

**LP5.** Tehnici de evaluare structurală și funcțională a celulelor și organitelor celulare.

### **Metode de analiză a acizilor nucleici. Principii**

Termenul de *ADN recombinant* se referă la combinațiile noi de ADN, obținute între anumite secvențe de ADN uman (sau de la alte organisme) și molecule de ADN bacterian (sau de la alte specii), capabile să se replice indefinit (formând clone moleculare) sau să exprime, într-o celulă gazdă, informația genetică pe care o conțin.

Tehnicile de ADN recombinant au inaugurat “era ingineriei moleculare” devenind posibilă trecerea de la observarea proceselor genetice la manipulare genică. Au fost înregistrate succese remarcabile în descifrarea structurii și funcției genelor cu aplicații în medicină (diagnosticul și tratamentul unor maladii), industria farmaceutică (obținerea unor proteine terapeutice și noi vaccinuri), agricultură și zootehnie (utilizarea unor biotehnologii în ameliorarea plantelor și animalelor).

Tehnicile ADN recombinant se pot grupa în două mari categorii:

**A. Clonarea ADN sau amplificarea selectivă a unei gene/secvențe de ADN**, bazată în esență pe mai multe runde de replicare a ADN care vor produce un număr mare de copii ale fragmentului respectiv:

**a) celulară, in vivo**, când se folosește mecanismul natural al replicării ADN.

Implică patru etape majore:

I. *formarea ADN recombinant* prin atașarea *in vitro* a fragmentelor de ADN uman la “un vector sau replicon” capabil de replicare independentă;

II. *transformarea*: transferarea moleculelor în *celule-gazdă* în care vectorul recombinant se replică independent de cromozomul celulei gazdă;

III. *Amplificarea* sau producerea de *clone celulare multiple*;

IV. *Izolarea clonelor de ADN recombinant* prin oprirea culturilor și izolarea selectivă a ADN recombinant.

**b) acelulară, in vitro, bazată pe reacția de polimerizare în lanț (PCR);**

Cu această metodă se poate amplifica selectiv o secvență scurtă de ADN sau ARN a cărei structură nucleotidică este parțial cunoscută. Amplificarea este considerabilă (de miliarde de ori) și rapidă (câteva ore), permițând obținerea unei cantități suficiente de material genetic necesar pentru analiză. Amplificarea selectivă *in vitro* se bazează pe *principiul extensiei unei amorse* ce declanșează sinteza ADN după *matrița* fragmentului ADN inițial (de amplificat).

Avantajele clonării aceluare a ADN prin PCR sunt determinate în primul rând de *simplitatea* sa (nu necesită nici o altă manipulare în afara variațiilor termice necesare diferitelor etape ale reacției, pretându-se astfel la automatizare) și rapiditatea cu care se obține multiplicarea secvențelor de interes. Prin acest tip de clonare, plecând de la o cantitate infimă de ADN (chiar de la o singură celulă) se poate obține, prin PCR, o cantitate suficientă de ADN țintă care poate fi vizualizată prin fluorescență în UV (după o colorare cu bromură de etidium) și/sau analizată direct.

## **B. Analiza sau detecția specifică a unei secvențe de ADN sau ARN**

**B1. Hibridizarea moleculară (prin complementaritate)** cu o *sondă* de acid nucleic marcată. Metodele se bazează pe capacitatea unor molecule monocatenare de acid nucleic de a forma, pe bază de complementaritate, molecule bicatenare. Tehnicile standard folosesc o sondă monocatenară de acid nucleic (cu o structură cunoscută), pentru a identifica o structură similară într-un amestec complex și heterogen de molecule de acid nucleic țintă (de obicei imobilizat pe un suport solid). Sonda este marcată cu un traser radioactiv sau cu un compus fluorescent. Marcarea permite *detectarea* secvenței/genei ce posedă o secvență omoloagă sondei folosite.

### **a) Analiza ADN genomic prin metoda de transfer Southern.**

Obiectivul principal al metodei este de a evidenția, cu ajutorul unei sonde specifice, prezența sau absența unui fragment de ADN omolog (“țintă”), obținut din *ADN genomic*, cu o anumită *enzimă de restricție*. Pentru aceasta, ADN extras din nucleii celulari este digerat cu una sau mai multe enzime de restricție, fragmentele separate după marime prin electroforeză în gel de agaroză, denaturate și apoi transferate (prin “*sugere*”/blotting) și imobilizate pe o membrană solidă de nitroceluloză pentru a fi hibridizate cu o sondă monocatenară specifică, marcată radioactiv. Sonda se va fixa numai pe secvența omoloagă de ADN (dacă este prezentă) iar poziția sa pe membrană va permite evaluarea mărimii sale;

### **b) Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice unei alele (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.

### **c) Analiza ARN mesager prin Northern blot**

Obiectivul principal al metodei este obținerea de informații privind profilurile de expresie (tipul celular, abundența transcriptului) a unei gene deja clonată. Punerea în evidență a unui

anumit ARNm se bazează pe hibridizarea moleculară a ARN cu o sondă complementară monocatenară.

**d) Hibridizarea in situ a ADN/ARN**

- pe preparate cromozomice în pro-metafază folosind sonde marcate (radioactiv sau molecule fluorescente - FISH) alese în funcție de obiectivul urmărit;
- pe secțiuni histologice pentru evidențierea unui anumit ARNm folosind ribosonde marcate;

**e) Identificarea ADN/ARN al organismelor exogene**

Permite depistarea oricărei infectări sau infestări printr-un microorganism bacterian, viral, fungic sau parazitar prin folosirea unor sonde corespunzătoare genomului aceluși organism.

**B2. Analiza secvenței nucleotidelor din ADN – secvențierea ADN**

După izolarea și amplificarea unui fragment ADN principala etapă de analiză genotipică este determinarea secvenței nucleotidice, deci a informației genetice a fragmentului respectiv. Această acțiune poate stabili structura genei precum și a secvenței de aminoacizi a proteinei codificată de genă. Metodele de secvențiere sunt:

- *tehnica de degradare chimică* descoperită de Walter Gilbert;
- *tehnica de sinteză enzimatică* elaborată de Fred Sanger;