

LP10. Tehnici moleculare utilizate pentru detectarea mutațiilor

A. Detectarea mutațiilor prin tehnici PCR.

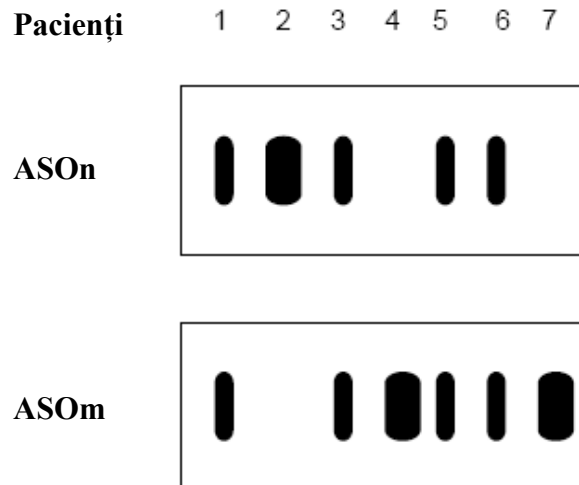
Marea majoritate a metodelor de diagnostic folosite pentru detecția mutațiilor și a polimorfismelor mononucleotidice (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) necesită amplificarea unei secvențe prin PCR urmată de determinarea variantelor specifice prin utilizarea unor sonde scurte de hibridizare sau a endonucleazelor de restricție. Tehnicile de hibridizare includ: **ASO** - Analiza mutațiilor punctiforme folosind sonde oligonucleotidice specifice unei alele (Allelic point mutation-Specific Oligonucleotidic probe), **TaqMan PCR**, **PCR-RFLP** - Polimorfisme ale lungimii fragmentelor de restricție (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism). Aceste metode sunt frecvent folosite pentru diagnosticul molecular al tumorilor familiale.

a) **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.

Aplicație. Utilizarea ASO în diagnosticul fibrozei chistice (Mucoviscidoza). Mucoviscidoza este o boală genetică cu transmitere autozomal-recesivă, determinând afectarea glandelor exocrine care produc o secreție anormal de vâscoasă, saracă în apă și substanțe organice. Secrețiile vâscoase obstruează lumenul bronsic, ductele pancreatice, căile biliare, ductele organelor reproductive, iar glandele seroase, glandele sudoripare produc o secreție anormală prin conținutul crescut de electroliți. Cea mai comună alelă pentru mucoviscidoză conține o deleție de 3pb a genei CF (ce codifică o proteină – CFTR). Statusul pacienților suspecți a fi afectați de această boală poate fi evaluat folosind 2 sonde ASO: normală, respectiv mutantă (vezi fig.1).

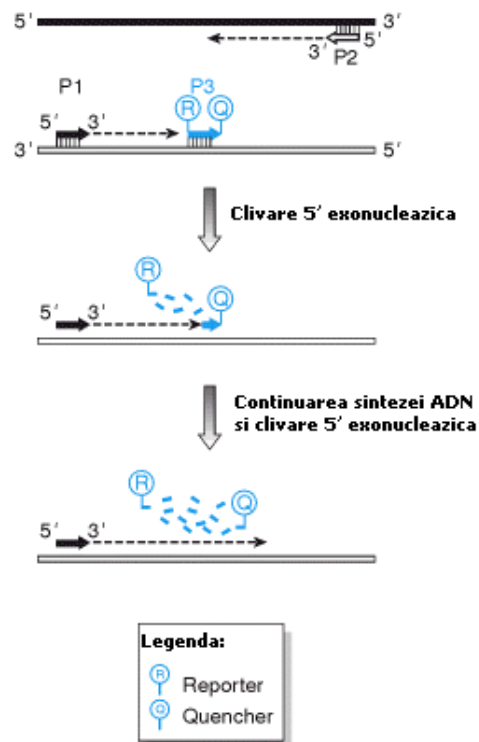
Fig.1. Autoradiogramă obținută prin hibridizarea sondelor oligonucleotidice alele-specifice cu ADN genomic de la 7 pacienți suspecți de fibroză cistică. Sondele ASO normale (**ASOn**) au secvența:
5'CACCAA**AG**ATGATATTTTC3'.
Sondele ASO mutante (**ASOm**) au secvența:
5'CACCAATGATATTTTC3'.



Întrebare: Pornind de la aspectul autoradiogramei ce puteți spune despre statusul pacienților (homozigot/heterozigot/sănătos)?

b) **TaqMan PCR** este o metodă de evaluare în timp real a acizilor nucleici folosind sonde dublu-marcate fluorogenic. Tehnica necesită un termocicler similar celui folosit în reacțiile PCR obișnuite prezentând în plus un sistem de stimulare și detecție a fluorocromilor având diferite lungimi de undă. În timpul reacției PCR, în momentul inițierii sintezei ADN, activitatea 5' → 3' exonucleazică a Taq polimerazei determină degradarea sondei dublu-marcate atașate la ADN țintă (de aici și numele **Taq** polymerase + **PacMan**). În plus față de cei 2 primeri PCR convenționali, P1 și P2, care sunt specifici secvenței țintă, cel de-al treilea primer, P3, este destinat legării specifice la un situs din secvența țintă în aval față de situsul de legare P1. P3 este marcat cu doi fluorofori, un colorant **reporter** (R), atașat la capătul 5', și un colorant fluorescent de anihilare a reporterului (Q - **quencher**) care are o lungime de undă de emisie diferită de cea a reporterului și care este atașat la capătul 3'. Pentru că are capătul 3' blocat primerul P3 nu poate servi drept amorsă în sinteza ADN, el fiind degradat de Taq polimerază în momentul extensiei P1 (vezi fig.2).

Fig.2. TaqMan PCR. În timpul reacției PCR, Taq ADN polimeraza sintetizează o nouă catenă ADN pornind de la P1 iar în momentul în care ajunge la nivelul P3 activitatea sa 5' → 3' exonucleazică determină degradarea progresivă a acestuia începând de la capătul 5'. La sfârșitul ciclului de amplificare catena de ADN nou sintetizată va cuprinde și secvența ocupată inițial de P3 iar cei doi coloranți R și Q nu se vor mai găsi pe aceeași moleculă. Rezultatul reacției este reprezentat de creșterea evidentă a intensității semnalului emis de reporterul ce nu se va mai găsi în imediata vecinătate a quencher-ului. Trebuie subliniat faptul că învecinarea inițială a reporterului cu quencher-ul nu anihilează complet semnalul, observându-se un background fluorescent.



c) **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).

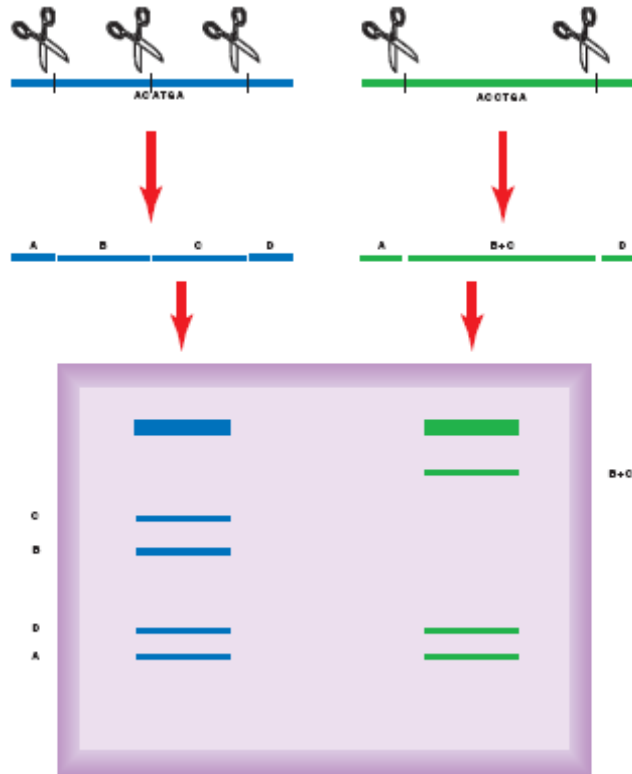


Fig.3. Polimorfismele lungimii fragmentelor de restricție (RFLP) pot fi identificate prin electroforeză în gel. Schimbarea unui singur nucleotid (A*C) poate determina pierderea situsului de restricție.