

BIOTEHNOLOGIA ADN. APLICAȚII MEDICALE

Introducere

Progresele din ultimii 30 de ani în domeniul biochimiei, biologiei moleculare și geneticii au permis manipularea moleculelor ADN și ARN în scopuri medicale. Principalele aplicații care beneficiază de aceste progrese sunt:

- identificarea genelor responsabile de maladiile monogenice ca de exemplu: miodistrofia Duchenne (gena pentru distrofină), hemocromatoza (gena HFE), mucoviscidoza (gena CFTR), etc.
- identificarea profilului genic de predispoziție la diferite boli:
 - diabet zaharat tip I
 - cancer
 - maladii cardiovasculare
- farmacogenomică: prognosticarea răspunsului individual în funcție de profilul genic la terapia medicamentoasă (de ex. familia de gene GST în terapia anticanceroasă)
- stadializarea diferitelor maladii în funcție de mutațiile apărute (de ex. în cazul leucemiilor)
- identificarea individuală pe baza profilului genic (teste de paternitate și de identificare).

Identificarea mutației Arg213Gly a genei EC-SOD prin metoda PCR-RFLP

Superoxid dismutaza (SOD) reprezintă prima și cea mai importantă linie a sistemului de apărare antioxidant enzimatic împotriva speciilor reactive ale oxigenului. Substituția Argininei cu Glicina în poziția 213 din structura EC-SOD (Superoxid Dismutaza Extracelulară) în domeniul de legare de heparinei este corelată mai ales cu bolile cardiovasculare. Deoarece EC-SOD este localizată strategic în peretele arterial între endoteliu și țesutul muscular neted, acest sistem enzimatic are un rol cheie în funcționarea endoteliului. Prin urmare, mutația Arg213Gly duce la alterarea funcției enzimatice a EC-SOD și este asociată cu funcționarea deficitară a endoteliului (disfuncție endotelială).

Identificarea acestei mutații în gena EC-SOD prin metoda PCR-RFLP presupune următoarele etape: extracția ADN genomic, amplificarea prin tehnica PCR a fragmentului de genă ce conține mutația, digestia enzimatică a produsului PCR, separarea electroforetică și vizualizarea fragmentelor obținute în urma digestiei enzimatice.

Extracția ADN genomic din sânge integral

Principiu

Separarea acizilor nucleici din celulă se poate realiza prin metode variate, diferențiate atât istoric cât mai ales prin destinația ulterioară a preparatului obținut. Toate metodele cuprind în general următoarele etape:

a) Obținerea omogenatului celular

Tehnicile folosite sunt diverse, de exemplu:

- ♦ Liza mecanică a pereților celulari folosind omogenizator cu cuțite sau Potter - Elvehjem
- ♦ Mojararea țesutului solidificat în azot lichid
- ♦ Digestia sau solubilizarea membranei celulare utilizând fie lizozim, fie detergenți (nonidet –P₄₀, Tween 20, PEG – 400)

b) Denaturarea și îndepărtarea nucleoproteinelor.

Baza procesului constă în denaturarea mult mai rapidă a proteinelor față de cea a acizilor nucleici. Tehnicile folosite sunt:

- ♦ Fierbere
- ♦ Denaturare cu: fenoli, cloroform, alcool izoamilic
- ♦ Concentrații saline mari ale următoarelor săruri: clorură de sodiu, acetat de sodiu, p-aminosalicilat, clorat de potasiu etc.

c) Îndepărtarea polizaharidelor și a lipidelor.

Lipidele se extrag prin solubilizare în alcool etilic, cloroform, fenol etc. Polizaharidele se extrag din fracțiunea citoplasmatică cu o soluție concentrată de clorură de sodiu (sau acetat de sodiu) 3 molar.

d) Purificarea acizilor nucleici.

Izolarea ADN printr-un număr redus de etape se face pe baza proprietății acestuia ca, în prezența sărurilor concentrate și a etanolului 70%, să compacteze sub forma unor filamente, putându-se identifica și separa din soluție.

În continuare prezentăm metoda organică de extracție a ADN din sânge integral recoltat pe anticoagulant (EDTA) ce cuprinde următoarele etape: liza membranelor celulare și nucleare, precipitarea proteinelor, centrifugare urmată de precipitarea ADN din supernatant.

Reactivi

- ♦ Tampon de liză a membranelor celulare: sucroză 0,65M, MgCl₂ 10mM, Triton X-100 2% în tampon Tris-HCl 20mM pH=7,80
- ♦ Soluție salină/EDTA : EDTA 24mM în soluție NaCl 75mM
- ♦ Soluție proteinază K : proteinază K 20 mg/ml, CaCl₂ 1mM, glicerol 30% în tampon Tris-HCl 10mM, pH=8,00
- ♦ Soluție SDS 10%
- ♦ Soluție fenol saturat cu apă
- ♦ Soluție fenol :cloroform 1 :1 saturat cu apă
- ♦ Soluție KCl 2M
- ♦ Etanol 70%, etanol 95%
- ♦ Soluție TE : EDTA 1 mM în tampon Tris-HCl 10 mM, pH=8,00

Mod de lucru (operația durează 4 ore):

I. Izolarea nucleilor :

1. Într-un tub de centrifugă de 15 ml se pun 5 ml de sânge recoltat pe EDTA
2. Se adaugă 5 ml tampon de liză a membranelor celulare diluat de 2 ori. Se amestecă ușor prin răsturnare.
3. Se incubează 5 minute la gheață
4. Se centrifughează 12 minute la 4°C la 1000xg. Rezultă un sediment format din nucleii celulari
5. Se decantează supernatantul

II. Liza nucleilor și deproteinizarea :

1. Se suspendă nucleii în 2 ml soluție salină/EDTA, prin pipetări repetate
2. Se adaugă 50 µl soluție proteinază K și 200 µl soluție SDS
3. Se incubează cel puțin 2 ore la 37°C amestecând ocazional

III. Extracția proteinelor :

1. Se adaugă 4 ml soluție fenol saturat cu apă
2. Se amestecă puternic până la formarea unei suspensii omogene
3. Se centrifughează 5 minute la 1500xg pentru a separa faza superioară apoasă ce conține ADN-ul, de faza inferioară, conținând solventul organic
4. Se decantează cu pipeta faza apoasă conținând ADN într-o eprubetă curată
5. Se repetă etapele 1-3, utilizând de data aceasta 4 ml soluție fenol :cloroform 1 :1 saturat cu apă
6. Se repetă punctul 4

IV. Precipitarea ADN

1. Se adaugă 100 µl soluție KCl, amestecând ușor prin răsturnare
2. Se pipetează ușor pe pereții vasului 5 ml soluție etanol 95% care acoperă soluția de ADN
3. Se introduce o pipetă Pasteur la limita de separare a celor două faze și, prin rotire continuă, se înfășoară ADN-ul în jurul pipetei, până când cele două faze sunt complet amestecate
4. Se introduce vârful pipetei cu ADN-ul înfășurat în 1 ml soluție etanol 70% 2 minute
5. Se scoate pipeta din etanol și se ține cu vârful în sus câteva secunde pentru a se scurge excesul de etanol. ADN-ul nu trebuie lăsat să se usuce
6. Se introduce vârful pipetei într-un tub de microcentrifugă ce conține 200 µl soluție TE și se incubează 20 minute la temperatura camerei. Dacă ADN-ul nu se desprinde de pe pipetă el se poate îndepărta prin frecarea ușoară de pereții tubului.
7. Se resuspendă ADN-ul prin incubare peste noapte la 4°C.

Amplificarea PCR a fragmentului genomic de interes

Principiu

Tehnica de amplificare a anumitor porțiuni de ADN utilizează reacția polimerizării în lanț (Polymerase Chain Reaction). Reacția polimerizării în lanț este o metodă in vitro de sintetizare enzimatică a unor secvențe specifice de ADN. Principiul metodei se bazează pe procesul replicării semiconservative.

Pentru a efectua o amplificare prin tehnica PCR, eșantionul ADN, care poate fi de ordinul a câtorva nanograme, este introdus într-un tub conținând următorii reactivi:

- o ADN polimerază termostabilă – Taq polimeraza extrasă din bacteria termofilă *Thermus aquaticus*
- cele patru dezoxiribonucleotide trifosfat (dATP, dCTP, dGTP și dTTP)
- două oligonucleotide specifice sintetice denumite amorse sau primeri
- soluție tampon ce conține ioni de Mg indispensabili funcționării optime a Taq polimerazei.

Metoda constă într-o serie de cicluri repetate, fiecare ciclu cuprinzând trei pași:

- denaturarea matriței de ADN
- atașarea amorsoarelor la matriță
- elongarea (sau extensia) amorsoarelor.

Cele două amorse oligonucleotidice specifice se leagă de secvențele lor complementare de pe matrița de ADN fiecare pe câte una din cele două catene, astfel încât să flancheze regiunea de interes, care trebuie amplificată. Prima amoră este complementară cu secvența unei catene care trebuie amplificată și se fixează la extremitatea acesteia, iar a doua este complementară cu cealaltă catenă, fixându-se la extremitatea opusă astfel încât cele două amorse flanchează regiunea de amplificat. Matrița de ADN este denaturată prin încălzire și incubată în prezența unui mare exces molar al ambelor amorse și al tuturor celor patru dezoxiribonucleotide. Amorsoarele atașate la matriță formează scurte porțiuni dublu catenare amoră / matriță.

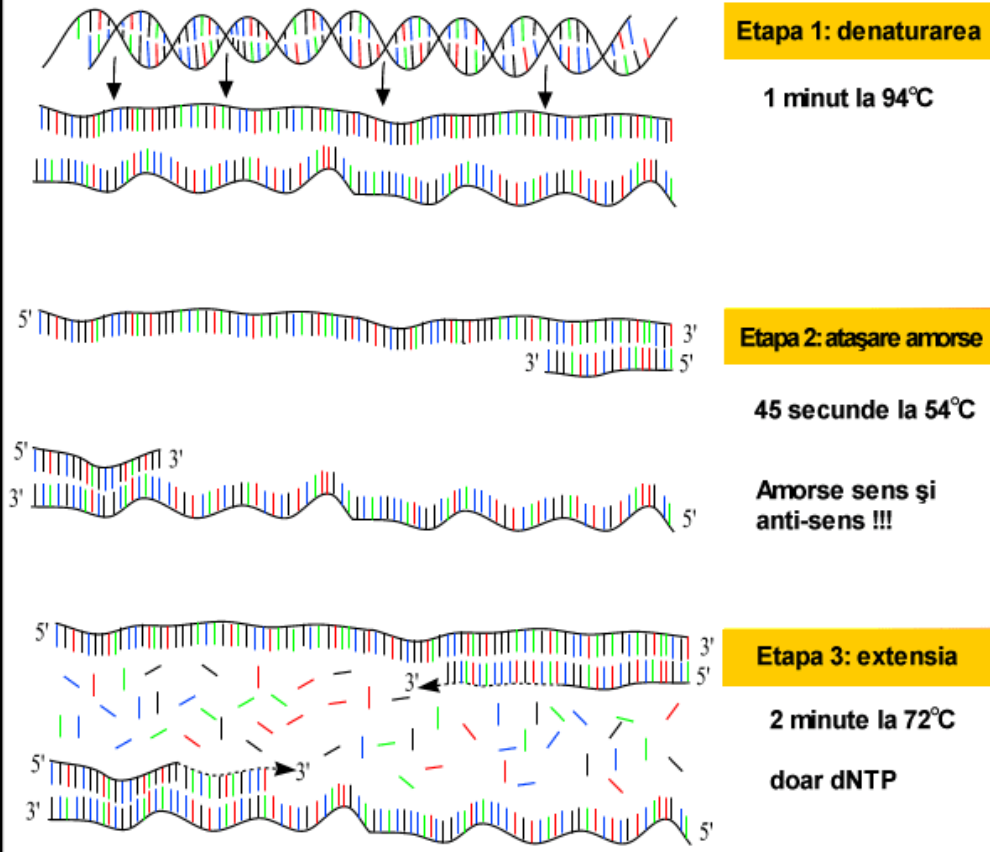
Aceste porțiuni dublu catenare servesc drept substrat pentru enzima Taq polimeraza, care adaugă noi nucleotide la capetele 3' ale amorsoarelor, sintetizând catenele complementare ale matrițelor. Se formează astfel două molecule dublu catenare de ADN, cu secvența de baze identică pe o anumită lungime (cea flancată de amorse). Compușii de reacție sunt încălziți din nou, pentru a denatura moleculele de ADN nou sintetizate. Reincubarea la temperatura care permite reatașarea amorsoarelor la matrițe (în număr de patru de această dată), asigură un nou ciclu de sinteză (Figura 6).

Temperaturile și timpii de incubare pentru fiecare pas depind de mai mulți factori, printre care, secvența de baze a amorsoarelor, lungimea amorsoarelor, scopul experimentului, etc. Deci parametrii specifici fiecărui pas diferă de la experiment la experiment. Temperatura de denaturare este de obicei de 94°C și desface legăturile de hidrogen și separă cele două catene de ADN, conferindu-le rolul de matrițe. Temperatura de hibridare este între 55-65°C, însă poate varia chiar în limite mai largi, și ea permite amorsoarelor să se atașeze la secvențele lor complementare de pe matriță. Temperatura de extensie, are valori cuprinse între 72 - 74°C și asigură funcționarea optimă a Taq polimerazei. Acest ciclu de temperaturi necesar reacției PCR este realizat automat de către un aparat numit termociclu (thermocycler), care asigură schimbarea rapidă a temperaturii reacției, cu o reducere drastică a inerției termice și cu menținerea precisă a pragurilor de temperatură programate.

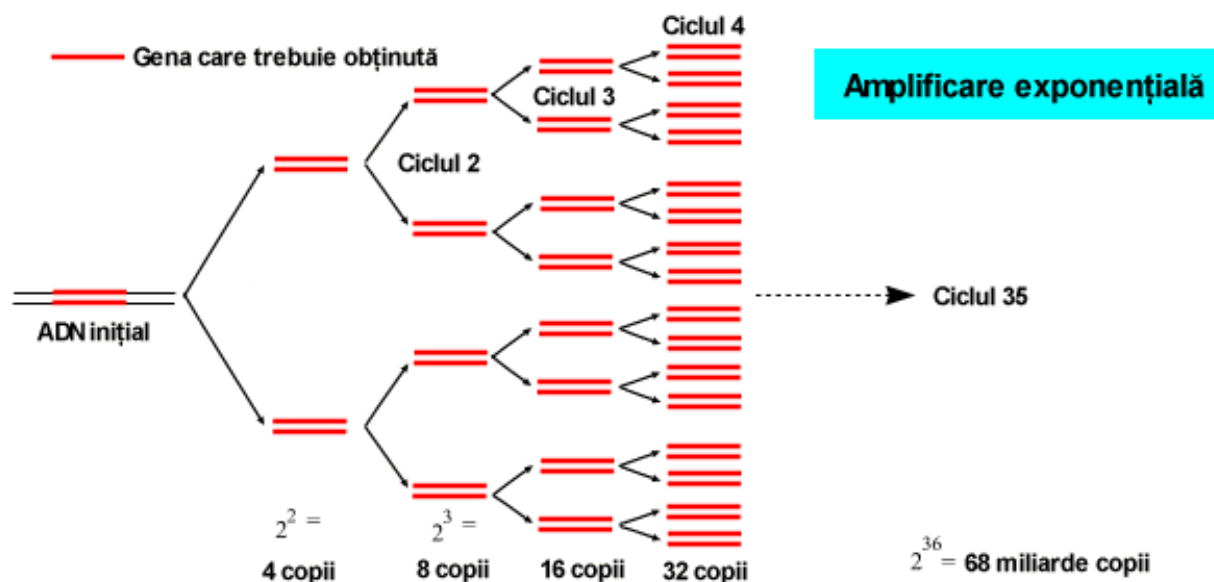
Ciclurile de denaturare – hibridizare – sinteză sunt repetate de obicei de 25 – 35 de ori, sau chiar până la 50 de ori în unele situații. Deoarece fiecare catena nou sintetizată într-un ciclu poate servi drept matriță în următorul ciclu, numărul de copii al ADN – ului țintă teoretic se dublează la fiecare ciclu (Figura 7). Deci la finalul a n cicluri rezulta, teoretic, 2^n molecule de ADN dublu catenar, care sunt copii ale fragmentului cuprins între secvențele de care se atașează amorsoarele.

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cicluri a câte 3 etape:



Principiul reacției PCR



Amplificarea exponențială a fragmentelor ADN prin reacția PCR

Prezentăm în continuare tehnica amplificării regiunii de interes ce conține mutația Arg213Gly din structura genei EC-SOD utilizând primeri specifici.

Materiale. Aparatură. Reactivi.

- ADN genomic
- primeri specifici
- soluție tampon ce conține nucleotide și ioni de Mg
- apă sterilă
- enzima Taq polimerază
- pipete automate de 0.5-10 μ l, 5-50 μ l
- vârfuri pipetă automată
- tuburi de 200 μ l, 500 μ l
- gheață
- Termocycler
- aparat vortex

Mod de lucru

Se utilizează primeri specifici pentru EC-SOD cu următoarea secvență nucleotidică:

primer sens: 5'- GGC TGG CCT GCT GCG TGG TGG-3'

primer antisens: 5'- CCT TGC ACT CGC TCT CGC GCG-3'

Se realizează amestecul de reacție conform tabelului:

Amestecul de reacție

Amestecul reacției PCR	Volumul
apă sterilă	17,5 μ l
soluție tampon	2,5 μ l

primer sens	2,5 µl
primer antisens	2,5 µl
enzimă Taq polimerază	0,5 µl
ADN genomic	2,5 µl

Se introduc tuburile cu amestecul de reacție în Termocycler care efectuează un program de amplificare specific:

- 5 min denaturare la 95°C
- 35 cicluri a câte:
 - denaturare 1 minut la 94°C
 - atașare primeri (annealing) 1 minut la 65°C
 - extensie 1 minut la 69°C

După terminarea programului de amplificare se scot tuburile cu probă din Termocycler și se verifică amplificarea PCR prin migrarea acestora într-un gel de electroforeza, în prezența unor markeri de ADN de masă moleculară cunoscută așa cum s-a prezentat în lucrarea precedentă.

Digestia enzimatică a produșilor PCR

Enzimele de restricție sunt endonucleaze care clivează molecula de ADN la nivelul unor situsuri specifice, numite situsuri de restricție, obținându-se astfel o multitudine de fragmente ADN, numite fragmente de restricție. La ora actuală se cunosc peste 3000 de astfel de enzime utilizate în tehnologia ADN recombinant. Enzimele de restricție sunt prezente în mod normal în celulele bacteriene reprezentând modalitatea defensivă a acestora împotriva infectării cu bacteriofagi al căror ADN este clivat.

Nomenclatura enzimelor de restricție se bazează pe numele genului și speciei bacteriei din care provine enzima respectivă, astfel prima literă a genului din care face parte bacteria și primele două litere ale speciei, formează împreună o abreviere de trei litere scrise italic, cum ar fi *Eco* (*Escherichia Coli*). Aceasta este urmată de inițiala tulpinii sau tipului celular, de exemplu *EcoR*. Când o anumită tulpină bacteriană are mai multe enzime de restricție, acestea sunt deosebite între ele prin adăugarea de cifre romane, de exemplu *EcoR* I și *EcoR* II.

Enzimele de restricție recunosc secvențe nucleotidice specifice de lungimi diferite și compoziție de nucleotide diferite, numite situsuri de restricție. Secvența tipică de recunoaștere pentru anumite enzime de restricție este o secvență palindromică de 4, 5, 6, 7 sau 8 nucleotide cu o axă simetrică de rotație (de exemplu, secvența de recunoaștere a *EcoR* I este GAATTC). Secvența palindromică poate fi întreruptă de o serie de 1-9 nucleotide fără specificitate (de exemplu, secvența specifică pentru *Sfi* I este GGCCNNNNNGGCC, unde N poate fi orice nucleotidă).

Unele enzime de restricție au secvențe de recunoaștere care permit palindromie diferită (de exemplu, secvența de recunoaștere pentru *AccI* este GTMKAC, unde M poate fi ori A ori C, iar K poate fi G respectiv T). Unele enzime de restricție nu au nevoie de secvențe de recunoaștere palindromice și acestea

taie ADN-ul la un anumit număr de nucleotide distanță de secvența sa de recunoaștere (de exemplu, secvența de recunoaștere pentru *Mbo II* este 5'...GAAGA...3', iar tăierea se face la 8 nucleotide distanță de capătul 3' pe una dintre catenele ADN și la 7 nucleotide distanță de capătul 5' pe cealaltă catenă ADN).

Numărul și dimensiunea fragmentelor obținute prin tăiere enzimatică depind de frecvența situsurilor de restricție din lanțul ADN. Tăind cu enzime de restricție care au situsuri de 4 nucleotide se vor obține multe fragmente de dimensiuni mici, în timp ce tăierea cu enzime cu secvențe de recunoaștere de 8 nucleotide duce la obținerea unui număr mic de fragmente de dimensiuni mari.

În cadrul tehnicii PCR-RFLP de identificare a unei mutații, are loc tăierea produsului PCR cu o enzimă de restricție specifică al cărei situs de restricție este inclus în fragmentul amplificat PCR ce cuprinde mutația. Enzima este astfel aleasă încât prezența situsului de restricție să fie condiționată de prezența mutației. În acest fel, produsul PCR va fi tăiat doar dacă există mutația, în caz contrar el rămânând intact.

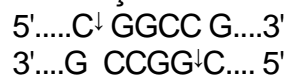
Prezentăm în continuare protocolul de digestie enzimatică cu enzima de restricție *Eco 52 I* în cazul produșilor PCR obținuți în urma amplificării fragmentului ce conține mutația Arg312Gly din gena EC-SOD.

Materiale. Aparatură. Reactivi.

- pipete automate de 0.5-10μl, 5-50 μl
- vârfuri pipetă automată
- tuburi de 200 μl, 500 μl
- aparat vortex
- centrifugă
- enzima de restricție *Eco 52 I*, 10 u/μl
- soluție de albumină serică bovină (BSA) acetilată
- soluție tampon pentru enzima de restricție
- produsul amplificării ADN
- apă sterilă

Mod de lucru

Digestia produsului PCR utilizează enzima *Eco 52 I*, restricția enzimatică având loc la nivelul secvenței nucleotidice:



Amestecul de restricție enzimatică se face conform tabelului:

Compoziția amestecului de restricție enzimatică

Amestecul reacției enzimatice	Volumul
apă sterilă	16,3 μl
soluție tampon enzima de restricție	2 μl
BSA acetilat, 10 μg/μl	0,2 μl
ADN, 1μg/μl	1 μl












enzimă de restricție 10 u/ml	0,5 µl
------------------------------	--------

Se amestecă ușor prin pipetare, se centrifughează 20 sec la viteză joasă, apoi se incubează la 37°C timp de 1-4 ore.

Evidențierea produșilor de digestie prin electroforeză în gel orizontal de agaroză

Evidențierea produșilor de digestie, și implicit existența sau nu a mutației se face prin migrarea electroforetică a acestora în gel de agaroză utilizând protocolul descris în lucrarea practică anterioară. Pentru încărcarea probei pe gel se utilizează tot amestecul de restricție enzimatică peste care se adaugă 4 µl de amestec de migrare.

Fragmentele ADN migrează într-o matrice de gel de agaroză de concentrație 2%, în câmp electric și la pH alcalin, separându-se sub forma unor benzi electroforetice. Fragmentele astfel separate se leagă de bromura de etidiu inclusă în gel, iar benzile fluorescente rezultate sunt vizualizate cu ajutorul unui transiluminator UV și fotografiate. Rezultatele ce se pot obține sunt reprezentate schematic în figura 8.

	Marker	Wild Type	Heterozigot mutant	Homozigot mutant
125PB				
100PB				
75PB				
50PB				
25PB				

Reprezentare schematică a celor trei posibilități de migrare a produșilor PCR în funcție de existența mutației

În urma amplificării PCR a fragmentului din gena EC-SOD ce conține poate mutația investigată se obțin fragmente având dimensiunea de 105 pb (perechi de baze). Dacă în urma restricției enzimatice acest fragment nu se digerează, adică dimensiunea lui rămâne neschimbată, înseamnă că mutația este absentă, individul respectiv având un profil genic de tip sălbatic (wild type).

Dacă în schimb mutația este prezentă pe o singură alelă (heterozigot) atunci enzima de restricție va acționa doar pe aceasta generând două fragmente de 25, respectiv 80pb, în timp ce pentru alela care nu conține mutația se vizualizează doar un singur fragment de 105 pb (nerestricționat). În acest caz, individul prezintă un profil genic constituit dintr-o alelă mutantă și una wild type (profil heterozigot mutant). Deci, în cazul existenței unui astfel de profil genic, se vor vizualiza în urma separării elctroforetice trei fragmente: unul de 105pb ce reprezintă fragmentul nerestricționat (alela fără mutație) și cele două fragmente de 25, respectiv 80pb rezultate în urma digestiei alelei ce prezintă mutația.

În cazul în care ambele alele prezintă mutația se obține un profil genic homozigot mutant reprezentat prin existența doar a celor două fragmente rezultate în urma digestiei enzimaticice.