

Biologie moleculară – LP 7

Reacția de polimerizare în lanț (PCR - Polymerase Chain Reaction)

Aplicații. Tehnica de lucru

Reacția de polimerizare în lanț a revoluționat biologia moleculară prin capacitatea sa de a amplifica și caracteriza cantități infime de acizi nucleici. Folosită inițial doar în cercetare metoda este în prezent foarte utilizată în medicină pentru identificarea mutațiilor în secvențele ADN precum și în depistarea, în probele biologice umane, a ADN-ului micro-organismelor. Printre cele mai importante aplicații ale PCR:

- 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;
- analiza cantitativă a ADN și/sau ARN;

Noțiuni cheie

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

În cei mai simpli termeni, PCR reprezintă copierea repetitivă a unor regiuni din ADN-ul dublucatenar. Procesul este schematizat în figura 1. Puterea acestei reacții derivă din abilitatea sa de a replica, în cantități mari, într-o scurtă perioadă de timp, regiuni specifice din ADN. Prin tehnica PCR este posibilă multiplicarea *in vitro* rapidă a unei secvențe ADN țintă. Pornindu-se de la o singură moleculă de ADN se generează o cantitate suficientă pentru clonare, secvențiere, cartare cu enzime de restricție, etc. Impactul PCR a fost subliniat în anul 1993 prin acordarea Premiului Nobel pentru Chimie profesorului Kary Mullis pentru contribuția sa în dezvoltarea acestei tehnologii.

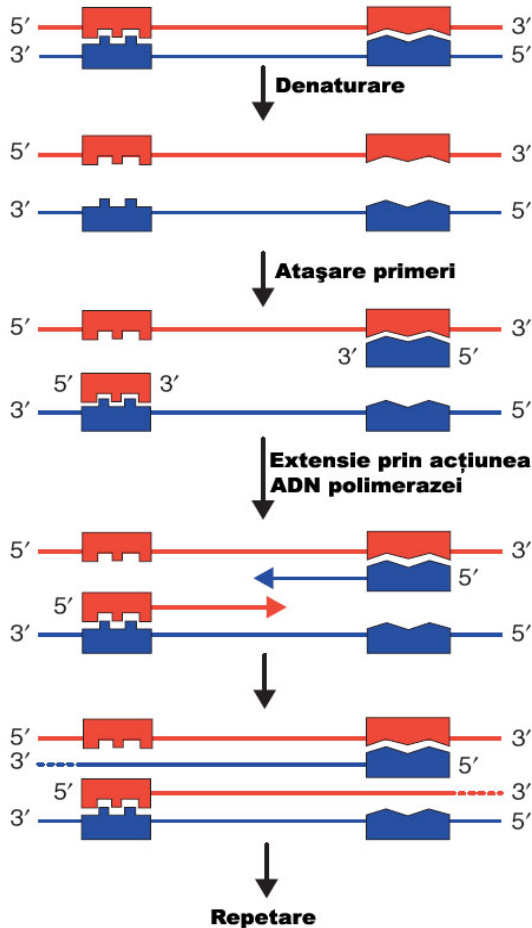


Figura 1. Etapele unui experiment PCR.

Cele două catene ale moleculei ADN țintă sunt denaturate (separate) prin încălzire. Secvențele inițiale ale fragmentului de amplificat sunt recunoscute de primerii oligonucleotidici. După etapa de denaturare temperatura este diminuată pentru a permite atașarea fiecăruia dintre cele două tipuri de primeri la regiunile complementare de pe fiecare catenă. Regiunea de amplificat este localizată între situsurile de atașare a perechii de primeri. În ultima etapă a unui ciclu PCR temperatura este crescută pentru asigurarea condițiilor optime de funcționare a ADN-polimerazei ce va determina extensia primerilor în prezența deoxiribonucleotid-trifosfaților. Acest ciclu: denaturare, atașare și extensie este repetat de 20-30 ori determinând o amplificare masivă a segmentului ADN cuprins între perechea de primeri.

PCR implică doi primeri oligonucleotidici, cu o lungime medie cuprinsă între 17-30 nucleotide, ce flanchează secvența ADN țintă ce urmează a fi copiată. Unul dintre primeri are aceeași secvență de nucleotide cu una din catenele ADN (numită catena sens), în timp ce al doilea primer are aceeași secvență cu cealaltă catenă (antisens). Primerul catenei sens se va împerechea, prin intermediul unor interacțiuni între bazele complementare, cu catena antisens și va iniția sinteza noii catene sens. Similar, primerul antisens se va lega de catena sens a ADN-ului și va iniția sinteza unei noi catene antisens. Reacția PCR este împărțită în trei faze separate, fiecare având loc la temperaturi diferite figura 1.

Ciclul *denaturare- atașare primeri – extensie* este repetat de 20-30 ori în vederea obținerii unei amplificări satisfăcătoare a secvenței ADN specifice. Cele trei etape ale fiecărui ciclu PCR sunt următoarele:

- *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.
- *Atașare 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.

- *Extensia.* O ADN-polimerază 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'. 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 poate fi complet automatizat în blocuri de incubare speciale. Mai mult, 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.

După un ciclu de replicare PCR se generează câte o nouă copie a fiecărei catene ADN inițiale, așa după cum se poate remarca din figura 1. Sit-ul de inițiere a sintezei ADN este ales prin legarea specifică a primerilor oligonucleotidici de catena matriță. Hibridizarea specifică, prin formarea de legături de hidrogen între bazele complementare, va poziționa specific fiecare nucleotid într-o secvență complementară cu matrița. Ceea ce nu este atât de evident este modul în care sinteza ADN este încheiată. În momentul în care se evaluează rezultatul unei reacții PCR tipice printr-o electroforeză în gel de agaroză (figura 2), se observă formarea unei benzi singulare distincte. Aceasta sugerează că fragmentele ADN produse sunt omogene și că ele încep și se sfârșesc cu aceleași secvențe.

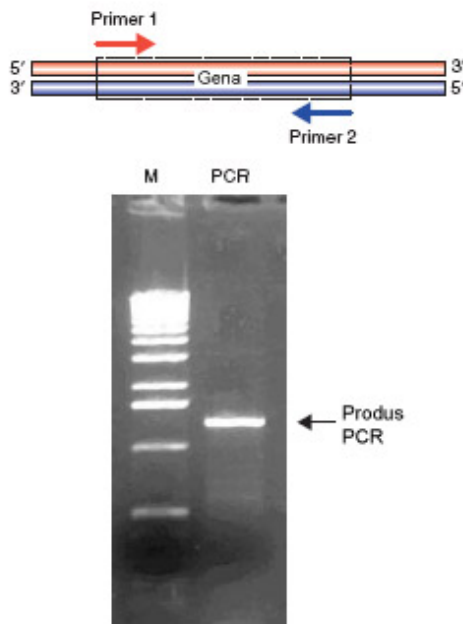


Figura 2. Amplificarea PCR a unei gene din ADN-ul genomic.

Doi primeri oligonucleotidici au fost sintetizați pentru flancarea unei gene aparținând genomului uman. S-a efectuat o reacție PCR având 25 cicluri. 1/10 din cantitatea de ADN astfel obținută a fost migrată în gel de agaroză în paralel cu o probă de ADN standard (M). Gelul a fost marcat cu etidium bromid și fotografiat în lumină UV.

Pentru a înțelege cum are loc acest proces trebuie să vedem cum se produc fragmentele ADN pe parcursul unui număr de cicluri PCR (figura 3). În timpul primului ciclu PCR cele două catene ADN țintă sunt separate, replicarea începând de la situsurile de legare a primerilor. Cele două catene ADN nou-sintetizate la sfârșitul ciclului 1 vor avea fiecare un capăt 5' determinat de locul de atașare a primerului, însă un capăt 3' imprecis definit. Sinteza ADN nu se va încheia la nivelul unui anumit nucleotid din secvența matriței ci doar în momentul în care va începe etapa de denaturare a ciclului 2. Fiecare dintre catenele ADN prezente la sfârșitul ciclului 2 va intra în următorul ciclu PCR devenind matrițe de care se vor lega noi primeri. În ciclul 2 primerii se vor lega atât de cele două catene originale cât și de cele sintetizate în timpul ciclului 1. Legarea primerilor la catenele matriță originale vor duce la formarea aceluiași tip de produs generat în timpul ciclului 1. Oricum, legarea primerilor de catenele ADN produse în ciclul 1, urmate de replicare vor determina formarea unor catene ADN cu ambele capete 5', respectiv 3', bine definite. Acest proces are loc datorită faptului că replicarea ADN se va încheia în momentul în care nu mai este nici o secvență de copiat. Astfel, la sfârșitul ciclului 2 sunt generate două catene precis "tăiate" la ambele capete. În acest moment aceste două catene sunt legate de două catene "tăiate" doar la capetele 5'. În ciclul următor (3) catenele precis definite la ambele capete vor deveni la rândul lor matrițe, permițând atașarea unui nou set de primeri.

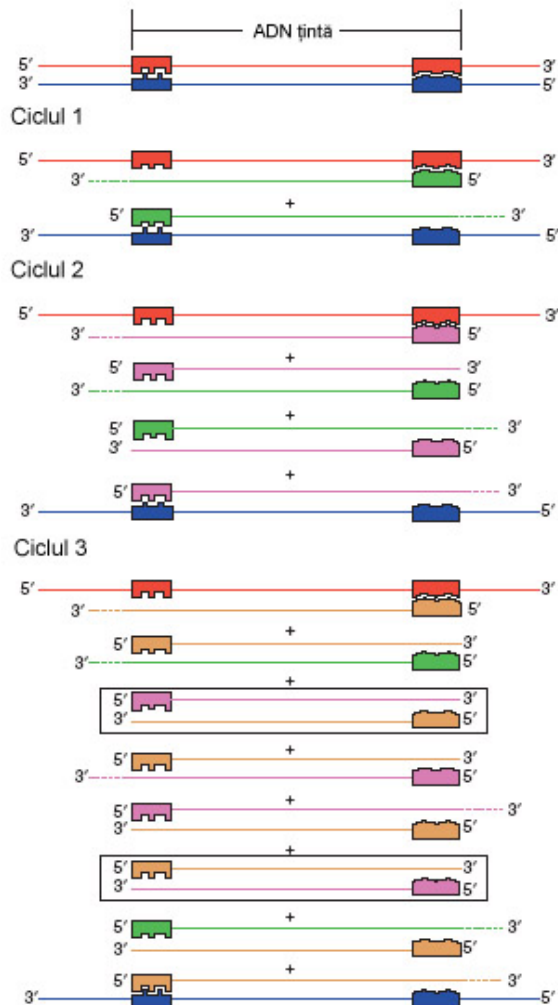


Figura 3. Producții formați în urma primelor trei cicluri ale experimentului PCR

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

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.

După ciclul PCR numărul 3, repetarea ciclurilor: denaturare termică, atașare a primerilor și extensie vor determina o acumulare exponențială a fragmentelor ADN țintă (vezi tabelul 1). După 25 cicluri, număr tipic pentru multe experimente PCR, este așteptată o amplificare de aproximativ 30 milioane de ori. Toate reacțiile PCR sunt "contaminate" cu un număr mic de fragmente ce au terminații nedorite, însă amplificarea masivă a fragmentelor ADN specifice le fac să fie aproape ne semnificative.

Amplificarea unor secvențe specifice din ADN

Echipamente și materiale necesare:

- ✓ termocicler (sistem de incubare a probelor respectând un program pre-setat);
- ✓ micropipete;
- ✓ hota sterila cu flux laminar;
- ✓ gheață;
- ✓ tuburi de aplicare de 0,2ml;
- ✓ ADN izolat și purificat (0.01-0.1μg);
- ✓ primer 1 (20pmol);
- ✓ primer 2 (20pmol);
- ✓ Tris-HCl (20mM, pH 8) - soluție tampon;
- ✓ MgCl₂ (2mM) - pentru eliberarea Mg²⁺ (co-factor pentru ADN polimeraze);
- ✓ KCl (25mM) sau KCl (10mM) și (NH₄)₂SO₄ (10mM);
- ✓ deoxinucleotid trifosfați (câte 50μg din dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- ✓ ADN polimerază tremostabilă (2 unități);
- ✓ volumul de reacție total: 50-100μL;

Mg²⁺ joacă un rol extrem de important, acest ion fiind necesar funcționării ADN polimerazei (Fig.1). Specificitatea PCR depinde de concentrația sa în amestecul de reacție, aceasta variind între 1-5mM.

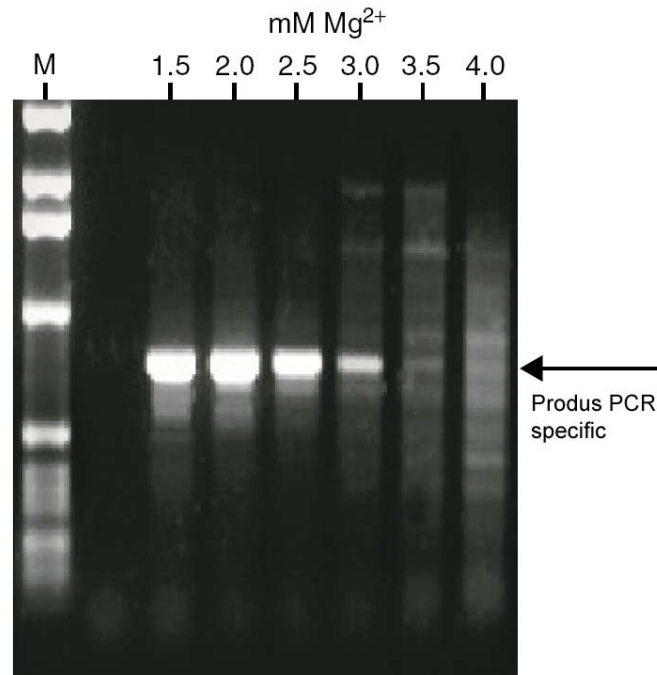


Fig.1 Efectul concentrației magneziului asupra eficienței și specificității unui experiment PCR. În acest experiment s-au folosit concentrații diferite de $MgCl_2$. După PCR produșii au fost separați printr-o electroforeză în agaroză și apoi colorați cu etidium bromid. Dimensiunea produșilor PCR a fost evaluată prin compararea cu un set de ADN de dimensiuni standard (M).

Concentrația soluției tampon și a sărurilor folosite este de obicei constantă, deși unele protocoale reduc nivelul de KCl pentru a crește durata de atașare a ADN polimerazei la catena matriță, rezultatul fiind un produs cu o lungime (secvență) mai mare. După ce toate componentele PCR au fost pipetate în tubul de amplificare se adaugă un ulei mineral care să prevină evaporarea probei în timpul etapelor de încălzire. O soluție alternativă este reprezentată de folosirea unui termociler cu capac încălzit. Parametrii obișnuiți ai unui ciclu de amplificare PCR pot fi:

- 94°C, 30s - Denaturare
- 60°C, 30s - Atașare primeri
- 72°C, 1min- Extensie

Etapele de denaturare și de atașare a primerilor sunt relativ scurte, însă suficiente pentru a permite ruperea și reformarea legăturilor de hidrogen dintre catenele de ADN. Protocoalele inițiale au inclus un pas inițial de denaturare (94°C, 2min) pentru a se asigura timpul necesar denaturării tuturor fragmentelor ADN. Acest tip de protocol este în prezent evitat pentru a se evita "crestarea" ADN-ului (ruperea legăturilor fosfodiesterice dintre nucleotidele de pe aceeași catenă). Lungimea fragmentelor amplificate dictează durata etapei de extensie. Marea majoritate a polimerazelor folosite în PCR au o rată de replicare *in vitro* a ADN-ului de 500-1000bp min⁻¹ (Tabel 1).

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 cuprin în general între 17 și 25. 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.

Tabel 1. Proprietățile diferitelor tipuri de ADN polimeraze termostabile					
	Taq ADN polimerază	Tfl ADN polimerază	Pfu ADN polimerază	Tli ADN polimerază	Tgo ADN polimerază
Organism	Thermus aquaticus	Thermus flavus	Pyrococcus furiosus	Thermococcus litoralis	Thermococcus gorgonarius
Condiții PCR optime					
Timpul de extensie/kb (min)	1	1	2	2	2
Temperatura de extensie (°C)	70-75	70-74	70-75	70-75	70-75
[Mg ²⁺] (mM)	1-4	1-4	2-4	2-4	2-4
pH@25°C	7.0-7.5	7.0-7.5	8.0-9.0	7.0-7.5	7.0-7.5
[dNTPs] (mM)	40-200	40-200	40-200	40-200	200
[primeri] (mM)	0.1-1.0	0.1-1.0	0.1-1.0	0.1-1.0	0.1-1.0
activitate 5'-3' exonucleazică	da	da	nu	nu	nu
activitate 3'-5' exonucleazică	nu	nu	Da	da	da
Rata de producere a erorilor (numărul de erori/baze replicate)	5.0x10 ⁻⁴	5.0x10 ⁻⁵	1.3x10 ⁻⁶	2.8x10 ⁻⁶	2.0x10 ⁻⁶

ADN polimerazele termostabile

Bacteria *Thermus aquaticus* a fost pentru prima dată descoperită în câteva izvoare termale din Parcul Național Yellowstone, Wyoming, SUA. Toleranța termică a acestui organism este cuprinsă între 50-80°C cu o temperatură optimă de creștere în jurul a 70°C. *Taq polimeraza* (izolată din aceste bacterii) este o enzimă monomerică cu o greutate moleculară de 94kDa. Enzima este ea însăși termostabilă; replică ADN-ul la 74°C și rămâne funcțională după incubare la 94°C. Enzima are activitate 5'-3' polimerazică și 5'-3' exonucleazică dar fără capacitate 3'-5' exonucleazică (corectarea erorilor). Lipsa activității 3'-5' exonucleazice se referă la incapacitatea înlăturării unei baze incorect adăugate lanțului în creștere și astfel sinteza unui produs cu mutații generate în timpul PCR. Taq polimeraza încorporează greșit o bază la fiecare 10⁴-10⁵ baze replicate. În cazul în care s-ar produce o eroare la 10⁴ baze replicate o secvența țintă de 1kb amplificată într-un proces de 25 cicluri cu Taq ar genera 10% din produși cu mutații.

ADN-ul țintă

- 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.

Primerii

- au o lungime cuprinsă între 17-30 nucleotide, suficientă pentru a permite recunoașterea unei secvențe unice în genom;
- vor conține aproximativ 50% GC;
- Temperatura de atașare a perechii de primeri - calculată din ecuația $2(AT)+4(GC)$ - folosită într-un experiment trebuie să fie aproximativ egală;
- 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;

Glosar:

Exonucleaze - enzime individuale sau părți componente ale unui complex enzimatic ce clivează secvențial nucleotidele la un capăt al unui lanț polinucleotidic. Aceste enzime hidrolizează legăturile fosfo-diesterice atât la capătul 3' cât și la cel 5'.