



BIOLOGIE

CELULARA SI MOLECULARA

LP07. Reactia de polimerizare in lant

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.

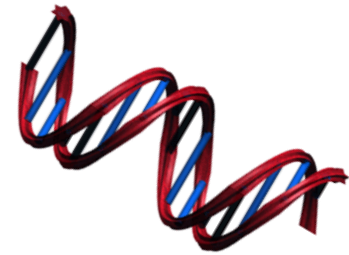
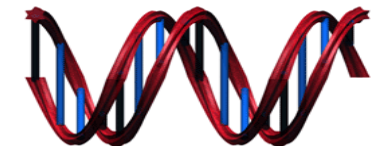
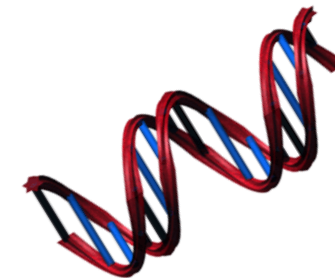
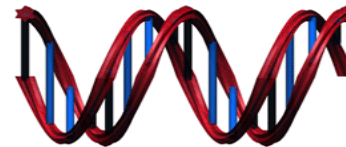
DGGE.

Real-Time PCR.

Secvențiere.

ADN și ARN non-self.

Reactia de polimerizare in lant (PCR).



Impactul PCR a fost subliniat în anul 1993 prin acordarea Premiului Nobel pentru Chimie profesorului Kary Mullis pentru contribuția sa în dezvoltarea acestei tehnologii.





Proprietati fundamentale si
caracteristice ale ADN care ii
confera calitatea de a fi ”
molecula esentiala a vietii”

1. Sa **stocheze** o cantitate mare de informatie, intr-o forma stabila, dar usor de descifrat;
2. Sa **reproduca** informatia (prin replicare) si sa o **transmita** cu mare fidelitate de la o generatie la alta (prin diviziune), eventual sa o ”**repare**” corect, daca se produce o leziune;
3. Sa **exprime** informatia genetica prin sinteza ARNm si, pe acesta baza, a unor proteine specifice;
4. Sa fie capabil de **variatie**.

Stocarea informației genetice

- ADN celular, localizat în nucleu, conține informația genetică;
- Informația este codificată:
 "literele" – bazele azotate;
 "cuvintele" – triplete de baze;
- rezolvă problema stocării informației genetice într-un spațiu foarte mic;
- ADN-ul dintr-un cromozom uman măsoară aprox. 5 cm;

poziția 1 capatul 5' ↓	poziția 2				poziția 3 capatul 3' ↓
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Stocarea informației genetice

- fiecare moleculă de ADN este împachetată într-un **cromozom**;
- **genomul** = informația genetică totală stocată în totalitatea cromozomilor unei celule;
- **genomul** unei celule diploide conține **46 de cromozomi**, respectiv **6 x 10¹⁰** nucleotide perechi.
- **un cromozom uman** conține în ADN-ul său între **50 x 10⁸** și **250 x 10⁸** perechi de nucleotide având o lungime desfășurată de **1,7-8,5 cm**.
- în nucleul organismelor superioare există un **exces foarte mare de ADN**:
 - o proteină de dimensiuni medii conține aprox. **300-400 aminoacizi**;
 - <=> codificată de **3 x nr. aminoacizilor** = aprox. **1000-1200 nucleotide**;
 - Concluzie**: regiunile esențiale de codificare, sunt întrerupte de spații largi de ADN neinformațional!!!

Stocarea informației genetice

- **Împachetarea ADN în celula eucariotă:**
 - **proteine histonice;**
 - **proteine nehistonice;**

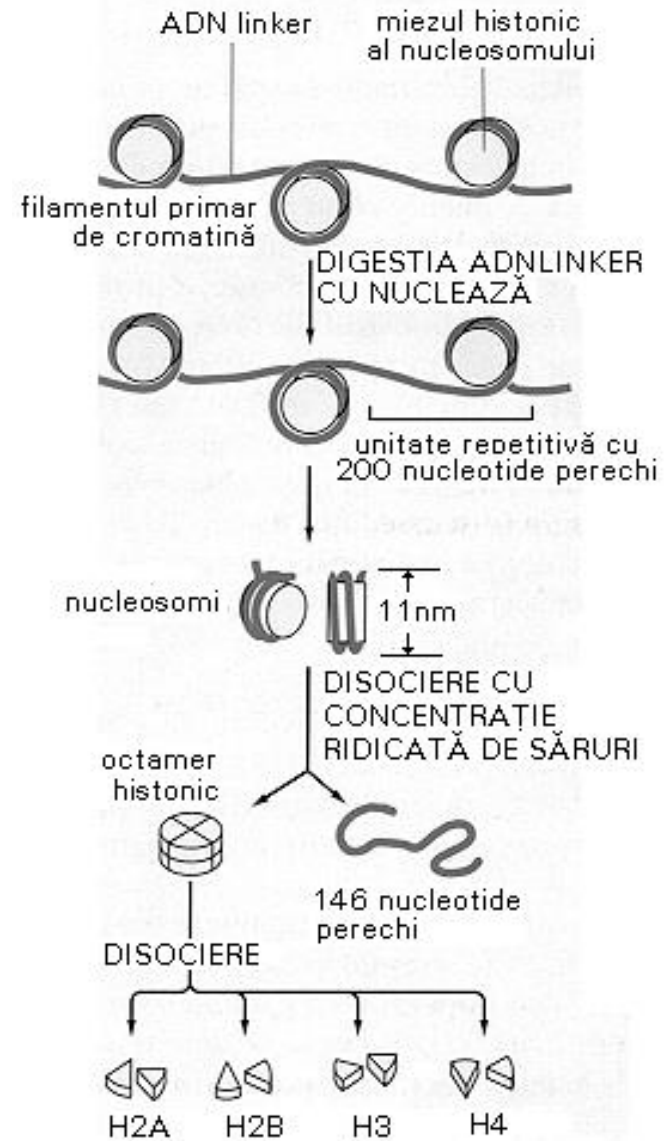
ADN + proteine de împachetare = fibrele de CROMATINĂ

Histonele = proteine mici care conțin o proporție foarte mare de aminoacizi încărcăți pozitiv (lizină și serină).

Histonele  **Nucleozomale: H2A, H2B, H3, H4**
H1

Histonele nucleozomale => împachetarea primară a ADN (ordin. I)
<=> structură numită nucleozom
=> cromatina de 30 nm

Structura nucleozomului



Replicarea ADN

- Reprezintă procesul de copiere fidelă a succesiunii de nucleotide din moleculele de ADN, deci a informației genetice, în scopul transmiterii acesteia de-a lungul generațiilor celulare.
- Procesul se desfășoară în faza S a ciclului celular.
- Este o reacție de polimerizare, are loc cu o rată de 500 nucleotide/secundă la bacterii și de 50 nucleotide/secundă la celulele de mamifere.
- Durata fazei S este de aproximativ 8 ore rezultatul fiind 2 cromozomi perfect identici cu cel de origine, uniți prin intermediul centromerului până în metafaza mitozei.
- Duplicarea cromozomilor implică atât replicarea moleculei lungi de ADN a fiecăruia, cât și asamblarea la ADN-ul nou format a noi proteine cromozomiale, ceea ce duce la formarea cromatinei.
- Viteza și acuratețea sunt asigurate de o "mașină replicativă" complexă, reprezentată de un complex multienzimatic.



Mecanismul molecular al replicării la eucariote

1. Aparatul de replicare:

- Replicarea ADN este realizată de ADN polimeraze, o familie de proteine ce catalizează polimerizarea dezoxiribonucleotidelor într-o catenă de ADN. Caracteristici generale ale ADN polimerazelor:
 - nu știu să înceapă sinteza unei catene ci numai să extindă o catenă de acid nucleic existentă și de aceea îi trebuie o amorsa de ARN(primer)
 - sintetizează în direcția 5'-3' o catenă nouă antiparalelă
 - acționează foarte precis recunoscând nucleotidul greșit și îndepărtându-l.

2. Inițierea replicării

- origini de replicare - în faza G1 prin formarea complexului de pre-inițiere a replicării în puncte diferite ale genomului numite origini de replicare.

3. Procesul de replicare

- ADN helicaze-desfac catenele temporar
- proteine SSB-țin separate catenele (helix destabilizatoare)
- ADN polimerazele aranjează secvențial și complementar nucleotidele activate



Mecanismul molecular al replicării la eucariote

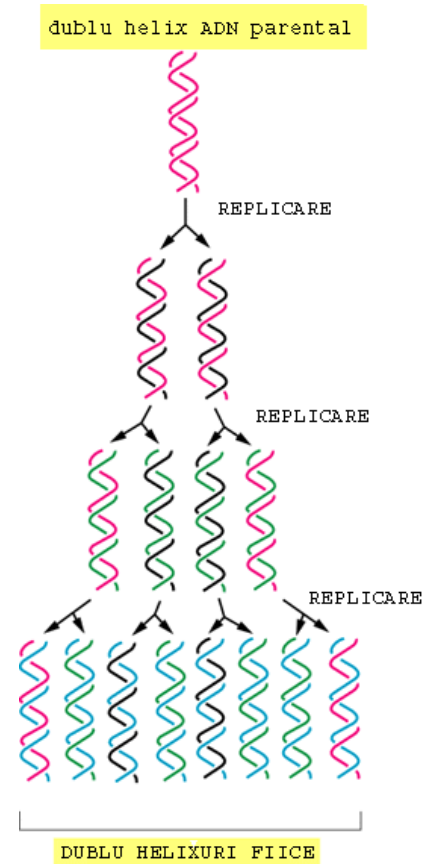
- Replicarea începe în punctul de origine a replicării și progresa bidirecțional formând furcile de replicare; se activează sincron mai multe origini de replicare în faza S (repliconi).
- Sinteza noilor catene are loc în faza S a ciclului celular.
- Pregătirea precoce a replicării are loc în faza G1 cu formarea complexului preinițiere a replicării, pre-RC, în puncte definite ale genomului (origini de replicare).
- La tranziția G1/S complexul pre-RC este activat prin acțiunea unor factori multipli ce permit fixarea ADN polimerazei și demararea replicării în faza S.



Mecanismul molecular al replicării la eucariote

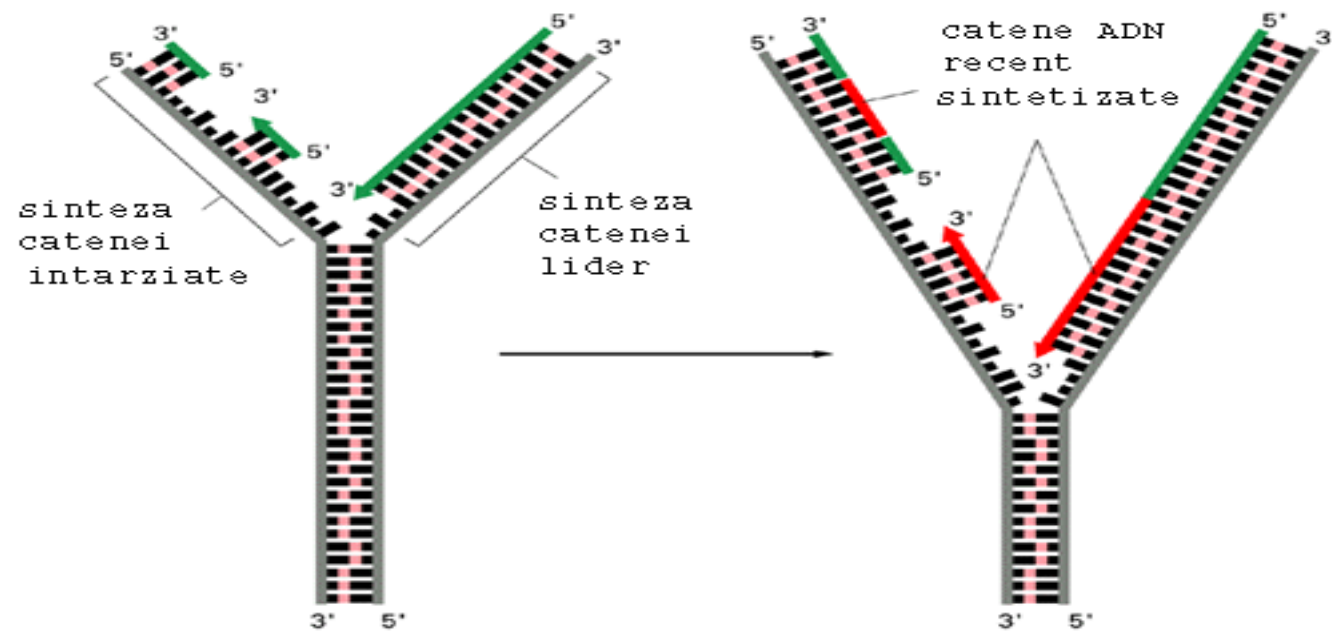
- Incepe în originile de replicare activate (au fixat ADN polimeraza și proteinele asociate) și de aici progresează în ambele direcții până ce ADN este complet duplicat. Cromatina este decondensată sub acțiunea enzimatică a histonacetiltransferazei dubla elice este despiralată sub acțiunea topoisomerezilor și astfel catenele sunt separate temporar de helicaze formându-se furca de replicare; pentru a le menține separate pe fiecare matrită se fixează proteine SSB care împiedică reimperecherea bazelor complementare, fiind menținute separate până la sinteza catenelor noi.
- ADN polimeraza aranjează secvențial și complementar dezoxiribonucleotidele activate.
- Declansarea replicării necesită sinteza unei amorse scurte de ARN sub acțiunea primazei care este apoi îndepărtată și ADN polimerazele preiau stafeta continuând sinteza.
- Terminarea replicării se face când polimerazele ajung la capatul repliconului sau la capatul catenei matrite.

Mecanismul molecular al replicării la eucariote



În timpul replicării, fiecare catenă veche de ADN servește ca matriță pentru sinteza unei catene noi. Astfel, secvența ADN de o lungime enormă este replicată "semiconservativ" de către ADN-polimerază.

Mecanismul molecular al replicării la eucariote



Furca replicativa

Denumită astfel deoarece regiunea aflată în replicare ce se mișcă de-a lungul helixului de ADN parental are o formă de Y. La nivelul furcii replicative, helixul ambelor molecule noi de ADN este sintetizat de un complex enzimatic extrem de sofisticat care conține și ADN-polimeraza.



Proteinele de la nivelul furcii replicative

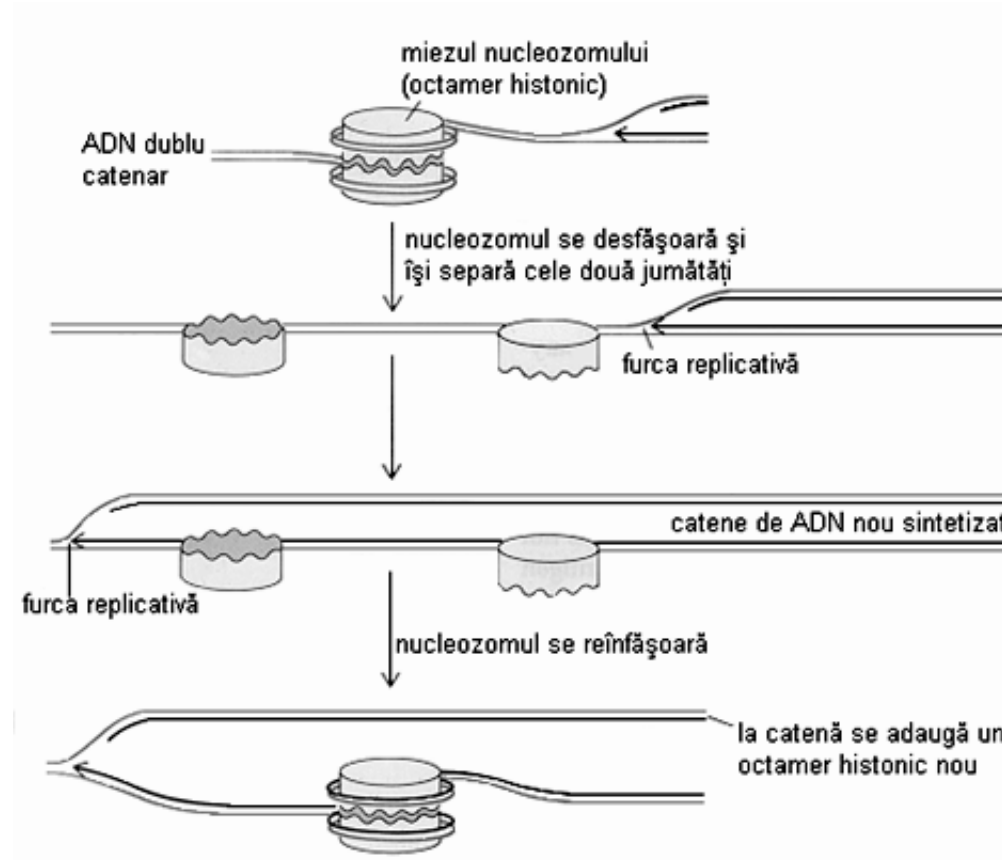
- ***ADN-helicaza***, hidrolizează ATP pentru a se mișca rapid de-a lungul unei monocatene de ADN;
- ***ADN-topoizomerazele*** funcționează ca "nucleaze reversibile" ce determină inițial ruperea dublei catene de ADN "în amonte" de furca replicativă, slăbind tensiunea care s-a creat în moleculă și apoi legarea la loc a capetelor libere;
- Proteinele helix-destabilizatoare, numite și proteine SSB ("single-strand DNA-binding proteins"), se leagă la catenele de ADN desfăcute din helix, fără a acoperi bazele.



Asamblarea histonelor pe
parcursul procesului de replicare

- La eucariote ADN-ul este replicat în starea sa structurată sub formă de cromatină, deci complexat cu proteinele histonice.
- Majoritatea organismelor posedă copii multiple ale fiecărei gene histonice (histonele fiind sintetizate aproape exclusiv în faza S a ciclului celular);
- Ipoteză: în momentul când furca replicativă ajunge la nivelul nucleozomului, se presupune că acesta se desface în doi "semi-nucleozomi" permițând astfel ADN-polimerazei să copieze lanțul desfăcut;

replicarea pe ADN-ul eucariot
organizat în cromatina nucleară





REACTIA DE POLIMERIZARE IN LANT (PCR-Polymerase Chain Reaction)

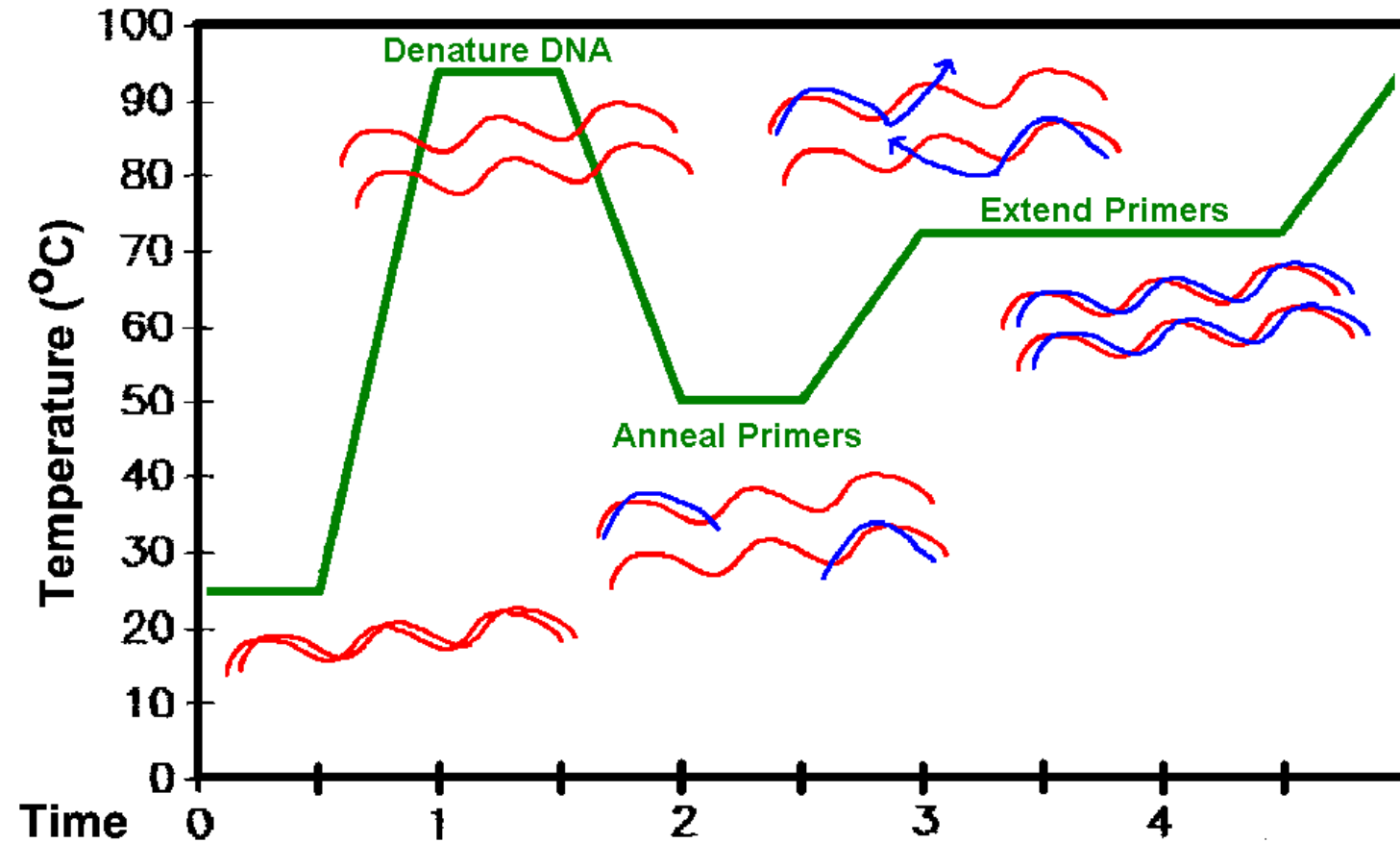
= tehnica de amplificare ”*in vitro*”
a unei secvente specifice de
ADN, prin cicluri repetate de
sinteza, indusa de primeri
specificali cu orientare reciproca

- PCR reprezintă amplificarea in vitro a secvențelor ADN specifice
- Ciclarea termică repetată determină copierea și multiplicarea ADN-ului dintre cele două sit-uri de legare a primerilor
- PCR necesită doi primeri – cate unul complementar pentru fiecare dintre cele două catene ADN – precum și o ADN polimerază

PCR-Polymerase Chain Reaction

Etapele unui ciclu PCR:

- 1.denaturare
- 2.atasare
- 3.extensie

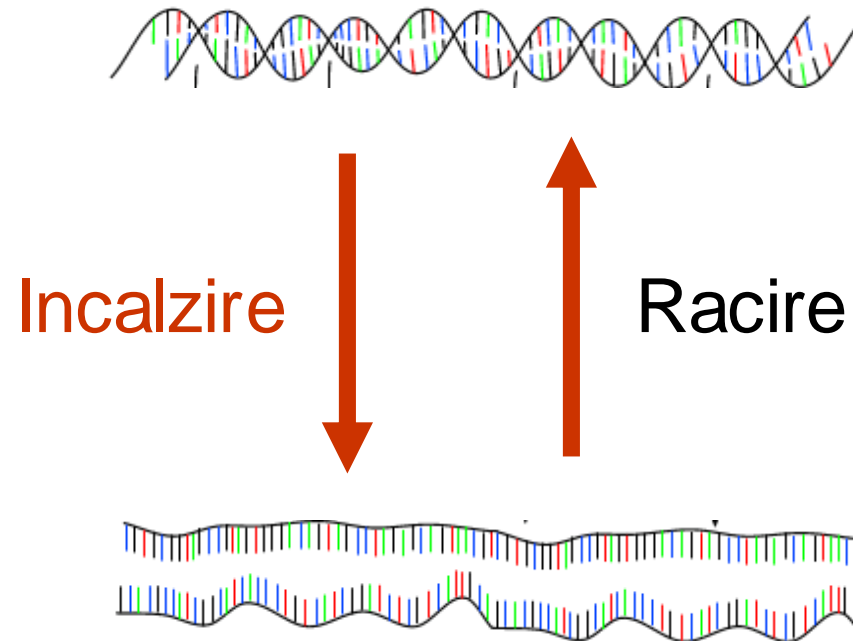


PCR-Polymerase Chain Reaction

Etapele unui ciclu PCR:

- 1.denaturare
- 2.atasare
- 3.extensie

- *Denaturare.* Cele două catene ale moleculei ADN țintă sunt separate prin încălzire, cel mai frecvent la temperatura de 94°C. Această energie determină ruperea legăturilor de hidrogen dintre bazele complementare, neafectând legăturile fosfo-diesterice dintre nucleotidele de pe aceeași catenă.



PCR-Polymerase Chain Reaction

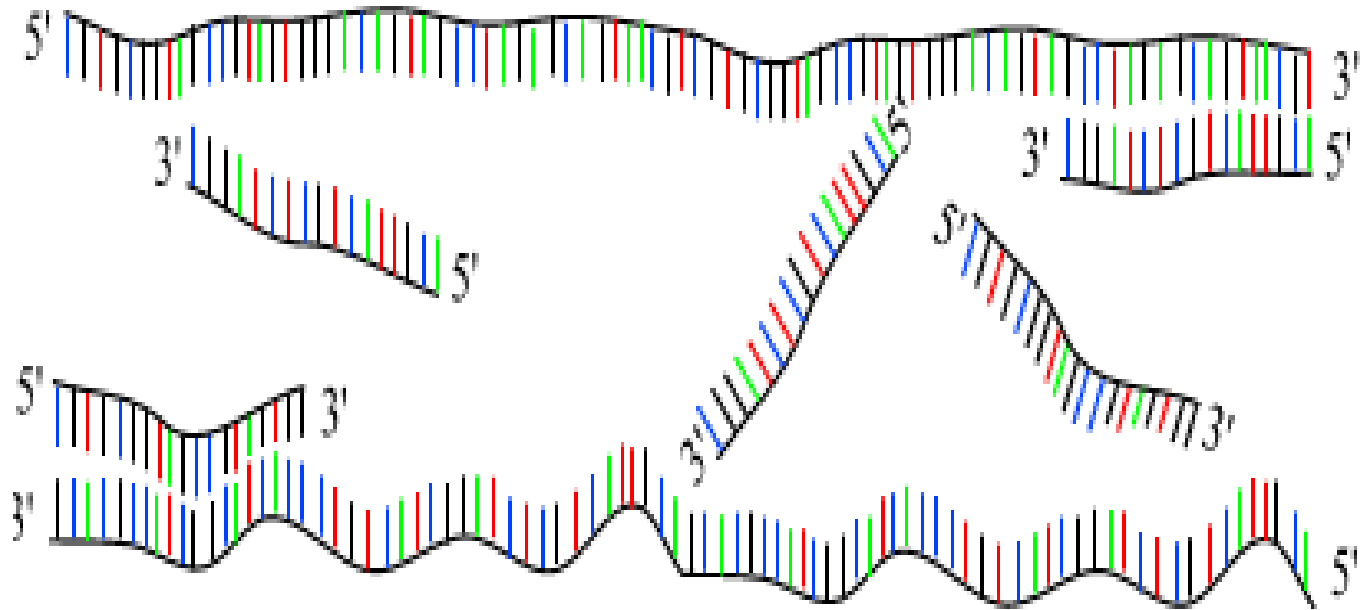
Etapele unui ciclu PCR:

1.denaturare

2.atasare

3.extensie

- *Ataşare primeri.* Cele două catene țintă sunt supuse unui proces de răcire în prezența unor primeri oligonucleotidici. Primul tip de primeri (sens) recunosc și se leagă de catena țintă antisens, cel de-al doilea tip (primeri antisens) legându-se de catena sens. Cele două tipuri de primeri sunt sintetizați în așa fel încât capetele lor 3' să fie în interiorul regiunii de amplificat. Temperatura de atașare la secvențele țintă depinde de secvența și lungimea primerilor. Tipic, această etapă se desfășoară la valori ale temperaturii cuprinse între 45-60°C.

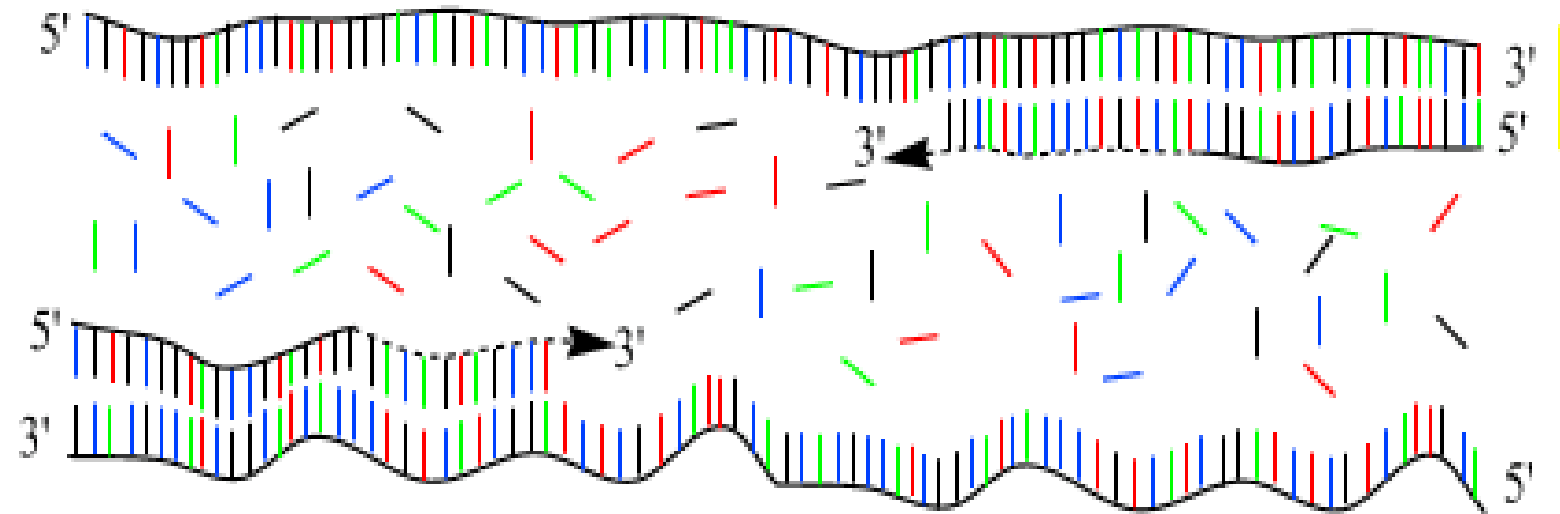


PCR-Polymerase Chain Reaction

Etapele unui ciclu PCR:

- 1.denaturare
- 2.atasare
- 3.extensie

- *Extensia.* O ADN-polimerază termostabilă se leagă la capătul 3'- liber al primerilor oligonucleotidici atașați și folosesc dNTPs (deoxiribonucleotid trifosfați) pentru a sintetiza o nouă catenă ADN în direcția 5'-3'. Taq ADN polimeraza are o temperatură optimă de catalizare a procesului de replicare in vitro la 72°C. Temperatura înaltă de desfășurare a extensiei determină o atașare specifică a primerilor de catenele țintă.



PCR-Polymerase Chain Reaction

Etapele unui experiment PCR:

denaturare initiala

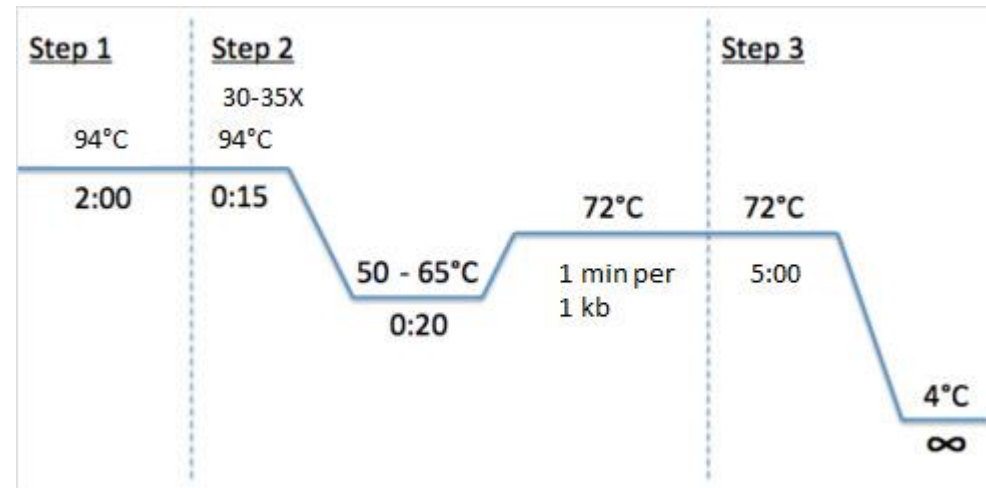
1.denaturare

2.atasare

3.extensie

extensie finala

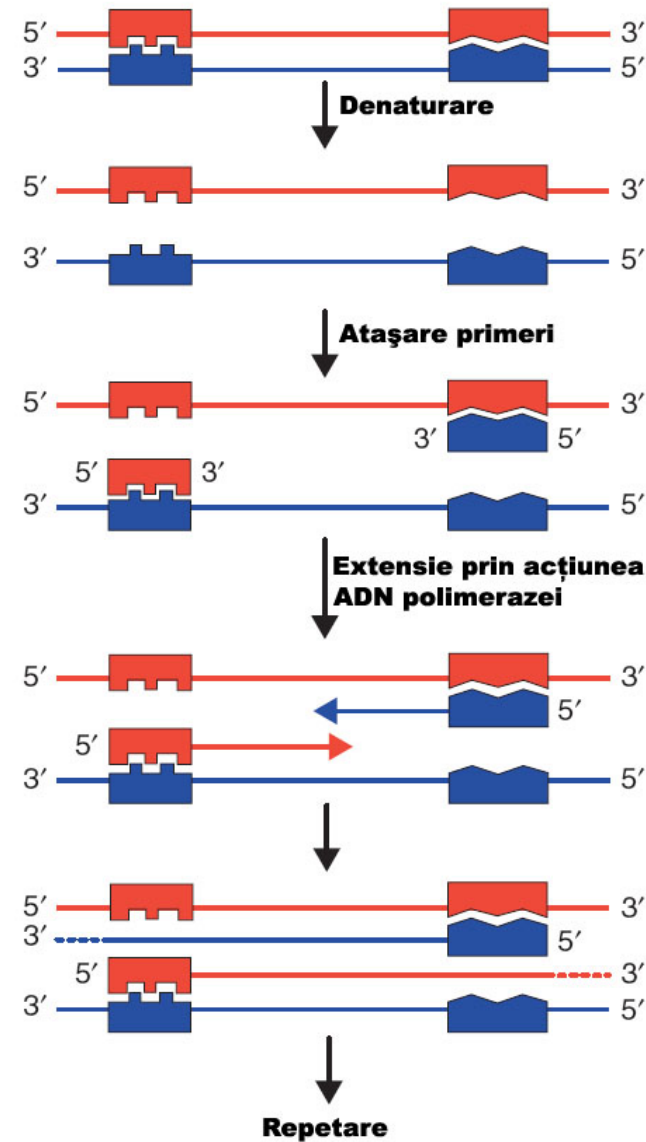
- Numărul total de cicluri depinde atât de cantitatea inițială de ADN cât și de cantitatea de produși de amplificare necesară după finalizarea PCR.
- În general, pentru a evita erorile de replicare probele vor fi supuse unui număr cât mai mic de ciclări cuprind în general între 17 și 25.
- Este necesara o etapa preliminara de denaturare prelungita (95 C, 10 min)
- După ultima ciclare multe protocoale includ o etapă suplimentară de extensie (72 C, 5min) pentru ca toate fragmentele existente să se regăsească în formă dublu-catenară și astfel să crească eficiența reacției.





REACTIA DE POLIMERIZARE IN LANT (PCR-Polymerase Chain Reaction)

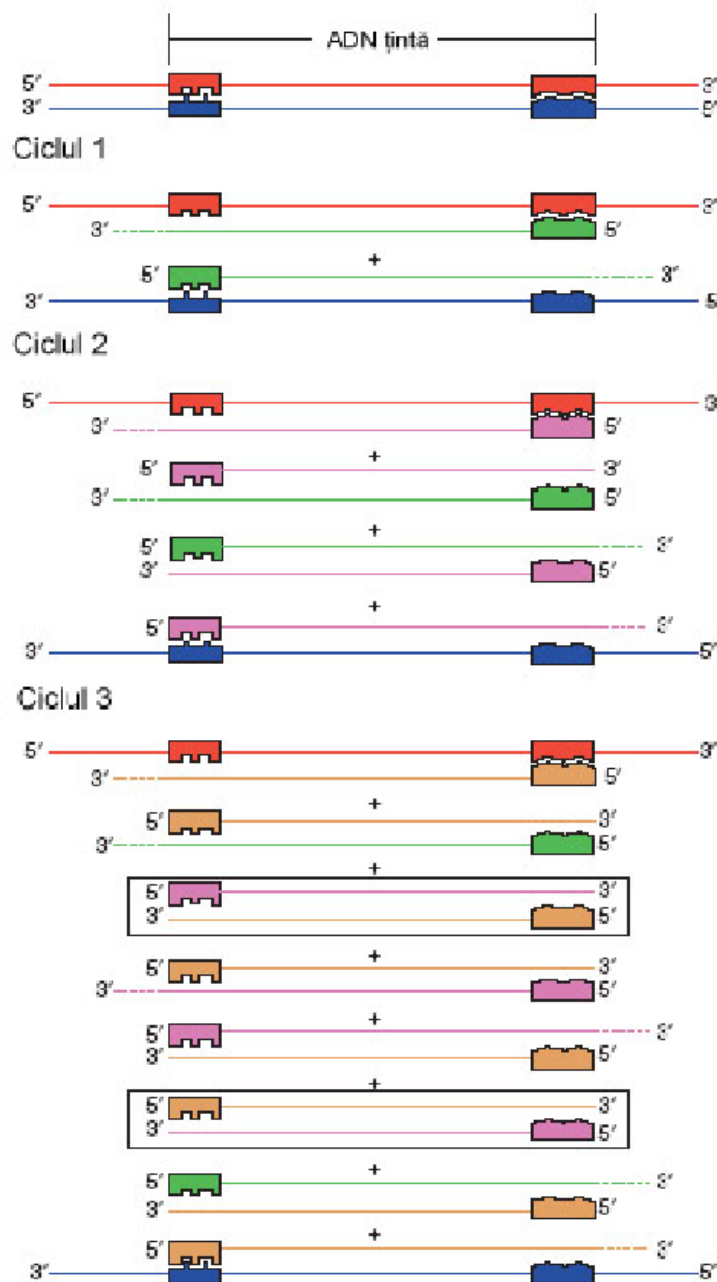
Molecula ADN țintă conține secvențe complementare celor două oligonucleotide. Oligonucleotidele acționează ca puncte de inițiere a replicării ADN. Producția fiecărui ciclu PCR vor deveni toți matrițe în replicarea ADN în ciclurile următoare.



REAȚIA DE POLIMERIZARE ÎN LANT (PCR-Polymerase Chain Reaction)

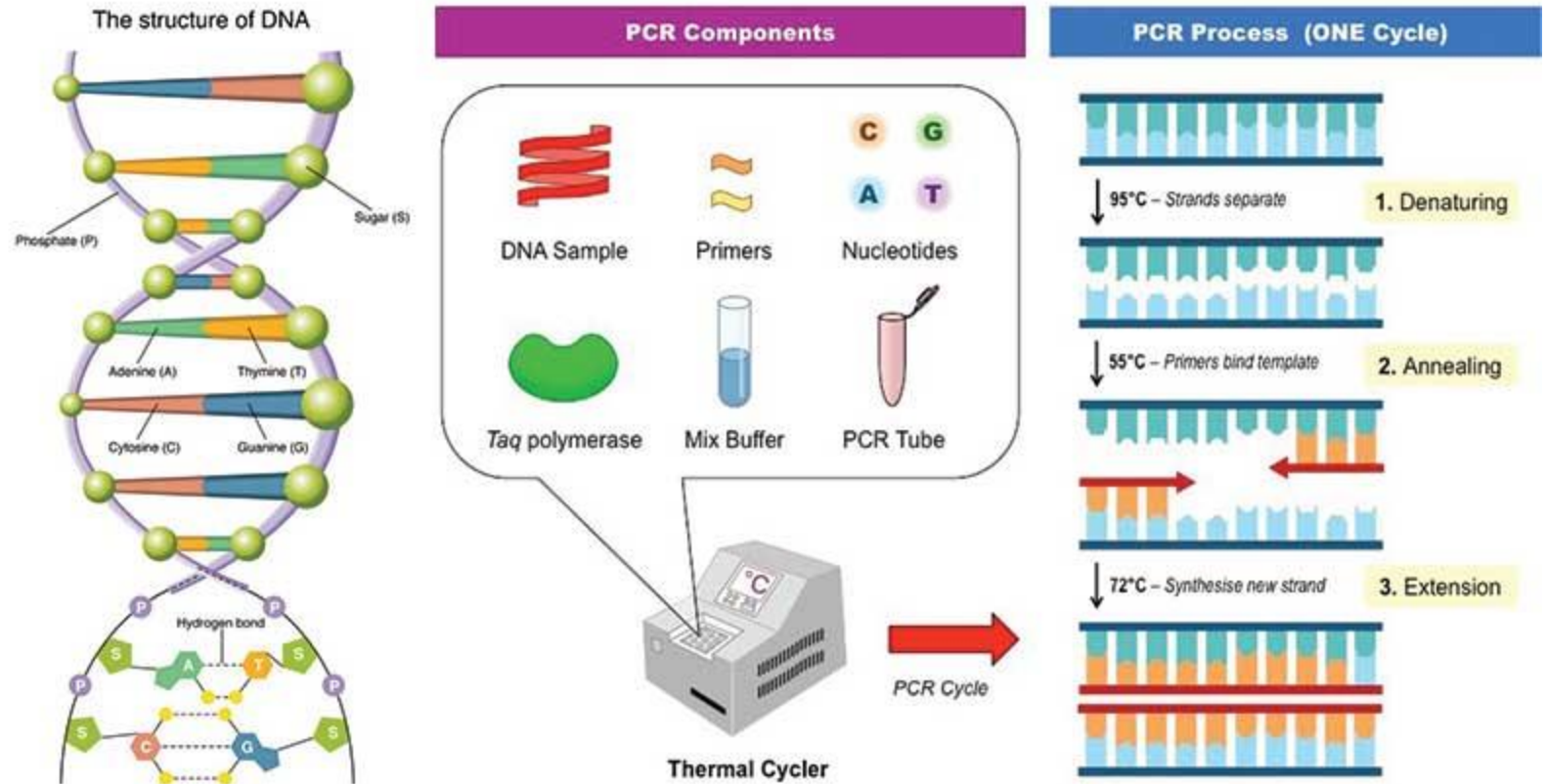
Produceți formați în urma primelor
trei cicluri ale experimentului PCR

La sfârșitul celui de-al treilea ciclu
se formează, alături de alte
fragmente ADN, duble catenă ce
corespund exact țintei. În ciclurile
următoare se va observa o
creștere exponențială a acestui
tip de molecule.



Componentele reactiei PCR

ADN
polimeraza
nucleotide
primeri
Mg²⁺
solutie tampon





Componentele reactiei PCR

ADN

polimeraza

nucleotide

primeri

Mg²⁺

solutie tampon

- integritatea si puritatea **ADN-ului** de analizat sunt esentiale; situsurile de legare a primerilor, precum și secvența dintre aceste două situsuri trebuie să fie intacte.
- **trebuie evitată contaminarea!** Pentru aceasta se vor manipula cu grijă probele, micropipetele, tuburile de amplificare, soluțiile tampon, enzimele, etc



Componentele reactiei PCR

ADN
polimeraza
nucleotide
primeri
Mg²⁺
solutie tampon

- functia enzimei ADN polimerază este de a crea molecule de ADN din nucleotide, folosind o matrita pentru a adauga nucleotide pe baza de complementaritate
- nu poate începe un nou lanț de la zero (de novo) – are nevoie de primeri
- ADN polimeraza adaugă nucleotide doar la capătul 3' al catenei nou formate, adăuga o nucleotidă numai unui grup 3'-hidroxid (OH) pre-existent
- face greșeli o dată la fiecare un miliard de baze copiate. Unele enzime ADN polimeraze pot corecta aceste greșeli. La recunoașterea unei baze incorecte, enzima ADN face un pas înapoi. Rolul de exonuclează al enzimei permite eliminarea bazei greșite. După eliminare, polimeraza poate introduce baza corectă și replicarea continuă.
- in alegerea unei polimeraze pentru un anumit experiment conteaza viteza de adaugare a nucleotidelor, rata de eroare, activitatea exonucleazica



Componentele reactiei PCR

ADN
polimeraza
nucleotide
primeri
Mg²⁺
soluție tampon

- Primele experimente PCR au utilizat drept enzimă de replicare fragmentul Klenow (fragment proteic de dimensiuni mari rezultat în urma clivării ADN polimerazei I). Acest fragment era însă degradat după etapa de denaturare astfel încât trebuia adăugată o nouă cantitate după fiecare ciclu de amplificare.
- Un progres extrem de important a fost cauzat de introducerea Taq ADN Polimerazei izolată și purificată de la bacteriile *Thermus aquaticus* (Lawyer et al., 1989). Taq ADN polimeraza este stabilă la temperaturi înalte – nu-și modifică activitatea după ce trece prin etape de denaturare termică la 94°C. Aceasta înseamnă că nu trebuie suplimentat mediul cu enzimă după fiecare ciclu PCR și că ciclurile de încălzire și răcire a probelor pot fi complet automatizate în blocuri speciale de incubare.



Componentele reactiei PCR

ADN
polimeraza
nucleotide
primeri
Mg²⁺
soluție tampon

- Primele experimente PCR au utilizat drept enzimă de replicare fragmentul Klenow (fragment proteic de dimensiuni mari rezultat în urma clivării ADN polimerazei I). Acest fragment era însă degradat după etapa de denaturare astfel încât trebuia adăugată o nouă cantitate după fiecare ciclu de amplificare.
- Un progres extrem de important a fost cauzat de introducerea Taq ADN Polimerazei izolată și purificată de la bacteriile *Thermus aquaticus* (Lawyer et al., 1989). Taq ADN polimeraza este stabilă la temperaturi înalte – nu-și modifică activitatea după ce trece prin etape de denaturare termică la 94°C. Aceasta înseamnă că nu trebuie suplimentat mediul cu enzimă după fiecare ciclu PCR și că ciclurile de încălzire și răcire a probelor pot fi complet automatizate în blocuri speciale de incubare.



Componentele reactiei PCR

ADN
polimeraza
nucleotide
primeri
Mg²⁺
solutie tampon

- au o lungime cuprinsă între 17-30 nucleotide, suficientă pentru a permite recunoașterea unei secvențe unice în genom;
- vor conține aproximativ 50% GC;
- secvențele cu regiuni lungi în care se găsește doar un singur tip de nucleotid trebuie evitate pentru a preveni atașarea primerului de secvențele repetitive din ADN-ul țintă;
- pentru evitarea formării primer-dimerilor un primer nu trebuie să aibă secvențe complementare cu perechea sa;
- temperatura de atașare a perechii de primeri - calculată din ecuația $2(AT)+4(GC)$ - folosită într-un experiment trebuie să fie aproximativ egală;
- temperatura de atasare trebuie sa permita catenelor ADN sa fie libere si sa nu se apropie foarte mult de temperature de extensie.



PCR-Polymerase Chain Reaction

Echipamente și materiale
necesare

- termocicler (sistem de incubare a probelor respectând un program pre-setat);
- micropipete;
- hota sterila PCR;
- gheață;
- tuburi de aplicare de 0,2ml;



PCR-Polymerase Chain Reaction

Echipamente și materiale
necesare

- ADN izolat și purificat (0.01-0.1 μg);
- primer 1 (20pmol);
- primer 2 (20pmol);
- Tris-HCl (20mM, pH 8) - soluție tampon;
- MgCl_2 (2mM) - pentru eliberarea Mg^{2+} (co-factor pentru ADN polimeraze);
- KCl (25mM) sau KCl (10mM) și $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10mM);
- deoxinucleotid trifosfați (câte 50 μg din dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- ADN polimerază termostabilă (2 unități);
- volumul de reacție total: 50-100 μL ;





PCR-Polymerase Chain Reaction

REACTIA DE POLIMERIZARE IN
LANT

Aplicatii:

- clonare moleculară;
- secvențiere ADN;
- arheologie;
- medicină legală;
- amplificarea unor secvențe necunoscute;
- patologie clinică;
- diagnostic genetic;
- caracterizarea unor mutații necunoscute;
- amprentare ADN/analiza populației;
- analiza genomului;
- etc



PCR-Polymerase Chain Reaction

REACTIA DE POLIMERIZARE IN
LANT avantaje

- Simplitatea metodei
- Rapiditate
- Eficace,
- Ieftina.

Fara PCR nu ar fi fost posibila secventierea genomului uman. A devenit metoda de electie in analiza genotipica mai ales in detectia mutatiilor punctiforme si studiul polimorfismelor genotipice.



PCR-Polymerase Chain Reaction

REACTIA DE POLIMERIZARE IN
LANT dezvantaje

- Necesitatea informatiilor despre secventa capetelor terminaleale ADN tinta(pentru fabricarea oligonucleotidelor specifice)
- Marimea mica a fragmentului amplificat
- Cantitate limitata de produs
- Infidelitatea replicarii ADN (frecventa relativ crescuta a erorilor de imperechere generate de Taq polimeraza, care nu are capacitate de corectie)
- Riscul contaminarilor si amplificarii parazite (amorsetele nu se fixeaza pe secventa tinta).



DISCUȚII

