

LP11. Analiza ADN: utilizarea secvențiatorului ADN în analiza de fragmente și secvența. Principii. Metode.

Secvențierea ADN implică o serie de tehnici și metode utilizate pentru determinarea succesiunii nucleotidelor într-un fragment de ADN analizat. Procesul de secvențiere ADN identifică specific semnalul nucleotidic pe care în convertește într-un format care poate fi descifrat de specialiști. Cartografierea secvenței de nucleotide a permis oamenilor de știință să înțeleagă mai bine genele și rolul lor în crearea corpului uman. Viteza rapidă de dezvoltare a tehnologiilor de secvențiere a ADN-ului au avut un rol esențial în descifrarea genomului uman (Human Genome Project). Proiecte similare, vizând ADN-ul diferitelor specii de animale, plante, precum cel al genomului microbial implică echipe de cercetători de pe toate continentele.

O importantă perioadă de timp detectarea variațiilor în secvența ADN fost strâns legată de metodele electroforetice. Electroforeza a fost folosită încă din anii '50, începând cu electroforeza pe hârtie (PE), urmata în anii '60 de electroforeza în gel de amidon (SGE), electroforeza în gel de agaroză (AE), electroforeza în gel de poliacrilamidă (PAGE), electroforeza prin focalizare izoelectrică (IEF), cromatografia în faza lichidă de înaltă performanță (HPLC) și spectrometria de masă (Maldi TOF-MS).

Apariția, în anii '80 a tehnicilor PCR, PCR-RFLP, SSCP (polimorfismul de conformație al fragmentelor de ADN monocatenare), RT-PCR (reacția în lanț a polimerazei în timp real) și a tehnicilor de secvențiere a ADN-ului, au permis descifrarea polimorfismelor care apar în structura genelor, care au repercusiuni asupra secvenței/expresiei proteice. Metodele au evoluat de la migrarea în gel de poliacrilamida și până la cele moderne de detectie prin electroforeza capilară, cu folosirea coloranților fluorescenți.

Metodele folosite pentru determinarea secvenței nucleotidice a unor fragmente ADN au fost descoperite în anul 1970 de către două echipe independente conduse de către Walter Gilbert (tehnica de degradare chimică) și Frederick Sanger (tehnica de sinteză enzimatică). Aceștia au primit împreună premiul Nobel pentru Chimie în anul 1980.

Metoda cea mai folosită a fost *tehnica de sinteză enzimatică a lui Sanger* care folosește dideoxinucleotidele ca „terminatori” de catenă nucleotid specifici, și cromatografia bidimensională. Ulterior au fost dezvoltate tehnici de secvențiere automată *bazate pe culoare* (fluorocromi), mult mai simple și mai rapide. De asemenea, au fost dezvoltate tehnologii precum *pirosecvențierea* și *secvențierea masivă paralelă* a unui număr foarte mare de fragmente diferite de ADN.

1. METODA DE SINTEZA ENZIMATICA (SANGER)

A. Secventierea ce folosește Primeri radiomarcați și analogi nucleotidici (dideoxynucleotide)

În această metodă se sintetizează o catenă nouă de ADN, complementară segmentului cu secvența necunoscută (ce funcționează ca matrice), utilizând ADN-polimerază și un primer radiomarcant (fixat la extremitatea 3' a fragmentului). Reacția poate fi inhibată (stopată) în dreptul unui anumit nucleotid, prin folosirea unor *analogi nucleotidici* de tipul dideoxynucleotidelor (ddNTP – au pierdut grupările 2'-OH și 3'-OH) (fig. 1). ADN-polimerază poate adăuga un astfel de nucleotid, dar, după ce acesta a fost incorporat, reacția se oprește datorită absenței grupării 3'-OH din dideoxynucleotid, necesară polymerizării (catena sintetizată este „terminată” de ultimul ddNTP). Se obțin astfel fragmente cu o lungime egală distanței dintre primer și locul unde s-a incorporat un anumit dideoxynucleotid.

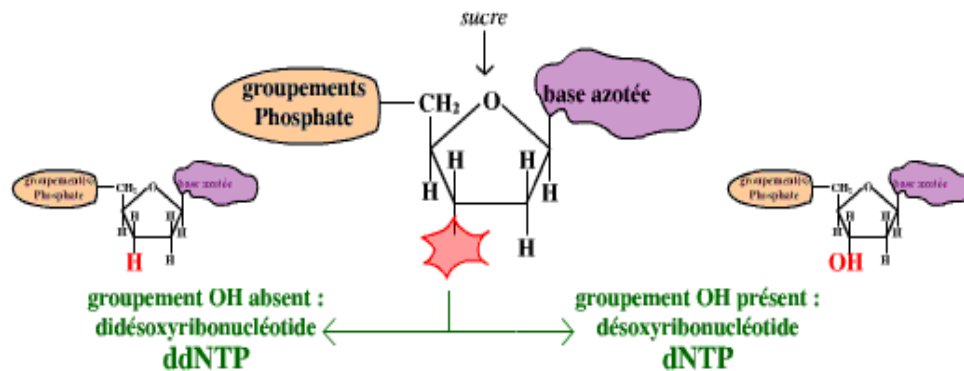


Figura 1

Inițial, molecula de ADN ce trebuie secvențiată este separată în cele două catene. Fiecare catenă este clonată într-un vector monocatenar (fagul M13), fiind inserată (cu capatul 3') într-un anumit situs, după o secvență cunoscută și marcată radioactiv, ce are rolul de primer. Aceste monocatene de ADN servesc ca *matrice* pentru sinteza unei noi catene, complementară, folosind ADN polimerază și nucleotidele necesare sintezei. Reacția se desfășoară concomitent în *patru eprubete*, în fiecare se va stabili localizarea unui anumit nucleotid folosind ca analog inhibitor un anumit dideoxynucleotid (fig. 2).

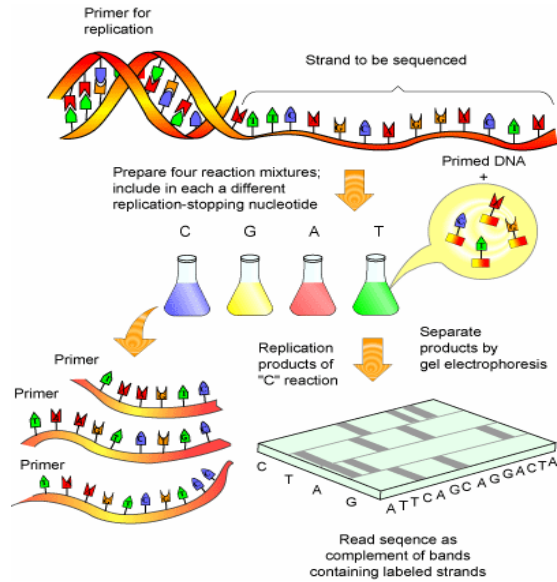


Figura 2

De exemplu, în eprubeta ce va stabili localizarea C se va adăuga dideoxinucleotidul ddCTP; atunci când ddCTP este incorporat în catenă în curs de formare, sinteza se oprește. Astfel se vor obține fragmente ADN de diferite lungimi, fiecare având la capătul terminal un anumit ddNTP. Producții celor patru amestecuri de reacție diferite sunt fracționate în paralel prin electroforeza în gel de poliacrilamidă, în condiții de denaturare. Fragmentele sunt separate în funcție de mărime.

Se observă o serie de benzi la poziții ce corespund localizării fiecărui nucleotid cu A/T/G/C. Ansamblul celor patru reacții poate fi citit pe o „scară” pozițională direcționată de la fragmentele cele mai mici la cele mai mari; astfel se poate determina *secvența* de nucleotide a fragmentului analizat (fig. 3).

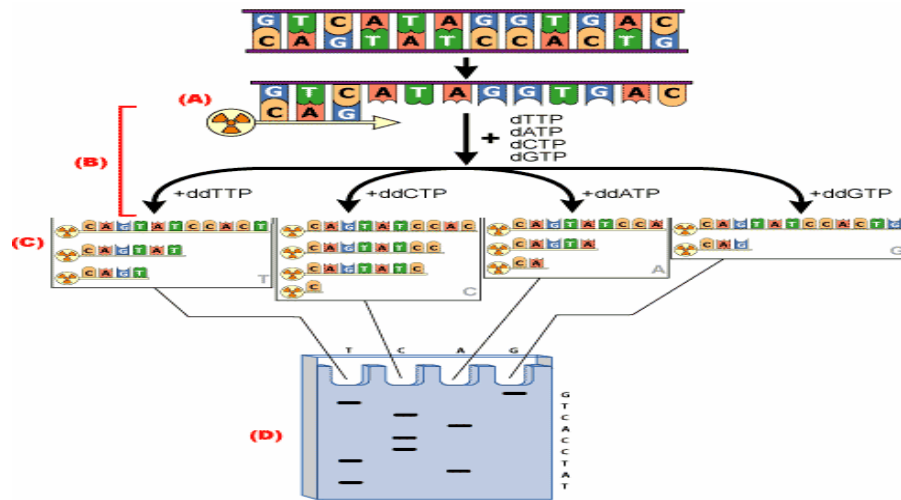


Figura 3

B. Secventierea prin terminatori ddNTP marcati fluorescent

Intr-o etapa ulterioara a fost introdusa tehnica „*dye – terminator sequencing*” in care ddNTP terminatori ai catenei sunt marcati fluorescent, fapt ce permite secventierea intr-o singura reactie; fragmentele nou sintetizate migreaza in gel printr-un *tub capilar* lung si extrem de subtire. La capatul capilarului o raza laser produce excitatia fluorocromilor si un monitor detecteaza semnalul fluorescent al fragmentului de ADN ce trece prin gel (fig. 4).

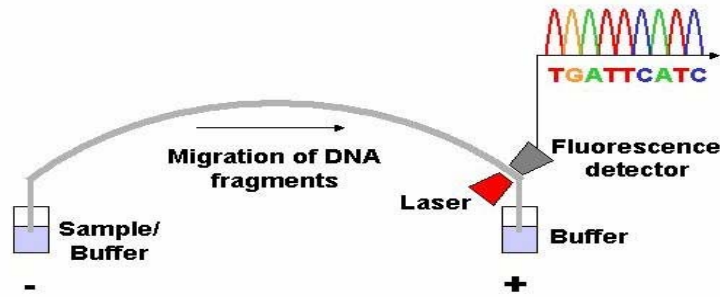


Figura 4

Computerul inregistreaza si stocheaza un profil distinct pentru fiecare fluorocrom colorat diferit, stabilind secventa nucleotidica determinata – cromatograma (electroferograma) (fig. 5).

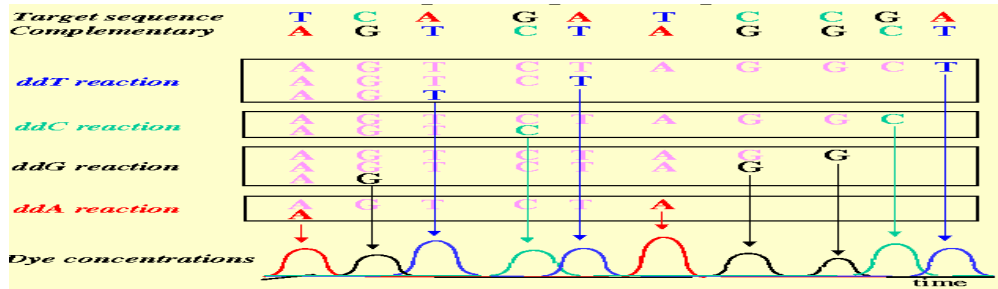


Figura 5

Metoda de secventiere cu „terminatori marcati fluorescent” a permis realizarea secventiatoarelor automate cu „debit inalt” care cresc enorm viteza si eficienta procesului de secventiere si scad costurile (fig. 6).

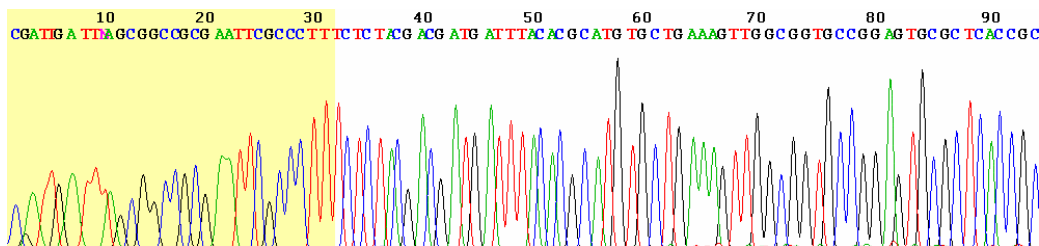


Figura 6

2. PIROSECVENTIEREA ITERATIVA

Metoda „clasica” a ddNTP, folosita timp de trei decenii, implica electroforeza in gel pentru separarea fragmentelor de ADN nou sintetizate; aceasta etapa este laborioasa si face tehnica putin eficienta (aprox. 30-60 kb/ciclu de 3-4 ore de electroforeza). In anul 2000 a fost introdusa o *tehnologie de secventiere a ADN complet diferita* care nu necesita electroforeza in gel si care permite inregistrarea secventei de ADN pe masura ce *un nou nucleotid este incorporat in catena nou sintetizata* de catre ADN polimeraza. Aceasta metoda foloseste o serie de reactii succesive de **pirosecventiere: eliberare și detecție a pirofosfaților**. Catenele noi de ADN sunt sintetizate de catre o ADN polimeraza ce foloseste precursori dezoxinucleotidtrifosfat (dNTP) si o matrita de ADN monocatenar. Cele patru tipuri de dNTP sunt furnizate secvential, nu toate odata. Cand este furnizat *dNTP-ul corect*, complementar matritei, ADN polimeraza il incorporeaza sub forma de dNMP (dezoxinucleotid monofosfat) si elibereaza un grup pirofosfat (PPi). Urmeaza o serie de reactii prin care se elibereaza o cantitate de lumina vizibila, detectata de o camera CCD (*charge-coupled device*). Acest semnal este proportional cu cantitatea de ATP produsa. In cazul in care este furnizat un nucleotid incorect el este degradat de o enzima (*apiraza*) si nu se produce semnalul luminos (fig. 7). Metoda, denumita și *secvențiere prin sinteză*, a fost introdusă și optimizată de către Pål Nyrén și Mostafa Ronaghi la **Royal Institute of Technology** – Stockholm, in anul 1996.

ADN-ul monocatenar este hibridizat cu primer-ul de secvențiere și incubat alături de enzimele: *ADN polimerază, ATP sulfurilază, luciferază și apirază*. Alături de aceste componente la reacție mai participă și *Adenozin 5' fosfosulfat (APS)* și *luciferină*.

Etape:

1. Adiția unuia dintre cele 4 tipuri de dNTPs (cu o singură modificare: dATP este înlocuit cu *dATPaS* ce nu este substrat pentru luciferază) inițiază pasul 2. În momentul incorporării corecte a unui dNTP de către ADN polimerază este eliberat un pirofosfat (PPi).

2. ATP sulfurilaza convertește PPi în ATP în prezența Adenozin 5' fosfosulfat. ATP-ul este utilizat de către luciferază pentru convertirea luciferinei în oxiluciferină. Acest proces este dependent de cantitatea de ATP prezentă. Semnalul luminos este detectat de camera CCD.

3. Nucleotidele neîncorporate sunt degradate de către apirază, reacția reîncepând cu un alt nucleotid.

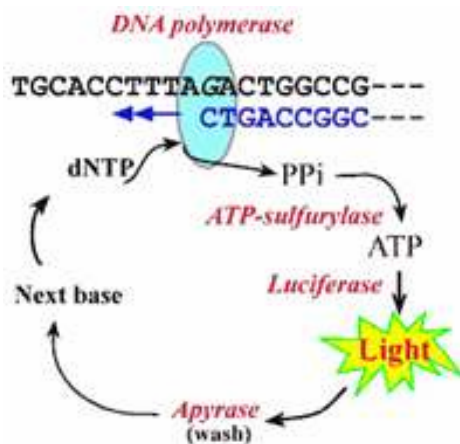


Figura 7

3. SECVENTIEREA MASIVA PARALELA

Metoda de pirosecventiere iterativa a stat la baza *tehnologiilor de secventiere masiva paralela (simultana) a ADN* de generatia a doua (care folosesc PCR pentru amplificarea ADN-ului tinta), disponibile in 2007 si apoi a tehnicilor de secventiere de generatia a treia (2008) care permit secventierea unei singure molecule de ADN fara sa fie nevoie de amplificarea ei.

A. Secventierea masiva paralela cu ADN amplificat

Primul val de tehnologii de secventiere bazate pe pirosecventiere utilizeaza PCR pentru amplificarea secventelor ADN-tinta (in locul clonarii) si permit procesarea simultana a milioane de secvente (tehnici de secventiere de generatia a doua). Metoda pirosecventierii masive paralele permite citirea in paralel a cateva sute de mii de secvente, fiecare cu o lungime de 300 – 500pb (in total >0.45 Gb pentru fiecare experiment ce dureaza circa 7 ore).

Pirosecventierea masiva paralela implica fragmentarea initiala a ADN in piese scurte de 300 – 500pb, urmata de legarea la capete a unor adaptor oligonucleotidici diferiti (unul din ei avand o molecula de biotina). Fragmentele ADN cu adaptorii legati sunt apoi denaturate si atasate pe suprafata unor microsferes acoperite cu streptavidina (ce recunoaste cu mare afinitate biotina). Microsferes sunt apoi separate individual cu ajutorul unei emulsii apa-ulei astfel incat fiecare picatura apoasa contine o singura microsfera si toti componentii necesari pentru PCR. Dupa amplificarea prin PCR fiecare microsfera are atasate pe suprafata circa 10 milioane copii ale fragmentului de ADN initial, imobilizata prin legaturi biotina-streptavidina. Emulsia este apoi dispersata, iar microsferes sunt depozitate in interiorul unei microcavitati “sapate” pe o lama de fibra optica (ce contine 1,6 milioane de cavitati); aceste cavitati sunt apoi umplute cu alte microsferes mult mai mici care au atasate pe suprafata ATP sulfurilaza si luciferaza (fig. 8).

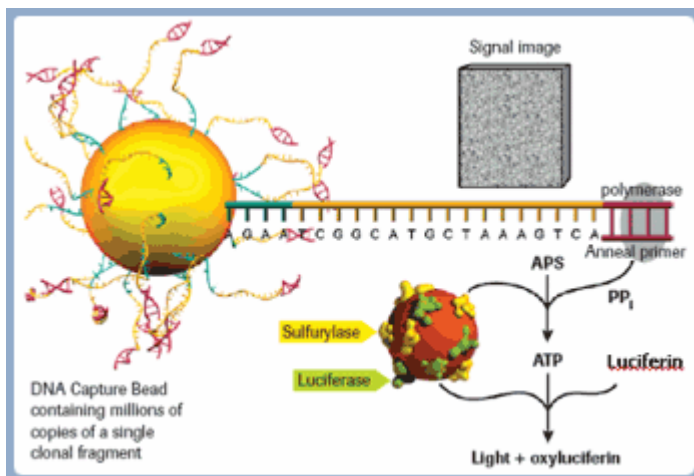


Figura 8

Placile care contin aceste microsferes sunt apoi spalate cu o succesiune precisa de precursori dNTP (T, apoi A, apoi C, apoi G), iar lumina emisa in cadrul fiecarei reactii este inregistrata corespunzator fiecarei cavitati (fig. 9).

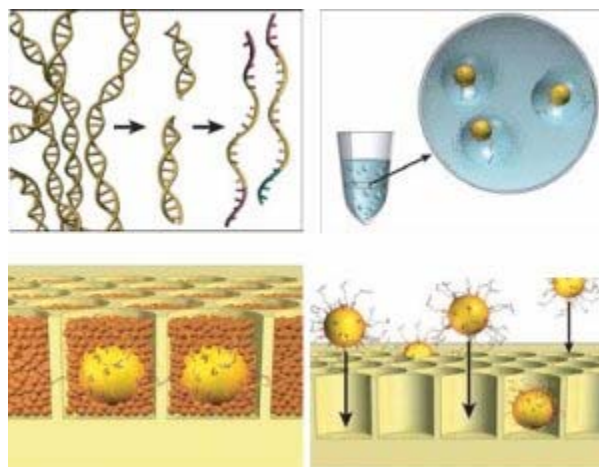


Figura 9

O tehnologie alternativa este secventierea masiva prin ligare, sau **tehnologia SOLID** (Sequencing by Oligonucleotide Ligation Detection). Aceasta tehnologie foloseste de asemenea strategia PCR pentru amplificarea fragmentelor de ADN individuale. Produsii amplificati sunt depozitati apoi aleatoriu pe suprafata unor micro-retele ce contin oligonucleotide marcate fluorescent. Aceasta tehnologie permite citirea unor fragmente scurte (circa 50pb) cu o secventa totala de 30 Gb (experiment de 7 zile) sau 50 Gb (experiment de 14 zile).

B. Secventierea masiva paralela fara amplificarea ADN-ului

Aceasta tehnologie de secventiere, cunoscuta si sub numele de **secventiere de generatia a treia**, permite secventierea unor molecule unice și neamplificate de ADN. Această metodă permite eliminarea erorilor ce pot apărea în cursul amplificării ADN, este mai simplă și are proiectate preturi mai reduse. Prima tehnologie din această categorie a fost introdusă în 2008 (HeliScope de către compania Helicos Biosciences). Această metodă presupune cicluri de aditie a unor nucleotide urmate de spalare; de aceea lungimea unei secvente citite este de doar 30pb. Deoarece reacțiile sunt extrem de dens compactate spațial (circa 100 milioane molecule matră / 1 cm²) tehnologia permite citirea a circa 40Gb pentru un experiment de 8 zile.

Există alte câteva tehnologii în curs de dezvoltare și care au potențialul de a schimba profund secventierea ADN, atât din punct de vedere al rapidității, cât și al costului. Cea mai promițătoare dintre acestea este **tehnologia SMRT** (Single-Molecule Real-Time Sequencing), ce va permite secventierea ADN la viteze ce circa 20000 ori mai mari decât tehnologiile de generatia a doua aflate în prezent pe piață.

Secventierea masivă paralelă a transformat radical genetica moleculară, fiind amplu folosită în secventierea rapidă a genomului uman, pentru determinarea genomului personal, identificarea mutațiilor și variantelor polimorfice asociate cu bolile comune, analiza transcriptomului și a interacțiunilor dintre ADN și proteinele implicate în reglarea expresiei genelor.

Aplicatii:

1. cartografierea genomului uman
2. diagnostic prenatal și postnatal
3. stabilirea profilului tumoral
4. afecțiuni genetice ereditare și congenitale
5. afecțiuni neurologice
6. farmcogenetica