



BIOLOGIE

CELULARA SI MOLECULARA

LP10. Tehnici de detectie a mutatiilor



Biologie Celulara si Moleculara

Modul Biologie celulara:

Notiuni microscopie

Evaluare organite celulare;

Culturi de celule;

Modul Biologie moleculara:

Izolarea ADN și ARN;

Amplificarea ADN/ARN

Electroforeza

Tehnici de detectare a mutațiilor:

ASO.

RFLP.

DGGE.

Real-Time PCR.

Secvențiere.

ADN și ARN non-self.

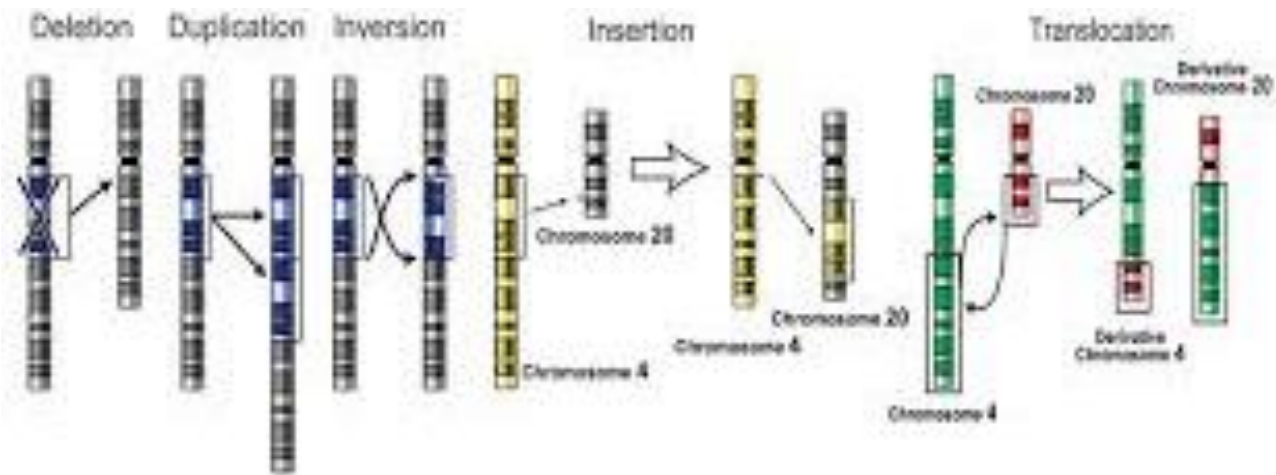
Tehnici de detectie a mutatiilor.

Mutatia

orice modificare in secventa sau aranjarea nucleotidelor din ADN

Clasificare:

1. mutatii genomice
2. mutatii cromozomiale
3. mutatii genice





Mutatia

orice modificare in secventa sau aranjarea nucleotidelor din ADN

Clasificare:

1. mutatii genomice
2. mutatii cromozomiale
3. **mutatii genice**

substitutii nucleotidice: tranzitii si transversii

deletii

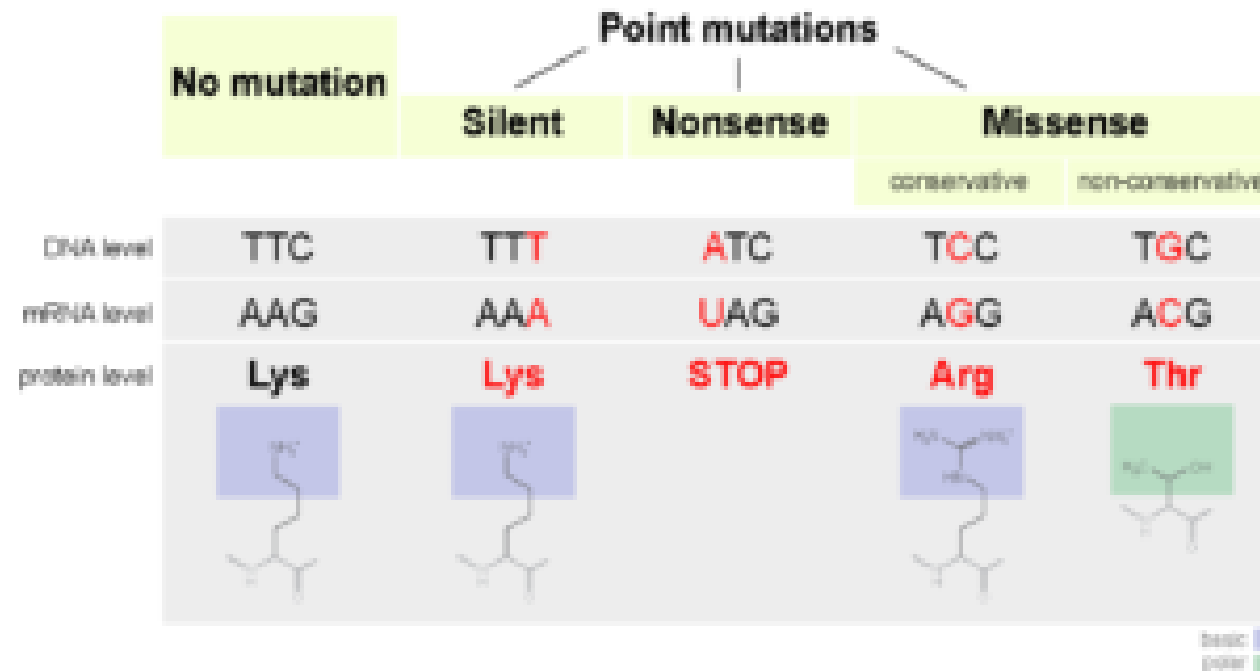
insertii

Mutatia

orice modificare in secventa sau aranjarea nucleotidelor din ADN

Clasificare:

1. mutatii genomice
2. mutatii cromozomiale
3. **mutatii genice**





Tehnici de detectie a mutatiilor

- **ASO**
- **RFLP**
- **REAL TIME PCR**

Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

ASO. Metoda folosește sonde ce corespund unei secvențe mici (20pb) din structura genei, permițând depistarea unor mutații specifice, cunoscute deja într-o anumită boală genetică. Aceste sonde scurte sunt cu mult mai *sensibile* la alterările minime ale secvenței genice, putând depista *modificări ale unei singure perechi de baze*.

În această metodă, o soluție apoasă de ADN genomic nefracționat este depusă, sub forma unei pete, direct pe o membrană de nitroceluloză (**dot-blot**) sau indirect, printr-o fantă (**slot-blot**); picătura este uscată și ADN imobilizat pe membrană este denaturat (prin tratarea filtrului cu alcali) și expus la o soluție ce conține *sonda monocatenară marcată*; aceasta se va hibridiza, formându-se un heteroduplex țintă-sondă ce va fi pus în evidență autoradiografic.

Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

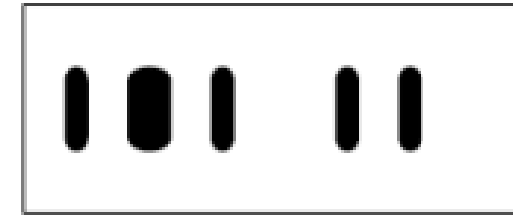
REAL TIME PCR

Fig.1. Autoradiogramă obținută prin hibridizarea sondelor oligonucleotidice alele-specifice cu ADN genomic de la 7 pacienți suspecți de fibroză cistică. Sondele ASO normale (ASOn) au secvența: 5'CACCAA**AG**ATGATATTTTC3'. Sondele ASO mutante (ASOm) au secvența: 5'CACCAATGATATTTTC3'.

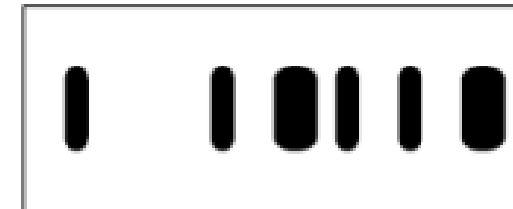
Pacienți

1 2 3 4 5 6 7

ASOn



ASOm



Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

PCR-RFLP reprezintă o metodă de detectare a polimorfismelor ADN ce implică utilizarea endonucleazelor de restricție. Aceste enzime bacteriene taie specific ADN la nivelul unor situsuri de recunoaștere determinând apariția unui set caracteristic de fragmente ce pot fi separate prin electroforeză în gel. Unele dintre polimorfisme alterează secvențele de recunoaștere, astfel enzimele fie nu recunosc un situs fie recunosc o altă secvență. Acest fapt duce la apariția unui nou set de fragmente ce pot fi comparate cu secvențele normale în vederea detectării diferențelor. Aceste diferențe sunt denumite polimorfisme ale lungimii fragmentelor de restricție (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism). Procesul de identificare a polimorfismelor genetice individuale este cunoscut sub numele de genotipare (fig.3).



Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

McGraw Hill Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)

GAATTC GAATTC GAATTC

CTTAAG CTTAAG CTTAAG

▶ Play ⏸ Pause ◀ Audio 📄 Text

Restriction enzymes recognize very specific sequences of nucleotides in DNA.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

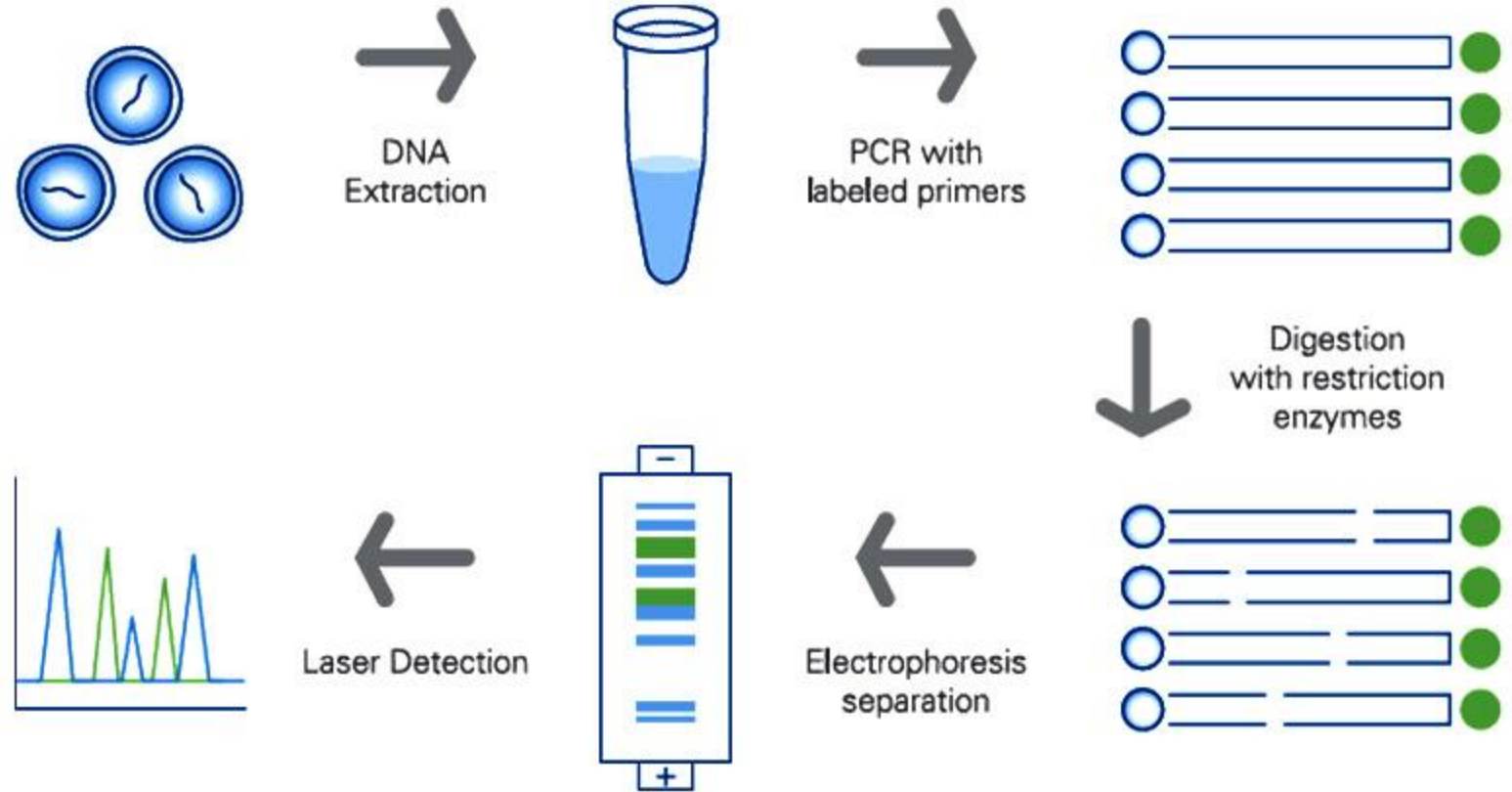
The image shows a McGraw-Hill interactive slide titled "Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)". It features a central diagram of a DNA double helix with three recognition sites for a restriction enzyme. The top strand contains the sequence GAATTC, and the bottom strand contains the complementary sequence CTTAAG. The recognition sites are highlighted in blue. Below the diagram is a control bar with "Play", "Pause", "Audio", and "Text" buttons, and a progress indicator. At the bottom, a text box states: "Restriction enzymes recognize very specific sequences of nucleotides in DNA." The copyright notice "Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc." is visible in the bottom right corner.

Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP (var. moderna)

REAL TIME PCR

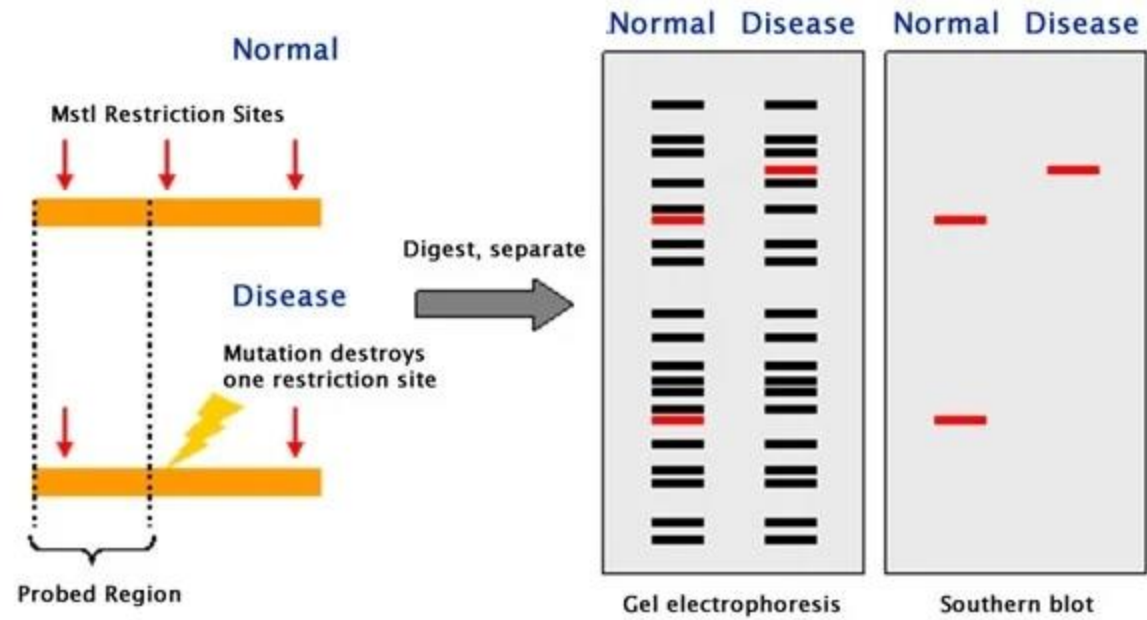


Tehnici de detectie a mutatiilor

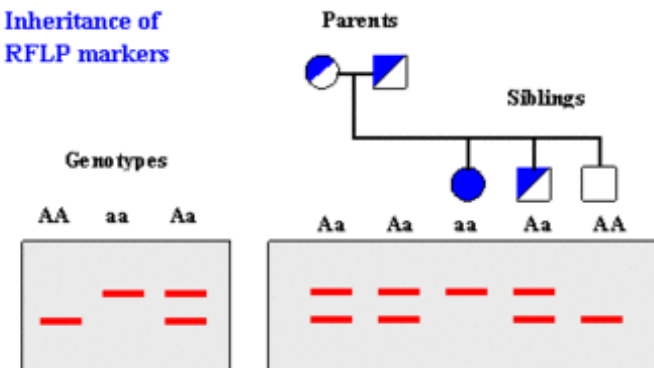
ASO

RFLP

REAL TIME PCR



Inheritance of RFLP markers





Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

- monitorizare in timp real a reactiei de polimerizare in lant;
- necesita prezenta unui reporter fluorescent care se leaga de produsul format ;
- “reporter “-ul genereaza un semnal fluorescent care reflecta cantitatea produsului format.



Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

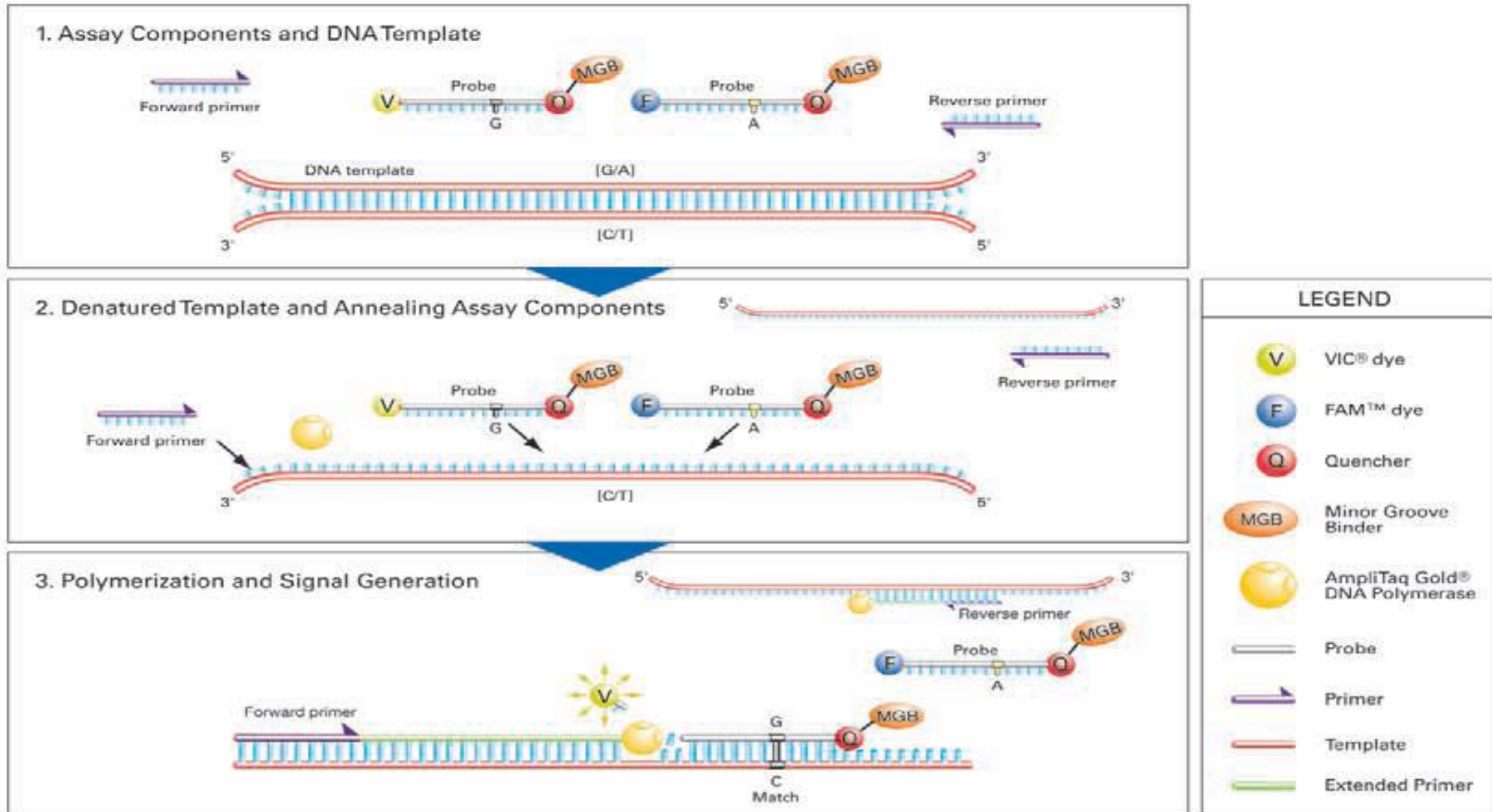
RFLP

REAL TIME PCR

- PCR

Etapa	Activarea AmpliTaqGold, UP	PCR	
		Ciclul (50 de cicluri)	
		Denaturare	Ataşare/ Extindere
Durata	10 min	15 sec	90 sec
Temperatura	95°C	92°C	60°C

REAL TIME PCR





Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

- **Componentele PCR**
- **TaqMan® Universal Master Mix:**
 1. ADN polimeraza AmpliTaq Gold, UP (Ultra Pure);
 2. deoxiribonucleotid trifosfați (dNTPs);
 3. componente tampon optimizate pentru sensibilitate, precizie, specificitate și duplicitate.
- **TaqMan® SNP Genotyping Assays:**
 1. primeri sens și antisens specifici pentru amplificarea secvenței de interes;
 2. două sonde TaqMan® MGB; fiecare sondă este alcătuită din:
 - un colorant reporter legat la capătul 5' al sondei:
 - colorantul VIC® care detectează secvența alelei 1;
 - colorantul 6FAM™ care detectează secvența alelei 2;
 - un ligand la scobitura mică a ADN (MGB – minor groove binder), care crește temperatura de topire (T_m) fără a crește lungimea sondei;
 - un colorant non-fluorescent de anihilare a reporterului (nonfluorescent quencher) localizat la capătul 3' al sondei.



Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

- Interpretare PCR

- Prezența semnalelor ambelor sonde într-o reacție permite genotiparea celor două variante alelice într-o secvență țintă de ADN. Astfel se determină prezența sau absența SNP-urilor pe baza schimbării fluorescenței coloranților asociați sondelor.

Fluorescența

Numai fluorescența colorantului VIC

Numai fluorescența colorantului 6FAM

Semnale fluorescente pentru ambii coloranți

Rezultat

Homozigozitate pentru alela 1

Homozigozitate pentru alela 2

Heterozigozitate pt alelele 1 și 2

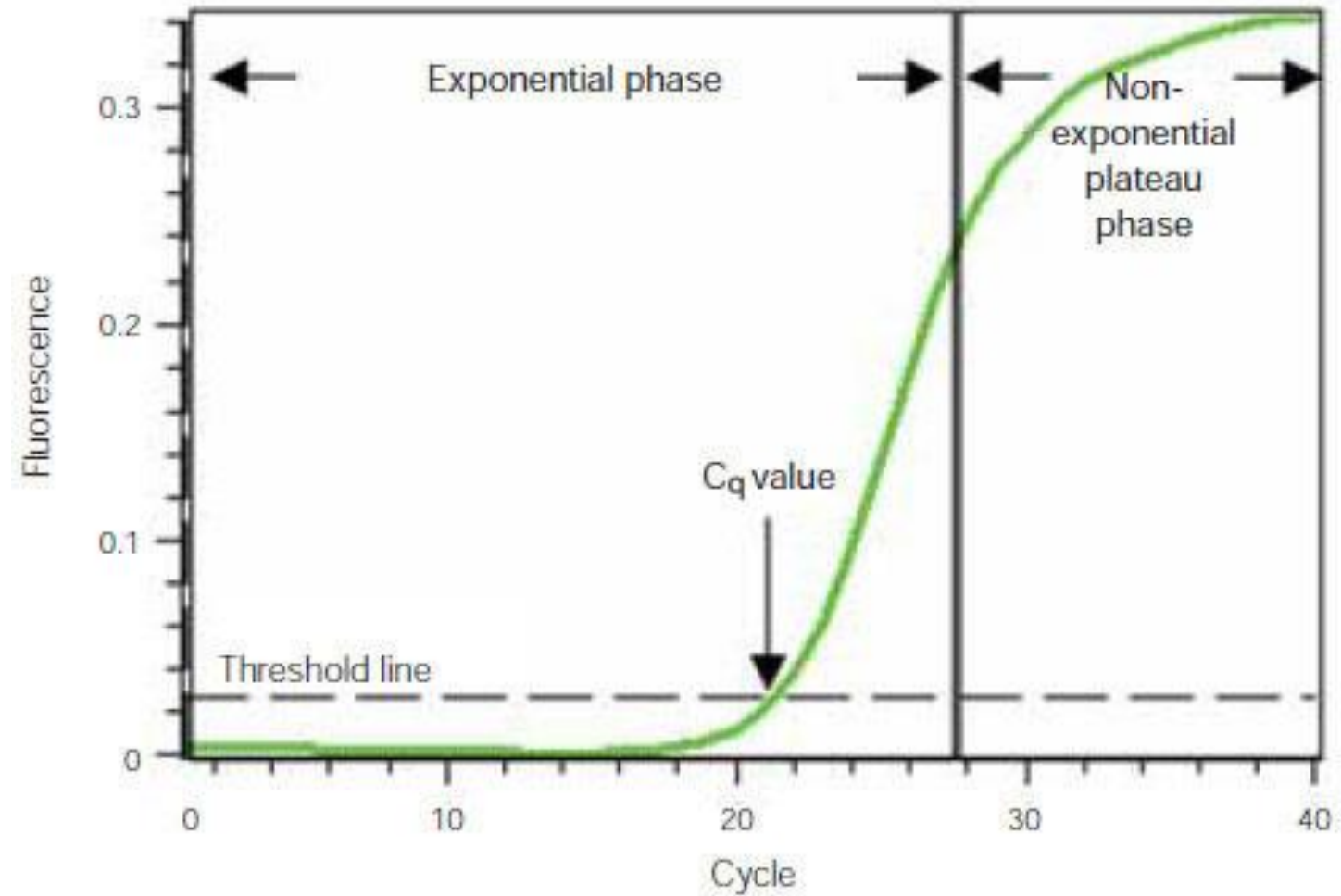
Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

- Interpretare PCR





Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

- **Interpretare PCR – exemplu**
- rs41423247 polymorphism (a G/C transversion substitution)
- **G – FAM**
- **C – VIC**
- **depresie vs fara depresie**

- **Context Sequence [VIC/FAM]:**
TCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCA[C/T]GTGTTTCGAAAGT
GTCAGCCAATGAT



Tehnici de detectie a mutatiilor

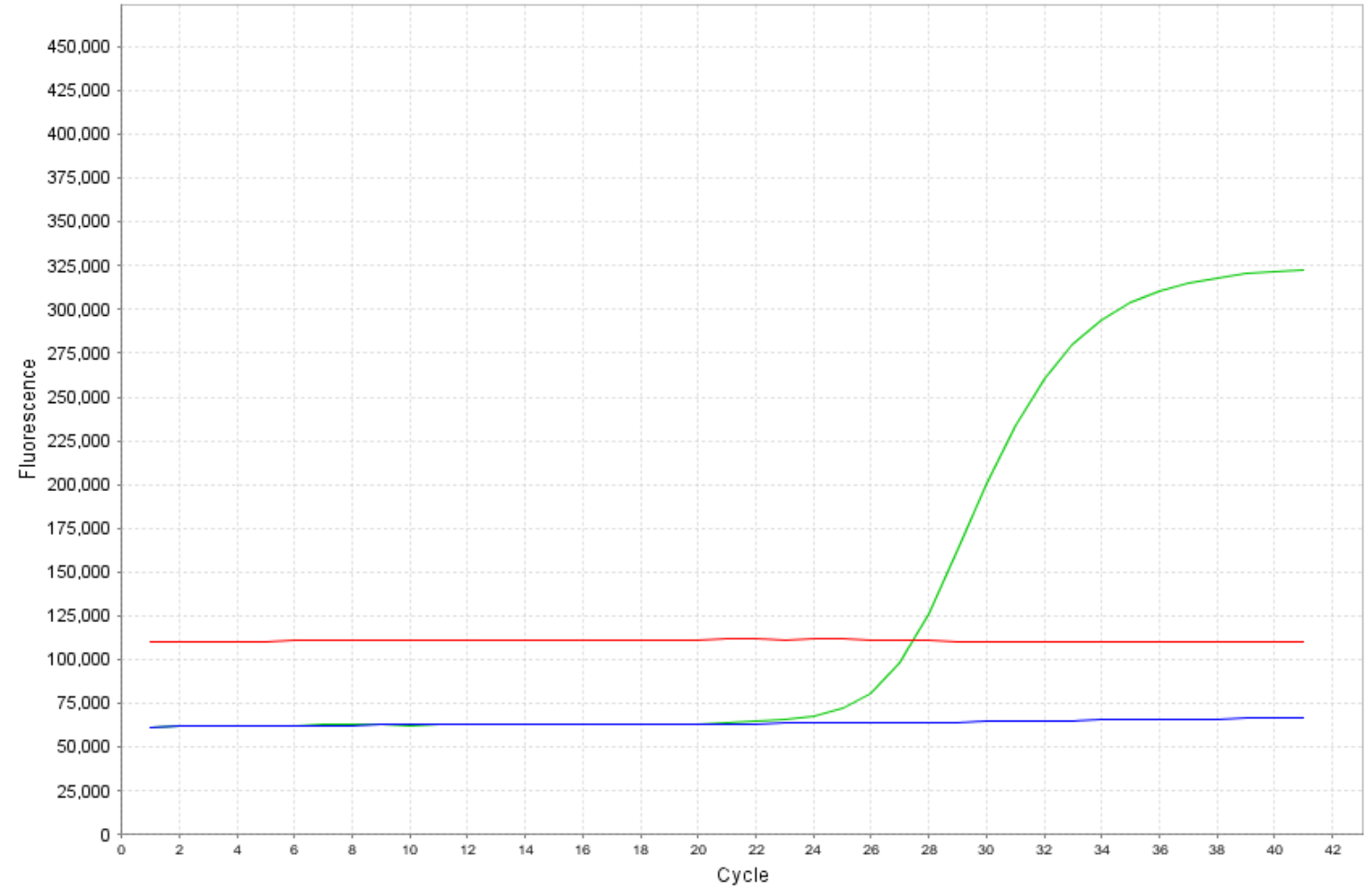
ASO

RFLP

REAL TIME PCR



Multicomponent Plot



Legend

■ FAM ■ ROX ■ VIC



Tehnici de detectie a mutatiilor

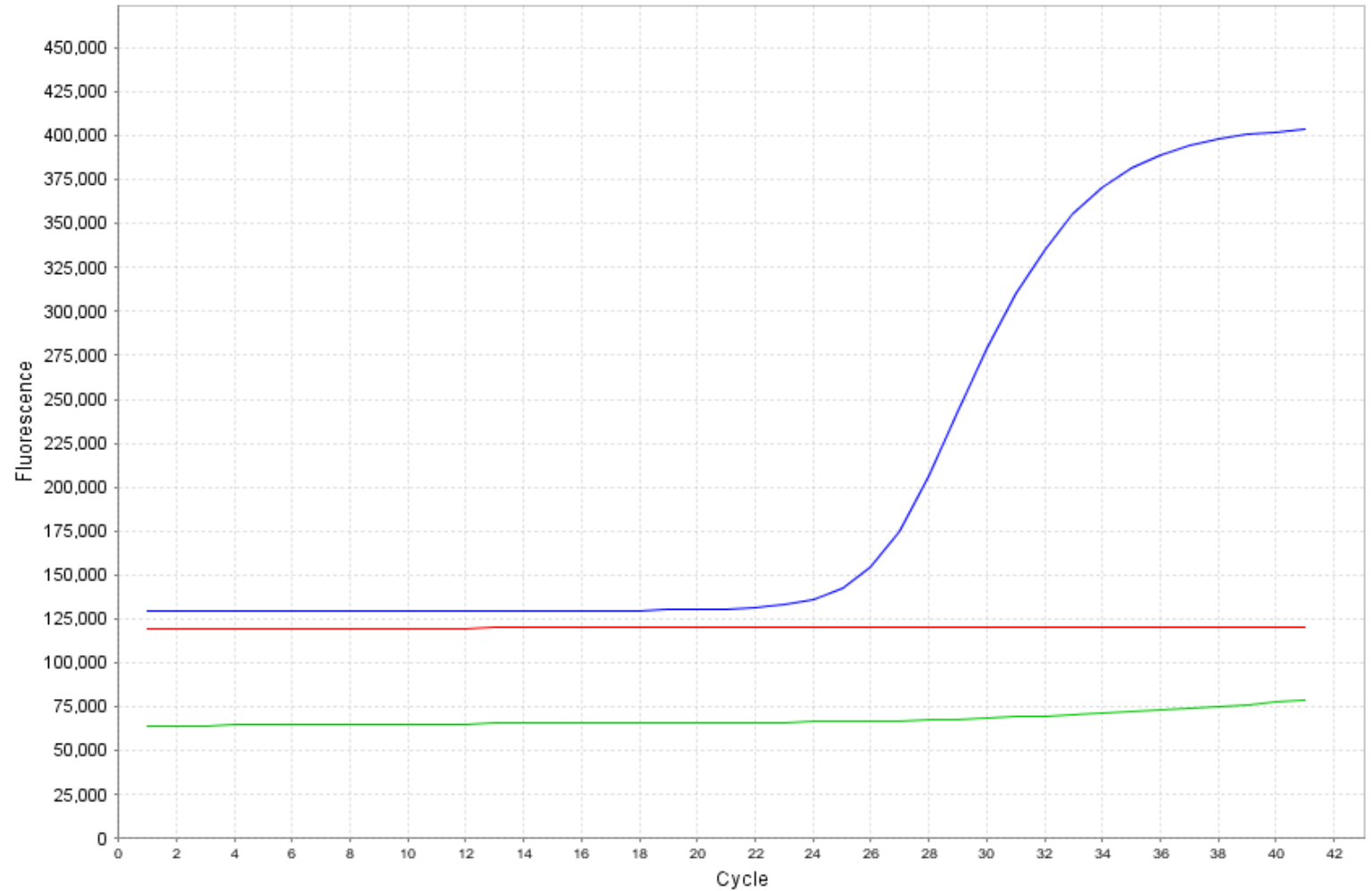
ASO

RFLP

REAL TIME PCR



Multicomponent Plot



Legend

- FAM
- ROX
- VIC



Tehnici de detectie a mutatiilor

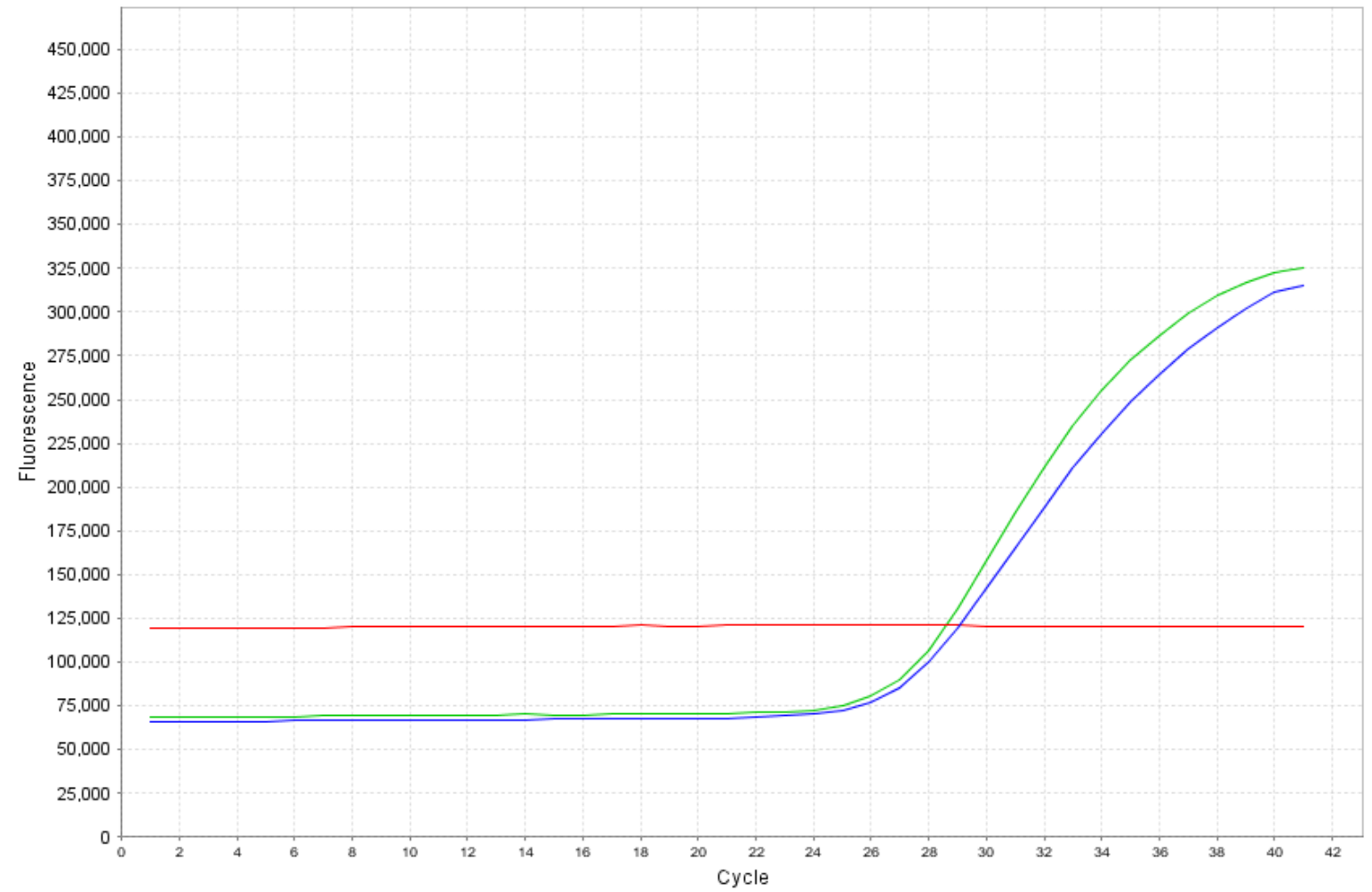
ASO

RFLP

REAL TIME PCR



Multicomponent Plot



Legend

- FAM
- ROX
- VIC

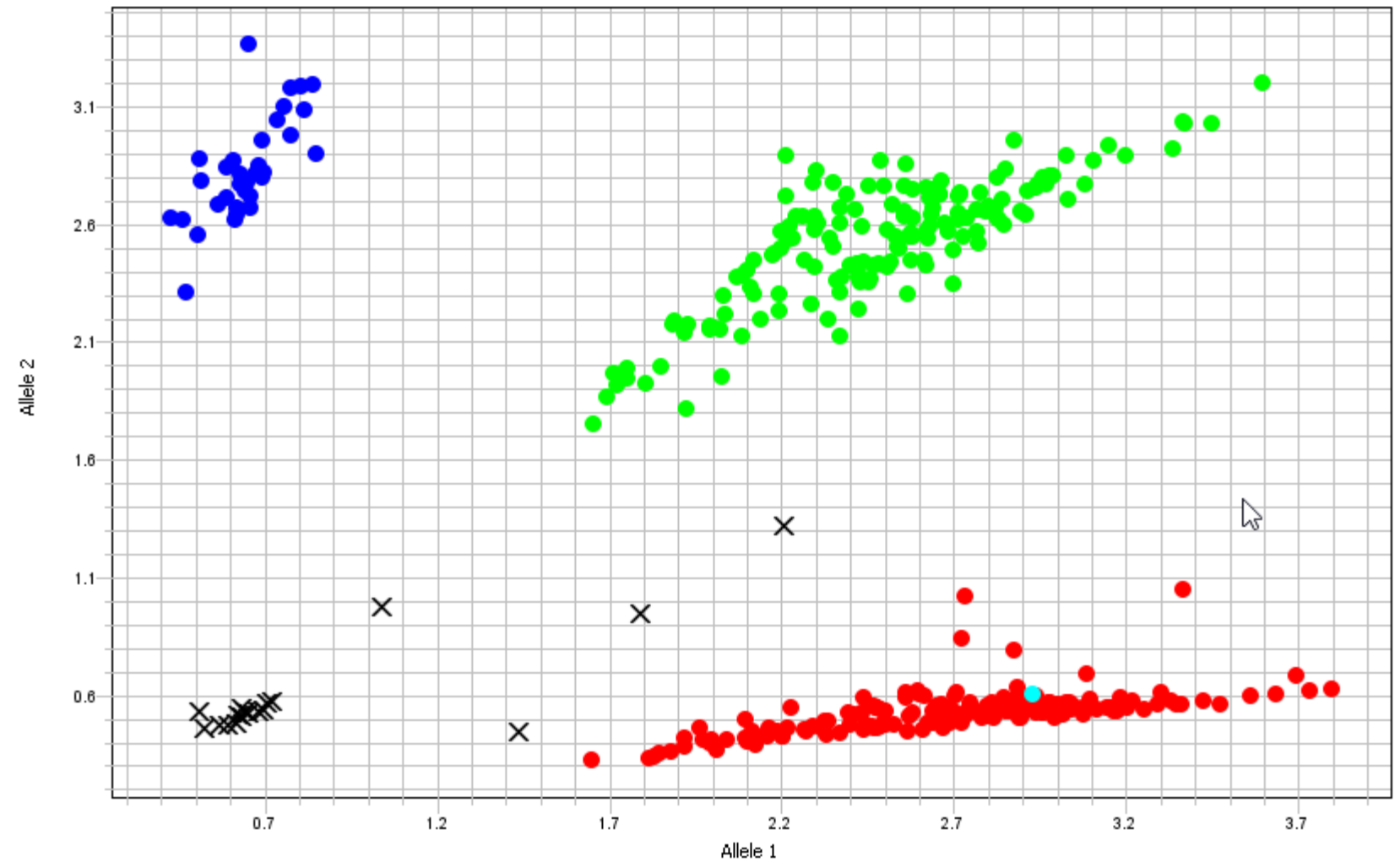
Tehnici de detectie a mutatiilor

ASO

RFLP

REAL TIME PCR

Allelic Discrimination Plot



Legend

- Homozygous Allele 1/Allele 1
- Homozygous Allele 2/Allele 2
- Heterozygous Allele 1/Allele 2
- × Undetermined



DISCUȚII

