioară apoasă se transferă într-un tub nou de microcentrifugă. Se adaugă 200 μ l de izopropanol rece, se agită puternic și se lasă 30 de minute la -20°C .

6. Centrifugare 15 minute la 13000 rpm. Supernatantul este înlăturat, iar sedimentul este resuspendat în 200 μ l tampon de extracție.

7. Se spală sedimentul cu 400 μ l de etanol 70% rece. Centrifugare 5 minute la 13000 rpm. Supernatantul se aruncă prin înclinarea ușoară a tubului.

8. Sedimentul se usucă în curent de aer și se resuspendă într-un volum adecvat de apă ultrapură. Soluția este incubată 15 minute la 50°C pentru solubilizarea ARN și apoi este stocată la -80°C , evitându-se ciclurile de îngheț-dezgeț.

CAPITOLUL III

METODE DE ANALIZĂ ALE BAZELOR AZOTATE ȘI ACIZILOR NUCLEICI

III.1. Spectrele de absorbție ale bazelor azotate

Principiul metodei

Bazele purinice și pirimidinice, nucleozidele și nucleotidele corespunzătoare pot fi ușor detectate datorită absorbției lor în UV. Bazele purinice și derivații lor nucleozidici și nucleotidici au o absorbție mai mare decât pirimidinele și derivații lor.

Spectrul de absorbție în UV pentru fiecare bază azotată sau nucleotid depinde de pH. La pH 7, lungimea de undă la care se înregistrează maximum de absorbție pentru bazele azotate se situează în jurul valorii de 260 nm.

Reactivi și aparatură: i) Soluții de baze azotate 10 $\mu\text{g/ml}$; ii) spectrofotometru UV-VIS.

Mod de lucru: se realizează spectrul de absorbție pentru toate soluțiile de baze azotate în intervalul 200–400 nm.

Rezultate și discuții

În urma realizării spectrelor se vor observa maximele de absorbție pentru fiecare soluție de bază azotată în parte. Valorile acestor maxime pot varia între anumite limite în funcție de pH.

În figurile 7 și 8 sunt prezentate spectrele de absorbție cele patru baze azotate întâlnite în structura ADN, la pH 6. Se pot observa maximele de absorbție cuprinse în intervalul 260 - 270 nm.

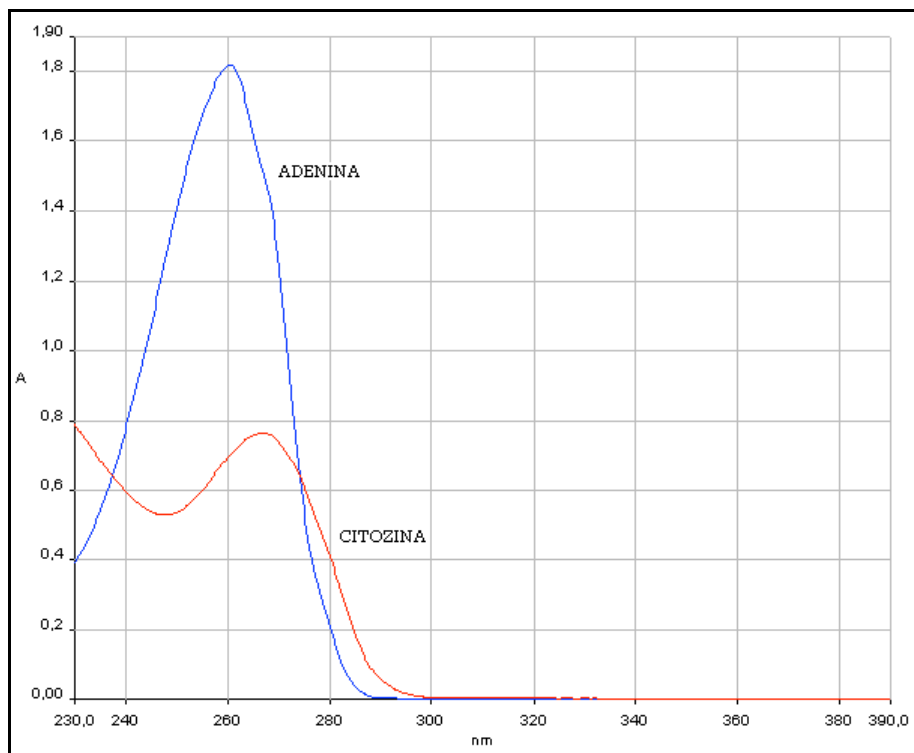


Figura 7: Spectrele de absorbție ale unor soluții de citozină și adenină la pH 6.

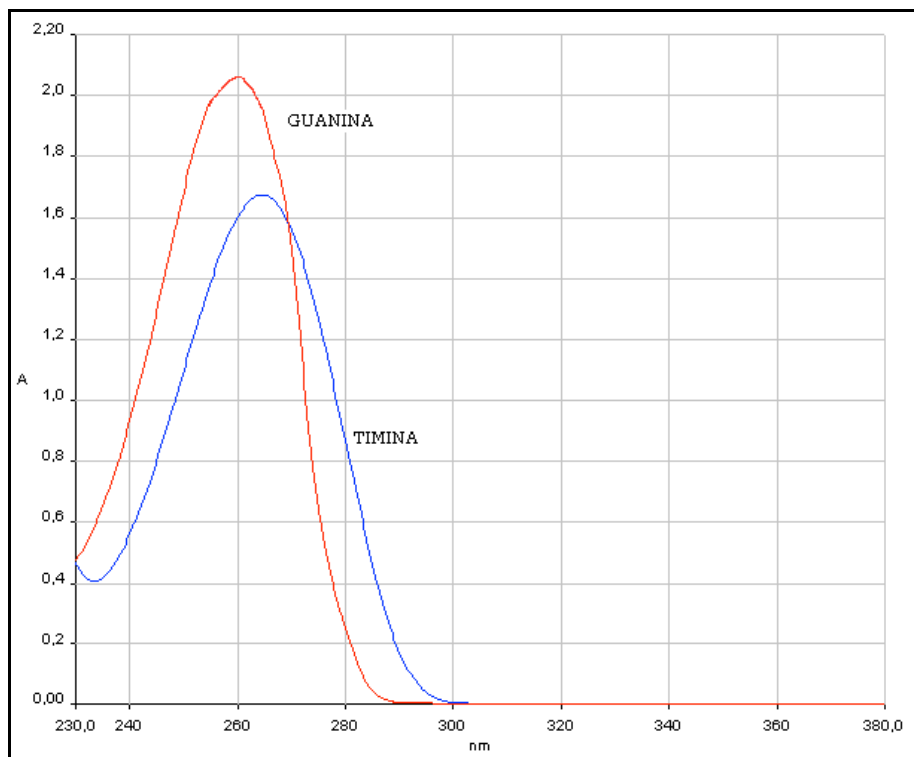


Figura 8: Spectrele de absorbție ale unor soluții de guanină și timină la pH 6.

III.2. Spectrul de absorbție al ADN. Determinarea spectrofotometrică a purității și concentrației ADN.

Principiul metodei

ADN extras din diferite surse biologice trebuie verificat pentru estimarea purității și integrității înainte de a fi utilizat în diferite manipulări moleculare.

Aprecierea gradului de puritate al unui extract ADN se realizează prin evaluarea valorii absorbanței la diferite lungimi de undă (260 și 280 nm), la un spectrofotometru UV, în cuve de cuarț cu drum optic cunoscut.

Folosirea acestor cuve este absolut necesară deoarece cuarțul permite trecerea radiațiilor luminoase din spectrul UV.

În paralel, se recomandă și determinarea întregului spectru de absorbție al probei în domeniul 200 - 400 nm, pentru a evidenția prezența altor maxime la lungimi de undă diferite de cele de interes, care pot aparține eventualilor contaminanți.

Verificarea purității ADN se realizează spectrofotometric pe baza următoarelor considerente:

- i) moleculele de ADN mono- sau dublucatenar prezintă absorbantă maximă la lungimi de undă cuprinse între 257 și 260 nm;
- ii) proteinele care pot impurifica extractul au absorbanta maximă la 280 nm;
- iii) glucidele rămase eventual în extract au absorbanta maxima la la 230 nm;
- iv) oligonucleotidele rezultate din fragmentarea ADN în timpul extracției prezintă absorbanta maximă la 220 nm.

Determinarea concentrației ADN dintr-un extract se bazează pe citirea absorbanței la 260 nm și pe folosirea următoarelor formule:

$A_{260} = 1$ corespunde la 50 μg ADN dc/ml;

$A_{260} = 1$ corespunde la 33 μg ADN mc/ml.

Reactivi și aparatură: i) soluție de ADN de concentrație necunoscută; ii) spectrofotometru UV-VIS.

Mod de lucru

Se determină spectrul de absorbție pentru soluția de ADN în intervalul 200–400 nm și se identifică maximul de absorbție. Se citesc absorbanțele soluției de ADN la 260, 230 și 280 nm și se calculează valorile rapoartelor A_{260}/A_{280} și A_{260}/A_{230} pentru a determina gradul de puritate al soluției. Cu ajutorul valorii de absorbanță la 260 nm se calculează concentrația soluției de ADN folosind formulele de mai sus.

Rezultate și discuții

În figura 9 este prezentat spectrul de absorbție al unei soluții de ADN cu identificarea maximului la 260nm. Eventualele maxime de absorbție pot fi datorate potențialilor contaminanți din soluția de ADN.

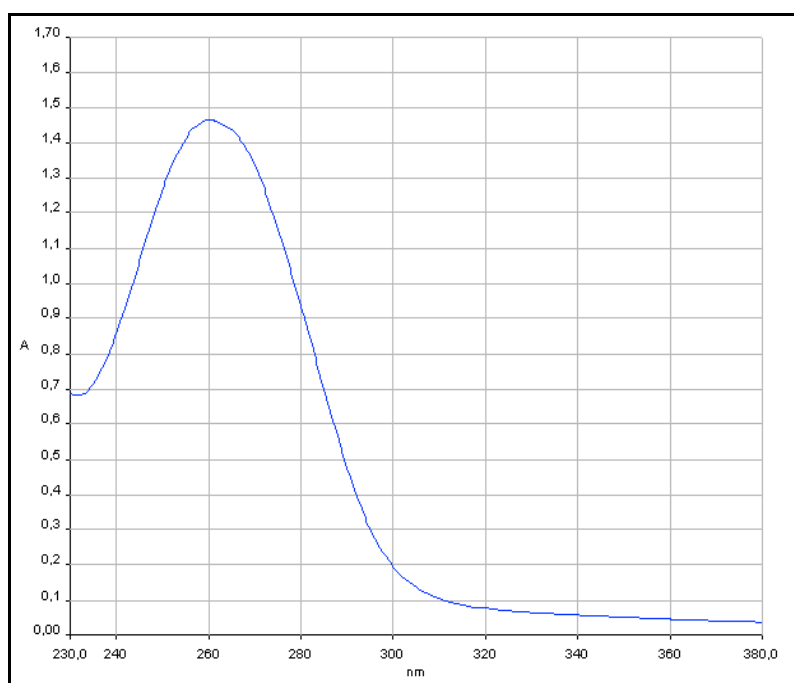


Figura 9: Spectrul de absorbție al unei soluții de acid deoxiribonucleic.

În funcție de valorile A_{260} și A_{280} se poate stabili gradul de contaminare proteică sau cu ARN a extractului ADN. Raportul optim A_{260}/A_{280} este cuprins între 1,8 și 2. Un raport mai mic de 1,8 ne indică prezența proteinelor în timp ce un raport mai mare de 2 este un indiciu al contaminării cu ARN.

Raportul A_{260}/A_{230} oferă informații asupra gradului de contaminare cu polizaharide a extractului ADN. Valoarea normală a acestuia este 2. Un raport mai mic indică o contaminare cu polizaharide.

III.3. Efectele hipocromic și hipercromic ale ADN

Principiul metodei

Absorbanța unei soluții de ADN la 260 nm reprezintă mai puțin de 40% din valoarea obținută prin însumarea absorbanțelor tuturor bazelor azotate componente, datorită intervenției forțelor de stivuire care contribuie la mascarea acestora în structura macromoleculii de ADN. Fenomenul poartă numele de efect hipocromic al ADN. Prin încălzirea și/sau denaturarea moleculei de ADN se observă apariția efectului hipercromic. Efectul se concretizează prin creșterea absorbanței și este cauzat atât de ruperea legăturilor de hidrogen, cât și de dispariția forțelor de stivuire din structura macromoleculii.

Reactivi și aparatură: i) soluție de ADN 50 $\mu\text{g/ml}$; ii) spectrofotometru UV-VIS.

Mod de lucru

Se măsoară absorbanța soluției de ADN la 260 nm, la temperatura camerei. Se încălzește soluția de ADN la fierbere timp de 5 minute și se plasează apoi direct pe gheață. După 5-10 minute se citește absorbanța.

III.4. Verificarea integrității ADN prin electroforeză în gel de agaroză

Principiul metodei

Electroforeza în gel de agaroză constituie o metodă standard pentru separarea, purificarea și identificarea moleculelor de ADN, inclusiv din amestecuri de unde acestea nu pot fi separate adecvat prin alte tehnici.

Pentru verificarea integritatii ADN genomic, precum și pentru estimarea gradului de contaminare cu ARN, extractul este supus unei electroforeze în gel de agaroză, în sistem submers pe placă orizontală. La pH alcalin sau neutru, acizii nucleici au sarcina electrică globală negativă. Ca urmare, dacă sunt plasați într-un câmp electric, moleculele acestora vor migra către anod.

Vizualizarea moleculelor de ADN se va realiza folosind bromura de etidiu. Acest fluorocrom este un agent intercalant care se inseră între planurile formate de bazele azotate la nivelul macromoleculei de ADN. Prin excitarea bromurii de etidiu în lumina UV ($\lambda = 250 - 310 \text{ nm}$) se obține o emisie în domeniul vizibil, la 520 nm (culoare roz-portocalie).

Material biologic: probe de ADN genomic. Se pot folosi în scop comparativ probe păstrate în condiții optime și probe lăsate câteva zile la temperatura camerei (în cazul acestora poate fi evidențiat fenomenul de fragmentare).

Reactivi și aparatură: i) tampon de electroforeză: TAE 1X – TRIS 0,040 M, acid acetic 0,040 M, EDTA 0,002 M. Se prepară ca soluție 10X care este apoi diluată înainte de folosire; ii) tamponul probei: albastru de bromfenol 0,3%, glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 10 mg/ml; iv) agaroză; v) tanc de electroforeză orizontală pentru separare de acizi nucleici; vi) sursă de curent; vii) transiluminator UV.

ATENȚIE: Bromura de etidiu este toxică și are un puternic efect mutagen.

Mod de lucru

1. Într-un pahar Erlenmeyer se cântăresc 0,4 g agaroză. Peste ea se adaugă 40 ml tampon TAE 1X (concentrația finală a agarozei 1%). Paharul se acopera cu o folie de plastic sau cu staniol și se încălzește la fierbere până la dizolvarea totală a agarozei.

2. Soluția obținută este lăsată la răcit până la o temperatură de 50-60 °C. În acest timp se vor adăuga 2 μl bromură de etidium pentru a permite vizualizarea ulterioară a ADN.

3. Se izolează tăvița aparatului de electroforeza cu bandă adezivă. Se montează pieptenul astfel încât dinții acestuia să nu atingă tavița și apoi se toarnă gelul cald (50°C). Se lasă 30-40 de minute la temperatura camerei pentru solidificare.

4. Se îndepărtează banda adezivă și pieptenul cu mare atenție, iar gelul solidificat complet se introduce în aparat.

5. Se amestecă proba de analizat cu tamponul sau și se încarcă cu mare atenție în godeuri cu o pipetă automată.

6. Se pune capacul aparatului și se conectează la sursa de curent fixată la o tensiune constantă (aproximativ 3V/cm). Durata migrării este de 50-60 de minute.

7. La finalizarea migrării moleculele de ADN se vor vizualiza cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Moleculele de ADN genomic migrează limitat deoarece sunt extrem de voluminoase. Înaintarea prin gelul de agaroză este foarte înceată datorită rezistenței opusă de acesta și imposibilității moleculelor de a pătrunde în porii gelului.

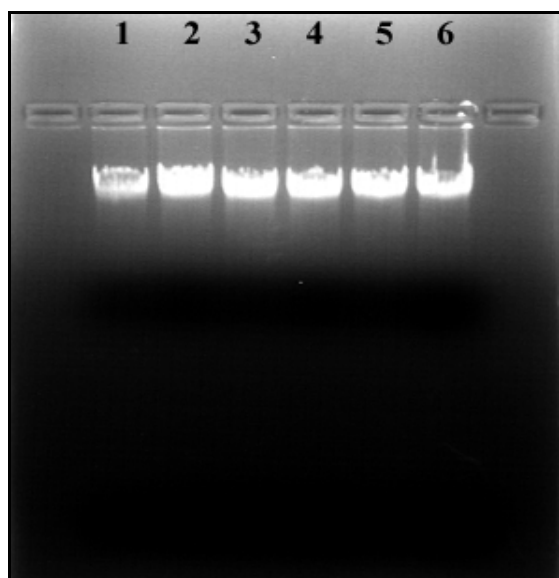


Figura 10: Electroforeză de ADN genomic în gel de agaroză în scopul evidențierii integrității acestuia. Liniile 1 – 6: ADN genomic nefragmentat.

În cazul unor molecule de ADN integre, nefragmentate, acestea vor putea fi observate sub forma unei benzi compacte, în apropierea godeurilor de start (Figura 10). Cu cât banda este mai groasă și mai intensă, cu atât proba de ADN este mai concentrată și mai nefragmentată.

În cazul unui ADN genomic degradat, fragmentat, benzile nu vor fi compacte și vor apărea sub forma unor dâre/”comete” (Figura 11). Aceste dâre/”comete” sunt cu atât mai lungi și mai intense, cu cât ADN este mai degradat. Ele apar datorită fragmentelor mici de ADN rezultate în urma scindării macromoleculelor inițiale. Degradarea probelor de ADN genomic apare în urma păstrării acestora în condiții neadecvate, procesul putând merge până la degradarea totală a ADN.

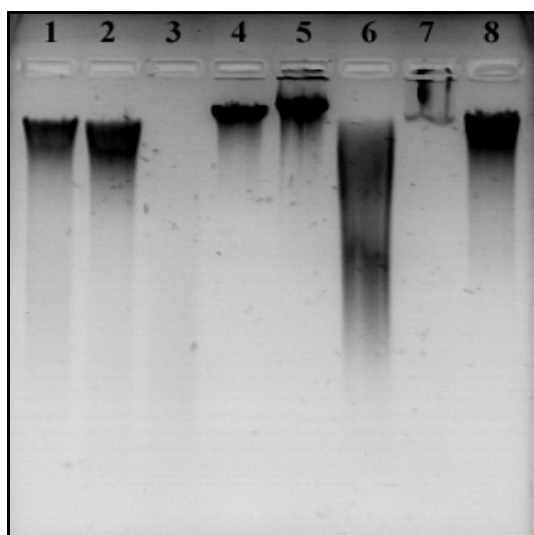


Figura 11: Electroforeză de ADN genomic în gel de agaroză în scopul evidențierii integrității acestuia. Liniile 4, 5: ADN genomic nefragmentat; liniile 1, 2, 8: ADN genomic parțial degradat, linia 6: ADN genomic puternic degradat, liniile 3, 7: ADN genomic degradat aproape în totalitate.

III.5. Electroforeza ADN în gel de poliacrilamidă

Principiul metodei

Electroforeza reprezintă o metodă fizico-chimică, analitică și preparativă care se bazează pe fenomenul migrării unor particule încărcate electric, într-un mediu lichid sau fixat pe suport solid, sub acțiunea unui câmp electric extern.

Gelul de poliacrilamidă are proprietăți optime de separare electroforetică. Este stabil, transparent, flexibil și se obține prin copolimerizarea acrilamidei cu N,N'-metilen-bisacrilamidei, în prezența de N,N,N',N'-tetrametilendiaminei (TEMED) și a persulfatului de amoniu drept catalizatori.

Practic, gelul de poliacrilamidă poate fi considerat o "sită moleculară" în care mărimea porilor depinde de concentrațiile inițiale ale monomerilor și de condițiile în care se desfășoară reacția de polimerizare (sistem catalitic, temperatură).

Material biologic: probe ADN genomic, produși PCR.

Reactivi și aparatură: i) soluție stoc acrilamidă/bis-acrilamidă 29:1 (30% m/v); ii) tampon de încărcare 5X. Pentru un volum de 50 ml se amestecă reactivii prezentați în tabelul 1; iii) N,N,N',N'-Tetrametilendiamină (TEMED); iv) persulfat de amoniu 10%; v) soluție de bromură de etidiu 10 μg/ml; vi) apă ultrapură; vi) tampon de electroforeză TBE 10X: TRIS 900 mM, acid boric 890 mM, EDTA x 2H₂O, sare tetrasodică 18 mM. Se prepară sub forma unei soluții 10X care este apoi diluată de zece ori înainte de folosire. Se stochează la temperatura camerei; vii) tanc de electroforeză verticală pentru acizi nucleici; viii) sursă de curent; ix) agitator; x) plită cu agitare magnetică și încălzire; xi) transiluminator UV.

Tabel 1: Reactivii și cantitățile necesare pentru prepararea tamponului de încărcare 5X.

Reactivi	Volum (50 ml)	Concentrație finală
Glicerol 80%	47 ml	75%
Albastru de bromfenol	125 mg	0,25%
Xylen Cyanol	125 mg	0,25%
TRIS 1 M (pH 7,4)	500 μl	10 mM
NaCl 5 M	100 μl	10 mM
EDTA 0,5 M	1000 μl	10 mM
SDS 10%	500 μl	0,1%

ATENȚIE: *Acrilamida este un agent neurotoxic. Poate provoca iritații ale pielii, ochilor și tractusului respirator și are potențial cancerigen. Bis-acrilamida este toxică și trebuie evitată inspirarea acesteia în timpul cântăririi.*

ATENȚIE: *N,N,N',N'-Tetrametilendiamină este toxică. Cauzează arsuri și iritații atunci când intră în contact cu pielea, mucoasele sau ochii.*

ATENȚIE: *Bromura de etidiu este toxică și are un puternic efect mutagen.*

Mod de lucru

1. Se curăță cu apă distilată și cu etanol 70% spațiatorii și placile de sticlă folosite la turnarea gelului. Etanolul este folosit pentru degresarea totală a plăcilor, acest lucru fiind necesar pentru evitarea formării bulelor de aer în momentul turnării gelului. La manipularea acestora este obligatorie folosirea mănușilor. Plăcile sunt lăsate la uscat. Atunci când plăcile sunt perfect uscate se trece la asamblarea lor.

2. Într-un pahar Berzelius steril, sub agitare continuă, se prepară gelul de poliacrilamidă respectând indicațiile prezentate în tabelul 2. Volumul total al soluției, având procentajul de poliacrilamidă dorit, este de 12 ml, suficient pentru un minigel cu grosimea de 1 mm pe modelul aparatelor de electroforeză în sistem vertical livrate de firmele **BioRad** sau **Hofer**. Gelul trebuie turnat imediat după adăugarea persulfatului de amoniu și a TEMED, în caz contrar existând riscul ca acesta să polimerizeze în pahar.

Tabel 2: Reactivii și cantitățile necesare pentru prepararea gelurilor de poliacrilamidă de diferite concentrații.

Concentrația gelului	Acrilamidă 30%	H ₂ O	TBE 10X	Persulfat de amoniu 10%	TEMED
8%	3,2 ml	7,6 ml	1,2 ml	200 μl	10 μl
10%	4 ml	6,8 ml	1,2 ml	200 μl	10 μl
12%	4,8 ml	6 ml	1,2 ml	200 μl	10 μl

ATENȚIE: *Dacă se dorește obținerea altor concentrații de poliacrilamidă se vor reface calculele adăugându-se cantitățile adecvate de reactivi.*

Gelurile pot fi realizate și cu soluții stoc de acrilamidă/bis-acrilamidă având alte raporturi ale monomerilor (ex. 19:1 sau 37,5:1), dar în aceste cazuri mobilitatea moleculelor de ADN va fi diferită.

3. Imediat după preparare gelul este turnat între plăcile pregătite în etapele 1 și 2. La finalul turnării se agaugă piptenul astfel încât să se evite formarea bulelor de aer între gel și dinții acestuia. Excesul de gel se va utiliza pentru a completa spațiile ramase libere între piepten și plăcile de sticlă.

4. Polimerizarea se realizează aproximativ o oră, la temperatura camerei, iar gelul bine izolat cu folie de plastic poate fi păstrat la 4⁰C timp de 2-3 zile.

5. Gelul este introdus cu atenție în aparatul de electroforeză. După adăugarea tamponului de electroforeză TBE 1X se îndepărtează pieptenul având grijă să nu se deterioreze godeurile.

6. Probele ADN și markerul de masă moleculară sunt amestecate cu o cantitate corespunzătoare de tampon de încărcare diluat și sunt introduse în godeuri cu ajutorul unei seringi sau a unei micropipete.

***ATENȚIE:** Trebuie evitată formarea bulelor de aer în momentul încărcării probelor în godeuri. Acestea pot bloca parțial sau total migrarea moleculelor de ADN în gel. Se recomandă ca timpul de încărcare a probelor să fie relativ scurt pentru a evita difuzia acestora.*

7. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește migrarea. Voltajul se fixează la valori cuprinse între 1 și 8 V/cm. În cazul unei tensiuni mai mari pot apărea fenomene de supraîncălzire zonală a gelului, acestea determinând deformarea fragmentelor de ADN.

8. La finalul migrării se oprește sursa de curent, se scoate gelul din tanc și se detașează plăcile de sticlă și spațiatorii. Se procedează cu foarte mare atenție deoarece gelul de poliacrilamidă este extrem de fragil și se poate rupe. Obligatoriu se folosesc mănuși.

9. Gelul este scufundat într-un vas cu soluție de bromură de etidiu și lăsat la colorare câteva minute după care este spălat între 10 și 30 minute într-un vas cu apă.

10. Vizualizarea moleculelor de ADN se realizează cu un ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Tehnica poate fi folosită pentru separarea și identificarea produșilor PCR sau pentru evidențierea produșilor reacțiilor de restricție enzimatică. De asemenea, tehnica poate fi utilizată și pentru separarea și, ulterior, purificarea din gel a unor produși de amplificare PCR în vederea secvențierii acestora.

Gelurile de poliacrilamidă prezintă o rezoluție mult mai crescută decât gelurile de agaroză și de aceea pot fi folosite pentru separarea și evidențierea unor fragmente de ADN mici și foarte apropiate ca mărime. În tabelul 3 sunt prezentate rezoluțiile gelurilor de poliacrilamidă de diferite concentrații și distanța estimată de migrare a coloranților adăugați în tamponul de încărcare a probei.

Tabel 3: Rezoluțiile gelurilor de poliacrilamidă la diferite concentrații și distanța aproximativă de migrare a albastrului de bromfenol și a xilen cianolului.

Acrilamidă (%)	Mărimea fragmentelor separate (pb)	Distanța de migrare a albastrului de bromfenol (pb)	Distanța de migrare a xilen cianolului (pb)
3,5	100 – 1000	100	460
5	100 – 500	65	260
8	60 – 400	45	160
12	50 – 200	20	70
20	5 – 100	12	45

III.6. Verificarea integrității ARN prin electroforeză în gel denaturant de agaroză

Principiul metodei

Electroforeza în gel de agaroză constituie o metodă standard pentru separarea și identificarea moleculelor de ARN. La pH alcalin sau neutru, acizii nucleici au sarcina electrică globală negativă. Ca urmare, dacă sunt plasați într-un câmp electric, moleculele acestora vor migra către anod.

Spre deosebire de ADN, moleculele de ARN prezintă un procent crescut de structuri secundare la nivelul conformației, fapt care impune folosirea unui gel denaturant

pentru evidențiere. Formaldehida, care are rolul de agent denaturant, asigură distrugerea structurilor secundare astfel încât migrarea moleculelor de ARN se realizează efectiv doar pe baza sarcinii și masei moleculare a acestora. Acest tip de electroforeză asigură doar separarea și evidențierea moleculelor mari de ARN (ARN ribozomal). Vizualizarea ARN se realizează utilizând bromura de etidiu.

Material biologic: probe de ARN.

Reactivi și aparatură: i) tampon de electroforeză: MOPS 1X – MOPS (Acid 3-[N-Morfolino]-propan-sulfonic) 40 mM (pH 7), acetat de sodiu 10 mM, EDTA (acid etilen-diamino-tetraacetic) 1 mM. Se prepară ca soluție 10X care este diluată înainte de folosire; ii) tampon de încărcare: formamidă 80%, TRIS (Tris-[hidroximetil]-aminometan) 45 mM, acid boric 45 mM, EDTA 1 mM; iii) soluție de bromură de etidiu 10 mg/ml; iv) agaroză; v) formaldehidă 37%; vi) formamidă; vii) apă ultrapură; viii) tanc de electroforeză pentru acizi nucleici; ix) sursă de curent; x) transiluminator UV.

ATENȚIE: Bromura de etidiu este toxică și are un puternic efect mutagen.

Mod de lucru

1. Într-un pahar Erlenmeyer se cântăresc 0,5 g agaroză, peste care se adaugă 36 ml de apă. Paharul se acopera cu o folie de plastic sau cu staniol și se încălzește până la dizolvarea totală a agarozei

2. Peste agaroză dizolvată se adaugă 5 ml tampon MOPS 10X și 9 ml formaldehidă 37%. Soluția obținută este lăsată la răcit până la o temperatură de 50-60 °C.

3. Se izolează tăvița aparatului de electroforeza cu bandă adezivă. Se montează pieptenul astfel încât dinții acestuia să nu atingă tavița și apoi se toarnă gelul cald (50°C). Se lasă 30-40 de minute la temperatura camerei pentru solidificare.

4. Se îndepărtează banda adezivă și pieptenul cu mare atenție, iar gelul solidificat complet se introduce în tancul de electroforeză.

5. Se amestecă proba ARN de analizat cu 2 μl MOPS 10X, 4 μl formaldehidă 37%, 10 μl formamidă și 0,1 μl soluție bromură de etidiu.

6. Amestecul este incubat 5 minute la 65°C. Se adaugă 2 µl tampon de încărcare și apoi amestecul se încarcă în godeuri.

7. Se pune capacul aparatului și se conectează la sursa de curent. Sursa este fixată la 80 V constant și la o durată a migrării de aproximativ 40 de minute.

9. La finalizarea migrării moleculele de ARN se vizualizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Electroforeza în gel de agaroză este utilizată cu succes pentru evaluarea integrității ARN total extras din diferite probe biologice.

Stabilitatea moleculelor de ARN este mult mai scăzută în comparație cu ADN. Procesul degradării acestora este mult mai frecvent și reprezintă un impediment major pentru experimentele ulterioare. În cazul unor molecule de ARN întregi se vor observa două benzi clare, corespunzătoare ARNr 28S și ARNr 18S. Banda pentru ARNr 28S trebuie să fie aproximativ de două ori mai intensă decât cea pentru ARNr 18S (Figura 12). Dacă benzile separate în gel nu sunt foarte clare și bine delimitate se poate trage concluzia că ARN este degradat/fragmentat.

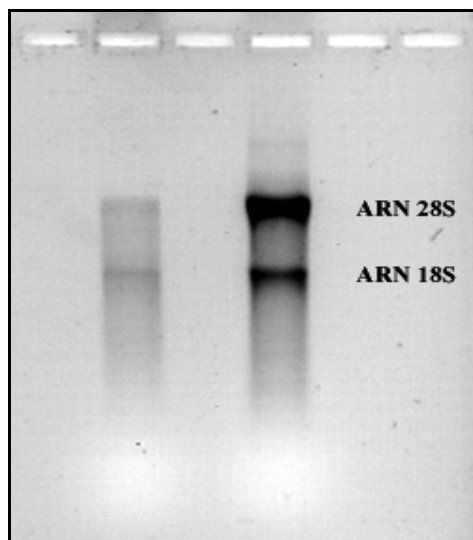


Figura 12: Electroforeză ARN în gel denaturant de agaroză.

CAPITOLUL IV

REAȚIA PCR – VARIANTE ȘI TEHNICI DERIVATE

Reacția de polimerizare în lanț (PCR) a fost pusă la punct în 1985 de către Kary Mullis și colaboratorii săi. Tehnica PCR este cu siguranță metoda care a cunoscut cea mai rapidă și spectaculoasă dezvoltare din istoria biochimiei, iar K. Mullis a primit premiul Nobel pentru chimie în 1993 deoarece aceasta tehnică a reușit să revoluționeze dezvoltarea biologiei moleculare având aplicabilitate largă în domenii din ce în ce mai diverse: genetică, microbiologie, virusologie, hematologie, oncologie, etc..

În decursul timpului au fost dezvoltate serie de interpretări ale conceptului de bază și introduse inovații atât la nivelul etapelor cât și la nivelul aparatului utilizat în vederea realizării practice și automatizării tehnicii. PCR se bazează pe o tehnologie *in vitro* care imită capacitatea naturală de replicare a ADN și care constă în generarea rapidă a unor copii multiple a unei secvențe nucleotidice țintă (ADN sau ARN). Numărul de copii ale secvenței țintă crește exponențial cu fiecare ciclu de amplificare, deoarece fiecare secvență nucleotidică nou sintetizată constituie o matriță pentru o nouă copie.

Prođușii PCR, care reprezintă copiii ale moleculelor de ADN/ARN țintă originale, sunt denumiți *ampliconi*. Această metodă permite detectarea cu specificitate foarte mare a unor concentrații foarte scăzute ale secvenței țintă. Cu toată simplitatea principiului tehnicii și faptul că realizarea practică a cunoscut evoluții de excepție, există numeroase etape care pot introduce erori în rezultatele obținute dacă nu sunt pe deplin controlate. Utilizatorul trebuie să înțeleagă și să integreze logic etapele care trebuie parcurse pentru obținerea unor rezultate finale corespunzătoare scopului în care este folosită tehnica.

Proprietatea ADN polimerazelor de a sintetiza noi catene de ADN pornind de la primeri oligonucleotidici este utilizată în tehnica PCR pentru a amplifica de aproximativ un milion de ori secvența țintă, prin replicări succesive.

Pentru a se putea realiza practic acest lucru este necesară alegerea unor secvențe oligonucleotidice (primeri sintetici), capabile să hibridizeze la capetele secvenței de amplificat și folosirea unei ADN polimeraze termostabile care permite automatizarea

procesului de amplificare conducând la acumularea exponențială a secvenței țintă la fiecare ciclu de amplificare. O reacție PCR se realizează în trei etape diferite:

I. Denaturarea ADN matriță.

II. Hibridizarea primerilor pe bază de complementaritate.

III. Sinteza unei noi catene având drept matriță catena țintă de ADN.

Prima etapă consta în denaturarea termică a macromoleculei de ADN dublu-catenare. Astfel, temperatura amestecului de reacție, care conține și ADN, este ridicată până la 94-96°C, determinând ruperea punților de hidrogen stabilite pe bază de complementaritate între cele două catene și a forțelor de stivuire care apar între planurile bazelor azotate. După această etapă, în soluție, vom regăsi ADN monocatenar.

În etapa a doua are loc hibridizarea primerilor sintetici la catena de ADN. Primerii sunt molecule oligonucleotidice monocatenare, scurte de ADN, desemnate artificial pe bază de complementaritate cu secvența din ADN care urmează a fi amplificată. Hibridizarea primerilor se efectuează prin scăderea temperaturii amestecului de reacție până la o valoare care permite refacerea punților de hidrogen dintre aceștia și catena matriță.

Desemnarea primerilor este un proces laborios de care depinde reușita reacției PCR. La alegerea acestora trebuie respectate câteva reguli generale:

a) lungimea optimă a primerilor trebuie să fie cuprinsă între 18 și 33 de nucleotide.

b) primerii trebuie să conțină un număr aproximativ egal din cele patru baze azotate, evitându-se pe cât posibil regiunile cu repetiții nucleotidice. Respectarea acestei reguli va conduce la eliminarea potențialelor regiuni cu structuri secundare.

c) perechile de primeri trebuie alese astfel încât să nu prezinte complementaritate la nivel intra- și interindividual, fiind astfel permisă reducerea la minim a posibilelor interacții dintre primeri (ex. formarea de dimeri de primeri).

d) distanța dintre doi primeri la nivelul matriței trebuie să fie mai mică de 5 kpb. S-a observat o eficiență foarte scăzută a reacției în cazul în care lungimea produsului de amplificare depășește 2-3 kpb.

e) pentru utilizarea acestora în condiții bune trebuie stabilită cu exactitate temperatura optimă de hibridizare.

În cea de-a treia etapă are loc sinteza unei noi catene de ADN complementară cu matrița, pornind de la primeri, cu ajutorul unei ADN polimeraze și în prezența deoxinucleotid trifosfaților. La final, în amestecul de reacție, se regăsesc moleculele de ADN dublucatenare, de aceeași lungime cu distanța dintre cei doi primeri la nivelul catenei matriță.

Sinteza noilor catene poate fi repetată prin reluarea celor trei etape într-un nou ciclu de amplificare. Fiecare catenă nou sintetizată devine matriță pentru un nou ciclu de amplificare, astfel încât secvența țintă de ADN este selectiv amplificată după fiecare ciclu de reacție. Produsul de reacție sau amplicon conține la capete secvențele primer folosite la amplificare.

IV.1. Realizarea reacției PCR în gradient de temperatură pentru optimizarea hibridizării primerilor

Principiul metodei

La începutul oricărui experiment care utilizează tehnica PCR este necesară parcurgerea unei etape extrem de importante care constă în optimizarea temperaturii de hibridizare a primerilor prin realizarea unei reacții PCR în gradient de temperatură. În această reacție, ADN matriță este hibridizat concomitent la temperaturi diferite cu aceiași primeri în scopul stabilirii temperaturii optime, care să permită eliminarea amplificărilor parazite și realizarea cu un randament maxim a reacției PCR. Totodată, în decursul unei astfel de reacții de optimizare, pot fi variate și intervalele de timp în care sunt parcurse treptele de temperatură, cât și numărul de cicluri de amplificare.

Material biologic: probe de ADN genomic de diferite proveniențe.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide, 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR

10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primer sens, 20 μM și primer antisens, 20 μM; vii) aparat PCR cu gradient de temperatură (termocicler); viii) microcentrifugă; ix) agitator.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză TAE 1X – TRIS 40 mM, acid acetic 40 mM, EDTA 2 mM care se prepară ca soluție 10X și este diluată înainte de folosire; ii) tamponul probei care conține albastru de bromfenol 0,3% și glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 10 μg/ml; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală pentru acizi nucleici; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV; ix) plită cu încălzire și agitare magnetică.

Mod de lucru

1. Se adaugă reactivii prezentați în tabelul 4 într-un tub de centrifugă pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifugează ușor.

Tabel 4: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR în gradient.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl ₂	1,5
Amestec de nucleotide	2
ADN Polimerază	0,1
Primer sens	între 0,1 – 0,2
Primer antisens	între 0,1 – 0,2
Apă deionizată	între 13,5 - 13,7
Volum total	20

2. Se adaugă 20 μl din amestecul de reacție pentru fiecare probă care va fi supusă unei anumite temperaturi de hibridizare a primerilor. Ulterior se adaugă câte 5 μl ADN genomic, diluat corespunzător (50 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor pentru omogenizare.

3. Tuburile se așează în aparatul de PCR și se realizează programarea aparatului în conformitate cu programul prezentat în tabelul 5.

Tabel 5: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					Etapa finală
	Etapa inițială	30 - 45 de cicluri			Extensie finală	
		Denaturare	Hibridizare	Extindere		
IQ Cycler	10 min. 95°C 1 ciclu	30 secunde 95°C	30 secunde <i>Temperatura poate varia între 50°C și 65°C.</i>	1 minut 72°C	10 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4.

Produșii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri cu o pipetă automată. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

În funcție de profilul, de numărul și intensitatea benzilor rezultate în urma reacției se stabilește temperatura optimă de hibridizare a primerilor. Tot pentru optimizarea reacției se poate varia și timpul etapelor de polimerizare și de extensie finală sau/și numărul de cicluri de amplificare.

Două electroforeze ale produșilor unor reacții PCR, în gradient de temperatură sunt prezentate în continuare. În ambele figuri, se observă clar influența temperaturii de hibridizare a primerilor asupra PCR. În figura 13, se observă formarea produșilor de amplificare nespecifici, pentru primele trei temperaturi de hibridizare. Acest **fapt** este datorat hibridizării nespecifice a primerilor, la nivelul altor situsuri decât cele pentru care

au fost desemnați. Aceeași situație este observată și în figura 14, în cazul primelor patru temperaturi setate. În urma analizei rezultatelor se poate afirma că temperaturile optime de hibridizare se încadrează în intervalul 56 - 60 °C (pentru primul exemplu) și între 58 și 60 °C (pentru exemplul al doilea).

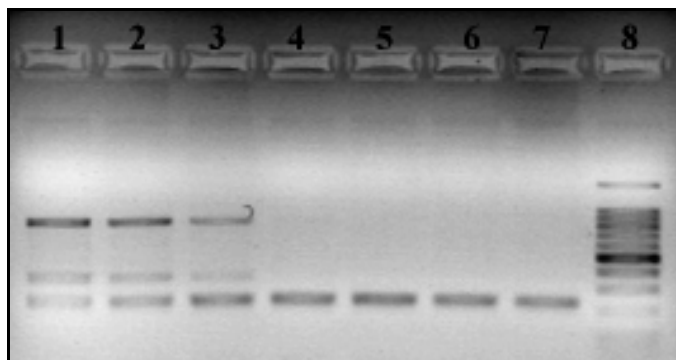


Figura 13: Reacție PCR în gradient de temperatură. 1 – 52°C; 2 – 52,7°C; 3 – 53,7°C; 4 – 55,1°C; 5 – 57,2°C; 6 – 58,6°C; 7 – 60 °C; 8 – marker de masă moleculară 100 pb.

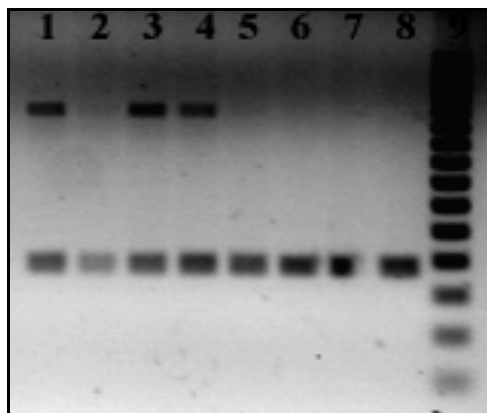


Figura 14: Reacție PCR în gradient de temperatură. 1 – 52 °C; 2 – 52,7 °C; 3 – 53,7 °C; 4 – 55,1 °C; 5 – 57,2 °C; 6 – 58,6 °C; 7 – 59,6 °C; 8 – 60 °C; 9 – marker de masă moleculară 50 pb.

IV.2. „Touch-Down PCR” cu adăugare de adjuvant

Principiul metodei

Această modalitate de amplificare urmărește eliminarea la maxim a produșilor nespecifici de reacție care apar mai ales în cazul moleculelor de ADN bogate în GC și datorate în principal supraîncolăcirilor ADN. Pentru realizarea acestui obiectiv

amplificarea începe cu cicluri de hibridizare la temperaturi crescute, acestea scăzând treptat către sfârșitul reacției. De asemenea, se folosesc ca adjuvanți diverse substanțe chimice (ex. DMSO), care au rolul de a se lega în zonele bogate în GC și de a relaxa supraîncolăcirile.

Material biologic: probe de ADN genomic.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide, 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) dimetil sulfoxid (DMSO); vii) primer sens, 20 μM și primer antisens, 20 μM; viii) aparat PCR cu gradient de temperatură; ix) hotă cu flux de aer; x) microcentrifugă; xi) agitator.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză TAE 1X – TRIS 40 mM, acid acetic 40 mM, EDTA 2 mM care se prepară ca soluție 10X și este diluată înainte de folosire; ii) tamponul probei care conține albastru de bromfenol 0,3% și glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 10 μg/ml; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală pentru acizi nucleici; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV sau sistem de videodocumentare; ix) plită cu încălzire și agitare magnetică.

Mod de lucru

1. Reactivii prezentați în tabelul 7 se adaugă într-un tub de microcentrifugă pentru obținerea amestecului de reacție. Vortexare și centrifugare ușoară în vederea unei bune omogenizări.

2. La 20 μl amestec de reacție se adaugă 5 μl ADN purificat, diluat corespunzător (circa 50 ng/reacție). Vortexare și centrifugare ușoară.

3. Tuburile se așează în aparatul de amplificare și acesta este programat în conformitate cu programul prezentat în tabelul 8.

Tabel 7: Reactivi, cantitățile și concentrațiile necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μl) și concentrație	Volum (μl) și concentrație	Volum (μl) și concentrație	Volum (μl) și concentrație
Tampon PCR 10X	2,5 (1X)	2,5 (1X)	2,5 (1X)	2,5 (1X)
MgCl ₂	1,5 (1,5mM)	1,5 (1,5mM)	1,5 (1,5mM)	1,5 (1,5mM)
dNTP	2 (0,8mM)	2 (0,8mM)	2 (0,8mM)	2 (0,8mM)
DMSO	0 (0%)	0,5 (2%)	1,25 (5%)	2,5 (10%)
ADN polimerază	0,1 (0,5U)	0,1 (0,5U)	0,1 (0,5U)	0,1 (0,5U)
Primer sens	0,6 (0,4 μM)	0,6 (0,4 μM)	0,6 (0,4 μM)	0,6 (0,4 μM)
Primer antisens	0,6 (0,4 μM)	0,6 (0,4 μM)	0,6 (0,4 μM)	0,6 (0,4 μM)
Apă ultrapură	12,7	12,2	11,45	10,2
Volum total	20	20	20	20

Tabel 8: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare								Etapa finală
	Etapa inițială	25 de cicluri			10 cicluri			Extindere finală	
		Denaturare	Anelare	Extindere	Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	5 min. 95°C 1 ciclu	60 sec. 94°C	60 sec. 63°C* - se scade 0,5°C / ciclu	1 minut și 30 sec 72°C	60 sec. 94°C	60 sec. 50°C	1 minut 72°C	1 minut 72°C	∞ 4°C

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4.

Produșii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri cu o pipetă automată. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă (3 V/cm) și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Eficiența reacției de amplificare depinde de modul în care au fost selectați primerii și de poziția de la nivelul macromoleculi de ADN la care aceștia hibridizează. În cazul hibridizării într-o zonă extrem de bogată în GC, care prezintă un procent mare de supraîncolăciri, chiar și în urma optimizării prin „touch-down PCR”, se pot obține mai multe benzi de ADN, corespunzătoare mai multor produși de amplificare.

Metoda este foarte eficientă dacă se pornește de la început cu un număr limitat de amplificări nespecifice. De asemenea, adăugarea adjuvanților nu este întotdeauna o necesitate putându-se încerca doar optimizarea prin variație de temperatură.

În figura 15 este prezentată o electroforeză a produșilor de amplificare pentru o reacție „Touch-Down PCR” la care s-a adăugat adjuvant.

Se poate observa clar îmbunătățirea amplificării prin obținerea unui număr din ce în ce mai scăzut de produși nespecifci și prin intensificarea benzilor determinată de creșterea concentrației produsului de interes. Optimizarea poate conduce până la eliminarea totală a produșilor nespecifci de amplificare.

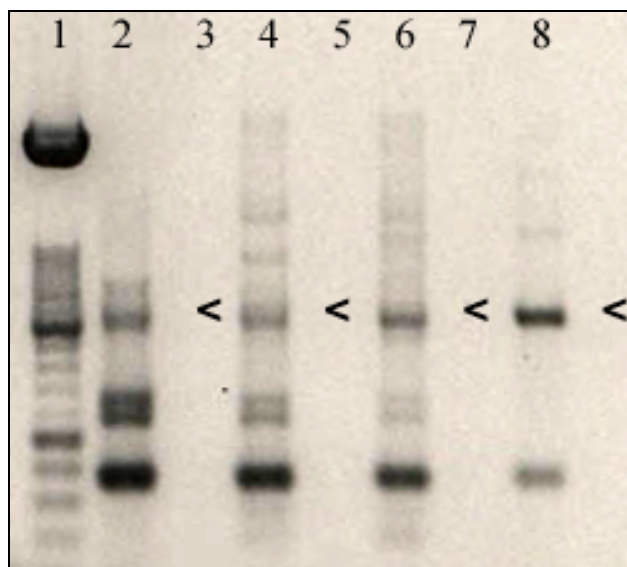


Figura 15: Electroforeză a produșilor obținuți prin „Touch-Down PCR” cu adăugare de adjuvant. 1 – marker de masă moleculară; 3, 5, 7 – martori negativi, 2, 4, 6, 8 – produșii reacțiilor „Touch-Down”. Banda de interes este marcată cu săgeată.

IV.3. Tehnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Principiul tehnicii se bazează pe compararea profilelor de restricție rezultate în urma digestiei ADN obținut prin extracție, clonare sau amplificare cu endonucleaze de restricție. Eventualele mutații care apar la nivelul secvenței ADN pot crea sau modifica un situs de restricție având drept rezultat obținerea de fragmente de restricție diferite.

Enzimele de restricție, au fost descoperite în urma studierii fenomenului de rezistență bacteriană la atacul bacteriofagilor determinat de sinteza unor enzime de restricție-modificare cu rol în degradarea materialului genetic fagic și protejarea celui propriu. Descoperirea, purificarea și caracterizarea unui număr foarte mare de astfel de enzime a impus adoptarea unei nomenclaturi universale. Astfel, pentru denumirea lor se folosește un cod de trei litere, în format italic, prima literă semnificând genul, iar celelalte două specia bacteriană de la care a fost izolată enzima. (ex: *Eco* – *Escherichia coli*). În unele cazuri, o a patra literă, în format normal, va indica tulpina bacteriană.

Dacă o anumită tulpină bacteriană are mai mult de un sistem de restricție-modificare, acestea se vor identifica prin numere romane. (ex. *Bgl* I și *Bgl* II).

Endonucleazele de restricție sunt enzime care recunosc secvențe de ADN specifice, scurte, recunoașterea fiind urmată de legare și apoi clivare, fie la nivelul situsului, fie la o distanță oarecare de acesta. Sistemele de restricție-modificare au fost împărțite în trei categorii: I, II și III. Categoriile I și III constau în enzime care au atât funcții de restricție cât și funcții de metilare. Ambele tipuri recunosc secvențe specifice, nemetilate, de ADN dublu catenar. Enzimele din categoria I clivează ADN într-o manieră situs-nespecifică, iar cele din categoria III taie la nivelul unor situsuri specifice situate la o distanță de 25-27 nucleotide de secvența de recunoaștere. În categoria II sunt incluse toate enzimele cu capacitate de restricție-modificare (pot îndeplini și funcția de metilare) care acționează exact la nivelul situsurilor de recunoaștere pe care le scindează sau modifică.

Experimental, se recomandă ca pentru o anumită secvență ADN să se identifice posibilele situsuri de restricție caracteristice genotipului normal. Ulterior se verifică dacă mutațiile pe care dorim să le identificăm afectează vreunul dintre aceste situsuri. Acestea

pot modifica un situs de restricție deja existent sau pot genera un situs nou. În abordarea modernă, tehnica RFLP se realizează prin amplificarea zonei de interes prin reacție PCR și digestia cu enzime de restricție a ampliconilor obținuți. Ea poate fi folosită pentru genotipare individuală, identificarea de polimorfisme normale și patologice și identificarea profilelor de restricție ale microorganismelor.

IV.3.1 Diagnostic genetic prin RFLP

A. Diagnosticarea deficienței de adeziune leucocitară bovină

Principiul metodei

Deficiența de adeziune leucocitară bovină (BLAD - **B**ovine **L**eukocyte **A**dhesion **D**eficiency) este o boală autozomală recesivă, congenitală, caracterizată fenotipic prin infecții bacteriene recurente, întârzierea vindecării rănilor, creștere neregulată, fiind asociată și cu neutrofilie.

Baza moleculară a BLAD este reprezentată de prezența unei mutații punctiforme (adenină trece în guanină) în poziția 383 de la nivelul ARNm/ADNc care determină substituția acidului aspartic cu glicina în poziția 128 a proteinei de adeziune D128G (Shuster *et al.*, 1992, Jorgensen *et al.*, 1993, Gerardi, 1996, Meylan *et al.*, 1997).

Vacile afectate de BLAD prezintă ulcere severe la nivelul membranelor mucoase orale, parodontoză severă, pierderea dinților, pneumonie cronică și diaree recurentă sau cronică. Ele mor la vârste tinere datorită complicațiilor (Nagahata *et al.*, 1993, 1997, Ackermann *et al.*, 1996, Ribeiro *et al.*, 2000).

Pentru diagnosticare s-au desemnat primeri specifici cu ajutorul cărora se poate amplifica zona în care a fost detectată mutația care duce la apariția maladiei. Produsul de amplificare obținut, care conține situsul la care poate apărea mutația, este supus digestiei cu ajutorul enzimei de restricție *Taq I*. Fragmentele rezultate în urma clivării sunt vizualizate prin electroforeză în gel de agaroză și apoi analizate pentru stabilirea genotipurilor.

Material biologic: probe de ADN genomic extrase de la exemplare de bovine.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide, 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primer sens CCTTCCGGAGGGCCAAGGGCT, 20 μM și primer antisens CTCGGTGATGCCATTGAGGGC, 20 μM; vii) aparat PCR; viii) microcentrifugă; ix) agitator.

Reactivi pentru reacția de restricție: i) tampon de restricție: 60 mM TRIS-HCl, 1 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT (ditiotreit) pH 7,5; ii) albumină serică bovină (BSA) acetilată 10 μg/μl; iii) endonucleaza de restricție *Taq I* 10 U/μl; iv) microcentrifugă; v) agitator; vi) termobloc.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză TAE 1X – TRIS 40 mM, acid acetic 40 mM, EDTA 2 mM care se prepară ca soluție 10X și este diluat înainte de folosire; ii) tamponul probei care conține albastru de bromfenol 0,3% și glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 10 μg/ml; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală pentru acizi nucleici; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV; ix) plită cu încălzire și agitare magnetică;

Mod de lucru

Amplificarea prin PCR

1. Reactivii prezentați în tabelul 9 se amestecă într-un tub de microcentrifugă pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifugează ușor.

2. Se adaugă 20 μl din amestecul de reacție în câte un tub de centrifugă 200 μl pentru fiecare exemplar testat.

3. Se adaugă 5 μl ADN extras de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 50 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul PCR și acesta se programează în conformitate cu programul prezentat în tabelul 10.

Tabel 9: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTP	2
Polimerază AmpliTaq Gold	0,1
Primer sens	0,2
Primer antisens	0,2
Apă ultrapură	13,5
Volum total	20

Tabel 10: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Etapa inițială	Timpii și temperaturile de incubare			Extensie finală	Etapa finală
		45 de cicluri				
		Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min. 95°C 1 ciclu	30 sec. 95°C	30 sec. 57°C	1 minut 72°C	15 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor de amplificare

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4. Produșii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Reacția de restricție

1. Se pipetează reactivii prezentați în tabelul 11 într-un tub de microcentrifugă pentru a obține amestecul de restricție. Se vortexează și se centrifughează.

2. Digestia se desfășoară la 37°C, timp de 3 ore. Deoarece enzima *Taq I* este termostabilă, reacția de restricție se poate desfășura și 2 ore la 65°C.

Tabel 11: Componentele și cantitățile necesare efectuării reacției de restricție.

Componente	Volum (μ l)
Tampon de restricție 10X	2
BSA acetilată	0,5
Produce PCR	15
<i>Taq I</i>	1,5
Apă deionizată	1
Volum total	20

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor rezultați în urma digestiei cu enzime de restricție

După terminarea reacției de restricție se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor.

Gelul de agaroză 3% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4.

Produșii de restricție se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri cu o pipetă automată. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă (3 V/cm) și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Pentru diagnosticarea deficienței de adeziune leucocitară bovină produsul PCR, având mărimea de 134 pb, a fost supus digestiei cu enzima de restricție *Taq I*. Situsul de restricție al enzimei este T↓CGA.

Genotipul homozigot normal prezintă două benzi, de 108 și 26 pb, datorită existenței situsului de restricție al *Taq I* la nivelul fragmentului amplificat.

În cazul apariției mutației punctiforme care declanșează maladia (A/G) situsul de restricție este modificat. Astfel, genotipul heterozigot purtător, care posedă o copie normală și una mutantă a genei, prezintă trei benzi de 108, 26 și 134 pb, iar cel homozigot recesiv o singură bandă de 134 pb (Figura 16).

În practică, prin analiza profilelor de restricție se pot identifica indivizii purtători, afectați sau normali, realizându-se astfel diagnosticarea diferitelor efective de animale.

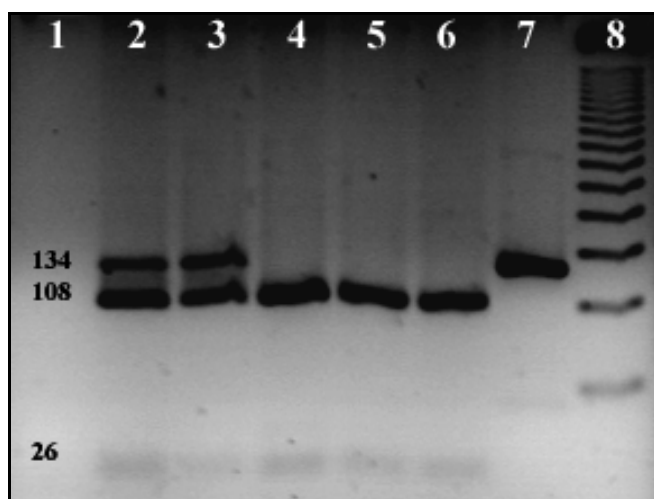


Figura 16: Electroforeză pentru evidențierea produșilor de restricție în vederea diagnosticării BLAD. 1 – martor negativ; 2, 3 – indivizi purtători; 4, 5, 6 – indivizi homozigoți normali; 7 – fragment nedigerat; 8 – marker de masă moleculară 50 bp (*Promega*).

B. Diagnosticarea deficienței în uridin-monofosfat sintază bovină

Principiul metodei

Deficiența în uridin 5' monofosfat sintaza (DUMPS – Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase) este o maladie genetică care afectează biosinteza pirimidinelor și se transmite autozomal recesiv (Shanks, 1992, Kuhn, 1994).

Uridin 5' monofosfat sintaza catalizează conversia acidului orotic în UMP. UMP este precursorul tuturor pirimidin nucleotidelor precum și un constituent normal în laptele de vacă (Shanks, 1989). Ca atare, enzima este absolut necesară pentru sinteza *de novo* a pirimidin nucleotidelor, componente ale ADN și ARN.

Creșterea și dezvoltarea homozigoților purtători ai acestei maladii este oprită, ducând la moartea embrionului în a 40 zi post-concepție (Shanks, 1990, Robinson, 1993). Animalele heterozigote sunt purtătoare ale alelei care cauzează apariția DUMPS (Harlizius, 1996). Jumătate din urmașii rezultați din împerecherea dintre animale heterozigote și animale normale sunt normali, cealaltă jumătate sunt purtători. Purtătorii genei mutante sunt identificați prin testarea activității enzimei uridin 5' monofosfat sintază eritrocitară. Activitatea acestei enzime în ficat, splină, rinichi, mușchi și glanda mamară este mai scăzută (Shanks 1990), reprezentând aproximativ jumătate din activitatea normală (Robinson, 1990).

În urma numeroaselor cercetări s-a determinat secvența genei care codifică pentru uridin 5' monofosfat sintază și s-au pus la punct teste de diagnostic pentru indivizii purtători. Genotipic, DUMPS este cauzată de o mutație punctiformă (C trece în T) la nivelul codonului 405, în exonul 5 (Viana, 1998) al genei care codifică enzima.

Pentru diagnosticarea prezenței mutației punctiforme s-au desemnat primeri specifici cu ajutorul cărora se poate amplifica zona de interes. Produsul de amplificare obținut, care conține situsul la care poate apărea mutația, este supus digestiei cu ajutorul enzimei de restricție *Ava I*. Fragmentele rezultate în urma clivării sunt vizualizate prin electroforeză în gel de agaroză și apoi analizate pentru stabilirea genotipurilor.

Material biologic: probe de ADN genomic extrase de la exemplare de bovine din diferite rase.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide, 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primer sens GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG, 20 μM și primer antisens GCTTCTAACTGAACTCCTCGAGT, 20 μM; vii) aparat PCR; viii) microcentrifugă; ix) agitator.

Reactivi și aparatură pentru reacția de restricție: i) tampon de restricție: 60 mM TRIS-HCl, 1 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT (ditiotreitol) pH 7,5; ii)

albumină serică bovină (BSA) acetilată 10 µg/µl; iii) endonucleaza de restricție *Ava I* 10U/µl; iv) termobloc; v) microcentrifugă; vi) agitator.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză TAE 1X – TRIS 40 mM, acid acetic 40 mM, EDTA 2 mM care se prepară ca soluție 10X și este diluat înainte de folosire; ii) tamponul probei care conține albastru de bromfenol 0,3% și glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 10 µg/ml; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală pentru acizi nucleici; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV; ix) plită cu încălzire și agitare magnetică.

Mod de lucru

Amplificarea prin reacție PCR

1. Se amestecă reactivii prezentați în tabelul 12 într-un tub de microcentrifugă pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifugează ușor.

Tabel 12: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (µl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTP	2
Polimerază AmpliTaq Gold	0,1
Primer sens	0,2
Primer antisens	0,2
Apă ultrapură	13,5
Volum total	20

2. Din amestecul de reacție se adaugă 20 µl în câte un tub de centrifugă pentru fiecare exemplar testat.

3. Se adaugă 5µl ADN extras de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 50 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul PCR. Se programează aparatul PCR la parametrii prezentați în tabelul 13.

Tabel 13: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					Etapa finală
	Etapa inițială	45 de cicluri			Extensie finală	
		Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min. 95°C 1 ciclu	30 sec. 95°C	30 sec. 58°C	1 minut 72°C	15 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor de amplificare

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4. Produșii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Reacția de restricție

1. Într-un tub de microcentrifugă se adaugă reactivii din tabelul 14 pentru a obține amestecul de restricție. Se vortexează și se centrifughează.
2. Digestia se desfășoară la 37°C, timp de 3 ore.

Tabel 14: Componentele și cantitățile necesare efectuării reacției de restricție.

Componente	Volum (μl)
Tampon de restricție 10X	2
BSA acetilată	0,5
Produce PCR	15
<i>Ava I</i>	1,5
Apă deionizată	1
Volum total	20

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor rezultați în urma digestiei cu enzime de restricție

După terminarea reacției de restricție se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor.

Gelul de agaroză 3% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4.

Produșii de restricție se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri cu o pipetă automată. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă (3 V/cm) și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Pentru diagnosticarea DUMPS produsul PCR, având mărimea de 110 pb, a fost supus digestiei cu enzima de restricție *Ava I*. Situsul de restricție al enzimei este C↓(T/C)CG(A/G)G.

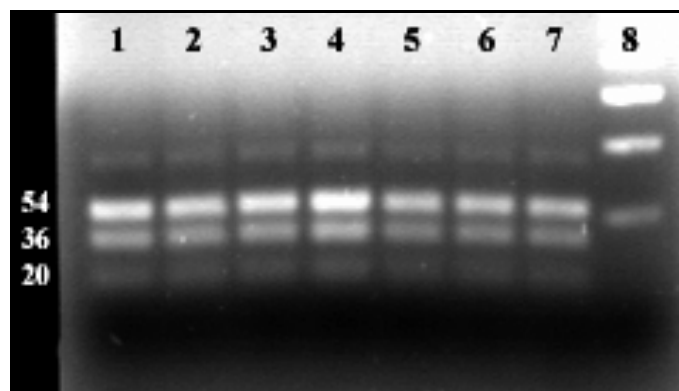


Figura 17: Electroforeză pentru evidențierea produșilor de restricție în vederea diagnosticării DUMPS. 1 – 7: indivizi homozigoți normali; 8 – marker de masă moleculară 50 bp (*Promega*).

În mod normal la nivelul fragmentului amplificat există două situsuri de restricție deci genotipul homozigot normal prezintă trei benzi de 54, 36 și 20 pb (Figura 17). În

cazul apariției mutației punctiforme care declanșează maladia (C/T), unul dintre cele două situsuri de restricție este modificat.

Astfel individul heterozigot purtător (una dintre cele două copii ale genei este normală, iar cealaltă mutantă) va prezenta patru benzi de 90, 54, 36 și 20 pb, iar cel homozigot recesiv două benzi de 90 și 20 pb.

Prin analiza profilelor de restricție se pot identifica indivizii purtători, afectați sau normali, realizându-se astfel diagnosticarea efectivelor de animale analizate.

IV.3.2 Evidențierea unor polimorfisme ADN prin tehnica RFLP

A. Evidențierea polimorfismului genei care codifică pentru β -lactoglobulină la bovine

β -lactoglobulina este una dintre cele mai importante proteine din laptele mamiferelor. Proteinele sunt sintetizate de celulele epiteliale ale glandelor mamare și joacă un rol crucial în asigurarea calității laptelui. Ele au un rol important în coagularea laptelui, element esențial în producerea brânzeturilor și a untului, și conferă valoare nutritivă lactatelor.

Până acum au fost descoperite 11 variante genetice care codifică forme diferite ale proteinei β -lactoglobulină, expresia acestora influențând calitatea laptelui: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J și W. Variantele A și B prezintă cel mai mare interes, deoarece au fost asociate cu performanțele de producție a laptelui și de asemenea cu procesarea eficientă și calitatea acestuia. Exemplarele homozigote BB furnizează un lapte bogat în grăsime și în proteine, foarte valoros în procesul de fabricare a brânzeturilor, în timp ce exemplarele homozigote AA dau lapte cu un procent mic de grăsime, dar în cantitate mai mare.

Metoda își propune identificarea alelelor A și B ale genei care codifică pentru β -lactoglobulină. Pentru analiza polimorfismului genei s-au desemnat primeri specifici cu

ajutorul cărora se poate amplifica zona în care a fost detectată mutația punctiformă responsabilă de apariția variantelor genetice.

Produsul de amplificare obținut, care conține situsul la care poate apărea mutația, este supus digestiei cu enzima de restricție *Hae III*. Fragmentele rezultate în urma clivării sunt vizualizate prin electroforeză în gel de agaroză și apoi analizate pentru stabilirea genotipurilor.

Material biologic: probe de ADN genomic.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare (dNTP); ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X - 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) polimerază ADN 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primer sens GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA 20 μM; vii) primer antisens CCCAGGACACCGGCTCCCGGTATAT 20 μM; viii) aparat de PCR; ix) microcentrifugă; x) agitator.

Reactivi și aparatură pentru reacția de restricție: i) tampon de restricție - 60 mM TRIS-HCl, 1 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT (ditiotritol) pH 7,5; ii) albumină serică bovină (BSA) acetilată 10 μg/μl; iii) endonucleaza de restricție *Hae III* 10U/μl; iv) termobloc; v) microcentrifugă; vi) agitator.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză: TAE 1X – TRIS 0,040 M, acid acetic 0,040 M, EDTA 0,002 M. Se prepară sub forma unei soluții 10X care este apoi diluată; ii) tamponul probei: albastru de bromfenol 0,3%, glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 10 μg/ml; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală pentru acizi nucleici; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV; ix) plită cu încălzire și agitare magnetică.

Mod de lucru

Amplificarea prin PCR

1. Într-un tub de microcentrifugă se amestecă reactivii prezentați în tabelul 15 pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifughează ușor.

Tabel 15: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTP	2
Polimerază AmpliTaq Gold	0,1
Primer sens	0,2
Primer antisens	0,2
Apă ultrapură	13,5
Volum total	20

2. În tuburi de centrifugă de 200 μl se pun 20 μl din amestecul de reacție pentru fiecare exemplar testat.

3. Se adaugă 5μl ADN extras de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 50 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul PCR, iar acesta se programează după parametrii prezentați în tabelul 16.

Tabel 16: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					
	Etapa inițială	45 de cicluri			Extensie finală	Etapa finală
		Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min. 95°C 1 ciclu	30 sec. 95°C	30 sec. 57°C	1 minut 72°C	15 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor de amplificare

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4.

Prođușii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Reacția de restricție

1. Reactivii prezentați în tabelul 17 se adaugă într-un tub de microcentrifugă pentru a obține amestecul de restricție. Se vortexează și se centrifughează.
2. Digestia se desfășoară la 37°C, timp de 3 ore.

Tabel 17: Componentele și cantitățile necesare efectuării reacției de restricție.

Componente	Volum (μl)
Tampon de restricție 10X	2
BSA acetilată	0,5
Produce PCR	16
<i>Hae III</i>	1,5
Volum total	20

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor rezultați în urma digestiei cu enzime de restricție

După terminarea reacției de restricție se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor.

Gelul de agaroză 3% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4.

Prođușii de restricție se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri cu o pipetă automată. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă (3 V/cm) și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Pentru identificarea alelelor A și B ale genei care codifică pentru β -lactoglobulină la bovine, produsul PCR, având mărimea de 262 pb, a fost supus digestiei cu enzima de restricție *Hae III* care recunoaște situsul palindromic format din patru nucleotide GG↓CC.

Genotipul AA va prezenta două benzi de 153 și 109 pb deoarece la nivelul fragmentului amplificat există un situs de restricție *Hae III*, corespunzător alelei A a genei. Prezența mutației punctiforme (T/C) generează un nou situs de restricție iar varianta genei care prezintă această mutație corespunde alelei B. Genotipul BB va prezenta trei benzi de 109, 79 și respectiv 74 pb.

Dacă se folosește separarea prin electroforeză în gel de agaroză standard, benzile de 79 și 74 pb migrează împreună, fiind foarte apropiate ca mărime, și nu vor putea fi clar separate și evidențiate. Ca atare, la vizualizarea gelului, se va observa în locul acestora o singură bandă. Deci, în cazul genotipului BB se vor evidenția practic doar două benzi, una la 109 pb și alta pentru 74/79 pb. Din aceste considerente genotipul heterozigot AB va prezenta trei benzi cu mărimea de 153, 109 și 74/79 pb (Figura 18).

Analiza profilelor de restricție permite identificarea genotipurilor AA, AB și BB pentru toate exemplarele bovine supuse analizei.

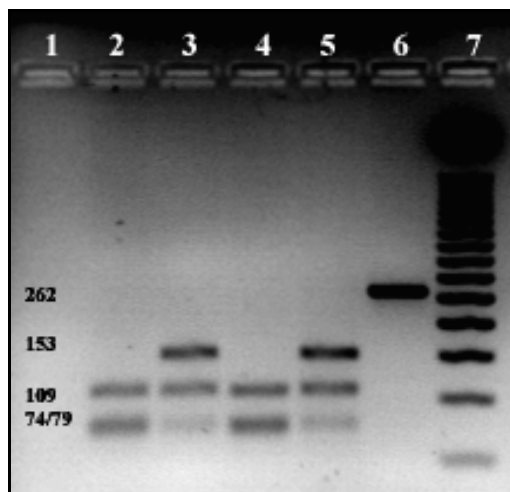


Figura 18: Electroforeză pentru evidențierea produsilor de restricție în vederea evidențierii alelelor A și B ale genei codificatoare pentru β -lactoglobulină la bovine. 1 – martor negativ; 2, 4 – genotip BB; 3, 5 – genotip AB; 6 – fragment netăiat; 7 – marker de masă moleculară 50 bp (*Promega*).

B. Analiza polimorfismului locusului *Extension* la cabaline

Principiul metodei

La mamifere, melanina este principalul pigment sintetizat de organism. Ea apare sub formă de granule la nivelul unor celule specializate numite melanocite. Variațiile de culoare ale robei la cai sunt datorate expresiei unor gene care, ai căror produși, prin activitatea lor, controlează tipul pigmentului din melanocite și/sau forma, numărul ori aranjamentul granulelor de pigment. Melanina apare în două forme moleculare: eumelanina, de culoare neagră sau brună, și pheomelanina, de culoare roșie sau galbenă. Se consideră că genele de la nivelul locilor *Extension* și *Agouti*, care controlează echilibrul dintre eumelanină și pheomelanină, sunt responsabile de apariția culorilor de bază roibă și neagră (Bowling, A.T., Ruvinsky, A., The Genetics of the Horse, 2000).

În acest context, receptorul pentru melanocortină (MC1R), codificat de gena *MC1R* (locusul *Extension*), și peptida sa antagonistă, proteina de semnalizare Agouti (ASIP – Agouti Signaling Protein), codificată de gena *ASIP* (locusul *Agouti*), controlează cantitatea și tipul de melanină din melanocite.

Deci, culoarea roibă apare la cai în urma interacției dintre genele *ASIP* și *MC1R*. Marklund și colaboratorii au descoperit în 1996 o mutație la nivelul genei *MC1R* care determină sinteza unui receptor defectiv. Această proteină este localizată în membrana melanocitelor și are rolul de a lega hormonul care stimulează activarea melanocitelor. La indivizii unde mutația lipsește, procesul de stimulare determină producerea de eumelanină în detrimentul pheomelaninei.

În cazul apariției mutației, proteina receptor defectivă nu își mai poate îndeplini rolul biologic de legare a hormonului stimulator și nu mai poate induce producerea de eumelanină. În consecință, la nivelul melanocitelor, se produce și se acumulează pheomelanină, aceasta determinând apariția culorii roibe. Mutația responsabilă de aceste modificări constă în înlocuirea unei citozine cu timină, aceasta conducând la substituirea fenilalaninei din secvența proteică normală cu serina. Deci, pentru apariția culorii roibe

este necesară prezența genotipului homozigot recesiv (**ee**) la nivelul locusului *Extension* și genotipurilor homozigot dominant (**AA**) sau heterozigot (**Aa**) la nivelul locusului *Agouti*.

Stabilirea genotipurilor de la nivelul locusului *Extension* se realizează prin tehnica RFLP. Au fost desemnați primeri care să flancheze regiunea unde poate să apară mutația punctiformă la nivelul genei *MC1R*, iar ampliconii sunt supuși digestiei enzimatică cu endonucleaza de restricție *Taq I*. Produșii de restricție sunt ulterior analizați folosind electroforeza în gel de agaroză.

Material biologic: probe de ADN genomic extrase de la cabaline din diferite rase.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primeri sens CCTACCTCGGGCTGACCACCAA și antisens GAGAGGAGACTAACCACCCAGATG; vii) aparat PCR; viii) centrifugă; ix) agitator.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză: TAE 1X – TRIS 0,040 M, acid acetic 0,040 M, EDTA 0,002 M. Se prepară sub forma unei soluții 10X care este apoi diluată; ii) tamponul probei: albastru de bromfenol 0,3%, glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 0,5 μg/ml; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală pentru acizi nucleici; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV; ix) plită cu încălzire și agitare magnetică.

Reactivi și aparatură pentru reacția de restricție: i) tampon de restricție care conține 60 mM TRIS-HCl, 1 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT (ditiotreitol) – pH 7,5; ii) albumină serică bovină (BSA) acetilată 10 μg/μl; iii) endonucleaza de restricție *Taq I* 10U/μl; iv) termobloc; v) microcentrifugă; vi) agitator.

Mod de lucru

Amplificarea prin PCR

1. Într-un tub de microcentrifugă se adaugă reactivii prezentați în tabelul 18 pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifugează ușor.

Tabel 18: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTP	2
Polimerază AmpliTaq Gold	0,1
Primer sens	0,5
Primer antisens	0,5
Apă ultrapură	12,9
Volum total	20

2. Din amestecul de reacție, în câte un tub de centrifugă 200 μl, se adaugă 20 μl pentru fiecare exemplar testat.

3. Se adaugă 5μl ADN extras de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 50 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul PCR, iar acesta se programează la parametrii prezentați în tabelul 19.

Tabel 19: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					
	Etapa inițială	42 de cicluri			Extensie finală	Etapa finală
		Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min.	30 sec.	30 sec.	1 minut	10 minute	∞ 4°C
	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	
	1 ciclu				1 ciclu	

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor de amplificare

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4. Produșii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se

încarcă în godeuri. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Reacția de restricție

1. Într-un tub de microcentrifugă se adaugă reactivii din tabelul 20 pentru a obține amestecul de restricție. Se vortexează și se centrifughează.

2. Digestia se desfășoară la 37°C, timp de 3 ore. Ținând cont că enzima este termostabilă se poate realiza și o incubare de doar 2 ore la 65°C.

Tabel 17: Componentele și cantitățile necesare efectuării reacției de restricție.

Componente	Volum (μl)
Tampon de restricție 10X	2
BSA acetilată	0,5
Produce PCR	16
<i>Taq I</i>	1,5
Volum total	20

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor rezultați în urma digestiei cu enzime de restricție

După terminarea reacției de restricție se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor.

Gelul de agaroză 3% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4.

Produșii de restricție se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri cu o pipetă automată. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă (3 V/cm) și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Situsul de restricție pentru *Taq I* este T↓CGA. În cazul alelei prezentei alelei **E** nu există un situs activ de restricție pentru *Taq I*, iar fragmentul amplificat rămâne netăiat și are lungimea de 459 pb. În cazul alelei **e** are loc înlocuirea citozinei cu timină și activarea unui situs de restricție pentru *Taq I* ceea ce duce la clivarea fragmentului inițial în două fragmente de 184, respectiv 275 pb. Astfel, genotipul EE va prezenta o singură bandă la 459 pb, genotipul ee două benzi la 275 și 184 pb, iar genotipul Ee trei benzi de 459, 275 și 184 pb (Figura 19).

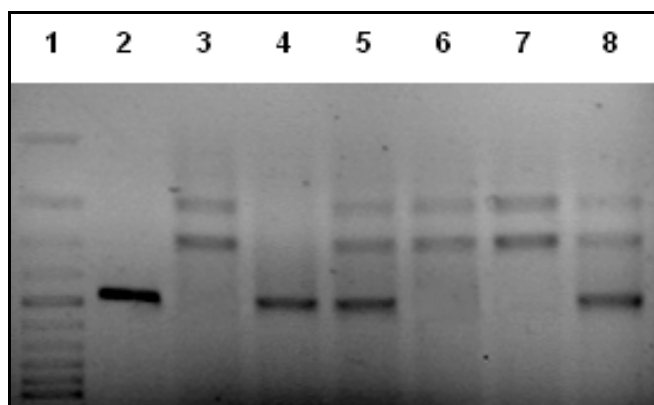


Figura 19: RFLP pentru analiza locusului *Extension*: 1 – marker de masă moleculară 100 bp (Promega); 2 – fragment netăiat; 3, 6, 7 – genotip ee; 4 – genotip EE; 5, 8 – genotip Ee.

IV.3.3 Identificarea speciei utilizând tehnica RFLP

A. Identificarea speciilor de sturioni din genurile *Acipenser* și *Huso*

Principiul metodei

Această metodă permite identificarea speciilor de sturioni prin amplificarea unei regiuni din genomul mitocondrial (ARN_t^{Glu} / citocrom b). Pentru diferențierea între speciile de sturioni produsul PCR de 462 pb a fost digerat cu diferite endonucleaze rezultând profile de restricție specie – specifice. Metoda permite diferențierea între 10 specii de

sturioni aparținând genurilor *Acipenser* și *Huso* și prezintă utilitate practică prin faptul că poate fi aplicată pentru verificarea provenienței loturilor de caviar.

Material biologic: probe de ADN genomic extrase de la sturioni din specii diferite.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază; v) apă ultrapură; vi) primer sens AAAAACCACCGTTGTTATTCAACTA 20 μM; vii) primer antisens GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 20 μM; viii) aparat PCR; xi) microcentrifugă; x) agitator.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză: TAE 1X – TRIS 0,040 M, Acid acetic 0,040 M, EDTA 0,002 M. Se prepară sub forma unei soluții 10X; ii) tamponul probei: albastru de bromfenol 0,3%, glicerol 30% în TAE 1X; iii) soluție de bromură de etidiu 10 μg/ml; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală pentru acizi nucleici; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV; ix) plită cu încălzire și agitare magnetică.

Reactivi și aparatură pentru reacția de restricție: i) tampon de restricție care conține 60 mM TRIS-HCl, 1 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT (ditiotreit) – pH 7,5; ii) albumină serică bovină (BSA) acetilată 10 μg/μl; iii) endonucleazele de restricție *Rsa I* și *Tru9 I* 10U/μl; iv) termobloc; v) microcentrifugă; vi) agitator.

Mod de lucru

Amplificarea prin reacție PCR

1. Într-un tub de microcentrifugă se amestecă reactivii prezentați în Tabelul 18 pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifugează ușor.

2. Se adaugă 40 μl din amestecul de reacție în câte un tub de centrifugă 200 μl pentru fiecare exemplar testat. Se vor amplifica probe de ADN genomic provenind de la speciile *Acipenser stellatus* și *Huso huso*.

3. Se adaugă 10 μ l ADN extras de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 60 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta se programează la parametrii prezentați în Tabelul 19.

Tabel 18: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μ l)
Tampon PCR 10X	5
MgCl ₂	3
dNTP	4
Polimerază AmpliTaq Gold	0,2
Primer sens	1
Primer antisens	1
Apă ultrapură	25,8
Volum total	40

Tabel 19: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Etapa inițială	45 de cicluri			Extensie finală	Etapa finală
		Denaturare	Anelare	Extindere		
		GeneAmp 9700	10 minute 95°C 1 ciclu	30 sec. 95°C	30 sec. 60°C	

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor de amplificare

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4. Produșii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Reacția de restricție

1. Se vor realiza două reacții de restricție diferite pentru probele amplificate aparținând ambelor specii. Se prepară separat amestecurile de reacție respectând indicațiile din Tabelele 20 și 21. Se vortexează și se centrifughează.

2. Pentru ambele reacții de restricție, digestia se desfășoară la 37°C, timp de 3 ore.

Tabel 20: Componentele și cantitățile necesare efectuării reacției de restricție.

Componente	Volum (μl)
Tampon de restricție 10X	2
BSA acetilată	0,5
Probus PCR	16
<i>Tru9 I</i>	1,5
Volum total	20

Tabel 21: Componentele și cantitățile necesare efectuării reacției de restricție.

Componente	Volum (μl)
Tampon de restricție 10X	2
BSA acetilată	0,5
Probus PCR	16
<i>Rsa I</i>	1,5
Volum total	20

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor rezultați în urma digestiei cu enzime de restricție

După terminarea reacției de restricție se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor.

Gelul de agaroză 3,5% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4. Produșii de restricție se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri cu o pipetă automată. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă (3 V/cm) și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Rezultate și discuții

Pentru identificarea corectă a speciilor de sturioni din Marea Neagră au fost alese trei enzime de restricție: *Rsa I* și *Tru 9I*. Digestia fragmentului ARN_t^{Glu}/ citocrom b cu cele două enzime de restricție, urmată de electroforeza în gel de agaroză 3,5% conduc la obținerea unor profile electroforetice caracteristice fiecărei specii analizate. Fragmentele mai mici de 50 pb nu au putut fi separate prin electroforeză. Situsul de restricție pentru *Tru 9I* este 5'T↓TAA 3', iar pentru *Rsa I* este 5'GT↓AC3'.

La *Acipenser stellatus*, în urma digestiei produsului PCR cu enzima de restricție *Tru 9I*, se obțin trei fragmente de 387, 66 și 9 pb, dintre care doar primele două vor putea fi evidențiate. La *Huso huso*, digestia produsului de amplificare cu enzima *Tru 9I*, determină apariția a patru fragmente, de 292, 95, 66 și 9 pb. Pe gelul de agaroză se evidențiază trei din cele patru fragmente, și anume de 292, 95 și 66 pb (Figura 20).

La *Huso huso*, în urma digestiei produsului PCR cu enzima *Rsa I*, s-au obținut trei fragmente, de 317, 112 și 33 pb. La *Acipenser stellatus*, fragmentul ARN_t^{Glu}/ citocrom b a rămas intact după incubarea cu *Rsa I* deoarece la nivelul acestuia nu există situsuri de restricție ale enzimei (Figura 21).

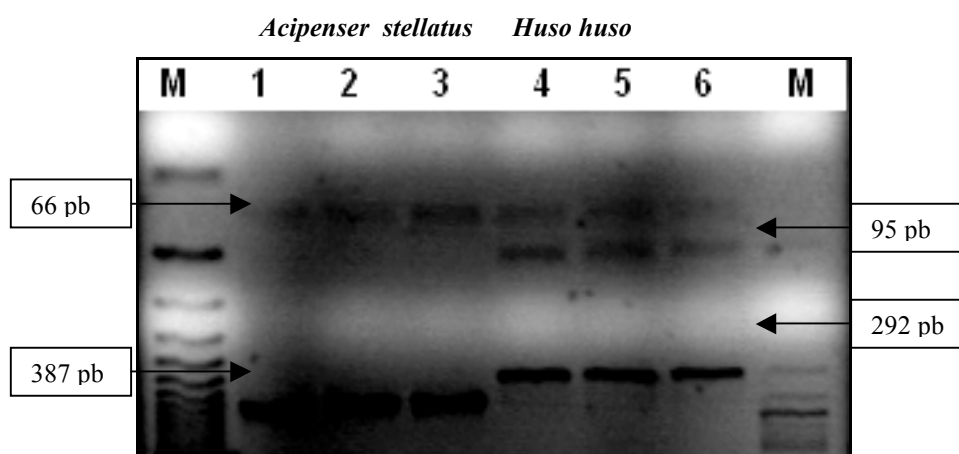


Figura 20: Profilul electroforetic după digestia fragmentului ARN_t^{Glu}/ citocrom b cu enzima de restricție *Tru 9 I* la *Acipenser stellatus* și *Huso huso*. M – marker de masă moleculară 50 bp (Promega); 1, 2, 3 – fragmente de 387 și 66 pb caracteristice pentru *Acipenser stellatus*; 3, 4, 5 – fragmente de 292, 95 și 66 pb caracteristice pentru *Huso huso*.

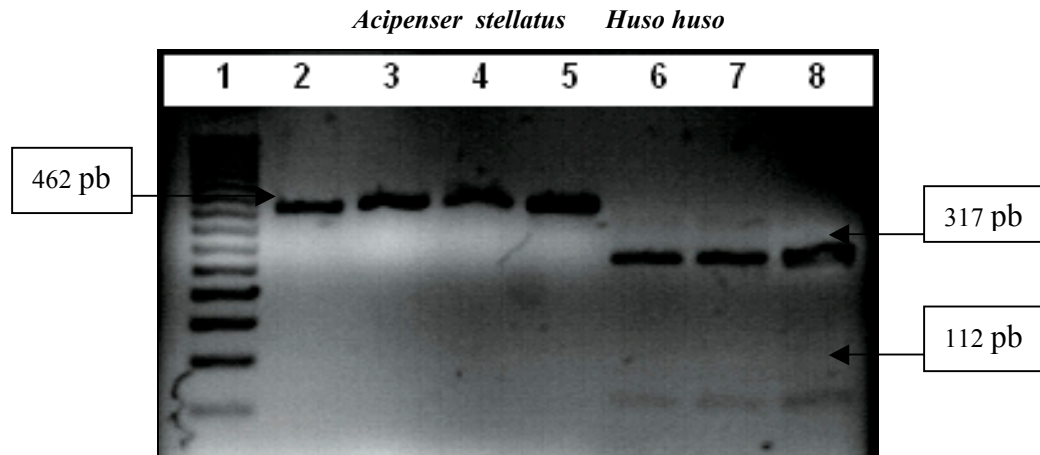


Figura 21: Profilul electroforetic după digestia fragmentului ARN_t^{Glu} /citocrom b cu enzima de restricție *Rsa I* la *Acipenser stellatus* și *Huso huso*. 1 – marker de masă moleculară 50 bp (Promega); 2, 3, 4, 5 – fragment de 462 pb caracteristice pentru *Acipenser stellatus*; 6, 7, 8 – fragmente de 317 și 112 pb caracteristice pentru *Huso huso*.

IV.4. Tehnica de analiză a fragmentelor marcate fluorescent

IV.4.1 Identificarea delețiilor folosind tehnica analizei fragmentelor marcate fluorescent (diagnosticarea imunodeficienței severe combinate la cabaline)

Principiul metodei

SCID (Severe Combined Immunodeficiency) este o maladie autozomal recesivă întâlnită la mamiferele superioare, inclusiv la om. La cai boala este cauzată de o deleție de cinci perechi de baze la nivelul genei care codifică subunitatea catalitică a protein kinazei ADN dependente și a fost raportată numai la rasa Pur Sânge Arab. Maladia se caracterizează printr-o diminuare severă a numărului de limfocite B și T și prin lipsa sintezei de anticorpi. Boala se manifestă numai în cazul homozigoților recesivi.

Conform Shin *et al.* (1997), în cazul apariției deleției are loc o deplasare a cadrului de citire care va duce la activarea unui codon STOP (codonul TAA) având drept rezultat sinteza unei proteine trunchiate care nu-și poate îndeplini funcția biologică (Figura 22).

Imunodeficiența severă combinată este datorată unei deleții de 5 perechi de baze la nivelul genei care codifică subunitatea catalitică a protein-kinazei ADN dependente și

poate fi diagnosticată cu ajutorul tehnicii PCR, urmată de o electroforeză capilară a fragmentelor amplificate și detecție fluorescentă a acestora.

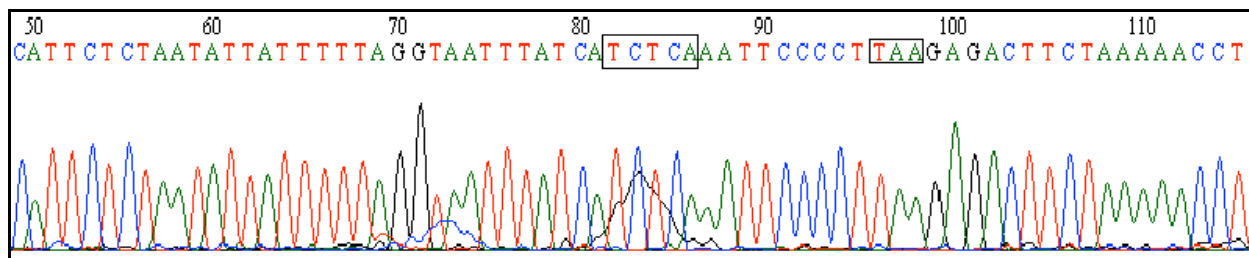


Figura 22: Secvența parțială a fragmentului amplificat în vederea diagnosticării SCID, situsul de 5 nucleotide care sunt deletate în cazul prezenței maladiei și codonul STOP activat în urma deleției.

Pentru aceasta se folosește o pereche de primeri marcați fluorescent cu colorantul **6-FAM** în scopul amplificării fragmentului care poate conține mutația. Producții reacției de amplificare sunt apoi supuși unei electroforeze capilare în prezența unui marker de masă moleculară și acesta marcat cu un fluorocrom.

Material biologic: probe de ADN genomic extrase de la cabaline din diferite rase.

Reactivi și aparatură: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază AmpliTaq Gold 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primer sens **6-FAM-GCAAAGGAGACAGAATT** 20μM; vii) primer antisens TGATGATGTCATCCCAGA 20 μM; viii) standard de masă moleculară „Gene-Scan-500 **ROX** Size Standard”; ix) formamidă deionizată; x) aparat PCR; xi) analizator genetic automat; xii) microcentrifugă; xiii) agitator; xiv) termobloc.

Mod de lucru

1. Pentru obținerea amestecului de reacție se respectă indicațiile prezentate în tabelul 22. Reactivii se introduc într-un tub de centrifugă de 0,5 ml care se vortexează și se centrifugează ușor.

Tabel 22: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTP	2
ADN Polimerază AmpliTaq Gold	0,1
Primer sens	0,6
Primer antisens	0,6
Apă ultrapură	12,7
Volum total	20

2. Un volum de 20 μl din amestecul de reacție se repartizează în câte un tub de centrifugă 200 μl pentru fiecare exemplar testat.

3. Se adaugă 5 μl ADN de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 30-40 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta este programat la parametrii prezentați în tabelul 23.

Tabel 23: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					Etapa finală
	Etapa inițială	30 de cicluri			Extensie finală	
		Denaturare	Hibridizare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min. 95°C 1 ciclu	30 sec. 95°C	30 sec. 53°C	1 minut 72°C	50 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

După realizarea reacției PCR probele se pregătesc pentru detectarea fragmentelor amplificate:

1. Se amestecă 0,5 μl produs de amplificare cu 0,5 μl din standardul de masă moleculară Gene-Scan-500 ROX Size Standard și 13 μl formamidă deionizată.

2. Imediat înainte de introducerea probelor în aparat se face denaturarea acestora prin încălzire la 95°C și apoi răcirea bruscă pe gheață.

3. Probele se introduc în analizatorul genetic automat ABI Prism 310.

Rezultate și discuții

În urma electroforezei capilare fragmentele rezultate sunt prelucrate cu ajutorul programelor GeneScan Analysis și Genotyper (*Applied Biosystems*). Prelucrarea constă în atribuirea fiecărei alele a unei mărimi în perechi de baze cu ajutorul căreia poate fi individualizată și ulterior analizată. În funcție de mărimea fragmentelor de amplificare obținute se poate stabili cu certitudine dacă individul analizat este sănătos, purtător sau bolnav.

Astfel, pentru un individ homozigot normal se obține un singur semnal cu mărimea de 235 pb (Figura 23), în cazul individului homozigot purtător se vor obține două semnale, unul la 235 pb și altul la 230 pb (datorită deleției de 5 pb), iar dacă individul analizat este homozigot recesiv se va evidenția un singur semnal la 230 pb. Semnalul este datorat prezenței a două alele identice ca mărime, suprapuse.

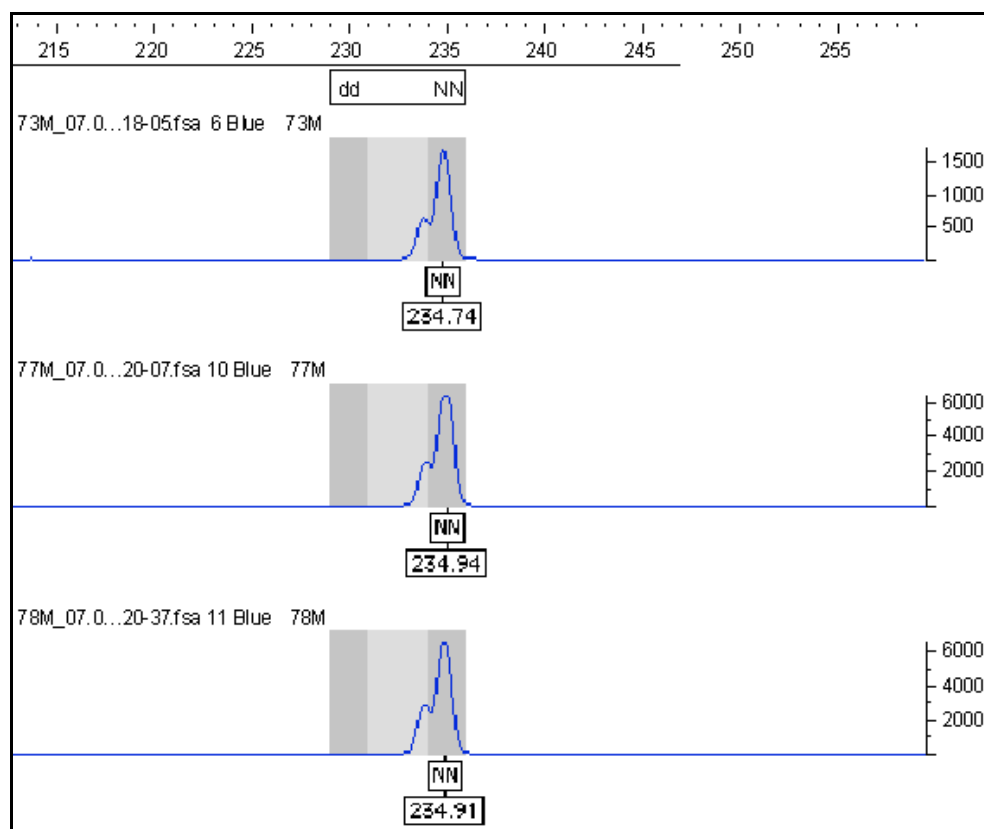


Figura 23: Profilele pentru trei exemplare din rasa Pur Sânge Arab diagnosticate normale pentru SCID.

IV.4.2 Identificarea inserțiilor folosind tehnica analizei fragmentelor marcate fluorescent (diagnosticarea Epidermolizei joncționale severe la cabaline)

Principiul metodei

JEB (Junctional Epidermolysis Bullosa) este o maladie autozomală cauzată de inserția unei citozine la nivelul genei *LAMC2* care codifică subunitatea $\gamma 2$ a lamininei 5 (proteină implicată în adeziunea celulară). Inserția duce la decalarea cadrului de citire și la sinteza unei proteine defective (Milenkovic *et al.*, 2003). Boala a fost descoperită la caii de tracțiune din Franța și Belgia. Se manifestă prin apariția unor joncțiuni dermo-epidermale anormale care au drept consecință o fragilitate a tegumentului și mucoaselor. Indivizii heterozigoți, purtători ai genei defective, nu manifestă simptomele bolii, dar o pot transmite în descendență.

Pentru a pune la punct o metodă de diagnostic au fost folosiți primeri care flanchează regiunea care poate conține inserția, primerul sens fiind marcat cu colorantul fluorescent 6-FAM. Producții de amplificare sunt supuși ulterior electroforezei capilare cu detecție în fluorescență, în prezența unui standard de masă moleculară.

Material biologic: probe de ADN genomic extras de la cabaline din diferite rase.

Reactivi și aparatură: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază AmpliTaq Gold 5 U/ μ l; v) apă ultrapură; vi) primer sens 6-FAM – TGTTACTCAGGGGATGAGAA 20 μ M; vii) primer antisens CTGGGGGCAGTTATTGCAC 20 μ M; viii) standard de masă moleculară „Gene-Scan-500 ROX Size Standard”; ix) formamidă deionizată; x) aparat PCR; xi) analizator genetic automat; xii) microcentrifugă; xiii) agitator; xiv) termobloc.

Mod de lucru

1. Într-un tub de centrifugă de 0,5 ml se adaugă reactivii din tabelul 24 pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifugează ușor.

Tabel 24: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTP	2
ADN Polimerază AmpliTaq Gold	0,1
Primer sens	0,6
Primer antisens	0,6
Apă ultrapură	12,7
Volum total	20

2. Câte 20 μl din amestecul de reacție se adaugă în câte un tub de centrifugă de 0,2 μl, pentru fiecare exemplar testat.

3. Se adaugă 5 μl ADN de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 30-40 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta se programează după parametrii prezentați în tabelul 25.

Tabel 25: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					
	Etapa inițială	30 de cicluri			Extensie finală	Etapa finală
		Denaturare	Hibridizare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min. 95°C 1 ciclu	30 sec. 95°C	30 sec. 57°C	45 secunde 72°C	50 minute 72°C 1 ciclu	

După realizarea reacției PCR probele se pregătesc pentru detectarea fragmentelor amplificate:

1. Se amestecă 0,5 μl produs de amplificare cu 0,5 μl din standardul de masă moleculară Gene-Scan-500 ROX Size Standard și 13 μl formamidă deionizată.

2. Înainte de introducerea probelor în aparat se face denaturarea acestora prin încălzire la 95°C și apoi răcirea bruscă pe gheață.

3. Probele se introduc în analizatorul genetic automat ABI Prism 310.

Rezultate și discuții

Prelucrarea rezultatelor se realizează cu ajutorul programelor GeneScan Analysis și Genotyper (*Applied Biosystems*) și constă în identificarea fiecărui fragment amplificat corespunzător mărimi în perechi de baze a acestuia.

Pentru a evidenția prezența inserției la exemplarele testate s-a analizat profilul produșilor de amplificare. Un individ homozigot normal va prezenta un singur semnal cu mărimea de 169 pb, unul heterozigot purtător va avea două semnale la 169 pb și la 170 pb, datorită inserției C, iar unul homozigot recesiv un singur semnal la 170pb (Figura 24).

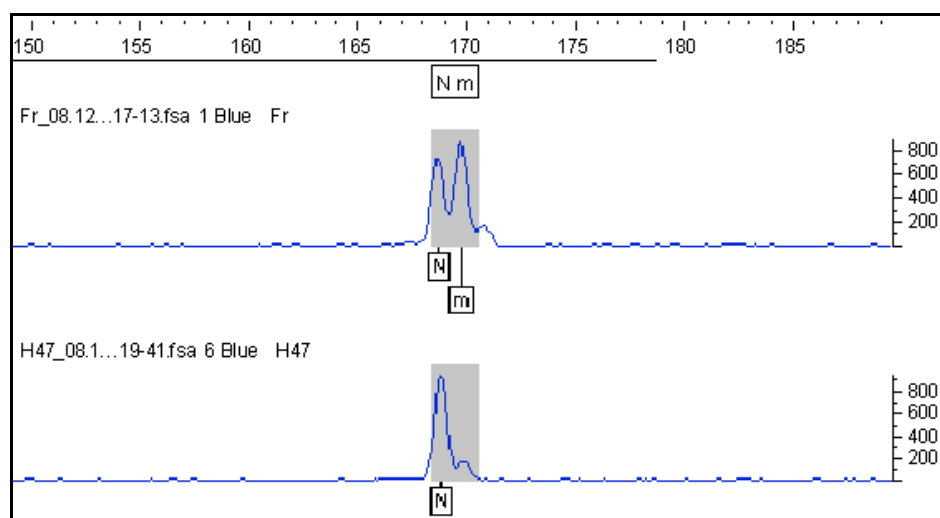


Figura 24: Profilele pentru două exemplare de cabaline diagnosticate ca purtător (sus), respectiv normal (jos) pentru JEB.

III.4.3 Identificarea mutațiilor punctiforme utilizând tehnicile RFLP și de analiză a fragmentelor marcate fluorescent (diagnosticarea Paraliziei hiperkalemice periodice la cabaline)

Principiul metodei

HYPP (Hyperkalemic Periodic Paralysis) este o maladie autozomală descoperită la rasa de cai Quarter Horse, dar și la om. Maladia este cauzată de o mutație punctiformă (C trece în G) la nivelul genei care codifică subunitatea alfa a canalului de sodiu din

membrana celulelor musculare striate. În urma mutației are loc înlocuirea fenilalaninei cu leucină, iar această modificare duce la creșterea excesivă a permeabilității membranei celulelor musculare pentru ionii de potasiu (Rudolph *et al.*, 1992).

Manifestările bolii sunt creșterea frecvenței respiratorii, spasme musculare necontrolate, stare de slăbiciune generală. În cazurile cele mai grave poate surveni decesul. Efectele apar și la indivizii heterozigoți, dar sunt extrem de puternice la cei homoziigoți recesivi.

Boala poate fi diagnosticată cu ajutorul tehnicii RFLP, urmată de o electroforeză capilară a fragmentelor de restricție și de detecția în fluorescență a acestora. Pentru aceasta se folosește o pereche de primeri marcați fluorescent cu 6-FAM în scopul amplificării fragmentului care poate conține mutația. Produșii reacției de amplificare sunt digerați cu endonucleaza de restricție *Taq I* și apoi supuși unei electroforeze capilare în prezența unui marker de masă moleculară marcat cu un fluorocrom. În urma amplificării se obține un fragment de 100 pb care conține și situsul la nivelul caruia poate apărea mutația punctiformă.

Material biologic: probe de ADN genomic extras de la cabaline din diferite rase.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) ADN polimerază AmpliTaq Gold 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primer sens 6-FAM - CGGGGGAGTGTGTGCTCAAGAT 20 μM; vii) primer antisens ACAATGGACAGGATGACAACCAC 20 μM; viii) standard de masă moleculară „Gene-Scan-500 ROX Size Standard”; ix) formamidă deionizată; x) aparat PCR; xi) analizator genetic automat; xii) microcentrifugă; xiii) agitator; xiv) termobloc.

Reactivi și aparatură pentru electroforeză: i) tampon de electroforeză: TAE 1X – TRIS 0,040 M, acid acetic 0,040 M, EDTA 0,002 M. Se prepară sub forma unei soluții 10X; ii) tamponul probei: albastru de bromfenol 0,3%, glicerol 30% în TAE 1X; iii)

soluție de bromură de etidium 10 $\mu\text{g/ml}$; iv) marker de masă moleculară; v) agaroză; vi) tanc de electroforeză orizontală; vii) sursă de curent; viii) transiluminator UV.

Reactivi și aparatură pentru reacția de restricție: i) tampon de restricție care conține 60 mM TRIS-HCl, 1 mM NaCl, 60 mM MgCl_2 , 10 mM DTT (ditiotritol) – pH 7,5; ii) albumină serică bovină (BSA) acetilată 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; iii) endonucleaza de restricție *Taq I* 10U/ μl ; iv) microcentrifugă; v) agitator; vi) termobloc.

Mod de lucru

Amplificarea prin reacție PCR

1. Reactivii prezentați în tabelul 26 se amestecă într-un tub de microcentrifugă de 0,5 ml pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifugează ușor.

Tabel 26: Reactivi și cantități necesare realizării reacției PCR.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR 10X	2,5
MgCl_2	1,5
dNTP	2
Polimerază AmpliTaq Gold	0,1
Primer sens	0,6
Primer antisens	0,6
Apă ultrapură	12,7
Volum total	20

2. Pentru fiecare exemplar testat se adaugă 20 μl din amestecul de reacție în câte un tub de centrifugă de 200 μl .

3. Se adaugă 5 μl ADN extras de la fiecare exemplar de testat, diluat corespunzător (circa 50 ng/reacție). Se vortexează și se centrifugează ușor.

4. Tuburile se așează în aparatul PCR, iar acesta se programează respectând parametrii prezentați în tabelul 27.

Tabel 27: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					Etapa finală
	Etapa inițială	40 de cicluri			Extensie finală	
		Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min. 95°C 1 ciclu	30 sec. 95°C	30 sec. 57°C	1 minut 72°C	30 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

Electroforeza în gel de agaroză în vederea vizualizării produșilor de amplificare

După terminarea reacției PCR se realizează o electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare.

Gelul de agaroză 2% se prepară în conformitate cu protocolul prezentat în Capitolul II, protocolul II.4. Produșii de amplificare se amestecă cu tamponul probei și se încarcă în godeuri. Se conectează tancul de electroforeză la sursa de curent și se pornește electroforeza. Migrarea se desfășoară la tensiune constantă și la temperatura camerei, timp de 40 – 50 de minute, în funcție de mărimea fragmentelor amplificate. La finalul migrării, vizualizarea benzilor de ADN se realizează cu ajutorul unui transiluminator UV.

Reacția de restricție

1. Reactivii din tabelul 28 sunt adăugați într-un tub de microcentrifugă pentru a obține amestecul de restricție. Se vortexează și se centrifughează.

2. Digestia se desfășoară la 37°C, timp de 3 ore. Deoarece enzima *Taq I* este termorezistentă digestia se poate realiza și timp de 2 ore la 65°C.

Tabel 28: Componentele și cantitățile necesare efectuării reacției de restricție.

Componente	Volum (μl)
Tampon de restricție 10X	1,5
BSA acetilată	0,4
Produce PCR	10
<i>Taq I</i>	1,1
Apă ultrapură	2
Volum total	15

Detectarea fragmentelor marcate fluorescent:

1. Se amestecă 1 µl produs de amplificare cu 0,5 µl din standardul de masă moleculară Gene-Scan-500 ROX Size Standard și 12,5 µl formamidă deionizată.
2. Înainte de introducerea probelor în aparat se face denaturarea acestora prin încălzire la 95°C (2 minute) și apoi răcirea bruscă pe gheață (cel puțin 3 minute).
3. Probele se introduc în analizatorul genetic automat ABI Prism 310.

Rezultate și discuții

În vederea diagnosticării maladiei au fost combinate tehnica RFLP și identificarea fragmentelor marcate fluorescent în sistem automat.

În funcție de profilul fragmentelor de restricție obținute se poate stabili cu certitudine dacă indivizii analizați sunt sănătoși, purtători sau bolnavi. Mutația punctiformă apare la nivelul situsului de restricție recunoscut de *Taq I* (T↓CGA). Astfel, în absența mutației situsul de restricție este activ și zona amplificată este tăiată în două fragmente de 65 și 35 pb. În prezența mutației (C/G), secvența recunoscută de enzimă este modificată, iar ampliconul rămâne intact (100 pb).

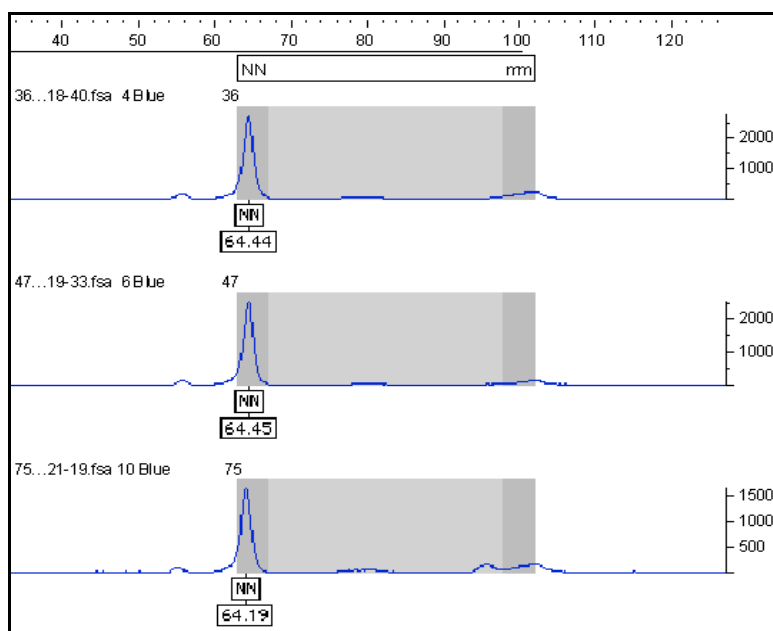


Figura 25: Profilele pentru trei exemplare de cabaline diagnosticate ca fiind normale pentru HYPP.

Analiza fragmentelor de restricție pentru un individ homozigot normal evidentiaza obținerea unui singur semnal cu mărimea de 65 pb (Figura 25). În cazul unui individ purtător se evidențiază două semnale, unul pentru 65 pb și altul pentru 100 pb, iar pentru un individ homozigot recesiv se evidențiază un singur semnal pentru 100 pb. În cazul indivizilor homozigoți normali se obține un singur semnal deoarece doar primerul sens este marcat fluorescent și astfel doar fragmentul de 65 pb din capătul 5' poate fi detectat de cititorul de fluorescență.

IV.5. Tehnica PCR multiplex

Tehnica utilizează pentru amplificare mai multe perechi de primeri simultan. Principala problemă pe care o pune această tehnică este alegerea seturilor de primeri. Este foarte dificilă alegerea mai multor perechi de primeri care să aibă aproximativ aceeași temperatură de hibridizare și care să nu formeze dimeri sau structuri secundare. De asemenea, ei trebuie să asigure amplificări eficiente și să nu furnizeze produși secundari de amplificare.

IV.5.1 Analiza prin PCR multiplex a microsateliților la sturioni

Pentru analiza microsateliților se realizează mai întâi o reacție de amplificare de ADN extras anterior, urmată de o electroforeză capilară și de detecția în fluorescență a produșilor rezultați. Amplificarea se va realiza printr-o reacție PCR multiplex care utilizează o combinație de mai mulți primeri cu secvențe nucleotidice specifice fragmentelor de interes. Rezultatul va fi amplificarea concomitentă a acestor zone. Pentru a putea funcționa, metoda trebuie să utilizeze pentru amplificare primeri cu temperaturi similare de hibridizare pentru genele studiate.

Amplificarea microsateliților din ADN genomic extras de la *Huso huso* se va realiza în două reacții PCR multiplex: una pentru markerii Aox 23 și LS-57, iar alta

pentru LS-19, LS-34, LS-54, LS-68 și Aox 45. Cele 7 perechi de primeri necesari amplificării microsateleților sunt marcați cu patru coloranți fluorescenți diferiți (Tabel 29).

Tabel 29: Șapte microsateleți specifici sturionilor și primerii marcați fluorescent necesari amplificării.

Primer	Secvență	Marcator	Culoare
LS-19 F LS-19 R	CATCTTAGCCGCTGGGTAC CAGGTCCCTAATAACAATGGC	6-FAM	Albastru
LS-34 F LS-34 R	TACATACCTTCTGCAACG GATCCCTTCTGTTATCAAC	VIC	Verde
LS-54 F LS-54 R	CATCTAGTCTTTGTTGATTACAG CAAAGGACTTTGAAACTAGG	NED	Galben
LS-57 F LS-57 R	GCTTGGTTGCTAGTTTGC GTACAGTATGAGACCACAGGC	PET	Roșu
LS-68 F LS-68 R	TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC AGCCCAACACAGACAATATC	NED	Galben
Aox 23 F Aox 23 R	CAGTGTGCTAGCTTCTCAATA GTTAGCTTAACCATGAATTGTG	6-FAM	Albastru
Aox 45 F Aox 45 R	TTGTTCAATAGTTTCCAACGC TGTGCTCCTGCTTTTACTGTC	PET	Roșu

După amplificare fragmentele obținute sunt supuse unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență. Concomitent cu migrarea acestora, este încărcat și un standard de masă moleculară, marcat cu un fluorocrom diferit, acesta permițând estimarea cu precizie a mărimii fragmentelor amplificate.

Material biologic: probe de ADN genomic de morun.

Reactivi și aparatură: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) polimerază AmpliTaq Gold 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primeri sens și antisens 20 μM din fiecare (Tabel 29); vii) formamidă deionizată; viii) standard de masă moleculară „Gene-Scan-500 LIZ Size Standard”; ix) aparat PCR; x) analizator genetic automat; xi) microcentrifugă; xii) agitator; xiii) termobloc.

Mod de lucru

Pentru fiecare animal testat au fost preparate două reacții PCR multiplex. După terminarea amplificării se combină produșii reacțiilor multiplex și se pun într-un singur tub de analiză pentru fiecare animal de testat.

Prepararea reacției 2-plex:

1. Reactivii prezentați în tabelul 30 se adaugă într-un tub de 0,5 ml pentru a obține amestecul de reacție. Se agită și se centrifughează.

Tabel 30: Componentele și volumele amestecului de PCR pentru reacția 2-plex.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR	2,5
Clorură de magneziu	1,5
Amestec de nucleotide	3
ADN polimerază AmpliTaq Gold	0,4
Perechile de primeri: Aox 23 și LS-57	0,3 din LS-57; 0,5 din Aox 23
Apă deionizată	11
Volum total	20

2. Pentru fiecare exemplar testat se adaugă 20 μl din amestecul de reacție în câte un tub de centrifugă de 200 μl.

3. Se adaugă 5 μl din ADN diluat corespunzător (40 ng/μl) de la fiecare exemplar de testat. Vortexare și centrifugare.

4. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta este programat respectând parametrii prezentați în tabelul 32.

Prepararea reacției 5-plex:

1. Reactivii prezentați în tabelul 31 se adaugă într-un tub de 0,5 ml pentru a obține amestecul de reacție. Se agită și se centrifughează.

2. Pentru fiecare exemplar testat se adaugă 20 μl din amestecul de reacție în câte un tub de centrifugă de 200 μl.

3. Se adaugă 5 μl din ADN diluat corespunzător (40 ng/μl) de la fiecare exemplar de testat. Vortexare și centrifugare.

4. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta este programat respectând parametrii prezentați în tabelul 32.

Tabel 31: Componentele și volumele amestecului de PCR pentru reacția 5-plex.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR	2,5
Clorură de magneziu	1,5
Amestec de nucleotide	3
ADN polimerază AmpliTaq Gold	0,4
Perechile de primeri: LS-19, LS-34, LS-54, LS-68 și Aox 45	0,5 din LS-19, LS-68; 0,4 din LS-34, LS-54; 0,5 din Aox 45
Apă deionizată	8,8
Volum total	20

Tabel 32: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					
	Etapa inițială	40 de cicluri			Extensie finală	Etapă finală
		Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 minute 95°C 1 ciclu	30 secunde 95°C	30 secunde 53 °C	1 minut 72°C	60 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

După realizarea reacției PCR probele se pregătesc pentru detectarea fragmentelor amplificate:

1. Se prepară probele ce urmează să fie încărcate în aparat și care vor conține 0,5 μl din standardul de masă moleculară Gene-Scan-500 LIZ Size Standard, 11,5 μl formamidă deionizată și câte 1 μl din produșii de amplificare ai celor două reacții PCR.

2. Imediat înainte de introducerea probelor în aparat se face denaturarea acestora prin încălzire la 95°C, 2 minute și apoi răcirea bruscă pe gheață.

3. Probele se introduc în analizatorul genetic automat. Aici, fragmentele amplificate din fiecare probă, sunt supuse unei electroforeze capilare, urmată de o detecție în fluorescență a acestora cu ajutorul unui cititor LASER special. Profilele rezultate sunt prelucrate cu ajutorul programelor GeneScan Analysis și Genotyper (*Applied Biosystems*).

Rezultate și discuții

Pentru a putea interpreta corect rezultatele unei analize de microsateliți analiza pornește de la profilul genetic neprelucrat rezultat în urma migrării și separării produșilor de amplificare. Prin prelucrarea acestuia se obține în final amprenta genetică a indivizilor.

Primerii folosiți de noi realizează amplificarea unor microsateliți care prezintă un număr variat de repetiții di-, tri- sau tetranucleotidice. Acestea conferă un aspect caracteristic profilelor genetice obținute. De asemenea, trebuie menționat că numărul de alele prezente pe un anumit locus depinde atât de homo- sau heterozigoția exemplarului analizat, cât și de gradul de poliploidie al genomului.

Astfel, la exemplarele homozigote care prezintă o singură alelă pe un anumit locus, pe electroforegramă o să apară un singur semnal. Exemplarele heterozigote prezintă două alele diferite pe un anumit locus, deci pe electroforegramă vor apărea două semnale. În cazul exemplarelor poliploide, numărul de alele pe un anumit locus poate fi mai mare de două, în funcție de gradul de poliploidie. În cazul morunilor locusul LS-57 este poliploid (Figurile 26 - 29).

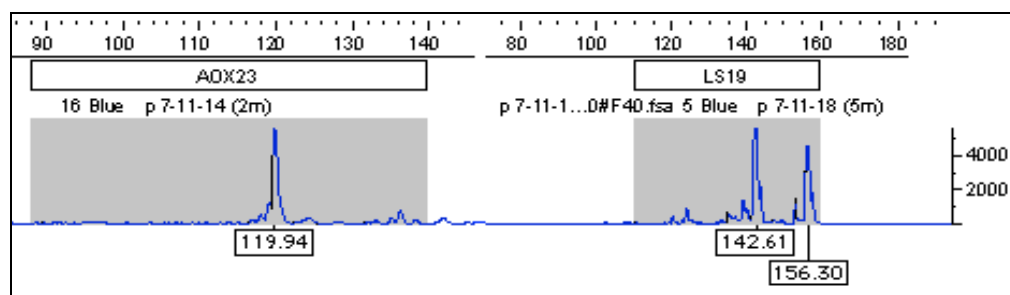


Figura 26: Profil specific pentru locii AOX 23 și LS-19 la *Huso huso*.

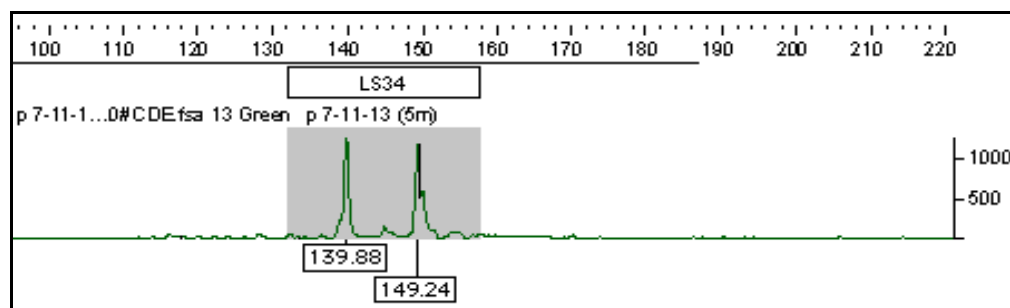


Figura 27: Profil specific pentru locusul LS-34 la *Huso huso*.

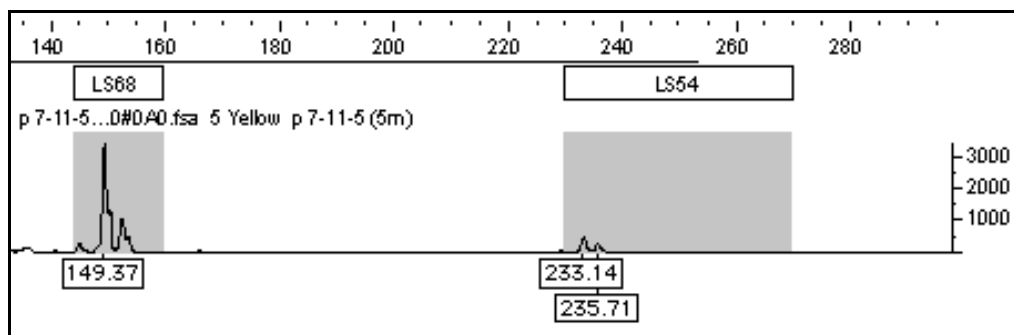


Figura 28: Profil specific pentru locii LS-68 și LS-54 la *Huso huso*.

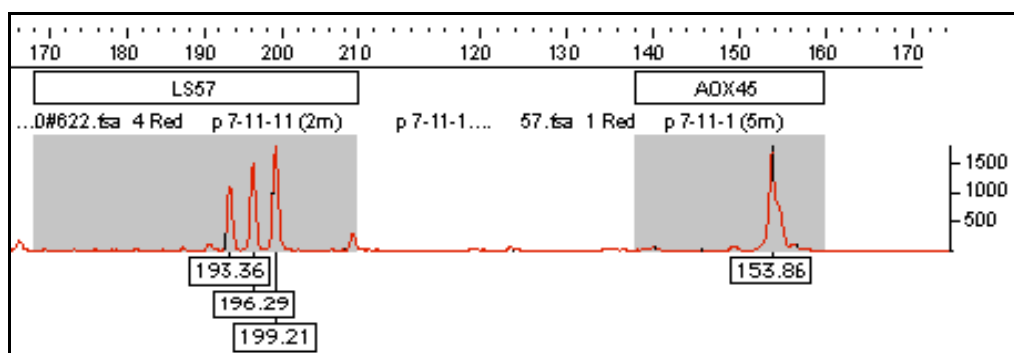


Figura 29: Profil specific pentru locii AOX 45 și LS-57 la *Huso huso*.

IV.5.2 Analiza prin PCR multiplex a microsateliților la suine

Principiul metodei

Pentru analiza microsateliților s-au desemnat primeri specifici regiunilor care urmează să fie amplificate, primerul sens fiind marcat cu un colorant fluorescent specific. Amplificarea microsateliților din ADN genomic extras de la suine se va realiza în două reacții PCR multiplex: una pentru markerii SW24, SO386 și SO005, iar alta pentru SW936, SO228, SO155, SW911, SO355, SW240, SW857 și SO101. Cele 11 perechi de primeri necesari amplificării microsateliților sunt marcate cu patru coloranți fluorescenți diferiți și sunt prezentate în tabelul 33.

După amplificare prin PCR-multiplex, fragmentele obținute sunt supuse unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență. Concomitent cu migrarea acestora, este

încărcat și un standard de masă moleculară, marcat la rândul său cu un fluorocrom diferit (LIZ), acesta permițând estimarea cu o înaltă precizie a mărimii fragmentelor amplificate.

Material biologic: probe de ADN genomic de la suine din diferite rase.

Reactivi și aparatură: i) amestec de deoxinucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; iv) polimerază AmpliTaq Gold 5 U/μl; v) apă ultrapură; vi) primeri sens și antisens 20 μM din fiecare (Tabel 33); vii) formamidă deionizată; viii) standard de masă moleculară „Gene-Scan-500 LIZ Size Standard”; ix) aparat PCR; x) analizator genetic automat; xi) microcentrifugă; xii) agitator; xiii) termobloc.

Tabel 33: 11 loci specifici suinelor și coloranții fluorescenți cu care sunt marcați primerii sens.

Microsatelit	Colorant	Culoare	Secvența primerilor
SW936	6-FAM	Albastru	F TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC R GTGCAAGTACACATGCAGGG
SO228	6-FAM	Albastru	F GGCATAGGCTGGCAGCAACA R GTTCCGCCCTCACAGACCCAAAT
SO155	6-FAM	Albastru	F TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTG R GTTAAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT
SW911	VIC	Verde	F CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC R CATCTGTGGAAAAAAAAAGCC
SO355	VIC	Verde	F TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG R GTTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA
SW240	NED	Galben	F AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG R AAACCATTAAGTCCCTAGCAA
SW857	NED	Galben	F TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC R GATCCTCCTCAAATCCCAT
SO101	NED	Galben	F GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG R GTCTCCCTCACACTTACCGCAG
SW24	PET	Roșu	F CTTTGGGTGGAGTGTGTGC R ATCCAAATGCTGCAAGCG
SO386	PET	Roșu	F GAACTCCTGGGTCTTATTTTCTA R GTCAAAAATCTTTTATCTCCAACAGTAT
SO005	PET	Roșu	F TCCTTCCCTCCTGGTAACTA R GCACTTCTGATTCTGGGTA

Mod de lucru

Pentru fiecare animal testat au fost preparate două reacții PCR multiplex. După terminarea amplificării se combină produșii reacțiilor multiplex și se pun într-un singur tub de analiză pentru fiecare animal de testat.

Prepararea reacției 3-plex:

1. Reactivii prezentați în tabelul 34 se adaugă într-un tub de centrifugă pentru a obține amestecul de reacție. Se agită și se centrifughează.

Tabel 34: Componentele și volumele amestecului de PCR pentru reacția 3-plex.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR	2,5
Clorură de magneziu	1,5
Amestec de nucleotide	2
ADN polimerază AmpliTaq Gold	0,3
Primeri sens și antisens	0,6 din SW24; 0,5 din SO386; 0,5 din SO005
Apă deionizată	10,5
Volum total	20

2. Un volum de 20 μl din amestecul de reacție se adaugă în câte un tub de centrifugă pentru fiecare exemplar testat. Se adaugă 5 μl din ADN diluat corespunzător (50 ng/μl) de la fiecare exemplar de testat. Vortexare și centrifugare.

3. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta se programează respectând parametrii prezentați în tabelul 36.

Prepararea reacției 8-plex:

1. Reactivii prezentați în tabelul 35 se adaugă într-un tub de 0,5 ml pentru a obține amestecul de reacție. Se agită și se centrifughează.

2. Un volum de 20 μl din amestecul de reacție se adaugă în câte un tub de 0,2 ml pentru fiecare exemplar testat.

3. Se adaugă 5 μl din ADN diluat corespunzător (50 ng/μl) de la fiecare exemplar de testat. Vortexare și centrifugare.

4. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta se programează respectând parametrii prezentați în tabelul 36.

Tabel 35: Componentele și volumele amestecului de PCR pentru reacția 8-plex.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR	2,5
Clorură de magneziu	1,5
Amestec de nucleotide	3
ADN polimerază	0,4
Primeri sens și antisens	0,3 din SW936; 0,4 din SO228; 0,5 din SO155; 0,3 din SW911; 0,4 din SO355; 0,4 din SW240; 0,4 din SW857; 0,4 din SO101
Apă deionizată	8,8
Volum total	20

Tabel 36: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					
	Etapa inițială	34 de cicluri			Extensie finală	Etapă finală
		Denaturare	Anelare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 minute 95°C 1 ciclu	30 secunde 95°C	30 secunde 60°C	1 minut 72°C	60 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

După realizarea reacției PCR probele se pregătesc pentru detectarea fragmentelor amplificate:

1. Se prepară probele ce urmează să fie încărcate în aparat și care vor conține 0,5 μl din standardul de masă moleculară Gene-Scan-500 LIZ Size Standard, 10,5 μl formamidă deionizată, 0,8 μl din producții de amplificare ai reacției 8-plex și 1,2 μl din producții reacției 3-plex.

2. Imediat înainte de introducerea probelor în aparat se face denaturarea acestora prin încălzire la 95°C, 2 minute și apoi răcirea bruscă pe gheață.

3. Probele se introduc în analizatorul genetic automat. Fragmentele amplificate, sunt supuse unei electroforeze capilare, urmată de o detecție în fluorescență. Profilele rezultate sunt prelucrate cu ajutorul programelor GeneScan Analysis și Genotyper.

Rezultate și discuții

Cei 11 microsateliți au fost amplificați prin două reacții multiplex și ampliconii migrați într-o singură rulare. În figurile 30 - 33 sunt prezentate rezultatele obținute pentru un singur exemplar.

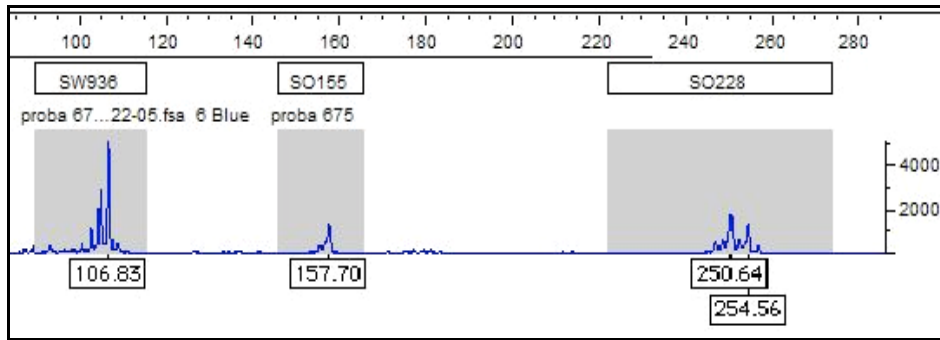


Figura 30: Profil specific pentru locii SW936, SO155 și SO228.

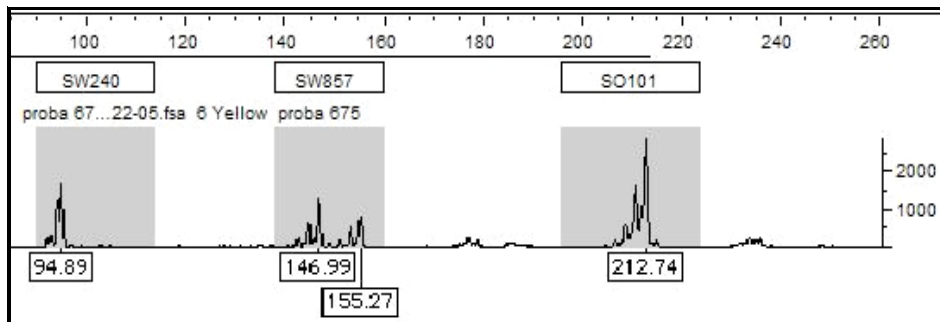


Figura 31: Profil specific pentru locii SW240, SW857 și SO101.

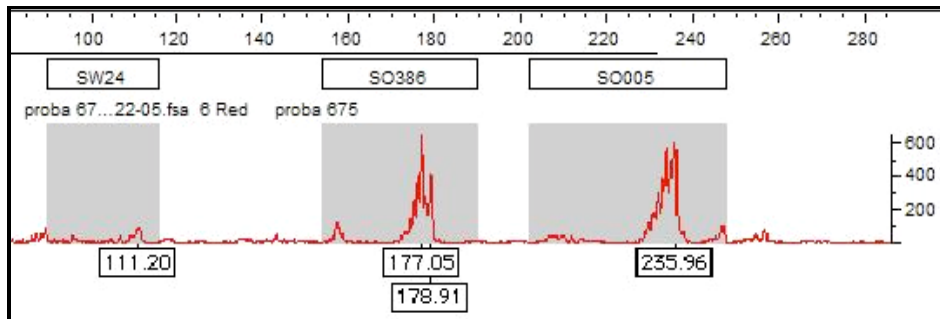


Figura 32: Profil specific pentru locii SW24, SO386 și SO005.

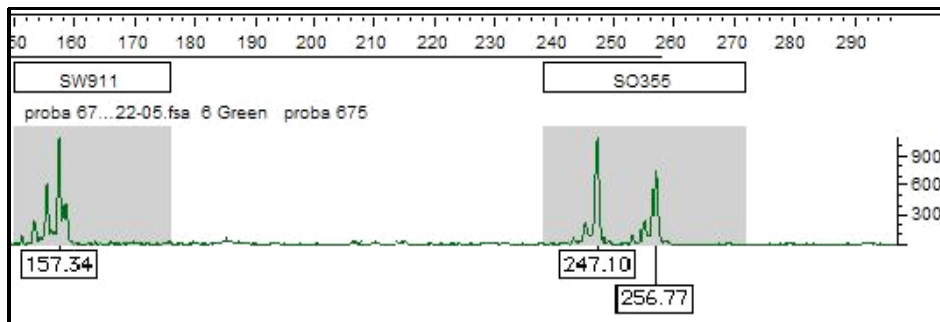


Figura 33: Profil specific pentru locii SW911 și SO355.

IV.5.3 Aplicații ale tehnicii PCR multiplex - Genotiparea la cabaline în vederea testării paternității

Principiul metodei

În cazul tehnicii de genotipare se realizează mai întâi o reacție PCR multiplex utilizând ADN genomic, urmată de o electroforeză capilară și de detecția în fluorescență a produșilor rezultați.

Pentru reacția PCR multiplex se utilizează o combinație de mai mulți primeri cu secvențe specifice fragmentelor de interes. Rezultatul va fi amplificarea concomitentă a acestor zone. Pentru a putea funcționa, metoda trebuie să utilizeze pentru amplificare primeri cu temperaturi similare de hibridizare la secvențele ADN de interes.

Amplificarea microsateliților din ADN extras s-a realizat cu ajutorul kitului StockMarks For Horses.

Kitul conține 17 perechi de primeri necesari amplificării a 17 microsateliți, marcați cu patru coloranți fluorescenți diferiți (6-FAM, NED, VIC și PET). Cei 17 microsateliți sunt amplificați printr-o singură reacție PCR multiplex. Temperaturile de hibridizare și concentrațiile primerilor sunt ajustate astfel încât să permită amplificarea celor 17 microsateliți într-o singură reacție PCR.

După amplificare, pentru a putea fi vizualizate, fragmentele obținute sunt supuse unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență. Concomitent cu migrarea acestora, este încărcat și un standard de masă moleculară, marcat la rândul său cu un fluorocrom diferit (**LIZ**), acesta permițând estimarea cu o înaltă precizie a mărimii fragmentelor amplificate.

Marcarea microsateliților și a standardului de masă moleculară cu cei cinci coloranți fluorescenți diferiți permite practic vizualizarea acestora în cadrul aceleiași migrări.

Cei 17 microsateliți amplificați cu ajutorul kitului StockMarks sunt prezentați în tabelul 37.

Tabel 37: 17 loci specifici cabalinelor amplificați cu ajutorul kitului StockMarks.

Locus	Colorant	Culoare	Mărimea estimată a fragmentelor (pb)
VHL20	6-FAM	Albastră	83–102
HTG4	6-FAM	Albastră	116–137
AHT4	6-FAM	Albastră	140–166
HMS7	6-FAM	Albastră	167–187
HTG6	VIC	Verde	74–103
AHT5	VIC	Verde	126–147
HMS6	VIC	Verde	154–170
ASB23	VIC	Verde	276–212
ASB2	VIC	Verde	237–268
HTG10	NED	Galbenă	83–110
HTG7	NED	Galbenă	114–128
HMS3	NED	Galbenă	146–170
HMS2	NED	Galbenă	215–236
ABS17	PET	Roșie	104-116
LEX3	PET	Roșie	137-160
HMS1	PET	Roșie	166-178
CA425	PET	Roșie	224-247

Material biologic: probe de ADN genomic de la familii de cabaline din diferite rase.

Reactivi și aparatură: i) StockMarks for Horses Kit (*Applied Biosystems*): amestec de 17 perechi de primeri marcați fluorescent; tampon PCR StockMarks care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,3; amestec de nucleotide 1,25 mM din fiecare; control ADN 10 ng/μl; polimerază AmpliTaq Gold 5 U/μl; ii) standard de masă moleculară „Gene-Scan-500 LIZ Size Standard” (*Applied Biosystem*); iii) formamidă deionizată; iv) aparat PCR **GeneAmp PCR System 9700** (*Applied Biosystems*); v) analizator genetic automat **ABI Prism 310** (*Applied Biosystems*); vi) microcentrifugă; vii) agitator; viii) termobloc.

Mod de lucru

Pentru fiecare animal testat este preparată o singură reacție PCR multiplex.

1. Reactivii prezentați în tabelul 38 se adaugă într-un tub de centrifugă pentru a obține amestecul de reacție. Se vortexează și se centrifughează.

Tabel 38: Componentele și volumele amestecului de PCR pentru reacția multiplex.

Componente	Volum (μl)
Tampon PCR StockMarks	2,5
Amestec de nucleotide	4
ADN polimerază AmpliTaq Gold	0,5
Amestec de primeri (17 perechi)	4
Apă deionizată	3
Volum total	14

2. Un volum de 14 μl din amestecul de reacție este repartizat în câte un tub de PCR de 0,2 ml pentru fiecare animal testat.

3. Se adaugă 1 μl din ADN izolat de la fiecare animal de testat, diluat corespunzător (5-10 ng/reacție). Se vortexează și se centrifughează.

4. Tuburile se așează în aparatul de PCR, iar acesta se programează respectând parametrii indicați în tabelul 39.

Tabel 39: Etapele reacției PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare					
	Etapa inițială	30 de cicluri			Extensie finală	Etapă finală
		Denaturare	Hibridizare	Extindere		
GeneAmp 9700	10 min. 95°C 1 ciclu	30 secunde 95°C	30 sec. 60°C	1 minut 72°C	60 minute 72°C 1 ciclu	∞ 4°C

După realizarea reacției PCR multiplex probele se pregătesc pentru detectarea fragmentelor amplificate:

1. Se amestecă 1 μ l produs de amplificare cu 0,5 μ l din standardul de masă moleculară Gene-Scan-500 LIZ Size Standard și cu 11,5 μ l formamidă deionizată.

2. Imediat înainte de introducerea probelor în aparat se face denaturarea acestora prin încălzire la 95°C și apoi răcirea bruscă pe gheață.

3. Probele se introduc în analizatorul genetic automat ABI Prism 310. Aici fragmentele amplificate din fiecare probă sunt supuse unei electroforeze capilare, urmată de o detecție în fluorescență a acestora cu ajutorul unui cititor LASER special.

4. Rezultatele sunt prelucrate cu ajutorul programelor GeneScan Analysis și Genotyper (*Applied Biosystems*). În urma analizei se vor obține amprentele genetice ale fiecărui exemplar.

Rezultate și discuții:

Polimorfismul microsateliților reflectă moștenirea genetică și permite detectarea diferențelor între diferiți indivizi. Prin urmare, aceștia sunt extrem de utili pentru stabilirea identității și verificarea paternității dacă sunt folosiți ca markeri ADN.

Pentru verificarea paternității, microsateliții trebuie să fie diferiți, să prezinte un grad înalt de polimorfism, să prezinte un nivel mutațional scăzut, să fie ușor de marcat și să poată fi amplificați într-o singură reacție PCR multiplex. Setul de markeri utilizați pentru testele de paternitate a fost realizat la ceva timp după începutul proiectului de cartare a genomului cailor, când erau cunoscuți relativ puțini microsateliți, dar a fost completat ulterior prin adăugarea de noi markeri, crescându-se astfel eficiența acestuia.

Pentru a putea interpreta corect rezultatele unei analize de microsateliți trebuie să ținem cont de mai multe aspecte. Practic analiza pornește de la profilul genetic neprelucrat rezultat în urma migrării și separării produșilor de amplificare (Figura 34). Prin prelucrarea acestuia se obține în final amprenta genetică a indivizilor.

Primerii din kitul StockMarks realizează amplificarea unor microsateliți care prezintă un număr variat de repetiții dinucleotidice. Acestea conferă un aspect caracteristic profilelor genetice obținute.

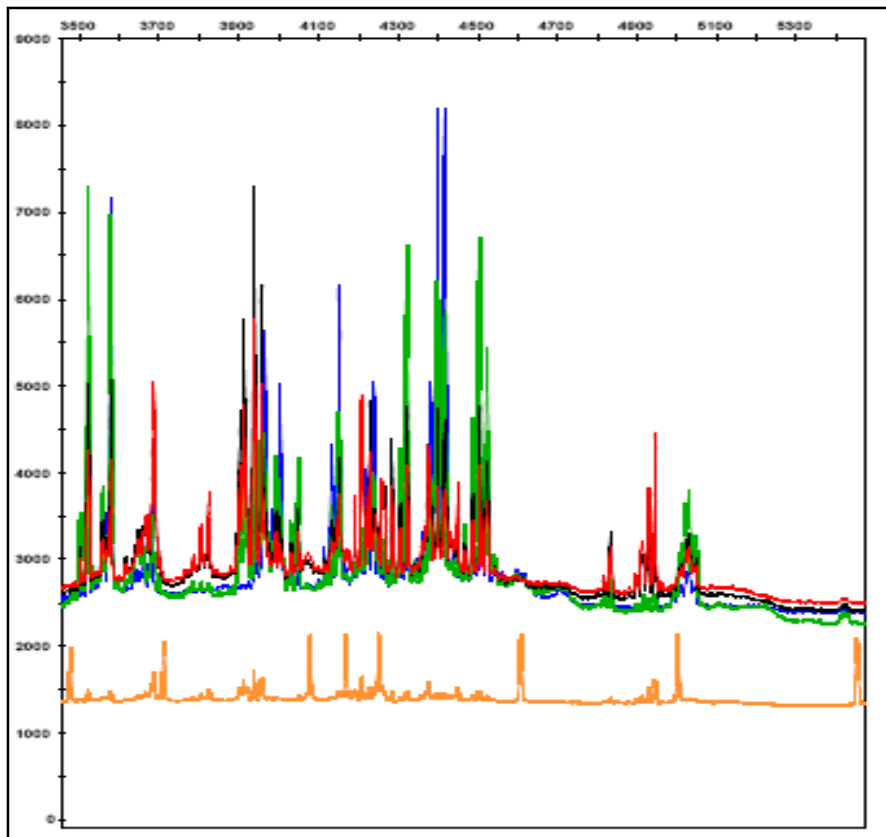


Figura 34: Profil genetic neprelucrat pentru un singur exemplar.

De asemenea, trebuie menționat că numărul de alele prezente pe un anumit locus depinde de homo- sau heterozigoția individului analizat. Astfel, la indivizii homozigoți care prezintă o singură alelă pe un anumit locus pe electroforegramă o să apară un singur semnal. Indivizii heterozigoți prezintă două alele diferite pe un anumit locus, deci pe electroforegramă vor apărea două semnale. Alinarea semnalelor obținute depinde și ea de mărimea microsateliților amplificați.

Pentru a realiza interpretarea corectă a testelor se desemnează inițial alelele produșilor. Acestea trebuie să fie moștenite, câte una una de la fiecare genitor în parte. Dacă nu există nici o nepotrivire la nivelul tuturor locilor analizați putem afirma că produsul aparține cu o probabilitate de peste 99,999% aceluia cuplu de genitori.

În Figurile 35 - 38 și în Tabelul 40 sunt prezentate comparativ rezultatele unui test de paternitate realizat cu un set de 17 microsateliți la o familie de cai din rasa Cal de Sport Românesc.

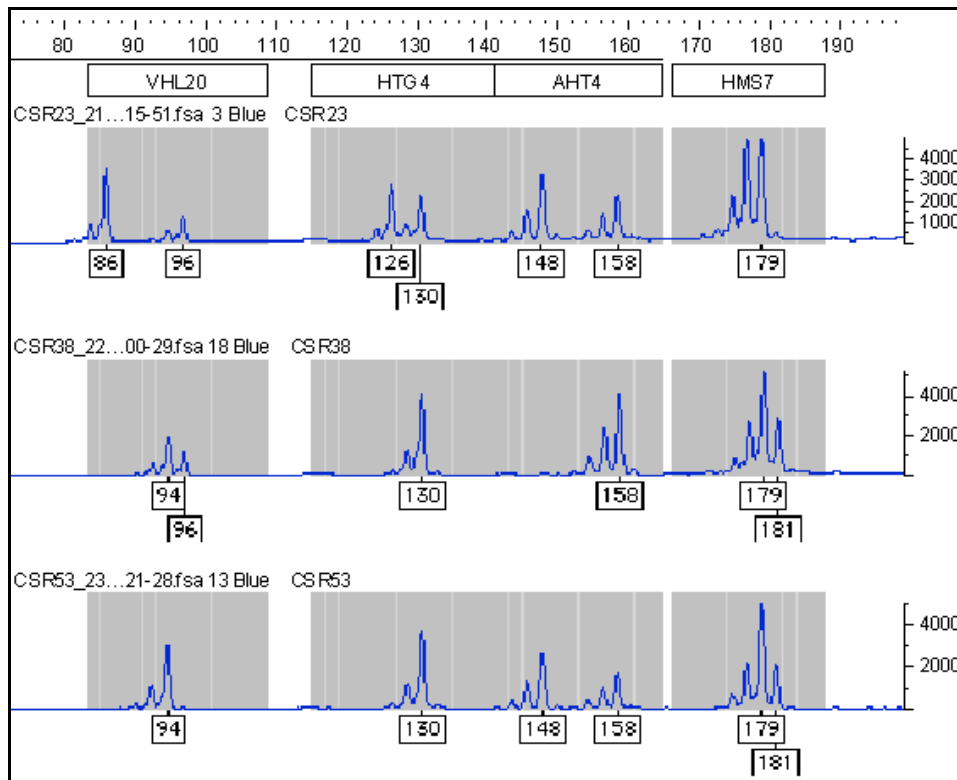


Figura 35: Profilele exemplarelor analizate pe locii VHL20, HTG4, AHT4 și HMS7.

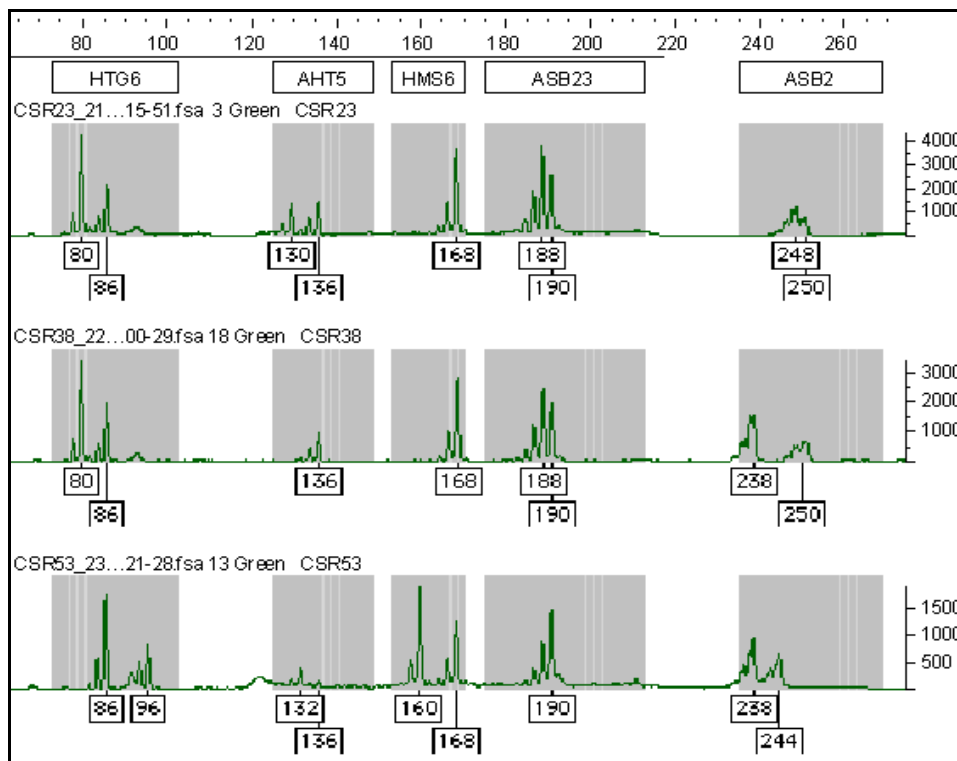


Figura 36: Profilele exemplarelor analizate pe locii HTG6, AHT5, HMS6, ASB23 și ASB2.

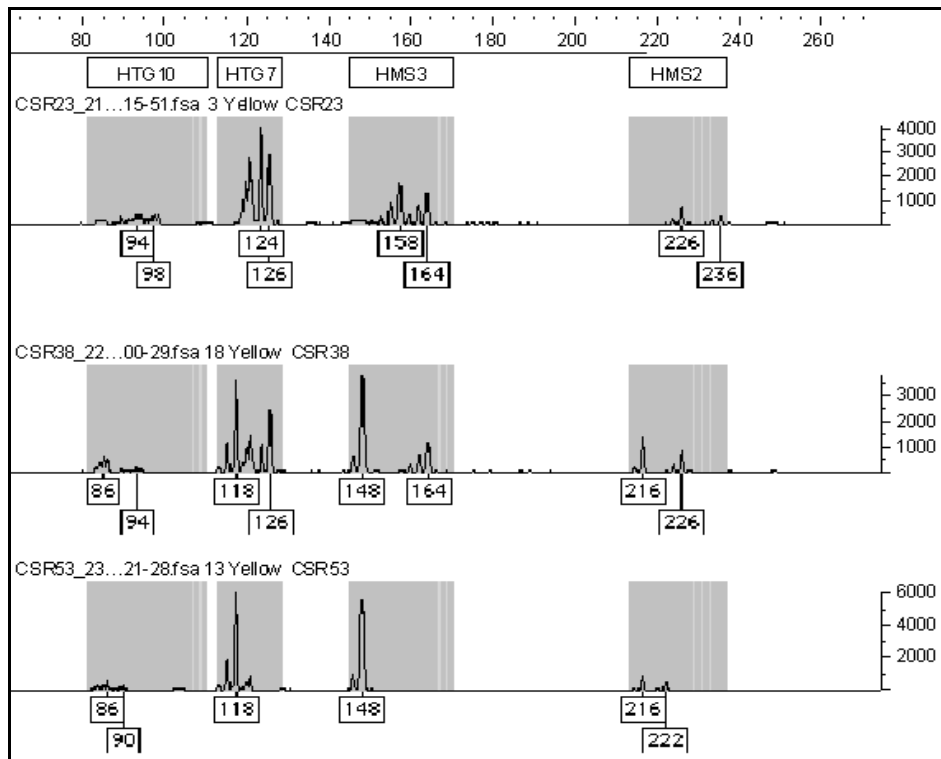


Figura 37: Profilele exemplarelor analizate pe locii HTG10, HTG7, HMS3 și HMS2.

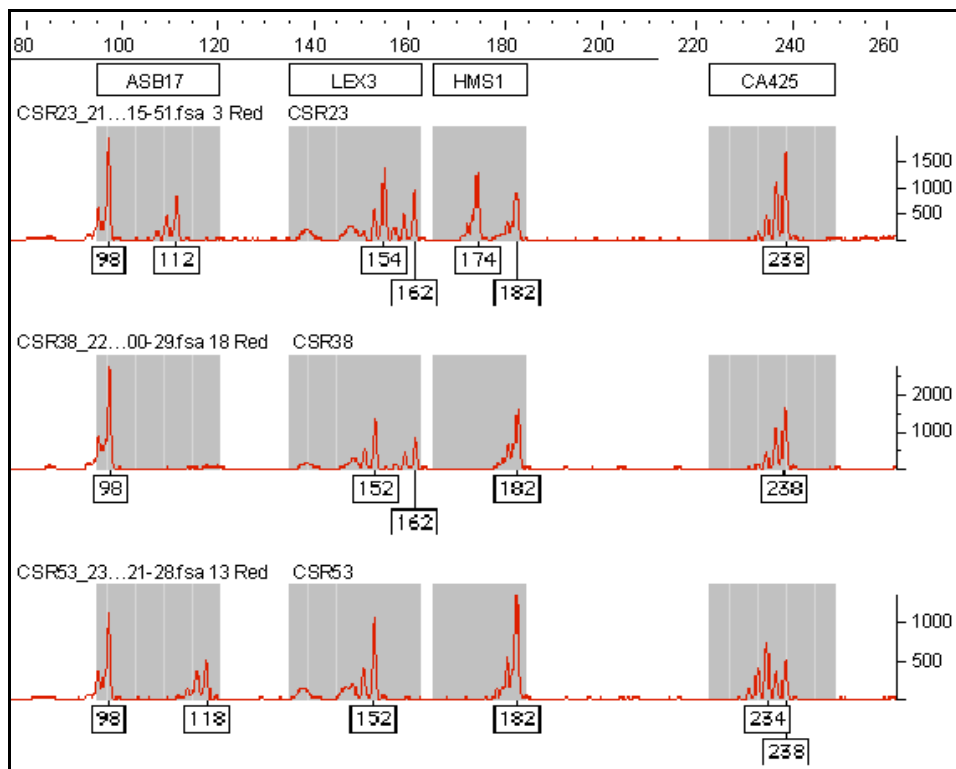


Figura 38: Profilele exemplarelor analizate pe locii ASB17, LEX3, HMS1 și CA425.

Tabel 40: Alelele prezente la iapă (23), produs (38) și armăsar (53).

Locus/Exemplar	Armăsar	Produs	Iapă
VHL20	94, 94	94, 96	86, 96
HTG4	130, 130	130, 130	126, 130
AHT4	148, 158	158, 158	148, 158
HMS7	179, 181	179, 181	179, 179
HTG6	86, 96	80, 86	80, 86
AHT5	132, 136	136, 136	130, 136
HMS6	160, 168	168, 168	168, 168
ASB23	190, 190	188, 190	188, 190
ASB2	238, 244	238, 250	248, 250
HTG10	86, 90	86, 94	94, 98
HTG7	118, 118	118, 126	124, 126
HMS3	148, 148	148, 164	158, 164
HMS2	216, 222	216, 226	226, 236
ASB17	98, 118	98, 98	98, 112
LEX3	152, 152	152, 162	154, 162
HMS1	182, 182	182, 182	174, 182
CA425	234, 238	238, 238	238, 238

În practică se întâlnesc și cazuri de excludere, în care produsul nu aparține unuia sau ambilor părinți. În astfel de cazuri el nu va avea alelele comune cu genitorii. Pentru a avea un caz de excludere, la analiza alelelor, trebuie să întâlnim cel puțin două nepotriviri între genitori și produs. Dacă există o singură excludere nu putem afirma cu siguranță că produsul nu aparține aceluia cuplu pentru că aceasta poate fi rezultatul unei mutații.

IV.6. Tehnica RT-PCR (PCR revers transcris)

Principiul metodei

Tehnica permite punerea în evidență a prezenței moleculelor de ARNm într-un țesut sau organ.

Principiul constă în extragerea ARN total din țesuturile sau organele studiate și copierea acestora într-o moleculă de ADN complementar cu ajutorul transcriptazei inverse și în prezența unor primeri adecvați. Moleculele de ADN obținute servesc drept matriță pentru o reacție PCR care folosește un cuplu de primeri specifici pentru secvența ADN de interes. În reacție se folosește o ADN polimerază ARN-dependentă. Hibridul ARN:ADN obținut în reacția de revers transcriere este supus unei reacții de degradare a catenei ARN cu ribonuclează, iar după aceea, la catena ADN rămasă intactă, este atașat un primer complementar cu capătul 3' al acesteia. După sinteza celei de-a doua catene de ADN moleculele sunt supuse unei reacții de PCR normale.

Material biologic: probe de ARN total.

Reactivi și aparatură: i) iScript™ cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad*): 5X iScript Reaction Mix; apă lipsită de nucleaze; enzimă „iScript Reverse Transcriptase”; ii) agitator; iii) microcentrifugă; iv) aparat PCR.

Mod de lucru

1. Se amestecă componentele prezentate în tabelul 41 în câte un tub de 0,5 ml. Se agită și se centrifughează ușor.

Tabel 41: Reactivi, cantități și concentrații necesare realizării reacției RT-PCR.

Componente	Volum (μl)	Cantitate
5X iScript Reaction Mix	4	1X
iScript Reverse Transcriptase	1	
Apă nucleaze-free	x	
ARN total	x	100 fg - 1μg
Volum total	20	

2. Se așează tuburile în aparatul PCR și acesta se programează respectând parametrii prezentați în tabelul 42.

3. După realizarea reacției RT-PCR probele se păstrează la -20 °C.

Tabel 42: Etapele reacției RT-PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare			
	Progene	5 minute 25 °C	45 minute 42 °C	5 minute 95 °C

IV.7 Tehnica Real-Time PCR

Real-Time RT-PCR este o metodă folosită pentru detectarea nivelului de expresie a genelor (cantitatea de ARNm) cu ajutorul moleculelor fluorescente. Metodele tradiționale folosesc gelul de agaroză pentru detectarea produșilor PCR. Aceasta ridică diverse probleme de rezoluție, sensibilitate sau precizie.

Metoda Real-Time PCR detectează acumularea ampliconului pe parcursul întregii reacții de amplificare, permițând monitorizarea în timp real a probei. Tehnica înglobează mecanismele de amplificare și detecție într-o singură etapă. Acest lucru este obținut în urma folosirii diferiților compuși fluorescenți care au capacitatea de a corela concentrația produșilor PCR cu intensitatea culorii. 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 care pot fi detectați.

IV.7.1 Cuantificarea relativă a expresiei genei leptinei la suine

Principiul metodei

Practic experimentul urmărește modificările expresiei genei care codifică pentru leptină la diferite rase de suine și în diferite tipuri de țesuturi. Cuantificarea ampliconilor se va realiza utilizând un compus chimic fluorescent (SYBR Green). Acesta are capacitatea de a se intercala între bazele azotate, iar atunci când este încorporat la nivelul ADN are o fluorescență de 200 de ori mai crescută decât atunci când este liber în soluție.

Material biologic: probe de ADNc (obținute prin RT-PCR).

Reactivi și aparatură: i) primeri specifici leptina sens TTGGCCCTATCTGTCCTACG (20μM); antisens TTTCTGGAAGGCAGACTGGT (20μM); GAPDH sens GGGCATGAACCATGAGAAGT (20μM); antisens TCTTCTGGGTGGCAGTGAT (20μM); ii) iQTM SYBR® Green Supermix (*Bio-Rad*): SYBR Green Super Mix (100mM KCl, 40mM Tris-HCl 0,4 mM (pH 8,4); ADN polimerază iTaq 50 U/ml, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I, 20 nM fluoresceină, stabilizatori); iii) agitator; iv) centrifugă de plăci; v) aparat Real-Time PCR.

Mod de lucru

Calcularea eficienței amplificării genei țintă (leptina) și genei de referință (GAPDH – gliceraldehid fosfat dehidrogenază)

Pentru calcularea eficienței se realizează 5 diluții seriale ale ADNc: 10X (10 ng/reacție), 10²X (1 ng/reacție), 10³X (0,1 ng/reacție), 10⁴X (0,01 ng/reacție), 10⁵X (0,001ng/reacție). Ulterior se parcurg următorii pași:

1. Componentele prezentate în tabelele 43 și 44 se amestecă în tuburi de centrifugă. Se agită și se centrifughează ușor. Se prepară două amestecuri de reacție separate, unul pentru gena de referință și altul pentru gena țintă.

Tabel 43: Amestecul de reacție pentru gena leptinei.

Componente	Volum (μl)	Concentrație
iQ SYBR Green Supermix	12,5	
Primer sens leptină	0,5	0,4μM
Primer antisens leptină	0,5	0,4μM
Apă fără nucleaze	7,4	
Volum total	21	

Tabel 44: Amestecul de reacție pentru gena GAPDH.

Componente	Volum (μl)	Concentrație
iQ SYBR Green Supermix	12,5	
Primer sens GAPDH	0,5	0,4μM
Primer antisens GAPDH	0,5	0,4μM
Apă fără nucleaze	7,4	
Volum total	21	

Tabel 45: Schema reacției Real-Time PCR.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare							Etapa finală
	Etapa inițială	45 de cicluri			Curba de melting			
		Denaturare	Hibridizare	Extindere				
IQ	5 minute	30 secunde	30 secunde	25secunde	1 minut	1 minut	Creșterea temperaturii cu 0,5 °C/ciclu	∞ 20°C
Cycler	95°C	95°C	61 °C	72°C	95°C	55°C		
	1 ciclu				1 ciclu	1 ciclu	85 cicluri	

2. În godeurile plăcuței de reacție se adăugă câte 21μl din amestecurile de reacție.
3. Se adaugă 4 μl ADNc, diluat corespunzător și se omogenizează prin amestecare cu vârful pipetei.
4. Plăcuța este sigilată cu o folie termorezistentă și se centrifughează ușor.
5. Se așează plăcuța în aparatul PCR și acesta este programat respectând parametrii prezentați în tabelul 45.

Fiecare diluție se lucrează în triplicat, iar la finalul reacției se realizează o analiză a datelor cu programul iCycler. În urma analizei se obține curba standard și eficiența reacției pentru fiecare genă analizată (Figurile 39 și 40).

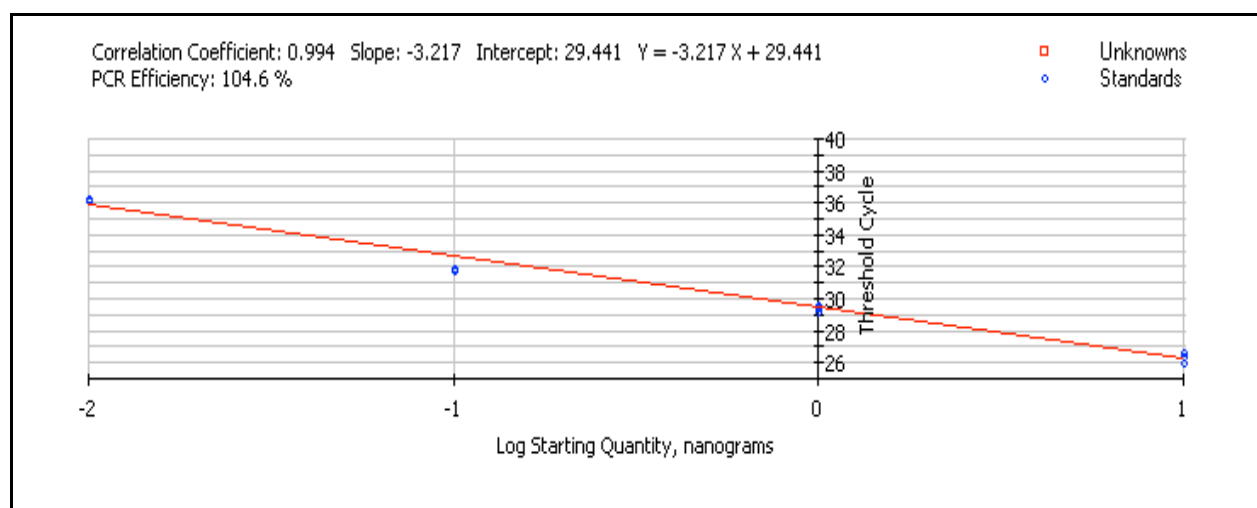


Figura 39: Calcularea eficienței și a curbei standard pentru gena leptinei.

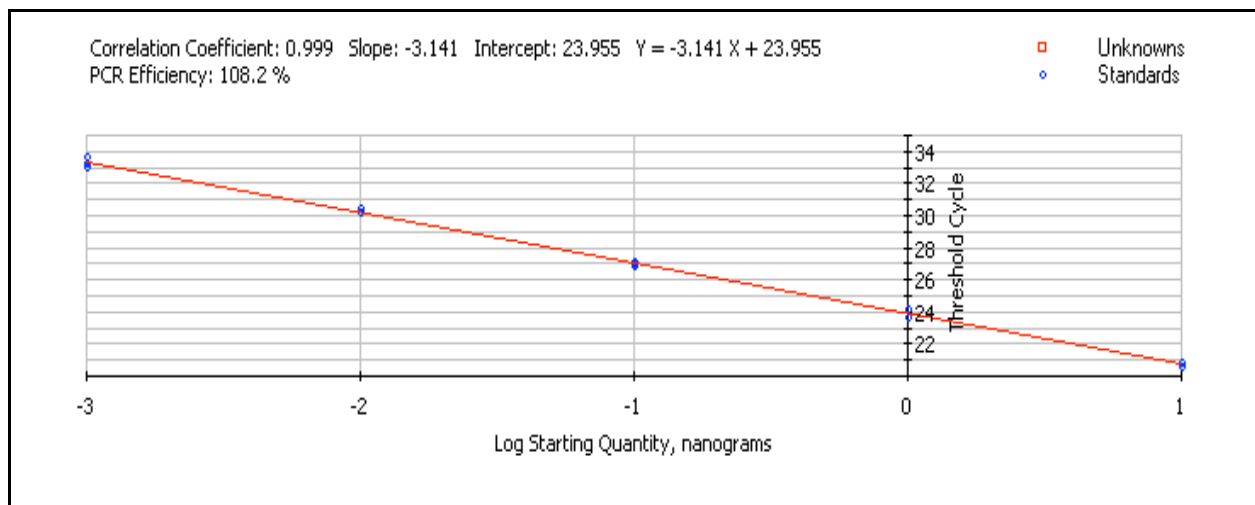


Figura 40: Calcularea eficienței și curbei standard pentru gena GAPDH.

Cuantificarea relativă a expresiei genei pentru leptină

1. Componentele prezentate în tabelele 43 și 44 se amestecă în tuburi de centrifugă. Se agită și se centrifughează ușor. Se prepară două amestecuri de reacție separate, unul pentru gena de referință și altul pentru gena țintă.

2. În godeurile plăcuței de reacție se adaugă câte 21μl din ambele amestecuri de reacție.

3. Se adaugă 4 μl ADNc, diluat corespunzător (10 ng/reacție) și se omogenizează prin amestecare cu vârful pipetei.

4. Plăcuța este sigilată cu o folie termorezistentă și se centrifughează ușor.

5. Se așează plăcuța în aparatul PCR și acesta este programat ca în Tabelul 45.

Fiecare probă a fost lucrată în triplicat; iar pentru fiecare rasă s-au ales câte trei exemplare. Rezultatele obținute au fost prelucrate cu programul iCycler.

Rezultate și discuții

După rularea probelor se obțin profilele din Figurile 41 - 43. Din curba exponențială de amplificare se obține valoarea Ct (ciclul la care intensitatea fluorescenței probele intersectează fluorescența prag, iar din curba de melting se determină existența

unei contaminări cu ADN genomic, prezența dimerilor de primeri și a amplificărilor nespecifice.

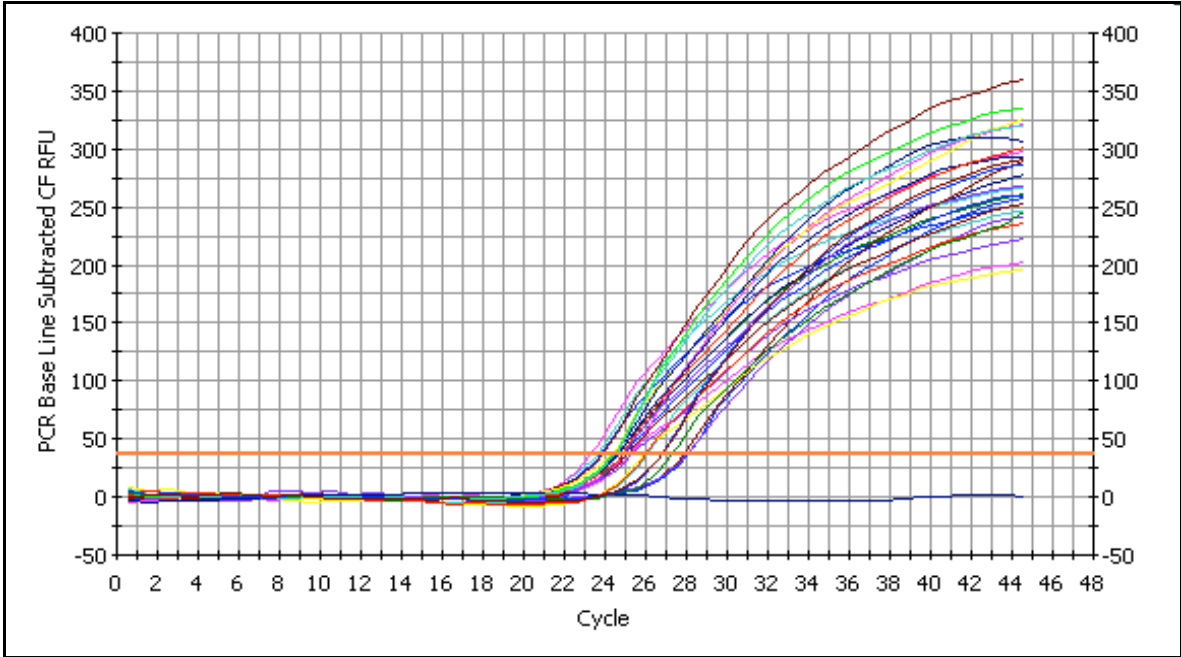


Figura 41: Curba exponențială de amplificare.

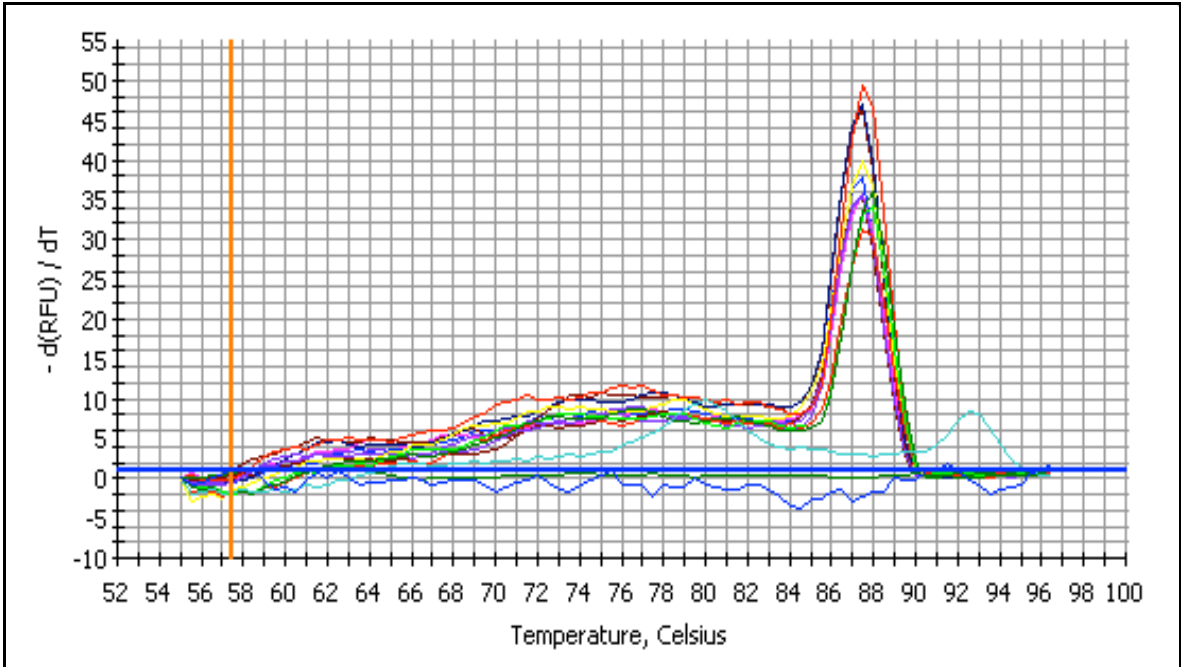


Figura 42: Curba de melting pentru produșii de amplificare ai genei pentru leptină.

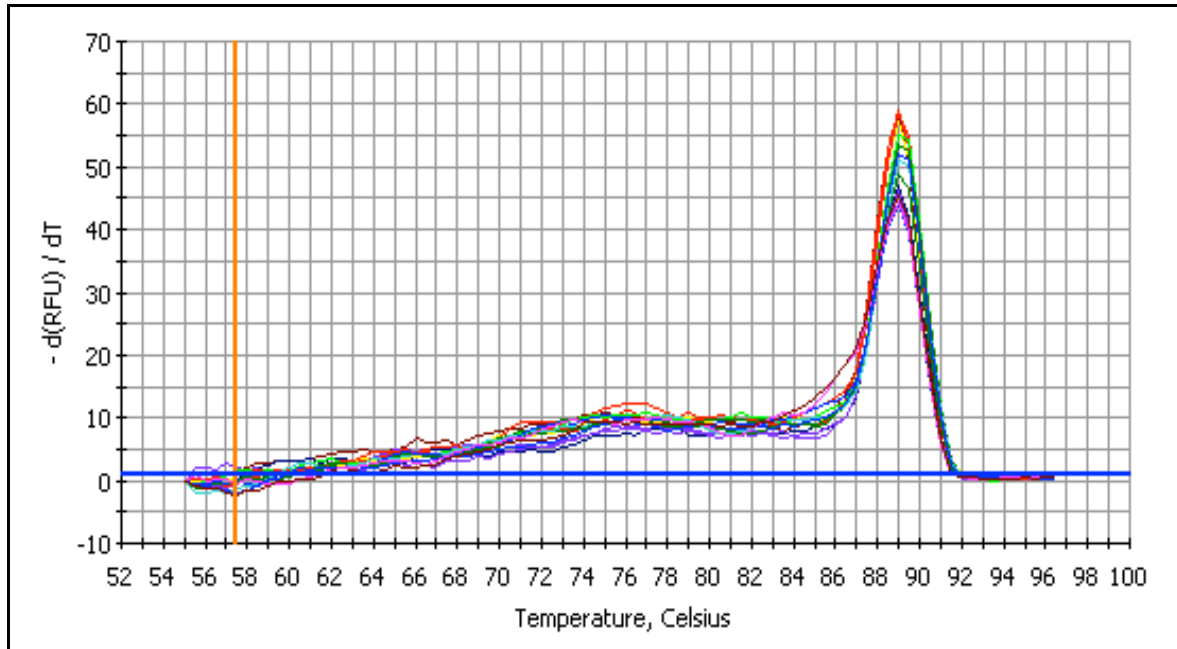


Figura 43: Curba de melting pentru produșii de amplificare ai genei pentru GAPDH.

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

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

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

N_o = numărul inițial de molecule de ADNc;

E = eficiența reacției PCR;

deci pentru probele noastre:

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

$$(N_{Ct})_{Aatar} = N_{oAatar}(1+E)^{CtAatar} \quad (N_{Ct})_{Batar} = N_{oBatar}(1+E)^{CtBatar}$$

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

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

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

$$N_{oAtar}/N_{oAref} = k * [(1+E)^{CtAref} / (1+E)^{CtAtar}] - \text{proba A - tratat}$$

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

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

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

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

Pentru determinarea diferenței de expresie a genei țintă între cele două probe se realizează raportul acestora: proba A/proba B. Vom avea 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 versus analizat); pentru o valoare >1 gena este supraexprimată în proba A analizată comparativ cu proba B control, iar pentru o valoare <1 gena este subexprimată în proba A comparativ cu proba B.

CAPITOLUL V. SECVENȚIALIZAREA ADN

V.1 Secvențializarea prin metoda „Dye-terminator”

Principiul metodei

Una dintre metodele folosite pentru secvențializare este „dye-terminator”.

În cazul acestei metode un primer oligonucleotidic este desemnat pe bază de complementaritate cu secvența pe care dorim să o secvențializăm. Plecând de la extremitatea 3'-OH a primerului împerecheat, o ADN polimerază sintetizează catena complementară în prezență de deoxinucleotide (dNTP) și dideoxinucleotide (ddNTP). Fiecare dintre aceste dideoxinucleotide sunt marcate cu câte un colorant fluorescent diferit. La fiecare încorporare a unui ddNTP elongarea catenei este stopată, ceea ce generează o colecție de fragmente de mărimi diferite, dar care se termină cu un ddNTP marcat corespunzător.

Dacă se păstrează o proporție corectă între prezența dNTP și ddNTP, se vor obține fragmente nou sintetizate de toate lungimile, terminate printr-un ddNTP diferit. Fluorescența acestora va fi analizată cu ajutorul unui detector LASER care excită marcatorul fluorescent, radiația acestuia fiind preluată de o cameră specială. Semnalul este prelucrat de programe specializate de calculator obținându-se în final electroforegrama corespunzătoare secvenței analizate.

În cazul experimentului de față am realizat amplificarea unui fragment de ADN la nivelul căruia este posibilă apariția unei mutații punctiforme care să conducă la declanșarea deficienței de adeziune leucocitară bovină.

Baza moleculară a maladii este reprezentată de prezența unei mutații punctiforme (adenină trece în guanină) de la nivelul ARNm/ADNc al genei CD18 care determină substituția acidului aspartic cu glicina în poziția 128 a proteinei de adeziune D128G (Shuster *et al.*, 1992, Jorgensen *et al.*, 1993, Gerardi, 1996, Meylan *et al.*, 1997).

Material biologic: probe de ADN genomic.

Reactivi și aparatură pentru reacția de amplificare: i) amestec de deoxi-nucleotide 10 mM din fiecare; ii) clorură de magneziu 25 mM; iii) tampon PCR 10X care conține 100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3; ADN polimerază AmpliTaq Gold 5 U/μl; iv) apă ultrapură; v) primeri sens și antisens 20 μM; vi) aparat PCR; vii) spectrofotometru UV/VIS; ix) agitator.

Reactivi și aparatură pentru purificare și precipitare: i) Wizard PCR Preps DNA Purification System (*Promega*); ii) izopropanol 80%; iii) formamidă deionizată; iv) soluție acetat de sodiu 3 M, pH 4,6; v) etanol 95% și 70%; vi) apă deionizată; vii) centrifugă de vid; viii) microcentrifugă; ix) agitator; x) pompă de vid; xi) plită cu încălzire și agitare magnetică.

Reactivi și aparatură pentru reacția de secvențializare: i) tampon BigDye 5X; ii) BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*) care conține: amestec de deoxinucleotid trifosfați, amestec de dideoxinucleotid trifosfați marcați fluorescent, ADN polimerază; vii) agitator; viii) termobloc; ix) microcentrifugă.

Mod de lucru

Inițial se realizează o reacție PCR folosind primeri specifici nemarcați fluorescent, prin care se amplifică fragmentul ce urmează a fi secvențiat. Amplificarea se realizează printr-o reacție PCR clasică.

După terminarea reacției PCR se trece la **purificarea produsilor de amplificare** folosind kitul **Wizard PCR Preps**.

1. Într-un tub de centrifugă de 1,5 ml se adaugă 100 μl de tampon de purificare.
2. Peste acesta se adaugă între 30 și 300 μl produs PCR și se vortexează puternic.
3. Se adaugă 1 ml de rășină de purificare și se vortexează puternic câte un minut de trei ori la rând.
4. Se pregătește o coloană de purificare, prin atașarea unei minicolonițe la suportul special, pentru fiecare produs care trebuie purificat.
5. Amestecul rășină-ADN se pipetează în coloane și apoi acestea sunt conectate la pompa de vid.

6. Pompa de vid este îndepărtată și se spală coloana cu 2 ml izopropanol 80 %. Se reconectează coloana la vid.

7. Rășina este uscată prin menținerea la vid timp de 30 de secunde. Coloana se îndepărtează și se transferă într-un tub de centrifugă nou.

8. Centrifugare 2 minute la 10000 rpm.

9. Coloana se transferă într-un alt tub de centrifugă curat, se adaugă 50 μ l apă ultrapură sau tampon TE și se incubează 1 minut la temperatura camerei.

10. Centrifugare 20 de secunde la 10000 rpm pentru a elua fragmentele de ADN. ADN purificat poate fi păstrat la 4 $^{\circ}$ C pe termen scurt sau la - 20 $^{\circ}$ C pentru un timp mai îndelungat.

După realizarea purificării, produșii obținuți sunt analizați la spectrofotometru pentru stabilirea concentrației și a raportului de puritate A_{260}/A_{280} .

În următoarea etapă se trece la realizarea **reacției de amplificare specifică pentru secvențializare**. Trebuie precizat că pentru secvențierea catenei sens se adaugă în amestecul de reacție numai primerul sens, iar pentru secvențierea catenei antisens numai primerul antisens, dar niciodată ambii.

1. Amestecul de reacție se prepară prin adăugarea componentelor prezentate în tabelul 46. Se vortexează și se centrifugează ușor.

Tabel 46: Reactivi și cantități necesare realizării reacției de amplificare specifică pentru secvențializare.

Componente	Cantități
Amestec de nucleotide și dideoxi-nucleotide marcate fluorescent	4 μ l
Proba ADN purificat	8 ng
Tampon BigDye 5x	2 μ l
Primer sens sau antisens	3,2 pmol
Apă deionizată	până la un volum final de 20 μ l

2. Tuburile se pun în aparatul PCR programat la parametrii indicați în tabelul 47.

La finalizarea reacției trebuie realizată **precipitarea** produșilor obținuți. Această etapă este absolut necesară deoarece în urma reacției de amplificare rămân neîncorporate multe dideoxinucleotide marcate fluorescent. Acestea trebuie eliminate complet înainte ca

probele să fie supuse electroforezei capilare. Excesul de dideoxinucleotide poate afecta rezultatele prin crearea unor zone cu fluorescență puternică la nivelul electroforegramelor. Precipitarea se poate realiza folosind una dintre metodele de mai jos.

Tabel 47: Schema reacției de amplificare specifică pentru secvențializare.

Aparat de PCR	Timpii și temperaturile de incubare				Etapa finală ∞ 4°C
	Etapa inițială	25 de cicluri			
		Denaturare	Hibridizare	Extindere	
GeneAmp 9700	1 minut 96°C	10 secunde 96°C	5 secunde 50°C	4 minute 60°C	

Precipitarea folosind acetat de sodiu/etanol

1. Amestecul de reacție se transferă într-un tub de centrifugă de 1,5 ml și se adaugă 2,5 ml acetat de sodiu 3 M, pH 4,6 și 50 μ l etanol 95%.

2. Se agită puternic și se incubează la temperatura camerei 15-20 minute pentru precipitarea produșilor de reacție.

Un timp de precipitare mai mic de 15 minute va cauza pierderea produșilor de reacție cu lungimi mici.

3. Centrifugare 20 minute, la 4°C și 14000 g.

4. Se aruncă cu atenție supernatantul prin aspersion cu micropipeta sau prin înclinarea tubului. Sedimentul este greu vizibil.

Este foarte important ca supernatantul să fie eliminat în întregime deoarece dideoxinucleotidele neîncorporate sunt dizolvate la nivelul lui.

5. Se adaugă 250 μ l etanol 70%, apoi se vortexează.

6. Centrifugare 5 minute la 13400 rpm.

7. Se îndepărtează supernatantul la fel ca în pasul 4.

8. Sedimentul este uscat la centrifuga de vid timp de 10-15 minute sau prin lăsare 1 minut la 90°C, în termobloc.

Precipitarea folosind izopropanol

1. Amestecul de reacție se transferă într-un tub de centrifugă de 1,5 ml și se adaugă 80 μl izopropanol 75%, rece.

2. Se agită puternic și se lasă tuburile 15 – 20 de minute la temperatura camerei pentru precipitarea produșilor de reacție.

Un timp de precipitare mai mic de 15 minute va cauza pierderea produșilor de reacție cu lungimi mici.

3. Centrifugare 20 de minute la 13400 rpm.

4. Se aruncă cu atenție supernatantul prin aspersie cu micropipeta sau prin înclinarea tubului. Sedimentul este greu vizibil.

Este foarte important ca supernatantul să fie eliminat în întregime deoarece dideoxinucleotidele neîncorporate sunt dizolvate la nivelul lui.

5. Se adaugă 250 μl izopropanol 75% și se amestecă puternic.

6. Centrifugare 5 minute la 13400 rpm.

7. Se îndepărtează supernatantul la fel ca în pasul 4.

8. Sedimentul este uscat la centrifuga de vid timp de 10-15 minute sau prin lăsare 1 minut la 90⁰C, în termobloc.

Precipitarea folosind etanol

Folosind acest tip de precipitare, urme de dideoxinucleotide marcate vor rămâne la nivelul probelor, acestea putând fii ulterior observate la începutul electroforegramelor (până la lungimea de 40 de baze). De asemenea, recuperarea fragmentelor scurte s-ar putea realiza cu dificultate.

1. Amestecul de reacție se transferă într-un tub de centrifugă de 1,5 ml și se adaugă 16 μl de apă deionizată și 64 μl etanol 95%, rece. Concentrația finală a etanolului trebuie să fie de aproximativ 60%.

2. Se agită puternic și se lasă tuburile 15 – 20 de minute la temperatura camerei pentru precipitarea produșilor de reacție.

Un timp de precipitare mai mic de 15 minute va cauza pierderea produșilor de reacție cu lungimi mici.

3. Centrifugare 20 de minute la 13400 rpm.

4. Se aruncă cu atenție supernatantul prin aspersie cu micropipeta sau prin înclinarea tubului. Sedimentul este greu vizibil.

Este foarte important ca supernatantul să fie eliminat în întregime deoarece dideoxinucleotidele neîncorporate sunt dizolvate la nivelul lui.

5. Se adaugă 250 μ l etanol 70% și se amestecă puternic.

6. Centrifugare 10 minute la 13400 rpm.

7. Se îndepărtează supernatantul la fel ca în pasul 4.

8. Sedimentul se usucă la centrifuga de vid timp de 10-15 minute sau prin lăsare 1 minut la 90⁰C, în termobloc.

Pregătirea probelor pentru electroforeza capilară

1. Precipitatul se resuspendă în 15 μ l formamidă deionizată. Se vortexează 30 secunde și se centrifughează ușor.

2. Conținutul se denaturează prin încălzire 3 minute, la 95⁰C și apoi plasare pe gheață 5 minute.

3. Probele se introduc în analizatorul genetic automat.

Rezultate și discuții

Electroforegramele rezultate în urma migrațiilor sunt prelucrate cu ajutorul programului Sequencing Analysis 5.1 (*AppliedBiosystems*) obținându-se secvențele de nucleotide ale acestora.

Există mai multe aplicații importante ale secvențializării acizilor nucleici. Una dintre ele este obținerea *de novo* a secvențelor și ulterior introducerea acestora în bazele de date internaționale. O altă aplicație este identificarea mutațiilor sau a polimorfismelor de secvență. În cazul de față am realizat amplificarea zonei de interes de la nivelul ADN genomic bovin în vederea evidențierii mutației punctiforme ce duce la declanșarea deficienței de adeziune leucocitară bovină.

În figura 45 este prezentată secvența revers (complement) a unui individ normal, iar în figura 46 secvența unui heterozigot purtător. În ultimul caz se poate observa clar

prezența mutației punctiforme nucleotidului notată cu N. Secvențele prezentate în imagini sunt obținute prin amplificarea cu primerul antisens, acest fapt generând apariția secvenței complementare și deci a polimorfismului complementar T trece în C. Individul heterozigot analizat prezintă o copie normală a genei (prezintă A, respectiv T în cazul complementului) și o copie mutantă (prezintă G, respectiv C în cazul complementului). În figura 47 este prezentată alinierea secvenței mutante cu secvența normală a genei.

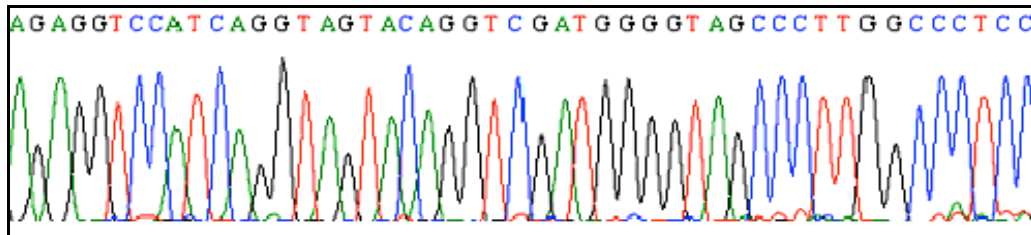


Figura 45: Secvență complementară caracteristică indivizilor normali pentru BLAD.

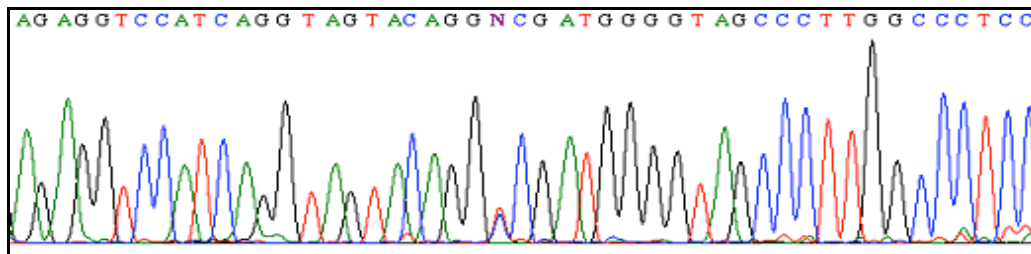


Figura 46: Secvență complementară caracteristică indivizilor heterozigoți purtători pentru BLAD.

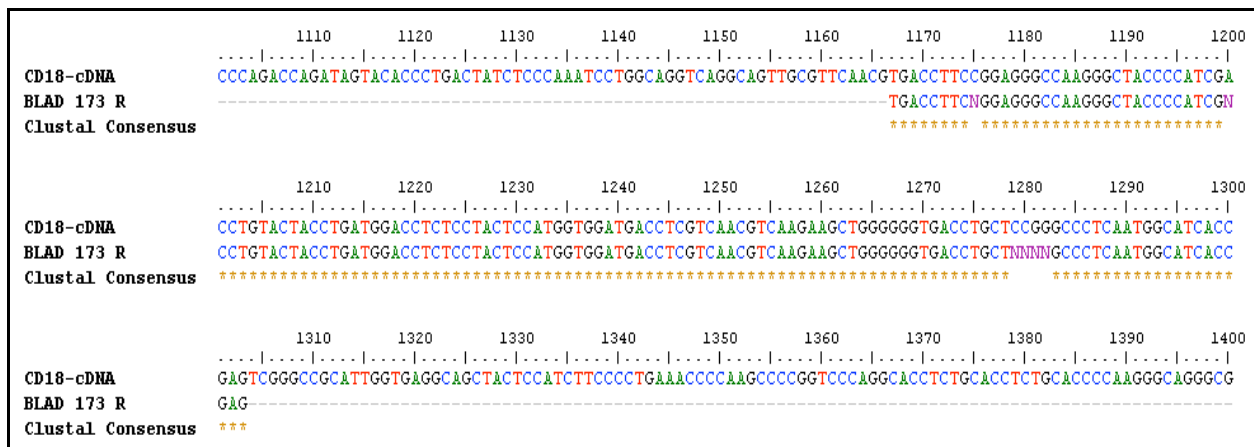


Figura 47: Alinierea secvenței normale și mutante la nivelul genei implicate în declanșarea BLAD.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. (2002) *Molecular Biology of The Cell*, 4th ed. Ed., Garland Science Taylor&Francis Group, New York.

Ackermann M.R., M.E. Kehrli, J.A. Laufer, L.T. Nusz: Alimentary and respiratory tract lesions in eight medically fragile Holstein cattle with bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD). *Vet. Pathol.* 33: 273-281, 1996.

d'Angelo, F., Santillo, A., Sevi, A., Albenzio, M. (2007) Technical Note: A Simple Salting-Out Method for DNA Extraction from Milk Somatic Cells: Investigation into the Goat *CSN1S1*. *Gene J. Dairy Sci.* 90:3550–3552.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (2002) *Short protocols in molecular biology* 5th Ed., John Wiley & Sons, S.U.A.

Bowling, A.T. and Ruvinsky, A. (2000) *The Genetics of the Horse*, CABI Publishing, Wallingford, U.K.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.

Clark D. (2005) *Molecular Biology*, Elsevier Academic Press.

Costache M., Dinischiotu A. (2004) *Acizi nucleici – Structură și organizare*, Ed. Ars Docendi, România.

Davis L.G., Dibner M.D., and Battery J.F. (1999) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Academic Press.

Gerardi A.S. Bovine leukocyte adhesion deficiency: a brief overview of a modern disease and its implications. *Folia Vet.* 40: 65-69, 1996.

Harlizius B., S. Schröber, I. Tammen, D. Simon: Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 113: 303-309, 1996.

John M. S. Bartlett and David Stirling, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 226: *PCR Protocols*, Second Edition, Humana Press Inc.

Jones, A. S. 1953. The isolation of bacterial nucleic acids using cetyl trimethylammonium bromide (cetavlon). *Biochim. Biophys. Acta.* 10:607-612.

Jorgensen C.B., J.S. Agerholm, J. Pedersen, P.D. Thomsen: Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Hosltein-Friesian Cattle. I. PCR screening and allele frequency Estimation. *Acta Vet. Scand.* 34: 231-236, 1993.

Kuhn M.T. and R.D. Shanks: Association of deficiency of uridine monophosphate synthase with production and reproduction. *J. Dairy Sci.* 77: 589-597, 1994.

Lewin B. (2004) *Genes VIII*, Pearson Education, S.U.A.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., and Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*, 4th ed. Ed., W. H. Freeman and Company, New York.

Marklund, L., Johansson-Moller, M., Sandberg, K. and Andersson, L. (1996) A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat colour in horses. *Mammalian Genome* 7, 895-899.

Meylan M., R. Abegg, H. Sager, T.W. Jungi, J. Martig: Fallvorstellung: Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD) in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 139: 277-281, 1997.

Milenkovic, D., Chaffaux, S., Taourit, S. and Gérard Guérin, G. (2003) A mutation in the *LAMC2* gene causes the Herlitz junctional epidermolysis bullosa (H-JEB) in two French draft horse breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35, 249-256.

Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8:4321- 4325.

Nagahata H., H. Nochi, K. Tamoto, H. Taniyama, H. Noda, M. Morita, M. Kanamaki, G.J. Kociba: Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Holstein Cattle. *Can. J. Vet. Res.* 57: 255-261, 1993.

Nagahata H., T. Miura, K. Tagaki, M. Othake, H. Noda, T. Yasuda, K. Nioka: Prevalence and Allele Frequency Estimation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian Cattle in Japan. *J. Vet. Med.Sci.* 59: 233-238, 1997.

Ribeiro L.A., E.E. Baron, M.L. Martinez, L.L. Coutinho: PCR screening and allele frequency estimation of bovine leucocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 23: 831-834, 2000.

Robinson J.L., R.D. Shanks: Review. The inherited deficiency of uridine monophosphate synthase in dairy cattle. *J. CAAS* 1: 1-4, 1990.

Robinson J.L., R.G. Popp, R.D. Shanks, A. Oosterhof, J.H. Veerkamp: Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein-Frisian cattle of North America and Europe. *Livest. Prod. Sci.* 36: 287-298, 1993.

Robinson, J.L., Dombrowski, D.B., Harpestad, G.W. and Shanks, R.D., 1984. Detection and prevalence of UMP synthase deficiency among dairy cattle. *J. Heredity*, 75: 277-280.

Rudolph J.A., Spier S.J., Byrns G., Rojas C.V., Bernoco D., Hoffman E.P. (1992) A sodium channel Phe to Leu mutation in periodic paralysis in Quarter Horses: a common defect disseminated by selective breeding of a popular sire. *Nature Genetics* 2, 144-147.

Shan-Rong Shi, Richard J. Cote, Lin Wu, Cheng Liu, Ram Datar, Yan Shi, Dongxin Liu, Hyoeun Lim, Clive R. Taylor (2002) DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections based on the Antigen Retrieval Principle: Heating Under the Influence of pH. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Volume 50 (8): 1005–1011.

Shanks R.D. and J.L. Robinson: Deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein cattle. *Cornell. Vet.* 80: 119-122, 1990.

Shanks R.D., D.ST.A. Bragg, E.P. Barton: Uridine Monophosphate synthase of Jersey Bulls. *J. Dairy Sci.* 72: 722-725, 1989.

Shanks R.D., D.A. Bragg, J.L. Robinson: Deficiency of uridine monophosphate synthase in Holstein cattle: inheritance and body measurements. *J. Anim. Sci.* 64: 695-700, 1987.

Shanks R.D., J.L. Robinson: Embryonic mortality attributed to inherited deficiency of uridine monophosphate synthase. *J. Dairy Sci.* 72: 3035-3039, 1989.

Shanks R.D., M.M. Greiner: Relationship between genetic merit of Holstein bulls and deficiency of uridine 5'-monophosphate synthase. *J. Dairy Sci.* 75: 2023-2029, 1992.

Shanks R.D.: Reproductive consequences of deficiency of uridine monophosphate synthase in Holstein cattle. *Am. J. Vet. Res.* 51: 800-802, 1990.

Shin, E.K., Perryman, L.E. and Meek, K. (1997) A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *Journal of Immunology* 158, 3565-3569.

Stryer A. (2003) *Biochemistry* 5th Ed., Freeman and Comapany, New York.

Taggart, J. B., Hynesp, A., Prodohl, A., Ferguson, A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. of Fish Biology* 40:963-965.

Shuster D.E., M.E. Kehrli, M.R. Ackermann, R.O. Gilbert: Identification and prevalence of a genetic defect that causes leucocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *PNAS* 80: 225-229, 1992.

Viana J.L., A. Fernandez, A. Iglesias, G. Santamarina: Diagnóstico y control de las principales enfermedades genéticas (citrulinemia, DUMPS y BLAD) descritas en ganado Holstein-Frisón. *Med. Vet.* 15: 538-544, 1998.

Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M., Losick R. (2004) *Molecular biology of the gene*, 5th Ed., Pearson Education, S.U.A.