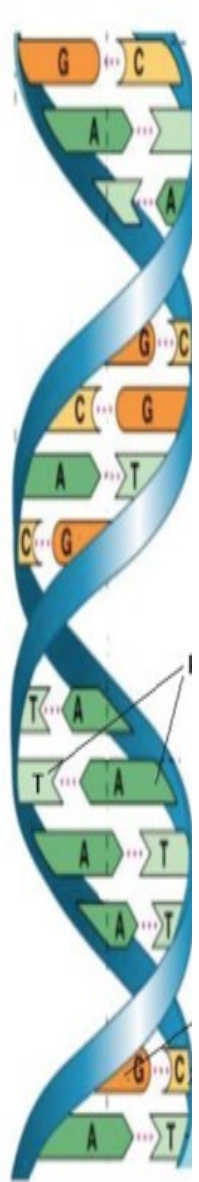


Lecția 2. ELEMENTE DE BAZĂ ALE TEHNOLOGIEI DE OBTINERE A OMG

Conținut:

1. Tehnologia ADN-lui recombinant, noțiuni generale
2. Etape generale în transformarea genetică
3. Identificarea, izolarea și clonarea genelor de interes



1. TEHNOLOGIA ADN-LUI RECOMBINANT, NOȚIUNI GENERALE



Recapitulare

Organism în al cărui GENOM au fost _____ noi, sau _____ expresia unor _____ prezente deja în celulă prin tehnici de ingenerie genetică

Ingeneria genetică este cunoscută sub mai mulți termeni:

manipularea genelor

clonarea genelor

tehnologia ADN-ului recombinant

modificare genetică

Tehnologia ADN-ului recombinant se aplică în diverse domenii:

- Cercetare de bază/fundamentală a structurii și funcției genelor
- Analiza genomului prin secvențierea ADN-ului
- Producerea de proteine utile prin tehnici noi
- Diagnostic și tratament medical – terapie genică etc.
- **Obținerea de plante și animale transgenice**

Transgeneza *versus* Terapie genică

În obținerea unui organism transgenic se urmărește transmiterea la urmași a modificării genetice (obținerea descendenților MG). Acest obiectiv al transgenezei este diferit de cel urmărit în terapia genică cu celule somatice, în care efectele transgenei sunt limitate la persoana care primește tratamentul.



Astfel, acest domeniu al ingineriei genetice a provocat o mare îngrijorare în societate și o reticență publică față de dezvoltarea și utilizarea organismelor transgenice. În plus, problemele științifice și tehnice asociate ingineriei genetice aplicate la organismele superioare sunt mai greu de rezolvat datorită dimensiunii și complexității genomului.

De asemenea, dezvoltarea plantelor și animalelor este un proces extrem de complex la care încă nu este pe deplin înțeles mecanismul molecular.

Totuși, sunt dezvoltate metode/abordări eficiente de transformare genetică și monitorizare.

Baza tehnologiei este informația genetică conținută în molecule de ADN. Această resursă genetică poate fi manipulată în diverse moduri pentru a realiza anumite obiective atât în știința teoretică, cât și în cea aplicată.

AN dețin informația genetică despre: structura organismului, particularitățile de dezvoltare, reproducere, răspunsului la acțiunea factorilor de mediu, interacțiunea dintre diferite elemente ale aceluiași organism sau cu alte organisme.

Caracteristici comune ale procesele moleculare de păstrare, transmitere, realizare a informației genetice la diferite organisme (anumite particularități similare la procariote și la eucariote, inclusiv la om)

- ❑ **Reglare spațio-temporală** (se realizează numai într-o anumită perioadă ontogenetică a celulei, dependent de tipul celulei, depind de semnale exogene și endogene);
- ❑ **Principiu de matrice (se asigură complementaritatea hibridizării AN):**
 - ambele catene ale moleculei de ADN sunt matrițe pentru sinteza noilor catene de ADN;
 - una din catenele moleculei de ADN este matriță în timpul reparării celeilalte catene de ADN;
 - una din catenele ADN-ului genic este matriță pentru sinteza moleculelor de ARN (ARNm, ARNt, ARNr) în timpul transcripției ADN-ului;
 - molecula de ARNm este matriță pentru sinteza polipeptidului în procesul translației codului genetic.
- ❑ **Factori proteici, unități de polimerizare:**

Replicare (ADN-polimeraze, dNTP – nucleotide, pentru formarea noilor catene)

Reparare (Endonucleaze, pentru înlăturarea fragmentului nucleotidic defect; ADN-polimeraze, sintetizează fragmente noi de ADN pentru înlocuirea golului/breșei); dNTP pentru formarea noilor catene de ADN

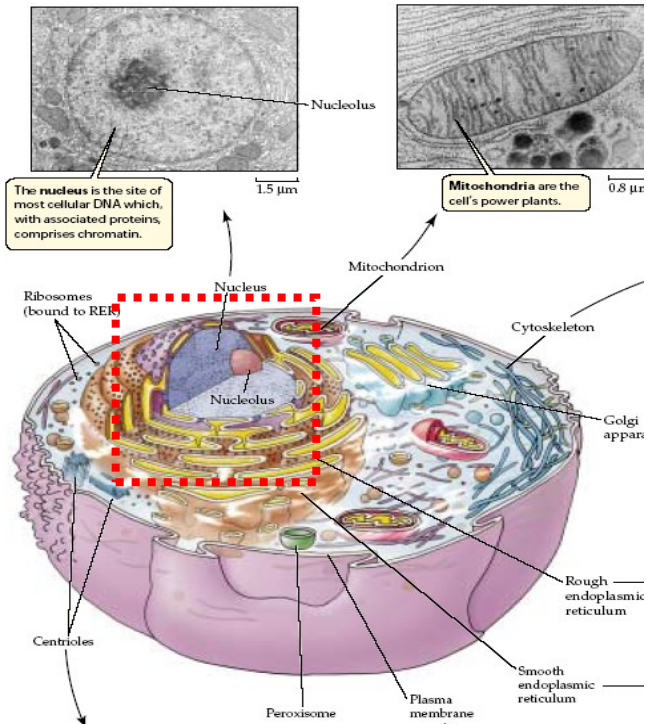
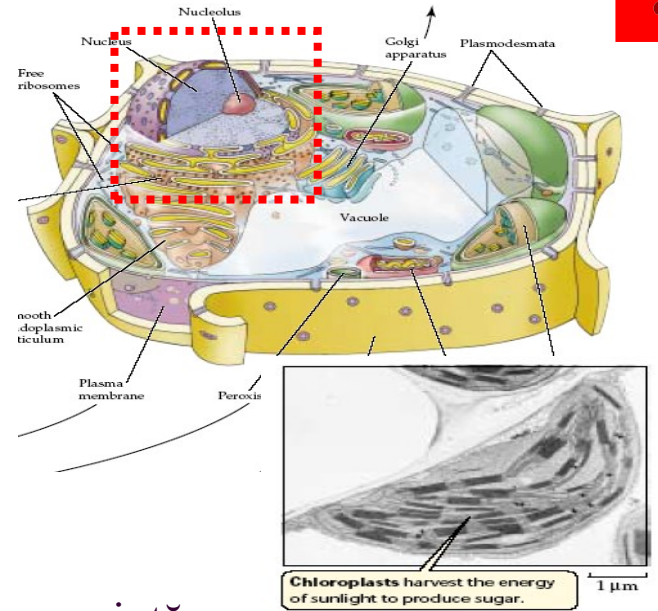
Transcripție (ARN-polimeraze și dNTP pentru sinteza catenei de ARN)

Translație (ribozomi; ARNt; aminoacizi – monomeri pentru formarea polipeptidului)

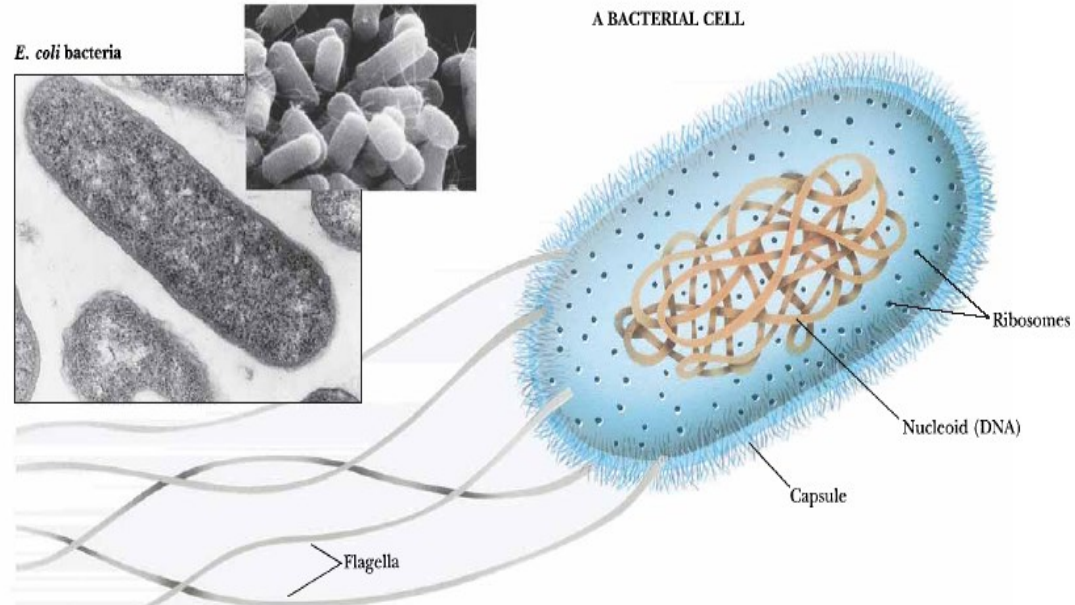
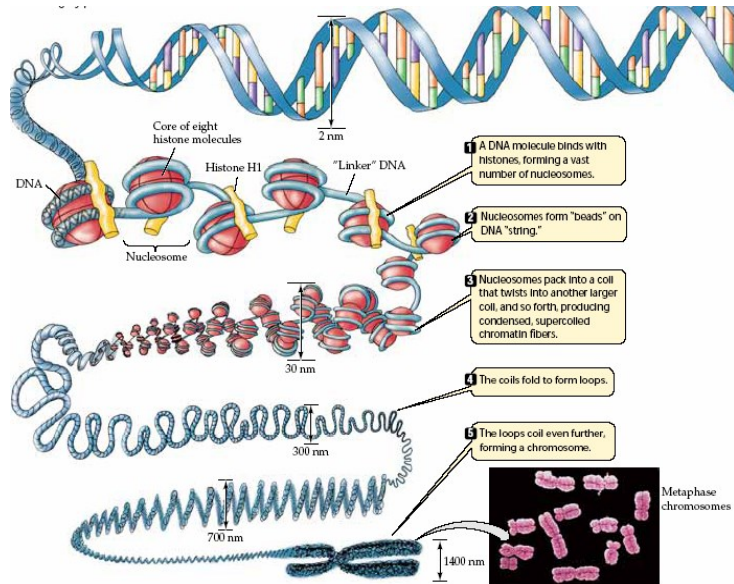
Celula eucariotă



Surse de material genetic



Celula procariotă

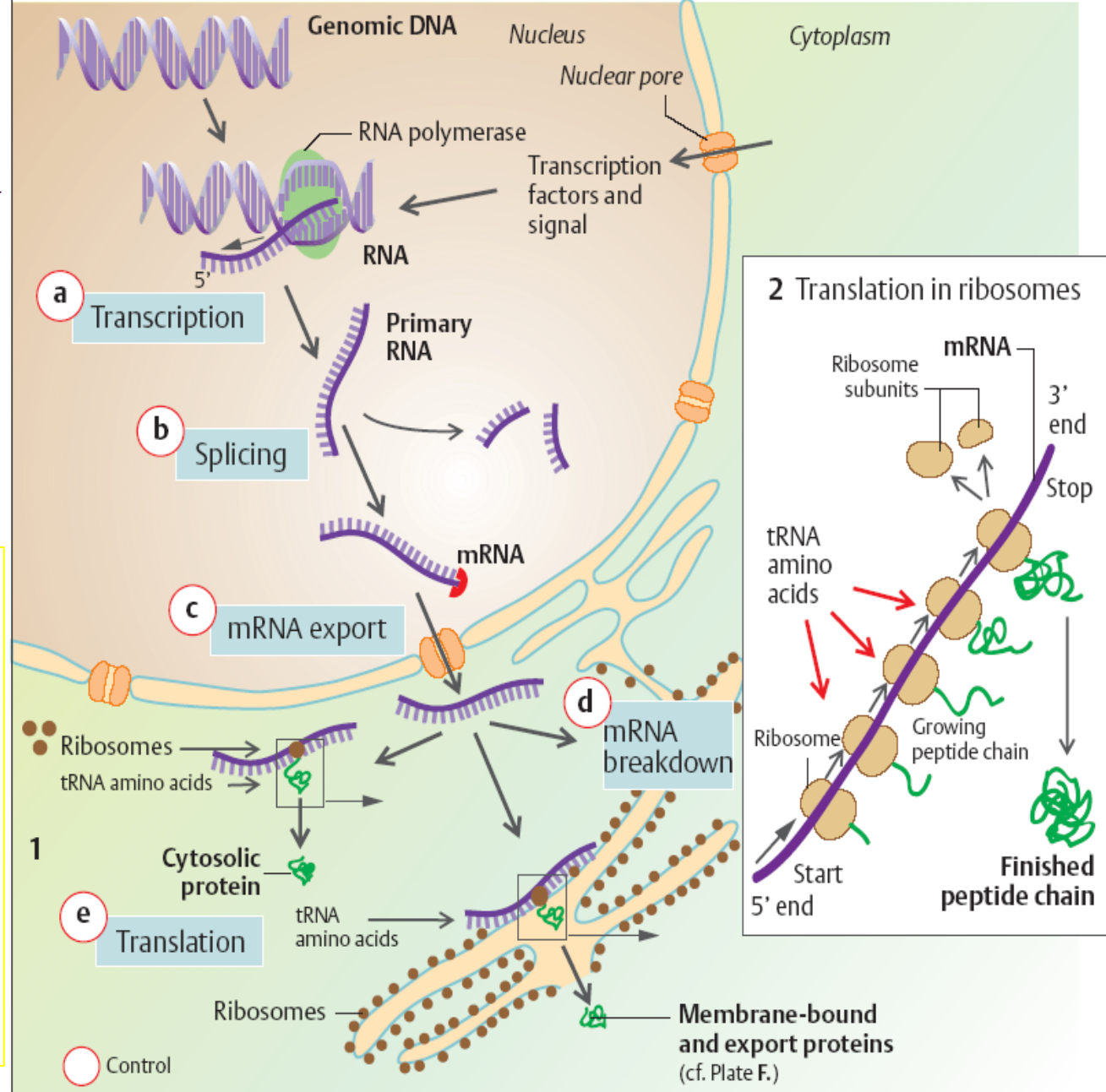


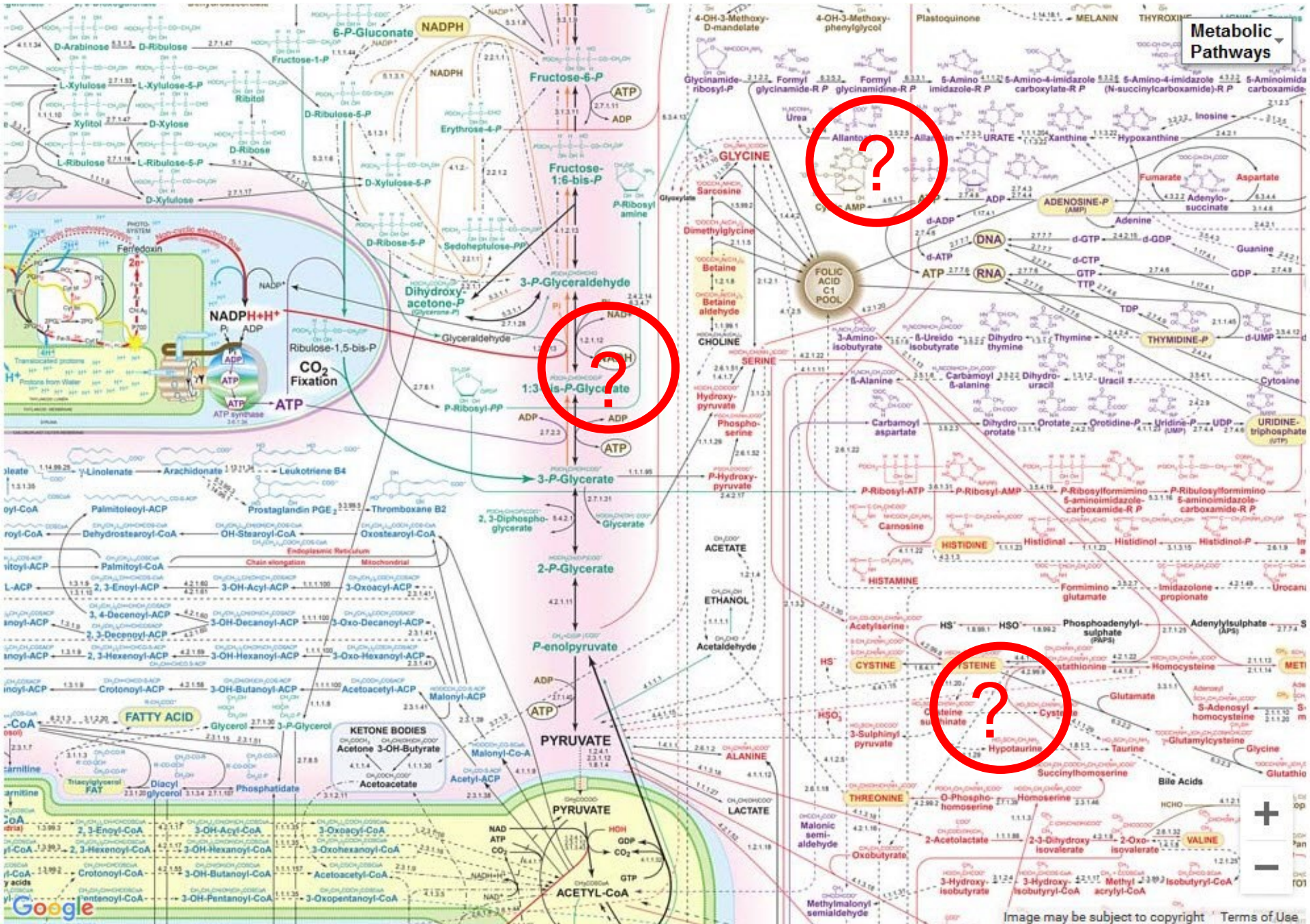
Recapitulare (Cursul de genetica, microbiologie)

Pentru a obține organisme cu fenotip modificat prin tehnicile ingineriei genice (OMG), transgena introdusă în organismul gază trebuie să fie funcțională - **expresie fenotipică a caracterului de interes**

Procesele moleculare de bază:
Replicarea ADN – transmiterea informației genetice (celulă –celulă, o generație de organisme - altei generații).

Transcripția ADN și translația ARNm – mesajul informațional este transcris în secvența nucleotidică de ARN și translat în proteine (realizarea informației) cu diferite funcții





Genotip - Fenotip

Procese generale în obținerea ADN recombinant

Molecule hibride formate din ADN din diferite surse (de ex. ADN vector și ADN de interes) poartă denumirea **ADN recombinant**.

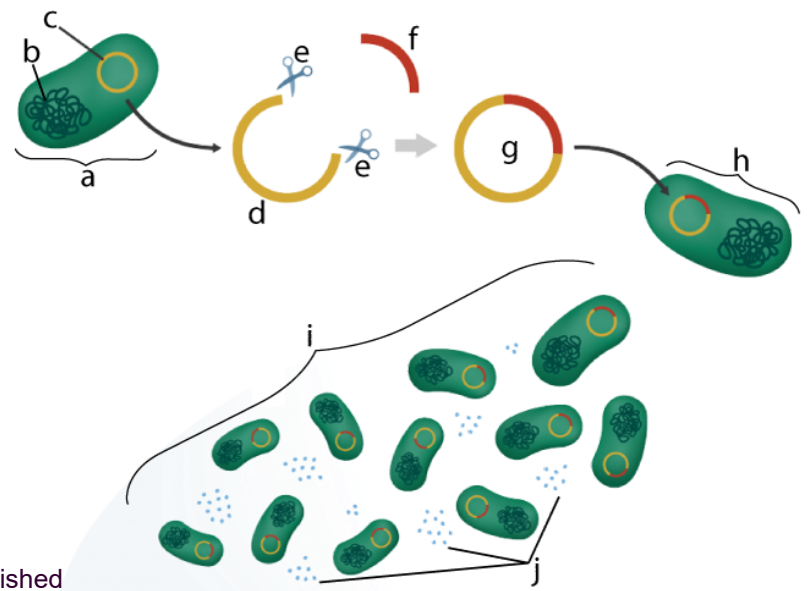
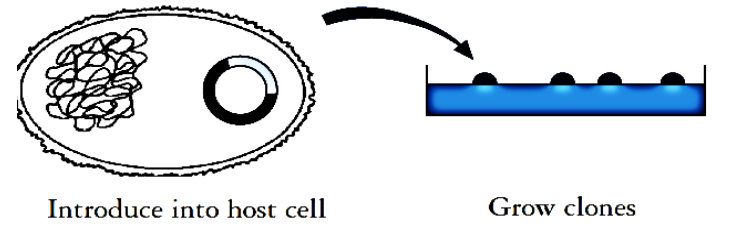
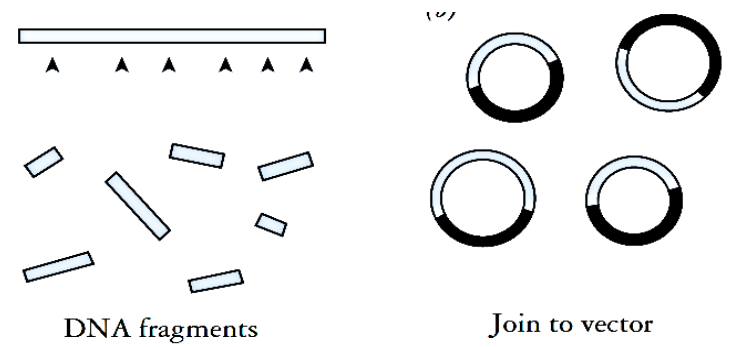
Material genetic suficient pentru un experiment de recombinare a AN (secvențe de la diferite specii, inclusiv din genomuri diferite: nuclear, mitocondrial, plastidic), se obține prin clonare. **Clonarea genelor** poate fi denumită și „**clonare moleculară**” pentru a distinge procesul de clonare a genelor de cel al clonării organismelor întregi.

Succesul manipulării genetice depinde de **capacitatea de a izola o singură secvență de ADN** din genom și clonarea acesteia. Ulterior, secvență specifică de ADN, poate fi utilizată pentru o varietate de scopuri.

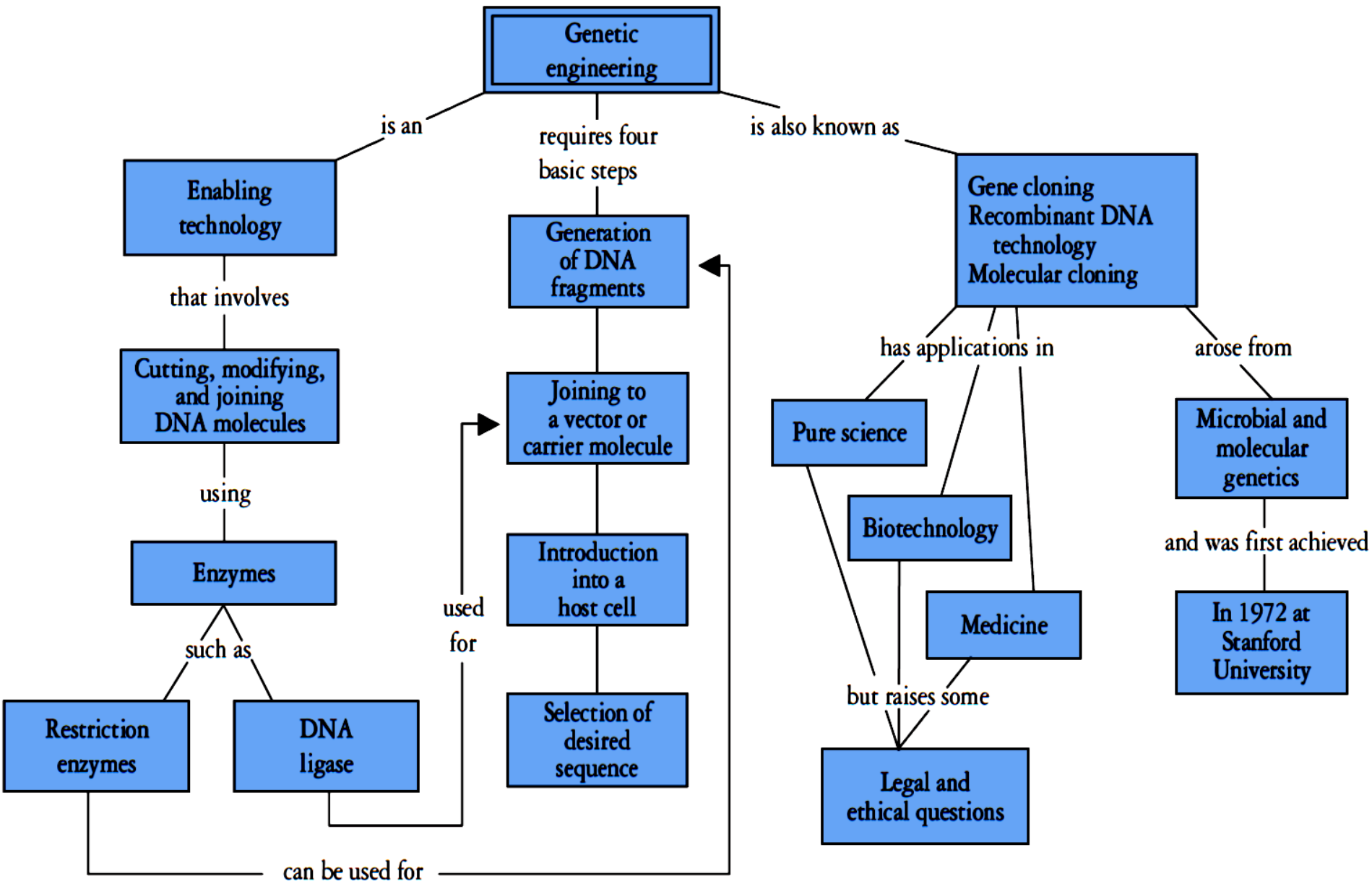
Prin analogie se poate considera clonarea genelor ca o formă de **agricultura moleculară**, care permite producerea de cantități mari (în contextul ingineriei genetice înseamnă **micrograme** sau **miligrame**) dintr-o anumită secvență de ADN. Chiar și în epoca contemporană a posibilităților de secvențiere la scară largă, capacitatea de a izola o anumită secvență genică este, încă, un aspect major/determinant al manipulării genelor efectuate de zi cu zi în laboratoarele de cercetare din întreaga lume.

Principiul general al clonării genelor poate fi considerată o serie de patru pași:

- **izolarea ADN** pentru clonare (o secvență de ADN sau o genă) și selecția **vectorului de clonare**
- **Ligarea ADN** la molecula vectorului
- **Introducere** vectorului într-o celulă gazdă pentru amplificare
- **Selectarea** clonelor care conțin secvența cercetată



Concept general





2. ETAPE GENERALE ÎN TRANSFORMARE GENETICA

I. Obținerea constructului genetic - *identificarea, izolarea și clonarea genelor de interes*

II. Transferul genelor – *transformare genetică*

III. Analiza OMG - *regenerarea, selecția și testarea plantelor MG.*

Elaborarea **strategiei** și a protocolului de **transformare** genetică depinde de:

- **interesele economice** (cercetare, comercializare)
- dotarea laboratorului (**echipament și facilități accesibile**, resurse financiare)
- **anumite particularități genetice ale speciei**
- **respectarea anumitor cerințe prevăzute de dosarul de notificare/înregistrare a OMG/PMG**

Obținerea autorizării unei varietăți MG impune respectarea următoarelor cerințe...

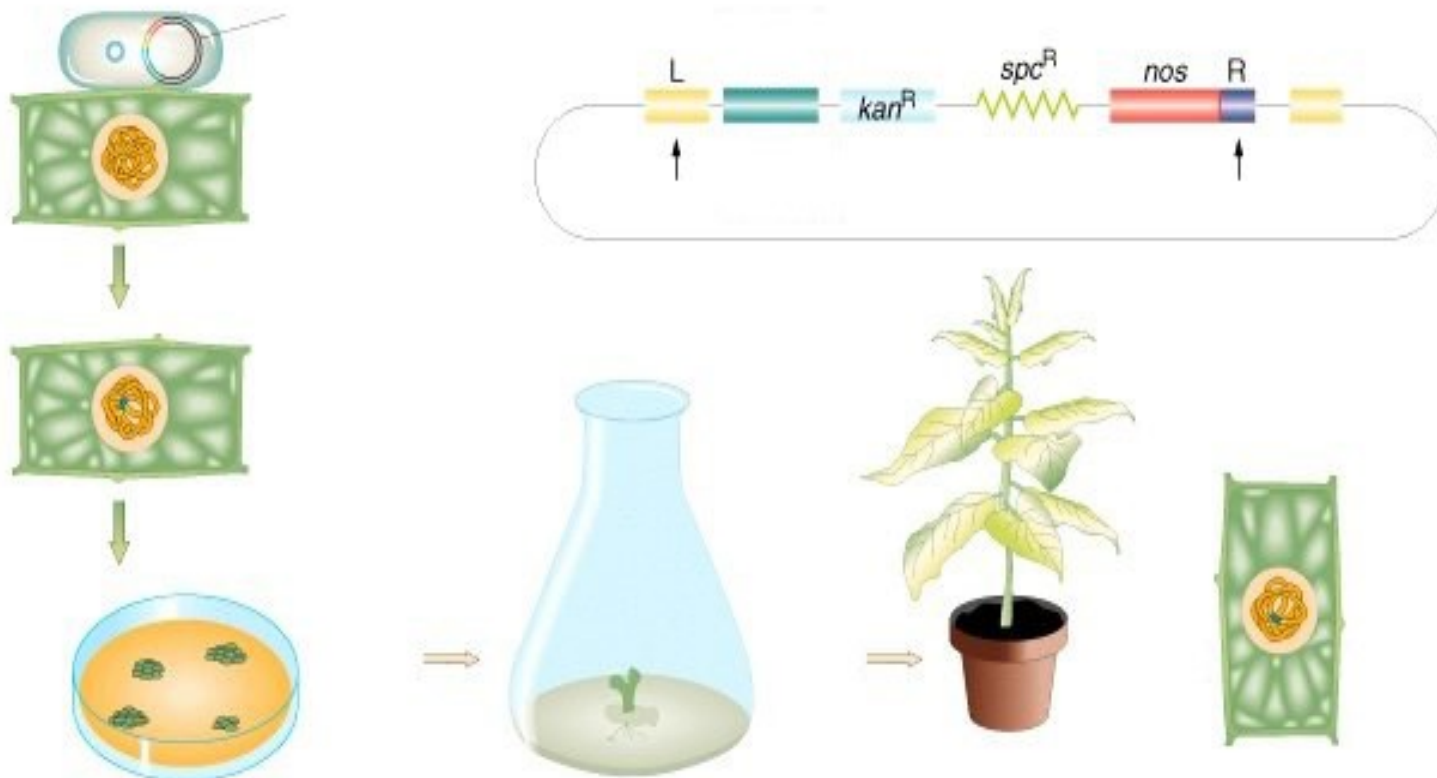
Transgenic

- stabilitate în expresia și moștenirea transgenelor în generațiile succesive
- segregare Mendeliană a fenotipului transgenic
- reglarea organ-specifică a expresiei alogenelor
- exploatarea produsului în scop agronomic, alimentar, medical, etc.

Contol

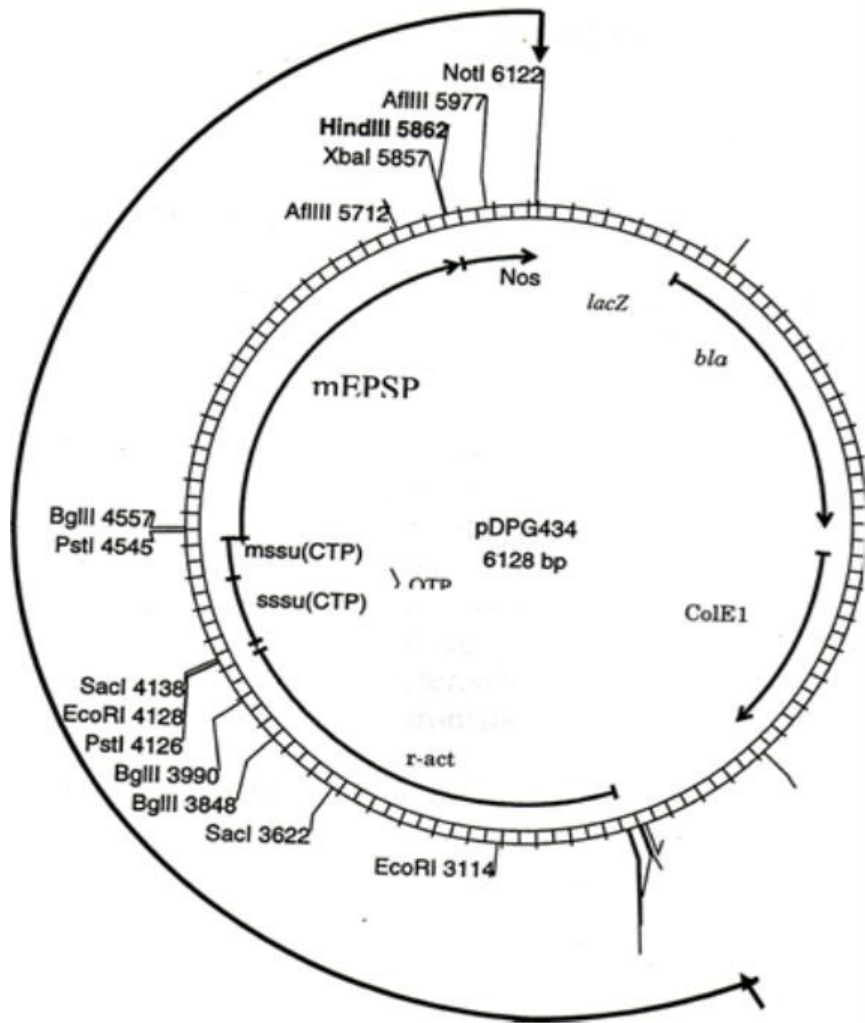
Formula transgenezei

Cultura in vitro + transfer de ADN \Rightarrow integrare = PMG



- 1 – Identificarea și izolarea genei „de interes”;
- 2 – Obținerea ADN-ului recombinant (integrarea transgenei în vector);
- 3 – Transferul genei himere (constructului genetic) în celula vegetală prin metode directe sau indirecte;
- 4 – Selectarea celulelor modificate genetic;
- 5 – Regenerarea plantelor din celulele transformate genetic;
- 6 – Reproducerea sexuală/ asexuală a plantelor modificate genetic.

Fragment AND-T (NotI fragment, 3,4 kb) utilizat în transf. genet. a liniei de porumb GA21, RR (toler. glifosat)



SacI 2679
NotI 2692
 XbaI 2699
 SphI 2729
 PstI 2735

Caseta cu gena *EPSPS* modificată:

P r-act - (1,37kb) și intronul de la gena actinei de la orez;

gena - 5-enolpiruvil și kimat-3-fosfat sintaza de la *Zea mays* - mEPSPS (1,34 kb) fuzionată cu o secvență N terminală a peptidei tranzit în cloroplast derivată de la genele RuBisCo de la *H. annuus* și *Zea mays* pentru a direcționa proteina mEPSPS spre cloroplast, unde are loc sinteza acizilor aromatici;

secvența N-terminală a peptidei tranzit în cloroplast (CTP) de la *H. annuus* și genele RuBisCo (sssu CTP, mssu CTP) de la *Zea mays* – OTP (0,37 kb)

NOS 3' secvența de terminare de la plasmida Ti din *Agrobacterium*

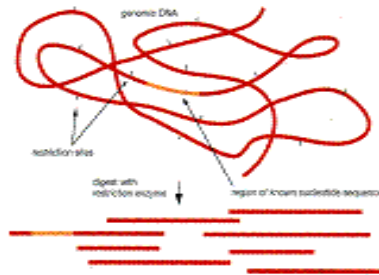
gena-marker bla (rezistența la ampicilină în bacterii p-u selecția bacteriilor cu plasmide),
(ori) -pentru replicarea plasmidei in *E. Coli*

3. IDENTIFICAREA, IZOLAREA ȘI CLONAREA GENELOR DE INTERES

Strategiile de identificare, izolare și clonare a genelor *de interes* depind de tipul celulei (pro-/eucariote), țesut, organ, fază de vegetație, specie.

IZOLAREA FRAGMENTELOR DE ADN UTILIZAT ÎN TEHNOLOGIA ADN-LUI RECOMBINANT

Izolarea fragmentelor de ADN prin digestie cu restricțaze

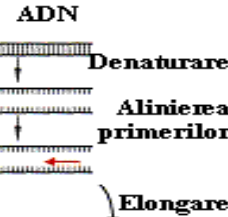


Fragmente ADN
"de interes"

Sinteza chimică și multiplicarea fragmentelor de ADN prin tehnologia PCR

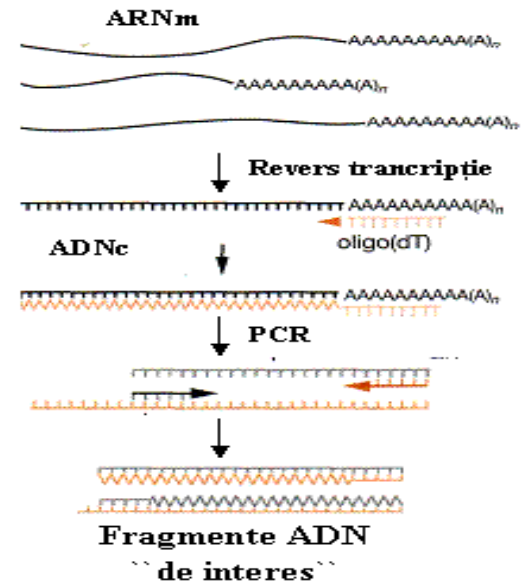
Tag-polimeraza
dNTP
ADN
primeri

Electroforeza



Fragmente ADN
"de interes"

Sinteza enzimatică a ADN-ului complimentar



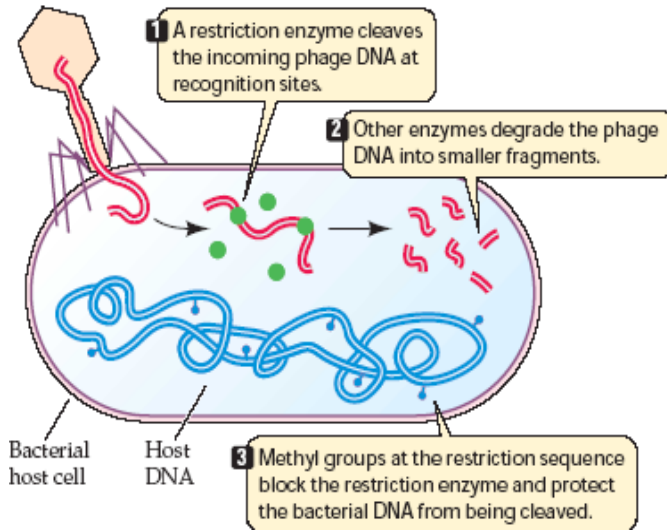
Fragmente ADN
"de interes"

3.1 Izolare genelor/fragmentelor ADN *de interes* prin utilizarea endonucleazelor de restricție (ER/restrictaze)

Cea mai simplă metodă de izolare a fragmentelor de ADN

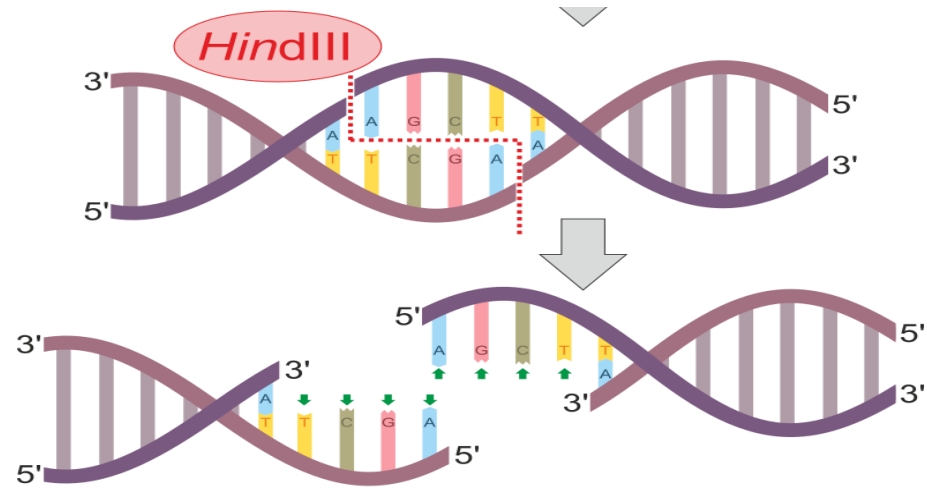


Utilizarea Endonucleazelor de restricție care scindează legăturilor fosfodiesterice din ADN.



Enzime de restricție

https://www.youtube.com/watch?v=rhd_fBPyzSM



Endonucleaze de restricție recunosc secvențe de 4-8 (de obicei 6) nucleotide - site de restricție, poziție în care este clivat ADN-ul (scindarea legăturilor fosfodiesterice din ADN).

! Pozițiile de restricție într-o moleculă de ADN pot fi precise dacă secvența ADN este cunoscută. **Această caracteristică stă la baza clonării genelor** și a altor activități ale tehnologiei ADN recombinant.

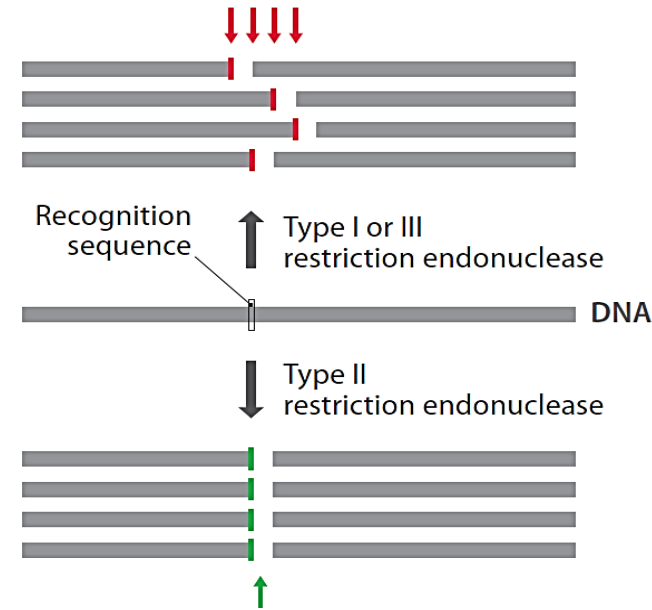
Tipuri de enzime de restricție utilizate în obținerea moleculelor de ADN recombinant (ADNr)

Există mai multe tipuri de ER, însă în obținerea ADNr sunt utilizate ER din calasa: I, II și III.

E I și E III - dependente de ATP, sunt utilizate în modificarea unumitor baze azotate prin metilare.

E I clivează secvența randomizat iar E III in / lângă situsuri specifice.

Aceste enzime nu permit un control strict asupra poziției clivării în raport cu secvența specifică din molecula de ADN recunoscută de enzimă



E II este pe larg utilizată în *ingineria genică* - nu sunt ATP dependente și sunt site-specifice.

Digestia ADN-ului cu o E de tip II are ca rezultat un set reproductibil de fragmente ale căror secvențe sunt previzibile, dacă se cunoaște secvența moleculei de ADN țintă.

***Enzimele de restricție recunosc secvența de nucleotide ___?___ indiferent de originea ___?_____.**

Funcția ER utilizate în obținerea ADN recombinant (ADNr), principiu general de acțiune

E (II) recunosc secvențe specifice de 4, 6,8 nucleotide cu structură de **palindrom** (secvențe repetate invers), având simetrie rotațională de tip doi, numite *situsuri*.

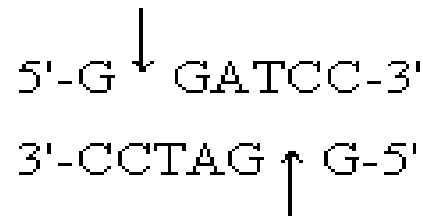
* **Palindrom** - secvențele se citesc similar în direcția de la 5 la 3 pe ambele catene (ex. cuv. mom)

Axa de simetrie



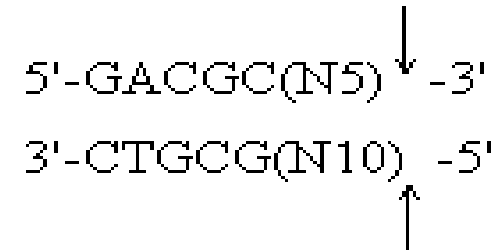
Secvențe ADN tăiate drept

fragmente cu capete drepte



Secvențe ADN tăiate decalat

extremități complementare sau coezive



Secvențe ADN tăiate decalat la distanțe diferite

fragmente cu extremități monocatenare cu secvențe nespecifice

* **EcoRI** conține cca. un site de clivare la fiecare 4,000 pb genom procariot tipic, sau 4 gene procariote. De aceea, această enzimă este pe larg utilizată în clivarea genomurilor mici (virusuri).

Comparație între endonucleazele de restricție de diferite tipuri

Sistemele de tip II includ enzime separate care îndeplinesc funcțiile de metilare și de restricție.

Există și un al **IV-lea sistem** de restricție/modificare: conține o enzimă de restricție care recunoaște și clivează o secvența de ADN metilată.

Anumite tulpini de *Streptococcus pneumoniae* conțin enzimă DpnI care clivează secvența GATC doar dacă această este metilată; aceste tulpini nu prezintă o metilaza care să metileze secvențele GATC. Alte tulpini ale acestei bacterii prezintă enzima DpnII, care clivează GATC nemetilate, dar aceste tulpini prezintă metilaze specifice, care modifică această secvență, astfel încât ADN-ul lor este metilat. DpnI poate fi folosită pentru restricția de substraturi metilate, substraturi pe care enzimele care recunosc aceeași secvență sunt înactive (Mbo I, Sau3A I). Ambele sisteme vor restricționa ADN-ul străin care intră în tulpina bacteriană și prezintă un model diferit de metilare. Sistemele de restricție care recunosc și clivează ADN metilat sunt rare și mai puțin eficiente, deoarece vor degrada doar moleculele de ADN care prezintă un model specific de metilare.

	Tip IV	Tip II	Tip III	Tip I
Structura proteica	Enzima bifuncțională	Metilaze și endonucleaze distincte	Enzima bifuncțională care conține 2 subunități	Enzima bifuncțională care conține 3 subunități
Situs de recunoastere	Secvența ADN metilată	Secvențe de 4-6 pb, adesea palindromice	Secvențe asimetrice de 5-7 pb	Secvențe bipartite și asimetrice
Situs de clivare	Același sau apropiat de situsul de recunoastere	Același sau apropiat de situsul de recunoastere	La 24-26 pb în aval față de situsul de recunoastere	Nespecific, la mai mult de 1000 pb de situsul de recunoastere
Restricție și metilare	Reacții separate	Reacții separate	Simultane	Exclusive
Funcție	modificare/restricție	metilare/restricție	modificare/restricție	modificare/restricție

DIVERSITATEA ENZIMELOR DE RESTRICȚIE

Aproape 4000 de enzime de tip II au fost izolate și peste 600 sunt disponibile pentru utilizare în laborator. Multe enzime au situsuri țintă hexanucleotidice, dar altele recunosc secvențe mai scurte sau mai lungi.

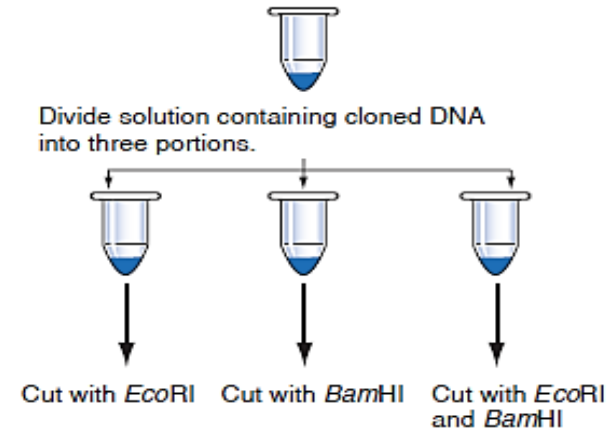
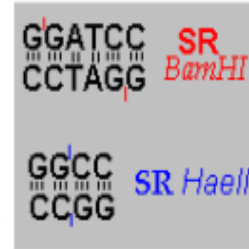
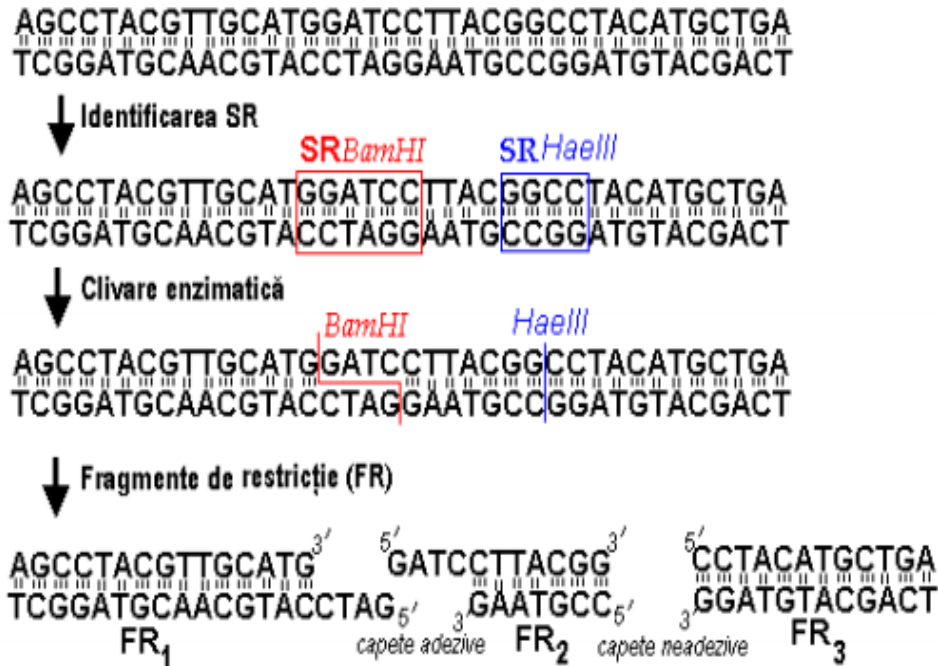
Există enzime cu **secvențe de recunoaștere** degenerare (situație ambiguă), acestea recunosc mai multe secvențe (familie de site-uri conexe), care încep și se termină cu anumite baze. De ex. Hinfl (*Haemophilus influenzae*), recunoaște 5'GANTC3', N este orice nucleotidă: 5'GAATC3', 5'GATTC3', 5'GAGTC3', și 5'GACTC3'.

Enzima de restricție	Bacteria	Tulpina/enzima	Secvența recunoscută/ Locul secționării
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	RY13, enzima 1	G↓AATTC
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	H, enzima 1	G↓GATCC
Bgl II	<i>Bacillus globigii</i>	enzima 2	A↓GATCT
Sal I	<i>Streptomyces albus</i>	enzima 1	G↓TCGAC
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	164, enzima 1	CTGCA↓G
Hind II	<i>Haemophilus influenzae</i>	D, enzima 2	A↓AGCTT
Kpn I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	enzima 1	GGTAC↓C
Xba I	<i>Xanthomonas bradii</i>	enzima 1	T↓CTAGA
Sau 3AI	<i>Staphylococcus aureus</i>	3A, enzima 1	N↓GATCN (N = oricare bază)
Hae III	<i>Haemophilus aegypticus</i>	enzima 3	GG↓CC

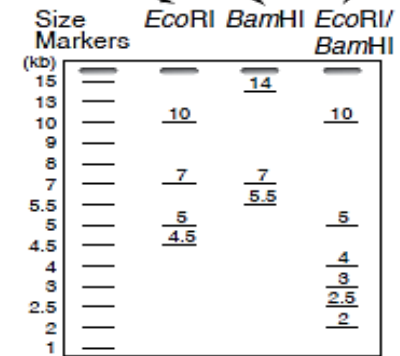
Cel mai des utilizate în tehnicile ingineriei genetice: Hae III, Eco RV, Eco RI, TagI, NotI etc.

Nomenclatura enzimelor de restricție a fost propusă de Smith și Nathans (1973) - acronim format din trei litere, din care prima reprezintă **genul**, iar următoarele două, **specia** bacteriei la care s-a identificat enzima. Acest acronim poate fi urmat de o literă și de cifre, care semnifică tulpina bacteriană din care s-a izolat enzima de restricție, și respectiv numărul enzimei identificate la specia în cauză. De ex. **EcoRI** reprezintă enzima izolată din *Escherichia coli*, tulpina **R**, enzima **I**, dar și EcoRII și EcoRV sunt sisteme diferite derivate din tulpina R de *E. coli*.

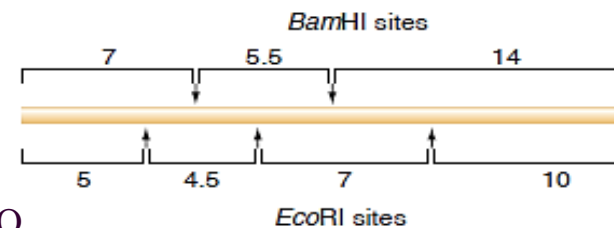
ER pot fi utilizate în diferite concentrații, timp de incubare și combinații de ER diferite, rezultând mai multe fragmente care ulterior sunt separate prin electroforeză în gel.



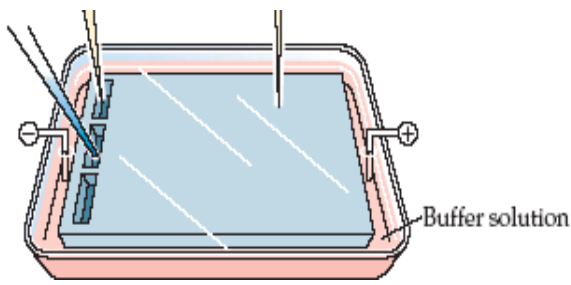
Load each digested sample into gel, along with size markers in a fourth lane.



Gel results

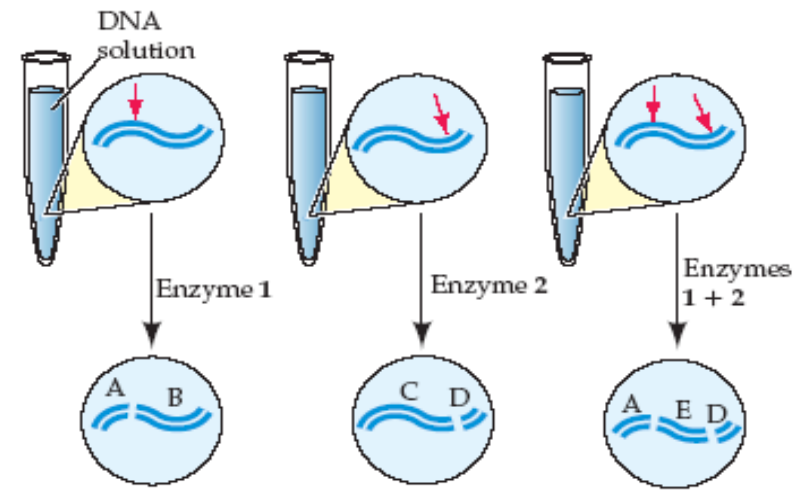


Sunt mai multe modalitati de vizualizare și documentare a rezultatelor restricției, însă, primar este necesară separarea fragmentelor care se realizează în gel de poliacrilamidă (PAAG) sau agaroză

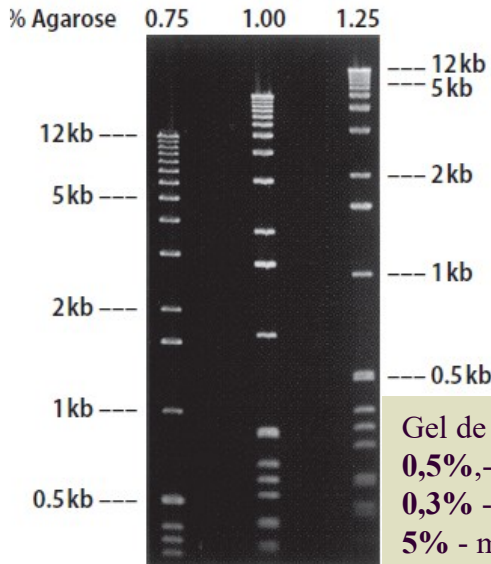
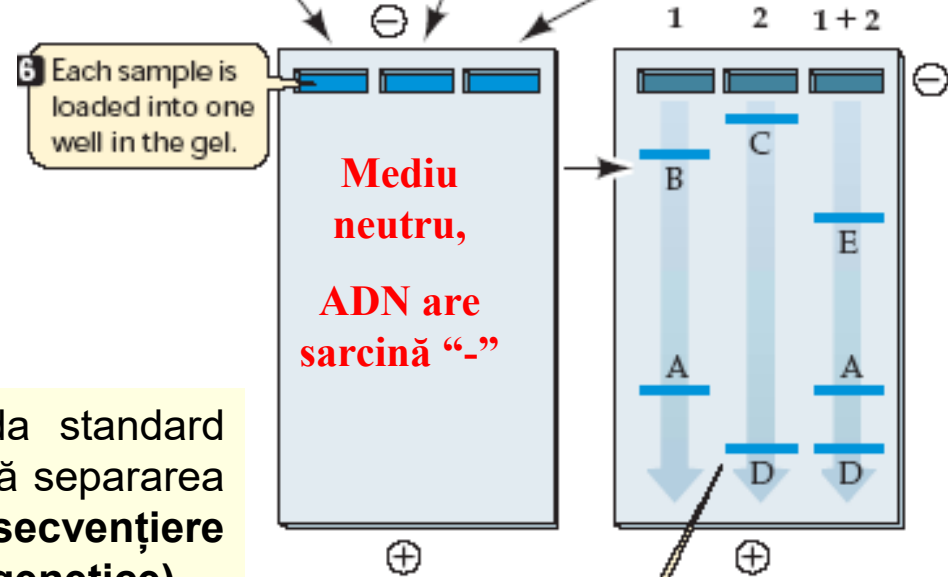


Clivarea, fragmentelor ADN și izolarea în gel-agaroză

Bromura de etidiu (**mutagen puternic**).
Sensibilitate -10 ng de ADN



- 3 Restriction enzyme 1 cuts the DNA once, resulting in fragments A and B.
- 4 Restriction enzyme 2 cuts the DNA once, at a different restriction sequence.
- 5 If both restriction enzymes are used, two cuts are made in the DNA.



Gel de agaroză:
0,5%,- molecule de 1-30 kb;
0,3% - molecule de până la 50 kb;
5% - molecule mai mici de 100-500 bp.

Electroforeză în gel de agaroză - metoda standard pentru vizualizare rezultatelor ER. Se utilizează separarea AN prin electroforeză PAAG în scopuri de secvențiere ADN, sau genotipare (obținerea ampretei genetice)

Fragmentul de ADN studiat (de ex. conține o genă) poate fi decupat din gel, ADN-ul purificat și analizat în continuare (clonare, secvențierea fragmentului).

Dacă dimensiunea fragmentului de interes nu este cunoscută, atunci se utilizează hibridizarea **Southern-blot** (de la numele inventatorului Edward Southern, 1975).

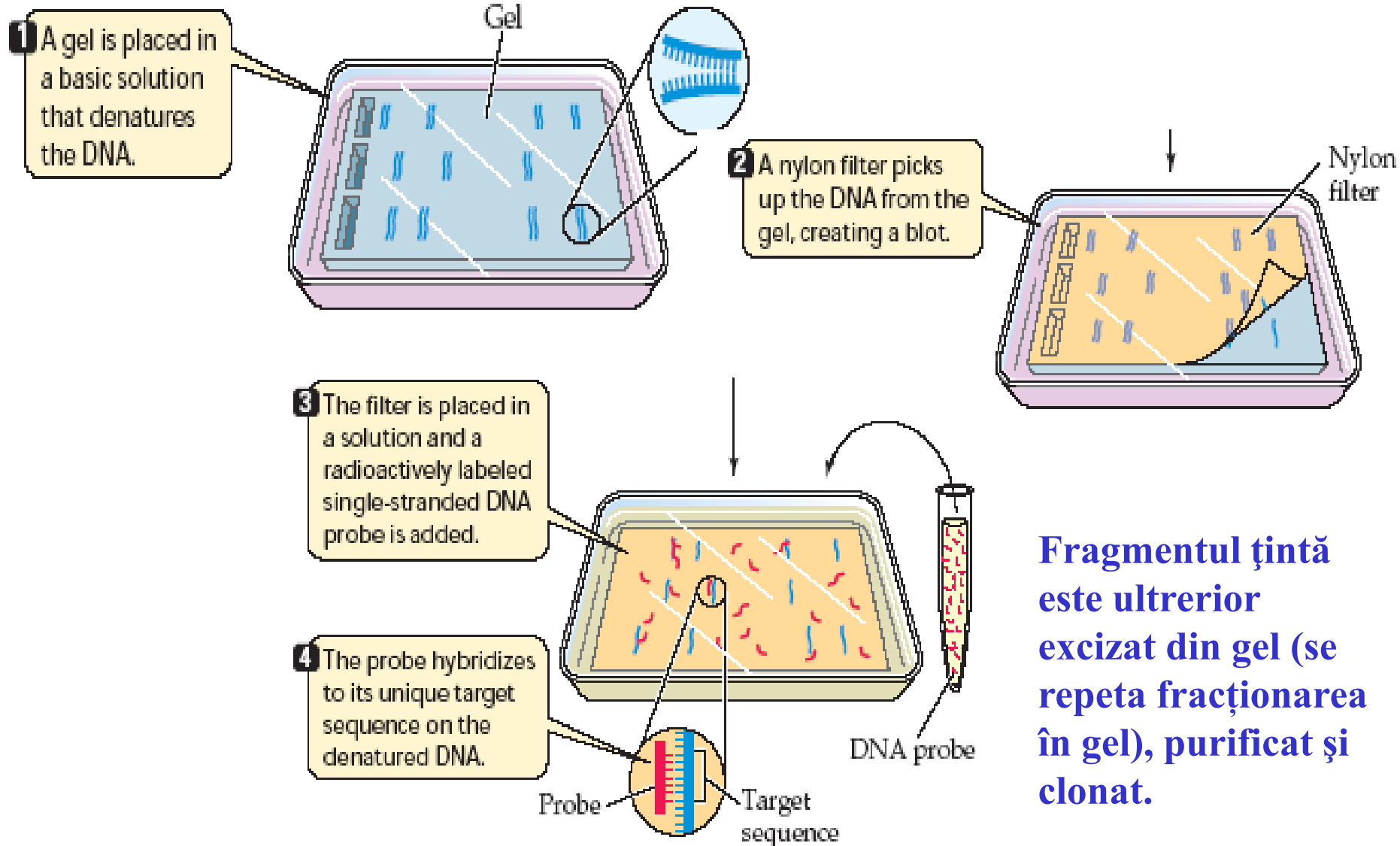
Singura cerință pentru ca această metodă să fie aplicată - cel puțin o parte din secvența de ADN de interes să fie cunoscută sau prezisă.

Identificarea secvenței țintă se face pe baza hibridării ADN-țintă cu o sondă (*secvențe scurte de ADN monocatenar, marcate radioactiv sau cu agenți fluorescenți și care sunt complementare secvenței de interes*).

Tehnica Southern-blot (tehnică în fază solidă) constă din următoarele etape:

- (1) extragerea din țesut/celule a ADN-ului genomic cu greutate moleculară mare;
- (2) digestia enzimatică a ADN-ului cu diferite ER, fiecare producând fragmente de lungime diferită;
- (3) separarea fragmentelor de restricție prin electroforeză în gel de agaroză;
- (4) denaturarea fragmentelor bicatenare cu o soluție alcalină;
- (5) transferul capilar al fragmentelor de ADN pe membrane de nitroceluloză și fixarea acestora de membrană prin încălzire treptată - 80° C sau UV cross-linkage;
- (6) hibridizarea cu sonde monocatenare radioactive;
- (7) autoradiografia pentru vizualizarea hibrizilor ADN țintă - ADN sondă și interpretarea rezultatelor.

Prezentare schematică a hibridizării *Southern-blot*

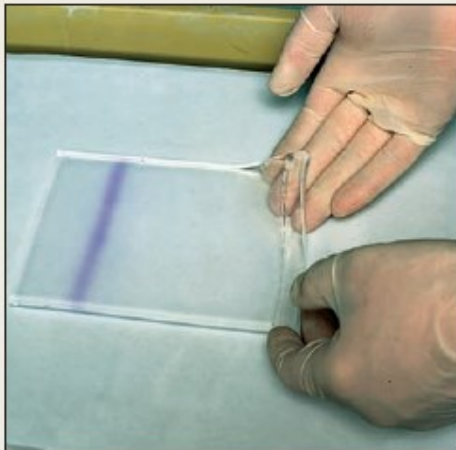


Fragmentul țintă este ulterior excizat din gel (se repeta fracționarea în gel), purificat și clonat.

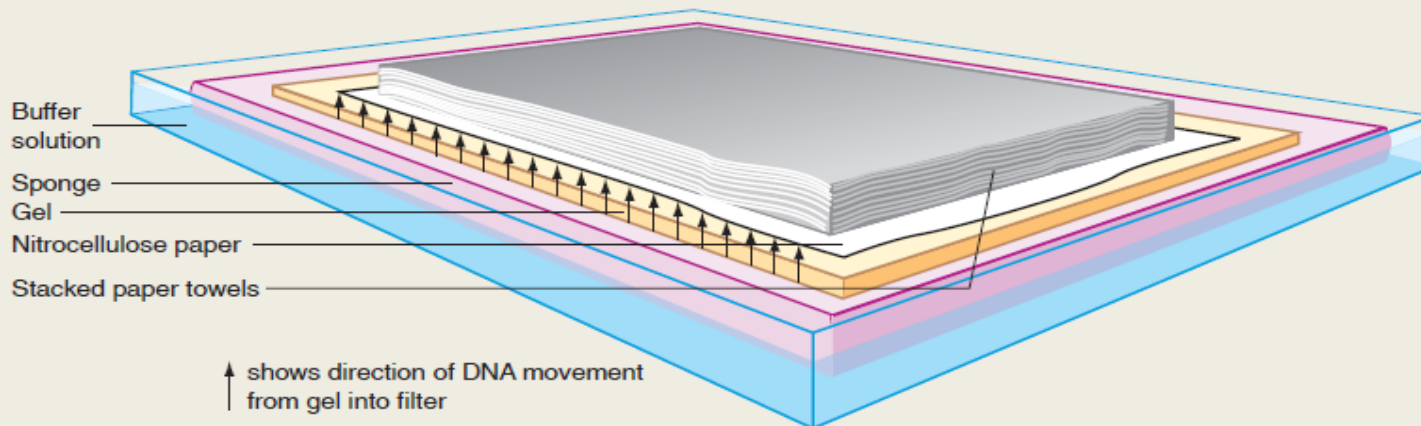
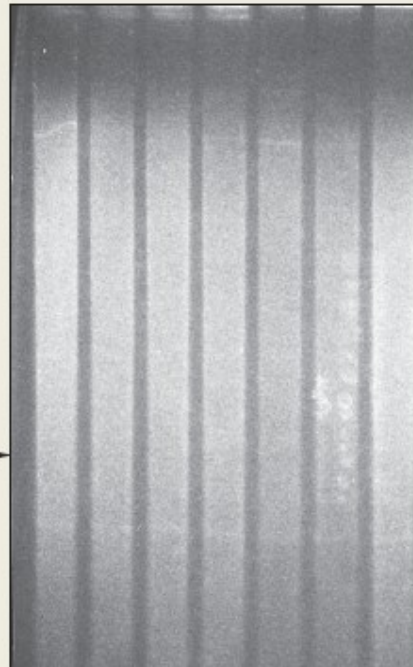
Prezentare schematică a hibridizării ***Southern-blot***

Southern Blot Analysis

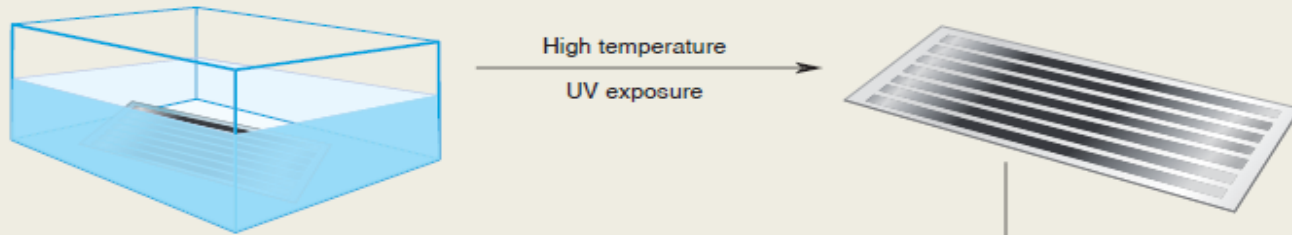
Genomic DNA was purified from the tissues of seven mice, and each sample was subjected to digestion with the restriction enzymes *EcoRI*. Digested samples were separated by electrophoresis in an agarose gel, as illustrated in Fig. 9.4.



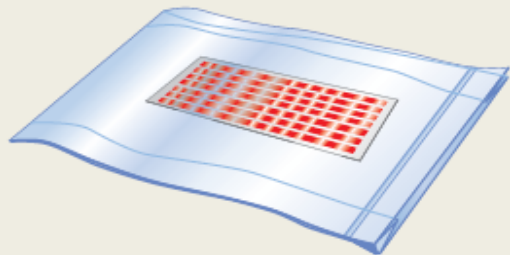
Stain with
ethidium bromide
to visualize total
genomic DNA under
UV illumination.



The Southern blot is removed from the blotting apparatus, incubated with NaOH to denature the transferred DNA, and then baked and exposed to UV radiation to attach the single-stranded DNA to the blot.

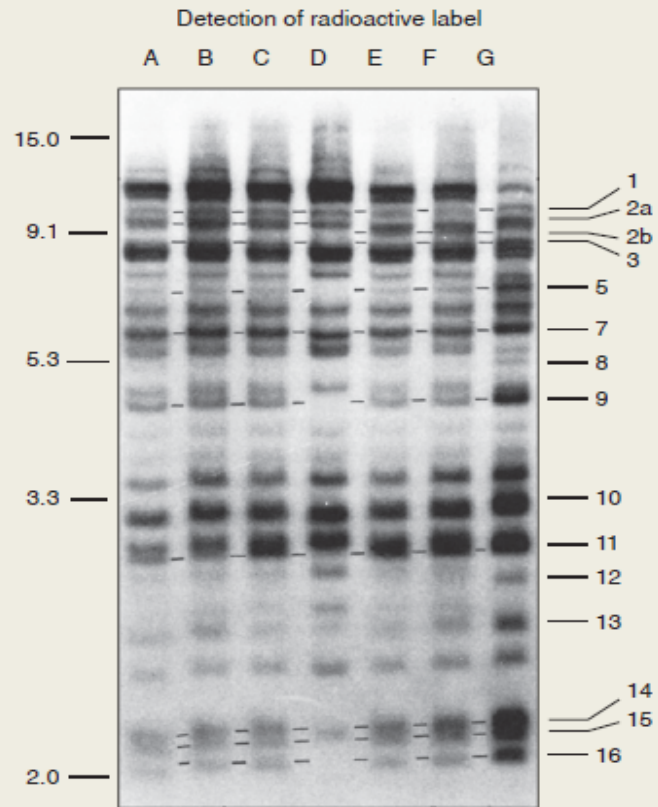


The blot is incubated with radioactive probe for a mouse major histocompatibility gene *H2K*.



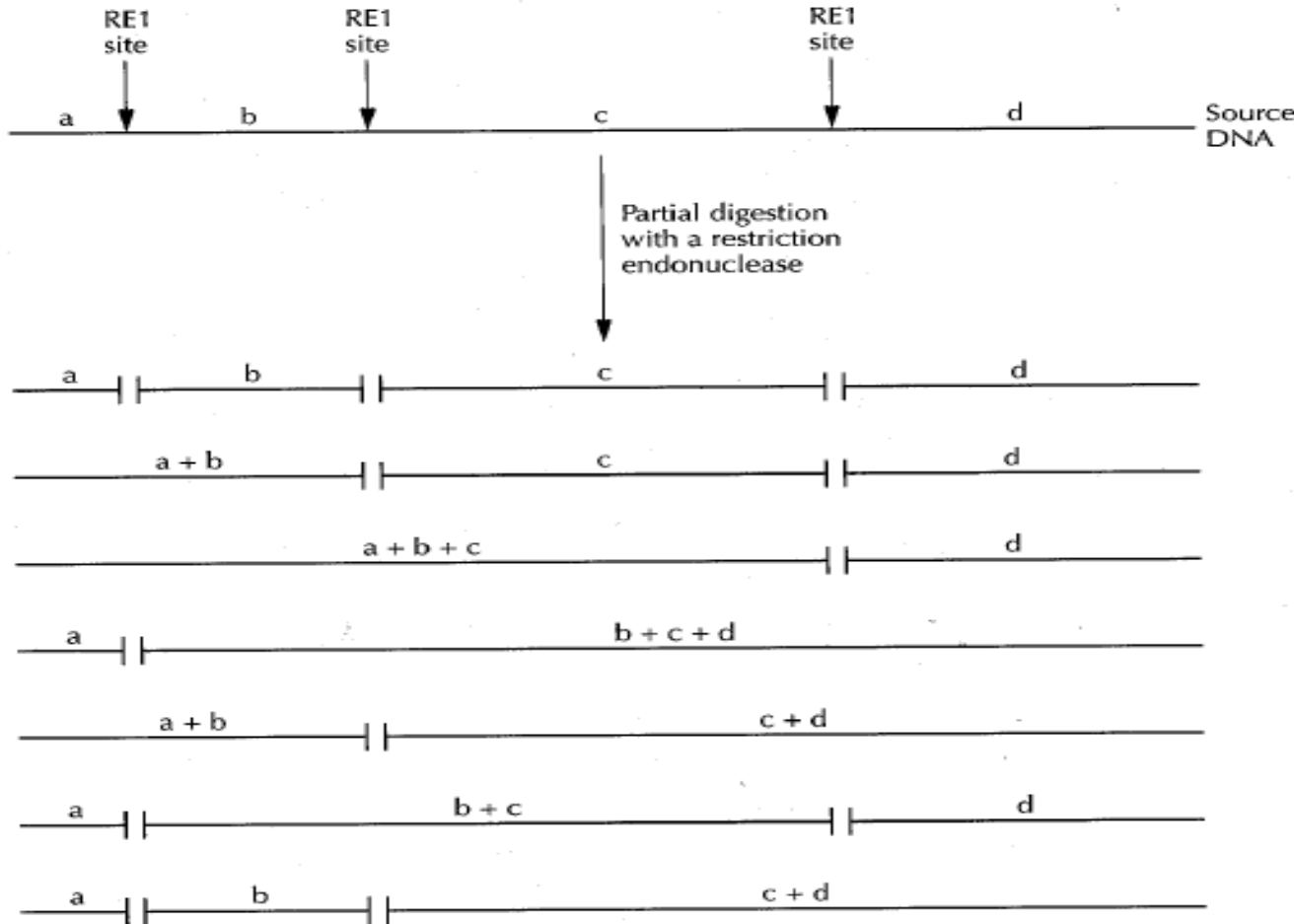
The distribution of unlabeled mouse genomic restriction fragments transferred from the gel to the blot is shown in *black*; *red bands* indicate locations on the blot where the *H2K* probe has hybridized to homologous mouse genomic DNA fragments.

Blot is removed, washed, and exposed to X-ray film.



In each genomic DNA sample, the *H2K* probe hybridizes to all 20–30 major histocompatibility-related genes present within the mouse genome.

Biblioteca de secvențe a genei de interes parțial digerate (fragmente de restricție)



**Dacă pentru o enzimă dată sunt n situsuri într-un segment ADN, atunci numărul fragment obț. va fi n+1

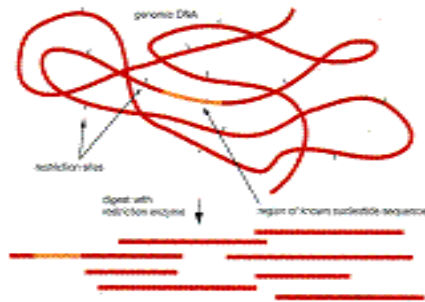
Rezultatele genotipării cu diferiți marcheri moleculari (**RFLP**, **RAPD**, **SSR** etc.) sunt utilizate în diferite scopuri, inclusiv cartografiere și obținerea hărților genetice a cromozomilor întregi sau pe regiuni

!!! Fragmentele de restricție obținute prin digestia enzimatică a ADN-lui au lungime variată în funcție de numărul situsurilor de restricție - **reprezintă** materialul inițial în **izolarea**, **clonarea genelor** și **obținerea constructului genetic** utilizat în transformare

3.2 Izolarea genelor/fragmentelor ADN „de interes” prin utilizarea Reacției de polimerizare în lanț (Polymerase Chain Reaction – PCR)

IZOLAREA FRAGMENTELOR DE ADN UTILIZAT ÎN TEHNOLOGIA ADN-LUI RECOMBINANT

Izolarea fragmentelor de ADN prin digestie cu restricțaze



Fragmente ADN
"de interes"

Sinteza chimică și multiplicarea fragmentelor de ADN prin tehnologia PCR

Tag-polimeraza
dNTP
ADN
primeri

Electroforeza



ADN

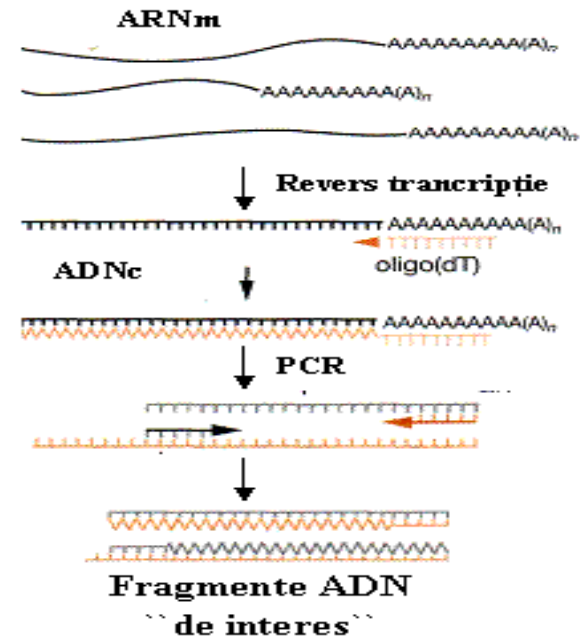
Denaturare

Alinierea primerilor

Elongare

Fragmente ADN
"de interes"

Sinteza enzimatică a ADN-lui complementar



Principiul metodei PCR

Deși au fost mai multe metode cu rezultate similare, încă din anul 1971, invenția PCR este atribuită lui Kary Mullis (1983).

PCR este o altă metodă de izolare dar și de multiplicare a ADN. Amplificarea/sinteza *in vitro* a diferitor fragmente de ADN este posibilă prin utilizarea **polimerazelor**, a unor secvențe nucleotidice specifice numite **primeri/amorse (P)**, a oligonucleotidelor ADN sintetizate chimic (**dNTP**, dezoxinucleotide) și a altor componente moleculare.

*Această metodă a fost posibilă în urma descoperirii ADN polimerazelor, termostabile (de la *Thermus aquaticus* – Taq-polimeraza și de la *Pyrococcus furiosus* – Pfu-polimeraza). În prezent sunt diferite variante recombinante ale enzimei, cu caracteristici îmbunătățite*

De ce avem nevoie ?

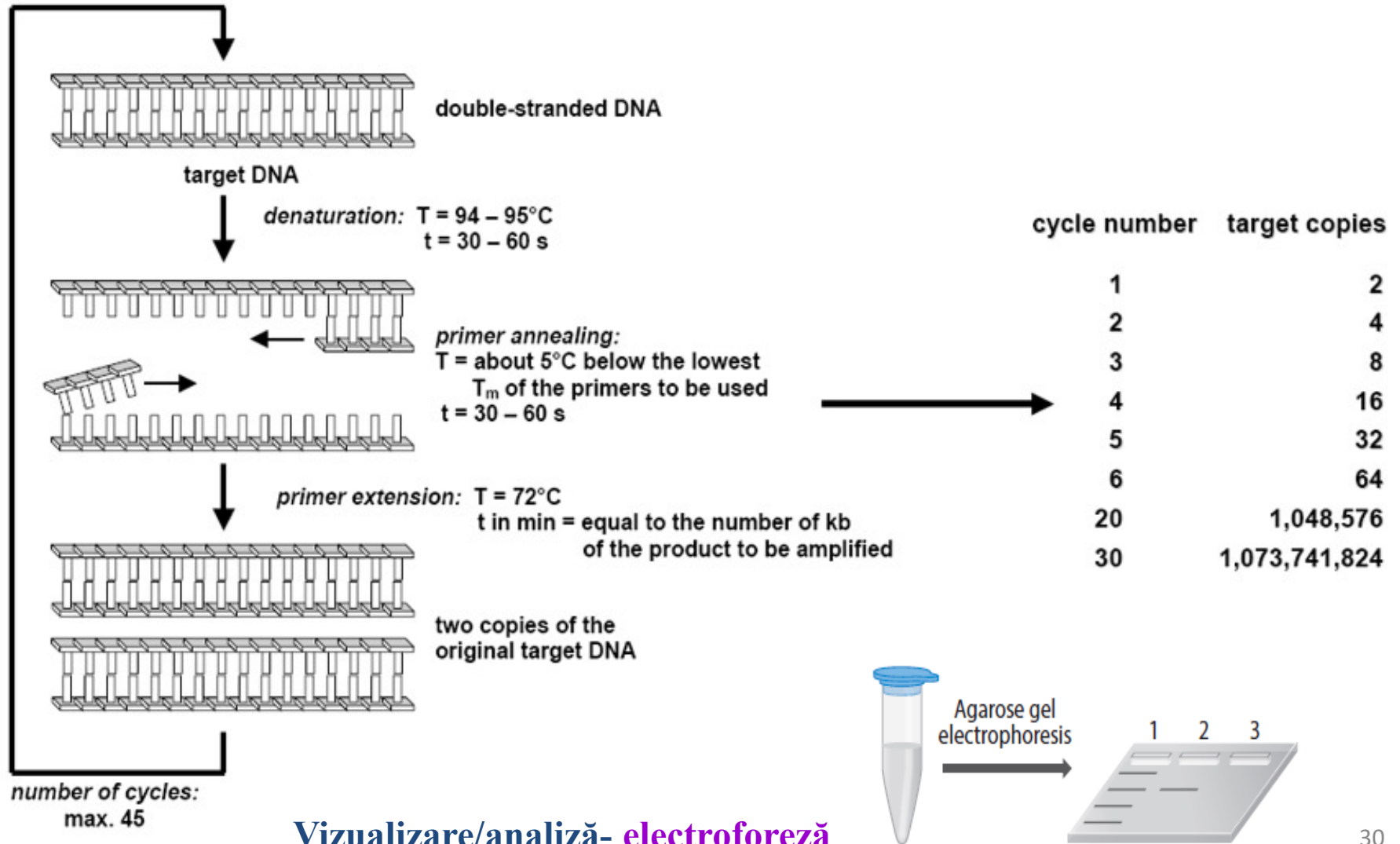
- Termocycler –amplificator
- ADN polimeraze, purificate și termostabile (Taq-polimeraza/Pfu-polimeraza alte.)
- Oligonucleotide ADN sintetizate chimic (dNTP A/T/G/C)
- Primeri - două secvențe nucleotidice complementare catenelor ADN (sens și antisens), atașate la capetele regiunii care urmează a fi amplificată, P. sp. -20-25 n. P. arb.- 10 n
- Matriță ADN (izolat din material biologic și purificat)

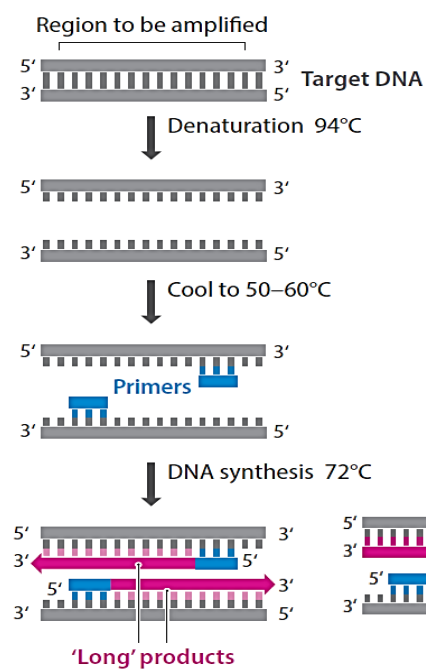


How to perform colony PCR: https://www.youtube.com/watch?v=Crv38J3_ZnM

PCR reaction types and applications: <https://www.youtube.com/watch?v=woYiV0KUUsk>

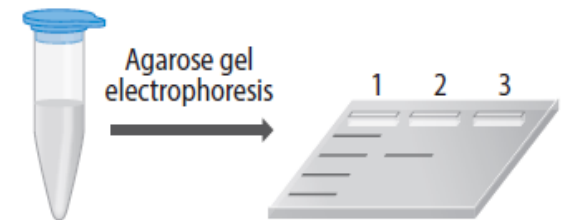
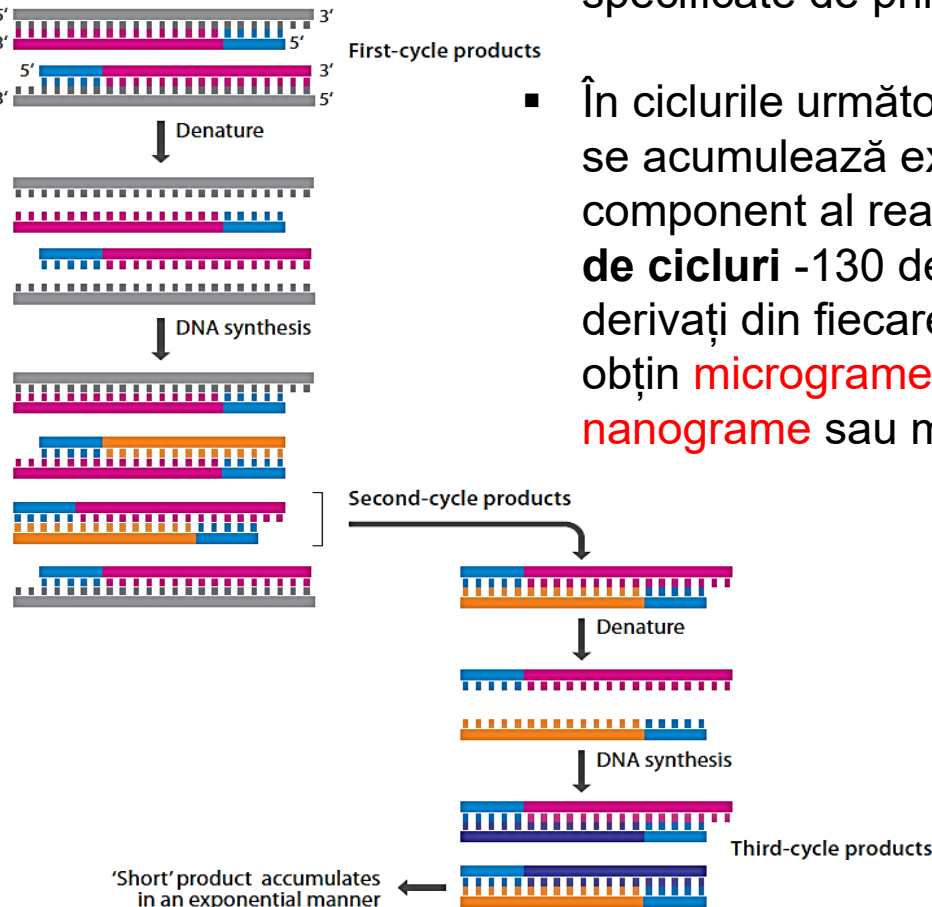
Principiul tehnic al PCR - cicluri de crestere a temperaturii - scăderea temperaturii, repetate succesiv, în scop de denaturare, renaturare (alinie), sinteză (elongare) ADN





În etapa 1 PCR - **produse lungi** sintetizate de pe fiecare catenă a ADN-ului țintă. **Aceste polinucleotide au extremitățile 5' identice și extrimități 3' aleatoare**, reprezentând **poziții în care sinteza ADN se termină întâmplător**.

- Ciclul de *denaturare-aliniere-sintează* se repetă, **produsele lungi** servesc ca **matrițe** pentru sinteza ADN-ului nou, generând, în cel de-al 3 ciclu, produse scurte, cu extremitățile 5' și 3' specificate de primeri aliniați specific.
- În ciclurile următoare, nr de produse specifice se acumulează exponențial până când un component al reacției este epuizat. **După 30 de cicluri** -130 de milioane de ampliconi derivați din fiecare moleculă de pornire (se obțin **micrograme de produs PCR** din câteva **nanograme** sau mai puțin de ADN țintă).



PRODUCT INFORMATION

Taq DNA Polymerase (recombinant)

#EP0402 500 U

Concentration: 5 u/μL
Lot: 00126886 Expiry Date: 11.2016

Store at -20°C



www.thermoscientific.com/onebio

Ordering Information

Taq DNA Polymerase (recombinant)

Component	#EP0401*	#EP0402	#EP0405	#EP0406
Taq DNA Polymerase, 5 u/μL	100 u	500 u	5 x 500 u	10 x 500 u
10X Taq Buffer with KCl	0.6 mL	2x1.25 mL	10x1.25 mL	20x1.25 mL
10X Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	0.6 mL	2x1.25 mL	10x1.25 mL	20x1.25 mL
25 mM MgCl ₂	0.6 mL	2x1.25 mL	10x1.25 mL	20x1.25 mL

Taq DNA Polymerase (recombinant), LC

Component	#EP0403*	#EP0404
Taq DNA Polymerase, 1 u/μL	100 u	500 u
10X Taq Buffer with KCl	0.6 mL	2x1.25 mL
10X Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	0.6 mL	2x1.25 mL
25 mM MgCl ₂	0.6 mL	2x1.25 mL

* Not available in USA and Canada.

Rev. 12 0688070000012000077

Description

Taq DNA Polymerase is a highly thermostable DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. The enzyme catalyzes 5'→3' synthesis of DNA, has no detectable 3'→5' exonuclease (proofreading) activity and possesses 5'→3' exonuclease activity. In addition, Taq DNA Polymerase exhibits deoxynucleotidyl transferase activity, which frequently results in the addition of extra adenines at the 3'-end of PCR products. Recombinant Taq DNA Polymerase is ideal for standard PCR of amplicons 5 kb or shorter.

Applications

- Routine PCR amplification of DNA fragments up to 5 kb (1).
- Generation of PCR product for TA cloning.
- DNA labeling (2-4).
- DNA sequencing (5).

Source

E.coli cells with a cloned *pol* gene from *Thermus aquaticus* YT1.

Definition of Activity Unit

One unit of the enzyme catalyzes the incorporation of 10 nmol of deoxyribonucleotides into a polynucleotide fraction (adsorbed on DE-81) in 30 min at 70°C. Enzyme activity is assayed in the following mixture: 67 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 6.7 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA, 0.75 mM activated salmon milt DNA, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 MBq/mL [³H]-dTTP.

Storage Buffer

The enzyme is supplied in: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20 and 50% (v/v) glycerol.

10X Taq Buffer with KCl

100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40.

10X Taq Buffer with (NH₄)₂SO₄

750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20.

Inhibition and Inactivation

- Inhibitors: ionic detergents (deoxycholate, sarkosyl and SDS) at concentrations higher than 0.06, 0.02 and 0.01%, respectively (6).
- Inactivated by phenol/chloroform extraction.

PROTOCOL

To prepare several parallel reactions and to minimize the possibility of pipetting errors, prepare a PCR master mix by mixing water, buffer, dNTPs, primers and Taq DNA Polymerase. Prepare sufficient master mix for the number of reactions plus one extra. Aliquot the master mix into individual PCR tubes and then add template DNA.

1. Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing.
2. Place a thin-walled PCR tube on ice and add the following components for each 50 μL reaction:

10X Taq Buffer	5 μL
dNTP Mix, 2 mM each (#R0241)	5 μL (0.2 mM of each)
Forward primer	0.1-1.0 μM
Reverse primer	0.1-1.0 μM
25 mM MgCl ₂ *	1-4 mM
Template DNA	10 pg - 1 μg
Taq DNA Polymerase	1.25 u
Water, nuclease-free (#R0581)	to 50 μL
Total volume	50 μL

*Volumes of 25 mM MgCl₂ required for specific final MgCl₂ concentration:

Final concentration of MgCl ₂ , mM	1	1.5	2	2.5	3	4
Volume of 25 mM MgCl ₂ to be added for 50 μL reaction, μL	2	3	4	5	6	8

3. Gently vortex the samples and spin down.
4. If using a thermal cycler that does not use a heated lid, overlay the reaction mixture with 25 μL of mineral oil.
5. Perform PCR using recommended thermal cycling conditions:

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	1-3 min	1
Denaturation	95	30 s	25-40
Annealing	T _m -5	30 s	
Extension	72	1 min/kb	
Final Extension	72	5-15 min	1

GUIDELINES FOR PREVENTING CONTAMINATION OF PCR REACTION

During PCR more than 10 million copies of template DNA are generated. Therefore, care must be taken to avoid contamination with other templates and amplicons that may be present in the laboratory environment. General recommendations to lower the risk of contamination are as follows:

- Prepare your DNA sample, set up the PCR mixture, perform thermal cycling and analyze PCR products in separate areas.
- Set up PCR mixtures in a laminar flow cabinet equipped with an UV lamp.
- Wear fresh gloves for DNA purification and reaction set up.
- Use reagent containers dedicated for PCR. Use positive displacement pipettes, or use pipette tips with aerosol filters to prepare DNA samples and perform PCR set up.
- Use PCR-certified reagents, including high quality water (e.g., Water, nuclease-free, (#R0581)).
- Always perform "no template control" (NTC) reactions to check for contamination.

GUIDELINES FOR PRIMER DESIGN

Use the ThermoScientific REviewer primer design software at www.thermoscientific.com/reviewer or follow general recommendations for PCR primer design as outlined below:

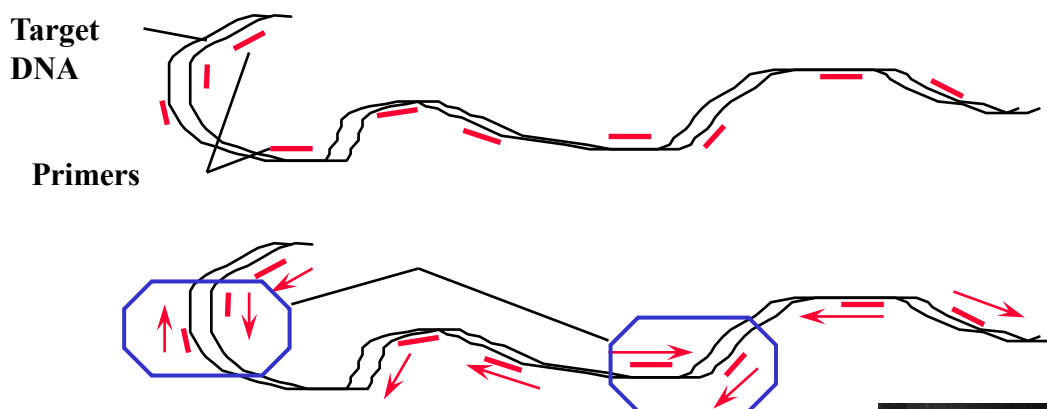
- PCR primers are generally 15-30 nucleotides long.
- Optimal GC content of the primer is 40-60%. Ideally, C and G nucleotides should be distributed uniformly along the primer.
- Avoid placing more than three G or C nucleotides at the 3'-end to lower the risk of non-specific priming.
- If possible, the primer should terminate with a G or C at the 3'-end.
- Avoid self-complementary primer regions, complementarities between the primers and direct primer repeats to prevent hairpin formation and primer dimerization.
- Check for possible sites of undesired complementary between primers and template DNA.
- When designing degenerate primers, place at least 3 conserved nucleotides at the 3'-end.
- When introducing restriction enzyme sites into primers, refer to the table "Cleavage efficiency close to the termini of PCR fragments" located on www.thermoscientific.com/onebio to determine the number of extra bases required for efficient cleavage.
- Differences in melting temperatures (T_m) between the two primers should not exceed 5°C.

(continued on reverse page)

Diferența dintre PCR cu primeri specifici și nespecifici Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Primeri arbitrari (10 nucleotide) ex. GTACTCGGTA

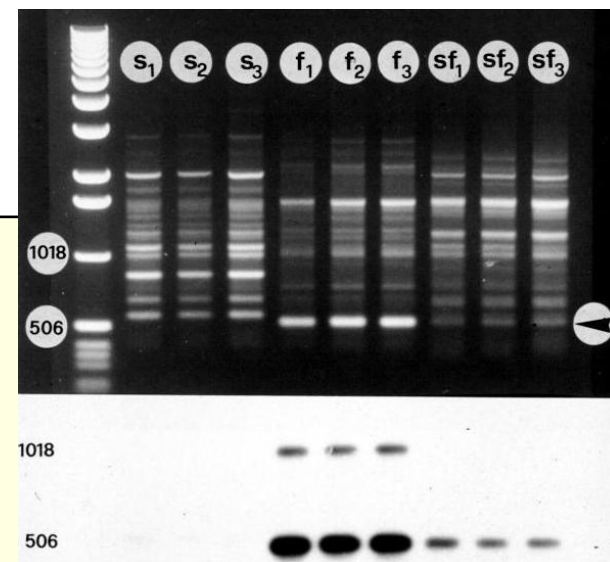
Primerii se aliniază/hibridizează în multe regiuni de pe cromozom



Se vor amplifica doar secvențele unde primerii sunt apropiați și amplasați în direcție opuse sens/antisens

Resultat: mai multe regiuni ale genomului au fost amplificate și vizualizate pe gel de agaroză colorat cu bromură de etidiu

Profilul RAPD obținut cu un singur primer la trei plante diferite



Puncte forte ale PCR



❑ Sensibilitate și Specificitate (în special dacă este asociat cu metode de hibridizare cu sonde și secvențiere ADN)

❑ Obținerea unei cantități mari de ADN, ușor de analizat: pentru ADN recombinant, identificarea unor fragmente specifice prin hibridizare, pentru secvențiere, etc.

❑ Aplicații practice în baza a diferitor variante PCR (diagnostic medical, starea de homo/heterozigoție) și de cercetare (polimorfism genetic, amprentă genetică, cartografiere etc.)

*Detectia ADN-ului viral cu mult timp înainte ca virusul să atingă niveluri **necesare pentru a iniția un răspuns la boală** este deosebit de important în identificarea timpurie a **tumorilor induse de virus**, astfel programele de tratament pot fi inițiate înainte ca să se dezvolte boala/tumoarea.*

Cantități mici de ADN inițial (fire de păr, pete de sânge și alte specimene medico-legale, oase, rămășițe conservate în situsurile arheologice).

Limitări

❑ Eșantioane foarte mici - proba poate deveni nereprezentativă

❑ Sensibilitatea este în funcție de calitatea ADN izolat

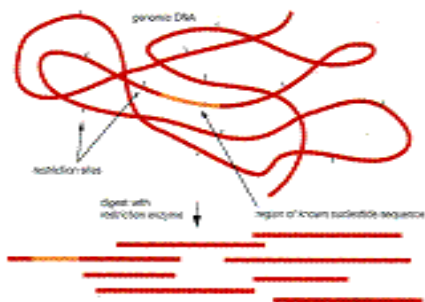
❑ PCR nu pot fi izolate gene sau alte părți ale genomului absolut necunoscute (deficiențe în proiectarea primerilor)

❑ Secvențe de până la 5 kb ușor sunt amplificate, cele de până la 40 kb -este posibil prin LongPCR. Fragmente mai lungi de cca 40 kb nu pot fi obținute prin PCR.

3.3 Izolarea genelor/fragmentelor ADN „de interes” prin sinteza ADNc Reverse Transcription – PCR

IZOLAREA FRAGMENTELOR DE ADN UTILIZAT ÎN TEHNOLOGIA ADN-LUI RECOMBINANT

Izolarea fragmentelor de ADN prin digestie cu restricțaze



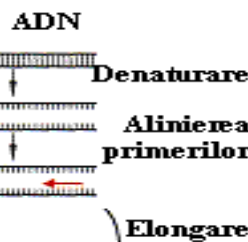
**Fragmente ADN
„de interes”**

<https://www.youtube.com/watch?v=4CsLLcveIB0>

**Sinteza chimică și
multiplicarea
fragmentelor de ADN
prin tehnologia PCR**

*Tag-polimerza
dNTP
ADN
primeri*

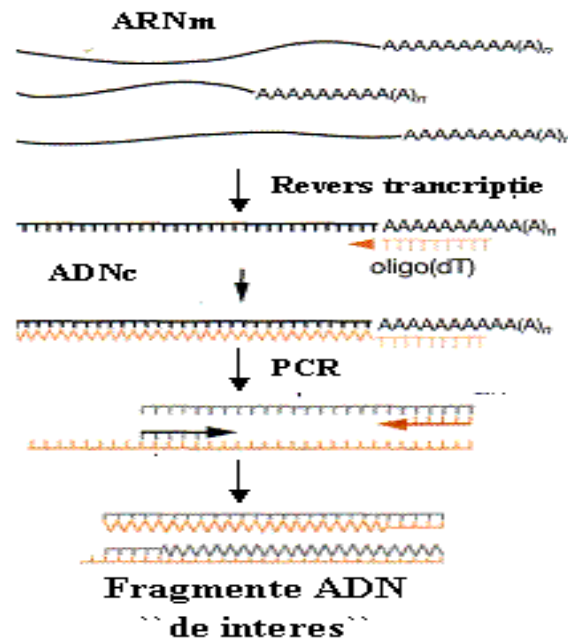
Electroforeza



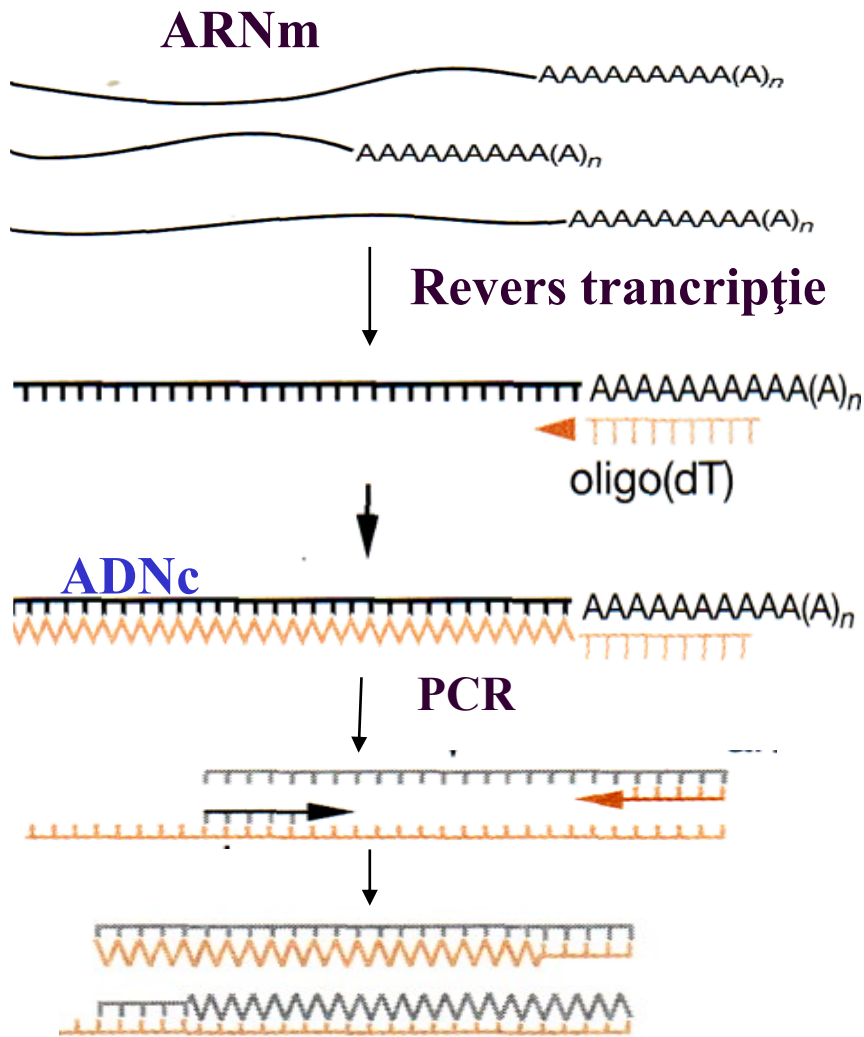
**Fragmente ADN
„de interes”**

<https://www.youtube.com/watch?v=E7eqc4r2iwl>

**Sinteza enzimatică a
ADN-ului complementar**



<https://www.youtube.com/watch?v=0MJTbrS4fbQ>



Izolarea și ulterior clonarea poate începe și prin extragerea **ARNtotal/ARNm** din țesuturi în faza de dezvoltare, în care gena „de interes” este expresată.

Prin sinteza copiilor ADN de pe ARNm (transcripție inversă) se obține ADNc

Protocolul este asemănător cu cel standard pentru PCR pe ADN, doar că se utilizează revers-transcriptază (ADN-polimeraza-ARN-dependentă) și RNasin (inhibitor de RNază).

Se aplică și tratarea cu DNază pentru a evita contaminarea cu ADN.

Colecție de ADNc

Avantaj – secvențe expresate / regiunea codantă a genei, concluzii cu referire la produsul de expresie genică

ADNc poate fi folosit ca sonda pentru a recunoaște rearanjările structurale ale unei gene.

Dezavantaj - nu oferă informații despre regiunile de flancare exon / intron, structura unei gene.

RT-PCR (PCR precedat de revers-transcriere)

În general, 1 µg ARN total este suficient pentru amplificarea ARNm/ADNc care este în 1-10 copii/celulă.

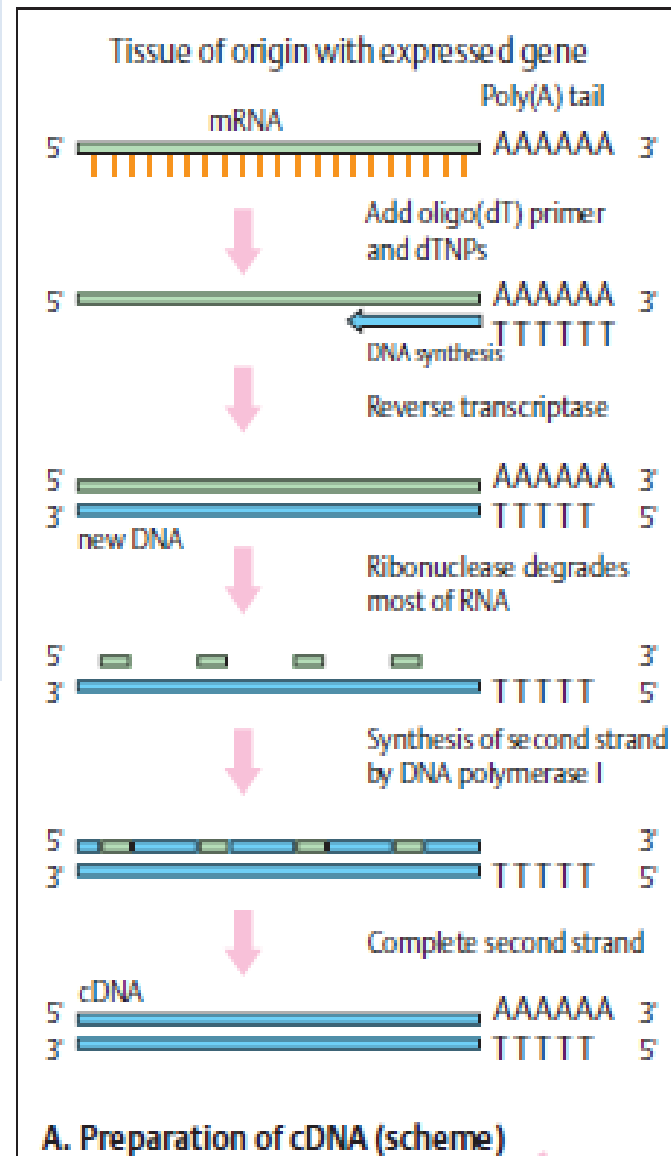
Ca primeri de reverstranscriere se pot utiliza oligo(dT) și hexameri aleatori (care asigură amplificarea nespecifică a ADNc) sau poate fi utilizat un primer antisens/revers specific, care urmează a fi utilizat în reacția PCR.

Când se analizează ARNm din organisme eucariote se recomandă ca primerii să fie derivați din exoni distincți, astfel se va evita obținerea ampliconilor nespecifici, sintetizați de pe ADN (o posibilă contaminare), iar ampliconul (produsul rezultat în urma reacției PCR) obținut va fi cel prevăzut.

Sinteza produsului poate fi urmărită în timpul PCR în timp real (Real-time PCR)

În cea mai simplă variantă de Real Time-PCR se utilizează un **colorant** (de ex. SYBR Green) care se introduce în amestecul PCR. Acest compus emite un semnal fluorescent atunci când se leagă de ADN bicatenar. Intensitatea semnalului fluorescent indică conținutul produsului sintetizat. **Dezavantajul – se** măsoară cantitatea totală de ADN dublu catenar în reacția PCR, fapt ce poate supraestima cantitatea reală de produs.

Primerii **uneori se refac singuri în diverse moduri nespecifice**, sporind cantitatea de ADN dublu catenar prezent în mediul de reacție analizat (**primeri dimerizați**).



Digital PCR vs. Real-time PCR:

https://www.youtube.com/watch?v=R92_RwoRSTk

Coronavirus Test: Real time RT-PCR:

https://www.youtube.com/watch?v=ThG_02miq-4

Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase

Pub. No. MAN0012757

Rev. Date 17 June 2016 (Rev. B.00)

Protocol for First Strand cDNA Synthesis

The following protocol is optimized to generate first-strand cDNA for use in two-step RT-PCR.

Mix and briefly centrifuge all components after thawing, keep on ice.

1. Add into sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	total RNA	0.1 ng-5 µg
	or poly(A) RNA	10 pg-500 ng
	or specific RNA	0.01 pg-0.5 µg
Primer	Oligo(dT) ₁₈ (#SO131)	0.5 µg (100 pmol)
	or Random hexamer (#SO142)	0.2 µg (100 pmol)
	or gene-specific primer	15-20 pmol
DEPC-treated water (#R0601)		to 12.5 µL

2. **Optional:** If RNA template is GC rich or is known to contain secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65 °C for 5 min, chill on ice, briefly centrifuge and place on ice.

3. Add the following components in the indicated order:

5X Reaction Buffer	4 µL
Thermo Scientific™ RiboLock RNase Inhibitor (#EO0381)	0.5 µL (20 U)
dNTP Mix, 10 mM each (#R0191)	2 µL (1 mM final concentration)
RevertAid Reverse Transcriptase	1 µL (200 U)
Total volume	20 µL

Mix gently and centrifuge briefly.

4. If oligo(dT)₁₈ primer or gene-specific primer is used, incubate 60 min at 42 °C.
If random hexamer primer is used, incubate 10 min at 25 °C followed by 60 min at 42 °C.
For transcription of GC rich RNA reaction temperature can be increased to 45 °C.
5. Terminate the reaction by heating at 70 °C for 10 min. Do not heat-inactivate enzyme prior to analysis of long cDNA to avoid cleavage.

Note

- The reverse transcription reaction product can be directly used in PCR or stored at -20 °C.
- Use 2 µL of the reaction mix to perform PCR in 50 µL volume.

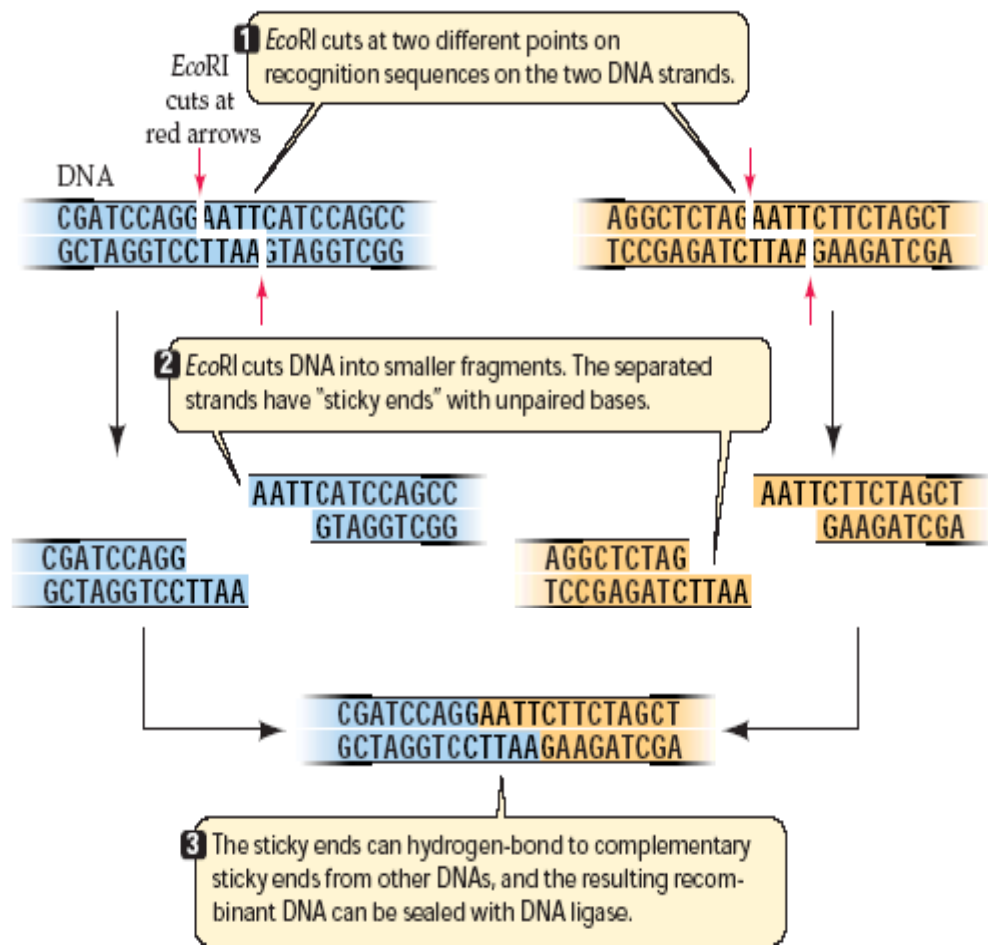
3.4 CLONAREA GENELOR. VECTORI DE CLONARE

Clonarea ADN *in vivo* (descoperită la începutul anilor 1970) – constă în izolarea unui fragment de ADN, introducerea lui prin ligare într-un vector și multiplicarea lui într-o celulă gazdă.

Vectorii de clonare - molecule de ADN care se replică independent de cromozomul celular, chiar și atunci când în structura lor sunt introduse artificial fragmente de ADN străin. Colecția de fragmente de ADN formată constituie o **bibliotecă de gene**.

Clonarea este posibilă datorită:

- 1- **ER** care clivează specific ADN și
- 2- **ADN-ligazelor, care leagă fragmentele de restricție obținute din diferite surse de ADN, formând astfel fragmente recombinante (ADNr)**



Comparație PCR *versus* vectori de clonare în obținerea copiilor de ADN

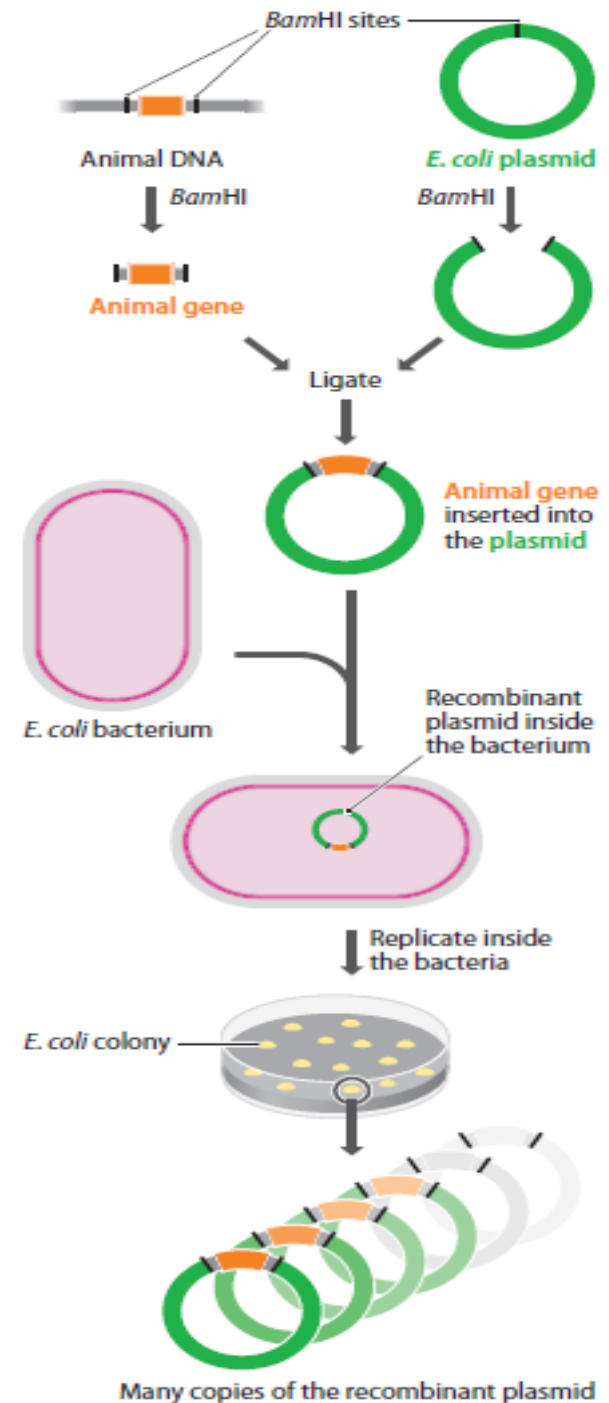
Pentru obținerea bibliotecelor de gene prin tehnica de clonare care implică vectorii de clonare, sunt necesare mai multe zile, comparativ cu amplificarea *in vitro* PCR.

Tehnica PCR permite amplificarea de miliarde de ori a unui fragment de ADN dintr-o anumită regiune a genomului doar în câteva ore.

Biblioteci de ADN

Biblioteca genomică - colecția de clone ce include cel puțin o copie a fiecărei secvențe de ADN din genomul care a fost fragmentat cu ER. O bibliotecă genomică este utilă pentru a identifica și izola o genă de interes prin **screening** cu sonde specifice.

Biblioteci cromozomiale - sunt obținute biblioteci de ADN pentru fiecare cromozom separat. Dacă o genă este localizată pe un cromozom cunoscut cu metode genetice, cercetarea va fi limitată la secvențele din biblioteca de gene a cromozomului analizat. Izolarea cromozomilor este posibilă datorită dimensiunii și morfologiei diferite ale cromozomilor, fapt ce permite separarea cu ajutorul citometriei în flux.

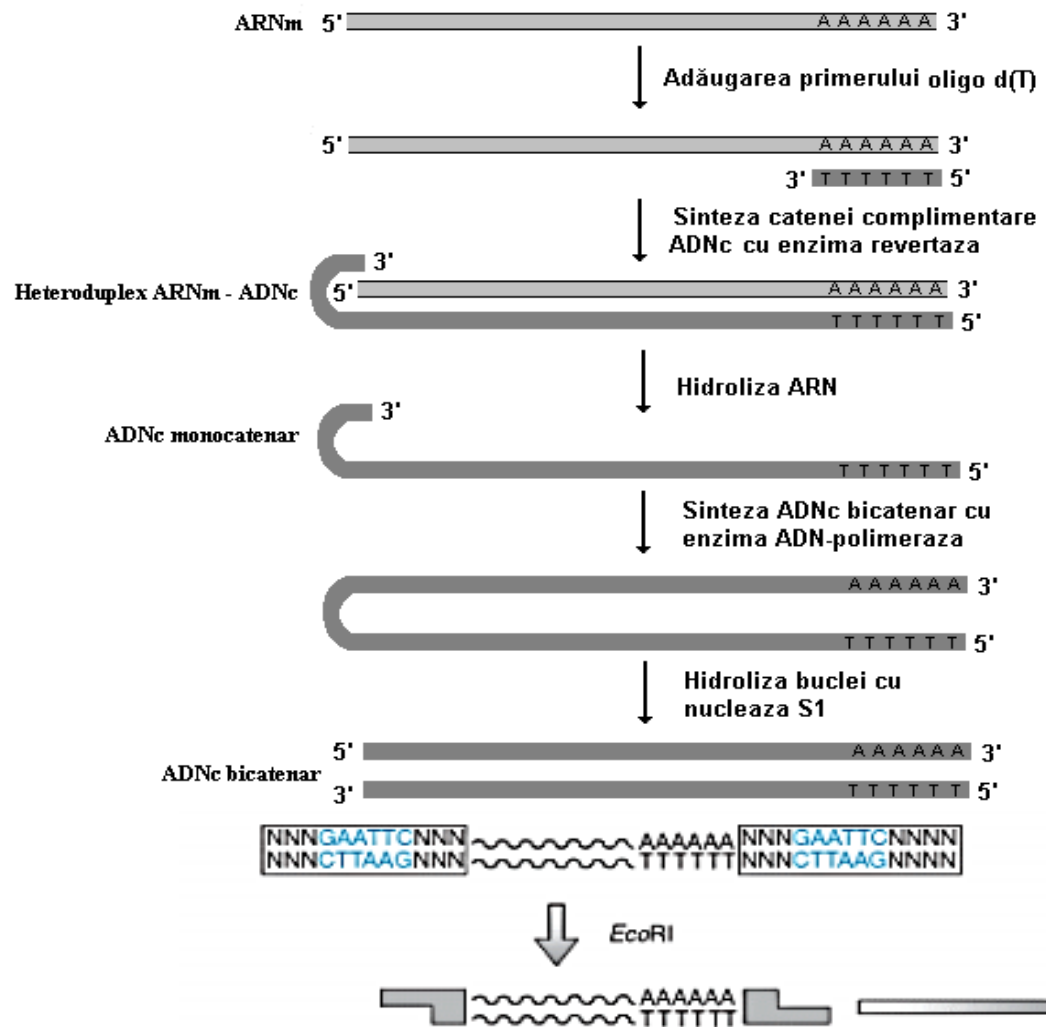


Biblioteci de ADNc - colecție de clone de ADNc. ADNc, fiind sintetizat pe matrița moleculelor de ARNm, corespunde genelor active transcripțional. ADNc se deosebește de ADN genomic prin lipsa intronilor și este identic cu secvența exonilor.

Spre deosebire de fragmentele de ADN obținute prin digestie cu ER, moleculele de ADNc nu au capete coezive. Din această cauză, pentru a fi introduse în vector, moleculelor de ADNc li se adaugă secvențe adaptor care conțin capete coezive.

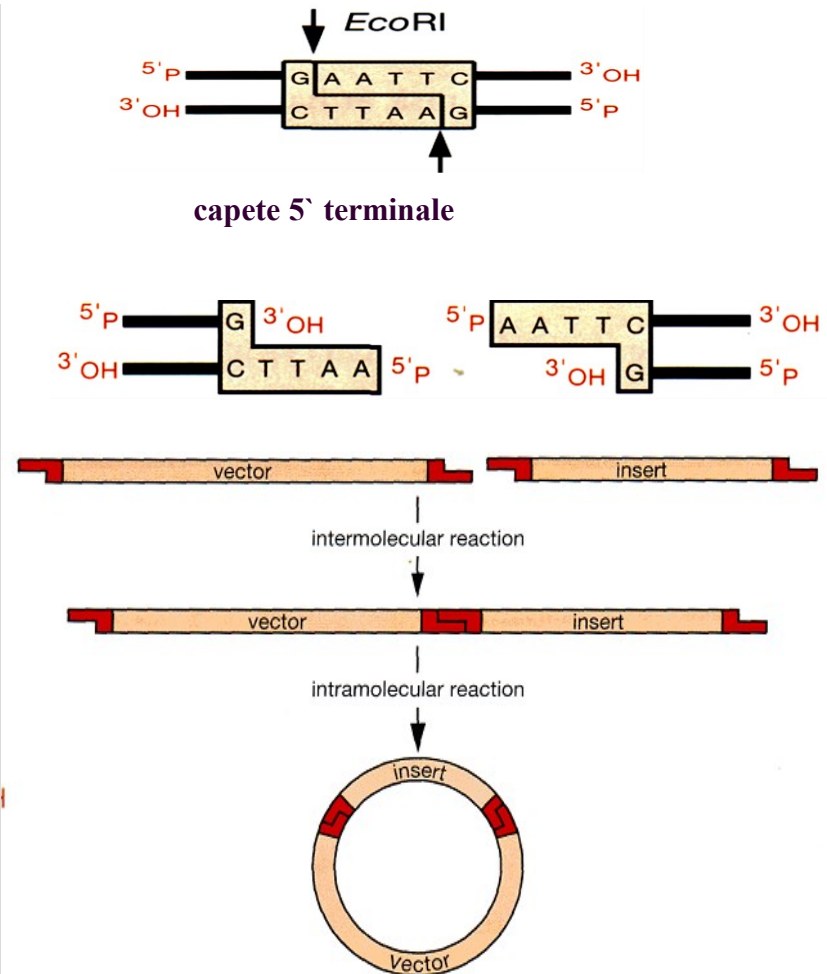
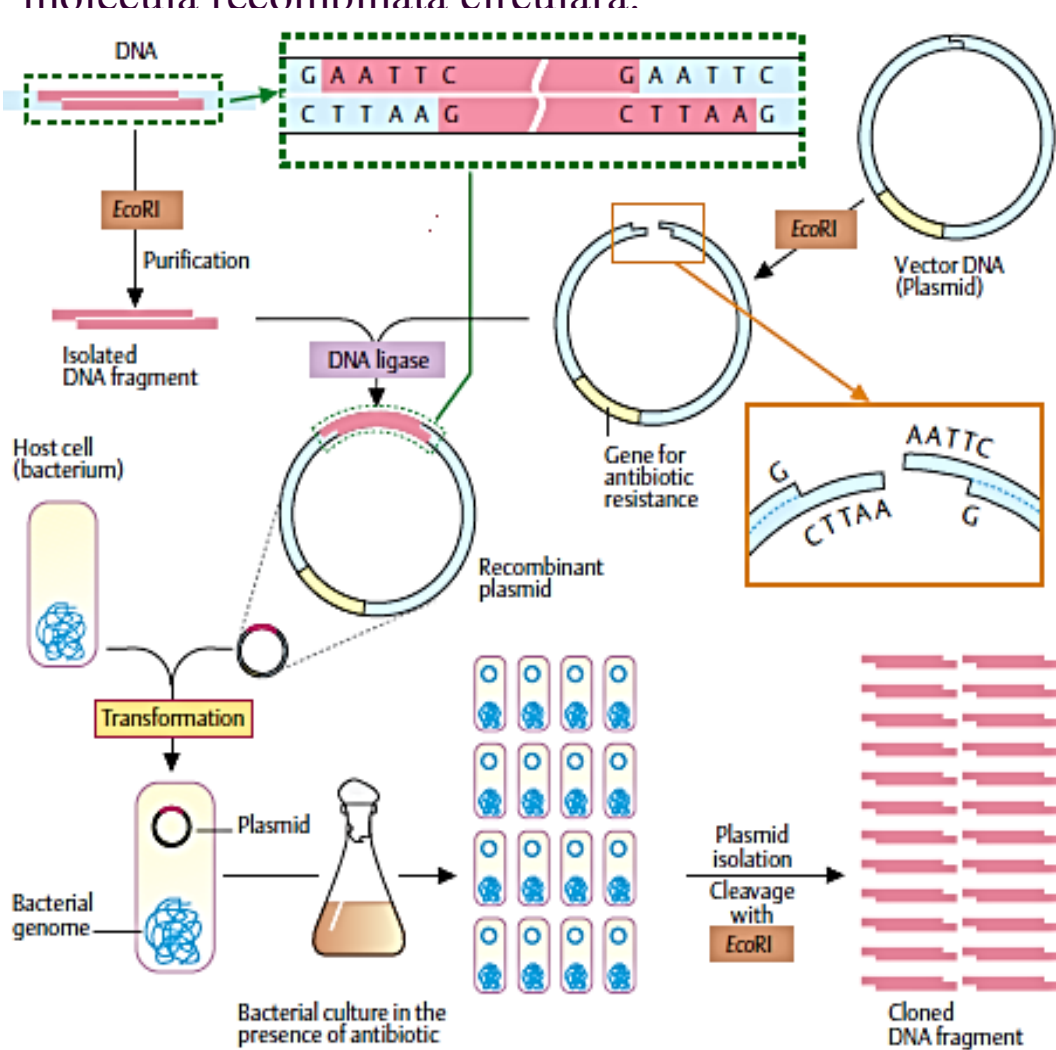
Obținerea bibliotecii de ADNc:

- (1) izolarea și purificarea ARN total sau ARNm;
- (2) Reacția de Revers transcriere; Reverstranscriptaza formează o buclă la capătul 3' al catenei de ADNc;
- (3) hidroliza ARNm;
- (5) sinteza catenei a doua de ADNc, bucla servește în calitate de primer pentru ADN-polimerază;
- (6) înlăturarea buclei cu ajutorul nucleazei S1.
- (7) ligarea la capete a unor fragmente cu secvențe recunoscute de ER (adaptorilor), care prin digestie va rezulta în capete coezive
- (8) introducerea fragmentelor de ADNc în vectori



Insertia fragmentelor de ADN în vectori de clonare

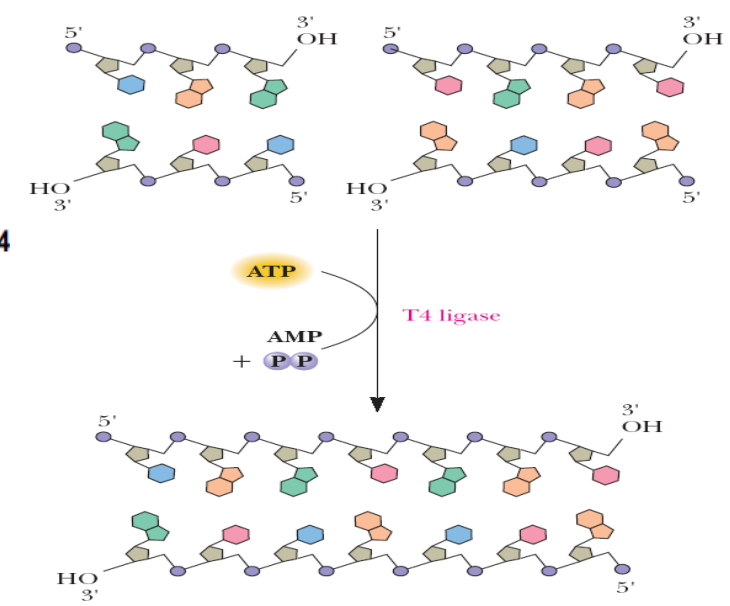
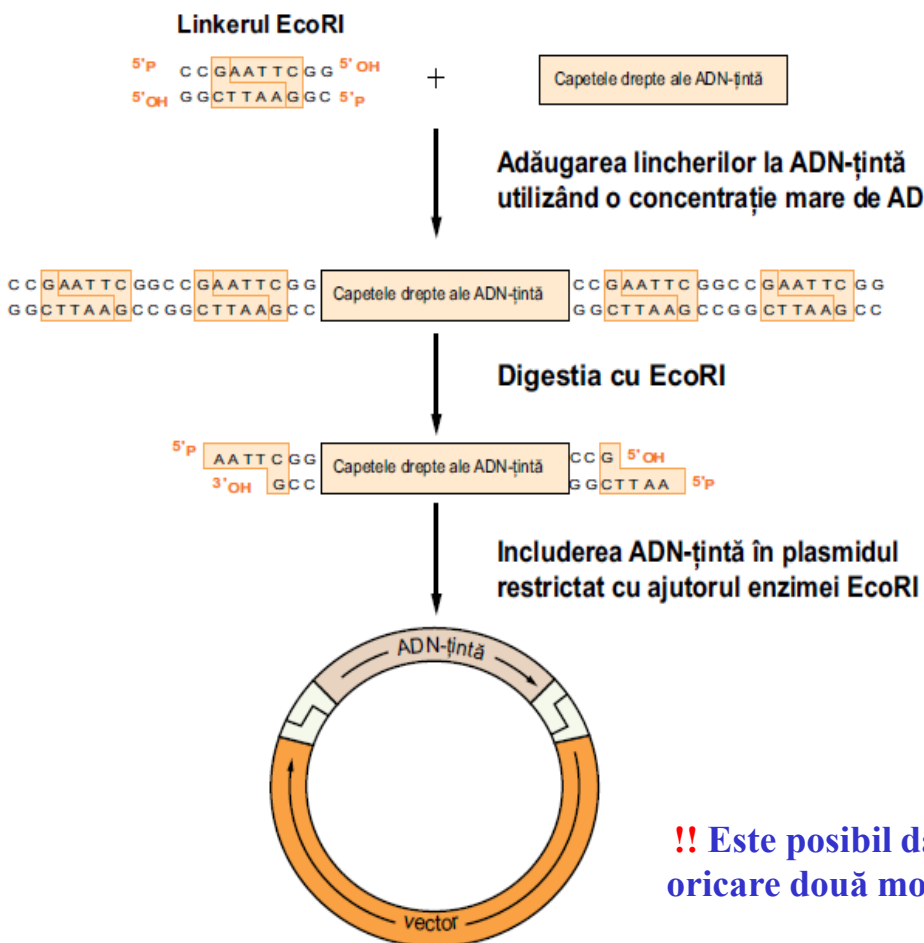
Obținerea unui plasmid recombinant circular capabil de transformare a bacteriei *Escherichia coli* (*E.coli*) are loc printr-o reacție *intermoleculară* între plasmida liniarizată și fragmentele de ADN cu capete coezive complementare vectorului, rezultând un hibrid molecular și o a doua reacție *intramoleculară*, prin care capetele coezive ale hibridului liniar se leagă formând o moleculă recombinată circulară.



Clonarea prin adăugarea unei secvențe linker/adaptor la ADN-ul „de interes” cu capete drepte

Atunci când sunt utilizate anumite ER care generează capete truncate, sau când este necesar de clonat ADNc, la ADN-ul cu capete drepte sunt atașate secvențe **adaptor/linker** care pot fi și secvențe **homopolimere poli A/poli C**. In același fel se modifică și ADN-ul vectorului, însă prin atașarea unei secvențe de nucleotide complementare poliT/poliG.

Secvențele linker - secvențe de sinteză, de 8-16 nucleotide, auto-complementare, care conțin situsuri de recunoaștere pentru ER care vor fi utilizate în clonare.



https://www.youtube.com/watch?v=xMBC3q_CbTA

DNA Ligase: How DNA Ligase works?

<https://www.youtube.com/watch?v=cFhouvr3rqs>

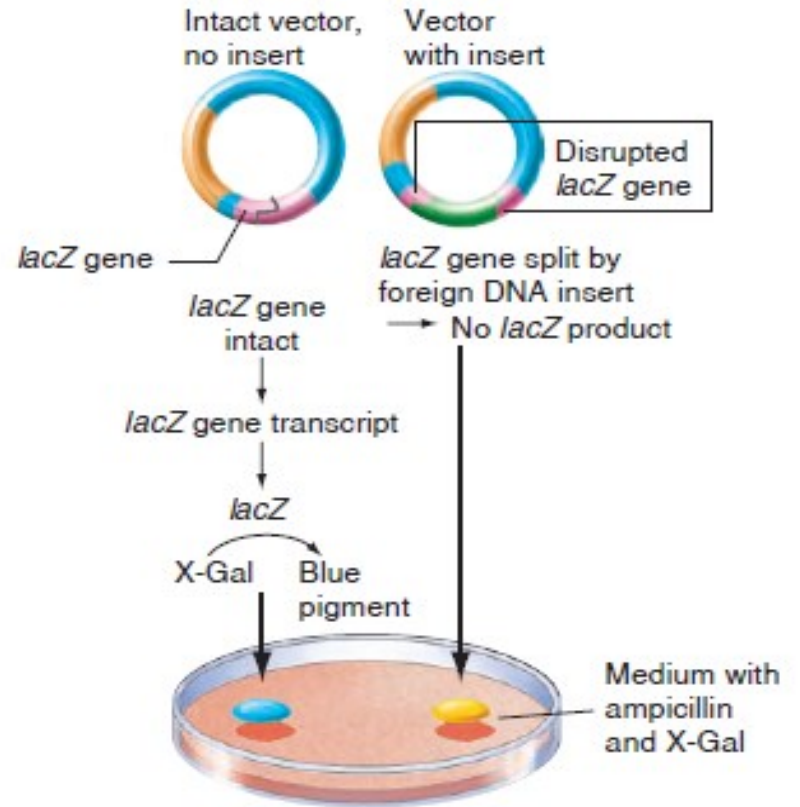
!! Este posibil datorită proprietății ADN ligazei T4 fagică de a lega covalent oricare două molecule străine de ADN chiar și fără capete coezive.

Clonarea prin utilizarea ER care generează capete coezive prezintă și un **!!dezavantaj** – pot hibridiza capetele coezive ale vectorului între ele, fără a forma o moleculă himeră.

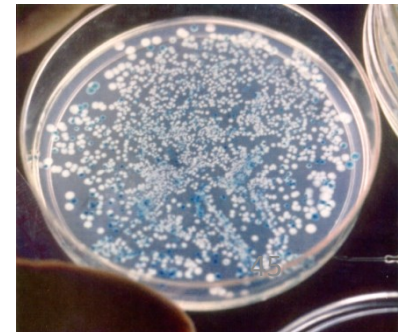
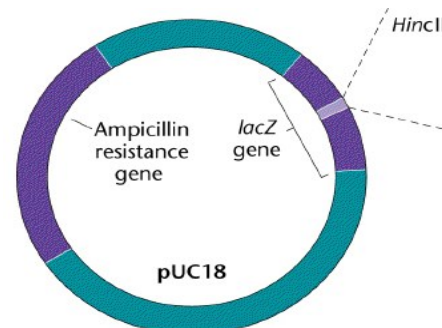
Soluție - Se elimină prin aplicare unor factori de selecție a vectorilor recombinanți

Unele tulpini de *E. coli* conțin în cromozomul lor o genă **lacZ** (codifică enzima β -galactozidază) **modificată** (nu au segmentul lacZ' care codifică regiunea α -peptidică a β -galactozidazei). Aceste forme mutante pot sintetiza enzima doar atunci când conțin o plasmidă cu segmentul lacZ' lipsă a genei, de ex. plasmida **pUC8**.

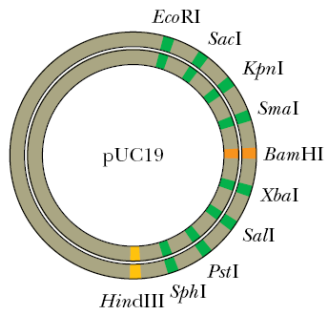
Prezența moleculelor funcționale de β -galactozidază este verificată prin testul histochimic cu X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -d-galactopiranozid) care se adaugă la agar, împreună cu ampicilina. Coloniile nerecombinante, ale căror celule sintetizează β -galactozidaza, vor fi colorate în albastru. Coloniile cu gena lacZ' perturbată nu vor sintetiza β -galactozidază, reacția chimică nu se va produce și astfel acestea vor fi albe. (Test de **selecție Lac**).



- Culoarea albastră este determinată de produsele scindării substratului Xgal de către enzima β -galactozidaza.
- coloniile albe _____????
- coloniile albastre _____???



Tipuri de vectori



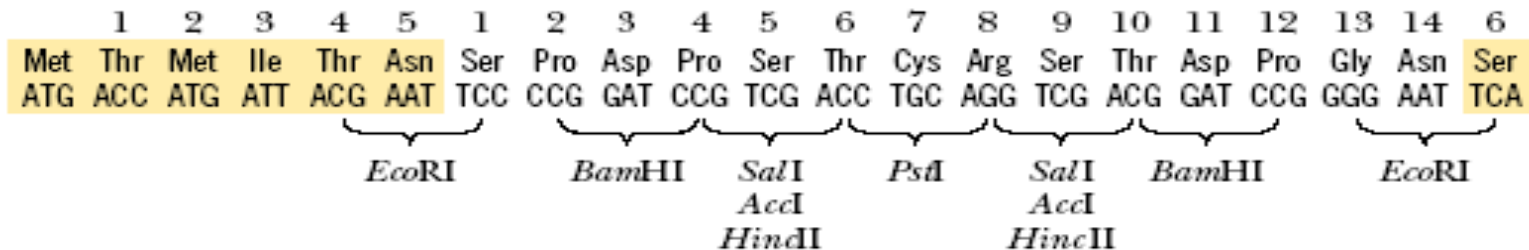
În calitate de vectori cel mai des se utilizează:

- plasmide
- derivați ai bacteriofagilor,
- cosmide,
- cromozomi artificiali de drojdie etc.

Varietatea de vectori este determinată de dimensiunea fragmentelor de ADN care pot fi inserate.

Vectorii utilizați în tehnologia ADN recombinant trebuie să corespundă următoarelor cerințe:

- să fie izolat și purificat cu ușurință,
- să poată fi introdus într-o celulă gazdă,
- să posedă o origine a replicării (*ori*) și astfel să se poată multiplica în celula-gazdă,
- să posedă un marker genetic stabil, care să permită identificarea și izolarea celulelor care conțin vectori,
- să conțină mai multe situsuri de restricție pentru o gamă variată de enzime asociate într-un polilinker (situsuri multiple pentru restrictaze) pentru inserția fragmentelor ADN.



!! Regiunea polilinker este creată astfel, încât să nu se rezume doar la situsuri multiple de clonare dar să reprezinte și o secvență continuă de codoni pentru a codifica o proteină

Siturile de inserție a ADN-lui pot fi în cadrul genelor care codifică marcheri - inactivarea

genei respective oferind o posibilitate de selecție.

ex. plasmid cu genele rezistenței la ampicilină și tetraciclină.

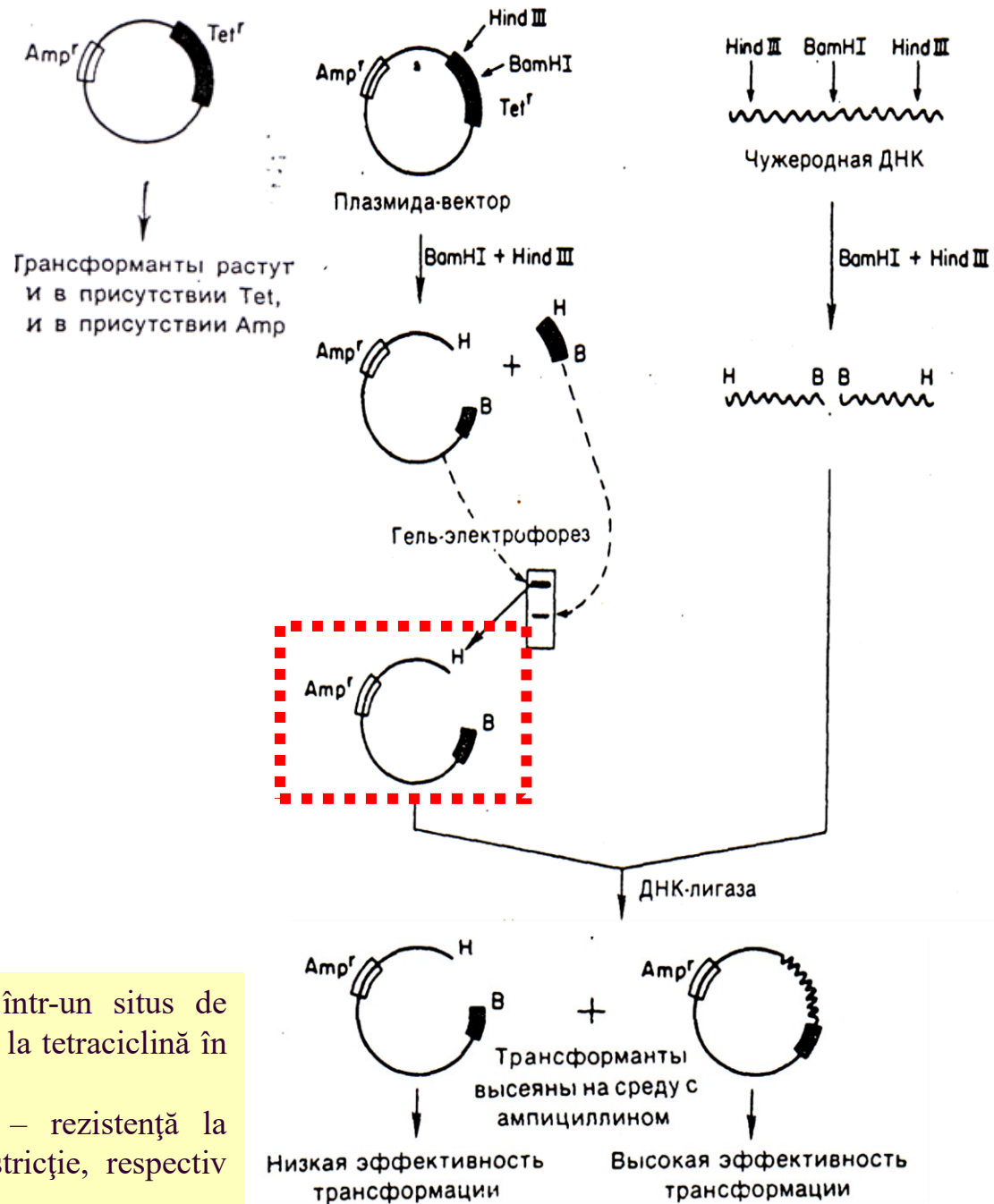
1. clivarea ADN-plasmidial cu *HindIII* și *BamHI* în situsurile corespunzătoare aflate la nivelul genei rezistenței la tetraciclină

2. izolarea fragmentului mare al ADN-lui plasmidic prin electroforeză.

3. este incubat cu ADN exogen restricționat tot cu aceste enzime, care în prezența unei ligaze se combină cu fragmentul ADN „de interes” datorită extremităților coezive.

4. transformarea bacteriei *E. coli*

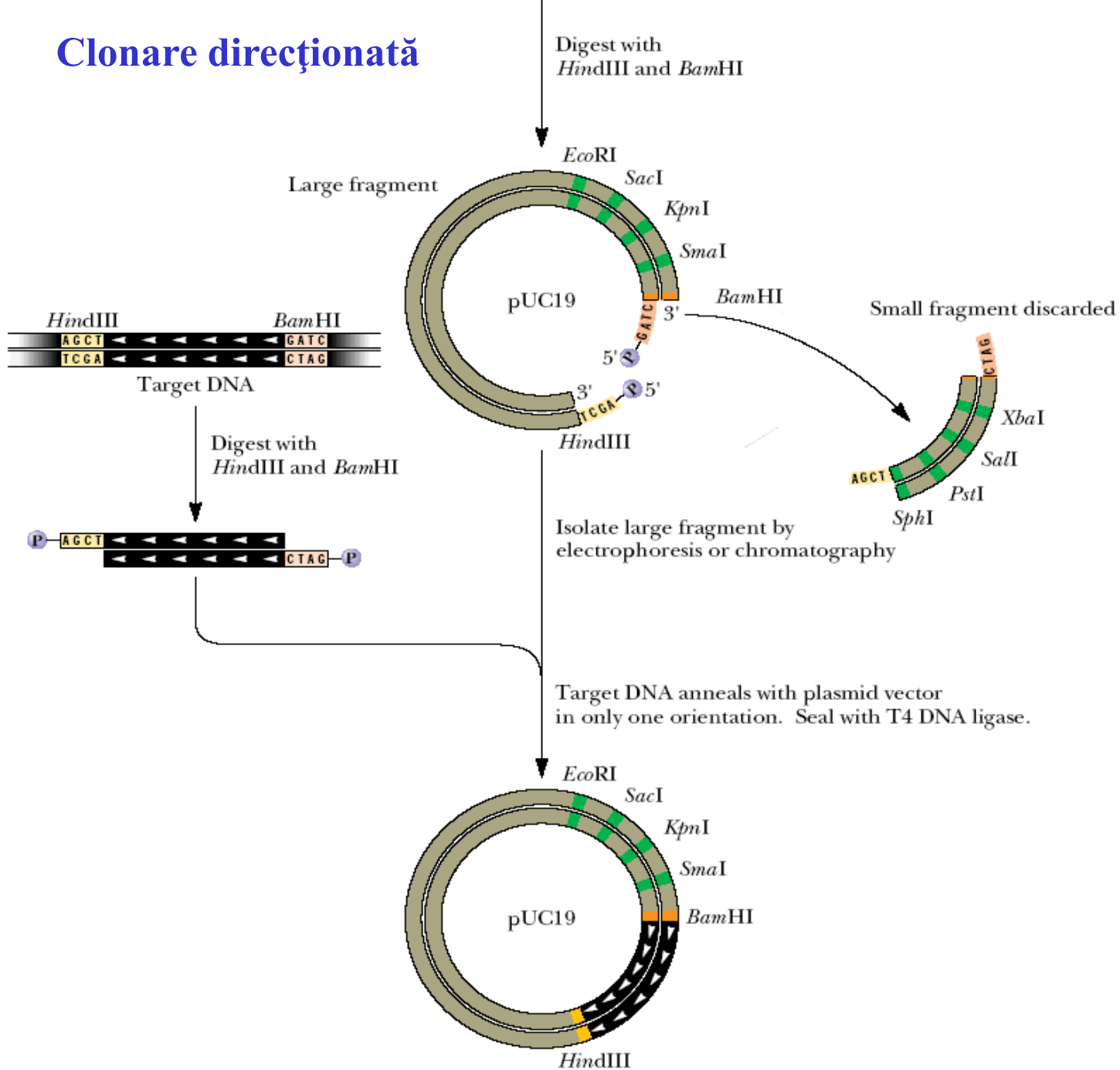
5. selecție pe mediu suplimentat cu ampicilină



Prezentare schematică a clonării fragmentelor într-un situs de inserare la nivelul genei care determină rezistența la tetraciclină în plasmida-vector (Маниатис și al., 1984)

Notății: **Amp^r-rezistență** la ampicilină; **Tetr** – rezistență la tetraciclină; *HindIII* și *BamHI* – enzime de restricție, respectiv fiind notate și fragmentele clivate.

Clonare direcționată



PLASMIDE (unități genetice extracromozomale)

❑ **Molec. ADN dublu catenare**, circulare, capabile de replicare independentă - se întâlnesc practic la toate speciile de bacterii.

❑ **Macromolecula de ADN** are dimensiuni de 100-200 kb – 1-3% din cantitatea totală a mater. genetic al bacteriei

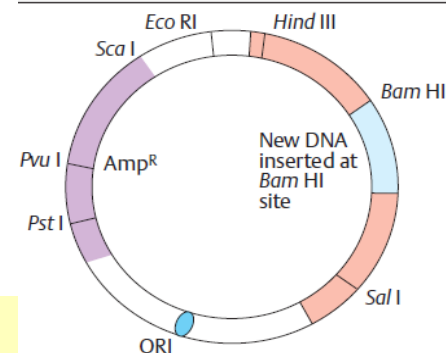
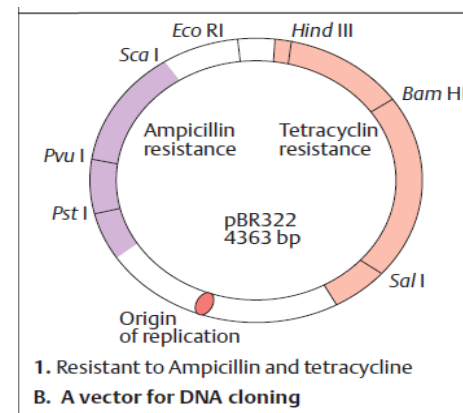
❑ **Prezența lor** nu este obligatorie

❑ **Plasmidele sunt dependente** de celula gazdă cu excepția autoreplicării și a controlului nr. de copii/cel. Plasmid mare – nr. de copii/celulă mic

❑ **Regiune ori** – inițierea replicării

❑ **Secvențe de inserție**

❑ **gene de reglare** și structurale (caracteristici fenotipice- rezistență la antibiotice, metale grele. Sinteza de antibiotice, toxine, enzime de rest.etc.)



Cei mai simpli vectori de clonare sunt proiectați în baza plasmidelor *E. coli*

Unul dintre cei mai populari vectori plasmidici este **pUC8 (anii 1980.)** derivat din **pBR322**, proiectat prin ligarea unor fragmente de restricție din trei plasmide *E. coli* care apar în mod natural: **R1, R6.5 și pMB1**.

pUC8 - este mică, 2,7 kb. are două gene:

- **O genă pentru rezistența la ampicilină** (β -lactamază, permite celulei să reziste la efectul inhibitor al ampicilinei).
- Gena **lacZ'**, care codifică o regiune a enzimei β -galactozidază, implicată în descompunerea lactozei în glucoză și galactoză.

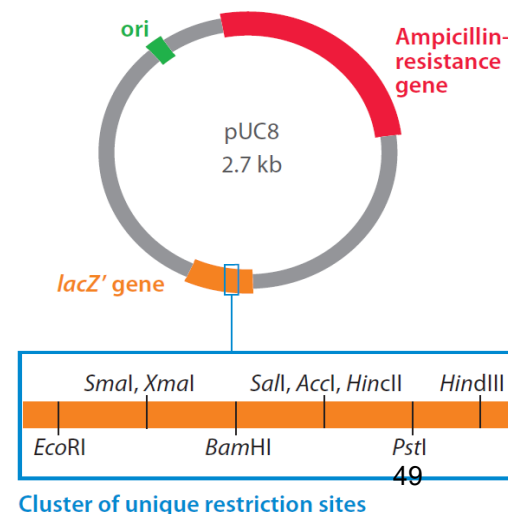


Table 5.3. | Some commercially available plasmid vectors

Vector	Features	Applications	Supplier
pBR322	Ap ^r Tc ^r Single cloning sites	General cloning and subcloning in <i>E. coli</i>	Various
pAT153	Ap ^r Tc ^r Single cloning sites	General cloning and subcloning in <i>E. coli</i>	Various
pGEM [®] -3Z	Ap ^r MCS SP6/T7 promoters <i>lacZ</i> α -peptide	General cloning and <i>in vitro</i> transcription in <i>E. coli</i> and single-stranded DNA production	Promega
pCI [®]	Ap ^r MCS T7 promoter CMV enhancer/promoter	Expression of genes in mammalian cells	Promega
pET-3	Ap ^r MCS T7 promoter	Expression of genes in bacterial cells	Stratagene
pCMV- Script [®]	Neo ^r Large MCS CMV enhancer/promoter	High level expression of genes in mammalian cells and cloning of PCR products	Stratagene

Note: There are hundreds of variants available from many different suppliers. A good source of information is the supplier's catalogue or website. Ap^r, ampicillin resistance; Tc^r, tetracycline resistance; Neo^r, neomycin resistance (selection using kanamycin in bacteria, G418 in mammalian cells); MCS, multiple cloning site; SP6/T7 are promoters for *in vitro* transcription; *lacZ*, β -galactosidase gene; CMV, human cytomegalovirus. The terms marked ® are registered trademarks of the suppliers.

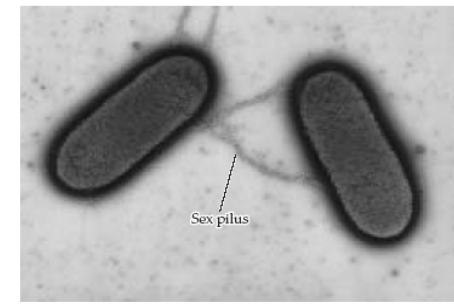
În laborator - plasmidele sunt transferate în bacterii prin transformare, include incubarea plasmidelor cu bacterii competente (permiabilitate tranzitorie pentru ADN-ul exogen).

Bacterii competente- permiabilitate pentru ADN exogen - incubare timp de 1 oră la 0°C în prezența 50 mM CaCl₂.

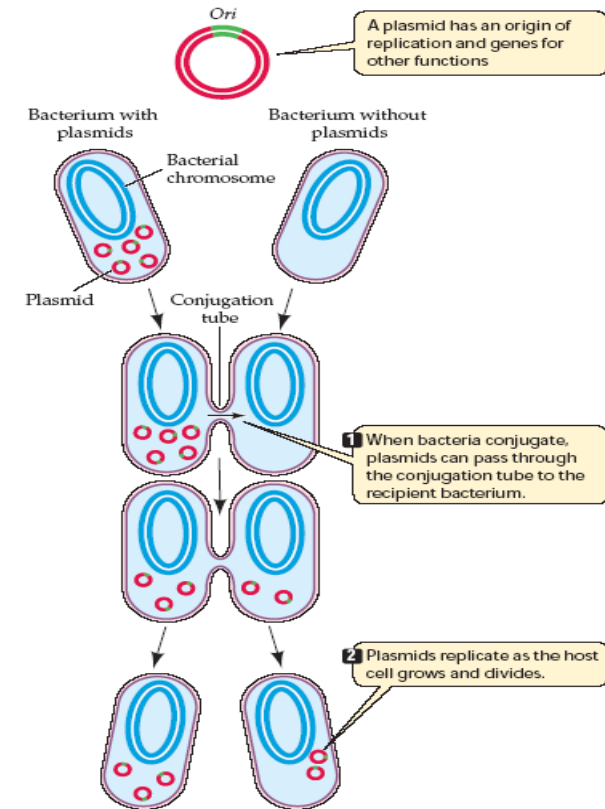
Plasmidele recombinante se incubează cu bacterii timp de 30 min la 0°C urmat de un șoc termic la la 37-42°C timp de 30-60 min.

Pentru ca plasmida să fie utilizată în calitate de vector trebuie:

- ✓ să fie de dimensiuni mici,
- ✓ replicarea să se afle sub un control redus din partea cromozomului bacterian,
- ✓ să conțină situsuri unice pentru una sau mai multe enzime de restricție, **aflate în regiuni neesențiale pentru replicare.**



13.8 Bacterial Conjugation Sex pili draw two bacteria into close contact, and a cytoplasmic conjugation tube forms. DNA is transferred from one cell to the other via the conjugation tube.



13.11 Gene Transfer by Plasmids When plasmids enter a cell via conjugation, their genes can be expressed in the new cell.



Exercițiu

Când este efectuată o experiență de transformare în laborator:

- se adăugă ADN recombinant la eprubeta cu *E. coli* competente;
- se incubează la rece pe gheață pentru a permite ADN să adere la celule;
- șoc termic, se transferă pe medii de cultură.

Enumără toate variantele control care sunt necesare pentru analiza rezultatelor la sfârșitul experienței.

Dacă nici o celulă/colonii nu vor crește în probele Dvs? Cum veți înțelege care etapă din experiență a fost greșită?

!! Vectorii de clonare derivați din plasmidele bacteriene (2,5-10 kb) nu tolerează secvențe de ADN mai mari de 6-8 kb, viteza lor de multiplicare și eficiența lor de transformare scade pe măsură ce dimensiunile inserțiilor cresc.

Inserțiile mai mari sunt predispuse la rearanjări sau să interfereze cu sistemul de replicare al plasmidelor.

Pentru clonarea fragmentelor de ADN mai mari de 10 kb au fost construiți vectori derivați din fagul λ .

Bacteriophagul λ - fag lizogen cu genomul sub forma unei molecule de ADN dublu catenar, liniar, de aproximativ 48,500 pb, include cel puțin 30 de gene

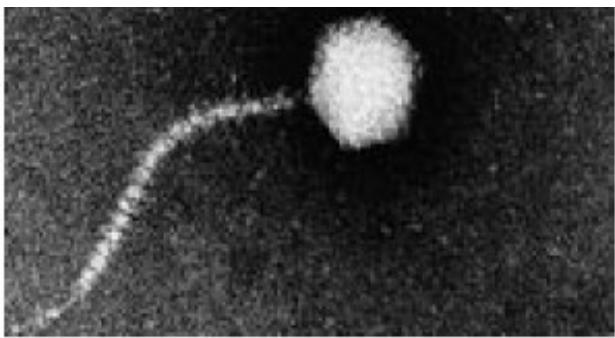


FIGURE 13.8 • Electron micrograph of bacteriophage λ . (Robley C. Williams, University of

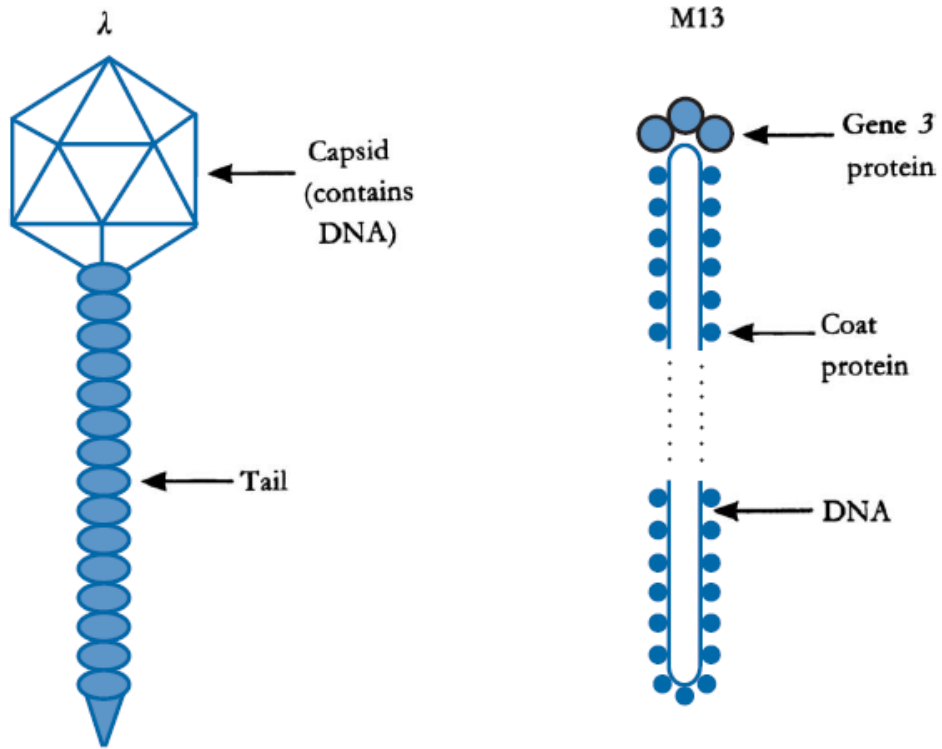
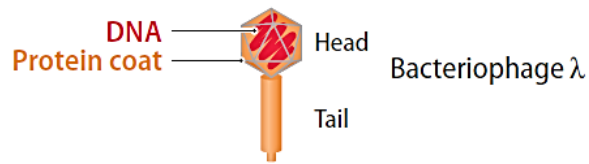


Fig. 5.3 Structure of bacteriophages λ and M13. Phage λ has a capsid or head that encloses the double-stranded DNA genome. The tail region is required for adsorption to the host cell. M13 has a simpler structure, with the single-stranded DNA genome being enclosed in a protein coat. The gene 3 product is important in both adsorption and extrusion of the phage. M13 is not drawn to scale; in reality it is a long thin structure.

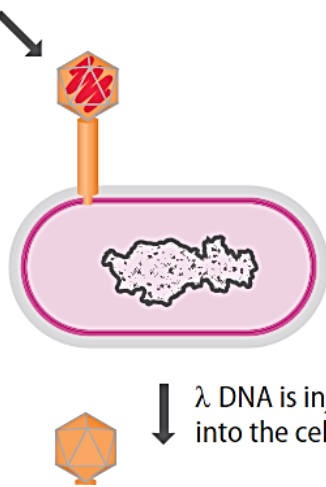
Desmond S. T. Nicholl, 2008. An Introduction to Genetic Engineering: Third Edition, Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York

Bacteriofagii - vectori de clonare

Genomurile bacteriofagilor posedă origini de replicare care le permit să fie propagate în bacterii.



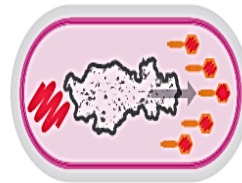
Bacteriophage λ attaches to an *E. coli* bacterium



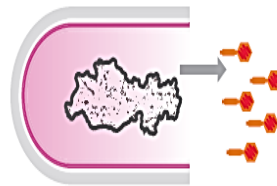
λ DNA is injected into the cell

(A) Lytic infection cycle

λ DNA directs synthesis of new phages



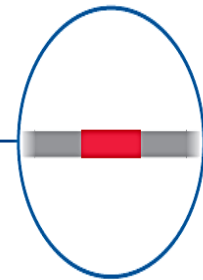
Cell lysis



New λ phages are released

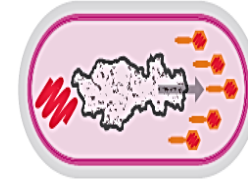
(B) Lysogenic infection cycle

Integration of λ DNA into the bacterial chromosome

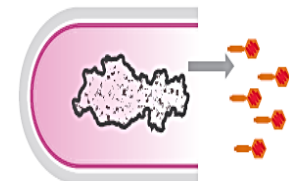


λ DNA integrated into the bacterial chromosome

Return to the lytic cycle, after many bacterial cell divisions



Cell lysis



New λ phages are released

Bacteriofagul λ , spre deosebire de alte tipuri de bacteriofagi, poate urma **ciclul litic**, sau de infecție **lizogenă**, în timpul căruia genomul λ se integrează în cromozomul bacterian, unde poate rămâne în repaus pentru multe generații, fiind reprodus împreună cu cromozomul gazdă de fiecare dată când celula se divide.

Lytic v. Lysogenic Cycles of Bacteriophages: <https://www.youtube.com/watch?v=hFwA0aBX5bE>

DNA Isolation From Phage Lysate: <https://www.youtube.com/watch?v=3PJThX63Xjw>

Construcția vectorilor derivați de la fagul λ s-a bazat pe o serie de particularități

□ Genomul fagului λ (48,5 kb) include o regiune de cca 15 kb (gene necesare pentru integrarea ADN-ului fagului în cromozomul *E. coli*.) a cărei deleții nu afectează capacitatea fagului de a infecta bacteriile și a sintetiza fagi noi prin ciclul litic, fapt ce a făcut posibilă eliminarea și înlocuirea acestuia cu fragmentul de ADN care trebuie clonat.

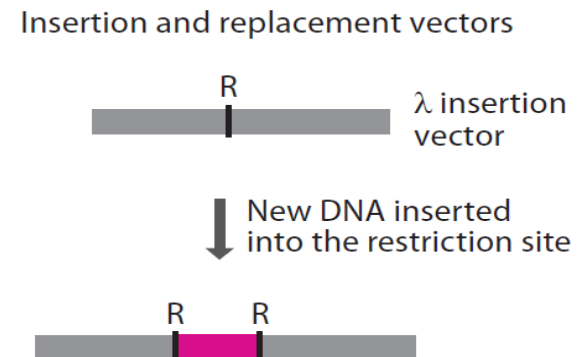
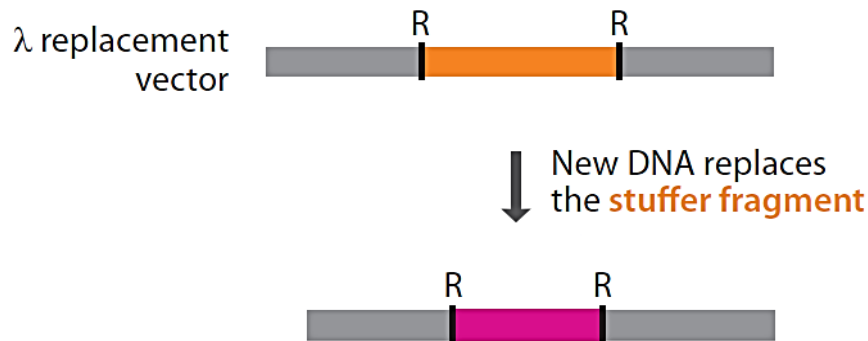
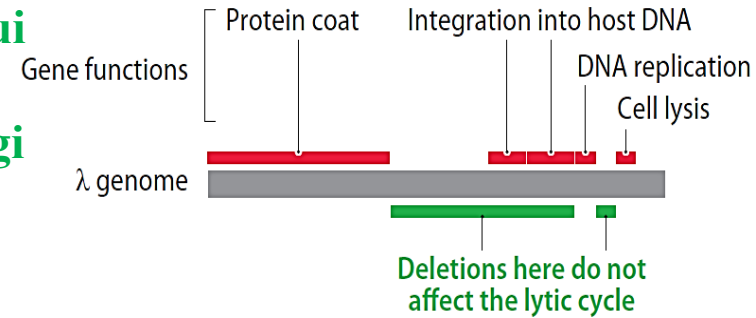
□ prezența unor situsuri de restricție pentru o serie de restrictaze importante în clonare.

De la fagul de tip sălbatic au fost construiți vectori:

-de inserție (λ *gt* și λ *ZAP*), la care ADN-ul opțional este parțial sau total eliminat, a fost introdus un situs de restricție unic,

-de înlocuire - două situsuri de restricție ce flanchează fragmentul central care este înlocuit cu ADN străin,

• Vectorii din noua generație posedă situsuri de clonare multiple care flanchează fragmentul central ce poate fi înlocuit: *EMBL*, λ *DASH*, λ *Charon 34, 35* etc.

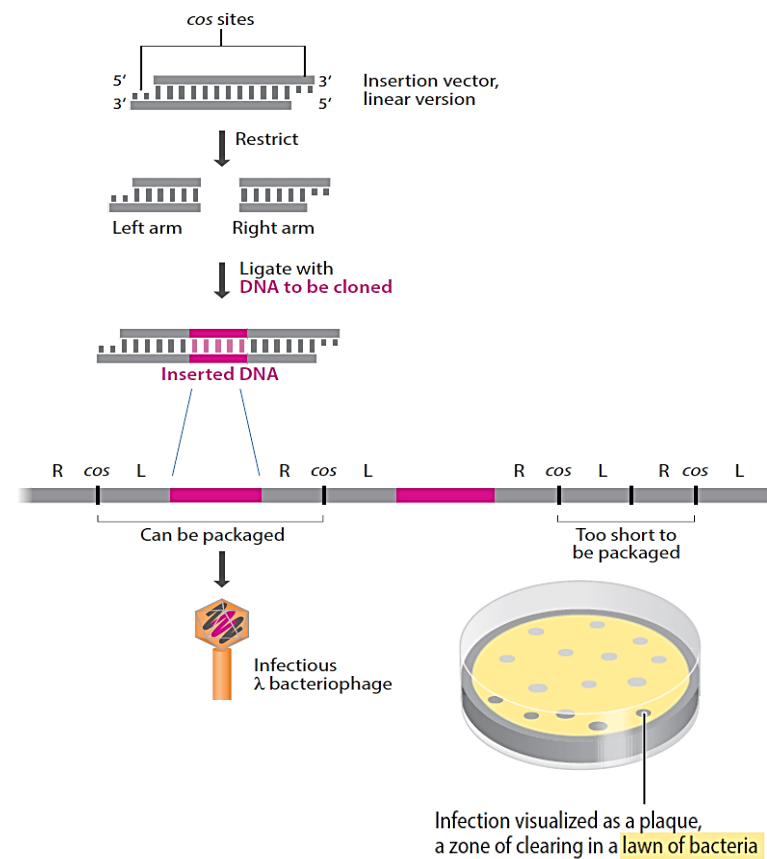


Genomul fagului λ – moleculele de ADN dublucatenar, liniar, se circularizează prin intermediul extremităților coezive monocatenare de 12 nucleotide (**situsuri cos**), înainte de integrare în situsuri specifice în cromozomul bacterian (printr-un crossingover) rezultând un profag linear, inert genetic, până când, în anumite condiții, se separă și inițiază ciclul litic. **Astfel, un vector de clonare λ** poate fi obținut ca o moleculă circulară ce poate fi reintrodusă în E. coli prin transinfecție.

Se obțin concatemi (copii de ADN fagic) care conțin fragmente (37-52 kb) inserate între brațul stâng și drept al fagului, la care se adăugă *in vitro* enzime de asamblare în particule de fag λ .

Fagii sunt incubați cu celule E. coli și prin transinfecție vectorul este inclus în bacterii.

<https://www.youtube.com/watch?v=oqYKPF7hnHs>

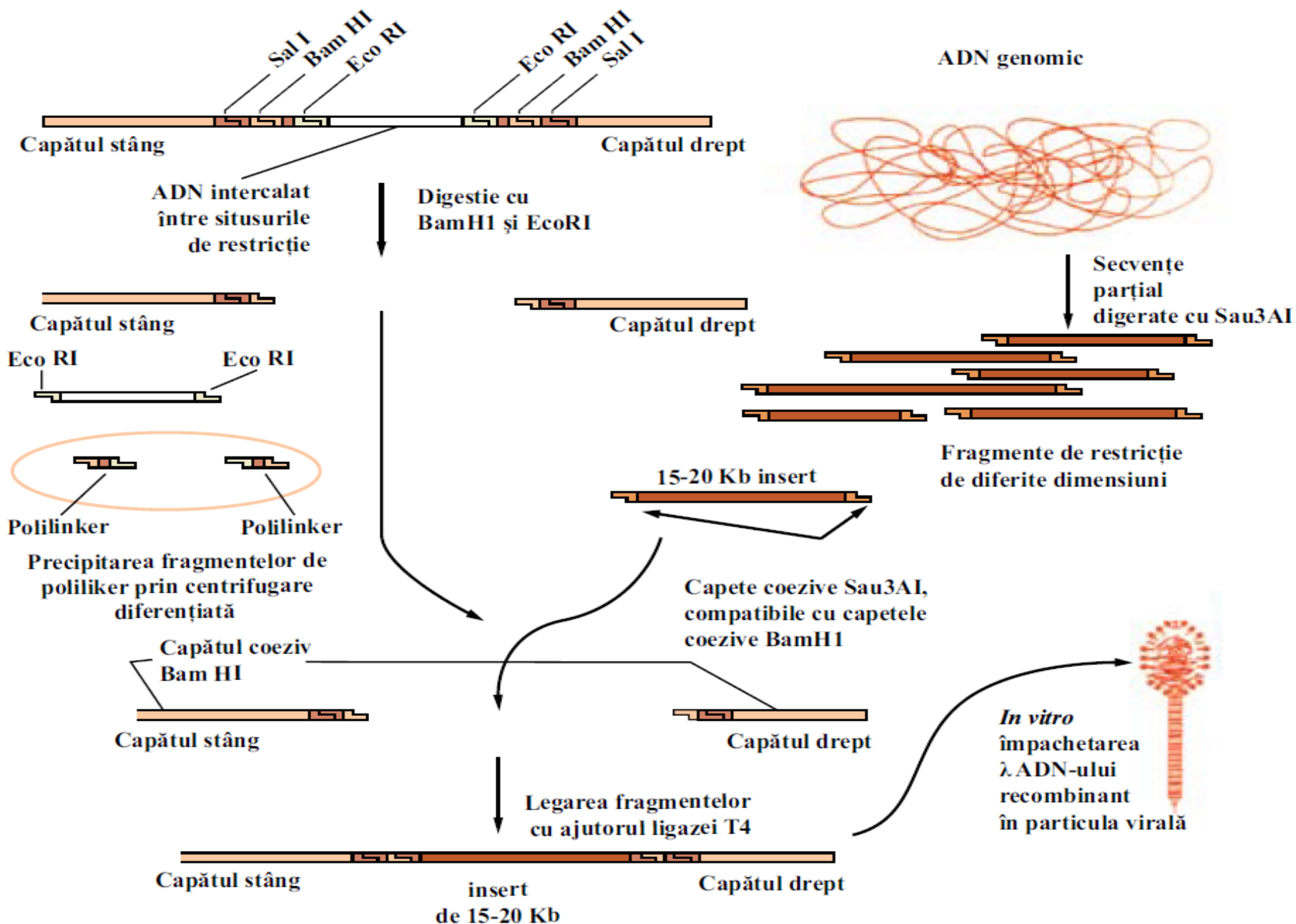


După infecție, bacteriile sunt multiplicare pe o placă de agar. Obiectivul este de a obține placi pure, vizibile, din fagi recombinanți.

Nu necesită marcheri de selecție

Ligarea celor două brațe, fără inserarea de ADN străin, rezultă o moleculă prea scurtă, mai mică decât 45 kb, care nu poate fi asamblată în particule de către enzimele ce recunosc situsurile cos.

Cu alți vectori, este necesar să se distingă plăcile recombinante de cele nerecombinante, prin sistemul β -galactozidază (vectorii λ conțin un fragment al genei lacZ în care este inserat ADN-ul de clonat) sau pot fi utilizate alte metode.



Prezentare schematică a clonării genelor „de interes” în vectorul fagic λ *EMBL3A* cu secvențe polilinker (Sambrook și Russell, 2001)...în *Aspecte metodologice în testarea plantelor modificate genetic*, 2008

Vectori pentru fragmente mai lungi de ADN

Prin intermediul fagului λ pot fi clonați până la 18 kb de ADN de interes – acestea sunt fragmente mici pentru scopuri de secvențiere a unui genom bacterian sau eucariot intact.

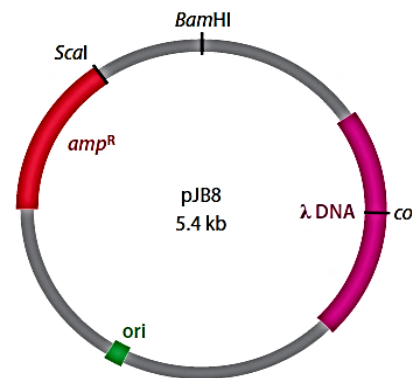
❖ Dacă un vector λ este utilizat pentru clonarea ADN uman, atunci sunt necesare peste jumătate de milion de clone pentru a exista o șansă de 95% ca o anumită parte a genomului să fie prezentă în bibliotecă.

!!! Pentru clonarea unor fragmente de ADN cu dimensiuni între **32 și 47 kb** au fost proiectați vectori **cosmide** – hibrizi derivați din fagul λ (situsurile *cos*) și plasmide (originea replicării, o genă de rezistență la un antibiotic și situs unic pentru enzimă de restricție).

Pentru clonare, ADN-ul genomic este digerat parțial cu o enzimă de restricție, care generează fragmente cu extremități coezive complementare vectorului (liniarizat cu aceeași enzimă de restricție). Fragmentele de ADN, lungi de **32-47 kb**, sunt izolate și atașate la vector. Rezultă concatameri, care conțin fragmente de ADN genomic și ADN aparținând vectorului. Un extract de fag ce conține α -terminaza clivează fragmentele recombinante de ADN care sunt asamblate în particule virale și introduse prin infecție în *E. coli*, unde sunt replicate în bacterie ca plasmide rezistente la antibiotice.

Utilizarea cosmidelor reduce dimensiunea bibliotecii genomice umane la aproximativ un sfert de milion de clone, ceea ce reprezintă o îmbunătățire în comparație cu o bibliotecă din fagi λ .

Cosmidele sunt primii vectori, care au fost utilizați în analiza genomurilor complexe.



Cosmidă tipică - pJB8, 5,4 kb, gena de rezistență la ampicilină (*amp^R*), un segment de ADN λ care conține situsul *cos* și o origine de replicare a *E. coli* (*ori*).

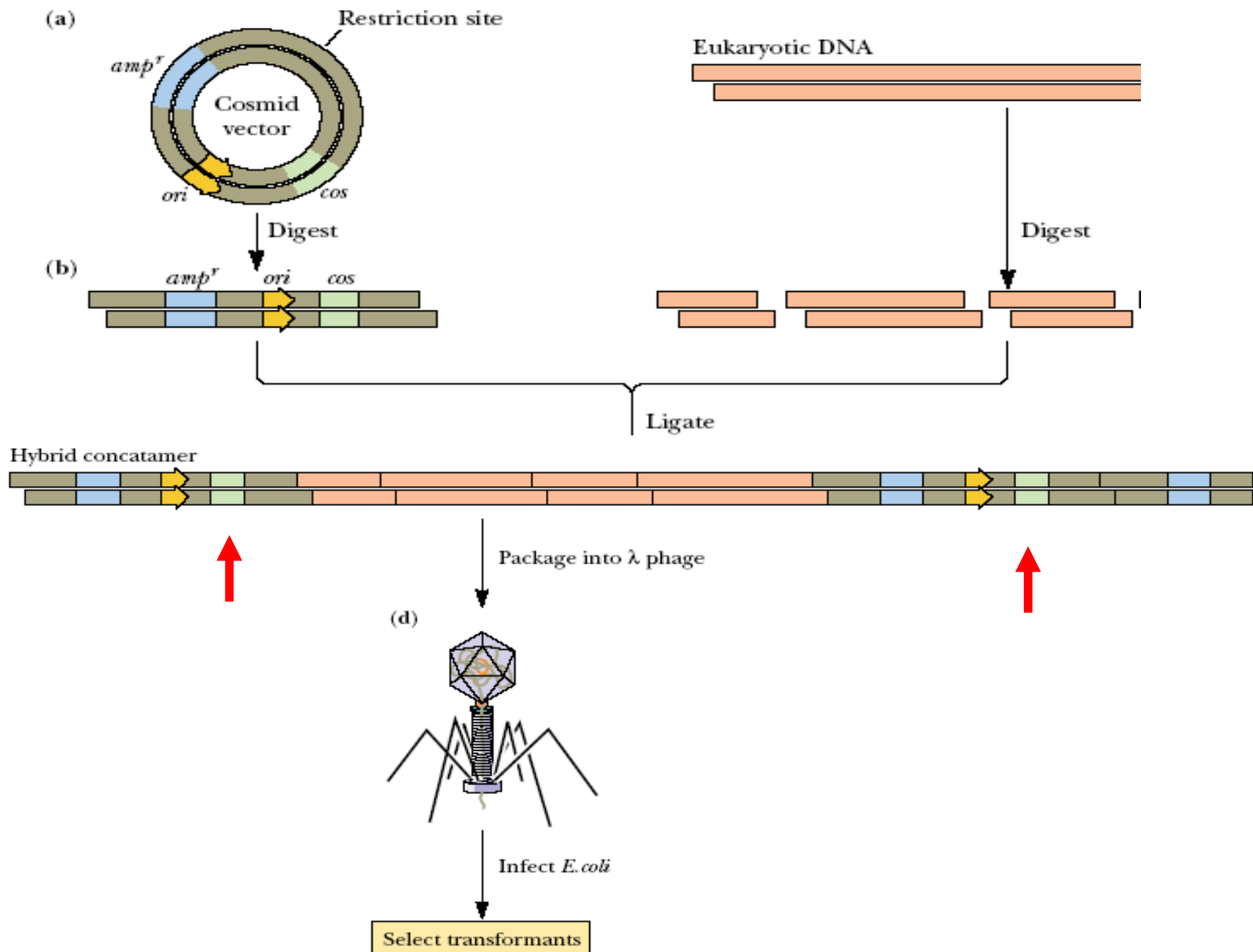


Table 5.4. Some commercially available bacteriophage-based vectors

Vector	Features	Applications	Supplier
λ GT11	λ insertion vector Insert capacity 7.2 kbp <i>lacZ</i> gene	cDNA library construction Expression of inserts	Various
λ EMBL3/4	λ replacement vectors Insert capacity 9–23 kbp	Genomic library construction	Various
λ ZAP Express [®]	λ -based insertion vector Capacity of 12 kbp <i>In vivo</i> excision of inserts Expression of inserts	cDNA library construction Also genomic/PCR cloning	Stratagene
λ FIX [®] II	λ -based replacement vector; capacity 9–23 kbp Spi ⁺ /P2 selection system to reduce non-recombinant background	Genomic library construction	Stratagene
pBluescript [®] II	Phagemid vector Produces single-stranded DNA	<i>In vitro</i> transcription DNA sequencing	Stratagene
SuperCos I	Cosmid vector with Ap ^r and Neo ^r markers, plus T3 and T7 promoters Capacity 30–42 kbp	Generation of cosmid-based genomic DNA libraries T3/7 promoters allow end-specific transcripts to be generated for chromosome walking techniques	Stratagene

Note: As with plasmid vectors, there are many variants available from a range of different suppliers. A good source of information is the supplier's catalogue or website. Ap^r, ampicillin resistance; Neo^r, neomycin resistance (selection using kanamycin in bacteria, G418 in mammalian cells); T3/7 are promoters for *in vitro* transcription; *lacZ*, β -galactosidase gene; SV40, promoter for expression in eukaryotic cells. Terms marked [®] are registered trademarks of Stratagene.

ADN-ul poate fi clonat în alte organisme decât *E. coli*

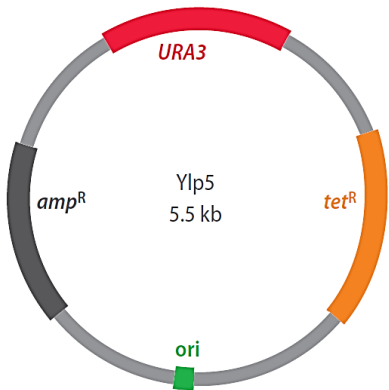
Vectorii de clonare bazați pe plasmide sau fagi au fost dezvoltați pentru majoritatea speciilor de bacterii studiate, *Bacillus*, *Streptomyces* și *Pseudomonas*, care sunt utilizați în același mod ca analogii *E. coli*.

Vectorii plasmidici sunt proiectați și pentru levuri și ciuperci. Unii dintre aceștea au originea replicării din *plasmida de 2 μm*, prezentă în multe tulpini de *Saccharomyces cerevisiae*, dar alți vectori plasmidici pentru drojdie și ciuperci au doar o origine *E. coli*.

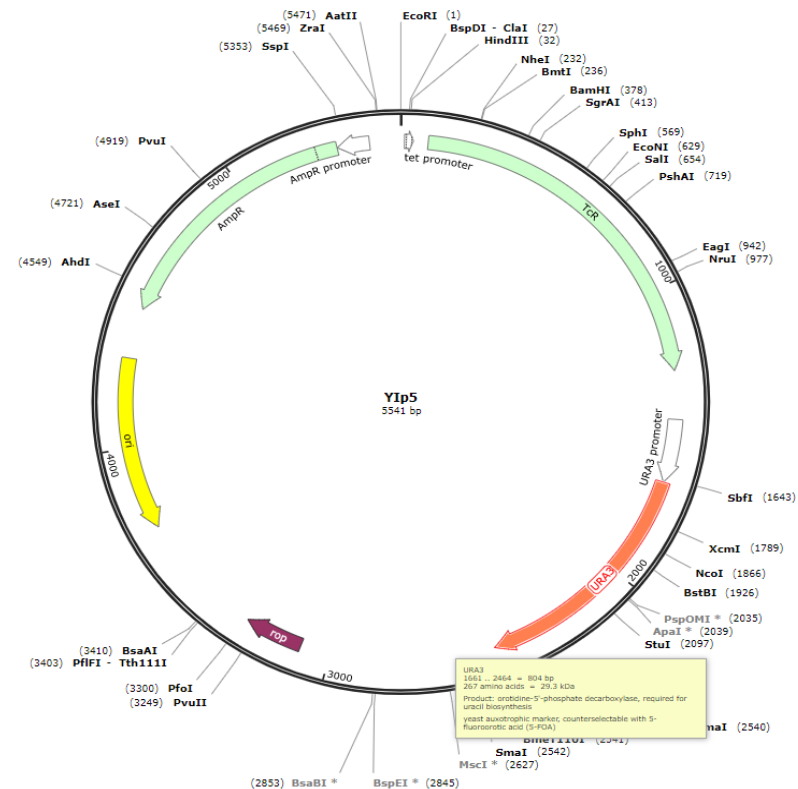
Un exemplu este **Ylp5** - o plasmidă *E. coli* ce prezintă o copie a genei drojdiei numită URA3. Prezența originii *E. Coli*, denotă că Ylp5 este un vector navetă care poate fi utilizat fie cu *E. coli*, fie cu *S. cerevisiae* ca gazdă.

Aceasta este o caracteristică utilă, deoarece clonarea în *S. cerevisiae* este un proces relativ dificil.

(A) Ylp5



https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=Ylp5

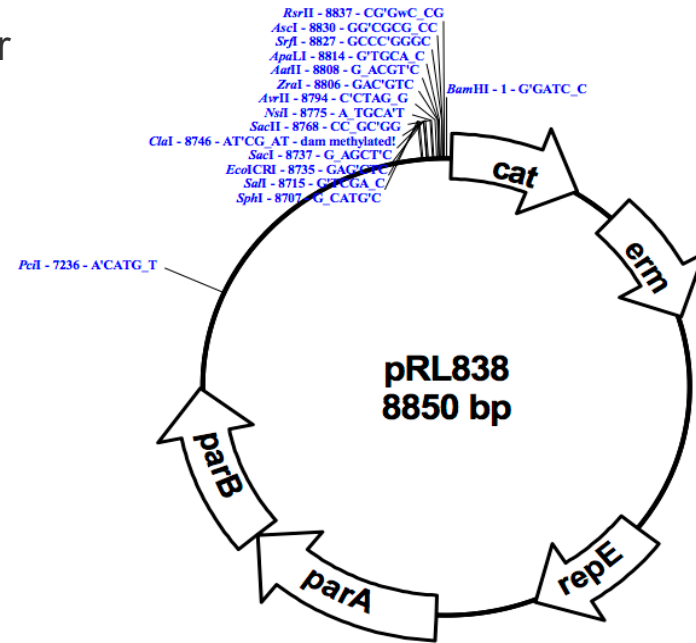


Alți vectori cu capacitate înaltă, utilizați în clonare sunt:

Cromozomi artificiali bacterieni – BAC (Bacterial Artificial Chromosome), se bazează pe plasmida F (de fertilitate) a *E. Coli*. Recombinanții sunt identificați prin selecția Lac. Pot clona fragmente de 300 kb și mai mult, iar inserțiile sunt foarte stabile. **BAC-urile au fost utilizate pe scară largă în proiectul genomului uman și sunt în prezent cei mai utilizați vectori pentru clonarea unor fragmente mari de ADN.**

Componentele comune ale unui vector BAC sunt;

1. *oriS* – secvențe de origine a replicării
2. *repE-F* - secvențe implicate în formarea asamblarea complexului de replicare, reglarea numărului de copii (1 copie/per celulă)
3. *parA* și *parB* - secvențe pentru partiția plasmidei F în celule fiice în cadrul diviziunii bacteriene și asigurarea unei prezențe stabile a vectorului în celula bacteriană
4. markeri de selecție - pentru selectarea transformanților; poate fi o genă de rezistență la antibiotice sau LacZ
5. T7 și SP6 – promotori fagici pentru transcrierea transgenelor
6. situsuri specifice de clonare



Bacterial artificial chromosome:

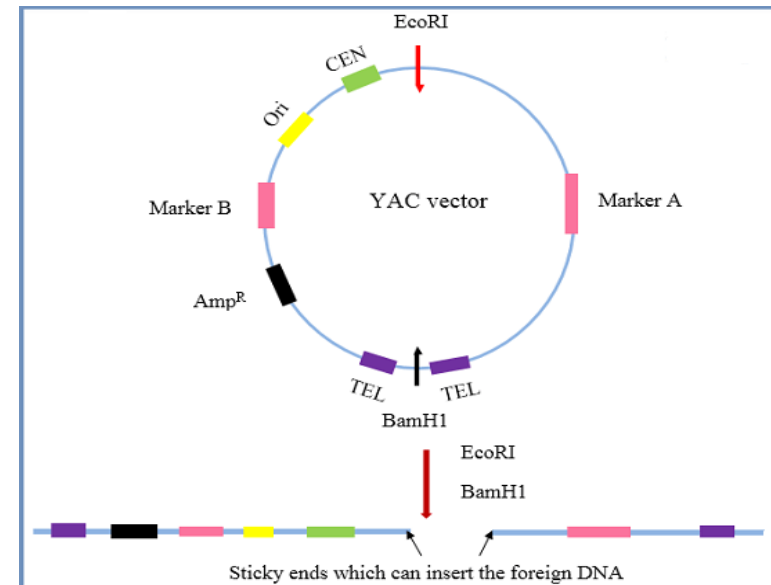
<https://www.youtube.com/watch?v=Qqsw6ytGsyE>

Cromozomi artificiali de drojdie -YAC (Yeast Artificial Chromosome), permit inserarea fragmentelor mari de ADN de 250-1400 kb/ (100-3000kb)

Componentele primare ale unui YAC sunt:

- CEN – un centromer de *S. Cerevisiae* care asigură segregarea/repartizarea egală în două celule fiice în timpul divizării.
- ARS (autonomous replication sequence) - originea replicării pentru replicarea autonomă în interiorul celulei de drojdie
- TEL – doi telomeri la ambele capete ale cromozomului, asigură menținerea stabilă în celulele gazdei
- TRP1 și URA3 - gene marker (pe fiecare braț a cromozomului) pentru selecția celulelor de drojdie transformate
- Gena marker selectabilă pentru bacterii
- BamHI și EcoRI - pentru liniarizarea și inserția fragmentului ADN
- situsuri de restricție

<https://orbitbiotech.com/yeast-artificial-chromosomes-yac-yeast-artificial-chromosomes-yac-ycp-yep-murray/>



Gazde de clonare

În calitate de *gazdă de clonare* sunt utilizate:

celula bacteriană (pentru plasmide, cosmide, bacteriofagi, BAC),

celulele drojdiilor (pentru plasmide, YAC),

celulele vegetale (plasmide, virusuri),

celulele animale (virusuri).

Există vectori care se pot replica în mai multe gazde – ***vectorii navetă***.

Scopul tehnologiei ADN rec

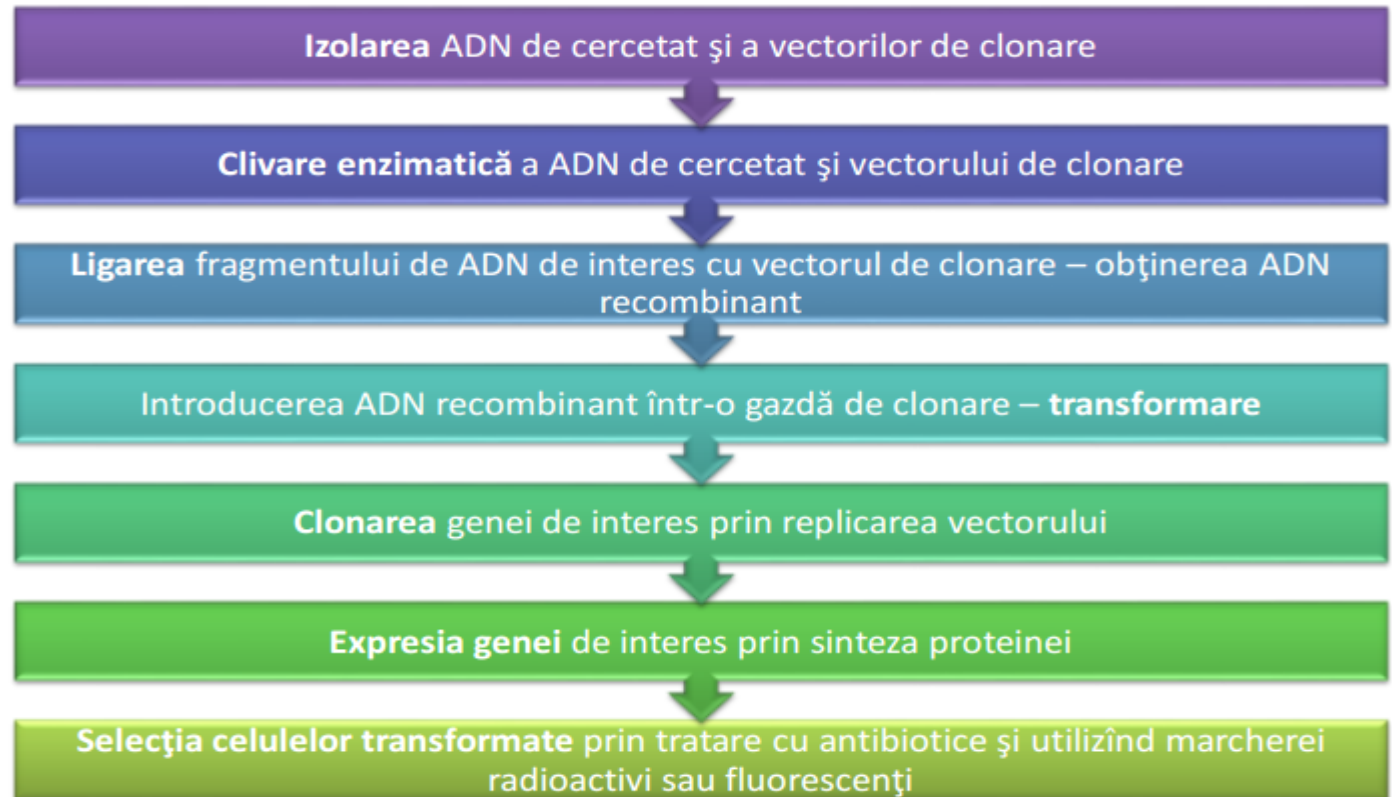
Clonarea genei/secvenței de interes cu scop de:

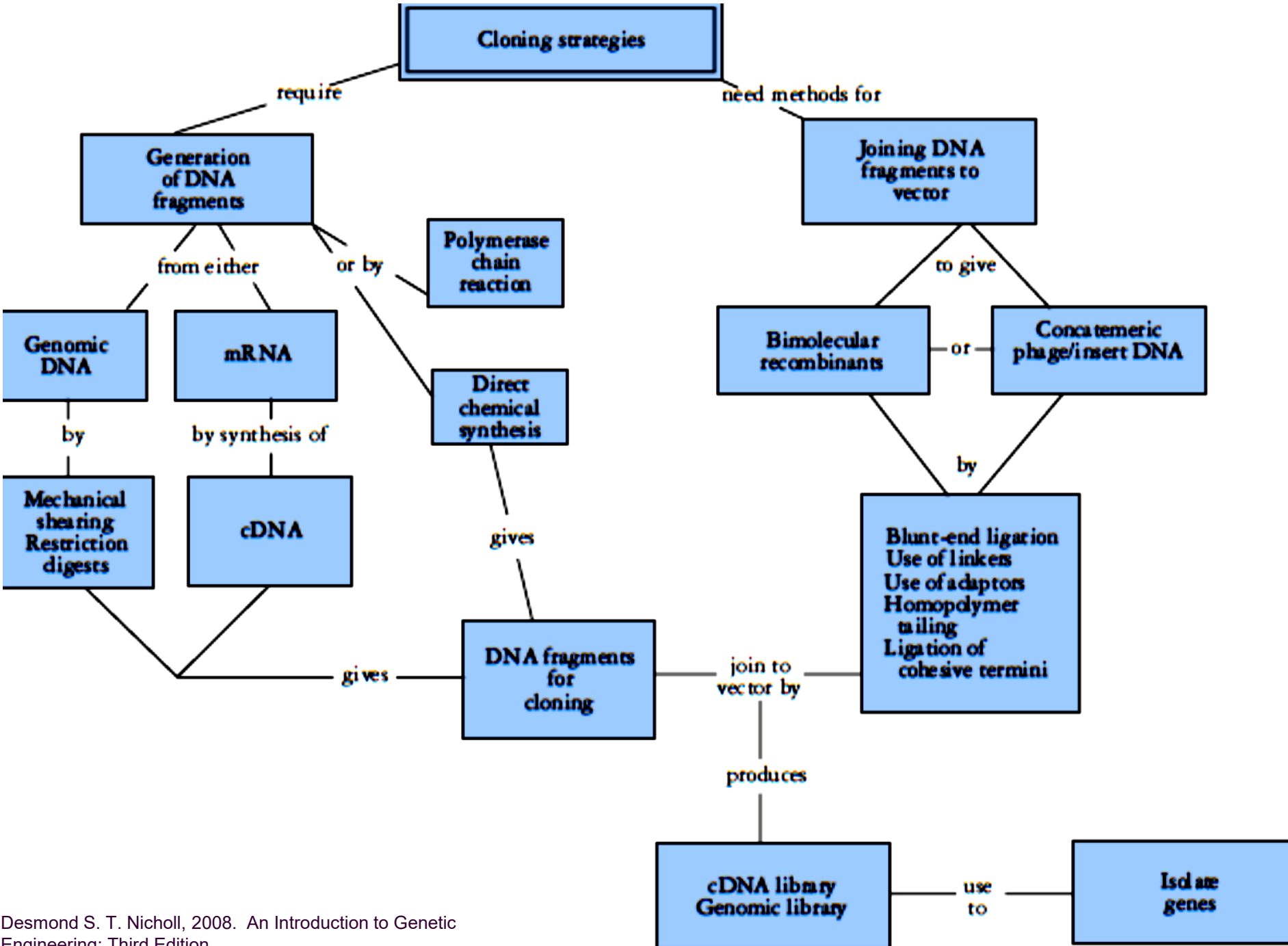
- multiplicare;
- izolare și formare a bibliotecilor de ADNrec;
- analiză moleculară.

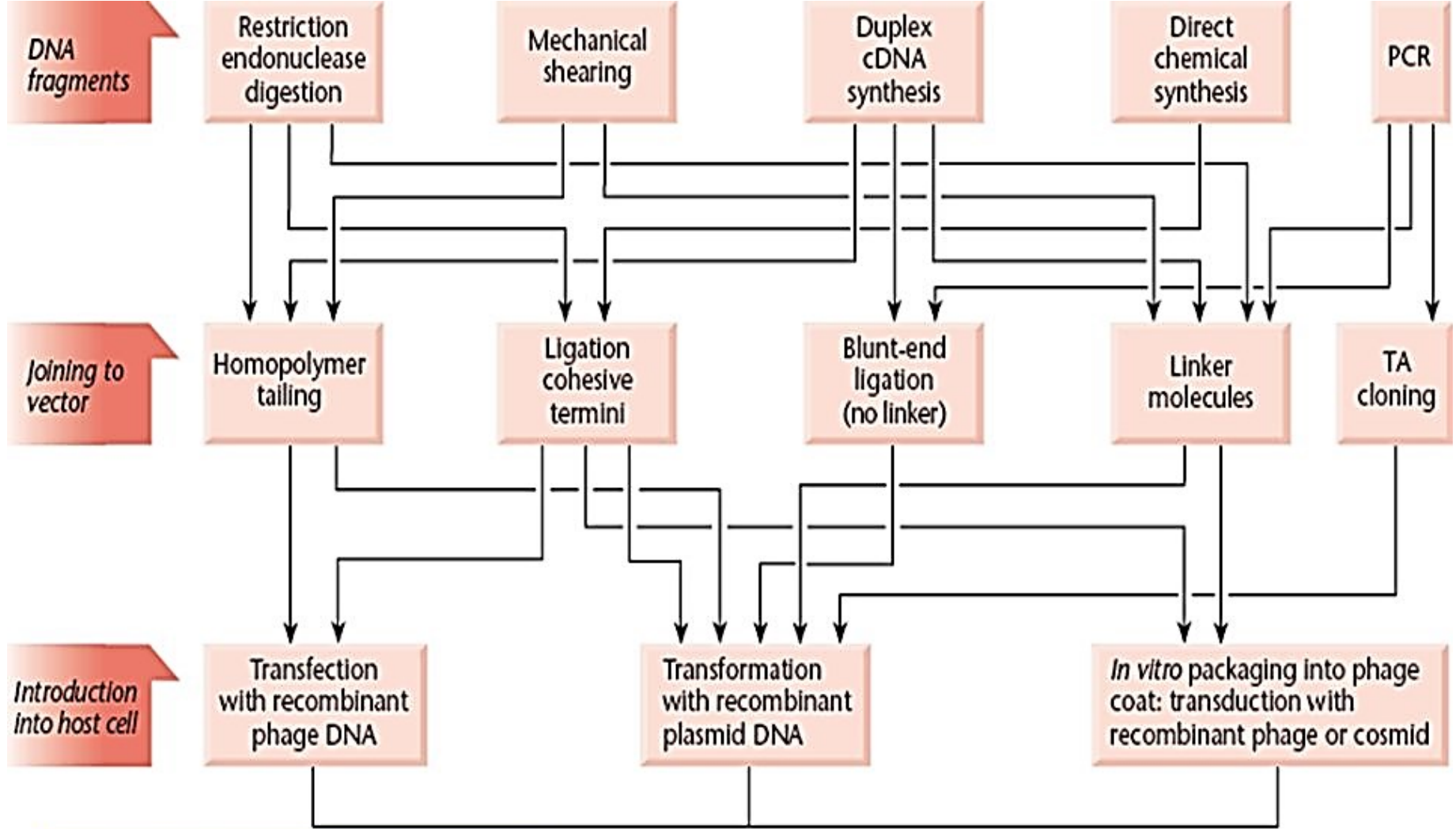
Expresia genică cu scop de:

- analiză a funcției genei clonate;
- obținerea produsului proteic.

Etapele obținerii ADN recombinant



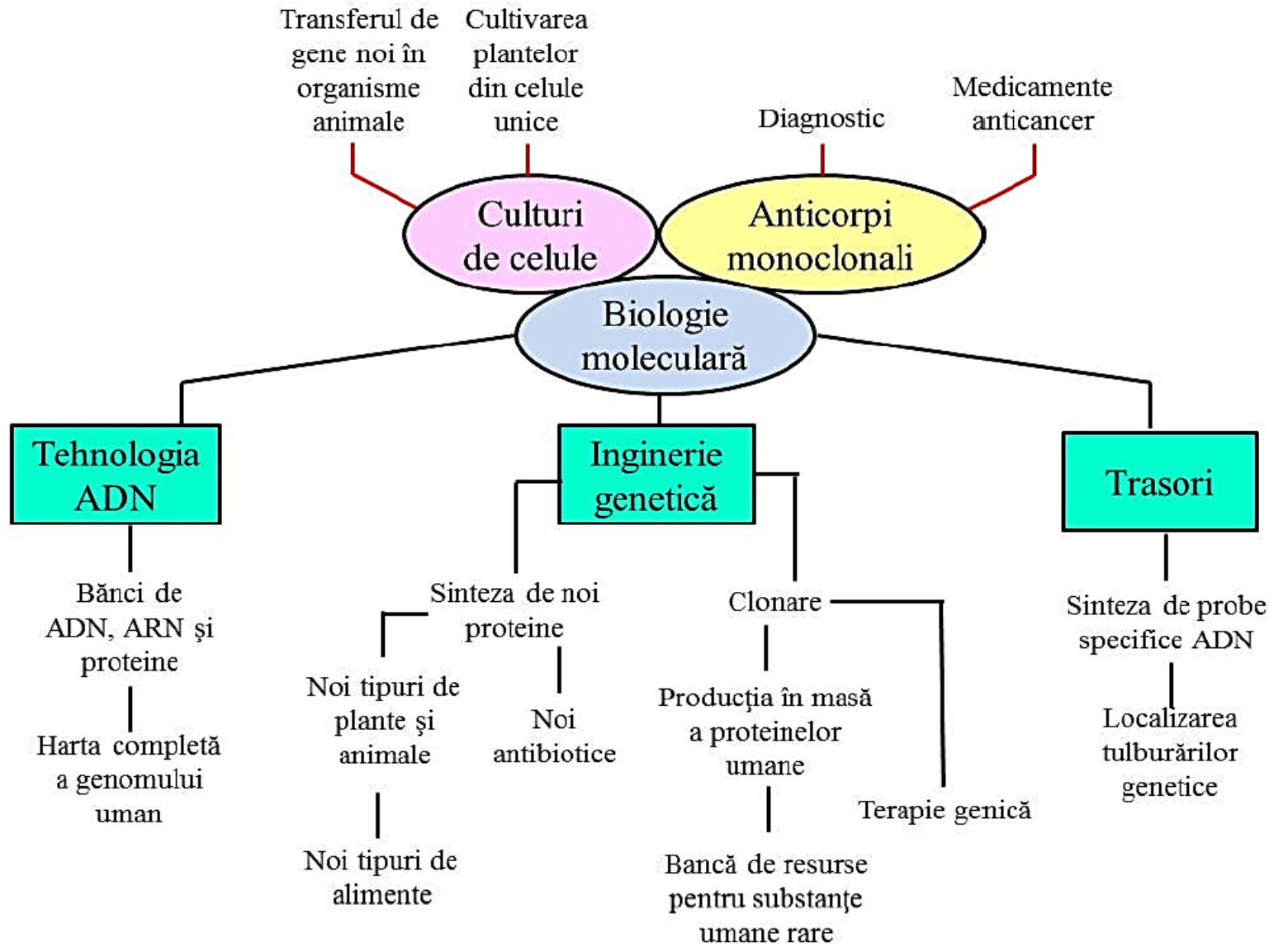




Generalized overview of cloning strategies



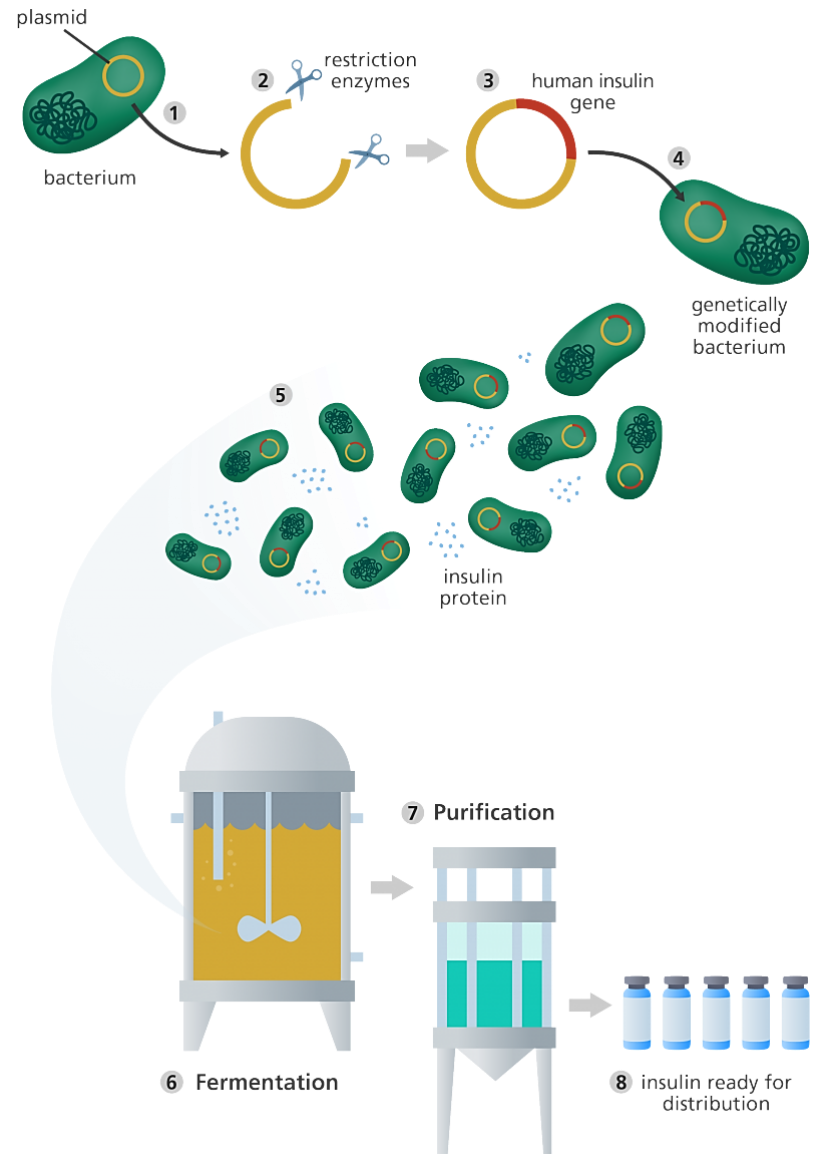
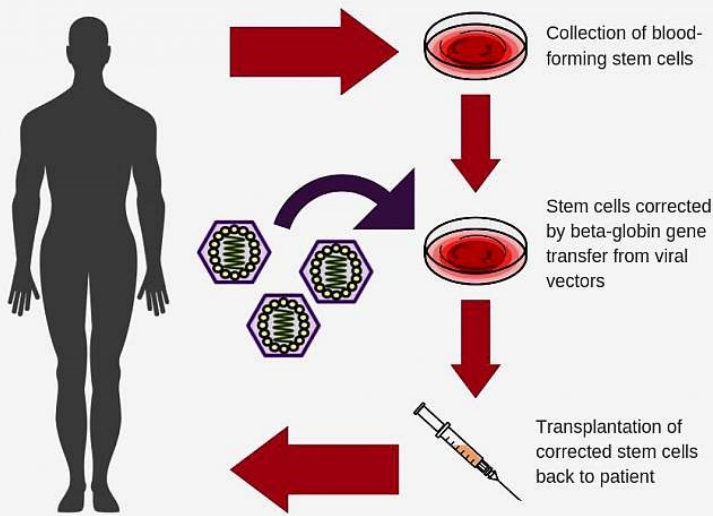
Rezumat, utilizări ale tehnologiei ADN recombinant



Rezumat, utilizări ale tehnologiei ADN recombinant

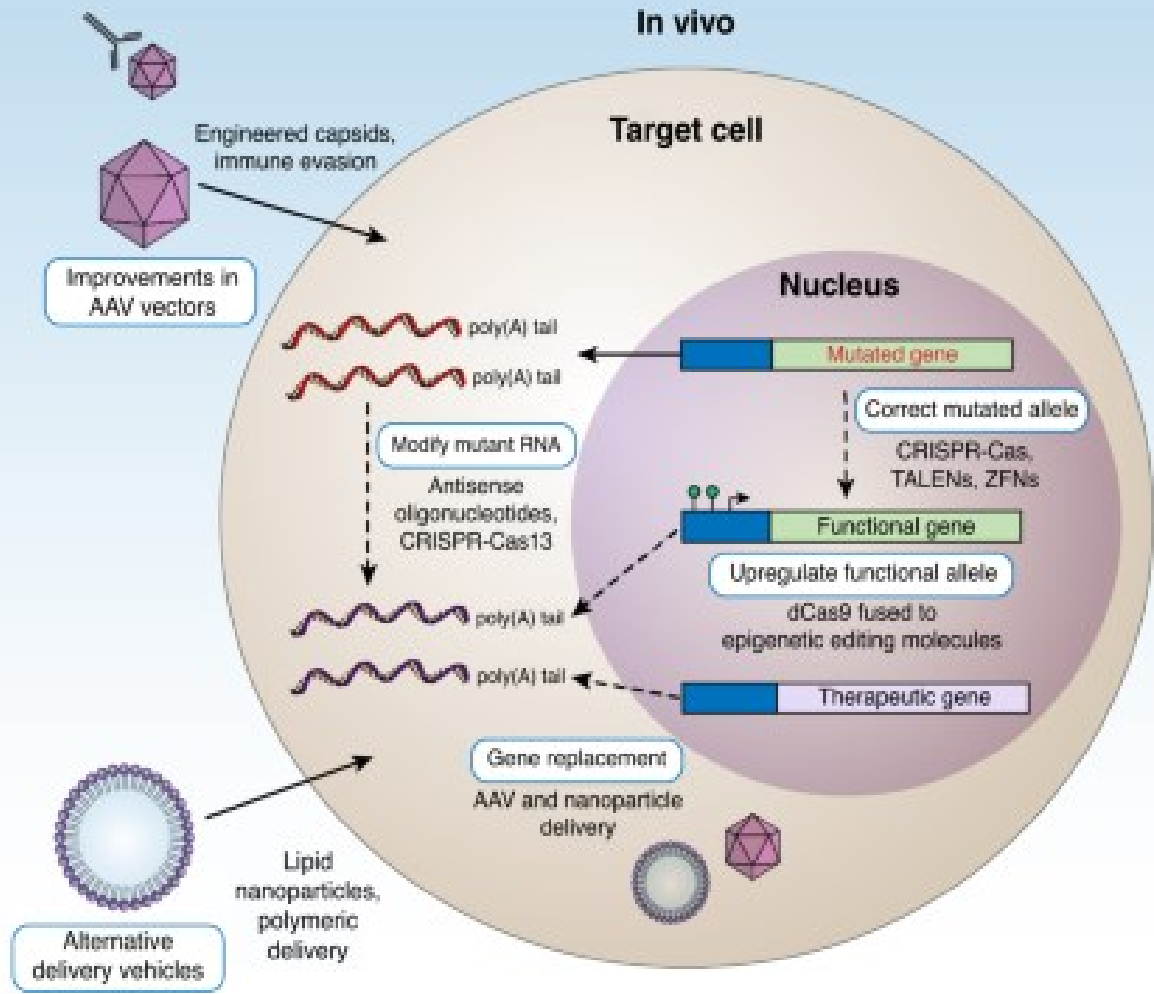
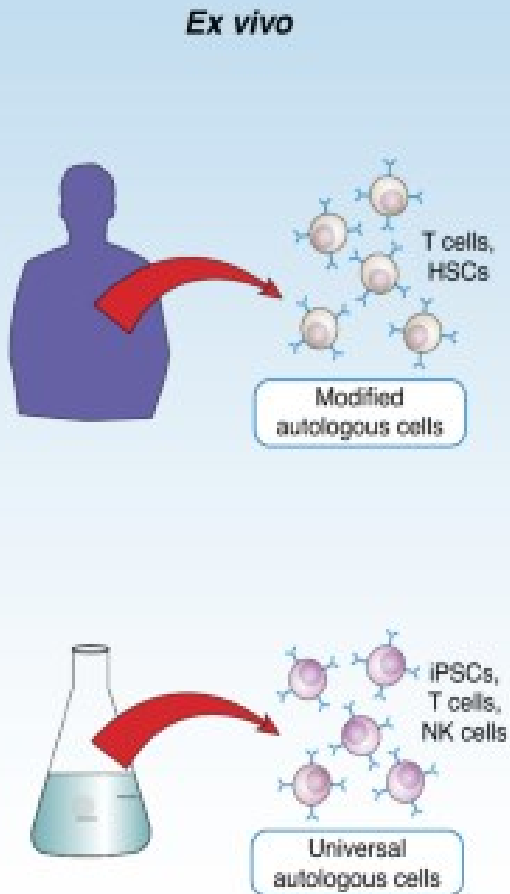
ADN recombinant

Gene therapy for sickle cell disease

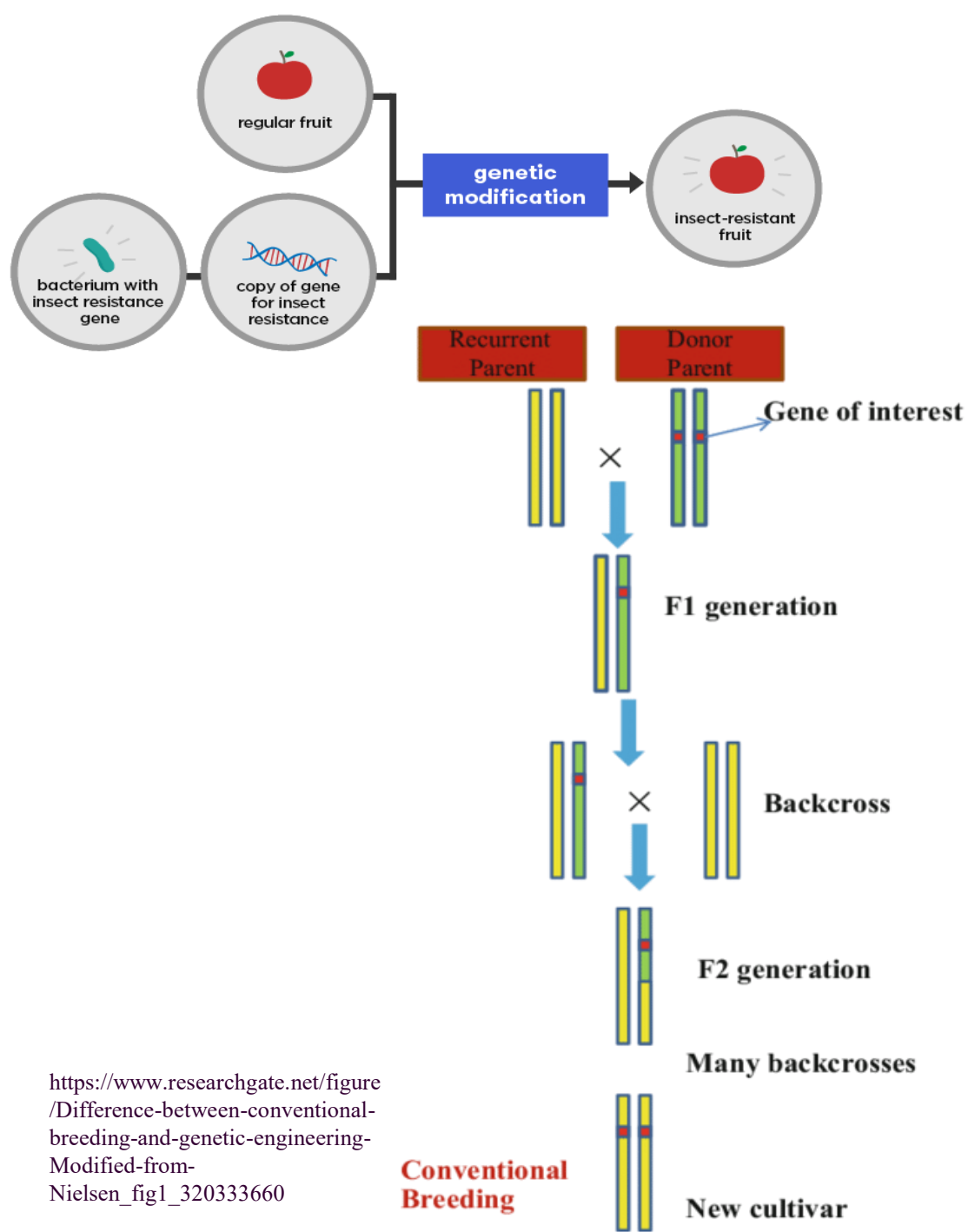


<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-researchers-create-new-viral-vector-improved-gene-therapy-sickle-cell-disease>

<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-genetic-engineering>

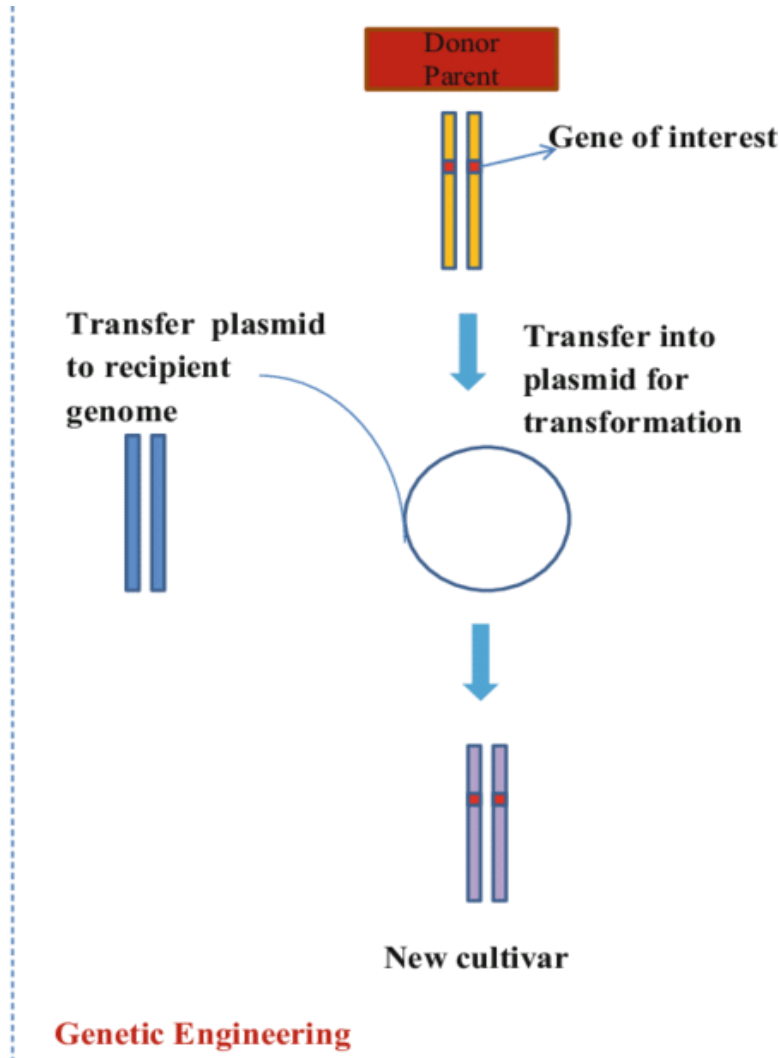


<https://www.science.org.au/curious/earth-environment/what-genetic-modification>



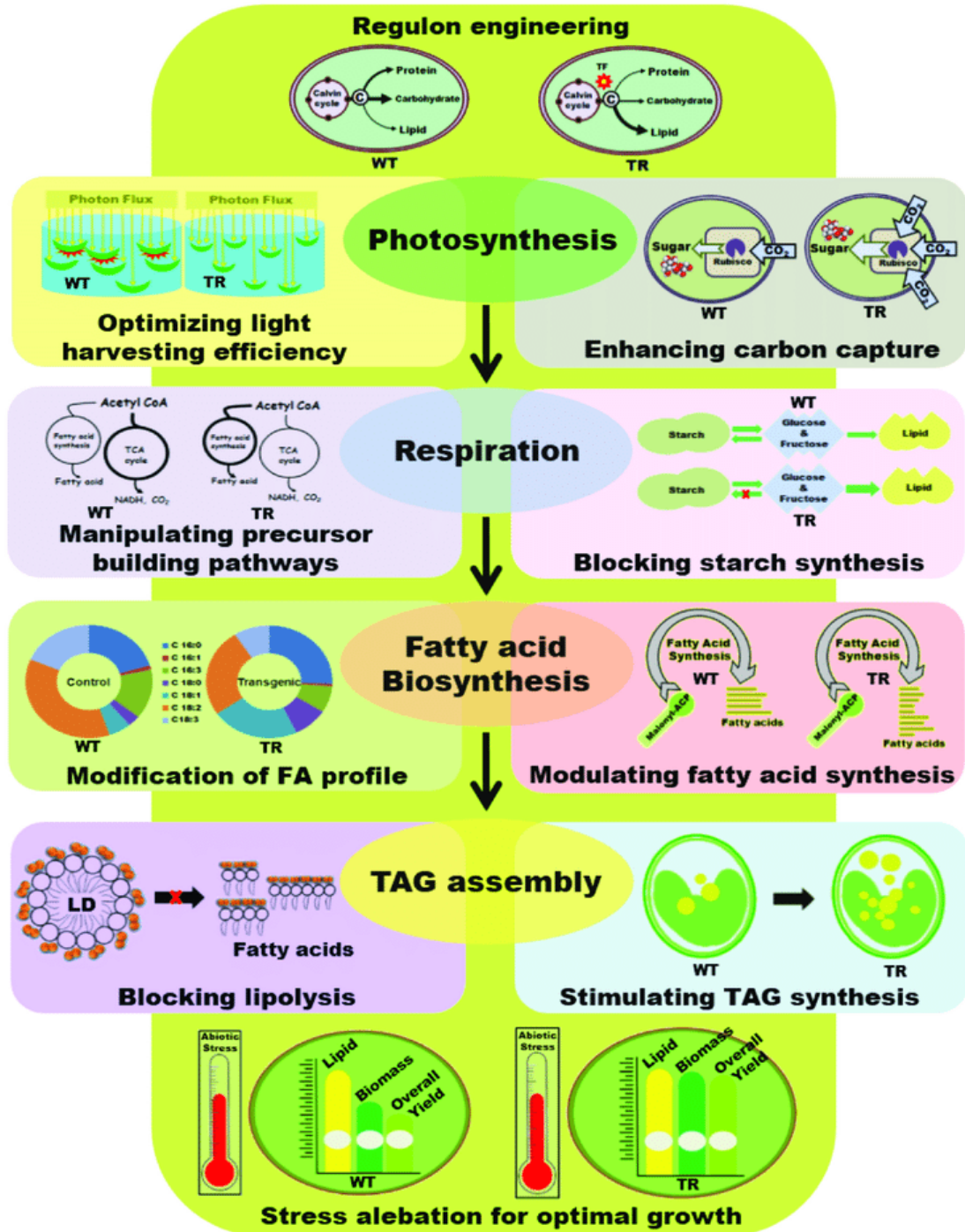
https://www.researchgate.net/figure/Difference-between-conventional-breeding-and-genetic-engineering-Modified-from-Nielsen_fig1_320333660

Conventional Breeding



Genetic Engineering

Schematic illustration of different genetic engineering strategies applied in microalgae for biodiesel application. WT, Wild type cells; TR, Transgenic cells; TF, Transcription factor; TCA, Tricarboxylic acid cycle; NADH, Nicotinamide adenine dinucleotide; FA, Fatty acid; LD, Lipid droplet.



https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-different-genetic-engineering-strategies-applied-in_fig1_328092157

Mulțumesc pentru atenție